明　細　書

発明の名称 ： 培養生成液製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ドナーから採取した骨髄液から作られる幹細胞を利用して培養生成液を製造する培養生成液製造方法に関する。

背景技術

[0002] 培養槽と、培養槽内を満たす培養液と、その表面に高低部を有して幹細胞付着性物質をコートさせた担体とを備え、担体表面に高低を形成させる低部が複数存在する幹細胞培養装置が開示されている（特許文献１参照）。この幹細胞培養装置では、担体を培養液中に浮遊させ、担体表面に幹細胞付着性物質を介して分散状態で付着させた幹細胞を担体表面から剥離させずに増殖させる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２０１４－１８３７７０号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 前記特許文献１に開示の幹細胞培養装置では、幹細胞を培養した後の培養液は廃棄処分される。幹細胞を培養した後の培養液には幹細胞から分泌された代謝物質が含まれ、その培養液を各種疾患の治療や美容のために使用することができる。しかし、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、ドナーから採取した組織またはその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、それら各種の幹細胞から分泌された多種多様な代謝物質が培養液に含まれることになり、各種の疾患や各種の美容に対する唯一特定の効果を有する培養生成液を作ることが困難であった。

[0005] 本発明の目的は、単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含み、

各種の疾患や各種の美容に対する唯一特定の効果を有する培養生成液を製造することができる培養生成液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

[0006] 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から作られる幹細胞を利用して培養生成液を製造する培養生成液製造方法である。

[0007] 前記前提における本発明の特徴は、培養生成液製造方法が、ドナーから採取した骨髄液を層状に分離する骨髄液分離工程と、骨髄液分離工程によって層状に分離し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する骨髄液抽出工程と、骨髄液抽出工程によって抽出した中間層骨髄液と所定の培養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、第１培養容器を所定時間静的に放置して中間層骨髄液に含まれる第１幹細胞を第１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１培養容器の底面に定着させた後、第１培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を第１培養容器に注入し、第１培養容器を所定時間静的に放置して第１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１目標割合に達するまで第１幹細胞を培養する幹細胞第１培養工程と、幹細胞第１培養工程における第１幹細胞の培養過程において、第１幹細胞の総平面面積が第１目標割合に達した場合、第１培養容器から第１幹細胞を採取する幹細胞第１採取工程と、幹細胞第１採取工程によって採取した第１幹細胞を層状に遠心分離する幹細胞分離工程と、幹細胞分離工程によって層状に分離した第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を採取する幹細胞第２採取工程と、幹細胞第２採取工程によって採取した第２幹細胞と所定の培養液とを第１培養容器よりも大きい容量かつ大きい底面面積の底面を有する第２培養容器に注入し、第２培養容器を所定時間静的に放置して第２幹細胞を第２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２培養容器の底面に定着させた後、第２培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を第２培養容器に

注入し、第２培養容器を所定時間静的に放置して第２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２目標割合に達するまで第２幹細胞を培養する幹細胞第２培養工程と、幹細胞第２培養工程における培養過程において、第２幹細胞の総平面面積が第２目標割合に達した場合、増殖した単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液を第２培養容器から抽出する培養生成液第１抽出工程とを有することにある。

[0008] 本発明の培養生成液製造方法の一例として、幹細胞第１定着工程および幹細胞第１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所定時間静的に放置し、幹細胞第２定着工程および幹細胞第２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所定時間静的に放置する。

[0009] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、培養生成液製造方法が、培養生成液第１抽出工程によって第２培養容器内から培養生成液を抽出した後、第２培養容器から第２幹細胞を採取する幹細胞第２採取工程と、所定容量かつ所定面積の底面を有して第２培養容器よりも大きい容量かつ大きい底面面積の底面を有する第３培養容器に幹細胞第２採取工程によって採取した第２幹細胞とあらたな培養液とを注入し、第３培養容器を所定時間静的に放置して第２幹細胞を第３培養容器の底面に定着させる幹細胞第３定着工程と、幹細胞第３定着工程によって第２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、第３培養容器を所定時間静的に放置して第３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３目標割合に達するまで第２幹細胞を培養する幹細胞第３培養工程と、幹細胞第３培養工程における培養過程において、第２幹細胞の総平面面積が第３目標割合に達した場合、増殖した単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液を第３培養容器から抽出する培養生成液第２抽出工程とを含む。

[0010] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例として、幹細胞第３定着工程および幹細胞第３培養工程では、第３培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置する。

[0011] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、骨髄液分離工程が、ドナーから２～３ｃｃの骨髄液を採取し、２～３ｃｃの骨髄液を上下方向へ延びる分離容器に注入し、分離容器を体温と略同一の温度で所定時間静的に放置して骨髄液を分離容器内において上下方向へ層状に分離させ、骨髄液抽出工程が、分離容器内において層状に分離し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する。

[0012] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、第１培養容器の容量が、約２０～３０ｃｃであり、第１幹細胞の初期平面形状が、略円形であり、第１幹細胞の変形後の平面形状が、略円形を核として第１幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、幹細胞第１定着工程では、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時間間隔で第１培養容器内の第１幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、第１幹細胞が初期平面形状から不定形の扁平形状に変形した場合、第１幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断する。

[0013] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例として、幹細胞第１採取工程では、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時間間隔で第１培養容器の底面に定着した第１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。

[0014] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、第１培養容器の底面面積に対する第１幹細胞の総平面面積の第１目標割合が７０～８０％である。

[0015] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、幹細胞分離工程が、第１幹細胞を分離容器に注入し、分離容器を遠心分離器に設置して第１幹細胞を遠心分離させ、幹細胞第１採取工程が、分離容器内において層状に遠心分離した第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を採取する。

[0016] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、第２培養容器の容量が約４０～６０ｃｃであり、第３培養容器の容量が約７０～８０ｃｃであり、第２幹細胞の初期平面形状が略円形であり、第２幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として第２幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり

、幹細胞第２定着工程および幹細胞第３定着工程では、第２培養容器および第３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時間間隔で第２および第３培養容器内の第２幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、第２幹細胞が初期平面形状から不定形の扁平形状に変形した場合、第２幹細胞が第２および第３培養容器の底面に定着したと判断する。

[0017] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例として、幹細胞第２採取工程および幹細胞第３採取工程では、第２培養容器および第３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時間間隔で第２および第３培養容器の底面に定着した第２幹細胞の第２および第３培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する。

[0018] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、第２培養容器の底面面積に対する第２幹細胞の総平面面積の第２目標割合が８８～９２％であり、第３培養容器の底面面積に対する第２幹細胞の総平面面積の第３目標割合が８８～９２％である。

[0019] 本発明の培養生成液製造方法の他の一例としては、第１および第２幹細胞が間葉系幹細胞である。

発明の効果

[0020] 本発明にかかる培養生成液製造方法によれば、層状に分離し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、中間層骨髄液を培養液とともに培養して第１幹細胞を第１培養容器の底面に定着させ、第１幹細胞を培養しつつ第１幹細胞の総平面面積が第１培養容器の底面面積に対して第１目標割合に達した場合、第１培養容器から第１幹細胞を採取し、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幹細胞を採取するとともに、第２幹細胞を培養液とともに培養して第２幹細胞を第２培養容器の底面に定着させ、第２培養容器内にあらたな培養液を注入し、第２幹細胞を培養しつつ第２幹細胞の総平面面積が第２培養容器の底面面積に対して第２目標割合に達した場合、第２幹細胞の培養過程において増殖した単一種の第２幹細胞か

ら分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液を第２培養容器から抽出するから、培養された単一種の第２幹細胞を利用することで、多種雑多な幹細胞から分泌された多種多様な代謝物質が含まれることはなく、単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含み、所定の疾患やスキンケア、ヘアケア、ボディケア等の所定の美容に対して唯一特定の効果を発揮する培養生成液を作ることができ、所定の疾患の治療に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができるとともに、所定の美容に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができる。培養生成液製造方法は、不要な幹細胞が除去されたピュア（純粋）な第２幹細胞を利用して培養生成液が作られ、その培養生成液に単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含ませることができるから、所定の疾患に対して高い治療効果を有し、その疾患を完治させる確立が高い培養生成液を作ることができ、所定の美容に対して高い効果を有する培養生成液を作ることができる。

[0021] 幹細胞第１定着工程および幹細胞第１培養工程において、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置し、幹細胞第２定着工程および幹細胞第２培養工程において、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置する培養生成液製造方法は、幹細胞第１定着工程および幹細胞第１培養工程において、第１培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置することで、第１培養容器の底面に第１幹細胞を確実に定着させることができ、第１幹細胞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、幹細胞第２定着工程および幹細胞第２培養工程において、第２培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置することで、第２培養容器の底面に第２幹細胞を確実に定着させることができ、第２幹細胞の増殖を確実に促進することができる。

[0022] 第２培養容器内から培養生成液を抽出した後に第２培養容器から第２幹細胞を採取し、第２幹細胞を培養液とともに培養して第２幹細胞を第２培養容器よりも大きい容量かつ大きい底面面積の底面を有する第３培養容器の底面に定着させ、第３培養容器内にあらたな培養液を注入し、第２幹細胞を培養

しつつ第２幹細胞の総平面面積が第３培養容器の底面面積に対して第３目標割合に達した場合、第２幹細胞の培養過程において増殖した単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液を第３培養容器から抽出する培養生成液製造方法は、第２幹細胞をさらに第３培養容器で培養し、第２幹細胞の総平面面積が第３培養容器の底面面積に対して第３目標割合に達した場合、第２幹細胞の培養過程において増殖した単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液を第３培養容器から抽出するから、幹細胞の培養過程において多種雑多な幹細胞が培養されることはなく、多種雑多な幹細胞から分泌された多種多様な代謝物質が含まれることはなく、単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含み、所定の疾患や所定の美容に対して唯一特定の効果を発揮する培養生成液を作ることができ、所定の疾患の治療に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができるとともに、所定の美容に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができる。培養生成液製造方法は、第２培養容器よりも大きい容量の第３培養容器を利用することで、一度に多量の培養生成液を作ることができる。

[0023] 幹細胞第３定着工程および幹細胞第３培養工程において、第３培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置する培養生成液製造方法は、幹細胞第３定着工程および幹細胞第３培養工程において、第３培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置することで、第２培養容器の底面に第２幹細胞を確実に定着させることができ、第２幹細胞の増殖を確実に促進することができる。

[0024] 骨髄液分離工程において、ドナーから２～３ｃｃの骨髄液を採取し、２～３ｃｃの骨髄液を上下方向へ延びる分離容器に注入し、分離容器を体温と略同一の温度で所定時間静的に放置して骨髄液を分離容器内において上下方向へ層状に分離させ、骨髄液抽出工程において、分離容器内において層状に分離し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する培養生成液製造方法は、多種雑多な幹細胞を含む骨髄液を体温と略同一の温度で所定時

間静的に放置して上下方向へ層状に分離させることで、骨髄液から特定の中間層骨髄液が確実に抽出され、その中間層骨髄液から単一種の第２幹細胞が培養されるから、不要な幹細胞が除去された単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含み、所定の疾患や所定の美容に対して唯一特定の効果を発揮する培養生成液を作ることができ、所定の疾患の治療に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができるとともに、所定の美容に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができる。

