# 明　細　書

## 発明の名称 ： 白血球または単核球の分離方法、分離材

## 技術分野

[0001] 本発明は、各血球成分を含む体液から、白血球または単核球を選択的に回収するための分離材、分離方法に関する。

## 背景技術

[0002] 近年、血液学や科学テクノロジーの急速な進歩に伴い、全血・骨髄・臍帯血・組織抽出物をはじめとする体液から必要な血液分画のみを分離して患者に投与することで治療効果を高め、さらに、治療に必要のない分画は投与しないことで副作用を抑制する、という治療スタイルが広く普及している。

[0003] 例えば、血液輸血もその１つである。赤血球製剤は、出血および赤血球が不足する場合、または赤血球の機能低下により酸素が欠乏している場合に使用される血液製剤である。赤血球製剤には、異常な免疫反応や移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）などの副作用を誘導する白血球は不要であり、フィルターで白血球を除去する必要がある。場合によっては白血球に加えて血小板も除去することもある。

[0004] 一方、血小板製剤は、血液凝固因子の欠乏による出血ないし出血傾向にある患者に使用される血液製剤である。血小板製剤の製造のためには、遠心分離により、血小板以外の不要な細胞や成分は除去され、必要とされる血小板成分のみが採取されている。

[0005] 加えて近年、白血病や固形癌治療に向けた造血幹細胞移植が盛んに行われるようになり、治療に必要な、造血幹細胞を含む白血球群を分離し投与する方法がとられている。この造血幹細胞のソースとして、ドナーの負担が少ない、増殖能力が優れている、等の利点から、骨髄や末梢血に加えて臍帯血も注目を浴びている。また近年、月経血中にも幹細胞が豊富に存在することが示唆され、これまで廃棄されていた月経血も貴重な幹細胞ソースとして利用される可能性がある。

[0006] 骨髄や末梢血に関して、不要な細胞を除き白血球を分離・純化して投与することが望まれている一方で、臍帯血についても血縁者のためのバンキングが盛んになり、使用時まで凍結保存する必要性から、凍結保存による赤血球溶血を防ぐことを目的に白血球は分離・純化されている。

[0007] 白血球の分離方法としては、フィコールを用いた比重液による遠心分離法や赤血球沈降剤であるヒドロキシエチルスターチを用いた遠心分離法が提案されているが、閉鎖系での処理が不可能であり異物や菌が混入すること、処理するのに長時間を要するなどの問題を有している。

[0008] 遠心分離法を用いない細胞分離方法として、最近では、赤血球と血小板は捕捉されず白血球のみを捕捉するフィルター材料を用いて白血球を回収する方法（特許文献１、特許文献２）も報告されている。しかしながら、従来、フィルターに白血球を捕捉させるためには繊維径が３μｍ未満である必要があると報告されており（非特許文献１）、各文献の報告においても使用されている分離材の繊維径は２．５μｍ未満である（特許文献１、特許文献２、特許文献３）。これは、従来の白血球除去フィルターが白血球を極限まで取り除くことを目的としているためであり、白血球の捕捉率が高い一方で、体液処理時に詰まりやすく、回収操作時に圧上昇を引き起こして細胞回収率の低下や手技的な問題を誘発するなどの問題があった。

[0009] 従って、白血球を回収するためのフィルターとしては、従来の白血球除去フィルターを転用しても十分な機能を果たすことはできなかった。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0010] 特許文献1：特表２００１－５１８７９２号公報

特許文献2：国際公開第９８／３２８４０号公報

特許文献3：特開平１０－３１３８５５号公報

### 非特許文献

[0011] 非特許文献1：繊維学会誌　Ｖｏｌ．６１、Ｎｏ．８　ｐ．Ｐ２１５－２１６（２００５）

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の目的は、各血球成分を含む体液から、圧上昇を回避しつつ、白血球または単核球を高い効率で回収するための高効率な分離材を提供すること、及び当該分離材を用いた細胞分離方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、体液から効率的に白血球または単核球を分離でき、かつ、圧上昇を引き起こしにくい分離材や、細胞分離方法に関して鋭意検討を行った。その結果、特定の分離材を用いることにより、高効率に白血球または単核球を分離できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0014] 即ち本発明は、平均繊維径が２．０μｍ以上６．０μｍ以下であり、かつ、通気度係数Ｍが６．２以上３５以下である不織布からなることを特徴とする、体液から白血球または単核球を分離するための分離材に関する。不織布が、ポリオレフィン、ポリアミド、およびポリエステルからなる群から選択される少なくとも１つからなることが好ましい。体液が、末梢血、臍帯血、骨髄、月経血、および組織抽出物からなる群から選択される少なくとも１つであることが好ましい。

[0015] また、本発明は、上記の分離材を、体液の入口と出口を有する容器に充填して得られる細胞分離用容器に関する。細胞分離用容器において、分離材が、体液の流れる方向に１枚または複数枚積層して充填されていることが好ましく、体液の流れる方向に圧縮された状態で充填されていることが好ましい。細胞分離用容器は、カラムタイプであることが好ましい。

[0016] また、本発明は、上記の分離材に体液を接触させて白血球または単核球を分離する工程を含む、細胞分離方法に関する。

[0017] また、本発明は、上記の細胞分離用容器に体液を接触させて白血球または単核球を分離材に捕捉させる第一の工程、および、剥離溶液を用いて白血球または単核球を分離材から回収する第二の工程からなる、白血球または単核球の細胞分離方法に関する。この細胞分離方法において、第一の工程が上記の

細胞分離用容器の入口から体液を導入し、出口から排出する工程であり、第二の工程が細胞分離用容器の出口から剥離溶液を導入し、入口から白血球または単核球を回収する工程であることが好ましい。さらに、第一の工程の後であって第二の工程の前に、入口から生理食塩水または緩衝液を導入することにより、細胞分離用容器内の夾雑成分を除去する工程を含むことが好ましい。さらに、第一の工程の前に、分離材を生理食塩水または緩衝液と接触させる工程を含むことが好ましい。さらに、第一の工程の前に、細胞分離容器の体液の入口を細胞分離容器の体液の出口より低い高さに固定する工程を含むことが好ましい。白血球と血小板が実質的に分離材に捕捉され、赤血球が実質的に捕捉されないことが好ましい。分離された白血球または単核球が、造血幹細胞および／または間葉系幹細胞を含むことが好ましい。

[0018] また、本発明は、上記の細胞分離方法によって得られた細胞を液体窒素環境下にすることを特徴とする凍結保存方法に関する。液体窒素環境下は－１９６℃から－３０℃であることが好ましい。この凍結保存方法において、ジメチルスルホキシド、デキストラン、アルブミン、およびヒドロキシエチルスターチからなる群から選択される少なくとも１つの凍結保護剤を使用することが好ましい。凍結保存した幹細胞の生存率が８０％以上であることが好ましい。

[0019] また、本発明は、上記の細胞分離方法によって得られた白血球、単核球、または幹細胞に関する。幹細胞は、ＣＤ３４陽性細胞、ＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陰性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陰性細胞、ＣＤ４５陰性且つＣＤ４４陽性且つＣＤ７３陽性且つＣＤ９０陽性細胞、ＣＤ４５陰性且つＣＤ２３５ａ陰性且つＣＤ３３陰性且つＣＤ７陰性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１６４陽性細胞、およびＣＤ４５陰性且つＣＤ３０９陽性細胞からなる群から選択されるいずれかの細胞を含むこ

