(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9月7日(07.09.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/159661 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/007449

(22) 国際出願日： 2018年2月28日(28.02.2018)

(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 2017-036263 2017年2月28日(28.02.2017) JP

(71) 出願人: シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号 Hyogo (JP).

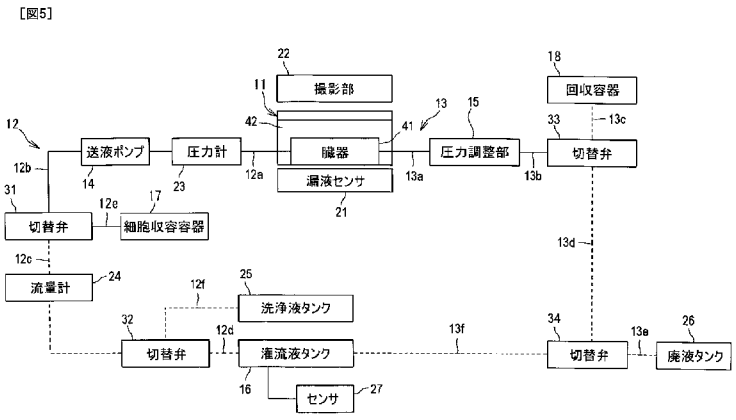
(72) 発明者: 堀 信康 (HORI, Nobuyasu); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 藤山 真吾 (FUJIYAMA, Shingo); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 野河 信太郎, 外 (NOGAWA, Shintaro et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満５丁目１６－３ 西天満ファイブビル 野河特許事務所 Osaka (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:** PERFUSION DEVICE AND PERFUSION METHOD

(54) 発明の名称： 灌流装置及び灌流方法



14 Fluid delivery pump
15 Pressure adjustment unit
16 Perfusion fluid tank
17 Cell-housing container
18 Collection container
21 Leak sensor
22 Image-capturing unit
23 Pressure gauge
24 Flow meter
25 Washing fluid tank
26 Waste liquid tank
27 Sensor
31, 32, 33, 34 Valve
41 Organ

(57) **Abstract:** The present invention pertains to a perfusion device and perfusion method for culturing undifferentiated cells using an organ or tissue taken from an organism.

(57) 要約: 本発明は、生体から摘出された臓器又は組織を用いて未分化細胞を培養するための灌流装置及び灌流方法に関する。

[続葉有]

WO 2018/159661 A1

(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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

明　細　書

発明の名称 ： 灌流装置及び灌流方法

技術分野

[0001] 本発明は、灌流装置及び灌流方法に関する。

背景技術

[0002] 幹細胞などの未分化細胞を所望の細胞に分化させる技術は、再生医療などに応用可能な技術として期待されている。細胞を分化させる手法は、通常、培養容器内で未分化細胞を培養して、分化を誘導する因子を添加することによるインビトロの培養系が利用される。しかし、所望の分化細胞を得るまでに数日の期間を要する。本発明者らは、近年、生体から摘出した臓器を用いるエクスビボの培養系により、より短い期間で細胞を分化させることに成功した。例えば、特許文献１には、生体から摘出した臓器の灌流を利用する方法が記載されている。この方法では、灌流している臓器内に未分化細胞を導入し、該細胞を臓器内で分化させて回収している。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：米国特許出願公開第2015/0275176号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、分化細胞の産業上の利用を考慮すると、臓器又は組織を用いるエクスビボの培養系においては、分化細胞の収量のさらなる向上が望まれる。

課題を解決するための手段

[0005] よって、本発明は、生体から摘出された臓器又は組織を配置するための収容部と、収容部に配置された臓器又は組織に、未分化細胞を含む液を導入する送液部と、未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収する回収部と、収容部に配置された臓器又は組織と送液部とを連結するための第１導管と、収容部に配置された臓器又は組織と回収部とを連結するための第２導管と、第

２導管に設けられた圧力調整部とを備える灌流装置を提供する。この灌流装置において、圧力調整部は、送液部が未分化細胞を含む液を臓器又は組織に導入するときに、臓器又は組織内が陽圧となるよう調整する。

[0006] また、本発明は、生体から摘出された臓器又は組織内に未分化細胞を含む液を導入する工程と、臓器又は組織内で未分化細胞を培養する工程と、臓器又は組織から、未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収する工程とを含む灌流方法を提供する。この灌流方法の導入工程では、陽圧下で未分化細胞を含む液を臓器又は組織に導入する。

[0007] さらに、本発明は、骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され、且つ該被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する加工骨の内部に未分化細胞を含む液を導入する工程と、加工骨の内部で未分化細胞を培養する工程と、加工骨の内部から、未分化細胞から分化した血小板を含む液を回収する工程とを含む灌流方法を提供する。

[0008] 本発明は、生体から摘出された臓器又は組織を配置するための収容部と、収容部に配置された臓器又は組織に、未分化細胞を含む液を導入する第１送液部と、未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収する回収部と、収容部に配置された臓器又は組織と第１送液部とを連結するための第１導管と、収容部に配置された臓器又は組織と回収部とを連結するための第２導管と、第２導管に設けられた第２送液部とを備える灌流装置を提供する。この灌流装置において、第２送液部は、臓器又は組織から導出された未分化細胞を含む液を、逆送液により臓器又は組織に導入する。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、未分化細胞から分化細胞を効率よく得ることを可能にする。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]灌流装置の構成を示す概略図である。

[図2]細胞の導入及び細胞の回収の手順を示す工程図である。

[図3]臓器の洗浄を行なう際の灌流装置の灌流システムの動作状態を示す回路

図である。

[図4]臓器の灌流を行なう際の灌流装置の灌流システムの動作状態を示す回路図である。

[図5]臓器への未分化細胞の導入を行なう際の灌流装置の灌流システムの動作状態を示す回路図である。

[図6]臓器内での細胞培養を行なう際の灌流装置の灌流システムの動作状態を示す回路図である。

[図7]臓器からの細胞の回収を行なう際の灌流装置の灌流システムの動作状態を示す回路図である。

[図8]装置の洗浄を行なう際の灌流装置の灌流システムの動作状態を示す回路図である。

[図9]実験例１で用いた灌流装置の構成を示す概略図である。

[図10A]加工骨又はチューブ内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合を示すグラフである。

[図10B]加工骨又はチューブ内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD61発現細胞の割合を示すグラフである。

[図11]実験例３で用いた灌流装置の構成を示す概略図である。

[図12A]脾臓又はチューブ内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合を示すグラフである。

[図12B]脾臓又はチューブ内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD61発現細胞の割合を示すグラフである。

[図13]フローサイトメトリ(FCM)解析によりCD42b陽性血小板の集団を抽出した結果を示すグラフである。

[図14]FCM解析によりCD61陽性血小板の集団を抽出した結果を示すグラフである。

[図15]FCM解析によりPAC-1陽性血小板の集団を抽出した結果を示すグラフである。

[図16A]導出孔を閉塞した状態における、灌流液の導入の開始から終了までの

間の加工骨内の圧力の変動を示すグラフである。

[図16B]導出孔を閉塞した状態における、灌流液の導入の開始から終了までの間の加工骨内の圧力の変動を示すグラフである。

[図17]２つの送液ポンプを備える灌流装置の構成を示す概略図である。

[図18]大腿骨内で培養した巨核球系細胞に由来する巨核球及び血小板を示す免疫染色像である。

発明を実施するための形態

[0011] [１．灌流装置]

(灌流装置の構成)

本明細書において、灌流とは、生体から摘出した臓器又は組織に液体を導入して、該臓器又は組織から液体を導出することをいう。本実施形態に係る灌流装置の一例を、図面を参照して以下に説明する。しかし、本実施形態はこの例のみに限定されない。本実施形態の灌流装置は、後述の灌流方法に用いることができる。図１に示されるように、灌流装置１０は、灌流システム１０ａと、制御部２０とを備える。ユーザが後述の送液ポンプ１４、圧力調整部１５及び切替弁３１、３２、３３及び３４を直接操作する場合は、灌流装置１０は制御部２０を備えなくてもよい。

[0012] 灌流システム１０ａは、臓器４１を配置するための容器１１と、臓器４１に液体を導入するための第１導管１２と、臓器４１から液体を導出するための第２導管１３と、送液ポンプ１４と、圧力調整部１５と、灌流液を収容するための灌流液タンク１６と、未分化細胞を収容するための細胞収容容器１７と、未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収するための回収容器１８とを備える。本実施形態では、漏液センサ２１、撮像部２２、圧力計２３、流量計２４、装置の洗浄液を収容するための洗浄液タンク２５、及び、廃液を回収するための廃液タンク２６、灌流液タンク１６に接続されたセンサ２７をさらに備える。

[0013] 容器１１は、本実施形態の灌流装置の収容部を構成する。容器１１は、生体から摘出された臓器４１及び保存液４２を収容できる容器であればよい。

以下において、容器１１には、臓器４１に代えて、生体から摘出された組織が配置されてもよい。容器１１は、開口部を有する開放系の容器であってもよいし、密閉可能な容器であってもよい。容器１１の容量は、臓器４１及び保存液４２を収容するのに十分な容量であればよい。容器１１に収容された臓器４１及び保存液４２は、所定温度に保たれることが好ましい。したがって、容器１１は、所定の温度に保持可能なインキュベータ内に配置されていてもよい。あるいは、容器１１の外周は、所定の温度に保持可能な保温部で覆われていてもよい。また、容器１１に収容された臓器４１及び保存液４２は、所定の二酸化炭素濃度に保たれることが好ましい。したがって、容器１１は、所定の二酸化炭素濃度に保持可能なインキュベータ内に配置されてもよい。

[0014] 容器１１には、漏液センサ２１が設置されてもよい。漏液センサ２１は、容器１１からの保存液の漏れの有無をモニターする。漏液センサ２１は、容器１１の外周に設けられていてもよいし、保存液の漏れの有無をモニターできる範囲内で容器１１と離隔して設けられていてもよい。

[0015] 容器１１には、撮影部２２が設置されてもよい。撮影部２２は、臓器４１の状態の変化をモニターする。撮影部２２は、容器１１内の臓器４１をモニターできる位置に設置してよい。

[0016] 第１導管１２は、臓器４１内へ導入される液体の流路となる管である。第１導管１２は、導管１２ａ、１２ｂ、１２ｃ、１２ｄ、１２ｅ及び１２ｆを備える。導管１２ａは、臓器４１と送液ポンプ１４とを連結する。導管１２ｂは、送液ポンプ１４と切替弁３１とを連結する。導管１２ｃは、切替弁３１と３２とを連結する。導管１２ｄは、切替弁３２と灌流液タンク１６とを連結する。導管１２ｅは、切替弁３１と細胞収容容器１７とを連結する。導管１２ｆは、切替弁３２と洗浄液タンク２５とを連結する。

[0017] 容器１１内に臓器４１が配置されている場合、第１導管１２は、容器１１内の臓器４１と、送液ポンプ１４及び灌流液タンク１６とを連結する。この場合、第１導管１２は、灌流液を臓器４１に導入する流路として機能する。

また、未分化細胞を含む液を臓器４１に導入する場合、第１導管１２は、容器１１内の臓器４１と、送液ポンプ１４及び細胞収容容器１７とを連結する。この場合、第１導管１２は、未分化細胞を含む液を臓器４１に導入する流路として機能する。容器１１内に臓器４１が配置されていない場合、第１導管１２は、容器１１と、送液ポンプ１４及び洗浄液タンク２５とを連結する。この場合、第１導管１２は、装置の洗浄液を容器１１に導入する流路として機能する。

[0018] 第１導管１２は、圧力計２３及び流量計２４を備える。圧力計２３は、第１導管１２内の圧力を計測する。後述の圧力調整部１５により第２導管１３が閉塞されている場合、圧力計２３により計測される圧力は、臓器４１内の圧力を反映する。流量計２４は、第１導管１２内の流量及び／又は流速を計測する。

[0019] 第１導管１２は、切替弁３１及び３２を備える。切替弁３１は、容器１１へ導入する液(細胞収容容器１７内の未分化細胞を含む液又は灌流液タンク１６内の灌流液)の切り替えを行う。切替弁３２は、容器１１へ導入する液(灌流液タンク１６内の灌流液又は洗浄液タンク２５内の洗浄液)の切り替えを行う。切替弁としては、三方活栓などの多方活栓、電磁弁などが挙げられるが、特に限定されない。

[0020] 灌流液タンク１６には、臓器４１に導入するための灌流液を収容する。灌流液タンク１６にはセンサ２７が設けられている。センサ２７は、灌流液タンク１６内の灌流液の状態、例えば、灌流液のpH、温度、溶存酸素量、酸化還元電位などを測定する。洗浄液タンク２５は、装置内の導管１２ａ、１２ｂ、１２ｃ、１２ｄ、１２ｅ、１３ａ，１３ｂ、１３ｃ、１３ｄ、１３ｅ及び１３ｆ、センサ２７、切替弁３１、３２、３３及び３４などを洗浄するための洗浄液を収容する。

[0021] 細胞収容容器１７は、臓器４１に導入するための未分化細胞を含む液を収容する。細胞収容容器１７は、未分化細胞を生存した状態で保持できる容器であればよい。細胞収容容器１７は、未分化細胞の生存に適した所定の温度

及び二酸化炭素濃度に保たれてもよい。細胞収容容器１７は、所定の温度及び二酸化炭素濃度に保持可能なインキュベータ内に配置されてもよい。

[0022] 送液ポンプ１４は、灌流液タンク１６内の灌流液、細胞収容容器１７内の未分化細胞を含む液、又は洗浄液タンク２５内の装置洗浄液の送液を行なう。送液ポンプとしては、チュービングポンプ、電磁ポンプなどが挙げられるが、特に限定されない。本実施形態において、送液ポンプ１４、灌流液タンク１６及び細胞収容容器１７は、灌流装置の送液部を構成する。

[0023] 第２導管１３は、臓器４１から導出された液体の流路となる管である。第２導管１３は、導管１３ａ、１３ｂ、１３ｃ、１３ｄ、１３ｅ及び１３ｆを備える。導管１３ａは、臓器４１と圧力調整部１５とを連結する。導管１３ｂは、圧力調整部１５と切替弁３３とを連結する。導管１３ｃは、切替弁３３と回収容器１８とを連結する。導管１３ｄは、切替弁３３と３４とを連結する。導管１３ｅは、切替弁３４と廃液タンク２６とを連結する。導管１３ｆは、切替弁３４と灌流液タンク１６とを連結する。

[0024] 容器１１内に臓器４１が配置されている場合、第２導管１３は、容器１１内の臓器４１と、灌流液タンク１６又は廃液タンク２６とを連結する。この場合、第２導管１３は、臓器４１から導出された灌流液の流路として機能する。また、未分化細胞を含む液を臓器４１に導入する場合、第２導管１３は、容器１１内の臓器４１と、回収容器１８とを連結する。この場合、第２導管１３は、臓器４１から導出された未分化細胞から分化した細胞を含む液の流路として機能する。容器１１内に臓器４１が配置されていない場合、第２導管１３は、容器１１と、廃液タンク２６とを連結する。この場合、第２導管１３は、容器１１から導出された洗浄液の流路として機能する。

[0025] 第２導管１３は、圧力調整部１５を備える。圧力調整部１５は、導管１３ａを介して臓器４１と連結する。圧力調整部１５は、送液ポンプ１４が未分化細胞を含む液を臓器４１に導入するときに、臓器４１内が陽圧となるよう調整する。ここで、「臓器又は組織内が陽圧となる」とは、送液側の流量と回収側の流量が同じときを基準として、回収側の流量が送液側の流量より低

い状態となることをいう。例えば、圧力調整部１５は、第２導管１３内の流量(又は流速)を変化させることにより、臓器４１内にかかる圧力を調整する。臓器４１に灌流液又は未分化細胞を含む液を導入するとき、圧力調整部１５は、第２導管１３内の流量(又は流速)を第１導管１２内の流量(又は流速)よりも低くすることで、臓器４１内に陽圧をかける。圧力調整部１５は、送液ポンプ１４が未分化細胞を含む液を臓器４１に導入するときに、第２導管１３を閉塞させて、臓器４１から液体が導出されないよう調節してもよい。このようにして、圧力調整部１５は、送液ポンプ１４が未分化細胞を含む液を臓器４１に導入するときに、臓器４１内を陽圧(例えば５kPa以上100 kPa以下、好ましくは10 kPa以上75 kPa以下の圧力)とする時間を設けるよう圧力を調整することができる。圧力調整部１５は、第２導管１３内の流量(又は流速)を元に戻すことにより、臓器４１内の圧力も元に戻る。圧力調整部１５としては、第２導管１３内の流量(又は流速)を調節できる限り、特に限定されないが、例えば三方活栓、二方活栓や電磁弁などの弁が挙げられる。

[0026] 第２導管１３は、切替弁３３及び３４を備える。切替弁３３は、臓器４１から導出された液の流路(導管１３ｃ又は１３ｄ)の切り替えを行う。切替弁３４は、導管１３ｄを流れてきた液の流路(導管１３ｅ又は１３ｆ)の切り替えを行う。

[0027] 回収容器１８は、臓器４１から導出された未分化細胞から分化した細胞を含む液を収容するための容器である。回収容器１８は、分化した細胞を生存した状態で保持できる容器であればよい。回収容器１８は、分化した細胞の生存に適した所定の温度及び二酸化炭素濃度に保たれてもよい。回収容器１８は、所定の温度及び二酸化炭素濃度に保持可能なインキュベータ内に配置されてもよい。本実施形態において、回収容器１８は、灌流装置の回収部を構成する。

[0028] 制御部２０は、灌流システム１０ａと接続されている。制御部２０は、漏液センサ２１で得られた漏液の有無の情報、撮影部２２で得られた臓器の状態の情報、圧力計２３で得られた流路内の圧力の情報、流量計２４で得られ

た流量の情報などに基づき、送液ポンプ１４及び圧力調整部１５の動作を制御できる。また、制御部２０は、後述の灌流方法の手順に従って、切替弁３１、３２、３３及び３４を制御できる。

[0029]（灌流装置の動作）

図面を参照して、本実施形態の灌流装置の動作の一例を説明する。しかし、本実施形態はこの例のみに限定されない。図２を参照して、本実施形態の灌流装置により、臓器への細胞導入及び臓器からの細胞回収を行う場合の手順について説明する。図２の各ステップにおける液体の流路を、図３～８に示す。これらの図において、実線で示された導管が液体の流路となり、破線で示された導管には液体は流れない。

[0030] 図２を参照して、ステップＳ１０１において、灌流液による臓器の洗浄を行なう。図３に示されるように、灌流液タンク１６と連結された導管１２ｄが、切替弁３２を介して導管１２ｃと接続されている。また、導管１２ｃは、切替弁３１を介して、導管１２ｂと接続されている。導管１２ｂは、送液ポンプ１４を介して、導管１２ａと接続されている。導管１２ａは、容器１１内に収容された臓器４１の動脈に接続されている。導管１３ａは、容器１１内に収容された臓器４１の静脈に接続されている。送液ポンプ１４により、灌流液タンク１６内の灌流液が第１導管１２を介して臓器４１に導入される。そして、灌流液は、導管１３ａを介して臓器から導出され、導管１３ｂ、１３ｄ及び１３ｅを通って廃液タンク２６に回収される。これにより、臓器内の血球細胞などを、未分化細胞の導入の前に取り除くことができる。

