

(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
2019年3月28日(28.03.2019)



(10) 国際公開番号
WO 2019/059278 A1

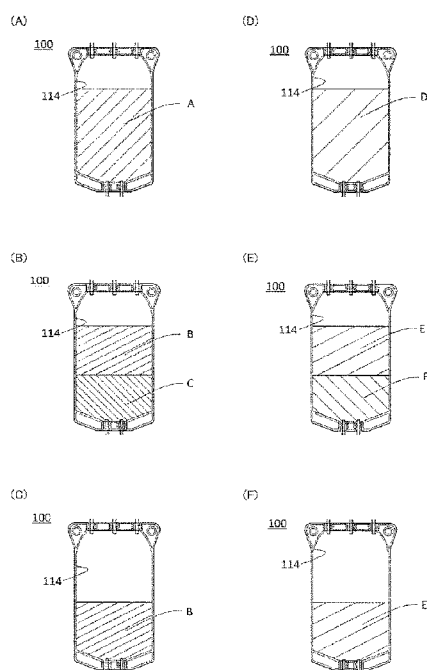
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/034815
- (22) 国際出願日: 2018年9月20日(20.09.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2017-180178 2017年9月20日(20.09.2017) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 林 真司 (HAYASHI Shinji); 〒5660072 大阪府摂津市鳥飼西5-1-1 株式会社カネカ内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都

港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ
MORITOWER 32階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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,

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING AND COLLECTING CELLS FROM BIOLOGICAL TISSUE

(54) 発明の名称: 生体組織からの細胞の分離回収方法



(57) Abstract: Provided is a method for enzymatically treating a biological tissue under low-load conditions for cells to separate and collect cells. The present invention relates to a method for separating and collecting cells from a biological tissue, the method including: step 1 of mixing the biological tissue with an enzyme solution in a volume of V_1 in a container to perform an enzymatic treatment, thereby preparing an enzymatically treated solution containing free cells; step 2 of allowing the container to stand to cause the separation of the enzymatically treated solution into an oily layer and an aqueous layer until a point of time at which the volume of the aqueous layer does not exceed $0.93 V_1$; step 3 of collecting the aqueous layer from the container and causing the oily layer to remain in the container at the point of time mentioned in step 2; and step 4 of supplying a washing solution into the container, then mixing the resultant solution with the oily layer remaining in the container, then causing the resultant mixture to stand to cause the separation into an oily layer and an aqueous layer, and then collecting the aqueous layer from the container and causing the oily layer to remain in the container.



WO 2019/059278 A1

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)）

(57) 要約：細胞に対し低負荷条件で、生体組織を酵素処理し細胞を分離し回収する方法を提供する。本発明は、容器内で、生体組織と体積 V_1 の酵素液とを混合し酵素処理を行い遊離細胞を含む酵素処理液を形成する工程 1 と、容器を静置し、酵素処理液を油層と水層に、水層の体積が $0.93 V_1$ を超えない時点まで分離させる工程 2 と、工程 2 での前記時点で、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程 3 と、洗浄液を容器内に供給し、容器内に残留した油層と混合し静置して油層と水層とに分離させ、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程 4 とを含む、生体組織から細胞を分離し回収する方法に関する。

明 細 書

発明の名称：生体組織からの細胞の分離回収方法

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪組織等の生体組織を酵素処理して細胞を分離させ回収する方法に関する。

背景技術

[0002] 脂肪組織に含まれる有核細胞の少なくとも一部は生体組織幹細胞であり、それらは成熟脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、血管内皮細胞等、様々な細胞へと分化可能であることが知られている。このような多分化能を有する脂肪由来生体組織幹細胞を効率良く分離・採取する方法は、再生医療発展の見地から極めて重要である。

[0003] 脂肪組織等の、有用細胞を含む生体組織から、有用細胞を取得する方法として、消化酵素で生体組織を分解して有用細胞を遊離させ、その後に遠心分離、濾過等の分離工程を経て有用細胞を回収する方法が知られている。

[0004] 例えば特許文献1の実施例1では、50mL容の遠心チューブに、脂肪組織とコラゲナーゼ液とを収容し、37℃、120回/minの条件で1時間振盪させて酵素反応を行い、その後にフィルターろ過及び遠心分離を行い、沈渣として沈降細胞集団（SVF画分）を取得することが記載されている。

[0005] 特許文献2には、脂肪組織試料から非脂肪細胞を分離するための装置として、第1シートの物質と、前記第1シートの物質に結合された第2シートの物質と、前記第1シートの物質と前記第2シートの物質との間で画成された複数のチャンバとを備える装置が開示されている。そして、複数のチャンバの1つである第1チャンバ内で、脂肪組織試料を、コラゲナーゼ等の酵素を含む解離溶液により処理して、脂肪組織試料を解離することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2008/018450号

特許文献2：特表2015-500031号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 生体組織から、細胞を遊離させるために、生体組織を酵素処理する方法が従来から行われている。

[0008] 例えば、特許文献1に記載されているように、生体組織の酵素処後に遠心分離を行い、有用細胞を含む水層と、脂質等の油溶成分を含む油層に分離し、水層を回収する方法が公知である。しかしながら、遠心分離は細胞に対する負荷が大きいため、細胞が損傷し易く、有用細胞を回収する目的では好ましいものではない。

[0009] 一方、脂肪組織等の生体組織を酵素処理して細胞を遊離させた酵素処理液が、細胞を含む水層と、脂質を含む油層とに完全に二層分離するには、長時間を要することが通常である。遠心分離を用いずに生体組織の酵素処理液から細胞を含む水層を回収しようとする、長時間を要し、細胞に負荷がかかり易い。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、細胞に対し低負荷条件で、生体組織を酵素処理し細胞を分離し回収する方法の提供を目的として鋭意検討した結果、以下の発明を完成するに至った。

(1) 生体組織から細胞を分離し回収する方法であって、

容器内で、生体組織と体積 V_1 の酵素液との混合物中で生体組織の酵素処理を行い、遊離細胞を含む酵素処理液を形成する工程1と、

工程1後に酵素処理液を収容した容器を静置し、酵素処理液を油層と水層に、水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点まで分離させる工程2と、

前記時点で、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程3と、

洗浄液を容器内に供給し、容器内に残留した油層と混合して混合液を形成

した後、容器を静置することで混合液を油層と水層とに分離させ、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程4とを含み、工程4を1回以上行うことを特徴とする方法。

(2) 生体組織が脂肪組織である、(1)に記載の方法。

(3) 工程4での洗浄液の体積が $0.10V_1$ 以上である、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 工程4での静置時間が、工程2での静置時間の $1/6$ 倍以上の時間である、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 工程2での静置時間が3分間以上30分間以下である、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 工程4での静置時間が3分間以上30分間以下である、(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 容器が、液体の排出口が形成された容器であり、

