

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：

細胞を分離する方法、細胞分離または濃縮用粒子およびキット

技術分野

[0001] 本発明の一実施形態は、細胞を分離する方法、細胞分離または濃縮用粒子およびキットに関する。

背景技術

[0002] 細胞および望ましくない不純物等を含有する混合物から目的とする細胞（以下「目的細胞」ともいう。）を識別したり分離することが行われている。このような細胞を識別・分離する方法としては下記の1)～3)の方法などが挙げられる。

[0003] 1) 細胞浸透性の染料等による細胞の識別・分離：各細胞は細胞全体の形、細胞全体に占める核の比率、細胞質に存在する顆粒の種類や量に応じて細胞浸透性の染料を利用して識別することができる。核や細胞内顆粒を識別のターゲットにする場合は、染料を用いて染色して検出する場合が多い。例えば、核を観察したい場合は、酢酸オルセインや酢酸カーミンを用いた染色、パパニコロウ染色、D A P I 染色などの方法が挙げられる。また、染料で染色して可視光で検出する他、蛍光染色で蛍光像として観察することもできる。検出には顕微鏡下で目視観察して識別する方法とCCDカメラなどで画像として識別する方法のいずれもが実用化されている。例えば、尿中に出現する異型細胞検査による膀胱がんや尿道がんなどの検査や血中の異型細胞の識別、組織中における細胞診によるがん検査などが挙げられる。

[0004] 2) 蛍光抗体法による細胞表面抗原（マーカー）染色による細胞の識別・分離：一般に、CDマーカーと呼ばれる細胞表面抗原を、それに特異的な蛍光標識抗体で染色する方法で、セルソーターによる細胞分離やフローサイトメーターや組織染色によるがん検査などに用いられている。もちろんこれらは、医療面のみならず、細胞生理研究や、工業的な細胞利用の場面でも多用

されている。

[0005] 前記1)や2)の方法は、細胞を識別して、単に、その形態学的な違いなどを調べるだけであれば、きわめて有用な方法である。特に、前記2)の方法は微細な分類が可能で、組織学的な研究や検査、セルソーターによる細胞分離には欠かせない方法となっている。しかしながら、細胞を分離し、その後に分離した細胞を培養して利用しようとするとき問題がある。すなわち、細胞表面抗原の蛍光標識抗体による修飾は通常非可逆的であるので、細胞分離後に残る細胞表面の蛍光標識抗体により、細胞機能が損なわれる可能性がある。特に、使用する蛍光物質にもよるが、多くの場合、細胞を識別するために十分量の蛍光標識抗体を細胞表面に結合させる必要があるため、これにより、その他の抗体やリガンドの接触が妨げられ、細胞機能が損なわれる。

[0006] 細胞および望ましくない不純物を含む混合物からの目的細胞の分離・濃縮は、困難な課題である。目的細胞が、培養液中、生物学的サンプル中、またはこれらの混合物中に存在する場合、目的細胞を分離・濃縮するには、目的細胞を捕捉し、実質的に全ての細胞を無傷で、すなわち、混合物等をさらに汚染するような細胞片の放出をもたらすと思われる細胞を死滅させることなく捕捉する、または、目的細胞の溶解なしに捕捉する必要があるため、特に困難となる。このため、細胞の分離や濃縮工程に用いられる試薬には、理想的には、効率的にかつ十分な細胞密度の範囲で細胞を捕捉でき、細胞壁の溶解が起きず、さらに意図しない細胞の活性化、分化誘導が起きないことなどが求められる。また、使用される試薬には、細胞を使用し、細胞そのもの、および／または細胞からの分泌物や抽出物などを分析する、フローサイトメトリー解析、ELISpotアッセイ、PCRまたは他の分析法などの下流工程に影響を与えないことも求められる。

[0007] このような目的細胞の分離・濃縮に適した方法として、下記3)の方法が挙げられる。

3) 標的物質と特異的に結合する別の物質を固定化した担体とのアフィニティによる細胞の識別・分離：標的物質が特異的に結合する別の物質、例え

ば、抗体、糖鎖やレクチンなどのリガンドを、微粒子やビーズなどの担体に結合したものをを用いることで、標的物質のアフィニティ分離を行うことができる。一般的には、磁力または重力による分離を容易にする材料をこの目的に使用できるが、近年、特異性の高さ、扱いやすさなどから、磁力（磁性体含有粒子）による分離手段が選択されている。

[0008] 磁性体含有粒子を用いた分離は、磁性体含有粒子のサイズ（体積平均粒径）に基づいて分類できる。すなわち、大（ $1.5\ \mu\text{m}$ 超～約 $50\ \mu\text{m}$ ）、中（ $0.1\ \mu\text{m}$ ～ $1.5\ \mu\text{m}$ ）、および、ナノ粒子とも呼ばれる小（ $<100\ \text{nm}$ ）に分類できる。

[0009] 大きな磁性体含有粒子（特に、体積平均粒径が $1.5\ \mu\text{m}$ を超え約 $50\ \mu\text{m}$ 以下）の典型例は、例えば、特許文献1に記載されており、Thermo fisher scientific社により製造されている。このような磁性体含有粒子は、粒子1個あたりに含まれる磁性体の含有量が多いので、簡単な研究室用磁石により容易に分離することができる。また、磁場を除去すると容易に分散しうることにより、細胞の分離にも適していると考えられる。

[0010] しかし一方で、前記大きな磁性体含有粒子には、多くの問題も存在している。例えば、Dynabeads (Thermo fisher scientific社製)などの大きな磁性体含有粒子とともに細胞をインキュベートする場合、該磁性体含有粒子が大きすぎて効果的に拡散が起こらないので、系を混合することにより生じる衝突により細胞を標識する必要がある。よって、細胞が、集団中に僅かしか存在しない場合、目的細胞を標識する確率は、系に添加された磁性体含有粒子数および混合時間の長さに関係すると考えられる。かなりの時間細胞を前記磁性体含有粒子と混合することは細胞にとって有害となるため、できるかぎり磁性体含有粒子濃度を増加させることが必要となるが、用いることのできる磁性体含有粒子の量には限界がある。また、磁性体含有粒子の使用量が増えるとコストが増加する。さらに、大きな磁性体含有粒子は非常に簡単な設計で、比較的低い磁場により磁気分離で

きるにもかかわらず、大きな磁性体含有粒子はカゴ様のクラスターを細胞周囲に形成する傾向にあるため、細胞を観察したり分析したりすることが困難になる傾向にある。それゆえ、分析前に磁性体含有粒子を目的細胞から遊離させなくてはならず、磁性体含有粒子を遊離させると、他の問題が生じやすい傾向にある。

[0011] ここで、非特許文献1や2には、有効なCTL活性化のためには、大きい連続表面の接触域が極めて重要であることが示されている。粒度4~5 μm のラテックスマイクロスフェアに固定されたクラスI同種抗原を使用すれば最適な刺激が提供され、粒径が減少するにつれて応答が急速に減少し、小さい粒子が多数あったとしても、有効なCTL活性化の点では大きな表面を有する粒子には及ばないことが記載されている。つまり、これらの文献の記載によれば、大きな磁性体含有粒子（マイクロサイズ）を使用する場合、細胞に与える影響が大きく、意図しない細胞の活性化や分化誘導が起きる可能性があることが分かる。

[0012] 前述の問題を解決する方法として、小さな磁性体含有粒子（<100nm）を用いることが考えられる。このような粒子の典型例は、特許文献2に記載されており、Miltenyi Biotec社（Germany）により製造されている。このような磁性体含有粒子を用いることで、前記問題を解決することができると考えられる。ただし、このような従来の小さな磁性体含有粒子は、比較的磁気応答性が弱いため、高勾配磁気分離（HGMS）法などの大きな磁界勾配を生じる方法等を用いる必要がある。

[0013] HGMS法とは、微細スチールウール、スチールガーゼまたはスチールマイクロビーズなどを充填したカラムを使用し、該カラムを磁石に隣接して配置して非常に急な勾配系を形成することで、磁気を増強する方法である。しかし、HGMSカラムを用いると、試料中の成分がカラム内にトラップされるという問題がある。それゆえ、HGMSカラム等を用いる方法は、特に、低頻度で捕捉される細胞が分離の目的である場合には望ましくない。さらにそのうえ、HGMSカラムを使用するとコストが高くなるという問題もあ

る。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：米国特許第4654267号明細書

特許文献2：米国特許第5693539号明細書

非特許文献

[0015] 非特許文献1：Molecular Therapy、16巻4号、765～772、2008年4月

非特許文献2：J Immunol 149：2402～2405、1992年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0016] 本発明の一実施形態は、細胞死や細胞の活性化を抑制しながらも、細胞を分離・濃縮することができる、特に、分離性能に誤差が生じ、コストの増加を引き起こすHGMSカラムのような消耗品を使用しなくても、十分に細胞を分離・濃縮することができる粒子および方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者は、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、下記構成例等によれば、前記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

なお、本明細書において、数値範囲等を表す記載「A～B」は、A以上B以下を意味し、AおよびBをその数値範囲に含む。

[0018] [1] 下記工程1および2を含み、

下記有機高分子含有磁性粒子が有機高分子および磁性粒子を含み、該有機高分子含有磁性粒子中の磁性粒子の含有量が40質量%以上であり、該有機高分子含有磁性粒子の体積平均粒径が10～1000nmである、
目的とする細胞または目的でない細胞を分離する方法。

前記目的とする細胞を含む試料と、有機高分子含有磁性粒子とを接触させる工程1

前記工程 1 で生じる、有機高分子含有磁性粒子と目的の細胞または目的でない細胞との複合体を、磁気分離する工程 2

[0019] [2] 前記有機高分子含有磁性粒子が、有機高分子および磁性粒子を含む粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する、[1]に記載の方法。

[3] 前記ポリマーが親水性ポリマーである、[2]に記載の方法。

[4] 前記親水性ポリマーが、(メタ)アクリル酸、メチル(メタ)アクリル酸、ジアセトン(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリルアミド、ジメチル(メタ)アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド塩酸塩、N,N-ジエチル(メタ)アクリルアミド、N-イソプロピル(メタ)アクリルアミド、グリセロール(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリルアミド-N-グリコール酸、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート、エチレングリコールモノ(メタ)アクリレート、2-スルホエチル(メタ)アクリレート、含リン(メタ)アクリル酸エステル、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレート、*t*-ブチルアミノエチル(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレート、グリセロール(メタ)アクリレート、ビニルスルホン、スチレンスルホン酸、2-(メタ)アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、(メタ)アクリロイルモルホリン、N-ビニルピロリドン、N-ビニルカプロラクタム、N-ビニルオキサゾリドン、N-ビニルサクシンイミド、ビニルピリジン、酢酸ビニル、イタコン酸、クロトン酸、N-ビニルイミダゾール、ビニルベンジルアンモニウム塩、ビニルベンジルアルコールおよびヒドロキシスチレンからなる群より選ばれる少なくとも1種のモノマーに由来する構造単位を含むポリマーである、[3]に記載の方法。

[0020] [5] 前記有機高分子含有磁性粒子の体積平均粒径の変動係数が25%以下である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[0021] [6] 前記有機高分子が架橋されている、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[0022] [7] 前記磁性粒子の体積平均粒径が5～25nmである、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[0023] [8] 前記有機高分子含有磁性粒子に、少なくとも1つのリガンドが物理吸着または化学結合している、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 前記リガンドが、抗体、抗原、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、多糖、糖、脂質、ビタミン、薬物、基質、ホルモンおよび神経伝達物質からなる群より選ばれる少なくとも1種である、[8]に記載の方法。

