

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7631423号
(P7631423)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
C 1 2 M	1/33 (2006.01)	C 1 2 M	1/33	
C 1 2 N	5/0775(2010.01)	C 1 2 N	5/0775	
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	D
請求項の数 21 (全45頁)				
(21)出願番号	特願2023-100150(P2023-100150)	(73)特許権者	518329365	
(22)出願日	令和5年6月19日(2023.6.19)		シノヴァ ライフ サイエンシーズ, イン	
(62)分割の表示	特願2021-163876(P2021-163876)		コーポレイテッド	
	)の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1	
原出願日	平成29年3月17日(2017.3.17)		8 0 1, アルハンブラ, ノース ブシュ	
(65)公開番号	特開2023-116738(P2023-116738		ネル アヴェニュー 3 1 2	
	A)	(74)代理人	100092783	
(43)公開日	令和5年8月22日(2023.8.22)		弁理士 小林 浩	
審査請求日	令和5年6月20日(2023.6.20)	(74)代理人	100120134	
(31)優先権主張番号	62/309,774		弁理士 大森 規雄	
(32)優先日	平成28年3月17日(2016.3.17)	(74)代理人	100126354	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 藤田 尚	
		(72)発明者	チ, ジョン	
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1	
			8 0 1, アルハンブラ ノース ブシュ	
			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)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織を分解する方法であって、
組織のサンプルを組織プロセッシング装置のプロセッシング容器に入れるステップ；な
らびに
前記組織のサンプルを、機械的衝撃および剪断力からの力に供し、前記組織を以下：
複数の細胞群；
複数の細胞群および複数の個々の細胞；または
複数の個々の細胞；
に分解するステップを含み、
前記機械的衝撃は、最大30,000rpmの速度で上下に関節運動することによって
前記容器と物理的に接触するインパクトアームによって生成され、
前記インパクトアームは、前記組織には物理的に接触しない、方法。

【請求項2】

前記プロセッシング装置が、
前記プロセッシング容器が取り付けられたプラットフォーム、および
前記インパクトアームの前記上下の関節運動を駆動する可変速モーターを備える、請求
項1に記載の方法。

【請求項3】

前記モーターが、前記インパクトアームの前記上下の関節運動を3,000rpmから

30,000rpmの速度で駆動するように調整可能な可変速モーターである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記機械的衝撃および剪断力が、前記組織を複数の細胞群および複数の個々の細胞に分解し；および

前記方法が、前記複数の細胞群から前記複数の個々の細胞を単離するステップをさらに含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記単離するステップが、濾過および／または遠心分離によって行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記単離するステップが30分以下で行われる、請求項4または5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記組織が、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、松果体組織、下垂体組織、甲状腺組織、副腎組織、膵臓組織、卵巣組織、および精巣組織から選択される、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記組織が脂肪組織であり、前記複数の細胞群が脂肪組織および細胞を含み、前記複数の個々の細胞が脂肪由来細胞を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記プラットフォームが3方向の平面で移動可能である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記プロセッシング容器がバッグであり、

前記バッグは、前記バッグの内部と流体連通している1つまたは複数の出口を備え、および／または

前記バッグは、前記バッグの内部と流体連通している入口を備える、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

第1の組織から細胞を単離する方法であって、

前記第1の組織のサンプルを組織プロセッシング装置のプロセッシング容器に入れるステップ；および

前記第1の組織のサンプルを、機械的衝撃および剪断力からの力に供し、前記組織を以下：

複数の細胞群；

複数の細胞群および複数の個々の細胞；または

複数の個々の細胞；

に分解するステップを含み、

前記機械的衝撃は、最大30,000rpmの速度で上下に関節運動することによって前記容器と物理的に接触するインパクトアームによって生成され、

前記インパクトアームは、第1の組織と物理的に接触しない、方法。

【請求項12】

前記プロセッシング装置が、

前記プロセッシング容器が取り付けられるプラットフォーム、および

前記インパクトアームの前記上下の関節運動を駆動する可変速モーターを備える、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

10

20

30

40

50

前記モーターが、前記インパクトアームの前記上下の関節運動を 3,000rpm～30,000rpm の速度で駆動するように調節可能な可変速モーターである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

