(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-509062
(P2019-509062A)
(43)公表日　平成31年4月4日(2019.4.4)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 5/071	(2010.01)	C12N	5/071	4B033
C12N 13/00	(2006.01)	C12N	13/00	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 47 頁）

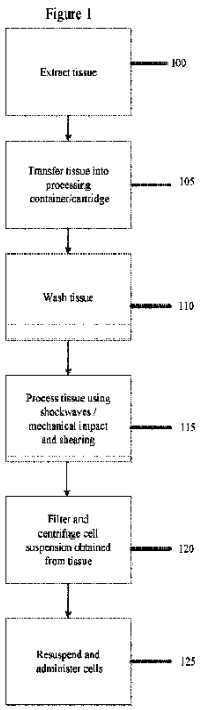
(21)出願番号　特願2018-568180 (P2018-568180)
(86)(22)出願日　平成29年3月17日 (2017.3.17)
(85)翻訳文提出日　平成30年11月14日 (2018.11.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/023084
(87)国際公開番号　WO2017/161343
(87)国際公開日　平成29年9月21日 (2017.9.21)
(31)優先権主張番号　62/309,774
(32)優先日　平成28年3月17日 (2016.3.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　518329365
シノヴァ　ライフ　サイエンシーズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９１８０１，アルハンブラ，ノース　ブシュネル　アヴェニュー　３１２
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100126354
弁理士　藤田　尚
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】衝撃波または機械的衝撃を使用する、細胞の分離、解離、および／または脱凝集

(57)【要約】
本開示によって提供される方法は、対外衝撃波、機械的衝撃、および／または、砕石術の原理を利用し、組織サンプルを、より小さい断片、すなわち、細胞群および／または単一の細胞に粉砕し、その後に、所望の細胞画分が、サンプルから単離され得る。本開示によって提供されるデバイスは、焦点を合わせられたおよび／もしくは方向付けされた衝撃波、ならびに／または、焦点を合わせられたおよび方向付けされた機械的衝撃を配備し、組織サンプルをバラバラにする。デバイスは、衝撃波または機械的衝撃への露出の間に、無菌の閉じた環境にサンプルを維持する。したがって、衝撃波および／または機械的衝撃は、閉じたデバイスの外側に発生させられ、デバイスの１つまたは複数の壁部を通してその内部へ伝送され、その内部に、サンプルが位置付けされている。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞画分を組織サンプルから単離する方法であって、前記方法は、
対象から組織サンプルを取得するステップと、
衝撃波、機械的衝撃からの力、または、その両方に、前記組織サンプルを接触させるステップと、
前記組織サンプルから細胞画分を単離するステップと、
を含み、
前記衝撃波および／または前記機械的衝撃からの前記力の供給源は、前記組織サンプルと物理的な接触をしない、方法。
【請求項２】
前記組織は、脂肪組織、脳組織、咽頭組織、喉頭組織、心臓組織、動脈組織、筋肉組織、肝臓組織、胆嚢組織、腎臓組織、小腸組織、大腸組織、リンパ節組織、肺組織、脾臓組織、骨髄組織、胃組織、静脈組織、膵臓組織、膀胱組織、骨、歯、象牙質組織、歯肉組織、皮膚組織、松果腺組織、下垂体組織、甲状腺組織、副腎組織、膵臓組織、卵巣組織および睾丸組織から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記組織は脂肪組織である、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記組織サンプルは、衝撃波と接触させられ、前記衝撃波の前記供給源は、衝撃波発生器によって動力を与えられる衝撃波アプリケーターである、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記組織サンプルは、機械的衝撃からの力と接触させられ、前記機械的衝撃からの前記力の前記供給源は、モーターによって動力を与えられるインパクトアームである、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記組織サンプルは、前記衝撃波および／または前記機械的衝撃からの前記力と接触する前に、１回または複数回洗浄される、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記衝撃波は、前記組織サンプルを、複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方に分解する、請求項１から４または６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記機械的衝撃からの前記力は、前記組織サンプルを、複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方に分解する、請求項１から３、５または６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞画分は、前記複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方を含み、前記細胞画分の単離は、遠心分離によって行われる、請求項７または請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
遠心分離は、３分から３０分間、５００ｇから２，０００ｇの速度で行われる、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
遠心分離は、１０分間１，２００ｇで行われる、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記単離された細胞画分は、遠心分離の後に再懸濁させられる、請求項９から１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記細胞画分は、３０分以内に単離される、請求項１から３、５、６、または８から１

２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
幹細胞を脂肪組織から単離する方法であって、前記方法は、
対象から脂肪組織サンプルを取得するステップと、
前記組織サンプルを容器またはカートリッジの中へ置くステップと、
前記組織サンプルを機械的衝撃からの力にさらし、前記幹細胞を解放するステップと、
前記脂肪組織から幹細胞画分を分離するステップと、
前記幹細胞画分を遠心分離するステップと、
を含み、
前記機械的衝撃からの前記力の供給源は、前記脂肪組織に物理的に接触しない、方法。
【請求項１５】
前記脂肪組織は、前記機械的衝撃からの前記力にさらされる前に、１回または複数回洗浄される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記機械的衝撃の前記力の前記供給源は、モーターによって動力を与えられるインパクトアームであり、前記モーターは、ギヤリングを含み、前記ギヤリングは、前記モーターが全速力で動作しているときに、前記インパクトアームの前記速度を低減させることができる、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記機械的衝撃からの前記力は、前記容器またはカートリッジの壁部を通して前記脂肪組織へ送達される、請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
前記ギヤリングは、前記インパクトアームの中での速度の１／１０の減速を可能にする、請求項１５から１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記モーターは、０．７５インチのギヤ直径を含み、３，０００ｒｐｍのモーター速度において、前記インパクトアームは、毎秒１１７．８インチの速度を有している、請求項１６から１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
幹細胞画分を分離するステップは、前記脂肪組織が、水性層から分離することを可能にするステップを含み、前記水性層は、前記幹細胞を含む、請求項１４から１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記幹細胞は、３０分以内に前記脂肪組織から単離される、請求項１４から２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
遠心分離は、３分から１０分間、５００ｇから１，６００ｇで行われる、請求項１４から２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
幹細胞を脂肪組織から単離する方法であって、前記方法は、
対象から脂肪組織サンプルを取得するステップと、
前記組織サンプルを容器またはカートリッジの中へ置くステップと、
前記組織サンプルを衝撃波にさらし、前記幹細胞を解放するステップと、
前記脂肪組織から幹細胞画分を分離するステップと、
前記幹細胞画分を遠心分離するステップと、
を含み、
前記衝撃波の供給源は、前記脂肪組織に物理的に接触しない、方法。
【請求項２４】
前記脂肪組織は、前記衝撃波にさらされる前に、１回または複数回洗浄される、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】
前記衝撃波の前記供給源は、衝撃波発生器によって動力を与えられる衝撃波アプリケーターである、請求項２３または請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記衝撃波は、前記容器またはカートリッジの壁部を通して前記脂肪組織へ送達される、請求項２３から２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記脂肪組織は、０．５ｂａｒから５．０ｂａｒのパワーを有する衝撃波にさらされる、請求項２３から２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記容器は、０．２５ｍｍ厚の壁部を有するビニールバッグであり、前記脂肪組織は、２．０ｂａｒから２．５ｂａｒのパワーを有する衝撃波にさらされる、請求項２３から２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
任意の１つの時点において前記衝撃波にさらされる前記脂肪組織の合計面積は、１ｃｍ^{2}から１００ｃｍ^{2}の範囲にある、請求項２３から２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記容器は、０．２５ｍｍ厚の壁部を有する１９オンスのビニールバッグであり、前記脂肪組織サンプルの合計量は、３０ｃｃであり、任意の１つの時点において前記衝撃波にさらされる前記脂肪組織の合計面積は、５ｃｍ^{2}である、請求項２３に記載の方法。
【請求項３１】
前記脂肪組織は、５，０００から１００，０００の範囲にあるいくつかの衝撃波にさらされる、請求項２３から３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
幹細胞画分を分離するステップは、前記脂肪組織が、水性層から分離することを可能にするステップを含み、前記水性層は、前記幹細胞を含む、請求項２３から３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
遠心分離は、３分から１０分間、５００ｇから１，６００ｇで行われる、請求項２３から３２のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
細胞バイオプロセッシングは、バイオ医薬品製造の形態であり、その目標は、治療用細胞の単離および／または生産のための再現性のあるロバストな製造プロセスを確立することである。
【背景技術】
【０００２】
現在の細胞製造プロセスは、極めてユーザー依存型であり、多数のポイントにおいて人間の介入を必要とする。その依存性に起因して、現在のプロセスは、面倒であり、極めて多様であり、高価であり、低い収率となる。
【０００３】
例として、多くの現在の製造プロセスは、以下のように行われる。組織サンプル（脂肪吸引物、全血、骨髄、臍帯血など）が、患者から取得される。取得された生物学的なサンプルが、バイオプロセッシングのために研究所へ移送される。研究所において、細胞分離技法が、所望の細胞画分を取得するために用いられる。次いで、細胞画分が単離され、患者使用のためにポイントオブケア設備に戻されるように移送されるか、または、細胞膨張のためにバイオリアクターの中への導入によってさらにプロセッシングされるかのいずれかである。細胞分離のいくつかの公知の方法は、所望の細胞画分を取得するために、サン

プルを異物（たとえば、ビーズ）と接触させることを必要とする、超音波キャビテーションを介した機械的な分離、酵素消化、または、他の機械的な手段の使用を含む。酵素の使用は、規制順守負担（regulatory compliance burden）の増加を結果として生じさせる。その理由は、酵素は、所望の結果を作り出すために、サンプルと直接的に接触した状態にならなければならないからである。また、酵素は、収穫された細胞の完全性を損なう可能性があり、場合によっては、その特性を変化させる。高い動力を与えられるソニケーションの使用は、同様に不完全である。ソニケーターチップは、周波数が固定されており、細胞または組織懸濁液の中へ導入されなければならず、それは、無菌状態に悪影響を与える可能性を有している。追加的に、そのような高エネルギー音波の使用は、大量のエネルギーをサンプルの中へ導入し、それは、熱として現れる。これは、細胞に損傷を与える可能性があり、これは、使用可能な細胞の収率を低減させる。

【０００４】

取得されると、膨張した細胞製品は、次いで、それが清浄されて濃縮されるバイオリアクターから移動させられる。テストサンプルが、品質検査のために、洗浄および濃縮された細胞製品から除去され、テスト結果が許容可能な製品を示す場合には、最終的に人工的に作り出された細胞製品は、長期間の保管のために準備されるか、凍結保存のために準備されるか、サンプルが導出された患者に投与されるか、または、先述のもののいくつかの組み合わせのいずれかである。

【０００５】

認識され得るように、これらのステップのいくつかは、サンプルを１つの容器から別の容器へ移動させることを必要とし、重度のユーザー介入を必要とし、重度のユーザー介入は、プロセッシングの間に１つまたは複数のサンプルをラベル貼り間違えまたは取り扱いミスするリスクを増大させるだけでなく、場合によっては、サンプルの無菌状態、同一性、純度、または効能に悪影響を与える。追加的に、このようにサンプルをプロセッシングするために必要とされる時間は、所望の細胞画分が、何時間にもわたって（何日もということはないとしても）患者への送達のための準備ができていないということを意味しており、これは、患者の健康に対して悪影響を有する可能性がある。危うくされた無菌状態に関する可能性、および、細胞サンプルをプロセッシングするために必要とされる不合理に長い時間の期間は、患者にとって、とりわけ、免疫力が低下した患者にとって、または、即座の治療を要求する患者にとって、許容不可能であり、また、タイムリーで高品質の治療を多くの患者に提供することを必要とする提供者にとって許容不可能である。

【発明の概要】

【０００６】

したがって、ポイントオブケアにおいて、複数のユーザー介入に対する必要性なしに、短い時間の期間で直接的に所望の細胞画分を取得する、最適化された拡張性のある方法が必要とされている。また、その方法を実施することができるデバイスも必要とされている。そのような方法およびデバイスが、本開示によって提供される。開示されている方法およびデバイスは、プロセッシングのために細胞サンプルを研究所へ移送する必要性を排除し、また、分離の間に細胞サンプルを異物と接触させず、ユーザーの接触がほとんどない状態で、非常に短い時間の期間に所望の細胞サンプルを提供する、プロセッシングされたサンプルを結果として生じさせ、それによって、高価な技術的資源の最適化を可能にする。

【０００７】

本明細書で開示されているデバイスおよび方法は、いくつかの特徴を有しており、そのうちの一つとして、単独でその望ましい属性の原因とならない。以下に続く特許請求の範囲を限定することなく、開示されているデバイスおよび方法の特定の特徴が、簡潔に議論されることとなる。この議論を考慮した後に、および、とりわけ、「発明を実施するための形態」という標題の章を読んだ後に、当業者は、どのようにデバイスおよび方法の特徴が、従来のシステムおよび方法を上回るいくつかの利点を提供するかということを理解することとなる。

【０００８】
１つの態様では、本開示は、細胞サンプルのバイオプロセッシング、たとえば、自己幹細胞療法のためにプロセッシングされる脂質組織サンプルのバイオプロセッシングに適切な完全に閉じたシステムを提供する。システムは、大気に開放しておらず、したがって、バイオプロセッシングの全体を通して、無菌のサンプルプロセッシングおよびサンプルの移送を可能にする。
【０００９】
第１の態様では、細胞画分を組織サンプルから単離する方法が提供され、方法は、対象から組織サンプルを取得するステップと、衝撃波、機械的衝撃からの力、または、その両方に、組織サンプルを接触させるステップと、組織サンプルから細胞画分を単離するステップと、を含み、衝撃波および／または機械的衝撃からの力の供給源は、組織サンプルと物理的な接触をしない。
【００１０】
いくつかの実施形態では、組織は、脂肪組織、脳組織、咽頭組織、喉頭組織、心臓組織、動脈組織、筋肉組織、肝臓組織、胆嚢組織、腎臓組織、小腸組織、大腸組織、リンパ節組織、肺組織、脾臓組織、骨髄組織、胃組織、静脈組織、膵臓組織、膀胱組織、骨、歯、象牙質組織、歯肉組織、皮膚組織、松果腺組織、下垂体組織、甲状腺組織、副腎組織、膵臓組織、卵巣組織および睾丸組織から選択される。
【００１１】
いくつかの実施形態では、組織は脂肪組織である。
【００１２】
いくつかの実施形態では、組織サンプルは、衝撃波と接触させられ、衝撃波の供給源は、衝撃波発生器によって動力を与えられる衝撃波アプリケーターである。
【００１３】
いくつかの実施形態では、組織サンプルは、機械的衝撃からの力と接触させられ、機械的衝撃からの力の供給源は、モーターによって動力を与えられるインパクトアームである。
【００１４】
いくつかの実施形態では、組織サンプルは、衝撃波および／または機械的衝撃からの力と接触する前に、１回または複数回洗浄される。
【００１５】
いくつかの実施形態では、衝撃波は、組織サンプルを、複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方に分解する。
【００１６】
いくつかの実施形態では、機械的衝撃からの力は、組織サンプルを、複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方に分解する。
【００１７】
いくつかの実施形態では、細胞画分は、複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方を含み、細胞画分の単離は、遠心分離によって行われる。
【００１８】
いくつかの実施形態では、遠心分離は、３分から３０分間、５００ｇから２，０００ｇの速度で行われる。
【００１９】
いくつかの実施形態では、遠心分離は、１０分間１，２００ｇで行われる。
【００２０】
いくつかの実施形態では、単離された細胞画分は、遠心分離の後に再懸濁させられる。
【００２１】
いくつかの実施形態では、細胞画分は、３０分以内に単離される。
【００２２】
第２の態様では、幹細胞を脂肪組織から単離する方法が提供され、方法は、対象から脂

肪組織サンプルを取得するステップと、組織サンプルを容器またはカートリッジの中へ置くステップと、組織サンプルを機械的衝撃からの力にさらし、幹細胞を解放するステップと、脂肪組織から幹細胞画分を分離するステップと、幹細胞画分を遠心分離するステップと、を含み、機械的衝撃からの力の供給源は、脂肪組織に物理的に接触しない。

