

(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2018-65132

(P2018-65132A)

(43) 公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
B 03 B 5/00 (2006.01) B 03 B 5/00 Z 4 D 0 7 1

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2017-232785 (P2017-232785)	(71) 出願人	000006231 株式会社村田製作所
(22) 出願日	平成29年12月4日 (2017.12.4)		京都府長岡京市東神足1丁目10番1号
(62) 分割の表示	特願2017-534851 (P2017-534851) の分割	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 睦
原出願日	平成29年3月1日 (2017.3.1)		
(31) 優先権主張番号	特願2016-55475 (P2016-55475)	(74) 代理人	100132241 弁理士 岡部 博史
(32) 優先日	平成28年3月18日 (2016.3.18)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100183265 弁理士 中谷 剣一
(31) 優先権主張番号	特願2016-172839 (P2016-172839)	(72) 発明者	近藤 孝志 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内
(32) 優先日	平成28年9月5日 (2016.9.5)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	萬壽 優 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内

最終頁に続く

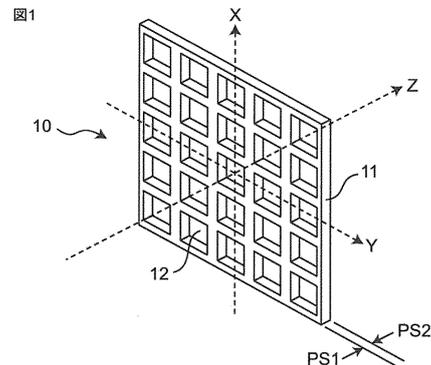
(54) 【発明の名称】 金属製多孔膜、それを用いた分級方法、および分級装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】細胞凝集塊の回収率を高めることができる金属製多孔膜、それを用いた分級方法及び分級装置の提供。

【解決手段】細胞凝集塊を分級する金属製多孔膜10であって、前記細胞凝集塊が捕捉される第1主面PS1と、第1主面PS1に対向する第2主面PS2とを有すると共に、第1主面PS1と第2主面PS2とを連通する複数の貫通孔12を有する膜部11を備える金属製多孔膜10。このような構成により、細胞凝集塊の回収率を高めることができる金属製多孔膜10。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 主面と、前記第 1 主面に対向する第 2 主面とを有すると共に、前記第 1 主面と前記第 2 主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える金属製多孔膜を準備するステップ、

細胞凝集塊を含む液体を前記金属製多孔膜に通過させ、前記細胞凝集塊を前記金属製多孔膜に捕捉することによって、前記細胞凝集塊を分級するステップ、

前記金属製多孔膜に捕捉された細胞凝集塊を凝集するステップ、
を含む細胞凝集塊の作製方法。

【請求項 2】

前記細胞凝集塊を凝集するステップは、第 1 細胞凝集塊を作製する第 1 凝集ステップと、前記第 1 細胞凝集塊より大きさが大きい第 2 細胞凝集塊を作製する第 2 凝集ステップとを含む、請求項 1 に記載の細胞凝集塊の作製方法。

【請求項 3】

前記金属製多孔膜を準備するステップは、第 1 金属製多孔膜と、第 1 金属製多孔膜の貫通孔の寸法より大きい複数の貫通孔を有する第 2 金属製多孔膜と、を準備し、

前記第 1 凝集ステップは、前記第 1 金属製多孔膜で捕捉された細胞凝集塊を凝集することによって前記第 1 細胞凝集塊を作製し、

前記第 2 凝集ステップは、前記第 2 金属製多孔膜で捕捉された細胞凝集塊を凝集することによって前記第 2 細胞凝集塊を作製する、

請求項 2 に記載の細胞凝集塊の作製方法。

【請求項 4】

細胞凝集塊を分級するための金属製多孔膜を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞凝集塊の作製方法を実施するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞凝集塊を分級する金属製多孔膜、それを用いた分級方法および分級装置に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞凝集塊（スフェロイド）を用いた薬効調査等において、均一な寸法の細胞凝集塊が求められている。

【0003】

例えば、特許文献 1 には、フィルタを用いて細胞塊を分級することが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2015 - 62400 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

近年、フィルタを用いた細胞凝集塊の分級において、細胞凝集塊の回収率を高めることが望まれている。

【0006】

本発明は、細胞凝集塊の回収率を高めることができる金属製多孔膜、それを用いた分級方法および分級装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の一態様の金属製多孔膜は、

10

20

30

40

50

細胞凝集塊を分級する金属製多孔膜であって、

前記細胞凝集塊が捕捉される第1主面と、前記第1主面に対向する第2主面とを有すると共に、前記第1主面と前記第2主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える。

【0008】

本発明の一態様の分級方法は、

細胞凝集塊を分級する分級方法であって、

前記細胞凝集塊が捕捉される第1主面と、前記第1主面に対向する第2主面とを有すると共に、前記第1主面と前記第2主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える金属製多孔膜を準備するステップ、

前記細胞凝集塊を含む液体を前記金属製多孔膜に通過させ、前記細胞凝集塊を前記金属製多孔膜に捕捉することによって、前記細胞凝集塊を分級するステップ、
を含む。

10

【0009】

本発明の一態様の分級装置は、

細胞凝集塊を分級する分級装置であって、

前記細胞凝集塊が捕捉される第1主面と、前記第1主面に対向する第2主面とを有すると共に、前記第1主面と前記第2主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える金属製多孔膜を備える。

【発明の効果】

【0010】

20

本発明によれば、細胞凝集塊の回収率を高めることができる金属製多孔膜、それを用いた分級方法および分級装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明に係る実施の形態1における金属製多孔膜の膜部の一部の拡大斜視図である。

【図2】図1の金属製多孔膜の膜部の一部を厚み方向から見た概略図である。

【図3】図2のA-A線で切断した断面図である。

【図4】本発明に係る実施の形態1の分級装置の構成を示す概略図である。

【図5】本発明に係る実施の形態1の分級装置のハウジングを示す斜視図である。

30

【図6】図5のハウジングの一部を断面で示す斜視図である。

【図7】本発明に係る実施の形態1の分級方法のフローチャートである。

【図8】異なる寸法を有する細胞凝集塊を含む液体を示す写真である。

【図9】実施例1において細胞凝集塊を捕捉した金属製多孔膜の一部を拡大して撮影した写真である。

【図10】比較例1において、細胞凝集塊を捕捉したナイロンメッシュの一部を拡大して撮影した写真である。

【図11】比較例1のナイロンメッシュの交差部を拡大して撮影した写真を示す。

【図12】異なる寸法の細胞凝集塊を含む液体を示す写真である。

【図13】実施例2において、最上段の金属製多孔膜で回収した細胞凝集塊の拡大写真である。

40

【図14】実施例2において、中央の金属製多孔膜で回収した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図15】実施例2において、最下段の金属製多孔膜で回収した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図16】実施例2において、最上段の金属製多孔膜を通過した後の液体の一部を拡大して撮影した写真である。

【図17】実施例2において、中央の金属製多孔膜を通過した後の液体の一部を拡大して撮影した写真である。

【図18】実施例2において、最下段の金属製多孔膜を通過した後の液体の一部を拡大し

50

て撮影した写真である。

【図19】実施例3において、培養した細胞凝集塊の一部を拡大して撮影した写真である。

【図20】実施例3において、最上段の金属製多孔膜で捕捉した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図21】実施例3において、中央の金属製多孔膜で捕捉した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図22】実施例3において、最下段の金属製多孔膜で捕捉した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図23】実施例3において、最下段の金属製多孔膜を通過した後の液体の一部を拡大して撮影した写真である。

【図24】実施例3において、細胞凝集塊の直径に対するATP活性量の測定結果を示す図である。

【図25】実施例3において、孔サイズ180 μ mの金属製多孔膜で捕捉された1組の細胞凝集塊の写真である。

【図26】実施例3において、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜で捕捉された1組の細胞凝集塊の写真である。

【図27】実施例3において、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜で捕捉された1組の細胞凝集塊の写真である。

【図28】実施例3において、最上段の金属製多孔膜で捕捉した図25に示す3個の細胞凝集塊を培養して作製した1個の細胞凝集塊の写真である。

【図29】実施例3において、中央の金属製多孔膜で捕捉した図26に示す3個の細胞凝集塊を培養して作製した1個の細胞凝集塊の写真である。

【図30】実施例3において、最下段の金属製多孔膜で捕捉した図27に示す3個の細胞凝集塊を培養して作製した1個の細胞凝集塊の写真である。

【図31】実施例4において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入して24時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す図である。

【図32】実施例4において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入して48時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す図である。

【図33】比較例2において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入して24時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す図である。

【図34】比較例2において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入して48時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す図である。

【図35】実施例5及び比較例3における細胞66の培養状態を示す図である。

【図36】実施例5及び比較例3において、培養された細胞のRLU発光量(ATP活性量)の測定結果を示す図である。

【図37】実施例6において、培養した細胞凝集塊の一部を拡大して撮影した写真である。

【図38】実施例6において、最上段の金属製多孔膜で捕捉した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図39】実施例6において、中央の金属製多孔膜で捕捉した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図40】実施例6において、最下段の金属製多孔膜で捕捉した細胞凝集塊の拡大写真である。

【図41】実施例6において、最下段の金属製多孔膜を通過した後の液体の一部を拡大して撮影した写真である。

【図42】実施例6において、細胞凝集塊の直径に対するATP活性量の測定結果を示す図である。

【図43】実施例6において、孔サイズ180 μ mの金属製多孔膜で捕捉された1組の細胞凝集塊の写真である。

10

20

30

40

50

【図 4 4】実施例 6 において、孔サイズ 100 μm の金属製多孔膜で捕捉された 1 組の細胞凝集塊の写真である。

【図 4 5】実施例 6 において、孔サイズ 58 μm の金属製多孔膜で捕捉された 1 組の細胞凝集塊の写真である。

【図 4 6】実施例 6 において、最上段の金属製多孔膜で捕捉した図 4 3 に示す 3 個の細胞凝集塊を培養して作製した 1 個の細胞凝集塊の写真である。

【図 4 7】実施例 6 において、中央の金属製多孔膜で捕捉した図 4 4 に示す 3 個の細胞凝集塊を培養して作製した 1 個の細胞凝集塊の写真である。

【図 4 8】実施例 6 において、最下段の金属製多孔膜で捕捉した図 4 5 に示す 3 個の細胞凝集塊を培養して作製した 1 個の細胞凝集塊の写真である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

(本発明に至った経緯)

細胞凝集塊は、例えば、がんの薬効を調査する場合に、がん細胞のモデルとして用いられている。がん細胞は、進行度合いによって細胞の大きさが異なる。また、がん細胞の大きさが異なれば、効果のある薬も異なる。例えば、初期がんや小さながん組織に対して効果のある薬は、進行がんや大きながん組織に対しての効果が小さい場合がある。このため、細胞凝集塊を用いた薬効調査において、異なる寸法の細胞凝集塊を用いて薬効調査を行うと、薬効データにばらつきが生じる。したがって、薬効データのばらつきを抑えるため、均一な寸法の細胞凝集塊を得ることが求められている。

【0013】

また、細胞凝集塊は、細胞凝集塊を再生医療用の組織として用いられようとしている。この場合、所望の大きさの組織が必要となるが、細胞凝集塊の作製の工夫によって所望の大きさの組織を作製することは難しく、様々な大きさの細胞凝集塊を作製しておいてから所望の大きさの組織を選択した方が効率が良い。従って、高効率に所望の組織を選択することが求められている。

【0014】

培養した細胞凝集塊を所望の寸法に調製する方法として、例えば、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタを用いて所望の寸法の細胞凝集塊を捕捉することによって細胞凝集塊を分級する方法が用いられている。しかしながら、これらのフィルタを用いた場合には、捕捉できる細胞凝集塊の寸法精度が低いため、回収率が低くなるといった問題がある。そこで、本発明者らは、これらの問題を解決するため、以下の発明に至った。

【0015】

本発明の一態様の金属製多孔膜は、
細胞凝集塊を分級する金属製多孔膜であって、
前記細胞凝集塊が捕捉される第 1 主面と、前記第 1 主面に対向する第 2 主面とを有すると共に、前記第 1 主面と前記第 2 主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える。

【0016】

このような構成により、細胞凝集塊の回収率を高めることができる。

【0017】

前記金属製多孔膜において、前記膜部の前記第 1 主面は、平坦状に形成され、
前記複数の貫通孔は、前記膜部の前記第 1 主面側の開口と前記第 2 主面側の開口とが連続した壁面を通じて連通していてもよい。

【0018】

このような構成により、細胞凝集塊の回収率を更に向上させることができる。

【0019】

前記金属製多孔膜において、前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの 100% 未満であってもよい。

【0020】

このような構成により、所望の細胞凝集塊を確実に捕捉することができる。

10

20

30

40

50

【0021】

前記金属製多孔膜において、前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの80%未満であってもよい。

【0022】

このような構成により、細胞凝集塊が変形したとしても確実に所望の細胞凝集塊を捕捉することができる。

【0023】

前記金属製多孔膜において、前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの20%以上であってもよい。

【0024】

このような構成により、捕捉対象ではない流体が通過しやすくなり、作業時間を短縮することができる。

【0025】

前記金属製多孔膜において、前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの40%以上であってもよい。

【0026】

このような構成により、捕捉対象ではない流体が更に通過しやすくなり、作業時間を短縮することができる。

【0027】

本発明の一態様の細胞凝集塊の分級方法は、
細胞凝集塊を分級する分級方法であって、
前記細胞凝集塊が捕捉される第1主面と、前記第1主面に対向する第2主面とを有すると共に、前記第1主面と前記第2主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える金属製多孔膜を準備するステップ、
前記細胞凝集塊を含む液体を前記金属製多孔膜に通過させ、前記細胞凝集塊を前記金属製多孔膜に捕捉することによって、前記細胞凝集塊を分級するステップ、
を含む。

