

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6845246号
(P6845246)

(45) 発行日 令和3年3月17日(2021.3.17)

(24) 登録日 令和3年3月1日(2021.3.1)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/26 (2006.01)	C 1 2 M 1/26
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 M
B O 3 B 5/00 (2006.01)	B O 3 B 5/00 Z
B O 1 J 19/00 (2006.01)	B O 1 J 19/00 A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 B

請求項の数 11 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2018-533164 (P2018-533164)	(73) 特許権者	516112772
(86) (22) 出願日	平成28年1月28日 (2016.1.28)		バイオリディックス リミテッド
(65) 公表番号	特表2019-509016 (P2019-509016A)		Biolidics Limited
(43) 公表日	平成31年4月4日 (2019.4.4)		シンガポール共和国 118257 シン
(86) 国際出願番号	PCT/SG2016/050040		ガポール シンガポール・サイエンス・パ
(87) 国際公開番号	W02017/131580		ーク 1 ナンバー02-03 サイエ
(87) 国際公開日	平成29年8月3日 (2017.8.3)		ス・パーク・ドライブ 81
審査請求日	平成30年12月11日 (2018.12.11)	(74) 代理人	100079108
			弁理士 稲葉 良幸
		(74) 代理人	100109346
			弁理士 大貫 敏史
		(74) 代理人	100117189
			弁理士 江口 昭彦
		(74) 代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体デバイスを用いたマルチステージ標的細胞富化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的細胞と非標的細胞とを含むサンプルを受容するための少なくとも1つの入口と、中心領域の上流端と周辺領域の下流端とを有する第1のスパイラルチャネル部分であって、前記上流端が前記入口に結合され、前記第1のスパイラルチャネル部分が、前記標的細胞と前記非標的細胞とが前記下流端で異なるストリームを占有するように構成される、第1のスパイラルチャネル部分と、

前記第1のスパイラルチャネル部分の前記下流端で非標的細胞のストリームに結合するように配置された第1の廃棄物出口と、

前記第1のスパイラルチャネル部分の前記下流端で標的細胞のストリームに結合するように配置されたリンクチャネル部分と、

周辺領域の上流端と中心領域の下流端とを有する第2のスパイラルチャネル部分であって、前記第2のスパイラルチャネル部分の前記上流端が前記リンクチャネル部分に結合され、前記第2のスパイラルチャネル部分が、前記標的細胞と前記非標的細胞とが前記下流端で異なるストリームを占有するように構成される、第2のスパイラルチャネル部分と、

前記第2のスパイラルチャネル部分の前記下流端で非標的細胞のストリームに結合するように配置された第2の廃棄物出口と、

前記第2のスパイラルチャネル部分の前記下流端で標的細胞のストリームに結合するように配置されたサンプル出口と、

前記第1のスパイラルチャネル部分の前記下流端を前記第1の廃棄物出口に結合する第

10

20

1の廃棄物出口部分及び前記第1の廃棄物出口の一部を構成する圧力コンペンセーター路と、

前記第2のスパイラルチャネルを前記サンプル出口に結合するサンプル出口結合路と、
前記第2のスパイラルチャネルを前記第2の廃棄物出口に結合する第2の廃棄物出口結合路と、

前記第1のスパイラルチャネル部分の前記上流端に結合された第1の緩衝液入口であって、シース緩衝液を受容するように構成された第1の緩衝液入口と、

前記第2のスパイラルチャネル部分の前記上流端に結合された第2の緩衝液入口であって、シース緩衝液を受容するように構成された第2の緩衝液入口と、を含むマイクロ流体デバイスであって、

前記第1の廃棄物出口部分は、下記式で示されるフロー抵抗 R_{w1} を有するように構成される、マイクロ流体デバイス。

$$r_{o1}' = (R_{w1} - r_{o1} R_{R1+S2}) / R_{C2+R2} // W2$$

(式中、 r_{o1} は前記リンクチャネル部分を通る流量 Q_{S12} と前記第1の廃棄物出口の流量 Q_{w01} との比に等しい回収側の流量比を示し、

r_{o1}' は、前記 r_{o1} と、前記第2の緩衝液入口への前記シース緩衝液の入力流量 Q_{B12} 及び前記第1の廃棄物出口の流量 Q_{w01} の比との合計に等しく、

R_{R1+S2} は、前記リンクチャネル部分のフロー抵抗を示し、 $R_{C2+R2} // W2$ は、前記第2のスパイラルチャネル部分と前記サンプル出口結合路及び前記第2の廃棄物出口結合路の平行な組み合わせとのフロー抵抗を示す。)

【請求項2】

前記第1の緩衝液入口が、前記第1のスパイラルチャネル部分の内側壁に近接する前記第1のスパイラルチャネル部分に前記シース緩衝液を導入するように配置され、かつ前記少なくとも1つの入口が、前記第1のスパイラルチャネル部分の外側壁に近接する前記第1のスパイラルチャネル部分に前記サンプルを導入するように配置される、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項3】

前記サンプルが血液サンプルまたは血液成分である、請求項1または2に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項4】

前記標的細胞が循環腫瘍細胞または循環希薄細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項5】

前記第1および第2のスパイラルチャネル部分が、前記標的細胞が慣性集束を起こすようにかつ前記非標的細胞がディーン力の影響下で横方向位置にマイグレートするように構成される、請求項1～4のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項6】

前記標的細胞が細胞直径閾値超の細胞直径を有し、かつ前記非標的細胞が前記細胞直径閾値未満の直径を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項7】

前記第1の廃棄物出口および前記リンクチャネル部分に関連するフロー抵抗が前記回収側の流量比 r_{o1} に基づいて構成される、請求項1～6のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項8】

前記第1の廃棄物出口および前記リンクチャネル部分に関連するチャンネル幅が前記回収側の流量比 r_{o1} に基づいて構成される、請求項7に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項9】

前記第2の廃棄物出口および前記サンプル出口に関連するフロー抵抗が前記回収側の流量比 r_{o1} に基づいて構成される、請求項7または8に記載のマイクロ流体デバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記第2の廃棄物出口および前記サンプル出口に関連するチャンネル幅が前記回収側の流量比 r_{o_1} に基づいて構成される、請求項9に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 11】

前記回収側の流量比 r_{o_1} が0.1~10の範囲内である、請求項7~10のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

10

本発明の実施形態は、サイズベース慣性分離を用いて血液および他の体液から標的細胞を富化するマイクロ流体デバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

背景

マイクロフルイディクスチップなどのマイクロ流体デバイスは、典型的には、材料（たとえば、ガラス、シリコン、またはポリジメチルシロキサン（PDMS）などのポリマー）中にエッチングまたは成形された一群のマイクロチャンネルを含む。かかるマイクロフルイディクスチップの用途は、不均一サンプルから希薄濃度の比較的大きな粒子/細胞の富化である。典型的な例は、非常に高いスループットで血液細胞から循環腫瘍細胞（CTC）を富化することである。患者の血液サンプルからCTCを富化することは、癌の診断および治療に不可欠である。難題は、患者の血液サンプル中のCTCが希薄なことである。すなわち、CTCは、転移疾患の患者では全血1mL当たりCTC1~10個程度の頻度で見いだされるが、同一体積の血液中には数百万個の白血球（WBC）および十億個の赤血球（RBC）が存在する。

