

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-333395

(P2004-333395A)

(43) 公開日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/50

F I

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/50

テーマコード (参考)

2 G O 4 5

K

T

B

K

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-132207 (P2003-132207)

(22) 出願日 平成15年5月9日(2003.5.9)

(71) 出願人 000126757

株式会社アドバンス

東京都中央区日本橋小舟町5番7号

(72) 発明者 石橋 広

東京都中央区日本橋小舟町5番7号 株式

会社アドバンス内

Fターム(参考) 2G045 BB03 BB24 CA11 CA25 FA37

FB03 FB05 FB07 FB12 JA01

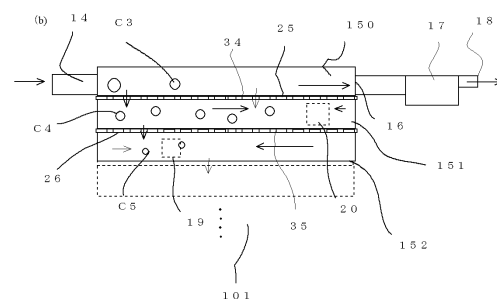
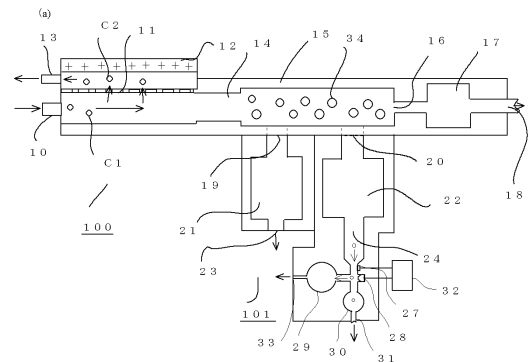
(54) 【発明の名称】 免疫計測システム

(57) 【要約】

【目的】主に末梢血等から免疫担当細胞を分離検出し、アレルギー等の免疫疾患の測定を行える分離システムを提案し、種々の免疫疾患の検査等を、簡易に行うことを実現する。

【構成】採血手段、前記採血手段で得られた血液から免疫関連細胞を分離する免疫系細胞分離手段、分離された免疫細胞を更に選択して免疫関連情報を得る免疫関連情報検出手段を有する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

採血された血液から免疫関連物質を分離する免疫系物質分離手段、分離された免疫物質を更に選択して免疫関連情報を得る免疫関連情報検出手段を有する免疫計測システム。

【請求項 2】

その一端に特定の細胞と結合する為の結合基を持ち、他端に標識要素を持つ細胞膜修飾要素を、細胞に結合させ、当該標識要素を検出することで、特定の細胞を識別計測する請求項 1 に記載の免疫計測システム。

【請求項 3】

前記結合基が、脂肪酸基である請求項 2 に記載の免疫計測システム。

10

【請求項 4】

前記結合基が、更に、抗体を接続してなる請求項 2 に記載の免疫計測システム。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、血液中から白血球等の免疫関連物質を分離し、計測するシステムに関する。

【0002】**【従来の技術】**

赤血球、白血球、血小板、フィブリノーゲン等の血球成分には種々の免疫細胞が含まれ、これら免疫細胞を測定することは、種々の疾病の診断あるいは、予防の点からも有益である。このような細胞の具体的な計測の必要性は、より身近なレベルでの実現が希求される。

20

【0003】**【特許文献 1】**

特表平 10 - 505905 公報には、免疫細胞の老化を診断するために、細胞集団に CD 28 抗原に特異的なモノクローナル抗体であって、検出可能な標識を有するものと反応させ、当該抗体との結合の可否により老化非老化を判定する手法が示されている。この様に識別可能な、抗体を細胞との結合の個別性を利用した免疫細胞の計測の使用が、一般的であるが手順が煩雑な点で専門家による作業が必要であり、簡単な計測とはいえない。

【0004】

30

【本発明が解決しようとする課題】

血液検査の簡素化により血液の取り扱いがより身近になろうとしている昨今において、血液中には、大きく分けて赤血球、白血球、血小板に区別されると共にその大きさが相違する点とその分極性等の物理的性状に基づいて、検出対象外となる赤血球を除去し、免疫細胞である白血球を分離抽出するシステムを提案する。

