

(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
2011年3月10日(10.03.2011)

(10) 国際公開番号
WO 2011/027832 A1

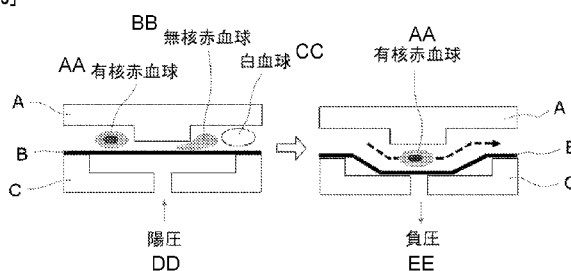
- (51) 国際特許分類:
G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/065058
- (22) 国際出願日: 2010年9月2日(02.09.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-205343 2009年9月4日(04.09.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 Ishikawa (JP). 学校法人金沢医科大学 (KANAZAWA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9200293 石川県河北郡内灘町大学1-1 Ishikawa (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 雲 健史 (KUMO, Takeshi) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 高村 禪 (TAKAMURA, Yuzuru) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 高林 晴夫 (TAKABAYASHI, Haruo) [JP/JP]; 〒9200293 石川県河北郡内灘町大学1-1 学校法人金沢医科大学内 Ishikawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,

[続葉有]

(54) Title: NUCLEATED RED BLOOD CELL CONCENTRATING/COLLECTING CHIP AND NUCLEATED RED BLOOD CELL CONCENTRATING/COLLECTING METHOD

(54) 発明の名称: 有核赤血球濃縮回収用チップ及び有核赤血球濃縮回収方法

[図3]



- AA NUCLEATED RED BLOOD CELL
- BB NON-NUCLEATED RED BLOOD CELL
- CC WHITE BLOOD CELL
- DD POSITIVE PRESSURE
- EE NEGATIVE PRESSURE

(57) Abstract: Provided is a chip or the like having a particulate concentrating mechanism such as a mechanism that can selectively concentrate nucleated red blood cells contained in maternal blood and derived from a fetus and can collect the concentrated liquid rich in nucleated red blood cells, and also provided is a nucleated red blood cell concentrating/collecting method. A micro-channel chip for concentrating nucleated red blood cells has an inlet-side channel, an outlet-side channel, and a separation narrow channel provided between the inlet-side channel and the outlet-side channel. The separation narrow channel has an inner wall having a dimension through which non-nucleated red blood cells easily pass and nucleated red blood cells hardly pass, and has a means for deforming or moving part of the inner wall of the channel to have a dimension through which nucleated red blood cells easily pass. The following are also provided: a method for collecting a liquid in which nucleated red blood cells obtained by using this chip are concentrated; and a micro-channel chip for concentrating particulates other than for concentrating nucleated red blood cells.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2011/027832 A1



PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

母体血に含まれる胎児由来の有核赤血球を選択的に濃縮し、かつ有核赤血球に富んだ濃縮液を回収できるなど、粒状物濃縮機構を有するチップ等の提供、および有核赤血球の濃縮回収方法の提供。有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップ。入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、分離用狭流路は、内壁が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有し、かつ前記流路の内壁の一部を变形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする手段を有する。このチップを用いた有核赤血球が濃縮された液の回収方法。有核赤血球濃縮用以外の粒状物濃縮用マイクロ流路チップ。

明 細 書

発明の名称：

有核赤血球濃縮回収用チップ及び有核赤血球濃縮回収方法

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2009年9月4日出願の日本特願2009-205343号の優先権を主張し、それらの全記載は、ここに特に開示として援用される。

技術分野

[0002] 本発明は、粒状物濃縮用マイクロ流路チップ、有核赤血球濃縮回収用チップ及び有核赤血球濃縮回収方法に関する。

背景技術

[0003] 従来の出生前の遺伝子診断法では、母体への肉体的・精神的な負担だけでなく、胎児への外傷、流産ほかのリスクが不可避であった。このような中、母体を循環する血液に胎児細胞（胎児由来の有核赤血球）が移行していることが知られるようになった。この母体血に含まれる胎児由来の有核赤血球を選択的に回収し、胎児の遺伝子を分析すれば、胎児への外傷や流産のリスク無く安全に出生前診断を行う事ができる。また、この方法を利用する事で、妊娠の初期での胎児遺伝子の診断を実現し、早期治療への足掛かりとする事が期待される。世界規模では、年間約500万件の出生前の遺伝子診断が実施されており、この安全な遺伝子診断方法を実用化できれば、世界市場において高い占拠率を占めることが期待される。

[0004] しかし、母体血1mL中に1個程度しか存在しないといわれる胎児由来の有核赤血球を回収するのは容易ではない。有核赤血球の表面の特殊な構造を認識する抗体を利用（抗原抗体反応）し、蛍光標識した血球をFACS（fluorescence activated cell sorting）等を用いて回収する方法などが、各国の研究機関において行われたが、いずれも頓挫している。

[0005] 確実性の高い有核赤血球の回収方法として、光学顕微鏡で観察した画像を解析し、検出した有核赤血球を回収する方法が考えられる。しかし、1 mL中に

存在する数十億個もの血球から有核赤血球を検出するにはあまりにも多くの時間を必要とするのが問題となる。

- [0006] 採血したサンプルを前処理し、有核赤血球の分離・濃縮を行うことで、この問題を解決することが期待される。現在、物理的な構造をフィルターとして用いることで血球を分離する方法として、マイクロサイズ構造（ピラー構造、ポア構造等）を作製し、目的とする細胞の分離・濃縮を行う発明・研究が報告されている。（特許文献1、2、3、非特許文献1、2、3）

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特表2009-509143号公報(W02007/035585)
特許文献2：特表2008-538283号公報(W02006/108101)
特許文献3：特表2006-501449号公報(W02004/029221)

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Immunology Letters Vol. 71, pp 5-11, 2000
非特許文献2：Biomolecular Engineering Vol.21, pp 157-162, 2005
非特許文献3：Journal of Chromatography A, 1162 (2007)187-192
- [0009] 特許文献1～3及び非特許文献1～3の全記載は、ここに特に開示として援用される。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 上述したような従来技術では、チップ内で目的とする細胞の分離或いは濃縮は達成されるものの、目的とする細胞を効果的に回収する機構がチップ内に存在しない。
- [0011] 例えば、非特許文献3に記載のチップは、細胞を細胞のサイズと変形性に基づいて分離するものであって、幅が15、10、5および2.5 μm の4段階に狭まるチャンネル（深さは5 μm で同一である）を有するものである。このチップに、直径が約8～13 μm である有核赤血球を含む血液サンプルを流す

と、有核赤血球は、幅 $15\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、および $5\mu\text{m}$ までのチャンネルは通過するが、 $2.5\mu\text{m}$ のチャンネルは通過できず、 $2.5\mu\text{m}$ のチャンネルの第一の列に保持される。母体血に比べて有核赤血球濃度が高い臍帯血を用いた実験では、第一の列が有核赤血球で閉塞されると、それ以降に到達した有核赤血球は、 $2.5\mu\text{m}$ の2つのチャンネルの間に設けられた退避路を經由して、出口に設けられた回収容器に回収された。この操作に6～8時間を要し、 $2.5\mu\text{m}$ のチャンネルの第一の列に保持されてしまった有核赤血球を回収する術は無く、有核赤血球の回収効率は極めて悪い。母体血に含まれる胎児由来の有核赤血球は極めて少なく（平均 1.2 細胞/ 1mL ）、このチップを用いる場合には、第一の列に閉塞した有核赤血球を回収する必要があるが、回収法は示されていない。

[0012] そこで本発明の目的は、母体血に含まれる胎児由来の有核赤血球を選択的に濃縮し、かつ有核赤血球に富んだ濃縮液を回収できる機構を有するチップおよびそれに類する寸法や変形性の異なる粒状物の混合物から特定の粒状物を回収できるチップを提供することにある。さらに本発明の目的は、母体血から有核赤血球を濃縮し、有核赤血球に富んだ濃縮液を回収する、有核赤血球の濃縮回収方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] [1]

任意の粒子径と任意の変形性を有する少なくとも1種類の粒状物（以下粒状物Aと呼ぶ）と前記粒状物Aより大きな粒子径と前記粒状物Aより低い変形性を有する少なくとも1種類の粒状物（以下粒状物Bと呼ぶ）との混合物から、前記粒状物Bを濃縮するために用いるマイクロ流路チップであって、

入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、

分離用狭流路は、内壁が、前記粒状物Aは通過しやすく、かつ前記粒状物Bは通過しにくい寸法を有し、かつ

前記流路の内壁の一部を変形または移動させて前記粒状物Bが通過しやすい寸

法にする手段を有する

前記マイクロ流路チップ。

[2]

有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップであって、

入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、

分離用狭流路は、内壁が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有し、かつ

前記流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする手段を有する

前記マイクロ流路チップ。

[3]

前記分離用狭流路の内壁は、流路に垂直の断面の高さが $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、幅が $5\mu\text{m}\sim 10\text{m}$ の範囲であり、流路の長さは $2\mu\text{m}\sim 1\text{m}$ の範囲である [2] に記載のマイクロ流路チップ。

[4]

有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップであって、

入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、

分離用狭流路は、内壁が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有し、かつ

前記寸法が、流路に垂直の断面の高さが $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、幅が $5\mu\text{m}\sim 10\text{m}$ の範囲であり、流路の長さは $2\mu\text{m}\sim 1\text{m}$ の範囲である

前記マイクロ流路チップ。

[5]

複数の分離用狭流路は、スペーサーで隔てられており、スペーサーの出口側流路に面する面は、出口側流路側に凸型形状の曲面であり、及び／又はスペーサーの入口側流路に面する面は、入口側流路側に凸型形状の曲面である1～

3のいずれかに記載のマイクロ流路チップ。

[6]