【0028】

このような構成により、細胞凝集塊の回収率を高めることができる。

【0029】

前記分級方法において、前記金属製多孔膜を準備するステップは、貫通孔の寸法が異なる複数の金属製多孔膜を準備すると共に、前記細胞凝集塊を含む液体が流れる流路の上流側から、前記複数の金属製多孔膜を前記貫通孔の寸法の大きい順に直列に配列してもよい。

【0030】

このような構成により、段階的に所望の寸法の細胞凝集塊を効率良く得ることができる。

【0031】

前記分級方法において、前記細胞凝集塊を分級するステップは、前記複数の金属製多孔膜のうち最下段に位置する金属製多孔膜で前記細胞凝集塊から単離した単離細胞を通過させてもよい。

【0032】

このような構成により、細胞凝集塊を含まず、単離細胞を含む液体を得ることができる。

【0033】

前記分級方法において、更に、最下段に位置する前記金属製多孔膜を通過した前記単離細胞を継代するステップを含んでもよい。

【0034】

このような構成により、最下段の金属製多孔膜を通過した液体に含まれる単離細胞を、新たな培地に移動させて培養することができる。あるいは、単離細胞を細胞凝集塊形成に

10

20

30

40

50

再び用いることもできる。

【0035】

前記分級方法において、更に、前記細胞凝集塊を前記金属製多孔膜に捕捉した状態で洗浄するステップを含んでもよい。

【0036】

このような構成により、分級された細胞凝集塊を容易に洗浄することができる。

【0037】

前記分級方法において、前記金属製多孔膜で捕捉された前記細胞凝集塊を回収するステップを含んでもよい。

【0038】

このような構成により、分級された細胞凝集塊を容易に回収することができる。

【0039】

前記分級方法において、前記金属製多孔膜を準備するステップは、滅菌した金属製多孔膜を準備してもよい。

【0040】

このような構成により、分級する前に金属製多孔膜に付着している菌によって細胞凝集塊が汚染されるのを防ぐことができる。

【0041】

前記分級方法において、前記細胞凝集塊を含む液体が前記金属製多孔膜を介して流れる流路は、外気から閉鎖されていてもよい。

【0042】

このような構成により、外気により細胞凝集塊が汚染されるのを防ぐことができる。

【0043】

本発明の一態様の細胞凝集塊の分級装置は、細胞凝集塊を分級する分級装置であって、前記細胞凝集塊が捕捉される第1主面と、前記第1主面に対向する第2主面とを有すると共に、前記第1主面と前記第2主面とを連通する複数の貫通孔を有する膜部を備える金属製多孔膜を備える。

【0044】

このような構成により、細胞凝集塊の回収率を高めることができる。

【0045】

前記分級装置において、貫通孔の寸法が異なる複数の金属製多孔膜を備え、前記複数の金属製多孔膜は、前記細胞凝集塊を含む液体が流れる流路の上流側から、前記貫通孔の寸法の大きい順に直列に配列されていてもよい。

【0046】

このような構成により、段階的に所望の寸法の細胞凝集塊を効率良く得ることができる。

【0047】

前記分級装置において、前記複数の金属製多孔膜のうち最下段に位置する金属製多孔膜の貫通孔の寸法は、前記細胞凝集塊から単離した単離細胞の大きさ以下であってもよい。

【0048】

このような構成により、最下段の金属製多孔膜によって捕捉する細胞凝集塊を規制することができる。

【0049】

前記分級装置において、前記複数の金属製多孔膜のうち最下段に位置する金属製多孔膜の貫通孔の寸法は、前記細胞凝集塊から単離した単離細胞を通過させることができる大きさであってもよい。

【0050】

このような構成により、細胞凝集塊を含まず、且つ単離細胞を含む液体を得ることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

前記分級装置において、更に、

前記金属製多孔膜を内包し、前記金属製多孔膜の前記第 1 主面に対向するように設けられた流体流入路と、前記金属製多孔膜の前記第 2 主面に対向するように設けられた流体排出路とを有するハウジング、
を備えてもよい。

【 0 0 5 2 】

このような構成により、金属製多孔膜を容易に保持して、回収率の高い分級を行うことができる。

【 0 0 5 3 】

前記分級装置において、前記細胞凝集塊を含む液体が前記金属製多孔膜を介して流れる流路は、外気から閉鎖されていてもよい。

【 0 0 5 4 】

このような構成により、外気により細胞凝集塊が汚染されるのを防ぐことができる。

【 0 0 5 5 】

前記分級装置において、前記金属製多孔膜は、滅菌されていてもよい。

【 0 0 5 6 】

このような構成により、分級する前に金属製多孔膜に付着している菌によって細胞凝集塊が汚染されるのを防ぐことができる。

【 0 0 5 7 】

以下、本発明に係る実施の形態 1 について、添付の図面を参照しながら説明する。また、各図においては、説明を容易なものとするため、各要素を誇張して示している。

【 0 0 5 8 】

(実施の形態 1)

[金属製多孔膜]

図 1 は、本発明に係る実施の形態 1 における金属製多孔膜 10 の一部の拡大斜視図である。図 1 中の X、Y、Z 方向は、それぞれ金属製多孔膜 10 の縦方向、横方向、厚み方向を示している。図 1 に示すように、金属製多孔膜 10 は、互いに対向する第 1 主面 P S 1 と第 2 主面 P S 2 とを有し、且つ両主面を貫通する複数の貫通孔 12 を有する膜部 11 を備える。金属製多孔膜 10 は、膜部 11 においてマトリクス状に一定の間隔で複数の貫通孔 12 を設けた板状構造体 (格子状構造体) である。金属製多孔膜 10 は、異なる寸法を有する複数の細胞凝集塊を含む液体を通過させることによって、細胞凝集塊を分級する金属製薄膜である。

【 0 0 5 9 】

本明細書において、「細胞凝集塊」とは、複数の細胞が接着することによって形成される細胞の集合塊を意味する。細胞凝集塊は、例えば、がん化細胞、肝細胞、i P S 細胞などを使用した細胞凝集塊である。

【 0 0 6 0 】

図 1 では金属製多孔膜 10 の全体を示していないが、実施の形態 1 では、金属製多孔膜 10 は、例えば、円形の金属メッシュである。金属製多孔膜 10 の寸法は、例えば、直径 7 . 8 mm、厚さ 20 μm である。金属製多孔膜 10 を構成する材料は、金、銀、銅、白金、ニッケル、ステンレス鋼、パラジウム、チタン、およびこれらの合金であってもよい。特に、金属製多孔膜 10 の材料としては、細胞凝集塊との生体親和性の観点から、金、ニッケル、ステンレス、チタンがよい。なお、金属製多孔膜 10 は、円形に限定されず、例えば、長方形、正方形等の矩形形状、又は楕円等の形状であってもよい。

【 0 0 6 1 】

図 2 は、金属製多孔膜 10 の膜部 11 の一部を厚み方向 (Z 方向) から見た概略図である。図 2 に示すように、複数の貫通孔 12 は、膜部 11 の第 1 主面 P S 1 及び第 2 主面 P S 2 上に周期的に配置されている。具体的には、複数の貫通孔 12 は、膜部 11 においてマトリクス状に等間隔で設けられている。複数の貫通孔 12 は、金属製多孔膜の第 1 主面

10

20

30

40

50

P S 1 側、即ち Z 方向から見て、正方形の形状を有する。複数の貫通孔 1 2 は、正方形の各辺と平行な 2 つの配列方向、即ち図 2 中の X 方向と Y 方向に等しい間隔で設けられている。なお、貫通孔 1 2 は、正方形に限定されず、例えば長方形、円、又は楕円などの形状であってもよい。また、孔の配列は、正方格子配列に限定されず、例えば方形配列であれば、2 つの配列方向の間隔は等しくない長方形配列でもよく、三角格子配列又は準周期配列などであってもよい。

【 0 0 6 2 】

貫通孔 1 2 の形状及び寸法は、細胞凝集塊の大きさ、形状に応じて適宜設計されるものである。実施の形態 1 において、貫通孔 1 2 は、例えば、金属製多孔膜 1 0 の膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 側、即ち Z 方向から見て正方形であり、一辺 d は、細胞凝集塊の大きさの 1 0 0 % 未満に設計される。好ましくは細胞凝集塊の大きさの 8 0 % 未満に設計されることで濾過中に細胞凝集塊が変形したとしても確実に捕捉することができる。また、一辺 d を細胞凝集塊の大きさの 2 0 % 以上とすることで捕捉対象ではない流体が通過しやすくなり、作業時間を短縮することができる。更に好ましくは細胞凝集塊の大きさの 4 0 % 以上とすることで更に流体が通過しやすくなる。また、貫通孔 1 2 間の格子間隔 b は、例えば、貫通孔 1 2 の一辺 d の 1 倍より大きく 1 0 倍以下であり、より好ましくは貫通孔 1 2 の一辺 d の 3 倍以下である。あるいは、開口率にして 1 0 % 以上が好ましい。なお、開口率は、(貫通孔 1 2 が占める面積) / (貫通孔 1 2 が空いていないと仮定したときの第 1 主面 P S 1 の投影面積) で計算される。なお、貫通孔 1 2 の形状は、正方形に限定されることなく、例えば、円形、楕円形、長方形、菱形などの形状であってもよい。実施の形態 1 では、正方形の貫通孔 1 2 の寸法を一辺 d で説明したが、貫通孔 1 2 の寸法を貫通孔 1 2 の幅で定義してもよい。貫通孔 1 2 の幅とは、貫通孔 1 2 が矩形の場合、対向する辺と辺との距離が最大になる線分に相当する。また、貫通孔 1 2 の幅は、貫通孔 1 2 が円形(楕円含む)の場合、長径に相当する。

10

20

【 0 0 6 3 】

金属製多孔膜 1 0 は、同じ大きさを有する複数の貫通孔 1 2 を含む。ここで、「同じ大きさ」とは、複数の貫通孔 1 2 の寸法のばらつきが $\pm 5 \mu\text{m}$ の範囲内であることを意味する。なお、複数の貫通孔 1 2 のうち一部の貫通孔は、異なる寸法で形成されていてもよい。例えば、分級の精度を損なわない程度で、金属製多孔膜 1 0 にかかる圧力を逃がすために、複数の貫通孔 1 2 のうち一部の貫通孔の寸法を他の貫通孔の寸法と比べて、大きく形成していてもよい。

30

【 0 0 6 4 】

なお、本明細書では、細胞凝集塊を液中に配置し、顕微鏡で観察した際、2 次元の観察像において、細胞凝集塊の外周の任意の 2 つの点を結んだ線のうち、最長なものを細胞凝集塊の長さとし、捕捉対象である細胞凝集塊 3 個以上についての平均値を「細胞凝集塊の大きさ」とした。

【 0 0 6 5 】

図 3 は、図 2 の金属製多孔膜 1 0 の膜部 1 1 の一部を A - A 線で切断した断面図である。図 3 に示すように、貫通孔 1 2 は、膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 側の開口と第 2 主面 P S 2 側の開口とが連続した壁面を通じて連通している。具体的には、貫通孔 1 2 は、第 1 主面 P S 1 側の開口が第 2 主面 P S 2 側の開口に投影可能に設けられている。即ち、金属製多孔膜 1 0 を第 1 主面 P S 1 側、即ち Z 方向から見た場合に、貫通孔 1 2 は、第 1 主面 P S 1 側の開口が第 2 主面 P S 2 側の開口と重なるように設けられている。実施の形態 1 において、貫通孔 1 2 は、その内壁が第 1 主面 P S 1 及び第 2 主面 P S 2 に対して垂直となるように設けられている。尚、第 1 主面 P S 1 側の開口の大きさと第 2 主面 P S 2 側の開口の大きさが異なってもよい。

40

【 0 0 6 6 】

また、金属製多孔膜 1 0 において、細胞凝集塊が捕捉される膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 は、平坦状に形成されている。即ち、膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 は、面一に形成されており、実質的に Z 方向に凹凸が形成されていない。また、膜部 1 1 の第 2 主面 P S 2 につい

50

ても、平坦状に形成されている。さらには、膜部 11 の両主面における面精度は、単離細胞の大きさよりも小さいことが好ましい。膜部 11 の両主面へ単離細胞が付着することを低減できるからである。

【0067】

[分級装置]

本発明の実施の形態 1 に係る分級装置について、図 4 を用いて説明する。図 4 は、実施の形態 1 に係る分級装置 50 の構成を示す概略図である。

【0068】

図 4 に示すように、分級装置 50 は、複数の金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C を備える。複数の金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C は、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c と単離細胞 62 とを含む液体 60 が流れる方向 70 へ直列に配列されている。実施の形態 1 においては、液体 60 が流れる流路において、上流側から金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順に配置されている。即ち、分級装置 50 において、金属製多孔膜 10 A を最上段に配置し、金属製多孔膜 10 B を中央に配置し、金属製多孔膜 10 C を最下段に配置している。また、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C は、液体 60 の流れる方向 70 に対してそれぞれの第 1 主面 P S 1 が直交するように配置されている。

10

【0069】

実施の形態 1 において、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c とは、それぞれ寸法が異なる細胞凝集塊である。細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c の寸法は、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c の順に大きい。即ち、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c において、細胞凝集塊 61 a が最も大きく、細胞凝集塊 61 c が最も小さい。

20

【0070】

本明細書において、「単離細胞」とは、細胞凝集塊を形成する 1 つの細胞であり、細胞凝集塊に接着せずに独立した状態の 1 つの細胞を意味する。即ち、「単離細胞」とは、細胞凝集塊から単離した 1 つの細胞を意味する。あるいは、細胞凝集塊の形成に関与しなかった単離した 1 つの細胞を意味する。実施の形態 1 において、単離細胞 62 の寸法は、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c よりも小さい。

【0071】

金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の膜部 11 a、11 b、11 c には、それぞれ異なる寸法の貫通孔 12 a、12 b、12 c が設けられている。貫通孔 12 a、12 b、12 c の寸法は、貫通孔 12 a、12 b、12 c の順に大きい。即ち、貫通孔 12 a、12 b、12 c において、貫通孔 12 a の寸法が最も大きく、貫通孔 12 c の寸法が最も小さい。

