

明 細 書

発明の名称：血液用デバイス

技術分野

[0001] 本発明は血液用デバイス、特に血球分離用デバイスに関する。また、これらデバイスの使用方法に関する。

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2018/123220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デバイスとその使用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>カラムと前記カラムの下流に位置する微細流路とを備える血液用デバイスであって、

前記カラムは多孔質材を固定相として備え、

前記微細流路に前記多孔質材と接触した血液が流れる、

血液用デバイス。

[0006] <2>前記多孔質材は粒子からなり、

前記カラムは、前記多孔質材を収容可能な収容部をさらに備え、前記収容部の下流の前記微細流路に近い側に、前記多孔質材の粒子をトラップするフィルターをさらに備え、

前記多孔質材の粒子からは、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、

前記フィルターの目開きは、前記カットオフ径よりも小さい、

<1>に記載の血液用デバイス。

[0007] <3>前記カットオフ径は25～100 μm の範囲にある、<2>に記載の血液用デバイス。

[0008] <4>前記フィルターが有する網目の径は20～40 μm の範囲にあり、当該範囲はカットオフ径未満である、<2>又は<3>のいずれか一項に記載の血液用デバイス。

[0009] <5>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d50Vが25～280 μm である、ただし前記粒子径分布はカットオフにより前記小さな粒子を除去する前の粒子径分布を表す、<2>～<4>のいずれか一項に記載の血液用デバイス。

[0010] <6>前記収容部の上流の前記微細流路に遠い側に、前記多孔質材の粒子をトラップするフィルターをさらに備える、

<2>～<5>のいずれか一項に記載の血液用デバイス。

[0011] <7>前記微細流路に前記多孔質材と接触した血液が流れると、前記微細流路が前記血液中の血球を水力学的に分級する、

<1>～<6>のいずれか一項に記載の血液用デバイス。

[0012] <8>前記微細流路は、ピラー密集帯と前記ピラー密集帯の下流に位置する水力学的流路とを備える平面的なチップで作られており、

前記カラムが前記平面的なチップの表又は裏に対して接続し、

前記微細流路から前記血液用デバイスの外部に前記水力学的に分級された血球を放出する出口をさらに備える、

血球分離用の、

<7>に記載の血液用デバイス。

[0013] <9>前記多孔質材は粒子からなり、

前記多孔質材の粒子は、多糖類、シリカ又は樹脂からなる多孔質性の表面を備える、

<1>～<8>のいずれか一項に記載の血液用デバイス。

[0014] <10>前記血液用デバイスは前記カラムと前記微細流路とが別体として提供されるものであり、前記カラムは連結部を有し、前記微細流路は入口を有し、前記連結部と前記入口とを連結することによって前記カラムと前記微細流路とを一体化させてから血液を前記カラムより通す、<1>～<9>のいずれか一項に記載の血液用デバイスの使用方法。

発明の効果

[0015] 本発明により微細流路中の目詰まりの解消に適したデバイスとその使用方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]血液分離用デバイスの模式図。

[図2]カラムの正面図。

[図3]多孔質の粒子の粒子径分布。

[図4]血液分離用デバイスの正面断面図。

[図5]図4のエリアVで示すカラムの拡大正面断面図。

[図6]図1のエリアVⅠで示す微細流路の観察像1（上段）及びそのスケッチ（下段）。実施例。

[図7]図1のエリアVⅠⅠで示す微細流路の部分平面図。

[図8]比較例1に係る微細流路の観察像2（上段）及びそのスケッチ（下段）。

[図9]比較例2に係る微細流路の観察像3（上段）及びそのスケッチ（下段）。

[図10]参考例の微細流路の断面図。

発明を実施するための形態

[0017] <1. 血液分離用デバイス>

[0018] 本発明の一態様は、カラムと前記カラムの下流に位置する微細流路とを備える血液分離用デバイスである。血液には、細胞及び血漿が含まれる。細胞には、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。血液分離用デバイスとは、血液中の細胞をその大きさによって分画する分級を行うためのデバイスである。血液分離用デバイスを用いて血液を分級することによって、特定の細胞腫が濃縮された細胞の集団を得ることができる。分級の例は微細流路内にて行う水力学的分級である。

[0019] 血液分離用デバイスを用いた分級の対象とする血液の種類および濃縮可能な細胞種の例は以下の通りである。

[0020] 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。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。カラムを用いて当該妊婦血を前処理する。微細流路を用いた分級により胎児由来有核赤血球を濃縮する。濃縮された胎児由来有核赤血球より胎児に対する診断に有用なデータを取得する。

[0021] 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（C T C）でもよい。取得される血液はC T Cを含有する。C T C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。カラムを用いて当該血液を前処理する。微細流路を用いた分級によりC T Cを濃縮する。C T Cが血液に含まれているか否かに関わらずC T Cを濃縮するのに必要な工程を実行する。濃縮されたC T Cよりがんの診断に有用なデータを取得する。

[0022] 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。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（M R D）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。かかる患者から採取した血液をカラムを用いて前処理する。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。濃縮された骨髓腫細胞よりM R Dに対する診断に有用なデータを取得する。