分離用狭流路の内壁を変形または移動させる手段が、分離用狭流路の内壁の少なくとも一部として設けた可撓性膜及びこの可撓性膜の流路と反対側に設けた圧力調整可能室から構成される[1]～[3]、[5]のいずれかに記載のマイクロ流路チップ。

[7]

入口側流路、出口側流路及び分離用狭流路はチップに内蔵されており、チップ表面に入口側流路に連絡する入口、出口側流路に連絡する出口、及び空気室に連絡する口を有する[6]に記載のマイクロ流路チップ。

[8]

各流路の内壁は、細胞付着防止コーティングや、非特異的吸着防止コーティングで表面処理されている[1]～[7]のいずれかに記載のマイクロ流路チップ。

[9]

[2]～[3]、[5]～[8]のいずれかに記載のマイクロ流路チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にした状態で、入口側流路から回収液を供給し、出口側流路から有核赤血球に富む液を回収することを含む、有核赤血球が濃縮された液の回収方法。

[10]

[4]に記載のマイクロ流路チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで入口側流路または出口側流路から回収液を供給し、出口側流路または入口側流路から有核赤血球に富む液を回収することを含む、有核赤血球が濃縮された液の回収方法。

[11]

無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料が、percollを用いた密度勾配遠心分離で1.070g/ml～1.095g/mlの密度の画分を回収したものである[9]または[10]に記載の方法。

[12]

無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料が、回収した画分を生理的条件下の食塩濃度を有する食塩水で、希釈されたものである[11]に記載の方法。

[13]

[6]または[7]に記載のマイクロ流路チップを用い、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給する際には、圧力調整可能室を分離用狭流路に対して陽圧にして、流路の内壁の一部が空気室側に凹むように変形することを防止する[9]、[11]～[12]のいずれかに記載の方法。

[14]

[6]または[7]に記載のマイクロ流路チップを用い、空気室内を分離用狭流路に対して減圧にすることで、流路の内壁の一部を空気室側に凹むように変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする、[9]、[11]～[13]のいずれかに記載の方法。

[15]

[6]または[7]に記載のマイクロ流路チップを用い、空気室内を分離用狭流路に対して減圧にすることで、流路の内壁の一部を空気室側に凹むように変形または移動させて、液の導入時、または洗浄時、気泡の除去時に、液が容易に分離用狭流路を通過できる寸法にする、[9]、[11]～[14]のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、母体血における濃度が極めて低い有核赤血球を、高効率で濃縮および回収することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]本発明の一態様のチップの三層構造を説明する分解図および流路形成層

Aの拡大図を示す。

[図2]本発明の一態様のチップの三層構造を説明するための、流路と平行な面での断面図を示す。

[図3]中間膜の動作と血球の分離の模式説明図である。左図は、空気室を僅かに陽圧にした状態であり、右図は、空気室を負圧にした状態である。

[図4]実施例1においてSU-8で作製した流路鑄型の間隙部を、走査型電子顕微鏡で観察した際のイメージである。この写真は鑄型であり、実際の流路はこの凹凸を反転したものである。

[図5]実施例2における密度勾配遠心分離の様子を示す写真である。左図は、母体血を入れた試験管である。中図は、母体血を生理食塩水で二倍希釈した際の写真である。右図は、1.075 g/mLと1.085 g/mLのPercoll溶液を重層した際の写真である。

[図6]実施例2における密度勾配遠心分離の様子を示す写真である。左図は、試験管に1.075 g/mLと1.085 g/mLのPercoll溶液を重層したのち、生理食塩水で2倍希釈した母体血を導入した際の写真である。中図は、遠心分離後の写真であり、各比重毎に分画されている。右図は、有核赤血球と好中球を主に含む比重に対応する分画を回収し、生理食塩水で2倍希釈した際の写真である。

[図7]実施例2における密度勾配遠心分離の様子を示す写真である。左図は、図6右図を遠心分離した後の写真である。右図は、Percoll多量含有層を取り除いた後の写真である。

[図8]実施例2において密度勾配遠心分離で得られた試料を示す写真である。左図は、全血をメイグリユンワルド-ギムザ染色法で染色し、顕微鏡で有核赤血球を観察した際の画像である。右図は、Percoll遠心分離後の血球をメイグリユンワルド-ギムザ染色法で染色し、顕微鏡で有核赤血球を観察した際の画像である。

[図9]実施例2での有核赤血球の濃縮回収における、中間膜の動作と間隙に留めた有核赤血球のリリースの様子を示す説明図である。

[図10]実施例2で有核赤血球の濃縮回収に用いたPDMSチップの外観（左図）

である。右図は、血球試料溶液を送液し、間隙部に留まる血球を顕微鏡で観察した際の画像である。

[図11]実施例2での有核赤血球の濃縮回収の様子を示す画像である。左図は、血球試料溶液を送液し、間隙部を通り抜ける血球を顕微鏡で観察した際の画像である。右図は、中間膜を動作させることで、間隙に留まっていた血球がリリースされる様子を顕微鏡で観察した際の画像である。

[図12]実施例2で濃縮回収された有核赤血球の画像である。

発明を実施するための形態

[0016] [粒状物濃縮用マイクロ流路チップ]

本発明は、任意の粒子径と任意の変形性を有する少なくとも1種類の粒状物(以下、粒状物Aと呼ぶ)と前記粒状物Aより大きな粒子径と前記粒状物Aより低い変形性を有する少なくとも1種類の粒状物(以下、粒状物Bと呼ぶ)との混合物から、前記粒状物Bを濃縮するために用いるマイクロ流路チップである。

このマイクロ流路チップは、

入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、

分離用狭流路は、内壁が、前記粒状物Aは通過しやすく、かつ前記粒状物Bは通過しにくい寸法を有し、かつ

前記流路の内壁の一部を変形または移動させて前記粒状物Bが通過しやすい寸法にする手段を有する。

[0017] 上記マイクロ流路チップを用いることで、上記粒状物AおよびBの混合物から、粒状物Bを濃縮して、分離することができる。上記粒状物AおよびBの混合物の例としては、例えば、血液を挙げることができ、具体的には、粒状物Aは、無核赤血球を挙げることができ、粒状物Bとしては、有核赤血球を挙げるができる。従って、本発明の粒状物濃縮用マイクロ流路チップの1つの態様として、無核赤血球と有核赤血球との混合物から、有核赤血球を濃縮する際に用いる、有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップを挙げるができる。

[0018] 本発明の上記粒状物濃縮用マイクロ流路チップでは、分離用狭流路は、内壁

が、前記粒状物Aは通過しやすく、かつ前記粒状物Bは通過しにくい寸法を有する。粒状物Aは通過しやすく、かつ粒状物Bは通過しにくい、分離用狭流路の内壁の寸法は、例えば、以下のように決定することができる。

[0019] 例えば、内壁の寸法を、流路に垂直の断面の高さ h 、幅 w および流路の長さ L とし、粒状物Aの粒子径 ϕA と変形性 dfA 、粒状物Bの粒子径 ϕB と変形性 dfB とすると、チップの性能として重要な要素である高さ h は、以下の条件を満たすように設定することができる。

$$\text{高さ } h > \phi A \times dfA \times k1$$

$$\text{高さ } h < \phi B \times dfB \times k1$$

ここで、 $k1$ は、任意の係数であるが、 dfA および dfB は全く変形しないものである場合を1とすれば、 $k=1$ とすることができる。粒子径 ϕA および ϕB は、公知の方法で適宜決定できる。また、 dfA および dfB は、主にチップにおけるサンプル液の流速や分離用狭流路入口の寸法により決まるものであり、分離用狭流路入口において粒状物にかかる応力を考慮して決定できる。具体的には、実際のサンプルをチップの試作品に適用し、分離用狭流路入口における粒状物の変形の度合いを顕微鏡などで観察することで、 dfA および dfB を求めることができる。

[0020] また、幅 w は高さ h に比べれば、粒状物Aの通過しやすさ、および粒状物Bの通過しにくさに対する影響は大きくはない。但し、粒状物Aを通過しやすくするために、少なくとも以下の条件を満たすことが適当である。

$$\text{幅 } w > \phi A \times (1/dfA) \times k2$$

この式では、 $k2$ は最低1であり、好ましくは例えば、2~30とすることができる。 $k2$ は30を超える値であってもよい。

[0021] 例えば、有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップにおいては、粒状物Aは無核赤血球に相当し、粒状物Bは有核赤血球に相当し、無核赤血球(粒状物A)の粒子径は約4~6 μm であるが、厚さ約2 μm の扁平状の粒子であり、 ϕA としては厚さ約2 μm を採用し、変形性 dfA は0.4~0.6である。有核赤血球(粒状物B)はステージによって粒子径は変化するが、本発明で扱うものは、粒子径 ϕB は約

8 ~ 13 μm であり、変形性dfBは0.7~0.9程度である。

[0022] 以下、本発明を、有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップを例に説明する。

[0023] [有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップ]

図1に基づいて本発明の有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップ1について説明する。図1の右側には、流路形成層A、中間膜Bおよび空気室形成層Cからなる3層構造を有するチップ1の分解説明図、左上側に流路形成層Aの上下面をひっくり返した図、左下側に流路形成層Aの分離用狭流路30付近の拡大図を示す。

[0024] チップ1は、流路形成層Aに入口側流路10、出口側流路20及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路30を有する。分離用狭流路30は、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有する狭流路である。無核赤血球は直径が約4~6 μm であるのに対して、有核赤血球は直径が約8~13 μm である。さらに、非特許文献3にも記載されているように、赤血球等の細胞は変形が可能であるので、上記サイズより狭い狭流路でも通過できる。前記分離用狭流路30は、具体的には、狭流路に垂直の断面の高さが1 μm ~5 μm の範囲であり、幅が5 μm ~10 μm の範囲であり、流路の長さは2 μm ~1 m の範囲であることができる。有核赤血球の分離には、特に、断面の寸法の影響が、図1に示す例では、断面の寸法のうちの高さの影響が大きい。実施例に示す実験の結果によれば、狭流路の高さが1 μm に近いほど、有核赤血球の回収率は高くなり、5 μm に近づくほど有核赤血球の回収率は低下する。狭流路に垂直の断面の高さは、好ましくは1~2 μm の範囲であり、幅が10 μm ~10 cm の範囲であり、流路の長さは20~300 μm の範囲であることができる。尚、上記有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップにおいては、無核赤血球のみならず白血球も分離用狭流路を通過させることができ、有核赤血球を白血球からも分離することができる。

