

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6364946号  
(P6364946)

(45) 発行日 平成30年8月1日(2018.8.1)

(24) 登録日 平成30年7月13日(2018.7.13)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/28</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 M 1/28
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04
<b>B 0 4 B</b>	<b>5/02</b>	<b>(2006.01)</b>	B 0 4 B 5/02 A
<b>B 0 4 B</b>	<b>11/04</b>	<b>(2006.01)</b>	B 0 4 B 11/04
<b>B 0 3 B</b>	<b>5/32</b>	<b>(2006.01)</b>	B 0 3 B 5/32

請求項の数 2 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-103703 (P2014-103703)	(73) 特許権者	000003300 東ソー株式会社 山口県周南市開成町4560番地
(22) 出願日	平成26年5月19日(2014.5.19)	(72) 発明者	森本 篤史 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社東京研究センター内
(65) 公開番号	特開2015-6169 (P2015-6169A)	(72) 発明者	最上 聡文 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社東京研究センター内
(43) 公開日	平成27年1月15日(2015.1.15)	(72) 発明者	飯嶋 和樹 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社東京研究センター内
審査請求日	平成29年4月18日(2017.4.18)	(72) 発明者	秋山 泰之 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社東京研究センター内
(31) 優先権主張番号	特願2013-114788 (P2013-114788)		
(32) 優先日	平成25年5月31日(2013.5.31)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成26年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「血中分子・遺伝子診断自動化システムの研究開発(血中循環がん細胞検出技術)」共同研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願)			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分離構造体及び分離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一端は閉塞して底部を形成し、他端は開口した筒状の構造体と、開口を密閉するキャップからなり、前記構造体は2以上の筒状部材より構成され、分離部にて分離可能であって、前記筒状部材のうち、一番下側にある筒状部材は開口部と底部を有し、それ以外の筒状部材は開口部と前記分離部を有しており、  
前記分離部は傾斜角度が30～70°である先細り形状であって、その先端部分に2～4mmの連通開口部を有し、フィルターは設置されていないことを特徴とする、分離構造体。

【請求項2】

液体試料から目的とする成分を分離する方法であって、請求項1に記載の分離構造体を使用して、密度勾配溶液を前記構造体底部から前記分離部近傍まで満たし、試料を重層して前記開口を密閉した状態で遠心分離する工程と、遠心分離後、開口部の密閉状態を維持したまま前記構造体を分離し、密閉を解いて目的とする細胞等を含む分画を回収する工程からなる、分離方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遠心力を利用して液体試料から目的とする成分を分離する分離構造体と当該分離構造体を用いた分離方法に関するものであり、特に好適には体液、分散組織標本又は

培養細胞のような細胞を含む試料から細胞を分離し、濃縮するための分離構造体及び分離方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

体液や細胞培養液等の生物学的液体から、又は、組織を懸濁・分散した分散組織標本から細胞のみを分離し、分離した細胞を臨床診断や治療へ応用する研究が進められている。例えば、血液や組織から分離した腫瘍細胞について、形態学的分析、組織型分析および遺伝子分析を行い、その知見に基づいて治療薬を選定することが挙げられる。

【0003】

血液等から細胞を分離する方法には、細胞をその密度に基づいて分離する密度勾配遠心法が知られている（特許文献1）。この方法は、密度勾配を形成した溶液（以下、密度勾配溶液と記載する）上に血液等の細胞を含む溶液を重層して遠心し、目的とする細胞を含有する層を回収することによって不要な細胞や血液に含まれる他の成分を含まない細胞分画を得るものである。その他にも遠心分離用容器として、チューブ内に設置された収縮領域を有する遠心分離チューブを使用し、遠心分離後にデカンテーションを行なう際に、底部の液体を混合することなく上部の液体を回収する遠心分離チューブ（特許文献2）、隔壁板、フィルター又は篩等の多孔性隔壁板によって特許文献2と同様の効果を達成する容器（特許文献3）、上部と下部チャンバーとフィルターメンブレンの積層体を含む濾過デバイス（特許文献4）が知られている。

【0004】

密度勾配溶液には、市販のもの（例えば、F i c o l l - P a q u e（GEヘルスケア バイオサイエンス社製）、密度約1.077g/mL、ショ糖とエピクロロヒドリンを共重合した分子量40万の合成品の水溶液）が使用されるが、目的とする細胞、ウイルス、細胞小器官、膜結合顆粒等よりも大きい密度の密度勾配溶液を使用することで、当該細胞等を密度勾配溶液上に維持したまま、他のより密度の大きい成分から分離することができる。なおF i c o l lは、それ自体に凝集作用があり、血液に含まれる赤血球や顆粒球を凝集して高分子化、沈降させることができるため、血液からの細胞等の分離をより効果的に実施し得る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第1997/021488号

【特許文献2】特許第3397795号

【特許文献3】特表2002-536635号

【特許文献4】国際公開第2012/154257号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

密度勾配遠心法には、使用する遠心分離手段のローター形状に合致した寸法形状の分離容器を使用するが、分離容器は通常、一端は閉塞して底部を形成し、他端は開口を密閉した概ね円筒状である。そのため、遠心分離操作を終了した後、密度勾配溶液中に密度に応じて移動した細胞等を分離容器から回収するに際しては、密閉を解いた開口端からピペット先端を差し込み、密度勾配溶液上の極めて薄い分画を回収することになるが、この操作には熟練が必要で、目的とする細胞等の回収率が変動しやすく、ピペット先端を密度勾配溶液中に差し込んでしまい、目的とする細胞等以外の細胞等を誤って回収する可能性があるという課題があった。

【0007】

そこでかかる課題を解決するために本発明の目的は、分離された細胞のうち、不要成分を構造体ごと切り離すことで、操作者の熟練度及び/又は目的とする細胞の密度によらずに効率的に回収し得る分離構造体（分離溶液）を提供することにある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

具体的には本発明の構成を採用する構造体で細胞等を分離した後、目的の細胞は自身の密度によって、分離液の上層/中層/下層のいずれかに位置する。つまり、本願発明の構造体は、分離部にて分離可能な2以上の筒状部材で構成されていることから、目的の細胞がどの層に位置しても操作者の熟練度に関係なく本構造体の切り離しという簡便な操作で回収することができる。

さらに具体的には、血液をF i c o l l - P a q u e (密度約1.077g/mL)で分離する例において、不要な細胞(赤血球)は下層に位置し、目的の細胞(がん細胞、白血球など)は上層に位置することになる。つまり、従来の血液細胞を濃縮/分離する方法として採用されている分離構造体は、1つの筒状部材で構成され、仕切り構造などで上層と下層を分ける分離構造体の発想は、基本的に上層に位置する細胞の回収に限定される。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 9 】

前記目的に鑑みて完成された本発明は、一端は閉塞して底部を形成し、他端は開口した筒状の構造体と、開口を密閉するキャップからなり、前記構造体は2以上の筒状部材より構成され、分離部にて分離可能であることを特徴とする、分離構造体である。また本発明は、液体試料から目的とする成分を分離する分離方法、特に密度の異なる2種以上の細胞群から目的とする一種の細胞を単離する方法であって、密度勾配溶液を前記構造体底部から前記分離部近傍まで満たし、試料を重層して前記開口を密閉した状態で遠心分離する工程と、遠心分離後、開口部の密閉状態を維持したまま前記構造体を分離し、密閉を解いて