30

【0072】

金属製多孔膜 10 A の貫通孔 12 a は、細胞凝集塊 61 a を通過させずに、細胞凝集塊 61 b、61 c と単離細胞 62 とを通過させることができる寸法で設計されている。具体的に、貫通孔 12 a は、細胞凝集塊 61 a よりも小さく、細胞凝集塊 61 b よりも大きい寸法で設計されている。このため、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c と単離細胞 62 とを含む液体 60 が金属製多孔膜 10 A を通過することによって濾過されると、細胞凝集塊 61 a は、貫通孔 12 a を通り抜けることができず、金属製多孔膜 10 A の第 1 主面 P S 1 上に捕捉される。即ち、金属製多孔膜 10 A の第 1 主面 P S 1 上には、貫通孔 12 a の寸法より大きい細胞凝集塊 61 a が捕捉される。一方、液体 60 に含まれる細胞凝集塊 61 b、61 c 及び単離細胞 62 は、貫通孔 12 a を通り抜けることができる。このため、金属製多孔膜 10 A で濾過された後の液体（濾液）60 A は、細胞凝集塊 61 b、61 c 及び単離細胞 62 を含んでいるが、細胞凝集塊 61 a を含まない。したがって、金属製多孔膜 10 A においては、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c と単離細胞 62 とを含む液体 60 から細胞凝集塊 61 a を分級することができる。

40

【0073】

金属製多孔膜 10 B の貫通孔 12 b は、細胞凝集塊 61 b を通過させずに、細胞凝集塊 61 c と単離細胞 62 とを通過させることができる寸法で設計されている。具体的に、貫

50

通孔 1 2 b は、細胞凝集塊 6 1 b よりも小さく、細胞凝集塊 6 1 c よりも大きい寸法で設計されている。このため、金属製多孔膜 1 0 A で濾過された液体 6 0 A が金属製多孔膜 1 0 B を通過することによって濾過されると、細胞凝集塊 6 1 b は、貫通孔 1 2 b を通り抜けることができず、金属製多孔膜 1 0 B の第 1 主面 P S 1 上に捕捉される。一方、液体 6 0 A に含まれる細胞凝集塊 6 1 c 及び単離細胞 6 2 は、貫通孔 1 2 b を通り抜けることができる。このため、金属製多孔膜 1 0 B で濾過された後の液体（濾液）6 0 B は、細胞凝集塊 6 1 c 及び単離細胞 6 2 を含んでいるが、細胞凝集塊 6 1 b を含まない。したがって、金属製多孔膜 1 0 B においては、細胞凝集塊 6 1 b、6 1 c と単離細胞 6 2 とを含む液体 6 0 A から細胞凝集塊 6 1 b を分級することができる。

【 0 0 7 4 】

金属製多孔膜 1 0 C の貫通孔 1 2 c は、細胞凝集塊 6 1 c を通過させずに、単離細胞 6 2 を通過させることができる寸法で設計されている。具体的に、貫通孔 1 2 c は、細胞凝集塊 6 1 c よりも小さく単離細胞 6 2 よりも大きい寸法で設計されている。このため、金属製多孔膜 1 0 B で濾過された液体 6 0 B が金属製多孔膜 1 0 C を通過することによって濾過されると、細胞凝集塊 6 1 c は、貫通孔 1 2 c を通り抜けることができず、金属製多孔膜 1 0 C の第 1 主面 P S 1 上に捕捉される。一方、液体 6 0 B に含まれる単離細胞 6 2 は、貫通孔 1 2 c を通り抜けることができる。このため、金属製多孔膜 1 0 C で濾過された後の液体（濾液）6 0 C は、単離細胞 6 2 を含んでいるが、細胞凝集塊 6 1 c を含まない。したがって、金属製多孔膜 1 0 C においては、細胞凝集塊 6 1 c と単離細胞 6 2 とを含む液体 6 0 B から細胞凝集塊 6 1 c を分級することができる。

【 0 0 7 5 】

また、金属製多孔膜 1 0 C で濾過された後の液体（濾液）6 0 C に含まれる単離細胞 6 2 は、継代することができる。あるいは、別の細胞凝集塊の作製に利用することができる。

【 0 0 7 6 】

このように、分級装置 5 0 においては、液体 6 0 が流れる流路の上流側から、複数の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C を貫通孔 1 2 a、1 2 b、1 2 c の寸法が大きい順に直列に配列している。このような構成によって、異なる寸法の細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c と単離細胞 6 2 とを含む液体 6 0 から所望の寸法の細胞凝集塊を段階的に分級することができる。

【 0 0 7 7 】

分級装置 5 0 は、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C を保持するハウジングを備えてもよい。この場合、分級装置 5 0 は、流体流入路と流体排出路とが設けられたハウジングに内包された金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C によって流体流入路から流入した流体中の濾過対象物を濾過し、当該金属製多孔膜を通過した流体を流体排出路から排出する。

【 0 0 7 8 】

図 5 は金属製多孔膜 1 0 A を保持するハウジング 2 0 の概略構造を示す分解斜視図であり、図 6 はその分解断面図である。なお、図 5 及び図 6 においては、金属製多孔膜 1 0 A の図示を省略している。

【 0 0 7 9 】

図 5 及び図 6 に示すように、ハウジング 2 0 は、略円筒形の第 1 ハウジング部 2 1 と、略円筒形の第 2 ハウジング部 2 2 とを備えている。

【 0 0 8 0 】

第 1 ハウジング部 2 1 は、金属製多孔膜 1 0 A の第 1 主面 P S 1 に対向するように設けられた流体流入路 2 1 a を備えている。第 1 ハウジング部 2 1 は、金属製多孔膜 1 0 A の外周部を挟持する第 1 枠部材 5 1 と一体に形成されている。すなわち、第 1 枠部材 5 1 は、第 1 ハウジング部 2 1 の一部として構成されている。第 1 枠部材 5 1 の内径は、例えば、6.0 mm である。

【 0 0 8 1 】

第 1 ハウジング部 2 1 の第 1 枠部材 5 1 の周囲には、流体流入路 2 1 a の延在方向と交

10

20

30

40

50

差（例えば、直交）する方向に延びるフランジ部 2 1 b が形成されている。フランジ部 2 1 b には、当該フランジ部 2 1 b の厚み方向に貫通する複数の貫通穴 2 1 c が形成されている。実施の形態 1 において、複数の貫通穴 2 1 c は、90 度間隔で 4 つ形成されている。フランジ部 2 1 b の厚さは、例えば、2.1 mm である。貫通穴 2 1 c の直径は、例えば、1.42 mm である。貫通穴 2 1 c の長さは、例えば、0.9 mm である。

【0082】

第 2 ハウジング部 2 2 は、金属製多孔膜 1 0 A の第 2 主面 P S 2 に対向するように設けられた流体排出路 2 2 a を備えている。第 2 ハウジング部 2 2 は、金属製多孔膜 1 0 A の外周部を挟持する第 2 枠部材 5 2 と一体に形成されている。すなわち、第 2 枠部材 5 2 は、第 2 ハウジング部 2 2 の一部として構成されている。第 2 枠部材 5 2 の内径は、例えば、6.0 mm である。

10

【0083】

第 2 ハウジング部 2 2 の第 2 枠部材 5 2 の周囲には、流体排出路 2 2 a の延在方向と交差（例えば、直交）する方向に延びるフランジ部 2 2 b が形成されている。フランジ部 2 2 b には、当該フランジ部 2 2 b の厚み方向に突出する複数の凸部 2 2 c が形成されている。実施の形態 1 において、複数の凸部 2 2 c は、90 度間隔で 4 つ形成されている。凸部 2 2 c の直径は、例えば、1.4 mm である。凸部 2 2 c の高さは、例えば、0.9 mm である。

【0084】

第 1 ハウジング部 2 1 と第 2 ハウジング部 2 2 とは、複数の凸部 2 2 c が複数の貫通穴 2 1 c に挿入されることで、互いに嵌合するように構成されている。第 1 ハウジング部 2 1 と第 2 ハウジング部 2 2 とが互いに嵌合することで、金属製多孔膜 1 0 A の外周部が第 1 枠部材 5 1 と第 2 枠部材 5 2 との間で保持される。

20

【0085】

ハウジング 2 0 は、例えば、ルアーロック型シリンジ（図示せず）に取り付けて使用することができる。この場合、第 1 ハウジング部 2 1 の末端部 2 1 d（図 6 では上端部）と第 2 ハウジング部 2 2 の末端部 2 2 d（図 6 では下端部）の少なくとも一方に、ルアーロック型シリンジと接続可能な突条部等を設ければよい。

【0086】

また、分級装置 5 0 においては、液体 6 0、6 0 A、6 0 B、6 0 C の流れる流路が外気から閉鎖されていてもよい。このように、液体 6 0、6 0 A、6 0 B、6 0 C を外気から遮断することによって、液体 6 0、6 0 A、6 0 B、6 0 C に含まれる細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c 及び単離細胞 6 2 が汚染されるのを防止することができる。

30

【0087】

[分級方法]

本発明の実施の形態 1 に係る分級方法について、図 7 を用いて説明する。図 7 は、実施の形態 1 に係る分級方法を示すフローチャートである。

【0088】

実施の形態 1 に係る分級方法は、複数の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C を用いて細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c と単離細胞 6 2 とを含む液体 6 0 を、細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c 及び単離細胞 6 2 のそれぞれに分級する。

40

【0089】

図 7 に示すように、ステップ S T 1 1 において、複数の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C を準備する。具体的には、液体 6 0 が流れる流路に、上流から金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C の順に直列に配列する（図 4 参照）。金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C については、前述した分級装置 5 0 の構成と同じであるため、説明を省略する。

【0090】

なお、ステップ S T 1 1 で準備する金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C は、滅菌処理がされているものであってもよい。滅菌処理は、例えば、ガンマ線照射によるガンマ線滅菌、高温高圧の飽和水蒸気によるオートクレーブ滅菌、酸化エチレンガスを用いた酸化工

50

チレングス滅菌、又はオゾンによる酸化滅菌などである。

【0091】

ステップST12において、金属製多孔膜10A、10B、10Cによって細胞凝集塊61a、61b、61cをそれぞれ分級する。ステップST12では、金属製多孔膜10A、10B、10Cに、細胞凝集塊61a、61b、61cと単離細胞62とを含む液体60を通過させることによって濾過を行う。

【0092】

より詳しく説明すると、まず、液体60を金属製多孔膜10Aに通過させることによって濾過を行う。金属製多孔膜10Aによる液体60の濾過によって、金属製多孔膜10Aの第1主面PS1上に、貫通孔12aの寸法より大きい細胞凝集塊61aを捕捉する。これにより、細胞凝集塊61aを分級する。

10

【0093】

次に、金属製多孔膜10Aで濾過された後の濾液、即ち細胞凝集塊61b、61cと単離細胞62とを含む液体60Aを、金属製多孔膜10Aの下流に配置された金属製多孔膜10Bに通過させることによって濾過を行う。金属製多孔膜10Bによる液体60Aの濾過によって、金属製多孔膜10Bの第1主面PS1上に、貫通孔12bの寸法より大きい細胞凝集塊61bを捕捉する。これにより、細胞凝集塊61bを分級する。

【0094】

次に、金属製多孔膜10Bで濾過された後の濾液、即ち細胞凝集塊61cと単離細胞62とを含む液体60Bを、金属製多孔膜10Bの下流に配置された金属製多孔膜10Cに通過させることによって濾過を行う。金属製多孔膜10Cによる液体60Bの濾過によって、金属製多孔膜10Cの第1主面PS1上に、貫通孔12cの寸法より大きい細胞凝集塊61cを捕捉する。これにより、細胞凝集塊61cを分級する。

20

【0095】

また、金属製多孔膜10Cで液体60Bを濾過することによって、濾液として単離細胞62を含む液体60Cを得ることができる。この液体60Cから取り出した単離細胞62は、継代することができる。即ち、液体60Cに含まれる単離細胞62を新しい培地に移動させて、再度培養することができる。

【0096】

ステップST13において、金属製多孔膜10A、10B、10Cに捕捉された細胞凝集塊61a、61b、61cを洗浄液で洗浄する。例えば、液体60が流れる方向70に洗浄液を流して、金属製多孔膜10A、10B、10Cに捕捉された状態で細胞凝集塊61a、61b、61cを洗浄する。なお、細胞凝集塊61a、61b、61cの洗浄方法については、これに限定されるものではなく、様々な洗浄方法を用いてもよい。また、ステップST13を省略しても良い。

30

【0097】

ステップST14において、金属製多孔膜10A、10B、10Cに捕捉された細胞凝集塊61a、61b、61cを回収する。例えば、細胞凝集塊61aを捕捉した状態の金属製多孔膜10Aを取り外し、金属製多孔膜10Aを培地に入れて、金属製多孔膜10Aの厚み方向に振動させる。これにより、金属製多孔膜10Aに捕捉されていた細胞凝集塊61aを、金属製多孔膜10Aの第1主面PS1から分離し、回収することができる。あるいは、細胞凝集塊61aが付着していない第2主面PS2から第1主面PS1に向かって貫通孔12aを通じて回収液を通過させることにより、細胞凝集塊61aを金属製多孔膜10Aの第1主面PS1から分離し、回収することができる。なお、細胞凝集塊61a、61b、61cの回収方法については、これに限定されず、様々な回収方法を用いてもよい。

40

【0098】

このようにして回収された細胞凝集塊61a、61b、61cは、薬効の調査に用いられる。例えば、がんに対する薬の効果を調査する場合、初期がんの薬効調査では、細胞凝集塊61a、61bより寸法の小さい細胞凝集塊61cを用いて薬効調査を行う。一方、

50

進行がんの薬効調査では、細胞凝集塊 6 1 a を用いて薬効調査を行う。

【 0 0 9 9 】

[効果]

