



(21)申請案號：108132814

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 11 日

(51)Int. Cl. : C12M1/12 (2006.01)

C12M3/06 (2006.01)

C12M3/00 (2006.01)

C12N1/02 (2006.01)

(30)優先權：2018/09/11 日本

2018-170092

(71)申請人：日商日產化學有限公司(日本) NISSAN CHEMICAL CORPORATION (JP)
日本(72)發明人：畑中大輔 HATANAKA, DAISUKE (JP)；木田克彦 KIDA, KATSUHIKO (JP)；金
木達朗 KANAKI, TATSURO (JP)；林寿人 HAYASHI, HISATO (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：18 共 76 頁

(54)名稱

分離裝置及使用其將分離對象物分離之方法

(57)摘要

本發明係一種分離裝置及分離方法，該分離裝置用以自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液，分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物。該分離裝置包括具有第 1 室及第 2 室之分離室，第 1 室與第 2 室由分離用網狀構造分隔。分離用網狀構造具有以抑制分離對象物通過之方式預先確定之大小之網眼，且以懸濁液中之液體通過上述網眼時該液體之行進方向具有垂直向上之方向分量之方式，於分離室中配置有分離用網狀構造。



202024314

【發明摘要】

【中文發明名稱】

分離裝置及使用其將分離對象物分離之方法

【中文】

本發明係一種分離裝置及分離方法，該分離裝置用以自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液，分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物。該分離裝置包括具有第1室及第2室之分離室，第1室與第2室由分離用網狀構造分隔。分離用網狀構造具有以抑制分離對象物通過之方式預先確定之大小之網眼，且以懸濁液中之液體通過上述網眼時該液體之行進方向具有垂直向上之方向分量之方式，於分離室中配置有分離用網狀構造。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

分離裝置及使用其將分離對象物分離之方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種分離裝置、及其用途，該分離裝置用以將藉由使用微細支架材進行之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液中之分離對象物自液體分離。

【先前技術】

【0002】 近年來，報告有如下技術，即為使包含經提高於水中之分散性之多糖類(甲殼素等非水溶性多糖類)之奈米纖維分散於液體培養基中作為微細支架材，而以懸浮狀態對動植物細胞及/或組織進行培養(專利文獻1)。

【0003】 藉由使用上述奈米纖維作為支架材並以接著於該奈米纖維之狀態對間葉系幹細胞或前驅脂肪細胞等接著性細胞進行培養，可於靜置之狀態下對該等細胞進行懸浮培養。該奈米纖維於液體培養基中為不溶性，具有於該液體培養基中懸浮並供細胞接著之活性。由此，於使用該奈米纖維之懸浮培養中，接著於該奈米纖維之間葉系幹細胞或前驅脂肪細胞顯示出長時間之生存性，一面維持其形質一面於該奈米纖維上良好地增殖。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】 [專利文獻1]國際公開第2015/111686號

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0005】 上述奈米纖維為生物降解性，可藉由將構成該奈米纖維之多糖類(例如甲殼素)分解之酵素(多糖類分解酵素)而分解。本發明人等注意到該方面，發現若對液體培養基中接著有培養細胞之奈米纖維應用上述多糖類分解酵素，則可於不使用蛋白質分解酵素之情況下、即一面抑制對培養細胞之損傷一面將培養細胞單離。

【0006】 然而，於使用多糖類分解酵素將以接著於上述奈米纖維上之狀態生長之培養細胞單離之情形時，需要利用該多糖類分解酵素將上述奈米纖維充分分解並使殘留之培養細胞沈澱以進行回收等製程。已知於此種回收製程中，伴隨對大量細胞進行培養，進而產生亦大量需要多糖類分解酵素之問題或未分解之多糖類殘留並混雜於所回收之培養細胞中之問題。又，亦已知於利用培養細胞於液體培養基中因自重而沈澱之方法之製程中，回收需要長時間，故而不佳，且於利用離心分離之製程中，培養細胞會受到損傷，故而不佳。

【0007】 另一方面，於細胞培養中，存在將由所培養之細胞產生之液性因子(培養細胞分泌至液體培養基中之物質、藉由將培養細胞溶解而獲得之物質等)作為應回收之對象物的情況。例如，於對附著於液體培養基中懸浮之微細支架材之細胞分泌至液體培養基中之物質進行回收之情形時，必須將(支架材及附著於其之培養細胞)與(液體培養基)分離以對液體培養基進行回收。又，於對培養細胞中所含之物質進行回收之情形時，必須利用試劑將培養細胞溶解於液體培養基中，並將(支架材)與(溶解有培養細胞之液體培養基)分離，以對該(溶解有培養細胞之液體培養基)進行回收。

【0008】於如上所述液體為通過對象物之情形時，作為不利用離心分離之簡單回收方法，考慮使用多孔性之過濾器來僅使液體通過以進行回收之方法。然而，已知於使用多孔性之過濾器之方法中，該過濾器會很快被(支架材及附著於其之培養細胞)或(支架材)堵塞，因此，必須頻繁更換過濾器，而難以高效率地僅對液體培養基進行回收。

【0009】本發明之目的在於消除上述問題，並提供一種分離裝置、及使用其之分離對象物之分離方法，該分離裝置可於使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養中，將分離對象物更高效率地分離，並獲得通過對象物。

[解決問題之技術手段]

【0010】本發明之主要構成如下所述。

[1]一種分離裝置，

其係用以自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物者，且

該分離裝置具有分離室，該分離室至少具有第1室及第2室，第1室與第2室由分離用網狀構造分隔，且以進入該分離裝置內之上述懸濁液中之液體自第1室通過上述分離用網狀構造而移動至第2室然後自該分離裝置流出之方式構成內部流路，

上述分離用網狀構造具有以抑制上述分離對象物通過之方式預先確定之大小之網眼，

以上述懸濁液中之液體通過上述網眼時該液體之行進方向具有垂直向上之方向分量之方式，於上述分離室中配置有上述分離用網狀構造。

[2]如上述[1]中記載之分離裝置，其中

於上述懸濁液中包含應與上述液體一起通過上述分離用網狀構造之固體之對象物，且

上述分離用網狀構造具有以抑制上述分離對象物通過且容許上述通過對象物通過之方式預先確定之大小之網眼。

[3]如上述[2]中記載之分離裝置，其中上述懸濁液中之液體係液體培養基，且上述分離對象物係藉由將支架材與接著性細胞分離之試劑而於液體培養基中自細胞剝離之支架材，通過對象物係自支架材剝離之接著性細胞。

[4]如上述[3]中記載之分離裝置，其中

上述支架材係包含非水溶性多糖類之奈米纖維，且

上述接著性細胞係選自由犬腎小管上皮細胞(Madin-Daby canine kidney cells，MDCK細胞)、中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cells，CHO細胞)、及間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells，MSC)所組成之群中之細胞。

[5]如上述[2]中記載之分離裝置，其中上述懸濁液中之液體係液體培養基，分離對象物係附著有於液體培養基中懸浮培養之接著性細胞之支架材，通過對象物係於懸浮培養中自細胞釋放至液體培養基中之液性因子。

[6]如上述[2]中記載之分離裝置，其中上述懸濁液中之液體係含有懸浮培養之接著性細胞之細胞溶解物的液體，分離對象物係藉由該細胞之溶解而殘留於上述液體中之支架材，通過對象物係藉由該接著性細胞之溶解而釋放至上述液體中之源自該接著性細胞之物質。

[7]如上述[1]至[6]中任一項中記載之分離裝置，其中上述分離用網狀構造為片狀或具有袋之形狀。

[8]如上述[1]至[7]中任一項中記載之分離裝置，其中

第1室具有：

第1流入埠，其用以使上述懸濁液自外部流入至第1室；

第2流入埠，其用以使洗淨液或試劑自外部流入至第1室；及

流出埠，其用以使分離對象物自第1室流出至外部。

[9]如上述[1]至[8]中任一項中記載之分離裝置，其中

第2室位於第1室之上，

第1室至少具有用以使上述懸濁液自外部流入之流入埠，且該流入埠設置於第1室之側壁。

[10]如上述[9]中記載之分離裝置，其中上述流入埠之中心軸線位於第1室之室內之總高度之40%以上之高度。

[11]如上述[9]或[10]中記載之分離裝置，其中

於第2室之上，進而具有向上方積層之1個以上之房室作為分離室，

上述1個以上之房室中之和第2室相鄰之房室與第2室由另一分離用網狀構造分隔，

於上述1個以上之房室為兩個以上之房室之情形時，上下相鄰之房室彼此另由其他分離用網狀構造分隔，

越位於上方之分離用網狀構造之網眼，該網眼之開口面積越小，以進一步抑制上述分離對象物通過。

[12]如上述[11]中記載之分離裝置，其中

於上述懸濁液中包含應與上述液體一起通過上述分離用網狀構造之固體之通過對象物，且

以容許上述通過對象物通過之方式預先確定位於最上方之分離用網

狀構造之網眼之大小。

[13]一種方法，

其係使用如上述[1]至[12]中任一項中記載之分離裝置，

自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液，
分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物。

[14]如上述[13]中記載之方法，其中

於上述懸濁液中包含應與上述液體一起通過上述分離裝置之分離用
網狀構造之固體之通過對象物，且

上述分離用網狀構造具有以抑制上述分離對象物通過且容許上述通
過對象物通過之方式預先確定之大小之網眼，

該方法具有對通過該分離用網狀構造之上述通過對象物進行回收之
步驟。

[15]如上述[13]或[14]中記載之方法，其中上述懸濁液中之液體通過
上述分離裝置之分離用網狀構造時之流速為0.01 mm/秒～25 mm/秒。

[發明之效果]

【0011】 於本發明之分離裝置(以下亦稱作該分離裝置)中，以懸濁
液中之液體通過分離用網狀構造之網眼時該液體之行進方向具有垂直向上
之方向分量之方式，配置有該分離用網狀構造。藉此，分離用網狀構造之
入口側之面成為懸垂面或朝向下方之面，因此，無法通過網眼而被該分離
用網狀構造截留之分離對象物因重力而自該分離用網狀構造剝落並沈澱。
例如，懸浮培養所使用之微細支架材或於該支架材附著有細胞者具有在液
體培養基中緩慢沈澱之傾向，因此，該等若被分離用網狀構造截留則會顯
示出因重力而自分離用網狀構造剝離並於液體中下降之傾向。由此，可抑

制分離用網狀構造之堵塞而高效率地將分離對象物分離或去除，亦可高效率地獲取通過對象物。

【0012】於支架材為包含非水溶性多糖類之奈米纖維且培養細胞為間葉系幹細胞之情形時，該分離裝置之有用性變得顯著。該奈米纖維緩慢沈澱，且藉由使用將非水溶性多糖類分解之酵素，即便不完全分解，亦容易自培養細胞剝離。藉此，可進一步減小培養細胞受到之損傷。若對以此方式獲得之懸濁液(奈米纖維與培養細胞以相互分離之狀態包含於液體中而成之懸濁液)應用本發明之分離裝置，則可一面抑制堵塞一面高效率地自該懸濁液分離奈米纖維，並可高效率地回收損傷較少之培養細胞。

【0013】不僅於如上所述之培養細胞之回收之情形時，於對在懸浮培養中自細胞釋放至液體培養基中之液性因子進行回收之情形時或於對藉由該細胞之溶解而釋放至上述液體中之源自該細胞之物質進行回收之情形時，本發明之分離裝置亦可一面抑制堵塞一面高效率地將懸濁液中之固體之分離對象物分離，因此，其有用性變得顯著。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖1係概略性地表示本發明之分離裝置之較佳態樣之一例之剖視圖。於圖中，以粗虛線表示分離用網狀構造之剖面。該虛線上之點彼此之間隔與實際之網眼之大小無關。分離對象物係由示意作為支架材之奈米纖維之波型符號進行表示，通過對象物係使用示意自支架材剝離之培養細胞之白色圓形符號進行表示(圖2、圖9、圖10亦相同)。

圖2係概略性地表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之剖視圖。

圖3(a)、(b)係概略性地表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之剖面

圖。於該圖中，為了對圖進行簡化而以粗實線描繪分離室之壁部。省略了分離對象物或通過對象物之圖示。

圖4(a)、(b)係概略性地表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之剖視圖。

圖5係表示用作分離用網狀構造之篩網之構成之圖。圖5(a)係表示篩網之片材面之特定區域之局部放大圖，圖5(b)係圖5(a)之X1-X1剖視圖。於圖5(b)中，對線材之剖面施加有影線。

圖6係表示用作分離用網狀構造之多孔膜之構成之圖。圖6(a)係表示多孔膜之片材面之特定區域之局部放大圖，圖6(b)係圖6(a)之X2-X2剖視圖。於圖6(b)中，對膜部分之剖面施加有影線。

圖7係表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之圖。圖7(a)係為了使該分離裝置之內部可見而將側壁部去除所得之圖，圖7(b)係圖7(a)之X3-X3剖視圖。

圖8係表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之圖。圖8(a)係為了使該分離裝置之內部可見而將側壁部去除所得之圖。圖8(b)係模式性地表示圖8(a)之分離裝置之構成之一例之立體圖。圖8(c)係模式性地表示圖8(a)之分離裝置之構成之其他例之立體圖。

圖9係表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之剖視圖。

圖10係表示該分離裝置之較佳態樣之其他例之剖視圖。

圖11係表示使用該分離裝置而構成之細胞培養系統之一例之方塊圖及配管圖。於圖中，以箭頭表示管路及液體之流動方向。

圖12係例示使用該分離裝置自懸濁液對細胞進行回收之製程之流程圖。

圖13係例示使用該分離裝置自懸濁液對液體培養基進行回收之製程

之流程圖。

圖14係例示使用該分離裝置對溶解有細胞之液體培養基進行回收之製程之流程圖。

圖15係表示本發明之實施例1中製作之該分離裝置之照片圖。

圖16(a)、(b)係表示本發明之實施例2之結果之顯微鏡照片圖。

圖17(a)、(b)係表示本發明之實施例3之結果之顯微鏡照片圖。

圖18係本發明之實施例5中之步驟1至步驟4之各步驟中獲得的懸濁液之顯微鏡照片圖。

【實施方式】

【0015】 首先，對本發明之分離裝置加以詳細說明。

本發明之分離裝置係用以自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液，分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物者。分離對象物可為應被捨棄者，亦可為應加以利用者。於圖1所示之例中，為了說明而將成為懸浮培養中之支架材的微細奈米纖維表示為分離對象物，將自其剝離之細胞(懸浮培養之細胞)表示為通過對象物。如圖1所示，該分離裝置1具有分離室10，該分離室10至少具有第1室10a及第2室10b。第1室10a與第2室10b由分離用網狀構造20分隔。於圖1之例中，自側方觀察分離室時之形狀係如產生滯留之角部(死角)較少之圓形，但亦可為橢圓形或適當帶弧度之四邊形等。於第1室10a設置有供懸濁液Q1流入之流入埠31，於第2室10b設置有供通過分離用網狀構造20之液體Q2流出之流出埠32。該分離裝置之整體之內部流路構成為：液體進入至內部，自第1室10a通過分離用網狀構造20之網眼而移動至第2室10b，然後向外部流出。分離用網狀構造20具有以抑制分離對象物E1通過之方式預先確定之大小

之網眼。關於通過對象物E2，將於下文進行敘述。此處重要之特徵係以懸濁液中之液體通過分離用網狀構造20之網眼時該液體之行進方向F具有垂直向上之方向分量Fv之方式於分離室10中配置有分離用網狀構造20。於圖1之例中，液體之行進方向F亦具有水平方向分量Fh。於圖1之例中，分離用網狀構造20為平坦之片狀之篩網。該分離用網狀構造以第2室10b側之面成為傾斜面之方式斜向傾斜而配置，由此，該分離用網狀構造之第1室10a側之面成為懸垂面。分離用網狀構造之第1室10a側之面亦可不整個面成為懸垂面，亦可包含藉由該分離用網狀構造彎曲或彎折而局部並非懸垂面之面。又，流入埠31並非必須設置於分離室之最下部，流出埠32並非必須設置於分離室之最上部。於圖1之構成中，於流入埠31設置於第1室10a之上部且流出埠32設置於第2室10b之下部之情形時，即便於流入埠31設置於高於流出埠32之位置之情形時，懸濁液中之液體通過分離用網狀構造20之網眼時該液體之行進方向F亦具有垂直向上之方向分量Fv。

藉由以上構成，被分離用網狀構造20之第1室10a側之面截留之分離對象物E1自該分離用網狀構造剝落並沈澱。由此，可抑制該分離用網狀構造之網眼被分離對象物E1堵塞，從而可使懸濁液中之液體或通過對象物E2高效率地通過分離用網狀構造並取出至該分離裝置外以進行回收。

【0016】 本發明中所謂之「藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液」包括如下者。

(A) 接著性細胞以附著於支架材之狀態溶解或分散之液體(例如，懸浮培養狀態下之液體、自其中僅去除特定量之液體培養基而成者等)。

(B) 藉由降低支架材與接著性細胞之接著能力之試劑，使接著性細胞自支架材剝離，從而使該細胞與支架材獨立地分散之液體。

(C)接著性細胞藉由細胞溶解試劑而溶解，藉此溶解或分散有自接著性細胞剝離之支架材及源自經溶解之接著性細胞之物質之液體。

(D)支架材藉由將支架材分解之試劑而分解，藉此分散有自支架材剝離之細胞及經分解之支架材之液體。

【0017】該分離裝置可用於將固體高效率地分離並僅使液體通過，但於上述懸濁液中亦可包含應與液體一起通過分離用網狀構造之固體之通過對象物。於圖1之例中，如上述(B)，藉由試劑使細胞E2自支架材E1剝離，該細胞E2成為固體之通過對象物。於此種情形時，分離用網狀構造20之網眼之大小以不僅抑制分離對象物E1通過，亦容許通過對象物E1通過之方式預先確定。

【0018】作為懸濁液、分離對象物及通過對象物，例示如下者。

(a)懸濁液中之液體係液體培養基，分離對象物係附著有細胞之支架材。於該情形時，不存在固體之通過對象物，可用於例如單純之分離對象物之濃縮或於懸浮培養中自細胞釋放至液體培養基中之液性因子之回收。

(b)懸濁液中之液體係液體培養基，分離對象物係藉由將支架材與接著性細胞分離之試劑而於液體培養基中自細胞剝離之支架材，固體之通過對象物係自支架材剝離之細胞。

(c)懸濁液中之液體係含有藉由將細胞溶解之試劑而溶解之該細胞之液體，分離對象物係藉由該細胞之溶解而殘留於上述液體中之支架材。不存在固體之通過對象物，但藉由該細胞之溶解而釋放至上述液體中之源自該細胞之物質為回收對象物。

以下例示進行懸浮培養之接著性細胞、液體培養基、用於懸浮培養之支架材、將該支架材與接著性細胞分離之試劑、自接著性細胞釋放至液

體培養基中之液性因子、將細胞溶解之試劑、藉由細胞之溶解而釋放至液體中之該細胞中之物質。

【0019】

(懸浮培養)

可藉由以附著於液體培養基中之適當之支架材(以下進行詳細敘述)之狀態對接著性細胞進行培養，來對接著性細胞進行懸浮培養(三維培養)。於本發明中，細胞之懸浮係指無論細胞是否沈澱，細胞均不與培養容器接著之狀態(不接著)。

【0020】 關於對接著性細胞進行懸浮培養時之溫度，若為動物細胞，則通常為25~39°C，較佳為33~39°C(例如37°C)。CO₂濃度通常於培養氣氛中為4~10體積%，較佳為4~6體積%。培養時間根據培養目的適當設定即可。

【0021】 接著性細胞之懸浮培養可使用細胞培養所通常使用之培養皿(Schale)、燒瓶、塑膠袋、Teflon(註冊商標)袋、皿、培養皿(Petri Dish)、組織培養用皿、多孔皿(multi-dish)、微量板(microplate)、微孔板(microwell plate)、多孔板(multi-plate)、多孔板(multiwell plate)、腔室載玻片(Chamber Slide)、試管、托盤、培養袋、旋轉瓶等培養容器來實施。該等培養容器較理想為細胞低接著性，以使附著於支架材之接著性細胞不與培養容器接著。作為細胞低接著性之培養容器，可使用培養容器之表面並未為了提昇與細胞之接著性而進行人工處理(例如，利用細胞外基質等進行之塗佈處理)者、或者培養容器之表面進行過人工處理以降低與細胞之接著性者。

【0022】 於需要更換培養基時，藉由進行離心分離或過濾處理而將

細胞分離後，於該細胞中添加新鮮之培養基即可。或者，藉由進行離心或過濾處理而將細胞適當濃縮後，於該濃縮液中添加新鮮之培養基即可。例如，進行離心分離時之重力加速度(G)為100~400 G，進行過濾處理時所使用之過濾器之細孔之大小為10 μm~100 μm，但並不限制於該等。

【0023】 接著性細胞之培養亦可藉由生物反應器或自動培養裝置而進行，其等可於機械控制下且於封閉環境下自動執行細胞播種、培養基更換、細胞圖像獲取、培養細胞回收，並一面控制pH、溫度、氧濃度等一面進行高密度之培養。

【0024】

(進行懸浮培養之接著性細胞)

「接著性細胞」係指生存或增殖需要容器壁等支架之細胞。上述進行懸浮培養之接著性細胞並無特別限定，例如可列舉幹細胞、前驅細胞、體性非幹細胞、初代培養細胞、細胞株、癌細胞等。幹細胞係指兼具對自我進行複製之能力與分化成其他複數種系統之細胞之能力的細胞。作為接著性之幹細胞之例，例如可列舉間葉系幹細胞、神經幹細胞、造血幹細胞、肝臟幹細胞、胰臟幹細胞、肌肉幹細胞、生殖幹細胞、腸道幹細胞、腫瘤幹細胞、毛囊幹細胞等體性幹細胞等，但並不限定於該等。間葉系幹細胞係指具有分化成骨細胞、軟骨細胞及脂肪細胞之全部或若干種之分化能之幹細胞。間葉系幹細胞以低頻度存在於骨髓、末梢血、臍帶血、脂肪組織等組織中，可藉由公知之方法自該等組織單離。前驅細胞係指處於自上述幹細胞分化成特定之體細胞或生殖細胞之中途階段的細胞。作為接著性之前驅細胞之例，例如可列舉前驅脂肪細胞、前驅心肌細胞、前驅內皮細胞、神經前驅細胞、肝臟前驅細胞、胰腺前驅細胞、腎臟前驅細胞等，

但並不限定於該等。作為接著性之體性非幹細胞之例，例如包含纖維母細胞、骨細胞、骨外被細胞、角質形成細胞(keratinocytes)、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、內皮細胞、血管內皮細胞、肝實質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神經系統細胞、神經膠質細胞、神經元、寡樹突膠細胞、小神經膠質細胞、星狀膠細胞、心臟細胞、食道細胞、肌肉細胞(例如，平滑肌細胞或骨骼肌細胞)、胰腺 β 細胞、黑色素細胞等，但並不限定於該等。初代培養細胞係指處於播種自活體分離之細胞或組織後直至進行第1次繼代為止之培養狀態的細胞。初代培養細胞例如可為自皮膚、腎臟、脾臟、腎上腺、肝臟、肺、卵巢、胰腺、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前列腺、睪丸、胸腺、肌肉、結合組織、骨、軟骨、血管組織、血液、心臟、眼、腦或神經組織等任意組織採取之細胞。細胞株係指藉由活體外之人為操作而獲得無限增殖能之細胞。本發明中使用之接著性細胞可較佳地列舉犬腎小管上皮細胞(MDCK細胞)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)、間葉系幹細胞(MSC)，可更佳地列舉間葉系幹細胞，但並不限定於該等。

【0025】 又，接著性細胞之來源亦並無特別限定，可為源自動物及植物中之任一種之細胞。作為動物，並無限定，例如可列舉魚類、兩栖類、爬蟲類、鳥類、泛甲殼類、六腳類、哺乳類等，較佳為哺乳類。作為哺乳類之例，並無限定，可列舉大鼠、小鼠、兔、豚鼠、松鼠、倉鼠、田鼠、鴨嘴獸、海豚、鯨、犬、貓、山羊、牛、馬、綿羊、豬、象、狨、松鼠猴、羅猴、黑猩猩、人類等。作為植物，只要為可對所採取之細胞進行液體培養者，則並無特別限定。例如，可列舉生產天然藥類(例如，皂苷、生物鹼類、小檗鹼、莨菪苷、植物固醇等)之植物(例如，藥用人參、

