

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月1日(01.02.2024)



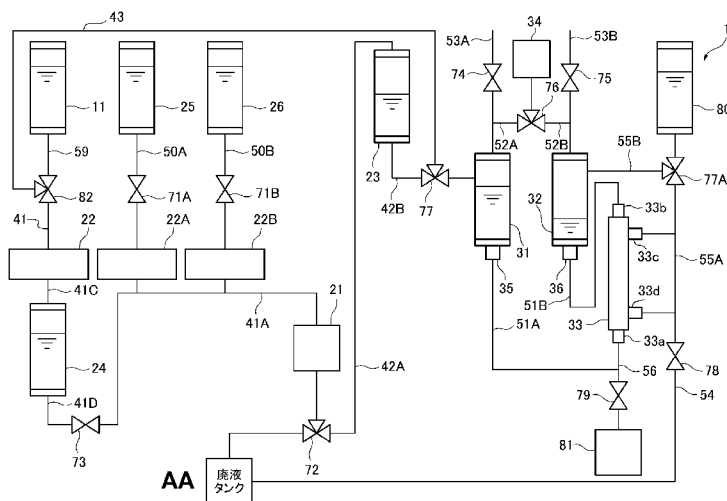
(10) 国際公開番号

WO 2024/024336 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) C12M 1/12 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C07K 1/34 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/022644
- (22) 国際出願日: 2023年6月19日(19.06.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-120666 2022年7月28日(28.07.2022) JP
- (71) 出願人: 株式会社ダイセル (DAICEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町3番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 昌子 弘一 (SHOJI, Koichi); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 ダイセン・メンブレン・システムズ株式会社内 Tokyo (JP). 佐藤 浩志 (SATO, Hiroshi); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 ダイセン・メンブレン・システムズ株式会社内 Tokyo (JP). 中塚 修志 (NAKATSUKA, Shuji); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 ダイセン・メンブレン・システムズ株式会社内 Tokyo (JP). 内村 誠一 (UCHIMURA, Seiichi); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 株式会社ダイセル内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 園田・小林弁理士法人 (SONODA & KOBAYASHI INTELLECTUAL PROPERTY

(54) Title: PURIFYING AND CONCENTRATING DEVICE FOR LIQUID COMPRISING MINUTE USEFUL SUBSTANCE AND METHOD FOR PRODUCING PURIFIED AND CONCENTRATED LIQUID OF MINUTE USEFUL SUBSTANCE USING SAME

(54) 発明の名称: 微小有用物質を含む液の精製濃縮装置及びそれを用いた微小有用物質の精製濃縮液の製造方法



AA Waste liquid tank

(57) Abstract: Provided are: a purifying and concentrating device for a liquid comprising a minute useful substance, the device being capable of producing a liquid (purified concentrated liquid of a minute useful substance) comprising a minute useful substance having high purity and high concentration and capable of preparing said purified and concentrated liquid more efficiently; and a method for producing a purified and concentrated liquid of a minute useful substance using said device. The purifying and concentrating device for the liquid comprising the minute useful substance, the device comprising: a starting material supply part for supplying liquid comprising the minute useful substance; a removing part for removing impurities in the liquid; a purifying and concentrating part for purifying the liquid supplied from the starting

LAW); 〒1630434 東京都新宿区西新宿二丁目 1
番 1 号 新宿三井ビル 3 4 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

material supply part or the removing part using a hollow fiber membrane and concentrating the liquid; and a first control part for controlling the timing of flow of the liquid from the starting material supply part to the purifying and concentrating part or flow of the liquid from the removing part to the purifying and concentrating part.

(57) 要約: 微小有用物質を高純度かつ高濃度で含む液(微小有用物質の精製濃縮液)を製造可能であり、かつより効率的に前記精製濃縮液を調製できる、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置及びそれを用いた微小有用物質の精製濃縮液の製造方法を提供する。微小有用物質を含む液を供給する原料供給部と、前記液中の不純物を除去する除去部と、前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮する精製濃縮部と、前記原料供給部から前記精製濃縮部への前記液の流通、又は、前記除去部から前記精製濃縮部への前記液の流通のタイミングを制御する第一制御部とを含む、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置。

明 細 書

発明の名称：

微小有用物質を含む液の精製濃縮装置及びそれを用いた微小有用物質の精製濃縮液の製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置と、それを用いた微小有用物質の精製濃縮液の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、核酸などの微小有用物質を含む液から、前記微小有用物質を分離精製する方法としては、例えば、分離膜を用いた方法が知られている。

[0003] 特許文献1には、細胞の培養槽から培養液を排出し、排出した培養液と同量の新鮮培地を前記培養槽に加えるブリーディング工程と、前記培養槽から抽出した培養液を、実質的に緻密層を有しない多孔膜を用いて濾過する濾過工程とを含み、前記濾過工程における濾過がタンジェンシャルフロー濾過であり、前記濾過工程における透過液の速度が1.0 L/MH以下である、有用物質を回収する方法が記載されている。特許文献1には、前記微小有用物質が、タンパク質、ウィルス、エクソソーム、及び核酸からなる群から選択されてもよいことが記載されている。

[0004] また、特許文献2には、細胞外小胞の1種であるエクソソームを効率的かつ大量に採取可能なエクソソーム抽出装置及びエクソソーム抽出方法が記載されている。特許文献2に記載のエクソソーム抽出装置は、原料供給部から供給されたエクソソームを含む原料液体を第一貯留部に送液した後、前記第一貯留部から、それぞれ役割の異なる、第一フィルター及び第二フィルターを含む循環経路を循環させて、液体内のエクソソームを濃縮している。

[0005] 特許文献1：特開2018-76291号公報

特許文献2：特開2021-145649号公報

発明の概要

[0006] 一般に、微小有用物質を含む原料液体中には不純物が含まれていることが多い。そのため、微小有用物質を高純度かつ高濃度で含む液（微小有用物質の精製濃縮液）を調製できる精製濃縮装置が求められている。また、より効率的に前記精製濃縮液を調製できる精製濃縮装置も求められている。

[0007] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、微小有用物質を高純度かつ高濃度で含む液（微小有用物質の精製濃縮液）を製造可能であり、かつより効率的に前記精製濃縮液を調製できる、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置及びそれを用いた微小有用物質の精製濃縮液の製造方法を提供することを目的とする。

[0008] 上記課題を解決するために、本開示では以下の手段を採用できる。

[1] 微小有用物質を含む液を供給する原料供給部と、前記液中の不純物を除去する除去部と、前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮する精製濃縮部と、前記原料供給部から前記精製濃縮部への前記液の流通、又は、前記除去部から前記精製濃縮部への前記液の流通のタイミングを制御する第一制御部とを含む、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置。

[2] 前記除去部が、前記液内の不純物を除去し、不純物を除去した後の前記液を前記精製濃縮部に供給する流路が接続された担体カラムを備える、[1]に記載の精製濃縮装置。

[3] 前記除去部が、前記液内の不純物を除去するろ過部材を備え、前記ろ過部材は、前記原料供給部から前記除去部へ前記液を供給する流路中に介装されている、[1]または[2]に記載の精製濃縮装置。

[4] 前記除去部が、前記担体カラムで処理した前記液を貯留する第一タンクを備え、前記第一タンクは、前記担体カラムから前記精製濃縮部へ前記液を供給する流路中に配置され、かつタンク内の前記液を前記精製濃縮部に供給する流路が接続されており、前記第一制御部は、前記タンク内の前記液を前記精製濃縮部へ供給するタイミングを制御する、[2]または[3]に記

載の精製濃縮装置。

〔５〕前記中空糸膜の、平均内径が０．２～１．４ｍｍであり、分画分子量が１万～１００万である、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔６〕前記精製濃縮部が、複数の前記中空糸膜が前記液の出入口を有する容器内に收容された中空糸膜モジュールを備え、前記容器は、前記中空糸膜に前記液を供給するための、第一の液の出入口及び第二の液の出入口と、前記中空糸膜を透過した前記液を排出するための第三の液の出入口を、少なくとも有する、〔１〕から〔５〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔７〕前記中空糸膜モジュールが内圧式である、〔６〕に記載の精製濃縮装置。

〔８〕前記精製濃縮部は、前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第二タンクと、前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第二の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第三タンクと、前記第二タンク又は前記第三タンクのいずれかを選択的に加圧する加圧装置と、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記中空糸膜モジュールに交互に供給するよう制御する第二制御部とを備える、〔６〕または〔７〕に記載の精製濃縮装置。

〔９〕前記第二制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を設定し、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量が設定された値となるように、前記加圧装置で前記第二タンク及び前記第三タンクを交互に加圧する、〔８〕に記載の精製濃縮装置。

〔１０〕前記第二タンク及び前記第三タンクは、タンク底部の前記液の出入口に光センサーを含むタンク内液量監視装置をそれぞれ備え、前記タンク内液量監視装置は、前記光センサーで前記液の出入口内に光を照射して光の透

過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の液量を監視するよう構成されており、前記第二制御部は、前記タンク内液量監視装置で前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を判断して、前記加圧装置で加圧するタンクを決定する、〔 9 〕に記載の精製濃縮装置。

〔 1 1 〕 前記精製濃縮部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置を監視するカメラを備え、前記第二制御部は、前記カメラから出力された前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置の情報に基づいて、前記加圧装置で加圧するタンクを決定する、〔 9 〕または〔 1 0 〕に記載の精製濃縮装置。

〔 1 2 〕 前記精製濃縮部が、希釈液を貯留し、前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給する流路が接続された第四タンクと、前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給するタイミングを制御する第三制御部とを備え、前記第三制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量の合計が、前記第二制御部で設定した値以下となった場合に、前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口から供給する、〔 8 〕から〔 1 1 〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔 1 3 〕 前記精製濃縮部が、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口又は前記第二の液の出入口と流路で接続され、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を回収する第五タンクと、前記第五タンクへの前記液の回収を制御する第四制御部とを備える、〔 8 〕から〔 1 2 〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔 1 4 〕 前記第二タンク及び前記第三タンクは、タンク底部の前記液の出入口に光センサーを含むタンク内液量監視装置をそれぞれ備え、前記タンク内液量監視装置は、前記光センサーで前記液の出入口内に光を照射して光の透過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の液量を監視するよう構成されており、前記第四制御部は、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して前記第二タンク及び前記第三タンク内の

前記液を前記第五タンクへ回収し、前記タンク内液量監視装置で前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を判断して、前記加圧装置を停止させる、
〔１３〕に記載の精製濃縮装置。

〔１５〕前記精製濃縮部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置を監視するカメラを備え、前記第四制御部は、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記第五タンクへ回収し、前記カメラから出力された前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置の情報に基づいて前記加圧装置を停止させる、〔１３〕または〔１４〕に記載の精製濃縮装置。

〔１６〕前記原料供給部、前記除去部、及び前記精製濃縮部を含む要素がハウジング内に配置された構成とされ、前記ハウジング内のクリーン度を管理する管理部を備え、前記管理部は、ろ過空気を前記ハウジング内に供給するファンフィルター装置を備える、〔１〕から〔１５〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔１７〕前記管理部は、ＵＶランプをさらに備える、〔１６〕に記載の精製濃縮装置。

〔１８〕前記除去部が、前記担体カラムを洗浄する洗浄液を貯留する第六タンクと、前記担体カラムを平衡化する平衡化液を貯留する第七タンクとを備える、〔２〕から〔１７〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔１９〕前記ろ過部材は、前記原料供給部の下部に配置されており、前記原料供給部から前記ろ過部材への前記液の供給が前記液の自重によって行われる、〔３〕から〔１８〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔２０〕前記第二タンク及び前記第三タンクの長手方向の側面が、前記中空糸膜モジュールの長手方向と平行となるように配置されている、〔８〕から〔１９〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔２１〕前記除去部が、前記液内の不純物を除去し、不純物を除去した後の前記液を前記精製濃縮部に供給する流路が接続された担体カラムと、前記担体カラムで処理した前記液を貯留する第一タンクを備え、前記第二タンク及

び前記第三タンクは、前記担体カラム及び前記第一タンクと流路で接続され、かつ前記担体カラム及び前記第一タンクの上方位置に配置されている、〔20〕に記載の精製濃縮装置。

〔22〕前記微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択される、〔1〕から〔21〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔23〕〔1〕から〔22〕のいずれかに記載の精製濃縮装置を用いて、微小有用物質が精製濃縮された前記液を製造する方法であって、前記微小有用物質を含む原料液を前記精製濃縮装置に供給して、前記液中の不純物を除去すること、及び／又は前記液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮することを含む、微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔24〕前記液中の不純物を除去することが、担体カラムで前記液中の不純物を吸着除去することを含む、〔23〕に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔25〕前記液を前記中空糸膜で精製し、濃縮することが、中空糸膜モジュールで前記液を交互タンジェンシャルフローろ過することを含む、〔23〕または〔24〕に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔26〕前記液を前記中空糸膜で精製し、濃縮することが、前記中空糸膜の表面に堆積した前記微小有用物質を回収しながら、中空糸膜モジュールで前記液を交互タンジェンシャルフローろ過することを含む、〔23〕から〔25〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔27〕前記液を前記中空糸膜で精製し、濃縮することが、濃縮された前記液に希釈液を供給してさらに精製し、濃縮することを含み、前記希釈液は、前記原料液の量（A）に対する、前記濃縮された前記液の量（B）（ B/A ）が、 $1/2 \sim 1/200$ となった場合に、前記液に供給される、〔23〕から〔26〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔28〕前記担体カラムで前記液中の不純物を除去することと、前記中空糸膜で精製し、濃縮することが並行して行われる、〔24〕から〔27〕のい

ずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔29〕前記微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択される、少なくとも1つである、〔23〕から〔28〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔30-1〕微小有用物質を含む液を供給する原料供給部と、前記原料供給部から供給された前記液を中空糸膜モジュールで精製し、濃縮する前記精製濃縮部とを含み、前記中空糸膜モジュールは、前記液を中空糸膜に供給するための、第一の液の出入口及び第二の液の出入口と、前記中空糸膜を透過した前記液を排出するための第三の液の出入口とを有し、前記精製濃縮部は、前記原料供給部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第二タンクと、前記原料供給部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第二の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第三タンクと、前記第二タンク及び前記第三タンクのいずれかを選択的に加圧する加圧装置と、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記中空糸膜モジュールに交互に供給するよう制御する第二制御部と、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液の量を監視する監視装置とを備え、前記第二制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を設定し、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量が設定された値となるように、前記加圧装置で前記第二タンク及び前記第三タンクを交互に加圧し、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量は、前記監視装置の情報に基づいて判断される、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置。

〔30-2〕微小有用物質を含む液を供給する原料供給部と、

前記原料供給部から供給された前記液を中空糸膜モジュールで精製し、濃縮する精製濃縮部とを含み、前記中空糸膜モジュールは、前記液を中空糸膜に供給するための、第一の液の出入口及び第二の液の出入口と、前記中空糸膜を透過した前記液を排出するための第三の液の出入口とを有し、前記精製

濃縮部は、前記原料供給部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第二タンクと、前記原料供給部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第二の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第三タンクと、前記第二タンク及び前記第三タンク内のいずれかの前記液を前記中空糸膜モジュールに選択的に送液する送液装置と、前記送液装置を、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記中空糸膜モジュールに選択的に供給するように制御する第二制御部と、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液の量を監視する監視装置とを備え、前記第二制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を設定し、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量が設定された値となった場合に、前記送液装置が前記第二タンク又は前記第三タンクから前記中空糸膜モジュールに選択的に送液するように制御し、

前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量は、前記監視装置の情報に基づいて判断される、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置。

〔３１〕前記中空糸膜の、平均内径が０．２～２．０ｍｍであり、分画分子量が５，０００～３００万である、〔３０－１〕又は〔３０－２〕に記載の精製濃縮装置。

〔３２〕前記監視装置が、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置を監視するカメラを備える、〔３０－１〕から〔３１〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔３３〕前記監視装置が、前記第二タンク及び前記第三タンクの底部の前記液の出入口にそれぞれ設けられ、前記液の出入口内に光を照射して光の透過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の前記液の量を監視する光センサーを備える、〔３０－１〕から〔３２〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔３４〕前記中空糸膜モジュールが内圧式である、〔３０－１〕から〔３３〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔３５〕前記精製濃縮部が、希釈液を貯留し、前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給する流路が接続された第四タンクと、前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給するタイミングを制御する第三制御部とを備え、前記第三制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量の合計が、前記第一制御部で設定した値以下となった場合に、前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口から供給する、〔３０－１〕から〔３４〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔３６〕前記精製濃縮部が、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口又は前記第二の液の出入口と流路で接続され、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を回収する第五タンクと、前記第五タンクへの前記液の回収を制御する第四制御部とを備える、〔３０－１〕から〔３５〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔３７〕前記第四制御部は、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記第五タンクへ回収し、前記監視装置で前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量を判断して、前記加圧装置を停止させる、〔３６〕に記載の精製濃縮装置。

〔３８〕前記微小有用物質が、電気活性高分子、レアメタルコロイド粒子、顔料、染料、無機又は有機ナノ粒子、タンパク質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、血管新生因子、成長因子、酵素、抗体、血漿タンパク、ウィルス、細胞外小胞、酵母、イースト、細胞、多糖類、及び微細藻類から選択される、〔３０－１〕から〔３７〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔３９〕前記中空糸膜の少なくとも一部に、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子が付着している、〔１〕から〔３８〕のいずれかに記載の精製濃縮装置。

〔４０〕前記中空糸膜モジュールが、少なくとも２つの第三の液の出入口を有し、前記第三制御部は、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口

及び前記第二の液の出入口の前記液の流通を止めた状態で、前記第四タンク内の前記希釈液を、前記中空糸膜モジュールが有する少なくとも2つの前記第三の液の出入口のうちの1つから供給し、その後、前記第一の液の出入口及び前記第二の液の出入口を前記液の流通を可能にした状態で、前記第四タンク内の前記希釈液を、前記中空糸膜モジュールが有する少なくとも2つの前記第三の液の出入口のうちの少なくとも1つから供給する、[12]から[22]のいずれか、または[35]から[39]のいずれかに記載の精製濃縮装置。

[41] 微小有用物質と不純物とを含む原料の液から、不純物を除去したのち、前記液を精製濃縮して、微小有用物質の精製濃縮液を製造する方法であって、前記液を精製濃縮することが、中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することを含み、かつ前記精製濃縮の過程において、前記中空糸膜モジュールの透過液側から希釈液を圧入して、前記中空糸膜を逆洗浄処理することを含む、微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[42] 前記中空糸膜モジュールに收容される前記中空糸膜が、セルロースアセテートを含む樹脂材料により構成されている、[41]に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[43] 前記中空糸膜モジュールに收容される前記中空糸膜の分画分子量が、10万～100万である、[42]に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[44] 前記液中の不純物を除去することが、担体カラムで前記液中の不純物を吸着除去することを含む、[41]から[43]のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[45] 前記中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することが、前記液を交互タンジェンシャルフローろ過することを含む、[41]から[44]のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[46] 前記中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することが、精製濃縮された前記液に希釈液を供給してさらに精製濃縮することを含み、前

記希釈液は、前記原料の液の量（A）に対する、前記精製濃縮された前記液の量（B）（ B/A ）が、 $1/2 \sim 1/200$ となった場合に、前記液に供給される、〔41〕から〔45〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔47〕前記担体カラムで前記液中の不純物を除去することと、前記中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することとが、並行して行われる、〔44〕から〔46〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔48〕前記微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択される、少なくとも1つである、〔41〕から〔47〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔49〕前記中空糸膜の少なくとも一部に、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子が付着している、〔41〕から〔48〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

〔50〕前記逆洗処理することに先立ち、前記中空糸膜モジュールをフラッシング処理することを含む、〔41〕から〔49〕のいずれかに記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[0009] 本開示によれば、微小有用物質を高純度かつ高濃度で含む液（微小有用物質の精製濃縮液）を製造可能であり、かつより効率的に前記精製濃縮液を調製できる、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置及びそれを用いた微小有用物質の精製濃縮液の製造方法を提供できる。また、本開示の精製濃縮装置は、自動制御によって微小有用物質を精製濃縮できる装置としても有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]第一の実施形態に係る精製濃縮装置の一例を示す概略構成図である。

[図2]第一の実施形態に係る除去部の一例を示す概略構成図である。

[図3]第一の実施形態に係る除去部の一例を示す概略構成図である。

[図4]第一の実施形態に係る除去部の一例を示す概略構成図である。

[図5]第一の実施形態に係る除去部の一例を示す概略構成図である。

[図6]第一の実施形態に係る除去部の一例を示す概略構成図である。

[図7]本開示の精製濃縮装置における中空糸膜モジュールの一例を示す概略断面図である。

[図8]第一の実施形態に係る精製濃縮部の一例を示す概略構成図である。

[図9]第一の実施形態に係る精製濃縮部の一例を示す概略構成図である。

[図10]第一の実施形態に係る精製濃縮部の一例を示す概略構成図である。

[図11]第一の実施形態に係る精製濃縮部の一例を示す概略構成図である。

[図12]第一の実施形態に係る精製濃縮装置の一例を示す概略構成図である。

[図13]第一の実施形態に係る精製濃縮装置の全体構成の一例を示す概略構成図である。

[図14]第二の実施形態に係る精製濃縮装置の全体構成の一例を示す概略構成図である。

[図15]中空糸膜の γ -グロブリン透過率を測定するための装置の一例である。

[図16]第一の実施形態に係る精製濃縮装置を用いた精製濃縮処理の一例を示すフローチャートである。

[図17]実施例4及び比較例3で得られた濃縮液をBCA assayにより測定した結果を示すグラフである。

[図18]実施例4及び比較例3で得られた濃縮液の吸光度チャートである。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、図面を用いて本開示の一例を説明するが、各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は、一例であって、本開示の主旨から逸脱しない範囲内で、適宜、構成の付加、省略、置換、及びその他の変更が可能である。本開示は、実施形態によって限定されることはなく、クレームの範囲によってのみ限定される。また、特定のパラメータについて、複数の上限値及び下限値が記載されている場合、これらの上限値及び下限値の内、任意の上限値と下限値とを組合せて好適な数値範囲とすることができる。

[0012] [微小有用物質を含む液の精製濃縮装置]

本開示は、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置に関する。本開示の精製濃縮装置は第一の実施形態及び第二の実施形態を有する。以下、本開示の精製濃縮装置の第一の実施形態について、図面を用いて説明する。

[0013] [第一の実施形態]

図1は本開示の第一の実施形態の一例である精製濃縮装置1（以下、「精製濃縮装置1」と記載する）を示す概略構成図である。本開示の精製濃縮装置1は、微小有用物質を含む原料を供給する原料供給部10と、液中の不純物を除去する除去部20と、原料供給部10又は除去部20から供給された液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮する精製濃縮部30と、原料供給部10から精製濃縮部30への液の流通、又は、除去部20から精製濃縮部30への液の流通のタイミングを制御する第一制御部110とを含む。原料供給部10の液は流路41を介して除去部20に供給されるか、または流路43を介して精製濃縮部30へ供給される。また除去部20の液は流路42を介して精製濃縮部30へ供給される。本開示の精製濃縮装置1は、微小有用物質を高純度かつ高濃度で含む液（微小有用物質の精製濃縮液）を製造可能であり、かつより効率的に前記精製濃縮液を調製できる。また、自動制御によって微小有用物質を精製濃縮できる装置としても有用である。なお、本開示において、「流路」とは、液が流れる管路のことを指す。

[0014] <原料供給部>

原料供給部10には、微小有用物質を含む液の原料液（以下、「原料液」と記載する）が貯留される。原料供給部10内の原料液は、その純度、すなわち、原料液内の不純物の濃度に応じて、除去部20又は精製濃縮部30へ供給される。原料液内の不純物の濃度が高い場合は、原料液が除去部20へ供給されるように設定し、原料液内の不純物の濃度が低い場合は、原料液が精製濃縮部30へ供給されるように設定できる。原料供給部10には、除去部20に原料液を供給するための流路41と、精製濃縮部30に原料液を供給するための流路43が接続されている。

[0015] 原料供給部 10 は、原料液を貯留する容器を有する。前記容器は、精製濃縮装置 1 に固定されていてもよく、容易に取り外しできるように設置されていてもよい。容器が容易に取り外しできるように設置されている場合、原料供給部 10 は容器を固定するための固定部材等の各種設備を含むことができる。

[0016] 原料液を貯留する容器の形状及びその容積は特に限定されず、微小有用物質の種類、原料液の量等に応じて決定できる。一実施形態において、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸等から選択される微小有用物質を含む原料液を精製濃縮する場合、前記容器の容積は、50～5,000 mL であってもよく、200～2,000 mL であってもよい。