20

目的とする細胞等を含む分画を回収する工程からなる細胞分離方法である。以下、図面に基づき本発明を詳細に説明する。

## 【 0 0 1 0 】

図1は、本発明の一態様を示した図である。本例の分離構造体1は、2及び3の2つの筒状部材からなる。分離構造体の上部を構成する筒状部材(上側)2(「筒状部材2」と記載することがある)は開口を有し(本図では密閉用のキャップ4により開口を密閉した状態を示すが、キャップ4は、分離構造体1に脱着可能に取り付けられれば良く、図1に示したキャップ式(筒状部材2へ挿入する形式)の他、ねじ込み式、シール式などが例示できる)、筒状部材(下側)3(「筒状部材3」と記載することがある)は、一端が閉塞して底部5を形成している。

30

## 【 0 0 1 1 】

筒状部材2及び3は、それぞれ開口又は底部の反対の端に連通開口端(分離部)が設けられ、該両部材が連結された場合に両筒状部材の内部空間が連通し、全体として一つの分離構造体を形成する。この連結は、各筒状部材を分離し得るようなものであれば良く、例えば各連通開口を互いに嵌合するような態様のほか、図1に示したように一方(筒状部材2)を他方(筒状部材3)に挿入するようにする、ねじ等を設ける、又は、両者を固定保持するジョイント部材を取り付ける等が例示できる。

## 【 0 0 1 2 】

連通開口端(分離部)6それ自体は、密度勾配溶液の上に重層された試料中の密度の大きい成分が通過する大きさであり、キャップ4による密閉状態を維持したまま筒状部材を分離したときに筒状部材2に保持された液体が流出しない寸法であればよい。なお筒状部材2又は筒状部材3の連通開口のいずれかには、垂直貫通孔が形成されたフィルター又はメッシュ状の濾材を設置することができる。かかるフィルター等の設置により、例えば遠心分離操作後に構造体が倒れたり、遠心分離手段への移送に伴い振動が加えられたときに、密度勾配溶液と試料との混合が生じたり、遠心分離操作後に筒状部材2に維持された密度の小さい成分と筒状部材3に移動した密度の大きい成分とが混合されてしまうことを防止することが可能となる。なお本例では、筒状部材2の連通開口端(分離部)6に至る部分の形状を、筒状部材3に向かって先細り形状(筒状部材2の先細り形状部分7)としてある。筒状部材2を連通開口に向かってこのような形状とすることにより、後述する実施例でも示したように、フィルターを設けると同様の効果を得ることができ、好ましい。

40

50

## 【0013】

本例の筒状部材は、寸法や形状について特に制限はないが、いずれも概ね円筒状である。また形状については、使用する遠心分離手段のローターに合致する形状であれば多角形状であっても良いが、製造、保管等の観点から円筒が特に好ましい。

## 【0014】

筒状部材2、3及びキャップ4は、アクリル、エポキシ、ポリスチレン等の樹脂、酸化ケイ素を主成分とした合成石英(SiO<sub>2</sub>)、セラミックス又は金属系材料等で構成することができるが、加工性や経済性の観点、そして特に血液等の生体試料を使用した後の廃棄性の問題からポリプロピレン、ポリスチレン樹脂の熱可塑性樹脂が好ましい。また、分離構造体の内面(試料が接触し得る面)は、目的とする細胞等の非特異的な吸着を防止する観点から親水性であるか、又は、別途の処理により親水化可能なものであることが好ましい。親水化のための処理は、特に制限されず、樹脂であれば、例えばコロナ放電処理により樹脂表面の表面エネルギーを活性化してカルボニル基等の極性基を生成して親水化する方法や、また例えば酸素プラズマ処理により電子・イオン・ラジカルを表面に照射し、-COOHや-COを導入して表面の親水性を向上させる方法を例示できる。また例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ(ヒドロキシアルキル)メタクリレート、ポリアクリルアミド、MPCポリマーなどの親水性ポリマーを塗布して表面を親水化する方法を例示できる。

10

## 【0015】

次に、上記説明した分離構造体を使用する本発明の分離方法について説明する。本発明は、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、糞便、痰、髄液、羊水等の生体試料、細胞の凝集物、腫瘍、リンパ節又は動脈といった器官や組織に由来する試料、細胞培養液等に含まれる細胞を分離するために使用することができる。器官や組織については、通常の処理に従って細胞懸濁液を調製後、本発明の分離方法を実施すれば良い。なお本明細書において、目的とする細胞の分離は当該細胞の濃縮と同義である。すなわち、遠心分離操作の後に、密度勾配溶液の上に維持される分画又は密度勾配溶液を通過してその下方に移動する分画の目的とする細胞等を回収することは、それ以外の分画に含まれる目的外成分の除去による、目的とする細胞等の濃縮にほかならない。

20

## 【0016】

密度勾配溶液は、それ自身で又は遠心分離によって密度勾配を形成する液体状の物質であり、目的とする細胞の密度(比重)を特定し、その分離に適当なものを選択して使用すれば良い。選択の指標としては、例えば栄養成分、pH、等張性等を例示できる。具体的にはショ糖、グリセロール、デキストラン、メトリザミド、イオディキサノール、ショ糖とエピクロロヒドリンの共重合体、ポリビニルピロリドンの被膜をもつコロイド状シリカ粒子、スクロースポリマー、ジアトリゾ酸、イオヘキソール、ニコデンツ等のイオン性又は非イオン性のものが例示できる。市販されている密度勾配溶液として、GEヘルスケアバイオサイエンス社製の商品名Ficoll、Ficoll-Paque又はPercoll、Axis-Shield PoC AS社製の商品名Lymphoprep、Polymorphprep又はOptiprepを例示できる。

30

## 【0017】

密度勾配溶液は、分離構造体1において、その底部(筒状部材3の底部5)から連通開口端(分離部)6近傍まで注入する。より具体的には、分離構造体1を静置した場合に、密度勾配溶液の液面高さが上側の筒状部材2の連通開口端より高くなる(筒状部材2側になる)ようにする。すなわち、試料溶液のうち、目的外の成分(細胞等)を下側の筒状部材(筒状部材3)に分離した際に、密度勾配溶液上に維持された目的成分(細胞)を筒状部材2に維持された状態で分離できる程度、好ましくは1mm程度、高くなるよう注入する。

40

## 【0018】

その後、試料溶液を密度勾配溶液の上に重層し、開口部をキャップ4で密閉し、遠心分離操作を行う。遠心分離操作は、一般には1000から2000×g程度の低速で実施す

50

れば良いが、目的とする細胞の密度や使用する密度勾配溶液の密度を勘案し、密度勾配溶液の上に維持される条件を選択する。例えば目的とする細胞が腫瘍細胞であり、上記のような遠心を行うのであれば、腫瘍細胞の種類に応じて密度勾配溶液の密度を  $1.060 \sim 1.095 \text{ g/mL}$  の範囲、生理学的浸透圧を  $200 \sim 450 \text{ mOsm/kg}$  の範囲、そして pH を  $6.8 \sim 7.8$  の範囲に調整することが例示できる。

#### 【0019】

遠心分離操作により、密度勾配溶液の密度より大きな密度を有する成分は密度勾配溶液の勾配層を通過して筒状部材 3 中に移動する。一方、密度勾配溶液より小さな密度の目的とする細胞は、筒状部材 2 内の密度勾配溶液の上に維持される。そこで開口部の密閉を維持したまま連結された筒状部材を図 1 で示した状態となるように分離すれば、上側の筒状部材 (筒状部材 2) 中に目的とする細胞を含む分画を回収することができる。この分画は、例えばキャップ 4 を取り外すことによって密閉状態を開放することで下方へ滴下させる等すれば、特別な熟練を要することなく容易に回収できる。一方、筒状部材 3 中に移動した分画については、例えば当該筒状部材とともに廃棄等することができる。