[0025] 第１培養容器の容量が約２０～３０ｃｃであり、第１幹細胞の初期平面形状が略円形であり、第１幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として第１幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、幹細胞第１定着工程において、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時間間隔で第１培養容器内の第１幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、第１幹細胞が初期平面形状から不定形の扁平形状に変形した場合、第１幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断する培養生成液製造方法は、第１培養容器の容量が３０ｃｃを超過すると、第１幹細胞が第１培養容器の底面に定着し難くなるとともに第１幹細胞の増殖が遅くなるが、前記容量の第１培養容器を使用することで、第１幹細胞が第１培養容器の底面に早期かつ容易に定着し、第１培養容器において第１幹細胞が素早く増殖することで、単一種の幹細胞が短い期間で作られるとともに、不要な幹細胞が除去された単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む多量の培養生成液を短い期間で作ることができる。培養生成液製造方法は、第１培養容器を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間間隔で第１培養容器内の第１幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、第１幹細胞が略円形を核として一方向へ不定形に伸張した扁平形状に変形した場合に第１幹細胞が第１培養容器の底面に定着したと判断することで、第１幹細胞の第１培養容器の底面への定着を見逃すことはなく、第１幹細胞の平面形状の変化によって第１幹細胞の第１培養容器の底面に対する定着を正確に把握する

ことができるとともに、第１培養容器の底面に対する第１幹細胞の定着を確認した後、第１培養容器内の培養液を排出しつつあらたな培養液を第１培養容器に注入することで、第１幹細胞の増殖を確実に促進することができ、その第１幹細胞を利用して単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0026] 幹細胞第１採取工程において、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時間間隔で第１培養容器の底面に定着した第１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培養生成液製造方法は、約１～２時間間隔で総平面面積を観察することで、第１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正確に確認することができ、第１培養容器の底面面積に対して第１幹細胞の総平面面積が第１目標割合に達したことを確実に把握することができるとともに、第１培養容器からの第１幹細胞の採取のタイミングを誤ることなく、第１幹細胞の活性を保持しつつ第１培養容器から第１幹細胞を採取することができ、その第１幹細胞を利用して単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0027] 第１培養容器の底面面積に対する第１幹細胞の総平面面積の第１目標割合が７０～８０％である培養生成液製造方法は、第１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８０％を超過して第１幹細胞が増殖すると、第１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第１幹細胞の総平面面積が７０～８０％に増殖したときに、第１幹細胞を第１培養容器から採取するから、第１幹細胞の活性を保持することができ、活性を保持した状態で第１幹細胞を増殖させることができるとともに、その第１幹細胞を利用して単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0028] 幹細胞分離工程において、第１幹細胞を分離容器に注入し、分離容器を遠心分離器に設置して第１幹細胞を遠心分離させ、幹細胞第１採取工程において、分離容器内において層状に遠心分離した第１幹細胞のうちの最下層に位

置する第２幹細胞を採取する培養生成液製造方法は、不要な幹細胞を含む第１幹細胞を遠心分離によって層状に分離させ、層状に遠心分離した第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を採取することで、第１幹細胞から特定の第２幹細胞を確実に抽出することができ、第１幹細胞から不要な幹細胞を除去することができる。培養生成液製造方法は、培養対象の特定種類の第２幹細胞のみを培養することができ、その第１幹細胞を利用して単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0029] 第２培養容器の容量が約４０～６０ｃｃであり、第３培養容器の容量が約７０～８０ｃｃであり、第２幹細胞の初期平面形状が略円形であり、第２幹細胞の変形後の平面形状が略円形を核として第２幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、幹細胞第２定着工程および幹細胞第３定着工程において、第２培養容器および第３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時間間隔で第２および第３培養容器内の第２幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、第２幹細胞が初期平面形状から不定形の扁平形状に変形した場合、第２幹細胞が第２および第３培養容器の底面に定着したと判断する培養生成液製造方法は、第２培養容器の容量が６０ｃｃを超過し、第３培養容器の容量が８０ｃｃを超過すると、第２幹細胞が第２および第３培養容器の底面に定着し難くなるとともに第２幹細胞の増殖が遅くなるが、前記容量の第２および第３培養容器を使用することで、第２幹細胞が第２および第３培養容器の底面に早期かつ容易に定着し、第２および第３培養容器において第２幹細胞が素早く増殖することで、単一種の第２幹細胞が短い期間で作られるとともに、不要な幹細胞が除去された単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む多量の培養生成液を短い期間で作ることができる。培養生成液製造方法は、第２および第３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時間間隔で第２および第３培養容器内の第２幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、第

２幹細胞が略円形を核として一方向へ不定形に伸張した扁平形状に変形した場合に第２幹細胞が第２および第３培養容器の底面に定着したと判断することで、第２幹細胞の第２および第３培養容器の底面への定着を見逃すことはなく、第２幹細胞の平面形状の変化によって第２幹細胞の第２および第３培養容器の底面に対する定着を正確に把握することができるとともに、第２および第３培養容器の底面に対する第２幹細胞の定着を確認した後、第２および第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２および第３培養容器に注入することで、第２幹細胞の増殖を確実に促進することができ、その第２幹細胞を利用して単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0030] 幹細胞第２および第３採取工程において、第２培養容器および第３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時間間隔で第２および第３培養容器の底面に定着した第２幹細胞の第２および第３培養容器の底面面積に対する総平面面積を観察する培養生成液製造方法は、約１～２時間間隔で総平面面積を観察することで、第２幹細胞の第２および第３培養容器の底面面積に対する総平面面積を正確に確認することができ、第２および第３培養容器の底面面積に対して第２幹細胞の総平面面積が第２および第３目標割合に達したことを確実に把握することができるとともに、第２および第３培養容器からの第２幹細胞の採取のタイミングを誤ることなく、第２幹細胞の活性を保持しつつ第２および第３培養容器から第２幹細胞を採取することができ、その第２幹細胞を利用して単一種の幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0031] 第２培養容器の底面面積に対する第２幹細胞の総平面面積の第２目標割合が８８～９２％であり、第３培養容器の底面面積に対する第２幹細胞の総平面面積の第３目標割合が８８～９２％である培養生成液製造方法は、第２および第３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９２％を超過して第２幹細胞が増殖すると、第２幹細胞の活性が次第に失われるが、第

２および第３培養容器の底面面積に対して第２幹細胞の総平面面積が８８～９２％に増殖したときに、第２幹細胞を第２および第３培養容器から採取するから、第２幹細胞の活性を保持することができ、活性を保持した状態で第２幹細胞を増殖させることができるとともに、その第２幹細胞を利用して単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含む培養生成液を確実に作ることができる。

[0032] 第１および第２幹細胞が間葉系幹細胞である培養生成液製造方法は、培養された単一種の第２間葉系幹細胞を利用することで、多種雑多な間葉系幹細胞から分泌された多種多様な代謝物質が含まれることはなく、単一種の第２間葉系幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含み、所定の疾患やスキンケア、ヘアケア、ボディケア等の所定の美容に対して唯一特定の効果を発揮する培養生成液を作ることができ、所定の疾患の治療に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができるとともに、所定の美容に有効に使用することが可能な培養生成液を作ることができる。培養生成液製造方法は、不要な幹細胞が除去されたピュア（純粋）な第２間葉系幹細胞を利用して培養生成液が作られ、その培養生成液に単一種の第２間葉系幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含ませることができるから、所定の疾患に対して高い治療効果を有し、その疾患を完治させる確立が高い培養生成液を作ることができ、所定の美容に対して高い効果を有する培養生成液を作ることができる。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]一例として示す培養生成液製造システムの概略構成図。

[図2]骨髄液分離工程の一例を示す説明図。

[図3]図２から続く骨髄液分離工程の説明図。

[図4]図３から続く骨髄液分離工程の説明図。

[図5]幹細胞第１観察工程の一例を示す説明図。

[図6]第１扁平培養容器の側面図。

[図7]第１間葉系幹細胞の平面形状の一例を示す部分拡大図。

[図8]第１間葉系幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図9]第１間葉系幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図10]幹細胞分離工程の一例を示す説明図。

[図11]幹細胞第２抽出工程の一例を示す説明図。

[図12]幹細胞第３観察工程の一例を示す説明図。

[図13]第２扁平培養容器の側面図。

[図14]第２間葉系幹細胞の平面形状の一例を示す部分拡大図。

[図15]第２間葉系幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図16]第２間葉系幹細胞の平面形状の他の一例を示す部分拡大図。

[図17]抽出された培養生成液および第２間葉系幹細胞の保存の一例を示す図。

[図18]幹細胞第５観察工程の一例を示す説明図。

[図19]第３扁平培養容器の側面図。

発明を実施するための形態

[0034] 一例として示す培養生成液製造システム１０の概略構成図である図１等の添付の図面を参照し、本発明にかかる培養生成液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、骨髄液分離工程の一例を示す説明図であり、図３は、図２から続く骨髄液分離工程の説明図である。図４は、図３から続く骨髄液分離工程の説明図である。

[0035] 培養生成液製造方法は、骨髄液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（単一種幹細胞）を培養しつつ、単一種の間葉系幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液を製造する。培養生成液製造方法は、複数のドナー（人）から採取した骨髄液（原料骨髄液）を原料とし、培養生成液製造システム１０を利用して骨髄液分離工程、骨髄液抽出工程、幹細胞第１定着工程、幹細胞第１培養工程、幹細胞第１採取工程、幹細胞分離工程、幹細胞第２採取工程、幹細胞第２定着工程、幹細胞第２培養工程、培養生成液第１抽出工程を経ることによって製造される。さらに、培養生成液製造システム１０を利用して幹細胞第２採取工程、幹

細胞第３定着工程、幹細胞第３培養工程、培養生成液第２抽出工程を経ることによって製造される。

[0036] 幹細胞第１定着工程には、幹細胞第１観察工程が含まれ、幹細胞第２採取工程には、幹細胞第２観察工程が含まれる。幹細胞第２定着工程には、幹細胞第３観察工程が含まれ、培養生成液第１抽出工程には、幹細胞第４観察工程が含まれる。幹細胞第３定着工程には、幹細胞第５観察工程が含まれ、培養生成液第２抽出工程には、幹細胞第６観察工程が含まれる。

[0037] 培養生成液製造システム１０は、コンピュータ１１とバーコードリーダ１２と電子顕微鏡１３と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。コンピュータ１１には、キーボード１４やマウス１５等の入力装置、ディスプレイ１６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。

[0038] 培養生成液製造システム１０では、ドナーデータ（ドナー特定情報）がＱＲコード（登録商標）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る。システム１０では、二次元コードとしてＱＲコードを使用しているが、ＱＲコードの他に、マトリックス式のＳＰコード、ベリコード（VeriCode）、マキシコード（MaxiCode）、ＣＰコード、DataMatrix、Code１、AztecCode、インタクタコード、カードｅを使用することができる。なお、システム１０で使用する二次元コードには、今後開発されるすべてのそれが含まれる。