濾過、

遠心分離、

前記組織を水層から分離させるステップであって、前記水層が前記細胞を含む、ステップ、または

前記のいずれかの組み合わせ、

によって前記細胞を単離することをさらに含む、請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記単離することが 30 分以下で行われる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

第 1 の組織が、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、松果体組織、下垂体組織、甲状腺組織、副腎組織、膵臓組織、卵巣組織、および精巣組織から選択される、請求項 11 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記細胞が幹細胞であり、前記方法が、第 2 の組織構造および／または器官構造に成長させるための組織スキャフォールドに前記幹細胞を播種するステップをさらに含む、請求項 14 または請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 18】

第 2 の組織構造が、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、松果体組織、下垂体組織、甲状腺組織、副腎組織、膵臓組織、卵巣組織、および精巣組織ならびにそれらの組合せから選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記器官構造が、心臓、筋肉、骨、軟骨、肝臓、および腎臓から選択される、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記細胞が幹細胞であり、前記方法が、前記幹細胞を人工多能性幹細胞に形質転換するステップをさらに含む、請求項 11 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記幹細胞に 1 つ以上の多能性転写因子を発現させることにより、形質転換が起こる、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【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】

50

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、骨髓、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。

10

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ない、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】

20

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。

30

【発明の概要】

【0006】

40

本開示は以下の「1」から「33」を含む。

「1」細胞画分を組織サンプルから単離する方法であって、上記方法は、

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、上記組織サンプルを接触させるステップと、

上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、

上記衝撃波および／または上記機械的衝撃からの上記力の供給源は、上記組織サンプルと物理的な接触をしない、方法。

50

〔２〕上記組織は、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、上記〔１〕に記載の方法。

〔３〕上記組織は脂肪組織である、上記〔１〕または上記〔２〕に記載の方法。

〔４〕上記組織サンプルは、衝撃波と接触させられ、上記衝撃波の上記供給源は、衝撃波発生器によって動力を与えられる衝撃波アプリーターである、上記〔１〕から〔３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５〕上記組織サンプルは、機械的衝撃からの力と接触させられ、上記機械的衝撃からの上記力の上記供給源は、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、上記〔１〕から〔３〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔６〕上記組織サンプルは、上記衝撃波および／または上記機械的衝撃からの上記力と接触する前に、１回または複数回洗浄される、上記〔１〕から〔５〕のいずれか一項に記載の方法。

〔７〕上記衝撃波は、上記組織サンプルを、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、上記〔１〕から〔４〕または〔６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔８〕上記機械的衝撃からの上記力は、上記組織サンプルを、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、上記〔１〕から〔３〕、〔５〕または〔６〕のいずれか一項に記載の方法。

20

〔９〕上記細胞画分は、上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、上記細胞画分の単離は、遠心分離によって行われる、上記〔７〕または上記〔８〕に記載の方法。

〔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、上記〔９〕に記載の方法。

〔１１〕遠心分離は、１０分間１，２００ｇで行われる、上記〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕上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、上記〔９〕から〔１１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１３〕上記細胞画分は、３０分以内に単離される、上記〔１〕から〔３〕、〔５〕、〔６〕または〔８〕から〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。

30

〔１４〕幹細胞を脂肪組織から単離する方法であって、上記方法は、対象から脂肪組織サンプルを取得するステップと、

上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、

上記組織サンプルを機械的衝撃からの力にさらし、上記幹細胞を解放するステップと、

上記脂肪組織から幹細胞画分を分離するステップと、

上記幹細胞画分を遠心分離するステップと、

を含み、

上記機械的衝撃からの上記力の供給源は、上記脂肪組織に物理的に接触しない、方法。

〔１５〕上記脂肪組織は、上記機械的衝撃からの上記力にさらされる前に、１回または複数回洗浄される、上記〔１４〕に記載の方法。

40

〔１６〕上記機械的衝撃の上記力の上記供給源は、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、上記モーターは、ギヤリングを含み、上記ギヤリングは、上記モーターが全速力で動作しているときに、上記インパクトアームの上記速度を低減させることができる、上記〔１４〕または上記〔１５〕に記載の方法。

〔１７〕上記機械的衝撃からの上記力は、上記容器またはカートリッジの壁部を通して上記脂肪組織へ送達される、上記〔１４〕または上記〔１５〕に記載の方法。

〔１８〕上記ギヤリングは、上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、上記〔１５〕から〔１７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１９〕上記モーターは、０．７５インチのギヤ直径を含み、３，０００rpmのモータ