10

#### 【0020】

以上、図 1 に示した態様に従って本発明を説明したが、本発明の分離構造体は 3 以上の筒状部材で構成することも可能である。この場合、筒状部材の一つは密閉される開口が設けられたものであり、これとは異なる一つの筒状部材は閉塞した底部を形成するものであり、これら以外は両端に連通開口を有する筒状部材となる。このような筒状部材を用い、目的とする細胞の密度や密度勾配溶液の密度に応じて分離する場所を変更すれば、目的とする細胞の種類 (密度) 毎に、当該細胞を分離することが可能となる。

20

#### 【0021】

以下に具体的に 3 つの分離可能な部材からなる構成を採用する分離構造体について図 1 1 を用いて説明するが、3 つの分離可能な部材からなる構成に限られるものではない。3 つの分離可能な部材からなる構成を採用する分離構造体を用いる効果として、目的とする成分 (細胞等) の種類 (密度) 毎に分離可能であること、目的とする成分 (細胞等) の密度分布を確認できることなどが挙げられる。

#### 【0022】

図 1 1 において、まず筒状部材 (上側) 4 1 に密度を知りたい目的とする成分 (細胞等) を含む試料溶液を注入し、それ以外の筒状部材である筒状部材 (中央) 4 2 及び筒状部材 (下側) 4 3 に密度が高い (例えば、約  $1.086 \text{ g/mL}$ ) の密度勾配溶液を満たした後、遠心分離をする。前記操作により、前記目的とする成分 (細胞等) を筒状部材 (上側) 4 1 にのみ回収することができる条件を見出すことで目的とする成分 (細胞等) の最大密度が分かる。

30

#### 【0023】

続いて、筒状部材 (中央) 4 2 に密度が低い (例えば、約  $1.030 \text{ g/mL}$ ) の密度勾配溶液及び筒状部材 (下側) 4 3 に前記検討で知り得た目的とする成分 (細胞等) の最大密度条件 (例えば、約  $1.086 \text{ g/mL}$ ) に相当する密度勾配溶液を満たして、遠心分離をする。前記同様に目的とする成分 (細胞等) を筒状部材 4 2 (中央) にのみ回収することができる条件を見出すことで目的とする成分 (細胞等) の最小密度が分かる。このようにして、目的とする成分 (細胞等) と密度勾配溶液の密度関係で単純に分離するだけでなく、目的とする成分 (細胞等) の性質 (密度) をも知ることができる。

40

#### 【0024】

本発明においては、目的とする成分 (細胞等) に特異的に結合する物質を添加し、又は、目的外の成分 (細胞等) に特異的に結合する物質を添加することにより、目的とする成分を更に効率的に分離することができる。図 2 に示すように、目的外の成分 (細胞等) 2 1 (「目的外の成分 2 1」と記載することがある) に対して特異的に結合する物質 2 2 と、密度を調整するための物質 2 3 との結合物を予め試料に添加すれば、両者の結合によって目的外の成分 2 1 の見かけ上の密度 (比重) が大きくなり、目的とする成分 (細胞等) 2 4 (「目的とする成分 2 4」と記載することがある) との差がはっきりとするため、両

50

者を効率的に分離することが可能になる。なお、特異的に結合する物質と多孔質シリカ粒子等の比較的密度が小さい物質を結合させれば、見かけ上の密度を小さくすることができる。このように、密度を調整する目的で使用する物質としては、前記多孔質シリカ粒子に加え、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロリド、ポリアクリロニトリル、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリカルボネート等のポリビニル化合物に代表される有機ポリマー、ポリスチレンラテックス、ナイロン、ポリテレフタレート等の共重合体、ガラス、シリカ、ジルコニア等の無機材料、セルロース、デキストラン、アガロース、セルロース、セファロース等の生体ポリマーが例示でき、目的とする細胞等と特異的に結合する物質として抗体、抗原、ペプチド、ポリペプチド、成長因子、サイトカイン、レクチン等の生体高分子を例示できる。

10

**【0025】**

また本発明の分離構造体で分離後、目的外成分（細胞等）を更に除去することで目的とする成分（細胞等）をより選択的に回収することができる。例えば、密度勾配遠心後の溶液をフィルターに通すことで目的外成分をフィルター通過させ、目的とする成分をフィルターに捕捉し、濃縮することができる。逆に目的とする成分をフィルター通過させ、目的外成分をフィルター捕捉してもよい。フィルターに形成する貫通孔は、使用用途によって適宜調整することができるが、例えば、がん細胞（約20 $\mu\text{m}$ ）をフィルターに捕捉する場合、開口部が円形となるものが好ましく、その孔径は1から20 $\mu\text{m}$ 、好ましくは1から10 $\mu\text{m}$ 、特に好ましくは2から8 $\mu\text{m}$ である。孔径が1 $\mu\text{m}$ より小さいとフィルターに目詰まりが発生することでフィルター付近の吸引圧が上昇し、細胞が破壊されることがある。一方で10 $\mu\text{m}$ より大きくなると、小径のがん細胞がフィルターを通過し取りこぼす可能性がある。貫通孔の数や配置については特に制限はないが、多数の貫通孔を設けることが細胞分離効率を向上する上で好ましい。多数の貫通孔を設ける場合、貫通孔間の距離（ある貫通孔の開口部の中心から、他の貫通孔の開口部の中心点までの距離）を等間隔とすることが好ましい。貫通孔間の距離は貫通孔の孔径を考慮して適宜決定することができるが、20 $\mu\text{m}$ 以上とすることを例示できる。より具体的には、例えば孔径が8から10 $\mu\text{m}$ である場合には、貫通孔間の距離を50 $\mu\text{m}$ 程度とすることが特に好ましい。

20

**【0026】**

上記説明した貫通孔を形成したフィルターは、具体的に例えば、電鍍技術を用いて貫通孔を形成したニッケル基板や、レーザー技術を用いて貫通孔を形成したガラスや石英基板を例示できる。いずれの技術によっても、ニッケル基板等に意図した通りの貫通孔を形成することができる。

30

**【0027】**

フィルターは、親水性であることが好ましい。かかる性質により、試料に含まれる成分の吸着が防止され、目詰まり等が発生し難いからである。この目的のためには、本来親水性である材料でフィルターを製造しても良いし、その表面を任意の処理によって親水化しても良い。表面親水化のための処理に特別の制限はなく、本発明の分離構造体の親水化方法にて説明したコロナ放電処理、プラズマ処理や親水性ポリマー塗布およびBSA（ウシ血清アルブミン）やOVA（卵白オボアルブミン）等のタンパク質溶液に浸漬して表面を親水化する方法が例示できる。

40

**【0028】**

また目的細胞をより選択的に分離する方法として、密度勾配遠心後に回収した細胞と抗体磁性粒子とを反応させることで目的とする成分を抗体磁性粒子結合させた後、磁力によって目的とする成分を捕捉することができる。逆に目的外成分に抗体磁性粒子結合させた後、磁力によって目的外成分を除去してもよい。その際に用いる抗体磁性粒子は目的とする成分に非反応である適切な材料により形成されていることが好ましい。例えば、血液中からがん細胞を回収する場合、密度勾配遠心分離後に含まれる目的外成分である白血球を抗体磁気微粒子で捕捉する。その目的外成分を除去するための抗体磁性粒子の抗体の種類は、目的外成分で発現しており、目的とする成分（細胞等）に発現していない表面マーカーに対する抗体から選択する。例えば、血液から白血球を除去する場合はCD1, CD2