とが好ましい。白血球は、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、またはＣＤ４５陽性且つＣＤ１１７陽性細胞を含むことが好ましい。

## 発明の効果

[0020] 本発明によれば、全血・骨髄・臍帯血・月経血・組織抽出物をはじめとする体液から、簡便且つ迅速に、目詰まりや圧上昇を起こしにくく効率的に白血球または単核球を分離することができる。

[0021] 本発明の分離材および細胞分離方法を用いると、従来報告されているよりも目詰まりを起こしにくいうえに、白血球や単核球の回収率が高いという多面的な利点がある。さらに、この技術は、バフィーコート等の前処理をした後に使用することも可能であるが、基本的にはそのような前処理をすること無く、末梢血、臍帯血、骨髄、月経血、組織抽出物から、白血球または単核球を分離することが可能である。

[0022] 本発明の分離材を容器に充填して得られるフィルターは無菌的な閉鎖系での処理に使用することも可能である。回収された白血球含有液または単核球含有液は造血幹細胞や間葉系幹細胞が豊富に含まれる細胞群であり、白血病治療、心筋再生や血管再生などの再生医療のための治療細胞調製用フィルターとして提供することが可能である。

[0023] 本発明の分離材を使用して得られる白血球は赤血球の混入率が極めて低く、使用時まで凍結保存しても溶血などに起因する影響は非常に少ない。また、白血球は無菌的に分離されていることから、そのまま増幅して細胞を調製することもできる。このため、本発明の分離材は、輸血用製剤調製用途に加えて、再生医療用の細胞ソースを調製するためのフィルターとして非常に有用である。本発明の分離材を使用することにより副作用が少なく安全性の高い治療用細胞の調製が可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0024] [図1]新鮮ウシ末梢血の白血球回収率の結果

[図2]新鮮ヒト末梢血の白血球回収率の結果

[図3]新鮮ブタ骨髄の白血球回収率の結果

[図4]新鮮ウシ末梢血の白血球回収率の結果

[図5]新鮮ヒト末梢血の白血球回収率の結果

[図6]新鮮ブタ骨髄の白血球回収率の結果

[図7]カラムの模式図

[図8]造血系幹細胞から成るコロニー写真

[図9]血球成分分離システムの一例

[図10]血球成分分離システムの一例（入口が出口より低い場合）

## 発明を実施するための形態

[0025] 以下に本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の説明に限定されるものではない。

[0026] 本発明は、平均繊維径が２．０μｍ以上６．０μｍ以下であり、かつ、通気度係数Ｍが６．２以上３５以下である不織布からなることを特徴とする、体液から白血球または単核球を分離するための分離材に関する。

[0027] 分離材は、材料と体液の接触時間の観点から繊維状であって容易に作製や入手ができる不織布により構成される。不織布の製造方法としては、大きく分けて湿式と乾式、さらには、レジンボンド、サーマルボンド、スパンレース、ニードルパンチ、ステッチボンド、スパンボンド、メルトブローなどが挙げられるが、これらの製法に限定されることはない。１０μｍ以下の繊維径を持つ不織布の場合、メルトブロー法やスパンレース法が好適である。不織布はカレンダー加工やプラズマ処理が施されていてもよい。

[0028] 不織布繊維としては、複合単糸を複数に分割した、いわゆる分割繊維も、好適に使用できる。繊維が複雑に絡み合って血球分離効率がよいからである。

[0029] 分離材は、容器に入れず使用してもよいし、体液の入口と出口を備えた容器に分離材を入れて使用してもよい。このうち、実用性を考慮すると、容器に入れて使用する後者の態様が好ましい。

[0030] 不織布を構成する繊維の平均繊維径は、２．０μｍ以上６．０μｍ以下であることが好ましく、２．５μｍ以上５．７μｍ以下であることがより好ましく、３．５μｍ以上５．０μｍ以下であることがさらに好ましい。平均繊維

径が２．０μｍより小さいと、目詰まりが起こり易くなり回収率が低下する傾向がある。平均繊維径が６．０μｍより大きいと、白血球の分離材への捕捉能が低下する傾向がある。

[0031] なお、平均繊維径とは繊維軸に対して直角方向の繊維の幅である。繊維径の測定は、不織布からなる分離材を走査型電子顕微鏡にて写真撮影し、写真に記載されたスケールから求めた繊維径の計算値を平均することにより求められる。つまり、測定した繊維径の平均値を意味しており、５０個以上、望ましくは１００個以上の平均値である。ただし、繊維が多数に重なりあった場合、他繊維が邪魔をしてその幅が測定できない場合、又は、著しく直径の異なる繊維が混在している場合などは、そのデータは除いて繊維径を算出する。

[0032] 分離材の通気度係数Ｍは６．２以上３５以下であることが好ましく、７．０以上１４．２以下であることがより好ましく、９．２以上１０．０以下であることがさらに好ましい。通気度係数が６．２より小さいと、細胞が密に分離材に捕捉されるため回収性能が低下する傾向がある。通気度係数が３５より大きいと、細胞が分離材に捕捉されにくくなる傾向がある。

[0033] なお、通気度係数Ｍは、分離材の通気度（ｃｃ／ｃｍ$^2$・ｓｅｃ）と厚み（ｍｍ）の積で定義される値であり、分離材の厚みの影響を除いた本質的なパラメーターである。すなわち、通気度は分離材の孔径の大きさに依存するパラメーターであるが、同じ通気度であっても分離材の厚みが小さいほど本質的な通気度はより小さく、同じ厚み相当に換算すると通気度は小さくなる。そこで通気度と厚みを掛け合わせることにより、分離材の本質的な孔径を表すパラメーターとなる。

[0034] 通気度は例えば、ＪＩＳ　Ｌ１０９６－１９９９に記載されたフラジール形法に則り、または準拠し、容易に測定することが可能である。また厚みについてもデジタルノギスをはじめ種々の機器で測定することが可能である。ただし、通気度の測定方法はこれらの測定方法に限定されるものではない。

[0035] 分離材の平均繊維径が２．０μｍ以上６．０μｍ以下であり、かつ、分離材

の通気度係数Ｍが６．２以上３５以下であると、白血球または単核球を効率良く分離することができる。

[0036] 分離材に用いられる材料としては、滅菌耐性や細胞への安全性の観点から、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリエステル等が望ましい。ポリオレフィンとしては、ポリプロピレン、ポリエチレン、高密度ポリエチレン、低密度ポリエチレン等が挙げられ、ポリアミドとしては、ナイロン等が挙げられ、ポリエステルとしては、ポリエチレンテレフタート、ポリブチレンテレフタレート等が挙げられる。さらに、ポリビニルアルコール、塩化ビニリデン、レーヨン、ビニロン、アクリル（ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリルニトリル、ポリアクリル酸、ポリアクリレート）、ナイロン、ポリイミド、アラミド（芳香族ポリアミド）、ポリアミド、キュプラ、カーボン、フェノール、ポリエステル、パルプ、麻、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリカーボネートなどの合成高分子、アガロース、セルロース、セルロースアセテート、キトサン、キチンなどの天然高分子、ガラスなどの無機材料や金属等も用いられるが、なかでも、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、アクリル、ナイロン、ポリウレタン、ガラスが好ましい。また、これらの材料は一種類単独とは限らず、必要に応じて材料を複合・混合・融合して用いてもよい。さらに必要ならば、蛋白質、ペプチド、アミノ酸、糖類など、特定の細胞に親和性を有する分子を材料に固定してもよい。