工程3及び4における水層の回収が、水層に対し鉛直下方に排出口が位置するように容器を配置し、排出口を通じて水層を回収することを含む、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2017-180178号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明の方法によれば、細胞に対し低負荷条件で、生体組織を酵素処理し細胞を分離し回収することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]生体組織の酵素処理を行うための容器の一実施形態を示す。

[図2]生体組織の酵素処理液からの水層の回収の手順を説明するための模式図である。

[図3]回収された細胞含有水層を濾過し貯留するための濾過貯留デバイスの一実施形態を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0014] <用語、材料>

生体組織は典型的には動物より採取した生体組織であり、例えば、脂肪、皮膚、血管、角膜、口腔、腎臓、肝臓、膵臓、心臓、神経、筋肉、前立腺、腸、羊膜、胎盤、臍帯などに由来する生体組織が挙げられる。本明細書で開示する方法は特に脂肪組織から間質血管画分（SVF）細胞を取り出すのに有用である。

[0015] 脂肪組織とは典型的には哺乳動物の脂肪組織であり、例えば、ヒト由来の皮下脂肪、内臓脂肪、白色脂肪、褐色脂肪である。脂肪組織は、任意の形状であってよく、例えば、脂肪組織をハサミ等の鋭利な器具を用いて破碎したもの、濾し器等を用いてミンチ状にしたもの、脂肪吸引法を用いて分解したものであってよい。ここで脂肪吸引法とは、一般的な美容成形外科で行なわれている吸引法であれば特に限定されず、例えば、超音波脂肪吸引、カニューレ等を用いたパワードリポサクション、シリンジ吸引等による方法である。

[0016] 本発明において遊離される細胞としては、生体組織幹細胞、白血球、単球、顆粒球、リンパ球、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、周細胞等、細胞治療や実験等の目的で採取が必要とされる有核細胞が例示できる。生体組織幹細胞は、好ましくは、脂肪由来間葉系幹細胞、脂肪由来間質幹細胞であり、より好ましくは細胞表面のCD34、73、90、105、106、133、166から選ばれる少なくとも一つを発現している脂肪由来間葉系細胞、脂肪由来間質幹細胞である。

[0017] 生体組織から細胞を遊離させるための酵素としては、コラゲナーゼ、メタロプロテアーゼ、ディスパーゼ、トリプシン、ヒアルロニダーゼ、キモトリプシン、ペプシン、アミノペプチダーゼ、リパーゼ、アミラーゼ及びそれらのリコンビナントから選ばれる少なくとも1種の分解酵素が使用できる。生体組織として脂肪組織を用いる場合には、酵素としては、短時間に、かつ低侵襲で分解するという観点から、コラゲナーゼ、メタロプロテアーゼ、ディ

スパーゼ、トリプシン及びヒアルロニダーゼから選択される少なくとも1種の分解酵素が好ましい。

[0018] 酵素を溶解または懸濁して酵素液を調製するための媒体、及び／又は、工程4で用いる洗浄液としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液、リンゲル液、ハンクス液、注射溶液、培地、等張液等の水系媒体を用いることができる。

[0019] <容器>

本発明の方法で酵素処理及び層分離に用いる容器（以下「処理容器」と称する場合がある）は、液体を収容することができる容器であれば特に限定されない。

[0020] 本発明の方法は遠心分離を必要としないため、袋状容器のような、一般的には遠心分離処理が難しい形状の容器であっても使用することができる。

[0021] 処理容器は、好ましくは、液体を排出するための排出口が形成された容器である。この場合、排出口を通じて水層を回収することが容易である。また、排出口を、回収しようとする水層の鉛直下方に位置させ、排出口を開放すると、重力により水層が排出されるため、ピペット等を用いて上方から水層を回収する方法と比べて油層と水層の界面を乱さず細胞に高負荷をかけずに水層を回収することが容易である。

[0022] 処理容器は少なくとも一部が透明又は半透明であり、酵素処理液の層分離状態が確認できるものであることが好ましい。

[0023] 処理容器は、より好ましくは、柔軟性（可撓性）を有する樹脂のシートにより壁面が形成された袋状容器であり、特に好ましくは、柔軟性を有する樹脂シートを2枚重ねて対向配置し、周縁部を熱融着又は接着剤により接合して袋状に形成した容器である。

[0024] 袋状容器である処理容器の具体例である処理容器100を、図1を参照して説明する。

[0025] 処理容器100は、第1空間114を内包する容器本体110と、第1空間114への材料の投入口121A、121B、121Cが形成された、投

入部120A、投入部120B、投入部120Cからなる投入部120と、第1空間114からの液体の排出口131A、131Bが形成された、排出部130A、排出部130Bからなる排出部130とを備える。

[0026] 投入部120Aは、第1空間114への材料の投入口121Aを形成する管部122Aと、管部122Aの入口を連通可能に封鎖するメスルアーロック123Aと、メスルアーロック123Aを保護する着脱自在の蓋部124Aと、管部122Aを通る液体を濾過するフィルター部125Aとを備える。

[0027] 投入部120Bは、第1空間114への材料の投入口121Bを形成する管部122Bと、管部122Bの入口を連通可能に封鎖するニードルレスポート123Bと、ニードルレスポート123Bを保護する着脱自在の蓋部124Bとを備える。

[0028] 投入部120Cは、第1空間114への材料の投入口121Cを形成する管部122Cと、管部122Cの入口を連通可能に封鎖するニードルレスポート123Cと、ニードルレスポート123Cを保護する着脱自在の蓋部124Cとを備える。

[0029] 排出部130Aは、第1空間114からの液体の排出口131Aを形成する管部132Aと、管部132Aの出口を連通可能に封鎖するニードルレスポート133Aと、ニードルレスポート133Aを保護する着脱自在の蓋部134Aとを備える。

[0030] 排出部130Bは、第1空間114からの液体の排出口131Bを形成する管部132Bと、管部132Bの出口を連通可能に封鎖するニードルレスポート133Bと、ニードルレスポート133Bを保護する着脱自在の蓋部134Bとを備える。

[0031] 本実施形態では、処理容器100は投入部120を3つ備えるが、1つのみ、2つのみまたは4つ以上の投入部を備えてもよい。投入部120は、処理容器100の第1空間114での生体組織の酵素処理に用いる材料（例えば生体組織、酵素液等）、或いは、洗浄液を第1空間114に投入するため

