

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/257854 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 27/06 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)

G01N 11/04 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 15/01 (2024.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2024/021668

(22) 国際出願日:

2024年6月14日(14.06.2024)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-099478 2023年6月16日(16.06.2023) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)

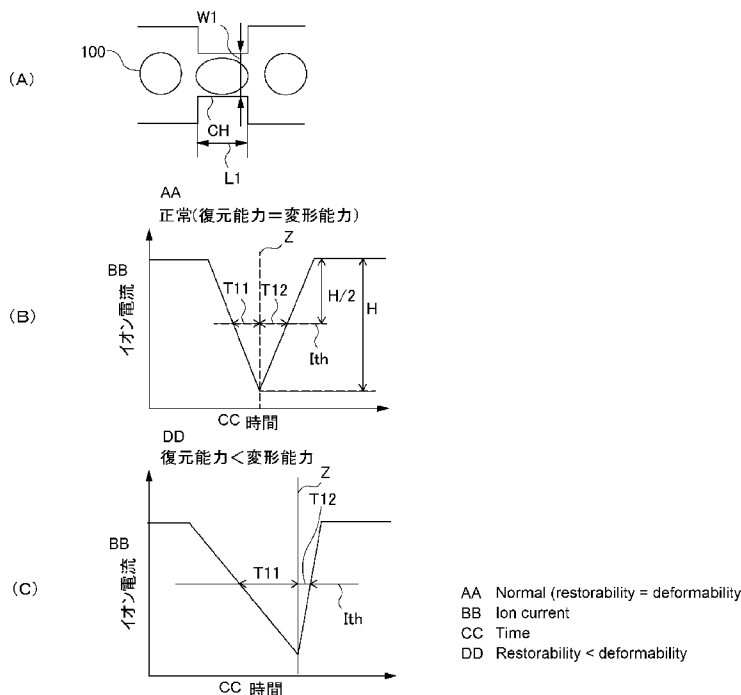
[JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 横田 一道 (YOKOTA Kazumichi); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 橋本 宗明(HASHIMOTO Muneaki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 梶本 和昭(KAJIMOTO Kazuaki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人栄光事務所(EIKOH, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING DEFORMABILITY OF FLOATING CELL

(54) 発明の名称: 浮遊細胞の変形能評価方法



(57) Abstract: The deformability of red blood cells (100) in an electrolyte solution (4) is evaluated using a sensing device (1). In an ion current waveform in which a horizontal axis represents time and a vertical axis represents a pulse-like ion current flowing between an input electrode (2) and an output electrode (3) when the red blood cells (100) pass through a detection channel CH, the symmetry in the horizontal axis direction with respect to the axis Z passing through the minimum value of the ion current and parallel to the vertical axis is determined, and the deformability of the red blood

目 7 番 1 3 号 虎 ノ 門 イ ー ス ト ビ ル デ
ィ ン グ 1 0 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

cells (100) is evaluated on the basis of the determination of the symmetry.

(57) 要約: センシングデバイス (1) を用いて電解質溶液 (4) 中の赤血球 (1 0 0) の変形能を評価する。横軸を時間、縦軸を赤血球 (1 0 0) が検出チャンネル C H を通過する際の入力電極 (2) 及び出力電極 (3) 間に流れるパルス状のイオン電流としたイオン電流波形において、イオン電流の最小値を通り、縦軸と平行な軸 Z に対する横軸方向の対称性を判定し、対称性の判定に基づいて赤血球 (1 0 0) の変形能を評価する。

明 細 書

発明の名称：浮遊細胞の変形能評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、浮遊細胞の変形能評価方法、に関する。

背景技術

[0002] 赤血球の変形能を評価する方法として、センシングデバイスを用いたものが提案されている（非特許文献1）。非特許文献1の評価方法は、電解質溶液を満たした微細な貫通孔（検出チャンネル）を介して流れるイオン電流を計測し、電解質溶液中の赤血球の変形能を評価する手法である。赤血球が検出チャンネルを通過すると、イオン電流の流れを阻害するため、イオン電流がパルス状に変化する。検出チャンネルの幅は赤血球よりも狭く設けられ、赤血球は検出チャンネルを通過する際に変形する。赤血球が硬くなると変形しにくくなるため検出チャンネルの通過時間が延び、イオン電流のパルス幅が長くなる。このイオン電流のパルス幅に基づいて赤血球の変形能を評価する。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：X. Yang, Z. Chen, J. Miao, L. Cui, W. Guan, “High-throughput and label-free parasitemia quantification and stage differentiation for malaria-infected red blood cells” Biosens. Bioelectron. 98 (2017) 408–414

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 上述した従来の評価方法では、検出チャンネルの幅が赤血球の直径よりもかなり狭い。しかも、イオン電流のパルス幅に基づいて変形能を評価してい

るため、精度よく評価するためには、検出チャンネルの長さを長くしてパルス幅を長くする必要があった。このため、検出チャンネルには赤血球がつまりやすい、という課題があった。検出チャンネルに赤血球がつまると、赤血球の変形能を評価することができなくなる。

[0005] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、赤血球がつまりにくいセンシングデバイスを用いても変形能力を評価できる浮遊細胞の変形能評価方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 前述した目的を達成するために、本発明に係る浮遊細胞の変形能評価方法は、下記〔１〕～〔３〕を特徴としている。

〔１〕

入力電極が設けられ、電解質溶液が満たされた第１槽と、
出力電極が設けられ、前記電解質溶液が満たされた第２槽と、
前記第１槽及び前記第２槽を連通する検出チャンネルと、を備えた
センシングデバイスを用いて前記電解質溶液中の浮遊細胞の変形能を評価する浮遊細胞の変形能評価方法であって、

第１軸を時間、第２軸を前記浮遊細胞が前記検出チャンネルを通過する際の前記入力電極及び前記出力電極間に流れるパルス状のイオン電流としたイオン電流波形において、前記イオン電流の最小値を通り、前記第２軸と平行な第３軸に対する第１軸方向の対称性を判定し、

前記対称性の判定に基づいて前記浮遊細胞の変形能を評価する、
浮遊細胞の変形能評価方法であること。

〔２〕

〔１〕に記載の浮遊細胞の変形能評価方法において、
前記イオン電流が閾値以下となった時間から前記イオン電流が前記最小値に達するまでの第１時間と、前記イオン電流が前記最小値から前記閾値に戻るまでの第２時間と、の比較に基づいて、前記対称性を判定する、
浮遊細胞の変形能評価方法であること。

[3]

[1] 又は [2] に記載の浮遊細胞の変形能評価方法において、
前記浮遊細胞は、血液細胞である、
浮遊細胞の変形能評価方法であること。

発明の効果

- [0007] 本発明によれば、赤血球がつまりにくいセンシングデバイスを用いて変形能力を評価できる浮遊細胞の変形能評価方法を提供することができる。
- [0008] 以上、本発明について簡潔に説明した。更に、以下に説明される発明を実施するための形態（以下、「実施形態」という。）を添付の図面を参照して通読することにより、本発明の詳細は更に明確化されるであろう。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1]図 1 は、本発明の浮遊細胞の変形能評価方法に用いられるセンシングデバイスの概略断面図である。
- [図2]図 2 (A) は、従来の赤血球の変形能評価方法で用いられる検出チャンネルの概略図であり、図 2 (B) は、図 2 (A) に示す検出チャンネルを用いたセンシングデバイスに流れるイオン電流を示すグラフである。
- [図3]図 3 (A) は、本実施形態の赤血球の変形能評価方法で用いられる検出チャンネルの概略図であり、図 3 (B) 及び図 3 (C) は、図 3 (A) に示す検出チャンネルを用いたセンシングデバイスに流れるイオン電流を示すグラフである。
- [図4]図 4 は、図 1 に示すセンシングデバイスの電解質溶液中に正常な赤血球、マラリアに感染した赤血球を含ませ、電流計でイオン電流を計測した結果を示すグラフである。
- [図5]図 5 (A) は、正常な赤血球が検出チャンネルを通る様子を説明した説明図であり、図 5 (B) は、マラリアに感染した赤血球が検出チャンネルを通る様子を説明した説明図である。
- [図6]図 6 は、他の実施形態におけるイオン電流波形の対称性の評価について説明するための説明図である。

