

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-524451
(P2005-524451A)

(43) 公表日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 M 1/02	A 6 1 M 1/02 5 2 0	4 C 0 7 7
B 0 4 B 5/02	B 0 4 B 5/02 A	4 D 0 5 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

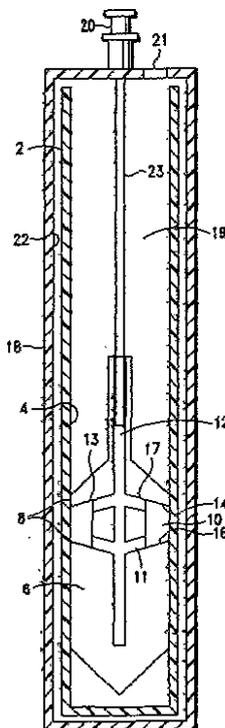
(21) 出願番号	特願2004-501069 (P2004-501069)	(71) 出願人	504407262 ハヌマン・エルエルシー アメリカ合衆国カリフォルニア州94124 サンフランシスコ・パルーアベニュー2180
(86) (22) 出願日	平成15年4月24日 (2003.4.24)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月2日 (2004.11.2)	(72) 発明者	ドリアン, ランデル アメリカ合衆国カリフォルニア州92117 7-4038 サンデイエゴ・キヤツスト ンドライブ5989
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/012888	(72) 発明者	ストーズ, リチャード・ウツド アメリカ合衆国カリフォルニア州94131 1-3014 サンフランシスコ・アーリン トンストリート378
(87) 国際公開番号	W02003/092894		
(87) 国際公開日	平成15年11月13日 (2003.11.13)		
(31) 優先権主張番号	60/377, 559		
(32) 優先日	平成14年5月3日 (2002.5.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/379, 951		
(32) 優先日	平成14年5月10日 (2002.5.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/382, 639		
(32) 優先日	平成14年5月21日 (2002.5.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板を血液から単離するための方法および装置

(57) 【要約】

縦の内表面を有する空洞のある遠心回転分離容器を含んでなる血小板収集装置。空洞内のフロートは、基部、基部の上の血小板収集表面、外表面を有する。フロート密度は赤血球の密度より低く且つ血漿の密度より高い。血小板収集表面は、フロートが分離された血液中に懸垂される時にはそれを血小板の高さより下に置くような位置をフロート上で有する。遠心中に、血小板またはパフィコートの層が血小板収集表面にすぐ隣接して集まる。血小板を次に血小板収集表面から除去する。沈殿中の赤血球を通して全血より大きい密度を有するフロートの動きが捕獲された血小板を放出して、血小板収率を高める。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

縦の内表面のある空洞を有する遠心回転分離容器と空洞内に配置されたフロートを含んでなる血液血小板分離装置であって、フロートが基部および基部の上にある血小板収集表面を有し、フロートが外表面を有し、フロートが赤血球の密度より低く且つ血漿の密度より高い密度を有し、そして血小板収集表面がフロート上に遠心後にそれを血小板の高さのすぐ下に置く高さに配置される、血液血小板分離装置。

【請求項 2】

空洞が円筒状内表面を有し且つフロートが円筒状外表面を有する、請求項 1 の血液血小板分離装置。

10

【請求項 3】

フロートの外表面と管の内表面との間の距離が 0.5 mm より小さい、請求項 2 の血液血小板分離装置。

【請求項 4】

内表面のある軟質内管および軟質内管に配置されたフロートを含んでなり、フロートが中立圧力条件下では軟質管の内表面と密封関係にある外表面を有し、この密封関係が中立圧力条件下でのフロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動きを防止し、フロートの外表面が高められた圧力条件下では軟質管の内表面と接触せず、それにより高められた圧力条件下ではフロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動き並びに円筒内のフロートの動きを可能にし、フロートが遠心後に分離された血液中の血小板層の高さのすぐ下に配置された血小板収集表面のある血小板受容器空洞を有し、そしてフロートが遠心後に分離された血小板を除去するための血小板受容器空洞と連結している溝を有する、請求項 1 の血液血小板収集装置。

20

【請求項 5】

フロートが遠位表面を有する近位部分および遠位表面と向かい合った近位表面を有する遠位部分を含んでなり、遠位表面および近位表面が血小板受容体空洞を規定する、請求項 4 の血小板収集装置。

【請求項 6】

外容器が血小板分離工程の開始時に血液を内管に導入するためおよび血小板分離工程の終了時に血小板を内管から除去するための口を含む、請求項 5 の血小板収集装置。

30

【請求項 7】

口がルーアー固定装置に連結している注射器を含む、請求項 6 の血小板収集装置。

【請求項 8】

外容器が遠心中の内管の膨張を制限するための内表面のある、請求項 4 の血小板収集装置。

【請求項 9】

フロートの外表面が空洞の内表面と滑動関係にある、請求項 1 の血液血小板分離装置。

【請求項 10】

フロートが遠位表面を有する近位部分および遠位表面と向かい合った近位表面を有する遠位部分を有する単一構造体を含んでなり、遠位表面および近位表面が血小板受容体空洞を規定し、血小板受容体空洞の上表面が血小板収集表面を規定する、請求項 9 の血小板収集装置。

40

【請求項 11】

遠心回転分離器が実質的に硬質管であり、そしてフロートが遠位表面を有する近位部分および遠位表面と向かい合った近位表面を有する遠位部分を含んでなり、遠位表面および近位表面が血小板受容体空洞を規定する、請求項 10 の血小板収集装置。

【請求項 12】

フロートの頂部表面が血小板収集表面を構成し、そしてこの装置がフロートの上に配置されそしてフロートおよび空洞と実質的に軸方向で共心性であるプランジャーとプランジャーを通して血漿絞り出し表面に伸びる流体除去通路を含み、プランジャーが空洞の内表

50

面から離れている円筒状外表面を有し、プランジャーの底が血小板収集表面と向かい合った血小板絞り出し表面を規定する、請求項 1 の血小板収集装置。

【請求項 1 3】

プランジャーの外表面と空洞の内表面との間に少なくとも 1 つのシールを有し、このシールが外表面および内表面と密封関係で配置される、請求項 1 2 の血小板収集装置。

【請求項 1 4】

フロートの頂部が血漿収集表面の上に配置された停止表面を含む、請求項 1 1 の血小板収集装置。

【請求項 1 5】

遠心回転分離器が実質的に硬質管であり、そしてフロートが円筒状外表面を有し、フロートが遠位表面を有する近位部分および遠位表面と向かい合った近位表面を有する遠位部分を含んでなり、遠位表面および近位表面が血小板受容体空洞を規定する、請求項 1 0 の血小板収集装置。

10

【請求項 1 6】

空洞内に配置されたフロートを含む、縦の内表面、近位端部および遠位端部のある空洞を有する遠心回転分離容器を用いて血小板を全血から分離する方法であって、フロートが基部および基部の上にある血小板収集表面を有し、フロートが外表面を有し、フロートの外表面と管の内表面との間の距離が 0.5 mm より小さく、フロートが赤血球の密度より低く且つ血漿の密度より高い密度を有し、フロートが完全に分離された血液中に懸垂される時には血小板収集表面がフロート上でそれを血小板の高さのすぐ下に置く位置を有し、この方法が

20

a) 遠心後に血小板の高さを血小板収集表面の位置に置くのに十分な量の全血を空洞に導入し、

b) 遠心回転分離容器に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、それにより赤血球を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を血小板収集表面にすぐ隣接して収集し、そして

c) 血小板を血小板収集表面から除去する

段階を含んでなる、血小板を全血から分離する方法。

【請求項 1 7】

フロートが全血より大きい密度を有し、そして遠心力下では、フロートが近位端部に向かって沈殿中の赤血球を通過して動き、捕獲された血小板を放出して血小板収集表面にすぐ隣接してそれらを収集し、それにより除去のために利用できる血小板の量を増加させる、請求項 1 6 の方法。

30

【請求項 1 8】

装置がフロートの上に配置されそしてフロートおよび空洞と実質的に軸方向で共心性であるプランジャーを含み、プランジャーが空洞の内表面から離れている円筒状外表面を有し、プランジャーの底が血小板収集表面と向かい合った血小板絞り出し表面を規定し、そして流体除去通路がプランジャーを通り血漿絞り出し表面を通過して伸び、この方法が

a) 遠心後に血小板の高さを血小板収集表面の位置に置くのに十分な量の全血を空洞に導入し、

40

b) 遠心回転分離容器に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、それにより赤血球を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を血小板収集表面上で収集し、

c) プランジャーを軸方向で血漿の頂部に向かって、血漿絞り出し表面が血小板収集表面の近くに且つそれから離れて置かれるまで、進め、

d) 血小板抽出管を流体除去通路を通して、その端部が血小板層と接触するまで、伸ばし、そして

e) 血小板濃縮物を血小板抽出管を通して除去する

段階を含んでなる、請求項 1 6 の方法。

【請求項 1 9】

50

フロートの頂部が血漿収集表面の上に配置された停止表面を含みそしてプランジャーを軸方向で、血漿絞り出し表面が停止表面に接触するまで、進行める、請求項18の方法。

【請求項20】

内表面、近位端部および遠位端部を有する軟質内管と軟質内管内に配置されたフロートを用いて血小板を全血から分離する方法であって、フロートが中立圧力条件下で軟質管の内表面と密封関係にある外表面を有し、この密封関係が中立圧力条件下でのフロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動きを防止し、フロートが遠心後に分離された血液

