

(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
2018年10月25日(25.10.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/194061 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/00 (2006.01) C12M 1/26 (2006.01)
B03B 5/00 (2006.01) C12N 5/0784 (2010.01)
C12M 1/12 (2006.01) C12N 5/0786 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/015879

(22) 国際出願日: 2018年4月17日(17.04.2018)

(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 2017-081617 2017年4月17日(17.04.2017) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 山下 敬太 (YAMASHITA Keita); 〒5660072 大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ 大阪工場内 Osaka (JP). 小嶋 真弘 (KOJIMA Masahiro); 〒5660072 大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ 大阪工場

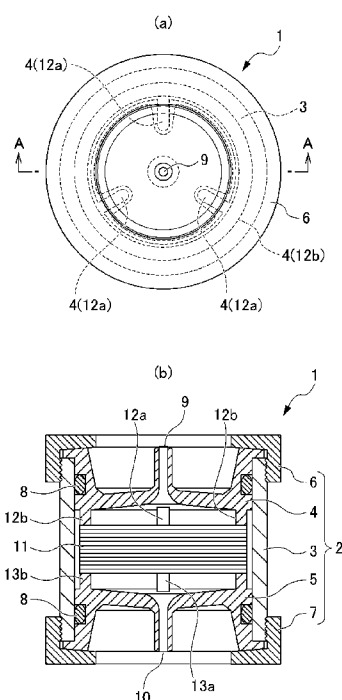
内 Osaka (JP). 牛崎 幸晋 (USHIZAKI Koshin); 〒5660072 大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ 大阪工場内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 新山 雄一 (NIHAYAMA Yuichi); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1-7-12 サピアタワー 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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.

(54) Title: FILTER CONTAINER FOR SEPARATING CELLS AND FILTER DEVICE FOR SEPARATING CELLS

(54) 発明の名称: 細胞分離用フィルター容器、細胞分離用フィルター装置



(57) Abstract: Provided are: a filter container for separating cells, said filter container holding a filter member housed therein and thus providing a filter device for separating cells by which cells can be collected at a high collection rate; a filter device for separating cells wherein a filter member is housed in the filter container for separating cells; a method for obtaining a cell-containing liquid, said method comprising a step wherein the filter device for separating cells is used; and a method for producing a dendritic cell-containing liquid, said method comprising a step wherein the filter device for separating cells is used. A filter container for separating cells which comprises a liquid inlet port, a liquid outlet port, a tubular filter member-housing part, a first filter-pressing part and a second filter-pressing part, wherein the first filter-pressing part is configured of three or more first protrusions and the ratio of the area of a polygon, said polygon being formed by individually connecting the tips of the three or more first protrusions, to the cross-sectional area of the inner space of the filter member-housing part at the first protrusion position is controlled within a preset range.

(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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 内部にフィルター部材を収容することにより、高い回収効率で細胞を回収できる細胞分離フィルター装置を与える細胞分離フィルター容器と、当該細胞分離フィルター容器内にフィルター部材が収容された細胞分離フィルター装置と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む細胞含有液の取得方法と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む樹状細胞含有液の製造方法とを提供する。液体導入口と、液体導出口と、筒状のフィルター部材収容部と、第1フィルター押え部と、第2フィルター押え部と、を有する細胞分離用フィルター容器において、第1フィルター押え部を3本以上の第1突起から構成し、3本以上の第1突起のそれぞれの先端を結んで形成される多角形の面積と、第1突起の位置におけるフィルター部材収容部の内部空間の断面の面積との比率を所定の範囲内とする。

明 細 書

発明の名称：

細胞分離用フィルター容器、細胞分離用フィルター装置

技術分野

[0001] 本発明は、細胞分離用フィルター容器と、当該細胞分離用フィルター容器内にフィルター部材が収容された細胞分離用フィルター装置と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む細胞含有液の取得方法と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む樹状細胞含有液の製造方法とに関する。

背景技術

[0002] 近年、血液学や科学テクノロジーの急速な進歩に伴い、全血・骨髓・臍帯血・組織抽出物をはじめとする体液から必要な血液分画のみを分離して患者に投与することで治療効果を高め、さらに、治療に必要なでない分画は投与しないことで副作用を抑制する、という治療スタイルが広く普及している。

[0003] 例えば、血液輸血もその1つである。赤血球製剤は、出血及び赤血球が不足する場合、又は赤血球の機能低下により酸素が欠乏している場合に使用される血液製剤である。赤血球製剤には、異常な免疫反応や移植片対宿主病（GVHD）等の副作用を誘導する白血球は不要である。このため、赤血球製剤では、フィルターで白血球が除去される必要がある。場合によっては白血球に加えて血小板も除去することもある。

[0004] 一方、血小板製剤は、血液凝固因子の欠乏による出血ないし出血傾向にある患者に使用される血液製剤である。血小板製剤の製造のためには、遠心分離により、血小板以外の不要な細胞や成分は除去され、必要とされる血小板成分のみが採取されている。

[0005] 加えて近年、白血病に向けた造血幹細胞移植が盛んに行われるようになってきている。造血幹細胞移植では、治療に必要な、造血幹細胞を含む白血球群を分離し投与する方法がとられている。この造血幹細胞のソースとして、ドナ

一の負担が少ない、増殖能力が優れている、等の利点から、骨髓や末梢血に加えて臍帯血が注目を浴びている。また近年、月経血中にも幹細胞が豊富に存在することが示唆されている。このため、これまで廃棄されていた月経血も貴重な幹細胞ソースとして利用される可能性がある。

また固形癌に治療に対しては樹状細胞療法が盛んに行われている。樹状細胞療法では、患者の血液や細胞培養液から治療のもととなる単球を含む細胞群を分離するケースがある。

[0006] 骨髓や末梢血等移植治療のソースに関して、不要な細胞を除き白血球を分離・純化して投与することが望まれている。また、使用時まで凍結保存する必要性から、凍結保存による赤血球溶血を防ぐことを目的に白血球は分離・純化されている。

[0007] 細胞分離方法として、最近では、赤血球と血小板は捕捉されず白血球のみを捕捉するフィルター材料を用いて白血球を回収する方法も報告されている（特許文献1、特許文献2、及び特許文献3を参照）。従来は遠心分離又は比重液を使用した密度勾配遠心法によって分離操作を行っていたが、フィルターを用いることで操作の簡略化や大型のセルプロセッシング施設が必要ない等の利点がある。

しかしながら、実際に細胞の分離を行う際には、原因は不明ながら、フィルター材料に充填する細胞分離材（フィルター部材）内を血液がうまく通過しなかったり、十分に高い回収率で目的とする種類の細胞を回収できない場合がある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2001-518792号公報

特許文献2：国際公開第98/32840号

特許文献3：特開平10-313855号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記のような事情に鑑み、本発明の目的は、内部にフィルター部材を収容することにより、高い回収効率で細胞を回収できる細胞分離フィルター装置を与える細胞分離フィルター容器と、当該細胞分離フィルター容器内にフィルター部材が収容された細胞分離フィルター装置と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む細胞含有液の取得方法と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む樹状細胞含有液の製造方法とを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、かかる課題を解決すべく、鋭意検討を進めた。その結果、液体導入口と、液体導出口と、筒状のフィルター部材収容部と、第1フィルター押え部と、第2フィルター押え部と、を有する細胞分離用フィルター容器において、第1フィルター押え部を3本以上の第1突起から構成し、3本以上の第1突起のそれぞれの先端を結んで形成される多角形の面積と、第1突起の位置におけるフィルター部材収容部の内部空間の断面の面積との比率を所定の範囲内とすることによって上記の課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

[0012] 〔1〕液体導入口と、液体導出口と、フィルター部材収容部と、第1フィルター押え部と、第2フィルター押え部と、を有する細胞分離用フィルター容器であって、

フィルター部材収容部が、両端に開口を有する筒状の部材であって、
液体導入口が、フィルター部材収容部の一方の開口端側に設けられ、
液体導出口が、フィルター部材収容部の他方の開口端側に設けられ、

第1フィルター押え部は、フィルター部材収容部の液体導入口側の位置において、フィルター部材収容部の内壁面又は内壁面の近傍から、フィルター部材収容部の内部空間の断面の中央又は略中央に向かって突出する、3本以上の第1突起からなり、

第1 フィルター押え部は、フィルター部材収容部内にフィルター部材が収容された際に、フィルター部材を変形させつつフィルター部材に当接するように設けられ、

第2 フィルター押え部は、第1 フィルター押え部と、第2 フィルター押え部とによってフィルター部材が挟み込まれるように、フィルター部材収容部の液体導出口側の位置に設けられ、

第1 フィルター押え部を構成する3本以上の第1 突起のそれぞれの先端を結んで形成される多角形の面積をA 1とし、第1 突起の位置におけるフィルター部材収容部の内部空間の断面の面積をA 2とする場合に、下記式：

$$\text{面積比率 } R 1 (\%) = A 1 / A 2 \times 100$$

で算出される面積比率R 1が、6～50%である、細胞分離用フィルター容器。

[0013] 〔2〕第2 フィルター押え部が、フィルター部材収容部の液体導出口側の位置において、フィルター部材収容部の内壁面又は内壁面の近傍より、フィルター部材収容部の内部空間の断面の中央又は略中央に向かって突出する、3本以上の第2 突起からなる、〔1〕に記載の細胞分離用フィルター容器。

