

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6237031号
(P6237031)

(45) 発行日 平成29年11月29日 (2017.11.29)

(24) 登録日 平成29年11月10日 (2017.11.10)

(51) Int. Cl.	F I	
B O 1 D 15/08 (2006.01)	B O 1 D	15/08
B O 3 B 5/00 (2006.01)	B O 3 B	5/00 Z
B O 1 J 20/28 (2006.01)	B O 1 J	20/28 Z
C 1 2 N 11/00 (2006.01)	C 1 2 N	11/00
G O 1 N 1/04 (2006.01)	G O 1 N	1/04 M
請求項の数 8 (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-193574 (P2013-193574)	(73) 特許権者	000003193
(22) 出願日	平成25年9月18日 (2013.9.18)		凸版印刷株式会社
(65) 公開番号	特開2015-58394 (P2015-58394A)		東京都台東区台東1丁目5番1号
(43) 公開日	平成27年3月30日 (2015.3.30)	(74) 代理人	100139686
審査請求日	平成28年8月23日 (2016.8.23)		弁理士 鈴木 史朗
		(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100108578
			弁理士 高橋 詔男
		(74) 代理人	100152146
			弁理士 伏見 俊介
		(72) 発明者	牧野 洋一
			東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 成分分離方法、成分分析方法及び成分分離装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

目的成分を含み得る液性の混合物である試料に対して、前記目的成分に対して特異性を有するアフィニティービーズおよび第二アフィニティービーズを添加し、

前記混合物と前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとを含む混合液を主流路に流し、

前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとが結合した前記目的成分を、前記主流路に接続された複数の分岐流路の一部に、水力学的濾過法により選択的に導入する成分分離方法。

【請求項2】

目的成分および第二目的成分を含み得る液性の混合物である試料に対して、前記目的成分に対して特異性を有するアフィニティービーズと、前記第二目的成分に対して特異性を有する第二アフィニティービーズを添加し、

前記混合物と前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとを含む混合液を主流路に流し、

水力学的濾過法により、前記アフィニティービーズと結合した前記目的成分を前記主流路に接続された複数の分岐流路の一部に選択的に導入し、かつ前記第二アフィニティービーズと結合した前記第二目的成分を、前記複数の分岐流路の一部であって前記アフィニティービーズと結合した前記目的成分とは異なる分岐流路に選択的に導入する成分分離方法

【請求項 3】

前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとは互いに粒子径が異なる、請求項 1 または 2 に記載の成分分離方法。

【請求項 4】

前記目的成分は、細胞または細胞由来成分である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の成分分離方法。

【請求項 5】

前記細胞由来成分が細胞特異的マーカーである、請求項 4 に記載の成分分離方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の成分分離方法を用いた成分分析方法であって、前記目的成分に特異性を有するように選択された物質を有する前記アフィニティービーズと、前記アフィニティービーズ上の前記物質とは異なる結合特異性を前記目的成分に対して有する第二の物質と標識物質との複合体と、前記試料とを混合し、分離された前記アフィニティービーズにおける前記標識物質による標識活性を測定する成分分析方法。

10

【請求項 7】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の成分分離方法を用いた成分分析方法であって、前記目的成分に特異性を有するように選択された物質を有する前記アフィニティービーズと、標識物質を含み前記物質と前記目的成分との結合を競合阻害可能な構造を有する複合体と、前記試料とを混合し、分離された前記アフィニティービーズにおける前記標識物質による標識活性を測定する成分分析方法。

20

【請求項 8】

目的成分に対する特異性を有するアフィニティービーズおよび第二アフィニティービーズと、

主流路と、前記主流路に接続された複数の分岐流路とを有し、前記前記アフィニティービーズおよび前記第二アフィニティービーズを含む混合液から前記アフィニティービーズを水力学的濾過法により分離する流路チップと、

前記混合液の溶媒と組成が異なり前記流路チップに供給され前記主流路において前記混合液に対して層流をなして流通可能な緩衝液と、

を備えた成分分離装置。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、目的成分を他の成分から分離する方法及びその装置、並びに、目的成分の分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、マイクロ流路内における安定な層流を用いた連続的な粒子分離方法が開発されている。特許文献 1 及び特許文献 2 には、水力学的濾過法を用いた分離方法が開示されている。

また、非特許文献 1 には、水力学的濾過法を用いて希釈血液から赤血球と白血球を分離し、同時に白血球を濃縮することが開示されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2007 - 21465 号公報

【特許文献 2】特開 2007 - 175684 号公報

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】電学論 E 2008 年 128 巻 10 号

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

特許文献1, 2並びに非特許文献1に記載の分離方法では、液体が好適に流れる寸法のマイクロ流路を用いていることから、マイクロ流路の内径に対して極端に小さな分子や細胞等を分離精製するのは困難である。また、外形寸法の差が小さい2成分を精度よく分離することも困難である。

【0006】

本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、その目的は、寸法差による分離が困難な成分を水力学的濾過法を用いて精度よく分離精製することである。また、本発明の別の目的は、寸法差による分離が困難な成分を水力学的濾過法を用いて精度よく分離精製された目的成分を用いた成分分析方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の一態様は、目的成分を含み得る液性の混合物である試料に対して、前記目的成分に対して特異性を有するアフィニティービーズおよび第二アフィニティービーズを添加し、前記混合物と前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとを含む混合液を主流路に流し、前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとが結合した前記目的成分を、前記主流路に接続された複数の分岐流路の一部に、水力学的濾過法により選択的に導入する成分分離方法である。