[0031] ステップＳ１０２において、灌流液による臓器の灌流を行なう。ステップＳ１０２における液体の流路を、図４に示す。図４では、図３と同様に、灌流液タンク１６と送液ポンプ１４とが、導管１２ｂ、１２ｃ及び１２ｄ、及び切替弁３１を介して接続されている。送液ポンプ１４と臓器４１とが、導管１２ａを介して接続されている。また、導管１３ａは、容器１１内に収容された臓器４１の静脈に接続されている。ステップＳ１０２では、ステップＳ１０１と同様、灌流液タンク１６内の灌流液が、送液ポンプ１４により第

１導管１２を介して臓器４１に導入される。そして、灌流液は、導管１３ａを介して臓器から導出され、導管１３ｂ、１３ｄ及び１３ｆを通って灌流液タンク１６に戻される。ステップＳ１０２では、圧力計２３及び流量計２４によって、流路内の圧力、臓器にかかる圧力及び灌流液の流量(又は流速)をモニターしてもよい。

[0032] ステップＳ１０３において、臓器への未分化細胞の導入を行なう。ステップＳ１０３における液体の流路を、図５に示す。図５に示されるように、未分化細胞を含む液を収容した細胞収容容器１７と連結された導管１２ｅが、切替弁３１を介して導管１２ｂと接続されている。このとき、切替弁３１における導管１２ｃ側の開口部は閉じられている。導管１２ｂは、送液ポンプ１４を介して、導管１２ａと接続されている。導管１２ａは、容器１１内に収容された臓器４１の動脈に接続されている。導管１３ａは、容器１１内に収容された臓器４１の静脈に接続されている。切替弁３３における導管１３ｃ側及び１３ｄ側の開口部は閉じられている。送液ポンプ１４により、細胞収容容器１７内の未分化細胞を含む液が、第１導管１２を介して臓器４１に導入される。このとき、圧力調整部１５が、導管１３ａ内の流量(又は流速)を低下させた状態で、未分化細胞を含む液を導入することにより、臓器４１内に陽圧をかけることができる。圧力調整部１５は、導管１３ａを閉塞させてもよい。臓器４１内を陽圧にすることで、未分化細胞を臓器４１内の全体に拡散及び浸透させることができる。ステップＳ１０３では、圧力計２３及び流量計２４によって、流路内の圧力、臓器にかかる圧力及び灌流液の流量(又は流速)をモニターしてもよい。

[0033] ステップＳ１０４において、臓器内での細胞培養を行なう。ステップＳ１０４における液体の流路を、図６に示す。切替弁３１における導管１２ｃ側及び１２ｅ側の開口部は閉じられている。また、切替弁３３における導管１３ｃ側及び１３ｄ側の開口部は閉じられている。このとき、送液ポンプ１４は作動していない。これにより、未分化細胞は、臓器４１内にとどまって培養される。

[0034] ステップＳ１０５において、細胞の回収を行なう。ここで、「回収」及び「回収する」とは、分化した細胞又は該細胞を含む液を臓器又は組織内から回収容器内へ移すことだけでなく、単に、分化した細胞又は該細胞を含む液を臓器又は組織の内部から外部へ取り出すことも含まれる。ステップＳ１０５における液体の流路を、図７に示す。図７では、図３と同様に、灌流液タンク１６と送液ポンプ１４とが、導管１２ｂ、１２ｃ及び１２ｄ、及び切替弁３１を介して接続されている。送液ポンプ１４と臓器４１とが、導管１２ａを介して接続されている。また、導管１３ａは、容器１１内に収容された臓器４１の静脈に接続されている。ステップＳ１０５では、ステップＳ１０１と同様、灌流液タンク１６内の灌流液が、送液ポンプ１４により第１導管１２を介して臓器４１に導入される。そして、臓器４１から、培養された細胞を含む液が導管１３ａを介して導出され、導管１３ｂ及び１３ｃを通って回収容器１８に回収される。このとき、回収された液には、未分化細胞から分化した細胞が含まれる。ステップＳ１０５では、圧力計２３及び流量計２４によって、流路内の圧力、臓器にかかる圧力及び灌流液の流量(又は流速)をモニターしてもよい。

[0035] ステップＳ１０６において、灌流装置の洗浄を行なう。このとき、臓器４１は、容器１１から取り外されている。ステップＳ１０６における液体の流路を、図８に示す。図８に示されるように、洗浄液タンク２５と連結された導管１２ｆが、切替弁３２を介して導管１２ｃと接続されている。また、導管１２ｃは、切替弁３１を介して、導管１２ｂと接続されている。導管１２ｂは、送液ポンプ１４を介して、導管１２ａと接続されている。導管１２ａは、容器１１に接続されている。導管１３ａは、容器１１に接続されている。送液ポンプ１４により、洗浄液タンク２５内の洗浄液が第１導管１２を介して容器１１に導入される。そして、洗浄液は、第２導管１３を介して容器１１から導出され、導管１３ｂ、１３ｄ及び１３ｅを通って廃液タンク２６に回収される。

[0036] さらなる実施形態では、送液ポンプ１４は、逆方向への送液(以下、「逆送

液」ともいう)が可能であってもよい。通常の送液の場合、送液ポンプ１４は、液体が第１導管から臓器又は組織内を通過して第２導管へ移動するように、送液を行う。逆送液の場合、送液ポンプ１４は、液体が第２導管から臓器又は組織内を通過して第１導管へ移動するように、送液を行う。未分化細胞を含む液を臓器又は組織内に一旦導入した後、逆送液すると、導入された未分化細胞を含む液は、臓器又は組織の内部で往復する。これにより、未分化細胞を臓器又は組織内により拡散させることができる。未分化細胞を含む液の送液及び逆送液は繰り返してもよい。逆送液可能な送液ポンプとしては、送液方向の切り替えが可能なチュービングポンプなどが挙げられる。

[0037] 別の実施形態では、灌流装置は、２つの送液ポンプを備えてもよい。この実施形態に係る灌流装置の一例を、図１７を参照して説明する。しかし、本実施形態は、この例のみに限定されない。図１７に示される灌流装置１０は、第２導管１３に第２送液ポンプ１４ｂを備え、圧力調整部１５を備えないこと以外は、図１に示される潅流装置１０と同じである。第２送液ポンプ１４ｂは、第２導管１３のいずれの位置に設置してもよいが、臓器４１と切替弁３３との間に連結することが好ましい。

[0038] 第１送液ポンプ１４ａは、図１に示される送液ポンプ１４と同じであり、灌流液タンク１６内の灌流液、細胞収容容器１７内の未分化細胞を含む液、又は洗浄液タンク２５内の装置洗浄液の送液を行なう。第２送液ポンプ１４ｂは、臓器又は組織の洗浄、灌流液の灌流、細胞の回収、及び灌流装置の洗浄のステップにおいては、第１送液ポンプ１４ａと同様に送液を行う。臓器又は組織への未分化細胞の導入のステップにおいては、第２送液ポンプ１４ｂは、逆送液により、臓器又は組織内から導出された未分化細胞を含む液を再度、臓器４１へ導入する。よって、第２送液ポンプ１４ｂは、送液方向の切り替えが可能なポンプが好ましい。

[0039] 臓器又は組織への未分化細胞の導入のステップにおいて、第１送液ポンプ１４ａによる送液と、第２送液ポンプ１４ｂによる逆送液とを交互に行うことによって、未分化細胞を含む液は臓器又は組織の内部で往復する。これに

より、未分化細胞を臓器又は組織内により拡散させることができる。

[0040] 未分化細胞の導入のステップにおける図１７に示す灌流装置の動作は、例えば、次のとおりである。第１送液ポンプ１４ａにより、細胞収容容器１７内の未分化細胞を含む液が、第１導管１２を介して臓器４１に導入される。第１送液ポンプ１４ａによる臓器４１への細胞の導入時は、第２送液ポンプ１４ｂは停止していてもよい。あるいは、第２送液ポンプ１４ｂは、第１送液ポンプ１４ａと同じ方向の送液を行ってもよい。送液をさらに続けることで、未分化細胞を含む液を、臓器４１内から導管１３ａ及び１３ｂを介して第２送液ポンプ１４ｂまで導出する。そして、第１送液ポンプ１４ａを停止し、第２送液ポンプ１４ｂを作動させて逆送液を行う。これにより、臓器４１内から導出された未分化細胞を含む液を再度、臓器４１内へ導入する。逆送液による未分化細胞を含む液の再導入後、第１送液ポンプ１４ａによる送液と、第２送液ポンプ１４ｂによる逆送液とを繰り返してもよい。あるいは、細胞の培養を行ってもよい。

[0041] [２．灌流方法]

本実施形態の灌流方法では、生体から摘出した臓器又は組織に未分化細胞を含む液を導入して、該細胞を臓器内で培養することにより、分化した細胞を含む液を回収する。したがって、本実施形態の灌流方法は、未分化細胞から分化した細胞を取得する方法とも解釈できる。

[0042] 本実施形態の灌流装置に用いられる臓器は、生体から摘出された臓器であれば特に限定されない。臓器は、実質臓器であってもよいし、管腔臓器であってもよい。実質臓器としては、例えば、脾臓、心臓、肝臓、肺、膵臓、腎臓、脳などが挙げられる。管腔臓器としては、例えば、小腸、大腸、直腸、子宮、膀胱などが挙げられる。それらの中でも、実質臓器が好ましく、脾臓、心臓、肝臓、肺、膵臓及び腎臓が特に好ましい。臓器の由来は特に限定されないが、ヒトを除く動物から摘出した臓器が好ましい。そのような動物としては、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、ニワトリなどが挙げられる。

[0043] 本実施形態の灌流装置に用いられる組織は、生体から摘出された組織であれば特に限定されず、例えば、骨(硬骨)、軟骨、筋肉、血管、気管などが挙げられる。組織の由来は特に限定されず、例えば、上述したヒトを除く動物から摘出した組織が好ましい。本実施形態では、組織として骨を用いることが好ましい。

[0044] 骨の種類は特に限定されず、長骨、短骨、扁平骨及び不規則骨のいずれの種類の骨を用いてもよい。長骨としては、例えば、上腕骨、橈骨、尺骨、中手骨、大腿骨、脛骨、腓骨、中足骨などが挙げられる。短骨としては、例えば、手根骨、足根骨などが挙げられる。扁平骨としては、例えば、頭頂骨、胸骨、肋骨、腸骨、恥骨、坐骨などが挙げられる。不規則骨としては、例えば、椎骨、肩甲骨などが挙げられる。それらの中でも、大腿骨、上腕骨、胸骨、恥骨、腸骨、肋骨及び椎骨が好ましい。

[0045] 本実施形態では、生体から摘出した臓器又は組織をそのまま用いてもよいし、臓器又は組織を灌流に適するように処理又は加工してもよい。例えば、臓器の動脈から液体を導入し、静脈から液体を導出することにより灌流を行う場合、液体が導入される動脈及び液体が導出される静脈以外の血管を結紮してもよい。液体を導入及び導出できる部位がない臓器又は組織を用いる場合は、該臓器又は組織に液体を導入及び導出するための孔などを形成してもよい。

[0046] 本実施形態では、灌流に適するように加工した骨(以下、「加工骨」ともいう)を用いることが特に好ましい。加工骨は、骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され、且つ該被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する。そのような加工骨は、特開2015-228848号公報を参照して調製できる。具体的には、加工骨は、骨を被覆剤で被覆することと、骨に孔を形成することにより、調製できる。被覆剤による骨の被覆と、孔の形成とを行う順序は限定されず、どちらを先に行ってもよい。

[0047] 被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔は、骨内に液体を導入し、骨内から液体を導出するための孔である。孔は１つであってもよいし

、複数であってもよい。孔が例えば２つである場合は、一方を、液体を導入するための孔(以下、導入孔という)とし、もう一方を、液体を導出するための孔(以下、導出孔という)としてもよい。導入孔及び導出孔の数は、互いに同じであってもよいし、異なっていてもよい。加工骨の孔が１つである場合、該孔は、導入孔及び導出孔としての役割を兼ねる。

[0048] 骨における孔の位置は特に限定されない。例えば、長骨の骨幹など骨膜に覆われた部分に孔を開ける場合、孔は、被覆剤及び骨膜を貫通して骨の内部に達する孔となる。骨の関節面には骨膜はなく、関節面は関節軟骨に覆われている。よって、骨の関節面に孔を開ける場合、孔は、被覆剤及び関節軟骨を貫通して骨の内部に達する孔となる。

[0049] 孔の深さは、この孔から導入される液体が骨髄と接触することが可能となる深さであることが好ましい。そのような孔の深さとしては、例えば、骨質に達する深さであり、好ましくは海綿質に達する深さであり、より好ましくは髄腔に達する深さである。孔の大きさは、細胞を含む液の導入及び導出が可能な大きさであればよい。例えば、孔の直径は、細胞を含む液の導入及び導出のために用いる管又は注射針と同じ直径である。

[0050] 導入孔と導出孔との間は、骨の大きさに応じて一定の距離があることが好ましい。例えば、大腿骨などの長骨の場合では、一方の骨端に近い骨幹部分に導入孔を形成し、反対側の骨端に近い骨幹部分に導出孔を形成してもよい。

[0051] 被覆剤は、骨の外表面に密着することにより、導出孔から回収されるべき液体及び細胞が骨の外表面から漏れ出ることを抑制するために用いられる。そのような被覆剤としては、当該技術において公知の樹脂、接着剤、高分子膜、ゲル、石膏などが挙げられる。被覆剤は、１種又は２種以上を用いてもよい。本明細書では、一部に肉片などが付着した骨の外表面を被覆剤で被覆する場合も、被覆剤が「骨の外表面に密着する」ことに含まれる。

[0052] 被覆剤としての樹脂は、硬化性樹脂、可塑性樹脂などを用いることができる。硬化性樹脂としては、熱硬化性樹脂、光硬化性樹脂などが例示される。

可塑性樹脂としては、熱可塑性樹脂などが例示される。熱硬化性樹脂としては、エポキシ樹脂、シリコーン樹脂、フェノール樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、フェノキシ樹脂、ビニルエステル樹脂、フラン樹脂、ジアリルフタレート樹脂などが挙げられる。

[0053] 熱可塑性樹脂としては、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン、スチレン・アクリロニトリル共重合体、高密度ポリエチレン、中密度ポリエチレン、低密度ポリエチレン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、ポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート、メタクリル・スチレン共重合体、酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート、フッ化ビニリデンなどが挙げられる。

[0054] 光硬化性樹脂としては、ウレタンアクリレート、エポキシアクリレート、ポリエステルアクリレート、ポリブタジエンアクリレート、シリコンアクリレート、アミノ樹脂アクリレート、脂環式エポキシ樹脂、グリシジルエーテルエポキシ樹脂、ウレタンビニルエーテル、ポリエステルビニルエーテルなどが挙げられる。

[0055] 熱硬化性樹脂及び熱可塑性樹脂の中には、常温で硬化する性質の樹脂がある。そのような常温硬化性樹脂としては、シリコーン樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂及びポリメチルメタクリレートなどが挙げられ、これらの樹脂は、加工骨に用いる被覆剤として特に適している。

[0056] 被覆剤としての接着剤は、無機系接着剤、天然系接着剤及び合成接着剤から適宜選択できる。無機接着剤としては、ケイ酸ソーダ、セメント、漆喰などが挙げられる。

[0057] 天然系接着剤としては、天然ゴム接着剤、カゼイン接着剤、耐水性デンプン接着剤、にかわ、アルブミンなどが挙げられる。

[0058] 合成接着剤としては、エポキシ樹脂系接着剤、アクリル樹脂系接着剤、α-オレフィン樹脂系接着剤、ポリエチレン樹脂系接着剤、酢酸ビニル樹脂系接着剤、塩化ビニル樹脂系接着剤、エチレン－酢酸ビニル樹脂系接着剤、シアノアクリレート系接着剤、水性高分子－イソシアネート系接着剤、クロロプ

レンゴム系接着剤、スチレン－ブタジエンゴム系接着剤、ニトリルゴム系接着剤、ポリサルファイド系接着剤、ブチルゴム系接着剤、シリコーンゴム系接着剤、ポリスチレン系接着剤、ポリ酢酸ビニル系接着剤、変性シリコーン系接着剤、ポリオレフィン系接着剤、ポリウレタン系接着剤、ポリメタクリレート樹脂系接着剤、フェノール樹脂系接着剤、尿素樹脂系接着剤、メラミン樹脂系接着剤、レゾルシノール系接着剤、ポリエステル系接着剤、ポリイミド系接着剤、ニトロセルロース接着剤、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどが挙げられる。これらの合成接着剤は、液体であってもよいし、エマルジョンであってもよい。また、アクリル樹脂系感圧型粘着テープのように、適当な基材に接着剤を塗布したテープを用いてもよい。

[0059] 被覆剤としての高分子膜は、生体高分子の膜及び合成高分子の膜から適宜選択できる。生体高分子の膜としては、例えば、キトサン、アルギン酸塩及びペクチンなどの多糖類の膜、並びに、再生セルロース及びセルローストリアセテートなどの植物由来のセルロース膜などが挙げられる。また、キトサン及びアルギン酸塩が交互に積層されてなる膜も被覆剤として適している。合成高分子の膜としては、ポリアクリロニトリル、ポリメチルメタクリレート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリ塩化ビニリデン、ポリ塩化ビニル、中密度ポリエチレン、低密度ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレンビニルアルコール共重合体などの膜が挙げられる。高分子膜の形状は特に限定されず、骨の形状に応じて、テープ、フィルム、シートなどの形状から適宜選択できる。

[0060] 被覆剤としてのゲルは、水を溶媒として包含するゲルから適宜選択することができ、例えば、寒天、ゼラチン、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、ポリヒドロキシエチルメタクリレートゲルなどが挙げられる。

[0061] 被覆剤としての石膏は、硫酸カルシウムを主成分とする。本実施形態の方法には、半水石膏、二水石膏、無水石膏などを用いることができる。ギプスのように、焼石膏粉末と綿布とを含むものを被覆剤として用いてもよい。

[0062] 被覆剤を骨の外表面に密着させる方法は、被覆剤の種類又は形態に応じて

適宜選択できる。例えば、液体の状態から硬化して固体の状態になる被覆剤を用いる場合は、液体の状態にある被覆剤に骨を浸すか又は液体の状態にある被覆剤を骨の外表面に塗布するなどして、骨全体を被覆剤で覆い、その状態で被覆剤を硬化させることが挙げられる。パテなどの可塑性のある状態から硬化する被覆剤を用いる場合は、可塑性のある状態の被覆剤で骨全体を覆い、その状態で被覆剤を硬化させることが挙げられる。薄膜状の形態をした被覆剤を用いる場合は、その被覆剤を骨の外表面に貼付するか又は被覆剤で骨を包むことより、骨全体を覆うことが挙げられる。

[0063] 本実施形態の灌流方法では、まず、上記の臓器又は組織に未分化細胞を含む液を導入する。これにより、未分化細胞が臓器又は組織の内部に導入される。ここで、「未分化細胞」とは、最終分化細胞以外の細胞をいう。「最終分化細胞」とは、細胞系譜において最終分化に至った細胞をいう。よって、最終分化細胞は、これ以上分化することがない。なお、本明細書では、最終分化細胞には血小板も含まれる。