[0039] 骨髄液分離工程では、ドナーから採取した骨髄液１８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）の骨髄液１８が採取される。骨髄液１８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、骨髄液１８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、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をコンピュータ１１に入力する。

[0040] コンピュータ１１は、ドナーデータが入力される度毎（ドナーから骨髄液１８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を生成し、ドナーデータをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（ドナーデータ記憶工程）。コンピュータ１１は、入力されたドナーデータを二次元コードライター機能によってＱＲコード（二次元コード）に変換し（二次元コード（ＱＲコード）変換手段）、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を出力するとともに（二次元コード（ＱＲコード）出力工程）、そのＱＲコードを各ドナーを特定するドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（二次元コード（ＱＲコード）記憶工程）。なお、２番目のドナーデータが入力された場合、ＱＲコードが印字された第２コード用紙を出力し、３番目のドナーデータが入力された場合、ＱＲコードが印字された第３コード用紙を出力するように、異なるドナーに応じて第１～第ｎコード用紙が出力される。

[0041] なお、ＮＯ１が印字された第１コード用紙１７に印字されたＱＲコードには、骨髄液分離工程、骨髄液抽出工程、幹細胞第１観察工程、幹細胞第１定着工程、幹細胞第１培養工程、幹細胞第２観察工程、幹細胞第１採取工程、幹細胞分離工程、幹細胞第２採取工程、幹細胞第３観察工程、幹細胞第２定着工程、幹細胞第２培養工程、幹細胞第４観察工程、培養生成液第１抽出工程、幹細胞第２採取工程、幹細胞第３定着工程、幹細胞第３培養工程、培養生成液第２抽出工程、幹細胞第２採取工程、幹細胞第５観察工程、幹細胞第３定着工程、幹細胞第３培養工程、幹細胞第６観察工程、培養生成液第２抽出工程を示す番号１が格納されている。コンピュータ１１は、骨髄液分離工程から培養生成液第１抽出工程の各工程を実施する度毎に、記憶領域に格納したドナーデータとバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコード

が示すドナーデータとを比較する。

[0042] ドナーから採取された２～３ｃｃの骨髄液１８は、図２に示すように、上下方向へ延びるガラス試験管１９（分離容器）内に注入（収容）される。なお、２～３ｃｃの骨髄液１８には、０．５～１ｍｌ（約５×１０^{7}（ｃｅｌｌｓ／ｍｌ））の複数種類の間葉系幹細胞が含まれる。骨髄液１８を注入するガラス試験管１９の外周面には、第１コード用紙１７が貼付されている。骨髄液１８を注入したガラス試験管１９は、図３に示すように、試験管立て２０にセットされ、試験管立て２０とともに恒温槽２１内に収容される。

[0043] 医師や看護師、研究者等の担当者は、ガラス試験管１９の外周面にＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を貼付した後、ガラス試験管１９のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。バーコードリーダ１２は、インターフェイス（有線または無線）を介してコンピュータ１１に接続されている。バーコードリーダ１２は、読み取ったＱＲコードをコンピュータ１１に送信する。

[0044] コンピュータ１１は、バーコードリーダ１２から送信されたＱＲコードが示す番号１およびドナーデータを記憶領域から抽出してキャッシュメモリに読み出すとともに、工程第１表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第１表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、骨髄液分離ボタン、骨髄液抽出ボタン、幹細胞第１観察ボタン、幹細胞第２観察ボタン、幹細胞第１採取ボタン、ログアウトボタンが表示される。ログアウトボタンをクリックすると、コンピュータ１１においてシステム１０が停止する。

[0045] 担当者は、ディスプレイ１６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１９に骨髄液１８を注入し、骨髄液１８を注入したガラス試験管１９を試験管立て２０に挿入（セット）する。担当者は、図３に示すように、試験管立て２０を恒温槽２１内に収容し、骨髄液１８を注入したガラス試験管１９を恒温槽２１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２１内の温度は、体温

と略同一の約３６～３７℃に保持されている。コンピュータ１１は、第１コード用紙１７に印字されたＱＲコードが示す番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、骨髄液分離実施中メッセージ、骨髄液分離終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。

[0046] ガラス試験管１９を恒温槽２１に所定時間（約２時間）静的に放置することで、図４に示すように、試験管２０に注入された骨髄液１８が試験管２０内において上下方向へ何層かの層状に分離される（骨髄液分離工程）。幹細胞の培養には通常１５０～２００ｃｃ（１５０～２００ｍｌ）の骨髄液が必要とされているが、培養生成液製造方法は、ドナーから採取された２～３ｃｃの少量の骨髄液１８から単一種幹細胞が作られるから、ドナーから２～３ｃｃの少量の骨髄液１８を採取すればよく、骨髄液１８の採取時にドナーにかかる負担を最小限にすることができる。

[0047] 骨髄液１８を層状に分離させた骨髄液分離工程の後、骨髄液抽出工程が行われる。骨髄液抽出工程では、層状に分離した骨髄液１８から中間層骨髄液２２が抽出される。担当者は、骨髄液１８が層状に分離したことを確認した後、ディスプレイ１６に表示された骨髄液分離終了ボタンをクリックする。骨髄液分離終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第２表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第２表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、骨髄液分離終了メッセージ、骨髄液抽出ボタン、幹細胞第１観察ボタン、幹細胞第２観察ボタン、幹細胞第１採取ボタンが表示される。

[0048] 担当者は、工程第２表示画面の骨髄液抽出ボタンをクリックし、ガラス試験管１９のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、骨髄液分離

終了メッセージ、骨髄液抽出実施中メッセージ、骨髄液抽出終了ボタンをディスプレイに表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0049] 担当者は、恒温槽２１内から試験管立て２０を取り出し、試験管立て２０からガラス試験管１９を引き抜き、層状に分離した骨髄液１８の特定の層に存在する中間層骨髄液２２を抽出する（骨髄液抽出工程）。担当者は、注射器（図示せず）を利用して層状に分離した骨髄液１８のうちの中間層に位置する２～４ｍｍの層厚みの中間層骨髄液２２を抽出（吸引）する。または、ピペット（図示せず）を利用して層状に分離した骨髄液１８のうちの中間層に位置する２～４ｍｍの層厚みの中間層骨髄液２２を抽出（吸引）する。

[0050] 培養生成液製造方法では、多種雑多な間葉系幹細胞を含む骨髄液１８を上下方向へ層状に分離させた後、注射器またはピペットを利用することで、骨髄液１８から特定の中間層骨髄液２２を確実に抽出することができ、骨髄液１８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。

[0051] 図５は、幹細胞第１観察工程の一例を示す説明図であり、図６は、第１扁平培養容器の側面図である。図７は、第１間葉系幹細胞２６の平面形状の一例を示す部分拡大図であり、図８は、第１間葉系幹細胞２６の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図７，８は、電子顕微鏡１３によって撮影された第１間葉系幹細胞２６の平面形状の拡大画像を示す。

[0052] 骨髄液１８から中間層に位置する特定の中間層骨髄液２２を抽出した骨髄液抽出工程の後、幹細胞第１観察工程が行われる。幹細胞第１観察工程では、中間層骨髄液２２および培養液２３を第１扁平培養容器２４（第１培養容器）に注入（収容）し、培養容器２４内を体温と略同一の温度（約３６～３７℃）に保持しつつ、培養容器２４が１２～２４時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）される。

[0053] 医師や看護師、研究者等の担当者は、骨髄液１８から特定の中間層骨髄液２２を抽出した後、ディスプレイ１６に表示された骨髄液抽出終了ボタンを

クリックする。骨髄液抽出終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第３表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第３表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、骨髄液分離終了メッセージ、骨髄液抽出終了メッセージ、幹細胞第１観察ボタン、幹細胞第２観察ボタン、幹細胞第１採取ボタンが表示される。

[0054] 担当者は、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を第１扁平培養容器２４の底面２７（底壁外面）に貼付する。次に、工程第３表示画面の幹細胞第１観察ボタンをクリックし、培養容器２４のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、骨髄液分離終了メッセージ、骨髄液抽出終了メッセージ、幹細胞第１観察実施中メッセージ、幹細胞第１観察終了ボタンをディスプレイに表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0055] 担当者は、注射器またはピペットに吸引された中間層骨髄液２２を培養容器２４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液２３を培養容器２４に注入（収容）する。第１扁平培養容器２４（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２７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２４は、頂部４０および底部３８と、頂部４０に形成された注入口４１とを有する。注入口４１は、蓋４２によって水密に閉塞されている。第１扁平培養容器２４として小容量かつ所定面積の底面２７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。幹細胞第１観察手段で使用される第１扁平培養容器２４は、その容量が約２０～３０ｃ

ｃ（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２４は、その一辺の長さが５～６ｍｍである。

[0056] 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。培養容器２４に注入された中間層骨髄液２２に含まれる第１間葉系幹細胞２６は、時間の経過とともに培養容器２４の底面２７に定着しつつ、培養液２３によって培養され、培養容器２４の底面２７において次第に増殖（分化）してコロニーを形成する。

[0057] なお、培養液には、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。

[0058] 担当者は、中間層骨髄液２２および培養液２３を第１扁平培養容器２４に注入した後、培養容器２４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３６の上面３７と第１扁平培養容器２４の底部３８との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２４の底部３８をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２４の底部３８が上となり培養容器２４の頂部４０（注入口４１）が下となるように、培養容器２４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３６の上面３７と第１扁平培養容器２４の頂部４０との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２４の頂部４０をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２４の頂部４０が上となり培養容器２４の底部３８が下となるように、培養容器２４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３６の上面３７に対する第１扁平培養容器２４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。

[0059] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３６の上面３７に対して第１扁平培養容器２４を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２４内において中間骨髄液２２および培養液２３が培養容器２４の頂部４０の側（または底部３８の側）に偏り、培養容器２４の頂部４９の側（または底部３８の側）において中間骨髄液２２と培養液２３との水圧が大きくなって第１間葉系幹細胞２６が培養容器２４の底部３８の側に集中し、それによって第１間葉系幹細胞２６どうしの活性が高まり、培養容器２４の底面２７において第１間葉系幹細胞２６を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0060] 電子顕微鏡１３は、インターフェイス（有線または無線）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。電子顕微鏡１３は、培養容器２４に注入された中間層骨髄液２２に含まれる第１間葉系幹細胞２６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２６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。

[0061] コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された第１間葉系幹細胞２６の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（幹細胞画像第１記憶工程）。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞２８の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１６に表示する。担当者は、ディスプレイ１６に表示された幹細胞２６の平面形状の拡大画像を１２～２４時間の間において約１～２時間間隔で確認（視認）し、中間層骨髄液２２に含まれる幹細胞２６の平面形状の変化を観察する（幹細胞第１観察工程）。なお、担当者が電子顕

