明　細　書

発明の名称 ： 多能性幹細胞製造システム

技術分野

[0001] 本発明は細胞保存技術に関し、特に多能性幹細胞製造システムに関する。

背景技術

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

[0003] このような背景の状況の下、京都大学の山中伸弥教授は、４種の遺伝子：Ｏｃｔ３／４、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃ、及びＳｏｘ２を体細胞に導入することにより、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）を樹立することに成功した。これにより、山中教授は、２０１２年のノーベル生理学・医学賞を受賞した（例えば、特許文献１参照。）。ｉＰＳ細胞は、拒絶反応や倫理的問題のない理想的な多能性細胞である。したがって、ｉＰＳ細胞は、細胞移植療法への利用が期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第４１８３７４２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ｉＰＳ細胞のような誘導幹細胞は、細胞に遺伝子等の誘導因子を導入することによって樹立され、拡大培養、凍結保存される。しかし、例えば臨床用

ｉＰＳ細胞（例えば、ＧＬＰ，ＧＭＰグレード）を作製し産業化するには、以下のような問題点がある。

[0006] １）　コスト

臨床用ｉＰＳ細胞は非常に綺麗に保たれたクリーンルームで作製、保存される必要がある。しかし、要求されるレベルの清潔度を維持するコストは非常に高額である。そのため、ｉＰＳ細胞を作るのにコストがかかり、産業化への大きな障害となっている。

[0007] ２）　品質

幹細胞の樹立から保存までの一連の作業が複雑であり、手作業によるところが多い。また、幹細胞の作製は、個人の技量に負っているところがある。その為、作製者や実験バッチによって、ｉＰＳ細胞の品質のばらつきが生じうる。

[0008] ３）　時間

クリーンルームの中で特定のドナー以外の他人のｉＰＳ細胞とのクロスコンタミネーションを防ぐために、一人の人間のみに由来するｉＰＳ細胞が所定の時間をかけてクリーンルーム内で作製される。またｉＰＳ細胞の樹立、品質評価には長時間を要する。しかし、ｉＰＳ細胞は、クリーンルームで一度に一人の人間のためだけに作製されるので、多くの希望者のｉＰＳ細胞を作製するのに非常に長い時間を要する。

[0009] ４）　人材

上述したように、現状、ｉＰＳ細胞の作製は手作業によるところが大きい。しかし、臨床用ｉＰＳ細胞を作製することができるのに必要な技術を有する技術者は少ない。

[0010] 幹細胞の樹立から保存までの一連の作業が複雑であるという問題がある。これに対し、本発明は、幹細胞を製造可能な幹細胞製造システムを提供することを目的の一つとする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明の態様によれば、細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路と、

導入前細胞送液路に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置と、誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞魂を作製する細胞塊作製装置と、導入前細胞送液路、誘導因子送液機構、因子導入装置、及び細胞塊作製装置を格納する筐体と、を備え、細胞塊作製装置が、因子導入装置で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置と、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置と、を備え、初期化培養装置が、誘導因子導入細胞に培地を補給する第１の培地補給装置を備え、拡大培養装置が、複数の細胞塊に培地を補給する第２の培地補給装置を備える、幹細胞製造システムが提供される。

[0012] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１の培地補給装置が、誘導因子導入細胞に培地を連続的に補給してもよい。

[0013] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１の培地補給装置が、誘導因子導入細胞に培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0014] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第２の培地補給装置が、複数の細胞塊に培地を連続的に補給してもよい。

[0015] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第２の培地補給装置が、複数の細胞塊に培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0016] 上記の幹細胞製造システムにおいて、因子導入装置が、導入前細胞送液路に接続された因子導入部と、多能性誘導因子を保存する因子保存部と、因子保存部から因子導入部に多能性誘導因子を流すための因子送液路と、因子送液路内の液体を流すためのポンプと、を備えていてもよい。

[0017] 上記の幹細胞製造システムにおいて、因子導入部において、ＲＮＡリポフェクションにより、細胞に多能性誘導因子が導入されてもよい。

[0018] 上記の幹細胞製造システムにおいて、多能性誘導因子がＤＮＡ、ＲＮＡ、又はタンパク質であってもよい。

[0019] 上記の幹細胞製造システムにおいて、多能性誘導因子がベクターに組み込まれていてもよい。

[0020] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ベクターがセンダイウイルスベクターであってもよい。

[0021] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チューブングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0022] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置が、誘導因子導入細胞とゲル培地が入れられる透析チューブと、透析チューブが入れられ、透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、を備える、浮遊培養器を備えていてもよい。

[0023] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブの分画分子量が０．１ＫＤａ以上であってもよい。

[0024] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなっていてもよい。

[0025] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１の培地補給装置が、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を補給してもよい。

[0026] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１の培地補給装置が、透析チューブ内にゲル培地を補給してもよい。

[0027] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備えていてもよい。

[0028] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。

[0029] 上記の幹細胞製造システムが、培地送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0030] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チューブングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0031] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備えていてもよい。

[0032] 上記の幹細胞製造システムが、容器に接続された廃液送液路であって、容

器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備えていてもよい。

[0033] 上記の幹細胞製造システムが、因子導入装置から初期化培養装置に誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0034] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入細胞送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。

[0035] 上記の幹細胞製造システムが、導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0036] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0037] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養装置が、複数の細胞塊とゲル培地が入れられる透析チューブと、透析チューブが入れられ、透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、を備える、浮遊培養器を備えていてもよい。

[0038] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブの分画分子量が０．１ＫＤａ以上であってもよい。

[0039] 上記の幹細胞製造システムにおいて、透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなっていてもよい。

[0040] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第２の培地補給装置が、容器内の透析チューブの周囲にゲル培地を補給してもよい。

[0041] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第２の培地補給装置が、透析チューブ内にゲル培地を補給してもよい。

[0042] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備えていてもよい。

[0043] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。

[0044] 上記の幹細胞製造システムが、培地送液路内の液体を流すためのポンプを

更に備えていてもよい。

[0045] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チューブングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0046] 上記の幹細胞製造システムが、補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備えていてもよい。

[0047] 上記の幹細胞製造システムが、容器に接続された廃液送液路であって、容器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備えていてもよい。

[0048] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置から拡大培養装置に誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0049] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置の浮遊培養器の透析チューブ内と、拡大培養装置の浮遊培養器の透析チューブ内と、を接続する導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0050] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入細胞送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。

[0051] 上記の幹細胞製造システムが、導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0052] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チューブングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0053] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置及び拡大培養装置の少なくとも一方が、内部に培地が入れられる二酸化炭素透過性バッグを備えていてもよい。

[0054] 上記の幹細胞製造システムにおいて、細胞塊作製装置が、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第１の分割機構と、拡大培養装置で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第２の分割機構と、を更に備えていてもよい。

[0055] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１の分割機構が、初期化培養装置から拡大培養装置に誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路に設けら

れていてもよい。

[0056] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の分割機構の少なくとも一方が、細胞塊をシングルセルに分割してもよい。

[0057] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の分割機構の少なくとも一方が、内部に貫通孔を有する分割器を備え、貫通孔が、大孔径部と、大孔径部と連通し、大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、を交互に有し、細胞塊を含む培地が、貫通孔を流れてもよい。

[0058] 上記の幹細胞製造システムにおいて、大孔径部の中心軸と、小孔径部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0059] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の分割機構の少なくとも一方が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、当該連結ブロックの第１の端部に凹部が、当該連結ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、当該連結ブロックが複数ある場合に、凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する第１の大孔径部と、第１の大孔径部と連通し、第１の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、小孔径部と連通し、小孔径部より孔径が大きく、凸部の先端に開口を有する第２の大孔径部と、を有し、細胞塊を含む培地が、貫通孔を流れてもよい。

[0060] 上記の幹細胞製造システムにおいて、連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第２の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第１の大孔径部と平滑に連通してもよい。

[0061] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の大孔径部の中心軸と、小孔径部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0062] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、当該先端ブロックの第１の端部に凹部が、当該先端ブロックの第２の端部にノズルが設けられており、当該先端ブロックの凹部が、連結ブロックの凸部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する大孔径部と、大孔径部と連通し、大孔径部より孔径が小さく、ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有していてもよい。

[0063] 上記の幹細胞製造システムにおいて、連結ブロックと先端ブロックとを連結した際、連結ブロックの第２の大孔径部と、先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通してもよい。

[0064] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、当該末端ブロックの第１の端部に凹部が、末端ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、当該末端ブロックの凸部が、連結ブロックの凹部と勘合してもよい。

[0065] 上記の幹細胞製造システムにおいて、第１及び第２の分割機構が、それぞれ、末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、挿入ノズルに連通する、細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器と、を更に備えていてもよい。

[0066] 上記の幹細胞製造システムにおいて、複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置を更に備え、筐体がパッケージ装置を格納してもよい。

[0067] 上記の幹細胞製造システムにおいて、細胞塊作製装置が、複数の細胞魂をパッケージ装置に順次送る細胞魂搬送機構を更に備えていてもよい。

[0068] 上記の幹細胞製造システムにおいて、パッケージ装置が、ペルチェ素子又は液体窒素を用いて細胞塊を凍結してもよい。

[0069] 上記の幹細胞製造システムにおいて、パッケージ装置が、気化圧縮又は気化吸収により細胞塊を凍結してもよい。

[0070] 上記の幹細胞製造システムが、筒状部材と、筒状部材の内部に配置された液体透過フィルターと、を備える溶液置換器であって、筒状部材に、液体透過フィルター上に、複数の細胞塊を含む溶液を導入するための細胞塊導入孔と、液体透過フィルター上に、置換溶液を導入するための置換溶液導入孔と、液体透過フィルター上に、複数の細胞塊を含む置換溶液を流出するための細胞塊流出孔と、液体透過フィルターを透過した溶液が流出する廃液流出孔と、が設けられている溶液置換器を更に備えていてもよい。

[0071] 上記の幹細胞製造システムが、廃液流出孔に接続された廃液送液路を更に

備え、複数の細胞塊を含む溶液の溶液を廃棄する際に廃液送液路における溶液の流動が許容され、置換溶液中に複数の細胞塊を分散させる際に廃液送液路における溶液の流動が許容されなくともよい。

[0072] 上記の幹細胞製造システムにおいて、置換溶液が培地、凍結保存液、又は細胞塊分割酵素溶液であってもよい。

[0073] 上記の幹細胞製造システムが、拡大培養装置から溶液置換器に複数の細胞塊を送るための導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0074] 上記の幹細胞製造システムが、拡大培養装置の浮遊培養器の透析チューブ内と、溶液置換器の細胞塊導入孔と、を接続する導入細胞送液路を更に備えていてもよい。

[0075] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入細胞送液路が二酸化炭素透過性であってもよい。

[0076] 上記の幹細胞製造システムが、導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0077] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チューブングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0078] 上記の幹細胞製造システムが、血液から細胞を分離する分離装置を更に備え、分離装置で分離された細胞を含む溶液が導入前細胞送液路を通過してもよい。

[0079] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置が、磁気細胞分離方法又は赤血球凝固剤を用いる方法によって血液から単核球を分離してもよい。

[0080] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置が、単核球を精製する単核球精製フィルターを更に備えていてもよい。

[0081] 上記の幹細胞製造システムが、導入前細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備えていてもよい。

[0082] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ポンプがダイヤフラムポンプ、チューブングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）であってもよい。

[0083] 上記の幹細胞製造システムが、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養

器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、筐体内に配置されるケースを更に備えていてもよい。

[0084] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、ケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0085] 上記の幹細胞製造システムが、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、筐体内に配置されるケースを更に備えていてもよい。

[0086] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、ケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0087] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内に配置される複数のケースを更に備え、複数のケースのそれぞれに、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかが格納されてもよい。

[0088] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、複数のケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0089] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内に配置される複数のケースを更に備え、複数のケースのそれぞれに、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、の少なくともいずれかが格納されてもよい。

[0090] 上記の幹細胞製造システムにおいて、分離装置と、因子導入部と、初期化培養装置の浮遊培養器と、拡大培養装置の浮遊培養器と、溶液置換器と、複数のケースと、が使い捨て可能であってもよい。

[0091] 上記の幹細胞製造システムにおいて、ケースと筐体が、互いに勘合する勘合部を備え、ケースが筐体内の所定の位置に配置されてもよい。

[0092] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケ

ース内の送液路と、ケース外のポンプと、が接続されてもよい。

[0093] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の因子導入部と、ケース外の因子保存部と、が接続されてもよい。

[0094] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の初期化培養装置の浮遊培養器及び拡大培養装置の浮遊培養器と、ケース外の培地を保存する培地保存部と、が接続されてもよい。

[0095] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の初期化培養装置の浮遊培養器及び拡大培養装置の浮遊培養器と、ケース外の廃液を保管する廃液保管部と、が接続されてもよい。

[0096] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の分離装置と、ケース外の血液を保存する血液保存部と、が接続されてもよい。

[0097] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の分離装置と、ケース外の血液分離剤を保存する分離剤保存部と、が接続されてもよい。

[0098] 上記の幹細胞製造システムにおいて、筐体内にケースが配置されると、ケース内の溶液置換器と、ケース外の凍結保存液を保存する凍結保存液保存部と、が接続されてもよい。

[0099] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置で培養される細胞を撮影する初期化培養撮影装置と、拡大培養装置で培養される細胞を撮影する拡大培養撮影装置と、を更に備えていてもよい。

[0100] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置は、それぞれ、テレセントリックレンズを介して細胞を撮影してもよい。

[0101] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部を更に備えていてもよい。

[0102] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、ハイパスフィルタを

適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、画像中の細胞塊を抽出してもよい。

[0103] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、画像にＤｉｓｔａｎｃｅＴｒａｎｓｆｏｒｍ法を適用してもよい。

[0104] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞魂の大きさを算出してもよい。

[0105] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養装置に移行されてもよい。

[0106] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、拡大培養装置において、複数の細胞塊が継代されてもよい。

[0107] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、初期化培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0108] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、拡大培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0109] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞魂の数を算出してもよい。

[0110] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、初期化培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0111] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、拡大培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0112] 上記の幹細胞製造システムが、培地の濁度と、培地中の細胞魂の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像に基づき、細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、算出された濁度の値と、関係と、に基づき、撮影された細胞魂の密度の値を算出する画像処理部を更に備えていてもよい。

[0113] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養装置に移行されてもよい。

[0114] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、拡大培養撮影装置において、複数の細胞塊が継代されてもよい。

[0115] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、初期化培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0116] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、拡大培養装置において培地の供給速度が変化してもよい。

[0117] 上記の幹細胞製造システムが、培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、初期化培養撮影装置及び拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像における培地の色の値を算出し、算出された色の値と、関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部を更に備えていてもよい。

[0118] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、初期化培養装置において培地が交換されてもよい。

[0119] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、拡大培養装置に

おいて培地が交換されてもよい。

[0120] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地の色が、培地の色相であってもよい。

[0121] 上記の幹細胞製造システムにおいて、初期化培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、初期化培養装置において培地が交換されてもよい。

[0122] 上記の幹細胞製造システムにおいて、拡大培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、拡大培養装置において培地が交換されてもよい。

[0123] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入前細胞送液路の内壁が、細胞非接着性であってもよい。

[0124] 上記の幹細胞製造システムにおいて、導入前細胞送液路と、誘導因子送液機構と、が、基板上に設けられていてもよい。

[0125] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内の気体を清浄にする空気清浄装置を更に備えていてもよい。

[0126] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内の気体の温度を管理する温度管理装置を更に備えていてもよい。

[0127] 上記の幹細胞製造システムが、初期化培養装置及び拡大培養装置における培地の温度を管理する温度管理装置を更に備えていてもよい。

[0128] 上記の幹細胞製造システムにおいて、温度管理装置が、培地の温度が所定の範囲より低い場合は、培地の温度を上昇させ、培地の温度が所定の範囲より高い場合は、培地の温度を低下させてもよい。

[0129] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内の気体の二酸化炭素濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を更に備えていてもよい。

[0130] 上記の幹細胞製造システムが、筐体内を乾熱滅菌又はガス滅菌する滅菌装置を更に備えていてもよい。

[0131] 上記の幹細胞製造システムにおいて、誘導因子送液機構、因子導入装置、及び細胞塊作製装置が、サーバーによって作業手順に基づいて制御され、サ

ーバーが、誘導因子送液機構、因子導入装置、及び細胞塊作製装置が作業手順に基づいて稼働しているか否か監視し、稼働記録を作成してもよい。

[0132] また、本発明の態様によれば、内部に細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、当該連結ブロックの第１の端部に凹部が、当該連結ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、当該連結ブロックが複数ある場合に、凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する第１の大孔径部と、第１の大孔径部と連通し、第１の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、小孔径部と連通し、小孔径部より孔径が大きく、凸部の先端に開口を有する第２の大孔径部と、を有する、細胞塊分割器が提供される。

[0133] 上記の細胞塊分割器において、連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第２の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第１の大孔径部と平滑に連通してもよい。

[0134] 上記の細胞塊分割器において、第１及び第２の大孔径部の中心軸と、小孔径部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0135] 上記の細胞塊分割器が、内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、当該先端ブロックの第１の端部に凹部が、当該先端ブロックの第２の端部にノズルが設けられており、当該先端ブロックの凹部が、連結ブロックの凸部と勘合し、貫通孔が、凹部と連通する大孔径部と、大孔径部と連通し、大孔径部より孔径が小さく、ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有していてもよい。

[0136] 上記の細胞塊分割器において、連結ブロックと先端ブロックとを連結した際、連結ブロックの第２の大孔径部と、先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通してもよい。

[0137] 上記の細胞塊分割器が、内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、末端ブロックの第１の端部に凹部が、末端ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、当該末端ブロックの凸部が、連結ブロックの凹部と勘合してもよい。

[0138] 上記の細胞塊分割器が、末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、挿入ノズルに連通する、細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器と、を更に備えていてもよい。

[0139] また、本発明の態様によれば、培養細胞を撮影する撮影装置と、撮影装置で得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。

[0140] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置は、テレセントリックレンズを介して細胞を撮影してもよい。

[0141] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、ハイパスフィルタを適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、画像中の細胞塊を抽出してもよい。

[0142] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、画像にＤｉｓｔａｎｃｅＴｒａｎｓｆｏｒｍ法を適用してもよい。

[0143] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞魂の大きさを算出してもよい。

[0144] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行されてもよい。

[0145] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、拡大培養において、複数の細胞塊が継代されてもよい。

[0146] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、培養器における培地の供給速度が変化してもよい。

[0147] 上記の幹細胞製造システムにおいて、画像処理部が、抽出した細胞魂の数を算出してもよい。

[0148] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出

された細胞塊の数に応じて、培養器における培地の供給速度が変化してもよい。

[0149] また、本発明の態様によれば、培養細胞を撮影する撮影装置と、培地の濁度と、培地中の細胞魂の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置と、撮影装置で得られた画像に基づき、細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、算出された濁度の値と、関係と、に基づき、撮影された細胞魂の密度の値を算出する画像処理部と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。

[0150] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置は、テレセントリックレンズを介して細胞を撮影してもよい。

[0151] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行されてもよい。

[0152] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、拡大培養において、複数の細胞塊が継代されてもよい。

[0153] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、培養器において培地の供給速度が変化してもよい。

[0154] また、本発明の態様によれば、培養細胞を撮影する撮影装置と、培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置と、撮影装置で得られた画像における培地の色の値を算出し、算出された色の値と、関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部と、を備える、幹細胞製造システムが提供される。