[0014] 〔3〕第2 フィルター押え部を構成する3本以上の第2 突起の先端を結んで形成される多角形の面積をA 3とし、第2 突起の位置におけるフィルター部材収容部の内部空間の断面の面積をA 4とする場合に、下記式：

$$\text{面積比率 } R 2 (\%) = A 3 / A 4 \times 100$$

で算出される面積比率R 2が、6～50%である、〔2〕に記載の細胞分離用フィルター容器。

[0015] 〔4〕面積比率R 1が、6～40%である、〔1〕～〔3〕のいずれか1つに記載の細胞分離用フィルター容器。

[0016] 〔5〕面積比率がR 2が、6～40%である、〔3〕に記載の細胞分離用フィルター容器。

[0017] 〔6〕第1 突起の本数が、5本以上12本以下である、〔1〕～〔5〕のいずれか1つに記載の細胞分離用フィルター容器。

[0018] 〔 7 〕 第 2 突起の本数が、 5 本以上 1 2 本以下である、〔 3 〕 又は〔 5 〕 に記載の細胞分離用フィルター容器。

[0019] 〔 8 〕 〔 1 〕 ～〔 7 〕 のいずれか 1 つに記載の細胞分離用フィルター容器と、フィルター部材とを有し、

 フィルター部材が、フィルター部材収容部に収容されている、細胞分離用フィルター装置。

[0020] 〔 9 〕 フィルター部材が不織布からなる、〔 8 〕 に記載の細胞分離用フィルター装置。

[0021] 〔 1 0 〕 単球を含む細胞含有液を取得する方法であって、

 単球と、単球よりも平均サイズの小さな細胞である小細胞とを含む粗細胞含有液を、〔 8 〕 又は〔 9 〕 に記載の細胞分離用フィルター装置内に液体導入口から供給した後に前記細胞分離用フィルター装置を通過させることで、単球をフィルター部材に捕捉させることと、

 細胞分離用フィルター装置内に回収液を供給することで、フィルター部材に捕捉された単球を回収液中に遊離させて細胞含有液を生じさせることと、

 細胞含有液を細胞分離用フィルター装置内から回収することと、を含む方法。

[0022] 〔 1 1 〕 回収液を液体導出口から供給し、細胞含有液を液体導入口から回収する、〔 1 0 〕 に記載の方法。

[0023] 〔 1 2 〕 樹状細胞療法に用いられる樹状細胞含有液を製造する方法であって、

 単球と、単球よりも平均サイズの小さな細胞である小細胞とを含む粗細胞含有液を、〔 8 〕 又は〔 9 〕 に記載の細胞分離用フィルター装置内に液体導入口から供給した後に前記細胞分離用フィルター装置を通過させることで、単球を前記フィルター部材に捕捉させることと、

 細胞分離用フィルター装置内に回収液を供給することで、フィルター部材に捕捉された単球を前記回収液中に遊離させて、細胞含有液を生じさせることと、

細胞含有液を細胞分離用フィルター装置内から回収することと、
細胞含有液に含まれる単球を樹状細胞に分化させることと、
を含む方法。

[0024] [13] 回収液を液体導出口から供給し、細胞含有液を液体導入口から回収する、[12]に記載の方法。

発明の効果

[0025] 本発明によれば、内部にフィルター部材を收容することにより、高い回収効率で細胞を回収できる細胞分離フィルター装置を与える細胞分離フィルター容器と、当該細胞分離フィルター容器内にフィルター部材が收容された細胞分離フィルター装置と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む細胞含有液の取得方法と、当該細胞分離用フィルター装置を用いる工程を含む樹状細胞含有液の製造方法とを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]細胞分離用フィルター容器の1例の概略を示す図である。

[図2]フィルター部材を收容した状態の細胞分離用フィルター装置の1例についての断面を示す図である。

[図3]ノズル付内蓋の1例の概略を示す図である。

[図4]第1フィルター押え部における、第1突起の突出の態様のバリエーションを模式的に示す図である。

[図5]実施例及び比較例で用いた細胞分離用フィルター装置が分解された状態の概略を示す図である。

[図6]実施例及び比較例で用いた細胞分離用デバイスの回路の概略を示す図である。

発明を実施するための形態

[0027] 以下、本発明の実施形態について、図面を参照しつつ説明する。

[0028] ≪細胞分離用フィルター容器≫

細胞分離用フィルター容器2は、液体導入口9と、液体導出口10と、フィルター部材收容部3と、第1フィルター押え部12と、第2フィルター押

え部 1 3 と、を有する。

以下、細胞分離用フィルター容器について、単に「容器」とも記す。

かかる細胞分離用フィルター容器 2 内に、不織布等からなるフィルター部材 1 1 を收容することにより、細胞分離用フィルター装置 1 が構成される。

以下、細胞分離用フィルター装置について単に「フィルター装置」とも記す。

[0029] 上記の細胞分離用フィルター容器 2 の構成について以下説明する。

[0030] <フィルター部材收容部>

フィルター部材收容部 3 は、両端に開口を有する筒状の部材である。フィルター部材收容部 3 は、後述するフィルター部材 1 1 を收容する。

以下、フィルター部材收容部 3 について、收容部 3 とも記す。

[0031] 收容部 3 の形状は、両端に開口を有する筒状である。筒状について、径方向の断面の形状は円形であっても、多角形のような円形以外の形状であってもよい。

收容部 3 の形状の好ましい具体例としては、例えば、容量約 0. 1 ~ 4 0 0 m L 程度、内径 0. 1 ~ 1 5 c m 程度、厚さ 0. 1 ~ 5 c m 程度の円筒状や、一片の長さ 0. 1 ~ 2 0 c m 程度の正方形又は長方形で、厚さが 0. 1 ~ 5 c m 程度の四角柱状等が挙げられる。

[0032] 例えば、図 1、図 2 (a)、及び図 2 (b) に示される、容器 2 の好ましい態様では、円筒形状の容器 2 が、円筒状の收容部 3 と、その上部及び下部にある開口部に蓋をすることができるノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 と、收容部 3 とノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 とを固定するための環状外蓋 6、及び環状外蓋 7 とで構成される。

[0033] ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 には、容器 2 内部に液体を導入するための液体導入口 9 と、容器 2 から液体を排出するための液体導出口 1 0 とがそれぞれ設けられている。

液体導入口 9 及び液体導出口 1 0 は液体を送液するためのチューブを接続しやすくするために、ノズルで構成されている。前記ノズルの形状や大きさ

については特に限定はない。

なお、便宜上、液体導入口 9、液体導出口 10 と称するが、フィルター装置 1 の使用時には、液体導入口 9 から液体が排出されてもよく、液体導出口 10 から液体が導入されてもよい。

[0034] ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 は栓型になっている。ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 は、それぞれ、収容部 3 の内腔に押し込まれる。そうすることで、ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 が、収容部 3 の内面と接して固定される。

ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 のそれぞれと、収容部 3 との接触面にはシール 8 が設けられるのが好ましい。このシール 8 により、ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 と収容部 3 との気密性を確実にして外部からの微生物等の侵入を防ぐことができる。シール 8 の好ましい一例としては、例えば、図 2 (b) に示されるように、ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 それぞれの表面に設けられた溝の周囲に設けられた樹脂製のパッキン（Ｏリング）が挙げられる。シール 8 の配置や構成については特に限定はない。

[0035] ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 は、それぞれ、収容部 3 に直接固定できるようにされてもよい（図示せず）。ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 と収容部 3 とが接触する面に、例えば、ネジを設けることでノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 と収容部 3 とを固定することができる。この場合、図 2 (b) に示される環状外蓋 6、及び環状外蓋 7 は不要となる。

[0036] 容器 2 内では、前記細胞分離材 11 が積層されて充填される。例えば、繊維径の異なる細胞分離材 11 を 2 層以上積層したフィルターとすることにより、細胞を捕捉する箇所が分散され、目詰まりの発生が抑制されるとともに、フィルターからの細胞の分離・回収も効率的に行うことができる。なお、繊維径が同じ細胞分離材が連続して積層された部分は、積層された細胞分離材の枚数によらず 1 層として扱う。

[0037] また、容器 2 には、液体導入口 9 側に独立して細胞分離材 11 内に留まっている非付着細胞を洗浄するための洗浄液導入口（図示せず）が設けられて

もよい。また、容器 2 は、液体導出口 10 側に、細胞分離材 11 に捕捉された細胞を回収するための細胞回収液導入口（細胞含有液及び洗浄液の流れとは逆方向から細胞回収液を流すため）を、独立して、備えていてもよい（図示せず）。

[0038] 容器 2 は、任意の構造材料を使用して作製することができる。構造材料としては、具体的には、非反応性ポリマー、生体親和性金属、合金、及びガラス等が挙げられる。非反応性ポリマーとしては、アクリロニトリルブタジエンスチレンターポリマー（ABS）等のアクリルニトリルポリマー；ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、テトラフルオロエチレンとヘキサフルオロプロピレンのコポリマー、及びポリ塩化ビニル等のハロゲン化ポリマー；ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロリドアクリルコポリマー、ポリカーボネートアクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリスチレン、及びポリメチルペンテン等が上げられる。容器の材料として有用な金属材料（生体親和性金属、合金）としては、ステンレス鋼や、チタン、白金、タンタル、金、及びそれらの合金や、金メッキ合金鉄、白金メッキ合金鉄、コバルトクロミウム合金、及び窒化チタン被覆ステンレス鋼等が挙げられる。特に好ましくは、耐滅菌製を有する素材である。耐滅菌性を有する素材としては、具体的には、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメチルペンテン等が挙げられる。

[0039] <第 1 フィルター押え部>

第 1 フィルター押え部 12 は、収容部 3 の液体導入口 9 側の位置において、収容部 3 の内壁面又は内壁面の近傍から、収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の中央又は略中央に向かって突出する、3 本以上の第 1 突起 12a からなる。

