

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年9月21日(21.09.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/159367 A1

- (51) 国際特許分類:
B03B 5/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
B01D 39/20 (2006.01) G01N 1/28 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/008145
- (22) 国際出願日: 2017年3月1日(01.03.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-055475 2016年3月18日(18.03.2016) JP
特願 2016-172839 2016年9月5日(05.09.2016) JP
- (71) 出願人: 株式会社村田製作所(MURATA MANUFACTURING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 近藤 孝志(KONDO, Takashi); 〒6178555 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 Kyoto (JP). 萬壽 優(BANJU, Masaru); 〒6178555 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 Kyoto (JP). 渡邊 順子(WATANABE, Junko); 〒6178555 京都府長岡京市東神足1丁目10番1号 株式会社

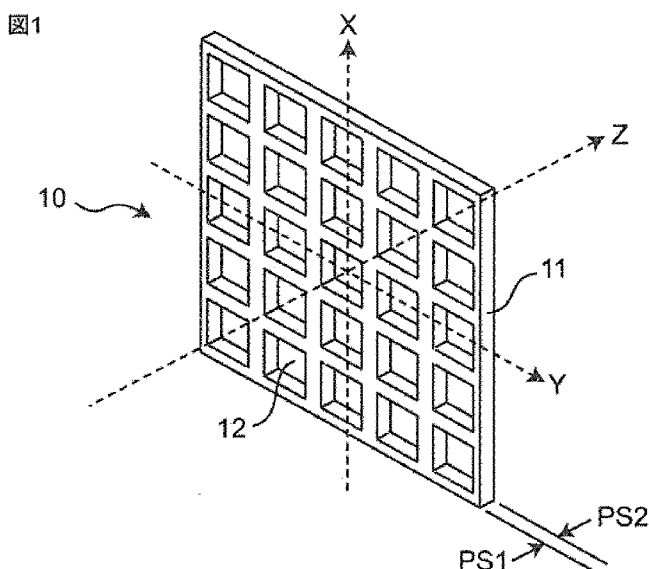
村田製作所内 Kyoto (JP). 長谷川 慎(HASEGAWA, Makoto); 〒5260829 滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園長浜バイオ大学内 Shiga (JP). 水上 民夫(MIZUKAMI, Tamio); 〒5260829 滋賀県長浜市田村町1266番地 学校法人関西文理総合学園長浜バイオ大学内 Shiga (JP).

- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) Title: METALLIC POROUS MEMBRANE, AND CLASSIFYING METHOD AND CLASSIFYING DEVICE USING SAME

(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) Abstract: Provided are a metallic porous membrane that can increase the recovery rate of cell aggregates, and a classifying method and a classifying device using the metallic porous membrane. This metallic porous membrane (10) for classifying cell aggregates (61) has a first primary surface (PS1) where the cell aggregates (61) are captured and a second primary surface (PS2) opposing the first primary surface, and is also provided with a membrane portion (11) having a plurality of penetration pores (12) that connect the first primary surface and the second primary surface. Such a configuration can increase the recovery rate of cell aggregates.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2017/159367 A1



MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

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。本発明の金属製多孔膜は、細胞凝集塊 (61) を分級する金属製多孔膜 (10) であって、前記細胞凝集塊 (61) が捕捉される第 1 主面 (PS1) と、前記第 1 主面に対向する第 2 主面 (PS2) 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 (12) を有する膜部 (11) を備える。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。

明 細 書

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

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、
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。

[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] 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。

[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。

[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。

[図44]実施例6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45]実施例6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46]実施例6において、最上段の金属製多孔膜で捕捉した図43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47]実施例6において、中央の金属製多孔膜で捕捉した図44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48]実施例6において、最下段の金属製多孔膜で捕捉した図45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では、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。

[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。

- [0051] 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。
- [0052] 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。
- [0053] 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。
- [0054] 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。
- [0055] 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。
- [0056] 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。
- [0057] 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。
- [0058] (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PS1と第2主面PS2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においてマトリッ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。

- [0059] 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、iPS細胞などを使用した細胞凝集塊である。
- [0060] 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7.8mm、厚さ20 μ m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。
- [0061] 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PS1及び第2主面PS2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PS1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12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12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。
- [0062] 貫通孔12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12は、例えば、金属製多孔膜10の膜部11の第1主面PS1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100%未満に設計される。好ましくは細胞凝集塊の大きさの80%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 20%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 40%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 12 間の格子間隔 b は、例えば、貫通孔 12 の一辺 d の 1 倍より大きく 10 倍以下であり、より好ましくは貫通孔 12 の一辺 d の 3 倍以下である。あるいは、開口率にして 10%以上が好ましい。なお、開口率は、(貫通孔 12 が占める面積) / (貫通孔 12 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 12 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 12 の寸法を一辺 d で説明したが、貫通孔 12 の寸法を貫通孔 12 の幅で定義してもよい。貫通孔 12 の幅とは、貫通孔 12 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 12 の幅は、貫通孔 12 が円形 (楕円含む) の場合、長径に相当する。

[0063] 金属製多孔膜 10 は、同じ大きさを有する複数の貫通孔 12 を含む。ここで、「同じ大きさ」とは、複数の貫通孔 12 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 12 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 10 にかかる圧力を逃がすために、複数の貫通孔 12 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。

[0064] 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。

[0065] 図 3 は、図 2 の金属製多孔膜 10 の膜部 11 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 12 は、膜部 11 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 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。

[0066] 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についても、平坦状に形成されている。さらには、膜部1 1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1 1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5 0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。複数の金属製多孔膜1 0 A、1 0 B、1 0 Cは、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が流れる方向7 0へ直列に配列されている。実施の形態1においては、液体6 0が流れる流路において、上流側から金属製多孔膜1 0 A、1 0 B、1 0 Cの順に配置されている。即ち、分級装置5 0において、金属製多孔膜1 0 Aを最上段に配置し、金属製多孔膜1 0 Bを中央に配置し、金属製多孔膜1 0 Cを最下段に配置している。また、金属製多孔膜1 0 A、1 0 B、1 0 Cは、液体6 0の流れる方向7 0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。

- [0069] 実施の形態1において、細胞凝集塊61a、61b、61c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61a、61b、61cの寸法は、細胞凝集塊61a、61b、61cの順に大きい。即ち、細胞凝集塊61a、61b、61cにおいて、細胞凝集塊61aが最も大きく、細胞凝集塊61cが最も小さい。
- [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61a、61b、61cよりも小さい。
- [0071] 金属製多孔膜10A、10B、10Cの膜部11a、11b、11cには、それぞれ異なる寸法の貫通孔12a、12b、12cが設けられている。貫通孔12a、12b、12cの寸法は、貫通孔12a、12b、12cの順に大きい。即ち、貫通孔12a、12b、12cにおいて、貫通孔12aの寸法が最も大きく、貫通孔12cの寸法が最も小さい。
- [0072] 金属製多孔膜10Aの貫通孔12aは、細胞凝集塊61aを通過させずに、細胞凝集塊61b、61c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12aは、細胞凝集塊61aよりも小さく、細胞凝集塊61b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61a、61b、61cと単離細胞62とを含む液体60が金属製多孔膜10Aを通過することによって濾過されると、細胞凝集塊61aは、貫通孔12aを通り抜けることができず、金属製多孔膜10Aの第1主面PS1上に捕捉される。即ち、金属製多孔膜10Aの第1主面PS1上には、貫通孔12aの寸法より大きい細胞凝集塊61aが捕捉される。一方、液体60に含まれる細胞凝集塊61b、61c及び単離細胞62は、貫通孔12aを通り抜けることができる。このため、金属製多孔膜10Aで濾過された後の液体（濾液）60Aは、細胞凝集塊61b、61c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。

[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、貫通孔 12 b は、細胞凝集塊 61 b よりも小さく、細胞凝集塊 61 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 10 A で濾過された液体 60 A が金属製多孔膜 10 B を通過することによって濾過されると、細胞凝集塊 61 b は、貫通孔 12 b を通り抜けることができず、金属製多孔膜 10 B の第 1 主面 P S 1 上に捕捉される。一方、液体 60 A に含まれる細胞凝集塊 61 c 及び単離細胞 62 は、貫通孔 12 b を通り抜けることができる。このため、金属製多孔膜 10 B で濾過された後の液体（濾液）60 B は、細胞凝集塊 61 c 及び単離細胞 62 を含んでいるが、細胞凝集塊 61 b を含まない。したがって、金属製多孔膜 10 B においては、細胞凝集塊 61 b、61 c と単離細胞 62 とを含む液体 60 A から細胞凝集塊 61 b を分級することができる。

[0074] 金属製多孔膜 10 C の貫通孔 12 c は、細胞凝集塊 61 c を通過させずに、単離細胞 62 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 c は、細胞凝集塊 61 c よりも小さく単離細胞 62 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 10 B で濾過された液体 60 B が金属製多孔膜 10 C を通過することによって濾過されると、細胞凝集塊 61 c は、貫通孔 12 c を通り抜けることができず、金属製多孔膜 10 C の第 1 主面 P S 1 上に捕捉される。一方、液体 60 B に含まれる単離細胞 62 は、貫通孔 12 c を通り抜けることができる。このため、金属製多孔膜 10 C で濾過された後の液体（濾液）60 C は、単離細胞 62 を含んでいるが、細胞凝集塊 61 c を含まない。したがって、金属製多孔膜 10 C においては、細胞凝集塊 61 c と単離細胞 62 とを含む液体 60 B から細胞凝集塊 61 c を分級することができる。

- [0075] また、金属製多孔膜10Cで濾過された後の液体（濾液）60Cに含まれる単離細胞62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。
- [0076] このように、分級装置50においては、液体60が流れる流路の上流側から、複数の金属製多孔膜10A、10B、10Cを貫通孔12a、12b、12c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61a、61b、61cと単離細胞62とを含む液体60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。
- [0077] 分級装置50は、金属製多孔膜10A、10B、10C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50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10A、10B、10C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。
- [0078] 図5は金属製多孔膜10Aを保持するハウジング20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10Aの図示を省略している。
- [0079] 図5及び図6に示すように、ハウジング20は、略円筒形の第1ハウジング部21と、略円筒形の第2ハウジング部22とを備えている。
- [0080] 第1ハウジング部21は、金属製多孔膜10A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を備えている。第1ハウジング部21は、金属製多孔膜10Aの外周部を挟持する第1枠部材51と一体に形成されている。すなわち、第1枠部材51は、第1ハウジング部21の一部として構成されている。第1枠部材51の内径は、例えば、6.0mmである。
- [0081] 第1ハウジング部21の第1枠部材51の周囲には、流体流入路21a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21bが形成されている。フランジ部21bには、当該フランジ部21bの厚み方向に貫通する複数の貫通穴21cが形成されている。実施の形態1において、複数の貫通穴21cは、90度間隔で4つ形成されている。フランジ部21bの

厚さは、例えば、2.1 mmである。貫通穴21cの直径は、例えば、1.42 mmである。貫通穴21cの長さは、例えば、0.9 mmである。

[0082] 第2ハウジング部22は、金属製多孔膜10A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を備えている。第2ハウジング部22は、金属製多孔膜10Aの外周部を挟持する第2枠部材52と一体に形成されている。すなわち、第2枠部材52は、第2ハウジング部22の一部として構成されている。第2枠部材52の内径は、例えば、6.0 mmである。

[0083] 第2ハウジング部22の第2枠部材52の周囲には、流体排出路22a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22bが形成されている。フランジ部22bには、当該フランジ部22bの厚み方向に突出する複数の凸部22cが形成されている。実施の形態1において、複数の凸部22cは、90度間隔で4つ形成されている。凸部22cの直径は、例えば、1.4 mmである。凸部22cの高さは、例えば、0.9 mmである。

[0084] 第1ハウジング部21と第2ハウジング部22とは、複数の凸部22cが複数の貫通穴21c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21と第2ハウジング部22とが互いに嵌合することで、金属製多孔膜10Aの外周部が第1枠部材51と第2枠部材52との間で保持される。

[0085] ハウジング20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21の末端部21d（図6では上端部）と第2ハウジング部22の末端部22d（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50においては、液体60、60A、60B、60C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60、60A、60B、60Cを外気から遮断することによって、液体60、60A、60B、60Cに含まれる細胞凝集塊61a、61b、61c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。

