

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6091648号
(P6091648)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 X
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/49 K
GO 1 N 27/02 (2006.01)	GO 1 N 37/00 I O I
GO 1 N 21/49 (2006.01)	GO 1 N 27/02 D
	GO 1 N 21/49 Z

請求項の数 18 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2015-547872 (P2015-547872)	(73) 特許権者	510273880
(86) (22) 出願日	平成25年12月26日 (2013.12.26)		コリア ユニバーシティ リサーチ アン
(65) 公表番号	特表2016-501382 (P2016-501382A)		ド ビジネス ファウンデーション
(43) 公表日	平成28年1月18日 (2016.1.18)		KOREA UNIVERSITY RE
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/012223		SEARCH AND BUSINESS
(87) 国際公開番号	W02014/104761		FOUNDATION
(87) 国際公開日	平成26年7月3日 (2014.7.3)		大韓民国、136-701 ソウル、ソン
審査請求日	平成27年6月15日 (2015.6.15)		ブクグ、アナムーロ 145
(31) 優先権主張番号	10-2012-0154057	(74) 代理人	100121500
(32) 優先日	平成24年12月27日 (2012.12.27)		弁理士 後藤 高志
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100121186
			弁理士 山根 広昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液サンプルが収容され、前記血液サンプルの流動によって発生した血小板の付着と凝集を計測するための計測装置；

前記計測装置に連結され、前記血液サンプルに往復せん断流動を発生させる流体駆動装置；及び

前記計測装置と前記流体駆動装置の間に設置され、駆動圧力の伝達および遮断を制御するバルブを含み、

前記バルブは周期的な開閉により脈動 (Pulsatile) の流動を作ることの特徴とする、マイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 2】

前記計測装置は、

血液サンプルが内部に収容されるサンプル貯留室；

前記のサンプル貯留室に連結され、前記血液サンプルのせん断流動を案内するマイクロチャンネル；

前記マイクロチャンネルと連結され、前記血小板の付着と凝集が発生する計測チャンバ；及び

前記計測チャンバで発生する血小板の付着と凝集を計測するためのセンサ部を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

10

20

【請求項 3】

前記流体駆動装置は、

リニアアクチュエータ；

前記リニアアクチュエータの駆動により直線往復運動するピストン；及び

前記ピストンの直線往復運動が可能のように設置されるシリンダを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 4】

前記マイクロチャンネルは複数の並列に配置されることを特徴とする、請求項 2 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 5】

前記並列に配置されたマイクロチャンネルに連結された計測チャンバには異なる薬物が提供されることを特徴とする、請求項 4 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 6】

前記センサ部は、電気インピーダンスを測定する電極センサ、濁度を測定する光センサ、揺れ圧力を測定する圧力センサ、前記血液サンプルの往復移動距離を測定するイメージセンサの中の少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項 2 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 7】

前記電極センサは、前記計測チャンバ内の両端に 2 つの電極で構成され、前記計測チャンバとの間の血小板の付着と凝集に応じて変化する電気インピーダンスの変化を測定することを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 8】

前記光センサは、前記計測チャンバの外部に光源と対向するように構成され、前記計測チャンバとの間の血小板の付着と凝集に応じて変化する光学的濁度の変化を測定することを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 9】

前記圧力センサは、前記計測装置と流体駆動装置を連結するバルブ、または前記サンプル貯留室に備えられ、前記計測チャンバで血小板の付着と凝集に応じて変化する揺れ圧力変化を測定することを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 10】

前記イメージセンサは、

前記マイクロチャンネルに光を照射する光源；及び

前記マイクロチャンネル内の血液を透過した光を受信して電気信号に変えて血液の流れの進行距離を測定する光計測センサを含むことを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 11】

前記光源は LED (Light Emitting Diode) であり、前記光計測センサは CCD (Charge Coupled Device) センサアレイであることを特徴とする、請求項 10 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 12】

前記計測チャンバは前記マイクロチャンネルの中央部に位置し、前記計測チャンバには前記血液サンプルの流動速度を低減させるための流路の急拡張部が形成されていることを特徴とする、請求項 2 に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項 13】

前記計測チャンバには、血小板の付着と凝集を促進し、これによる流動の減少を誘導するための複数のマイクロファイラーが設けられることを特徴とする、請求項2に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項14】

前記計測チャンバの内部には、複数の玉が備えられることを特徴とする、請求項2に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項15】

前記計測チャンバには、フィブリノゲン、アラキドン酸 (Arachidonic acid)、コラーゲン、エピネフリン、アデノシン二リン酸 (ADP)、PGE1 (Prostaglandin E1)、TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide)、P2Y1レセプターアンタゴニスト (antagonist)、P2Y12レセプターアンタゴニストの中から選択される1種以上の薬物が提供されることを特徴とする、請求項2に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項16】

