

明 細 書

発明の名称：細胞を分離する方法、およびそのためのデバイス

技術分野

[0001] 本発明は、それぞれに異なる表面特性を備える複数の細胞群の中から、特定の表面特性を有する細胞群を選択的に分離する方法に関する。また、本発明は、血液等、細胞を含む細胞懸濁液に含まれる微小凝集物を除去する方法、及びこの微小凝集物除去機構を備えたデバイス、並びに細胞分離部分を備えたデバイスに関する。

背景技術

[0002] 特定の細胞を液性の混合試料（例えば血液や培養液）から分離することは、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。一般的には、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）を分離するのに有用であることが知られている。他にも、フローサイトメトリー法や磁気分離方法といった方法も当該目的に有用であることが判明しており、また、特許文献1にあるように液性の混合試料から、細胞をその大きさによってフィルター構造によって分離する方法も知られている。更に、特許文献2にあるように細胞をその大きさによって決定論的横置換法（Deterministic Lateral Displacement : DLD）と呼ばれる原理を用いた流体デバイスを用いて分離する方法も知られている。

[0003] しかしながら、特許文献1、2に記載の分離方法では、液性の混合試料から細胞自身の大きさによって分離を行う方法であるため、異なる種類の細胞であっても、大きさが近似している細胞を分離することは困難である。また、特許文献3に記載の分離方法では、細胞を複合粒子とした後にふるい膜を用いた分離方法を用いているが、このような分離方法をもちいた場合、洗浄の工程を伴うなどの処理に手間がかかることや細胞のロスが生じることなどが問題となっており、迅速で簡便かつ高精度の分離精製方法が必要とされる

。このほかにも、特許文献4～6のような方法が提案されている。

[0004] また、血液中の細胞についても、細胞の大きさ等により分離することも試みられている。しかしながら、血液中の循環腫瘍細胞（C T C）の分離は、白血球細胞（ $10 - 20 \mu m$ ）と大きさが近似しているため、上記D L D原理に基づく方法では、分離が困難であった。

[0005] 更に、特許文献1、2に記載の分離方法では、試料中に存在する微小凝集物の影響により、分離の基本原理解部分で目詰まりを生じるため、分離の精度を低下させ、または分離を不可能にさせる場合がある。

[0006] 微小凝集物は、フィブリン、その他の変性タンパク質、脂肪等が凝集して出来る。そして、微小凝集物は白血球等の血球細胞と同等程度の大きさのものから、 $200 \mu m$ を超えるものもあり、粘性を有していることが特徴である。これらの微小凝集物は、採取直後の新鮮な試料中においても存在しており、保存期間が長いほど、保存温度が低いほど、その数が増し、大きさも増していく傾向がある。また、採取時に抗凝固剤等を混合した試料であっても、この微小凝集物が存在していることが特徴である。

[0007] このため、これらの微小凝集物を除去せずに、公知の細胞分離処理を実施すると、微小凝集物によってデバイス中の一部において目詰まりが生じ、目的とする細胞の分離精度が低下することや、処理そのものが困難となる場合がある。

[0008] これに対し、特許文献7、特許文献8にあるような微小凝集物除去フィルターを用いた微小凝集物除去の方法が開示されている。しかしながら、これらの方法では、大量の試料を処理できるが、目的とする細胞の損失が生じ、試料中に含まれる希少な細胞を損失することなく分離する際には不適である。また、市販のナイロンメッシュフィルターを用いたろ過除去方法では、目的とする細胞の損失が生じる得ることや、微小凝集物が完全に除去できない場合がある。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公報第2009/097247号

特許文献2：米国特許第7735652号

特許文献3：特表2008-507956号公報

特許文献4：国際公報第2011/111740号

特許文献5：特表2013-501924号公報

特許文献6：特開2013-142540号公報

特許文献7：特開2010-213820

特許文献8：特開2005-204781

非特許文献

[0010] 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

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、細胞の大きさが近似していることから、大きさによる分離が難しい細胞を、細胞の表面特性の相違を利用して、精度良く、迅速、簡便に分離する方法を提供することを課題とするものである。また、本発明は、血液等、細胞を含む細胞懸濁液から、含まれる目的細胞を精度良く分取する際の前処理に用いる方法であり、試料中の目的細胞を損失なく、かつ試料中の微小凝集物を精度良く除去することで、その後の細胞分離において、より精度良く目的の細胞を分取することができる方法、およびデバイスを提供することを課題とするものである。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明の一つの態様は、決定論的横置換法（DL D）の原理を応用し、担体に目的細胞又は目的外細胞を捕捉させて粒子サイズを増加させた後に、DL D原理に基づいて粒子サイズにより細胞を分離する方法に関する。

[0013] まず、本発明の第一の態様は、目的細胞及び目的外細胞の2種類以上の細

胞を含む細胞懸濁液から、連続的な液体の流れ中で、サイズにより細胞を分離する方法であって、

前記目的細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉物質を、前記細胞懸濁液に加えて、前記目的細胞と前記対象捕捉物質との複合体を生成する工程と、

前記複合体を含む細胞懸濁液を、DLDマイクロ流路構造を有する分離エリアを備える細胞分離デバイスに導入する工程であって、前記細胞分離デバイスのバッファー導入口にバッファーを加えて流し、および前記細胞懸濁液をサンプル導入口に加えて流し、前記細胞分離デバイスの複数の分離エリア中を通過させる工程と、

前記細胞懸濁液から、決定された閾値以上のサイズを有する複合体を分離する工程であって、閾値よりも小さいサイズを有する細胞は細胞懸濁液の流れと一緒に移動し、且つ閾値以上のサイズを有する複合体は流れに対し斜め方向に変位して移動することで分離する工程と、および、

分離された前記複合体を排出口から回収する工程と、
を備える細胞の分離方法である。

[0014] また、本発明の第二の態様は、目的細胞及び目的外細胞の2種類以上の細胞を含む細胞懸濁液から、連続的な液体の流れ中で、サイズにより細胞を分離する方法であって、

前記目的外細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉物質を、前記細胞懸濁液に加えて、前記目的外細胞と前記対象捕捉物質との複合体を生成する工程と、

前記複合体を含む細胞懸濁液を、DLDマイクロ流路構造を有する分離エリアを備える細胞分離デバイスに導入する工程であって、前記細胞分離デバイスのバッファー導入口にバッファーを加えて流し、および前記細胞懸濁液をサンプル導入口に加えて流し、前記細胞分離デバイスの複数の分離エリア中を通過させる工程と、

前記細胞懸濁液から、決定された閾値以上のサイズを有する複合体を分離

する工程であって、閾値よりも小さいサイズを有する細胞は細胞懸濁液の流れと一緒に移動し、且つ閾値以上のサイズを有する複合体は流れに対し斜め方向に変位して移動することで分離する工程と、および、

分離された前記目的細胞を排出口から回収する工程と、
を備える細胞の分離方法である。

[0015] さらに、本発明では、前記対象捕捉物質が、前記目的細胞又は前記目的外細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉分子と、前記対象捕捉分子を担持する物質との複合体からなることが好ましく、前記対象捕捉分子が、抗体、ペプチドアプタマー、レクチン、細胞間接着分子、糖鎖、細胞認識性の高分子であることが好ましく、前記対象捕捉分子を担持する物質が、ポリスチレン又はラテックスであることが好ましい。

[0016] また、本発明では、決定された閾値が $20 \sim 60 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $30 \sim 50 \mu\text{m}$ であることが更に好ましい。さらに、本発明では、前記細胞懸濁液が血液であることが好ましく、前記目的細胞が腫瘍細胞であることが好ましく、循環腫瘍細胞であること、または上皮系腫瘍細胞であることが更に好ましい。

[0017] また、本発明の別の態様は、目的細胞および微小凝集物を含む細胞懸濁液から、連続的な液体の流れ中で微小凝集物を除去する方法であって、第2のマイクロ流路構造を有する除去機構を備える微小凝集物除去デバイスに、細胞懸濁液または細胞懸濁液とバッファー液との混合液を流し、微小凝集物除去デバイスのマイクロ流路中を通過させて、微小凝集物を捕捉する工程、を備えた、微小凝集物を除去する方法である。この微小凝集物を除去する方法は、微小凝集物を含む細胞懸濁液（血液等）中の微小凝集物を除去する方法として有用である。また、この微小凝集物を除去する方法を、上記細胞の分離方法と組み合わせて使用すると、より好適に細胞を分離方法することが出来る。

[0018] この目的細胞は、目的細胞と担体物質との複合体を含有しても良い。また、この第2のマイクロ流路構造は、 $30 \mu\text{m}$ より大きい間隔で設置されたピ

ラーにより構成されていることが好ましい。また、この第2のマイクロ流路構造のピラー設置間隔は、微小凝集物を含む細胞懸濁液から目的細胞（例えば、血液から循環腫瘍細胞[CTC]）を分離する場合、上記細胞を分離方法と組み合わせて使用する際、ピラー設置間隔は、例えば、 $80\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ と設定すればよく、 $100\mu\text{m}\sim 230\mu\text{m}$ と設定することがより好ましく、 $120\mu\text{m}\sim 220\mu\text{m}$ と設定することが、更に好ましい。

[0019] また、この細胞懸濁液は血液であることが好ましく、さらに、この血液は、抗血液凝固試薬が添加されていることが好ましく、この抗血液凝固剤は、トロンビンインヒビターであることがより好ましく、このトロンビンインヒビターは、PACKであることが、特に好ましい。

[0020] さらに、本発明の別の態様は、第2のマイクロ流路構造を有する除去機構を備える微小凝集物除去デバイスであって、第2のマイクロ流路構造は、 $30\mu\text{m}$ より大きい間隔で設置されたピラーにより構成され、第2のマイクロ流路の前方には試料導入口を、マイクロ流路の後方には試料排出口を有することを特徴とする微小凝集物除去デバイスである。この第2のマイクロ流路構造は、2つの別々のマイクロ流路構造部分から構成されることが好ましく、この2つの別々のマイクロ流路構造部分の間には、流れ幅を収束させる部分を有することが好ましい。

