

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5920895号
(P5920895)

(45) 発行日 平成28年5月25日(2016.5.25)

(24) 登録日 平成28年4月22日(2016.4.22)

| | | | | | |
|----------------|--------------|------------------|---------|-------|-------|
| (51) Int. Cl. | | F I | | | |
| C 1 2 N | 5/00 | (2006.01) | C 1 2 N | 5/00 | |
| C 1 2 N | 5/09 | (2010.01) | C 1 2 N | 5/09 | |
| G O 1 N | 37/00 | (2006.01) | G O 1 N | 37/00 | 1 0 1 |
| C 1 2 M | 1/00 | (2006.01) | C 1 2 M | 1/00 | A |

請求項の数 19 (全 19 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2013-528369 (P2013-528369) | (73) 特許権者 | 506115514 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年9月12日 (2011.9.12) | | ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア |
| (65) 公表番号 | 特表2013-541331 (P2013-541331A) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トゥエルフス フロ ア |
| (43) 公表日 | 平成25年11月14日 (2013.11.14) | (74) 代理人 | 110001302 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2011/051224 | | 特許業務法人北青山インターナショナル |
| (87) 国際公開番号 | W02012/037030 | (72) 発明者 | ディ カルロ, ディノ |
| (87) 国際公開日 | 平成24年3月22日 (2012.3.22) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90 024, ロサンゼルス, レプリングアベニ ュー 919, アpartment 108 |
| 審査請求日 | 平成26年9月10日 (2014.9.10) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/382, 840 | | |
| (32) 優先日 | 平成22年9月14日 (2010.9.14) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体捕獲渦を使用して不均一溶液から細胞を単離する方法及びデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞を単離する方法において：

インレットとアウトレットに接続された少なくとも一のマイクロ流体チャネルを有するマイクロ流体デバイスであって、前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルが当該チャネルの長さに沿って配置された少なくとも一の拡張領域を具え、前記少なくとも一の拡張領域が、流体の流れに応じて前記少なくとも一の拡張領域内に渦を発生させるように構成された、前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法において急激に増大する部分を具える、マイクロ流体デバイスを提供するステップと；

細胞集団を含む溶液を前記インレットに流すステップと；

前記少なくとも一の拡張領域内にできた渦の中の少なくともいくつかの細胞であって、その径が10 μmを超えるいくつかの細胞を捕獲するステップと；

前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルを通る溶液の流速を下げることによって、前記複数の拡張領域から前記捕獲した細胞を放出するステップと；
を具えることを特徴とする方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法において、前記インレットに流れる溶液が均質な細胞集団を含むことを特徴とする方法。

【請求項3】

請求項1に記載の方法において、前記インレットに流れる溶液が不均質な細胞集団を含

10

20

むことを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも一の拡張領域が、流れの軸に対して少なくとも 45° を成して延在する立ち上がり壁を具えることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも一の拡張領域が、矩形、正方形、三角形、多角形、または半円形のプロファイルを有することを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも一の拡張領域が、前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法が急激に減少する部分を具えることを特徴とする方法。

10

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも一の拡張領域が、前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法が実質的に減少しないことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも一の拡張領域が、前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法が徐々に減少する部分を具えることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法において、前記放出された細胞が前記アウトレットで回収されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

20

請求項 1 に記載の方法において、直径が $15 \mu\text{m}$ より大きい細胞が前記渦の中に捕獲されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法において、前記捕獲された細胞ががん細胞を含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法において、前記捕獲された細胞を放出するステップが、前記少なくとも一のマイクロ流体チャネルを通る溶液の流速をほぼゼロに下げるステップと、洗浄溶液を流し始めるステップと、を具えることを特徴とする方法。

【請求項 13】

30

請求項 3 に記載の方法において、前記不均質細胞集団が、がん細胞を含む集団を具え、当該がん細胞が前記渦の中に捕獲されることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 3 に記載の方法において、前記不均質細胞集団を含む溶液が、血液、尿、胸膜液、及び腹膜洗浄液の一つを含むことを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法において、前記マイクロ流体デバイスが、前記インレット及び前記アウトレットに接続された複数のマイクロ流体チャネルを具えることを特徴とする方法。

【請求項 16】

40

請求項 1 に記載の方法において、前記複数のマイクロ流体チャネルが、二次元アレイ、又は、三次元アレイに配置されていることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の方法において、前記捕獲した細胞が、ある閾値を超えるサイズであり、当該閾値を下回るサイズの細胞が前記渦を実質的に通過することを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の方法が更に、一またはそれ以上の溶液をインレットに流す一方で、前記捕獲した細胞を含む前記渦を連続的に維持するステップを具えることを特徴とする方法。

【請求項 19】

50

請求項 18 に記載の方法において、前記一またはそれ以上の溶液が、標識、固定剤、透過剤、及び洗浄液のうちの少なくとも一つを具えることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2010年9月14日に提出された米国暫定特許出願第61/382,840号の優先権を主張する。優先権は35 U.S.C. § 119に基づく。上述の特許出願は、ここに完全に記載されているものとして引用により組み込まれている。

【0002】

10

技術分野

本発明が属する分野は、一般的に、細胞又は粒子の単離と選別を行うマイクロ流体デバイスおよび方法に関する。特に、本発明が属する分野は、マイクロ流体捕獲渦を使用して細胞又は粒子を不均一溶液から単離するマイクロ流体デバイスおよび方法に関する。

【背景技術】

【0003】

標準的な卓上遠心分離機は、生命科学の研究所で細胞生物学研究と医療診断における試料調整に普遍的に使用されている最も一般的な器具の一つである。典型的な調整手順では、細胞を標識化して洗浄するのに複数回の遠心分離ステップが必要であるが、診断と研究に時間と手間とコストがかかる。実際、アッセイ自体は非常に小型化され自動化されているが、これらのアッセイに必要なサンプル調整は将来的な自動化のキータラゲットとして認識されてきた。

20

【0004】

遠心分離機は、遠心分離機を非常に広く使用する三つの臨界的サンプル調整ステップである、(i) サイズ/密度による細胞分離、(ii) 細胞濃縮、及び(iii) 溶液交換、を行う。遠心分離機はこのような全く異なる機能を実行することができるため、小型化したプラットフォームでこれらの機能を実現することは困難であった。小型化したマイクロ流体によるアプローチは、これらの機能のうち一つか二つを実装することができる。例えば、サイズと密度による細胞分離は、物理的な障害物、外力、あるいは流体力を用いて、異なるアウトレットにおける回収用マイクロチャネル内の規定の場所に粒子を案内することによって行うことができる。これらの方法では、高分解能の細胞分離を提供できる一方で、典型的な回収液量が注入した液量と同じである。すなわち、有意な濃度が達成されない。この出力量が大きいと、大きな視野をスキャンして対象の細胞を観察することが必要である下流側の細胞検出プラットフォームを邪魔したり、あるいは、回収した細胞を溶解させなくてはならない場合に、対象の生物分子を希釈してしまうことがある。したがって、ある濃縮方法を分離システムとインラインで用いて迅速な検出と分析を行うためには、液量を低減する必要がある。

30

【0005】

マイクロ流体システムを用いて局所領域に粒子と細胞を濃縮させる技術には様々なものがある。これらの技術の内、機械的なトラップが最も一般的に使用されている方法である。この方法は粒子と細胞を物理的構造体に固定して、試薬を複数段階でかん流させて、溶液交換を介してオンチップで細胞アッセイを行うことができる。しかしながら、更に下流側で分析を行うために、必要に応じて粒子と細胞を放出することが重要になることがある。濃度と放出に成功しても、これらのトラップ-放出システムで固定された細胞は、トラップの中に無理に入り、より容量の大きいスループットで操作するときダメージを受けることになり、これによって、濃縮ファクタが希少細胞濃度に、あるいは細胞溶液を希釈するのに必要なもの以下に制限される。したがって、伝統的な遠心分離器のすべての機能とフレキシビリティを概括する一般的な小型化ツールは、未だにできていない。