[図7]図7は、図1に示すセンシングデバイスの電解質溶液中に古い赤血球、G A赤血球を含ませ、電流計でイオン電流を計測した結果を示すグラフである。

[図8]図8は、図1に示すセンシングデバイスの電解質溶液中に正常な赤血球、古い赤血球、G A赤血球を含ませ、電流計でイオン電流を計測した結果を示すグラフである。

[図9]図9は、細胞膜のヤング率ごとにシミュレーションしたイオン電流波形を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明に関する具体的な実施形態について、各図を参照しながら以下に説明する。本発明は浮遊細胞の変形能評価方法は、図1に示すセンシングデバイス1を用いて電解質溶液中の浮遊細胞の変形能を評価する方法である。ここで、浮遊細胞は、電解質溶液中を浮遊できる細胞であり、培地中で浮遊した状態で増殖する培養細胞のほか、付着性の細胞を処理して浮遊状態とした細胞を含む。好ましくは、血液細胞であり、白血球などの核を有する細胞だけでなく、赤血球など核なしの細胞も含む。以下の実施形態においては、浮遊細胞としての赤血球の変形能を評価する例について説明する。

[0011] 以下、説明の便宜上、図1等にも示すように、「高さ方向D1」、「長さ方向D2」及び「幅方向D3」を定義する。「長さ方向D1」は後述する第1槽5と第2槽6とを連通する方向として定義され、「高さ方向D1」、「長さ方向D2」及び「幅方向D3」は、互いに直交している。

[0012] まず、本実施形態の赤血球の変形能評価方法（以下、単に「評価方法」と略記する）に用いられるセンシングデバイス1について説明する。図1に示すように、センシングデバイス1は、入力電極2が設けられ、電解質溶液4が満たされた第1槽5と、出力電極3が設けられ、電解質溶液4が満たされた第2槽6と、第1槽5及び第2槽6を連通する検出チャンネルCH、入口部7及び出口部8と、を備えている。

[0013] 入力電極2及び出力電極3は、長尺な円柱状に設けられている。入力電極

2 及び出力電極 3 は、長手方向が高さ方向 D 1 に沿って配置され、長さ方向 D 2 に並べて配置される。入力電極 2 は、一端が第 1 槽 5 内の電解質溶液 4 内に浸され、他端が第 1 槽 5 から突出している。出力電極 3 は、一端が第 2 槽 6 内の電解質溶液 4 内に浸され、他端が第 2 槽 6 から突出している。入力電極 2 及び出力電極 3 間には、直流電源 10 から出力される直流の低電圧が印加される。また、入力電極 2 及び出力電極 3 間には、電流計 11 が設けられ、電流計 11 により入力電極 2 及び出力電極 3 間に流れるイオン電流を計測することができる。

[0014] 本実施形態では、第 1 槽 5 及び第 2 槽 6 は絶縁体膜 9 により仕切られ、絶縁体膜 9 に検出チャンネル C H、入口部 7 及び出口部 8 が設けられている。検出チャンネル C H は、入口部 7 及び出口部 8 との間に設けられている。検出チャンネル C H は、長さ方向 D 2 に沿った流路長さ L 1 を有している。入口部 7 と検出チャンネル C H とは検出チャンネル C H の入口部 7 側の端部を介して連通する。出口部 8 と検出チャンネル C H とは検出チャンネル C H の出口部 8 側の端部を介して連通する。検出チャンネル C H は、断面四角形状に設けられ、長さ方向 D 2 の入口部 7 側の端部から出口部 8 側の端部に亘って高さ W 1 が同じに設けられている。

[0015] 入口部 7 は、第 1 槽 5 と検出チャンネル C H とを連通する。出口部 8 は、検出チャンネル C H と第 2 槽 6 とを連通する。入口部 7 及び出口部 8 は、長さ方向 D 2 の一端から他端に亘って同じ高さに設けられている。また、入口部 7 及び出口部 8 は、検出チャンネル C H を中心に長さ方向 D 2 に対称に設けられ、検出チャンネル C H に近づくに従って幅が小さくなるように設けられている。

[0016] 次に、上述した図 1 に示すセンシングデバイス 1 を用いて電解質溶液 4 中の赤血球の変形能を評価する方法について説明する。入力電極 2 及び出力電極 3 間に低電圧を印加すると、入力電極 2 からのイオン電流は、検出チャンネル C H を通って出力電極 3 に向かって流れる。このとき、図 2 及び図 3 に示すように、電解質溶液 4 中の赤血球が検出チャンネル C H を通ると、イオ

ン電流の流れが阻害され、イオン電流が一時的に小さくなり、パルス状のイオン電流が検出される。本実施形態及び背景技術で説明した従来の評価方法は、上記イオン電流に基づいて赤血球の変形能を評価する。

[0017] 次に、本発明者らは従来の評価方法について考えてみた。赤血球100は、円盤状であり、直径約 $7\mu\text{m}$ ～ $8\mu\text{m}$ 、高さ $2\mu\text{m}$ ～ $3\mu\text{m}$ である。従来の評価方法で用いられる検出チャンネルCHは、図2に示すように、幅W2と高さが赤血球100の直径よりもかなり小さい $5\mu\text{m}$ ($W2 = 5\mu\text{m}$)、流路長さL2が $45\mu\text{m}$ ($L2 = 45\mu\text{m}$) に設けられている。従来の検出チャンネルCHは、幅W2が狭く、流路長さL2も長いため、赤血球100がつまりやすい、という課題がある。

[0018] 従来の評価方法では、検出チャンネルCHの幅W2を狭く流路長さL2を長くして、赤血球100の変形能力が低下すると、赤血球100が検出チャンネルCHを通りにくくなることを利用して、イオン電流のパルス幅T2により赤血球100の変形能の評価を行っている。このイオン電流のパルス幅T2は、上述した変形能力に依存するが、修復能力には依存しないため、修復能力の評価ができていない、という課題がある。

[0019] 発明者らは、これら課題を解決すべく、鋭意探求した結果、図3(A)に示すように、流路長さL1を従来の検出チャンネルCHの長さL2 ($= 45\mu\text{m}$) よりも短くすると、好ましくは検出チャンネルCHの幅W1を従来の検出チャンネルCHの幅W2 ($= 5\mu\text{m}$) よりも広くすると、赤血球100のつまりを低減し、イオン電流が定常値から最小値に達するまでが変形能力に応じ、最小値から定常値に戻るまでが修復能力に依存して、修復能力の評価を行えるのではないかと考えた。

[0020] 赤血球100は、検出チャンネルCHに入る際に通常の円盤状から検出チャンネルCHの幅W1に合わせた楕円盤状に変形する。また、赤血球100は、検出チャンネルCHを出る際に楕円盤状から円盤状に修復する。このとき、修復能力が変形能力より低くなると、赤血球100は楕円盤状から通常の円盤状に修復しにくくなる。このため、イオン電流を阻害しにくい楕円盤