[0155] 上記の幹細胞製造システムにおいて、撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、培養器において培地が交換されてもよい。

[0156] 上記の幹細胞製造システムにおいて、培地の色が、培地の色相であってもよい。

発明の効果

[0157] 本発明によれば、幹細胞を製造可能な幹細胞製造システムを提供可能である。

図面の簡単な説明

[0158] [図1]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの模式図である。

[図2]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの導入細胞送液路の一例の模式的断面図である。

[図3]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの導入細胞送液路の一例の模式的断面図である。

[図4]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムで用いられる培養バッグの模式図である。

[図5]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器の模式図である。

[図6]本発明の実施の形態に係る補給培地送液ポンプと浮遊培養器の模式図である。

[図7]本発明の実施の形態に係る補給培地送液ポンプと浮遊培養器の模式図である。

[図8]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器と撮影装置の模式図である。

[図9]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器と撮影装置の模式図である。

[図10]本発明の実施の形態に係る細胞の画像の一例である。

[図11]本発明の実施の形態に係る中央演算処理装置の模式図である。

[図12]本発明の実施の形態に係る細胞塊の画像の一例である。

[図13]本発明の実施の形態に係る二値化処理された細胞塊の画像の一例である。

[図14]本発明の実施の形態に係るハイパスフィルタを適用された細胞塊の画像の一例である。

[図15]本発明の実施の形態に係る分水嶺アルゴリズムを適用された細胞塊の画像の一例である。

[図16]本発明の実施の形態に係るＤｉｓｔａｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法

を適用された細胞塊の画像の一例である。

[図17]本発明の実施の形態に係る分水嶺アルゴリズムを適用された細胞塊の画像の一例である。

[図18]本発明の実施の形態に係る複数領域に分割された細胞塊の画像の一例である。

[図19]本発明の実施の形態に係る輪郭が抽出された細胞塊の画像の一例である。

[図20]本発明の実施の形態に係る輪郭が抽出された細胞塊の画像の一例である。

[図21]本発明の実施の形態に係る細胞のサイズのヒストグラムの一例である。

[図22]本発明の実施の形態に係る浮遊培養器と撮影装置の模式図である。

[図23]本発明の実施の形態に係る培地のｐＨと培地の色相との関係を示すグラフの一例である。

[図24]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図25]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図26]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図27]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図28]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図29]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図30]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図31]本発明の実施の形態に係る細胞塊分割器の模式図である。

[図32]本発明の実施の形態に係る分割された細胞塊の画像の一例である。

[図33]本発明の実施の形態に係る溶液置換器の模式図である。

[図34]本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムの模式図である。

[図35]実施例１に係る蛍光顕微鏡写真である。

[図36]実施例１に係る蛍光活性化フローサイトメーターによる分析結果を示すグラフである。

[図37]実施例２に係るｉＰＳ細胞のコロニーの写真である。

[図38]実施例２に係るｉＰＳ細胞のコロニーの写真である。

[図39]実施例２に係るｉＰＳ細胞のコロニーの写真である。

[図40]実施例２に係るｉＰＳ細胞のコロニーの分化の状態を示すグラフである。

[図41]実施例３に係るｉＰＳ細胞のコロニーの写真である。

[図42]実施例４の結果を示すグラフである。

[図43]実施例５に係るｉＰＳ細胞塊の写真である。

[図44]実施例５の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0159] 以下に本発明の実施の形態を説明する。以下の図面の記載において、同一又は類似の部分には同一又は類似の符号で表している。但し、図面は模式的なものである。したがって、具体的な寸法等は以下の説明を照らし合わせて判断するべきものである。また、図面相互間においても互いの寸法の関係や比率が異なる部分が含まれていることは勿論である。

[0160] 本発明の実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図１に示すように、血液から細胞を分離する分離装置１０と、分離装置１０で分離された細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路２０と、導入前細胞送液路２０内に多能性誘導因子を送る誘導因子送液機構２１と、導入前細胞送液路２０に接続され、細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置３０と、誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞魂を作製する細胞塊作製装置４０と、複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置１００と、を備える。

[0161] 幹細胞製造システムは、さらに、分離装置１０、導入前細胞送液路２０、誘導因子送液機構２１、因子導入装置３０、細胞塊作製装置４０、及びパッケージ装置１００を格納する小型の筐体２００を備える。

[0162] 幹細胞製造システムは、さらに、筐体２００内の気体を清浄にする空気清浄装置、筐体２００内の気体の温度を管理する温度管理装置、及び筐体２０

０内の気体の二酸化炭素（CO_2）濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を備えていてもよい。空気清浄装置は、筐体２００内の気体の清浄度を監視する清浄度センサーを備えていてもよい。空気清浄装置は、例えば、ＨＥＰＡ（Ｈｉｇｈ　Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ　Ｐａｒｔｉｃｕｌａｔｅ　Ａｉｒ）フィルター等を用いて、筐体２００内の空気を清浄化する。空気清浄装置は、例えば、筐体２００内の空気の清浄度を、ＩＳＯ基準　１４６４４－１でＩＳＯ１からＩＳＯ６のクラスにする。温度管理装置は、筐体２００内の気体の温度を監視する温度センサーを備えていてもよい。CO_2濃度管理装置は、筐体２００内の気体のCO_2濃度を監視するCO_2濃度センサーを備えていてもよい。

[0163] 筐体２００には、例えば扉等が設けられているが、扉が閉じられた状態では、内部が完全に閉鎖され、内部の空気の清浄度、温度、及びCO_2濃度を一定に保つことが可能である。筐体２００は、外部から内部の装置の状態を観察できるよう、透明であることが好ましい。また、筐体２００は、ゴム手袋等のグローブが一体化された、グローブボックスであってもよい。

[0164] 分離装置１０は、例えばヒトの血液が入ったバイアルを受け取る。分離装置１０は、例えば、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ヘパリン、及び生物学的製剤基準血液保存液Ａ液（ＡＣＤ－Ａ液、テルモ株式会社）等の抗凝固剤を保存する抗凝固剤タンクを備えている。分離装置１０は、ポンプ等を用いて、抗凝固剤タンクから、ヒトの血液に、抗凝固剤を添加する。

[0165] また、分離装置１０は、例えば、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＲＥＭＩＵＭ（登録商標、ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社）等の単核細胞分離用試薬を保存する分離用試薬タンクを備えている。分離装置１０は、ポンプ等を用いて、分離用試薬タンクから、例えば１５ｍＬチューブ２本に、単核細胞分離用試薬を５ｍＬずつ分注する。なお、チューブの代わりに、樹脂バッグを用いてもよい。

[0166] さらに、分離装置１０は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）等の緩衝液を保存する緩衝液タンクを備えている。分離装置１０は、ポンプ等を用いて、

緩衝液タンクから、例えばヒトの血液５ｍＬに、緩衝液５ｍＬを加えて希釈する。またさらに、分離装置１０は、ポンプ等を用いて、希釈されヒトの血液を、チューブ中の単核細胞分離用試薬上に、５ｍＬずつ加える。

[0167] 分離装置１０は、温度設定可能な遠心機をさらに備える。遠心機は、例えば１８℃に設定される。分離装置１０は、移動装置等を用いて、単核細胞分離用試薬及びヒトの血液等が入れられたチューブを、遠心機のホルダーに入れる。遠心機は、チューブ中の溶液を、例えば４００×ｇで３０分間遠心する。チューブの代わりに、樹脂バッグを遠心させてもよい。

[0168] 遠心後、分離装置１０は、チューブ中の溶液の単核球で白く濁った中間層をポンプ等で回収する。分離装置１０は、ポンプ等を用いて、回収した単核球の懸濁液を、導入前細胞送液路２０に送り出す。あるいは、さらに、分離装置１０は、回収した単核球溶液２ｍＬに対し、例えばＰＢＳ１２ｍＬを加えて、チューブを遠心機のホルダーに入れる。遠心機は、チューブ中の溶液を、例えば２００×ｇで１０分間遠心する。

[0169] 遠心後、分離装置１０は、ポンプ等を用いて、チューブ中の溶液の上清を吸引して除去し、Ｘ－ＶＩＶＯ　１０（登録商標、ロンザジャパン株式会社）等の単核球培地３ｍＬをチューブ中の単核球溶液に加えて懸濁する。分離装置１０は、ポンプ等を用いて、単核球懸濁液を、導入前細胞送液路２０に送り出す。なお、分離装置１０は、透析膜を使用して、血液から単核球を分離してもよい。また、皮膚等から予め分離された繊維芽細胞等の体細胞を使用する場合は、分離装置１０は無くともよい。

[0170] 分離装置１０は、遠心分離以外の方法で、誘導に適した細胞を分離してもよい。例えば、分離すべき細胞がＴ細胞であればＣＤ３，ＣＤ４，ＣＤ８のいずれかが陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。分離すべき細胞が血管内皮前駆細胞であればＣＤ３４が陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。分離すべき細胞がＢ細胞であれば、ＣＤ１０，ＣＤ１９，ＣＤ２０のいずれかが陽性である細胞をパニングにより分離すればよい。また、パニングに限らず、磁気細胞分離方法（ＭＡＣＳ）やフローサイトメト

リー等により分離してもよい。また、誘導に適した細胞は、血液由来の細胞に限定されない。

[0171] 誘導因子送液機構２１は、誘導因子導入試薬溶液等を保存する誘導因子導入試薬タンクを備える。遺伝子導入試薬溶液等の誘導因子導入試薬溶液は、例えば、Ｈｕｍａｎ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標、ロンザジャパン株式会社）溶液等のエレクトロポレーション溶液、サプリメント溶液、及びプラスミドセットを含む。プラスミドセットは、例えば、ｐＣＸＬＥ－ｈＯＣＴ３／４－ｓｈｐ５３－Ｆを０．８３μｇ、ｐＣＸＬＥ－ｈＳＫを０．８３μｇ、ｐＣＥ－ｈＵＬを０．８３μｇ、及びｐＣＸＷＢ－ＥＢＮＡ１を０．５μｇ含む。誘導因子送液機構２１は、マイクロポンプ等を用いて、誘導因子導入試薬溶液中に単核球懸濁液が懸濁されるように、誘導因子導入試薬溶液を、導入前細胞送液路２０に送り出す。

[0172] 導入前細胞送液路２０の内壁には、細胞が接着しないよう、ｐｏｌｙ－ＨＥＭＡ（ｐｏｌｙ ２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ）をコーティングして、細胞非接着性にしてもよい。あるいは、導入前細胞送液路２０の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、導入前細胞送液路２０の材料に、温度伝導率が良く、CO_2透過性の材料を用いることにより、導入前細胞送液路２０内の条件が、筐体２００内の管理された温度及びCO_2濃度と同等になる。さらに、導入前細胞送液路２０には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0173] 導入前細胞送液路２０に接続された因子導入装置３０は、例えばエレクトロポレーターであり、誘導因子導入試薬溶液と単核球懸濁液の混合液を受け取り、単核球に対してプラスミドのエレクトロポレーションを実施する。因子導入装置３０は、エレクトロポレーションを実施後、プラスミドをエレクトロポレーションされた単核球を含む溶液に、単核球培地を加える。因子導入装置３０は、ポンプ等を用いて、プラスミドをエレクトロポレーションされた単核球（以下、「誘導因子導入細胞」という。）を含む溶液を、導入細胞送液路３１に送り出す。

[0174] なお、因子導入装置３０は、エレクトロポレーターに限定されない。因子導入装置３０は、細胞に初期化因子をコードしているＲＮＡをリポフェクション法により導入してもよい。リポフェクション法とは、陰性荷電物質である核酸と、陽性荷電脂質と、の複合体を、電気的な相互作用により形成し、複合体をエンドサイトーシスや膜融合により細胞内に取り込ませる方法である。リポフェクション法は、細胞へのダメージが少なく、導入効率に優れており、操作が簡便であり、時間がかからない等の利点を有する。また、リポフェクション法においては、細胞のゲノムに初期化因子が挿入される可能性がないため、得られた幹細胞を全ゲノムシークエンスして、外来遺伝子の挿入の有無を確認する必要がない。多能性誘導因子としての初期化因子ＲＮＡは、例えば、Ｏｃｔ３／４のｍＲＮＡ、Ｓｏｘ２のｍＲＮＡ、Ｋｌｆ４のｍＲＮＡ、及びｃ－ＭｙｃのｍＲＮＡを含む。

[0175] 初期化因子ＲＮＡのリポフェクションには、例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）或いはリポフェクション試薬が用いられる。ＲＮＡのリポフェクション試薬としては、ｓｉＲＮＡのリポフェクション試薬及びｍＲＮＡのリポフェクション試薬が使用可能である。より具体的には、ＲＮＡのリポフェクション試薬としては、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ（登録商標）２０００、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ（登録商標）３０００、ＮｅｏｎＴｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、Ｓｔｅｍｆｅｃｔ ＲＮＡ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ ｒｅａｇｅｎｔ（Ｓｔｅｍｆｅｃｔ）、ＮｅｘｔＦｅｃｔ（登録商標）ＲＮＡ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｂｉｏｏ Ｓｉｅｎｔｉｆｉｃ）、Ａｍａｘａ（登録商品）Ｈｕｍａｎ Ｔ ｃｅｌｌ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商品）ｋｉｔ（Ｌｏｎｚａ社、ＶＡＰＡ－１００２）、Ａｍａｘａ（登録商品）Ｈｕｍａｎ ＣＤ３４ ｃｅｌｌ

Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商品）ｋｉｔ（Ｌｏｎｚａ社、ＶＡＰＡ－１００３）、及びＲｅｐｒｏＲＮＡ（登録商標）トランスフェクション試薬（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）等が使用可能である。

[0176] 因子導入装置３０が、リポフェクション法により細胞に初期化因子を導入する場合は、初期化因子ＲＮＡ及び試薬等が、誘導因子送液機構２１により導入前細胞送液路２０に送り出される。

[0177] 導入細胞送液路３１の内壁には、細胞が接着しないよう、ｐｏｌｙ－ＨＥＭＡをコーティングして、非接着性にしてもよい。あるいは、導入細胞送液路３１の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、導入細胞送液路３１の材料に、温度伝導率が良く、CO_2透過性の材料を用いることにより、導入細胞送液路３１内の条件が、筐体２００内の管理された温度及びCO_2濃度と同等になる。さらに、導入細胞送液路３１には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。また、エレクトロポレーションの後は、多くの細胞が死に、死んだ細胞の細胞塊ができることがある。そのため、導入細胞送液路３１に、死細胞塊を除去するフィルターを設けてもよい。あるいは、図２に示すように、導入細胞送液路３１内部に、内径を断続的に変化させる一又は複数の襞を設けてもよい。またあるいは、図３に示すように、導入細胞送液路３１の内径を断続的に変化させてもよい。

[0178] 図１に示すように、導入細胞送液路３１に接続された細胞塊作製装置４０は、因子導入装置３０で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置５０と、初期化培養装置５０で樹立された幹細胞からなる細胞塊（細胞コロニー）を複数の細胞塊に分割する第１の分割機構６０と、第１の分割機構６０で分割された複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置７０と、拡大培養装置７０で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第２の分割機構８０と、複数の細胞魂をパッケージ装置１００に順次送る細胞魂搬送機構９０と、を備える。

[0179] 初期化培養装置５０は、内部にウェルプレートを格納可能である。また、

初期化培養装置５０は、ピペッティングマシンを備える。初期化培養装置５０は、導入細胞送液路３１から誘導因子導入細胞を含む溶液を受け取り、ピペッティングマシンで、溶液をウェルに分配する。初期化培養装置５０は、ウェルに誘導因子導入細胞を分配後、例えば３、５、７日目に、ＳｔｅｍＦｉｔ（登録商標、味の素株式会社）等の幹細胞培地を加える。培地にサプリメントとして塩基性の線維芽細胞成長因子（ｂａｓｉｃ　ＦＧＦ）を添加してもよい。なお、ＳｔｅｍＢｅａｄｓ　ＦＧＦ２（フナコシ）のような、ＦＧＦ－２（ｂａｓｉｃ　ＦＧＦ，ｂＦＧＦ，ＦＧＦ－ｂ）を培地に供給し続ける徐放性ビーズを培地に添加してもよい。また、ＦＧＦは不安定な場合があるので、ヘパリン模倣ポリマーをＦＧＦに共役させ、ＦＧＦを安定化させてもよい。さらに、培地に、トランスフォーミング増殖因子ベータ（ＴＧＦ－β）や、アクチビン（Ａｃｔｉｖｉｎ）等を添加してもよい。初期化培養装置５０は、ウェルに誘導因子導入細胞を分配後、例えば９日目に、培地交換を行い、以降、ｉＰＳ細胞の細胞塊（コロニー）が１ｍｍを越える程度まで、２日おきに培地交換を行う。なお、培地を交換するとは、培地を一部置換することや、補給することも含む。

[0180] 細胞塊が形成されると、初期化培養装置５０は、ピペッティングマシンで細胞塊を回収し、回収した細胞塊にＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ（登録商標、ライフテクノロジーズ社）等のトリプシン代替組み替え酵素を添加する。さらに、初期化培養装置５０は、回収した細胞塊が入っている容器をインキュベーターに入れて、３７℃、$CO_2$５％で１０分間、細胞塊と、トリプシン代替組み替え酵素と、を反応させる。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。例えば、初期化培養装置５０は、ピペッティングマシンによるピペッティングにより、細胞塊を砕く。またあるいは、初期化培養装置５０は、フィルターが設けられたパイプや、図２又は図３に示した導入細胞送液路３１と同様に、内径を断続的に変化させるパイプに細胞塊を通して、細胞塊を砕いてもよい。その後、初期化培養装置５０は、砕かれた細胞塊が入れられた溶液に、ＳｔｅｍＦｉｔ（登録商

標、味の素株式会社）等の多能性幹細胞用培地を加える。

[0181] なお、初期化培養装置５０における培養は、ウェルプレートではなく、CO_2透過性のバッグの中で行ってもよい。また、培養は接着培養であってもよいし、浮遊培養であってもよい。浮遊培養である場合は、攪拌培養を行ってもよい。また、培地が寒天状であってもよい。寒天状の培地としては、ゲランガム（ｇｅｌｌａｎ　ｇｕｍ）ポリマーが挙げられる。寒天状の培地を用いると、細胞が沈んだり、接着したりすることがないため、浮遊培養でありながら、攪拌する必要がなく、一細胞由来の単一細胞塊を作製する事が出来るさらに、初期化培養装置５０における培養は、ハンギングドロップ培養であってもよい。

[0182] 初期化培養装置５０は、ウェルプレートやCO_2透過性のバッグに培養液を含む培地を補給する第１の培地補給装置を備えていてもよい。第１の培地補給装置は、ウェルプレートやCO_2透過性のバッグ内の培養液を回収し、フィルターや透析膜を用いて培養液をろ過して、浄化された培養液を再利用してもよい。また、その際、再利用される培養液に成長因子等を添加してもよい。また、初期化培養装置５０は、培地の温度を管理する温度管理装置、及び培地近傍の湿度を管理する湿度管理装置等をさらに備えていてもよい。

[0183] 初期化培養装置５０において、例えば、細胞を、図４に示すような透析膜等の培養液透過性のバッグ３０１に入れ、培養液透過性のバッグ３０１を、培養液非透過性のCO_2透過性のバッグ３０２に入れて、バッグ３０１、３０２に培養液を入れてもよい。初期化培養装置５０は、新鮮な培養液が入ったバッグ３０２を複数用意しておき、所定の期間ごとに、細胞が入ったバッグ３０１を入れるバッグ３０２を、新鮮な培養液が入っているバッグ３０２に交換してもよい。