10

中の血小板の高さのすぐ下の血小板収集表面のある血小板受容器を有し、この方法が

a) 遠心後に血小板の高さを血小板支持表面の高さにすぐ隣接して置くのに十分な量の全血を高められた圧力下で内管に導入し、
b) 管に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、フロートの外表面を軟質管の内表面から離し、フロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動き並びに管内のフロートの動きを可能にし、赤血球を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を血小板収集表面にすぐ隣接して収集し、そして

c) 血小板を血小板収集表面から除去する
段階を含んでなる、血小板を分離する方法。

【請求項21】

内管がそれと共軸性の硬質外管の中に配置され、外管が遠心中に内管壁の膨張を制限するための内表面を有する、請求項20の方法。

【請求項22】

20

空洞内に配置されたフロートを含む近位端部および遠位端部を有する容器の中で遠心により血小板を全血から分離する方法であって、フロートが赤血球の密度より低く且つ全血の密度より高い密度を有し、この方法が

a) 全血を空洞に導入し、
b) 容器に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、それにより赤血球を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を赤血球と血漿収集部との間にある血小板層の中で収集し、ここで遠心力の適用中に、フロートが沈殿中の赤血球を通過して動き、フロートの動きが捕獲された血小板を放出させ、それらを血小板層の中で収集可能にし、そして

c) 血小板を血小板収集表面から除去する
段階を含んでなる、血小板を分離する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、赤血球、血漿および血小板画分への血液の迅速分別用の装置および方法に関する。各画分は利用することができまたは血液ドナーに戻すことができる。有用な高濃度血小板画分は 2×10^6 個の血小板 / μL より大きい処理前の抗凝血処理された全血中の濃度の2倍以上の血小板濃度を有する。本発明は、治療を助けまたは促進する自己由来濃縮血小板画分の迅速製造用に特に価値がある。

【背景技術】

40

【0002】

血液は分別することができそして血液の種々の画分を種々の医学的需要のために使用することができる。例えば、貧血（低い赤血球水準）は赤血球の注入で処置することができる。血小板減少症（低い血小板水準）は血小板濃縮物の注入で処置することができる。

【0003】

重力または遠心力の影響下で、血液は自然に三層中に沈殿する。平衡状態で、頂部にある低密度層は血漿と称する麦わら色の透明流体である。血漿は、塩類、代謝物質、ペプチド類、および小さいもの（インシュリン）から非常に大きいもの（補体成分）までの範囲の多くの蛋白質の水溶液である。血漿自体は薬品中の用途を制限したが、さらに分別して例えば血友病（因子V I I I）を処置するためまたは止血剤（フィブリノゲン）として使

50

用される蛋白質を生成することができる。

【0004】

底にある高密度層は、酸素輸送用に特定された無核赤血球を含んでなる深赤色の粘着性流体である。赤血球の高い比重の原因とる高濃度のキレート化された鉄またはヘムにより、赤色が付与される。血液型に適合したパック入り赤血球は、例えば出血により引き起こされる貧血の処置に有用である。赤血球よりなる全血の相対容量はヘマトクリットと称され、そして正常人間では約38%～約54%の範囲でありうる。

【0005】

中間層は最も小さく、赤血球層の頂部にあり且つ血漿の下にある薄い白色帯として出現し、そしてパフィコートと称される。パフィコート自体は、2つの主要成分である核形成された白血球および血小板と称する無核の比較的小さい物体を有する。白血球は免疫を与えそして組織片除去に寄与する。血小板は血管内の破裂を封印して出血を止めそして成長および創傷治癒因子を創傷部位に運ぶ。

10

血小板の抽出

全血からの血小板の抽出は研究されていた(非特許文献1)。輸血薬品では、その意図は各々の患者に必要な成分だけを輸血することであるため、血液センターの目標は血液成分をできる限り純粋に、すなわち最も少ない汚染細胞を有する形態で、製造することである。血小板は単離および精製が最も難しい。非特許文献1からのデータに基づくと、最適な遠心条件下(低速における長期間)でも、血小板のかなりの部分が沈殿した赤血球の中に捕獲されたままである。

20

【0006】

数年にわたり、血小板を赤血球、白血球および血漿から分離するための遠心方法が開発された。これらの方法は、成分をプラスチックバッグシステムおよびアフエレス(s a p h e r e s i s)装置の両者の中で、そしてさらに最近では特殊装置の中で、分離する。歴史的に言えば、ほとんどの血小板濃縮物はドナーから得られそして血小板減少症を処置するために、すなわち異種間で、使用される。さらに最近では、血小板濃縮物は創傷治癒を促進するために使用されており、そして自己由来血小板濃縮物の使用(血小板ドナーの処置のための血小板の隔離(sequestration))が増大している。

【0007】

種々の血液細胞および血漿の沈殿は細胞の異なる比重および媒体の粘度に基づく。これはスベドベルグ(Svedberg)式:

30

【0008】

【数1】

$$V = ((2/9)\omega^2 R(d_{\text{細胞}} - d_{\text{血漿}})r^2) / \eta_t$$

【0009】

[式中、

V = 沈殿速度であり、

= 回転の角速度であり、

40

R = 血液細胞からローター中心までの放射方向距離であり、

d = 比重であり、

r = 血液細胞の半径であり、

$\eta_t = \eta$ の温度における媒体の粘度である]

にほぼ従い遠心により促進させうる。

【0010】

血液成分の特性を表に示す。

【0011】

【表 1】

成分	直径 (μm)	比重 (g/ml)	変形	付着
赤血球	5.4	1.100	+++	-
顆粒球	9.6	1.085	+	++

10

リンパ球	7.6	1.070	±	±
単球	11.2	1.063	±	+
血小板	3.2	1.058	±	+++

20

血漿	NA	1.026	NA	NA
添加剤 溶液	NA	1.007	NA	NA

30

【0012】

平衡となるまで沈殿した時に、最も高い比重（密度）を有する成分は事実上底に沈殿し、そして最も軽いものは頂部に上昇する。しかし、成分が沈殿する速度はほぼスベドベルグ式により支配され、沈殿速度は成分の寸法の平方に比例する。換言すると、最初に白血球の如き比較的大きい成分が例えば血小板の如き比較的小さい成分よりはるかに速く沈殿するが、実際には成分の積層は密度により支配される。

弱回転遠心

全血が低速（1,000gまで）で短時間（2～4分間）にわたり遠心される場合には、白血球が赤血球から速く沈殿しそして両者とも血小板よりはるかに速く沈殿する（上記のスベドベルグによる）。より高い速度では、同じ分布がより短い時間で得られる。これが、明白に分離されておらず且つ（1）大多数の懸濁された血小板並びに少量の白血球および赤血球を含有する血漿、並びに（2）その下にある大多数の白血球および一部の血小板と混合された赤血球の薄層よりなる血液成分の層を生成する。全血からの血小板に富んだ血漿（PRP）の回収方法はこの原理に基づく。遅い遠心後に全血中の血小板のほとんどが血漿の中であって血漿中の血小板の濃度が高まるため、用語「血小板に富んだ」はこの成分に関して使用される。パック入り赤血球およびPRP中への分離までだけ分別を行う遠心沈殿を「弱回転」と称する。「弱回転」はここでは、赤血球は沈殿するが血小板は懸濁液中に残る遠心条件を記述するために使用される。「強回転」はここでは、赤血球が沈殿し且つ血小板が赤血球層のすぐ上にある層の中に沈殿する遠心条件を記述するために使用される。

40

50

2 回転血小板分離

弱回転後に、PRPを赤血球層から分離容器に除去することができ、そして第二遠心段階でPRPを血小板が少ない血漿(PPP)および血小板濃縮物(PC)に分別することができる。第二回転で、血小板は一般に遠心されて少量の血漿中より後で再懸濁させるペレットにされる。

【0013】

最も普遍的なPRP製造方法では、2~4分間にわたる1,000g~2,500gにおける全血の遠心が大多数の血小板を含有するPRPを生ずる。3-バッグシステムにおける1単位(450ml)の全血の遠心後に、PRPは空の付属バッグに移されそして次に強回転にかけられて血小板を沈殿させそして実質的に細胞を含まない血漿を生成する。血小板が少ない血漿(PPP)のほとんどが約50mlを除いて除去されそして血小板のペレットがばらばらにされそしてこの上澄み液と混合される。場合により、ほぼすべての血漿を除去しそして追加溶液で再構成してもよい。集合した血小板を回収可能にするためには、血小板が再び再懸濁されそして次に攪拌機に貯蔵される前に混合物を1~2時間静止させる。