ここで、内壁面の近傍の位置は、所定の条件を満たす第 1 突起 12a を設けることによる、所望する効果が得られる限り特に限定されない。内壁面の

近傍の位置は、典型的には、収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）において、内壁面からの距離が、収容部 3 の内部空間についての径方向断面における中央から内壁面までの距離の 20%以内である位置である。

収容部 3 の内壁面の近傍から第 1 突起 12a が突出する場合の具体例としては、例えば、図 3 に示されるノズル付内蓋 4 を収容部 3 にはめ込んで、第 1 突起 12a からなる第 1 フィルター押え部 12 を設ける場合が挙げられる。この場合、収容部 3 の内壁面よりも、ノズル付内蓋 4 が備える第 1 環状支持体 12b の厚さ分内側の位置から、第 1 突起 12a が収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の中央又は略中央に向かって突出する。

なお、図 2（a）、及び図 3 には、第 1 突起 12a が 3 本である場合について図示される。

[0040] 収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の中央とは、断面の形状における重心の位置を意味する。収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の中央は、断面の形状が円形であれば、円の中心であるし、正方形であれば、対角線の交点である。

収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の略中央は、上記の中央の近傍の領域であれば特に限定されない。略中央の範囲をあえて定義すれば、上記の中央を中心とする円形の領域であって、収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の面積に対して 50 面積%程度の面積を有する円の範囲である。

[0041] 第 1 突起 12a の突出の態様の具体例について、図 4（a）～図 4（d）に示す。

図 4（a）には、収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の中央に向かって、同じ長さの複数の第 1 突起 12a が真っ直ぐに突出する態様を示される。

図 4（b）には、収容部 3 の内部空間の断面（径方向断面）の略中央の領域に向かうが、中央からずれた方向に向かって、同じ長さの複数の第 1 突起 12a が真っ直ぐに突出する態様を示される。

また、図 4（c）に示されるように、第 1 突起 12a は屈曲しつつ突出し

てもよい。この場合、第1突起12aを、収容部3の径方向断面に対して垂直な方向から観察した形状は、例えば、円弧状でもよく、S字状でもよく、ジグザグ状でもよい。

さらに、図4(d)に示されるように、複数の第1突起12aは、長さの異なる複数種の突起を含んでいてもよい。

これらの中では、図4(a)、及び図4(b)に示されるように、収容部3の内部空間の断面（径方向断面）の中央に向かって、複数の第1突起12aが真っ直ぐ突出するのが好ましく、図4(a)に示されるように、収容部3の内部空間の断面（径方向断面）の中央に向かって、同じ長さの複数の第1突起12aが真っ直ぐに突出するのがより好ましい。

[0042] 第1突起12aの本数は、3本以上であれば特に限定されない。所望する細胞の回収率をより高めやすいことから、第1突起12aの本数は5本以上12本以下であるのが好ましく、6本以上10本以下であるのがより好ましい。

第1フィルター押え部12において、複数の第1突起12aは、等間隔で配置されてもよいし、不均一な間隔で配置されてもよい。フィルター部材11にむらなく細胞を含む液体を浸透させやすい点からは、第1フィルター押え部12において、複数の第1突起12aが、等間隔で配置されるのが好ましい。

[0043] 第1フィルター押え部12は、収容部3内に後述するフィルター部材11が収容された際に、フィルター部材11を変形させつつフィルター部材11に当接するように設けられる。

[0044] 第1フィルター押え部12を構成する第1突起12aの、第1突起12aが突出する方向に対して垂直な断面の形状は、特に限定されない。第1突起と、フィルター部材11とを広い面で接触させやすいことから、典型的には、一辺がフィルター部材11と当接する矩形であるのが好ましい。

[0045] 収容部3内にフィルター部材11が収容される場合、フィルター部材11は、後述する第2フィルター押え部13により支持された状態で、第1フィ

ルター押え部 1 2 と当接する。その結果、第 1 フィルター押え部 1 2 を構成する第 1 突起 1 2 a は、フィルター部材 1 1 の第 1 突起 1 2 a と当接する表面を、陥没させつつ押し込む。

その結果、フィルター部材 1 1 の第 1 突起 1 2 a と当接する部分の付近では、フィルター部材 1 1 が圧縮される。その一方で、フィルター部材 1 1 の第 1 突起 1 2 a と当接しない部分の付近ではフィルター部材 1 1 がゆるむ。このゆるみの現象は、フィルター部材 1 1 の弾性（反発力）により生じるものであり、表層における当接部からの距離に応じてゆるみの度合いが部分的に変化する。

そうすると、フィルター部材 1 1 の表層における、複数の第 1 突起 1 2 a の先端で形成される多角形に相当する領域では、フィルター部材 1 1 の表層付近の密度が疎になる。他方、フィルター部材 1 1 の表層における、複数の第 1 突起 1 2 a に当接する領域やその近傍の領域ではフィルター部材 1 1 の表層付近が密になる。

[0046] このように、フィルター部材 1 1 の表層に疎密が形成されることにより、分離対象の細胞のサイズに応じた、回収率の調整を行いやすくなると考えられる。

具体的には、フィルター部材 1 1 が疎である部分では、フィルター部材 1 1 内の表層付近での空孔が広がる一方で、フィルター部材 1 1 の厚さ方向の中心部付近では空孔のサイズが変化しない。そうすると、サイズの小さな細胞を、フィルター部材 1 1 の厚さ方向の中心部付近まで入り込ませることができる。一方で、フィルター部材 1 1 の表層付近では、サイズの大きな空孔にサイズの大きな細胞を捕捉しやすい。

[0047] その結果、細胞の捕捉後に、細胞分離用フィルター装置 1 内に回収液を導入した際に、フィルター部材 1 1 の表層付近の大きな細胞は回収液内に容易に遊離する一方で、フィルター部材 1 1 の厚さ方向中心部付近の小さな細胞は回収液内に遊離しにくい。

[0048] 上記の理由から、複数の第 1 突起 1 2 a の先端で形成される多角形の面積

を、収容部 3 の内部空間の径方向の断面の面積に対して、後述する所定の比率であるようにすることにより、所望するサイズの細胞の回収率を高められると推測される。

[0049] 具体的には、第 1 フィルター押え部 1 2 を構成する 3 本以上の第 1 突起 1 2 a のそれぞれの先端を結んで形成される多角形の面積を A 1 とし、第 1 突起 1 2 a の位置における収容部 3 の内部空間の断面（径方向の断面）の面積を A 2 とする場合に、下記式：

$$\text{面積比率 } R 1 (\%) = A 1 / A 2 \times 100$$

で算出される面積比率 R 1 が、6～50%であるように、第 1 突起 1 2 a が設けられる。

上記面積比率 R 1 としては、6～40%がより好ましく、6～30%がさらに好ましく、7～28%が特に好ましい。

[0050] 前述の通り、第 1 突起 1 2 a によりフィルター部材 1 1 が陥没させつつ押し込まれることにより、フィルター部材 1 1 の表層に疎密が形成される。そして、上記の面積比率 R 1 が 6～50%であることにより、フィルター部材 1 1 の表層付近での、サイズの大きな空孔へのサイズの大きな細胞の捕捉しやすさと、サイズの小さな細胞のフィルター部材 1 1 の厚さ方向の中心部付近への閉じ込めやすさを、適切な程度に調整することができる。また、表層の疎密は液体の流路確保にも大きく関わっている。

具体的には、R 1 が 6%未満であると、フィルター部材 1 1 の表層において、密である領域が広すぎるため、一部の疎な領域に液体の流路が限定される。その結果、偏流を起こしフィルター効果が得られない。他方で、R 1 が 50%超であると、フィルター部材 1 1 の表層において、疎密のコントラストが小さく、また疎である領域が広すぎる。このため、フィルター部材 1 1 内の表層付近で広がった空孔をサイズの大きな細胞が通過する。その結果、サイズの大小に関わらず細胞が厚さ方向のより奥部に閉じ込められ、細胞回収できない、もしくは分離対象の細胞のサイズに応じた回収率の調整が困難となる。

[0051] 第1フィルター押え部12は、収容部3の内壁から直接突出するように設けられてもよい。容器2へのフィルター部材11の収容が容易であることから、第1フィルター押え部12は、ノズル付内蓋4における容器2の収容部3の内部空間に差し込む先端面に、図3に示されるように、第1環状支持体12bと、第1突起12aとから構成されるように設けられるのが好ましい。

第1突起12aは、図3に示される通り、第1環状支持体12bにより支持される。

[0052] 上記のように、第1フィルター押え部12がノズル付内蓋4に設けられる場合、例えば、図4(a)中に点線で示される四角形Xが、複数の第1突起12aのそれぞれの先端を結んで形成される多角形に相当する。この四角形Xの面積が、前述のA1に相当する。

他方、図4(a)中、第1環状支持体12bの外周に相当する円の面積は、第1突起12aの位置における収容部3の内部空間の断面（径方向の断面）の面積であるA2に等しい。

[0053] <第2フィルター押え部>

第2フィルター押え部13の形状は、容器2の内部にフィルター部材11を収容した際に、フィルター部材11の片面から他方の面に向けて通液可能な状態でフィルター部材11を支持できれば特に限定されない。

上記の条件を満たす第2フィルター押え部13の具体例としては、メッシュや目皿等が挙げられる。

[0054] フィルター装置1に、細胞を含有する液体を通液させる際に、液体導入口9から液体導出口10へ、又は液体導出口10から液体導入口9へ液体を良好に流通させやすいことから、第2フィルター押え部13は、第1フィルター押え部12と同様に、収容部3の液体導出口10側の位置において、収容部3の内壁面又は内壁面の近傍より断面（径方向断面）の中央又は略中央に向かって突出する、3本以上の第2突起13aから構成されるのが好ましい。