[0037] 体液とは、全血、末梢血、骨髄、臍帯血、月経血、組織抽出物、およびそれらの組み合わせを意味し、粗分離したものであっても構わない。また、体液の採取源となる動物種としては、例えば、ヒト、ウシ、マウス、ラット、ブタ、サル、イヌ、ネコなどの哺乳動物が挙げられる。

[0038] 体液は、前もって抗凝固剤で処理されたものであってもよい。抗凝固剤としては、ＡＣＤ（acid-citrate-dextrose）液、ＣＰＤ（citrate-phosphate-dextrose）液、ＣＰＤＡ（citrate-phosphate-dextrose-adenine）液などのクエン酸抗凝固剤、ヘパリン、低分子ヘパリン、フサン（メチル酸ナファモス

タット）、ＥＤＴＡ等の抗凝固剤が挙げられる。各分画の使用目的に影響がなければ、特に体液の保存条件は問わない。

[0039] 上記の分離材により分離することのできる白血球または単核球としては、具体的には、リンパ球、単球、ＣＤ３陽性細胞、ＣＤ１４陽性細胞、ＣＤ１９陽性細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞が挙げられる。

[0040] 本発明は、また、上記の分離材を体液の入口と出口を有する容器に充填して得られる細胞分離用容器に関する。

[0041] 分離材を充填する容器の形態、大きさ、材質は特に限定はない。容器の形態は、球、コンテナ、カセット、バッグ、チューブ、カラム等、任意の形態であってよい。好ましい具体例としては、例えば、容量約０．１ｍＬから４００ｍＬ程度、直径約０．１ｃｍから１５ｃｍ程度の半透明の筒状容器が挙げられる。また、一片の長さ０．１ｃｍから２０ｃｍ程度の長方形または正方形で、厚みが０．１ｃｍから５ｃｍ程度の四角柱容器等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0042] 容器の型としては、クロスフロータイプ、カラムタイプ等が挙げられる。クロスフロータイプまたはカラムタイプのどちらでも使用することができ、特に容器のタイプは限定されないが、回収液を均一に導入できるという観点からカラムタイプがより好ましい。従来の有核細胞を捕捉する細胞分離容器においては、効率良く細胞を回収できるという観点からクロスフロータイプが使用されているが、高い粘度の剥離溶液しか使用できないという制限があった。しかし、本発明の分離材をカラムタイプの容器と組み合わせると、低い粘度の剥離溶液でも細胞回収率の低下はなく、高い分離性能が得られる。

[0043] カラムタイプとは、例えばフィルター面に対して面の中心付近に液の入口と出口が付いている容器、またはフィルター面に対して垂直に入口部と出口部が位置している容器、またはフィルター面に対して垂直方向に液が流れることを特徴とする容器、または分離材の圧縮方向に対して平行に液が流れることを特徴とするような容器のことをいう。図７にカラムタイプの一例を示した。

[0044] 一方、クロスフロータイプとは、白血球除去フィルター（旭化成メディカル株式会社製「セパセル」、ポール社製「ピュアセルＲＣ」）に代表されるように、フィルター面に対して液の入口と出口の位置が面の中心から外れており、フィルター面に対して平行に入口部と出口部が位置している容器を差す。ここでフィルター面に対して入口部と出口部が垂直に位置しているとは面から入口と出口の角度（鋭角）が４５度以上９０度未満であることを指し、フィルター面に対して入口部と出口部が平行に位置しているとは面から入口と出口の角度（鋭角）が０度以上４５度未満であることを意味する。

[0045] 容器は、任意の構造材料を使用して作製することができる。構造材料としては具体的には、非反応性ポリマー、生物親和性金属、合金、ガラス等が挙げられる。非反応性ポリマーとしては、アクリロニトリルブタジエンスチレンターポリマー等のアクリロニトリルポリマー；ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、テトラフルオロエチレンとヘキサフルオロプロピレンのコポリマー、ポリ塩化ビニル等のハロゲン化ポリマー；ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロリドアクリルコポリマー、ポリカーボネートアクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリスチレン、ポリメチルペンテン等が挙げられる。容器の材料として有用な金属材料（生物親和性金属、合金）について、ステンレス鋼、チタン、白金、タンタル、金、およびそれらの合金、並びに金メッキ合金鉄、白金メッキ合金鉄、コバルトクロミウム合金、窒化チタン被覆ステンレス鋼等が挙げられる。

[0046] これらのうち、滅菌耐性を有する構造材料が好ましく、具体的にはポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリメチルペンテン等が挙げられる。

[0047] 分離材は、不織布からなる分離材を適当な大きさに切断し、厚み１ｍｍから２００ｍｍ程度に、体液の流れる方向に、１枚または複数枚積層して使用されることが好ましい。各分画の分離効率の面から、積層の厚みは１．５ｍｍから１５０ｍｍであることがより好ましく、２ｍｍから１００ｍｍであるこ

とがさらに好ましい。

[0048] 分離材を容器に充填する場合には、体液の流れる方向に、１枚または複数枚積層状態で使用することができ、厚みは１ｍｍから５０ｍｍ程度であることが好ましい。各分画の分離効率の面から１．５ｍｍから４０ｍｍであることがより好ましく、２ｍｍから３５ｍｍであることがさらに好ましい。

[0049] また分離材をロール状に巻いて、容器に充填してもよい。ロール状で使用する場合、該ロールの内側から外側に向けて体液を処理することにより血球を分離してもよいし、或いはその逆に該ロールの外側から内側に向けて体液を処理してもよい。

[0050] 分離材を容器に充填する際には、体液の流れる方向に圧縮して容器に充填してもよいし、圧縮せずに容器充填してもよい。圧縮の有無は、分離材の材質等に応じて適宜選定することができる。

[0051] 細胞分離容器において、分離材は適当な大きさに切断した平板状で充填されてもよいし、ロール状に巻いた形状で充填されてもよい。さらには、２種以上併用してもよいし、上述した分離材以外の分離材を併用してもよく、実質的に白血球を捕捉し回収するような分離システムを構成できればよい。実質的に白血球を捕捉するとは、分離材と接触した体液に含まれる白血球のうち６０％以上が分離材に捕捉されることを意味する。さらに、細胞分離用容器全体に捕捉される白血球のうち、本発明の分離材が捕捉した白血球が６０％以上の割合を占めることが好ましい。

[0052] 細胞分離容器は、赤血球を実質的に捕捉せず、白血球を実質的に捕捉するという特徴を有する。ここで赤血球を実質的に捕捉しないとは、分離材と接触した体液に含まれる赤血球のうち６０％以上が分離材を通過する性質を持つことを意味する。さらに、本発明の分離材は、血小板が実質的に捕捉される材料であってもよいが、これに限定されない。血小板が実質的に捕捉されるとは、分離材と接触した体液に含まれる血小板のうち、５０％以上が分離材に捕捉されることを意味する。６０％以上が分離材に捕捉されることがより好ましい。

[0053] また、本発明は、上述の分離材に体液を接触させて、白血球または単核球を分離する工程を含む、細胞分離方法に関する。さらに、本発明は、上述の細胞分離容器に体液を接触させて白血球または単核球を分離材に捕捉させる第一の工程、および、剥離溶液を用いて、捕捉した白血球または単核球を分離材から回収する第二の工程からなる、細胞分離方法に関する。