微鏡１３の観察窓から第１間葉系幹細胞２６の平面形状の変化を１２～２４時間の間において約１～２時間間隔で直接観察してもよい。

[0062] 培養生成液製造方法では、中間層骨髄液に含まれる第１間葉系幹細胞２６培養しつつ第１間葉系幹細胞２６を第１扁平培養容器２４（第１培養容器）の底面２７に定着させる（幹細胞第１定着工程）。第１間葉系幹細胞２６の初期平面形状は略円形であり、幹細胞２６の平面形状が略円形の場合、幹細胞２６が培養容器２４の底面２７（底壁内面）に定着しておらず、幹細胞２６が増殖（分化）を開始していない。第１間葉系幹細胞２６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２６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２６が培養容器２４の底面２７（底壁内面）に定着し、幹細胞２６が増殖（分化）を開始している。

[0063] 担当者は、幹細胞第１観察工程における観察の結果、図６に示すように、ディスプレイ１６に表示された第１間葉系幹細胞２６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２６が培養容器２４の底面２７（底壁内面）に定着していないと判断し、幹細胞２６の平面形状の変化を約１～２時間間隔で継続して観察する。担当者は、幹細胞第１観察工程における観察の結果、図７に示すように、ディスプレイ１６に表示された第１間葉系幹細胞２６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２６が培養容器２４の底面２７に定着したと判断する。

[0064] 第１間葉系幹細胞２６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２６が容器の底面に定着し難くなるとともに幹細胞２６の増殖が遅くなるが、培養生成液製造方法は、前記容量かつ前記底面面積の第１扁平培養容器２４を使用することで、幹細胞２６を培養容器２４の底面２７に容易に定着させることができ、培養容器２４において幹細胞２６を素早く増殖させることができる。

[0065] 培養生成液製造方法は、培養容器２４を体温と略同一の温度で１２～２４時間静的放置しつつ、１２～２４時間の間において約１～２時間間隔で培養容器２４内の第１間葉系幹細胞２６の初期平面形状からの変形を観察するか

ら、幹細胞２６の変形を見逃すことはなく、幹細胞２６の培養容器２４の底面２７に対する定着を正確に確認することができる。

[0066] 図９は、第１間葉系幹細胞２６の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図９は、電子顕微鏡１３によって撮影された第１間葉系幹細胞２６の平面形状の拡大画像を示す。幹細胞第１観察工程における観察の結果、第１間葉系幹細胞２６（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２６の第１扁平培養容器２４（第１培養容器）の底面２７への定着を確認した幹細胞第１定着工程の後、幹細胞第１培養工程および幹細胞第２観察工程が行われる。

[0067] 幹細胞第１培養工程および幹細胞第２観察工程では、培養容器２４内に注入されている培養液２３が培養容器２４から排出（廃棄）され、培養容器２４内にあらたな培養液２３が注入（収容）される。次に、培養容器２４が体温と略同一の温度（約３６～３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）され、培養容器２４の底面面積に対する第１間葉系幹細胞２６の総平面面積が第１目標割合に達するまで幹細胞２６が培養される（幹細胞第１培養工程）。

[0068] ３６～４８時間の放置時間において約１～２時間間隔で培養容器２４の底面２７に定着した第１間葉系幹細胞２６の培養容器２４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２６の総平面面積が培養容器２４の底面面積に対して第１目標割合に達したか否かが判断される。培養容器２４の底面面積に対する第１間葉系幹細胞２６の総平面面積の第１目標割合は、７０～８０％（７０～８０％コンフルエント）である。

[0069] 医師や看護師、研究者等の担当者は、中間層骨髄液２２に含まれる第１間葉系幹細胞２６の培養容器２４の底面２７に対する定着を確認した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第１観察終了ボタンをクリックする。幹細胞第１観察終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第４表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第４表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、骨髄液分離終了メッセ

ージ、骨髄液抽出終了メッセージ、幹細胞第１観察終了メッセージ、幹細胞第２観察ボタン、幹細胞第１採取ボタンが表示される。

[0070] 担当者は、工程第４表示画面の幹細胞第２観察ボタンをクリックし、培養容器２４を電子顕微鏡１６の試料ホルダから取り外すとともに、培養容器２４のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、骨髄液分離終了メッセージ、骨髄液抽出終了メッセージ、幹細胞第１観察終了メッセージ、幹細胞第２観察実施中メッセージ、幹細胞第２観察終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0071] 担当者は、幹細胞第１観察工程において培養容器２４に注入した培養液２３を培養容器２４から排出（廃棄）し、あらたな培養液２３を培養容器２４に注入（収容）する。あらたな培養液２３は、幹細胞第１観察工程において注入されたそれと同一である。担当者は、あらたな培養液２３を培養容器２４に注入した後、培養容器２４を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。

[0072] なお、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６の上面３７と第１扁平培養容器２４の底部３８との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２４の底部３８をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２４の底部３８が上となり培養容器２４の頂部４０（注入口４１）が下となるように、培養容器２４を所定角度に傾斜させた状態に保持する（図６参照）。また、電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６の上面３７と第１扁平培養容器２４の頂部４０との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２４の頂部４０をスペーサ

ー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２４の頂部４０が上となり培養容器２４の底部３８が下となるように、培養容器２４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３６の上面３７に対する第１扁平培養容器２４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。

[0073] 培養生成液製造方法は、第１間葉系幹細胞２６の定着を確認した後、培養容器２４の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を培養容器２４に注入することで、幹細胞２６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３６の上面３７に対して第１扁平培養容器２４を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２４内において第１間葉系幹細胞２６および培養液２３が培養容器２４の頂部４０の側（または底部３８の側）に偏り、培養容器２４の頂部４０の側（または底部３８の側）において第１間葉系幹細胞２６と培養液２３との水圧が大きくなって第１間葉系幹細胞２６が培養容器２４の底部３８の側に集中し、それによって第１間葉系幹細胞２６どうしの活性が高まり、培養容器２４の底面２７において第１間葉系幹細胞２６を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0074] 電子顕微鏡１３は、培養容器２４内の第１間葉系幹細胞２６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２６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。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞２６の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（幹細胞画像第２記憶工程）。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された幹細胞２６の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１６に表示する。

[0075] 担当者は、ディスプレイ１６に表示された第１間葉系幹細胞２６の平面形状の拡大画像を３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で確認（視認）し、培養容器２４の底面２７に定着した幹細胞２６の培養容器２４の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、幹細胞２６の総平面面積が培養容器

２４の底面面積に対して第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（幹細胞第２観察工程）。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から第１間葉系幹細胞２６の培養容器２４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２６の総平面面積が培養容器２４の底面面積に対して第１目標割合（７０～８０％コンフルエント）に達したか否かを判断してもよい。

[0076] 担当者は、幹細胞第２観察工程における観察の結果、図７に示すように、ディスプレイ１６に表示された第１間葉系幹細胞２６の培養容器２４の底面面積に対する総平面面積が第１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２６の培養容器２４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１６に表示された拡大画像の全面積に対して第１間葉系幹細胞２６の総平面面積が第１目標割合に達した場合に、幹細胞２６の培養容器２４の底面面積に対する総平面面積が第１目標割合に達したものとする。

[0077] 幹細胞第２観察工程における観察の結果、第１間葉系幹細胞２６が培養容器２４の底面２７（底壁内面）において増殖して幹細胞２６がコロニーを形成し、幹細胞２６の平面形状が拡張することで、図８に示すように、ディスプレイ１６に表示された幹細胞２６の培養容器２４の底面面積に対する総平面面積が第１目標割合（７０～８０％コンフルエント）に達した場合、培養容器２４から幹細胞２６を抽出する幹細胞第１採取工程が行われる。幹細胞第１採取工程では、第１間葉系幹細胞２６の総平面面積が第１目標割合に達した時点で、培養容器２４内において増殖（分化）した第１間葉系幹細胞２６が培養容器２４から採取される。

[0078] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第１間葉系幹細胞２６の培養容器２４の底面面積に対する総平面面積が第１目標割合に達したことを確認した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第２観察終了ボタンをクリックする。幹細胞第２観察終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第５表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第５表示画

面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、骨髄液分離終了メッセージ、骨髄液抽出終了メッセージ、幹細胞第１観察終了メッセージ、幹細胞第２観察終了メッセージ、幹細胞第１採取ボタンが表示される。

[0079] 担当者は、工程第５表示画面の幹細胞第１採取ボタンをクリックし、培養容器２４のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、骨髄液分離終了メッセージ、骨髄液抽出終了メッセージ、幹細胞第１観察終了メッセージ、幹細胞第２観察終了メッセージ、幹細胞第１採取実施中メッセージ、幹細胞第１採取終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0080] 担当者は、培養容器２４に注入されている幹細胞第２観察時の培養液２３を注射器またはピペットを利用して培養容器２４から排出（廃棄）し、培養容器２４内をＰＢＳで洗浄した後、注射器またはピペットに吸引されたトリプシン液を培養容器２４内に注入する。培養容器２４にトリプシン液を注入すると、培養容器２４の底面２７に定着した第１間葉系幹細胞２６がトリプシン液によって底面２７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２６を採取（吸引）し、幹細胞２６をピペット内に収容する（幹細胞第１採取工程）。

[0081] 培養生成液製造方法は、約１～２時間間隔で総平面面積を観察することで、第１間葉系幹細胞２６の培養容器２４の底面面積に対する総平面面積を正確に確認することができ、培養容器２４の底面面積に対して幹細胞２６の総平面面積が第１目標割合に達したことを確実に把握することができる。

[0082] 図１０は、幹細胞分離工程の一例を示す説明図である。培養容器２４から

第１間葉系幹細胞２６を採取した幹細胞第１採取工程の後、幹細胞分離工程が行われる。幹細胞分離工程では、第１採取手段によって採取された第１間葉系幹細胞２６が遠心分離器２８によって層状に遠心分離される。医師や看護師、研究者等の担当者は、第１間葉系幹細胞２６を培養容器２４からピペットに吸引した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第１採取終了ボタンをクリックする。

[0083] 幹細胞第１採取終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第６表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第６表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞分離ボタン、幹細胞第２抽出ボタン、幹細胞第３観察ボタン、幹細胞第４観察ボタン、第１抽出ボタンが表示される。担当者は、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を第１間葉系幹細胞２６を注入するガラス試験管２９の外周面に貼付する。

[0084] 次に、工程第６表示画面の幹細胞分離ボタンをクリックし、ガラス試験管２９のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞分離実施中メッセージ、幹細胞分離終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0085] 担当者は、ピペット内の第１間葉系幹細胞２６をそのガラス試験管２９に注入（収容）し、ガラス試験管２９を遠心分離器２８に設置（セット）する。担当者は、幹細胞２６を遠心分離器２８によって所定時間遠心分離した後、ガラス試験管２９を遠心分離器２８から取り出す。ガラス試験管２９内の第１間葉系幹細胞２６は、遠心分離器２８によって上下方向へ何層かの層状

に分離する（幹細胞分離工程）。

[0086] 図１１は、幹細胞第２採取工程の一例を示す説明図である。第１間葉系幹細胞２６を層状に分離させた幹細胞分離工程の後、幹細胞第２採取工程が行われる。幹細胞第２採取工程では、層状に分離した第１間葉系幹細胞２６から下層（最下層）に位置する第２間葉系幹細胞３０が採取される。医師や看護師、研究者等の担当者は、遠心分離器２８によって第１間葉系幹細胞２６を上下方向へ層状に分離させた後、ガラス試験管２９を遠心分離器２８から取り出し、ディスプレイ１６に表示された幹細胞分離終了ボタンをクリックする。