【００２３】

いくつかの実施形態では、脂肪組織は、機械的衝撃からの力にさらされる前に、１回または複数回洗浄される。

【００２４】

いくつかの実施形態では、機械的衝撃の力の供給源は、モーターによって動力を与えられるインパクトアームであり、モーターは、ギヤリングを含み、ギヤリングは、モーターが全速力で動作しているときに、インパクトアームの速度を低減させることができる。

【００２５】

いくつかの実施形態では、機械的衝撃からの力は、容器またはカートリッジの壁部を通して脂肪組織へ送達される。

【００２６】

いくつかの実施形態では、ギヤリングは、インパクトアームの中での速度の１／１０の減速を可能にする。

【００２７】

いくつかの実施形態では、モーターは、０．７５インチのギヤ直径を含み、３，０００ｒｐｍのモーター速度において、インパクトアームは、毎秒１１７．８インチの速度を有している。

【００２８】

いくつかの実施形態では、幹細胞画分を分離することは、脂肪組織が、水性層から分離することを可能にし、水性層は、幹細胞を含む。

【００２９】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、３０分以内に脂肪組織から単離される。

【００３０】

いくつかの実施形態では、遠心分離は、３分から１０分間、５００ｇから１，６００ｇで行われる。

【００３１】

第３の態様では、幹細胞を脂肪組織から単離する方法が提供され、方法は、対象から脂肪組織サンプルを取得するステップと、組織サンプルを容器またはカートリッジの中へ置くステップと、組織サンプルを衝撃波にさらし、幹細胞を解放するステップと、脂肪組織から幹細胞画分を分離するステップと、幹細胞画分を遠心分離するステップと、を含み、衝撃波の供給源は、脂肪組織に物理的に接触しない。

【００３２】

いくつかの実施形態では、脂肪組織は、衝撃波にさらされる前に、１回または複数回洗浄される。

【００３３】

いくつかの実施形態では、衝撃波の供給源は、衝撃波発生器によって動力を与えられる衝撃波アプリケーターである。

【００３４】

いくつかの実施形態では、衝撃波は、容器またはカートリッジの壁部を通して脂肪組織へ送達される。

【００３５】

いくつかの実施形態では、脂肪組織は、０．５ｂａｒから５．０ｂａｒのパワーを有する衝撃波にさらされる。

【００３６】

いくつかの実施形態では、容器は、０．２５ｍｍ厚の壁部を有するビニールバッグであり、脂肪組織は、２．０ｂａｒから２．５ｂａｒのパワーを有する衝撃波にさらされる。

【００３７】
いくつかの実施形態では、任意の１つの時点において衝撃波にさらされる脂肪組織の合計面積は、１ｃｍ^{2}から１００ｃｍ^{2}の範囲にある。
【００３８】
いくつかの実施形態では、容器は、０．２５ｍｍ厚の壁部を有する１９オンスのビニールバッグであり、脂肪組織サンプルの合計量は、３０ｃｃであり、任意の１つの時点において衝撃波にさらされる脂肪組織の合計面積は、５ｃｍ^{2}である。
【００３９】
いくつかの実施形態では、脂肪組織は、５，０００から１００，０００の範囲にあるいくつかの衝撃波にさらされる。
【００４０】
いくつかの実施形態では、幹細胞画分を分離することは、脂肪組織が、水性層から分離することを可能にし、水性層は、幹細胞を含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、遠心分離は、３分から１０分間、５００ｇから１，６００ｇで行われる。
【００４２】
本開示の特徴および利点は、例示目的の実施形態を記述する以下の詳細な説明および添付の図面を参照して、さらに説明され得る。
【図面の簡単な説明】
【００４３】
【図１】本開示によって提供される実施形態による、細胞画分を組織サンプルから単離する方法の概観である。
【図２】本開示によって提供されるシステムおよび方法において使用するのに適切な対外衝撃波デバイスの代表的な例を示す図である。
【図３】本開示によって提供されるシステムおよび方法において使用するのに適切な機械的衝撃デバイスの代表的な例を示す図である。
【図４】本開示によって提供される対外衝撃波および／または機械的衝撃デバイスとともに使用するのに適切なリジッドの自己完結型のカートリッジの第１の代表的な例を示す図である。示されている実施形態では、いくつかの内部コンポーネントは、可撓性の容器である。
【図５】本開示によって提供される対外衝撃波および／または機械的衝撃デバイスとともに使用するのに適切なリジッドの自己完結型のカートリッジの代表的な例を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００４４】
本開示の実施形態が説明される前に、そのような実施形態が単なる例として提供されるということ、および、本明細書で説明されている本開示の実施形態に対するさまざまな代替例が、本開示を実施する際に用いられ得るということが理解されるべきである。ここで、多数の変形例、変化例、および置換例が、本開示から逸脱することなく、当業者に考え付くこととなる。
【００４５】
別段の定義がない限り、本明細書で使用されているすべての技術的用語および科学的用語は、本開示が属する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有している。本明細書で説明されているものと同様または同等の方法および材料が、本開示の実施または検査において使用され得るが、適切な方法および材料が、下記に説明されている。矛盾する場合には、定義を含む特許明細書が、支配することとなる。それに加えて、材料、方法、および例は、単なる例示目的のものであり、限定することを意図していない。多数の変形例、変化例、および置換例が、本開示から逸脱することなく、当業者に考え付くこととなる。

【００４６】
明細書および特許請求の範囲に使用されているように、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈がそうでないことを明確に示していなければ、複数の言及を含む。たとえば、「１つの細胞」という用語は、複数の細胞（その混合物を含む）を含む。
【００４７】
本明細書で使用されているように、「対外衝撃波」、「複数の対外衝撃波」、および／または「ＥＳＷ」は、音波と同様に、機械的なエネルギーの急激な高い振幅パルスを意味しており、それらは、関心のサンプルの外部で発生させられ、次いで、そのサンプルに伝送される。その点で、ＥＳＷの発生源は、サンプルと物理的な接触をしない。衝撃波自身は、サンプルに接触するが、発生源は、サンプルに接触しない。したがって、対外衝撃波は、サンプルからのいくらかの距離にある供給源によって発生させられ、次いで、サンプルに伝送される。伝送は、空気を通して、および／または、サンプルがその中に位置付けされている容器の壁部を通して、行われることが可能である。ＥＳＷは、たとえば、サンプル全体、または、サンプルの一部分だけをカバーする関心のエリアの中にＥＳＷを濃縮させるために、焦点を合わせられたおよび／または方向付けされ得る。
【００４８】
本明細書で使用されているように、「対象」または「患者」は、哺乳類、たとえば、人間を表している。
【００４９】
本開示によって提供される方法は、対外衝撃波、機械的衝撃、振動および／または、砕石術の原理を利用し、組織サンプルを、より小さい断片、すなわち、細胞群および／または単一の細胞に粉砕し、その後に、所望の細胞画分が、サンプルから単離され得る。さまざまな態様において、この方法は、サンプルを対象から単離するステップであって、サンプルは、関心の細胞タイプを含む、ステップと、そのサンプルを、ＥＳＷを発生させるために使用されるデバイスと接触させるのではなく、対外衝撃波と接触させ、サンプルを小さい細胞群および／または個々の細胞に分解するステップと、次いで、分解されたサンプルから関心の細胞タイプを単離するステップとを含む。
【００５０】
本開示によって提供されるデバイスは、焦点を合わせられたおよび／もしくは方向付けされた衝撃波、ならびに／または、焦点を合わせられたおよび方向付けされた機械的衝撃を利用し、関心のサンプルをバラバラにする。さまざまな態様において、本開示によって提供されるデバイスは、衝撃波または機械的衝撃への露出の間に、無菌の閉じた環境にサンプルを維持する。したがって、衝撃波および／または機械的衝撃は、閉じた無菌の容器の外側に発生させられ、容器の１つまたは複数の壁部を通してその内部へ伝送され、その内部に、サンプルが位置付けされている。
【００５１】
関心のサンプルから所定の距離にＥＳＷの供給源を維持することによって、ＥＳＷの供給源（ＥＳＷを発生させるデバイス）は、サンプルと物理的な接触をしない。これは、サンプルの無菌状態、およびサンプルから単離される任意の細胞画分の無菌状態を、大きく改善する。医療提供者の視点から、これは、また、無菌状態の要件を大きく改善し、サンプルから導出される関心の細胞画分が患者使用に関して無菌であることを保証するのを助ける。追加的に、関心のサンプルからＥＳＷ発生源を維持することは、発生器がエネルギーまたは熱を関心のサンプルの中へ追加すること（それは、細胞に損傷を与えるかまたは細胞を殺し、ＤＮＡに損傷を与え、収率を劇的に減少させる可能性がある）とはならないということを保証する。その点で、本開示によって提供されるデバイスは、超音波などのような他の公知のシステムに対する改善である。
【００５２】
本開示によって提供される方法およびデバイスは、いくつかの実施形態では、３０分以内において、組織サンプルから所望の細胞画分を迅速に単離することができる。開示され

ている方法およびデバイスが使用され得る速度は、サンプルから単離される所望の細胞画分が、即座の使用のために利用可能であり得るという点において、重大な利点を付与する。

【００５３】

方法

図１は、本開示によって提供される実施形態による、関心の細胞画分を組織サンプルから単離する方法を提示している。

【００５４】

示されている実施形態では、方法は、第１に対象から組織を抽出することによって始まる（１００）。対外衝撃波にさらされるときに組織が破壊されることとなるという条件で、組織は、任意のタイプのものであることが可能である。いくつかの実施形態では、組織は、脂肪組織または脂質である。いくつかの実施形態では、組織は、内部器官、たとえば、脳、咽頭、喉頭、心臓、動脈、筋肉、肝臓、胆嚢、腎臓、小腸、大腸、リンパ節、肺、脾臓、骨髄、胃、静脈、膵臓、膀胱、骨、歯、象牙質、歯肉、または皮膚などからのものである。いくつかの実施形態では、組織は、内分泌系のコンポーネント、たとえば、松果腺、下垂体、甲状腺、副腎、膵臓、卵巣、または睾丸からのものである。

【００５５】

抽出は、任意の数の公知の方法を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、組織抽出は、シリンジを介して行われる。いくつかの実施形態では、組織抽出は、外科的に行われ、組織サンプルが、対象から除去されると、第１の容器の中へ置かれるようになっている。

【００５６】

次いで、組織は、プロセッシング容器またはカートリッジの中へ移送される１０５。本開示によって提供されるデバイスは、高速で使いやすいＥＳＷ細胞バイオプロセッシングに必要とされるコンポーネントのすべてを提供する。開示されている方法および／またはデバイスのコンポーネントのうちのいくつかは、互いから分離可能であるにもかかわらず、それらは、完全に無菌の様式で互いに接続するように構成されており、それによって、プロセッシングの間の１つのコンポーネントから別のコンポーネントへのサンプルの移送を可能にする。その点で、サンプルの全体が、単一のシステムの中でプロセッシングされ、それによって、無菌状態を保証する。

【００５７】

無菌の移送は、サンプルを外側の環境に露出させることなく実施される。その点で、移送は、閉じた無菌の環境を維持することとなる任意の数の方式を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、対象から抽出されるサンプルを含有する第１の容器と、プロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって達成される。いくつかの実施形態では、移送は、無菌の接続デバイスを使用して、第１の容器およびプロセッシング容器またはカートリッジを無菌ドッキングさせることによって達成される。サンプルは、機械的にまたは重力流のいずれかによって、第１の容器からプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。

【００５８】

いくつかの実施形態では、第１の容器は、カートリッジの中へ挿入されており、無菌の接続デバイスを使用して無菌ドッキングされ、カートリッジの中のプロセッシング容器になる。プロセッシングチャンバーとしての第１の容器は、すでにサンプルを含有している。

【００５９】

その点で、この開示において、１つの容器から別の容器へ移動させられるものとして、組織および／または細胞サンプルが開示されるたびに、そのような移動は、閉じたシステムの完全性を維持するように行われることが可能であり、それによって、サンプルを外側の環境に露出させない。

【００６０】
サンプルがプロセッシング容器またはカートリッジへ移送されると、組織サンプルは、１回または複数回、洗浄される１１０。洗浄は、無菌の生理食塩水溶液の使用を介して、本明細書で説明されているように行われることが可能である。洗浄は、サンプルがプロセッシングの前に可能な限り多くの不純物を欠いていることを保証し、したがって、そこから単離されることとなる細胞画分の純度レベルを向上させる。
【００６１】
いくつかの実施形態では、洗浄は、プロセッシング容器またはカートリッジの機械的な撹拌によって実施される。複数の洗浄ステップが望まれおよび／または必要である場合には、無菌の生理食塩水は、単一の洗浄が完了した後に、プロセッシング容器またはカートリッジからドレン排出され、新しい無菌の生理食塩水が、それぞれの後続の洗浄のために容器またはカートリッジの中へ導入される。その点で、無菌の生理食塩水がドレン排出され、新しい無菌の生理食塩水が容器またはカートリッジの中へ導入されるたびに、それは、本明細書で説明されているように、閉じた無菌の環境を維持するように行われる。
【００６２】
洗浄の後に、組織サンプルはプロセッシングされる１１５。示されているように、プロセッシングは、ＥＳＷ、機械的衝撃、振動、および剪断、または、それらの組み合わせの使用を介して、行われることが可能である。
【００６３】
いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ＥＳＷを介して行われ、組織サンプルが、複数の小さい細胞群に分解される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ＥＳＷを介して行われ、組織サンプルが、複数の小さい細胞群および複数の個々の細胞に分解される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ＥＳＷを介して行われ、組織サンプルが、複数の個々の細胞に完全に分解される。
【００６４】
いくつかの実施形態では、プロセッシングは、機械的衝撃および剪断を介して行われ、組織サンプルが、複数の小さい細胞群に分解される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、機械的衝撃および剪断を介して行われ、組織サンプルが、複数の小さい細胞群および複数の個々の細胞に分解される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、機械的衝撃および剪断を介して行われ、組織サンプルは、複数の個々の細胞に完全に分解される。
【００６５】
いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ＥＳＷおよび機械的衝撃および剪断の組み合わせを介して行われ、組織サンプルが、複数の小さい細胞群に分解される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ＥＳＷおよび機械的衝撃および剪断の組み合わせを介して行われ、組織サンプルが、複数の小さい細胞群および複数の個々の細胞に分解される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ＥＳＷおよび機械的衝撃および剪断の組み合わせを介して行われ、組織サンプルが、複数の個々の細胞に完全に分解される。
【００６６】
プロセッシングの後に、サンプルの残したものを表す細胞懸濁液（これは、複数の小さい細胞群、複数の個々の細胞、または、その両方である可能性がある）が、濾過および遠心分離される１２０。濾過は、プロセッシング容器もしくはカートリッジとは別々のデバイスの中で、または、プロセッシング容器もしくはカートリッジそれ自体の中で、行われることが可能である。いくつかの実施形態では、濾過は、別々のデバイスの中で行われ、そのケースでは、細胞懸濁液は、本明細書で説明されているように、無菌の手段を介してフィルターへ移送される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が容器またはカートリッジから１つまたは複数の遠心チューブの中へ移動させられているときに、濾過が行われる。
【００６７】
いくつかの実施形態では、濾過デバイスへの移送は、プロセッシング容器またはカート

リッジと濾過デバイスとの間で、オス型のおよびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって達成される。いくつかの実施形態では、移送は、無菌の接続デバイスを使用して、プロセッシング容器またはカートリッジおよび濾過デバイスを無菌ドッキングさせることによって達成される。サンプルは、機械的にまたは重力流のいずれかによって、プロセッシング容器またはカートリッジから濾過デバイスへ移送される。

【００６８】

いくつかの実施形態では、濾過は、本明細書で説明されているように、プロセッシング容器またはカートリッジの中で行われる。

【００６９】

さまざまな態様では、遠心分離は、プロセッシング容器またはカートリッジの外側で行われる。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、プロセッシング容器またはカートリッジの内側に位置付けされている１つまたは複数の遠心チューブへ移送される。充填されるときに、遠心チューブは、本明細書で説明されているように、プロセッシング容器またはカートリッジから遠心分離機へ無菌の手段を介して移動させられる。

【００７０】

いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、本明細書で説明されているように、プロセッシング容器またはカートリッジの外側に位置付けされている１つまたは複数の遠心チューブへ、無菌の手段を介して移送される。充填されるときに、遠心チューブは、本明細書で説明されているように、プロセッシング容器またはカートリッジから遠心分離機へ無菌の手段を介して移動させられる。