実施の形態 1 に係る金属製多孔膜 1 0 によれば、以下の効果を奏することができる。

【 0 1 0 0 】

金属製多孔膜 1 0 においては、細胞凝集塊 6 1 が捕捉される第 1 主面 P S 1 と、第 1 主面に対向する第 2 主面 P S 2 とを有すると共に、第 1 主面 P S 1 と第 2 主面 P S 2 とを連通する複数の貫通孔 1 2 を有する膜部 1 1 を備えている。このような構成により、細胞凝集塊 6 1 を分級する際の寸法精度を高めることができるため、細胞凝集塊 6 1 の回収率を高めることができる。

10

【 0 1 0 1 】

金属製多孔膜 1 0 は、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタと比べて、剛性が高い。そのため、細胞凝集塊 6 1 を含む液体 6 0 を濾過する際、金属製多孔膜 1 0 では、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタと比べて、膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 に液体 6 0 による圧力が加わっても貫通孔 1 2 が変形しにくい。したがって、金属製多孔膜 1 0 は、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタと比べて、貫通孔 1 2 より大きい細胞凝集塊 6 1 を、金属製多孔膜 1 0 の第 1 主面 P S 1 上に確実に捕捉することができる。なお、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタは、膜面に液体 6 0 による圧力が加わると、貫通孔が変形しやすいため、貫通孔よりも大きい細胞凝集塊 6 1 がフィルタを通過してしまう場合がある。

20

【 0 1 0 2 】

金属製多孔膜 1 0 において、貫通孔 1 2 は、膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 側の開口と第 2 主面 P S 2 側の開口とが連続した壁面を通じて連通している。また、貫通孔 1 2 では、膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 側の開口が第 2 主面 P S 2 側の開口に投影可能に設けられている。このような構成により、貫通孔 1 2 より小さい細胞凝集塊 6 1 が貫通孔 1 2 を通り抜けやすくなっている。なお、メンブレンフィルタでは、貫通孔が膜部の第 1 主面側の開口と第 2 主面側の開口とが連続した壁面を通じて連通しておらず、貫通孔 1 2 より小さい細胞凝集塊 6 1 が貫通孔を通りにくい。このため、メンブレンフィルタでは、フィルタ内に細胞凝集塊 6 1 が残ってしまう。

【 0 1 0 3 】

また、金属製多孔膜 1 0 において、細胞凝集塊 6 1 を捕捉する膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 が平坦状に形成されている。即ち、金属製多孔膜 1 0 の膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 は、面一に形成されている。このような構成により、金属製多孔膜 1 0 の貫通孔 1 2 よりも小さい細胞凝集塊 6 1 は、貫通孔 1 2 へ流入しやすくなっている。また、金属製多孔膜 1 0 の膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 上に捕捉された細胞凝集塊 6 1 を回収するとき、細胞凝集塊 6 1 を膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 から容易に分離することができる。なお、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタでは、細胞凝集塊 6 1 を捕捉する膜部の第 1 主面に凹凸が形成されている。このため、貫通孔より小さい細胞凝集塊 6 1 であっても、この凹凸部分に引っ掛かることがあるため、所望の寸法以外の細胞凝集塊 6 1 を回収することがある。また、細胞凝集塊 6 1 を回収するとき、この凹凸部分に細胞凝集塊 6 1 が引っ掛かることがある。

30

40

【 0 1 0 4 】

金属製多孔膜 1 0 は火炎滅菌によっても変化することなく、さらには、熱伝導性も高いため、高い滅菌効果が得られる。

【 0 1 0 5 】

このように、金属製多孔膜 1 0 では、貫通孔 1 2 より大きい細胞凝集塊 6 1 をより確実に捕捉できると共に、貫通孔 1 2 より小さい細胞凝集塊 6 1 を貫通孔 1 2 に流入させやすい構成になっている。また、金属製多孔膜 1 0 では、膜部 1 1 の第 1 主面 P S 1 から細胞凝集塊 6 1 を簡単に分離して回収することができる。このため、金属製多孔膜 1 0 は、メンブレン又はナイロンメッシュ等のフィルタに比べて、分級する細胞凝集塊 6

50

1の寸法精度を向上させると共に、回収率を向上させることができる。

【0106】

実施の形態1に係る分級装置50によれば、以下の効果を奏することができる。

【0107】

分級装置50によれば、前述した金属製多孔膜10を用いて細胞凝集塊61の分級を行うため、細胞凝集塊61の回収率を高めることができる。

【0108】

分級装置50は、異なる寸法の貫通孔12a、12b、12cを有する金属製多孔膜10A、10B、10Cを備える。複数の金属製多孔膜10A、10B、10Cは、細胞凝集塊61a、61b、61cを含む液体60が流れる流路の上流側から、貫通孔12a、12b、12cの寸法の大きい順に直列に配列されている。このような構成により、複数の金属製多孔膜10A、10B、10Cを用いて、液体60から細胞凝集塊61a、61b、61cをそれぞれ分級することができる。即ち、分級装置50によれば、段階的に寸法の異なる細胞凝集塊61a、61b、61cを得ることができる。また、分級装置50では、上流側の金属製多孔膜によって捕捉し損ねた細胞凝集塊61a、61b、61cを、下流側の金属製多孔膜によって確実に回収することができる。

10

【0109】

分級装置50において、最下段に位置する金属製多孔膜10Cの貫通孔12cの寸法は、単離細胞62を通過させることができる大きさに設計されている。このような構成により、細胞凝集塊61a、61b、61cを分級した後、単離細胞62を含む液体60Cを得ることができる。そのため、単離細胞62を継代することができる。即ち、単離細胞62を新しい培地に移動させて、再度培養することによって、例えば、細胞の生死判定を行うことができる。あるいは、単離細胞62を別の細胞凝集塊の作製に利用することもできる。

20

【0110】

分級装置50において、金属製多孔膜10A、10B、10Cは、当該金属製多孔膜の第1主面PS1に対向するように設けられた流体流入路21aと、当該金属製多孔膜の第2主面PS2に対向するように設けられた流体排出路22aとを有するハウジング20に收容することができる。このような構成により、流体流入路21aと流体排出路22aとを有するハウジング20内に金属製多孔膜10A、10B、10Cを容易に保持することができる。また、金属製多孔膜10A、10B、10Cの外周部を挟持する第1枠部材51及び第2枠部材52が、それぞれ第1ハウジング部21及び第2ハウジング部22と一体に形成されているので、分級装置50の部品点数を減らすことができる。

30

【0111】

実施の形態1に係る分級方法によれば、以下の効果を奏することができる。

【0112】

分級方法によれば、前述した金属製多孔膜10を用いて、細胞凝集塊61の分級を行うため、細胞凝集塊61の回収率を高めることができる。また、分級方法は、前述した分級装置50の効果と同様の効果を有する。

【0113】

分級方法において、細胞凝集塊61a、61b、61cを金属製多孔膜10A、10B、10Cで捕捉した状態で洗浄することができる。例えば、液体60の流れる方向70の方向に洗浄液を流すことによって、金属製多孔膜10A、10B、10Cで捕捉した細胞凝集塊61a、61b、61cを洗浄することができる。このため、分級した細胞凝集塊61a、61b、61cを容易に洗浄することができる。

40

【0114】

分級方法では、例えば、細胞凝集塊61a、61b、61cを捕捉した金属製多孔膜10A、10B、10Cを培地の中で、金属製多孔膜10A、10B、10Cの厚さ方向に振動させる等によって、細胞凝集塊61a、61b、61cを容易に回収することができる。あるいは、細胞凝集塊61aが付着していない第2主面PS2から第1主面PS1に

50

向かって貫通孔 1 2 a を通じて回収液を通過させることにより、細胞凝集塊 6 1 a を金属製多孔膜 1 0 A の第 1 主面 P S 1 から分離し、回収することができる。このように、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C のそれぞれに捕捉された細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c は、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C から容易に分離することができる。

【0115】

分級方法では、分級された細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c を用いて薬効調査をすることができる。分級された細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c は、それぞれ均一な寸法となっているため、薬効調査データのばらつきを低減することができる。

【0116】

なお、実施の形態 1 において、分級装置 5 0 は、複数の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C を備える構成について説明したが、これに限定されない。分級装置 5 0 は、少なくとも 1 つ以上の金属製多孔膜 1 0 を備えていればよい。また、複数の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C は、それぞれ異なる寸法の貫通孔 1 2 a、1 2 b、1 2 c を設けた構成について説明したが、これに限定されない。例えば、複数の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C は、同じ寸法の貫通孔 1 2 を設けてもよい。このような構成により、上流側の金属製多孔膜 1 0 A で捕捉し損ねた細胞凝集塊 6 1 a を下流側の金属製多孔膜 1 0 B で捕捉することができる。

10

【0117】

実施の形態 1 において、最下段の金属製多孔膜 1 0 C の貫通孔 1 2 c が、単離細胞 6 2 を通過させることができる寸法で設計されている構成について説明したが、これに限定されない。金属製多孔膜 1 0 C の貫通孔 1 2 c は、例えば、細胞凝集塊から単離した単離細胞 6 2 の大きさ以下で設計されていてもよい。即ち、金属製多孔膜 1 0 C の貫通孔 1 2 c は、単離細胞 6 2 と同じ寸法で設計されていてもよいし、又は単離細胞 6 2 よりも小さい寸法で設計されていてもよい。

20

【0118】

実施の形態 1 において、第 1 ハウジング部 2 1 と第 2 ハウジング部 2 2 とは、複数の凸部 2 2 c が複数の貫通穴 2 1 c に挿入されることで、互いに嵌合するように構成したが、本発明はこれに限定されない。例えば、第 1 ハウジング部 2 1 に複数の貫通穴を設け、第 2 ハウジング部 2 2 に複数の凸部を設け、当該複数の凸部を複数の貫通穴に挿入することで、第 1 ハウジング部 2 1 と第 2 ハウジング部 2 2 とが互いに嵌合するように構成されてもよい。第 1 ハウジング部 2 1 と第 2 ハウジング部 2 2 とが互いに嵌合する構造であればよい。

30

【0119】

実施の形態 1 において、第 1 枠部材 5 1 及び第 2 枠部材 5 2 が、それぞれ第 1 ハウジング部 2 1 及び第 2 ハウジング部 2 2 と一体に形成される構成について説明したが、これに限定されない。例えば、第 1 枠部材 5 1 及び第 2 枠部材 5 2 は、第 1 ハウジング部 2 1 及び第 2 ハウジング部 2 2 と別々の部材で構成されていてもよい。

【0120】

以下、実施例について説明する。

【0121】

(実施例 1)

実施例 1 においては、実施の形態 1 の金属製多孔膜 1 0 を用いて、細胞凝集塊 6 1 の分級を行った。また、比較例 1 として、ナイロンメッシュを用いて、細胞凝集塊 6 1 の分級を行った。

40

【0122】

実施例 1 及び比較例 1 において、細胞凝集塊 6 1 を含む液体 6 0 を図 8 に示す。図 8 に示すように、液体 6 0 には、異なる寸法の複数の細胞凝集塊 6 1 が含まれている。

【0123】

図 8 に示す細胞凝集塊 6 1 は、直径 3 5 mm のディッシュに N I H 3 T 3 / r a s が含まれた液量 0 . 2 m l の細胞懸濁液を播種し、汎用のインキュベーターで 1 日培養するこ

50

とによって作製した。このとき、培地は3 ml、総細胞凝集塊数は約 1×10^5 個であった。

【0124】

実施例1は、実施の形態1の金属製多孔膜10を用いた。金属製多孔膜10は、ニッケル製の円形のメッシュである。金属製多孔膜10は、外径が7.8 mmであり、中央部に直径6 mmの膜部11を形成している。膜部11には、正方形の貫通孔12が正方格子配列で設けられている。貫通孔12の一辺は、120 μ mである。貫通孔12の間隔、即ち2つの貫通孔12、12の間の金属部分の距離は、50 μ mである。言い換えると、貫通孔12の格子間隔は170 μ mである。厚みは17 μ mである。また、金属製多孔膜10は、分級を行う前にガンマ線照射によって滅菌処理が行われている。実施例1では、図8

10

【0125】

比較例1は、ナイロンメッシュを用いた。ナイロンメッシュは、ナイロン6.6製の円形のメッシュである。ナイロンメッシュは、外径が7.8 mmであり、中央部に直径6 mmの膜部を形成している。膜部には、正方形の貫通孔が正方格子配列で設けられている。貫通孔の一辺は、131 μ mである。貫通孔の間隔、即ちナイロンメッシュの線径は、72 μ mである。言い換えると、貫通孔の格子間隔は203 μ mである。なお、ナイロンメッシュは、ガンマ線を照射すると、メッシュ自体が損傷するため、滅菌処理を行っていない。比較例1では、図8に示す異なる寸法の細胞凝集塊61を含む液体60を、ナイロン

20

【0126】

図9は、実施例1において、細胞凝集塊61を分級した後の金属製多孔膜10の一部の写真を示す。図10は、比較例1において、細胞凝集塊61を分級した後のナイロンメッシュの一部の写真を示す。

【0127】

図9に示す実施例1の金属製多孔膜10では、図10に示す比較例1のナイロンメッシュと比べて、より多くの細胞凝集塊61が捕捉されていることがわかる。即ち、実施例1では、比較例1と比べて、より多くの細胞凝集塊61を回収できていることがわかる。

【0128】

比較例1のメッシュ構造体では、液体60が通過することによって膜部に圧力がかかると、貫通孔が変形する。このため、ナイロンメッシュの貫通孔よりも大きい細胞凝集塊61が、変形した貫通孔を通過してしまうことがある。このため、比較例1では、回収されるべき寸法の細胞凝集塊61が、ナイロンメッシュによって回収できなかったものと考えられる。