10

【0014】

血小板を固い非生理学的表面に対して沈殿させることにより遠心が血小板を損傷しうるということが信じられている。そのような表面上でのパッキングが部分的活性化を誘発しそして生理学的損傷を引き起こして再懸濁時に部分的に崩壊する「傷ついた」血小板を生ずることがある。

20

強回転遠心

遠心が低速で続けられる場合には、白血球は赤血球の頂部に沈殿するが血小板は血漿中に懸濁されて残るであろう。長期にわたる低速遠心後にのみ血小板も赤血球の頂部に沈殿するであろう。

【0015】

血液処理機(非特許文献2)を用いる実験は、高速(2,000g-3,000g)における遠心が短時間で同様な細胞分離パターンを生ずることを示した。最初に細胞が寸法に応じて分離し、すなわち白血球は赤血球より速く沈殿しそして血小板は血漿中に残る。すぐに、赤血球が互いに絞り出される血漿および白血球の上に「パック」される。それらの比較的低い密度のために、遠心力が充分高く且つ沈殿時間が充分長い限り、白血球および血小板は赤血球と血漿との界面に向かって上向きに押されるが上方にある血漿層の中の血小板はこの界面の頂部に沈殿するであろう。血漿、血小板、白血球および赤血球はそれらの密度に応じて最終的には積層されるであろう。赤血球層の上に沈殿した血小板は「2回転」技術により単離されるものより少なく活性化される。

30

血小板収率および遠心速度

いわゆる「パフィコート」は血小板および白血球の層よりなるが、普通は血漿層の下方部分および赤血球物体の上層と共に回収される。この用途では、血小板層に関する全ての言及は白血球が存在しない場合には血小板層を意味しまたは白血球が血小板と混合されて存在する場合にはパフィコート層を意味することを意図する。

【0016】

本発明の工程および方法は、低いおよび高い遠心力の両者を包含する広範囲における血小板単離および収集を行う。有効な分離は高いgの遠心を必要とせず、600g-1000gまたは低速遠心で良好な結果が得られた。高速遠心は2000gより大きい遠心力をさす。実験は、約700gの力における長い(30-45分間の)遠心が各成分への全血のほとんど完全な分離を与える。そのような長い時間は、手術中の自己由来使用に関しては実用的且つ経済的であるとは考えられない。パフィコート分離に関しては、約3,000gにおいて7~10分間にわたり回転させて全血を細胞を含まない血漿、60-70%の白血球および70-80%の血小板を含有するパフィコート、並びに約30%の白血球および10-20%の血小板で汚染された赤血球に分離させることができる。

40

アフエレシス - 単一回転血小板分離

50

アフエレシス、すなわち他の成分をドナーに再注入しながらの血液からの血小板の分離、を行うための特殊な装置が発明されていた。これにより、赤血球の損失がドナーが与える血液の量を制限するため、二段階遠心で可能なものより多い血小板をドナーが与える。典型的には、2～3時間のアフエレシス工程は従来の供血の6倍以上に相当する 3×10^{11} 個の血小板を含有する血小板生成物を生ずるであろう。

【0017】

血小板濃縮物の単一段階製造方法の最初の例証は25年以上前に報告された(非特許文献2)。この最初の試みでは、異なる遠心時間後にそして異なる速度で収集された画分中の血小板、白血球および赤血球の存在下でのかなりの重複のために、異なる細胞成分間の完全な分離は、少なくとも一段階では、得られなかった。多くの改良されたアフエレシス方法および装置が開発され、そして引用された特許に記載されている。

10

【0018】

アフエレシス方法では、吸引された血液は直ちに抗凝血剤と混合され、遠心され(ヘモネティックス(Haemonetics)、バクスター(Baxter)CS3000およびアミクス(Amicus)、コーブ・スペクトラ(Cobe Spectra)、フレゼニウス(Fresenius)AS104、AS204)、そして密度に応じて成分に分離される。パフィコートは目によりまたは光学センサーにより認識されそして血小板に富んだ層は別のバッグに向けられる。種々の製造業者のソフトウェアを調節して白血球汚染のない血小板濃縮物を製造しているが、あるものは血小板回収後の追加濾過を必要とし、他のものはアフエレシスシステム中に組み入れられた特殊な技術または道具を有する。

20

ロイコリダクション(Leukoreduction)

研究室2回転処理およびアフエレシス方法の両者から生ずるPCはドナー白血球を含有する。白血球は血小板貯蔵に悪影響を与えそしてサイトキン(cytokine)生成により輸血後に副作用を与えることが示された。非自己白血球(異種白血球)およびそれらが製造するサイトキンが受容者の白血球により激しい反応を引き起こしうるため、PRPおよびPCからの白血球の除去(ロイコリダクション)が主要な問題である。1999年に、FDA血液生成物勧告委員会(FDA Blood Product Advisory Committee)は米国における全ての非白血球成分の慣例的ロイコリダクションを推奨した(非特許文献3)。従って、非自己由来白血球が有害な免疫反応を刺激するため、先行技術の多くは血小板濃縮物のロイコリダクションに焦点をあてている。本発明の方法は患者の血液から自己由来血小板を迅速に回収するための簡便な方法を提供するため、免疫反応は危険ではなく、そして白血球の存在はほとんどまたは全く関係ない。

30

自己由来血小板

自己由来血小板は異種血小板と比べて利点を有することが示された。異種または外来性調剤と関連する疾病伝染および免疫学的反応に関する事象は最少にされる。自己由来調剤が手術時に製造されることが、研究室システムにより起きうる試料の誤標識に関連する危険性を減ずる。自己由来血小板の使用は時間のかかるスクリーニング試験の必要性を回避する。血小板活性化を行う時間がより少ない。部分的に活性化される貯蔵された血小板とは異なり、自己由来血小板の活性化状態は、最初に製造された時点で、元の全血中のものと同様であることが見出された(非特許文献4)。

40

【0019】

血小板は、創傷治癒のための助剤として使用することができる。ナイトン(Knighton)は、治癒を促進するための創傷に対する自己由来血小板放出剤の適用を記述している(非特許文献5)。さらに最近の研究は、血小板自体を使用する。マークス(Marx)は、歯科インプラント処置後の骨の治癒を劇的に促進させる血小板調剤を記述している(非特許文献6)。他の研究者は、医学的処置以外のための、例えば、斑点穴の処置(非特許文献7)、美容手術における治癒改良(非特許文献8)、および止血のための使用(非特許文献9)に関する同様な主張を行っている。

【0020】

50

最近の数年間に、元来は流出した血液から赤血球を洗浄するために発明された装置（自己輸血装置）が自己由来血小板の分離を可能にするために、普通は手術中に、応用された。この工程は、自己由来白血球はそれらが自己白血球であるため患者の白血球からの反応を引き起こさないためPCからの白血球の除去がもはや重要でないという大きな利点を有する。例えば、PRPの隔離が心臓手術中の異種輸血を減少させる（非特許文献10）。種々の製造業者からの自己輸血装置（例えば、エレクトロメディックス（Electro Medics）500）を使用して高い血小板濃度を有する自己由来血小板調剤を製造することができる。

【0021】

自己由来血小板濃縮物を製造するために使用される自己輸血装置は熟練操作員並びにかなりの時間および費用を必要とする。ほとんどの装置は大量の血液を必要とする。エレクトロメディックス500は手術中に置かれた中枢神経カテーテルを通し400～450mlの自己由来全血を吸引する。それが血液を吸引するにつれて、分離器がクエン酸リン酸デキストロース（citrate phosphate dextrose）（CPD）を加えて抗凝血処理する。血液を次に遠心してその三種の基本成分にする。赤血球層が最も低い水準で、血小板濃縮物層が中間水準で、そしてPPP層が頂部で生成する。細胞分離器が増分的に各層を密度の低いものから密度の高いものに分け、従ってそれがPPP（約200ml）を最初にそしてPC（約70ml）を次に分け、残存赤血球（約180ml）が残る。PPPが除去された時に、赤血球からPCを精確に分離可能にするために遠心速度を2400RPMに下げる。実際、最も直前に合成されそしてその結果として最も高い活性を有する血小板は比較的大きくそして上部の1mmの赤血球と混合されるため、この層はPRP生成物中に含まれて赤味を与える。

【0022】

最近、自己由来血小板濃縮物を手術中に製造するために特別に設計された装置、例えばスマートプレップ自己由来血小板濃縮物システム（SmartPreP Autologous Platelet Concentrate System）（ハーベスト・オートロゴス・ヘモバイオロジックス（Harvest Autologous Hemobiologics）、ノルウェル、マサチューセッツ州）が導入されている。それは、ほとんどの自己輸血機械中で使用される500ccの血液と比べて、90～180ccの血液を必要とする。さらに、二種の別の製品であるプラズマシール（PlasmaSeal）装置（プラズマシール、サンフランシスコ、カリフォルニア州）および血小板濃縮物収集システム（Platelet Concentrate Collection System）（インプラント・イノベーションズ・インコーポレーテッド（Implant Innovations, Inc.）、パーム・ビーチ・ガーデンズ、フロリダ州）がまもなく市場に導入される。これらの装置は必要な費用および時間を幾分減らしたが、現在市場に導入されている装置には熟練操作員が必要である。従って、血小板濃縮物を製造するための簡単で且つ迅速な自動化された方法および装置に対する要望が依然として残る。

