

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-88831
(P2018-88831A)

(43) 公開日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
C 1 2 M	1/26	(2006.01)	C 1 2 M	1/26	4 B O 2 9
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 O 2 A
					4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2015-77161 (P2015-77161)
 (22) 出願日 平成27年4月3日(2015.4.3)
 (出願人による申告)平成26年度、文部科学省、地域イノベーション戦略支援プログラム、関西ライフイノベーション戦略プロジェクト、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 000000941
 株式会社カネカ
 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号
 300061835
 公益財団法人神戸医療産業都市推進機構
 兵庫県神戸市中央区港島南町2丁目2番
 510094724
 国立研究開発法人国立循環器病研究センター
 大阪府吹田市藤白台五丁目7番1号
 (74) 代理人 100074561
 弁理士 柳野 隆生
 (74) 代理人 100124925
 弁理士 森岡 則夫

最終頁に続く

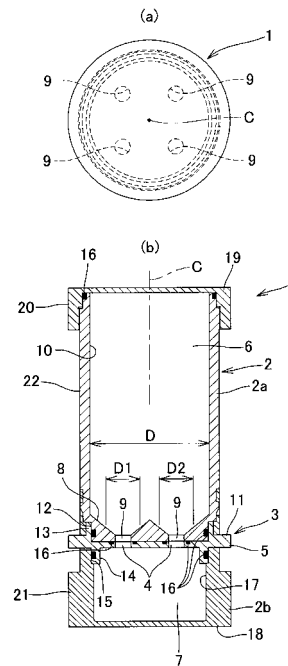
(54) 【発明の名称】細胞分離デバイス及び細胞分離システム

(57) 【要約】

【課題】細胞含有液を充填する際に分離液との境界面に乱れを生じさせることなく容易に充填することができ、遠心分離後に成層した細胞の分離を容易に行うことができ、しかも所望の細胞を高純度で回収することができる細胞分離デバイス、前記細胞分離デバイスを用いて所望の細胞を効率よく回収することができる細胞分離システムを提供すること。

【解決手段】上方から内部に液体を充填できる容器と、前記容器の内部を上下に仕切る仕切り機構とを備え、前記仕切り機構が貫通孔を備えた仕切り板及び前記仕切り板に接する前記容器の上方内部下面の内部に通じる孔を備えた隔壁を有しており、前記仕切り板が前記容器の長軸方向の中心を回転軸として回転することで、容器の上方内部と下方内部とを連通状態又は遮断状態に切り替え可能に構成されていることを特徴とする細胞分離デバイス。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞含有液から目的の細胞を分離する細胞分離デバイスであって、
内部に液体を充填できる容器と、
前記容器の内部を上下に仕切る仕切り機構と
を備え、

前記仕切り機構が貫通孔を備えた仕切り板及び前記仕切り板に接する前記容器の上方内
部下面に容器の内部に通じる孔を備えた隔壁を有しており、前記仕切り板が前記容器の長
軸方向の中心を回転軸として回転することで、容器の上方内部と下方内部とを連通状態又
は遮断状態に切り替え可能に構成されていることを特徴とする細胞分離デバイス。

10

【請求項 2】

前記容器の内部の表面粗さ R_a が $0.1 \sim 20 \text{ nm}$ である請求項 1 に記載の細胞分離デ
バイス。

【請求項 3】

前記貫通孔の断面積が、前記容器内部の最大の断面積に対して $3 \sim 25 \%$ である請求項
1 又は 2 に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 4】

前記容器の上方内部における容量が、容器の下方内部の容量の 130% 以上である請求
項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細胞分離デバイス。

20

【請求項 5】

前記貫通孔及び / 又は前記隔壁に設けた孔を少なくとも 2 つ有し、前記少なくとも 2 つ
設けた孔同士が、前記容器の長軸方向の中心から均等な位置に配置されている請求項 1 ~
4 のいずれか 1 項に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 6】

前記容器の上方内部の内径が、前記隔壁に設けた孔に向けて徐々に縮径していくように
構成される請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 7】

前記貫通孔の周囲又は前記隔壁に設けた孔の周囲にシール材を有する請求項 1 ~ 6 のい
ずれか 1 項に記載の細胞分離デバイス。

30

【請求項 8】

前記容器の底部を接地した状態で自立可能な構成を備えている請求項 1 ~ 7 のいずれか
1 項に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 9】

前記容器の底部表面が平面である請求項 8 に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 10】

前記容器の上部及び / 又は下部の側面が遠心分離機に設けられている容器設置用アダプ
ターの表面に固定できるように、前記容器の上部及び / 又は下部の外径が他の容器の側面
の外径よりも大きく構成されている請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の細胞分離デバイ
ス。

40

【請求項 11】

前記容器の上部に液体供給用及び / 又は排出用の口が設けられている請求項 1 ~ 10 の
いずれか 1 項に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 12】

前記容器の上方内部に微細孔を有するフィルターが設けられている請求項 1 ~ 11 のい
ずれか 1 項に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 13】

前記フィルターの平均細孔径が $0.1 \sim 8 \mu\text{m}$ である請求項 12 に記載の細胞分離デバ
イス。

【請求項 14】

前記液体供給用又は排出用の口が 2 つ以上あり、少なくとも一つの口が、前記容器の上

50

方内部の前記フィルターよりも下方側に設けられている請求項 1 2 又は 1 3 に記載の細胞分離デバイス。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の細胞分離デバイスと、
洗浄液用バッグ及び / 又は微細孔を有するフィルターと、

からなり、

前記細胞分離デバイスに、前記洗浄液用バッグ及び / 又は前記微細孔を有するフィルターがチューブで接続されていることを特徴とする細胞分離システム。

【請求項 1 6】

細胞含有液用バッグと廃液用バッグがさらに接続されている請求項 1 5 に記載の細胞分離システム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遠心分離を用いて単核球などの細胞種を分離できる細胞分離デバイス及び該細胞分離デバイスを含む細胞分離システムを用いて、前記細胞を得る技術に関する。

【背景技術】

20

【0002】

従来、血液などから細胞を分離する一般的な技術としては、試験管の底部にフィコール・パック (Ficoll-Paque, 登録商標、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ (Pharmacia Fine Chemicals) 社製) などの分離液を設置して遠心分離する方法が知られている (例えば、特許文献 1、2 参照。)。この方法は、所定量のフィコール・パックを試験管底に設置する工程、血液試料をフィコール・パック上にピペットで移す工程、フィコール・パックの比重よりも大きい比重を有する血液成分が、フィコール・パックを通過するように遠心分離する工程、及び、フィコール・パックの上方に分離された単核球層をピペットで採取する工程からなる。しかし、特許文献 1、2 に記載の方法では、試料を分離液の上に載置する際の境界面の乱れや、分離回収時の他層との混合などにより、目的とする細胞を所望の純度で得ることが困難であった。

30

【0003】

そこで、このような問題点に対処する技術として、第 1 液体容器収容部を有する第 1 容器と、第 2 液体収容部を有し前記第 1 容器の下方に設けられる第 2 容器とを備え、第 1 容器と第 2 容器とが相対回転可能に取り付けられ、第 1 容器と第 2 容器とを相対回転させることにより、第 1 液体収容部と前記第 2 液体収容部とを連通させる連通状態と、前記第 1 液体収容部と前記第 2 液体収容部との連通を遮断する遮断状態とを切替可能な切替機構を備えた細胞分離装置が提案されている (例えば、特許文献 3 参照。)。しかし、前記のように複数の容器や部材を連結させた構造では、操作が煩雑になり、容器同士の連通状態・遮断状態を切り替えるために容器自体を回転させると容器に充填されている液体に振動が加わるため、回転操作に注意が必要になり、注意を怠ると、成層された細胞の境界面が振動により動いてしまうという問題がある。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特表 2010 - 504083 号公報

【特許文献 2】特表 2007 - 509601 号公報

【特許文献 3】特開 2013 - 132240 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 5 】

本発明は、前述した課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、細胞含有液を充填する際に分離液との境界面に乱れを生じさせることなく容易に充填することができ、遠心分離後に成層した細胞の分離を容易に行うことができ、しかも所望の細胞を高純度で回収することができる細胞分離デバイスを提供することにある。

また、本発明の他の目的は、前記のような細胞分離デバイスを用いて所望の細胞を効率よく回収することができる細胞分離システムを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、内部に液体を充填できる容器内部にその内部を上下に仕切ることができる仕切り機構を設け、前記仕切り機構として貫通孔を備えた仕切り板を採用し、この仕切り板が前記容器の長軸方向の中心を回転軸として回転するように構成することで、前記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明が提供するものは以下の通りである。

(1) 細胞含有液から目的の細胞を分離する細胞分離デバイスであって、

内部に液体を充填できる容器と、

前記容器の内部を上下に仕切る仕切り機構と

を備え、

前記仕切り機構が貫通孔を備えた仕切り板及び前記仕切り板に接する前記容器の上方内部下面に容器の内部に通じる孔を備えた隔壁を有しており、前記仕切り板が前記容器の長軸方向の中心を回転軸として回転することで、容器の上方内部と下方内部とを連通状態又は遮断状態に切り替え可能に構成されていることを特徴とする細胞分離デバイス。