20

【0008】

本発明の他の態様は、目的成分および第二目的成分を含み得る液性の混合物である試料に対して、前記目的成分に対して特異性を有するアフィニティービーズと、前記第二目的成分に対して特異性を有する第二アフィニティービーズを添加し、前記混合物と前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとを含む混合液を主流路に流し、水力学的濾過法により、前記アフィニティービーズと結合した前記目的成分を前記主流路に接続された複数の分岐流路の一部に選択的に導入し、かつ前記第二アフィニティービーズと結合した前記第二目的成分を、前記複数の分岐流路の一部であって前記アフィニティービーズと結合した前記目的成分とは異なる分岐流路に選択的に導入する成分分離方法である。

。

【0009】

前記アフィニティービーズと前記第二アフィニティービーズとは互いに粒子径が異なってもよい。

30

【0013】

前記目的成分が細胞と細胞由来成分との少なくともいずれかを含んでいてよい。

前記細胞由来成分が細胞特異的マーカーであってもよい。

【0014】

本発明の別の態様は、上記態様の成分分離方法を用いた成分分析方法であって、前記目的成分に特異性を有するように選択された物質を有する前記アフィニティービーズと、前記アフィニティービーズ上の前記物質とは異なる結合特異性を前記目的成分に対して有する第二の物質と標識物質との複合体と、前記試料とを混合し、分離された前記アフィニティービーズにおける前記標識物質による標識活性を測定する成分分析方法である。

40

【0015】

本発明のさらに別の態様は、上記態様の成分分離方法を用いた成分分析方法であって、前記目的成分に特異性を有するように選択された物質を有する前記アフィニティービーズと、標識物質を含み前記物質と前記目的成分との結合を競合阻害可能な構造を有する複合体と、前記試料とを混合し、分離された前記アフィニティービーズにおける前記標識物質による標識活性を測定する成分分析方法である。

【0016】

本発明のさらに別の態様は、目的成分に対する特異性を有するアフィニティービーズおよび第二アフィニティービーズと、主流路と、前記主流路に接続された複数の分岐流路と

50

を有し、前記前記アフィニティービーズおよび前記第二アフィニティービーズを含む混合液から前記アフィニティービーズを水力学的濾過法により分離する流路チップと、前記混合液の溶媒と組成が異なり前記流路チップに供給され前記流路チップの一部の流路において前記混合液に対して層流をなして流通可能な緩衝液と、を備えた成分分離装置である。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、寸法差による分離が困難な成分を水力学的濾過法を用いて精度よく分離精製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

10

【図1】本発明の第1実施形態の成分分離装置を示す模式図である。

【図2】同実施形態の成分分離装置の作用を説明するための図である。

【図3】本発明の第2実施形態の成分分離装置を示す模式図である。

【図4】同実施形態の他の構成例の成分分離装置を示す模式図である。

【図5】同実施形態のさらに他の構成例の成分分離装置を示す模式図である。

【図6】第1実施形態の成分分離装置を用いた実施例を説明するための図である。

【図7】同実施形態の成分分離装置を用いた他の実施例を説明するための図である。

【図8】同実施形態の成分分離装置を用いたさらに他の実施例を説明するための図である。

。

【発明を実施するための形態】

20

【0019】

(第1実施形態)

本発明の第1実施形態について説明する。

まず、本実施形態の成分分離方法に用いる成分分離装置1の構成について説明する。図1は、本実施形態の成分分離装置を示す模式図である。

【0020】

図1に示すように、成分分離装置1は、分離する対象となる目的成分52に対して特異性を有するアフィニティービーズ2と、アフィニティービーズ2を含む混合液50が流れるマイクロ流路7が形成された流路チップ5と、流路チップ5のマイクロ流路7に注入される緩衝液23とを有する。

30

【0021】

アフィニティービーズ2は、単一の粒子径を有する略球状部材である。アフィニティービーズ2は、アフィニティービーズ2の粒子径を規定するビーズ本体3と、ビーズ本体3の外面に固定された抗体4とを有する。

【0022】

ビーズ本体3は、任意の粒子径から適宜選択された単一の粒子径を有する略球状部材である。ビーズ本体3の粒子径は、流路チップ5に形成されたマイクロ流路7の内径に対応して選択される。また、ビーズ本体3の粒子径は、目的成分52以外に試料51に含まれる粒子の径とは異なっていることが好ましい。

本実施形態では、複数のアフィニティービーズ2を用いて目的成分52の分離を行う。このため、各アフィニティービーズ2は、比重が揃っていることが好ましい。すなわち、ビーズ本体3は、単一材料からなる樹脂部材や、複数の樹脂が均一に混練された樹脂部材あるいは単一材料からなる金属・無機部材や、複数の金属部材が均一に混練された金属・無機部材等から形成される。

40

また、ビーズ本体3は、中実であってもよいし、中空であってもよいし、多孔質であってもよい。たとえばビーズ本体3が多孔質であると、抗体4を固定可能な表面積が広くとれる。

ビーズ本体3の材質として、高分子ポリマーが選択されてよい。具体的には、ビーズ本体3は、ポリスチレンやラテックス等からなる。ビーズ本体3の外面には、カルボキシル基が露出していることが好ましい。本実施形態では、ビーズ本体3の外面のカルボキシル

50

基がスクシンイミドで活性化され、抗体 4 との結合性が高められている。

【0023】

抗体 4 は、目的成分 5 2 に対して特異性を有する抗体であれば、構成は特に限定されない。また、目的成分 5 2 に対する特異性を高める目的で、ビーズ本体 3 の外面に固定される抗体 4 はモノクローナル抗体であってよい。また、目的成分 5 2 に対する結合可能性を高める目的で、ビーズ本体 3 の外面に固定される抗体 4 は、ポリクローナル抗体であってよい。なお、ビーズ本体 3 の外面に固定される抗体 4 は I g G、I g A、I g M、I g D、及び I g E のいずれでも構わないが、量産性を考慮すると I g G 抗体若しくは I g M 抗体が好ましい。

また、目的成分 5 2 以外に対する非特異的結合を防ぐ目的で、ビーズ本体 3 の外面に固定される抗体 4 は F a b フラグメントであってもよい。

【0024】

流路チップ 5 は、たとえば、非特許文献 1 に開示されたマイクロチャネルを好適に適用できる。

本実施形態における流路チップ 5 は、ポリジメチルシロキサン (P D M S) 等の樹脂製基板に所定形状をなすマイクロ流路 7 がパターン形成された本体部 6 a と、マイクロ流路 7 に蓋をするように本体部 6 a に固定されたガラス板等による蓋部 6 b とを有する。

【0025】

マイクロ流路 7 は、目的成分 5 2 を含む液性の混合物である試料 5 1 とアフィニティービーズ 2 とを含んだ混合液 5 0 が注入される第一インレット 8 と、第一インレット 8 に連通し直線状に延びる主流路 9 と、緩衝液 2 3 を主流路 9 に注入するために主流路 9 に連通して設けられた第二インレット 1 0 と、主流路 9 の最下流において主流路 9 に連通された第一アウトレット 1 1 と、主流路 9 から分岐して直線状に延びる複数の分岐流路 1 2 と、分岐流路 1 2 の最下流において各分岐流路 1 2 に連通された第二アウトレット 1 8 とを有する。

【0026】

主流路 9 の断面形状は、略矩形形状であってよい。本実施形態では、主流路 9 の断面形状は、幅 5 0 マイクロメートル、長さ 7 m m に設定されている。

【0027】

第二インレット 1 0 は、主流路 9 のうち第一インレットの下流であって分岐流路 1 2 の上流にある領域において主流路 9 に接続されている。

【0028】

第一アウトレット 1 1 は、第二アウトレット 1 8 において分離されなかった残り成分を貯留するための貯留部である。本実施形態では、第一アウトレット 1 1 には、主に、アフィニティービーズ 2 よりも粒子径が大きな成分と、緩衝液 2 3 とが貯留される。

【0029】

複数の分岐流路 1 2 は、長さ、幅、深さ、径などのスケールのうちいずれか 1 つ以上が適切に調節された流路を 1 つ以上有する流路構造を有する。複数の分岐流路 1 2 は、主流路 9 の上流側に接続された第一分岐流路 1 3 と、主流路 9 と第一分岐流路 1 3 との接続部よりも下流において主流路 9 に接続された第二分岐流路 1 4 とを有する。複数の分岐流路 1 2 は、主流路 9 の流通方向に直交する断面において、第二インレット 1 0 と主流路 9 との接続部に対向する位置で主流路 9 に対して接続されている。

【0030】

第一分岐流路 1 3 は、ある一定の大きさ以上のアフィニティービーズ 2 が第一分岐流路 1 3 に導入されないように、長さ、幅、深さ、径などのスケールのうちいずれか 1 つ以上が適切に調節された流路を 1 つ以上有する流路構造を有する。第一分岐流路 1 3 は、試料 5 1 とアフィニティービーズ 2 との混合液 5 0 から、アフィニティービーズ 2 よりも粒子径が小さい成分を除去するための流路である。

第一分岐流路 1 3 の寸法は、上流側において相対的に細く、下流側において相対的に太い。具体的には、第一分岐流路 1 3 における上流側の細い部分は幅 1 5 μ m、下流側の太

10

20

30

40

50

い部分は幅 $25\ \mu\text{m}$ とされている。また、第一分岐流路 13 全体の長さは $14\ \text{mm}$ とされている。また、本実施形態では、100本の第一分岐流路 13 が主流路 9 に接続されている。

【0031】

第二分岐流路 14 は、アフィニティービーズ 2 が主流路 9 から引き込まれ得る断面形状及び寸法を有する流路である。第二分岐流路 14 は、長さ、幅、深さ、径などのスケールのうちいずれか 1 つ以上が適切に調節された流路を 1 つ以上有する流路構造を有する。

第二分岐流路 14 は、第二分岐流路 14 と主流路 9 との分岐点においてある一定の大きさ以上の粒子が第二分岐流路 14 に導入されないようにすることができ、ある一定の大きさ以下の粒子も第二分岐流路 14 より下流へと導入されないようにすることができる。すなわち、本実施形態では、主流路 9 を通じて導入された全ての一定の大きさ以下の粒子を含む流体、もしくはある一定の大きさ以上の粒子を全く含まない流体が、第二分岐流路 14 から回収され得る。

第二分岐流路 14 は、流通方向に沿う長さが互いに異なる一号分岐流路 15、二号分岐流路 16、及び三号分岐流路 17 を有する。本実施形態では、一号分岐流路 15 が最も長く、二号分岐流路 16 が続いて長く、三号分岐流路 17 が最も短い。一号分岐流路 15、二号分岐流路 16、及び三号分岐流路 17 の流路幅は、アフィニティービーズ 2 の粒径に対応して設定されている。一例を挙げると、一号分岐流路 15 は、一号分岐流路 15 における上流側において相対的に細く、下流側において相対的に太い。具体的には、一号分岐流路 15 における上流側の細い部分は幅 $25\ \mu\text{m}$ 、下流の太い部分は幅 $35\ \mu\text{m}$ とされている。また、一号分岐流路 15 全体の長さは $17\ \text{mm}$ とされており、本実施形態では 10 本の一号分岐流路 15 が主流路 9 に接続されている。

また、二号分岐流路 16 は、二号分岐流路 16 における上流側において相対的に細く、下流側において相対的に太い。具体的には、二号分岐流路 16 における上流側の細い部分は幅 $25\ \mu\text{m}$ 、下流の太い部分は幅 $35\ \mu\text{m}$ とされている。また、二号分岐流路 16 全体の長さは $7\ \text{mm}$ とされており、本実施形態では 10 本の二号分岐流路 16 が主流路 9 に接続されている。

また、三号分岐流路 17 は、三号分岐流路 17 における上流側において相対的に細く、下流側において相対的に太い。具体的には、三号分岐流路 17 における上流側の細い部分は幅 $25\ \mu\text{m}$ 、下流の太い部分は幅 $35\ \mu\text{m}$ とされている。また、三号分岐流路 17 全体の長さは $3\ \text{mm}$ とされており、本実施形態では 10 本の三号分岐流路 17 が主流路 9 に接続されている。

【0032】

第二アウトレット 18 は、アフィニティービーズ 2 の粒子径に満たない径の粒子成分とアフィニティービーズ 2 とを分取するための貯留部である。第二アウトレット 18 は、第一分岐流路 13 の下流に接続された一号アウトレット 19 と、一号分岐流路 15 の下流に接続された二号アウトレット 20 と、二号分岐流路 16 の下流に接続された三号アウトレット 21 と、三号分岐流路 17 の下流に接続された四号アウトレット 22 とを有する。

本実施形態では、一号アウトレット 19 にはアフィニティービーズ 2 の粒子径に満たない径の粒子成分が貯留され、二号アウトレット 20 と、三号アウトレット 21 と、四号アウトレット 22 とは、アフィニティービーズ 2 の粒子径に応じてアフィニティービーズ 2 が貯留される。

【0033】

緩衝液 23 は、アフィニティービーズ 2 に対して特異的に結合する物質を含まず、且つ試料 51 を変性させない組成を有する液体である。特に、本実施形態の緩衝液 23 は、目的成分 52 におけるエピトープの構造と、抗体 4 における抗原認識部位との両方に対して、特異性の低下につながる影響を与えない組成であることが好ましい。さらに、緩衝液 23 は、アフィニティービーズ 2 と試料 51 との混合液 50 とともに主流路 9 を流れるときに好適に 2 層の層流を形成するように、組成が選択されてよい。

【0034】

上記の成分分離装置 1 の作用について、本実施形態の成分分離方法とともに説明する。図 2 は、本実施形態の成分分離装置 1 の作用を説明するための図である。

図 2 に示すように、本実施形態の成分分離装置 1 は、所定の粒子径を有するアフィニティービーズ 2 に対する目的成分 5 2 の特異的結合と、水力学的濾過法による粒子径に応じたアフィニティービーズ 2 の分離との組み合わせによって、アフィニティービーズ 2 に対して特異性を有する目的成分 5 2 を、目的成分 5 2 を含む得る液性の混合物（試料 5 1）から分離する。

【 0 0 3 5 】

具体的には、まず、第二インレット 1 0 に緩衝液 2 3 を注入し、第二インレット 1 0 に緩衝液 2 3 が注入されている状態で、もしくは同時に、第一インレット 8 に、試料 5 1 とアフィニティービーズ 2 とを混合してなる混合液 5 0 を注入する。すると、主流路 9 には、試料 5 1 とアフィニティービーズ 2 との混合液 5 0 と緩衝液 2 3 とが層となる 2 層の層流構造が生じる。試料 5 1 とアフィニティービーズ 2 との混合液 5 0 は主流路 9 の流通方向に直交する断面において分岐流路 1 2 に近い側を流れるので、混合液 5 0 の一部は分岐流路 1 2 に入り込む。このとき、分岐流路 1 2 の断面の形状及び寸法に応じて、混合液 5 0 は、粒子径ごとに分画される。

【 0 0 3 6 】

本実施形態では、第一分岐流路 1 3 には、アフィニティービーズ 2 の粒子径よりも小さい粒子径を有する成分が流れ込む。さらに、第二分岐流路 1 4 には、アフィニティービーズ 2 を含む成分が流れ込む。

【 0 0 3 7 】

アフィニティービーズ 2 には、試料 5 1 中の目的成分 5 2 に対して特異性を有する抗体 4 が固定されているので、第二分岐流路 1 4 において分離されたアフィニティービーズ 2 には、目的成分 5 2 が結合している。

【 0 0 3 8 】

目的成分 5 2 が結合しているアフィニティービーズ 2 を回収して、必要に応じて公知の方法により洗浄し、公知の方法によってアフィニティービーズ 2 から目的成分 5 2 を溶出することにより、目的成分 5 2 を高純度に得ることができる。なお、目的成分 5 2 が結合しているアフィニティービーズ 2 が、回収後の処理に必要な程度に緩衝液 2 3 によって洗浄されていれば、アフィニティービーズ 2 の回収後に別途洗浄をしなくてもよい場合もある。

【 0 0 3 9 】

本実施形態の成分分離装置 1 では、目的成分 5 2 自体がその大きさによる分離が困難な大きさの成分であっても、目的成分 5 2 に特異的に結合するアフィニティービーズ 2 をその大きさによって試料 5 1 から分離することで、目的成分 5 2 を試料 5 1 中から分離することができる。

また、目的成分 5 2 と他の成分との大きさに顕著な差がない場合でも、アフィニティービーズ 2 が結合した目的成分 5 2 は、当該他の成分よりも顕著に大きな差を有する複合体となるので、目的成分 5 2 が高純度に分離される。

【 0 0 4 0 】

（第 2 実施形態）

次に、本発明の第 2 実施形態について説明する。図 3 は、本実施形態の成分分離装置を示す模式図である。図 4 は、本実施形態の他の構成例の成分分離装置を示す模式図である。図 5 は、本実施形態のさらに他の構成例の成分分離装置を示す模式図である。

本実施形態では、成分分離装置における流路チップの構成が上記第 1 実施形態と異なっている。すなわち、本実施形態では、アフィニティービーズ 2 の分離手法が上記第 1 実施形態と異なっている。

【 0 0 4 1 】

（構成例 1）

図 3 に示すように、本構成例の成分分離装置における流路チップ 5 A は、渦巻き状に形

10

20

30

40

50

成されたマイクロ流路を有している。本構成例の成分分析装置では、目的成分を含み得る試料をマイクロ流路において渦巻きの中心側の端から流すことにより流路内にディーン渦を発生させることにより、マイクロ流路における渦巻きの中心側と外側とに粒子径に応じて各粒子を分離する。

このような構成であっても上記実施形態の成分分離装置 1 と同様に目的成分を他の成分から分離することができる。

【 0 0 4 2 】

(構成例 2)

図 4 に示すように、本構成例の成分分離装置における流路チップ 5 B は、2つのインレットが集合されて第 1 実施形態と同様に層流を形成する主流路に対し粒子懸濁液（第一のインレット）よりもシース液量（第二のインレット）を相対的に多く流すことにより、ピンチ部分で流路壁に整列した粒子が流路壁から粒子中心位置の差を生じ、この差がピンチ部下流で増幅され、粒子の流れと垂直な方向に粒子径に応じた分離が可能であるため、主流路の下流側の端に連通され複数方向へ分岐された分岐流路で各粒子を回収する。

本構成例では、2つのインレットの一方に試料及びアフィニティービーズを注入し、2つのインレットの他方に緩衝液を注入する。

このような構成であっても上記実施形態の成分分離装置 1 と同様に目的成分を他の成分から分離することができる。

【 0 0 4 3 】

(構成例 3)

図 5 に示すように、本構成例の成分分離装置における流路チップ 5 C は、移動弾性表面波を発生させる電極部と、電極部の近傍に配された主流路と、主流路の一端に設けられた第一インレット及び第二インレットと、主流路の他端に設けられた分岐流路とを有する。

本変形例では、流路内を流れる細胞その他の粒子に対して移動弾性表面波が到達すると、粒子径に応じて主流路内で各粒子が移動されて、粒子径に応じて分岐流路にて分取できる。

このような構成であっても上記実施形態の成分分離装置 1 と同様に目的成分を他の成分から分離することができる。

【 0 0 4 4 】

次に、以下に示す各実施例に基づいて、上記第 1 実施形態の成分分離装置 1 及び成分分離方法についてより詳細に説明する。図 6 は、第 1 実施形態の成分分離装置を用いた実施例を説明するための図である。図 7 は、同実施形態の成分分離装置を用いた他の実施例を説明するための図である。図 8 は、同実施形態の成分分離装置を用いたさらに他の実施例を説明するための図である。

【 実施例 1 】

【 0 0 4 5 】

ヒト前立腺抗原（PSA）に対するモノクローナル抗体 1 H 1 2（ハイテスト）を粒径 2.8 μm のビーズ（ダイナビーズ、インビトロジェン）に固定化し、1 H 1 2 とは異なる PSA のエピトープを認識するモノクローナル抗体 5 A 6（ハイテスト）を 10 μm のビーズ（コアビーズ）に固定化した。

0、4、10 ng/mL の PSA（図 6 に符号 2 4 で示す）と、1 H 1 2 標識ビーズ（図 6 に符号 2 5 で示す）と、5 A 6 標識ビーズ（図 6 に符号 2 6 で示す）を含む PBS を、室温にてインキュベートし第一インレット 8 に 30 μL / mL で注入し、緩衝液 2 3 となる PBST を第二インレット 10 に 30 μL / mL で注入した。

すると、粒径 2.8 μm の抗体標識ビーズ 2 5 が一号アウトレット 1 9 へ、粒径 10 μm の抗体標識ビーズ 2 6 が二号アウトレット 2 0 へ、PSA を介して両ビーズ 2 5、2 6 の抗体が結合した複合体ビーズ（図 6 に符号 2 7 で示す）が三号アウトレット 2 1 及び四号アウトレット 2 2 へそれぞれ分離された。三号アウトレット 2 1 及び四号アウトレット 2 2 において検出される複合体ビーズは PSA の濃度に応じて増加した。

本実施例では、複合体ビーズ 2 7 は、粒径 2.8 μm の抗体標識ビーズ 2 5 と粒径 10

10

20

30

40

50

μm の抗体標識ビーズ26とのどちらよりも大きいので、複合体ビーズ27、粒径2.8 μm の抗体標識ビーズ25、及び粒径10 μm の抗体標識ビーズ26が混合された混合液から複合体ビーズを分離できる。

【実施例2】

【0046】

ヒトEpCAMに対する抗体を固定化したビーズ（粒径3 μm 、Magnosphere TMMC2900、コスモバイオ）、及び目的成分52である大腸癌細胞（HT-29）を希釈した血液に加え、室温にてインキュベートした。

図7に示すように、第一インレット8に抗体標識ビーズ（図7に符号28で示す）を含む希釈血液を30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ で注入し、第二インレット10に緩衝液であるPBSTを30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ で注入した。

すると、赤血球（図7にRBCと示す）及び抗体標識ビーズ28が一号アウトレット19へ、白血球（図7にWBCと示す）が二号アウトレット20及び三号アウトレット21へ、大腸癌細胞が結合した抗体標識ビーズ28が四号アウトレット22へそれぞれ分離された。

なお、本実施例の方法を患者由来の試料51に適用した場合、ヒトEpCAMはヒト上皮細胞もしくはヒト上皮系腫瘍細胞に発現し、特にヒト上皮系腫瘍細胞に高発現であるので、ヒト上皮系腫瘍細胞をEpCAM標識ビーズを用いて精度よく分離できる。

【実施例3】

【0047】

ヒトCD63に対する抗体を固定化したビーズ（粒径2.8 μm 、ダイナビーズ）、ヒトIgGに対する抗体（ミリボア、AP112）、及びヒト血清アルブミンに対する抗体（アブカム、ab2406）を固定化したビーズ（粒径10 μm 、コアビーズ）を希釈した血清に加え、室温にてインキュベートした。

図8に示すように、抗CD63抗体標識ビーズ（図8に符号29で示す）及びhIgG抗体標識ビーズ（図8に符号30で示す）、及び抗ヒト血清アルブミン抗体標識ビーズ（図8に符号31で示す）を含む希釈血清を第一インレット8に30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ で注入し、緩衝液であるPBSを第二インレット10に30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ で注入した。

すると、抗CD63抗体標識ビーズ29が一号アウトレット19へ、エクソソーム32がCD63を介して結合した抗CD63抗体標識ビーズ29が二号アウトレット20へ、ヒトIgG33、 α マクログロブリン34が結合したhIgG抗体標識ビーズ30, 31が三号アウトレット21及び四号アウトレット22へそれぞれ分離された。

【0048】

上記実施形態及び各実施例に示した方法及び装置によれば、アフィニティービーズ2の大きさという単純な物理的特性と抗体4などの特性の高い親和分子を組み合わせることにより、目的成分52となる分子をその分子の大きさではなくアフィニティービーズ2の粒子径を用いて分離することができる。

【0049】

例えば、サンドイッチイムノアッセイ可能な捕捉抗体を結合させたビーズをアフィニティービーズとして採用し、このアフィニティービーズと、酵素等により標識した標識抗体とを共に試料に混合し、上記の装置を用いて、未反応の標識抗体と、抗原抗体反応による生じたビーズ複合体とを水力学的濾過により分離計測すれば、ビーズ複合体あたりの標識活性を検出することにより、抗原抗体反応性を定量することも可能である。

同様に、特定のエピトープに特異性を有する抗体が結合されたビーズと、酵素等により標識された抗原と、試料とを混合して、上記の装置を用いて、ビーズ複合体を水力学的濾過により他の成分から分離することもできる。この場合、試料中の目的成分とビーズ上の抗体との結合を、標識された抗原が競合的に阻害するので、水力学的濾過により分離計測したビーズ複合体あたりの標識活性を競合的に検出して試料中の抗原量を定量することも可能である。

【0050】

10

20

30

40

50

さらにまた、異なった大きさのビーズに、サンドイッチイムノアッセイ可能な捕捉抗体と検出抗体をそれぞれ標識しておき、抗原とのサンドイッチ反応に伴うビーズ複合体は未反応抗体標識ビーズよりも粒径が大きくなることから、未反応抗体標識ビーズと抗原抗体反応によるビーズ複合体を水力学的濾過により分離計測すれば、抗原抗体反応性を複合体ビーズ粒子数として検出、定量することも可能である。その際、ビーズ粒径の種類を複数用意すれば、同時に複数の抗原を分析することも可能である。

たとえば、サンドイッチ反応における各ビーズの径が5マイクロメートルであるとする、結合が起こっていない各ビーズの径は5マイクロメートルであり、サンドイッチ反応により複合体化すると10マイクロメートル程度以上になる。これにより、非特許文献1において開示された赤血球と白血球との径の差と略同様の差が、未結合ビーズとビーズ複合体との間に生じる。これにより、非特許文献1に開示されたマイクロチャネルの構成を用いて目的成分の分離を好適に行うことができる。

10

【0051】

また、別な応用例としては、任意の抗体を標識したビーズと生体サンプルを反応させ、その抗体に特異的に結合する表面抗原を有する例えば循環型癌細胞などを抗体の種類とそれに対応したビーズの粒子径に基づいて分離、調製することも可能である。

【0052】

さらには、細胞から分泌される小胞で、その機能が注目されているエクソソームなど細胞由来成分の分離に応用することができる。エクソソームは従来、煩雑な超遠心分離や密度勾配超遠心分離法で分取されているが、均一でなく、調製の再現性、品質に問題がある。抗CD63抗体標識磁性ビーズを用いるアフィニティー分離法も市販されているが、調製には時間がかかる。抗CD63抗体等のエクソソームに結合する抗体を標識したビーズと水力学的濾過を用いることによりエクソソームを簡便に分離することができる。また、抗IgG、ヒト血清アルブミン抗体を標識したビーズによるアバンダント蛋白質を除去することにより、従来法よりもより簡便に均質なエクソソームを分取することができる。これによりエクソソーム機能解析や新規バイオマーカーの発見が加速される。

20

【0053】

以上、本発明の実施形態について図面を参照して詳述したが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。

たとえば、目的成分が抗体である場合には、ビーズ本体には、目的分子となる抗体に特異的に結合可能な抗原が結合されてよい。また、ビーズ本体に結合される物質と目的成分との関係は、受容体に対するリガンドなど相互作用に関わる分子、或いはアプタマーのような蛋白質以外の分子であってもよい。

30

目的成分に特異性を有する物質の例としては、上記実施形態で説明した抗体の他に、ペプチド、アプタマー、オレイル鎖を含む化合物、並びに脂質特異的に結合可能な物質、あるいは低分子化合物等を挙げることができる。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明は研究用試薬、診断薬用前処理試薬に用いるタンパクの分離、精製に利用することが可能である。

40

【符号の説明】

【0055】

- 1 成分分離装置
- 2 アフィニティービーズ
- 3 ビーズ本体
- 4 抗体
- 5 流路チップ
- 6 a 本体部(PDMS)
- 6 b 蓋部(ガラス板)
- 7 マイクロ流路

50

8	第一インレット	
9	主流路	
10	第二インレット	
11	第一アウトレット	
12	分岐流路	
13	第一分岐流路	
14	第二分岐流路	
15	一号分岐流路	
16	二号分岐流路	
17	三号分岐流路	10
18	第二アウトレット	
19	一号アウトレット	
20	二号アウトレット	
21	三号アウトレット	
22	四号アウトレット	
23	緩衝液	
24	P S A	
25	1 H 1 2 標識ビーズ	
26	5 A 6 標識ビーズ	
27	複合体ビーズ	20
28	抗 E p C A M 抗体標識ビーズ	
29	抗 C D 6 3 抗体標識ビーズ	
30	抗 h I g G 抗体標識ビーズ	
31	抗ヒト血清アルブミン抗体標識ビーズ	
32	エクソソーム	
33	ヒト I g G 抗体	
34	α マクログロブロン	
50	混合液	
51	試料	
52	目的成分	30

【図 1】

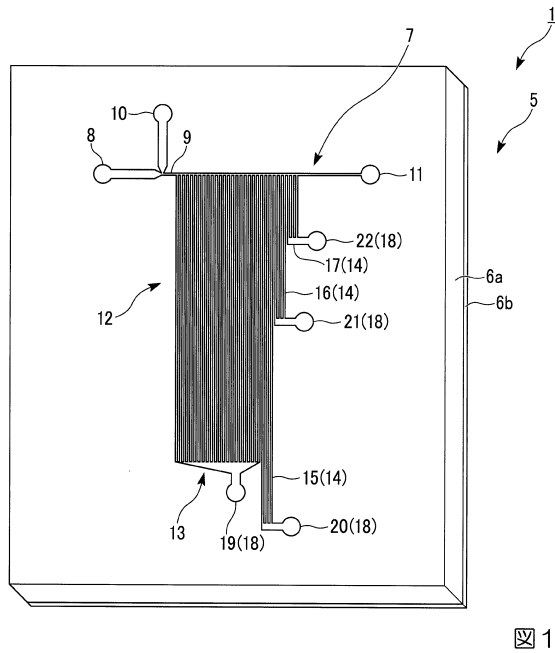


図 1

【図 2】

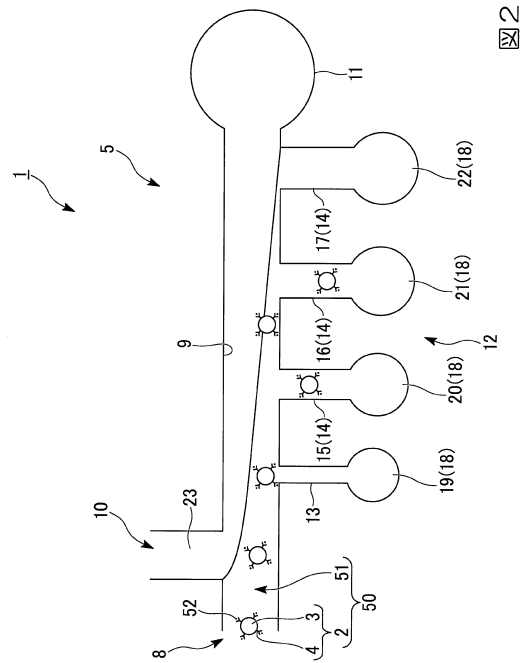


図 2

【図 3】

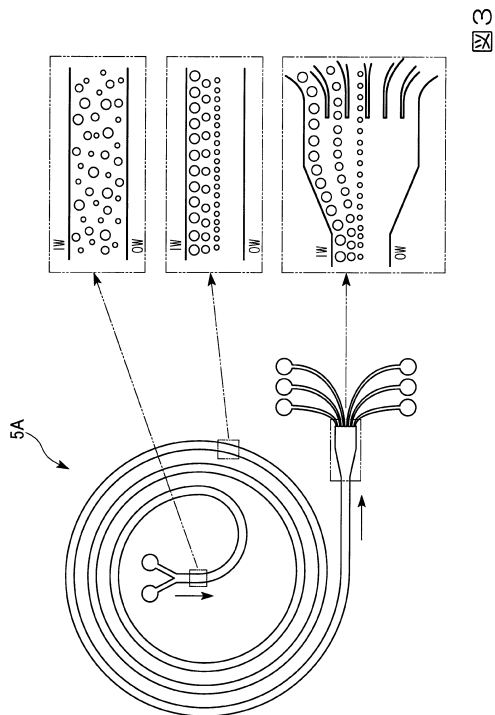


図 3

【図 4】

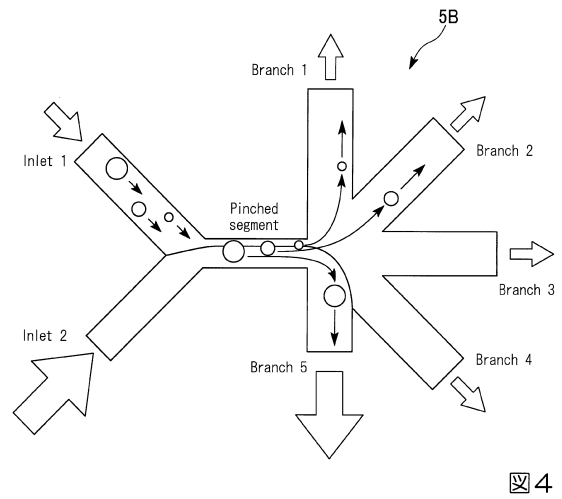
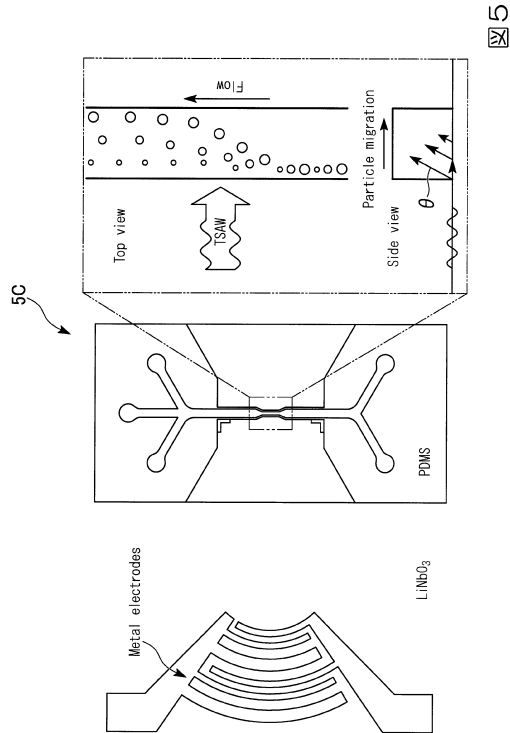
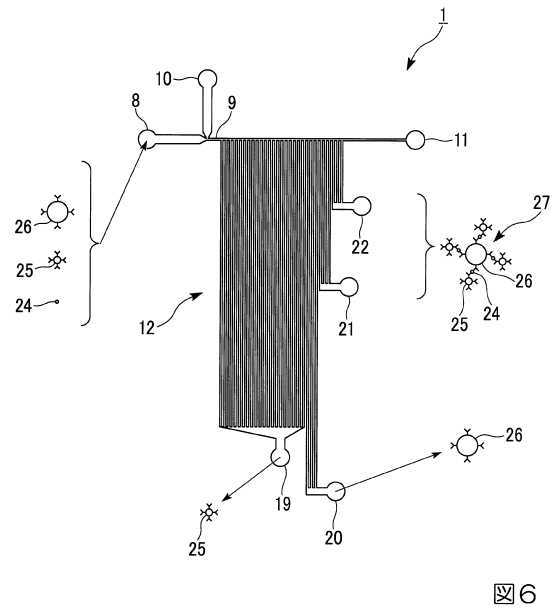


図 4

【図 5】



【図 6】



【図 7】

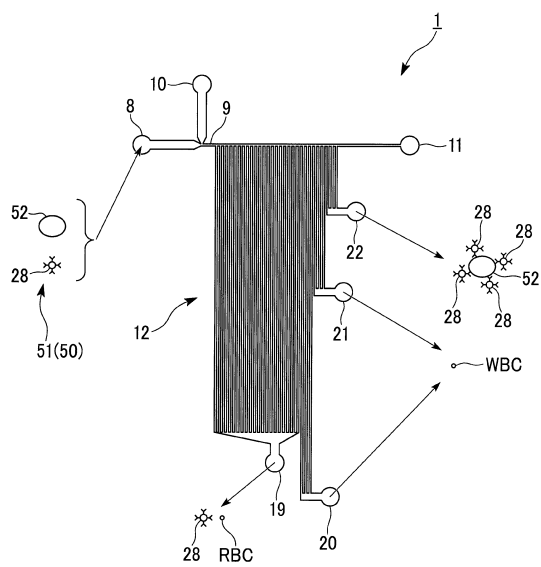


図 7

【図 8】

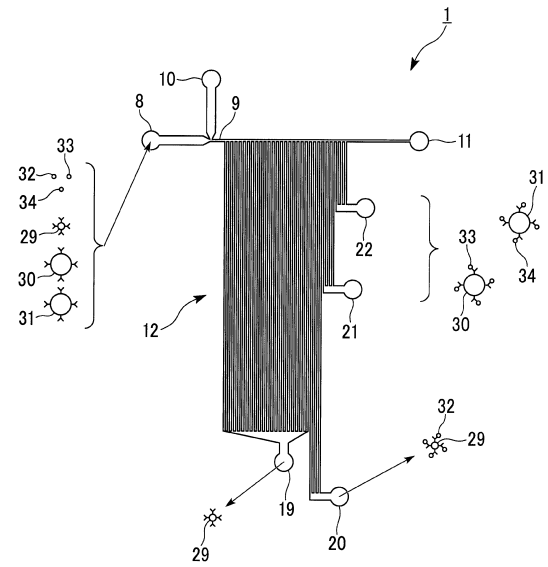


図 8

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 1
