

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3985185号
(P3985185)

(45) 発行日 平成19年10月3日(2007. 10. 3)

(24) 登録日 平成19年7月20日(2007. 7. 20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A
B 0 4 B 5/04 (2006. 01)	B 0 4 B 5/04
B 0 4 B 7/02 (2006. 01)	B 0 4 B 7/02
C 1 2 N 5/06 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 E
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48 M

請求項の数 2 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2000-519286 (P2000-519286)	(73) 特許権者	500188978
(86) (22) 出願日	平成10年10月29日(1998. 10. 29)		シター・ジャムマリア
(65) 公表番号	特表2001-521755 (P2001-521755A)		イタリア国、27012 チェルトサ デ
(43) 公表日	平成13年11月13日(2001. 11. 13)		イ パヴィア、コロソ パルティジアニ、
(86) 国際出願番号	PCT/EP1998/006865		32
(87) 国際公開番号	W01999/023471	(74) 代理人	100065385
(87) 国際公開日	平成11年5月14日(1999. 5. 14)		弁理士 山下 穰平
審査請求日	平成17年10月28日(2005. 10. 28)	(72) 発明者	シター・ジャムマリア
(31) 優先権主張番号	M197A002457		イタリア国、27012 チェルトサ デ
(32) 優先日	平成9年10月31日(1997. 10. 31)		イ パヴィア、コロソ パルティジアニ、
(33) 優先権主張国	イタリア(IT)		32
		審査官	斎藤 真由美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人又は動物の細胞を含む細胞分散液から密度の異なるこれらの細胞を分離する装置と方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

底部(3)と頂部を有しており且つ、その一端が前記底部に近いチャンバーの内部に開き又他端が加圧された液源に連結可能である第一導管(4)と、その一端が装置頂部に対応する高さで同じチャンバーに開いていて同じく他端が前記装置の外側のチューブ(8)に開いている第二導管(7)を少なくとも含む装置の底部から頂部に向かって断面積が減少している細長い前記チャンバー(2)を含んでおり、その一端が前記チャンバーの長さの中間の高さで開き他端が装置から外部に開いている少なくとも一つの付加的導管(9)があること及び前記底部の近くに前記第一導管から流入してきた流体を前記チャンバー(2)の全断面にわたって均等に分散させるために流れ偏向管(11)が装備される点の特徴とする、人又は動物の細胞が含まれている細胞分散液から密度の異なるこれらの細胞を分離する装置。

【請求項 2】

先ず第一に、密度が装置の底部(3)の近くの最大値から頂部付近の最小値まで変化する液体で予め満たされた分離装置(1)のチャンバー(2)内に細胞集団の分散液が導入され、そして細胞分散液の入った装置は異なった密度を持つ別個の分画中に細胞を分配させるため遠心分離に掛けられる、人又は動物の細胞を含む細胞分散液から異なった密度を持つこれらの細胞の分離方法において、分離された分画の回収が分離装置の底部に非常に濃密な水に混じらない液体を導入することによって行われ、その間チャンバー内の層を成した細胞の分画が圧縮されて前記チャンバーの中間の高さで少なくとも一つの導管(9)

10

20

の端部を通して押出されるように、装置の頂部に前記非常に濃密な液体と同じ圧力で導管(7)を通して同時に気体をポンプで入れることを特徴としている上記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は生体細胞を含む分散液から異なった密度の生体細胞集団の効率的で急速な分離を可能にする装置と方法に関するもので、前記装置は装置の底部から頂部に向って断面積が減少する細長いチャンバーより成っており、又前記方法は密度が装置の底部近くの最大値から頂部近くの最小値まで変化する液体で予め満たされた装置の前記チャンバー内への細胞集団の分散液の導入、細胞分散液の入った装置を遠心分離法に掛けること、及び分離装置の底部に非常に濃密な水に混じらない液体を導入しその間チャンバー内の層を成した細胞の分画が前記チャンバーの長さの中間の高さに位置する少なくとも一つの孔を通して排出されるように、装置の頂部に前記非常に濃密な液体と同じ圧力で同時に気体を入れることにより分離された分画を捕集することより成っている。

10

【0002】

(背景技術)