状のまま検出チャンネルCH外にでるため、イオン電流が定常値から最小値に達するまでの時間よりも、最小値から定常値に戻るまでの時間が短くなる。

[0021] そして、赤血球100が正常であり、変形能力と修復能力とが同じ場合、検出チャンネルCHに入る時の変形と、検出チャンネルCHからでるときの修復と、が同程度であるため、図3（B）に示すように、横軸（第1軸）を時間、縦軸（第2軸）をイオン電流としたイオン電流波形が、イオン電流の最小値を通り縦軸に平行な軸Z（第3軸）に対する横軸方向（第1軸方向）が対称となる、と考えた。

[0022] また、赤血球100に異常が生じ、変形能力と修復能力とに偏りが生じた場合、図3（C）に示すように、イオン電流波形が、軸Zに対して横軸方向に対称とならない、と考えた。すなわち、修復能力が変形能力より低いと、図3（C）に示すように、イオン電流波形の軸Zが右側（時間が経過する側）に偏る。このことを利用して、イオン電流波形の軸Zの横軸方向の対称性に基づいて赤血球100の評価を行えるのではないかと考えた。

[0023] この考えを検証すべく下記の試験1を行った。

[0024] [試験1]

センシングデバイス1の検出チャンネルCHとしては、幅 $W1 = 5 \mu m$ 、流路長さ $L1 = 10 \mu m$ のものをを用いた。このセンシングデバイス1の電解質溶液4に正常な赤血球100と、マラリアに感染した赤血球100と、を含ませた。電解質溶液4としては、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline, PBS）を使用した。正常の赤血球100は柔軟であり、変形しやすく（変形能が高く）、変形からの修復も容易である（修復能が高い）。一方、マラリアに感染した赤血球100は、赤血球100内にマラリア原虫由来の核200（図5参照）ができ、柔軟性が失われることが知られている。また、寿命が近づいた赤血球100も柔軟性が失われることが知られている。そして、蛍光核染色でマラリアに感染した赤血球100を蛍光顕微鏡で可視化できるようにし、正常な赤血球100

が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流と、マラリアに感染した赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流と、を測定した。なお、蛍光核染色は、赤血球を固くするなどの影響を与えない程度のごく少量を用いた。また、この測定においては、1.0Vの直流電源10を用いて、入力電極2，出力電極3間に1.0Vの電圧を印加し、イオン電流のサンプリングレートを200kHzとした。測定結果を図4に示す。図4においては、正常な赤血球100のイオン電流と、マラリアに感染した赤血球100のイオン電流と、は縦軸をずらしてグラフが見やすいようにしている。

[0025] 正常な赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流波形は、図4中の一点鎖線で示すように、軸Zに対して横軸方向に対称となることが分かった。これは、図5（A）に示すように、正常な赤血球100の場合、修復能力が高いからであると考えられる。

[0026] これに対して、マラリアに感染した赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流波形は、図4中の実線で示すように、軸Zに対して横軸方向に対称となっておらず、非対称であることが分かった。マラリアに感染した赤血球のイオン電流波形の軸Zは、横軸方向の図面右側（つまり、時間が経過する方）に偏っている。これは、マラリアに感染した赤血球100は修復能力が正常赤血球よりも低いためと考えられる。

[0027] 次に、本発明者らは、上記結果の再現性を確認すべく、下記の試験2を行った。

[0028] [試験2]

センシングデバイス1の検出チャンネルCHとしては、幅 $W1 = 10 \mu m$ 、流路長さ $L1 = 10 \mu m$ のものをを用いた。このセンシングデバイス1の電解質溶液4に正常な赤血球100を含ませた。電解質溶液4としては、リン酸緩衝生理食塩水を使用した。そして、正常な赤血球100が通過する際のイオン電流を2000パルス分計測した。この測定においては、1.0Vの直流電源10を用いて、入力電極2，出力電極3間に1.0Vの電圧を印加

し、イオン電流のサンプリングレートを200kHzとした。測定した結果、2000パルス分のイオン電流波形のうち、最も頻度の高いイオン電流波形が軸Zに対して横軸方向に対称になることが確認することができた。

[0029] また、センシングデバイス1の電解質溶液4に感染率91.3%のマラリア感染赤血球100を含ませた。そして、マラリア感染赤血球100が通過する際のイオン電流を2000パルス分測定した。結果、2000パルス分のイオン電流波形のうち、最も頻度の高いイオン電流波形が軸Zに対して横軸方向に非対称になることを確認することができた。

[0030] 上述した試験からイオン電流波形において、軸Zに対する横軸方向の対称性を判定し、その対称性に基づいて赤血球100の変形能を評価できることが分かった。このことを利用して、本実施形態の赤血球100の評価方法においては、イオン電流波形において、軸Zに対する横軸方向の対称性を判定し、その対称性に基づいて赤血球100の変形能を評価する。

[0031] 次に、イオン電流波形の対称性の判定方法について説明する。図3に示すように、イオン電流が閾値 I_{th} 以下となった時間からイオン電流が最小値に達するまでの第1時間 T_{11} と、イオン電流が最小値から閾値 I_{th} に戻るまでの第2時間 T_{12} と、の比較に基づいて、対称性を判定する。この第1時間 T_{11} と第2時間 T_{12} との差分($T_{11} - T_{12}$)又は比(T_{11} / T_{12})が所定値以下であれば、イオン電流波形が対称であり、赤血球100に異常が生じていないと評価する。一方、第1時間 T_{11} と第2時間 T_{12} との差分($T_{11} - T_{12}$)又は比(T_{11} / T_{12})が所定値を超えていれば、イオン電流波形が非対称であり、赤血球100が硬くなっていると評価する。なお、閾値 I_{th} は、イオン電流の定常値以下、最小値より大きく設定される。好ましくは、イオン電流のピーク高さHの半分に設定すると、対称性の評価が容易となる。

[0032] イオン電流が非対称と判定した際に、図3(C)に示すように、第1時間 $T_{11} >$ 第2時間 T_{12} であれば、イオン電流波形の軸Zが右側に偏り、赤血球100の修復能力が変形能力よりも低いと評価する。ただし、第1時間

T 1 1, T 1 2については、ばらつきや計測誤差などもあるため、多数個の赤血球 1 0 0 が通過したときのイオン電流波形を測定し、その平均を求めてもよい。

[0033] 上述した実施形態によれば、イオン電流波形の対称性を判定し、対称性に基づいて赤血球の変形能を評価している。これにより、幅が広く、流路長さが長い検出チャンネル、すなわち赤血球がつまりにくいセンシングデバイス 1 を用いても、赤血球の変形能を評価することができる。

[0034] 上述した実施形態によれば、第 1 時間 T 1 1 と第 2 時間 T 1 2 との比較に基づいてイオン電流波形の対称性を判定している。これにより、簡単にイオン電流波形の対称性を判定することができる。

[0035] なお、本発明は、上述した実施形態に限定されるものではなく、適宜、変形、改良、等が可能である。その他、上述した実施形態における各構成要素の材質、形状、寸法、数、配置箇所、等は本発明を達成できるものであれば任意であり、限定されない。

[0036] 上述した実施形態によれば、第 1 時間 T 1 1 と第 2 時間 T 1 2 との比較に基づいてイオン電流波形の対称性を判定していたが、これに限ったものではない。例えば、図 6 に示すように、第 1 時間 T 1 1 におけるイオン電流と閾値 I_{th} との差分の積分値 S_1 と、第 2 時間におけるイオン電流と閾値 I_{th} との差分の積分値 S_2 と、の差分又は比の比較に基づいてイオン電流の対称性を判定するようにしてもよい。具体的には、差分の場合は 0 を越えてれば非対称と判定し、比の場合は、1 を越えていれば非対称と判定することが考えられる。