[0025] 分離用狭流路30は、図1に示すように、複数の狭流路30a、30b、30c・・・30jを有することが好ましく、例えば、分離用狭流路30は、5~20個の狭流路を有することができる。ただし、狭流路の数に制限はなく、

狭流路は、例えば、1~20000個の範囲で有することができる。

[0026] 複数の分離用狭流路30は、スペーサー31で隔てられており、スペーサー31の出口側流路20に面する面32aは、出口側流路側に凸型形状の曲面であり、スペーサーの入口側流路10に面する面32bは、入口側流路側に凸型形状の曲面であることが、スペーサーの入口側および出口側に血球塊が形成しにくく、血液試料の流通を妨げないという観点から好ましい。凸型形状の曲面は、具体的には、設計上、直径20~40 μ mの半円で行った。さらに、分離用狭流路30を形成するための堤33の側面33b（入口側流路10に面する面）および側面33a（出口側流路20に面する面、図示せず）も同様に凸形状（側面33bおよび33aの全体としては波形状）にすることもできる。

[0027] 入口側流路10、出口側流路20及び分離用狭流路30はチップ1に内蔵されており、チップ1の表面には、入口側流路に連絡する入口11、出口側流路に連絡する出口21、及び空気室に連絡する口51を有する。チップ1は、図1および2（断面図）に示す様に、例えば、流路形成層A、中間膜Bおよび空気室形成層Cからなる3層構造を有することができる。流路形成層Aは、一方の面に入口側流路10、出口側流路20及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路30を有する。流路形成層Aは、他方の面（対向する面）に入口側流路に連絡する入口11と出口側流路に連絡する出口21を有する。さらに、流路形成層Aは、他方の面に、空気室に連絡する口51を有する。

[0028] 中間膜Bは、流路形成層Aおよび空気室形成層Cの平面寸法と同様の平面寸法を有することができ、流路形成層Aが有する空気室50に連絡する口51と空気室形成層Cが有する空気室50との間を連絡する開口41を有する。

[0029] チップ1は、さらに、分離用狭流路30の狭流路30a、30b、30c・・・・30jの内壁の一部を変形または移動させて、分離用狭流路30を有核赤血球が通過しやすくする手段を有する。分離用狭流路の内壁を変形または移動させる手段は、分離用狭流路の内壁の少なくとも一部として設けた可撓

性膜 40 及びこの可撓性膜の流路と反対側に設けた空気室 50 から構成されることができる。中間膜 B の一部である可撓性膜 40 はダイアフラム機能を有し、空気室 50 を流路側に対し陽圧にすることで可撓性膜 40 は、分離用狭流路 30 を形成するスペーサー 31 に押し付けられ、分離用狭流路 30 が、上記所定の寸法を有するように制御される。なお、中間膜 B 自体の弾性や、中間膜とスペーサーの間の接着性等によって所定の寸法を維持できる場合は、特に空気室 50 を流路側に対して陽圧にしなくてもよい。この状態では、有核赤血球は分離用狭流路 30 を通過できないか、または通過しにくい。それに対して、空気室 50 を減圧することで、可撓性膜 40 は、空気室 50 側に撓み、可撓性膜 40 と分離用狭流路 30 の可撓性膜 40 と対向する面との間の距離は大きくなり、分離用狭流路 30 を有核赤血球が通過しやすくなる。

[0030] 本発明のチップを用いた有核赤血球の濃縮と回収について、図 3 を用いてさらに説明する。本発明のチップ 1 は、分離用狭流路 30 の一部に、空圧制御により変形するダイアフラム機能を有する可撓性膜 40 と空気室 50 からなるダイアフラム駆動機構を組み込んだ狭流路（マイクロ間隙）を有する。母体から採取した、目的とする細胞（有核赤血球）を含む血液サンプルを図 3 左の様な、狭流路（マイクロ間隙）を持つマイクロ流路を通す。有核赤血球は、他の赤血球に比べ、狭流路を通りにくい（大きいか変形し難い）ので、有核赤血球を選択的に狭流路の前にトラップし、狭流路を通りやすい他の細胞（主に無核の赤血球）と分離（分離が不完全な場合、濃縮）できる。その後、図 3 の右図のように、ダイアフラム機能を有する可撓性膜 40 を空気室 50 を減圧にすることで変形させて、狭流路の前にトラップされていた有核赤血球を含む、有核赤血球が濃縮された細胞群を回収することができる。

[0031] 可撓性膜 40 は、空気室 50 を流路側に対し陽圧にして有核赤血球を選択的に狭流路の前にトラップする際には、狭流路が所定の寸法を維持でき、空気室 50 を減圧にした際には、有核赤血球が狭流路を通過できる程度の隙間を狭流路に与えられる物性を有するものであることが適当である。そのような

観点から、可撓性膜40（あるいは中間膜B）は、例えば、シリコーン樹脂製で適度な弾性と硬さを有するものであることが適当である。適度な弾性と硬さとは、例えば、流路側に対し陽圧にした際は、間隙の寸法を保つのに十分変形しにくく、流路側に対し負圧にした際は有核赤血球を回収するのに十分変形することである。したがってこの適度な弾性と硬さは、スペーサー31とスペーサー31の間隔や、空気室50の大きさや形に依存する値である。尚、シリコーン樹脂膜の弾性と硬さは、膜厚によっても変化するので、同一の材質のシリコーン樹脂を用い、膜厚を調整することで、所望の弾性と硬さを有する膜とすることもできる。シリコーン樹脂としては、例えば、ポリジメチルシロキサンを挙げることができ、スペーサー31の間隔が $30\mu\text{m}$ であり、空気室50が十分大きい場合は、膜厚は、例えば、 $20\sim 200\mu\text{m}$ の範囲とすることができる。

[0032] 各流路の内壁は、例えば、細胞付着防止用コーティング剤や非特異吸着防止用コーティング剤で表面処理されることができる。この表面処理により、血球や血小板、たんぱく質などの各流路の内壁への付着や凝集を抑制して、上記分離を容易に行うことができる。非特異吸着防止用コーティング剤の例としては、ポリエチレングリコール（PEG）を主成分とするBlockmaster CE-510（JSR株式会社）及びLipidure（日油株式会社）等を挙げることができる。

[0033] 本発明は、入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、分離用狭流路は、内壁が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有し、かつ前記寸法が、流路に垂直の断面の高さが $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、幅が $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の範囲であり、流路の長さは $2\mu\text{m}\sim 1\text{m}$ の範囲である有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップも包含する。この態様のマイクロ流路チップにおける入口側流路、出口側流路及び分離用狭流路は、上記で説明した態様の有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップと同様である。また、分離用狭流路の内壁の寸法が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有し、かつ前記寸法が、流路に垂

直の断面の高さが $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、幅が $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の範囲であり、流路の長さは $2\mu\text{m}\sim 1\text{m}$ の範囲であることが適当であることは、上記で説明した態様の有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップと同様である。

[0034] 但し、この態様のチップは、流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする手段を有さない。この態様のチップを用いる場合、有核赤血球の濃縮と回収は、マイクロ流路チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで入口側流路または出口側流路から回収液を供給し、出口側流路または入口側流路から有核赤血球に富む液を回収することで行うことができる。即ち、この態様のチップは、流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする手段を有さないが、上記方法で、有核赤血球が濃縮された液を回収することができる。

[0035] [粒状物濃縮用マイクロ流路チップおよび有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップの作製方法]

本発明のチップを作製するためには様々な技術を利用することができ、利用される技術は一部には最適な材料に基づいて選択される。本発明のチップを作製するための代表的材料には、ガラス、シリコン、スチール、ニッケル、ポリメタクリル酸メチル (PMMA)、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリオレフィン、シリコン類 (例、ポリジメチルシロキサン)、およびそれらの組み合わせが含まれる。その他の材料は、当技術分野において知られている。これらの材料で流路を作製する方法は当技術分野において知られている。これらの方法には、フォトリソグラフィー (例、立体リソグラフィーまたはX線フォトリソグラフィー)、モールディング法、エンボス加工法、シリコン微細加工法、湿式もしくは乾式化学エッチング法、ミリング法、ダイヤモンド切削法、リソグラフィーによる電気めっきおよび成形法 (LIGA) および電気めっき法が含まれる。例えば、ガラスについては、後に湿式 (KOH) または乾式エッチング (フッ素またはその他の反応ガスを用いた反応性イオンエッチング) を実施する伝統的なフォトリソグラフィーによるシリ

コン作製法を利用できる。レーザー微細加工法などの技術は、高度の光子吸収効率を備えるプラスチック材料のために採用できる。この技術は、この工程が連続的種類であるため、低スループット作製のために適合する。大量生産されるプラスチック製チップには、熱可塑性射出成形法、および圧縮成形法が適合する。本発明のチップを作製するためには、（サブミクロンで機能の忠実度を保存する）コンパクトディスクの大量生産に使用される従来の熱可塑性射出成形法もまた利用されてよい。例えば、チップの機能は従来型のフォトリソグラフィーによってガラスマスター上で複製される。ガラスマスターを電気鋳造すると、頑丈で耐熱衝撃性、熱伝導性かつ硬質の型が作り出される。この型は、機能をプラスチック製チップに成形する射出成形法または圧縮成形法のためのマスターテンプレートとして機能する。チップを作製するために使用されるプラスチック材料並びに光学的品質および最終製品のスループットに関する要件に依存して、製造方法として圧縮成形法または射出成形法を選択できる。圧縮成形法（ホットエンボス加工法またはリリーフインプリンティング法とも呼ばれる）には、小型構造にとって卓越しているが高縦横比構造を複製する際に使用するのは困難でサイクル時間が長い高分子量ポリマーと適合する利点がある。射出成形法は、高縦横比構造とも良好に作用するが、低分子量ポリマーにとって最も適合する。