【非特許文献1】ピエテルツ（Pietersz）著、2000

【非特許文献2】デウィット（deWit）著、1975

【非特許文献3】ホルム（Holme）著、2000

【非特許文献4】クラウザー（Crawther）著、2000

【非特許文献5】ナイトン（Knighton）著、1986

【非特許文献6】マークス（Marx）著、1998

【非特許文献7】ゲーリング（Gehring）著、1999

【非特許文献8】マン（Man）著、2001

【非特許文献9】オズ（Oz）著、1992

【非特許文献10】ストーバー（Stover）著、2000

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

本発明は、抗凝血処理された全血から自己由来血小板濃縮物の簡単で且つ迅速な製造のための方法および装置に関する。

【課題を解決するための手段】

【0024】

この論議は、回転ローター内の事項の多くの記述を包含する。ローターの参照フレーム内では、重力の影響は遠心力と比べて極小である。従って、ローター内では、「頂部」は軸により近い管の端部を意味しそして「底」はローターの周囲により近い管の端部を意味する。

【0025】

本発明の他の特徴は、ペレット化により血小板が表面に対して集合しないことである。

【0026】

本発明の別の特徴は、赤血球の密度より低く且つ全血のものより高い密度を有するフロートの使用であり、全血の密度は赤血球が沈殿するにつれて混合物中で上昇し、赤血球を静かに破壊して遊離状態の捕獲された血小板にし、それにより血小板収率を大きく増加させる。

【0027】

本発明の他の特徴は、装置が完全に自動化されそして最初の装置の充填および作動と次の血小板濃縮物の回収との間に使用者の介在の必要がないことである。

【0028】

本発明の他の特徴は、種々の量の血液を同一装置により処理できることである。

【0029】

本発明の他の特徴は、異なるヘマトクリットおよび異なる血漿密度の血液を同一装置により処理できることである。

【0030】

本発明の他の特徴は、生成物中の血小板の濃度を要望により変動させうることである。

【0031】

本発明の他の特徴は、処理が一回の遠心段階だけを包含することである。

【0032】

本発明の他の特徴は、処理が迅速であることである。

【0033】

本発明のフロート収集血液血小板分離装置は、縦の内表面のある分離室空洞を有する遠心回転分離容器を含んでなる。フロートは空洞内に配置され、フロートは基部、基部の上にある血小板収集表面、および外表面を有する。フロートの外表面と空洞の内表面との間の距離は0.5mm、好ましくは0.2mmより短く、そして最適には0.03mmより短くすることができる。フロートは、赤血球の密度より低く且つ血漿の密度より高い密度を有する。血小板収集表面は、フロートが完全に分離された血液の中に懸垂された時にフロート上でそれを血小板の高さのすぐ下に置くような位置を有する。空洞は円筒状の内表面を有することができそしてフロートは相補性の円筒状の外表面を有する。

【0034】

一つの態様では、装置は軟質内管を含み、そしてフロートは軟質内管の中に配置される。フロートは、中立圧力条件下で軟質管の内表面と密封関係にある外表面を有し、この密封関係が中立圧力条件下でのフロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動きを防止する。フロートの外表面は高められた圧力条件下で軟質管の内表面と接触しておらず、それにより高められた圧力条件下でのフロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動き並びに管内のフロートの動きを可能にする。フロートは、遠心後に分離された血液中の血小板層の高さのすぐ下に配置された血小板受容器空洞を有する。フロートは、遠心後に分離された血小板をそこから除去するための血小板受容器空洞と連結している溝を有する。一つの配置では、フロートは遠位表面を有する近位部分および遠位表面と向かい合った近位表面を有する遠位部分を含んでなり、遠位表面および近位表面が血小板受容器空洞

10

20

30

40

50

を規定する。好ましくは、外容器は血小板分離工程の開始時に血液を内管に導入するためおよび血小板分離工程の終了時に血小板を内管から除去するための口を含む。場合により、この口はルーアー固定装置に連結している注射器を含む。外容器は遠心中の内管の膨張を制限するための内表面のあることができる。

【0035】

さらに別の態様では、遠心回転分離器は実質的に硬質管であり、そしてフロートは遠位表面を有する近位部分および遠位表面と向かい合った近位表面を有する遠位部分を含んでなり、遠位表面および近位表面が血小板受容体空洞を規定する。この空洞は、血小板収集表面である表面を有する。フロートの外表面は好ましくは空洞の内表面と滑動関係にある。

10

【0036】

ここで使用される用語「血小板収集表面」は、血小板またはパフィコート層を支持する表面を意味すると定義される。好ましくは、血小板を保護するために血小板層は支持体層と直接には接触せず、そして最適には血小板は血小板収集表面上の赤血球の薄い緩衝またはクッション層の上に沈殿する。

【0037】

別の態様では、フロートの頂部表面が血小板収集表面を構成する。この形状では、装置はフロート上に配置されそしてフロートおよび空洞と実質的に軸方向で共心性であるプランジャーを含むことができ、場合により存在するこのプランジャーは管の相補性円筒状内表面から離れた円筒状外表面を有する。表面間の有効な液体密封性を与えるために空間を小さくすることができ、または空間が比較的大きい場合には、プランジャーの外表面と空洞の内表面との間に少なくとも1つのシールを付与することができ、このシールは外表面および内表面と密封関係で配置される。場合により、プランジャーの底は血小板収集表面と向かい合った血小板絞り出し表面を有し、そして流体除去通路がプランジャーおよび血漿絞り出し表面を通して血小板受容器空洞の中に伸びる。好ましくは、フロートの頂部は血漿収集表面上に伸びる停止表面を含む。

20

【0038】

上記の装置を用いて全血から血小板を分離するための本発明の方法は、最初に遠心後にフロートを分離室の床より上に上昇させそして血小板収集表面を血小板の高さのすぐ下に置くのに十分な量の全血を空洞に導入する段階を含む。分離室は空洞であり、その中で血液が赤血球、血漿および血小板（パフィコート）層に分離される。遠心回転分離容器に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、それにより赤血球を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を血小板収集表面上で収集する。血小板を次に血小板収集表面から除去する。

30

【0039】

装置がフロートの上に配置されそして空洞と実質的に軸方向で共心性であるプランジャーを含む場合には、本発明の方法は遠心後に血小板の高さを血小板収集表面の位置に配置するのに十分な量の全血を空洞に導入する段階を含んでなる。遠心回転分離容器に次に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、それにより赤血球を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を血小板収集表面にすぐ隣接して収集する。プランジャーを次に軸方向で血漿の頂部に向かって、血漿絞り出し表面が血小板収集表面にすぐ隣接して且つそこから離れて配置されるまで、進める。血小板抽出管を流体除去通路を通して、その端部が血小板層と接触するまで、伸ばし、そして血小板濃縮物を血小板抽出管から除去する。場合により、プランジャーを押し下げながら、血小板が少ない血漿を血小板抽出管を通して注射器または他の受容器の中で収集することができる。血小板を次に別個の注射器または他の受容器の中で抽出することができる。

40

【0040】

場合により、装置にはプランジャー配置がなくてもよい。この態様では、沈殿した血小板層の上からある量の血小板が少ない血漿を最初に除去した後には保有された少量の血漿中に懸垂された血小板収集表面から血小板を回収する。

50

【0041】

フロートの頂部が血漿収集表面上に配置された停止表面を含む装置の態様では、プランジャーを軸方向で、血漿絞り出し表面が停止表面に接触するまで、進める。

【0042】

軟質管内にフロートを有する装置では、この方法は遠心後にフロートを分離室の床の上に上昇させそして血小板収集表面を血小板の高さのすぐ下に配置するのに十分な量の全血を内管に導入する段階を含む。管に次に遠心力を軸方向で遠位端部に向かってかけ、それにより血液細胞を遠位端部で濃縮し、血漿を近位端部に向かって収集し、そして血小板を血小板収集表面にすぐ隣接して収集する。血小板を次に環状の血小板受容器空洞から除去する。

10

【0043】

フロートの頂部表面が血小板収集表面を構成する場合には、装置は場合によりフロートの上に配置されそしてフロートおよび空洞と実質的に軸方向で共心性であるプランジャーを含む。プランジャーは空洞の内表面から離された円筒状の外表面を有し、プランジャーの底が血小板収集表面と向かい合った血漿絞り出し表面を規定する。流体除去通路はプランジャーを通して血漿絞り出し表面に伸びる。この態様では、この方法は血漿絞り出し表面が血小板層にすぐ隣接するまでプランジャーをフロートに向かって動かす追加段階を含み、そして血小板を次に流体除去通路を通して除去する。この態様では、プランジャーがフロートに向かって動くにつれて血漿が流体除去通路を通して絞り出される。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0044】

本発明のさらに完全な理解およびその付随する利点の多くは以下の詳細な記述を添付図面と関連して考察する時にさらに良く理解されるため、それらは容易に入手されるであろう。