本発明は細胞の分散液中に存在する細胞集団から密度の異なる人又は動物の細胞分画を分離する装置と方法の両方に関する。

【0003】

人又は動物の細胞は異なった密度(一般に 1.04 g/cm^3 と 1.1 g/cm^3 の間)を持ち又各細胞のタイプ毎にそれ自身特有の密度を持つことが知られている。

20

【0004】

細胞の不均質な集団の分散液から同じタイプの可能な濃縮又は精製のために異なった細胞タイプを分離することが屡々重要であり又必要となることも又知られている。このことは正常細胞及び新形成の集団の両者に関する生化学及び機能分析を可能にする基本である。

【0005】

より精密でより注意深い異なった密度の細胞の分離、及びより迅速な分離操作で得られた資料は実行手順に伴う利益と共に等しく良好で有用であるだろう。

【0006】

例えば、あるタイプの細胞が極微量血液又は人の組織内に存在することを考慮するならば、これらの効果的で迅速な同定から、化学的、生化学的又は医学的干渉の可能性、さもなければ不可能性又は仮説に過ぎなかったことなどが出てくることは明らかである。

30

【0007】

現在最も進んだ細胞分離技術では内部に空洞を持つケーシングより成っている分離装置を使用する。空洞は端部又は底部の近くで最大の断面積を持ちそこからのチューブ又はダクトの端部は蠕動ポンプに連結可能であり、先細になった表面により横に限界が定められる。空洞は出口の孔を持つケーシングの反対端又は頂部に向って先細になっている。最初に、液体が蠕動ポンプと勾配ミキサーを用いて分離装置の空洞底部に導入される。液体の密度は空洞内の液体の量がそれが充填されるまで増加するにつれて緩やかに増加する。斯くして、分離装置の空洞は装置空洞の頂部から底部まで密度が増加して、實際上逐次連続した液層を為している液体で満たされる。この時点で、液体の供給は中止されそして密度によって均質な細胞分画の中に分離されるべき細胞集団の分散液が上部空洞部分が満たされるまで頂部の孔を通して導入される：分散液の導入と同時に、最初に導入された液体の対応する量が分離装置底部から流出させられ、従って細胞集団分散液は装置空洞内に沈降できる。

40

【0008】

そこで分離装置は遠心分離の間、分離装置の軸とその頂部近傍に垂直な回転軸を持つ遠心分離機内に封じられる。遠心分離機内では、非常に大きな力が装置内に封じられた液体に伝達され(例えば 400 g)、その結果液体中の細胞集団分散液の分配は密度の異なっている細胞の帯(又は層)の形になる。

50

【0009】

そこで分離装置は遠心分離機から取外されそして非常に濃密な水に混じらない液体が後述のように分画された細胞分散液を（同装置の頂部にある孔から）排除しながら底部に導入される：増加する密度勾配を持つ望ましい数（例えば10又は12）の別個の分散液分画が分離装置の頂部を通して抽出される、細胞は隣接する分画とは異なる密度を持っている各分画中に存在する。

【0010】

上記の簡潔に要約した装置と方法論は、Giammaria Sitar and Piermaria Fomasari 社による H A E M A T O L O G I C A（血液学）、V o l . 7 4 , N 1 , 1 月 - 2 月 , 1 9 8 9 ; 及び Pretlow II T G と Pretlow T P 版による 細胞分離：方法と選ばれた応用、
10 ニューヨーク、アカデミックプレス社、1982（5巻）により詳しく述べられている。

【0011】

然し、上記の異なった分離された細胞分画の回収システムはその限界を有していて或種の
厳しい問題が存在する。事実、異なって続く細胞分画の捕集は装置の底部においてポンプ
される濃密液体の押上げの下、分離装置頂部における小さな孔を通して行われる。これは
細胞密度が異なる異なった隣接層の中に流体力学的擾乱を引き起こす、そして又異なった
密度の細胞が捕集又は分配される層又は帯の（現場技術者には周知の）広域化を引き起し、
主に均質な密度であって帯毎に異なっている細胞が捕集される帯を分離している液体層
の収縮を結果として生じ、それは遠心分離の間に分離された種々の細胞分画の再混合さえ
招き得る。この現象はより困難で且つ受容れ難い、細胞が捕集された帯の狭隘化、及び細胞
20 を互いに分離している距離の縮小化である。