[0064] 未分化細胞としては、例えば、幹細胞及び前駆細胞が挙げられる。幹細胞としては、ES細胞(Embryonic Stem cells)、クローンES細胞、iPS細胞(induced Pluripotent Stem cells)、MUSE細胞(Multiliniage-differentiating Stress Enduring cells)、間葉系幹細胞、神経幹細胞、上皮幹細胞、肝幹細胞、生殖幹細胞、造血幹細胞、骨格筋幹細胞などが挙げられる。前駆細胞としては、血小板前駆細胞、肝臓前駆細胞、心臓前駆細胞、神経前駆細胞などが挙げられる。血小板前駆細胞としては、巨核球前駆細胞、巨核芽球、前巨核球、巨核球(成熟巨核球)などが挙げられる(以下、これらを総称して「巨核球系細胞」ともいう)。肝臓前駆細胞としては、肝芽細胞、肝前駆細胞、肝星細胞前駆細胞、肝幹前駆細胞、肝臓の血管内皮前駆細胞、肝臓の中皮細胞前駆細胞などが挙げられる。心臓前駆細胞としては、心筋前駆細胞、心臓の血管内皮前駆細胞などが挙げられる。神経前駆細胞としては、ニューロン前駆細胞、グリア前駆細胞、脳神経系の血管内皮前駆細胞などが挙げられる。

[0065] 好ましい実施形態では、未分化細胞として巨核球系細胞を用いる。巨核球

系細胞は、例えば、造血幹細胞をサイトカインなどで刺激することにより得ることができる。本実施形態の灌流方法において巨核球系細胞を含む液を用いた場合、該巨核球系細胞が臓器又は組織内で分化することにより、血小板を得ることができる。本実施形態の灌流方法により得られる血小板は、生体内の血小板と同様の機能を有する。

[0066] 未分化細胞を含む液は、未分化細胞を、該未分化細胞の生存又は培養が可能な液体に含めることにより調製できる。そのような液体としては、液体培地、臓器保存液、リンゲル液、クレブス-リンガー液、生理食塩水、及びそれらの混合物などが挙げられる。以下、これらの液体を総称して「灌流液」ともいう。液体培地としては、例えば、RPMI培地(Roswell Park Memorial Institute medium)、MEM培地(Minimum Essential Media)、DMEM培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium)、Ham's F-12培地などが挙げられる。臓器保存液としては、セルシオ(Celsior)液、LPD(Low potassium dextran)液、ET-Kyoto液、ユーロ-コリンズ(Euro-Collins)液、UW(UNIVERSITY of Wisconsin)液などが上げられる。灌流液には、必要に応じて、細胞の維持などに適した添加物、例えば、血漿、血清、アミノ酸などが含まれてもよい。

[0067] 未分化細胞を含む液における細胞濃度は、特に限定されないが、例えば、1×10^3 cells/mL以上1×10^8 cells/mL以下の範囲から適宜決定すればよい。未分化細胞を含む液の量は特に限定されないが、例えば0.1 mL以上50 mL以下の範囲から適宜決定すればよい。なかでも、0.5 mL以上３mL以下の範囲が望ましい。

[0068] 本実施形態では、未分化細胞を含む液を臓器又は組織に導入する手段は、特に限定されない。例えば、送液ポンプに連結したチューブ、シリンジに連結した注射針により、臓器又は組織における液体が導入される部位から、未分化細胞を含む液を流し込むことが挙げられる。または、臓器又は組織における液体が導入される部位に、チューブなどを介して未分化細胞を含む液を含む容器を連結し、該液を、臓器又は組織における液体が導出される部位からシリンジ又は送液ポンプにより吸引してもよい。あるいは、これらの方法

を組み合わせてもよい。上述の本実施形態の灌流装置を用いて、未分化細胞を含む液を導入してもよい。未分化細胞を含む液を臓器に導入する場合、該臓器の血管を介して導入することが好ましい。未分化細胞を含む液を加工骨に導入する場合は、該加工骨に形成された孔から導入することが好ましい。

[0069] 未分化細胞を含む液の流速は、臓器の灌流実験において一般的に設定される流速であればよい。例えば、0.01 mL/min以上100 mL/min以下、好ましくは0.1 mL/min以上50 mL/min以下、より好ましくは1 mL/min以上20 mL/min以下の範囲から適宜設定してもよい。未分化細胞を含む液の温度は、該未分化細胞が生存可能な温度であればよい。そのような温度は、例えば４℃以上40℃以下、好ましくは20℃以上38℃以下、特に好ましくは37℃である。

[0070] 本実施形態では、陽圧下で未分化細胞を含む液を臓器又は組織に導入することが好ましい。ここで、陽圧下での未分化細胞を含む液の導入には、臓器又は組織に陽圧がかかる状態で、未分化細胞を含む液を該臓器又は組織に導入することを含む。すなわち、未分化細胞を含む液の導入に従って臓器又は組織内にかかる圧力が上昇する状態で、未分化細胞を含む液を臓器又は組織に導入してもよい。例えば、臓器又は組織内を陽圧とする時間を設けて、未分化細胞を含む液を導入してもよい。これにより、臓器又は組織内の全体に未分化細胞を行き渡らすことができ、臓器又は組織内への未分化細胞の導入量を増加できる。臓器又は組織内の圧力は、該臓器又は組織が破損しない程度の圧力が好ましい。加工骨を用いる場合は、導入孔に接続した導管に圧力計を設置して、圧力が例えば５kPa以上100 kPa以下、好ましくは10 kPa以上75 kPa以下の範囲となるように、未分化細胞を含む液を導入すればよい。

[0071] 陽圧下での導入は、臓器又は組織から液体が導出されない状態で、該臓器又は組織内に未分化細胞を含む液を導入することにより行うことができる。例えば、臓器又は組織における液体が導出される部位を閉塞させることで、該臓器又は組織は液体が導出されない状態となる。より具体的には、液体が導入される部位が臓器の動脈であり、液体が導出される部位が該臓器の静脈である場合、該静脈又はこれに接続した導管を閉塞させる。この状態で臓器

の動脈から未分化細胞を含む液を導入すると、該臓器内の圧力が上昇する。加工骨を用いる場合は、導出孔又はこれに接続した導管を閉塞させる。この状態で加工骨の導入孔から未分化細胞を含む液を導入すると、該加工骨内の圧力が上昇する。加工骨に形成された孔が１つの場合は、該孔に未分化細胞を含む液を導入することで、該加工骨内の圧力が上昇する。これにより、臓器又は組織内を陽圧とする時間を設けて、未分化細胞を含む液を導入できる。液体が導出される部位を閉塞させる手段は、閉塞状態を解除できる限り特に限定されない。例えば、液体が導出される部位を栓又はフィルムで塞いでもよいし、該部位に接続された導管を弁で閉じてもよい。

[0072] 本実施形態では、臓器又は組織に未分化細胞を含む液を導入する方向は、一方向である必要はない。例えば、導入孔から未分化細胞を含む液を一旦導入した後、未分化細胞を含む液を逆方向に送液させるようにシリンジ又は送液ポンプを作動させてもよい。このような操作を１回行うか又は複数回繰り返すことにより、未分化細胞を含む液を臓器又は組織内で往復移動させることができる。これにより、臓器又は組織内の全体に未分化細胞を行き渡らすことができ、臓器又は組織内への未分化細胞の導入量を増やすことができる。

[0073] 本実施形態では、未分化細胞を含む液の導入前に、臓器又は組織に灌流液を灌流させてもよい。これにより、臓器又は組織内が灌流液で洗浄されて、該臓器又は組織内に存在する細胞などの夾雑物を除去できる。灌流液を導入する手段としては、例えば、送液ポンプに連結したチューブ、シリンジに連結した注射針により、臓器又は組織における液体が導入される部位から灌流液を流し込むことが挙げられる。または、臓器又は組織における液体が導入される部位に、チューブなどを介して灌流液を含む容器を連結し、該灌流液を、臓器又は組織における液体が導出される部位からシリンジ又は送液ポンプにより吸引してもよい。あるいは、これらの方法を組み合わせてもよい。上述の本実施形態の灌流装置を用いて、灌流液を導入してもよい。

[0074] 灌流液の流速は特に限定されず、例えば、未分化細胞を含む液の流速と同

程度でよい。灌流の時間は特に限定されず、例えば１分以上50時間以下、好ましくは15分以上25時間以下、より好ましくは30分以上10時間以下である。灌流液の温度は特に限定されず、例えば、例えば４℃分以上50℃以下、好ましくは20℃以上45℃以下、より好ましくは22℃以上42℃以下である。特に好ましい温度は37℃である。

[0075] 本実施形態では、未分化細胞を含む液の導入及び灌流の際に、臓器又は組織の乾燥を防ぐために、該臓器又は組織を適切な液体に浸しておくか又は該液体中に静置してもよい。そのような液体としては、上記の灌流液から適宜選択できる。加工骨を用いる場合は、液体中に浸漬させる必要はない。

[0076] 本実施形態の灌流方法では、未分化細胞を含む液を導入した臓器又は組織内で、該未分化細胞を培養する。培養を行うことにより、未分化細胞は、臓器又は組織内で分化する。ここで、「未分化細胞の分化」及び「未分化細胞が分化する」とは、未分化細胞の分化が進むことを意味する。したがって、未分化細胞の分化には、未分化細胞(例えば巨核芽球)が最終分化細胞(例えば血小板)になることだけでなく、未分化細胞(例えば巨核芽球)が、より分化の進んだ未分化細胞(例えば巨核球)になることも含まれる。すなわち、未分化細胞から分化した細胞は、最終分化細胞であってもよいし、さらに分化可能な細胞であってもよい。

[0077] 培養は、導入された未分化細胞が臓器又は組織内に滞留した状態を維持することにより行われることが好ましい。例えば、未分化細胞を含む液を導入した臓器又は組織を、該未分化細胞の培養に適した条件下で静置してもよい。また、上述の本実施形態の灌流装置を用いている場合は、送液ポンプを停止するか又は切替弁を操作して、臓器又は組織への液体の導入を停止してもよい。培養においては、臓器又は組織における液体が導入又は導出される部位から、未分化細胞を含む液が漏出しないように、これらの部位を閉塞させてもよい。

[0078] 未分化細胞の培養に適した条件自体は、当該技術分野において公知である。未分化細胞を含む液を導入した臓器又は組織は、細胞培養に用いられるCO_2

インキュベータなどに入れてもよい。温度条件としては、例えば４℃分以上50℃以下、好ましくは20℃以上45℃以下、より好ましくは22℃以上42℃以下である。特に好ましい温度は37℃である。培養の時間は特に限定されないが、例えば、例えば10分以上72時間以下、好ましくは１時間以上48時間以下、より好ましくは２時間以上30時間以下である。

[0079] 本実施形態の灌流方法では、上記の培養の終了後、臓器又は組織から、未分化細胞から分化した細胞を含む液(以下、「分化細胞を含む液」ともいう)を回収する。分化細胞を含む液には、未分化細胞から分化した細胞の産生物が含まれていてもよい。そのような産生物は、分化細胞の分泌物であってもよいし、分化細胞の分解産物であってもよい。

[0080] 分化細胞を含む液を臓器又は組織から回収する手段は、特に限定されない。例えば、臓器又は組織の液体が導入される部位に灌流液を導入することにより、分化細胞を含む液を、該臓器又は組織の液体が導出される部位から導出させてもよい。あるいは、臓器又は組織の液体が導出される部位から、分化細胞を含む液を吸引してもよい。分化細胞を含む液の回収には、送液ポンプに連結したチューブ、シリンジに連結した注射針などを用いてもよい。あるいは、上述の本実施形態の灌流装置を用いてもよい。分化細胞を含む液を臓器から回収する場合、該臓器の血管を介して回収することが好ましい。分化細胞を含む液を加工骨から回収する場合は、該加工骨に形成された導出孔から回収することが好ましい。

[0081] 灌流液の導入によって分化細胞を含む液を導出して回収する場合、導入する灌流液の量は、臓器又は組織内の細胞を十分に導出可能な量であることが好ましい。そのような量としては、例えば、導入した未分化細胞を含む液を回収できる量として、２mL以上2000 mL以下であればよい。灌流液の流速は特に限定されず、例えば、未分化細胞を含む液の流速と同程度でよい。灌流液の温度は、分化細胞が生存可能な温度であればよい。そのような温度は、例えば４℃分以上50℃以下、好ましくは20℃以上45℃以下、より好ましくは22℃以上42℃以下である。特に好ましい温度は37℃である。

[0082] 本発明のさらなる実施形態は、上記の加工骨を用いる血小板の産生方法を提供する。この方法では、まず、骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され且つ該被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する加工骨の内部に、未分化細胞を含む液を導入する。この実施形態では、未分化細胞を導入するときに、加工骨の内部に圧力をかけなくてもよい。未分化細胞としては、血小板に分化可能な未分化細胞が好ましく、例えば巨核球系細胞が挙げられる。この方法に用いる加工骨、及び未分化細胞を含む液の導入の手段及び条件などの詳細については、上述のとおりである。次いで、加工骨の内部で未分化細胞を培養する。培養は、未分化細胞と骨髄とが接触可能な状態で行うことが好ましい。培養条件の詳細については、上述のとおりである。そして、加工骨の内部から、未分化細胞から分化した血小板を含む液を回収する。回収の手段及び条件などの詳細については、上述のとおりである。

[0083] また、本発明のさらなる実施形態は、骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され且つ該被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する加工骨を配置するための収容部と、灌流部に配置された加工骨に、未分化細胞を含む液を送液する送液部と、未分化細胞から分化した血小板を含む液を回収する回収部と、灌流部に配置された加工骨と送液部とを連結するための第１導管と、灌流部に配置された加工骨と回収部とを連結するための第２導管とを備える灌流装置を提供する。この灌流装置において、送液部は、第１導管を介して、灌流液及び／又は未分化細胞を含む液を加工骨に導入する。回収部は、第２導管を介して、加工骨から導出された血小板を含む液を回収する。加工骨は、少なくとも２つの孔を有することが好ましい。この場合、少なくとも１つの孔を、加工骨内部に液体の導入するための導入孔とし、第１導管と接続してもよい。また、残りの孔を、加工骨内部から液体を導出するための導出孔とし、第２導管と接続してもよい。

[0084] 以下に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0085] 実験例１： 加工骨を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導

（１）材料

(1.1) 灌流部の作製

ケタラールで麻酔したブタ(体重14.6 kg、２ヶ月齢)から右後足の大腿骨を摘出した。得られた大腿骨を、エポキシ樹脂系接着剤であるエポキシパテ水中用(セメダイン株式会社)で覆い、約20分間静置してエポキシパテを硬化させた。エポキシパテで被覆した大腿骨に電動ドリルで直径1.1 mmの孔を２つ形成した。孔は、大腿骨の両骨端付近に形成した。以下、形成した孔を、導入孔及び導出孔と呼ぶ。導入孔及び導出孔のそれぞれに注射針(18G、テルモ株式会社)を挿入して、灌流装置に用いられる加工骨を得た。

[0086] (1.2) 灌流液の調製

RPMI-1640 medium Hepes modification (R5886、Sigma社)に、10%(終濃度) FBS(Hyclone社製)、50倍希釈Antibiotic-Antimycotic(15240-062、Gibco社)、２mM(終濃度) L-Glutamin (G7513、Sigma社)を加えて、灌流液を調製した。

[0087] (1.3) 巨核球系細胞の調製

(i) CD34陽性造血幹細胞の分化誘導

ヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞(Human CB $CD34^+$ Mixed、ST-70008、ベリタス社)をPBSで洗浄した。該細胞を、サイトカインカクテル(StemSpan Megakaryocyte Expansion Supplement、ST-2696、ベリタス社)を終濃度１%で含むヒト巨核球分化誘導培地(SFEMII、ST-09655、ベリタス社)に藩種した。細胞密度が1×10^5～1×10^6 cells/mLとなるように継代を３又は４日毎に行った。継代では、細胞を含む培地を遠心分離(300 g、５分間、室温)し、上清を捨て、細胞に上記の培地を添加した。19日間の培養により、CD34陽性造血幹細胞を巨核球系細胞へ分化させた。

[0088] (ii) 蛍光色素での巨核球系細胞の染色

上記で得た巨核球系細胞を含む培地を遠心分離(200 g、10分間、室温)し、

上清を捨て、細胞に30 mLのPBSを添加した。同じ操作をさらに行った後、CFSE溶液(１mg/mL)を３μL添加して(終濃度0.1μg/mL)、37℃で30分間静置した。その後、巨核球系細胞を含む液を遠心分離し(200 g、10分間、室温)、上清を捨て、30 mLのPBSを添加した。巨核球系細胞を含む液を遠心分離し(200 g、10分間、室温)、上清を捨て、灌流液を添加した。これにより、CFSE染色した巨核球系細胞を得た。

[0089] (２) 巨核球系細胞の分化誘導

(2.1) 灌流

実験例１では、図９に示される加工骨を用いた灌流装置を形成した。ここで、図９を参照して、灌流装置について説明する。灌流装置２０１は、大腿骨２１２及び被覆剤２１３からなる加工骨２１１と、灌流液を加工骨に導入する第１導管２１４と、灌流液を加工骨から導出する第２導管２１５と、灌流液を収容したシリンジ２１６と、加工骨から導出された液を回収するシリンジ２１７とを備える。図９において、シリンジ２１７は、シリンジポンプ２１８にセットされている。

[0090] 灌流装置２０１は、具体的には次のようにして形成した。導入孔に挿入した注射針に、チューブ(内径0.8 mm、Masterflex社)を介して50 mLシリンジ(テルモ株式会社)を連結した。また、導出孔に挿入した注射針に、チューブを介して、シリンジポンプ(YMC社)にセットされた50 mLシリンジを連結した。これにより、加工骨を用いる灌流装置２０１を形成した。以下、導入孔に連結したシリンジを「シリンジＡ」とも呼び、導出孔に連結したシリンジを「シリンジＢ」とも呼ぶ。シリンジＡに50 mLの灌流液を収容した。シリンジポンプの流量設定を7 mL/minにしてシリンジＢを引き、加工骨内に陰圧をかけた。このとき、必要に応じて、シリンジＡを押して灌流液の導入を促した。これにより、シリンジＡ内の灌流液が導入孔から加工骨の中に入り、導出孔からシリンジＢへ導出された。すなわち、灌流液が加工骨内を灌流した。シリンジＡに灌流液を補給して、計280 mLの灌流液を灌流させた。

[0091] (2.2) 細胞の導入及び培養

導入孔に連結された50 mLシリンジを、巨核球系細胞(1.1×10^{6}個)を含む３mLの灌流液を収容した10 mLシリンジ(テルモ株式会社)に取り替え、導入孔に接続した。シリンジポンプを作動させ、シリンジＡ内の巨核球系細胞を含む灌流液が無くなるまで、加工骨内に陰圧をかけた。これにより、巨核球系細胞を加工骨の中に導入した。巨核球系細胞を導入した加工骨を37℃に設定したCO_2インキュベータ内に２時間静置して、巨核球系細胞をブタ大腿骨内部で３時間培養した。なお、コントロールとして、同じ細胞濃度で巨核球系細胞を含む灌流液をチューブに入れ、37℃に設定したCO_2インキュベータ内で３時間培養した。

[0092] (2.3) 細胞の回収

培養後、30 mLの灌流液を収容した50 mLシリンジを導入孔に接続し、シリンジポンプにより加工骨内に陰圧をかけて、灌流液を灌流させた。このとき、シリンジＡを押して灌流液の導入を促した。これにより、導出孔から導出された灌流液(30 mL)をシリンジＢ内に回収した。回収した灌流液に、PFAの終濃度が１％となるようにPFA/PBSを添加して、灌流液中の細胞を固定した。コントロールとしてインビトロ環境下(チューブ内)で培養した細胞も同様に、PFA/PBS(終濃度１％)で固定した。