[0024] [10] 有機高分子および無機粒子を含む有機高分子含有粒子であって、

該有機高分子含有粒子中の無機粒子の含有量が40質量%以上であり、
該有機高分子含有粒子の体積平均粒径が10～1000nmである、
細胞分離または濃縮用粒子。

[11] 前記無機粒子が磁性粒子である、[10]に記載の粒子。

[0025] [12] 前記有機高分子含有粒子が、有機高分子および無機粒子を含む粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する、[10]または[11]に記載の粒子。

[13] 前記ポリマーが親水性ポリマーである、[12]に記載の粒子。

[0026] [14] [10]～[13]のいずれかに記載の粒子、および、
該粒子を分離するための部材を含む、
キット。

発明の効果

[0027] 本発明の一実施形態によれば、細胞への影響（細胞死や細胞の活性化）がほとんどなく、細胞を分離・濃縮することができる。

さらに本発明の一実施形態によれば、HGMSカラムのような消耗品を使

用しなくても、十分に細胞を分離・濃縮することができるため、細胞分離性能の誤差を極力小さくすることができ、さらにコストの削減効果も期待できる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]図1は、実施例1における細胞分離・濃縮結果を示すフローサイトメーターによるプロット図である（縦軸：FSC、横軸：FL-2、左図：調整したPBMC溶液を用いたプロット図、右図：細胞分離・濃縮後のプロット図）。

発明を実施するための形態

[0029] <<細胞分離または濃縮用粒子>>

本発明の一実施形態に係る細胞分離または濃縮用粒子（以下「本分離粒子」ともいう。）は、有機高分子および無機粒子を含む有機高分子含有粒子であって、該有機高分子含有粒子中の無機粒子の含有量が40質量%以上であり、該有機高分子含有粒子の体積平均粒径が10～1000nmである粒子である。なお、本分離粒子は、細胞を分離または濃縮するために使用する粒子でもある。

このような本分離粒子は、細胞への影響が少ない粒子である。また、本分離粒子は、無機粒子を高含量で含むため、該粒子を用いることで、高い回収率で細胞を分離することができる。

[0030] なお、前記細胞への影響とは、その使用前後で、目的細胞に対して、意図していない細胞死や細胞の刺激応答を引き起こすことである。目的細胞に影響が起きる割合の許容範囲は、10%以下であり、好ましくは5%以下、より好ましくは1%以下である。該割合が10%を超える場合、必要量の細胞を確保することが困難になる傾向にある。なお、目的細胞に影響が起きる割合は、例えば、下記実施例3に記載の方法に基づく、細胞分離前の細胞の生存率と細胞分離後の細胞の生存率との関係（（細胞分離前の細胞の生存率－細胞分離後の細胞の生存率）／細胞分離前の細胞の生存率×100）や、下記実施例4に記載の方法に基づく、細胞分離前後の細胞活性化の程度（|細

胞分離前の染色された細胞数－細胞分離後の染色された細胞数 | / 細胞分離前の染色された細胞数 × 100) から判断することができる。

[0031] 本分離粒子は、目的細胞や目的でない細胞（以下「非目的細胞」ともいう。）を分離するため、特に目的細胞が不純物と共に存在する系から目的細胞を分離するために使用することができ、より具体的には、目的細胞を分離し、次いで、分離した細胞への増殖刺激、分化誘導や遺伝子導入等の細胞加工や、細胞表面抗原解析に基づいた細胞分類等の細胞解析などに使用することができる。

本分離粒子は、細胞の分離・濃縮前後で、目的細胞への影響（目的細胞に変化が起こる可能性）が少ないため、基礎研究における細胞解析のみならず、細胞を用いる臨床・診断分野等においても好適に用いられる。特に、細胞治療において用いる特定細胞加工物や再生医療製品等の製造においても利用が期待できる。

[0032] 本分離粒子の体積平均粒径（以下、単に「粒径」ともいう。）は、目的細胞への影響が少なく、十分に細胞を分離・濃縮することができ、取扱い性に優れ、無機粒子を高含量で含みながらも粒子同士の凝集が起こりにくい粒子を容易に得ることができる等の点から、10nm以上、好ましくは50nm以上、より好ましくは100nm以上であり、1000nm以下、好ましくは1000nm未満、より好ましくは500nm以下、さらに好ましくは200nm以下である。

前記粒径が1000nmを超えていると、本分離粒子と目的細胞や非目的細胞との反応性に劣るため、生物学的標本などの試料中に含まれる目的細胞の割合が少ない場合、分離性能が悪くなる。一方で、生物学的標本などの試料中に含まれる目的細胞の割合が多い場合、目的細胞を分離するために必要な本分離粒子の数を確保するためには、本分離粒子の使用量が多くなってしまい、分離・濃縮に要するコストが高くなる。また、前記粒径が10nmよりも小さくなると、本分離粒子のブラウン運動により、磁気応答性が悪くなる傾向にあり、細胞を十分に分離・濃縮するために、HGMS法などの外部

からの磁気増強が必要となる場合がある。なお、前記粒径が200nm以下の場合、本分離粒子が0.22 μ mの滅菌フィルターを通過することができるため、臨床用途において有利となる。

前記粒径は、動的光散乱法を原理とする測定機器、例えば、ナノトラックUPA-EX150（日機装（株）製）により測定できる。

[0033] 粒径が前記範囲にある本分離粒子は、該粒子の単位質量あたりに結合できるリガンドの結合量を多くすることができる。特に、無機粒子が磁性粒子である場合には、前記粒径の粒子であっても、磁気分離性能に優れる粒子となるため、従来困難であった、リガンド結合量を多くすることと、優れた磁気分離性とを両立することができる。

[0034] 本分離粒子は、粒径の変動係数（CV値）が25%以下であることが好ましく、20%以下がより好ましい。

CV値が前記範囲にあると、バラつきが少なく、所望の特性が容易に発揮されやすい粒子を容易に得ることができ、特に、無機粒子が磁性粒子である場合には、磁気分離の際に分離時間にバラつきが生じ難いため好ましい。

該CV値は、例えば、動的光散乱式粒径分布測定装置（日機装（株）製、ナノトラックUPA-EX150）を用いて測定することができ、具体的には、下記式によって算出することができる。

$$CV(\%) = [\text{粒径標準偏差}(\sigma) / \text{体積平均粒径}(D_n)] \times 100$$

[0035] 本分離粒子は、有機高分子と無機粒子とを含めば特に制限されず、これら以外の他の成分、例えば、該粒子を製造する際に磁性流体を用いる場合、該磁性流体中に含まれる従来公知の成分を含んでいてもよい。

[0036] <無機粒子>

前記無機粒子としては特に制限されないが、磁性粒子が好ましい。無機粒子として磁性粒子を用いることで、細胞を分離、濃縮する際に、簡便な方法であり、目的細胞への影響が少ない磁気分離により、細胞を分離・濃縮することができるため好ましい。

なお、本分離粒子は、有機高分子含有粒子でもあるが、好ましくは、該粒

子における無機粒子が磁性粒子である有機高分子含有磁性粒子（以下「本粒子」ともいう。）であり、下記本分離方法では、この本粒子（有機高分子含有磁性粒子）を使用することを特徴とする。

[0037] 前記無機粒子の材質としては、具体的には、鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルもしくはガドリニウム等の単体、それらの酸化物、またはそれらの合金；およびフェライト類からなる群より選択される1種または2種以上の無機材料等が好ましい。中でも、磁気分離性能により優れる本分離粒子が得られる等の点から、鉄酸化物である赤鉄鉱等の金属酸化物；磁鉄鉱、マンガンフェライト、ニッケルフェライトまたはマンガン亜鉛フェライト等のフェライト類；コバルト合金；およびニッケル合金から選択される1種または2種以上が好ましい。

[0038] 磁気分離性能により優れる本分離粒子が得られる等の点から、残留磁気がない超常磁性を有する材料が好ましい。超常磁性を有する材料としては特に限定されず、例えば、四三酸化鉄（ Fe_3O_4 ）、 γ -三二酸化鉄（ $\gamma-Fe_2O_3$ ）等の各種フェライト類が挙げられる。特に、金属酸化物が好ましく、四三酸化鉄（ Fe_3O_4 ）が特に好ましい。

[0039] 前記磁性粒子としては、 Fe^{2+} と Fe^{3+} とを1：2の割合で含む混合液を塩基性の溶液に滴下し、共沈反応させることで得られる Fe_3O_4 等を用いることができる。また、EMG2001（フェローテック社製）等の磁性流体に含まれる磁性粒子、フェリコロイドHC-50（（株）タイホーコーザイ製）等の市販品も用いることができる。

[0040] 本分離粒子中の前記無機粒子の粒径は、無機粒子の有する特性を十分に発揮できる粒子が得られ、特に、磁気分離性能に優れる本粒子が得られる等の点から、好ましくは5nm以上、より好ましくは8nm以上であり、好ましくは25nm以下、より好ましくは20nm以下、さらに好ましくは15nm以下である。

[0041] 前記有機高分子中における無機粒子の分散径は、好ましくは1nm以上であり、好ましくは30nm以下である。前記分散径が1nm未満であると、

無機粒子の製造自体が困難であることに加え、無機粒子が磁性粒子である場合の磁気応答特性が低下し、磁気分離性能が低下する傾向にある。また、前記分散径が30nmを超えると、無機粒子が磁性粒子である場合、残留磁気を生じやすくなり、自己凝集しやすくなることに加え、該磁性粒子が本分離粒子の表面に露出しやすくなる。

前記分散径は、より好ましくは5nm以上であり、より好ましくは20nm以下である。

前記分散径は、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて測定することができる。

[0042] [無機粒子の含有量]

本分離粒子は、目的細胞への影響が少なく、十分に細胞を分離・濃縮することができる等の点から、無機粒子の含有量が40質量%以上、好ましくは50質量%以上、より好ましくは55質量%以上であり、好ましくは95質量%以下、より好ましくは92質量%以下である。

該無機粒子の含有量は、本分離粒子を500℃、20分で加熱することで、高分子成分を揮発させ、無機粒子のみとした場合の、加熱前後の重量変化から算出した値である。この測定の際には、例えば、差動型示差熱天秤（（株）リガク製、TG-8120）を用いることができる。無機粒子の含有量が40質量%を下回ると、細胞の分離・濃縮性能が悪く、特に、無機粒子として磁性粒子を用いる場合には、磁気応答性が悪くなるため、十分に細胞を分離・濃縮するには、分離性を向上させるための手段、例えば、HGMS法等を行うことが必要となる。

[0043] <有機高分子>

前記有機高分子は本分離粒子のマトリックスとしての役割を有する。なお、該有機高分子には、本分離粒子に含まれ得る、下記ポリマー層、リガンドおよびブロッキング剤等は含まれない。

前記有機高分子としては公知の高分子を用いることができ、特に限定されないが、例えばエチレン性不飽和結合を有するモノマーを重合した高分子が

好ましい。該モノマーとしては、スチレン系モノマー、塩化ビニル、ビニルエステル類、不飽和ニトリル類、(メタ)アクリル酸エステルおよびそれらの誘導体等が挙げられる。

[0044] 前記モノマーとしてより具体的には、スチレン、 α -メチルスチレン、 p -メチルスチレン、 p -クロロスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系モノマー；塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル類；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル類；(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸2-エチルヘキシル、(メタ)アクリル酸ステアリル、エチレングリコール(メタ)アクリレート、トリフルオロエチル(メタ)アクリレート、ペンタフルオロプロピル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート、テトラヒドロフルフリル(メタ)アクリレート等の(メタ)アクリル酸エステルおよびそれらの誘導体等が挙げられるが、これら例示に限定されない。

これらのモノマーは単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0045] 前記有機高分子としては、水系媒体中における分散性などに優れる本分離粒子が得られる等の点から、スチレン系モノマーに由来する構成単位を含む高分子が好ましい。

スチレン系モノマーに由来する構成単位の含有量は、水系媒体中における分散性などにより優れる粒子が得られる等の点から、本分離粒子に含まれる有機高分子の総量を100質量%として、好ましくは60質量%以上、より好ましくは70質量%以上、さらに好ましくは80質量%以上であり、好ましくは100質量%以下、より好ましくは97質量%以下、さらに好ましくは93質量%以下である。

[0046] 前記有機高分子は、架橋されていることが好ましく、その架橋度は、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上、さらに好ましくは7%以上である。架橋度が前記数値以上である場合、後述するポリマー層に含まれ得る親水性ポリマーが、可動性マトリックスとしてふるまうことを軽減でき、また

、本分離粒子同士が吸着したり、吸着し凝集することを軽減できる。

前記架橋度は、例えば、下記架橋性モノマーを用いる場合、その仕込み量から算出することができる（下記架橋性モノマーを用いる場合、有機高分子を合成する際に用いるモノマー全量に対する架橋性モノマーの使用量の割合（質量%））。

[0047] 有機高分子を架橋する方法としては特に制限されないが、例えば、架橋性モノマーを用いる方法、架橋剤を用いる方法が挙げられる。

前記架橋性モノマーとしては、例えば、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、1, 6-ヘキサンジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールプロパンテトラ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレートおよびその異性体、トリアリルイソシアヌレートおよびその誘導体が挙げられるが、これら例示に限定されない。

前記架橋剤としては、例えば、有機過酸化物、フェノール樹脂、硫黄、硫黄化合物、p-キノン、p-キノンジオキシムの誘導体、ビスマレイミド化合物、エポキシ化合物、シラン化合物、アミノ樹脂、ポリオール、ポリアミン、トリアジン化合物、金属石鹼が挙げられるが、これら例示に限定されない。

これら架橋性モノマーや架橋剤は単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0048] 本分離粒子中の有機高分子の含有量は、無機粒子をしっかりと保持し、物理的強度に優れる本分離粒子を容易に得ることができる等の点から、また、無機粒子が磁性粒子である場合には、さらに磁気分離性能に優れる本粒子を得ることができる等の点から、無機粒子の含有量が前記範囲にあり、かつ、該無機粒子を保持することができる量であれば特に制限されないが、好ましくは20質量%未満、より好ましくは18質量%以下、特に好ましくは15質量%以下であり、好ましくは5質量%以上、より好ましくは8質量%以上

、特に好ましくは10質量%以上である。

[0049] <他の成分>

本分離粒子は、該粒子を製造する際に磁性流体を用いる場合、該磁性流体中に含まれる従来公知の成分や、該粒子を製造する際に用いる界面活性剤などの従来公知の成分を含んでいてもよい。このような従来公知の成分としては、界面活性剤、該界面活性剤以外の、酸基含有化合物、アミノ基含有化合物、シラン基含有化合物およびチタン原子含有化合物などの安定化剤が挙げられるが、これら例示に限定されない。

これらの従来公知の成分は、それぞれ単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0050] 前記界面活性剤としては、特に制限されず、従来使用されている化合物を適宜使用することができ、例えば、オレイン酸塩、カルボン酸塩、スルホン酸塩、硫酸エステル塩、リン酸エステル塩などのアニオン性界面活性剤；アミノ酸塩、第4級アンモニウム塩などのカチオン性界面活性剤；グリセリン脂肪酸エステルなどのエステル型、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルなどのエーテル型、脂肪酸ポリエチレングリコールなどのエステル・エーテル型等のノニオン性界面活性剤；アルキルベタインなどの両性界面活性剤が挙げられる。

[0051] 前記酸基含有化合物としては、例えば、特開2008-258564号公報に記載のカルボキシ基またはスルホ基を有する化合物や無機酸が挙げられるが、これら例示に限定されない。

前記アミノ基含有化合物としては、例えば、特開平7-94315号公報に記載の含フッ素アミンが挙げられるが、これら例示に限定されない。

前記シラン基含有化合物としては、例えば、シラン基含有表面処理剤が挙げられ、該表面処理剤としては、例えば、特開平10-4006号公報に記載のアルコキシシラン、特開2004-205481号公報に記載のシラン化合物が挙げられるが、これら例示に限定されない。

前記チタン原子含有化合物としては、チタニウムカップリング剤が挙げら

れ、該カップリング剤としては、例えば、チタニウムトリイソステアロイルイソプロポキサイド、(2-n-ブトキシカルボニルベンゾイルオキシ)トリブトキシチタン、チタニウムアセチルアセトネート、イソブトキシチタニウムエチルアセトアセテート、テトライソプロピルチタネート、テトラn-ブチルチタネートが挙げられるが、これら例示に限定されない。

[0052] 本分離粒子は、そのまま様々な用途に用いることができるが、所望の用途に応じた粒子表面とするために、有機高分子および無機粒子を含む粒子（該粒子を「ベース粒子」ともいう。）の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する（以下ベース粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する粒子を「被覆粒子」ともいう。）ことが好ましい。

本分離粒子がポリマー層を有することで、目的細胞の不用な活性化をより抑制することができ、細胞への毒性がより低い粒子となる。

[0053] [ポリマー層]

前記ポリマー層の成分としては特に制限されないが、ビニル系ポリマーが好ましく、その合成に使用するビニル系モノマーとしては、スチレン、 α -メチルスチレン、ハロゲン化スチレン、ジビニルベンゼンなどの芳香族ビニル単量体；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニルなどのビニルエステル類；アクリロニトリルなどの不飽和ニトリル類；メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ラウリル（メタ）アクリレート、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレートなどのエチレン性不飽和カルボン酸エステル；アクロレイン；などが挙げられるが、これら例示に限定されない。

前記ビニル系ポリマーは単独重合体であっても、2種以上のモノマーの共重合体であってもよい。

[0054] また、前記ポリマー層は、前記ビニル系モノマーと、ブタジエン、イソプレンなどの共役ジオレフィン；（メタ）アクリル酸、イタコン酸、無水マレイン酸、クロトン酸などのモノまたはジカルボン酸化合物またはその酸無水

物；（メタ）アクリルアミド、グリシジル（メタ）アクリレート、N-メチロール（メタ）アクリルアミド、N-イソプロピル（メタ）アクリルアミド、2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、グリセロールモノ（メタ）アクリレート、連鎖数2~40のポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを側鎖とする（メタ）アクリレート、ジアリルフタレート、アリル（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、スチレンスルホン酸およびそのナトリウム塩、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸およびそのナトリウム塩、イソプレンスルホン酸およびそのナトリウム塩などの、前記ビニル系モノマーと共重合可能なモノマーとの共重合体からなる層であってもよい。

[0055] 前記ポリマー層は、その30質量%以上、好ましくは50質量%以上、より好ましくは70質量%以上が親水性ポリマーからなる層であることが望ましい。前記ポリマー層中の親水性ポリマー量が30質量%よりも少ない場合、分離対象となる細胞（目的細胞または非目的細胞）以外の細胞の吸着が起こりやすくなり、非特異的な細胞分離が起こる可能性がある。

[0056] 本明細書において親水性とは、水との親和力が強い性質を持つことを意味する。具体的には、常温（25℃）において純水100gに対して1g以上溶解するポリマーを、親水性ポリマーという。

[0057] 前記親水性ポリマーを含むポリマー層は、親水性モノマーを重合することで形成したホモポリマー又はコポリマー層でもよく、形成したポリマー層を化学変換により親水化した層であってもよく、親水性高分子を直接コーティングした層であってもよい。

前記親水性モノマーとしては、（メタ）アクリル酸、メチル（メタ）アクリル酸；ジアセトン（メタ）アクリルアミド、（メタ）アクリルアミド、ジメチル（メタ）アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミド塩酸塩、N,N-ジエチル（メタ）アクリルアミド、N-イソプロピル（メタ）アクリルアミド、グリセロール（メタ）アクリルアミド、（メタ）アクリルアミド-N-

グリコール酸などの（メタ）アクリルアミド系化合物；ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、ヒドロキシブチル（メタ）アクリレート、エチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、2-スルホエチル（メタ）アクリレート、含リン（メタ）アクリル酸エステル、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、*t*-ブチルアミノエチル（メタ）アクリレート、グリシジル（メタ）アクリレート、グリセロール（メタ）アクリレートなどの（メタ）アクリレート系化合物；ビニルスルホン、スチレンスルホン酸、2-（メタ）アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸などのスルホン系化合物；（メタ）アクリロイルモルホリン、*N*-ビニルピロリドン、*N*-ビニルカプロラクタム、*N*-ビニルオキサゾリドン、*N*-ビニルサクシンイミド、ビニルピリジン、酢酸ビニル、イタコン酸、クロトン酸、*N*-ビニルイミダゾール、ビニルベンジルアンモニウム塩、ビニルベンジルアルコール、ヒドロキシスチレン等が挙げられるが、これら例示に限定されず、また、これらは、1種を用いても2種以上を用いてもよい。

[0058] 前記親水性モノマーとしては、ベース粒子表面で重合しやすい等の点から、（メタ）アクリル酸、メチル（メタ）アクリル酸、ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、エチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、含リン（メタ）アクリル酸エステル、グリシジル（メタ）アクリレート、グリセロール（メタ）アクリレート、（メタ）アクリロイルモルホリンおよびイタコン酸から選ばれる少なくとも1種がより好ましい。

[0059] また、前記ポリマー層は、架橋されていることが好ましく、該架橋の方法としては、前述の有機高分子を架橋する方法と同様の方法等が挙げられる。

[0060] 前記ポリマー層は、可動性マトリックスを含まないことが好ましい。これは、特表2015-533493号公報によると、Microbeads（Miltenyi Biotech社製）などの、可動性ポリマーマトリックス（非固体表面）を有する磁性体含有粒子は、その可動性により細胞表面に張り付くように変形し、あたかも大きな粒子のようにふるまうことで、細胞

への刺激を誘導する可能性があり、可動性マトリックスを有する磁性体含有粒子は、意図しない細胞の活性化、分化誘導を引き起こす可能性があるためである。

可動性マトリックスとしては、デキストランやポリサッカライドなどの多糖からなる層が代表され、その特性については、Langmuir 2006、22(12)、5485~5490頁(Bertholonら)に示されている。

[0061] 可動性マトリックスを有するか否かは、2種類以上の異なる方法によって粒子の大きさ(粒径)を測定した場合に、各方法で得られる大きさの値が一致するか一致しないかにより判別することができる。なお、可動性マトリックスを有する粒子は、各方法で得られる大きさの値が一致しない。

可動性マトリックスを有する粒子は、透過型電子顕微鏡法(TEM)では特定の大きさの直径を有すると測定されるが、動的光散乱法(DLS)ではそれよりもかなり大きい直径を有すると測定される(例えば、デキストランマトリックスと埋め込まれた酸化鉄ナノ粒子とからなる臨床用コントラスト試薬であるAMI-25(Advanced Magnetics社製)の直径は、TEMによると5~10nmであるのに対して、DLSによると80~150nmである。これは、水溶液中の粒子の総体積の99%超が可動性マトリックスで占められることを意味する(Wangら、Eur. Radiol.、2001、2323頁)。つまり、TEMとDLS等で測定した粒径に相違が小さければ、可動性マトリックスでないといえる。

本分離粒子は、TEMで測定した粒径とDLSで測定した粒径との比が0.5以上、1.5以下の範囲にあることが好ましい。

[0062] 本分離粒子は、少なくとも1つのリガンドを化学結合可能な表面を有することが好ましく、具体的には、反応性官能基を含む表面を有することが好ましい。

前記反応性官能基としては、抗原や抗体などを共有結合により結合可能な基であることが好ましく、所望の用途に応じて適宜選択すればよいが、例え

ば、カルボキシ基、NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）基、アミノ基、トシル基、チオール基、マレイミド基、ジメチルアミノ基、スルホン酸基が挙げられる。

[0063] 前記反応性官能基は、その官能基を有するモノマーを用いて導入してもよく、化学変換により導入してもよい。

前記官能基を有するモノマーとしては、前記親水性モノマーと同様の化合物等が挙げられるが、これら例示に限定されず、また、これらは、1種を用いても2種以上を用いてもよい。

[0064] 前記ポリマー層の含有量（厚み）は特に制限されず、得られる被覆粒子における無機粒子の含有量が前記範囲となるような量であることが好ましい。

[0065] 本分離粒子は、細胞との反応において優れた反応場、特に特異的な反応場を容易に提供できる等の点から、少なくとも1つのリガンドが物理吸着した粒子、好ましくは疎水性相互作用によりリガンドが吸着した粒子、または、少なくとも1つのリガンドが化学結合した粒子、好ましくはリガンドが粒子表面の反応性官能基と共有結合した粒子であることが好ましい。

[0066] [リガンド]

前記リガンドは、分離対象となる細胞（目的細胞または非目的細胞）に対して適度なアフィニティを有するものであれば、その種類は特に限定されない。リガンドの具体例としては、プロテインA、プロテインG、プロテインL、Fc結合タンパク、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、これらの機能性変異体等のタンパク質；アミノ酸；インシュリン等のペプチド；モノクローナル抗体等の抗体；抗原；酵素；ホルモン；DNA、RNA等の核酸；ヌクレオチド；ヌクレオシド；ヘパリン、ルイスX、ガングリオシド等の糖類または多糖類；脂質；ビオチン等のビタミン；薬物；基質；神経伝達物質；イミノジ酢酸、合成色素、2-アミノフェニルホウ素酸、4-アミノベンズアミジン、グルタチオンやそれらの誘導体のような低分子化合物が挙げられる。これらのリガンドはその化合物のまま用いてもよいが、これらの化合物を酵素処理等することによって得られるそのフラグメントを用いても

よい。また、前記リガンドは、人工的に合成されたペプチドやペプチド誘導体、リコンビナントであってもよい。

[0067] <本分離粒子の製造方法>

本分離粒子を製造する方法としては特に限定されず、例えば、懸濁重合法、マイクロサスペンション重合法、ミニエマルション重合法、分散重合法等を応用した方法が挙げられる。なかでも、粒径の小さな粒子を容易に製造することができることから、ミニエマルション重合法を応用した方法が好適である。

[0068] さらに、本粒子の製造方法としては、磁気分離性能に優れ、所望形状の（凝集体の発生が抑制され、略球状である）粒子を高生産効率で容易に製造することができる等の点から、下記工程（A）～（C）を含む方法（以下「本製造方法」ともいう。）がより好ましい。

工程（A）：磁性流体、モノマーおよび重合開始剤を混合して流体状の混合物（以下、「モノマー混合液」という。）を調製する工程

工程（B）：前記モノマー混合液を分散させてエマルションを調製する工程

工程（C）：前記エマルション中のモノマーを重合させる工程

[0069] <工程（A）>

前記工程（A）は、磁性流体、モノマーおよび重合開始剤を混合してモノマー混合液を調製する工程である。

前記工程（A）では、このようなモノマー混合液を調製し、この混合液を用いてその後の工程を経て本粒子を製造するため、磁性粒子（無機粒子）が高含量、特に前記範囲に含まれる本粒子を、容易に、高生産効率で製造することができる。特に、前記工程（A）において、磁性流体を用いるため、該流体中に含まれる磁性粒子が均一分散した状態で本粒子を製造することができ、有機高分子中における磁性粒子（無機粒子）の分散径が前記範囲にある本粒子を容易に製造することができ、磁性粒子の凝集が抑制された所望の粒子を容易に製造することができる。また、前記工程（A）において、モノマ

一および重合開始剤を含む混合液を調製するため、磁性粒子が有機高分子からなるマトリックス中に均一に分散し、かつ、磁性粒子の凝集が生じ難いために、磁性粒子含量が40質量%以上という高含量の粒子を容易に得ることができる。また、磁性粒子の凝集体が発生し難いために、本粒子の粒径の制御および形状の制御が容易であり、粒度分布を狭くすることができる。

[0070] 一方、従来の有機高分子含有磁性粒子の製造方法においては、磁性粒子を所定の分散径で有機高分子中に微分散させる等のために、まず、有機溶媒中に磁性粒子を分散させた磁性粒子分散液を調製し、具体的には、磁性流体から液状媒体である水または有機溶媒を除去して磁性粒子を分離し、分離した磁性粒子にさらに別の溶媒を添加することで磁性粒子分散液を調製し、そこに、モノマー、重合開始剤および共界面活性剤を加えることでモノマー混合液を調製していた。

しかしながら、本発明者が鋭意検討した結果、このような従来の製造方法では、磁性流体から液状媒体を除去する際に磁性粒子同士が凝集し、分散状態が悪化するため、結果として磁性粒子を高含量で含む粒子を容易に、高生産効率で得ることができないことが分かった。

[0071] また、別の従来の有機高分子含有磁性粒子の製造方法においては、磁性粒子を含むエマルジョンにモノマーおよび重合開始剤を添加していた。

しかしながら、本発明者が鋭意検討した結果、このような従来の製造方法では、モノマーを重合する際に、略球状以外の形状になったり、凝集体が発生したりして、磁性粒子を高含量で含む所望形状の有機高分子含有磁性粒子を容易に、高生産効率で製造することができないことが分かった。

[0072] 従って、本製造方法では、磁性流体を処理、例えば、磁性流体から液状媒体を除去する工程を経ることなく、そのまま磁性流体を用い、かつ、該流体とモノマーおよび重合開始剤とを混合してモノマー混合液を調製することが好ましい。

[0073] (磁性流体)

工程(A)で用いる磁性流体は、磁性粒子を含む。

通常、磁性流体は、(a) 直径数 nm～数十 nm の磁性粒子と、(b) 水、有機溶剤または油などの液体（分散媒）と、(c) 磁性粒子を分散媒に安定に分散させるための安定化剤とを含む。

磁性流体中では、通常、磁性粒子表面に界面活性剤などの安定化剤層が存在するために、磁性粒子同士で反発力が働き、凝集や沈降が起こらず、磁性粒子は該流体中で安定な分散状態を保つ。また、磁性流体は、磁界の発生していない場合には通常の液体として振る舞うが、磁場をかけると液体の粘度が変わり、あたかも液体全体が強磁性を有しているかのように挙動する性質を持っている。また、外部から磁界、重力、遠心力などの外力が加えられても流体中の磁性粒子の分散状態が維持され、このため、液体にもかかわらず磁石に吸引されるという特徴がある。

[0074] (a) 直径数 nm～数十 nm の磁性粒子としては、直径数 nm～数十 nm の、好ましくは粒径が 5～25 nm の前記磁性粒子を用いることができ、好ましい粒子（材料、粒径等）も前記無機粒子の欄で挙げたのと同様である。

該磁性粒子は、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0075] (b) 水、有機溶剤または油などの液体（分散媒）としては、磁性粒子の分散性に優れ、磁性粒子を溶解させず、かつ、モノマーと混合可能なものであることが好ましい。このような分散媒としては、有機溶剤が好ましく、該有機溶剤としては、脂肪族炭化水素系溶媒を含有することが好適である。前記脂肪族炭化水素系溶媒としては、磁性粒子の分散性に特に優れることから、炭素数 5～20 の直鎖または分岐の化合物が好適であり、炭素数 5～7 の直鎖または分岐の化合物がより好適である。具体的には、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、イソブタン、イソペンタン等が挙げられるが、これら例示に限定されない。

前記分散媒は、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0076] 前記有機溶剤中における脂肪族炭化水素系溶媒の含有量としては、80質量%以上であることが好ましい。80質量%以上であると、磁性粒子の分散性に優れ、本粒子中における磁性粒子の凝集を抑制でき、本粒子における磁

性粒子含量のバラツキも抑制できる。

[0077] 前記磁性流体中における有機溶剤の含有量としては、磁性粒子100質量部に対して、好ましくは20質量部以上であり、好ましくは500質量部以下である。有機溶剤の含有量が20質量部未満であると、十分に磁性粒子を分散できない場合があり、500質量部を超えると、下記工程(C)の後に残存溶剤の除去が必要となり、本粒子製造の操作が煩雑となることがある。前記有機溶剤の含有量は、より好ましくは30質量部以上であり、より好ましくは300質量部以下である。

[0078] (c) 磁性粒子を分散媒に安定に分散させるための安定化剤としては、磁性流体に従来使用されているものを適宜使用することができ、前記本分離粒子の他の成分の欄で説明した安定化剤と同様の安定化剤等が挙げられる。

該安定化剤は、それぞれ単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよく、例えば、磁性流体は、界面活性剤、酸基含有化合物、アミノ基含有化合物、シラン基含有化合物およびチタン原子含有化合物からなる群より選ばれる少なくとも一つを含むことが好ましい。

[0079] (モノマー)

工程(A)で用いるモノマーとしては、前記有機高分子を合成する際に用いるモノマーと同様のモノマーが挙げられ、好ましいモノマーも同様である。

該モノマーは、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0080] 前記モノマーの使用量としては特に限定されないが、得られる本粒子中の磁性粒子含量が前記範囲となる量であることが好ましく、具体的には、磁性流体中の磁性粒子100質量部に対し、好ましくは1質量部以上、より好ましくは3質量部以上、さらに好ましくは5質量部以上、特に好ましくは10質量部以上、好ましくは100質量部以下、より好ましくは50質量部以下、さらに好ましくは20質量部未満である。

このような量でモノマーを用いると、磁性粒子の含有量が前記範囲内にあり、磁気分離性能および物理的強度に優れる本粒子を容易に得ることができ

る。

[0081] (重合開始剤)

工程(A)で用いる重合開始剤としては、熱重合性のラジカル重合開始剤が好ましく、例えば、2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル、2, 2'-アゾビス-(2-メチルプロパンニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2, 4-ジメチルペンタンニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2-メチルブタンニトリル)、1, 1'-アゾビス-(シクロヘキサンカルボニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2, 4-ジメチル-4-メトキシバレロニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2, 4-ジメチルバレロニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2-アミジノプロパン)塩酸塩等のアゾ系開始剤；過酸化ベンゾイル、クメンヒドロペルオキシド、過酸化水素、過酸化アセチル、過酸化ラウロイル、過硫酸塩(例：過硫酸アンモニウム)、過酸化エステル(例：t-ブチルペルオクテート、 α -クミルペルオキシピバレート)等の過酸化物タイプのラジカル系重合開始剤；が挙げられ、これら例示に限定されない。

該重合開始剤は、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0082] 前記重合開始剤の使用量としては特に限定されないが、モノマー100質量部に対して、好ましくは0.1質量部以上、より好ましくは0.5質量部以上、さらに好ましくは1質量部以上であり、好ましくは30質量部以下、より好ましくは20質量部以下、さらに好ましくは10質量部以下である。

[0083] 磁性流体、モノマーおよび重合開始剤を混合する際の混合の順番は特に制限されず、また、この混合の際には、必要に応じて界面活性剤を用いてもよい。

[0084] <工程(B)>

前記工程(B)は、前記モノマー混合液を分散させてエマルジョンを調製する工程である。この工程(B)では、好ましくは、前記モノマー混合液は、界面活性剤を溶解させた水系媒体に分散される。

[0085] 前記水系媒体としては特に限定されず、通常は蒸留水やイオン交換水等の

水が用いられる。

水系媒体とは、少なくとも50質量%以上を水が占める媒体をいう。

[0086] 前記界面活性剤としては特に限定されず、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤のいずれも用いることができる。なかでも、アニオン性界面活性剤が好適である。

前記界面活性剤は、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0087] アニオン性界面活性剤としては特に限定されず、ドデシル硫酸、ドデシルベンゼン硫酸、デシルベンゼン硫酸、ウンデシルベンゼン硫酸、トリデシルベンゼン硫酸、ノニルベンゼン硫酸などのナトリウム、カリウムまたはアンモニウム塩等が挙げられる。

[0088] カチオン性界面活性剤としては特に限定されず、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、塩化ヘキサデシルピリジニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム等が挙げられる。

[0089] ノニオン性界面活性剤としては特に限定されず、例えば、ポリビニルアルコールが挙げられる。また、ノニオン性界面活性剤としては、例えば、T r i t o n X-100、X-114、X-305、N-101（以上、ユニオンカーバイド社製）、T w e e n 20、40、60、80、85（以上、アイ・シー・アイ社製）、B r i j 35、58、76、98（以上、アイ・シー・アイ社製）、N o n i d e t P-40（シエル社製）、I g e p o l C0530、C0630、C0720、C0730（ローヌ・プーラン社製）等の市販品を用いることができる。

[0090] また、前記界面活性剤としては、前記モノマーと重合可能な反応基を有する反応性界面活性剤も用いることができる。該反応基としては、例えば、ビニル基、アシル基、（メタ）アクリロイル基等のエチレン性不飽和基が好適である。

[0091] 前記界面活性剤の使用量としては特に限定されないが、エマルションを容易に調製することができる等の点から、モノマー混合液100質量部に対して、好ましくは0.01質量部以上、より好ましくは0.1質量部以上であ

り、好ましくは100質量部以下、より好ましくは5質量部以下である。

[0092] モノマー混合液を分散させる方法としては、例えば、界面活性剤を含む水系媒体中に前記モノマー混合液を加え、高い剪断力を発生させる剪断混合装置によって乳化させる方法が挙げられる。

[0093] 前記剪断混合装置としては特に限定されず、例えば、ホモジナイザー（IKA社製）、ヒストロン（マイクロテック・ニチオン社製）、ポリトロン（キネマティカ社製）およびTKオートホモキサー（特殊機化工業（株）製）等のバッチ式乳化機；エバラマイルダー（大平洋機工（株）製）、TKフィルミックス、TKパイプラインホモキサー（特殊機化工業（株）製）、コロイドミル（（株）神鋼環境ソリューション製）、クレアミックス（エム・テクニク社製）、スラッシャー、トリゴナル湿式微粉碎機（日本コークス工業（株）製）、キャビトロン（ユーロテック社製）およびファインフローミル（太平洋機工（株）製）等の連続式乳化機；マイクロフルイダイザー（みずほ工業（株）製）、ナノマイザー（ナノマイザー社製）およびAPVガウリン（ガウリン社製）等の高圧乳化機；膜乳化機（冷化工業（株）製）等の膜乳化機；バイブロミキサー（冷化工業（株）製）等の振動式乳化機；超音波ホモジナイザー（ブランソン社製）等の超音波乳化機；が挙げられ、なかでも、プローブ式の超音波分散機が好適に用いられる。

[0094] 工程（B）では、前記と同様の効果の点から、得られるエマルション中の液滴の粒径が、所望の本粒子の粒径と同程度になるように、前記モノマー混合液を分散させることが好ましく、具体的には、前記本粒子の粒径と同様（好ましい範囲も同様）の粒径の液滴を含むエマルションが得られるように、前記モノマー混合液を分散させることが好ましい。

[0095] このようなモノマー混合液の分散条件としては、例えば、前記モノマー混合液を分散させる際に、超音波分散機を用いる場合、超音波出力は、好ましくは5W以上であり、好ましくは200W以下である。超音波出力が5W未満の場合、分散力不足により大きな液滴が生じ、工程（C）における重合反応が困難になる場合があり、200Wを超えると、所望の粒子が得られない

場合がある。

また、超音波の照射時間としては、超音波出力にもよるが、1回の超音波照射の時間は、好ましくは10秒以上、より好ましくは30秒以上、さらに好ましくは1分以上であり、好ましくは10分以下、より好ましくは5分以下、さらに好ましくは3分以下である。

なお、超音波の照射は1回でも複数回でもよい。

[0096] 〈工程 (C)〉

前記工程 (C) は、前記エマルション中のモノマーを重合させる工程である。この工程により、本粒子を得ることができる。

[0097] 前記重合の条件は、用いるモノマー等により適宜選択すればよいが、通常、50℃以上、95℃以下で5時間以上、24時間以下程度加熱することにより行う。

[0098] なお、従来の有機高分子含有磁性粒子の製造方法では、磁性粒子含量の異なる粒子が製造されるため、モノマーを重合させた後に、所望の磁性粒子含量の有機高分子含有磁性粒子を分画し、回収する工程が必要であったが、本製造方法によれば、磁性粒子含量が略一定の本粒子を得ることができるため、このような分画する工程を要することなく、磁性粒子を高含量で含む粒子を容易に調製することができる。このため、本製造方法は生産性に優れた方法であるといえる。

[0099] 〈他の工程〉

本製造方法は、必要により、前記工程 (A) ~ (C) 以外の他の工程を含んでもよい。

該他の工程としては、例えば、前記工程 (C) で得られた本粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を形成する工程、該工程で得られた被覆粒子または前記工程 (C) で得られた本粒子にリガンドを吸着または結合させる工程、リガンドが結合した粒子をブロッキングする工程、前記各工程で得られた粒子分散液を、磁気分離法により水等により洗浄する洗浄工程が挙げられる。

[0100] ・ポリマー層を形成する工程

前記ポリマー層は、例えば、ベース粒子、好ましくは前記工程（C）で得られた本粒子分散液の存在下で、前述のポリマー層を形成するモノマーとして挙げたモノマーを、必要により、重合開始剤、乳化剤、分散剤、界面活性剤、電解質、架橋剤、分子量調節剤などの存在下で、液体中で（共）重合を行うことにより形成することができる。このようにポリマー層を形成することにより、当該ポリマー層の表面に所望の官能基を導入することができるなど、所望の表面特性を有する被覆粒子を容易に得ることができるため好ましい。また、前記ポリマー層を形成後、エチレン性不飽和カルボン酸アルキルエステルのアルカリ加水分解、ビニルエステルのアルカリけん化などの方法により被覆粒子表面に存在する官能基を改変することも可能である。

さらに、前記ポリマー層の形成を2回以上行ってもよい。すなわち、前記被覆粒子は、2層以上のポリマー層を有していてもよい。

[0101] なお、ポリマー層をこのように形成する場合の、ベース粒子とモノマーとを接触させる方法としては特に制限されないが、例えば、前記モノマーを、一括方式、分割方式あるいは連続添加方式のいずれかによりベース粒子またはベース粒子分散液に添加する方法が挙げられる。

[0102] 前記重合の条件は、用いるモノマーや重合開始剤等により適宜選択すればよいが、重合温度は、通常10℃以上、好ましくは30℃以上であり、通常90℃以下、好ましくは85℃以下であり、重合時間は、通常1時間以上、30時間以下程度である。

[0103] 前記重合開始剤としては、水への溶解性の観点から分類すると、油溶性の重合開始剤が好ましい。水溶性の重合開始剤を用いるとベース粒子表面における重合ではなく、ベース粒子を含まないポリマー層のみからなる新粒子が多量に生じる傾向がある。

[0104] 前記油溶性重合開始剤としては、ベンゾイルペルオキシド、ラウロイルペルオキシド、*t*-ブチルペルオキシ2-エチルヘキサネート、ジ（3，5，5-トリメチルヘキサノイル）パーオキシド、アゾビスイソブチロニトリ

ル等の過酸化物・アゾ化合物などを挙げることができるが、これら例示に限定されない。

前記重合開始剤は、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

前記重合開始剤の使用量は、モノマー100質量部に対し、好ましくは0.01質量部以上、8質量部以下である。

[0105] 前記乳化剤としては、通常使用されるアニオン性界面活性剤またはノニオン性界面活性剤等を用いることができる。

前記乳化剤は、単独で用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

[0106] 前記アニオン性界面活性剤としては、高級アルコール硫酸エステルアルカリ金属塩、アルキルベンゼンスルホン酸アルカリ金属塩、コハク酸ジアルキルエステルスルホン酸アルカリ金属塩、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸アルカリ金属塩、ポリオキシエチレンアルキル（またはアルキルフェニル）エーテルの硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキル（またはアルキルフェニル）エーテルのリン酸エステル塩、ナフタレンスルホン酸ナトリウムホルマリン縮合物などの他、ラテムルS-180A（花王（株）製）、エレミノールJS-2（三洋化成（株）製）、アクアロンHS-10（第一工業製薬（株）製）、アデカリアソープSE-10N（（株）ADEKA製）などが挙げられるが、これら例示に限定されない。

[0107] また、ノニオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルなどの他、アクアロンRS-20（第一工業製薬（株）製）、アデカリアソープNE-20（（株）ADEKA製）などが挙げられる。

[0108] ・リガンドを吸着または結合させる工程

前記工程（C）で得られた本粒子または前記ポリマー層を形成する工程で得られた被覆粒子にリガンドを吸着または結合させる工程としては、特に制限されず、従来公知の方法で行えばよい。

前記リガンドが物理吸着した粒子は、例えば、前記有機高分子が疎水性の高分子となるようなモノマーを用いて得られた粒子とリガンドとを接触させ

ることのできる。

リガンドを化学結合する方法は常法に従えばよいが、共有結合法で行うことが好ましい。例えば、粒子表面がカルボキシ基を有し、リガンドがアミノ基を有するものである場合は、脱水縮合剤を用いて結合させればよい。

[0109] ・リガンドが結合した粒子をブロッキングする工程

本製造方法では、リガンドが吸着または結合した本粒子に、ブロッキング剤を結合させる工程を含んでもよい。

このような工程を経て得られる本粒子を用いることで、非特異反応の低減、本粒子の分散性向上、リガンドの変性を抑制でき、目的細胞への影響をより低減することができる。

ブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン（BSA）、スキムミルク、ゼラチン、カゼイン、合成ポリマー等が挙げられる。

[0110] 合成ポリマーを用いたブロッキング剤としては、ポリオキシエチレン等の親水ポリマーを側鎖に有するビニルモノマーの共重合体、ポリオキシエチレン等の親水性モノマーと他モノマーとのブロック共重合体、末端に官能基を有するポリオキシエチレン等の親水性ポリマーなどが挙げられる。特に、特開2008-170417号公報に示されるポリオキシエチレンの片末端にポリアミンを有する構造の合成ポリマーは、本粒子表面への非特異吸着抑制のみならず、リガンドの配向を整列させ、反応性を向上させる効果も見られることから好適に使用できる。

[0111] ブロッキング剤は、リガンドが吸着または結合した本粒子表面に物理吸着させてもよく、化学結合させてもよい。ブロッキング剤を吸着または結合させる方法は、用いる粒子やブロッキング剤により、適宜選択すればよく、従来公知の方法で行えばよい。

[0112] ≪目的とする細胞または目的でない細胞を分離する方法≫

本発明の一実施形態に係る、目的とする細胞（目的細胞）または目的でない細胞（非目的細胞）を分離する方法（以下「本分離方法」ともいう。）は、下記工程1および2を含み、

有機高分子および磁性粒子を含み、磁性粒子の含有量が40質量%以上であり、体積平均粒径が10~1000nmである、前記本粒子を用いる方法である。

工程1：前記目的とする細胞を含む試料と、本粒子とを接触させる工程

工程2：前記工程1で生じる、本粒子と目的の細胞または目的でない細胞との複合体を、磁気分離する工程

[0113] 本分離方法によれば、HGMS法等を使用しなくても、細胞への影響（細胞死や細胞の活性化）がほとんどなく、細胞を分離することができ、高回収率で細胞を分離することができる。

[0114] 本分離方法は、前記工程1の前に、対象から目的とする細胞を含む試料（生物学的標本）を得る工程を含んでいてもよい。

前記生物学的標本としては、尿、血漿、血清、唾液、精液、便、痰、脳脊髄液、涙液、粘液、羊水、末梢血試料、骨髓吸引液、細針吸引液、リンパ節生検、上皮組織、骨や軟骨を含む結合組織、筋組織および神経組織などから採取した検体などの生体由来サンプル、さらに初代細胞、培養細胞などの細胞懸濁液等が挙げられる。

[0115] 前記目的細胞としては、あらゆる細胞が含まれる。例えば、T細胞、制御性T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、造血幹細胞が挙げられる。

前記非目的細胞は、試料中に含まれる目的細胞以外の細胞であればよく、該非目的細胞を選択的に分離、除去することで、試料中の目的細胞を分離・濃縮することができる。

[0116] 工程1における、試料と本粒子とを接触させる工程は、試料中に含まれる分離の対象となる目的細胞または非目的細胞と本粒子とを接触させる工程であることが好ましい。

該接触の方法としては、試料と本粒子とを混合すればよく、その際に、必要により、転倒混和、攪拌等を行ってもよい。

[0117] 工程1における接触条件は、本粒子と目的細胞または非目的細胞との複合

体が得られれば特に制限されないが、接触温度は、好ましくは1℃以上、より好ましくは2℃以上であり、好ましくは30℃以下、より好ましくは25℃以下であり、接触時間は、好ましくは1分以上、より好ましくは5分以上であり、好ましくは60分以下、より好ましくは45分以下である。

[0118] 工程1で用いる本粒子は、前述したとおりであるが、目的細胞または非目的細胞のどちらかと特異的に反応する特異的なリガンドを結合した有機高分子含有磁性粒子であることが好ましい。

[0119] 工程2は、具体的には、磁石により、非目的細胞と目的細胞一本粒子複合体とを分離、または、目的細胞と非目的細胞一本粒子複合体とを分離する工程が挙げられる。

[0120] 前記磁気分離は、前記と同様の理由から、米国特許第5693539号明細書に記載のような高勾配磁気分離(HGMS)技術を用いたカラム等を使用せず、約5キロガウスまでほどの低い勾配において行うことが好ましい。

[0121] 前記磁気分離は、具体的には、以下の方法が好ましい。

非目的細胞と目的細胞一本粒子複合体とを分離する場合、工程1で形成した複合体を含む反応槽の外側から磁石等により磁気分離し該複合体を集め、該複合体以外の非目的細胞等を含む試料を排出し、リン酸緩衝液等の洗浄液を添加する。その後、磁石を取り除き、複合体を分散させて洗浄する。この操作は、複数回、例えば10回まで程度繰り返してもよい。

また、目的細胞と非目的細胞一本粒子複合体とを分離する場合、工程1で形成した複合体を含む反応槽の外側から磁石等により磁気分離し該複合体を集め除去することで、非目的細胞が除去され目的細胞が濃縮された試料を得ることができる。

[0122] 本分離方法は、細胞を分離・濃縮した後に、細胞一本粒子複合体から、細胞と本粒子とをそれぞれ解離する工程を含んでもよい。該解離の方法としては、結合定数の異なる競合物質などの解離剤を用いる方法、光や熱により開裂するリンカーを使用する方法、化学反応や酵素反応によりリンカーを切断可能な解離剤を用いる方法などが挙げられる。

結合定数の異なる競合物質を用いる方法としては、特許第5686098号に記載の方法が挙げられる。また、光開裂リンカーを用いる方法としては、特許第4669704号に記載の方法を応用する方法が挙げられる。

[0123] 《キット》

本発明の一実施形態に係るキットは、前記本分離粒子および該粒子を分離するための部材を含む。

前記本分離粒子を分離するための部材としては、本分離粒子が本粒子である場合には、永久磁石や電磁石などの磁場印加部材、より具体的には、磁気スタンド等が挙げられ、本分離粒子が本粒子以外の粒子である場合には、遠心分離機や、所定の孔径を有するフィルター等のろ過部材等が挙げられる。

[0124] また、前記キットは、前記以外の他の成分、例えば、本分離粒子を分散させる媒体、本分離粒子がリガンドを有する粒子である場合、該リガンドと特異的に反応する物質（蛍光物質などにより標識化されたものを含む）、前記解離剤、洗浄液、ブロッキング剤を含んでもよい。

[0125] 《細胞を分離または濃縮するための装置》

本発明の一実施形態は、細胞を分離または濃縮するための装置であってもよく、該装置は、本分離粒子を用いて細胞を分離または濃縮するための装置であり、例えば、本分離粒子が本粒子である場合、本分離粒子の分散液を保持する容器と、容器中に含まれる本粒子を当該容器の内壁面等に捕捉する磁場印加部材および前記磁場印加部材により捕捉されない物質を除去する除去部材を有する磁気分離機構とを備えた装置が挙げられる。

[0126] 本願は、前述した本発明の実施態様に関し、更に以下の実施態様も開示する。

[0127] [10'] 細胞を分離または濃縮するために使用する下記要件（1）～（3）を満たす有機高分子含有粒子。

要件（1）：前記有機高分子含有粒子は、有機高分子および無機粒子を含む

要件（2）：前記有機高分子含有粒子中の無機粒子の含有量が40質量%

以上である

要件（３）：前記有機高分子含有粒子の体積平均粒径が10～1000nmである

[0128] [11'] 前記無機粒子が磁性粒子である、[10']に記載の粒子。

[0129] [12'] 前記有機高分子含有粒子が、有機高分子および無機粒子を含む粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する、[10']または[11']に記載の粒子。

[13'] 前記ポリマーが親水性ポリマーである、[12']に記載の粒子。

[0130] [14'] [10']～[13']のいずれかに記載の粒子、および、
該粒子を分離するための部材を含む、
キット。

実施例

[0131] 以下、実施例、比較例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

[0132] 下記合成例における溶液中の分散質または粒子の体積平均粒径は、動的光散乱式粒径分布測定装置（日機装（株）製、ナノトラックUPA-EX150）を用いて測定した。

また、下記実施例および比較例で得られた粒子中の磁性粒子含有量は、差動型示差熱天秤（（株）リガク製、TG-8120）を用いて500℃で測定した。

[0133] [合成例1]

磁性流体「EMG2001」（該磁性流体27.0g中に磁性粒子を14.3g含有、ヘプタン分散液、フェローテック社製）27.0gに、スチレン1.35g、ジビニルベンゼン0.15gおよび2,2'-アゾビスイソブチロニトリル0.06gを加え、混合してモノマー混合液を得た。次いで、ドデシル硫酸ナトリウム0.75gを溶解させた水溶液75gを、得られたモノマー混合液に加え、超音波ホモジナイザー（（株）日本精機製作所製

、US300T)を用いて、氷冷下で、超音波処理(2分間の超音波照射(超音波出力:150W)と、その後の2分間の超音波照射の停止)を行った。この超音波処理を10回繰り返して、磁性粒子を含むモノマー混合液が水中に分散したエマルションを調製した。得られたエマルション中の液滴の体積平均粒径は104nmであった。

[0134] 次いで、得られたエマルションを、70℃で7時間重合し、磁気分離により水で洗浄することで、有機高分子含有磁性粒子Aの分散液を得た。こうして得られた粒子分散液中の有機高分子含有磁性粒子Aの体積平均粒径は103nmであり、該有機高分子含有磁性粒子Aの磁性粒子含有量は90質量%であった。この磁性粒子含有量の値は、理論値と一致しており、生産効率よく、有機高分子含有磁性粒子(分散液)が得られたことが分かる。なお、理論値(質量%)とは、仕込んだ磁性粒子、モノマー、開始剤が全て有機高分子含有磁性粒子となったと仮定した時の値を意味し、「磁性粒子量×100/(磁性粒子量+各モノマー量+開始剤量)」より求められる。また、得られた有機高分子含有磁性粒子の粒径分布が一群となったことから、所望形状の有機高分子含有磁性粒子を高生産効率で得ることができたことが分かる。

[0135] メタクリル酸メチル1.2g、トリメチロールプロパントリメタクリレート0.3g、メタクリル酸0.3gおよびジ(3,5,5-トリメチルヘキサノイル)パーオキサイド(日油(株)製;パーロイル355)0.1gを混合した液に、ドデシル硫酸ナトリウム0.15gを溶解した水溶液30gを添加し、超音波ホモジナイザー(US300T)によりエマルションcを作製した。

[0136] セパラブルフラスコに、作製した有機高分子含有磁性粒子Aの分散液73.5g(有機高分子含有磁性粒子A3.0g含有)を入れ、水浴で温度を60℃にコントロールしながら、前記エマルションcを2時間かけて滴下した。滴下終了後、温度を60℃に保持し、1時間かけて重合し、80℃に昇温した後、2時間かけて反応を終了させた。得られた分散液を、磁気分離により水で洗浄することで、被覆粒子Cの分散液を作製した。得られた粒子分散

液中の被覆粒子Cの体積平均粒径は109nmであり、該被覆粒子Cの磁性粒子含有量は59質量%であった。

[0137] 被覆粒子C10mgをpH5.0の100mM MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate) バッファー1mLに分散させ、そこに、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩 (WSC、(株) 同仁化学研究所製) を10mg/mLの濃度となるようにpH5.0の100mM MESバッファーに溶解させたWSC溶液0.1mLを添加し、室温で30分回転攪拌した。そこに、さらに、ストレプトアビジン0.2mgを溶解させたpH5.0の100mM MESバッファー0.1mLを添加し、室温で2時間回転攪拌した後、トリスバッファーで4回洗浄することにより、未反応のストレプトアビジンを除去し、被覆粒子Cの表面にストレプトアビジンを固定化したストレプトアビジン結合粒子を調製した。BCAアッセイにより、ストレプトアビジンの結合量を調べたところ、18 μ g/mL被覆粒子Cであった。

[0138] 抗ヒトCD4抗体2mgに対して、5.69mg/mLのNHS化ビオチン (H1759、Sigma-Aldrich社製) DMSO溶液を8 μ L添加し、室温で3時間静置した。その後、限外ろ過によって未反応のビオチンを除去し、DMSO溶液を0.5wt%BSA、2mMEDTAを含むD-PBS溶液 (以下「反応バッファー」という。) に置換することで、ビオチン標識抗ヒトCD4抗体を得た。

[0139] ストレプトアビジン結合粒子0.2mgおよび前記で得られたビオチン標識抗ヒトCD4抗体0.4 μ gをテストチューブに取り、60分間室温で振とう混和し、反応させた。その後磁気スタンドを使用して反応液中からビオチン標識抗ヒトCD4抗体が結合したストレプトアビジン結合粒子を分離し、0.05%Tween20含有TBSで2回洗浄することで、抗ヒトCD4抗体結合有機高分子含有磁性粒子I (磁性粒子含有量: 57質量%、体積平均粒径: 150nm) を得た。なお、体積平均粒径の変動係数は20%であった。

[0140] [合成例 2]

合成例 1 において、磁性流体の使用量を 1 g に変更することで、磁性粒子含有量が 22 質量%であり、体積平均粒径が 155 nm である抗ヒト CD4 抗体結合有機高分子含有磁性粒子 I を得た。なお、体積平均粒径の変動係数は 23% であった。

[0141] [実施例 1]

<PBMC からの CD4 (+) 細胞のポジティブ分離>

前記で得られた抗ヒト CD4 抗体結合有機高分子含有磁性粒子 I を、乾燥重量が 0.2 mg となるようにテストチューブに取り分け、反応バッファー 0.5 ml に分散させ、粒子分散液 1 を得た。

[0142] 購入したヒト PBMC (ヒト末梢血単核細胞、Precision Bioservices 社製) を解凍したのち、10% FBS 含有 RPMI 培地 (Thermo fisher scientific 社製) 中で一晩培養した。その後反応バッファーで 3 回洗浄し、同バッファーにて 2×10^6 cells/ml に調整した。調整したヒト PBMC 液を先の粒子分散液 1 に 50 μ l ずつ添加した後、室温で 30 分間転倒混和することにより、細胞と有機高分子含有磁性粒子とを反応させた。その後磁気スタンドを使用して反応液中から有機高分子含有磁性粒子を磁気分離し、反応バッファーで 3 回洗浄を行うことにより、目的細胞-抗体結合有機高分子含有磁性粒子の複合体を得ることで、調整したヒト PBMC 液中の CD4 (+) 細胞を分離した。

[0143] その後、目的細胞-抗体結合有機高分子含有磁性粒子の複合体を 100 μ l の反応バッファーに懸濁させ、そこに 10 μ l の PE 標識抗 CD4 抗体 (Biolegend 社製) を添加し、室温、暗所の条件にて 10 分間細胞と反応させた。反応後、反応バッファーで 3 回洗浄し、未反応の PE 標識抗 CD4 抗体を除去した。その後、目的細胞-抗体結合有機高分子含有磁性粒子の複合体を 2 ml の反応バッファーに懸濁させ、該懸濁液中の細胞を Accuri C6 Flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン アンド カンパニー製) にて解析した。縦軸を前方散乱光 (FSC) とし、横軸

を側方散乱光（SSC）としてプロットし、ゲーティングを行った。続いて、縦軸をFSCとし、横軸をFL-2として、CD4（-）細胞の割合とCD4（+）細胞の割合をプロットした。

[0144] なお、前記調整したヒトPBMC液中のCD4（-）細胞とCD4（+）細胞の割合についても、前記と同様にして求めた。結果を図1に示す。

[0145] ヒトPBMC液中のCD4（+）細胞の割合は56.7%であったが、抗体結合有機高分子含有磁性粒子を用いた磁気分離により91.8%まで分離、濃縮することができた。前記Flow cytometerで計測された細胞の個数に基づいて、式（磁気分離後のCD4（+）細胞数／前記調整したヒトPBMC液中のCD4（+）細胞の数×100）から算出した細胞の回収率は95%であった。

[0146] [比較例1]

前記で得られた抗ヒトCD4抗体結合有機高分子含有磁性粒子IIを用いた以外は実施例1と同様の方法で、調整したヒトPBMC液からCD4（+）細胞を分離した。磁気分離により、CD4（+）細胞の割合を90.2%まで分離、濃縮できたが、細胞の回収率はわずか38%であった。

[0147] [実施例2]

<ヒトPBMCからのCD8（+）細胞のポジティブ分離>

合成例1において、抗ヒトCD4抗体の代わりに、抗ヒトCD8抗体を用いた以外は合成例1と同様にして、抗ヒトCD8抗体結合有機高分子含有磁性粒子を作成し、該抗ヒトCD8抗体結合有機高分子含有磁性粒子を用いた以外は実施例1と同様の方法で、調整したヒトPBMC液中からCD8（+）細胞の分離、濃縮を行った。その結果、調整したヒトPBMC液中の初期CD8（+）細胞の割合は62.3%であったが、抗体結合有機高分子含有磁性粒子を用いた磁気分離により91.4%まで分離、濃縮することができた。細胞の回収率は93%であった。

[0148] [比較例2]

合成例2において、抗ヒトCD4抗体の代わりに、抗ヒトCD8抗体を用

いた以外は合成例2と同様にして、抗ヒトCD8抗体結合有機高分子含有磁性粒子を作成し、該抗ヒトCD8抗体結合有機高分子含有磁性粒子を用いた以外は実施例2と同様の方法で、調整したヒトPBMC液中からCD8(+)細胞の分離、濃縮を行った。その結果、抗体結合有機高分子含有磁性粒子を用いた磁気分離により90.8%まで分離、濃縮することができたが、細胞の回収率はわずか24%であった。

[0149] [実施例3]

<細胞分離前後の細胞死の割合>

実施例1と同様の方法で分離したCD4(+)細胞について、Annexi V Assay Kits(株)医学生物学研究所製を用いて、細胞生存率を調べた。その結果、調整したヒトPBMC液から一部を取り出して測定した場合の調整したヒトPBMC液中のCD4(+)細胞の細胞生存率が87.4%であり、磁性粒子で分離した後のCD4(+)細胞の細胞生存率が88.1%であり、細胞生存率に違いは見られなかった。

[0150] [実施例4]

<分離後細胞の培養、活性化の有無>

実施例1と同様の方法で分離した目的細胞-抗体結合有機高分子含有磁性粒子の複合体(PE標識抗CD4抗体と反応させる前の複合体)を、10%FBS含有RPMI培地(Thermo fisher scientific社製)にて、48時間培養した。そして実施例1と同様の方法で、分離前のヒトPBMCおよび分離後の目的細胞(CD4(+)細胞)をPE標識抗ヒトCD69抗体(Biolegend社製)で染色した。その結果、PE標識抗ヒトCD69抗体で染色された細胞はおらず、分離前のヒトPBMCも、分離後の細胞も活性化が起こることはなかった。

[0151] [実施例5]

<分離後細胞の活性化>

実施例1と同様の方法で分離した目的細胞-抗体結合有機高分子含有磁性粒子の複合体(PE標識抗CD4抗体と反応させる前の複合体)について、

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific社製) を用いて、細胞の活性化を行った。活性化を行った細胞を、実施例4と同様の手法で、PE標識抗ヒトCD69抗体 (BioLegend社製) で染色した。その結果、63.2%の細胞が染色され、細胞の活性化が起こっていることが確認できた。

なお、分離前のヒトPBMCを同様に活性化し、同様に染色した場合、(64.1)%の細胞が染色され、細胞の活性化が起こっていることが確認できた。

[0152] [実施例6]

<抗体のデスチオビオチン化>

デスチオビオチン (MP Biomedicals社製) 5mgを0.5mlのジメチルスルホキシドに溶解させた。この溶液にN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC塩酸塩) を各5.36mg (デスチオビオチンのカルボキシ基に対して1.2等量) 加え、室温で60分間反応した。この反応液から3 μ lを分け取り、抗ヒトCD4抗体2mgを1mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) に溶解した液に加え、さらに室温で3.5時間反応した。未反応のデスチオビオチンを限外ろ過で除去し、デスチオビオチン標識抗CD4抗体を得た。

[0153] ビオチン標識抗ヒトCD4抗体の代わりに前記デスチオビオチン標識抗ヒトCD4抗体を使用し、実施例1記載の方法と同様にして、デスチオビオチン標識抗ヒトCD4抗体結合有機高分子含有磁性粒子を作製した。

[0154] <ヒトPBMCからの細胞分離>

実施例1記載の方法と同様にして、ヒトPBMCからCD4(+)細胞を分離した。

[0155] <解離剤の調製 (ビオチン誘導体が結合したポリアクリル酸の合成)>

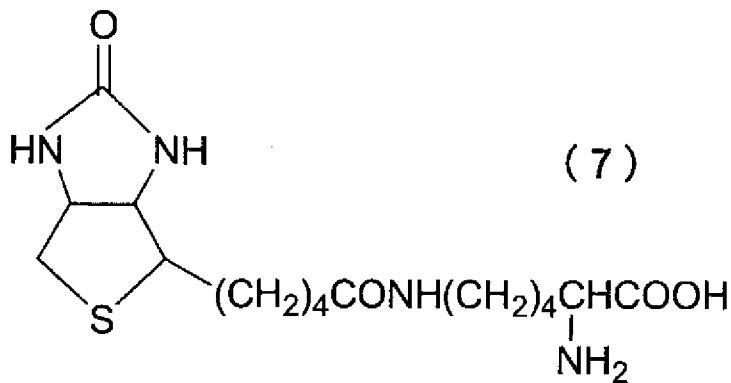
分子量25万のポリアクリル酸 (PAA、和光純薬工業(株)製) 0.1

gを5mlの10mMリン酸緩衝溶液（pH7.0）に溶解し、EDC塩酸塩を133mg（ポリアクリル酸のカルボキシ基に対して0.5等量）加えた。続いて、アミノ基を有するビオチン誘導体である下記式（7）で表される化合物（Biotin-PEO-LC-Amine; Thermofisher scientific社製）のジメチルスルホキシド溶液（10mg/ml）を1.67ml加え、さらに室温で3.5時間反応した。未反応のビオチン誘導体を限外ろ過で除去し、水溶性のビオチン誘導体結合PAAを得た。

PAAに結合したビオチンの定量をHABA法に従って行った。

以上により、PAA1分子当たり平均で40分子のビオチン誘導体が結合した解離剤（「PAA-Biotin40」という。）を得た。

[0156] [化1]



[0157] <解離剤の添加による細胞と有機高分子含有磁性粒子の解離>

前記で作製した解離剤をPBS溶液で2mg/mlに調製し、それを分離したCD4(+)細胞(CD4(+)細胞-抗体結合有機高分子含有磁性粒子の複合体)に250μl添加し、室温で20分間穏やかに混和した。その後、磁気スタンドを使って有機高分子含有磁性粒子を分離し、上清中の解離したCD4(+)細胞を回収した。有機高分子含有磁性粒子から解離したCD4(+)細胞の数を、フローサイトメーターを用いてカウントしたところ、95%の細胞が解離できていた。

[0158] [実施例7]

実施例6と同様に有機高分子含有磁性粒子から解離させた細胞について、実施例3と同様にして、細胞死の割合を確認したところ、細胞分離前後（細胞分離前および実施例6における解離後）において、細胞生存率に違いは見られなかった。

[0159] [実施例8]

実施例6と同様に有機高分子含有磁性粒子から解離させた細胞について、実施例4と同様にして、細胞の活性化の有無を確認したところ、分離前の細胞と同様に、細胞の活性化は起こっていなかった。

[0160] [実施例9]

実施例6と同様に有機高分子含有磁性粒子から解放させた細胞について、実施例5と同様にして、細胞を活性化させたところ、分離前の細胞と同様に、活性化が起きていることを確認できた。

[0161] [試験例]

<必要粒子量比較>

合成例1において、被覆粒子Cを粒径 $3\mu\text{m}$ の有機高分子含有磁性粒子（Magnosphere MS300/Carboxyl、JSRライフサイエンス（株）製）に変更した以外は合成例1と同様にして、抗ヒトCD4抗体結合有機高分子含有磁性粒子ⅠⅠⅠを作製した。作製した抗体結合粒子ⅠⅠⅠおよび抗体結合粒子ⅠⅠⅠを用いて、CD4（+）である細胞株SUPT1細胞の分離を試みた。その結果、 1×10^7 個の細胞を80%以上回収するために必要な粒子量は、抗体結合粒子Ⅰが0.25mgであったのに対し、抗体結合粒子ⅠⅠⅠでは3mgであった。