(2) 前記容器の内部の表面粗さ R_a が $0.1 \sim 20 \text{ nm}$ である (1) に記載の細胞分離デバイス。

(3) 前記貫通孔の断面積が、前記容器内部の最大の断面積に対して $3 \sim 25 \%$ である (1) 又は (2) に記載の細胞分離デバイス。

(4) 前記容器の上方内部における容量が、容器の下方内部の容量の 130% 以上である (1) ~ (3) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(5) 前記貫通孔及び / 又は前記隔壁に設けた孔を少なくとも 2 つ有し、前記少なくとも 2 つ設けた孔同士が、前記容器の長軸方向の中心から均等な位置に配置されている (1) ~ (4) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(6) 前記容器の上方内部の内径が、前記隔壁に設けた孔に向けて徐々に縮径していくように構成される (1) ~ (5) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(7) 前記貫通孔の周囲又は前記隔壁に設けた孔の周囲にシール材を有する (1) ~ (6) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(8) 前記容器の底部を接地した状態で自立可能な構成を備えている (1) ~ (7) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(9) 前記容器の底部表面が平面である (8) に記載の細胞分離デバイス。

(10) 前記容器の上部及び / 又は下部の側面が遠心分離機に設けられている容器設置用アダプターの表面に固定できるように、前記容器の上部及び / 又は下部の外径が他の容器の側面の外径よりも大きく構成されている (1) ~ (9) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(11) 前記容器の上部に液体供給用及び / 又は排出用の口が設けられている (1) ~ (10) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(12) 前記容器の上方内部に微細孔を有するフィルターが設けられている (1) ~ (11) のいずれかに記載の細胞分離デバイス。

(13) 前記フィルターの平均細孔径が $0.1 \sim 8 \mu\text{m}$ である (12) に記載の細胞分離デバイス。

10

20

30

40

50

(14) 前記液体供給用又は排出用の口が2つ以上あり、少なくとも一つの口が、前記容器の上方内部の前記フィルターよりも下方側に設けられている(12)又は(13)に記載の細胞分離デバイス。

(15) (1) ~ (14) のいずれかに記載の細胞分離デバイスと、
洗浄液用バッグ及び/又は微細孔を有するフィルターと、
からなり、

前記細胞分離デバイスに、前記洗浄液用バッグ及び/又は前記微細孔を有するフィルターがチューブで接続されていることを特徴とする細胞分離システム。

(16) 細胞含有液用バッグと廃液用バッグがさらに接続されている(15)に記載の細胞分離システム。

【発明の効果】

【0008】

本発明の細胞分離デバイスは、上方から内部に液体を充填できる容器と、前記容器の内部を上下に仕切る仕切り機構とを備え、前記仕切り機構が貫通孔を備えた仕切り板及び前記仕切り板に接する前記容器の上方内部下面に容器の内部に通じる孔を備えた隔壁を有しており、前記仕切り板が前記容器の長軸方向の中心を回転軸として回転することで容器の上方内部と下方内部とを連通状態又は遮断状態に切り替え可能に構成されていることで、予め容器の下方内部に分離液を充填した後に前記仕切り板を回転させて上方内部と下方内部とを遮断状態にしておき、その上から細胞含有液を充填してから、前記仕切り板を回転させて上方内部と下方内部とを連通状態にすることができ、その際に、分離液と細胞含有液との境界面に乱れを生じさせることなく容易に細胞分離液を分離液上に充填することができる。また、細胞分離デバイスを遠心分離した後に前記仕切り板を回転させて容器上方内部と下方内部とを遮断状態にすることで、容器上方内部に成層した単核細胞などの所望の細胞を下方内部に沈降した赤血球などの他の細胞と分離することが容易にでき、また、上方内部で成層している所望の細胞を高純度で回収することができる。

【0009】

前記容器の内部の表面粗さ R_a が $0.1 \sim 20 \text{ nm}$ であることで、容器の内部の表面への細胞の付着を抑えて、細胞の回収率及び純度を向上することができる。

【0010】

前記貫通孔の断面積を前記容器内部の最大の断面積に対して $3 \sim 25\%$ に調整することで、遠心分離時において容器上方内部に充填されている細胞含有液中の細胞が貫通孔を通過して下方内部にスムーズに移動できるため、分離操作後の成層の境界面がより水平になり、また成層の厚みも均一になりやすい。

【0011】

前記容器の上方内部における容量を容器の下方内部の容量の 130% 以上に調整することで、容器の下方内部から前記仕切り機構付近まで十分な量の分離液を充填することができ、密度勾配を用いた細胞分離を効率よく行うことができる。

【0012】

前記貫通孔及び/又は前記隔壁に設けた孔を少なくとも2つ有し、前記少なくとも2つ設けた孔同士が、前記容器の長軸方向の中心から均等な位置に配置されることで、遠心分離時の細胞の移動をスムーズに行うことができる。

【0013】

前記容器の上方内部の内径が、前記隔壁に設けた孔に向けて徐々に縮径していくように構成されることで、遠心分離処理を施した際に、容器の上方内部にある細胞、特に密度の大きな細胞が速やかに容器の下方内部に沈降し易くなり、単核球などの目的の細胞が容器上方内部で均一な厚みの層を形成し易くすることができる。

【0014】

前記貫通孔の周囲又は前記隔壁に設けた孔の周囲にシール材を設けることで、容器と仕切り機構の可動部材である仕切り板との間の水密性を高めることができ、遠心分離を行ったり、仕切り板を回転させても液漏れが起こらないようにすることができる。

10

20

30

40

50

【0015】

前記細胞分離デバイスは、前記容器の底部を接地した状態で自立可能な構成を備えていることで、細胞分離デバイスを自立させながら大きな振動を与えることなく、前記仕切り機構の仕切り板の回転操作を行うことができ、その結果、細胞含有液を充填する操作が行い易くなり、また、遠心分離後に成層した各層の境界面が動くことを防ぐことができる。前記容器の底部表面は平面であることが好ましい。

【0016】

前記容器の上部及び/又は下部の側面が遠心分離機に設けられている容器設置用アダプターの表面に固定できるように、前記容器の上部及び/又は下部の外径が他の容器の側面の外径よりも大きく構成されていることで、前記遠心分離機による遠心分離時に、前記容器設置用アダプター内で前記細胞分離デバイスが振動せずに遠心分離できるため、成層の厚みが均一になり、精度のよい細胞の分離を行うことができる。

10

【0017】

前記容器の上部に液体供給用及び/又は排出用の口が設けられていることで、細胞含有液を供給する操作及び/又は成層した細胞を排出する操作を効率よく行うことができる。

【0018】

前記容器の上方内部に微細孔を有するフィルターが設けられていてもよい。この場合、細胞分離デバイスの上下を反転させることで、容器上方内部に成層した細胞と他の媒体とを分離して、細胞のみを選択的に細胞分離デバイス内に残すことができる。また、洗浄液を容器上方内部に導入した後、同様に細胞分離デバイスの上下を反転させて洗浄液を細胞分離デバイスから排出することで細胞の洗浄操作も行うことができる。

20

前記フィルターの平均細孔径は、0.1～8μmであることが好ましい。

【0019】

前記液体供給用又は排出用の口が2つ以上あり、少なくとも一つの口が、前記容器の上方内部の前記フィルターよりも下方側に設けられていることで、細胞分離デバイスを立設した状態で、細胞含有液を前記フィルターよりも下側に設けた口から供給することができ、また、遠心分離後では前記フィルターを用いて細胞分離デバイス内に残した細胞を前記下方側に設けた口から排出することができる。

【0020】

また、本発明の細胞分離システムは、前記細胞分離デバイスと、洗浄液用バッグ及び/又は微細孔を有するフィルターとからなり、前記細胞分離デバイスに、前記洗浄液用バッグ及び/又は前記微細孔を有するフィルターがチューブで接続されていることで、洗浄液用バッグから洗浄液を前記細胞分離デバイスに導入して細胞を洗浄することができる。また、微細孔を有するフィルターを用いることで細胞を媒体から分離したりすることができる。

30

【0021】

前記細胞分離システムでは、細胞含有液用バッグと廃液用バッグがさらにチューブで接続されていることで、例えば、細胞含有液用バッグから細胞含有液を細胞分離デバイスに充填する操作を容易にし、また、遠心分離後の細胞分離デバイスの容器の上方内部に充填される細胞以外の溶媒を廃液用バッグに排出する操作を容易にできる。

40

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の細胞分離デバイスの一実施態様を示す概略説明図である。

【図2】仕切り機構を構成する仕切り板の一実施態様を示す概略説明図である。

【図3】蓋19を除く図1に示す細胞分離デバイスの概略分解図を示す。

【図4】本発明の別の細胞分離デバイスの実施態様を示す概略説明図である。

【図5】本発明の別の細胞分離デバイスの実施態様を示す概略説明図である。

【図6】本発明の別の細胞分離デバイスの実施態様を示す概略説明図である。

【図7】本発明の細胞分離デバイスを用いて細胞分離を行う工程を示す概略説明図である。

50

【図 8】本発明の細胞分離システムの一実施態様を示す概略説明図である。

【図 9】本発明の別の細胞分離システムの一実施態様を示す概略説明図である。

【図 10】本発明の別の細胞分離システムの一実施態様を示す概略説明図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の細胞分離デバイスは、細胞含有液から目的の細胞を分離する細胞分離デバイスであって、

内部に液体を充填できる容器と、

前記容器の内部を上下に仕切る仕切り機構と

を備え、

前記仕切り機構が貫通孔を備えた仕切り板及び前記仕切り板に接する前記容器の上方内部下面に前記容器の内部に通じる孔を備えた隔壁を有しており、前記仕切り板が前記容器の長軸方向の中心を回転軸として回転することで、容器の上方内部と下方内部とを連通状態又は遮断状態に切り替え可能に構成されていることを特徴とする。

