

明 細 書

発明の名称：微細流路による血球の分級のための血液の前処理

技術分野

[0001] 本発明は血液の前処理に関し、特に微細流路による血球の分級のための血液の前処理に関する。また血液の前処理の評価方法に関する。

背景技術

[0002] 特許文献 1 には微細流路による血球の分級が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第 2 0 1 8 / 1 2 3 2 2 0 号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 血液を微細流路中に流すと微細流路中で目詰まりが生じることがある。本発明は目詰まりの解消に適した方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] < 1 >

血液を微細流路中に流すことで血液中の細胞を分級する前に、
前記細胞を含む血液を多孔質材の有する多孔質性の表面に接触させる、
血液の前処理方法。

< 2 >

前記多孔質材を、前記細胞を含む血液中に添加するとともにこれと混合することで、前記細胞を含む血液を前記多孔質性の表面に接触させる、

< 1 >に記載の前処理方法。

< 3 >

前記多孔質材は前記多孔質性の表面が多糖類からなる粒子であるとともに、液体中に懸濁された状態で前記細胞を含む血液中に添加される、

< 2 >に記載の前処理方法。

<4>

前記粒子は粒子径分布を有するとともに、その体積基準の積算分布における中央粒子径 d_{50V} が $25 \sim 280 \mu m$ である、

<3>に記載の前処理方法。

<5>

前記多孔質材は、前記多孔質材をゲル濾過クロマトグラフィーに用いた場合にDNAを分画することができるものであり、ここで、前記多孔質材の前記DNAに対する排除限界は45塩基対以上である、

<4>に記載の前処理方法。

<6>

前記多孔質材は、前記多孔質材をゲル濾過クロマトグラフィーに用いた場合にタンパク質を分画することができるものであり、前記多孔質材の前記タンパク質に対する分画範囲の下限が $1 \times 10^4 Da$ 以上であるか、前記多孔質材の前記タンパク質に対する分画範囲の上限が $4 \times 10^6 Da$ 以上であるかの少なくともいずれかを満たす、

<4>に記載の前処理方法。

<7>

前記粒子からは、カットオフ径以下の粒子径を有する小さな粒子が予め除去されており、

前記カットオフ径は $25 \sim 100 \mu m$ の範囲にある、

<4>に記載の前処理方法。

<8>

前記多孔質材の表面に接触させる血液は他の液体によって希釈されていない全血であるとともに前記多孔質材の表面に接触させた後に全血を他の液体で希釈する、又は

前記多孔質材の表面に接触させる血液は、他の液体によって予め希釈された全血である、

<3>に記載の前処理方法。

< 9 >

< 3 >に記載の前処理方法に基づき、前記細胞を含む血液を前処理した後、
前記前処理した血液を前記微細流路中に流すことで前記血液中の細胞を水力学的に分級する、
血液中の細胞の分級方法。

< 10 >

前記前処理において、
前記粒子は粒子径分布を有しているとともに、その体積基準の積算分布における中央粒子径 d_{50V} が $25 \sim 280 \mu m$ であり、さらに
前記粒子からは篩い分けによりカットオフ径以下の小さな粒子が予め除去されており、
前記分級において、
前記微細流路中の前記水力学的な分級を行う箇所の上流には、血液の流れを平面的なものとする扁平なエントリ一流路が設けられており、
前記カットオフ径は、前記エントリ一流路の断面における短手方向の長さよりも大きい、
< 9 >に記載の分級方法。

< 11 >

前記エントリ一流路には、前記血液の流れを横切るようにピラー密集帯が設けられており、
前記ピラー密集帯中の各ピラーは前記短手方向に沿って立っている、
< 10 >に記載の分級方法。

< 12 >

前記分級は胎児由来有核赤血球、循環腫瘍細胞（CTC）及び骨髓腫細胞のいずれかを濃縮するものである、
< 11 >に記載の分級方法。

< 13 >

血液の前処理に対する評価方法であって、

細胞を含む血液に対して前処理を施した後、前記血液を微細流路中に流すところ、前記微細流路の途中には前記血液の流れを横切るようにピラー密集帯が設けられており、

前記ピラー密集帯及びその下流側でこれと隣り合う、ピラーが疎になっている区画中に生じるデブリを、血液を流し始めてから一定時間経過後に観測する、

評価方法。

< 1 4 >

前記区画は、最も上流のピラー密集帯及びその次に位置するピラー密集帯と前記微細流路の側壁とによって囲まれており、

前記区画を平面視したときに、前記区画に対して前記デブリの占める割合を面積比で求める、

< 1 3 >に記載の評価方法。

< 1 5 >

前記細胞を含む血液を被験材料の表面に接触させることで前記前処理を行う、

< 1 4 >に記載の評価方法。

< 1 6 >

前記細胞を含む血液中に被験材料を添加するとともにこれと混合することで前記前処理を行う、

< 1 4 >に記載の評価方法。

発明の効果

[0006] 本発明により微細流路中の目詰まりの解消に適した方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]前処理のステップを含む流れ図。

[図2]多孔質の粒子の粒子径分布。

[図3]微細流路の平面図。

[図4]微細流路の部分平面図。

[図5]微細流路の詳細な部分斜視図。

[図6]エントリ一流路の斜視図。

[図7]微細流路の観察像 1（上段）及びそのスケッチ（下段）。

[図8]前処理に対する評価作業の流れ図。

[図9]微細流路の観察像 2（上段）及びそのスケッチ（下段）。

[図10]目詰まり率のグラフ 1。

[図11]目詰まり率のグラフ 2。

発明を実施するための形態

[0008] < 1. 血液の前処理方法の位置づけ >

[0009] 本発明の一態様は血液の前処理に関する。血液の前処理の詳細を説明する前に、図を参照しつつ前処理の位置づけを説明する。図には血液の前処理のステップ S 8 0 を含む流れ図が示されている。ステップ S 8 0 の実施にあたり、事前にステップ S 7 9 において生体から血液の採取が行われる。

[0010] 前処理のステップ S 8 0 は、血液中の細胞に対する分級のステップ S 8 1 を行う前に実施する。血液中の細胞に対する分級とは、血液中の細胞をその大きさによって分画することである。ステップ S 8 1 は特に血液を微細流路中に流すことで行われるものである。ステップ S 8 1 の分級の例は微細流路内にて行う水力学的分級である。微細流路はマイクロメートルオーダーの流路構造を有する。このようなマイクロ流路構造は血液の分級に適したものである（特許文献 1）。血液の分級に用いられる微細流路を有するチップを特に血球分離チップと呼ぶ場合がある。

[0011] 図 1 においてステップ S 8 1 の分級によって特定の粒子径分布を有する細胞の集団が得られる。血液中の細胞は様々な大きさの細胞が混じりあっている。各細胞種は細胞の大きさに関して固有の粒子径分布を示す。したがって分級により得られた細胞の集団には特定の細胞種が濃縮されている。