収容部 3 の内壁面の近傍についての典型的な例は、第 1 フィルター押え部 1 2 について説明した通りである。

図 5 では、上記の 3 本以上の第 2 突起 1 3 a から構成される第 2 フィルター押え部 1 3 を備えるフィルター装置 1 又は容器 2 が示される。

[0055] 第 2 フィルター押え部が、3 本以上の第 2 突起 1 3 a から構成される場合、第 2 突起 1 3 a の突出のしかたや形状は、第 2 突起 1 2 a について説明した突出のしかたや形状と同様であるのが好ましい。

また、第 2 フィルター押え部 1 3 を構成する 3 本以上の第 2 突起 1 3 a のそれぞれの先端を結んで形成される多角形の面積を A_3 とし、第 2 突起 1 3 a の位置における収容部 3 の内部空間の断面（径方向の断面）の面積を A_4 とする場合に、下記式：

$$\text{面積比率 } R_2 (\%) = A_3 / A_4 \times 100$$

で算出される面積比率 R_2 が、6～50%であるように、第 2 突起 1 3 a が設けられるのが好ましい。

上記面積比率 R_2 としては、6～40%がより好ましく、6～30%がさらに好ましく、7～28%が特に好ましい。

R_2 が 6%未満、又は 50%超である場合には、前述の R_1 の値によっては、 R_1 が 6%未満、又は 50%超である場合について説明した不具合と同様の不具合が生じる場合がある。

[0056] 以上説明した、細胞分離用フィルター容器 2 に、後述するフィルター部材 1 1 を収容して細胞分離用フィルター装置 1 を構成することにより、高い回収率で目的とする細胞を回収しやすい。

[0057] <<細胞分離用フィルター装置>>

細胞分離用フィルター装置 1 は、上記の通り、前述の細胞分離用フィルター容器 2 に、フィルター部材 1 1 を収容して構成されている。

図 6 には、前述の細胞分離用フィルター容器 2 が、収容部 3、ノズル付内蓋 4、ノズル付内蓋 5 と、環状外蓋 6、及び環状外蓋 7 から構成される場合の、細胞分離用フィルター装置 1 の概略分解図が示される。

以下、フィルター部材 11 について説明する。

[0058] <フィルター部材>

フィルター部材 11 の形態は、特に限定されず、連通孔構造の多孔質体、繊維の集合体、織物等が挙げられる。好ましくは繊維で構成される織布又は不織布であり、より好ましくは不織布である。

[0059] フィルター部材 11 の材質としては、例えば、ポリオレフィン（例えば、ポリプロピレン、ポリエチレン、高密度ポリエチレン、及び低密度ポリエチレン等）、ポリエステル、塩化ビニル、ポリビニルアルコール、塩化ビニリデン、レーヨン、ビニロン、ポリスチレン、アクリル系樹脂（例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクロニトリル、ポリアクリル酸、ポリアクリレート等）、ナイロン（例えば、脂肪族ポリアミド、芳香族ポリアミド（アラミド））、ポリウレタン、ポリイミド、キュプラ、ケブラー、カーボン、フェノール樹脂、テトロン、パルプ、麻、セルロース、ケナフ、キチン、キトサン、ガラス、及び綿等を挙げることができる。中でも、ポリエステル、ポリプロピレン、アクリル、レーヨン、ナイロン、ポリブチレンテレフタレート、及びポリエチレンテレフタレート等の高分子を好適に用いることができる。フィルター部材 11 は、これらの材質のうち、単一の材質からなってもよいし、複数の材質を組み合わせた複合材からなってもよい。

[0060] フィルター部材 11 の平均繊維径としては、目的の細胞の種類に合わせて適宜選択すればよく特に限定はない。

[0061] フィルター部材 11 の性能をより向上させるために、フィルター部材 11 に親水化処理を行ってもよい。

親水化処理により、目的とする必要細胞以外の細胞における非特異的な捕捉の抑制、細胞含有液を偏り無くフィルター部材 11 中に通過させる性能の向上、必要細胞の回収効率向上等の効果が付与され得る。

[0062] 親水化処理方法としては、

水溶性多価アルコール、水酸基、カチオン基、又はアニオン基を有する化合

物、あるいはその共重合体（例えば、ヒドロキシエチルメタクリレート、及びジメチルアミノエチルメタクリレート等を含む単量体の共重合体等）を吸着させる方法；

水溶性高分子（ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等）を吸着させる方法；

疎水性膜に親水性高分子を固定する方法（例えば、表面に親水性モノマーを化学的に結合させる方法等）；

電子線照射する方法；

含水状態で細胞分離フィルターに放射線を照射することで親水性高分子を架橋不溶化する方法；

乾燥状態で熱処理することにより親水性高分子を不溶化し固定する方法；

疎水性膜の表面をスルホン化する方法；

親水性高分子と疎水性ポリマードープとの混合物から膜をつくる方法；

アルカリ（NaOH、KOH等）の水溶液による処理により膜表面に親水基を付与する方法；

疎水性多孔質膜をアルコールに浸漬した後、水溶性ポリマー水溶液で処理乾燥後、熱処理や放射線等で不溶化処理する方法；又は、

界面活性作用を有する物質を吸着させる方法等が挙げられる。

[0063] 親水性高分子としては、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、エチレンービニルアルコール共重合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、多糖類（セルロース、キチン、キトサン等）、及び水溶性多価アルコール等が挙げられる。

[0064] 疎水性ポリマーとしては、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン（ポリエチレン、ポリプロピレン等）、アクリル、ウレタン、ビニロン、ナイロン、及びポリエステル等が挙げられる。

[0065] 回収目的とする細胞のフィルター部材への付着性を向上させるために、細胞付着性のタンパク質や、目的とする幹細胞上の発現されている特異的抗原に対する抗体を、フィルター部材上に固定化してもよい。細胞付着性のタン

パク質としては、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、及びコラーゲン等が挙げられる。抗体としては、CD73、CD90、CD105、CD166、CD140a、及びCD271等が挙げられるが、これらに限定されない。固定化方法としては、例えば、一般的なタンパク質の固定化方法である、臭化シアン活性化法、酸アジド誘導体法、縮合試薬法、ジアゾ法、アルキル化法、及び架橋法等の方法を任意に用いることができる。

[0066] フィルター部材11の厚さは特に限定されない。フィルター部材11の厚さは、前述の第1フィルター押え部12と第2フィルター押え部13との間隔を考慮して適宜決定される。典型的には、フィルター部材11の厚さは、3～20mmが好ましく、5～10mmがより好ましい。

フィルター部材11の開口径としては、通気度 ($\text{cc}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$) と厚み (mm) の積 (通気度係数M) から定義することができる。範囲としては7.0以上14.2以下が好ましく、9.2以上10.0以下が最も好ましい。

[0067] 《所望する細胞を含む細胞含有液を取得する方法》

以上説明した細胞分離用フィルター装置を用いる処理により、所望する細胞を含む細胞含有液を取得することができる。

[0068] <細胞>

取得対象の細胞は、特に限定されない。例えば、人工多能性幹細胞 (iPS細胞)、胚性幹細胞 (ES細胞)、間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系細胞、脂肪由来間質幹細胞、多能性成体幹細胞、骨髓ストローマ細胞、及び造血幹細胞等の多分化能を有する生体幹細胞；T細胞、B細胞、キラーT細胞 (細胞障害性T細胞)、NK細胞、NKT細胞、及び制御性T細胞等のリンパ球系の細胞；マクロファージ、単球、樹状細胞、顆粒球、赤血球、血小板等、神経細胞、筋細胞、線維芽細胞、肝細胞、及び心筋細胞等の体細胞；、及び、遺伝子の導入や分化等の処理を行った細胞が挙げられる。

[0069] このような細胞の中では、回収率を高める効果が顕著に表れやすいことから白血球、造血幹細胞及び／又は単核球が好ましく、単球がより好ましい。

なお、白血球としては、末梢血中の好中球、好酸球、及び好塩基球等の顆粒球、並びに単球、及びリンパ球等の単核球が挙げられる。

以下、単球を含む細胞含有液を取得する方法を代表例として説明する。

[0070] <単球を含む細胞含有液を取得する方法>

単球を含む細胞含有液を取得する好適な方法は、

単球と、単球よりも平均サイズの小さな細胞である小細胞とを含む粗細胞含有液を、前述の細胞分離用フィルター装置 1 内に液体導入口 9 から供給した後に細胞分離用フィルター装置 1 を通過させることで、単球をフィルター部材 11 に捕捉させることと、

細胞分離用フィルター装置 1 内に回収液を供給することで、フィルター部材 11 に捕捉された単球を回収液中に遊離させて記細胞含有液を生じさせることと、

細胞含有液を細胞分離用フィルター装置 1 内から回収することと、を含む方法である。

[0071] 粗細胞含有液としては、少なくとも単球と、単球よりも平均サイズの小さな細胞である小細胞とを含む細胞を含む懸濁液であれば特に限定されず用いることができる。かかる小細胞の好適な具体例としては、顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）、リンパ球、赤血球、及び血小板等が挙げられる。例えば、臍帯等の生体組織を酵素処理や破碎処理や抽出処理や分解処理や超音波処理等をした後の懸濁液、血液や骨髓液、臍帯血等の体液、血液や骨髓液を密度勾配遠心処理やろ過処理や酵素処理や分解処理や超音波処理等の前処理をして調製された細胞懸濁液等が粗細胞含有液として例示される。