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
B 0 1 J	19/00	(2006.01)	B 0 1 J	19/00	3 2 1
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/24	(2006.01)	C 1 2 Q	1/24	
C 1 2 N	11/02	(2006.01)	C 1 2 N	11/02	
C 1 2 N	11/14	(2006.01)	C 1 2 N	11/14	

- (72)発明者 平瀬 匠
東京都台東区台東 1 丁目 5 番 1 号 凸版印刷株式会社内
- (72)発明者 入江 新司
千葉県市原市泉台 2 丁目 1 7 番 2
- (72)発明者 小原 収
千葉県木更津市請西 2 丁目 2 0 - 2 5

審査官 池田 周士郎

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 4 4 6 3 0 (U S , A 1)
特開 2 0 1 1 - 0 1 3 2 0 8 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 0 0 6 7 2 (J P , A)
特開平 0 7 - 2 6 5 6 0 6 (J P , A)
特開昭 6 2 - 2 9 4 9 6 4 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- B 0 1 J 2 0 / 0 0 - 2 0 / 3 4
B 0 1 D 1 5 / 0 0 - 1 5 / 4 2
B 0 1 J 1 9 / 0 0 - 1 9 / 3 2
B 0 3 B 1 / 0 0 - 1 3 / 0 6
C 1 2 N 1 1 / 0 0 - 1 3 / 0 0
G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 3 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)