に用いられる。また、投入部と排出部を別々に備えている必要はなく、投入部を備えず、後述する排出部が投入部として兼用できるように構成されていてもよい。

[0032] 本実施形態では、処理容器100は、排出部130を2つ備えるが、1つのみ又は3つ以上の排出部を備えてもよい。排出部130は、生体組織を酵素処理して形成される遊離細胞を含む酵素処理液の少なくとも一部を第1空間114から排出するために用いられる。

[0033] 容器本体110は、第1樹脂シート111と第2樹脂シート112とを対向配置し、周縁部を熱融着により接合して袋体としたものである。第1樹脂シート111と第2樹脂シート112が熱融着により接合した部分を融着部113とする。容器本体110には、第1樹脂シート111と第2樹脂シート112との間に第1空間114が形成されている。なお、図1は、第1空間114が空の状態の処理容器100の平面模式図であり、図示しないが、第1空間114に生体組織及び酵素を含む反応混合液が収容されると、容器本体110は袋状に膨張する。第1空間114において生体組織の酵素処理が行われる。投入部120A、120B、120Cの管部122A、122B、122Cは、それらの一方の端部が、容器本体110の長手方向の一端の辺上の、第1樹脂シート111と第2樹脂シート112との間に配置され、その周りの第1樹脂シート111と第2樹脂シート112が熱融着により接合されて、容器本体110と一体化されている。同様に、排出部130A、130Bの管部132A、132Bは、それらの一方の端部が、容器本体110の長手方向の他端の辺上の、第1樹脂シート111と第2樹脂シート112との間に配置され、その周りの第1樹脂シート111と第2樹脂シート112が熱融着により接合されて、容器本体110と一体化されている。

[0034] 本実施形態では容器本体110の投入部120が配置される側の辺の両端の、融着部113よりも外側の部分に、貫通孔115、115が形成されている。貫通孔115はフックなどに掛けるために用いることができる。

[0035] 第1樹脂シート111及び第2樹脂シート112並びに各管部122A、

122B、122C、132A、132Bは、柔軟性を有する材料により形成されることが好ましい。柔軟性を有する材料の具体例としては、軟質塩化ビニル、塩化ビニル、ポリウレタン、エチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリエチレンやポリプロピレンのようなポリオレフィン、スチレン-ブタジエンスチレン共重合体又はその水添物及びスチレン-イソプレンスチレン共重合体またはその水添物等の熱可塑性エラストマー、ならびに、熱可塑性エラストマーとポリオレフィン及びエチレン-エチルアクリレート等の軟化剤との混合物等の、柔軟性を有する樹脂が挙げられる。第1樹脂シート111及び第2樹脂シート112は、少なくとも一部を透明または半透明の材料からなるものとするのが好ましい。第1樹脂シート111及び第2樹脂シート112の内側面は、ナシジ加工されていると、水層の排出時に残液を少なくすることができるため好ましい。

[0036] <生体組織から細胞を分離し回収する方法>

本発明の方法の工程1~4の具体的な一実施形態を、図2を参照して説明する。図2は、処理容器として図1に示す処理容器100を例示するが、他の容器も使用できることは上述の通りである。

[0037] 工程1は、容器内で、生体組織と体積 V_1 の酵素液との混合物中で生体組織の酵素処理を行い、遊離細胞を含む酵素処理液を形成する工程である。

[0038] 生体組織及び酵素の具体例は既述の通りである。

[0039] 「酵素液」は、酵素が水系媒体中に溶解又は懸濁した液を指す。酵素液は、予め酵素と水系媒体とを全量混合して酵素液としてから容器に投入する必要はなく、酵素、水系媒体を別々に容器に投入し、容器内で酵素液を形成してもよい。このため酵素液の体積 V_1 は、酵素処理を行うために容器内に投入された酵素、酵素液、水系媒体の体積を合計して算出することができる。

[0040] 生体組織と酵素液との体積比は、特に限定されないが、工程2、工程4での層分離のためには、生体組織の体積に対して、酵素液の体積 V_1 が、好ましくは30%~500%、より好ましくは30%~300%、より好ましくは50%~200%、より好ましくは70%~130%である。

- [0041] 工程 1 では、生体組織と酵素液を含む混合物を収容した容器を振盪させるか容器内で混合物を攪拌することにより、生体組織の酵素処理を促進することができる。酵素処理の温度、時間は適宜調節することができる。
- [0042] 工程 1 により、遊離細胞を含む酵素処理液 A が容器内に形成される（図 2（A）参照）。
- [0043] 工程 2 は、工程 1 後に酵素処理液を収容した容器を静置し、酵素処理液を油層と水層に、水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点まで分離させる工程である。図 2（B）に示すように、工程 1 で形成された生体組織の酵素処理液は、脂質等の成分を含む油層 B と、水系媒体中に遊離細胞を含む水層 C とに、時間経過とともに層分離する。生体組織が脂肪組織である場合、脂肪細胞は油層 B に含まれ、脂肪由来幹細胞は水層 C に含まれる。工程 1 終了後は酵素処理液 A として全体が濁った状態であったものが、時間経過とともに油層 B と水層 C がそれぞれ明確になり、最終的には境界が明確な二層に分離する。完全に二層分離したときの水層の体積は、酵素液量 V_1 に近い体積となる。しかし二層に完全に分離するには長時間を要するため、その間に細胞がダメージを受けるといった問題がある。そこで本発明の工程 2 では、容器中の水層の体積が V_1 となるまで待たず、水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点まで分離させたら、工程 3 において水層を回収することで、工程 2 での静置時間を短縮し、細胞への負荷を軽減する。工程 2 において「水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点」は、より好ましくは「水層の体積が $0.92V_1$ を超えない時点」であり、より好ましくは「水層の体積が $0.91V_1$ を超えない時点」であり、より好ましくは「水層の体積が $0.90V_1$ を超えない時点」であり、より好ましくは「水層の体積が $0.89V_1$ を超えない時点」であり、より好ましくは「水層の体積が $0.70V_1$ を超えない時点」である。「水層の体積が $0.93V_1$ （或いは、 $0.92V_1$ 、 $0.91V_1$ 、 $0.90V_1$ 、 $0.89V_1$ 、 $0.70V_1$ ）を超えない時点」とは、水層の体積が好ましくは $0.20V_1$ 以上 $0.93V_1$ （或いは、 $0.92V_1$ 、 $0.91V_1$ 、 $0.90V_1$ 、 $0.89V_1$ 、 $0.70V_1$ ）以下、好ましくは $0.30V_1$ 以

