

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7593753号
(P7593753)

(45)発行日 令和6年12月3日(2024.12.3)

(24)登録日 令和6年11月25日(2024.11.25)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/02 (2006.01)	C 1 2 M	1/02	A
C 1 2 M	1/24 (2006.01)	C 1 2 M	1/24	
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	Z

請求項の数 5 (全9頁)

(21)出願番号	特願2020-119854(P2020-119854)	(73)特許権者	000224101 Z A C R O S 株式会社 東京都文京区小石川一丁目1番1号
(22)出願日	令和2年7月13日(2020.7.13)	(74)代理人	100165179 弁理士 田 崎 聡
(65)公開番号	特開2022-16884(P2022-16884A)	(74)代理人	100140774 弁理士 大浪 一徳
(43)公開日	令和4年1月25日(2022.1.25)	(74)代理人	100155066 弁理士 貞廣 知行
審査請求日	令和5年4月24日(2023.4.24)	(72)発明者	都倉 知浩 東京都新宿区西新宿一丁目2 3 番 7 号 藤森工業株式会社内
		(72)発明者	松田 博行 東京都新宿区西新宿一丁目2 3 番 7 号 藤森工業株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 振とう培養装置および振とう培養方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

培養容器の底面に湾曲面を有し、前記湾曲面の高さが、前記底面の中心部において高く、前記底面の周辺部において低くなるように前記湾曲面が形成され、前記培養容器が、可撓性の内袋と、前記湾曲面を有する湾曲部材と、前記内袋を収容する金属の外殻とを備え、前記湾曲部材が、前記外殻の底面と前記内袋との間に設置されることを特徴とする振とう培養装置。

【請求項2】

前記底面が円形であり、前記培養容器が前記底面上に円筒状の側面を有することを特徴とする請求項1に記載の振とう培養装置。

【請求項3】

前記湾曲面が前記底面の中心部の周囲で回転対称な形状であることを特徴とする請求項1または2に記載の振とう培養装置。

【請求項4】

前記内袋が、前記外殻に収容されていることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の振とう培養装置。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の振とう培養装置を用いて培養物の振とう培養を行うことを特徴とする振とう培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】**【0001】**

本発明は、振とう培養装置および振とう培養方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

微生物、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞などの培養により、医薬品、食品、化粧品やこれらの原材料などとして有用な各種物質が生産されている。

特許文献1には、可撓性を有する培養バッグを収めるハウジング部の内面で、培養バッグと当接する当接面の一部に、湾曲凸状の突起部からなるバッフルが設けられたシングルユース細胞培養装置が記載されている。

10

特許文献2には、液状の内容物を入れる円柱状の攪拌容器の内部に、水平方向に延在して設けられた突起状のバッフルを有する培養容器が記載されている。

特許文献3には、培養容器の内部底面の外形が円形であって、底面に対して同心状に設けられた凹状の環状路として、振とう培養時に培養液の流れの方向を定め得る流路が設けられた培養容器が記載されている。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0003】**

【文献】特開2017-35009号公報

【文献】特開2019-198850号公報

20

【文献】特開平9-65876号公報

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

特許文献1には、培養液の一部がバッフルに衝突することにより、旋回流の方向が転向されて上下方向の流れが生じ、培養液が均一になるように、効率的に混合することができるとの記載がある。

特許文献2には、内容物に作用するシアを抑制するために、マイルドに攪拌しても、高い攪拌効率で均一に混合することが可能になるとの記載がある。

特許文献3には、培養液中に浮遊する動物細胞は、培養液の流れに沿って定められた流れ方向に滑らかに移動するので、動物細胞同士が衝突することが大幅に減少し、動物細胞が傷つくことを抑制できるとの記載がある。

30

【0005】

再生医療に使用される幹細胞のように、大量の細胞を培養する場合、攪拌または振とうにより、細胞がシアストレスを受けることで生育阻害を及ぼす。シアストレスを低減する目的で、単に流れの速度を低下させるのでは、内容物の混合が不十分になるため生育阻害を及ぼす。