[0017] <除去部>

除去部 20 は、流路 41 を介して原料供給部 10 から供給された原料液内の不純物を除去する。この構成によれば、微小有用物質の精製濃縮液を効率的に調製できる。以下、除去部 20 で不純物が除去された液を、「粗精製液」と記載する。

[0018] 図 2～6 に、除去部 20 のいくつかの代表的な概略構成例を示す。

図 2 に示す除去部 20 には、原料液内の不純物を除去する担体カラム 21 が設けられている。担体カラム 21 の一方は流路 41 と接続され、他方は粗精製液を精製濃縮部 30 に供給するための流路 42 と接続されている。担体カラム 21 からの流路 42 には廃液タンク（後述する）に液を排出するための流路（後述する）が接続されていてもよい。

除去部 20 には担体カラム 21 に替えて、原料液内の不純物を吸着除去できる吸着材が充填された容器を備えた装置が設けられていても良い。それらの容器内では、攪拌や振動・振とう等の作用によって原料液内の不純物を吸着材へ吸着させて、不純物を除去・低減することができる。このような装置として、ローテーターを用いることもできる。不純物が吸着された充填剤は、任意のフィルトレーションユニットによって、除去できる。

[0019] 図 3 に示す除去部 20 は、担体カラム 21 と、担体カラム 21 で処理した

粗精製液を貯留する第一タンク 23 とを備える。第一タンク 23 は流路 42 中に配置されている。つまり、流路 42 は、第一タンク 23 を挟んで、担体カラム 21 側に位置する流路 42A と、精製濃縮部側に位置する流路 42B とに分かれて配置されている。粗精製液が担体カラム 21 から流路 42A を介して第一タンク 23 に貯留され、第一タンク 23 に貯留された粗精製液は流路 42B を介して精製濃縮部 30 に供給される。流路 42B には、三方弁 77 が設けられている。第一制御部 110 は、精製濃縮部 30 での粗精製液の処理状況に応じて、流路 42B 内の三方弁 77 を精製濃縮部 30 側に開けて、第一タンク 23 内の粗精製液を精製濃縮部 30 に供給する。この構成によれば、粗精製液を第一タンク 23 に一旦貯留した後、精製濃縮部 30 に供給できるため、除去部 20 での不純物除去処理と精製濃縮部 30 での精製濃縮処理とを並行して行うことができる。その結果、効率的に精製濃縮処理を行うことができる。図 4～6 に示す除去部 20 の構成については後述する。

[0020] (担体カラム)

担体カラム 21 には、原料液内の微小有用物質以外の不純物を除去できる材料が充填されている。前記材料は、原料液内の不純物を吸着除去できる吸着材であることが好ましい。

吸着材としては、前記不純物を吸着保持できる多孔質粒状物が好ましい。多孔質粒状物とは、その表面及び内部に多数の細孔を有する粒状の物質を指し、高分子の多孔質粒状物や無機材料の多孔質粒状物を用いることができる。精製濃縮装置 1 で処理する原料液に含まれる微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素及び核酸等の生体物質である場合、前記多孔質粒状物としては、細孔内部が正に荷電されているものが好ましい。

これらの多孔質粒状物は、1 または異なる吸着性能を有している複数のものを組み合わせて使用することができる。

異なる吸着性能を有している複数の多孔質粒状物は、細孔径が異なるもの、多孔質粒状物の比表面積が異なるもの、多孔質粒状物の平均粒子径が異なるもの、多孔質粒状物を構成する基材の種類が異なるもの、多孔質粒状物の

細孔内部表面に存在する官能基の種類や密度が異なるもの等が例示できる。

このような多孔質粒状物としては、例えば、セルロース、アガロース、デンプン、アミロース、デキストラン、プルラン、グルコマンナンなどの多糖類、ポリアクリル酸またはその誘導体、ポリビニルアルコール、ナイロン、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどの合成高分子、ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、ヒドロキシアパタイト等を基材とするものが挙げられる。これらは1種単独で用いられてもよく、2種以上を併用してもよい。また、イオン交換とサイズ排除を有するミックスモード担体、好ましくはカチオン交換とサイズ排除を有するミックスモード担体であってもよい。

[0021] 前記多孔質粒状物は、原料液中に含まれる不純物の種類等に応じて、平均細孔径が0.1～1,000nmの範囲のものから選択できる。なお、前記平均細孔径は、水銀圧入法や逆サイズ排除クロマトグラフィーにより測定できる。

また、前記多孔質粒状物は、原料液中に含まれる不純物の種類等に応じて、平均粒子径が1～1,000 μ mの範囲のものから選択してもよい。前記平均粒子径は、レーザー回析散乱法により測定することができる。

[0022] 一実施形態において、精製濃縮装置1で処理する原料液に含まれる微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素及び核酸等の生体物質である場合、担体カラム21は、抗体カラムを含んでいてもよい。「抗体カラム」とは、抗原（不純物）と結合できる抗体が固定された担体を充填したカラムを指す。原料液が前述の生体物質を含む場合、前記生体物質以外の不純物と結合（吸着）できる抗体を固定した担体を充填した抗体カラムを採用できる。なお、前述の生体分子を微小有用物質として含む原料液中には、複数種類の不純物が含まれていることが多いため、不純物の種類に応じた複数の抗体カラムを用いてもよい。

[0023] また、担体カラム21に替えて、複数本の担体カラムを組み合わせてモジュール化したもの（カラムモジュール）を採用することもできる。カラムモ

ジュールを用いる場合、それぞれの担体カラムに内包される吸着材の種類は、同じであってもよく、異なってもよい。また、担体カラムの内径や長さも、同じであってもよく、異なってもよい。

[0024] 図4に示す除去部20は、担体カラム21を洗浄するための洗浄液を貯留する第六タンク25（洗浄液貯留タンク）と、担体カラム21を平衡化するための平衡化液を貯留する第七タンク26（平衡化液貯留タンク）とを備える。図4の除去部20において、第六タンク25は流路50Aを經由して流路41へ洗浄液を供給できるように構成されている。また、第七タンク26は流路50Bを經由して流路41へ平衡化液を供給できるように構成されている。流路50A及び50Bには、開閉弁71A及び71Bが配置されている。担体カラム21から粗精製液を精製濃縮部30に供給する流路42には、三方弁72が設けられている。

[0025] 一実施形態において、1バッチ分の原料液を処理して吸着飽和に達した担体カラム21を洗浄、平衡化処理して、さらに次の1バッチの原料液の処理を行うことが好ましい。担体カラム21の洗浄、平衡化処理は、流路50A及び50Bに設けられた開閉弁71A及び71Bを開けて、第六タンク25及び第七タンク26から洗浄液及び平衡化液を担体カラム21に供給することで実施できる。担体カラム21を処理した後の洗浄液及び平衡化液は、流路42に設けられた三方弁72から廃液タンク（後述する）に排出されるよう構成されることが好ましい。

[0026] （洗浄液及び平衡化液）

担体カラム21を洗浄する洗浄液としては、例えば、塩化ナトリウム水溶液、塩酸、クエン酸、次亜塩素酸ナトリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液等を採用できる。安全性の観点からは、塩化ナトリウム水溶液を用いることが好ましい。担体カラム21内に洗浄液が流れ込むと、担体カラム21内の吸着材に付着した不純物が除去される。洗浄液で除去した後、担体カラム21の平衡化を行う。平衡化液としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液（PBS）、トリス塩酸緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸リ

ン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等を採用できる。

なお、洗浄液及び平衡化液を貯留する第六タンク 25、第七タンク 26 の材質としては特に限定されず、例えば、後述する第二タンク 31 及び第三タンク 32 と同じ構成としてもよい。タンク内の貯留液の量を目視で確認しやすい観点からは、第六タンク 25、第七タンク 26 は透明性を有していることが好ましい。

[0027] 図 5 に示す除去部 20 は、担体カラム 21 に液を供給する前に、液内の不純物を除去するろ過部材を備える。図 5 に示す除去部 20 は、流路 41 にろ過部材 22 が介装された構成となっている。ろ過部材 22 でろ過処理された原料液は、流路 41 のうち、ろ過部材 22 を挟んで担体カラム 21 側に位置する流路 41 A から担体カラム 21 に供給される。この構成によれば、ろ過部材 22 で前処理した後の原料液を担体カラム 21 に供給できる。以下、ろ過部材 22 で処理した原料液を「前処理液」と記載する。なお図 5 における除去部 20 は、ろ過部材 22 と担体カラム 21 を有する構成となっているが、ろ過部材 22 のみを有する構成とすることもできる。

[0028] 図 6 に示す除去部 20 は、ろ過部材 22 からの前処理液を貯留するタンク 24（前処理液貯留タンク）を備えている。ろ過部材 22 からの前処理液は流路 41 C を介してタンク 24 に貯留される。タンク 24 に貯留された前処理液は、流路 41 D を介して担体カラム 21 へ供給される。第一制御部 110（図示せず）は、担体カラム 21 での不純物除去処理の進捗に応じて、流路 41 D 内の開閉弁 73 を開けて、タンク 24 内の前処理液を担体カラム 21 に供給できる。この構成によれば、前処理液をタンク 24 に一旦貯留した後、担体カラム 21 に供給できるため、ろ過部材 22 でのろ過処理と、担体カラム 21 での不純物除去処理とを並行して行うことができ、効率的に精製濃縮処理することができるため好ましい。

[0029] 図 6 において、ろ過部材 22 は原料供給部 10 の下部に配置された構成とされている。この構成によれば、原料供給部 10 からろ過部材 22 への原料液の供給が、原料液の自重によって進行するため、原料供給部 10 からろ過

部材 22 へ原料液を供給するための送液部材（ポンプ等）を省略できる。そのため、よりコンパクトな精製濃縮装置とすることができるため好ましい。

[0030] （ろ過部材）

ろ過部材 22 は、原料液をろ過処理する部材である。原料液に含まれる微小有用物質が、細胞外小胞を含む場合、ろ過部材 22 は、精密ろ過膜（精密ろ過膜モジュール）を備えるろ過フィルターであることが好ましい。原料液中の細胞等、目的とする細胞外小胞より大きな生体分子等の不純物を効率的にろ過除去する観点からは、精密ろ過膜（精密ろ過膜モジュール）の平均孔径は $0.10 \sim 0.50 \mu\text{m}$ が好ましく、 $0.15 \sim 0.30 \mu\text{m}$ がさらに好ましい。また、精密ろ過膜の材料としては、ポリエーテルスルホン、ポリビニリデンフロライド等が好ましい。また、精密ろ過膜はこれらの材料で構成された市販品を用いることができる。

[0031] （第一制御部）

次に、第一制御部の詳細について図 16 のフローチャートを用いて説明する。

図 16 は、図 13 に示す精製濃縮装置 1 を用いて精製濃縮処理を行う場合の基本的なフローチャートである。図 16 のフローチャート内に各制御部における液の流通制御の一例を示す。

第一制御部 110 は、原料供給部 10 内の原料液の不純物濃度によって設定された結果に基づいて、原料液を除去部 20 又は精製濃縮部 30 に供給できる。原料液の不純物濃度が高い場合、原料供給部 10 内の原料液が除去部 20 に供給されるように設定する。その場合、第一制御部 110 は、図 13 の容器 11 の下部に配置された三方弁 82 を流路 41 側に開いて、原料液を除去部 20（図 13 ではろ過部材 22）に供給する。原料液の不純物濃度が低い場合、原料供給部 10 内の原料液が精製濃縮部 30 に供給されるように設定する。その場合、第一制御部 110 は、前記三方弁 82 を流路 43 側に開いて、原料液を精製濃縮部 30 に向けて送液することができる。ろ過部材 22 で処理された液（前処理液）は、タンク 24 に供給される。第一制御部

110は、第一タンク23（粗精製液貯留タンク）内の粗精製液の量が設定された値になるまで、タンク24から担体カラム21に向けて液を供給できる。具体的には、タンク24の下部に設けられた開閉弁73を開けて、担体カラム21に前処理液を供給することができる。

[0032] 第一タンク23内の粗精製液の量が予め設定された値に達すると、第二タンク31に送液される。この時、第一制御部110は、第二タンク31及び第三タンク32内の液量も確認できる。第一制御部110は、後述するタンク内液量監視装置35、36及び／又はカメラによる液面監視に基づき、第二タンク31及び第三タンク32内の液量が予め設定された液量であると判断した場合に、流路42Bに接続されている三方弁77を第二タンク31側に向けて開き、第一タンク23内の粗精製液を第二タンク31に供給することができる。

[0033] 図13の第一タンク23に接続された流路42Bには、タンク内の液量を判断するレベルセンサー（図示せず）が設けられている。第一制御部110は、前記レベルセンサーの情報に基づいて、第一タンク23内に粗精製液が残っているかどうかを判断できる。第一タンク23内の粗精製液が第二タンク31に全て供給されたと判断すると、第一制御部110は、開閉弁73を開いて、タンク24内の前処理液を担体カラム21に再度供給できる。このように液の流れを制御することで、1バッチの処理が終わるごとに担体カラム21の洗浄、平衡化処理を行うことができる。

[0034] <精製濃縮部>

精製濃縮部30は、原料供給部10又は除去部20から供給された液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮する。中空糸膜を用いて精製濃縮するので、微小有用物質を高純度かつ高濃度で含む液を調製することができる。

[0035] （中空糸膜）

本開示の中空糸膜の材質は、本開示の使用目的や微小有用物質を含む液の性質等に応じて、適宜、設計することができる。

具体的には、ポリビニリデンフロライド（PVDF）、ポリエーテルスル

ホン（PES）、ポリスルホン（PSf）、ポリオレフィン（PE、PP、PTFE等）、ポリアミド、ポリアクリロニトリル、セルロースアセテート（CA）等の有機高分子系材料及びそれらの変性体を適用できる。

さらに、上記から選択される複数成分からなる複合中空糸膜も適用できる。

このうち、微小有用物質が、エクソソーム等の生体分子である場合は、セルロースアセテート（CA）製の中空糸膜を使用することが好ましい（すなわち、セルロースアセテートを含む樹脂材料により構成されていることが好ましい）。セルロースアセテート製の中空糸膜を使用することで、精製濃縮処理時のろ過速度の低下を抑え、かつ中空糸膜の膜表面に堆積した微小有用物質の回収効果をより向上させることができる。その理由として、生体分子の表面電荷が弱い負電荷であり、セルロースアセテート膜も弱い負電荷であるため、生体分子とセルロースアセテート膜とが強いクーロン力で引き合うことが無く、循環線速度を適正に制御することによってクロスフローろ過のせん断力が機能しやすいこと等が挙げられる。また、セルロースアセテート膜を用いることにより、後述の方法で中空糸膜の膜表面に堆積した微小有用物質をより効率的に回収できる。

[0036] 本開示の中空糸膜の材質は、本開示の使用目的や、微小有用物質を含む原料液の性質等に応じて、適宜設計することができるが、その上に、微小有用物質を含む原料液の性質に応じて、中空糸膜表面の耐ファウリング性を向上させるために適切な物質をコーティング処理することもできる。

[0037] コーティング処理は、例えば、特許6081290号公報に記載されているスルホン化ポリエーテルスルホンとポリエーテルスルホンからなる中空糸膜表面にカチオン性ポリマーを結合させる方法と同様な方法で実施することができる。

つまり、中空糸膜をコーティング物質の水溶液（水分散液）の中へ浸漬する方法や、中空糸膜や中空糸膜モジュールの状態で、コーティング物質の水溶液（水分散液）を中空糸膜へ通液することで、中空糸膜表面へ吸着結合さ

せたのち、コーティング物質の薄層上にただ堆積されただけのコーティング物質を水洗して取り除く方法を用いることができる。

[0038] ある種の培養上清液の中のある種の細胞外小胞の濃縮精製を行う場合において、セルロースアセテート製の中空糸膜へある種の生体分子をコーティング処理することが精製濃縮効率と細胞外小胞等の微小有用物質の回収率を高める点で好ましい場合がある。

[0039] 一例としては、酢酸セルロース製中空糸膜モジュール（分画分子量30万、膜面積0.062 m²）に対し、リン酸緩衝液（PBS）に溶解した1.3 mg/mLの脱脂粉乳溶液を、200 mL/分の通液速度で10分間通液し、中空糸膜表面へ脱脂粉乳中のカゼイン等の生体分子を薄層として吸着結合させるためのコーティング処理を施した後、薄層上にただ堆積されただけの余分な成分を除くため250 mLのリン酸緩衝液（PBS）で膜通水洗浄したものをを用いることができる。

[0040] 一実施形態において、中空糸膜の耐ファウリング性を高める観点から、中空糸膜の少なくとも一部の領域に、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子が付着していることが好ましい。生体分子は、中空糸膜の表面の半分以上の領域に亘って付着していることがより好ましく、全領域に付着していることが好ましい。一実施形態において、中空糸膜の少なくとも一部の表面に、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子を含む層が形成されていることが好ましい。「生体分子を含む層」とは、中空糸膜の少なくとも一部の領域に、生体分子を含む物質が、ある広がりを持って付着していることを意味している。生体分子を含む層は、中空糸膜の表面の半分以上の領域に形成されていることが好ましく、全領域に形成されていることがより好ましい。一実施形態において、中空糸膜の少なくとも一部の表面が、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子によりコーティングされていることが好ましい。

[0041] 微小有用物質とは異なる種類の生体分子としては、血液、乳、軟骨等の動物細胞組織や他の生物細胞組織から得られるものであり、代表例としては、スキムミルクや脱脂粉乳等に含まれる生体分子（例えばカゼイン）、；血清

等に含まれる生体分子（例えば、血清グロブリン、血清アルブミン）；ゼラチン（例えばフィッシュゼラチン）等が挙げられ、これらから選択される１以上であってよい。

[0042] （中空糸膜の平均内径）

本開示の中空糸膜の平均内径は、本開示の使用目的や微小有用物質を含む液の性質等に応じて、適宜設計することができる。一実施形態において、 $0.2\text{ mm} \sim 1.4\text{ mm}$ の平均内径を有する中空糸膜を採用できる。別の実施形態において、 $0.2\text{ mm} \sim 2.0\text{ mm}$ の平均内径を有する中空糸膜を採用できる。なお、本開示における「中空糸膜の平均内径」は、１本の中空糸膜を長手方向に対して垂直な任意の面で切断し、その切断面の中空部と内接する最小の円の直径より算出した値である。本開示では、上記の切断面における任意の１０箇所以上１００箇所以下の前記直径を測定し、その平均値を「平均内径」とする。

[0043] なお、本開示の中空糸膜は、平均外径が $0.3\text{ mm} \sim 2.0\text{ mm}$ であってよい。一実施形態において、中空糸膜の平均内径が $0.2\text{ mm} \sim 1.0\text{ mm}$ である場合の平均外径は $0.3\text{ mm} \sim 1.4\text{ mm}$ であってよい。またその他の実施形態において、中空糸膜の平均内径が $1.0\text{ mm} \sim 1.4\text{ mm}$ である場合の平均外径は $1.5\text{ mm} \sim 2.0\text{ mm}$ であってよい。なお、「中空糸膜の平均外径」は、前述の中空糸膜の平均内径と同じ方法で切断した中空糸膜において、その切断面の外縁を内包する最小の円の直径より算出した値である。本開示では、上記の切断面における任意の１０箇所以上１００箇所以下の前記直径を測定し、その平均値を「平均外径」とする。

[0044] 本開示の使用目的において、中空糸膜が柔軟になりすぎない膜厚を確保しやすく、かつ中空糸膜の膜表面に堆積した微小有用物質の回収効率が向上しやすい観点からは、中空糸膜の平均内径は $0.6\text{ mm} \sim 1.4\text{ mm}$ であってよい。

さらに、微小有用物質を含む液の運転時の液粘度によって前記平均内径を調整してもよい。液粘度が高い場合（例えば、液温 20°C 、せん断速度 25

s^{-1} における液粘度が、 $10 \sim 30 \text{ mPa} \cdot s$ である場合）は、平均内径が $1.0 \text{ mm} \sim 1.4 \text{ mm}$ の太径中空糸膜を用いることが好ましい。また、微小有用物質を含む液の運転時の液粘度が低い場合（例えば、液温 20°C 、せん断速度 25 s^{-1} における液粘度が、 $10 \text{ mPa} \cdot s$ 未満である場合）は、平均内径が $0.6 \text{ mm} \sim 1.0 \text{ mm}$ の中空糸膜を用いることが好ましい。なお、中空糸膜の平均内径が大きくなると、前記中空糸膜を中空糸膜モジュールとして用いる場合に、有効膜面積が低下しやすくなる。よって、中空糸膜モジュールとした場合の有効膜面積の低下を抑制しやすい観点からは、平均内径が $0.2 \text{ mm} \sim 1.0 \text{ mm}$ の中空糸膜を用いることが好ましい。

[0045] （中空糸膜の分画分子量）

本開示の中空糸膜の分画分子量は、本開示の使用目的や、微小有用物質を含む原料液の性質等に応じて、適宜設計することができる。一実施形態において、前記分画分子量は $5,000 \sim 300$ 万であってもよく、 1 万 ~ 100 万であってもよい。微小有用物質が特定のタンパク質の場合、前記タンパク質の分子量よりも少し低い分画分子量の中空糸膜（例えば、タンパク質の分子量よりも $10 \sim 50\%$ 程度低い分画分子量を有する中空糸膜等）を用いることが好ましい。一実施形態において、微小有用物質がエクソソームである場合、中空糸膜の分画分子量は 5 万 ~ 100 万であることが好ましく、 7 万 ~ 80 万であることがより好ましく、 10 万 ~ 50 万であることがさらに好ましい。

[0046] 本開示の中空糸膜モジュールの γ -グロブリン透過率は、微小有用物質が細胞外小胞である場合は、精製濃縮の効率性の観点から、 $5 \sim 90\%$ が好ましく、 $10 \sim 80\%$ がより好ましい。本開示において、前述の γ -グロブリンを含む、微小有用物質を含む液内の不純物の透過率を測定する方法は特に限定されず、従来公知の方法を採用できる。具体的には、前記不純物と近似する分子構造、かつ同程度の分子量を有する標準物質の透過率を測定する方法などを採用できる。前記透過率の測定する場合、中空糸膜モジュールを使用する場合や、前記中空糸膜モジュールに使用する一本の中空糸膜を直接使

用する場合がある。更には、内圧式中空糸膜モジュールの前記透過率を、一本の中空糸膜で中空糸膜外側から圧力を掛けて内側へ透過させる方法で測定された透過率で代用することもできる。

[0047] (中空糸膜モジュール)

本開示における精製濃縮部 30 は、複数の前記中空糸膜が、液の出入口を有する容器内に收容された中空糸膜モジュールを備えた構成とすることができる。また、前記容器は、前記中空糸膜に液を供給するための、第一の液の出入口 33a 及び第二の液の出入口 33b と、前記中空糸膜を透過した液を排出するための第三の液の出入口 33c、33d を、少なくとも有する。

本開示の中空糸膜モジュールに用いる中空糸膜の本数は、特に限定されない。本開示の使用目的および精製濃縮される微小有用物質の重量等に応じて、適宜、必要な有効膜面積が得られるようモジュール内に組み入れる本数を設計することができる。

[0048] 中空糸膜は接着剤等で束ねられて前記容器内に収納されることが好ましい。本開示において、微小有用物質を含む液が中空糸膜モジュールの第一の液の出入口 33a 及び／又は第二の液の出入口 33b から供給されると、容器内の中空糸膜束の一方側（中空糸膜束の内側又は外側）へ液が流れ込んで、中空糸膜束で精製、濃縮される。中空糸膜束を透過した液は中空糸膜束の他方側（中空糸膜束の外側又は内側）へ流れ出て、第三の液の出入口 33c、33d から排出される。この時、透過されることなく中空糸膜束の内側又は外側に滞留した液は、第一の液の出入口及び／又は第二の液の出入口から中空糸膜モジュール外へ排出（回収）することができる。以下、本開示において、中空糸膜を透過した液を「透過液」と記載し、中空糸膜を透過せず中空糸膜に滞留した液を「濃縮液」と記載する。なお「濃縮液」は、中空糸膜で精製、濃縮処理された全ての液を意味する。

[0049] 微小有用物質を含む液が、中空糸膜束の内側へ供給されるものは、内圧式中空糸膜モジュールであり、中空糸膜束の外側へ供給される中空糸膜モジュールは、外圧式中空糸膜モジュールである。以下、本開示における中空糸膜

モジュールの一実施形態として、内圧式中空糸膜モジュールの一例について説明する。

- [0050] 図7は内圧式中空糸膜モジュール33の一例を示す概略断面図である。中空糸膜モジュール33は、筒状容器61内に、複数の中空糸膜が束ねられた中空糸膜束60が収容されている。前記複数の中空糸膜は、生体適合性のある封止接着剤（例えば、ポリウレタン系封止接着剤等）で束ねられて中空糸膜束60を構成しており、かつ筒状容器61内の長手方向の両端に前記封止接着剤からなる接着剤層62a、62bで接着固定された構成となっている。筒状容器61は、透明性の観点からは、ポリカーボネート、ポリ（メタ）アクリレート、ポリスルホン等の材料で構成されていてもよい。なお、筒状容器61の両端面61a、61bは複数の中空糸膜が開口した状態となっている。中空糸膜モジュール33の長手方向の両端部には、第一の液の出入口33a及び第二の液の出入口33bが設けられている。また、中空糸膜モジュール33の長手方向の側面部には、第三の液の出入口33c、33dが設けられている。第一の液の出入口33a及び／又は第二の液の出入口33bから供給された液は、中空糸膜束60の内側に送液されて精製、濃縮される。また中空糸膜束60の外側に透過した透過液は、筒状容器61の側面に設けられた第三の液の出入口33c、33dから排出される。なお、第三の液の出入口は、筒状容器61の側面上部及び側面下部の少なくとも2か所に設けられることが好ましい。図7では、第三の液の出入口33c、33dが、中空糸膜モジュール33の一方の側面部のみに設けられた構成となっているが、これに限定されない。第三の液の出入口33c、33dは、一方の側面部と他方の側面部に分けて設けられていてもよい。

- [0051] 図7は内圧式中空糸膜モジュールを例示したが、本開示の中空糸膜モジュールは上述の通り外圧式であってもよい。外圧式の場合、第一から第三の液の出入口の設置個所、及び設置方法を適宜設計することが必要である。

- [0052] （中空糸膜モジュールの充填率）

本開示の中空糸膜モジュールにおける充填率は、5～55%が好ましく、

20～55%がより好ましく、25～55%が更に好ましい。前記充填率とは、中空糸膜モジュールの、一般的には筒状容器の短手方向の断面積に占める、中空糸膜束の外径部の断面積の総和の百分率を指す。前記充填率が5～55%であれば、中空糸膜モジュールの大きさを最適化しつつ、中空糸膜の膜表面に堆積した微小有用物質をより効率的に回収できる。

[0053] 以下、本開示の精製濃縮部30が、中空糸膜モジュール33を備える場合の態様について図面を用いて説明する。

[0054] 図8～11に、精製濃縮部30のいくつかの代表的な概略構成図を示す。なお、本開示の精製濃縮装置1には、概略構成図では省略するバルブ、自動弁、逆流防止弁、オリフィス、流量計、圧力計、液位計、破裂板等の安全装置等が含まれる場合がある。

[0055] 図8に示す精製濃縮部30は、第二タンク31及び第三タンク32と、第二タンク31及び第三タンク32に接続された中空糸膜モジュール33と、第二タンク31及び第三タンク32を加圧する加圧装置34とを備える。加圧装置34は、にはガス供給路52を介して三方弁76と接続されている。

第二タンク31は、原料供給部10又は除去部20から供給された液、すなわち、原料液又は粗精製液を貯留するタンクであり、中空糸膜モジュール33の第一の液の出入口33aと流路51Aを介して接続されている。また、第三タンク32は、第二タンク31と同様に、原料液又は粗精製液を貯留するタンクであり、中空糸膜モジュール33の第二の液の出入口33bと流路51Bを介して接続されている。第二タンク31及び第三タンク32の上部は加圧装置34に接続されている。第二制御部120（図示せず）は、加圧装置34を作動させ、三方弁76の切り替えを行うことにより、第二タンク31又は第三タンク32のいずれかを選択的に加圧して、第二タンク31又は第三タンク32内の原料液又は粗精製液が、中空糸膜モジュール33に交互に（選択的に）供給されるように制御する。第二タンク31又は第三タンク32から排出された液は、中空糸膜モジュール33で精製、濃縮されたのち、他方のタンクまで送液される。以下、第二タンク31内に貯留された

液であり、精製濃縮処理が完了する前の液を、「第二貯留液」と記載し、第三タンク 3 2 内に貯留された液であり、精製濃縮処理が完了する前の液を「第三貯留液」と記載する。なお、図 8 では、流路 4 2、4 3 が第二タンク 3 1 に接続された構成となっているが、流路 4 2、4 3 は第三タンク 3 2 に接続された構成としてもよい。なお、第二制御部 1 2 0 の詳細については後述する。

[0056] (加圧装置)

本開示の加圧装置 3 4 は、ガス供給源からのガスを第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内に供給する。加圧のためのガスは、第二制御部 1 2 0 (図示せず) によって三方弁 7 6 が切り替えられて、圧力計 (図示せず) を備えたガス供給路 5 2 A、5 2 B から第二タンク 3 1 又は第三タンク 3 2 へ供給される。ガスとしては、窒素、アルゴン、ヘリウム等の不活性ガス、二酸化炭素、ろ過空気等から選択できる。

[0057] 加圧装置 3 4 で第二タンク 3 1 を加圧する場合、第二制御部 1 2 0 (図示せず) は、ガス供給源 (図示せず) からのガスをガス供給路 5 2 に供給し、三方弁 7 6 を切り替えてガス供給路 5 2 A へ送る。この時、ガス抜き路 5 3 A の開閉弁 7 4、流路 4 2、4 3 を接続する三方弁 7 7 を閉じ、ガス抜き路 5 3 B の開閉弁 7 5 を開ける。一方、加圧装置 3 4 で第三タンク 3 2 を加圧する場合、第二制御部 1 2 0 は、ガス供給源 (図示せず) からのガスをガス供給路 5 2 に供給し、三方弁 7 6 を切り替えてガス供給路 5 2 B へ送る。この時、ガス抜き路 5 3 B の開閉弁 7 5、三方弁 7 7 を閉じ、ガス抜き路 5 3 A の開閉弁 7 4 を開ける。これらの操作により、加圧装置 3 4 で第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 を選択的に加圧することができる。

[0058] (第二タンク及び第三タンク)

本開示の精製濃縮装置 1 において、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 は、目視や、後述するカメラで第二貯留液及び第三貯留液の液面位置を観察できるように、透明性を有していることが好ましい。また、タンクの内壁面に第二貯留液又は第三貯留液が付着して残留することを防止する観点からは、

撥水性を有する材料で構成されていることがより好ましい。具体的には、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 は、ポリアクリロニトリル；ポリ（メタ）アクリル酸エステルなどのポリ（メタ）アクリレート；ポリカーボネート；フッ素樹脂等を含む材料で構成されていることが好ましい。なお、後述するタンク内液量監視装置等により第二タンク 3 1 又は第三タンク 3 2 の液の出入口の透明部分の液位を管理する場合、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 の素材は、不透明な材料、例えば金属製や繊維強化樹脂製のタンクを使用できる。

[0059] 図 8 に示す精製濃縮部 3 0 では、第二貯留液は流路 5 1 A を介して第一の液の出入口 3 3 a から中空糸膜モジュール 3 3 内に入り、中空糸膜束 6 0 で精製、濃縮されたのち、第二の液の出入口 3 3 b から排出されて、第三タンク 3 2 まで送液される。この場合、中空糸膜束 6 0 の長手方向の膜表面に対して液が平行に流れる、タンジェンシャルフローろ過によって第二貯留液が精製、濃縮される。また、中空糸膜束 6 0 を透過した透過液は、中空糸膜モジュール 3 3 の第三の液の出入口 3 3 c、3 3 d に接続された流路 5 4 から廃液タンク（後述する）に排出される。

[0060] 同様に、第三貯留液は流路 5 1 B を介して第二の液の出入口 3 3 b から中空糸膜モジュール 3 3 内に入り、中空糸膜束 6 0 で、精製、濃縮されたのち、第一の液の出入口 3 3 a から排出されて第二タンク 3 1 まで送液される。この場合も、中空糸膜束 6 0 の長手方向の膜表面に対して液が平行に流れる、タンジェンシャルフローろ過によって第三貯留液が精製、濃縮される。この操作を交互に繰り返すことにより、中空糸膜表面に微小有用物質や不純物が堆積し難くなる。その結果、液の透過速度の低下を抑え、処理効率を高く維持できる。すなわち、液を交互タンジェンシャルフローろ過することにより、微小有用物質をより高純度かつより高濃度で含む液をより効率的に製造することができる。

[0061] 第二制御部 1 2 0 は、第二貯留液及び第三貯留液の量を設定し、これら第二及び第三貯留液が設定された値となるように、加圧装置 3 4 と開閉弁を制

御して、第二タンク 3 1 又は第三タンク 3 2 を交互に加圧できる。

[0062] 図 8 の精製濃縮部 3 0 は、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の液量を監視する装置を備えた構成とすることができる。この構成によれば、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の液量を把握できるため、より効率よく交互タンジェンシャルフローろ過を行うことができる。

[0063] 図 9 に示す精製濃縮部 3 0 は、図 8 に示す精製濃縮部 3 0 と同じ構成を有するとともに、さらに、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 が、タンク底部の液の出入口に光センサー（図示せず）を含むタンク内液量監視装置 3 5、3 6 をそれぞれ備えている。タンク内液量監視装置 3 5、3 6 は、光センサーで第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 の液の出入口に光を照射して、液の出入口における光の透過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の液量を監視するよう構成されている。第二制御部 1 2 0（図示せず）は、タンク内液量監視装置 3 5、3 6 で第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の第二貯留液及び第三貯留液の液量を判断して、加圧装置 3 4 で加圧するタンクを決定する。

[0064] （タンク内液量監視装置）

本開示のタンク内液量監視装置 3 5、3 6 は、光センサーを備える。光センサーは投光素子及び受光素子を備えており、投光素子からタンク底部の液の出入口に向けて光を照射し、光の透過光の強度（透過率）を受光素子で検出する。なお、タンク底部の、液の出入口の光が照射される部分は透明な素材で構成されている。検出した透過率はさらに検出部に送信される。検出部が透過率の変化を検出すると、第二制御部 1 2 0 は加圧装置 3 4 で加圧するタンクを変更する。

[0065] タンク内液量監視装置と第二制御部との関係について、より具体的に説明する。

第二タンク 3 1 が加圧装置 3 4 で加圧されて、第二貯留液が第三タンク 3 2 に向けて供給されている場合、第二タンク 3 1 内の第二貯留液の量が低下すると、加圧装置 3 4 から供給されたガスが第二タンク 3 1 の液の出入口か

ら排出されて、液の出入口内の光の透過率が変化する。タンク内液量監視装置 35 が透過率の変化を検出すると、第二制御部 120（図示せず）は、三方弁 76 を切り替えて加圧装置 34 で加圧するタンクを第二タンク 31 から第三タンク 32 に変更する。同様に、第三タンク 32 の液の出入口に設けられたタンク内液量監視装置 36 が透過率の変化を検出すると、第二制御部 120 は三方弁 76 を切り替えて、加圧装置 34 で加圧するタンクを第三タンク 32 から第二タンク 31 に変更する。タンク内液量監視装置 35、36 はファイバセンサであってもよい。このようにして、第二制御部 120 は、第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の液を中空糸膜モジュールに交互に供給するよう制御することができる。

[0066] その他の実施形態においては、精製濃縮部 30 内に配置されたカメラの映像を元に、タンク内の液量を監視してもよい。すなわち、精製濃縮部 30 が、第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の液面位置を監視するカメラを備え、第二制御部 120 は、前記カメラから出力された第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の液面位置の情報からタンク内の液量を把握し、加圧装置 34 で加圧するタンクを決定してもよい。具体的には、精製濃縮部 30 は、第二タンク 31 及び第三タンク 32 の液面を観察できる位置にカメラを備えており、前記カメラから出力された液面位置の映像は検出部に送信される。検出部は、液面位置の情報から第二タンク 31 及び第二タンク 31 内の液量を判断する。例えば、検出部が、カメラの液面位置の情報から第二タンク 31 内の第二貯留液の量が予め設定した量以下になったと判断した場合、第二制御部 120 は、三方弁 76 を切り替えて、加圧装置 34 で加圧するタンクを第二タンク 31 から第三タンク 32 に変更する。同様に、検出部が第三タンク 32 内の第三貯留液の量が予め設定した量以下になったと判断した場合、第二制御部 120 は、三方弁 76 を切り替えて、加圧装置 34 で加圧するタンクを第三タンク 32 から第二タンク 31 に変更する。

[0067] （第二制御部）

第二制御部 120 の液の流通制御における判断の一例を、図 16 のフロー

チャートに示す。図 16 に示す通り、第二制御部 120 は、主に第二タンク 31 と第三タンク 32 間で液（粗精製液又は原料液）を流通させるために、開閉弁や加圧装置を操作できる。また、第二制御部 120 は、タンク内液量監視装置 35、36 及び／又はカメラによる情報に基づいて、第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の液量を判断し、タンク内の液を流通させることができる。さらに第二制御部 120 は、第二タンク 31 及び／又は第三タンク 32 内の液量を設定することもできる。タンク内の液量の設定方法の一例（管理液面位置 C の設定）については後述する。

[0068] 図 10 の精製濃縮部 30 は、中空糸膜モジュール 33 に希釈液を供給して、中空糸膜束 60 内の複数の中空糸膜を洗浄する洗浄タンクを備える。図 10 に示す精製濃縮部 30 は、希釈液を貯留し、前記希釈液を中空糸膜モジュール 33 の第三の液の出入口 33c、33d に供給する流路 55A が接続された第四タンク 80 と、第四タンク 80 内の前記希釈液を中空糸膜モジュール 33 の第三の液の出入口 33c、33d に供給するタイミングを制御する第三制御部 130（図示せず）とを備えている。第四タンク 80 には、タンク内の希釈液を第三タンク 32（又は第二タンク 31）に直接供給する流路 55B が接続されている。

[0069] （第三制御部）

第三制御部 130 は第四タンク 80 内の希釈液の流通を制御する。第三制御部 130 の液の流通制御における判断の一例を、図 16 のフローチャートに示す。第三制御部 130 は、液の精製濃縮処理時に、第四タンク 80 から、第三タンク 32、又は中空糸膜モジュール 33 のいずれかに希釈液を供給することができる。以下、第三タンク 32 に希釈液を供給することを「希釈処理」と記載し、中空糸膜モジュール 33 に希釈液を供給することを「逆洗浄処理」と記載する。

[0070] （希釈液）

希釈液は、本開示の目的や微小有用物質の種類に応じて、例えば、純水；水道水、地下水、海水又は河川水等の濾過水；種々の水溶液等を用いること

ができる。微細有用物質がエクソソームである場合には、生理食塩水、医療用または生化学用の緩衝液が好ましい。前記緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液（PBS）、トリス塩酸緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等を使用することができる。

希釈液は、本開示の目的に応じて、不純物を含まないことが好ましいが、不純物を含まない希釈液の入手が困難な場合は、不純物濃度の低いもの（例えば、不純物濃度が500ppm未満のもの）を使用することができる。

[0071] 前記希釈液は、微小有用物質を含む原料液の量（A）に対する、第二タンク31（又は第三タンク32）内の濃縮された液の量（B）（ B/A ）が、 $1/2 \sim 1/200$ となった場合に、第二タンク31（又は第三タンク32）内にある濃縮液に供給することができる。その際、前記濃縮液の量（B）は、後述の方法で設定された管理液面位置Cの液量と等しくとも良い。

さらに、第一タンク23から粗精製液が第二タンク31に供給されると（または、流路43を介して原料液が第二タンク31に供給されると）、第三制御部130は希釈処理を行うことができる。第三制御部130は、タンク内液量監視装置35及び／又はカメラの液面位置情報に基づいて、第二タンク31内に粗精製液又は原料液が供給されたことを判断できる。一実施形態において、第三制御部130は、粗精製液の量が $1/2 \sim 1/200$ の液量になるまで交互タンジェンシャルフロー濾過して濃縮精製を行なった後、設定液量になるまで希釈処理（又は逆洗浄処理）を実施し、希釈液を供給できる。希釈処理を行う場合、第三制御部130は、三方弁77Aを流路55B側に開けて、第四タンク80内の希釈液を第三タンク32に供給する。

[0072] 第三制御部130は、第二タンク31及び第三タンク32内の液の合計量が、予め設定された液量以下（例えば、後述の方法で設定された管理液面位置C以下）になったと判断した場合に、逆洗浄処理を行うことができる。逆洗浄処理を行う場合、第三制御部130は、三方弁77Aを流路55A側に開く。第四タンク80内の希釈液は流路55Aを介して中空糸膜モジュール33の第三の液の出入口33c及び33dからモジュール内に供給される。

その後、中空糸膜束 60 の透過液側から濃縮液側に向けて希釈液が流れる。中空糸膜モジュール 33 が内圧式である場合、第三の液の出入口 33 c 及び 33 d からモジュール内に供給された希釈液は、中空糸膜束 60 の外側から内側に向けて流れる。これにより、中空糸膜の膜表面、特に中空糸膜内部の膜表面に堆積した微小有用物質を、第一の液の出入口 33 a 及び／又は第二の液の出入口 33 b から第二タンク 31 及び／又は第三タンク 32 に回収することができる。この処理により、中空糸膜表面へ堆積した微小有用物質や不純物が剥離されて、液の透過速度がほぼ元値にまで回復される。また、希釈液で液が希釈されることによって不純物が均一に分散されて、除去効率が上がる。その結果、液の精製、濃縮の効率をより高めることができる。

[0073] なお、逆洗浄を実施する前には、中空糸膜モジュール中に残存している透過液が逆洗浄液に混じり濃縮液側へ流入することを防止するために、洗浄液（希釈液）であらかじめフラッシング処理を行い、中空糸膜モジュール中に残存している透過液を洗浄液（希釈液）で置換する操作を任意に行うことができる。

[0074] この際、洗浄液（希釈液）の使用量は、中空糸膜モジュール中に残存している透過液容量の 1 ～ 8 倍量が好ましく、2 ～ 6 倍量がより好ましい。

[0075] ある種の培養上清液の中のある種の細胞外小胞の濃縮精製を行う場合において、逆洗浄の前にフラッシング操作を実施した場合、フラッシング操作を実施しない場合と比べて不純物タンパク質残存量を半分以下にできる場合がある。

[0076] 中空糸膜モジュール 33 が内圧式である場合、図 7 における第三の液の出入口 33 c または 33 d どちらか一方を入り口として、他方を出口として中空糸膜モジュール中に残存している透過液を洗浄液（希釈液）で置換する操作を行うことができる。

中空糸膜には通液抵抗があるため、第三の液の出入口 33 c 及び 33 d のうちのどちらか一方から希釈液を供給すれば、膜側への漏れ込みは少ない状態で、中空糸膜モジュール 33 中に残存している透過液を希釈液で置換する

ことができる。

一方、例えば、第一の液の出入口 3 3 a 及び第二の液の出入口 3 3 b の出口付近の流路上に、図示しない開閉弁を設け、この開閉弁を閉じることにより、第一の液の出入口 3 3 a 及び第二の液の出入口 3 3 b の前記液の流通を止めることもできる。この状態で、第三の液の出入口 3 3 c 及び 3 3 d のうちのどちらか一方から希釈液を供給することにより、他方の第三の液の出入口 3 3 c 又は 3 3 d から希釈液が排出される。これにより、中空糸膜モジュール 3 3 中に残存している透過液を希釈液で置換することができる。

[0077] フラッシング処理のタイミングは、前記第三制御部により制御される。例えば、第一の液の出入口 3 3 a 及び第二の液の出入口 3 3 b の出口付近の流路上に、図示しない開閉弁が設けられている場合について説明すると、第三制御部は、第二タンク 3 1 及び前記第三タンク 3 2 内の前記液量の合計が、前記第二制御部で設定した値以下となった場合に、前記第一の液の出入口 3 3 a 及び前記第二の液の出入口 3 3 b の付近に設置された開閉弁を閉じて前記液の流通を止めた状態で、前記第四タンク 8 0 内の希釈液を、中空糸膜モジュール 3 3 が有する少なくとも 2 つの前記第三の液の出入口 3 3 c 及び 3 3 d のうちのいずれか 1 つから供給できる。このとき、廃液タンクに接続された流路 5 4 に設けられている開閉弁 7 8 は開いている。その後、前記第一の液の出入口 3 3 a 及び前記第二の液の出入口 3 3 b の付近に設置された開閉弁を開いて前記第一の液の出入口 3 3 a 及び前記第二の液の出入口 3 3 b を流通可能な状態とし、前記第四タンク 8 0 内の希釈液を、中空糸膜モジュール 3 3 が有する少なくとも 2 つの前記第三の液の出入口 3 3 c 及び 3 3 d のうちのいずれか 1 つから供給することにより逆洗浄を行うことができる。

このとき、廃液タンクに接続された流路 5 4 に設けられている開閉弁 7 8 は閉じている。

[0078] 図 1 1 に示す精製濃縮部 3 0 は、中空糸膜モジュール 3 3 で精製、濃縮した濃縮液を回収する回収タンクを備える。図 1 1 の精製濃縮部 3 0 は、中空糸膜モジュール 3 3 の第一の液の出入口 3 3 a と流路 5 6 で接続された第五

タンク 8 1 と、第五タンク 8 1 への、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の液の回収を制御する第四制御部 1 4 0（図示せず）とを備えている。なお、第五タンク 8 1 は、中空糸膜モジュール 3 3 の第二の液の出入口 3 3 b に接続されていてもよい。図 1 1 では、流路 5 6 は流路 5 1 A を介して中空糸膜モジュール 3 3 に接続された構成となっている。第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 で交互タンジェンシャルフローろ過による精製濃縮処理が行われている間は、開閉弁 7 9 は閉じられている。精製濃縮処理後、開閉弁 7 9 を開けて加圧装置 3 4 を稼働させることで、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の濃縮液を第五タンク 8 1 に回収できる。なお、濃縮液を回収するタンクは、精製濃縮部 3 0 内ではなく、精製濃縮装置外に配置する構成としてもよい。

[0079] （第四制御部）

第四制御部 1 4 0 は、第二タンク 3 1、第三タンク 3 2 内の濃縮液を回収するタイミングを制御する。第四制御部 1 4 0 の液の流通制御における判断の一例を、図 1 6 のフローチャートに示す。

[0080] 第四制御部は、タンク内液量監視装置 3 5、3 6 及び／又はカメラで、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の濃縮液の液量を判断する。濃縮液の液量は、後述する管理液面位置 C から判断してもよい。精製濃縮処理が終わったと判断した場合、第四制御部 1 4 0 は加圧装置 3 4 で第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 を加圧する。この時、ガス抜き路 5 3 A の開閉弁 7 4、ガス抜き路 5 3 B の開閉弁 7 5、開閉弁 7 8、三方弁 7 7、7 7 A は閉じておき、開閉弁 7 9 を開く。タンク内液量監視装置 3 5、3 6 が透過率の変化を検出した場合、又は前記カメラの映像から第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の濃縮液の量がゼロになったと判断した場合、第四制御部 1 4 0 は加圧装置 3 4 を停止して、第五タンク 8 1 への濃縮液の回収を終了する。具体的には、第四制御部 1 4 0 は、第五タンク 8 1 の上部の液の出入口に設置されたファイバセンサ（図示せず）で流路 5 6 内の濃縮液量を監視し、前記液量がゼロになったと判断した場合、濃縮液の回収を終了してもよい。あるいは、

流路 5 6 内部の濃縮液回収操作は、人がマニュアルで操作することもできる。さらに、流路 5 6 は、エアグリッパー等で固定保持することができる。

[0081] 図 1 2 に、第一の実施形態に係る精製濃縮装置の構成例を示す。図 1 2 の精製濃縮装置 1 は、原料供給部 1 0、除去部 2 0、及び精製濃縮部 3 0 を含む要素が、ハウジング内に配置されている。図 1 2 の精製濃縮装置 1 において、ハウジングのサイズは特に限定されない。また、精製濃縮装置 1 は、ハウジング内のクリーン度を管理する管理部（図示せず）を備える。この構成によれば、精製濃縮装置 1 内を清潔に保つことができ、微小有用物質を含む液の汚染を防ぐことができる。またハウジング内にろ過空気を供給するファンフィルター装置 9 1 がハウジング 1 0 0 の上部（頂部）に配置され、UV ランプ 9 2 がハウジング 1 0 0 内に配置された構成となっている。これらの組み合わせにより、ハウジング 1 0 0 内のクリーン度をより高めることができる。

[0082] （ファンフィルター装置）

ファンフィルター装置 9 1 は、ろ過空気をハウジング内に供給できる構成を有している。ファンフィルター装置 9 1 は、プレフィルターを内蔵したファン付きのフィルターユニットとすることができる。プレフィルターとしては、ハウジング 1 0 0 内のクリーン度に応じて、HEPA フィルター、ULPA フィルター、ケミカルフィルター、繊維活性炭フィルター等を採用できる。