[0037] 上述した実施形態によれば、入口部 7 及び出口部 8 を長さ方向に対称に設け、正常な赤血球 1 0 0 が検出チャンネル C H を通過したときのイオン電流波形を横軸方向に対称にしていたが、これに限ったものではない。入口部 7 及び出口部 8 は長さ方向に対称でなくてもよい。この場合、正常な赤血球 1 0 0 が検出チャンネル C H を通過したときのイオン電流波形の横軸方向の対称性と、判定対象となる赤血球 1 0 0 が検出チャンネル C H を通過したとき

のイオン電流波形の横軸方向の対称性とを比較して、赤血球１００の評価を行なえばよい。

[0038] 上述した実施形態によれば、〔試験１〕，〔試験２〕により、マラリア感染した赤血球１００が検出チャンネルＣＨを通過したときのイオン電流波形が非対称であることを確認した。しかしながら、赤血球が硬くなる原因は、マラリア感染だけではない。例えば、糖尿病などの病気によっても赤血球１００が硬くなることが知られている。また、経時劣化によっても赤血球１００が硬くなることが知られている。

[0039] 本発明者らは、マラリア感染以外に起因して赤血球が硬くなった場合でも、イオン電流波形が非対称となるか確認すべく、下記の試験３、試験４を行った。

[0040] 〔試験３〕

センシングデバイス１の検出チャンネルＣＨとしては、幅 $W1 = 4 \mu m$ 、流路長さ $L1 = 10 \mu m$ のものをを用いた。このセンシングデバイス１の電解質溶液４に採血後数日以上経過して経時劣化した赤血球１００を含ませた。そして、経時劣化した赤血球１００が検出チャンネルＣＨを通過したときのイオン電流を測定した。また、センシングデバイス１の電解質溶液４に細胞を硬化する試薬として知られているグルタルアルデヒド（以下、「GA」と略記）を用いて硬化させた赤血球１００（以下、「GA赤血球１００」と略記）を含ませた。そして、GA赤血球１００が検出チャンネルＣＨを通過したときのイオン電流波形を計測した。結果を図７に示す。

[0041] 詳しく説明すると、経時劣化した赤血球１００（ヘマトクリット値５０％、採決後数日以上冷凍保存）を電解質溶液４であるリン酸緩衝生理食塩水（PBS溶液）で２度洗浄（１５００G、５分間の遠心）し、洗浄した $4 \times 10^6 / mL$ の赤血球１００を懸濁させたPBS溶液を調整した。この経年劣化した赤血球１００を懸濁させたPBS溶液２ μL を、既にPBS溶液が充填された第１槽５及び第２槽６内に入れて、経年劣化した赤血球１００が検出チャンネルＣＨを通過したときのイオン電流波形を測定した。

[0042] また、赤血球100を懸濁させたPBS溶液200 μ Lに10%GAを2 μ L添加して0.1%GA濃度にしたもの2 μ Lを、既にPBS溶液が充填された第1槽5及び第2槽6内に入れて、GA赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流波形を測定した。

[0043] 図7に示すように、経時劣化した赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流波形は、第1時間T11>第2時間T12となっており、非対称になることを確認することができた。また、GA赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流波形も、第1時間T11>第2時間T12となっており、非対称になることを確認することができた。

[0044] [試験4]

センシングデバイス1の検出チャンネルCHとしては、幅 $W1 = 2\mu\text{m}$ 、流路長さ $L1 = 10\mu\text{m}$ のものをを用いた。このセンシングデバイス1の電解質溶液4に健常人の正常な赤血球100を含ませた。そして、正常な赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流を測定した。また、センシングデバイス1の電解質溶液4に採血後数日以上経過した経時劣化した赤血球100を含ませた。そして、経年劣化した赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流を測定した。また、また、センシングデバイス1の電解質溶液4に糖尿病の赤血球100のモデルとしてグルコース（GC；血糖）に浸した赤血球100（以下、「GC赤血球」と略記）を含ませた。そして、GC赤血球100が検出チャンネルCHを通過したときのイオン電流を測定した。結果を図8に示す。

[0045] 詳しく説明すると、健常人血液（採血直後）を懸濁したPBS溶液を正常な赤血球100を含ませた電解質溶液4とした。経時劣化した赤血球100を含ませた電解質溶液4としては、上記[試験3]と同様に $4 \times 10^6 / \text{mL}$ の経時劣化した赤血球100を懸濁させたPBS溶液200 μ Lを用いた。また、PBSA溶液（PBS+1%ヒト血清アルブミン）にグルコース（終濃度20%）を加えて、グルコース溶液を作成する。グルコース溶液と、経

時劣化した赤血球 100 を懸濁させた PBS 溶液と、を 1 : 1 で混合し、36、5℃で、5時間攪拌した後、PBSで2度洗浄（1500G、5分間の遠心）して、GC赤血球 100 を含ませた電解質溶液 4 とした。

[0046] 図 8 に示すように、正常な赤血球 100 が検出チャンネル CH を通過したときのイオン電流波形は、第 1 時間 T_{11} ÷ 第 2 時間 T_{12} となっており、対象になっていることを確認することができた。正常な赤血球 100 を含む電解質溶液 4 には、赤血球 100（7－8 μm ）より径の大きな白血球等（8－15 μm ）も含まれているが、それらによる検出チャンネル CH のつまりは数百パルスの計測では見られなかった。これは全血で赤血球 100 は数百万個／ μL 含まれるのに対し、白血球は数千万個／ μL 程度の赤血球 100 の 1／1000 以下であり、通貨細胞は確率的にほぼ赤血球 100 となり、計測の障害となるつまりが生じなかったためと考えられる。

[0047] また、経時劣化した赤血球 100、糖尿病の赤血球 100 のモデルである GC 赤血球 100 が検出チャンネル CH を通過したときのイオン電流波形も、第 1 時間 T_{11} > 第 2 時間 T_{12} となっており、非対称になることを確認することができた。

[0048] これらの結果から、本手法が全血の PBS 溶液の計測という簡便な評価方法でも、正常な赤血球 100 に対して、経時劣化した赤血球 100 や糖化による赤血球 100 の変化能低下を評価できることが分かった。

[0049] また、上述した実施形態では、赤血球 100 について評価していたが、これに限ったものではない。赤血球以外の浮遊細胞（例えば白血球、血小板などの血液細胞）についても同様の評価を行うようにしてもよい。

[0050] 本発明者らは、上述した変形能の評価方法が、赤血球以外の浮遊細胞にも適用できるか確認すべく、浮遊細胞の細胞膜のヤング率ごとのイオン電流波形について有限要素法によるシミュレーションを行った。このシミュレーションでは、検出チャンネル CH を幅 $W_1 = 10 \mu\text{m}$ 、流路長さ $L_1 = 10 \mu\text{m}$ とした。また、細胞径 8 μm 、細胞膜厚 80 nm の浮遊細胞としてモデル化した。また、第 1 槽 5 の水圧を 10 Pa、第 2 槽 6 の水圧を 0 Pa とした

。非圧縮性流体についてのナビエストークス方程式、応力とひずみの関係式を用いて、流体－構造連成（Fluid-Structure Interaction、FSI）計算を行い、得られた細胞形状－時間モデルから、下記の式（１）によって電流値 I を求めた。 $I = E \sigma \int A(D) dD \dots$
（１） E ：入力電極２及び出力電極３に印加する電圧（１．０Ｖ） σ ：電解質溶液４の電気伝導率（１．７３Ｓ／ｍ） $A(D)$ ：検出チャンネルＣＨ内の長さ方向 D の位置 D における浮遊細胞を除いた流路断面積