前記P2Y1レセプターアンタゴニストはMRS2179、MRS2279、MRS2500、A2P5P、A3P5P、A3P5PSの中から選択される1種以上であり、

前記P2Y12レセプターアンタゴニストはクロピドグレル (clopidogrel)、チクロピジン (ticlopidine)、プラスグレル (prasugrel)、AR-C67085MX、カングレロル (cangrelor)、C1330-7、MRS2395、2-methylthioadenosine-5'-monophosphateの中から選択される1種以上であり、

前記薬物は、表面コーティング及び液体注入の中の少なくとも一つの形で供給されることを特徴とする、請求項15に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項17】

前記流体駆動装置によって発生するせん断流動で、最小せん断率が5000 (s⁻¹)以上であるか、最小せん断力が8 Pa以上であることを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置。

【請求項18】

血液サンプルを両側に配置したサンプル貯留室に注入するステップ；

前記サンプル貯留室を連結するマイクロチャンネルを介して前記血液サンプルが往復せん断流動をするようにするステップ；

前記マイクロチャンネルに接続されたバルブを周期的に開閉し、前記血液サンプルの脈動 (Pulsatile) の流動を作るステップ；

前記マイクロチャンネルの中央部に位置する計測チャンバに薬物を提供して血小板と反応するようにするステップ；及び

前記計測チャンバ内で血小板の付着と凝集により発生する変化を計測するステップを含む、マイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血小板機能と薬物反応検査装置及び方法に関するもので、より詳細には、血栓性虚血および出血症の早期診断と予後と関連して、簡単な使い捨てマイクロチップ内部の流動により少量の血液で大量の検体を自動で検査することができるマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置及び方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

血栓症 (Thrombosis) は、血管内で止血または血栓などが生成されるもので、これらの症状は、心臓の冠状動脈や脳血管で発生すると、心臓麻痺又は脳梗塞を誘発し

10

20

30

40

50

、サイレントキラーの異名を持つ血栓症は、現代人の主な死亡原因として浮上している。問題は、これらの血栓症または出血性症が遺伝的欠陥だけで診断されず、まだ明らかになっていない状態である。

【0003】

さらに、このような血栓症の有病率が遺伝及び後天的な発生の要因等により非常に急速に増加している点が、より深刻な問題である。したがって、血栓症や出血性症を定量的に検査して、これにより早期診断及び予後を判断することができる装置と方法が古くから要求されてきた。

【0004】

傷を負った血管の止血機転に関与するいくつかの因子が存在するが、各要素の生化学的と生理学機転とも重要に作用し、その中でも、血小板の止血機転は決定的な役割をはたすことも知られている。血小板は傷のない血管壁では付着しないが、傷の発生した血管壁には生化学的および生理学的な機転が同時に作用していかなる流動条件であっても関係なく、止血が行われるように作用する。

【0005】

このような血小板の機能 (function) を細分化して検査する様々な方法と装置が並行して開発されてきた。血小板機能検査は、主に血小板の数的に異常のない出血性疾患で先天性または後天性血小板機能の異常による出血性疾患を鑑別するために重要な検査である。また、このような血小板機能検査は、心血管疾患の治療および予防に使用される抗血小板薬剤により出血性傾向の増加や薬剤の耐性の検査のためにも多く利用されている。

【0006】

血管内皮細胞に傷が発生した場合、血管内皮細胞の内部物質を構成するコラーゲンのような物質が血液の流動にさらされて、血小板はこれらの物質に付着しながら活性化される。血小板の付着機転は血液の流動の環境に応じて、異なる特性を帯びるようになる。

【0007】

これを詳細に説明すると、動脈のように血流速度が速く、血管壁に作用するせん断力が高い場合、血小板が血管内膜に付着しにくい、このような条件で活性化されて血管壁に付着しやすいフォンヴィレブラント因子 (vWF: von Willebrand factor) によって血小板が血管壁に付着される。もちろん、血小板の細胞膜に存在する糖タンパク質受容体 (glycoproteic receptor) 複合体の GPIb-IX-V などがフォンヴィレブラント因子 (vWF) との相互作用を誘発して付着されることが知られている。

【0008】

このように付着した血小板は同類の血小板を引き込んで凝集 (aggregation) を誘発させて止血をすることになり、以後再びフィブリンによって止血作用を強化する。