長春花、天仙子、黃連、顛茄等)或生產成為化妝品和食品之原料之色素或多糖體(例如，花青苷、紅花色素、茜草色素、番紅花色素、黃酮類等)之植物(例如，藍莓、紅花、西洋茜草、番紅花等)、或者生產原料藥之植物等，但並不限定於其等。於本發明中，較佳為使用哺乳類之接著性細胞。

【0026】

(液體培養基)

可用於上述懸浮培養之液體培養基可根據使用之接著性細胞之種類等適當選擇，例如，於以哺乳類之接著性細胞之培養為目的之情形時，可將哺乳類細胞之培養所通常使用之培養基用作本發明之培養基組合物所含之培養基。作為哺乳類細胞用之培養基，例如可列舉達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、Ham F12培養基(Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12培養基、McCoy 5A培養基(McCoy's 5A medium)、伊格爾最低必需培養基(Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM)、阿爾法改良伊格爾最低必需培養基(alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium, α MEM)、最低必需培養基(Minimum Essential Medium)、RPMI1640培養基(Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, 洛斯維帕克紀念研究所1640培養基)、Iscove改良達爾伯克培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM)、MCDB131培養基(Molecular, Cellular, and Developmental Biology 131 Medium, 分子細胞和發育生物學131培養基)、Williams培養基E、IPL41培養基、Fischer's培養基、StemPro34(Invitrogen公司製造)、X-VIVO 10(Cambrex公司製造)、X-VIVO 15(Cambrex公司製造)、

HPGM(Cambrex公司製造)、StemSpan H3000(STEMCELL Technologies 公司製造)、StemSpanSFEM(STEMCELL Technologies 公司製造)、StemlineII(Sigma-Aldrich公司製造)、QBSF-60(Quality Biological公司製造)、StemProhESCSFM(Invitrogen公司製造)、mTeSR1或mTeSR2培養基(STEMCELL Technologies 公司製造)、Sf-900II(Invitrogen公司製造)、Opti-Pro(Invitrogen公司製造)等。

【0027】

(用於懸浮培養之支架材)

上述用於懸浮培養之支架材只要為可使得對接著性細胞進行懸浮培養者，則並無特別限定，可較佳地使用包含非水溶性多糖類之奈米纖維或微載體珠(microcarrier beads)等。使細胞於微載體珠之載體表面植活並對包含該珠粒之培養基進行攪拌而以懸浮狀態進行培養之方法通常亦被稱作「微載體培養」或「懸濁培養」等，但於本說明書中，該培養方法亦包含於「懸浮培養」中。

【0028】 於本說明書中，「奈米纖維」係指平均纖維直徑(D)為0.001~1.00 μm 之纖維。本發明中使用之奈米纖維之平均纖維直徑較佳為0.005~0.50 μm ，更佳為0.01~0.05 μm ，進而較佳為0.01~0.02 μm 。可用於懸浮培養之奈米纖維之縱橫比(L/D)係藉由平均纖維長度/平均纖維直徑而獲得，並無特別限定，通常為2~500，較佳為5~300，更佳為10~250。又，亦包含該等以二次聚集體之形式會合而成之纖維。

【0029】 於使用奈米纖維對接著性細胞進行懸浮培養之情形時，對培養基添加另外製備之接著性細胞並均勻混合即可。此時之混合方法並無特別限制，例如可列舉：移液等手動進行之混合；使用攪拌器、漩渦混合

機、微量板混合機、振盪機等機器之混合。混合後，可於靜置狀態下對所獲得之細胞懸濁液進行培養，亦可視需要一面進行旋轉、振盪或攪拌一面進行培養。其轉速及頻度根據本領域技術人員之目的適當設定即可。例如，自繼代培養回收接著性細胞，使用適當之細胞解離液使接著性細胞分散為單個細胞、或與此接近之狀態，將分散之接著性細胞懸浮於培養基中，對其進行懸浮培養(較佳為懸浮靜置培養)。

【0030】 於較佳態樣中，於奈米纖維與液體培養基混合時，該奈米纖維一面保持初始纖維直徑一面於該液體中分散，具有於不實質上提高該液體之黏度之情況下實質上保持附著於奈米纖維之細胞以防止其沈澱而附著於培養容器的效果。不實質上提高液體之黏度係指液體之黏度不會超過 $8 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ 。此時該液體之黏度(即，下述本發明之培養基組合物之黏度)為 $8 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ 以下，較佳為 $4 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ 以下，更佳為 $2 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ 以下。包含奈米纖維之液體之黏度例如可於 25°C 條件下使用音叉振動式黏度測定(SV-1A, A & D Company Ltd.)進行評價。

【0031】 作為構成奈米纖維之非水溶性多糖類，可列舉：纖維素、半纖維素等纖維素類；甲殼素、聚葡萄糖等幾丁質等，但並不限定於該等。非水溶性多糖類較佳為纖維素、甲殼素或聚葡萄糖，更佳為甲殼素。

【0032】 纖維素係指葡萄糖之六員環即D-葡萄糖吡喃糖以 β -1、4葡萄糖苷鍵結而成之天然高分子化合物。作為原料，例如可使用木材、竹、麻、黃麻、洋麻、棉花、農作物、食物殘渣等源自植物之纖維素、或細菌纖維素、剛毛藻(Cladophora)、灰胞藻(Glaucocystis)、法囊藻、海鞘纖維素等微生物產生或者動物產生之纖維素。源自植物之纖維素係被稱作微

原纖維之非常細之纖維進而成束而階段性地形成為高次結構之原纖維、薄片、纖維細胞。又，細菌纖維素係自菌細胞分泌之纖維素之微原纖維以原本之粗細形成微細之網狀構造。

【0033】於本發明中，棉花或細菌纖維素等高純度之纖維素原料可直接以原料之形式使用，但此外之源自植物之纖維素等較佳為使用經過單離、精製者。於本發明中較佳地使用之纖維素係棉花纖維素、細菌纖維素、牛皮紙漿纖維素、微晶纖維素等。

【0034】幾丁質係指選自由甲殼素及聚葡萄糖胺糖所組成之群中之1種以上之糖類。構成甲殼素及聚葡萄糖胺糖之主要糖單元分別為N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖胺，通常將N-乙醯葡萄糖胺之含量較多而相對於酸性水溶液為難溶性者稱為甲殼素，將葡萄糖胺之含量較多而相對於酸性水溶液為可溶性者稱為聚葡萄糖胺糖。於本說明書中，為了方便起見，將構成糖中N-乙醯葡萄糖胺所占之比率為50%以上者稱作甲殼素，將未達50%者稱作聚葡萄糖胺糖。就達成較高之懸浮作用之觀點而言，構成甲殼素之糖單元中N-乙醯葡萄糖胺所占之比率越高越佳。構成甲殼素之糖單元中N-乙醯葡萄糖胺所占之比率較佳為80%以上，更佳為90%以上，進而較佳為98%以上，最佳為100%。

【0035】作為甲殼素之原料，例如可使用蝦、蟹、昆蟲、貝、蘑菇等眾多生物資源。本發明中使用之甲殼素可為源自蟹殼或蝦殼之甲殼素等具有 α 型之晶體結構之甲殼素，亦可為源自烏賊之甲殼之甲殼素等具有 β 型之晶體結構之甲殼素。蟹或蝦之外殼被作為產業廢棄物處理之情況較多，容易獲取，且就有效利用之觀點而言，作為原料較佳，但其需要脫蛋白步驟及脫灰步驟以將以雜質之形式包含之蛋白質或灰分等去除。因此，於本

發明中，較佳為使用已經實施脫基質處理之精製甲殼素。精製甲殼素有市售。

【0036】 藉由將上述含有非水溶性多糖類之原料粉碎，可獲得包含該非水溶性多糖類之奈米纖維。粉碎方法並無限定，為了微細化至符合本發明之目的之下述纖維直徑、纖維長度，較佳為高壓均質機、研磨機(石磨)、或者珠磨機等媒體攪拌磨機等可獲得較強之剪切力之方法。

【0037】 該等之中，較佳為使用高壓均質機進行微細化，例如較理想為使用如日本專利特開2005-270891號公報或日本專利第5232976號中揭示之濕式粉碎法進行微細化(粉碎化)。具體而言，可藉由如下方式而實施：使用藉由自一對噴嘴以高壓分別噴射分散有原料之分散液並使其等進行碰撞從而將原料粉碎者、例如星爆系統(SUGINO MACHINE(股)製造之高壓粉碎裝置)或NanoVater(吉田機械興業(股)之高壓粉碎裝置)。

【0038】 於使用上述高壓均質機將原料微細化(粉碎化)時，微細化或均質化之程度取決於向高壓均質機之超高壓腔室壓送之壓力、及通過超高壓腔室之次數(處理次數)、及水分散液中之原料之濃度。壓送壓力(處理壓力)並無特別限定，通常為50~250 MPa，較佳為150~245 MPa。

【0039】 又，微細化處理時之水分散液中之原料之濃度並無特別限定，通常為0.1質量%~30質量%，較佳為1質量%~10質量%。微細化(粉碎化)之處理次數並無特別限定，其亦取決於上述水分散液中之原料之濃度，但存在如下情況，即於原料之濃度為0.1~1質量%之情形時，處理次數為10~100次左右會充分微細化，但於原料之濃度為1~10質量%時，則需要10~1000次左右。

【0040】 上述微細化處理時之水分散液之黏度並無特別限制，例

如，於非水溶性多糖類為 α 甲殼素之情形時，該水分散液之黏度之範圍為1~100 mPa·S，較佳為1~85 mPa·S(根據25°C條件下之音叉振動式黏度測定(SV-1A，A & D Company Ltd.))。又，微細化處理時之水分散液中之非水溶性多糖類之粒徑亦並無特別限制，例如，於非水溶性多糖類為 α 甲殼素之情形時，該水分散液中之 α 甲殼素之平均粒徑之範圍為0.5~200 μm ，較佳為30~150 μm (根據雷射繞射/散射式粒徑分佈測定裝置LA-960(堀場製作所))。

【0041】再者，可用於懸浮培養之奈米纖維之製備方法於WO2015/111686等中有記載。

【0042】作為可用於懸浮培養之微載體珠，只要為接著性細胞可於其表面植活且可維持及增殖者，則並無特別限定，可使用公知之微珠粒。珠粒之形狀可列舉球狀、長球狀、橢圓體狀等，並無特別限定。作為該微載體珠之例，可列舉玻璃珠粒、聚苯乙烯珠粒、陶瓷珠粒等，但並不限定於該等。微載體珠有市售，根據進行培養之接著性細胞之種類等適當選擇最佳者即可。

【0043】於使用微載體珠對接著性細胞進行懸浮培養之情形時，對含有微載體珠之培養基添加另外製備之接著性細胞並均勻混合即可。此時之混合方法並無特別限制，例如可列舉：移液等手動進行之混合；使用攪拌器、漩渦混合機、微量板混合機、振盪機等機器之混合。混合後，一面對所獲得之細胞懸濁液進行旋轉、振盪或攪拌一面進行培養，維持使植活有細胞之微載體珠懸浮之狀態。其轉速或頻度根據本領域技術人員之目的適當設定即可。

【0044】

(將支架材與接著性細胞分離之試劑)

作為將支架材與接著性細胞分離之試劑，只要為可將支架材與接著性細胞分離者，則並無特別限定。作為將支架材與接著性細胞分離之試劑之例，可列舉「將支架材分解之試劑」或「使細胞之接著能力降低之試劑」等，但並不限定於該等。作為將支架材分解之試劑，只要為可將支架材分解而將支架材與接著性細胞剝離者，則並無特別限定。例如，於使用纖維素奈米纖維作為支架材之情形時，作為其分解酵素，可使用纖維素酶(內葡聚糖酶(endoglucanase)(EC 3.2.1.4)(「EG」)、外切葡聚糖酶(exoglucanase)或纖維二糖水解酶(Cellobiohydrolase)(EC 3.2.1.91)(「CBH」)、 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)($[\beta]$ -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶($[\beta]$ -D-glucosideglucohydrolase)，EC 3.2.1.21)(「BG」))。於在纖維素原料中包含較多半纖維素之情形時，較佳為除了纖維素酶以外，亦添加木聚糖酶(Xylanase)或甘露醇分解酶(mannanase)作為用以將半纖維素分解之酵素。又，於使用甲殼素或聚葡萄糖胺糖作為非水溶性多糖類之情形時，作為其分解酵素，可使用殼質酶、甲殼二糖酶(Chitobiase)、殼聚糖酶(Chitosanase)、 β -1,3-葡聚醣酶等。亦可組合使用複數種將支架材分解之試劑。例如，於使用甲殼素或聚葡萄糖胺糖作為非水溶性多糖類之情形時，作為其分解試劑，亦可使用選自由殼質酶、甲殼二糖酶、殼聚糖酶、及 β -1,3-葡聚醣酶所組成之群中之2、3或4種酵素之混合物。Yatalase(TAKARA BIO)係包含殼質酶、甲殼二糖酶、殼聚糖酶、及 β -1,3-葡聚醣酶之混合物，可較佳地用作將甲殼素或聚葡萄糖胺糖分解之試劑。

【0045】 例如，於支架材為包含非水溶性多糖類之奈米纖維之情形

時，對附著於該奈米纖維之接著性細胞之懸濁液添加該非水溶性多糖類之分解酵素，將混合物培養足以將接著性細胞剝離之時間。該剝離並非必須使用可能對所培養之細胞造成損傷之螯合劑(EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid，四乙酸乙二胺))或蛋白質分解酵素(胰蛋白酶(trypsin)、膠原酶(Collagenase))。利用非水溶性多糖類之分解酵素之培養溫度通常為20°C ~ 37°C。培養時間亦取決於酵素之種類等，但通常為5 ~ 60分鐘。於奈米纖維分解而使接著性細胞自奈米纖維剝離後，可藉由供至本發明之分離裝置來高效率地回收所剝離之接著性細胞。

【0046】 又，使細胞之接著能力降低之試劑只要為使細胞之接著能力降低者，則並無特別限定。作為該試劑，可將胰蛋白酶、膠原酶、玻尿酸酶(Hyaluronidase)、彈性蛋白酶、及鏈蛋白酶(Pronase)等蛋白質分解酵素或EDTA等用作使細胞之接著能力降低之試劑。例如，於支架材為微載體珠之情形時，對附著於該微載體珠之接著性細胞之懸濁液添加該試劑，將混合物培養足以使接著性細胞之接著降低之時間。該試劑之存在下之懸濁液之培養溫度通常為20°C ~ 37°C。培養時間亦取決於酵素之種類等，但通常為5 ~ 60分鐘。於藉由接著性細胞之接著能力之降低而使接著性細胞自支架材剝離後，可藉由供至本發明之分離裝置來高效率地回收所剝離之接著性細胞。

【0047】

(自接著性細胞釋放至液體培養基中之液性因子)

針對產生所需之液性因子之接著性細胞，於使其附著於包含非水溶性多糖類之奈米纖維之狀態下，對其進行懸浮培養，並使用本發明之分離裝置自培養物(例如培養上清液)分離目標液性因子，藉此可獲得該液性因

子。作為液性因子，可列舉抗體、酵素(尿激酶等)、激素(胰島素等)、細胞激素(干擾素、介白素、腫瘤壞死因子、群落刺激因子、生長因子等)、疫苗之抗原、其他生理活性物質(蛋白質、肽等)，但並不限定於該等。產生液性因子之接著性細胞包含皮膚細胞、軟骨細胞、肝細胞、胰腺細胞、腎細胞、間葉系幹細胞、脂肪細胞等非轉形細胞、或者導入有編碼該液性因子之基因或與有用物質之生物合成相關之基因之轉形細胞。產生所需之液性因子之接著性細胞較佳為將該液性因子分泌至細胞外之細胞。作為產生液性因子之接著性細胞，具體而言，可列舉導入有編碼該液性因子之基因或與該液性因子之生物合成相關之基因之HEK(Human embryonic kidney，人胚腎)293、CHO(Chinese Hamster Ovary，中國倉鼠卵巢)-K1、BHK(Baby Hamster Syrian Kidney，幼倉鼠腎)-21、MDCK、Vero(Verda Reno，非洲綠猴腎)、HepG2(human hepatoma cell，人肝癌細胞)、MCF-7(human breast cancer cells，人乳腺癌細胞)等，但並不限定於該等。用於產生重組蛋白質等液性因子之細胞為本領域技術人員所周知。

【0048】

(細胞溶解用試劑)

作為細胞溶解試劑，只要為具有將細胞之膜破壞或者溶解而使細胞內所含之所需之物質溶出至細胞外之作用者，則並無特別限定，可自該技術領域中公知之化合物或組合物之中適當選擇而使用。作為細胞溶解試劑，具體而言，可列舉有機溶劑、高離液鹽(chaotropic salt)、界面活性劑等，但並不限定於該等。再者，作為細胞溶解試劑，可使用1種試劑，亦可使用2種以上之試劑。

【0049】

(藉由接著性細胞之溶解而釋放至液體中之該細胞中之物質)

藉由細胞之溶解而釋放至液體中之物質包含細胞中所含之一切物質，並無特別限定，作為一例，可列舉不會分泌至所培養之接著性細胞之細胞外之蛋白質、病毒、核酸分子等。

【0050】

(分離用網狀構造之配置姿勢)

於圖1之例中，分離用網狀構造之網狀部分為片狀(即，較薄之平板狀)之篩網，該分離用網狀構造之第1室10a側之面(下表面)成為懸垂面，相對於水平面僅傾斜仰角 θ 。只要為此種構成，則雖其亦根據分離室之形狀而異，但因分離用網狀構造斜向橫穿分離室，故使得該分離用網狀構造之面積(存在網眼之面之面積)變得更大之情況較多，從而即便流量較大亦可降低線性流速，故而較佳。又，亦可期待當進入至第1室之液體流以一定角度碰撞分離用網狀構造時附著於分離用網狀構造之分離對象物容易被該液體流剝離等作用。

另一方面，於圖2之例中，分離用網狀構造與圖1之例同樣地，網狀之部分為片狀之篩網，但該分離用網狀構造之第1室10a側之面(下表面)成為水平面(仰角 θ 為0度)，並朝向正下方之方向(換言之，懸濁液中之液體通過分離用網狀構造20之網眼時該液體之行進方向F僅具有垂直向上之方向分量Fv)。此種態樣因作用於被網眼截留之分離對象物之重力全部作為垂直於分離用網狀構造之下表面剝離之力作用於該分離對象物，故可最有效地消除堵塞，而較佳。

【0051】 分離用網狀構造之下表面與水平面之間之角度(圖1之仰角

θ)只要為0度以上且未達90度即可，於如圖1之態樣般傾斜配置分離用網狀構造且使液體自下方流入至第1室之情形時，就期待附著於分離用網狀構造之分離對象物容易被該液體流剝離等作用以抑制因分離對象物造成之堵塞之觀點而言， $45\text{度} \leq \theta < 90\text{度}$ 為仰角 θ 之較佳範圍。如上所述，使分離用網狀構造之下表面成為水平面之態樣(仰角 $\theta = 0\text{度}$)與使分離用網狀構造之下表面成為傾斜之懸垂面之態樣各有優點，因此，亦可根據用途或分離室之內部形狀選擇較佳態樣。

【0052】 圖3係圖2之態樣之變化，其中分離用網狀構造20之下表面成為水平面(仰角 θ 為0度)，且分離室以該分離用網狀構造之面積(存在網眼之面之面積)變得更大之方式擴展。於圖3(a)之態樣中，流入埠31設置於第1室之中央，流出埠32亦設置於第2室之中央，液體自正下方進入至第1室，向正上方通過分離用網狀構造，並自第2室向正上方流出。另一方面，於圖3(b)之態樣中，流入埠31設置於第1室之側面，流出埠32設置於與流入埠31之位置為相反側之第2室之側面，液體自側方進入至第1室，向正上方通過分離用網狀構造，並自第2室向側方流出。於圖3之例中，分離室之形狀為於角部設置有弧度之圓柱狀(旋轉中心軸為紙面之縱向)，但較佳為以液流藉由分離用網狀構造之整個面擴散之方式適當決定該分離室之形狀。

【0053】

(分離用網狀構造之形狀)

分離用網狀構造之形狀(網狀部分之形狀)不僅可為如圖1、圖2所示之平坦之片狀，亦可為如圖4所例示之袋之形狀。

於圖4(a)所例示之態樣中，以袋之開口朝向下之方式配置有分離用

網狀構造20，該袋之內部為第1室10a之一部分或全部，該袋之外部為第2室10b。於圖4(a)之例中，該袋之內部為第1室10a之全部，但若該袋之位置於分離室內向上方移動，則該袋之內部成為第1室10a之一部分。該袋之壁部中，相互面對之內表面不相互平行，隨著自上述開口向袋內更深處進入，該內表面彼此之間之距離逐漸變窄。藉此，該袋之內表面全部成為傾斜之懸垂面或朝向正下方之面。

於圖4(b)所例示之態樣中，以袋之開口朝向上方之方式配置有分離用網狀構造20，該袋之外部為第1室10a，該袋之內部為第2室10b之一部分或全部。於圖4(b)之例中，該袋之內部為第2室10b之全部，但若該袋之位置於分離室內向下方移動，則該袋之內部成為第2室10b之一部分。該袋之壁部中，相互面對之內表面不相互平行，隨著自上述開口向袋內更深處進入，該內表面彼此之間之距離逐漸變窄。藉此，該袋之外面全部成為傾斜之懸垂面或朝向正下方之面。

【0054】

(分離用網狀構造之網之構造)

分離用網狀構造具有以分離對象物不會通過之方式(即，被截留之方式)預先確定之大小之網眼。藉此，與液體一起進入該分離裝置內之固體中之具有意欲分離之大小的分離對象物無法通過分離用網狀構造之網眼而滯留於第1室。由此，可將滯留於第1室之分離對象物分離。自懸濁液分離之分離對象物可為應被廢棄者，亦可為應加以回收利用者。

【0055】 分離用網狀構造可為用線材編織而成之篩網，亦可為於膜面設置有大量貫通孔之多孔膜。至於篩網，由於具有各種線徑之線材及各種開口率之素材被廉價地市售，又，只要是包含圓線(截面形狀為圓形之

線材)之篩網，則會抑制細胞等柔軟之分離對象物被切斷而通過網狀等現象，阻擋之可能性變高，故而較佳。以下，對篩網進行說明，但亦可藉由多孔膜達成相同之構成。

【0056】

(分離用網狀構造之貫通孔之開口形狀之圓當量直徑)

分離用網狀構造之貫通孔(網眼)之開口形狀之圓當量直徑根據分離對象物及通過對象物而異。例如，若分離對象物為聚苯乙烯珠粒等用作懸浮培養之支架材之粒狀物或球狀物(例如，CellBIND(註冊商標)表面微載體(粒徑125~212 μm ，Corning公司製造)且通過對象物為自該支架材剝離之細胞，則貫通孔之開口形狀之圓當量直徑設為該珠粒無法通過之尺寸，較佳為20 μm ~200 μm 左右，更佳為20 μm ~100 μm ，進而較佳為20 μm ~50 μm 。若不存在通過對象物而僅為液體，則貫通孔之開口形狀之圓當量直徑亦可更小。

若係分離對象物為附著於上述珠粒之狀態之犬腎小管上皮細胞(MDCK細胞)或中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)、間葉系幹細胞(MSC)等細胞，且不存在通過對象物而僅液體通過之情形，則貫通孔之開口形狀之圓當量直徑可例示1 μm ~20 μm 左右。

若分離對象物為用作MDCK細胞、CHO細胞、MSC等之懸浮培養之支架材的包含非水溶性多糖類之奈米纖維，且通過對象物為自該支架材剝離之細胞，則貫通孔之開口形狀之圓當量直徑較佳為10 μm ~200 μm 左右，更佳為20 μm ~100 μm ，進而較佳為20 μm ~50 μm 。若不存在通過對象物而僅為液體，則貫通孔之開口形狀之圓當量直徑亦可更小。

又，若係分離對象物為附著於上述奈米纖維之狀態之MDCK細胞、

CHO細胞、MSC等細胞，且不存在通過對象物而僅液體通過之情形，則貫通孔之開口形狀之圓當量直徑較佳為 $1\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ 左右，更佳為 $5\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ ，進而較佳為 $10\ \mu\text{m}\sim 50\ \mu\text{m}$ 。

