

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6933212号  
(P6933212)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月23日(2021.8.23)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>BO1D</b>	12/00 (2006.01)	BO1D	12/00
<b>BO1J</b>	19/00 (2006.01)	BO1J	19/00 3 2 1
<b>C12Q</b>	1/02 (2006.01)	BO1J	19/00 N
<b>C12M</b>	1/26 (2006.01)	C12Q	1/02
<b>GO1N</b>	1/04 (2006.01)	C12M	1/26

請求項の数 11 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-524090 (P2018-524090)  
 (86) (22) 出願日 平成29年6月19日(2017.6.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2017/022554  
 (87) 国際公開番号 W02017/221898  
 (87) 国際公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)  
 審査請求日 令和2年5月18日(2020.5.18)  
 (31) 優先権主張番号 特願2016-121791 (P2016-121791)  
 (32) 優先日 平成28年6月20日(2016.6.20)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 日本国(JP)

(73) 特許権者 000003193  
 凸版印刷株式会社  
 東京都台東区台東1丁目5番1号  
 (74) 代理人 110001243  
 特許業務法人 谷・阿部特許事務所  
 (72) 発明者 新井 憲彰  
 東京都台東区台東一丁目5番1号 凸版印刷株式会社内  
 審査官 青木 太一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体媒体の置換方法及び該方法のための流路デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の液体媒体から第二の液体媒体中に目的粒子を移動させることにより、液体媒体を置換する方法であって、

(i) 試料液体及び第二の液体媒体を含む、少なくとも二以上の液体をそれぞれ同一方向に送液することにより、複数の層流部分からなる層流を形成する工程であって、前記試料液体が、分散状態の目的粒子を含む第一の液体媒体であり、前記層流は少なくとも、前記試料液体により構成される第一の層流部分と、前記第二の液体媒体により構成される第二の層流部分とを含む、工程と、

(ii) 前記層流に外力を作用させることにより、前記目的粒子を前記第一の層流部分から前記第二の層流部分に移動させる工程であって、前記目的粒子は、外力の作用により前記第二の層流部分の方向に移動することを可能にする少なくとも一の物理的特性を有する工程と、

(iii) 前記第二の層流部分から、前記目的粒子を含む層流画分を回収する工程であって、前記層流画分の回収が、前記層流の流れ方向に垂直な層流画分回収面から行われ、かつ、前記層流画分回収面と前記第一の層流部分の断面とが離間しており、

前記層流が、前記第二の層流部分に隣接し、かつ第一の層流部分とは反対側の位置に第三の液体媒体により構成される第三の層流部分をさらに含み、

前記目的粒子が生体粒子とビーズとの複合体粒子であって、前記第二の液体媒体が前記複合体粒子を解離させて、前記生体粒子を解離させることができ、

10

20

前記外力の作用により前記ビーズを前記第三の層流部分に移動させ、前記第二の層流部分から前記生体粒子を回収する、  
ことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記第一及び第二の層流部分が互いに隣接接触していることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記外力が、電場、磁場、水力学的濾過、または決定論的側方移動 (DL D) による外力のいずれか一種以上であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記外力が少なくとも、決定論的側方移動 (DL D) による外力を含み、前記目的粒子の物理的特性が粒径であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記生体粒子が、生体分子、細胞外小胞、細胞のいずれかであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記生体粒子が、生体分子、細胞のいずれかであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記生体粒子が、細胞であることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

第一の液体媒体から第二の液体媒体中に目的粒子を移動させることのできる流路デバイスであって、

該流路デバイスが、

( i ) 前記流路デバイスの前方に、試料液体を導入するための第一の導入口及び第二の液体媒体を導入するための第二の導入口を少なくとも含む複数の導入口と、

( i i ) 層流を形成できる流路と、

( i i i ) 前記流路デバイスの後方に、少なくとも第一の排出口及び第二の排出口を含む二以上の排出口と、

( i v ) 外力を付与する機構と、

を備え、

前記試料液体が、分散状態の目的粒子を含む第一の液体媒体であり、

前記流路は少なくとも、前記試料液体により構成される第一の層流部分、及び第二の液体媒体により構成される第二の層流部分を含む層流を形成することができ、

前記第二の排出口が、前記外力の作用により前記第二の層流部分に移動してきた前記目的粒子を含む層流画分を、前記層流の流れ方向に垂直な層流画分回収面から回収するための、目的粒子回収用排出口であり、

前記第一の排出口が、前記第二の排出口からみて前記第一の層流部分の側にあり、

前記第一の層流部分の側にある前記第二の排出口の隔壁が、前記層流画分回収面と前記第一の層流部分の断面とが離間するような位置に備えられており、

前記流路デバイスの前方に、第三の液体媒体を導入するための第三の導入口がさらに備えられ、

前記流路が、さらに第三の液体媒体による第三の層流部分をも含む層流を形成することができ、

前記第三の導入口が、前記第三の層流部分が前記第二の層流部分に隣接し、かつ第一の層流部分とは反対側に位置するように備えられており、

前記目的粒子が、前記目的粒子が生体粒子とビーズとの複合体粒子であって、前記第二の液体媒体が前記複合体粒子を解離させて、前記生体粒子を遊離させることができ、

前記外力の作用により前記ビーズを前記第三の層流部分に移動させ、前記生体粒子が、前記第二の層流部分から回収される、

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、流路デバイス。

【請求項 9】

前記第一及び第二の層流部分が互いに隣接接触して形成されるように、前記第一及び第二の導入口が隣接して形成されていることを特徴とする、請求項 8 に記載の流路デバイス。

【請求項 10】

前記外力を付与する機構が、決定論的側方移動 (DL D) を利用するための複数の柱状構造による所定の配置パターン構造であることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の流路デバイス。

【請求項 11】

請求項 8 に記載の流路デバイスを複数含む流路デバイス系であって、前記複数の流路デバイスは直列接続されており、前記直列接続は、一の流路デバイスの前記第二の排出口と、直列接続の相手方となる他の一の流路デバイスの前記第一の導入口とを接続して形成され、前記各流路デバイスの外力を付与する機構または外力の強さが互いに異なることを特徴とする、流路デバイス系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、液体媒体の置換方法、特に目的粒子として、生体粒子、ビーズ、若しくは該生体粒子とビーズとの複合体粒子のいずれかを少なくとも含む液性混合試料の液体媒体を置換する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

液性混合試料 (例えば血液や培養液、反応溶液) から目的粒子を分離し、液体媒体を置換することは、基礎研究、診断及び治療を行うために必要とされる手法である。

【0003】

一般的に例えば、液性混合試料中に含まれる蛋白質等の液体媒体置換を行う場合、抗体標識磁性粒子を用いて蛋白質等を捕捉し複合体粒子を形成した後、磁力で当該複合体粒子を捕捉し、続いて上清の除去、洗浄を繰り返す事で、目的の液体媒体へと置換する手法が取られている。

【0004】

また遠心分離法等を用いて固有密度 (比重) を有する細胞 (例えば、白血球と赤血球) を分離する方法や、フローサイトメトリー法といった方法も当該目的に使用できることが知られている。

【0005】

もっとも、目的粒子を含む液性混合試料において、その液体媒体を精度良く置換する方法としては、遠心分離等による液体固体分離を行った後、液体部分を除き、新たな液体媒体を加える操作を繰り返し行う事で置換する方法が従来一般的である。

【0006】

しかしながら、このような従来の方法では、その過程において目的粒子にロスが生じる事が課題となっている。また、精度良く液体媒体の置換を行う事を狙いとする場合には、洗浄を繰り返す必要があるが、とりわけ混合試料中に含まれる目的粒子が希少なものである場合に、その回収率が低減してしまう恐れがある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】 D.W. Inglis, et al, Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement, Lab on a Chip, 6, 655-658 (2006).

【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

したがって、本発明の課題は、液性試料中の目的粒子の損失を最小限に留めつつ、精度よく、所望の液体媒体に置換する方法及び該方法のためのデバイスを提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

## [本発明の第一の態様]

本発明の第一の態様は、

第一の液体媒体から第二の液体媒体中に目的粒子を移動させることにより、液体媒体を置換する方法であって、

(i) 試料液体及び第二の液体媒体を含む、少なくとも二以上の液体をそれぞれ同一方向に送液することにより、複数の層流部分からなる層流を形成する工程であって、

前記試料液体が、分散状態の目的粒子を含む第一の液体媒体であり、

前記層流は少なくとも、前記試料液体により構成される第一の層流部分と、前記第二の液体媒体により構成される第二の層流部分とを含む、工程と、

(ii) 前記層流に外力を作用させることにより、前記目的粒子を前記第一の層流部分から前記第二の層流部分に移動させる工程であって、前記目的粒子は、外力の作用により前記第二の層流部分の方向に移動することを可能にする少なくとも一の物理的特性を有する工程と、

(iii) 前記第二の層流部分から、前記目的粒子を含む層流画分を回収する工程であって、前記層流画分の回収が、前記層流の流れ方向に垂直な層流画分回収面から行われ、かつ、前記層流画分回収面と前記第一の層流部分の断面とが離間していることを特徴とする方法、である。

## 【0010】

## [本発明の第二の態様]

本発明の第二の態様は、

第一の液体媒体から第二の液体媒体中に目的粒子を移動させることのできる流路デバイスであって、

該流路デバイスが、

(i) 前記流路デバイスの前方に、試料液体を導入するための第一の導入口及び第二の液体媒体を導入するための第二の導入口を少なくとも含む複数の導入口と、

(ii) 層流を形成できる流路と、

(iii) 前記流路デバイスの後方に、少なくとも第一の排出口及び第二の排出口を含む二以上の排出口と、

(iv) 外力を付与する機構と、

を備え、

前記試料液体が、分散状態の目的粒子を含む第一の液体媒体であり、

前記流路は少なくとも、前記試料液体により構成される第一の層流部分、及び第二の液体媒体により構成される第二の層流部分を含む層流を形成することができ、

前記第二の排出口が、前記外力の作用により前記第二の層流部分に移動してきた前記目的粒子を含む層流画分を、前記層流の流れ方向に垂直な層流画分回収面から回収するための、目的粒子回収用排出口であり、