[0054] 具体的には、第一の工程として、分離材が充填された容器に体液を入口側より注入し、白血球または単核球を捕捉させ赤血球は通過させる。次いで第二の工程として、容器の出口方向から、すなわち、体液や洗浄液の通液方向とは逆方向から、剥離溶液を流すことにより、分離材に捕捉された白血球または単核球を高収率で分離回収することができる。また必ずしも必要ではないが、体液を分離材に接触させ白血球を分離材に捕捉させる工程の後に、洗浄液を同方向より通液することにより容器内に溜まった赤血球を効率的に回収・分離することもできる。

[0055] 体液の入口と出口を有する細胞分離容器に、体液を流す際は、体液の入口を体液の出口よりも高くなるようにセットし、重力と同方向に体液を流してもよいが、体液の入口を体液の出口よりも低くなるようにセットし、重力と逆方向に体液を流してもよい。重力と逆方向に体液を流すことにより、体液が容器内に均一に流れることから分離効率をさらに向上させることができる。

[0056] 上記の細胞分離容器を使用して、血球成分分離システムを構成することができる。血球成分分離システムは、細胞分離容器の他に、洗浄溶液や剥離溶液の入口や出口、赤血球回収のバッグ、白血球回収のバッグ等を同時に備えていることが実用的であり好ましい。この場合、細胞分離容器は、体液が流入する入口と流出する出口を有しており、さらに体液の入口や体液の入口とは独立して、容器内に溜まった赤血球を流す洗浄溶液の流入部を有し、さらに体液の出口や体液の出口とは独立して洗浄液の流出部を有し、尚且つ、上記体液及び洗浄液の流出部或いは流出部以外に、独立して、剥離溶液を導入するための入口も備えていることが好ましい。容器に付属する洗浄液の入口や出口は、体液の入口や出口として機能してもよく、入口側の回路に、三方活

栓等を介して、血液バッグと洗浄溶液バッグが接続されていてもよい。分離溶液の導入口は体液の出口として機能してもよい。また、剥離溶液の回収側は体液の入口として機能してもよく、同様に三方活栓を介して各バッグやシリンジ等が接続されていてもよい。図９、図１０に血球成分分離システムの一例を示す。

[0057] 血球成分分離システムには、さらに、体液の保存バッグ、分離された白血球を回収するための剥離溶液回収バッグ、赤血球回収バッグなどが備え付けられていることが好ましい。これらのバッグが上記記載の各溶液の入口や出口に接続されることで、無菌的な閉鎖系で体液を分離することが可能となる。また各バッグは使用後に切り離して使えることが好ましく、一般的に使用されている血液バッグのような形状をしていてもよいが、平板状のカートリッジ方式等でもよい。各バッグの形態としては、必要に応じて細胞培養可能なバッグ、凍結保存耐性を有するバッグ等を選択してもよい。

[0058] 本発明の分離方法について具体的に説明する。

１）体液送液工程

分離材を充填した容器の体液入口側より体液を通液する際には、体液を入れた容器から送液回路を通じて自然落下で送液しても、ポンプにより送液してもよい。また、体液を入れたシリンジを直接、容器に接続し、手でシリンジを押してもよい。ポンプにより通液する場合には、送液速度が速過ぎると分離効率が落ち、遅過ぎると処理時間がかかる傾向がある。送液速度としては、例えば０．１ｍＬ／ｍｉｎから１００ｍＬ／ｍｉｎの速度が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0059] また体液送液工程の前処理として、生理食塩水や緩衝液で分離材を浸漬させる工程を実施してもよい。この操作は必ずしも必要ではないが、分離材の上記溶液への浸漬が分離効率の向上と血液流路確保に影響すると考えられるため、場合によっては実施してもよい。この前処理溶液は以下の洗浄工程に用いる溶液と同一である必要はないが、同一であれば溶液バッグを共有できるため、回路システムの単純化と操作性の観点から同一であることが好ましい

。前処理の液量としては、分離材が充填される容器の１倍から１００倍程度が実用的であり好ましい。使用できる緩衝液としては、特に限定されないが、リンゲル液、細胞培養に用いる培地、リン酸緩衝液等の一般的な緩衝液が好ましい。

[0060] ２）洗浄工程

本工程は必ずしも必要ではないが、夾雑物の除去効率を高める場合には実施してもよい。この工程により除去できる夾雑物として、赤血球、血漿等の非血球成分が挙げられる。洗浄液の流入側より体液送液工程と同方向より洗浄液を通液する際には、洗浄液は回路を通じて、自然落下で送液しても、ポンプにより送液してもよい。ポンプにより送液する場合の流速は、体液送液工程と同程度であり、０．１ｍＬ／ｍｉｎから１００ｍＬ／ｍｉｎの速度が挙げられるが、これに限定されるものではない。洗浄量は容器の容量によって異なるが、洗浄量が少なすぎると容器に残存する赤血球成分が多くなり、洗浄量が多すぎると分離効率が落ちるとともに多大な時間を要することから、容器の０．５倍から１００倍程度の液量で洗浄することが好ましい。

[0061] 使用できる洗浄液としては、赤血球のみを洗い流すことが可能であり回収される白血球中の他血球の混入を抑制でき、血球の捕捉状態を保持することができれば、どのような溶液を用いても構わないが、生理食塩水、リンゲル液、細胞培養に用いる培地、リン酸緩衝液等の一般的な緩衝液が好ましい。

[0062] ３）白血球または単核球の剥離

分離材を充填した容器に体液の通液とは逆方向（体液流出側）より剥離溶液を注入し、白血球を剥離させる。剥離溶液を注入する際には、剥離溶液を予めシリンジ等に入れておき、シリンジのプランジャーを手や機器を用いて勢い良く押し出すことにより実行できる。回収液量や流速は、容器の容量や処理量により異なるが、容器の１倍から１００倍程度の液量で、流速０．５ｍＬ／ｓｅｃから２０ｍＬ／ｓｅｃの流速が好ましいが、これらに限定されるものではない。

[0063] 剥離溶液は低張液であれば特に限定されないが、生理的食塩水、リンゲル液

、デキストラン糖注、ヒドロキシエチルスターチなどの注射用剤として使用実績があるものや、緩衝液、細胞培養用培地等が挙げられる。

[0064] また捕捉された細胞の回収率を上げるために回収液の粘張度を上げてもよい。そのために上記分離溶液にアルブミン、フィブリノゲン、グロブリン、デキストラン、ヒドロキシエチルスターチ、ヒドロキシエチルセルロース、コラーゲン、ヒアルロン酸、ゼラチン等を添加できるが、これらに限定されるものではない。剥離溶液の粘度は特に限定されないが、粘度が高すぎると回収操作が行いにくくなる傾向があることから、２０ｍＰａ・ｓ以下がより好ましい。カラムタイプの容器であれば低粘度の剥離溶液を使用しても分離性能は低下しないことから１０ｍＰａ・ｓ以下でも使用することができる。更には５ｍＰａ・ｓ以下の剥離溶液でも使用することが可能である。

[0065] 上記の細胞分離方法により回収された白血球には、造血幹細胞、間葉系幹細胞、ＣＤ３４陽性細胞が含まれることが好ましい。

[0066] また、本発明は、上記の細胞分離方法によって得られた細胞を液体窒素環境下にすることを特徴とする凍結保存方法に関する。上記の細胞分離方法は、従来の遠心分離法に比して細胞に与えるストレスが非常に低いため、この細胞分離方法で得られた細胞は、凍結保存後の活性が非常に高い。