[0036] チップは、一つまたは複数のピースで作製され、その後組立てられてよい。1つの態様では、このチップの流路形成層A、中間膜B、空気室形成層Cの各層は図1に示されているように、流路あるいは貫通孔等を有している。チップの層は、クランプ、接着剤、熱、陽極結合、または表面基間の反応（例、ウエハー結合）によって一緒に結合されてよい。または、一つより多くの平面内に流路を備えるチップは、例えば立体リソグラフィーまたはその他の三次元作製技術を使用して、単一ピースとして作製されてよい。

[0037] 1つの態様では、このチップはPMMAから製造される。

[0038] [有核赤血球濃縮液の調製方法]

本発明は、有核赤血球濃縮液の調製方法も包含する。この有核赤血球濃縮液

の調製方法は、上記本発明のマイクロ流路チップを用いる方法である。具体的には、

(1) チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで

(2) 流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にした状態で、入口側流路から回収液を供給し、出口側流路から有核赤血球に富む液を回収すること

を含む方法である。

[0039] 無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料は、母体から採取した、目的とする細胞(有核赤血球)を含む血液サンプルである。1回に採取される血液サンプル量は、通常5～10mL程度である。本発明ではこれらの全量または一部を用いて有核赤血球に富む液を回収することができる。

[0040] 無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料は、チップでの濃縮処理に先立って、有核赤血球含有濃度の高い画分としておくことが、効率的に有核赤血球を回収するという観点から好ましい。有核赤血球含有濃度の高い画分は、例えば、percollを用いた密度勾配遠心分離で例えば、1.070g/ml～1.095g/ml、あるいは1.075g/ml～1.085g/mlの密度の画分を回収したものであることができる。前者の範囲であれば、より広範囲から有核赤血球を回収でき、一方後者の範囲であれば、範囲は前者の範囲より狭まるが、有核赤血球に共存する無核赤血球等の割合が低下するので分離効率はよくなる。但し、この方法に限定される意図ではなく、その他にも、Ficoll法、赤血球凝集法等の方法を用いても、有核赤血球含有濃度の高い画分を得ることはできる。また有核赤血球よりも大きいか変形しにくい細胞、たとえば白血球は、適当な方法を用いて除いておくことが望ましい。この目的のために、本発明を寸法を変えて用いることもできる。

[0041] 無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料は、回収した画分を生理的条件下の食塩濃度を有する食塩水で、希釈されたものであることが、チップの狭流路での血球の詰まりやその他の流路の内壁への血球の付着を抑制できるという

観点から適当である。生理的条件の食塩濃度は、例えば、 $8 \sim 10 \text{ mg} / \text{mL}$ の範囲である。食塩水による希釈の程度は、流速、流路構造等を考慮して適宜決定され、血球濃度が $1.1 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^6 \text{ cells} / \mu \text{L}$ の範囲になるように希釈することが適当である。

- [0042] チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収する操作は、試料の供給速度（流量）を、例えば、 $1 \sim 100 \mu \text{L} / \text{分}$ の範囲で実施することができる。試料の供給は、マイクロシリンジポンプ（IC3100 / KN3319040 テックジャム社）等を用いて行うことができる。
- [0043] マイクロ流路チップは、前記本発明のチップであり、具体的には、分離用狭流路の内壁を変形または移動させる手段が、分離用狭流路の内壁の少なくとも一部として設けた可撓性膜及びこの可撓性膜の流路と反対側に設けた空気室から構成されるものであり、さらに、入口側流路、出口側流路及び分離用狭流路はチップに内蔵されており、チップ表面に入口側流路に連絡する入口、出口側流路に連絡する出口、及び空気室に連絡する口を有するチップを用いることが適当である。その上で、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給する際には、必要なら空気室を流路側に対して陽圧にして、流路の内壁の一部が空気室側に凹むように変形または移動することを防止する。
- [0044] 分離用狭流路を透過した液の回収が終了したら、流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にした状態で、入口側流路から回収液を供給し、出口側流路から有核赤血球に富む液を回収する。具体的には、上記マイクロ流路チップにおいて、空気室内を減圧にすることで、流路の内壁の一部を空気室側に凹むように変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする。有核赤血球に富む液の回収にも、例えば、上記の希釈で使用した生理的条件の食塩濃度を有する食塩水を用いることができる。
- [0045] 回収された有核赤血球に富む液は、胎児診断等に用いることができる。より具体的には、たとえば、メイグリユンワルド・ギムザ染色液で、血球の染色

が行われる。顕微鏡観察用のプレパレート上に溶液を2.5 μ Lずつ滴下し引きガラスを使って塗抹し、乾燥させる。その後、染色液を満たしたガラス容器に浸し染色、洗浄後、乾燥させる。顕微鏡観察によって形態学的に有核赤血球の選別、回収が行われ、最終的に有核赤血球のDNAの抽出、遺伝子の解析が行われる。

[0046] 本発明の粒状物濃縮用マイクロ流路チップは、有核赤血球の濃縮に限らず、同様にサイズや硬さ、変形のしやすさが異なる粒子状のものの分離、濃縮に用いることができる。特に、白血球と赤血球を分離、回収することもできる。この場合、赤血球が粒状物A(任意の粒子径と任意の変形性を有する少なくとも1種類の粒状物)であり、白血球が粒状物B(前記粒状物Aより大きな粒子径と前記粒状物Aより低い変形性を有する少なくとも1種類の粒状物)である。また間隙の寸法の違う本発明のチップを、複数直列に接続することにより、様々な画分を回収することもできる。また、本発明のチップの上流に、有核赤血球よりも大きい細胞、特に白血球を通さない間隙を有する粒状物濃縮用マイクロ流路チップを別途設けることは、特に有効である。但し、前述のように、本発明のマイクロ流路チップを用いることで、無核赤血球のみならず白血球も分離用狭流路を通過させることができ(その際、有核赤血球は分離用狭流路を通過しない)、その結果、白血球からも有核赤血球を分離することができる(実施例3参照)。

[0047] 本発明のチップを用いた濃縮および回収を実施する際は、通常、マイクロ流路内に空気のみが満たされた状態から、最初になんらかの液をいれる操作が必要になる場合がある。その際、しばしば、気泡が狭い部分、この場合は分離用狭流路30付近に留まったり、液が狭い部分を乗り越えるのに長時間や、強い圧力が必要になる場合がある。本発明においては、このときにダイアフラムを変形させ、液導入を容易にすることができる。

[0048] 前述のように、本発明は、流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする手段を有さないチップも包含するが、この態様のチップを用いる場合、有核赤血球の濃縮と回収は、マイクロ流路チップ

の入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで入口側流路または出口側流路から回収液を供給し、出口側流路または入口側流路から有核赤血球に富む液を回収することで、有核赤血球が濃縮された液を回収することができる。無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料及び回収液は、前記の説明と同様のものである。

実施例

[0049] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定される意図ではない。

実施例 1

チップの作製

PDMS (polydimethylsiloxane) 樹脂によるチップを完成させるまでの一連の工程は、流路パターン設計、光リソグラフィー用のマスクの作製、流路鑄型の作製、鑄型を使ったPDMS流路層の作製、各層の貼り合わせに大別できる。

[0050] 流路パターン設計

流路パターンは、PC上でIllustrator (Adobe社) を用いて作図した。

[0051] 光リソグラフィー用のマスクの作成

流路パターンを透明なOHPフィルムに印刷する。このフィルムを透明なガラス板に張り付け、光リソグラフィーのためのマスクを完成させた。

[0052] 流路鑄型の作製

流路鑄型の材料には、光硬化性レジストSU-8 (米国 MICRO CHEM社) を用いた。6インチの片面鏡面研磨シリコンウェハー (GZ-N, 信越化学工業株式会社、厚み625 μm 結晶面<100>) を基板として使用した。基板表面を超純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた後、Acetone (EL grade, 関東化学株式会社) で洗浄し、窒素ガスで再び乾燥させた。スピコーター (1H-DX2, ミカサ株式会社) に、洗浄後の基板を固定し、SU-8を鏡面側に適量を滴下した後、スピコートした。次にSU-8を塗布した基板をホットプレート (DATAPLATE,

アズワン株式会社)上に置き、65°Cで1分間、95°Cで1分間加熱した後、ホットプレートの電源を切り、基板温度が室温程度に下がるまで放置した(プリベイク)。次にコンタクト露光型マスクアライナー(Suss MJB3 UV400、米国 Karl Suss社)に前述した流路パターンを有するガラスマスクをセットし、波長365nm(i線)の紫外線を、基板のSU-8塗布側に照射した。UV露光後の基板をホットプレート上に置き、65°Cで1分間、95°Cで1分間加熱した後、ホットプレートの電源を切り、基板温度が室温程度に下がるまで放置した(ポストベイク)。次に基板を、現像液(SU-8 Developer、MICRO CHEM社)に1分30秒浸し、マスクによってUV露光されていないSU-8部位を除去した後、窒素ガスで基板を乾燥させ、SU-8による流路鑄型を完成させた。

[0053] 鑄型を使ったPDMS流路層の作成

シリコーン系樹脂であるPDMS (polydimethylsiloxane) の材料として、SYLGA RD 184 silicone elastomer Kit (Dow corning Toray社)を使用した。PDMS主剤と架橋剤とを重量比10:1の割合で混合し、混合時に取り込まれた空気を除去するためにベルジャー内にPDMSを静置し、完全に脱泡されるまでロータリー真空ポンプで減圧した。周囲にPDMSが流れ出さないようにシリコーンゴムで作製した枠を取り付けたSU-8流路鑄型に、脱泡したPDMSを流し込んだ。