40

【0006】

マイクロ流体構造内での渦の形成は、集束とフィルタレーションの強化に用いられてき

50

た。例えば、Park et al. (Jae-Sung et al., Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels, Lab Chip, 9, 939-948 (2009))は実験に使用するマイクロ流体デバイスを開示しており、これは、一連の突然拡張及び収縮するチャンネルを用いて硬い微粒子を集束させる。所定の流速で、この拡張したチャンネル内に渦が形成される。この膨張したチャンネル内に形成された渦が、筒状ピンチ効果のような横方向の粒子の移動を誘発する。ある長さのマイクロチャンネルに沿って一連のこれらの拡張したチャンネルを設けることによって、剛体マイクロ粒子が徐々にマイクロチャンネルの反対側に移動する(すなわち、集束して)ことができる。しかしながら、重要なことは、拡張したチャンネルが粒子をトラップしないことである。代替的に、Park et al. は、デバイスを通過する微粒子が連続的に集束する構造を開示している。Park et al. では、小径(直径7 μm)のポリスチレンマイクロスフェアが、マルチオリフィスマイクロチャンネルを通過したが、これらの粒子の捕獲は観察されなかった。Park et al. は、更に、大きいサイズの粒子は、渦が形成された拡張チャンネル領域から離れる傾向にあることを観察した。Park et al. は、また、最大慣性揚力値とするためにはサンプル中の粒子が硬い球形でなくてはならず、これはもともと一般的に変形可能な生体細胞と共に使用することに明らかに逆行している。構造的には、Park et al. は、むしろ小さいサイズの拡張チャンネルを開示しており、これは、上流側の収縮チャンネルに対して約80 μm 外側に拡張する。更に、拡張チャンネルの長さも短く、200 μm であると開示されている。

10

20

【0007】

米国特許出願第2008/0318324号(Chiu et al.)は、がん細胞の高スループットスクリーニング用バイオチップを開示している。このデバイスは、噴出フィルタレーションを使用して、体液サンプルから腫瘍細胞を分離するようにしている。噴出フィルタレーションとは、フローチャンネル内部のフィルタレーション媒体又は形態学的特徴によって流体が分散するあるいは再分配されるフィルタレーション構造を意味する。Chiu et al. では、フィルタレーション媒体が細胞の幅より小さい幅を有する側壁開口である。一の実施例では、Chiu et al. は、流れを遅くしたり早くしたりする拡張及び収縮ポイントを有する1-Dチャンネルを開示している。Chiu et al. は、高速で流体が分離し、流体フローを動的に代えることによって、フィルタレーション動作に役立つ内部微小渦を形成することを開示している。しかしながら、この微小渦は、デバイスを通過する細胞をトラップしない。むしろ、チャンネル部分を埋めている開口が、サイズの大きい細胞がそこを通過しないようにすることによって、サイズの大きい細胞を保持している。集中又はフィルタレーション媒体を助ける目的で渦を生成する構造が開示されているが、これらの構造は、その中の細胞を選択的に捕獲するように使用されていない。

30

【発明の概要】

【0008】

本発明の一実施例では、細胞を分離する方法が、インレットとアウトレットに連結された少なくとも一のマイクロ流体チャンネルを有するマイクロ流体デバイスを提供するステップを具えており、少なくとも一のマイクロ流体チャンネルがその長さに沿って配置した少なくとも一の拡張領域を具え、この少なくとも一の拡張領域が、流体の流れに応じて少なくとも一の拡張領域内で渦を生成するように構成された少なくとも一のマイクロ流体チャンネルの断面寸法の急激な増大を含む。細胞集団を含む溶液をインレットに流す。少なくともいくつかの細胞が、少なくとも一の拡張領域内にできた渦内にトラップされ、この少なくともいくつかの細胞の径は10 μm である。捕獲された細胞は、少なくとも一のマイクロ流体チャンネルを通る溶液の流速を低くすることによって、複数の拡張領域から解放される。

40

【0009】

50

本発明の別の実施例では、分離した細胞周辺の溶液を交換する方法が、インレットとアウトレットに連結された少なくとも一のマイクロ流体チャネルを有するマイクロ流体デバイスを提供するステップを具え、この少なくとも一のマイクロ流体チャネルがその長さに沿って配置された少なくとも一の拡張領域を具え、この少なくとも一の拡張領域が、流体の流れに応じて少なくとも一の拡張領域内に渦を発生させるように構成された、少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法において急激な増大を具えている。細胞集団を含む第1の溶液をインレットに流す。少なくとも一の拡張領域内にできた渦内に細胞の少なくとも一部がトラップされる。第1の溶液と異なる一またはそれ以上の溶液を、インレットに流す一方で、捕獲したセルを含む渦を連続的に維持する。

【0010】

本発明の別の実施例では、サイズによって粒子又は細胞を捕獲する方法が、インレットとアウトレットに連結された少なくとも一のマイクロ流体チャネルを有するマイクロ流体デバイスを提供するステップを具え、この少なくとも一のマイクロ流体チャネルがその長さに沿って配置された少なくとも一の拡張領域を具え、この少なくとも一の拡張領域が、流体の流れに応じて少なくとも一の拡張領域内で渦を生成するように構成された少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法において急激な増大を具えている。複数の細胞又は粒子を含む溶液をインレットに流す。少なくとも一の拡張領域内にできた渦内に細胞又は粒子の少なくともいくつかはトラップされ、閾値を超えるサイズを有する細胞又は粒子が、渦内に実質的に捕獲され、閾値以下のサイズを有する細胞又は粒子は、実質的に渦を通過する。

【0011】

本発明の別の実施例では、マイクロ流体デバイスが、少なくとも一のインレットとアウトレットに連結された少なくとも一のマイクロ流体チャネルを含む基体を具え、この少なくとも一のマイクロ流体チャネルが、少なくとも一のマイクロ流体チャネルの長さに沿って配置された少なくとも一の拡張領域を具え、この少なくとも一の拡張領域が、少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法において少なくとも80 μm の急激な増大を具え、少なくとも一の拡張領域が流体の流れに応じて少なくとも一の拡張領域内に渦を生成するように構成されている。

【0012】

本発明の別の実施例では、マイクロ流体システムが、少なくとも一のインレットとアウトレットに連結された少なくとも一のマイクロ流体チャネルを含む基体を具え、この少なくとも一のマイクロ流体チャネルが、少なくとも一のマイクロ流体チャネルの長さに沿って配置された少なくとも一の拡張領域を具え、この少なくとも一の拡張領域が、少なくとも一の拡張領域が流体の流れに応じて少なくとも一の拡張領域内に渦を生成するように構成されている少なくとも一のマイクロ流体チャネルの断面寸法において急激な増大を具えている。このシステムは、粒子又は細胞を含む少なくとも一のインレットへ流体を送り込むように構成された少なくとも一のポンプを具える。この少なくとも一のポンプにコンピュータが操作可能に接続されており、少なくとも一のマイクロ流体チャネルを通過する流体の流速を調整する。

【図面の簡単な説明】**【0013】**

【図1】図1Aは、一の実施例による細胞を単離するマイクロ流体システムを示す図である。図1Bは、別の実施例による細胞を単離するマイクロ流体システムを示す図である。図1Cは、単一の拡張領域を有するマイクロ流体チャネルを示す図である。図1D乃至1Gは、拡張領域の様々なジオメトリを示す図である。図1Hは、複数の拡張領域を有するマイクロ流体チャネルの平面図である。図1Iは、図1HのA-A'ラインに沿った断面図である。図1Jは、本発明の別の態様による拡張領域を有するマイクロ流体チャネルを示す図である。

【図2】図2は、細胞を単離するマイクロ流体デバイスを示す図である。マイクロ流体デバイスに沿った異なるポイントにおける細胞サイズを変えるのに作用する力のグラフ表示

10

20

30

40

50

も含まれる。

【図3】図3は、平行形状を有する細胞を単離する別のマイクロ流体デバイスを示す図である。

【図4】図4Aは、より大きいがん細胞を捕獲する拡張領域を有するデバイスの一部を通過する血液細胞とがん細胞を示す図である。複数の拡張領域を含むデバイスの対応する顕微鏡画像がすぐ下に示されている。図4Bは、図4Aのデバイスを通るリン酸緩衝生理食塩水(PBS)のフラッシュを示す図であり、赤血球細胞(RBCs)は排出するが、がん細胞は拡張領域に残されている。複数の拡張領域を含むデバイスの対応する顕微鏡画像がすぐ下に示されている。図4C乃至4Fは、レイノルズ数(Rc)270で、図3に示すマイクロ流体デバイスを通過するHeLa細胞でスパイクされた血液サンプルを示す図である。図4Cは、t=0秒で撮影された画像を示す。図4Dは、t=9秒で撮影された画像を示す。図4Eは、t=17秒で撮影された画像を示す。図4Fは、t=18秒で撮影された画像を示す。HeLa細胞は、拡張領域内にできた渦に捕獲されているところが見える。図4Gは、細胞凝集機能として、マイクロ流体デバイスの捕獲効率の比較を示す。