50

、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD16、CD19、CD20、CD22、CD23、CD33、CD34、CD36、CD41、CD42、CD45、CD45RA、CD45RO、CD56、CD66b等から選ぶのがよい。

【0029】

更には2以上の目的外の成分が存在する場合、目的外の成分同士を結合する結合剤を用いて濃縮することも可能である。例えば、血液中から極微量のがん細胞を分離する場合や一部の白血球成分を分離する場合、赤血球および白血球と結合可能な結合剤（例えば、RosetteSep(StemCell Technologies社製)）を用いて濃縮することができる。結合剤は、一つまたはそれ以上の白血球や赤血球と結合可能であるか、細胞の表面抗原と結合するものであればよく、白血球を凝集させるか、または、白血球を赤血球に結合させることができる抗体であればよい。結合剤によって密度が大きくなった粒子（細胞凝集体）は、遠心分離中に、目的とする成分（例えば、がん細胞など）から分離され得る。

10

【発明の効果】

【0030】

本発明の分離構造体及び分離方法は、遠心分離操作の後、目的とする細胞等が含まれる分画を回収するにあたり、分離構造体ごと不要な分画を分離し、分離構造体を構成する筒状部材の密閉を開放する、という極めて簡単な操作を行うのみである。従って、分離容器の開口端からピペット先端を差し込み、密度勾配溶液上の極めて薄い分画を回収することと比較して、熟練が不要となる、目的とする細胞等を安定的に回収し得る、ピペット先端を密度勾配溶液中に差し込んでしまい、目的とする細胞等以外の細胞等を誤って回収する可能性が低い、という効果を奏することができる。このような効果により、操作者の熟練に依存しない細胞の分離が可能となり、目的とする細胞等の分離操作を機械操作による自動化することも可能となる。

20

【0031】

また本発明の分離構造体及び分離方法は、2以上の分離可能な部材からなる構成を採用することにより、不要成分を構造体ごと切り離し、目的とする細胞の種類（密度）毎に、当該細胞を効率的に回収することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

30

【0032】

【図1】本発明の分離構造体を説明するための図である。

【図2】本発明の分離方法を説明するための図である。

【図3】本発明の分離方法を説明するための図である。

【図4】本発明の実施例1で用いた分離構造体を示す図である。

【図5】本発明の実施例1、2及び比較例で実施した細胞の測定方法を説明するための図である。

【図6】本発明の実施例2におけるがん細胞回収率を示す図である。

【図7】本発明の実施例4におけるがん細胞回収率を示す図である。

【図8】本発明の実施例5におけるがん細胞回収率を示す図である。

40

【図9】本発明の実施例6におけるがん細胞回収率を示す図である。

【図10】本発明の実施例8におけるがん細胞回収率を示す図である。

【図11】本発明の実施例10で用いた分離構造体を示す図である。

【図12】本発明の実施例10の分離方法を説明するための図である。

【図13】本発明の実施例10におけるがん細胞回収率を示す図である。

【図14】本発明の実施例11におけるがん細胞回収率を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

50

## 【実施例 1】

## 【0034】

## 基本原理

図 1 に示した態様の分離構造体を使用して、がん細胞の分離を行った。分離構造体は、詳細には、筒状部材 2 は内径 16 mm、縦 80 mm、容量 13 mL の円筒状のポリプロピレン製部材である。部材の内面にはウシ血清アルブミン (BSA) をコーティングし、親水化することで細胞等の非特異吸着を防止してある。また筒状部材 2 の先細り形状部分 7 の傾斜角度は 30° であり、筒状部材 3 との連通開口は 2 mm である。筒状部材 3 は、内径 10 mm、縦 43 mm、容量 2 mL のポリプロピレン製部材である。

## 【0035】

図 3 に模式的に示したように、分離構造体の下側の筒状部材 3 に、密度が 1.077 g/mL の密度勾配溶液 31 (Axis - Shield PoC AS 社製、商品名 Lymphoprep) を 2 mL 注入した (図中下部の白抜き部分が密度勾配溶液で満たした部分である)。詳しくは密度勾配溶液の液面高さが、上側の筒状部材 2 の連通開口 6 よりも約 1 mm 高くなるように (従って液面は、上側筒状部材の内部に位置する) 注入した。続いて密度勾配溶液の上に、3 mL の血液試料と 3 mL の生理食塩水の混合液 32 を重層した (図中、黒塗部分が重層した混合液の部分である)。なお血液試料は、インフォームドコンセントを得て取得した健常者血液に約 30 個のヒトがん細胞を懸濁した懸濁液である。添加する当該がん細胞はあらかじめ蛍光染色試薬 (株式会社同仁化学研究所製、商品名 Calcein AM) で標識している。なお、当該がん細胞は、細胞密度が約  $2 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> になるように静置培養後、0.25% トリプシン / 1 mM EDTA により細胞をディッシュから剥離し、限界希釈により調整したものである。

## 【0036】

試料注入後、分離構造体の開口をキャップ 4 (ポリプロピレン製) で密閉し、1100 × g で 10 分間、室温にて遠心分離した。遠心分離操作により、図 4 左に示したように、密度勾配溶液と試料の界面 (Lymphoprep 液の頂部) 33 に細胞は維持された。キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材 2 及び 3 を分離部で分離した後、図 4 右に示したようにキャップをはずして密閉を開放することで、上側の筒状部材 2 の連通開口 6 より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させ、下方に設置した 50 mL チューブで回収するとともに、上側筒状部材の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。

## 【0037】

回収した細胞の懸濁液を 0.4% クエン酸ナトリウム / PBS 溶液で 30 mL までメスアップし、300 × g で 10 分間室温にて遠心分離し、ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を 300 mM のマンニトール溶液 30 mL に再懸濁し、300 × g で 5 分間室温にて遠心分離した。この遠心分離操作は、細胞破片及び血小板を除去し、目的とする細胞を濃縮するためのものである。

## 【0038】

回収した細胞の測定は、スライドへの塗布もしくはウェルへ捕捉した細胞を顕微鏡観察する手法やフローサイトメトリー法などを用いることができる。本実施例 1 では、分離した細胞を誘電泳動力によって基板上に備えた孔径 30 μm、深さ 30 μm の保持孔 (約 100 万個) に捕捉して測定する手法を採用した。

## 【0039】

図 5 に示した装置を使用して、分離された細胞が目的とするヒト乳がん細胞であることを確認した。図 5 の装置は、電源 34、電極基板 35 及び 36 を有し、基板間に電圧を印加することにより細胞 37 に誘電泳動力 38 を作用させ、保持孔 39 内に導入し捕捉するものである (特許第 4910716 号公報参照)。分離された細胞懸濁液を、この装置に供して保持孔に捕捉した細胞を蛍光顕微鏡 40 で観察した。その結果、保持孔には約 40 万個の正常白血球とともに、約 27 個のがん細胞が捕捉され (回収率約 90%)、本発明の分離構造体を用いることで、構造体を構成する筒状部材の分離、開口を密閉するキャ

10

20

30

40

50



ップの取り外しという簡単な操作により、高い回収率をもって目的とする細胞を分離できる。

【実施例 2】

【0040】

実施例 1 と同様の操作を行い、がん細胞の分離を行った。分離構造体は、詳細には、筒状部材 2 は内径 18 mm、縦 70 mm、容量 15 mL の円筒状のポリプロピレン製部材である。部材の内面にはウシ血清アルブミン (BSA) をコーティングし、親水化することで細胞等の非特異吸着を防止してある。また筒状部材 2 の先細り形状部分 7 の傾斜角度は 30° であり、筒状部材 3 との連通開口は 2 mm である。筒状部材 3 は、内径 10 mm、縦 54 mm、容量 2 mL のポリプロピレン製部材である。

