

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年12月29日(29.12.2016)



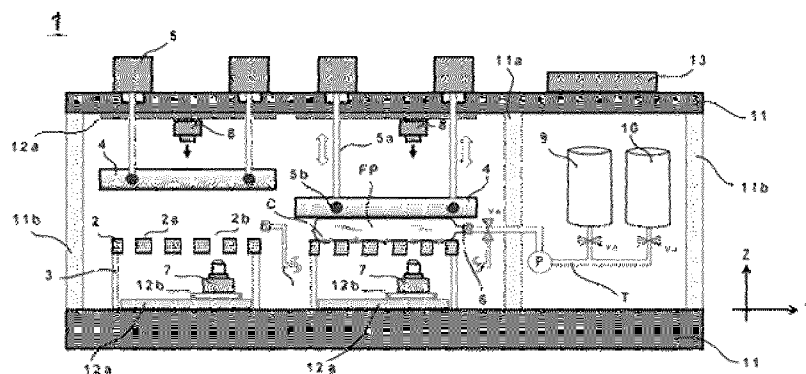
(10) 国際公開番号
WO 2016/208526 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/068212
- (22) 国際出願日: 2016年6月20日(20.06.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-124785 2015年6月22日(22.06.2015) JP
- (71) 出願人: 東洋製罐グループホールディングス株式会社(TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.) [JP/JP]; 〒1418627 東京都品川区東五反田2丁目18番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 末永 亮(SYENAGA, Ryo); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町22-4 東洋製罐グループホールディングス株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP). 田中 郷史(TANAKA, Satoshi); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町22-4 東洋製罐グループホールディングス株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP). 柏原賢(KASHIWABARA, Ken); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町22-4 東洋製罐グループホールディングス株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP). 戸谷 貴彦(TOTANI, Takahiko); 〒2400062 神奈川県横浜市保土ヶ谷区岡沢町22-4 東洋製罐グループホールディングス株式会社 総合研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人太田特許事務所(OHTA PATENT OFFICE); 〒1510053 東京都渋谷区代々木二丁目23番1号 ニューステイトメナービル356 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: CELL CULTURE METHOD, JIG FOR CELL CULTURE, AND CELL CULTURE DEVICE

(54) 発明の名称: 細胞培養方法、細胞培養用具および細胞培養装置



(57) Abstract: [Problem] To provide a cell mass culture technique in which a flexible culture container is used, and the risk of contamination is suppressed while the formation of cell aggregates is allowed if necessary. [Solution] A pressure is applied to a culture container which is filled with cells and a liquid culture medium while the culture container is placed on a placement surface having one or more indentations, so that an uneven section conforming to the indentations is formed in an outer surface of the culture container by the application of the pressure, and in this state, the cells in the culture container are cultured.

(57) 要約: 【課題】可撓性を有する培養容器を用い、必要に応じて細胞の凝集塊を形成可能としつつコンタミネーションリスクが抑制された細胞の大量培養手法を提供する。【解決手段】1又は複数の窪みを有する載置面に細胞と培養液とが充填された可撓性を有する培養容器を載置しつつ前記培養容器に対して圧力を印加し、前記圧力の印加によって前記窪みに倣った凹凸部を前記培養容器の外面に形成した状態で、前記培養容器内の細胞を培養する。



WO 2016/208526 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：細胞培養方法、細胞培養用治具および細胞培養装置 技術分野

[0001] 本発明は、可撓性を有する培養容器を用いた細胞培養に関し、より具体的には可撓性培養容器内の細胞培養面に安定して細胞の凝集塊を形成可能な細胞培養方法、細胞培養用治具および細胞培養装置に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子治療や再生医療に代表される近代医療分野では、目的とする細胞や組織などを人工的な環境下で培養することが行われている。例えば現時点における細胞培養の手法としては、次に挙げる技術が知られている。

[0003] まず第1の手法としては、実験室などで好適に用いられるウェルプレートを用いた培養手法が挙げられる。この手法では、1又は複数個のウェル（凹部）が形成されたプレートを用い、細胞と培養液とを個々のウェル内に導入して細胞培養が行われる。しかしながらこの第1の手法においては、ウェルが大気解放されているため異物が混入するリスクが高く、さらにはウェル毎の注入、回収動作が煩雑であるといった課題がある。

[0004] これに対し密閉性を改善させた第2の手法として、特許文献1に例示される如き密閉型トレイ容器も存在する。この手法では、細胞及び培養液を導入する凹部を有するトレイの上面がフィルムで封止される。したがってこの第2の手法によれば第1の手法に比して密閉性が改善されることで上記したコンタミネーションリスクが抑制される。

しかしながら第2の手法であっても、培養液の出し入れの際には空気の出し入れを伴うため依然としてコンタミネーションリスクは高いと言える。さらに凹部を備えた培養容器として立体形状となるため、かさばってしまい取扱いが容易とは言えない。

[0005] このように現在の細胞培養の多くは凹部やウェルといった固形の底に細胞を集めて培養を行うものであるが、再生医療などの急速な進歩から近年では

細胞の大量培養が求められている。

かような要求に応える大量培養の手法として、例えば特許文献2に例示される如きガス透過性のある可撓性培養容器を用いて閉鎖系で自動的に細胞の大量培養を行う手法が開発されている。この可撓性培養容器は比較的大きなサイズで製造することが可能であるので細胞の大量培養が可能であり、さらには閉鎖系であるために培養期間中における異物（菌やウイルスなど）のコンタミネーションリスクを低減できるというメリットもあり好ましい。

[0006] 一方で、例えば特許文献3に示されるごとく、神経幹細胞などの再生医療用幹細胞の培養においては、その培養初期に細胞の凝集塊を形成することで効率よく細胞が大量培養できる旨が開示されている。

そしてこの特許文献3の手法では、細胞の凝集塊が形成されやすい断面U字型の凹部が一側に形成された断面U字型容器を用い、この凹部で細胞の凝集塊を形成した後に容器を回転させることで他側の断面平型部で細胞培養を継続する技術が開示されている。

[0007] 特許文献1：特許第5098471号
特許文献2：特許第5344094号
特許文献3：特許第4543212号

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、上記したウェルプレート、密閉型トレイ容器及び断面U字型容器のいずれもその取扱いには熟練を要し、作業者の熟練度に依って培養された細胞の品質がばらつくという課題がある。また、作業者が介在しなければならぬという点でそもそも大量生産には極めて不向きであり、操作ミスやコンタミネーションリスクが依然として高い点においても課題は大きい。

[0009] 一方で可撓性培養容器を用いた培養手法を用いれば上記したリスクは概ね解消することが出来るのであるが、例えば神経幹細胞などの再生医療用幹細胞などの大量培養を如何にして行うかについてはまだまだ発展の余地がある

。

本発明は上記した課題を一例として解決することを鑑み、その趣意は可撓性を有する培養容器を用いて、種々の細胞を安価に高品質で且つ大量に培養可能な細胞培養方法、細胞培養用治具及び細胞培養装置を実現することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 上記目的を達成するため、本発明の細胞培養方法は、細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器を載置面に載置しつつ、前記可撓性培養容器に対して圧力を印加し、前記圧力の印加によって前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を変形させた状態で、前記可撓性培養容器内の細胞を培養することを特徴とする。

[0011] また、上記目的を達成するため、本発明の細胞培養用治具は、細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面と、前記載置面に対向して設けられ、前記可撓性培養容器を加圧しながら前記載置面との間で当該可撓性培養容器を保持可能な第1の位置と、少なくともその一部が前記載置面に対して前記第1の位置よりも離れた第2の位置とを移動可能な押圧蓋と、を含むことを特徴とする。

[0012] また、上記目的を達成するため、本発明の細胞培養装置は、細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面と、前記載置面に可撓性培養容器が載置された後に、前記可撓性培養容器に圧力を印加して前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を変形させる制御を行う制御装置と、を含むことを特徴とする。

[0013] また、上記目的を達成するため、本発明の培養液の攪拌方法は、細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器を載置面に載置しつつ、前記可撓性培養容器に対して押圧部材で押圧し、前記押圧部材の押圧によって前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を変形させた状態で、前記押圧部材と前記可撓性培養容器との間に攪拌部材を挿通させることを特徴とする。

[0014] また、上記目的を達成するため、本発明の培養液の攪拌装置は、細胞と培

養液とが充填された可撓性培養容器の外面上に変形を与える載置面と、前記載置面上に載置された前記可撓性培養容器に対して圧力を印加する押圧部材と、前記押圧部材と前記可撓性培養容器の間を挿通可能な撹拌部材と、前記撹拌部材を駆動する撹拌部材駆動装置と、を含むことを特徴とする。

- [0015] また、上記目的を達成するため、本発明の培養液の撹拌方法は、細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器を載置面上に載置しつつ、前記可撓性培養容器に対して押圧部材で押圧し、前記押圧部材の押圧によって前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面上を変形させた状態で、さらに前記押圧部材を揺動させて前記培養液の撹拌を行うことを特徴とする。

発明の効果

- [0016] 本発明によれば、可撓性を有する培養容器を用いて、細胞の凝集塊を必要に応じて形成可能としつつ、コンタミネーションリスクが抑制された高品質な細胞の大量培養が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]第1実施形態における細胞培養装置の正面図である。
[図2]第1実施形態における細胞培養装置の側面図である。
[図3]第1実施形態で用いられる可撓性培養容器を示す図である。
[図4]第1実施形態における細胞培養装置のうち架台の詳細を示す斜視図である。
[図5]第1実施形態における細胞培養方法を示すフロー図である。
[図6]第1実施形態で適用可能な細胞培養用治具を示す斜視図である。
[図7]第2実施形態における細胞培養装置の正面図である。
[図8]第3実施形態における細胞培養装置の正面図である。
[図9]第4実施形態における細胞培養装置の正面図である。
[図10]第5実施形態における培養液の撹拌装置および細胞培養装置の正面図である。
[図11]第5実施形態における撹拌方法を説明する状態遷移図である。
[図12]第5実施形態における撹拌部材16の変形例を示す図である。

[図13]第5実施形態における攪拌部材16の他の変形例を示す図である。

[図14]変形例1における細胞培養装置の正面図である。

[図15]変形例2における細胞培養装置の架台を示す斜視図及び断面図である。

。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、適宜図面を参照しつつ本発明の細胞培養方法、細胞培養用治具および細胞培養装置について具体的に説明する。なお、説明の便宜上、以下の記載においてX方向、Y方向、およびZ方向をそれぞれ規定したが、本発明の権利範囲を意図的に限定又は減縮するものでない。

[0019] ≪第一実施形態≫

まず本発明の第一実施形態について、図1～6を参照しつつ説明する。

[細胞培養装置]

図1は本発明の第一実施形態にかかる細胞培養装置1の正面図を示し、図2は同細胞培養装置1の側面図を示している。

細胞培養装置1は、1又は複数の窪み2bが形成された載置面2aを有する架台2と、この載置面2aに可撓性培養容器FPが載置された後に可撓性培養容器FPに圧力を印加してその外面FPSに窪み2bに倣った凹凸部を形成する制御を行う制御装置13を少なくとも含んで構成される。この細胞培養装置1は、適切な温度（例えば37℃）、炭酸ガス濃度（例えば5～10%CO₂濃度）、及び湿度（例えば約95%）に調整されたフレーム11内において可撓性培養容器FP内の細胞Cを培養するものである。

[0020] ここで可撓性培養容器FPとは、フィルムベースの軟包材を材料として袋状に形成された可撓性を有する培養容器のことである。この可撓性培養容器FPは、細胞Cの培養に好適なガス透過性を有し、かつ内容物を確認できるように、一部又は全部が透明性を有していることが好ましい。

可撓性培養容器FPは、例えば図3(a)～(c)に例示されるとおり、基層f₁、内層f₂および外層f₃の3層構造の多層フィルムで構成されるとともに、公知の培養液及び細胞Cの出し入れなどを行うためのポートFP₁が1

又は2以上備えられている。

基材 f_1 及び内層 f_2 は、高ガス透過性、ヒートシール性、及び透明性を備えた材料を用いて構成される。また、内層2は上記特性に加え、低細胞毒性を備える材料で構成される。このような材料としては、例えば直鎖状低密度ポリエチレン (LLDPE, Linear Low Density Polyethylene) や、超低密度ポリエチレン (VLDPE, Very Low Density Polyethylene/ULDPE, Ultra Low Density Polyethylene)、低密度ポリエチレン (LDPE, Low Density Polyethylene)、あるいはこれらのブレンドなどのポリエチレン系樹脂を用いることができる。