[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10A、10B、10Cを用いて細胞凝集塊61a、61b、61cと単離細胞62とを含む液体60を、細胞凝集塊61a、61b、61c及び単離細胞62のそれぞれに分級する。

[0089] 図7に示すように、ステップST11において、複数の金属製多孔膜10A、10B、10Cを準備する。具体的には、液体60が流れる流路に、上流から金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に直列に配列する（図4参照）。金属製多孔膜10A、10B、10Cについては、前述した分級装置50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ST11で準備する金属製多孔膜10A、10B、10C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エチレンガス滅菌、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。

- [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。
- [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。
- [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。

[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、進行がんの薬効調査では、細胞凝集塊61aを用いて薬効調査を行う。

[0099] [効果]

実施の形態1に係る金属製多孔膜10によれば、以下の効果を奏することができる。

[0100] 金属製多孔膜10においては、細胞凝集塊61が捕捉される第1主面PS1と、第1主面に対向する第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を備えている。このような構成により、細胞凝集塊61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61の回収率を高めることができる。

[0101] 金属製多孔膜10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61を含む液体60を濾過する際、金属製多孔膜10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11の第1主面PS1に液体60による圧力が加わっても貫通孔12が変形しにくい。したがって、金属製多孔膜10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12より大きい細胞凝集塊61を、金属製多孔膜10の第1主面PS1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61がフィルタを通過してしまう場合がある。

[0102] 金属製多孔膜10において、貫通孔12は、膜部11の第1主面PS1側の開口と第2主面PS2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12では、膜部11の第1主面PS1側の開口が第2主面PS2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12より小さい細胞凝集塊61が貫通孔12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12より小さい細胞凝集塊61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61が残ってしまう。

[0103] また、金属製多孔膜10において、細胞凝集塊61を捕捉する膜部11の第1主面PS1が平坦状に形成されている。即ち、金属製多孔膜10の膜部11の第1主面PS1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10の貫通孔12よりも小さい細胞凝集塊61は、貫通孔12へ流入しやすくなっている。また、金属製多孔膜10の膜部11の第1主面PS1上に捕捉された細胞凝集塊61を回収するとき、細胞凝集塊61を膜部11の第1主面PS1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61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61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61を回収することがある。また、細胞凝集塊61を回収するとき、この凹凸部分に細胞凝集塊61が引っ掛かることがある。

[0104] 金属製多孔膜10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。

[0105] このように、金属製多孔膜10では、貫通孔12より大きい細胞凝集塊61をより確実に捕捉することができると共に、貫通孔12より小さい細胞凝集塊61を貫通孔12に流入させやすい構成になっている。また、金属製多

孔膜 10 では、膜部 11 の第 1 主面 P S 1 から細胞凝集塊 61 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 10 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 61 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 12 a、12 b、12 c を有する金属製多孔膜 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 を含む液体 60 が流れる流路の上流側から、貫通孔 12 a、12 b、12 c 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 10 A、10 B、10 C を用いて、液体 60 から細胞凝集塊 61 a、61 b、61 c 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 61 a、61 b、61 c 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 61 a、61 b、61 c 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。

[0109] 分級装置 50 において、最下段に位置する金属製多孔膜 10 C の貫通孔 12 c 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 61 a、61 b、61 c を分級した後、単離細胞 62 を含む液体 60 C 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。

[0110] 分級装置 50 において、金属製多孔膜 10 A、10 B、10 C 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。

[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。

[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。このように、金属製多孔膜10A、10B、10C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。

[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。

[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21と第2ハウジング部22とが互いに嵌合する構造であればよい。

[0119] 実施の形態1において、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51及び第2枠部材52は、第1ハウジング部21及び第2ハウジング部22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10を用いて、細胞凝集塊61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61の分級を行った。

[0122] 実施例1及び比較例1において、細胞凝集塊61を含む液体60を図8に示す。図8に示すように、液体60には、異なる寸法の複数の細胞凝集塊61が含まれている。

[0123] 図8に示す細胞凝集塊61は、直径35mmのディッシュにNIH3T3/rasが含まれた液量0.2mlの細胞懸濁液を播種し、汎用のインキュベーターで1日培養することによって作製した。このとき、培地は3ml、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7.8mmであり、中央部に直径6mm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、 $120 \mu\text{m}$ 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、 $50 \mu\text{m}$ である。言い換えると、貫通孔12の格子間隔は $170 \mu\text{m}$ である。厚みは $17 \mu\text{m}$ 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に示す異なる寸法の細胞凝集塊61を含む液体60を、金

属製多孔膜 10 に通過させて濾過することによって、細胞凝集塊 61 の分級を行った。

[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 μm である。貫通孔の間隔、即ちナイロンメッシュの線径は、72 μm である。言い換えると、貫通孔の格子間隔は 203 μm 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、ナイロンメッシュに通過させて濾過することによって、細胞凝集塊 61 の分級を行った。

[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。

[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。

[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 P S1 は、平坦状に形成されている。このため、実施例 1 では、金属製多孔膜 10 の第 1 主面 P S1 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。

[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10A、10B、10Cは、外径が7.8mmであり、中央部に直径6mmの膜部11a、11b、11cを形成している。膜部11a、11b、11cには、正方形の貫通孔12a、12b、12cが正方格子配列で設けられている。貫通孔12a、12b、12c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10A、10B、10C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10A、10B、10Cの順で直列に配列されている。

[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1ml、分級装置50に投与し、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61a、61b、61c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10A、10B、10Cをそれぞれ取り出した。次に、各々の金属製多孔膜10A、10B、10Cについて、細胞凝集塊が捕捉された面（第1主面PS1）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PS2）から生理食塩水5ml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。

[0135] 図13は、実施例2において金属製多孔膜10A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10Aでは、貫通孔12aより大きい細胞凝集塊61aが捕捉されていることがわかる。

[0136] 図14は、実施例2において金属製多孔膜10B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10Bでは、貫通孔12bより大きい細胞凝集塊61b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10C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10Cでは、貫通孔12

cより大きい細胞凝集塊61c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行い、金属製多孔膜10A、10B、10Cで濾過された後の液体60A、60B、60C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10Aを通過した後の液体60A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10Aを通過した液体60Aには、細胞凝集塊61b、61cと単離細胞62とが含まれているが、細胞凝集塊61a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10Bを通過した後の液体60B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10Bを通過した液体60Bには、細胞凝集塊61cと単離細胞62とが含まれているが、細胞凝集塊61bは含まれていないことがわかる。

[0141] 図18は、実施例2において金属製多孔膜10Cを通過した後の液体60C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10Cを通過した液体60Cには、単離細胞62が含まれているが、細胞凝集塊61c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10A、10B、10Cにおいて所望の寸法の細胞凝集塊61a、61b、61cを捕捉することができる。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61a、61b、61cを分級することができる。

[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NIH3T3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 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。

- [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61a、61b、61c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10A、10B、10Cの貫通孔12a、12b、12cの孔サイズは、それぞれ、180 μ m、100 μ m、58 μ mである。ここで、貫通孔12a、12b、12c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61a、61b、61cを含む培地60を、金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に通過させることによって、細胞凝集塊61a、61b、61cの分級を行った。具体的には、新たに培養液を投入した3.5mmディッシュを3個用意し、金属製多孔膜10A、10B、10Cで捕捉された細胞凝集塊61a、61b、61cを、逆洗することによってそれぞれの3.5mmディッシュに移した。
- [0148] 図20は、実施例3において金属製多孔膜10Aで捕捉した細胞凝集塊61a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10Bで捕捉した細胞凝集塊61b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10C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。

- [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。
- [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 Imager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。
- [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。

[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

[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。

- [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。
- [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。
- [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] 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 Image r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ソーム阻害剤である。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- κ B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 $180 \mu\text{m}$ の金属製多孔膜10A、孔サイズ10

0 μ m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 Image r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、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。

[0170] 図31は、実施例4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32は、実施例4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 Image rで各細胞凝集塊の直径と体積を求めた。

[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、1

0.0 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。

[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。

[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。

[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18mm、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。

[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] 実施例5及び比較例3の培地60と細胞66を、それぞれ20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、TOYOINK製のATP試薬を100 μ L添加した後に、プレートリーダー(Perkin Elmer製Fusion α -FP)でRLU発光量(ATP活性量)を測定した。

[0181] 図36は、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36に示すように、実施例5と比較例3と比較すると、RLU発生量(ATP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10が、細胞の培養に何ら影響を与えないことを示している。

[0182] (実施例6)

実施例6においては、実施の形態1の分級装置50を用いて、培養したマウスES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7.8mmであり、中央部に直径6mm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 μm である。厚みは17 μm 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6では、図37に示す異なる寸法の細胞凝集塊61を含む液体60を、金属製多孔膜10に通過させて濾過することによって、細胞凝集塊61の分級を行った。

[0183] 細胞凝集塊は、マウスES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 3×10^5 個/ m^2 であった。37度のインキュベーション内で48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。

[0184] 図37は、培養した細胞凝集塊の一部を拡大した写真を示す。図37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61a、61b、61cが生成されていることがわかる。

[0185] 実施例6において、分級装置50の金属製多孔膜10A、10B、10Cの貫通孔12a、12b、12cの孔サイズは、それぞれ、180 μm 、100 μm 、58 μm である。ここで、貫通孔12a、12b、12c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。

[0186] 実施例6では、図37に示す異なるサイズの細胞凝集塊61a、61b、61cを含む培地60を、金属製多孔膜10A、10B、10Cの順に通過させることによって、細胞凝集塊61a、61b、61cの分級を行った。具体的には、新たに培養液を投入した3.5mmディッシュを3個用意し、金属製多孔膜10A、10B、10Cで捕捉された細胞凝集塊61a、61b、61cを、逆洗することによってそれぞれの3.5mmディッシュに移した。

[0187] 図38は、実施例6において金属製多孔膜10Aで捕捉した細胞凝集塊61aの一部を拡大した写真を示す。図39は、実施例6において金属製多孔膜10Bで捕捉した細胞凝集塊61bの一部を拡大した写真を示す。図40は、実施例6において金属製多孔膜10C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41は、実施例6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。

[0188] 図38～図41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41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。

[0189] 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61a、61b、61cを含む培地60（図37参照）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38～図41参照）。

[0190] 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。

[0191] 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 Imager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13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10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16個を選択した。

[0192] 図42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42の横軸は細胞凝集塊の直径、縦軸はATP活性量である。図42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。

[0193] 図42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。

[0194] 図42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次の曲線になる。

[0195] 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2に示す。

[0196]

[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

[0197] 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、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10A、10B、10C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10A、10B、10C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、31%、12%、23%であった。

[0198] 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。

[0199] 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43は、実施例6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44は、実施例6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45は、実施例6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。

[0200] 実施例6では、金属製多孔膜10Aで捕捉された図43に示す細胞凝集塊

61aを30組、孔サイズ100 μ mの金属製多孔膜10Bで捕捉された図44に示す細胞凝集塊61bを17組、孔サイズ58 μ mの金属製多孔膜10Cで捕捉された図45に示す細胞凝集塊61c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。

[0201] 図46は、実施例6において、金属製多孔膜10Aで捕捉した図43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47は、金属製多孔膜10Bで捕捉した図44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48は、金属製多孔膜10Cで捕捉した図45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。

[0202] 再培養して作製した図46～図48に示す細胞凝集塊63、64、65について、前述のCell Image r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、 $441 \pm 146 \mu\text{m}$ 、 $203 \pm 26 \mu\text{m}$ 、 $114 \pm 34 \mu\text{m}$ 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、33%、13%、30%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2に示す結果と同等であった。

[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。

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

請求の範囲

- [請求項1] 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、
金属製多孔膜。
- [請求項2] 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る、請求項1に記載の金属製多孔膜。
- [請求項3] 前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの100%未満である、
請求項1又は2に記載の金属製多孔膜。
- [請求項4] 前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの80%未満である、
請求項1又は2に記載の金属製多孔膜。
- [請求項5] 前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの20%以上である、
請求項1～4のいずれか一項に記載の金属製多孔膜。
- [請求項6] 前記貫通孔の幅は、前記細胞凝集塊の大きさの40%以上である、
請求項1～4のいずれか一項に記載の金属製多孔膜。
- [請求項7] 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、分級方法。
- [請求項8] 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する、請求項7に記載の分級方法。