[0093] (３) FCM解析

巨核球系細胞から分化した血小板を、血小板の表面マーカーであるCD42b及びCD61に基づいて検出した。具体的な操作は、次のとおりである。固定した細胞を含む灌流液を遠心分離(200 g、10分間、室温)し、上清を捨て、細胞に30 mLのPBSを添加した。同じ操作をさらに行った。細胞を含む液を遠心分離(1500 g、10分間、室温)し、上清を捨てた。同じ操作をさらに２度行った。その後、APC標識抗CD42b抗体又はAlexa647標識抗CD61抗体を、細胞を含む液100 μLに対して抗体20 μLの割合で添加し、30分間の抗原抗体反応を行った。陰性コントロールとして、同じ色素で標識した上記抗体のIsotype抗体を用いた。反応後、細胞を含む液を遠心分離(1500 g、10分間、室温)し、上清を捨て、細胞に１％BSA/PBSを添加した。免疫染色した細胞のFCM解析には、FACS Ve

rse(BD社)を用いた。FCM解析では、まずCFSE陽性の細胞を抽出し、次に血小板サイズの細胞を抽出し、最後にCD42b陽性又はCD61陽性の細胞を抽出した。これにより、CFSE陽性且つCD42b陽性又はCD61陽性の血小板を抽出した。

[0094]（４）結果

FCM解析の結果を、図１０Ａ及びＢに示す。図中、「in vitro」とは、チューブ内で培養した細胞を示す。図１０Ａ及びＢに示されるように、加工骨内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は18.7％であり、CD61発現細胞の割合は82.9％であった。回収した液におけるCD42b発現細胞の濃度は201.3 cells/mLであり、CD61発現細胞の濃度は653.3 cells/mLであった。一方、インビトロ環境下(チューブ内)で巨核球系細胞を培養した場合、血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は3.0％であり、CD61発現細胞の割合は78.2％であった(図１０Ａ及びＢ参照)。これらの結果より、巨核球系細胞を加工骨に導入して培養することにより、インビトロ環境下(チューブ内)での培養よりも、巨核球系細胞を効率よく血小板に分化させることが可能であることが示された。

[0095] 実験例２： 加工骨を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導(２)

実験例２では、実験例１とは別に調製した巨核球系細胞(8.0×10^6個)を含む２mLの灌流液を加工骨に導入したこと以外は実験例１と同様にして、巨核球系細胞の分化誘導及びFCM解析を行った。

[0096] その結果、加工骨内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は22.2％であり、CD61発現細胞の割合は60.5％であった。一方、コントロールとしてインビトロ環境下(チューブ内)で巨核球系細胞を培養した場合、血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は4.54％であり、CD61発現細胞の割合は52.2％であった。これらの結果より、巨核球系細胞を加工骨に導入して培養することにより、インビトロ環境下(チューブ内)での培養よりも、巨核球系細胞を効率よく血小板に分化させることが可能であることが示された。

[0097] 実験例３： 脾臓を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導

（１）材料

(1.1) 灌流部

ケタラールで麻酔したブタ(体重13.8 kg、２ヶ月齢)から脾臓を摘出し、短胃動脈は結紮した。脾動脈及び脾静脈のそれぞれにトップエックステンションチューブ(X1-L75、株式会社トップ)を挿管し、各チューブに三方活栓(R型360°、テルモ株式会社)を取り付けて、灌流装置に用いられる脾臓を得た。実験例３では、脾動脈に挿管したチューブを、脾臓に液体を導入する管に用い、脾静脈に挿管したチューブを、脾臓から液体を導出する管に用いた。脾臓への挿管後、１％(v/v)ヘパリン含有生理食塩水を脾動脈から500 mL導入して、脾静脈から導出させて、脾臓を灌流できることを確認した。また、これにより、脾臓内の血液凝固作用を抑制した。

[0098] (1.2) 灌流液及び巨核球系細胞

灌流液及び巨核球系細胞を実験例１と同様にして調製した。

[0099] （２）巨核球系細胞の分化誘導

(2.1) 灌流

実験例３では、図１１に示される脾臓を用いた灌流装置を形成した。ここで、図１１を参照して、灌流装置について説明する。灌流装置３０１は、脾臓３４１を収容した容器３１１と、灌流液を脾臓に導入する第１導管３１２と、臓器から灌流液を導出する第２導管３１３と、送液ポンプ３１４(マスターフレックス送液ポンプ、07528-10、ヤマト科学)と、灌流液を収容した容器３１５と、脾臓内の圧力を調整する切替弁としての三方活栓３１６と、導出された液を回収する容器３１７とを備える。容器３１１において、脾臓３４１は生理食塩水３４２中に静置されている。第１導管３１２は、チューブ３２１(上記のトップエックステンションチューブ)、三方活栓３２２、チューブ３２３及び３２４(内径4.8 mm、Masterflex社)を備える。第１導管３１２は、脾臓と、送液ポンプ３１４及び容器３１５とを連結する。第２導管３１３は、チューブ３３１(上記のトップエックステンションチューブ)、三方活栓３１６及びチューブ３３２(内径4.8 mm、Masterflex社)を備える。第２導

管３１３は、脾臓と、導出された液を回収する容器３１７とを連結する。

[0100] 灌流装置３０１を、37℃に設定したCO_2インキュベータ内に静置し、送液ポンプ３１４を作動させた。灌流液が脾動脈から脾臓へ導入され、脾静脈から導出された。送液ポンプの流速設定を約10 mL/minとして、灌流を３時間行った。

[0101] (2.2) 細胞の導入及び培養

容器３１５に、巨核球系細胞(5.0×10^7個)を含む20 mLの灌流液を収容した。送液ポンプ３１４を作動させ、巨核球系細胞を含む灌流液を脾動脈から脾臓へ導入した。このとき、三方活栓３１６を操作して、灌流液がチューブ３３２から導出されないようにした。三方活栓３１６により第２導管が閉塞した状態で脾臓に灌流液が導入されるので、脾臓内が陽圧となる。巨核球系細胞を含む灌流液の導入後、三方活栓３２２を操作して、該灌流液がチューブ３２１へ逆流しないようにした。これにより脾臓内の陽圧が維持された。そして、巨核球系細胞が導入された脾臓を上記のインキュベータ内で３時間静置することにより、陽圧下で巨核球系細胞を培養した。なお、コントロールとして、同じ細胞濃度で巨核球系細胞を含む灌流液をチューブに入れ、インキュベータ内で３時間培養した。

[0102] (2.3) 細胞の回収

培養後、灌流液を灌流させて、脾静脈から導出された灌流液を120 mL回収した。そして、実験例１と同様にして、脾臓及びチューブから回収した灌流液中の細胞を固定した。

[0103] （３）FCM解析

実験例１と同様にして、回収した細胞の免疫染色及びFCM解析を行った。

[0104] （４）結果

FCM解析の結果を、図１２Ａ及びＢに示す。図中、「in vitro」とは、チューブ内で培養した細胞を示す。図１２Ａ及びＢに示されるように、脾臓内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は17.7％であり、CD61発現細胞の割合は82.3％であった。一方、イン

ビトロ環境下(チューブ内)で巨核球系細胞を培養した場合、血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は4.4％であり、CD61発現細胞の割合は80.0％であった(図１２Ａ及びＢ参照)。これらの結果より、巨核球系細胞を脾臓に導入して培養することにより、インビトロ環境下(チューブ内)での培養よりも、巨核球系細胞を効率よく血小板に分化させることが可能であることが示された。

[0105] 実験例４： 加工骨を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導(３)

(１) 材料

実験例４では、実験例１と同様にして、ブタ大腿骨から作製した加工骨を用いる灌流装置を作製した。また、灌流液及び巨核球系細胞を実験例１と同様にして調製した。

[0106] (２) 巨核球系細胞の分化誘導

(2.1) 灌流、細胞の導入及び培養

実験例１と同様にして、280 mLの灌流液を加工骨内に灌流させた。導入孔に連結された50 mLシリンジを、巨核球系細胞(1.0×10^7個)を含む２mLの灌流液を収容した10 mLシリンジ(テルモ株式会社)に取り替え、導入孔に接続した。シリンジＢに連結したチューブをパラフィルムで覆うことで閉塞させ、灌流液が導出孔から導出されないようにした。そして、シリンジＡを押して、巨核球系細胞を含む灌流液を加工骨内に導入した。導出孔が塞がれた状態で加工骨に灌流液が導入されるので、加工骨内が陽圧となる。巨核球系細胞を含む灌流液の導入後、シリンジＡと該シリンジＡを連結したチューブを外し、チューブをパラフィルムで覆うことで閉塞させ、該灌流液が導入孔から逆流又は導入した液が乾燥しないようにした。そして、巨核球系細胞が導入された加工骨を上記のインキュベータ内で３時間静置することにより、加工骨内で巨核球系細胞を培養した。なお、コントロールとして、同じ細胞濃度で巨核球系細胞を含む灌流液をチューブに入れ、インキュベータ内で３時間培養した。

[0107] (2.2) 細胞の回収

培養後、60 mLの灌流液を灌流させて、導出孔から導出された灌流液(60 mL)をシリンジＢ内に回収した。そして、実験例１と同様にして、脾臓及びチューブから回収した灌流液中の細胞を固定した。

[0108]（３）FCM解析

実験例１と同様にして、回収した細胞の免疫染色及びFCM解析を行った。また、巨核球系細胞から分化した血小板の活性化を解析するために、上記(2.1)及び(2.2)と同様にして加工骨内で培養した細胞を、固定せずに回収した。回収した細胞をトロンビンで刺激し、標識抗PAC-1抗体で染色してFCM解析によりPAC-1陽性細胞をFCM解析により検出した。ここで、PAC-1は活性化血小板の表面マーカーである。また、トロンビンで刺激していない細胞についても同様に解析した。陰性コントロールとして、抗PAC-1抗体及び該抗体と競合するペプチドであるRGDSを添加した細胞についても同様に解析した。

[0109]（４）結果

FCMの結果を図１３、１４及び１５に示す。これらの図のグラフにおいて、縦軸は細胞数を示し、横軸は蛍光強度を示す。図１３中、黒線は、Isotype抗体(ネガティブコントロール)を反応させた場合の結果であり、赤線は、抗CD42b抗体を反応させた場合の結果である。つまり、赤線で示された結果から、黒線で示された結果を差し引いた値(蛍光強度が5×10^{1}以上の赤線部)がCD42bに由来した蛍光信号(CD42bを発現した細胞)となる。図１３中、右上に挿入した図は、スキャッタグラム(横軸：前方散乱光強度、縦軸：側方散乱光強度)であり、ゲート(スキャッタグラム上の四角形)内にプロットされたドットはCD42b陽性の血小板を示す。加工骨内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は10.0％であった。図１４は、CD61に対して得られた結果であり、この図のグラフにおける縦軸、横軸、挿入図(スキャッタグラム)は図１３と同様である。加工骨内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD61発現細胞の割合は76.3％であった。

[0110] 図１５中、黒線は、RGDS(ネガティブコントロール)を反応させた場合の結

果であり、水色の線は、トロンビン刺激をしていないサンプルに対して抗PAC-1抗体を反応させた場合の結果であり、赤線は、トロンビン刺激後に抗PAC-1抗体を反応させた場合の結果である。つまり、赤線で示された結果から、黒線で示された結果を差し引いた値(蛍光強度が5 $x10^2$以上の赤線部)がトロンビン刺激に応じてPAC-1を発現した血小板に由来した蛍光信号(PAC-1を発現した細胞)となる。トロンビンで刺激した場合のPAC-1陽性細胞の割合は25.0%であった。回収した液におけるCD42b発現細胞の濃度は1341 cells/mLであり、CD61発現細胞の濃度は9381 cells/mLであった。一方、インビトロ環境下(チューブ内)で巨核球系細胞を培養した場合、血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は5.8%であり、CD61発現細胞の割合は79.1%、PAC-1発現細胞の割合は15.1%であった。これらの結果より、陽圧下で巨核球系細胞を加工骨に導入し、その後加工骨内で巨核球系細胞を培養することにより、インビトロ環境下(チューブ内)での培養よりも、巨核球系細胞を効率よく血小板に分化させることが可能であることが示された。また、実験例１の結果と比較すると、陽圧下で巨核球系細胞を加工骨に導入することにより、産生された血小板の数(濃度)が大幅に増加した。

[0111] 実験例５： 加工骨を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導(４)

実験例５では、実験例１とは別に作製した加工骨を用いて、巨核球系細胞(1.0×10^7個)を含む２mLの灌流液又は巨核球系細胞(1.0×10^7個)を含む３mLの灌流液を加工骨に導入したこと以外は実験例４と同様にして、巨核球系細胞の分化誘導及びFCM解析を行った。

[0112] 上記の２mLの灌流液を導入した場合、加工骨内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は12.7%であり、CD61発現細胞の割合は76.5%であった。回収した液におけるCD42b発現細胞の濃度は3181 cells/mLであり、CD61発現細胞の濃度は18000 cells/mLであった。

[0113] 上記の３mLの灌流液を導入した場合、加工骨内に導入した巨核球系細胞に由来する血小板サイズの細胞に占めるCD42b発現細胞の割合は13.0%であり、

CD61発現細胞の割合は78.1％であった。回収した液におけるCD42b発現細胞の濃度は1036 cells/mLであり、CD61発現細胞の濃度は6227 cells/mLであった。

[0114] 以上のとおり、実験例４の結果と同様に、陽圧下で巨核球系細胞を加工骨に導入することにより、産生された血小板の数(濃度)が大幅に増加した。

[0115] 実験例６： 加工骨内の圧力の測定

実験例６では、実験例１の灌流装置において、シリンジＡと、導入孔に挿入された注射針との間にチューブを介して圧力計(株式会社テムテック研究所)を設置した。そして、実験例４と同様にシリンジＢに連結したチューブを塞いだ状態で、加工骨に３mLの灌流液を導入した。灌流液の導入の開始から終了までの間の加工骨内の圧力の変動をモニタリングした。この実験を２回行った。結果を図１６Ａ及びＢに示す。

[0116] 図１６Ａ及びＢに示されるように、灌流液の導入を開始すると圧力が上昇し、導入中は加工骨内には65～75 kPaの圧力がかかっていた。シリンジＡ内の灌流液がなくなると、圧力は20～30 kPaまで下降した。そして、シリンジＡを取り外して導入孔を開放すると、圧力は瞬時に０kPaとなった。これらの結果より、導出孔側の導管を閉塞した状態で灌流液を導入することにより、加工骨内が陽圧となることが確認できた。

[0117] 実験例７： 加工骨を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導(５)

(１) 材料

実験例７では、被覆剤としてロックタイト(商標)速乾性エポキシパテ(ヘンケル社)を用いたことと、導入孔及び導出孔として直径1.3 mmの孔を形成したこと以外は、実験例１と同様にして加工骨を調製した。また、実験例１と同様にして、灌流液、及びCFSE染色した巨核球系細胞を調製した。

[0118] (２) 巨核球系細胞の分化誘導

(2.1) 灌流

実験例７では、シリンジＡに灌流液を補給して、計300 mLの灌流液を加工骨内に灌流させたこと以外は、実験例１と同様にして灌流した。

[0119] (2.2)細胞の導入及び培養

CFSE染色した巨核球系細胞をPBSで洗浄後、10 mLの灌流液で細胞を再懸濁し、1.48×10^7 cells/10 mLの細胞懸濁液を作製した。導入孔に連結された50 mLシリンジを、巨核球系細胞(1.48×10^7個)を含む10 mLの灌流液を収容した10 mLシリンジA(テルモ株式会社)に取り替え、導入孔に接続した。導出孔に接続した空のシリンジBに取り付けたシリンジポンプを7 mL/minで作動させて吸引することで、加工骨内に陰圧をかけた。これにより、シリンジA内の巨核球系細胞を含む液を加工骨内に導入した。シリンジBには、導出孔から吸引された巨核球系細胞を含む液が回収された。シリンジA内の巨核球系細胞を含む液が無くなった後、シリンジポンプをシリンジBからシリンジAに付け替えた。シリンジポンプで空のシリンジAを吸引して、シリンジBに回収されていた巨核球系細胞を含む液を、導出孔から加工骨内に導入した。このように、シリンジポンプを付け替えて陰圧下で細胞懸濁液を導入する操作を5回繰り換えした。これにより、巨核球系細胞を含む液を加工骨内部で2.5回往復移動させた。

[0120] 巨核球系細胞を導入した加工骨を37℃に設定したCO_2インキュベータ内に静置して、巨核球系細胞をブタ大腿骨内部で3時間培養した。なお、コントロールとして、同じ細胞濃度で巨核球系細胞を含む液をポリプロピレンチューブに入れ、37℃に設定したCO_2インキュベータ内で3時間培養した。

[0121] (3) 大腿骨組織の解析

(3.1)大腿骨組織切片の作製

実験例7では、培養後の細胞の回収を行わずに大腿骨組織の解析を行った。インキュベーション後の大腿骨を電動ノコギリで切断し、スパチュラで骨髄を掻き出した。OCTコンパウンド(サクラファインテックジャパン社)を用いて骨髄を包埋し、ドライアイス上で凍結ブロックを作製した。巨核球系細胞を導入していない対照として、脛骨の凍結ブロックも作製した。クライオセクショニング(Leica社)を用いて厚さ10μmの骨髄切片を作製し、生理食塩水に10分間浸漬してOCTコンパウンドを洗浄した。骨髄切片に4%PFA/PBSを100μ

L/切片で添加し、室温で10分間固定した。固定した骨髄切片を生理食塩水に浸漬して洗浄した後、１μLのCD61-AF647抗体(クローン：VI-PL2、BioLegend社)、0.1μLのHoechst33342及び99μLのPBSの混合液を100μL/切片で添加し、室温で10分間染色した。染色した骨髄切片を生理食塩水に浸漬して洗浄した後、50%グリセロール/PBS溶液で封入した。

[0122] (3.2)巨核球及び血小板の計数

蛍光顕微鏡(BZ-X700、キーエンス社)を用いて組織切片を観察した。巨核球は、CFSE陽性(緑色)かつCD61陽性(赤色)である。よって、画像上で黄～橙色を呈し、かつHoechst33342陽性(青色)を示す、大きさ10μm～70μmの細胞を、巨核球として定義した。一方、血小板は、画像上で黄～橙色を呈し、かつHoechst33342陽性(青色)を示さない、大きさ２～７μmの有形成分と定義した。

[0123] (４)結果

得られた画像の例を図１８に示す。図中、巨核球(図中、白色の矢印)の近傍に血小板(図中、グレーの矢印)が多数観察された。複数の領域を観察し、巨核球及び血小板数を計数したところ、巨核球１個あたり血小板は平均4.27個であった。なお、対照として作製した脛骨の凍結ブロックについては、巨核球及び血小板のいずれも観察されなかった。一方、コントロールとしてインビトロ環境下(チューブ内)で培養した巨核球系細胞を含む液について、実験例１で記載したFCM解析を行ったところ、巨核球１個あたり血小板は0.012個しか産生されていなかった。以上より、巨核球系細胞を加工骨内に導入し培養することにより、インビトロ環境下(チューブ内)での培養よりも、巨核球系細胞を効率よく血小板に分化させることが可能であることが示された。

[0124] 実験例８： 加工骨を用いた灌流装置による未分化細胞の分化誘導(６)