[0012] 図 1 において、ステップ S 8 2 で濃縮した細胞種が利用される。濃縮した

細胞種から、例えば医師による診断に利用可能なデータを取得できる。診断の対象者と濃縮すべき細胞種には以下の組み合わせが挙げられる。これらは例示である。

- [0013] 図1において対象とする血液には濃縮すべき細胞種として血球が含まれる。血球は胎児由来有核赤血球でもよい。ステップS79において取得される血液は胎児由来有核赤血球を含有する。胎児由来有核赤血球は妊婦血に含まれる。診断の対象者は胎児及び妊婦である。ステップS80において妊婦血を前処理する。ステップS81において分級により胎児由来有核赤血球を濃縮する。ステップS82において胎児に対する診断に有用なデータを取得する。
- [0014] 図1において対象とする血液には濃縮すべき細胞種として、血液中を循環する細胞であって血球ではない他の細胞が含まれる。それは循環腫瘍細胞（CTC）でもよい。ステップS79において取得される血液はCTCを含有する。CTCは例えばがんの疑われる被験者、がん患者及びがんの治療をすでに受けた被験者の血液に含まれる可能性がある。これらの者が診断の対象者となる。ステップS80においてこれらの血液を前処理する。ステップS81において分級によりCTCを濃縮する。CTCが血液に含まれているか否かに関わらずCTCを濃縮するのに必要な工程を実行する。ステップS82においてがんの診断に有用なデータを取得する。
- [0015] 図1において対象とする血液に含まれる細胞であって濃縮すべき細胞種は骨髓腫細胞でもよい。ステップS79において取得される血液は骨髓腫細胞を含有する。骨髓腫細胞は例えば骨髓腫の治療を行った患者から微小残存病変（MRD）として検出される可能性がある。これらの者が診断の対象者となる。骨髓腫の一例は多発性骨髓腫である。ステップS80においてかかる患者から採取した血液を前処理する。ステップS81において分級により骨髓腫細胞を濃縮する。骨髓腫細胞が血液に含まれているか否かに関わらず骨髓腫細胞を濃縮するのに必要な工程を実行する。ステップS82においてMRDに対する診断に有用なデータを取得する。

[0016] 図1において、ステップS79、ステップS81及びステップS82はステップS80の技術的意味を理解するために説明した。したがってこれらのステップは本態様において必須ではない。またこれらのステップの間に他のステップが導入されてもよい。ステップS80の前及び後のいずれかに他のステップが導入されてもよい。

[0017] <2. 血液の前処理方法の詳細>

[0018] 図1に示す前処理のステップS80をさらに詳細に説明する。ステップS80では血液を多孔質材の有する多孔質性の表面に接触させる。血液には、血球及び血液中を循環する他の細胞が含まれる。血液は細胞及び血漿を含んでいる。血液を多孔質性の表面に接触させるために多孔質材を血液中に添加する。容器に分取した血液に対して多孔質材を添加することで行ってもよい。予め容器中に多孔質材を分取しておくとともに、さらにかかる容器に血液を取り入れることで行ってもよい。さらに多孔質材と血液とを混合する。多孔質材が血液全体に散らばるようにこれらをよく混合することがよい。

[0019] 多孔質材は血液中で沈むものでもよい。多孔質材は粒子でもよい。粒子は球状でもよい。粒子はビーズでもよい。本明細書においてビーズとは、各粒子が球状となるような手法で形成された粒子群をいう。粒子を血液に懸濁してもよい。多孔質材が粒子である場合、多孔質材を血液ではない液体に予め懸濁してもよい。血液ではない液体は緩衝液や保存液でもよい。血液ではない液体に血清を添加してもよい。血清としてFBSを使用してもよい。多孔質材の粒子の懸濁液を血液中に添加することで、血液と多孔質材とを接触させてもよい。

[0020] 多孔質性の表面に接触させる血液は、他の液体によって希釈されていない全血でもよい。全血とは血液が血液成分ごとに分離されておらず、血球、血漿等の全ての成分を含んでいるものを言う。

[0021] 図1に示すステップS79で全血を採取した後、ステップS80で前処理するまでの間、全血を一定期間保存してもよい。保存期間は1～72時間でもよい。保存の温度は室温1～30℃（日本薬局方）でもよい。保存の温度

は4～25℃が好ましく、4℃が特に好ましい。なお保存の温度にはプラスマイナス2℃の範囲内の揺れがあってもよい。揺れの範囲はプラスマイナス1℃であることが好ましい。ステップS79で採血後に採血の施設外に全血を輸送してからステップS80の前処理をするときは全血を4℃に保ちながら輸送することが好ましい。また保存の工程を挟むことなく、ステップS79で全血を採取した後、速やかにステップS80で前処理をしてもよい。

[0022] 図1に示すステップS80の前処理において、多孔質材と血液とを混合した上で、所定の時間、所定の温度でインキュベートすることが好ましい。時間は例えば1～60分とすることができる。30分±5分としてもよい。インキュベートの温度は室温1～30℃（日本薬局方）でもよい。インキュベートの温度は4～25℃でもよい。インキュベートの温度は全血中の細胞や物質の状態を著しく害するものでなければ特に制限されない。例えば4℃の環境下で全血を保存した後、25℃の環境下で、すでに冷やされている全血をインキュベートしてもよい。

[0023] 多孔質材が粒子である場合、多孔質材の添加量は、希釈していない血液1mLあたり10～50 μ Lである。希釈血の希釈倍率に合わせて多孔質材の添加量を調整してもよい。この場合、希釈率が高いほど、多孔質材の添加量を少なくしてもよい。例えば1mLの血液を5倍に希釈した場合、5mLの希釈血に対して10 μ Lの多孔質材を添加してもよい。1mLの血液を2.5倍に希釈した場合、2.5mLの希釈血に対して20 μ Lの多孔質材を添加してもよい。

[0024] 上記において多孔質材の体積を特定するにあたり多孔質材は水で膨潤しているものとする。多孔質材のビーズである場合は、多孔質材をビーズ液の状態に取り扱ってもよい。ビーズ液は多孔質材をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に混ぜたものである。ここでビーズの間の隙間はビーズの体積に便宜的に含めた上で、多孔質材のビーズを計り取るものとする。例として50%を多孔質材のビーズが占め、残りの50%をPBSが占めているビーズ液を用いてもよい。

- [0025] 上記において多孔質材は事前に洗浄しておいてもよい。洗浄はPBSで行ってもよい。洗浄は血液の希釈用の液体や蒸留水で行ってもよい。洗浄は2回行ってもよく、3回以上行ってもよい。
- [0026] 図1において、例えばステップS79の血液の採取と同時にステップS80の前処理を行ってもよい。例えば多孔質材を採血管内に予め配置しておく。これにより血液の採取と同時に採取した全血と多孔質材とを採血管内で接触させる。採血管を振って血液を多孔質材にさらによく接触させてもよい。
- [0027] 図1において前処理のステップS80では、多孔質性の表面に接触させる血液は、他の液体によって希釈された全血でもよい。例えばステップS79の血液の採取の後、ステップS80にて血液を多孔質材に接触させる前に生体から採取された血液を他の液体で希釈する。本明細書において希釈済みの全血も血液に含むものとする。希釈率は1倍より大きく、10倍以下でもよい。すなわち全血の体積1に対して体積0より大きく、体積9以下の他の液体を添加してもよい。希釈率は1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5及び5.0倍のいずれかでもよい。希釈率は6、7、8及び9倍のいずれかでもよい。
- [0028] 一例において、全血1mLに対し50～100 μ Lのビーズ液（ビーズ50体積%）を加え、30分、25℃の環境条件下で回転混和する。この回転混和中に多孔質材のビーズと血球とはインキュベートされる。これをPBSで希釈したものに対して血球の分級を行う。他の一例において、全血をPBSで希釈した後に多孔質材を加えてもよい。この場合インキュベートは行わずに分級する。また多孔質材を大きめのチューブ内にあらかじめ添加しておき、ここに希釈血をさらに添加してもよい。また予め用意した希釈溶液に多孔質材を添加しておき、ここに全血を添加することで希釈と、多孔質材との接触を同時に行ってもよい。
- [0029] 多孔質材が血漿中に含まれる成分と反応してもよい。例えば多孔質材が血漿中に含まれる成分を吸着してもよい。吸着される成分は直接に微細流路を目詰まりさせるものであってもよい。吸着される成分は微細流路の目詰まり