30

【0129】

図11は、ナイロンメッシュの交差部Z1の拡大写真を示す。ナイロンメッシュは、線状のナイロンを編み込んで作製されているため、線状のナイロンが交差する交差部Z1では、ナイロンメッシュの厚み方向に段差部が形成される。即ち、ナイロンメッシュにおいて、細胞凝集塊61を捕捉する主面が、複数の段差部により凹凸を含む面となっている。このため、ナイロンメッシュの貫通孔を通過可能な細胞凝集塊61が、交差部Z1に引っ掛かってしまうことがある。このように、ナイロンメッシュの交差部Z1に引っ掛かった細胞凝集塊61は、回収できなくなることがある。また、ナイロンメッシュの交差部Z1に引っ掛かった細胞凝集塊61を回収できたとしても、この細胞凝集塊61は、所望の寸法のものではないため、分級したい細胞凝集塊61を得ることができない。

40

【0130】

一方、実施例1の金属製多孔膜10では、液体60が通過することによって膜部11に圧力がかかっても、貫通孔12が変形しにくい。このため、金属製多孔膜10の貫通孔12よりも大きい細胞凝集塊61は、貫通孔12を通過することが少ない。また、実施例1では、金属製多孔膜10の第1主面PS1は、平坦状に形成されている。このため、実施

50

例 1 では、金属製多孔膜 10 の第 1 主面 P S 1 で、貫通孔 12 を通過可能な寸法の細胞凝集塊 61 が引っ掛からずに、貫通孔 12 を通過することができる。したがって、実施例 1 では、比較例 1 よりも多くの細胞凝集塊 61 を回収することができたと考えられる。また、実施例 1 では、比較例 1 よりも寸法精度を向上させた細胞凝集塊 61 を回収することができると考えられる。

【0131】

このように、比較例 1 のナイロンメッシュでは、細胞凝集塊 61 の回収率の低下、分級の誤差、再現性の低下が生じる。したがって、実施例 1 の金属製多孔膜 10 では、ナイロンメッシュと比べて、細胞凝集塊 61 の回収率、分級の精度、再現性を向上させることができる。

10

【0132】

(実施例 2)

実施例 2 においては、実施の形態 1 の分級装置 50 を用いて、異なる寸法の複数の細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c の分級を行った。なお、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c の寸法については、細胞凝集塊 61 a が最も大きく、細胞凝集塊 61 c が最も小さい寸法とする。

【0133】

実施例 2 は、実施の形態 1 の分級装置 50 を用いた。分級装置 50 の金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C は、ニッケル製の円形のメッシュである。金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C は、外径が 7.8 mm であり、中央部に直径 6 mm の膜部 11 a、11 b、11 c を形成している。膜部 11 a、11 b、11 c には、正方形の貫通孔 12 a、12 b、12 c が正方格子配列で設けられている。貫通孔 12 a、12 b、12 c の寸法は、それぞれ正方形の一辺が 180 μ m、120 μ m、58 μ m、格子間隔が 260 μ m、170 μ m、76.3 μ m、厚みが 20 μ m、17 μ m、20 μ m である。また、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C は、分級を行う前にガンマ線照射によって滅菌処理が行われている。実施例 2 の分級装置 50 では、液体 60 の流路の上流側から金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順で直列に配列されている。

20

【0134】

図 12 は、実施例 2 において異なる寸法の細胞凝集塊を含む液体 60 を示す。実施例 2 では、図 12 に示す異なる寸法の細胞凝集塊を含む液体 60 を 1 mL、分級装置 50 に投入し、デッドエンド方式にて濾過を行うことによって細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c の分級を行った。濾過を開始してから 5 分後に、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C をそれぞれ取り出した。次に、各々の金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C について、細胞凝集塊が捕捉された面（第 1 主面 P S 1）を下側にした状態で、細胞凝集塊が捕捉されていない面（第 2 主面 P S 2）から生理食塩水 5 mL を通過させることで、シャーレに細胞凝集塊を回収した。回収した細胞凝集塊を顕微鏡にて観察した。

30

【0135】

図 13 は、実施例 2 において金属製多孔膜 10 A で回収した細胞凝集塊の拡大写真を示す。図 13 に示すように、金属製多孔膜 10 A では、貫通孔 12 a より大きい細胞凝集塊 61 a が捕捉されていることがわかる。

40

【0136】

図 14 は、実施例 2 において金属製多孔膜 10 B で回収した細胞凝集塊の拡大写真を示す。図 14 に示すように、金属製多孔膜 10 B では、貫通孔 12 b より大きい細胞凝集塊 61 b が捕捉されていることがわかる。

【0137】

図 15 は、実施例 2 において金属製多孔膜 10 C で回収した細胞凝集塊拡大写真を示す。図 15 に示すように、金属製多孔膜 10 C では、貫通孔 12 c より大きい細胞凝集塊 61 c が捕捉されていることがわかる。

【0138】

また、前述した実施例 2 の条件と同じ条件で液体 60 の濾過を行うことによって分級を

50

行い、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C で濾過された後の液体 60 A、60 B、60 C の一部を顕微鏡にて拡大観察した。

【0139】

図 16 は、実施例 2 において金属製多孔膜 10 A を通過した後の液体 60 A の一部を拡大した写真を示す。図 16 に示すように、金属製多孔膜 10 A を通過した液体 60 A には、細胞凝集塊 61 b、61 c と単離細胞 62 とが含まれているが、細胞凝集塊 61 a は含まれていないことがわかる。

【0140】

図 17 は、実施例 2 において金属製多孔膜 10 B を通過した後の液体 60 B の一部を拡大した写真を示す。図 17 に示すように、金属製多孔膜 10 B を通過した液体 60 B には、細胞凝集塊 61 c と単離細胞 62 とが含まれているが、細胞凝集塊 61 b は含まれていないことがわかる。

10

【0141】

図 18 は、実施例 2 において金属製多孔膜 10 C を通過した後の液体 60 C の一部を拡大した写真を示す。図 18 に示すように、金属製多孔膜 10 C を通過した液体 60 C には、単離細胞 62 が含まれているが、細胞凝集塊 61 c は含まれていないことがわかる。

【0142】

このように、実施例 2 の分級装置 50 では、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C において所望の寸法の細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c を捕捉していることができる。即ち、実施例 2 の分級装置 50 では、段階的に異なる寸法の細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c を分級することができる。

20

【0143】

(実施例 3)

実施例 3 においては、実施の形態 1 の分級装置 50 を用いて、培養した細胞凝集塊 (スフェロイド) を大きさ毎に分級した。

【0144】

細胞凝集塊は、ras 遺伝子が導入された NIH 3 T 3 細胞を 10% FBS が含まれた 1% PCSM の DMEM 培地で培養した。使用した容器は、3.5 mm ディッシュであり、播種細胞数は 3×10^5 個/ml であった。37 度のインキュベーション内で 24 時間培養した結果、様々な大きさの細胞凝集塊を生成することができた。

30

【0145】

図 19 は、培養した細胞凝集塊の一部を拡大した写真を示す。図 19 に示すように、分級する前において、異なるサイズの細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c が生成されていることがわかる。

【0146】

実施例 3 において、分級装置 50 の金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の貫通孔 12 a、12 b、12 c の孔サイズは、それぞれ、 $180 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{m}$ 、 $58 \mu\text{m}$ である。ここで、貫通孔 12 a、12 b、12 c の形状は、正方形であり、孔サイズとは正方形の孔の一辺の長さ d を意味する。

【0147】

実施例 3 では、図 19 に示す異なるサイズの細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c を含む培地 60 を、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順に通過させることによって、細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c の分級を行った。具体的には、新たに培養液を投入した 3.5 mm ディッシュを 3 個用意し、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C で捕捉された細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c を、逆洗することによってそれぞれの 3.5 mm ディッシュに移した。

40

【0148】

図 20 は、実施例 3 において金属製多孔膜 10 A で捕捉した細胞凝集塊 61 a の一部を拡大した写真を示す。図 21 は、実施例 3 において金属製多孔膜 10 B で捕捉した細胞凝集塊 61 b の一部を拡大した写真を示す。図 22 は、実施例 3 において金属製多孔膜 10

50

Cで捕捉した細胞凝集塊61cの一部を拡大した写真を示す。図23は、実施例3において金属製多孔膜10Cを通過した後の液体60の一部を拡大した写真を示す。

【0149】

図20～22に示すように、金属製多孔膜10A、10B、10Cでは、それぞれほぼ均等なサイズの細胞凝集塊61a、61b、61cが捕捉されていることがわかる。また、図23に示すように、金属製多孔膜10Cを通過した後の液体60には、細胞凝集塊61a、61b、61cが含まれておらず、細胞凝集塊61a、61b、61cよりも小さいサイズの細胞凝集塊61dが含まれていることがわかる。なお、金属製多孔膜10Cを通過した後の液体60には、細胞凝集塊61dの他に、例えば、単離細胞62などを含んでいてもよい。

10

【0150】

このように、実施例3において、異なる大きさの細胞凝集塊61a、61b、61cを含む培地60(図19参照)を、金属製多孔膜10A、10B、10Cに通過させることによって、細胞凝集塊61a、61b、61cをサイズ毎に分級することができたことがわかる(図20～23参照)。

【0151】

次に、細胞凝集塊のサイズと活性の関係を調べるために、細胞凝集塊を含む培地をディッシュ毎に等分し、等分した一方の培地に対してATP活性量を測定した。ここで、ATP活性量の測定は、ATP定量アッセイ(Cell Titer - Glo(登録商標), Promega)によって行った。ATP活性量とは、細胞の活性、即ち細胞の生存率を意味している。即ち、ATP活性量の値が大きいほど、生きた細胞が多いことを意味する。なお、等分したうちの他方の培地は、後述の再培養に使用した。

20

【0152】

各ディッシュ内の細胞凝集塊を、ピペットで無作為に1個ずつ選択し、U底プレート(375ウェル)に投入した。そして、Cell Image rで各細胞凝集塊の直径とATP活性量を測定した。なお、孔サイズ180 μ mの金属製多孔膜10Aで捕捉された細胞凝集塊61aは17個、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜10Bで捕捉された細胞凝集塊61bは20個、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜10Cで捕捉された細胞凝集塊61cは12個を選択した。

【0153】

図24は、実施例3において、細胞凝集塊の直径に対するATP活性量の測定結果を示す。図24の横軸は細胞凝集塊の直径、縦軸はATP活性量である。図24において、四角の点は、孔サイズ180 μ mの金属製多孔膜10Aで捕捉された細胞凝集塊61aに関するデータ、三角の点は、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜10Bで捕捉された細胞凝集塊61bに関するデータ、菱形の点は、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜10Cで捕捉された細胞凝集塊61cに関するデータを示す。

30

【0154】

図24に示すように、金属製多孔膜10A、10B、10Cのそれぞれで捕捉された細胞の活性が保たれていることがわかる。具体的に説明すると、ATP活性量は、生きている細胞が多いほど、活性量(RLU発光量)の値が大きくなる。細胞凝集塊は、サイズが大きくなるほど、多くの細胞を含んで構成される。そのため、細胞凝集塊のサイズが大きくなるほど、細胞凝集塊に含まれる細胞が生きていれば、ATP活性量の値は大きくなる。

40

【0155】

図24に示すように、細胞凝集塊の直径が大きくなるほど、ATPの活性量の値が大きくなっていることがわかる。このことから、金属製多孔膜10A、10B、10Cのそれぞれで捕捉された細胞の活性が保たれていることがわかる。即ち、金属製多孔膜10A、10B、10Cのそれぞれで捕捉された細胞が生存していることがわかる。なお、元来、細胞凝集塊は、表面近傍の細胞のみ活性が保たれており、細胞凝集塊の中心部の細胞の活性は失われている。そのため、細胞凝集塊の直径とATP活性量の関係は、2次から3次

50

の曲線になる。

【0156】

金属製多孔膜10A、10B、10Cのそれぞれで捕捉された細胞凝集塊に関して、細胞凝集塊の直径の最大値、最小値、平均値、及び標準偏差を表1に示す。

【0157】

【表1】

表1

細胞凝集塊の直径	孔径180 μ m画分 (n=17)	孔径100 μ m画分 (n=20)	孔径58 μ m画分 (n=12)
最大値(μ m)	495	268	158
最小値(μ m)	267	138	65
平均値(μ m)	365	203	111
標準偏差	68	36	30

10

【0158】

表1に示すように、孔サイズ180 μ mの金属製多孔膜金属製多孔膜10A、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜10B、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜10Cにおいて、捕捉された細胞凝集塊の直径の最大値は、それぞれ、495 μ m、268 μ m、158 μ mであった。捕捉された細胞凝集塊の直径の最小値は、金属製多孔膜金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に、267 μ m、138 μ m、65 μ mであった。捕捉された細胞凝集塊の直径の平均値は、金属製多孔膜金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に、365 μ m、203 μ m、111 μ mであった。捕捉された細胞凝集塊の標準偏差は、金属製多孔膜金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に、68、36、30であった。また、捕捉された細胞凝集塊の平均値に対する標準偏差の割合は、金属製多孔膜金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に、19%、18%、27%であった。

20

【0159】

更に、分級した細胞凝集塊61a、61b、61cを再培養した。なお、再培養には、前述の等分したうちの他方の培地を用いた。

【0160】

各ディッシュ内の細胞凝集塊61a、61b、61cを、ピペットで無作為に3個ずつ選択して1組とし、この1組をU底プレート(375ウェル)に投入した。図25は、実施例3において、孔サイズ180 μ mの金属製多孔膜10Aで捕捉された1組の細胞凝集塊61aの写真を示す。図26は、実施例3において、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜10Bで捕捉された1組の細胞凝集塊61bの写真を示す。図27は、実施例3において、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜10Cで捕捉された1組の細胞凝集塊61cの写真を示す。

30

【0161】

実施例3では、金属製多孔膜10Aで捕捉された図25に示す細胞凝集塊61aを33組、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜10Bで捕捉された図26に示す細胞凝集塊61bを43組、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜10Cで捕捉された図27に示す細胞凝集塊61cを34組作製した。これらを37度のインキュベーション内で24時間培養した結果、3個の細胞凝集塊から1個の細胞凝集塊を作製することができた。