[0021] さらに、本発明の別の態様は、第2のマイクロ流路構造を有する微小凝集物除去部分と、細胞を分離する細胞分離部分とを連続して備える一体型細胞分離デバイスであって、第2のマイクロ流路構造は、 $30\mu\text{m}$ より大きい間隔で設置されたピラーにより構成され、第2のマイクロ流路構造の前方には試料導入口を、細胞分離部分の後方には試料排出口を有し、微小凝集物を除去する部分の後方に、細胞を分離する部分を連続して備えることを特徴とする一体型細胞分離デバイスである。この細胞を分離する部分が、決定論的横置換法(DLD)に基づくサイズ分画による分離構造であることを特徴とする一体型細胞分離デバイスであることが好ましい。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、従来技術に比較し、細胞自身の大きさの差による分離が困難な細胞を精度良く、迅速、簡便に分離することができる。また、本発明の方法によれば、流路に導入された目的細胞と、目的外細胞に大きさの差異を生じさせて、目的細胞を目的外細胞と分離することにより、細胞自体に加わるダメージが小さいうえに、目的細胞を高精度でかつ選択的に分離することもできる。また、目的細胞の分離に際して、複雑な装置、工程を必要とせず、単純な構造の流路によって目的細胞を分離できる。

[0023] また、本発明によれば、従来技術に比較し、目的とする細胞の損失が無く、含まれる微小凝集物を精度良く除去することができる。また、本発明によれば、細胞分離デバイスを用いた手法において、一体型の連続した流路構造とすることにより、微小凝集物を除去した後に目的の細胞を精度良く分離することができる。さらに、本発明の一体型細胞分離デバイスを使用すると、微小凝集物除去機構を有しないデバイスと比較して、送液中の詰まりを防止し、比較的多くの溶液から細胞を分離して処理することが出来る。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]本発明の実施形態に係る分離方法の基本原理を説明する模式図である。

[図2]本発明の実施形態に係るDLDマイクロ流路の基本構造（分離エリア）を備えた分離デバイスを説明する模式図である。

[図3]本発明の実施形態に係るDLDマイクロ流路の基本構造を備えた分離デバイスの鉛直方向断面模式図である。

[図4]本発明の実施形態に係る送液部および回収部を備えた分離装置を説明する模式図である。

[図5]本発明の実施形態に係る細胞を含む細胞懸濁液及び対象捕捉物質を説明する模式図である。

[図6]本発明の実施形態に係る目的細胞を捕捉する分離方法を説明する模式図である。

[図7]本発明の実施形態に係る目的外細胞を捕捉する分離方法を説明する模式図である。

[図8]本発明の実施例 1 ～ 3 を説明するための模式図である。

[図9]本発明の実施例 4 を説明するための模式図である。

[図10]本発明の実施形態に係る微小凝集物を除去する方法を説明する模式図である。

[図11]本発明の実施形態に係る微小凝集物除去デバイスのピラー構造を説明する模式図である。

[図12]本発明の実施形態に係る微小凝集物除去デバイスを説明する模式図である。

[図13]本発明の実施形態に係る微小凝集物除去デバイス（２つのマイクロ流路構造を有する態様）を説明する模式図である。

[図14]本発明の実施形態に係る微小凝集物除去デバイスの側面方向の断面模式図である。

[図15]本発明の実施形態に係る微小凝集物除去機構を備えた細胞分離デバイスを説明する模式図である。

[図16]本発明の実施例を説明するための模式図である。

[図17A]本発明の実施例を説明するための微小凝集物の除去の様子（デバイス導入口近傍）を示す図である。

[図17B]本発明の実施例を説明するための微小凝集物の除去の様子（デバイス中間部）を示す図である。

[図17C]本発明の実施例を説明するための微小凝集物の除去の様子（デバイス排出口近傍）を示す図である。

[図17D]本発明の実施例を説明するための微小凝集物の除去の様子（処理前の試料）を示す図である。

[図17E]本発明の実施例を説明するための微小凝集物の除去の様子（処理後の試料）を示す図である。

[図18A]本発明の実施例を説明するための分離デバイスにおいて詰まりが解消された様子を示す図である。

[図18B]本発明の実施例を説明するための分離デバイスにおいて詰まりが解消

された様子を示す図である。

[図19]本発明の比較例を説明するための分離デバイスにおける詰まりの様子を示す図である。

[図20A]一体型の細胞分離デバイスの一例を示す平面図である。

[図20B]一体型の細胞分離デバイスの一例を示す側面図である。

[図21]一体型の細胞分離デバイスの平面図、流れ幅を収束させる部分の拡大図および、細胞分離部分の拡大図である。

[図22]血液サンプルに特定の抗体を付着させたビーズを加えたサンプルの希釈溶液および、その拡大図である（細胞分離前）。

[図23]本発明の分離方法により、目的細胞（ビーズ[黒色部分]および腫瘍細胞[白色部分]の複合体：(c)および拡大図(d)）と目的外細胞（赤血球等(a)）が分離されたことを示す図である。なお、写真(c)と写真(d)の撮影条件は異なる。

[図24]分離前の希釈溶液と、本発明の細胞分離方法により分離された目的細胞およびその他血球細胞等を示す。

発明を実施するための形態

[0025] 1. 本発明の細胞を分離する原理

本発明は、決定論的横置換法（DL D）の原理を応用し、担体に目的細胞又は目的外細胞を捕捉させて粒子サイズを増加させた後に、DL D原理に基づいて粒子サイズにより細胞を分離する方法に関するものである。

[0026] 図1は、本発明の実施形態に係る分離方法の基本原理を説明する模式図である。分離の基本原理には決定論的横置換法（D e t e r m i n i s t i c L a t e r a l D i s p l a c e m e n t : D L D）と呼ばれる手法を用いている。

[0027] 1-1. 決定論的横置換法（DL D）

決定論的横置換法（DL D）とは、わずかにずれたピラー構造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 1 を参照）。決定論的横置換法とよばれる、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る方法では、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とになる。

[0028] 一般的に、この DLD 原理は、細胞の分離、例えば、血液中の成分、赤血球、白血球、CTC の分離にも応用されている。寸法選別マイクロポスト構造上に血液細胞を流すことで、DLD を用いたマイクロ流体デバイス中を通過させることで、細胞の大きさにより、DLD マイクロ流路により大きめの細胞を選び出すことが出来る。しかしながら、血液中に存在する腫瘍細胞は、白血球と細胞の大きさが近似しているため、両者を分けて分離することは困難である。

[0029] 本発明では、後述するように、目的細胞又は目的外細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉物質を、細胞懸濁液に加えて、目的細胞又は目的外細胞と対象捕捉物質との複合体を生成させることにより、大きさに差異を設けた後に、DLD マイクロ流路の基本構造を有する細胞分離デバイスを利用して、細胞を分離するものである。

[0030] 1-2. DLD 原理における斜方向に変位する粒子直径の閾値、細胞分離デバイス

非特許文献 1 に記載の DLD 原理に基づいて、分離をしたい粒径により、斜方向に変位する粒子直径の閾値 (D_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、以下の式から求めることが出来る。

$$D_c = 2 \eta G \varepsilon \quad \text{式 1}$$

D_c : 斜方向に変位する粒子直径の閾値

η : 変数

G : ピラー間ギャップ

ε : ピラーのずれ角度 ($\tan \theta$)

[0031] そして、上記式 1 を解くと、下記の近似式 2 が得られる。

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

[0032] そして、経験則から、 $0.06 < \varepsilon < 0.1$ 程度の場合に良好であることから、

$\varepsilon = \tan \theta = 1 / 1.5 = 0.67$ を用いて、以下の関係式を導くことが出来る。

$$G \div 2.62057 D_c \quad \text{式 3}$$

[0033] そして、上記の式から、斜方向に変位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 を算出して、特定のピラー間ギャップのピラー（障害物構造）が設置された基本構造部分を有する細胞分離デバイスを作製することが出来る。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細胞分離デバイスを作製することが出来る。

[0034] まず、図 1 では、DLD マイクロ流路の基本構造 20（分離エリア）が示され、矢印方向に向かう流体の流れ方法に対し、一定の規則に従い斜めに配列した障害物構造 21 が設けられている。矢印方向に向かう流体中において、障害物構造 21 周辺部においては流れ速度の変化が生じる。この連続して配列された障害物構造 21 による流れ速度の変化を利用し、ある一定の大きさを閾値として、流体中に含まれる粒子について大きさ依存的に進行方向を変化させることができる。

[0035] 進行方向の変化について、ある一定の大きさ以上の粒子 22 は、連続して配列された障害物構造 21 の配置に従い斜め方向に変位していく。一方、ある一定の大きさ（閾値）未満の粒子 23 は前述の粒子の振る舞いに従わず、流れ方向に沿って障害物構造 21 を迂回しながら直進する。

[0036] このように、目的とする大きさを分離可能な閾値設定を行った障害物構造 21 の配列パターンを公知の方法（非特許文献 1）に従い設計することにより、様々な目的の粒子の大きさ依存的に、流れ方向に対して直行する方向に粒子を分離することができる。更には流れ方向下流部にそれぞれ異なる回収流路を設けることにより、分離した粒子をそれぞれ回収することが可能である。

- [0037] なお、障害物構造 21 の形状は図示のような円柱構造のみに限定されず、目的とする流れ速度変化を生じさせることのできる形状であれば、例えば三角柱のような、多角柱構造とすることも可能である。
- [0038] 図 2 は、本発明の実施形態に係る DLD マイクロ流路の基本構造を備えた細胞分離デバイス 30 を説明する模式図である。以下、細胞分離デバイス 30 の基本構造について上面から見た図によって説明を行う。まず、流体の入口構造としては、サンプル導入口 31 及び、バッファー導入口 32 とを備えている。
- [0039] また、流体の出口構造としては、斜めに配列された障害物構造部の配置に従った方向に変位して進んだ、閾値（ある一定の大きさ）以上の粒子を含む画分を排出する第一の排出口 33 と流れ方向に沿って直進した、ある一定の大きさ未満の粒子を含む画分を排出する第二の排出口 34 と、とを備えている。なお、第一の排出口 33 及び第二の排出口 34 は模式図のようにそれぞれ一つのみには限定されず、目的に応じて複数の出口を有していても良い。
- [0040] 細胞分離デバイスのサンプル導入口 31 及びバッファー導入口 32 と、第一の排出口 33 及び第二の排出口 34 との間には、マイクロピラー構造を有する DLD マイクロ流路の基本構造 20 が連続的に配置をされており、この連続構造部分により、混合液に含まれる粒子を大きさ流れ方向に対して直交する方向に大きさ依存的に分離することができる。基本構造 20 の連続配置部分に関しては、一定して同じ設計の基本構造が連続していても良く、目的に応じて、徐々に設計を変化させた領域を設定することも可能である。バッファー液としては、細胞への影響を避けるために、等張液を一種または複数組合せて使用することが出来、例えば、生理食塩水、PBS 等を使用すれば良い。
- [0041] サンプル導入口 31 から流体デバイス 30 内への入口部分の構造については、混合液を後述のように流す必要がある為、図示のような一定幅の隔壁構造を設けることが好ましい。サンプル導入口 31 から送液した混合液はバッファー導入口 32 から送液したバッファー溶液と層流（流れ方向に平行して