- [0023] 以下に水力学的な分級のためのデバイスの一例を示す。まず、図1の模式図を参照して血液分離用デバイス1の全体像について説明する。図1には血液分離用デバイス1が示されている。
- [0024] 図1に示すように、血液分離用デバイス1は、カラム50と微細流路20とを備える。図1に示すように、いくつかの微細流路20を重ねることで、多層構造を有する流路チップ70としてもよい。流路チップ70は1層の微細流路20のみを有するチップでもよい。以下、流路チップ70の最上層の微細流路20について説明する。流路チップ70の最上層よりも下の層は、以下に説明する微細流路20と同様の微細流路を備えていてもよく、異なる微細流路を備えていてもよい。カラム50と微細流路20とは別体として構成されてもよい。カラム50は微細流路20の上流側に配置される。
- [0025] 図1に示すように、カラム50の一端と血液BLを入れたシリンジ30とが連結される。また、カラム50の他端と微細流路20の入口21aとが連結される。カラム50は少なくとも多孔質材51とフィルター53a、bとを備える。一態様においてカラム50はこれに充填された多孔質材51を固定相とし、血液BLを移動相としてカラムクロマトグラフィーを行うためのものである。カラム50の詳細は図2を用いて後述する。血液BLと多孔質材51の多孔質性の表面とを接触させ、血液BL中の成分と反応し相互作用させる。このようにシリンジ30から所定の流量で血液BLを送りカラム50を通過することによって前処理された血液BLが微細流路20の入口21aに入る。
- [0026] 微細流路20は血球をはじめとする浮遊細胞の分離に用いる。図1に示す微細流路20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又は流路チップと呼ぶ場合がある。血液BLは、微細流路20にて分級され各出口22a-cへと到達する。
- [0027] 図1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 2 1 a となっている。主流路 2 3 のもう一方の端は出口 2 2 c となっている。微細流路 2 0 はさらに副流路 2 4 を有する。副流路 2 4 の端は入口 2 1 b となっている。副流路 2 4 の端は合流部 2 8 にて主流路 2 3 に接続している。

[0028] 図 1 において主流路 2 3 は入口 2 1 a から出口 2 2 c に向かって順に流路パート 2 5 a - d を有する。流路パート 2 5 a - d は入口 2 1 a から出口 2 2 c まで一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。

[0029] 図 1 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。

[0030] 図 1 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。

[0031] シリンジ 3 0 からは、所定の流量で血液 B L をカラム 5 0 に送る。カラム 5 0 に送られた血液 B L は入口 2 1 a を経由して流路パート 2 5 a に入る。

[0032] 図 1 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 と連結されている。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。

[0033] 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。図1のエリアV 1 1で示す流路パート2 5 b－dを通過した浮遊細胞の分級過程の詳細については図7を用いて後述する。

[0034] <2. カラムの詳細>

次に、図2を参照してカラム5 0の詳細について説明する。以降、図中のX、Y及びZの各軸はカラム5 0の構成機能を理解するために便宜的に示したものである。

[0035] 図2には正面視したカラム5 0が示されている。カラム5 0はカラム本体6 0を備える。カラム本体6 0は、少なくとも多孔質材5 1と、多孔質材5 1を収容する収容部5 2と、フィルター5 3 a、bとを備える。カラム5 0はさらに連結部5 4、5 5を備えてもよい。連結部5 4はシリンジ3 0に着脱可能である。連結部5 5は微細流路2 0の入口2 1 aに着脱可能である。フィルター5 3 aと連結部5 4との間にチューブ5 6を備えてもよい。

以下、各構成の詳細について説明する。

[0036] <2－1. 多孔質材>

[0037] 多孔質材5 1は表面が多孔質性を有する材料である。換言すると、多孔質材5 1の表面には多数の微細孔が形成されている。多孔質材5 1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。なお、多孔質材5 1は血液中で沈むものでもよい。多孔質材5 1として用いられる粒子からは、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カットオフ径以下の粒子径を有する小さな粒子を予め除去することである。具体的には、メッシュによる篩い分け等で行うことができる。多孔質材のカットオフの詳細は、<3. >にて

後述する。

- [0038] 多孔質材 51 が有する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。例えば多孔質材 51 が全血中に含まれる浮遊細胞の一部と相互作用してもよい。相互作用する成分はそれ自体が微細流路 20 の目詰まりとなるものであってもよい。相互作用する成分は微細流路 20 の目詰まりを間接的に促進するものであってもよい。
- [0039] 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と相互作用してもよい。
- [0040] 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。
- [0041] 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シ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。また、多孔質材の材質はシリカ又は樹脂でもよい。
- [0042] 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 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 以上でもよく、以下でもよい。
- [0043] 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 $4 \times 10^6 \text{ Da}$ 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。

[0044] <2-2. 収容部>

[0045] 図2に示すように、収容部52は多孔質材51を収容可能な構成である。収容部52の形状としては、両端面が開口した端面であり例えば断面視円筒状や角筒状の中空状とすることができる。例えば収容部52の形状を円筒状とした場合、収容部52が角部を有さないことにより角部での多孔質材51及び流す血液BLの滞留を抑制できる。したがって、収容部52の形状は円筒状とすることが特に好ましい。収容部52の形状を断面視円筒状とする場合、当該断面形状には正円、略正円、楕円のいずれも含まれるものとする。