[請求項9] 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る、請求項8に記載の分級方法。

[請求項10] 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む、請求項9に記載の分級方法。

[請求項11] 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む、請求項7～10のいずれか一項に記載の分級方法。

[請求項12] 更に、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む、請求項7～11のいずれか一項に記載の分級方法。

[請求項13] 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する、請求項7～12のいずれか一項に記載の分級方法。

[請求項14] 更に、分級された前記細胞凝集塊を用いて、薬効を調査するステップを含む、請求項7～13のいずれか一項に記載の分級方法。

[請求項15] 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る、請求項7～14のいずれか一項に記載の分級方法。

[請求項16] 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、分級装置。

[請求項17] 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

る、請求項 16 に記載の分級装置。

[請求項18] 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る、請求項 17 に記載の分級装置。

[請求項19] 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る、請求項 17 に記載の分級装置。

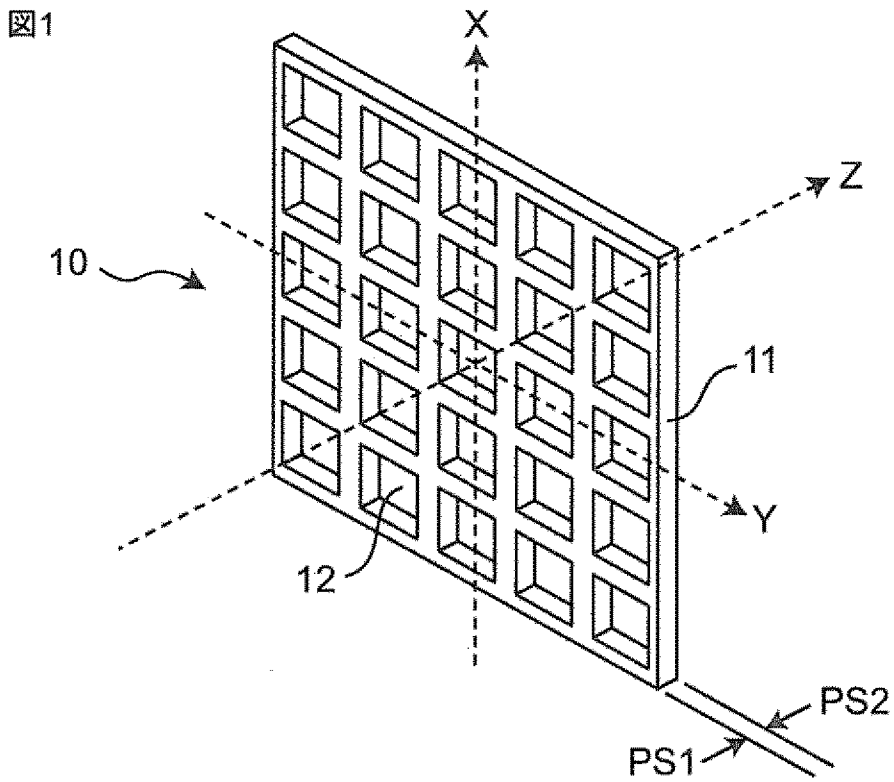
[請求項20] 更に、

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、を備える、請求項 16～19 のいずれか一項に記載の分級装置。

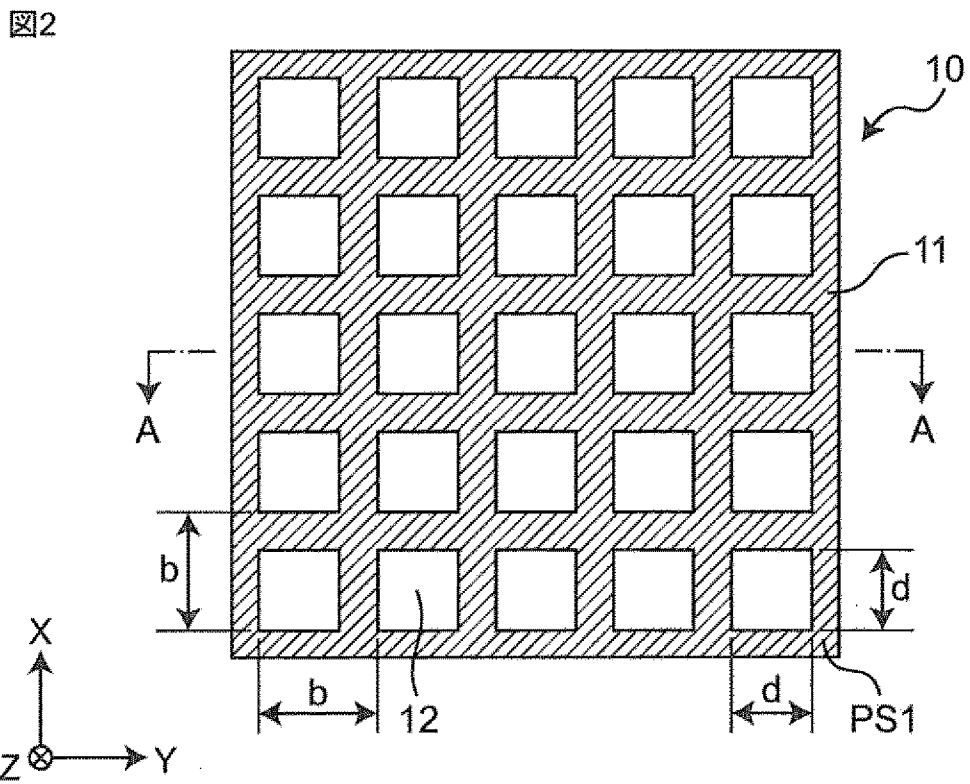
[請求項21] 前記細胞凝集塊を含む液体が前記金属製多孔膜を介して流れる流路は、外気から閉鎖されている、請求項 16～20 のいずれか一項に記載の分級装置。

[請求項22] 前記金属製多孔膜は、滅菌されている、請求項 16～21 のいずれか一項に記載の分級装置。

[図1]

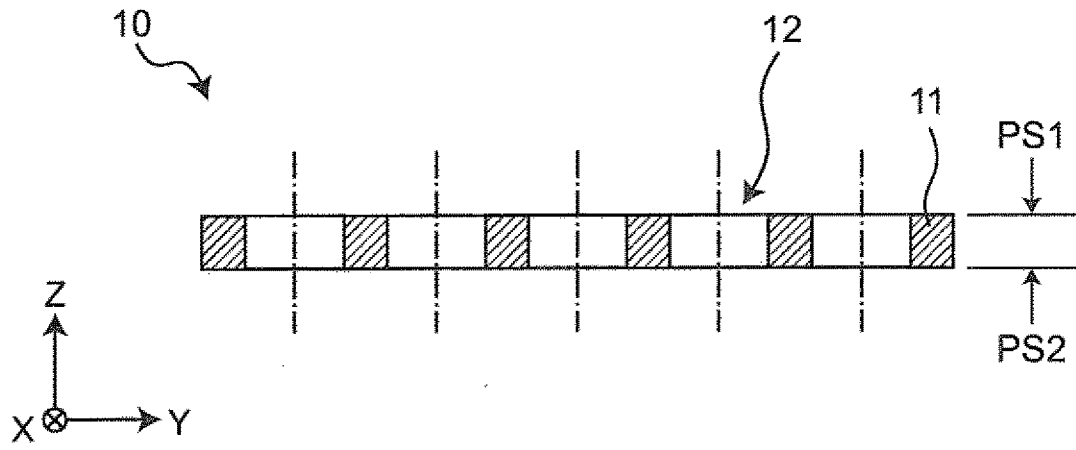


[図2]



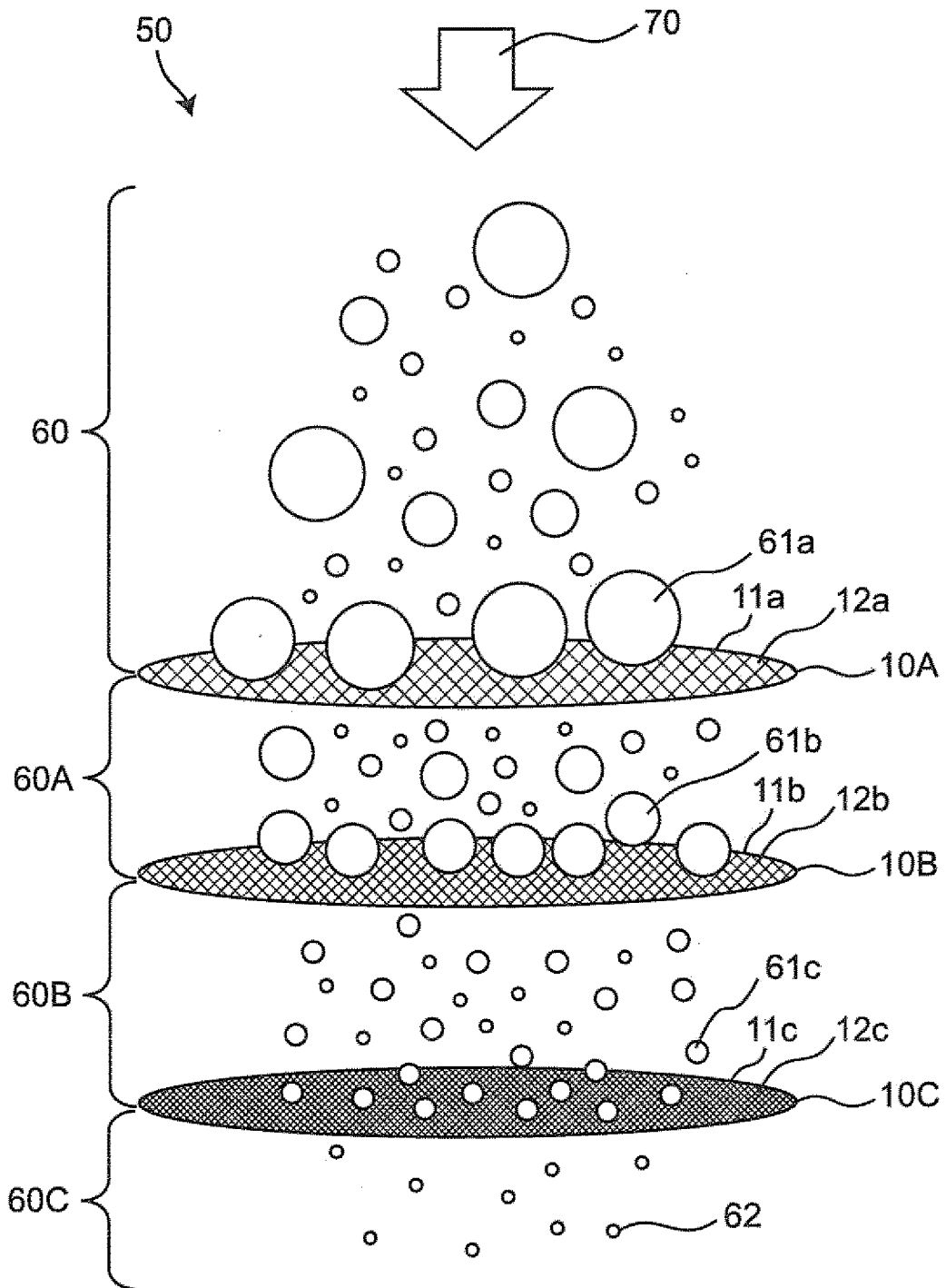
[図3]