【0006】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、培養物に作用するシアストレスを低減して、生育阻害を抑制することが可能な振とう培養装置および振とう培養方法を提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】**【0007】**

前記課題を解決するため、本発明は、培養容器の底面に湾曲面を有し、前記湾曲面の高さが、前記底面の中心部において高く、前記底面の周辺部において低くなるように前記湾曲面が形成されていることを特徴とする振とう培養装置を提供する。

【0008】

前記底面が円形であり、前記培養容器が前記底面上に円筒状の側面を有してもよい。

前記湾曲面が前記底面の中心部の周囲で回転対称な形状であってもよい。

前記培養容器が、前記湾曲面を有する外殻と、前記外殻に収容された可撓性の内袋とを

50

備えてもよい。

前記培養容器が、可撓性の内袋と、前記湾曲面を有する湾曲部材と、前記内袋を収容する外殻とを備え、前記湾曲部材が、前記外殻の底面と前記内袋との間に設置されてもよい。

【0009】

また、本発明は、前記振とう培養装置を用いて培養物の振とう培養を行うことを特徴とする振とう培養方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、培養容器の底面に形成された湾曲面の高さが、底面の中心部において高く、底面の周辺部において低くなっているため、振とうの動力が作用しにくい底面の中心部における培養液の深さが浅く、振とうの動力が作用しやすい底面の周辺部における培養液の深さが深くなる。これにより、底面の中心部と周辺部との間の速度勾配を減少させ、より小さい動力で振とうさせて、シアストレスを低減することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】第1実施形態の振とう培養装置における培養容器の外観を示した斜視図である。

【図2】第2実施形態の振とう培養装置における培養容器の内部を示した断面図である。

【図3】第3実施形態の振とう培養装置における培養容器の内部を示した断面図である。

【図4】第4実施形態の振とう培養装置における培養容器の内部を示した断面図である。

【発明を実施するための形態】

20

【0012】

以下、好適な実施形態に基づき、図面を参照して本発明を説明する。

【0013】

図1に、第1実施形態の振とう培養装置における培養容器の外観を示す。この培養容器10は円柱状であり、底面13に湾曲面14を有する。湾曲面14の高さは、底面13の中心部において高く、底面13の周辺部において低くなっている。培養容器10の底面13は円形である。さらに培養容器10は、底面13上に円筒状の側面11を有する。側面11の上部において、培養容器10の上面12は閉鎖されていてもよく、上面12が開放されていてもよい。

【0014】

30

培養容器10を備える振とう培養装置を用いて培養物の振とう培養を行う場合、静置状態において、培養液等の液体Lの液面Sが湾曲面14の上方にある。液面S上には、気体Gが存在している。培養容器10によれば、振とうの動力が作用しにくい底面13の中心部における液体Lの深さD1が浅く、振とうの動力が作用しやすい底面13の周辺部における液体Lの深さD2が深くなる。これにより、底面13の中心部と周辺部との間の速度勾配を減少させ、より小さい動力で振とうさせて、シアストレスを低減することができる。液体Lは、例えば水を主成分としてもよい。

【0015】

湾曲面14を設けずに、底面13が平坦な場合、底面13の中心部では、振とうの動力が作用しにくいいため、液体Lの流速が小さくなりやすい。また、底面13の周辺部では、振とうの動力が作用しやすいため、液体Lの流速が大きくなりやすい。湾曲面14を設けた場合は、底面13の中心部では、液体Lの深さD1が浅いため、より小さい動力で振とうさせても、適度な流速を得ることができる。このため、底面13の周辺部の速度は、従来に比べて流速が低くなる傾向になり、径方向の速度勾配が減少し、よりマイルドな攪拌が可能になる。これにより、培養物の分布が底面13の中心部から周辺部まで広く分散しても、内容液である液体Lの混合を促進して、生育阻害を抑制することができる。