[0067] 細胞を凍結保存する際は、凍結時の細胞を保護する目的で、凍結保護剤が添加される。添加される凍結保護剤の種類は特に制限されないが、ジメチルスルホキシド、デキストラン、アルブミン、ヒドロキシエチルスターチ等が使用できる。上記凍結保護剤は単独で使用してもよいが数種を組み合わせて使用してもよい。

[0068] 凍結保存方法では、細胞は液体窒素環境下で保存されればよく、液体窒素に浸った状態で保存してもよく、また液体窒素の気体下で保存しても構わない。保存時の温度は特に限定されないが、細胞の活性の低下を防ぐためにー１９６℃からー３０℃であることが好ましい。ー１９６℃からー５０℃であることがより好ましく、ー１９６℃からー７０℃であることがさらに好ましい。

[0069] 本発明は、また、上述の凍結保存方法によって得られた白血球、単核球、幹細胞に関する。上述の凍結保存方法によって得られる幹細胞としては、体液中に含まれる、自己複製能を持ち尚且つ分化能を有する細胞であればどのような幹細胞であっても構わない。具体的には、造血幹細胞、間葉系幹細胞、Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ－ｌｉｋｅ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ、血管内皮前駆細胞、などが挙げられる。

[0070] 造血幹細胞の例としては、ＣＤ３４陽性細胞、ＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陰性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陰性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１６４陽性細胞が挙げられる。

[0071] 一般的な造血幹細胞としては、ＣＤ３４陽性細胞またはＣＤ１３３陽性細胞が挙げられるが、臍帯血では、造血幹細胞が、ＣＤ３４陰性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陰性細胞へと分化すると考えられている。本発明の分離材を使用すればこれらの造血幹細胞も分離することができ、また分離後の細胞は凍結しても活性の低下は少ない。また造血幹細胞の中でも特に移植時の生着に関わると言われている、造血増殖因子（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｆａｃｔｏｒ）の受容体であるＣＤ１１７陽性細胞、細胞接着に関わるＣＤ１６４陽性細胞についても、本発明の分離材で分離後に凍結しても活性の低下は少ない。

[0072] また臍帯血中間葉系幹細胞と考えられているＣＤ４５陰性且つＣＤ４４陽性且つＣＤ７３陽性且つＣＤ９０陽性細胞も、本発明の分離材で分離後に凍結しても活性の低下は少ない。臍帯血中には間葉系幹細胞は僅かしか存在せず、遠心分離ではロスが大きく分離しにくいという問題があったが、本発明の分離材では効率的に分離することが可能である。

[0073] 臍帯血中にはＬｉｎｅａｇｅ　Ｎｅｇａｔｉｖｅ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌという多分化能を有する興味深い幹細胞が存在し、Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ－ｌｉｋ

ｅ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌと呼ばれている。本発明の分離材では、このＣＤ４５陰性且つＣＤ２３５ａ陰性且つＣＤ３３陰性且つＣＤ７陰性細胞を効率的に分離することが可能であり、凍結しても活性の低下は少ない。

[0074] 血管内皮前駆細胞のＣＤ４５陰性且つＣＤ３０９陽性細胞についても、本発明の分離材で分離後に凍結しても活性の低下は少ない。

[0075] また、白血球中のＣＤ４５陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１１７陽性細胞についても、本発明の分離材で分離後に凍結しても活性の低下は少ない。

[0076] 凍結保存後の細胞の生存率は、８０％以上であることが好ましく、８５％以上であることがより好ましい。

## 実施例

[0077] 以下、実施例において本発明に関して詳細に述べるが、本発明は以下の実施例の態様に限定されるものではない。以下の実施例及び比較例に示した不織布は非圧縮時の厚みが全て一定の範囲になるように枚数を調整し、充填している。また実施例および比較例における、分離材を充填した容器は図７に示したようなカラムタイプであり、液の入口と出口はフィルターの面に対して中心に位置しており、フィルター面に対して垂直に液の入口と出口が位置している。

[0078] （実施例１）

厚さ６ｍｍ直径１８ｍｍの、ポリカーボネートからなるカラム状の容器に、ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径２．０μｍ、通気度係数Ｍ＝７．０）２８枚を、積層状態で、図７に示した態様となるよう充填した。まず生理食塩水４５ｍＬを入口側よりシリンジを用いて手押しで通液した。次にＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬ（ＣＰＤ：血液＝２００：２８で混合した１２％ＣＰＤを含むウシ末梢血）を２．５ｍＬ／ｍｉｎの速度で通液し、次に同方向より生理食塩水１０ｍＬを通液した。その後、逆方向から１０％ＦＢＳ添加αＭＥＭ培地３０ｍＬ（粘度２．９ｍＰａ・ｓ）をシリンジを用いて手押しで通液することにより白血球を回収した。剥離溶液はス

ムーズに導入することができた。処理前血液の血算、回収した溶液の血算を血球カウンター（シスメックス社製、Ｋ－４５００）により測定し、白血球の回収率を算出した。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0079]（実施例２）

ポリプロピレン製不織布（平均繊維径３．５μｍ、通気度係数Ｍ＝９．６）を２８枚積層状態で充填したこと以外は実施例１と同様の操作を実施した。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0080]（実施例３）

ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径２．９μｍ、通気度係数Ｍ＝１０．０）を２８枚積層状態で充填したこと以外は実施例１と同様の操作を実施した。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0081]（実施例４）

ナイロン製不織布（平均繊維径５．０μｍ、通気度係数Ｍ＝９．２）を３２枚積層状態で充填したこと以外は実施例１と同様の操作を実施した。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0082]（比較例１）

ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径１．７μｍ、通気度係数Ｍ＝５．９）を８４枚積層状態で充填したこと以外は実施例１と同様の操作を実施した。回収操作時に少し抵抗がかかっていたことから、カラム内圧が高く詰まっていることが示唆された。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0083]（比較例２）

ポリプロピレン製不織布（平均繊維径２．１μｍ、通気度係数Ｍ＝６．０）を３０枚積層状態で充填したこと以外は実施例１と同様の操作を実施した。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0084]（比較例３）

ポリプロピレン製不織布（平均繊維径４．９μｍ、通気度係数Ｍ＝３９．６）を２４枚積層状態で充填したこと以外は実施例１と同様の操作を実施した

。結果は表１、図１、および図４に示した。

[0085] [表1]

| | 不織布材料 | 平均繊維径[μm] | 通気度係数M | 積層枚数 | 体液 | 白血球回収率[%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 実施例1 | ポリブチレンテレフタレート | 2.0 | 7.0 | 28 | 新鮮ウシ血液 | 77 |
| 実施例2 | ポリプロピレン | 3.5 | 9.6 | 28 | 新鮮ウシ血液 | 84 |
| 実施例3 | ポリブチレンテレフタレート | 2.9 | 10.0 | 28 | 新鮮ウシ血液 | 88 |
| 実施例4 | ナイロン | 5.0 | 9.2 | 32 | 新鮮ウシ血液 | 81 |
| 比較例1 | ポリブチレンテレフタレート | 1.7 | 5.9 | 84 | 新鮮ウシ血液 | 67 |
| 比較例2 | ポリプロピレン | 2.1 | 6.0 | 30 | 新鮮ウシ血液 | 71 |
| 比較例3 | ポリプロピレン | 4.9 | 39.6 | 24 | 新鮮ウシ血液 | 61 |