10

【図5】図5Aは、様々な血液濃度における、マイクロ流体デバイスで達成した濃縮比(%)を示すグラフである。図5Bは、様々な血液濃度における、マイクロ流体デバイスで達成した純度(%)を示すグラフである。図5Cは、様々な血液濃度における、マイクロ流体デバイスで達成した捕獲効率(%)を示すグラフである。

【図6】図6Aは、MCF7細胞を含む溶液(溶液A)を示す図であり、拡張領域内にできた渦に細胞が捕獲されている。図6Bは、ストレプトアビジンで被覆したマイクロスフェアを含む溶液Bで生じる第1の溶液交換を示す図である。図6Cは、ストレプトアビジンで被覆したマイクロスフェアとのMCF7の反応を示す図である。図6Dは、洗浄液として作用する溶液C(すなわち、PBS)で行った第2の溶液交換を示す図である。図6Eは、図6Aに対応するMCF7細胞の顕微鏡画像を示す図であり、細胞がマイクロ流体デバイスの拡張領域内にできた渦の中で周回している。左下は、矩形領域を拡大して示す図である。右下は、正方形領域を拡大して示す図である。図6Fは、図6Bに対応する顕微鏡画像を示す図である。左下は、矩形領域を拡大して示す図である。右下は、正方形領域を拡大して示す図である。図6Gは、図6Cに対応する顕微鏡画像を示す図である。左下は、矩形領域を拡大して示す図である。右下は、正方形領域を拡大して示す図である。図6Hは、図6Dに対応する顕微鏡画像を示す図である。左下は、矩形領域を拡大して示す図である。右下は、正方形領域を拡大して示す図である。

20

30

【図7】図7は、細胞サンプル、標識化剤、及び洗浄液の三つの異なる溶液に接続された三つのインレットを含む別の実施例によるマイクロ流体デバイスを示す図である。

【図8】図8Aは、図7に示すデバイスで行われた、トラッピング、蛍光溶液交換、反応、及び洗浄の連続ステップを示す図である。

【図9】図9は、順次、流体渦の内部に捕獲され、パラホルムアルデヒドで固定され、透過して、抗サイトケラチン-PE&DAPIで標識化された細胞クラスタの蛍光画像を示す図である。

【図10】図10は、マイクロ流体デバイスと、標準遠心分離について、時間を関数とした、細胞(ビオチニル化した抗EpCAMで被覆したMCF7細胞)ごとに結合させた複数のストレプトアビジンで比較したマイクロビーズを示すグラフである。

40

【図11】図11は、マイクロ流体デバイスと、標準遠心分離について、細胞ごとに結合させたビーズの数を関数とする、相対的に正規化した周波数を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

図1Aは、サイズの異なる細胞12を含む不均一溶液から細胞12を単離するマイクロ流体デバイス10を示す。マイクロ流体デバイス10は、細胞12を単離するために使用するように図1Aに示されているが、マイクロ流体デバイス10は、粒子(図示せず)の分離に関連して使用することができるものと解するべきである。したがって、ここでの用語「

50

細胞」の使用は、粒子に置き換えることができる。図1Aに見られるように、マイクロ流体デバイス10は、インレット18とアウトレット20に接続したマイクロ流体チャンネル16を含む基板14を具える。マイクロ流体チャンネル16の寸法は、様々である。一例として、マイクロ流体チャンネル16の幅は、50 μm 、高さ70 μm である。マイクロ流体チャンネル16の幅の典型的な寸法は、20 μm 乃至200 μm の範囲である。マイクロ流体チャンネル16の高さの典型的な寸法は、20 μm 乃至500 μm の範囲である。長さも様々であるが、一般的に長さ数センチメートル(例えば、4.5cm)である。基板14は、マイクロ流体デバイスに使用される従来の材料でできている。これらの材料には、ガラス、シリコン、あるいはポリジメチルシロキサン(PDMS)がある。PDMSでは、マイクロ流体デバイス10を作るのにソフトリソグラフィ技術を用いることができる。PDMSの実施例では、モールド作成用に、4インチのシリコンウエハを厚さ70 μm のネガティブフォトリソグリスト(KMPR 1050, Microchem)でスピンコートし、設計されたCr-フォトリソマスクを介して紫外線に露出させ、現像する。PDMS(Sylgard 184, Dow Corning)を、予め準備したモールドに入れて、脱気した。焼成したPDMS鑄造物を、モールドから外して、ピン万力(ピン万力セットA、Technical Innovations Inc.)でインレット18とアウトレット20をあけた。パンチで穴をあけたPDMS層を、PDMSとスライドガラス表面とともにエアプラズマ(Plasma Cleaner, Harrick Plasma)にかけて、スライドガラスに接続し、デバイスを封入した。

【0015】

図1Aの実施例では、インレット18は実際は、インレット18'とインレット18"の二つのインレットを含む。第1のインレット18'を用いて、不均一な細胞集団12を含む溶液を導入する。第2のインレット18"は、第2の別の溶液を導入するのに使用できる。以下により詳細に説明するように、第2のインレット18"は、洗浄液、標識(例えば、蛍光ラベル、抗体、核酸染料、蛍光発生基質)、あるいはその他の化学物質(例えば、固定剤あるいは透過剤)をマイクロ流体チャンネル16に導入するのに使用できる。

【0016】

図1Aに見られるように、インレット18'、18"は、それぞれポンプ22、24に連結されている。各ポンプ22、24を用いて、設定した流速で各溶液をマイクロ流体デバイス10に送達することができる。当業者に知られているどのようなタイプのポンプでも本発明に関連して使用することができる。このようなポンプには、限定するものではなく、シリンジポンプ、圧搾空気に作用して流体をくみ上げるポンプ、蠕動ポンプ又は容積型ポンプなどがある。図1Aは、マイクロ流体デバイス10と共に使用するシリンジポンプ22、24を示している。例えば、Harvard Apparatus, PHD2000シリンジポンプを用いて、10 μl /分乃至4.5ml/分の範囲の全流速を維持することができる。通常は、ポンプ22、24の設定は、マイクロ流体デバイス10を通る流速が100 μl /分になるように設定する。

【0017】

図1Aは、システム100の一部として、マイクロ流体デバイス10を制御するのに使用できるコンピュータ40を示す。コンピュータ40は、通常、その中に少なくとも一つのプロセッサ42を具えており、コンピュータ40内にある、あるいはコンピュータ40に保存されているソフトウェアを実行する。コンピュータ40はまた、マイクロ流体デバイス10の様々なパラメータを表示するのに使用できるモニタ44を具えている。これらのパラメータには、例えば、ポンプ22、24の流速、ポンプ22、24に含まれる流体の体積、及びその他の操作データがある。コンピュータ40は、好ましくは、ポンプ22、24に、コンピュータ40がポンプ4の個々の流速又は操作状態を調整できるように、接続されている。コンピュータ40は、あらかじめ設定したアルゴリズム又はコンピュータ40に保存している指示セットを用いて、ポンプ22、24を自動的に制御することができる。代替的に、ポンプ22、24の制御を、通常コンピュータとともに使用されるインターフェースデバイス(例えば、キーボード、マウス、その他)を用いて手動で調整でき

10

20

30

40

50

る。

【0018】

溶液交換操作中に、コンピュータ40によって、所望の溶液の流れをマイクロ流体デバイス10で確実に維持することができる。例えば、一のポンプ22が遅くなるか、止まってしまったときに、第2のポンプ24の流速を上げて、所望の流速を確実に維持する。

【0019】

図1Bは、圧力駆動ポンプシステム46を使用する代替のシステム200を示す。ポンプシステム46は、第1の流体52(例えば、洗浄液)と第2の流体54(例えば、血液)をデバイス10に送り込むのに、レギュレータ50とともに、圧力ガス源48を使用している。このシステム200では、液体用バルブ56、58が、デバイス10のインレットとアウトレットにそれぞれ設けられている。コンピュータ40は、圧力駆動ポンプシステム46と液体用バルブ56、58を制御するように構成されている。例えば、バルブ56を用いて、第1の流体52又は第2の流体54のデバイス10への流れを開閉することができる。バルブ58は、廃液容器60と、例えば、96ウエルプレートを具える回収デバイス62の間のアウトレットの流れを切り替えるのに使用することができる。

【0020】

図1Aに見られるように、マイクロ流体チャネル16は、マイクロ流体チャネル16の長さに沿って選択されたポイントに位置する複数の拡張領域30を具える。拡張領域30は、マイクロ流体チャネル16の幅が急激に増大し、これは、所定の閾値流速であるいはこの流速以上で各拡張領域30内に渦を形成させる、分離した境界層を作る。拡張領域30内にできた渦であり、これがマイクロ流体デバイス10を通過して移動する不均一な細胞12の溶液から細胞亜集団12を捕捉する。しかしながら、これらの渦は、慣性を用いて湾曲させたチャネルフローにできるDean渦(J. Wang et al. *Vortex-assisted DNA Delivery, Lab Chip*, 2010, 10, 2057-2061(2010))や、非対称的に構成されたマイクロチャネルによって形成された渦(Stott, et al., *Isolation of Circulating Tumor Cells Using a Microvortex-Generating Herringbone-Chip*, *Proc Natl. Acad. Sci.* 107(43): 18392-7(2010))など流れ方向にできた渦と異なる。以下により詳細に説明するように、所定の閾値あるいはカットオフサイズ(マイクロ流体デバイス10の流速とジオメトリによる)以上の細胞12は、拡張領域30に入り、再循環している渦の中に捕捉又は捕獲される。この閾値サイズより小さい細胞12は捕捉されることなく、マイクロ流体デバイス10の下流側へ流れてゆく。一般的に、最も有効な捕獲は、直径15 μm より大きい細胞12に対して生じる。10 μm より小さい径では、捕獲効率は低い(例えば5%)。したがって、意味のある捕獲を行うには、捕獲する細胞12の径が10 μm でなくてはならない。拡張領域30のジオメトリはさまざまである。例えば、拡張領域30は、図1Aに示すように矩形でもよいが、図1C乃至1Gに示すように正方形、三角形、多角形、あるいは半円形プロファイルであってもよい。矩形型の拡張領域30では、主マイクロ流体チャネル16に平行な方向にある拡張領域30の長手側で捕獲能力がより良好である。一般的に、拡張領域30の主壁31(図1Cに示す)は、上流側マイクロ流体チャネル16の流れ方向に対して45°またはそれ以上の角度がついている。

【0021】

図1Cは、上流側マイクロ流体チャネル16に沿った単一の拡張領域30を示している。上述したように、立ち上がりの壁31は、図1Cに破線Aで示す流れの軸に対して45°又はそれ以上角度がついている。これに関して、拡張領域30は、断面寸法(例えば、幅と高さ)が、マイクロ流体チャネル16のすぐ上流側部分における断面寸法に比して、急激に増大している。図1Cの実施例では、立ち上がり壁31は、ちょうど90°より小さい角度がついており、最小限45°の閾値を大きく超えている。拡張領域30はまた、立ち下がり壁33を有している。立ち下がり壁33は、流れ方向Aに対して角度がついて

10

20

30

40

50

いてもよい。一般的に、立ち下がり壁 33 の角度は重要でなく、どのような角度であってもよい。例えば、一の実施例では、立ち下がり壁 33 の角度が小さく、立ち下がり壁 33 を、マイクロ流体チャンネル 16 の幅に対して徐々にテーパさせるようにしてもよい。さらに別の代替例では、立ち下がり壁 33 がなく、拡張部分がマイクロ流体チャンネル 16 の元の寸法に戻らない。

【0022】

図 1 J に示す別の実施例では、拡張領域 30 は、湾曲した立ち上がり壁 31 を具える。この点で、立ち上がり壁 31 は、始めに、マイクロ流体チャンネル 16 の上流側から徐々に開いてゆき、立ち上がり壁 31 の長さに沿って大きく開いている。この実施例では、立ち上がり壁 31 の様々なポイントに沿ってひかれた接線が、流れ A の軸に比べてかなり異なる角度を有する。例えば、立ち上がり壁 31 の開始部分近傍では、角度 θ_1 が小さく、 45° より小さい。しかし、立ち上がり壁 31 の終端付近では、角度 θ_2 が急であり、 45° 以上である。図 1 J に示すもののように湾曲したあるいは不連続的な拡張領域 30 の場合、立ち上がり壁 31 の全長に沿って、流れ A の軸に対する平均角度を表す θ_{AVE} が、 45° より大きくなくてはならない ($\theta_{AVE} > 45^\circ$)。

【0023】

図 1 H は、マイクロ流体チャンネル 16 の長さに沿って設けた複数の拡張領域 30 の平面図である。図 1 I は、図 1 H の A - A' 線に沿った断面図である。図 1 H と 1 I とともに、マイクロ流体チャンネル 16 と拡張領域 30 の様々な寸法を示す。上述したように、マイクロ流体チャンネル 16 の幅 (w) の典型的な寸法は、 $20\ \mu\text{m}$ 乃至 $200\ \mu\text{m}$ の範囲である。マイクロ流体チャンネル 16 の高さ (h) の典型的な寸法は、 $20\ \mu\text{m}$ 乃至 $500\ \mu\text{m}$ の範囲である。拡張領域 30 は、 $80\ \mu\text{m}$ 乃至 $800\ \mu\text{m}$ の範囲であるが、少なくとも $80\ \mu\text{m}$ でなくてはならない距離 (x) を延在している。拡張領域 30 は、 $200\ \mu\text{m}$ 乃至 $2\ \text{m}$ の範囲である距離 (y) を延在している。隣接する拡張領域 30 は、典型的には $20\ \mu\text{m}$ を超える距離 (z) だけ分かれている。いくつかの実施例では、単一の拡張領域 30 があり、ここでは隣接する拡張領域 30 がない。マイクロ流体チャンネル 16 の断面プロファイルは、ほぼ矩形、台形、あるいは正方形である。マイクロ加工プロセスは、若干台形の断面を作るか、あるいは若干丸みを帯びたコーナーを作る。チャンネル 16 は、円形又は半円形の断面を有していてもよいが、現在のマイクロ加工技術はこれらのジオメトリを製造しない。ここに述べた方法とデバイスは、これらの変形例に及ぶ。

【0024】

図 1 A に戻ると、拡張領域 30 は、マイクロ流体チャンネル 16 の反対側に設けることができる。これによって、単一のマイクロ流体チャンネル 16 がより大きい捕獲能力を有するようになる。更に、以下により詳細に説明するように、この構成によって、多数のチャンネル 16 が平行構造に整列している場合、拡張領域 30 の千鳥配列が可能になる。すなわち拡張領域 30 が互いにオフセットして、図 3 に見られるように隣接するマイクロ流体チャンネル 16 の拡張領域 30 と交互になるので、隣接するマイクロ流体チャンネル 16 を密に詰めることができる。更に、図 1 A を参照すると、より大きいサイズの細胞 12 が拡張領域 30 で捕獲される一方、より小さいサイズの細胞 12 は捕獲されず、マイクロ流体チャンネル 16 を下流側に流れて、アウトレット 20 から出てゆく。より大きいサイズの細胞 12 (拡張領域 30 に示されている細胞) は、拡張領域 30 内に作られた渦流内に捕獲される。より小さいサイズの細胞 12 は、そのサイズが小さいため、渦流内に捕獲されず、拡張領域 30 の外へ出てゆく。したがって、より小さいサイズの細胞 12 は、拡張領域 30 の渦で捕獲されることなく、マイクロ流体チャンネル 16 の下流側へ流れ続ける。

【0025】

図 2 は、サイズの異なる細胞 12 を含む不均一溶液から細胞 12 を単離するデバイス 10、並びにマイクロ流体チャンネル 16 と拡張領域 30 内の対応する流れを示す。図 2 は、マイクロ流体チャンネル 16 と拡張領域 30 の、A、B、C で特定される三つの領域を拡大して示す図である。図 A に見られるように、サイズの異なる不均一な細胞集団 12 が、シリンジポンプ 22、24 のうちの一方を介してデバイスに送り込まれる。他方のシリンジ

10

20

30

40

50

ポンプは、洗浄液あるいはPBSなどのその他の溶液を含んでいてもよい。まず、図Aに示すように、細胞12はy方向にランダムに分散される。細胞12に、二つの対抗する力、すなわち、細胞12をマイクロ流体チャンネル16の壁に向かって移動させるよう細胞に作用するせん断勾配力(F_L せん断勾配)と、マイクロ流体チャンネル16の壁から細胞12を遠ざけるウォール効果揚力(F_L ウォール効果)がかかる。

【0026】

断面が矩形のまっすぐなマイクロ流体チャンネル16を用いることで、流れている細胞12の動的均衡位置によって、図2の図Bに示すように、動的水平方向均衡位置 $X_{e,q}$ と、均一な細胞速度になる。ここで、 $X_{e,q}$ は、細胞12の中心とマイクロ流体チャンネル16の壁との間の距離として定義される。細胞12が拡張領域30に進むと(図2においては、二つの相対する拡張領域30がある)、より大きい F_L せん断勾配がかかっているより大きい細胞12が、渦の中心に向かって押されて捕獲され、一方で、より小さい細胞12は拡張領域30の外にチャンネル内へ流されて、アウトレット20へと下流へ流れ続ける。一般的に、 F_L せん断勾配力は、細胞径(a)の三乗に対応しており、より大きい細胞12にはより大きい F_L せん断勾配力がかかる。サイズに応じた水平方向の移動が、細胞12を、細胞12が分離されて残り、その周辺を回る渦の中心に向けて分離下境界線(区分線)を超えて流線の向こう側に駆動する。これによって、切り捨てサイズ以下のサイズを選択する捕獲が可能となり、細胞は区分線を越えて、フォーカスされた流れに残るのに十分な速度で移動せず、アウトレット20から流れ出る。

【0027】

図3は、細胞12を単離するマイクロ流体デバイス10の別の実施例を示す図である。このデバイスはインレット18とアウトレット20に連結された複数のチャンネル16を具える。図3は、8つの独立したチャンネル16を示しており、これらのチャンネルは互いにはほぼ平行に配置されている。各マイクロ流体チャンネル16は、10個の独立した拡張領域30を有する。もちろん、使用するチャンネル16の数はいくつでもよいと解すべきである。同じことが、単一のマイクロ流体チャンネル16に沿って設けた拡張領域30の数にも言える。単一のマイクロ流体チャンネル16に沿って設けた隣接する拡張領域30間のスペースは、様々であるが、1mmのスペースが機能することが分かっている。追加のチャンネル16を加えて、大規模なパラレルデバイス10を作ってもよい。チャンネル16は、互いに千鳥配置されている隣接するチャンネル16の拡張領域30に対してまっすぐである。この設計により、隣接するチャンネル16を互いに密に配置することが可能となり、これによって、マイクロ流体デバイス10の全体的な設置面積が小さくなる。図3は、二次元レイアウトされたチャンネル16のアレイを示しているが、このチャンネル16のアレイは三次元レイアウトにしてもよい。三次元構造により、スループットを上げることができる。

【0028】

図3のデバイスでは、マイクロ流体チャンネル16が、幅 $50\mu\text{m}$ 、高さ $70\mu\text{m}$ の、矩形の高アスペクト比を持つチャンネルである。インレット18は、細胞12を含むサンプル用の第1のインレット18'と、PBS又はその他の洗浄液を含む第2のインレット18''を具える。デュアルインレット18'、18''構成は、マイクロ流体デバイス10内で容易かつ迅速な溶液交換が可能となり、例えば、捕獲されなかった細胞12を洗い流し、回収したサンプルの最終的な濃縮比と純度を強化する手段を提供する。マイクロ流体デバイス10の長さは数センチメートルである。拡張領域30は、所定のコンパクトな設置面積に最大数の拡張領域30を配置するために、交互になったパターンにおかれている。図3に示すデバイスでは、拡張領域が、 $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ の寸法を有する正方形である。

【0029】

細胞12が拡張領域30に捕獲されると、渦のサイズを小さくしてゆき、最後になくすことで細胞12は拡張領域30から放出される。これは、入力流速を低減する(例えば、ポンプ22、24の流速を低減する)ことによって行われる。低減させた流速が、渦のサイズを小さくして、そこに捕獲されている細胞12をマイクロ流体チャンネル16の流れの

10

20

30

40

50

中に放出させ、デバイスのアウトレット 20 へ運ぶ。図 3 に示すデバイスでは約 4 ml / 分の流速が、最も良いことが分かっている。代替的に、流速を急にほぼゼロになるまで小さくして、マイクロ流体デバイス 10 を流れる流体の流れを止めるようにしてもよい。この代替例では、オフチップではなく、オンチップで細胞 12 を回収することができる。

【 0 0 3 0 】

実施例 1：稀ながん細胞の血液からの濃縮

図 3 のマイクロ流体デバイス 10 を、正常な人の血液細胞（直径 2 乃至 15 μm ）からがん細胞（直径 20 μm ）を分離して集中させるのに適用し、高スループットでサイズベースの濃縮及び集中させる有用性を示した。血液から濃縮及び集中させたがん細胞は、循環腫瘍細胞（CTCs）が患者の状態に関する情報をリアルタイムで提供することができ、がん治療をモニタリングできるので、臨床診断に特に重要である。生存 CTCs を血液から迅速、有効、かつ標識のないアプローチで単離することは、依然として技術的に非常に難しい。CTCs は、10 億の血液細胞につき一の細胞というほど低い割合の稀な事象である。現在の戦略は、診断用の CTCs の計数に注目が集まっているが、研究目的で生存 CTCs のより大きいサンプルを集めることが緊急目的である。このことは、大きな血液体積をより高いスループットで処理し、修飾した基質又は磁気ビーズに目的の細胞をつけることなく濃縮することが必要であり、更なる分析又は培養のために、捕捉した細胞を個々に選択するアドバンテージを提供している。

【 0 0 3 1 】

このデバイス 10 は、稀な細胞を、ml / 分の範囲で液体体積を処理し、サイズと密度をベースにした分離を行って目的の細胞を濃縮し、捕捉した細胞をより小さい濃縮した体積にして放出する、大規模な平行デバイスで濃縮するという要望に取り組むものである。稀な細胞濃縮を示すために、希釈したヒトの血液中にスパイクさせた蛍光ラベルを行った乳がん細胞（MCF-7）を、図 3 に示すデバイスと同様のデバイス 10 に、4.4 ml / 分の速度で注入した。MCF7 の乳がん細胞を、10% の FBS と、1% の牛のインスリンと、1% のペニシリン/ストレプトマイシンで補填した DMEM を含む媒体で培養し、使用する前にトリプシン処理を行って再度懸濁させた。血液は、健康な人間のボランティアから、訓練された外科医が回収し、実験用に PBS 中で 5 乃至 20% に希釈した。

【 0 0 3 2 】

これらの高い流速では、上流側渦タンクにチャネルの変形が見られたが、周囲圧力により近いところで作動する下流側の渦チャンバは変形しないことを考えると、捕捉は影響を受けない。より高い操作流速は、むしろ結合強度によって制限を受ける。

【 0 0 3 3 】

単細胞と 2 - 4 細胞クラスタに含まれるクラスタ細胞としてのスパイク MCF-7 細胞は、臨床サンプルに有意なレベルで存在していることが示されていた。血液細胞とがん細胞が、図 4 A の上側パネルにある単一の拡張領域 30 の図に示すように、注入ステップの間に渦の中に入り周回するのが観察された。図 4 A の下側パネルは、拡張領域 30 中に含まれる赤血球細胞と共に捕捉されたがん細胞を示す顕微鏡画像である。赤血球細胞は、希釈サンプルを用いた実験では同じサイズの粒子が渦の中へ移動しなかった場合でも、渦に入ることが観察された。同様に、高い細胞濃度は、細胞間に衝突と流体力学的攪乱を誘発し、クロスストリームの移動と渦へ入ることを引き起こす。

【 0 0 3 4 】

更に、各拡張領域 30 が維持される細胞の最大容量がある。渦が拡張領域 30 全体を占めた後、最大で ~ 40 単細胞 MCF7 をより高い流速範囲以上で維持することができる。ほとんどのスパイク実験条件は、この最大値以下に保たれた。溶液が完全に処理されると、渦で捕捉した細胞を、渦をこわすことなく PBS で洗浄した。このことは、図 4 B の上側パネルに示されている。図 4 B の下側パネルは、より小さく密度の高い RBCs を除去するために、PBS 洗浄溶液を導入した後も捕捉されたがん細胞を示す顕微鏡画像である。興味深いことに、最初に渦に入った血液細胞は安定的に捕捉されずトラップからシステムの外にまたすぐに出てしまい、周回しているより大きい安定的に捕捉されたがん細胞を

10

20

30

40

50

残すことが観察された。赤血球細胞と白血球細胞は、両方ともより密度が高く及び/又はサイズがより小さいため、安定した周回を形成できない。洗浄した細胞は、特性評価と計数用に、96 - ウェル - プレートのうちの一のウェルに放出した。

【0035】

マイクロ流体デバイス10は、目標細胞濃度、濃縮、及び純度の重要な数値指標を定量化する場合に、良好に機能する。~500がん細胞でスパイクした5% v/vの血液(例えば、0.5 mLの全血、または、~25億の血液細胞)の10 mL容量の血液細胞(n=6サンプル)を、比較的少量の血液細胞コンタミネーションで、<3分間、200 mLより少ない最終容量へ濃縮した(20倍の容量濃縮)。これは、図5Aに見られるように、3.4百万の濃縮比(出力溶液中の混入血液細胞に対する目標がん細胞の比を、入力溶液中の同じ比で除したものに該当する。この高い濃縮レベルによって、200 mLの最終容量において高純度のがん細胞を導出する: 図5Bに見られるように、~40%(平均で、 102 ± 21 のがん細胞、及び 221 ± 155 の血液細胞)である。マイクロ流体デバイス10とサンプルで処理したスパイクがん細胞(n=3)がない血液サンプルがウェルに回収され、これは 772 ± 283 の赤血球細胞と、 4 ± 1 CD45+の赤血球細胞を有することが分かった。これは、スパイク血液サンプルを用いてマイクロウェルに見られる血液細胞混入量と同じである。達成した濃縮レベルは、百万乃至一千万の濃縮を報告している目標細胞を分離する分子親和性ベース及びフィルターベースのアプローチと比較できる。処理したサンプルの純度は、9.2乃至14.0%のスパイクがん細胞の純度を報告している親和性ベースのアプローチと比較して、高い。処理したサンプル中の血液の希釈を少なくすることで細胞処理スループットが上がるが、スパイク細胞の捕獲効率は下がる。図5Cに示すように、血液濃度が高くなり、捕獲効率が下がり、10乃至20%のスパイクがん細胞が回収された。より高い血液濃度によって、流体渦のサイズと位置を変化させる流体粘度がより高くなり、捕獲効率が下がる。

【0036】

この高い血液濃度での比較的低い捕獲効率は、この技術を1乃至10細胞/mLで生じる超希な細胞を単離するのに有効なものにするためには、高容量の血液を処理しなければならない(10 mL又はそれ以上)ことを示唆している。しかしながら、ここに述べたマイクロ流体デバイス10の高いスループット(2 cm^2 のチップに対して~5 mL/分の希釈血液)は、妥当な時間(<30分)内で大容量の操作を行いうることを示している。

【0037】

マイクロ流体デバイス10に捕捉した細胞は、高い生存レベルを維持した。蛍光生/死アッセイで測定したところ、デバイスを通して細胞を注入した後の細胞の生存には有意な変化は見られなかった(90.1% vs 90.3%初期)。生存細胞は、いくつかのサンプル調整アプリケーションに重要である。マイクロ流体デバイス10で捕捉して放出した細胞は、免疫染色などの標準的な分子アッセイに使用できる。この結果、標識のないスパイク血液サンプルがマイクロ流体デバイス10で濃縮された。次いで、がん細胞は放出され、マイクロウェルで標識した。染色したがん細胞は、サイトケラチン-PEとDAPIに対してポジティブであり、CD45に対してネガティブである。この一のデバイスで濃縮するが、細胞を更なる処理用に小容量に移す能力は、稀な単細胞の分析に大きなアドバンテージを提供する。

【0038】

図4C乃至4Fは、レイノルド数(R_c)270で、図3のマイクロ流体デバイス10を用いて、HeLa細胞でスパイクした血液サンプルを同様に濃縮した結果を示す。マイクロ流体デバイス10は、HeLa細胞が拡張領域30で捕捉されると、PBS洗浄液で洗浄する。捕獲したHeLa細胞は、流速を $R_c = 5$ に下げることによって拡張領域30から放出させた。図4Gは、細胞濃度に応じたマイクロ流体デバイス10の捕獲効率の比較を示す。細胞数は、マイクロ流体デバイス10を通して処理したスパイクHeLa細胞の数を表す。

【0039】

10

20

30

40

50

実施例 2 : 細胞標識と溶液交換

マイクロ流体デバイス 10 は、特定分子のマーカースとして細胞を効果的に標識するのに使用することもできる。伝統的な遠心分離機では、一連の標識化及び洗浄ステップを介して細胞サンプルを特定のマーカースとして標識している。これは、標識化試薬を用いて遠心分離管で細胞をインキュベートするステップと、この細胞を卓上遠心分離機でペレットに濃縮するステップと、手動吸引によって非結合標識化試薬を含む上澄み層を除去するステップと、細胞を新しい媒体に手動で再懸濁させるステップを含む。これらの操作は、流体渦内に細胞を捕獲することによってマイクロ流体デバイス 10 内で行われ、連続して、捕獲されて周回する細胞を標識化試薬に露出させ、更に、PBS 洗浄溶液で洗浄する。標識化細胞は、次いで流速を下げることによって、回収バイアルに小容量で放出された。

10

【0040】

図 6 A 乃至 6 D は、それぞれ、捕獲 (図 6 A)、第 1 の溶液交換 (図 6 B)、反応 (図 6 C)、及び第 2 の溶液交換 (図 6 D) を示す。図 6 E 乃至 6 H は、それぞれ、マイクロ流体デバイス 10 に注入したビオチニル化した EpCAM でインキュベートした実際の MCF7 細胞の図 6 A 乃至 6 D に対応する顕微鏡画像である。図 6 E に示すように、細胞が渦に捕獲され、一定の回転及び周回動作を行っている。図 6 F は、ストレプトタビジンで被覆したマイクロスフェアを用いた第 1 の溶液交換を示す。ストレプトタビジンで被覆したマイクロスフェアは、拡張領域 30 に入る。図 6 G は、ストレプトタビジンで被覆したマイクロスフェアの MCF7 細胞との連続的な反応を示す。図 6 H は、第 2 の溶液 (すなわち、PBS 洗浄液) との溶液交換を示す。PBS 洗浄液は、非結合マイクロスフェア (矢印 A) を除去する。洗浄が完了した後、マイクロ流体デバイス 10 の流速を下げることで細胞が渦トラップから放出され、特徴化を行うために 96 ウエルプレートに回収される。図 6 H の矢印 B は、2 分以上で次第に細胞に結合した粒子を指している。

20

【0041】

流体渦の中の適所に細胞を安定して保持する能力によって、標識化剤と洗浄溶液との複数の溶液交換を自動化できるフォーマットで行うことが可能である。追加の新しい溶液は、各々、完全に交換するには約 100 ms かかる。同じ標識化反応は、従来の遠心分離ベースのプロセスでは 3 回の洗浄ステップを含む 6 回の遠心分離ステップが必要であり、> 30 分のサンプル調整時間 (標識化試薬でのインキュベーション時間を除く) を要する。各遠心分離及び洗浄ステップは、潜在的に一部の細胞が失われ、5 乃至 10 分を要する。