層を成す流れ)を保持しながら、例えば図18Aに示すように流れて行き、一定の閾値より大きい粒子は前述の分離原理に従い、流れ方向に対して斜め方向へ変位する事で、図18Bに示すように混合液の層から分離される。一方、一定の閾値未満の大きさの粒子は混合液の層の流れに従い直進して流れる。このように、細胞の分離を行う目的から、サンプル導入口31の位置は流体デバイス30における第二の排出口34側に寄せて設置をする必要がある。

[0042] また、第一の排出口33及び第二の排出口34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38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、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38を49:1の間隔となるように設けた場合、第一の排出口33から得られる液量を概ね50倍に濃縮する事が可能である。このように、用途に応じて混合液中の粒子の分離だけでなく、液量の濃縮にも用いることが可能である。例として、図2の隔壁38や図21の分岐部39に示す、yとxの比率を1:1や49:1などに設定することで実現することが可能である。

[0043] 図3は、本発明の実施形態に係る細胞分離デバイスの鉛直方向断面の模式図である。細胞分離デバイス30は、DLDMマイクロ流路の基本構造20を構成し、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36と、平面構造部37との接合によって作成され、その空間に流路空間35を有している。また、それぞれサンプル導入口31、バッファ導入口32、第一の排出口33、第二の排出口34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。

[0044] 流路空間35の高さは複合体5が通過可能な高さに設定されていれば何ら限定は無いが、精度の良い分離を行う為に、好ましくは複合体5が流路空間35の高さ方向に同時に2つ以上存在し得ない高さに設定する事が望ましい

。

[0045] 流路構造部 3 6 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。また、平面構造部 3 7 については、平坦かつ流路構造部 3 6 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。

[0046] なお、本細胞分離デバイス 3 0 はそれぞれ基本構造及び導入口、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何ら問題無く、例えば図示の平面構造部 3 7 側の部材にそれぞれ基本構造及び導入口、排出口構造部等の形状を備えている構造とする事もできる。

[0047] 図 4 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分離装置を説明する模式図である。分離装置 4 0 は、D L D マイクロ流路の基本構造を有する細胞分離デバイス 3 0 に、それぞれサンプル導入口 3 1 にサンプル送液部 4 1、バッファー導入口 3 2 にバッファー送液部 4 2 を設けている。また、第一の排出口 3 3 に第一の回収部 4 3、第二の排出口 3 4 に第二の回収部 4 4 を設けている。

[0048] サンプル送液部 4 1 とバッファー送液部 4 2 はそれぞれ送液系を備えた機構を有しており、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、必要に応じてサンプル送液部 4 1 には複合体 5 の沈殿、及び凝集を防ぐための攪拌機構や、混合液 4 を調整する自動化機構を備えていても良い。

[0049] 第一の回収部 4 3、第二の回収部 4 4 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、分離開始直前、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。

[0050] 2. 本発明の細胞分離方法

以下、本発明の分離方法について、図を参照しながら説明する。

[0051] 本発明は、上記のように、目的細胞及び目的外細胞の２種類以上の細胞を含む細胞懸濁液を、連続的な液体の流れ中で、サイズにより細胞を分離する方法である。なお、「細胞懸濁液」としては、目的細胞及び目的外細胞の２種類以上の細胞を含むものであれば、特に限定されないが、例えば、血液、リンパ液、唾液、尿、涙等の体液を例示できる。

[0052] ２－１．目的細胞又は目的外細胞と対象捕捉物質との複合体を生成する工程
図５は、本発明の実施形態に係る細胞を含む細胞懸濁液及び対象捕捉物質を説明する模式図である。まず、目的細胞２および目的外細胞３を含む細胞懸濁液１に対して、目的細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉分子１０と、対象捕捉分子１０を担持する物質１１との結合体である対象捕捉物質１２を、細胞懸濁液１中に混合させることにより、得られた混合液４中では、目的細胞２と対象捕捉物質１２との複合体５が形成される。

[0053] なお、細胞懸濁液１中に含まれる目的外細胞３は１種類に限定されず、対象捕捉分子１０が認識する目的細胞の細胞表面に特徴的な構造を有していない細胞であれば、種類や数は限定されない。また、対象捕捉分子１０は、目的細胞２の細胞表面に特徴的な構造を認識する分子であり、かつ目的細胞２以外の細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識しない分子であれば１種類に限定されず、適宜必要な種類や数を、複数選択して使用することもできる。

[0054] より詳しくは、対象捕捉分子１０を担持する物質１１に、同一または異なる種類の複数の対象捕捉分子１０を担持させて対象捕捉物質１２を作成しても良い。また、複数の対象捕捉分子１０を担持させる物質１１に、同一種類または、異なる種類の対象捕捉分子１０を担持しても良く、目的の用途に応じて、適宜選択して、対象捕捉物質１２を作成できる。なお、精度良く目的細胞を得るためには、前述の条件を充足する対象捕捉分子１０を複数組み合わせ、使用することが好ましい。更に、対象捕捉分子を担持する物質１１の大きさも目的用途に応じて複数種類の大きさを使い分けて使用することができる。

[0055] 例えば、目的細胞２が更に a、b、…、とそれぞれ細胞表面に特徴的な構

造を有している場合、対象捕捉分子 1 0 a を備える物質 1 1 a、対象捕捉分子 1 0 b を備える物質 1 1 b、…、とをそれぞれ用いることにより、対象捕捉分子を担持する物質 1 1 a 及び、対象捕捉分子を担持する物質 1 1 b、…、との大きさが違うことを利用し、後の分離工程において複数の分離閾値エリアを通過させることにより、それぞれ a、b、…、の特徴的構造を有する目的細胞をそれぞれの排出口へと分離して、回収することも可能である。

[0056] また、目的の用途に応じては、目的外細胞 3 と対象捕捉分子との複合体粒子を形成させて分離して、目的外細胞を除去することもできる。

[0057] より詳しくは、目的細胞 2 および目的外細胞 3 を含む細胞懸濁液 1 に、目的外細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉分子 1 0 と、対象捕捉分子 1 0 を担持する物質 1 1 との結合体である対象捕捉物質 1 2 を加えることにより、混合液 4 中にて、目的外細胞 3 と対象捕捉物質 1 2 との複合体 5 を形成させることが可能である（図示せず）。

[0058] なお、この場合でも同様に対象捕捉分子 1 0 に関しては、目的外細胞表面に特徴的な構造を認識する分子であり、かつ目的細胞 2 の細胞表面に特徴的な構造を認識しない分子であれば 1 種類に限定されず、適宜必要な種類や数を、複数選択して使用することもできる。

[0059] 対象捕捉分子 1 0 は、複合体 5 を形成させる細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する分子であり、かつそれ以外の細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識しない分子であれば、特に限定はされない。対象捕捉分子 1 0 としては、例えば、抗体、ペプチドアプタマー、レクチン、細胞間接着分子、糖鎖、その他細胞認識性の高分子等のいずれか、または、これらから複数を組み合わせさせて適宜使用することができる。

[0060] 対象捕捉分子を担持する物質 1 1 は、金属、無機材料、樹脂などの高分子から形成された部材を使用することが出来る。この部材は、単一材料から形成しても良いし、複数の種類を組合せて使用しても良い。複数の種類の材料を使用する場合、各成分が、均一に混練されるようにして形成された部材を使用することが好ましい。また、対象捕捉分子を担持する物質 1 1 の材質と

して、高分子ポリマーが選択されてよく、具体的には、ポリスチレンやラテックス等を使用することができる。

[0061] この対象捕捉分子を担持する物質 1 1 は、上記の材料からなるものであれば特に部材は限定されないが、この後の分離の段階において重要な要素となるため、比重が均一であるものを使用することが好ましい。更には細胞懸濁液 1 中での反応の際に、比重が小さい場合、細胞懸濁液中への分散が均一にならない場合があるため、水に近いまたは水よりも比重がやや大きい部材を選択することが好ましい。

[0062] 対象捕捉物質 1 2 は、上記のように対象捕捉分子 1 0 と、対象捕捉分子 1 0 を担持する物質 1 1 との結合体である。対象捕捉分子 1 0 と、それを担持する物質 1 1 とは、公知の方法により結合させることが出来る。例えば、対象捕捉分子としての抗体を物質 1 1 に固定化するには、物理的吸着による方法、化学結合による方法等を使用することが出来る。化学結合による場合、例えば、表面に水酸基を含む材質から出来ている場合、抗体中のカルボキシル基を活性エステル化した後、水酸基とこのエステル基とを反応させることで、抗体を表面に固定化させることが出来る。また、Protein A や Protein G を介した結合方法も使用することが可能である。なお、対象捕捉物質 1 2 は、市販されているもの、例えば、抗体を担持させたビーズを購入して使用することも出来る。

[0063] 対象捕捉物質 1 2 の大きさは、複合体 5 の大きさが、区別するその他の細胞の大きさよりも、大きくなり且つ区別できるサイズとなるように選択する必要がある。例えば、目的細胞 2 と対象捕捉物質 1 2 の複合体 5 を形成し、目的外細胞 3 との分離を行う場合には、複合体 5 の大きさを目的外細胞 3 よりも大きくしなければならない。

