

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4713735号  
(P4713735)

(45) 発行日 平成23年6月29日 (2011. 6. 29)

(24) 登録日 平成23年4月1日 (2011. 4. 1)

(51) Int. Cl.

F I

**B03C 1/00 (2006.01)****A61K 35/14 (2006.01)****B01D 43/00 (2006.01)****G01N 33/543 (2006.01)****G01N 33/553 (2006.01)**

B03C 1/00 A

A61K 35/14 Z

B01D 43/00 Z

G01N 33/543 541A

G01N 33/553

請求項の数 21 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2000-549351 (P2000-549351)  
 (86) (22) 出願日 平成11年5月13日 (1999. 5. 13)  
 (65) 公表番号 特表2002-515319 (P2002-515319A)  
 (43) 公表日 平成14年5月28日 (2002. 5. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IL1999/000255  
 (87) 国際公開番号 W01999/059694  
 (87) 国際公開日 平成11年11月25日 (1999. 11. 25)  
 審査請求日 平成18年5月10日 (2006. 5. 10)  
 (31) 優先権主張番号 124514  
 (32) 優先日 平成10年5月17日 (1998. 5. 17)  
 (33) 優先権主張国 イスラエル (IL)

(73) 特許権者 506419087  
 バイオセブ リミテッド  
 イスラエル, 12900 カヅリン,  
 ビー. オー. ボックス 12  
 (74) 代理人 100103816  
 弁理士 風早 信昭  
 (74) 代理人 100120927  
 弁理士 浅野 典子  
 (72) 発明者 デヴィッドソン, チェイム  
 イスラエル, 13401 サフェド,  
 ロハメイ ハゲタオト ストリート 1  
 71

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択された粒子、特に生物細胞を磁気的に分離するための方法と装置

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中の目標粒子の濃縮、または目標粒子に関する試料の希薄化を作り出すために試料から目標粒子を磁気的に分離する方法であって、その方法が：

前記目標粒子に特異的に結合して前記目標粒子を磁気的に標識する磁気粒子と前記試料との試料混合物を作る；

緩衝液源に連結可能な入口と緩衝液のための出口を含むチューブを通して緩衝液を供給する；

前記緩衝液の流れが前記チューブを通して作られた後に、前記緩衝液及び前記試料混合物が前記チューブを通して供給されるとき緩衝液が前記試料混合物のための連続液体キャリアを形成するように、前記チューブを通して流れる緩衝液中に前記試料混合物を導入する；及び

磁気化ステーションにおいて前記チューブを横切って磁界を適用し、そこで前記磁気的に標識された目標粒子を分離させて磁気化ステーションのチューブ内の緩衝液中に保持させる；

ことを含む場合において、前記磁気化ステーションにおける前記チューブが、複数の相互連結された直線部を含む長い曲がりくねった形態のものであること、前記磁界が磁石間の第一空気間隙と、磁気化コア素子間の第二空気間隙とを含む閉鎖磁気回路を規定する磁気化コア素子に取り付けられた磁石により作られること、前記チューブが前記空気間隙の両者を通過すること、及び供給チューブの直線部に対して一つの閉鎖磁気回路があるこ

とを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記磁気化コア素子がそれらの間に第三空気間隙をさらに規定し、それを通して前記チューブが通過することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記磁界が、閉鎖磁気回路を規定する磁気化コア素子に取り付けられた永久磁石により作られること、前記永久磁石は互いに整合しており、前記磁気化コア素子は互いに整合しており、従ってそれらは、供給チューブの各直線部に対して二つの閉鎖磁気回路を規定し、二つの閉鎖磁気回路の一方は前記第一空気間隙及び第三空気間隙を含み、他方は前記第二空気間隙及び前記第三空気間隙を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記試料混合物がチューブの入口端と前記磁気化ステーションの間の位置で前記緩衝液中に導入されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料混合物中の磁気粒子により磁氣的に標識され、分離され、かつ磁気化ステーションのチューブ内の緩衝液内に保持される目標粒子が引き続いて前記試料混合物の緩衝液中への導入、及びチューブを横切る磁界の適用を停止することによりチューブから除去され、一方緩衝液がチューブを通して供給され、この緩衝液で前記磁氣的に標識された目標粒子をフラッシュアウトすることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記緩衝液及び試料混合物が前記チューブを通して受け容器中に重力供給されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記緩衝液及び試料混合物の前記受け容器中への供給を制御するために減圧が前記受け容器に適用されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記緩衝液及び試料混合物の前記受け容器中への供給を制御するために正圧が前記チューブに適用されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記目標粒子が前記試料中の選択された生物細胞であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記試料が血液試料であり、前記目標細胞が血液試料中の選択されたタイプのリンパ球であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

試料と混合された前記磁気粒子が磁気マイクロビーズの形であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記磁界が予め決められた磁界強度を作るように制御されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