上 0.93 （或いは、 $0.92V_1$ 、 $0.91V_1$ 、 $0.90V_1$ 、 $0.89V_1$ 、 $0.70V_1$ ） V_1 以下、より好ましくは $0.40V_1$ 以上 $0.93V_1$ （或いは、 $0.92V_1$ 、 $0.91V_1$ 、 $0.90V_1$ 、 $0.89V_1$ 、 $0.70V_1$ ）以下、より好ましくは $0.50V_1$ 以上 $0.93V_1$ （或いは、 $0.92V_1$ 、 $0.91V_1$ 、 $0.90V_1$ 、 $0.89V_1$ 、 $0.70V_1$ ）以下となる時点である。

[0044] 工程2のより好ましい実施形態では、工程1において生体組織の体積に対して酵素液の体積 V_1 が200%以下である場合、工程2の「水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点」は「水層の体積が $0.70V_1$ を超えない時点」であり、工程1において生体組織の体積に対して酵素液の体積 V_1 が200%を超える場合、工程2の「水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点」は、「水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点」、「水層の体積が $0.92V_1$ を超えない時点」、「水層の体積が $0.91V_1$ を超えない時点」、「水層の体積が $0.90V_1$ を超えない時点」、又は「水層の体積が $0.89V_1$ を超えない時点」である。

[0045] 工程2での静置時間は3分間以上30分間以下であることが好ましく、5分間以上15分間以下であることが特に好ましい。工程2での静置時間をこの範囲とすることで、細胞への負荷を抑制しつつ水層と油層を分離することが容易となる。

[0046] 工程3は、工程2において水層の体積が $0.93V_1$ を超えない程度にまで分離した時点で、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程である。図2（B）は、工程2において油層Bと水層C（体積は $0.93V_1$ 以下、好ましくは $0.92V_1$ 以下、好ましくは $0.91V_1$ 以下、好ましくは $0.90V_1$ 以下、好ましくは $0.89V_1$ 以下、好ましくは $0.70V_1$ 以下とする）に分離した状態を示し、図2（C）は、工程3において、処理容器100から水層Cを回収するとともに油層Bを容器100内に残留させた状態を示す。

[0047] 水層Cの回収は、図2（B）に示すように、水層Cの鉛直下方に容器の排

出口が位置するように容器を配置し、排出口を通じて水層を回収することが好ましい。

[0048] 工程4は、洗浄液を容器内に供給し、容器内に残留した油層と混合して混合液を形成した後、容器を静置することで混合液を油層と水層とに分離させ、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程である。上記の通り、工程1～3では水層Cの体積が $0.93V_1$ を上回る前に水層Cを回収するため、容器に残留する油層Bには、本来水層Cに含まれるべき目的細胞が残留している可能性が高い。そこで工程4により、油層中に残留している目的細胞を回収する。

[0049] 図2(C)には、工程3終了後に、処理容器100内に油層Bが残留している状態を示す。工程4では、まず、処理容器100内に洗浄液を供給し油層Bと混合して、図2(D)に示すように、混合液Dを形成する。そして、処理容器100内で、混合液Dを静置して、図2(E)に示すように、油層Eと水層Fとに分離させる。更に、処理容器100から水層Fを回収し、図2(F)に示すように、油層Eを処理容器100内に残留させる。工程4により回収された水層は、目的とする細胞を含んでおり、工程3で回収した水層と併せて細胞懸濁液とすることができる。

[0050] 工程4において容器内に供給する洗浄液の体積は、好ましくは $0.10V_1$ 以上、より好ましくは $0.20V_1$ 以上、より好ましくは $0.30V_1$ 以上、より好ましくは $0.40V_1$ 以上、より好ましくは $0.50V_1$ 以上である。洗浄液の体積は大きいほど油層からの細胞の回収には好適である。また、洗浄液の体積が好ましくは $3.00V_1$ 以下、より好ましくは $2.00V_1$ 以下であると、より好ましくは $1.50V_1$ 以下であると、回収した水層からなる細胞懸濁液を、中空糸分離膜を用いて濃縮洗浄処理することが容易である。

生体組織の体積に対して、工程1で用いる酵素液の体積 V_1 と工程4で用いる洗浄液の体積（工程4を複数回行う場合は使用した洗浄液の合計体積）との合計体積を、好ましくは150%以上800%以下であり、より好ましくは200%以上500%以下とすることにより、比較的高密度の細胞懸濁液

を、細胞に対し低負荷条件で調製することが容易である。

[0051] 工程4において、混合液を収容した容器を静置する時間は、細胞の水層への回収効率を高める観点から、工程2での静置時間の1/6倍以上であることが好ましく、0.3倍以上であることがより好ましく、0.5倍以上であることがより好ましく、0.5~1.5倍であることが特に好ましい。工程4での静置時間もまた、長すぎると細胞に負荷となる可能性があるから、3分間以上30分間以下であることが好ましく、5分間以上15分間以下であることが特に好ましい。工程2での静置時間をこの範囲とすることで、細胞への負荷を抑制しつつ水層と油層を分離することが容易となる。

[0052] 工程4は1回のみ行ってもよいし、2回、3回又はそれ以上の回数繰り返し行ってもよい。

[0053] 工程2及び工程4での静置時間の累計は、細胞に対する負荷を小さくする観点から、好ましくは60分間以下、より好ましくは40分間以下、より好ましくは35分間以下である。

[0054] <濾過貯留デバイス>

本発明の方法で分離された水層は、図3に示すような濾過貯留デバイス200に回収し貯留することが好ましい。

[0055] 図3に示す実施形態の濾過貯留デバイス200は、濾過器210と、貯留容器220とを備える。濾過器210には、管231と、管232とが通液可能に接続されており、管231から流入した液体は、濾過器210内に配置されたメッシュシート211を通過して管232に排出される。メッシュシート211の目開は、目的とする細胞（例えば脂肪由来幹細胞）が通過することができ、不要な成分（例えば脂肪細胞）が通過することができない寸法に設定されている。

[0056] 管231の上流側には、処理容器100が備えるニードルレスポート133A、133Bと接続可能なオスコネクター233が設けられ、オスコネクター233を保護する蓋部234が取り付けられている。管231の外側には更に、管231内の流路を開閉するためのローラークランプ235が設置

されている。

[0057] 貯留容器 220 は、袋状容器であって、管 232 の一端が通液可能に接続されている。濾過器 210 を通過した細胞懸濁液は管 232 を通って貯留容器 220 に貯留される。

[0058] 貯留容器 220 には更に、管 236 の一端が通液可能に接続されている。管 236 の他端にはニードルレスポート 237 が配置され、更にニードルレスポート 237 を保護する蓋部 238 が取り付けられている。

[0059] 処理容器 100 のニードルレスポート 133A、133B と、濾過貯留デバイス 200 のオスコネクター 233 とを接続し、処理容器 100、濾過器 210、貯留容器 220 がこの順で鉛直方向の上から下になるように配置する。そして、本発明の方法の工程 3 及び工程 4 において水層の回収を行うときに、ローラークランプ 235 を操作して管 231 内の流路を開放し、水層を、濾過器 210 を通過させて貯留容器 220 に貯留する。