【0009】

しかし、このように血小板の機能が常に良い方のみ作用するのではなくて、特定の流動条件や状況では逆機能に作用することができる。例えば、動脈硬化により血管壁が局部的に狭窄された場合、血小板がこのような部分を通過しながら、高いせん断率にさらされて活性化されることにより、狭窄部の後方部に付着及び凝集が発生し、血管が詰まった血栓症を誘発することもある。

【0010】

前述したように、血流の流動の大きさに応じて、すなわち流動による剪断力 (shear stress) によって血小板及びフォンヴィレブラント因子 (vWF) は活性化され、付着性が大幅に増加して止血機転を持つようになる。このように血小板やフォンヴィレブラント因子 (vWF) の活性化に必要なせん断力は 8 Pa 以上であり、せん断率 (shear rate) では 5,000 1/s 以上であることが知られている。

【0011】

このように、止血または血栓症の早期診断及び予後の検査のために、さまざまなデバイスが提案され開発されたが、これを計測センサを基準に区分すると、電氣的、光学的、および出血の停止時間を測定する方式などで区別することができる。

【0012】

出血時間（Bleeding time、BT）検査法は約100年前に開発された出血時間を測定する検査として、現在まで血小板機能のスクリーニングでたまに使われる。しかし、現在使用されている血小板機能検査の場合、標準化が難しく、臨床的有用性が少なく、侵襲的方法を使用する問題があり、それに応じて血小板機能を測定することができる客観的な測定法が求められてきた。

【0013】

10

以上の問題を解決するために考案されて血小板の機能を測定する技術として使用されている血小板機能アナライザー（Platelet Function Analyzer）（例えば、PFA-100）の場合には、高せん断率で活性化されたフォンヴィレブラント因子（vWF）によって血小板が凝集される特性を利用したもので、このような特性を測定するために、長い毛細管に高せん断率で全血を流動させた後、コラーゲン（Collagen）と一緒にADPあるいはエピネフリン（Epinephrine）がコーティングされたオリフィス（orifice）に血小板が凝集されてオリフィス穴が詰まる閉鎖時間を圧力または流量などで測定する方法が行われている。

【0014】

このような血小板機能検査のためには、フォンヴィレブラント因子（vWF）の機能に絶対的に依存しなければならず、ヘマトクリット（Hct）に依存する検査が行われ、抗アスピリン（Aspirin）または抗クロピドグレル（Clopidogrel）検査が不可能な短所がある。また、血小板の機能検査のために二段階にわたって検査が必要であり、検査コストが上がる短所を持っている。

20

【0015】

特に、フォンヴィレブラント因子（vWF）を活性化するために、血液サンプルを高いせん断率で一定時間以上に露出しなければならず、そのためにPFA-100は非常に長い毛細管に速い速度で血液を流動させる方法を採用した。しかし、このような方法は、多くの血液が必要となるだけでなく、せん断率が最大となる毛細血管の壁の近くのフォンヴィレブラント因子（vWF）は容易に活性化されるが、せん断率が最小となる管の中心部に位置するフォンヴィレブラント因子（vWF）は活性化されない問題を有し、これにより検査結果の反復性に問題をもたらす短所を持っている。

30

【0016】

Diamed社のIMPACTはCone-Plate方式の回転型クエット流動方式を採用して、その中に満たされた血液に均一なせん断力を加えるように構成され、高いせん断力を加えた場合、血小板の付着度を測定する方法である。これは、PFA-100と同様に、フォンヴィレブラント因子（vWF）及びフィブリノーゲン（Fibrinogen）の濃度及び機能に非常に依存的な短所を持っている。

【0017】

Verify-NOW（Accumetrics）は、血小板凝集の程度を光学センサを利用して、濁度で測定する原理を採用したが、これは血液中のアゴニスト（agonist）を混合し、コラーゲンが表面にコーティングされたマイクロ玉と作用させて血液中に血小板が凝集するようにした後、これを時間に応じて濁度に測定する方式なので、従来のいくつかの濁度測定方式の技術的欠点をそのまま保持したにもかかわらず、最近に使用頻度が増えている状況である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

したがって、本発明の目的は、前記のような従来技術の問題を解決するためのもので、一回の検査で出血性および血栓性症の複合的な複数の早期診断及び予後の検査ができるよ

50

うにして検査コストを低減し、検査の繰り返し性と精度を向上させることができるマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置及び方法を提供することである。

【0019】

本発明の他の目的は、自動で血液の流動の閉鎖時間（Closure time）を測定することができる構造を持つマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置及び方法を提供することである。

【0020】

本発明が解決しようとする課題は、以上で言及した技術的課題に限定されず、言及されていない他の技術的課題は下の記載から、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者に明確に理解することができるだろう。