【００７１】

遠心分離の持続期間および速度は、プロセッシングされている組織タイプに応じて、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、３～３０分の期間間、５００ｇ～２，０００ｇの速度で遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、１０～２５分間、１，０００ｇ～１，８００ｇの速度で遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、１０分間１，２００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、７分間１，２００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、５分間１，２００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、３分間１，２００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、１０分間９００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、７分間９００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、５分間９００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、３分間９００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、１０分間６００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、７分間６００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、５分間６００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液は、３分間６００ｇで遠心分離される。

【００７２】

細胞懸濁液の中に存在する複数の細胞タイプが遠心分離を介して互いから分離され得る、多数の手段が存在している。たとえば、密度勾配が利用され得、遠心分離の間に、細胞が、その固有の密度にしたがって、帯へと分離する。追加的に、サイズ排除プロトコルが、サイズを介して細胞を分離するために使用され得る。追加的に、たとえば、プロセッシングされる組織サンプルを静置させる（allowed to settle）ことによって、および、遠心分離の前に、望ましくない細胞破片を所望の細胞画分から分離することによって、分離は、遠心分離の前に始まることが可能である。使用される分離技法のタイプは、単離されることとなる所望の細胞画分に基づいて変化することが可能である。

【００７３】

所望の細胞画分が単離されると、細胞画分は、細胞画分が導出された対象への投与のために再懸濁され得る１２５。いくつかの実施形態では、所望の細胞画分は、遠心チューブから取得される流体の小さい体積の中に再懸濁される。いくつかの実施形態では、所望の細胞画分は、無菌の生理食塩水の中に再懸濁される。

【００７４】
１つの態様では、所望の細胞画分は、幹細胞であり、幹細胞が導出される組織は、脂質である。
【００７５】
脂質から幹細胞をプロセッシングする方法の第１の実施形態は、以下の通りである。
【００７６】
脂質が、リポサクションを介して患者から取得される。リポサクションは、シリンジを介して実施され得、ここで、脂質は、針を介して直接的に、または、リポサクションマシンを介して、患者から除去される。リポサクションの間に除去される脂質の量は、望まれる幹細胞の数に応じて、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、リポサクションは、ミニリポサクションであり、ミニリポサクションでは、約３０ｃｃから約５０ｃｃの脂質が患者から除去される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、マイクロリポサクションであり、マイクロリポサクションでは、約５ｃｃから約２９ｃｃの脂質が患者から除去される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、典型的な臨床的リポサクションであり、そのケースでは、３００ｃｃ以上の脂質が患者から除去される。
【００７７】
脂質が患者から除去されると、脂質は、無菌のプロセッシング容器またはカートリッジの中へ移送される。移送は、本明細書で説明されているように、無菌の手段を介して行われる。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジは、シリンジと容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、プロセッシング容器またはカートリッジの中で無菌ドッキングされている。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとカートリッジの中のプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、脂質は、リポサクションデバイスを介して患者から除去され、無菌の接続デバイスを使用してリポサクションデバイスおよびプロセッシング容器またはカートリッジを無菌ドッキングさせることによって、リポサクションデバイスからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。
【００７８】
いくつかの実施形態では、移送は、重力流を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、機械的に行われることが可能であり、たとえば、シリンジのプランジャーを物理的に押圧することによって、および、シリンジの内部からプロセッシング容器またはカートリッジの内部へ脂質を押し込むことによって、行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、ポンプなどのようなデバイスを介して行われることが可能である。
【００７９】
脂質を受け入れるために使用される容器またはカートリッジの容積は、患者から取得される脂質の量とともに変化することが可能である。いくつかの実施形態では、ミニリポサクションを介して除去された３０ｃｃから５０ｃｃの脂質が、９流量オンスから１９流量オンスの容積を有する容器またはカートリッジへ移送される。
【００８０】
次いで、患者から除去される脂質の量に等しい無菌の生理食塩水の体積が、脂質を洗浄するために、容器またはカートリッジへ移送される。例として、３０ｃｃの脂質が患者から除去された場合には、次いで、３０ｍＬの無菌の生理食塩水が、サンプルを洗浄するために使用される。いくつかの実施形態では、次いで、患者から除去される脂質の量よりも大きい無菌の生理食塩水の体積が、脂質を洗浄するために、容器またはカートリッジへ移

送される。例として、３０ｃｃの脂質が患者から除去された場合には、次いで、３５ｍＬの無菌の生理食塩水が、サンプルを洗浄するために使用される。いくつかの実施形態では、次いで、患者から除去される脂質の量よりも小さい無菌の生理食塩水の体積が、脂質を洗浄するために、容器またはカートリッジへ移送される。例として、３０ｃｃの脂質が患者から除去された場合には、次いで、２５ｍＬの無菌の生理食塩水が、サンプルを洗浄するために使用される。いくつかの実施形態では、無菌の生理食塩水の体積の組み合わせが、脂質を洗浄するために、脂質の量に追加される。容器またはカートリッジへの生理食塩水の移送は、本明細書で説明されているように、システムの無菌状態を維持するように実施される。いくつかの実施形態では、無菌の生理食塩水を保持する容器とプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、無菌の生理食塩水は、容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、無菌の接続デバイスを使用して、無菌の生理食塩水容器およびプロセッシング容器またはカートリッジを無菌ドッキングさせることによって、無菌の生理食塩水は、容器またはカートリッジへ移送される。

【００８１】

洗浄は、脂質および無菌の生理食塩水を含有する容器またはカートリッジを穏やかに振るかまたは旋回させることによって実施される。

【００８２】

次いで、容器またはカートリッジは、（今では洗浄された）脂質が無菌の生理食塩水から分離されるように置かれる。脂質は生理食塩水よりも密度が低いので、脂質は、生理食塩水の上部に上昇して浮かぶこととなる。分離が行われるために必要とされる時間の量は、脂質サンプルの個々の構成に応じて変化することとなる。いくつかの実施形態では、分離は、１分から３０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１０秒から１分で生じ得る。

【００８３】

次いで、生理食塩水は、可能な限り完全に容器またはカートリッジからドレン排出され、したがって、脂質だけが残る。ドレン排出は、本方法において利用される容器またはカートリッジのタイプに応じて、さまざまな手段を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、生理食塩水は、容器またはカートリッジの底部に位置付けされているチューブを介して、容器またはカートリッジから外へドレン排出される。ドレン排出は、シリンジもしくはポンプのいずれかを使用して能動的に進行するか、または、重力流を介して受動的に進行することが可能である。いくつかの実施形態では、ドレン排出は、本明細書で説明されているように、無菌のシステムの完全性を維持するように行われる。

【００８４】

洗浄の完了後に、脂質が黄金色になり、生理食塩水がわずかにだけ濁るまで、洗浄が繰り返される。いくつかの実施形態では、洗浄は、１～５回行われ、いくつかの実施形態では、１～４回行われ、いくつかの実施形態では、１～３回行われ、いくつかの実施形態では、１～２回行われ、いくつかの実施形態では、１回行われる。

【００８５】

洗浄が完了すると、脂質は、プロセッシングのために準備される。

【００８６】

随意的に、これは必要とされないが、無菌の生理食塩水が、プロセッシングのためのバッグに追加される。生理食塩水の追加は、細胞および／または小さい細胞群がプロセッシングの間に互いから離れるように自由に移動できる空間を提供することとなり、それによって、脂質を個々の細胞へと分解することを助ける。生理食塩水が追加される場合には、本明細書で説明されているように、無菌のシステムの完全性を維持することとなる様式で、生理食塩水が追加される。

【００８７】

随意的に追加される生理食塩水の体積は、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、追加される生理食塩水の体積は、患者から除去される脂質の体積の０倍から２倍の範囲にある。いくつかの実施形態では、等しい量の生理食塩水が使用される（たとえば、３０ｃｃの脂質に対して３０ｍＬの生理食塩水）。

【００８８】

過剰な空気が、ポンプまたはシリンジを使用して、容器またはカートリッジから除去される。いくつかの実施形態では、過剰な空気が、無菌の生理食塩水洗浄液がそこからドレン排出される容器またはカートリッジの底部に位置付けされている同じチューブから除去される。いくつかの実施形態では、空気は、本明細書で説明されているように、無菌の閉じたシステムの完全性を維持する様式でドレン排出される。

【００８９】

次いで、プロセッシング容器またはカートリッジは、プロセッシング装置へ移動させられる。適切なプロセッシング装置２００の例が、図２に示されている。示されている実施形態では、プロセッシング容器またはカートリッジ２０５は、プロセッシングのためのリジッドプラットフォーム２１０の上に固着されている。プラットフォーム２１０は、ＥＳＷプロセッシングの間に、容器またはカートリッジ２０５の移動を制御する。

【００９０】

プラットフォーム２１０は、木材、金属、プラスチック、およびアクリルなどを含む、任意の適切なリジッド材料から作製され得る。いくつかの実施形態では、プラットフォーム２１０は、木材から作製されている。

【００９１】

プロセッシング装置２００は、容器またはカートリッジ２０５の内部に衝撃波を送達することができる衝撃波アプリケーター２１５を収容している。衝撃波アプリケーター２１５は、アプリケータープラットフォーム２２０を介してプロセッシング装置２００の上に収容されている。アプリケータープラットフォーム２２０および衝撃波アプリケーター２１５は、容器またはカートリッジ２０５の中に含有されている脂質から所定の距離だけ離れて維持され、衝撃波アプリケーター２１５が、決して、脂質と直接的に接触した状態に置かれないようになっている。これは、脂質へ送達される衝撃波が対外的であり、またはＥＳＷであるということを保証する。いくつかの実施形態では、衝撃波アプリケーター２１５は、プロセッシング容器またはカートリッジ２０５と直接的に接触した状態に置かれていてもよい。そのような実施形態では、容器またはカートリッジ２０５の壁部は、衝撃波アプリケーター２１５が決して脂質と直接的に接触しないということを保証する。

【００９２】

アプリケータープラットフォーム２２０の移動、ひいては、衝撃波アプリケーター２１５の移動は、３つの方向の平面（Ｘ、Ｙ、およびＺ）の中で行われることが可能であり、そのそれぞれは、それ自身のモーター：Ｘ平面モーター２３０、Ｙ平面モーター２３５、およびＺ平面モーター２４０によって制御される。いくつかの実施形態では、これらのモーターは、ＮＥＭＡ　１７ステッパーモーターである。モーター２３０、２３５、および２４０のそれぞれは、モーターコントローラー２２５によって制御され、モーターコントローラー２２５は、容器またはカートリッジ２０５の上方および周りで、アプリケータープラットフォーム２２０および衝撃波アプリケーター２１５の移動を３次元で可能にする。いくつかの実施形態では、モーターは、ＭａｒｌｉｎファームウェアによってプログラムされたＡｒｄｕｉｎｏマイクロプロセッサーｖ６ボードによって制御される。いくつかの実施形態では、モーターは、Ｍａｒｌｉｎファームウェアを備えたＡｒｄｕｉｎｏ　ｖ６ボードによって制御される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｙ平面モーター２３５だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｚ平面モーター２４０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０およびＹ平面モーター２３５だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０およびＺ平面モーター２４０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｙ平

面モーター２３５およびＺ平面モーター２４０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０、Ｙ平面モーター２３５、およびＺ平面モーター２４０が使用される。

【００９３】

アプリケータープラットフォーム２２０および衝撃波アプリケーター２１５のこの３次元の移動は、抽出されるサンプルの中の脂質のすべてが、プロセッシングの間に対外衝撃波に露出されることを可能にする。

【００９４】

次いで、脂質をバラバラにするために、衝撃波が、衝撃波アプリケーター２１５から、トランスミッションゲル、または、トランスミッションゲルを含有する膜を通して、容器またはカートリッジ２０５の壁部を通して、脂質サンプルへ送達され、小さい細胞群および個々の細胞を脂質から切り離す。いくつかの実施形態では、トランスミッションゲルは、ＤＪＯ，ＬＬＣ，１４３０ Ｄｅｃｉｓｉｏｎ Ｓｔｒｅｅｔ，Ｖｉｓｔａ，ＣＡ ９２０８１，ＵＳＡによってＣｈａｔｔａｎｏｏｇａのために製造されるＲＥＦ ４２４８ Ｃｏｎｄｕｃｔｏｒ Ｔｒａｎｓｍｉｓｓｉｏｎ Ｇｅｌである。プロセッシングの前に無菌の生理食塩水が脂質に追加されるそれらの実施形態では、脂質から切り離された小さい細胞群および／または個々の細胞が、生理食塩水の中へ移動することとなる。

【００９５】

衝撃波アプリケーター２１５は、衝撃波発生器２４５によって動力を与えられ、衝撃波発生器２４５は、ＥＳＷを作り出し、ＥＳＷは、衝撃波アプリケーター２１５を介して脂質へ伝送される。いくつかの実施形態では、衝撃波発生器は、Ｓｔｏｒｚ Ｍｅｄｉｃａｌ ＡＧ，８２７４ Ｔａｇｅｒｗｉｌｅｎ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ製のＭａｓｔｅｒ Ｐｕｌｓ ＭＰ１００である。いくつかの実施形態では、衝撃波発生器は、Ｌｕｍｓａｉｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｉｎｃ．，４／Ｆ，Ｎｏ． ９Ｙｉ，Ｌａｎｅ ２，Ｓｕｉｄｅ Ｒｏａｄ，Ｓｈａｎｇｈａｉ，２００３３１，Ｃｈｉｎａ製のＢＳ－ＳＷＴ２Ｘである。

【００９６】

脂質へ送達されるＥＳＷのパワーは、変化することが可能である。たとえば、厚い壁で囲まれた容器またはカートリッジ２０５の壁部を透過するために、ＥＳＷのパワーを増加させることが必要である可能性がある。一般的に、脂質へ送達されるＥＳＷのパワーは、容器もしくはカートリッジ２０５の壁部の厚さ、および／または、容器もしくはカートリッジ２０５が作製されている材料に応じて、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、脂質へ送達されるＥＳＷのパワーは、０．５ｂａｒから５．０ｂａｒの範囲にある。いくつかの実施形態では、脂質へ送達されるＥＳＷのパワーは、１．０ｂａｒから４．５ｂａｒの範囲にある。いくつかの実施形態では、脂質へ送達されるＥＳＷのパワーは、１．５ｂａｒから４．０ｂａｒの範囲にある。いくつかの実施形態では、脂質へ送達されるＥＳＷのパワーは、２．０ｂａｒから３．５ｂａｒの範囲にある。いくつかの実施形態では、容器２０５は、０．２５ｍｍ厚の壁部を有するビニールバッグであり、ＥＳＷのパワーレベルは、２．０ｂａｒから２．５ｂａｒの範囲にある。

【００９７】

衝撃波アプリケーター２１５によって送達されるＥＳＷによってカバーされるエリアは、変化することが可能である。衝撃波アプリケーター２１５によってカバーされるエリアが大きくなればなるほど、ＥＳＷに露出される脂質の表面積は大きくなる。いくつかの実施形態では、衝撃波アプリケーター２１５によってカバーされる合計面積は、１ｃｍ^{2}から１００ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から９０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から８０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から７０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から６０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から５０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から４０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から３０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^2

から２０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から１０ｃｍ^{2}の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１ｃｍ^{2}から５ｃｍ^{2}の範囲にある。いくつかの実施形態では、衝撃波アプリケーター２１５によってカバーされる合計面積は、５ｃｍ^{2}である。

【００９８】

１つの実施形態では、容器２０５は、０．２５ｍｍ厚の壁部を有する１９オンスのビニールバッグであり、患者から取得される脂質の合計量は、３０ｃｃであり、および、随意的な追加の３０ｍＬの生理食塩水（脂質サンプルに等しい体積）が、プロセッシングの前にビニールバッグに追加される。この実施形態では、ＥＳＷに露出されるバッグの合計面積、ひいては、脂質サンプルの合計量は、おおよそ５ｃｍ^{2}である。

【００９９】

脂質サンプルへ送達される衝撃波の数は、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、衝撃波の合計数は、５，０００から１００，０００の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１０，０００から５０，０００の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１０，０００から２５，０００の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１０，０００から２０，０００の範囲にある。いくつかの実施形態では、衝撃波の合計数は、２５，０００である。