また、粗細胞含有液は、上記した白血球等の細胞を生体外で培養液や刺激因子等を用いて培養や増殖等をした後の懸濁液であってもよい。

ここで、「粗細胞含有液」とは、細胞分離用フィルター装置 1 による細胞を取得する処理に供される細胞含有液を意味する。

[0072] 細胞分離用フィルター装置 1 の液体導入口 9 から粗細胞含有液を導入する際には、液体導入口 9 と液体導出口 10 との間に差圧を生じさせればよい。

差圧を生じさせる方法は、特に限定されない。かかる方法としては、粗細胞含有液を加圧させる、又は重力差を利用することで細胞分離用フィルター装置 1 内へ粗細胞含有液の導入させる方法や、液体導出口 10 側を減圧して、細胞分離用フィルター装置 1 内へ粗細胞含有液を吸入する方法等が挙げられる。

このようにして、細胞分離用フィルター装置 1 内に粗細胞含有液を供給し、粗細胞含有液をフィルター部材 11 と接触させて、単球をフィルター部材 11 に捕捉させる。

差圧の程度としては、容器 2 や、フィルター部材 11 に破損が生じたり、粗細胞含有液に含まれる細胞の過度の破砕が生じたりしない程度であれば、特に限定されない。

フィルター部材 11 は、単球を捕捉できるものを使用すればよい。

[0073] 次いで、単球を捕捉したフィルター部材 11 に回収液を供給することで、フィルター部材 11 から単球を回収液中に遊離させ、単球を含む細胞含有液を生成させる。この白血球等を含む回収液を液体導入口 9 から回収専用のバッグ等に導入することで白血球等を回収することができる。

回収液は、液体導出口 10 又は液体導入口 9 から細胞分離用フィルター装置 1 内に導入される。また、単球を含む細胞含有液を、細胞分離用フィルター装置 1 内から回収する方法は特に限定されない。典型的には、液体導入口 9 から単球を含む細胞含有液が回収される。

回収液の流れによって、フィルター部材 11 に捕捉された単球を回収液中に遊離させやすいことから、回収液を、液体導出口 10 からフィルター部材 11 を通過するように細胞分離用フィルター装置 1 内に導入するのが好ましい。この場合、所謂逆洗操作を行うのが好ましい。逆洗操作は、液体導出口 10 から回収液を導入しつつ、単球を含む細胞含有液をそのまま液体導入口 9 から回収する操作である。

[0074] 回収液は、細胞と等張である溶液であれば特に限定はない。回収液の具体例としては、生理食塩液やリンゲル液等の注射溶剤として使用実績のある液

や、緩衝液、及び細胞培養用の培地等が挙げられる。特に、細胞含有液の使用が培養工程を経る際は、そのまま培養が行える培地が好ましい。細胞含有液が培養工程を経ずそのまま治療に用いられる際は、生理食塩液等の点滴等に使用実績のある等張液等、安全性が保証されている回収液を使用することが好ましい。

[0075] 以上説明した操作は、室温下で行われてもよいし、冷蔵温度下で行われてもよい。冷蔵温度下で行われる操作としては、冷蔵された粗細胞含有液の処理が挙げられる。粗細胞含有液の保管としては、冷蔵温度に設定した冷蔵庫による保管、ウォーターバスによる保管、及びドライアイスによる保管等が挙げられる。汎用性から冷蔵庫による保管が好ましい。冷蔵温度としては、 1°C 以上 6°C 以下が好ましく、より好ましくは 3°C 以上 5°C 以下が好ましい。冷蔵温度が 1°C 未満では細胞は死滅し、 6°C を超えて保存すると細菌が繁殖しコンタミネーションを起こす可能性がある。

[0076] また、フィルター部材 11 の状態を整えて、単球を捕捉しやすくする観点から、細胞分離用フィルター装置 1 内に粗細胞含有液を供給する前に、液体導入口 9 又は液体導出口 10 から生理食塩水又は緩衝液を細胞分離用フィルター装置 1 内に導入し、フィルター部材 11 と生理食塩水又は緩衝液とを接触させてもよい。

[0077] 回収液を用いて単球を含む細胞含有液を生じさせる前に、生理食塩水又は緩衝液を液体導入口 9 から導入して液体導出口 10 から導出させることにより、フィルター内の夾雑成分を除去できる。これにより回収される細胞（単球）内へ不要成分を低減することができる。

[0078] ≪樹状細胞療法に用いられる樹状細胞含有液を製造する方法≫

前述の細胞分離用フィルター装置 1 を用いて、樹状細胞療法に用いられる樹状細胞含有液を好適に製造することができる。

かかる方法では、まず、前述の単球を含む細胞含有液の取得方法に従って、単球を含む細胞含有液を取得する。

次いで、得られた細胞含有液に含まれる単球を、周知の種々の方法に従っ

て、樹状細胞に分化させる。典型的には、樹状細胞の分化誘導用のタンパク質キットや、培地が市販されており、これらを用いて、単球から樹状細胞を誘導することができる。

実施例

[0079] 以下、実施例において本発明に関して詳細に述べるが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

[0080] (実施例 1 ～ 6、比較例 1、及び比較例 2)

図 5 に示されるように、表 1 に示す高さ（内寸 5 mm、又は 12 mm）と直径（内径 60 mm、又は 45 mm）の円筒状の収容部 3 に、直径 60 mm、又は 45 mm の丸型にカットされたポリエステル不織布（目付 35 g/m²、フィルター部材 11）を 50 枚、もしくは 105 枚充填した。次いで、収容部 3 の上下の開口部に、第 1 フィルター押え部を備えるノズル付内蓋 4 と、第 2 フィルター押え部を備えるノズル付内蓋 5 とを差し込んだ。ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 を、これらの上から環状外蓋 6、及び環状外蓋 7 でネジ止めし、図 1、2 (a)、及び 2 (b) に示されるような構造を有する細胞分離フィルター装置 1 を作製した。

[0081] なお、ノズル付内蓋 4、及びノズル付内蓋 5 には、互いに同一の形状の第 1 フィルター押え部と、第 2 フィルター押え部とが設けられた。そして、第 1 突起 12 a と、第 2 突起 13 a とは、それぞれ、第 1 環状支持体 12 b と、第 2 環状支持体 13 b とから、収容部 3 の径方向断面の中央に向かって真っすぐ突出するように設けられた。

また、第 1 フィルター押え部と、第 2 フィルター押え部とにおいて、複数の第 1 突起 12 a と、複数の第 2 突起 13 a とを、それぞれ、等間隔であるように設けた。

[0082] 図 2 (a)、図 3、及び図 5 に示される第 1 フィルター押え部 12 及び第 2 フィルター押え部 13 の形状は一例であって、実施例で用いた第 1 フィルター押え部 12 及び第 2 フィルター押え部 13 がそれぞれ有する、第 1 突起 12 a 及び第 2 突起 13 a の本数、形状、及び長さは、図 2 (a)、図 3、

及び図 5 に示される形状に限定されない。

[0083] 次に、細胞分離用フィルター装置 1 の液体導入口 9 と液体導出口 10 とに、図 6 に示される回路を接続して細胞分離用デバイス 22 を作製した。

[0084] 図 6 に示される回路において、液体導入口 9 にはチューブ 14 a が接続された。このチューブ 14 a には、細胞懸濁液を収容する手段 15 及びプライミング用生理食塩水を収容する手段 16 に接続されたチューブ 14 b と、フィルターを通過した回収液を収容する手段（回収バッグ）17 及び回収バッグ等に回収された回収液を回収する手段 18 に接続されたチューブ 14 c とを、流路切り替え手段 19 c を介して接続された。

チューブ 14 b には流路切り替え手段 19 b を介して、細胞懸濁液を収容する手段 15 とプライミングやカラムの洗浄に用いる生理食塩水を収容する手段 16 とが接続された。

チューブ 14 c には流路切り替え手段 19 c を介して、フィルターを通過した回収液を収容する手段 17 と回収バッグ等に回収された回収液を回収する手段 18 とが接続された。

また、液体導出口 10 にはチューブ 14 d が接続され、且つ流路切り替え手段 19 d を介して、フィルターを通過した細胞懸濁液を収容する手段（廃液バッグ）20 及び回収液を回収する手段 21 が接続された。

[0085] 細胞分離用デバイス 22 を用いて細胞（単球）分離操作を実施した。なお、各流路切り替え手段の操作は、細胞分離用フィルター装置 1 に通液する液体の種類、送液する目的の手段に応じて、適宜行われた。

まず、生理食塩水を収容する手段 16 の生理食塩水 50 mL ~ 150 mL を用いて細胞分離用フィルター装置 1 のプライミング操作を行った。その後、廃液バッグ 20 に細胞分離用フィルター装置 1 を通過した生理食塩液を回収した。

次に、細胞懸濁液を収容する手段 15 から白血球濃厚液（CPD で抗凝固したブタ血液）100 mL を、細胞分離用フィルター装置 1 に重力を利用して通液した。その後、通過液を廃液バッグ 20 に回収した。

上記操作で使用した白血球濃厚液は、CPDで抗凝固したブタ血液を3000rpm、30分遠心分離して得たバッフィーコートより、処理する白血球数が $1.0 \times 10^9 \text{ cells} \sim 4.0 \times 10^9 \text{ cells}$ になるように調製した。

その後、流路切り替え手段19bを用いて、生理食塩水を収容する手段16の生理食塩水100mLを細胞分離用フィルター装置1に重力を利用して通液した。次いで、通過液を廃液バッグ20に回収した。