[0051] シミュレーションした結果を図９に示す。同図に示すように、ヤング率が高いほど修復力が低くなり、修復力が低いほど右側に傾くことが分かった。すなわち、イオン電流波形は、細胞膜のヤング率に応じて変形するため、赤血球以外の浮遊細胞にも上記変形能の評価方法を適用できることが確認できた。

[0052] 上述した実施形態によれば、検出チャンネルＣＨとしては断面四角形状のものをを用いていたが、これに限ったものではない。検出チャンネルＣＨとしては、赤血球などの浮遊細胞を通すことができる形状であればよく、断面円状であってもよい。

[0053] 上述した実施形態によれば、幅 $W1 = 5 \mu m$ または $10 \mu m$ 、流路長さ $L1 = 10 \mu m$ の検出チャンネルＣＨを用いていたが、これに限ったものではない。検出チャンネルＣＨは浮遊細胞のサイズに合わせて設計される。例えば、浮遊細胞が詰まらずに通過する幅 $W1$ を求め、求めた幅 $W1$ においてイオン電流波形の対称性の判定が可能となる流路長さ $L1$ に設計することが考えられる。赤血球の場合は、幅 $W1$ を $5 \mu m \sim 30 \mu m$ 、流長さ $L1$ を $1 \mu m \sim 30 \mu m$ に設計してもよい。より好ましくは、幅 $W1$ を $5 \mu m \sim 20 \mu m$ 、流路長さ $L1$ を $1 \mu m \sim 20 \mu m$ に設計してもよい。より好ましくは、幅 $W1$ を $5 \mu m \sim 10 \mu m$ 、流路長さ $L1$ を $1 \mu m \sim 10 \mu m$ に設計してもよい。

[0054] ここで、上述した本発明に係る浮遊細胞の変形能評価方法の実施形態の特徴をそれぞれ以下〔１〕～〔３〕に簡潔に纏めて列記する。

[0055] [1]

入力電極（２）が設けられ、電解質溶液（４）が満たされた第１槽（５）と、

出力電極（３）が設けられ、前記電解質溶液が満たされた第２槽（６）と、

前記第１槽及び前記第２槽を連通する検出チャンネル（ＣＨ）と、を備えた

センシングデバイス（１）を用いて前記電解質溶液中の浮遊細胞の変形能を評価する浮遊細胞の変形能評価方法であって、

第１軸を時間、第２軸を前記浮遊細胞が前記検出チャンネルを通過する際の前記入力電極及び前記出力電極間に流れるパルス状のイオン電流としたイオン電流波形において、前記イオン電流の最小値を通り、前記第２軸と平行な第３軸に対する第１軸方向の対称性を判定し、

前記対称性の判定に基づいて前記浮遊細胞の変形能を評価する、
浮遊細胞の変形能評価方法。

[2]

[1]に記載の浮遊細胞の変形能評価方法において、

前記イオン電流が閾値以下となった時間から前記イオン電流が前記最小値に達するまでの第１時間と、前記イオン電流が前記最小値から前記閾値に戻るまでの第２時間と、の比較に基づいて、前記対称性を判定する、

浮遊細胞の変形能評価方法。

[3]

[1]又は[2]に記載の浮遊細胞の変形能評価方法において、

前記浮遊細胞は、血液細胞である、

浮遊細胞の変形能評価方法。

[0056] 本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

[0057] 本出願は、2023年6月16日出願の日本特許出願（特願2023-099478）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

産業上の利用可能性

[0058] 本発明によれば、赤血球がつまりにくいセンシングデバイスを用いても変形能力を評価できる浮遊細胞の変形能評価方法を提供することができる。この効果を奏する本発明は、浮遊細胞の変形能評価方法に関して有用である。

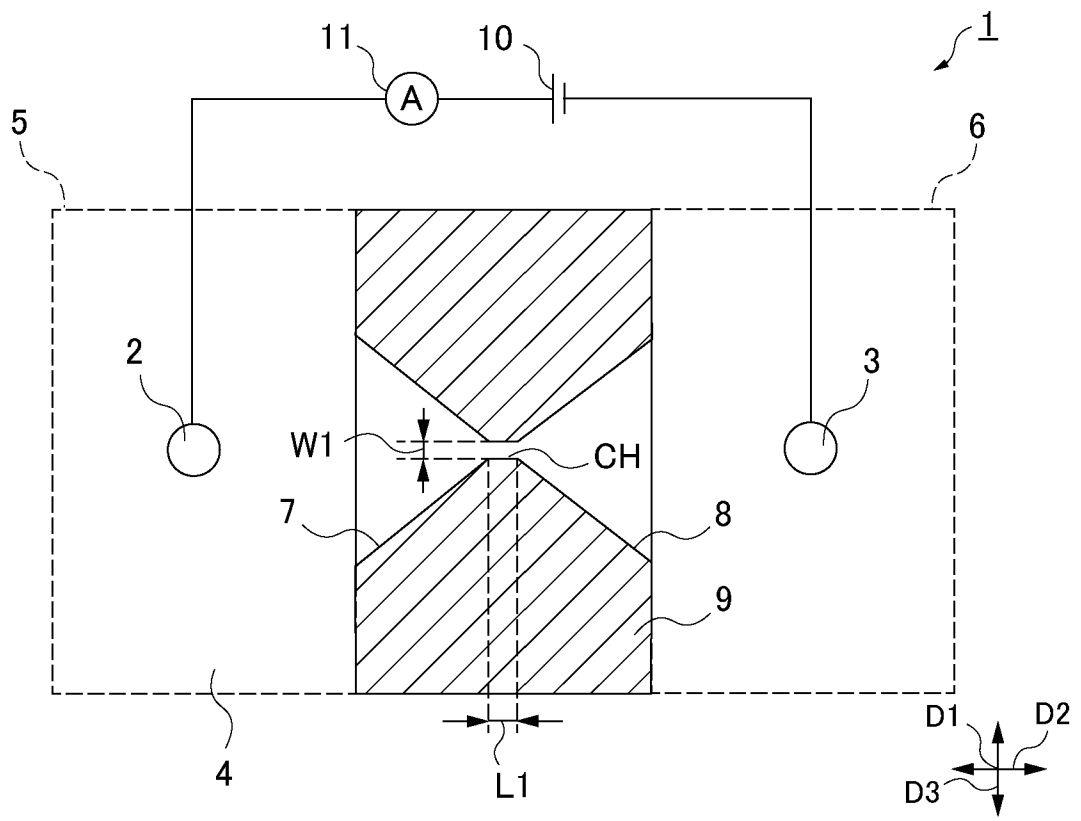
符号の説明

- [0059]
- 1 センシングデバイス
 - 2 入力電極
 - 3 出力電極
 - 4 電解質溶液
 - 5 第1槽
 - 6 第2槽
 - 100 赤血球（浮遊細胞）
 - CH 検出チャンネル
 - lth 閾値
 - T11 第1時間
 - T12 第2時間
 - Z 軸（第3軸）