[0086] （実施例５）

ＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬの代わりに、ＣＰＤ抗凝固の新鮮ヒト血液１０ｍＬを用いた以外は実施例１と同様の分離材を用い、同様の操作を実施した。さらに、処理前の血液、回収した分離溶液をＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎで溶血後、フローサイトメーター（ＢＤ　ＦＡＣＳ Ｃａｎｔｏ）により単核球陽性率を求め、白血球数と単核球陽性率を掛けあわせて総単核球数を算出した。回収した溶液中の総単核球数を処理前の総単核球数で割った割合を単核球回収率とした。結果は表２、図２、および図５に示した。

[0087] （実施例６）

ＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬの代わりに、ＣＰＤ抗凝固の新鮮ヒト血液１０ｍＬを用いた以外は実施例２と同様の分離材を用い、同様の操作を実施した。結果は表２、図２、および図５に示した。

[0088] （実施例７）

ＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬの代わりに、ＣＰＤ抗凝固の新鮮ヒト血液１０ｍＬを用いた以外は実施例３と同様の分離材を用い、同様の操作を実施した。さらに、処理前の血液、回収した分離溶液をＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎで溶血後、フローサイトメーター（ＢＤ　ＦＡＣＳ Ｃａｎｔｏ）により単核球陽性率を求め、白血球数と単核球陽性率を掛けあわせて総単核球数を算出した。回収した溶液中の総単核球数を処理前の総単

核球数で割った割合を単核球回収率とした。結果は表２、図２、および図５に示した。

[0089]（実施例８）

ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径２．９μｍ、通気度係数Ｍ＝１０．０）の代わりにポリプロピレン製不織布（繊維径５．７μｍ、通気度係数Ｍ＝１４．２）を４０枚積層状態で充填したこと以外は実施例７と同様に操作を実施した。結果は表２、図２、および図５に示した。

[0090]（比較例４）

ＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬの代わりに、ＣＰＤ抗凝固の新鮮ヒト血液１０ｍＬを用いた以外は比較例１と同様の分離材を用い、同様の操作を実施した。回収操作時に少し抵抗がかかっていたことから、カラム内圧が高く詰まっていることが示唆された。結果は表２、図２、および図５に示した。

[0091]（比較例５）

ＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬの代わりに、ＣＰＤ抗凝固の新鮮ヒト血液１０ｍＬを用いた以外は比較例２と同様の分離材を用い、同様の操作を実施した。結果は表２、図２、および図５に示した。

[0092] [表2]

| | 不織布材料 | 平均繊維径[μm] | 通気度係数M | 積層枚数 | 体液 | 白血球回収率[%] | 単核球回収率[%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 実施例5 | ポリブチレンテレフタレート | 2.0 | 7.0 | 28 | 新鮮ヒト血液 | 70 | 90 |
| 実施例6 | ポリプロピレン | 3.5 | 9.6 | 28 | 新鮮ヒト血液 | 70 | − |
| 実施例7 | ポリブチレンテレフタレート | 2.9 | 10.0 | 28 | 新鮮ヒト血液 | 76 | 90 |
| 実施例8 | ポリプロピレン | 5.7 | 14.2 | 40 | 新鮮ヒト血液 | 76 | 89 |
| 比較例4 | ポリブチレンテレフタレート | 1.7 | 5.9 | 84 | 新鮮ヒト血液 | 58 | 78 |
| 比較例5 | ポリプロピレン | 2.1 | 6.0 | 30 | 新鮮ヒト血液 | 58 | − |

[0093]（実施例９）

ＣＰＤ抗凝固の新鮮ウシ血液２０ｍＬの代わりに、ヘパリン（最終濃度５０単位／ｍＬ）とＣＰＤ（最終濃度１２％）で抗凝固した新鮮ブタ骨髄１０ｍＬを用いた以外は実施例３と同様の分離材を用い、同様の操作を実施した。結果は表３、図３、および図６に示した。

[0094]（実施例１０）

ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径５．３μｍ、通気度係数Ｍ＝２０．０）を２４枚積層状態で充填したこと以外は実施例９と同様の操作を実施した。結果は表３、図３、および図６に示した。

[0095]（比較例６）

比較例２の分離材を用いた以外は実施例９と同様の操作を実施した。回収操作時にシリンジで押し出すのに非常に抵抗があり、スムーズに押し出すことができなかったことから、カラム内圧が高く詰まっていることが示唆された。結果は表３、図３、および図６に示した。

[0096][表3]

| | 不織布材料 | 平均繊維径[μm] | 通気度係数M | 積層枚数 | 体液 | 白血球回収率[%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 実施例９ | ポリブチレンテレフタレート | 2.9 | 10.0 | 28 | 新鮮ブタ骨髄 | 66 |
| 実施例１０ | ポリブチレンテレフタレート | 5.3 | 20.0 | 24 | 新鮮ブタ骨髄 | 56 |
| 比較例６ | ポリプロピレン | 2.1 | 6.0 | 30 | 新鮮ブタ骨髄 | 32 |

[0097]（実施例１１）

実施例３の分離材、１２％ＣＰＤを含む新鮮ウシ血液２５ｍＬを用い、１０％ＡＣＤ－Ａ、１０％ＦＢＳ含有αＭＥＭ培地３０ｍＬ（粘度２．９ｍＰａ・ｓ）で回収操作を行った。結果は表４に示した。

[0098]（実施例１２）

１０％ＡＣＤ－Ａ、４％ヒト血清アルブミン含有低分子デキストラン糖注（大塚製薬社製）（粘度７．３ｍＰａ・ｓ）を用いること以外は実施例１１と同様の分離材、同様の方法で実験を実施した。結果は表４に示した。

[0099]（実施例１３）

１０％ＡＣＤ－Ａ含有サリンヘス輸液６％（フレゼニウスカービジャパン社製）（粘度２．３ｍＰａ・ｓ）を用いること以外は実施例１１と同様の分離材、同様の方法で実験を実施した。結果は表４に示した。

[0100]（実施例１４）

１０％ＡＣＤ－Ａ、４％ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液６％（フレ

ゼニウスカービジャパン社製）（粘度４．３ｍＰａ・ｓ）を用いること以外は実施例１１と同様の分離材、同様の方法で実験を実施した。結果は表４に示した。

[0101]（実施例１５）

１０％ＡＣＤ－Ａ含有２０％スクロースを用いること以外は実施例１１と同様の分離材、同様の方法で実験を実施した。結果は表４に示した。

[0102]（実施例１６）

１０％ＡＣＤ－Ａ含有生理食塩水（大塚製薬社製）（粘度１．１ｍＰａ・ｓ）を用いること以外は実施例１１と同様の分離材、同様の方法で実験を実施した。結果は表４に示した。

[0103] [表4]

| | 剥離溶液 | 剥離溶液の粘度 [mPa・s] | 白血球回収率 [%] |
|---|---|---|---|
| 実施例11 | FBS含有αMEM培地 | 2.9 | 85 |
| 実施例12 | ヒト血清アルブミン含有低分子デキストラン糖注 | 7.3 | 96 |
| 実施例13 | サリンヘス輸液 | 2.3 | 89 |
| 実施例14 | ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液 | 4.3 | 98 |
| 実施例15 | スクロース溶液 | - | 93 |
| 実施例16 | 生理食塩水 | 1.1 | 84 |