【0045】

本発明は、数種の態様がある血液血小板分離装置である。全ての態様が、縦の内表面のある空洞を有する遠心回転分離容器を含んでなる。フロートが空洞内に配置される。フロートは基部および基部の上にある血小板収集装置を有する。フロートは外表面を有する。一般に、フロートの外表面と空洞の内表面との間の距離は0.5mmより小さく、好ましくは0.2mmより小さくそして最適には0.03mmより小さくすることができる。軟質管のある態様に関しては、表面を接触させることができる。血小板収集表面は、フロートが完全に分離された血液の中に懸垂された時にフロートの上でそれを血小板の高さのすぐ下に置く配置を有する。

30

【0046】

患者血液は静脈切開針もしくは中枢静脈カニューレまたは他の全血収集手段により得ることができる。血液は直ちに抗凝血剤、例えばACD-Aまたはヘパリン、と混合される。

【0047】

図1は、本発明の分離装置の図式的断面図である。この態様の血液血小板収集装置は、内表面4を有する軟質内管2および軟質内管中に配置されたフロート6を含んでなる。フロートは、管が中立圧力下にある時に軟質管の内表面と密封関係にある外表面8を有する。この状態で、この密封関係がフロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動きを防止する。

40

【0048】

軟質管内の圧力が遠心下で高められた時にフロート6の外表面8は軟質管2の内表面4と接触しない。これが、フロートの外表面と軟質管の内表面との間の流体の動き並びに管内のフロートの自由な動きを可能にする。

【0049】

フロートは、遠心後に分離された血液中の血小板の高さのすぐ下の位置に血小板収集表面16がある血小板受容器空洞10を有する。フロート6は、遠心後に分離された血小板

50

を除去するための血小板受容器空洞 10 に連結している血小板収集溝 11 および血小板吸引溝 12 を有する。

【0050】

フロート 6 は、遠位表面 14 を有する近位区画 13 および遠位表面 14 に向かい合った近位表面 16 を有していない遠位区画 15 を含んでなる。遠位表面 14 および近位表面 16 が血小板受容器空洞 10 を規定する。フロート 6 は赤血球の比重より低く且つ血漿の比重より高い比重を有するため、平衡時にパフィコート血小板層がフロートの上部および下部要素の間に隔離される。最適な血小板回収のためには、赤血球が沈殿するにつれてフロートが管の底から上昇することが不可欠である。これには、フロートが全血より大きい密度を有することが必要である。

10

【0051】

この態様の血小板収集装置は、内管 2 を取り囲む実質的に非軟質である外容器 18 を含む。内管 2 内の圧力が遠心中に上昇するにつれて、外容器 18 の内表面 22 が内管の膨張を制限する。

【0052】

外容器は、血小板分離工程の開始時に血液を内管に導入するためおよび血小板分離工程の終了時に血小板を血小板受容器空洞 10 から溝 11 および 12 を通して除去するための口 20 を含む。この口には、充填注射器および血小板除去注射器に連結させるためのルーア固定装置を付与することができる。

20

【0053】

血液が分離溝 19 に導入されるにつれて、排気溝 17 が空気を溝 12 を通して上方に排気する。

【0054】

この態様では、針または小管 23 が好ましくはルーア固定装置 20 に固定される。管 23 は溝 12 の内径より小さい外径を有するため、フロート 6 が遠心中に上昇するにつれて管は溝 12 内を自由に滑動することができる。

【0055】

本発明の装置を簡単な操作で使用して血小板を製造することができる。それは、注射器中での抗凝血剤、例えばヘパリン、クエン酸塩または EDTA、を含有する血液の収集、注射器からの抗凝血処理された血液による分離管への充填、血液を赤血球、血漿および血小板パフィコート画分に分離するための遠心、並びに別の注射器による血小板パフィコート画分の除去を含む。

30

【0056】

フロートは 2 つの円錐体から作成することができ、それらの基部は場合により窪んでいてもよい。分離室空洞は好ましくは下方にある円錐体の形状を反映する窪んだ底を有するため、ブイがその初期状態にある時には空洞の底で停止し、下方にあるブイの底と空洞の底との間に小さい空間がある。軟質管 2 は好ましくはフロートの最大外径より小さい内径を有する弾性スリーブであるため、それはフロートをその位置で支持する。軟質管 2 の外径は硬質円筒体 18 の内径より小さいため、内管と硬質円筒体との間に空間が存在する。滑らかな球、例えばボールベアリング、のような小球を 2 つの円錐体の間に付与して、血小板を血小板パフィコート層の中に分散させることができる。溝 12 はフロート 6 の基部のわずかに上で終わっている。殺菌性排気装置 21 が空気を装置の内外に通す。

40

【0057】

図 2 - 7 は、分離工程の異なる段階における本発明の装置の継続的な図式的断面図である。

【0058】

図 2 は上昇した注射器 26 のプランジャー 24 を示し、そして注射器胴体 28 に血液 30 が充填されている。

【0059】

図 3 は、血液 30 を内管 2 の中に押し出す位置に下げられたプランジャー 24 を示す。

50

【0060】

図4は、血液30の一部が遠心中にフロートと内管2との間を通過して内管の底32を満たした後の位置を示す。

【0061】

図5は血液成分を赤血球画分34へ分離するのに十分な時間にわたる遠心後の血液成分を示し、ここではフロート6は浮いており、血漿画分36はフロート6の上であり、そしてパフィコートまたは血小板層38は受容器空洞10の中にある。遠心の終了時に、血液はその三成分に分別されて残り、そしてこれらの成分の位置はフロートに関して同じままである。もはや遠心力により生ずる圧力下がないため、弾性スリーブ2は硬質円筒体18から離れて収縮しそしてプイをその場に固定する。

10

【0062】

驚くべきことに、本発明では、血小板のはるかにより小さい画分が赤血球パックと共に残っており、隔離された血小板のより高い収率を可能にする。赤血球が沈殿するにつれて装置の底から上昇するフロートが赤血球パックを流動化して赤血球を放出するため、それらはより容易に上昇してパフィコートと一緒にになる。

【0063】

再懸濁粒子が血小板受容器中に存在する場合には、装置全体を振るかまたは回転させて粒子を2つの円錐体の間の空間内で転がし、パフィコートを破壊しそして均質懸濁液の中に混合することができる。或いは、収集注射器を用いて血小板を血小板-含有区画の内外に噴射することにより再懸濁させることもできる。或いは、空気の泡を内部で捕獲するかまたは血小板-含有区画に導入することができ、そして装置を振るか、逆転するかまたは回転することにより血小板を再懸濁させることができる。懸濁させたパフィコートを次にルアー20を通して吸引する。除去された量は、排気口21を通して装置に入る空気により置換される。

20

【0064】

図6は、ルアー口20に固定された新しい注射器40を有する装置を示す。

【0065】

図7は、血小板46を受容器空洞10内の血小板収集表面16の上から注射器の胴体44の中に吸引した後に上昇した注射器プランジャー42を示す。懸濁させた血小板層はルアー20を通して吸引されていた。除去された量は殺菌性排気口21を通して装置に入りそしてさらに血小板受容器10の中に入る空気により置換される。血小板を患者を処置する医師に提供するために、血小板46を含有する注射器40は次に除去される(示されていない)。

30

【0066】

図8は、血小板受容器92、収集管96の内部に伸びる排気溝93、および血小板受容器92から収集管96の内部に伸びる血小板排出溝94を有するフロート部品90の同寸法図である。この態様は半球状の底98を有する。円筒体は好ましくは半球状の底98を反映する窪んだ底を有するため、プイがその初期状態にあって円筒体の底近くに停止している時には、フロートと底との間の空間は最小にされる。半球状の底98から伸びる突起97により、下方プイの底と円筒体の底との間に空間が保たれて管の底に対するフロートの真空粘着を確実に防止する。

40

【0067】

図9は、本発明のプランジャー-フロート態様の図式的断面図である。この態様では、軸方向で共心性であるフロート100およびプランジャー102はキャップ106の付いた硬質管または円筒体104の中央空洞103の中に含有されている。キャップ106は、血液が加えられるかまたは血小板が除去される時の管の内外への空気の動きを可能にするための排気穴108を有する。それは、血液を円筒体に導入するためおよび流体を円筒体から除去するために使用される針または管を受けるためのルアー口110を含む。

【0068】

フロート100は、抗凝血処理された血液が分離器に導入される前に管の底114の上

50

で停止する突起スペーサー 1 1 3 のある底表面 1 1 2 を有する。フロートは、分離された血液中の血小板層のすぐ下にあるように配置される上表面 1 1 5 を有する。フロートの上方構造は突起 1 1 6 を含み、その頂端部 1 1 8 は工程中にプランジャー 1 0 2 の下方への動きを制限するための停止具として作用する。血小板収集溝 1 2 0 はフロートの中心に配置される。血小板排出溝 1 2 2 は表面 1 1 5 の高さから血小板収集溝 1 2 0 の内部に伸びる。