以上之尺寸係各分離對象物、通過對象物之一例。可根據各分離對象物之尺寸或通過對象物之尺寸以及通過對象物之有無，以抑制該分離對象物通過之方式適當決定。

以下，例示接著性細胞為MSC，且支架材為奈米纖維之情形時的各部分之較佳尺寸等，但其等以外之其他細胞或支架材亦可分別適當變更為相應之尺寸。

【0057】 僅藉由上述圓當量直徑之規定，會包含如狹縫之細長之開口形狀或如迷宮般錯綜複雜之開口形狀，從而導致分離對象物以外之應使其通過之固體亦全部被截留。

因此，於本發明中，於僅將支架材分離之情形時，除了上述圓當量直徑之限定以外，亦於限定條件中加入該開口形狀為可收容直徑為 $10\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ 之圓(以下稱作收容圓)之形狀。此處，所謂開口形狀可收容收容圓，包括收容圓與開口形狀內切之情況或收容圓與開口形狀一致之情況。收容圓之直徑更佳為直徑 $20\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ ，進而較佳為直徑 $20\ \mu\text{m}\sim 50\ \mu\text{m}$ 。於開口形狀為圓形之情形時，收容圓之直徑＝圓當量直徑，於此外之情形時，收容圓之直徑 $<$ 圓當量直徑。

又，於將於支架材附著有細胞者分離之情形時，除了上述圓當量直徑之限定以外，亦於限定條件中加入該開口形狀為可收容直徑 $1\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ 之收容圓之形狀。收容圓之直徑更佳為直徑 $5\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ ，進而較佳為直徑 $10\ \mu\text{m}\sim 50\ \mu\text{m}$ 。

【0058】

(網眼之開口形狀)

分離用網狀構造之網眼之開口形狀並無特別限定，可為三角形、四邊形、六邊形、其他多邊形或不規則形狀等，但作為通常之價廉且高品質之篩網之開口形狀，可列舉正方形。於自正面觀察篩網之片材表面之情形時，如圖5(a)所示，經線與緯線看起來線性交叉，且網眼亦看起來為平面之正方形。當微觀觀察各個網眼時，經線與緯線以避免彼此重疊之方式三維編織，因此，如圖5(b)所示，構成將1個正方形之網眼200包圍之4邊的4根線材(2根經線(201、202)及2根緯線(211、212))分別於篩網之厚度方向上劇烈起伏。該正方形之開口之4邊中之相互對向的平行之2邊之間之距離W1可為上述收容圓之直徑。

【0059】 線材之直徑亦可根據分離對象物而變更，且大致相同，較佳為10 μm ~100 μm 左右，更佳為30 μm ~80 μm 。

線材之材料可列舉尼龍、聚丙烯、聚乙烯、聚酯、PTFE(Poly Tetra Fluoro Ethylene，聚四氟乙烯)、EVA(Ethylene vinyl acetate，乙烯-乙酸乙酯)、PPS(Polyphenylene sulfide，聚苯硫醚)、PEEK(polyetheretherketone，聚醚醚酮)、芳香族聚醯胺、不鏽鋼等。

於分離對象物為所培養之接著性細胞(細胞塊)之情形時，可藉由將線材加粗以抑制細胞被線材切斷，又，亦可藉由減緩通過分離用網狀構造之液體之流速以抑制細胞被線材切斷。藉由進一步增大供配置分離用網狀構造之分離室之容積，使液流之截面積大於其他管路之截面積，並使分離用網狀構造之網眼之開口面積之總和大於其他管路之截面積，而使通過分離用網狀構造之液體培養基之流速變慢，從而抑制細胞被分離用網狀構造分

割。藉此，細胞被分離用網狀構造截留而滯留於第1室10a。分離用網狀構造之網眼之開口面積之總和較佳為其他配管用管之截面積之0.01倍～1000倍左右，更佳為0.1倍～500倍左右。例如，於配管用管之截面積為1 mm²～50 mm²左右之情形時，分離用網狀構造之網眼之開口面積之總和較佳為0.01 mm²～50000 mm²左右。

【0060】

(多孔膜)

分離用網狀構造亦可為多孔膜。如圖6(a)、(b)所示，多孔膜具有於膜厚度之方向上貫通之大量貫通孔200及作為該等貫通孔彼此之間之隔壁之樑部220而構成。貫通孔200與上述篩網同樣地，具有抑制分離對象物通過之大小之開口形狀。樑部220係位於相鄰之貫通孔彼此之間之材料部分(自膜去除貫通孔後之剩餘部分)。該樑部以構成網狀之方式一體連接。多孔膜之貫通孔200之開口形狀、開口面積、樑部之寬度可與上述篩網之開口形狀、開口面積、線材之粗細相同。作為多孔膜之製造方法，可例示樹脂成形、打孔、對膜進行蝕刻、電鑄等。

【0061】

(分離用網狀構造之面積、分離室之容積)

分離用網狀構造之面積(面向第1室，存在網眼之區域之面積)根據該分離裝置之用途(小規模實驗用或大規模產業用)決定即可，並無特別限定，例如，若為小規模實驗用，則可例示100～5000 mm²左右作為較佳範圍，若為大規模產業用，則可例示5000～50000 mm²左右作為較佳範圍。

分離室之容積亦根據該分離裝置之用途決定即可，並無特別限定，例如，若為小規模實驗用，則可例示000～50000 mm³左右作為較佳範圍。

圍，若為大規模產業用，則可例示50000～500000 mm³左右作為較佳範圍。

【0062】

(分離室之形狀、埠、分離用網狀構造之位置)

分離室之形狀並無特別限定，可列舉圓柱狀、角柱狀(長方體)、板狀(圓板、四方板狀)、塊狀(球狀、橢圓球狀、接近立方體之形狀)、不規則形狀等。此種分離室中之流入埠、分離用網狀構造、流出埠之位置亦並無特別限定，較佳為以進入該分離裝置內之懸濁液中之液體以更低之阻力順暢地自第1室較佳地通過分離用網狀構造而移動至第2室然後自該分離裝置流出之方式構成內部流路。又，較佳為以進入該分離裝置內之懸濁液中之液體相對於分離用網狀構造更大程度地擴散並通過該分離用網狀構造之方式決定分離室之形狀及埠之位置。

【0063】

(分離室之壁部之材料)

構成分離室之壁部之材料並無特別限定，可列舉聚苯乙烯或聚丙烯、聚對苯二甲酸乙二酯、聚碳酸酯、丙烯酸、矽、聚偏二氟乙烯等有機高分子材料或不鏽鋼等金屬材料。就可價廉地成形且對高壓釜或 γ 射線之耐性之觀點而言，可例示聚丙烯或聚碳酸酯、丙烯酸作為較佳之材料。

【0064】

(用以將分離用網狀構造配置於分離室內之構成)

作為用以將分離用網狀構造配置於分離室內之構成，並無特別限定，例如可列舉如下構成等：準備第1室及第2室作為不同之零件，藉由該等將分離用網狀構造夾入並固定；或於1個分離室內插入具有接著部分之

分離用網狀構造，利用接著部分將分離用網狀構造接著並固定於該分離室之內壁，而將該分離室分為第1室及第2室。接著可為使用接著劑之接著、零件本身彼此之熔接等。

【0065】

(第1室具有複數個流入流出埠之態樣)

於該分離裝置中，亦可根據目的於第1室、第2室分別設置複數個埠。

於圖7所示之態樣例中，於第1室設置有3個埠(第1流入埠311、第2流入埠312、及流出埠313)，於第2室僅設置有流出埠32。於圖7所示之態樣例中，分離室之外形為圓板狀(圓柱狀)，各埠位於分離室之外周側面上隔著角度90度之間隔之位置。

圖8所示之態樣例亦同樣地，於第1室設置有3個埠(第1流入埠314、第2流入埠315、及流出埠316)，於第2室僅設置有流出埠32。於圖8所示之態樣例中，分離室之形狀為長方體狀(較薄之板狀)，各埠於分離室之外周側面之4面中之相互對向之2面分別設置有2個。作為圖8(a)所示之態樣之更具體之例，可例示圖8(b)所示之態樣、及圖8(c)所示之態樣。

於圖8(b)所示之態樣中，分離室為具有8個頂點(C11、C12、C13、C14、C31、C32、C33、C34)之長方體狀(如將較薄之四邊形之板水平放倒之形狀)。該分離室藉由水平配置之方形之片狀之分離用網狀構造20而分隔為下側之第1室10a與上側之第2室10b。該分離用網狀構造20之4個頂點為C21、C22、C23、C24。第1室中之第1流入埠314及第2流入埠315位於側面(C22、C23、C33、C32)內，第1室中之流出埠316位於側面(C21、C24、C34、C31)內。又，第2室之流出埠32位於側面(C11、C14、C24、

C21)內。

於圖8(c)所示之態樣中，分離室為具有8個頂點(C41、C42、C43、C44、C51、C52、C53、C54)之長方體狀(如將較薄之四邊形之板垂直立起之形狀)。該分離室藉由傾斜配置之方形片狀之分離用網狀構造20而分隔為下側之第1室10a與其斜上側之第2室10b。方形片狀之分離用網狀構造20之4個頂點為C41、C52、C53、C44。第1室中之第1流入埠314及第2流入埠315位於側面(C41、C51、C52)內，第1室中之流出埠316位於側面(C44、C54、C53)內。又，第2室之流出埠32位於側面(C44、C53、C43)內。

於圖7、圖8中之任一態樣中，第1流入埠均為用以使懸濁液自外部流入至第1室之埠。又，第2流入埠為用以使洗淨液或試劑等自外部流入至第1室之埠。作為上述試劑，可列舉細胞剝離液(例如，可將支架材分解之試劑)或用以將細胞溶解之細胞溶解試劑等。又，設置於第1室之流出埠係用以使藉由分離用網狀構造而殘留於第1室內之分離對象物流出至外部之埠。

藉由設置該等埠，可將外部之試劑容器與分離室之第1室連接，從而於第1室中應用該試劑進行支架材之剝離或細胞之溶解。又，若將其他外部容器與第1室連接，則亦可使殘留於第1室內之分離對象物移動至該外部容器，而可構築適於封閉系統之培養系統之流路。

【0066】

(第1室之流入埠之位置)

於圖9所示之態樣例中，第2室10b位於第1室10a之上，片狀之分離用網狀構造20呈水平配置。由此，通過分離用網狀構造20之網眼時液體之

行進方向F為垂直向上之方向。

於圖9所示之態樣例中，第1室至少具有用以使懸濁液Q1自外部流入之流入埠31，且該流入埠31設置於第1室之側壁。藉此，分離室之底面變得平坦，可穩定地配置於基座面上。

又，作為較佳態樣，流入埠之中心軸線之高度h1位於第1室之室內之總高度H1之40%以上之高度，較佳為60%以上之高度。藉此，於第1室內，於較流入埠31之中心軸線之高度h1更靠下方存在空間。藉由該空間之存在及自設置於側面之流入埠流入之懸濁液Q1之流動，可於第1室10a內使分離對象物與通過對象物較佳地循環，並使分離對象物一面自分離用網狀構造剝落一面滯留於上述空間。滯留於該空間之分離對象物不會成為新流入之通過對象物之障礙。又，流入埠31並未設置於第1室之底面，因此，新流入之懸濁液亦不會將滯留於該空間之底之分離對象物向上方帶起。由此，通過對象物較佳地通過分離用網狀構造。流入埠之中心軸線之高度h1之上限係流入埠之開口之上端與分離用網狀構造之下表面接觸之位置。即，若將開口之口徑設為d，則流入埠之中心軸線之高度h1之上限為自分離用網狀構造之下表面僅降低d/2之位置。

【0067】 設置於第2室之流出埠32之位置並無特別限定，如圖9所示之態樣例，亦可設置於第2室之側面。於圖9所示之態樣例中，設置於第1室之流入埠31與設置於第2室之流出埠32係設置於分離室之側面中之相互為相反側之面，但亦可設置於同一側之面。流入埠31及流出埠32之位置較佳為考慮配管作業或管所占之配管空間而適當決定。

【0068】

(分離室藉由兩個以上之分離用網狀構造而分為3個以上之態樣)

於圖9之態樣中，分離室係藉由1個分離用網狀構造而分為2個者，但亦可於第2室之上進而設置向上方積層之1個以上之房室作為分離室。上述1個以上之房室中之和第2室相鄰之房室與第2室由另一分離用網狀構造分隔。又，於上述1個以上之房室為兩個以上之房室之情形時，上下相鄰之房室彼此另由其他分離用網狀構造分隔。

於圖10所示之態樣例中，於圖9所示之第2室之上，進而設置向上方積層之房室10c作為分離室。第2室10b位於第1室10a之上，於其等之間水平配置有片狀之分離用網狀構造21，第3室10c位於第2室10b之上，於其等之間水平配置有片狀之分離用網狀構造22。換言之，分離室藉由2個分離用網狀構造21、22而分為3個房室10a、10b、10c。流出埠設置於位於最上方之房室(第3室10c)。於此種構成中，越位於上方之分離用網狀構造之網眼，該網眼之開口面積越小，以進一步抑制上述分離對象物通過。藉此，相較於分離用網狀構造為單個之情形，增加流量時之分離能(即，即便增加流量，亦不會使分離對象物通過而將其截留之性能)提昇，故而較佳。

【0069】

(上下重疊複數個之態樣2)

於圖10所示之態樣中，於在懸濁液Q1中僅分散有作為固體之分離對象物E1之情形時，位於最上方之分離用網狀構造22之網眼之大小之下限並無特別限定，較佳為如應使其通過之液體可以更小之阻力高效率地通過之大小。

另一方面，於圖10所示之態樣中，於在懸濁液Q1中不僅包含作為固體之分離對象物E1亦包含固體之通過對象物E2之情形時，位於最上方之

分離用網狀構造22之網眼之大小係以抑制分離對象物E1通過但可使通過對象物E2通過之大小之方式確定。如此，藉由多段設置分離用網狀構造之態樣，可增大最初之分離用網狀構造21之網眼，從而於通過該分離用網狀構造21時進行粗篩而僅將較大之分離對象物先去除，因此，即便增加相對流量，分離能亦不會下降，故而較佳。

【0070】

(使用本發明之分離裝置之細胞培養系統)

圖11係表示使用該分離裝置而構成之細胞培養系統之一例之方塊圖及配管圖。於圖中，以箭頭表示管路及液體之流動方向。於圖11所例示之構成中，支架材及附著於其之細胞藉由該分離裝置而自懸濁液分離，僅包含液性因子之液體培養基通過並被回收，或者自細胞剝離之支架材藉由該分離裝置而自懸濁液分離，包含細胞之液體培養基通過並被回收。於圖之例中，送液泵S1、S2為管泵，容器110、120、160、170為柔軟之袋，將容器彼此連接之配管為軟質管，從而使細胞或液體培養基不會露出至外部大氣之封閉系統中之細胞培養及細胞之分離、回收成為可能。

【0071】 於液體培養基容器110收容有分散有支架材之液體培養基。液體培養基容器110經由配管P1與細胞培養容器120連接，於配管P1之路徑上設置有送液泵S1，分散有支架材(例如，以甲殼素為主成分之奈米纖維)之液體培養基被送至細胞培養容器120中。另一方面，自細胞注入埠130向細胞培養容器120中注入僅特定量之用於播種至該容器內之接著性細胞(例如，MDCK細胞、CHO細胞、MSC)，並於細胞培養容器120內進行懸浮培養。該細胞培養系統整體被配置於培養箱內並保持於適當之溫度(例如，33°C ~ 39°C)。

【0072】 圖11中例示之細胞培養系統如下作動。

首先，於僅對包含液性因子(例如， $\text{INF-}\beta$ (interferon- β ，干擾素- β)、外來體)之液體培養基進行回收之情形時，包含附著有細胞之支架材之懸濁液自細胞培養容器120通過配管P2被送入至該分離裝置1之第1室10a。於是，附著有細胞之支架材殘留於第1室10a，僅液體培養基通過分離用網狀構造20而進入至第2室10b，並自該分離裝置流出。該液體培養基通過配管P3、切換閥150、配管P4而收容至液體(上清液)回收容器160。該程序亦可用於細胞培養容器120內之細胞(附著於支架材)之濃縮。例如，於該情形時，以進給方向反轉之方式操作送液泵S2，使殘留於第1室10a之濃縮物返回至細胞培養容器120，並自液體培養基容器110再次送入液體培養基，藉此可於細胞培養容器120內繼續培養。

其次，於自懸浮培養之接著性細胞將支架材分離並對包含細胞之液體培養基進行回收之情形時，自試劑注入埠140向細胞培養容器120內送入試劑(例如，Yatalase)，以自該接著性細胞將支架材剝離。此時，以進給方向反轉之方式操作送液泵S2。將支架材與細胞已經剝離之懸濁液自細胞培養容器120通過配管P2送入至該分離裝置1之第1室10a。於是，支架材被分離而殘留於第1室10a(於第1室內亦殘留液體培養基)，細胞及液體培養基通過分離用網狀構造20而進入至第2室10b，並自該分離裝置流出。細胞及液體培養基通過配管P3、切換閥150、配管P5而收容至細胞回收容器170。

該等回收操作可將細胞培養系統取出至培養箱外而進行，亦可於培養箱內進行。

【0073】 圖11所示之系統僅為一例，亦可以所培養之細胞與液體培

養基一起於不與外部大氣直接接觸之情況下通過該分離裝置之分離用網狀構造(或者進入至該分離裝置之第1室之後不通過分離用網狀構造)而於容器彼此之間移動之方式(或者返回至原來之容器之方式)，將所需數量之容器以配管連接。

【0074】 上述細胞培養系統所使用之容器並無特別限定，可例示細胞培養等所使用之柔軟之袋、硬質之塑膠或玻璃製之瓶子或燒瓶等作為較佳者。亦可根據培養規模使用適當之攪拌裝置(例如：振盪器、槳式攪拌器等)。

【0075】 各容器之容量根據系統之用途(小規模實驗用或大規模產業用)決定即可，並無特別限定，例如，若為小規模實驗用，則可例示10 mL(毫升)~1000 mL左右作為較佳範圍，若為大規模產業用，則可例示1 L~1000 L左右作為較佳範圍。

【0076】 送液泵並無特別限定，可列舉注射器、管泵等作為較佳者。

【0077】 於使用透氣袋或附通氣帽之燒瓶作為容器之情形時，培養箱較佳為使用可控制內部之溫度及氣體濃度(尤其CO₂濃度)之裝置。又，於容器為氣體不透過性之密閉容器之情形時，可藉由培養基更換等來控制液體培養基中之CO₂濃度，從而可使用僅進行溫度控制之培養箱。

【0078】

(分離方法)

本發明可提供一種方法，其係使用上述本發明之分離裝置，自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液，較佳地分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物。如上所述，懸濁液所含之固體、應分

離之對象物及應使其通過之對象物之組合種類繁多。例如，於懸濁液中之液體為液體培養基且分離對象物為附著有接著性細胞之支架材之情形時，不存在固體之通過對象物，該方法可用於液體之單純之去除(濃縮)或於懸浮培養中自接著性細胞釋放至液體培養基中之液性因子之回收。分離對象物亦可為回收對象物。於懸濁液中之液體為液體培養基且分離對象物為藉由將支架材與接著性細胞分離之試劑而於液體培養基中自接著性細胞剝離之支架材之情形時，通過對象物(回收對象物)為自支架材剝離之接著性細胞。於懸濁液中之液體為含有藉由將接著性細胞溶解之細胞溶解試劑而溶解之該細胞之液體且分離對象物為藉由該細胞之溶解而殘留於上述液體中之支架材之情形時，通過對象物(回收對象物)為藉由該細胞之溶解而釋放至上述液體中之源自該細胞之物質。

【0079】

(流速、流量)

懸濁液中之液體通過該分離裝置之分離用網狀構造時之流速並無特別限定，就提昇分離性且抑制堵塞之方面而言，較佳為0.01 mm/秒～25 mm/秒，更佳為0.1 mm/秒～15 mm/秒，進而較佳為1 mm/秒～10 mm/秒。

就提昇分離性且抑制堵塞之方面而言，通過分離用網狀構造之面積(作為網有效地發揮作用之部分之面積)每1 cm²之液體之流量較佳為1～10 mL/min，更佳為2～5 mL/min，進而較佳為3 mL/min。下述實施例3係以30 mL/min實施者，分離用網狀構造之面積約為12 cm²，因此分離用網狀構造之面積每1 cm²之流量為2.5 mL/min。

【0080】

(分離及回收例1：懸浮培養之移植用MSC之回收)

圖12係表示使用本發明之分離裝置對懸浮培養之移植用MSC進行回收之情形時之製程之一例的流程圖。

如該流程圖所示，首先，使用支架材(例如甲殼素奈米纖維)對細胞進行懸浮培養。

然後，可藉由將懸濁液(於液體培養基中分散有附著有細胞之支架材)送入至該分離裝置，使特定量之液體培養基通過，對附著有細胞之支架材進行濃縮。此時，可對通過該分離裝置之液體培養基(培養上清液)進行回收。

然後，注入含有將支架材分解之酵素(例如Yatalase)之溶液，並培養特定時間，藉此將支架材表面分解，從而使細胞自支架材剝離。於注入酵素溶液之前，亦可利用PBS(-)(phosphate buffer saline，磷酸緩衝液)等進行洗淨。

然後，對培養基或PBS(-)進行送液，將支架材截留，僅使細胞通過，藉此對該細胞進行回收。此時，藉由對分離用網狀構造之篩網面而向與重力方向相反之方向送液，可進行有效之細胞回收。

然後，對回收液進行離心分離，去除上清液，藉此僅對細胞進行回收。

【0081】

(分離及回收例2：於對懸浮培養後之液體培養基進行回收之情形時)

圖13係表示使用本發明之分離裝置而對懸浮培養後之液體培養基進行回收之情形時之製程之一例的流程圖。如該流程圖所示，使用支架材對接著性細胞進行懸浮培養之後，將懸濁液(於液體培養基中分散有附著有

接著性細胞之支架材)送入至本發明之分離裝置，藉此可將附著有細胞之支架材去除，並進行液體培養基(培養上清液)之回收。附著有接著性細胞之支架材亦可返回至培養容器而再次供至懸浮培養。

【0082】

(分離及回收例3：於對源自所培養之細胞之物質進行回收之情形時)

圖14係表示使用本發明之分離裝置，於懸浮培養後對源自所培養之細胞之物質進行回收之情形時之製程之一例的流程圖。

如該流程圖所示，首先，使用支架材細胞對進行懸浮培養。

然後，將懸濁液(於液體培養基中分散有附著有細胞之支架材)送入至該分離裝置，使液體培養基通過，對附著有接著性細胞之支架材進行濃縮。此時，亦可視需要對通過該分離裝置之液體培養基(培養上清液)進行回收。

然後，利用細胞溶解試劑將細胞溶解。其結果，於懸濁液中包含自細胞剝離之支架材及細胞溶解物。

然後，利用本發明之分離裝置將支架材去除，使包含細胞溶解物之液體通過，並對該液體進行回收。

[實施例]

【0083】

[製備例1]

(包含甲殼素奈米纖維之培養基組合物之製備)

將依據上述專利文獻1(國際公開第2015/111686號)之記載而製備之2質量%甲殼素奈米纖維(生質奈米纖維BiNFi-S、SUGINO MACHINE股份有限公司)以成為1%(w/v)之方式混合於超純水(Milli-Q水)中並使其懸

濁。其後，將該等之水溶液於121°C下進行20分鐘之高壓釜殺菌。將所獲得之1%(w/v)甲殼素奈米纖維分散液以最終濃度成為0.01或0.02%(w/v)之方式添加至間葉系幹細胞增殖培養基2(# C-28009, TAKARA BIO公司製造)(以下，亦存在記作培養基之情況)中並使其懸濁，藉此製備以分散之狀態包含甲殼素奈米纖維之培養基組合物(以下，記作CNF培養基組合物)。

【0084】

[實施例1]

(分離裝置之製作)

如圖15之照片圖中所示之外觀，將50 mL錐形管(Falcon(R)，Corning公司製造)於45 mL刻度之位置切斷為上側部分及下側部分，將下側部分上下翻轉並將下端之圓錐狀部分自下方插入至上側部分，將該上側部分之內部作為第1室10a。

於上述第1室10a之上連接具有流入埠31之連接環31R，於其上依序重疊連接3個細胞過濾器(pluriStrainer(註冊商標)，pluriSelect Life Science公司製造)21A、22A、23A，進而於其上連接上下開口之圓錐台狀之筒(漏斗，pluriSelect Life Science公司製造)10d，獲得本發明之分離裝置。上述3個細胞過濾器之各者之分離用網狀構造(篩網)之方形之開口之圓當量直徑自下方起依序為100 μm、60 μm、20 μm。