10

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明は、前記のような目的を達成するために、血液サンプルが収容され、前記血液サンプルの流動によって発生した血小板の付着と凝集を計測するための計測装置；及び前記計測装置に連結され、前記血液サンプルに往復せん断流動を発生させる流体駆動装置を含むマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置を提供する。

【0022】

前記計測装置は、血液サンプルが内部に収容されるサンプル貯留室；前記のサンプル貯留室に連結され、前記血液サンプルのせん断流動を案内するマイクロチャンネル；前記マイクロチャンネルと連結され、前記血小板の付着と凝集が発生する計測チャンバ；及び前記計測チャンバで発生する血小板の付着と凝集を計測するためのセンサ部を含むことができる。

20

【0023】

前記流体駆動装置は、リニアアクチュエータ；前記リニアアクチュエータの駆動により直線往復運動するピストン；及び前記ピストンの直線往復運動が可能なように設置されるシリンダを含むことができる。

【0024】

前記計測装置と流体駆動装置の間には、駆動圧力の伝達および遮断を制御するバルブが設置されることができる。

【0025】

前記バルブは周期的な開閉により脈動（Pulsatile）の流動を作ることができる。

30

【0026】

前記マイクロチャンネルは複数が並列に配置されることができる。

【0027】

前記並列に配置されたマイクロチャンネルに連結された計測チャンバには異なる薬物が提供されることができる。

【0028】

前記センサ部は、電気インピーダンスを測定する電極センサ、濁度を測定する光センサ、揺れ圧力を測定する圧力センサ、前記血液サンプルの往復移動距離を測定するイメージセンサの中の少なくとも一つを含むことができる。

40

【0029】

前記電極センサは、前記計測チャンバ内の両端に2つの電極で構成され、前記計測チャンバとの間の血小板の付着と凝集に応じて変化する電気インピーダンスの変化を測定することができる。

【0030】

前記光センサは、前記計測チャンバの外部に光源と対向するように構成され、前記計測チャンバとの間の血小板の付着と凝集に応じて変化する光学的濁度の変化を測定することができる。

【0031】

50

前記圧力センサは、前記計測装置と流体駆動装置を連結するバルブ、または前記サンプル貯留室に備えられ、前記計測チャンバで血小板の付着と凝集に応じて変化する揺れ圧力変化を測定することができる。

【0032】

前記イメージセンサは、前記マイクロチャンネルに光を照射する光源；及び前記マイクロチャンネル内の血液を透過した光を受信して電気信号に変えて血液の流れの進行距離を測定する光計測センサを含むことができる。

【0033】

前記光源はLED (Light Emitting Diode) であり、前記光計測センサはCCD (Charge Coupled Device) センサアレイであること
10

【0034】

前記計測チャンバは前記マイクロチャンネルの中央部に位置し、前記計測チャンバには前記血液サンプルの流動速度を低減させるための流路の急拡張部が形成されていることができる。

【0035】

前記計測チャンバには、血小板の付着と凝集を促進し、これによる流動の減少を誘導するための複数のマイクロファイラが設けられることができる。

【0036】

前記計測チャンバの内部には、複数の玉が備えられることができる。
20

【0037】

前記計測チャンバには、フィブリノゲン、アラキドン酸 (Arachidonic acid)、コラーゲン、エピネフリン、アデノシンリン酸 (ADP)、PGE1 (Prostaglandin E1)、TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide)、P2Y1レセプターアンタゴニスト (antagonist)、P2Y12レセプターアンタゴニストの中から選択される1種以上の薬物が提供されることができる。

【0038】

前記P2Y1レセプターアンタゴニストはMRS2179、MRS2279、MRS2500、A2P5P、A3P5P、A3P5PSの中から選択される1種以上であること
30

【0039】

前記P2Y12レセプターアンタゴニストはクロピドグレル (clopidogrel)、チクロピジン (ticlopidine)、プラスグレル (prasugrel)、AR-C67085MX、カングレロル (cangrelor)、C1330-7、MRS2395、2-methylthioadenosine-5'-monophosphateの中から選択される1種以上であることができる。

【0040】

前記薬物は、表面コーティング及び液体注入の中の少なくとも一つの形で供給されることができる。
40

【0041】

前記流体駆動装置によって発生するせん断流動で、最小せん断率が5000 (s^{-1}) 以上であるか、最小せん断力が8 Pa 以上であることができる。

【0042】

また、本発明は、上述した検査装置を利用して、血液サンプルを両側に配置したサンプル貯留室に注入するステップ；前記サンプル貯留室を連結するマイクロチャンネルを介して前記血液サンプルが往復せん断流動をするようにするステップ；前記マイクロチャンネルの中央部に位置する計測チャンバに薬物を提供して血小板と反応するようにするステップ；及び前記計測チャンバ内で血小板の付着と凝集により発生する変化を計測するステップを含む、マイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査方法を提供する。
50