20

【0003】

図1は、国際特許出願PCT/SG2013/000442号（国際公開第2015/057159号として公開された）に記載のバイオチップ設計の模式図を示す。マイクロ流体デバイス100は、スパイラルカーブマイクロチャンネル110を含む。サンプル入口 S_{112} およびシース緩衝液入口 B_{114} は、スパイラルカーブマイクロチャンネル110の中心領域に位置する。サンプル入口結合路116は、サンプル入口をスパイラルカーブマイクロチャンネル110に結合する。緩衝液入口結合路118は、シース緩衝液入口114をスパイラルカーブマイクロチャンネル110に結合する。サンプル入口結合路116および緩衝液入口結合路118は、スパイラルカーブマイクロチャンネル110の上流端の合流点120で連結する。スパイラルカーブマイクロチャンネル110の下流端には、チャンネルがサンプル出口結合路124と廃棄物出口結合路とにスプリットする二分岐点120が存在する。サンプル出口結合路124は、サンプル出口 S_{126} に接続され、廃棄物出口結合路128は、廃棄物出口 W_{130} に接続される。サンプルは、チャンネル湾曲の外側からスパイラルカーブマイクロチャンネル110に導入される。細胞は、シース緩衝液の助けを借りて外側チャンネル壁に整列する。カーブスパイラルマイクロチャンネル110は、CTCなどの大きな細胞をWBCおよびRBCなどのより小さな細胞から分離するように構成される。カーブスパイラルマイクロチャンネル110の寸法は、より小さな細胞はディーン力の影響下でチャンネルを横切って移動するが大きな細胞は単一平衡位置に集束させてそれを占有するように選択される。このことは、ディーンサイクルの半分の後では大きな細胞も小さな細胞もチャンネルの内側を占有することを意味する。カーブセクションの端までの長さは、より小さな細胞が1回のディーンサイクルを終了するように選択される。そのため、カーブセクションの端では、より小さな細胞は1回のディーンサイクルを終了しており、チャンネルの外側に移動していることになる。したがって、二分岐点122では、より大きなCTCは、内側チャンネル壁に集束されてサンプル出口126から捕集されるが、より小さな細胞は、外側チャンネル壁の個別ストリーム中に存在し、廃棄物出口13

30

40

50

0 から出る。

【0004】

PCT/SG2013/000442号に記載のマイクロ流体チップは、0.25 mL/minの駆動で、1.5倍濃縮RBC枯渇血液溶液において、標的CTCから99.99%の白血球を除去可能である。つまり、元の血液サンプル7.5 mLを処理した場合、何千個ものWBC汚染とCTCとを取り出すことが可能である。これらのWBCはより小さなサイズであるが、入力時の高い細胞負荷により引き起こされる立体的相互作用に起因して、細胞はCTCチャンネル内に捕集される。これは理想的なシナリオであるが、臨床サンプルでは条件はより複雑になる。WBCの全数は、化学療法後に劇的に増加する可能性があり、血餅の発生確率もまた、後期癌患者で増加する可能性がある。また、チップを介してサンプルを処理するためのポンプシステムの正確性および安定性の必要性も非常に高い。こうして、WBC汚染は、スパイラルマイクロ流体チップを用いたシングルステージ分離後に何万個にも増加する可能性がある。このWBC汚染は、低いシグナル対ノイズに起因してこれらの希薄標的細胞の下流の分析（たとえば、蛍光in-situハイブリダイゼーション(FISH)、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、または次世代シーケンシング(NGS)を制限する可能性がある。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

20

本発明の第1の態様によれば、マイクロ流体デバイスが提供される。マイクロ流体デバイスは、標的細胞と非標的細胞とを含むサンプルを受容するための少なくとも1つの入口と、中心領域の上流端と周辺領域の下流端とを有する第1のスパイラルチャンネル部分であって、上流端が入口に結合され、第1のスパイラルチャンネル部分が、標的細胞と非標的細胞とが下流端で異なるストリームを占有するように構成される、第1のスパイラルチャンネル部分と、第1のスパイラルチャンネル部分の下流端で非標的細胞のストリームに結合するように配置された第1の廃棄物出口と、第1のスパイラルチャンネル部分の下流端で標的細胞のストリームに結合するように配置されたリンクチャンネル部分と、周辺領域の上流端と中心領域の下流端とを有する第2のスパイラルチャンネル部分であって、第2のチャンネル部分の上流端がリンクチャンネル部分に結合され、第2のスパイラルチャンネル部分が、標的細胞と非標的細胞とが下流端で異なるストリームを占有するように構成される、第2のスパイラルチャンネル部分と、第2のスパイラルチャンネル部分の下流端で非標的細胞のストリームに結合するように配置された第2の廃棄物出口と、第2のスパイラルチャンネル部分の下流端で標的細胞のストリームに結合するように配置されたサンプル出口と、を含む。

30

【0006】

マイクロ流体デバイスは、スパイラルチャンネル部分をそれぞれ有する2ステージを含む。血液サンプルなどのサンプルが第1ステージのスパイラルチャンネルを通り抜けた後、WBCの大部分は第1の廃棄物出口を介して枯渇され、第2ステージに入る全細胞は劇的に低減される。この低濃度により第2ステージでは立体的相互作用または細胞間相互作用のいずれの可能性も排除されるので、高富化CTCサンプルが提供される。血液サンプルを用いた試験では、全WBC数を血液7.5 mL当たり500細胞以内に十分に制御可能であることが確認される。これは言い換えれば、WBCに対してCTCが100,000倍富化されることになる。

40

【0007】

実施形態では、マイクロ流体デバイスは、第1のスパイラルチャンネル部分の上流端に結合された第1の緩衝液入口であって、シース緩衝液を受容するように構成された第1の緩衝液入口と、第2のスパイラルチャンネル部分の上流端に結合された第2の緩衝液入口であって、シース緩衝液を受容するように構成された第2の緩衝液入口と、をさらに含む。第1の緩衝液入口は、第1のスパイラルチャンネル部分の内側壁に近接する第1のスパイラルチャンネル部分にシース緩衝液を導入するように配置し得るとともに、少なくとも1つの入

50

口は、第1のスパイラルチャネル部分の外側壁に近接する第1のスパイラルチャネル部分にサンプルを導入するように配置される。

【0008】

実施形態では、マイクロ流体デバイスは、第1のスパイラルチャネル部分の下流端を第1の廃棄物出口に結合する圧力コンペンセーター路であって、第2のスパイラルチャネル部分の流体抵抗を補償するように選択された流体抵抗を有する圧力コンペンセーター路をさらに含む。

【0009】

サンプルは、血液サンプルまたは血液成分であり得るとともに、標的細胞は、循環腫瘍細胞または循環希薄細胞、たとえば、循環胎児細胞、循環内皮細胞、および循環幹細胞であり得る。

10

【0010】

実施形態では、第1および第2のスパイラルチャネル部分は、標的細胞が慣性集束を起こすようにつかつ非標的細胞がディーン力の影響下で横方向位置にマイグレートするように構成される。