[0104] 実施例１１～１６の結果に示されているように、本発明の分離材を用いれば、どのような回収液を用いても、高い回収率で白血球を回収することができる。

[0105]（実施例１７）

実施例８で回収された細胞を白血球濃度２×１０$^6$になるように調製し、メチルセルロース培地ＭｅｔｈｏＣｕｌｔ　Ｈ４０３４（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）３ｍＬに対して０．３ｍＬを添加した後、混合液１．１ｍＬをペトリディッシュに分注し、３７℃、５％$CO_2$下で培養した。１４日後に顕微鏡にて観測したところ、赤血球系前駆細胞や白血球前駆

細胞等の造血系幹細胞から成る各種コロニーが形成され、回収された細胞がＣＤ３４陽性細胞や造血幹細胞を含むことが確認された。造血系幹細胞からなるコロニーの写真を図８に示す。

[0106] （実施例１８）

実施例９、実施例１０で回収された細胞溶液の３ｍＬを１０％ＦＢＳ含有αＭＥＭ培地で合計１０ｍＬとし、１０ｃｍのシャーレに播種し、３７℃、５％$CO_2$下で培養した。３日毎に培地交換を行い、９日間培養した結果、シャーレに接着する間葉系幹細胞のコロニーを確認し、回収された細胞が間葉系幹細胞を含むことが確認された。

[0107] （実施例１９）

厚さ１２ｍｍ直径４４ｍｍの、ポリカーボネートからなるカラム状の容器に、ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径３．５μｍ、通気度係数Ｍ＝８．９）１１２枚を、積層状態で、図７に示した態様となるよう充填した。図１０に記載したように入口が出口より低くなるように細胞分離容器をセットした。まず生理食塩水約５０ｍＬを体液の入口から出口へ流れるように通液した。次にＣＰＤ抗凝固ヒト末梢血８０ｍＬを同方向へ通液し、白血球を細胞分離容器に捕捉させた。最後にラインを切り替え、通液とは逆方向つまり体液の出口から入口に流れるように、４％ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液６％（フレゼニウスカービジャパン社製）（粘度４．３ｍＰａ・ｓ）を、シリンジを用いて手押しで導入し、細胞を細胞回収バッグに回収した。結果は表５に示した。

[0108] （実施例２０）

４％ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液６％（フレゼニウスカービジャパン社製）（粘度４．３ｍＰａ・ｓ）の代わりに生理食塩水（粘度１．１ｍＰａ・ｓ）を用いること以外は実施例１９と同様の操作を行った。結果は表５に示した。

[0109] （実施例２１）

ＣＰＤ抗凝固ヒト末梢血の代わりにＣＰＤ抗凝固ヒト臍帯血を用いること以

外は実施例１９と同様の操作を行った。結果は表５に示した。

[0110] （実施例２２）

厚さ１２ｍｍ直径４４ｍｍの、ポリカーボネートからなるカラム状の容器に、ポリブチレンテレフタレート製不織布（平均繊維径３．５μｍ、通気度係数Ｍ＝８．９）１１２枚を、積層状態で、図７に示した態様となるよう充填した。図９に示したように入口が出口より高くなるように細胞分離容器をセットした。まず生理食塩水約５０ｍＬを体液の入口から出口へ流れるように通液した。次にＣＰＤ抗凝固ヒト臍帯血８０ｍＬを同方向へ通液し、白血球を細胞分離容器に捕捉させた。最後にラインを切り替え、通液とは逆方向つまり体液の出口から入口に流れるように、４％ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液６％（フレゼニウスカービジャパン社製）（粘度４．３ｍＰａ・ｓ）を、シリンジを用いて手押しで導入し、細胞を細胞回収バッグに回収した。結果は表５に示した。

[0111] （実施例２３）

ＣＰＤ抗凝固ヒト末梢血８０ｍＬの代わりにＣＰＤ抗凝固ウシ末梢血１５０ｍＬを用いること以外は実施例１９と同様の操作を行った。結果は表５に示した。

[0112] （実施例２４）

ＣＰＤ抗凝固ヒト臍帯血８０ｍＬの代わりにＣＰＤ抗凝固ウシ末梢血１５０ｍＬを用いること以外は実施例２２と同様の操作を行った。結果は表５に示した。

[0113]

[表5]

| | 体液 | 剥離溶液 | 剥離溶液の粘度[mPa・s] | 入口の位置 | 白血球回収率[%] | 単核球回収率[%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 実施例19 | ヒト末梢血 | ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液 | 4.3 | 出口より低い | 78 | 83 |
| 実施例20 | ヒト末梢血 | 生理食塩水 | 1.1 | 出口より低い | 73 | 75 |
| 実施例21 | ヒト臍帯血 | ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液 | 4.3 | 出口より低い | 82 | 80 |
| 実施例22 | ヒト臍帯血 | ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液 | 4.3 | 出口より高い | 75 | 81 |
| 実施例23 | ウシ末梢血 | ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液 | 4.3 | 出口より低い | 93 | — |
| 実施例24 | ウシ末梢血 | ヒト血清アルブミン含有サリンヘス輸液 | 4.3 | 出口より高い | 83 | — |

[0114] 以上の結果より、本発明の分離材及び分離方法を用いることにより、圧上昇を引き起こしにくく、尚且つ剥離溶液の種類に依存せず、効率良く白血球または単核球を分離可能であることが分かる。入口が出口より低くなるように細胞分離容器をセットすることにより、白血球回収率をさらに向上させることができる。一方、比較例に示したように、繊維径や通気度係数Mが小さい不織布を使用すると、圧が上昇する傾向があり、総じて白血球回収率が低下する傾向がある。

[0115] （実施例２５）

実施例２１、および実施例２２で分離した細胞を凍結保存し、凍結保存後の細胞の活性を評価した。分離した細胞をＣｒｙｏｂａｇ（Ｍａｃｏｐｈａｒｍａ社製）に移し４℃に冷やした後、ＤＭＳＯの最終濃度が１０％になるように凍結保護剤としてＤＭＳＯとデキストラン４０の混合液を添加した。その後プログラムフリーザーで少しずつ段階的に温度を下げ、液体窒素タンクの中（マイナス１９６℃）で、凍結状態で保存した。１４日間後、凍結保存した細胞を３７℃の温浴中で解凍し、デキストランとアルブミンの混合液に移した。その混合液を遠心し上清を除いた後、細胞をデキストランとアルブミンの混合液に再度懸濁し、細胞のカウントを行った。分離後回収率として、分離前の細胞数に対する、分離後の処理液中に含まれる細胞数の割合を算出した。また、凍結後回収率として、凍結前の細胞数に対する、凍結後の処理液中に含まれる細胞数の割合を算出した。

[0116] 実施例２１で得られた細胞については、白血球、単核球、ＣＤ３４陽性細胞、ＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陰性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１６４陽性細胞、及びＣＤ４５陽性且つＣＤ１１７陽性細胞について分離後の回収率、凍結保存後の回収率、凍結保存後の生存率を算出した。結果は表６に示した。

[0117] [表6]

| | 分離後回収率 | 凍結後回収率 | 凍結後の生存率 |
|---|---|---|---|
| 白血球 | 82 | 70 | 80 |
| 単核球 | 80 | 96 | |
| CD34陽性細胞 | 86 | 80 | |
| CD133陽性細胞 | 98 | 94 | |
| CD34陰性且つCD133陽性細胞 | 67 | 100 | |
| CD34陽性且つCD133陽性細胞 | 100 | 87 | |
| CD45陽性且つCD133陽性且つCD117陽性細胞 | 96 | 89 | |
| CD45陽性且つCD133陰性且つCD164陽性細胞 | 89 | 100 | |
| CD45陽性且つCD117陽性細胞 | 61 | 100 | |