40

【0162】

図28は、実施例3において、金属製多孔膜10Aで捕捉した図25に示す3個の細胞凝集塊61aを培養して作製した1個の細胞凝集塊63の写真を示す。図29は、金属製多孔膜10Bで捕捉した図26に示す3個の細胞凝集塊61bを培養して作製した1個の細胞凝集塊64の写真を示す。図30は、金属製多孔膜10Cで捕捉した図27に示す3個の細胞凝集塊61cを培養して作製した1個の細胞凝集塊65の写真を示す。

【0163】

50

再培養して作製した図28～30に示す細胞凝集塊63、64、65について、前述のCell Imagerを使用して大きさを測定した。細胞凝集塊63、64、65の大きさの平均値と標準偏差は、それぞれ、 $340 \pm 81 \mu\text{m}$ 、 $194 \pm 34 \mu\text{m}$ 、 $110 \pm 30 \mu\text{m}$ であった。また、細胞凝集塊63、64、65の大きさの平均値に対する標準偏差の割合は、それぞれ、24%、18%、27%であった。これらの値は、金属製多孔膜10A、10B、10Cで分級した表1に示す結果と同等であった。

【0164】

以上の結果は、細胞凝集塊の作製において、金属製多孔膜10A、10B、10Cを使用して、異なるサイズの細胞凝集塊を含む培地から所望のサイズの細胞凝集塊を分級可能であることを示している。また、金属製多孔膜10A、10B、10Cで分級された細胞凝集塊を用いて更に培養した場合、培養される細胞凝集塊の大きさを均一化させやすいことを示している。

【0165】

(実施例4)

実施例4においては、実施の形態1の分級装置50を用いて分級した細胞凝集塊(スフェロイド)を用いて薬効調査を行った。また、比較例2として、分級していない細胞凝集塊、即ち異なるサイズの細胞凝集塊を用いて薬効調査を行った。

【0166】

実施例4及び比較例2では、抗がん剤ボルテゾミブ(Bortezomib)に対する薬効を調査した。ボルテゾミブは、再発または難治性多発性骨髄腫の治療に用いられるプロテアーム阻害剤である。作用機序としては、アポトーシス誘導、増殖抑制、血管新生抑制により抗腫瘍作用を示すことが知られている。また、NF-kBの活性化を阻害し、接着阻害及び/又はIL-6分泌の抑制を引き起こすことが知られている。

【0167】

細胞凝集塊は、ras遺伝子が導入されたNIH3T3/EGFP細胞を10%FBSが含まれた1%PCSMのDMEM培地で培養した。使用した容器は、3.5mmディッシュであり、播種細胞数は 1×10^5 個/mlであった。37度のインキュベーション内で24時間培養した結果、様々な大きさの細胞凝集塊を生成することができた。この細胞凝集塊を含む培地を二等分し、一方を実施例4に、他方を比較例2に使用した。

【0168】

実施例4では、孔サイズ180 μm の金属製多孔膜10A、孔サイズ100 μm の金属製多孔膜10Bを通過させた後、金属製多孔膜10B上に捕捉された細胞凝集塊を1個ずつ選択し、U底プレート(375ウェル)に投入した。そして、Cell Imagerで各細胞凝集塊の直径と体積を求めた。

【0169】

実施例4では、次に、各ウェルに対して、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入した。その後、37度のインキュベーション内で24時間培養した後、ATP定量アッセイ(Cell Titer-Glo(登録商標), Promega)によってATP活性量を測定した。さらにその後、37度のインキュベーション内で24時間培養した後(合計48時間)、ATP活性量を測定した。

【0170】

図31は、実施例4において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入して24時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す。図32は、実施例4において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100nM投入して48時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す。なお、図31及び図32において、縦軸はATP活性率を示し、横軸はボルテゾミブ濃度を示す。

【0171】

一方、比較例2では、金属製多孔膜による分級を行わずに細胞凝集塊を1個ずつ選択し、U底プレート(375ウェル)に投入した。そして、Cell Imagerで各細胞凝集塊の直径と体積を求めた。

10

20

30

40

50

【0172】

比較例2では、次に、各ウェルに対して、ボルテゾミブを1、3、10、20、100 nM投入した。その後、37度のインキュベーション内で24時間培養した後、ATP定量アッセイ(Cell Titer - Glo (登録商標), Promega)によってATP活性量を測定した。さらにその後、37度のインキュベーション内で24時間培養した後(合計48時間)、ATP活性量を測定した。

【0173】

図33は、比較例2において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100 nM投入して24時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す。図34は、比較例2において、ボルテゾミブを1、3、10、20、100 nM投入して48時間培養した細胞凝集塊のATP活性量の測定結果を示す。なお、図33及び図34において、縦軸はATP活性率を示し、横軸はボルテゾミブ濃度を示す。

10

【0174】

図31及び図32に示される実施例4のATP活性率と、図33及び図34に示される比較例2のATP活性率とを比較すると、実施例4は比較例2よりもエラーバーが小さいことがわかる。これは、細胞凝集塊を用いた薬効試験(薬効研究又は薬効開発)において、金属製多孔膜10を用いた分級により得られた均一なサイズの細胞凝集塊を用いて薬効試験を行うことにより、信頼性の高い結果が得られることを示している。即ち、金属製多孔膜10を用いて細胞凝集塊の分級を行うことによって、精度の高い薬効試験結果を得られるという効果がある。また、金属製多孔膜10は、ナイロンメッシュ等と比べて機械強度が高いため、分級精度が高い。そのため、金属製多孔膜10によれば、ナイロンメッシュ等と比べて、薬効試験において細胞凝集塊のサイズに起因する試験結果の誤差を小さくすることができる。

20

【0175】

(実施例5)

実施例5においては、金属製多孔膜10が細胞凝集塊の培養に与える影響を調べるために、火炎滅菌した金属製多孔膜10を培養液に浸した状態で細胞凝集塊を培養した。また、比較例3として、金属製多孔膜10を培養液に浸さない状態で細胞凝集塊を培養した。

【0176】

実施例5及び比較例3では、ras遺伝子が導入されたNIH3T3細胞を、ダルベッコ変法イーグル培地DMEM(ナカライテスク製)に5% FCSと1% PCSMを添加した培地で培養した。

30

【0177】

図35は、実施例5及び比較例3における細胞66の培養状態を示す。図35に示すように、ウェルプレート80(住友ベークライト製スミロナイトプレート24F)を準備した。ウェルプレート80において、A列の3つのウェルに比較例3の細胞66及び培地60を播種し、C列の3つのウェルに実施例5の細胞66及び培地60を播種した。なお、1ウェルあたりの播種量は、細胞の数が 7.0×10^4 個、培地が2 mlであった。

【0178】

実施例5では、金属製多孔膜10を3枚用意し、1秒間バーナーで曝した。その後、金属製多孔膜10を切断し、ウェル内の培地60に浸漬した。なお、実施例5に用いた金属製多孔膜10は、外形18 mm、厚み40 μ mである。貫通孔12の形状は、正方形であり、正方形の一辺の長さは58 μ mである。また、2つの貫通孔12の間の距離bは、18 μ mである。

40

【0179】

実施例5では、金属製多孔膜10を培地60に浸漬させた状態で、細胞66の培養を10分間行った後、金属製多孔膜10を取り除いた。一方、比較例3では、金属製多孔膜10を培地に浸漬させずに、細胞66の培養を10分間行った。そして、実施例5及び比較例3で培養された細胞の活性量を以下の方法で確認した。

【0180】

50

実施例 5 及び比較例 3 の培地 6 0 と細胞 6 6 を、それぞれ 2 0 分割して別のプレートに分注した。分注された培地、細胞それぞれに、T O Y O I N K 製の A T P 試薬を 1 0 0 μ L 添加した後に、プレートリーダー (P e r k i n E l m e r 製 F u s i o n - F P) で R L U 発光量 (A T P 活性量) を測定した。

【 0 1 8 1 】

図 3 6 は、実施例 5 及び比較例 3 において、培養された細胞の R L U 発光量 (A T P 活性量) の測定結果を示す。図 3 6 に示すように、実施例 5 と比較例 3 と比較すると、R L U 発光量 (A T P 活性量) が同等であることがわかる。これは、火炎滅菌された金属製多孔膜 1 0 が、細胞の培養に何ら影響を与えないことを示している。

【 0 1 8 2 】

(実施例 6)

実施例 6 においては、実施の形態 1 の分級装置 5 0 を用いて、培養したマウス E S 細胞に由来する細胞凝集塊 (スフェアまたは胚様体) を大きさ毎に分級した。金属製多孔膜 1 0 は、ニッケル製の円形のメッシュである。金属製多孔膜 1 0 は、外径が 7 . 8 mm であり、中央部に直径 6 mm の膜部 1 1 を形成している。膜部 1 1 には、正方形の貫通孔 1 2 が正方格子配列で設けられている。貫通孔 1 2 の一辺は、1 2 0 μ m である。貫通孔 1 2 の間隔、即ち 2 つの貫通孔 1 2 の間の金属部分の距離は、5 0 μ m である。言い換えると、貫通孔 1 2 の格子間隔は 1 7 0 μ m である。厚みは 1 7 μ m である。また、金属製多孔膜 1 0 は、分級を行う前にガンマ線照射によって滅菌処理が行われている。実施例 6 では、図 3 7 に示す異なる寸法の細胞凝集塊 6 1 を含む液体 6 0 を、金属製多孔膜 1 0 に通過させて濾過することによって、細胞凝集塊 6 1 の分級を行った。

【 0 1 8 3 】

細胞凝集塊は、マウス E S 細胞を 1 0 % F B S が含まれた 1 % P C S M の D M E M 培地で培養した。使用した容器は、3 . 5 mm ディッシュであり、播種細胞数は $3 \times 1 0 ^ 5$ 個 / m l であった。3 7 度のインキュベーション内で 4 8 時間培養した結果、様々な大きさの細胞凝集塊を生成することができた。

【 0 1 8 4 】

図 3 7 は、培養した細胞凝集塊の一部を拡大した写真を示す。図 3 7 に示すように、分級する前において、異なるサイズの細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c が生成されていることがわかる。

【 0 1 8 5 】

実施例 6 において、分級装置 5 0 の金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C の貫通孔 1 2 a、1 2 b、1 2 c の孔サイズは、それぞれ、1 8 0 μ m、1 0 0 μ m、5 8 μ m である。ここで、貫通孔 1 2 a、1 2 b、1 2 c の形状は、正方形であり、孔サイズとは正方形の孔の一辺の長さ d を意味する。

【 0 1 8 6 】

実施例 6 では、図 3 7 に示す異なるサイズの細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c を含む培地 6 0 を、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C の順に通過させることによって、細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c の分級を行った。具体的には、新たに培養液を投入した 3 . 5 mm ディッシュを 3 個用意し、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C で捕捉された細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c を、逆洗することによってそれぞれの 3 . 5 mm ディッシュに移した。

【 0 1 8 7 】

図 3 8 は、実施例 6 において金属製多孔膜 1 0 A で捕捉した細胞凝集塊 6 1 a の一部を拡大した写真を示す。図 3 9 は、実施例 6 において金属製多孔膜 1 0 B で捕捉した細胞凝集塊 6 1 b の一部を拡大した写真を示す。図 4 0 は、実施例 6 において金属製多孔膜 1 0 C で捕捉した細胞凝集塊 6 1 c の一部を拡大した写真を示す。図 4 1 は、実施例 6 において金属製多孔膜 1 0 C を通過した後の液体 6 0 の一部を拡大した写真を示す。

【 0 1 8 8 】

図 3 8 ~ 図 4 1 に示すように、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C では、それぞれほ

10

20

30

40

50

ば均等なサイズの細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c が捕捉されていることがわかる。また、図 4 1 に示すように、金属製多孔膜 1 0 C を通過した後の液体 6 0 には、細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c が含まれておらず、細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c よりも小さいサイズの細胞凝集塊 6 1 d が含まれていることがわかる。なお、金属製多孔膜 1 0 C を通過した後の液体 6 0 には、細胞凝集塊 6 1 d の他に、例えば、単離細胞 6 2 などを含んでいてもよい。

【 0 1 8 9 】

このように、実施例 6 において、異なる大きさの細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c を含む培地 6 0 (図 3 7 参照) を、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C に通過させることによって、細胞凝集塊 6 1 a、6 1 b、6 1 c をサイズ毎に分級することができたことがわかる (図 3 8 ~ 図 4 1 参照) 。

10

【 0 1 9 0 】

次に、細胞凝集塊のサイズと活性の関係を調べるために、細胞凝集塊を含む培地をディッシュ毎に等分し、等分した一方の培地に対して ATP 活性量を測定した。ここで、ATP 活性量の測定は、ATP 定量アッセイ (Cell Titer - Glo (登録商標) , Promega) によって行った。ATP 活性量とは、細胞の活性、即ち細胞の生存率を意味している。即ち、ATP 活性量の値が大きいほど、生きた細胞が多いことを意味する。なお、等分したうちの他方の培地は、後述の再培養に使用した。

【 0 1 9 1 】

各ディッシュ内の細胞凝集塊を、ピペットで無作為に 1 個ずつ選択し、U 底プレート (3 7 5 ウェル) に投入した。そして、Cell Image r で各細胞凝集塊の直径と ATP 活性量を測定した。なお、孔サイズ 1 8 0 μm の金属製多孔膜 1 0 A で捕捉された細胞凝集塊 6 1 a は 1 3 個、孔サイズ 1 0 0 μm の金属製多孔膜 1 0 B で捕捉された細胞凝集塊 6 1 b は 1 0 個、孔サイズ 5 8 μm の金属製多孔膜 1 0 C で捕捉された細胞凝集塊 6 1 c は 1 6 個を選択した。