また、外層 f_3 としては密度 $0.886 \text{ g/cm}^3 \sim 0.93 \text{ g/cm}^3$ のポリエチレン系樹脂が好適である。なお、外層 f_3 は適宜省略してもよい。

なお、本実施形態に好適な可撓性培養容器FPのより詳細な構造は、例えば特許第5344094号などを参照してもよい。

[0021] 可撓性培養容器FP内で培養される細胞Cに特に制限はないが、細胞の凝集塊を形成することが有効な細胞（人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、神経幹細胞、肝細胞、角膜幹細胞、及び臍島細胞など）が特に好適である。

また可撓性培養容器FPに供給される培地としての培養液も、培養する細胞Cに応じて適宜選択される。

以下、かような細胞C及び培養液が充填された可撓性培養容器FPを用いて細胞培養を行う細胞培養装置1につき、更に付属する各構成の詳細を説明する。

[0022] 架台2は、後述する可撓性培養容器FPが載置される板材であり、例えば金属や硬質樹脂などから形成されている。なお、図1などにおいては、構造の理解を容易にするために架台2は断面で示されているが、実際は板状の外形を有している。この架台2は、図4に示されるように、可撓性培養容器FPが載置される載置面2aと、この載置面2a内において1又は複数だけ形成される窪み2bとを有している。また、架台2に、例えば可撓性培養容器

F Pを架台2に固定するための固定具などを設けてもよい。さらに、架台2に、コイル線や熱電対あるいはペルチェ素子などの温調装置を設け、この架台2に搭載された温調装置によって可撓性培養容器F Pの温調を行ってもよい。さらに、架台2に、細胞Cが窪み2 bに集まることを助長したり、培養液を攪拌するための機構として、例えば振動モータや振動子などを付けてもよい。かような振動子としては、例えば超音波振動子、 piezo駆動型振動子、水晶振動子などが挙げられる。また、この振動子の設置個所としては特に制限はないが、例えば載置面2 a上や窪み2 b内、あるいは架台2の載置面2 aとは反対側の裏面などが挙げられる。

載置面2 aは、可撓性培養容器F Pの外面に変形を与える機能を有し、架台2のうち可撓性培養容器F Pが載置される平坦な面であるとともに、この平坦な面内に1または複数の窪み2 bが形成されている。

窪み2 bは、載置面2 aから窪んだ部位をいい、本実施形態においては架台2の載置面2 aから反対側の背面にかけて貫通した貫通孔の形状を備えている。このように載置面2 aにおいて窪み2 bが1又は複数設けられることで、この載置面2 aには1又は複数の凹凸が形成されることになる。なお、本発明でいう「窪み」は、可撓性培養容器F Pの外表面F P s（後述）が載置面2 aから窪み2 b側に突出することで凹凸状になる形状であればよく、必ずしも貫通させずに凹部となってもよい。

[0023] 架台支持柱3は、架台2を支持する金属または樹脂材であり、その内側の空間に観察装置7およびステージ装置12などを収容可能である。本実施形態では、架台2の四隅を計4本の架台支持柱3が支持する形態となっている。

押圧部材4は、可撓性培養容器F Pに対向して配置され、可撓性培養容器F Pを押圧する底面が例えば平面である立体形状の部材である。この押圧部材4の材質としては、本実施形態ではアクリルなどの透明な樹脂が用いられている。押圧部材4の平面形状は、少なくとも可撓性培養容器F Pより大きいことが望ましいが、可撓性培養容器F Pより小さくても可撓性培養容器F

Pに所望の圧力がかけられれば大きさなどに特に制限はない。なお、後述する照明装置8が不要であれば、押圧部材4の材質は透明な樹脂でなくともよく、例えば金属で構成されていてもよい。

なお、押圧部材4の上述した底面は平らである必要は必ずしもなく、例えば底面が曲面（-Z方向（下方）に出っ張った凸面）である立体形状のものを用いることもできる。また、可撓性培養容器FP内のガス交換を促進するため、押圧部材4の底面（載置面2aと対向する側の面）には1又は複数の穴などが設けられていてもよい。

[0024] 加圧装置5は、ピストンロッド5aおよび接続リンク5bを介して押圧部材4と接続され、後述する制御装置13の制御の下で押圧部材4を架台2に対して進退させる。加圧装置5およびピストンロッド5aとしては公知のピストンポンプなどが適用可能である。

なお、本実施形態では、押圧部材4の概ね四隅に1本ずつピストンロッド5aが接続リンク5bを介して押圧部材4と接続されており、押圧部材4の底面（架台2と対向する側の面）が水平状態を維持したまま当該押圧部材4を下降（-Z方向へ移動）させることが可能となっている。また、後述するとおり、各々のピストンロッド5aは独立して制御させることが可能となっており、ピストンロッド5aの下降中に適宜その姿勢を調整することが可能となっている。

なお、1つの押圧部材4に対するピストンロッド5aおよび接続リンク5bの数は上記した4つに限られず、1セット以上あればよい。また、図示では加圧装置5は別個に記載したが、各ピストンロッド5aを独立して制御可能であれば加圧装置5は兼用されていてもよい。

[0025] 容器接続口6は、可撓性培養容器FPのポートFP₁と接続可能に設置されている。本実施形態では制御装置13により容器接続口6の開閉が制御され、この制御によって載置面2aに載置された可撓性培養容器FPにはチューブT経由で新たな培地が供給されるとともに、使用済の培地が可撓性培養容器FPからチューブT経由で回収される。

なお、以下では、後述する培地供給タンク 9 や培地回収タンク 10 が可撓性培養容器 F P とは独立して設置される例を説明するが、これに限られない。すなわち、培地供給タンクおよび培地回収タンクはそれぞれ専用バッグとして可撓性培養容器 F P に付属させて、細胞 C の一回の培養毎に専用バッグごと交換可能とされていてもよい。

なお、本実施形態では、容器接続口 6 には識別タグ読取部（不図示）が設けられており、容器接続口 6 と接続される可撓性培養容器 F P の内容が識別可能となっている。すなわち可撓性培養容器 F P の一部（ポート F P₁ 付近など）には識別タグが添付されており、容器内に充填された細胞 C の種別や培養液の組成などが当該識別タグに紐づけられている。これにより、例えば制御装置 13 は識別タグ読取部で読み取られた情報に基づいて培養動作の開始や停止など適切な培養処理を実行することが可能となる。なお本実施形態でいう培養動作とは、可撓性培養容器 F P 周りの調温・調湿、押圧部材 4 の動作制御（押圧力の調整など）、培地の供給や回収などが含まれる。また、本実施形態で用いる識別タグに特に制限はなく公知の部材を用いてもよいが、バーコードや QR コードさらには RF タグや IC タグなどが好適な例である。

[0026] 観察装置 7 は、対物レンズなどを介して可撓性培養容器 F P 内の細胞 C の状態を観察する装置であり、例えば光学顕微鏡、CCD や CMOS イメージセンサーが搭載された蛍光顕微鏡などが例示される。この観察装置 7 は、後述するステージ装置 12 上で水平方向に移動可能なように架台 2 の下方に配置されている。なお本実施形態では 1 つの架台 2 に対して 1 つの観察装置 7 が設けられているが、これに限られずに窪み 2 b の位置に応じて複数配置される形態など 1 つの架台 2 に対して複数の観察装置 7 を設置してもよい。また、観察装置 7 は水平方向に移動可能であることに加えて X 軸方向周り（ θ X 方向）および Y 軸方向周り（ θ Y 方向）にも変位可能であり、観察時の観察装置 7 の姿勢が調整可能となっている。なお、観察装置 7 は、必要に応じて観察した領域を撮像し、この撮像したデータを不図示のメモリなどに記憶

することが可能となっている。

[0027] 照明装置 8 は、観察装置 7 が可撓性培養容器 F P 内の細胞 C の状態を観察するときに必要な光を発する装置であり、本実施形態では観察装置 7 と対となって設けられている。なお照明装置 8 としては公知の種々の光源を用いてよいが、例えば観察装置 7 が蛍光顕微鏡である場合には励起光を発生させる水銀ランプなどが例示される。なお本実施形態では架台 2（載置面 2 a）に対して撮像装置 7 と反対側に照明装置 8 が配置されているが、これに限られずに架台 2（載置面 2 a）に対して撮像装置 7 と同じ側に照明装置 8 が配置されていてもよい。また、図 1 に示されるように、照明装置 8 を X Y ステージ 1 2 a などの駆動機構により撮像装置 7 との光軸を一致させながら水平方向に移動可能としてもよいし、撮像装置 7 との光軸を調整する調整機構を備えていてもよい。あるいは、照明装置 8 は移動させずに、1 又は複数の照明装置 8 をフレーム 1 1 上などに固定配置してもよい。

[0028] 培地供給タンク 9 は、細胞 C の培養に必要な培地（培養液など）が貯留される容器である。そして制御装置 1 3 は、バルブ V a およびポンプ P を制御することでチューブ T を介してこの培地供給タンク 9 に貯留された培地を可撓性培養容器 F P へ供給する制御を行う。なお、培地供給タンク 9 には不図示の温調装置が搭載されており、この温調装置によって容器内が培地の鮮度や品質を維持できる温度に維持されている。

培地回収タンク 1 0 は、可撓性培養容器 F P で細胞 C の培養に用いられて効用を終えた培地を回収するための容器である。制御装置 1 3 は、バルブ V a およびポンプ P を制御することでチューブ T を介して可撓性培養容器 F P から不要な培地（培養液）を回収する制御を行う。なお、培地回収タンク 1 0 に回収された培地は、廃棄されるか、又は適切な処理を経た後に培地供給タンク 9 に供給され再利用が為されてもよい。

また、培地供給タンク 9 および培地回収タンク 1 0 が上述した専用バッグの形態である場合には、バルブ V a やポンプ P に培養液が接触しないように、バルブ V a としてはピンチバルブが、ポンプ P としてはペリスタポンプが

それぞれ好適となる。

[0029] フレーム 11 は、架台 2 や押圧部材 4 など細胞 C の培養に必要な上記各部材が配置される收容空間を形成する枠体である。本実施形態のフレーム 11 は、例えばステンレスやアルミなどの金属で形成されてなり、図 1 および図 2 に示すとおり隔壁 11 a、側壁 11 b、正面扉 11 c および背面板 11 d を更に含んで構成されている。このうち隔壁 11 a は、架台 2 や押圧部材 4 が配置される空間と、培地供給タンク 9 および培地回収タンク 10 が配置される空間とを区画する。したがって本実施形態では可撓性培養容器 F P が收容される空間は、培地供給タンク 9 などが配置される空間とは独立して空調制御することが可能となっている。また、正面扉 11 c には取っ手 O P が設けられ、作業者は任意のタイミングで取っ手 O P を介して正面扉 11 c を開閉させることが可能となっている。

[0030] ステージ装置 12 は、制御装置 13 の制御の下で、上記した観察装置 7 を載置面 2 a と平行な方向に二軸駆動させる X Y ステージ 12 a を含む。この X Y ステージ 12 a としては、例えば送りねじ機構やリニアボールガイド、クロスローラーガイド、平面モータシステムなど公知の二軸駆動機構が適用可能である。

また、ステージ装置 12 は、観察装置 7 の焦点を調整するための Z ステージ 12 b をさらに含んで構成されている。本実施形態では可撓性培養容器 F P のフィルム厚や上述した凹部の膨らみ度合いによって焦点が変化する可能性もあるので、焦点調整用の Z ステージ 12 b は高精度な観察を実現するためには特に有効である。なお、具体的な焦点の調整手法に特に制限はないが、例えば画像処理を用いたコントラスト方式が非制限的な手法として挙げられる。この Z ステージ 12 b は、観察装置 7 の下方に配置され、観察装置 7 を載置面 2 a と垂直な方向（Z 方向）に移動させる。Z ステージ 12 b としては、公知のネジ式やエアシリンダ式など種々の機構が適用可能であり、X Y ステージ 12 a 上に配置されてもよいし、X Y ステージ 12 a ごと Z 方向に上下動させてもよい。また、X Y ステージ 12 a と Z ステージ 12 b とを