[0087] 幹細胞分離終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第７表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第７表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取ボタン、幹細胞第３観察ボタン、幹細胞第４観察ボタン、培養生成液第１抽出ボタンが表示される。

[0088] 担当者は、工程第７表示画面の幹細胞第２採取ボタンをクリックし、ガラス試験管２９のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取実施中メッセージ、幹細胞第２採取終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0089] 担当者は、ガラス試験管２９において層状に分離した第１間葉系幹細胞２６のうちの下層（最下層）に存在する第２間葉系幹細胞３０を採取する（幹細胞第２採取工程）。担当者は、注射器を利用して層状に分離した第１間葉

系幹細胞２６のうちの下層（最下層）に位置する第２間葉系幹細胞３０を採取（吸引）する。または、ピペットを利用して層状に分離した第１間葉系幹細胞２６のうちの下層（最下層）に位置する第２間葉系幹細胞３０を採取（吸引）する。

[0090] 培養生成液製造方法は、不要な幹細胞を含む第１間葉系幹細胞２６を遠心分離器２８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２６のうちの下層（最下層）に位置する第２間葉系幹細胞３０を採取することで、幹細胞２６から特定の第２間葉系幹細胞３０を確実に採取することができ、幹細胞２６から不要な間葉系幹細胞を除去することができる。

[0091] 培養生成液製造方法は、第１扁平培養容器２４（第１培養容器）の底面面積に対する第１間葉系幹細胞２６の総平面面積が８０％を超過して幹細胞２６が増殖すると、幹細胞２６の活性が次第に失われるが、培養容器２４の底面面積に対して幹細胞２６の総平面面積が７０～８０％に増殖したときに、幹細胞２６を培養容器２４から採取するから、幹細胞２６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２６を増殖させることができるとともに、幹細胞２６から活性を有する第２間葉系幹細胞３０を採取することができる。

[0092] 図１２は、第２定着手段に含まれる幹細胞第３観察工程の一例を示す説明図であり、図１３は、第２扁平培養容器の側面図である。図１４は、第２間葉系幹細胞３０の平面形状の一例を示す部分拡大図であり、図１５は、第２間葉系幹細胞３０の平面形状の他の一例を示す部分拡大図である。図１４，１５は、電子顕微鏡１３によって撮影された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像を示す。

[0093] 第１間葉系幹細胞２６から下層（最下層）に位置する特定の第２間葉系幹細胞３０を採取した幹細胞第２採取工程の後、幹細胞第３観察工程および幹細胞第２定着工程が行われる。幹細胞第３観察工程および幹細胞第２定着工程では、第２間葉系幹細胞３０および培養液２３が第２扁平培養容器２５（第２培養容器）に注入（収容）され、培養容器２５が体温と略同一の温度（

約３６～３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）される。

[0094] ３６～４８時間の放置時間において約１～２時間間隔で培養容器２５内の第２間葉系幹細胞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２５の底面２７に定着したか否かが判断される。第２間葉系幹細胞３０および培養液２３を注入する培養容器２５の底面２７（底壁外面）には、ドナーを特定するＱＲコードを印字した第１コード用紙１７が貼付されている。

[0095] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第１間葉系幹細胞２６から特定の第２間葉系幹細胞３０を採取した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第２採取終了ボタンをクリックする。幹細胞第２採取終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第８表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第８表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察ボタン、幹細胞第４観察ボタン、培養生成液第１抽出ボタンが表示される。

[0096] 担当者は、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を第２扁平培養容器２５の底面２７（底壁外面）に貼付する。次に、工程第８表示画面の幹細胞第３観察ボタンをクリックし、培養容器２５のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察実施中メッセージ、幹細胞第３観察終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレ

イ１６に表示する。

[0097] 担当者は、注射器またはピペットに吸引された第２間葉系幹細胞３０を培養容器２５に注入（収容）するとともに、培養液２３を培養容器２５に注入（収容）する。第２扁平培養容器２５（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、所定容量かつ所定面積の底面２７を有する平面形状が略四角形の扁平な容器であり、底面２７の面積が第１扁平培養容器２４（第１培養容器）の約２倍である。第２扁平培養容器２５は、頂部４３および底部４４と、頂部４３に形成された注入口４５とを有する。注入口４５は、蓋４６によって水密に閉塞されている。第２扁平培養容器２５として所定容量かつ所定面積の底面２７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。

[0098] 幹細胞第３観察工程で使用される第２扁平培養容器２５（第２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２５は、その一辺の長さが約７～８．５ｍｍである。培養液２３は、幹細胞第１観察において注入されたそれと同一である。培養容器２５に注入された第２間葉系幹細胞３０は、時間の経過とともに培養容器２５の底面２７に定着しつつ、培養液２３によって培養され、培養容器２５の底面２７において次第に増殖（分化）してコロニーを形成する。

[0099] 担当者は、第２間葉系幹細胞３０および培養液２３を第２扁平培培養容器２５に注入した後、培養容器２５を電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６に設置（セット）する。電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６の上面３７と第２扁平培養容器２５の底部４４との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２５の底部４４をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２５の底部４４が上となり培養容器２５の頂部４３（注入口４５）が下となるように、培養容器２５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３６の上面３７と第２扁平培養容器２５の頂部４３との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２５の頂部４３をスペーサー３

９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２５の頂部４３が上となり培養容器２５の底部４４が下となるように、培養容器２５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３６の上面３７に対する第２扁平培養容器２５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。

[0100] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３６の上面３７に対して第２扁平培養容器２５を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２５内において第２間葉系幹細胞３０および培養液２３が培養容器２５の頂部４３の側（または底部４４の側）に偏り、培養容器２５の頂部４３の側（または底部４４の側）において第２間葉系幹細胞３０と培養液２３との水圧が大きくなって第２間葉系幹細胞３０が培養容器２５の底部４４の側に集中し、それによって第２間葉系幹細胞３０どうしの活性が高まり、培養容器２５の底面２７において第２間葉系幹細胞３０を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0101] 電子顕微鏡１３は、培養容器２５に注入された第２間葉系幹細胞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。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（幹細胞画像第３記憶工程）。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１６に表示する。担当者は、ディスプレイ１６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（幹細胞第３観察工程）。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時間間隔で直接観察してもよい。

[0102] 第２間葉系幹細胞３０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が培養容器２５の底面２７（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。第２間葉系幹細胞３０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が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、幹細胞３０が培養容器２５の底面２７（底壁内面）に定着し、幹細胞３０が増殖（分化）を開始している。

[0103] 担当者は、幹細胞第３観察工程における観察の結果、図１２に示すように、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞３０の平面形状が略円形のまま観察される場合、幹細胞３０が培養容器２５の底面２７（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時間間隔で継続して観察する。担当者は、幹細胞第３観察手段における観察の結果、図１３に示すように、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞３０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２５の底面２７に定着したと判断する（幹細胞第２定着工程）。

[0104] 第２間葉系幹細胞３０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、培養生成液製造方法は、前記容量かつ前記底面面積の第２扁平培養容器２５を使用することで、幹細胞３０を培養容器２５の底面２７に容易に定着させることができ、培養容器２５において幹細胞３０を素早く増殖させることができる。

[0105] 培養生成液製造方法は、培養容器２５を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で培養容器２５内の第２間葉系幹細胞３０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２５の底面２７に対する定着を正確に確認することができる。

[0106] 図１６は、第２間葉系幹細胞３０の平面形状の他の一例を示す部分拡大図であり、図１７は、抽出された培養生成液３１および第２間葉系幹細胞３０の保存の一例を示す図である。図１６は、電子顕微鏡１３によって撮影された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像を示す。幹細胞第３観察工程

における観察の結果、第２間葉系幹細胞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２扁平培養容器２５（第２培養容器）の底面２７への定着を確認した幹細胞第３観察工程の後、幹細胞第２培養工程および幹細胞第４観察工程が行われる。

[0107] 幹細胞第２培養工程および幹細胞第４観察工程では、培養容器２５内に注入されている培養液２３が培養容器２５から排出（廃棄）され、培養容器２５にあらたな培養液２３が注入（収容）される。培養容器２５が体温と略同一の温度（約３６～３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）され、培養容器２５において第２間葉系幹細胞３０が培養される（幹細胞第２培養工程）。３６～４８時間の放置時間において約１～２時間間隔で培養容器２５の底面２７に定着した第２間葉系幹細胞３０の培養容器２５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３０の総平面面積が培養容器２５の底面面積に対して第２目標割合に達したか否かが判断される。培養容器２５の底面面積に対する第２間葉系幹細胞３０の総平面面積の第２目標割合は、８８～９２％（８８～９２％コンフルエント）である。

[0108] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第２間葉系幹細胞３０の培養容器２５の底面２７に対する定着を確認した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第３観察終了ボタンをクリックする。幹細胞第３観察終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第８表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第８表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察終了メッセージ、幹細胞第４観察ボタン、培養生成液第１抽出ボタンが表示される。

[0109] 担当者は、工程第８表示画面の幹細胞第４観察ボタンをクリックし、培養容器２５を電子顕微鏡１３の試料ホルダから取り外すとともに、培養容器２５のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバー

コードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダによって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察終了メッセージ、幹細胞第４観察実施中メッセージ、幹細胞第４観察終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0110] 担当者は、幹細胞第２培養工程および幹細胞第４観察工程において培養容器２５内に注入した培養液２３を培養容器２５から排出（廃棄）し、あらたな培養液２３を培養容器２５に注入（収容）する。あらたな培養液２３は、幹細胞第１観察手段において注入されたそれと同一である。担当者は、あらたな培養液２３を培養容器２５に注入した後、培養容器２５を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６の上面３７と第２扁平培養容器２５の底部４４との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２５の底部４４をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２５の底部４４が上となり培養容器２５の頂部４３（注入口４５）が下となるように、培養容器２５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３６の上面３７と第２扁平培養容器２５の頂部４３との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器２５の頂部４３をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２５の頂部４３が上となり培養容器２５の底部４４が下となるように、培養容器２５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３６の上面３７に対する第２扁平培養容器２５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。

[0111] 培養生成液製造方法は、第２間葉系幹細胞３０の定着を確認した後、培養

容器２５内の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を培養容器２５に注入することで、第２間葉系幹細胞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３６の上面３７に対して第２扁平培養容器２５を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器２５内において第２間葉系幹細胞３０および培養液２３が培養容器２５の頂部４３の側（または底部４４の側）に偏り、培養容器２５の頂部４３の側（または底部４４の側）において第２間葉系幹細胞３０と培養液２３との水圧が大きくなって第２間葉系幹細胞３０が培養容器２５の底部４４の側に集中し、それによって第２間葉系幹細胞３０どうしの活性が高まり、培養容器２５の底面２７において第２間葉系幹細胞３０を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0112] 電子顕微鏡１３は、培養容器２５内の第２間葉系幹細胞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。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（幹細胞画像第４記憶工程）。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１６に表示する。