20

【 0 1 9 2 】

図 4 2 は、実施例 6 において、細胞凝集塊の直径に対する ATP 活性量の測定結果を示す。図 4 2 の横軸は細胞凝集塊の直径、縦軸は ATP 活性量である。図 4 2 において、四角の点は、孔サイズ 1 8 0 μm の金属製多孔膜 1 0 A で捕捉された細胞凝集塊 6 1 a に関するデータ、三角の点は、孔サイズ 1 0 0 μm の金属製多孔膜 1 0 B で捕捉された細胞凝集塊 6 1 b に関するデータ、菱形の点は、孔サイズ 5 8 μm の金属製多孔膜 1 0 C で捕捉された細胞凝集塊 6 1 c に関するデータを示す。

30

【 0 1 9 3 】

図 4 2 に示すように、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C のそれぞれで捕捉された細胞の活性が保たれていることがわかる。具体的に説明すると、ATP 活性量は、生きている細胞が多いほど、活性量 (R L U 発光量) の値が大きくなる。細胞凝集塊は、サイズが大きくなるほど、多くの細胞を含んで構成される。そのため、細胞凝集塊のサイズが大きくなるほど、細胞凝集塊に含まれる細胞が生きていれば、ATP 活性量の値は大きくなる。

【 0 1 9 4 】

図 4 2 に示すように、細胞凝集塊の直径が大きくなるほど、ATP の活性量の値が大きくなっていることがわかる。このことから、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C のそれぞれで捕捉された細胞の活性が保たれていることがわかる。即ち、金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C のそれぞれで捕捉された細胞が生きていることがわかる。なお、元来、細胞凝集塊は、表面近傍の細胞のみ活性が保たれており、細胞凝集塊の中心部の細胞の活性は失われている。そのため、細胞凝集塊の直径と ATP 活性量の関係は、2 次から 3 次の曲線になる。

40

【 0 1 9 5 】

金属製多孔膜 1 0 A、1 0 B、1 0 C のそれぞれで捕捉された細胞凝集塊に関して、細胞凝集塊の直径の最大値、最小値、平均値、及び標準偏差を表 2 に示す。

50

【 0 1 9 6 】

【表 2】

細胞凝集塊の直径	孔径180 μ m画分(n=13)	孔径100 μ m画分(n=10)	孔径58 μ m画分(n=16)
最大値(μ m)	649	211	136
最小値(μ m)	276	142	59
平均値(μ m)	413	178	99
標準偏差	130	22	25

【 0 1 9 7 】

10

表 2 に示すように、孔サイズ 180 μ m の金属製多孔膜金属製多孔膜 10 A、孔サイズ 100 μ m の金属製多孔膜 10 B、孔サイズ 58 μ m の金属製多孔膜 10 C において、捕捉された細胞凝集塊の直径の最大値は、それぞれ、649 μ m、211 μ m、136 μ m であった。捕捉された細胞凝集塊の直径の最小値は、金属製多孔膜金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順に、276 μ m、142 μ m、59 μ m であった。捕捉された細胞凝集塊の直径の平均値は、金属製多孔膜金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順に、413 μ m、178 μ m、99 μ m であった。捕捉された細胞凝集塊の標準偏差は、金属製多孔膜金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順に、68、36、30 であった。また、捕捉された細胞凝集塊の平均値に対する標準偏差の割合は、金属製多孔膜金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C の順に、31%、12%、23% であった。

20

【 0 1 9 8 】

更に、分級した細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c を再培養した。なお、再培養には、前述の等分したうちの他方の培地を用いた。

【 0 1 9 9 】

各ディッシュ内の細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c を、ピペットで無作為に 3 個ずつ選択して 1 組とし、この 1 組を U 底プレート (375 ウェル) に投入した。図 4 3 は、実施例 6 において、孔サイズ 180 μ m の金属製多孔膜 10 A で捕捉された 1 組の細胞凝集塊 61 a の写真を示す。図 4 4 は、実施例 6 において、孔サイズ 100 μ m の金属製多孔膜 10 B で捕捉された 1 組の細胞凝集塊 61 b の写真を示す。図 4 5 は、実施例 6 において、孔サイズ 58 μ m の金属製多孔膜 10 C で捕捉された 1 組の細胞凝集塊 61 c の写真を示す。

30

【 0 2 0 0 】

実施例 6 では、金属製多孔膜 10 A で捕捉された図 4 3 に示す細胞凝集塊 61 a を 30 組、孔サイズ 100 μ m の金属製多孔膜 10 B で捕捉された図 4 4 に示す細胞凝集塊 61 b を 17 組、孔サイズ 58 μ m の金属製多孔膜 10 C で捕捉された図 4 5 に示す細胞凝集塊 61 c を 50 組作製した。これらを 37 度のインキュベーション内で 24 時間培養した結果、3 個の細胞凝集塊から 1 個の細胞凝集塊を作製することができた。

【 0 2 0 1 】

図 4 6 は、実施例 6 において、金属製多孔膜 10 A で捕捉した図 4 3 に示す 3 個の細胞凝集塊 61 a を培養して作製した 1 個の細胞凝集塊 63 の写真を示す。図 4 7 は、金属製多孔膜 10 B で捕捉した図 4 4 に示す 3 個の細胞凝集塊 61 b を培養して作製した 1 個の細胞凝集塊 64 の写真を示す。図 4 8 は、金属製多孔膜 10 C で捕捉した図 4 5 に示す 3 個の細胞凝集塊 61 c を培養して作製した 1 個の細胞凝集塊 65 の写真を示す。

40

【 0 2 0 2 】

再培養して作製した図 4 6 ~ 図 4 8 に示す細胞凝集塊 63、64、65 について、前述の Cell Imager を使用して大きさを測定した。細胞凝集塊 63、64、65 の大きさの平均値と標準偏差は、それぞれ、 $441 \pm 146 \mu$ m、 $203 \pm 26 \mu$ m、 $114 \pm 34 \mu$ m であった。また、細胞凝集塊 63、64、65 の大きさの平均値に対する標準偏差の割合は、それぞれ、33%、13%、30% であった。これらの値は、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C で分級した表 2 に示す結果と同等であった。

50

【0203】

以上の結果は、細胞凝集塊の作製において、金属製多孔膜10A、10B、10Cを使用して、異なるサイズの細胞凝集塊を含む培地から所望のサイズの細胞凝集塊を分級可能であることを示している。また、金属製多孔膜10A、10B、10Cで分級された細胞凝集塊を用いて更に培養した場合、培養される細胞凝集塊の大きさを均一化させやすいことを示している。

【0204】

本発明は、添付図面を参照しながら好ましい実施形態に関連して十分に記載されているが、この技術の熟練した人々にとっては種々の変形や修正は明白である。そのような変形や修正は、添付した特許請求の範囲による本発明の範囲から外れない限りにおいて、その中に含まれると理解されるべきである。

10

【産業上の利用可能性】

【0205】

本発明は、細胞凝集塊の回収率を高めて分級を行うことができるため、例えば、薬効調査や再生医療薬の製造等の分野に有用である。

【符号の説明】

【0206】

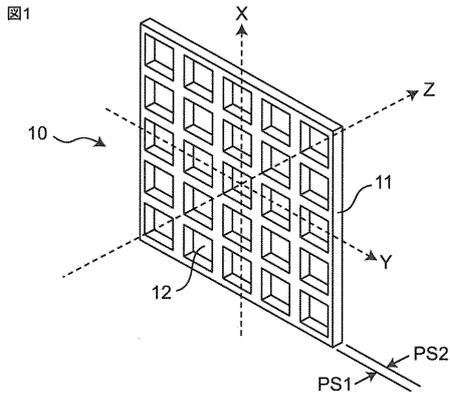
- 10、10A、10B、10C 金属製多孔膜
- 11、11a、11b、11c 膜部
- 12、12a、12b、12c 貫通孔
- 20ハウジング
- 21 第1ハウジング部
- 21a 流体流入路
- 21b フランジ部
- 21c 貫通穴
- 21d 末端部
- 22 第2ハウジング部
- 22a 流体排出路
- 22b フランジ部
- 22c 凸部
- 22d 末端部
- 50 分級装置
- 60、60A、60B、60C 液体
- 61、61a、61b、61c、61d 細胞凝集塊
- 62 単離細胞
- 63、64、65 細胞凝集塊
- 66 細胞
- 70 液体の流れる方向
- 80 ウェルプレート
- PS1 第1主面
- PS2 第2主面