実施例

[0060] <実験 1>

[0061] 3名のヒト（ドナー 1、ドナー 2、ドナー 3）及び 1匹のウサギ（ドナー 1）からの脂肪組織を、コラゲナーゼにより処理し、細胞懸濁液を調製する工程を以下の各条件で行った。

[0062] 酵素処理用バッグとして、厚さ 0.4 mm の軟質ポリ塩化ビニルの概ね長方形の柔軟なシートを 2枚重ね合わせ、長手方向の一端の辺上に 3つの投入部 120A、120B、120C を設け、他端の辺上に 2つの排出部 130A、130B を設ける以外は外縁部を熱融着により融着することで、前記 2枚のシートに挟まれた、空の状態の内寸が幅約 140 mm、長さ約 196 mm の概ね長方形の収容部が形成された図 1 に示す形態のバッグ 100（袋状容器）を用いた。このバッグの前記収容部の内容積は約 600 mL である。

[0063] 遠沈管として、ポリプロピレン製の容量が 50 mL の遠沈管を用いた。

[0064] 前記酵素処理用バッグの収容部内に、55～105 mL の脂肪組織と、55～105 mL のコラゲナーゼ液（コラゲナーゼ濃度 0.1 w/v % となる

ように生理食塩液で溶解して調製した)とを、脂肪組織とコラゲナーゼ液の体積比が1:1となるように收容した。このときのコラゲナーゼ液の体積を「初期酵素液量」とする。

[0065] 酵素処理用バッグの收容部の内容積は600 mLであるのに対して、脂肪組織とコラゲナーゼ液とを含む反応混合液は最大でも210 mLであり内容積と比較して少ない。このため、收容部に反応混合液を收容した酵素処理用バッグをクランプにより一部を封止して、酵素処理用バッグの收容部のうち、反応混合液を收容する部分の容積を、收容物の体積に近づけるように調節した。

[0066] 前記遠沈管に、20 mLの脂肪組織と、20 mLのコラゲナーゼ液（コラゲナーゼ濃度0.1 w/v%となるように生理食塩液で溶解、脂肪組織とコラゲナーゼ液は1:1）とを收容し蓋を閉じて密閉した。

[0067] 脂肪組織及びコラゲナーゼ液からなる混合物を收容した前記の酵素処理用バッグ又は遠沈管を、シェーカーに設置し、37℃、30分間、60 rpmの条件で振盪させ酵素反応を行った。

[0068] 30分の酵素反応後に以下の条件で各容器内の混合液から細胞懸濁液を回収した。

[0069] 条件1（実施例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を收容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の100体積%の洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して收容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を收容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の100体積%の洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つ

を介して収容部内に再び供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。3回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。

[0070] 条件2（実施例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の100体積%の洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。2回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。

[0071] 条件3（実施例）

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の50体積%の洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の50体積%の洗浄液を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に再び供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バ

ッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。3回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。

[0072] 条件4（実施例）

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして5分間静置し、5分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の50体積%の洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び5分間静置し、5分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の50体積%の洗浄液を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に再び供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び5分間静置し、5分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の50体積%の洗浄液を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に再び供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び5分間静置し、5分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。4回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。

[0073] 条件5（比較例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして30分間静置し

、30分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収し、細胞懸濁液とした。

[0074] 条件6（比較例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した遠沈管を800G、10分の条件で遠心分離し水層を全量回収し、細胞懸濁液とした。

[0075] 条件1～5で初回に回収された回収液の体積を測定し、回収液の体積の初期酵素液量の体積に対する割合（体積％）を求めた。

[0076] 条件6では、遠心分離で回収された水層の体積を測定し、水層の体積の初期酵素液量の体積に対する割合（体積％）を求めた。

[0077] また、条件1～6で得られた細胞懸濁液中の細胞数をフローサイトメーターおよびBD Trucount Tubesを用いて測定した。細胞数は、ヒト細胞についてはCD34陽性細胞数とCD45陽性細胞数の和から算出し、ウサギ細胞についてはRetitic Countを用いて測定した。脂肪由来幹細胞数は、CD34陽性／CD45陰性／CD31陰性の細胞数から算出した。細胞数は、使用した脂肪組織の体積1mL当たりの細胞数で表した。

結果を表1に示す。

[0078]

[表1]

脂肪組織	容器	条件	脂肪量 (mL)	初期酵素 液量V ₁ (mL)	工程2			工程4			静置時間 の累計 (工程2+ 工程4)	取得細胞数 ($\times 10^4$ 細胞/ 脂肪mL)	脂肪由来 幹細胞 ($\times 10^4$ 細胞/ 脂肪mL)	
					分離した水層量 mL	V ₁ との 比	静置 時間 (分)	洗浄液量 mL	V ₁ との 比	静置 時間 (分)				実施 回数 (回)
ヒト ドナー1	バッグ	1	75	75	38.9	0.51V ₁	10	75	1.0V ₁	10	2	58.5	25	
ヒト ドナー1	バッグ	5	75	75	52	0.63V ₁	30	-	-	-	-	16.7	6	
ヒト ドナー1	遠沈管	6	20	20	22.5	1.13V ₁	-	-	-	-	-	20	9.5	
ヒト ドナー2	バッグ	1	105	105	68.8	0.66V ₁	10	105	1.0V ₁	10	2	60.7	28.6	
ヒト ドナー2	遠沈管	6	20	20	22.7	1.14V ₁	-	-	-	-	-	31	19.7	
ヒト ドナー3	バッグ	2	90	90	55	0.61V ₁	10	90	1.0V ₁	10	1	28.7	9.4	
ヒト ドナー3	遠沈管	6	20	20	23	1.15V ₁	-	-	-	-	-	17.8	5.2	
ウサギ ドナー1	バッグ	1	55	55	16.9	0.31V ₁	10	55	1.0V ₁	10	2	5.6	-	
ウサギ ドナー1	バッグ	3	55	55	21.4	0.39V ₁	10	27.5	0.5V ₁	10	2	5.1	-	
ウサギ ドナー1	バッグ	4	55	55	14.6	0.27V ₁	5	27.5	0.5V ₁	5	3	4.5	-	
ウサギ ドナー1	バッグ	5	20	20	-	0.36V ₁	30	-	-	-	-	1.1	-	