試料中の目標粒子の濃縮、または目標粒子に関する試料の希薄化を作り出すために試料から目標粒子を磁氣的に分離するための装置であって、その装置が：

入口端及び出口端を有する供給チューブ；

緩衝液供給源；

前記緩衝液供給源から供給チューブの入口端へ緩衝液を供給するための緩衝液チューブ；

前記目標粒子に特異的に結合して前記目標粒子を磁氣的に標識する磁気粒子と前記試料との試料混合物を含有するための試料容器；

50

前記試料容器を前記供給チューブの前記入口端に連結する試料チューブであって、緩衝液が、供給チューブを通して供給された混合物の磁氣的に標識された目標粒子のための連続液体キャリアを形成するように、緩衝液の流れが前記供給チューブ中に作られた後で前記供給チューブを通した前記混合物の供給を可能にする試料チューブ；

磁気化ステーションにおいて供給チューブを横切って磁界を作るための磁界発生手段；及び

緩衝液及び目標粒子の希薄化された試料を受けるための供給チューブの出口端に設けられた受け容器；

を含む場合において、前記磁気化ステーションにおける前記供給チューブが、複数の相互連結された直線部を含む長い曲がりくねった形態のものであること、前記磁界が磁石間の第一空気間隙と、磁気化コア素子間の第二空気間隙とを含む閉鎖磁気回路を規定する磁気化コア素子に取り付けられた磁石により作られること、前記供給チューブが前記空気間隙の両者を通過すること、及び供給チューブの直線部に対して一つの閉鎖磁気回路があることを特徴とする装置。

10

【請求項 1 4】

前記磁気化コア素子がそれらの間に第三空気間隙をさらに規定し、それを通して前記供給チューブが通過することを特徴とする請求項 1 3 に記載の装置。

【請求項 1 5】

前記磁界が、閉鎖磁気回路を規定する磁気化コア素子に取り付けられた永久磁石により作られること、前記永久磁石は互いに整合しており、前記磁気化コア素子は互いに整合しており、従ってそれらは、供給チューブの各直線部に対して二つの閉鎖磁気回路を規定し、二つの閉鎖磁気回路の一方は前記第一空気間隙及び第三空気間隙を含み、他方は前記第二空気間隙及び前記第三空気間隙を含むことを特徴とする請求項 1 3 に記載の装置。

20

【請求項 1 6】

前記緩衝液チューブが緩衝液供給源を供給チューブの入口端に連結する第一連結部と、試料混合物を前記緩衝液中に供給チューブの前記入口端と前記磁気化ステーションの間の位置で導入するための第二連結部を含むことを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 1 7】

前記受け容器が緩衝液と試料混合物が前記供給チューブを通して前記受け容器に重力供給されるように供給チューブの前記入口端の下に設けられていることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 に記載の装置。

30

【請求項 1 8】

前記受け容器が供給チューブを通る緩衝液と試料混合物の供給を制御するために吸引源に連結されていることを特徴とする請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 1 9】

前記装置が前記受け容器の代わりに供給チューブの出口端に設けられる別の容器を更に含み；磁界の適用及び前記試料混合物の緩衝液中への導入の両者が、供給チューブを通して供給される緩衝液が磁氣的に標識された目標粒子を前記別の容器中にフラッシュアウトさせるように、停止可能であることを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の装置。

40

【請求項 2 0】

前記装置が前記供給チューブを通して供給される緩衝液中の空気の状態を検出するための空気泡センサ、前記供給チューブに供給される試料混合物中の空気の状態を検出するための空気泡センサ、及び空気泡の検出により前記緩衝液または試料混合物の流れを中断するための前記センサにより制御される制御器を更に含むことを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 2 1】

前記磁界が磁石間の第一空気間隙と、磁気化コア素子間の第二空気間隙とを含む閉鎖磁気回路を規定する磁気化コア素子に取り付けられた磁石により作られること、前記供

50

給チューブが前記空気間隙の両者を通過すること、及び前記磁気化コア素子がそれらの間に第三空気間隙をさらに規定し、それを通して前記供給チューブが通過することを特徴とする請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

この発明の分野及び背景

本発明は試料から選択されたタイプの粒子（以下“目標粒子”と称す）を磁氣的に分離して試料中の目標粒子の濃縮、及び／または目標粒子に関して試料の希薄化、を作るための方法と装置に関する。この発明は特に選択されたタイプの生物細胞、例えば血液試料中の選択されたタイプのリンパ球細胞を磁氣的に分離するのに有用であり、従ってそのような応用に関して特に以下に説明される。

10

【0002】

生物細胞の磁氣的分離を含む多数の応用が文献、例えば米国特許 4710472 及びそこに引用された多くの刊行物中に記載されており、それらはここに参考までに組み入れられる。多くのそのような応用は一つまたはそれ以上の特定のタイプの細胞（以下“目標細胞”と称す）の分離のみならず、目標細胞中の及び／または非目標細胞中の細胞膜の品質の維持も必要とする。かくして、積極的選別工程においては、目標細胞は試料から試験のためにまたは研究、診断または臨床目的のための使用のために分離され；一方希薄化工程においては、試料は試験のためにまたは非目標細胞の使用のために目標細胞を希薄化させられる。非目標細胞からの目標細胞の分離、及び目標細胞及び非目標細胞の両者の膜の維持は特に現在リンパ球集団で実行されている研究で重要でありかつ癌の早期発見で重要な役割を演じている。