最後に、生理食塩水50mLを10～50mL／秒の流量で、回収液を回収する手段21としてシリンジを用いて手動で細胞分離用フィルター装置1の液体導出口10より導入した。次いで、回収液（細胞含有液）を、液体導入口9に接続した回収バッグ17に回収した。

回収液（細胞含有液）、及び、処理前の細胞懸濁液（粗細胞含有液）の白血球濃度を、血球カウンター（K-4500、シスメックス社）により測定した。また、単球濃度に関しては、細胞表面マーカーであるCD14に対して蛍光標識し、上記血球カウンター及びフローサイトメーター（FACS canto、BD社）により測定した。その後、処理前の細胞懸濁液と回収液の体積より白血球数及び単球数を算出して、白血球回収率、単球回収率をそれぞれ求めた。結果は表1に示した。

[0086]

[表1]

		実施例						比較例	
		1	2	3	4	5	6	1	2
フィルター 部材収容部 形状	高さ (mm)	5	5	5	5	5	5	1 2	5
	内径 (mm)	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	6 0	4 5	6 0
	内部空間断面積 A 2 (mm ²)	2 8 2 6	2 8 2 6	2 8 2 6	2 8 2 6	2 8 2 6	2 8 2 6	1 5 9 0	2 8 2 6
第 1 押え部 / 第 2 押え部 形状	突起本数	9	1 0	1 0	9	9	9	3	9
	突起長さ (mm)	1 5	1 1	1 5 及び 1 1	1 9	1 1 及び 7	1 9 及び 6	1 2	2 2
	多角形面積 A 1 (mm ²)	4 7 2	7 6 6	6 5 6	2 2 1	1 0 2 9	8 6 5	8 3	8 5
A 1 / A 2 (面積%)		1 7	2 7	2 3	7	3 6	3 1	5	3
単球回収率 (%)		7 5	5 0	4 9	5 5	5 2	8 3	2 9	2 9
白血球回収率 (%)		6 2	5 1	3 8	5 2	4 7	6 6	6 6	4 9

[0087] 表 1 によれば、所定の面積比率 R 1 (A 1 / A 2 (面積%)) が 6 ~ 5 0 % であるように構成された実施例の細胞分離用フィルター装置 1 を用いる場合、高い回収率で単球を回収できる（さらに純度高く単球を回収できる）一方で、所定の面積比率 R 1 (A 1 / A 2 (面積%)) が 6 ~ 5 0 % から外れるように構成された細胞分離用フィルター装置 1 を用いる場合、低い回収率及び低純度でしか単球を回収できないことが分かる。

符号の説明

- [0088]
- 1 細胞分離用フィルター装置
 - 2 細胞分離用フィルター容器
 - 3 フィルター部材収容部
 - 4、5 ノズル付内蓋
 - 6、7 環状外蓋
 - 8 シール
 - 9 液体導入口
 - 1 0 液体導出口
 - 1 1 フィルター部材

1 2 第1 フィルター押え部

1 2 a 第1 突起

1 2 b 第1 環状支持体

1 3 第2 フィルター押え部

1 3 a 第2 突起

1 3 b 第2 環状支持体

請求の範囲

[請求項1]

液体導入口と、液体導出口と、フィルター部材収容部と、第1フィルター押え部と、第2フィルター押え部と、を有する細胞分離用フィルター容器であって、

前記フィルター部材収容部が、両端に開口を有する筒状の部材であって、

前記液体導入口が、前記フィルター部材収容部の一方の開口端側に設けられ、

前記液体導出口が、前記フィルター部材収容部の他方の開口端側に設けられ、

前記第1フィルター押え部は、前記フィルター部材収容部の前記液体導入口側の位置において、前記フィルター部材収容部の内壁面又は内壁面の近傍から、前記フィルター部材収容部の内部空間の断面の中央又は略中央に向かって突出する、3本以上の第1突起からなり、

前記第1フィルター押え部は、前記フィルター部材収容部内にフィルター部材が収容された際に、前記フィルター部材を変形させつつ前記フィルター部材に当接するように設けられ、

前記第2フィルター押え部は、前記第1フィルター押え部と、前記第2フィルター押え部とによって前記フィルター部材が挟み込まれるように、前記フィルター部材収容部の前記液体導出口側の位置に設けられ、

前記第1フィルター押え部を構成する3本以上の前記第1突起のそれぞれの先端を結んで形成される多角形の面積をA1とし、前記第1突起の位置における前記フィルター部材収容部の内部空間の断面の面積をA2とする場合に、下記式：

$$\text{面積比率 } R1 (\%) = A1 / A2 \times 100$$

で算出される面積比率R1が、6～50%である、細胞分離用フィルター容器。

- [請求項2] 前記第2フィルター押え部が、前記フィルター部材収容部の前記液体導出口側の位置において、前記フィルター部材収容部の内壁面又は内壁面の近傍より、前記フィルター部材収容部の内部空間の断面の中央又は略中央に向かって突出する、3本以上の第2突起からなる、請求項1に記載の細胞分離用フィルター容器。
- [請求項3] 前記第2フィルター押え部を構成する3本以上の前記第2突起の先端を結んで形成される多角形の面積を A_3 とし、前記第2突起の位置における前記フィルター部材収容部の内部空間の断面の面積を A_4 とする場合に、下記式：
$$\text{面積比率 } R_2 (\%) = A_3 / A_4 \times 100$$
で算出される面積比率 R_2 が、6～50%である、請求項2に記載の細胞分離用フィルター容器。
- [請求項4] 前記面積比率 R_1 が、6～40%である、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞分離用フィルター容器。
- [請求項5] 前記面積比率が R_2 が、6～40%である、請求項3に記載の細胞分離用フィルター容器。
- [請求項6] 前記第1突起の本数が、5本以上12本以下である、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞分離用フィルター容器。
- [請求項7] 前記第2突起の本数が、5本以上12本以下である、請求項3又は5に記載の細胞分離用フィルター容器。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか1項に記載の細胞分離用フィルター容器と、フィルター部材とを有し、
前記フィルター部材が、前記フィルター部材収容部に收容されている、細胞分離用フィルター装置。
- [請求項9] 前記フィルター部材が不織布からなる、請求項8に記載の細胞分離用フィルター装置。
- [請求項10] 単球を含む細胞含有液を取得する方法であって、
前記単球と、前記単球よりも平均サイズの小さな細胞である小細胞

とを含む粗細胞含有液を、請求項 8 又は 9 に記載の細胞分離用フィルター装置内に前記液体導入口から供給した後に前記細胞分離用フィルター装置を通過させることで、前記単球を前記フィルター部材に捕捉させることと、

前記細胞分離用フィルター装置内に回収液を供給することで、前記フィルター部材に捕捉された前記単球を前記回収液中に遊離させて前記細胞含有液を生じさせることと、

前記細胞含有液を前記細胞分離用フィルター装置内から回収することと、

を含む方法。

[請求項11] 前記回収液を前記液体導出口から供給し、前記細胞含有液を前記液体導入口から回収する、請求項 10 に記載の方法。

[請求項12] 樹状細胞療法に用いられる樹状細胞含有液を製造する方法であって、

単球と、単球よりも平均サイズの小さな細胞である小細胞とを含む粗細胞含有液を、請求項 8 又は 9 に記載の細胞分離用フィルター装置内に前記液体導入口から供給した後に前記細胞分離用フィルター装置を通過させることで、前記単球を前記フィルター部材に捕捉させることと、