【 0 0 6 9 】

フロート 1 0 0 は分離された赤血球より低く且つ血漿より高い密度を有するため、それは赤血球層の上に、血液がその成分に分離された時に血小板収集表面 1 1 5 を血小板層のすぐ下に置く高さで浮くであろう。最適な血小板回収のためには、赤血球が沈殿するにつれてフロートが管の底から上昇することが不可欠である。これには、フロートが全血より高い密度を有することが必要である。

10

【 0 0 7 0 】

プランジャー 1 0 2 は場合により、管 1 0 4 の内表面 1 2 6 から離されているかまたはそれと滑動関係にある外表面 1 2 4 を有する。示されている態様では、プランジャー 1 0 2 がフロート 1 0 0 に向かって動く時にフロートと管表面との間での液体の漏出を防止するために、O - リングでありうるシール 1 2 8 および 1 3 0 が付与されている。外表面 1 2 4 と管表面 1 2 6 との間の許容量が十分に小さい場合には、プランジャーがフロートに向かって動く時におよび生成物が吸引される時にプランジャーと管との間の液体の漏出を防止するためのシールは必要ない。

20

【 0 0 7 1 】

プランジャーは底表面 1 3 2 および流体漏出またはスノーケル管 1 3 4 を有する。プランジャーがフロートに向かって下方に動く時には、この底表面 1 3 2 により付与される圧力がプランジャー 1 0 2 の下にある液体を上方にスノーケル管 1 3 4 を通してプランジャーの上にある空洞の中に絞り出す。

【 0 0 7 2 】

プランジャーには中央溝 1 3 6 が付与されており、それを通して管または針が挿入されて血小板に富んだ流体をプランジャーの底とフロートの頂部との間の空間から除去する。

【 0 0 7 3 】

外管並びに円筒状外形に適合するフロートおよびプランジャーを有するこの態様が示されているが、外容器はフロートおよびプランジャーの寸法に適合するいずれかの内部形状、例えば対応する多角形の外形を有するフロートおよびプランジャーと組み合わせられた四角いまたは他の多角形の形状を有する窪み、であってよいことは当業者に容易に明らかになるであろう。円筒状構造が有利である。

30

【 0 0 7 4 】

図 1 0 は、管 1 4 0 を通しての注射器 1 4 2 から分離室 1 0 3 への抗凝血処理された血液 1 3 8 の導入後の図 9 の態様の図式的断面図である。

【 0 0 7 5 】

図 1 1 は、赤血球層 1 4 4、血漿層 1 4 6 および血小板層 1 4 8 への血液の遠心分離後の図 9 の態様の図式的断面図である。フロート 1 0 0 が上昇して血小板収集表面 1 1 5 を血小板 1 4 8 の高さのすぐ下に置いてある。

40

【 0 0 7 6 】

図 1 2 は、プランジャー 1 0 2 の中央溝 1 3 6 中への注射器 1 4 3 の注射針 1 5 0 の挿入後の図 9 の態様の図式的断面図である。

【 0 0 7 7 】

図 1 3 は、注射器 1 4 3 を下方に、その下表面 1 3 2 がフロート 1 0 0 の停止先端 1 1 8 と接触する高さまで押すことによるプランジャー 1 0 2 の押し下げ後の図 9 の態様の図式的断面図である。プランジャー 1 0 2 により置換された血漿はスノーケル管 1 3 4 を通して搾り出されている。

【 0 0 7 8 】

50

注射器 143 のピストン 150 の吸引が、血小板に富んだ混合物を血小板層から溝 122 および 120 (図 9) を通してそして上方に管 150 を通して注射器管 145 の中に吸引する。液体高さの上にあるスノーケル管 134 の位置が、血小板懸濁液の除去により作成された空間を空気流で満たす。

【0079】

図 14 は、場合により存在してもよい口 151 を追加した図 9 に示された態様の変種である。この図は、注射器 142 から口 151 を通って導入された血液 154 が下方に溝 136 を通って分離溝 103 の中に流れる。

【0080】

図 15 は、本発明のプランジャー - フロート態様の図式的断面図である。この態様では、軸方向で共心性であるフロート 160 およびプランジャー 162 はキャップ 166 を有する硬質管または円筒体 164 の分離室空洞 163 の中に含有されている。フロートは、分離された血液中の血小板層のすぐ下にあるように配置されている血小板収集表面 165 を有する。キャップ 166 は、血液がその内部に加えられる時に管からの空気の漏出を可能にするための排気穴 168 を有する。それはまた、血液を分離室 163 に導入するための針または管および遠心後に血小板を含有する流体をすぐ隣接する血小板収集表面 165 から除去するための針または管を受けるルアー 170 も有する。

【0081】

フロート 160 は、抗凝血処理された血液が分離器に導入される前に管の底 174 の上で停止する底表面 172 を有する。フロートの上方構造は突起 176 を含み、その頂端部 178 は工程中にプランジャー 162 の下方への動きを制限するための停止具として作用する。フロートの中心にある血小板収集溝 180 は、表面 165 の高さから伸びる血小板排出溝 182 と連結する。

【0082】

フロート 160 は分離された赤血球より低く且つ血漿より高い密度を有するため、血液がその成分に分離される時にはそれは赤血球層の中で血小板収集表面 165 を血小板層のすぐ下に置くような高さで浮くであろう。最適な血小板回収のためには、赤血球が沈殿するにつれてフロートが管の底から上昇することが不可欠である。これには、フロートが全血より大きい密度を有することが必要である。

【0083】

遠心後にプランジャー 162 がフロート 160 に向かって押し下げられるにつれて、血漿が軟質スノーケル管 188 を通ってプランジャー 162 の上にある空間 186 の中に上昇する。血小板が中央溝 184 (図 13 に示されている通りにして挿入される) を通って伸びる管により除去される時には、空気が管 188 を通って管の頂部にある (液体の高さの上) その入り口から流れて、除去される液体を置換する。

【0084】

プランジャーは最大量の血液を分離室に導入可能にするその最も高い高さで示されており、その最も高い高さはキャップ 166 に接する管 192 の頂部 190 により制限される。この全長はスノーケル管 188 のたわみ性により可能になる。

【0085】

図 16 は、遠心後で且つ血小板層の除去前の本発明のプランジャー - フロート態様の図式的断面図である。この態様では、フロート 200 はキャップ 206 を有する硬質管または円筒体 204 の中央空洞 202 の中に含有される。キャップ 206 は、血液が加えられるかまたは血小板が除去される時に管の内外への空気の動きを可能にする排気穴 208 を有する。それは、血液を円筒体に導入するためおよび流体を円筒体から除去するために使用される針および管を受けるための口 210 並びに遠心後に血小板を収集するための注射針 (示されていない) を受けるための口 212 を含む。

【0086】

フロート 200 は、抗凝血処理された血液が分離器に導入される前に管の底で停止する突起スペーサー 216 のある底表面 214 を有する。フロートは遠心中に赤血球層の中で

10

20

30

40

50

上昇する。フロート200は、分離された血液中の血小板層のすぐ下にあるように配置される上表面218を有する。フロートの上方構造は、血小板またはパフィコート層の上に伸びる突起220を含む。

【0087】

フロート200は分離された赤血球より低く且つ血漿より高い密度を有するため、血液がその成分に分離される時にはそれは赤血球層の中で血小板収集表面218を血小板層のすぐ下に置く高さで浮くであろう。最適な血小板回収のためには、赤血球が沈殿するにつれてフロートが管の底から上昇することが不可欠である。それには、フロートが全血より高い密度を有することが必要である。

【0088】

図16の「プランジャーなしプランジャー」装置は製造が最も簡単であり且つ最も安価である。使用者は、血小板を再懸濁させる前に血小板が少ない血漿を単に多少除去することにより、血小板濃度因子を変動させることができる。それには、所望する量の血小板が少ない血漿を正確に除去するために使用者はよりたくさんの注意および管理を必要とする。図1のパラソルフロートシステムおよび図9のプランジャー-フロートシステムは図16の単純フロート態様より良好な再現性を与える。

【0089】

本発明を以下の具体的であるが非限定的である実施例によりさらに説明する。

【実施例1】

【0090】

パラソルフロート装置

図1に描写されたタイプのパラソルデザイン血小板濃縮装置を組み立てた。フロートはポリエチレンおよびポリカーボネートから、 1.06 g/ml の全密度を有するような割合で、構成された。フロートの外径は 2.62 cm でありそしてその全長は 4.57 cm であった。フロートを、血小板受容器空洞内にある2個の直径 0.32 cm のステンレス鋼ボールと一緒に、軟質シリコンゴム管の密封された端部の中に挿入した。軟質管は 2.54 cm の内径、 0.08 cm の壁厚さ、および密封された遠位端部を有していた。フロートを含む軟質管は、 2.86 cm の内径および 11.43 cm の長さを有する硬質ポリカーボネート管の中に囲まれていた。軟質管の頂部は硬質管の頂部の上で折られそして 7.62 cm 管23（図1参照）を有するキャップが溝12とかみ合う管23を有する軟質管の折られた頂部の上に適合された。

【0091】

装置に、CPDA-1で抗凝血処理された 30 ml の吸引したての全血を充填した。装置をIECセントラ（Centra）CL2遠心機の中で30分間にわたり 3000 rpm で遠心した。遠心後に、管を激しく揺らして血小板を血小板受容器空洞内にステンレス鋼ボールにより誘発される攪拌により再懸濁させた。 5 cc の濃縮された血小板を血小板受容器空洞から血小板抽出管（23）を通して除去した。

【0092】

血小板数を下記の通りにして測定した： 0.5 cc のこの試料を 10 cc のイソトン（Isoton）II等張性希釈剤で希釈しそして 500 g において1.5分間にわたり遠心した。 0.5 cc のこの希釈した試料をさらに別の 10 cc のイソトンIIの中で希釈しそして 3 fl より大きい粒子をクルター（Coulter）Z-1粒子分析器上で計数した。この結果を全血の同様に処理した試料中の粒子数と比較した。処理した試料からのこれらの小さい粒子が血小板を表す。濃縮された血小板の試料は導入された全血中に存在する血小板の66%を全血中で測定された濃度の2.86倍の濃度で含有していた。

【0093】

図1に示された「パラソル」装置は製造が最も難しく且つ費用がかかるが、使用は最も容易である。赤血球濃度はこの生成物では変動がより大きい。これは異なる血漿濃度から生じ、そしてヘマトクリット-依存性変動が減速中の弾性スリーブの収縮による流体の交換量において存在する。

10

20

30

40

50

【実施例 2】

【0094】

スノーケル付きプランジャー - フロート装置

図 9 に描写されたタイプの血小板濃縮装置を組み立てた。フロートはポリエチレンおよびポリカーボネートから、 1.08 g/ml の全密度を有するような割合で、構成された。フロートの外径は 2.535 cm でありそしてその全長は 1.2 cm であった。フロートを、 2.540 cm の内径および 11.43 cm の長さを有する硬質ポリカーボネート管の中に挿入した。硬質管の底を密封した。

【0095】

装置に、CPDA - 1 で抗凝血処理された 25 cc の吸引したての全血を充填した。装置を IEC CRU 5000 遠心機の中で 15 分間にわたり 1800 rpm で遠心した。遠心後に、 10 cc の注射器に連結された鋭利でない皮膚針を中央到達口を通してそれがフロートの頂部で停止具に衝突するまで挿入することにより、プランジャーを押し下げた。 0.5 cc を皮膚針 (血小板抽出管) を通して吸引した後に、装置を激しく揺らして血小板を血小板受容器空洞内に再懸濁させた。さらに 3.5 cc の濃縮された血小板を血小板受容器空洞から皮膚針 (血小板抽出管) を通して除去した。

10

【0096】

0.5 cc のこの試料を 10 cc のイソトン II 等張性希釈剤で希釈しそして 500 g において 1.5 分間にわたり遠心した。 0.5 cc のこの希釈した試料をさらに別の 10 cc のイソトン II の中で希釈しそして 3 fl より大きい粒子をクルター Z - 1 粒子分析器上で計数した。この結果を全血の同様に処理した試料中の粒子数と比較した。処理した試料からのこれらの小さい粒子が血小板を表す。濃縮された血小板の試料は導入された全血中に存在する血小板の 69% を全血中で測定された濃度の 4.30 倍の濃度で含有していた。

20

【0097】

図 9 に示された「プランジャー」装置は、製造に費用がかからず且つ生成物中の赤血球率における変動が少ないという利点を有する。プランジャー - フロート組み合わせは、プランジャーとフロートとの間の容量がより少なく且つ隙間内のパフフィコートの高さを保ちながら全範囲の血漿密度に依然として適合しうるため、より大きい濃度係数を与える。赤血球汚染はヘマクリットと無関係である。

30

【実施例 3】

【0098】

スノーケルなしのプランジャー - フロート装置

プランジャー下の空間とプランジャー上の空間との間の流体連結だけが血小板受容器空洞によるようにするためにスノーケル管を用いないこと以外は、図 9 に描写されたタイプの血小板濃縮装置を組み立てた。フロートはポリエチレンおよびポリカーボネートから、 1.08 g/ml の全密度を有するような割合で、構成された。フロートの外径は 2.535 cm でありそしてその全長は 1.2 cm であった。フロートを、 2.540 cm の内径および 11.43 cm の長さを有する硬質ポリカーボネート管の中に挿入した。硬質管の底を密封した。

40

【0099】

装置に、CPDA - 1 で抗凝血処理された 25 cc の吸引したての全血を充填した。装置を IEC CRU 5000 遠心機の中で 15 分間にわたり 1800 rpm で遠心した。遠心後に、 10 cc の注射器に連結された鋭利でない皮膚針を中央到達口を通して挿入しそしてそれがフロートの頂部で停止具に衝突するまで注射器本体を押し下げることにより、プランジャーを押し下げた。注射器本体が押し下げられるにつれて、血小板が少ない血漿が中に集められた。血小板が少ない血漿を含有する注射器を除去しそして第二注射器を針に連結した。 0.5 cc を皮膚針 (血小板抽出管) を通して吸引した後に、装置を激しく揺らして血小板を血小板受容器空洞内に再懸濁させた。さらに 3.5 cc の濃縮された血小板を血小板受容器空洞から皮膚針 (血小板抽出管) を通して除去した。

50

【0100】

0.5ccのこの試料を10ccのイソトーンII等張性希釈剤で希釈しそして500gにおいて1.5分間にわたり遠心した。0.5ccのこの希釈した試料をさらに別の10ccのイソトーンIIの中で希釈しそして3flより大きい粒子をクルターZ-1粒子分析器上で計数した。この結果を全血の同様に処理した試料中の粒子数と比較した。処理した試料からのこれらの小さい粒子が血小板を表す。濃縮された血小板の試料は導入された全血中に存在する血小板の74%を全血中で測定された濃度の4.61倍の濃度で含有していた。この濃度は、フロートなしで匹敵する条件下での単なる遠心で得られたものよりはるかに大きくそして赤血球層内の小板の濃度ははるかに低いため、遠心中のフロートの壁と管の壁との間の赤血球懸濁液の流れが赤血球を静かに崩壊させそして捕獲された血小板を放出してそれらを血小板またはパフィコート層の中で収集可能にする。

【0101】

この実施例で使用されたスノーケルなしの「プランジャー」装置では、血小板が少ない血漿が注射器の中にプランジャーの押し下げ中に集められる。これが、「標準的」プランジャー装置の全ての利点を与え且つ例えば止血物質としてのようなその使用を望むいずれの人のためにも注射器中で血小板が少ない血漿を供給する。

【0102】

装置の種々の別の構造も本発明の概念内で可能である。例えば、パイを含んでなる2つの円錐体を漏斗によりまたは種々の区画間を連結しそして沈殿中に区画間の細胞沈殿を行う窪みを有する円錐体により置換することができる。区画間の開口部が処理並びにパフィコートの再懸濁および吸引中の画分の実質的な混合を防止するのに十分なほど小さい限り、種々の区画の完全な流体分離は必須でない。所望するなら、血小板が枯渇した血漿および赤血球の回収手段を付与することができる。血液を導入し且つパフィコートを吸引するための管および溝は共心性または硬質である必要はない。血液と接触する内表面が滑らかであり且つ血小板を捕獲したりまたは活性化したりしない限り、弾性スリーブを圧縮性材料、例えば、フォーム、により置換することができる。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】本発明の分離装置の図式的断面図である。

【図2】注射器のプランジャーが上昇されそして注射器胴体に血液が充填されている図1の装置を示す。

【図3】プランジャーが血液を内管中に強制加入させる位置に押し下げられた後の図1の装置を示す。

【図4】血液の一部がフロートと内管との間を通過して内管の底を充填した後の図1の装置を示す。

【図5】血液がフロートの上にある血漿画分であるフロートが停止する赤血球画分と受容器空洞内のパフィコートまたは血小板層とに分離した後の図1の装置を示す。

【図6】新しい注射器がルアー口に連結された後の図1の装置を示す。

【図7】血小板を受容器空洞から注射器胴体内に吸引した後に注射器プランジャーが上昇した図1の装置を示す。

【図8】フロートの底が半球形を有する図1の分離装置の別のフロートデザインの同寸法図である。

【図9】本発明のプランジャー-フロート態様の図式的断面図である。

【図10】分離室への抗凝血処理された血液の導入後の図9の態様の図式的断面図である。

【図11】赤血球、血漿および血小板層への血液の遠心分離後の図9の態様の図式的断面図である。

【図12】注射針の挿入後の図9の態様の図式的断面図である。

【図13】フロート停止部に衝突する高さまでのプランジャーの押し下げ後の図9の態様の図式的断面図である。

10

20

30

40

50

【図14】図9の態様とは別の充填口を通す血液の導入を示すその態様に関連する別の態様の図式図である。

【図15】キャップに固定された軟質スノーケル管を含む本発明のプランジャー - フロート装置のさらに別の態様の図式図である。

【図16】遠心後でありそして血小板層の除去前の本発明のプランジャー - フロート態様の図式的断面図である。

【図1】

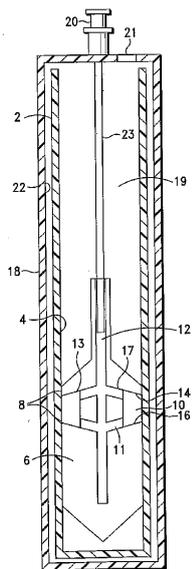


FIG.-1

【図16】

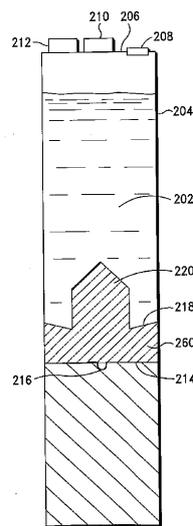


FIG.-16

【図2】

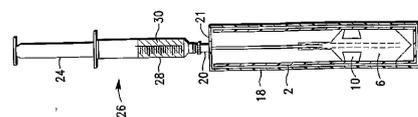


FIG.-2

【 図 3 】

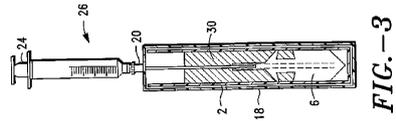


FIG.-3

【 図 4 】

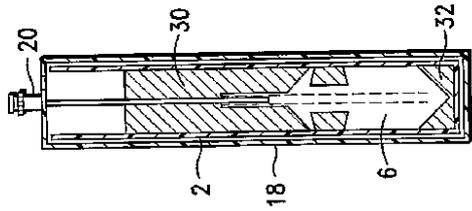


FIG.-4

【 図 5 】

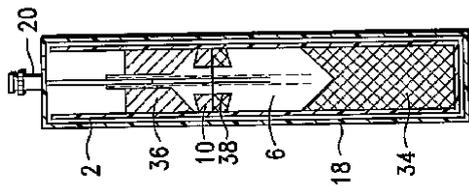


FIG.-5

【 図 6 】

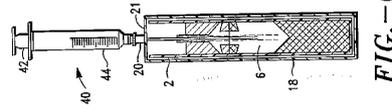


FIG.-6

【 図 7 】

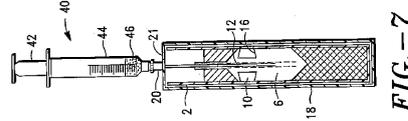


FIG.-7

【 図 8 】

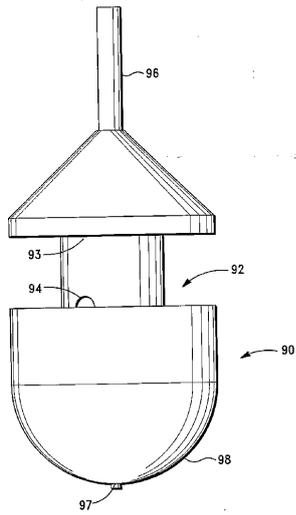


FIG.-8

【 図 9 】

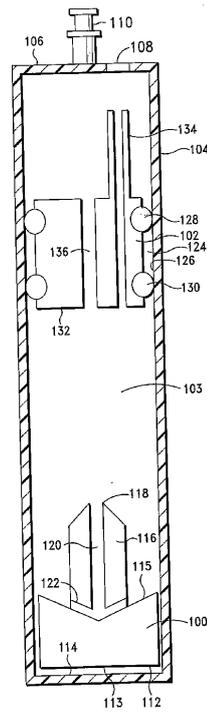


FIG.-9

【 図 1 0 】

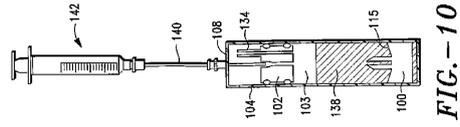


FIG.-10

【 図 1 1 】

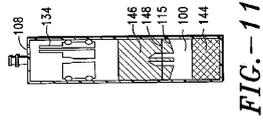


FIG.-11

【 図 1 2 】

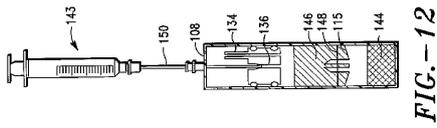


FIG.-12

【 図 1 3 】

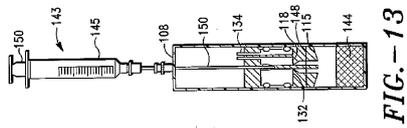


FIG.-13

【 図 1 5 】

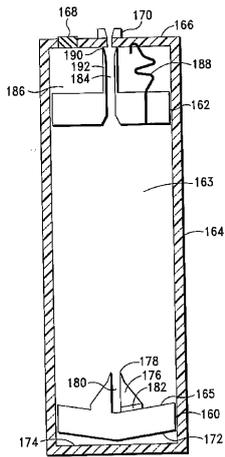


FIG.-15

【 図 1 4 】

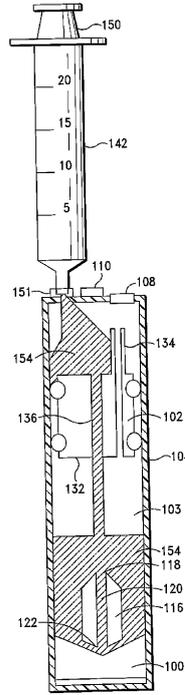


FIG.-14

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 03/12888
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01L3/14		
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) IPC 7 B01L A61B B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP 1 005 910 A (BECTON DICKINSON CO) 7 June 2000 (2000-06-07) abstract; figures paragraph '0007! - paragraph '0057!	1-3,9, 16,17, 20-22 4-8,10, 11,14,15
X A	US 5 393 674 A (LEVINE ROBERT AARON ET AL) 28 February 1995 (1995-02-28) abstract; figures column 3, line 54 -column 5, line 27	22 1-11, 14-17, 20-22
A	US 4 269 718 A (PERSIDSKY MAXIM D) 26 May 1981 (1981-05-26) column 4, line 64 -column 5, line 43; figures 3,4 --- -/--	12,13, 18,19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C: <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex:		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *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		*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 *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 *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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 October 2003		Date of mailing of the international search report 31. 10. 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smith-Hewitt, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 03/12888
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 577 513 A (VAN VLASSELAER PETER) 26 November 1996 (1996-11-26) abstract; figures column 2, line 55 -column 6, line 30 -----	12, 13, 18, 19
A	WO 01 03756 A (IMPLANT INNOVATIONS INC) 18 January 2001 (2001-01-18) abstract; figures the whole document -----	12, 13, 18, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 03/12888**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 03 A2888

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11,14-17,20-22

(For Claims 4-8,10-11,14-15 due to non-unity a posteriori)
The provision of a platelet receptor cavity which allows platelets to be collected separately within a cavity of the float.

2. Claims: 12,13,18,19

The provision of a plunger positioned above the float.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 03/12888

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1005910	A	07-06-2000	EP 1005910 A2	07-06-2000
			JP 2000189406 A	11-07-2000
			US 6516953 B1	11-02-2003
US 5393674	A	28-02-1995	AT 153761 T	15-06-1997
			CA 2058670 A1	01-07-1992
			CN 1063163 A , B	29-07-1992
			DE 69126293 D1	03-07-1997
			DE 69126293 T2	15-01-1998
			DK 493838 T3	28-07-1997
			EP 0493838 A1	08-07-1992
			ES 2104654 T3	16-10-1997
			GR 3023914 T3	30-09-1997
			JP 2036075 C	28-03-1996
			JP 4303730 A	27-10-1992
			JP 7074772 B	09-08-1995
			MX 9102860 A1	01-07-1992
			NO 915134 A	01-07-1992
			RU 2088921 C1	27-08-1997
			US 4269718	A
DE 3117710 A1	08-04-1982			
FR 2481614 A1	06-11-1981			
GB 2075376 A , B	18-11-1981			
JP 57026619 A	12-02-1982			
SE 8102776 A	06-11-1981			
US 5577513	A	26-11-1996	AT 168288 T	15-08-1998
			AU 680383 B2	24-07-1997
			AU 3502395 A	22-03-1996
			CA 2198606 A1	07-03-1996
			DE 69503512 D1	20-08-1998
			DE 69503512 T2	08-04-1999
			DK 778794 T3	19-04-1999
			EP 0778794 A1	18-06-1997
			ES 2121414 T3	16-11-1998
			HK 1013807 A1	23-06-2000
			JP 10509580 T	22-09-1998
			NZ 292754 A	28-01-1999
			WO 9606679 A1	07-03-1996
			WO 0103756	A
EP 1202758 A1	08-05-2002			
WO 0103756 A1	18-01-2001			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 キング,スコット

アメリカ合衆国カリフォルニア州94133-3531 サンフランシスコ・モンゴメリーストリー
ト1360

Fターム(参考) 4C077 AA12 BB04 CC01 DD13 EE01
4D057 AA03 AB01 AC01 AD01 BA15 BC03