次に、これをオープン (DKN 301, ヤマト科学株式会社)に入れ、65°Cで5時間静置することでPDMSを硬化させた。硬化したPDMS流路を流路鑄型から丁寧に剥がし、アセトンで洗浄したベルト用の穴空けを使ってPDMS流路の必要な部位に穴をあけ、溶液導入用のリザーバーあるいは空圧制御用のチューブを取り付ける穴を作製した。

[0054] 各層の貼り合わせ

PDMSに付着した埃等の不純物を取り除くため、超純水で洗浄し窒素ガスで乾燥させた。表面を洗浄したB層とC層を、反応性イオンエッチング装置(Reactive Ion Etching-10NR、サムコ株式会社)により、100sccm、100W、8.8Paで10秒間、酸素プラズマ処理した。このプラズマ処理によって親水性に改質された表面に触れぬよう注意しながら、B層とC層をピンセットで操作し、これ

らを貼り合わせ、PDMSチップを完成させた。

- [0055] チップは、図1および2に示すように、流路層と薄膜層(中間膜層)、空気層の3層構造で作製した。但し、図1では空気室50の空気注入口51を流路10の入り口11と流路20の出口21と同じ面に設けているのに対して、図2では、空気室50の空気注入口51を流路10の入り口11と流路20の出口21と反対の面に設けている。図2は、チップの三層構造を説明するための、流路と平行な面での断面図であり、A層には母体血を導入する流路が微細加工されている。B層は、C層の空気室部分を流路側に対し陽圧または負圧する事で変形し、図面中央の間隙部で上下する。
- [0056] 流路中央部には、微小な隙間(微小間隙)30を作製した。流路10の入り口11と流路20の出口21として、直径5mmの穴を作製し、中間膜Bとの張り合わせにより、リザーバーを作製した。
- [0057] 図3は、中間膜の動作と血球の分離の模式説明図であり、微小な隙間(微小間隙)30付近を拡大して示している。図3の左図は、C層の空気室を流路側に対し僅かに陽圧にすることで、溶液の流れによる圧力でB層の中間膜が下がるのを防ぐことができ、変形のし易い有核赤血球以外の血球が、間隙を通り流れていく様子を表した。図3の右図は、C層の空気室を減圧する事で、B層の中間膜を下げ、間隙部の流路が拡張するので、留まった有核赤血球を回収のためにリリースする状態を示す。
- [0058] 図3に示すように、中間膜Bは、空気室50に注入させる空気により上下に振幅し、ダイアフラム駆動の一部とした。ダイアフラムの駆動は、空気室50の空気注入口51を下側に作製することで容易に行えるようにした。ダイアフラムの駆動による中間膜Bの振幅は、空気室50に注入する空気の圧力により操作した。
- [0059] 図4は、SU-8で作製した流路鋳型の間隙部を、走査型電子顕微鏡で観察した際のイメージである。この写真は鋳型であり、実際の流路はこの凹凸を反転したものである。図4に示すように、一本の流路から計10本の流路に分岐する流路層を作製した。複数に分岐している流路部は、間隙部であり、高さ1.4 μ m

以下になるよう作製した。間隙の高さは、本実施例における回収対象である有核赤血球が留まるように作製しなければならない。そこで、間隙の高さを2.5 μm 以下から始め、流速0.1~10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で行ったところ、有核赤血球は、間隙の高さが1.4 μm の時点で留まっていた。以上のことから、本チップについては高さ1.4 μm 以下になるよう作製した。流路のスペーサーは、微小な間隙によってチップが撓む現象を抑えるために作製した。間隙部のスペーサー入り口の形状は、四角状から丸状にする（エッジを丸める）ことで血液通過時に発生する淀み現象を抑えられるよう作製した。

[0060] 実施例 2

実施例 1 で作製したチップを用いて、以下の方法により母体血から有核赤血球の濃縮および回収を行った。

<血液導入方法>

採血した時の血液量では、チップで有核赤血球を濃縮するまでに時間を要する。このため、血液量を減らす工程が必要となる。そこで、密度勾配遠心分離を行い有核赤血球を濃縮し、血液量を少なくした。

[0061] 1. 密度勾配遠心分離

母体血(6.0mL~7.0mL)は、ピペットを用いて分取し、半分ずつ遠沈管へ移す。母体血の採血量は、個人差のある血液の粘性などに影響され若干変化するが6.0mL以上は、確実に採取されている。半分に分けた母体血は、0.9%(g/mL)NaCl水溶液を用いて2倍希釈する。別の遠沈管に、密度の異なるPercoll(1.075 g/mL、1.085 g/mL)を用いて密度勾配を作製する。この結果を図5の、母体血を入れた試験管の写真(左図)、母体血を生理食塩水で二倍希釈した際の写真(中図)、および1.075 g/mLと1.085 g/mLのPercoll溶液を重層した際の写真(右図)として示す。

[0062] 次いで、密度勾配を作製した遠沈管へ、2倍に希釈した母体血を注ぐ。遠心機を用いて遠心分離する。(3000rpm、1750×g、30min)遠心後に発現した有核赤血球含有層をピペットを用いて回収する。回収した有核赤血球含有層を0.9%(g/mL)NaCl水溶液を用いて2倍希釈する。結果を図6の、試験管に1.075 g/mLと

1. 0.85 g/mLのPercoll溶液を重層したのち、生理食塩水で2倍希釈した母体血を導入した際の写真（左図）、遠心分離後の写真（中図、各比重毎に分画されている）、および有核赤血球と好中球を主に含む比重に対応する分画を回収し、生理食塩水で2倍希釈した際の写真（右図）として示す。

[0063] 密度勾配遠心分離後、回収し、0.9% (g/mL) NaCl水溶液を用いて2倍希釈した有核赤血球含有層は、Percollを多量に含んでいる。このため、残留しているPercollは、遠心分離をさらに行うことで、血球の上層へ多く移動し、アスピレーターを用いて除去する。上記のPercoll除去法を洗浄と呼称する。洗浄は、3回以上行う。この結果を、図7に示す。図6右図の試料を遠心分離した後の写真（左図）、およびPercoll含有層を取り除いた後の写真（右図）である。

[0064] 洗浄し、回収した血液の全量は、約30 μ L~60 μ Lにすることができ、全体量を少量にした。有核赤血球の濃縮は、1視野あたりの血球数が減少していたことから、できていると言える。結果を図8に示す。左図は、全血をメイグリュンワルド-ギムザ染色法で染色し、顕微鏡で有核赤血球を観察した際の画像である。右図、Percoll遠心分離後の血球をメイグリュンワルド-ギムザ染色法で染色し、顕微鏡で有核赤血球を観察した際の画像である。

[0065] 2. 密度勾配遠心分離後の血液をチップへ導入する

2.1 チップの原理

実施例1で作製したチップを用いての有核赤血球の回収は、分離用狭流路である流路の間隙部に有核赤血球を留めかつ無核赤血球等は通過させ（図9左図）、その後、中間膜を動作させる（図9右図）ことで行う。間隙部の高さは、微小間隙部の最適化で行い1.0 μ mにした。血液が流路通過時に淀みを生じることがあり、これに対する解消案は、微小間隙部の最適化で述べた。

[0066] 2.2 血液をチップへ導入する

2.1で血液量を少なくした母体血(30 μ L~60 μ L)を4倍希釈しチップへ導入する。導入する速度は、10 μ L/minで行う。中間膜動作前にリザーバー部まで通過した血液は、マイクロピペッターを用いて逐次回収した。図10（左図）に用いたPDMSチップの外観を示す。右図は、血球試料溶液を送液し、間隙部に

留まる血球を顕微鏡で観察した際の画像である。

[0067] 間隙部に留まった血球は、0.9% (g/mL) NaCl水溶液を追加して導入し、中間膜を動作させ、リザーバー部で回収する。図11が、この時の様子を示す画像である。左図は、血球試料溶液を送液し、間隙部を通り抜ける血球を顕微鏡で観察した際の画像である。右図は、中間膜を動作させることで、間隙に留まっていた血球がリリースされる様子を顕微鏡で観察した際の画像である。

[0068] <導入後の血球>

間隙部入口に留まった血球をリリースし、リザーバー部から回収した。回収した溶液をギムザ染色して標本作製し、顕微鏡で有核赤血球を確認した写真を図12に示す。矢印は、有核赤血球を示す。

[0069] 上記操作を、間隙（分離用狭流路）の高さが $1.0\mu\text{m}$ 、 $1.4\mu\text{m}$ または $1.85\mu\text{m}$ である3種類のチップを用いて実施した。発見した有核赤血球の数は、間隙の高さに応じて減少していた。間隙（分離用狭流路）の高さが $1.0\mu\text{m}$ 、 $1.4\mu\text{m}$ 、 $1.85\mu\text{m}$ の時、留まった有核赤血球は、各々8細胞、6細胞、3細胞だった。それぞれの回収率は、 $8/8$ 、 $6/8$ 、 $3/8$ であった。有核赤血球の回収率は、間隙の高さ $1.0\mu\text{m}$ の時もっとも高い値を指している。つまり、有核赤血球を留めるに有利な間隙の高さは、 $1.0\mu\text{m}$ 以下であるといえる。回収されたサンプル中に赤血球は、確認できなかった。これは、赤血球がほとんど間隙部を通過していたためだと考えられる。以上のことから、チップへ導入した後では、チップへ導入する前よりも有核赤血球以外の血球がほとんどなかったため、有核赤血球の濃縮ができたといえる。

[0070] 実施例3

次に実施例2のチップを用いて、白血球と赤血球の除去率を求めた。まず、母体血1 mL中のもとの白血球数と赤血球数をFACSで計測する。また同じ母体血1 mLを微小間隙 $1.0\mu\text{m}$ のチップに通し、回収した通過液中の白血球数と赤血球数をFACSで計測する。間隙通過後の液中の血球数を、もとの母体血中の血球数で割って100を掛けたものを通過率(%)とし、 $100 - \text{通過率}$ を捕捉率とし、これを赤血球と白血球についてもとめる。そのほかの条件は実施

例2と同じである。

- [0071] 次にこの結果を示す。母体血 1 mL 中のもとの赤血球数は 3.63×10^9 個であった。通過した赤血球数は 3.40×10^9 個であった。これより赤血球通過率は 93.6%、赤血球捕捉率は 6.34% であった。また、母体血 1 mL 中の白血球数は 1.66×10^7 個であった。通過した白血球数は 1.64×10^7 個であった。これより白血球通過率は 98.7% であり、白血球捕捉率は 1.27% であった。
- [0072] 有核赤血球よりも、大きい白血球がかなりの率で除去できることは特筆すべきことである。これは、白血球は、脱核前の有核赤血球よりも、生きた核を持っており、柔軟性に富み、変形しやすいからと考えられる。
- [0073] 以上より、本実施例における白血球と赤血球の除去率はおよそ 95% であり、全体の血球数を約 20 分の 1 に減らすことができる。これは、そのまま自動画像処理に要する時間を 20 分の 1 に短縮できることを示し、効果は絶大である。

産業上の利用可能性

- [0074] 本発明は、有核赤血球濃縮用チップの製造および利用分野に有用である。

符号の説明

- [0075] 1 チップ
- 10 入口側流路
 - 11 入口側流路に連絡する入口
 - 20 出口側流路
 - 21 出口側流路に連絡する出口
 - 30 分離用狭流路
 - 31 スペーサー
 - 40 可撓性膜（中間膜B）
 - 50 空気室
 - 51 空気室に連絡する口

請求の範囲

- [請求項1] 任意の粒子径と任意の変形性を有する少なくとも1種類の粒状物(以下粒状物Aと呼ぶ)と前記粒状物Aより大きな粒子径と前記粒状物Aより低い変形性を有する少なくとも1種類の粒状物(以下粒状物Bと呼ぶ)との混合物から、前記粒状物Bを濃縮するために用いるマイクロ流路チップであって、
入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、
分離用狭流路は、内壁が、前記粒状物Aは通過しやすく、かつ前記粒状物Bは通過しにくい寸法を有し、かつ
前記流路の内壁の一部を変形または移動させて前記粒状物Bが通過しやすい寸法にする手段を有する
前記マイクロ流路チップ。
- [請求項2] 有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップであって、
入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、
分離用狭流路は、内壁が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血球は通過しにくい寸法を有し、かつ
前記流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする手段を有する
前記マイクロ流路チップ。
- [請求項3] 前記分離用狭流路の内壁は、流路に垂直の断面の高さが $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、幅が $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の範囲であり、流路の長さは $2\mu\text{m}\sim 1\text{m}$ の範囲である請求項2に記載のマイクロ流路チップ。
- [請求項4] 有核赤血球濃縮用マイクロ流路チップであって、
入口側流路、出口側流路及び入口側流路と出口側流路の間に分離用狭流路を有し、
分離用狭流路は、内壁が、無核赤血球は通過しやすく、かつ有核赤血

球は通過しにくい寸法を有し、かつ

前記寸法が、流路に垂直の断面の高さが $1\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、幅が $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の範囲であり、流路の長さは $2\mu\text{m}\sim 1\text{m}$ の範囲である

前記マイクロ流路チップ。

[請求項5] 複数の分離用狭流路は、スペーサーで隔てられており、スペーサーの出口側流路に面する面は、出口側流路側に凸型形状の曲面であり、及び／又はスペーサーの入口側流路に面する面は、入口側流路側に凸型形状の曲面である請求項1～3のいずれかに記載のマイクロ流路チップ。

[請求項6] 分離用狭流路の内壁を変形または移動させる手段が、分離用狭流路の内壁の少なくとも一部として設けた可撓性膜及びこの可撓性膜の流路と反対側に設けた圧力調整可能室から構成される請求項1～3、5のいずれかに記載のマイクロ流路チップ。

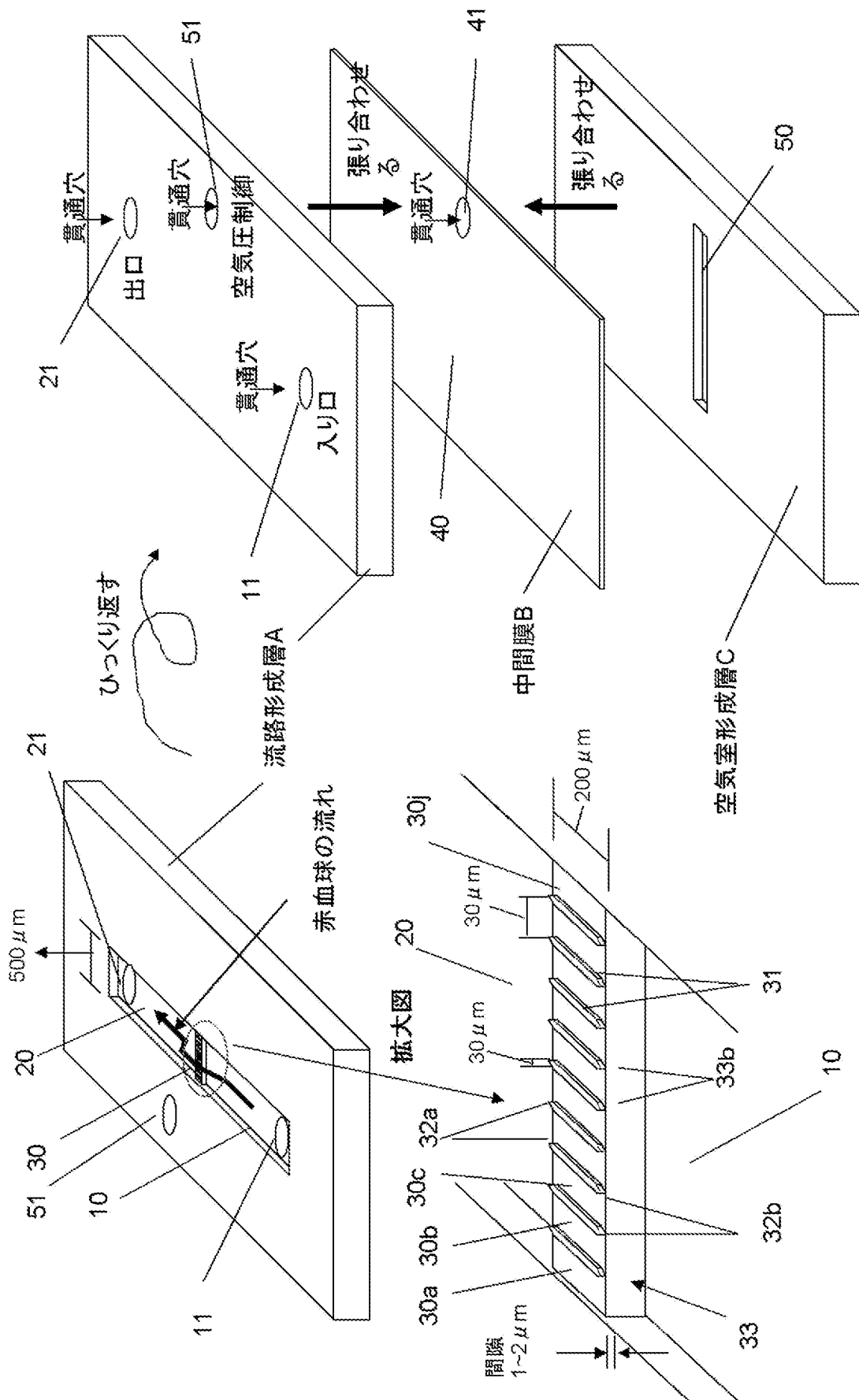
[請求項7] 入口側流路、出口側流路及び分離用狭流路はチップに内蔵されており、チップ表面に入口側流路に連絡する入口、出口側流路に連絡する出口、及び空気室に連絡する口を有する請求項6に記載のマイクロ流路チップ。

[請求項8] 各流路の内壁は、細胞付着防止コーティングや、非特異的吸着防止コーティングで表面処理されている請求項1～7のいずれかに記載のマイクロ流路チップ。

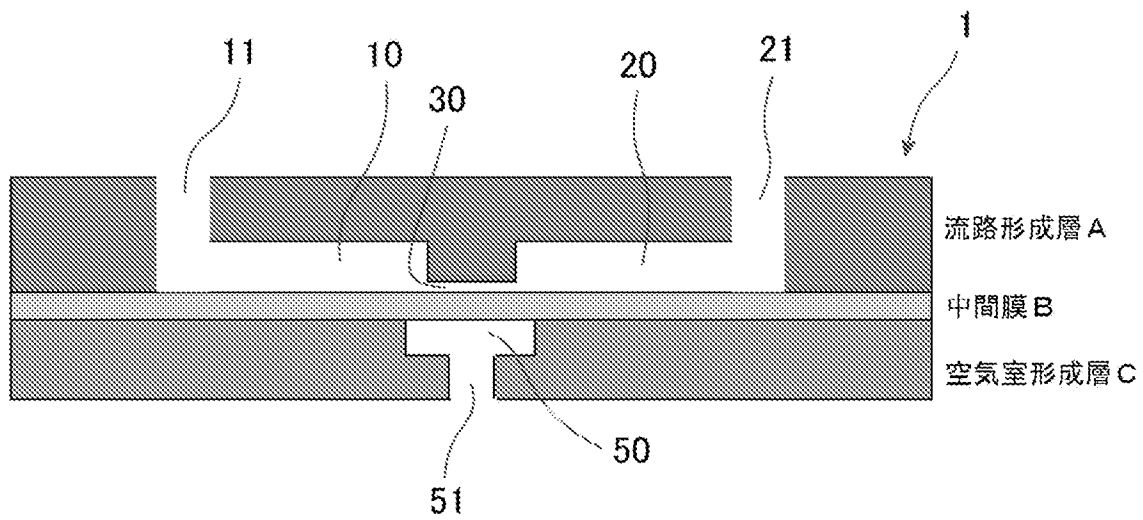
[請求項9] 請求項2～3、5～8のいずれか1項に記載のマイクロ流路チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで流路の内壁の一部を変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にした状態で、入口側流路から回収液を供給し、出口側流路から有核赤血球に富む液を回収することを含む、有核赤血球が濃縮された液の回収方法。