於該分離裝置中，細胞過濾器21A之篩網與細胞過濾器22A之篩網之間之空間為第2室10b，細胞過濾器22A之篩網與細胞過濾器23A之篩網之間之空間為第3室10c，其上之圓錐台狀之筒10d之內部為第4室。本實施例之分離裝置於構造上之概念上與圖10所示之分離裝置相同。

【0085】**[實施例2]**

(使用分離裝置之細胞與支架材之分離)

使用實施例1中製作之分離裝置，研究細胞與支架材之分離。

將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，TAKARA BIO公司製造)以成為100萬細胞/10 mL之方式懸濁於製備例1所製作之0.02%(w/v)甲殼素奈米纖維調配培養基組合物後，填充至10 mL注射器(TERUMO公司製造)中。將其與分離裝置之連接環橫部之埠連接並進行注入。

然後，將填充有40 mL之間葉系幹細胞增殖培養基2之50 mL注射器(TERUMO公司製造)與埠連接，以0.5 mL/sec之流速注入培養基，藉此使培養基相對於篩網逆著重力方向自下方流入。

對流入至漏斗部之培養基進行回收，對回收液進行離心分離(300×g，3分鐘)後，去除上清液。於殘留之沈澱物中添加培養基10 mL進行再懸濁，使用CellTiter-Glo(Promega公司)，利用讀板儀(Tecan公司製造)對懸濁液之細胞中所含之ATP(adenosine triphosphate，三磷酸腺苷)量進行定量。

【0086】 以針對分離操作前之培養後細胞懸濁液測得之RLU(relative light unit，相對光單位)值為基準(細胞回收率100%)，將進行分離操作時獲得之RLU值加以比較而算出細胞回收率。

其結果，細胞回收率為89%。又，利用倒立顯微鏡觀察回收後之懸濁液及分離裝置下部之殘渣，結果確認到於回收後之懸濁液中幾乎觀察不到甲殼素奈米纖維。於圖16(a)、(b)中表示各者之顯微鏡照片。圖16(a)係

表示通過該分離裝置之液體中所含之固體之顯微鏡照片圖，圖16(b)係表示殘留於該分離裝置之第1室之液體中所含之固體(殘渣)的顯微鏡照片圖。

【0087】

[比較例1]

(利用細胞過濾器之細胞與支架材之分離)

將連接環與50 mL錐形管連接，且依序放置並固定20 μm 、60 μm 、100 μm 之細胞過濾器及漏斗。

將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，TAKARA BIO公司製造)以成為100萬細胞/10 mL之方式懸濁於製備例1所製作之0.02%(w/v)甲殼素奈米纖維調配培養基組合物後，利用電動移液器(VIOLAMO disposable pipet)進行抽吸，使懸濁液沿著漏斗緩慢流出至細胞過濾器上。

然後，將無填充之10 mL注射器與連接環橫部之埠連接，並緩慢拉拽注射器之活塞，藉此對錐形管內進行減壓，使液體通過細胞過濾器。

然後，使40 mL之間葉系幹細胞增殖培養基2沿著漏斗緩慢注入至細胞過濾器上，將無填充之50 mL注射器與連接環橫部之埠連接，並緩慢拉拽注射器之活塞，藉此對錐形管內進行減壓，使液體通過細胞過濾器。

對錐形管內之培養基進行離心分離(300 \times g，3分鐘)後，去除上清液。

於殘留之沈澱物中添加培養基10 mL進行再懸濁，使用CellTiter-Glo(Promega公司)，利用讀板儀(Tecan公司製造)對懸濁液之細胞中所含之ATP量進行定量。

【0088】以針對分離操作前之培養後細胞懸濁液測得之RLU值為基準(細胞回收率100%)，將進行分離操作時獲得之RLU值加以比較而算出細胞回收率。其結果，細胞回收率為52%。

認為該結果係由於：藉由自上部依序進行過濾，甲殼素奈米纖維將篩網以覆蓋之形式堵塞，而阻礙細胞通過。又，目視觀察再懸濁之液體，結果見到與細胞不同之懸浮物，由此確認到甲殼素奈米纖維之混入，亦可知分離不充分。由此，顯示了利用實施例1中製作之分離裝置形狀於實施例2中進行之分離回收方法之有效性。

【0089】

[實施例3]

(使用袋型細胞過濾器之細胞與支架材之分離)

使用作為市售品之一構件之骨髓液過濾器(Kaneka公司製造)，研究細胞與支架材之分離。

將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，TAKARA BIO公司製造)以成為100萬細胞/10 mL之方式懸濁於製備例1所製作之0.02%(w/v)甲殼素奈米纖維調配培養基組合物後，填充至10 mL注射器中。將該注射器與骨髓液過濾器之一端連接，自下部向上部方向送液。

然後，更換為填充有25 mL之培養基之50 mL注射器，自下部向上部方向送液，將自上部之流路流出之培養基回收至50 mL錐形管。

對回收液進行離心分離(300×g，3分鐘)後，去除上清液。

於殘留之沈澱物中添加培養基10 mL進行再懸濁，利用細胞計數器(TC-20，Bio-Rad公司製造)對細胞數進行計測，結果回收率與回收前之細胞數相比成為86%。

又，使用CellTiter-Glo(Promega公司)，利用讀板儀(Tecan公司製造)對懸濁液之細胞中所含之ATP量進行定量。以針對分離操作前之培養後細胞懸濁液測得之RLU值為基準(細胞回收率100%)，將進行分離操作時獲得之RLU值加以比較而算出細胞回收率。

其結果，細胞回收率為83%。又，利用倒立顯微鏡觀察回收後之懸濁液及分離裝置下部之殘渣，結果確認到於懸濁液中幾乎觀察不到甲殼素奈米纖維。於圖17(a)、(b)中表示各者之顯微鏡照片。圖17(a)係表示通過該分離裝置之液體中所含之固體之顯微鏡照片圖，圖17(b)係表示殘留於該分離裝置之第1室之液體中所含之固體(殘渣)的顯微鏡照片圖。

【0090】 將上述實施例2、4及比較例1之結果彙總於表1。

於比較例1中，觀察到回收液中殘留較多支架材，相對於此，於實施例2、4中，確認到幾乎不存在支架材。又，實施例2、4藉由自下部流入而使細胞不易與外部大氣接觸，從而可防止於回收過程中細胞乾燥，而達成有效率之回收。

【0091】 [表1]

	回收率(%)	支架材殘留※1	空氣接觸※2
實施例2	89	○	○
實施例3	83	○	○
比較例1	52	×	×

【0092】 ※1…○：回收液中混入極少量支架材、×：回收液中混入較多支架材

※2…○：很少暴露於空氣、×：經常暴露於空氣

【0093】

[實施例4]

將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，TAKARA BIO

公司製造)以成為40000細胞/mL之方式，播種至上述製備例1所製作之0.01%(w/v)甲殼素奈米纖維調配培養基組合物及未添加培養基後，以成為每1孔2 mL之方式分注至6孔平底超低接著表面微量板(Corning公司製造，#3471)之孔中。

各板於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內於靜置狀態下進行培養，持續5天。於第5天進行細胞回收之操作。培養後，將該細胞/甲殼素奈米纖維懸濁液回收至15 mL離心管，進行離心分離(220×g，3分鐘)。

去除上清液後，添加3 mL之D-PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline，杜氏磷酸緩衝液)(#045-29795，富士軟片和光純藥公司製造)，洗淨後，進行離心分離(220×g，3分鐘)。

繼而，使作為將支架材分解之試劑之Yatalase(#T017，TAKARA BIO公司製造)以成為1%(w/v)之方式溶解於D-PBS中。利用2 mL/15 mL離心管，添加於DMEM(低葡萄糖)(#041-29775，富士軟片和光純藥公司製造)中添加有1%(w/v)Yatalase溶液(最終濃度0.4%)及Tryple select(1×)(#12563029，Thermo Fisher Scientific公司製造)(最終濃度0.1×)之剝離溶液(樣品1)、添加有1%(w/v)Yatalase溶液(最終濃度0.4%)之剝離溶液(樣品2)。

又，作為對照樣品，僅添加2 mL之DMEM(低葡萄糖)(樣品3)。於懸濁後再次播種至6孔平底超低接著表面微量板中，於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內靜置1小時。

繼而，將剝離之細胞、甲殼素奈米纖維及培養基回收至15 mL離心管，進行離心分離(220×g，3分鐘)。

於去除上清液後，添加3 mL之D-PBS，洗淨後，進行離心分離

(220×g，3分鐘)。於去除上清液後，添加2 mL之培養基，播種至6孔接著表面微量板(Corning公司製造，# 3516)中，於CO₂培養箱(37℃、5%CO₂)內靜置3小時。於3小時後，對上清液及甲殼素奈米纖維進行回收，進行離心分離(220×g，3分鐘)。

於去除上清液後，添加ATP試劑500 μL(CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay(CellTiter-Glo™發光法細胞活力檢測試劑盒)，Promega公司製造)。

又，對接著於6孔接著表面微量板之細胞添加2 mL之D-PBS進行洗淨，進行去除後添加ATP試劑500 μL。

使用Enspire(Perkin Elmer公司製造)，進行發光值(RLU)之測定，算出 $100 \times (\text{微量板上之RLU}) / (\text{微量板中之RLU} + \text{甲殼素奈米纖維中之RLU})$ ，藉此算出利用剝離溶液所得之回收率。其結果，於樣品1及樣品2中分別可回收78%及69%之細胞。另一方面，於未對剝離溶液進行處置之對照群中，回收率為5%。

根據以上之結果顯示，藉由使用將支架材分解之試劑，可使懸浮培養之接著細胞自支架材簡便地剝離，進而可高效率地對該剝離之細胞進行回收。

【0094】

[實施例5]

(自分散培養至細胞與支架材之分離及細胞回收的一連串之研究)

<<步驟1：培養步驟>>

將所培養之源自人類骨髓之間葉系幹細胞(C-12974，TAKARA BIO公司製造)以成為10000細胞/mL之方式，播種至上述製備例1所製作之

0.01%(w/v)CNF培養基組合物中後，以成為每1孔10 mL之方式向6孔平底超低接著表面微量板(Corning公司製造、# 3471)之孔中分注4孔。各板於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內於靜置狀態下進行培養，持續5天。

<<步驟2：基材與細胞之粗分離步驟>>

將培養後之懸濁液(40 mL)回收至50 mL錐形管，進行離心分離(300×g，3分鐘)，去除上清液(35 mL)。然後，添加藉由於密度梯度調整液(Percoll PLUS，GE Healthcare公司製造)(45 mL)中添加10×PBS(-)(5 mL)所得之等張Percoll液(10 mL)，藉由移液進行混合後，進行離心分離(400×g，10分鐘)，藉此使未附著有細胞之基材沈澱，僅使附著於基材之細胞組分留在上層。將該上層(10 mL)回收至50 mL錐形管，藉由添加PBS(-)(40 mL)進行稀釋後進行離心分離(400×g，3分鐘)並去除上清液(40 mL)而進行洗淨。

<<步驟3：自基材將細胞剝離之步驟>>

然後，添加細胞剝離用酵素(Accumax，Nacalai Tesque公司製造)(10 mL)，並於CO₂培養箱(37°C、5%CO₂)內進行靜置，藉此自基材將細胞剝離。

<<步驟4：基材與細胞之分離及細胞回收>>

然後，將於獲得之懸濁液中添加有培養基(10 mL)者填充至50 mL注射器(Nipro公司製造)中，將該注射器與作為市售品之一構件之骨髓液過濾器(Kaneka公司製造)之一端連接後，自下部向上部方向送液，繼而，更換為填充有25 mL之培養基之50 mL注射器，自下部向上部方向送液，將自上部之流路流出之培養基全部(約40 mL)回收至50 mL錐形管。對其進行離心分離(300×g，3分鐘)，藉由去除上清液(35 mL)而進行濃縮並對細

胞進行回收。將步驟1至4之各步驟中獲得之懸濁液之顯微鏡照片示於圖18。

[產業上之可利用性]

【0095】 藉由本發明，提供一種分離裝置，其可於使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養中更高效率地分離分離對象物並獲得通過對象物。可提供一種藉由使用該分離裝置而將分離對象物較佳地分離之方法，而可使通過對象物較佳地通過並較佳地對回收對象物進行回收。

【0096】 本申請基於在日本提出申請之日本專利特願 2018-170092(申請日：2018年9月11日)，其內容全部包含於本說明書中。

【符號說明】

【0097】

1	分離裝置
10	分離室
10a	第1室
10b	第2室
10c	第3室
10d	圓錐台狀之筒
20	分離用網狀構造
21	分離用網狀構造
21A	細胞過濾器
22	分離用網狀構造
22A	細胞過濾器
23A	細胞過濾器

31	流入埠
31R	連接環
32	流出埠
110	容器
120	容器
130	細胞注入埠
140	試劑注入埠
150	切換閥
160	容器
170	容器
200	貫通孔
201	經線
202	經線
211	緯線
212	緯線
220	樑部
311	第1流入埠
312	第2流入埠
313	流出埠
314	第1流入埠
315	第2流入埠
316	流出埠
C11	頂點

C12	頂點
C13	頂點
C14	頂點
C21	頂點
C22	頂點
C23	頂點
C24	頂點
C31	頂點
C32	頂點
C33	頂點
C34	頂點
C41	頂點
C42	頂點
C43	頂點
C44	頂點
C51	頂點
C52	頂點
C53	頂點
C54	頂點
E1	分離對象物
E2	通過對象物
F	通過分離用網狀構造之網眼時液體之行進方向
Fh	水平方向分量

Fv	行進方向F之垂直向上之方向分量
H1	第1室之室內之總高度
h1	流入埠之中心軸線之高度
P1	配管
P2	配管
P3	配管
P4	配管
Q1	懸濁液
Q2	液體
S1	送液泵
S2	送液泵
W1	距離
θ	仰角

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種分離裝置，其係用以自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物者，且

該分離裝置具有分離室，該分離室至少具有第1室及第2室，第1室與第2室由分離用網狀構造分隔，且以進入該分離裝置內之上述懸濁液中之液體自第1室通過上述分離用網狀構造而移動至第2室，然後自該分離裝置流出之方式構成內部流路，

上述分離用網狀構造具有以抑制上述分離對象物通過之方式預先確定之大小之網眼，

以上述懸濁液中之液體通過上述網眼時該液體之行進方向具有垂直向上之方向分量之方式，於上述分離室中配置有上述分離用網狀構造。

【第2項】

如請求項1之分離裝置，其中於上述懸濁液中包含應與上述液體一起通過上述分離用網狀構造之固體之通過對象物，且

上述分離用網狀構造具有以抑制上述分離對象物通過且容許上述通過對象物通過之方式預先確定之大小之網眼。

【第3項】

如請求項2之分離裝置，其中上述懸濁液中之液體係液體培養基，且上述分離對象物係藉由將支架材與接著性細胞分離之試劑而於液體培養基中自細胞剝離之支架材，通過對象物係自支架材剝離之接著性細胞。

【第4項】

如請求項3之分離裝置，其中上述支架材係包含非水溶性多糖類之奈

米纖維，且

上述接著性細胞係選自由犬腎小管上皮細胞(MDCK細胞)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)、及間葉系幹細胞(MSC)所組成之群中之細胞。

【第5項】

如請求項2之分離裝置，其中上述懸濁液中之液體係液體培養基，且分離對象物係附著有於液體培養基中懸浮培養之接著性細胞之支架材，通過對象物係於懸浮培養中自細胞釋放至液體培養基中之液性因子。

【第6項】

如請求項2之分離裝置，其中上述懸濁液中之液體係含有懸浮培養之接著性細胞之細胞溶解物之液體，且分離對象物係藉由該細胞之溶解而殘留於上述液體中之支架材，通過對象物係藉由該接著性細胞之溶解而釋放至上述液體中之源自該接著性細胞之物質。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之分離裝置，其中上述分離用網狀構造為片狀或具有袋之形狀。

【第8項】

如請求項1至7中任一項之分離裝置，其中第1室具有：
第1流入埠，其用以使上述懸濁液自外部流入至第1室；
第2流入埠，其用以使洗淨液或試劑自外部流入至第1室；及
流出埠，其用以使分離對象物自第1室流出至外部。

【第9項】

如請求項1至8中任一項之分離裝置，其中第2室位於第1室之上，第1室至少具有用以使上述懸濁液自外部流入之流入埠，且該流入埠

設置於第1室之側壁。

【第10項】

如請求項9之分離裝置，其中上述流入埠之中心軸線位於第1室之室內之總高度之40%以上之高度。

【第11項】

如請求項9或10之分離裝置，其中於第2室之上，進而具有向上方積層之1個以上之房室作為分離室，且

上述1個以上之房室中之和第2室相鄰之房室與第2室由另一分離用網狀構造分隔，

於上述1個以上之房室為2個以上之房室之情形時，上下相鄰之房室彼此另由其他分離用網狀構造分隔，

越位於上方之分離用網狀構造之網眼，該網眼之開口面積越小，以進一步抑制上述分離對象物通過。

【第12項】

如請求項11之分離裝置，其中

於上述懸濁液中包含應與上述液體一起通過上述分離用網狀構造之固體之通過對象物，且

以容許上述通過對象物通過之方式預先確定位於最上方之分離用網狀構造之網眼之大小。

【第13項】

一種分離方法，其係使用如請求項1至12中任一項之分離裝置，

自藉由使用微細支架材之接著性細胞之懸浮培養所獲得的懸濁液，分離該懸濁液中所含之固體之分離對象物。

【第14項】

如請求項13之方法，其中於上述懸濁液中包含應與上述液體一起通過上述分離裝置之分離用網狀構造之固體之通過對象物，且

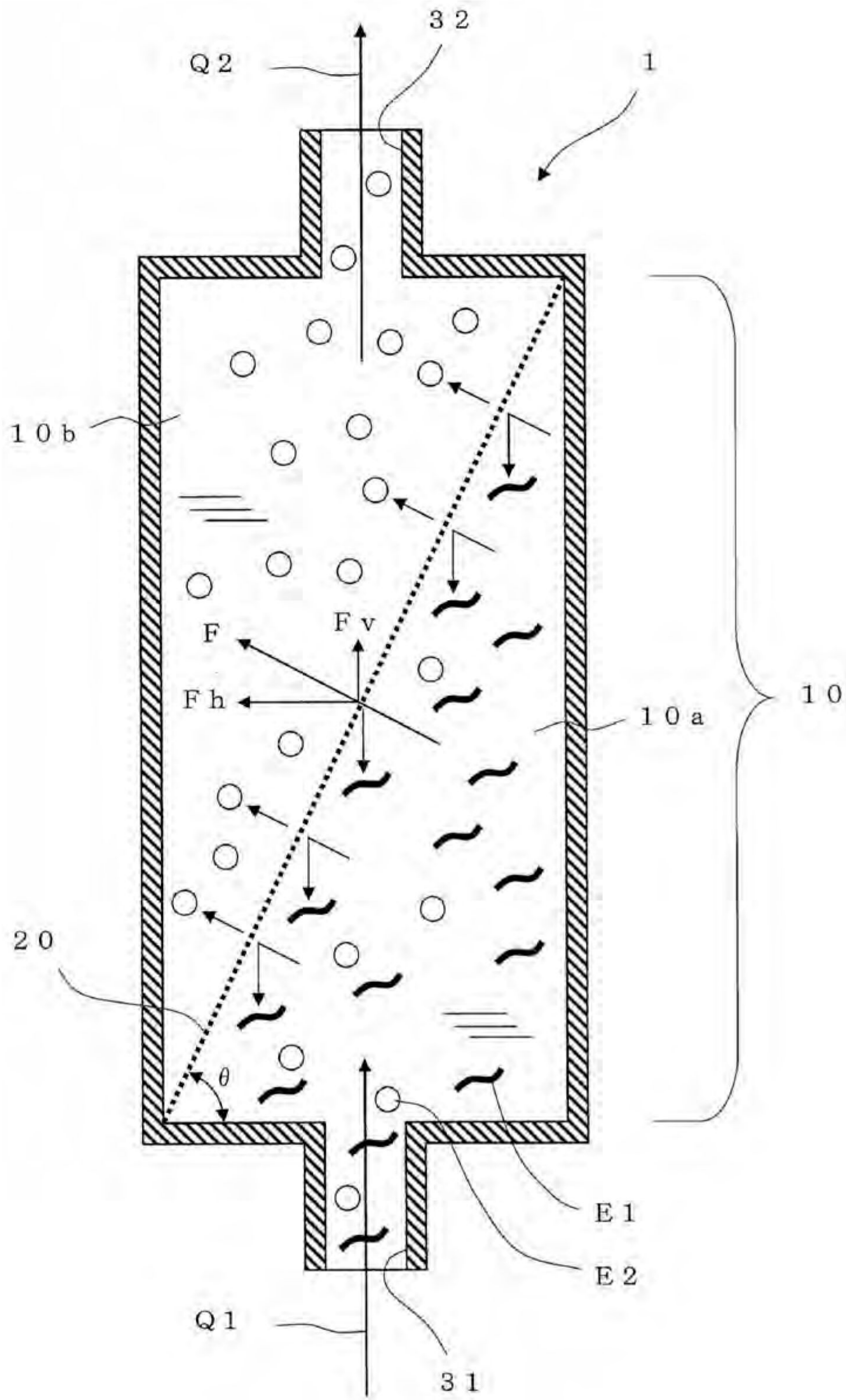
上述分離用網狀構造具有以抑制上述分離對象物通過且容許上述通過對象物通過之方式預先確定之大小之網眼，