前記細胞分離用フィルター装置内に回収液を供給することで、前記フィルター部材に捕捉された前記単球を前記回収液中に遊離させて、細胞含有液を生じさせることと、

前記細胞含有液を前記細胞分離用フィルター装置内から回収することと、

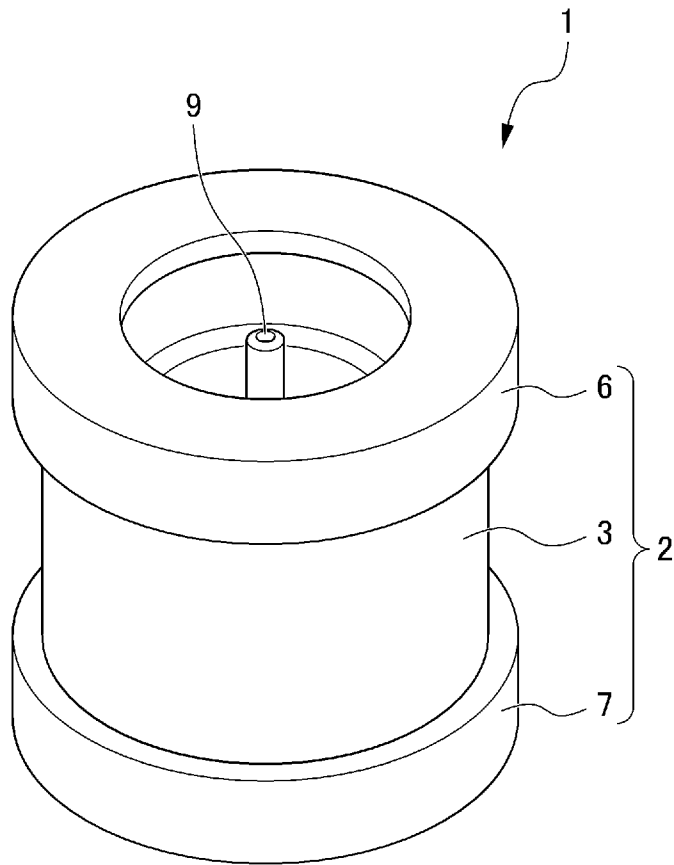
前記細胞含有液に含まれる前記単球を前記樹状細胞に分化させることと、

を含む方法。

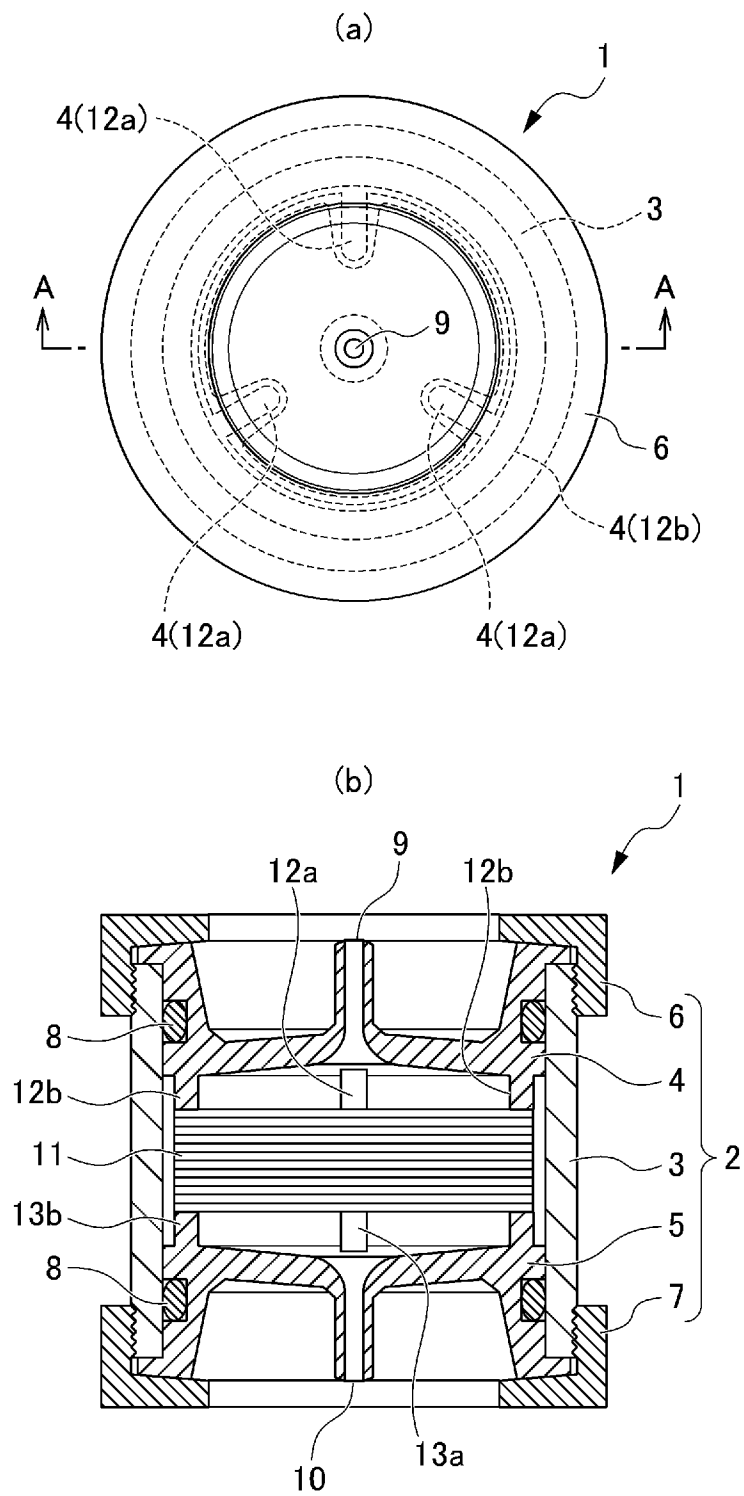
[請求項13] 前記回収液を前記液体導出口から供給し、前記細胞含有液を前記液

体導入口から回収する、請求項 1 2 に記載の方法。

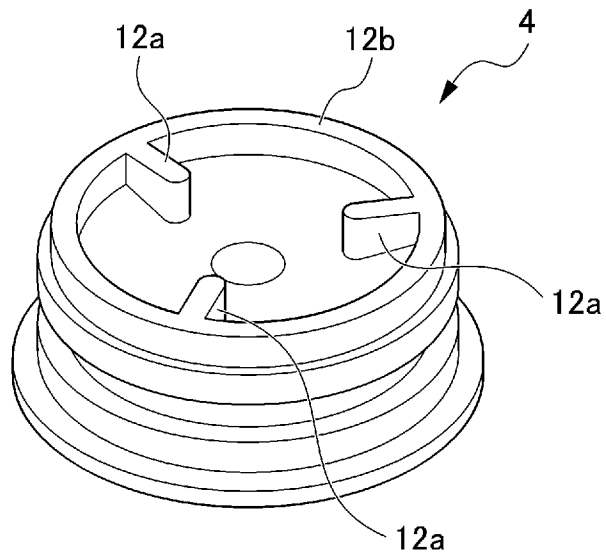
[図1]



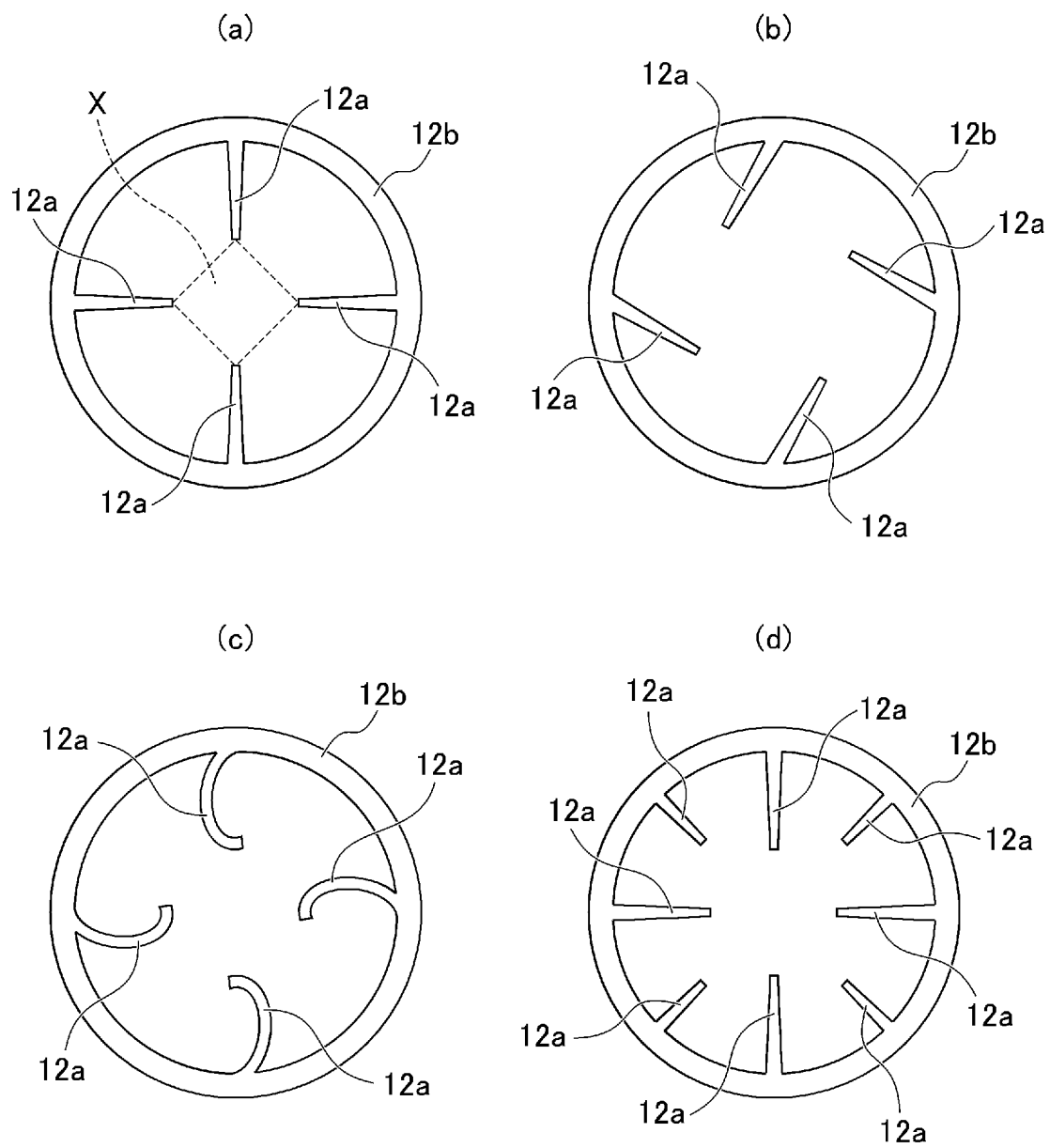
[図2]