【0005】**【課題を解決するための手段】**

上記に鑑み本発明は、採血手段で得られた血液から免疫関連細胞を分離する免疫系細胞分離手段、分離された免疫細胞を更に分離して免疫関連情報を得る免疫関連情報検出手段により、アレルギー等の免疫疾患等を測定するシステムを提案するものである。

40

即ち本発明は、分泌物質ごとに細胞を分類可能としたり、特定の分泌細胞の集団を形成するなどして、分泌物質即ちサイトカインを分泌する細胞を選択的に検出する工程をより簡素に行おうとするものである。

本発明におけるサイトカインを例示すると、IFN、IL1、IL2、IL4、IL10、IL12、TGF、TNF、GMCSF、およびSCFなど、が例示されるが、その他、抗体、ホルモン、酵素、およびタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【0006】

本発明における採血手段は、特に限定されるものではなく、ランセットを用いて皮膚に損傷を与えて皮膚から血液を表出させ、これをピペットなどの採取する方法や、真空採血管、

50

注射器により皮膚に穿刺するなどして血液を採取する手段が例示されるが、これらに限るものではなく、好ましくは、より少量で、皮膚に対し、無痛か刺痛をより与えない手法が好ましい。

【0007】

本発明では、場合により予め血球等の細胞を分離する分離手段は、フィルタによる分離、遠心分離等の通常の方法を利用すれば足り、特に限定されるものではないが、簡易的な手法としては、ヘマセップ膜（商標）等の血球分離膜を利用した、血清と血球の分離が予めおこなわれてもよく、又この様な分離を必要としない場合もある。

【0008】

本発明における免疫細胞分離手段においては、まず目的外となる細胞である赤血球と、白血球とを分離するために、赤血球は、マイナスに帯電していることから、プラスに帯電しているイオン交換膜や、電極を配置することで、赤血球とその他の細胞を区別する。

これは、例えば、特開2000-171461号公報に開示されているような、イオン交換膜の利用が好適である。

更にその際、赤血球のみが通過するような、孔径を有する多孔質膜を組み合わせる。

これは、例えば、赤血球が7.8 μm であることから、これくらいの、孔径を有する多孔質膜を用いる。

【0009】

赤血球が除かれた白血球等の細胞において、好中球 直径12 - 15 μm 、好酸球直径13 - 20 μm 、好塩基球直径10 - 16 μm 、単球 直径15 - 20 μm 、リンパ球 直径7 - 10 μm 、血漿3 μm と直径に応じたフィルターを底面に有する流路を上下に重ね。上方が、孔径の大きいフィルターとすることで、球径毎に細胞を収集することができる。

本発明は、主に免疫担当細胞の選択的採取を主とし、直径の異なる細胞を個々に選択し、収集した後、分泌物毎に選択される。

これは、好ましくは、サイトカインの種類毎に免疫担当細胞を分別できることが好ましく、例えば、特表平8-504574号公報に開示された、分泌物ごとに蛍光化標識分子を結合して、FACSscan、イメージ分析、細胞学的標識、免疫アッセイ等の分析手段を用いて、蛍光的、磁氣的に計測する手法が用いられてもよい。

更に本発明は、蛍光標識、磁気標識を細胞に結合させ、その数等を計数する為に、PLL（ポリエリジン）-PEG-アンカー分子よりなる細胞修飾要素を利用して、個々のほぼ均一な細胞を凝集させて、蛍光度を実質的に増幅することで、観察を容易にすることが好ましい。

【0010】

本発明におけるアンカー分子としての脂肪酸及び脂肪酸基としては、例えばオレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、アラキドン酸、エンコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ジヒドロキシステアリン酸、セレブロン酸、リシノール酸、ヒドロキシネルボン酸、ヒドノカルプス酸、ショールムーグリン酸、ゴルリン酸、ラクトバシル酸、イタコン酸、トリコサン二酸、クロトン酸、ミリストレイン酸、等の脂肪酸から誘導される、オレイル基、ステアリル基、パルミチル基、エルカエル基、ネルボネル基、リノール基、 α -リノレリル基、アラキドエル基、エンコサペンタエル基、ドコサペンタエル基、その他上記脂肪酸の誘導体を有するものが例示されるが、その他の生体親和性を有する疎水性化合物であればいかなるものであってもよい。、その結合支持するものとしてポリエチレングリコール、界面活性剤等が例示される。

【0011】

標識分子として用いられる抗体は、例えば、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、ハプテンおよび抗体フラグメント、二重特異性抗体および生成物抗原上のエピトープに特異的に結合する抗体同等物である分子等よりなる抗体が示される。