を間接的に促進するものであってもよい。

- [0030] 多孔質材の表面には多数の微細孔が形成されている。多孔質材は多孔質ではないその他の材料と結合していてもよい。例えば多孔質ではない粒子が多孔質材でコートされていることで多孔質性の粒子となってもよい。粒子の中心は多孔質性でなくてもよい。粒子の中心は強磁性体でもよい。
- [0031] 多孔質材の材質は多糖類でもよい。多孔質材の微細孔は多糖類で形成されたものでもよい。多糖類は架橋されていてもよい。多糖類はアガロース、デキストラン及びアリルデキストランのいずれかでもよい。多糖類は修飾されていてもよい。修飾はDEAE (Diethylethanolamine) 修飾でもよい。
- [0032] 粒子状の多孔質材はゲル濾過クロマトグラフィーに用いることのできるものでもよい。ゲル濾過クロマトグラフィーとは移動相が水溶液であるサイズ排除クロマトグラフィーである。またこの時にDNAを分画することができるものでもよい。多孔質材のDNAに対する排除限界は45塩基対以上であることが好ましい。多孔質材のDNAに対する排除限界は165塩基対以上でもよく、以下でもよい。多孔質材のDNAに対する排除限界は1078塩基対以上でもよく、以下でもよい。
- [0033] 粒子状の多孔質材はタンパク質を分画することができるものでもよい。多孔質材のタンパク質に対する分画範囲の下限が 1×10^4 Da以上であることが好ましい。多孔質材のタンパク質に対する分画範囲の上限が 4×10^6 Da以上であることが好ましい。粒子状の多孔質材は少なくとも上記いずれかを満たすことが好ましい。
- [0034] 図2には多孔質の粒子の粒子径分布が体積基準の積算分布で示されている。多孔質材の粒子は粒子径分布を有する。多孔質材の中央粒子径 d_{50V} (Median particle size of the cumulative volume distribution) は体積基準の積算分布における中央粒子径である。粒子が多糖類からなる場合、粒子が緩衝液中で膨潤した状態における粒子径を基準とする。粒子径の測定例はレーザ回折・散乱法で求めた有効径やコールター法で求めた球体積相当径である。

- [0035] 図2において、中央粒子径 d_{50V} は $500\mu m$ 未満であることが好ましい。中央粒子径 d_{50V} は好ましくは $25\sim 280\mu m$ 、より好ましくは $25\sim 165\mu m$ 、さらに好ましくは $45\sim 165\mu m$ である。中央粒子径 d_{50V} がかかる範囲にあることで、多孔質材の表面積を、血液との接触に好適なものとすることができる。
- [0036] 図2において多孔質材の粒子からは、必要に応じて小さい粒子がカットオフされていることが好ましい。カットオフとは、多孔質材の粒子から、小さい粒子が取り除かれることである。一態様において、カットオフ径 C_F 以下の粒子径を有する小さな粒子が予め除去される。カットオフ径 C_F の範囲は $25\sim 100\mu m$ である。カットオフ径 C_F は $40\sim 70\mu m$ でもよい。小さな粒子の除去はメッシュによる篩い分けで行うことが好ましい。例えばセルストレーナーを用いて多孔質材の粒子の集団から小さな粒子を除去してもよい。小さな粒子が除去されていることで、血中に混ざった小さな粒子による微細流路の目詰まりを抑制できる。微細流路の種類によっては微細流路に進入した小さな粒子が何事もなく微細流路から流し出される。そのような流路では小さな粒子による目詰まりを考慮しなくてもよい。しかしながらそのような微細流路でも血中の何らかの化学的成分による目詰まり（後に述べるデブリ）は生じることがある。したがってカットオフしていない粒子の使用は目詰まりの抑制に有効である。
- [0037] 元の粒子から小さな粒子が除去されると元の粒子の粒子径分布が変わる。すなわちカットオフにはサイズセレクションの効果がある。サイズセレクション後は中央粒子径も変化する。便宜上、本明細書において中央粒子径 d_{50V} は、カットオフにより元の粒子から小さな粒子を除去する前の粒子径分布に基づくものとする。
- [0038] <3. 血液中の細胞の分級方法>
- [0039] 図1を改めて参照する。本発明の一態様はステップS80とステップS81とを組み合わせた血液中の細胞の分級方法である。まず上述した前処理方法に基づき細胞を含む血液を処理する（ステップS80）。次に、前処理し

た血液を微細流路中に流すことで血液中の細胞を水力学的に分級する（ステップS 8 1）。

[0040] 図 1 において血液を予め希釈してから、ステップS 8 1 で分級をしてもよい。希釈はステップS 8 0 の前処理の前に行ってもよく、後に行ってもよい。分級する時点での全血に対する希釈率は 1 倍より大きく、10 倍以下でもよい。すなわち全血の体積 1 に対して体積 0 より大きく、体積 9 以下の他の液体を添加してもよい。希釈率は 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 及び 5.0 倍のいずれかでもよい。希釈は前処理の前と後の両方で行ってもよい。例えば、前処理を行う前に 2～3 倍に全血を希釈しておいて、前処理が終わった後にさらにこれを希釈して全血に対する 5 倍希釈としてもよい。

[0041] 図 1 に示すステップS 8 0 で血液の前処理をした後、ステップS 8 1 で分級するまでの間、前処理済みの血液を保存してもよい。前処理後の保存の温度の範囲は $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ でもよい。保存の工程を挟むことなく、前処理後速やかにステップS 8 1 で分級をしてもよい。

[0042] <4. 分級デバイス>

[0043] 以下に水力学的な分級のためのデバイスの一例を示す。図 3 には平面視した微細流路 20 が示されている。微細流路 20 は血球を初めとする浮遊細胞の分離用の流路チップである。図中の X、Y 及び Z の各軸は微細流路 20 の機能を理解するために便宜的に示したものである。これらの軸は、微細流路 20 の形状を具体的に限定するものではない。

[0044] 図 3 において微細流路 20 は主流路 23 を有する。主流路 23 の一方の端は入口 21 a となっている。主流路 23 のもう一方の端は出口 22 c となっている。微細流路 20 はさらに副流路 24 を有する。副流路 24 の端は入口 21 b となっている。副流路 24 の端は合流部 28 にて主流路 23 に接続している。

[0045] 図 3 において主流路 23 は入口 21 a から出口 22 c に向かって順に流路パート 25 a～d を有する。流路パート 25 a～d は入口 21 a から出口 2

2 cまでつながりとなっている。流路パート2 5 aと流路パート2 5 bとの間に合流部2 8がある。

[0046] 図3において微細流路2 0は支流路2 6 a及び2 6 bを有する。支流路2 6 a及び2 6 bはいずれも主流路2 3から分岐する流路である。上流側から順に支流路2 6 a及び支流路2 6 bがこの順で主流路2 3から分岐する。支流路2 6 a及び2 6 bの一端は流路パート2 5 cで主流路2 3と接続する。流路パート2 5 cにおいて、副流路2 4と対向する側に支流路2 6 a及び2 6 bが配置されている。支流路2 6 a及び2 6 bの他端に出口2 2 a及び出口2 2 bがある。

[0047] 図3において支流路2 6 a及び2 6 bはいずれも主流路2 3から分岐する細流路を複数個有する。各細流路は主流路2 3の上流から下流へ方向に沿って並ぶ。各細流路はそれぞれ出口2 2 a及び2 2 bに達する。各細流路はそれぞれ出口2 2 a及び2 2 bの手前で合流する。流路パート2 5 cの下流には流路パート2 5 dがある。流路パート2 5 dは出口2 2 cに達する。