40

【0016】

図2に、第2実施形態の振とう培養装置における培養容器10Aの内部を示す。この培養容器10Aは、円筒状の側面11と、円形の上面12と、外周が円形の底面13とを有する。底面13と一体に湾曲面14が形成されている。第1実施形態の培養容器10と同

50

様に、培養容器 10A の底面 13 の中心部における液体 L の深さ D1 は浅く、底面 13 の周辺部における液体 L の深さ D2 は深くなっている。これにより、底面 13 の中心部と周辺部との間の速度勾配を減少させ、より小さい動力で振とうさせて、シアストレスを低減することができる。

【0017】

図 3 に、第 3 実施形態の振とう培養装置における培養容器 10B の内部を示す。この培養容器 10B は、湾曲面 14 を有する外殻 15 と、外殻 15 に收容された可撓性の内袋 16 とを備えている。外殻 15 は、円筒状の側面 11 と、円形の上面 12 と、外周が円形の底面 13 と、湾曲面 14 とを有する。第 1 実施形態の培養容器 10 と同様に、培養容器 10B の底面 13 の中心部における液体 L の深さ D1 は浅く、底面 13 の周辺部における液体 L の深さ D2 は深くなっている。これにより、底面 13 の中心部と周辺部との間の速度勾配を減少させ、より小さい動力で振とうさせて、シアストレスを低減することができる。

10

【0018】

図 4 に、第 4 実施形態の振とう培養装置における培養容器 10C の内部を示す。この培養容器 10C は、可撓性の内袋 16 と、湾曲面 14 を有する湾曲部材 17 と、内袋 16 を收容する外殻 18 とを備えている。外殻 18 は、円筒状の側面 11 と、円形の上面 12 と、円形の底面 13 とを有する。湾曲部材 17 は、外殻 18 の底面 13 と内袋 16 との間に設置されている。外殻 18 は底面 13 に湾曲面 14 を有しないことから、底面 13 が平坦でもよい。第 1 実施形態の培養容器 10 と同様に、培養容器 10C の底面 13 の中心部における液体 L の深さ D1 は浅く、底面 13 の周辺部における液体 L の深さ D2 は深くなっている。これにより、底面 13 の中心部と周辺部との間の速度勾配を減少させ、より小さい動力で振とうさせて、シアストレスを低減することができる。

20

【0019】

次に、培養容器 10, 10A, 10B, 10C について、より詳しく説明する。

【0020】

培養容器 10, 10A または培養容器 10B の外殻 15, 18 は、側面 11 と上面 12 と底面 13 とが一体に構成されてもよく、側面 11 の途中、側面 11 と上面 12 との間、側面 11 と底面 13 との間などに継ぎ目を有してもよい。前記継ぎ目の両側の各部分が相互に結合されていてよい。前記継ぎ目の両側の各部分が分割可能であってもよい。例えば、側面 11 と底面 13 とを一体の容器本体とし、上面 12 を前記容器本体に対して開閉可能な蓋部としてもよい。

30

【0021】

液体 L が内袋 16 に密閉状態で收容される場合には、上面 12 を省略したり、内袋 16 の一部を側面 11 の上端より上方に突出させたりしてもよい。内袋 16 は、湾曲面 14 の内側に重ね合わされて、湾曲面 14 の断面形状に沿って変形していてもよい。内袋 16 に收容された液体 L は、外殻 15, 18 に触れないことが好ましい。内袋 16 の形状は特に限定されないが、四角柱状、六角柱状、八角柱状等の多角柱状あるいは円柱状が挙げられる。内袋がガゼット袋であると、外殻 15, 18 の外で折り畳みが容易になるため、好ましい。内袋 16 が、二重袋や三重袋など多重の包装袋であると、内袋 16 から液体 L が漏れにくいので好ましい。