[0113] 担当者は、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞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時間間隔で確認（視認）し、培養容器２５の底面２７に定着した幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、幹細胞３０の総平面面積が培養容器２５の底面面積に対して第２目標割合（８２～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断する（幹細胞第４観察手段）。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から第２間葉系幹細胞３０の培養容器２５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２５の底面面積に対して第２目標割合（

８８～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断してもよい。

[0114] 担当者は、幹細胞第４観察工程における観察の結果、図１３に示すように、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積が第２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２５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１６に表示された拡大画像の全面積に対して第２間葉系幹細胞３０の総平面面積が第２目標割合に達した場合に、幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積が第２目標割合に達したものとする。

[0115] 幹細胞第４観察工程における観察の結果、第２間葉系幹細胞３０が第２扁平培養容器２５（第２培養容器）の底面２７（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、図１４に示すように、ディスプレイ１６に表示された幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積が第２目標割合（８８～９２％コンフルエント）に達した場合、培養容器２５において、単一種の第２間葉系幹細胞３０が増殖しているとともに、活性を有する単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１が生成されている。

[0116] 培養生成液製造方法は、第２扁平培養容器２５（第２培養容器）の底面面積に対する第２間葉系幹細胞３０の総平面面積が９２％を超過して幹細胞３０が増殖すると、幹細胞３０の活性が次第に失われるが、培養容器２５の底面面積に対して幹細胞３０の総平面面積が８８～９２％に増殖したときに、幹細胞３０を培養容器２５から抽出するから、幹細胞３０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３０を増殖させることができる。

[0117] 幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積が第２目標割合に達した場合、培養容器２５から培養生成液３１を抽出する培養生成液第１抽出工程が行われる。培養生成液第１抽出工程では、活性を有する第２間葉系幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１が培養容器２５から抽出される。培養生成液製造方法は、約１～２時間間隔で総平面

面積を観察することで、第２間葉系幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積を正確に確認することができ、培養容器２５の底面面積に対して幹細胞３０の総平面面積が第２目標割合に達したことを確実に把握することができる。

[0118] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第２間葉系幹細胞３０の培養容器２５の底面面積に対する総平面面積が第２目標割合に達したことを確認した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第４観察終了ボタンをクリックする。幹細胞第４観察終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第９表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第９表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察終了メッセージ、幹細胞第４観察終了メッセージ、培養生成液第１抽出ボタンが表示される。

[0119] 担当者は、工程第９表示画面の培養生成液第１抽出ボタンをクリックし、培養容器２５のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察終了メッセージ、幹細胞第４観察終了メッセージ、培養生成液第１抽出終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0120] 担当者は、幹細胞第４観察工程において培養容器２５内に注入した培養液２３から変化した培養生成液３１を注射器やピペットを利用して培養容器２５から吸引し（培養生成液第１抽出工程）、培養生成液３１を保存容器３２

に注入（収容）する。保存容器３２に注入された培養生成液３１は、不要な間葉系幹細胞が除去された活性を有する特定種類の単一種の間葉系幹細胞（単一種幹細胞）から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１である。

[0121] 担当者は、培養生成液３１を保存容器３２に注入した後、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を保存容器３２の外周面に貼付する。担当者は、ディスプレイ１６に表示された第９表示画面の培養生成液第１抽出終了ボタンをクリックし、保存容器３２のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせた後、培養生成液３１を注入した保存容器３２を冷蔵庫３４に収納する。培養生成液３１は、冷蔵庫３４において約３～４℃で保存される。

[0122] ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞分離終了メッセージ、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第３観察終了メッセージ、幹細胞第４観察終了メッセージ、培養生成液抽出終了メッセージ、培養生成液製造終了ボタン、培養生成液製造継続ボタンをディスプレイ１６に表示する。培養生成液の製造を終了する場合、培養生成液製造終了ボタンをクリックする。培養生成液製造終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１においてシステム１０が停止する。

[0123] 培養生成液製造終了ボタンをクリックした場合、培養容器２５から幹細胞３０を採取する幹細胞採取工程が行われる。幹細胞採取工程では、培養容器２５内において増殖（分化）した第２間葉系幹細胞３０が培養容器２５から採取される。培養容器２５内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器２５内に注入する。培養容器２５にトリプシン液を注入すると、培養容器２５の底面２７に定着した第２間葉系幹細胞３０がトリプシン液によって底面２７から剥離し、トリプシン液の水面に浮上する。担当者は、注射器また

はピペットを利用して第２間葉系幹細胞３０を吸引し、幹細胞３０を注射器またはピペットから保存容器３３に注入（収容）する。

[0124] 保存容器３３に注入された第２間葉系幹細胞３０は、不要な間葉系幹細胞が除去された活性を有する特定種類の単一種の間葉系幹細胞（単一種幹細胞）である。担当者は、第２間葉系幹細胞３０（単一種の間葉系幹細胞）を保存容器３３に注入した後、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を保存容器３３の外周面に貼付し、第２間葉系幹細胞３０を注入した保存容器３３を冷蔵庫３４に収納する。第２間葉系幹細胞３０（単一種の間葉系幹細胞）は、冷蔵庫３４において約３～４℃で保存される。

[0125] 培養生成液製造方法は、層状に分離し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、中間層骨髄液を培養液２３とともに培養して第１間葉系幹細胞２６（第１幹細胞）を第１培養容器２４の底面２７に定着させ、幹細胞２６を培養しつつ幹細胞２６の総平面面積が第１培養容器２４の底面面積に対して第１目標割合に達した場合、培養容器２４から幹細胞２６を採取し、層状に分離させた幹細胞２６のうちの下層（最下層）に位置する第２間葉系幹細胞３０（第２幹細胞）を採取するとともに、幹細胞３０を培養液２３とともに培養して幹細胞３０を第２培養容器２５の底面２７に定着させ、培養容器２５内にあらたな培養液２３を注入し、幹細胞３０を培養しつつ幹細胞３０の総平面面積が培養容器２５の底面面積に対して第２目標割合に達した場合、幹細胞３０の培養過程において増殖した単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１を培養容器２５から抽出するから、培養された活性を有する単一種の第２幹細胞３０を利用することで、多種雑多な幹細胞から分泌された多種多様な代謝物質が含まれることはなく、活性を有する単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質のみを含み、所定の疾患やスキンケア、ヘアケア、ボディケア等の所定の美容に対して唯一特定の効果を発揮する培養生成液３１を製造することができ、所定の疾患の治療に有効に使用することが可能な培養生成液３１を製造することができるとともに、所定の美容に有効に使用することが可能な培養生成液

３１を製造することができる。

[0126] 培養生成液製造方法は、不要な幹細胞が除去されたピュア（純粋）な第２間葉系幹細胞３０（第２幹細胞）を利用して培養生成液３１が作られ、その培養生成液３１に単一種の第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質のみを含ませることができるから、所定の疾患に対して高い治療効果を有し、その疾患を完治させる確立が高い培養生成液３１を作ることができ、所定の美容に対して高い効果を有する培養生成液３１を作ることができる。培養生成液製造方法によって製造された培養生成液３１は、たとえばそれを肌に塗布することで、やけどや湿疹等の肌の疾患の治療に使用することができ、それを目に点眼することで目薬として使用することができるとともに、鼻に注入することで花粉症の治療に使用することができ、それを頭皮に塗布することで頭皮の疾患の治療に使用することができる。また、それを肌荒れや吹き出物、日焼け対策として使用することができ、美白や皺の除去等の美容に使用することができる。

[0127] 図１８は、幹細胞第５観察工程の一例を示す説明図であり、図１９は、第３扁平培養容器の側面図である。培養生成液の製造を継続する場合、培養容器２５において増殖（分化）した第２間葉系幹細胞３０を培養容器２５から採取する幹細胞第２採取工程が行われる。幹細胞第２採取工程では、培養容器２５内において増殖（分化）した第２間葉系幹細胞３０が培養容器２５から採取される。

[0128] 医師や看護師、研究者等の担当者は、ディスプレイ１６に表示された培養生成液製造継続ボタンをクリックする。培養生成液製造継続ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第１０表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第１０表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞第２採取ボタン、幹細胞第５観察ボタン、幹細胞第６観察ボタン、培養生成液第２抽出ボタンが表示される。

[0129] 担当者は、工程第１０表示画面の幹細胞第２採取ボタンをクリックし、培養容器２５のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコー

ドがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞第２採取実施中メッセージ、幹細胞第２採取終了ボタン、幹細胞第５観察ボタン、幹細胞第６観察ボタン、培養生成液第２抽出ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0130] 担当者は、培養容器２５内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器２５内に注入し、トリプシン液の水面に浮上した第２間葉系幹細胞３０を注射器またはピペットを利用して採取（吸引）し、幹細胞２６を注射器内またはピペット内に収容する（幹細胞第２採取手段）。担当者は、培養容器２５から幹細胞３０を採取した後、幹細胞第２採取終了ボタンをクリックする。幹細胞第２採取終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第１１表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第１１表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第５観察ボタン、幹細胞第６観察ボタン、培養生成液第２抽出ボタンが表示される。

[0131] 培養容器２５から第２間葉系幹細胞３０を採取した幹細胞第２採取工程の後、幹細胞第５観察工程および幹細胞第３定着工程が行われる。幹細胞第５観察工程および幹細胞第３定着工程では、第２間葉系幹細胞３０および培養液２３が第３扁平培養容器３５（第３培養容器）に注入（収容）され、培養容器３５が体温と略同一の温度（約３６～３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）される。

[0132] ３６～４８時間の放置時間において約１～２時間間隔で培養容器３５内の第２間葉系幹細胞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３５の底面２７に定着したか否かを

判断する。第２間葉系幹細胞３０および培養液２３を注入する培養容器３５の底面２７（底壁外面）には、ドナーを特定するＱＲコードを印字した第１コード用紙１７が貼付されている。

[0133] 医師や看護師、研究者等の担当者は、培養容器２５から第２間葉系幹細胞３０を採取した後、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を第３扁平培養容器３５の底面２７（底壁外面）に貼付する。次に、工程第１１表示画面の幹細胞第５観察ボタンをクリックし、培養容器２５のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第５観察実施中メッセージ、幹細胞第５観察終了ボタン、幹細胞第６観察ボタン、培養生成液第２抽出ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0134] 担当者は、注射器またはピペットに吸引された第２間葉系幹細胞３０を培養容器３５に注入（収容）するとともに、培養液２３を培養容器３５に注入（収容）する。第３扁平培養容器３５（第３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、所定容量かつ所定面積の底面２７を有する平面形状が略四角形の扁平な容器であり、底面２７の面積が第２扁平培養容器２５（第２培養容器）よりも大きい。第３扁平培養容器３５は、頂部４７および底部４８と、頂部４７に形成された注入口４９とを有する。注入口４９は、蓋５０によって水密に閉塞されている。第３扁平培養容器３５として所定容量かつ所定面積の底面２７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。