20

【0003】

生物細胞の分離のための現在使用されている一つの技術は MiniMACS 分離カラム（Miltenyi Biotec GmbH）を用いる。この技術は極めて小さな、直径が約 50 nm の、すなわちウィルスの寸法に比べて真核細胞の容積より容積で約 100 万倍小さい、常磁性体マイクロビーズを使用する。かかる磁気マイクロビーズはそれらが目標細胞を磁氣的に標識しまたは染色するように、ある細胞、すなわち目標細胞に対して選択的親和性を持つように作られる。試料は液体透過性磁気体、例えばスチールウールまたはメッシュ、を含む磁気分離カラム中に導入され、かつ磁界がカラムを横切って適用され、かくして磁氣的に染色された細胞がカラムの液体透過性磁気体に保持され、一方染色されなかった細胞はカラムを通過する。しかし、この既知工程では、細胞の膜が液体透過性磁気体により過剰に損傷され、これが研究または臨床目的のためのこの技術の有効性を減少する。

30

【0004】

この発明の目的及び簡単な概要

本発明の目的は膜に上述の既知の技術程の大きな損傷を起こさない態様で試料から選択されたタイプの目標粒子を磁氣的に分離する方法を提供することにある。本発明の今一つの目的はこの新規な方法により目標粒子を磁氣的に分離するための装置を提供することにある。

【0005】

40

本発明の一形態によれば、試料中の目標粒子の濃縮、または目標粒子に関して試料の希薄化、を作るために試料から選択されたタイプの目標粒子を磁氣的に分離する方法が提供され、それは：目標粒子を磁氣的に染色する選択的親和性を持つ磁気粒子と試料との試料混合物を作る；緩衝液源に連結可能な入口及び緩衝液のための出口を含むチューブを通して緩衝液を供給する；緩衝液が試料混合物に対して両者がチューブを通して供給されるとき試料混合物のための連続液体キャリアを形成するように試料混合物を緩衝液中に導入する；及び磁気化ステーションでチューブを横切って磁界を適用しそこで磁氣的に染色された目標粒子を分離させ磁気化ステーションのチューブ内の緩衝液中に保持させる；を含む。

【0006】

かかる方法は特に希薄化工程で有用であり、そこでは目標粒子の希薄化された試料が診断

50

試験、研究、または臨床目的のために作られる。

【0007】

説明された好適実施例の更なる特徴によれば、磁気化ステーションのチューブ内の緩衝液中に分離されかつ保持された試料混合物中の磁氣的に染色された目標粒子は引き続いて試料混合物の緩衝液中への導入及びチューブを横切る磁界の適用を停止することによりチューブから除去され、一方緩衝液がチューブを通して供給され磁氣的に染色された目標粒子を緩衝液でフラッシュアウトする。かかる方法は特に積極的選別工程で有用であり、そこでは目標粒子は診断試験、研究または臨床目的のために分離され使用される。

【0008】

本発明の別の形態によれば、試料中の目標粒子の濃縮、または目標粒子に関して試料の希薄化、を作るために試料から選択されたタイプの目標粒子を磁氣的に分離するための装置が提供され、それは：緩衝液をチューブの入口端の緩衝液供給源からチューブの出口端に供給するチューブ；目標粒子を磁氣的に染色する選択的親和性を持つ磁気粒子と試料との試料混合物及び緩衝液を、緩衝液がチューブを通して供給されるとき磁氣的に染色された目標粒子に対して緩衝液が連続的液体キャリアを形成するように、チューブ中に投入するための投入口；磁気化ステーションでチューブを横切って磁界を作りそこで磁氣的に染色された目標粒子を分離させて磁気化ステーションのチューブ内の緩衝液中に保持させるための磁界発生手段；及び緩衝液及び目標粒子の希薄化された試料を受けるためのチューブの出口端に設けられた容器；を含む。

【0009】

この装置が積極的選別工程で使用される場合、この装置は更に最初に述べた容器の代わりにチューブの出口端に設けられることのできる第二の容器を含み；加えて、磁界の適用及び混合物の緩衝液中への投入の両者が停止されチューブを通して供給された緩衝液が磁氣的に染色された目標粒子を第二容器中にフラッシュアウトさせる。

【0010】

かかる方法及び装置は目標粒子または非目標粒子のいずれにも過度の損傷を起こすことなく、選択されたタイプの粒子（目標粒子）、特に生物細胞（目標細胞）の分離を可能とすることが見出された。かくして、目標粒子及び非目標粒子の両者に対して連続液体キャリアを形成する緩衝液が工程の両相中の両タイプの粒子（または細胞）を物理的に支持する一定液体容積を作り、それにより両相中の両タイプの粒子に対する損傷を最少化する。