[0079] <実験 2>

ヒトドナー 4 からの脂肪組織を、コラゲナーゼにより処理し、細胞懸濁液を調製する工程を以下の各条件で行った。

[0080] 酵素処理用バッグ及び遠沈管は、実験 1 で使用したものと同一ものを用いた。

[0081] 前記酵素処理用バッグの収容部内に、10 mL の脂肪組織と、30 mL のコラゲナーゼ液（実験 1 参照）とを収容した。下記の条件 11～15、17 では、このときのコラゲナーゼ液の体積を「初期酵素液量」とした。下記の条件 16 では、コラゲナーゼ液 30 mL に生理食塩水 12 mL を加えた体積 42 mL を「初期酵素液量」とした。

[0082] 酵素処理用バッグの収容部の内容積は 600 mL であるのに対して、脂肪組織とコラゲナーゼ液とを含む反応混合液は 40 mL であり内容積と比較して少ない。このため、収容部に反応混合液を収容した酵素処理用バッグをクランプにより一部を封止して、酵素処理用バッグの収容部のうち、反応混合液を収容する部分の容積を、収容物の体積に近づけるように調節した。

[0083] 前記遠沈管に、10 mL の脂肪組織と、30 mL のコラゲナーゼ液（実験 1 参照）とを収容し蓋を閉じて密閉した。

[0084] 脂肪組織及びコラゲナーゼ液からなる混合物を収容した前記の酵素処理用バッグ又は遠沈管を、シェーカーに設置し、37℃、30 分間、60 rpm の条件で振盪させ酵素反応を行った。

[0085] 30 分の酵素反応後に以下の条件で各容器内の混合液から細胞懸濁液を回収した。

[0086] 条件 11（実施例）：

30 分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ 100 を、排出部 130A、130B が鉛直下方になるように吊るして 10 分間静置し、10 分間経過時点での水層（下層）を排出部 130A、130B の 1 つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の 20 体積%に相当する 6 mL の洗浄液（生理食塩液）を投入部 120A、120B、120C の 1 つを

介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。2回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。2回の回収により回収された水層の合計量を総回収液量とした。

[0087] 条件12（実施例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の20体積%に相当する6mLの洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の20体積%に相当する6mLの洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に再び供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。3回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。3回の回収により回収された水層の合計量を総回収液量とした。

[0088] 条件13（実施例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つか

ら取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の10体積%に相当する3 mLの洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。2回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。2回の回収により回収された水層の合計量を総回収液量とした。

[0089] 条件14（実施例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の10体積%に相当する3 mLの洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。次に、前記初期酵素液量の10体積%に相当する3 mLの洗浄液（生理食塩液）を投入部120A、120B、120Cの1つを介して収容部内に再び供給し残存画分と混合して混合液とし、混合液を収容した酵素処理用バッグ100を、排出部130A、130Bが鉛直下方になるように吊るして再び10分間静置し、10分間経過時点での水層（下層）を排出部130A、130Bの1つから取り出し回収した。3回の回収により回収された水層は1つにまとめて、細胞懸濁液とした。3回の回収により回収された水層の合計量を総回収液量とした。

[0090] 条件15（比較例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100を、

排出部130A, 130Bが鉛直下方になるように吊るして30分間静置し、30分間経過時点での水層（下層）を排出部130A, 130Bの1つから取り出し回収し、細胞懸濁液とした。回収された細胞懸濁液の量を総回収液量とした。

[0091] 条件16（比較例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した酵素処理用バッグ100に、12mLの生理食塩水を加えて混合し、混合後の酵素処理用バッグ100を、排出部130A, 130Bが鉛直下方になるように吊るして30分間静置し、30分間経過時点での水層（下層）を排出部130A, 130Bの1つから取り出し回収し、細胞懸濁液とした。回収された細胞懸濁液の量を総回収液量とした。

[0092] 条件17（比較例）：

30分の酵素反応後に酵素反応液を収容した遠沈管を800G、10分の条件で遠心分離し水層を全量回収し、細胞懸濁液とした。回収された細胞懸濁液の量を総回収液量とした。

[0093] 条件11～16で初回に回収された回収液の体積を測定し、回収液の体積の初期酵素液量の体積に対する割合（体積%）を求めた。

[0094] 条件17では、遠心分離で回収された水層の体積を測定し、水層の体積の初期酵素液量の体積に対する割合（体積%）を求めた。

[0095] また、条件1～17で得られた細胞懸濁液中の細胞数をフローサイトメーターおよびBD Trucount Tubesを用いて測定した。細胞数は、ヒト細胞についてはCD34陽性細胞数とCD45陽性細胞数の和から算出し、ウサギ細胞についてはRetiCountを用いて測定した。脂肪由来幹細胞数は、CD34陽性/CD45陰性/CD31陰性の細胞数から算出した。細胞数は、使用した脂肪組織の体積1mL当たりの細胞数で表した。

結果を表2に示す。

[0096]

[表2]