[0135] 幹細胞第５観察工程で使用される第３扁平培養容器３５（第３培養容器）

は、その容量が約７０～８０ｃｃ（好ましくは、７５ｃｃ）であり、その底面面積が約７５～１０８ｍｍ^{2}である。第３扁平培養容器は、その一辺の長さが約８．７～１０．４ｍｍである。培養液２３は、幹細胞第１観察において注入されたそれと同一である。培養容器３５に注入された第２間葉系幹細胞３０は、時間の経過とともに培養容器３５の底面２７に定着しつつ、培養液２３によって培養され、培養容器３５の底面２７において次第に増殖（分化）してコロニーを形成する。

[0136] 担当者は、第２間葉系幹細胞３０および培養液２３を培養容器３５に注入した後、培養容器３５を電子顕微鏡１３の試料ホルダに設置（セット）する。電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６の上面３７と第３扁平培養容器３５の底部４８との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器３５の底部４８をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２５の底部４８が上となり培養容器２５の頂部４７（注入口４９）が下となるように、培養容器３５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３６の上面３７と第３扁平培養容器３５の頂部４８との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器３５の頂部４７をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器３５の頂部４７が上となり培養容器３５の底部４９が下となるように、培養容器３５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３６の上面３７に対する第３扁平培養容器３５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。

[0137] 培養生成液製造方法は、試料ホルダ３６の上面３７に対して第３扁平培養容器３５を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器３５内において第２間葉系幹細胞３０および培養液２３が培養容器３５の頂部４７の側（または底部４８の側）に偏り、培養容器３５の頂部４７の側（または底部４８の側）において第２間葉系幹細胞３０と培養液２３との水圧が大きくなって第２間葉系幹細胞３０が培養容器３５の底部４８の側に集中し、それによって第２間葉系幹細胞３０どうしの活性が高まり、培養容器３５の底面２７におい

て第２間葉系幹細胞３０を容易かつ迅速に定着させることができる。

[0138] 電子顕微鏡１３は、培養容器３５に注入された第２間葉系幹細胞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。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（幹細胞画像第５記憶工程）。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１６に表示する。担当者は、ディスプレイ１６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（幹細胞第５観察工程）。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時間間隔で直接観察してもよい。

[0139] 第２間葉系幹細胞３０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が培養容器３５の底面２７（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。第２間葉系幹細胞３０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が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、幹細胞３０が培養容器３５の底面２７（底壁内面）に定着し、幹細胞３０が増殖（分化）を開始している。

[0140] 担当者は、幹細胞第５観察工程における観察の結果、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞３０の平面形状が略円形のまま観察される場合（図１２援用）、幹細胞３０が培養容器３５の底面２７（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時間間隔で継続して観察する。担当者は、幹細胞第３観察手段における観察の結果、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞３０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（図１３援用）、幹細胞３０が培養容器３５の底面２７に定着したと判断する（幹細胞第３定着工程）

。

[0141] 第２間葉系幹細胞３０の定着時に容量が８０ｃｃを超過するとともに底面面積が１０８ｍｍ^{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、培養生成液製造方法は、前記容量かつ前記底面面積の第３扁平培養容器３５を使用することで、幹細胞３０を培養容器３５の底面２７に容易に定着させることができ、培養容器３５において幹細胞３０を素早く増殖させることができる。

[0142] 培養生成液製造方法は、培養容器３５を体温と略同一の温度で３６～４８時間静的放置しつつ、３６～４８時間の間において約１～２時間間隔で培養容器３５内の第２間葉系幹細胞３０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３５の底面２７に対する定着を正確に確認することができる。

[0143] 幹細胞第５観察工程における観察の結果、第２間葉系幹細胞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３扁平培養容器３５（第３培養容器）の底面２７への定着を確認した幹細胞第３定着工程の後、幹細胞第３培養工程および幹細胞第６観察工程が行われる。

[0144] 幹細胞第３培養工程および幹細胞第６観察工程では、培養容器３５内に注入されている培養液２３が培養容器３５から排出（廃棄）され、培養容器３５にあらたな培養液２３が注入（収容）される。培養容器３５が体温と略同一の温度（約３６～３７℃）で３６～４８時間静的に放置（動かすことなく静かに放置）され、培養容器３５において第２間葉系幹細胞３０が培養される（幹細胞第３培養工程）。３６～４８時間の放置時間において約１～２時間間隔で培養容器３５の底面２７に定着した第２間葉系幹細胞３０の培養容器３５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３０の総平面面積が培養容器３５の底面面積に対して第３目標割合に達したか否かが判断される。培養容器３５の底面面積に対する第２間葉系幹細胞３０

の総平面面積の第３目標割合は、８８～９２％（８８～９２％コンフルエント）である。

[0145] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第２間葉系幹細胞３０の培養容器３５の底面２７に対する定着を確認した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第５観察終了ボタンをクリックする。幹細胞第５観察終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第１２表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第１２表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第５観察終了メッセージ、幹細胞第６観察ボタン、培養生成液第２抽出ボタンが表示される。

[0146] 担当者は、工程第１２表示画面の幹細胞第６観察ボタンをクリックし、培養容器３５を電子顕微鏡１３の試料ホルダから取り外すとともに、培養容器３５のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせる。ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダによって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第５観察終了メッセージ、幹細胞第６観察実施中メッセージ、幹細胞第６観察終了ボタン、培養生成液第２抽出ボタンをディスプレイ１６に表示する。それらドナーデータが不一致の場合、コンピュータ１１は、エラーメッセージおよび培養中止メッセージをディスプレイ１６に表示する。

[0147] 担当者は、幹細胞第５観察工程において培養容器３５内に注入した培養液２３を培養容器３５から排出（廃棄）し、あらたな培養液２３を培養容器３５に注入（収容）する。あらたな培養液２３は、幹細胞第１観察手段において注入されたそれと同一である。担当者は、あらたな培養液２３を培養容器３５に注入した後、培養容器３５を電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６に設置

（セット）する。

[0148] 電子顕微鏡１３の試料ホルダ３６の上面３７と第３扁平培養容器３５の底部４８との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器３５の底部４８をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器２５の底部４８が上となり培養容器２５の頂部４７（注入口４９）が下となるように、培養容器３５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３６の上面３７と第３扁平培養容器３５の頂部４８との間にスペーサー３９を介在させ、培養容器３５の頂部４７をスペーサー３９によって持ち上げた状態に保持し、培養容器３５の頂部４７が上となり培養容器３５の底部４９が下となるように、培養容器３５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３６の上面３７に対する第３扁平培養容器３５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。

[0149] 培養生成液製造方法は、第２間葉系幹細胞３０の定着を確認した後、培養容器３５内の培養液２３を排出しつつあらたな培養液２３を培養容器３５に注入することで、第２間葉系幹細胞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３６の上面３７に対して第３扁平培養容器３５を前記傾斜角度で傾斜させることで、培養容器３５内において第２間葉系幹細胞３０および培養液２３が培養容器３５の頂部４７の側（または底部４８の側）に偏り、培養容器３５の頂部４７の側（または底部４８の側）において第２間葉系幹細胞３０と培養液２３との水圧が大きくなって第２間葉系幹細胞３０が培養容器３５の底部４８の側に集中し、それによって第２間葉系幹細胞３０どうしの活性が高まり、培養容器３５の底面２７において第２間葉系幹細胞３０を容易かつ迅速に増殖（分化）させることができる。

[0150] 電子顕微鏡１３は、培養容器３５内の第２間葉系幹細胞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。コンピュータ１

１は、電子顕微鏡１３から送信された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをドナー識別子に関連付けた状態で記憶領域に格納（記憶）する（幹細胞画像第６記憶工程）。コンピュータ１１は、電子顕微鏡１３から送信された第２間葉系幹細胞３０の平面形状の拡大画像と撮影時間とをディスプレイ１６に表示する。

[0151] 担当者は、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞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時間間隔で確認（視認）し、培養容器３５の底面２７に定着した幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積を観察しつつ、幹細胞３０の総平面面積が培養容器３５の底面面積に対して第３目標割合（８２～９２％コンフルエント）に達したか否かを判断する（幹細胞第６観察工程）。なお、担当者が電子顕微鏡１３の観察窓から第２間葉系幹細胞３０の培養容器３５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３５の底面面積に対して第３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。

[0152] 担当者は、幹細胞第６観察工程における観察の結果、ディスプレイ１６に表示された第２間葉系幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積が第３目標割合（８８～９２％コンフルエント）に達していない場合（図１３援用）、幹細胞３０の培養容器３５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１６に表示された拡大画像の全面積に対して第２間葉系幹細胞３０の総平面面積が第３目標割合に達した場合に、幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積が第３目標割合に達したものとする。

[0153] 幹細胞第６観察工程における観察の結果、第２間葉系幹細胞３０が第３扁平培養容器３５（第３培養容器）の底面２７（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１６に表示された幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積が第３目標割合（８８～９２％コンフルエント）に達した場合

（図１４援用）、培養容器３５において、単一種の第２間葉系幹細胞３０が増殖しているとともに、活性を有する単一種の幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１が生成されている。

[0154] 培養生成液製造方法は、第３扁平培養容器３５（第３培養容器）の底面面積に対する第２間葉系幹細胞３０の総平面面積が９２％を超過して幹細胞３０が増殖すると、幹細胞３０の活性が次第に失われるが、培養容器３５の底面面積に対して幹細胞３０の総平面面積が８８～９２％に増殖したときに、幹細胞３０を培養容器３５から抽出するから、幹細胞３０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３０を増殖させることができる。

[0155] 幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積が第３目標割合に達した場合、培養容器３５から培養生成液３１を抽出する培養生成液第２抽出工程が行われる。培養生成液第２抽出工程では、活性を有する第２間葉系幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１を培養容器３５から抽出する。培養生成液製造方法は、約１～２時間間隔で総平面面積を観察することで、第２間葉系幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積を正確に確認することができ、培養容器３５の底面面積に対して幹細胞３０の総平面面積が第３目標割合に達したことを確実に把握することができる。

[0156] 医師や看護師、研究者等の担当者は、第２間葉系幹細胞３０の培養容器３５の底面面積に対する総平面面積が第３目標割合に達したことを確認した後、ディスプレイ１６に表示された幹細胞第６観察終了ボタンをクリックする。幹細胞第６観察終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１は、工程第１３表示画面（図示せず）をディスプレイ１６に表示する。工程第１３表示画面には、番号１およびドナーデータが表示されるとともに、幹細胞第２採取終了メッセージ、幹細胞第５観察終了メッセージ、幹細胞第６観察終了メッセージ、培養生成液第２抽出ボタンが表示される。

[0157] 担当者は、幹細胞第６観察工程において培養容器３５内に注入した培養液２３から変化した培養生成液３１を注射器やピペットを利用して培養容器３

５から吸引し（培養生成液第２抽出工程）、培養生成液３１を保存容器３２に注入（収容）する。保存容器３２に注入された培養生成液３１は、不要な間葉系幹細胞が除去された活性を有する特定種類の単一種の間葉系幹細胞（単一種幹細胞）から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１である。