前記第一の排出口が、前記第二の排出口からみて前記第一の層流部分の側にあり、

前記第一の層流部分の側にある前記第二の排出口の隔壁が、前記層流画分回収面と前記第一の層流部分の断面とが離間するような位置に備えられていることを特徴とする、流路デバイス、である。

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明によれば、従来技術に比較し目的粒子の損失をより低減させつつ、精度よく液体

10

20

30

40

50

媒体の置換をすることができる。

【0012】

また、本発明では連続してその液体媒体の置換をすることも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の実施形態に係る液体媒体の置換方法の一例を説明する模式図である。

【図2】本発明の実施形態に係る3以上の層流部分を用いた液体媒体の置換方法の一例を説明する模式図である。

【図3】本発明の実施形態に係る流路デバイスの基本構造の一例を説明する模式図である。

10

【図4】本発明の実施形態に係る流路デバイスの一例を説明する模式図である。

【図5】本発明の実施形態に係る3以上の層流部分を構成する流路デバイスの基本構造の一例を説明する模式図である。

【図6】本発明の実施形態に係る流路デバイスの鉛直方向断面図の一例を示す模式図である。

【図7】本発明の実施形態に係る送液部および回収部を備えた流路装置の一例を説明する模式図である。

【図8】本発明の実施形態に係る粒子を移動させる外力の基本原理の一例を説明する模式図である。

【図9】本発明の実施形態に係る決定論的側方移動(DLD)構造部分を備えた流路デバイスの一例を説明する模式図である。

20

【図10】本発明の実施形態に係る決定論的側方移動(DLD)構造部分を備えた流路デバイスの鉛直方向断面図の一例を示す模式図である。

【図11】本発明の実施例を説明する流路デバイスの一例を示す模式図である。

【図12】本発明の実施例で用いた流路デバイスの一例の概観図である。

【図13】本発明の実施例で用いた流路デバイスの一例の構造詳細図である。

【図14】本発明の実施例で用いた流路デバイス中の層流形成の様子の一列を説明する図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

30

[1. 本発明の第一の態様の液体媒体の置換方法]

以下、本発明の液体媒体の置換方法について、図を参照しながら説明する。

【0015】

本発明は、目的粒子1(細胞等を含む生体粒子や、ビーズ、ビーズと生体粒子との複合体粒子)を含む液性の混合試料(試料液体)から、その目的粒子の損失を最小限に留めつつ、混合試料の液体媒体(第一の液体媒体)を所望の第二の液体媒体に置換する方法である。

【0016】

試料液体とは、分散状態の目的粒子を含む液体媒体(第一の液体媒体)であり、目的粒子を含む液性の混合試料そのものでもよいし、あるいは適宜任意の緩衝液で希釈した液体でもよい。例えば試料液体として、血球細胞を含む血液、リンパ液、唾液、尿、涙等の体液を挙げることができる。

40

【0017】

なお、ここでいう第一の液体媒体は、試料液体から目的粒子を除いた残りの部分全部を指すものであり、純粋な液体媒体そのもののみならず、目的粒子以外の含有成分が含まれる場合には、それらも第一の液体媒体を構成するものとして扱う。

【0018】

液体媒体(培養溶液等)中に懸濁された目的粒子としては、例えば、生体粒子、ビーズ、ビーズと生体粒子との複合体粒子が含まれる。また、より具体的な生体粒子の例としては、生体分子(例えば、核酸、蛋白質、糖、脂質、等)、細胞外小胞(例えば、エクソソ

50

ーム、アポトーシス小体、等)、細胞が含まれる。このように、目的粒子としては、単一の物質であっても、その他の物質との複合体であっても良い。また、試料液体中に含まれる目的粒子の種類や数は限定されない。複合体粒子を形成するビーズとしては、ビーズに、生体粒子の特徴的構造を認識する対象捕捉分子を結合させたものが例示できる。このような対象捕捉分子としては、抗体、ペプチドアダプター、レクチン、細胞間接着分子、糖鎖、細胞認識性の高分子が好ましく、このような対象捕捉分子を担持するビーズとしては、ポリスチレンビーズやラテックスビーズ、磁性ビーズ等が好ましい。なお、これらの一例に限定されず、本目的を達成できる手段であれば何ら限定はされず適宜手段を選択し、利用する事ができる。

#### 【0019】

第二の液体媒体は、目的粒子を受け取るのに好適な任意の液体媒体を用いることができる。もっとも、目的粒子に細胞が含まれ、細胞生存性への影響を回避したい目的であれば、等張液を一種または複数組合せて使用することができ、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液(PBS)等を使用すれば良い。また、目的粒子に核酸、蛋白質などが含まれる場合、これら物質の変性を回避する目的から、好適な緩衝液を選択することが好ましい。また、第二の液体媒体が、pH等の調節により、複合体粒子を解離させて目的粒子を遊離させるものであってもよい。なお、目的粒子を液体媒体中で溶解、若しくは任意の反応をさせる場合には、必要に応じて適宜好適な液体媒体を選択すれば良く、前述の限りではない。

#### 【0020】

本発明の液体媒体の置換方法は、同一方向に並行して流れる、試料液体により構成される第一の層流部分と前記第二の液体媒体により構成される第二の層流部分とを少なくとも含む層流を利用し、目的粒子を、外力の作用により第一の層流部分から第二の層流部分の方向に移動させることで、目的粒子を含む液体媒体を第一の液体媒体から第二の液体媒体に置換するものである。

#### 【0021】

ここで、層流とは、管内に粘性流体を流す場合において、流体の各部分が管軸に平行に整然と運動し、隣り合った流体部分が混じり合うことのない滑らかな流れのことをいう。これに対して層流でない流れを乱流といい、乱流においては隣り合った流体部分が混じり合う。このような互いに混じり合わないという層流の性質を利用することで、精度よく、液体媒体の置換が可能となる。本発明の方法で用いる層流は、少なくとも試料液体から構成される第一の層流部分と、所望の液体媒体である第二の液体媒体から構成される第二の層流部分を少なくとも含む。ここで、層流部分とは、所定の液体媒体から構成され、所定の流速で一体として流れる層流を意図している。このため、液体媒体が異なる(たとえば、目的粒子以外の含有成分が互いに異なるリン酸緩衝液)場合や、流速が異なる場合(液体媒体の送液装置が異なる場合は、流速が異なるものと看做す)における互いに並行して流れる層流は別個の層流部分として扱う。また、液体媒体が同一であり、同一の送液装置で液体媒体を送液する場合であっても、該送液装置につながる液体媒体導入口が2つに分かれているため、空間的に分離した2つの層流が形成される場合は、それらは別々の層流部分とする(図13~図14の導入口32B参照)。もっとも、層流状態をできるだけ乱さないという観点からは、異なる層流部分の単位断面面積当たりの流速はできる限り同一に設定することが好ましい。

#### 【0022】

また、本発明の方法においては、目的粒子は、外力の作用により第二の層流部分の方向に移動することを可能にする少なくとも一の物理的特性を有する。好ましい外力として、電場、磁場、水力学的濾過または決定論的側方移動(DLD)による外力のいずれか一種以上を挙げることができ、それぞれに対応する目的粒子の物理的特性は、それぞれ電荷、磁性、粒径である。例えば、目的粒子が磁性を有しているものであれば、層流平面上、流れ方向に対し直角方向へ磁場を与える事で、試料液体から構成される第一の層流部分から目的の液体媒体(第二の液体媒体)から構成される第二の層流部分へ、徐々に移動をさせることができる。流体力学的手法としては、例えば、DLDを原理とした構造を流路デバ

10

20

30

40

50

イス中に設ける事で、目的粒子の大きさに従い、同様に目的の液体媒体（第二の液体媒体）から構成される第二の層流部分へと移動させることができる。

【0023】

このような目的粒子の物理的特性は、たとえば生体粒子の物理的性質そのものを利用してよいが、ビーズと生体粒子との複合体粒子を形成させた際の、ビーズの物理的性質に由来するものであってもよい。たとえばビーズと目的の生体粒子との複合体粒子とすることで、少なくとも粒径のサイズを調節することができる。

【0024】

本発明の液体媒体の置換方法は、より具体的には、(i) 試料液体により構成される第一の層流部分と第二の液体媒体により構成される第二の層流部分とを少なくとも含む層流を形成する工程、(ii) 外力を作用させることにより、目的粒子を試料液体から第二の液体媒体へ移動させる工程、及び(iii) 移動してきた目的粒子の層流画分を回収する工程、を含む。

10

【0025】

図1には、試料液体により構成される第一の層流部分11と、所望の液体媒体である第二の液体媒体により構成される第二の層流部分12とからなる層流とが互いに隣接している一例が図示されており、外力Fの作用により目的粒子1が、第一の層流部分11から第二の層流部分12に移動する様子が示されている、なお、図1中、14は層流の流れ方向に垂直な平面である層流画分回収面を示し、この面を通過する第二の層流部分12の層流画分を回収することで、目的粒子を回収する。

20

【0026】

ここで、本発明の方法においては、層流画分回収面と前記第一の層流部分の断面とが離間している。より好ましくは、層流画分回収面は第二の層流部分の断面の内部にある。層流画分回収の際に可能な限り、試料液体の混入を避けるためである。ここで、第一の層流部分の断面とは、第一の層流部分の層流流れ方向に垂直な断面のことをいう。また、離間の程度については、層流画分回収面における層流状態の乱れや層流界面における拡散による液体媒体の移動の影響等を考慮して決定することができる。図1に示される一例においては、少なくとも層流画分回収面は、第二の層流部分の層流流れ方向に垂直な断面の内部にある。