（１）材料

実験例７と同様にして加工骨を調製した。また、実験例１と同様にして、灌流液、及びCFSE染色した巨核球系細胞を調製した。

[0125] （２）巨核球系細胞の分化誘導

(2.1) 灌流

実験例７と同様にして、シリンジＡに灌流液を補給して、計300 mLの灌流液を加工骨内に灌流させた。

[0126] (2.2)細胞の導入及び培養

細胞の導入及び培養については、巨核球系細胞の導入量を除いて実験例４と同様にして、次のように行った。CFSE染色した巨核球系細胞をPBSで洗浄後、500μLの灌流液で細胞を再懸濁し、3.6×10^6 cells/500μLの細胞懸濁液を作製した。導入孔に連結された50 mLシリンジを、巨核球系細胞(3.6×10^6個)を含む500μLの灌流液を収容した1 mLシリンジＡ(テルモ株式会社)に取り替え、導入孔に接続した。実験例４と同様に、シリンジＢに連結したチューブをパラフィルムで覆うことで閉塞させ、灌流液が導出孔から導出されないようにした。そして、シリンジＡを押して、巨核球系細胞を含む灌流液を加工骨内に導入した。導出孔が塞がれた状態で加工骨に灌流液が導入されるので、加工骨内が陽圧となる。巨核球系細胞を含む灌流液の導入後、シリンジＡと該シリンジＡを連結したチューブを外し、チューブをパラフィルムで覆うことで閉塞させ、該灌流液が導入孔から逆流又は導入した液が乾燥しないようにした。そして、巨核球系細胞が導入された加工骨を上記のインキュベータ内で３時間静置することにより、加工骨内で巨核球系細胞を培養した。

[0127] (３)大腿骨組織の解析

実験例７と同様にして、大腿骨組織切片の作製と解析を行った。

[0128] (４)結果

組織切片の画像(図示せず)を観察したところ、実験例７と同様に多数の巨核球及び血小板が認められた。計数の結果、巨核球１個あたり血小板は平均5.07個であった。なお、対照として作製した脛骨の凍結ブロックについては、巨核球及び血小板のいずれも観察されなかった。以上より、巨核球系細胞を加工骨に導入して培養することにより、インビトロ環境下(チューブ内)での培養よりも、巨核球系細胞を効率よく血小板に分化させることが可能であることが示された。

符号の説明

[0129] １０　灌流装置

１０ａ　灌流システム

１１　容器

１２　第１導管

１２ａ、１２ｂ、１２ｃ、１２ｄ、１２ｅ、１２ｆ　導管

１３　第２導管

１３ａ、１３ｂ、１３ｃ、１３ｄ、１３ｅ、１３ｆ　導管

１４　送液ポンプ

１４ａ　第１送液ポンプ

１４ｂ　第２送液ポンプ

１５　圧力調整部

１６　灌流液タンク

１７　細胞収容容器

１８　回収容器

２０　制御部

２１　漏液センサ

２２　撮像部

２３　圧力計

２４　流量計

２５　洗浄液タンク

２６　廃液タンク

３１、３２、３３、３４　切替弁

２０１、３０１　灌流装置

２１１　加工骨

２１２　大腿骨

２１３　被覆剤

２１４　第１導管

２１５　第２導管

２１６、２１７　シリンジ

２１８　シリンジポンプ

３１１　脾臓を収容した容器

３１２　第１導管

３１３　第２導管

３１４　送液ポンプ

３１５　灌流液を収容した容器

３１６、３２２　三方活栓

３２１、３２３、３２４、３３１、３３２　チューブ

３４１　脾臓

３４２　生理食塩水

請求の範囲

[請求項1] 生体から摘出された臓器又は組織を配置するための収容部と、

前記収容部に配置された臓器又は組織に、未分化細胞を含む液を導入する送液部と、

前記未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収する回収部と、

前記収容部に配置された臓器又は組織と、前記送液部とを連結するための第１導管と、

前記収容部に配置された臓器又は組織と、前記回収部とを連結するための第２導管と、

前記第２導管に設けられた圧力調整部と

を備え、

前記圧力調整部は、前記送液部が前記未分化細胞を含む液を前記臓器又は組織に導入するときに、前記臓器又は組織内が陽圧となるよう調整する、

灌流装置。

[請求項2] 圧力調整部が、第２導管内の流速又は流量を調節する弁である請求項１に記載の灌流装置。

[請求項3] 圧力調整部は、前記送液部が前記未分化細胞を含む液を前記臓器又は組織に導入するときに、前記臓器又は組織内を５kPa以上100 kPa以下の圧力とする時間を設けるよう圧力を調整する、請求項１又は２に記載の灌流装置。

[請求項4] 圧力調整部は、前記送液部が前記未分化細胞を含む液を前記臓器又は組織に導入するときに、臓器又は組織から液体が導出されないよう調整する請求項１～３のいずれか１項に記載の灌流装置。

[請求項5] 前記第１導管に圧力計が設けられた請求項１～４のいずれか１項に記載の灌流装置。

[請求項6] 前記臓器が、ヒトを除く動物から摘出された実質臓器である請求項１～５のいずれか１項に記載の装置。

[請求項7] 前記組織が、骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され、且つ前記被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する加工骨である請求項１～６のいずれか１項に記載の装置。

[請求項8] 前記未分化細胞が巨核球系細胞であり、前記未分化細胞から分化した細胞が血小板である請求項１～７のいずれか１項に記載の装置。

[請求項9] 前記送液部が、逆送液可能である請求項１～８のいずれか１項に記載の装置。

[請求項10] 生体から摘出された臓器又は組織を配置するための収容部と、

前記収容部に配置された臓器又は組織に、未分化細胞を含む液を導入する第１送液部と、

前記未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収する回収部と、

前記収容部に配置された臓器又は組織と、前記第１送液部とを連結するための第１導管と、

前記収容部に配置された臓器又は組織と、前記回収部とを連結するための第２導管と、

前記第２導管に設けられた第２送液部と

を備え、

前記第２送液部は、前記臓器又は組織から導出された未分化細胞を含む液を、逆送液により前記臓器又は組織に導入する、

灌流装置。

[請求項11] 生体から摘出された臓器又は組織内に未分化細胞を含む液を導入する工程と、

前記臓器又は組織内で前記未分化細胞を培養する工程と、

前記臓器又は組織から、前記未分化細胞から分化した細胞を含む液を回収する工程と

を含み、

前記導入工程において、陽圧下で前記未分化細胞を含む液を前記臓器又は組織に導入する、

灌流方法。

[請求項12] 導入工程において、臓器又は組織内を５kPa以上100 kPa以下の圧力とする時間を設けて未分化細胞を含む液を導入する請求項１１に記載の灌流方法。

[請求項13] 導入工程において、臓器又は組織から液体が導出されない状態で、前記臓器又は組織内に前記未分化細胞を含む液を導入する請求項１１又は１２に記載の灌流方法。

[請求項14] 前記未分化細胞が巨核球系細胞であり、前記未分化細胞から分化した細胞が血小板である請求項１１～１３のいずれか１項に記載の灌流方法。

[請求項15] 前記臓器が、ヒトを除く動物から摘出された実質臓器である請求項１１～１４のいずれか１項に記載の灌流方法。

[請求項16] 臓器が、脾臓、心臓、肝臓、肺、腎臓及び膵臓から選択される請求項１５に記載の灌流方法。

[請求項17] 組織が、ヒトを除く動物から摘出された骨である請求項１１～１４のいずれか１項に記載の灌流方法。

[請求項18] 前記組織が、骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され、且つ前記被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する加工骨である請求項１７に記載の灌流方法。

[請求項19] 前記骨が、大腿骨、上腕骨、胸骨、恥骨、腸骨、肋骨及び椎骨から選択される請求項１７又は１８に記載の灌流方法。

[請求項20] 前記骨が、ブタから摘出された大腿骨であり、前記大腿骨に導入する未分化細胞を含む液が、0.5 mL以上３mL以下の範囲である請求項１７又は１８に記載の灌流方法。

[請求項21] 前記被覆剤が、樹脂、接着剤、高分子膜、ゲル及び石膏から選択される少なくとも１種である請求項１８～２０のいずれか１項に記載の灌流方法。

[請求項22] 前記導入孔及び前記導出孔が、導入された未分化細胞が骨髄と接触

可能な深さを有する孔である請求項１７～２１のいずれか１項に記載の灌流方法。

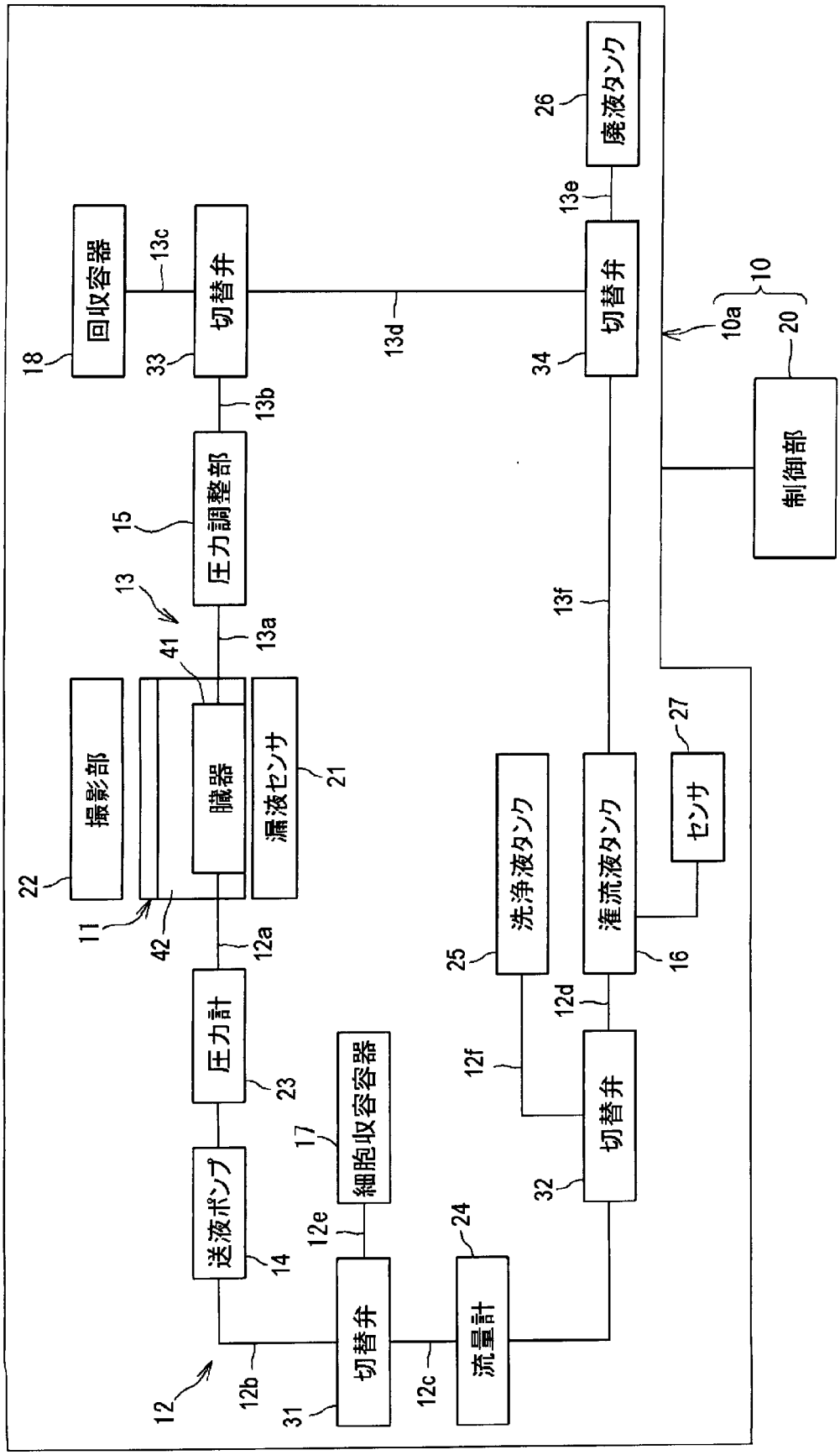
[請求項23] 骨の外表面に密着する被覆剤で骨の外表面が被覆され、且つ前記被覆剤及び骨の外表面を貫通して骨の内部に達する孔を有する加工骨の内部に未分化細胞を含む液を導入する工程と、

前記加工骨の内部で前記未分化細胞を培養する工程と、

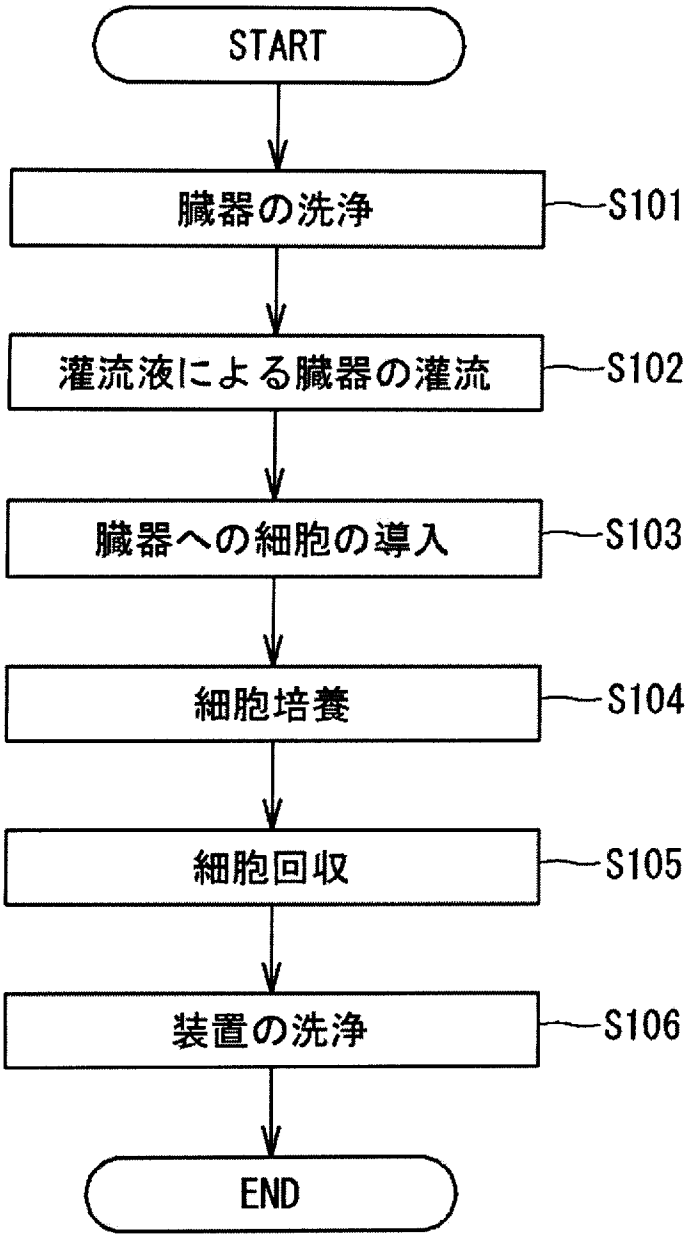
前記加工骨の内部から、前記未分化細胞から分化した血小板を含む液を回収する工程とを含む、灌流方法。

[請求項24] 前記の未分化細胞を含む液を導入する工程において、前記の未分化細胞を含む液を加工骨の内部で往復移動させて導入する請求項２３に記載の灌流方法。

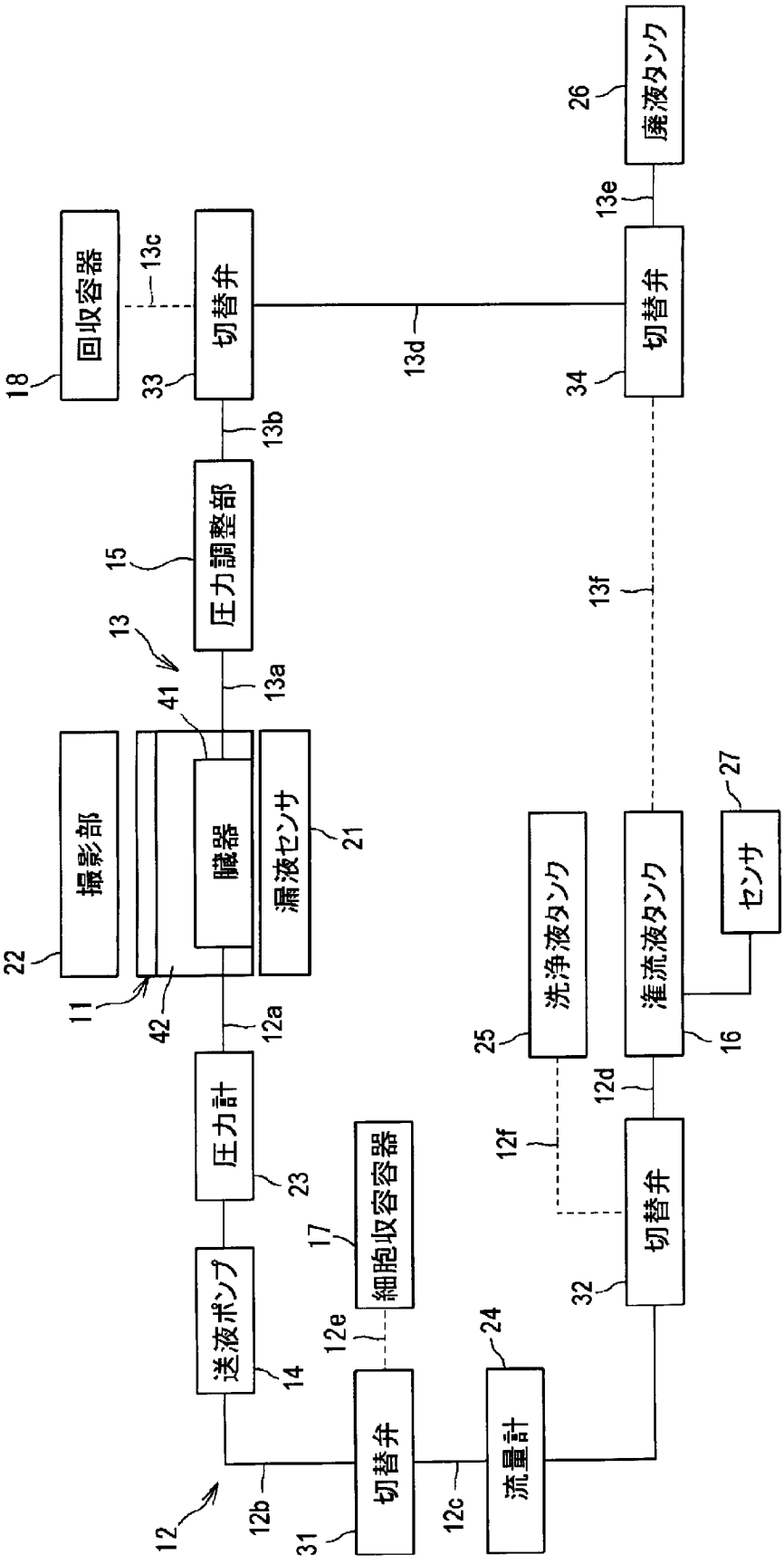
[図1]


回収容器
18
13c
切替弁
33
13b
圧力調整部
15
13
41
13a
撮影部
22
臓器
漏液センサ
21
11
42
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
12
12b
切替弁
31
12e
細胞収容器
17
12c
流量計
24
洗浄液タンク
25
12f
切替弁
32
灌流液タンク
16
12d
センサ
27
13f
切替弁
34
13d
廃液タンク
26
13e
制御部
20
10a
10