【0011】

本発明の方法及び装置は特に選択されたタイプの生物細胞を分離するために有用であるが、かかる方法及び装置はまた他のタイプの粒子、例えば選択された蛋白質を分離するためにも使用されることができる。また、説明された方法及び装置は好ましくは商業的に入手可能な磁気マイクロビーズを使用するが、目標粒子に対して選択された親和性を持つ他の磁気粒子が目標粒子を磁氣的に染色しまたは標識するために使用されることができることは認められるであろう。

【0012】

この発明の更なる特徴及び利点は以下の説明から明らかとなるであろう。

【0013】

図面の簡略説明

この発明が例としてのみ、添付図面に関してここに説明される。図面において：

図1は本発明により構成された装置の一形式の基本要素を概略的に示し；

図2は図1の装置と同様な装置及びそのための主制御器を含むシステムを概略的に示し；

図3は本発明により構成された装置の第二形式の基本要素を示し；

図4は図3の線4-4に沿った断面図であり；

図5は図4の線5-5に沿った断面図であり；

図6は図3-5の装置の磁気化ステーションの一方側における、磁石保持器、及びそれらの対応する磁石を示す分解三次元図であり；そして

図7はこの発明により構成された別の装置を示す。

## 【 0 0 1 4 】

好適実施例の説明

図 1 に示された装置は特にリンパ球、赤血球細胞、及び / またはマクロファージのような、あるタイプの目標細胞を血液試料から磁氣的に分離するために有用である。

## 【 0 0 1 5 】

示された装置は血液試料を含む試料容器 1 0 を含む。血液試料が容器 1 0 中に導入される前または後に、それは容器 1 0 内の血液試料中の目標細胞を磁氣的に染色または標識する選択的親和性を持つ磁気粒子、好ましくは商業的に入手可能な磁気マイクロビーズと混合される。

## 【 0 0 1 6 】

この装置は更に磁気分離工程で使用される緩衝液の供給源として作用する別の容器 1 1 を含む。容器 1 1 中の緩衝液はノーマルセーライン溶液、P B S、及び同様物のような商業的に入手可能な緩衝液のいずれかであることができる。

## 【 0 0 1 7 】

図 1 に示された装置は更に緩衝容器 1 1 からの緩衝液を磁気化ステーション 1 3 を通して受け容器 1 4 に供給するための供給チューブ 1 2 を含む。図 1 の実施例では供給チューブ 1 2 を介しての緩衝液の供給は重力及び減圧により実現される。この目的のために、二つの供給容器 1 0 及び 1 1 は受け容器 1 4 の上に位置しており；受け容器 1 4 は一端で受け容器の内部と、そして他端で減圧源 1 6 と連通する減圧管 1 5 を含む。

## 【 0 0 1 8 】

試料容器 1 0 内の血液試料は磁氣的に染色された目標細胞並びに非目標細胞を含む。血液試料はライン 1 7 を介して磁気化ステーション 1 3 の上流位置の供給チューブ 1 2 内の投入口 1 2 a 中に導入される。しかし、試料が供給チューブ 1 2 中に導入される前に、供給チューブはまず容器 1 からの脱ガスされた緩衝液で満たされ、予め決められた流速が実現される。流速は好ましくは秒当たり一滴より少なく；好ましい流速は分当たり 6 - 8 滴である。流速の設定は減圧源 1 6 を制御することにより、または図 2 に関して以下により詳細に説明されるであろうような一つまたはそれ以上の弁を制御することにより実現されることができる。

## 【 0 0 1 9 】

容器 1 1 からの緩衝液はかくして目標細胞及び非目標細胞をその中に含む混合物と緩衝液の両者が磁気化ステーション 1 3 を通って供給チューブ 1 2 を介して流れるときの、容器 1 0 から投入口 1 2 a を介して導入された血液試料中の磁氣的に染色された目標細胞及び非目標細胞のための連続液体キャリアとして作用する。磁気化ステーション 1 3 の磁石 1 8 は、非磁気化細胞及び血液試料の他の構成成分を持つ緩衝液が供給チューブ 1 2 の出口端を通して受け容器 1 4 中に流れるときに磁気化ステーション 1 3 の緩衝液内の磁氣的に染色された目標細胞を分離し保持するに十分な磁界を供給チューブ 1 2 を横切って適用する。受け容器 1 4 はかくして血液試料の非目標細胞と一緒に緩衝液を受ける。なぜなら血液試料の磁氣的に染色された目標細胞（その中に混合された磁気粒子を含む）が磁気化ステーション 1 3 内の磁石 1 8 により作られた磁束により停滞的に保持されるからである。

## 【 0 0 2 0 】

受け容器 1 4 の内容物はかくして初期試料について実行された希薄化工程の結果を構成する。なぜならこれらの内容物は磁気化ステーション 1 3 内で分離されて保持される磁氣的に染色された目標細胞（及び容器 1 0 内の初期試料に添加された磁気粒子）を除いては試料の初期構成成分の全てを含むからである。従って、容器 1 4 の内容物は、初期試料について実行された他のいずれの対応する希薄化工程の結果を用いるときと同じ態様で、診断、研究、または臨床目的のために試験されまたは使用されることができる。

## 【 0 0 2 1 】

もしまた初期試料について積極的選別工程を実行すること（すなわち診断、研究、または臨床目的のために分離された目標細胞を使用すること）が望まれるなら、これは：（ a ）緩衝液をチューブ 1 2 を通して供給し続ける；（ b ）試料容器 1 0 からの混合物の供給及

10

20

30

40

50

び磁気化ステーション 13 における磁界の適用を停止する；及び (c) 受け容器 14 を他の受け容器 (図示せず) で置き換えて供給チューブ 12 を通して供給された緩衝液によりフラッシュアウトされる目標細胞を受ける；ことによりなされることができる。一般的に試料容器 10 からの試料の導入を停止した後、磁気化ステーション 13 における磁界の適用の停止及び二つの容器の切替えを短時間遅らせて磁気化ステーション 13 内に保持された磁氣的に染色された目標粒子が第二受け容器にフラッシュアウトされる前にそのような粒子を緩衝液ですすぎ可能とすることが好ましいであろう。

【0022】

磁気化ステーション 13 における磁石 18 は磁氣的に分離された目標細胞をフラッシュアウトするときに磁気化ステーションから物理的に除去されまたは移動させることができる 10  
永久磁石であることができる。これに代え、これらの磁石 18 は磁気分離相中に連結器 19 (図2) を介して電氣的に印加され、フラッシュアウト相中に電氣的に脱印加される電磁石であることができる。

【0023】

緩衝液容器 11 から供給された緩衝液が一定のかつ連続流体容積を提供し、それにより試料容器 10 から供給された試料混合物の構成成分の全てのための連続液体キャリアを形成することは分かるであろう。これは目標細胞の希薄化された初期試料が容器 14 内に受け入れられるところの初期希薄化段階時にも、また磁気化ステーション 13 内に分離されて保持された目標細胞が緩衝液により他の受け容器中にフラッシュアウトされるところの積極的選別段階時の両者において真実である。緩衝液はかくして、上述の通常の Mini M 20  
ACS 工程に比べたとき、細胞膜の可能な損傷または破裂を実質的に減らすように分離工程の両相時の目標細胞及び非目標細胞の両者を連続的に支持する。加えて、以下に更に説明されるであろうように、図 1 に示された方法は分離工程におけるより大きな処理能力及び改善された効率を提供するために自動化することが大いに可能である。

【0024】

以下は血液試料から選択された目標細胞を磁氣的に分離するための図 1 に関して上述された装置及び方法を使用する一例である：

【0025】

混合リンパ球試料が正常な、健康な血液の一定量から通常のフィコール勾配を用いて得られた。この試料は二つの群：参照及び実験、に分割された。商業的に入手可能な CD 19 30  
磁気マイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH により供給された) が試料中の B 細胞のみを標識する目的のために実験リンパ球に添加された。CD 19 マイクロビーズによる染色後に、細胞は PBS で二度すすがれた。

【0026】

分離装置は供給チューブ 12 を緩衝液溜めからの脱ガスされた緩衝液で満たしかつすぐことにより調製された。分離を通して、システムは脱ガスされた緩衝液で満たされたままである。

【0027】

染色されたリンパ球混合物がチューピングの “ピギーバックサイト” 中に挿入された 0 . 40  
4 × 13 針を持つ 1 ml の注射器 (プランジャーなし) によりシステム中に導入された。減圧システムが分当たり 6 滴の安定な流速を維持した。染色された混合物の全てがシステムに入った後、針が除去されシステムは緩衝液の追加の 400 µl が分離システムを流れるまで流し続けた。流れが停止された。受け管が除去され、“A” と標識され、第二管で置き換えられた。

【0028】

磁界は停止され；流れは復元され；そしてラインは 500 µl の緩衝液でフラッシュされた。流れは再び停止され、この第二管が取り除かれ “B” と標識された。

【0029】

対照群及び管 “A” と “B” からの細胞が二重盲検条件で光学顕微鏡により膜状態と血球計数器を用いて細胞数が試験された。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

対照と実験試料の間の細胞品質に変化はなかった。通常、B細胞は8 - 11 %の全リンパ球集団を含む。8 . 8 % B細胞をもたらしたこの分離結果は、細胞品質の変化なしに特定の集団を分別する能力を証明している。

## 【 0 0 3 1 】

Bリンパ球を染色するCD19マイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)の利用は全リンパ球集団から略10 %の収集を作り出すと期待される。光学顕微鏡、CellScan、及びFACSにより試験された実際の結果は以下の如くであった：

1 . 収集は8 . 8 %から11 . 1 %の範囲で作りに出された。これらの細胞のFACS分析は希望の細胞の97 %純度集団を示した。

2 . 膜品質は工程により影響を受けなかった。これは光学顕微鏡及びCellScan試験の両者により確かめられた。

3 . 非染色リンパ球集団(非目標細胞)は略95 % Tリンパ球を含み略90 %の全リンパ球集団から構成されると期待された。これらの細胞のFACS分析は平均93 %純度Tリンパ球集団を示した。顕微鏡試験はこれらのTリンパ球が平均90 %の全リンパ球集団から構成されていることを確認した。

## 【 0 0 3 2 】

上述の例においては、磁界はネオジムの永久磁石により作られ；チューピングは0 . 80 mm注入チューピングであり；緩衝液は以下の組成のものであった：

0 . 15 ml EDTA (エチレンジアミン四酢酸)；

1 . 10 ml BSA796 (ウシ血清アルブミン)；

13 . 75 ml PBS (リン酸緩衝セーライン、カルシウムとマグネシウムなし)；

15 . 00 ml 全緩衝液を生成する。

## 【 0 0 3 3 】

図2は図1の基本システムを概略的に示すがシステムの操作を自動化するための主制御器を備えている。

## 【 0 0 3 4 】

かくして、図2に示されたシステムはシステムの総合操作を制御するための概括的に20で示されたマイクロプロセッサ制御器を含む。制御器20への入力は緩衝液容器11からの緩衝液の供給流速を設定するための流速選択器21；緩衝液供給チューブ12内の空気泡の存在を検出するための空気泡センサ22；及び試料供給チューブ17内の空気泡の存在を検出するための空気泡センサ23を含む。これらのセンサはもし空気泡が検出されるなら流体流を停止(センサ22は弁27を閉じ、センサ23は弁28を閉じるであろう)することにより定常流体水準の完全性を保護する。制御器20はまた容器14への流れを検出するための流速センサ29からの入力を含む。

## 【 0 0 3 5 】

制御器20は逆に磁気化ステーション13の電磁石18をそれらの連結器19に連結されたライン24を介して制御し、ライン25及び/または減圧弁26を介して減圧源16を、供給ライン12中の弁27を介して緩衝液の供給速度を、及び試料ライン17中の弁28を介して試料の供給速度を制御する。

## 【 0 0 3 6 】

図3 - 6は磁気化ステーションが試料を運ぶ緩衝液の実質的により長い流路を占めることを可能とし、それにより総合分離工程の処理能力及び/または効率を増やすための磁気化ステーション13内の磁気装置の構成における変化を示す。かくして、図1と2に示された装置においては、磁気化ステーション13は供給チューブ12の真直ぐな長さを占めるが、図3においては磁気化ステーション(ここでは30で示されている)は供給チューブ12の長い、曲がりくねった長さを占めるように構成されている。

## 【 0 0 3 7 】

図4に詳細に示されるように、磁気化ステーション30は背面取付板31と前面取付板3

10

20

30

40

50



2を含み、これらは板31内の開口ポスト31a内に摩擦嵌合により受け入れられた板32内のピン32aにより一緒に組み立てられる。前面取付板31は磁気化コア素子34によりそれぞれ運ばれた複数の永久磁石33を備え；同様に背面取付板32は磁気化コア素子36によりそれぞれ運ばれた複数の永久磁石35を備えている。

【0038】

永久磁石33と35は互いに整合しており、かつ磁気化コア素子34と36は互いに整合しており、従ってそれらは二つの閉鎖磁気回路を規定し、一つは空気間隙 $AG_1$ 、 $AG_2$ を含み、他は空気間隙 $AG_1$ 、 $AG_3$ を含む。供給チューブ12は全ての三つの空気間隙 $AG_1$  -  $AG_3$ を通過し、従って永久磁石により作られた磁界は供給チューブの実質的長さに渡って有効である。

10

【0039】

背面取付板31は一对の揺り腕37、38により可動的に取り付けられている。各揺り腕は背面取付板31への旋回可能な取付具37a、38a、及び支持表面42から突出するピン41、42にスライド可能に受け入れられたカラー39、40への別の旋回可能な取付具37b、38bを含む。カラー39は上部ピン41にスライド可能に受け入れられており、カラー40はピン41の下支持表面43に固定された下部ピン42にスライド可能に受け入れられている。二つのカラー39、40はそれらのそれぞれのピン41、43上のコイルばね44、45により外向きに偏倚されている。

【0040】

図5に示されるように、背面板31はその上方端に三つの開口ポスト31aと、上方端のポストに関して千鳥足関係の下方端の三つのそのようなポストを含む。前面取付板32のピン32aは板31の開口ポスト31a内に受け入れられるように対応して配置されている。かくして前面板32が取り除かれると、供給チューブ12は曲がりくねった様式(図5)で背面板31の上方及び下方ポスト31aの周りに巻かれることができ、下向きに延びかつ上向きに延びる直線部12a - gを作る。最後の下向きに延びる直線部12gは図3の受け容器14に連結される。

20

【0041】

図6に示されるように、供給チューブの各直線部12a - 12gに対し、一つの磁石33がある。例示の例は七つのそのような直線部を示すので、図6は七つのそのような磁石33とそれらのそれぞれのコア素子34を示す。前面板32により運ばれた対応する数の磁石35とコア素子36があり、前面板の磁石35は背面板の磁石33と整合している。上述のように、各対の磁石とコア素子は供給チューブの各直線部12a - 12gのための三つの空気間隙( $AG_1$  -  $AG_3$ 、図4)を規定し、従って磁気化ステーションの磁界は供給チューブのかなりの長さに渡り有効である。

30

【0042】

前面板32を背面板31に適用するときポスト31a内に受け入れられるようにそれらのポストと同じ数と配置の前面板32のピン32aはピンがポスト内に受け入れられるとき摩擦嵌合を作り出す寸法をしている。ポスト31はまた供給チューブ12のそれぞれの直線部12a - 12gを受け入れるための二つの板31、32により運ばれた磁石33、35間の、46で示された(図4)、空間を規定するような寸法をしている。

40

【0043】

供給チューブが背面板31内の開口されたポスト31aに渡って曲がりくねった様式で適用された後、前面板32がピン32aをポスト31aを通して挿入することにより適用される。ピン32aがポスト31a内に受け入れられると、ピンはカラー39、40と係合し、それらをばね44、45に抗して固定表面43に向けて動かす。背面板31はかくして揺り腕37、38により前面板32に向けて動かされ、それにより供給チューブ12のそれぞれの直線部を二つの磁石群33、35間にしっかりと挟む。

【0044】

図7は図3の装置に似た装置を示すが、図7の装置は更にチューブ112を介して磁気化ステーション130に供給される前に、入口管110を介して適用される試料混合物、及

50

び入口 1 1 1 を介して適用される緩衝液を予備混合するための供給チューブ 1 1 2 の投入口 1 1 2 a の混合室 1 0 0 を含む。図 7 の装置は更に蠕動ポンプのようなポンプ 1 3 2 をチューブ 1 1 2 の出口端に含み、そこから受け容器 ( 1 4 、図 3 ) 中への液体の供給を制御する。

【 0 0 4 5 】

全ての上述の実施例において、磁界は予め決められた磁界強度を作るための特別の手段により制御されることができる。この目的のために、永久磁石を用いるときは磁気空気間隙が変更されることができ、電磁石を用いるときは電流が例えば図 2 のマイクロプロセッサ 2 0 を介して変更されることができる。

【 0 0 4 6 】

この発明が血液の試料からの選択された目標細胞に関して上述されたが、この発明は選択された蛋白質のような、身体からの他の目標粒子、または他のタイプの粒子の選別のための多くの他の応用で使用されることができることは認められるであろう。また、磁気マイクロビーズの使用が好ましいが、この工程で他の磁気粒子が使用されることができることは認められるであろう。更に、放射能、導電率、等のような他のセンサが含まれることができる。この発明の多くの他の改変、変更及び応用は明らかであるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明により構成された装置の一形式の基本要素を概略的に示す。

【図 2】 図 1 の装置と同様な装置及びそのための主制御器を含むシステムを概略的に示す。

【図 3】 本発明により構成された装置の第二形式の基本要素を示す。

【図 4】 図 3 の線 4 - 4 に沿った断面図である。

【図 5】 図 4 の線 5 - 5 に沿った断面図である。

【図 6】 図 3 - 5 の装置の磁気化ステーションの一方側における、磁石保持器、及びそれらの対応する磁石を示す分解三次元図である。

【図 7】 本発明により構成された別の装置を示す。

10

20

【図 1】

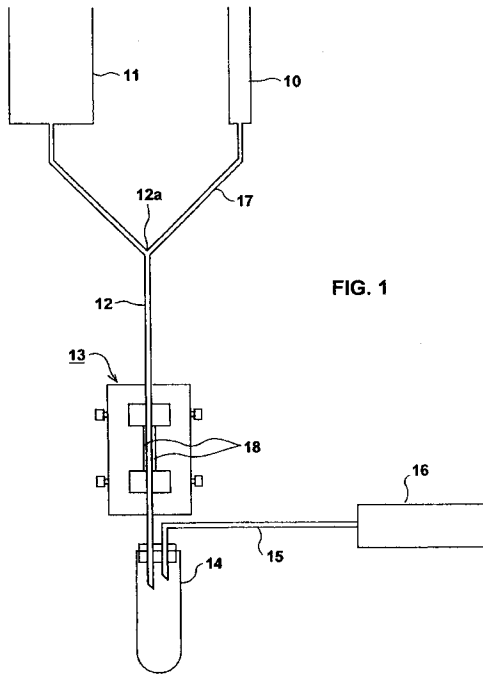


FIG. 1

【図 2】

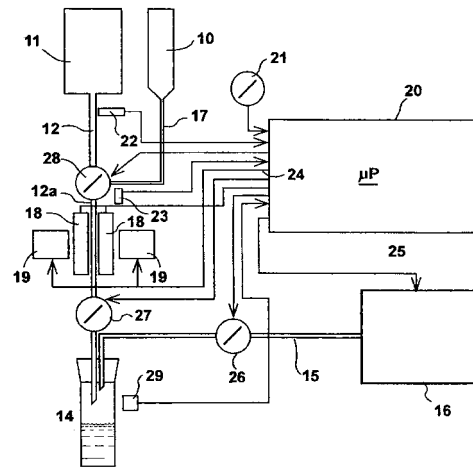


FIG. 2

【図 3】

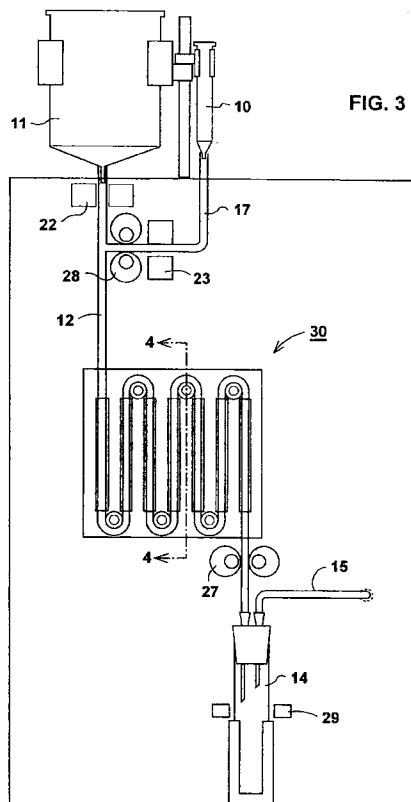


FIG. 3

【図 4】

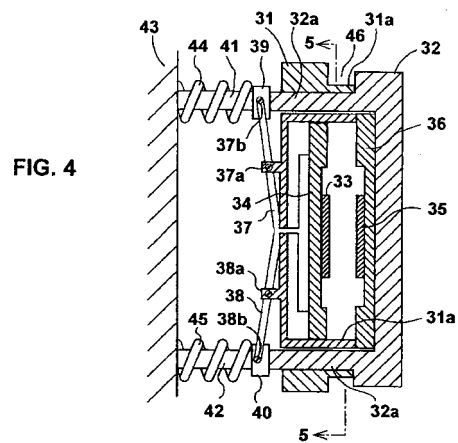
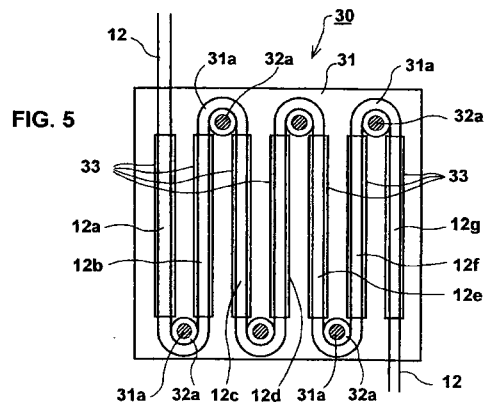
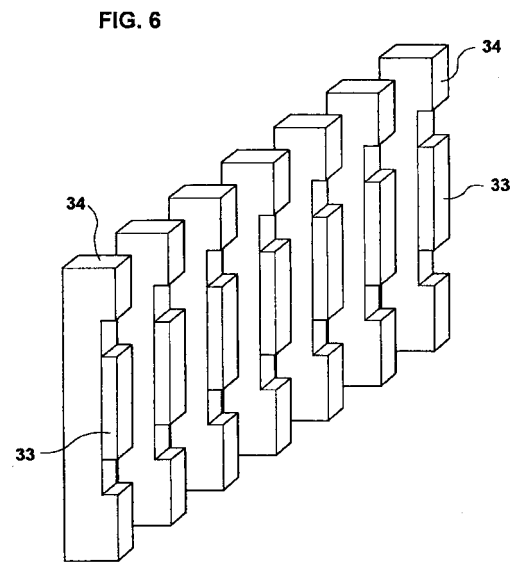


FIG. 4

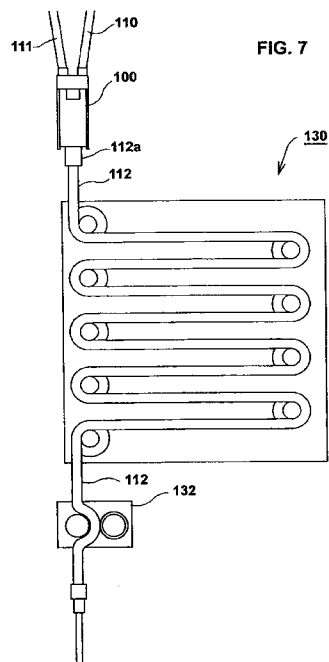
【図 5】



【図 6】



【図 7】



---

フロントページの続き

(72)発明者 クライン, オファー  
イスラエル, 12 240 ディー.エヌ. ガリル エリオン, モシェイヴ シェアー イ  
ェシャヴ (番地なし)

(72)発明者 ラミシュ, アハロン  
イスラエル, 52 255 ラマツ ガン, ハフラ ストリート 19

審査官 三崎 仁

(56)参考文献 特表平08-510390(JP,A)  
特表平04-500008(JP,A)  
米国特許第04710472(US,A)  
米国特許第04904391(US,A)  
米国特許第05711871(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B03C1/00-1/32

B01D35/06,43/00

A61K35/14

G01N33/543-33/553