30

【0027】

他方、目的粒子の十分な回収率を得る観点からは、できるだけ漏れなく目的粒子を回収できるのに十分な大きさの層流画分回収面を確保することが好ましい。好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、もっとも好ましくは99%以上の目的粒子を回収できるのに十分な面積の層流画分回収面を設定することが好ましい。このためには、層流の流速や流路長、外力による目的粒子の移動速度等を調節することにより、層流画分回収面における目的粒子の分布ができるだけ狭くなるように設計することが有利である。特に、流路長を十分長くすることが有利である。

【0028】

層流の構成としては、図1のように層流部分が2つの場合に限られず、必要に応じて3つ以上としても良い。

40

【0029】

例えば試料液体から構成される第一の層流部分と、所望の液体媒体（第二の液体媒体）から構成される第二の層流部分との間に、任意のその他の液体媒体（第三の液体媒体）から構成される第三の層流部分を設ける構成とすることで、層流界面での拡散による液体媒体成分の移動の影響をより一層低減でき、成分の共雑を低減できることや、第三の層流部分を粒子が通過する過程で目的粒子以外の共雑物の洗浄が可能である。このため、より高精度に液体媒体の置換を実施する場合には、第一の層流部分と、第二の層流部分との間に介在する第三の層流部分を設けた構成がより好ましい。

【0030】

このような構成の一例として図2の構成を一例として挙げる事ができる。すなわち、

50

図 2 には、試料液体により構成される第一の層流部分 1 1 と、置き換えたい液体媒体である第二の液体媒体により構成される第二の層流部分 1 2 とに加えて、第一の層流部分と第二の層流部分の間に、第三の液体媒体による第三の層流部分 1 3 をさらに含む層流を用いた一例を図示している。図 1 1、1 3 及び 1 4 もこの構成の一例に含まれる。

【 0 0 3 1 】

なお、図 2 では、層流画分回収面 1 4 が図 1 と同様、第二の層流部分の断面の内部にある一例が図示されている。しかし、この図 2 のような構成例では、層流画分 1 4 が第一の層流部分の断面と離間するためには、必ずしも、第二の層流部分の層流流れ方向に垂直な断面の内部にある必要はなく、第三の層流部分 1 3 の層流の流れ方向に垂直な断面の一部を含んでもよい。特に第三の液体媒体が第二の液体媒体と同一の液体媒体である場合には、なおさら、第三の層流部分 1 3 の層流の流れ方向に垂直な断面の一部を含んでもよい。もっとも前述した精度よく液体媒体の置換をする観点からは、層流画分回収面は少なくとも第二の層流部分の層流流れ方向に垂直な断面と同一とするか、より好ましくは前記断面の内部にあることが好ましい。

【 0 0 3 2 】

さらに本発明の方法で用いる層流の構成としては、図 1 や図 2 に示される例のみならず、追加の層流部分を他の任意の位置、たとえば第二の層流部分に隣接し、かつ第一の層流部分とは反対側の位置に第三の液体媒体により構成される第三の層流部分を含めることができる。このような一例において、有利な用い方もできる。たとえば、目的粒子とする生体粒子について、該生体粒子とビーズとの複合体粒子を用い、第二の液体媒体として pH 等の調節により複合体粒子が解離して、目的の生体粒子が遊離するような液体媒体を用い、外力の作用がビーズの性質（たとえばビーズの有する磁性等）による場合を考える。この場合、第二の層流部分で遊離したビーズは、更に外力の作用により第三の層流部分に移動するが、目的の生体粒子自体には、もはや外力による作用は及ばず、第二の層流部分に留まるため、第二の層流部分から、目的の生体粒子のみを直接、回収することも可能である。また、この場合、層流画分回収面は、第一の層流部分の断面と離間しているのみならず、ビーズの混入を回避するのに必要な限度において第三の層流部分の断面とも離間していることが好ましい。さらにこの場合の層流画分回収面は、第二の層流部分の断面の内部にあることが好ましい。

【 0 0 3 3 】

[ 2 . 本発明の第二の態様の流路デバイス ]

前記 1 . で説明した本発明の第一の態様の液体媒体を置換する方法に好適に用いられる流路デバイスは、

( i ) 流路デバイスの前方に、試料液体を導入するための第一の導入口及び第二の液体媒体を導入するための第二の導入口を少なくとも含む複数の導入口と、

( i i ) 層流を形成できる流路と、

( i i i ) 流路デバイスの後方に、少なくとも第一の排出口及び第二の排出口を含む二以上の排出口と、

( i v ) 外力を付与する機構と、

を備え、

流路は少なくとも、試料液体により構成される第一の層流部分、及び第二の液体媒体により構成される第二の層流部分を含む層流を形成することができ、

第二の排出口が、外力の作用により第二の層流部分に移動してきた目的粒子を含む層流画分を、層流の流れ方向に垂直な層流画分回収面から回収するための、目的粒子回収用排出口であり、

第一の排出口が、第二の排出口からみて第一の層流部分の側にあり、

第一の層流部分の側にある第二の排出口の隔壁が、層流画分回収面と第一の層流部分の断面とが離間するような位置に備えられている。

【 0 0 3 4 】

ここで、第一の排出口と第二の排出口とが互いに隣接している場合には、第一の層流部

10

20

30

40

50

分の側にある第二の排出口の隔壁は、第一の排出口と第二の排出口との間を隔てる隔壁である。しかし、第一の排出口と第二の排出口との間に追加の排出口（例えば第三の排出口）が介在し、かつ前記追加の排出口と第二の排出口とが隣接している場合には、第一の層流部分の側にある第二の排出口の隔壁は、前記追加の排出口と第二の排出口との間を隔てる隔壁である。

【0035】

用いることのできる流路は、層流を生じさせることができる機構を備えていれば、特に限定されない。もっとも、用いる流路幅あるいは流速等により、層流とならず乱流（混合流）を生じさせてしまう場合は、層流を形成する条件下で用いるべきである。

【0036】

なお、層流となるか乱流となるかは、レイノルズ数と呼ばれる慣性力を粘性力で割った値に相当する無次元数が指標となることが知られている。たとえば、円管内の流れの場合、層流と乱流の境界となる臨界レイノルズ数は、およそ2000～4000程度が目安といわれている。流体の粘性係数が大きい場合、あるいは流速が小さい場合、粘性力が支配的となり層流を生じさせる方向に傾く。また、集積回路のマイクロ加工技術を利用した微細構造を有するマイクロ（流路）デバイスでは一般に、レイノルズ数が小さく層流になるとされている。

【0037】

また、層流画分回収面から回収するとは、層流画分回収面を通過する層流部分を回収することを意味する。

【0038】

以下、本発明の流路デバイスについて、図を参照しながら説明する。

【0039】

図3は試料液体から構成される第一の層流部分と所望の液体媒体である第二の液体媒体から構成される第二の層流部分からなる層流を形成できる、本発明の流路デバイスの基本構造30の一例を上面から観察した模式図である。

【0040】

まず、図3の流路デバイスの入口構造としては、試料液体導入口31及び液体媒体（第二の液体媒体）導入口32Aとを備えている。また、図3の流路デバイスの流体の出口構造としては、主に試料液体を排出する第一の排出口41及び、目的の液体媒体（第二の液体媒体）を排出する第二の排出口42Aとを備えている。なお、導入口や排出口の数については、図1のようにそれぞれ2つに必ずしも限定されるものではなく、目的に応じてより多くの導入口及び排出口を設けても良い。

【0041】

また、図3にも示されているとおり、流路デバイスの試料液体導入口31及び液体媒体導入口32Aと、第一の排出口41及び第二の排出口42Aとの間には、目的粒子を移動させる外力を与える機構Fを有している。この機構により、層流平面上、試料液体中に含まれる目的粒子を流れ方向に対して直交する方向に移動させることができる。

【0042】

外力を与える機構Fとしては、流路に沿って一定して同じ設計の機構が連続していても良く、目的に応じて、適宜手法を組み合わせ、また、流路に沿って徐々に設計を変化させた機構を設定することも可能である。該外力はすでに前記したように、電場、磁場、水力学的濾過、または決定論的側方移動（DLD）による外力のいずれか一種以上が好ましいが、目的粒子を移動させることができれば、特にこれらに限定されない。

【0043】

なお、図3には、層流流れに垂直な平面上にある層流画分回収面14も図示されている。隔壁43は、この層流画分回収面14が第一の層流部分の断面15と離間するように設けられる。目的とする液体媒体以外の液体媒体の混入を避けるためである。図3に示す一例の場合、層流画分回収面14は第二の層流部分の断面の内部にある。

【0044】

10

20

30

40

50

もっとも、層流画分回収面 1 4 は、目的粒子をできるだけ漏れなく回収するとの観点からは、十分な面積の層流画分回収面を設定することが好ましい。このためには、層流の流速や流路長、外力による目的粒子の移動速度等を調節することにより、層流画分回収面における目的粒子の分布ができるだけ狭くなるように設計することが有利である。特に、流路長を十分長くすることが有利である。

【 0 0 4 5 】

図 4 は、図 3 の流路デバイスの 2 つの導入口及び 2 つの排出口がそれぞれ独立となるように隔壁構造を設けた流路デバイスの一例を図示したものである。試料液体導入口 3 1 から流路デバイス 4 0 内への入口部分の構造については、試料液体を、所望の液体媒体（第二の液体媒体）との層流として流す必要がある為、図示のようなそれぞれ独立の隔壁構造を設けることが好ましい。試料液体導入口 3 1 から送液した試料液体は、液体媒体導入口 3 2 A から送液した第二の液体媒体（典型的には緩衝液）と層流（流れ方向に平行して層を成す流れ）を保持しながら、流れて行き、目的粒子は前述の外力を与える機構に従い、流れ方向に対して斜め方向へ移動する事で、試料液体の層流部分から目的の液体媒体である第二の液体媒体の層流部分へと移動する。一方、目的粒子以外については試料液体の層流部分（第一の層流部分）の流れに従い大局的に直進して流れる。

10

【 0 0 4 6 】

このように、液体媒体の置換をより有効に行う目的から、流路デバイス平面上における層流流れに垂直な方向における試料液体導入口 3 1 の位置は、同方向における第二の排出口 4 2 A の側ではなく、同方向における第一の排出口 4 1 の側に寄せて設置することが好ましい。