一体化して少なくとも3軸駆動が可能なステージ構成としてもよい。

なお、上記したとおり、照明装置8も架台2の下方に配置する場合には、この照明装置8もステージ装置12で二軸駆動してもよい。

空調設備Uは、図2に示すとおり、背面板11d側に設置されており、可撓性培養容器FPや架台2が收容される空間の温度または湿度の調整を行う装置である。したがって本実施形態では、空調設備Uは、制御装置13の制御の下で、細胞Cの培養に最適な温度および湿度が維持されるように空調動作を実行する。

[0031] 制御装置13は、例えば所定のプログラムが保存されたメモリや演算機能を有するCPUを備えたコンピュータであり、上記した各部材の制御を行って細胞Cの培養を統括する機能を備えている。

なお、図示では制御装置13はフレーム11上に便宜的に配置したが、この例に限られない。例えばディスプレイを伴って側面板11bに制御装置13が組み込まれた形態でもよいし、制御対象の上記各部材と有線又は無線を介して接続されたパーソナルコンピュータやラップトップコンピュータの形態でもよい。

[0032] [細胞培養方法]

次に図5を用いて本実施形態の細胞培養方法について説明する。

ここで、本実施形態の細胞培養方法は、1又は複数の窪みを有する載置面に細胞と所定の培養液とが充填された可撓性を有する培養容器を載置しながら培養容器に対して圧力を印加し、この圧力の印加によって載置面と接する可撓性培養容器の外面を変形させた状態で、可撓性培養容器内の細胞を培養することなどに主として特徴がある。

[0033] すなわち、まず図5(a)に示されるように、培養容器としての可撓性培養容器FPが架台2の載置面2aに載置される(ステップ1)。架台2は載置面2aに対して陥没した窪み2bが形成されているが、この状態のままでは可撓性培養容器FPの外面FPSは窪み2bに倣った凹凸部が形成されていない。

なお、架台2に温調装置が搭載されている場合には、このステップ1以降において架台2を温調することで可撓性培養容器FP内の培地温度などを調整することとしてもよい。

続いて図5(b)に示されるように、可撓性培養容器FP内の細胞Cを攪拌(懸濁)させる(ステップ2)。このように可撓性培養容器FP内の細胞Cを攪拌(懸濁)することで、後の工程において各凹部に入る細胞Cの数がおおよそ均一化することが可能となる。攪拌(懸濁)処理は、可撓性培養容器FPが載置面2aに載置されるのと同様か、あるいは押圧部材4による加圧の直前に行うことが好ましい。しかしながら攪拌(懸濁)処理のタイミングは上記に限定されず、可撓性培養容器FPが載置面2aに載置されてから加圧が開始されるまでの間で1又は複数回実施されてもよい。また、可撓性培養容器FPが載置面2aに載置された時点で既に細胞Cが攪拌(懸濁)されている場合には、このステップ2は省略してもよい。

[0034] 載置面2aに可撓性培養容器FPが載置された後は、図5(c)に示されるように、押圧部材4を用いて可撓性培養容器FPを押圧することで可撓性培養容器FPの外面FPSに窪み2bに倣った凹凸部を形成する(ステップ3)。換言すれば、細胞培養装置1の制御装置13は、加圧装置5を制御して押圧部材4を下方に移動させ、この移動によって可撓性培養容器FPのうちの上面(押圧部材4と対向する側の面)に押圧部材4が押し当てられる。可撓性培養容器FPの外面FPSは、この押圧部材4による圧力の印加によって1又は複数の凹凸に倣った形状に変形する。

そして押圧部材4によって可撓性培養容器FPの外面FPSに凹凸部が形成されると、可撓性培養容器FP内に拡散又は浮遊していた細胞Cは凹部(窪み2bに入り込んだ領域)内で凝集し始める。このように本実施形態では、載置面2aの窪み2bに倣った凹凸部を可撓性培養容器FPの外面に形成した状態で細胞Cが培養されることになる。押圧部材4による可撓性培養容器FPへの加圧状態は、細胞が全て沈殿するのに要する時間、例えば数分～数十分間だけ継続されるようにして静置される。これにより、静置後には培

養液中を浮遊していた細胞Cはすべて沈殿される。

[0035] そして図5（d）に示されるように、押圧部材4による可撓性培養容器FPへの加圧が維持されたまま細胞Cの培養が継続される（ステップ4）。このステップ4では、上述した凹部内で細胞Cの凝集が進行することで凝集塊C'が形成される。なお、凝集塊C'をどの程度の大きさとするかは、培養する細胞Cの種類に応じて様々であるので、実験やシミュレーションによって適宜決定してもよい。

なお、このステップ3又はステップ4においては、観察装置7から得られる可撓性培養容器FPの外面FPSの状態や細胞Cの凝集度合などに基づいて、押圧部材4による押圧力を可変するなどして調整されるようにしてもよい。このように、本実施形態の観察装置7は、押圧部材4による押圧が可撓性培養容器FPに印加された状態でこの可撓性培養容器FPの内部や外面を観察可能となっている。また、本実施形態の観察装置7は、窪み2bを介して可撓性培養容器FPの内部を観察することが可能となっている。

[0036] そして上記した凹部内で細胞Cの凝集塊が形成されて所定の時間が経過した後、図5（e）に示されるように、細胞Cの培養中に押圧部材4の押圧を解放することによって可撓性培養容器FPの外面FPSに形成された凹凸部を平坦化する（ステップ5）。換言すれば、細胞培養装置1の制御装置13は、加圧装置5を制御して押圧部材4を上方に移動させ、この移動によって可撓性培養容器FPのうちの上面に押し当てられていた押圧部材4が上方へ退避する。これにより、押圧力から解放された可撓性培養容器FPのうち載置面2aと接する外面FPSは載置面2aにほぼ平行で平らな状態となるので、細胞培養に使用される領域（面積）を拡大することができる。

なお、このステップ5の状態ですべて静置することで細胞の培養が更に進行し、所定時間経過後に細胞の培養が終了する。細胞の培養が終了した後で、作業者は、正面扉11cを解放して載置台2aから可撓性培養容器FPを取り出すことで作業を完結させる。

[0037] ここで、細胞Cの培養中に印加した圧力（押圧力）を解放する理由は、次

のとおりである。

すなわち、培養する細胞Cの種類によっては凝集塊を形成したほうが培養効率は大きく向上するものの、一方で凹部を維持したままでは培養中に不都合が生じてしまう可能性も想定できる。

より具体的には、細胞Cの培養中には、容器内の一部の培地を交換して鮮度を高めたり、容器内へ透過するガス（二酸化炭素や酸素など）を効率よく容器内で拡散させる必要も生ずることを想定せねばならない。しかしながら可撓性培養容器FPの外面FPsに凹凸部が維持されたままであると、特に培地（培養液など）の量が少ない場合には、凸部において容器の底面と対向する面との間隙が十分に確保できず、培地の循環やガスの拡散などが途絶えてしまう恐れも考えられる。

よって本実施形態では、図5（e）のごとく所定の大きさの凝集塊C'が形成された後は、可撓性培養容器FPの上記凹凸部を平坦化することで培地やガスの効率的な循環や拡散が実現されるようにした。

[0038] なお、本手法を用いずに培地やガスの効率的な循環や拡散を実現しようとする場合には、例えば大きな容器へ凝集塊C'を移し替えることが考えられるが、以下に述べるような様々なリスクが伴う。すなわち、面積の大きな容器に凝集塊C'を移し替える作業を行う場合にはピペットなどを用いる必要があり、これにより培養液が強く攪拌されてしまうことで凝集塊C'が崩れてしまうことや、個々の細胞Cに剪断力などの物理的ストレスがかかってその後の培養に悪影響を及ぼすことなど様々なリスクが発生する。

しかしながら本実施形態のごとき方法を用いれば、押圧部材4による加圧を除荷するだけで、上記で述べたリスクは伴わずに実質的に大きな容器へ凝集塊C'を移し替えたに匹敵する効果を楽しむことが可能となる。

[0039] なお、上記したステップ1～ステップ5の間もしくはこれに並行して、新たな培地が培地供給タンク9から容器内へ適宜供給されてもよいし、容器内から使用済の培地が培地回収タンク10に回収されてもよい。

また、観察装置7による細胞Cやその凝集塊などの観察は、ステップ1～

ステップ5の間で連続して行われてもよいし、断続的に行われてもよい。また、観察装置7をステージ装置12で適宜駆動させることにより、可撓性培養容器FPの凹凸部のうち異なる複数の箇所の凝集塊などを順次観察してもよい。

[0040] [細胞培養用治具]

上記したとおり、可撓性培養容器FPはコンタミネーションのリスクが抑制されておりその取扱いが容易であるので、本実施形態ではこの可撓性培養容器FPを保持する可搬性の細胞培養用治具を採用した。この細胞培養用治具を用いる目的の1つは、従来のフラスコやシャーレあるいはウェルプレートなどと同様に手で持ち運びが可能な利点は踏襲しつつ、更に効率的でコンタミリスクの少ない態様で細胞の培養を行うことを実現するものである。

すなわち、本実施形態の細胞培養用治具は、細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面と、この載置面に対向して設けられ、載置面に載置される可撓性培養容器を加圧しながら載置面との間で当該可撓性培養容器を保持可能な第1の位置と、少なくともその一部がこの載置面に対して第1の位置よりも離れた第2の位置とを移動可能な押圧蓋と、を含むことを主な特徴としている。

この細胞培養用治具によれば、可撓性培養容器FPを保持した状態で、例えば一般的に細胞培養で用いられるCO₂インキュベータと、培養液の追加や交換を行うクリーンベンチと、培養容器内の細胞の観察を行う顕微鏡との間の移動を行うことなどが可能となる。

[0041] 具体的には、図6に示すとおり、本実施形態では細胞培養用治具20と細胞培養用治具30の二種類の治具のいずれかが好適に用いられる。

細胞培養用治具20は、図6(a)に示されるとおり、ベース21と、ベース21上に設けられて1又は複数の窪みを有する載置面22と、この載置面22に対向して設けられた押圧蓋26を含んで構成されている。

押圧蓋26は、上蓋24と支柱25を介して接続されており、支柱25によって姿勢を維持されたままで上蓋24に対して接近又は離隔可能となって

いる。また、上蓋 24 はヒンジ 23 を介してベース 21 と接続されており、上蓋 24 がヒンジ 23 を軸に回転できるように構成されている。

[0042] よって、可撓性培養容器 F P を細胞培養用治具 20 に收容する際には、まずヒンジ 23 を介して上蓋 24 が開いた状態（押圧蓋 26 は第 2 の位置となる）で載置面 22 に可撓性培養容器 F P を載置し、次いで不図示のロック機構により上蓋 24 がベース 21 に対してロックされるまで上蓋 24 を閉じる（押圧蓋 26 の少なくとも一部が載置面に近づいて第 1 の位置となる）。

このとき、上蓋 24 の移動に伴って押圧蓋 26 が支柱 25 を介して上蓋 24 側に移動し、これにより可撓性培養容器 F P に押圧蓋 26 によって押圧力が付与される。なお、このときの押圧力は、押圧蓋 26 の質量によって発生させることもできるし、不図示の開き止めロックを用いて押圧蓋 26 を可撓性培養容器 F P に押付けた状態でロックをかけることによっても発生させることができる。

そして作業者は、押圧蓋 26 による押圧力が可撓性培養容器 F P に付与された状態の細胞培養用治具 20 を、CO₂ インキュベータ内に手などで持ち運んで可撓性培養容器 F P 内の細胞を培養する作業を行う。

なお、本実施形態の細胞培養用治具 20 は、CO₂ インキュベータ内で使用する態様以外にも、例えば細胞培養装置 1 内で使用してもよい。細胞培養用治具 20 を細胞培養装置 1 で使用する場合には架台 2 を省略してもよく、その場合にはベース 21 と架台支持柱 3 の先端とが接続して固定が可能な構造となっていることが好ましい。

[0043] 一方で細胞培養用治具 30 は、図 6 (b) に示されるとおり、1 又は複数の窪みを有する載置面を有する下蓋 31 と、この下蓋 31 の載置面に対向して設けられた押圧蓋 33 と、この下蓋 31 と押圧蓋 33 とを連結する平行リンク 32 とを含んで構成されている。