20

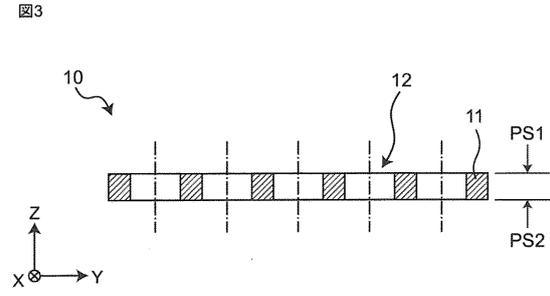
30

40

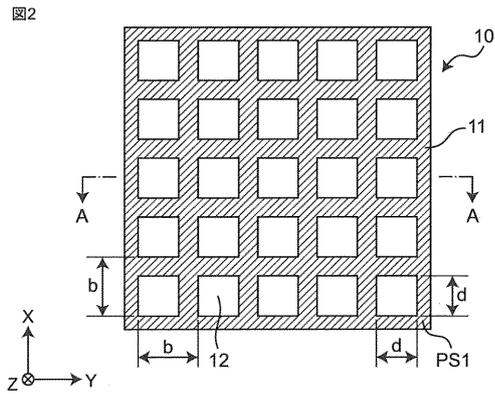
【 図 1 】



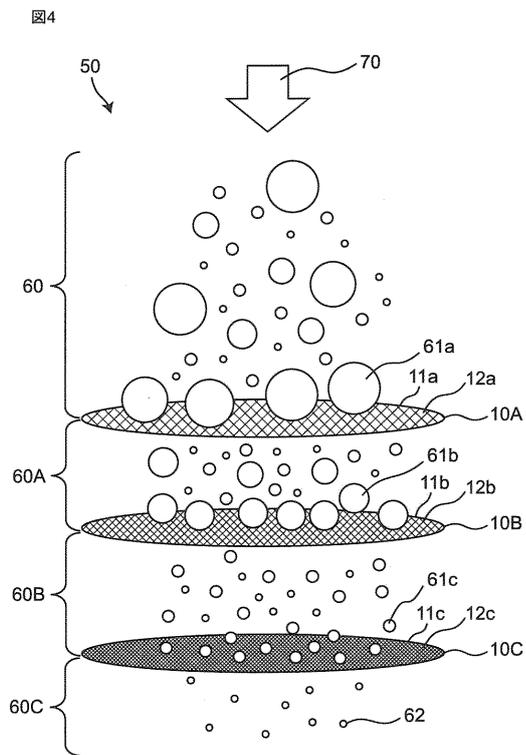
【 図 3 】



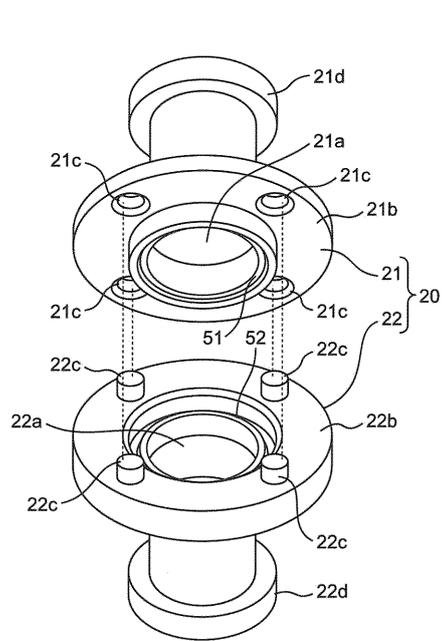
【 図 2 】



【 図 4 】

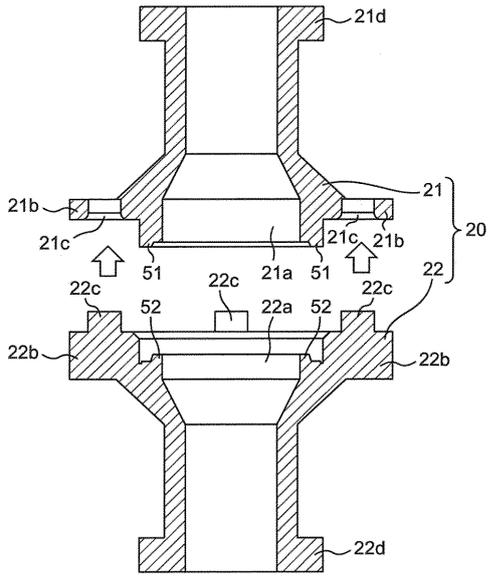


【 図 5 】



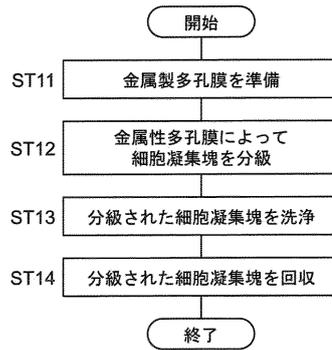
【 図 6 】

図6



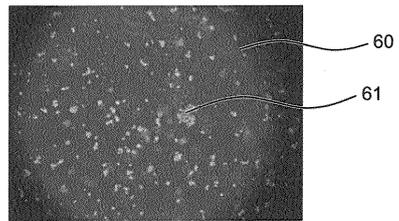
【 図 7 】

図7



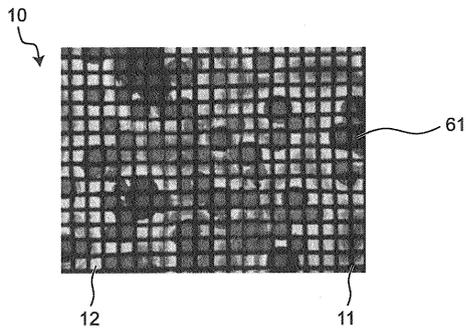
【 図 8 】

図8



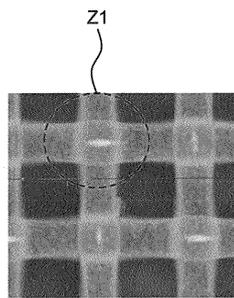
【 図 9 】

図9



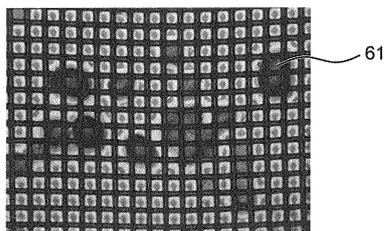
【 図 1 1 】

図11



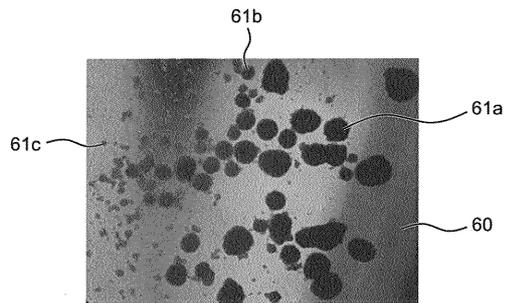
【 図 1 0 】

図10



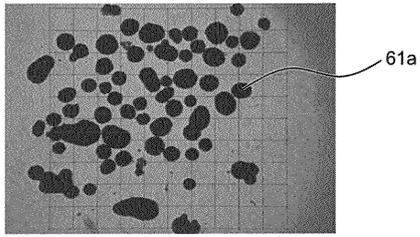
【 図 1 2 】

図12



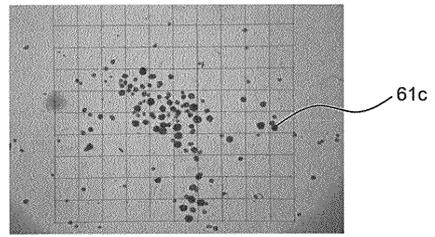
【 図 1 3 】

図13



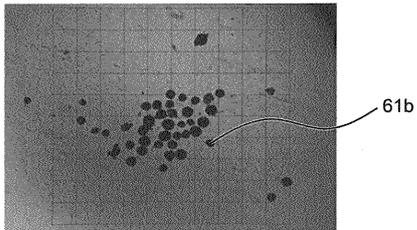
【 図 1 5 】

図15



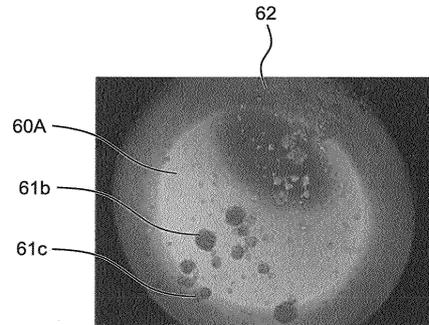
【 図 1 4 】

図14



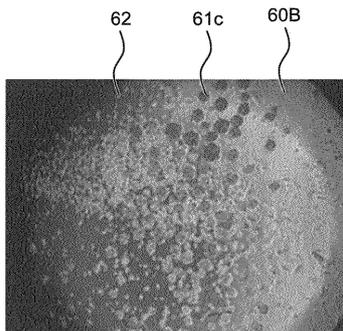
【 図 1 6 】

図16



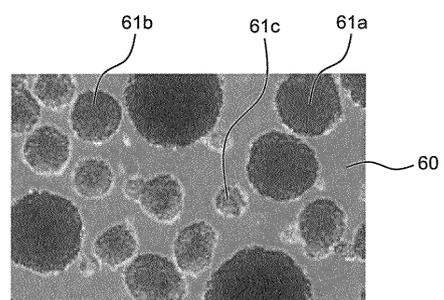
【 図 1 7 】

図17



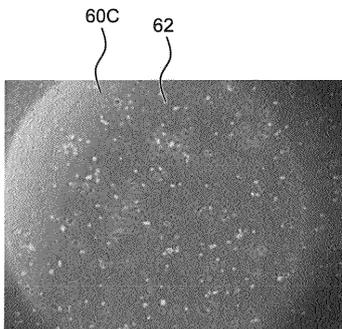
【 図 1 9 】

図19



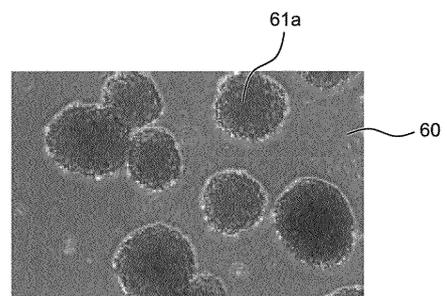
【 図 1 8 】

図18



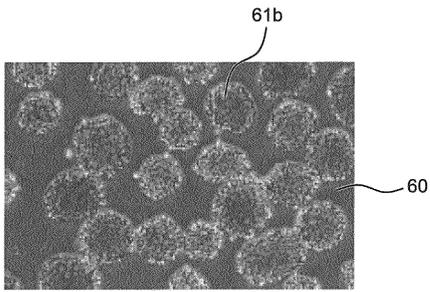
【 図 2 0 】

図20



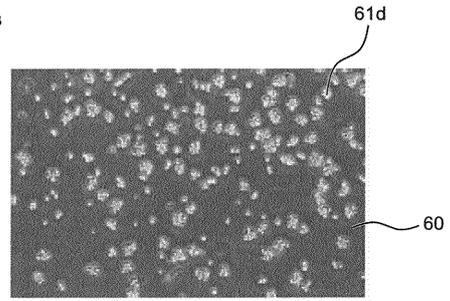
【 図 2 1 】

図21



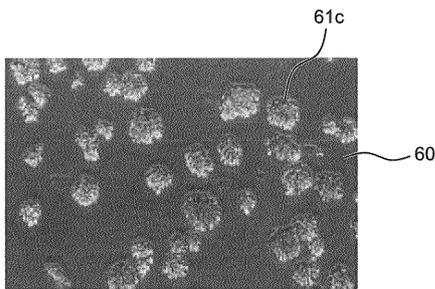
【 図 2 3 】

図23



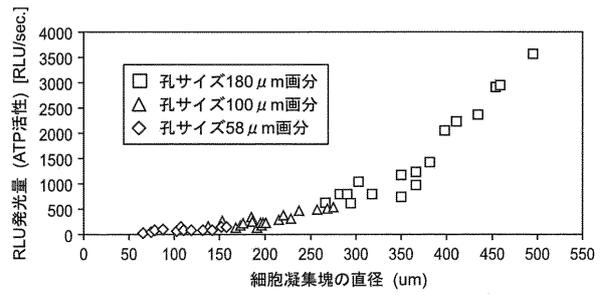
【 図 2 2 】

図22



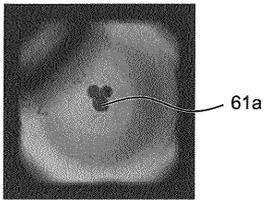
【 図 2 4 】

図24



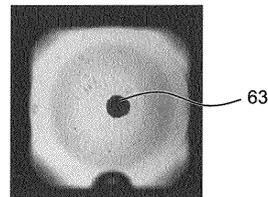
【 図 2 5 】

図25



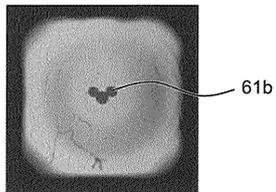
【 図 2 8 】

図28



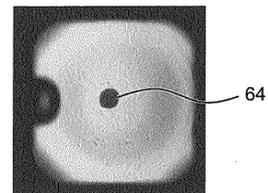
【 図 2 6 】

図26



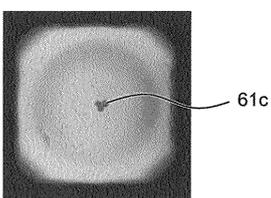
【 図 2 9 】

図29



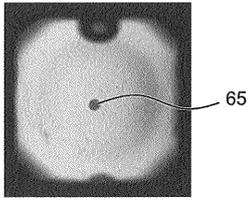
【 図 2 7 】

図27



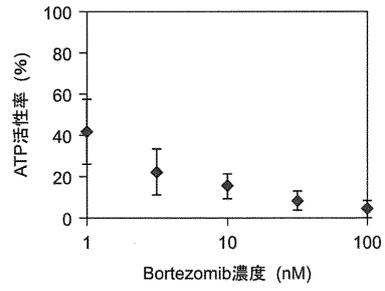
【 図 3 0 】

図30



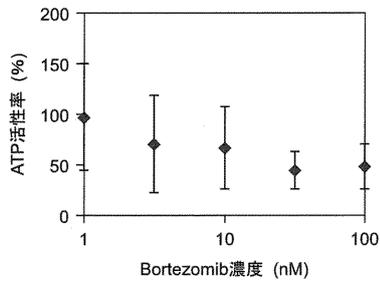
【 図 3 2 】

図32



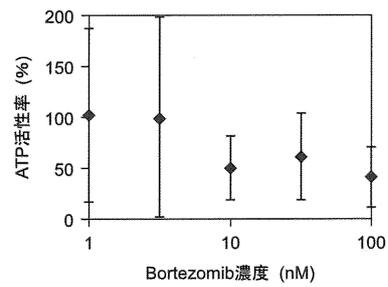
【 図 3 1 】

図31



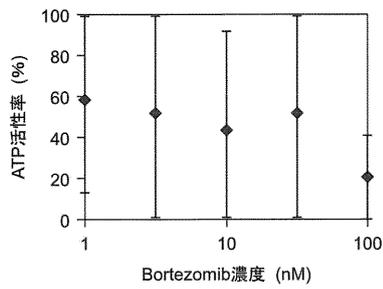
【 図 3 3 】

図33



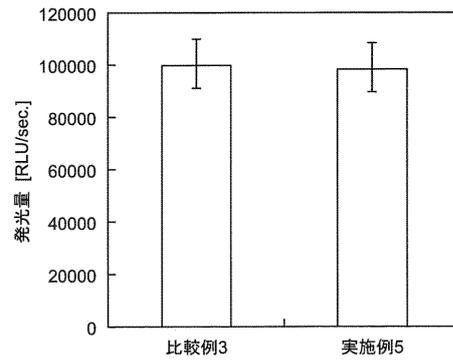
【 図 3 4 】

図34



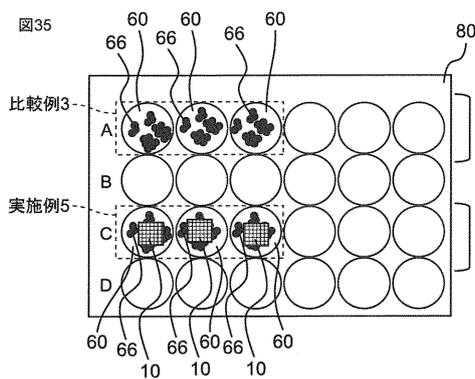
【 図 3 6 】

図36



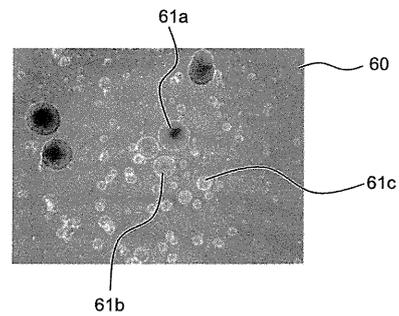
【 図 3 5 】

図35



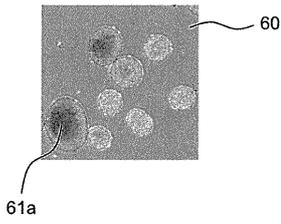
【 図 3 7 】

図37



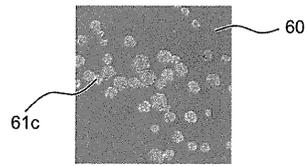
【 図 3 8 】

図38



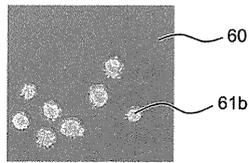
【 図 4 0 】

図40



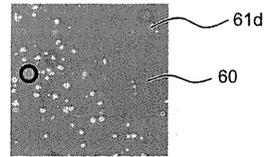
【 図 3 9 】

図39



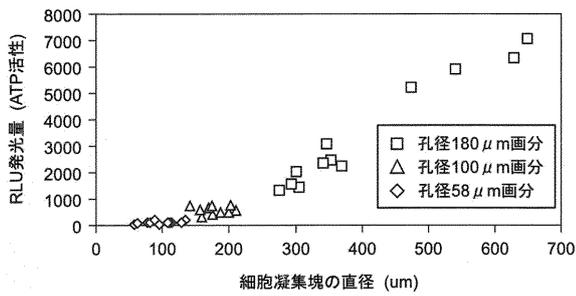
【 図 4 1 】

図41



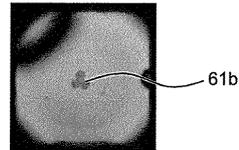
【 図 4 2 】

図42



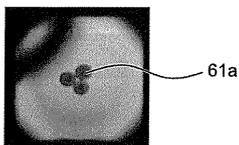
【 図 4 4 】

図44



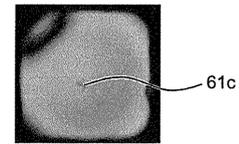
【 図 4 3 】

図43



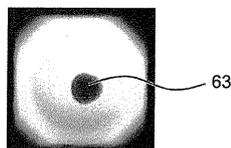
【 図 4 5 】

図45



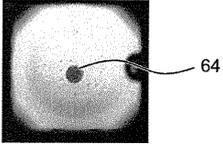
【 図 4 6 】

図46



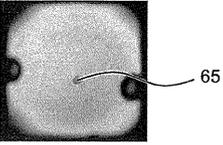
【 図 4 7 】

図47



【 図 4 8 】

図48



フロントページの続き

(72)発明者 渡邊 順子

京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社村田製作所内

(72)発明者 長谷川 慎

滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学内

(72)発明者 水上 民夫

滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園 長浜バイオ大学内

Fターム(参考) 4D071 AA02 AB02 AB62 AB63 DA20