20

【 0 0 4 7 】

同様に、流路デバイス平面上における層流流れに垂直な方向における液体媒体（第二の液体媒体）導入口 3 2 A の位置は、同方向における第一の排出口 4 1 の側ではなく、同方向における第二の排出口 4 2 A の側に寄せて設置をすることが好ましい。

【 0 0 4 8 】

また、第一の排出口 4 1 及び第二の排出口 4 2 A の構造は、排出される液量を調整するために、目的に応じて設計を適宜変更することが可能である。例えば、排出口付近の隔壁 4 3 を図面上部から下部に向かって 1 : 1 の間隔となるように設けた場合（第一の層流部分と第二の層流部分の流速が同一の場合、 $x^2 : y^2 = 1 : 1$ 、図 4 ）、それぞれの排出口から得られる液量は概ね 1 : 1 となる。これに対して、同様に隔壁 4 3 を 9 : 1 の間隔となるように設けた場合、第二の排出口 4 2 A から得られる液量を概ね 10 倍に濃縮する事が可能である（第一の層流部分と第二の層流部分の流速が同一の場合、 $x^2 : y^2 = 9 : 1$ 、図 4 ）。このように、用途に応じて目的粒子の液体媒体の置換だけでなく、液量の濃縮にも用いることが可能である。

30

【 0 0 4 9 】

同様に、導入口も適宜変更する事で（たとえば図 4 の隔壁 4 4 の位置の調節等）、使用する液量の比率（第一の層流部分と第二の層流部分の流速が同一の場合、 $x^1 : y^1$ ）変更も可能であることから、使用液量を削減したい場合などに効果的である。

【 0 0 5 0 】

また、目的に応じて 3 つ以上の層流部分を構成する場合については、図 5 のように試料液体の層流部分（第一の層流部分）と目的の液体媒体（第二の液体媒体）の層流部分（第二の層流部分）との間に、別の液体媒体（第三の液体媒体）の層流部分（第三の層流部分）を設ける構造とすることができる。

40

【 0 0 5 1 】

この場合、第三の液体媒体の導入口として液体媒体（第三の液体媒体）導入口 3 2 B 及びこの第三の液体媒体を排出する第三の排出口 4 2 B を適宜設定することができる。液体媒体導入口 3 2 B は試料液体導入口 3 1 及び液体媒体（第二の液体媒体）導入口 3 2 A の間に存在している事が本手法の目的から適している。これに対して、第三の排出口 4 2 B については、第一の排出口 4 1 を利用してまとめることで代替できるため、設置は必ずし

50

も必須ではない。もっとも本発明の目的から、目的とする液体媒体（第二の液体媒体）へのその他の液体媒体の混入を最小限に抑えるため、第二の排出口42Aを上記のように、他の液体媒体と共用しないことが好ましい。

【0052】

同様に、目的に応じて、層流部分の個数を4、5、...、n個以上の構成とする場合については、これら液体媒体それぞれの層の導入口及び、この別の液体媒体を排出する排出口を適宜設定する事ができる。また、同様にそれらの液体媒体（第二の液体媒体以外の追加の液体媒体）導入口は試料液体導入口31及び液体媒体（第二の液体媒体）導入口32Aの間に存在していることが好ましいが、必ずしもそうする必要はない。他方、追加の液体媒体用の排出口については、第二の液体媒体の排出口である第二の排出口以外の排出口（たとえば第一の排出口）を利用することで代替も可能であるから、追加の排出口の設置は必ずしも必須ではない。

10

【0053】

なお、図5では、図3や図4と同様、層流画分回収面14が第二の層流部分の断面の内部となるように排出口側隔壁43が設けられた一例を図示しているが、これはあくまで好ましい態様の一例にすぎない。図5の例では第二の層流部分と、試料液体から構成される第一層流との間には第三の層流部分が介在しているため、層流画分回収面14が第一の層流部分の断面と離間している限りは、排出口側隔壁43が第三の層流部分の方にずれて設けられていてもよい。もっとも、より精密に液体媒体を置換する観点からは、層流画分回収面ができるだけ多く第一の層流部分の断面と離間していることが好ましく、第二の層流部分の断面の内部とすることが好ましい。

20

【0054】

図6は、本発明の実施形態に係る流路デバイスの一例の鉛直方向断面の模式図である。

【0055】

流路デバイス40は、それぞれの導入口、排出口構造部等の形状を備えた流路構造部50と、平面構造部51との接合によって作成することができ、その空間に流路空間53を有している。また、それぞれ試料液体導入口31、液体媒体（第二の液体媒体）導入口32A、第一の排出口41、第二の排出口42A部分には、適宜チューブを接合させ、またシリンジ等との接合部を設けることにより、適宜変更を加えて使用することもできる。

【0056】

流路空間53の高さは目的粒子が通過可能な高さに設定されていれば何ら限定は無い。

30

【0057】

流路構造部50の部材、及び流路構造の作製方法は公知のいずれかの方法を適宜選択して作製することができる。部材の材料としては、例えば、ガラス、シリコン、ジメチルポリシロキサン、プラスチック等を用いることができる。

【0058】

また、平面構造部51については、平坦かつ流路構造部50と接合可能な材料であれば特に限定されないが、強度を有している、ガラス、プラスチック等を使用することが好ましい。

【0059】

なお、本流路デバイス40はそれぞれ流路構造及び導入口、排出口構造部等の形状を備え、流路空間が形成されていればよく、例えば図示の平面構造部51側の部材にそれぞれ流路構造及び導入口、排出口構造部等の形状を備えている構造とすることもできる。

40

【0060】

図7は、本発明の実施形態に係る送液部および回収部を備えた流路装置の一例を説明する模式図である。

【0061】

流路装置80は、流路デバイス40に複数の送液部及び回収部を備えた装置である。図7には、試料液体導入口31に試料液体送液部81、液体媒体導入口32Aに液体媒体送液部82A、第一の排出口41に第一の回収部91、第二の排出口42Aに第二の回収部

50

9 2 A を設けた例を図示している。

【 0 0 6 2 】

試料液体送液部 8 1 と液体媒体送液部 8 2 A は、それぞれ送液系を備えた機構を有することができ、一定の速度でそれぞれ独立した送液が可能である。これらは一定の速度で送液可能な機構であれば特に限定はされないが、例えば、シリンジポンプ等による送液が好適である。また、必要に応じて試料液体送液部 8 1 には粒子の沈殿、及び凝集を防ぐための攪拌機構を備えていても良い。

【 0 0 6 3 】

第一の回収部 9 1、第二の回収部 9 2 A に関しては排出液を回収できる機構であれば特に限定されないが、開始直前、直後で排出液の分画ができる機構等を備えていても良い。

10

【 0 0 6 4 】

前記同様、目的に応じて 4、5、...、n 層以上の構成とする場合については、各液体媒体の導入口及び排出口を適宜設定し、それぞれに対応する送液部、及び回収部を適宜設けることができる。

【 0 0 6 5 】

更に本発明の流路デバイスを複数、直列接続した流路デバイス系とすることもできる。直接接続はたとえば、一の流路デバイスの第二の排出口と、直列接続の相手方となる他の一の流路デバイスの第一の導入口とを接続して形成することができる。また、用いる複数の流路デバイスに適用される外力の機構または外力の強さを互いに異ならせることができる。これにより、目的粒子のより精密な移動を可能とすることができる。

20

【 0 0 6 6 】

たとえば、目的粒子として生体粒子の分離を行う場合、生体粒子とビーズとの複合体粒子を用い、かつ第二の液体媒体として pH 等の調節により複合体粒子が解離して目的の生体粒子が遊離するような液体媒体を用い、外力の作用がビーズの性質（たとえばビーズの有する磁性や大きさ等）による場合を考える。この場合、第二の層流部分で遊離した生体粒子とビーズをさらに、直接接続された他の一の流路デバイスに導入することにより、この他の一の流路デバイスにおける外力の作用によりビーズのみを移動させ、目的の生体粒子のみを直接、回収することも可能である。この場合、前記他の一の流路デバイスにおいては、複合体を形成していない生体粒子の回収は、第一の層流部分から行われることになる。また、この場合の前記他の一の流路デバイスにおける層流画分回収面は第二の層流部分の断面から離間していることが好ましく、第一の層流部分の断面の内部にあることがより好ましい。

30

【 0 0 6 7 】

[ 3 . 本発明の実施例で用いる粒子を移動させるための外力 ]

次に、本発明の実施例で具体的に用いていた目的粒子を移動させる外力である、決定論的側方移動 (DL D) の原理について以下、説明する。

【 0 0 6 8 】

[ 3 - 1 . 決定論的側方移動 (DL D) ]

決定論的側方移動 (DL D) とは、わずかにずれた柱状構造 (ピラー) に粒子の分散液を流した際、大きい粒子はピラー周囲に生じる流れの変化より斜めに流れるのに対し、小さい粒子は層流に乗って大域的には直線的に進む性質を利用して、寸法によるソーティングを実現する方法である (非特許文献 1、図 8 を参照)。

40

【 0 0 6 9 】

規則的な障害物 (マイクロピラー) をずらしながら配置した流路を用い、小さい粒子は流れに乗って直進する一方、大きな粒子は障害物周囲に生じる流れの変化に従い、障害物のずれに沿って斜めに進む。このため、目的粒子について、本手法を応用させる事で層間移動の外力を与えることができる。

【 0 0 7 0 】

[ 3 - 2 . DL D 原理における斜め方向に移動する粒子直径の閾値 ]

非特許文献 1 に記載の DL D 原理に基づいて、斜め方向に移動する粒子直径の閾値 (D

50

c)を設定することが出来る。より具体的には、閾値  $D_c$  の設定は、以下の式 1 から求めることが出来る。

【0071】

$$D_c = 2 G \quad (\text{式 1})$$

ここで、

$D_c$  : 斜め方向に移動する粒子直径の閾値

: 変数

$G$  : ピラー間ギャップ

: ピラーのずれ角度 ( $\tan$ )