図3



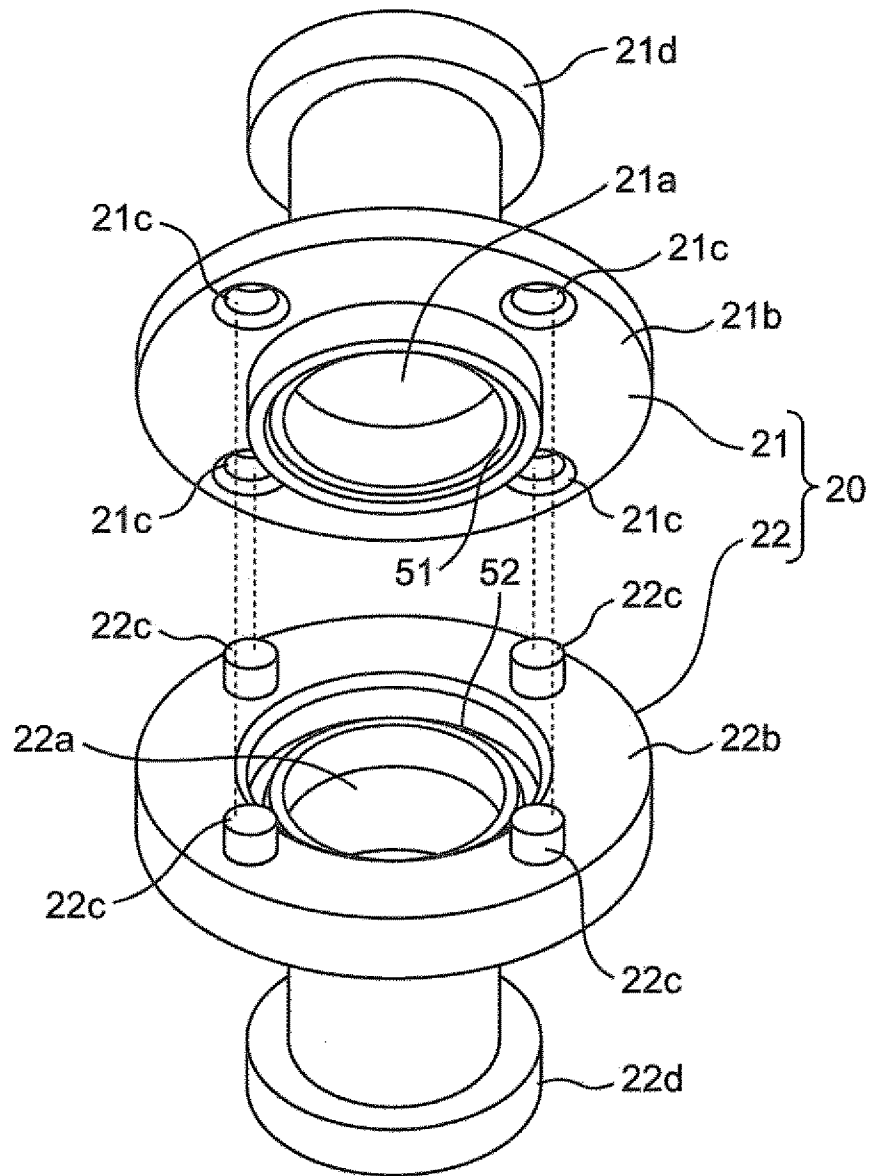
[図4]

図4



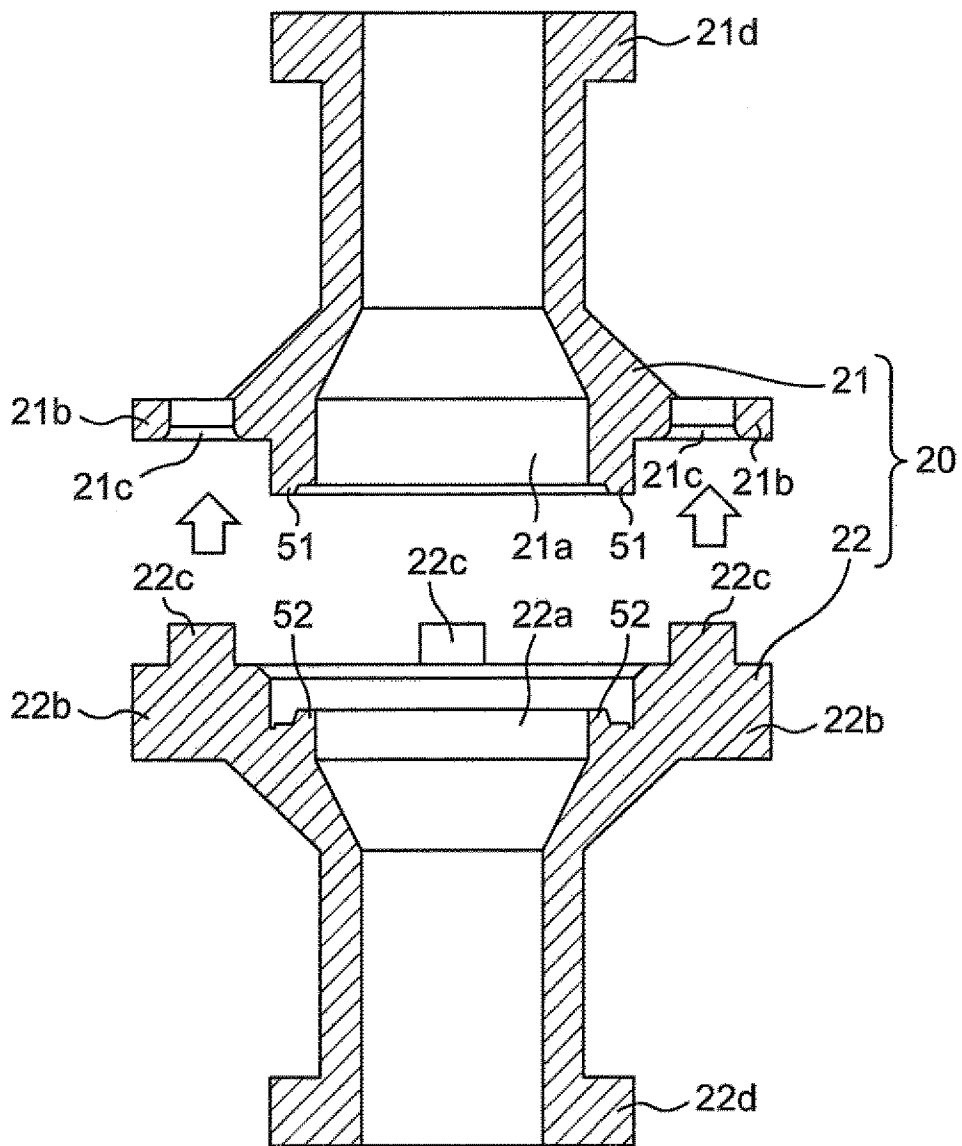
[図5]

図5



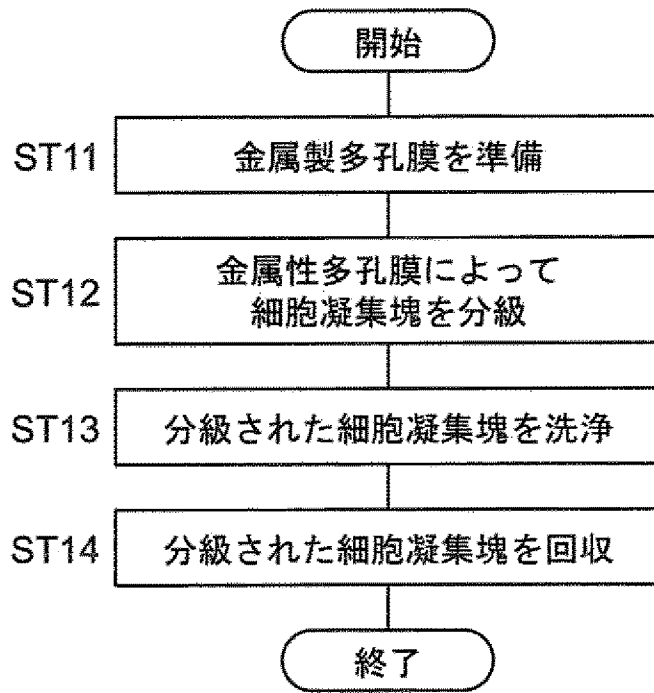
[図6]

図6



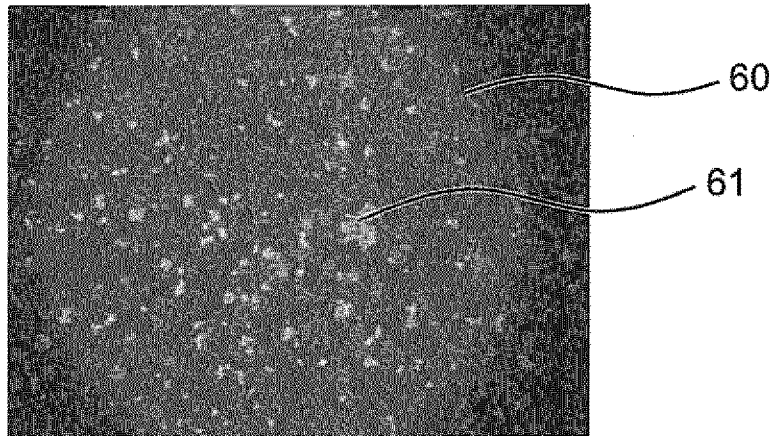
[図7]

図7



[図8]

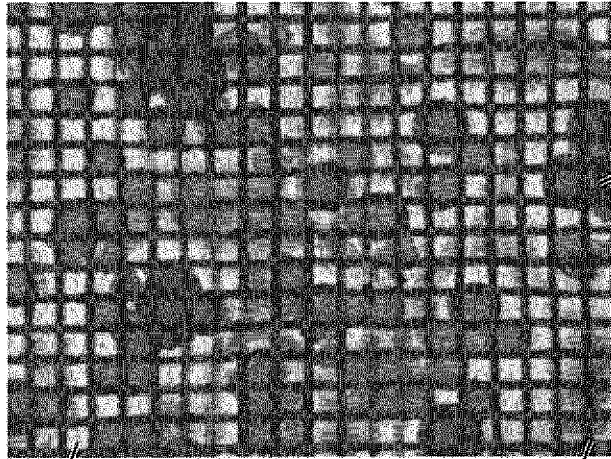
図8



[図9]

図9

10



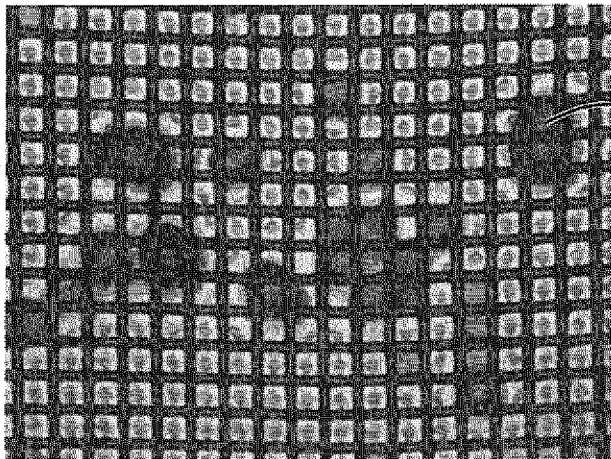
61

12

11

[図10]