【0024】

本発明において細胞分離デバイスとは、遠心分離機の回転子の容器設置用アダプターに挿入して、遠心分離処理を施すことができるデバイスをいう。遠心分離機としては、細胞含有液に高速回転をかけて細胞含有液中の細胞を密度差によって成層して分離することができる装置であればよく、特に限定はない。中でも、本発明の細胞分離デバイスは、分離液を用いる遠心分離法に好適に使用することができる。

【0025】

本発明において、細胞含有液とは、回収目的の細胞が含有されている液体をいう。細胞含有液としては、例えば、血液、リンパ液、細胞培養液、臍帯血、骨髓液などが挙げられる。

本発明において、回収目的の細胞としては、単核球細胞、造血幹細胞、リンパ球、単球、間質細胞、循環腫瘍細胞などが挙げられる。

前記細胞含有液に含まれる溶媒としては、水、緩衝液、生理食塩水、血漿、間質液、培地などが挙げられる。

【0026】

本発明に用いる分離液は、回収目的の細胞を分離できる比重に調整された液体であって、細胞に悪影響を及ぼさず、刺激が小さい液体であればその組成は特に限定されないが、例えば、リン酸緩衝生理食塩水等の緩衝液に、細胞への刺激が小さい高分子化合物、例えば、ショ糖とエピクロロヒドリンの共重合体であるフィコール（シグマ社）、ポリエチレングリコール、デキストラン等を用いて、比重を調整した溶液を用いることができる。また、市販の血球分離液、例えばヒト用リンパ球比重分離液（比重 1.119；シグマアルドリッチ社）を用いて、前記分離液と高分子化合物を所望の比重となるように混合してもよい。

分離液の調製に用いられる高分子化合物としては、細胞への刺激が小さいものであれば特に限定されず、例えばフィコール、デキストランなどが挙げられ、特にフィコールが好ましい。また、分離液には、各種塩類、生理活性物質、抗酸化物などを適宜配合することができる。例えば、単核球を分離するのに好適な分離液としては、GEヘルスケア・ジャパン社のFicoll-Paque PREMIUM（比重 1.073、1.077、1.083）を購入して用いてもよいし、フィコール溶液、コンレイ液、蒸留水などを混合して調製してもよい。

また、単核球以外の細胞を回収するための分離液としては、パーコール（Percoll）、パーコールプラス（Percoll plus）などのGEヘルスケア・ジャパン社製の市販の分離液も使用できる。

【0027】

前記細胞分離デバイスは、内部に液体を充填できる容器と、前記容器の内部を上下に仕切る仕切り機構とを備える。

前記内部に液体を充填できる容器は上方から液体を導入できるように設計されても良い

10

20

30

40

50

。なお、本発明において、上方とは、例えば、図1(b)に示すように、細胞分離デバイス1を立設した場合の上方向をいい、下方とは細胞分離デバイスを立設した場合の下方向をいう。

【0028】

前記容器の形状及び大きさとしては、遠心分離機の回転子の容器設置用アダプターに挿入できる形状及び大きさであればよく、特に限定はない。例えば、容器内部に液体を充填し易く、遠心分離の際に細胞が成層し易い観点から、円筒形状の容器が好ましい。

【0029】

前記容器の構造材料としては具体的には、非反応性ポリマー、生物親和性金属、合金、ガラス等が挙げられる。非反応性ポリマーとしては、アクリロニトリルブタジエンスチレンコポリマー等のアクリロニトリルポリマー、ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、テトラフルオロエチレンとヘキサフルオロプロピレンのコポリマー、ポリ塩化ビニル等のハロゲン化ポリマー、ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリエステル、コポリエステル、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロリドアクリルコポリマー、ポリカーボネートアクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリスチレン、ポリメチルペンテン等が挙げられる。この中でも特に滅菌耐性を有する点で、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメチルペンテン、コポリエステル等が好ましい。

一方、容器の構造材料として金属材料（生物親和性金属、合金）を使用する場合は、例えばステンレス鋼、チタン、白金、タンタル、金、及びそれらの合金、並びに金メッキ合金鉄、白金メッキ合金鉄、コバルトクロミウム合金、窒化チタン被覆ステンレス鋼等が挙げられる。

【0030】

また、前記容器の内部の表面は、表面粗さRa0.1~20nmに調整されていることが好ましい。このように表面粗さRaを調整することで、容器の内部の表面に細胞が付着する量を低減することができる。

前記表面粗さRaとは算術平均粗さを意味し、粗さ曲線からその平均線の方向に基準長さだけを抜き取り、この抜き取り部分の平均線の方向にx軸を、縦倍率の方向にy軸を取り、粗さ曲線を $y = f(x)$ で表したときに、次の式によって求められる値をマイクロメートル(μm)で表したものをいう。なお、式中、「l」は基準長さを示す。

【0031】

【数1】

$$Ra = \frac{1}{l} \int_0^l |f(x)| dx$$

【0032】

表面粗さRaを測定する具体的方法としては、例えば、原子間力顕微鏡（キーエンス製、VN-8010）の粗さ計測機能を用いて測定することができる。

【0033】

前記容器の内部は仕切り機構によって上方内部と下方内部とに分離されている。前記容器の上方内部は、遠心分離前には細胞含有液が充填され、また、遠心分離後に目的の細胞が成層する部分である。

また、前記容器の下方内部は、遠心分離前には前記分離液が充填され、また、遠心分離後には赤血球などの密度の大きな細胞が沈降する部分である。

【0034】

前記容器の上方内部の容量としては、容器の下方内部の容量の130%以上に調整することで、特に、フィコール・パックなどの分離液を容器の下方内部から前記仕切り機構付近まで充填、その分離液の上に細胞含有液を重層できるため、遠心分離を効率よく行うこ

とができる。前記上方内部に容量は130%以上であれば特に限定されず、140%以上、150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上となるように設計しても良いし、また500%以下、490%以下、480%以下、470%以下、460%以下、450%以下、440%以下、430%以下、420%以下、410%以下、400%以下、350%以下、300%以下、250%以下、200%以下となるように設計しても良い。

【0035】

本発明の細胞分離デバイスでは、前記仕切り機構は、前記貫通孔を備えた仕切り板及び前記仕切り板に接する容器の上方内部下面に前記容器の内部に通じる孔を備えた隔壁から構成されており、前記隔壁の孔に、仕切り板を回転させて仕切り板の貫通孔を少なくとも一部重ねることで、容器の上方内部と下方内部とが連通状態となり、さらに回転させて前記隔壁の孔から貫通孔を外すことで、容器の上方内部と下方内部とが遮断状態となる。

10

また、前記のような構成の仕切り機構で連通状態、遮断状態の切り替え操作を行う場合、上方内部の下面を形成する隔壁が回転しないため、上方内部に充填される細胞含有液などの液体を動かす必要がない。その結果、遠心分離前において分離液と細胞含有液との接触する液面を前記孔の断面積分に低減させて、接触面の乱れを最小限に抑えることができ、また、遠心分離後においては成層した各層の面に影響を与えずに分離操作を行うことができる。

【0036】

前記隔壁の孔の形状、大きさ及び数については、特に限定はないが、遠心分離時の細胞の移動をスムーズに行う観点から、前記仕切り板の貫通孔の形状、大きさ及び数と合わせることが好ましい。

20

【0037】

前記隔壁に設けた孔は、前記仕切り板上に配置された貫通孔と少なくとも一部が重なるように配置されることが好ましい。

また、前記隔壁に設けた孔の数は、1つでも2つ以上でもよいが、少なくとも2つある場合には、前記容器の長軸方向の中心から均等な位置に各孔を配置することで、遠心分離時の細胞の移動をスムーズに行うことができる。

【0038】

また、前記容器の上方内部の内径は、上方内部下面の隔壁に設けた孔に向けて徐々に縮径していくように構成されていてもよい。前記容器の上方内部の内径とは、前記上方内部を構成している容器の内腔部分の径をいう。本発明では、前記上方内部の内径が、前記のように構成されていることで、分離処理を施した際に、容器の上方内部になる細胞、特に密度の大きな細胞が速やかに容器の下方内部に沈降しやすくなり、その結果として、所望の細胞が均一な厚みの層を形成し易くすることができる。

30

前記縮径の態様としては、容器の内腔壁が直線的又は段階的に前記縮径していく形状が挙げられるが、特に限定はない。

【0039】

前記仕切り機構を構成する仕切り板は、前記容器の内部に配置される。前記仕切り板の形状は、前記容器の内部の形状に合わせればよく、特に限定はない。例えば、前記容器が円筒状のチューブ形状である場合、前記仕切り板を円形にすることで、好適に切り替え操作を行うことができる。

40

前記仕切り板の厚みについては、遠心分離時にかかる加圧に耐えられればよく、特に限定はない。

【0040】

また、前記貫通孔の断面積は、前記容器内部の最大の断面積に対して3~25%に調整されていることで、遠心分離時において容器上方内部に充填されている細胞含有液中の細胞が貫通孔を通過して下方内部にスムーズに移動できるため、分離操作後の成層の境界面がより水平になり、また成層の厚みも均一にし易くすることができる。

なお、前記容器内部の最大の断面積とは、容器内腔の最大面積をいう。

50

貫通孔の断面積及び容器の断面積は、深さ方向と直交する方向の内側の断面積を算出して求める。また、貫通孔が複数個ある場合は、全ての貫通孔の断面積の総和を貫通孔の断面積とする。

【0041】

前記貫通孔の形状については、前記容器の長軸方向から見た形状として、円形、楕円形、三角形、四角形、多角形などが挙げられるが、遠心分離時に前記容器の上方内部から下方内部へ向かって密度の大きな細胞、例えば赤血球が沈降し易い観点から、円形が好ましい。