そして、上記式 1 を解くと、下記の近似式 2 が得られる。

【0072】

$$D_c = 1.4 G^{0.48} \quad (\text{式 2})$$

経験則から、 $0.06 < \tan < 0.1$  程度の場合に分離が良好であることから、

$$\tan = 1 / 15 = 0.067$$

を用いて、以下の関係式 3 を導くことが出来る。

【0073】

$$G = 2.62057 D_c \quad (\text{式 3})$$

そして、上記の式 3 から、斜め方向に移動する粒子直径の閾値  $D_c$  に基づいて、ピラー間ギャップ  $G$  を算出し、特定のピラー間ギャップのピラー（障害物構造）が設置された構造部分を有する流路デバイスを作製することが出来る。

【0074】

このようにして、目的の閾値  $D_c$  を有する DLD マイクロ流路を有する流路デバイスを作製することが出来る。

【0075】

例として、図 9 のように目的粒子を移動させる外力として前記 DLD を基本構造とした DLD 構造部分 101 を設けた流路デバイス 100 として使用することが可能である。また、断面を図 10 に示す。

【0076】

なお、粒子直径の閾値以外で液体媒体の置換をより有効に行うための因子として重要なのは流路長である。側方への移動距離は流路長に比例するため、流路長が長いほど、好ましい。

【0077】

以上、本発明の実施形態を詳述してきたが、実際には、上記の実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の変更があっても本発明に含まれる。

【実施例】

【0078】

本実施例では、懸濁液中に含まれる  $30 \mu\text{m}$  ビーズ、もしくはビーズと生体粒子との複合体粒子の分離及び液体媒体の置換を目的とした。

【0079】

(作製例 1) 流路デバイスの作製

決定論的側方移動 (DLD) 法の原理に基づき、ジメチルポリシロキサン (PDMS) を使用して、粒径  $30 \mu\text{m}$  を分離の閾値  $D_c$  として設定した決定論的側方移動 (DLD) 構造を有する流路デバイスを作製した。

【0080】

具体的には、下記式：

$$G = 2.62057 D_c$$

に  $D_c = 30 \mu\text{m}$  を代入して得られた  $G = 78.6 \mu\text{m}$  から、直径  $15 \mu\text{m}$  のピラーが、間隔  $78.6 \mu\text{m}$  で配列され、

また、好適な分離条件：

$$\tan = 1 / 15$$

10

20

30

40

50

から、このピラーを15段で一列ずれるように配置した基本構造を有するものである。

【0081】

また、流路空間の高さは50 $\mu$ mとした。

【0082】

より具体的には、上記基本構造を有するように、マスクを使用してレジスト型を作製した後に、ジメチルポリシロキサン(PDMS)をモールドイングして、ピラーが等間隔で配置されるPDMS製流路を作製して、マイクロピラー構造を有するDLDMマイクロ流路の流路構造部50とした。

【0083】

そして、この流路構造部50の両端の一方には、ポート穴をあけ、試料液体(第一の液体媒体+目的粒子)導入口31と液体媒体(第二の液体媒体)導入口32Aを、他方には第一の排出口41と第二の排出口42Aを設けた。ここで、排出口近傍でたとえ、ごくわずかな乱流が発生した場合でも、回収層流画分に第一の層流部分から直接、試料液体が混入することのないよう考慮して、層流の流れ方向に垂直な第二の排出口42Aの層流画分回収面と、試料液体から構成される第一の層流部分の断面とが離間するような位置に、第一の排出口41と第二の排出口42Aの間の隔壁43を設けた。

【0084】

次いで、この流路構造部50を、平面構造部51としてのガラス基板に接合させ、流路構造部とガラス基板との間の空間に流路空間52が形成されるようにした。

【0085】

そして、試料液体導入口31と緩衝液液体媒体導入口32A、および、第一の排出口41と第二の排出口42Aにチューブを取付けて送液装置を備えた流路デバイスを作製した。

【0086】

この流路デバイスを以下の実施例1~3で使用した。

なお、この流路デバイスの第一の層流部分と第二の層流部分の流路幅の比(x1:y1、図4)は、およそ1:1であった。

【0087】

(実施例1)

試料液体として、目的粒子である30 $\mu$ mのビーズサンプルを懸濁させた第一の液体媒体[5%牛血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝液(PBS)]、第二の液体媒体として、リン酸緩衝液(PBS)を準備し、作製例1で作製した流路デバイスを用いて、該ビーズサンプルを第一の液体媒体から第二の液体媒体に移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

【0088】

まず、前記試料液体及び第二の液体媒体を送液する前に、0.05%ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(Tween)含有リン酸緩衝液(PBS)を事前に試料液体導入口31及び液体媒体導入口32Aより通水し、流路中から気泡を除去した後、リン酸緩衝液(PBS)をそれぞれ通水し、流路デバイス内を第二の液体媒体であるリン酸緩衝液(PBS)で満たした。

【0089】

次に、試料液体を試料液体導入口31に、第二の液体媒体を液体媒体導入口32Aからそれぞれシリジポンプにて10 $\mu$ L/minの一定速度で送液し、試料液体により構成された第一の層流部分及び第二の液体媒体により構成された第二の層流部分からなる層流の形成を確認した。

【0090】

第一の排出口41から得られた排出液、及び、第二の排出口42Aから得られた排出液をそれぞれ顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口41から得られた排出液に30 $\mu$ mビーズは含まれておらず、また、第二の排出口42Aから得られた排出液(回収層流画分)中に30 $\mu$ mビーズが含まれている事を顕微鏡下での観察にて確認した。

10

20

30

40

50

## 【0091】

さらにそれぞれの排出液上清について、ピシンコニン酸（BCA）アッセイによりタンパク質の定量を行った所、第一の排出口41から得られた排出液の上清からは約5%の蛋白質の含有が検出されたが、第二の排出口42Aから得られた排出液中の上清からはほぼ検出されなかった。

## 【0092】

以上のように、第一の液体媒体中に分散された30 $\mu$ mビーズサンプルについて、作製例1の流路デバイスを用いて第二の液体媒体中へ移動させることで、液体媒体の置換ができた事が確認された。

## 【0093】

（比較例1）

5%BSA含有PBS中に懸濁された30 $\mu$ mビーズサンプルをチューブに取り、1000 $\times$ g（重力加速度）で遠心分離した後、PBSを添加し、液体媒体の置換を行った。その結果、30 $\mu$ mビーズの量がロスが生じ、かつBCA（ピシンコニン酸）アッセイを行ったところ、その上清から微量の蛋白質が検出された。

## 【0094】

（実施例2）

5%BSA含有PBS（第一の液体媒体）中に10ng/mL濃度で懸濁された癌胎児性抗原（CEA、型式「HISCL CEAキャリブレータ」、カイノス社）に対して、抗CEAモノクローナル抗体を標識した30 $\mu$ mビーズサンプルを反応させて、複合体粒子を形成させた。

## 【0095】

これにより得られた試料液体について、実施例1と同様、作製例1で作製した流路デバイスを用いて、別途用意したPBS（第二の液体媒体）中へ、前記複合体を移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

## 【0096】

まず、試料液体及びPBSを送液する前に、0.05%Tween含有PBS緩衝液を事前に試料液体導入口31及び液体媒体導入口32Aより通水し、流路中から気泡を除去し、デバイス内を満たした。

## 【0097】

次に、試料液体を試料液体導入口31に、PBSを液体媒体導入口32Aからそれぞれシリジポンプにて10 $\mu$ L/minの一定速度で送液し、試料液体により構成された第一の層流部分及び第二の液体媒体により構成された第二の層流部分からなる層流の形成を確認した。

## 【0098】

第一の排出口41から得られた排出液、及び、第二の排出口42Aから得られた排出液をそれぞれ顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口41から得られた排出液に30 $\mu$ mビーズは含まれておらず、また、第二の排出口42Aから得られた排出液中に30 $\mu$ mビーズが含まれている事を顕微鏡下での観察にて確認した。

## 【0099】

さらにそれぞれの排出液上清について、BCAアッセイによりタンパク質の定量を行った所、第一の排出口41から得られた排出液の上清からは約5%の蛋白質の含有が検出されたが、第二の排出口42Aから得られた排出液中の上清からはほぼ検出されなかった。

## 【0100】

以上のように、30 $\mu$ mビーズ複合体について、作製例1の流路デバイスを用いて第二の液体媒体中へ移動させることで、第一の液体媒体をPBSに置換できた事が確認された。

## 【0101】

なお、本実施例で用いた抗原のサイズは、ビーズのサイズと比べてかなり小さいため、本実施例のように複合体粒子を形成させても、複合体粒子のサイズはビーズ自体のサイズ

10

20

30

40

50

と大きく異なることはない。

【0102】

(比較例2)

上記同様の目的で、5% BSA含有PBS中に10 ng/mL濃度で懸濁されたCEA抗原(型式「HISCL CEAキャリブレータ」、カイノス社)に対して、抗CEAモノクローナル抗体を標識した30 μmビーズサンプルを反応させ、複合体を形成させた。

【0103】

これにより得られた試料液体をチューブに取り、1000 × gで遠心分離した後、PBSを添加し、液体媒体の置換を行った。その結果、30 μmビーズの量がロスが生じ、かつBCA(ビシンコニン酸)アッセイを行ったところ、その上清から微量の蛋白質が検出された。

10

【0104】

(実施例3)

本実施例は全血中に混入させたヒト乳がん由来細胞(MCF-7)を分離し、別途用意したPBS(第二の液体媒体)中に移動させることで、全血(第一の液体媒体)をPBSに置換する目的で行った。

【0105】

まず、事前にプローブとして有核細胞染色試薬(Hoechst 33342 solution: タカラバイオ)にて染色を行ったヒト乳がん由来細胞(MCF-7: DSファーマバイオメディカル)を、PBSにて希釈した正常全血内に加えて試料サンプルとした。