40

【0022】

振とう培養装置は、上述の培養容器 10, 10A, 10B, 10C に加えて、培養容器 10, 10A, 10B, 10C を振とうさせる振とう装置（図示せず）を備えることができる。振とう装置は、底面 13 の中心を円形の軌道上で水平方向に回転移動させる公転運動をさせながら振とうさせることが好ましい。これにより、攪拌時に液面 S は左右に盛り上がり、中央部が凹状となる。底面 13 の側面 11 に近い周辺部では、液面 S の高さが上下に振動する。

【0023】

培養容器 10, 10A の材質または培養容器 10B, 10C の外殻 15, 18 の材質は

50

特に限定されないが、十分な硬さ（剛性）を有することが好ましく、例えば、ステンレス等の金属、樹脂、木材、集成材、繊維強化プラスチック等の複合材料が挙げられる。内袋 16 を構成するフィルムの材質は特に限定されないが、ポリスチレン、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン等の熱可塑性樹脂や、これらの樹脂の少なくとも 1 種を含む積層体が挙げられる。内袋 16 は、シングルユース（使い捨て）であってもよい。

【0024】

側面 11、底面 13 または湾曲面 14 の内面は、平滑面であってもよい。側面 11、底面 13 または湾曲面 14 の少なくとも一部に、特許文献 1 に記載される湾曲凸状の突起部が設けられてもよい。湾曲凸状の突起部について、形状、個数、配置等は特に限定されない。側面 11 に、特許文献 2 に記載される水平方向に延在した突起状のバッフルが設けられてもよい。突起状のバッフルについて、形状、個数、配置等は特に限定されない。

10

【0025】

内袋 16 および湾曲部材 17 は、外殻 15、18 の所定位置に設置された状態で提供されてもよく、外殻 15、18 の付属部品として提供されてもよく、外殻 15、18 とは別に提供されてもよい。内袋 16 なしで使用し得る培養容器 10、10A を外殻 15、18 として使用し、内袋 16 を組み合わせてもよい。

【0026】

培養容器 10、10A、10B、10C の容積は、1L 以上であることが好ましい。好ましくは前記容積が 5L 以上、10L 以上、20L 以上、50L 以上、100L 以上、200L 以上である。前記容積が 1000L、3000L、5000L 等であってもよい。前記容積が大きい方が大量の攪拌に適している。液体 L が内袋 16 に収容される場合、内袋 16 の容量は、培養容器 10B、10C の容積に適合することが好ましい。外殻 15、18 に収容される内袋 16 の内容物は、液体 L の液体および気体 G を含むことが好ましい。

20

【0027】

内袋 16 には、培地や雰囲気ガス等の内容物の追加、取り出し、内容物の pH 等の制御、添加物等の追加等の目的で、チューブ、ホース、注出口、注入口、コック、キャップ、注ぎ口等を 1 つ以上設けることもできる。チューブには、フィルター、フローモニター、流量計、バルブ、ポンプ等を設けてもよい。内袋 16 およびその付属物は、培養や衛生等の目的では必要に応じて、使用前に滅菌されていることが好ましい。滅菌手段は使用の目的等に応じて適宜選択でき、具体例として、線等の放射線、エチレンオキサイド等のガス、水蒸気等による加熱などが挙げられる。

30

【0028】

上述の培養容器 10、10A、10B、10C は、振とう型培養容器として、回分培養（バッチ培養）、流加培養（フェドバッチ方式）、灌流培養（パーフュージョン方式）のいずれにも応用することができる。培養工程において培養される微生物、細胞等の培養物としては、特に限定されないが、菌類、細菌類、ウイルス、酵母、藻類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞、バイオ医薬製造用の CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞や、HeLa 細胞、COS 細胞、再生医療用途の iPS 細胞、間葉系幹細胞を始めとした幹細胞、分化させた組織細胞などの動物細胞、などが挙げられる。また、培養工程においては、微生物、細胞等の培養物を目的物として得る場合に限らず、培養物が産生した酵素、抗体、化学物質等の産物を培養液から回収することも可能である。

40

【0029】

液体 L 等の内容物の温度については、ヒータ等の温度調整機能を用いて温度調整を行うことができる。培養を行う場合の温度は、培養物の種類にもよるが、例えば動物細胞の場合、4～40℃ が好ましく、25～37℃ が特に好ましい。培養物を培養しないで培地等の攪拌装置として用いる場合は、冷却してもよい。冷却温度としては、例えば 4～20℃ が挙げられる。温度管理は、温度計の測定値を利用することで、フィードバック制御を行うことができる。温度計は、接触式温度計でもよいが、据え置き型、取り付け型などの非接触式温度計が好ましい。液体 L の粘度（粘性率）は、水と同程度（約 1 mPa・s）であってもよく、水より高粘度であってもよい。

50

【 0 0 3 0 】

湾曲面 1 4 の形状は、底面 1 3 の中心部の周囲で回転対称な形状であってもよい。湾曲面 1 4 を構成し得る回転対称な形状としては、球面、回転楕円面、回転放物面、回転双曲面等の曲面が挙げられる。図 2 ~ 図 4 に示すように、底面 1 3 の中心軸を含む断面における湾曲面 1 4 の形状としては、円弧、楕円弧、放物線、双曲線等の曲線形状が挙げられる。底面 1 3 の周辺部から中心部に向けて、周辺部における傾斜が大きく、中心部における傾斜が小さい形状であってもよい。底面 1 3 の全体が湾曲面 1 4 であってもよい。底面 1 3 のうち湾曲面 1 4 以外の部分の形状は、特に限定されないが、例えば、水平面、傾斜面等であってもよい。

【 0 0 3 1 】

湾曲面 1 4 は、稜線を有しない滑らかな曲面に限らず、例えば、放射状または同心状の稜線により複数の面が接続された形状であってもよい。稜線とは、複数の異なる面の間で境界線を構成する線である。湾曲面 1 4 に含まれる稜線は、直線でも曲線でもよい。底面 1 3 の周辺部から中心部に向かう湾曲面 1 4 の高さの変化は、連続的でもよく、段階的でもよい。底面 1 3 の中心軸を含む断面において、湾曲面 1 4 が階段状に湾曲してもよい。階段状の湾曲面 1 4 としては、例えば、底面 1 3 からの高さが高くなるほど、各段の径が小さくなるように積層された形状が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

階段状の湾曲面 1 4 の形状が、底面 1 3 の中心部の周囲で回転対称な形状であってもよい。階段状の湾曲面 1 4 を構成する各段が、同心状に形成されてもよい。階段状の湾曲面 1 4 において、同心状の稜線の間を構成する面は、水平面、傾斜面、垂直面、円錐面、円柱面などから選択されてもよい。階段状の湾曲面 1 4 は、底面 1 3 に一体化されてもよく、複数の段を含む湾曲部材 1 7 から構成されてもよい。段ごとに分割された段部材を組み合わせて階段状の湾曲部材 1 7 を構成することもできる。階段状の湾曲面 1 4 の各段を形成する段部材の形状は、例えば、径の異なる円柱状または円錐台状であってもよい。段部材の上面または下面は、湾曲面 1 4 に限られず、平面であってもよい。

【 0 0 3 3 】

湾曲部材 1 7 は、湾曲面 1 4 を放射状、同心状等に分割した複数の部材から構成してもよい。湾曲面 1 4 の形状が異なる湾曲部材 1 7 を外殻 1 5 , 1 8 に設置可能にしてもよい。湾曲面 1 4 を有する底面 1 3 の上に、湾曲部材 1 7 を設置可能にしてもよい。湾曲面 1 4 を有する湾曲部材 1 7 の上に、別の湾曲部材 1 7 を設置可能にしてもよい。湾曲部材 1 7 の着脱または交換により、条件に応じた適宜の湾曲面 1 4 を使用可能にしてもよい。

【 0 0 3 4 】

湾曲面 1 4 の高さは、底面 1 3 の中心部における液体 L の深さ D_1 や、底面 1 3 の周辺部における液体 L の深さ D_2 の比率が適切となるように、適宜設計することが可能である。中心部における深さ D_1 と周辺部における深さ D_2 との比率は特に限定されないが、深さ比 D_1 / D_2 の値として、例えば、 $0.01 \sim 0.99$ が挙げられる。前記深さ比 D_1 / D_2 の値の具体例としては、 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 、 0.7 、 0.8 、 0.9 、 0.95 、 0.99 、またはこれらの中間値が挙げられる。

【 0 0 3 5 】

図 1 に示すように、湾曲面 1 4 の直径を A、底面 1 3 の直径を B とするとき、湾曲面 1 4 の直径 A は、底面 1 3 の直径 B と同程度でもよい。湾曲面 1 4 の直径 A は、底面 1 3 の直径 B より小さくてもよい。底面 1 3 または湾曲面 1 4 の平面形状が円形でない場合は、例えば、長径、対角線長などの最大径を直径とすることができる。直径比 A / B の値は例えば、 $0.1 \sim 1.0$ が挙げられる。前記直径比 A / B の値の具体例としては、 0.1 、 0.3 、 0.5 、 0.7 、 0.8 、 0.9 、 0.95 、 0.99 、 1.0 またはこれらの中間値が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

以上、本発明を好適な実施形態に基づいて説明してきたが、本発明は上述の実施形態に

10

20

30

40

50

限定されず、本発明の要旨を逸脱しない範囲で種々の改変が可能である。改変としては、各実施形態における構成要素の追加、置換、省略、その他の変更が挙げられる。また、2以上の実施形態に用いられた構成要素を適宜組み合わせることも可能である。

【0037】

湾曲面14を有する湾曲部材17と、底面13に湾曲面を有しない外殻18とを組み合わせる場合に、内袋16を省略して、湾曲部材17を固定した外殻18を培養容器として用いることも可能である。湾曲部材17が外殻18の底面13に確実に固定される等して支障がない場合は、内袋16を介することなく、湾曲部材17を固定した外殻18の内部に直接に液体Lを収容することができる。

【符号の説明】

【0038】

A...湾曲面の直径、B...底面の直径、D1...底面の中心部における培養液の深さ、D2...底面の周辺部における培養液の深さ、G...気体、L...液体、S...液面、10, 10A, 10B, 10C...培養容器、11...側面、12...上面、13...底面、14...湾曲面、15...湾曲面を有する外殻、16...内袋、17...湾曲部材、18...湾曲面を有しない外殻。

10

20

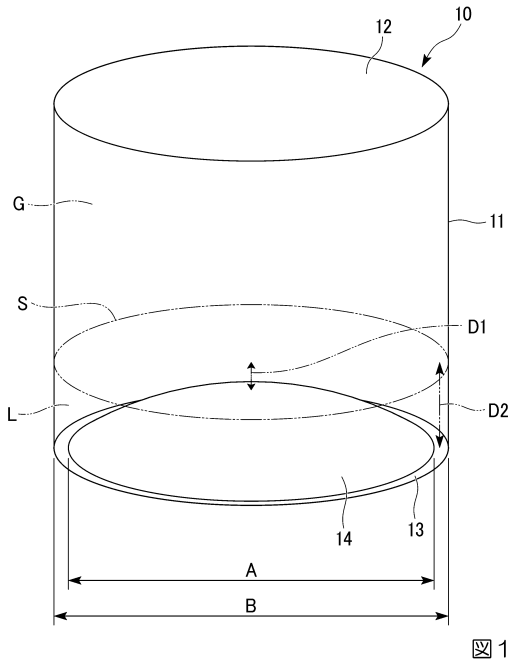
30

40

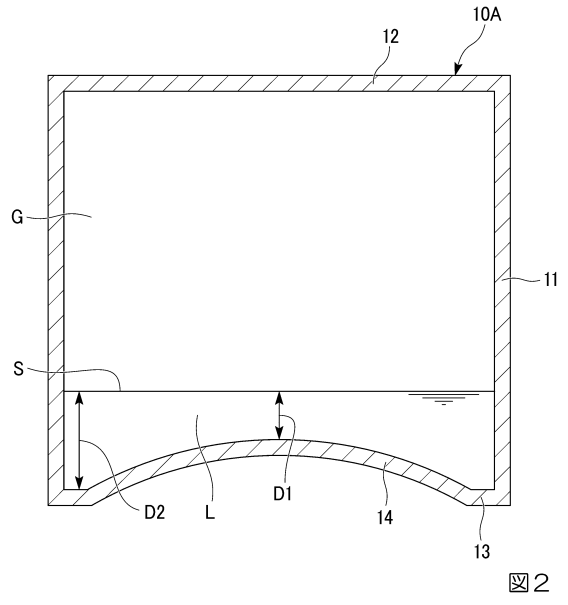
50

【図面】

【図 1】



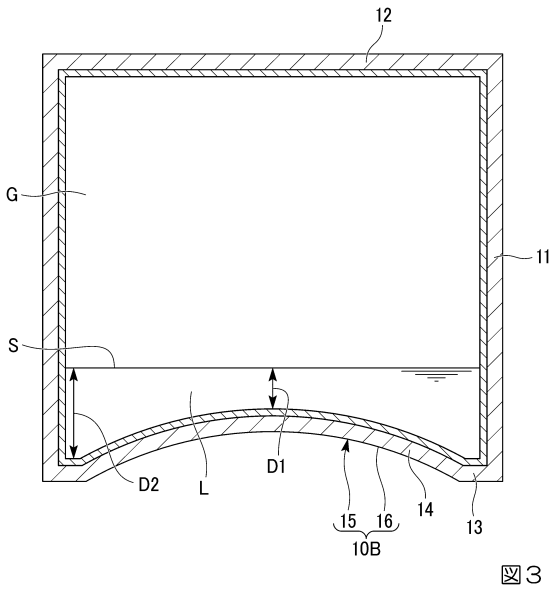
【図 2】



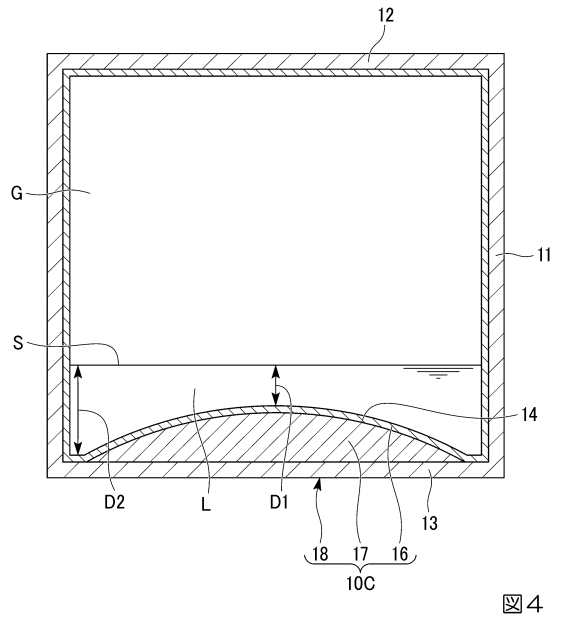
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 伊藤 将太

東京都新宿区西新宿一丁目23番7号 藤森工業株式会社内

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 再公表特許第2018/207907(JP, A1)
中国特許出願公開第109628285(CN, A)
中国特許出願公開第102776116(CN, A)
特開2017-035009(JP, A)
特開2019-198850(JP, A)
特開2016-202089(JP, A)
特開2007-282629(JP, A)
特開平09-065876(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12M 1/00

C12M 1/02

C12M 1/24

C12M 3/00