10

【0041】

図 3 に模式的に示したように、分離構造体の下側の筒状部材 3 に、密度が 1.077 g/mL の密度勾配溶液 31 (Axis-Shield PoC AS 社製、商品名 Lymphoprep) を 2 mL 注入した (図中下部の白抜き部分が密度勾配溶液で満たした部分である)。詳しくは密度勾配溶液の液面高さが、上側の筒状部材 2 の連通開口端 (分離部) 6 よりも約 1 mm 高くなるように (従って液面は、上側筒状部材の内部に位置する) 注入した。続いて密度勾配溶液の上に、3 mL の血液試料と 3 mL の生理食塩水の混合液 (血液試料と生理食塩水の混合液 (重層した混合液の部分)) 32 を重層した (図中、黒塗部分が重層した混合液の部分である)。なお血液試料は、インフォームドコンセントを得て取得した健康者血液に約 30 個のヒトがん細胞を懸濁した懸濁液である。添加する当該がん細胞はあらかじめ蛍光染色試薬 (株式会社同仁化学研究所製、商品名 Calcein AM) で標識している。なお、当該がん細胞は、細胞密度が約  $2 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> になるように静置培養後、0.25% トリプシン / 1 mM EDTA により細胞をディッシュから剥離し、限界希釈により調整したものである。

20

【0042】

試料注入後、分離構造体の開口をキャップ 4 (ポリプロピレン製) で密閉し、1100 × g で 10 分間、室温にて遠心分離した。遠心分離操作により、図 4 左に示したように、密度勾配溶液と試料の界面 (Lymphoprep 液の頂部) 33 に細胞は維持された。キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材 2 及び 3 を分離部で分離した後、図 4 右に示したようにキャップをはずして密閉を開放することで、上側の筒状部材 2 の連通開口端 (分離部) 6 より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させ、下方に設置した 50 mL チューブ 50 (「チューブ 50」と記載することがある) で回収するとともに、上側筒状部材の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。

30

【0043】

回収した細胞の懸濁液を 0.4% クエン酸ナトリウム / PBS 溶液で 30 mL までメスアップし、300 × g で 10 分間室温にて遠心分離し、ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を 300 mM のマンニトール溶液 30 mL に再懸濁し、300 × g で 5 分間室温にて遠心分離した。この遠心分離操作は、細胞破片及び血小板を除去し、目的とする細胞を濃縮するためのものである。

【0044】

回収した細胞の測定は、スライドへの塗布もしくはウェルへ捕捉した細胞を顕微鏡観察する手法やフローサイトメトリー法などを用いることができる。本実施例 1 では、分離した細胞を誘電泳動力によって基板上に備えた孔径 30 μm、深さ 30 μm の保持孔 (約 100 万個) に捕捉して測定する手法を採用した。

40

【0045】

図 5 に示した装置を使用して、分離された細胞が目的とするがん細胞であることを確認した。図 5 の装置は、電源 34、電極基板 35 及び 36 を有し、基板間に電圧を印加することにより細胞 37 に誘電泳動力 38 を作用させ、保持孔 39 内に導入し捕捉するものである (特許第 4910716 号公報参照)。分離された細胞懸濁液を、この装置に供して保持孔に捕捉した細胞を蛍光顕微鏡 40 で観察した。2 種の乳がん細胞 (SKBR3, M

50

MDA - MB - 231), 2種の非小細胞肺癌(PC9, A549), 2種の小細胞肺癌(H69, SBC-1)の回収率は図6に示すように74.6~92.4%であった。なお、がん細胞とともに混入する正常白血球は約400万個であった。本発明の分離構造体を用いることで、構造体を構成する筒状部材の分離、開口を密閉するキャップの取り外しという簡単な操作により、様々な細胞種を高い回収率をもって分離できる。

#### 【実施例3】

##### 【0046】

試料として、健常者血液に約30個のヒト乳がん細胞(SKBR3)を混合させた3mLの懸濁液を用い、実施例1と同様に遠心分離操作を実施して細胞を密度勾配溶液と試料の界面に維持した。遠心分離操作の終了後、キャップ2を取り外し、分離構造体の各筒状部材を分離することなく転倒させて開口から密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させ、チューブ50に回収するとともに、上側筒状部材の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。この際、分離構造体の上側の筒状部材の、連通開口に向かう先細り形状の部分によって、下側の構造体に移動した、主に赤血球を含むペレットが上側の筒状部材側へ逆流することはなかった。

10

##### 【0047】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とするヒト乳がん細胞であることを確認した。その結果、保持孔には約400万個の正常白血球とともに、約26個のがん細胞が捕捉され(回収率約85%)、本発明の分離構造体を用いることで、開口を密閉するキャップの取り外し、構造体の転倒という簡単な操作により、高い回収率をもって目的とする細胞を分離できる。

20

#### 【実施例4】

##### 【0048】

##### 凝集法の基本原理

実施例1と同様に密度勾配溶液の上へ健常者血液3mLに約30個のがん細胞を混合させた試料と3mLの生理食塩水と75 $\mu$ Lの結合剤(商標RosetteSep, StemCell Technologies Inc)の混合液を重層し、遠心分離、回収操作を実施した。

##### 【0049】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とするがん細胞であることを確認した。2種の乳がん細胞(SKBR3, MDA - MB - 231), 2種の非小細胞肺癌(PC9, A549), 2種の小細胞肺癌(H69, SBC-1)の回収率は図7に示すように76.8~91.4%であった。なお、がん細胞とともに混入する正常白血球は約30万個であり、結合剤で目的外の細胞(赤血球、白血球)を互いに結合することで密度を高くし、目的の細胞(がん細胞)との密度差を大きくしたうえで、本発明の分離構造体を用いた分離を行うことにより、高い回収率と選択性をもって目的とする細胞を分離できる。

30

#### 【実施例5】

##### 【0050】

##### 密度差分離における遠心条件の最適化

実施例3と同様にして、健常者血液に約30個のヒト乳がん細胞(SKBR3)を混合させた試料、生理食塩水、結合剤の混合液を密度勾配溶液の上へ重層し、遠心分離、回収操作を実施した。なお、密度差分離における遠心条件は1100~3000 $\times$ g、3~10分間、室温にて実施した。遠心分離後、キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材2及び3を分離部で分離した後、キャップをはずして密閉を開放することで、上側の筒状部材2の連通開口端(分離部)6より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させ、下方に設置したチューブ50で回収するとともに、上側筒状部材の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。

40

##### 【0051】

回収した細胞の懸濁液を0.4%クエン酸ナトリウム/PBS溶液で30mLまでメス

50

アップし、 $300 \times g$ 、10分間室温にて遠心分離した。ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を $300 \text{ mM}$ のマニトール溶液 $30 \text{ mL}$ に再懸濁した後、 $300 \times g$ で5分間室温にて遠心分離した。

【0052】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とする乳がん細胞であることを確認した。図8に遠心条件とがん細胞回収率の結果を示した。密度差分離での遠心条件は、 $2000 \times g$ 、5分間で最大 $88.1\%$ に達し、それ以上に遠心加速度を上昇させると細胞への負荷が大きくなり、回収率は低下した。

【実施例6】

【0053】

回収操作における遠心条件の最適化

実施例3と同様にして、健常者血液に約30個のヒト乳がん細胞(SKBR3)を混合させた試料、生理食塩水、結合剤の混合液を密度勾配溶液の上へ重層し、遠心分離、回収操作を実施した。なお、密度差分離における遠心条件は $2000 \times g$ 、5分間、室温にて実施した。遠心分離後、キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材2及び3を分離部で分離した後、キャップをはずして密閉を開放することで、上側の筒状部材2の連通開口端(分離部)6より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させ、下方に設置したチューブ50で回収するとともに、上側筒状部材の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。