【0011】

実施形態では、標的細胞は細胞直径閾値超の細胞直径を有し、かつ非標的細胞は細胞直径閾値未満の直径を有する。

【0012】

実施形態では、第1の廃棄物出口およびチャネルリンク部分に関連するフロー抵抗は、フロー比に基づいて構成される。第1の廃棄物出口およびチャネルリンク部分に関連するチャネル幅もまた、フロー比に基づいて構成し得る。

20

【0013】

第2の廃棄物出口およびサンプル出口に関連するフロー抵抗は、フロー比に基づいて構成し得る。第2の廃棄物出口およびサンプル出口に関連するチャネル幅もまた、フロー比に基づいて構成し得る。

【0014】

フロー比は0.1～10の範囲内であり得る。

【0015】

図面の簡単な説明

30

以下では、限定されるものではないが例として添付の図面を参照して本発明の実施形態を説明する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】シングルスパイラルチャネルステージを有するマイクロ流体デバイスの例を示す。

【図2a】2つのスパイラルチャネルステージを有する本発明の実施形態に係るマイクロ流体デバイスを示す。

【図2b】2つのスパイラルチャネルステージを有する本発明の実施形態に係るマイクロ流体デバイスを示す。

40

【図3】図1に示されるマイクロ流体デバイスのフロー抵抗の模式モデルを示す。

【図4a】図2aまたは2bに示されるマイクロ流体デバイスのフロー抵抗の模式モデルを示す。

【図4b】図4aに示される模式モデルの簡略図を示す。

【図5】シングルステージマイクロ流体デバイスおよび2ステージマイクロ流体デバイスにより達成される富化の比較を模式的に示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の実施形態は、スパイラルマイクロチャネルでサイズベース慣性分離を用いて細胞を単離するためのマイクロ流体デバイスに関する。マイクロ流体デバイスは、材料、た

50

例えば、ガラス、シリコン、またはポリジメチルシロキサン（P D M S）などのポリマー中にエッチングまたは成形された一群のマイクロチャネルを有するマイクロ流体チップとして実現し得る。

【0018】

スパイラルマイクロチャネル内を流れる細胞は、慣性揚力と遠心加速度誘起ディーン抗力との組合せに晒される。細胞サイズの4乗で変化する慣性揚力は、マイクロチャネル断面内の識別可能な複数の平衡位置に細胞を集束させることに関与する。スパイラル形マイクロチャネルを設計することにより、ディーン抗力の成分を加えて、これらの複数の平衡位置を内側マイクロチャネル壁近傍の1つだけに低減することが可能である。異なる細胞サイズでは慣性揚力とディーン抗力との比が異なるので、細胞はそのサイズに基づいてマイクロチャネル断面に沿った識別可能な位置に平衡化し得る。その際、最も大きな細胞は、マイクロチャネル壁の最も近くに平衡化する。この結果、適切な出口の設計により独立して捕集できる識別可能な細胞ストリームが発生する。

10

【0019】

そのため、マイクロ流体デバイスの少なくとも1つの入口で細胞懸濁液を断面の一部に閉じ込めることにより、かつより大きな細胞のみが慣性力による影響を受け、一方、より小さな細胞はディーン抗力による影響のみを受けることを保証することにより、高分解能分離を達成可能である。

【0020】

曲線チャネルを通して流れる流体は、半径方向外向きに遠心加速度を受けて、チャネルの頂部半分および底部半分にディーンボルテックスとして知られる2つの異方向回転ボルテックスの形成をもたらす。これらの二次フローの大きさは、

20

【数1】

$$D_e = \frac{\rho U_F D_H}{\mu} \sqrt{\frac{D_H}{2R_C}} = R_e \sqrt{\frac{D_H}{2R_C}} \quad (1)$$

により与えられる無次元パラメーターのディーン数（ D_e ）により定量化される。式中、 ρ は流体密度（ kg/m^3 ）であり、 U_f は平均フロー速度（ m/s ）であり、 μ は流体の粘度（ kg/ms ）であり、 R_c はチャネル路の曲率半径（ m ）であり、 D_H はチャネル水力直径（ m ）であり、かつ R_e はフローのレイノルズ数（慣性力対粘性力の比）である。フロー速度は、流量またはポンプモジュール（たとえばシリンジポンプ）の圧力を変化させることにより調整される。そのため、曲線チャネル内を流れる粒子は、これらの横方向ディーンフローの存在により抗力を受けて、ボルテックス内のフロー方向に沿って連行および駆動される。この運動は言い換えれば、内側壁と外側壁との間でチャネル幅に沿って粒子が往復移動することになり、頂部または底部から可視化したときに下流距離が増加する。これらの細胞がチャネル内を流れるときに横方向にマイグレートする速度はディーン数に依存し、

30

【数2】

$$U_{\text{ディーン}} = k D_e^2 \frac{\mu}{\rho D_H} \quad (\text{m/s}) \quad (2)$$

40

を用いて計算可能である。式中、 ρ は流体密度（ kg/m^3 ）であり、 μ は流体の粘度（ kg/ms ）であり、 D_H はチャネル水力直径（ m ）であり、かつ k は、これらの曲線チャネルに対して経験的に約 0.01 と決定される、かつこれらのチャネルの COMSOL モデルを用いて検証される、スケーリング係数である。

【0021】

ディーンボルテックスに沿って粒子が横切る横方向距離は、「ディーンサイクル」によ

50

り定義可能である。たとえば、マイクロチャネル内側壁近傍に初期に位置決めされて下流の所与の距離でチャネル外側壁にマイグレートする粒子は、ディーンサイクルの1/2を終了したと言われる。マイクロチャネル内側壁近傍の元の位置に戻るとフルディーンサイクルが終了する。そのため、所与のマイクロチャネル長さでは、流量（ Re ）増加条件を用いると粒子は複数のディーンサイクルマイグレーションを起こすことが可能である。完全ディーンサイクルマイグレーションの長さは、

$$L_{DC} = 2w + h \quad (m) \quad (3)$$

として計算可能である。式中、 w はマイクロチャネル幅（ m ）であり、かつ h はマイクロチャネル高さ（ m ）である。その結果、ディーンマイグレーションに必要とされる全マイクロチャネル長さは、

【数3】

$$L_C = \frac{U_f}{U_{\text{ディーン}}} \times L_{DC} \quad (m) \quad (4)$$

により与えられる。ストークスの法則：

$$F_D = 3 \mu U_{\text{ディーン}} a_c \quad (N) \quad (5)$$

によりディーン抗力の大きさが与えられることを認識すべきである。式中、 a_c は細胞直径（ m ）である。

【0022】

ディーン抗力以外に、マイクロチャネル寸法に匹敵する直径を有するより大きな細胞はまた、認知可能な慣性揚力（ F_L ）（剪断誘起および壁誘起の両方）を受けて、それらの集束および平衡化をもたらす。ポアズイユフローの放物線速度プロファイルの結果として生じる剪断誘起慣性揚力 F_{IL} が粒子に作用して、粒子はマイクロチャネル中心からチャネル壁に方向付けられる。これらの粒子がチャネル壁のより近くに移動するにつれて、粒子の周りに形成された回転後流が壁の突然の存在により攪乱されて揚力（ F_{WL} ）が誘起され、粒子は壁からマイクロチャネル中心に方向付けられる。これらの2つの対向する揚力の結果として、粒子は、マイクロチャネル周辺近傍の識別可能かつ予測可能な位置に平衡化（集束）する。この作用は、マイクロチャネル寸法に匹敵するサイズすなわち $a_c/h = 0.1$ を有する粒子では支配的である。とくに、慣性揚力（ F_L ）の大きさは、