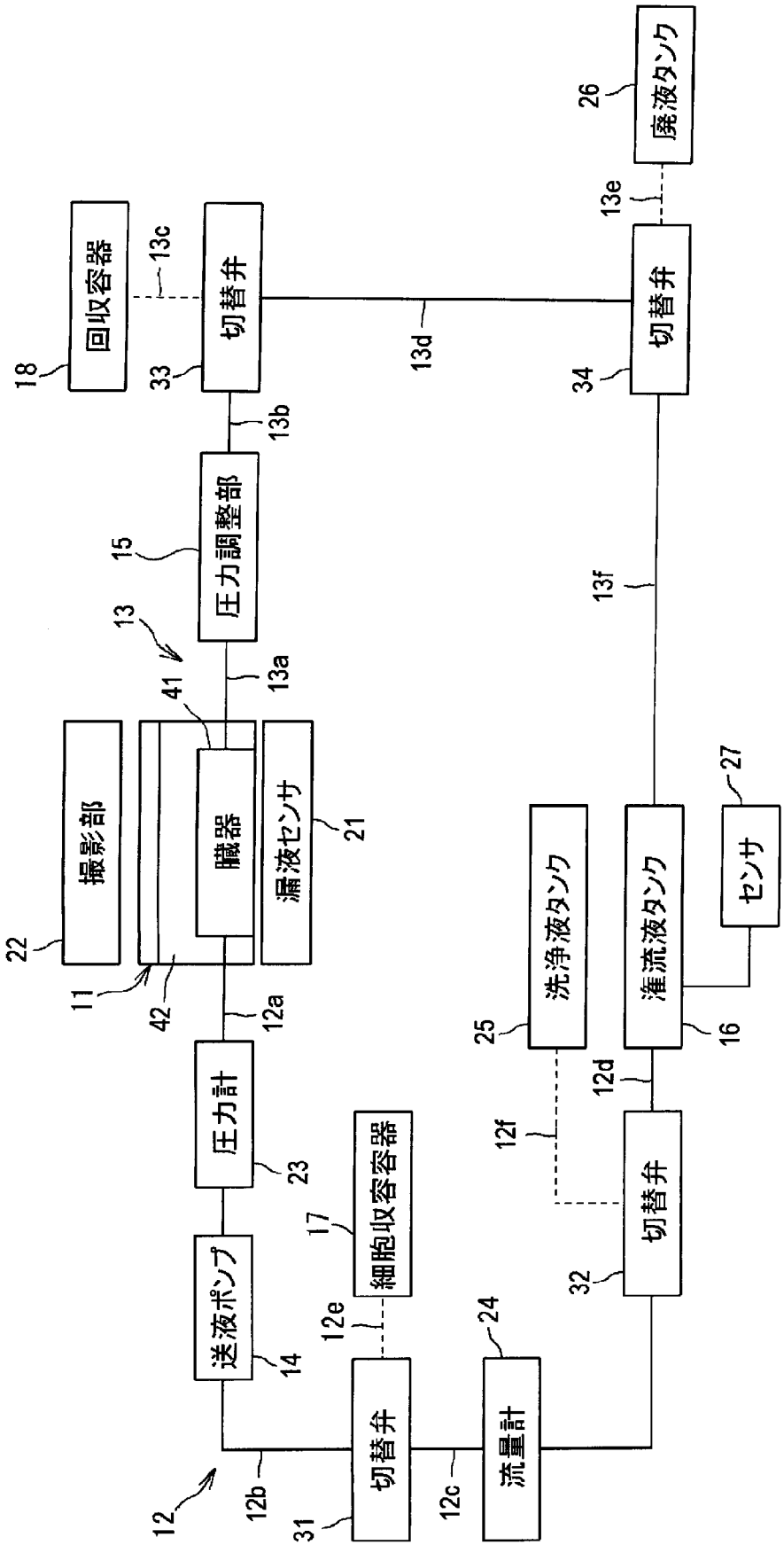
[図2]


START
臓器の洗浄
S101
灌流液による臓器の灌流
S102
臓器への細胞の導入
S103
細胞培養
S104
細胞回収
S105
装置の洗浄
S106
END

[図3]

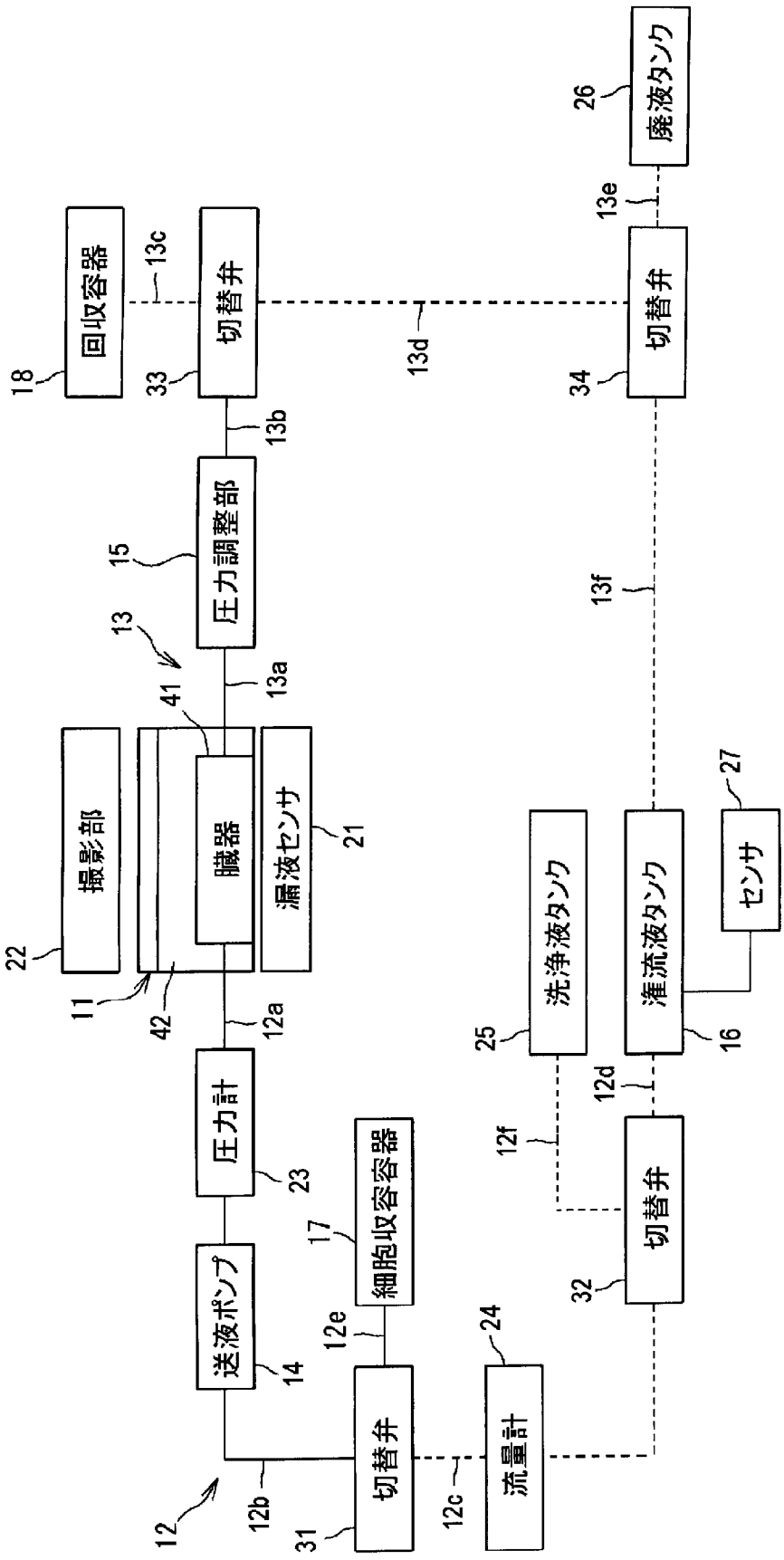

回収容器
18
13c
切替弁
33
13b
圧力調整部
15
13
41
13a
撮影部
22
臓器
11
42
漏液センサ
21
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
12
12b
細胞収容器
17
12e
切替弁
31
12c
流量計
24
13d
切替弁
34
廃液タンク
26
13e
13f
洗浄液タンク
25
12f
灌流液タンク
16
12d
センサ
27
切替弁
32

[図4]

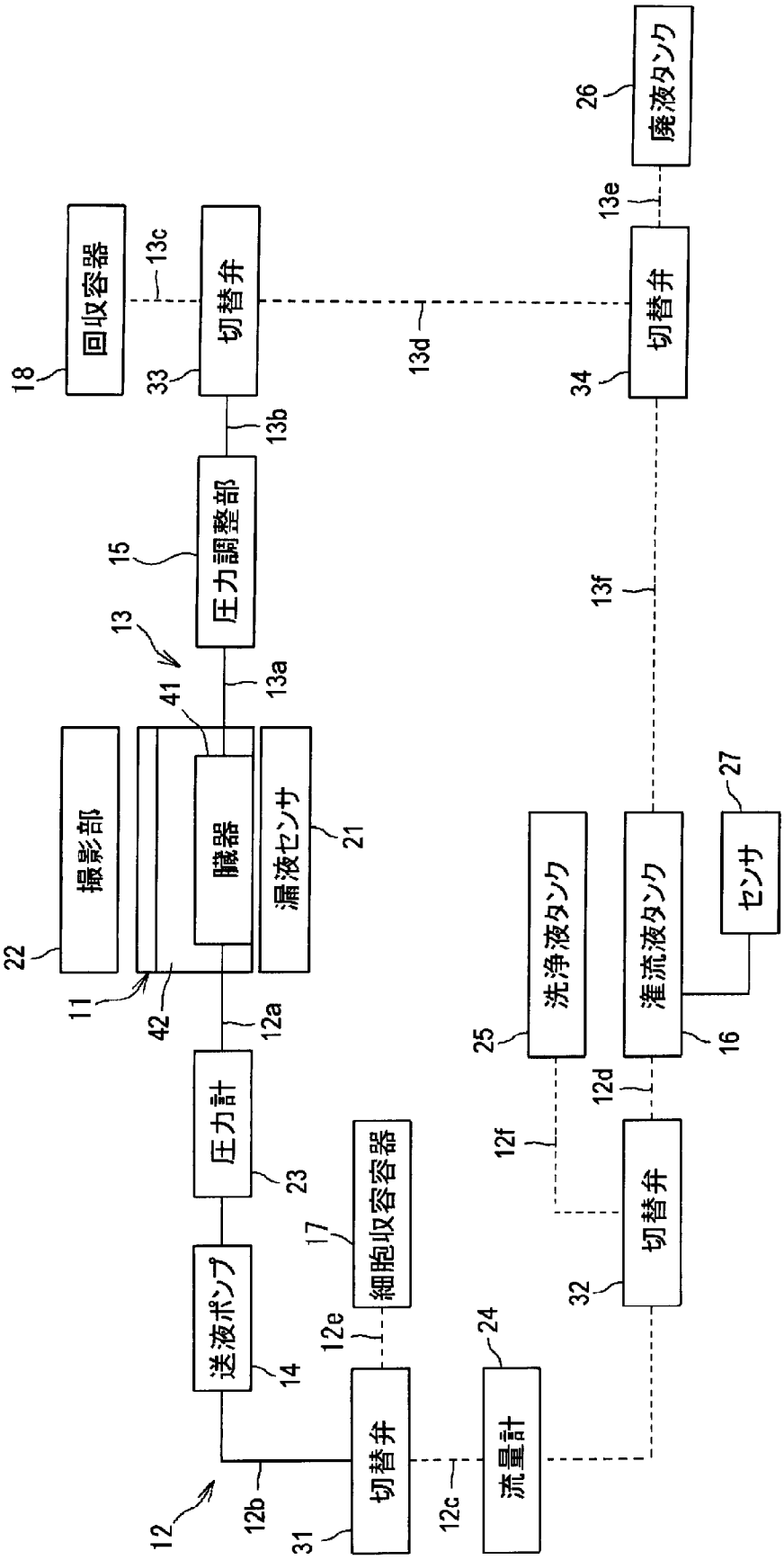


回収容器
18
13c
切替弁
33
13d
切替弁
34
13e
廃液タンク
26
13b
圧力調整部
15
13
13a
41
撮影部
22
臓器
漏液センサ
21
11
42
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
細胞収容容器
17
12e
切替弁
31
12b
12
流量計
24
12c
切替弁
32
12f
12d
洗浄液タンク
25
灌流液タンク
16
センサ
27
13f

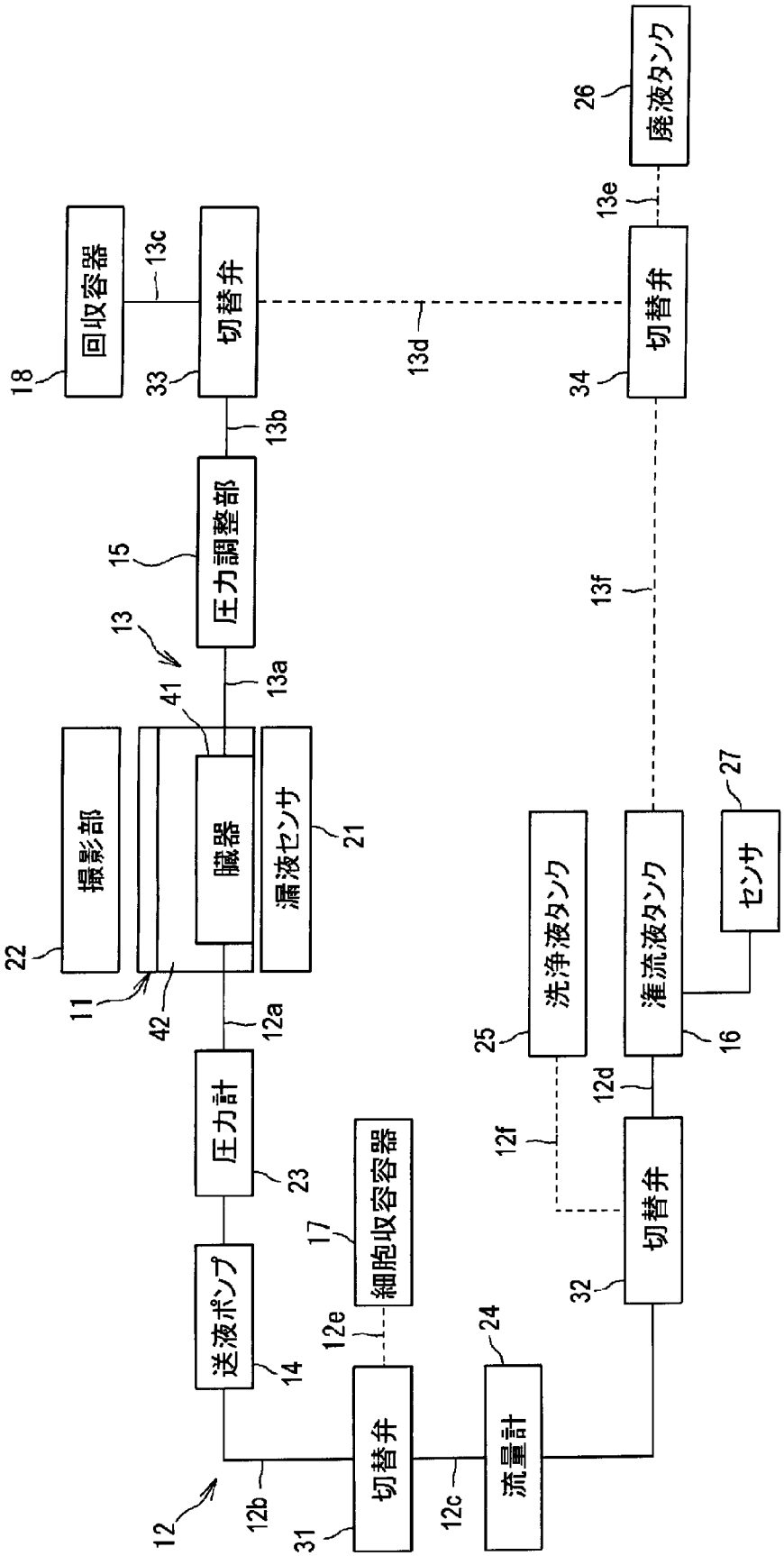
[図5]


回収容器
18
切替弁
33
13c
13b
圧力調整部
15
13
41
13a
撮影部
22
臓器
漏液センサ
21
11
42
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
細胞収容器
17
12e
切替弁
31
12b
12
流量計
24
12c
13d
切替弁
34
廃液タンク
26
13e
13f
洗浄液タンク
25
灌流液タンク
16
センサ
27
12d
12f
切替弁
32

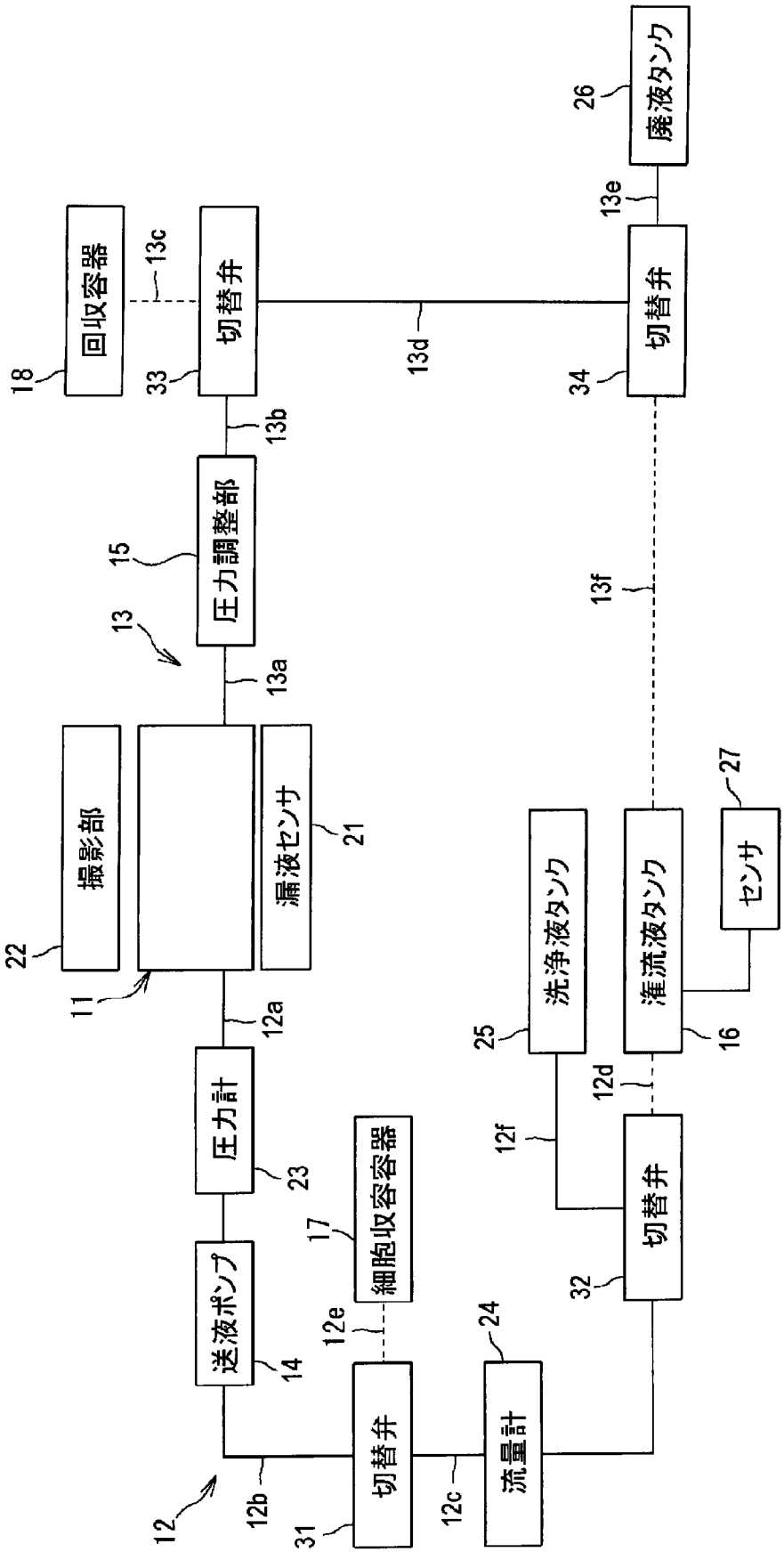
[図6]