[0046] <2-3. フィルター>

[0047] フィルター53a、bは、多孔質材の粒子は通過できないが、微細流路で分級を行う血液などの所望の液体は通過できる網目構造を有する。すなわち、フィルター53a、bは多孔質材の粒子をトラップする。多孔質材の粒子からは、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いるため、ある一定の粒子径以下の小さな粒子は排除されている。したがって、フィルター53a、bは、多孔質材の粒子のカットオフ径、すなわち多孔質材の粒子に含まれる最小の粒子径より小さく、血球をはじめとする細胞は通過可能な網目構造を備えることが好ましい。ここで、細胞の大きさは、例えば大きいもので $12 \mu\text{m}$ 程度である。したがって、例えば、各網目構造が $20 \sim 40 \mu\text{m}$ の径、特に好ましくは $20 \mu\text{m}$ 径を有するフィルターを用いることができる。すなわち、網目構造の径が揃っていることが好ましい。当該網目構造を備えることにより、フィルター53a、bによって多孔質材の粒子がカラム本体60の外部へと漏れ出すことを抑制できる。

[0048] ここで、本明細書における「網目構造」とは、フィルター53a、bの目開きのことを意味する。網目構造は、直線が縦横に交差するように配置され構成されたものと、多角形が繰り返し配置されたものの両者を含む。直線が

縦横に交差するように配置されたものとして、例えば、格子状のものを含む。網目構造は、円形が繰り返し配置されたものでもよい。

[0049] フィルターは、フィルター５３ｂとして示すように、収容部５２の両端のうち少なくとも微細流路２０の入口２１ａ側に配置できる。すなわち、フィルター５３ｂはカラム５０中の血液の流れの下流側に配置することができる。また、フィルター５３ａ、ｂは収容部５２の両端に配置することもできる。すなわち、フィルター５３ａ、ｂは、カラム５０中の血液の流れの上流側および下流側の両方に配置することができる。つまりフィルター５３ａ、ｂは、収容部５２の両端面に位置する開口端面の全面を完全に覆うように配置できる。フィルター５３ａ、ｂの外径は、収容部５２の開口端面の全面を完全に覆うために少なくとも収容部５２の外径以上の径を有することが好ましい。フィルター５３ａ、ｂを収容部５２の両端面に配置することによって、血液ＢＬは収容部５２に充填された多孔質材５１に接触しつつ、多孔質材５１が外部へ漏れ出ることを抑制できる。

[0050] ＜２－４．連結部＞

[0051] 連結部５４、５５は、カラム本体６０をカラム５０の上流に位置するシリンジ及び下流に位置する微細流路へと連結するための部材である。図２に示すように、連結部５４はシリンジ３０に着脱可能な構成である。連結部５５は微細流路２０の入口２１ａに着脱可能な構成である。連結部５４、５５の形状は特に限定されないが、各構成へと着脱容易な構成とすることが好ましい。例えば、連結部５４は、シリンジ３０の先端の凸部の形状に嵌まる凹部を備える形状とすることができる。

[0052] 例えば、連結部５５は、微細流路２０の入口２１ａの凹部に対応する凸部を備える形状とすることができる。また、各凸部及び凹部の表面にネジ状の溝を設け、互いに回転させ連結することもできる。このような構成とすることにより、カラム５０と微細流路２０とを確実に連結することができ、操作性が向上する。

[0053] 連結部５４、５５の形状は例えば一度シリンジ３０や入口２１ａへと連結

を行うと取り外すことができない構成としてもよい。取り外し不可の構成とした場合、より確実に連結でき、各連結部にシリンジ30からの圧力がかかった場合においても、連結部を流れる血液が外部へと漏れ出にくい。すなわち、連結部における水密性を向上させることができる。

[0054] <2-5. チューブ>

図2に示すように、一態様ではフィルター53aと連結部54との間にチューブ56を備える。チューブ56は可撓性を有していてもよく、例えばシリコン樹脂チューブやポリ塩化ビニルのチューブ等を用いることができる。チューブ56を備えることによって、血液を送り込むシリンジからカラム本体60までの距離を取ることができる。例えばチューブ56上にピンチバルブを設けてもよい。また、カラム50を微細流路20中に配置する場合は、フィルター53bと連結部55との間に別途チューブを設けてもよい。なお、シリンジ30からカラム本体60までの距離が短い場合、チューブ56は備えなくてもよい。チューブ56を備えず、<2-4.>にて説明した連結部54を備える場合、例えばフィルター53aに連結部54が直接連結された構成とすることも可能である。

[0055] <3. 多孔質材の粒子のカットオフ>

[0056] 次に、図3を参照して多孔質の粒子の粒径分布について説明した後、多孔質材の粒子のカットオフについてより詳細に説明する。カットオフとは、多孔質材の粒子から小さい粒子を取り除くことを意味する。

[0057] 図3には多孔質の粒子の粒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ー回折・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。

[0058] 図3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。

[0059] 図3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。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。すなわち、カットオフ径 C_F は多孔質材の粒子に含まれる最小の粒子径を意味する。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 の範囲は $25 \sim 70 \mu m$ であり、好ましくは $40 \sim 70 \mu m$ である。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、血中に混ざった多孔質材中の小さな粒子による微細流路の目詰まりを抑制できる。

[0060] 微細流路の種類によっては微細流路に進入した多孔質材中の小さな粒子が何事もなく微細流路から流し出される。そのような微細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。したがってそのような微細流路に対しても、多孔質材の粒子を適用することは目詰まりの抑制に有効であり、また多孔質材の粒子において小さな粒子をカットオフしているか否かに関わらない。