可撓性培養容器 F P を下蓋 31 の載置面に載置する際には、図 6 (b) の左側に示されるように、押圧蓋 33 は第 2 の位置に移動される。

そして載置面に可撓性培養容器 F P が載置された後は、図 6 (b) の右側

に示されるように、平行リンク32を駆動させて押圧蓋33を可撓性培養容器FPに押し当てる。

次いで、押圧蓋33による可撓性培養容器FPへの押圧力を維持しつつ不図示のロック機構で下蓋31と押圧蓋33とをロックする（押圧蓋33は載置面に近づいて第1の位置となる）。

なお、この細胞培養用治具30をCO₂インキュベータ内又は細胞培養装置1内で用いる態様は、上述した細胞培養用治具20の場合と同様なのでその説明は省略する。

[0044] 上記した第1実施形態では、図1でY方向に並んで2つの架台2が配置される例を示したが、これに限られず1つのみの配置でもよいし、3つ以上並べて配置してもよい。また、図2ではX方向に関して1つの架台のみ配置された例を示したが、これに限られずに2つ以上並べて配置してもよい。

さらに、架台2を収容するフレーム11を高さ方向（Z方向）に複数並べて配置してもよい。または、フレーム11内を高さ方向に複数の区画に分離し、この分離した区画内にそれぞれ架台2や押圧部材4を配置してもよい。

[0045] <<第2実施形態>>

次に本発明の第2実施形態について、図7を参照して説明する。

第2実施形態における第1実施形態との相違点は、可撓性培養容器FPに付与される圧力を、架台2'を介して負圧源14によって発生させている点、撮像装置7'が架台2'の上方に配置される点などが挙げられる。

よって以下では第1実施形態との相違点を主として説明し、第1実施形態と同じ構成あるいは機能を有する要素については第1実施形態と同一の符号を付してその説明を適宜省略する（後述する第3～第5実施形態、および変形例1、2についても同じ）。

[0046] 図7に示されるとおり、本実施形態の細胞培養装置1の架台2'は、載置面2'aと、この載置面2'aから下方（-Z方向）に陥没した窪み2'bを備えている。なお、本実施形態の窪み2'bは、架台2'をZ方向に貫通する貫通孔とはなっておらず、載置面2'aに対して有底の凹部となってお

り、さらに窪み2' bの底には流路1 4 bが形成されている。

また、本実施形態の細胞培養装置1は、架台2'の載置面2' a上に載置された可撓性培養容器F Pに対して窪み2' bを介して吸引力を発生させる負圧発生装置を備えている。この負圧発生装置は、負圧源1 4、この負圧源1 4と架台2'の流路1 4 bとを結ぶ配管1 4 aを含んで構成されている。

[0047] このように架台2'の下方には負圧発生装置が配置されているため、本実施形態の撮像装置7'は架台2'に対して上方に配置されてX方向またはY方向に移動が可能となっている。なお、本実施形態では押圧部材4は存在しないため、照明装置8'も撮像装置7'と並んで配置されている。

以上説明した第2実施形態によっても、押圧部材を用いずに負圧発生装置を用いて可撓性培養容器F Pの外表面F P sを吸引することで、可撓性培養容器F Pの外表面F P sは負圧の印加によって窪み2' b(1又は複数の凹凸)に倣った形状に変形し、これにより架台2'の窪み2' bに倣った凹凸部を外表面F P sに形成することができる。

なお本実施形態では負圧源1 4を用いて窪み2' b内を負圧にしたが、負圧源に代えて陽圧源を用いて窪み2' bを介して可撓性培養容器F Pに陽圧を印加してもよい。

[0048] <<第3実施形態>>

次に本発明の第3実施形態について、図8を参照して説明する。

第3実施形態における第1実施形態との相違点は、架台2''がアクリル樹脂などの透明部材で構成されている点、架台2''の窪み2'' bが貫通孔ではなく有底の凹部である点などが挙げられる。

[0049] 本実施形態の観察装置7は、透明な架台2''を介して可撓性培養容器F P内の細胞Cの凝集塊などを観察可能であることに加え、載置面2'' a上の培地や浮遊する細胞Cなども必要に応じて観察することが可能となっている。

換言すれば、本実施形態では、観察装置7は可撓性培養容器F Pのすべての箇所について観察や撮像することが可能となっている。

なお、本実施形態では、窪み2'' bが貫通孔ではなく有底の凹部であると

したが、これに限られずに窪み 2" b の形状を貫通孔としてもよい。

以上説明した第 3 実施形態によれば、可撓性培養容器 F P の凹部以外に細胞 C が偏在していないか確認することができ、これにより効率的に凹部内に細胞 C を集めて凝集塊を形成することが可能となる。

[0050] << 第 4 実施形態 >>

次に本発明の第 4 実施形態について、図 9 を参照して説明する。

第 4 実施形態における第 1 実施形態との相違点は、架台 2" がアクリル樹脂などの透明部材で構成されている点、架台 2" の窪み 2" b が貫通孔ではなく有底の凹部である点、さらに押圧部材 4 が削除されて調圧装置 1 5 が具備される点などが挙げられる。

[0051] すなわち、図 9 に示すとおり、本実施形態では押圧部材 4 の押圧に代えて、調圧装置 1 5 によって可撓性培養容器 F P が配置される空間 S P の圧力（気圧）が高められる。

一方で本実施形態の架台 2" b は凹部であるため、載置面 2" a に可撓性培養容器 F P が載置されたとき上記凹部が閉空間となっている。

したがって、調圧装置 1 5 による圧力の印加で空間 S P の圧力が上記閉空間よりも高まることで、窪み 2" b に倣った凹凸部が可撓性培養容器 F P の外面 F P s に形成されることとなる。

以上説明した第 4 実施形態によれば、押圧部材 4 などによって物理的に加圧するのではなく非接触状態で可撓性培養容器 F P を加圧するので、可撓性培養容器 F P の損傷を極力抑制しつつ所望の凹凸部を形成することができる。

[0052] << 第 5 実施形態 >>

次に本発明の第 5 実施形態について、図 10～13 を参照して説明する。

第 5 実施形態における第 1 実施形態との相違点は、本実施形態は培養液の攪拌装置と攪拌方法を含む点、さらには押圧部材 4 によって押圧された可撓性培養容器 F P と当該押圧部材 4 との間に挿通可能な攪拌部材 1 6 とこの攪拌部材 1 6 を駆動する攪拌部材駆動装置 1 7 を有する点などが挙げられる。

上記各実施形態で説明したとおり、可撓性培養容器 F P 内における培養液中の細胞 C は、凝集塊 C' として存在することができる。ここで、細胞 C に養分を効果的に供給することなどを目的として、所定時間ごとに可撓性培養容器 F P 内の培養液を攪拌する作業が必要となる。このとき、可撓性培養容器 F P 内には凝集塊 C' が形成されているので、この凝集塊 C' は可能な限り移動させずに培養液だけ攪拌することが望ましい。

そこで本実施形態では、以下で説明する培養液の攪拌装置および攪拌方法を採用した。

[0053] <培養液の攪拌装置>

図 10 に示すとおり、本実施形態の培養液の攪拌装置は、細胞 C と培養液とが充填された可撓性培養容器 F P の外面に変形を与える載置面と、この載置面に載置された可撓性培養容器 F P に対して圧力を印加する押圧部材 4 と、この押圧部材 4 と可撓性培養容器 F P の間を挿通可能な攪拌部材 16 と、この攪拌部材 16 を駆動する攪拌部材駆動装置 17 と、を含んで構成されている。

なお、載置面については、上記した第 1 実施形態～第 4 実施形態のいずれかに開示された架台（架台 2、架台 2' および架台 2''）に対応する載置面を適用してもよい。

[0054] 攪拌部材 16 は、押圧部材 4 による可撓性培養容器 F P への加圧状態が維持されたままで、これら押圧部材 4 と可撓性培養容器 F P との間に挿通される機能を有する。この攪拌部材 16 の材質としては特に制限はなく、例えばステンレスなどの金属材料やプラスチックなどの樹脂材料が適用できる。また、この攪拌部材 16 の少なくとも可撓性培養容器 F P と接触する面に、例えばフッ素系材料によるコーティングや研磨処理などの各種表面処理が施されて低摩擦化されていてもよい。なお、押圧部材 4 と攪拌部材 16 との接触による摩耗を抑制する観点からは、攪拌部材 16 のうち押圧部材 4 と対向する面も上記した表面処理が施されていてもよい。

より具体的には図 11 にも示されるとおり、本実施形態の攪拌部材 16 と

しては、その断面が矩形状で四隅の角がR状に面取り加工された直方体が例示できる。ここで、攪拌部材16のZ方向における厚みは、可撓性培養容器FPの厚みなどに応じて適宜設定されるが、可撓性培養容器FPの厚みに対して過度に厚い場合には攪拌時に可撓性培養容器FPの噛み込みや凝集塊Cの移動を誘発してしまう。従って、攪拌部材16の厚み（非限定的な一例）としては、3mm以下とすることが好ましい。また、攪拌部材16のY方向における幅（非限定的な一例）は、可撓性培養容器FPのY方向における幅に応じて適宜設定されるが、例えば5～10mm程度が好ましい。さらに攪拌部材16のX向における長さ（非限定的な一例）は、可撓性培養容器FPのX方向における幅などに応じて適宜設定されるが、例えば可撓性培養容器FPのX方向における幅よりも大きいことが好ましい。

[0055] 攪拌部材駆動装置17は、攪拌部材16を支持するとともに、この攪拌部材16を可撓性培養容器FPと押圧部材4との間における挿通方向（Y方向）へ移動させる機能を有する。攪拌部材駆動装置17としては公知の種々の動力機構が適用可能であり、例えばガスシリンダ、ラック&ピニオン機構、ボールネジ直動機構、あるいは磁石を利用した直動機構などが挙げられる。

図10に示すとおり、本実施形態の攪拌部材駆動装置17は、押圧部材4の一方の側（上面側）に搭載されており、押圧部材4の他方の側（底面側）に設置された攪拌部材16と接続されている。これにより、加圧装置5によって押圧部材4が架台2に対して進退する際にも、この押圧部材4の移動に追従することが可能となる。

なお、攪拌部材駆動装置17は、必ずしも押圧部材4に搭載される必要はなく、例えば載置面側に設けられていてもよい。また、押圧部材4以外に攪拌部材駆動装置17が設置される場合には、押圧部材4におけるZ方向の変位に追従可能とするため、Z方向に対して変位可能な弾性部材（バネ機構など）を介して攪拌部材16と攪拌部材駆動装置17が設置されることが好ましい。

また、攪拌部材駆動装置17は、ピストンなど公知の昇降機構を介して攪

拌部材 16 を昇降（Z 方向に関して移動）可能なように支持していてもよい。これにより、例えば制御装置 13 の制御の下で、押圧部材 4 の移動とは独立して攪拌部材 16 の Z 方向における位置を調整することが可能となる。

[0056] <培養液の攪拌方法>

次に、図 11 をさらに用いて本実施形態における培養液の攪拌方法について説明する。

すなわち、本実施形態の培養液の攪拌方法は、細胞 C と培養液とが充填された可撓性培養容器 F P を載置面に載置し、この可撓性培養容器 F P に対して押圧部材 4 で押圧し、さらに押圧部材 4 の押圧によって載置面と接する可撓性培養容器 F P の外面を変形させた状態で押圧部材 4 と可撓性培養容器 F P との間に攪拌部材 16 を挿通させることを主とした特徴としている。

[0057] まず図 11 (a) に攪拌部材 16 の初期位置を示す。同図に示すとおり、押圧部材 4 による可撓性培養容器 F P への押圧がなされて可撓性培養容器 F P 内で凝集塊 C' が形成され始めた初期においては、攪拌部材 16 は、押圧部材 4 あるいは載置面の端部に対応する初期位置で待機している。

なお、上記した待機位置としては、押圧部材 4 あるいは載置面の端部に限られず、可撓性培養容器 F P の内圧が変化しない位置であれば、例えば可撓性培養容器 F P の端部など他の位置でもよい。