【0042】

前記貫通孔の数については、1個でもよいが、好ましくは2個以上、より好ましくは3個以上、さらに好ましくは4個以上の複数個でもよく、特に限定はない。

前記貫通孔は、前記仕切り板上に配置されるのであれば特に限定されないが、前記容器の上方内部下面の隔壁に配置された孔と少なくとも一部が重なるように配置されることが好ましい。また、前記貫通孔の数は、1つでも2つ以上でもよいが、少なくとも2つある場合には、前記容器の長軸方向の中心から均等な位置に各貫通孔を配置することで、遠心分離時の細胞の移動をスムーズに行うことができる。

【0043】

中でも、前記貫通孔及び/又は前記隔壁に設けた孔を少なくとも2つ有し、前記少なくとも2つ設けた孔同士が、前記容器の長軸方向の中心から均等に配置されていることで、遠心分離時に前記貫通孔と前記孔との位置をあわせることで、前記孔同士を通じて前記容器の上方内部にある細胞が、下方内部へ移動することがよりスムーズに行われる。

【0044】

前記貫通孔の周囲又は前記隔壁に設けた孔の周囲にシール材を有することで、容器と仕切り機構の可動部材である仕切り板との間の水密性をより高めることができる。

シール材の材質としては、ニトリルゴム、フッ素ゴム、ウレタンゴム、シリコンゴム、エチレンプロピレンゴム、水素化ニトリルゴム、クロロブレンゴム、アクリルゴム、ブチルゴム、クロロスルホン化ポリエチレン、エピクロルヒドリンゴム、天然ゴム、フッ素樹脂などが挙げられるが、特に限定はない。

【0045】

また、前記仕切り板の側面には取っ手を設けることで、仕切り板を回転し易くすることができる。取っ手の構成については、指で仕切り板を回転できるような形状であればよく、特に限定はない。

【0046】

前記容器の上方内部下面の隔壁に前記仕切り板を前記容器の長軸方向の中心を回転軸として回転可能に取り付ける方法としては、例えば、前記上方内部下面の隔壁表面と、前記仕切り板の表面とを接触させながら、前記上方内部下面の側壁に、前記仕切り板の表面に設けた凸部とを嵌合させるように構成することが挙げられる。

【0047】

また、前記仕切り板の下方にも凸部を設け、この凸部の側面と容器の下方内部の側面とを接触させるように嵌合させるように構成することで、仕切り板をより安定に容器内部に配置できる。

【0048】

なお、前記のように容器の上方内部下面の隔壁に加えて容器下方内部側に隔壁を設けてもよい。

【0049】

本発明において、前記仕切り板で仕切られる容器の上方と下方とは、別の容器部材で構成されていてもよいし、一体の容器部材で構成されていてもよい。別の容器部材で構成されている場合、例えば、上方容器の下端を前記仕切り板に嵌合させ、さらに仕切り板の側面を下方容器の上端の側面に嵌合させ、下方容器の上端をさらに上方容器の側面に嵌合させる方法が挙げられる。また、一体の容器部材である場合には、3Dプリンターなどを用

10

20

30

40

50

いて、容器を前記仕切り板とともに作製することができる。

【0050】

前記容器の底部は、本発明の細胞分離デバイスを接地した状態で自立可能になるような構成にすることが好ましい。この自立可能な構成を備えることで、前記仕切り機構の仕切り板の回転操作を、細胞分離デバイスを自立させながら大きな振動を与えることなく行うことができ、その結果、細胞含有液を充填する操作が行い易くなり、また、遠心分離後に成層した各層の境界面が動くことを防ぐことができる。

前記自立可能な構成としては、容器の底部表面を平面にすることが好ましい。

【0051】

前記容器の上部は開口していてもよいが、細菌などの混入を防ぐ観点から、蓋が設けられることが好ましい。蓋の形状については、蓋が前記容器上部にしっかりと固定できればよく、特に限定はない。

10

【0052】

また、前記容器の上部及び／又は下部の側面が遠心分離機に設けられている容器設置用アダプターの表面に固定できるように、前記容器の上部及び／又は下部の外径が他の容器の側面の外径よりも大きく構成されていることが好ましい。このように構成されていることで、前記遠心分離機による遠心分離操作時に、前記容器設置用アダプター内で前記細胞分離デバイスが振動せずに回転できるため、成層の厚みが均一になり、精度のよい遠心分離を行うことができる。

【0053】

20

前記容器の上部には液体供給用及び／又は排出用の口が設けられていてもよい。前記容器の上部に液体供給用及び／又は排出用の口が設けられていることで、細胞含有液を供給する操作及び／又は成層した細胞を排出する操作を効率よく行うことができる。具体的には、前記蓋又は前記容器側面に前記口を設ければよい。

前記容器の上部に設ける口の形状及び大きさについては、特に限定はない。

【0054】

また、前記容器の上方内部に微細孔を有するフィルターが設けられていることで、成層した細胞のみを選択的に細胞分離デバイス内に残すことができ、また、細胞の洗浄操作も行い易くなる。

【0055】

30

前記「微細孔」とは、目的の細胞よりも小さい孔をいう。中でも、前記フィルターの平均細孔径は、所望の細胞を細胞分離デバイス内に残しやすくする観点から、 $0.1 \sim 8 \mu\text{m}$ であることが好ましい。

前記平均細孔径は、パームポロメーター（PMI社製）により測定すればよい。

【0056】

前記フィルターの形状としては、層状のフィルターなどが挙げられるが、特に限定はない。フィルターの材質としては、ステンレス、ニッケル、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリスチレン、ポリアルキル（メタ）アクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリクロロプレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリブタジエン、ブタジエン - アクリロニトリル共重合体、スチレン - ブタジエン共重合体、エチレン - ビニルアルコール共重合体、セルロースジアセテート、エチルセルロースなどが挙げられるが、特に限定はない。

40

【0057】

中でも、前記液体供給用又は排出用の口は2つ以上あり、少なくとも一つの口が、前記容器の上方内部の前記フィルターよりも下方側に設けられていることで、細胞分離デバイスを立設した状態で、細胞含有液を前記フィルターよりも下側に設けた口から供給することができ、また、遠心分離後では前記フィルターを用いて細胞分離デバイス内に残した細胞を前記下方側に設けた口から排出することができる。

【0058】

50

前記のような構成を有する本発明の細胞分離デバイスは、他の細胞分離用器具と接続することで細胞分離システムを形成することができる。例えば、本発明の細胞分離デバイスと、洗浄液用バッグ及び/又は微細孔を有するフィルターとからなり、前記細胞分離デバイスに、前記洗浄液用バッグ及び/又は前記微細孔を有するフィルターがチューブで接続されているシステムが挙げられる。このような構成とすることで、遠心分離後の細胞分離デバイスに洗浄液用バッグから洗浄液を導入して細胞を洗浄したり、さらに微細孔を有するフィルターを用いることで細胞を洗浄液から分離したりすることができる。

【0059】

また、前記チューブは、細胞分離システムを構成する細胞分離デバイスなどの各細胞分離器具へ細胞含有液、洗浄液、回収液などの液体を導入したり、導出したりするために使用される。前記チューブとしては、所望の位置に配置された各細胞分離器具へ装着できる柔軟性を有していればよく、素材、サイズ、形状などについては特に限定はない。

10

【0060】

また、前記細胞分離システムには、細胞含有液用バッグと廃液用バッグとがさらに接続されていてもよい。このような構成とすることで、遠心分離前に細胞含有液用バッグから細胞含有液を細胞分離デバイスに充填する操作を容易にし、また、遠心分離後の細胞分離デバイスの容器上方内部に充填される細胞以外の溶媒を廃液用バッグに排出する操作を容易にできる。

なお、遠心分離時には、前記細胞分離デバイスは、前記細胞分離システムから取り外して遠心分離機に装着し、遠心分離後に前記細胞分離デバイスを再び前記細胞分離システムに接続してもよい。

20

【0061】

前記洗浄液用バッグ、細胞含有液用バッグ及び廃液用バッグとしては、市販されている公知のバッグを用いればよく、特に限定はない。

【0062】

また、前記微細孔を有するフィルターは、細胞を濃縮洗浄することを目的とするものである。前記フィルターの平均細孔径は、 $0.1 \sim 8 \mu\text{m}$ であればよい。

前記微細孔を有するフィルターは、各バッグと細胞分離デバイスとを接続するチューブの所望の位置に接続すればよい。例えば、前記微細孔を有するフィルターを内蔵する出入口を有する容器を作製し、この容器の出入口を前記チューブに接続すればよい。

30

【0063】

また、前記各バッグと細胞分離デバイスとを接続するチューブには、所望の細胞の回収操作や洗浄操作を複数回行う際に、洗浄液、細胞含有液、廃液などを効率よく通液するために複数の分岐を設けることが好ましい。前記分岐には、具体的には三方活栓、四方活栓、クランプ、シリンジ接続可能な三つ又分岐管を用いる方法が挙げられるが、特に限定はない。

【0064】

前記細胞分離デバイスから目的の細胞を回収する場合、前記細胞分離デバイスに回収液を導入し、前記細胞分離システムに接続した細胞回収バッグに回収液とともに目的の細胞を回収してもよい。この細胞回収バッグは、予め前記細胞分離システムに接続しておいてもよいし、細胞回収バッグと接続可能なチューブ、即ち、スパイク付チューブ、ルアーアダプター（オス、メス）付チューブ、或いはSCD接続を行ってもよい。