[0061] 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。

[0062] 以上が本発明に係る血液分離用デバイスである。

カラムと微細流路とは別体として構成されてもよい。使用時に、カラムと

微細流路とを組み合わせることで1つの血球分離用デバイスとして使用することができる。カラムと微細流路とは、例えば上述の凹凸構造を備える連結部によって連結することができる。また、例えば凹凸構造の表面にネジ状の溝を備える連結部によっても連結することができる。

[0063] また、カラムと微細流路とは一体として構成されてもよい。例えば微細流路の入口に連結されたカラム構造を備える構造としてもよい。また、本発明に係る血液分離用デバイスは、シリンジと一体型のカートリッジとしてもよい。さらにこのカートリッジを、微細流路を駆動するための駆動装置に接続するか、又は駆動装置内部に配置するなどして用いてもよい。

[0064] 以下、図4～図7を参照して血液分離用デバイスを用いた血液の分級過程の詳細について説明する。

[0065] <4. 血液の流れの概略>

[0066] 以下、図4を参照して血液分離用デバイス内部の血液の流れを説明する。

図では、血液分離用デバイスを正面側から断面視している。白抜き矢印は血液B Lの一連の流れを示す。本例の流路チップ70は微細流路20及びこれと同等の微細流路からなる8層を有する。流路チップ70の最上層は、微細流路20の入口21aに接続する入口71を取り付けた板状のシートからなる。入口71は、流路チップ70の微細流路20の入口21aとその他の微細流路の入口とを束ねる入口である。流路チップ70はその最下層に、微細流路20の出口22cに接続する出口72を備える。出口72は、流路チップ70の微細流路20の出口22cとその他の微細流路の出口とを束ねる出口である。白抜き矢印が示すように、シリンジ30から送られた血液B Lは、カラム50を通過する。カラム50内での血液B Lのふるまいは図5を用いて後述する。

[0067] 以下、流路チップ70のうち、最上層の微細流路20について説明する。他の層も微細流路20と同様の構成を備える。図4に示すように、カラム50と入口71を通過した血液B Lは、入口21aより微細流路20内に入る。微細流路20中に入った血液B Lは、積層された微細流路20の各層に形

成された主流路23に入る。流路パート25aはフィルターの役割を果たすピラー密集帯11、13と、区画12、14とを備える。図4では、ピラー密集帯11、13は縦線のハッチングで示す。流路パート25aの詳細は図6を用いて後述する。つまり、微細流路20は、ピラー密集帯11、13と、当該ピラー密集帯11、13の下流に位置する水力学的流路とを備える平面的なチップで作られている。

[0068] 図4において、流路パート25aを通過した血液は続いて図1に示した流路パート25b-dを通過する。これにより微細流路20は血液に含まれる浮遊細胞を分級する。流路チップ70中の下層の微細流路も同様に浮遊細胞を分級する。分級された浮遊細胞のうち出口22cを経由した先の出口72には画分F3が到達する。浮遊細胞を分級する過程の詳細は図7を用いて後述する。

[0069] <5. カラムと血液との相互作用>

[0070] 以下、図5を参照し、カラムと血液との相互作用を説明する。図5は図4のエリアVで示すカラム50の拡大正面断面図である。図5にはカラムと血液との相互作用の様子が示されている。

[0071] 図5では説明を簡単にするため、微細流路20と微細流路の下層の流路を代表する微細流路80との合計2層のみを示す。

[0072] 図5では血液の流れを黒矢印で示す。血液BLは無核赤血球27、有核細胞29a-c及び沈殿原因物質CCを含む。有核細胞29a-cはそれぞれ大きさが異なる細胞である。沈殿原因物質CCは、微細流路20及び微細流路80の詰まり（デブリ）の一因と推測される物質である。

[0073] 図5に示すように、シリンジ30から所定の流量で送られた血液BLは、カラム50のカラム本体60を通過する。図5に示すように、多孔質材51中を沈殿原因物質CCが通過する。ここで多孔質材51は、血液中に含まれる沈殿原因物質CCと相互作用することで、これらの沈殿性を大幅に低下させる。十分量の多孔質材51を用いることで、沈殿原因物質CCが微細流路20のゲル状のデブリをほとんど形成しない程度までその沈殿性を低下させ

ることが好ましい。多孔質材 51 が沈殿原因物質 CC を吸着することで微細流路 20 及びその他の微細流路の詰まり（デブリ）の発生を抑制してもよい。一方、無核赤血球 27 及び有核細胞 29 a - c は多孔質材 51 の隙間を流れていく。したがって多孔質材 51 は血球の流れを妨げない。

[0074] <6. ピラー密集帯>

[0075] カラム 50 を通過した血液は続いて主流路 23 が備えるピラー密集帯 11 を通過する。以下、図 6 を参照し、ピラー密集帯について説明する。

[0076] 図 6 には図 1 のエリア V I で示す微細流路の観察像（上段）及びそのスケッチ（下段）が示されている。図 6 を参照してピラー密集帯 11 について説明する。図 6 は実施例の観察像でもある。実施例については後述する。

[0077] 図 6 に示すピラー密集帯 11 はフィルターの役割を果たす。ピラー密集帯 11 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 11 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。ピラー密集帯 11 は流路パート 25 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（白抜き矢印で示す）。ピラー密集帯 11 は流路パート 25 a の上面と下面とを連結している。各ピラーの形状は血液の流れに対して大きな抵抗となる形状ではない。すなわち、各ピラーの形状は流体に対する抵抗が少なくなる形状が好ましく、例えば平面視で円状、楕円状、流線形を有する滴型とすることができる。図 6 では一例として滴型のピラーを示したがこれに限定されるものではない。またピラー密集帯 11 は血液の流速を著しく低下させるものではない。

[0078] 図 6 において流路パート 25 a は区画 12 を有する。区画 12 はピラー密集帯 11 の下流側でピラー密集帯 11 と隣り合う。区画 12 ではピラーが疎になっている。流路パート 25 a はピラー密集帯 13 をさらに備える。ピラー密集帯 13 はピラー密集帯 11 から見た下流方向においてピラー密集帯 11 の次に位置するピラー密集帯である。ピラー密集帯 13 の構成はピラー密集帯 11 と同等であってもよい。

- [0079] 図6において、区画12はピラー密集帯11と、ピラー密集帯13と、流路パート25a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25aはさらに区画14を有する。区画14はピラー密集帯13の下流側でピラー密集帯13と隣り合う。流路パート25aは区画14の下流にもさらにピラー密集帯を備える。符号15、17は実施例にて説明する。
- [0080] <7. 微細流路の浮遊細胞分級過程>
- [0081] 流路パート25aが備えるピラー密集帯11を通過した血液に含まれる浮遊細胞は、続いて流路パート25b-dにおいて分級される。以下、図7を参照し、微細流路の浮遊細胞分級過程について説明する。
- [0082] 図7には平面視した微細流路20が示されている。図は微細流路20による浮遊細胞の分級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26aには10本の細流路が、支流路26bには3本の細流路が示されている。
- [0083] 図7に示すように、流路パート25bのさらに上流である流路パート25a（図7では不図示）から血液BLが連続的に流れてくる。血液BLは細胞を大量に含んでいる。血液BLの流れに対して、その側方より清澄液CLの流れを連続的に接触させる。これにより主流路23を流れる細胞を、主流路23の側方から連続的に押し込む。結果として血液BLの流れは清澄液CLの流れとは反対側に連続的に押し込まれる。流路パート25b-cにおいて、支流路26a及び26b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。
- [0084] 図7に示すように、支流路26aには無核赤血球27が連続的に流れ込む。流路パート25bにおいて血液BL中の無核赤血球27を水力学的に分級する。分級は血液BLの流れのうち、清澄液CLの流れとは接触していない側で連続的に行われる。
- [0085] 図7に示すように、支流路26aは無核赤血球27の除去流路として働く。支流路26aの有する細流路の内接径は12~19 μ mである。内接径は13、14、15、16、17、及び18 μ mのいずれかでもよい。

[0086] 図7に示すように支流路26bには有核細胞29a-cが連続的に流れ込む。流路パート25bの下流の流路パート25cにおいて、血液BL中の有核細胞29a-cを水力学的に分級する。分級は血液BLの流れのうち、清澄液CL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26bより有核細胞の細胞懸濁液を連続的に得る。

[0087] 図7に示すように支流路26bは有核細胞29a-cの回収流路として働く。支流路26bの有する細流路の内接径は20~30 μm である。内接径は21、22、23、24、25、26、27、28及び29 μm 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 μm と考えられる。

[0088] 図7に示す支流路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。他の支流路において同様である。支流路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1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。

[0089] 以上により、支流路26a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29a及びその他の有核細胞は下流で分級を受ける。

[0090] 以上が一実施形態に係る血液分離用デバイスを用いて分級を行う一連の流れである。

[0091] <実施例>

本実施例では、図6、8及び9を参照し、カラムによる微細流路の目詰まり解消効果を調べた実施例及び比較例とその効果を説明する。

本実施例の一連の流れは次の(1)~(5)の通りである。

(1) 多孔質の粒子であるビーズに含まれる小さな粒子のカットオフを行う。

(2) 血液に蛍光パーティクルをスパイクして試料血を得る。

(3) 血液を血液分離用デバイスに流し、分級する。

(4) 分級後、F 1 - F 3 分画を回収し、蛍光パーティクルの回収率を評価する。

(5) 分級中の血球分離チップの目詰まり率を評価する。

上記(1)～(3)は実施例で行う分級の説明である。(4)は分級の結果得られたデータの評価である。(5)は分級中に得られたデータの評価である。

[0092] (1-1.) カットオフ

[0093] 本実施例では多孔質の粒子に対して小さな粒子のカットオフを行う。本実施例では多孔質の粒子としてビーズのSephacrose CL-6Bを用いる。Sephacroseは商標である。Sephacrose CL6B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。カットオフ前の粒子径は45～165 μm である。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。セルストレーナーの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カラムに収容し、前処理に用いる。なおメッシュサイズが小さいほど、メッシュ上に濾別される粒子の数が増える。ビーズの洗浄をPBSで2回行う。

[0094] 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PBSをベースにした緩衝液である。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。

[0095] (1-2.) カットオフ径の評価

[0096] 分級を終えた血球分離チップを顕微鏡で観察する。100 μm のビーズをカラムに入れて血液を前処理した場合、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目詰まりを起こしていた。これに対し、カットオフ径70 μm 及び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目詰まりが見られなかった。デブリによる流路の目詰まり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。

[0097] 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目詰まり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 μm を採用する。

[0098] カットオフを行ったビーズをカラムの収容部に収容する。カラムには例えばカットオフ径70 μm のビーズを50 μL 収容する。

[0099] (2) 血液への蛍光パーティクルのスパイク

[0100] 本実施例における「血液」とは、健康なヒトの成人から採取した全血である。血液を採取する際に用いる採血管には、血液凝固を抑制するクエン酸およびEDTAが含まれる。指定量の血液を採血管内に採取することで、自動的に適切な分量のクエン酸およびEDTAが血液中に添加される。採血後4℃で保存されていた3日目の全血に対して蛍光パーティクルをスパイクすることで試料血を得る。ここでスパイクとは細胞か細胞を模したものを微量加えることをいう。「蛍光パーティクル」とは、妊婦血に含まれる微量の胎児由来有核赤血球を模した球状の粒子である。例えば図5では有核細胞29a-cに相当するものである。得られた試料血に清澄液(PBSをベースにした緩衝液)を加え、5倍に希釈する。本実施例では直径の異なる2種類の蛍光パーティクルを血液にスパイクする。具体的には直径8.42 μm と直径10 μm

の樹脂製の蛍光パーティクルを血液にスパイクする。直径 $8.42\text{ }\mu\text{m}$ の蛍光パーティクルとして、SpheroTech社のFITC Particles (cat#F1CP-80-2)を用いる。 $10.0\text{ }\mu\text{m}$ の蛍光パーティクルとして、Invitrogen社のFluoSpheres (商標) polystyrene microspheres, $10\text{ }\mu\text{m}$, blue fluorescent (365/415)を用いる。希釈血 1 mL に対し、直径 $8.42\text{ }\mu\text{m}$ と直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ の、直径の異なる各蛍光パーティクルをそれぞれ 60 個ずつ合計 120 個スパイクする。なお、蛍光パーティクルのスパイク後に全血の希釈を行ってもよい。例えば、全血 1 mL に対し、直径 $8.42\text{ }\mu\text{m}$ と直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ の、直径の異なる各蛍光パーティクルをそれぞれ 300 個ずつスパイクし、 5 倍に希釈してもよい。

[0101] (3) 血球分離チップによる分級

[0102] 希釈した試料血をカラムに通すことで前処理を行い、1層の血球分離チップによって分級し、蛍光パーティクルを回収する。分級の結果を図1及び図6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。蛍光パーティクル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。

[0103] 実施例、比較例1及び比較例2において流す試料血は上記(2)で述べた通りであり、同条件である。シリンジから試料血を送る速度を $20\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ とする。シリンジから清澄液を送る速度を $40\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ とする。分級開始後 90 分、試料血を 1.8 mL 流した時点において、F1～F3分画蛍光パーティクルからなる画分から蛍光パーティクルを回収し、回収率を求める。

[0104] 実施例と、比較例1及び比較例2とで異なる点は、血液分離用デバイスのカラムの構成である。

実施例のカラムはCL-6Bビーズ及びフィルターの両方を備える。カラムにはカットオフ径 $70\text{ }\mu\text{m}$ のCL-6Bビーズが $50\text{ }\mu\text{L}$ 充填されている。フィルターの網目は格子状であり、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 径である。

比較例 1 はカラムを備えない。すなわち、比較例 1 では CL-6B ビーズ及びフィルターの両方を備えない。試料血は直接血球分離チップへと導入される。

比較例 2 のカラムは CL-6B ビーズが充填されていない。すなわち、比較例 2 のカラムはフィルターのみを備え、CL-6B ビーズは備えない。フィルターの網目は実施例と同様格子状であり、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 径である。

[0105] (4) 蛍光パーティクルの回収率の評価

[0106] 蛍光パーティクルの回収率は、以下の式 1 を用いて求めることができる。

[式 1]

[蛍光パーティクル回収率 (%)] = (一定時間に回収された蛍光パーティクルの数) / (一定時間内に分画された血球に含まれている蛍光パーティクル数の期待値) * 100

「一定時間に回収された蛍光パーティクルの数」は実際に測定することで見つかった蛍光パーティクルの数である。

上記 [式 1] の「一定時間内に分画された血球に含まれている蛍光パーティクル数の期待値」は以下の式 2 を用いて求めることができる。

[式 2]

[一定時間内に分画された血球に含まれている蛍光パーティクル数の期待値 (個)] = { (一定時間内に分画された血球数 (cells)) / (全血 1 mL あたりの血球数 (cells/mL)) } * (蛍光パーティクルを 5 倍希釈血に加えた時点での全血 1 mL あたりの蛍光パーティクルの個数 (個 / mL))

[0107] 実施例及び比較例 1、2 の蛍光パーティクルの回収率を以下の表 1 に示す。

[0108] [表1]

表 1. 実施例及び比較例 1、2 の蛍光パーティクルの回収率を示す。

	CL-6B ビーズ	フィルター	蛍光パーティクルの回収率 (%)	
			直径 $8.42\text{ }\mu\text{m}$	直径 $10\text{ }\mu\text{m}$
実施例	+	+	84.5	110.4
比較例 1	—	—	96.6	114.7
比較例 2	—	+	109.8	114.3

- [0109] 実施例について、表1の上段にはカットオフ径70 μ mのCL-6Bビーズ、試料血を90分間流した場合の蛍光パーティクルの回収率が示されている。F1～F3からなる画分から測定により見つかった蛍光パーティクルの数は、直径8.42 μ mの蛍光パーティクルが76個、直径10.0 μ mの蛍光パーティクルが85個である。画分F1～F3からなる画分から見つかった血球数は 1.27×10^9 個である。蛍光パーティクルを加える前の全血の1mLあたりの血球数は 4.42×10^9 個である。蛍光パーティクルを5倍希釈血に加えた時点での全血1mLあたりの蛍光パーティクルの個数は直径8.42 μ mのものが313個、直径10 μ mのものが268個である。以上の測定値より上記計算式〔式1〕及び〔式2〕を用いて求めた蛍光パーティクルの回収率は、直径8.42 μ mのものは84.5%であり、直径10 μ mのものは110.4%であった。
- [0110] 比較例1について、表1の中段にはカットオフ径70 μ m、試料血を90分間流した場合の蛍光パーティクルの回収率が示されている。F1～F3からなる画分から測定により見つかった蛍光パーティクルの数は、直径8.42 μ mの蛍光パーティクルが114個、直径10.0 μ mの蛍光パーティクルが131個である。画分F1～F3からなる画分から見つかった血球数は 1.70×10^9 個である。蛍光パーティクルを加える前の全血の1mLあたりの血球数は 4.42×10^9 個である。蛍光パーティクルを5倍希釈血に加えた時点での全血1mLあたりの蛍光パーティクルの個数は直径8.42 μ mのものが307個、直径10 μ mのものが297個である。以上の測定値より上記計算式〔式1〕及び〔式2〕を用いて求めた蛍光パーティクルの回収率は、直径8.42 μ mのものは96.6%であり、直径10 μ mのものは114.7%であった。
- [0111] 比較例2について、表1の下段にはカットオフ径70 μ m、試料血を90分間流した場合の蛍光パーティクルの回収率が示されている。F1～F3からなる画分から測定により見つかった蛍光パーティクルの数は、直径8.42 μ mの蛍光パーティクルが133個、直径10.0 μ mの蛍光パーティク

ルが127個である。画分F1～F3からなる画分から見つかった血球数は 1.71×10^9 個/mLである。蛍光パーティクルを加える前の全血の1 mLあたりの血球数は 4.42×10^9 個である。蛍光パーティクルを5倍希釈血に加えた時点での全血1 mLあたりの蛍光パーティクルの個数は直径8.42 μ mのものが313個、直径10 μ mのものが289個である。以上の測定値より上記計算式〔式1〕及び〔式2〕を用いて求めた蛍光パーティクルの回収率は、直径8.42 μ mのものは109.8%であり、直径10 μ mのものは114.3%であった。

[0112] カットオフ径70 μ mのCL-6Bビーズを用いた場合、胎児由来有核赤血球の代替として用いた蛍光パーティクルの回収率はいずれも80%以上であったことから、回収率は十分に高いものと判断される。

[0113] 本実施例は胎児由来有核赤血球の濃縮のモデル実験として行われる。上記の結果からカラムを用いた前処理は胎児由来有核赤血球の濃縮において有用であることが示される。具体的には血球分離チップの目詰まりを抑制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。本実施例の血液分離用デバイスを用いた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胎児由来有核赤血球の取得量が大きいことを示す。

[0114] (5) 血球分離チップの目詰まり率の評価

[0115] 以下、血球分離チップの目詰まり率の評価について、図6、8及び9を参照し説明する。

上記(4)で分級を終える前に、血液をチップに流している状態で図1の微細流路20(血球分離チップ、以下チップ)の画像データを取得する。当該取得した画像データについて画像解析を行うことによって目詰まり率の評価を行う。具体的には、図1のチップの主流路23(流路パート25a)を評価する。本実施例と、比較例1及び比較例2における流路パート25aの評価は、試料血を流し始めてから30～90分後に行う。実施例では目詰まりは観察されず、比較例1及び2において目詰まりが観察された。以下、

目詰まりが生じた比較例 1 を示す図 8 を参照し、具体的な目詰まり率の評価方法について説明する。

- [0116] 図 8 には比較例 1 における流路パート 25 a の観察像（上段）及びそのスケッチ（下段）が示されている。図 8 は図 1 のエリア V I で示した部分の拡大図である。目詰まり率の評価は区画 12 に対して行う。USB カメラ（ホーザン株式会社）の下に試料血を流し続けている状態のチップを配置する。チップを平面視しながら観察像を取得する。チップを H0ZAN USB cam software で撮影して図 8 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。
- [0117] 図 8 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。「デブリ」とは、試料血に含まれる沈殿原因物質 C C（図 5 参照）から形成されたゲル状の物質である。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つけられる。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。
- [0118] 図 8 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。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。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。
- [0119] 図 9 には比較例 2 における流路パート 25 a の観察像（上段）及びそのスケッチ（下段）が示されている。図 6 には実施例 1 における流路パート 25 a の観察像（上段）及びそのスケッチ（下段）が示されている。
- [0120] 上述の通り（（4）参照）、比較例 1、比較例 2 及び実施例のカラムの条件は以下の通りである。