そして図 11 (b) および (c) に示すとおり、可撓性培養容器 F P 内で凝集塊 C' が形成されて所定の時間が経過した後、制御装置 13 は、攪拌部材駆動装置 17 を制御して攪拌部材 16 を挿通方向（Y 方向）に移動させる制御を行う。これにより、押圧部材 4 による可撓性培養容器 F P への押圧が維持された状態で、押圧部材 4 と可撓性培養容器 F P との間に攪拌部材 16 が滑り込んで挿通される。なお、攪拌部材 16 の挿通方向への移動速度は、可撓性培養容器 F P の厚みなどに応じて適宜設定されるが、比較的低速（例えば $1 \sim 5 \text{ mm/sec}$ ）であることが好ましい。また、攪拌部材 16 の挿通方向への移動速度を一定とせず、例えば $1 \text{ mm/sec} \sim 2 \text{ mm/sec}$ の間で断続的に移動速度を変化させてもよい。

[0058] 本実施形態では、攪拌部材 16 の上記した挿通（移動）に伴って、可撓性培養容器 F P では攪拌部材 16 に接触している付近の領域のみ培養液の局所的な動きが発生し、この培養液の局所的な動きは攪拌部材 16 の移動とともに挿通方向（Y 方向）に遷移していく。そしてこの培養液の動きは局所的なものであるため、可撓性培養容器 F P 内の底に沈む凝集塊 C' には何ら影響を与えることがない。

これにより、可撓性培養容器 F P に形成された凹部（ウェル）に存在する凝集塊 C' が分散して不均一になってしまうのを抑制しつつ、可撓性培養容器 F P 内の上方に存在する培養液を効率的に攪拌することが可能となる。換言すれば、可撓性培養容器 F P 内で凝集塊 C' が沈んだ状態のままで培養液を緩やかに攪拌することが可能となる。

[0059] なお、制御装置 13 は、攪拌部材 16 が押圧部材 4 と可撓性培養容器 F P との間を挿通するとき、可撓性培養容器 F P にかかる圧力がほぼ一定となるように押圧部材 4 の押圧を調整してもよい。換言すれば、制御装置 13 は、攪拌部材 16 が押圧部材 4 と可撓性培養容器 F P との間を挿通する前後で、この可撓性培養容器 F P の内圧が変化しないように押圧部材 4 の押圧を調整してもよい。

すなわち、攪拌部材 16 の挿通によって可撓性培養容器 F P 内における内圧が変化することになるが、例えば制御装置 13 によって押圧部材 4 をやや上昇させる（載置面に対して離間させる）ことで、攪拌部材 16 による上記した内圧の上昇を相殺することが可能となる。

これにより可撓性培養容器 F P 内の凝集塊 C' に余計な刺激を与えずに、攪拌部材 16 による上記した攪拌動作を実行することが可能となる。

[0060] なお本実施形態では、攪拌部材 16 として、断面が矩形状で面取り R 加工が四隅に施された形状を用いたが、これに限定されない。

例えば図 12（a）に示すとおり、断面が矩形状で可撓性培養容器 F P と接触する底面側の角のみ面取り R 加工が施された形状を用いてもよい。

さらには、図 12（b）に示すとおり、断面が円または楕円形状で X 方向

に延びる円柱状の形状を用いてもよい。

さらには、図12(c)に示すとおり、断面が半円または半楕円形状であって、押圧部材4と接する上面が平面となった形状を用いてもよい。

[0061] また、本実施形態の攪拌部材16は、挿通方向(Y)に対して垂直(直角)となるように配置されていたが、これに限定されない。

例えば図13に示すとおり、攪拌部材16は、当該攪拌部材16の挿通方向に対して斜めに傾斜するよう配置されていてもよい。

より具体的には、図13(a)のとおり、攪拌部材16は、X方向における中心がY方向側に飛び出た形状(「ブーメラン形状」、あるいは「くの字形状」とも称される)となってもよい。これにより、攪拌部材16の挿通に伴って可撓性培養容器FPとの間で生じる摩擦を減少させることが可能となる。さらには、図13(b)のとおり、攪拌部材16は、X方向に対して傾斜するように、押圧部材4の両側に配置される攪拌部材駆動装置17のY方向における位置をズラしてもよい。この形態によっても、攪拌部材16の挿通に伴って可撓性培養容器FPとの間で生じる摩擦を減少させることが可能となる。

以上説明した本実施形態における培養液の攪拌装置は、例えば上記した細胞培養装置に組み込まれていてもよい。また、本実施形態における培養液の攪拌方法は、例えば上記した細胞培養方法に組み込まれていてもよい。

また、本実施形態では、押圧部材4の押圧によって載置面と接する可撓性培養容器FPの外面を変形させた状態で押圧部材4と可撓性培養容器FPとの間に攪拌部材16を挿通させたが、本発明はこの態様に限られるものではない。すなわち、例えば第2実施形態や第4実施形態のごとく押圧部材4を用いずに載置面側における可撓性培養容器FPの外面を変形させた状態で、可撓性培養容器FPの上面に攪拌部材16を滑らせて移動してもよい。換言すれば、外力を付与することで可撓性培養容器FPにおける載置面側の外面を変形させた状態で、少なくとも可撓性培養容器FPの上面に攪拌部材16を滑らせるように移動させてもよい。

[0062] 上記した各実施形態は、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々の変形が可能である。以下、各実施形態に適宜適用が可能な変形例について説明する。なお、既述した各実施形態の構成と同じ機能・作用を奏するものは同じ参照番号を付し、その説明は適宜省略する。

[0063] <<変形例 1 >>

図 1 4 は、上記各実施形態に適用が可能な細胞培養装置 1 の変形例を示す正面図である。この変形例に係る細胞培養装置 1 の制御装置 1 3 は、加圧装置 5 を制御して押圧部材 4 を X 軸周りに回転させる機能を備えている。より具体的には、本変形例の制御装置 1 3 は、押圧部材 4 に接続された加圧装置 5 a と 5 b による進退動作の周期をずらすことで、押圧部材 4 の姿勢を変位させる。

そして制御装置 1 3 は、架台 2 の載置面に載置された可撓性培養容器 F P に対して押圧部材 4 を用いて押圧力を付与した後に、加圧装置 5 を制御して押圧を維持しつつ押圧部材 4 を X 軸周りに微小な範囲で回転（揺動）させる制御を行う。

[0064] 本変形例 1 によれば、押圧部材 4 を X 軸周りに揺動させることで可撓性培養容器 F P 内の培地が攪拌され、これにより可撓性培養容器内の培地や透過ガスが効果的に攪拌される。

なお、本変形例では押圧部材 4 を X 軸周りに揺動させる例を説明したが、Y 軸周りに押圧部材 4 を揺動させてもよいし、X 軸および Y 軸以外の任意の軸周りに揺動させてもよい。

[0065] このように、本変形例 1 によれば、押圧部材 4 による比較的小さな傾きでも可撓性培養容器 F P 内では培養液の大きな移動を生じさせることが可能となる。したがって、本変形例 1 は、可撓性培養容器 F P 内で細胞 C を巻き上げるほどの強い攪拌（懸濁）を行うときに好適であると言える。

すなわち本変形例 1 は、細胞培養装置に限られず培養液の攪拌方法や攪拌装置としても有効である。かような培養液の攪拌方法は、細胞 C と培養液とが充填された可撓性培養容器 F P を載置面に載置しつつ、この可撓性培養容

器 F P に対して押圧部材 4 で押圧し、この押圧部材 4 の押圧によって載置面と接する可撓性培養容器 F P の外面を変形させた状態で、さらに押圧部材 4 を揺動させて培養液の攪拌を行うことを特徴する。また、培養液の攪拌装置は、細胞 C と培養液とが充填された可撓性培養容器 F P の外面に変形を与える載置面と、この載置面に載置された可撓性培養容器 F P に対して圧力を印加する押圧部材 4 と、この押圧部材 4 によって可撓性培養容器 F P に対して圧力が印加された状態で押圧部材を揺動させる制御を行う制御装置 1 3 を含むことを特徴とする。

[0066] <<変形例 2 >>

図 1 5 は、変形例 2 における細胞培養装置の架台を示す斜視図及び断面図である。

図 1 5 (a) に示されるとおり、本変形例の架台 2 ? は、載置面 2 ? a と、テーパ面 2 ? c によって形成された窪み 2 ? b を有している。なお、本変形例では窪み 2 ? b は 5 つ存在するが、5 つ以外の任意の数でもよい。

そして図 1 5 (b) に示されるとおり、テーパ面 2 ? c は、載置面 2 ? a に向かうにつれて径が漸次広くなるように設けられている。

[0067] 本変形例 2 によれば、テーパ面 2 ? c によって載置面 2 ? a と窪み 2 ? b との境界が鈍角状となるので、可撓性培養容器 F P が架台 2 ? に載置された際に不用意に損傷してしまうことなどが抑制される。

本発明は、以上で説明した各実施形態や各変形例に限定されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲内において種々の組み合わせや変更が可能であることを付言する。

例えば上記では、1 又は複数の窪み（貫通孔や凹部）が載置面に設けられることで可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面が構成されていたが、これに限られずに例えば複数の突起（短いピンなど）が載置面から立った形態や、金網のごとき網目状パターン部材の表面を載置面として構成してもよい。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明は、特に細胞培養の過程において細胞の凝縮塊を形成しながら大量培養する場合などに、好適に利用することが可能である。

符号の説明

- [0069] 1 細胞培養装置
- 2、2'、2"、2? 架台
- 3 架台支持柱
- 4 押圧部材
- 5 加圧装置
- 6 容器接続口
- 7 観察装置
- 8 照明装置
- 9 培地供給タンク
- 10 培地回収タンク
- 11 フレーム
- 12 ステージ装置
- 12a XYステージ
- 12b Zステージ
- 13 制御装置
- 14 負圧源
- 15 調圧装置
- 16 攪拌部材
- 17 攪拌部材駆動装置
- U 空調設備
- FP 可撓性培養容器
- C 細胞

請求の範囲

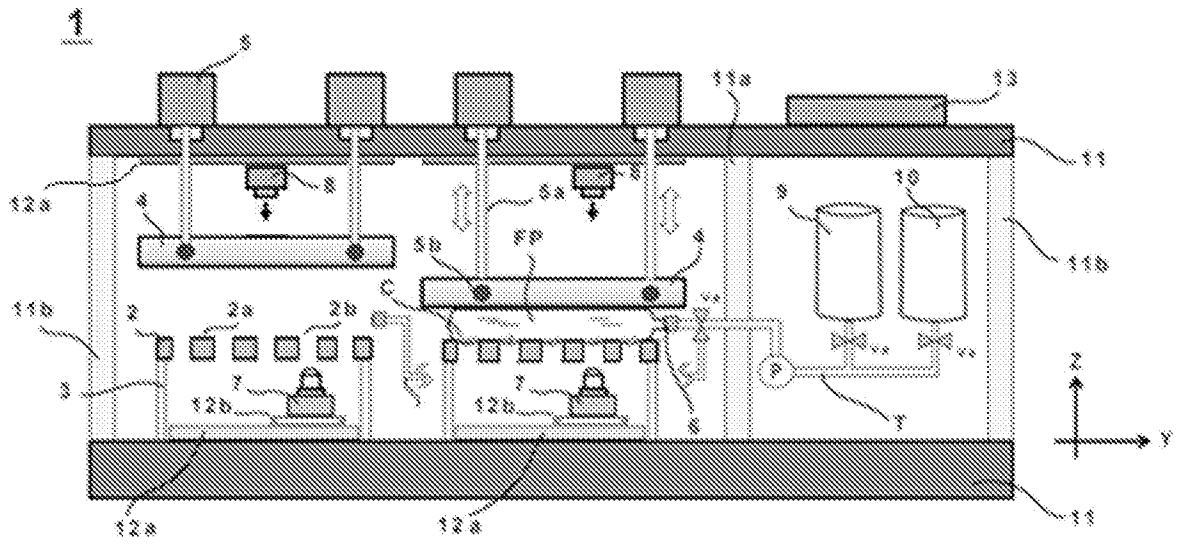
- [請求項1] 細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器を載置面に載置しつつ、前記可撓性培養容器に対して圧力を印加し、
前記圧力の印加によって前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を変形させた状態で、前記可撓性培養容器内の細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法。
- [請求項2] 前記載置面には1又は複数の凹凸が形成されてなり、
前記可撓性培養容器の外面は、前記圧力の印加によって前記1又は複数の凹凸に倣った形状に変形する請求項1に記載の細胞培養方法。
- [請求項3] 押圧部材を用いて前記載置面上の前記可撓性培養容器を押圧することで、前記可撓性培養容器の外面を前記1又は複数の凹凸に倣った形状に変形させる請求項2に記載の細胞培養方法。
- [請求項4] 前記細胞の培養中に前記圧力の印加を解除することにより、前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を平坦化させる請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞培養方法。
- [請求項5] 細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面と、
前記載置面に対向して設けられ、前記可撓性培養容器を加圧しながら前記載置面との間で当該可撓性培養容器を保持可能な第1の位置と、少なくともその一部が前記載置面に対して前記第1の位置よりも離れた第2の位置とを移動可能な押圧蓋と、
を含むことを特徴とする細胞培養用治具。
- [請求項6] 細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面と、
前記載置面に可撓性培養容器が載置された後に、前記可撓性培養容器に圧力を印加して前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を変形させる制御を行う制御装置と、
を含むことを特徴とする細胞培養装置。