その他、磁性ビーズ複合体化抗体、コロイドビーズ複合体化抗体、FITC複合体化抗体

10

20

30

40

50

、フェコエリトリン複合体化抗体、P e r C P複合体化抗体、A M C A複合体化抗体、蛍光粒子複合体化抗体、等が好適に用いられる。

磁気標識として例えば、D y n a l (N o r w a y) , A d v a n c e d M a g n e t i c s (C a m b r i d g e M A . U . S . A .)等の商標を付した()内企業により提案されているものが例示され、その大きさは、外部磁力により、細胞が移動可能な程度の磁力と大きさ、5 n m以上の大きさのものが例示される。

【0012】

本発明では、主に分泌細胞からなる免疫細胞を分離し集団化させた後、様々な免疫情報検出手法がとられるものであるが、例えば、検出された免疫細胞にアレルギー源などをふりかけ、反応により産生されるサイトカインを抗体などを用いて積極的に検出したり、
上述した細胞修飾要素によって直接分離固定された免疫細胞の一つであるヘルパーT細胞のアレイを作成し、各種アレルギーに対する反応を検出したり、各種病原菌に対する抗体が存在するかどうかの検査も例示される。

10

さらに、予防接種の代わりとしての利用。各人のB細胞を取り出し、抗原(病原菌やウイルス由来のタンパク質)を与えることで抗体産生細胞に分化させ、これを患者血中に戻すという白血球除去療法の様な、免疫療法にも活用できる可能性がある。

また、免疫研究にも活用することが出来る。免疫の活性を向上させる成分の探索や、サイトカイン系の研究にも利用できる。

【0013】

更に本発明では、上述した細胞修飾要素と、検出目的とする分泌物質(リガンド)に対応する受容体とを結合したものを血液中に投与し、細胞修飾要素が細胞にアンカリングした後、当該抗体と結合する分泌物質を表面に有する補足体を血液中に浸漬する。

20

補足体は、少なくとも拡散しない形態のものであるか、余計な細胞修飾要素を補足できるものであればよい。即ち、当該補足体は、細胞修飾要素がアンカリングした細胞であって、目的としない分泌物質等を寄せ集め補足するためのものである。

更に抗体には、上述した様な磁気或いは蛍光物質が結合し標識化されている。

当該受容体は、リガンドが、抗体の場合は、抗原であり、抗原の場合は抗体である。

【0014】

予め、測定対象となるリガンドに対する受容体、例えば、抗体であれば、適当な動物に、リガンドを接種し、公知手順により抗体を得る。

30

当該抗体に蛍光物質を標識として結合し、更に細胞修飾要素に結合する。細胞修飾要素としては、P E Gにオレイル基を結合したB A M(商標)が例示されるが、これに限るものではない。

標識化抗体を有する細胞修飾要素を、血液中に投与する。細胞修飾要素のオレイル基は、細胞膜に結合すると共に、受容体は細胞から分泌されるリガンドと結合する。

その際明らかに不要な細胞は、予め分離しておくことが好ましい。

次に、当該リガンドを付着した補足体を血液中に浸漬し、リガンドと結合しない受容体を補足する。その際、細胞膜とオレイル基の結合力が強い場合は、そのまま不要な細胞も補足できると共に、結合力が弱い場合でも、不要な標識を有する細胞修飾要素は、補足体に補足される。

40

結果として、計測を目的とする免疫細胞が標識化され、その数、存在を検出することができるものである。

【0015】

図1は、本発明の一実施例を示す図である。当該実施例は、計測対象とならない細胞などの物質を除去する為の構成をしめすものである。

図1(a)は、上面から見た概略図であり、図1(b)は、免疫担当細胞分離部101を側面から見た図である。

10は、血液入力部であり、採取された主に末梢血を流入する部分である。

11は、分離膜であり、赤血球が通過する程度の多孔質膜で形成されている。

12は、プラス帯電部であり、イオン交換膜、プラス側電極で構成されている。

50

13は、赤血球取り出し部であり、ある程度の吸引力が加わっている。

14は、流路であり、15は、免疫担当細胞分離部101における積層フィルター流路であって、図中では、3段に分かれており、個々の流路間を孔径の異なるフィルターで分割したものである。上段の流路150と中断の流路151の間の多孔質膜25の孔径は、例えば、単球を通過しない程度の孔径15 μ m以下の大きさとしたものであり、多孔質膜26は、例えば、好中球を通過させない程度の直径10 μ m以下の孔径を有するものとする。