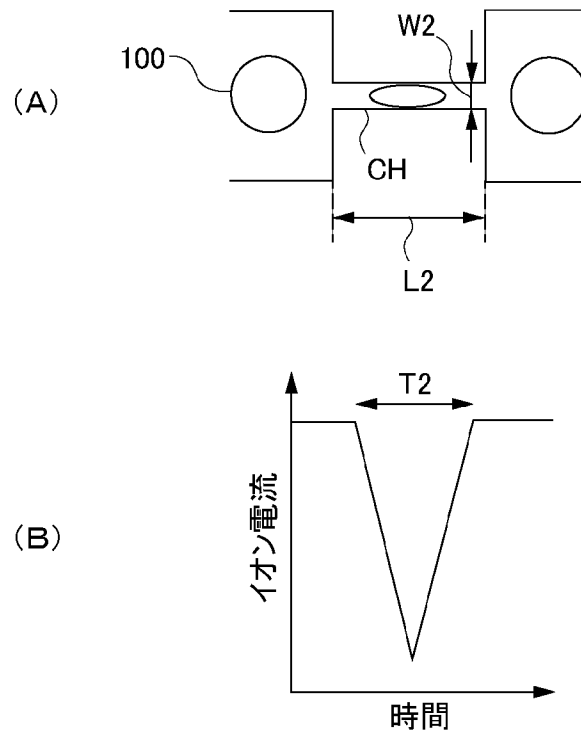
請求の範囲

- [請求項1] 入力電極が設けられ、電解質溶液が満たされた第1槽と、
出力電極が設けられ、前記電解質溶液が満たされた第2槽と、
前記第1槽及び前記第2槽を連通する検出チャンネルと、を備えた
センシングデバイスを用いて前記電解質溶液中の浮遊細胞の変形能
を評価する浮遊細胞の変形能評価方法であって、
第1軸を時間、第2軸を前記浮遊細胞が前記検出チャンネルを通過
する際の前記入力電極及び前記出力電極間に流れるパルス状のイオン
電流としたイオン電流波形において、前記イオン電流の最小値を通り
、前記第2軸と平行な第3軸に対する第1軸方向の対称性を判定し、
前記対称性の判定に基づいて前記浮遊細胞の変形能を評価する、
浮遊細胞の変形能評価方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の浮遊細胞の変形能評価方法において、
前記イオン電流が閾値以下となった時間から前記イオン電流が前記
最小値に達するまでの第1時間と、前記イオン電流が前記最小値から
前記閾値に戻るまでの第2時間と、の比較に基づいて、前記対称性を
判定する、
浮遊細胞の変形能評価方法。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の浮遊細胞の変形能評価方法において、
前記浮遊細胞は、血液細胞である、
浮遊細胞の変形能評価方法。

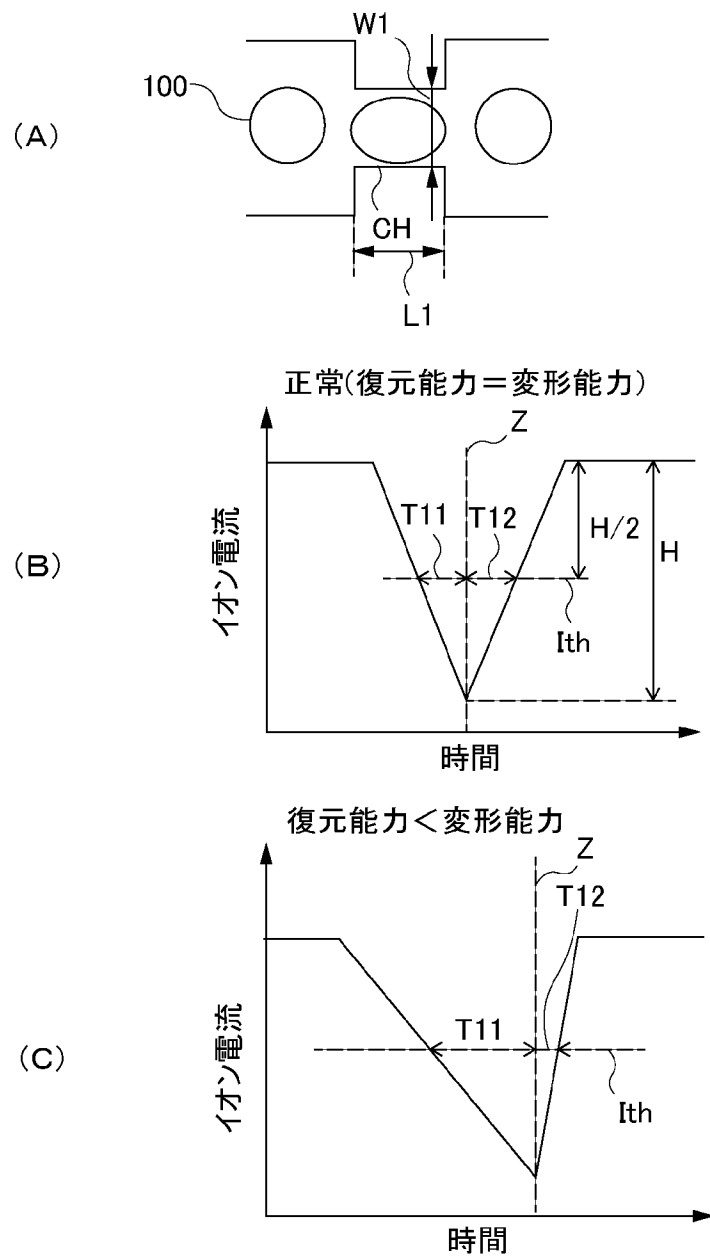
[図1]



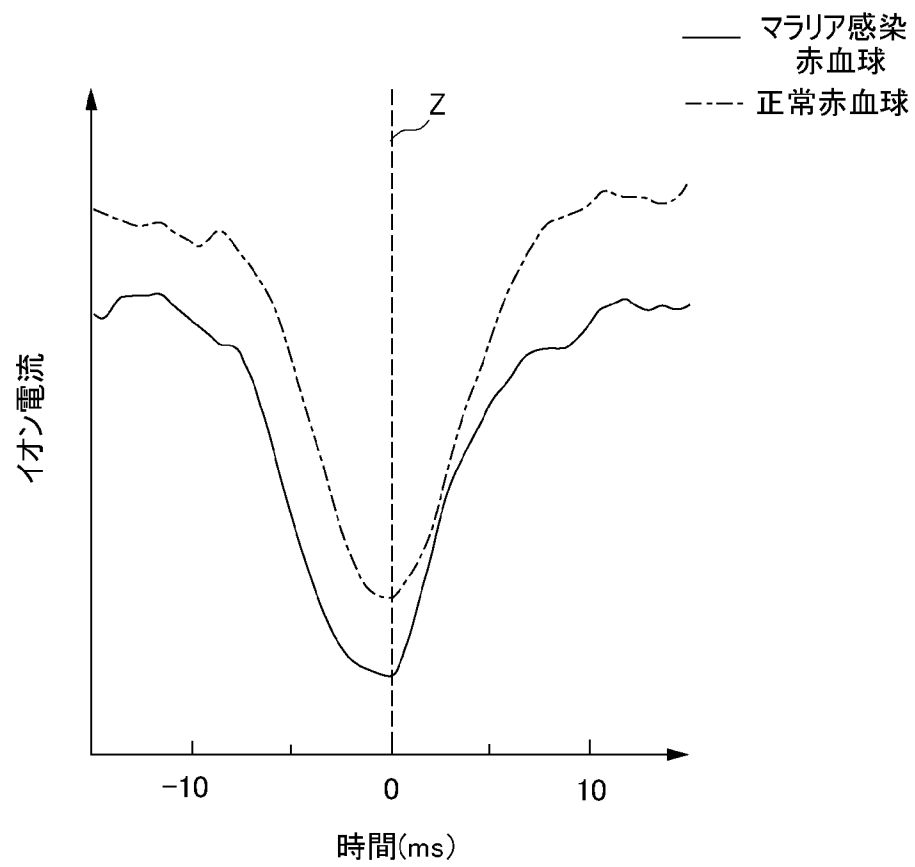
[図2]