50

一速度において、上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、上記[16]から[18]のいずれか一項に記載の方法。

[20] 幹細胞画分を分離するステップは、上記脂肪組織が、水性層から分離することを可能にするステップを含み、上記水性層は、上記幹細胞を含む、上記[14]から[19]のいずれか一項に記載の方法。

[21] 上記幹細胞は、30分以内に上記脂肪組織から単離される、上記[14]から[20]のいずれか一項に記載の方法。

[22] 遠心分離は、3分から10分間、500gから1,600gで行われる、上記[14]から[21]のいずれか一項に記載の方法。

[23] 幹細胞を脂肪組織から単離する方法であって、上記方法は、対象から脂肪組織サンプルを取得するステップと、

上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、

上記組織サンプルを衝撃波にさらし、上記幹細胞を解放するステップと、

上記脂肪組織から幹細胞画分を分離するステップと、

上記幹細胞画分を遠心分離するステップと、

を含み、

上記衝撃波の供給源は、上記脂肪組織に物理的に接触しない、方法。

[24] 上記脂肪組織は、上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、上記[23]に記載の方法。

[25] 上記衝撃波の上記供給源は、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、上記[23]または上記[24]に記載の方法。

[26] 上記衝撃波は、上記容器またはカートリッジの壁部を通して上記脂肪組織へ送達される、上記[23]から[25]のいずれか一項に記載の方法。

[27] 上記脂肪組織は、0.5barから5.0barのパワーを有する衝撃波にさらされる、上記[23]から[26]のいずれか一項に記載の方法。

[28] 上記容器は、0.25mm厚の壁部を有するビニールバッグであり、上記脂肪組織は、2.0barから2.5barのパワーを有する衝撃波にさらされる、上記[23]から[27]のいずれか一項に記載の方法。

[29] 任意の1つの時点において上記衝撃波にさらされる上記脂肪組織の合計面積は、 1 cm^2 から 100 cm^2 の範囲にある、上記[23]から[28]のいずれか一項に記載の方法。

[30] 上記容器は、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、上記脂肪組織サンプルの合計量は、30ccであり、任意の1つの時点において上記衝撃波にさらされる上記脂肪組織の合計面積は、 5 cm^2 である、上記[23]に記載の方法。

[31] 上記脂肪組織は、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、上記[23]から[30]のいずれか一項に記載の方法。

[32] 幹細胞画分を分離するステップは、上記脂肪組織が、水性層から分離することを可能にするステップを含み、上記水性層は、上記幹細胞を含む、上記[23]から[31]のいずれか一項に記載の方法。

[33] 遠心分離は、3分から10分間、500gから1,600gで行われる、上記[23]から[32]のいずれか一項に記載の方法。

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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【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。

20

【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アケーターである。

30

【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。

40

【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。

50

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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ーケーターである。

【0034】

50

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、0.5 bar から 5.0 bar 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、0.25 mm 厚の壁部を有するビニールバッグであり、脂肪組織は、2.0 bar から 2.5 bar 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、1 cm² から 100 cm² の範囲にある。

10

【0038】

いくつかの実施形態では、容器は、0.25 mm 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、30 cc 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、5 cm² 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。

20

【0041】

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

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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つ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ら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。

20

【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、碎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碎し、その後、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。

30

【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。

40

【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

50

一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、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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攪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。

10

【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。

20

【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。

30

40

【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

50

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

10

20

30

40

50

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。

10

20

【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。

30

【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。

40

【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】

50

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）。

10

【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。

20

【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ションャー215を収容している。衝撃波アプリケーションャー215は、アプリケーションャ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。アプリケーションャープラットフォーム220および衝撃波アプリケーションャー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、衝撃波アプリケーションャー215が、決して、脂質と直接的に接触した状態に置かれなくなっている。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、衝撃波アプリケーションャー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、衝撃波アプリケーションャー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。

30

【0092】

アプリケーションャープラットフォーム220の移動、ひいては、衝撃波アプリケーションャー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、アプリケーションャープラットフォーム220および衝撃波アプリケーションャー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v6ボードによって制御される。いくつか

40

50

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。

10

【0093】

アプリケーションプラットフォーム220および衝撃波アプリケーション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對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、衝撃波アプリケーション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。

20

【0095】

衝撃波アプリケーション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、衝撃波アプリケーション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. 9 Yi, Lane 2, Suid Road, Shanghai, 200331, China 製の BS-SWT2X である。

30

【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、0.5 bar から 5.0 bar 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、1.0 bar から 4.5 bar 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、1.5 bar から 4.0 bar 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、2.0 bar から 3.5 bar の範囲にある。いくつかの実施形態では、容器205は、0.25 mm 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、2.0 bar から 2.5 bar の範囲にある。

40

【0097】

衝撃波アプリケーション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。衝撃波アプリケーション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

50

施形態では、衝撃波アプリーター 215 によってカバーされる合計面積は、 1 cm^2 から 100 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 90 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 80 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 70 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 60 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 50 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 40 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 30 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 20 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 10 cm^2 の範囲にあり、いくつかの実施形態では、 1 cm^2 から 5 cm^2 の範囲にある。いくつかの実施形態では、衝撃波アプリーター 215 によってカバーされる合計面積は、 5 cm^2 である。

10

【0098】

1つの実施形態では、容器 205 は、 0.25 mm 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、 30 cc であり、および、随意的な追加の 30 mL 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、およそ 5 cm^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。

20

【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。衝撃波アプリーター 215 の上の 5 cm^2 のアプリ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。

30

【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、機械的な攪拌にさらされる。いくつかの実施形態では、機械的な攪拌は振ることである。いくつかの実施形態では、機械的な攪拌は、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、およそ 10 秒である。攪拌は、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。

40

【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

50

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、40 μm から100 μm 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、70 μm 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500 gから1,600 g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1,200 g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、1 mLから5 mL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、スカフフォールド、フィブリン、グルー、または、前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ます。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フ

10

20

30

40

50

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ことによって、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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、脂質組織を粉碎し、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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、40 μm から 100 μm 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、70 μm 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。

10

【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500 gから1,600 g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1,200 gでの遠心分離によって濃縮される。

20

【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、1 mL から 5 mL 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。

30

【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ます。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ことによって、人工多能性幹細胞へと変換される。

40

【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。

50

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、リボ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、リボ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、リボ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 1 x 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ことによって、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、1 mL から 50 mL の範囲にある容量、いくつかの実施形態では、0.5 mL から 20 mL の範囲にある容量、およびいくつかの実施形態では、250 μ L から 2.0 mL 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し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、流体が弁を通して流れることを引き起こす。プ

10

20

30

40

50

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

E S W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、機械的に攪拌される。

【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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【0211】

除去の間に、40 μm 、70 μm 、または100 μm 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1,200 gで遠心分離する。

20

【0214】

随意的に：1 mL 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°C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、1 mL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）破碎のものとを比較することであった。

30

【0218】

材料：

1,500 mLの1xリン酸緩衝生理食塩水（PBS）

35 mLの1x赤血球（RBC）溶解バッファー

200 mL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15 mLの10%ウシ胎児血清（FBS）

40

【0219】

方法：

コントロール

おおよそ250 mLの脂肪吸引物が、無菌の60 mLカテーテルを使用して、100 mL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

50

それぞれの洗浄に関して、無菌の1 x P B S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10 mLセロロジカルピペットが使用され、45 mLの下澄みを、第4の最終的な洗浄液から、3つの無菌の50 mL円錐形状のチューブの中へ、40 μ m、70 μ m、および100 μ mチューブ無菌フィルターを通して移送した。合計で135 mL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

200 mLの脂肪吸引物が、無菌の500 mLガラスボトルの中へ堆積させられた。200 mL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、軽く攪拌された。

【0224】

次いで、ボトルは、37°C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、最後にもう一回攪拌され、水槽から除去された。

【0225】

ボトルの外部は、70% E T O H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10 mLセロロジカルピペットが使用され、3つの無菌の50 mL円錐形状のチューブの中へ、40 μ m、70 μ m、および100 μ m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135 mLの下澄みが移送された。バランスのために45 mL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°Cにおいて1,200 g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% E T O H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。25 mLセロロジカルピペットを使用して、5 mLの10% F B Sが、それぞれのチューブの中へディスプレイされ、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。F B S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°Cにおいて1,200 gで遠心分離された。遠心チューブの外部は、70% E T O H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】

E S Wプロセッシング

200 mLの脂肪吸引物が、無菌の60 mL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500 mLレッグカテーテルバッグの中へ移送された。無菌の1 x P B Sが、200 mL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400 mLであった。およそ2 mL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、2 b a rおよび21 H zにおいて、およそ10,000 E S W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10,000 E S W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% E T O Hによってクリーニングされ、それが、ヒュー

10

20

30

40

50

ムフードの中へ置かれた。

【0230】

バッグが攪拌され、500 mL 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10 mL 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50 mL 円錐形状のチューブの中へ、40 μ m、70 μ m、および100 μ m チューブ無菌フィルターを通して移送された。合計で135 mL 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、1,200 g および37°C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、5 mL の1 x RBC 溶解バッファが、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°C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。25 mL の無菌の1 x PBS が、溶解バッファ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】

細胞カウティング

無菌のマикроピペットチップを使用して、300 μ L の無菌の1 x PBS が、6つの無菌の0.5 mL マicro遠心チューブの中へ移送された。また、75 μ L のそれぞれの50 mL サンプルチューブが、細胞カウティングのために、それぞれのマicro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、100 μ L のトリパンブルーが、それぞれのマicro遠心チューブに追加され、10 μ L 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】

10

20

30

40

50

【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

【 0 2 3 7 】

10

20

30

40

50

【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

【 0 2 3 8 】

10

20

30

40

50

【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】

10

20

30

40

50

【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
O	100	4	5	4	4	17	300	75	4	6800 00	
O	40	0	0	1	2	3	300	75	4	1200 00	
O	70	0	0	0	0	0	300	75	4	0	
E	100	8	5	11	9	33	300	75	4	1320 000	1.94
E	40	3	1	2	3	9	300	75	4	3600 00	3.00
E	70	2	1	2	3	8	300	75	4	3200 00	#DIV /0!
O	100	10	11	10	13	44	300	75	4	1760 000	
O	40	18	13	12	12	55	300	75	4	2200 000	
O	70	10	14	1	9	34	300	75	4	1360 000	
C	100	27	36	35	27	125	300	75	4	5000 000	2.84
C	40	13	16	19	23	71	300	75	4	2840 000	1.29
C	70	15	22	22	31	90	300	75	4	3600 000	2.65
O	100	3	1	2	0	6	300	75	4	2400 00	
O	40	2	3	4	2	11	300	75	4	4400 00	
O	70	2	4	2	1	9	300	75	4	3600 00	
E	100	20	6	16	12	54	300	75	4	2160 000	9.00
E	40	19	22	28	24	93	300	75	4	3720 000	8.45
E	70	3	4	5	4	16	300	75	4	6400 00	1.78

【 0 2 4 1 】

概要

M o x i Z 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 E S W 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。

【 0 2 4 2 】

10

20

30

40

【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

10

【0 2 4 3】

コラゲナーゼは、一貫して、約 3.8×10^5 細胞数/mL を作り出した。E S W は、 1.67×10^5 から 7.08×10^5 細胞数/mL の範囲にあった。

【0 2 4 4】

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、E S W 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。

【0 2 4 5】

議論

20

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、E S W 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、E S W 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、E S W は、 4.32×10^5 のコラゲナーゼピークと比較して 7.08×10^5 の細胞収率を作り出し、それは、164% の収率の増加であった。

【0 2 4 6】

上記に提示されているデータを所与として、50 cc から 60 cc の脂肪吸引物のサンプルが、E S W 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。

30

【0 2 4 7】

したがって、幹細胞を脂肪組織から遊離させるために E S W を使用するという事は、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】

【0 2 4 8】

- 2 0 0 プロセッシング装置
- 2 0 5 プロセッシング容器またはカートリッジ
- 2 1 0 プラットフォーム
- 2 1 5 衝撃波アプリーケーター
- 2 2 0 アプリーケータープラットフォーム
- 2 2 5 モーターコントローラー
- 2 3 0 X 平面モーター
- 2 3 5 Y 平面モーター
- 2 4 0 Z 平面モーター
- 2 4 5 衝撃波発生器
- 3 0 0 プロセッシング装置
- 3 0 5 モーター
- 3 1 0 インパクトアーム
- 3 1 5 プラットフォーム

40

50

4 0 0	カートリッジ	
4 0 5	脂肪チャンバー	
4 1 0	第 1 の一方向弁	
4 1 5	流体リザーバー	
4 2 0	第 2 の一方向弁	
4 2 5	外部アクチュエーター	
4 3 0	第 1 のプランジャー	
4 3 5	細胞リザーバー	
4 4 0	第 3 の一方向弁	
4 4 5	第 2 の外部アクチュエーター	10
4 5 0	第 2 のプランジャー	
4 5 5	第 4 の一方向弁	
4 6 0	遠心チューブ	
5 0 0	カートリッジ	
5 0 5	脂肪チャンバー	
5 1 0	第 1 の一方向弁	
5 1 5	流体リザーバー	
5 2 0	第 2 の一方向弁	
5 2 5	外部アクチュエーター	
5 3 0	第 1 のプランジャー	20
5 3 5	細胞リザーバー	
5 4 0	第 3 の一方向弁	
5 4 5	第 2 の外部アクチュエーター	
5 5 0	第 2 のプランジャー	
5 5 5	第 4 の一方向弁	
5 6 0	遠心分離コンポーネント	
5 6 5	アクセスポート	

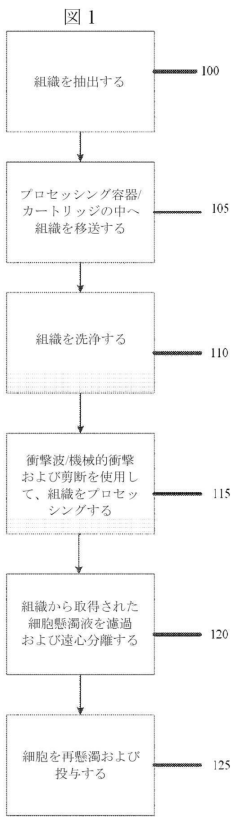
30

40

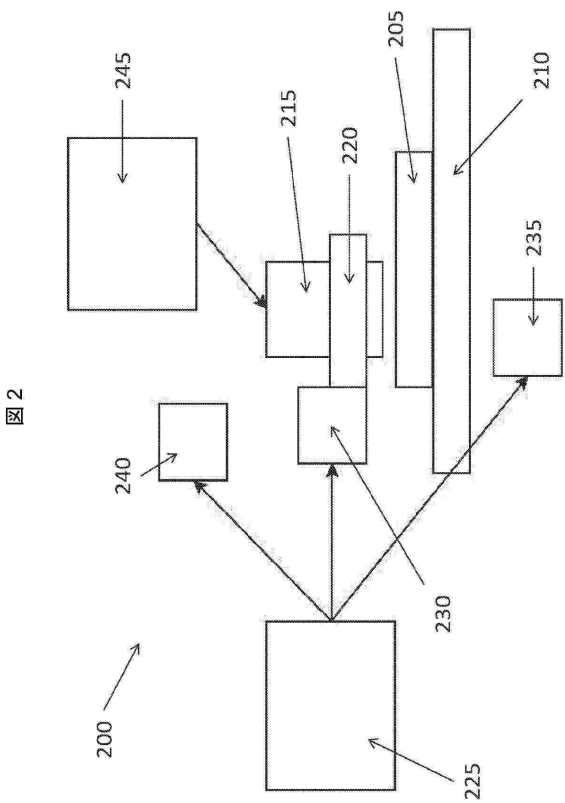
50

【図面】

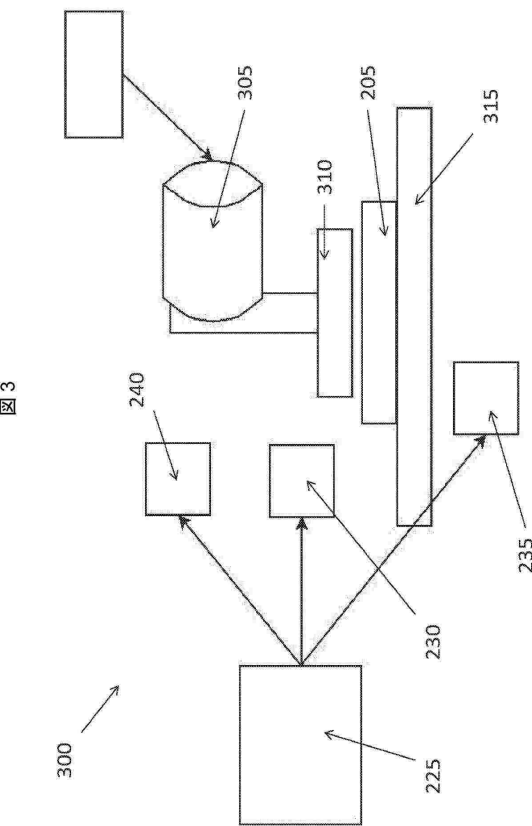
【図 1】



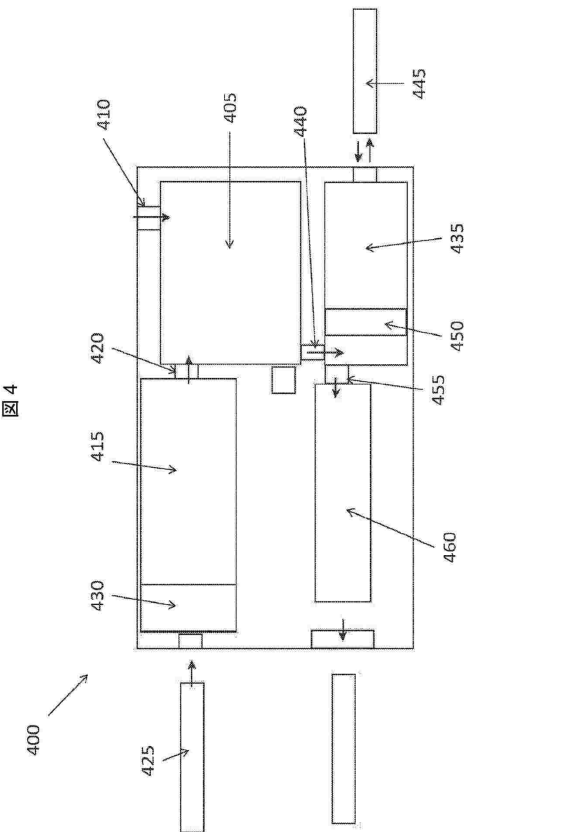
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

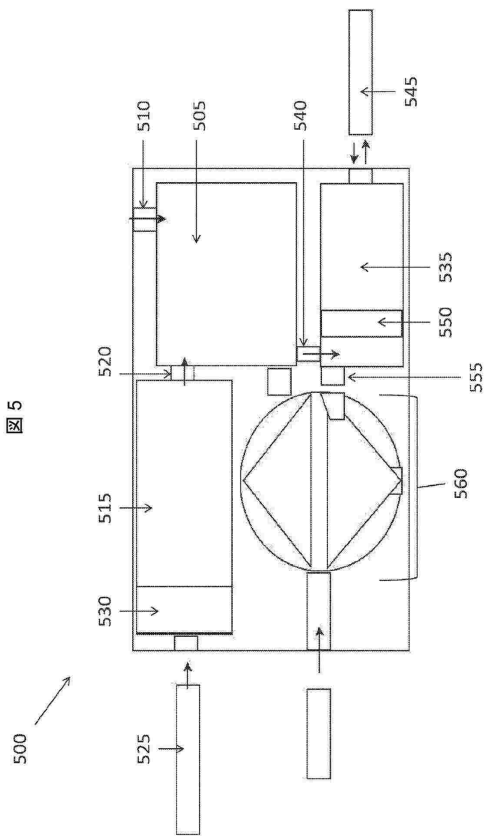
20

30

40

50

【図 5】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- ル アヴェニュー 312 シノヴァ ライフ サイエンスーズ, 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 サイエンスーズ, 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 サイエンスーズ, 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 サイエンスーズ, インコーポレイテッド内
審査官 松田 芳子
(56)参考文献 特開2016-028614 (JP, A)
特開昭61-230957 (JP, A)
米国特許出願公開第2006/0051865 (US, A1)
米国特許出願公開第2011/0034832 (US, A1)
米国特許出願公開第2009/0169642 (US, A1)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 5/00
C12M 1/00
CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)