40

また、細胞回収バッグとしては、凍結保存耐性を有するバッグ、細胞培養可能なバッグ等を使用することができる。

【0065】

また、前記細胞分離システムには、目的に応じて、他の細胞分離用器具をチューブを介して接続してもよい。

前記細胞分離用器具としては、例えば、細胞回収液を容器に導入するために使用される細胞回収液導入ポート、細胞を濃縮するために使用される中空系フィルターモジュール、前記中空系フィルターモジュールで濃縮を行う際に細胞含有液を滞留させるために使用さ

50

れる循環バッグ、細胞分離システム内の圧力を調整するためのエアフィルターなどが挙げられる。

なお、前記細胞分離システムにおける細胞分離用器具の設置位置については、特に限定はない。

【0066】

以下、細胞分離デバイスの実施態様を図に基づいて説明する。

【0067】

図1(a)、1(b)に、本発明で用いる細胞分離デバイス1の一例を示す。なお、図1(a)は細胞分離デバイス1の上面図、図1(b)は細胞分離デバイス1の側面方向からの断面図である。また、図2に、図1(b)に示す細胞分離デバイス1の内部に備えた仕切り板5の上面図を示す。

10

【0068】

前記細胞分離デバイス1は、上方から内部に液体を充填できる容器2と前記容器2の内部を上下に仕切る仕切り機構3とを備える。

【0069】

前記容器2の形状としては、図1(a)、1(b)に示すように円筒形状が挙げられるが、遠心分離機の回転子の容器設置用アダプターに挿入できるのであれば、他の形状でもよく、特に限定はない。

【0070】

また、前記容器2の内部の表面は、表面粗さ Ra 0.1~20nmに調整されていることで、容器2の内部の表面に細胞が付着して分離・回収できなくなる量を低減することができる。

20

【0071】

前記容器2の内部は、前記仕切り機構3により、上方内部6と下方内部7とに仕切られている。細胞分離デバイス1の上方内部6は、遠心分離前には細胞含有液が充填され、また、遠心分離後に目的の細胞が成層する部分である。

前記下方内部7は、遠心分離前には前記分離液が充填され、また、遠心分離後には赤血球などの密度の大きな細胞が沈降する部分である。

【0072】

前記容器2の上方内部6における容量としては、容器の下方内部7の容量の130%以上に調整することが好ましい。

30

【0073】

前記仕切り機構3は、前記容器2の内部を上下に仕切ることが可能な機構であり、貫通孔4を備えた仕切り板5及び前記仕切り板5に接する前記容器2の上方内部6下面に容器2の内部に通じる孔9を備えた隔壁8を有しており、前記仕切り板5が前記容器2の長軸方向の中心Cを回転軸として回転することで、前記貫通孔4と前記孔9との位置をあわせたり、外したりして、容器2の上方内部6と下方内部7とを連通状態又は遮断状態に切り替えることができる。

【0074】

前記仕切り機構3は、前記仕切り板5に接する容器2の上方内部6下面の隔壁8及び貫通孔4を備えた仕切り板5から構成される。

40

例えば、図1(b)に示すように、回転させた仕切り板5の貫通孔4を前記隔壁8に設けた孔9と重ねることで、容器2の上方内部6と下方内部7とが連通状態となる。また、図示しないが、仕切り板5を容器の長軸方向の中心Cを回転軸として回転させて、貫通孔4の位置を孔9と重ならない位置に移動させることで、容器2の上方内部6と下方内部7とを遮断状態にすることができる。

【0075】

前記貫通孔4及び前記上方内部6下面の隔壁8に設けた孔9は、前記容器2の長軸方向の中心Cから均等な位置に配置されていることで、開閉操作をスムーズに行うことができる。

50

【0076】

前記貫通孔4の形状については、前記容器2の長軸方向から見た形状として、円形、楕円形、三角形、四角形、多角形などが挙げられるが、遠心分離時に前記容器2の上方内部6から下方内部7へ向かって密度の大きな細胞、例えば赤血球が沈降し易い観点から、円形が好ましい。

【0077】

前記貫通孔4の数については、1個でもよいが、好ましくは2個以上、より好ましくは3個以上、さらに好ましくは4個以上の複数個でもよく、特に限定はない。

【0078】

前記貫通孔4の断面積は、前記容器2内部の最大の断面積に対して3～25%に調整されていることが好ましい。前記貫通孔4の断面積を前記範囲に調整することで、遠心分離時において容器2の上方内部6に充填されている細胞含有液中の細胞が貫通孔4を通過して下方内部7に移動するのをスムーズに行うことができ、分離操作後の成層の境界面がより水平になり、また成層の厚みも均一にし易くすることができる。

なお、前記容器2内部の最大の断面積とは、容器内腔の最大面積をいう。また、複数の貫通孔を有するときは、その複数の貫通孔の断面積の和が容器内部の最大の断面積に対して3～25%になるよう設計することが好ましい。

【0079】

前記貫通孔4を有する仕切り板5は、前記容器2の内部に配置される。前記仕切り板5の形状は、前記容器2の内部の形状に合わせればよく、特に限定はない。

前記仕切り板5の厚みについては、遠心分離時にかかる加圧に耐えられればよく、特に限定はない。

【0080】

また、前記容器2の上方内部6の内径は、上方内部6下面の隔壁8に設けた孔9に向けて徐々に縮径していくように構成されていてもよい。前記容器2の上方内部6の内径Dとは、前記上方内部6を構成している容器2の内腔部分の径をいい、具体的には、図1(b)に示すように、前記隔壁8は容器2の上方内部6を形成する内腔壁10間の長さである。また、前記外径Dが上方内部6下面の隔壁8に設けた孔9に向けて徐々に縮径していく構成とは、例えば、図1(b)に示すように、前記隔壁8に設けた孔9に向かって内腔壁10の厚みが大きくなるような構成、前記隔壁8の中心C付近から孔9の辺縁部付近にかけて隔壁8の垂直方向の厚みが徐々に減少するような構成などが挙げられる。図1(b)では、孔9付近の容器2の内径(D1+D2)は、それより上方の内径Dよりも小さくなるように構成されている。

前記縮径の態様としては、図示しないが、容器2の内腔壁10が段階的に前記縮径していく形状であってもよい。

【0081】

また、図1(b)、図2に示すように、前記仕切り板5の側面には取っ手11を設けていてもよい。前記取っ手11の構成については、指で仕切り板5を回転できるような形状であればよく、特に限定はない。

【0082】

また、前記容器2の上方内部6下面の隔壁8に前記仕切り板5を前記容器2の長軸方向の中心Cを回転軸として回転可能に取り付ける方法としては、例えば、図1(b)に示すように、前記上方内部6下面の隔壁8の外側の表面と、前記仕切り板5の表面とを接触させながら、前記上方内部6下面の側壁12に、前記仕切り板5の表面に設けた凸部13の内側の表面を嵌合させることが挙げられる。この場合、前記容器2の長軸方向から見た前記上方内部6下面の側壁12の形状と、前記仕切り板5の表面に設けた凸部13との形状は、いずれも円形状にすることで前記仕切り板5は前記容器2の長軸方向の中心Cを回転軸として回転可能になる。

【0083】

また、図1(b)に示すように、前記仕切り板5の下方にも上方とは別に凸部14を設

10

20

30

40

50

け、この凸部 1 4 の外側の表面と容器 2 の下方内部 7 を構成する上部側面 1 5 とを接触させるように嵌合させることで、細胞分離デバイス 1 内において前記仕切り板 5 を回転させる際により安定して動かすことができる。

この場合、前記容器 2 の長軸方向から見た前記仕切り板 5 の下方凸部 1 4 の形状と下方内部 7 の側壁 1 5 の形状とは、いずれも円形状とする。

【 0 0 8 4 】

また、図 1 (b)、図 2 に示すように、前記貫通孔 4 の周囲にシール材 1 6 を有することで、容器 2 と仕切り機構 3 の可動部材である仕切り板 5 との間の水密性をより高めることができる。

また、前記シール材 1 6 を設置する位置としては、図示しないが、前記容器 2 の上方内部 6 の下面の隔壁に設けた孔 9 の周囲に設けてもよい。

さらに、シール材 1 6 を、図 1 (b) に示すように、前記容器 2 と前記仕切り板 5 との接触面に設けることで、仕切り板 5 を回転させた場合に、前記接触面から液体が漏れ出すことを防ぐことができる。

【 0 0 8 5 】

また、前記仕切り板 5 で仕切られる容器 2 の上方内部 6 と下方内部 7 とは、図 1 (b)、3 に示すように、それぞれ別の容器部材で構成されていてもよい。例えば、上側容器部材 2 a の下端の外側面 1 2 に前記仕切り板 5 の上側凸部 1 3 の内側面を嵌め込み、次いで仕切り板 5 の上側凸部 1 3 の外側面に、下側容器部材 2 b の上端内側面 1 7 を嵌め込み、さらに下側容器部材 2 b の上端内側面 1 7 を上側容器部材 2 a の外側面 1 2 に固定する方法が挙げられる。図 3 に示すように、下側容器部材 2 b には、仕切り板 5 の取っ手 1 1 を嵌め込み、軸を中心とする回転移動を可能にする溝 4 0 や上側容器部材 2 a の下端の外表面に設けた固定具 4 1 を嵌め込んで固定するための孔 4 2 が設けられている。

【 0 0 8 6 】

また、図示しないが、前記仕切り板 5 で仕切られる容器 2 の上方内部 6 と下方内部 7 とは、一体の容器部材で構成されていてもよい。一体の容器部材は 3 D プリンターなどを用いて、予め設計した形状になるように、前記仕切り板とともに作製することができる。