[0083] （UV ランプ）

UV ランプ 9 2 は、UV（紫外線）を照射してハウジング 1 0 0 内を殺菌できるものであれば特に限定されない。また、ハウジング 1 0 0 内に配置される UV ランプ 9 2 の数も特に限定されず、ハウジング 1 0 0 内のクリーン度に応じて 2 以上の UV ランプを配置してもよい。

[0084] （クリーン度）

精製濃縮装置 1 をハウジング 1 0 0 内に各要素が配置された構成とする場合、前述の管理部によってハウジング 1 0 0 内のクリーン度を高めることが

できる。一実施形態において、ハウジング100内のクリーン度は、ISO 14644-1:2015で規定される清浄度クラスにおいて、クラス8以下となるように管理されていてもよく、クラス5以下となるように管理されていてもよい。

[0085] (微小有用物質)

微小有用物質としては、特に限定されない。一実施形態においては平均粒径100 μ m未満の微小有用物質であってもよい。また別の実施形態においては、平均分子量が5,000以上の微小有用物質であってもよい。これらのうち、医薬品、化粧品、健康食品として有用な物質全般を採用できる。

微小有用物質の具体例としては、例えば、タンパク質（例えば、熱ショックタンパク質、細胞骨格タンパク質、膜輸送タンパク質、膜貫通タンパク質、コラーゲン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等）、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、血管新生因子、成長因子、酵素、抗体、血漿タンパク、ウィルス（ウィルス様粒子を含む）、細胞外小胞（例えば、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体等）、酵母、イースト細胞、および微細藻類等の生体分子、フコイダン等の多糖類等が挙げられる。

その他、生体分子の一種であり、バイオ燃料等に用いられる特定の微生物も挙げられる。

これらのうち、微小有用物質は、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択されてもよい。

[0086] [微小有用物質が精製濃縮された液の製造方法：第一の実施形態]

以下、本開示の精製濃縮装置1を用いた微小有用物質が精製濃縮された液の製造方法について、図13を用いて説明する。本開示の第一の実施形態に係る製造方法は、精製濃縮装置1を用いて、微小有用物質が精製濃縮された前記液を製造する方法であって、前記微小有用物質を含む原料液を前記精製濃縮装置に供給して、前記液中の不純物を除去すること、及び／又は前記液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮することを含む。

[0087] 図13は、本開示の精製濃縮装置1の全体構成の一例を示す構成図である

。原料供給部 10 は、微小有用物質を含む液の原料液を貯留する容器 11 が配置された構成となっている。本装置を起動させると、三方弁 82 が開き、容器 11 内の原料液は、自重による落下及び流路 41A に設けられたポンプ（図示せず）等によって流路 59 に供給される。原料液は三方弁 82 を操作することで、流路 41 又は流路 43 に供給される。第一制御部 110 は、原料液中の不純物の濃度によって設定された情報に基づいて、原料液を除去部 20 又は精製濃縮部 30 に供給する。第一制御部 110 は、三方弁 82 を流路 43 側を開いて、前記培養液を流路 43 から精製濃縮部 30 に送液する。

[0088] 流路 41 に供給された原料液は、ろ過部材 22 で前処理されたのち、流路 41C を介してタンク 24 に供給される。タンク 24 内の液量は、レベルセンサー（図示せず）による液面位置監視によって制御できる。開閉弁 73 を開くと、タンク 24 内の前処理液は流路 41D から流路 41A に供給される。

[0089] （不純物除去処理）

担体カラム 21 まで供給された前処理液は、担体カラム 21 内の吸着材によって、液内の不純物を吸着除去して粗精製液としたのち、流路 42A を介して第一タンク 23 まで供給される。担体カラム 21 による不純物除去処理は、原料液又は前処理液内の不純物の濃度を、1,000ppm 以下にまで低減させること、好ましくは 500ppm 以下まで低減させることであってもよい。

[0090] 一実施形態において、不純物除去処理は、1 バッチ分の原料液処理により吸着飽和に達した担体カラム 21 を洗浄、平衡化処理して、さらに次の 1 バッチ分の原料液を処理することを繰り返してもよい。

図 13 の精製濃縮装置 1 は、第六タンク 25 と第七タンク 26 とを備えた構成となっている。吸着飽和に達した担体カラム 21 を洗浄、平衡化処理する場合、まず開閉弁 71A（電磁弁等）を開いて、第六タンク 25 内の洗浄液を、流路 50A を介してろ過部材 22A に供給する。ろ過部材 22A で洗浄液内の不純物を除去したのち、流路 41A から担体カラム 21 に洗浄液を

供給する。担体カラム 2 1 を洗浄した後の洗浄液は、三方弁 7 2 を開くことで、廃液タンクに排出できる。なお、ろ過部材 2 2 A はろ過部材 2 2 と同じろ過部材を採用できる。洗浄処理後、開閉弁 7 1 B（電磁弁等）を開いて、第七タンク 2 6 内の平衡化液をろ過部材 2 2 B に供給する。ろ過部材 2 2 B で平衡化液内の不純物を除去したのち、流路 4 1 A から担体カラム 2 1 に平衡化液を供給する。担体カラム 2 1 を平衡化した後の平衡化液は、三方弁 7 2 を開くことで、廃液タンクに排出できる。なお、ろ過部材 2 2 B もろ過部材 2 2 と同じ部材を採用できる。

[0091] 担体カラム 2 1 の洗浄及び平衡化は、担体カラム 2 1 で処理した原料液の量によって任意に設定できる。一実施形態においては、担体カラム 2 1 の容量の 5 ～ 1 0 0 倍の原料液を処理した場合に、担体カラム 2 1 の洗浄、平衡化を行ってもよい。例えば、1, 0 0 0 m L の原料液を処理する場合、担体カラム 2 1 で原料液を 2 0 ～ 1 5 0 m L 処理するごとに、担体カラム 2 1 の洗浄、平衡化処理を行うことができ、5 0 ～ 1 0 0 m L 処理するごとに、洗浄、平衡化処理を行うこともできる。

[0092] 本開示の製造方法においては、担体カラム 2 1 で原料液中の不純物を除去すること、及び精製濃縮部 3 0 の中空糸膜で液を精製し、濃縮することが並行して行われることが好ましい。この場合、より効率的に微小有用物質が精製濃縮された液を製造することができる。

図 1 3 では、粗精製液が流路 4 2 A を介して第一タンク 2 3 に貯留される。前述の第一制御部 1 1 0 は、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の第二貯留液及び第三貯留液の量が予め設定された液量であると判断した場合に、第一タンク 2 3 に貯留された粗精製液を流路 4 2 B に送る。三方弁 7 7 の方向を切り替えることで、流路 4 2 B から第二タンク 3 1 に粗精製液が供給される。第二タンク 3 1 内（又は第三タンク 3 2 内）に粗精製液が供給されると、第二制御部 1 2 0（図示せず）は、加圧装置 3 4 を稼働して交互タンジェンシャルフローろ過による精製濃縮処理を開始する。

[0093] 上述した通り、本開示の第一の実施形態に係る精製濃縮装置 1 は、除去部

20での不純物除去処理と、精製濃縮部30での精製濃縮処理が並行して行われるように構成されてもよい。その場合、各工程で処理された液を貯留するタンクを複数配置した構成とすることが好ましい。精製濃縮装置1をよりコンパクトな構成とする観点から、各タンクの配置位置を調整してもよい。例えば、図13の精製濃縮装置1では、粗精製液を貯留する第一タンク23が、第二タンク31及び第三タンク32の上方位置に配置された構成となっているが、第二タンク31及び第三タンク32が第一タンク23の上方位置となるように配置してもよい。また、図13に示すように、第二タンク31及び第三タンク32の長手方向の側面が、中空糸膜モジュール33の長手方向と平行となるように配置されてもよい。

[0094] 以下、精製濃縮部30で粗精製液（又は原料液）を交互タンジェンシャルフローろ過する場合の好ましい操作について説明する。一実施形態において、粗精製液の精製濃縮処理は、第一処理から第二処理、および第三処理に分けて行われることが好ましい。なお、第一処理を行う前に、タンク内の液量の設定を行う。以下に、管理液面位置Cを設定してから第一処理を行う例について説明する。

[0095] （管理液面位置Cの設定）

第一処理を行う前に、管理液面位置Cの量を設定する。

第一タンク23内には、抗体カラム21で処理された粗精製液が貯留されている。管理液面位置Cの液量は、逆洗浄処理を開始すべき液量と等しく、第一タンク23内に貯留される粗精製液の最大容量の $1/2$ から $1/20$ の液量になるよう、予め設定される。第二タンク31内の粗精製液が予め設定された管理液面位置Cの量になると、第一タンク23内の粗精製液を第二タンク31に供給することができる。さらに、粗精製液が第二タンク31に供給された後に、第三制御部130が、三方弁77Aを流路55B側に開いて、第四タンク80から希釈液を第二タンク31に供給する。

[0096] 管理液面位置Cを設定した後、第二タンク31及び第三タンク32の液面制御位置を設定する。第二タンク31を加圧装置34で加圧して第三タンク

32内の希釈液を第二タンク31まで送液する。この時、第二制御部120は、第三タンク32の低液面位置(L3)を設定し、第三タンク32内の希釈液がL3となるまで第二タンク31に希釈液を供給する。さらに第二制御部120は、第三タンク32内の希釈液がL3となった場合の、第二タンク31の第二貯留液(粗精製液と希釈液の混合液)の液面位置を高液面位置(H2)として設定する。また第二タンク31の上部から第二貯留液が溢れるのを防ぐ観点から、高液面位置の上方に高一高液面位置(HH2)を設定する。次に、第二制御部120は、第二タンク31を加圧装置34で加圧して第三タンク32に第二貯留液を送液する。この時、第二制御部120は第二タンク31の低液面位置(L2)を設定し、第二タンク31内の第二貯留液がL2となるまで第三タンク32に第二貯留液を供給する。さらに第二制御部120は第二タンク31がL2となった場合の第三タンク32の液面位置を高液面位置(H3)として設定する。第三タンク32も漏洩を防ぐ観点からHH3を設定する。第二制御部120は、H2及びL3、H3及びL2の合計液量から管理液面位置Cを設定し、第二タンク31及び第三タンク32間の交互タンジェンシャルフローろ過が、管理液面位置Cの範囲で液を移動させて行われるようにする。なお、L2、L3は前述のタンク内液量監視装置35、36によるタンクの液の出入口の透過率の変化に基づいて設定されてもよく、カメラによる液面位置の映像に基づいて設定されてもよい。

また、L2、L3、H2、H3、HH2及びHH3の位置は、第二タンク31、第三タンク32の容量、及び粗精製液の量に応じて適宜設定可能である。

[0097] (精製濃縮処理：第一処理)

次に、精製濃縮処理における第一処理について説明する。管理液面位置Cの液量を下回らないように第二制御部120は、第二タンク31及び第三タンク32を加圧装置34で交互に加圧して、第二貯留液及び第三貯留液を中空糸膜モジュール33に交互に供給する。このように交互タンジェンシャルフローろ過することで、微小有用物質を含む液の濃縮精製操作を実施する。

透過液は第三の液の出入口 33c、33d から流路 54 を介して廃液タンクに廃棄される。

[0098] 第二タンク 31 または第三タンク 32 の液量が設定値になったことを確認し、粗精製液の適量を第二タンク 31 または第三タンク 32 に追加供給することができる。

さらに、第二タンク 31 または第三タンク 32 の液量が、管理液面位置 C の液量と等しくなった際には、逆洗浄処理をすることが好ましい。

[0099] 逆洗浄処理に用いられる希釈液量としては、管理液面位置 C の液量の 2 倍～200 倍にすることができる。前記の希釈液量としては、第二タンク 31 または第三タンク 32 の容積が必要以上に大きくならない観点としては、管理液面位置 C の液量の 2 倍～20 倍が好ましい。また、逆洗浄処理に用いられる希釈液量は、逆洗浄操作の度に、適宜、変更することもできる。さらに、逆洗浄処理を実施するタイミングとしては、第二タンク 31 または第三タンク 32 の液量が、管理液面位置 C の液量と等しくなった場合以外でも適宜、実施できる。その一例として、圧力変動や流量変動の状況から透過速度の低下が懸念される場合、または透過速度の低下傾向が判断できる場合、中空糸膜の閉塞発生を未然防止するための安全操作を実施する場合等が挙げられる。

また上記希釈液の一部を希釈処理として第二タンク 31 または第三タンク 32 へ直接送液することもできる。

希釈処理に使用する希釈液の量は、希釈操作の度に、適宜、変更することもできる。

[0100] 一実施形態において、第二タンク 31 及び第三タンク 32 は、中空糸膜モジュール 33 の膜面における線速度が 0.3 m/秒～2 m/秒となるように加圧装置 34 で加圧されることが好ましい。なお「膜面における線速度」とは、1 m² の膜面に対して流れる微小有用物質を含む液の 1 秒当たりの流量 (m³) であり、単位は m/秒である。膜面における線速度が 0.3～2.0 m/秒となるように加圧装置 34 でタンクを加圧することにより、精製濃縮効

率が向上しやすく、また膜面速度を上昇させるための圧力レベルが高くなりすぎず、微小有用物質に加わる剪断力が高くなりすぎて微小有用物質が変形することを防ぎやすい。加圧装置 34 によるタンク内の加圧は、前記膜面における線速度が 0.5～1.5 m/秒となる範囲で行われてもよい。

[0101] 中空糸膜モジュール 33 の運転圧力は、液の入口圧力を 0.01 MPa～0.2 MPa に調整することが好ましく、0.02 MPa～0.15 MPa に調整することがより好ましく、0.03 MPa～0.12 MPa に調整することがさらに好ましい。

また、微小有用物質を含む液の運転時の液粘度が、液温 20℃、せん断速度 25 s⁻¹における液粘度で、10～30 mPa・s である場合は、膜面における線速度を 0.7～1.4 m/秒にできるように、中空糸膜の平均内径は、1.0 mm～1.4 mm の太径中空糸膜を使用することができる。その際の運転圧力は、液の入口圧力を 0.08 MPa～0.2 MPa に調整することが好ましい。

[0102] 中空糸膜は、中空糸膜表面の耐ファウリング性を向上させるため、及び／又は微小有用物質の回収率を高めるために適切な物質がコーティング処理されていてもよい。コーティング処理の方法については上述のとおりである。

[0103] 第一処理では、粗精製液の量が、上記の方法により予め設定した管理液面位置 C の量と等しい液量になるまで精製濃縮処理を行うことが好ましい。精製濃縮処理の後、第三制御部 130 は、第四タンク 80 から希釈液を供給する。希釈液は、管理液面位置 C の液量の 2 倍～200 倍の値となるまで供給できる。すなわち、第一処理では、濃縮液を 2 倍～20 倍希釈することを含むことができる。

希釈液は、第三タンク 32 に直接供給されてもよく（希釈処理）、中空糸膜モジュール 33 から第二タンク 31 及び第三タンク 32 に供給してもよい（逆洗浄処理）。逆洗浄処理を行う場合、図 13 の精製濃縮装置 1 では、三方弁 77A の方向を流路 55A 側に開いて、中空糸膜モジュール 33 の第三の液の出入口 33c、33d から希釈液を供給する。中空糸膜モジュール 3

3から供給された希釈液は、第二タンク31及び第三タンク32まで供給される。逆洗浄処理を行うことで、中空糸膜の膜表面に堆積した微小有用物質を回収しつつ、濃縮された液も希釈できるため好ましい。以下、第一処理によって得られた液を「第一処理液」と記載する。

[0104] (精製濃縮処理：第二処理)

第一処理液を、さらに第二処理して、より微小有用物質が精製濃縮された液を得る。

前述の第一処理により第一処理液内の不純物濃度が低減されているため、第二処理は、さらに第一処理液内の不純物の量が少なくなるように（すなわち、微小有用物質の純度が高められるように）処理することが好ましい。一実施形態において、第二処理は、濃縮液の量が管理液面位置Cで設定した値に対して、逆洗浄処理や希釈処理で管理液面位置Cの液量の2倍～200倍の希釈液を加えた後、さらに管理液面位置Cの液量になるまで精製濃縮操作を繰り返すことが好ましい。すなわち、第二処理では、濃縮液を2倍～20倍希釈することを含むことができる。第一処理と同じく、希釈液は、第三タンク32に直接供給されてもよく（希釈処理）、中空糸膜モジュール33から第二タンク31及び第三タンク32に供給してもよい（逆洗浄処理）。精製濃縮処理と希釈処理とを組み合わせた第二処理は、2～20セット行われることが好ましく、2～10セット行われることがより好ましい。以下、上述の第二処理によって得られた濃縮液を「第二処理液」と記載する。

[0105] (精製濃縮処理：第三処理)

第二処理液を更に第三処理して、より微小有用物質が精製濃縮された液を得ることもできる。第三処理では、希釈液は用いず、交互タンジェンシャルフロー濾過操作のみを必要程度に応じ実施できる。以下、上述の第三処理によって得られた濃縮液を「第三処理液」と記載する。

[0106] (回収処理)

本開示の製造方法は、第二処理液または第三処理液を回収することを含んでいてもよい。第二タンク31、第三タンク32及び中空糸膜モジュール3

3内の第二処理液は、加圧装置34で加圧されることにより、流路56を介して第五タンク81に回収できる。第四制御部140は、加圧装置34で加圧する際、開閉弁79を開けて、開閉弁74、75、78、三方弁77、77Aは閉じておく。上述の通り、第四制御部140は、第五タンク81の上部の液の出入口に設置されたファイバセンサで流路56内の濃縮液量を監視し、前記液量がゼロになったと判断した場合、濃縮液の回収を終了してもよい。あるいは、流路56内部の濃縮液回収操作は、人がマニュアルで操作することもできる。さらに、流路56は、エアグripper等で固定保持することができる。

[0107] (フラッシング処理)

逆洗浄を実施する前には、中空糸膜モジュール中に残存している透過液が逆洗浄液に混じり濃縮液側へ流入することを防止するために、洗浄液（希釈液）であらかじめフラッシング処理を行い、中空糸膜モジュール中に残存している透過液を洗浄液（希釈液）で置換する操作を任意に行うことができる。フラッシング処理の方法については上述のとおりである。

[0108] (回収処理直前における中空糸膜面に堆積している微小有用物質洗い出し操作)

本開示の製造方法は、回収処理直前における中空糸膜面に堆積している微小有用物質洗い出し操作を含んでいてもよい。

一例としてある種の培養上清液の中のある種の細胞外小胞の濃縮精製を行う場合において、中空糸膜面に割と強固に堆積している細胞外小胞は、濃縮液に分散されていないため前記回収処理では回収率が低くなることがある。そのため、中空糸膜面に堆積している細胞外小胞を少量の逆洗浄液（希釈液）により濃縮液中へ再分散させる操作工程を、回収処理直前のタイミングで実施することができる。この際、フラッシング操作を十分に実施し、用いる逆洗浄液（希釈液）を少量にすることが好ましく、用いる逆洗浄液（希釈液）容量は、一例として第一流路の容量の半分量から2倍量が好ましい。

この際の通液速度は、精製濃縮工程における通液速度と同等にすることが

できる。

[0109] [その他の実施形態：微小有用物質を含む液の段階的精製濃縮]

本開示の第一の実施形態に係る製造方法におけるその他の実施形態は、微小有用物質を含む液の段階的精製濃縮を含む、精製濃縮液の製造方法である。微小有用物質を含む液の精製濃縮を段階的に実施する方法として、二つ以上の平均内径の中空糸膜モジュールを用いて２段階以上の精製濃縮処理を行うことが例示できる。具体的には、本開示の平均内径が0.6 mm～1.0 mmの中空糸膜モジュール33を用いて１段階目の精製濃縮液を得て、次に平均内径が1.0 mm～1.4 mmの中空糸膜モジュール装置を用いて最終的な精製濃縮液を得る方法が挙げられる。

[0110] [第二の実施形態]

次に、本開示の精製濃縮装置の第二の実施形態について、図面を用いて説明する。なお、以下の記載において、第一の実施形態と同じ構成を有するものは同じ符号を用い、その詳細な説明を省略する。

図14は本開示の第二の実施形態の精製濃縮装置2（以下、「精製濃縮装置2」と記載する）の一例を示す概略構成図である。本開示の精製濃縮装置2は、原料供給部10と、原料供給部10から供給された液を中空糸膜モジュール33で精製し、濃縮する精製濃縮部30とを含み、中空糸膜モジュール33は、前記液を中空糸膜に供給するための、第一の液の出入口33a及び第二の液の出入口33bと、前記中空糸膜を透過した前記液を排出するための第三の液の出入口33c、33dとを有し、精製濃縮部30は、原料供給部10から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュール33の第一の液の出入口33aに前記液を供給する流路が接続された第二タンク31と、原料供給部10から供給された前記液を貯留し、中空糸膜モジュール33の第二の液の出入口33bに前記液を供給する流路が接続された第三タンク32と、第二タンク31及び第三タンク32のいずれかを選択的に加圧する加圧装置34と、加圧装置34で第二タンク31又は第三タンク32内を選択的に加圧して、第二タンク31及び第三タンク32内の前記液を中空糸

膜モジュール 33 に交互に供給するよう制御する第二制御部（図示せず）と、第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の前記液の量を監視する監視装置（図示せず）とを備え、前記第二制御部は、第二タンク 31 及び第二タンク 31 内の液量を設定し、第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の液量が設定された値となるように、加圧装置 34 で第二タンク 31 及び第三タンク 32 を交互に加圧し、第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の前記液量は、前記監視装置の情報に基づいて判断される。

本開示の精製濃縮装置 2 は、概略構成図では省略するバルブ、自動弁、逆流防止弁、オリフィス、流量計、圧力計、液位計、破裂板等の安全装置、除害設備、圧力調整設備、中間槽、サンプリングや多段階分子量分割操作等に使用できる枝抜き設備等が含まれる場合がある。

さらに、精製濃縮装置 2 における監視装置には、装置スケール（規模）等に応じて、適宜、機械式または反射式等の公知の液面計（液位計）やロードセルなどの重量監視装置や積算流量計装置を、単独または複数併用することができる。

[0111] 図 14 の精製濃縮装置 2 は、精製濃縮装置 1 の除去部 20 を有さない構成である。精製濃縮装置 2 も、自動制御によって微小有用物質を精製濃縮できる装置として有用である。この構成によれば、原料供給部 10 内の原料液は、流路 201 を介して直接、精製濃縮部 30 の第二タンク 31（又は第三タンク 32）に供給される。図 14 の精製濃縮装置 2 は、原料液中の不純物濃度が非常に低い、高純度な微小有用物質を含む原料液の精製濃縮装置として有用である。図 1 ～図 13 に示す精製濃縮装置 1 は、除去部 20 と精製濃縮部 30 とを有しており、かつ除去部 20 での不純物除去処理と精製濃縮部 30 での精製濃縮処理とを並行して行うことができる。つまり精製濃縮装置 1 は、より効率的に微小有用物質が精製濃縮された濃縮液を調製できる装置である。一方で精製濃縮装置 2 は除去部 20 を有さず、原料供給部 10 から精製濃縮部 30 に直接原料液を供給して、原料液の精製濃縮処理が可能である。そのため、精製濃縮装置 2 は精製濃縮装置 1 で調製された精製濃縮液を、

さらに精製濃縮するための装置としても有用である。

[0112] また、精製濃縮装置 2 を 2 つ連結することで 3 種の分子量分画ができる。

「3 種の分子量分画ができる」とは、第一の膜の透過液と、第一の膜の濃縮液を第二の膜へ送って、透過液と濃縮液とに分画できることを指す。第二の膜の透過液は、第一の膜で濃縮し、第一の膜の透過液は、別の膜や別の濃縮装置で濃縮することもできる。一実施形態において、精製濃縮装置 2 は、精製濃縮装置 1 で調製された精製濃縮液を、低分子量（例えば、分画分子量が 1 万～10 万の微小有用物質）と高分子量（分画分子量が 10 万超の微小有用物質）とに分画するための装置としても使用できる。

[0113] 図 14 の精製濃縮装置 2 において、第二タンク 31 及び第三タンク 32 は精製濃縮装置 1 と同じ構成とすることができる。精製濃縮装置 2 は、例えば精製濃縮装置 1 のような装置で調製された濃縮液を原料液として用いることが想定されることから、第二タンク 31 及び第三タンク 32 の容積は、精製濃縮装置 1 の第二タンク 31、第三タンク 32 よりも小さくすることもできる。また前記タンクは精製濃縮装置 1 のものよりも大きくすることもできる。また、第一タンク 23 を省略することも可能である。更に、精製濃縮装置 1 と同様に、ファイバセンサ等により第二タンク 31 又は第三タンク 32 の液の出入口の透明部分の液位を管理する場合、第二タンク 31 及び第三タンク 32 の素材は、不透明な材料、例えば金属製や繊維強化樹脂製のタンクを使用できる。