- [請求項10] 請求項4に記載のマイクロ流路チップの入口側流路から、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給し、出口側流路から分離用狭流路を透過した液を回収し、次いで入口側流路または出口側流路から回収液を供給し、出口側流路または入口側流路から有核赤血球に富む液を回収することを含む、有核赤血球が濃縮された液の回収方法。
- [請求項11] 無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料が、percollを用いた密度勾配遠心分離で1.070g/ml～1.095g/mlの密度の画分を回収したものである請求項9または10に記載の方法。
- [請求項12] 無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料が、回収した画分を生理的条件の食塩濃度を有する食塩水で、希釈されたものである請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 請求項6または7に記載のマイクロ流路チップを用い、無核赤血球及び有核赤血球を含有する試料を供給する際には、圧力調整可能室を分離用狭流路に対して陽圧にして、流路の内壁の一部が空気室側に凹むように変形することを防止する請求項9、11～12のいずれかに記載の方法。
- [請求項14] 請求項6または7に記載のマイクロ流路チップを用い、空気室内を分離用狭流路に対して減圧にすることで、流路の内壁の一部を空気室側に凹むように変形または移動させて有核赤血球が通過しやすい寸法にする、請求項9、11～13のいずれかに記載の方法。
- [請求項15] 請求項6または7に記載のマイクロ流路チップを用い、空気室内を分離用狭流路に対して減圧にすることで、流路の内壁の一部を空気室側に凹むように変形または移動させて、液の導入時、または洗浄時、気泡の除去時に、液が容易に分離用狭流路を通過できる寸法にする、請求項9、11～14のいずれかに記載の方法。

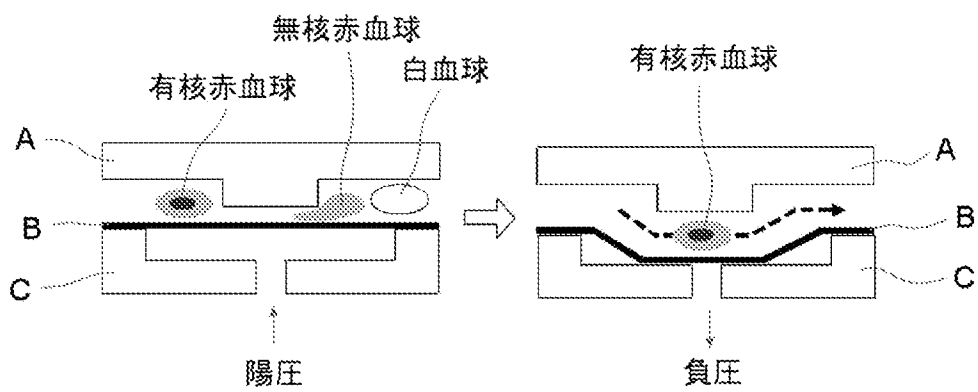
[図1]



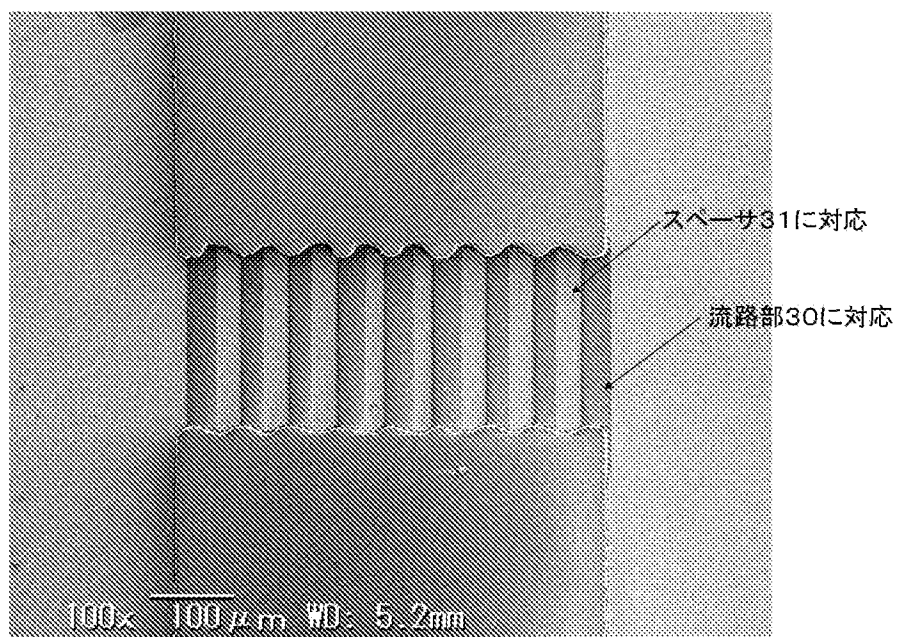
[図2]



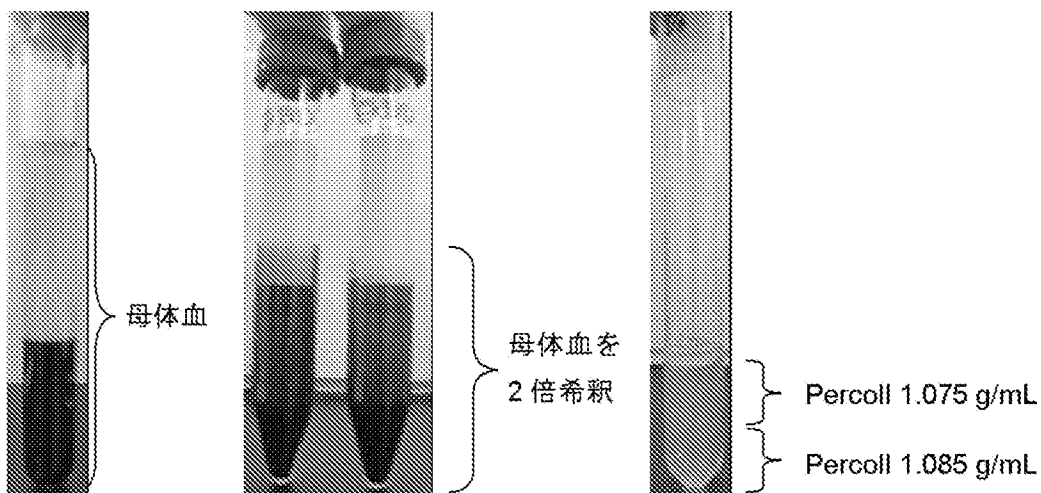
[図3]



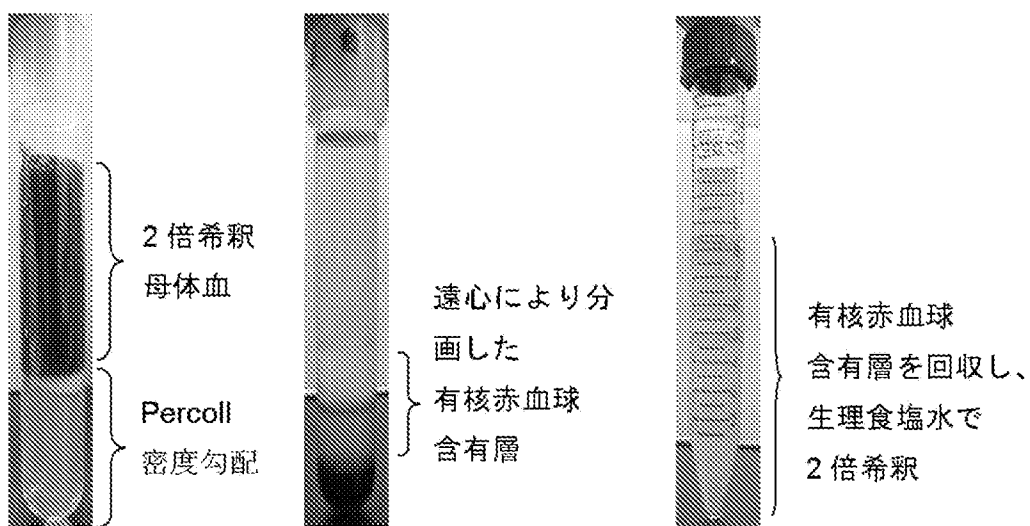
[図4]



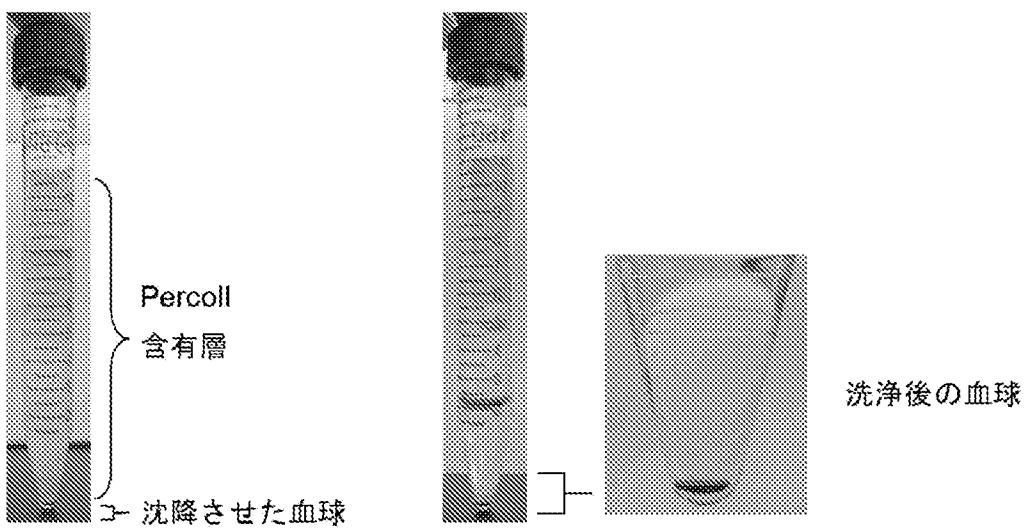
[図5]