【 0 0 8 7 】

本発明の細胞分離デバイスは、前記容器 2 の底部を接地した状態で自立可能な構成を備えていてもよい。前記自立可能な構成としては、例えば、図 1 (b) に示すように、容器 2 の底部表面 1 8 を平面にすることが挙げられる。

【 0 0 8 8 】

また、前記容器 2 の上部は開口していてもよいが、目的の細胞のロスや他の細胞の混入を防ぐ観点から、蓋 1 9 が設けられることが好ましい。蓋 1 9 の形状については特に限定はない。また、蓋 1 9 と前記容器 2 上部とはしっかりと固定していることが好ましい。

【 0 0 8 9 】

前記容器 2 の上部及び / 又は下部の外側面が遠心分離機に設けられている容器設置用アダプターの表面に固定できるように、前記容器 2 の上部及び / 又は下部の外径が他の容器 2 の側面の外径よりも大きく構成されていてもよい。例えば、図 1 (b) に示すように、蓋 1 9 の外側面 2 0 の外径と、下側容器部材 2 b の外側面 2 1 の外径とが、上側容器部材 2 a の外側面 2 2 の外径よりも大きく構成されていればよい。この場合、蓋 1 9 の外側面 2 0 の外径と、下側容器部材 2 b の外側面 2 1 の外径とは同じ大きさになるように調整することで、市販の遠心分離機の容器設置用アダプターに細胞分離デバイス 1 を安定に設置することができる。

なお、前記仕切り板 5 における設ける取っ手 1 1 を含む外径は、蓋 1 9 の外側面 2 0 の外径及び下側容器部材 2 b の外側面 2 1 の外径と略同じ大きさまたはそれ以下になるように調整する。

【 0 0 9 0 】

前記容器 2 の上部には液体供給用及び / 又は排出用の口が設けられていてもよい。例えば、図 4 (a)、4 (b) に示す細胞分離デバイス 1 a のように、前記容器 2 の上部に設

10

20

30

40

50

けた蓋 19 に液体又は気体供給用及び / 又は排出用の口 23 a、23 b、23 c が設けられていてもよい。この場合、例えば、口 23 a を細胞含有液や洗浄液などの液体供給口とし、口 23 b を気体供給口、口 23 c を細胞回収口及び / 又は廃液排出口とする。

前記容器の上部に設ける口 23 a、23 b、23 c の形状及び大きさについては、特に限定はない。

【0091】

なお、図 4 (a)、4 (b) に示す細胞分離デバイス 1 a について、前記に説明した以外の構成は図 1 に示す細胞分離デバイス 1 の構成と同じであればよい。

【0092】

また、図 5 (a)、5 (b) に示す細胞分離デバイス 1 b のように、前記容器 2 の上方内部 6 に微細孔を有するフィルター 24 が設けられていてもよい。前記フィルター 24 の平均細孔径は、所望の細胞を細胞分離デバイス内に残しやすくする観点から、0.1 ~ 8 μm であることが好ましい。前記フィルター 24 の形状は、層状のフィルターであればよい。

10

【0093】

細胞分離デバイス 1 b においては、容器 2 の上部の蓋 19 に液体供給口 23 a、気体供給口 23 b 及び排出口 23 c を有する。また、液体供給口 23 a では、図 5 (b) に示すように、蓋 19 に設けた口から別のチューブ 25 を挿入し、このチューブ 25 の端を前記上方内部 6 の前記フィルター 24 を貫通させるように構成しているために、液体供給口 23 a の位置を前記フィルター 24 よりも下方側に設けることができる。このように液体供給口 23 a の位置をフィルター 24 よりも下方側に設けることで、蓋 19 を細胞分離デバイス 1 b に固定したままで、前記フィルター 24 を通過させずに細胞含有液を容器 2 内部に供給することができる。また、前記細胞分離デバイス 1 b を遠心分離した後では、液体供給口 23 a を閉じ、排出口 23 c を開き、前記細胞分離デバイス 1 b の上下の位置を反転させることで、前記フィルター 24 を用いて細胞分離デバイス 1 b 内に細胞を残しながら、細胞含有液の溶媒を排出口 23 c から排出することができる。

20

【0094】

また、図 6 (a)、6 (b) に示す細胞分離デバイス 1 c のように、気体供給口 23 b、液体排出口 23 c を容器 2 の上部の蓋 19 の上面に設け、且つ容器 2 内部に設けたフィルター 24 よりも下方側の外側面に液体供給口 23 a を設けてもよい。

30

【0095】

なお、図 5、6 に示す細胞分離デバイス 1 b、1 c について、前記に説明した以外の構成は図 1 に示す細胞分離デバイス 1 の構成と同じであればよい。

【0096】

次に、本発明の細胞分離デバイスを用いた細胞分離の方法を説明する。前記細胞分離は、例えば、図 7 に示す手順で行うことができる。

【0097】

まず、蓋 19 に 3 つの口 23 a、23 b、23 c を有するタイプの細胞分離デバイス 1 a の仕切り板 5 を回転させて貫通孔 4 と、容器 2 の上方内部 6 の下面の隔壁 8 に設けた孔 9 とを重ねることで、容器 2 の上方内部 6 と下方内部 7 とを連通状態にする。

40

次に、細胞分離デバイス 1 a の上方の口 23 a から、分離液 26 を注入して、下方内部 7 を満たす (図中、(a))。

次に、仕切り板 5 を回転させて前記仕切り板 5 の貫通孔 4 の位置を隔壁 8 の孔 9 とずらすことで、容器 2 の上方内部 6 と下方内部 7 とを遮断状態にし、細胞分離デバイス 1 a の上方の口 23 a から細胞含有液 27 を注入する (図中、(b))。

次に、細胞分離デバイス 1 a の前記仕切り板 5 を回転させて前記仕切り板 5 の貫通孔 4 の位置を隔壁 8 の孔 9 に重ねることで、容器 2 の上方内部 6 と下方内部 7 とを連通状態にし、遠心分離機に細胞分離デバイス 1 a を装着して、遠心分離を行い、細胞成分の成層を行う (図中、(c))。なお、遠心分離時には細胞分離デバイス 1 a 内部への雑菌の混入を防ぐために、前記口 23 a、23 b、23 c にそれぞれ蓋をしておいてもよい。

50

次に、遠心分離機から細胞分離デバイス 1 a を取り出して容器 2 内部で成層している単核球 2 8 を回収する。なお、細胞含有液 2 7 が血液である場合、遠心分離後の細胞分離デバイス 1 a では、容器 2 の内部において下から順番に、赤血球層 2 9 (下方内部 7)、分離液層 3 0 (下方内部 7 及び上方内部 6)、単核球 2 8 (上方内部 6)、血漿層 3 1 (上方内部 6) が成層される。また、単核球 2 8 を回収する際には、前記仕切り板 5 を回転させて前記仕切り板 5 の貫通孔 4 の位置を隔壁 8 の孔 9 とずらして、容器 2 上方内部 6 と下方内部 7 とを遮断状態にしておくことで、前記下方内部 7 にある赤血球などの他の細胞の混入を簡単に防いで、単核球 2 8 を効率よく回収することができる。

【0098】

次に、前記細胞分離デバイスを用いた細胞分離システムを説明する。

10

前記細胞分離システムにおいて細胞分離デバイスに接続する細胞分離用器具としては、処理目的に応じて適宜選択すればよい。

【0099】

例えば、本発明の細胞分離デバイスと、洗浄液用バッグ及び/又は微細孔を有するフィルターとからなり、前記細胞分離デバイスに、前記洗浄液用バッグ及び/又は前記微細孔を有するフィルターがチューブで接続されているシステムが挙げられる。

この細胞分離システムでは、遠心分離後の細胞分離デバイスに洗浄液用バッグから洗浄液を導入して細胞を洗浄したり、さらに微細孔を有するフィルターを用いることで細胞を洗浄液から分離したりすることができる

【0100】

20

具体的には、図 8 に示す細胞分離システム 3 2 a、図 9 に示す細胞分離システム 3 2 b、図 10 に示す細胞分離システム 3 2 c が挙げられる。

【0101】

図 8 に示す細胞分離システム 3 2 a は、蓋 1 9 に 3 つの口を有する細胞分離デバイス 1 a が使用されており、前記細胞分離デバイス 1 a には、細胞含有液を収容した細胞含有液用バッグ 3 5、細胞分離デバイス 1 a に気体を通すためのエアフィルター 3 4、遠心分離後の細胞分離デバイス 1 a 内にある所望の細胞を洗浄するのに使用する洗浄バッグ 3 7 がチューブを介して接続されており、細胞を分離するためのクリップ 4 6 を有する。前記洗浄バッグ 3 7 には、チューブを介して、洗浄液を収容した洗浄液用バッグ 3 3、細胞分離システム 3 2 a で生じる廃液を収容するための廃液バッグ 3 6 及び所望の細胞を収容するための細胞回収バッグ 3 8 が接続されている。

30

【0102】

図 9 に示す細胞分離システム 3 2 b では、細胞分離デバイス 1 a に、細胞含有液用バッグ 3 5、エアフィルター 3 4、洗浄液用バッグ 3 3、細胞回収バッグ 3 8、廃液バッグ 3 6 及び細胞回収液導入ポート 4 3 がチューブを介して接続されている。前記細胞回収液導入ポート 4 3 は、細胞回収液を細胞分離システム 3 2 b に導入するために使用される。

【0103】

図 10 に示す細胞分離システム 3 2 c では、細胞分離デバイス 1 a に、細胞含有液用バッグ 3 5、エアフィルター 3 4 及び循環バッグ 4 4 がチューブを介して接続されている。前記循環バッグ 4 4 には、洗浄液用バッグ 3 3、細胞回収バッグ 3 8 及び細胞含有液を濃縮するための中空系フィルターモジュール 4 5 が接続されている。循環バッグ 4 4 と中空系フィルターモジュール 4 5 との間では細胞含有液を循環できる回路が形成されており、前記中空系フィルターモジュール 4 5 にはさらに廃液バッグ 3 6 が接続されている。

40

【0104】

前記細胞分離システム 3 2 a、3 2 b、3 2 c を構成するチューブについて、3 本のチューブが接続している部分には、図示しないが、三方コックや栓などを設けて通液を任意に止めることができるようになっている。

【0105】

また、前記細胞分離デバイス 1 a を遠心分離に供する時には、前記細胞分離デバイス 1 を前記細胞分離システム 3 2 a、3 2 b、3 2 c から取り外して遠心分離機に装着する。

50

また、遠心分離後に前記細胞分離デバイス 1 a を再び前記細胞分離システム 3 2 a、3 2 b、3 2 c に接続する。

【0106】

次に、前記細胞分離システム 3 2 a、3 2 b、3 2 c を用いて細胞分離を行う方法について説明する。

【0107】

図 8 に示す細胞分離システム 3 2 a では、遠心分離前に細胞含有液用バッグ 3 5 から細胞含有液を細胞分離デバイス 1 a に供給した後、細胞分離デバイス 1 a を取り外して図 7 に示す遠心分離処理を行う。遠心分離後、細胞分離デバイス 1 a を細胞分離システム 3 2 a に取り付ける。

次いで、細胞分離デバイス 1 a を上下に反転させて洗浄バッグ 3 7 に単核球を含む液体を導入する。

さらに洗浄バッグ 3 7 には、洗浄液用バッグ 3 3 から生理食塩水などの洗浄液を導入して単核球を希釈洗浄する。

その後、洗浄バッグ 3 7 を前記細胞分離システム 3 2 a から取り外して遠心分離し、単核球を沈降させた後、単核球のない位置で洗浄バッグ 3 7 の下部をクリップ 4 6 で止める。

次いで、洗浄バッグ 3 7 を上下に反転させて廃液バッグ 3 6 に生理食塩水を含む廃液を導入する。なお、この洗浄操作は複数回行ってよい。

次いで、洗浄液用バッグ 3 3 から少量の洗浄液を洗浄バッグ 3 7 に供給し、クリップ 3 7 を外し、単核球を懸濁した後、細胞回収バッグ 3 8 に単核球を回収する。

【0108】

図 9 に示す細胞分離システム 3 2 b では、遠心分離前に細胞含有液用バッグ 3 5 から細胞含有液を細胞分離デバイス 1 a に供給した後、細胞分離デバイス 1 a を取り外して図 7 に示す遠心分離処理を行う。遠心分離後、細胞分離デバイス 1 a を細胞分離システム 3 2 b に取り付ける。

次いで、細胞分離デバイス 1 a を上下反転させて単核球を含む液体をフィルター 2 4 に通し、廃液を廃液バッグ 3 6 に導入する。

さらに洗浄液用バッグ 3 3 から生理食塩水などの洗浄液をフィルター 2 4 に導入して単核球を洗浄する。なお、この洗浄操作は複数回行ってよい。

その後、細胞回収液導入ポート 4 3 から少量の細胞回収液をフィルター 2 4 に導入して、細胞回収バッグ 3 8 に単核球を回収する。

【0109】

図 10 に示す細胞分離システム 3 2 c では、遠心分離前に細胞含有液用バッグ 3 5 から細胞含有液を細胞分離デバイス 1 a に供給した後、細胞分離デバイス 1 a を取り外して図 7 に示す遠心分離処理を行う。遠心分離後、細胞分離デバイス 1 a を細胞分離システム 3 2 c に取り付ける。

次いで、遠心分離後の細胞分離デバイス 1 a を上下反転させて単核球を含む液体を循環バッグ 4 4 に導入する。洗浄液用バッグ 3 3 から生理食塩水などの洗浄液を循環バッグ 4 4 に導入した後、溶液を中空糸フィルターモジュール 4 5 を用いて循環させることで単核球を濃縮洗浄し、廃液は廃液バッグ 3 6 に導入する。なお、この洗浄操作は複数回行ってよい。

その後、循環バッグ 4 4 の単核球を細胞回収バッグ 3 8 に回収する。

【0110】

以上のような構成を有する細胞分離システム 3 2 a、3 2 b、3 2 c は、いずれも、細胞含有液用バッグ 3 5 から細胞含有液を細胞分離デバイス 1 a に充填する操作が容易であり、また、遠心分離後の細胞分離デバイス 1 a の上方内部 6 に充填される細胞以外の溶媒を廃液用バッグ 3 6 に排出する操作を容易にできるため、所望の細胞を効率よく回収することができる。

【符号の説明】

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

- 1、 1 a、 1 b、 1 c 細胞分離デバイス
- 2 容器
- 2 a 上側容器部材
- 2 b 下側容器部材
- 3 仕切り機構
- 4 貫通孔
- 5 仕切り板
- 6 上方内部
- 7 下方内部
- 8 隔壁
- 9 孔
- 10 内腔壁
- 11 取っ手
- 12 上側容器部材 2 a の下端の外表面
- 13 仕切り板 5 の上側凸部
- 14 仕切り板 5 の下側凸部
- 15 容器 2 の下方内部 7 の上部側面
- 16 シール材
- 17 下側容器部材 2 b の上端内側面
- 18 容器 2 の底部表面
- 19 蓋
- 20 蓋 19 の外側面
- 21 下側容器部材 2 b の外側面
- 22 上側容器部材 2 a の外側面
- 23 口
- 24 フィルター
- 25 チューブ
- 26 分離液
- 27 細胞含有液
- 28 単核球
- 29 赤血球層
- 30 分離液層
- 31 血漿層
- 32 a、 32 b、 32 c 細胞分離システム
- 33 洗浄液用バッグ
- 34 エアフィルター
- 35 細胞含有液用バック
- 36 廃液バッグ
- 37 洗浄バッグ
- 38 細胞回収バッグ
- 40 溝
- 41 上側容器部材 2 a の下端の外表面 12 の固定具
- 42 固定具 41 を固定するための孔
- 43 細胞回収液導入ポート
- 44 循環バッグ
- 45 中空糸フィルターモジュール
- 46 クリップ