30

【0042】

高速標識化は、常にリフレッシュした環境の分子標識に露出させるように流体渦の中で回転し周回している細胞によって支援される。換言すると、渦中の標識化試薬の強い還流によって、細胞表面近くに試薬の非常に小さな空乏化した領域ができ、細胞表面により多くの試薬を強い勾配で引き寄せさせる。この高速標識化は、細胞表面上のストレプトタビジンで被覆したマイクロスフェアのビオチニル化した抗 EpCAM 抗体への結合 (図 6 A 乃至 6 H) を調べることによって観察した。マイクロ流体デバイス 10 中の細胞が、同数のマイクロビーズを 5 分で蓄積し、標準プロトコルで調整した細胞は 30 分で蓄積することがわかった。更に、30 分後、マイクロ流体デバイス 10 で標識した細胞は、標準的な方法に比べて細胞あたりに結合したマイクロビーズの数が平均で 2 倍であった。

40

【0043】

実施例 3 : シーケンシャル操作 : 標識化に続いて行う稀な細胞の濃縮

遠心分離機で行うことができる複数のシーケンシャルのサンプル調整ステップ (例えば、捕獲、蛍光溶液交換、反応及び洗浄) を、図 7 に示すマイクロ流体デバイス 10 を用いて成功裏に行った。この実施例では、マイクロ流体デバイス 10 が、三つのインレット 18'、18''、および 18''' を具える。一のインレット 18' は、細胞サンプルを送達するのに使用されるシリンジポンプ 22 に接続されている。第 2 のシリンジポンプ 24 は、蛍光剤を送達するのに使用される。第 3 のシリンジポンプ 26 は、洗浄液 (PBS) を送達するのに使用される。サイズベースの血液からのがん細胞の捕獲、シーケンシャルな蛍光標識、及び、放出した細胞の分析を < 1 時間で行った。希釈したがん細胞でスパイ

50

クしたヒトの血液(10 mL)をマイクロ流体デバイス10に~3分間注入し、がん細胞を濃縮した。次いで、捕獲された細胞を、固定剤(パラホルムアルデヒド)と透過剤で調整し、蛍光抗体(抗サイトケラチンPE & DAPI)で20分間染色した。捕獲、第1の溶液交換、反応、第2の溶液交換のシーケンスは、図8A乃至8Dに示す。次いで、細胞をPBSで<1分間洗浄し、特徴化を行うために96-ウエルプレートに回収した。回収した細胞は、サイトケラチンとDAPIに対してはポジティブであり、流体渦内部にシーケンシャルに捕獲され、パラホルムアルデヒドで固定され、透視化され、抗サイトケラチン-PE & DAPIで標識化した細胞クラスターの蛍光画像を示す図9に見られるように、シーケンシャルなサンプル調整が成功したことがわかる。図10Aに示すように、ビオチニル化した抗サイトケラチン-EpCAMで被覆したMCF7細胞は、ストレプトタビジン結合マイクロビーズでの30分後の標準オフチッププロトコルと同じレベルで、<5分以内で被覆した。図11Aは、30分後の細胞集団の上にマイクロビーズを用いた均一な標識を示す。更に、マイクロ流体デバイス10(遠心分離-オンチップ)により、細胞あたりより多数のビーズが結合した。この結果、単一の簡単なプラットフォームでの細胞分析に必要なすべてのサンプル調整プロセスへの完全なルートが示された。

10

【0044】

ここに述べたデバイス10と方法は、安価で迅速な循環腫瘍細胞(CTC)の分析に有益である。CTCの検出と計数は、乳がんの状況と予後をモニタする価値のある有望な診断ツールである。CTCは、血流を介して拡散する腫瘍由来の細胞であり、腫瘍の悪性度を反映することができる。CTCは10億個の細胞あたり1個というほど低い割合で生じる稀な事象である。したがって、CTCの単離は、有意な技術的チャレンジを提供する。ここに述べたデバイス10と方法は、CTCと血液細胞間の細胞サイズ差(CTCは、RBCより2-4倍大きい)を利用して、生きたCTCを全血から標識をしない方法で単離できる。デバイス10と方法のその他の潜在的アプリケーションには、母体血液細胞から胎児細胞を単離する工程を含む出生前診断がある。対象となる胎児細胞を、標識化することなく、あるいは外付けの大きな機械を使うことなく単離することができる。

20

【0045】

マイクロ流体デバイス10は、CTCの単離に特定のアプリケーションを有するが、その他のアプリケーションに、サンプルから得た細胞12の濃縮がある。例えば、拡張領域30で捕獲できるサイズを有する目標の細胞12を捕捉して、サンプル中に濃縮した形で放出される。例えば、尿、胸膜液、腹腔洗浄液などの生物学的源の流体に含まれる細胞12をマイクロ流体デバイス10に流して、ここに含まれる細胞12を濃縮することができる。この点に関して、マイクロ流体デバイス10は、細胞12の濃縮に非常に適している。例えば、容積ベースでは、マイクロ流体デバイス10は、細胞12を、最初の溶液中の細胞12の濃度の10倍又は20倍以上に濃縮することができる。

30

【0046】

実施例を示して説明したが、ここに開示した本発明の概念の範囲から外れることなく、様々な変形例が考えられる。例えば、ここにはいくつかの実施例が説明されているが、様々な態様あるいは要素がその他の個別の実施例と交換可能であることは自明である。本発明は、したがって、特許請求の範囲の記載及びその均等物以外によっては限定されるものではない。