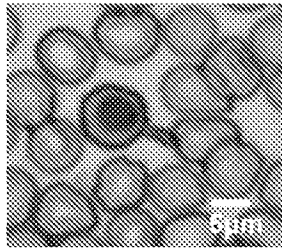
[図6]



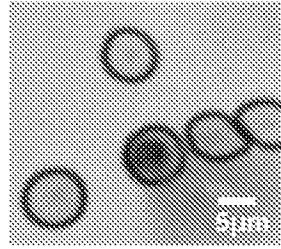
[図7]



[図8]

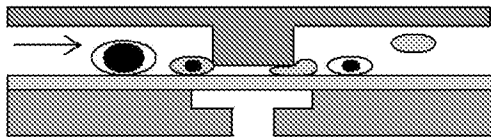


全血に含まれる
有核赤血球

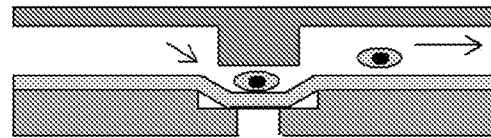


Percoll 遠心分離後
に含まれる有核赤
血球

[図9]

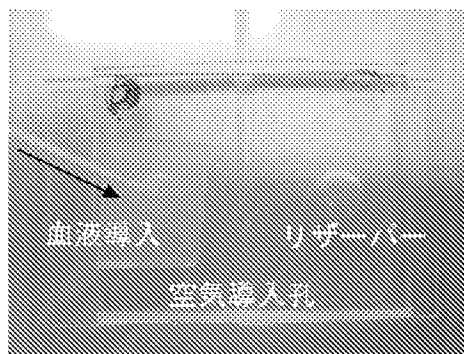


中間膜動作前



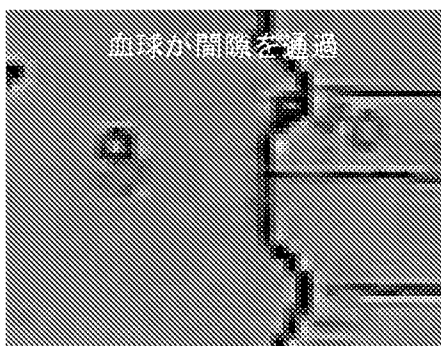
中間膜動作後

[図10]

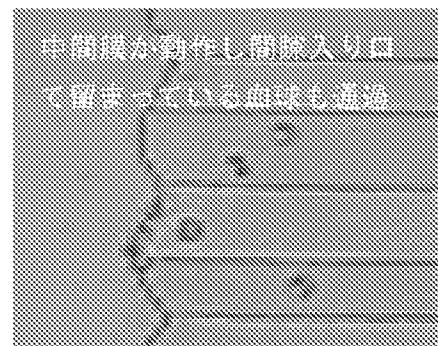


血球が隙間に留まっている

[図11]

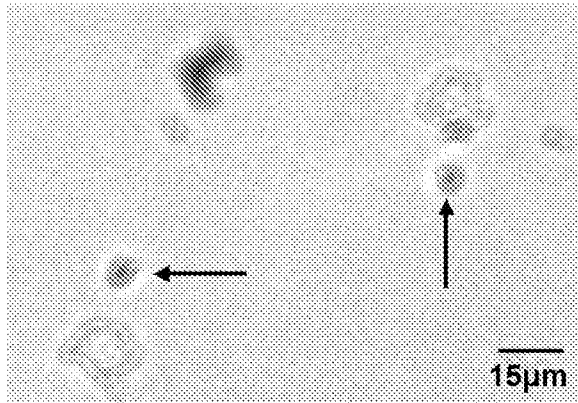


血球が隙間を通過



中間膜が動作し隙間入り口
で留まっている血球も通過

[12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/065058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/48(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i, G01N33/49(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

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)

G01N33/48, C12M1/00, C12N5/078, G01N33/49, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2005-851 A (Kanagawa Academy of Science and Technology), 06 January 2005 (06.01.2005), entire text; all drawings (Family: none)	1, 6, 7, 9/2, 3, 8, 11-15
X/Y	Mohamed, H. et al., Biochip for separating fetal cells from maternal circulation., J Chromatogr A, Vol.1162(2), 2007, p.187-192, particularly, Abstract	4, 5, 10/2, 3, 8, 11-15
Y	JP 2006-501449 A (The General Hospital Corp.), 12 January 2006 (12.01.2006), paragraph [0064] & US 2006/0134599 A1 & EP 1569510 A & WO 2004/029221 A2 & CA 2500392 A & AU 2003277153 A	8

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 October, 2010 (27.10.10)

Date of mailing of the international search report
09 November, 2010 (09.11.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/065058

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Haruo TAKABAYASHI, "Botai Kecchu Taiji Yukaku Sekkekkyu Bunri Kaishu Bunseki", Gene & medicine, 2001, vol.5, no.3, pages 392 to 393, entire text, all drawings	11,12
P,X	Takeshi KUMO et al., "Bisho Kangeki Kozo o Mochiita Yukaku Sekkekkyu Noshuku ni Okeru Kekkyu Bunri Tokusei", Extended Abstracts, Japan Society of Applied Physics and Related Societies (CD-ROM), 03 March 2010 (03.03.2010), vol.57th, page ROMBUNNO.19P-ZD-5	1-15
P,X	Takeshi KUMO et al., "Bisho Kangeki o Mochiita Taiji Yurai Yukaku Sekkekkyu no Chushutsu", Extended abstracts; the Japan Society of Applied Physics, 08 September 2009 (08.09.2009), vol.70th, no.3, page 1195	1-15
P,X	Takeshi KUMO et al., "Bisho Kangeki to Diaphragm Kozo no Kumiawase ni yoru Taiji Yurai Yukaku Sekkekkyu no Hosoku Oyobi Kaishu", Society for Chemistry and Micro-Nano Systems Koen Yoshishu, 07 November 2009 (07.11.2009), vol.20th, page 113	1-15
A	WO 2003/050532 A1 (Netech Inc.), 19 June 2003 (19.06.2003), & US 2005/0214758 A1 & EP 1462800 A1 & WO 2003/050532 A1 & CA 2469878 A & CN 1615437 A	1-15
A	JP 2009-504154 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON), 05 February 2009 (05.02.2009), & US 2007/0037172 A1 & US 2008/0248499 A1 & EP 1940538 A & WO 2007/021409 A1 & WO 2008/157220 A1	1-15
A	WO 2008/011486 A2 (BIOCEPT, INC.), 24 January 2008 (24.01.2008), & JP 2009-544043 A & US 2006/0160243 A1 & US 2009/0136982 A1 & EP 2052074 A & CA 2658336 A & KR 10-2009-0033899 A & CN 101535466 A & IL 196553 D & KR 10-2007-0116585 A & CN 101102847 A & IL 184345 D	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i, G01N33/49(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

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))
 Int.Cl. G01N33/48, C12M1/00, C12N5/078, G01N33/49, G01N37/00

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 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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(JDreamII)

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
X /Y	JP 2005-851 A (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2005.01.06, 全文、全図 (ファミリーなし)	1, 6, 7, 9 /2, 3, 8, 11-15
X /Y	Mohamed, H. et al., Biochip for separating fetal cells from maternal circulation., J Chromatogr A, Vol.1162(2), 2007, p.187-192、特に Abstract	4, 5, 10 /2, 3, 8, 11-15

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	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 27. 10. 2010	国際調査報告の発送日 09. 11. 2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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 2006-501449 A (ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション) 2006.01.12, 【0064】 & US 2006/0134599 A1 & EP 1569510 A & WO 2004/029221 A2 & CA 2500392 A & AU 2003277153 A	8
Y	高林晴夫, 母体血中胎児有核赤血球 分離・回収・分析, 遺伝子医学, 2001, Vol.5 No.3, Page.392-393、全文、全図	11, 12
PX	雲健史 他, 微小間隙構造を用いた有核赤血球濃縮における血球分離特性, 応用物理学関係連合講演会講演予稿集(CD-ROM), 2010.03.03, Vol.57th Page.ROMBUNNO.19P-ZD-5	1-15
PX	雲健史 他, 微小間隙を用いた胎児由来有核赤血球の抽出, 応用物理学学会学術講演会講演予稿集, 2009.09.08, Vol.70th No.3, Page.1195	1-15
PX	雲健史 他, 微小間隙とダイアフラム構造の組み合わせによる胎児由来有核赤血球の捕捉および回収, 化学とマイクロ・ナノシステム研究会講演要旨集, 2009.11.07, Vol.20th, Page.113	1-15
A	WO 2003/050532 A1 (株式会社ネーテック) 2003.06.19, & US 2005/0214758 A1 & EP 1462800 A1 & WO 2003/050532 A1 & CA 2469878 A & CN 1615437 A	1-15
A	JP 2009-504154 A (ユニバーシティ・オブ・ワシントン) 2009.02.05, & US 2007/0037172 A1 & US 2008/0248499 A1 & EP 1940538 A & WO 2007/021409 A1 & WO 2008/157220 A1	1-15
A	WO 2008/011486 A2 (BIOCEPT, INC.) 2008.01.24, & JP 2009-544043 A & US 2006/0160243 A1 & US 2009/0136982 A1 & EP 2052074 A & CA 2658336 A & KR 10-2009-0033899 A & CN 101535466 A & IL 196553 D & KR 10-2007-0116585 A & CN 101102847 A & IL 184345 D	1-15