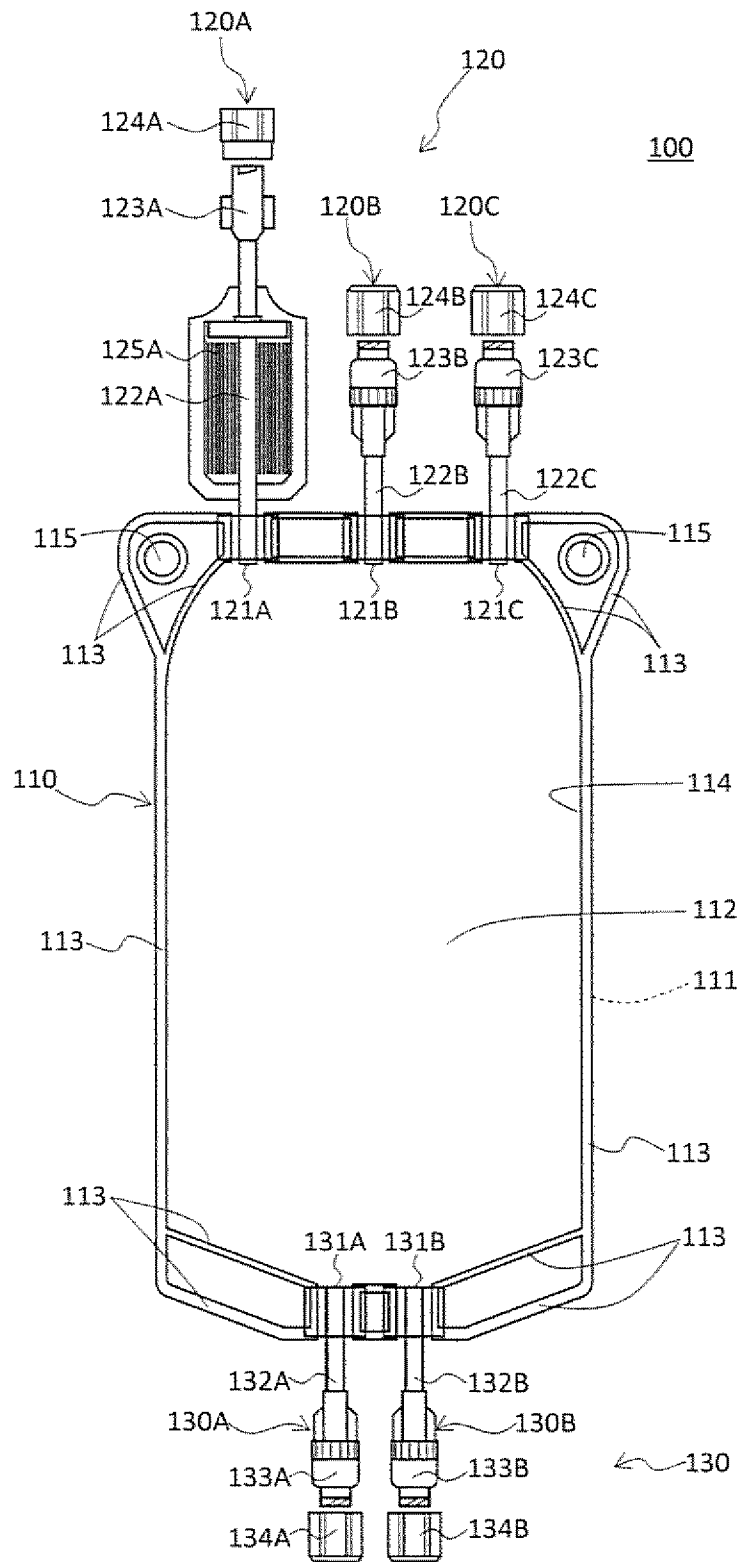
脂肪組織	容器	条件	脂肪量 (mL)	初期酵素液量V ₁ (mL)	工程2			工程4				静置時間の累計 (工程2+工程4)	取得細胞数 (x10 ⁴ 細胞/脂肪mL)	脂肪由来幹細胞 (x10 ⁴ 細胞/脂肪mL)	総回収液量 (mL)
					分離した水層量 V ₁ との比	静置時間 (分)	mL	洗浄液量 V ₁ との比	静置時間 (分)	実施回数 (回)					
ヒトドナー4	バッグ	11	10	30	26.8	0.89V ₁	10	6	0.2V ₁	10	1	20	67.2	22.9	32.3
ヒトドナー4	バッグ	12	10	30	26.8	0.89V ₁	10	6	0.2V ₁	10	2	30	69.1	23.4	38.7
ヒトドナー4	バッグ	13	10	30	26.7	0.89V ₁	10	3	0.1V ₁	10	1	20	48.6	16.2	30.8
ヒトドナー4	バッグ	14	10	30	26.7	0.89V ₁	10	3	0.1V ₁	10	2	30	50.1	16.6	34.0
ヒトドナー4	バッグ	15	10	30	29.3	0.98V ₁	30	-	-	-	-	30	38.6	13.6	29.3
ヒトドナー4	バッグ	16	10	30+12	40.8	0.97V ₁	30	-	-	-	-	30	46.9	16.2	40.8
ヒトドナー4	遠沈管	17	10	30	29.5	0.98V ₁	-	-	-	-	-	-	41.6	12.4	29.5

[0097] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

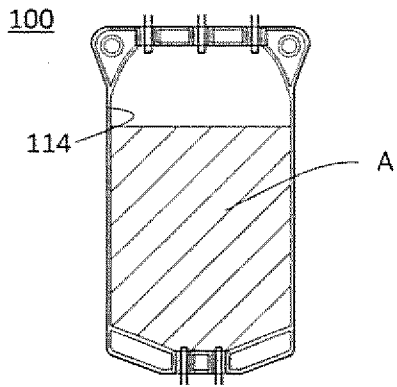
- [請求項1] 生体組織から細胞を分離し回収する方法であって、
容器内で、生体組織と体積 V_1 の酵素液との混合物中で生体組織の酵素処理を行い、遊離細胞を含む酵素処理液を形成する工程1と、
工程1後に酵素処理液を収容した容器を静置し、酵素処理液を油層と水層に、水層の体積が $0.93V_1$ を超えない時点まで分離させる工程2と、
前記時点で、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程3と、
洗浄液を容器内に供給し、容器内に残留した油層と混合して混合液を形成した後、容器を静置することで混合液を油層と水層とに分離させ、容器から水層を回収するとともに油層を容器内に残留させる工程4と
を含み、工程4を1回以上行うことを特徴とする方法。
- [請求項2] 生体組織が脂肪組織である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 工程4での洗浄液の体積が $0.10V_1$ 以上である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 工程4での静置時間が、工程2での静置時間の $1/6$ 倍以上の時間である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 工程2での静置時間が3分間以上30分間以下である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 工程4での静置時間が3分間以上30分間以下である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 容器が、液体の排出口が形成された容器であり、
工程3及び4における水層の回収が、水層に対し鉛直下方に排出口が位置するように容器を配置し、排出口を通じて水層を回収することを含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

[図1]

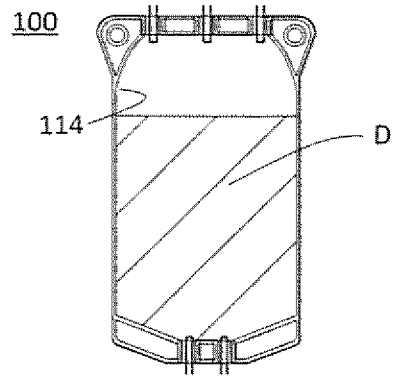


[図2]

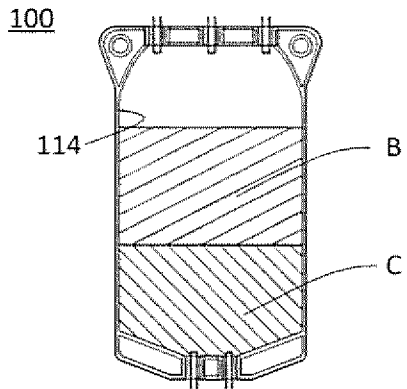
(A)



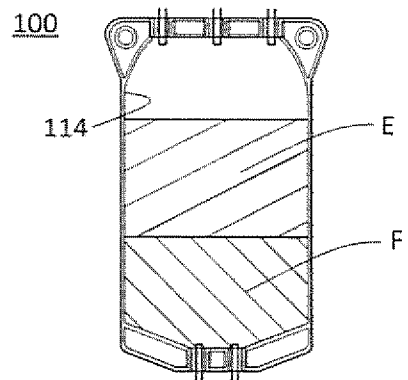
(D)