【０１００】

この実施形態では、幹細胞は、患者から取得される脂質サンプルから分離される。衝撃波アプリケーター２１５の上の５ｃｍ^{2}のアプリケーターチップを使用して、２．０から２．５のｂａｒ範囲における１０，０００から５０，０００の衝撃波数範囲は、幹細胞および間質血管細胞画分の両方を脂質から分離するのに十分である。本明細書で使用されているように、「間質血管細胞画分」は、細胞画分（これは、いくつかの実施形態では、脂質である）を分離および解離することから取得される細胞を含む、プロセッシングされた組織サンプルから取得される細胞画分を意味している。間質血管細胞画分は、限定することなく、なかでも、幹細胞、成長因子、および前駆細胞を含む。

【０１０１】

ＥＳＷが脂質サンプルに印加された後に、容器またはカートリッジは、短い時間の期間にわたって、機械的な撹拌にさらされる。いくつかの実施形態では、機械的な撹拌は振ることである。いくつかの実施形態では、機械的な撹拌は、１回または複数回、容器またはカートリッジ２０５を逆さまにすることである。いくつかの実施形態では、短い時間の期間は、１秒から３０秒の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１秒から１５秒の範囲にあり、いくつかの実施形態では、１秒から１０秒の範囲にある。いくつかの実施形態では、短い時間の期間は、おおよそ１０秒である。撹拌は、脂質から遊離された幹細胞および間質血管細胞画分が、容器またはカートリッジ２０５の中に依然として存在し得る脂肪質の細胞破片および任意のなかなか消えない脂質組織から分離することを可能にする。

【０１０２】

次いで、（今ではプロセッシングされた）脂質が、ＥＳＷによって脂質から分離された幹細胞および間質血管細胞画分を今では含有する無菌の生理食塩水から分離されるように、容器またはカートリッジ２０５は置かれる。脂質は、幹細胞を含有する生理食塩水よりも密度が低いので、脂質は、生理食塩水の上部に上昇して浮かぶこととなる。分離が行われるために必要とされる時間の量は、脂質サンプルの個々の構成に応じて変化することとなる。いくつかの実施形態では、分離は、１分から３０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１０秒から１分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分未満に行われることが可能である。

【０１０３】

幹細胞は、ここで、脂質サンプルから分離されており、ここで、無菌の生理食塩水層の中に懸濁している。

【０１０４】
次いで、幹細胞を含有する生理食塩水層は、可能な限り完全に容器またはカートリッジ２０５から除去され、したがって、脂質だけが残る。除去は、本方法において利用される容器またはカートリッジ２０５のタイプに応じて、さまざまな手段を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、生理食塩水は、容器またはカートリッジ２０５の底部に位置付けされているチューブを介して、容器またはカートリッジ２０５から外へドレン排出される。ドレン排出は、シリンジもしくはポンプのいずれかを使用して能動的に進行するか、または、重力流を介して受動的に進行することが可能である。いくつかの実施形態では、幹細胞を含有する層は、本明細書で説明されているように、閉じた無菌の環境の完全性を維持することとなる様式で除去される。

【０１０５】
いくつかの実施形態では、幹細胞を含有する生理食塩水層は、容器またはカートリッジ２０５からの除去の間に、フィルターを通過させられる。フィルターのサイズは変化することが可能である。いくつかの実施形態では、フィルターサイズは、４０μｍから１００μｍの範囲にある。いくつかの実施形態では、フィルターサイズは、７０μｍである。さまざまな実施形態では、フィルターは、ナイロンである。

【０１０６】
容器またはカートリッジ２０５からの除去の後または間のいずれかにおいて、幹細胞を含有する生理食塩水は、１つまたは複数の遠心チューブの中へ移動させられる。いくつかの実施形態では、移動は、本明細書で説明されているように、閉じた無菌の環境の完全性を維持することとなる様式で行われる。遠心チューブの底部においてペレットの中へ幹細胞を濃縮させるために、遠心分離が続く。

【０１０７】
幹細胞は、３分から１０分にわたる５００ｇから１，６００ｇでの遠心分離によって濃縮される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、１０分にわたる１，２００ｇでの遠心分離によって濃縮される。

【０１０８】
流体は、チューブから除去され、底部に幹細胞だけを残す。流体は、デカンティング、吸引、または同様の手段によって除去され得る。

【０１０９】
少量の流体が、幹細胞を再懸濁させるために遠心チューブの中へ入れられる。いくつかの実施形態では、遠心チューブに追加される流体の量は、１ｍＬから５ｍＬの範囲にある。いくつかの実施形態では、流体は、生理食塩水、多血小板血漿、ヒアルロン酸、固定用ゲル（fixing gel）、ヒドロゲル、スカッフォールド、フィブリン、グルー、または、先述のもののいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、細胞が、遠心分離吸引物の中に再懸濁される。

【０１１０】
幹細胞が懸濁液の中に浮かんでいる状態で、幹細胞は、使用のための準備ができている。そのような使用は、限定することなく、幹細胞が導出された患者の中への再導入、凍結保存、および膨張などを含むことが可能である。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、患者使用のために、皮下注射針を介してシリンジの中へ移動させられる。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、心臓、筋肉、骨、軟骨、肝臓、腎臓、または、他の組織および器官構造体へと成長するための組織スカッフォールドの中へ種を撒かれる。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、幹細胞が多能性転写因子（pluripotency transcription factors）を表現することを引き起こすによって、人工多能性幹細胞へと変換される。

【０１１１】
脂質から幹細胞をプロセッシングする方法の第２の実施形態は、以下の通りである。

【０１１２】
脂質が、リポサクションを介して患者から取得される。リポサクションは、シリンジを

介して実施され得、ここで、脂質は、針を介して直接的に、または、リポサクションマシンを介して、患者から除去される。リポサクションの間に除去される脂質の量は、望まれる幹細胞の数に応じて、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジは、シリンジとカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、カートリッジの中で無菌ドッキングされている。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとカートリッジの中のプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、ミニリポサクションであり、ミニリポサクションでは、約３０ｃｃから約５０ｃｃの脂質が患者から除去される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、マイクロリポサクションであり、マイクロリポサクションでは、約５ｃｃから約２９ｃｃの脂質が患者から除去される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、典型的な臨床的リポサクションであり、そのケースでは、３００ｃｃ以上の脂質が患者から除去される。

【０１１３】

脂質が患者から除去されると、脂質は、無菌のプロセッシング容器またはカートリッジの中へ移送される。移送は、本明細書で説明されているように、無菌の手段を介して行われる。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、脂質は、リポサクションデバイスを介して患者から除去され、無菌の接続デバイスを使用してリポサクションデバイスおよびプロセッシング容器またはカートリッジを無菌ドッキングさせることによって、リポサクションデバイスからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、移送は、重力流を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、機械的に行われることが可能であり、たとえば、シリンジのプランジャーを物理的に押圧することによって、および、シリンジの内部からプロセッシング容器またはカートリッジの内部へ脂質を押し込むことによって、行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、ポンプなどのようなデバイスを介して行われることが可能である。

【０１１５】

脂質を受け入れるために使用される容器またはカートリッジの容積は、患者から取得される脂質の量とともに変化することが可能である。いくつかの実施形態では、ミニリポサクションを介して除去された３０ｃｃから５０ｃｃの脂質が、９流量オンスから１９流量オンスの容積を有する容器またはカートリッジへ移送される。

【０１１６】

次いで、患者から除去される脂質の量に等しい無菌の生理食塩水の体積が、脂質を洗浄するために、容器またはカートリッジへ移送される。例として、３０ｃｃの脂質が患者から除去された場合には、次いで、３０ｍＬの無菌の生理食塩水が、サンプルを洗浄するために使用される。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジは、シリンジとカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、カートリッジの中で無菌ドッキングされている。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとカートリッジの中のプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。容器またはカートリッジへの生理食塩水の移送は、本明細書で説明されているように、システムの無菌状態を維持するように実施される。いくつかの実施形態では、無菌の生理食塩水を保持する容器とプロセッシング容器ま

たはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、無菌の生理食塩水は、容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、無菌の接続デバイスを使用して、無菌の生理食塩水容器およびプロセッシング容器またはカートリッジを無菌ドッキングさせることによって、無菌の生理食塩水は、容器またはカートリッジへ移送される。

【０１１７】

洗浄は、脂質および無菌の生理食塩水を含有する容器またはカートリッジを穏やかに振るかまたは旋回させることによって実施される。

【０１１８】

次いで、容器またはカートリッジは、（今では洗浄された）脂質が無菌の生理食塩水から分離されるように置かれる。脂質は生理食塩水よりも密度が低いので、脂質は、生理食塩水の上部に上昇して浮かぶこととなる。分離が行われるために必要とされる時間の量は、脂質サンプルの個々の構成に応じて変化することとなる。いくつかの実施形態では、分離は、１分から３０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から５分で生じ得る。

【０１１９】

次いで、生理食塩水は、可能な限り完全に容器またはカートリッジからドレン排出され、したがって、脂質だけが残る。ドレン排出は、本方法において利用される容器またはカートリッジのタイプに応じて、さまざまな手段を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、生理食塩水は、容器またはカートリッジの底部に位置付けされているチューブを介して、容器またはカートリッジから外へドレン排出される。ドレン排出は、シリンジもしくはポンプのいずれかを使用して能動的に進行するか、または、重力流を介して受動的に進行することが可能である。いくつかの実施形態では、ドレン排出は、本明細書で説明されているように、無菌のシステムの完全性を維持するように行われる。

【０１２０】

洗浄の完了後に、脂質が黄金色になり、生理食塩水がわずかにだけ濁るまで、洗浄が繰り返される。いくつかの実施形態では、洗浄は、１～５回行われ、いくつかの実施形態では、１～４回行われ、いくつかの実施形態では、１～３回行われ、いくつかの実施形態では、１～２回行われ、いくつかの実施形態では、１回行われ。

【０１２１】

洗浄が完了すると、脂質は、プロセッシングのために準備される。

【０１２２】

随意的に、これは必要とされないが、無菌の生理食塩水が、プロセッシングのためのバッグに追加される。生理食塩水の追加は、細胞および／または小さい細胞群がプロセッシングの間に互いから離れるように自由に移動できる空間を提供することとなり、それによって、脂質を個々の細胞へと分解することを助ける。生理食塩水が追加される場合には、本明細書で説明されているように、無菌のシステムの完全性を維持することとなる様式で、生理食塩水が追加される。

【０１２３】

随意的に追加される生理食塩水の体積は、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、追加される生理食塩水の体積は、患者から除去される脂質の体積の０倍から２倍の範囲にある。いくつかの実施形態では、等しい量の生理食塩水が使用される（たとえば、３０ｃｃの脂質に対して３０ｍＬの生理食塩水）。

【０１２４】

過剰な空気が、ポンプまたはシリンジを使用して、容器またはカートリッジから除去される。いくつかの実施形態では、過剰な空気が、無菌の生理食塩水洗浄液がそこからドレン排出される容器またはカートリッジの底部に位置付けされている同じチューブから除去される。いくつかの実施形態では、空気は、本明細書で説明されているように、無菌の閉じたシステムの完全性を維持する様式でドレン排出される。

【０１２５】
次いで、プロセッシング容器またはカートリッジは、プロセッシング装置へ移動させられる。適切なプロセッシング装置３００の例が、図３に示されている。示されている実施形態では、プロセッシング容器またはカートリッジ２０５は、プロセッシングのためのリジッドプラットフォーム３１５の上に固着されている。プラットフォーム３１５は、プロセッシングの間に、容器またはカートリッジ２０５の移動を制御する。
【０１２６】
プラットフォーム３１５は、木材およびプラスチックなどを含む、任意の適切なリジッド材料から作製され得る。いくつかの実施形態では、プラットフォーム３１５は、木材から作製されている。
【０１２７】
この実施形態では、機械的衝撃が使用され、脂質組織を粉砕し、幹細胞を解放する。
【０１２８】
機械的衝撃は、モーター３０５によって発生させられ、モーター３０５は、インパクトアーム３１０を駆動し、インパクトアーム３１０は、プロセッシングされることとなる脂質を含有する容器またはカートリッジ２０５と物理的な接触をする。この実施形態では、モーター３０５は、インパクトアーム３１０を駆動し、インパクトアーム３１０が上下に関節運動するようになっており、その運動の範囲の底部において、容器またはカートリッジ２０５と接触する。いくつかの実施形態では、モーターは、Ｂｌａｃｋ ａｎｄ Ｄｅｃｋｅｒ，１０００ Ｓｔａｎｌｅｙ Ｄｒｉｖｅ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｔａｉｎ，ＣＴ ０６０５３，ＵＳＡ製のモデルＢＤＥＪＳ３００Ｃからの４．５Ａｍｐモーターである。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、モーター３０５は、可変速モーターであり、この可変速モーターは、０ｒｐｍから３０，０００ｒｐｍの範囲にあるレートで、いくつかの実施形態では、０ｒｐｍから２０，０００ｒｐｍの範囲にあるレートで、いくつかの実施形態では、０ｒｐｍから１０，０００ｒｐｍの範囲にあるレートで、いくつかの実施形態では、０ｒｐｍから５，０００ｒｐｍの範囲にあるレートで、インパクトアームを駆動するために調節可能である。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、モーター３０５は、ギヤリングを含み、ギヤリングは、より多くのトルクを発生させるために、モーター３０５が全速力（いくつかの実施形態では、３０，０００ｒｐｍ）で動作しているときに、インパクトアーム３１０の速度を低減させることができる。これが行われるときに、インパクトアーム３１０によって発生させられる運動量は、容器またはカートリッジ２０５の中の組織へ移送される。これは、脂質組織が分解され、幹細胞が脂肪質の組織から遊離される、レートを大きく増加させる。
【０１３１】
１つの実施形態では、モーター３０５は、３０，０００ｒｐｍから３，０００ｒｐｍの速度において、１／１０の減速を可能にするようにギヤを取り付けられている。この実施形態では、モーター３０５は、０．７５インチのギヤ直径を含み、これは、この１／１０の減速を可能にする。３，０００ｒｐｍ、および、０．７５インチのギヤ直径において、インパクトアーム３１０は、毎秒１１７．８インチの速度に到達し、その速度において、インパクトアーム３１０は、前後に関節運動し、したがって、容器またはカートリッジ２０５と接触する。インパクトアーム３１０が容器またはカートリッジ２０５と接触することができる速度は、大きく低減されたプロセッシング時間を可能にする。これは、非常に長いプロセッシング時間を必要とする、公知のまたは既存の組織プロセッシング技法に対して、重大な利点を持つ。
【０１３２】
組織は、脂質が所望のレベルに分解されるまで、または、所望の量の幹細胞が脂質から遊離されるまで、機械的衝撃に露出される。いくつかの実施形態では、脂質サンプルは、３０分以内にプロセッシングされる。いくつかの実施形態では、脂質サンプルは、３０秒

から３０分の間でプロセッシングされ、いくつかの実施形態では、３０秒から２０分の間でプロセッシングされ、いくつかの実施形態では、３０秒から１０分の間でプロセッシングされ、いくつかの実施形態では、３０秒から５分の間でプロセッシングされる。

【０１３３】

プラットフォーム３１５の移動は、３つの方向の平面（Ｘ、Ｙ、およびＺ）の中で行われ、そのそれぞれは、それ自身のモーター：Ｘ平面モーター２３０、Ｙ平面モーター２３５、およびＺ平面モーター２４０によって制御される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｙ平面モーター２３５だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｚ平面モーター２４０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０およびＹ平面モーター２３５だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０およびＺ平面モーター２４０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｙ平面モーター２３５およびＺ平面モーター２４０だけが使用される。いくつかの実施形態では、Ｘ平面モーター２３０、Ｙ平面モーター２３５、およびＺ平面モーター２４０が使用される。モーター２３０、２３５、および２４０のそれぞれは、モーターコントローラー２２５によって制御され、モーターコントローラー２２５は、３次元でのプラットフォーム３１５の移動を可能にする。

【０１３４】

プラットフォーム３１５のこの最大で３次元の移動は、抽出されたサンプルの中の脂質のすべてが、プロセッシングの間に機械的衝撃に露出されることを可能にし、サンプルおよびプロセッシング装置の最適な位置決めを可能にする。