[0184] また、初期化培養装置５０における培養方法は、上記の方法に限定されず、図５に示すような浮遊培養器を用いてもよい。図５に示す浮遊培養器は、誘導因子導入細胞とゲル培地が入れられる透析チューブ７５と、透析チューブ７５が入れられ、透析チューブ７５の周囲にゲル培地が入れられる容器７

６と、を備える。また、浮遊培養器は、透析チューブ７５の周囲にゲル培地の水素イオン指数（ｐＨ）を測定するｐＨセンサーを備えていてもよい。

[0185] 透析チューブ７５は、半透膜からなり、例えば、ＲＯＣＫ阻害剤を透過させる。透析チューブ７５の分画分子量は、０．１ＫＤａ以上、１０ＫＤａ以上、あるいは５０ＫＤａ以上である。透析チューブ７５は、例えば、セルロースエステル、エチルセルロース、セルロースエステル類、再生セルロース、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリメチルメタクリレート、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエステル系ポリマーアロイ、ポリカーボネート、ポリアミド、セルロースアセテート、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、銅アンモニウムレーヨン、鹸化セルロース、ヘモファン膜、フォスファチジルコリン膜、及びビタミンＥコーティング膜等からなる。

[0186] 容器７６としては、遠心チューブのような円錐チューブが使用可能である。容器７６は、例えば、ポリプロピレンからなる。容器７６は、CO_2透過性であってもよい。CO_2透過性の容器７６としては、Ｇ－Ｒｅｘ（登録商標、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）が使用可能である。

[0187] 誘導因子導入細胞は、透析チューブ７５内に入れられる。ゲル培地は、撹拌されない。また、ゲル培地は、フィーダー細胞を含まない。透析チューブ７５には、透析チューブ７５内に細胞を含む培地を送液するための送液路が接続されていてもよい。また、透析チューブ７５には、透析チューブ７５内の細胞を含む培地を容器外部に送液するための送液路が接続されていてもよい。

[0188] ゲル培地は、例えば、血液細胞培地又は幹細胞用培地に脱アシル化ジェランガムを終濃度が０．５重量％から０．００１重量％、０．１重量％から０．００５重量％、あるいは０．０５重量％から０．０１重量％となるよう添加することにより調製される。例えば、初期化培養の当初は、血液細胞培地から作製したゲル培地を用い、その後は、幹細胞用培地から作製したゲル培地を用いる。

[0189] 幹細胞用培地としては、例えば、Ｐｒｉｍａｔｅ ＥＳ Ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ(ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ)等のヒトＥＳ／ｉＰＳ培地を使用可能である。

[0190] ただし、幹細胞用培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えばＰｒｉｍａｔｅ ＥＳ Ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ、Ｒｅｐｒｏｓｔｅｍ、ＲｅｐｒｏＦＦ、ＲｅｐｒｏＦＦ２、ＲｅｐｒｏＸＦ（Ｒｅｐｒｏｃｅｌｌ）、ｍＴｅＳＲ１、ＴｅＳＲ２、ＴｅＳＲＥ８、ＲｅｐｒｏＴｅＳＲ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＰｌｕｒｉＳＴＥＭ（登録商標）Ｈｕｍａｎ ＥＳ／ｉＰＳ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｍｅｒｃｋ）、ＮｕｔｒｉＳｔｅｍ （登録商標）ＸＦ／ＦＦ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｕｍ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ ｉＰＳ ａｎｄ ＥＳ Ｃｅｌｌｓ、Ｐｌｕｒｉｔｏｎ ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｍｅｄｉｕｍ（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ）、ＰｌｕｒｉＳＴＥＭ（登録商標）、Ｓｔｅｍｆｉｔ ＡＫ０２Ｎ、Ｓｔｅｍｆｉｔ ＡＫ０３（Ａｊｉｎｏｍｏｔｏ）、ＥＳＣ－Ｓｕｒｅ（登録商標）ｓｅｒｕｍ ａｎｄ ｆｅｅｄｅｒ ｆｒｅｅ ｍｅｄｉｕｍ ｆｏｒ ｈＥＳＣ／ｉＰＳ（Ａｐｐｌｉｅｄ ＳｔｅｍＣｅｌｌ）、及びＬ７（登録商標）ｈＰＳＣ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｓｙｓｔｅｍ （ＬＯＮＺＡ）等を利用してもよい。

[0191] ゲル培地は、ジェランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも１種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

[0192] あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA) 、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide ter

minated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくの温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

[0193] 透析チューブ７５内に入れられるゲル培地は、ＲＯＣＫ阻害剤を含んでいなくてもよい。容器７６内の透析チューブ７５の周囲に入れられるゲル培地には、例えば、ＲＯＣＫ阻害剤を終濃度が１０００μｍｏｌ／Ｌ以上０．１μｍｏｌ／Ｌ以下、１００μｍｏｌ／Ｌ以上１μｍｏｌ／Ｌ以下、あるいは５μｍｏｌ／Ｌ以上２０μｍｏｌ／Ｌ以下となるよう、毎日添加する。ＲＯＣＫ阻害剤を透析チューブ７５の周囲のゲル培地に添加することにより、ＲＯＣＫ阻害剤が透析チューブ７５内に浸透し、細胞によるコロニー形成が促進される。

[0194] ゲル培地は、例えば、ｂａｓｉｃ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ｂＦＧＦ）やＴＧＦ－β等の成長因子を含んでいてもよいし、含んでいなくともよい。

[0195] 透析チューブ７５内で細胞を浮遊培養する間、容器７６内の透析チューブ７５の周囲のゲル培地は交換される。なお、培地を交換するとは、培地を一部置換することや、補充することも含む。この場合、透析チューブ７５内にゲル培地を補給しなくともよい。あるいは、透析チューブ７５内で細胞を浮遊培養する間、透析チューブ７５内にゲル培地が補給される。この場合、容器７６内の透析チューブ７５の周囲にゲル培地を補給しなくともよい。

[0196] 実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図６に示すように、培地補給装置としての補給培地送液ポンプ７７を用いて、容器７６内の透析チューブ７５の周囲のゲル培地を、交換、あるいは補給する。補給培地送液ポンプ７７としては、点滴に用いられるポンプ等が使用可能である。補給培地送液ポン

プ７７と、浮遊培養器の容器７６と、は、送液チューブ７８で接続される。補給培地送液ポンプ７７は、送液チューブ７８を介して、浮遊培養器の容器７６内にゲル培地を送液する。浮遊培養器の容器７６には、廃液チューブ７９が接続されている。浮遊培養器の容器７６内のゲル培地は、廃液チューブ７９を介して排出される。浮遊培養器の容器７６内のゲル培地は、例えば、補給培地送液ポンプ７７によって補給される新鮮なゲル培地による圧力によって排出されてもよいし、重力を利用して排出してもよいし、排出ポンプによって排出してもよい。

[0197] 補給培地送液ポンプ７７から培養器に送液されるゲル培地の温度は、例えば、培養器中のゲル培地の温度が急激に変化しないように設定される。例えば、培養器中のゲル培地の温度が３７℃である場合は、培養器に送液されるゲル培地の温度も３７℃に設定される。ただし、培養器に送液される前の培地は、冷蔵保存部で、例えば４℃等の低温で冷蔵保存されていてもよい。

[0198] 例えば、補給培地送液ポンプ７７によって浮遊培養器の容器７６内に送液されるゲル培地の量と、浮遊培養器の容器７６から排出されるゲル培地の量と、が同じになるよう、補給培地送液ポンプ７７は制御される。補給培地送液ポンプ７７は、浮遊培養器の容器７６内に、常時、ゲル培地を送液してもよいし、適宜間隔をおいて、ゲル培地を送液してもよい。

[0199] ゲル培地を常時送液する場合、送液されるゲル培地の流量は、一定であっても、一定でなくてもよい。例えば、後述するように、培地及び培地中の細胞塊を撮影装置で監視し、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、送液されるゲル培地の流量を増加させたり、減少させたりしてもよい。

[0200] また、ゲル培地を常時送液せずに、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、ゲル培地の送液の開始及び終了をしてもよい。この場合も、培地及び培地中の細胞塊の状態に応じて、送液されるゲル培地の流量を増加させたり、減少させたりしてもよい。

[0201] なお、培養器に送液されるゲル培地の流量が大きすぎると、培養器内の細胞がゲル培地の圧力によりダメージを受ける場合がある。そのため、培養器

に送液されるゲル培地の流量は、細胞がダメージを受けないように設定される。

[0202] 培地を交換せずに細胞の培養を続けると、細胞が排出する乳酸等の老廃物の蓄積や、ｐＨの変化が、細胞培養に悪影響を及ぼしうる。また、培地中に含まれるｂＦＧＦやリコンビナントタンパク質等の様々なタンパク質が分解され、細胞の培養に必要な成分が培地から損なわれうる。

[0203] これに対し、補給培地送液ポンプ７７で新鮮な培地を培養器中に送液し、古い培地を培養器から排出することにより、培養器中から老廃物を除去し、培地中のｐＨを適切な範囲内に保ち、細胞の培養に必要な成分を補給することが可能になる。これにより、培地の状態を一定に近い状態に保つことが可能である。

[0204] なお、図６においては、補給培地送液ポンプ７７と、浮遊培養器の容器７６と、が、送液チューブ７８で接続される例を示した。これに対し、図７に示すように、補給培地送液ポンプ７７と、浮遊培養器の容器７６内の透析チューブ７５内と、を送液チューブ７８で接続してもよい。透析チューブ７５内に新鮮なゲル培地を送液することにより、透析チューブ７５内の培地に含まれる老廃物が、透析チューブ７５外に排出される。また、透析チューブ７５内の培地のｐＨを適切な範囲内に保ち、透析チューブ７５内の培地に細胞の培養に必要な成分を補給することが可能である。

[0205] 図１に示す幹細胞製造システムは、初期化培養装置５０における培養を撮影する写真カメラやビデオカメラ等の初期化培養撮影装置をさらに備えていてもよい。ここで、初期化培養装置５０で使用される培地に無色の培地を用いると、有色の培地を用いた場合に生じうる乱反射や自家蛍光を抑制することが可能となる。ただし、培地のｐＨを確認するために、フェノールレッド等のｐＨ指示薬を含んでいてもよい。また、誘導された細胞と、誘導されなかった細胞とでは、細胞の形状及び大きさ等が異なるため、幹細胞製造システムは、初期化培養装置５０における細胞を撮影することにより、誘導された細胞の割合を算出する誘導状態監視装置を、さらに備えていてもよい。あ

るいは、誘導状態監視装置は、抗体免疫染色法又はＲＮＡ抽出法により、誘導された細胞の割合を特定してもよい。さらに、幹細胞製造システムは、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等により、誘導されていない細胞を取り除く、未誘導細胞除去装置を備えていてもよい。

[0206] シャーレのような平らなディッシュ上で細胞を培養している場合は、細胞の存在範囲は、平面的に広がる。そのため、撮影装置のレンズの光軸がディッシュ面と直交するよう、撮影装置とシャーレを配置すれば、シャーレ上のほぼ全ての細胞に焦点を合わせることが可能である。

[0207] しかし、細胞を培地の中に浮遊させて浮遊培養を行う場合、細胞の存在範囲が３次元的に広がるため、撮影装置から各細胞までの光軸方向の距離にばらつきが生じる。そのため、レンズを用いずに全ての細胞に焦点を合わせることが困難になりうる。

[0208] これに対し、明るいレンズ（Ｆ値の小さいレンズ）を用いたり、明るい照明を被測定対象物に照射しつつ、レンズの絞りをできるだけ絞って撮像したりすることにより、被写界深度を深くすることが可能である。

[0209] あるいは、レンズの焦点位置を少しずつ変化させながら複数枚の画像を撮像し、撮像した複数枚の画像を合成して、擬似的に深く焦点の合った画像を得てもよい。また、複数枚の画像のそれぞれは、焦点の合った細胞のと、焦点が合っていないぼやけた細胞と、が交ざった画像になる。そのため、複数枚の画像から焦点の合った部分画像を集めて、１枚の合成画像を生成してもよい。

[0210] あるいは、図８に示すように、初期化培養撮影装置１７１と、浮遊培養器内の細胞等の被写体と、の間には、テレセントリックレンズ１７２を配置してもよい。テレセントリックレンズ１７２は、細胞等の被写体からレンズ絞りの中心を通る主光線をレンズ光軸と平行にするため、初期化培養撮影装置１７１から浮遊培養器内の複数の細胞のそれぞれまでの距離が一様でなくても、撮像される細胞の大きさが距離に応じて変化しない。

[0211] 図９は、図８に示した浮遊培養器等を上方から見た模式図である。なお、

図９においては、図８に示した容器７６が省略されている。初期化培養撮影装置１７１で細胞を撮像する場合、初期化培養撮影装置１７１の光軸に対して垂直な方向、あるいは垂直な方向から撮影装置に近い方向に細胞観察用照明光源１７３を配置し、細胞観察用照明光源１７３から細胞に照明光を照射する散乱光照明法を用いるとよい。これにより、細胞に当たった照明光による散乱光は初期化培養撮影装置１７１に届くが、細胞に当たらなかった照明光は培地を透過して初期化培養撮影装置１７１には届かなくなる。そのため、画像において培地の部分が相対的に暗くなり、細胞の部分の相対的に明るくなる。ただし、画像において細胞を認識できれば、照明法はこれに限定されない。図１０は、散乱光照明法で撮像された細胞の画像の一例である。培地の部分が相対的に暗くなり、細胞の部分の相対的に明るくなっている。

[0212] 実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図１１に示すように、初期化培養撮影装置１７１が撮像した画像を画像処理する画像処理部５０１を備える中央演算処理装置（ＣＰＵ）５００を備えていてもよい。ＣＰＵ５００には、キーボード及びマウス等の入力装置４０１、並びにモニター等の出力装置４０２が接続されていてもよい。ＣＰＵ５００は、バス及び画像インターフェース等を介して、初期化培養撮影装置１７１から画像を受け取る。

[0213] 画像処理部５０１は、細胞の画像において、細胞又は細胞塊の輪郭を定義する輪郭定義部５１１を備えていてもよい。図１２は、マクロズームレンズ等を介して拡大して撮像されたｉＰＳ細胞塊の画像の一例である。図１２に示す画像において、白い塊に見える部分がｉＰＳ細胞塊であり、背景の暗い部分が培地である。

[0214] ここで、図１２に示す画像が８ビットのグレースケール画像である場合、所定の閾値以上の輝度の値を有する画素の輝度の値を例えば２５５のような最高輝度の値にし、所定の閾値未満の輝度の値を有する画素の輝度の値を例えば０のような最低輝度の値に置き換える二値化処理を画像に加えると、図１３に示すように、培地の部分のみならず、細胞塊の内部も最低輝度の黒となり、細胞塊の内部と、培地の部分と、が連結した部分が生じうる。そのた

め、二値化処理では、細胞又は細胞塊を抽出できない場合がある。

[0215] これに対し、図１１に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部５１１は、細胞の画像に、空間周波数に含まれる所定の周波数以上の高周波成分を通過させ、所定の周波数未満の低周波成分をブロックし、輝度値を例えば０のような最低値にするハイパスフィルタを適用する。細胞の画像において、細胞又は細胞塊の部分においては、空間周波数に含まれる高周波成分が多く、培地の部分においては、空間周波数に含まれる高周波成分が少ない。そのため、図１４に示すように、ハイパスフィルタを適用された細胞の画像においては、培地の部分の輝度の値が、例えば０のような最低値となり、細胞又は細胞塊の部分においては、輝度の値がそのままとなる。そのため、輝度が最低値とならなかった部分を、細胞又は細胞塊であるとみなすことが可能である。

[0216] ここで、図１４に示す画像において、輝度が最低値とならなかった部分をブロブ（Ｂｌｏｂ）として、ブロブ解析により検出しても、例えば、互いに接している２つの細胞塊を、１つの細胞塊として認識してしまう場合がある。

[0217] これに対し、図１１に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部５１１は、ハイパスフィルタを適用した画像に、分水嶺アルゴリズムを適用する。分水嶺アルゴリズムは、画像の輝度勾配を山の起伏と見なし、山の高い位置（輝度値の大きい位置）から低い位置（輝度値の小さい位置）へと流れ込む水の作る区域を１つの領域とするように、画像の分割を行う。

[0218] 例えば、実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部５１１は、画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、画像にＤｉｓｔａｎｃｅ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法で変換する。Ｄｉｓｔａｎｃｅ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法とは、画像の各画素の輝度の値を、直近の背景画素までの距離に応じて置換する画像変換の方法である。例えば、図１５（ａ）に示すように、ハイパスフィルタを適用した画像において、培地の領域の輝度値を、一括して最高輝度値である２５５に変換し、図１５（ｂ）に示すように白の背景にする。さらに

、細胞領域内部の各画素の輝度の値を、直近の背景画素までの距離に応じて、０以上２５５未満に変換する。例えば、直近の背景画素から離れるほど、輝度の値を低くする。

[0219] 次に、実施の形態に係る幹細胞製造システムの輪郭定義部５１１は、Ｄｉｓｔａｎｃｅ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法で変換された画像に、分水嶺アルゴリズムを適用する。図１５（ｂ）に示す画像において、輝度の低い暗い部分を山の嶺とみなし、画像に対して垂直方向上から水を落としたときに、図１５（ｃ）の矢印に示すように、水がどのように流れて行くかを推測し、図１５（ｃ）の破線に示すように、様々な方向から流れてきた水がぶつかる箇所を谷とみなし、当該谷の底において、細胞領域を分割する。

[0220] 図１４に示す画像の細胞領域の画素を、Ｄｉｓｔａｎｃｅ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法で変換すると、図１６で示す画像が得られる。図１６で示す画像に分水嶺アルゴリズムを適用すると、図１７に示す画像が得られる。得られた分割線を図１２に示す元の画像に重ねると、図１８に示す画像が得られる。図１８において、分割線で分割された各領域に存在する細胞塊は、複数の細胞塊が接した塊ではなく、１個の細胞塊であるとみなすことが可能である。そのため、各領域において、図１９に示すように、細胞塊の輪郭を抽出することにより、１個の細胞塊を正確に抽出することが可能となる。

[0221] 図１１に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部５０１は、細胞評価部５１２をさらに備えていてもよい。細胞評価部５１２は、輪郭定義部５１１が抽出した１個の細胞塊の大きさ等を評価する。例えば、細胞評価部５１２は、輪郭定義部５１１が抽出した１個の細胞塊の面積を算出する。さらに、例えば、１個の細胞塊の形状が円形とみなせる場合、細胞評価部５１２は、下記（１）式を用いて、面積から、１個の細胞塊の直径を算出する。

$$D = 2(s/\pi)^{1/2} \qquad (1)$$

ここで、Ｄは直径、Ｓは面積を表す。

[0222] 細胞塊が大きく成長しすぎると、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部

に行き届かず、細胞が分化してしまう場合がある。また、細胞塊が小さすぎる状態のままＲＯＣＫ阻害剤を用いない拡大培養に移行すると、細胞死や核型異常が生じる場合がある。したがって、細胞評価部５１２は、個々の細胞塊の大きさが適切な範囲外になった場合、警告を発してもよい。また、細胞評価部５１２は、個々の細胞塊の大きさが所定の閾値以上になった場合、拡大培養に移行するタイミングであることを出力してもよい。さらに、算出された細胞塊の大きさに応じて、初期化培養装置５０における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の大きさが大きくなるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0223] 実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部５０１は、画像処理された画像から得られる情報を統計処理する統計処理部５１３をさらに備えていてもよい。図２０は、図１０で示した画像に画像処理をして、細胞塊の部分を抽出して輪郭を付した例である。図２１は、図２０に示した画像に基づいて作成された、細胞塊のサイズのヒストグラムの一例である。このように、細胞の情報を連続的、かつ定期的に取得することにより、細胞塊の成長度、数、及び密集度等を定量的に把握することが可能であり、培養結果を安定化させることが可能である。また、算出された細胞塊の数に応じて、初期化培養装置５０における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の数が増えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0224] 図１１に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部５０１は、培地の画像から培地の濁度を算出し、培地の濁度に基づき、培地中の細胞塊の密度を算出する密度算出部５１４をさらに備えていてもよい。

[0225] 例えば、ＣＰＵ５００には、揮発性メモリ、又は不揮発性メモリ等を備える関係記憶装置４０３が接続されている。関係記憶装置４０３は、例えば、予め取得された、培地の濁度と、培地中の細胞塊の密度と、の関係を保存する。密度算出部５１４は、関係記憶装置４０３から、濁度と密度の関係を読み出す。さらに、密度算出部５１４は、培地の画像から算出した培地の濁度の値と、濁度と密度の関係と、に基づいて、培地中の細胞塊の値の密度を算

出する。これにより、培地から細胞塊を採取することなく、非破壊的に、細胞塊の密度を測定することが可能である。

[0226] また、密度算出部５１４は、細胞塊の密度が所定の閾値以上になった場合、拡大培養に移行するするタイミングであることを出力してもよい。さらに、密度算出部５１４は、培地中の細胞塊の密度を経時的に算出し、細胞塊の増殖速度を算出してもよい。異常な増殖速度は、細胞が異常であることを表す場合がある。例えば、密度算出部５１４は、異常な増殖速度が算出された場合は、警告を発する。この場合、細胞の培養を中止してもよい。

[0227] 培地中の細胞塊の密度が高くなり、細胞塊同士の距離が近くなりすぎると、複数の細胞塊同士が接着して一つの大きな細胞塊となる場合がある。大きな細胞塊においては、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部に行き届かず、内部の細胞が分化してしまう場合がある。反面、培地中の細胞塊の密度が好適な範囲より低いと、細胞塊の成長速度、及び細胞塊の形成能が著しく減少する場合がある。

[0228] これに対し、密度算出部５１４によれば、細胞塊の密度を算出することが可能であるため、細胞塊の密度が好適な範囲内にあるか否かを容易に判断することが可能である。細胞塊の密度が好適な範囲より低くなった場合は、例えば培養を中止する判断をしてもよい。さらに、算出された細胞塊の密度に応じて、初期化培養装置５０における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の密度が増えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0229] また、細胞の代謝等に伴う培地の色の変化を観察するために、図２２に示すように、浮遊培養器を挟んで初期化培養撮影装置１７１と対向する位置に、培地観察用照明光源１７４を配置してもよい。培地観察用照明光源１７４としては、例えば面光源が使用可能であり、培地観察用照明光源１７４は、例えば、白色平行光を発する。培地観察用照明光源１７４で発せられた照明光は、培地を透過して初期化培養撮影装置１７１に入射するため、初期化培養撮影装置１７１で培地の色を撮像することが可能である。

[0230] 通常、細胞培養を行う場合、培地のｐＨは６．８から７．２付近の一定の値にされる。培地のｐＨを測定する際には、培地にはフェノールレッド等のｐＨ試薬が添加される。フェノールレッドは、培地のｐＨによって変化する。培地と接する気体中の二酸化炭素濃度が十分でない場合、培地に含まれる重炭酸由来の二酸化炭素と、気体中の二酸化炭素が平衡化しないため、培地はアルカリ性になり、培地の色は赤紫色になる。また、細胞が排出した乳酸を主とする老廃物が蓄積すると、培地は酸性になり、培地の色は黄色になる。培地が酸性になることは、培地中の栄養分が枯渇していることも表している。

[0231] 図１１に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムの画像処理部５０１は、培地観察用照明光源で照明された培地の画像に基づいて、培地の評価をする培地評価部５１５をさらに備えていてもよい。培地評価部５１５は、例えば、培地の画像を画像処理して、ＨＳＶによって、培地の色を、色相（Ｈｕｅ）、彩度（Ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ）、明度（Ｖａｌｕｅ）の３つパラメーターで表現する。このうち、色相は、一般に「色合い」とか「色味」といわれる概念に対応するパラメーターである。色相は、一般に、角度の単位で表現される。

[0232] 図２３は、培地を交換せずに細胞を長期間培養した場合における培地の色相の変化と、培地のｐＨの変化と、の関係を示すグラフの一例である。培養開始直後、培地のｐＨは７．７近くであったが、時間の経過とともに、培地のｐＨは７．１近くまで低下した。これに伴い、培地の色相も、培養開始直後は４０近くであったのが、時間の経過とともに、６０近くまで上昇した。このように、培地の色相は、培養時間、及び培地のｐＨと相関する。したがって、図１１に示す培地評価部５１５は、培地の色相を監視することにより、培地の状態を判断する。

[0233] 例えば、関係記憶装置４０３は、予め取得された、培地の色相と、培地のｐＨと、の関係を保存する。培地評価部５１５は、関係記憶装置４０３から、色相とｐＨの関係を読み出す。さらに培地評価部５１５は、培地の画像か

ら算出した培地の色相の値と、色相とｐＨの関係と、に基づいて、撮影された培地のｐＨの値を算出する。例えば、培地評価部５１５は、経時的に培地の画像を取得し、培地のｐＨの値を算出してもよい。

[0234] なお、図７に示すように、培地のｐＨはｐＨセンサー２７１により測定してもよい。また、培地の温度を温度計２７２で測定してもよい。この場合、培地評価部５１５は、ｐＨセンサー２７１から培地のｐＨの値を受信し、温度計２７２から培地の温度の値を受信してもよい。

[0235] 培地評価部５１５は、培地の色相又は培地のｐＨが所定の範囲以外になった場合、培地の交換を促進すると判断したり、培地においてコンタミネーションが生じていると判断したりしてもよい。なお、培地を交換するとは、培地を一部置換することや、補充することも含む。

[0236] 培地の成分を化学的に分析することは、コストがかかり、また、化学的に培地を分析するために培地をシステムの外部に取り出すと、培地の無菌状態が保たれないおそれがある。これに対し、培地の色相を監視することにより、培地の状態を監視することは、低コストであり、また、培地の無菌状態に影響を与えない。

[0237] 培地評価部５１５が培地の色相又は培地のｐＨが所定の範囲以外であると判断した場合、例えば図６に示す補給培地送液ポンプ７７によって、浮遊培養器の透析チューブ７５の周囲の培地が交換される。あるいは、培地の交換が常にされている場合は、補給培地送液ポンプ７７による浮遊培養器の透析チューブ７５の周囲の培地の交換速度が上昇され、交換される培地の流量が上昇する。これにより、培地のｐＨを細胞培養に適した範囲に維持し、培地に十分な栄養分を補給することが可能である。

[0238] さらに、培地評価部５１５は、培地の色相の変化速度から、細胞の増殖速度を算出してもよい。例えば、関係記憶装置４０３は、予め取得された、培地の色相の変化速度と、細胞の増殖速度と、の関係を保存する。培地評価部５１５は、関係記憶装置４０３から、色相の変化速度と増殖速度の関係を読み出す。さらに、培地評価部５１５は、算出された色相の変化速度の値と、

色相の変化速度と増殖速度の関係と、に基づいて、細胞の増殖速度の値を算出する。

[0239] また、培地評価部５１５は、培地の温度が所定の範囲以外であると判断した場合、培養器の周囲の温度、あるいは供給される培地の温度を変更するよう、温度管理装置を制御してもよい。例えば、培地の温度が所定の範囲より低い場合は、培地評価部５１５は、培地の温度が上がるよう、温度管理装置を制御する。また、培地の温度が所定の範囲より高い場合は、培地評価部５１５は、培地の温度が下がるよう、温度管理装置を制御する。

[0240] 図１に示す初期化培養装置５０には、第１細胞塊送液路５１が接続されている。初期化培養装置５０は、トリプシン代替組み替え酵素と細胞塊の含有液を、ポンプ等を用いて、第１細胞塊送液路５１に送り出す。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。また、第１細胞塊送液路５１は、所定の大きさ未満の誘導された細胞のみを通す内径を有し、所定の大きさ以上の誘導されていない細胞を除去する分岐流路に接続されていてもよい。上述したように、ゲル培地を用いる場合は、ゲル培地を吸い上げることにより、細胞塊を回収することが可能である。

[0241] 細胞塊を含む溶液を第１細胞塊送液路５１に送り出すポンプは、例えば、図１１に示した細胞評価部５１２が算出した細胞塊の大きさの値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。あるいは、細胞塊を含む溶液を図１に示す第１細胞塊送液路５１に送り出すポンプは、例えば、図１１に示した密度算出部５１４が算出した細胞塊の密度の値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。

[0242] 図１に示す第１細胞塊送液路５１の内壁には、細胞が接着しないよう、ｐｏｌｙ－ＨＥＭＡをコーティングして、細胞非接着性にしてもよい。あるいは、第１細胞塊送液路５１の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、第１細胞塊送液路５１の材料に、温度伝導率が良く、CO_2透過性の材料を用いることにより、第１細胞塊送液路５１内の条件が、筐体２００内の管理された温度及びCO_2濃度と同等になる。さらに、第１細胞塊送液路

５１には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0243] 第１細胞塊送液路５１は、第１の分割機構６０に接続されている。第１の分割機構６０は、例えば、メッシュを備える。溶液に含まれる細胞塊は、水圧によってメッシュを通過する際、メッシュの各孔の大きさの複数の細胞塊に分割される。例えば、メッシュの各孔の大きさが均一であれば、分割後の複数の細胞塊の大きさも、ほぼ均一となる。あるいは、第１の分割機構６０は、ノズルを備えていてもよい。例えば、略円錐状のノズルの内部を階段状に微細加工することにより、溶液に含まれる細胞塊がノズルを通過する際に、複数の細胞塊に分割される。

[0244] またあるいは、第１の分割機構６０は、図２４に示すように、末端ブロック６１、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３を備える細胞塊分割器を備えていてもよい。末端ブロック６１、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３は、それぞれ、内部に細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が設けられている。図２５及び図２６に示すように、末端ブロック６１、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３は連結される。細胞塊分割器は、一つの連結ブロック６２を備えていてもよいし、複数の連結ブロック６２を備えていてもよい。

[0245] 図２４に示すように、連結ブロック６２の第１の端部には凹部６２ａが、連結ブロック６２の第１の端部と対向する第２の端部には凸部６２ｂが設けられている。凸部６２ｂは、例えば円柱状である。図２５及び図２６に示すように、連結ブロック６２が複数ある場合、凸部６２ｂは、隣接する連結ブロック６２の凹部６２ａと勘合する。図２４に示す凸部６２ｂの側壁は、平滑であってもよいし、雄ネジが設けられていてもよい。凹部６２ａの内壁は、平滑であってもよいし、雌ネジが設けられていてもよい。

[0246] 連結ブロック６２に設けられた貫通孔は、凹部６２ａと連通する第１の大孔径部６２ｃと、第１の大孔径部６２ｃと連通し、第１の大孔径部６２ｃより孔径が小さい小孔径部６２ｄと、小孔径部６２ｄと連通し、小孔径部６２

ｄより孔径が大きく、凸部６２ｂの先端に開口を有する第２の大孔径部６２ｅと、を有する。

[0247] 第１の大孔径部６２ｃ、小孔径部６２ｄ、及び第２の大孔径部６２ｅのそれぞれの断面形状は、例えば円である。第１の大孔径部６２ｃの孔径と、第２の大孔径部６２ｅの孔径と、は、例えば同じである。これにより、図２５及び図２６に示すように連結ブロック６２が複数あり、複数の連結ブロック６２を連結した場合に、第２の大孔径部６２ｅが、隣接する連結ブロック６２の第１の大孔径部６２ｃと平滑に連通する。

[0248] 図２４に示す第１及び第２の大孔径部６２ｃ、６２ｅの孔径は、例えば２．０ｍｍ以上４．０ｍｍ以下であるが、特に限定されない。小孔径部６２ｄの孔径は、例えば０．４ｍｍ以上１．２ｍｍ以下であるが、特に限定されない。第１の大孔径部６２ｃから小孔径部６２ｄに連続する部分には、段が形成されている。また、小孔径部６２ｄから第２の大孔径部６２ｅに連続する部分にも、段が形成されている。段の側壁は、貫通孔の中心軸に対して垂直であってもよいし、９０°未満に傾斜していてもよい。

[0249] 連結ブロック６２の第１及び第２の大孔径部６２ｃ、６２ｅの中心軸と、小孔径部６２ｄの中心軸と、は、一致していてもよい。あるいは、図２７に示すように、連結ブロック６２の第１及び第２の大孔径部６２ｃ、６２ｅの中心軸と、小孔径部６２ｄの中心軸と、は、オフセットしていてもよい。

[0250] 図２４に示す先端ブロック６３の第１の端部には凹部６３ａが、先端ブロック６３の第１の端部と対向する第２の端部にはノズル部６３ｂが設けられている。先端ブロック６３と、連結ブロック６２と、を連結する際、先端ブロック６３の凹部６３ａは、連結ブロック６２の凸部６２ｂと勘合する。凹部６３ａの内壁は、平滑であってもよいし、雌ネジが設けられていてもよい。

[0251] 先端ブロック６３に設けられた貫通孔は、凹部６３ａと連通する大孔径部６３ｃと、大孔径部６３ｃと連通し、大孔径部６３ｃより孔径が小さく、ノズル部６３ｂの先端に開口を有する小孔径部６３ｄと、を有する。

[0252] 大孔径部６３ｃ及び小孔径部６３ｄのそれぞれの断面形状は、例えば円である。先端ブロック６３の大孔径部６３ｃの孔径と、連結ブロック６２の第２の大孔径部６２ｅの孔径と、は、例えば同じである。これにより、図２５及び図２６に示すように、連結ブロック６２と、先端ブロック６３と、を連結した場合に、連結ブロック６２の第２の大孔径部６２ｅが、隣接する先端ブロック６３の大孔径部６３ｃと平滑に連通する。

[0253] 図２４に示す大孔径部６３ｃの孔径は、例えば２．０ｍｍ以上４．０ｍｍ以下であるが、特に限定されない。小孔径部６３ｄの孔径は、例えば０．４ｍｍ以上１．２ｍｍ以下であるが、特に限定されない。大孔径部６３ｃから小孔径部６３ｄに連続する部分には、段が形成されている。段の側壁は、貫通孔の中心軸に対して垂直であってもよいし、９０°未満に傾斜していてもよい。

[0254] 末端ブロック６１の第１の端部には凹部６１ａが、末端ブロック６１の第１の端部と対向する第２の端部には凸部６１ｂが設けられている。末端ブロック６１と、連結ブロック６２と、を連結する際、末端ブロックの凸部６１ｂは、連結ブロック６２の凹部６２ａと勘合する。末端ブロックの凸部６１ｂの側壁は、平滑であってもよいし、雄ネジが設けられていてもよい。

[0255] 末端ブロック６１に設けられた貫通孔は、凹部６１ａと連通し、凸部６１ｂの先端に開口を有する大孔径部６１ｃを少なくとも有する。

[0256] 凹部６１ａ及び大孔径部６１ｃのそれぞれの断面形状は、例えば円である。末端ブロック６１の大孔径部６１ｃの孔径と、連結ブロック６２の第２の大孔径部６２ｅの孔径と、は、例えば同じである。これにより、図２５及び図２６に示すように、末端ブロック６１と、連結ブロック６２と、を連結した場合に、末端ブロック６１の大孔径部６１ｃが、隣接する連結ブロック６２の大孔径部６２ｃと平滑に連通する。

[0257] 図２４に示す大孔径部６１ｃの孔径は、例えば２．０ｍｍ以上４．０ｍｍ以下であるが、特に限定されない。

[0258] 末端ブロック６１、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３のそれぞれ

の材料としては、ポリプロピレン等の樹脂が挙げられるが、これに限定されない。

[0259] 図２５、図２６、及び図２７に示すように、末端ブロック６１の凹部６１ａには、例えば、挿入ノズル６４が挿入される。挿入ノズル６４には、直接、又はチューブ等を介して、細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器が接続される。末端ブロック６１、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３を連結し、先端ブロック６３のノズル部６３ｂを、細胞塊を含む培地に刺し、吸引排出器で培地の吸引排出を１回するか、あるいは培地の吸引排出を繰り返すと、細胞塊を含む培地は、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３内の貫通孔内を往復する。連結ブロック６２、及び先端ブロック６３内の貫通孔には、段が設けられているため、培地中の細胞塊は効率的に小さな細胞塊に分割される。

[0260] 従来、細胞塊の分割は、テクニシャンがピペットマン等を用いて行っていた。しかし、図３２（ａ）に示すように、従来の方法では、分割された細胞塊の大きさが不均一であった。また、テクニシャンによって、得られる細胞塊の大きさがまちまちであった。分割後の細胞塊が大きすぎると、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部に行き届かず、細胞が分化してしまう場合がある。また、細胞塊が小さすぎると、ＲＯＣＫ阻害剤を用いない場合、細胞死や核型異常が生じる場合がある。これに対し、図２５、図２６、及び図２７に示したような細胞塊分割器を用いると、図３２（ｂ）に示すように、細胞塊を、均一な大きさの細胞塊に分割することが可能である。なお、細胞塊分割器を用いて細胞塊を分割する際に、培地が、トリプシン、あるいはＴｒｙｐＬＥ Ｅｘｐｒｅｓｓ（登録商標、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）、ＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（登録商標、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）、又はＴｒｙｐＬＥ Ｓｅｌｅｃｔ（登録商標、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）等の酵素を含んでいてもよい。また、連結ブロック６２を増やしたり、培地を吸引排出する際の圧力を上昇させたりすることにより、細胞塊をシングルセルにま

で分解することも可能である。

[0261] なお、大孔径部と小孔径部の適当な繰り返し数、長さ等が決定された場合は、細胞塊分割器は、複数のブロックから構成されなくともよい。例えば、細胞塊分割器は、図２８に示すような、内部に貫通孔を有する一体型の柱状形状を有し、細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が、大孔径部６５ａ、６５ｃ、６５ｅ、６５ｇと、大孔径部６５ａ、６５ｃ、６５ｅ、６５ｇと連通し、大孔径部６５ａ、６５ｃ、６５ｅ、６５ｇより孔径が小さい小孔径部６５ｂ、６５ｄ、６５ｆと、を交互に有していてもよい。この場合も、図２９に示すように、大孔径部６５ａ、６５ｃ、６５ｅ、６５ｇの中心軸と、小孔径部６５ｂ、６５ｄ、６５ｆの少なくとも一部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0262] また、細胞塊分割器に１回のみ培地を通して、培地中の細胞塊を小さな細胞塊に分割してもよい。その場合、図３０に示すように、細胞塊分割器の両端にチューブ等を挿入可能な挿入部６６ａ、６６ｂを設けてもよい。培地は、挿入部６６ａから貫通孔を経て挿入部６６ｂから排出され、その間に、培地に含まれる細胞塊が分割される。この場合も、図３１に示すように、大孔径部６５ａ、６５ｃ、６５ｅ、６５ｇの中心軸と、小孔径部６５ｂ、６５ｄ、６５ｆの少なくとも一部の中心軸と、がオフセットしていてもよい。

[0263] 図１に示す第１の分割機構６０には、拡大培養装置７０が接続されている。第１の分割機構６０で分割された細胞塊を含む溶液は、拡大培養装置７０に送られる。

[0264] 拡大培養装置７０は、内部にウェルプレートを格納可能である。また、拡大培養装置７０は、ピペッティングマシンを備える。拡大培養装置７０は、第１の分割機構６０から複数の細胞塊を含む溶液を受け取り、ピペッティングマシンで、溶液をウェルに分配する。拡大培養装置７０は、ウェルに細胞塊を分配後、３７℃、$CO_2$５％で細胞塊を例えば８日前後培養する。また、拡大培養装置７０は、適宜培地交換を行う。

[0265] その後、拡大培養装置７０は、細胞塊にＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ（登

録商標、ライフテクノロジーズ社）等のトリプシン代替組み替え酵素を添加する。さらに、拡大培養装置７０は、細胞塊が入っている容器をインキュベーターに入れて、３７℃、$CO_2$５％で１分間、細胞塊と、トリプシン代替組み替え酵素と、を反応させる。なお、物理的に細胞塊を砕ける場合は、トリプシン代替組み替え酵素はなくともよい。例えば、拡大培養装置７０は、ピペッティングマシンによるピペッティングにより、細胞塊を砕く。またあるいは、拡大培養装置７０は、フィルターが設けられたパイプや、図２又は図３に示した導入細胞送液路３１と同様に、内径を断続的に変化させるパイプに細胞塊を通して、細胞塊を砕いてもよい。その後、拡大培養装置７０は、細胞塊が入れられた溶液に、維持培養培地等の培地を加える。さらに、拡大培養装置７０は、接着培養である場合は、自動セルスクレーパー等で容器から細胞塊を剥がし、細胞塊を含む溶液を、拡大培養送液路７１を介して、第１の分割機構６０に送る。

[0266] なお、拡大培養装置７０における培養は、ウェルプレートではなく、CO_2透過性のバッグの中で行ってもよい。また、培養は接着培養であってもよいし、浮遊培養であってもよいし、ハンギングドロップ培養であってもよい。浮遊培養である場合は、攪拌培養を行ってもよい。また、培地が寒天状であってもよい。寒天状の培地としては、ゲランガム（ｇｅｌｌａｎ　ｇｕｍ）ポリマーが挙げられる。寒天状の培地を用いると、細胞が沈んだり、接着したりすることがないため、浮遊培養でありながら、攪拌する必要がない。

[0267] 拡大培養装置７０は、ウェルプレートやCO_2透過性のバッグに培養液を補給する第２の培地補給装置を備えていてもよい。第２の培地補給装置は、ウェルプレートやCO_2透過性のバッグ内の培養液を回収し、フィルターや透析膜を用いて培養液をろ過して、浄化された培養液を再利用してもよい。また、その際、再利用される培養液に成長因子等を添加してもよい。また、拡大培養装置７０は、培地の温度を管理する温度管理装置、及び培地近傍の湿度を管理する湿度管理装置等をさらに備えていてもよい。

[0268] 拡大培養装置７０においても、例えば、細胞を、図４に示すような透析膜

等の培養液透過性のバッグ３０１に入れ、培養液透過性のバッグ３０１を、培養液非透過性のCO_2透過性のバッグ３０２に入れて、バッグ３０１、３０２に培養液を入れてもよい。初期化培養装置５０は、新鮮な培養液が入ったバッグ３０２を複数用意しておき、所定の期間ごとに、細胞が入ったバッグ３０１を入れるバッグ３０２を、新鮮な培養液が入っているバッグ３０２に交換してもよい。

[0269] また、拡大培養装置７０における培養方法は、上記の方法に限定されず、初期化培養装置５０における培養方法と同様に、図５に示すような浮遊培養器を用いてもよい。拡大培養装置７０においては、図５に示す浮遊培養器の透析チューブ７５に、複数の細胞塊が入れられる。浮遊培養器の詳細は、上述したとおりである。また、拡大培養装置７０においても、図６に示すように、補給培地送液ポンプ７７を用いて、容器７６内の透析チューブ７５の周囲のゲル培地を、交換、あるいは補給する。あるいは、図７に示すように、補給培地送液ポンプ７７と、浮遊培養器の容器７６内の透析チューブ７５内と、を送液チューブ７８で接続して、透析チューブ７５内の培地に細胞の培養に必要な成分を補給してもよい。

[0270] 図１に示す幹細胞製造システムは、拡大培養装置７０における培養を撮影する拡大培養撮影装置をさらに備えていてもよい。ここで、拡大培養装置７０で使用される培地に無色の培地を用いると、有色の培地を用いた場合に生じうる乱反射や自家蛍光を抑制することが可能となる。ただし、培地のｐＨを確認するために、フェノールレッド等のｐＨ指示薬を含んでいてもよい。また、誘導された細胞と、誘導されなかった細胞とでは、細胞の形状及び大きさ等が異なるため、幹細胞製造システムは、拡大培養装置７０における細胞を撮影することにより、誘導された細胞の割合を算出する誘導状態監視装置を、さらに備えていてもよい。あるいは、誘導状態監視装置は、抗体免疫染色法又はＲＮＡ抽出法により、誘導された細胞の割合を特定してもよい。さらに、幹細胞製造システムは、磁気細胞分離方法やフローサイトメトリー等により、誘導されていない細胞を取り除く、未誘導細胞除去装置を備えて

いてもよい。

[0271] 拡大培養撮影装置は、図８に示した初期化培養撮影装置１７１と同様であり、テレセントリックレンズ１７２を介して拡大培養装置７０における培養を撮影してもよい。拡大培養撮影装置が撮影する際の照明の方法等も、初期化培養撮影装置１７１が撮影する際の照明の方法等と同様であり、上述したとおりである。

[0272] 拡大培養撮影装置も、図１１に示す画像処理部５０１を備えるＣＰＵ５００と接続されている。輪郭定義部５１１、細胞評価部５１２、統計処理部５１３、密度算出部５１４、及び培地評価部５１５を備える画像処理部５０１は、初期化培養撮影装置１７１が撮像した画像と同様に、拡大培養撮影装置が撮像した画像を画像処理する。画像処理部５０１の詳細は、上述したとおりである。

[0273] 例えば、拡大培養において、細胞塊が大きく成長しすぎると、培地中に含まれる栄養やホルモンが内部に行き届かず、細胞が分化してしまう場合がある。また、細胞塊が小さすぎる状態のまま継代すると、ＲＯＣＫ阻害剤を用いない場合、細胞死や核型異常が生じる場合がある。したがって、細胞評価部５１２は、個々の細胞塊の大きさが適切な範囲外になった場合、警告を発してもよい。また、細胞評価部５１２は、個々の細胞塊の大きさが所定の閾値以上になった場合、継代するタイミングであることを出力してもよい。この場合、細胞塊を粉砕して個々の細胞塊を小さくし、再度培養器中で培養を再開する継代をしてもよい。さらに、継代において細胞塊を破砕した後に個々の細胞塊の大きさを算出することにより、破砕が適切になされたか否かを判断することも可能である。またさらに、算出された細胞塊の大きさに応じて、拡大培養装置７０における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の大きさが大きくなるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0274] また、統計処理部５１３で算出された細胞塊の数に応じて、拡大培養装置７０における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の数が増

えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0275] 密度算出部５１４は、細胞塊の密度が所定の閾値以上になった場合、継代するタイミングであることを出力してもよい。細胞塊の密度が好適な範囲より高くなった場合は、例えば継代することにより、細胞塊の密度を好適な範囲内に調整することが可能である。さらに、継代において細胞塊を破砕した後に細胞塊の密度を算出することにより、破砕が適切になされたか否かを判断することも可能である。さらに、算出された細胞塊の密度に応じて、拡大培養装置７０における培地の供給速度を変化させてもよい。例えば、細胞塊の密度が増えるにつれて、培地の供給速度を上昇させてもよい。

[0276] 培地評価部５１５が培地の色相又は培地のｐＨが所定の範囲以外であると判断した場合、拡大培養装置７０においても、例えば図６に示す補給培地送液ポンプ７７によって、浮遊培養器の透析チューブ７５の周囲の培地が交換される。あるいは、培地の交換が常にされている場合は、補給培地送液ポンプ７７による浮遊培養器の透析チューブ７５の周囲の培地の交換速度が上昇され、交換される培地の流量が上昇する。これにより、培地のｐＨを細胞培養に適した範囲に維持し、培地に十分な栄養分を補給することが可能である。

[0277] 図１に示す第１の分割機構６０で分割された細胞塊は、再び拡大培養装置７０内で培養される。必要な細胞の量が得られるまで、第１の分割機構６０における細胞塊の分割と、拡大培養装置７０内での細胞塊の培養が繰り返される。

[0278] 拡大培養装置７０中の細胞塊を含む溶液を、拡大培養送液路７１を介して、第１の分割機構６０に送り出すポンプは、例えば、図１１に示した細胞評価部５１２が算出した細胞塊の大きさの値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。あるいは、細胞塊を含む溶液を図１に示す第１細胞塊送液路５１に送り出すポンプは、例えば、図１１に示した密度算出部５１４が算出した細胞塊の密度の値が、所定の閾値以上になった場合に、駆動されてもよい。

[0279] 拡大培養装置７０には、第２細胞塊送液路７２が接続されている。拡大培養装置７０は、拡大培養され、容器から剥離された細胞塊の含有液を、ポンプ等を用いて、第２細胞塊送液路７２に送り出す。ただし、浮遊培養の場合は、剥離は不要である。第２細胞塊送液路７２は、所定の大きさ未満の誘導された細胞のみを通す内径を有し、所定の大きさ以上の誘導されていない細胞を除去する分岐流路に接続されていてもよい。

[0280] 第２細胞塊送液路７２の内壁には、細胞が接着しないよう、ｐｏｌｙ－ＨＥＭＡをコーティングして、細胞非接着性にしてもよい。あるいは、第２細胞塊送液路７２の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、第２細胞塊送液路７２の材料に、温度伝導率が良く、CO_2透過性の材料を用いることにより、第２細胞塊送液路７２内の条件が、筐体２００内の管理された温度及びCO_2濃度と同等になる。さらに、第２細胞塊送液路７２には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0281] 第２細胞塊送液路７２は、第２の分割機構８０に接続されている。第２の分割機構８０は、例えば、メッシュを備える。溶液に含まれる細胞塊は、水圧によってメッシュを通過する際、メッシュの各孔の大きさの複数の細胞塊に分割される。例えば、メッシュの各孔の大きさが均一であれば、分割後の複数の細胞塊の大きさも、ほぼ均一となる。あるいは、第２の分割機構８０は、ノズルを備えていてもよい。例えば、略円錐状のノズルの内部を階段状に微細加工することにより、溶液に含まれる細胞塊がノズルを通過する際に、複数の細胞塊に分割される。

[0282] あるいは、第２の分割機構８０は、第１の分割機構６０と同様に、図２４から図２７に示す末端ブロック６１、連結ブロック６２、及び先端ブロック６３を備える細胞塊分割器、あるいは図２８から図３１に示す一体型の細胞分割器を備えていてもよい。細胞塊分割器の詳細は、上述したとおりである。

[0283] 図１に示す第２の分割機構８０に、複数の細胞魂をパッケージ装置１００に順次送る細胞魂搬送機構９０が接続されている。細胞魂搬送機構９０と、

パッケージ装置１００と、の間には、パッケージ前細胞流路９１が接続されている。細胞魂搬送機構９０は、ポンプ等を用いて、第２の分割機構８０で分割された細胞塊のそれぞれを、パッケージ前細胞流路９１を介して、パッケージ装置１００に順次送る。

[0284] パッケージ前細胞流路９１には、細胞が接着しないよう、ｐｏｌｙ－ＨＥＭＡをコーティングしてもよい。あるいは、パッケージ前細胞流路９１の材料に、細胞が接着しにくい材料を用いてもよい。また、パッケージ前細胞流路９１の材料に、温度伝導率が良く、CO_2透過性の材料を用いることにより、パッケージ前細胞流路９１内の条件が、筐体２００内の管理された温度及びCO_2濃度と同等になる。パッケージ前細胞流路９１には、コンタミネーション防止の観点から、逆流防止弁が設けられていてもよい。

[0285] パッケージ前細胞流路９１には、凍結保存液送液機構１１０が接続されている。凍結保存液送液機構１１０は、細胞凍結保存液をパッケージ前細胞流路９１に送り込む。これにより、パッケージ前細胞流路９１内で、細胞塊が細胞凍結保存液で懸濁される。

[0286] パッケージ装置１００は、パッケージ前細胞流路９１を介して送られてきた複数の細胞塊のそれぞれを順次凍結する。例えば、パッケージ装置１００は、細胞塊を受け取るたびに細胞塊をクライオチューブ等の凍結保存容器に入れ、細胞塊溶液を例えば－８０℃以下で瞬間的に凍結する。体積あたりの表面積が小さい凍結保存容器を用いると、凍結に時間がかかる傾向にあるため、体積あたりの表面積が大きい凍結保存容器を用いることが好ましい。体積あたりの表面積が大きい凍結保存容器を用いることにより、解凍後の細胞の生存率を高くすることが可能となる。凍結保存容器の形状としては、キャピラリー状及び球状が挙げられるが、これらに限定されない。また、必要とされる解凍後の細胞の生存率によっては、必ずしも瞬間凍結をしなくともよい。

[0287] 凍結には、例えば、ガラス化（Ｖｉｔｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）法を用いる。この場合、細胞凍結保存液としては、ＤＡＰ２１３（コスモバイオ株式会

社）及びＦｒｅｅｚｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍ（リプロセル株式会社）が使用可能である。凍結は、ガラス化法以外の通常の方法で行ってもよい。この場合、細胞凍結保存液としては、ＣｒｙｏＤｅｆｅｎｄ－Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ（Ｒ＆Ｄシステム社）や、ＳＴＥＭ－ＣＥＬＬＢＡＮＫＥＲ（登録商標、日本全薬工業株式会社）等が使用可能である。凍結は、液体窒素によって行ってもよいし、ペルチェ素子によっておこなってもよい。ペルチェ素子を用いると、温度変化を制御したり、温度のムラを抑制したりすることが可能となる。パッケージ装置１００は、凍結保存容器を、筐体２００の外に搬出する。凍結細胞が臨床用途である場合は、凍結保存容器は完全閉鎖系であることが好ましい。ただし、パッケージ装置１００は、幹細胞を凍結することなく、保存容器内にパッケージしてもよい。

[0288] あるいは、パッケージ装置１００においては、図３３に示すような溶液置換器１０１を用いて、細胞塊の溶液を培地から凍結保存液に置換してもよい。溶液置換器１０１の内部には、底面上に、細胞塊が透過しない細孔が設けられたフィルター１０２が設けられている。また、溶液置換器１０１には、内部のフィルター１０２上に細胞塊を含む培地を送液する第１の送液流路１０３が接続された細胞塊導入孔、内部のフィルター１０２上に細胞塊を含まない凍結液を送液する第２の送液流路１０４が接続された置換溶液導入孔、内部のフィルター１０２上から細胞塊を含む凍結液を排出する第１の排出流路１０５が接続された細胞塊流出孔が設けられている。さらに、溶液置換器１０１には、フィルター１０２を透過した溶液を排出する第２の排出流路１０６が接続された廃液流出孔が設けられている。第１の送液流路１０３、第２の送液流路１０４、第１の排出流路１０５、及び第２の排出流路１０６のそれぞれには、チューブ等が使用可能である。

[0289] まず、図３３（ａ）及び図３３（ｂ）に示すように、第２の排出流路１０６における溶液の流動を停止させた状態で、第１の送液流路１０３から溶液置換器１０１内部に、細胞塊を含む培地を入れる。次に、図３３（ｃ）に示すように、第２の排出流路１０６における溶液の流動を許容する状態にし、

培地を溶液置換器１０１から排出する。この際、図３３（ｄ）に示すように、細胞塊は、フィルター１０２上に残る。さらに、図３３（ｅ）及び図３３（ｆ）に示すように、第２の排出流路１０６における溶液の流動を停止させた状態で、第２の送液流路１０４から溶液置換器１０１内部に、凍結保存液を入れ、凍結保存液中に細胞塊を分散させる。その後、図３３（ｇ）に示すように、第１の排出流路１０５から、細胞塊を含む凍結保存液を排出する。細胞塊を含む凍結保存液は、第１の排出流路１０５を経由して、凍結保存容器等に送られる。

[0290] なお、図３３に示す溶液置換器１０１は、培地から凍結保存液への置換だけでなく、古い培地から新しい培地への置換にも使用可能である。この場合、第２の送液流路１０４は、新しい培地を送液する。あるいは、溶液置換器１０１は、細胞塊を分割する際に、培地を、細胞塊分割酵素を含む溶液に置換するためにも使用することができる。細胞塊分割酵素の例としては、例えば、トリプシンや、ＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ（登録商標、ライフテクノロジーズ社）等のトリプシン代替組み替え酵素が挙げられる。この場合、第２の送液流路１０４は、細胞塊分割酵素を含む溶液を送液する。

[0291] 図１に示す幹細胞製造システムは、パッケージ装置１００におけるパッケージ工程を撮影するパッケージ工程撮影装置をさらに備えていてもよい。

[0292] 幹細胞製造システムは、筐体２００内を滅菌する滅菌装置をさらに備えていてもよい。滅菌装置は、乾熱滅菌装置であってもよい。この場合、分離装置１０、導入前細胞送液路２０、誘導因子送液機構２１、因子導入装置３０、細胞塊作製装置４０、及びパッケージ装置１００等の電気を使用する装置の配線は、耐熱性を有する配線であることが好ましい。あるいは、滅菌装置は、オゾンガス、過酸化水素ガス、又はホルマリンガス等の滅菌ガスを筐体２００内に放出して、筐体２００内を滅菌してもよい。

[0293] 幹細胞製造システムは、分離装置１０、導入前細胞送液路２０、誘導因子送液機構２１、因子導入装置３０、細胞塊作製装置４０、及びパッケージ装置１００等の動作記録、並びに撮影装置が撮影した画像を、有線又は無線に

より、外部のサーバーに送信してもよい。また、外部のサーバーにおいて、ニューラルネットワークにより、例えば、誘導因子導入条件、培養条件、及び凍結条件等の条件と、幹細胞の不完全な初期化、幹細胞の分化及び増殖の失敗、及び染色体異常等の結果と、の関連を分析し、結果を導く条件を抽出したり、結果を予測したりしてもよい。さらに、外部サーバーは、標準作業手順（ＳＯＰ）に基づいて、幹細胞製造システムの分離装置１０、誘導因子送液機構２１、因子導入装置３０、細胞塊作製装置４０、及びパッケージ装置１００等を制御し、ＳＯＰに基づいて各装置が稼働しているか否かを監視し、各装置の稼働記録を自動的に生成してもよい。

[0294] 以上説明した幹細胞製造システムによれば、全自動で、ｉＰＳ細胞等の幹細胞の誘導、樹立、拡大培養、及び凍結保存を一括して行うことが可能となる。

[0295] なお、実施の形態に係る幹細胞製造システムは、図１に示す構成に限定されない。例えば、図３４に示す実施の形態に係る幹細胞製造システムにおいては、血液保存部２０１から単核球分離部２０３に、血液送液路２０２を経由して血液が送液される。血液保存部２０１及び単核球分離部２０３としては、例えばチューブが使用可能である。血液送液路２０２は、例えば、樹脂チューブやシリコンチューブ等である。後述する他の送液路も同様である。血液保存部２０１には、バーコード等の識別子を付けて、血液の情報を管理してもよい。送液には、ポンプ２０４が使用される。ポンプ２０４としては、容積式ポンプが使用可能である。容積式ポンプの例としては、ピストンポンプ、プランジャーポンプ、及びダイヤフラムポンプを含む往復ポンプ、あるいは、ギアポンプ、ベーンポンプ、及びネジポンプを含む回転ポンプが挙げられる。ダイヤフラムポンプの例としては、チュービングポンプ及び圧電（ピエゾ）ポンプが挙げられる。チュービングポンプの例としては、ペリスタポンプ（登録商標、アトー株式会社）、並びにＲＰ－Ｑ１及びＲＰ－ＴＸ（高砂電気工業株式会社）が挙げられる。圧電ポンプの例としては、ＳＤＭＰ３０４、ＳＤＰ３０６、ＳＤＭ３２０、及びＡＰＰ－２０ＫＧ（高砂電気

工業株式会社）が挙げられる。また、様々な種類のポンプを組み合わせたマイクロ流体チップモジュール（高砂電気工業株式会社）を用いてもよい。ペリスタポンプ（登録商標）、チュービングポンプ、及びダイヤフラムポンプ等の密閉型ポンプを用いると、血液送液路２０２内部の血液にポンプが直接接触することなく、送液することが可能である。後述する他のポンプにおいても同様である。あるいは、ポンプ２０４、並びに後述するポンプ２０７、ポンプ２１６、ポンプ２２２、ポンプ２２５、ポンプ２３４、ポンプ２４２、及びポンプ２５２としては、シリンジポンプを使用してもよい。密閉型ポンプ以外のポンプであっても、加熱滅菌処理等により再利用が可能である。

[0296] 単核球分離部２０３には、分離剤保存部２０５から、送液路２０６及びポンプ２０７を介して、赤血球凝固剤が送られる。分離剤保存部２０５としては、例えばチューブが使用可能である。分離剤保存部２０５には、バーコード等の識別子を付けて、分離剤の情報を管理してもよい。赤血球凝固剤としては、例えば、ＨｅｔａＳｅｐ（登録商標、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）や赤血球凝固剤（ニプロ）等が使用可能である。単核球分離部２０３内において、赤血球凝固剤によって赤血球が沈降し、単核球が分離される。単核球分離部２０３内の単核球を含む上澄みは、単核球送液路２０８及びポンプ２０９を介して、単核球精製フィルター２１０に送られる。単核球精製フィルター２１０において、単核球以外の成分が除去され、単核球を含む溶液が得られる。単核球精製フィルター２１０としては、Ｐｕｒｅｃｅｌｌ（登録商標、ＰＡＬＬ）、セルソーバＥ（旭化成株式会社）、セパセルＰＬ（旭化成株式会社）、アダカラム（登録商標、ＪＩＭＲＯ）、及び分離バック（ニプロ株式会社）等が使用可能である。

[0297] 図３４においては、単核球分離部２０３、分離剤保存部２０５、単核球精製フィルター２１０、及びポンプ２０４、２０７、２０９等が、分離装置を構成している。

[0298] 単核球を含む溶液は、導入前細胞送液路２１１及びポンプ２１２を介して、因子導入部２１３に送られる。因子導入部２１３としては、例えばチュー

ブが使用可能である。因子導入部２１３には、多能性誘導因子を含む因子保存部２１４から、因子送液路２１５及びポンプ２１６を介して、多能性誘導因子が送られる。因子保存部２１４としては、例えばチューブが使用可能である。因子保存部２１４には、バーコード等の識別子を付けて、多能性誘導因子の情報を管理してもよい。因子保存部２１４及びポンプ２１６等が、誘導因子送液機構を構成している。因子導入装置としての因子導入部２１３において、多能性誘導因子が、例えばＲＮＡリポフェクション法によって細胞に導入され、誘導因子導入細胞が作製される。ただし、誘導因子のトランスフェクションの方法は、ＲＮＡリポフェクション法に限定されない。例えば、多能性誘導因子を含むセンダイウイルスベクターを用いてもよい。あるいは、多能性誘導因子がタンパク質であってもよい。

[0299] 誘導因子導入細胞は、導入細胞送液路２１７及びポンプ２１８を介して、細胞塊作製装置の一部としての初期化培養器２１９に送られる。導入細胞送液路２１７は、例えば、温度透過性かつCO_2透過性である。初期化培養器２１９としては、図５に示す浮遊培養器を用いてもよい。この場合、誘導因子導入細胞は、透析チューブ内に入れられる。図３４に示す初期化培養器２１９には、細胞に多能性誘導因子が導入されてから最初の数日間、血液細胞培地を含む血液細胞培地保存部２２０から、培地送液路２２１及びポンプ２２２を介して、血液細胞培地が補給される。培地送液路２２１は、例えば、温度透過性かつCO_2透過性である。血液細胞培地保存部２２０には、バーコード等の識別子を付けて、血液細胞培地の情報を管理してもよい。血液細胞培地保存部２２０、培地送液路２２１、及びポンプ２２２は、培地補給装置を構成している。ポンプ２２２は、図１１に示したＣＰＵ５００の指示に従って、血液細胞培地を連続的に補給してもよいし、血液細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0300] その後、図３４に示す初期化培養器２１９には、幹細胞培地を含む幹細胞培地保存部２２３から、培地送液路２２４及びポンプ２２５を介して、幹細胞培地が補給される。幹細胞培地保存部２２３には、バーコード等の識別子

を付けて、幹細胞培地の情報を管理してもよい。培地送液路２２４は、例えば、温度透過性かつCO_2透過性である。幹細胞培地保存部２２３、培地送液路２２４、及びポンプ２２５は、培地補給装置を構成している。ポンプ２２５は、図１１に示したＣＰＵ５００の指示に従って、幹細胞培地を連続的に補給してもよいし、幹細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0301] 血液細胞培地保存部２２０及び幹細胞培地保存部２２３は、例えば、冷蔵保存部２５９で４℃等の低温で冷蔵保存されていてもよい。血液細胞培地保存部２２０及び幹細胞培地保存部２２３から送られる培地は、例えば、冷蔵保存部２５９の外の加熱器で３７℃に昇温されてから培養器に送れてもよい。あるいは、低温保存されていた培地は、送液路を進む間に３７℃に昇温するよう、送液路の周囲の温度を設定してもよい。初期化培養器２１９内の古くなった培地は、廃液送液路２２６及びポンプ２２７を介して、廃液保管部２２８に送られる。廃液保管部２２８には、バーコード等の識別子を付けて、廃液の情報を管理してもよい。

[0302] 初期化培養器２１９で培養された細胞塊は、導入細胞送液路２２９、ポンプ２３０、及び細胞塊分割器２３１を介して、細胞塊作製装置の一部としての第１の拡大培養器２３２へ送られる。細胞塊分割器２３１は、例えば、図３０又は図３１に示す構成を備えていてもよい。細胞塊分割器２３１を通過することにより、細胞塊は、より小さな細胞塊に分割される。図３４に示す第１の拡大培養器２３２としては、図５に示す浮遊培養器を用いてもよい。この場合、細胞塊は、透析チューブ内に入れられる。図３４に示す第１の拡大培養器２３２には、幹細胞培地を含む幹細胞培地保存部２２３から、培地送液路２３３及びポンプ２３４を介して、幹細胞培地が補給される。導入細胞送液路２２９及び培地送液路２３３は、例えば、温度透過性かつCO_2透過性である。幹細胞培地保存部２２３、培地送液路２３３、及びポンプ２３４は、培地補給装置を構成している。ポンプ２３４は、図１１に示したＣＰＵ５００の指示に従って、幹細胞培地を連続的に補給してもよいし、幹細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0303] 図３４に示す第１の拡大培養器２３２内の古くなった培地は、廃液送液路２３５及びポンプ２３６を介して、廃液保管部２２８に送られる。

[0304] 第１の拡大培養器２３２で培養された細胞塊は、導入細胞送液路２３７、ポンプ２３８、細胞塊分割器２３９を経て、細胞塊作製装置の一部としての第２の拡大培養器２４０へ送られる。細胞塊分割器２３９は、例えば、図３０又は図３１に示す構成を備えていてもよい。細胞塊分割器２３９を通過することにより、細胞塊は、より小さな細胞塊に分割される。図３４に示す第２の拡大培養器２４０としては、図５に示す浮遊培養器を用いてもよい。この場合、細胞塊は、透析チューブ内に入れられる。図３４に示す第２の拡大培養器２４０には、幹細胞培地を含む幹細胞培地保存部２２３から、培地送液路２４１及びポンプ２４２を介して、幹細胞培地が補給される。導入細胞送液路２３７及び培地送液路２４１は、例えば、温度透過性かつCO_2透過性である。幹細胞培地保存部２２３、培地送液路２４１、及びポンプ２４２は、培地補給装置を構成している。ポンプ２４２は、図１１に示したＣＰＵ５００の指示に従って、幹細胞培地を連続的に補給してもよいし、幹細胞培地を所定のタイミングで補給してもよい。

[0305] 図３４に示す第２の拡大培養器２４０内の古くなった培地は、廃液送液路２４３及びポンプ２４４を介して、廃液保管部２２８に送られる。

[0306] 第２の拡大培養器２４０で培養された細胞塊は、導入細胞送液路２４５及びポンプ２４６を経て、溶液置換器２４７へ送られる。溶液置換器２４７は、例えば図３３に示す構成を備えていてもよい。図３４に示す溶液置換器２４７内において、細胞塊はフィルターで保持され、培地は、廃液送液路２４８及びポンプ２４９を介して、廃液保管部２２８に送られる。

[0307] ポンプ２４９の駆動停止により廃液送液路２４８内の溶液の流動を停止した後、あるいは弁等で廃液送液路２４８を閉じた後、溶液置換器２４７には、凍結保存液を含む凍結保存液保存部２５０から、送液路２５１及びポンプ２５２を介して、凍結保存液が入れられる。これにより、凍結保存液中に細胞塊が分散する。

[0308] 細胞塊を分散させた凍結保存液は、パッケージ装置の一部としての送液路２５３及びポンプ２５４を介して、凍結保存容器２５５内に送られる。凍結保存容器２５５は、低温保管庫２５６に入れられている。低温保管庫２５６には、液体窒素保管庫２５７から送液路２５８を介して、例えば－８０℃の液体窒素が送られる。これにより、凍結保存容器２５５内の細胞塊が凍結させられる。ただし、細胞塊の凍結は、液体窒素に依らなくともよい。例えば、低温保管庫２５６が、圧縮式冷凍庫、吸収式冷凍庫、あるいはペルチェ式冷凍庫等の冷凍庫であってもよい。

[0309] 上述した送液路には、適宜、逆流防止弁を設けてもよい。上述した送液路、単核球分離部２０３、単核球精製フィルター２１０、因子導入部２１３、初期化培養器２１９、第１の拡大培養器２３２、第２の拡大培養器２４０、及び溶液置換器２４７等は、樹脂等からなる例えばカセット状のケース２５９に格納されている。ケース２５９は、例えば、滅菌処理可能な耐熱性材料からなる。ケース２５９内は、例えば、３７℃、CO_2濃度５％のように、細胞培養に適した環境にされる。培地が流れる送液路は、例えば、CO_2透過性材料からなる。ただし、ケース２５９はカセット状に限られない。例えば、可撓性のバックであってもよい。また、上述した送液路、単核球分離部２０３、単核球精製フィルター２１０、因子導入部２１３、初期化培養器２１９、第１の拡大培養器２３２、第２の拡大培養器２４０、及び溶液置換器２４７等は、複数のケースに分割されて格納されてもよい。

[0310] ケース２５９は、筐体２００内に配置される。ポンプ、血液保存部２０１、分離剤保存部２０５、因子保存部２１４、血液細胞培地保存部２２０、幹細胞培地保存部２２３、廃液保管部２２８、凍結保存容器２５５、低温保管庫２５６、及び液体窒素保管庫２５７は、筐体２００の内部かつケース２５９の外部に配置される。

[0311] ケース２５９と、筐体２００は、例えば、互いに勘合する勘合部を備える。そのため、ケース２５９は、筐体２００内の所定の位置に配置される。また、筐体２００内において、ポンプ、血液保存部２０１、分離剤保存部２０

５、因子保存部２１４、血液細胞培地保存部２２０、幹細胞培地保存部２２３、廃液保管部２２８、凍結保存容器２５５、低温保管庫２５６、及び液体窒素保管庫２５７は、所定の位置に配置される。ケース２５９が筐体２００内の所定の位置に配置されると、ケース２５９内の送液路は、ポンプ、血液保存部２０１、分離剤保存部２０５、因子保存部２１４、血液細胞培地保存部２２０、幹細胞培地保存部２２３、廃液保管部２２８、凍結保存容器２５５、低温保管庫２５６、及び液体窒素保管庫２５７と接する。

[0312] 例えば、ケース２５９及びその内包物は使い捨て可能であり、細胞塊の凍結が完了した後は、廃棄して、新しいものと交換してもよい。あるいは、ケース２５９及びその内包物を再利用する場合は、ケース２５９にバーコード等の識別子を付け、使用回数等を管理してもよい。

[0313] 以上説明した実施の形態に係る幹細胞製造システムによれば、人を介さずに、血液から自動的にｉＰＳ細胞等の幹細胞の冷凍保存物を製造することが可能である。

[0314] （その他の実施の形態）

上記のように、本発明を実施の形態によって記載したが、この開示の一部をなす記述及び図面はこの発明を限定するものであると理解するべきではない。この開示から当業者には様々な代替実施の形態、実施の形態及び運用技術が明らかになるはずである。例えば、因子導入装置３０は、エレクトロポレーションやＲＮＡリポフェクションではなく、レトロウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルス等のウイルスベクターや、プラスミドを用いるトランスフェクション、あるいはタンパク質トランスフェクションにより、細胞を誘導してもよい。また、導入前細胞送液路２０、導入細胞送液路３１、細胞塊送液路５１、拡大培養送液路７１、細胞塊送液路７２、及びパッケージ前細胞流路９１はマイクロフルイディクス技術により基板上に設けられていてもよい。この様に、本発明はここでは記載していない様々な実施の形態等を包含するということを理解すべきである。

[0315] （実施例１）

（準備）

ヒト血液細胞は健康な成人男性から入手した。また、修飾化ｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ社）、非接着ディッシュ、１５ｍＬチューブ、５０ｍＬチューブ、フィコール、サイトフローメータ（ＢＤ）、ＣＤ３４に対する抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）、ＣＤ３に対する抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）、ＭＡＣＳ（登録商標）バッファ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）、Ｔ細胞培地、低血清培地（Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）、Ｇｉｂｃｏ）、ｓｉＲＮＡ導入試薬（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＲＮＡｉＭＡＸ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒＳｃｉｅｎｃｅ）、及びＴＲＡ－１－６０に対する抗体（ＢＤ）を用意した。

[0316] Ｔ細胞（ＣＤ３陽性細胞）培地は、以下Ａ培地とＢ培地の混合液であった。Ａ培地は、１５ｍＬのＸ　ｖｉｖｏ－１０（Ｌｏｎｚａ社、０４－７４３Ｑ）及びＩＬ－２（１０μｇ／ｍＬ）の混合液であった。Ｂ培地は１．５ｍＬチューブにＸ　ｖｉｖｏ－１０及びＤｙｎａｂｅａｄｓＣＤ３／ＣＤ２８（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社，　１１１－３１Ｄ）５０μＬを混合し、５秒間ボルテックス後、スピンダウンし、ＤｙｎａＭａｇ－２（Ｔｈｅｒｍｏ　ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）に静置し、一分静置後、上清を取り除いたものであった。

[0317] また、１０ｍＬの無血清培地（ＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｈ３０００、ＳＴＥＭＣＥＬＬＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に、１０μＬのＩＬ－６（１００μｇ／ｍＬ）、１０μＬのＳＣＦ（３００μｇ／ｍＬ）、１０μＬのＴＰＯ（３００μｇ／ｍＬ）、１０μＬのＦｌｔ３リガンド（３００μｇ／ｍＬ）、及び１０μＬのＩＬ－３（１０μｇ／ｍＬ）を加えて血球培地（血液幹・前駆細胞培地）を調製した。

[0318] また、それぞれ濃度が１００ｎｇ／μＬのＯＣＴ３／４のｍＲＮＡ含有液、ＳＯＸ２のｍＲＮＡ含有液、ＫＬＦ４のｍＲＮＡ含有液、ｃ－ＭＹＣのｍＲＮＡ含有液、ＬＩＮ２８ＡのｍＲＮＡ含有液、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）のｍＲＮＡ含有液を用意した。次に、３８５μＬのＯＣＴ３／４の

ｍＲＮＡ含有液、１１９μＬのＳＯＸ２のｍＲＮＡ含有液、１５６μＬのＫＬＦ４のｍＲＮＡ含有液、１４８μＬのｃ－ＭＹＣのｍＲＮＡ含有液、８３μＬのＬＩＮ２８ＡのｍＲＮＡ含有液、及び１１０μＬのＧＦＰのｍＲＮＡ含有液を混合し、初期化因子混合液を得た。得られた初期化因子混合液を５０μＬずつ容量１．５ｍＬのＲＮａｓｅ－Ｆｒｅｅのチューブ（エッペンドルフチューブ（登録商標）、エッペンドルフ）に分注し、－８０℃の冷凍庫に保存した。

[0319] （単核球の調製）

遠心機を１８℃に設定した。５ｍＬから５０ｍＬの血液を採血し、血液にＥＤＴＡを加えて優しく混ぜた。また、ヒトリンパ球分離用の媒体（Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＲＥＭＩＵＭ、ＧＥヘルスケア・ジャパン）を５ｍＬずつ２本の１５ｍＬチューブに分注した。５ｍＬのＰＢＳを血液に加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に５ｍＬずつ重層した。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブの管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上に加えた。

[0320] チューブ中の溶液を、４００×ｇ、１８℃で３０分間遠心した。この際、加速、減速ともゆっくり行った。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れた。この白く濁った中間層は、単核球を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい１５ｍＬチューブに移した。この際、下層は吸い取らないようにした。白く濁った中間層は、１本のチューブより１ｍＬ程度回収できた。２本分の中間層をまとめて１本のチューブに移した。

[0321] 回収した単核球に対し、１２ｍＬのＰＢＳを加えて、溶液をさらに２００×ｇ、１８℃で１０分間遠心した。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、３ｍＬの既知組成無血清造血細胞培地（Ｘ－ＶＩＶＯ（登録商標）１０、ロンザ）を加えて懸濁し、単核球懸濁液を得た。そのうち１０μＬの単核球懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントした。

[0322] （ＣＤ３４又はＣＤ３陽性細胞の分離）

１×１０^{7}個の単核球と、ＣＤ３４抗体又はＣＤ３抗体と、を、４℃の溶液１００μＬ中で１５分反応させた。反応後、溶液に５ｍＬのＭＡＣＳ（登録商標）バッファ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を加え、２７０ｇで遠心した。遠心後、上清を除去し、１ｍＬのＭＡＣＳバッファを添加した。その後、自動磁気細胞分離装置（ａｕｔｏＭＡＣＳ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）の分離プログラムを利用して、単核球のうち、ＣＤ３４陽性細胞又はＣＤ３陽性細胞を分離した。