【数4】

$$F_L = C_L \rho G^2 a_c^4 \quad (N) \quad (6)$$

により与えられる。式中、 C_L は、チャネル断面を横切る粒子位置の関数である揚力係数であり0.5の平均値が仮定され、かつ G は、流体の剪断速度（ $1/s$ ）である。ポアズイユフローの G の平均値は $G = U_{max} / D_H$ により与えられる。式中、 U_{max} は最大流体速度（ m/s ）であり、 $2 \times U_F$ として近似可能である。したがって、次いで、以上の式（6）の慣性揚力（ F_L ）は、再度、

【数5】

$$F_L = \frac{2\rho U_F^2 a_c^4}{D_H^2} \quad (N) \quad (7)$$

として表現可能である。曲線ジオメトリーを有するマイクロチャネルでは、慣性揚力（ F_L ）とディーン抗力（ F_D ）との間の相互作用により、平衡位置を頂部および底部の各ディーンボルテックス内の内側チャネル壁近傍の2つだけに低減する。2つの平衡位置は、マイクロチャネル高さに沿って互いに重なり合い、所与の粒子サイズではマイクロチャネル内側壁から同一距離に位置決めされる。すなわち、マイクロチャネル幅を横切って単一

10

20

30

40

50

位置とみなされる。

【0023】

これらの2つ現象、すなわち、ディーンマイグレーションおよび慣性集束の利点を生かせば、さまざまなサイズの粒子および細胞の混合物を分離することが可能である。マイクロチャンネルパラメーター（すなわち、幅、高さ、長さ、曲率半径、および流量）の大きさは、より大きな細胞/粒子が慣性集束を起こし、一方、より小さな細胞/粒子（サイズカットオフ未満）は集束作用を受けないことを保証するように以上に記載の数学モデルに基づいて選択される。入口では、細胞/粒子混合物はマイクロチャンネルの内側壁近傍に閉じ込められ、細胞/粒子が下流に移動するにつれて、より小さな粒子はディーン抗力の影響下でチャンネル断面の他方の半分に移る。これに対して、サイズカットオフ超の細胞/粒子は、強い慣性揚力を受けて内側チャンネル壁近傍に集束した状態を維持する。こうして、出口では、より小さな細胞/粒子は小細胞出口から捕集可能であり、一方、より大きな細胞/粒子は大細胞出口から捕集可能であるので、分離および単離が達成される。サイズカットオフは、2つの力（すなわち、慣性揚力（ F_L ）およびディーン抗力（ F_D ））の比：
【数6】

$$i_F = F_L / F_D = \frac{85.11 R_C a_C^3}{D_H^4} = \frac{85.11 R_C a_C^3}{h^4} \quad (8)$$

により推定可能である。式中、 i_F は力の比であり、かつ残りのパラメーターは、式（1）、（5）、および（6）で定義した上記の内容に従って理解すべきである。フロー密度（ ρ ）および液体粘度（ μ ）とは、密度および粘度の組合せを意味する。シースまたはサンプルのいずれかを調整することにより、最終的な流体の密度および粘度を調整することが可能である。得られた実験データによれば、 i_F の閾値は、粒子/細胞の慣性集束に関しては約2である。 i_F の上限は > 100 であり得る。2未満の i_F の試験条件では、粒子/細胞は、ディーン抗力の影響のみを受けるので、ディーンフローで循環する。すなわち、粒子/細胞が慣性集束を起こすには、 i_F を2以上（すなわち $i_F \geq 2$ ）にすべきである。こうして、力の比 i_F は、粒子/細胞が慣性集束を起こすかを決定する閾値因子として作用することが分かる。式（8）から、 i_F は、曲率半径、粒子/細胞の直径（すなわち、細胞/粒子のサイズ）、さらには水力直径などのいくつかのパラメーターにより決定されることが分かる。

【0024】

これらのパラメーターのうち、水力直径および粒子/細胞のサイズは、細胞/粒子が慣性集束を受けるか否かの決定に最も有意な影響を及ぼす。低アスペクト比の長方形断面チャンネルを分離に使用すべきであるので、チャンネル高さ h は、既知の直径を有する粒子/細胞がチャンネルの側部に集束可能であるかまたはディーンフローに沿って移動するかを決定する重要なパラメーターである（ D_H は、低アスペクト比のチャンネルでは h により置換え可能である）。したがって、対象の粒子/細胞のサイズ範囲内で、チャンネルの内側に集束させる必要のある粒子/細胞に対して $h < 10 \times a_c$ となるようにチャンネル高さを選択することが妥当である。

【0025】

以上のことから、本明細書に記載の研究は、そうした2つの現象、すなわち、ディーンマイグレーションおよび慣性集束の利点を生かして、血液からCTCを単離するその能力を実証することに注目すべきである。より具体的には、マイクロ流体デバイスで血液からCTCを分離および単離するためのサイズベース分離法を以下に説明する。これは、CTCと他の血液細胞とのサイズ差を活用することにより機能する（すでに上述した通り）。

【0026】

図2aは、本発明の実施形態に係るマイクロ流体デバイスを示す。マイクロ流体デバイス200は、第1のスパイラルマイクロチャンネルステージ210と第2のスパイラルマイクロチャンネルステージ250とを含む。第1のスパイラルマイクロチャンネルステージ21

10

20

30

40

50

0 は、第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 を含む。第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 は、上流端 2 2 2 から下流端 2 2 4 まで 2 つの略環状のループを有する反時計方向のスパイラル路に従う。上流端 2 2 2 は、第 1 のマイクロチャンネル部分 2 2 0 の中心領域に位置する。下流端 2 2 4 は、第 1 のマイクロチャンネル部分の周辺領域に位置する。そのため、第 1 のマイクロチャンネル部分 2 2 0 の半径は、上流端 2 2 2 から下流端 2 2 4 まで増加する。

【 0 0 2 7 】

サンプル入口 $S_{I 2 1 2}$ および第 1 の緩衝液入口 $B_{I 1 2 1 4}$ は、第 1 のマイクロチャンネル部分 2 2 0 の中心領域に位置する。サンプル入口 2 1 2 および第 1 の緩衝液入口 2 1 4 は両方とも、第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 の上流端 2 2 2 に結合される。サンプル入口結合路 2 1 6 は、サンプル入口 2 1 2 を第 1 のマイクロチャンネル部分 2 1 0 の上流端 2 2 2 に結合し、第 1 の緩衝液入口結合路 2 1 8 は、第 1 の緩衝液入口 2 1 4 を第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 の上流端 2 2 2 に結合する。サンプル入口結合路 2 1 6 は、第 1 の緩衝液入口結合路 2 1 8 よりも狭い。第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 の上流端 2 2 2 は、サンプル入口結合路 2 1 6 と第 1 の緩衝液入口結合路 2 1 8 との合流点を形成する。合流点では、サンプル入口結合路 2 1 6 は、第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 の外側に位置し、第 1 の緩衝液入口結合路 2 1 8 は、第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 2 0 の内側に位置する。

【 0 0 2 8 】

第 1 のスパイラルチャンネル部分 2 2 0 の下流端 2 2 4 は、二分岐点 2 2 6 に結合され、そこで、マイクロチャンネルは、リンクチャンネル部分 2 4 0 と第 1 の廃棄物出口部分 2 3 0 とにスプリットする。リンクチャンネル部分 2 4 0 は、第 1 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 2 1 0 を第 2 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 2 5 0 に結合する。第 1 の廃棄物出口部分 2 3 0 は、第 1 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 2 1 0 を第 1 の廃棄物出口 $W_{O 1 2 3 2}$ に結合する。リンクチャンネル部分 2 4 0 は、第 1 のスパイラルチャンネル部分 2 2 0 の下流端 2 2 4 の内側壁に位置する。第 1 の廃棄物出口部分 2 3 0 は、第 1 のスパイラルチャンネル部分 2 2 0 の下流端 2 2 4 の外側壁に位置する。チャンネルリンク部分 2 4 0 のチャンネル幅は、第 1 の廃棄物出口チャンネル部分 2 3 0 のチャンネル幅未満である。第 1 の廃棄物出口チャンネル部分 2 3 0 は、曲げ部により接続された複数の直線セクションを含む。直線セクションおよび曲げ部は、圧力コンペンセーター路 2 3 4 を構成する。

【 0 0 2 9 】

第 2 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 2 5 0 は、第 2 スパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 を含む。第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 は、上流端 2 6 2 から下流端 2 6 4 まで 2 つの略環状のループを有する反時計方向のスパイラル路に従う。上流端 2 6 2 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 の周辺領域に位置する。下流端 2 6 4 は、第 2 のマイクロチャンネル部分 2 6 0 の中心領域に位置する。そのため、第 2 のマイクロチャンネル部分 2 6 0 の半径は、上流端 2 6 2 から下流端 2 6 4 まで減少する。

【 0 0 3 0 】

第 2 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 2 5 0 は、第 2 の緩衝液入口結合路 2 5 4 に結合された第 2 の緩衝液入口 $B_{I 2 2 5 2}$ をさらに含む。第 2 の緩衝液入口結合路 2 5 4 は、合流点 2 5 6 でチャンネルリンク路 2 4 0 に連結する。合流点 2 5 6 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 の上流端 2 6 2 に結合される。合流点 2 5 6 では、チャンネルリンク路 2 4 0 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 の外側壁に連結し、第 2 の緩衝液入口結合路 2 5 4 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 の内側壁に連結する。チャンネルリンク路 2 4 0 のチャンネル幅は、第 2 の緩衝液入口結合路 2 5 4 のチャンネル幅未満である。

【 0 0 3 1 】

第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 2 6 0 の下流端 2 6 4 は、チャンネルがサンプル

10

20

30

40

50

出口結合路 266 と第 2 の廃棄物出口結合路 268 とにスプリットする二分岐点を形成する。サンプル出口結合路 266 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 260 の内側壁に位置し、第 2 の廃棄物出口結合路 268 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 260 の外側壁に位置する。サンプル出口結合路 266 のチャンネル幅は、第 2 の廃棄物出口結合路 266 のチャンネル幅未満である。サンプル出口結合路 266 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 260 をサンプル出口 270 に結合する。第 2 の廃棄物出口結合路 268 は、第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 260 を第 2 の廃棄物出口 272 に結合する。

【0032】

次に、サンプル中の標的細胞を非標的細胞から分離するためのマイクロ流体デバイス 200 の使用について説明する。サンプルはたとえば血液サンプルであり得るとともに、標的細胞は CTC でありかつ非標的細胞は WBC および RBC であり得る。標的 CTC は非標的細胞よりも大きなサイズを有するが、かなり低い濃度で存在する。

【0033】

標的細胞と非標的細胞とを含有するサンプルはサンプル入口 212 に導入され、シース緩衝液は第 1 の緩衝液入口 214 に導入される。サンプルおよびシース緩衝液の入力圧力はポンプシステムを用いて制御される。第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 220 の上流端 222 では、標的細胞および非標的細胞は両方とも、合流点でのサンプル入口結合路 216 および第 1 の緩衝液入口結合路 218 の位置に起因してチャンネルの外側壁の近くに位置するであろう。

【0034】

細胞が第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 220 を回って移動するにつれて、慣性揚力と以上に記載の遠心加速度誘起ディーン抗力との組合せに晒される。第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 220 の寸法は、標的細胞が慣性集束を起こし、一方、より小さな非標的細胞はディーン抗力のみを受けるように選択される。細胞が受ける力により、細胞はすべて第 1 のスパイラルチャンネル部分 220 の外側壁から内側壁に向かって移動する。より小さな非標的細胞はディーン力の影響下で移動するので、非標的細胞がフルディーンサイクルを行った後、それらは移動して外側壁の近くの位置に戻っているであろう。より大きな標的細胞は、標的細胞を内側壁の近くの平衡位置に到達させる慣性集束を起こす。

【0035】

第 1 のスパイラルマイクロチャンネル部分 220 の長さは 1 回の完全ディーンサイクルに必要とされる長さになるように選択されるので、第 1 のスパイラルチャンネル部分 220 の下流端 224 では、標的細胞は内側チャンネル壁の近くの位置に存在し、一方、非標的細胞は外側細胞壁の近くに存在するであろう。

【0036】

したがって、二分岐点 226 では、標的細胞はチャンネルリンク路 240 に移動し、非標的細胞は第 1 の廃棄物出口部分 230 に移動するであろう。

【0037】

第 2 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 250 に入る非標的細胞の数は、サンプル入口の数と比較して著しく枯渇されるであろう。第 2 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 250 で起こるプロセスは以上に記載のものに類似しているが、非標的細胞の大部分が第 1 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 210 で除去されるので、2 つのステージの組合せにより標的細胞の非常に高い富化を達成可能である。

【0038】

合流点 256 では、第 1 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 210 で富化された標的細胞を含むサンプルは、第 2 のシース緩衝液入口 252 を介して入力されるシース緩衝液と組み合わせられる。チャンネルリンク路 240 は第 2 のスパイラルマイクロチャンネル部分 260 の外側壁に位置するので、細胞は初期に外側チャンネル壁の近くの位置を占有する。第 1 のスパイラルマイクロチャンネルステージ 210 で起こるものに類似したプロセスでは

10

20

30

40

50

、標的細胞は、内側チャンネル壁の近くの平衡位置に移動させる慣性集束を受ける。非標的細胞は、初期に内側チャンネル壁に向かって移動させるディーン抗力を受ける。非標的細胞は、フルディーンサイクルを受けた後、外側チャンネル壁の近くの位置に移動しているであろう。そのため、第2のスパイラルマイクロチャンネル部分の長さをフルディーンサイクルに対応するように選択すれば、非標的細胞は、第2のスパイラルマイクロチャンネル部分260の上流端264で外側チャンネル壁の近くの位置を占有するであろう。したがって、残りの非標的細胞は第2の廃棄物出口結合路268に入り、一方、標的細胞はサンプル出口結合路266に入るであろう。

【0039】

第1の廃棄物出口チャンネル部分230の圧力コンペンセーター路234は、第2のスパイラルマイクロチャンネルステージ250に起因するチャンネル抵抗を補償するように含まれる。

10

【0040】

図2bは、本発明の実施形態に係るマイクロ流体デバイスを示す。図2bに示されるマイクロチャンネル装置300のスパイラルマイクロチャンネルステージの構成は、図2aに示されるマイクロチャンネル装置200の構成と異なる。同じ特徴部に対しては図2aと同じ参照数字が図2bで使用される。

【0041】

マイクロ流体デバイス300は、第1のスパイラルマイクロチャンネルステージ210と第2のスパイラルマイクロチャンネルステージ250とを含む。図2bのマイクロ流体デバイス300では、第1のスパイラルステージのマイクロチャンネルステージ210および第2のマイクロチャンネルステージ250は両方とも、同一の回転方向のフローを有する。第1のスパイラルマイクロチャンネルステージ210は、時計方向のスパイラル路に従う第1のスパイラルマイクロチャンネル部分220を含む。図2aに示されるマイクロ流体デバイス300と同様に、サンプル入口 S_I 212および第1の緩衝液入口 B_{I1} 214は、第1のマイクロチャンネル部分220の中心領域に位置する。

20

【0042】

第1のスパイラルチャンネル部分220の下流端224は、二分岐点226に結合され、そこで、マイクロチャンネルは、リンクチャンネル部分240と第1の廃棄物出口部分230とにスプリットする。リンクチャンネル部分240は、第1のスパイラルマイクロチャンネルステージ210を第2のスパイラルマイクロチャンネルステージ250に結合する。第1の廃棄物出口部分230は、第1のスパイラルマイクロチャンネルステージ210を第1の廃棄物出口 W_{O1} 232に結合する。この実施形態では、第1の廃棄物出口部分230は、反時計回転方向のスパイラル路を有する。

30

【0043】

第2のスパイラルマイクロチャンネルステージ250は、図2aを参照して以上に記載した通りである。

【0044】

図3は、図1に示されるマイクロ流体デバイスのフロー抵抗の模式図を示す。 P_{BI} 、 P_{SI} 、 P_{SO} 、および P_{WO} は、それぞれ、緩衝液入口114、サンプル入口112、サンプル出口126、および廃棄物出口130の圧力を表す。 R_B および R_S は、それぞれ、緩衝液入口結合部分118およびサンプル入口結合部分116のフロー抵抗を表す。 R_C は、スパイラルマイクロチャンネル部分110のフロー抵抗を表す。 R_R および R_W は、それぞれ、サンプル出口結合部分234および廃棄物出口結合部分128のフロー抵抗を表す。各チャンネルセクションのフロー抵抗は、ハーゲン・ポアズイユの法則：

40

$$P = 128 \mu L Q / (d^4) \quad (8.1)$$

に従って計算可能である。式中、 P は圧力損失であり、 L はチャンネルセクションの長さであり、 μ は流体の動粘度であり、 Q は体積流量であり、 d はチャンネルの水力直径である。

【0045】

50

そのため、所与のチャンネルに対して、このチャンネルセクションの抵抗は、

$$R = P / Q = 128 \mu L / (d^4) \quad (8.2)$$

に固定される。

【0046】

シングルステージ設計では、主要因子の1つは、回収（サンプル出口）側と廃棄物側との流量比 r_o である。この比は回収率と富化率とのバランスを決定する。所与のマイクロチャンネル設計に対してこの比を計算するために、図3に示されるものに類似したフロー抵抗の模式図を描くことが可能である。本発明の場合には、非圧縮性ニュートン流体の層流を考える。ここで、流量比 r_o は、ハーゲン・ポアズイユの法則を用いて計算可能である。このモデルは、サンプル/廃棄物の出力比、たとえば、 $r_o = Q_s / Q_w$ の計算用である。式中、 Q_s および Q_w は、それぞれ、サンプル出力フローおよび廃棄物出力フローである。 r_o は、標的細胞と共に捕集される汚染細胞の数を制限するので、富化係数にきわめて重要である。たとえば、CTC単離では、 r_o の調整は、単離の回収率および汚染率に重大な影響を及ぼす可能性があり、設計上、主要因子の1つである。

10

【0047】

図4aは、2ステージマイクロ流体デバイス、たとえば、図2aおよび2bに示されるもののフロー抵抗を示す。かかる設計では、適正流量さらには効率的富化を保証するために2ステージ間の抵抗を一致させることが適切である。図4aは、第2ステージのサンプル入力に接続された第1ステージのサンプル出力を有する2つのシングルステージシステムとして2ステージ設計をモデル化することにより得られる。ここで、図4aでは、図2aおよび2bのチャンネルリンク路240は、第1ステージのサンプル出口抵抗 R_{R1} と第2ステージのサンプル入口結合抵抗 R_{S2} との組合せに対応することに留意されたい。図4aの下付き文字1または2は、それぞれ、第1ステージおよび第2ステージを表す。

20

【0048】

図4bは、図4aに例示されるシステムの簡略平衡図を示す。図4bでは、第1の廃棄物出口の出口圧力 (P_{W01})、第2の廃棄物出口の出口圧力 (P_{W02})、およびサンプル出口の出口圧力 (P_{S0}) がすべて等しいと仮定される。図4bでは、流量は次のように示される。すなわち、 Q_{BI1+SI} は、第1のスパイラルステージへのサンプルおよび緩衝液の両方の入力流量であり、 Q_{W01} は、第1ステージの廃棄物出力の流量であり、 Q_{BI2} は、第2ステージへのシース緩衝液の入力流量であり、かつ Q_{S0+W02} は、第2ステージのサンプル出力および廃棄物出力の出力流量である。第2ステージのサンプル入力レート Q_{SI2} は第1ステージのサンプル出力に等しいことに留意されたい。なぜなら、それはチャンネルリンク路240を通るフローであるからである。

30

【0049】

図4bでは、 R_{W1} は、第1の廃棄物出口部分230のフロー抵抗である。 R_{R1+S2} は、チャンネルリンク路240のフロー抵抗である。 $R_{C2+R2//W2}$ は、第2のスパイラルマイクロチャンネル部分260およびサンプル出口結合路266と第2の廃棄物出口結合路268との平行な組合せのフロー抵抗である。出力の要件さらにはシステムの安定性を満たすように注意深く設計または選択しなければならないのは、図4bに示される各要素のフロー抵抗である。

40

【0050】

第2ステージの設計問題は、以下のように記述可能である。

【0051】

Q_{BI2} および Q_{BI1+SI} を仮定して、

$$Q_{S01} / Q_{W01} = Q_{SI2} / Q_{W01} = (Q_{BI1+SI} - Q_{W01}) / Q_{W01} = r_{o1} \quad (9)$$