【０１３５】

長さ、インパクト表面の面積、インパクト表面の数、および、インパクトアーム３１０の形状は、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、インパクト表面の合計面積、および／または、インパクト表面の合計数を増加させることは、脂質サンプルをプロセッシングするために必要とされる時間の量を低減させる。

【０１３６】

次いで、（今ではプロセッシングされた）脂質が、機械的衝撃によって脂質から分離された幹細胞を今では含有する無菌の生理食塩水から分離されるように、容器またはカートリッジ２０５は置かれる。脂質は、生理食塩水よりも密度が低いので、脂質は、生理食塩水の上部に上昇して浮かぶこととなる。分離が行われるために必要とされる時間の量は、脂質サンプルの個々の構成に応じて変化することとなる。いくつかの実施形態では、分離は、１分から３０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分未満に行われることが可能である。いくつかの実施形態では、分離は、１０秒から１分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分未満に行われることが可能である。

【０１３７】

幹細胞および間質血管細胞画分は、ここで、脂質サンプルから分離されており、ここで、生理食塩水の中に懸濁している。

【０１３８】

次いで、幹細胞を含有する生理食塩水層は、可能な限り完全に容器またはカートリッジ２０５から除去され、したがって、脂質だけが残る。除去は、本方法において利用される容器またはカートリッジ２０５のタイプに応じて、さまざまな手段を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、生理食塩水は、容器またはカートリッジ２０５の底部に位置付けされているチューブを介して、容器またはカートリッジ２０５から外へドレン排出される。ドレン排出は、シリンジもしくはポンプのいずれかを使用して能動的に進行するか、または、重力流を介して受動的に進行することが可能である。いくつかの実施形態では、幹細胞を含有する層は、本明細書で説明されているように、閉じた無菌の環境の完全性を維持することとなる様式で除去される。

【０１３９】
いくつかの実施形態では、幹細胞を含有する生理食塩水は、容器またはカートリッジ２０５からの除去の間に、フィルターを通過させられる。フィルターのサイズは変化することが可能である。いくつかの実施形態では、フィルターサイズは、４０μｍから１００μｍの範囲にある。いくつかの実施形態では、フィルターサイズは、７０μｍである。さまざまな実施形態では、フィルターは、ナイロンである。
【０１４０】
容器またはカートリッジ２０５からの除去の後または間のいずれかにおいて、幹細胞を含有する生理食塩水は、１つまたは複数の遠心チューブの中へ移動させられる。いくつかの実施形態では、移動は、本明細書で説明されているように、閉じた無菌の環境の完全性を維持することとなる様式で行われる。遠心チューブの底部においてペレットの中へ幹細胞を濃縮させるために、遠心分離が続く。
【０１４１】
幹細胞は、３分から１０分にわたる５００ｇから１，６００ｇでの遠心分離によって濃縮される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、１０分にわたる１，２００ｇでの遠心分離によって濃縮される。
【０１４２】
流体は、チューブから除去され、底部に幹細胞だけを残す。流体は、デカンティング、吸引、または同様の手段によって除去され得る。
【０１４３】
少量の流体が、幹細胞を再懸濁させるために遠心チューブの中へ入れられる。いくつかの実施形態では、遠心チューブに追加される流体の量は、１ｍＬから５ｍＬの範囲にある。いくつかの実施形態では、流体は、生理食塩水、多血小板血漿、ヒアルロン酸、固定用ゲル、ヒドロゲル、スカッフォールド、フィブリングルー、グルー、または、先述のもののいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、細胞が、遠心分離吸引物の中に再懸濁される。
【０１４４】
幹細胞が懸濁液の中にある状態で、幹細胞は、使用のための準備ができている。そのような使用は、限定することなく、幹細胞が導出された患者の中への再導入、凍結保存、および膨張などを含むことが可能である。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、患者使用のために、皮下注射針を介してシリンジの中へ移動させられる。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、心臓、筋肉、骨、軟骨、肝臓、腎臓、または、他の組織および器官構造体へと成長するための組織スカッフォールドの中へ種を撒かれる。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、幹細胞が多能性転写因子を表現することを引き起こすによって、人工多能性幹細胞へと変換される。
【０１４５】
上記に説明されている第１および第２の方法では、容器またはカートリッジ、および、機械的なエネルギー供給源は、移動可能である。いくつかの実施形態では、脂質は、ＥＳＷまたはインパクト表面の下に設置されているチャンバーを通してポンプ送りされる。これらの実施形態では、バッグおよび機械的なエネルギー供給源の両方は、適切な場所に固定されており、組織は、チャンバーを通過させられ、ＥＳＷおよび／または機械的なエネルギー供給源に露出される。
【０１４６】
脂質から幹細胞をプロセッシングする方法の第３の実施形態は、以下の通りである。
【０１４７】
脂質が、リポサクションを介して患者から取得される。リポサクションは、シリンジを介して実施され得、ここで、脂質は、針を介して直接的に、または、リポサクションマシンを介して、患者から除去される。リポサクションの間に除去される脂質の量は、望まれる幹細胞の数に応じて、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、リポサク

ションは、ミニリポサクションであり、ミニリポサクションでは、約３０ｃｃから約５０ｃｃの脂質が患者から除去される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、マイクロリポサクションであり、マイクロリポサクションでは、約５ｃｃから約２９ｃｃの脂質が患者から除去される。いくつかの実施形態では、リポサクションは、典型的な臨床的リポサクションであり、そのケースでは、３００ｃｃ以上の脂質が患者から除去される。

【０１４８】

脂質が患者から除去されると、脂質は、無菌のプロセッシングカートリッジの中へ移送される。移送は、本明細書で説明されているように、無菌の手段を介して行われる。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとプロセッシングカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシングカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジは、シリンジとカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、カートリッジの中で無菌ドッキングされている。いくつかの実施形態では、脂質は、シリンジを介して患者から除去され、シリンジとカートリッジの中のプロセッシング容器またはカートリッジとの間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、シリンジからプロセッシング容器またはカートリッジへ移送される。いくつかの実施形態では、脂質は、リポサクションデバイスを介して患者から除去され、無菌の接続デバイスを使用してリポサクションデバイスおよびプロセッシングカートリッジを無菌ドッキングさせることによって、リポサクションデバイスからプロセッシングカートリッジへ移送される。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、移送は、重力流を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、機械的に行われることが可能であり、たとえば、シリンジのプランジャーを物理的に押圧することによって、および、シリンジの内部からプロセッシングカートリッジの内部チャンバーの中へ脂質を押し込むことによって、行われることが可能である。いくつかの実施形態では、移送は、ポンプなどのようなデバイスを介して行われることが可能である。

【０１５０】

脂質を受け入れるカートリッジ４００、５００の内部チャンバーの容積（たとえば、図４および図５に提供されているカートリッジ実施形態を参照）は、患者から取得される脂質の量とともに変化することが可能である。いくつかの実施形態では、ミニリポサクションを介して除去される３０ｃｃから５０ｃｃの脂質が、カートリッジ４００、５００の脂肪チャンバー４０５、５０５へ移送される。

【０１５１】

この実施形態では、脂質は、自己完結型のカートリッジ４００、５００の特定のコンポーネント４０５、５０５の中へ注入され、カートリッジ４００、５００は、サンプルを外側の環境に露出させることなく脂質サンプルのプロセッシングをカートリッジ４００、５００の中に完全に収容するように設計されている。いくつかの実施形態では、脂質を受け入れるカートリッジ４００、５００の中に位置付けされている脂肪チャンバー４０５、５０５は、９流量オンスから１９流量オンスの容積を有する可撓性のバッグである。

【０１５２】

さまざまな態様では、カートリッジ４００、５００は、ＥＳＷまたは機械的衝撃デバイス、および、本明細書で開示されている方法のいずれかとともに使用するように設計されている。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、下記に説明されているプロセッシングステップのうちのいくつかを自動的に実行するマシンによって実施される。いくつかの実施形態では、プロセッシングは、ユーザーによって実施され、ユーザーは、下記に説明されているステップを手動で実施する。両方の実施形態において、プロセッシングは、外部で制御され、カートリッジ４００、５００の内部プロセッシングが、サンプルが外側の環境に露出されることもなく、無菌の様式で実施されるようになっている。

【０１５３】
示されている実施形態では、脂質サンプルは、第１の一方向弁４１０、５１０に脂質サンプルを通すことによって、脂肪チャンバー４０５、５０５の中へ導入される。第１の一方向フロー弁４１０、５１０の方向は、示されているように、脂肪チャンバー４０５、５０５の内部へ向かう方向になっている。いくつかの実施形態では、患者から取り出した後の脂質を保持する容器と、プロセッシングカートリッジ４００、５００の第１の一方向弁４１０、５１０との間で、オス型およびメス型のルアーロックコネクターを互いに取り付けることによって、脂質は、脂肪チャンバー４０５、５０５の内部チャンバーの中へ導入される。いくつかの実施形態では、脂質は、リポサクションデバイスを介して患者から除去され、無菌の接続デバイスを使用して、リポサクションデバイスおよびプロセッシングカートリッジを無菌ドッキングさせることによって、リポサクションデバイスからプロセッシングカートリッジへ移送される。

【０１５４】
脂肪チャンバー４０５、５０５の内側に入ると、脂質は、プロセッシングの前に洗浄される。カートリッジ４００、５００は、流体リザーバー４１５、５１５を含有しており、流体リザーバー４１５、５１５は、無菌の生理食塩水で充填されており、いくつかの実施形態では、無菌の１ｘリン酸緩衝生理食塩水で充填されており、これは、組織を洗浄するために使用される。無菌の生理食塩水を脂肪チャンバー４０５、５０５の内部へ導入するために、生理食塩水は、第２の一方向弁４２０、５２０を通して脂肪チャンバー４０５、５０５の内部へ入れられる。フローの方向は、示されているようになっている。生理食塩水は、外部アクチュエーター４２５、５２５の使用を介して、脂肪チャンバー４０５、５０５の内部へ移動させられ、外部アクチュエーター４２５、５２５は、第１の一方向弁４２０、５２０を通して生理食塩水を押し込むために、第１のプランジャー４３０、５３０を移動させる。いくつかの実施形態では、外部アクチュエーター４２５、５２５は、ユーザーによって手動で動作させられ、ユーザーは、所望の量の生理食塩水が第２の一方向弁４２０、５２０を通して脂肪チャンバー４０５、５０５の内部へ入れられるまで、アクチュエーター４２５、５２５を押圧する。いくつかの実施形態では、外部アクチュエーター４２５、５２５の移動は自動化されており、外部マシンが、外部アクチュエーター４２５、５２５が示されている方向に移動することを引き起こし、それによって、第２の一方向弁４２０、５２０を通して脂肪チャンバー４０５、５０５の内部へ入る所望の量の生理食塩水を計量する。

【０１５５】
洗浄は、脂質および無菌の生理食塩水を含有するカートリッジ４００、５００を穏やかに振るかまたは旋回させることによって実施される。

【０１５６】
次いで、カートリッジ４００、５００は、（今では洗浄された）脂質が無菌の生理食塩水から分離されるように置かれる。この実施形態では、カートリッジ４００、５００は、２つの変形例を有している。いくつかの実施形態では、カートリッジ４００、５００は、固定された垂直方向の配向を有しており、脂肪チャンバー４０５、５０５の中に含有されている脂質および生理食塩水洗浄液が、常に自然に重力を介して互いから分離することとなり、脂質が、脂肪チャンバー４０５、５０５の上部に浮かぶ。いくつかの実施形態では、カートリッジ４００、５００は、水平方向の配向を有しており、垂直方向に回転させられ、脂質が浮かび、生理食塩水洗浄液から分離することを可能にする。脂質は生理食塩水よりも密度が低いので、脂質は、生理食塩水の上部に上昇して浮かぶこととなる。分離が行われるために必要とされる時間の量は、脂質サンプルの個々の構成に応じて変化することとなる。いくつかの実施形態では、分離は、１分から３０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から１０分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分から５分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１０秒から１分で生じ得る。いくつかの実施形態では、分離は、１分未満に行われることが可能である。

【０１５７】
次いで、生理食塩水は、可能な限り完全に脂肪チャンバー４０５、５０５からドレン排出され、したがって、脂質だけが残る。ドレン排出は、本方法において利用されるカートリッジ４００、５００のタイプに応じて、さまざまな手段を介して行われることが可能である。いくつかの実施形態では、生理食塩水は、カートリッジ４００、５００の外側につながる脂肪チャンバー４０５、５０５の底部に位置付けされているチューブを介して、脂肪チャンバー４０５、５０５から外へカートリッジ４００、５００から離れるようにドレン排出される。ドレン排出は、シリンジもしくはポンプのいずれかを使用して能動的に進行するか、または、重力流を介して受動的に進行することが可能である。いくつかの実施形態では、ドレン排出は、本明細書で説明されているように、無菌のシステムの完全性を維持するように行われる。

【０１５８】
洗浄の完了後に、脂質が黄金色になり、生理食塩水がわずかにだけ濁るまで、洗浄が繰り返される。いくつかの実施形態では、洗浄は、１～５回行われ、いくつかの実施形態では、１～４回行われ、いくつかの実施形態では、１～３回行われ、いくつかの実施形態では、１～２回行われ、いくつかの実施形態では、１回行われる。

【０１５９】
いくつかの実施形態では、無菌の生理食塩水が流体リザーバー４１５、５１５から使い尽くされるまで、洗浄が繰り返される。いくつかの実施形態では、脂肪チャンバー４０５、５０５の中の生理食塩水洗浄液が十分に透明になり、洗浄の後に、５０％から１００％の光が生理食塩水を通過し、高い程度の透明度を示すまで、洗浄が繰り返される。いくつかの実施形態では、設定数の洗浄サイクルが完了するまで、洗浄が繰り返され、設定数は、いくつかの実施形態では、１回から５回の洗浄であり、いくつかの実施形態では、１回から４回の洗浄であり、いくつかの実施形態では、１回から３回の洗浄であり、いくつかの実施形態では、１回から２回の洗浄であり、いくつかの実施形態では、１回の洗浄であり、いくつかの実施形態では、２回の洗浄であり、いくつかの実施形態では、３回の洗浄である。

【０１６０】
洗浄が完了すると、脂質は、プロセッシングのための準備ができている。

【０１６１】
脂肪チャンバー４０５、５０５の中の脂質は、幹細胞を脂質から遊離させるために、脂質をＥＳＷおよび／または機械的衝撃にさらすことによって、方法１および２において上記に説明されている方法のうちの１つにしたがってプロセッシングされる。いくつかの実施形態では、カートリッジ４００、５００は、脂肪チャンバー４０５、５０５の上方に開口部を有しており、最適なプロセスを可能にし、ＥＳＷ、および／または、機械的衝撃からの力が、カートリッジ４００、５００の外部のリジッドプラスチックを通過しないようになっている。そのような実施形態では、可撓性の脂肪チャンバー４０５、５０５壁部は、プロセッシングのために露出される。

【０１６２】
組織プロセッシングが完了した後に、脂質は、流体から分離して上部まで上昇することを許容される。上記に記述されているように、この実施形態では、カートリッジ４００、５００は、２つの変形例を有している。いくつかの実施形態では、カートリッジ４００、５００は、固定された垂直方向の配向を有しており、脂肪チャンバー４０５、５０５の中に含有されているプロセッシングされた脂質および生理食塩水が、常に自然に重力を介して互いから分離することとなり、脂質が、脂肪チャンバー４０５、５０５の上部に浮かぶ。いくつかの実施形態では、カートリッジ４００、５００は、水平方向の配向を有しており、垂直方向に回転させられ、脂質が浮かび、生理食塩水から分離することを可能にする。脂質は生理食塩水よりも密度が低いので、脂質は、生理食塩水の上部に上昇して浮かぶこととなる。ここで、脂質から遊離された幹細胞は、生理食塩水層の中に含有されている。