図 14 の精製濃縮装置 2 において、移液装置は、加圧装置 34 のみに限定されるものでなく、ポンプ送液や位置エネルギーを利用する送液を単独または併用した送液装置により行うこともできる。

移液に位置エネルギーを用いるために、昇降装置等を介して第二タンク 31 及び第三タンク 32 内の液面の高さを制御することや、液の出入り口の高さの位置を適宜変更することもできる。

図 14 の精製濃縮装置 2 においては、第二タンク 31 又は第三タンク 32 の液の泡立ちを抑制するため、液の入り口の高さの位置が、液面より高い場

合には、タンク上部の気体を巻き込まないように配管径、送液流量を適宜調整したり、配管出口から液面までの高さを自動調整できる設備、破泡・脱泡設備等を設置することができるし、場合により適切な消泡剤を添加することもできる。

[0114] 図14の精製濃縮装置2において、中空糸膜モジュール33内の中空糸膜は、中空糸膜表面の耐ファウリング性を向上させるため、及び／又は精製濃縮効率や細胞外小胞の回収率を高めるために、精製濃縮装置1と同様の方法で、適切な物質でコーティング処理されていてもよい。

図14の精製濃縮装置2において、中空糸膜モジュール33内の中空糸膜の平均内径は液の粘度によって適宜調整できる。一実施形態において、中空糸膜の平均内径は、0.2～2.0mmであってもよい。前述の精製濃縮装置1と同様に、液粘度が高い場合（例えば、液温20℃、せん断速度25 s⁻¹における液粘度が、10～30 mPa・sである場合）は、平均内径が1.0mm～1.4mmの太径中空糸膜を用いることが好ましい。また、微小有用物質を含む液の運転時の液粘度が低い場合（例えば、液温20℃、せん断速度25 s⁻¹における液粘度が、10 mPa・s未満である場合）は、平均内径が0.2mm～1.0mmの中空糸膜を用いることが好ましい。なお、中空糸膜の平均内径が大きくなると、前記中空糸膜を中空糸膜モジュールとして用いる場合に、有効膜面積が低下しやすくなる。よって、中空糸膜モジュールとした場合の有効膜面積の低下を抑制しやすい観点からは、平均内径が0.2mm～1.0mmの中空糸膜を用いることが好ましい。

[0115] 図14の精製濃縮装置2において、図示した要素以外に、図1～13の精製濃縮装置1と同じ要素を有していてもよい。例えば、図14の精製濃縮装置2において、第二タンク31及び第三タンク32内の液量を監視する監視装置は、前述のタンク内液量監視装置35、36及び／又はカメラを備えていてもよい。精製濃縮装置2の第二制御部も、精製濃縮装置1の第二制御部120と同じ構成とできる。すなわち、第二制御部は、タンク内液量監視装置35、36が備える光センサーが検出した光の透過率の変化に基づいてタ

ンク内の液量を把握し、加圧装置 3 4 で加圧するタンクを決定できる。また、第二制御部は、カメラから出力された液面位置の情報からタンク内の液量を把握して、加圧装置 3 4 で加圧するタンクを決定できる。精製濃縮装置 2 において、前記監視装置は、タンク内液量監視装置 3 5、3 6 を備えていることが好ましい。

上記のように、精製濃縮装置 2 において、移液装置は、加圧装置のみに限定されるものでなく、ポンプ送液や位置エネルギーを利用する送液を単独でまたは併用して行うこともできる。この場合において、第二制御部は、昇降装置等を介して、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の液面の高さを制御するように構成することができ、液の出入り口の高さの位置を制御するように構成することもできる。このような構成により、第二制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記中空糸膜モジュールに選択的に供給するように送液装置を制御することができる。

[0116] 図 1 4 の精製濃縮装置 2 における精製濃縮部 3 0 は、中空糸膜モジュール 3 3 に希釈液を供給し、中空糸膜束 6 0 内の複数の中空糸膜を洗浄する洗浄タンクを備えた構成とすることができる。すなわち、精製濃縮装置 2 の精製濃縮部 3 0 は、希釈液を貯留し、前記希釈液を中空糸膜モジュール 3 3 の第三の液の出入口 3 3 c、3 3 d から供給する流路が接続された第四タンク（図 1 0 の符号 8 0）を備えていてもよい。また、精製濃縮装置 1 と同じ第三制御部 1 3 0 を備えていてもよい。すなわち、精製濃縮装置 2 における第三制御部は、第二タンク 3 1 及び第三タンク 3 2 内の液量の合計が、第二制御部で設定した値以下となった場合に、第四タンクの希釈液を中空糸膜モジュール 3 3 の第三の液の出入口 3 3 c、3 3 d から供給できる。この構成によれば、中空糸膜内部の膜表面に堆積した微小有用物質を回収しながら、原料液を精製濃縮できる。また、第四タンクは、第二タンク 3 1 又は第三タンク 3 2 と接続されていてもよい。

精製濃縮装置 2 において、精製濃縮装置 1 と同様に、中空糸膜モジュール 3 3 に希釈液を供給する（逆洗浄する）前に、中空糸膜モジュール 3 3 中に

残存している透過液が逆洗浄液に混じり濃縮液側へ流入することを防止するために、洗浄液（希釈液）であらかじめフラッシングを行い、中空糸膜モジュール中に残存している透過液を洗浄液（希釈液）で置換する操作を任意に行うことができる。

[0117] 図14の精製濃縮装置2における精製濃縮部30は、第二タンク31、第三タンク32及び中空糸膜モジュール33内の濃縮液を回収するための第五タンク81を備えていてもよい。また、第五タンク81への濃縮液の回収を制御する第四制御部を備えていてもよい。これら第五タンク81及び第四制御部の構成は、精製濃縮装置1と同じ構成とすることができる。

[0118] 第二の実施形態に係る精製濃縮装置で精製濃縮される微小有用物質としては、精製濃縮装置1で説明したのと同じものであってもよく、異なってもよい。第二の実施形態に係る精製濃縮装置で精製濃縮される微小有用物質は、電気活性高分子、レアメタルコロイド粒子、顔料、染料、無機又は有機ナノ粒子等の工業用途における微小有用物質を含むことができる。一般に、これら工業用途における微小有用物質を含む液を精製濃縮処理する場合は、液内の不純物除去処理を必要としない。そのため、本開示の第二の実施形態に係る装置を好適に用いることができる。

[0119] [微小有用物質が精製濃縮された液の製造方法：第二の実施形態]

本開示の精製濃縮装置2を用いた微小有用物質が精製濃縮された液の製造方法としては、前述の精製濃縮装置1を用いた場合の製造方法のうち、不純物除去処理を省いた工程を含む方法が例示できる。なお、精製濃縮装置2は除去部20を有さない構成であるが、精密ろ過膜等を用いたプレろ過処理や凝集沈殿処理等の前処理工程を含む場合がある。

[0120] 図14の精製濃縮装置2において、原料液を原料供給部10内の容器等に仕込んだ後、開閉弁210を開くと、流路201を介して、第二タンク31（又は第三タンク32）に原料液が供給される。第二タンク31（又は第三タンク32）内に供給された原料液は交互タンジェンシャルフローろ過によって精製濃縮される。精製濃縮処理の後、タンク内及び中空糸膜モジュール

内の濃縮液を第五タンク 8 1 に回収する。

[0121] [その他の実施形態：微小有用物質の分子量分画及び精製濃縮]

本開示の第二の実施形態に係る製造方法におけるその他の実施形態は、微小有用物質の分子量分画及び精製濃縮処理を含む、精製濃縮液の製造方法である。微小有用物質を二つ以上の成分として分子量分画することと、それぞれの液の濃縮精製を実施する方法としては、二つ以上の分画分子量の中空糸膜モジュールを備える本開示の精製濃縮装置 2 を、2 以上連結すること、または 2 段階以上の精製濃縮処理を行うことを例示できる。

具体的には、分子量分布の幅広いコンドロイチン硫酸を含む液の精製濃縮液を製造する場合は、分画分子量 1 万の装置と、分画分子量 7 万の装置を連結するか、2 段階以上の精製濃縮操作をすることで、3 つの分子量分布を有するコンドロイチン硫酸の精製（分子量精製）濃縮液を得ることができる。この場合、分画分子量 1 万未満の成分の濃縮は、分画分子量 1 万の装置での透過液を膜分離装置以外の装置で濃縮してもよく、NF 膜濃縮装置（例えば、特許 7 0 2 1 4 0 0 号公報に記載の膜を使用した装置）で濃縮してもよい。

実施例

[0122] 以下、実施例を示して本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の記載によって限定されるものではない。

[0123] <中空糸膜モジュール 3 3 の作製>

平均内径 0.8 mm、平均外径 1.3 mm、分画分子量 30 万のセルロースアセテート（CA）製の中空糸膜（ダイセン・メンブレン・システムズ（株）製）75 本を束ねた中空糸膜束 60 を、ポリカーボネート製の筒状容器 61 に収容して、図 7 に記載の内圧式中空糸膜モジュールを作成した。中空糸膜モジュール 3 3 の 0.1 MPa における純水透過流量は、28.8 L/Hr であった。また、以下の測定方法で測定された γ -グロブリン透過率は 54 % であり、中空糸膜の有効長さが 17 cm で、有効膜面積は 0.0312 m² であり、中空糸膜の充填率は 30 % であった。

[0124] (γ -グロブリン透過率測定)

図15の γ -グロブリン透過率測定装置300を用いて、以下の操作で γ -グロブリン透過率を測定した。

1) タンク302に γ -グロブリン水溶液(γ -グロブリン濃度100 ppm)を仕込んだ。

2) 中空糸膜303を流路305に接続した。

3) バルブV-1から窒素ガスを注入して、タンク302に0.1 MPaの圧力をかけた。中空糸膜303の内表面から外表面に向かって前記水溶液をろ過し、ろ過液は容器307に廃棄し、透過液を容器306に回収した。なお、初期の透過液(約100 mL)は廃棄し、その後に排出された透過液を透過率測定用サンプルとした。

装置300で透過液のサンプルを作成した後、以下の方法で γ -グロブリン透過率を測定した。

4) 分光光度計((株)島津製作所製、製品名「UV2450」)を用いて、 γ -グロブリン水溶液(100 ppm)の280 nmの吸光度(A1)と、透過液の280 nmの吸光度(A2)を測定し、計算式($A2/A1 \times 100$)により γ -グロブリン透過率(%)を算出した。

[0125] <精製濃縮装置1>

以下に図13の精製濃縮装置1を用いた場合の具体的操作を説明する。

原料供給部10、除去部20、精製濃縮部30を含む要素を、幅800 mm、奥行き350 mm、高さ1745 mmのハウジング100(図示せず)内に配置する。

精製濃縮装置1の頂部にファンフィルター装置91(アズワン(株)製、製品名「ピュアスペース01」、ULPAフィルターユニット付き、風量1 m³/min)(図示せず)を配置して、ろ過空気がハウジング100内にダウンフローされる構成とする。

また、ハウジング100内には、UVランプ92(大和電機産業(株)製、グロー式殺菌灯)(図示せず)を4灯取りつける。

精製濃縮装置 1 の底部には、自在ストッパー付き移動キャスター（図示せず）を取りつける。

精製濃縮装置 1 の前面には扉（図示せず）が配置され、前記扉には精製濃縮装置 1 の工程を管理するタッチパネル（（株）キーエンス、製品名「タッチパネルディスプレイ 型式：VT-W4M」）（図示せず）を取り付ける。

精製濃縮装置 1 には圧縮空気を取り込み口（図示せず）と、DC 電源（図示せず）を配置する。圧縮空気は、レギュレーターで 0.05 MPa まで減圧され、担体カラム 21 の洗浄、平衡化处理、不純物除去処理、精製濃縮処理、逆洗浄処理のために、複数の開閉弁（2 ポート電磁弁）、三方弁（3 ポート電磁弁）、電磁弁マニホールドを介して、液の供給先の切り替えや、供給の制御を行う。また、レギュレーターで 0.3 MPa まで減圧した圧縮空気は、濃縮液を回収する際のエアージェリップにも用いる。

[0126] （原料供給部 10）

原料液を貯留する容器 11 を配置する。

[0127] （除去部 20）

担体カラム 21 は、内径 25 mm ϕ のカラム内に、吸着材担体（Cytiva 製、製品名「CaptTMCore 700」（17548101））5 mL を封入した構成とする。

ろ過部材 22 としては、精密ろ過膜（ミリポア社製、製品名「Millex-GP」、材質：ポリエーテルスルホン、孔径：0.22 μ m）を用いる。

第六タンク 25 には、洗浄液として 2 M 塩化ナトリウム水溶液を仕込む。

第七タンク 26 には、平衡化液として、50 mM Tris-HCl（pH 7.2）溶液を仕込む。

図 13 に示す通り、複数の開閉弁（電磁弁）を介して、タンク 24、第六タンク 25、第七タンク 26 から流路 41A を介して担体カラム 21 に向けて液が供給されるように構成する。流路 41A にはチューブポンプ（図示せ

ず)を配置する。

[0128] (精製濃縮部30)

中空糸膜として、上記で作製した中空糸膜モジュール33を用いる。

第二タンク31、第三タンク32には、ポリ(メタ)アクリレート製の透明容器(容量120mL)を用いた。第二タンク31及び第二タンク31底部の液の出入口には、光センサーを含むタンク内液量監視装置35、36(株)キーエンス製、パイプ取付型液面検出ファイバユニット(型式:FU-95S))を配置する。

第四タンク80には、希釈液としてリン酸緩衝液(PBS)を仕込む。

[0129] [実施例1]

原料液として、下記方法で調製したエクソソームを含む間葉系幹細胞の培養上清液800mLを容器11に仕込む。

＜エクソソームを含む間葉系幹細胞の培養上清液の調製＞

ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞は、Ultra ExoMCulture Medium for Extracellular Vesicles(FK-K0204024, Santeja)を用いて培養する。

細胞が培養容器接着面の約80%を覆った状態で、フェノールレッド不含のUltra ExoMCultureMediumに交換して、48時間培養を行う。

その後、培養上清液を遠心力2000×gで10分間、4℃で遠心して細胞破片を取り除き培養上清液を調製する。

[0130] 容器11内の原料液をろ過部材22に供給して全量前処理を行い、その後、タンク24(前処理液貯留タンク)に貯留する。

次に、第六タンク25(洗浄液貯留タンク)から洗浄液50mLを担体カラム21に5mL/分で供給して担体カラム21を洗浄した後、洗浄液を廃液タンクに排出する。その後、第七タンク26(平衡化液貯留タンク)から平衡化液50mLを担体カラム21に5mL/分で供給して担体カラム21を平衡化した後、平衡化液を廃液タンクに排出する。

[0131] <不純物除去処理>

タンク 2 4 内の前処理液 5 0 m L を担体カラム 2 1 に供給し、前処理液中の宿主由来タンパク質（H C P s）や D N A 等を担体で吸着除去する。得られた粗精製液を、流路 4 2 A を介して第一タンク 2 3 に供給する。その後、2 回目の担体カラム 2 1 の洗浄、平衡化処理を上記と同じ条件で実施する。2 回目の洗浄、平衡化処理の後、タンク 2 4 内の前処理液 5 0 m L を担体カラム 2 1 に供給して 2 回目の不純物除去処理を実施する。その後は同様に、3 回目の担体カラム 2 1 の洗浄、平衡化処理と、3 回目の不純物除去処理を行う。続いて、4 ～ 1 6 回目の担体カラム 2 1 の洗浄、平衡化処理と、4 ～ 1 6 回目の不純物除去処理を行う。

[0132] <精製濃縮処理>

不純物除去処理と精製濃縮処理を並行して行う。

まず、1 ～ 4 回目の不純物除去処理によって貯留された第一タンク 2 3 内の粗精製液（約 2 0 0 m L）を 0. 0 5 M P a の圧縮空気です第二タンク 3 1 まで送液する。その際、まず 1 回目の粗精製液（約 5 0 m L）を第二タンク 3 1 に送液した後に加圧装置 3 4 で第二タンク 3 1 を加圧して、管理液面位置 C の液量を 1 0 m L に設定し、第二タンク 3 1 の液量が 1 0 m L を下回らないように交互タンジェンシャルフローろ過（T F F）による精製濃縮処理を実施する。その後、逐次、2 ～ 4 回目の粗精製液を第二タンク 3 1 に送液しながら、第二タンク 3 1 の液量が 1 0 m L を下回らないように交互タンジェンシャルフローろ過（T F F）による精製濃縮処理を継続して行う。

[0133] 次に、逆洗浄処理を行う。逆洗浄処理には、希釈液を 9 0 m L 用いる。また、希釈液には、リン酸緩衝液（P S B）を用いる。希釈液で逆洗浄処理を行った後、第二タンク 3 1 の液量が 1 0 m L を下回らないように、交互タンジェンシャルフローろ過（T F F）による精製濃縮処理を行う。その後、5 ～ 8 回目の不純物除去処理によって得られた粗精製液、9 ～ 1 2 回目の粗精製液、及び 1 3 ～ 1 6 回目の粗精製液を、それぞれ第二タンク 3 1 に注ぎ足しながら、精製濃縮処理と逆洗浄処理を行う。なお、逆洗浄処理は、前述の

逆洗浄処理後の粗精製液の送液量が200 mLになる毎に実施し、精製濃縮処理は第二タンク31の液量が10 mLを下回らないように交互タンジェンシャルフローろ過（TFF）に行う。合計で800 mLの粗精製液の精製濃縮処理及び逆洗浄処理を行ない、第二タンク31の液量が10 mLになった後は、希釈液量を90 mL（10倍希釈）とした逆洗浄処理と精製濃縮処理を3回繰り返して、エクソソームの精製濃縮液を得る。

[0134] <回収処理>

得られたエクソソームの精製濃縮液は流路56を介して第五タンク81に全量回収する。濃縮液の回収処理は第五タンク81の上部の液の出入口に設置されたファイバセンサで流路56内の濃縮液量を監視し、ファイバセンサが気泡を感知する段階まで2つのタンク内の濃縮液を第五タンク81へ回収する。この時得られるエクソソーム精製濃縮液の収量は0.8～80 mLとなり、エクソソーム回収率は50～100%となる。また、タンパク質除去率は80%以上となることが想定される。

[0135] [実施例2]

原料液として、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞培養上清液800 mLを用いた。培養上清液中のタンパク質濃度、CD9/CD63陽性細胞外小胞をそれぞれBradford法、ELISA法で定量したところ、タンパク質濃度は0.49 mg/mL、152 pg/mLであった。

上記培養上清液に対して、50 mM Tris-HCl（pH 7.2）溶液で平衡化した、カチオン交換とサイズ排除を有するミックスモード担体を80 mL添加し、50 mLチューブに分注後、ローテーターを用いて10分間室温にて10 rpm/minの回転速度で転倒混和した。その後、室温にて10,000 × gで5分間遠心し、さらに上清液を0.22 μmフィルトレーションユニットを用いてろ過することで、担体を除去した。得られた担体処理済み培養上清液790 mL中のタンパク質濃度は0.06 mg/mL、エクソソーム濃度は144 pg/mLであった。

[0136] 次に担体処理した培養上清液を、容器11から流路43を介して第二タン

ク 3 1 に供給し、加圧装置 3 4 での加圧条件を、窒素ガス圧 0. 0 4 M P a として交互タンジェンシャルフローろ過を行った。残量が 1 0 m L となったところで、逆洗浄を行うため、第四タンク 8 0 より 9 0 m L のリン酸緩衝液 (P B S) を中空糸膜モジュール 3 3 側から供給した。その後、交互タンジェンシャルフローろ過と、9 0 m L のリン酸緩衝液の供給をさらに 2 回繰り返した後、交互タンジェンシャルフローろ過によって 1 2. 9 m L の精製濃縮液を得た。得られた精製濃縮液のタンパク質濃度は 0. 0 9 m g / m L 、エクソソーム濃度は 7 1 4 9 p g / m L であった。濃度と液量から算出したタンパク質除去率は 9 9 % 以上であり、回収率は 7 6 % であった。

[0137] [比較例 1]

比較例 1 として、タンパク質濃度 0. 5 2 m g / m L 、エクソソーム濃度 1 3 0 p g / m L の培養上清液 8 0 0 m L を原料液として用い、容器 1 1 から流路 4 3 を介して第二タンク 3 1 に前記原料液を供給して、交互タンジェンシャルフローろ過による精製濃縮処理を行った。なお、比較例 1 では途中の洗浄工程を、逆洗浄ではなく順洗浄により行った以外は、実施例 2 と同じ条件で精製濃縮処理を行った。順洗浄は、第四タンク 8 0 内の希釈液を流路 5 5 B を介して第三タンク 3 2 に供給した後、中空糸膜モジュール 3 3 まで希釈液を供給して中空糸膜を洗浄することにより実施した。最終的に、1 1 m L の精製濃縮液を得た。また精製濃縮液中のタンパク質濃度は 0. 0 2 m g / m L 以下であり、エクソソーム濃度は 2 5 9 5 p g / m L であった。濃度と液量から算出したタンパク質除去率は 9 9 % 以上であり、回収率は 2 7 % であった。この結果より、逆洗浄を行うことにより、回収率が向上することが分かった。

[0138] [実施例 3]

ここでは、精製濃縮工程において、中空糸膜の表面を生体分子でコーティング処理することにより、微小有用物質の回収率をさらに向上させる方法について検討した。

原料液として、タンパク質濃度 0. 4 9 m g / m L 、エクソソーム濃度 1

66. 4 pg/mLの間葉系幹細胞の培養上清液790 mLを用いた。

エクソソームの濃度は、CD9/CD63 ELISA法 (EXHO102 EL、コスモ・バイオ)で定量分析したところの、検量線作成に用いたCD9/CD63融合標準タンパク質相当量である。

培養上清液790 mLに対して、50 mM Tris-HCl (pH 7.2) 溶液で平衡化した担体 (細孔内部が正に荷電されている多孔質粒状物であり、細胞外小胞を除いた負に荷電されている不要物を吸着保持できる吸着剤) を79 mL添加し、ローテーターを使用して室温にて10分間転倒混和した。その後、担体-細胞上清混合液から0.22 μmフィルトレーションユニット (S2GPU11RE, Merck Millipore) を用いて、担体を除去し、担体処理した培養上清液を得た。

[0139] 次に、担体処理した培養上清液をろ過圧力30~40 kPaの交互タンジェンシャルフロー方式でろ過して精製及び濃縮した。ろ過膜には、酢酸セルロース製中空糸膜モジュール (分画分子量30万、膜面積0.062 m²) を用いた。前記ろ過膜は、膜表面を生体分子でコーティング処理したものをを用いた。コーティング処理は、前記ろ過膜に、PBSに溶解した1.3 mg/mLのスkimミルク溶液を200 mL/分の通液速度で10分間通液することにより行った。これにより、膜表面にskimミルク中のある種の生体分子が薄層として吸着結合したコーティング処理膜が得られた。その後、250 mLのPBSでろ過膜を通水洗浄し、薄層上にただ堆積されただけの余分なskimミルクを除いた。

[0140] ここで、前記ろ過膜とskimミルク中のある種の生体分子との結合状態は、水洗および運転操作条件下では脱落せず、さらに長期運転でもろ過性能の減少が殆どない程度にまで強く結合されている。

[0141] 濃縮液の液量が10 mLになるまで交互タンジェンシャルフローろ過を繰り返す、その後、90 mLのPBSを中空糸膜モジュールに供給することで濃縮液を希釈した。この濃縮ろ過・希釈工程をさらに2回繰り返した後、交互タンジェンシャルフローろ過によって11.9 mLの精製濃縮液 (細胞外

小胞精製物)を得た。最終的に得られたエクソソームの濃縮液中の細胞外小胞をCD9/CD63 ELISA法(EXHO102EL、コスモ・バイオ)で定量分析したところ、検量線作成に用いたCD9/CD63融合標準タンパク質相当で3,746.7 pg/mLであり、回収率は33.9%であった。

[0142] [比較例2]

スキムミルクによるコーティングを行っていない中空糸膜を用いて同様の操作を行ったところ、回収率は7.4%であった。

[0143] 実施例3及び比較例2の結果から、生体分子によりコーティング処理された中空糸膜(すなわち、少なくとも一部の領域上に、微小有用物質とは異なる種類の生体分子が付着している中空糸膜)を用いることにより、微小有用物質の回収率が向上することが分かった。