[0158] 担当者は、培養生成液３１を保存容器３２に注入した後、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を保存容器３２の外周面に貼付する。担当者は、ディスプレイ１６に表示された第１３表示画面の培養生成液第２抽出終了ボタンをクリックし、保存容器３２のＱＲコードをバーコードリーダ１２に読み取らせた後、培養生成液３１を注入した保存容器３２を冷蔵庫３４に収納する。培養生成液３１は、冷蔵庫３４において約３～４℃で保存される。

[0159] ＱＲコードがバーコードリーダ１２からコンピュータ１１に送信されると、コンピュータ１１は、ディスプレイ１６に表示されたドナーデータ（メモリに読み出したドナーデータ）とバーコードリーダ１２によって読み取られたＱＲコードが示すドナーデータとを比較し、それらドナーデータが一致した場合、番号１およびドナーデータをディスプレイ１６に表示するとともに、培養生成液抽出終了メッセージ、培養生成液製造終了ボタンをディスプレイ１６に表示する。担当者は、培養生成液製造終了ボタンをクリックする。培養生成液製造終了ボタンをクリックすると、コンピュータ１１においてシステム１０が停止する。

[0160] 培養生成液製造終了ボタンをクリックした場合、培養容器２５から幹細胞３０を採取する幹細胞採取工程が行われる。幹細胞採取工程では、培養容器３５内において増殖（分化）した第２間葉系幹細胞３０を培養容器３５から採取する。担当者は、培養容器３５内をＰＢＳで洗浄した後、トリプシン液を培養容器３５内に注入し、トリプシン液の水面に浮上する第２間葉系幹細胞３０を注射器またはピペットを利用して吸引し、幹細胞３０を注射器またはピペットから保存容器３３に注入（収容）する。

[0161] 保存容器３３に注入された第２間葉系幹細胞３０は、不要な間葉系幹細胞

が除去された活性を有する特定種類の単一種の間葉系幹細胞（単一種幹細胞）である。担当者は、第２間葉系幹細胞３０（単一種の間葉系幹細胞）を保存容器３３に注入した後、ＱＲコードが印字された第１コード用紙１７を保存容器３３の外周面に貼付し、第２間葉系幹細胞３０を注入した保存容器３３を冷蔵庫３４に収納する。第２間葉系幹細胞３０（単一種の間葉系幹細胞）は、冷蔵庫３４において約３～４℃で保存される。

[0162] 培養生成液製造方法は、第２培養容器２５内から培養生成液３１を抽出した後に第２培養容器２５から第２幹細胞３０を採取し、幹細胞３０を培養液２３とともに培養して幹細胞３０を第２培養容器２５よりも大きい容量の第３培養容器３５の底面２７に定着させ、培養容器３５内にあらたな培養液２３を注入し、幹細胞３０を培養しつつ幹細胞３０の総平面面積が培養容器３５の底面面積に対して第３目標割合に達した場合、幹細胞３０の培養過程において増殖した活性を有する単一種の第２幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質を含む培養生成液３１を培養容器３５から抽出するから、幹細胞３０の培養過程において多種雑多な幹細胞が培養されることはなく、多種雑多な幹細胞から分泌された多種多様な代謝物質が含まれることはなく、活性を有する単一種の第２幹細胞３０から分泌された所定の代謝物質のみを含み、所定の疾患や所定の美容に対して唯一特定の効果を発揮する培養生成液３１を製造することができ、所定の疾患の治療に有効に使用することが可能な培養生成液３１を製造することができるとともに、所定の美容に有効に使用することが可能な培養生成液３１を製造することができる。

符号の説明

[0163] １０ 培養生成液製造システム

１１ コンピュータ

１２ バーコードリーダ

１３ 電子顕微鏡

１４ キーボード

１５ マウス

１６　ディスプレイ
１７　第１コード用紙
１８　原料骨髄液
１９　ガラス試験管
２０　試験管立て
２１　恒温槽
２２　中間層骨髄液
２３　培養液
２４　第１培養容器（第１扁平培養容器）
２５　第２培養容器（第２扁平培養容器）
２６　第１間葉系幹細胞（第１幹細胞）
２７　底面
２８　遠心分離器
２９　ガラス試験管
３０　第２間葉系幹細胞（第２幹細胞）
３１　培養生成液
３２　保存容器
３３　保存容器
３４　冷蔵庫
３５　第３培養容器（第３扁平培養容器）
３６　試料ホルダ
３７　上面
３８　底部
３９　スペーサー
４０　頂部
４１　注入口
４２　蓋
４３　頂部

４４　底部

４５　注入口

４６　蓋

４７　頂部

４８　底部

４９　注入口

５０　蓋

請求の範囲

[請求項1] ドナーから採取した骨髄液から作られる幹細胞を利用して培養生成液を製造する培養生成液製造方法において、

前記培養生成液製造方法が、前記ドナーから採取した骨髄液を層状に分離する骨髄液分離工程と、前記骨髄液分離工程によって層状に分離し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する骨髄液抽出工程と、前記骨髄液抽出工程によって抽出した前記中間層骨髄液と所定の培養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、前記第１培養容器を所定時間静的に放置して前記中間層骨髄液に含まれる第１幹細胞を該第１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１培養容器の底面に定着させた後、前記第１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１培養容器に注入し、前記第１培養容器を所定時間静的に放置して該第１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１目標割合に達するまで該第１幹細胞を培養する幹細胞第１培養工程と、前記幹細胞第１培養工程における前記第１幹細胞の培養過程において、前記第１幹細胞の総平面面積が前記第１目標割合に達した場合、前記第１培養容器から前記第１幹細胞を採取する幹細胞第１採取工程と、前記幹細胞第１採取工程によって採取した前記第１幹細胞を層状に遠心分離する幹細胞分離工程と、前記幹細胞分離工程によって層状に分離した前記第１幹細胞のうちの最下層に位置する第２幹細胞を採取する幹細胞第２採取工程と、前記幹細胞第２採取工程によって採取した前記第２幹細胞と所定の培養液とを前記第１培養容器よりも大きい容量かつ大きい底面面積の底面を有する第２培養容器に注入し、前記第２培養容器を所定時間静的に放置して前記第２幹細胞を該第２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２培養容器の底面に定着させた後、前記第２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２培養容器に注入し、前記第２培養容器を所定時間静的に放置して該第２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２目標割合に達するまで該第２幹細胞を培養する幹細胞第２培養工程と、前記幹細胞第２培養工程における培養過程において、前記第２幹細胞の総平面面積が前記第２目標割合に達した場合、増殖した単一種の前記第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む前記培養生成液を前記第２培養容器から抽出する培養生成液第１抽出工程とを有することを特徴とする培養生成液製造方法。

[請求項2] 前記幹細胞第１定着工程および前記幹細胞第１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所定時間静的に放置し、前記幹細胞第２定着工程および前記幹細胞第２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所定時間静的に放置する請求項１に記載の培養生成液製造方法。

[請求項3] 前記培養生成液製造方法が、前記培養生成液第１抽出工程によって前記第２培養容器内から培養生成液を抽出した後、前記第２培養容器から前記第２幹細胞を採取する幹細胞第２採取工程と、所定容量かつ所定面積の底面を有して前記第２培養容器よりも大きい容量かつ大きい底面面積の底面を有する第３培養容器に前記幹細胞第２採取工程によって採取した前記第２幹細胞とあらたな培養液とを注入し、前記第３培養容器を所定時間静的に放置して前記第２幹細胞を該第３培養容器の底面に定着させる幹細胞第３定着工程と、前記幹細胞第３定着工程によって前記第２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、前記第３培養容器を所定時間静的に放置して該第３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３目標割合に達するまで該第２幹細胞を培養する幹細胞第３培養工程と、前記幹細胞第３培養工程における培養過程において、前記第２幹細胞

の総平面面積が前記第３目標割合に達した場合、増殖した単一種の前記第２幹細胞から分泌された所定の代謝物質を含む前記培養生成液を前記第３培養容器から抽出する培養生成液第２抽出工程とを含む請求項１または請求項２に記載の培養生成液製造方法。

[請求項4] 前記幹細胞第３定着工程および前記幹細胞第３培養工程では、前記第３培養容器を所定角度に傾斜させた状態で所定時間静的に放置する請求項３に記載の培養生成液製造方法。

[請求項5] 前記骨髄液分離工程が、前記ドナーから２～３ｃｃの骨髄液を採取し、前記２～３ｃｃの骨髄液を上下方向へ延びる分離容器に注入し、前記分離容器を体温と略同一の温度で所定時間静的に放置して該骨髄液を該分離容器内において上下方向へ層状に分離させ、前記骨髄液抽出工程が、前記分離容器内において層状に分離した前記骨髄液のうちの中間層に位置する前記中間層骨髄液を抽出する請求項１ないし請求項４いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項6] 前記第１培養容器の容量が、約２０～３０ｃｃであり、前記第１幹細胞の初期平面形状が、略円形であり、前記第１幹細胞の変形後の平面形状が、前記略円形を核として該第１幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、前記幹細胞第１定着工程では、前記第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時間間隔で前記第１培養容器内の第１幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、前記第１幹細胞が初期平面形状から前記不定形の扁平形状に変形した場合、該第１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ないし請求項５いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項7] 前記幹細胞第１採取工程では、前記第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時間間隔で前記第１培養容器の底面に定着した前記第１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６いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項8] 前記第１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の第１目標割合が、７０～８０％である請求項７に記載の培養生成液製造方法。

[請求項9] 前記幹細胞分離工程が、前記第１幹細胞を分離容器に注入し、前記分離容器を遠心分離器に設置して該第１幹細胞を遠心分離させ、前記幹細胞第１採取工程が、前記分離容器内において層状に遠心分離した前記第１幹細胞のうちの最下層に位置する前記第２幹細胞を採取する請求項１ないし請求項８いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項10] 前記第２培養容器の容量が、約４０～６０ｃｃであり、前記第３培養容器の容量が、約７０～８０ｃｃであり、前記第２幹細胞の初期平面形状が、略円形であり、前記第２幹細胞の変形後の平面形状が、前記略円形を核として該第２幹細胞が一方向へ不定形に伸張した扁平形状であり、前記幹細胞第２定着工程および前記幹細胞第３定着工程では、前記第２培養容器および前記第３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時間間隔で前記第２および第３培養容器内の第２幹細胞の初期平面形状からの変形を観察し、前記第２幹細胞が初期平面形状から前記不定形の扁平形状に変形した場合、該第２幹細胞が前記第２および第３培養容器の底面に定着したと判断する請求項３ないし請求項９いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項11] 前記幹細胞第２採取工程および前記幹細胞第３採取工程では、前記第２培養容器および前記第３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時間間隔で前記第２および第３培養容器の底面に定着した前記第２幹細胞の該第２および第３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３ないし請求項１０いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項12] 前記第２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の第２目標割合が、８８～９２％であり、前記第３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の第３目標割合が、８８～９２％である請求項３ないし請求項１１いずれかに記載の培養生成液製造方法。

[請求項13] 前記第１および第２幹細胞が、間葉系幹細胞である請求項１ないし請求項１２いずれかに記載の培養生成液製造方法。