となるように R_{R1+S2} 、 $R_{C2+R2//W2}$ 、および R_{W1} を計算する。

【0052】

ここで、 Q_{BI2} および Q_{BI1+SI} のフローインならびに Q_{S0+W02} および Q_{W01} のフローアウトは正であると仮定する。

50

【 0 0 5 3 】

質量保存およびハーゲン・ポアズイユの法則に従って、

$$Q_{B I 2} + Q_{B I 1} + S I = Q_{S O} + W_{O 2} + Q_{W O 1} \quad (10)$$

が得られる。

【 0 0 5 4 】

すべての出口圧力が等しいと仮定することにより、式(8.2)に従えば、c1の後の圧力低下の大きさは、流体がw1およびc2を流れるとき、等しいことになる。すなわち、

$$Q_{S O} + W_{O 2} \frac{R_{C 2} + R_{2} / / W_{2}}{W_{2}} + Q_{S I 2} \frac{R_{R 1} + S_{2}}{W_{2}} = P_{C 2} + R_{2} / / W_{2} + P_{R 1} + S_{2} = P_{W 1} = Q_{W O 1} R_{W 1} \quad (11)$$

または

$$\frac{R_{C 2} + R_{2} / / W_{2}}{(R_{W 1} - r_{O 1} R_{R 1} + S_{2})} = Q_{W O 1} / Q_{S O} + W_{O 2} \quad (11.1)$$

【 0 0 5 5 】

式(9)および(10)から、 $Q_{S O} + W_{O 2}$ および $Q_{W O 1}$ の所望の値を得ることが可能である。

【 0 0 5 6 】

$r_{O 1}' = r_{O 1} + Q_{B I 2} / Q_{W O 1} = (Q_{B I 2} + Q_{S I 2}) / Q_{W O 1}$ を定義することにより、

$$\begin{aligned} r_{O 1}' &= (Q_{B I 2} + Q_{S I 2}) / Q_{W O 1} \\ &= Q_{S O} + W_{O 2} / Q_{W O 1} \\ &= (R_{W 1} - r_{O 1} R_{R 1} + S_{2}) / R_{C 2} + R_{2} / / W_{2} \quad (12) \end{aligned}$$

を得ることが可能である。

【 0 0 5 7 】

フロー抵抗 $R_{C 2} + R_{2} / / W_{2}$ 、 $R_{W 1}$ 、および $R_{C 2} + R_{2} / / W_{2}$ のうち2つの値が与えられれば、最後の1つは計算可能であることが式(12)から分かる。これら値を設計する目的は $r_{O 1}$ または $r_{O 1}'$ をできる限り安定になるようにすることであるので、こうして2ステージチップの全設計のガイドラインは以下のように与えることが可能であると要約できる。

【 0 0 5 8 】

最初に、大きな粒子がチャンネルの内側に集束し、一方、小さな成分はディーンボルテックスフローに従ってチャンネル断面の外側半分にマイグレートする要件を満たすように、主要セクション、すなわち、すべてのステージのスパイラルセクションの長さ、曲率半径、チャンネル断面の幅および高さを決定する。一般的には、チャンネルの設計を単純化するために、各ステージのスパイラルセクションが同一の形状パラメーター、すなわち、長さ、曲率半径、チャンネル断面の幅および高さを共有するようにできる。チップのチャンネル構造を2次元に維持することが望まれるので、すべてのチャンネルセクションの高さHをスパイラルセクションの高さに等しい高さに固定することが可能である。

【 0 0 5 9 】

次いで、ポアズイユの式を用いて $R_{C 1} = R_{C 2} = R_C = 128 \mu L_C / (d_C^4)$ を計算することが可能である。さらに設計を単純化するために、 $r_{O 1} = r_{O 2}$ および $Q_{B I 2} = Q_{W O 1}$ とすることが可能である。したがって、 $r_{O 1}' = r_{O 1} + 1 = r_{O 2} + 1$ が得られる。一実施形態では、サンプル側の入力体積の約27%および各ステージの廃棄物側の73%を捕集する。すなわち、 $r_{O 1} = r_{O 2} = 0.37$ 。この出力比の実用範囲は、実際の分離実験では0.1~10であり得る。

【 0 0 6 0 】

次いで、二分岐点264近傍の乱流の発生を防止するために、 $r_{O 2} = W_{R 2} / W_{W 2}$ となるように最終ステージの出力セクションの幅 $W_{R 2}$ および $W_{W 2}$ を決定する。これらのセクションの長さは、 $r_{O 2} = Q_{S O 2} / Q_{W O 2} = R_{W O 2} / R_{S O 2}$ の要件を満たすようにポアズイユの式に従って設計可能である。

【0061】

次いで、平衡フロー抵抗 $R_{C2} + R_{R2} // W_2 = R_{C2} + R_{R2} // R_{W2}$ を計算する。ここで、 $R_{R2} // R_{W2}$ は、並列の抵抗の組合せを表す。

【0062】

次いで、 $r_{O1} W_{R1} / W_{W1}$ となるように第1ステージの出力セクションの幅 W_{R1} および W_{W1} を決定可能である。

【0063】

チップ製造に対する許容差の制限から、より狭いチャネル（サンプル側）よりもより広いチャネル（廃棄物側）の方が抵抗の正確性を制御しやすいことが分かる。そのため、図4bの3つの抵抗セクションすべてが流量分配に重要な役割を果たすが、2ステージのリンクセクションをより短くすること、すなわち、 R_{R1+S2} を可能な限り小さくすることが有利であり、これは、図2aおよび2bに示されるチャネルリンクセクション240に対応する。次いで、第1の廃棄物出力の長さをそれに応じて計算可能である。

10

【0064】

入力時の適正なサンプル分配を保証するために、入力の幅は、それぞれ、各入力の流量に比例するように設計すべきである。

【0065】

次いで、セクションの長さが要件を満たすとともに互いに近づきすぎない位置に、入力および出力ポートを計画し配置することが可能である。ポンプ機構の負荷を低減するために大きな抵抗のセクションは回避すべきである。

20

【実施例】

【0066】

一実施形態例では、マイクロ流体デバイスはCTC分離に使用される。目標は、他の血液細胞（RBC約8μm、WBC約10~15μm、WBCの直径の典型的な値は約12μmである）からCTC（約20μm）を単離することである。図2aに類似したレイアウトおよび10mmの曲率半径を有する500μm（幅）×175μm（高さ）×約2.25ループのチャネルを有する2ステージ設計を用いて分離を完了する。最終ステージでかなりロバストな純度を達成可能であるので、このチップのスループットをシングルチップよりも高くすることも可能である。現在の設計の等価なスループットはRBC溶解全血約340μL/minであるので、7.5mLの血液サンプルを22分で処理可能である。CTCの回収率は>50%であり、かつ全WBC数を500個以内に制御可能であるので、下流の各種分子分析に好適である。

30

【0067】

以下の表AおよびBは、シングルステージチップおよび2ステージチップで7.5mLの血液をスパイクしたときの癌細胞系（H1975細胞）の回収率および得られた不純物レベル（全白血球数）に関してシングルステージチップと2ステージチップとの比較を示す。

【0068】

【表 1】

シングルステージチップ 全白血球			
	回収率 (%)	数	純度 (%)
1	73.80	11664	1.27
2	50.30	11628	0.87
3	74.90	48312	0.31
4	53.40	18828	0.57
5	53.40	14688	0.73
6	45.90	17028	0.54
7	38.70	20304	0.38
8	46.60	12744	0.73
9	63.40	53352	0.24
10	76.00	23868	0.64
平均	57.64	23242	0.63