[0144] [実施例4]

ここでは、精製濃縮工程において得られる精製濃縮液中の微小有用物質の純度をさらに向上させる方法について検討した。

[0145] 原料液として、タンパク質濃度1.49 mg/mL、エクソソーム濃度196 pg/mLの羊膜由来の間葉系幹細胞の培養上清液40 mLを用いた。培養上清液中のエクソソームを、酢酸セルロース製中空糸膜モジュール33(分画分子量30万、膜面積0.01 m²、透過側容積(つまり中空糸外部空間(ECS: Extracapillary Space)10 mL)を搭載した精製濃縮装置を用いて、ろ過圧力30~40 kPaの交互タンジェンシャルフロー方式で分離精製及び濃縮を行った。培養上清液を約10 mLまで濃縮した後、希釈液(PBS)40 mLを中空糸膜モジュールの第三の液の出入口33cから注入し、第三の液の出入口33dに排出した。これにより、ECS内に滞留する透過液中の不純物をPBSによってフラッシングした。その後、同じ希釈液(PBS)90 mLを中空糸膜モジュール33の透過側から濃縮側に圧入して逆圧洗浄(逆洗)を行った。再び、同様の条件で分離精製操作を行い、培養上清液が約10 mLに達した時点で同様のフラッ

シングと逆洗を行う操作をさらに2回行った。逆洗を3回行った後に培養上清液を5.5 mLまで濃縮した。得られた精製濃縮液中のタンパク質量残存量をBCA assayによって測定したところ、タンパク質濃度は0.16 mg/mLであった。結果を図17に示す。また、得られた精製濃縮液について、TECAN製吸光マイクロプレートリーダーInfinite M Nano+を用いて、吸光度を測定した。結果を図18に示す。

[0146] [比較例3]

実施例4と同様の分離精製操作において、PBSによるECS内のフラッシング操作を行わず、培養上清液を5.2 mLまで濃縮した。得られた精製濃縮液中のタンパク質量残存量をBCA assayによって測定したところ、タンパク質濃度は0.36 mg/mLであった。結果を図17に示す。また、得られた精製濃縮液について、実施例4と同様に吸光度を測定した。結果を図18に示す。

[0147] 図17、18において、「Before」は、精製濃縮処理前の試料を意味しており、「ECFあり」は実施例4の方法で得られた精製濃縮液を示し、「ECSなし」は比較例3の方法で得られた精製濃縮液を示している。図17から明らかなように、実施例4の方法によれば、不純物としてのタンパク質濃度がより低下しており、エクソソームの純度をより向上させることができる。図18において、波長557 nm付近のピークは、培養液中にpH指示薬として含まれるフェノールレッドに由来するピークであり、精製濃縮液における不純物に該当する。図18に示すように、実施例4の方法によれば、不純物としてのフェノールレッドの濃度がより低下しており、エクソソームの純度をより向上させることができる。

[0148] これらの結果から、中空糸膜モジュールの逆洗浄工程前に、ECS内をPBSや生理食塩水等の希釈液で押し流し（フラッシング）、ECS内に残存する不純物を除去することにより、得られる精製濃縮液中の不純物の濃度をより低下させることができ、その結果、微小有用物質の純度をさらに向上させることができることが分かった。非限定的な理由として、フラッシングす

ることにより、その後の希釈液による逆洗工程において精製濃縮液にECS内の不純物が再混入することを防ぐことができるためであると考えられる。

[0149] [実施例5]

原料液として、タンパク質濃度1.25mg/mL、エクソソーム濃度138pg/mLの羊膜由来の間葉系幹細胞の培養上清液200mLを用いた。培養上清液中のエクソソームを、酢酸セルロース製中空糸膜モジュール（分画分子量30万、膜面積0.01m²、ESC10mL）を搭載した精製濃縮装置を用いて、交互タンジェンシャルフロー方式で分離精製及び濃縮を行った。培養上清液を約17mLまで濃縮した後、希釈液（PBS）40mLを中空糸膜モジュールの第三の液の出入口33cから注入し、第三の液の出入口33dに排出した。これにより、ECS内に滞留する透過液中の不純物をPBSによってフラッシングした。その後、同じ希釈液（PBS）160mLを中空糸膜モジュール33の透過側から濃縮側に圧入して逆圧洗浄（逆洗）を行った。再び、同様の条件で分離精製操作を行い、培養上清液が約17mLに達した時点で同様のフラッシングと逆洗を行う操作をさらに2回行った。逆洗後の培養上清液を17mLまで濃縮した。再度、逆洗を行って中空糸膜表面に付着した微小有用物質を精製濃縮液中に洗い出し、精製濃縮液50mLを回収した。得られた精製濃縮液中の細胞外小胞をCD9/CD63 ELISA法（EXHO102EL、コスモ・バイオ）で定量分析したところ、検量線作成に用いたCD9/CD63融合標準タンパク質相当で486pg/mLであり、回収率は88%であった。この結果から、精製濃縮液を回収する直前に中空糸膜モジュールに希釈液をさらに供給して微小有用物質の洗い出し操作を行うことにより、微小有用物質の回収率を80%以上にすることができることが分かった。

符号の説明

- [0150] 1、2 精製濃縮装置、10 原料供給部、11 容器、20 除去部、21 担体カラム、22 ろ過部材、23 第一タンク（粗精製液貯留タンク）、24 タンク（前処理液貯留タンク）、25 第六タンク（洗浄液貯留

タンク)、26 第七タンク(平衡化液貯留タンク)、30 精製濃縮部、
31 第二タンク、32 第三タンク、33 中空糸膜モジュール、33a
第一の液の出入口、33b 第二の液の出入口、33c, 33d 第三の
液の出入口、34 加圧装置、35, 36 タンク内液量監視装置、41～
43 流路、80 第四タンク(希釈液貯留タンク)、81 第五タンク(
回収タンク)、91 ファンフィルター装置、92 UVランプ、110
第一制御部

請求の範囲

- [請求項1] 微小有用物質を含む液を供給する原料供給部と、
前記液中の不純物を除去する除去部と、
前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮する精製濃縮部と、
前記原料供給部から前記精製濃縮部への前記液の流通、又は、前記除去部から前記精製濃縮部への前記液の流通のタイミングを制御する第一制御部とを含む、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置。
- [請求項2] 前記除去部が、前記液内の不純物を除去し、不純物を除去した後の前記液を前記精製濃縮部に供給する流路が接続された担体カラムを備える、請求項1に記載の精製濃縮装置。
- [請求項3] 前記除去部が、前記液内の不純物を除去するろ過部材を備え、
前記ろ過部材は、前記原料供給部から前記除去部へ前記液を供給する流路中に介装されている、請求項1または2に記載の精製濃縮装置。
- [請求項4] 前記除去部が、前記担体カラムで処理した前記液を貯留する第一タンクを備え、
前記第一タンクは、前記担体カラムから前記精製濃縮部へ前記液を供給する流路中に配置され、かつタンク内の前記液を前記精製濃縮部に供給する流路が接続されており、
前記第一制御部は、前記タンク内の前記液を前記精製濃縮部へ供給するタイミングを制御する、請求項2に記載の精製濃縮装置。
- [請求項5] 前記中空糸膜の、平均内径が0.2～1.4mmであり、分画分子量が1万～100万である、請求項1または2に記載の精製濃縮装置。
- [請求項6] 前記精製濃縮部が、複数の前記中空糸膜が前記液の出入口を有する容器内に収容された中空糸膜モジュールを備え、
前記容器は、前記中空糸膜に前記液を供給するための、第一の液の

出入口及び第二の液の出入口と、前記中空糸膜を透過した前記液を排出するための第三の液の出入口を、少なくとも有する、請求項 1 に記載の精製濃縮装置。

[請求項7] 前記中空糸膜モジュールが内圧式である、請求項 6 に記載の精製濃縮装置。

[請求項8] 前記精製濃縮部は、前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第二タンクと、

前記原料供給部又は前記除去部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第二の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第三タンクと、

前記第二タンク又は前記第三タンクのいずれかを選択的に加圧する加圧装置と、

前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記中空糸膜モジュールに交互に供給するよう制御する第二制御部とを備える、請求項 6 に記載の精製濃縮装置。

[請求項9] 前記第二制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を設定し、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量が設定された値となるように、前記加圧装置で前記第二タンク及び前記第三タンクを交互に加圧する、請求項 8 に記載の精製濃縮装置。

[請求項10] 前記第二タンク及び前記第三タンクは、タンク底部の前記液の出入口に光センサーを含むタンク内液量監視装置をそれぞれ備え、

前記タンク内液量監視装置は、前記光センサーで前記液の出入口内に光を照射して光の透過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の液量を監視するよう構成されており、

前記第二制御部は、前記タンク内液量監視装置で前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を判断して、前記加圧装置で加圧するタン

クを決定する、請求項 9 に記載の精製濃縮装置。

[請求項11] 前記精製濃縮部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置を監視するカメラを備え、

前記第二制御部は、前記カメラから出力された前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置の情報に基づいて、前記加圧装置で加圧するタンクを決定する、請求項 9 に記載の精製濃縮装置。

[請求項12] 前記精製濃縮部が、希釈液を貯留し、前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給する流路が接続された第四タンクと、

前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給するタイミングを制御する第三制御部とを備え、

前記第三制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量の合計が、前記第二制御部で設定した値以下となった場合に、前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口から供給する、請求項 8 に記載の精製濃縮装置。

[請求項13] 前記精製濃縮部が、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口又は前記第二の液の出入口と流路で接続され、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を回収する第五タンクと、前記第五タンクへの前記液の回収を制御する第四制御部とを備える、請求項 8 に記載の精製濃縮装置。

[請求項14] 前記第二タンク及び前記第三タンクは、タンク底部の前記液の出入口に光センサーを含むタンク内液量監視装置をそれぞれ備え、

前記タンク内液量監視装置は、前記光センサーで前記液の出入口内に光を照射して光の透過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の液量を監視するよう構成されており、

前記第四制御部は、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して前記第二タンク及び前記第三タンク内の前

記液を前記第五タンクへ回収し、前記タンク内液量監視装置で前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を判断して、前記加圧装置を停止させる、請求項 13 に記載の精製濃縮装置。

[請求項15] 前記精製濃縮部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置を監視するカメラを備え、

前記第四制御部は、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記第五タンクへ回収し、前記カメラから出力された前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置の情報に基づいて前記加圧装置を停止させる、請求項 13 に記載の精製濃縮装置。

[請求項16] 前記原料供給部、前記除去部、及び前記精製濃縮部を含む要素がハウジング内に配置された構成とされ、前記ハウジング内のクリーン度を管理する管理部を備え、

前記管理部は、ろ過空気を前記ハウジング内に供給するファンフィルター装置を備える、請求項 1 または 2 に記載の精製濃縮装置。

[請求項17] 前記管理部は、UVランプをさらに備える、請求項 16 に記載の精製濃縮装置。

[請求項18] 前記除去部が、前記担体カラムを洗浄する洗浄液を貯留する第六タンクと、前記担体カラムを平衡化する平衡化液を貯留する第七タンクとを備える、請求項 2 に記載の精製濃縮装置。

[請求項19] 前記ろ過部材は、前記原料供給部の下部に配置されており、前記原料供給部から前記ろ過部材への前記液の供給が前記液の自重によって行われる、請求項 3 に記載の精製濃縮装置。

[請求項20] 前記第二タンク及び前記第三タンクの長手方向の側面が、前記中空糸膜モジュールの長手方向と平行となるように配置されている、請求項 8 に記載の精製濃縮装置。

[請求項21] 前記除去部が、前記液内の不純物を除去し、不純物を除去した後の前記液を前記精製濃縮部に供給する流路が接続された担体カラムと、

前記担体カラムで処理した前記液を貯留する第一タンクを備え、

前記第二タンク及び前記第三タンクは、前記担体カラム及び前記第一タンクと流路で接続され、かつ前記担体カラム及び前記第一タンクの上方位置に配置されている、請求項 20 に記載の精製濃縮装置。

[請求項22] 前記微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択される、請求項 1 または 2 に記載の精製濃縮装置。

[請求項23] 請求項 1 または 2 に記載の精製濃縮装置を用いて、微小有用物質が精製濃縮された前記液を製造する方法であって、

前記微小有用物質を含む原料液を前記精製濃縮装置に供給して、前記液中の不純物を除去すること、及び／又は前記液を中空糸膜で精製し、かつ濃縮することを含む、微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項24] 前記液中の不純物を除去することが、担体カラムで前記液中の不純物を吸着除去することを含む、請求項 23 に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項25] 前記液を前記中空糸膜で精製し、濃縮することが、中空糸膜モジュールで前記液を交互タンジェンシャルフローろ過することを含む、請求項 23 に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項26] 前記液を前記中空糸膜で精製し、濃縮することが、前記中空糸膜の表面に堆積した前記微小有用物質を回収しながら、中空糸膜モジュールで前記液を交互タンジェンシャルフローろ過することを含む、請求項 23 に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項27] 前記液を前記中空糸膜で精製し、濃縮することが、濃縮された前記液に希釈液を供給してさらに精製し、濃縮することを含み、

前記希釈液は、前記原料液の量 (A) に対する、前記濃縮された前記液の量 (B) (B/A) が、 $1/2 \sim 1/200$ となった場合に、前記液に供給される、請求項 23 に記載の微小有用物質の精製濃縮液

の製造方法。

[請求項28] 前記担体カラムで前記液中の不純物を除去することと、前記中空糸膜で精製し、濃縮することが並行して行われる、請求項24に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項29] 前記微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択される、少なくとも1つである、請求項23に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項30] 微小有用物質を含む液を供給する原料供給部と、
前記原料供給部から供給された前記液を中空糸膜モジュールで精製し、濃縮する精製濃縮部とを含み、

前記中空糸膜モジュールは、前記液を中空糸膜に供給するための、第一の液の出入口及び第二の液の出入口と、前記中空糸膜を透過した前記液を排出するための第三の液の出入口とを有し、

前記精製濃縮部は、前記原料供給部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第二タンクと、

前記原料供給部から供給された前記液を貯留し、前記中空糸膜モジュールの前記第二の液の出入口に前記液を供給する流路が接続された第三タンクと、

前記第二タンク及び前記第三タンク内のいずれかの前記液を前記中空糸膜モジュールに選択的に送液する送液装置と、

前記送液装置を、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記中空糸膜モジュールに選択的に供給するように制御する第二制御部と、

前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液の量を監視する監視装置とを備え、

前記第二制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量を設定し、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液量が設定された値

となった場合に、前記送液装置が前記第二タンク又は前記第三タンクから前記中空糸膜モジュールに選択的に送液するよう制御し、

前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量は、前記監視装置の情報に基づいて判断される、微小有用物質を含む液の精製濃縮装置。

[請求項31] 前記中空糸膜の、平均内径が0.2～2.0mmであり、分画分子量が5,000～300万である、請求項30に記載の精製濃縮装置。

[請求項32] 前記監視装置が、前記第二タンク及び前記第三タンク内の液面位置を監視するカメラを備える、請求項30または31に記載の精製濃縮装置。

[請求項33] 前記監視装置が、前記第二タンク及び前記第三タンクの底部の前記液の出入口にそれぞれ設けられ、前記液の出入口内に光を照射して光の透過率を検出し、前記透過率の変化に基づいてタンク内の前記液の量を監視する光センサーを備える、請求項30または31に記載の精製濃縮装置。

[請求項34] 前記中空糸膜モジュールが内圧式である、請求項30または31に記載の精製濃縮装置。

[請求項35] 前記精製濃縮部が、希釈液を貯留し、前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給する流路が接続された第四タンクと、

前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口に供給するタイミングを制御する第三制御部とを備え、

前記第三制御部は、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量の合計が、前記第二制御部で設定した値以下となった場合に、前記第四タンク内の前記希釈液を前記中空糸膜モジュールの前記第三の液の出入口から供給する、請求項30に記載の精製濃縮装置。

- [請求項36] 前記精製濃縮部が、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口又は前記第二の液の出入口と流路で接続され、前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を回収する第五タンクと、前記第五タンクへの前記液の回収を制御する第四制御部とを備える、請求項30または31に記載の精製濃縮装置。
- [請求項37] 前記送液装置が、加圧装置を備え、
前記第四制御部は、前記加圧装置で前記第二タンク又は前記第三タンク内を選択的に加圧して前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液を前記第五タンクへ回収し、前記監視装置で前記第二タンク及び前記第三タンク内の前記液量を判断して、前記加圧装置を停止させる、請求項36に記載の精製濃縮装置。
- [請求項38] 前記微小有用物質が、電気活性高分子、レアメタルコロイド粒子、顔料、染料、無機又は有機ナノ粒子、タンパク質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、血管新生因子、成長因子、酵素、抗体、血漿タンパク、ウィルス、細胞外小胞、酵母、イースト、細胞、多糖類、及び微細藻類から選択される、請求項30または31に記載の精製濃縮装置。
- [請求項39] 前記中空糸膜の少なくとも一部に、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子が付着している、請求項1、2、30または31に記載の精製濃縮装置。
- [請求項40] 前記中空糸膜モジュールが、少なくとも2つの前記第三の液の出入口を有し、
前記第三制御部は、前記中空糸膜モジュールの前記第一の液の出入口及び前記第二の液の出入口の前記液の流通を止めた状態で、前記第四タンク内の前記希釈液を、前記中空糸膜モジュールが有する少なくとも2つの前記第三の液の出入口のうちの1つから供給し、その後、前記第一の液の出入口及び前記第二の液の出入口を前記液の流通を可能にした状態で、前記第四タンク内の前記希釈液を、前記中空糸膜モ

ジュールが有する少なくとも2つの前記第三の液の出入口のうちの少なくとも1つから供給する、請求項12または35に記載の精製濃縮装置。

[請求項41] 微小有用物質と不純物とを含む原料の液から、不純物を除去したのち、前記液を精製濃縮して、微小有用物質の精製濃縮液を製造する方法であって、

前記液を精製濃縮することが、中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することを含み、かつ前記精製濃縮の過程において、前記中空糸膜モジュールの透過液側から希釈液を圧入して、前記中空糸膜を逆洗浄処理することを含む、微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項42] 前記中空糸膜モジュールに収容される前記中空糸膜が、セルロースアセテートを含む樹脂材料により構成されている、請求項41に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項43] 前記中空糸膜モジュールに収容される前記中空糸膜の分画分子量が、10万～100万である、請求項41に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項44] 前記液中の不純物を除去することが、担体カラムで前記液中の不純物を吸着除去することを含む、請求項41または42に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

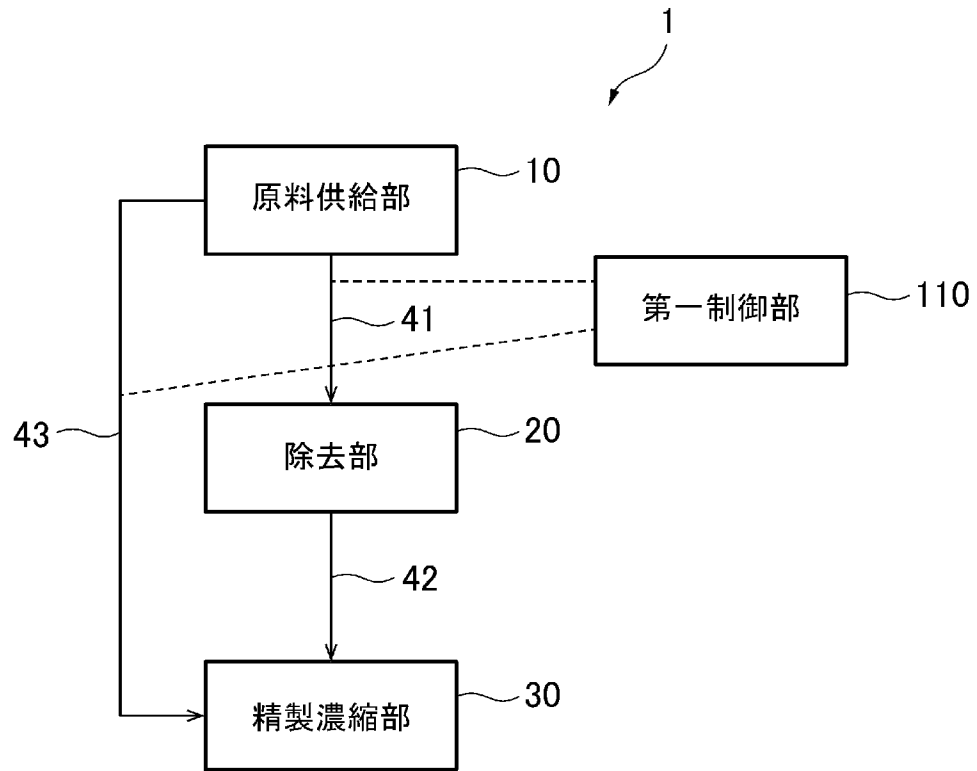
[請求項45] 前記中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することが、前記液を交互タンジェンシャルフローろ過することを含む、請求項41または42に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

[請求項46] 前記中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することが、精製濃縮された前記液に希釈液を供給してさらに精製濃縮することを含み、前記希釈液は、前記原料の液の量(A)に対する、前記精製濃縮された前記液の量(B) (B/A) が、 $1/2 \sim 1/200$ となった場合に、前記液に供給される、請求項41または42に記載の微小有

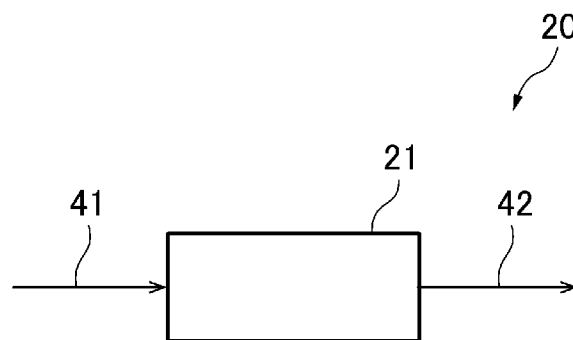
用物質の精製濃縮液の製造方法。

- [請求項47] 前記担体カラムで前記液中の不純物を除去することと、前記中空糸膜モジュールを用いて前記液を精製濃縮することとが、並行して行われる、請求項44に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。
- [請求項48] 前記微小有用物質が、細胞外小胞、抗体、ウィルス、タンパク質、酵素、及び核酸から選択される、少なくとも1つである、請求項41または42に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。
- [請求項49] 前記中空糸膜の少なくとも一部に、前記微小有用物質とは異なる種類の生体分子が付着している、請求項41または42に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。
- [請求項50] 前記逆洗浄処理することに先立ち、前記中空糸膜モジュールをフラッシング処理することを含む、請求項41または42に記載の微小有用物質の精製濃縮液の製造方法。

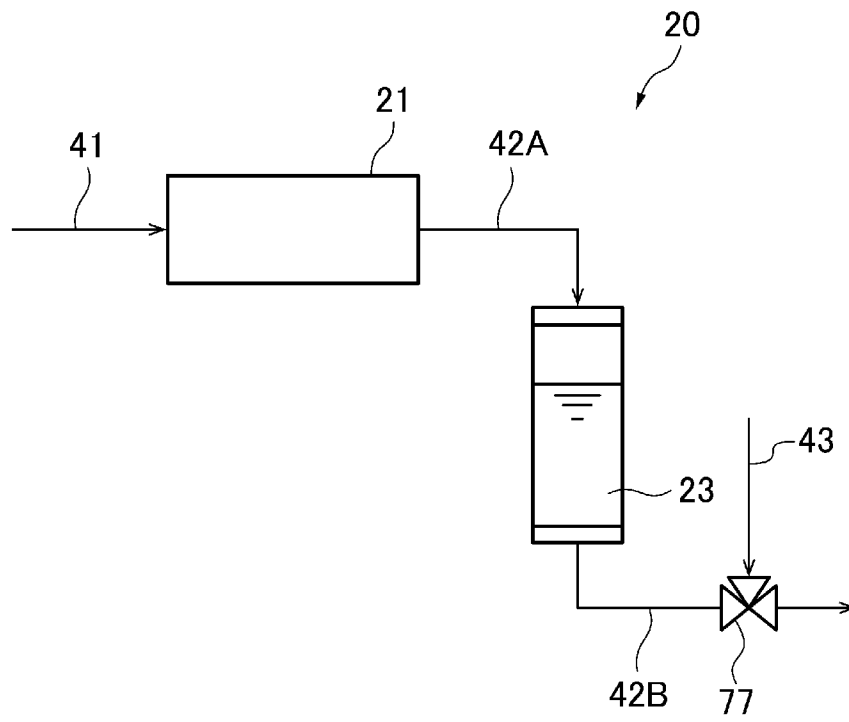
[図1]