【０１６３】
次いで、幹細胞を含有する生理食塩水は、脂肪チャンバー４０５、５０５から、カートリッジ４００、５００の中に位置付けされている細胞リザーバー４３５、５３５へ、脂質から離れるように、第３の一方向弁４４０、５４０を通して移動させられる。生理食塩水は、第２の外部アクチュエーター４４５、５４５の使用を介して、細胞リザーバー４３５、５３５の内部へ移動させられ、第２の外部アクチュエーター４４５、５４５は、第３の一方向弁４４０、５４０を通して生理食塩水を押し込むために、第２のプランジャー４５０、５５０を移動させる。細胞リザーバー４３５、５３５の中には、第２のプランジャー４５０、５５０が、完全に閉じた構成で配向されており、細胞リザーバー４３５、５３５が完全に閉じられているようになっている。このように、第２のアクチュエーター４４５、５４５を移動させることは、第３の一方向弁４４０、５４０から離れるように、第２のプランジャー４５０、５５０を移動させ、細胞リザーバー４３５、５３５の内側に軽度の真空を生成させ、この真空は、幹細胞を含有する生理食塩水層を、脂肪チャンバー４０５、５０５から、第３の一方向弁４４０、５４０を通して、細胞リザーバー４３５、５３５の内部へ引き込む。いくつかの実施形態では、第２の外部アクチュエーター４４５、５４５は、ユーザーによって手動で動作させられ、ユーザーは、幹細胞を含有する生理食塩水の全体が第３の一方向弁４４０、５４０を通して細胞リザーバー４３５、５３５の内部へ引き込まれるまで、第２のアクチュエーター４４５、５４５を引っ張る。いくつかの実施形態では、第２の外部アクチュエーター４４５、５４５の移動は自動化されており、外部マシンが、第２の外部アクチュエーター４４５、５４５を引っ張り、幹細胞を含有する生理食塩水を細胞リザーバー４３５、５３５の中へ移動させる。

【０１６４】
いくつかの実施形態では、幹細胞を含有する生理食塩水は、残された望まれない細胞破片をプロセッシングされた脂肪質の組織から濾過して除くために、メッシュを通して引き込まれる。いくつかの実施形態では、メッシュは、脂肪チャンバー４０５、５０５の中に位置付けされており、脂肪チャンバー４０５、５０５の中において、メッシュは、第３の一方向弁４４０、５４０の開口部をカバーしている。いくつかの実施形態では、メッシュは、細胞リザーバー４３５、５３５の内部に位置付けされており、細胞リザーバー４３５、５３５の内部において、メッシュは、第３の一方向弁４４０、５４０の出口をカバーしている。いくつかの実施形態では、メッシュは、細胞リザーバーの内部に位置付けされており、細胞リザーバーの内部において、メッシュは、第４の一方向弁４５５、５５５の開口部をカバーしている。いくつかの実施形態では、メッシュの中の細孔は、サイズが４０μｍから１００μｍの範囲にあり、いくつかの実施形態では、細孔は、サイズが７０μｍである。いくつかの実施形態では、メッシュは、ナイロンである。

【０１６５】
図４に示されている実施形態では、幹細胞を含有する画分は、細胞リザーバー４３５の内部から、第４の一方向弁４５５を通して、カートリッジ４００の中に含有されている遠心チューブ４６０の中へ移送される。幹細胞画分は、第２の外部アクチュエーター４４５の使用を介して、遠心チューブ４６０の中へ移動させられ、第２の外部アクチュエーター４４５は、第３の一方向弁４４０を通して遠心チューブ４６０の中へ生理食塩水を押し込むために、第２のプランジャー４５０を移動させる。本明細書で説明されているように、この移動は、手動で実施され得るか、または、それは、自動化され得る。次いで、遠心チューブ４６０は、遠心分離のために、カートリッジ４００から除去される。遠心分離は、上記に説明されている２つの実施形態のいずれかに説明されているように進行し、幹細胞のペレットが、遠心チューブ４６０の底部に残る。

【０１６６】
図５に説明されている実施形態では、幹細胞を含有する画分は、細胞リザーバー５３５の内部から、第４の一方向弁５５５を通して、カートリッジ５００の中に含有されている遠心分離コンポーネント５６０の中へ移送される。遠心分離コンポーネント５６０は、三角形のチャンバーであり、三角形のチャンバーは、遠心分離機コンポーネントとして作用

する。これは、細胞を生理食塩水から外へスピンさせ、細胞がチャンバーの外側縁部における単一のポイントに濃縮するようになっている。アクセスポート５６５は、ユーザーが幹細胞ペレットへのアクセスを得ることを可能にし、ペレットを再懸濁させ、および／または、遠心分離コンポーネント５６０からペレットを除去するようになっている。いくつかの実施形態では、遠心分離コンポーネント５６０の動作は、外部装置によって自動化および制御されており、ここで、外部装置は、チャンバーの中心においてカートリッジの中へ挿入するモーターおよびギヤを通して、スピンチャンバーと係合している。その点で、遠心分離コンポーネント５６０は、ダイレクトドライブであるかまたはギヤ付きであることが可能である。幹細胞を含有する層／下澄みが、上記に説明されているように、遠心分離コンポーネントの中へロードされ、他方の側が、遠心分離の前にバランスさせられる。遠心分離コンポーネントの中へ導入されると、幹細胞は、３分から１０分間、５００ｇから１６００ｇで遠心分離される。いくつかの実施形態では、遠心分離は、１０分間１２００ｇで行われる。

【０１６７】

細胞を再懸濁させるために、少量の流体が、チューブの中へ入れられる。これは、典型的に、１ｍＬから５ｍＬである。流体は、生理食塩水、多血小板血漿、ヒアルロン酸、または、固定用ゲル、ヒドロゲル、スカッフォールド、またはフィブリンまたはグルー、または他の化合物であることが可能である。

【０１６８】

細胞が懸濁液の中にある状態で、細胞は、さらなる使用のために、皮下注射針を通してシリンジの中へ吸い込まれる。これは、プロセッシングマシンによって自動的に行われるか、または、オペレーターによって手動で行われる。

【０１６９】

少量の流体が、幹細胞を再懸濁させるために使用される。いくつかの実施形態では、細胞を再懸濁させるために追加される流体の量は、１ｍＬから５ｍＬの範囲にある。いくつかの実施形態では、流体は、生理食塩水、多血小板血漿、ヒアルロン酸、固定用ゲル、ヒドロゲル、スカッフォールド、フィブリン、グルー、または、先述のもののいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、細胞が、遠心分離吸引物の中に再懸濁される。

【０１７０】

幹細胞が懸濁液の中に浮かんでいる状態で、幹細胞は、使用のための準備ができている。そのような使用は、限定することなく、幹細胞が導出された患者の中への再導入、凍結保存、および膨張などを含むことが可能である。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、患者使用のために、皮下注射針を介してシリンジの中へ移動させられる。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、心臓、筋肉、骨、軟骨、肝臓、腎臓、または、他の組織および器官構造体へと成長するための組織スカッフォールドの中へ種を撒かれる。いくつかの実施形態では、濃縮されて再懸濁された幹細胞は、幹細胞が多能性転写因子を表現することを引き起こすによって、人工多能性幹細胞へと変換される。

【０１７１】

デバイス

上述のように、本開示は、組織サンプルをバイオプロセッシングするための方法およびシステムを提供する。また、さまざまな態様において、本開示は、開示されている方法とともに使用するのに適切な使いやすいデバイスを提供し、そのようなデバイスは、外側の環境に対して閉じられており、単回使用のために設計されている。そのようなデバイスは、単回使用カートリッジを含み、単回使用カートリッジは、単一のデバイスの中での完全なプロセッシングを可能にする。

【０１７２】

容器

上記に説明されている実施形態は、しおれた（wither）組織サンプル、脂質サンプル、

所望の細胞画分を含有する画分、幹細胞を含有する画分、または、先述のもののいずれかの組み合わせの受容部として、１つまたは複数の容器を利用する。そのような容器は、図１のステップ１０５において利用される容器；容器２０５；脂肪チャンバー４０５、５０５；流体リザーバー４１５、５１５；および細胞リザーバー４３５、５３５を含む。これらの容器は、本開示によって提供されるシステムおよび方法とともに使用するのに適切であり、可撓性であるか、リジッドであるか、または半リジッドであることが可能である。いくつかの実施形態では、容器は、シリンジである。

【０１７３】

図１のステップ１０５において利用される容器；容器２０５；脂肪チャンバー４０５、５０５；流体リザーバー４１５、５１５；および細胞リザーバー４３５、５３５のそれぞれは、それ自体によって、または、密閉型のカートリッジの一部として、外側の環境に対して閉じられており、また、使い捨てのものである。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、図１のステップ１０５において利用される容器；容器２０５；脂肪チャンバー４０５、５０５；流体リザーバー４１５、５１５；および細胞リザーバー４３５、５３５のそれぞれは、可撓性の容器であり、たとえば、可撓性のバッグである。そのような実施形態では、それぞれの容器は、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）、ポリ（ビニル）クロライド（ＰＶＣ）、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）、ナイロン、または、他のプラスチックから作製され得る。

【０１７５】

可撓性の容器のそれぞれは、ブロー成形され得る。いくつかの実施形態では、可撓性の容器のそれぞれは、ラジオ周波溶接されるか、高周波溶接されるか、または誘導加熱溶接され得、また、ブロー成形され得る。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、可撓性の容器のそれぞれは、可撓性の容器の内部チャンバーと流体接続している少なくとも１つの出口部を有する３次元のバッグである。いくつかの実施形態では、単一の容器は、容器の内部チャンバーと流体接続している２つ以上の出口部を有することが可能である。そのような出口部は、たとえば、容器の内部チャンバーから流体をドレン排出させるために、または、容器の内部から別の容器へ流体を移動させるために使用され得る。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、容器は、縁部に沿って容器の外側に位置付けされている１つまたは複数の孔部を含むことが可能であり、１つまたは複数の孔部は、空間に容器を吊り下げるために使用され得る。

【０１７８】

容器の合計容積は、５流量オンスから５０流量オンスであることが可能であり、いくつかの実施形態では、９流量オンスから１９流量オンスであることが可能である。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、組織サンプル、無菌の生理食塩水、またはその他の形態で、入力を受け取るために、容器は、別個のポイントにおいて入口ラインまたは接続部を受け入れるように構成されており、入口ラインまたは接続部は、容器の内部と流体接続している入口部に接続する。閉じた無菌の環境の完全性を維持するために、入口ラインまたは接続部は、メス型のルアー接続部を含み、メス型のルアー接続部は、容器が外部デバイスに接続されることを可能にし、容器は、組織サンプルを含有するシリンジ、物質がそこから問題の容器の中へ移送されることとなる別の容器、またはその他である。他の実施形態では、入口ラインまたは接続部は、無菌の接続デバイスを使用して外部デバイスに接続するための無菌のドックを含む。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、容器は、平坦なバッグであることが可能であり、平坦なバッグは、上部縁部、底部縁部、および、２つの実質的に同様の側部縁部を有している。底部

縁部は、流体をバッグから外へドレン排出するために、バッグの内部と流体接続している出口部を含む。また、平坦なバッグは、バッグの内部の中への材料の無菌での導入を可能にする入口部を有している。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、容器は、形状が長方形になっている３次元のバッグであり、３次元のバッグは、上部縁部、底部縁部、および、２つの実質的に同様の側部縁部を有している。底部縁部は、流体を容器から外へドレン排出するために、容器の内部と流体接続している出口部を含む。上部縁部は、容器の中への材料の導入のための、容器の内部と流体接続している入口部を含む。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、容器は、ラインを介して１つまたは複数の他の容器に接続されている。ラインは、ポリ（ビニル）クロライド（ＰＶＣ）、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）、または、他の材料から作製され得るチュービングである。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、容器は、半リジッドであることが可能である。そのような実施形態では、容器は、リジッドプラスチックハウジングを含み、リジッドプラスチックハウジングは、その形状を維持しており、組織プロセッシングの間にハウジングの内側に可撓性の容器を保持することができる。ハウジングは、それがプラットフォーム２１０または３１５への取り付けのポイントを含有するように構成されている。

【０１８４】

リジッドプラスチックハウジングは、たとえば、高密度ポリエチレン（ＨＤＰＥ）またはポリプロピレン（ＰＰ）を含む、任意の適切なリジッドプラスチック材料から作製され得る。リジッドプラスチック材料は、弾性的な変形を示さず、また、リジッドプラスチック材料は、可撓性のプラスチックによって典型的に表される弾性的な挙動のいずれを表すこともない。リジッドプラスチックハウジングは、射出成形またはダイカットされ得る。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、可撓性の容器は、リジッドプラスチックハウジングの中に含有されており、リジッドプラスチックハウジングは、可撓性の容器を完全に密閉してもよく、またはしなくてもよい。いくつかの実施形態では、可撓性の容器は、リジッドプラスチックハウジングの中に完全に密閉されているわけではない。むしろ、ハウジングは、可撓性の容器を部分的に密閉し、組織プロセッシングの間にそれを適切な場所に保持している。

【０１８６】

カートリッジ

さまざまな態様では、本開示とともに使用するのに適切なカートリッジは、それらの内部の中に１つまたは複数の容器を収容することができる３次元の容器である。内部容器は、１つまたは複数のラインおよび／または弁によって接続され得る。適切なカートリッジの例は、図４および図５に示されているカートリッジ４００、５００である。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、カートリッジは、リジッドプラスチック材料から作製されており、リジッドプラスチック材料は、その形状を維持しており、組織プロセッシングの間にカートリッジの内側に可撓性の容器のうちの少なくとも１つ、好ましくは、複数を保持することができる。容器は、それらがプラットフォーム２１０または３１５への取り付けの１つまたは複数のポイントを含有するように構成されている。

【０１８８】

リジッドプラスチックは、たとえば、高密度ポリエチレン（ＨＤＰＥ）またはポリプロピレン（ＰＰ）を含む、任意の適切なリジッドプラスチック材料から作製され得る。リジッドプラスチック材料は、弾性的な変形を示さず、また、リジッドプラスチック材料は、可撓性のプラスチックによって典型的に表される弾性的な挙動のいずれを表すこともない。リジッドプラスチックカートリッジは、射出成形またはダイカットされ得る。

【０１８９】
容器の他の態様は、上記に説明されている。
【０１９０】
遠心チューブ
本開示の方法およびデバイスとともに使用するのに適切な遠心チューブは、遠心ローターに正確にフィットするように設計されている、ガラスまたはプラスチックの精密に仕上げられた高強度チューブである。遠心チューブの容量は、プロセッシングされることとなる組織サンプルの合計体積に応じて、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、遠心チューブは、１ｍＬから５０ｍＬの範囲にある容量、いくつかの実施形態では、０．５ｍＬから２０ｍＬの範囲にある容量、およびいくつかの実施形態では、２５０μＬから２．０ｍＬの範囲にある容量を有している。
【０１９１】
いくつかの実施形態では、遠心チューブは、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ（登録商標）チューブであり、いくつかの実施形態では、マイクロフュージチューブであり、いくつかの実施形態では、マイクロ遠心チューブである。
【０１９２】
遠心チューブの材料は、変化することが可能である。いくつかの実施形態では、遠心チューブは、ガラスから作製されている。いくつかの実施形態では、遠心チューブは、プラスチックである。それぞれの実施形態では、遠心チューブは、単回使用のために設計されており、使い捨てのものである。いくつかの実施形態では、遠心チューブは、ポリエチレンなどのような可撓性の透明なプラスチックから作製されており、形状が半円錐形状になっており、一体型のヒンジ式のシーリングキャップを含む。
【０１９３】
一方向弁
一方向弁は、流体が単一の方向だけにそれを通って流れることを可能にする弁である。
【０１９４】
さまざまな態様では、本開示のデバイスおよび方法とともに使用するのに適切な一方向弁は、２ポート弁を含み、２ポート弁は、２つの開口部を有しており、一方は、流体が進入するためのものであり、他方は、流体が離れるためのものである。一方向弁は、流体の一定方向のフローを自動的に提供するように機能し、任意のユーザーの介入または制御を必要としない。いくつかの実施形態では、本開示の方法およびデバイスに有用な一方向弁は、ポリ（プロピレン）などのようなリジッドプラスチックから作製されている。
【０１９５】
いくつかの実施形態では、本開示のデバイスおよび方法とともに使用するのに適切な一方向弁は、ボール逆止弁であり、ボール逆止弁において、流体の逆流を防止するコンポーネントは、球形のボールである。いくつかの実施形態では、ボールは、一方向弁を閉じた状態に維持することを助けるためにばね荷重式になっている。
【０１９６】
いくつかの実施形態では、本開示のデバイスおよび方法とともに使用するのに適切な一方向弁は、ダイヤフラム逆止弁であり、ダイヤフラム逆止弁は、弁閉鎖を生成させるように位置決めされているフレキシングゴムダイヤフラムを含む。そのような実施形態では、上流側に生成される圧力は、ユーザー介入によって、または、自動化されたプロセスを介して、ダイヤフラムが開くこと、および、流体が弁を通って流れることを引き起こす。プラスの圧力が停止すると、ダイヤフラムが閉じ、流体フローを終了させる。
【０１９７】
いくつかの実施形態では、本開示のデバイスおよび方法とともに使用するのに適切な一方向弁は、スウィング逆止弁、または、傾斜式ディスク逆止弁である。そのような実施形態では、ディスクは、一方向への流体フローを可能にするために、および、反対側方向への流体逆行を阻止するために使用される、弁の可動パーツである。
【０１９８】

例

本明細書で説明されている材料、方法、および実施形態は、以下の例においてさらに定義されている。また、特定の実施形態は、本明細書において例の中に定義されている。これらの例は、特定の実施形態を示しているが、図示目的のためだけに与えられているということが理解されるべきである。本明細書での開示およびこれらの例から、当業者は、本開示の本質的な特徴を確認することが可能であり、また、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、さまざまな使用法および条件にそれを適合させるように、本発明のさまざまな変形および修正を行うことが可能である。

【０１９９】

例１

ＥＳＷ組織プロセッシングのための一般的プロトコル

脂肪吸引物が、対象から取得され、脂肪吸引物は、体積がおおよそ３０ｃｃである。プロセッシングの前に、脂肪吸引物は、おおよそ０．２５インチ厚さの側壁部を有する、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）、ポリ（ビニル）クロライド（ＰＶＣ）、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡ）またはナイロンの可撓性の無菌のバッグへ移送される。無菌のカテーテルバッグが十分である。

【０２００】

生理食塩水バッグからのオス型のルアーロックコネクターを、可撓性のバッグの上に位置付けされているメス型のルアーロックコネクターに接続することによって、および、生理食塩水を可撓性のバッグの中へ手動でディスペンスすることによって、脂肪吸引物は、可撓性のバッグの中へ導入される無菌の生理食塩水の等しい体積を使用して洗浄される。次いで、脂肪吸引物および生理食塩水洗浄液は、可撓性のバッグを穏やかに振ることによって、機械的に撹拌される。

【０２０１】

組織サンプル／生理食塩水洗浄液の混合物は、少なくとも１０分間静置させ、脂肪吸引物が生理食塩水の上部に浮かぶことを可能にする。

【０２０２】

下澄みまたは生理食塩水洗浄液は、可撓性のバッグの底部に位置付けされているドレンラインを介して、可撓性のバッグから除去される。シリンジをラインに接続することによって、および、下澄みをバッグから外へ引き出すことによって、または、重力流によって、除去が行われることが可能である。

【０２０３】

洗浄は、３～４回繰り返され、最終的な洗浄でバッグの中の無菌の生理食塩水洗浄液を残す。

【０２０４】

次のステップは、Ｍａｓｔｅｒｐｕｌｓ　ＭＰ１００対外衝撃波発生器を使用して、対外衝撃波を脂肪吸引物に印加することである。

【０２０５】

発生器は、可撓性のバッグの壁部と接触してもよいが、衝撃波発生器が脂肪吸引物自体に接触しないことを保証するように注意が払われるべきである。

【０２０６】

必要な場合には、脂肪吸引物への衝撃波の印加の前に、超音波ゲルが可撓性のバッグの側部に塗布されてもよい。

【０２０７】

１分から３０分間、ＥＳＷを脂肪吸引物に印加する。

【０２０８】

その後に、振るかまたは軽くボルテックスすることによって、可撓性のバッグを穏やかに撹拌する。

【０２０９】

今プロセッシングされた脂肪吸引物を静置し、脂肪質の組織の残りのものが生理食塩水

の上部に浮かぶことができるようになっている。
【０２１０】
上記に説明されているように、無菌のシリンジをドレンチューブに取り付けることによって、および、可能な限り多くの下澄みを引き出すことによって、可撓性のバッグから下澄みを除去する。残っている脂肪組織のいずれも取らない。
【０２１１】
除去の間に、４０μｍ、７０μｍ、または１００μｍの細孔サイズを有する３つのナイロンメッシュフィルターのうちの１つに下澄みを通す。
【０２１２】
下澄みを１つまたは複数の無菌の遠心チューブの中へ分配する。奇数の数のチューブが使用される場合には、無菌の生理食塩水を含有するバランスチューブがバランスのためにローターの中に設置されることを保証する。
【０２１３】
１０分間１，２００ｇで遠心分離する。
【０２１４】
随意的に：１ｍＬ　ＲＢＣ溶解バッファーの中にペレットを再懸濁させ、１０分間３７℃で水槽の中で培養する。ＲＢＣバッファーを中和させる。
【０２１５】
ＲＢＣ溶解バッファーが望まれない場合には、１ｍＬの無菌の生理食塩水の中に細胞ペレットを再懸濁させる。
【０２１６】
細胞をカウントする。
【０２１７】
例２
脂肪吸引物プロセッシング方法の比較
要約：この例に関して実施されるテストの目的は、コラゲナーゼ消化を使用して脂肪組織から抽出される間葉系幹細胞からの有核細胞の収率と、対外衝撃波（ＥＳＷ）破砕のものとを比較することであった。
【０２１８】
材料：
１，５００ｍＬの１ｘリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）
３５ｍＬの１ｘ赤血球（ＲＢＣ）溶解バッファー
２００ｍＬの０．１％コラゲナーゼタイプＩ
ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）の中の１５ｍＬの１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）
【０２１９】
方法：
コントロール
おおよそ２５０ｍＬの脂肪吸引物が、無菌の６０ｍＬカテーテルを使用して、１００ｍＬビーカーの中へ移送された。過剰な流体がビーカーの中へほとんど導入されないか全く導入されないことを保証することに注意が払われた。
【０２２０】
脂肪吸引物は、おおよそ等しい体積の無菌の１ｘＰＢＳによって４回洗浄された。それぞれの洗浄に関して、無菌の１ｘＰＢＳがビーカーに追加され、２回はかき混ぜられ、混合物は、静置させた。下澄みが、吸引することによってビーカーから除去された。脂肪吸引物は、合計で４回洗浄された。
【０２２１】
第４の洗浄の後に、サンプルは、１０分間静置させた。
【０２２２】
無菌の１０ｍＬセロロジカルピペットが使用され、４５ｍＬの下澄みを、第４の最終的

な洗浄液から、３つの無菌の５０ｍＬ円錐形状のチューブの中へ、４０μｍ、７０μｍ、および１００μｍチューブ無菌フィルターを通して移送した。合計で１３５ｍＬの下澄みが、コントロールとして使用するために移送された。

【０２２３】

コラゲナーゼ消化

２００ｍＬの脂肪吸引物が、無菌の５００ｍＬガラスボトルの中へ堆積させられた。２００ｍＬの０．１％コラゲナーゼタイプＩが、ボトルに追加された。脂肪吸引物がコラゲナーゼと均一に混合されることを保証するために、ボトルは、それを数回逆さまにすることによって、軽く撹拌された。

【０２２４】

次いで、ボトルは、３７℃で水槽の中へ置かれた。１０分ごとに、ボトルが、水槽から除去され、数回逆さまにされ、脂肪吸引物を再分配し、ボトルが落ち着かされた。３０分の培養の後に、ボトルは、最後にもう一回撹拌され、水槽から除去された。

【０２２５】

ボトルの外部は、７０％ＥＴＯＨによってスプレーされ、ヒュームフードの中に置かれた。脂肪吸引物およびコラゲナーゼ混合物は、１０分間静置させた。

【０２２６】

無菌の１０ｍＬセロロジカルピペットが使用され、３つの無菌の５０ｍＬ円錐形状のチューブの中へ、４０μｍ、７０μｍ、および１００μｍチューブ無菌フィルターを通して下澄みを移送した。合計で１３５ｍＬの下澄みが移送された。バランスのために４５ｍＬの水を含有する第４のチューブを含む、３つのチューブが、コラゲナーゼ消化された細胞ペレットを取得するために、１０分間３７℃において１，２００ｇで遠心分離された。

【０２２７】

コラゲナーゼ懸濁液を含有する３つのチューブの外部は、７０％ＥＴＯＨによってクリーニングされ、ヒュームフードの中へ置かれ、バランスチューブを残した。上澄みが吸引され、それぞれのチューブの中に細胞ペレットを残した。２５ｍＬセロロジカルピペットを使用して、５ｍＬの１０％ＦＢＳが、それぞれのチューブの中へディスペンスされ、それぞれのチューブは、ペレットを再懸濁させるために、５秒間ボルテックスされた。ＦＢＳは、任意の残りのコラゲナーゼ活性を中和させるために使用された。

【０２２８】

３つのチューブは、１０分間３７℃において１，２００ｇで遠心分離された。遠心チューブの外部は、７０％ＥＴＯＨによってクリーニングされ、チューブは、ヒュームフードの中に置かれた。上澄みが吸引され、細胞ペレットを残した。

【０２２９】

ＥＳＷプロセッシング

２００ｍＬの脂肪吸引物が、無菌の６０ｍＬカテーテルシリンジを使用して、残りの下澄みのすべてとともに、無菌の５００ｍＬレッグカテーテルバッグの中へ移送された。無菌の１ｘＰＢＳが、２００ｍＬの合計流体体積を実現するために追加され、合計体積は、脂肪吸引物を含む４００ｍＬであった。おおよそ２ｍＬの超音波ゲルが、カテーテルバッグに塗布された。大きいチップを使用して、２ｂａｒおよび２１Ｈｚにおいて、おおよそ１０，０００ＥＳＷパルスが、バッグの内側のサンプルに投与された。このプロセスは、追加的な１０，０００ＥＳＷパルスに関して、バッグの他方の側において繰り返された。カテーテルバッグの外部が、７０％ＥＴＯＨによってクリーニングされ、それが、ヒュームフードの中へ置かれた。

【０２３０】

バッグが撹拌され、５００ｍＬビーカーの中に注ぎ込んで空にされ、懸濁液は、１０分間静置させた。無菌の１０ｍＬセロロジカルピペットを使用して、下澄みが、３つの無菌の５０ｍＬ円錐形状のチューブの中へ、４０μｍ、７０μｍ、および１００μｍチューブ無菌フィルターを通して移送された。合計で１３５ｍＬの下澄みが移送された。

【０２３１】

濃縮および溶解

コントロール懸濁液を含有する３つのチューブ、および、プロセッシングされた懸濁液を含有する３つのチューブが、１０分間、１，２００ｇおよび３７℃で遠心分離された。上澄みが、すべてのチューブから吸引され、それぞれのペレットを残し、５ｍＬの１ｘＲＢＣ溶解バッファーが、それぞれのチューブに追加された。それぞれのチューブは、ペレットを再懸濁させるために、５秒間ボルテックスされ、チューブは、１０分間、３７℃水槽の中へ置かれた。

【０２３２】

それぞれのチューブの外部は、７０％ＥＴＯＨによって消毒され、チューブは、ヒュームフードの中に置かれた。２５ｍＬの無菌の１ｘＰＢＳが、溶解バッファーを希釈および中和させるために、それぞれのチューブに追加された。

【０２３３】

細胞カウンティング

無菌のマイクロピペットチップを使用して、３００μＬの無菌の１ｘＰＢＳが、６つの無菌の０．５ｍＬマイクロ遠心チューブの中へ移送された。また、７５μＬのそれぞれの５０ｍＬサンプルチューブが、細胞カウンティングのために、それぞれのマイクロ遠心チューブの中へ移送された。

【０２３４】

それぞれのサンプルの中の細胞の数が、ＭタイプおよびＳタイプの両方のカセットを備えたＭｏｘｉＺ細胞カウンターを使用してカウントされた。カウントするために、１００μＬのトリパンブルーが、それぞれのマイクロ遠心チューブに追加され、１０μＬのそれぞれのサンプルが、ヘモサイトメーターウェルの中へロードされ、細胞がカウントされた。

【０２３５】

結果：

ＭｏｘｉＺ細胞カウンター

表１は、ＭｏｘｉＺ自動化細胞カウンターを使用した細胞カウントの結果を示している。２つのタイプのカセットが、カウントするために使用された（ＭおよびＳ）。サンプル列において、「ｃ」は、コラゲナーゼ消化を表し、「ｅ」は、ＥＳＷプロセッシングを表し、「０」は、コントロールを表している。「完了」列の中の「ｙ」を伴うカウントだけが有効である。

【０２３６】

【表１－１】

表1

テスト番号	サンプル	フィルターサイズ(μL)	カセット	完了	カウント(細胞数/mL)	平均細胞サイズ(μm)	平均細胞体積(pL)
377	0	100	m	y	2.42E+05	6.082	0.118
373	0	40	m	y	2.11E+05	6.021	0.114
375	0	70	m	y	2.14E+05	6.087	0.118
387	e	100	s	y	2.22E+05	5.937	0.11
379	e	40	m	y	1.72E+05	6.196	0.125
381	e	70	m	y	2.08E+05	6.255	0.128
380	e	70	m	y	2.01E+05	6.633	0.153
376	0	100	m	n	1.42E+08	10.168	0.55
389	0	100	s	n	1.19E+06	7.952	0.263
372	0	40	m	n	2.05E+06	9.158	0.402
386	0	40	s	n	1.77E+06	9.259	0.416
374	0	70	m	n	5.00E+07	8.263	0.295
388	0	70	s	n	7.67E+05	10.351	0.581
382	e	100	m	n	1.27E+06	8.77	3.53
383	e	100	m	n	8.51E+05	7.615	0.231
378	e	40	m	n	1.80E+06	10.173	0.551
384	e	40	s	n	1.66E+06	8.448	0.316

【０２３７】

【表１－２】

テスト番号	サンプル	フィルターサイズ(μL)	カセット	完了	カウント(細胞数/mL)	平均細胞サイズ(μm)	平均細胞体積(pL)
385	e	70	s	n	9.04E+05	9.531	0.453
	c	100	m	y	4.32E+05	7.159	0.192
	c	100	s	y	3.12E+05	6.773	0.163
	c	40	m	y	4.07E+05	7.345	0.207
	0	40	s	n	1.81E+06	11.119	0.72
	0	40	m	n	1.20E+06	6.978	0.178
	0	70	m	n	2.33E+06	7.394	0.212
	0	70	m	n	7.36E+05	6.279	0.13
	c	70	m	n	5.55E+06	9.401	0.435
	c	70	s	n	2.02E+06	9.897	0.508
424	0	100	s	y	5.40E+05	6.376	0.136
416	0	100	m	y	1.34E+05	6.524	0.145
415	0	40	m	y	1.25E+05	6.322	0.132
413	0	70	m	y	1.41E+05	6.233	0.127
420	e	100	m	y	2.46E+05	6.867	0.17
417	e	40	m	y	1.67E+05	6.407	0.138
418	e	70	m	y	2.18E+05	6.27	0.129
416	0	100	m	n	1.51E+07	11.459	0.788
414	0	100	m	n	7.34E+05	6.493	0.143
412	0	40	m	n	7.64E+06	8.292	0.299
421	0	40	s	n	2.53E+06	9.511	0.451
422	0	40	s	n	1.75E+06	10.231	0.561
423	0	70	s	n	2.06E+06	11.347	0.765
419	e	100	m	n	4.50E+06	11.626	0.823
428	e	100	s	n	3.11E+06	8.158	0.284
426	e	40	s	n	1.24E+06	10.186	0.553
425	e	40	s	n	7.99E+05	10.188	0.554
427	e	70	s	n	5.49E+05	8.768	0.353
	c	100	s	y	4.32E+05	6.283	0.13
	c	100	m	y	3.93E+05	6.972	0.177
	c	70	m	y	3.11E+05	7.006	0.18
	0	100	m	n	7.89E+08	8.455	0.443

【０２３８】

【表１－３】

テスト番号	サンプル	フィルターサイズ(μL)	カセット	完了	カウント(細胞数/mL)	平均細胞サイズ(μm)	平均細胞体積(pL)
	0	100	s	n	1.92E+06	10.829	0.665
	0	40	m	n	2.70E+07	9.092	0.393
	0	40	s	n	7.21E+05	6.876	0.17
	0	70	m	n	3.57E+06	10.556	0.616
	0	70	s	n	1.38E+06	10.327	0.577
	c	40	m	n	5.22E+06	8.805	0.357
	c	40	s	n	1.27E+06	7.043	0.183
	c	70	s	n	1.29E+06	6.458	0.141
	0	100	s	y	2.15E+05	5.909	0.108
	0	40	m	y	1.95E+05	6.888	0.171
	e	100	m	y	6.97E+05	6.669	0.155
	e	40	m	y	7.08E+05	6.853	0.169
	0	100	m	n	8.20E+05	6.897	0.172
	0	40	s	n	2.32E+06	10.365	0.583
	0	70	m	n	3.19E+06	10.4	0.589
	0	70	s	n	1.98E+06	9.702	0.478
	e	100	s	n	1.60E+06	5.837	0.104
	e	40	s	n	1.48E+06	6.078	0.118
	e	70	m	n	4.01E+06	8.499	0.321
	e	70	s	n	2.02E+06	7.934	0.261

【０２３９】

ヘモサイトメーター

表２は、ビジュアルヘモサイトメーターから取得されるカウントを詳述しており、それぞれの象限（quadrant）からの細胞カウント、象限の総計、希釈係数、および、合計の計算された細胞を伴っている。細胞の数は、コントロール群の中の細胞のカウントを参照して考慮されるべきである。プロセッシングされた細胞とコントロール細胞との比率は、収率の重要な指標である。

【０２４０】

【表２】

表２

サンプル	フィルターサイズ (μL)	象限 nt 1	象限 nt 2	象限 nt 3	象限 nt 4	象限の総計	希釈液 (μL)	懸濁液 (μL)	係数	合計	比率
0	100	4	5	4	4	17	300	75	4	680000	
0	40	0	0	1	2	3	300	75	4	120000	
0	70	0	0	0	0	0	300	75	4	0	
E	100	8	5	11	9	33	300	75	4	1320000	1.94
E	40	3	1	2	3	9	300	75	4	360000	3.00
E	70	2	1	2	3	8	300	75	4	320000	#DIV/0!
0	100	10	11	10	13	44	300	75	4	1760000	
0	40	18	13	12	12	55	300	75	4	2200000	
0	70	10	14	1	9	34	300	75	4	1360000	
C	100	27	36	35	27	125	300	75	4	5000000	2.84
C	40	13	16	19	23	71	300	75	4	2840000	1.29
C	70	15	22	22	31	90	300	75	4	3600000	2.65
0	100	3	1	2	0	6	300	75	4	240000	
0	40	2	3	4	2	11	300	75	4	440000	
0	70	2	4	2	1	9	300	75	4	360000	
E	100	20	6	16	12	54	300	75	4	2160000	9.00
E	40	19	22	28	24	93	300	75	4	3720000	8.45
E	70	3	4	5	4	16	300	75	4	640000	1.78

【０２４１】

概要

ＭｏｘｉＺ自動化細胞カウンターを使用した有効なカウントのうち、コントロール、コラゲナーゼ、およびＥＳＷに関して、細胞カウントに関する総平均は、表３に示されている通りである。

【０２４２】
【表３】

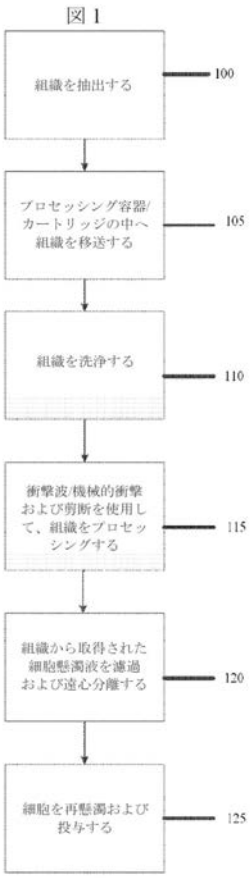
表3

サンプル	平均	SD
0	2.24E+05	1.18E+05
C	3.81E+05	5.11E+04
E	3.15E+05	2.08E+05

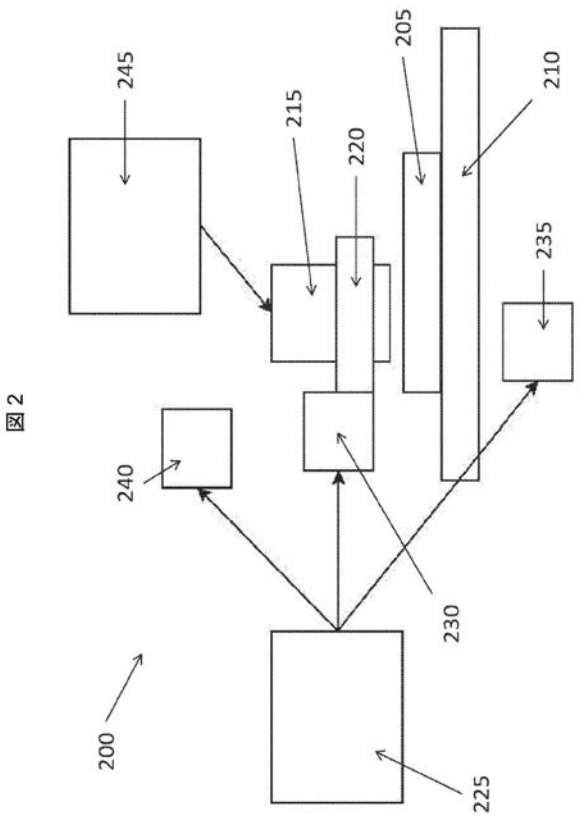
【０２４３】
コラゲナーゼは、一貫して、約３．８Ｅ＋０５細胞数／ｍＬを作り出した。ＥＳＷは、１．６７ｅ＋０５から７．０８ｅ＋０５細胞数／ｍＬの範囲にあった。
【０２４４】
ヘモサイトメーターカウントの中の細胞の比率を見ると、ＥＳＷプロセスは、最高の比率を作り出し、その比率は、コントロールよりも１．７８倍から９．０倍高い範囲にあった。コラゲナーゼだけが、コントロールよりも１．２９倍から２．８４倍高い範囲にある比率を作り出した。
【０２４５】
議論
これらのデータは、高い数の間葉系幹細胞を脂肪組織から作り出すために、ＥＳＷが効果的であるということを示している。これらのデータに基づいて、間葉系幹細胞を取得するために、ＥＳＷが、脂肪組織の超音波プロセッシングまたはコラゲナーゼプロセッシングのいずれかに対する実行可能な代替例であるということが結論付けられた。ピークを比較すると、ＥＳＷは、４．３２ｅ＋０５のコラゲナーゼピークと比較して７．０８ｅ＋０５の細胞収率を作り出し、それは、１６４％の収率の増加であった。
【０２４６】
上記に提示されているデータを所与として、５０ｃｃから６０ｃｃの脂肪吸引物のサンプルが、ＥＳＷプロセッシングから約５百万個の細胞を生み出すこととなり、コラゲナーゼ消化から約３百万個の細胞を生み出すこととなるということを結論付けることが合理的である。
【０２４７】
したがって、幹細胞を脂肪組織から遊離させるためにＥＳＷを使用するということは、公知の技法を上回る重大な利点を持つということが明らかである。
【符号の説明】
【０２４８】
２００　プロセッシング装置
２０５　プロセッシング容器またはカートリッジ
２１０　プラットフォーム
２１５　衝撃波アプリケーター
２２０　アプリケータープラットフォーム
２２５　モーターコントローラー
２３０　Ｘ平面モーター
２３５　Ｙ平面モーター
２４０　Ｚ平面モーター
２４５　衝撃波発生器
３００　プロセッシング装置
３０５　モーター
３１０　インパクトアーム
３１５　プラットフォーム

４００　カートリッジ
４０５　脂肪チャンバー
４１０　第１の一方向弁
４１５　流体リザーバー
４２０　第２の一方向弁
４２５　外部アクチュエーター
４３０　第１のプランジャー
４３５　細胞リザーバー
４４０　第３の一方向弁
４４５　第２の外部アクチュエーター
４５０　第２のプランジャー
４５５　第４の一方向弁
４６０　遠心チューブ
５００　カートリッジ
５０５　脂肪チャンバー
５１０　第１の一方向弁
５１５　流体リザーバー
５２０　第２の一方向弁
５２５　外部アクチュエーター
５３０　第１のプランジャー
５３５　細胞リザーバー
５４０　第３の一方向弁
５４５　第２の外部アクチュエーター
５５０　第２のプランジャー
５５５　第４の一方向弁
５６０　遠心分離コンポーネント
５６５　アクセスポート

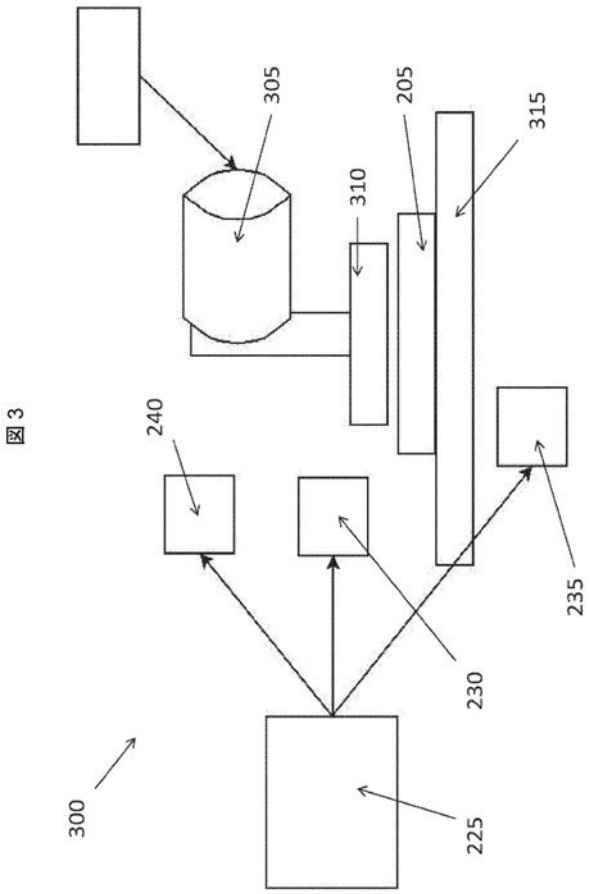
【図１】


図１
組織を抽出する
100
プロセッシング容器/カートリッジの中へ組織を移送する
105
組織を洗浄する
110
衝撃波/機械的衝撃および剪断を使用して、組織をプロセッシングする
115
組織から取得された細胞懸濁液を濾過および遠心分離する
120
細胞を再懸濁および投与する
125

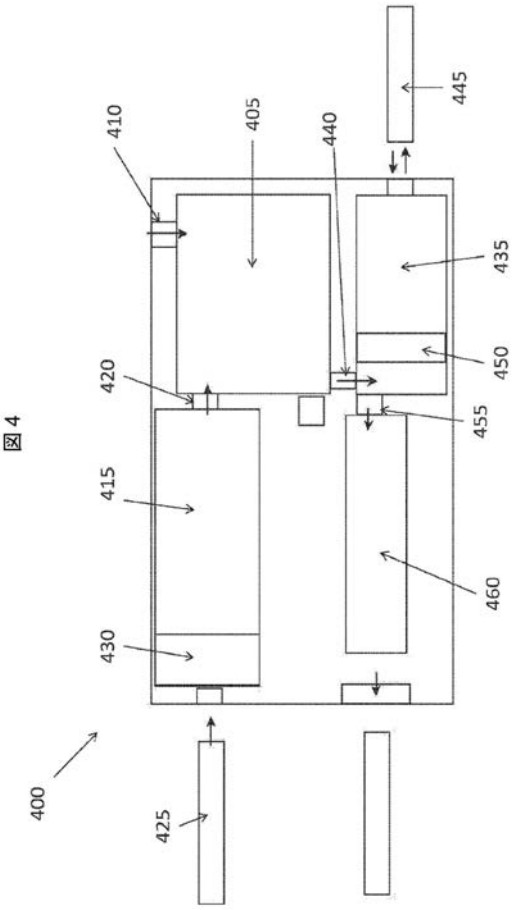
【図２】


図２
245
215
220
205
210
235
240
230
200
225

【図３】


図３
305
205
315
310
240
235
230
300
225

【図４】


図４
445
410
405
440
435
450
420
455
415
460
430
400
425

【図５】

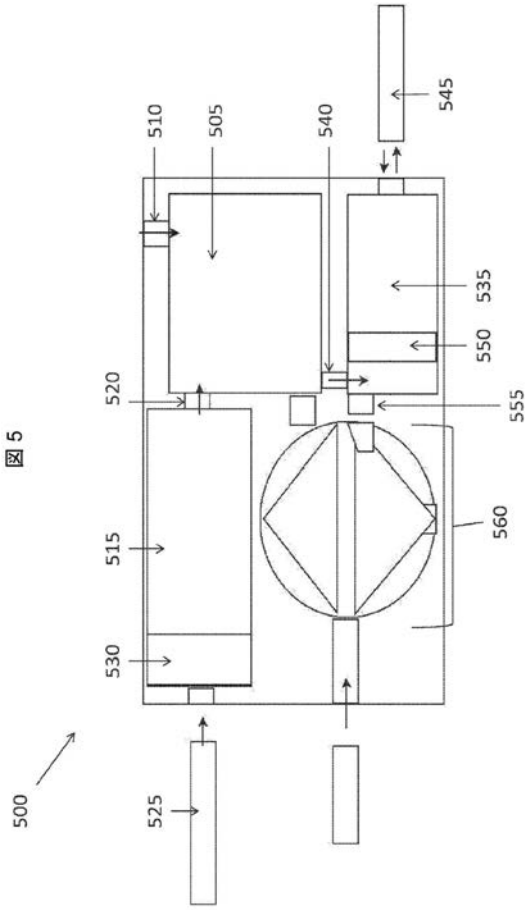


図5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/023084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12M1/33 C12N5/0775
ADD.

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)
C12M C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/231244 A1 (SYNOVA LIFE SCIENCES LLC) 20 August 2015 (2015-08-20) figures 1-4 paragraphs [0003], [0009], [0010], [0018] - [0021], [0051], [0055], [0070], [0073], [0076], [0080], [0082] -----	1-4, 6-15,17, 20-33
X	US 2006/051865 A1 (HIGGINS ET AL.) 9 March 2006 (2006-03-09) figure 1 paragraphs [0002], [0006] - [0008], [0017], [0025], [0026], [0028], [0030], [0039], [0040] ----- -/--	1-4,6,7, 9-13, 23-33

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
21 June 2017	29/06/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Alvarez Alvarez, C

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/023084

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/024450 A1 (QUICK ET AL.) 28 January 2016 (2016-01-28) figures 3B,13,14 paragraphs [0002], [0081], [0124] - [0126] -----	1,2,5,7, 8,14-22
A	US 2008/009885 A1 (DEL GIGLIO) 10 January 2008 (2008-01-10) paragraphs [0003], [0085]; figure 1 -----	1-33

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/023084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015231244 A1	20-08-2015	US 2015231244 A1	20-08-2015
		WO 2015127126 A1	27-08-2015
US 2006051865 A1	09-03-2006	NONE	
US 2016024450 A1	28-01-2016	AU 2013205148 A1	02-10-2014
		CA 2906088 A1	25-09-2014
		CN 105189729 A	23-12-2015
		EP 2970856 A1	20-01-2016
		HK 1219291 A1	31-03-2017
		JP 2016512689 A	09-05-2016
		US 2016024450 A1	28-01-2016
		WO 2014153072 A1	25-09-2014
US 2008009885 A1	10-01-2008	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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

(72)発明者 チ，ジョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１８０１，アルハンブラ ノース ブシュネル アヴェニュー ３１２ シノヴァ ライフ サイエンシーズ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 レイブン，レイモンド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１８０１，アルハンブラ ノース ブシュネル アヴェニュー ３１２ シノヴァ ライフ サイエンシーズ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 リッチマン，マーク
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１８０１，アルハンブラ ノース ブシュネル アヴェニュー ３１２ シノヴァ ライフ サイエンシーズ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 チ，ベン－チェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１８０１，アルハンブラ ノース ブシュネル アヴェニュー ３１２ シノヴァ ライフ サイエンシーズ，インコーポレイテッド内

Ｆターム(参考) 4B033 ND12 NG05 NH06 NJ10 NK10
4B065 AA90X BD14 BD15 CA44