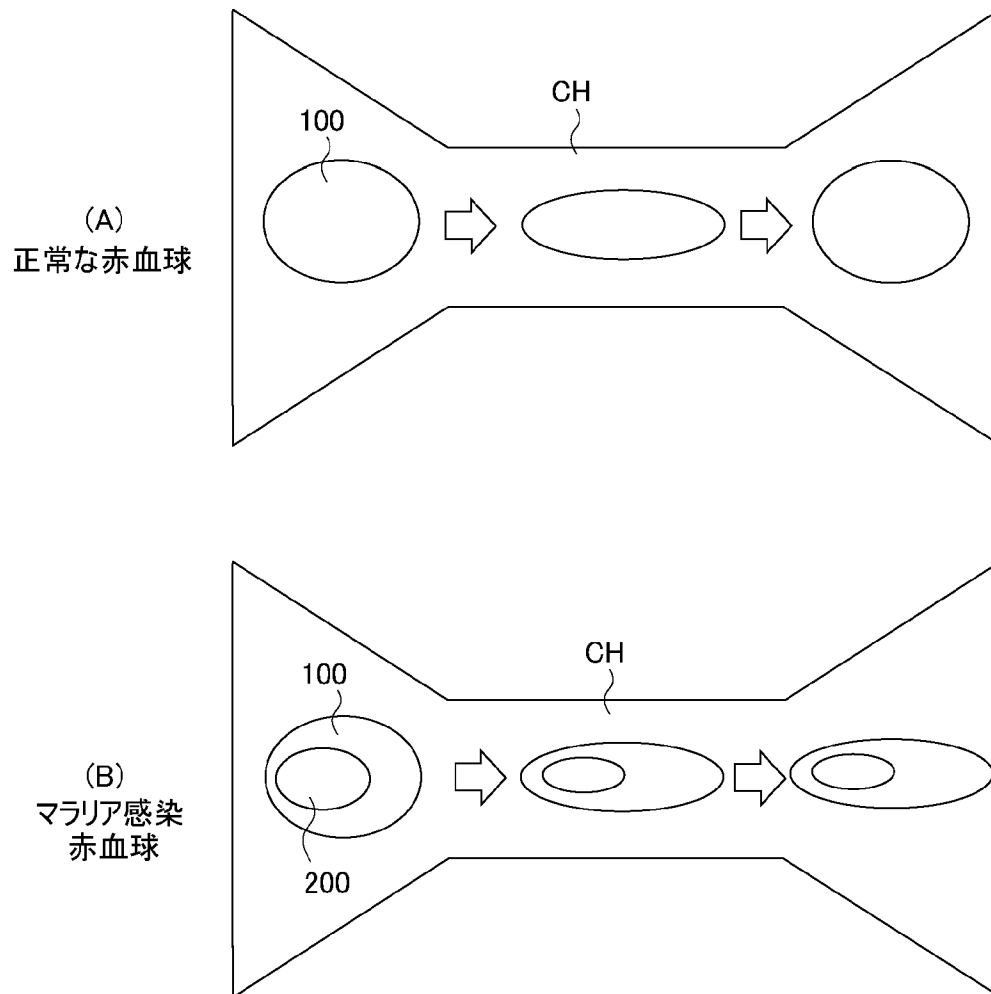
[図3]



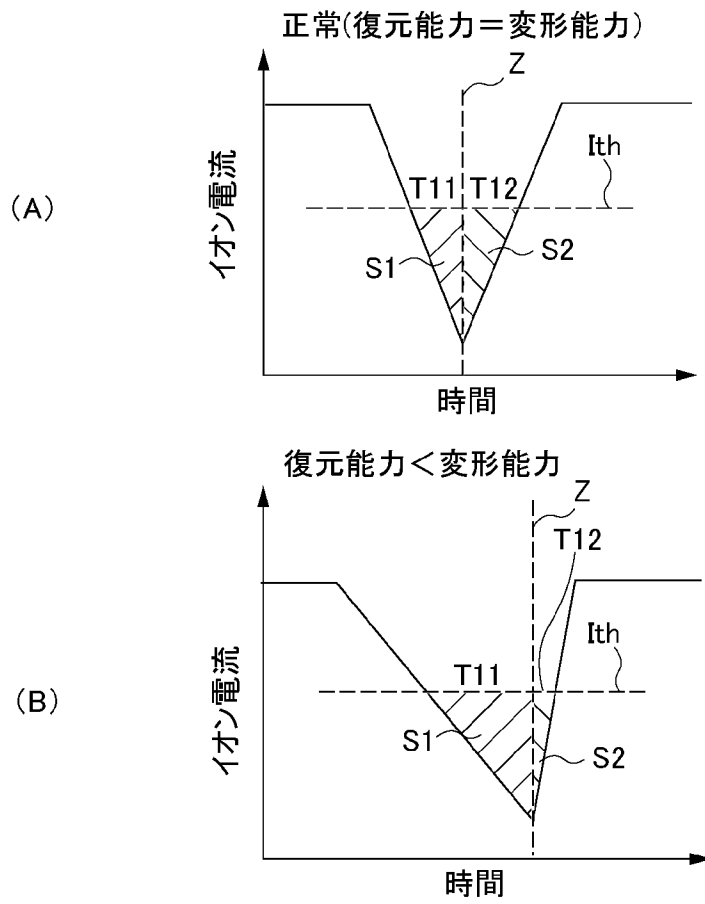
[図4]



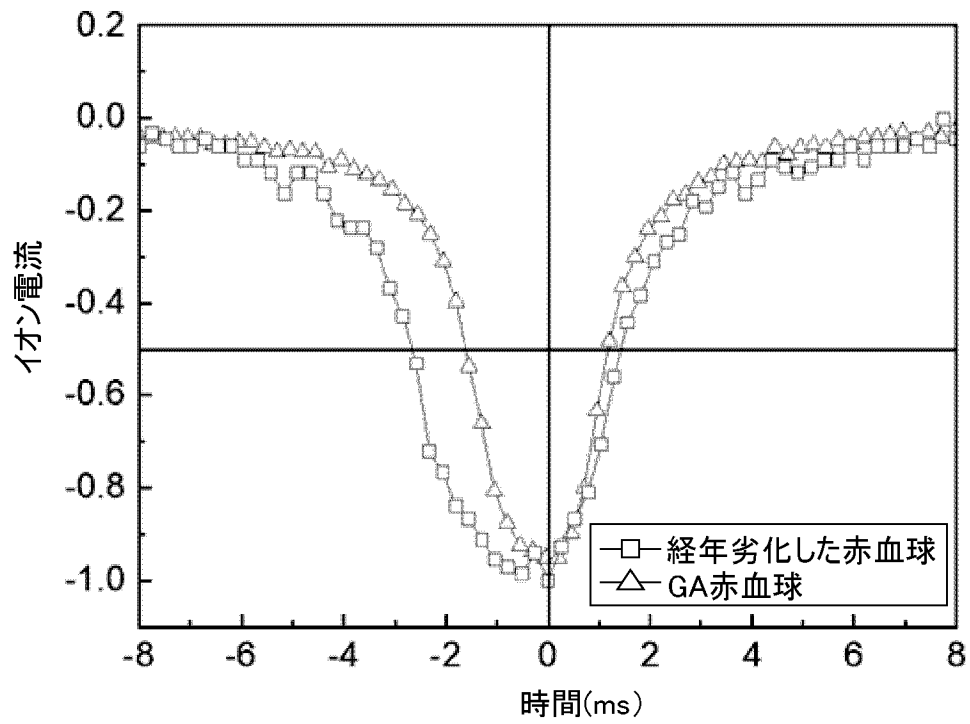
[図5]