40

【図 1 - 1】

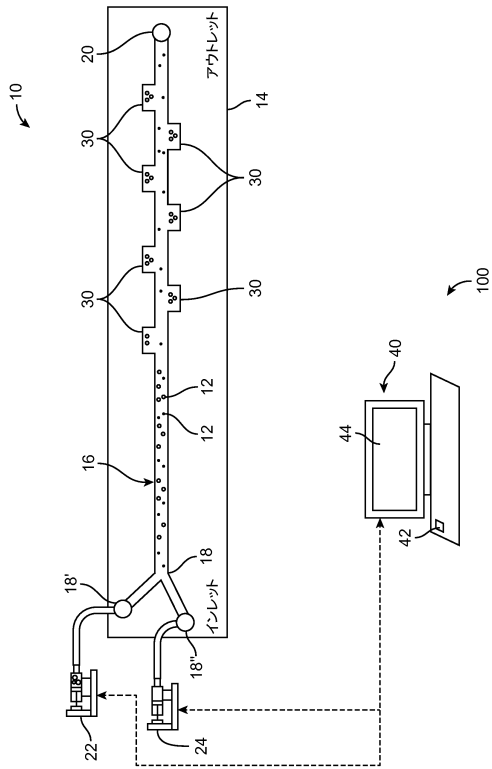


FIG. 1A

【図 1 - 2】

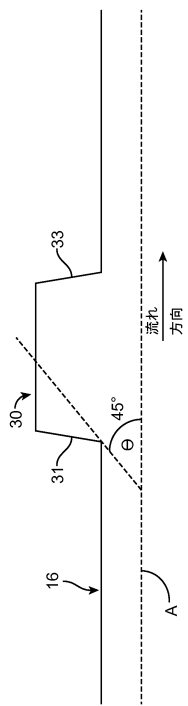


FIG. 1C

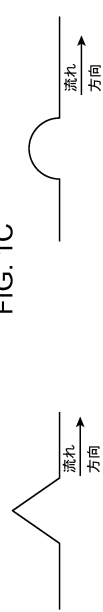


FIG. 1D

FIG. 1E



FIG. 1F

FIG. 1G

200

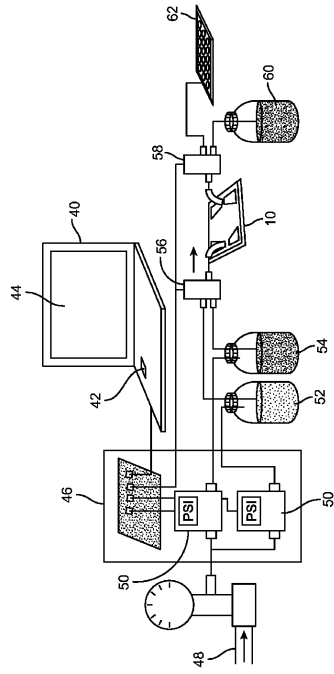


FIG. 1B

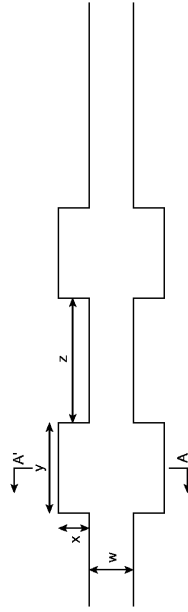


FIG. 1H

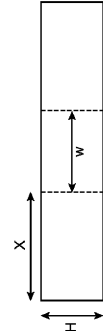
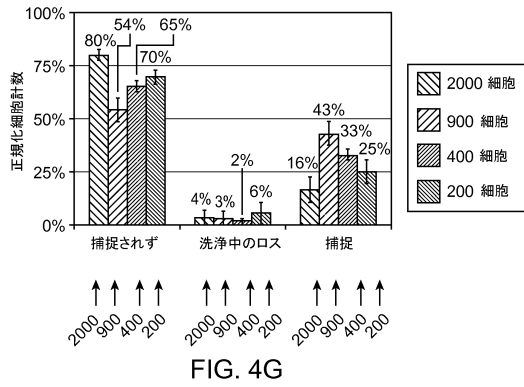
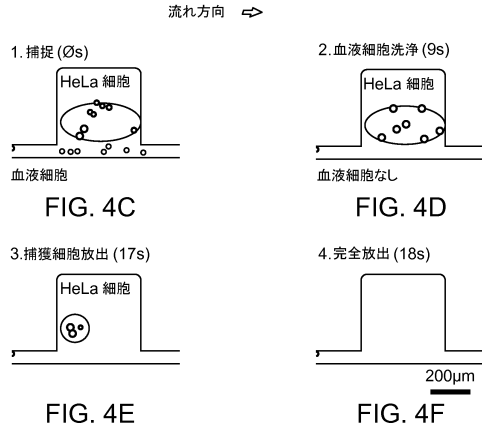
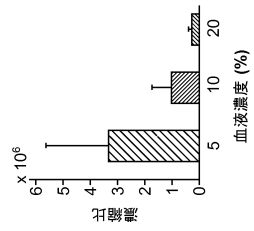
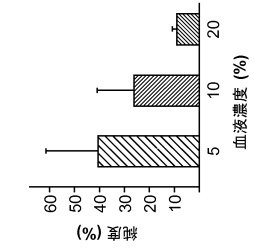
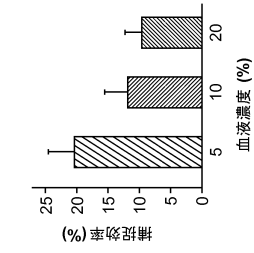


FIG. 1I

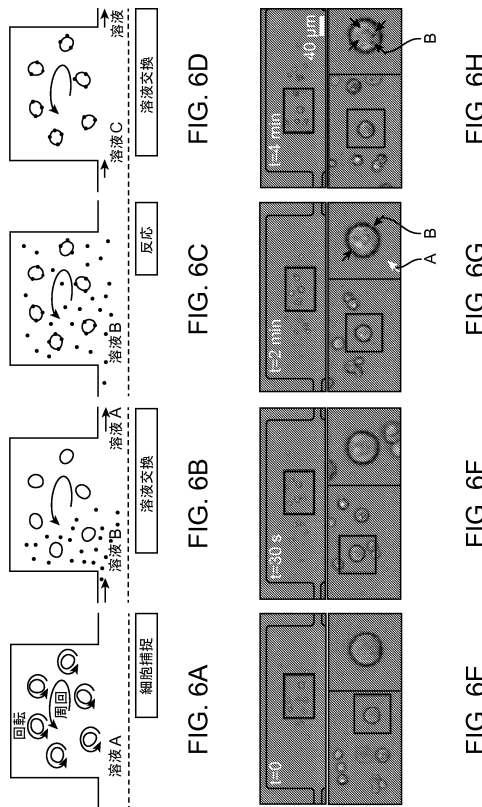
【 図 4 - 2 】



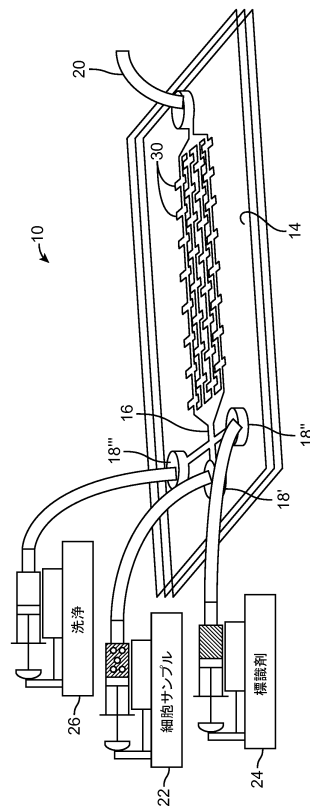
【 図 5 】



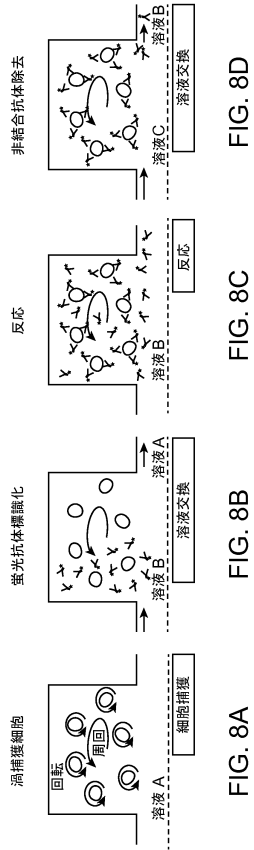
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

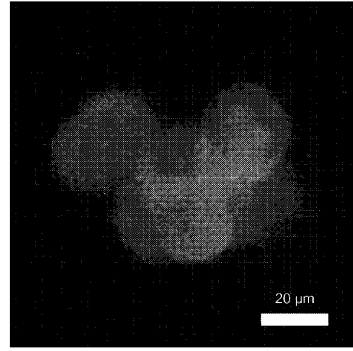


FIG. 9

【 図 10 】

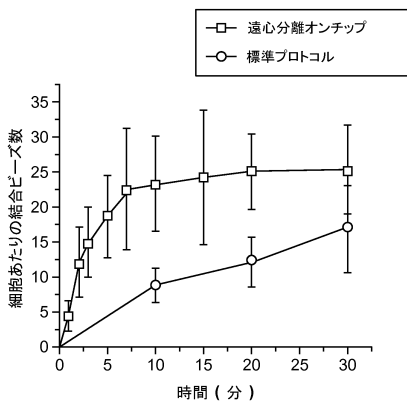


FIG. 10

【 図 11 】

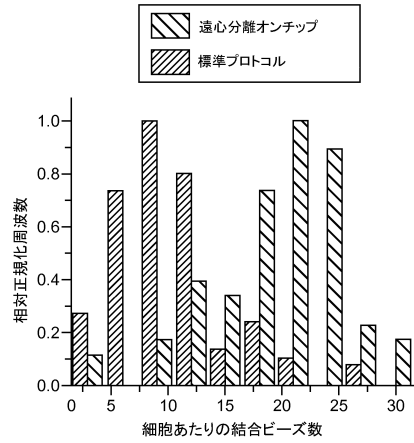


FIG. 11

フロントページの続き

(72)発明者 ホ, スジョン, シー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02125, ボストン, マウントヴァーノンストリート
401, アpartment 134

(72)発明者 マッハ, アルバート, ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95120, サンノゼ, スプリングヒルウェイ 1140

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特開2009-291783(JP, A)

特表2007-522913(JP, A)

特開2010-281701(JP, A)

Anal Chem., 2009 Oct 15, 81(20), p.8280-8

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00-5/28

C12M 1/00-3/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/BIOSIS(STN)