20

【0106】

この試料サンプルに対し、対象捕捉分子としてヒト上皮細胞接着分子(EpCAM)に対するモノクローナル抗体(抗EpCAM抗体)を担持した粒径30 μmの抗EpCAM抗体標識ビーズ[CD326(EpCAM), Human, pluribeads, sbeads: pluriselect]を添加し、室温にて攪拌しながらインキュベートして複合体を形成させ試料液体を得た。

【0107】

この試料液体について、作製例1で作製した流路デバイスを用いて、別途用意したPBS(第二の液体媒体)中へ、前記複合体を移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

30

【0108】

まず、デバイスを、予め1% BSA含有PBSで満たしておき、試料液体を試料液体導入口31に、PBSを液体媒体導入口32Aからそれぞれシリンジポンプにて10 μL/minの一定速度で送液し、試料液体により構成された第一の層流部分及びPBSにより構成された第二の層流部分からなる層流の形成を確認した。

【0109】

第一の排出口41から得られた排出液、及び、第二の排出口42Aから得られた排出液をそれぞれ蛍光顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口41から得られた排出液に30 μmビーズ及び該ビーズと細胞との複合体は含まれておらず、その他、血球細胞及び血液成分が観察された。また、第二の排出口42Aから得られた排出液中に30 μmビーズ及び該ビーズと細胞との複合体が含まれている事を蛍光顕微鏡下での観察にて確認した。

40

【0110】

以上のように、30 μmビーズ複合体について、作製例1の流路デバイスを用いてPBS中へ移動させることで、第一の液体媒体をPBSに置換できた事が確認された。

【0111】

なお、本実施例で用いたMCF-7細胞のサイズは30 μm未満であり、分離の閾値として30 μmを採用した場合、30 μmビーズとの複合体粒子を形成した細胞のみ側方移動し、ビーズ未結合の細胞があった場合、係る未結合の細胞は側方移動せずに第一の排出口41から出てしまう事になる。このため、ビーズを過剰に用いる等、試料液体中の細胞

50

をできるだけ残らずビーズとの複合体粒子とすることが、損失を最小限として回収率を上げる観点で好ましい。

【0112】

(比較例3)

上記同様の目的で、実施例3で調製した試料液体をチューブに取り、 $1000 \times g$ で遠心分離した後、PBSを添加し、液体媒体の置換を行った。実施例3に比較し、 $30 \mu m$ ビーズ及びその細胞複合体の量がロスが生じてしまい、また、赤血球等の混入が起こり、目的とする複合体粒子を精度良くPBS液体媒体へ置換する事ができなかった。

【0113】

(作製例2)

次に、作製例1にて作製した流路デバイスと同様のマイクロピラー構造を備えるものの、導入口が3つからなる図11~図14に示すデバイスを設計し、同様の作製方法に従いデバイスを作製した。

【0114】

以下、本流路デバイスを実施例4~6にて使用した。

【0115】

なお、図14にも図示されているように、この流路デバイスでは、試料液体から構成される第一の層流部分は専ら第一の排出口41から排出され、目的粒子を含有する層流画分を回収する第二の排出口42Aと第一の排出口41の間には、第三の排出口42Bが介在しているため、層流画分回収面と第一の層流部分の断面とが明白に大きく離間している。

【0116】

層流形成の確認として、まず、 $0.05\%$  Tween含有PBSを事前に試料液体導入口31及び2つの液体媒体導入口32A及び32Bより通水し、流路中から気泡を除去した後、PBSをそれぞれ通水し、流路デバイス内をPBSで満たした。

【0117】

次に、試料液体導入口31から $5\%$  BSA含有PBSを、シリンジポンプにて $10 \mu L / min$ の一定速度で送液し、液体媒体導入口32AからPBSをシリンジポンプにて $10 \mu L / min$ の一定速度で送液し、液体媒体導入口32Bから超純水をシリンジポンプにて10倍量となる $100 \mu L / min$ の一定速度で送液した。

【0118】

試料液体により構成された第一の層流部分、該第一の層流部分の両側にそれぞれ位置する超純水により構成された第三及び第四の層流部分、及びPBSから構成された第二の層流部分からなる、図14に示すような層流を形成できた。

【0119】

なお、液体媒体導入口32Bからの送液速度を、液体媒体導入口32Aからの送液速度の10倍に設定したのは、送液量を流路体積に比例した量とすることによって、層流全体の流速が一樣となるように考慮したものである。

【0120】

以下、この送液量比率にて実験を実施した。

【0121】

(実施例4)

実施例1と同様、試料液体として、目的粒子である $30 \mu m$ のビーズサンプルを懸濁させた第一の液体媒体( $5\%$  BSA含有PBS)、第二の液体媒体として、PBSを準備した。

【0122】

そして、作製例2により作製した流路デバイスを用いて、該ビーズサンプルを第一の液体媒体から第二の液体媒体に移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

【0123】

まず、サンプル及びPBSを送液する前に、 $0.05\%$  Tween含有PBSバッファ

10

20

30

40

50

ーを事前に試料液体導入口3 1及び2つの液体媒体導入口3 2 A及び3 2 Bより通水し、流路中から気泡を除去した後、PBSをそれぞれ通水し、流路デバイス内をPBSで満たした。

【0 1 2 4】

次に、試料液体を試料液体導入口3 1にシリンジポンプにて10  $\mu$ L/minの一定速度で送液し、PBSを液体媒体導入口3 2 Aにシリンジポンプにて10  $\mu$ L/minの一定速度で送液し、及び3 2 BからPBSをシリンジポンプにて100  $\mu$ L/minの一定速度で送液し、層流の形成を確認した。

【0 1 2 5】

その後、第一の排出口4 1から得られた排出液、及び、第二の排出口4 2 Aから得られた排出液をそれぞれ顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口4 1から得られた排出液に30  $\mu$ mビーズは含まれておらず、また、第二の排出口4 2 Aから得られた排出液中に30  $\mu$ mビーズが含まれている事を顕微鏡下での観察にて確認した。

10

【0 1 2 6】

また、第三の排出口4 2 Bから得られた排出液に30  $\mu$ mビーズは含まれていなかった。

【0 1 2 7】

さらにそれぞれの排出液上清について、BCAアッセイによりタンパク質の定量を行った所、第一の排出口4 1から得られた排出液の上清からは約1%の蛋白質の含有が検出されたが、第二の排出口4 2 Aから得られた排出液中の上清からはほぼ検出されなかった。

20

【0 1 2 8】

また、実施例1での結果に比較し、より低値を示した。

【0 1 2 9】

以上のように、第一の液体媒体中に分散された30  $\mu$ mビーズサンプルについて、作製例2の流路デバイスを用いてPBS中へ移動させることで、より精度よく液体媒体の置換ができた事が確認された。

【0 1 3 0】

(実施例5)

実施例2と同様、5%BSA含有PBS(第一の液体媒体)中に10 ng/mL濃度で懸濁された癌胎児性抗原(CEA、型式「HISCL CEAキャリブレータ」、カインス社)に対して、抗CEAモノクローナル抗体を標識した30  $\mu$ mビーズサンプルを反応させて、複合体粒子を形成させた。

30

【0 1 3 1】

これにより得られた試料液体について、実施例4と同様、作製例2で作製した流路デバイスを用いて、別途用意したPBS(第二の液体媒体)中へ、前記複合体粒子を移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

【0 1 3 2】

まず、試料液体及びPBSを送液する前に、0.05%Tween含有PBSを事前に試料液体導入口3 1及び2つの液体媒体導入口3 2 A及び3 2 Bより通水し、流路中から気泡を除去し、デバイス内を満たした。

40

【0 1 3 3】

次に、試料液体を試料液体導入口3 1に、PBSを液体媒体導入口3 2 Aからそれぞれシリンジポンプにて10  $\mu$ L/minの一定速度で送液し、液体媒体導入口3 2 BからPBSをシリンジポンプにて100  $\mu$ L/minの一定速度で送液し、層流の形成を確認した。

【0 1 3 4】

第一の排出口4 1から得られた排出液、及び、第二の排出口4 2 Aから得られた排出液をそれぞれ顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口4 1から得られた排出液に30  $\mu$ mビーズは含まれておらず、また、第二の排出口4 2 Aから得られた排出液中に30  $\mu$ mビーズが含まれている事を目視にて確認した。また、第三の排出口4 2 Bから得られた排出

50

液に30 μmビーズは含まれていなかった。

【0135】

さらにそれぞれの排出液上清について、BCAアッセイによりタンパク質の定量を行った所、第一の排出口41から得られた排出液の上清からは約1%の蛋白質の含有が検出されたが、第二の排出口42Aから得られた排出液中の上清からはほぼ検出されなかった。また、実施例2での結果と比較し、より低値を示した。

【0136】

以上のように、30 μmビーズ複合体粒子について、作製例2の流路デバイスを用いてPBS中へ移動させることで、第一の液体媒体をPBSへより精度良く置換できた事が確認された。

10

【0137】

(実施例6)

実施例3と同様に、全血中に混入させたヒト乳がん由来細胞(MCF-7)を分離し、別途用意したPBS(第二の液体媒体)中に移動させることで、全血(第一の液体媒体)をPBSに置換する目的で行った。

【0138】

まず、事前にプローブとして有核細胞染色試薬(Hoechst 33342 solution: タカラバイオ)にて染色を行ったヒト乳がん由来細胞(MCF-7: DSファーマバイオメディカル)を、PBSにて希釈した正常全血内に加えて試料サンプルとした。

20

【0139】

この試料サンプルに対し、対象捕捉分子としてヒトEpCAMに対するモノクローナル抗体(抗EpCAM抗体)を担持した粒径30 μmの抗EpCAM抗体標識ビーズ[CD326(EpCAM), Human, pluriBeads, s-beads: pluri select]を添加し、室温にて攪拌しながらインキュベートして複合体粒子を形成させ試料液体を得た。

【0140】

この試料液体について、作製例2で作製された流路デバイスを用いて、別途用意したPBS(第二の液体媒体)中へ、前記複合体粒子を移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