該方法具有對通過該分離用網狀構造之上述通過對象物進行回收之步驟。

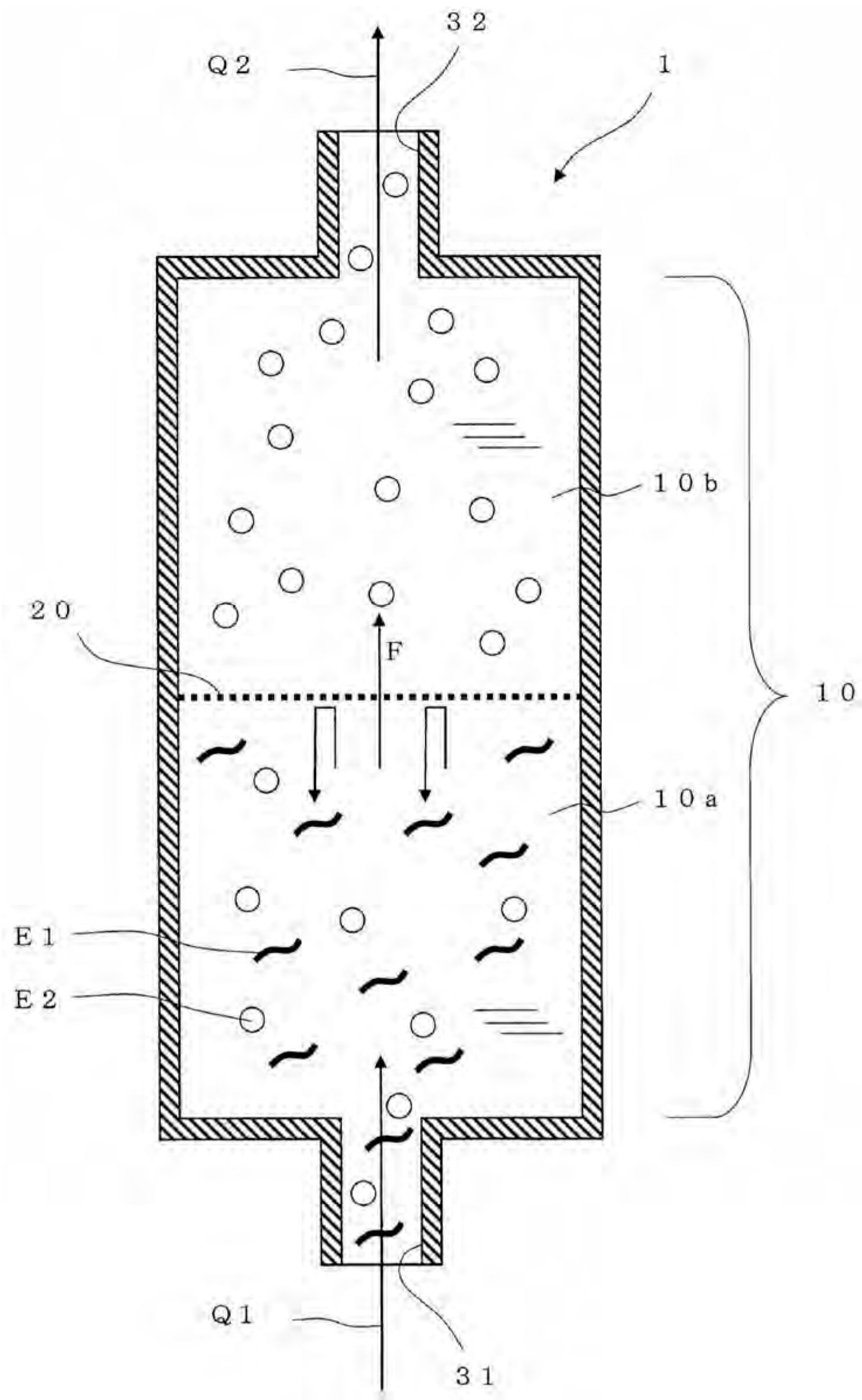
【第15項】

如請求項13或14之方法，其中上述懸濁液中之液體通過上述分離裝置之分離用網狀構造時之流速為0.01 mm/秒～25 mm/秒。

【發明圖式】

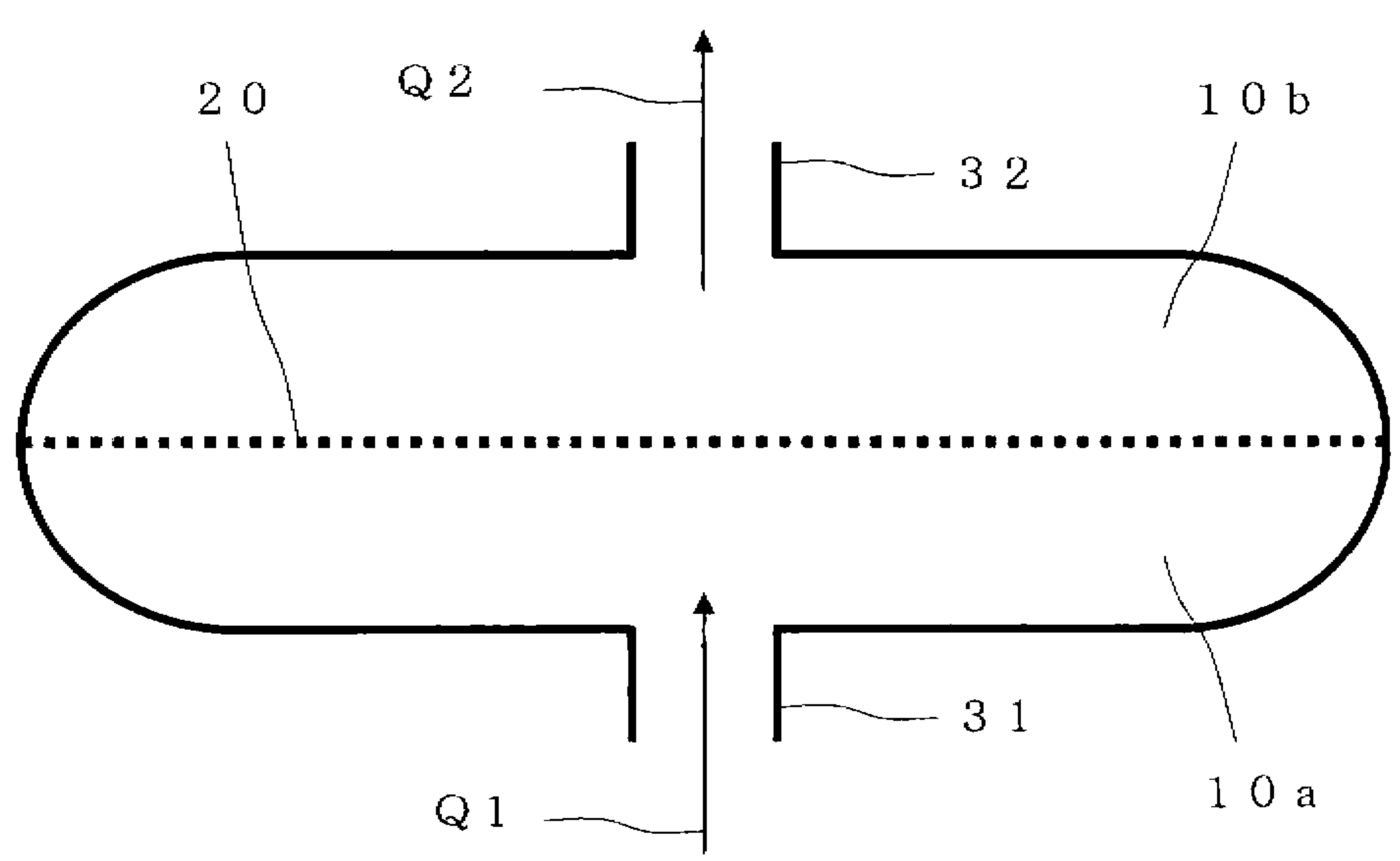


【圖1】

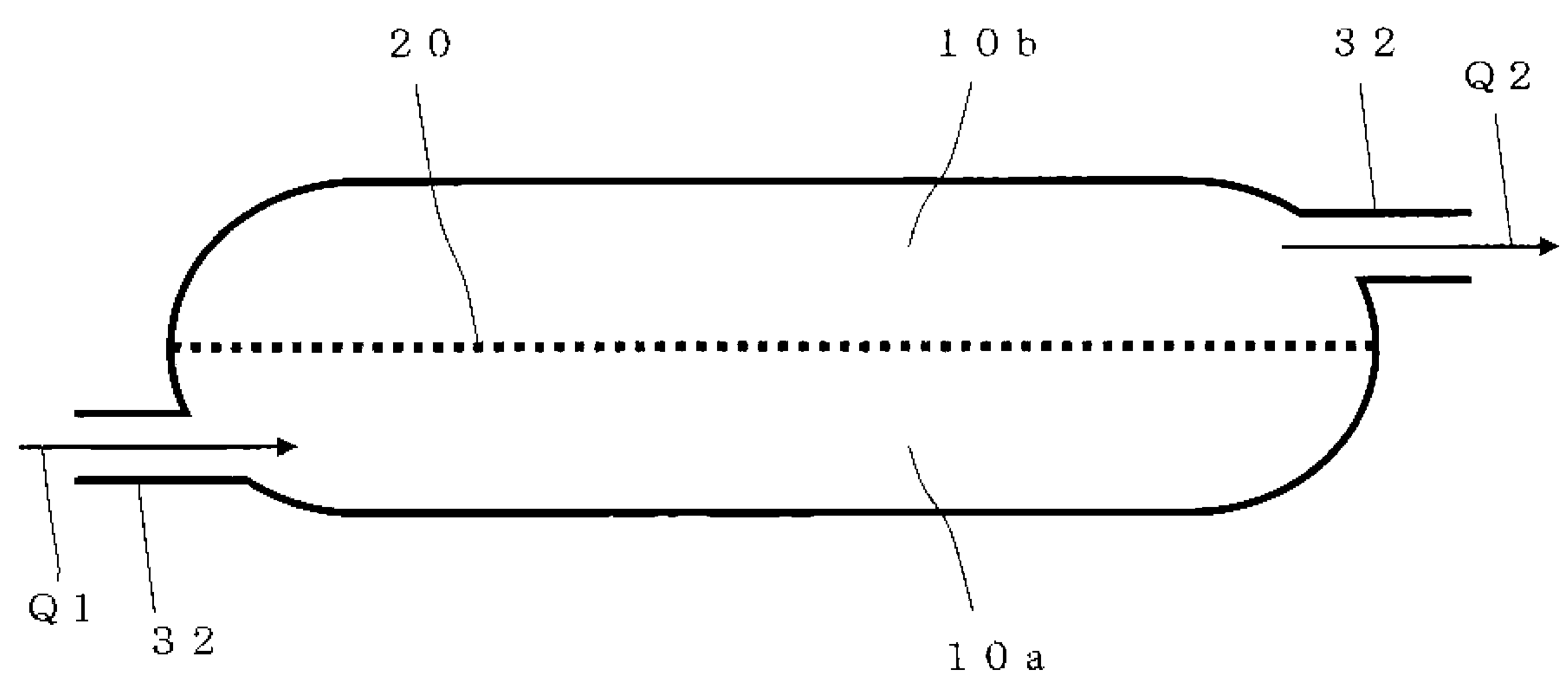


【圖2】

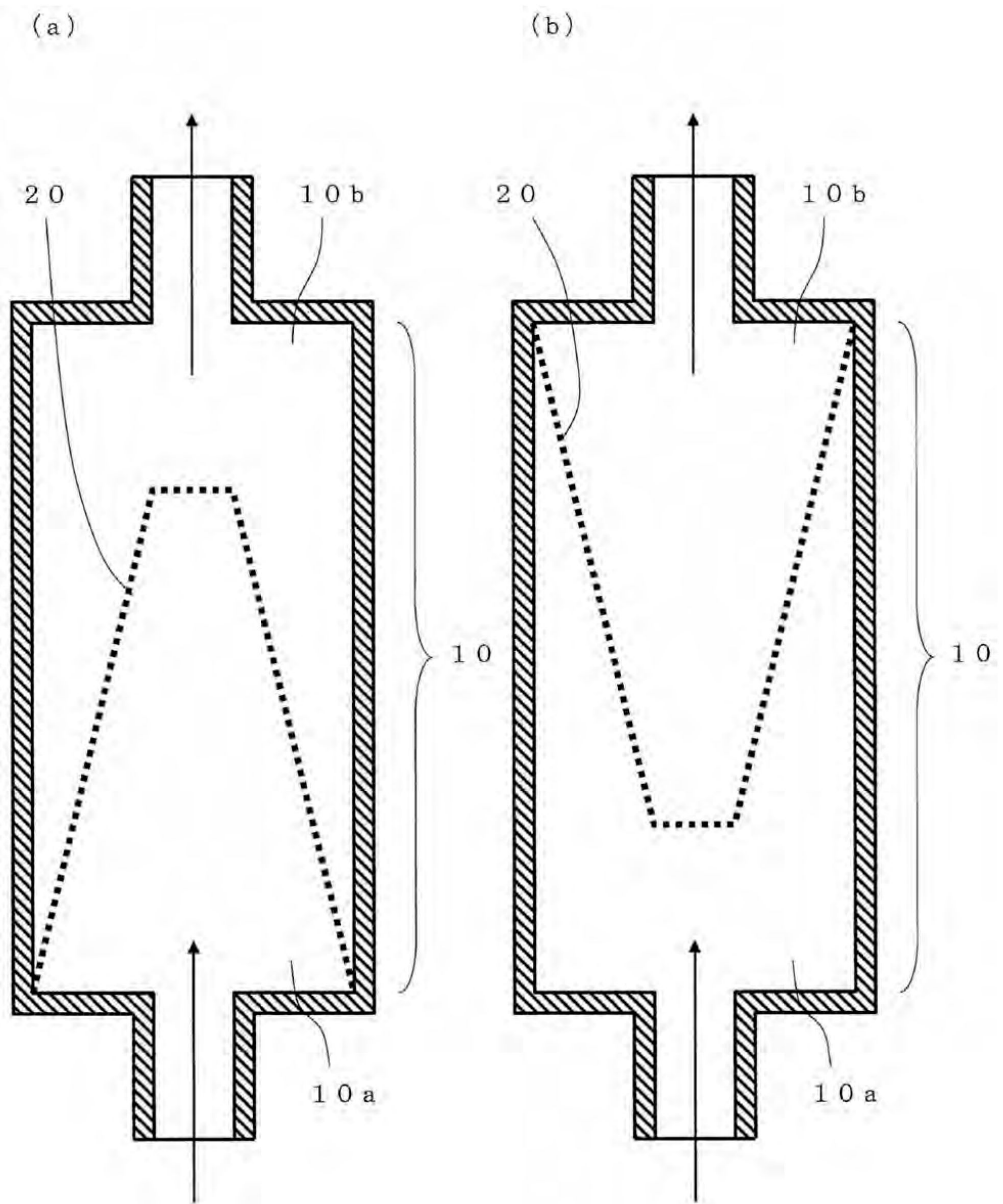
(a)



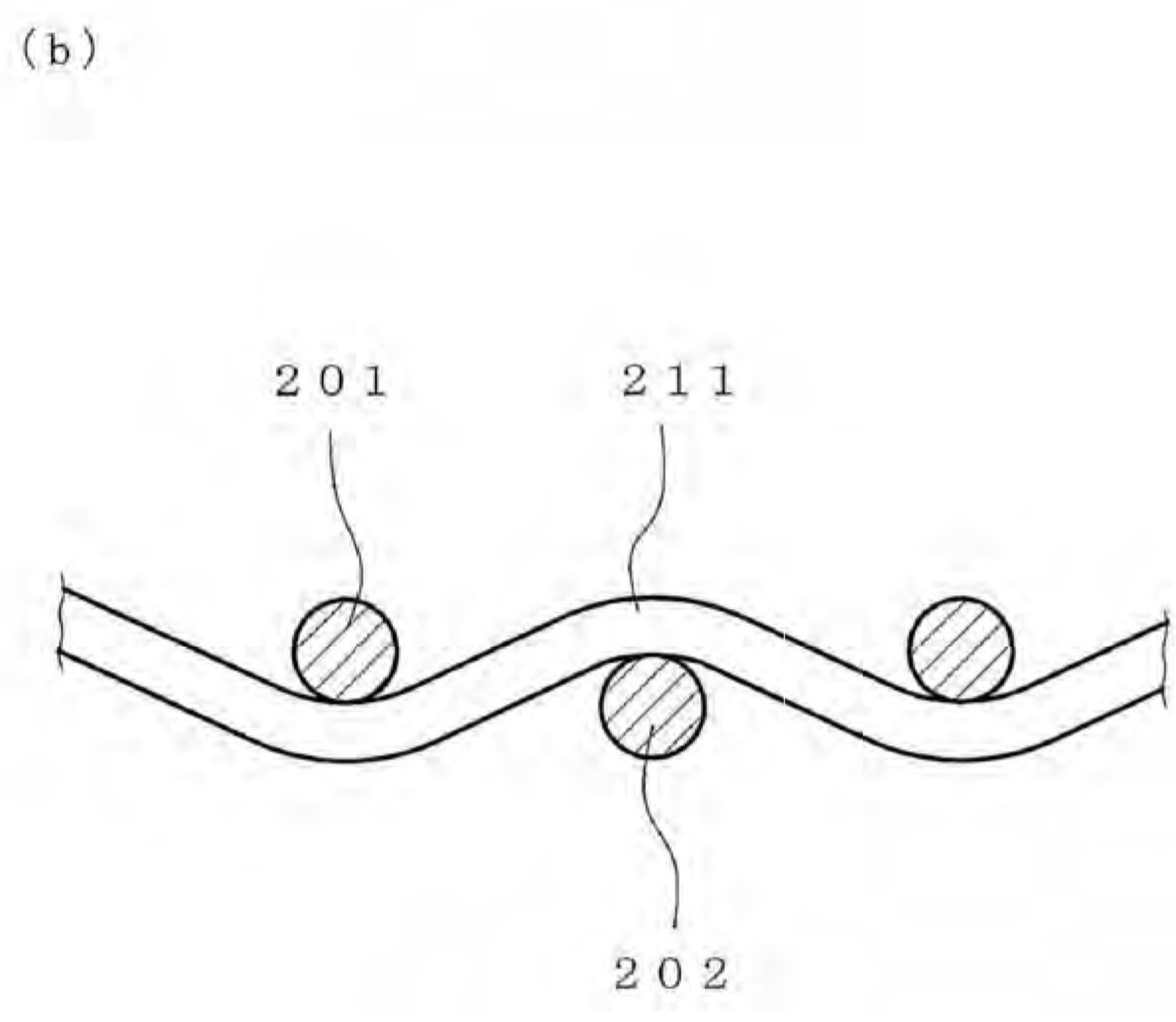
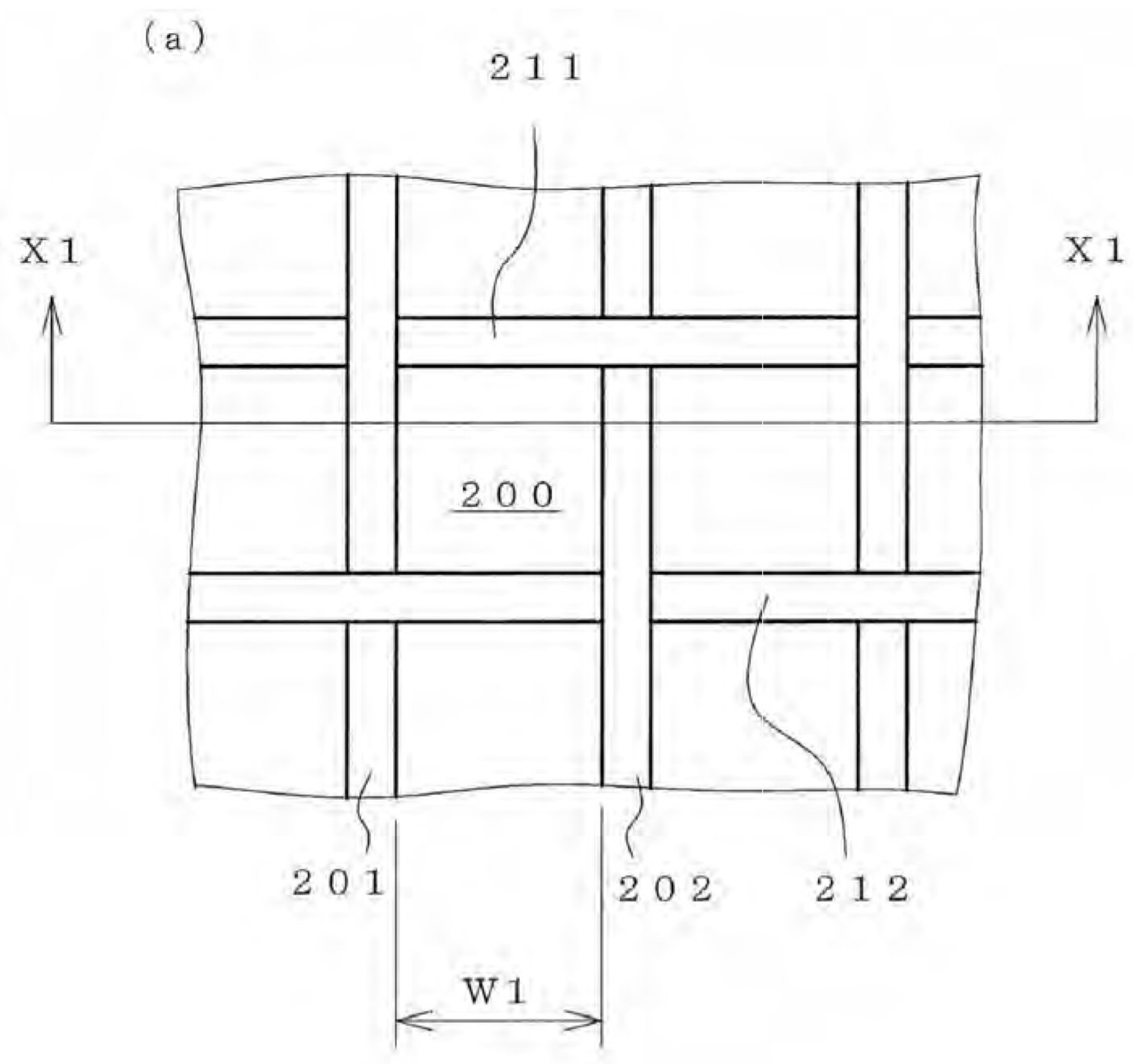
(b)