[0323] （分離した細胞の培養）

分離した５×１０^{6}個の単核球を１ｍＬのＴ細胞培地、又は血液幹・前駆細胞培地に懸濁し、１２ウェルプレートに播種し、培養した。培養条件は、CO_2濃度が５％、酸素濃度が１９％、及び温度が３７℃であった。

[0324] （初期化因子のリポフェクション）

１００μＬの低血清培地（Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）、Ｇｉｂｃｏ）と２５μＬの初期化因子混合液を混合し、第１の混合液とした。また、１１２．５μＬの低血清培地（Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）、Ｇｉｂｃｏ）と１２．５μＬのｓｉＲＮＡ導入試薬（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＲＮＡｉＭＡＸ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒＳｃｉｅｎｃｅ）を混合し、第２の混合液とした。その後、第１の混合液と、第２の混合液と、を混合し、１５分室温で静置してリポフェクション反応液とした。

[0325] 得られたリポフェクション反応液のうち６０μＬを、単核球を培養している１２ウェルプレートに穏やかに添加し、引き続き、３７℃で１８時間、単核球をフィーダーフリーで培養した。培養条件は、CO_2濃度が５％、酸素濃度が１９％、及び温度が３７℃であった。リポフェクション反応液を添加した時の単核球の密度は３×１０^{6}であった。１８時間後、単核球を１５ｍＬチューブに回収し、３００ｇで遠心し、上清を除去した。その後、１．２５ｍＬのＣＤ３４用血球培地を１５ｍＬチューブに添加して、単核球懸濁液を同じ１２ウェルプレートに戻し、一晩３７度で単核球をフィーダーフリーで培

養した。培養条件は、CO_2濃度が５％、及び酸素濃度が１９％であった。上記工程を２日に１回、７日間繰り返した。

[0326] （ＧＦＰの発現の確認）

リポフェクションを開始してから７日目に、リポフェクションを合計４回した細胞の密度は、3×10^6であった。細胞の一部を１２ウェルプレートから取り出し、蛍光顕微鏡でＧＦＰの発現を確認したところ、図３５に示すように、ＧＦＰの発現が確認された。これにより、単核球にｍＲＮＡがトランスフェクションし、トランスフェクトされたｍＲＮＡからタンパク質が合成されていることが確認された。

[0327] （ＴＲＡ－１－６０の発現の確認）

リポフェクションを開始してから７日目に、細胞の一部を１２ウェルプレートから取り出し、取り出した細胞を、初期化され始めたｉＰＳ細胞で特異的に発現する表面抗原であるＴＲＡ－１－６０に対する抗体であって、ＡＬｏｐｈｙｃｏｃｙａｎｉｎ（ＡＰＣ）蛍光色素で標識された抗体で染色した。その後、蛍光活性化セルソータ（ＦＡＣＳ（登録商標）、ＢＤ）で、ＴＲＡ－１－６０陽性細胞の割合を確認することによって、細胞においてリプログラミングが開始され、ｉＰＳ細胞遺伝子が発現し、ｉＰＳ細胞ができてくる事を確認した。

[0328] 図３６に示すように、自家蛍光の強度をｘ軸に、蛍光標識抗ＴＲＡ－１－６０抗体の蛍光強度をｙ軸にとったドットプロットを作成した。遺伝子を導入しなかったネガティブコントロールでは、ＴＲＡ－１－６０陽性細胞は検出されなかった。これに対し、実験１，２及び３において、ＴＲＡ－１－６０陽性細胞が検出された。なお、実験１では、マーカーによる分離をしていない単核球全体から誘導した結果であり、実験２は、ＣＤ３陽性で分離した細胞から誘導した結果であり、実験３は、ＣＤ３４陽性で分離した細胞から誘導した結果である。したがって、初期化因子ＲＮＡのリポフェクションを用いて、血液由来の細胞に初期化因子を導入し、ｉＰＳ細胞を誘導できることが示された。

[0329] （実施例２）

５００ｍＬのＰｒｉｍａｔｅ ＥＳ Ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ(ＲｅｐｒｏＣＥＬＬ)、及び０．２ｍＬの濃度が１０μｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＧｉｂｃｏＰＨＧ０２６６）を混合し、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を調製した。

[0330] また、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地に脱アシル化ジェランガム（日産化学）を濃度が０．０２重量％となるよう添加し、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を調製した。さらに、５ｍＬの濃度が２．５重量％のトリプシン、５ｍＬの濃度が１ｍｇ／ｍＬのコラゲネースＩＶ、０．５ｍＬの濃度が０．１ｍｏｌ／ＬのＣａＣｌ２、１０ｍＬのＫｎｏｃｋＯｕｔ血清代替（登録商標、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ １０８２８－０２８）、及び３０ｍＬの精製水を混合して、一般にＣＴＫ溶液と呼ばれる剥離液を調製した。

[0331] フィーダー細胞上でｉＰＳ細胞を培養している６ウェルディッシュ（Ｔｈｅｒｍｏｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ １２－５５６－００４）にＣＴＫ溶液を３００μＬ添加し、CO_2インキュベーター中で３分インキュベートした。３分後、インキュベーターからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみが剥がれていることを確認し、アスピレータを用いてＣＴＫ溶液を取り除いた。ＣＴＫ溶液を取り除いた後、６ウェルディッシュにＰＢＳ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈ ｓｃ－３６２１８３）を５００μＬ添加し、ｉＰＳ細胞を洗浄後、６ウェルディッシュからＰＢＳを取り除き、０．３ｍＬの剥離液（Ａｃｃｕｔａｓｅ、登録商標）を６ウェルディッシュに添加し、CO_2インキュベーターに入れ、５分間インキュベートした。その後、０．７ｍＬのｂＦＧＦ含有ｉＰＳ培地を６ウェルディッシュに添加し、ｉＰＳ細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

[0332] ｉＰＳ細胞を懸濁後、４ｍＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を１５ｍＬの遠心チューブに添加し、遠心機を用いてｉＰＳ細胞懸濁液を２７０ｇで遠心した。遠心後、上清を取り除き、１ｍＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を１５ｍＬの遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、５×10^5個ずつｉＰＳ細胞を１５ｍＬファルコンチューブ（登録

商標、Ｃｏｒｎｉｎｇ　３５２０９６）又は非接着ディッシュに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

[0333] １５ｍＬチューブにおいては、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を２ｍＬ用いた。非接着ディッシュにおいては、ゲル化していないｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を２ｍＬ用いた。各培地にはＲＯＣＫ阻害剤（Ｓｅｌｌｅｃｋ Ｓ１０４９）が１０μｍｏｌ／Ｌとなるよう添加した。その後、１５ｍＬチューブ及び非接着ディッシュに、毎日５００μＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地 を添加し、非接着ディッシュに、毎日５００μＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を添加した。また、１５ｍＬチューブ及び非接着ディッシュに、毎日、終濃度が１０μｍｏｌ／ＬとなるようＲＯＣＫ阻害剤を添加し、７日間、浮遊培養を続けた。

[0334] その結果を図３７に示す。図３７（ｂ）に示すように、非接着ディッシュでゲル化していないｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を用いてｉＰＳ細胞を培養した場合、ｉＰＳ細胞のコロニー同士の凝集が顕著に認められた。これに対し、図３７（ａ）に示すように、１５ｍＬチューブ中でｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を用いてｉＰＳ細胞を培養した場合、目立った凝集は認められなかった。図３８（ａ）は、１５ｍＬチューブにおいて、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を用いてｉＰＳ細胞を培養したときの１日目の写真であり、図３８（ｂ）は、１５ｍＬチューブにおいて、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を用いてｉＰＳ細胞を培養したときの９日目の写真である。図３８（ａ）及び図３８（ｂ）の写真から、異なる株のｉＰＳ細胞同士が凝集せずに、コロニーを形成したことが確認された。

[0335] 図３９（ａ）は、ゲル培地中で７日間浮遊培養したｉＰＳ細胞のコロニーをフィーダー細胞上に再播種する直前時の写真である。図３９（ｂ）は、その３日後にコロニーの形態を確認した時の写真である。その結果、図４０に示すように、９５％以上のコロニーが未分化であることが確認された。よって、ｉＰＳ細胞をゲル培地中で、未分化の状態を維持したまま培養することができることが示された。

[0336] （実施例３）

実施例２と同じｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地、及びｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を調製した。フィーダー細胞上でｉＰＳ細胞を培養している６ウェルディッシュにＣＴＫ溶液を３００μＬ添加し、CO_2インキュベーター中で３分間インキュベートした。３分後、インキュベーターからディッシュを取り出し、フィーダー細胞のみがはがれていることを確認し、アスピレータを用いてＣＴＫ溶液を取り除いた。ＣＴＫ溶液を取り除いた後、ディッシュにＰＢＳを５００μＬ添加し、ｉＰＳ細胞を洗浄後、ディッシュからＰＢＳを取り除き、０．３ｍＬのＡｃｃｕｍａｘをディッシュに添加し、ディッシュをCO_2インキュベーターに入れ、５分間インキュベートした。その後、０．７ｍＬのｂＦＧＦ含有ｉＰＳ培地をディッシュに添加し、ｉＰＳ細胞をシングルセルになるまで懸濁した。

[0337] ｉＰＳ細胞を懸濁後、４ｍＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を１５ｍＬ遠心チューブに添加し、遠心機を用いてｉＰＳ細胞懸濁液を２７０ｇで遠心した。遠心後、上清を取り除き、１ｍＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地を１５ｍＬ遠心チューブに添加し、血球計算版を用いて細胞数を計算した。細胞計算後、５×１０^５個ずつｉＰＳ細胞を、１５ｍＬチューブに播種し、以後攪拌することなく浮遊培養した。

[0338] １５ｍＬチューブにおいては、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を２ｍＬ用いた。各培地にはＲＯＣＫ阻害剤が１０μｍｏｌ／Ｌとなるよう添加した。その後、１５ｍＬチューブに、毎日５００μＬのｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳゲル培地を添加した。なお、５００μＬのゲル培地は、０．５μＬのＲＯＣＫ阻害剤を含んでいた。また、コントロールとして、ＲＯＣＫ阻害剤を添加していない以外は同じ条件で、ｉＰＳ細胞を、７日間、浮遊培養した。

[0339] 図４１（ａ）に示すように、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地にＲＯＣＫ阻害剤を添加しなかった場合、ｉＰＳ細胞はコロニーを形成しなかった。これに対し、図４１（ｂ）に示すように、ｂＦＧＦ含有ヒトｉＰＳ培地にＲＯＣＫ阻害剤を添加した場合、ｉＰＳ細胞はコロニーを形成した。この結果から、

シングルセルからｉＰＳ細胞を浮遊培養する場合、ＲＯＣＫ阻害剤が有効であることが示された。

[0340] （実施例４）

透析チューブを格納する容器として、CO_2透過性ではない容器であるＦａｌｃｏｎ　コニカルチューブ　５０　ｍＬ（登録商標）と、CO_2透過性の容器であるＧ－Ｒｅｘ（登録商標、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）を用いて、容器以外は同条件で細胞を浮遊培養した。その結果、図４２に示すように、CO_2透過性の容器を用いて培養したほうが、細胞の生存率は高かった。

[0341] （実施例５）

ｉＰＳ細胞を含有するゲル培地を分画分子量が１００ｋＤａの透析チューブを備える２つの透析モジュール（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｇ２３５０３５）のそれぞれに入れた。さらに、透析モジュールを５０ｍＬ遠心チューブにそれぞれ入れ、遠心チューブ内の透析チューブの周囲にゲル培地を入れた。また、ｉＰＳ細胞を含有するゲル培地を別の５０ｍＬ遠心チューブに直接入れた。

[0342] その後、数日間、内部に透析チューブを入れた２つの遠心チューブのうちの１つの遠心チューブに、図６に示すようにポンプを接続して、遠心チューブ内のゲル培地を連続的に交換した。ゲル培地は４℃で保管し、遠心チューブに達するときには３７℃になるよう設定した。内部に透析チューブを入れた２つの遠心チューブのうちの他方の遠心チューブには、ポンプを接続せず、遠心チューブ内のゲル培地を交換しなかった。また、内部に透析チューブを入れていない遠心チューブ内のゲル培地も交換しなかった。

[0343] 同じ期間培養した後、それぞれの容器内で培養された細胞を観察したところ、図４３及び図４４に示すように、細胞塊を透析チューブ内で培養し、透析チューブの周囲のゲル培地をポンプで連続的に交換した場合は、多数の細胞塊が形成された。また、分化した細胞は極めて少なかった。しかし、細胞塊を透析チューブ内で培養し、透析チューブの周囲のゲル培地をポンプで連続的に交換しなかった場合は、細胞塊は少なくなり、分化した細胞が増えた

。また、透析チューブを用いずに細胞塊を培養し、ゲル培地をポンプで連続的に交換しなかった場合は、細胞塊はほとんど形成されなかった。

符号の説明

[0344] １０　分離装置

２０　導入前細胞送液路

２１　誘導因子送液機構

３０　因子導入装置

３１　導入細胞送液路

４０　細胞塊作製装置

５０　初期化培養装置

５１　細胞塊送液路

６０　分割機構

６１　末端ブロック

６１ａ 凹部

６１ｂ 凸部

６１ｃ 大孔径部

６２　連結ブロック

６２ａ 凹部

６２ｂ 凸部

６２ｃ 大孔径部

６２ｄ 小孔径部

６２ｅ 大孔径部

６３　先端ブロック

６３ａ 凹部

６３ｂ ノズル部

６３ｃ 大孔径部

６３ｄ 小孔径部

６４　挿入ノズル

６５ａ 大孔径部

６５ｂ 小孔径部

６６ａ 挿入部

６６ｂ 挿入部

７０ 拡大培養装置

７１ 拡大培養送液路

７２ 細胞塊送液路

７５ 透析チューブ

７６ 容器

７７ 補給培地送液ポンプ

７８ 送液チューブ

７９ 廃液チューブ

８０ 分割機構

９０ 細胞魂搬送機構

９１ パッケージ前細胞流路

１００ パッケージ装置

１０１ 溶液置換器

１０２ フィルター

１０３ 送液流路

１０４ 送液流路

１０５ 排出流路

１０６ 排出流路

１１０ 凍結保存液送液機構

１７１ 初期化培養撮影装置

１７２ テレセントリックレンズ

１７３ 細胞観察用照明光源

１７４ 培地観察用照明光源

２００ 筐体

２０１ 血液保存部

２０２ 血液送液路

２０３ 単核球分離部

２０４ ポンプ

２０５ 分離剤保存部

２０６ 送液路

２０７ ポンプ

２０８ 単核球送液路

２０９ ポンプ

２１０ 単核球精製フィルター

２１２ ポンプ

２１３ 因子導入部

２１４ 因子保存部

２１５ 因子送液路

２１６ ポンプ

２１７ 導入細胞送液路

２１８ ポンプ

２１９ 初期化培養器

２２０ 血液細胞培地保存部

２２１ 培地送液路

２２２ ポンプ

２２３ 幹細胞培地保存部

２２４ 培地送液路

２２４ ポンプ

２２５ ポンプ

２２６ 廃液送液路

２２７ ポンプ

２２８ 廃液保管部

２２９ 導入細胞送液路

２３０ ポンプ

２３１ 細胞塊分割器

２３２ 拡大培養器

２３３ 培地送液路

２３４ ポンプ

２３５ 廃液送液路

２３６ ポンプ

２３７ 導入細胞送液路

２３８ ポンプ

２３９ 細胞塊分割器

２４０ 拡大培養器

２４１ 培地送液路

２４２ ポンプ

２４３ 廃液送液路

２４４ ポンプ

２４５ 導入細胞送液路

２４６ ポンプ

２４７ 溶液置換器

２４８ 廃液送液路

２４９ ポンプ

２５０ 凍結保存液保存部

２５１ 送液路

２５２ ポンプ

２５３ 送液路

２５４ ポンプ

２５５ 凍結保存容器

２５６ 低温保管庫

２５７ 液体窒素保管庫

２５８ 送液路

２５９ 冷蔵保存部

２５９ ケース

２７１ センサー

２７２ 温度計

３０１ バッグ

３０２ バッグ

４０１ 入力装置

４０２ 出力装置

４０３ 関係記憶装置

５００ ＣＰＵ

５０１ 画像処理部

５１１ 輪郭定義部

５１２ 細胞評価部

５１３ 統計処理部

５１４ 密度算出部

５１５ 培地評価部

請求の範囲

[請求項1] 細胞を含む溶液が通過する導入前細胞送液路と、

前記導入前細胞送液路に接続され、前記細胞に多能性誘導因子を導入して誘導因子導入細胞を作製する因子導入装置と、

前記誘導因子導入細胞を培養して幹細胞からなる複数の細胞魂を作製する細胞塊作製装置と、

前記導入前細胞送液路、前記誘導因子送液機構、前記因子導入装置、及び前記細胞塊作製装置を格納する筐体と、

を備え、

前記細胞塊作製装置が、

前記因子導入装置で作製された誘導因子導入細胞を培養する初期化培養装置と、

前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊を拡大培養する拡大培養装置と、

を備え、

前記初期化培養装置が、前記誘導因子導入細胞に培地を補給する第１の培地補給装置を備え、

前記拡大培養装置が、前記複数の細胞塊に培地を補給する第２の培地補給装置を備える、

幹細胞製造システム。

[請求項2] 前記第１の培地補給装置が、前記誘導因子導入細胞に前記培地を連続的に補給する、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項3] 前記第１の培地補給装置が、前記誘導因子導入細胞に前記培地を所定のタイミングで補給する、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項4] 前記第２の培地補給装置が、前記複数の細胞塊に前記培地を連続的に補給する、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項5] 前記第２の培地補給装置が、前記複数の細胞塊に前記培地を所定のタイミングで補給する、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項6] 前記因子導入装置が、

前記導入前細胞送液路に接続された因子導入部と、

前記多能性誘導因子を保存する因子保存部と、

前記因子保存部から前記因子導入部に前記多能性誘導因子を流すための因子送液路と、

前記因子送液路内の液体を流すためのポンプと、

を備える、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項7] 前記因子導入部において、ＲＮＡリポフェクションにより、前記細胞に前記多能性誘導因子が導入される、請求項６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項8] 前記多能性誘導因子がＤＮＡ、ＲＮＡ、又はタンパク質である、請求項６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項9] 前記多能性誘導因子がベクターに組み込まれている、請求項６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項10] 前記ベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項11] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項12] 前記初期化培養装置が、

前記誘導因子導入細胞とゲル培地が入れられる透析チューブと、

前記透析チューブが入れられ、前記透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、

を備える、浮遊培養器

を備える、

請求項１又は６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項13] 前記透析チューブの分画分子量が０．１ＫＤａ以上である、請求項１２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項14] 前記透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなる、請求項１２又は１３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項15] 前記第１の培地補給装置が、前記容器内の前記透析チューブの周囲に前記ゲル培地を補給する、請求項１２から１４のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項16] 前記第１の培地補給装置が、前記透析チューブ内に前記ゲル培地を補給する、請求項１２から１４のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項17] 前記補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備える、請求項１５又は１６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項18] 前記培地送液路が二酸化炭素透過性である、請求項１７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項19] 前記培地送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項１７又は１８に記載の幹細胞製造システム。