比較例 1 はカラムを備えない。すなわち、比較例 1 では CL-6B ビーズ及びフィルターの両方を備えない。試料血は直接血球分離チップへと導入される。

比較例 2 のカラムは CL-6B ビーズが充填されていない。すなわち、比較例 2 のカラムはフィルターのみを備え、CL-6B ビーズは備えない。フィルターの網目は格子状であり、 $20\mu\text{m}$ 径である。

実施例のカラムは CL-6B ビーズ及びフィルターの両方を備える。カラムにはカットオフ径 $70\mu\text{m}$ の CL-6B ビーズが $50\mu\text{L}$ 充填されている。フィルターの網目は格子状であり、 $20\mu\text{m}$ 径である。

[0121] 実施例及び比較例 1、2 の血球分離チップの目詰まり率を以下の表 2 に示す。当該目詰まり率は、試料血を 90 分間流した時点における目詰まり率である。

[0122] [表2]

表2. 実施例及び比較例1、2の血球分離チップの目詰まり率を示す。

	CL-6B ビーズ	フィルター	血球分離チップの目詰まり率(%)
実施例	+	+	0.0
比較例1	—	—	46.6
比較例2	—	+	96.5

[0123] 表 2 に示すように、CL-6B ビーズ及びフィルターの両方を備えない比較例 1 では、目詰まり率は 46.6% であった。また、フィルターのみを備え、CL-6B ビーズは備えないカラムを有する比較例 2 では、目詰まり率は 96.5% に上昇し、区画 12 のほとんどが目詰まりを起こしていた。これは、フィルター単体では目詰まりを抑制しないことを示している。図 8 及び図 9 に示すように、各比較例ではピラー密集帯 11 からデブリが連なるようにして目詰まりを生じていることが推察される。さらに、比較例 2 では比較例 1 に比べて目詰まり率が上昇していることから、フィルターによってデブリの原因である沈殿原因物質が発生しやすくなることが考えられる。

[0124] これに対し、CL-6B ビーズ及びフィルターの両方を備えるカラムを有する実施例ではデブリが観察されず、目詰まり率は 0.0% であった。以上の結果より、CL-6B ビーズ及びフィルターを備えるカラムは、デブリの発生を抑制す

ることができる。したがって、目詰まりの解消に適した血液分離用デバイスを提供することが可能となる。さらに、本実施例及び各比較例において使用した血液は、採血後3日経過した血液である。そのような血液であっても、少量のビーズを用いることによって胎児由来有核赤血球等の稀少細胞を回収することが可能となる。

[0125] <参考例>

図10は、カラムを用いずに分級を行っている様子を表す参考例である。図は、微細流路20に血液BLとともに多孔質材51を流し入れる様子を示す部分正面断面図である。血液BLは無核赤血球27、有核細胞29a-c及び沈殿原因物質CCを含む。多孔質材51は例えば沈殿原因物質CCと相互作用し、微細流路20中の目詰まり解消効果を備えるものである。

[0126] 図10において、微細流路80は図5で説明した下層の微細流路である。微細流路80は入口81aと主流路83とを備える。入口81aは微細流路20の入口21aと同等である。主流路83は微細流路20の主流路23と同等である。

[0127] 図10では血液の流れを黒矢印で示す。血液BLは微細流路20の入口21aを経由して主流路23へと入る。血液BLの流し始めは、多孔質材51が入口81aに溜まる。入口21aには溜まらない。主流路23や主流路83には多孔質材51は進入しない。すなわち、血液BLの流し始めでは、入口81aに充填された多孔質材51が血液BLと相互作用する。その一方で、入口21aでは多孔質材51が充填されていないので多孔質材51による目詰まり解消効果を得られない可能性がある。つまり、血液BLとともに流し入れる多孔質材51の量が少ない場合、流路チップ70の上部において多孔質材51による微細流路20中の目詰まり解消効果にばらつきが生じ得る可能性がある。これに対し、カラムにCL-6Bビーズ及びフィルターの両方を備える実施例では、血液BLが主流路23に入る前に血液BLとCL-6Bビーズとが反応するため、分級される前に沈殿原因物質を除去することができる。したがって特にビーズの量が少ない場合に本実施例に係るカラムを備える血液

分離用デバイスは有利である。

[0128] 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。例えば血球分離用デバイスはその他の血液用デバイスであってもよい。一例において、血液用デバイスはカラムと、カラムの下流に位置する微細流路とを備える。カラムは多孔質材を固定相として備える。多孔質材と接触した血液が微細流路に流れる。一例において、血液用デバイスは血液分析デバイスである。血液は微細流路内で物理的にあるいは化学的に分析される。

[0129] この出願は、2019年10月23日に出願された日本出願特願2019-192420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

[0130] 1 血球分離用デバイス、11 ピラー密集帯、12 区画、13 ピラー密集帯、14 区画、15 エリア、16 デブリ部、17 流動部、20 微細流路、21 a, b 入口、22 a-c 出口、23 主流路、25 a-d 流路パート、26 a, b 支流路、27 無核赤血球、28 合流部、29 a-c 有核細胞、30 シリンジ、35 シリンジ、50 カラム、51 多孔質材、52 収容部、53 a, b フィルター、54 連結部、55 連結部、56 チューブ、60 カラム本体、70 流路チップ、71 入口、72 出口、80 微細流路、81 a 入口、83 主流路、BL 血液、CC 沈殿原因物質、CF カットオフ径、CL 清澄液、F1-F3 画分