[0048] 図3において入口2 1 aは前処理された血液B Lを入れたシリンジ3 0と接続される。シリンジ3 0からは、所定の流量で血液B Lを入口2 1 aに送る。血液B Lは入口2 1 aを経由して流路パート2 5 aに入る。血液B Lの前処理はシリンジ3 0内で行ってもよい。シリンジ3 0内で血液B Lの前処理を行ってからシリンジ3 0より微細流路2 0に血液B Lを送る。

[0049] 図3において微細流路2 0は副流路2 4を有する。副流路2 4はシリンジ3 5と接続されている。シリンジ3 5には清澄液C Lが入れられている。清澄液C Lは浮遊細胞を含まない液体である。清澄液C Lは血球やその他の細胞にダメージを与えない液体である。清澄液C Lは緩衝液である。清澄液C LはP B Sでもよい。シリンジ3 5内に圧力をかけることで清澄液C Lは入口2 1 bから副流路2 4に入る。清澄液C Lは副流路2 4を流れる。清澄液C Lは流路パート2 5 bに流入する。

[0050] 各出口には細胞懸濁液の画分が排出される。出口2 2 cには画分F 3が、出口2 2 bには画分F 2が、出口2 2 aには画分F 1が得られる。画分F 1

及び画分 F 2 には流路パート 2 5 c で分級された細胞がそれぞれ含まれる。
画分 F 3 には流路パート 2 5 c を通過した血漿が含まれる。

- [0051] 図 4 には平面視した微細流路 2 0 が示されている。図は微細流路 2 0 による浮遊細胞の分別の過程を模式的に表している。説明を簡単にするため、支流路 2 6 a には 1 0 本の細流路が、支流路 2 6 b には 3 本の細流路が示されている。
- [0052] なお図 4 及び図 5 は特開 2 0 0 7 - 1 7 5 6 8 4 号公報より引用し一部を変更した。分級のメカニズムは特開 2 0 0 7 - 1 7 5 6 8 4 号公報において特に詳細に説明されている。
- [0053] 図 4 に示すように、流路パート 2 5 b のさらに上流から血液 B L が連続的に流れてくる。血液 B L は細胞を大量に含んでいる。血液 B L の流れに対して、その側方より清澄液 C L の流れを連続的に接触させる。これにより主流路 2 3 を流れる細胞を、主流路 2 3 の側方から連続的に押し込む。結果として血液 B L の流れは清澄液 C L の流れとは反対側に連続的に押し込まれる。流路パート 2 5 b ~ c において、支流路 2 6 a 及び 2 6 b 側に連続的に浮遊細胞が押しやられるとともに、これらの支流路に浮遊細胞が連続的に流れ込む。
- [0054] 図 4 に示すように、支流路 2 6 a には無核赤血球 2 7 が連続的に流れ込む。流路パート 2 5 b において血液 B L 中の無核赤血球 2 7 を水力学的に分級する。分級は血液 B L の流れのうち、清澄液 C L の流れとは接触していない側で連続的に行われる。
- [0055] 図 4 に示すように、支流路 2 6 a は無核赤血球 2 7 の除去流路として働く。支流路 2 6 a の有する細流路の内接径は 1 2 ~ 1 9 μm である。内接径は 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、及び 1 8 μm のいずれかでもよい。
- [0056] 図 4 に示すように支流路 2 6 b には有核細胞 2 9 a - c が連続的に流れ込む。流路パート 2 5 b の下流の流路パート 2 5 c において、血液 B L 中の有核細胞 2 9 a - c を水力学的に分級する。分級は血液 B L の流れのうち、清澄液 C L の流れとは接触していない側で連続的に行われる。特に支流路 2 6

bより有核細胞の細胞懸濁液を連続的に得る。

[0057] 図4に示すように枝流路26bは有核細胞29a-cの回収流路として働く。枝流路26bの有する細流路の内接径は20~30 μ mである。内接径は21、22、23、24、25、26、27、28及び29 μ mのいずれかでもよい。有核赤血球を初めとする有核細胞の径の大きさは11~13 μ mと考えられる。

[0058] 図4に示す枝流路26a及び26bの各細流路の内接径は細流路の直交断面における内接円の直径である。細流路の断面は四角形でも他の多角形でも円でもよい。他の枝流路において同様である。枝流路26a及び26bに取り込まれなかった浮遊細胞や血漿はフロースルーFTとして連続的に流路パート25dを通過する。その後、図3において出口22cに到達する。例えば凝集した血球などがフロースルーFTに含まれる。

[0059] 図5において流路パート25cに焦点を絞りつつ微細流路の詳細が示されている。本実施例に係る水力学的な分級では、細流路の内接径の値が分級される浮遊細胞の径の最大値と等しくなっているわけではない。したがって本実施例に係る水力学的な分級は単純な濾過と異なる。本実施例に係る水力学的な分級を以下に説明する。

[0060] 図5には流路パート25cが示されている。さらに枝流路26aの持つ細流路が表されている。説明を簡単にするため枝流路26aを構成する細流路を一本のみとする。図5の説明において枝流路26aを構成する細流路を単に枝流路26aと称する。

[0061] 図5に示すように流路パート25cには液流LFが連続的に導入される。液流LFは上述の血液BLと清澄液CLとを含む。液流LF中でこれらの液はその界面で部分的に混じり合っている。液流LF中には大きな細胞として有核細胞29aと、小さな細胞として無核赤血球27とが含まれている。図中において有核細胞29aは他の有核細胞を代表して描かれている。

[0062] 図5において液流LFのうち、枝流路26aへ導入される部分を液流LEとする。液流LFのうち、枝流路26aへ導入されず、下流に向かって流れ

ていく部分を液流L Gとする。液流の内、液流L Gにのみハッチングがなされている。ここで液流L Eの流量は液流L Eの断面に比例する。液流L Eは支流路26 a側の流路パート25 cの内壁に沿って流れる。液流L Eの流量は支流路26 a中の液流L Eの流速にも比例する。

[0063] 図5において液流L E中を流れる無核赤血球27が支流路26 aへ導入される。一方、有核細胞29 aはその体積の半分以上が液流L G側に属している。有核細胞29 aは液流L Eに対して一部接触するに過ぎない。このため有核細胞29 aは支流路26 aへは導入されない。このとき有核細胞29 aの径は支流路26 aの内接径より小さくてもよい。仮に液流L Eの流量が大きくなれば液流L Eの断面が大きくなる。この場合、有核細胞29 aが液流L Eに飲み込まれることで、支流路26 aへ誘導されることも考えられる。

[0064] 図5において有核細胞29 aは液流L Gに乗ってさらに下流に運ばれる。以上により、支流路26 aからはある大きさ以上の浮遊細胞を含まない流体を回収することができる。結果として無核赤血球27がここで分級を受ける。また有核細胞29 a及びその他の有核細胞は下流で分級を受ける。

[0065] <5. エントリー流路>

[0066] 図3に戻る。微細流路20中の流路パート25 aは水力学的な分級を行う流路パート25 cの上流に位置する。流路パート25 aはさらに清澄液CLの流れが合流する合流部28の上流に位置する。流路パート25 aは入口21 aに接続する。以下流路パート25 aをエントリー流路という場合がある。

[0067] 図6にはエントリー流路に当たる流路パート25 aが示されている。血液は入口21 aから流路パート25 aに進入する。流路パート25 aは扁平である。流路パート25 a中の血液の流れは平面的なものとなる。流路パート25 aのYZ断面における短手方向の長さは寸法SDとして表されている。

[0068] 図6に即して言えば寸法SDは流路パート25 aの高さにあたる。寸法SDは $25 \pm 5 \mu\text{m}$ であることが好ましい。好適な寸法SDを選択することで血球中の細胞が流れやすくなる。また流路パート25 aで血球中の細胞をY

方向に広げることができる。さらに寸法SDは他の流路パートにわたって維持されていることが好ましい。かかる構成により+Y方向から来る清澄液の流れによって+X方向に流れる血液の流れを-Y方向に押し込みやすくなる(図4参照)。

[0069] 図2に戻る。先に述べた通り、前処理に用いる多孔質の粒子は粒子径分布を有する。また一態様においてその中央粒子径 d_{50V} が $500\mu m$ 未満である。中央粒子径 d_{50V} は好ましくは $25\sim 280\mu m$ 、より好ましくは $25\sim 165\mu m$ 、さらに好ましくは $45\sim 165\mu m$ である。

[0070] 図2において、先に述べたところに従い前処理において粒子からは篩い分けによりカットオフ径CF以下の小さな粒子が予め除去されていることが好ましい。カットオフ径CFの範囲は $25\sim 70\mu m$ であり、好ましくは $25\sim 40\mu m$ である。

[0071] 図6には多孔質の粒子PPが示されている。粒子PPはカットオフ径CFよりも大きな粒子径を有する。好ましい一態様においてカットオフ径CFは寸法SDよりも大きい。言い換えればほぼ全ての粒子PPの粒子径は寸法SDよりも大きい。ここで寸法SDよりも小さな粒子径を有する粒子PPが残っていたとしても、これは例えば篩い分けの不完全さなどにより偶発的に混入した粒子と考えられる。

[0072] 図6において、粒子PPの粒子径を上記の通り設定することで、粒子PPの流路パート25aへの侵入を防ぐことができる。好ましい一態様において流路パート25aの途中にはピラー密集帯11が設けられている。ピラー密集帯11中の各ピラーは流路パート25aの上面と下面とを接続している。粒子PPの粒子径を上記の通り設定することで、粒子PPがピラー密集帯11を塞ぐことを防止できる。ピラー密集帯11の構成と働きは以下に述べる。

[0073] <6. ピラー密集帯>

[0074] 図7には流路パート25aの観察像及びそのスケッチが示されている。流路パート25aはピラー密集帯11を備える。ピラー密集帯11は流路パー

ト 2 5 a 中の血液の流れを横切るように設けられている。血液は図中の上流の左側から下流の右側に流れる。

[0075] 図 7 において流路パート 2 5 a は区画 1 2 を有する。区画 1 2 はピラー密集帯 1 1 の下流側でピラー密集帯 1 1 と隣り合う。区画 1 2 ではピラーが疎になっている。流路パート 2 5 a はピラー密集帯 1 3 をさらに備える。ピラー密集帯 1 3 はピラー密集帯 1 1 から見た下流方向においてピラー密集帯 1 1 の次に位置するピラー密集帯である。ピラー密集帯 1 3 の構成はピラー密集帯 1 1 と同等であってもよい。

[0076] 図 7 において、区画 1 2 はピラー密集帯 1 1 と、ピラー密集帯 1 3 と、流路パート 2 5 a の側壁すなわち微細流路の側壁とによって囲まれている。流路パート 2 5 a はさらに区画 1 4 を有する。区画 1 4 はピラー密集帯 1 3 の下流側でピラー密集帯 1 3 と隣り合う。流路パート 2 5 a は区画 1 4 の下流にもさらにピラー密集帯を備える。符号 1 5 ～ 1 7 は実施例にて説明する。

[0077] 図 7 において、上述したピラー密集帯 1 1 は血液の流れに対して大きな抵抗となるものではない。またピラー密集帯 1 1 は血液の流速を著しく低下させるものではない。ピラー密集帯 1 1 はフィルターの役割を果たす。ピラー密集帯 1 1 は血液中の不純物、例えば血球よりも大きな不溶成分がピラー密集帯 1 1 の下流の流路パートに入り込まないようにする。また凝集塊となっている血球があれば、一つ一つの血球をバラバラにするという役割を果たす。

[0078] < 7. 前処理の実施例 >

[0079] 本実施例では、図 7 ～ 図 1 1 に基づき血液の前処理方法の例とその効果を説明する。図 7 は後述する。図 8 は前処理に対する評価作業の流れ図である。ステップ S 8 9 において人体より採血する。血液はステップ S 9 0 における前処理の前に 4℃ で、1 ～ 4 8 時間保存したものである。

[0080] 図 8 のステップ S 9 0 において血液を多孔質材の多糖類ビーズで前処理する。これにあたりビーズを事前に洗浄する。まず 1. 5 m L チューブに P B S で 2 倍希釈したビーズを加える。P B S とビーズとを混和した後に、5 0

0 × g で 2 分、R T（室温、25℃）で遠心することで上清を廃棄する。さらに P B S を加えて洗浄を繰り返すことで、全部で 3 回の洗浄作業を行う。洗浄後、元の 2 倍希釈時の体積まで P B S でメスアップする。この P B S とビーズの混合物をビーズ液として血液に添加する。

[0081] 図 8 のステップ S 9 0 において血液にビーズを添加することで血液を前処理する。実施例において血液に対して多糖類の多孔性のビーズ B O 1、B O 2 及び B O 3 を添加しそれぞれ混合する。ビーズの添加量は、希釈した血液 1 m L あたり 5 0 μ L である。混合は 25℃で 3 0 分間、回転混和することで行う。3 0 分間経過後、回転混和をやめ、さらに 3 0 分間、R T で放置する。ビーズ (Beads) の一覧は次の通りである。

[0082] [表1]

Beads	Product name	DNA exclusion limit	Protein fractionation range
B01	Sepharose CL-6B	45 – 165 bp	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$ Da
B02	Sephacryl-500-HR	1078 bp	$4 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ Da
B03	Sephadex G-75	20 – 25 bp, estimated	$3 \times 10^3 - 8 \times 10^4$ Da

[0083] ビーズはいずれも Merck (Sigma-Aldrich) より入手した。製品名 (Product name) の欄に記載の Sepharose、Sephacryl 及び Sephadex はいずれも商標である。

[0084] DNA 排除限界 (DNA Exclusion Limit, Fractionation Range [Mr] DNA Exclusion Limit) は以下の通り説明される。すなわちビーズの微細孔の径の最大値より大きい溶質粒子は微細孔から排除される。溶質粒子として DNA が選択された場合には、その塩基数を基準とした排除の限界がある。Mr は相対分子質量 (relative molecular mass) 。

[0085] タンパク質分画範囲 (Protein fractionation range) は球状タンパク質の分子サイズ (Da) に関する分画範囲 (Fractionation range [Mr], Globular proteins) である。

[0086] ビーズ B O 1、Sepharose CL-6B のゲルマトリックスは 6 % 架橋アガロース

からなる球状体である。粒子径は $45 \sim 165 \mu\text{m}$ 。

- [0087] ビーズB02、Sephacryl 500-HR (Sigma-Aldrich、製品番号S500HR) のゲルマトリックスはアリルデキストランとN, N'-メチレンビスアクリルアミドとの架橋性共重合体からなる。体積基準の積算分布における中央粒子径 (Median particle size of the cumulative volume distribution, Particle size, d_{50V}) は $50 \mu\text{m}$ 以下。粒子径は $25 \sim 75 \mu\text{m}$ 。デキストランを基準とした分画範囲 (Fractionation [Mp] Dextrans) は $4 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ 。Mpはピークトップ分子量 (Peak molecular weight)。デキストランに対する排除限界は 100×10^6 。
- [0088] ビーズB03、Sephadex G-75のゲルマトリックスは架橋デキストランからなる。ウェット状態の粒子径は $90 \sim 280 \mu\text{m}$ 。ドライ状態の粒子径は $40 \sim 120 \mu\text{m}$ 。デキストランを基準とした分画範囲 (Fractionation [Mp] Dextrans) は $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 。デキストランに対する排除限界は 7×10^4 よりも大きい。Sephadex G-50のDNA排除限界は20bpである。またSephadex G-100のDNA排除限界は25bpである。Sephadex G-75はこれらの中間のDNA排除限界を有すると考えられる。したがってSephadex G-75のDNA排除限界は20以上、25以下の範囲にあると推定される。
- [0089] 次に図8に示すステップS91で血液をPBSで希釈する。希釈倍率は2～3倍である。
- [0090] 次に図8に示すステップS92で血球分離チップ (微細流路) に血液を流す。なおビーズを血液中より取り除く処理は一切しなかった。
- [0091] 次に図8に示すステップS93でチップを観察する。観察はステップS92で血液を流し始めてから30～90分後に行う。観察は血液を血球分離チップに流しながら行う。
- [0092] 図7に戻る。観察は区画12に対して行う。USBカメラ (ホーザン株式会社) の下にチップを配置する。チップを平面視しながら観察する。チップをH0ZAN USB cam softwareで撮影して図7の上段に示す画像データを得る。画像データはImageJソフトウェアに読み込み、同ソフトウェア上で解析する。

- [0093] 図7において画像データ中から区画12に相当するエリア15を切り取る。エリア15中の総ピクセル数を区画12の総面積として取り扱う。エリア15中のデブリ部16を目視により流動部17と区別する。デブリ部16はピラー密集帯11を起点に蓄積したデブリで占められている。このデブリがピラー密集帯11の中にまで入り込むとピラー密集帯11の目詰まりの原因となる。デブリ部16によって血球の流れが押しのけられる。これに対して流動部17では血球がスムーズに流れている。
- [0094] 図7において目視によりデブリ部16と流動部17との間に線を引く。線で区切られたデブリ部16内のピクセルの数を求める。区画12内の全てのデブリ部16のピクセル数の総和をデブリ面積とする。区画12の総面積に占めるデブリ面積を百分率で求める。かかる値を目詰まり率とする。
- [0095] 図9には比較例C01における流路パート25aの観察像及びそのスケッチが示されている。比較例C01ではビーズを添加しないこと以外は上記実施例と同様に血液を調製する(No beads)。かかる血液を上記同様に血球分離チップに流す。観察も上記同様に行ったところ、エリア15中、デブリ部16が大部分(70%以上)を占めていた。またデブリが細分化されていた。
- [0096] 図9に示す比較例C01では目詰まり率の算出方法を変更する。エリア15からデブリ部16を除いた部分、すなわち流動部17のピクセル数の総和を得る。これを流動部17の面積として特定する。エリア15の総面積から流動部17の面積を減算して、デブリ部16の推定面積を得る。この推定面積をデブリ面積とする。
- [0097] 図9に示すエリア15は区画12の全範囲に一致する。エリア15は区画12の一部範囲でもよい。
- [0098] 図9において区画12とピラー密集帯11との境界から、ピラー密集帯11の内部に向かってデブリが侵入している。あるいはピラー密集帯11の内部に発生したデブリが区画12にまで連なっているとも推察される。
- [0099] 図10は目詰まり率を表すグラフ1である。ビーズB01及びビーズB0

3で前処理した血液は、比較例C 0 1の血液に比べて目詰まり率が低い。したがって、多孔質性の表面を有する多糖類ビーズは目詰まり防止効果をもたらすことが分かった。

[0100] 図1 1は目詰まり率を表すグラフ2である。ビーズB 0 2及びビーズB 0 3で前処理した血液は、比較例C 0 2 (Control) の血液に比べて目詰まり率が低い。図1 1の結果からも多孔質性の表面を有する多糖類ビーズは目詰まり防止効果をもたらすことが確認できた。なお比較例C 0 2のControlでは血液に対してビーズ及びP B Sの混合物を加えることなく、血液に対して回転混和操作のみ行う。

[0101] 図1 0及び図1 1に示すようにビーズB 0 1及びビーズB 0 2はビーズB 0 3よりも強い目詰まり防止効果を有している。表1に示すようにビーズB 0 1及びビーズB 0 2はビーズB 0 3よりもDNAの排除限界が高い。またビーズB 0 1及びビーズB 0 2はビーズB 0 3に比較して、タンパク質の分画範囲がより大きなタンパク質の側に偏っている。

[0102] 比較例C 0 3として多孔性のないアガロース粉末を上記同様に血液に混合して前処理を行った。比較例C 0 4としてアガロース粉末を溶解して形成したアガロースゲルのスラント型のゼリーの表面に血液を接触させることで前処理を行った。いずれの比較例でも前処理を行わなかった場合と比較して顕著な目詰まり防止効果は見られなかった。多糖類の化学的性質よりも、前処理に用いる材料に多孔性のあることが、目詰まり防止効果を得るのに重要であることが分かった。

[0103] 他の一例として図8においてステップS 9 0で前処理する前に、ステップS 9 1の希釈を先に行う。すなわちステップS 9 0とステップS 9 1の順序を入れ替える。ビーズはB 0 1 (Sephacrose CL-6B) を用いる。この場合でも目詰まり防止効果のあることが確認できた。

[0104] < 8. 前処理と分級の組み合わせの実施例 >

[0105] (1) カットオフと前処理

[0106] 本実施例では前処理用の多孔質の粒子に対して小さな粒子のカットオフを

行う。本実施例ではビーズB01のSephacrose CL-6Bを用いる。1 mLのビーズをナイロン製のセルストレーナー（FALCON、商標）に入れる。スターラーで攪拌しながら一晩かけてビーズに対する濾別を行う。濾別にかかる時間は数時間から24時間でもよい。濾別は蒸留水中で行う。セルストレーナーのメッシュサイズは40 μm 、70 μm 及び100 μm である。濾別は各メッシュサイズのセルストレーナーごとに行う。ここでは70 μm メッシュのセルストレーナーの使用例について詳述する。メッシュサイズがカットオフ径に対応する。カットオフにより濾別された大きな粒子を前処理に用いる。なおメッシュサイズが小さいほど、大きな粒子の収量が多い。ビーズの洗浄をPBSで2回行う。

[0107] 各ビーズを、ビーズと同体積の清澄液で懸濁する。2 mLの清澄液に対してビーズの懸濁液20 μL を添加して、これらをよく混合する。清澄液は予め1%のFBSを添加したPBSである。ビーズと清澄液の混合液を、さらに清澄液に添加する。清澄液の一部を予め血球分離チップに流すことで事前に血球分離チップの内部を緩衝液に浸す。血球分離チップを浸す処理は40分行う。

[0108] (2) カットオフ径の評価

[0109] 分級を終えた血球分離チップを顕微鏡で観察する。カットオフ径70 μm 及び100 μm のビーズで前処理した場合、それぞれ図6に示すようなエントリー流路（流路パート25a）の内部や入口21aの近傍でデブリが観察された。流路はデブリによってやや閉塞していた。これに対し、カットオフ径40 μm のビーズで前処理した場合デブリは見られなかった。また2時間40分にわたって試料血の分級を続けたが流路の閉塞が見られなかった。デブリによる流路閉塞に対する抑制効果を得るにはカットオフ径を70 μm 以下とするのが望ましいことが分かった。カットオフ径は60 μm でもよく、50 μm でもよい。

[0110] なおカットオフ径40 μm 、70 μm 及び100 μm のいずれの場合においても、試料血は全量を血球分離チップで処理することができた。デブリに

よって血球分離チップが閉塞し分画できない試料血が余ることはなかった。

以下の試験ではカットオフ径 $70\ \mu\text{m}$ を採用する。

[0111] (3) 細胞スパイク

[0112] 本実施例ではK562細胞を全血にスパイクすることでCTCのモデルとする。健康なヒトから全血を採取するとともに 4°C で保管する。採血後1日目の全血に対してK562細胞の懸濁液を添加することで試料血を得る。添加量は血液2 mLに対して865.4個とする。K562細胞は慢性骨髄性白血病の患者に由来する、リンパ球様の浮遊性の培養細胞である。

[0113] 添加するK562細胞の数は次のようにして予め推定しておく。まずK562細胞をヘキスト染色する。染色後、顕微鏡で細胞を観察することで細胞数をカウントする。以上によりK562細胞の懸濁液の体積当たりのK562細胞の数が確認できる。

[0114] 試料血を上述のビーズを混合した清澄液(1% FBS-PBS)で5倍に希釈する。ビーズと試料血が接触することで前処理が行われる。希釈した試料血を速やかに血球分離チップに流すことで血球を分級する。分級の結果を図3及び図4に沿って説明すると画分F2にはリンパ球を含む白血球が多く得られる。画分F1に無核の成熟赤血球が多く得られる。なお血球分離チップに流入した細胞は大部分($>99.9\%$)が画分F1に流出する。F3には多くの血球は得られない。K562細胞はリンパ球様であるから画分F2に含まれることが期待される。

[0115] (4) 分級の定量評価

[0116] 分級の定量結果を表2に示す。上段はビーズを試料血に接触させなかった場合(Beads less)を表す。下段は $70\ \mu\text{m}$ でカットオフしたビーズを試料血に接触させた場合(Cut off)を表す。分級を開始後の経過時間(Time course、分)は0~15分、15~45分、45~75分の3つの時間区間に区切られている。

[0117]

[表2]

	Time course (min)	Whole blood					K562 cells			
		Input cell number ($\times 10^9$)	Input volume (mL)	Output volume (F1,F2,F3) (mL)	Output cell number (F1,F2,F3) ($\times 10^9$)	Rate of collection	Input cell conc. (Cells/mL)	Input cell number	Output cell number (F2,F3)	Rate of collection
Beads less	0 - 15	3.18	0.075	0.065	3.56	111.9%	443.0	33.23	34	102.3%
	15 - 45	6.36	0.150	0.146	8.67	136.3%	443.0	66.45	91	136.9%
	45 - 75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cut off	0 - 15	3.18	0.075	0.065	3.39	106.6%	432.7	32.45	26	80.1%
	15 - 45	6.36	0.150	0.153	7.92	124.5%	432.7	64.91	57	87.8%
	45 - 75	6.36	0.150	0.155	8.66	136.2%	432.7	64.91	54	83.2%

[0118] 表2の左側には全血 (Whole blood) に関して、血球を含む試料血中の細胞

の数の集計が示されている。血球分離チップに流入する細胞数 (Input cell number) は、希釈血の単位体積 (mL) あたりの血球数を測定することで得る。測定はPBSで所定の希釈率にて希釈した全血 10 μ L を、TC20 Automated Cell Counter (BIO RAD) で処理することで行う。さらに得られた測定値に希釈率と全血の体積とを掛け合わせて算出する。

[0119] 表2の左側には血球分離チップに流入する試料血中の細胞数 (Input cell number) が示されている。さらに血球分離チップに流入する試料血の体積 (Input volume) が全血に換算された状態で示されている。

[0120] さらに表2には画分F1、F2及び画分F3に流出する細胞の合計数 (Output cell number) ($\times 10^9$) が示されている。流入する細胞数 (Input cell number) に対する、流出する細胞の合計数 (Output cell number) の比が回収率 (Rate of Collection, %) として示されている。表2中には回収率 (Rate of Collection, %) が100%を超えているサンプルがいくつかある。これは、分画を行った全血の体積が小さいことから、細胞数の測定時の希釈や細胞数の測定で誤差が発生することに起因すると推察される。

[0121] 全血中の細胞をビーズとの接触無しで分級する。この場合は、血球分離チップ内に詰まりが発生してしまう。したがって45分を超えて細胞の分級を継続することは困難である。一方でカットオフしたビーズに接触させた全血中の細胞は、そのほぼ全てが回収される。

[0122] (5) 有核細胞の回収率の評価

[0123] 表2の右側にはスパイクしたK562細胞に関して、血球を含む試料血中の細胞の数の集計が示されている。画分F2及び画分F3に流出するK562細胞の数を実測する。なお細胞数の実測に当たりK562細胞と、全血に由来する他の有核細胞とを見分ける必要がある。これはスパイクする前にあらかじめK562細胞をHoechst33342 (Sigma-Aldrich製) で染色しておき、分画後に回収されたフラクションの細胞をキーエンス社のオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 で観察し、核が蛍光標識されている細胞をK562細胞、無いものを全血に由来する他の有核細胞と区別することにより行う。

- [0124] 得られた数値 (Output cell number) は回収率 (Rate of Collection) の算出に用いる。ここで回収率とは、実際に画分 F 2 及び画分 F 3 中に回収された K562 細胞の数を血球分離チップに流入する K562 細胞の数 (Input cell number) に対する百分率で示したものである。
- [0125] 血球分離チップに流入する K562 細胞の数 (Input cell number) は次の通り説明される。ビーズ無し (Beads less) の試験では、試料血を用意するために用いた全血 1 mL あたり 443 個となるように K562 細胞を試料血に混和する。この値は流入する細胞の濃度 (Input cell conc.) として表 2 に表されている。分級開始後 0 ~ 15 分における、分画された試料血の体積 (Input cell volume) は 0.075 mL である。ただしこの値は希釈を考慮し、全血の体積に換算されている。この時間区間において流入する細胞の数 (Input cell number) は $443 \times 0.075 = 33.23$ 個である。この時間区間において全ての K562 細胞が画分 F 2 及び画分 F 3 のいずれかに回収されると仮定すると、33.23 個の K562 細胞が回収される。ビーズ無し (Beads less) のこの時間区間 (Time course, 0 ~ 15 分) では、画分 F 2 及び画分 F 3 に流出する K562 細胞の数 (Output cell number) が 34 個である。この値は回収された K562 細胞の数の実測値である。K562 細胞の回収率 (Rate of Collection) は $34 / 33.23 \times 100 = 102.3\%$ になる。
- [0126] 表 2 において分級開始後 15 ~ 45 分における、分画された試料血の体積 (Input cell volume) は 0.150 mL である。ただしこの値は希釈を考慮し、全血の体積に換算されている。この時間区間において流入する細胞の数 (Input cell number) は $443 \times 0.150 = 66.45$ 個である。画分 F 2 及び画分 F 3 に流出する K562 細胞の数 (Output cell number, 実測値) は 91 個である。K562 細胞の回収率 (Rate of Collection) は $91 / 66.45 \times 100 = 136.9\%$ になる。
- [0127] 表 2 の下段にはカットオフ径 70 μm の場合の K562 細胞の回収率 (Rate of Collection) がさらに示されている。画分 F 2 及び画分 F 3 からなる画分中に見つかった K562 細胞の測定数 (Output cell number) は、各時間区間にお

いて26、57及び54個であった。カットオフ径70 μ mのビーズによる前処理においてK562細胞の回収率(Rate of Collection)はいずれの時間区間でも80%以上であったことから、回収率(Rate of Collection)は十分に高いものと判断される。

[0128] 本実施例はCTCの濃縮のモデル実験として行われる。上記の結果から前処理はCTCの濃縮において有用であることが示される。具体的にはチップの目詰まりを防止することで長時間の分級を行うことができることが示される。本実施例の方法により長時間の分級を行うことで大量の試料血を処理することができる。このことは一回の処理あたりのCTCの取得量が大きいことを示す。またCTCと同様に血液中に微量しか含まれない細胞、例えば妊婦血中の胎児赤芽球の濃縮にもこれらが有効であると考えられる。

[0129] <9. 前処理の評価方法>

[0130] 本発明の他の一態様は血液の前処理に対する評価方法である。図8に戻り、これを参照しながら説明する。ステップS89で細胞を含む血液を採取する。ステップS90で細胞を含む血液に対して前処理を施す。

[0131] ステップS90の前処理においては、細胞を含む血液を被験材料の表面に接触させる。被験材料は粉末状でもよい。被験材料は容器の表面に形成された構造体でもよい。あるいは細胞を含む血液中に被験材料を添加するとともにこれと混合する。被験材料は血液に溶け込むものでもよい。

[0132] 図8に示すようにステップS91で血液を希釈する。希釈倍率は少なくとも2倍であることが好ましい。希釈倍率は例えば2~3倍である。希釈は例えばPBSで行う。希釈はステップS90の前に行ってもよい。すなわちステップS90とステップS91の順序を入れ替えてもよい。ステップS90の前に希釈してからステップS91でさらに希釈してもよい。

[0133] ステップS92で血液を微細流路中に流す。図7に示すように微細流路の途中には血液の流れを横切るようにピラー密集帯11が設けられている。ピラー密集帯11及びその下流側でこれと隣り合う区画12中に生じるデブリ部16を観察する。区画12ではピラーが無い、ピラーが疎になっている

。

[0134] 血液を流し始めてから一定時間経過後に、図 7 に示す区画 1 2 中に生じるデブリ部 1 6 を観測する。時間の長さは例えば 3 0 ～ 9 0 分である。エリア 1 5 に対してデブリ部 1 6 の占める割合を面積比で求める。求め方は上述の実施例にならってもよい。

[0135] なお、本発明は上記実施の形態に限られたものではなく、趣旨を逸脱しない範囲で適宜変更することが可能である。

[0136] この出願は、2 0 1 8 年 1 0 月 2 5 日に出願された日本出願特願 2 0 1 8 - 2 0 0 7 1 2 を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

符号の説明

[0137] 1 1 ピラー密集帯、1 2 区画、1 3 ピラー密集帯、1 4 区画、1 5 エリア、1 6 デブリ部、1 7 流動部、2 0 微細流路、2 1 a - b 入口、2 2 a - c 出口、2 3 主流路、2 4 副流路、2 5 a - d 流路パート、2 6 a - b 枝流路、2 7 無核赤血球、2 8 合流部、2 9 a - c 有核細胞、3 0 シリンジ、3 5 シリンジ、B 0 1 - 0 3 ビーズ、B L 血液、C 0 1 - 0 4 比較例、C F カットオフ径、C L 清澄液、d 5 0 V 中央粒子径、L E 液流、L F 液流、L G 液流、P P 粒子、S 7 9 - 8 2 ステップ、S 8 9 - 9 3 ステップ、S D 寸法

請求の範囲

- [請求項1] 血液を微細流路中に流すことで血液中の細胞を分級する前に、
前記細胞を含む血液を多孔質材の有する多孔質性の表面に接触させる、
血液の前処理方法。
- [請求項2] 前記多孔質材を、前記細胞を含む血液中に添加するとともにこれと混合することで、前記細胞を含む血液を前記多孔質性の表面に接触させる、
請求項1に記載の前処理方法。
- [請求項3] 前記多孔質材は前記多孔質性の表面が多糖類からなる粒子であるとともに、液体中に懸濁された状態で前記細胞を含む血液中に添加される、
請求項2に記載の前処理方法。
- [請求項4] 前記粒子は粒子径分布を有するとともに、その体積基準の積算分布における中央粒子径 d_{50V} が $25 \sim 280 \mu m$ である、
請求項3に記載の前処理方法。
- [請求項5] 前記多孔質材は、前記多孔質材をゲル濾過クロマトグラフィーに用いた場合にDNAを分画することができるものであり、ここで、前記多孔質材の前記DNAに対する排除限界は45塩基対以上である、
請求項4に記載の前処理方法。
- [請求項6] 前記多孔質材は、前記多孔質材をゲル濾過クロマトグラフィーに用いた場合にタンパク質を分画することができるものであり、前記多孔質材の前記タンパク質に対する分画範囲の下限が $1 \times 10^4 Da$ 以上であるか、前記多孔質材の前記タンパク質に対する分画範囲の上限が $4 \times 10^6 Da$ 以上であるかの少なくともいずれかを満たす、
請求項4に記載の前処理方法。
- [請求項7] 前記粒子からは、カットオフ径以下の粒子径を有する小さな粒子が予め除去されており、

前記カットオフ径は25～100 μm の範囲にある、

請求項4に記載の前処理方法。

[請求項8]

前記多孔質材の表面に接触させる血液は他の液体によって希釈されていない全血であるとともに前記多孔質材の表面に接触させた後に全血を他の液体で希釈する、又は

前記多孔質材の表面に接触させる血液は、他の液体によって予め希釈された全血である、

請求項3に記載の前処理方法。

[請求項9]

請求項3に記載の前処理方法に基づき、前記細胞を含む血液を前処理した後、

前記前処理した血液を前記微細流路中に流すことで前記血液中の細胞を水力学的に分級する、

血液中の細胞の分級方法。

[請求項10]

前記前処理において、

前記粒子は粒子径分布を有しているとともに、その体積基準の積算分布における中央粒子径 d_{50V} が25～280 μm であり、さらに

前記粒子からは篩い分けによりカットオフ径以下の小さな粒子が予め除去されており、

前記分級において、

前記微細流路中の前記水力学的な分級を行う箇所の上流には、血液の流れを平面的なものとする扁平なエントリ一流路が設けられており、

前記カットオフ径は、前記エントリ一流路の断面における短手方向の長さよりも大きい、

請求項9に記載の分級方法。

[請求項11]

前記エントリ一流路には、前記血液の流れを横切るようにピラー密集帯が設けられており、

前記ピラー密集帯中の各ピラーは前記短手方向に沿って立っている

、

請求項 10 に記載の分級方法。

[請求項12] 前記分級は胎児由来有核赤血球、循環腫瘍細胞（C T C）及び骨髓腫細胞のいずれかを濃縮するものである、

請求項 11 に記載の分級方法。

[請求項13] 血液の前処理に対する評価方法であって、

細胞を含む血液に対して前処理を施した後、前記血液を微細流路中に流すところ、前記微細流路の途中には前記血液の流れを横切るようにピラー密集帯が設けられており、

前記ピラー密集帯及びその下流側でこれと隣り合う、ピラーが疎になっている区画中に生じるデブリを、血液を流し始めてから一定時間経過後に観測する、

評価方法。

[請求項14] 前記区画は、最も上流のピラー密集帯及びその次に位置するピラー密集帯と前記微細流路の側壁とによって囲まれており、

前記区画を平面視したときに、前記区画に対して前記デブリの占める割合を面積比で求める、

請求項 13 に記載の評価方法。

[請求項15] 前記細胞を含む血液を被験材料の表面に接触させることで前記前処理を行う、

請求項 14 に記載の評価方法。

[請求項16] 前記細胞を含む血液中に被験材料を添加するとともにこれと混合することで前記前処理を行う、

請求項 14 に記載の評価方法。