【0012】

これらの問題を解決し最小にするために、分離装置の底部に加圧された液体が極めてゆっ
くりと導入される、然し事実は異なった細胞分画の捕集には長くて受容れ難い時間が必要
であった。既述の Giammaria Sitar and Piemaria Fomasari社の出版物；及び T U L P ,
A n a l . B i o c h e m . 1 9 8 1 , V o l . 1 1 7 , ページ 3 5 4 - 3 6 5 を参照。

【0013】

（発明の開示）

本発明の主な目的は遠心分離後装置内に分離された細胞の分画の容易且つ非常に明確な捕
集を可能にする装置と方法を見出すことにある。
30

【0014】

もう一つの目的は有用な資料、さもなければ無用と証明されるであろう資料の可能な捕集
を為して、現在可能なものよりも短い時間で種々の細胞分画の回収を可能にすることに
ある。

【0015】

上記の目的その他は断面積が底部から装置の頂部に向って減少する細長いチャンバーを含
んでいる底部と頂部を持つ分離装置により満たされ、チャンバーは少なくともその一端が
前記底部近くの前記チャンバーの内部に開き他端が加圧された液源に連結可能である第一
導管と、その一端が装置頂部に対応している同じチャンバー内に開いている第二導管を含
んでおり、前記装置にはその一端が前記チャンバーの縦に沿って開き他端が装置の外部に
40 開いている少なくとも一つの付加的導管があることにより特徴付けられる。

【0016】

本発明は又、先ず第一に細胞集団の分散液が密度が装置底部付近の最大値から頂部付近の
最小値まで変化する液体で予め満たされた分離装置チャンバー内に導入されるような、人
又は動物の細胞集団からの細胞分画の分離方法にも関する。そこで装置は細胞が異なった
密度を持つ別個の分画の中に分配するように遠心分離に掛けられる、その方法は分離され
た分画の回収が装置の底部に非常に濃密な水に混じらない液体を導入し同時に（非常に濃
密な液体と同じ供給圧力で）気体をポンプで入れて、従ってチャンバー内部の層になった
細胞分画が前記チャンバーの縦に沿った中間帯域に位置している少なくとも一つの孔を通
って排出されると云う事実によって特徴付けられる。
50

【 0 0 1 7 】

上記の方法を押し進めて分離装置内で成層して見出された細胞の帯は同じチャンバー内で遠心分離の後で（既知の方法で起こったような膨張の代りに）圧縮された、見方によれば種々の帯はどんな流体力学的擾乱を受けることなく、即ち細胞の帯はそれらの直に隣接したものと再混合することなく（同じチャンバーの横に設置された孔を通して）チャンバーから排出されて、きれいな方法で分離回収できたことが見出された。

【 0 0 1 8 】

上記の方法を押し進めることにより、種々の細胞分画が既知の技術によるよりも大きなスピードで、且つ細胞分画が既述のように混合されることなく分離回収できたことも確かめられた。

10

【 0 0 1 9 】

（発明を実施するための最良の形態）

装置の構造と発明の手順をよりはっきりするために、制限のない例として添付の図面を参照しながら可能性のある応用を今既述するであろう。

【 0 0 2 0 】

先ず第一に、空洞 2 を密封している、固着した底部 3 本体があるその底部（図面に関して）に向ってより大きな断面積を持つ実質的に円錐形の表面（点線）によって境界を定められた内部鐘形空洞 2 を持つ細長いケーシング 1 より作られた既知の構造の分離装置を図解した図 1 を参照する。ケーシング 1 はその上端からチューブ 5 が伸びて、その下端は適当な方法で、例えば一連のボルト（図示していない）又はねじ結合でケーシング 1 に固定されている底部 3 の中に配置された導管 6 を通って空洞 2 の内部に開いているダクト 4 と組合わされている。

20

【 0 0 2 1 】

本発明に従えば装置の底部近くに流れ偏向管 11 が内部チャンバー 2 の全断面にわたって導管 6 から流入する流体を均等に分散するために備えられる。

【 0 0 2 2 】

空洞 2 はチューブ 8 と空洞を繋いでいるダクト 7 により組合わされたケーシング 1 の頂部に向って先細りになっている。

【 0 0 2 3 】

図解された装置を使用したい時、空洞 2 はチューブ 5、ダクト 4 及び導管 6 を使って、それが空洞内に導入されるにつれて密度が徐々に増加する液体で、それが充満するまで既知の方法により充填される。

30

【 0 0 2 4 】

斯くして空洞 2 は実質的に装置の頂部から底部まで密度が増加している液体の逐次連続した層から作られた液体で満たされる。そこでチューブ 5 を通る液体の供給は停止されて、密度により均質な細胞分画の中に分離されるべき細胞集団分散液が空洞 2 に導入され、その間液体の対応する容積はチューブ 5 を通って引き抜かれる。

【 0 0 2 5 】

そこで分離装置は液体への細胞集団分散液の分配が異なった密度の細胞層の形で得られるまで高速遠心分離機の中に設置される。

40

【 0 0 2 6 】

この時点で、非常に濃密な水に混じらない液体がチューブ 5 を通って空洞 2 の中に導入され、増加する密度勾配の個別の細胞分散分画を望まれる数だけ捕集しながらチューブ 8 から既述の方法で分画された細胞分散液を排出させる。

【 0 0 2 7 】

図 1 に関する上述の個別の細胞分画の回収システムでは、チューブ 8 による異なっている細胞分画の排出が装置底部における導管 6 から出てくる濃密液体の押上げで、帯毎に異なる以外に均質な密度の細胞を捕集する帯を分離している液体層の周知の収縮又は薄層化を完全に伴って起きると云う（結果としての個別の帯の分離捕集の困難さ）厳しい問題が存在する。このことは遠心分離の間に分離された種々の細胞分画の解決困難で受容れ難い再

50

混合に通じ得る。

【0028】

上記問題を最小にするために、空洞2の底部における液体の導入は極度にゆっくりと行われる、それは現場技術者に知られている如く極端に困難な個別の細胞分画の回収に長時間を要することを意味する。

【0029】

図2から4までは本発明に従う分離装置を図解している。

【0030】

この分離装置は図1のそれに類似である：明確のために、図1で使われたのと同じ参照番号を各種部品を図示するのに図2から4でも採用した。

10

【0031】

図2から4の分離装置は、チューブ10が上端から伸びてその下端が縦に沿って空洞2の中間の内側に開いている二つの補助ダクト9がケーシング1に設置される（実際には、二つ以上又は一つでさえもあり得る）と云う事実で、図1のそれとは違っている。

【0032】

図2から4での装置の充填と遠心分離の手順は図1に関して既に述べたのでここでは繰り返さない。装置からの個別の分離された細胞分画の回収段階は大いに異なっている。

【0033】

事実、分離された分画の捕集は空洞2の底部における非序に濃密な水に混じらない液体の導入により起こる（既知の技術と同じ）、同時に濃密液体と同じ圧力で頂部にチューブ8を通して気体（例えば空気）をポンプで入れる、従って空洞2の中の層になった細胞分画は圧縮されてダクト9を通して押出される。

20

【0034】

上記方法を進めると、空洞2の中で層状になった個別の細胞の帯の回収は既知の技術で可能であったよりも遙かに高速で実行されるばかりでなく、帯は空洞2の中で圧縮され（既知の技術での膨張の代りに）又それ故にどんな流体力学的擾乱も受けることなく、即ちそれらの直に隣接している細胞の帯が再混合することなく、空洞2の外に排出されてきれいな方法で別々に捕集できるようなことも起こり、従って試験された細胞集団に最初に存在した種々の密度の細胞の明確で急速な区分化を可能とすることがわかった。

【0035】

装置の用法を例示するために、人の骨髄からの細胞集団の分離が一例として取上げられるであろう。

30

【0036】

人の骨髄は異なった密度を持つ種々の細胞集団を含み（“Haematologica”，1月-2月号1997参照）：幾つかの細胞のタイプは軽く（低密度）、他は中間の密度であり又その他は重い（高密度）ことが知られている。前記細胞集団を分離してそれらを別々に捕集するために、細胞分離機が図2から4に関して上述の如く使用される、ここで空洞2は90mlの容積を持ち、又種々のダクトは直径2mmである。