[0064] より詳しくは、目的細胞 2 の直径が $10 \sim 14 \mu\text{m}$ であり、かつ目的外細胞 3 の直径が $8 \sim 12 \mu\text{m}$ である場合には、少なくとも対象捕捉物質の直径は $2 \mu\text{m}$ 以上であることが必要であり、より精度良く分離するためには $5 \mu\text{m}$ 以上が好ましく、後の実験に支障をきたさない範囲であれば、更に直径の

大きいものを用いることが好ましい。また、DLD原理に基づく細胞分離装置、一般的な細胞の大きさ等から、より具体的には、対象捕捉物質12の大きさは、 $7\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$ であり、好ましくは、 $15\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ であり、更に好ましくは、 $20\mu\text{m}\sim 40\mu\text{m}$ である。特に、血液中の循環腫瘍細胞（CTC）は、白血球細胞（ $10\sim 20\mu\text{m}$ ）と大きさが近似しているため、血液中からの循環腫瘍細胞を分離する際には、 $20\mu\text{m}\sim 40\mu\text{m}$ の直径の対象捕捉物質を使用することが好ましい。

[0065] 2-2. 複合体を、細胞分離デバイスを使用して分離する工程

本発明は、複合体を含む細胞懸濁液を、DLDマイクロ流路構造を有する分離エリアを備える細胞分離デバイスに導入する工程であって、細胞分離デバイスのバッファー導入口にバッファーを加えて流し、および細胞懸濁液をサンプル導入口に加えて流し、細胞分離デバイスの複数の分離エリア中を通過させる工程、および、細胞懸濁液から、決定された閾値以上のサイズを有する複合体を分離する工程であって、閾値よりも小さいサイズを有する細胞は細胞懸濁液の流れと一緒に移動し、且つ閾値以上のサイズを有する複合体は流れに対し斜め方向に変位して移動することで分離する工程を含む。

[0066] 2-2-1. 目的細胞との複合体を作成して分離する工程

まず、本発明の第一の態様は、目的細胞との複合体を作成したのち、DLDマイクロ流路構造を有する分離エリアを備える細胞分離デバイスを使用して、決定された閾値以上のサイズを有する複合体を分離するものである。

[0067] 図6は、本発明の実施形態に係る目的細胞を捕捉する分離方法を説明する模式図である。この方法ではまず、目的細胞2および目的外細胞3を含む細胞懸濁液に対して、目的細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉物質12を混合させることにより、目的細胞2と対象捕捉物質12との複合体5を形成させる。

[0068] 次に、流路空間部を予めバッファーで満たして気泡を除去した状態に準備しておいた細胞分離デバイス30に対し、前記目的外細胞3及び複合体5を有する混合液4をサンプル導入口31から細胞分離デバイス30中に導入し

、かつ同時にバッファー導入口32からバッファーを連続して導入する。その後、細胞分離デバイス30中では、細胞分離デバイス30中に連続して設けられたDLDマイクロ流路構造を有する基本構造20（分離エリア）により目的外細胞3は直進し、一方、複合体5は流れと斜め方向に変位して移動し分離がなされる。この結果、第一の排出口33から目的細胞2を有する複合体粒子5が得られ、第二の排出口34からは目的外細胞3が得られる。以上のように、細胞の分離を行うことができる。

[0069] 本発明では、第一工程で目的細胞との複合体を形成させた後、決定された閾値以上のサイズを有する複合体を分離するものである。この際、閾値は、複合体の大きさにより依存するが、複合体の大きさ、対象捕捉物質の大きさ、目的細胞、および、区別すべき目的外細胞の大きさ等との関係から、好適な範囲を選択することが出来る。

[0070] 例えば、血液中の細胞の分離に利用する場合を想定すると、赤血球は、6～8 μm であるが、白血球は9～15 μm と比較的大きく、血液中に存在しうる循環性腫瘍細胞（CTC）は、10～20 μm 程度であるため、目的外細胞となる白血球と分離するため、閾値は20 μm 以上であることが好ましく、30 μm 以上であることが更に好ましい。一方、精度良く分離するためには、比較的大きいサイズの対象捕捉物質を使用することが好ましく、対象捕捉物質の大きさは、上記のように、好ましくは、15 μm ～50 μm であり、更に好ましくは、20 μm ～40 μm である。このため、例えば、大きさが30 μm の対象捕捉物質を使用した場合には、目的細胞である循環性腫瘍細胞（CTC）との複合体は、40～50 μm 程度の大きさになると想定できる。また、好ましい範囲である大きさが20 μm ～40 μm の対象捕捉物質を使用した場合には、複合体の大きさは、30 μm ～60 μm になると想定できる。以上を総合すると決定すべき閾値は、区別すべき目的外細胞の大きさ以上であり、かつ、目的細胞と対象捕捉物質の大きさから想定される複合体の大きさの上限以下であることが、簡易かつ精度良く、目的細胞を分離するためには好ましい。具体的には、決定する閾値 D_c は、20～60 μm

mに設定することが好ましく、30～50 μ mに設定することが更に好ましい。

[0071] なお、この閾値 D_c の範囲は、対象捕捉物質、目的細胞、目的外細胞、および複合体の大きさにより変わることから、目的細胞、目的外細胞、および対象捕捉物質を適宜選択することにより、決定することが出来る。

[0072] 2-2-2. 目的外細胞との複合体を作成して分離する工程

本発明の第二の態様は、目的外細胞との複合体を作成したのち、DLDMマイクロ流路構造を有する分離エリアを備える細胞分離デバイスを使用して、決定された閾値以上のサイズを有する複合体を分離するものである。

[0073] 図7は、本発明の実施形態に係る目的外細胞を捕捉する分離方法を説明する模式図である。前述の方法に対し、この方法ではまず、目的細胞2および目的外細胞3を含む細胞懸濁液に対して、目的外細胞の細胞表面に特徴的な構造を認識する対象捕捉物質12を混合させることにより、目的外細胞3と対象捕捉物質12との複合体5を形成させる。

[0074] 次に、前述の方法と同様に、流路空間部を予めバッファーで満たして気泡を除去した状態に準備しておいた細胞分離デバイス30に対し、前記目的細胞2および複合体5を含む混合液4をサンプル導入口31から細胞分離デバイス30中に導入し、かつ同時にバッファー導入口32からバッファーを連続して導入する。その後、細胞分離デバイス30中では、細胞分離デバイス30中に連続して設けられた基本構造20部により目的細胞2及び複合体5は流れ方向と鉛直方向に分離がなされる。その結果、第一の排出口33から目的外細胞3を有する複合体5が得られ、第二の排出口34からは目的細胞2が得られる。以上のように、細胞の分離を行うことが出来る。

[0075] 上記の2つの方法は、目的に応じて適宜使い分けることができる。例えば、目的細胞2に対する対象捕捉分子10が明確かつ特異性が高い場合には、図6で説明の方法を好適に用いることができる。一方、目的細胞2に対する対象捕捉分子10が明確でない場合には、図7で説明の方法を用いて目的細胞2を分離することが可能である。また、目的外細胞3の種類や数に応じて

、適宜それぞれの手法を使い分けることができる。

[0076] 更に、分離後の目的に応じて、前記2つの方法を使い分けることができる。例えば、目的細胞2について、複合体5を形成させずそのままの状態で分取したい目的の場合には、図7で説明の方法で実施することができる。また、図6で説明の方法で実施した場合も、公知のいずれかの方法を用いて複合体5を解離させて、目的細胞2と対象捕捉物質12とに分け、更に公知のいずれかの方法を用いて目的細胞2のみを分離する手法をとることも可能であるが、手順が煩雑であることから、この場合は、図7で説明の方法で実施することが好ましい。

[0077] 2-3. 回収する工程

本発明では、分離された目的細胞を含む複合体を排出口から回収する工程、または、分離された目的細胞を排出口から回収する工程、を含む。本発明の第一の態様のように、目的細胞と対象捕捉物質との複合体を生成させた場合は、複合体を排出口から回収し、本発明の第二の態様のように、目的外細胞と対象捕捉物質との複合体を生成させた場合は、目的細胞を排出口から回収する。これらの回収は、例えば、排出口にチューブを取付けてポンプで吸引する等、適宜公知の方法を使用して行うことが出来る。

[0078] 2-4. 微小凝集物を除去する工程

本発明の細胞を分離する方法において、血液等の微小凝集物を含む細胞懸濁液から、目的細胞を分離する場合、分離工程の前に、後述する微小凝集物を除去する工程を、追加することが好ましい。この工程は、血液等の前処理として行うことも出来るが、上記細胞を分離する方法と組合せる場合、血液等と前記複合体を生成する工程の後で、且つ、細胞分離デバイスに導入する工程の前に、この微小凝集物を除去する工程を設けると、目的細胞の分離を有効に行うことが出来る。

[0079] 本発明の別の態様は、マイクロ流路構造を有する除去機構を備える微小凝集物除去デバイスにより、血液等に含まれる微小凝集物を除去する方法、及び微小凝集物除去デバイスに関するものである。

[0080] 3. 本発明のデバイスを使用した微小凝集物の除去原理

3-1. 本発明の微小凝集物除去デバイス

図10は、本発明の微小凝集物を除去する方法で使用する、微小凝集物除去機構の基本構造110を説明する模式図である。矢印方向に向かう流体の流れ方向に対して、鉛直方向に構造物111が設置されており、流れによって試料中の微小凝集物112が構造物111に捕捉されていく。この構造物111を、流れ方向に対して水平方向に、一定間隔で複数設けることにより、順次微小凝集物が構造物により捕捉され、流れ方向の下流に行くに従って試料中の微小凝集物が除去される。

[0081] 図11は、微小凝集物除去機構が一定間隔のピラー構造121により構成されていることを示す説明図である。一定の規則に従ったピラー構造を配置することにより、順次微小凝集物を捕捉した部分を迂回する流れが生じ、効率的に順次微小凝集物を除去することができる。このように、流れが迂回することで、目的とする細胞等の損失が回避でき、かつ流速の減少を伴わずに処理することが可能である。

[0082] このピラーの形状は、例えば、円柱構造としても良いが、目的とする微小凝集物を捕捉できる構造であれば、特に形状は限定されず、例えば、その水平方向断面形状がひし形となるような、多角柱構造とすることも可能である。各ピラーの直径は、例えば、5～30 μm 程度の大きさとすることができる。

[0083] さらに、このピラー構造は形状の基本構造を一定間隔で連続して配置しても良く、目的に応じて、徐々に形状および配置を変化させて設置することも可能である。このように、ピラー構造は、微小凝集物除去機構全体に規則的な間隔で配置される場合に限定されず、ランダムに設置されてもよい。例えば、流れ方向の上流部では、設置間隔が広く、下流部に行くに従い徐々に設置間隔が狭くなるような配置としても良い。更に、除去機構の一部のみにピラー構造を設置したり、除去機構の特定の部分に異なる基本構造のピラー構造を設置しても良い。また流路全体の幅も一様でなくても良く、必要に応じ

て途中で流路幅を狭めた形状としても良い。

- [0084] このピラーの設置間隔は、狭くし過ぎると流れ方向の上流部から順次微小凝集物が捕捉されていくため、上流部から優先的に詰まりが生じやすい。このため、試料中に大きい微小凝集物が存在したり、微小凝集物が多く含まれる場合には、流れ方向の上流部ではピラーの設置間隔を広めにとることが好ましく、流れ方向の下流部では、流れ方向の上流部で捕捉しきれなかった小さな微小凝集物を捕捉するように、上流部に比較し、設置間隔を徐々に狭くする配置が好ましい。上流部のピラー設置間隔が初めから狭い場合には、捕捉された微小凝集物により、除去機構に詰まりが生じ、処理が不可能になる可能性や、目的の細胞等が捕捉されてしまい、損失が生じる可能性がある。
- [0085] ピラー構造が流れ方向に対して直線状に配置されると、微小凝集物が捕捉されることなく下流までそのまま到達する可能性がある。このため、本発明の微小凝集物を捕捉して除去する目的からは、流れ方向に対して、ピラー構造が直線状に配置されないようにすることが好ましい。例えば、ピラーは流れ方向に対して、概ね、5～30個のピラーが流れ方向に設置される毎に1列ずれた配置することができ、10～20個のピラーが流れ方向に設置される毎に1列ずれた配置とすることが、流れを維持して、効率良く微小凝集物を分離するためには好ましい。
- [0086] ピラーの設置間隔は、細胞懸濁液中に含まれる目的細胞（その目的細胞と担体物質との複合体を含む）の大きさ以上であることが好ましい。設置間隔が、目的細胞の大きさより小さい場合、目的細胞（その目的細胞と担体物質との複合体）がピラー間に捕捉されてしまうため、目的細胞の損失が生じてしまう。
- [0087] 例えば、一般的に血液に含まれる細胞の大きさは大きいもので30 μm 程度となることから、血液中の全ての細胞を対象とした分離をする目的であれば、これ以上の大きさにすることが好ましく、例えば、赤血球、血小板の分離が目的であり、白血球を除去する必要がある場合などは、これら細胞を

区分する大きさである、 $8\ \mu\text{m}$ 以上の大きさと設定することができる。

[0088] また、予め細胞懸濁液中の目的の細胞に対し、担体物質を結合させ複合体とした後に、微小凝集物の除去を行うこともできる。この場合については、目的細胞（その目的細胞と担体物質との複合体）がピラー間に捕捉されて目的細胞の損失が生じることから、この複合体の大きさ以上であることが好ましい。具体的には、担体物質としては抗体等が標識されたビーズ等が挙げられるが、これに限定されず、任意の物質を担体物質として考えて良い。

[0089] 例えば、 $30\ \mu\text{m}$ の大きさの担体物質を用いて概ね $20\ \mu\text{m}$ の大きさの細胞との複合体とした場合には、ピラーの設置間隔は $50\ \mu\text{m}$ 以上とすることが好ましい。

[0090] また、ピラーの設置間隔は、 $200\ \mu\text{m}$ 以下の部分を有することが好ましい。微小凝集物の中には、比較的小さい大きさのものも存在するため、除去機構のピラー設置間隔をすべて $200\ \mu\text{m}$ 以上とした場合には、微小凝集物を完全に除けない可能性がある。ただし、すべてのピラー設置間隔が $200\ \mu\text{m}$ 以下である必要は無く、目的に応じてそれ以上の設置間隔のピラー構造を設けることができる。

[0091] 上記のように、本発明の微小凝集物除去デバイスにおいて、微小凝集物除去機構となるマイクロ流路構造（本明細書中において、「第2のマイクロ流路構造」という場合がある）は、 $30\ \mu\text{m}$ より大きい間隔で設置されたピラーにより構成されることが好ましく、また、 $200\ \mu\text{m}$ 以下の間隔で設置されたピラーにより構成されることが好ましい。このマイクロ流路構造のピラー設置間隔は、目的細胞（その目的細胞と担体物質との複合体）と、除去する微小凝集物の大きさに依存するが、血液を対象として、血液中の微小凝集物を除去する場合、ピラー設置間隔は、例えば、 $50\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$ と設定すればよく、 $70\ \mu\text{m} \sim 170\ \mu\text{m}$ と設定することがより好ましく、 $90\ \mu\text{m} \sim 150\ \mu\text{m}$ と設定することが、更に好ましい。なお、このピラー設置間隔は、マイクロ流路構造中に、2つ以上の異なる間隔でピラーが設置される場合、平均の間隔を意味する。

- [0092] 一方、目的細胞と担体物質とを結合させた複合体は、目的細胞と比較して、担体物質の大きさだけ大きくなる。このため、血液中で、この複合体を形成させた場合、血液中の微小凝集物を除去し、且つ、この複合体を回収する（詰まりを防止する）ためには、ピラー設置間隔は、担体物質の大きさだけ広くすることが好ましい。例えば、直径30～50 μm の担体物質を使用した場合、ピラー設置間隔は、例えば、80 μm ～250 μm と設定すればよく、100 μm ～230 μm と設定することがより好ましく、120 μm ～220 μm と設定することが、更に好ましい。
- [0093] 微小凝集物除去デバイスでは、上記のように、複数のマイクロ流路構造部分を設けても良い。複数のマイクロ流路構造部分を設けることにより微小凝集物の除去効率は上がるが、目的細胞（その目的細胞と担体物質との複合体）の回収効率や、デバイスの構造を単純化するという点からは、2つのマイクロ流路構造部分を設けることが好ましい。
- [0094] 2つのマイクロ流路構造部分を設けた場合、その中間に流れ幅を収束させる部分を設けることが好ましい（図13）。この部分は、マイクロ流路構造部分よりも狭く、ピラーは設置されていない。この部分には、最初のマイクロ流路構造部分（構造部 α ）を通過した微小凝集物が集積され、次のマイクロ流路構造部分（構造部 β ）へと流れていく（図13、図20A）。このような流れ幅を収束させる部分を設けることにより、微小凝集物を効率良く除去することが出来る。
- [0095] 上記のように、2つ以上のマイクロ流路構造部分を設けた場合、微小凝集物除去デバイスでは、目的細胞が排出される下流部側のマイクロ流路構造部分（構造部 β ）のピラー設置間隔を、上記のように、80 μm ～250 μm と設定すればよく、100 μm ～230 μm と設定することが好ましく、120 μm ～220 μm と設定することがより好ましい。そして、目的細胞を含む溶液が導入される上流部側のマイクロ流路構造部分（構造部 α ）のピラー設置間隔は、下流部側のマイクロ流路構造部分（構造部 β ）と同等に設定するか、それよりも広くすることにより、微小凝集物の除去効率を上げ、微

小凝集物による詰まりを防止しつつ、比較的多くの試料の処理が可能となる。

[0096] そして、本発明の一つの態様は、上記のようなマイクロ流路構造を有する除去機構を備える微小凝集物除去デバイスであり、マイクロ流路の前方には試料導入口を、マイクロ流路の後方には試料排出口を有することが出来る。

[0097] 3-2. 本発明の微小凝集物除去デバイスの具体例

図12は、本発明の一実施形態である微小凝集物除去デバイスを説明する模式図である。

[0098] 以下、微小凝集物除去デバイス130のマイクロ流路の基本構造について、上面から見た図によって説明する。まず、試料の入口構造としては、サンプル導入口131と、流体の出口構造としてサンプル排出口132、とを備えており、サンプル導入口131及びサンプル排出口132との間に微小凝集物を除去するためのマイクロ流路の基本構造110（微小凝集物除去機構）が連続して設けられている。このマイクロ流路の基本構造は、上記のように、例えば、2つのマイクロ流路構造部分を設けることが出来る（図13）。

[0099] 図14は、本発明の実施形態に係る微小凝集物除去デバイスの鉛直方向断面の模式図である。微小凝集物除去デバイス130は、マイクロ流路の基本構造110から構成され、それぞれ導入口131、排出口132等の形状を備えたマイクロ流路構造部141と、平面構造部142との接合によって作製され、その空間に流路空間143を有している。また、それぞれ導入口131、排出口132部分には、適宜送液用の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。さらに導入口131、排出口132に関しては、試料の導入、排出液を回収できる構造であれば特に限定されないが、処理開始直前または直後に、分画ができる機構等を備えていても良い。

[0100] マイクロ流路構造部141の流路構造（例えば、ピラーの配置）は、公知の方法を適宜選択して作製することができる。流路構造部の部材の材料とし

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。また、平面構造部 142 については、平坦かつ流路構造部 141 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。また、透明な部材であると流路内部の観察が容易であり、微小凝集物の除去や目的細胞の損失の有無が把握できるため好ましい。

[0101] なお、本発明の微小凝集物除去デバイス 130 は、それぞれマイクロ流路の基本構造 110、導入口 131、及び排出口 132 等の形状を備え、マイクロ流路の流路空間 143 が形成されたもの、例えば、図示の平面構造部 142 側の部材にそれぞれ基本構造 110 及び導入口 131、排出口 132 等の形状を備えている構造とすることもできる。

[0102] 本発明の微小凝集物除去デバイス 130 は、単独で利用できるが、排出口 132 に備えた送液用のチューブ等を用いて、任意の細胞分離デバイスに接続することで、連続したシステムとして使用でき目的に応じて使用方法を選択することができる。

[0103] 3-3. 一体型の細胞分離デバイス

図 15 は、本発明の別の実施形態を示す、一体型の微細胞分離デバイス 150 を説明する模式図である。上記のように、本発明の微小凝集物除去デバイスは、細胞分離デバイスに接続させて連続したシステムとして利用できる。この際、使用の簡便性や、製造コストの観点から、微小凝集物除去デバイスと、細胞分離デバイスとを一体として備えた細胞分離デバイスとして使用することが好ましい。また、接続に用いるチューブ内での試料ロスも低減できることから、必要に応じてこのように、一体型のデバイスとすることもできる。

[0104] また、この細胞分離デバイスは、分離する細胞のサイズにより分画する（サイズ分画）分離機構であることが好ましい。試料中の微小凝集物を除くことにより、分画に与える影響を無くすることができるため、分離機構の効果が最大限に発揮され、分離精度を高めることができる。サイズ分画による分離

機構としては、例えば、DL D原理に基づく細胞分離デバイスが挙げられる。DL D原理に基づく細胞分離デバイスは、上記に述べた方法により製造することが出来る。そして、この一体型の細胞分離デバイスの中では、上記のように、2つの別々のマイクロ流路構造部分を備えた微小凝集物除去デバイスの後方に、DL D原理に基づく細胞分離デバイスを連結した一体型の細胞分離デバイスが好ましい（図20Aおよび図20B）。図20Aのような一体型の細胞分離デバイスにおいて、バッファー液は、バッファー導入口32から導入され、微小凝集物除去機構（構造部 α 、 β ）の外側を流れ、微小凝集物が除去された細胞懸濁液と合流して細胞分離機構（細胞分離部分）に流れ込む。すなわち、図20Aの形態では、バッファー導入口32から導入されたバッファー液は、微小凝集物除去機構には導入されない。

[0105] 4. 本発明の微小凝集物を除去する方法

本発明の微小凝集物を除去する方法は、上記のように、連続的な液体の流れ中で、血液等の細胞懸濁液（試料）から微小凝集物を除去する方法である。なお、細胞懸濁液（試料）としては、特に限定されないが、例えば、血液、リンパ液、唾液、尿、涙等の体液を例示できる。これらは、そのまま使用しても良く、任意のバッファー液での希釈を行っても良い。また、使用するバッファー液に関しても、対象とする細胞懸濁液（試料）や、分離する目的細胞、含まれる微小凝集物により適宜選択して使用することができる。バッファー液としては、細胞への影響を避けるために、等張液を一種または複数組合せて使用することが出来、例えば、生理食塩水、PBS等を使用すれば良い。

[0106] 本発明で除去される微小凝集物は、培養細胞の懸濁液等にも含まれるが、本発明の微小凝集物を除去する方法は、細胞懸濁液（試料）として、特に血液を用いた場合において好適である。血液中の微小凝集物は、フィブリン、その他の変性タンパク質、脂肪等が凝集したものに由来しており、特に粘性を有していることから、除去機構のピラー構造に捕捉されやすく、一度ピラー構造に捕捉された後に、脱離して流れ方向の下流に流出することが少ない。

ため、本発明の方法で対象とする試料として好適である。

[0107] 本発明の第一の態様は、目的細胞および微小凝集物を含む細胞懸濁液から、連続的な液体の流れ中で微小凝集物を除去する方法であって、マイクロ流路構造（微小凝集物除去機構）を備える微小凝集物除去デバイスに、細胞懸濁液または細胞懸濁液とバッファー液との混合液を流し、微小凝集物除去デバイスのマイクロ流路中を通過させて、微小凝集物を捕捉する工程、を備えた、微小凝集物を除去する方法である。なお、微小凝集物を捕捉する工程の後、目的細胞を回収する工程を設けることも出来る。

[0108] 本発明では、上記本発明の微小凝集物除去デバイスに、細胞懸濁液およびバッファー液を加える。この際、予めバッファー液を流しておき、その後細胞懸濁液を加えても良いし、細胞懸濁液をバッファー液に混合し希釈した後、加えても良い。そして、上記のように、本発明の除去方法では、微小凝集物を捕捉する工程により、細胞懸濁液中の微小凝集物が捕捉されて除去され、目的細胞を含む細胞懸濁液は、除去デバイスの排出口から回収される。また、除去デバイスの排出口に送液用のチューブ等を備えた場合には、チューブ等を通して回収される。また、上記のように、細胞分離デバイスに接続させて連続したシステムとした場合（一体型の細胞分離デバイスを含む）には、微小凝集物が除去されて回収された細胞懸濁液は、その後、細胞の分離が行われる。なお、バッファー液に対する細胞懸濁液の量は特に限定されず、また、細胞懸濁液を流す速度についても、特に限定されない。この流速については、本発明の微小凝集物除去デバイスの導入口または排出口の何れか一方、または両方にポンプ等を設置することで、適宜速度を調整できる。

[0109] 本発明の方法は、血液等、細胞を含む細胞懸濁液から、含まれる目的細胞を精度良く分取する際の前処理に用いる方法であり、試料中の目的細胞を損失なく、かつ試料中の微小凝集物を精度良く除去することで、その後の細胞分離において、より精度良く目的の細胞を分取することができる。

[0110] 本発明の別の態様では、本発明の血液から微小凝集物を除去する方法において、抗血液凝固試薬を添加する態様を含む。血液中には、既に微小凝集物

が存在している他、血液を処理する過程で、新たに微小凝集物が生成してしまう可能性がある。このため、上記の本発明の方法により、既に存在する微小凝集物の除去はできるが、血液を処理中に新たに微小凝集物が生じること防止するために、その希釈バッファー液の組成中に抗血液凝固試薬を加えることが好ましい。そして、抗血液凝固試薬を加えることにより、本発明の微小凝集物を除去する方法により、微小凝集物を除去した血液を、その後の血液検査、各種の処理（血液成分の分離等を含む）に好適に使用することができる。

[0111] 抗血液凝固試薬としては、クエン酸ナトリウム、EDTA、ヘパリン等が例示されるが、これらの中では、トロンビンインヒビターを使用することが好ましく、PACK等の試薬を使用することが、更に好ましい。

[0112] クエン酸ナトリウム、EDTA等は、カルシウムイオンを阻害して間接的に血液凝固作用を阻害するが、直接的に凝固因子であるトロンビンを阻害する方が効果的である。また、トロンビンインヒビターとしては、ヘパリンは遊離トロンビンのみを阻害するが、PACK ($C_{21}H_{31}ClN_6O_3 \cdot 2HCl$) [1-(2-Amino-3-phenylpropanoyl)-N-[1-chloro-6-(diaminomethylideneamino)-2-oxohexan-3-yl]pyrrolidine-2-carboxamide]は遊離トロンビン、結合トロンビンの双方に作用するためより効果的である。

[0113] 本発明の除去方法は、血液中に既に存在する微小凝集物を除去するものであり、PACK等のトロンビンインヒビターを併用することにより、血液中の微小凝集物を新たな生成を抑制しつつ、血液中に既に存在する微小凝集物を除去することが出来るという特徴を有する。

[0114] 本発明では、上記のマイクロ流路構造を有する微小凝集物除去デバイスと、トロンビンインヒビターを含む希釈バッファー液とを併用することで、本発明の微小凝集物除去デバイス、および、任意選択的に接続される細胞分離装置の使用時において、微小凝集物の目詰まりを好適に解消することが出来る。その結果、本発明の微小凝集物除去デバイスを使用した除去方法により、効率的且つ継続的な、微小凝集物の除去、および、細胞成分の分離を行うこ

とができる。

- [0115] 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

- [0116] 以下、本実施形態について、実施例を示して詳細に説明する。但し、実際には、本実施形態は、下記の実施例に限定されるものではない。

- [0117] 1. 細胞分離の実施例

(1) 実施例で使用した細胞分離デバイス

本実施例では、血液中の腫瘍細胞の分離を目的とした。このため、対象捕捉分子としては、抗体を担持させた $30\mu\text{m}$ のビーズを使用した。そして、決定論的横置換法の原理に基づき、ジメチルポリシロキサン（PDMS）を使用して、粒径 $40\mu\text{m}$ を分離の閾値 D_c として設定したDLDMマイクロ流路構造を有する基本構造（分離エリア）を備える細胞分離デバイスを作製した。

- [0118] 具体的には、細胞分離デバイスは、

$$G \div 2.62057D_c \quad \text{式3}$$

上記式3に $D_c = 40\mu\text{m}$ を代入して得られた $G = 104.8\mu\text{m}$ から、直径 $15\mu\text{m}$ のピラーが、間隔 $104.8\mu\text{m}$ で配列され、また、好適な分離条件である $\varepsilon = \tan\theta = 1/15$ 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（図1参照）。また、流路空間の高さは $50\mu\text{m}$ とした。

- [0119] 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マイクロ流路の基本構造部36とした。そして、この基本構造部36の両端の一方には、ポート穴をあけサンプル導入口31とバッファー導入口32を、他方には第一の排出口33と第二の排出口34

を設けた。そして、ガラスの基板 37 に接合させ、基本構造部と基板の空間に流路空間 35 が形成されるようにした。そして、サンプル導入口 31 とバッファー導入口 32、および、第一の排出口 33 と第二の排出口 34 にチューブを取付けて細胞分離装置を作製した。この細胞分離装置を実施例 1～3 では使用した。

[0120] 実施例 4 では、粒径 $10\ \mu\text{m}$ を分離の閾値として設定した構造部 a (60 a)、及び粒径 $40\ \mu\text{m}$ を分離の閾値として設定した構造部 b (60 b) の基本構造を備えた以外は、同様の構成を有する細胞分離デバイスを作製して使用した。

[0121] (2) 細胞が分離されたか否かの評価

実施例の細胞分離は、顕微鏡試料台の上で行い目視により分離されたか否かを確認した。具体的には、バッファー流路口から PBS を $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ で流し、試料流入口から細胞懸濁液を $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ で 10 分間流した。選別後、回収した試料を透過型の光学顕微鏡、及び蛍光顕微鏡で観察した。

[0122] (実施例 1)

図 8 は、本実施例の説明を行うための図である。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) を分離する目的で行った。まず、ヒト乳がん由来細胞 (DSファーマバイオメディカル) 51 を、PBS バッファーにて希釈した正常全血内に加えて試料サンプルとした。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 $30\ \mu\text{m}$ の抗 EpcAM 抗体標識ビーズ (CD326 (EpcAM), Human, pluriBeads, s-beads: pluri select) 55 を添加し、室温にて攪拌しながらインキュベートしてサンプル 50 を得た。粒径 $40\ \mu\text{m}$ を分離の閾値として設定した上記細胞分離デバイス 30 を、予め PBS で満たしておき、反応後のサンプル 50 をサンプル導入口 31 へ $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ の速度でシリンジポンプを用いて送液を行った。また、同時に PBS をバッファー導入

口32へ100 μ l/minの速度で送液した。回収した試料の顕微鏡観察については、透過型の光学顕微鏡にて形態による観察を行った他、細胞の性質による区別を行う為、がん細胞及び白血球細胞を染色する為の有核細胞染色試薬(Hoechst 33342 solution:タカラバイオ)による染色、がん細胞を染色する為の抗サイトケラチン抗体(Anti-pan Cytokeratin 抗体[PCK-26](FITC):Abcam)による染色、及び、白血球細胞を染色する抗CD45抗体(Anti-CD45-APC, Mono(ML2):フナコシ)による染色を行った後、蛍光顕微鏡での観察、確認を行った。

[0123] その結果、全血中の成分のうち白血球52、赤血球53、血小板54等が第二の排出口34から回収されたことを確認した。また、抗EpCAM抗体標識ビーズ55と複合体5を形成したヒト乳がん由来細胞51は第一の排出口33から選択的に排出された。本実施例では以上のように、抗EpCAM抗体標識ビーズ55と複合体5を形成したヒト乳がん由来細胞51を選択的に分離できたことを顕微鏡により確認した(図8)。

[0124] (実施例2)

実施例1と同様に、ヒト乳がん由来細胞(MCF-7)のかわりにヒト前立腺がん由来細胞(LNCap)(DSファーマバイオメディカル)を正常全血に加えたサンプルを用いて同様に実施した結果、全血中の成分のうち白血球、赤血球、血小板等が第二の排出口から回収されたことを確認した。また、抗EpCAM抗体標識ビーズと複合体を形成したヒト前立腺がん由来細胞は第一の排出口から選択的に排出された。本実施例では以上のように、抗EpCAM抗体標識ビーズ55と複合体5を形成したヒト前立腺がん由来細胞を選択的に分離できたことを顕微鏡により確認した。

[0125] (実施例3)

実施例1及び2と同様に、ヒト由来がん細胞を正常全血に加えたサンプルのかわりに担がん患者由来の血液を用いて、同様に実施した結果、EpCAMを発現している上皮系腫瘍細胞を精度良く分離できたことを顕微鏡により

確認した。

[0126] (比較例 1)

比較例として、抗 E p C A M 抗体標識ビーズを用いずに、希釈した担がん患者由来の血液を細胞分離デバイスにて分離を試みたところ、一部サイズがオーバーラップしている白血球と上皮系腫瘍細胞との分離を行うことができなかった。

[0127] (実施例 4)

担がん患者血液中に存在する上皮系腫瘍細胞の中には、E p C A M の発現が弱い細胞群が存在することが知られている。そのため、抗 E p C A M 抗体標識ビーズを用いた手法では目的とする上皮系腫瘍細胞の取り逃しが懸念された。そこで、より高精度に、担がん患者血液中に存在する上皮系腫瘍細胞を分離することを試みた。図 9 は本実施例の説明を行うための図である。

[0128] まず、塩化アンモニウム処理により溶血処理を行い、赤血球を除去した担がん患者血液に対し、対象捕捉分子としてヒト C D 4 5 に対するモノクローナル抗体 (抗 C D 4 5 抗体) を担持した粒径 $30\mu\text{m}$ の抗 C D 4 5 抗体標識ビーズ (p l u r i S e l e c t : C D 4 5 , H u m a n , p l u r i B e a d s , s - b e a d s) 62 を添加し、室温にて攪拌しながらインキュベートしてサンプル 50 を得た。粒径 $10\mu\text{m}$ を分離の閾値として設定した構造部 a (60 a)、及び粒径 $40\mu\text{m}$ を分離の閾値として設定した構造部 b (60 b) の構造を備えた細胞分離デバイス 30 を、予め P B S で満たしておき、反応後のサンプルをサンプル導入口 31 へ $100\mu\text{l}/\text{min}$ の速度でシリンジポンプを用いて送液を行った。また、同時に P B S をバッファー導入口 32 へ $100\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で送液した。

[0129] その結果として、まず構造部 a (60 a) により全血中の成分のうち、 $10\mu\text{m}$ 未満の大きさである血小板 54 及び細胞残渣が排出口 A (A) から回収されたことを確認した。また、構造部 b (60 b) により、粒径が $40\mu\text{m}$ より大きい、白血球 52 及び抗 C D 4 5 抗体標識ビーズ 62 との複合体 5 が排出口 B (B) から回収されたことを確認した。更に、粒径が $40\mu\text{m}$ よ

り小さい上皮系腫瘍細胞 61 が排出口 C (C) より回収されたことを顕微鏡により確認した。

[0130] 2. 微小凝集物除去の実施例

本実施例では、正常ヒト全血[コージンバイオ(株)製]を試料として、試料中に含まれる微小凝集物の除去を目的とした。

[0131] (実施例 5)

図 16 は、本発明の実施例を説明するための模式図である。以下、実施例で用いた微小凝集物除去デバイス 160 のマイクロ流路構造を有する除去機構の構造について、上面から見た図によって説明を行う。微小凝集物除去デバイスの微小凝集物除去機構は、図 16 に示すピラー構造 [ピラー直径: 15 μm 、ピラー間隔: 60 μm 、ピラーは流れ方向に対して 15 段で 1 列ずれた配置、流路深さ: 50 μm] を有している。

[0132] より具体的には、上記マイクロ流路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) をモールドディングして、ピラーが等間隔で配置される PDMS 製流路を作製して、図 14 の模式図で示すピラー構造を有する基本構造部 141 とした。そして、この基本構造部 141 にポート穴をあけ、導入口 131 と排出口 132 とを設けた。そして、ガラス基材からなる平面構造部 142 に接合させ、基本構造部と基板の空間に流路空間 143 が形成されるようにした。そして、導入口 131 と排出口 132 にチューブを取付けて微小凝集物除去デバイスを作製した。この微小凝集物除去デバイスを実施例にて使用した。

[0133] 微小凝集物除去の様子は、倒立顕微鏡ステージ上から、目視及び画像として観察し、また、動画として撮影した。具体的には、前述の微小凝集物除去デバイスの導入口に対して、0.05% Tween 含有 PBS バッファーを事前に通水し、流路中から気泡を除去した後、前述の血液を 0.05% Tween 含有 PBS バッファーにて 2 倍希釈したものを、シリンジポンプにて 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ の一定速度にて 1 mL 処理した。

[0134] その結果、図 17A～図 17E に示すように、微小凝集物除去デバイス内

にて微小凝集物が捕捉される様子が観察された。導入口近傍においては微小凝集物が多く捕捉されており（図17A）、排出口に近づくにつれて微小凝集物が減少し（図17B）、排出口近傍においては微小凝集物が無くなっている（図17C）ことを確認した。また、この微小凝集物除去デバイスを通過させる前後の試料を倒立顕微鏡下にて比較して観察した。デバイス通過前においては微小凝集物が存在していた（図17D）が、デバイス通過処理後においては微小凝集物が除去されている（図17E）ことが確認できた。

[0135]（比較例2）

前述の実施例5に記載の方法と同様にし、ピラー間隔のみを10 μ mとして作製した微小凝集物除去デバイスを用いて、同様に試料の処理を行った。その結果、微小凝集物以外にも、ピラー間に白血球等の大型の細胞が堆積してしまう様子が観察された。また、1mLの全量を処理し終わる前にデバイス内に詰まりが生じ、全量の処理を行うことができなかった。

[0136]（実施例6～10）および（比較例3）

実施例5と同様に、ピラーの間隔（Gap）が、それぞれ50 μ m、60 μ m、100 μ m、150 μ mおよび、200 μ mの微小凝集物除去デバイスを作製した（それぞれ、実施例2～6）。また比較例2として、ピラー間隔が60 μ mであるが、ピラーの配置が一直線であるデバイスを作製した。そして、上記の様に調整した血液試料に対して、大きめの細胞を模した直径30 μ mのビーズを試料に添加し、実施例1と同様の方法にて、それぞれのデバイスを通過させ、その結果を表1に示す。それぞれ、微小凝集物（異物）の除去ができたものを◎、概ねできたものを○、一部できたものを△と標記し、またビーズの損失（詰まり）があったものを×、損失（詰まり）が無かったものを○、と標記している。

[0137] [表1]

	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	実施例10	比較例3
Gap(μ m)	50	60	100	150	200	60(直線配置)
異物除去	◎	◎	◎	○	△	△
ビーズ詰まり	×	×	○	○	○	×

[0138] (実施例 1 1)

実施例 1 0 (Gap幅: $200\ \mu\text{m}$)、実施例 8 (Gap幅: $100\ \mu\text{m}$)、実施例 7 (Gap幅: $60\ \mu\text{m}$) で用いた微小凝集物除去デバイスを、この順番で直列に接続した構造の微小凝集物除去デバイスを用いて、上記の血液試料を処理した結果、 $1\ \text{mL}$ 以上の血液試料からビーズの損失が無く、微小凝集物を除去することができた。

[0139] (実施例 1 2)

まず、実施例 1 1 で用いた微小凝集物除去デバイスの排出口に、分離閾値 $30\ \mu\text{m}$ とした DLD を分離原理とした分離デバイスのサンプル導入口を接続して、一体型の細胞分離デバイスとした。この一体型の細胞分離デバイスを、予め 1% BSA、 $5\ \text{mM}$ EDTA 含有 PBS バッファーで満たしておいた。次に、この一体型の細胞分離デバイスに、血液希釈バッファーとして 1% BSA、 $5\ \text{mM}$ EDTA を含む PBS を用いて血液を 2 倍希釈し、最終濃度 $80\ \mu\text{M}$ の PPACK を添加したものをを用いて、細胞を模した直径 $30\ \mu\text{m}$ のビーズを添加した試料を微小凝集物除去デバイスの導入口から流した。また、分離デバイスのバッファー導入口から、バッファー (1% BSA、 $5\ \text{mM}$ EDTA を含む PBS) を流した。その結果、図 18 A に示すように分離デバイスにおける詰まりが全く無く、かつ図 18 B の破線で囲った部分に示すように $30\ \mu\text{m}$ のビーズを分離することができた。

[0140] なお、分離閾値 $30\ \mu\text{m}$ とした DLD を分離原理とした分離デバイスは、以下のようにして作製した。上記の決定論的横置換法 (DLD) 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 DLD マイクロ流路構造を有する基本構造 (分離機構) を備える細胞分離デバイスを作製した。

[0141] 具体的には、この細胞分離デバイスは、

$$G \div 2.62057 D_c \quad \text{式 3}$$

上記式 3 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

件である $\varepsilon = \tan \theta = 1 / 1.5$ から、このピラーを 1.5 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。また、流路空間の高さは $50 \mu\text{m}$ とした。

[0142] 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 DLD マイクロ流路の基本構造部とした。

[0143] (比較例 4)

血液希釈バッファーとして 1% BSA、5 mM EDTA を含む PBS を使用し、血液を 2 倍希釈したものを微小凝集物除去デバイスに通さずに、直接上記の分離デバイスに通じたところ、図 19 に示すように分離デバイスの上流部において詰まりが生じてしまい、分離を行うことができなかった。

[0144] 3. 一体型分離デバイスの実施例

(1) 一体型分離デバイスの作成

まず、上記実施例 5 同様に、2 つのマイクロ流路構造部分 (構造部 α : ピラーの間隔は $200 \mu\text{m}$ 、構造部 β : ピラーの間隔は $150 \mu\text{m}$) を直列に接続した微小凝集物除去デバイスを設計した (図 13)。なお、構造部 α 、構造部 β の外側の側面は、流路端部での詰まりを防止するため、流路壁面から $80 \mu\text{m}$ 以内の部分にはピラーを設けていない。また、構造部 α 、構造部 β の間には、流れ幅を収束させる部分が設けられている。この 2 つの構造部分を有する微小凝集物除去デバイスに、分離閾値 $30 \mu\text{m}$ とした DLD を分離原理とした分離デバイスとを一体化した設計として、一体型の細胞分離デバイスを作製した (図 20A および 20B)。

[0145] (2) 試料サンプルの調製

上記実施例 1 と同様に、正常ヒト全血 (コージンバイオ (株)) に対し、ヒト乳がん由来細胞株 (MCF-7) (DS ファーマバイオメディカル) をスパイクし、模擬がん患者血液検体を調整し、試料サンプルとした。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E p C A M抗体）を担持した粒径30 μ mの抗E p C A M抗体ビーズ（CD326（E p C A M）、Human, p l u r i B e a d s、s - b e a d s : p l u r i s e l e c t）を添加し、室温にて攪拌しながらインキュベートしてサンプルを得た。得られたサンプルを1% B S A、5 m M E D T A 含有P B Sバッファで2倍希釈し、最終濃度が80 μ Mとなるように、トロンビンインヒビター（P P A C K）を添加したものをサンプル溶液とした（図22、図24[分離前]）。

[0146] （実施例13）

上記一体型細胞分離デバイスを、予め1% B S A、5 m M E D T A 含有P B Sバッファで満たしておいた。そして、上記サンプル溶液をサンプル導入口31へ50 μ l / m i nの速度でシリンジポンプを用いて送液を行った。また同時に1% B S A、5 m M E D T A 含有P B Sバッファをバッファ導入口32へ500 μ l / m i nの速度で送液し、それぞれの回収口（33、34）から回収を行った。

[0147] 回収した試料の顕微鏡観察については、透過型の光学顕微鏡にて形態による観察を行った。また、細胞の性質による区別を行う為、がん細胞及び白血球細胞を染色する為の有核細胞染色試薬（H o e c h s t 3 3 3 4 2 s o l u t i o n : タカラバイオ）による染色、がん細胞を染色する為の抗サイトケラチン抗体（A n t i - p a n C y t o k e r a t i n 抗体 [P C K - 2 6] (F I T C) : A b c a m）による染色、及び、白血球細胞を染色する抗CD45抗体（A n t i - C D 4 5 - A P C, M o n o (M L 2) : フナコシ）による染色を行った後、蛍光顕微鏡下での観察、確認を行った。一体型細胞分離デバイスの、分離構造部の拡大を図23bに示す。

[0148] その結果、デバイス内に詰まりを生じさせることなく、全血中の成分のうち白血球、赤血球、血小板等が第二の排出口（34）から回収されたことを確認した（図23a、図24[その他血球細胞]）。また、抗E p C A M抗体標識ビーズと複合体を形成したヒト乳がん由来細胞（M C F - 7）は第一の排出口（33）から選択的に排出された（図23cおよび図23d、図24[

目的細胞])). 本実施例では以上のように、抗E p C A M抗体標識ビーズと複合体を形成したヒト乳がん由来細胞(M C F - 7)を選択的に分離できたことを顕微鏡下での評価及び目視により確認した。

[0149] (実施例14)

上記実施例13と同様に、ヒト乳がん由来細胞(M C F - 7)のかわりにヒト前立腺がん由来細胞(L N C a p) (D Sファーマバイオメディカル)を正常全血に加えたサンプルを用いて同様に実施した結果、全血中の成分のうち白血球、赤血球、血小板等が第二の排出口(34)から回収されたことを確認した。また、抗E p C A M抗体標識ビーズと複合体を形成したヒト前立腺がん由来細胞は第一の排出口(33)から選択的に排出された。本実施例では以上のように、抗E p C A M抗体標識ビーズと複合体を形成したヒト前立腺がん由来細胞を選択的に分離できたことを顕微鏡下での評価により確認した。

[0150] (実施例15)

上記実施例13と同様に、ヒト由来がん細胞を正常全血に加えたサンプルのかわりに担がん患者由来の血液を用いて、同様に実施した結果、E p C A Mを発現している上皮系腫瘍細胞を精度良く分離できたことを顕微鏡により確認した。

[0151] (実施例16-18)

この実施例16では、2つのマイクロ流路構造部分(構造部 α :ピラーの間隔は200 μ m、構造部 β :ピラーの間隔は200 μ m)を直列に接続した微小凝集物除去デバイスに、分離閾値30 μ mとしたD L Dを分離原理とした分離構造部とを接続して、一体型の細胞分離デバイスを作製した。そして、上記実施例13[ヒト乳がん由来細胞(M C F - 7)]、実施例14[ヒト前立腺がん由来細胞(L N C a p)]、および実施例15[担がん患者由来の血液]のサンプルについて、この一体型の細胞分離デバイスを使用して、同様に微小凝集物を除去、および、細胞分離を行った(実施例16-18)。その結果、何れの場合も、詰まりが生じることなく、目的とする細胞を分離で

きたことを確認した。

[0152] (実施例 19-21)

実施例 19 では、代わりに、2つのマイクロ流路構造部分（構造部 α : ピラーの間隔は $300\ \mu\text{m}$ 、構造部 β : ピラーの間隔は $200\ \mu\text{m}$ ）を直列に接続した微小凝集物除去デバイスに、分離閾値 $30\ \mu\text{m}$ とした DLD を分離原理とした分離構造部とを接続して、一体型の細胞分離デバイスを作製した。そして、上記実施例 13 [ヒト乳がん由来細胞 (MCF-7)]、実施例 14 [ヒト前立腺がん由来細胞 (LNCap)]、および実施例 15 [担がん患者由来の血液] のサンプルについて、この一体型の細胞分離デバイスを使用して、同様に微小凝集物を除去、および、細胞分離を行った（実施例 19-21）。何れの場合も、詰まりが生じることなく、目的とする細胞を分離できたことを確認した。

[0153] (比較例 5-7)

比較例 5-7 として、微小凝集物除去構造（微小凝集物除去デバイス）を有しない、分離閾値 $30\ \mu\text{m}$ とした DLD を分離原理とした分離構造部のみを有する細胞分離デバイスを作製して、上記実施例 13-15 で使用したサンプルについて、実施例 13-15 と同様の細胞分離を行った。結果は、少量のサンプルの分離は出来たが、溶液量を増加させたところ、分離構造部において詰まりが生じて、継続的な分離は出来なかった。

産業上の利用可能性

[0154] 本発明の細胞分離方法、微小凝集物除去方法、微小凝集物除去部分および細胞分離部分を備えたデバイスは、研究用途、診断用途、医薬品の製造等における細胞の分離、精製に利用することが可能である。

符号の説明

- [0155] 1 細胞懸濁液
2 目的細胞
3 目的外細胞
4 混合液

5 複合体

1 0 対象捕捉分子

1 1 対象捕捉分子を担持する物質

1 2 対象捕捉物質

2 0 D L D マイクロ流路の基本構造

2 1 障害物構造

2 2 一定の大きさ以上の粒子

2 3 一定の大きさ未満の粒子

3 0 D L D マイクロ流路を備えた細胞分離デバイス

3 1 サンプル導入口

3 2 バッファー導入口

3 3 第一の排出口

3 4 第二の排出口

3 5 流路空間

3 6 流路構造部

3 7 平面構造部

3 8 隔壁

3 9 分岐部

4 0 送液部および回収部を備えた細胞分離装置

4 1 サンプル送液部

4 2 バッファー送液部

4 3 第一の回収部

4 4 第二の回収部

5 0 サンプル

5 1 ヒト乳がん由来細胞

5 2 白血球

5 3 赤血球

5 4 血小板

- 5 5 抗E p C A M抗体標識ビーズ
- 6 0 a 構造部 a
- 6 0 b 構造部 b
- 6 1 上皮系腫瘍細胞
- 6 2 抗C D 4 5 抗体標識ビーズ
- A 排出口 A
- B 排出口 B
- C 排出口 C
- 1 1 0 基本構造
- 1 1 1 構造物
- 1 1 2 微小凝集物
- 1 2 1 ピラー構造部
- 1 3 0 微小凝集物除去デバイス
- 1 3 1 導入口
- 1 3 2 排出口
- 1 4 1 流路構造部
- 1 4 2 平面構造部
- 1 4 3 流路空間
- 1 5 0 微小凝集物除去構造を備えた細胞分離デバイス
- 1 5 1 微小凝集物除去機構
- 1 5 2 細胞分離機構
- 1 6 0 実施例で使用する微小凝集物除去デバイス