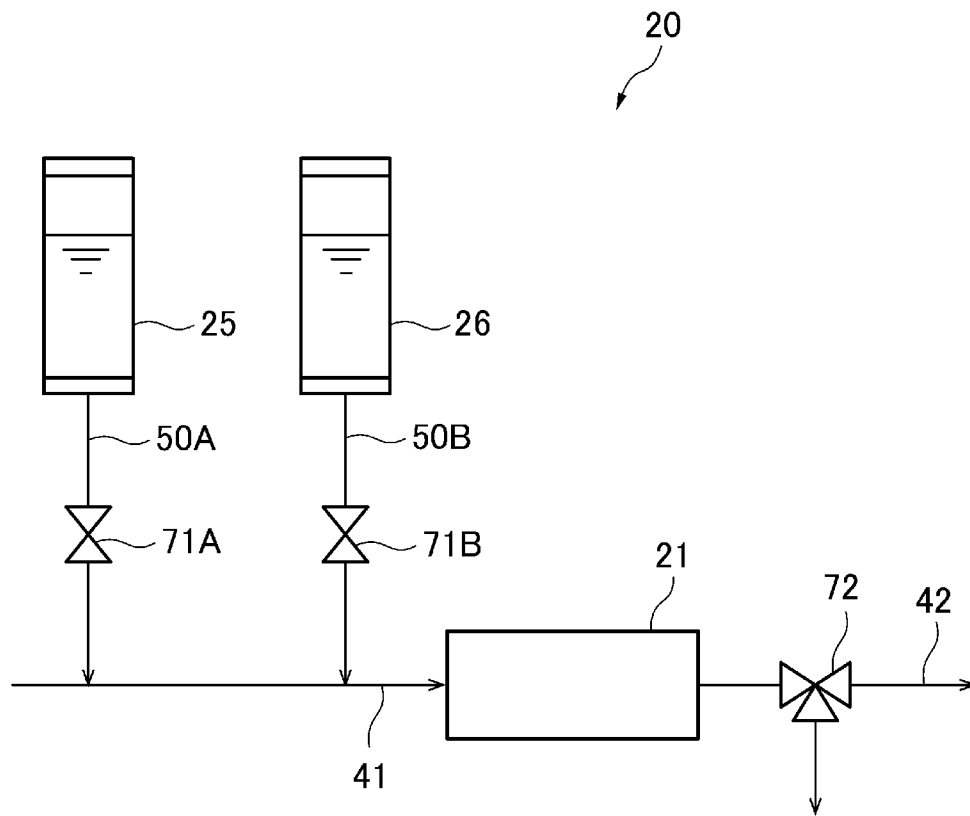
[図2]



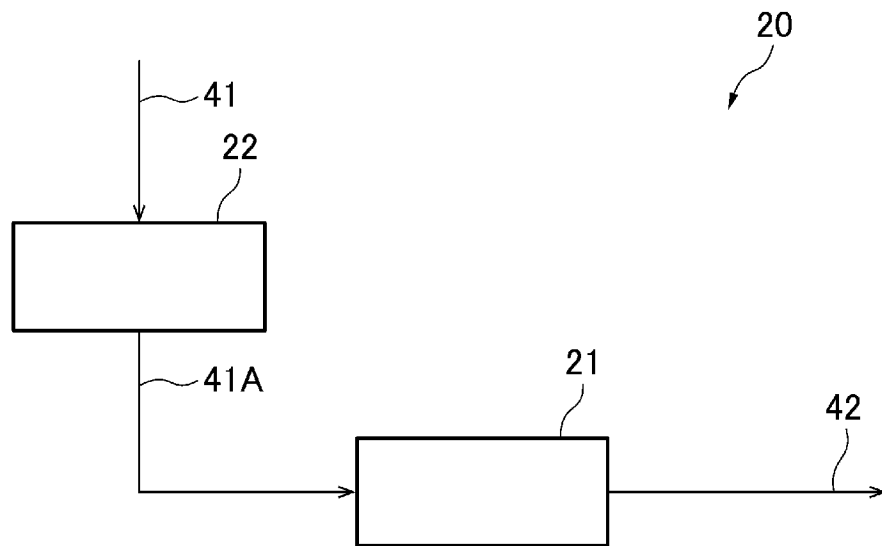
[図3]



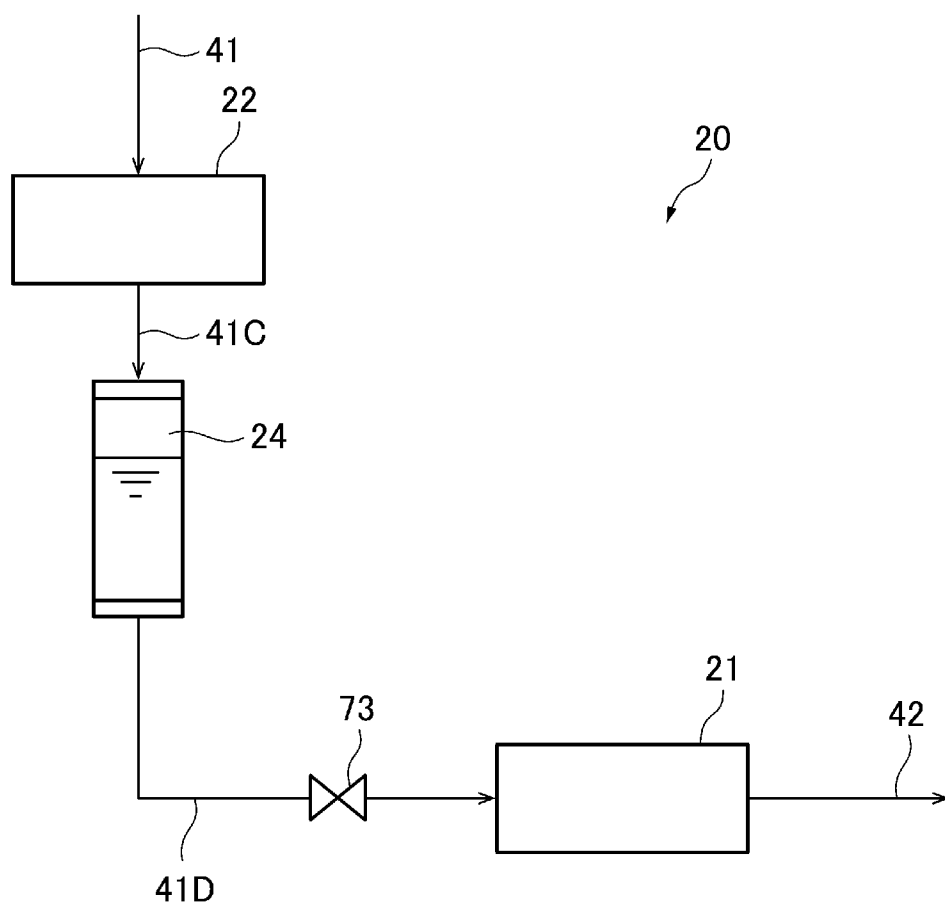
[図4]



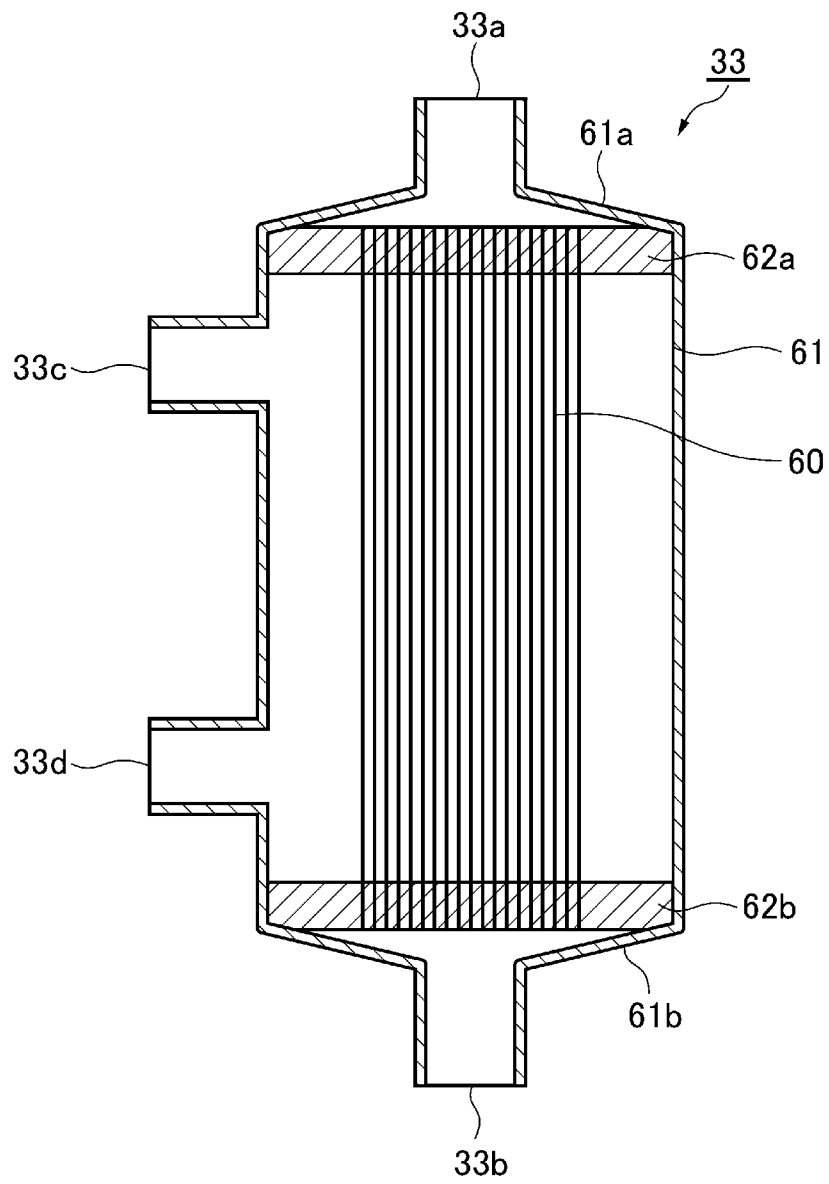
[図5]



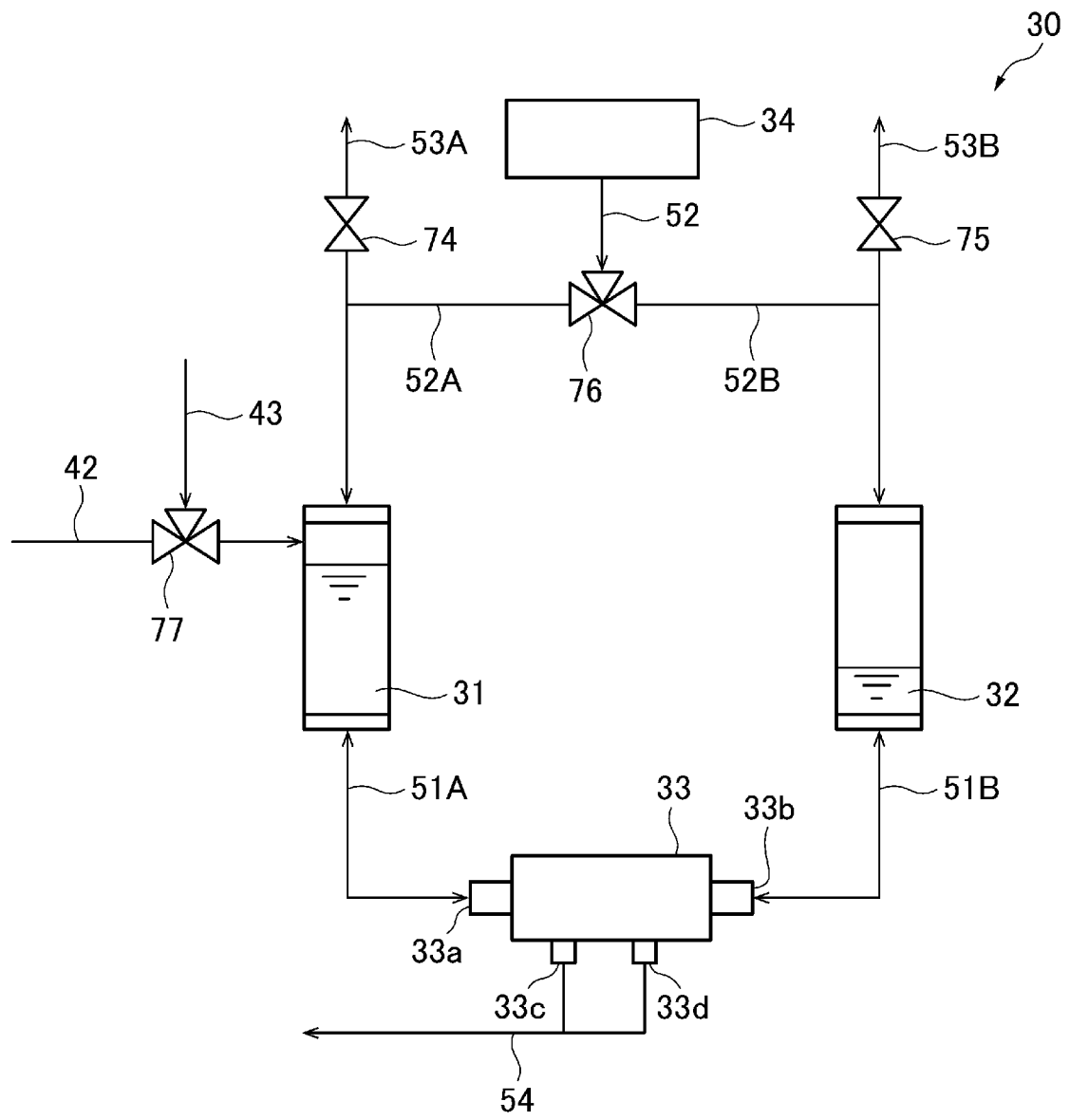
[図6]



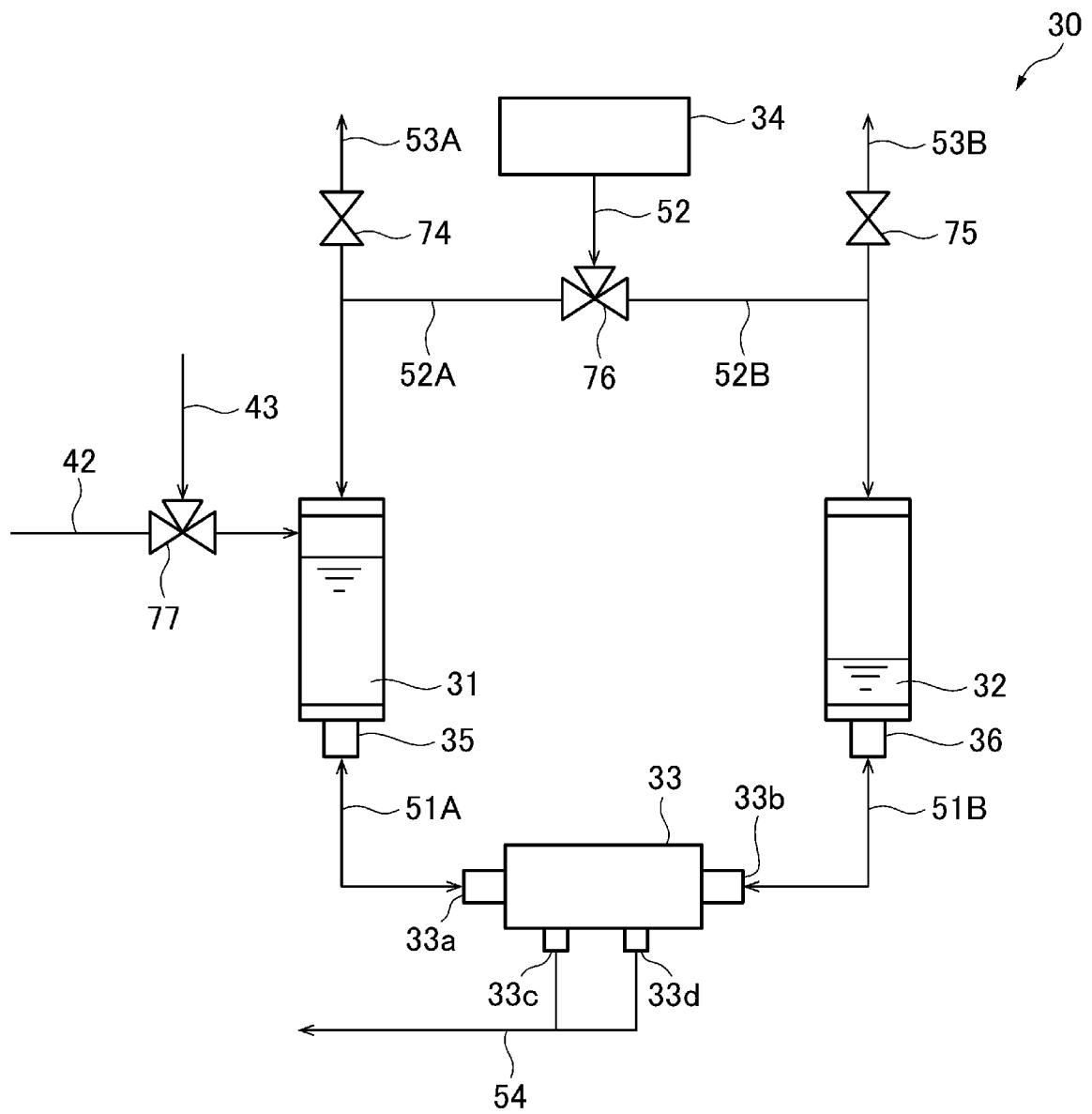
[図7]



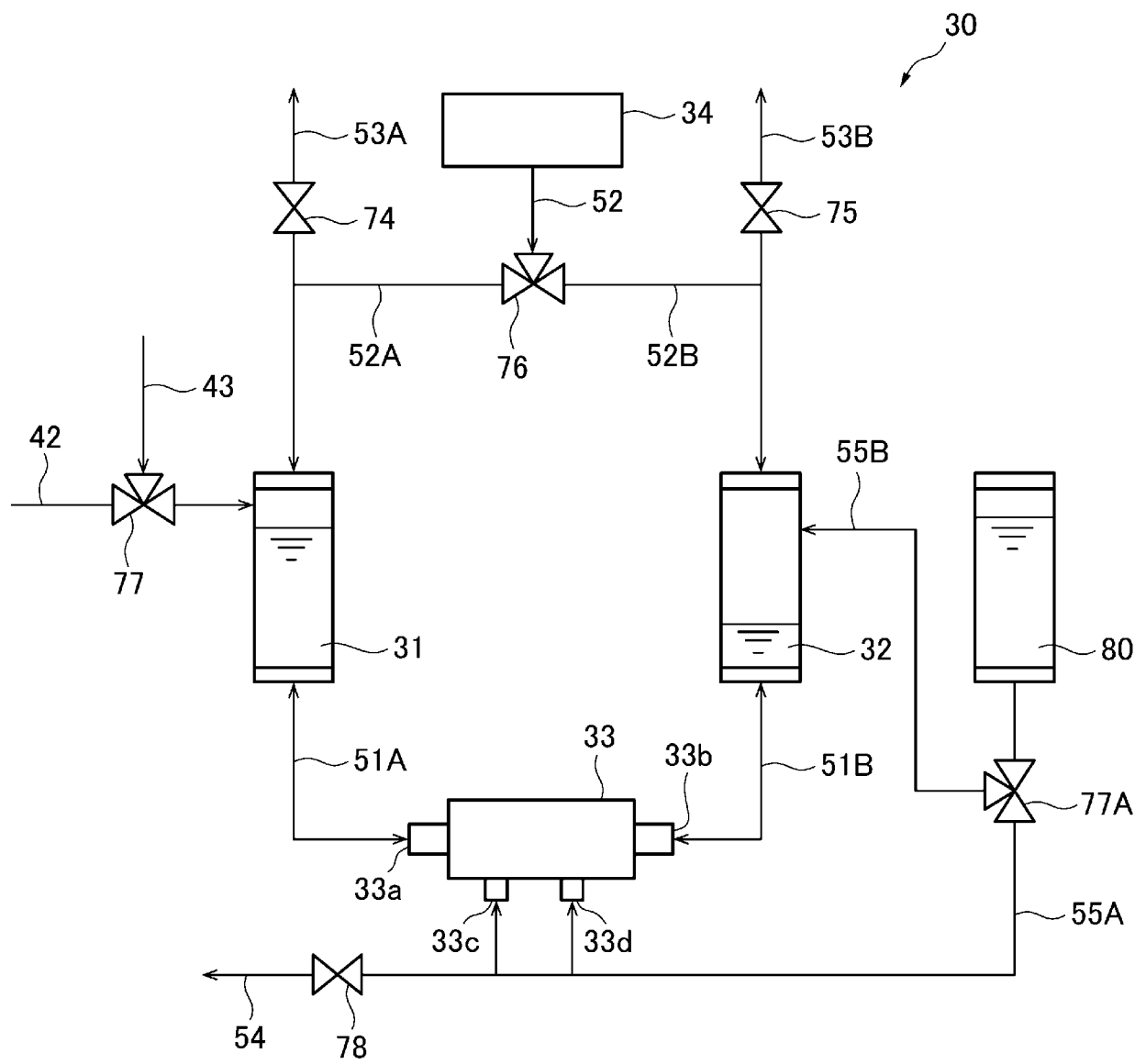
[図8]



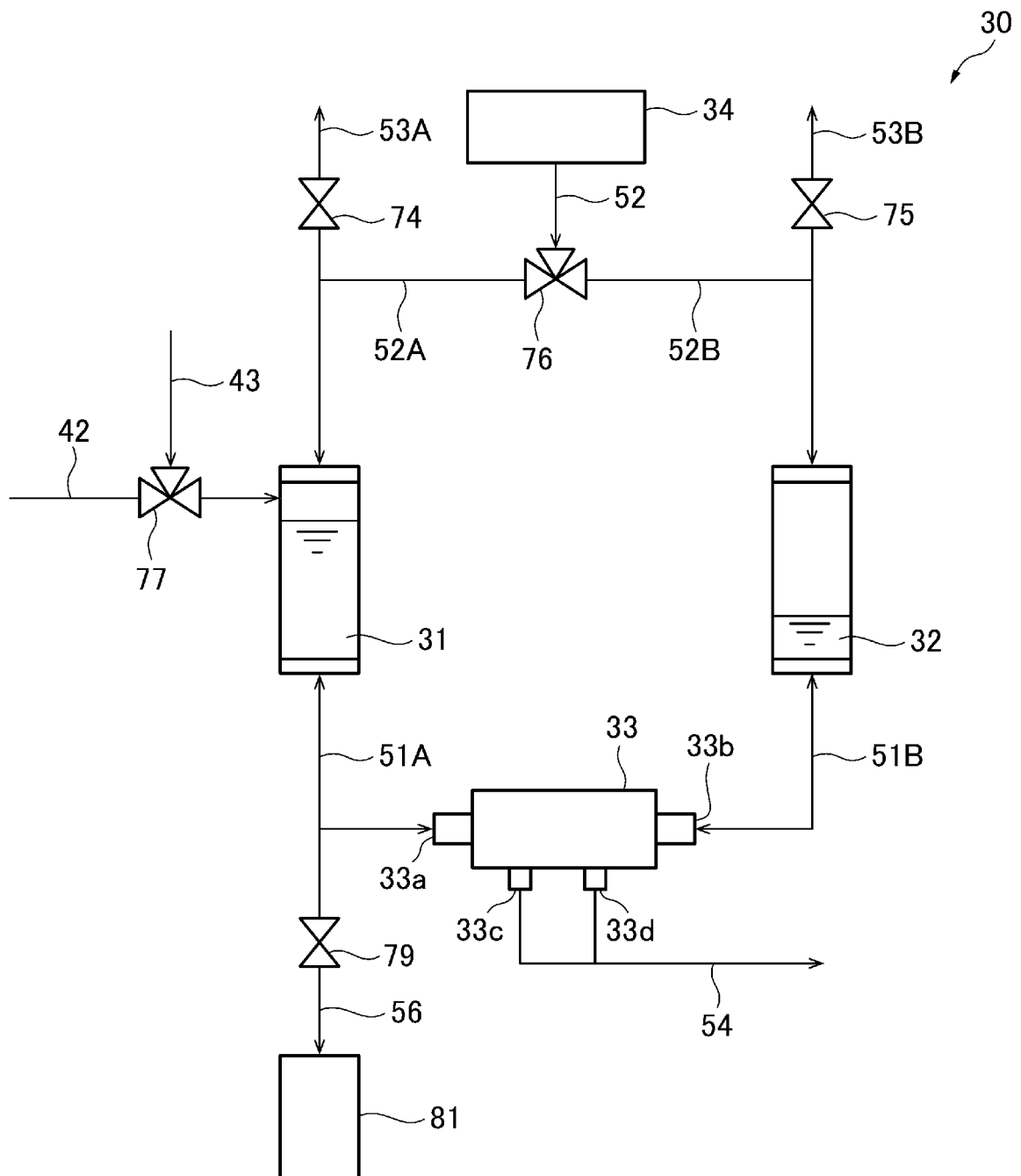
[図9]