30

【0141】

まず、流路デバイスを、予め1%BSA含有PBSで満たしておき、試料液体を試料液体導入口31に、PBSを液体媒体導入口32Aからそれぞれシリンジポンプにて10 μL/minの一定速度で送液し、また、液体媒体導入口32Bから、1%BSA含有PBSをシリンジポンプにて100 μL/minの一定速度で送液した。

【0142】

第一の排出口41から得られた排出液、及び、第二の排出口42Aから得られた排出液をそれぞれ蛍光顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口41から得られた排出液に30 μmビーズは含まれておらず、その他、血球細胞及び血液成分が観察された。

【0143】

また、第二の排出口42Aから得られた排出液中に30 μmのビーズ及び該ビーズと細胞との複合体粒子が含まれている事を蛍光顕微鏡下での観察にて確認した。実施例3での結果と比較し、より精度良く、血液成分(赤血球や白血球等)の混入が低減された様子を確認した。

40

【0144】

また、第三の排出口42Bから得られた排出液に30 μmのビーズ及び該ビーズと細胞との複合体粒子は含まれていなかった。

【0145】

以上のように、全血中に混入させた30 μmビーズ複合体粒子について、作製例2の流路デバイスを用いてPBS中へ移動させることで、第一の液体媒体をPBSへより精度良

50

く置換できた事が確認された。

【0146】

(実施例7)

更に実施例6と同様にして、全血中に混入させたヒト乳がん由来細胞(MCF-7)を分離し、別途用意した10% FBS含有DMEM培地(第二の液体媒体)中に移動させることで、全血(第一の液体媒体)を10% FBS含有DMEM培地(第二の液体媒体)に置換する目的で行った。

【0147】

すなわち、実施例6で調製した試料液体について、作製例2で作製された流路デバイスを用いて、別途用意した10% FBS含有DMEM培地(第二の液体媒体)中へ、複合体粒子を移動させることで、液体媒体の置換を行うことを試みた。

10

【0148】

まず、流路デバイスを、予め1% BSA含有PBSで満たしておき、試料液体を試料液体導入口31に、10% FBS含有DMEM培地を液体媒体導入口32Aからそれぞれシリンジポンプにて10 $\mu$ L/minの一定速度で送液し、また、液体媒体導入口32Bから、1% BSA含有PBSをシリンジポンプにて100 $\mu$ L/minの一定速度で送液し、層流の形成を確認した。

【0149】

第一の排出口41から得られた排出液、及び、第二の排出口42Aから得られた排出液をそれぞれ顕微鏡下で観察したところ、第一の排出口41から得られた排出液に30 $\mu$ m

20

ビーズは含まれておらず、その他、血球細胞及び血液成分が観察された。

【0150】

また、第二の排出口42Aから得られた排出液中に30 $\mu$ mのビーズ及び該ビーズと細胞との複合体が含まれている事を顕微鏡下での観察にて確認した。

【0151】

また、第三の排出口42Bから得られた排出液に30 $\mu$ mのビーズ及び該ビーズと細胞との複合体粒子は含まれていなかった。

【0152】

以上の様に10% FBS含有DMEM培地中に置換したビーズおよびその細胞との複合体粒子は再度、液体媒体を置換することなく、また、希釈をすることなく、そのまま培養

30

に供する事ができた。

【産業上の利用可能性】

【0153】

本発明の液体媒体の置換方法、およびデバイスは、研究用途、診断用途、医薬品の製造等における核酸、蛋白質、細胞等の分離、および精製に利用することが可能である。

【符号の説明】

【0154】

1 ... 目的粒子

11 ... 第一の層流部分(分散した目的粒子を含む第一の液体媒体)

12 ... 第二の層流部分(目的粒子を受け取る第二の液体媒体)

40

F ... 外力

13 ... 第三の層流部分(第三の液体媒体)

14 ... 層流画分回収面

15 ... 第一の層流部分の(層流流れに垂直な)断面

30 ... 流路デバイスの基本構造の一例

31 ... 試料液体導入口(分散した目的粒子を含む第一の液体媒体)

32A ... 液体媒体導入口(目的粒子を受け取る第二の液体媒体)

41 ... 第一の排出口

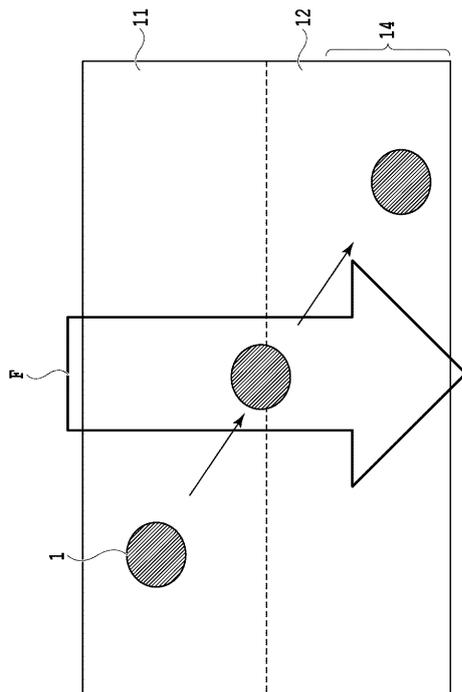
42A ... 第二の排出口(目的粒子含有層流画分回収用排出口)

40 ... 流路デバイスの他の構造の一例

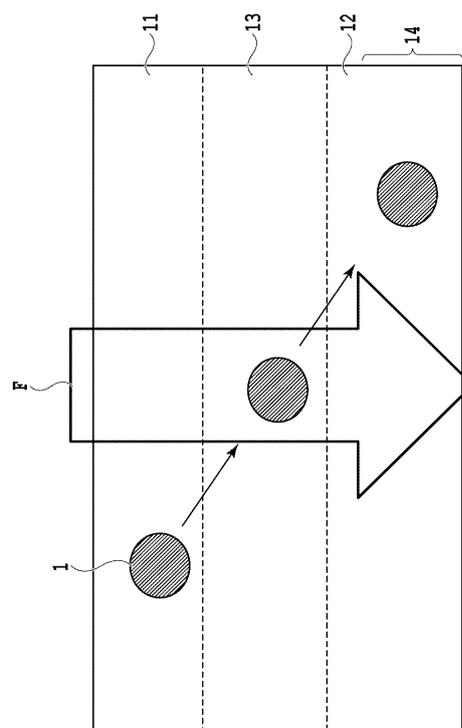
50

- 4 3 ... 排出口側隔壁
- 4 4 ... 導入口側隔壁
- 3 2 B ... 液体媒体導入口 ( 第三の液体媒体 )
- 4 2 B ... 第三の排出口
- 5 0 ... 流路構造部
- 5 1 ... 平面構造部
- 5 3 ... 流路空間
- 8 1 ... 試料液体送液部
- 8 2 A ... 液体媒体送液部 ( 第二の液体媒体送液部 )
- 9 1 ... 第一の回収部
- 9 2 A ... 第二の回収部 ( 目的粒子含有層流画分回収部 )
- 1 0 0 ... 実施例で使用の流路デバイス
- 1 0 1 ... 決定論的側方移動 ( D L D ) 構造部分
- x 1 ... 第一の層流部分の幅
- y 1 ... 第二の層流部分の幅
- x 2 ... 第一の排出口による排出幅
- y 2 ... 第二の排出口による排出幅