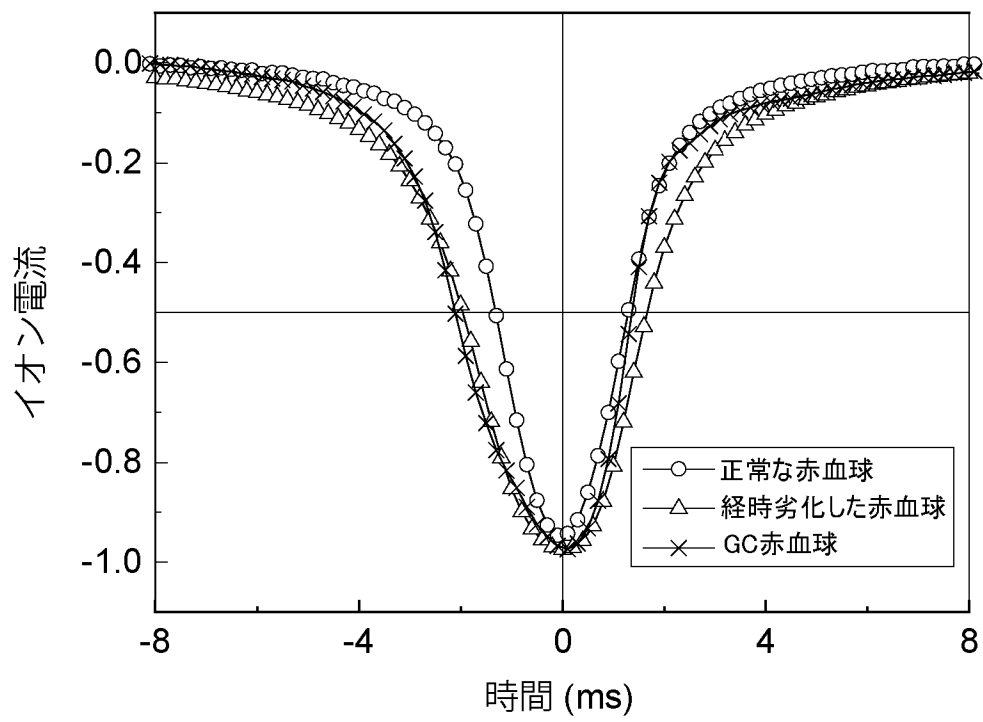
[図6]



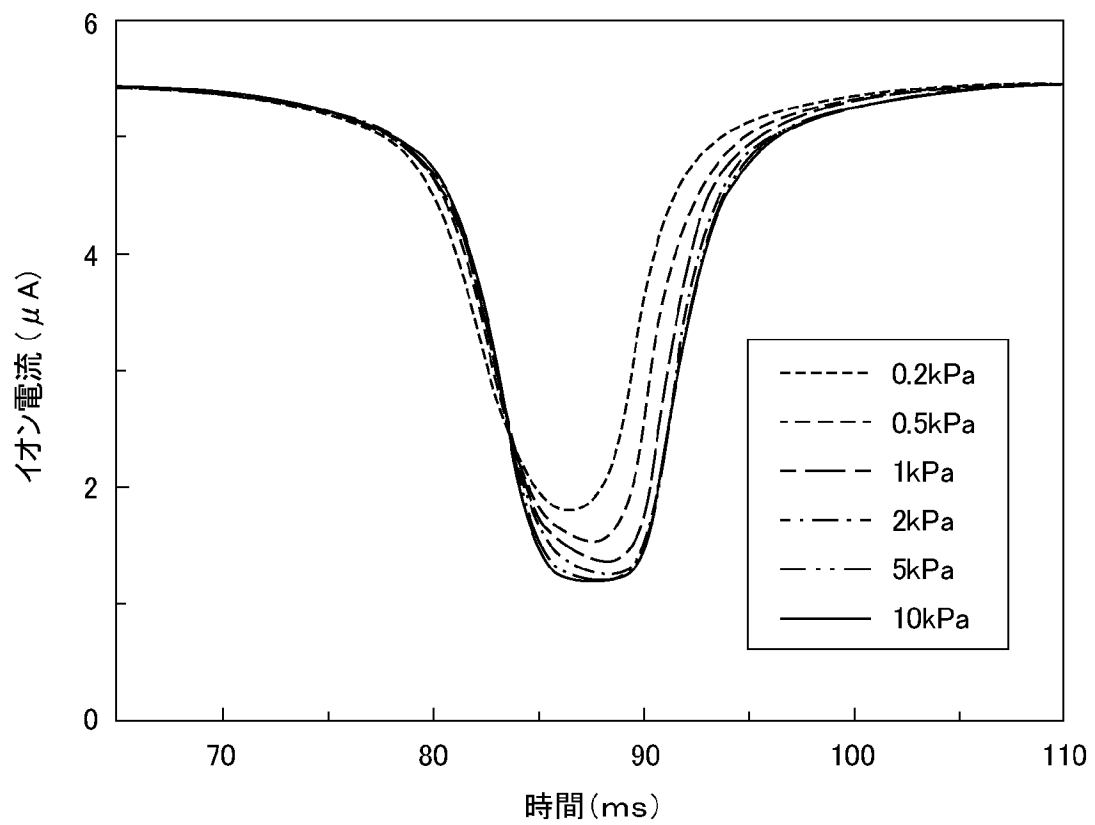
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 27/06 (2006.01)i; G01N 11/04 (2006.01)i; G01N 15/01 (2024.01)i; G01N 27/00 (2006.01)i; G01N 33/49 (2006.01)i FI: G01N27/06 Z; G01N15/01; G01N33/49 F; G01N27/00 Z; G01N11/04 A According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N11/04; G01N15/01; G01N27/00-G01N27/10; G01N27/14-G01N27/24; G01N33/49 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2022/0314219 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 06 October 2022 (2022-10-06) paragraphs [0002], [0033]-[0104], fig. 1-5	1-3
A	JP 1-196566 A (ADVANCE CO., LTD.) 08 August 1989 (1989-08-08)	1-3
A	WO 2016/063858 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 28 April 2016 (2016-04-28)	1-3
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 July 2024		Date of mailing of the international search report 16 July 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/021668

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2022/0314219	A1	06 October 2022	EP 4067865 A1 KR 10-2022-0135619 A	
JP	1-196566	A	08 August 1989	(Family: none)	
WO	2016/063858	A1	28 April 2016	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

G01N 27/06(2006.01)i; G01N 11/04(2006.01)i; G01N 15/01(2024.01)i; G01N 27/00(2006.01)i;
G01N 33/49(2006.01)i
FI: G01N27/06 Z; G01N15/01; G01N33/49 F; G01N27/00 Z; G01N11/04 A

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

G01N11/04; G01N15/01; G01N27/00-G01N27/10; G01N27/14-G01N27/24; G01N33/49

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	US 2022/0314219 A1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 06.10.2022 (2022 - 10 - 06) 段落 [0002]、[0033] - [0104]、図1-5	1-3
A	JP 1-196566 A (株式会社アドバンス) 08.08.1989 (1989 - 08 - 08)	1-3
A	WO 2016/063858 A1 (国立大学法人名古屋大学) 28.04.2016 (2016 - 04 - 28)	1-3

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 04.07.2024

国際調査報告の発送日 16.07.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

小澤 瞬 2W 6003

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/021668

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2022/0314219	A1	06.10.2022	EP	4067865	A1	
				KR	10-2022-0135619	A	
JP	1-196566	A	08.08.1989	(ファミリーなし)			
WO	2016/063858	A1	28.04.2016	(ファミリーなし)			