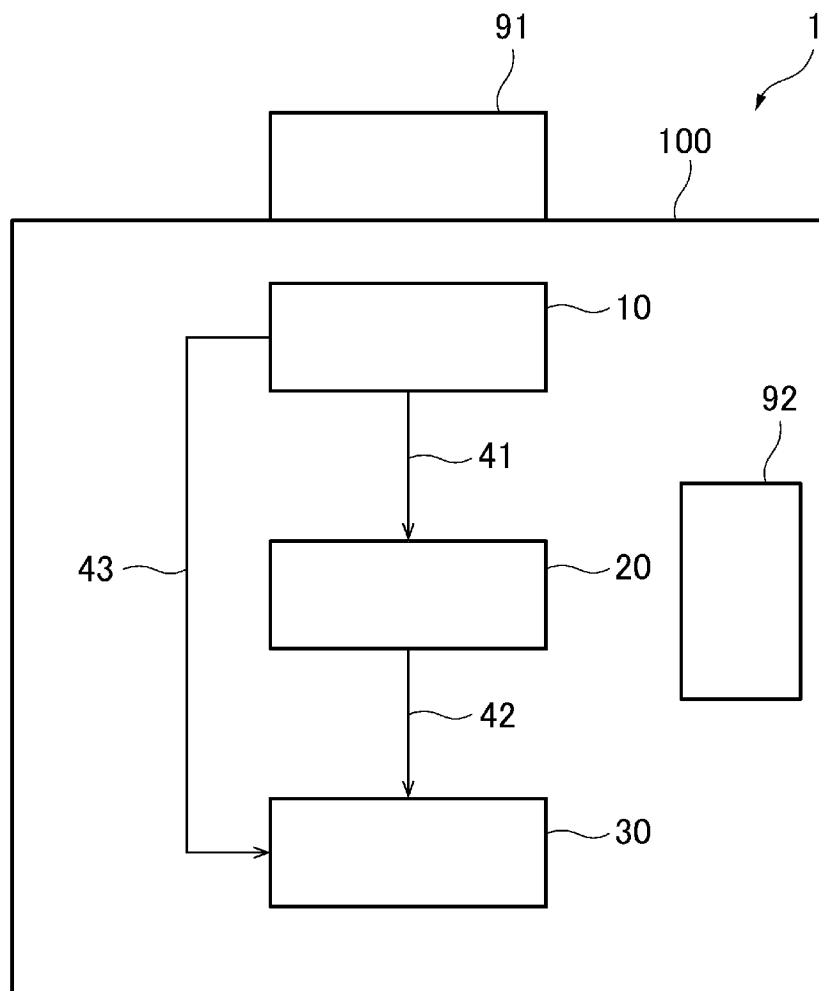
[図10]



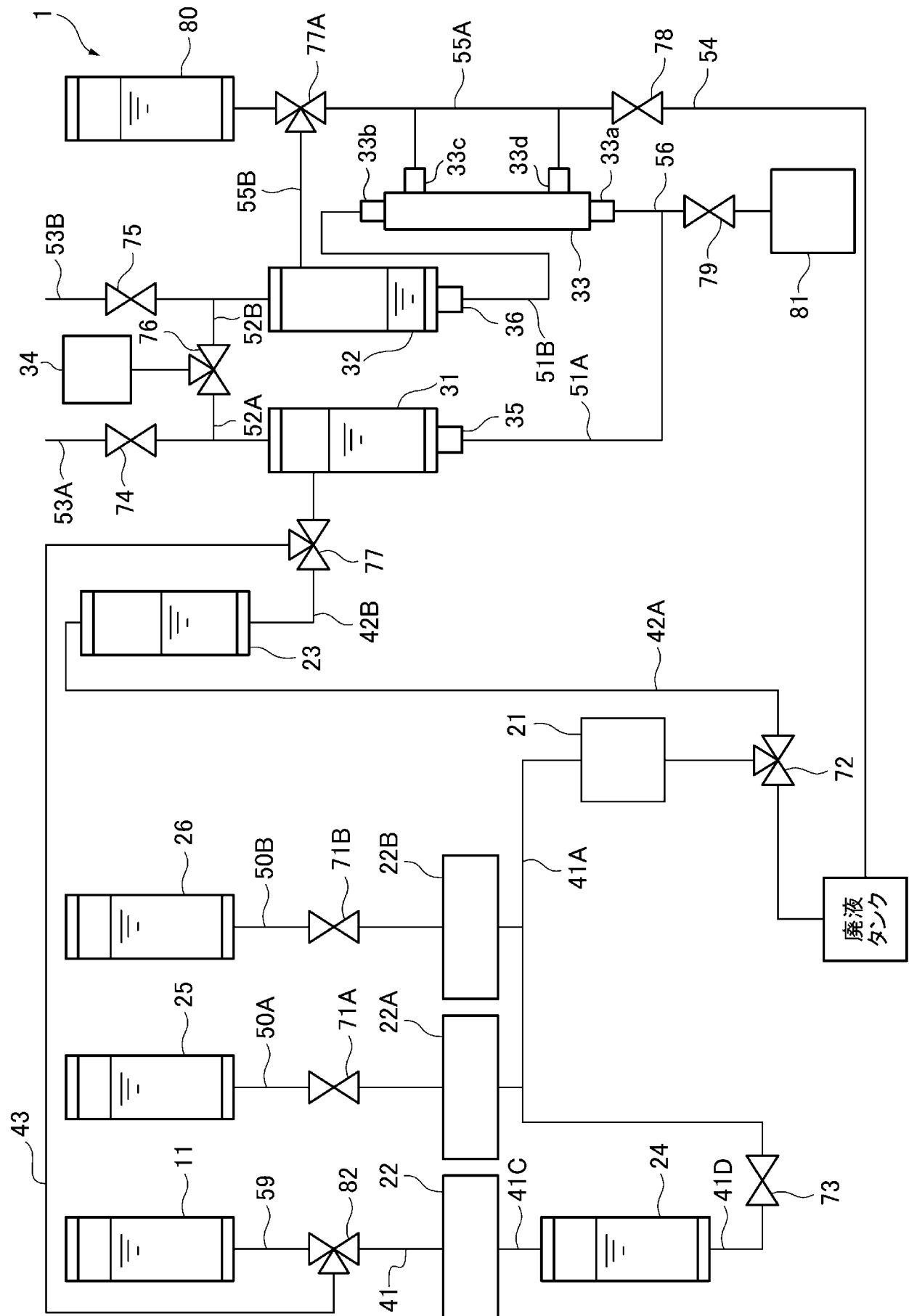
[図11]



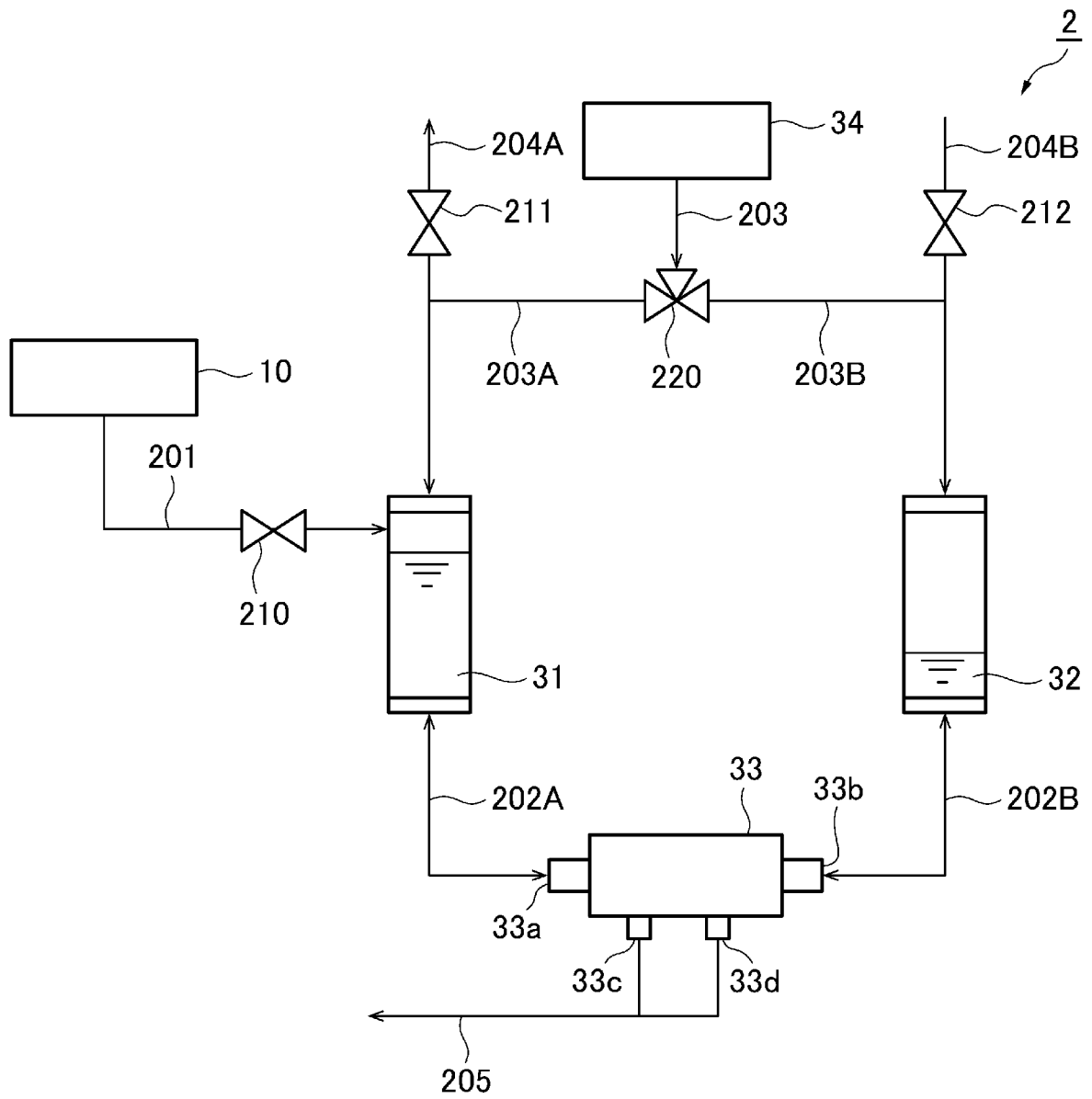
[図12]



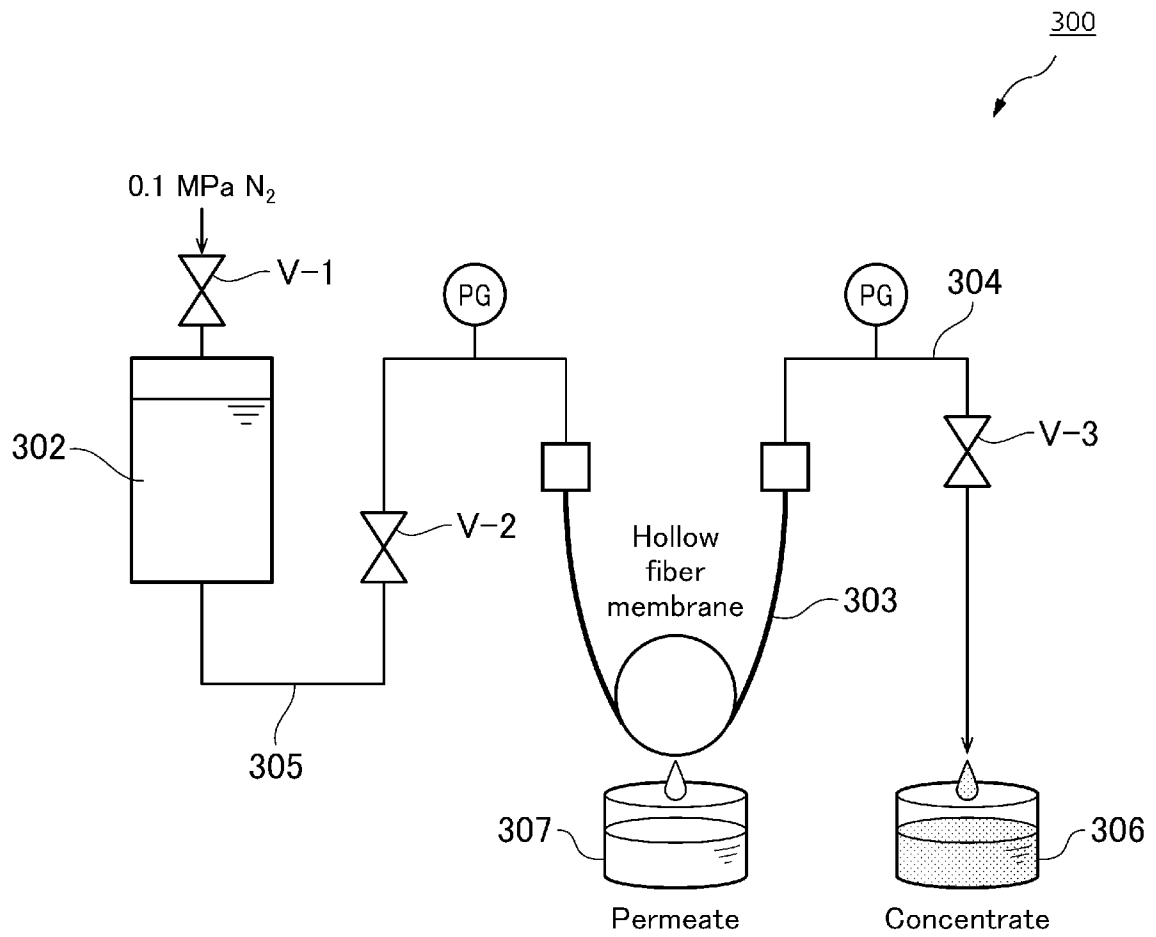
[図13]



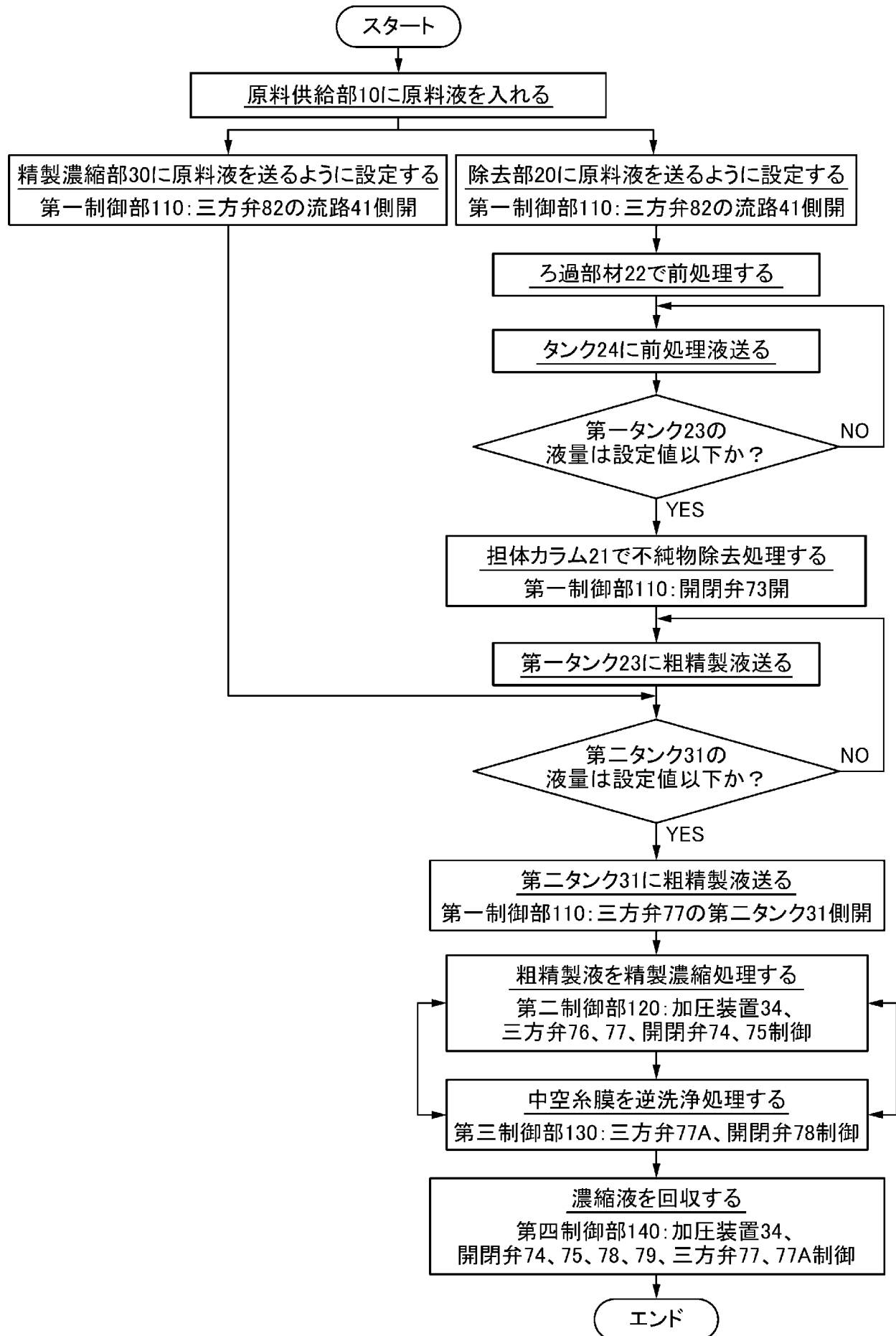
[図14]



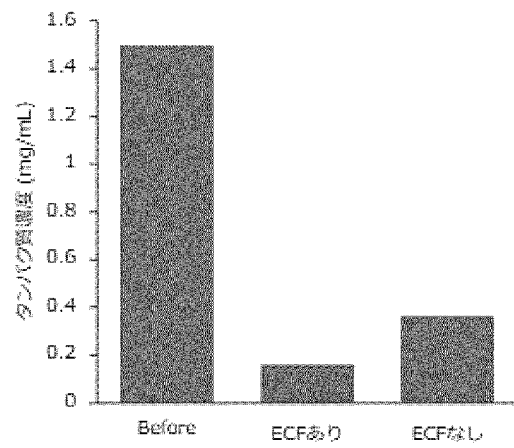
[図15]



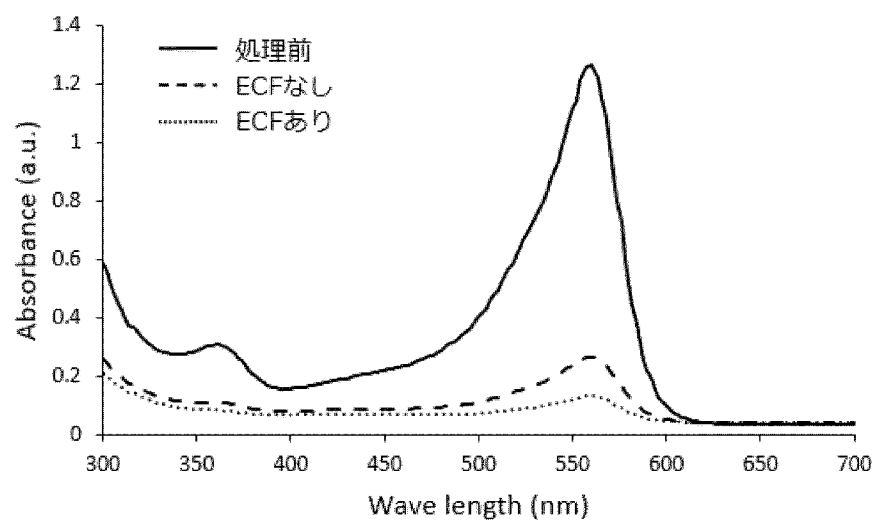
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/00(2006.01)i; *C07K 1/16*(2006.01)i; *C07K 1/34*(2006.01)i; *C12M 1/12*(2006.01)i; *C12N 5/071*(2010.01)i;
C12N 15/10(2006.01)i
 FI: C12M1/00 A; C07K1/16; C07K1/34; C12M1/12; C12N5/071; C12N15/10 110Z; C12N15/10 120Z

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)

C12M1/00; C07K1/16; C07K1/34; C12M1/12; C12N5/071; C12N15/10

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 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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 (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2021-145649 A (SHIBUYA KOGYO CO., LTD.) 27 September 2021 (2021-09-27) claim 1, paragraphs [0009], [0012], fig. 1-4	1-50
Y	JP 2018-076291 A (ASAHI KASEI MEDICAL CO., LTD.) 17 May 2018 (2018-05-17) claims	1-50
Y	US 2011/0028759 A1 (HYFLUX IP RESOURCES PTE LTD.) 03 February 2011 (2011-02-03) claims, paragraph [0018]	1-50
A	JP 2002-535665 A (ANOSYS, INC.) 22 October 2002 (2002-10-22) entire text, all drawings	1-50
A	CORSO, Giulia et al. Reproducible and scalable purification of extracellular vesicles using combined bind-elute and size exclusion chromatography. Scientific Reports. 14 September 2017, vol. 7, Article No. 11561, pages 1-10, DOI: 10.1038/s41598-017-10646-x entire text, all drawings	1-50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July 2023

Date of mailing of the international search report

05 September 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022644

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/027185 A1 (MIE UNIV.) 06 February 2020 (2020-02-06) entire text, all drawings	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/022644

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2021-145649	A	27 September 2021	US 2021/0291083 A1 claim 1, paragraphs [0023]- [0024], [0031]-[0032], fig. 1-4 EP 3885429 A1	
JP	2018-076291	A	17 May 2018	(Family: none)	
US	2011/0028759	A1	03 February 2011	CN 101967091 A	
JP	2002-535665	A	22 October 2002	US 6899863 B1 whole document EP 1143982 A2 CN 1355704 A	
WO	2020/027185	A1	06 February 2020	US 2021/0239664 A1 whole document EP 3832305 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C07K 1/16(2006.01)i; C07K 1/34(2006.01)i; C12M 1/12(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)i FI: C12M1/00 A; C07K1/16; C07K1/34; C12M1/12; C12N5/071; C12N15/10 110Z; C12N15/10 120Z		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12M1/00; C07K1/16; C07K1/34; C12M1/12; C12N5/071; C12N15/10		
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 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 2021-145649 A（澁谷工業株式会社）27.09.2021（2021-09-27） 請求項1, 段落0009, 0012, 図1-4	1-50
Y	JP 2018-076291 A（旭化成メディカル株式会社）17.05.2018（2018-05-17） 特許請求の範囲	1-50
Y	US 2011/0028759 A1 (HYFLUX IP RESOURCES PTE LTD) 03.02.2011（2011-02-03） Claims, Paragraph 0018	1-50
A	JP 2002-535665 A（アノシス・インコーポレーテッド）22.10.2002（2002-10-22） 全文、全図	1-50
A	CORSO, Giulia et al., Reproducible and scalable purification of extracellular vesicles using combined bind-elute and size exclusion chromatography, Scientific Reports, 2017.09.14, Vol. 7, Article No. 11561, pp. 1-10, DOI: 10.1038/s41598-017-10646-x 全文、全図	1-50
A	WO 2020/027185 A1（国立大学法人三重大学）06.02.2020（2020-02-06） 全文、全図	1-50
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “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 “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） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “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 “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 “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27.07.2023		国際調査報告の発送日 05.09.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 大西 隆史 4N 1149 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/022644

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2021-145649	A	27.09.2021	US 2021/0291083 A1 Claim 1, Paragraphs 0023-0024, 0031-0032, Figs. 1-4 EP 3885429 A1	
JP	2018-076291	A	17.05.2018	(ファミリーなし)	
US	2011/0028759	A1	03.02.2011	CN 101967091 A	
JP	2002-535665	A	22.10.2002	US 6899863 B1 Whole Document EP 1143982 A2 CN 1355704 A	
WO	2020/027185	A1	06.02.2020	US 2021/0239664 A1 Whole Document EP 3832305 A1	