請求の範囲

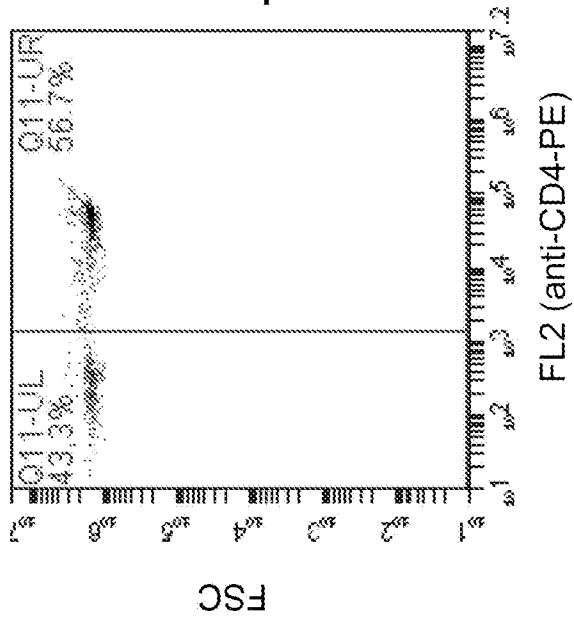
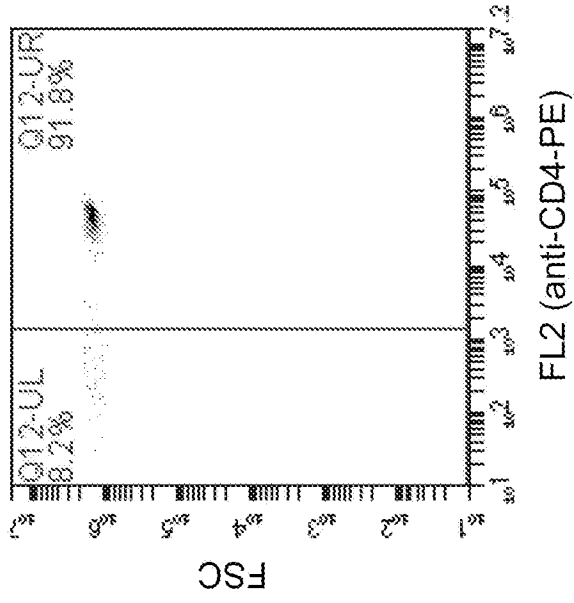
- [請求項1] 下記工程 1 および 2 を含み、
下記有機高分子含有磁性粒子が有機高分子および磁性粒子を含み、
該有機高分子含有磁性粒子中の磁性粒子の含有量が 40 質量%以上であり、
該有機高分子含有磁性粒子の体積平均粒径が 10～1000 nm である、
目的とする細胞または目的でない細胞を分離する方法：
工程 1 ; 前記目的とする細胞を含む試料と、有機高分子含有磁性粒子とを接触させる工程、
工程 2 ; 前記工程 1 で生じる、有機高分子含有磁性粒子と目的の細胞または目的でない細胞との複合体を、磁気分離する工程。
- [請求項2] 前記有機高分子含有磁性粒子が、有機高分子および磁性粒子を含む粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記ポリマーが親水性ポリマーである、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項4] 前記親水性ポリマーが、(メタ)アクリル酸、メチル(メタ)アクリル酸、ジアセトン(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリルアミド、ジメチル(メタ)アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド塩酸塩、N,N-ジエチル(メタ)アクリルアミド、N-イソプロピル(メタ)アクリルアミド、グリセロール(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリルアミド-N-グリコール酸、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート、エチレングリコールモノ(メタ)アクリレート、2-スルホエチル(メタ)アクリレート、含リン(メタ)アクリル酸エステル、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレート、t-ブチルアミノエチル(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレート、グリセロール(メタ)アクリレート、ビニ

ルスルホン、スチレンスルホン酸、2-(メタ)アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、(メタ)アクリロイルモルホリン、N-ビニルピロリドン、N-ビニルカプロラクタム、N-ビニルオキサゾリドン、N-ビニルサクシンイミド、ビニルピリジン、酢酸ビニル、イタコン酸、クロトン酸、N-ビニルイミダゾール、ビニルベンジルアンモニウム塩、ビニルベンジルアルコールおよびヒドロキシスチレンからなる群より選ばれる少なくとも1種のモノマーに由来する構造単位を含むポリマーである、請求項3に記載の方法。

- [請求項5] 前記有機高分子含有磁性粒子の体積平均粒径の変動係数が25%以下である、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記有機高分子が架橋されている、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 前記磁性粒子の体積平均粒径が5~25nmである、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記有機高分子含有磁性粒子に、少なくとも1つのリガンドが物理吸着または化学結合している、請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 前記リガンドが、抗体、抗原、核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、多糖、糖、脂質、ビタミン、薬物、基質、ホルモンおよび神経伝達物質からなる群より選ばれる少なくとも1種である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 有機高分子および無機粒子を含む有機高分子含有粒子であって、
該有機高分子含有粒子中の無機粒子の含有量が40質量%以上であり、
該有機高分子含有粒子の体積平均粒径が10~1000nmである、
細胞分離または濃縮用粒子。
- [請求項11] 前記無機粒子が磁性粒子である、請求項10に記載の粒子。

- [請求項12] 前記有機高分子含有粒子が、有機高分子および無機粒子を含む粒子の少なくとも一部の表面にポリマー層を有する、請求項10または11に記載の粒子。
- [請求項13] 前記ポリマーが親水性ポリマーである、請求項12に記載の粒子。
- [請求項14] 請求項10～13のいずれか1項に記載の粒子、および、
該粒子を分離するための部材を含む、
キット。

[] 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/02 (2006.01) i, B82Y5/00 (2011.01) i, B82Y25/00 (2011.01) i,
B82Y40/00 (2011.01) i, C12M1/26 (2006.01) i, C12Q1/24 (2006.01) i,
G01N33/543 (2006.01) i

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)

Int.Cl. C12Q1/02, B82Y5/00, B82Y25/00, B82Y40/00, C12M1/26,
C12Q1/24, G01N33/543

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

| | |
|--|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2019 |
| Registered utility model specifications of Japan | 1996-2019 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2019 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | JP 2007-530422 A (TRITON BIOSYSTEMS INC.) 01 November 2007, claims, paragraph [0069], examples 2-4, 7-8, tables 3-4 & US 2005/0271745 A1, claims, paragraph [0082], examples 2-4, 7-8, tables 3-4 & EP 1648381 A1 & WO 2005/006356 A1 | 1, 7-11, 14 1-14 |

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

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

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 04 February 2019 (04.02.2019) | Date of mailing of the international search report 12 February 2019 (12.02.2019) |
|--|---|

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043191

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|------------------------|
| X Y | JP 2002-503814 A (IMMUNIVEST CORPORATION) 05 February 2002, claims, paragraph [0015], examples 1-2 & US 2001/0018192 A1, claims, paragraph [0074], examples 1-2 & EP 1062515 A1 & WO 1999/041613 A1 | 1, 8-11 1-14 |
| X Y | JP 2000-306718 A (JSR CORPORATION) 02 November 2000, paragraphs [0001], [0023], [0053]-[0059], examples 1-5, 7, 9-13, tables 2-4 (Family: none) | 1, 6, 8-11, 14 1-14 |
| Y | US 2016/0145600 A1 (CORNING INCORPORATED) 26 May 2016, claims, paragraphs [0026], [0041], [0063], fig. 1 (Family: none) | 1-14 |
| Y | 上津原朋広, 外 4 名, バイオセパレーション用磁性粒子 "Magnosphere" の開発, JSR TECHNICAL REVIEW (2008) no. 115, pp. 20-26, [retrieval date 04 February 2019], Internet <URL:http://www.jsr.co.jp/pdf/rd/tec115-4.pdf>, ISSN:0916-7129, page 21, right column, paragraphs [0002]-[0003], page 23, section "3.2.1", page 23, fig. 3, page 25, section "3.3.3", page 26, section "4", (UETSUHARA, Tomohiko et al., "Development of Magnetic Particles for Biomolecule Separation") | 3-9, 12-14 |
| Y | JP 2012-506771 A (DSM IP ASSETS B.V.) 22 March 2012, claims & US 2011/0263011 A1, claims & EP 2346952 A1 & WO 2010/049535 A1 | 3-9, 12-14 |
| Y | JP 2017-203763 A (SUMITOMO RUBBER INDUSTRIES, LTD.) 16 November 2017, claims & US 2017/0320056 A1, claims & EP 3244208 A1 | 3-9, 12-14 |
| Y | WO 2006/123686 A1 (JSR CORPORATION) 23 November 2006, paragraph [0039] & US 2009/0014682 A1, paragraph [0046] & JP 2006-321932 A | 5-9 |
| Y | JP 2016-57106 A (JSR CORPORATION) 21 April 2016, paragraph [0061] & US 2016/0069871 A1, paragraph [0098] | 5-9 |

| | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|--|---|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| <p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y25/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i, C12M1/26(2006.01)i, C12Q1/24(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12Q1/02, B82Y5/00, B82Y25/00, B82Y40/00, C12M1/26, C12Q1/24, G01N33/543</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2019年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2019年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2019年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2019年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2019年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2019年 | | | | | | | | | | |
| <p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>C. 関連すると認められる文献</p> | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 | | | | | | | | | |
| X Y | <p>JP 2007-530422 A (トリトン バイオシステムズ、インク.) 2007.11.01, 特許請求の範囲, [0069], 実施例2-4, 実施例7-8, 表3-4 & US 2005/0271745 A1, 特許請求の範囲, [0082], 実施例2-4, 実施例7-8, 表3-4 & EP 1648381 A1 & WO 2005/006356 A1</p> | <p>1,7-11, 14 1-14</p> | | | | | | | | | |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> | | <p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> | | | | | | | | | |
| <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> | | <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> | | | | | | | | | |
| <p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">04.02.2019</p> | | <p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">12.02.2019</p> | | | | | | | | | |
| <p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p> | | <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:60%;"> <p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">藤澤 雅樹</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> </td> <td style="width:10%; text-align: center;">4B</td> <td style="width:30%; text-align: center;">5802</td> </tr> </table> | | <p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">藤澤 雅樹</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> | 4B | 5802 | | | | | |
| <p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">藤澤 雅樹</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> | 4B | 5802 | | | | | | | | | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| X Y | JP 2002-503814 A (イムニベスト・コーポレーション) 2002.02.05, 特許請求の範囲, [0015], 実施例1-2 & US 2001/0018192 A1, 特許請求の範囲, [0074], 実施例1-2 & EP 1062515 A1 & WO 1999/041613 A1 | 1, 8-11 1-14 |
| X Y | JP 2000-306718 A (ジェイエスアール株式会社) 2000.11.02, [0001], [0023], [0053] - [0059], 実施例1-5, 実施例7, 実施例9-13, 表2-4 (ファミリーなし) | 1, 6, 8-11, 14 1-14 |
| Y | US 2016/0145600 A1 (CORNING INCORPORATED) 2016.05.26, 特許請求の範囲, [0026], [0041], [0063], 図1 (ファミリーなし) | 1-14 |
| Y | 上津原朋広, 外4名, "バイオセパレーション用磁性粒子" Magnosphere" の開発, JSR TECHNICAL REVIEW (2008) No.115, pp.20-26, [検索日 2019.02.04], インターネット <URL: http:// www. jsr. co. jp/pdf/rd/tec115-4. pdf >, ISSN: 0916-7129, 第21頁右欄第2-3段落, 第23頁「3.2.1」項, 第23頁図3, 第25 頁「3.3.3」項, 第26頁「4」項 | 3-9, 12-14 |
| Y | JP 2012-506771 A (ディーエスエム アイピー アセツ ビー. ブイ.) 2012.03.22, 特許請求の範囲 & US 2011/0263011 A1, 特許請求の範囲 & EP 2346952 A1 & WO 2010/049535 A1 | 3-9, 12-14 |
| Y | JP 2017-203763 A (住友ゴム工業株式会社) 2017.11.16, 特許請求の範囲 & US 2017/0320056 A1, 特許請求の範囲 & EP 3244208 A1 | 3-9, 12-14 |
| Y | WO 2006/123686 A1 (J S R株式会社) 2006.11.23, [0039] & US 2009/0014682 A1, [0046] & JP 2006-321932 A | 5-9 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| Y | JP 2016-57106 A (J S R株式会社) 2016. 04. 21, [0061] & US 2016/0069871 A1, [0098] | 5-9 |