

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-98704

(P2005-98704A)

(43) 公開日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/48

// BO 4 B 5/02

F I

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48

BO 4 B 5/02

テーマコード (参考)

2 GO 4 5

4 DO 5 7

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2001-70651 (P2001-70651)

(22) 出願日 平成13年3月13日 (2001.3.13)

(71) 出願人 594174563

緒方 肇

大阪府枚方市香里丘4丁目8番地10号

(74) 代理人 100071973

弁理士 谷 良隆

(72) 発明者 緒方 肇

大阪府枚方市香里丘4丁目8番10号

Fターム(参考) 2G045 AA01 BB10 CA25 HB02 HB04

HB05

4D057 AA03 AD01 AE11 BA15

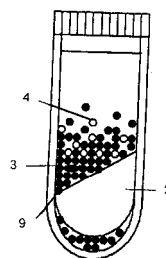
(54) 【発明の名称】 比重の異なる微粒子の分別法

(57) 【要約】

【課題】血液から赤血球を分別する場合などのように、比重の異なる二種以上の微粒子を含む液体中の微粒子を簡便な方法で精度よく比重の高低による二群に分別する方法の提供。

【解決手段】比重の異なる二種以上の微粒子を含む微粒子群を、その微粒子群の比重の中間帯に位置する比重を持ち、微粒子群との接触面の外縁が遠心管に内接して上下に移動可能である固体介在物と共に遠心して、遠心管内壁と固体介在物との接触面を通して高比重微粒子を固体介在物の下方に、または低比重微粒子を固体介在物の上方に移動させると同時に固体介在物を比重の高低二粒子群の中間に移動、介在させることにより比重の異なる微粒子を分別するという新規な方法が前記課題を解決した。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

比重の異なる二種以上の微粒子を含む微粒子群を、その微粒子群の比重の中間帯に位置する比重を持ち、微粒子群との接触面の外縁が遠心管に内接して上下に移動可能である固体介在物と共に遠心して、遠心管内壁と固体介在物との接触面を通して高比重微粒子を固体介在物の下方に、または低比重微粒子を固体介在物の上方に移動させると同時に固体介在物を比重の高低二粒子群の中間に移動、介在させることを特徴とする比重の異なる微粒子の分別法。

【請求項 2】

固体介在物の形状が、球状、楕円体状または微粒子群との接触面の少なくとも一部が遠心管内壁に対して鋭角で接触している柱状であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 3】

微粒子の粒径が $0.01 \sim 200 \mu\text{m}$ の範囲内にあることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

微粒子が液体中に懸濁しているかまたはコロイド状として存在していることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

微粒子を含む液体が、体液であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

固体介在物が、寒天、ゼラチン、合成樹脂、セラミクス、タンパク質、多糖類から選ばれた一種であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 7】

遠心管内に、外縁が遠心管に内接し且つ上下に移動可能な固体介在物を収容したことを特徴とする請求項 1 記載の方法を実施するための装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、二種類の微粒子を比重の違いにより簡便かつ高い精度で分別する方法およびその装置に関する。特に体液から赤血球を分画除去するのに適した方法並びに装置に関する。 30

【0002】**【従来の技術】**

血液などからの赤血球の除去法および有核細胞の分離法には、従来から(1)バフィー・コート採取法、(2)溶血による赤血球除去法、(3)赤血球凝集沈降分離法、(4)比重溶液の密度勾配を利用した遠心分離法などの手法が知られている。

【0003】**【発明が解決しようとする課題】**

前記公知の手法には、それぞれ次のような問題点があった。

(1) バフィー・コート採取法

この方法は、採取しようとする有核細胞への大量の赤血球の混入が不可避で、また有核細胞の回収率も手技を施す人の熟練度に大きく左右される。 40

(2) 溶血による赤血球除去法

この方法は、溶血に用いる試薬の細胞毒性が不可避であり、有核細胞の回収率および純度は、試薬の濃度や混合比率および反応時間といった条件に左右される。また、大容量の検体には不向きである。

(3) 赤血球凝集沈降分離法

この方法によって満足しうる回収率を得るためには、試料を等張液で希釈するか、または凝集沈降手技を数回反復する必要がある。従って、分画後に浮遊細胞を再度遠沈洗浄してデキストランやヘタスターチなどの凝集薬を除去し、多量の溶液中に拡散した状態で存在 50

する有核細胞を回収する必要がある、作業工程が多く煩雑である。

(4) 比重溶液の密度勾配を利用した遠心分離法

この方法は、溶液の重層や目的とする比重帯の分離手技等、慎重な操作と熟練が要求される。また、分画後に浮遊細胞を再度遠沈洗浄して、たとえばファイコール (Ficoll)、パーコール (Percoll) 等の比重溶液を除去する必要がある、作業工程が多く煩雑である。

また、血清分離用には既にゾル状の介在物を用いて、血球等の分離を行う方法も知られてはいるが、細胞分離用として用いるためには、介在物の厳密な比重調整が必要で、かつ検体の比重分布そのものの個体差に影響されるため、安定した結果が得られない。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、比重の異なる二種以上の微粒子と特定の比重と形状を有する固体介在物を一緒に遠心することにより、高比重の微粒子を固体介在物の下方に、または低比重の微粒子を固体介在物の上方に移動させ、比重の異なる微粒子を互いに分離する方法を見つけた。

すなわち、本発明は、

(1) 比重の異なる二種以上の微粒子を含む微粒子群を、その微粒子群の比重の中間帯に位置する比重を持ち、微粒子群との接触面の外縁が遠心管に内接して上下に移動可能な固体介在物と共に遠心して、遠心管内壁と固体介在物との接触面を通して高比重微粒子を固体介在物の下方に、または低比重微粒子を固体介在物の上方に移動させると同時に固体介在物を比重の高低二粒子群の中間に移動、介在させることを特徴とする比重の異なる微粒子の分別法。

(2) 固体介在物の形状が、球状、楕円体状または微粒子群との接触面の少なくとも一部が遠心管内壁に対して鋭角で接触している柱状であることを特徴とする(1)記載の方法。

(3) 微粒子の粒径が $0.01 \sim 200 \mu\text{m}$ の範囲内にあることを特徴とする(1)記載の方法。

(4) 微粒子が液体中に懸濁しているかまたはコロイド状として存在していることを特徴とする(1)記載の方法。

(5) 微粒子を含む液体が、体液であることを特徴とする(1)記載の方法。

(6) 固体介在物が、寒天、ゼラチン、合成樹脂、セラミクス、タンパク質、多糖類から選ばれた一種であることを特徴とする(1)記載の方法。

(7) 遠心管内に、外縁が遠心管に内接し且つ上下移動が可能な固体介在物を収容したことを特徴とする(1)記載の方法を実施するための装置、である。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明において、分別の対象となる比重の異なる二種以上の微粒子とは、微粒子径が $0.01 \sim 200 \mu\text{m}$ 程度のもので、微粒子の種類、形状を問わず、比重の異なる二種以上の微粒子を含む微粒子群、特に微粒子が液体媒体中混在している状態の微粒子群である。その代表的なものは、体液、特に赤血球、白血球などの種々の比重の異なる細胞を含む血液である。その他、比重の異なるコロイド微粒子を含むコロイド液、ミセルを含む液、エマルション、サスペンションなども含まれる。本発明においては、特に体液中の細胞集団から赤血球を分離除去して有核細胞を採取するのに適している。

本発明に用いられる遠心管1は、材質、大きさ等は、特に限定されるものではなく、通常の遠心分離器に用いられるものであればよいが、半球状、半楕円体状、コーン状などの形状を有する底部6と、それに続く円筒状の胴部7からなるものがよい。遠心管の材質は、ガラス、合成樹脂、ゴム、金属等が用いられる。

【0006】

本発明に用いられる固体介在物2は、比重の異なる二種以上の微粒子が、液体に分散されている場合は、その液体に不溶のもので、遠心力が加わったとき微粒子が遠心管器壁と内接している固体介在物との間を移動しうる僅かの隙間を有しているものか、または、その

10

20

30

40

50

ような間隙を生む程度の柔軟性を有しているもの、すなわち、弾性体がよい。

固体介在物 2 の材質は、たとえば、寒天、ゼラチン、シリコン樹脂、ポリスチレン樹脂、ABS 樹脂、ポリウレタン樹脂等の合成樹脂、ガラスなどのセラミクス、タンパク質、多糖類等が挙げられる。

固体介在物 2 の比重は、その中に比重の異なる微粉末たとえば、シリカ、クレー、セラミクスパウダー、金属粉末などを必要量混合することにより調節することができる。

【0007】

本発明の特徴の一つは、固体介在物を微粒子群中に介在させ、固体介在物の微粒子群との分界面の形状を遠心力方向に直交する平面以外の形状、例えば、球状、楕円体状または微粒子群との接触面の少なくとも一部が遠心管内壁に対して鋭角で接触している柱状に設定したことである。

10

図 4 ~ 6 に示したように、遠心力により、微粒子群を含む液 10 の微粒子が整然とした比重勾配を形成する。ついで固体介在物 2 よりも高比重の微粒子 3 が遠心管内壁と固体介在物との接触面 9 の間を擦り抜けて順々に固体介在物の下方に移動し、その結果固体介在物 2 は上方に移動する。最終的な定常状態においては、固体介在物の面 8 と遠心管内壁との漸近により構成される狭い空間 5 に微粒子群は少量の比重勾配を残したまま拮抗する。従って、微粒子群自体の比重にロット差がある場合でも、目的とする低比重微粒子 4 を他の微粒子の混在が少ない状態で安定して分別することができる。

固体介在物 2 の望ましい形状の一つは、球（図 3）または楕円体である。他の望ましい形状は、固体介在物が微粒子群に接している面と遠心力方向、すなわち遠心管内壁とのなす角度が鋭角である柱状体（図 1 および 2）である。この場合の角度は、20 ~ 70 度が好ましく、30 ~ 60 度であることがより好ましい。

20

固体介在物が微粒子と接する面 8 は、平面であっても、曲面であってもよい。固体介在物の比重は、微粒子分別の目的に応じて適宜選択することができるが、分別しようとする二つの微粒子の比重の間にくるように適当な比重を有する物質を混入することで、その比重を任意に調節することができる。

【0008】

遠心管底部内壁には、遠心した際、固体介在物が遠心管の上下に移動しやすくするために、パラフィン等の離型剤を塗布しておくこともできる。

次に本発明の代表的な実施方法について、図面を参照しながら説明する。

30

まず、図 4 に示される通り、半径 r の半球状の底部 6 とそれに続く円筒状胴部 7 を有する遠心管 1 に、上面に傾斜面 8 を有する固体介在物 2 を、遠心管 1 に内接するように配置する。この遠心管 1 に赤血球 3（高比重微粒子）と有核細胞 4（低比重微粒子）の比重の異なる二種の微粒子を含む血液 10 を入れ、遠心管を遠心機にかける。遠心を始めると、高比重である赤血球 3 が固体介在物傾斜面と遠心管内壁が漸近してくる部分 5 に集まり、さらに遠心力が加わるとその赤血球 3 は、遠心管内壁と固体介在物との間 5 を擦り抜けて固体介在物の下方に移動し、一方固体介在物 2 は、赤血球との比重差により生じる負の遠心力により押し上げられて上方に移動する。遠心終了時点では、血球は低比重から高比重へと整然と積層する。そして、固体介在物の下方には大部分の赤血球 3 が移動し、有核細胞 4 と赤血球 3 とが接する界面 9 に固体介在物 2 が介在する。

40

比重の異なる二種以上の微粒子の混合物 10 は、固体介在物の下方に配置してもよい。この場合は、まず、遠心管に、比重の異なる二種以上の微粒子の混合物 10 を入れ、その上に成形された固体介在物 2 を挿入する。この場合の固体介在物の形状は、球形または楕円形のものが、挿入が容易であることにおいて好ましい。この比重の異なる二種以上の微粒子の混合物と固体介在物を収容した遠心管を遠心すると低比重微粒子 4 が遠心管内壁と固体介在物との接触面の間 9 を擦り抜けて固体介在物の上方に移動し、高比重粒子 3 が固体介在物の下方に留まる。その際、固体介在物 2 は、低比重粒子 4 が上方に移動した分だけ下方に移動する。

遠心する場合の遠心力と時間は、分別しようとする微粒子の種類や量により適宜決めればよい

50

遠心後は、固体介在物より上にある低比重微粒子 4 を含む液相を遠心管の傾斜により、又は、ピペットなどの吸引具により取り出すことにより、容易に高低二群の微粒子を分別することができる。

【 0 0 0 9 】

【実施例】

実施例 1

シリカ粉末で比重調節し加熱融解した寒天（比重 1 . 0 5 ） 3 m l を予め内壁にパラフィン塗布した 1 5 m l 容の遠心管に注ぎ、冷却して固化させ、遠心管に内接する大きさの上面が遠心力ベクトル軸方向に対して約 6 0 度の斜面を形成している固体介在物を成形した。この遠心管にヒト末梢血（比重：約 1 . 0 5 6 ） 5 m l を注ぎ、遠心装置にかけて 3 0 0 G で、1 5 分間遠心した。固体介在物の傾斜面の下部に沈降した赤血球（平均比重：1 . 0 9 6 ）が器壁を伝って固体介在物の下方に移動し、同時に固体介在物が上方に押し上げられた。最終的には固体介在物の上方に白血球と血漿成分（比重：1 . 0 2 1 5 ）を含む画分が残し、下方に赤血球が集積した。

10

【 0 0 1 0 】

この実験の結果を〔表 1 〕に纏めた。

実施例 2

固体介在物の遠心管内壁と接するポリスチレン樹脂製の球（比重 1 . 0 5 ）を用い、5 0 0 G で 2 0 分遠心した外は実施例と同様に血液を処理した。その結果も〔表 1 〕に纏めた。

20

【 0 0 1 1 】

【表 1 〕

		遠 心 前	実施例 1	実施例 2
			角度 $\alpha = 60^\circ$	球
遠心力 G × 分		0	300 × 15	500 × 20
血液の容量 (m l)		5	214	2.3
赤血球	数 ($\times 10^4 / \mu l$)	556	194	30
	ヘモグロビン (g / d l)	16	5.6	0.8
	ヘマトクリット (%)	52.6	18.9	3.4
白血球	総数 ($/ \mu l$)	6900	14500	14000
	顆粒球の数 ($/ \mu l$)	2300	6200	4100
	リンパ球の数 ($/ \mu l$)	4600	8300	9900
回収率	赤血球 (%)	100	16.7	2.5
	白血球 (%)	100	89.9	93.3

30

40

【 0 0 1 2 】

【発明の効果】

本発明の方法は、比較的簡単な装置を用いて、従来法の遠心分離操作を行うだけで、比重の異なる二種以上の微粒子を含む微粒子群を、比重の高低二群に高い精度で分画することができる。特に、血液中から赤血球を分離し、有核細胞である白血球を摂取するのに極めて適した方法である。

【図面の簡単な説明】

50

【図 1】傾斜した上面を有する固体介在物の平面図

【図 2】傾斜した上面を有する固体介在物の垂直断面図

【図 3】球状の固体介在物を配置した遠心管の垂直断面図

【図 4】遠心前の傾斜した上面を有する固体介在物を収容した遠心管垂直断面の模式図

【図 5】遠心中の傾斜した上面を有する固体介在物を収容した遠心管垂直断面の模式図

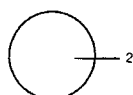
【図 6】遠心終了時の傾斜した上面を有する固体介在物を収容した遠心管垂直断面の模式図

【符号の説明】

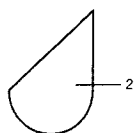
- 1 . 遠心管
- 2 . 固体介在物
- 3 . 赤血球
- 4 . 有核細胞
- 5 . 固体介在物の傾斜した上面と遠心管内壁が漸近する部分
- 6 . 遠心管底部
- 7 . 遠心管胴部
- 8 . 固体介在物の微粒子群と接触する面
- 9 . 低比重微粒子と高比重微粒子とが接する面
- 10 . 血液

10

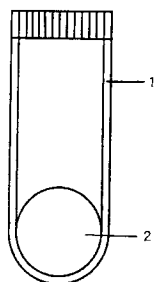
【図 1】



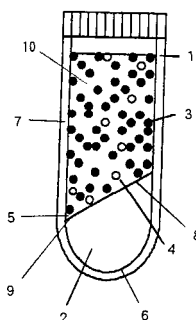
【図 2】



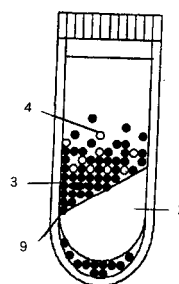
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【 図 6 】