回収容器
18
切替弁
33
13c
13b
圧力調整部
15
13
41
13a
撮影部
22
臓器
漏液センサ
21
11
42
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
12
12b
細胞収容容器
17
12e
切替弁
31
12c
流量計
24
廃液タンク
26
13e
切替弁
34
13d
13f
洗浄液タンク
25
灌流液タンク
16
センサ
27
12d
12f
切替弁
32

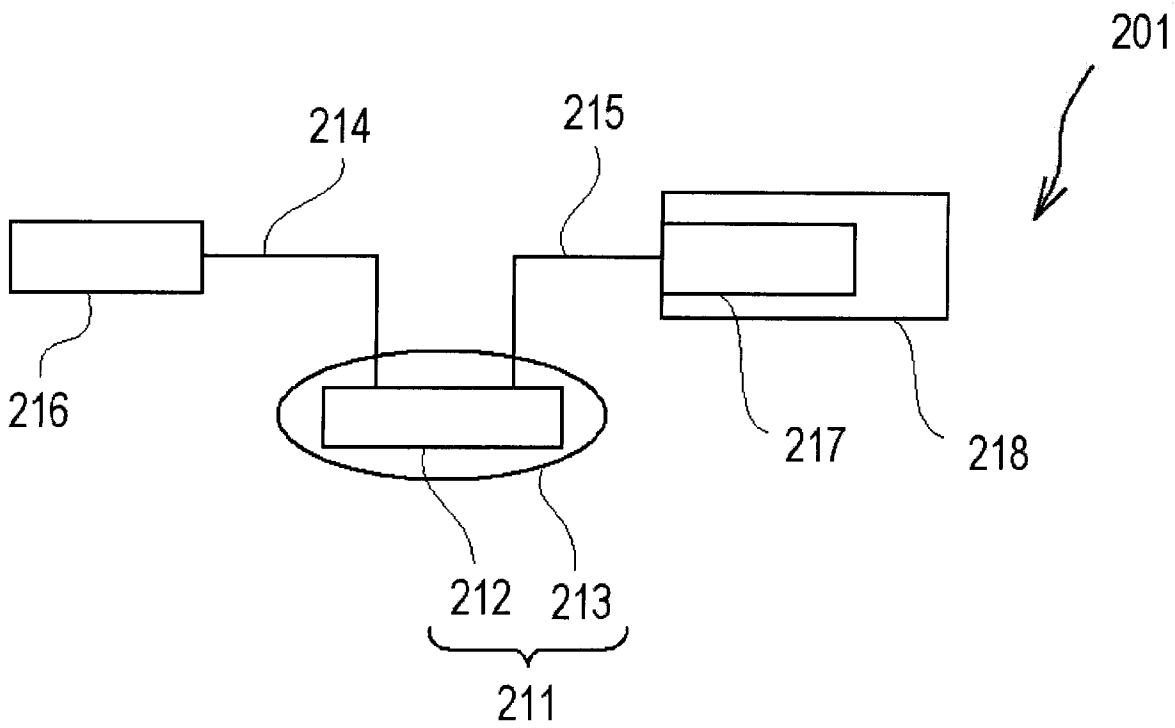
[図7]


回収容器
18
13c
切替弁
33
13b
圧力調整部
15
13
41
13a
撮影部
22
臓器
漏液センサ
21
11
42
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
12
12b
17
細胞収容器
12e
切替弁
31
12c
流量計
24
13d
切替弁
34
廃液タンク
26
13e
13f
洗浄液タンク
25
灌流液タンク
16
12d
センサ
27
12f
切替弁
32

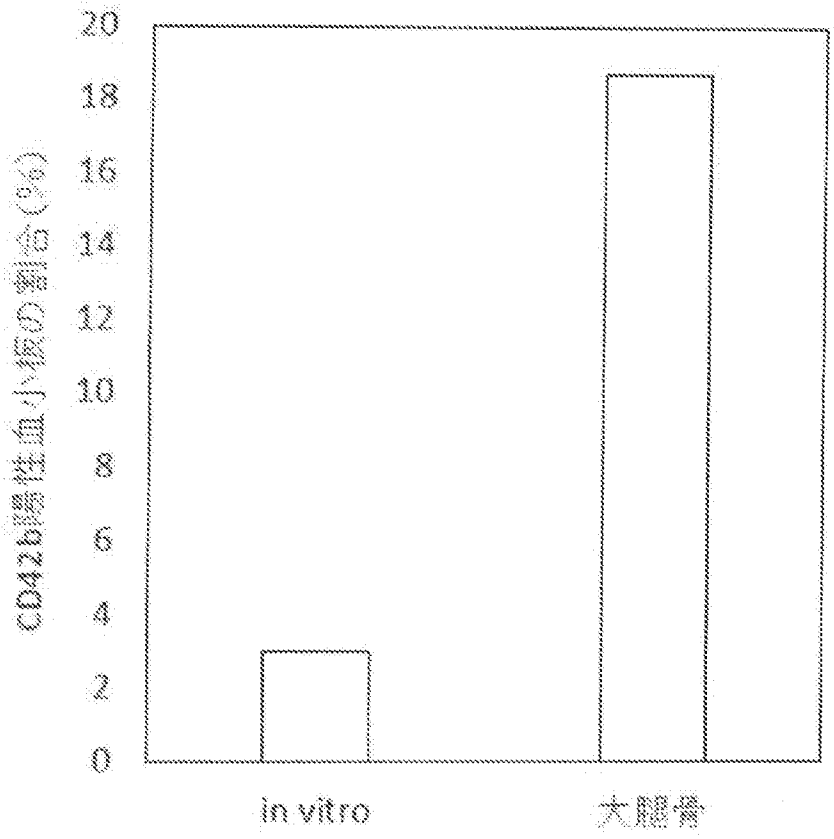
[図8]


回収容器
18
13c
切替弁
33
13b
圧力調整部
15
13
13a
撮影部
22
漏液センサ
21
11
12a
圧力計
23
送液ポンプ
14
12
12b
細胞収容容器
17
12e
切替弁
31
12c
流量計
24
13d
切替弁
34
廃液タンク
26
13e
13f
洗浄液タンク
25
灌流液タンク
16
12d
センサ
27
12f
切替弁
32

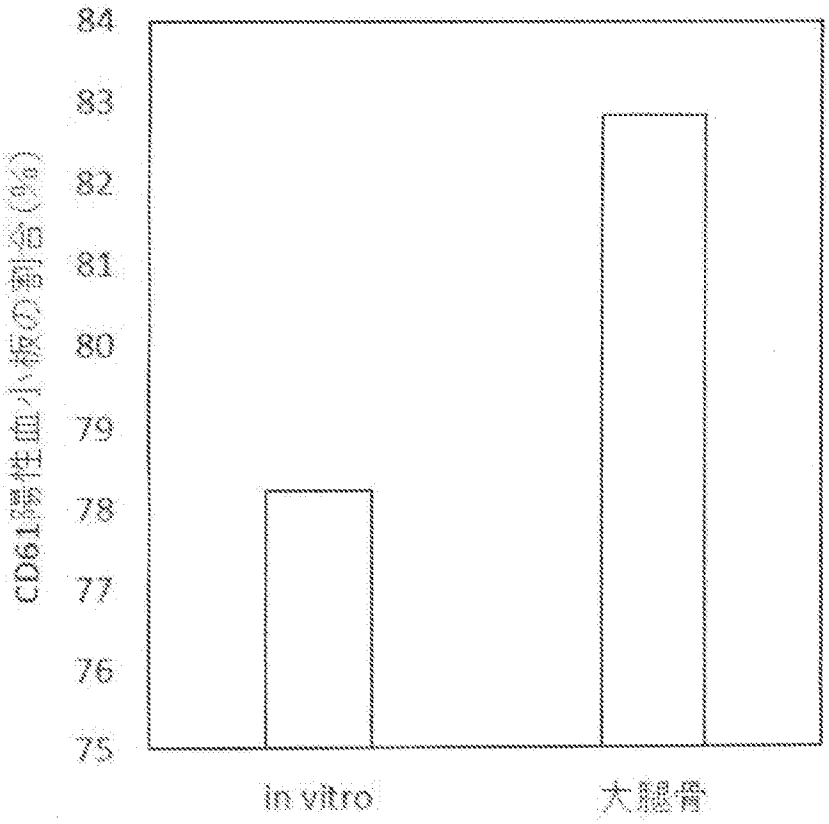
[図9]


201
214
215
216
217
218
212
213
211

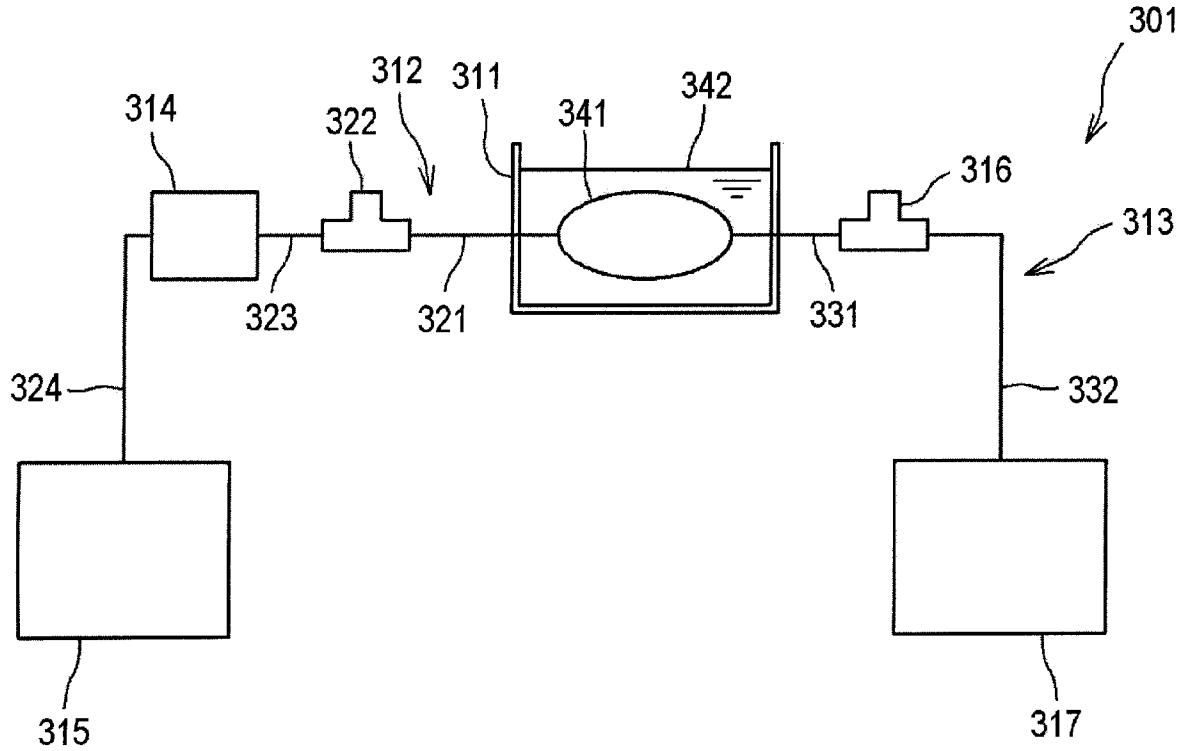
[図10A]


CD42b陽性血小板の割合(%)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
in vitro
大腿骨

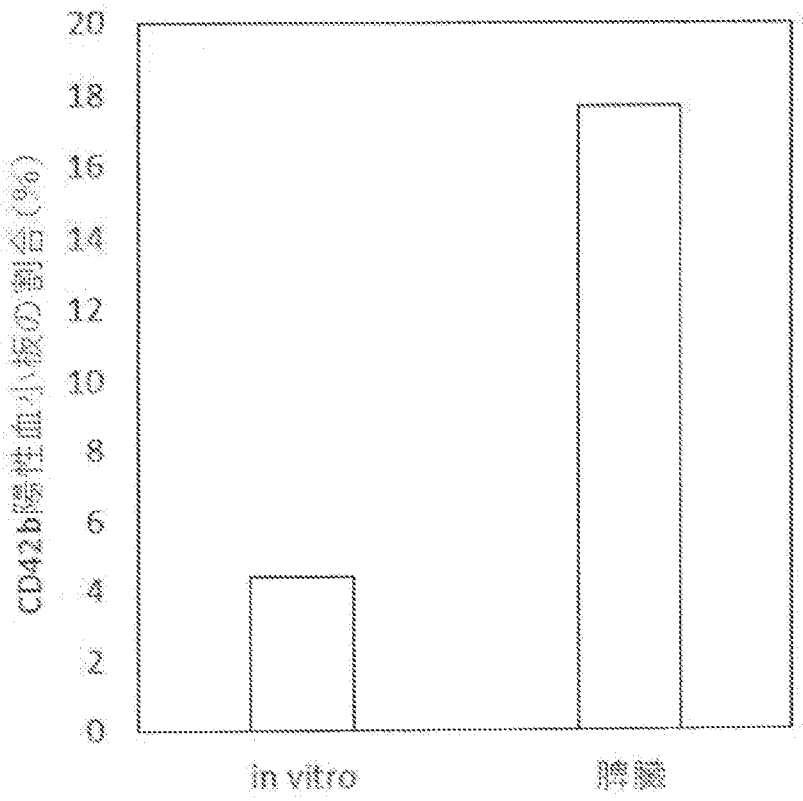
[図10B]


84
83
82
81
80
79
78
77
76
75
CD61陽性血小板の割合(%)
In vitro
大腿骨

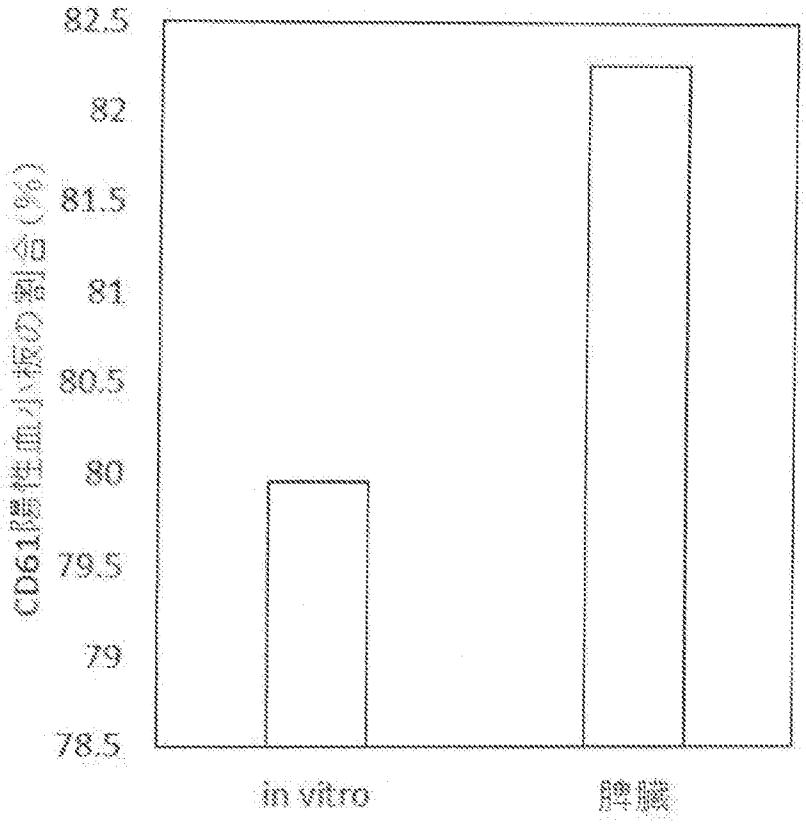
[図11]


301
312
311
342
314
322
341
316
313
323
321
331
324
332
315
317

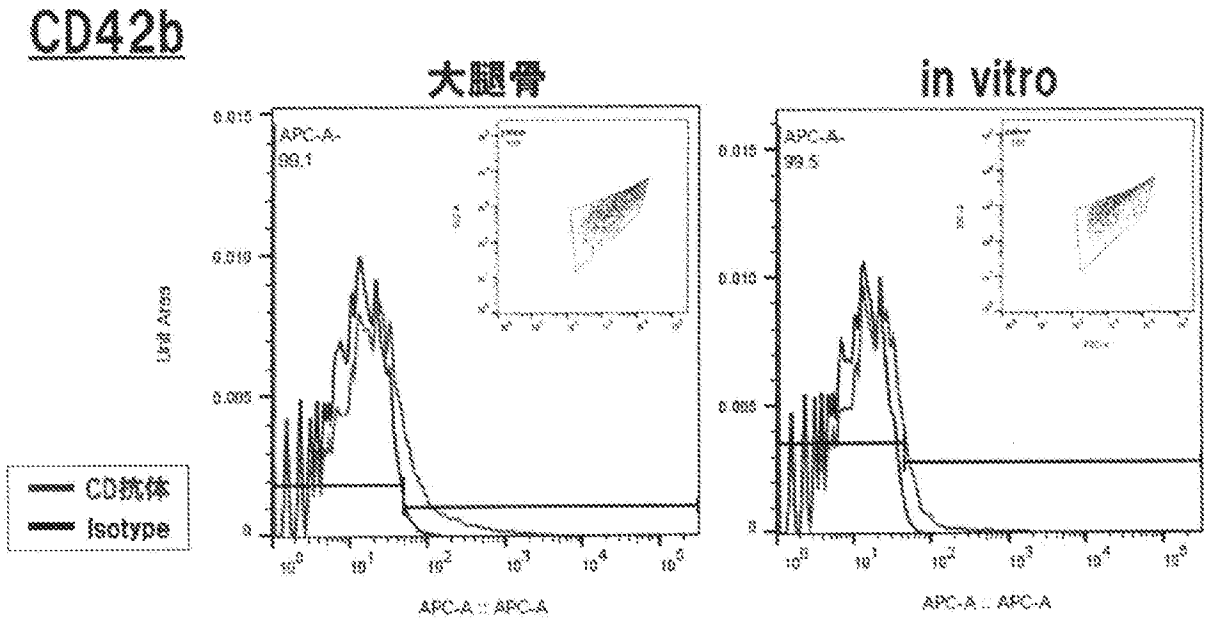
[図12A]


CD42b陽性血小板の割合(%)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
in vitro
脾臓