- [請求項7] 前記載置面には1又は複数の凹凸が形成されてなり、
前記可撓性培養容器の外表面は、前記圧力の印加によって前記1又は複数の凹凸に倣った形状に変形する請求項6に記載の細胞培養装置。
- [請求項8] 前記載置面に対向して配置される押圧部材を更に具備し、
前記制御装置は、前記載置面に載置された前記可撓性培養容器に対して前記押圧部材を押し当てる制御を行う請求項6又は7に記載の細胞培養装置。
- [請求項9] 前記圧力が印加された状態における前記可撓性培養容器の内部を観察する観察装置をさらに具備する請求項6～8のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
- [請求項10] 前記観察装置は、前記載置面を介して前記可撓性培養容器の内部を観察する請求項9に記載の細胞培養装置。
- [請求項11] 前記観察装置を、少なくとも前記載置面と平行な方向に移動させるステージ装置を更に具備する請求項9又は10に記載の細胞培養装置。
- [請求項12] 前記観察装置は、前記載置面に対して複数設置されてなる請求項9～11のいずれか一項に記載の細胞培養装置。
- [請求項13] 細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器を載置面に載置しつつ、前記可撓性培養容器に対して押圧部材で押圧し、
前記押圧部材の押圧によって前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外表面を変形させた状態で、前記押圧部材と前記可撓性培養容器との間に攪拌部材を挿通させることを特徴とする培養液の攪拌方法。
- [請求項14] 前記攪拌部材の挿通方向に対して当該攪拌部材を斜めに傾斜させて前記押圧部材と前記可撓性培養容器との間を挿通させる請求項13に記載の培養液の攪拌方法。
- [請求項15] 前記攪拌部材が前記押圧部材と前記可撓性培養容器との間を挿通する前後で、前記可撓性培養容器にかかる圧力が変化しないように前記押圧部材の押圧を調整する請求項13又は14に記載の培養液の攪拌

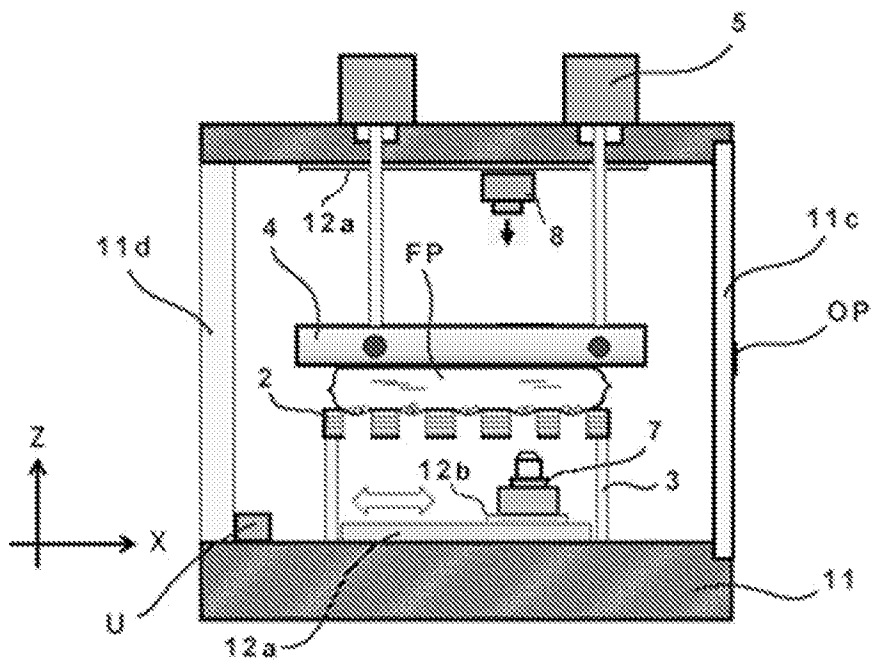
方法。

- [請求項16] 細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器の外面に変形を与える載置面と、
- 前記載置面に載置された前記可撓性培養容器に対して圧力を印加する押圧部材と、
- 前記押圧部材と前記可撓性培養容器の間を挿通可能な撹拌部材と、
- 前記撹拌部材を駆動する撹拌部材駆動装置と、
- を含むことを特徴とする培養液の撹拌装置。
- [請求項17] 前記撹拌部材は、当該撹拌部材の挿通方向に対して斜めに傾斜するよう配置されてなる請求項16に記載の培養液の撹拌装置。
- [請求項18] 前記撹拌部材が前記押圧部材と前記可撓性培養容器との間を挿通する前後で、前記可撓性培養容器にかかる圧力が変化しないように前記押圧部材の押圧を調整する制御装置と、をさらに含む請求項16又は17に記載の培養液の撹拌装置。
- [請求項19] 細胞と培養液とが充填された可撓性培養容器を載置面に載置しつつ、前記可撓性培養容器に対して押圧部材で押圧し、
- 前記押圧部材の押圧によって前記載置面と接する前記可撓性培養容器の外面を変形させた状態で、さらに前記押圧部材を揺動させて前記培養液の撹拌を行うことを特徴とする培養液の撹拌方法。

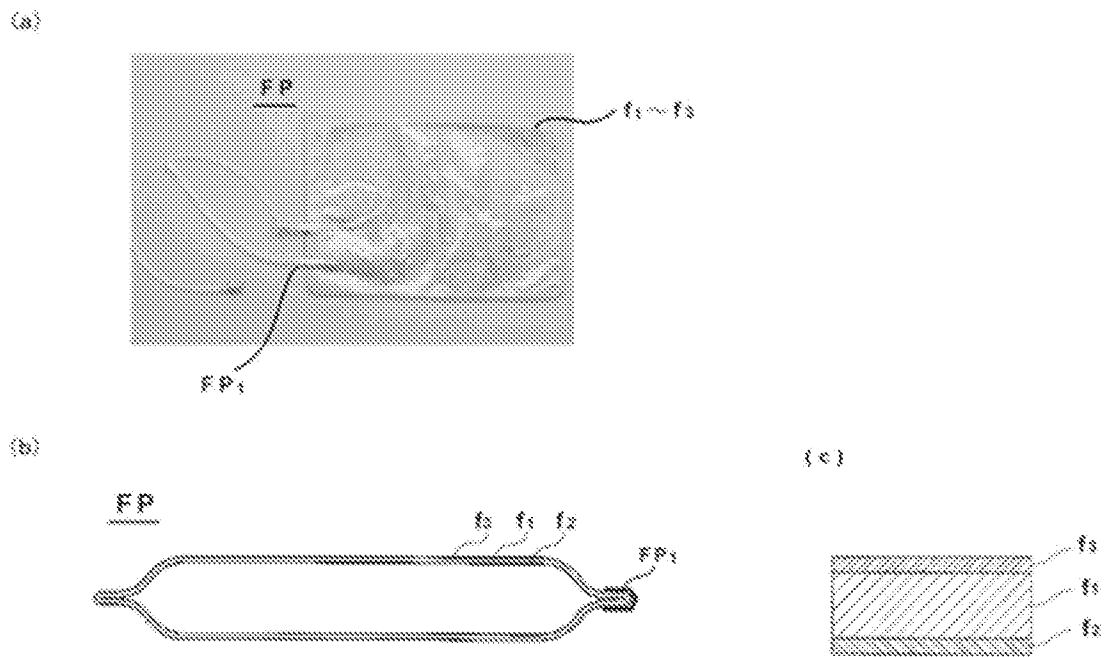
[図1]



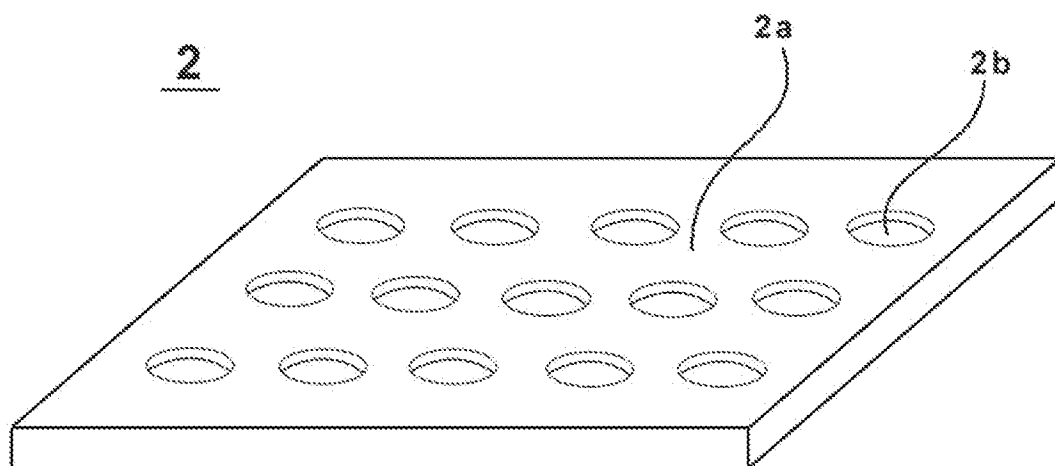
[図2]



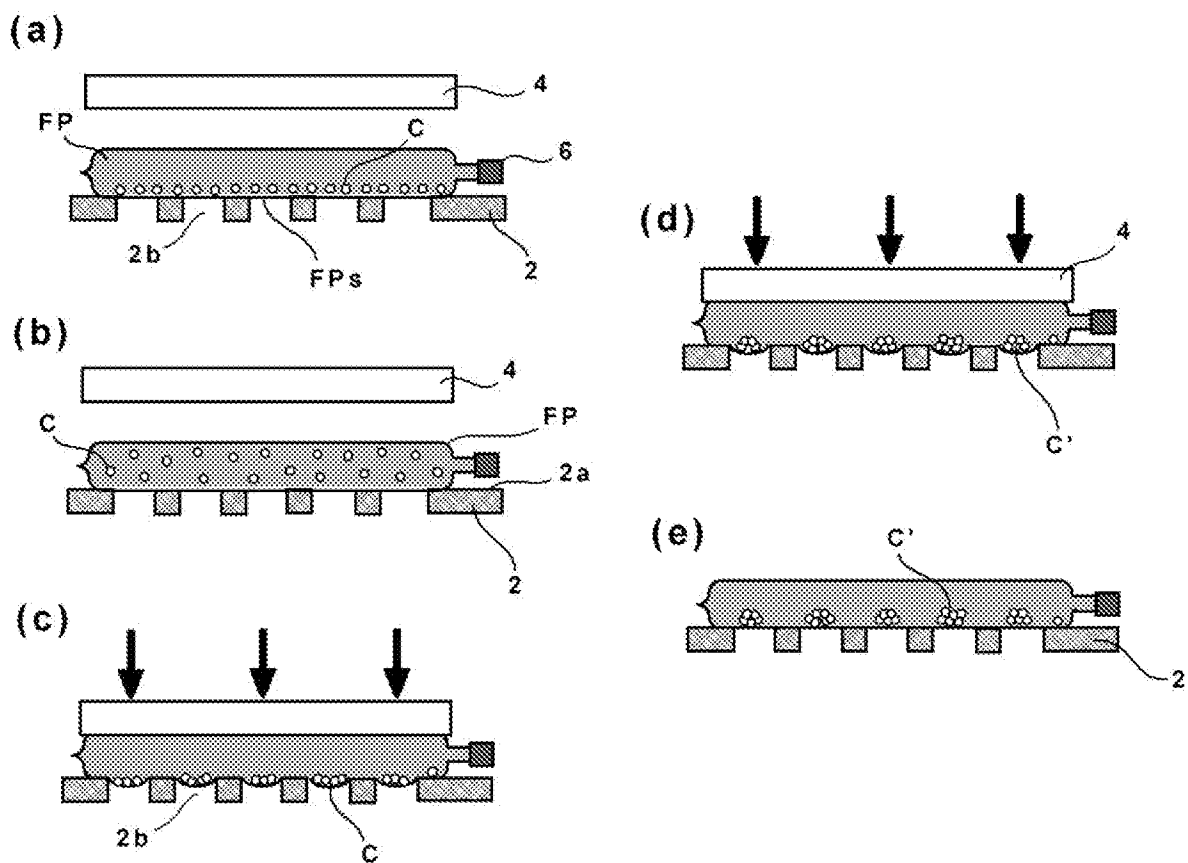
[図3]