[請求項20] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項１９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項21] 前記補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備える、請求項１７から２０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項22] 前記容器に接続された廃液送液路であって、前記容器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備える、請求項１２から２１のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項23] 前記因子導入装置から前記初期化培養装置に前記誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備える、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項24] 前記導入細胞送液路が二酸化炭素透過性である、請求項２３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項25] 前記導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項２３又は２４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項26] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項２５に記載の幹細胞製造システム。

[請求項27] 前記拡大培養装置が、

前記複数の細胞塊とゲル培地が入れられる透析チューブと、

前記透析チューブが入れられ、前記透析チューブの周囲にゲル培地が入れられる容器と、

を備える、浮遊培養器

を備える、

請求項１又は１２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項28] 前記透析チューブの分画分子量が０．１ＫＤａ以上である、請求項２７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項29] 前記透析チューブがセルロースエステル、セルロースエステル類、再生セルロース、及びセルロースアセテートから選択される少なくとも一つからなる、請求項２７又は２８に記載の幹細胞製造システム。

[請求項30] 前記第２の培地補給装置が、前記容器内の前記透析チューブの周囲に前記ゲル培地を補給する、請求項２７から２９のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項31] 前記第２の培地補給装置が、前記透析チューブ内に前記ゲル培地を補給する、請求項２７から２９のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項32] 前記補給されるゲル培地が流れる培地送液路を更に備える、請求項３０又は３１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項33] 前記培地送液路が二酸化炭素透過性である、請求項３２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項34] 前記培地送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項

３２又は３３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項35] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項３４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項36] 前記補給されるゲル培地を冷蔵保存する冷蔵保存部を更に備える、請求項３２から３５のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項37] 前記容器に接続された廃液送液路であって、前記容器内のゲル培地を外部に流出させるための廃液送液路を更に備える、請求項２７から３６のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項38] 前記初期化培養装置から前記拡大培養装置に前記誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路を更に備える、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項39] 前記初期化培養装置の前記浮遊培養器の前記透析チューブ内と、前記拡大培養装置の前記浮遊培養器の前記透析チューブ内と、を接続する導入細胞送液路を更に備える、請求項２７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項40] 前記導入細胞送液路が二酸化炭素透過性である、請求項３８又は３９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項41] 前記導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項３８から４０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項42] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項４１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項43] 前記初期化培養装置及び前記拡大培養装置の少なくとも一方が、内部に培地が入れられる二酸化炭素透過性バッグを備える、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項44] 前記細胞塊作製装置が、

前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる細胞塊を複数の細

胞塊に分割する第１の分割機構と、

前記拡大培養装置で拡大培養された幹細胞からなる細胞塊を複数の細胞塊に分割する第２の分割機構と、

を更に備える、請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項45] 前記第１の分割機構が、前記初期化培養装置から前記拡大培養装置に前記誘導因子導入細胞を送るための導入細胞送液路に設けられている、請求項４４に記載の幹細胞培養システム。

[請求項46] 前記第１及び第２の分割機構の少なくとも一方が、前記細胞塊をシングルセルに分割する、請求項４４又は４５に記載の幹細胞培養システム。

[請求項47] 前記第１及び第２の分割機構の少なくとも一方が、内部に貫通孔を有する分割器を備え、前記貫通孔が、大孔径部と、前記大孔径部と連通し、前記大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、を交互に有し、前記細胞塊を含む培地が、前記貫通孔を流れる、請求項４４又は４５に記載の幹細胞製造システム。

[請求項48] 前記大孔径部の中心軸と、前記小孔径部の中心軸と、がオフセットしている、請求項４７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項49] 前記第１及び第２の分割機構の少なくとも一方が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、

当該連結ブロックの第１の端部に凹部が、当該連結ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、

当該連結ブロックが複数ある場合に、前記凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、

前記貫通孔が、前記凹部と連通する第１の大孔径部と、前記第１の大孔径部と連通し、前記第１の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、前記小孔径部と連通し、前記小孔径部より孔径が大きく、前記凸部の先端に開口を有する第２の大孔径部と、を有し、

前記細胞塊を含む培地が、前記貫通孔を流れる、

請求項４４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項50] 前記連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第２の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第１の大孔径部と平滑に連通する、請求項４９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項51] 前記第１及び第２の大孔径部の中心軸と、前記小孔径部の中心軸と、がオフセットしている、請求項４９又は５０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項52] 前記第１及び第２の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、

当該先端ブロックの第１の端部に凹部が、当該先端ブロックの第２の端部にノズルが設けられており、

当該先端ブロックの凹部が、前記連結ブロックの凸部と勘合し、

前記貫通孔が、前記凹部と連通する大孔径部と、前記大孔径部と連通し、前記大孔径部より孔径が小さく、前記ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有する、

請求項４９から５１のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項53] 前記連結ブロックと前記先端ブロックとを連結した際、前記連結ブロックの第２の大孔径部と、前記先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通する、請求項５２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項54] 前記第１及び第２の分割機構が、それぞれ、内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、

当該末端ブロックの第１の端部に凹部が、前記末端ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、

当該末端ブロックの凸部が、前記連結ブロックの凹部と勘合する、

請求項４９から５３のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項55] 前記第１及び第２の分割機構が、それぞれ、前記末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、

前記挿入ノズルに連通する、前記細胞塊を含む培地を吸引排出する

吸引排出器と、

を更に備える、請求項５４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項56] 前記複数の細胞塊のそれぞれを順次パッケージするパッケージ装置を更に備え、

前記筐体が前記パッケージ装置を格納する、

請求項１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項57] 前記細胞塊作製装置が、前記複数の細胞魂を前記パッケージ装置に順次送る細胞魂搬送機構を更に備える、請求項５６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項58] 前記パッケージ装置が、ペルチェ素子又は液体窒素を用いて前記細胞塊を凍結する、請求項５６又は５７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項59] 前記パッケージ装置が、気化圧縮又は気化吸収により前記細胞塊を凍結する、請求項５６又は５７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項60] 筒状部材と、

前記筒状部材の内部に配置された液体透過フィルターと、

を備える溶液置換器であって、

前記筒状部材に、

前記液体透過フィルター上に、前記複数の細胞塊を含む溶液を導入するための細胞塊導入孔と、

前記液体透過フィルター上に、置換溶液を導入するための置換溶液導入孔と、

前記液体透過フィルター上に、前記複数の細胞塊を含む置換溶液を流出するための細胞塊流出孔と、

前記液体透過フィルターを透過した溶液が流出する廃液流出孔と、

が設けられている溶液置換器を更に備える、請求項１又は２７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項61] 前記廃液流出孔に接続された廃液送液路を更に備え、

前記複数の細胞塊を含む溶液の溶液を廃棄する際に前記廃液送液路

における溶液の流動が許容され、

前記置換溶液中に前記複数の細胞塊を分散させる際に前記廃液送液路における溶液の流動が許容されない、

請求項６０に記載の溶液置換器。

[請求項62] 前記置換溶液が培地、凍結保存液、又は細胞塊分割酵素溶液である、請求項６０又は６１に記載の溶液置換器。

[請求項63] 前記拡大培養装置から前記溶液置換器に前記複数の細胞塊を送るための導入細胞送液路を更に備える、請求項６０から６２のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項64] 前記拡大培養装置の前記浮遊培養器の前記透析チューブ内と、前記溶液置換器の前記細胞塊導入孔と、を接続する導入細胞送液路を更に備える、請求項６０から６２のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項65] 前記導入細胞送液路が二酸化炭素透過性である、請求項６３又は６４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項66] 前記導入細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項６３から６５のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項67] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項６６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項68] 血液から細胞を分離する分離装置を更に備え、

前記分離装置で分離された細胞を含む溶液が前記導入前細胞送液路を通過する、

請求項１又は６０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項69] 前記分離装置が、磁気細胞分離方法又は赤血球凝固剤を用いる方法によって前記血液から単核球を分離する、請求項６８に記載の幹細胞製造システム。

[請求項70] 前記分離装置が、前記単核球を精製する単核球精製フィルターを更

に備える、請求項６９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項71] 前記導入前細胞送液路内の液体を流すためのポンプを更に備える、請求項６８から７０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項72] 前記ポンプがダイヤフラムポンプ、チュービングポンプ、又はペリスタポンプ（登録商標）である、請求項７１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項73] 前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、前記筐体内に配置されるケースを更に備える、請求項２７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項74] 前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記ケースと、が使い捨て可能である、請求項７３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項75] 前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、の少なくともいずれかを格納するケースであって、前記筐体内に配置されるケースを更に備える、請求項６８に記載の幹細胞製造システム。

[請求項76] 前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、前記ケースと、が使い捨て可能である、請求項７５に記載の幹細胞製造システム。

[請求項77] 前記筐体内に配置される複数のケースを更に備え、

前記複数のケースのそれぞれに、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、の少なくともいずれかが格納される、請求項２７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項78] 前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記複数のケースと、が使い捨て可能である、請求項７７に記

載の幹細胞製造システム。

[請求項79] 前記筐体内に配置される複数のケースを更に備え、

前記複数のケースのそれぞれに、前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、の少なくともいずれかが格納される、請求項２７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項80] 前記分離装置と、前記因子導入部と、前記初期化培養装置の浮遊培養器と、前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記溶液置換器と、前記複数のケースと、が使い捨て可能である、請求項７９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項81] 前記ケースと前記筐体が、互いに勘合する勘合部を備え、前記ケースが前記筐体内の所定の位置に配置される、請求項７３から８０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項82] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の送液路と、前記ケース外のポンプと、が接続される、請求項７３から８１のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項83] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記因子導入部と、前記ケース外の前記因子保存部と、が接続される、請求項７３から８２のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項84] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記初期化培養装置の浮遊培養器及び前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記ケース外の培地を保存する培地保存部と、が接続される、請求項７３から８３のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項85] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記初期化培養装置の浮遊培養器及び前記拡大培養装置の浮遊培養器と、前記ケース外の廃液を保管する廃液保管部と、が接続される、請求項７３から８４のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項86] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記分離

装置と、前記ケース外の血液を保存する血液保存部と、が接続される、請求項７５又は８０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項87] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記分離装置と、前記ケース外の血液分離剤を保存する分離剤保存部と、が接続される、請求項７５、７６、及び８６のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項88] 前記筐体内に前記ケースが配置されると、前記ケース内の前記溶液置換器と、前記ケース外の凍結保存液を保存する凍結保存液保存部と、が接続される、請求項７５又は７６に記載の幹細胞製造システム。

[請求項89] 前記初期化培養装置で培養される細胞を撮影する初期化培養撮影装置と、

前記拡大培養装置で培養される細胞を撮影する拡大培養撮影装置と、

を更に備える、請求項１から８８のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項90] 前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置は、それぞれ、テレセントリックレンズを介して前記細胞を撮影する、請求項８９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項91] 前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部を更に備える、請求項８９又は９０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項92] 前記画像処理部が、前記ハイパスフィルタを適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、前記画像中の細胞塊を抽出する、請求項９１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項93] 前記画像処理部が、前記画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、前記画像にＤｉｓｔａｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法を適用する、請求項９２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項94] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞魂の大きさを算出する、請求

項９２又は９３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項95] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が前記拡大培養装置に移行される、請求項９４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項96] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、前記拡大培養装置において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項９４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項97] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、前記初期化培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項９４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項98] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、前記拡大培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項９４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項99] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞魂の数を算出する、請求項９２又は９３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項100] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、前記初期化培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項９９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項101] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、前記拡大培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項９９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項102] 培地の濁度と、培地中の細胞魂の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、

前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像に基づき、前記細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、前記算出された濁度の値と、前記関係と、に基づき、撮影された細胞魂の密度の値を算出する画像処理部を更に備える、

請求項８９又は９０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項103] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、前記初期化培養装置で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が前記拡大培養装置に移行される、請求項１０２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項104] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、前記拡大培養撮影装置において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項１０２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項105] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、前記初期化培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項１０２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項106] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、前記拡大培養装置において培地の供給速度が変化する、請求項１０２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項107] 培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置を更に備え、

前記初期化培養撮影装置及び前記拡大培養撮影装置の少なくともいずれかで得られた画像における培地の色の値を算出し、前記算出された色の値と、前記関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部を更に備える、請求項８９又は９０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項108] 前記初期化培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記初期化培養装置において培地が交換される、請求項１０７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項109] 前記拡大培養撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記拡大培養装置において培地が交換される、請求項１０７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項110] 前記培地の色が、前記培地の色相である、請求項１０７から１０９

のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項111] 前記初期化培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記初期化培養装置において培地が交換される、請求項１から１１０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項112] 前記拡大培養装置で測定された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、前記拡大培養装置において培地が交換される、請求項１から１１０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項113] 前記導入前細胞送液路の内壁が、細胞非接着性である、請求項１から１１２のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項114] 前記導入前細胞送液路と、前記誘導因子送液機構と、が、基板上に設けられている、請求項１から１１３のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項115] 前記筐体内の気体を清浄にする空気清浄装置を更に備える、請求項１から１１４のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項116] 前記筐体内の気体の温度を管理する温度管理装置を更に備える、請求項１から１１５のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項117] 前記初期化培養装置及び前記拡大培養装置における培地の温度を管理する温度管理装置を更に備える、請求項１から１１５のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項118] 前記温度管理装置が、前記培地の温度が所定の範囲より低い場合は、培地の温度を上昇させ、前記培地の温度が所定の範囲より高い場合は、前記培地の温度を低下させる、請求項１１７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項119] 前記筐体内の気体の二酸化炭素濃度を管理する二酸化炭素濃度管理装置を更に備える、請求項１から１１８のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項120] 前記筐体内を乾熱滅菌又はガス滅菌する滅菌装置を更に備える、請求項１から１１９のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項121] 前記誘導因子送液機構、前記因子導入装置、及び前記細胞塊作製装置が、サーバーによって作業手順に基づいて制御され、前記サーバーが、前記誘導因子送液機構、前記因子導入装置、及び前記細胞塊作製装置が前記作業手順に基づいて稼働しているか否か監視し、稼働記録を作成する、請求項１から１２０のいずれか１項に記載の幹細胞製造システム。

[請求項122] 内部に細胞塊を含む培地が流れる貫通孔が設けられた連結ブロックを備え、

当該連結ブロックの第１の端部に凹部が、当該連結ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、

当該連結ブロックが複数ある場合に、前記凸部が隣接する連結ブロックの凹部と勘合し、

前記貫通孔が、前記凹部と連通する第１の大孔径部と、前記第１の大孔径部と連通し、前記第１の大孔径部より孔径が小さい小孔径部と、前記小孔径部と連通し、前記小孔径部より孔径が大きく、前記凸部の先端に開口を有する第２の大孔径部と、を有する、

細胞塊分割器。

[請求項123] 前記連結ブロックが複数あり、当該複数の連結ブロックを連結した場合に、第２の大孔径部が、隣接する連結ブロックの第１の大孔径部と平滑に連通する、請求項１２２に記載の細胞塊分割器。

[請求項124] 前記第１及び第２の大孔径部の中心軸と、前記小孔径部の中心軸と、がオフセットしている、請求項１２２又は１２３に記載の細胞塊分割器。

[請求項125] 内部に貫通孔が設けられた先端ブロックを更に備え、

当該先端ブロックの第１の端部に凹部が、当該先端ブロックの第２の端部にノズルが設けられており、

当該先端ブロックの凹部が、前記連結ブロックの凸部と勘合し、

前記貫通孔が、前記凹部と連通する大孔径部と、前記大孔径部と連

通し、前記大孔径部より孔径が小さく、前記ノズルの先端に開口を有する小孔径部と、を有する、

請求項１２２から１２４のいずれか１項に記載の細胞塊分割器。

[請求項126] 前記連結ブロックと前記先端ブロックとを連結した際、前記連結ブロックの第２の大孔径部と、前記先端ブロックの大孔径部と、が、平滑に連通する、請求項１２５に記載の細胞塊分割器。

[請求項127] 内部に貫通孔が設けられた末端ブロックを更に備え、

前記末端ブロックの第１の端部に凹部が、前記末端ブロックの第２の端部に凸部が設けられており、

当該末端ブロックの凸部が、前記連結ブロックの凹部と勘合する、

請求項１２２から１２６のいずれか１項に記載の細胞塊分割器。

[請求項128] 前記末端ブロックの凹部に挿入される挿入ノズルと、

前記挿入ノズルに連通する、前記細胞塊を含む培地を吸引排出する吸引排出器と、

を更に備える、請求項１２７に記載の細胞塊分割器。

[請求項129] 培養細胞を撮影する撮影装置と、

前記撮影装置で得られた画像にハイパスフィルタを適用する画像処理部と、

を備える、幹細胞製造システム。

[請求項130] 前記撮影装置は、テレセントリックレンズを介して前記細胞を撮影する、請求項１２９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項131] 前記画像処理部が、前記ハイパスフィルタを適用した画像に分水嶺アルゴリズムを適用して、前記画像中の細胞塊を抽出する、請求項１２９又は１３０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項132] 前記画像処理部が、前記画像に分水嶺アルゴリズムを適用する前に、前記画像にＤｉｓｔａｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ法を適用する、請求項１３１に記載の幹細胞製造システム。

[請求項133] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞魂の大きさを算出する、請求

項１３１又は１３２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項134] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行される、請求項１３３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項135] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさが閾値以上である場合、拡大培養において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項１３３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項136] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の大きさに応じて、培養器における培地の供給速度が変化する、請求項１３３に記載の幹細胞製造システム。

[請求項137] 前記画像処理部が、前記抽出した細胞魂の数を算出する、請求項１３１又は１３２に記載の幹細胞製造システム。

[請求項138] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の数に応じて、培養器における培地の供給速度が変化する、請求項１３７に記載の幹細胞製造システム。

[請求項139] 培養細胞を撮影する撮影装置と、

培地の濁度と、培地中の細胞魂の密度と、の関係を記憶する関係記憶装置と、

前記撮影装置で得られた画像に基づき、前記細胞が培養されている培地の濁度の値を算出し、前記算出された濁度の値と、前記関係と、に基づき、撮影された細胞魂の密度の値を算出する画像処理部と、

を備える、幹細胞製造システム。

[請求項140] 前記撮影装置は、テレセントリックレンズを介して前記細胞を撮影する、請求項１３９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項141] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、初期化培養で樹立された幹細胞からなる複数の細胞塊が拡大培養に移行される、請求項１３９又は１４０に記載の幹細胞

製造システム。

[請求項142] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度が閾値以上である場合、拡大培養において、前記複数の細胞塊が継代される、請求項１３９又は１４０に記載の幹細胞製造システム。

[請求項143] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された細胞塊の密度に応じて、培養器において培地の供給速度が変化する、請求項１３９に記載の幹細胞製造システム。

[請求項144] 培養細胞を撮影する撮影装置と、

培地の色と、培地の水素イオン指数と、の関係を記憶する関係記憶装置と、

前記撮影装置で得られた画像における培地の色の値を算出し、前記算出された色の値と、前記関係と、に基づき、撮影された培地の水素イオン指数の値を算出する画像処理部と、

を備える、幹細胞製造システム。

[請求項145] 前記撮影装置で撮影された画像から算出された水素イオン指数が所定の範囲外である場合、培養器において培地が交換される、請求項１４４に記載の幹細胞製造システム。

[請求項146] 前記培地の色が、前記培地の色相である、請求項１４４又は１４５に記載の幹細胞製造システム。