【0054】

回収した細胞の懸濁液を $0.4\%$ クエン酸ナトリウム/PBS溶液で $30 \text{ mL}$ までメスアップし、 $300 \sim 900 \times g$ 、 $5 \sim 10$ 分間室温にて遠心分離した。ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を $300 \text{ mM}$ のマニトール溶液 $30 \text{ mL}$ に再懸濁した後、 $300 \times g$ で5分間室温にて遠心分離した。

【0055】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とする乳がん細胞であることを確認した。図9に遠心条件とがん細胞回収率の結果を示した。回収時の遠心条件は、 $300 \times g$ 、10分間で最大 $89.2\%$ に達し、遠心加速度 $300 \times g$ で遠心時間10分未満では十分に細胞が沈降せず、12分以上になると過度な負荷と経時的な細胞死滅により回収率が低下した。また遠心加速度を $900 \times g$ 以上にすると細胞への顕著な重力負荷が認められ、回収率は大きく低下した。

【実施例7】

【0056】

先細り形状の傾斜角度の最適化(密度勾配溶液 $1.077 \text{ g/mL}$ )

実施例3と同様にして、健常者血液に約30個のヒト乳がん細胞(SKBR3)を混合させた試料、生理食塩水、結合剤の混合液を密度勾配溶液の上へ重層し、遠心分離、回収操作を実施した。なお、密度差分離における遠心は $2000 \times g$ 、5分間、回収における遠心は $300 \times g$ 、10分間室温にて実施した。実施例6で使用した分離構造体は、筒状部材2は内径 $18 \text{ mm}$ 、縦 $70 \text{ mm}$ 、容量 $15 \text{ mL}$ の円筒状のポリプロピレン製部材である。部材の内面にはウシ血清アルブミン(BSA)をコーティングし、親水化することで細胞等の非特異吸着を防止してある。また筒状部材2の先細り形状部分7の傾斜角度は $30$ 、 $50$ 、 $70^\circ$ であり、筒状部材3との連通開口は $2 \text{ mm}$ である。筒状部材3は、内径 $10 \text{ mm}$ 、縦 $54 \text{ mm}$ 、容量 $2 \text{ mL}$ のポリプロピレン製部材である。

【0057】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とする乳がん細胞であることを確認した。筒状部材2の先細り形状部分7の傾斜角度が $30^\circ$ で最大 $86.5\%$ に達し、傾斜角度が大きくなるに従い、筒状部材2側の密度勾配溶液と試料の界面(Lymphoprep液の頂部)に維持されたがん細胞が筒状部材3側へ移動しやすくなるため、筒状部材2の先細り形状部分7の傾斜角度 $50^\circ$ で $75\%$ 、 $70^\circ$ で $73\%$ と回収率が低下した。

10

20

30

40

50

## 【実施例 8】

## 【0058】

## 密度勾配溶液の最適化

実施例 3 と同様にして、健常者血液に約 30 個のヒト乳がん細胞 (SKBR3) を混合させた試料、生理食塩水、結合剤の混合液を密度勾配溶液の上へ重層し、遠心分離、回収操作を実施した。なお、密度差分離における遠心は  $2000 \times g$ 、5 分間、回収における遠心は  $300 \times g$ 、10 分間室温にて実施した。実施例 7 では、分離構造体 1 の筒状部材 3 に、密度が  $1.077$ 、 $1.082$ 、 $1.084$ 、 $1.091 \text{ g/mL}$  の密度勾配溶液を  $2 \text{ mL}$  注入した。

## 【0059】

図 5 に示した装置を使用して、実施例 1 と同様に、分離された細胞が目的とする乳がん細胞であることを確認した。図 10 に密度勾配溶液の密度とがん細胞回収率の結果を示した。密度勾配溶液の密度の上昇に伴い、がん細胞回収率は向上し、密度が  $1.091 \text{ g/mL}$  で回収率  $96.9\%$  であった。

## 【実施例 9】

## 【0060】

## 連通開口径の最適化 (キャップ密閉で液体保持できる仕様)

実施例 3 と同様にして、健常者血液に約 30 個のヒト乳がん細胞 (SKBR3) を混合させた試料、生理食塩水、結合剤の混合液を密度勾配溶液の上へ重層し、遠心分離、回収操作を実施した。実施例 9 で使用した分離構造体は、筒状部材 2 は内径  $18 \text{ mm}$ 、縦  $70 \text{ mm}$ 、容量  $15 \text{ mL}$  の円筒状のポリプロピレン製部材である。部材の内面にはウシ血清アルブミン (BSA) をコーティングし、親水化することで細胞等の非特異吸着を防止してある。また筒状部材 2 の先細り形状の部分 7 の傾斜角度は  $70^\circ$  であり、筒状部材 3 との連通開口は  $2$ 、 $4$ 、 $6 \text{ mm}$  である。筒状部材 3 は、内径  $10 \text{ mm}$ 、縦  $54 \text{ mm}$ 、容量  $2 \text{ mL}$  のポリプロピレン製部材である。

## 【0061】

遠心分離後、キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材 2 及び 3 を分離部で分離した際、連通開口が  $2$ 、 $4 \text{ mm}$  では筒状部材 2 に保持された液体が流出しなかったが、 $6 \text{ mm}$  ではわずかに流出が認められた。

## 【0062】

図 5 に示した装置を使用して、実施例 1 と同様に、分離された細胞が目的とする乳がん細胞であることを確認したところ、連通開口が  $2$ 、 $4 \text{ mm}$  の場合、それぞれ回収率が  $86.2\%$ 、 $85.5\%$  であったのに対し、 $6 \text{ mm}$  では  $72.2\%$  と回収率の顕著な低下が認められた。

## 【実施例 10】

## 【0063】

## 三分割構造体の使用例

図 11 に示した態様の分離構造体を使用して、がん細胞の分離を行った。分離構造体は、詳細には、キャップ 49 と筒状部材 41、42、43 から構成される。筒状部材 41 は内径  $20 \text{ mm}$ 、縦  $60 \text{ mm}$ 、容量  $11 \text{ mL}$  の円筒状のポリプロピレン製部材である。また筒状部材 41 の先細り形状の部分 44 の傾斜角度は  $70^\circ$  であり、筒状部材 42 との連通開口は  $2 \text{ mm}$  である。筒状部材 42 は内径  $14 \text{ mm}$ 、縦  $30 \text{ mm}$ 、容量  $3 \text{ mL}$  の円筒状のポリプロピレン製部材である。筒状部材 42 の先細り形状の部分 45 の傾斜角度は  $30^\circ$  であり、筒状部材 43 との連通開口は  $2 \text{ mm}$  である。筒状部材 43 は、内径  $14 \text{ mm}$ 、縦  $41 \text{ mm}$ 、容量  $2.5 \text{ mL}$  のポリプロピレン製部材である。なお部材の内面にはウシ血清アルブミン (BSA) をコーティングし、親水化することで細胞等の非特異吸着を防止してある。

## 【0064】

分離構造体の下側の筒状部材 43 には、密度が  $1.077 \sim 1.086 \text{ g/mL}$  の密度勾配溶液 (下側の筒状部材を満たした部分) 46 を  $2.5 \text{ mL}$  注入した (図中下部の白抜