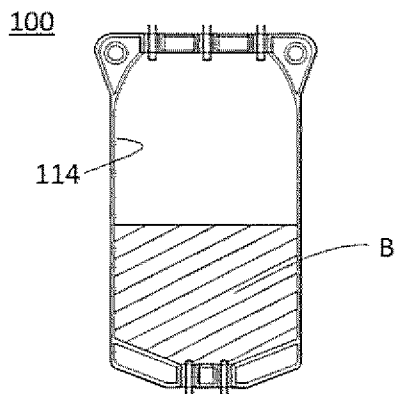
(B)



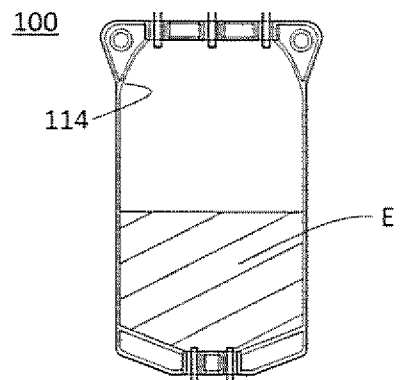
(E)



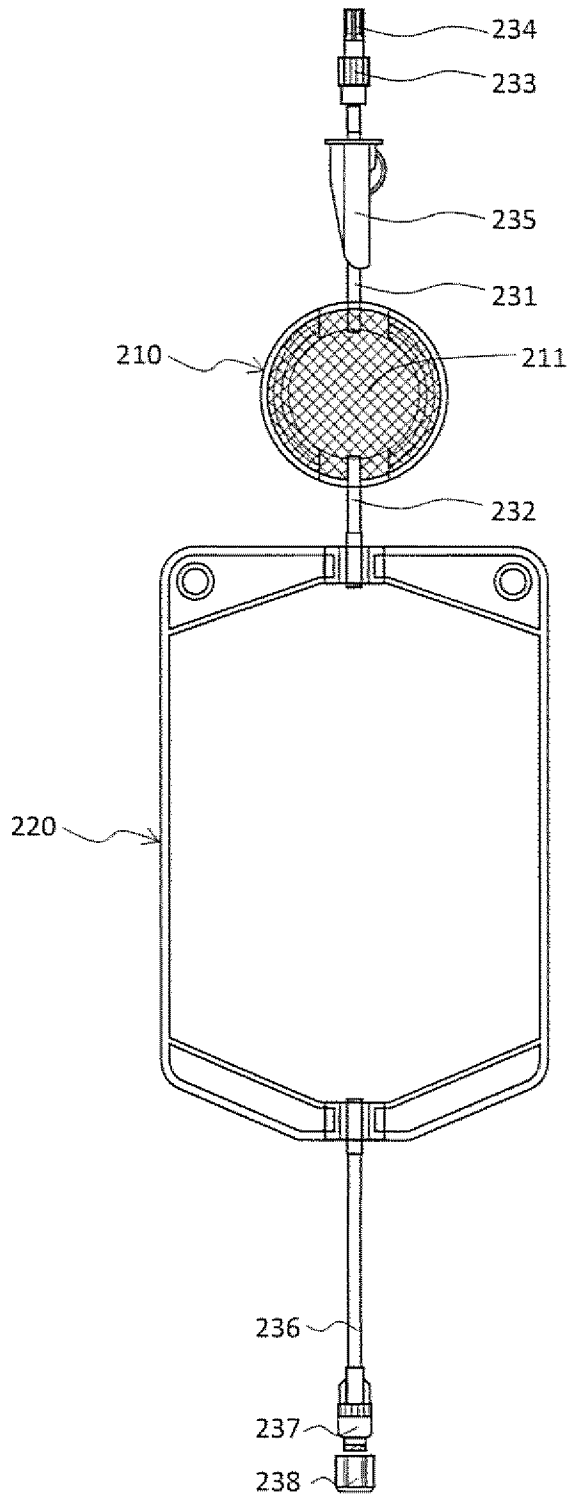
(C)



(F)



[図3]



200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/034815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl. C12N5/077 (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. C12N5/077

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/MEDLINE/MEBASE/Biosis (STN), WPIDS/WPIX (STN)
 Japio/GPG/FX AGRICOLA (STN) PSTA (STN) TOXSENTA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-289076 A (KANEKA CORP.) 08 November 2007, claims, paragraphs [0010]-[0019], [0038], examples (Family: none)	1-7
A	JP 2007-185157 A (KANEKA CORP.) 26 July 2007, examples (Family: none)	1-7
A	JP 2011-010583 A (KANEKA CORP.) 20 January 2011, claims, paragraph [0029] (Family: none)	1-7

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

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

Date of the actual completion of the international search 27 November 2018 (27.11.2018)	Date of mailing of the international search report 04 December 2018 (04.12.2018)
--	---

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/034815

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/111386 A1 (KANEKA CORP.) 15 September 2011, claims (Family: none)	1-7
A	JP 2015-519067 A (ZHENG, Chong) 09 July 2015, paragraph [0060] & US 2015/0068959 A1: paragraph [0084] & WO 2014/089838 A1 & EP 2933326 A1	1-7
A	中山享之, 加藤栄史, 脂肪組織由来間葉系幹細胞を利用した細胞療法-現状と展望-, Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, 2013, vol. 59, no. 3, pp. 450-456, fig. 2, (NAKAYAMA, Takayuki, KATO, Hidefumi, "CELL THERAPY USING ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS : CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES")	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/077(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. C12N5/077

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), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), Japio-GPG/FX, AGRICOLA (STN), FSTA (STN), TOXCENTER (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	JP 2007-289076 A (株式会社カネカ) 2007.11.08, 特許請求の範囲、 0010-0019、0038、実施例 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 2007-185157 A (株式会社カネカ) 2007.07.26, 実施例 (ファミ リなし)	1-7
A	JP 2011-010583 A (株式会社カネカ) 2011.01.20, 特許請求の範囲、 0029 (ファミリーなし)	1-7

☑ 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

27.11.2018

国際調査報告の発送日

04.12.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

太田 雄三

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3959

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
A	WO 2011/111386 A1 (株式会社カネカ) 2011.09.15, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 2015-519067 A (ZHENG Chong) 2015.07.09, 006 O & US 2015/0068959 A1:[0084] & WO 2014/089838 A1 & EP 2933326 A1	1-7
A	中山亨之, 加藤栄史, 脂肪組織由来間葉系幹細胞を利用した細胞療法—現状と展望—, Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, 2013, Vol. 59, No. 3, p. 450-456, Fig. 2	1-7