【0037】

90mlの液体（1.050から1.100g/lの間の連続密度勾配を持つ）がダクト4を通して分離装置の中に導入される。そこで骨髄の単分散細胞懸濁液5mlが導管8を通して既に存在している液体の上に導入される。

40

【0038】

斯くして載荷された細胞分離装置は、装置の空洞2の内部に存在する懸濁液の個々の帯に異なった細胞集団の連続的層形成を得るために、400gで1時間遠心分離に掛けられる。そうして分離された、種々の細胞分画の分離捕集のために、重い水に混じらない液体が2ml/分の流速でダクト4を通して底部に導入され、一方同時に同じ速度（2ml/分）でチューブ8を通して頂部から空気がポンピングされる。斯くして空洞2の中間に設置されたダクト9の出口の孔の高さに存在する中間密度の細胞分画は、流体力学的擾乱による他の細胞分画との再混合無しで、圧縮されてこれこれ等を通して押出されそして数分間

50

(約５分間)で捕集される。

【００３９】

同様に、懸濁液の上部に位置している軽い細胞分画、又は同じ懸濁液の低部に位置する重いものを捕集するには、既述の横の出口の孔を通して望まれる細胞分画を捕集するため空洞２に重い液体が底部から（蠕動ポンプを使って）そして空気が頂部から導入された後、横の出口の孔（ダクト９）の高さで望まれる細胞分画を得るように頂部又は底部に向かって（ダクト４とチューブ８に連結された蠕動ポンプを使って）種々の密度の層を動かすことで十分である。

【図面の簡単な説明】

【図１】 既知の細胞分離装置の概略図。

10

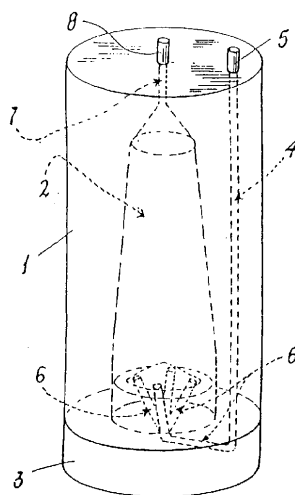
【図２】 本発明に従う分離装置の概略図。

【図３】 図２の線３－３に従う装置の縦断面図。

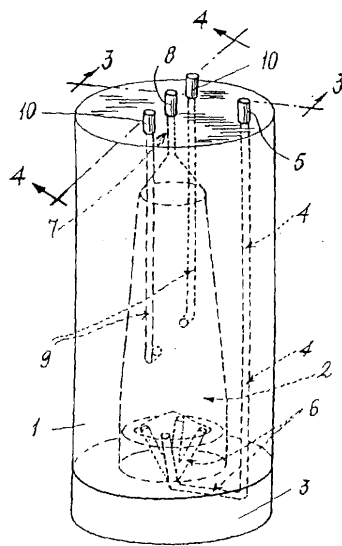
【図４】 図２の線４－４に従う装置の縦断面図。

【図１】

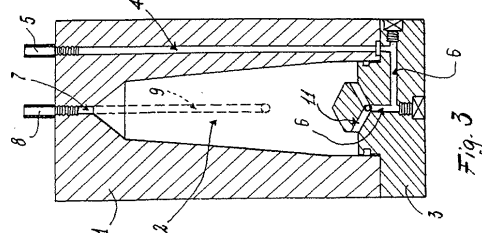
(従来技術)

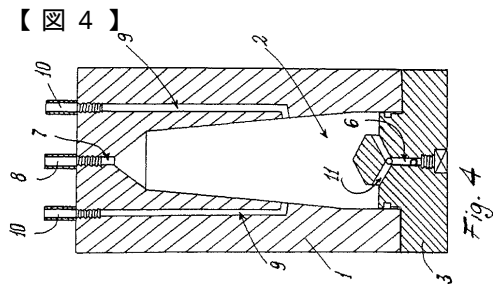


【図２】



【図３】





フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12M 1/00-3/10

C12N 15/00-90

C12N 1/00—9/99

C12Q 1/00—70

G01N 33/00-98