【0016】

16、19、20は、取り出し口であり、直径の大きな血球を取り出す口である。17、21、22は、操作領域であり、特定の標識を細胞に結合させると共に、細胞修飾要素を添加して凝集させる部分等でもある。操作領域17は、外部モニター可能な領域となっている。 10

18は、流路であり、積層フィルターの上段の流路150内に操作領域方向へ流れを形成するための部分である。23は、流路であり、積層フィルター流路153内に操作領域21への流れを形成するためのものである。24は、流路であり、積層フィルター下段の流路152内に操作領域22への流れを形成するためのものである。

それぞれの吸引口は、多孔質膜における、細胞のつまりを防ぐために、個々の段の流れを同じくらいにすることが好ましく、又、積層フィルター流路15の距離を蛇行するなどして長くとることが好ましい。赤血球分離部100も同様に、長い流路を形成することが好ましい。電氣的計測のための構成は、その他のそれぞれの流路18、23にも構成されているが、同一のものであるので、省略した。 20

27は、測色センサーであり、着色した細胞が通過すると、その部分で、反射光度が特に変化し、これを電氣的に検出するようなものである。

【0017】

28は、吐出ノズルであり、内部流体（権濁液）を局所的に噴出するものである。本実施例では、吐出構成としたが、逆の吸引構成であっても良く、又、特定の細胞をピックアップする磁力出力部であってもよい。

29は、収容部であり、吐出ノズル28の吐出力により、押し出された細胞が収容される部分である。収容部29には、吐出力を有効にするための吸引口33が設けられている。

30は、吐出ノズル28の吐出力を受けずに、移動した細胞が収容される収容部30であり、収容部30には、更に吸引口31が設けられている。 30

32は、制御部であり、マイクロコンピュータ等で構成され、測色センサー27の電気信号を入力し、特定の着色標識細胞又は、磁化標識細胞の通過を識別判定し、その結果で、吐出ノズル28に出力信号を出力する為のものである。

本実施例は、シリコン等の樹脂を硬化させて、個々の上段の流路、中段の流路、下段の流路を形成した後、これを積層して形成したものであっても良い。多孔質膜は、シリコン膜にレーザで、所望の孔径の孔を形成するものが例示される。

【0018】

次に本実施例の動作を説明する。

採血した血液を、血液入力部10から注入する。血液中の赤血球は、赤血球分離部100は、流路18、23、24の少なくともどれか一つまたは、複数の吸引により、免疫担当細胞分離部101方向へ、流れを生じる。血球C1は、流れに沿って、免疫担当細胞分離部101方向へ流れるが、その際、プラス帯電部12方向へ、赤血球が流れ、分離膜11を通過して、赤血球取り出し部13の吸引により取り出される。 40

ここで、赤血球C2とその他、白血球などの免疫担当細胞が分離され、白血球27などの免疫担当細胞は、流路14を流れて、免疫担当細胞分離部101に到達する。白血球27は、積層フィルター流路の上段150の流れに沿って、取り出し口16方向に流れるが、中段の積層フィルター流路151の取り出し口20方向の流れによって生じる多孔質膜25の上段から中段方向への流れにおいて、多孔質膜25の孔径15 μ m以下の球径の細胞C4が、中段の流路151へ孔34を介して流れ込む、ここで、多孔質膜25を通過し 50

なかった細胞は、そのまま取り出し口 16 から、操作領域 17 に到達する。

【0019】

中段の流路 151 は、取り出し口 20 方向に流れが形成されているが、下段の流路 152 の取り出し口 19 方向への流れによって、多孔質膜 26 に中段から下段方向へ、流れが生じ、孔径が 10 μm 以下の細胞が、孔 35 を介して下段へ流れ込む、中段 151 で流れた取り出し口 20 から取り出された細胞は、主に好中球、好酸基球であり、操作領域 22 で、更に分泌物ごとの細胞の選択が行われる。

下段の流路 152 中の細胞は、主にリンパ球以下の直径を有するものであり、好ましくは、更に孔径の小さい 5 μm 以下の多孔質膜を介した下段を設けて、血漿を下段へ落とし、免疫細胞を、より選別的に操作領域 21 に取り出す。