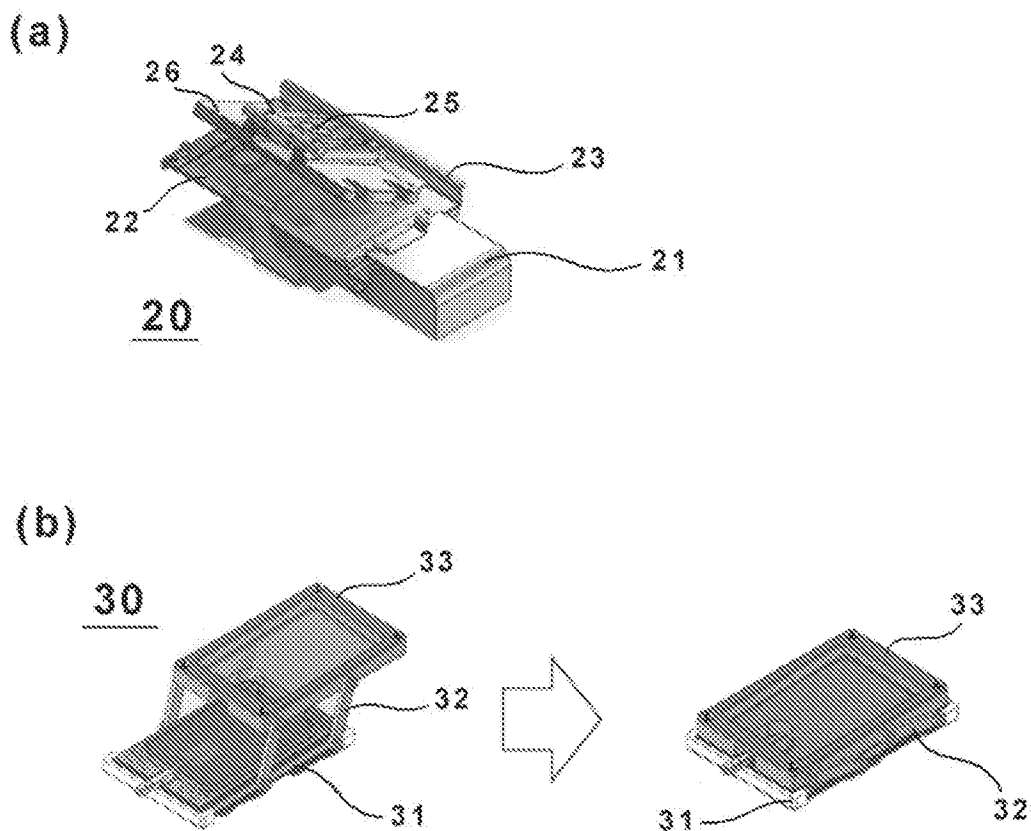
[図4]



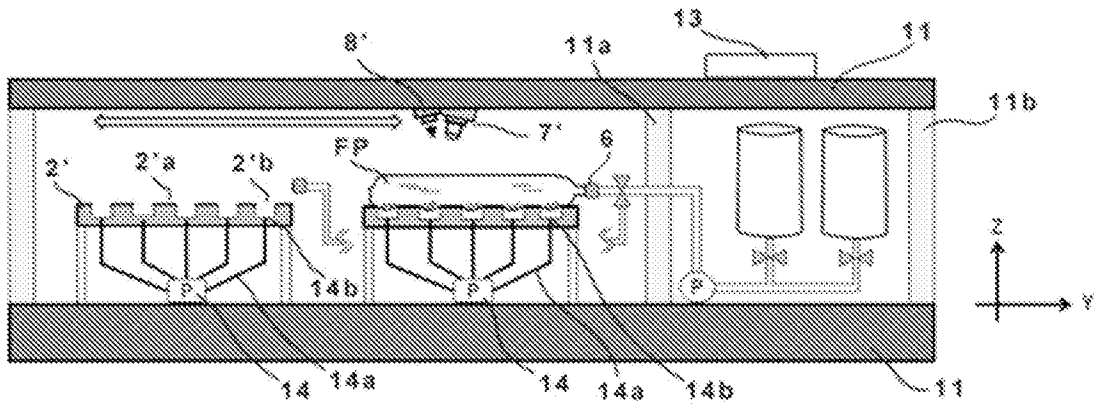
[図5]



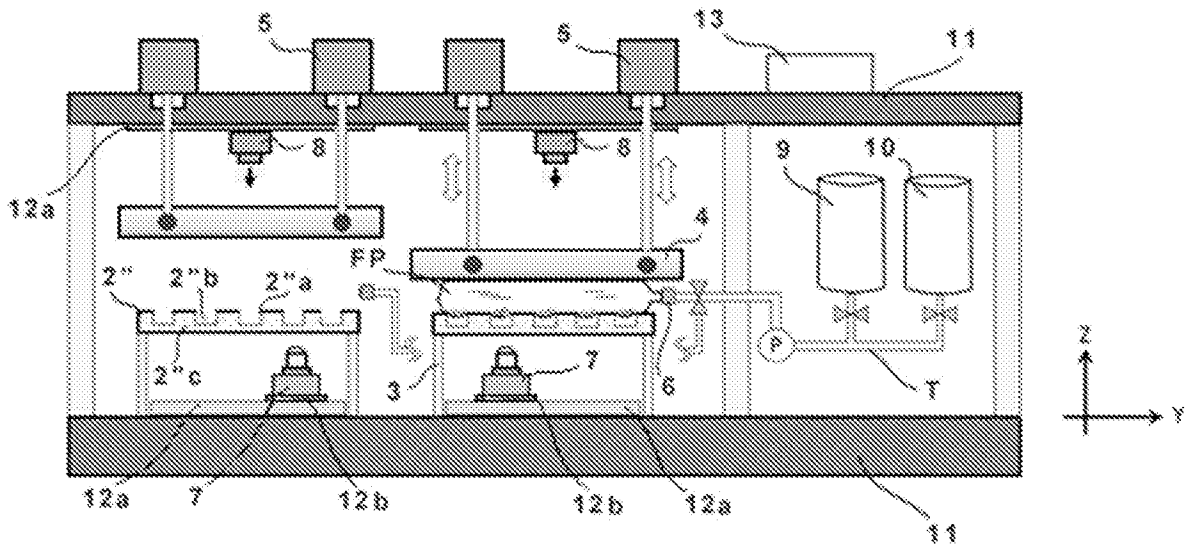
[図6]



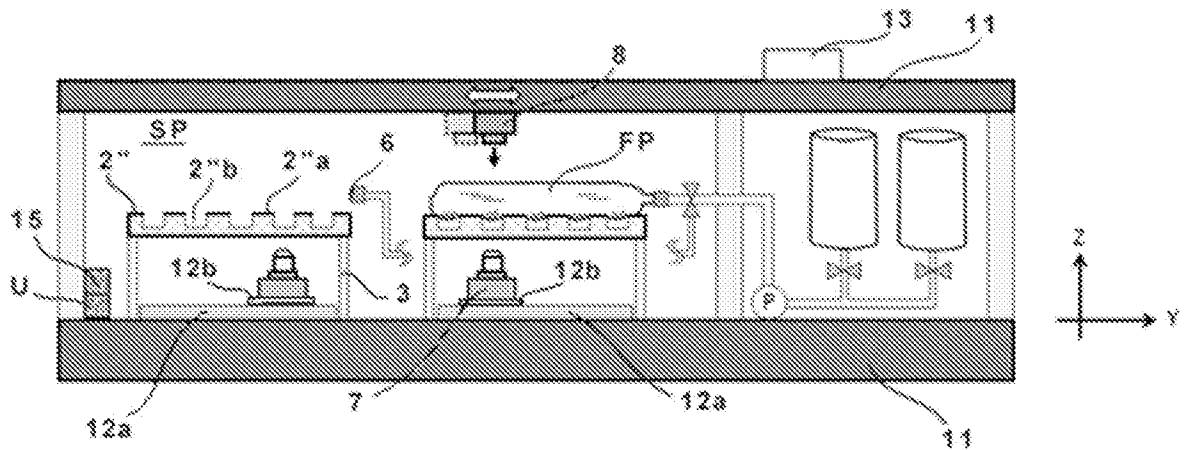
[図7]



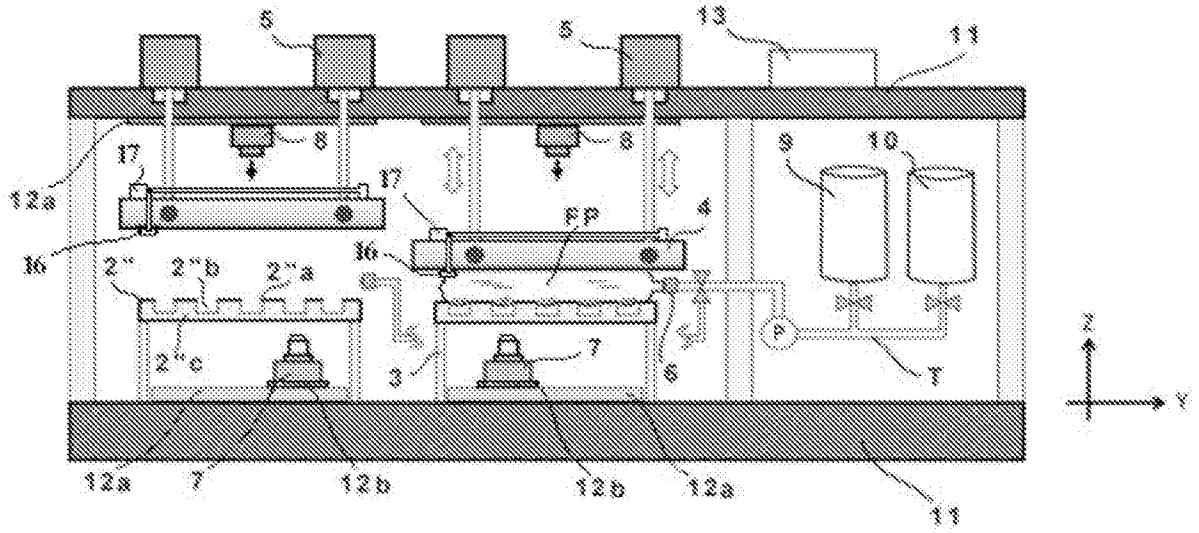
[図8]