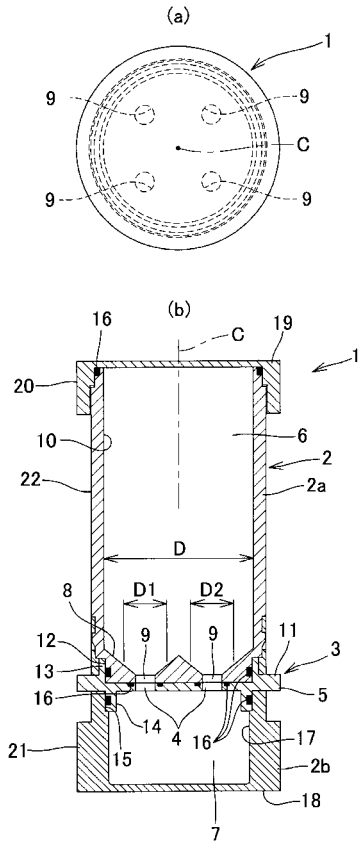
10

20

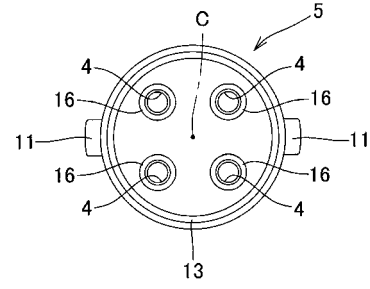
30

40

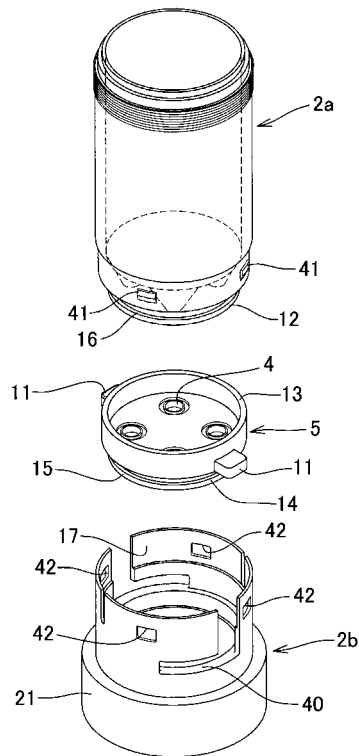
【 図 1 】



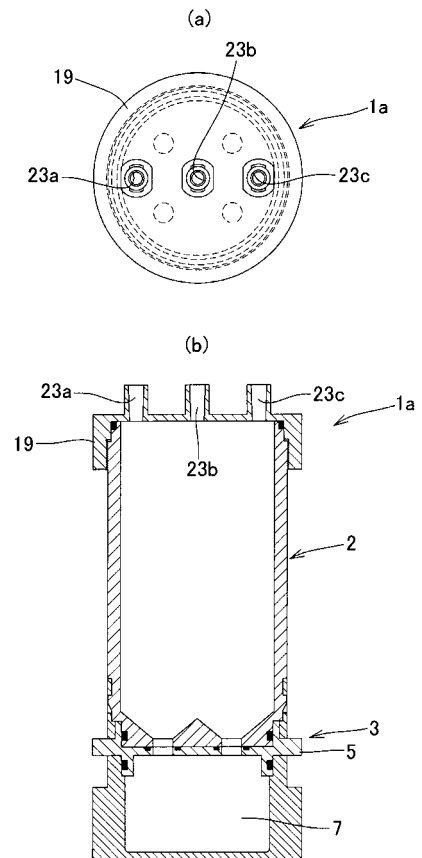
【 図 2 】



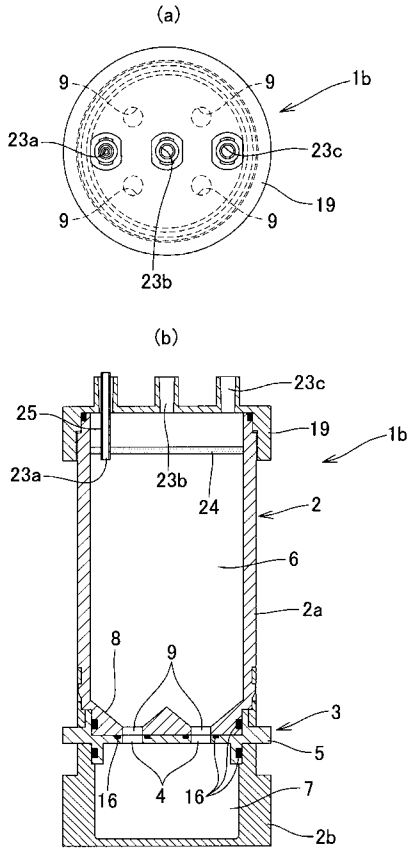
【 図 3 】



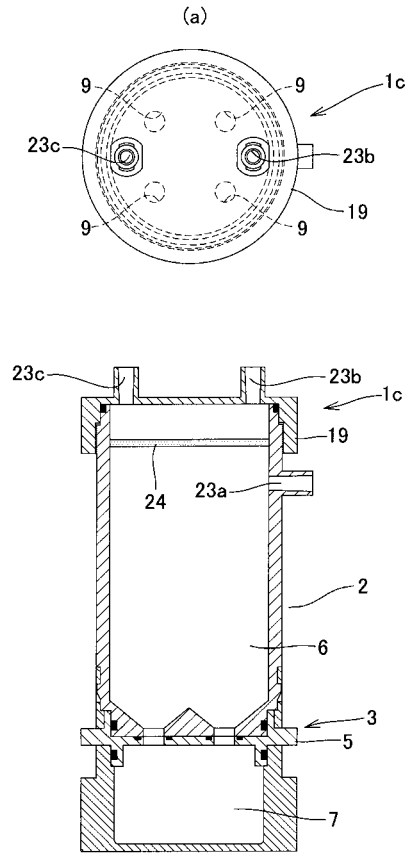
【 図 4 】



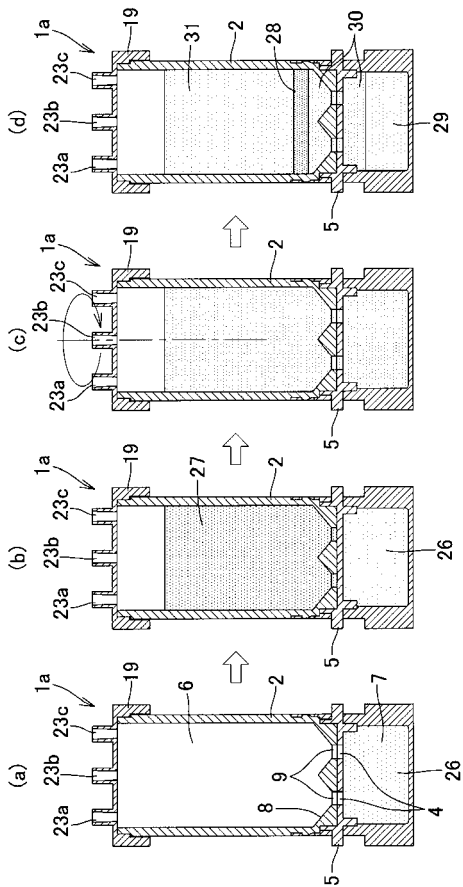
【 図 5 】



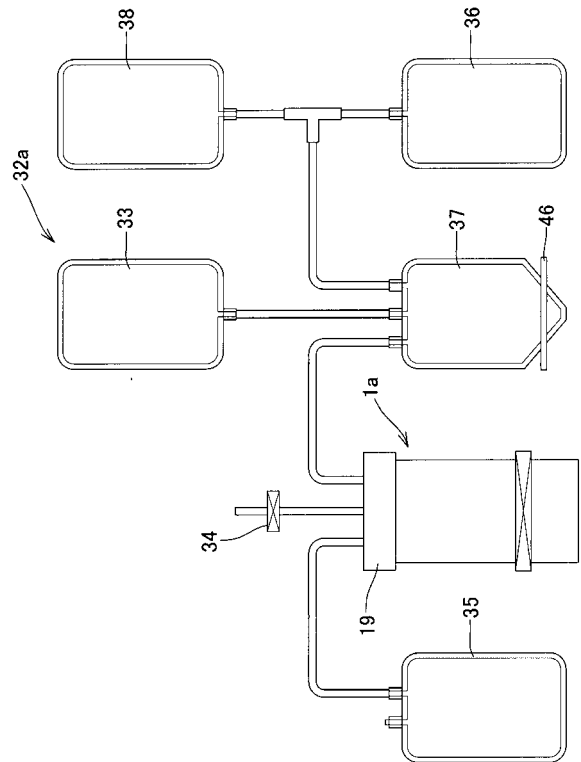
【 図 6 】



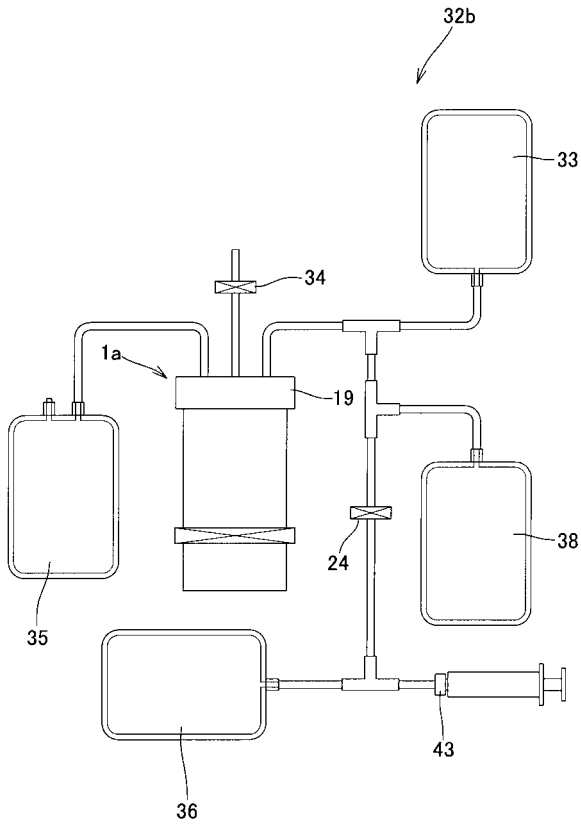
【 図 7 】



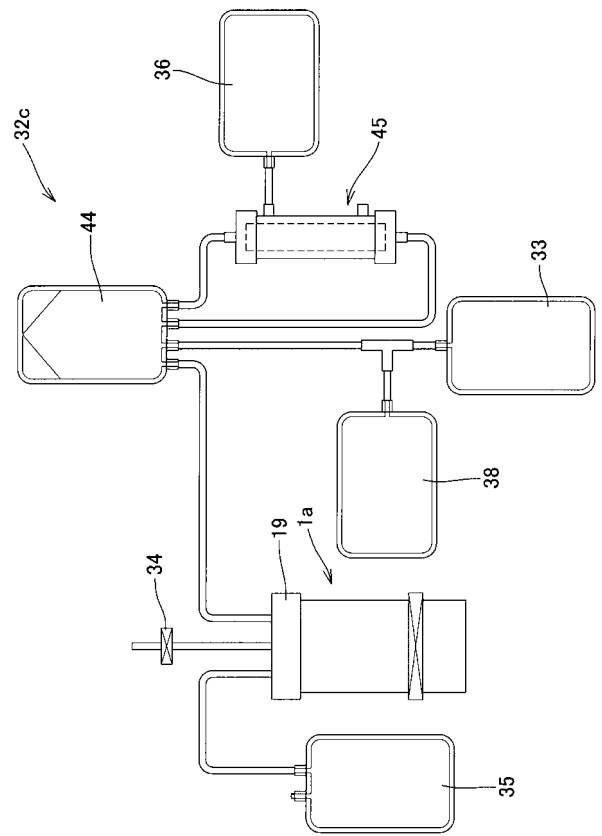
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(74)代理人 100141874

弁理士 関口 久由

(74)代理人 100163577

弁理士 中川 正人

(72)発明者 鈴木 育浩

兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 株式会社カネカ 高砂工業所内

(72)発明者 高村 佳典

大阪府大阪市城東区諏訪 3 - 4 - 19 株式会社セミテック内

(72)発明者 田口 明彦

兵庫県神戸市中央区港島南町 2 丁目 2 番 公益財団法人先端医療振興財団先端医療センター内

(72)発明者 山原 研一

大阪府吹田市藤白台五丁目 7 番 1 号 国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所内

Fターム(参考) 4B029 AA09 BB11 CC01 CC02 CC08 DG08 FA04 FA05 GA02 GB04

GB05 HA02 HA05

4B065 AA90X BD14