【圖3】

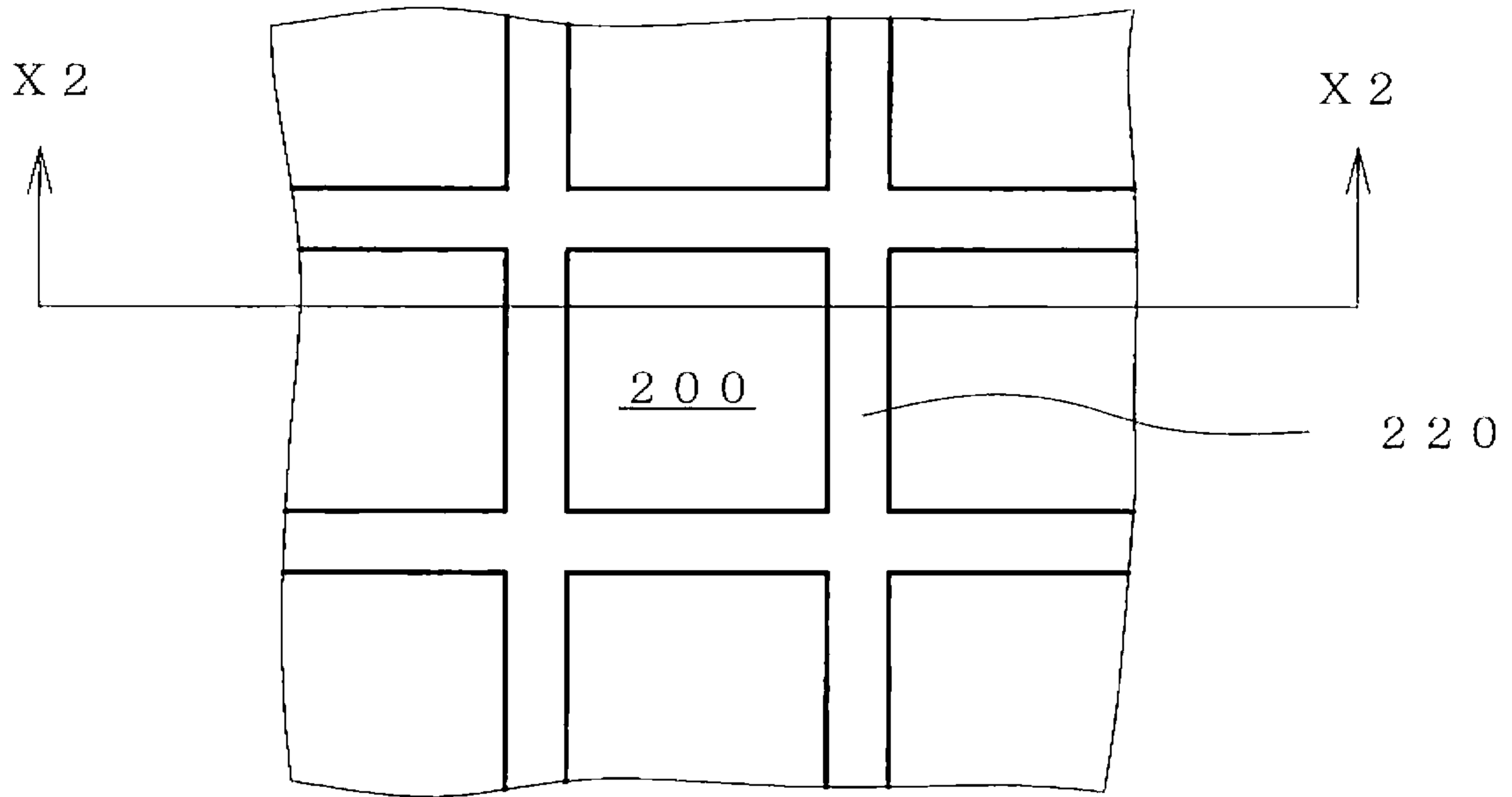


【圖4】

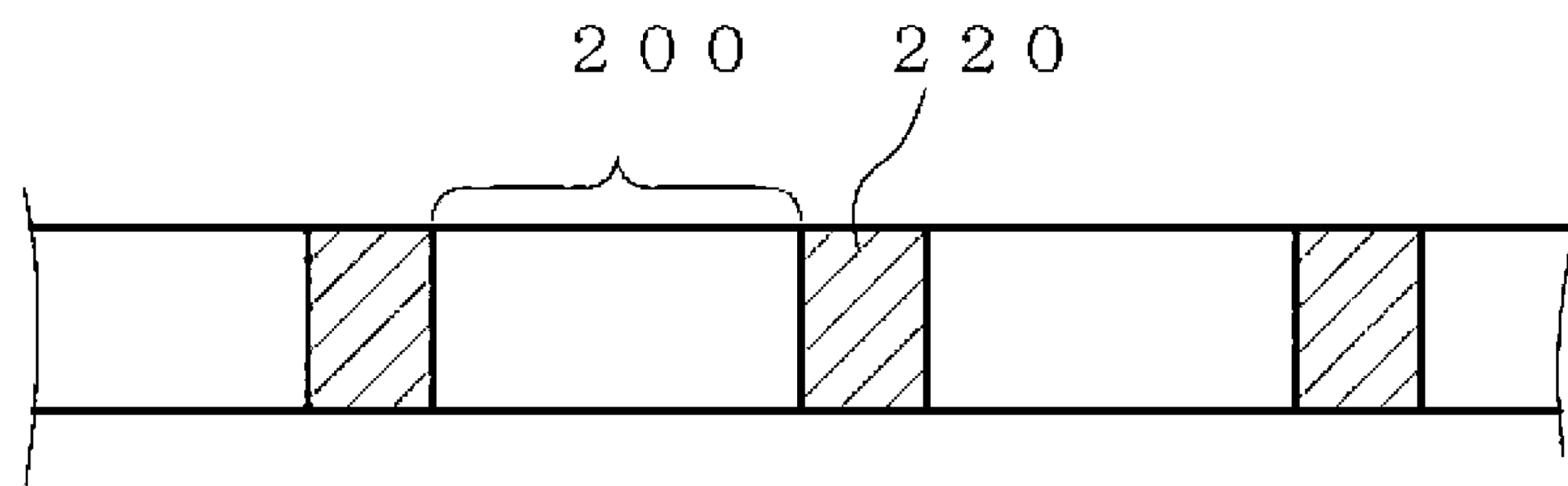


【圖5】

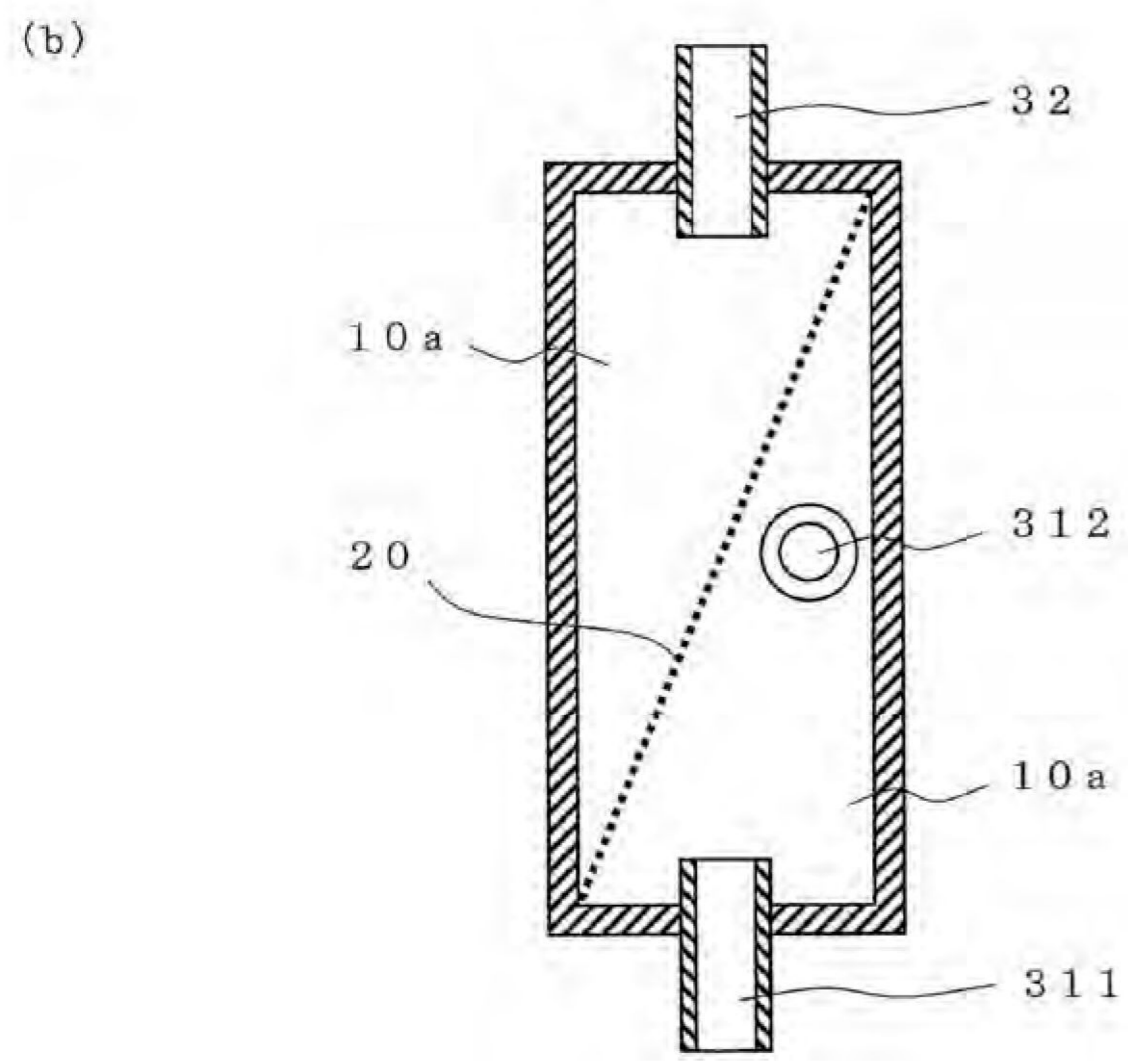
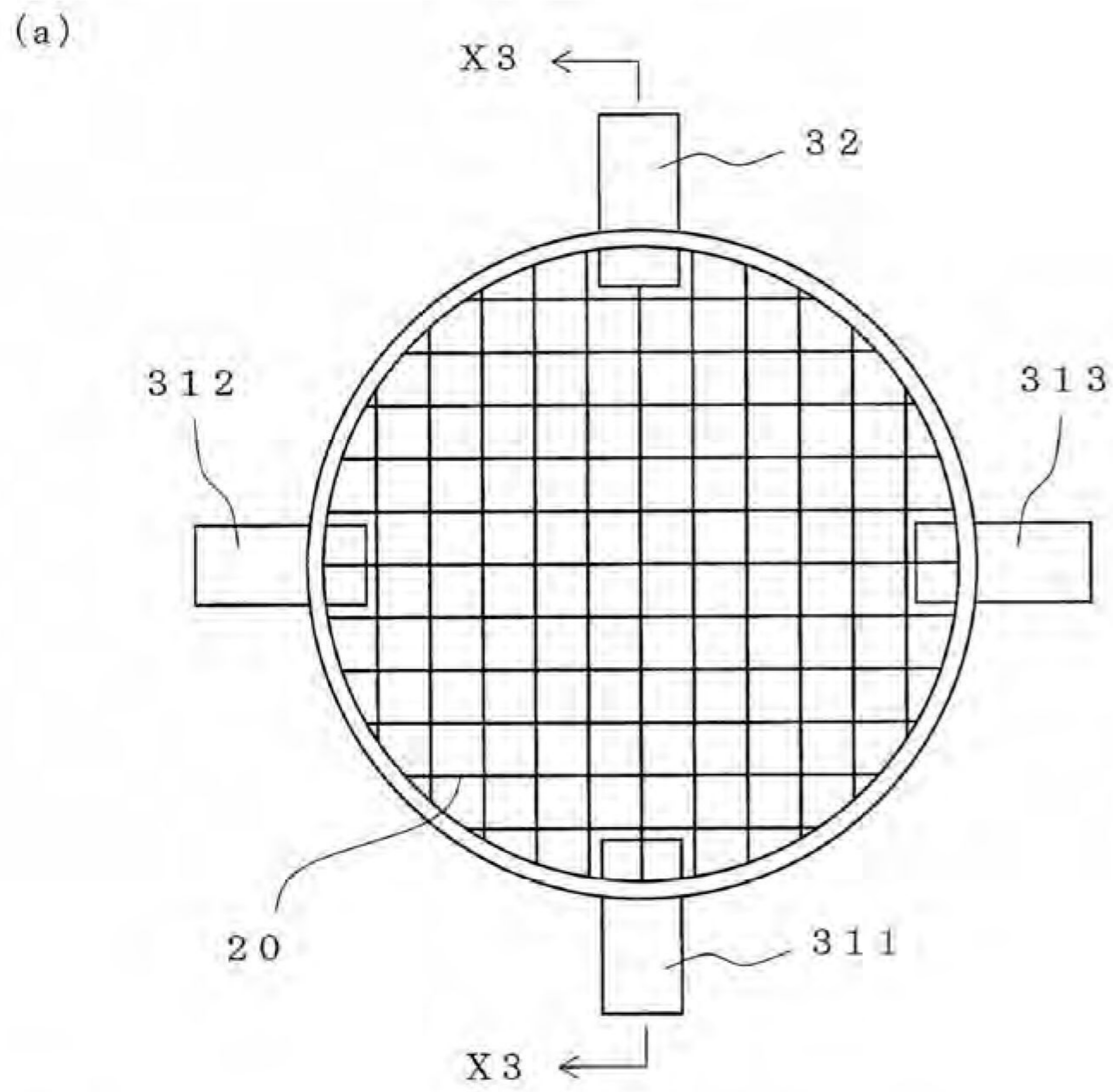
(a)



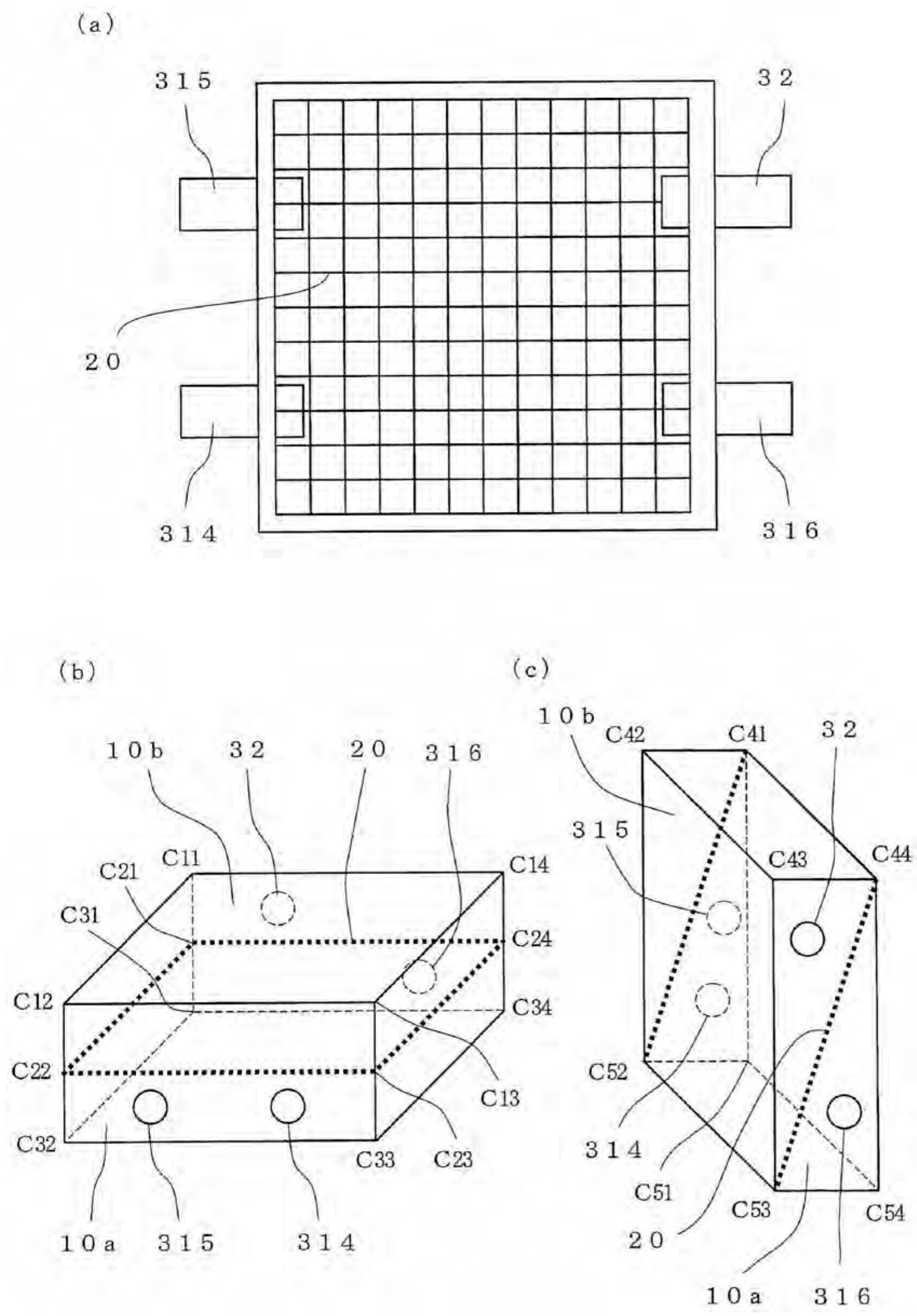
(b)



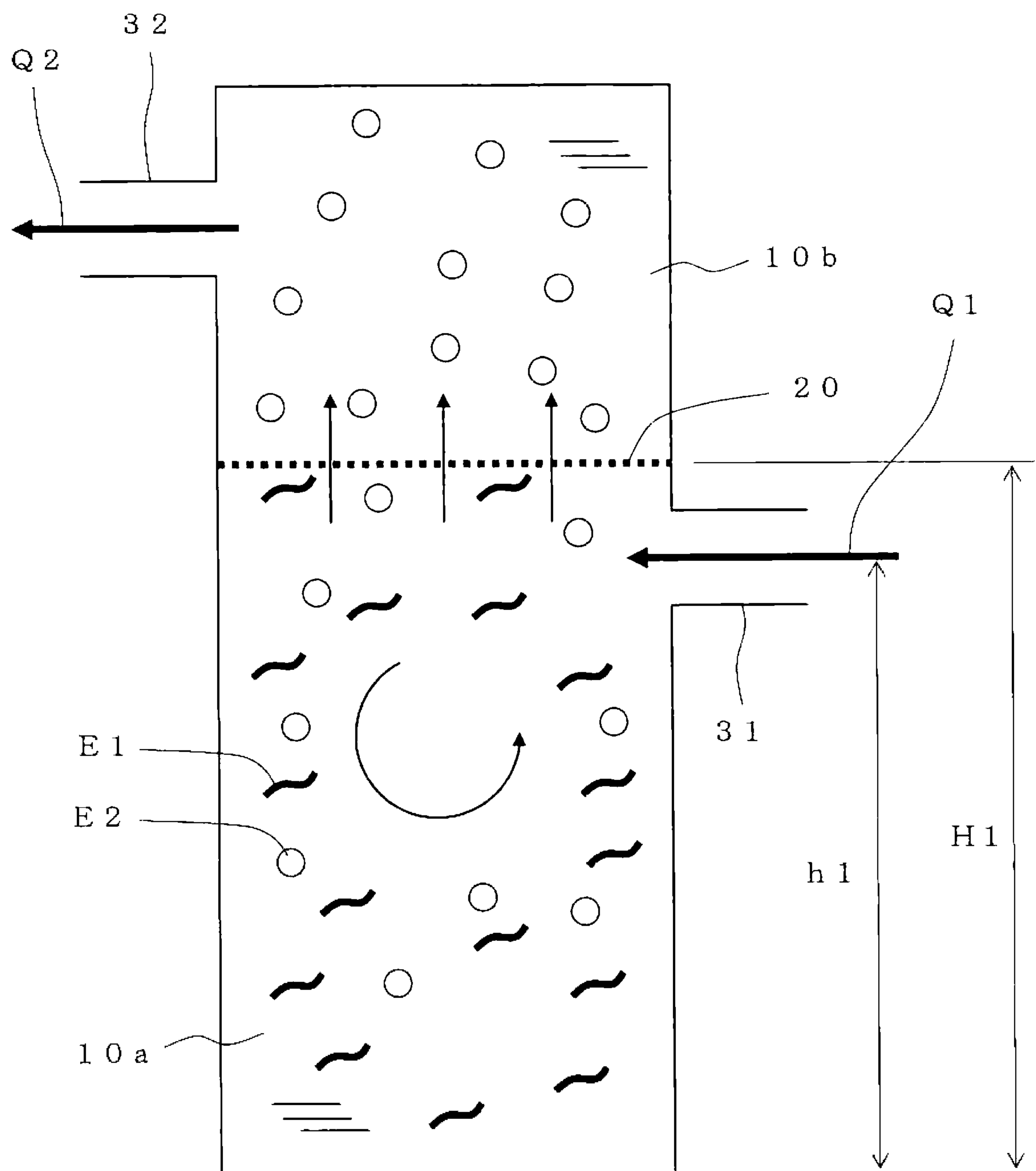
【圖6】



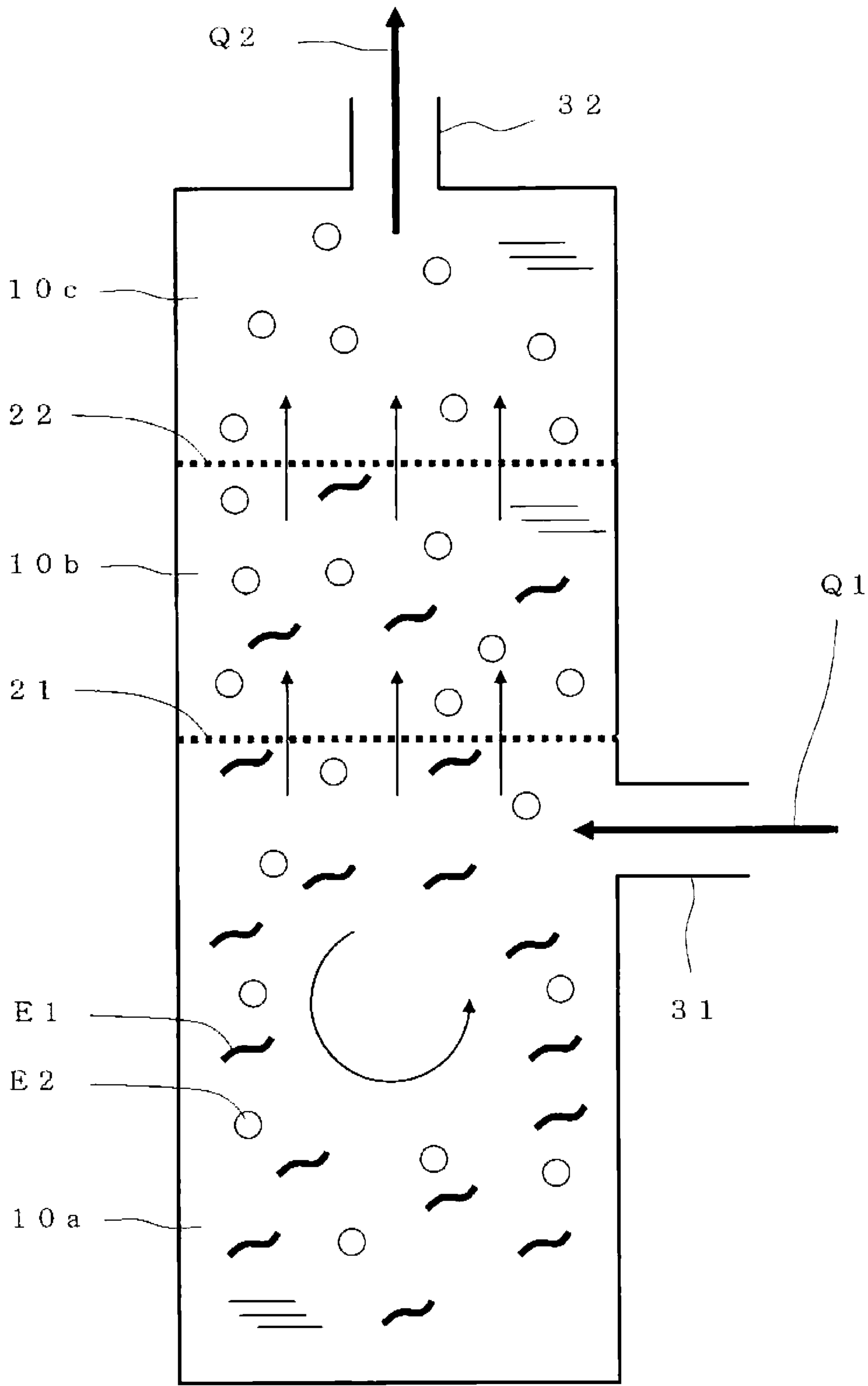
【圖7】



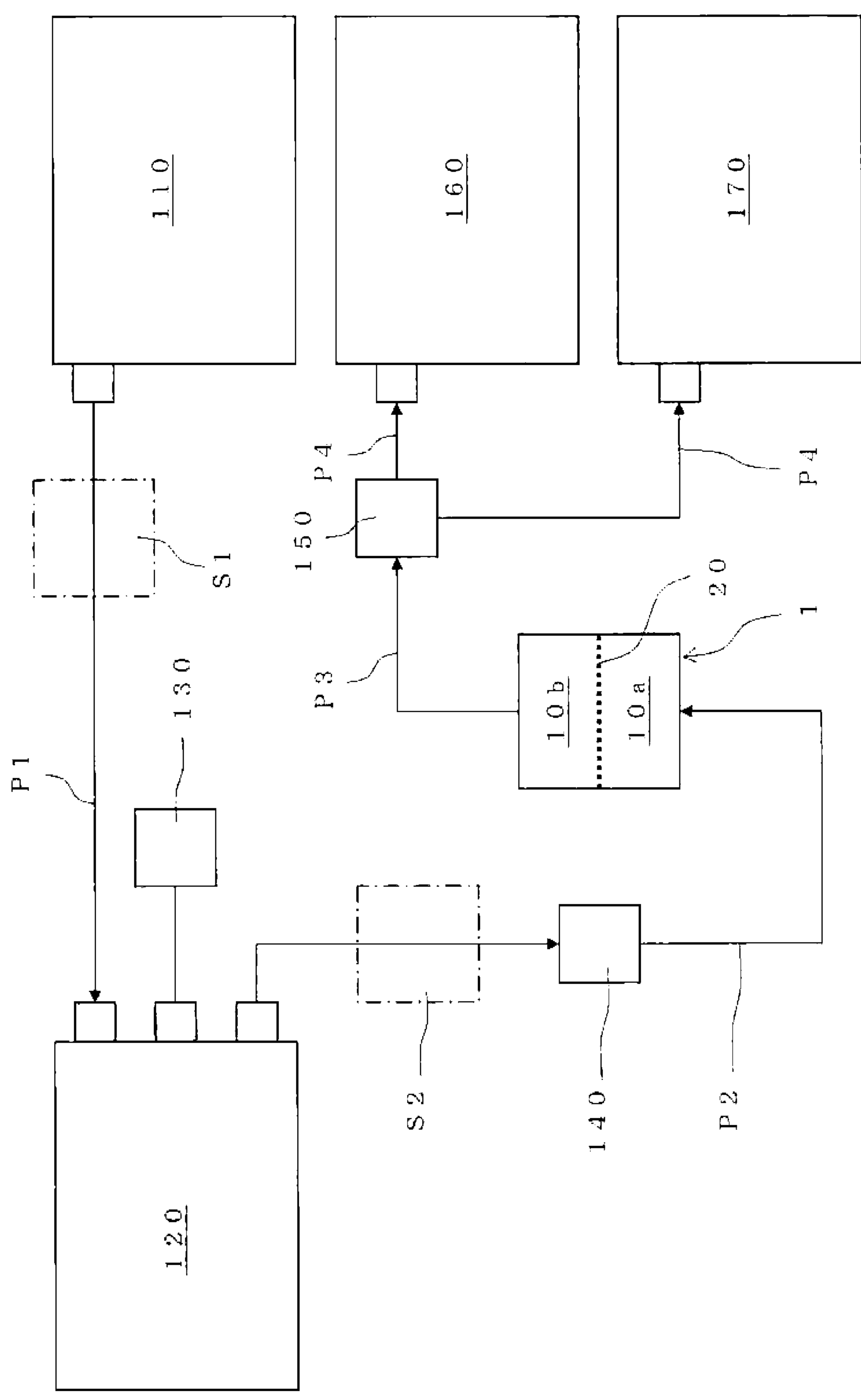
【圖8】



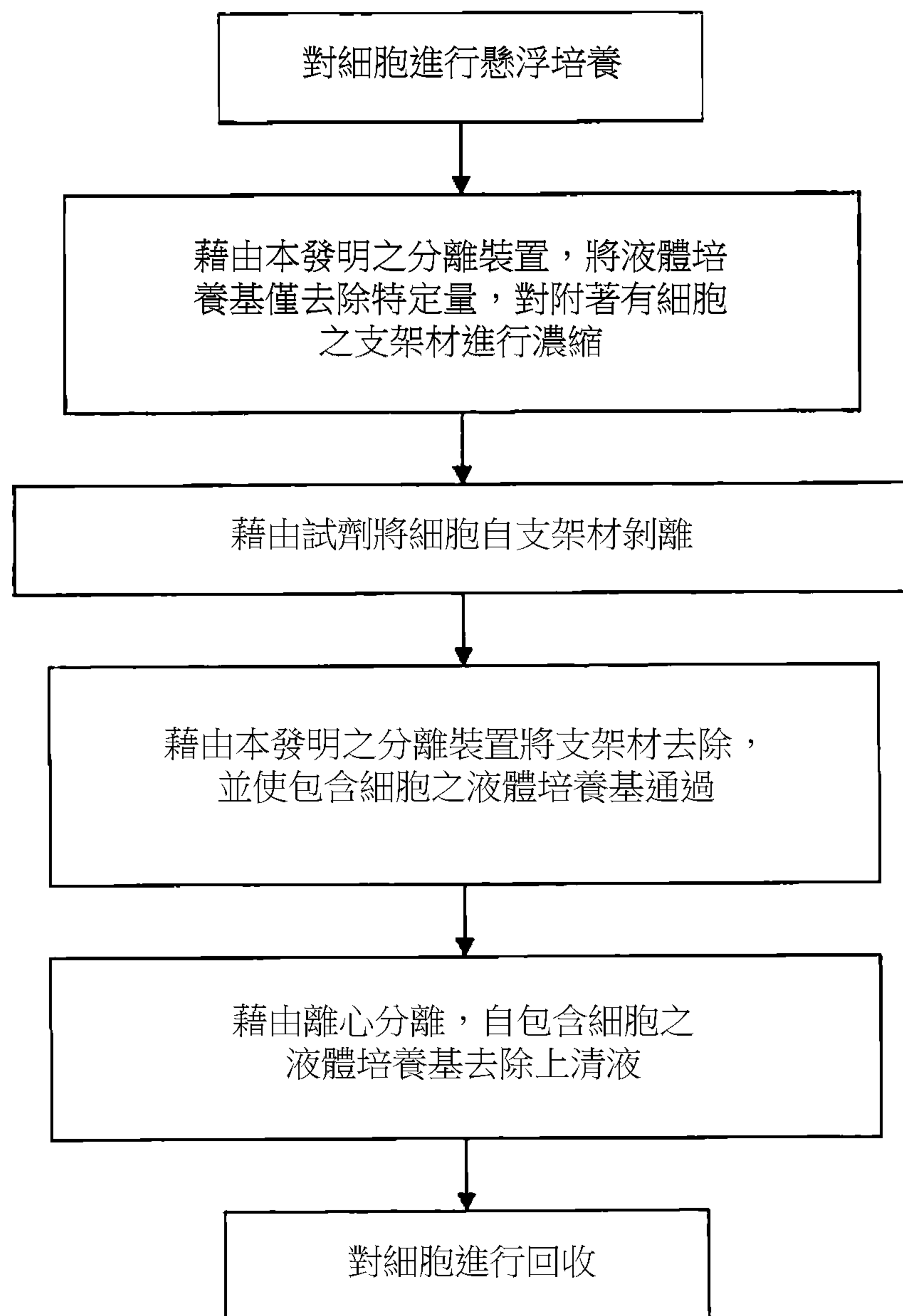
【圖9】



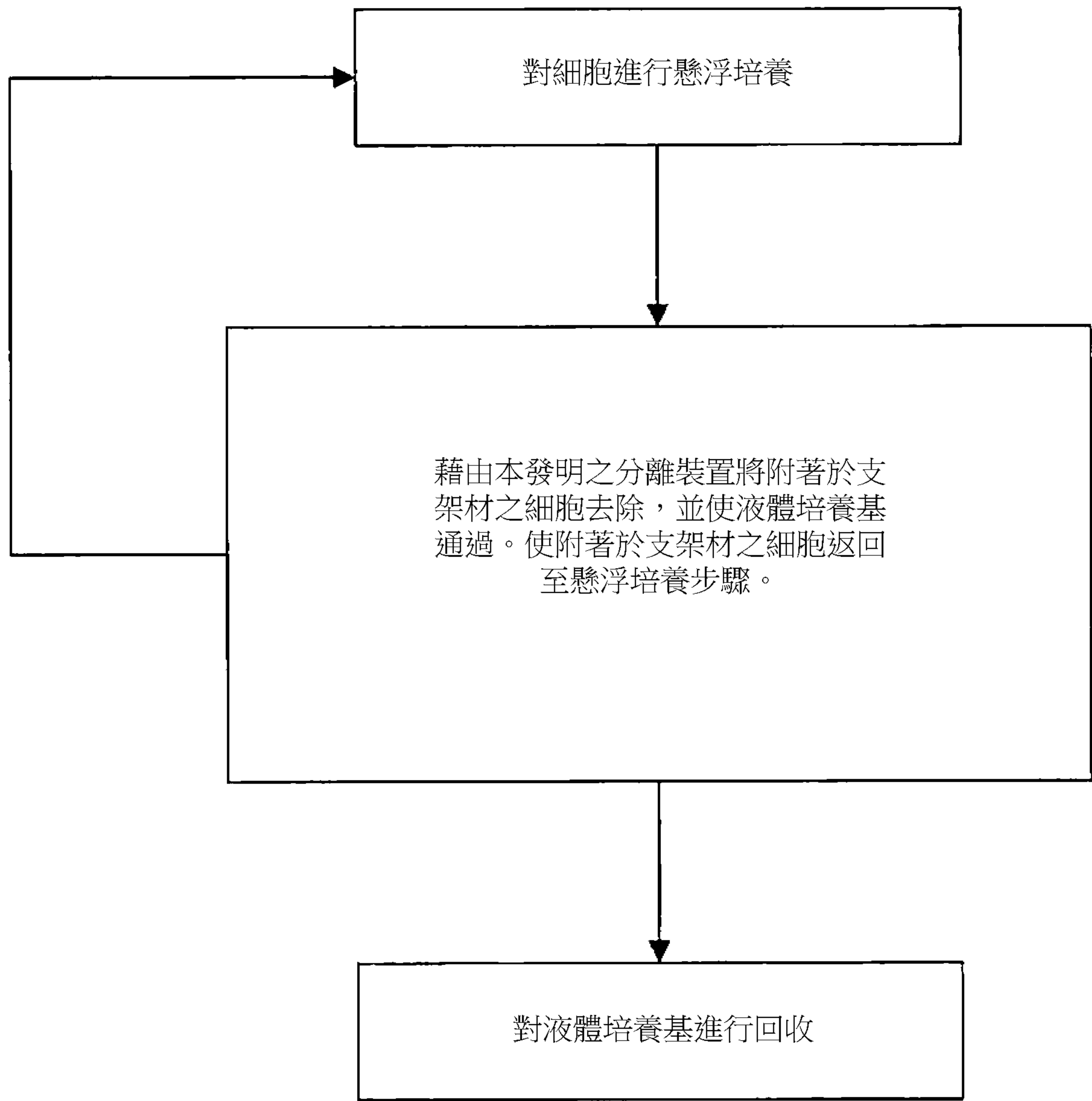
【圖10】



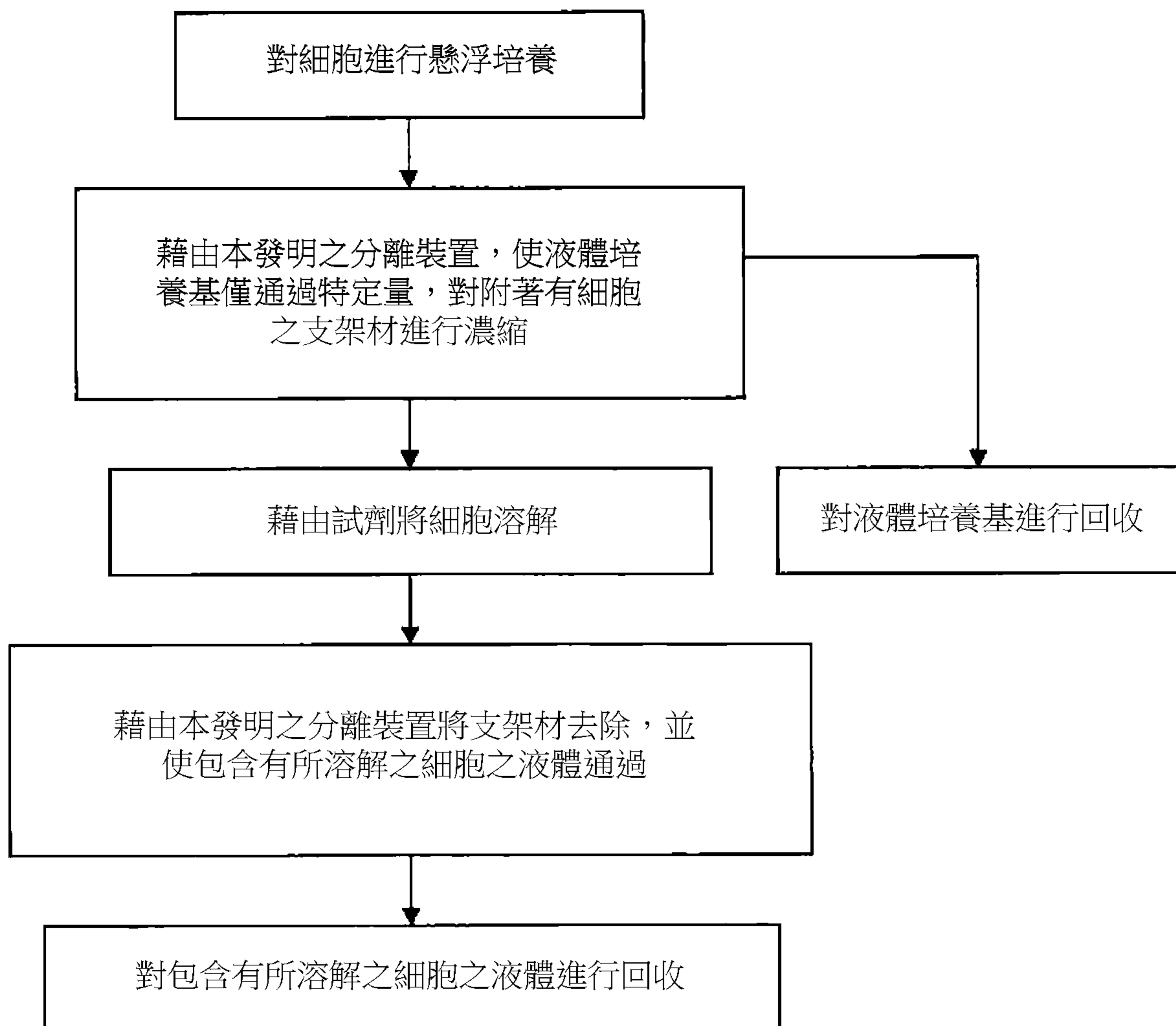
【圖11】



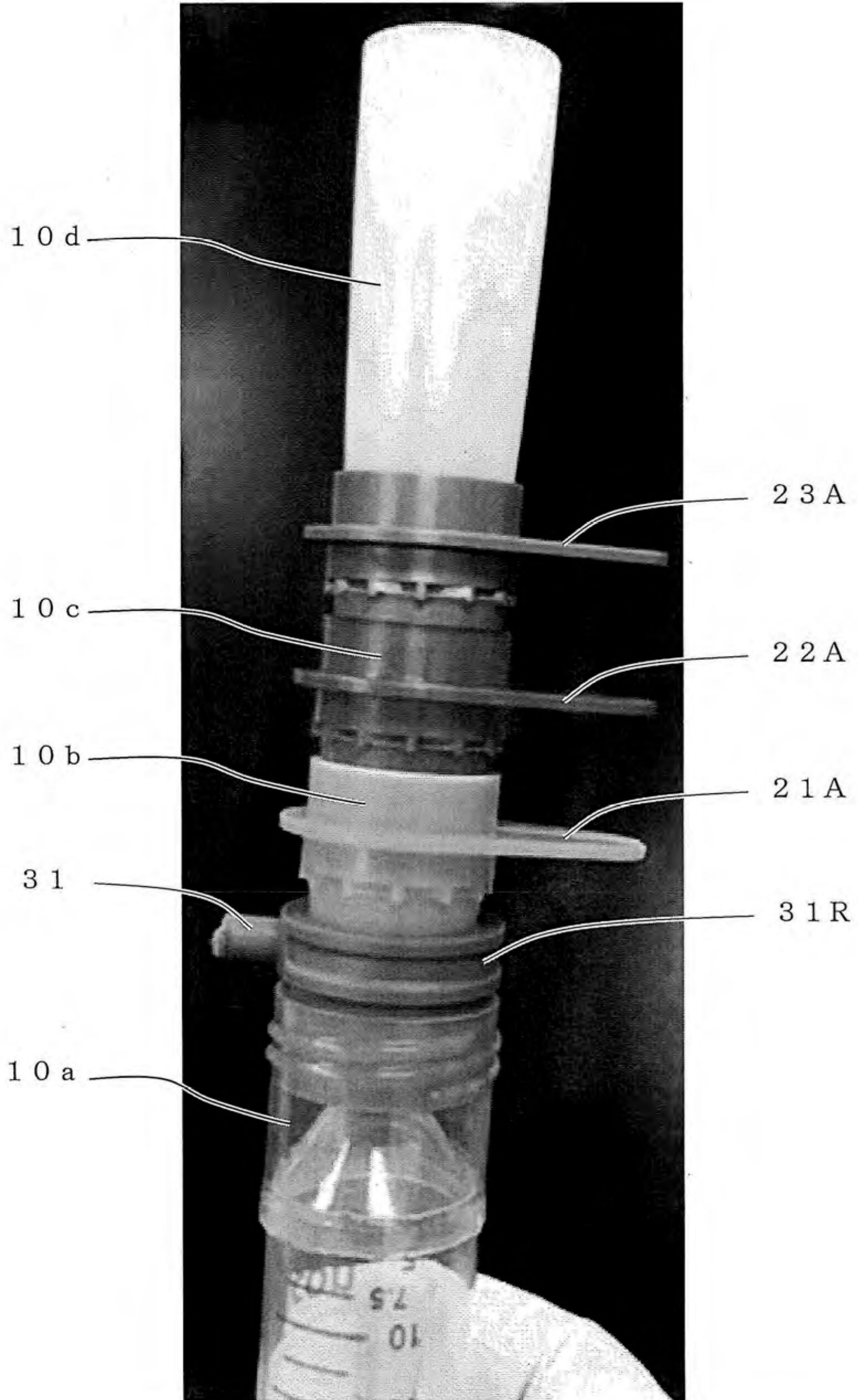
【圖12】



【圖13】

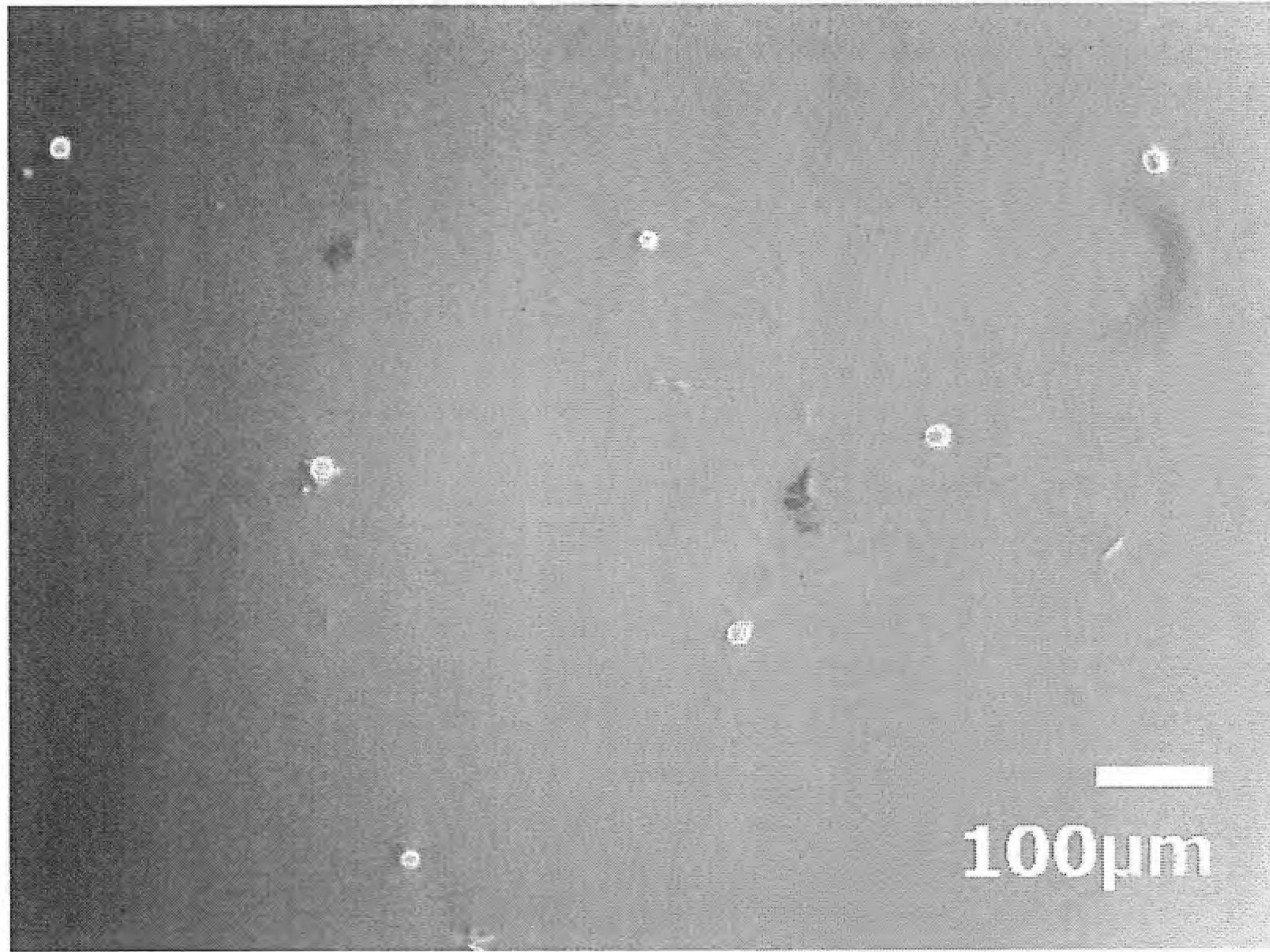


【圖14】

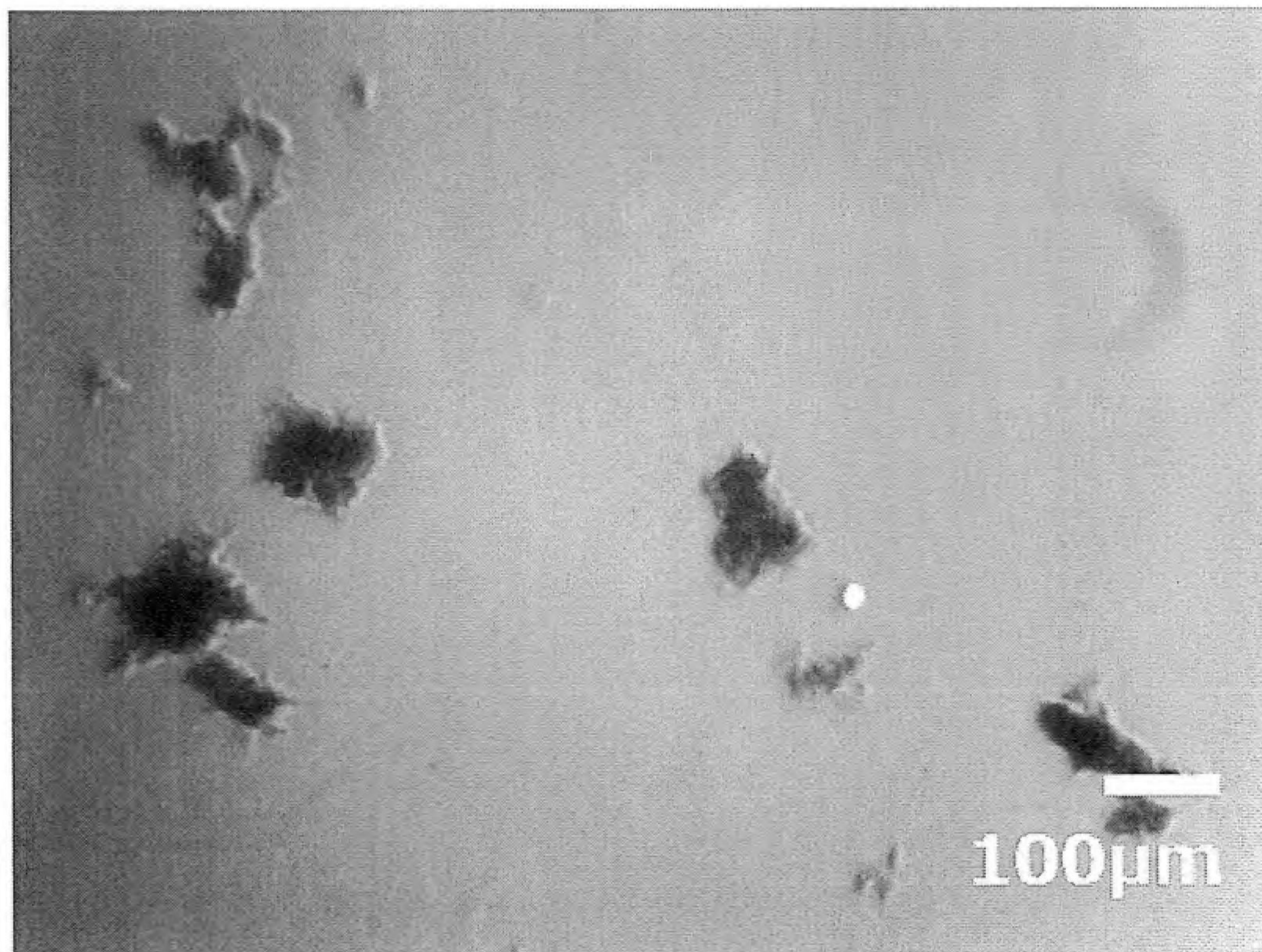


【圖15】

(a)

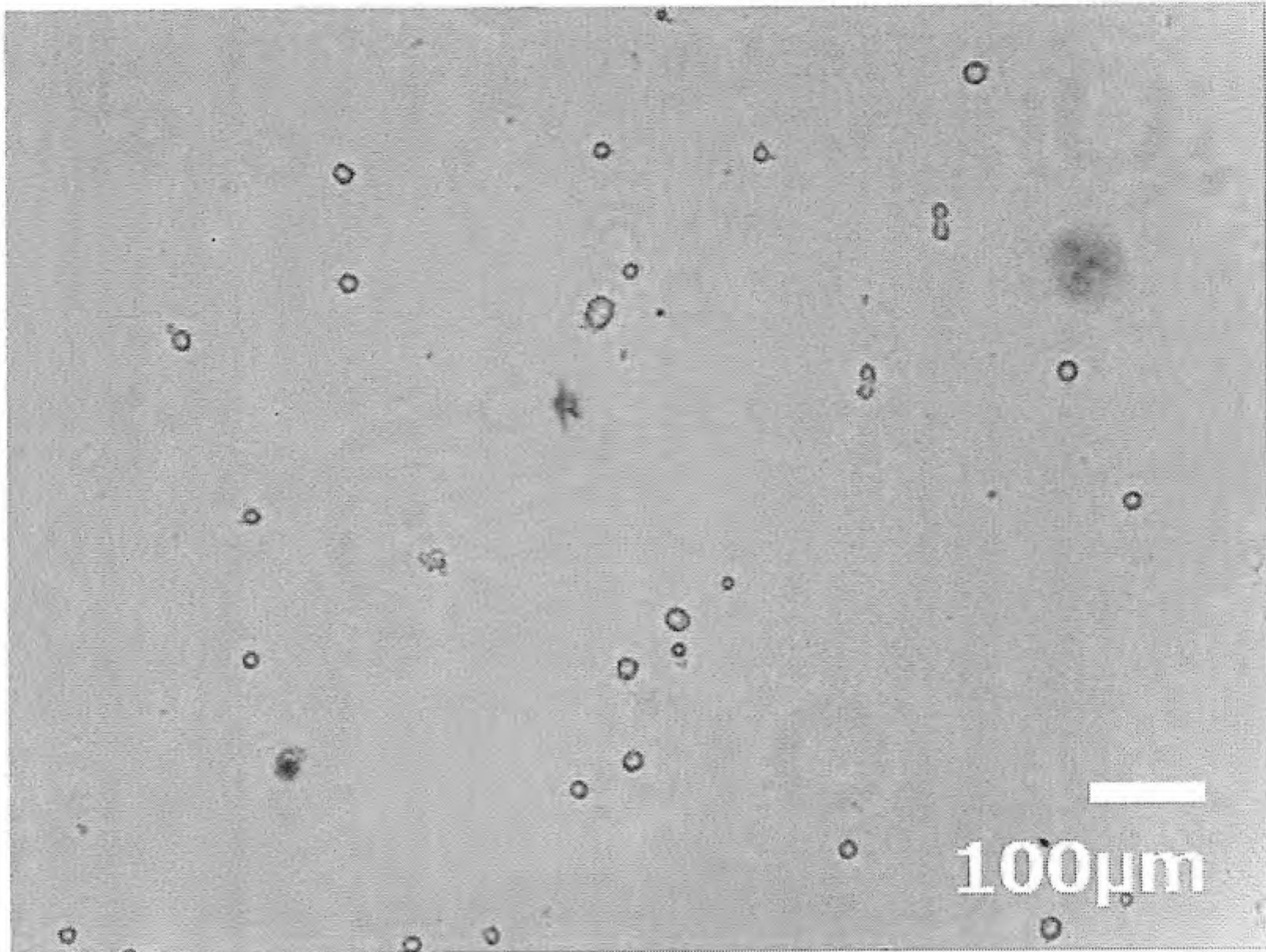


(b)

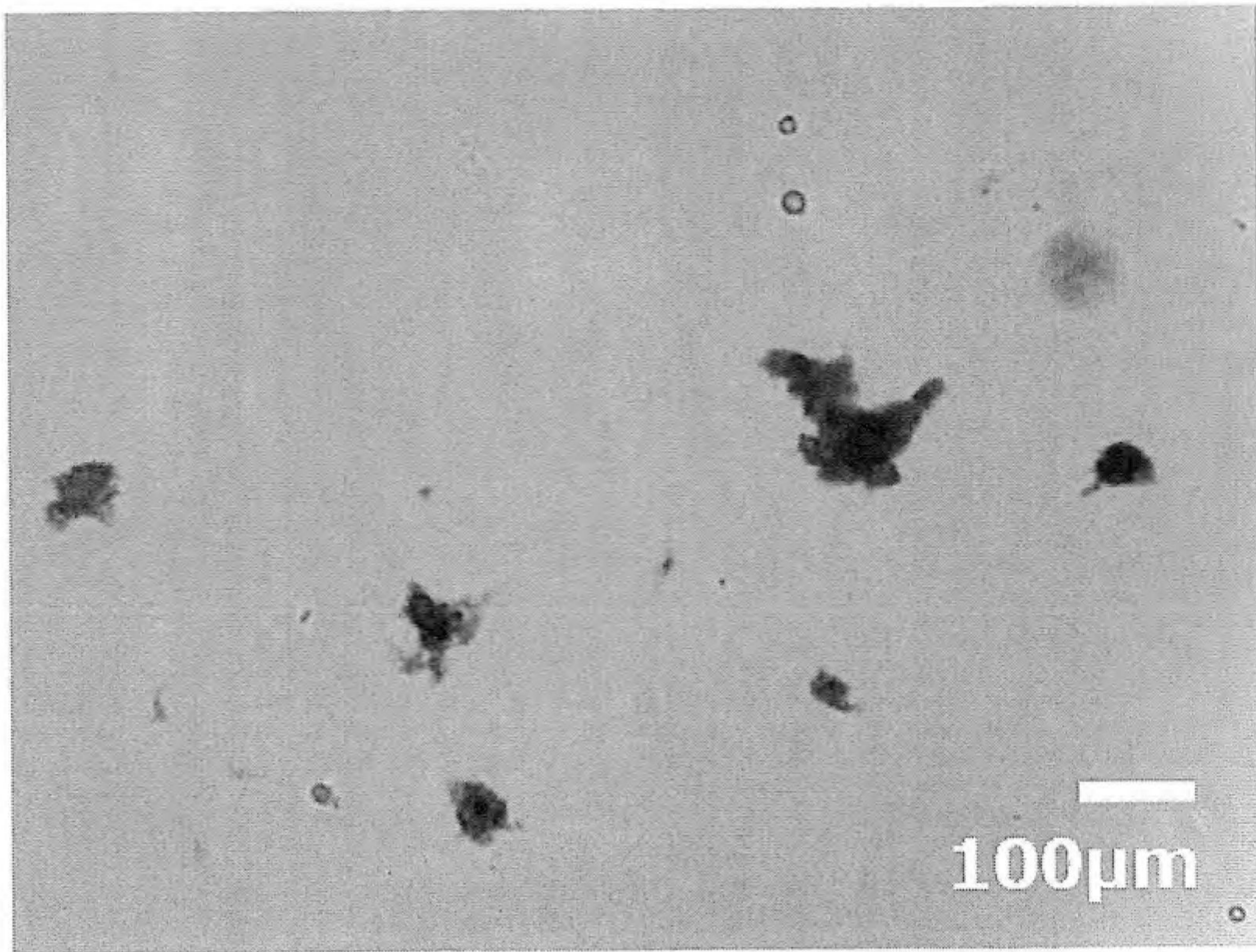


【圖16】

(a)

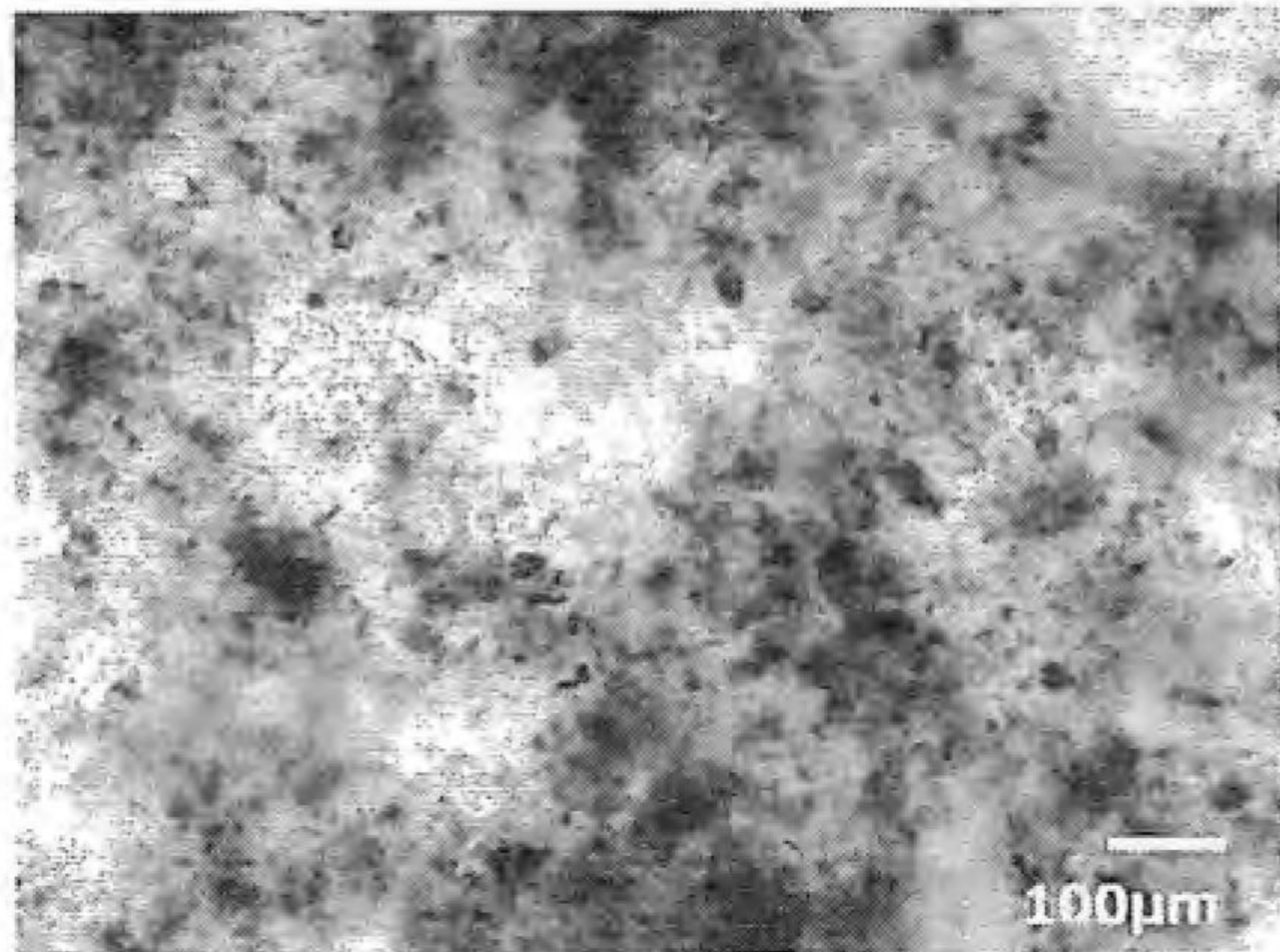


(b)

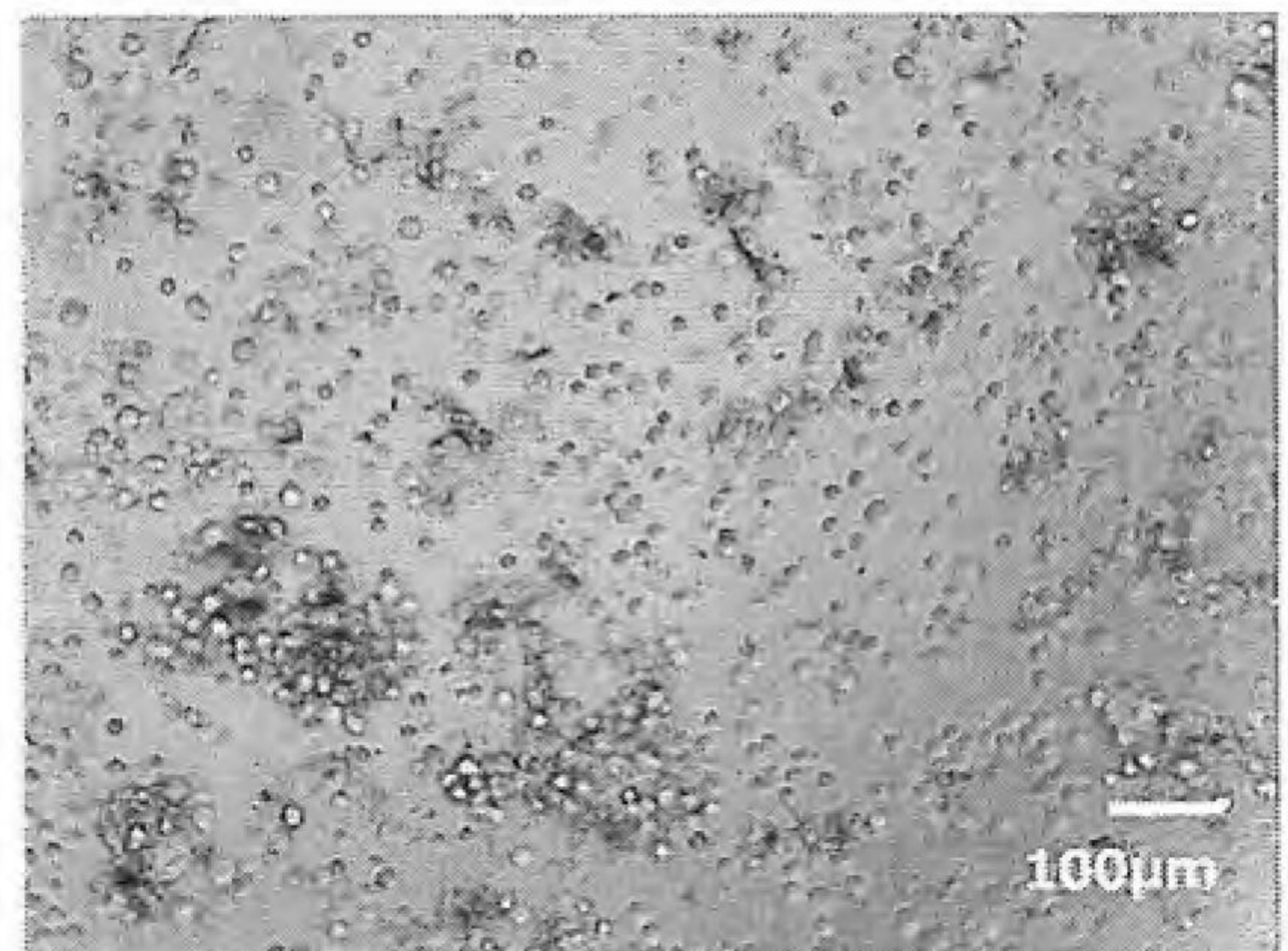


【圖17】

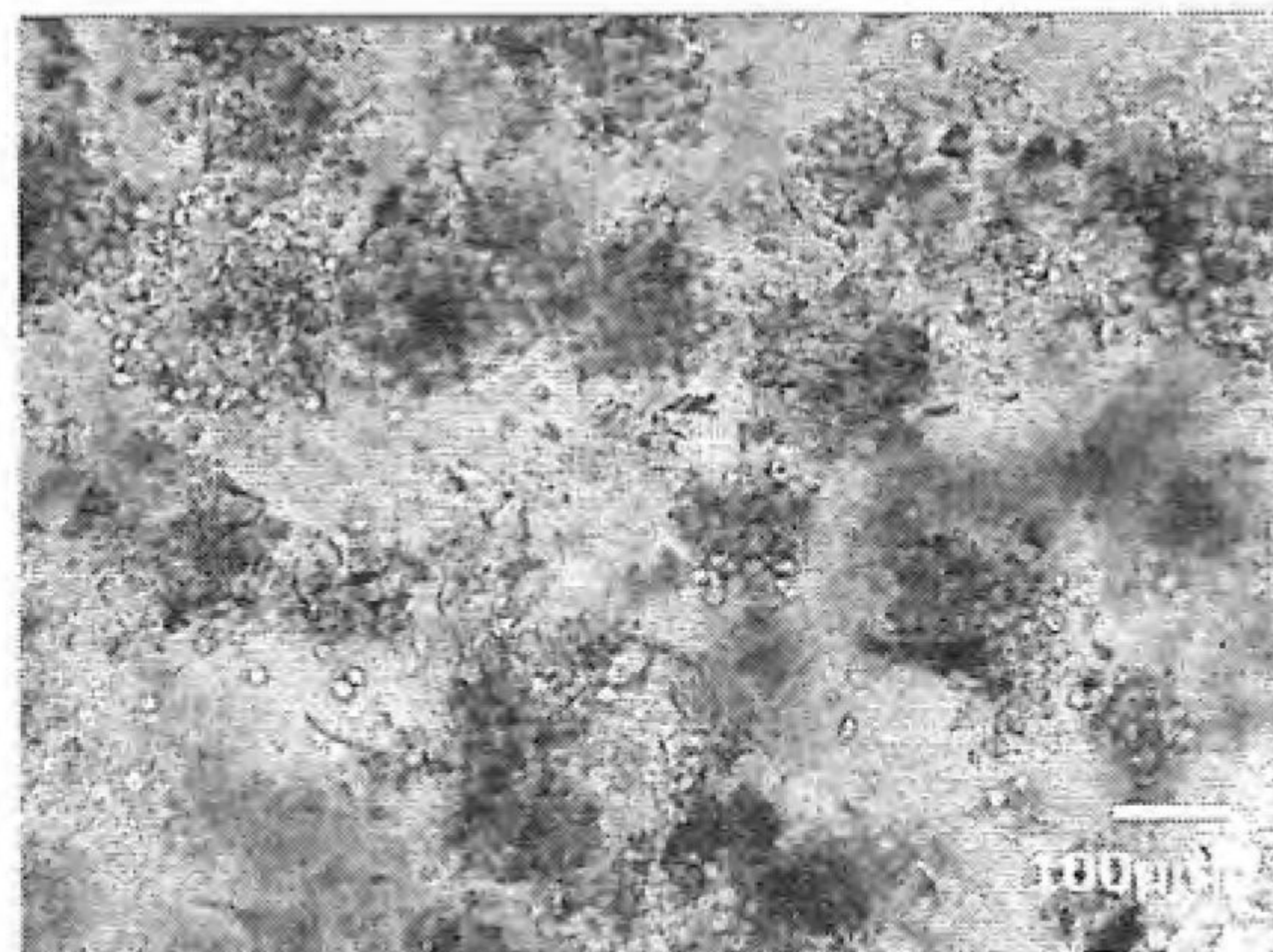
步驟1：培養後



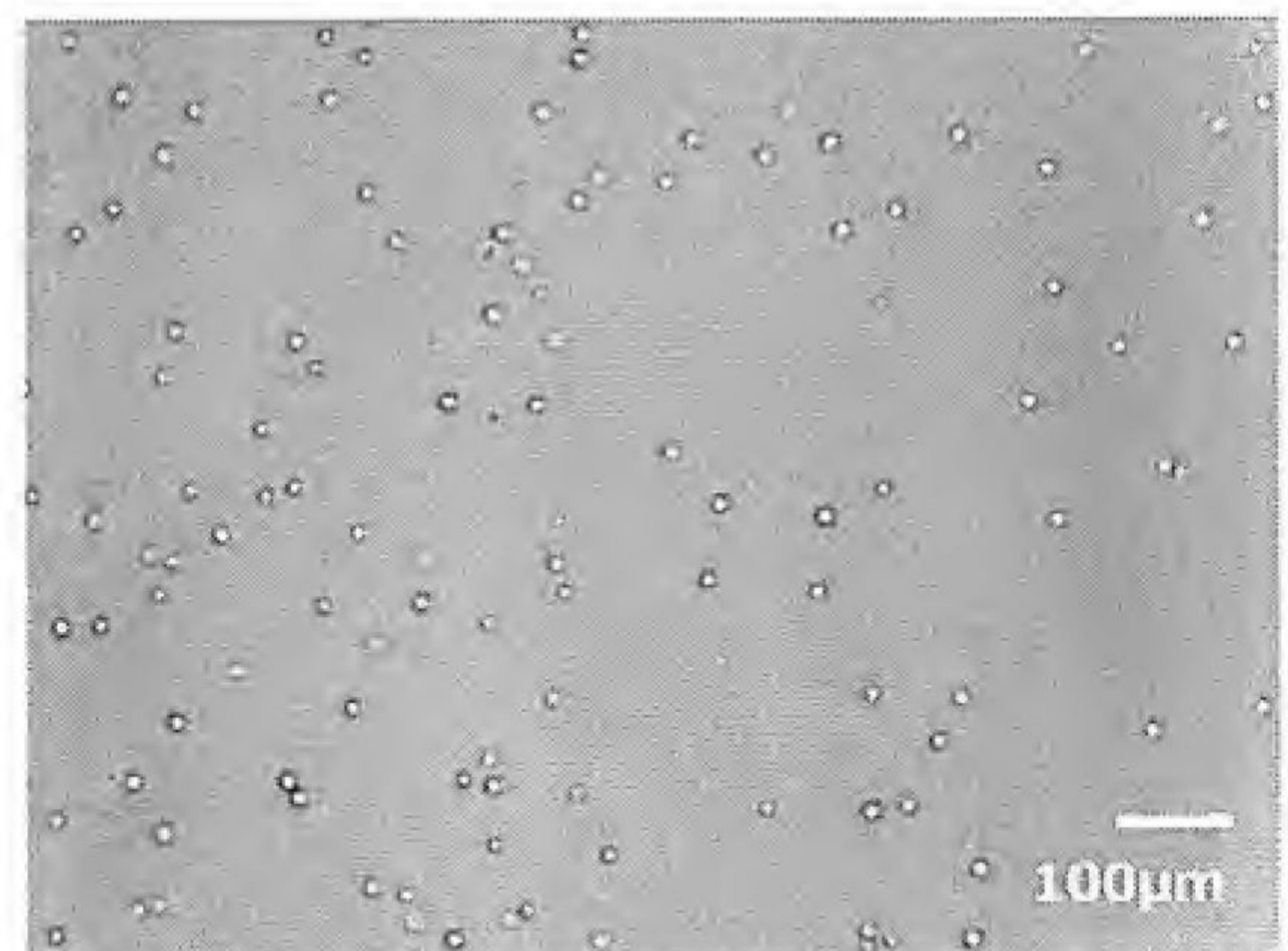
步驟3：酵素處理後



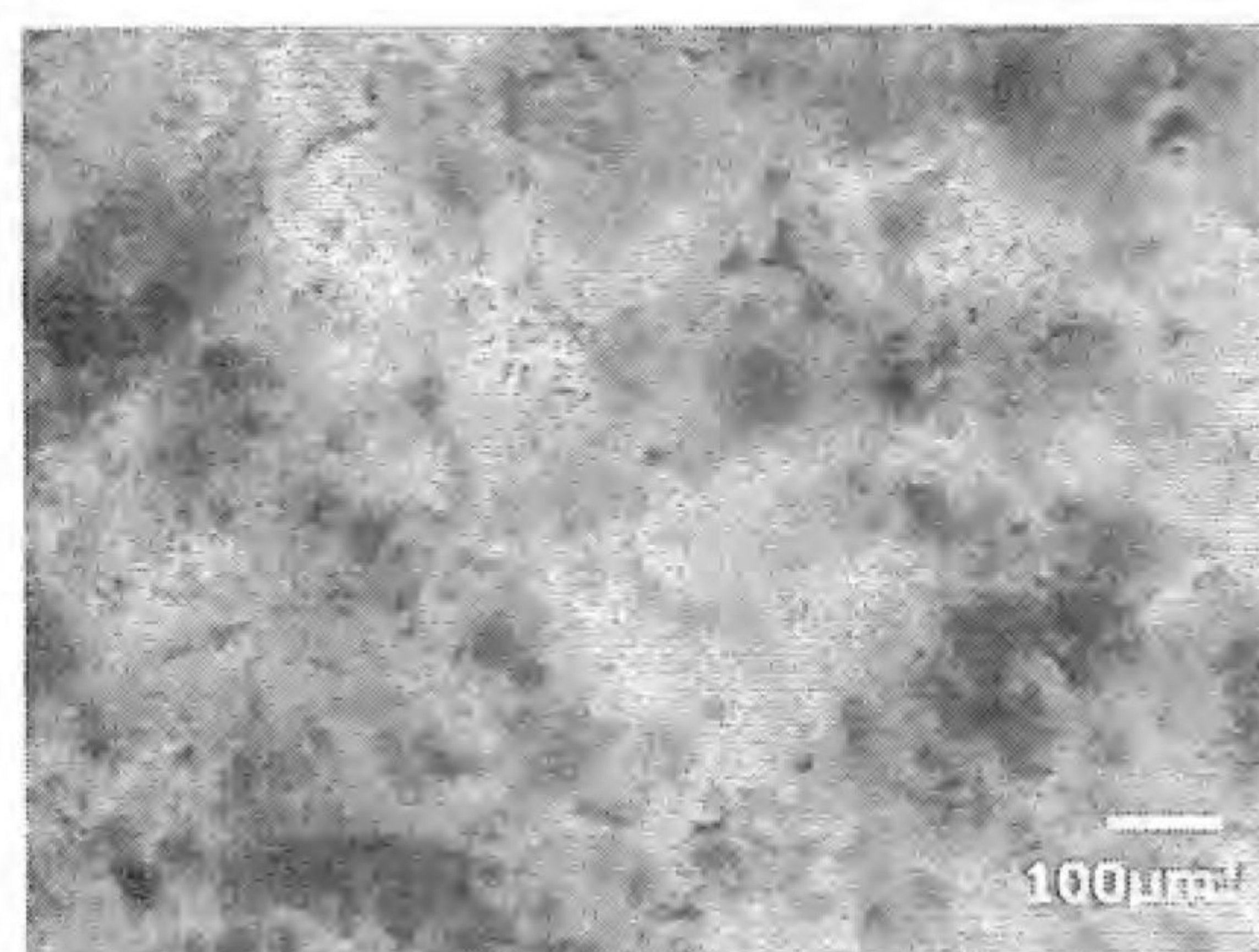
步驟2：上層



步驟4：細胞回收後



步驟2：沈澱



【圖18】