10

20

30

40

50

き部分が密度勾配溶液で満たした部分である)。続いて、分離構造体の中間の筒状部材(中央)42(筒状部材42と記載することがある)に密度が $1.030 \sim 1.086 \text{ g/mL}$ の密度勾配溶液(中央の筒状部材を満たした部分)47(「密度勾配溶液47」と記載することがある)を $3 \text{ mL}$ 注入した(図中中間の斜線部分が密度勾配溶液で満たした部分である)。最後に密度勾配溶液47の上に、健常者血液に約30個のヒト乳がん細胞(SKBR3)を混合させた $3 \text{ mL}$ の試料と $3 \text{ mL}$ の生理食塩水、 $75 \mu\text{L}$ の結合剤の混合液(試料、生理食塩水、結合剤)48(混合液48と記載することがある)を重層した(図中、黒塗部分が重層した混合液の部分である)。

#### 【0065】

試料注入後、分離構造体の開口をキャップ49(ポリプロピレン製)で密閉し、 $2000 \times g$ で5分間、室温にて遠心分離した。図12に示したように遠心分離後、キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材42及び43を分離部で分離し、続いて筒状部材41及び42を分離部で分離することにより筒状部材42の連通開口より密度勾配溶液の一部と筒状部材42内の細胞のみを流出させ、下方に設置したチューブ50で回収するとともに、筒状部材42の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。最後にキャップをはずして密閉を開放することで、筒状部材41の連通開口より密度勾配溶液の一部と筒状部材41内の細胞を流出させ、前記した操作と同様に下方に設置したチューブ50で回収するとともに、筒状部材41の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。

#### 【0066】

回収した各々の細胞懸濁液を $0.4\%$ クエン酸ナトリウム/PBS溶液で $30 \text{ mL}$ までメスアップし、 $300 \times g$ で10分間室温にて遠心分離し、ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を $300 \text{ mM}$ のマンニトール溶液 $30 \text{ mL}$ に再懸濁し、 $300 \times g$ で5分間室温にて遠心分離した。この遠心分離操作は、細胞破片及び血小板を除去し、目的とする細胞を濃縮するためのものである。

#### 【0067】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とする乳がん細胞であることを確認した。図13に筒状部材42及び43に注入した密度勾配溶液の密度と各筒状部材からのがん細胞回収率の結果を示した。本発明の分離構造体を用いることで、構造体を構成する各筒状部材の分離、開口を密閉するキャップの取り外しという簡単な操作により、目的とする細胞の種類(密度)毎に、当該細胞を分離することが可能となる。

#### 【実施例11】

#### 【0068】

密度遠心分離後画分の磁気ビーズによる二次分離

試料として、健常者血液に約30個のがん細胞を混合させた $3 \text{ mL}$ の懸濁液を用い、実施例1と同様に遠心分離操作を実施して細胞を密度勾配溶液と試料の界面に維持した。遠心分離操作の終了後、キャップを取り外すことなく分離構造体を構成する筒状部材を2及び3を分離部で分離した後、図4右に示したようにキャップをはずして密閉を開放することで、上側の筒状部材2の連通開口端(分離部)6より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させ、下方に設置したチューブで回収するとともに、上側筒状部材の内壁を洗浄し、壁に付着した細胞も同時に回収した。

#### 【0069】

回収した細胞の懸濁液を $0.4\%$ クエン酸ナトリウム/PBS溶液で $30 \text{ mL}$ までメスアップし、 $300 \times g$ で10分間室温にて遠心分離し、ペレットの頂部の液体をピペットで取り出した。ペレットは $500 \mu\text{L}$ のPBS溶液に再懸濁し、白血球を除去するための抗体磁性粒子(Dynabeads CD45, invitrogen)を $25 \mu\text{L}$ 添加した後、攪拌しながら20分、4で抗原抗体反応した。反応後の容器を磁石に設置することで容器壁面に抗体磁性粒子と結合した白血球を捕捉、除去すると同時にがん細胞が含まれる溶液を回収した。回収した細胞懸濁液は $300 \text{ mM}$ のマンニトール溶液 $30 \text{ mL}$ ま

10

20

30

40

50

でメスアップし、 $300 \times g$ で5分間室温にて遠心回収した。

【0070】

図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とするがん細胞であることを確認した。2種の乳がん細胞（SKBR3，MDA-MB-231），2種の非小細胞肺癌（PC9，A549），2種の小細胞肺癌（H69，SBC-1）の回収率は図14に示すように37～87.3%であった。なお、がん細胞とともに混入する正常白血球は約200万個であり、本発明の分離構造体を用いた分離および抗体磁性粒子を用いた白血球の除去により、高い回収率と選択性をもって目的とする細胞を分離できる。

比較例1

市販の密度勾配遠心法による血液分離キット（Axis-Shield PoC AS社製、商品名Lymphoprep Tube、密度勾配溶液（Lymphoprep）の密度 $1.077 g/mL$ ）を使用して、実施例1で使用した試料からのヒト乳がん細胞（SKBR3）の分離を実施した。試料をキットに含まれる分離容器の密度勾配溶液の上に重層した後、 $1100 \times g$ で10分間室温にて遠心分離した。遠心分離後、密度勾配溶液と試料の界面（Lymphoprep液の頂部）に維持された細胞を、分離容器を転倒して流出させ、チューブ50に回収するとともに、容器内壁及び分離容器内のフィルターを洗浄し、それらに付着した細胞を同時に回収した。

【0071】

回収した細胞の懸濁液を0.4%クエン酸ナトリウム/PBS溶液で30mLまでメスアップし、 $300 \times g$ で10分間室温にて遠心分離し、ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を300mMのマンニトール溶液30mLに再懸濁し、 $300 \times g$ で5分間室温にて遠心分離した。この遠心分離操作は、細胞破片及び血小板を除去し、目的とする細胞を濃縮するためのものである。

【0072】

前記遠心分離操作後、ペレットの頂部の液体をピペットで取り出し、ペレット中の細胞を300mMのマンニトール溶液1mLに再懸濁した。図5に示した装置を使用して、実施例1と同様に、分離された細胞が目的とするヒト乳がん細胞であることを確認した。その結果、保持孔には約440万個の正常白血球が捕捉され、がん細胞は約25個（回収率約83%）であった。また同様の操作を再度実施したが、その結果は、保持孔には約400万個の正常白血球が捕捉され、がん細胞は約14個（回収率約45%）と、操作毎にがん細胞の回収率が大きく変動した。この結果から、上側の筒状部材の連通開口より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させる本発明によって、安定して高い回収率でがん細胞を回収できることが分かる。

【0073】

比較例2

$1100 \times g$ での遠心分離操作の後、密度勾配溶液と試料の界面（密度勾配溶液の頂部）に維持された細胞をピペットで吸引してチューブに回収した以外は実施例1と同様の操作を実施した。その結果、保持孔には約410万個の正常白血球が捕捉されたが、がん細胞は約21個（回収率約71%）にとどまり、遠心分離操作後にピペットによってがん細胞を吸引する操作により、がん細胞の回収率が低下した。この結果から、上側の筒状部材の連通開口より密度勾配溶液の一部とその上に維持された細胞を流出させる本発明によって、安定して高い回収率でがん細胞を回収できることが分かる。