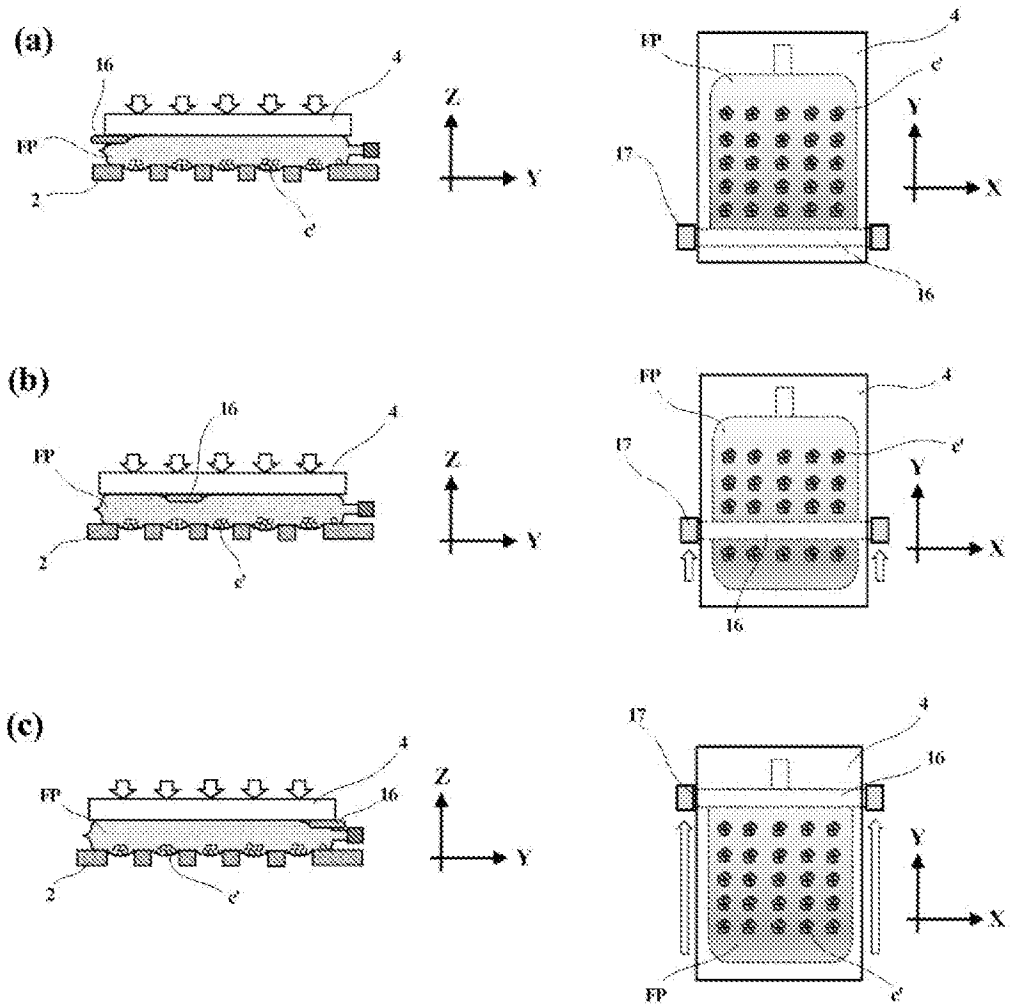
[図9]



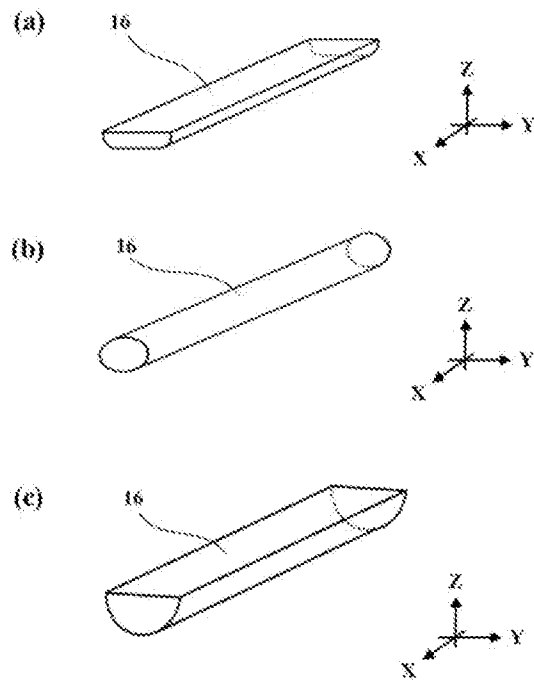
[図10]



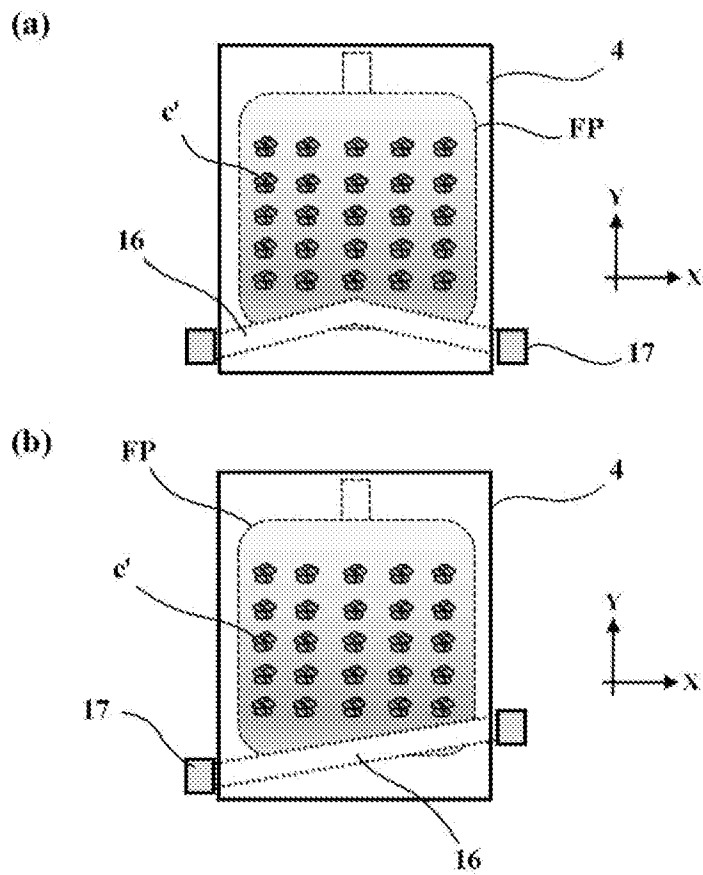
[図11]



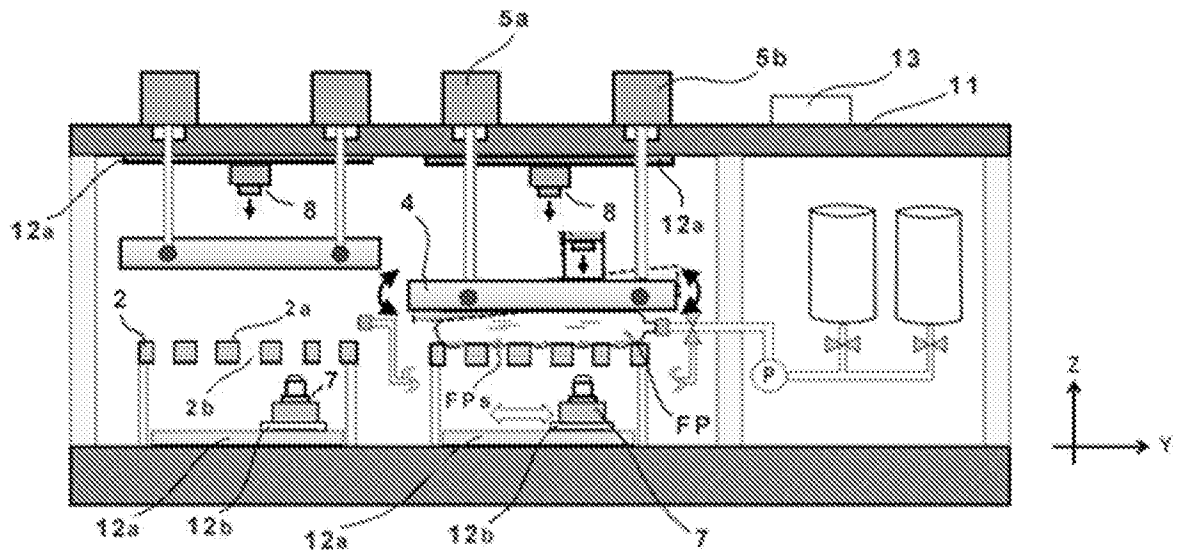
[図12]



[図13]

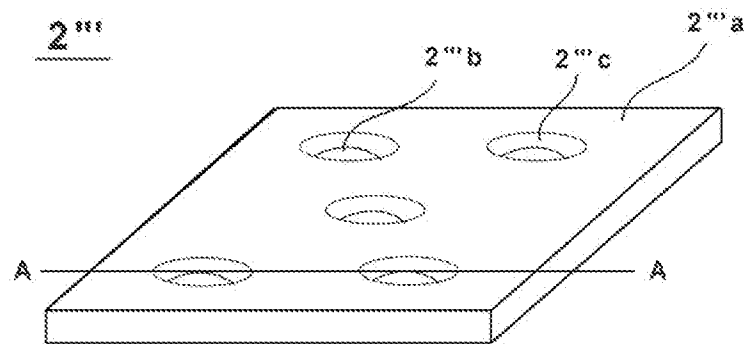


[図14]



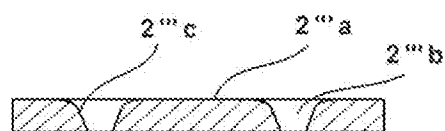
[図15]

(a)



(b)

A-A断面



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/00, C12M1/00, C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2012-239401 A (Toyo Seikan Kaisha, Ltd.), 10 December 2012 (10.12.2012), claims 1, 3, 6, 7; paragraphs [0031] to [0032], [0039], [0047], [0050]; fig. 1 (Family: none)	1-10/11,12, 15,18
X/Y	WO 2014/045532 A1 (Toyo Seikan Group Holdings, Ltd.), 27 March 2014 (27.03.2014), paragraphs [0012], [0017] to [0018], [0042], [0047], [0053] to [0061]; fig. 1, 9, 10 & JP 2014-64476 A & US 2015/0191262 A1 paragraphs [0023] to [0027], [0048] to [0049], [0085], [0093], [0103] to [0117]; fig. 1, 9, 10 & EP 2899283 A1 & KR 10-2015-0038073 A & CN 104619855 A	5-10,13,14, 16,17,19/11, 12,15,18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 September 2016 (15.09.16)	Date of mailing of the international search report 27 September 2016 (27.09.16)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/068212

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2014/208004 A1 (Toyo Seikan Group Holdings, Ltd.), 31 December 2014 (31.12.2014), paragraphs [0024] to [0029], [0037]; fig. 3, 5 & JP 2015-8667 A & US 2016/0208219 A paragraphs [0053] to [0060], [0074]; fig. 3, 5 & EP 3015544 A & CN 105339488 A & KR 10-2016-0007659 A	5-10, 12/ 11, 12
Y	WO 2015/004862 A1 (Toyo Seikan Group Holdings, Ltd.), 15 January 2015 (15.01.2015), paragraphs [0024], [0026] & JP 2015-15908 A & US 2016/0109354 A paragraphs [0058], [0060] & EP 3020797 A & CN 105209594 A & KR 10-2016-0011657 A	11
P,A	JP 2015-116150 A (Toyo Seikan Group Holdings, Ltd.), 25 June 2015 (25.06.2015), entire text (Family: none)	1-19

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N5/00, C12M1/00, C12M3/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), DWPI (Thomson Innovation)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X/ Y	JP 2012-239401 A（東洋製罐株式会社）2012.12.10, 請求項1、3、6及び7、[0031]-[0032]、[0039]、[0047]、[0050]、 図1等 (ファミリーなし)	1-10/ 11, 12, 15, 18	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 15.09.2016		国際調査報告の発送日 27.09.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 鈴木 崇之	4 B 4 1 5 2
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X / Y	WO 2014/045532 A1 (東洋製罐グループホールディングス株式会社) 2014.03.27, [0012]、[0017]-[0018]、[0042]、[0047]、[0053]-[0061]、図1、 図9、図10等 & JP 2014-64476 A & US 2015/0191262 A1, [0023]-[0027], [0048]-[0049], [0085], [0093], [0103]-[0117], Fig. 1, Fig. 9, Fig. 10, etc. & EP 2899283 A1 & KR 10-2015-0038073 A & CN 104619855 A	5-10, 13, 14, 16, 17, 19/ 11, 12, 15, 18
X/ Y	WO 2014/208004 A1 (東洋製罐グループホールディングス株式会社) 2014.12.31, [0024]-[0029]、[0037]、図3、図5 & JP 2015-8667 A & US 2016/0208219 A, [0053]-[0060], [0074], Fig. 3, Fig. 5 & EP 3015544 A & CN 105339488 A & KR 10-2016-0007659 A	5-10, 12/ 11, 12
Y	WO 2015/004862 A1 (東洋製罐グループホールディングス株式会社) 2015.01.15, [0024]、[0026] & JP 2015-15908 A & US 2016/0109354 A, [0058], [0060] & EP 3020797 A & CN 105209594 A & KR 10-2016-0011657 A	11
P, A	JP 2015-116150 A (東洋製罐グループホールディングス株式会社) 2015.06.25, 全文 (ファミリーなし)	1-19