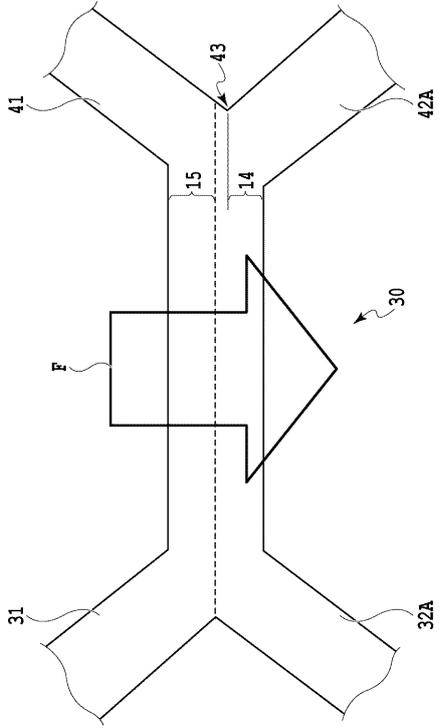
【 図 1 】



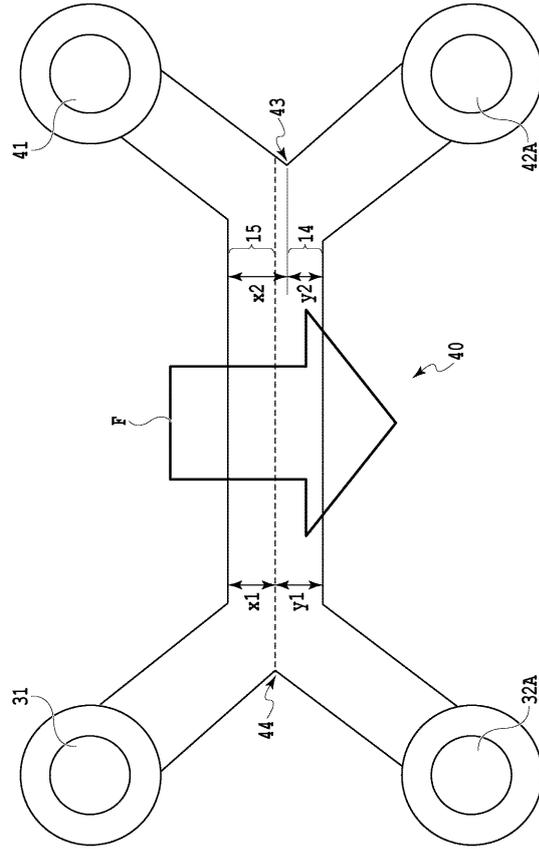
【 図 2 】



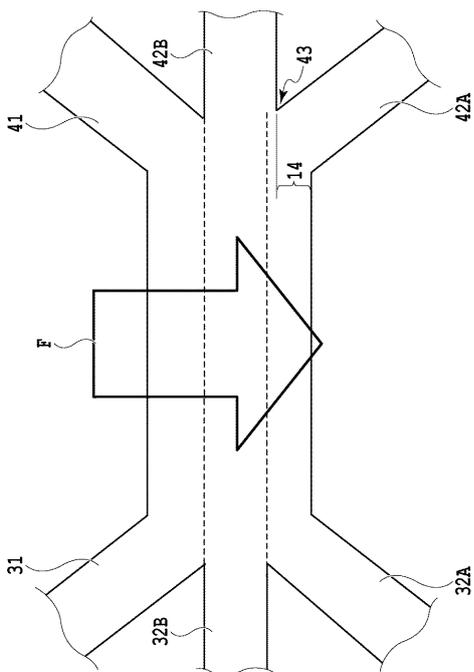
【 図 3 】



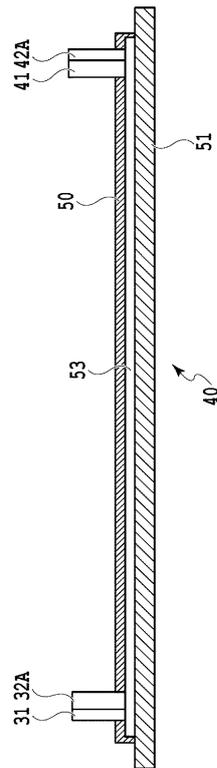
【 図 4 】



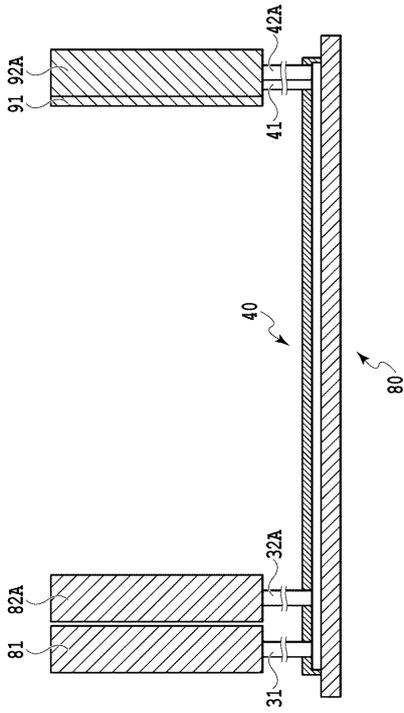
【 図 5 】



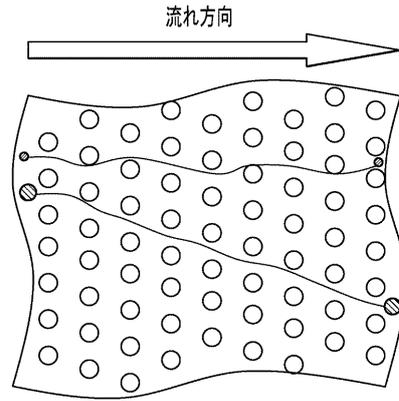
【 図 6 】



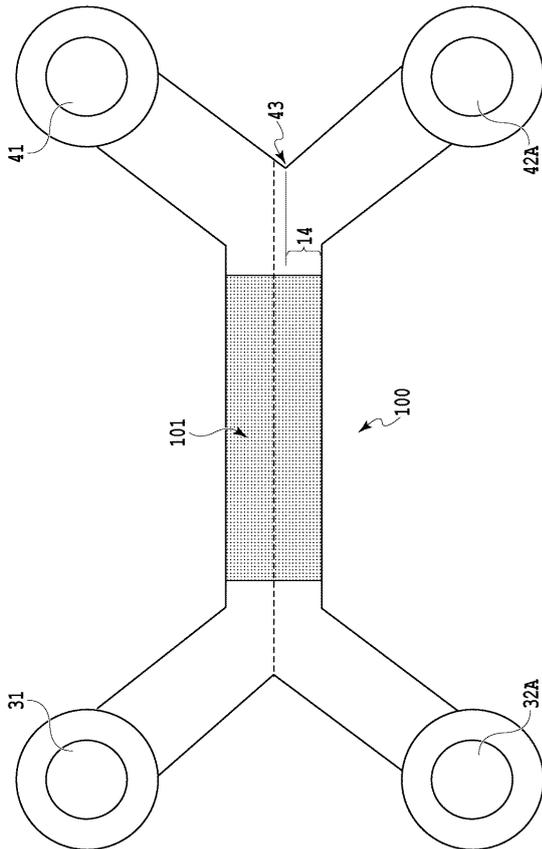
【図7】



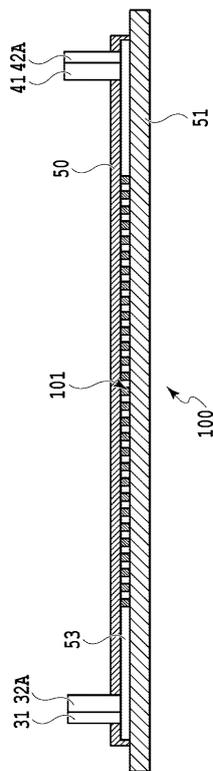
【図8】



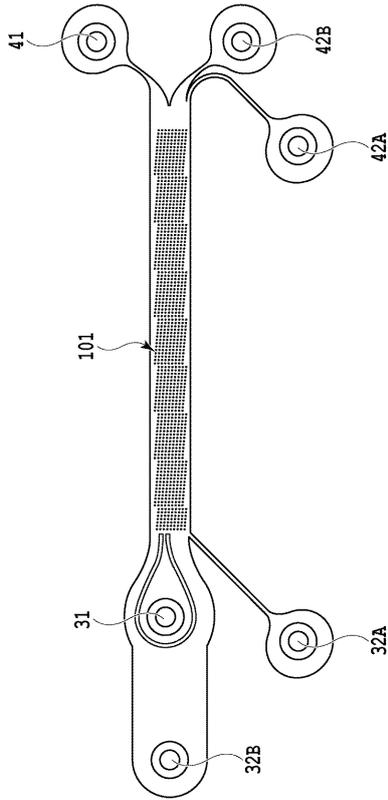
【図9】



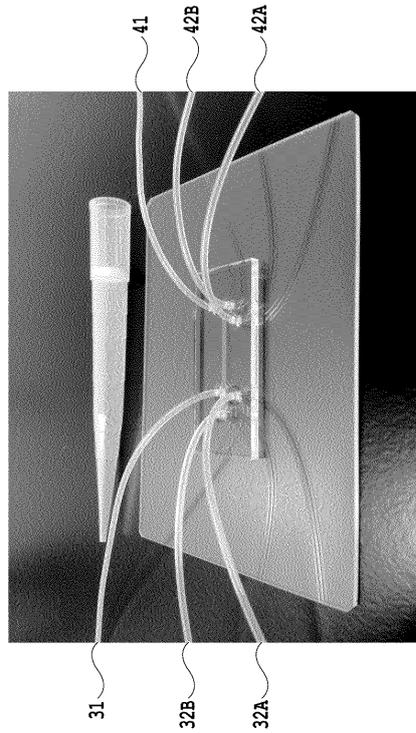
【図10】



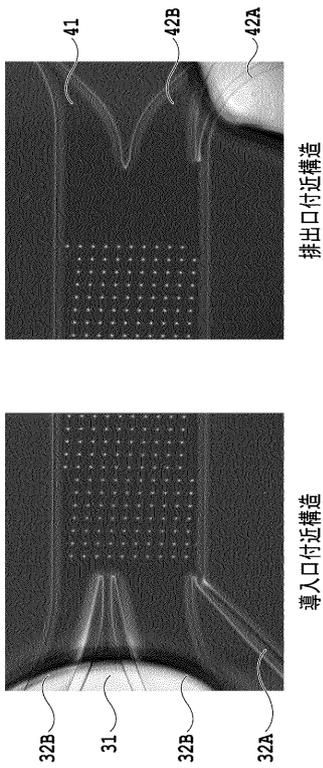
【図11】



【図12】



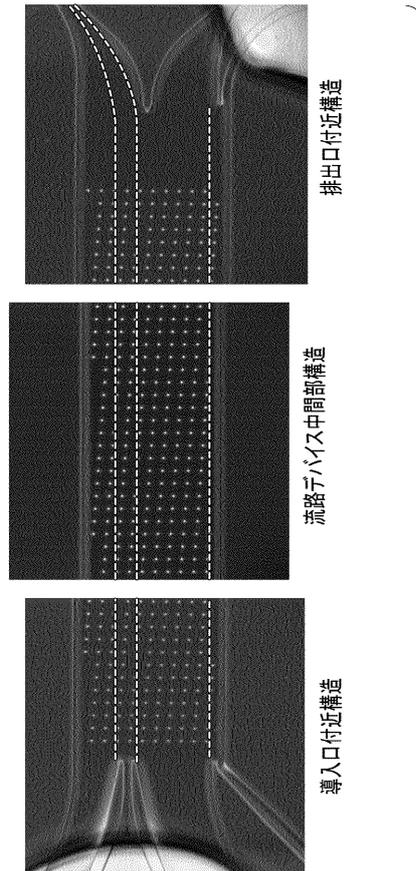
【図13】



排出口付近構造

導入口付近構造

【図14】



排出口付近構造

流路パイプ中間部構造

導入口付近構造

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 1/04 H

(56)参考文献 特表2009-511001(JP,A)  
特表2011-522219(JP,A)  
特表2012-529983(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B 0 1 D 1 1 / 0 0 - 1 1 / 0 4

B 0 1 D 1 2 / 0 0

B 0 1 J 1 9 / 0 0 - 1 9 / 3 2

B 0 1 D 4 3 / 0 0

B 0 3 C 1 / 0 0 - 1 / 3 2

B 8 1 C 1 / 0 0 - 7 / 0 4

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 3 4

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

G 0 1 N 3 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )