

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第6989907号

(P6989907)

(45)発行日 令和4年2月15日(2022.2.15)

(24)登録日 令和3年12月7日(2021.12.7)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 M	1/12 (2006.01)	C 1 2 M	1/12
C 1 2 M	1/26 (2006.01)	C 1 2 M	1/26
C 1 2 N	1/02 (2006.01)	C 1 2 N	1/02
B 0 1 D	63/02 (2006.01)	B 0 1 D	63/02
C 1 2 N	5/0784(2010.01)	C 1 2 N	5/0784

請求項の数 9 (全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2016-188166(P2016-188166)	(73)特許権者	596029111 米満 吉和 福岡県福岡市中央区警固 1 - 1 0 - 9 - 9 0 3
(22)出願日	平成28年9月27日(2016.9.27)	(73)特許権者	516061713 株式会社ガイアバイオメディシン 福岡県福岡市中央区警固 1 - 1 0 - 9 - 9 0 3
(65)公開番号	特開2018-50502(P2018-50502A)	(74)代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(43)公開日	平成30年4月5日(2018.4.5)	(72)発明者	原田 結 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号 国立大学法人九州大学内
審査請求日	令和1年7月26日(2019.7.26)	(72)発明者	米満 吉和 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 懸濁液を無菌的に処理するための器具

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

懸濁媒である液 A と懸濁質を含む懸濁液から液 A を無菌的に分離するための、少なくとも以下を備える器具：

- ・懸濁液から液 A を分離するための中空系型分離器であって、
中空系内側に通じる、懸濁液を通過させるための入口および出口、および
中空系外側に通じる、分離された液 A を排出するための少なくとも一つの排出口
を備える、中空系型分離器；
- ・前記中空系型分離器の入口に連結された、懸濁液を含むバッグを非滅菌環境において無菌的に接続するための、無菌接続コネクタ；
- ・前記中空系型分離器の排出口に連結された、分離された液 A を貯留するための排液バッグ；および
- ・前記中空系型分離器の入口または出口に連結された、液 A が分離された懸濁質を貯留するための回収バッグ
であって

懸濁質が静脈投与される治療用細胞であり、液 A が培養液であり；
前記中空系型分離器の中空系が、細胞懸濁液が通過可能な内径、および細胞と培養液を分離可能な孔径を有するものであり；
前記中空系型分離器の入口に連結された第一の液 B 入りバッグ、および前記中空系型分離器の出口に連結された第二の液 B 入りバッグを備え、液 B が液 A が分離された治療用細胞

を洗浄または回収するための静脈投与に適した液である、
細胞懸濁液の培養液を静脈投与に適した液に無菌的に置換するための器具。

【請求項 2】

さらに以下を備える、請求項 1 に記載の器具：

- ・前記中空系型分離器の出口を塞ぐための第一のクランプ、および
- ・前記中空系型分離器の排出口を塞ぐための第二のクランプ。

【請求項 3】

下記を含む、治療用細胞調製用キット：

- ・請求項 1 または 2 に記載の器具；および
- ・少なくとも一つの無菌接続コネクタを備える、保存液とともに有用細胞を含む、保存細胞入りバッグ。

10

【請求項 4】

さらに下記を含む、請求項 3 に記載のキット：

- ・細胞培養液を含む、培養液入りバッグ。

【請求項 5】

有用細胞が、樹状細胞、NK細胞、NK T細胞、活性化T細胞、およびCAR-T細胞からなる群より選択されるいずれかである、請求項 3 または 4 に記載のキット。

【請求項 6】

以下の工程を含む、懸濁媒である液 A と有用細胞を含む懸濁液から、液 A が無菌的に分離された有用細胞を調製する方法：

20

- (1) 請求項 1 または 2 に記載された器具の無菌接続コネクタに、懸濁液が保持された懸濁液入りバッグを無菌接続し；
- (2) 懸濁液を、前記中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた前記中空系型分離器に供給して液 A を分離し、このとき分離された液 A は排液バッグに貯留され、液 A が分離された有用細胞は中空系の内側に残留し；
- (3) 予め準備した液 B を、前記中空系型分離器の出口から、排出口が塞がれた前記中空系型分離器に供給して中空系内側の有用細胞を押し出し、回収バッグに貯留する。

【請求項 7】

以下の工程を含む、細胞懸濁液から、培養液が静脈投与に適した液に無菌的に置換された治療用細胞を調製する方法：

30

- (1) 請求項 1 または 2 に記載された器具の無菌接続コネクタに、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを無菌接続し；
- (2) 細胞懸濁液を、前記中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた前記中空系型分離器に供給して培養液を分離し、このとき分離された培養液は排液バッグに貯留され、培養液が分離された細胞は中空系の内側に残留し；
- (3) 第一の液 B 入りバッグから静脈投与に適した液を、出口が塞がれた前記中空系型分離器に供給して中空系内側に残留する培養液が分離された細胞を洗浄し；
- (4) 第二の液 B 入りバッグから静脈投与に適した液を、排出口が塞がれた前記中空系型分離器に供給して中空系内側の洗浄済細胞を押し出し、回収バッグに貯留する。

【請求項 8】

40

工程(1)の前に、さらに下記の工程を含む、請求項 7 に記載の調製方法：

- (0) 保存液とともに凍結された細胞を含む細胞保存バッグに、培養液を無菌的に加えて、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを得る。

【請求項 9】

細胞が、樹状細胞、NK細胞、NK T細胞、活性化T細胞、およびCAR-T細胞からなる群より選択されるいずれかである、請求項 8 に記載の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、粒子が液体中に分散した懸濁液の無菌的な処理、例えば細胞懸濁液の培養液を

50

無菌的に他の液に置換すること、に関する。本発明は、ライフサイエンス、医療、および治療用細胞の製造等の分野で有用である。

【背景技術】

【0002】

患者に投与することによりがん等の疾患の処置に用いられる治療用細胞の調製に際しては、多くの場合、まず生体から採取した細胞群から必要な細胞のみを分離することを要する。また、得られた細胞は、通常、体外で誘導、増殖、活性化等のための培養工程を経るが、患者への投与に際しては、培養液由来の成分を除去する必要がある。

【0003】

特許文献1は、血液から比重差選別によらず、吸引操作を用いて短時間で容易に幹細胞を含む白血球成分を濃縮する装置を提供することを課題としてなされたものであり、赤血球の変形能に着目し、微細孔を有する膜フィルタを用いて赤血球や血漿などを通過させ、白血球を含む成分を非ろ過成分として回収する手段を用いた幹細胞を含む白血球成分を濃縮する装置を提案する。この装置は、血漿バック - 白血球捕捉器 - 回収バックの径路によって、血漿を利用して逆洗して白血球を回収する白血球分画回収系回路を構成することができること、および血液を移送させる手段としてシリンジを回路中に設け、シリンジを駆動源として用いることにより装置を静置して用いることができ、上下反転等の姿勢変更が不要である旨が述べられている。

10

【0004】

また特許文献2は、簡便な方法で、短時間に、細胞をロスすることなく、細胞へ大きなダメージを与えることなく、細胞濃縮液を製造する方法として、細胞懸濁液入口、ろ液出口、細胞懸濁液出口、及び、前記細胞懸濁液入口と前記細胞懸濁液出口の間に配置された中空系型分離膜を備え、内圧ろ過方式である細胞懸濁液処理器を用いる細胞濃縮液の製造方法であって、前記中空系型分離膜の内側の孔の平均孔径が $0.1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ であり、かつ、ろ液の初期ろ過速度を中空系内を流れる細胞懸濁液の線速度で除した値が 2.5 以下である、細胞濃縮液の製造方法を提案する。そしてこの方法によれば、懸濁液中の細胞以外の蛋白質などの夾雑物を取り除きつつ、高効率に細胞を回収でき、中空系における細胞の目詰まりを低減しながら細胞濃縮液を製造できる旨を述べている。そして、細胞の負荷となるような膜の逆洗浄による目詰まりの抑制方法等を使用しないので、細胞へのダメージが少なくなり、細胞生存率が高くなること、また、無菌的な閉鎖系で処理することが可能なので、濃縮された細胞は細胞治療用として提供できることが述べられている。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特開2012-139112号公報(特許第5785713号)

国際公開WO2013/061859

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

治療用の細胞を調製するためには、効率のみならず、品質および安全性の確保の面からの検討も必要である。また特殊な設備を要さず、一般の医療施設の現場で簡便な操作により効率よく調製することができれば、当該医療を享受できる患者数の飛躍的な増加が期待できる。本発明者らは、再生医療等製品(細胞治療、遺伝子治療)の製造に関わる技術の研究・開発を重ね、実用可能なNK細胞GMP製造技術の確立に至り、最終製剤設計を進めてきた。その中で、完全閉鎖系による操作の重要性に着目するに至った。

40

【0007】

高活性NK細胞はその活性を維持したまま凍結/融解することができないため、凍結した状態で輸送されたNK細胞は、患者への投与の前に、まず再活性化のための培養工程を要する。この培養工程は無菌的に行う必要がある。次いで培養された細胞から培養液成分を除去し、得られた細胞を、点滴投与に適したラクトリンゲル液等に適切な細胞濃度で再懸

50

濁しなけなければならない。培養液の除去は、遠心分離技術により、細胞を遠心管中で沈降させ、上清である培養液を除去することにより行えるが、作業を無菌的に行う必要から、クリーンルーム内での実施を要し、特別な設備と熟練した技術者を擁する施設でなければ、患者に投与するための細胞が調製できないという問題があった。

【 0 0 0 8 】

凍結された細胞を培養し、また治療に際しては培養した細胞から培養液を除去し、必要に応じ洗浄や点滴液に懸濁する操作を完全閉鎖回路で行うことができれば、治療用細胞としての安全性がより高まることに加え、一般の医療施設のような非滅菌環境下でも対応することができる。

【 0 0 0 9 】

また細胞培養液のみならず、懸濁液を無菌的に処理できる簡易なシステムがあれば、治療用細胞の調製以外にも種々の場面への適用が期待できる。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、細胞のような粒子を含む懸濁液から懸濁媒を無菌的に除去するような処理を行う方法について鋭意検討した。その結果、中空系型のフィルタを用い、懸濁液を中空系内を通過させることにより懸濁質である粒子から懸濁媒である液体部分を効率よく除去することができ、またこのような中空系を用いたシステムは、完全閉鎖系であり、かつ送液のための電動のポンプも要さない実用に適した回路として構成することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 1 1 】

本発明は、以下を提供する。

[1] 懸濁媒である液 A と懸濁質を含む懸濁液から液 A を無菌的に分離するための、少なくとも以下を備える器具：

・懸濁液から液 A を分離するための中空系型分離器であって、

中空系内側に通じる、懸濁液を通過させるための入口および出口、および

中空系外側に通じる、分離された液 A を排出するための少なくとも一つの排出口

を備える、中空系型分離器；

・中空系型分離器の入口に連結された、懸濁液を含むバッグを非滅菌環境において無菌的に接続するための、無菌接続コネクタ；

・中空系型分離器の排出口に連結された、分離された液 A を貯留するための排液バッグ；および

・中空系型分離器の入口または出口に連結された、液 A が分離された懸濁媒を貯留するための回収バッグ。

[2] さらに以下を備える、1 に記載の器具：

・中空系型分離器の入口または出口に連結された、懸濁媒が分離された懸濁質を洗浄または回収するための液 B を含む、少なくとも一つの液 B 入りバッグ。

[3] 液 B 入りバッグを 2 つ備える、2 に記載の器具。

[4] 第一の液 B 入りバッグが中空系型分離器の入口に連結されており、第二の液 B 入りバッグが中空系型分離器の出口に連結されている、2 または 3 に記載の器具。

[5] さらに以下を備える、1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の器具：

・中空系型分離器の出口を塞ぐための第一のクランプ、および

・中空系型分離器の排出口を塞ぐための第二のクランプ。

[6] 懸濁質が細胞であり、液 A が培養液である細胞懸濁液から培養液を無菌的に分離するための器具であり；

中空系型分離器の中空系が、細胞懸濁液が通過可能な内径、および細胞と培養液を分離可能な孔径を有するものである、1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の器具。

[7] 細胞が静脈投与される治療用細胞であり、細胞懸濁液の培養液を静脈投与に適した液に無菌的に置換するための器具であり；

中空系型分離器の入口に連結された第一の液 B 入りバッグ、および中空系型分離器の出口

10

20

30

40

50

に連結された第二の液 B 入りバッグを備え、液 B が静脈投与に適した液である、6 に記載の器具。

[8] 下記を含む、治療用細胞調製用キット：

・ 7 に記載の器具；および

・ 少なくとも一つの無菌接続コネクタを備える、保存液とともに有用細胞を含む、保存細胞入りバッグ。

[9] さらに下記を含む、8 に記載のキット：

・ 細胞培養液を含む、培養液入りバッグ。

[10] 有用細胞が、樹状細胞、NK細胞、NK T細胞、活性化T細胞、およびCAR-T細胞からなる群より選択されるいずれかである、8 または 9 に記載のキット。

10

[11] 以下の工程を含む、懸濁媒である液 A と有用細胞を含む懸濁液から、液 A が無菌的に分離された有用細胞を調製する方法：

(1) 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載された器具の無菌接続コネクタに、懸濁液が保持された懸濁液入りバッグを無菌接続し；

(2) 懸濁液を、中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して液 A を分離し、このとき分離された液 A は排液バッグに貯留され、液 A が分離された有用細胞は中空系の内側に残留し；

(3) 予め準備した液 B を、中空系型分離器の出口から、排出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側の有用細胞を押し出し、回収バッグに貯留する。

[12] 以下の工程を含む、細胞懸濁液から、培養液が静脈投与に適した液に無菌的に置換された治療用細胞を調製する方法：

20

(1) 7 に記載された器具の無菌接続コネクタに、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを無菌接続し；

(2) 細胞懸濁液を、中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して培養液を分離し、このとき分離された培養液は排液バッグに貯留され、培養液が分離された細胞は中空系の内側に残留し；

(3) 第一の液 B 入りバッグから静脈投与に適した液を、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側に残留する培養液が分離された細胞を洗浄し；

(4) 第二の液 B 入りバッグから静脈投与に適した液を、排出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側の洗浄済細胞を押し出し、回収バッグに貯留する。

30

[13] 工程(1)の前に、さらに下記の工程を含む、12 に記載の調製方法：

(0) 保存液とともに凍結された細胞を含む細胞保存バッグに、培養液を無菌的に加えて、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを得る。

[14] 細胞が、樹状細胞、NK細胞、NK T細胞、活性化T細胞、およびCAR-T細胞からなる群より選択されるいずれかである、13 に記載の調製方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明により、非滅菌環境下であっても無菌的に、懸濁液からの懸濁媒の除去、懸濁質の洗浄、懸濁質の別の懸濁媒への再懸濁等の処理を行うことができる。また本発明により、電動の機械を用いずに、当該処理を行うことができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の器具、およびキットの例

【図2】本発明の器具による処理時の例

【図3】細胞導入時および細胞回収時を示す図

【図4】回収率のグラフ

【発明を実施するための形態】

【0014】

数値範囲「X ~ Y」は、特に記載した場合を除き、両端の数値 X および Y を含む。「A および / または B」は、特に記載した場合を除き、A および B のうちのすくなくとも一方の

50

意である。調製方法は製造方法と言い換えることができる。

【 0 0 1 5 】

< 処理の対象となる懸濁液、懸濁質、懸濁媒（液 A ） >

本発明の器具により、種々の懸濁液を処理することができる。懸濁液とは、固体が液体中に分散した状態のものをいい、懸濁質（固形の分散質）と、懸濁媒（液体である分散媒）を含む。分散は、均一でなくてもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の器具は、懸濁媒である液 A と懸濁質を含む懸濁液から液 A を無菌的に分離するために用いられる。懸濁質は、種々の種類、形状およびサイズの粒子であり得、特に限定されないが、本発明は、医薬、化粧品、または食品として許容される粒子、例えば、DDS として用いられる高分子ミセルによるナノ粒子、化粧品に用いられる粉体、培養細胞、治療用細胞等に好ましく適用することができる。特に好ましい例は、浮遊性の動物細胞（以下、動物細胞を、単に「細胞」ということがある。）であり、さらに好ましい例は、ヒトまたは非ヒト動物における疾患または状態の処置（予防、治療等）に用いられる細胞（治療用細胞）である。なお、以下では本発明、およびその実施態様を、本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合を例に説明することができるが、当業者であれば、その説明を適宜、他の場合にも当てはめて本発明を理解することができる。

【 0 0 1 7 】

懸濁媒である液 A は、懸濁質に応じた様々な種類の液体であり得る。懸濁質が浮遊性の細胞であるとき、液 A は、例えば、細胞を保存するための液、または培養液である。細胞を保存するための液の例は、必要に応じ、細胞を凍結障害から保護するための成分、例えば DMSO、グリセロール、血清等を含む、培養液である。培養液は、細胞の種類に応じて、例えば、動物細胞培養用の基礎培地として知られる、DMEM、EMEM、RPMI - 1640、 α -MEM、F - 12、F - 10、M - 199 等の中から、適宜選択して用いることができる。培養液は、細胞の増殖、分化・誘導、活性化のための成分を含んでもよい。このような成分には、血清、サイトカイン、増殖因子、ホルモンが含まれ、具体的には、インスリン、トランスフェリン、血清アルブミン、IL - 2 等である。

【 0 0 1 8 】

懸濁液、および液 A の量は、目的に応じて適宜とすることができる。本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合、懸濁液は $10^7 \sim 10^9$ オーダーの数の細胞を含んでいる場合があり、液量としては、10 mL ~ 1 L であり得る。

【 0 0 1 9 】

< 器具、キット >

本発明は、懸濁媒である液 A と懸濁質を含む懸濁液から液 A を無菌的に分離するための、少なくとも以下を備える器具を提供する：

・ 懸濁液から液 A を分離するための中空系型分離器であって、

中空系外側に通じる、分離された液 A を排出するための少なくとも一つの排出口、および中空系内側に通じる、懸濁液を通過させるための入口および出口

を備える、中空系型分離器；

・ 中空系型分離器の入口に連結された、懸濁液を含むバッグを非滅菌環境において無菌的に接続するための、無菌接続コネクタ；

・ 中空系型分離器の排出口に連結された、分離された液 A を貯留するための排液バッグ；

・ 中空系型分離器の入口または出口に連結された、液 A が分離された懸濁媒を貯留するための回収バッグ。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、下記 A 部および B 部を含む、治療用細胞調製用のキットを提供する：

A 部：本発明の器具からなる部分

B 部：少なくとも一つの無菌接続コネクタ（4 a、9 a）を備える、保存液や培養液とともに有用細胞を含む、細胞懸濁液入りバッグ（7）からなる部分

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

50

キットはさらに、下記C部を含むことができる。

C部：細胞培養液を含む、培養液入りバッグ（8）からなる部分。

【0022】

本発明の器具、およびキットの例を、図1に示した。本発明の器具（A部）は、少なくとも、中空系型分離器（1）、中空系型分離器の排出口に連結された、排液バッグ（2）、中空系型分離器の入口または出口に連結された、回収バッグ（3）、中空系型分離器の入口に連結された無菌接続コネクタ（4b）を含むが、図1に示した態様においては、さらに中空系型分離器（1）の出口（12）に連結された液B入りバッグ（5）と、中空系型分離器（1）の入口（11）に連結された液B入りバッグ（6）を備えている。図1には、他に、B部として、無菌接続コネクタ（4a、9a）を備える、懸濁液入りバッグ（7）と、C部として無菌接続コネクタ（9b）を備え、懸濁液入りバッグ（7）に加えるための液が入ったバッグ（8）が示されている。以下では、必要に応じ、図1を参照し、図1中に示された符号を括弧内で引用しつつ、本発明、およびその実施態様を説明する。

10

【0023】

[中空系型分離器]

本発明の器具は、中空系型分離器（1）を備える。中空系型分離器とは、中空系型分離膜（単に、中空系ということもある。ストロー状であり、壁面に無数の孔がある膜。）を使用し、分離、または分離能に基づく濃縮、分子ふるい、透析、液交換等の目的のために用いるものをいう。中空系型分離器は、典型的には、図2の上図および下図の中央に示されるものである。中空系型分離器は、ストレートな胴部とその両側のヘッダー部からなり、ヘッダー部は、中空系内側に通じる入口（11）および出口（12）を備え、胴部は、中空系外側に通じる少なくとも一つの排出口（13、14）を備える。本発明における中空系型分離器の胴部は、当業者によく知られているように、内部に中空系を数十本から数千本程度束ねたものが充填されており、束を容器内部に固定するとともに、中空系の開口端を形成する樹脂層部を備える。そのため中空系内側に通じる入口および出口と、排出口が中空系型分離膜により隔てられた構造となっている。

20

【0024】

本発明においては、中空系型分離器の中空系内側を懸濁液が流れ、中空系の外側に懸濁液（液A）がろ過され、懸濁質から懸濁媒が除去される。中空系型分離器をこのように用いることにより、膜面における懸濁液の流速が十分に速く、またクロスフロー（タンジェンシャルフローともいう。）効果により懸濁質が膜面に付着しにくい。そのため高い圧力負担を要せずに懸濁液を迅速に除去することができ、懸濁質へのダメージが少なく、かつ懸濁質を高濃度にまで濃縮できる。

30

【0025】

中空系型分離器に用いられる中空系は、懸濁質が通過可能な内径、および懸濁質と懸濁液（液A）を分離可能な孔径を有するものである。懸濁質が細胞である場合、内径は0.03mm以上とすることができ、0.1mm以上であることが好ましく、0.3mm以上であることがより好ましい。内径の上限値は特に限定されないが、径の小さい中空系が多く存在することにより処理のための膜面積が大きくなり、効率的に分離が行えるとの観点からは、例えば2mm以下のものを用いることができ、1mm以下のものを用いることが好ましい。

40

【0026】

懸濁質が細胞である場合、孔径（ポアサイズということもある。）は、細胞より小さければよい。例えば、0.05 μ m以上10 μ m以下とすることができ、0.1 μ m以上5 μ m以下であることが好ましく、0.15 μ m以上1 μ m以下であることがより好ましい。孔径が小さすぎると、十分なる過速度が得られない。また10 μ mを超えると、処理する細胞が孔に入りこむことで、細胞の回収率が低下する可能性がある。

【0027】

中空系の孔径は、対象とする細胞が適切に処理できるサイズ、すなわち細胞と通過させずに懸濁液（液A）をろ過できるサイズであればよいので、中空系型分離器として既存のも

50

のをを用いる場合は、マイクロフロー（MF）型といわれる孔径の比較的大きい中空系を用いたものか、またはウルトラフロー（UF）型といわれる分子分画能を有する中空系のうち、孔径が比較的大きい（分画分子量が比較的大きい）中空系を用いたものを選択するとよい。UF型を選択する場合、分画分子量が、除去したいと考える成分（例えば、培養液成分、細胞の増殖、分化・誘導、活性化のためのインスリン、トランスフェリン、血清アルブミン、IL-2成分）を通過させるのに十分な大きさであるものを選択するとよい。中空系型分離器として既存のものを用いる場合、製造者が表示する公称の孔径サイズに基づき、選択することができる。あるいは、中空系の孔径として、走査型電子顕微鏡観察において計測される20個の孔の直径（楕円の場合は長径）を平均したものを基準としてもよい。

10

【0028】

中空系型分離器の中空系の内側には、効率的に十分な処理が行えるとの観点からは、処理しようとする懸濁液に含まれる懸濁質をすべて格納できることが好ましい。本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合、1回で処理される細胞数は、 $\sim 2 \times 10^9$ 個であると考えられるので、この量を格納することができる中空系内側総容積を有する中空系型分離器を選択するとよい。中空系内側総容積は、次の式で計算することができる。中空系内側総容積（mL、または cm^3 ）= [中空系内径（cm）/ 2]² × π × 中空系長さ（cm）× 中空系本数（本）

【0029】

中空系型分離器は、その処理量を表す指標として、膜面積が表示される場合がある。中空系型分離膜の膜面積は、通常、次の式で計算される。

20

膜面積（ cm^2 ）= 中空系内径（cm）× π × 中空系長さ（cm）× 系本数

【0030】

本発明者らの検討によると、内径0.7mm、孔径0.25 μm の中空系を用いた膜面積150 cm^2 の中空系型分離器により、 1×10^7 個の細胞の処理を好適に行うことができた。また、この中空系型分離器の中空系内側総容積は約2.6mLと計算されるので、培養液を分離することにより細胞密度を $\sim 8 \times 10^8$ 個/mL程度にまで濃縮することができる。すると、中空系内部に $\sim 2.0 \times 10^9$ 個の細胞を格納することができる。

【0031】

したがって、 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^9$ 個の細胞を処理するためには、膜面積が10 $\text{cm}^2 \sim 20,000 \text{cm}^2$ の中空系型分離器を用いることにより、好適に処理することができる。

30

膜面積がある程度大きい分離器を用いることにより、十分な分離が達成できる一方で、膜面積が一定値以下の分離器を用いることにより、細胞の回収率の低下やコストを抑えることができる。

【0032】

中空系の素材は、目的の分離を行うことができる限り、特に限定されないが、滅菌に耐える素材であることが好ましい。また、治療用の細胞の処理に用いる場合は、医療用具として許容される素材であることが好ましい。具体的には、ポリオレフィン系またはポリスルホン系の高分子材料であることが好ましく、より特定すると、ポリエチレン（PE）、ポリスルホン（PS）、ポリエーテルスルホン（PES）、修飾ポリエーテルスルホン（mPES）、混合セルロースエステル（ME）であることがより好ましい。

40

【0033】

なお、本発明に関し、滅菌というときは、手段は特に限定されず、オートクレーブや煮沸のような熱滅菌、酸化エチレンガスや過酸化水素ガスのような殺菌性のガスによるガス滅菌、紫外線、線、または電子線等による照射滅菌を例示することができる。好ましくは、医療用具の滅菌手段として許容されるものがよい。

【0034】

中空系型分離器の胴部およびヘッダー部の素材は、目的の分離が行える限り、特に限定されないが、分離が目視で確認できるように透明であり、かつ滅菌に耐える素材であること

50

が好ましい。具体的にはポリスルホン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリメチルペンテン、またはポリスチレン等のブロック共重合体であることが好ましい。中空系型分離膜を固定する樹脂層部の素材も、目的の分離が行える限り、特に限定されないが、滅菌に耐える素材であることが好ましい。具体的には、ポリウレタン樹脂、エポキシ樹脂、またはシリコーン樹脂であることが好ましい。

【0035】

中空系型分離器により、懸濁媒である液Aと懸濁質を含む懸濁液から液Aを分離することができる。本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合、液Aは通常、細胞の増殖、分化・誘導、活性化のための成分を含む培養液であるが、このような成分は、患者に投与する際には十分に除去されていることが好ましい。本発明においては、中空系型分離器を用いることにより、このような成分を、治療用細胞から十分に除去することができる。

10

【0036】

[バッグ]

本発明の器具は、中空系型分離器(1)の排出口(13、14)に連結された、分離された液Aを貯留するための排液バッグ(2)、および中空系型分離器の入口(11)または出口(12)に連結された、液Aが分離された懸濁質を貯留するための回収バッグ(3)を備える。回収バッグ(3)は、本発明の器具が点滴により静脈投与される治療用細胞の処理のために用いるものである場合は、点滴に適したもの(点滴用バッグ)とすることができる。

20

【0037】

回収バッグ(3)は、中空系型分離器(1)の入口(11)または出口(12)に連結されるが、後述する、1つの液B入りバッグ(5)とは、中空系型分離器(1)を挟んで、逆の側に連結されることが好ましい。すなわち、中空系型分離器(1)の入口(11)に回収バッグ(3)が連結される場合は、中空系型分離器(1)の出口(12)に少なくとも1つの液B入りバッグ(5)が連結され、中空系型分離器(1)の出口(12)に回収バッグ(3)が連結される場合は、中空系培養器(1)の入口(11)に少なくとも1つの液B入りバッグ(5)が連結されることが好ましい。このような構成とすることにより、液Bを中空系型分離器(1)内の液Aが分離された懸濁質を押し出すようにして、回収用バッグ(3)に懸濁質を貯留することができるからである。回収バッグ(3)はまた、三方活栓(iv)等の流路の切り替え可能な接続部を介して連結されていることが好ましい。

30

【0038】

本発明の器具は、排液バッグ(2)、および回収バッグ(3)のほか、中空系型分離器(1)の入口(11)または出口(12)に連結された、懸濁媒が分離された懸濁質を洗浄または回収するための液Bを含む、少なくとも1つの(例えば2つの)液B入りバッグ(5、6)を備えていてもよい。あるいは、液B入りバッグを容易に接続するための少なくとも1つの(例えば2つの)コネクタを備えていてもよい。コネクタは、非滅菌環境において無菌的に接続するための、無菌接続コネクタとすることができる。中空系型分離器(1)、排液バッグ(2)、および回収バッグ(3)を連結した部分と、液B入りバッグ(5、6)とは、それぞれに適した滅菌手段により別個に滅菌した後に、無菌的に接続することができる。

40

【0039】

液Bは、懸濁質を洗浄するため、および/または液Aと置換し、懸濁質を再懸濁するために用いられる液である。液Bとしては、目的に応じ、種々の液を選択しうるが、本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合、細胞の洗浄のための液Bとしては、緩衝効果のあるリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline; PBS)、トリス緩衝生理食塩水(Tris Buffered Saline; TBS)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES Buffered Saline)、生理食得水、リンゲル液(乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液等)、5%グルコース水溶液等を用いることができる。点滴のために細胞

50

を再懸濁するためには、点滴するのに許容される液が用いられる。このような液の例は、リンゲル液（乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液等）、生理食得水、5%グルコース水溶液等である。

【0040】

液Bの量は、洗浄、点滴のための再懸濁等、液Bの使用目的に応じて適宜とすることができるが、通常、中空系型分離器で処理される懸濁液または液Aの0.5~4倍程である。

【0041】

好ましい態様においては、液B入りバッグ（5、6）を2つ以上備え、少なくとも1つを中空系型分離器（1）の入口（11）に連結し、少なくとも1つを出口（12）に連結し、一方を懸濁質の洗浄のために用い、他方を回収、および再懸濁のために用いる。洗浄ための液Bと回収・再懸濁のための液Bを分けることにより、十分な量で洗浄を行うことができ、また正確な量の液Bに懸濁質を再懸濁した状態で、回収することができる。また、このような構成により、洗浄のための送液と回収のための送液を逆方向に行うことになり、回収率が高くなるのが期待できるほか、器具全体においてチューブの接続箇所を少なくすることができ、器具の製造上のメリットがある。中空系型分離器の入口側に連結される液B入りバッグ（6）は、三方活栓（v）等の流路の切り替え可能な接続部を介して連結されていることが好ましい。

10

【0042】

それぞれのバッグの個数、タイプ（型）、および容量は、特に限定されず、分離される液Aの量、貯留される懸濁質の量、必要な液Bの量等に応じて、適宜とすることができる。例えば、ピロー型バッグ、円筒タンク型バッグ、コンテナタンク型バッグ、角型タンク型バッグ等を用いることができ、50mL、100mL、200mL、300mL、500mL、1L、5L、10L、20L、50L等の容量のものを適宜使用することができる。治療用細胞の処理のためには、排液バッグは、50mL~5Lの容量のものを選択することができ、回収バッグは、点滴に適した容量、例えば50mL~1L程度の容量のものを選択することができる。また、液B入りバッグは、例えば50mL~1L程度の容量のものを選択することができる。

20

【0043】

バッグの素材は、バッグに圧力を加えて変形させ、内容物を押し出すことができるよう軟質樹脂材料であれば、特に限定されないが、液の移動や貯留が目視で確認できるように透明または半透明であり、かつ滅菌に耐える素材であることが好ましい。具体的には、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブタジエン、エチレン・酢酸ビニル共重合体（EVA）、エチレン・ビニルアルコール共重合樹脂（EVOH）、ポリ塩化ビニル（塩ビ）等が例示できる。バッグの素材はまた、環境に配慮して、ハロゲン系素材でなく、また可塑剤DEHPを使用しないものがより好ましい。本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合、バッグは、医療用具として認められたものであることが好ましい。

30

【0044】

[無菌接続コネクタ]

本発明の器具は、中空系型分離器（1）の入口（12）に連結された、懸濁液を含むバッグを非滅菌環境において無菌的に接続するための、無菌接続コネクタ（4b）を備える。非滅菌環境とは、クリーンルームのような特別な施設内ではない通常のオープンな環境、例えば、病院や医院の診察室、病室、研究室、家庭等を指す。

40

【0045】

無菌接続コネクタ（4b）は、無菌接続装置のような特別な機械を要さず、2つのチューブを、チューブ内を外部雰囲気曝露することなく接続できるものをいい、市販のものを利用することができる。無菌接続コネクタ（4b）は、例えば、ポール社のMedlockコネクタ、およびKleenpak（登録商標）コネクタ、ザルトリウムステディムバイオテック社のOpta（登録商標）STF-Iコネクタ、ミリポア社のLynx（登録商標）STコネクタ、コールダープロダクツ社のAseptiQuik（登録商標）コネクタのような、2つの部品からなる無菌接続コネクタの一方であることができる。

50

【 0 0 4 6 】

無菌接続コネクタ（４ｂ）は、目的の接続を行うことができるものである限り、特に限定されないが、バッグ等の他のパーツに適した滅菌に耐える素材であることが好ましい。無菌接続コネクタ（４ｂ）の素材は、例えば、ポリカーボネート、シリコーンゴム、ポリエチレン、ポリエチルスルホンとすることができる。

【 0 0 4 7 】

〔チューブ〕

本発明の器具においては、中空系型分離器、各バッグ、および無菌接続コネクタ等のパーツは、液密（水が漏れない状態）に連結されており、連結には、チューブを用いることができる。

10

【 0 0 4 8 】

チューブの素材は、中空系型分離器、バッグ、コネクタを液密に連結できる軟質樹脂材料であれば、特に限定されないが、必要に応じそれらの素材とともに滅菌することができ、液の移動が目視で確認できるように透明、または半透明であることが好ましい。具体的には、ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン-プロピレン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体（EVA）等のポリオレフィン、ポリスチレン、ポリアミド、ポリイミド、ポリ-（４-メチルペンテン-１）、アイオノマー、アクリル系樹脂、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリブチレンテレフタレート（PBT）等のポリエステル、スチレン系、ポリオレフィン系、ポリ塩化ビニル系、ポリウレタン系、ポリエステル系、ポリアミド系等の各種熱可塑性エラストマー、シリコーン樹脂、ポリウレタン等、またはこれらを主とする共重合体、ブレンド体、ポリマーアロイが挙げられる。

20

【 0 0 4 9 】

〔他のパーツ〕

本発明の器具は、上記の中空系型分離器、バッグ、および無菌接続コネクタ以外に、必要に応じ各種の部材を備えていてもよい。例えば、クランプ、サンプリングポート、活栓、クレープコネクタ等である。

【 0 0 5 0 】

好ましい態様においては、中空系型分離器（１）の出口（１２）を塞ぐための第一のクランプ（i）、および中空系型分離器の排出口を塞ぐための第二のクランプ（ii、iii）を備える。第二のクランプ（ii、iii）は、排出口が複数ある場合はそれぞれを塞ぐために複数備えることができる。また本発明の器具は、流路を切り替えるため、または流路を分枝させるために、三方活性（vi、v）を適所に備えていてもよい。

30

【 0 0 5 1 】

〔B部〕

懸濁媒である液Aと懸濁質を含む懸濁液は、本発明の器具により処理される前は、懸濁液を含むバッグ（７）に収納された形態とすることができる。本発明により提供されるキットは、上述の器具からなるA部のほか、B部として、このような懸濁液を含むバッグ（７）からなる部分を含む。懸濁液を含むバッグ（７）は、本発明の器具に無菌的に接続するための無菌接続コネクタ（４a）を備えていることが好ましい。懸濁液を含むバッグ（７）はまた、他の溶液を含むバッグ（８）に無菌的に接続するための更なる無菌接続コネクタ（9a）を備えていてもよい。

40

【 0 0 5 2 】

〔C部〕

本発明のキットは、他の溶液を含むバッグ（８）を含んでいてもよい。他の溶液を含むバッグ（８）は、懸濁液を含むバッグ（７）に無菌的に接続するための無菌接続コネクタ（9b）を備えていることが好ましい。本発明の器具が治療用細胞を処理するためのものである場合、バッグに含まれる他の溶液の例は、治療用細胞を培養し、活性化するための成分を含む液であり、具体的には、上述した培養液に、細胞の増殖、分化・誘導、活性化のための成分（例えば、血清、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、具体的には、インスリン、トランスフェリン、血清アルブミン、IL-2等）を含んだものである。

50

【 0 0 5 3 】

キットにおいては、A部、B部、およびC部に分割されているために、使用直前まで、それぞれを適温に保つことができる。例えば、A部は常温保存し、B部は凍結保存し、およびC部は冷蔵保存することができる。

【 0 0 5 4 】

キットはまた、A部、B部、およびC部以外に、他のものを含んでもよい。例えば、A部、B部、およびC部の接続方法、使用手順、注意事項等の情報を記録した媒体を含んでもよい。

【 0 0 5 5 】

< 有用細胞の調製方法 >

本発明はまた、以下の工程を含む、懸濁媒である液Aと有用細胞を含む懸濁液から、液Aが無菌的に分離された有用細胞を調製する方法を提供する：

・中空系型分離器（中空系内側に通じる、懸濁液を通過させるための入口および出口、および中空系外側に通じる、分離された液Aを排出するための少なくとも一つの排出口を備える。）の入口から、懸濁液を、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して液Aを分離し、分離された液Aを排出口から排出させ、液Aが分離された有用細胞を中空系の内側に残留させ；

・予め準備した液Bを、中空系型分離器の出口から、排出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側に残留された有用細胞を押し出し、有用細胞を回収する。

あるいは、以下の工程を含む、懸濁媒である液Aと有用細胞を含む懸濁液から、液Aが無菌的に分離された有用細胞を調製する方法を提供する：

(1) 上述の本発明の器具の無菌接続コネクタに、懸濁液が保持された懸濁液入りバッグを無菌接続し；

(2) 懸濁液を、中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して液Aを分離し、このとき分離された液Aは排液バッグに貯留され、液Aが分離された有用細胞は中空系の内側に残留し；

(3) 予め準備した液Bを、中空系型分離器の出口から、排出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側の有用細胞を押し出し、回収バッグに貯留する。

【 0 0 5 6 】

有用細胞の例は、ヒトまたは非ヒト動物における疾患または状態の処置（予防、治療等）に用いられる細胞（治療用細胞）である。すなわち本願は、以下の工程(1)~(3)を含む、細胞懸濁液から、培養液が静脈投与に適した液に無菌的に置換された治療用細胞を調製する方法も提供する：

(1) 上述の本発明の器具の無菌接続コネクタに、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを無菌接続し；

(2-1) 細胞懸濁液を、中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して培養液を分離し、このとき分離された培養液は排液バッグに貯留され、培養液が分離された細胞は中空系の内側に残留し；

(2-2) 第一の液B入りバッグから静脈投与に適した液を、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側に残留する培養液が分離された細胞を洗浄し；

(3) 第二の液B入りバッグから静脈投与に適した液を、排出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側の洗浄済細胞を押し出し、回収バッグに貯留する。

【 0 0 5 7 】

工程(1)の前には、さらに下記の工程を含むことができる：

(0) 保存液とともに凍結された細胞を含む細胞保存バッグに、培養液を無菌的に加えて、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを得る。

【 0 0 5 8 】

図2に、本発明の有用細胞の調製方法を実施する際の、本発明の器具の使用時の例を示した。以下では、必要に応じ、図2を参照し、図2中に示された符号を括弧内で引用しつつ、本発明、およびその実施態様を説明する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

工程(1)は、本発明の器具の無菌接続コネクタに、細胞懸濁液が保持された細胞懸濁液入りバッグを無菌接続する工程である。具体的には、細胞懸濁液入りバッグ(7)を無菌接続コネクタ(4a)を利用し、無菌接続コネクタ(4b)を備える器具と連結し、器具による処理を開始する。

【 0 0 6 0 】

工程(2)は、細胞懸濁液を、中空系型分離器の入口から、出口が塞がれた中空系型分離器に供給して培養液を分離する工程である。具体的には、三方活栓(i v、v)を適切に設定した状態で、細胞懸濁液入りバッグ(7)を加圧し、懸濁液を中空系型分離器の入口から中空系型分離器に供給する。このとき、中空系型分離器の出口に連結した流路を第一のクランプ(i)で塞いでおくことにより、懸濁媒である液Aの少なくとも一部が中空系膜を通過し、中空系型分離器(1)の排出口(13、14)を通して排液バッグ(2)に貯留される。一方、液Aの少なくとも一部が分離された細胞は、中空系の内側に残留する。

10

【 0 0 6 1 】

工程(2)の後、工程(3)の前に、細胞の洗浄のための工程を実施してもよい。具体的には、三方活栓(i v)を切り替え、液B入りバッグ(6)を加圧し、液Bを中空系型分離器の入口から中空系型分離器に供給することにより、液Bで中空系の内側に残留する細胞を洗浄する。液Bは中空系膜を通過し、中空系型分離器(1)の排出口(13、14)を通して排液バッグ(2)に貯留される。

【 0 0 6 2 】

工程(3)は、液Bを、中空系型分離器の出口から、排出口が塞がれた中空系型分離器に供給して中空系内側の有用細胞を押し出し、回収バッグに貯留する工程である。具体的には、第一のクランプ(i)を解除し、三方活栓(v)を切り替え、液B入りバッグ(5)を加圧して液Bを中空系型分離器の出口から中空系型分離器に供給する。このとき、中空系型分離器の排出口(13、14)に連結した流路を第二のクランプ(i i、i i i)で塞いでおくことにより、中空系の内側の細胞が液Bで押し出され、中空系型分離器(1)の出口(11)を通過して、回収バッグ(3)に貯留される。回収バッグ(3)に貯留された細胞懸濁液は、懸濁媒が液Aから液Bに置換されている。

20

【 0 0 6 3 】

治療用細胞を調製する場合、懸濁液を含むバッグ(7)は、治療用細胞を含み、保存や輸送のために凍結されており、患者のいる医療施設において、投与前に解凍し、再度、細胞を培養し、活性化等の処理をする場合がある。このような場合、工程(1)の前に、保存液とともに凍結された細胞を含む細胞保存バッグに、培養液を無菌的に加える工程(0)を実施することができる。具体的には、懸濁液を含むバッグ(7)を培養・活性化のための溶液を含むバッグ(8)に無菌接続コネクタ(9a、9b)を利用して無菌的に接続し、培養・活性化のための溶液を懸濁液を含むバッグに導入する。

30

【 0 0 6 4 】

本発明においては、液の入ったバッグを加圧することにより送液することができる。加圧に際しては、バッグに外から一定圧を加えることによって、液量を調整する器具を用いることができる。このような器具は、加圧バッグ、あるいはディスボ加圧バッグと呼ばれ、市販されている。市販の加圧バッグは通常、圧力メーターを備えており、加圧の程度を確認しながら送液を行うことができる。

40

【 0 0 6 5 】

<用途、その他>

本発明は、懸濁媒である液Aと懸濁質を含む懸濁液から液Aを無菌的に分離することに関するが、懸濁質の例は、研究、検査、治療、有用物質の生産等において好ましく用いられる有用細胞である。有用細胞は、特に限定されないが、具体的には、人工多能性幹細胞(i P S細胞)、胚性幹細胞(E S細胞)、造血幹細胞、骨髄ストローマ細胞、間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系細胞、脂肪由来間質幹細胞、多能性成体幹細胞、T細胞、B細胞、キラーT細胞(細胞障害性T細胞)、NK(Natural killer)細胞、NK T(Natural kill

50

er T) 細胞、制御性T細胞などのリンパ球系の細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、顆粒球、赤血球、血小板など、神経細胞、筋細胞、線維芽細胞、肝細胞、心筋細胞などの体細胞または、遺伝子の導入や分化などの処理を行った細胞を挙げることができる。

【0066】

本発明は、有用細胞のうち、特にヒトまたは非ヒト動物の疾患または状態の処置のために用いられる治療用細胞を処理するのに適している。治療用細胞の例として、樹状細胞、NK細胞、NKT細胞、活性化T細胞（ナイーブT細胞が抗原と遭遇して活性化された結果生じるエフェクターT細胞の機能的な亜群であるTh1細胞、Th2細胞、TFH細胞、Th17細胞、Treg細胞等を含む。）、およびCAR-T細胞（Chimeric antigen receptor-T cell）を挙げることができる。

10

【0067】

本発明により調製された、治療用細胞が適用可能な疾患または状態には、がん、感染症、自己免疫疾患、アレルギー等が含まれる。

【実施例】

【0068】

K562細胞（ヒト白血病細胞株）は、10%牛胎児血清（ニチレイバイオサイエンス、カタログ番号171012-500ML）および100ユニットのペニシリン、100 µg/mLのストレプトマイシン（ナカライテスク、カタログ番号26253-84）を含むRPMI1640培地（和光純薬工業、カタログ番号：189-02025）（以下、培地とする）で培養した。ノイバウエル計算盤（エルマ販売株式会社、カタログ番号03-202-1）を使用してK562細胞の細胞数を

20

【0069】

この細胞液（30 mL）を片側の導入口よりmicroza中空糸タイプペンシル型モジュール（旭化成ケミカルズ、ASA PMP-003、ポリエチレン製中空糸を使用、中空糸内径0.7mm、有効膜面積150cm²、公称孔径0.25 µm）に50 mLシリンジ（テルモ、カタログ番号SS-50ESZ）を用いて導入した。この時、導入口と反対側の原水出口は、チューブ（サンゴバン株式会社、C-フレックス374-500-3、熱可塑性エラストマー製）を繋げクランプを使用して塞ぎ、濾水出口及び濾水ドレイン口には、チューブ（サンゴバン株式会社、C-フレックス374-125-2）をつなげて、チューブの先は、排液入れに入れて、排液を回収した（図3上参照）。

30

【0070】

次に、濾水出口及び濾水ドレイン口をクランプで塞ぎ、原水出口のチューブを取り除いた後、50 mLのラクトリンゲル液（扶桑薬品株式会社、JANコード4 987197 900152）を入れた50 mLシリンジを直接接続した。プランジャーを押し、ラクトリンゲル液を導入し、導入口からの溶出液を回収した（回収液1とする）（図3下参照）。回収液1中の細胞を0.4%トリパンブルー溶液（ライフテクノロジーズ、カタログ番号15250-061）を用いて2倍に希釈して、ノイバウエル計算盤を用いてカウントした。その結果、 1.55×10^5 細胞数/mLが50 mL回収された（ 7.75×10^6 細胞、回収率：77.5%）。

【0071】

さらに50 mLのラクトリンゲル液を入れた50 mLシリンジを用いて、原水出口側より導入し、導入口からの溶出液を回収した（回収液2とする）。回収液2の細胞数をノイバウエル計算盤を用いてカウントした。その結果、 5.0×10^4 細胞数/mLが50 mL回収された（ 2.50×10^6 細胞、回収率：25.0%）。

40

【0072】

回収液1と回収液2を合計すると約100%になり、導入した細胞全てが回収された。結果を下表および図4に示した。

【0073】

50

【表 1】

	細胞数	回収率
導入細胞	1.00E+07	100%
回収細胞_回収1	7.75E+06	77%
回収細胞_回収2	2.50E+06	25%
回収1+2	1.03E+07	102%

【符号の説明】

【 0 0 7 4 】

- 1 中空系型分離器
- 2 排液バッグ
- 3 回収バッグ
- 4 無菌接続コネクタ
- 5、6 液 B 入りバッグ
- 7 懸濁液入りバッグ
- 8 他の溶液（培養液）入りバッグ
- 1 1 入口
- 1 2 出口
- 1 3、1 4 排出口
- i 第一のクランプ
- i i、i i i 第二のクランプ
- i v、v 三方活栓
- A 器具からなる部分
- B 懸濁液バッグからなる部分
- C 他の溶液（培養液）入りバッグからなる部分

10

20

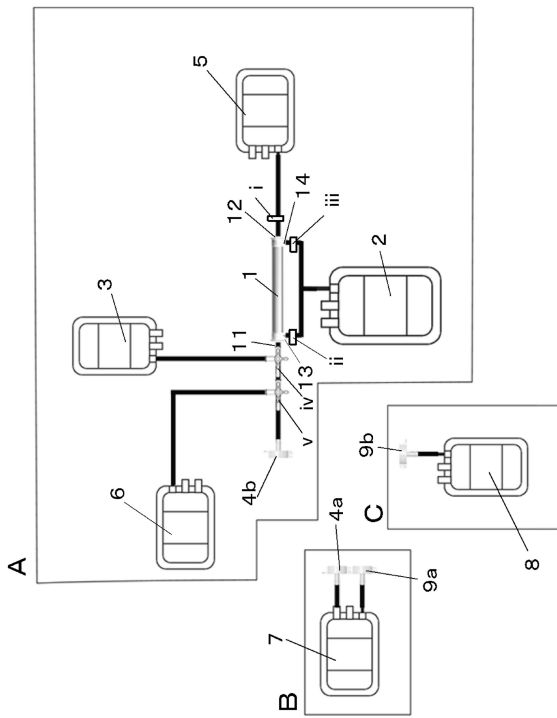
30

40

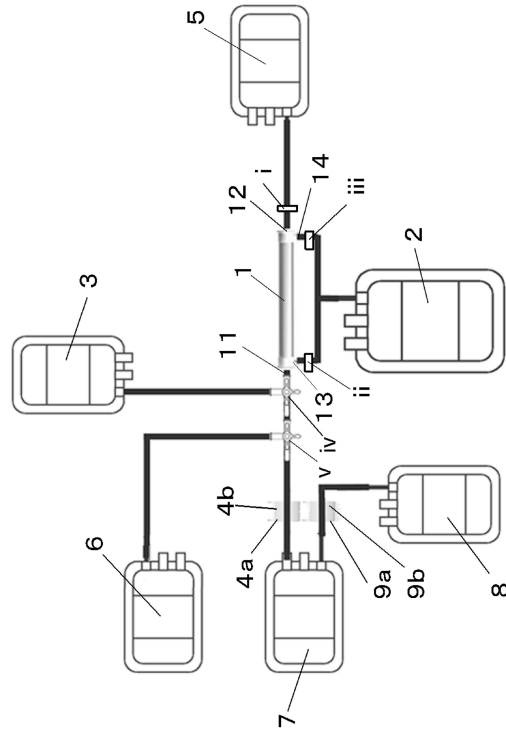
50

【図面】

【図 1】



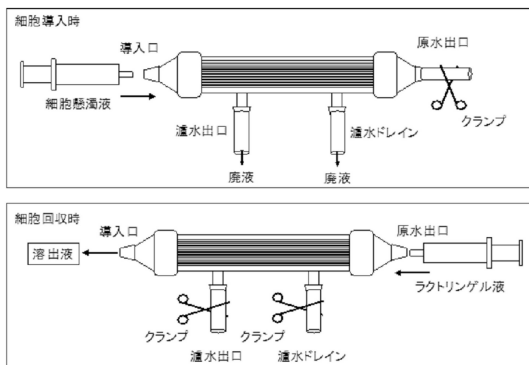
【図 2】



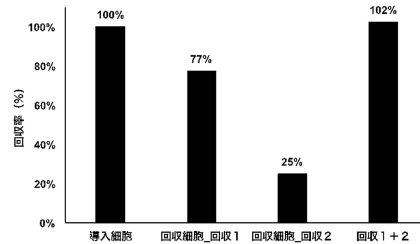
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15	A
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	A

国立大学法人九州大学内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献

特開 2 0 1 4 - 0 6 4 8 0 5 (J P , A)
 特開 2 0 1 5 - 0 4 2 1 6 7 (J P , A)
 特開 2 0 1 1 - 1 7 2 7 9 7 (J P , A)
 中国特許出願公開第 1 0 5 9 2 5 4 7 5 (C N , A)
 国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 7 9 4 6 (W O , A 1)
 特開平 0 2 - 1 6 8 9 6 0 (J P , A)
 特表 2 0 1 5 - 5 3 1 0 6 0 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 0 2 1 3 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 1 8 5 9 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 5 / 1 2 5 8 5 2 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 8 - 5 3 8 5 1 4 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 5 / 1 6 2 2 1 1 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 0 - 5 0 4 9 4 2 (J P , A)
 特開 2 0 0 5 - 3 3 6 0 8 0 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 M 1 / 0 0
 C 1 2 M 3 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 P u b M e d