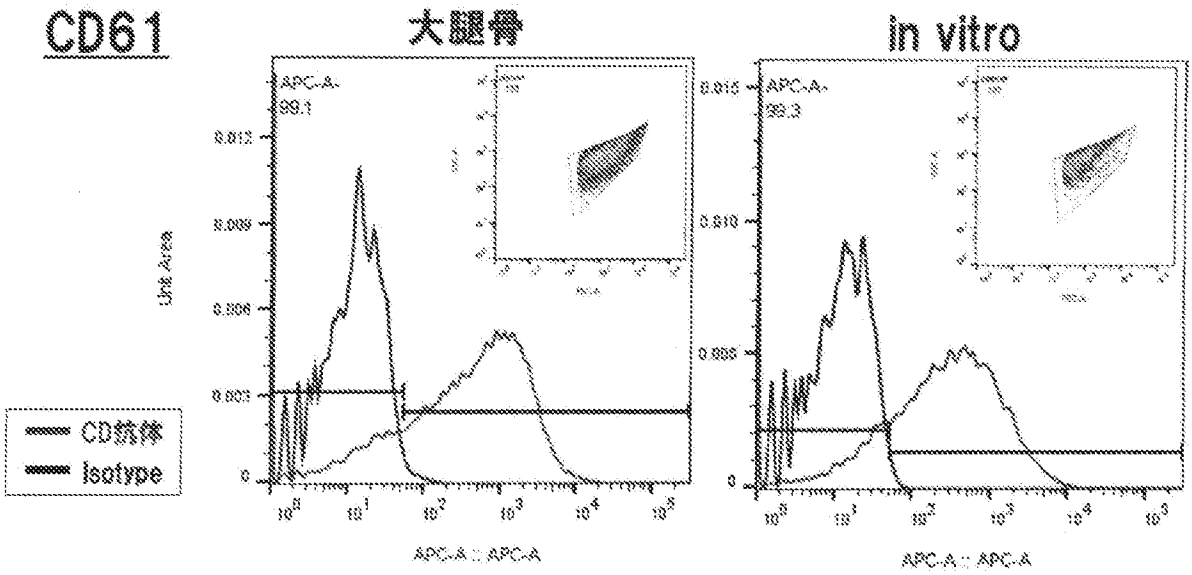
[図12B]


CD61陽性血小板の割合(%)
82.5
82
81.5
81
80.5
80
79.5
79
78.5
in vitro
脾臓

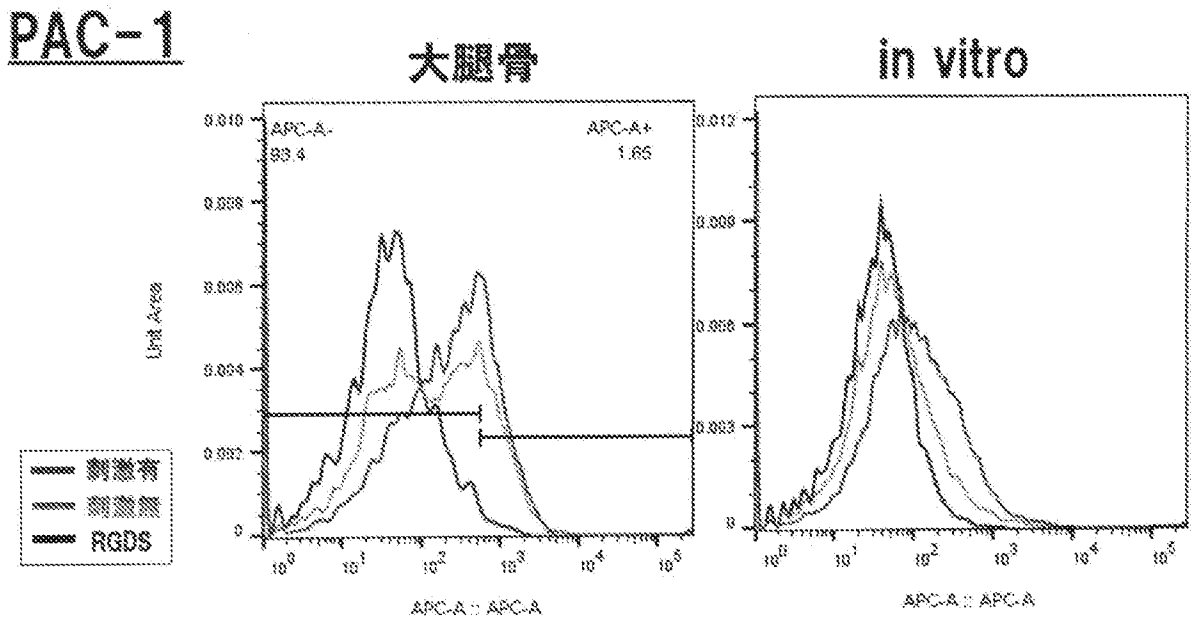
[図13]


CD42b
大腿骨
in vitro
CD抗体
Isotype
APC-A :: APC-A

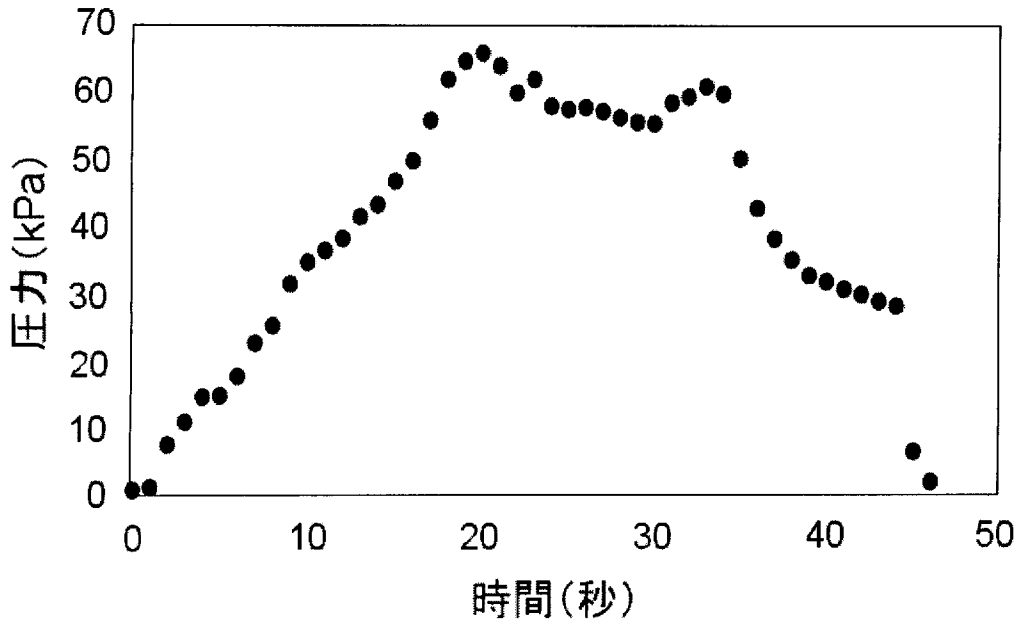
[図14]


CD61
大腿骨
in vitro
CD抗体
Isotype
APC-A :: APC-A

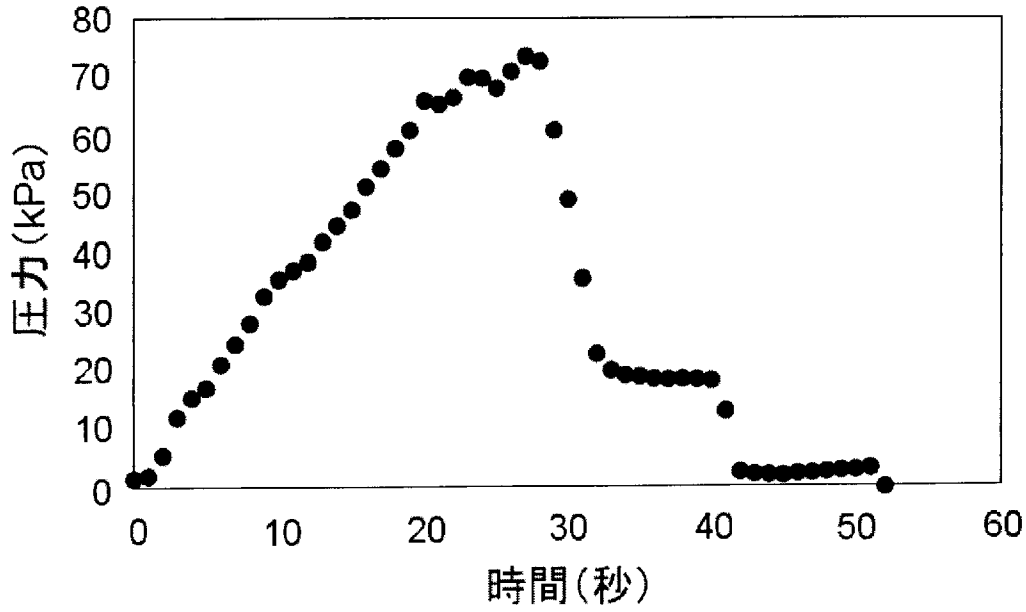
[図15]


PAC-1
大腿骨
in vitro
APC-A-
93.4
APC-A+
1.65
RGDS
APC-A :: APC-A
APC-A :: APC-A

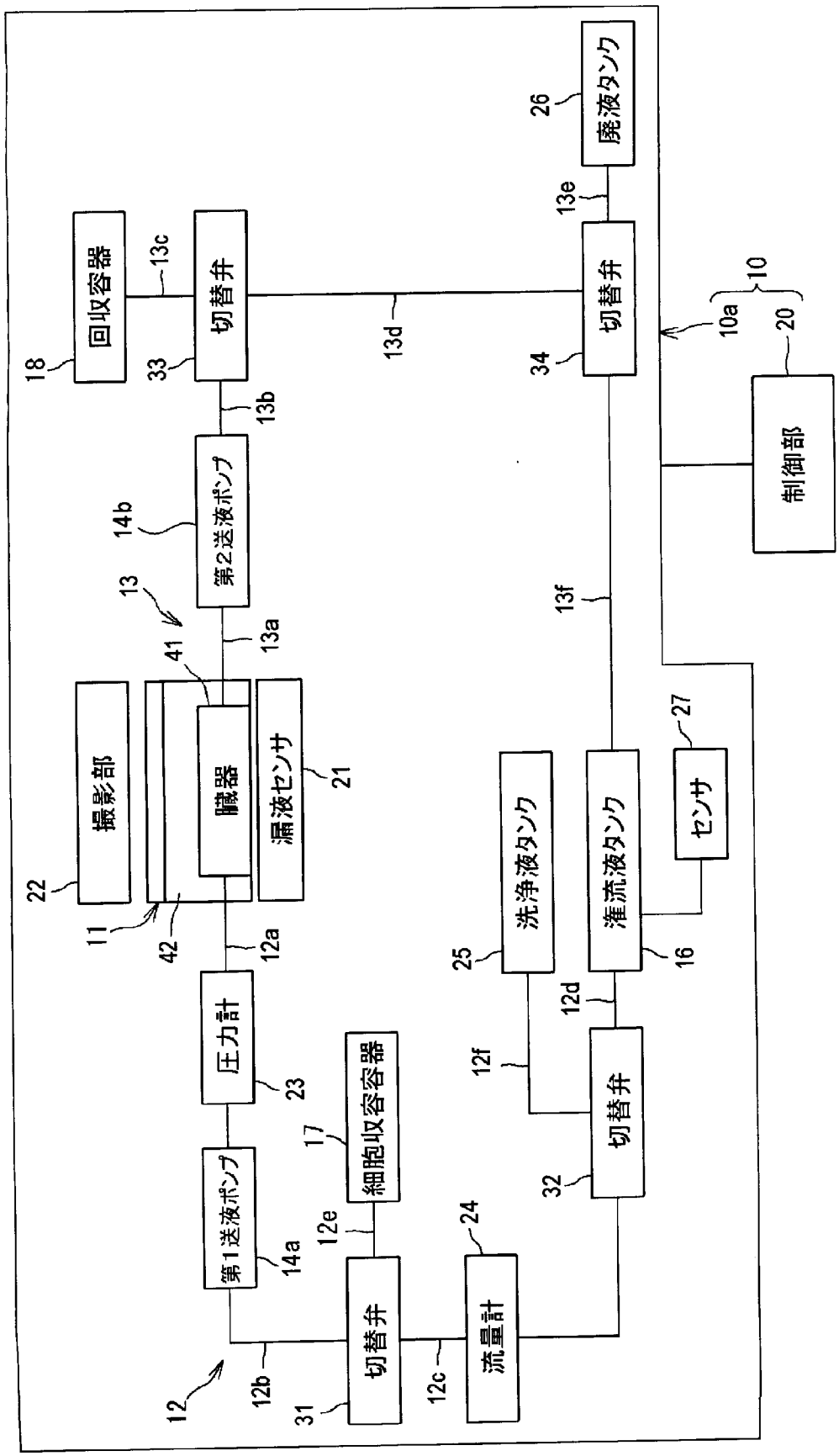
[図16A]


圧力(kPa)
時間(秒)
0
10
20
30
40
50
60
70

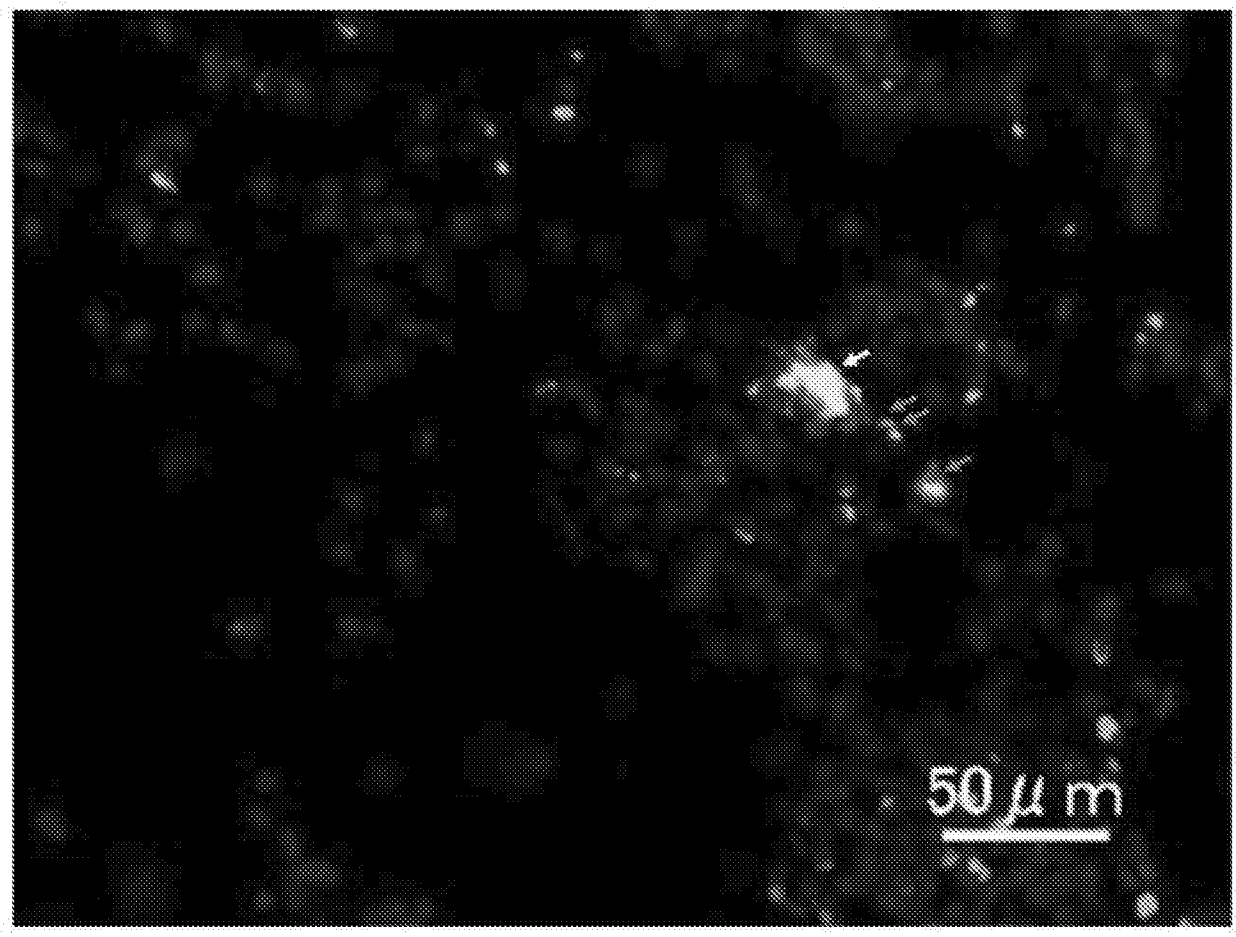
[図16B]



[図17]


回収容器
18
切替弁
33
13c
13b
第2送液ポンプ
14b
13
41
13a
撮影部
22
臓器
漏液センサ
21
11
42
12a
圧力計
23
第1送液ポンプ
14a
細胞収容器
17
12e
切替弁
31
流量計
24
12b
12c
12
廃液タンク
26
13e
切替弁
34
13d
13f
洗浄液タンク
25
灌流液タンク
16
12d
センサ
27
切替弁
32
12f
制御部
20
10a
10

[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/007449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/078(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. C12M3/00, C12N5/071, C12N5/078

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)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2016-185115 A (SYSMEX CORPORATION) 27 October 2016, claims, examples, drawings, paragraphs [0011], [0015], [0035], [0057] & US 2016/0278365 A1, claims, examples, figures, paragraphs [0029], [0033], [0066], [0093] & EP 3072537 A1	1-3, 8, 11-17, 19, 20/7-10, 18-24
Y/A	JP 2015-228848 A (SYSMEX CORPORATION) 21 December 2015, claims, examples, drawings, paragraphs [0005], [0019], [0023] & US 2015/0353892 A1, claims, examples, figures, paragraphs [0005], [0024], [0028] & EP 2952580 A1 & CN 105274052 A	7-9, 18-24/1-6, 10-17
Y/A	JP 2006-246720 A (THE FOUNDATION FOR THE PROMOTION OF INDUSTRIAL SCIENCE) 21 September 2006, paragraph [0025] & US 2008/0145925 A1, paragraph [0096]	9, 10, 24/1-8, 11-23

☐ 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	Date of mailing of the international search report
02 May 2018 (02.05.2018)	15 May 2018 (15.05.2018)

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

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７４４９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M3/00(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N5/078(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.　C12M3/00, C12N5/071, C12N5/078

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/Y	JP 2016-185115 A（シスメックス株式会社）2016.10.27, 特許請求の範囲、実施例、図面、［００１１］、［００１５］、［００３５］、［００５７］ & US 2016/0278365 A1, Claims,Examples,Figures,[0029],[0033],[0066],[0093] & EP 3072537 A1	1-6,8,11-17,19,20/7-10,18-24

☑　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
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０２．０５．２０１８	１５．０５．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　４８６８
北田　祐介
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/A	JP 2015-228848 A（シスメックス株式会社）2015.12.21, 請求の範囲、実施例、図面、［０００５］、［００１９］、［００２３］ & US 2015/0353892 A1, Claims,Examples,Figures,[0005],[0024],[0028] & EP 2952580 A1 & CN 105274052 A	7-9,18-24/1-6,10-17
Y/A	JP 2006-246720 A（財団法人生産技術研究奨励会）2006.09.21, ［００２５］ & US 2008/0145925 A1, [0096]	9,10,24/1-8,11-23