10

表A: シングルステージチップの結果

20

【 0 0 6 9 】

【表 2】

2ステージチップ 全白血球			
	回収率 (%)	数	純度 (%)
1	51.05	86	58.45
2	30.37	133	30.37
3	39.64	229	27.76
4	32.98	233	21.02
5	45.83	191	23.04
6	41.67	159	25.16
7	51.00	307	16.61
8	50.00	274	17.88
9	49.15	190	15.26
10	46.94	197	11.68
平均	43.86	200	24.72

30

表B: 2ステージチップの結果

40

【 0 0 7 0 】

以上の表は、2ステージチップではシングルステージチップのほぼ100倍の不純物枯渇を達成可能であることを示す。

【 0 0 7 1 】

慣性マイクロ流体技術を用いたサイズベース分離の品質に影響を及ぼし得る各種因子が存在する。不純物からの標的細胞の富化に関して、理由としては、サンプルの品質、細胞の濃度、ポンプの安定性および繰返し性、チップ製造の許容差などが挙げられる。細胞の小さな凝塊は、マイクロチャンネル内の流動プロファイルを攪乱する可能性があり、何百/何千個もの不純物を標的細胞出力に誘導するおそれがある。さらに、高濃度のサンプルた

50

例えば血液サンプルでは、立体的相互作用もまた、標的チャネル出力に入る非標的細胞をもたらして富化率を低減する可能性がある。ポンプストラテジーの脈動は、標的細胞出力に入る不純物を著しく増加させて富化係数を低減する可能性がある。製造または他の問題に起因する出力体積比の偏りは、定常不純物フローを標的細胞出力に導いて富化率をさらに低減するおそれがある。

【0072】

図5は、シングルステージチップおよび2ステージチップを用いた富化（不純物の枯渇）を示す模式グラフ（原寸通りではない）である。

【0073】

図5に示されるように、シングルステージチップを用いた場合、2ステージチップと比較して、流量変動、出力圧力差、チップ間の製造許容差、およびサンプル品質の変動を伴って、標的細胞の富化（不純物の枯渇）に劇的な影響がある。

【0074】

以上に列挙した理由により、シングルステージのスパイラルマイクロチャネルバイオチップでは、図5に示される高富化を達成することは困難である。マルチステージチップ設計を用いれば、上述した理由により、影響を最小限に抑えることが可能である。不純物の大部分は第1ステージで除去されるであろうから、第2ステージに入る細胞負荷（ロード）は全サンプルの $< 0.1\%$ になるであろう。かかる低細胞濃度では、サンプル品質、細胞間の立体的相互作用、ポンプの安定性、さらには製造の許容差の影響は最小限に抑えられるので、図5に示されるより高い安定性および繰返し性が得られる。

【0075】

添付の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の実施形態に対して形態および詳細のさまざまな修正および変更を行い得ることは、当業者であれば分かるであろう。

【図1】

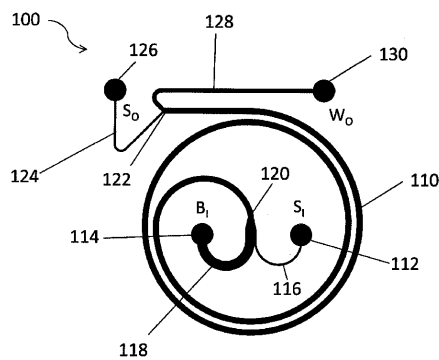
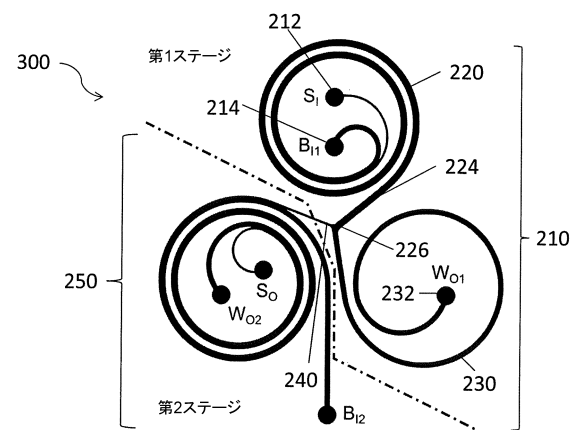
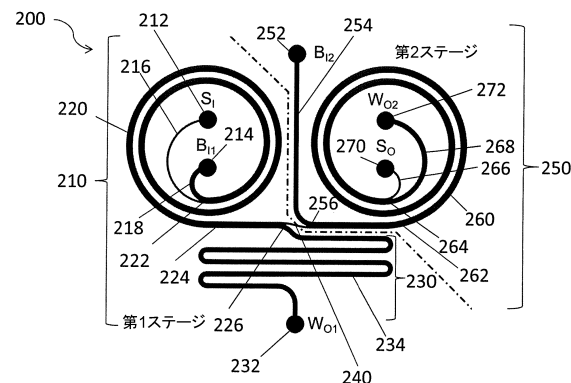


Figure 1

【図2b】



【図2a】



【図3】

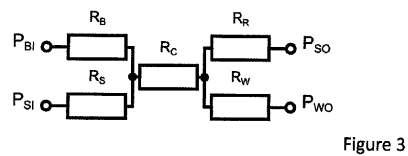


Figure 3

10

20

【 図 4 a 】

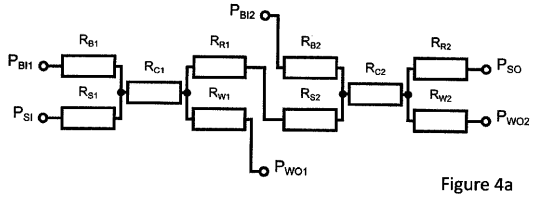


Figure 4a

【 図 4 b 】

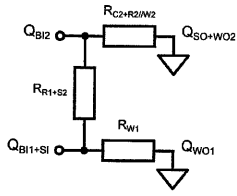
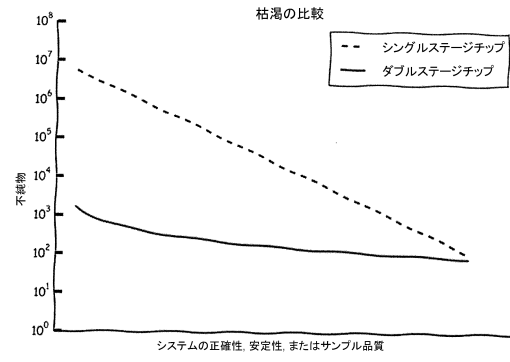


Figure 4b

【 図 5 】



システムの正確性, 安定性, またはサンプル品質

フロントページの続き

(72)発明者 バガット, アリ アスガー エス.
シンガポール国, シンガポール 598742, ヒューム アベニュー 63, ナンバー10-0
5

(72)発明者 グアン, グオフォン
シンガポール国, シンガポール 118998, ノーマントン パーク 1, ナンバー13-15
3

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 特開2010-284643(JP, A)
特表2013-521001(JP, A)
特表2017-500006(JP, A)
特表2015-535728(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/26

G01N 33/48

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)