[0118] 実施例２２で得られた細胞については、白血球、単核球、ＣＤ３４陽性細胞、ＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陰性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陽性細胞、ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陰性細胞、ＣＤ４５陰性且つＣＤ４４陽性且つＣＤ７３陽性且つＣＤ９０陽性細胞、ＣＤ４５陰性且つＣＤ２３５ａ陰性且つＣＤ３３陰性且つＣＤ７陰性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１１７陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１６４陽性細胞、ＣＤ４５陰性ＣＤ３０９陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、ＣＤ４５陽性且つＣＤ１１７陽性細胞について、分離後の回収率、凍結保存後の回収率、凍結保存後の生存率を算出した。結果は表７に示した。

[0119]

[表7]

| | 分離後回収率 | 凍結後回収率 | 凍結後の生存率 |
|---|---|---|---|
| 白血球 | 75 | 75 | 86 |
| 単核球 | 81 | 93 | |
| CD34陽性細胞 | 100 | 100 | |
| CD133陽性細胞 | 100 | 100 | |
| CD34陰性且つCD133陽性細胞 | 100 | 100 | |
| CD34陽性且つCD133陽性細胞 | 100 | 99 | |
| CD34陽性且つCD133陰性細胞 | 100 | 100 | |
| CD45陰性且つCD44陽性且つCD73陽性且つCD90陽性細胞 | 63 | 100 | |
| CD45陰性且つCD235a陰性且つCD33陰性且つCD7陰性細胞 | 100 | 100 | |
| CD45陽性且つCD133陽性且つCD117陽性細胞 | 100 | 79 | |
| CD45陽性且つCD133陰性且つCD117陽性細胞 | 77 | 75 | |
| CD45陽性且つCD133陽性且つCD164陽性細胞 | 100 | 100 | |
| CD45陽性且つCD133陰性且つCD164陽性細胞 | 100 | 100 | |
| CD45陰性CD309陽性細胞 | 88 | 88 | |
| CD45陽性且つCD164陽性細胞 | 100 | 100 | |
| CD45陽性且つCD117陽性細胞 | 94 | 95 | |

[0120] 以上のように、本発明の細胞分離方法は、細胞に与えるストレスが非常に低いため、この細胞分離方法で得られた細胞は、凍結保存後でも、高い活性を維持している。

## 符号の説明

[0121] １　体液の入口

２　体液の出口

３　分離材

４、５　分離材を圧縮させるためのワッシャー

６　容器

７　血球分離カラム

８　チャンバー

９　血球分離材の充填された容器

１０　体液バッグ

１１　プライミング液バッグ（兼洗浄液バッグ）

１２　赤血球回収バッグ

１３　白血球回収バッグ（単核球回収バッグ）

１４　回収ポート

１５、１６、１７　三方活栓

１８～２４　回路

# 請求の範囲

[請求項1] 平均繊維径が２．０μｍ以上６．０μｍ以下であり、かつ、通気度係数Ｍが６．２以上３５以下である不織布からなることを特徴とする、体液から白血球または単核球を分離するための分離材。

[請求項2] 不織布が、ポリオレフィン、ポリアミド、およびポリエステルからなる群から選択される少なくとも１つからなる、請求項１に記載の分離材。

[請求項3] 体液が、末梢血、臍帯血、骨髄、月経血、および組織抽出物からなる群から選択される少なくとも１つである、請求項１または２に記載の分離材。

[請求項4] 請求項１～３のいずれかに記載の分離材を、体液の入口と出口を有する容器に充填して得られる細胞分離用容器。

[請求項5] 分離材が、体液の流れる方向に１枚または複数枚積層して充填されていることを特徴とする、請求項４に記載の細胞分離用容器。

[請求項6] 分離材が、体液の流れる方向に圧縮された状態で充填されていることを特徴とする、請求項４または５に記載の細胞分離用容器。

[請求項7] カラムタイプであることを特徴とする、請求項４～６のいずれかに記載の細胞分離用容器。

[請求項8] 請求項１～３のいずれかに記載の分離材に体液を接触させて白血球または単核球を分離する工程を含む、細胞分離方法。

[請求項9] 請求項４～７のいずれかに記載の細胞分離用容器に体液を接触させて白血球または単核球を分離材に捕捉させる第一の工程、および、剥離溶液を用いて、捕捉した白血球または単核球を分離材から回収する第二の工程からなる、細胞分離方法。

[請求項10] 第二の工程が、細胞分離用容器の出口から剥離溶液を導入し、入口から白血球または単核球を回収する工程である、請求項９に記載の細胞分離方法。

[請求項11] さらに、第一の工程の後であって第二の工程の前に、入口から生理食

塩水または緩衝液を導入することにより、細胞分離用容器内の夾雑成分を除去する工程を含む、請求項９または１０に記載の細胞分離方法。

[請求項12] さらに、第一の工程の前に、分離材を生理食塩水または緩衝液と接触させる工程を含む、請求項９～１１のいずれかに記載の細胞分離方法。

[請求項13] さらに、第一の工程の前に、細胞分離容器の体液の入口を細胞分離容器の体液の出口より低い高さに固定する工程を含む、請求項９～１２のいずれかに記載の細胞分離方法。

[請求項14] 白血球と血小板が実質的に分離材に捕捉され、赤血球が実質的に捕捉されないことを特徴とする、請求項８～１３のいずれかに記載の細胞分離方法。

[請求項15] 分離された白血球または単核球が、造血幹細胞および／または間葉系幹細胞を含むことを特徴とする、請求項８～１４のいずれかに記載の細胞分離方法。

[請求項16] 請求項８～１５のいずれかに記載の細胞分離方法に、さらに、液体窒素環境下にする工程を含むことを特徴とする、細胞の凍結保存方法。

[請求項17] 液体窒素環境下がー１９６℃からー３０℃であることを特徴とする請求項１６に記載の凍結保存方法。

[請求項18] ジメチルスルホキシド、デキストラン、アルブミン、およびヒドロキシエチルスターチからなる群から選択される少なくとも１つの凍結保護剤を使用することを特徴とする請求項１６または１７に記載の凍結保存方法。

[請求項19] 凍結保存した幹細胞の生存率が８０％以上であることを特徴とする請求項１６～１８のいずれかに記載の凍結保存方法。

[請求項20] 請求項８～１５のいずれかに記載の細胞分離方法によって得られた白血球、単核球、または幹細胞。

[請求項21] ＣＤ３４陽性細胞、

ＣＤ１３３陽性細胞、

ＣＤ３４陰性且つＣＤ１３３陽性細胞、

ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陽性細胞、

ＣＤ３４陽性且つＣＤ１３３陰性細胞、

ＣＤ４５陰性且つＣＤ４４陽性且つＣＤ７３陽性且つＣＤ９０陽性細胞、

ＣＤ４５陰性且つＣＤ２３５ａ陰性且つＣＤ３３陰性且つＣＤ７陰性細胞、

ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１１７陽性細胞、

ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１１７陽性細胞、

ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、

ＣＤ４５陽性且つＣＤ１３３陰性且つＣＤ１６４陽性細胞、および

ＣＤ４５陰性且つＣＤ３０９陽性細胞

からなる群から選択される

いずれかの細胞を含む請求項２０に記載の幹細胞。

［請求項22］ ＣＤ４５陽性且つＣＤ１６４陽性細胞、または

ＣＤ４５陽性且つＣＤ１１７陽性細胞を含む請求項２０に記載の白血球。