【符号の説明】

【0074】

- 1：分離構造体
- 2：筒状部材（上側）
- 3：筒状部材（下側）
- 4：キャップ
- 5：底部

10

20

30

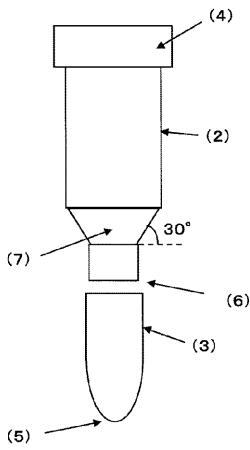
40

50

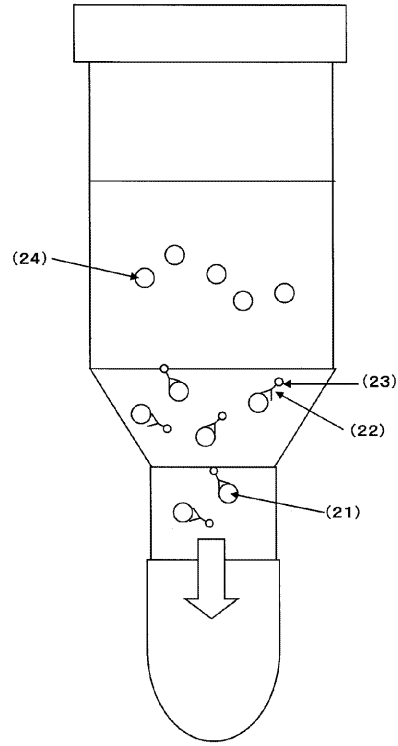
- 6 : 連通開口端 ( 分離部 )
- 7 : 筒状部材の先細り形状部分
- 2 1 : 目的外の成分 ( 細胞等 )
- 2 2 : 目的外の成分に対して特異的に結合する物質
- 2 3 : 密度を調整するための物質
- 2 4 : 目的とする成分 ( 細胞等 )
- 3 1 : 密度勾配溶液 ( 密度勾配溶液で満たした部分 )
- 3 2 : 血液試料と生理食塩水の混合液 ( 重層した混合液の部分 )
- 3 3 : 密度勾配溶液と試料の界面
- 3 4 : 交流電源 10
- 3 5 : 上部電極基板
- 3 6 : 下部電極基板
- 3 7 : 細胞
- 3 8 : 誘電泳動力
- 3 9 : 保持孔
- 4 0 : 蛍光顕微鏡
- 4 1 : 筒状部材 ( 上側 )
- 4 2 : 筒状部材 ( 中央 )
- 4 3 : 筒状部材 ( 下側 )
- 4 4 : 先細り形状 ( 上側の筒状部材 ) 20
- 4 5 : 先細り形状 ( 中央の筒状部材 )
- 4 6 : 密度勾配溶液 ( 下側の筒状部材を満たした部分 )
- 4 7 : 密度勾配溶液 ( 中央の筒状部材を満たした部分 )
- 4 8 : 混合液 ( 試料、生理食塩水、結合剤 )
- 4 9 : キャップ
- 5 0 : 5 0 m L チューブ

【図1】

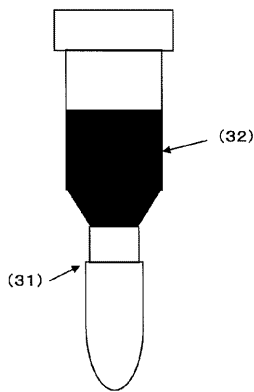
(1)



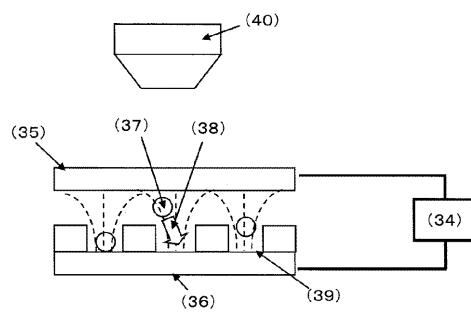
【図2】



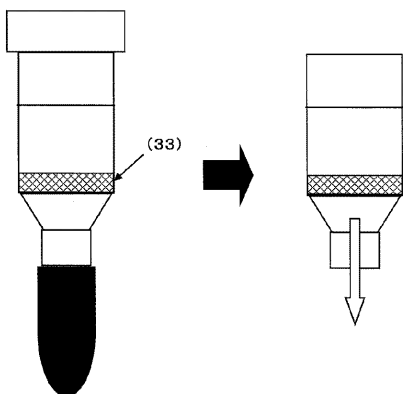
【図3】



【図5】



【図4】



【図6】

がん種	細胞株	回収率(%)
乳がん	SKBR3	88.2
	MDA-MB-231	86.4
非小細胞肺がん	PC9	92.4
	A549	74.6
小細胞肺がん	H69	84.1
	SBC-1	88.5



【図7】

がん種	細胞株	回収率(%)
乳がん	SKBR3	85.4
	MDA-MB-231	82.9
非小細胞肺がん	PC9	91.4
	A549	76.8
小細胞肺がん	H69	86.3
	SBC-1	89.0

【図8】

遠心加速度(G)	遠心時間(分)	回収率(%)
1100	10	85.4
1500	5	75.0
2000	5	88.1
2000	3	79.4
2500	3	76.5
3000	3	82.9

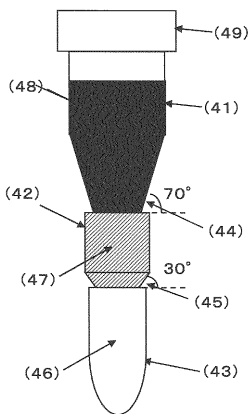
【図9】

遠心加速度(G)	遠心時間(分)	回収率(%)
300	5	79.5
300	7	80.6
300	10	89.2
300	12	81.4
300	15	71.1
500	5	77.1
700	5	81.3
900	5	48.6

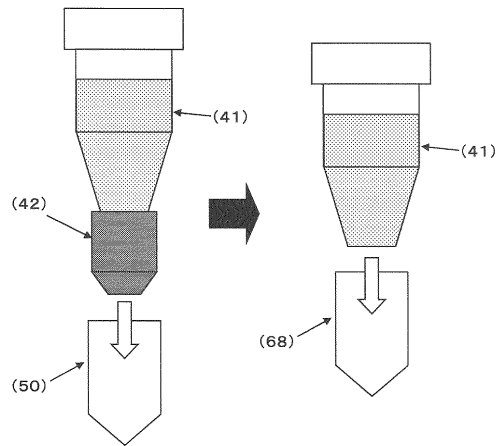
【図10】

密度(g/mL)	回収率(%)
1.077	86.5
1.082	89.2
1.084	91.7
1.091	96.9

【図11】



【図12】



【図13】

密度(g/mL)		回収率(%)	
密度勾配溶液46	密度勾配溶液47	筒状部材42	筒状部材41
1.077	1.077	3.6	85.5
1.077	1.063	71.3	11.3
1.077	1.040	81.0	1.0
1.077	1.030	81.8	0
1.086	1.086	0	90.7
1.082	1.082	2.1	85.1
1.082	1.077	8.2	78.7
1.082	1.063	55.7	31.4
1.082	1.040	83.6	0
1.082	1.030	88.8	0

【 図 1 4 】

がん種	細胞株	回収率(%)
乳がん	SKBR3	80.5
	MDA-MB-231	73.5
非小細胞肺がん	PC9	87.3
	A549	56.2
小細胞肺がん	H69	73.0
	SBC-1	37.0

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<i>G 0 1 N</i>	<i>1/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>1/10</i>	<i>H</i>
<i>C 1 2 M</i>	<i>1/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 M</i>	<i>1/00</i>	<i>A</i>

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特開2006-246835(JP,A)  
特開2006-280318(JP,A)  
特開平03-270701(JP,A)  
特開2006-067901(JP,A)  
国際公開第2005/035737(WO,A1)  
特開2002-291874(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12M 1/00-3/10  
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
PubMed