10

以上の操作により、種類毎に大別された免疫担当細胞が得られ、更に操作領域 22 では、サイトカインなどを分泌する細胞の分泌物で着色標識する抗体標識物質を一端に接続し、他端にアンカー分子を接続した細胞修飾要素を添加する、アンカー分子は、細胞膜に結合すると共に、細胞は着色標識される。

抗体標識により着色された細胞は、吸引口 31 の吸引力により、流路 24 を介して収容部 30 方向に移動するが、測色センサー 27 の付近を通過した際、測色センサー 27 は、着色された細胞の通過を電気信号として制御部 32 へ電気信号として出力する。

制御部 32 は、この通過を認識し吐出ノズル 28 に吐出動作開始信号を出力する。

吐出ノズル 28 は、吐出動作を行い、吐出力により、着色標識細胞は、収容部 29 へ、移動する。

20

その他、着色されていない細胞又は、他の着色標識細胞は、収容部 30 へ、移動する。

この動作により、収容部 29 に収容された細胞は、特定のサイトカインを分泌する免疫細胞であり、その存在、個数が計数可能として検出される。

尚、このような電氣的測色の組み合わせは、並列して複数設けても良い。

その他、このような電氣的検出ではなく、そのまま操作領域 22 上でフローサイトメトリ等上述した測定手段を用いて、測定するものであってもよい。

【0020】

【発明の効果】

以上詳述のごとく本発明は、目的とする免疫担当細胞の存在、その数あるいは、分布などを、おおよそ自動的に検出することができるものである。

30

【図面の簡単な説明】

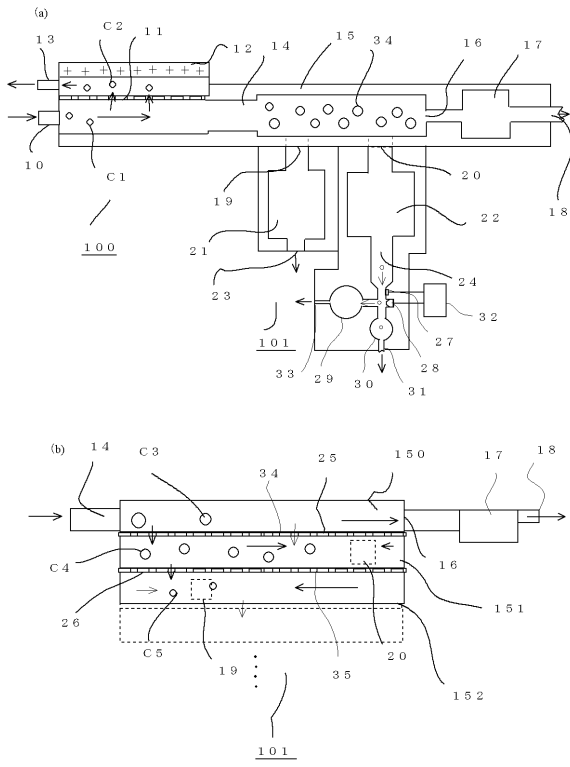
【図 1】本発明の一実施例を説明するための図。

【符号の説明】

- | | |
|-------------|-----------|
| 10 | 血液入力部 |
| 11 | 分離膜 |
| 12 | プラス帯電部 |
| 13 | 赤血球取り出し部 |
| 14、18、23、24 | 流路 |
| 15 | 積層フィルター流路 |
| 16、19、20 | 取り出し口 |
| 17、21、22 | 操作領域 |
| 25 | 多孔質膜 |
| 26 | 多孔質膜 |

40

【図 1】



专利名称(译)	免疫测量系统		
公开(公告)号	JP2004333395A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2003132207	申请日	2003-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	联合胶体有限公司		
申请(专利权)人(译)	提前有限公司		
[标]发明人	石橋 広		
发明人	石橋 広		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/50		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.T G01N33/48.B G01N33/50.K		
F-TERM分类号	2G045/BB03 2G045/BB24 2G045/CA11 2G045/CA25 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/JA01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[目的] 提出一种分离系统，其可以主要从外周血等中检测免疫活性细胞，并测量过敏等免疫疾病，并且容易进行各种免疫疾病检查。 采血装置，用于从采血装置获得的血液分离免疫相关细胞的免疫系统细胞分离装置，以及用于进一步选择分离的免疫细胞以获得免疫相关信息的免疫相关信息检测装置。 [选型图]图1