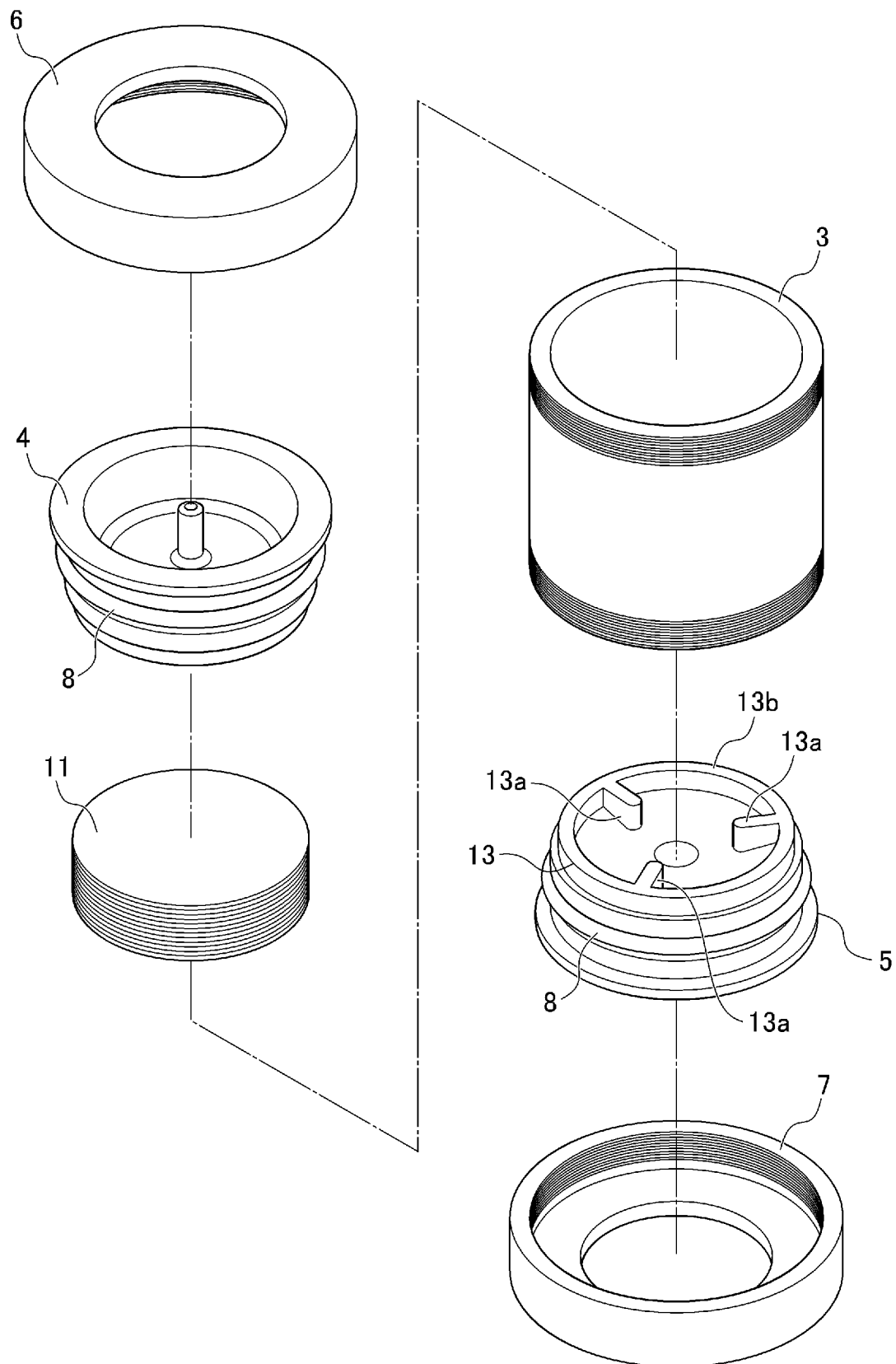
[図3]



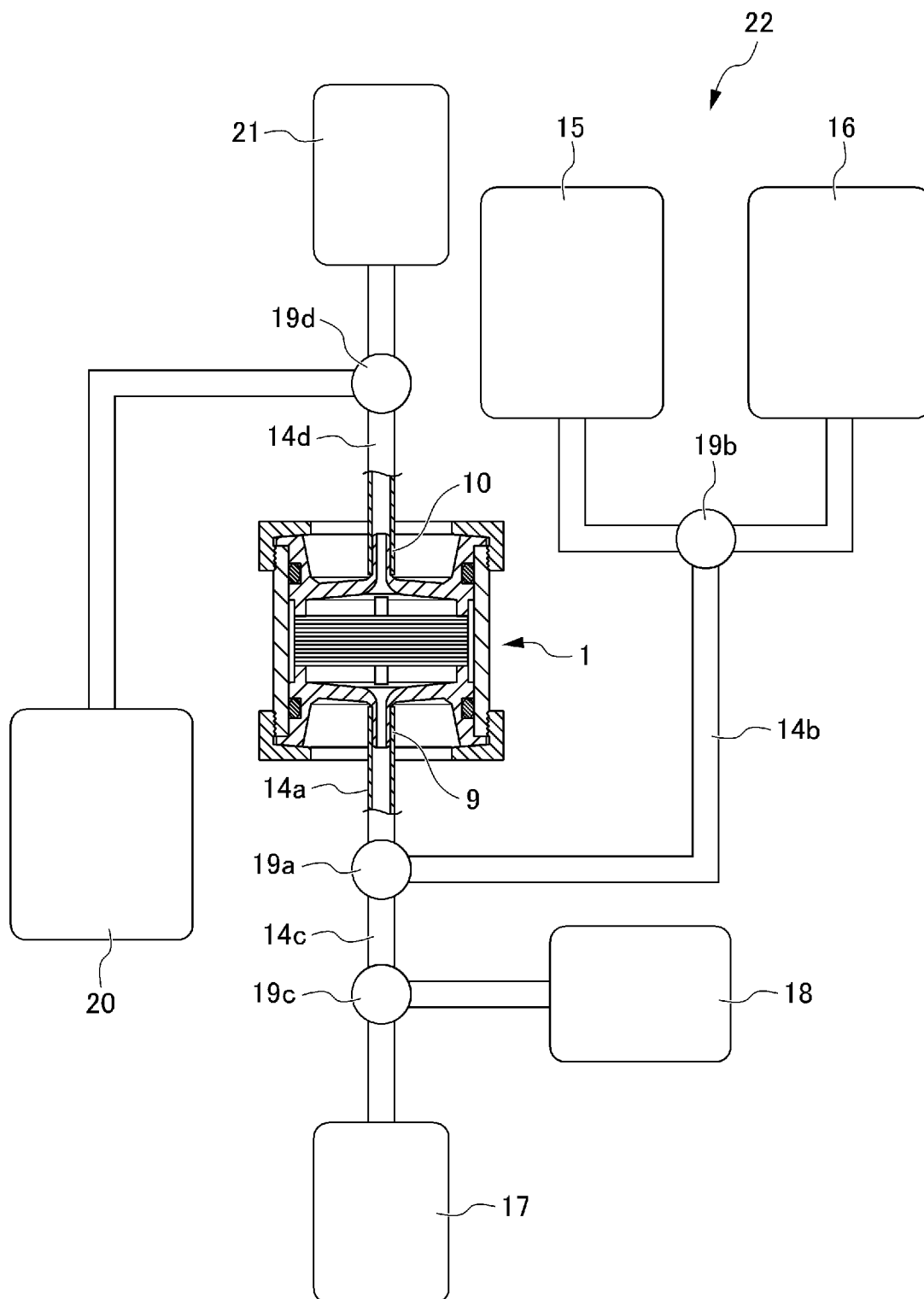
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/015879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12M1/00 (2006.01) i, B03B5/00 (2006.01) i, C12M1/12 (2006.01) i,
C12M1/26 (2006.01) i, C12N5/0784 (2010.01) i, C12N5/0786 (2010.01) 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)

Int.Cl. C12M1/00, B03B5/00, C12M1/12, C12M1/26, C12N5/0784, C12N5/0786

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2016/002505 A1 (KANEKA CORP.) 07 January 2016, claims, paragraphs [0046], [0061], [0068], examples, drawings (Family: none)	1-11 12-13
X Y	JP 2016-10394 A (KANEKA CORP.) 21 January 2016, claims, paragraphs [0049], [0055], [0067], examples, drawings (Family: none)	1-11 12-13
Y	JP 2009-207381 A (KANEKA CORP.) 17 September 2009, claims, examples (Family: none)	12-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 June 2018 (22.06.2018)

Date of mailing of the international search report
10 July 2018 (10.07.2018)

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/JP2018/015879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-312737 A (KANEKA CORP.) 06 December 2007, claims, examples & US 2009/0239300 A1, claims, examples & WO 2007/139028 A1	12-13
A	JP 2011-10581 A (KANEKA CORP.) 20 January 2011, claims, examples (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, B03B5/00(2006.01)i, C12M1/12(2006.01)i, C12M1/26(2006.01)i, C12N5/0784(2010.01)i, C12N5/0786(2010.01)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. C12M1/00, B03B5/00, C12M1/12, C12M1/26, C12N5/0784, C12N5/0786

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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）

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	WO 2016/002505 A1（株式会社カネカ）2016.01.07, 請求の範囲, 段落0046, 0061, 0068, 実施例, 図面（ファミリーなし）	1-11 12-13
X Y	JP 2016-10394 A（株式会社カネカ）2016.01.21, 特許請求の範囲, 段落0049, 0055, 0067, 実施例, 図面（ファミリーなし）	1-11 12-13
Y	JP 2009-207381 A（株式会社カネカ）2009.09.17, 特許請求の範囲, 実施例（ファミリーなし）	12-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

22.06.2018

国際調査報告の発送日

10.07.2018

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）

木原 啓一郎

4 B

4867

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
Y	JP 2007-312737 A (株式会社カネカ) 2007.12.06, 特許請求の範囲, 実施例 & US 2009/0239300 A1, Claims, Examples & WO 2007/139028 A1	12-13
A	JP 2011-10581 A (株式会社カネカ) 2011.01.20, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-13