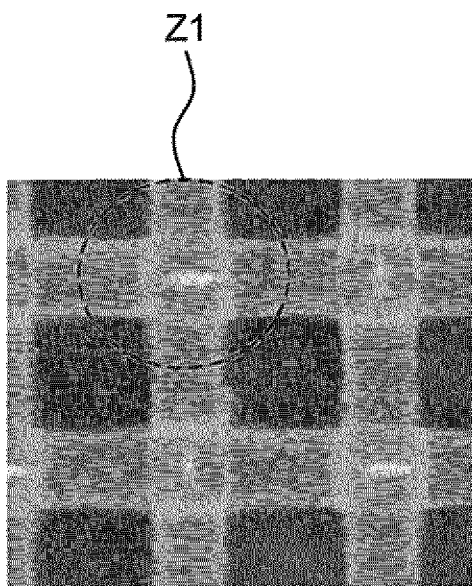
図10



61

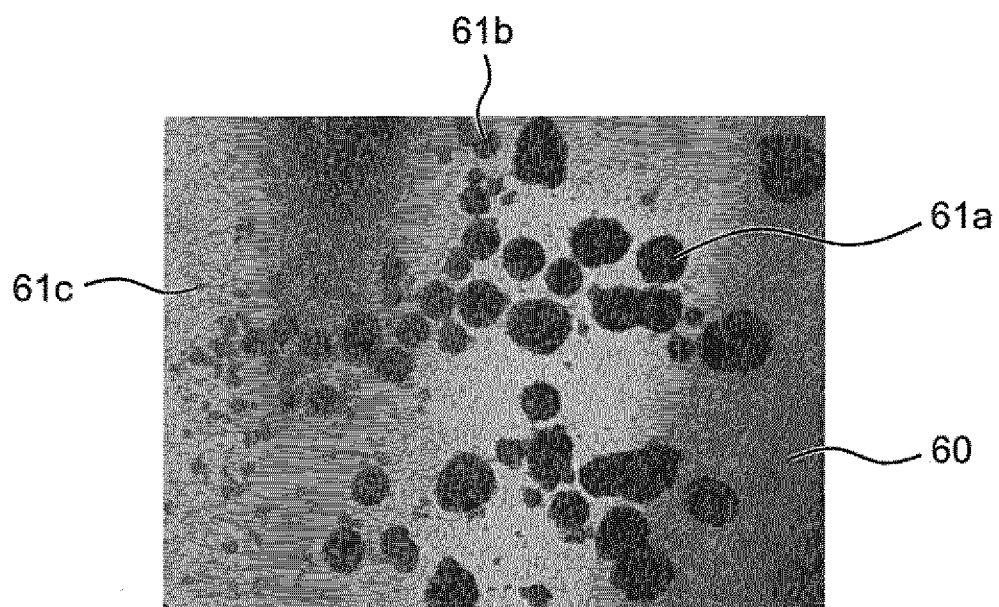
[図11]

図11



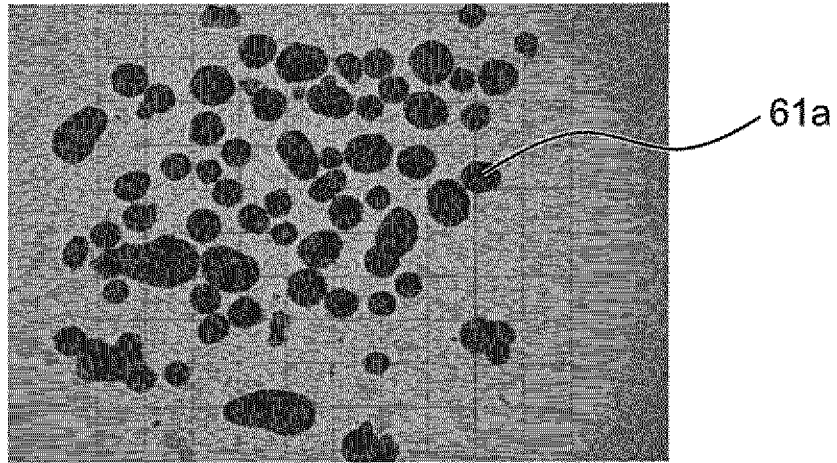
[図12]

図12



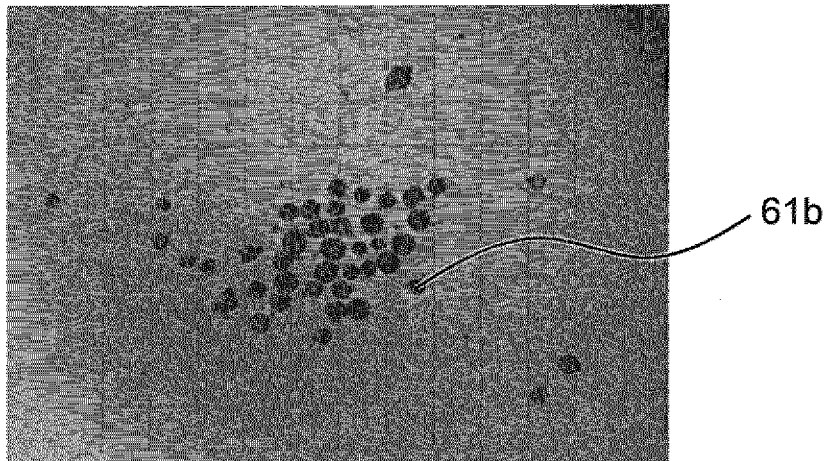
[図13]

図13



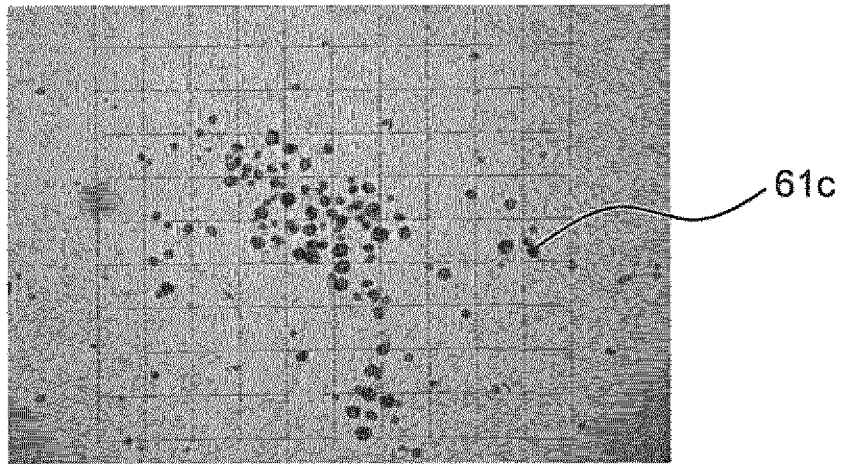
[図14]

図14



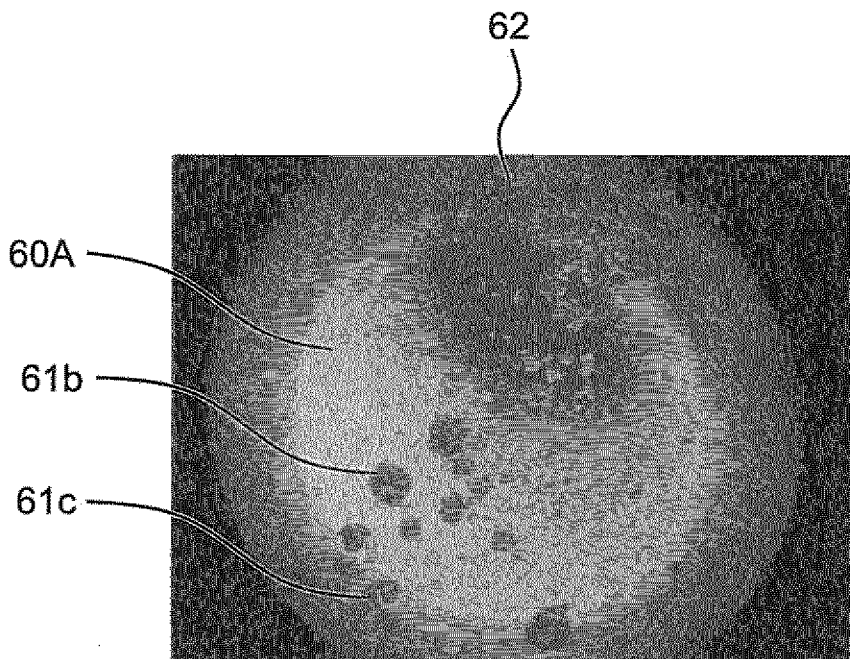
[図15]

図15



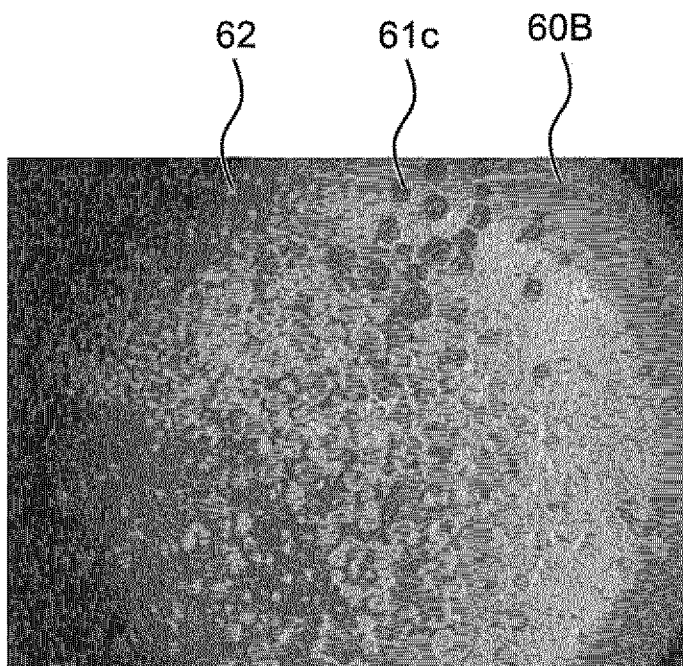
[図16]

図16



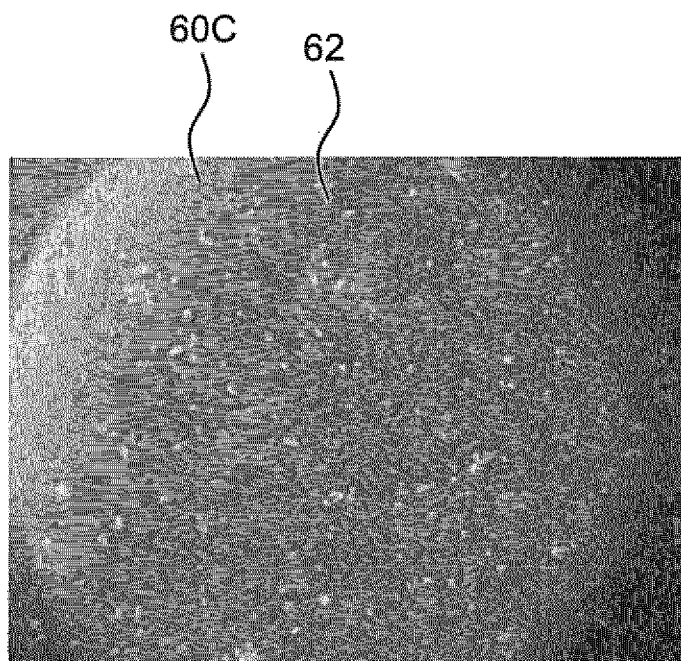
[図17]

図17



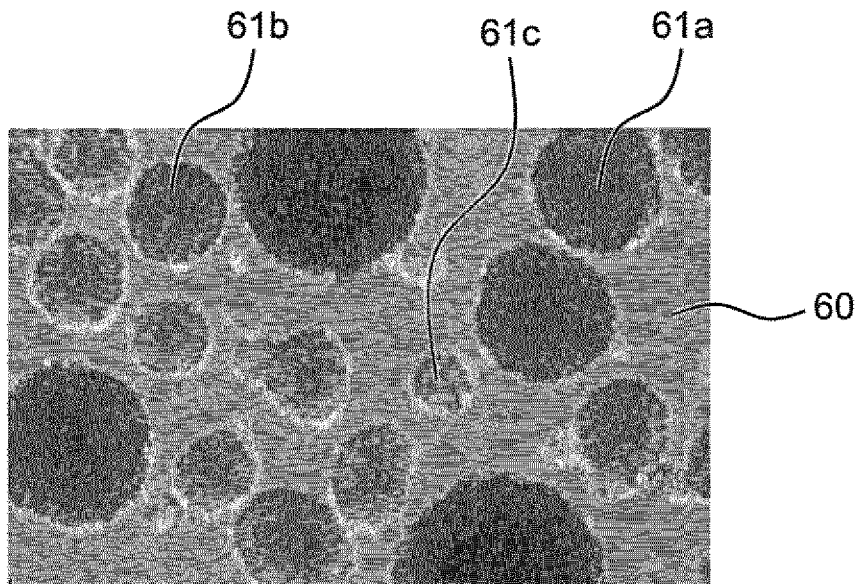
[図18]

図18



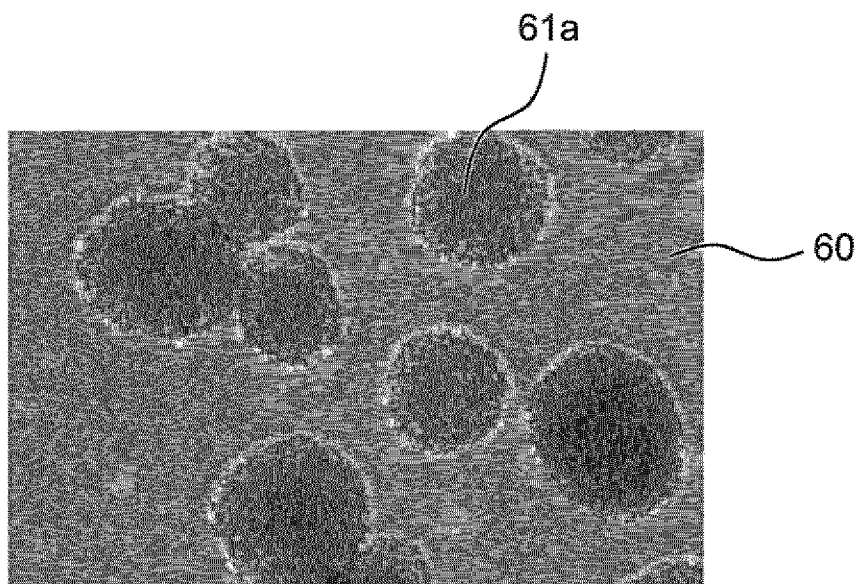
[図19]

図19



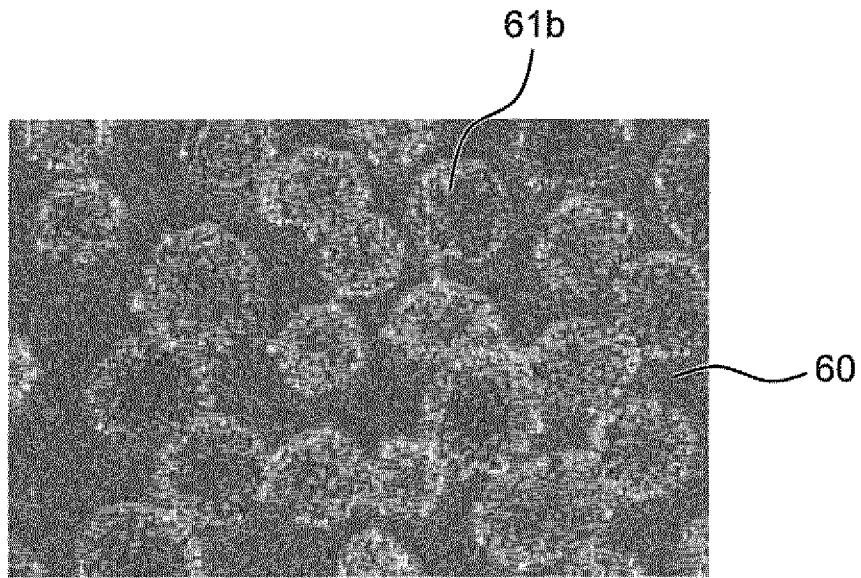
[図20]

図20



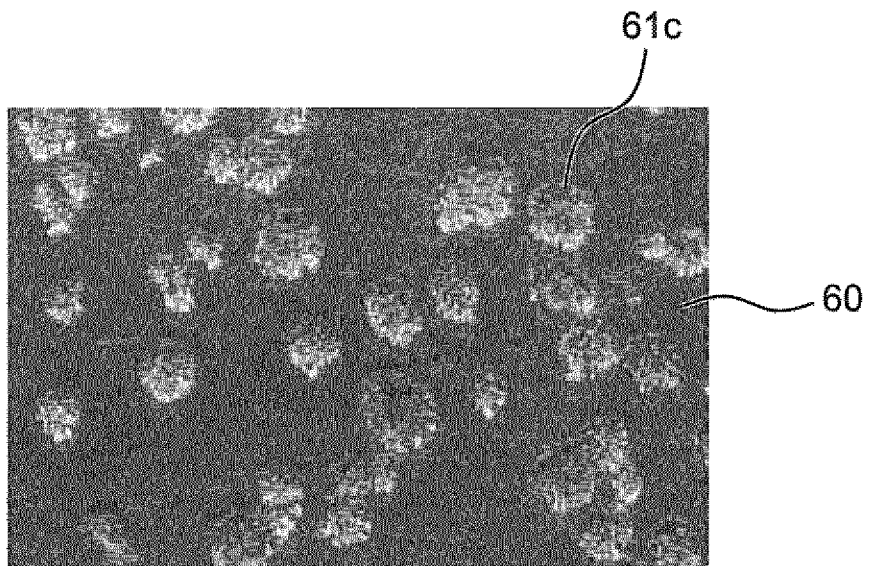
[図21]

図21



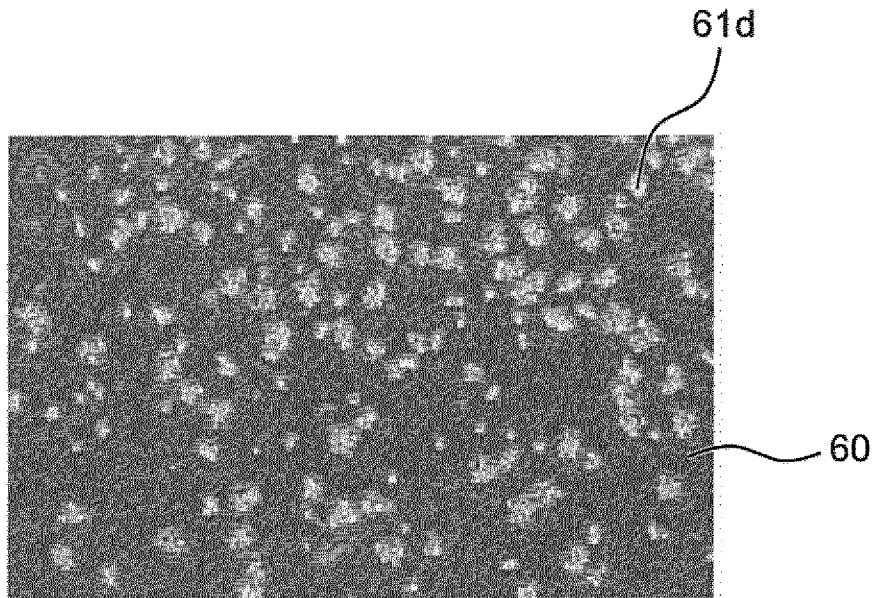
[図22]

図22



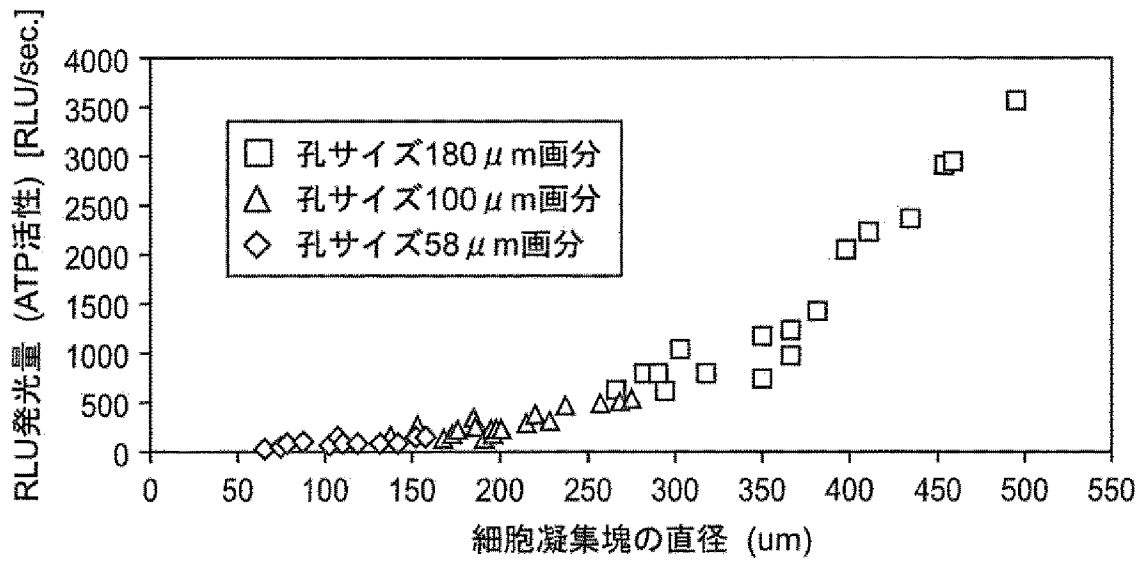
[図23]

図23



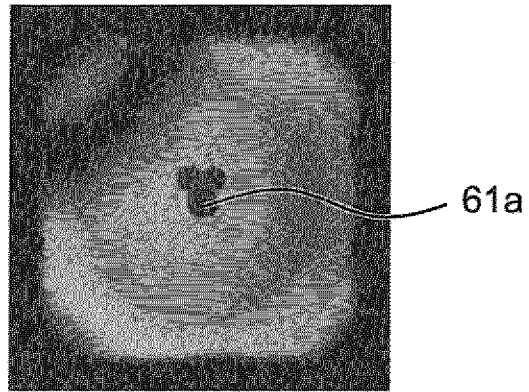
[図24]

図24



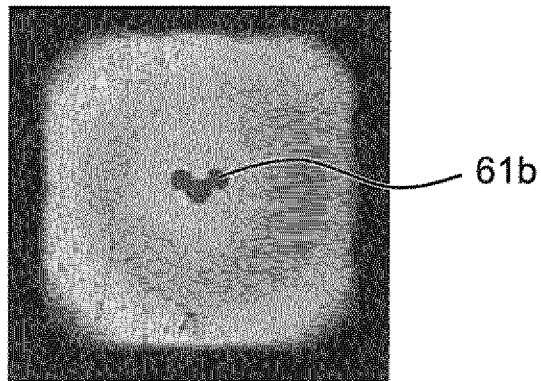
[図25]

図25



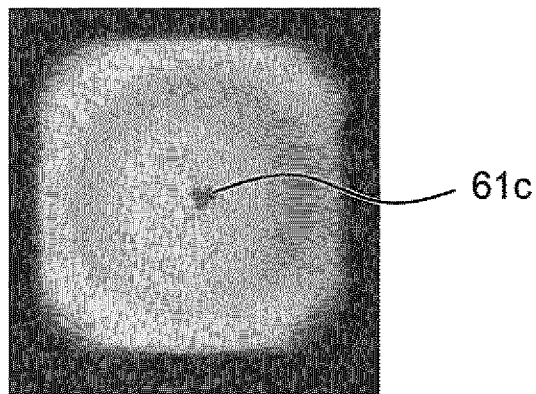
[図26]

図26



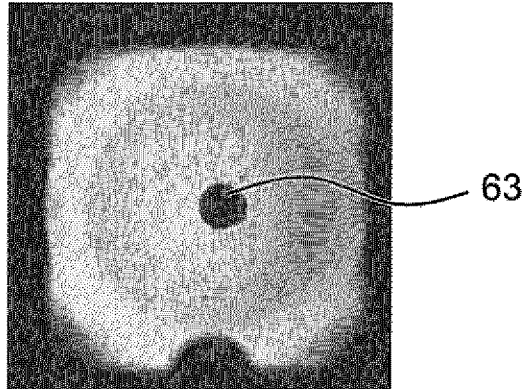
[図27]

図27



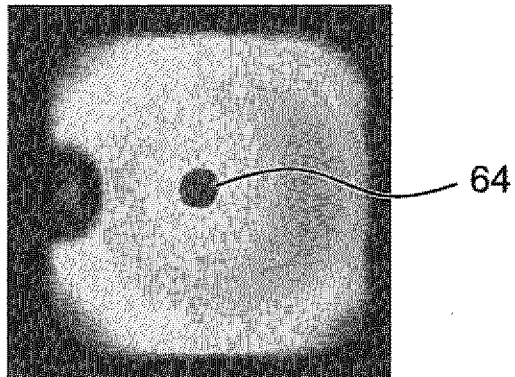
[図28]

図28



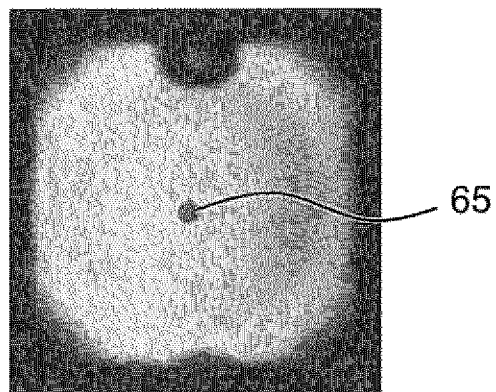
[図29]

図29



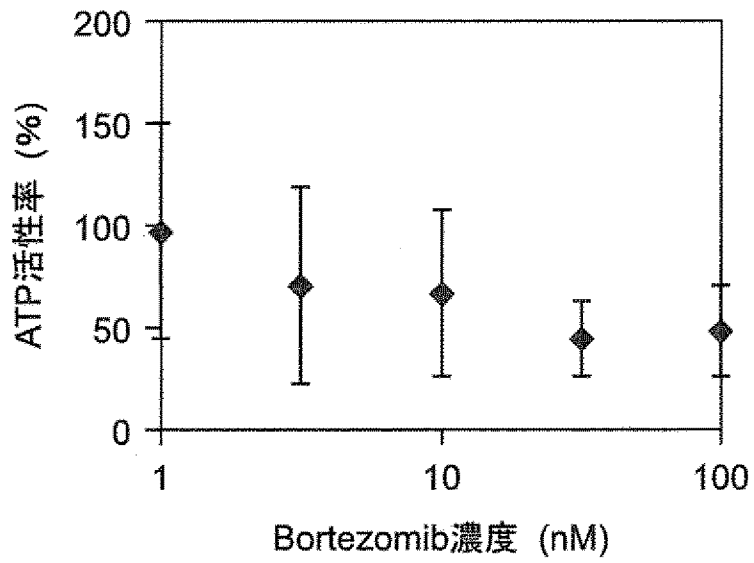
[図30]

図30



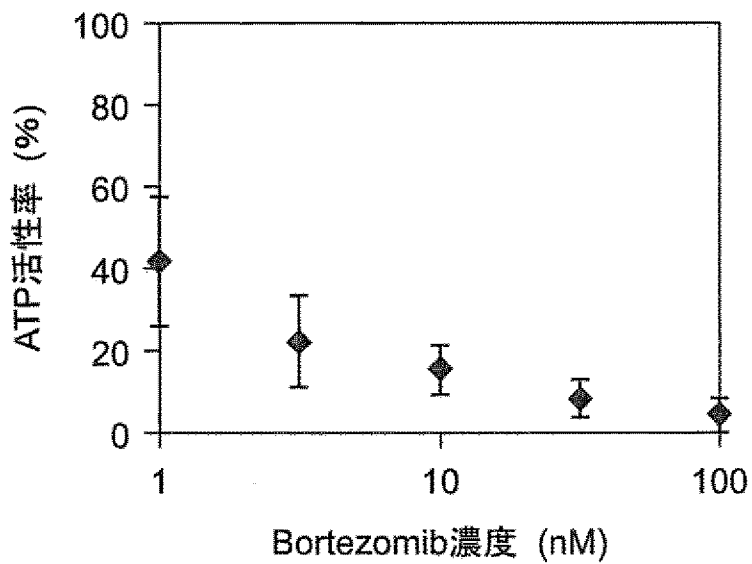
[図31]

図31



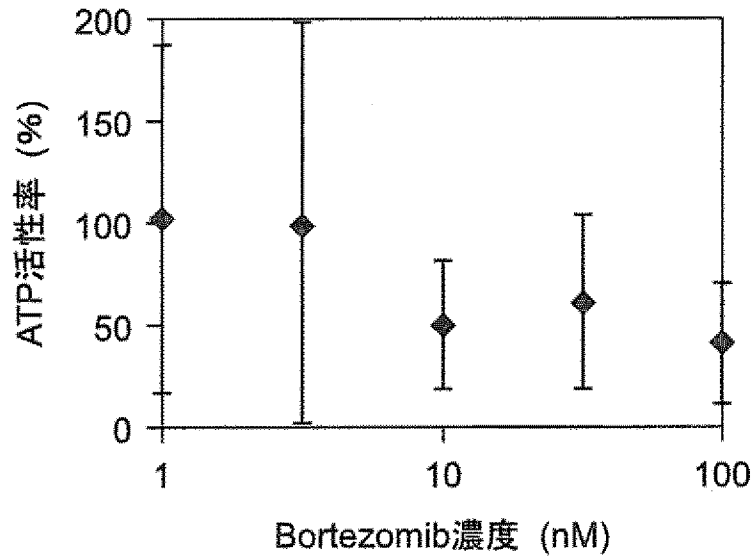
[図32]

図32



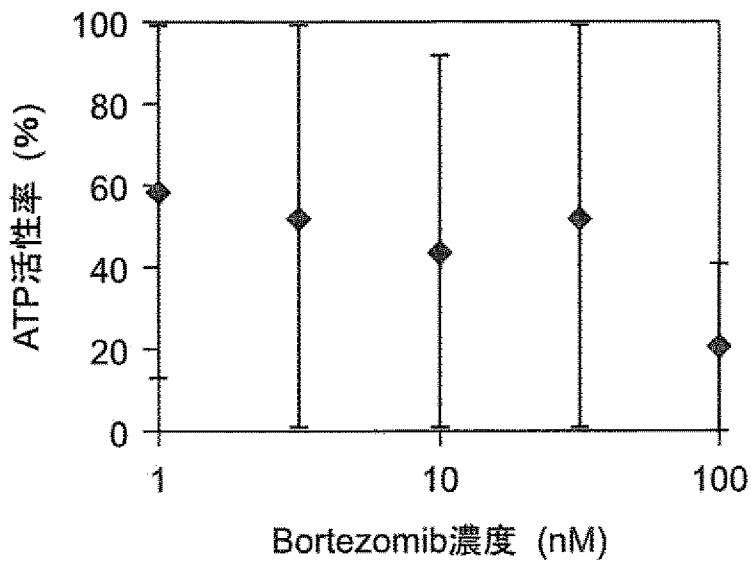
[図33]

図33

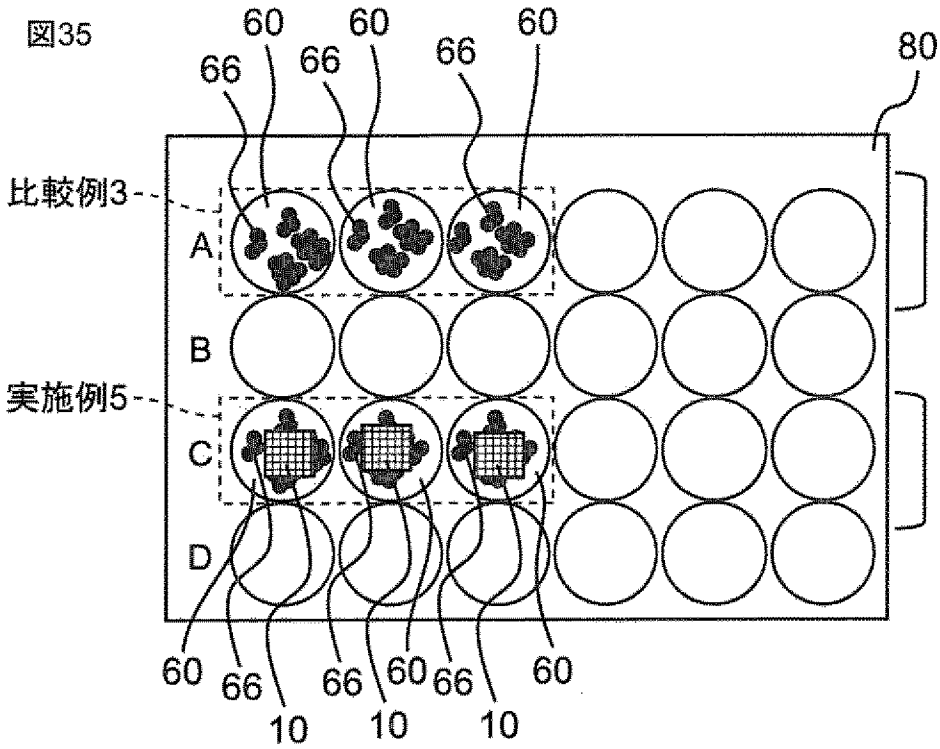


[図34]

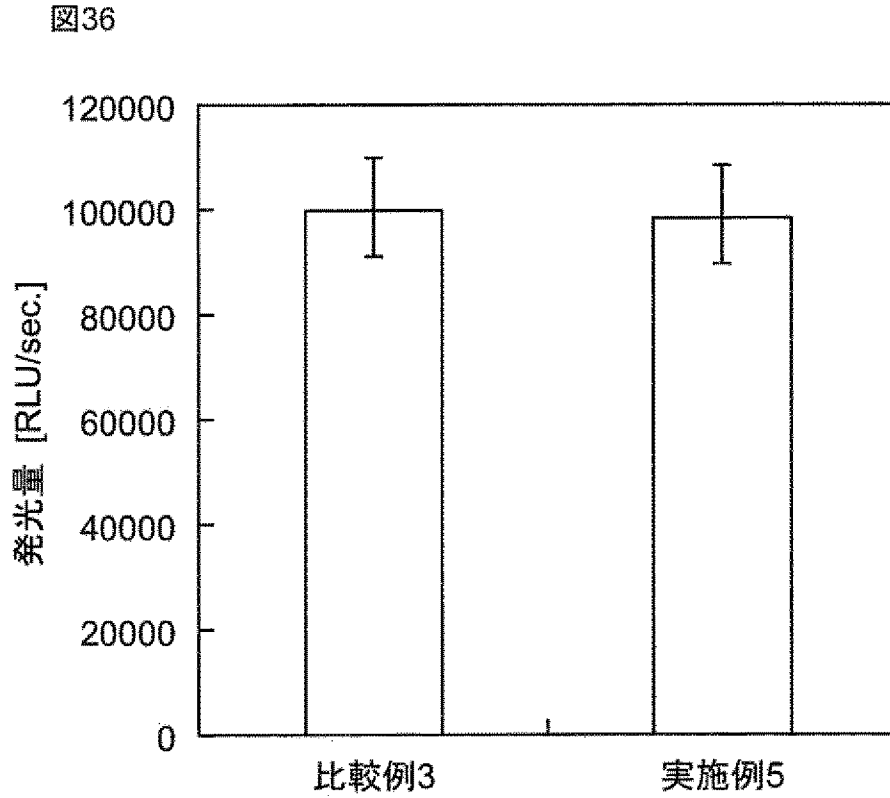
図34



[図35]

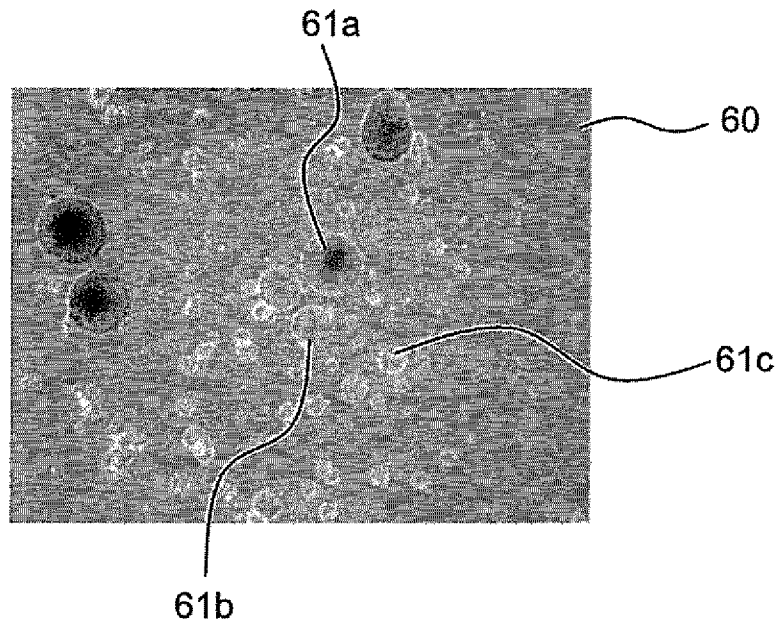


[図36]



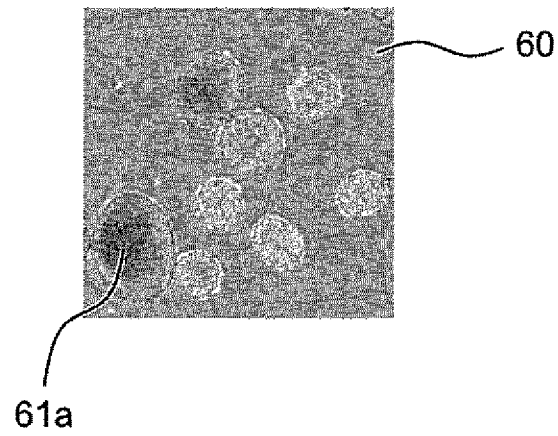
[図37]

図37



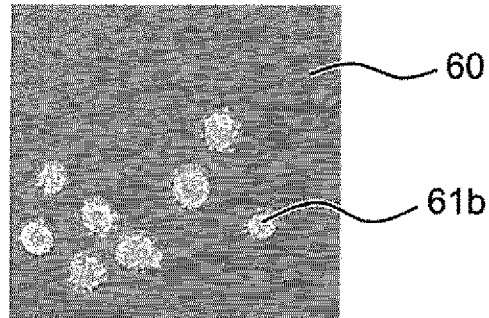
[図38]

図38



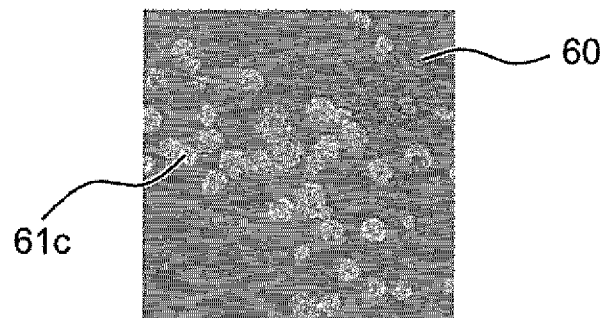
[図39]

図39



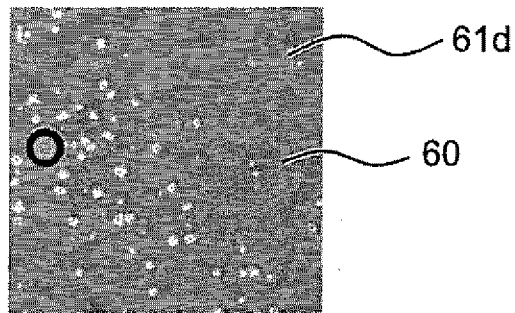
[図40]

図40



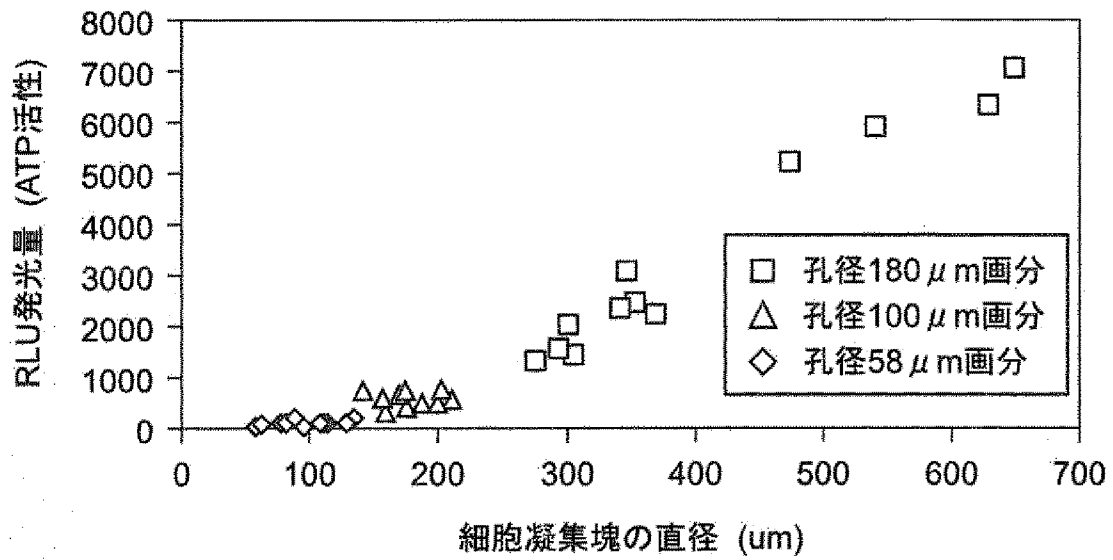
[図41]

図41



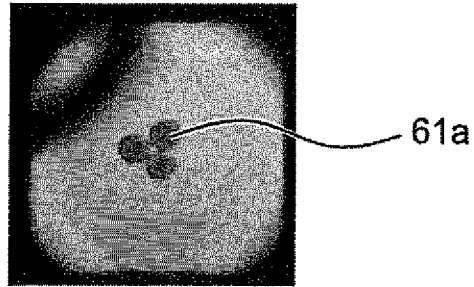
[図42]

図42



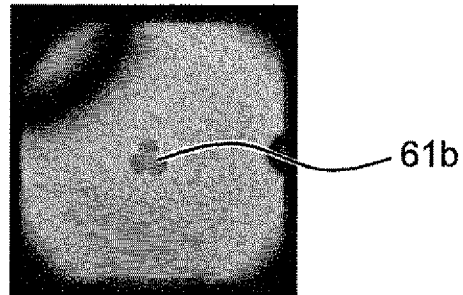
[図43]

図43



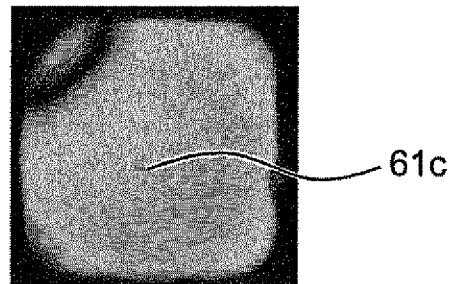
[図44]

図44



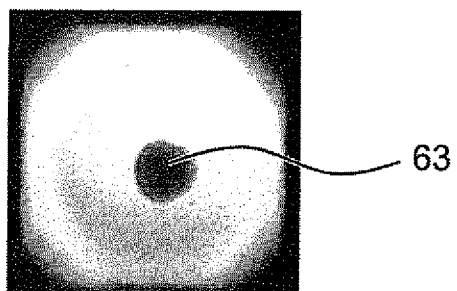
[図45]

図45



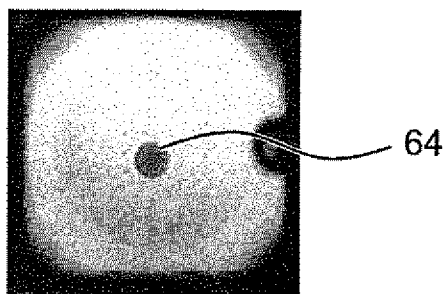
[図46]

図46



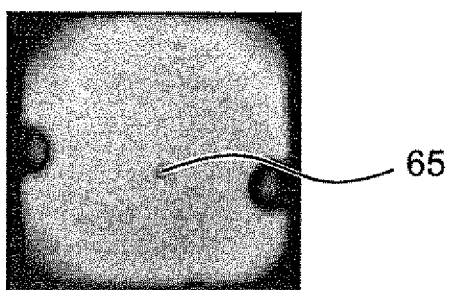
[図47]

図47



[図48]

図48



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/008145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
B03B5/00(2006.01)i, B01D39/20(2006.01)i, C12M3/06(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
B03B5/00, B01D39/20, C12M3/06, C12N5/00, G01N1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2017</i>
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2017</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2017</i>

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 DWPI (Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-233209 A (Furukawa Electric Advanced Engineering Co., Ltd.), 15 December 2014 (15.12.2014), claims; paragraphs [0030] to [0080]; drawings (Family: none)	1-22
Y	JP 2013-42689 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 04 March 2013 (04.03.2013), claims; paragraphs [0008] to [0019] & DE 202012003212 U & CN 202730123 U	1-22
Y	JP 2015-62400 A (National Institute of Radiological Sciences), 09 April 2015 (09.04.2015), claims; paragraphs [0018] to [0085]; drawings (Family: none)	10-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 March 2017 (24.03.17)	Date of mailing of the international search report 04 April 2017 (04.04.17)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/008145

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/002497 A1 (Kaneka Corp.), 05 January 2012 (05.01.2012), claims; paragraphs [0032] to [0094]; drawings & JP 5821847 B2 & US 2013/0109086 A1 claims; paragraphs [0047] to [0211]; drawings & EP 2589652 A1 & CN 102971411 A & KR 10-2013-0123366 A	11-15, 21-22
Y	JP 4-142441 A (Fujitsu Ltd.), 15 May 1992 (15.05.1992), claims; page 3, upper left column, line 1 to lower left column, line 11; drawings (Family: none)	13-15, 22
A	WO 2013/093954 A1 (Yamaha Motor Co., Ltd.), 27 June 2013 (27.06.2013), claims; examples; drawings & US 2014/0322747 A1 claims; examples; drawings & EP 2796540 A1 & CN 104011197 A & KR 10-2014-0102251 A & KR 10-2016-0114730 A	1-22
A	JP 2015-188316 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 02 November 2015 (02.11.2015), claims; examples; drawings (Family: none)	1-22
A	US 2003/0134416 A1 (YAMANISHI Douglas), 17 July 2003 (17.07.2003), claims; examples; drawings & WO 2003/031938 A2 & EP 1439897 A2 & EP 2156879 A2 & CA 2462914 A & AT 479490 T & DK 1439897 T & AU 2002334989 A	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. B03B5/00(2006.01)i, B01D39/20(2006.01)i, C12M3/06(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. B03B5/00, B01D39/20, C12M3/06, C12N5/00, G01N1/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2017年
 日本国実用新案登録公報 1996-2017年
 日本国登録実用新案公報 1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2014-233209 A (株式会社古河電工アドバンストエンジニアリング) 2014.12.15, 特許請求の範囲、段落【0030】～【0080】、 図面 (ファミリーなし)	1-22
Y	JP 2013-42689 A (日立化成株式会社) 2013.03.04, 特許請求の範囲、 段落【0008】～【0019】 & DE 202012003212 U & CN 202730123 U	1-22

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 24.03.2017	国際調査報告の発送日 04.04.2017
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 金 公彦	4Q	8925
	電話番号 03-3581-1101 内線 3468		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-62400 A (独立行政法人放射線医学総合研究所) 2015.04.09, 特許請求の範囲、段落【0018】～【0085】、図面 (ファミリーなし)	10-15
Y	WO 2012/002497 A1 (株式会社カネカ) 2012.01.05, 請求の範囲、段落[0032]～[0094]、図面 & JP 5821847 B2 & US 2013/0109086 A1, 特許請求の範囲, 段落 [0047] ～ [0211] , 図面 & EP 2589652 A1 & CN 102971411 A & KR 10-2013-0123366 A	11-15, 21-22
Y	JP 4-142441 A (富士通株式会社) 1992.05.15, 特許請求の範囲、第3ページ左上欄第1行～左下欄第11行、図面 (ファミリーなし)	13-15, 22
A	WO 2013/093954 A1 (ヤマハ発動機株式会社) 2013.06.27, 請求の範囲、実施例、図面 & US 2014/0322747 A1, 特許請求の範囲, 実施例, 図面 & EP 2796540 A1 & CN 104011197 A & KR 10-2014-0102251 A & KR 10-2016-0114730 A	1-22
A	JP 2015-188316 A (日立化成株式会社) 2015.11.02, 特許請求の範囲、実施例、図面 (ファミリーなし)	1-22
A	US 2003/0134416 A1 (YAMANISHI Douglas) 2003.07.17, 特許請求の範囲、実施例、図面 & WO 2003/031938 A2 & EP 1439897 A2 & EP 2156879 A2 & CA 2462914 A & AT 479490 T & DK 1439897 T & AU 2002334989 A	1-22