【発明の効果】

【0043】

本発明によれば、血液サンプルが並列チャネルを介して、それぞれのチャネルで異なる薬物によって検査することができ、一回の検査で複合的な血小板機能に対する複数の検査が可能であり、検査時間が減少して、検査コストも低減する効果がある。

【0044】

また、往復流動メカニズムによって血液サンプルが並列チャネルを介して、それぞれのチャネルで臨界せん断力以上のせん断往復流動に十分な時間の間にさらされるように構成されて、一度通り過ぎ戻って来ることができない流動（Once-through flow）に比べて血小板とフォンヴィレブラント因子（vWF）などの因子の均一で完全な活性化を確保することができ、血小板凝集現象の繰り返し再現性を向上させることができる効果がある。

10

【0045】

また、計測チャンバ内に血小板が付着および凝集する現象をリアルタイムで顕微鏡を介して観察することができ、薬物別に定性的な分析が可能な効果がある。

【0046】

また、血液に接触する部分がすべて使い捨てで製作され、使用后廃棄することができ、ユーザーの利便性と血液感染などの危険から脱する効果を得ることができる。

【0047】

また、計測時間の短縮と、複数のサンプルが同時に測定することができるシステムの具現化が可能であり、大量の検査を実行するに適した効果がある。

20

【0048】

また、様々なアゴニストおよびアンタゴニストの薬剤を液相に直接投入したり、流路の特定の面にコーティングして、様々な薬理学的検査を行うことができる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】本発明の一実施形態に係るマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置及び方法の構成図である。

【図2A】本発明の一実施形態に係る計測装置の構成図である。

【図2B】本発明の一実施形態に係る計測装置の構成図である。

30

【図3】計測チャンバ内にマイクロフィラーが備わることを示した構成図である。

【図4】計測チャンバ内に玉が備わることを示した構成図である。

【図5A】電気インピーダンスに基づいて測定するセンサ部の構成図である。

【図5B】図5Aのセンサ部により計測されたグラフである。

【図6A】光センサを使用して濁度に基づいて測定するセンサ部の構成図である。

【図6B】図6Aのセンサ部により計測されたグラフである。

【図7A】イメージセンサによりマイクロチャンネルの血液サンプルの移動度を計測するセンサ部の構成図である。

【図7B】図7Aのセンサ部により計測されたグラフである。

【図8A】揺れ圧力を計測するためのセンサ部の構成図である。

40

【図8B】図8Aのセンサ部により計測されたグラフである。

【図8C】図8Aのセンサ部により計測されたグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0050】

以下、本発明に係るマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置及び方法の一実施形態を添付された図面を参照して詳細に説明する。

【0051】

図1は、本発明の一実施形態に係るマイクロ流動チップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置の構成図であり、図2Aおよび図2Bは本発明の一実施形態に係る計測装置の構成図である。

50

【0052】

図示されたところによると、本発明に係るマイクロチップベースの血小板の機能と薬物反応検査装置は、血液サンプルが収容され、前記血液サンプルの流動によって発生した血小板の付着と凝集を計測するための計測装置10、及び、前記計測装置10に連結され、前記血液サンプルに往復せん断流動を発生させる流体駆動装置20を含む。

【0053】

まず、計測装置10において、計測装置10は血液サンプルが内部に収容されるサンプル貯留室11を含む。そして、サンプル貯留室11の一側にはマイクロチャンネル12が連結される。マイクロチャンネル12は血液サンプルのせん断流動を案内するために連結される部分として、サンプル貯留室11の間に連結されている。

10

【0054】

マイクロチャンネル12は、その断面形状が四角形などの多角形、円形または楕円形であることができる。たとえば、断面形状が正方形であるチャンネルの場合、一つの角の長さは1~1,000 μm 、好ましくは10~200 μm 、さらに好ましくは20~50 μm であることができる。断面形状が円形である場合にも、前記範囲の直径を有することができる。

【0055】

マイクロチャンネル12は、図2Aに示すように一つで構成されることもでき、図2Bに示すように複数の並列に配置されて構成することもできる。マイクロチャンネル12が並列に配置される場合、それぞれの計測チャンバ14には異なる薬物が供給されることができる。

20

【0056】

そして、マイクロチャンネル12の一側には、血小板の付着および凝集を計測するための計測チャンバ14が連結される。計測チャンバ14は、マイクロチャンネル12の中央部に設置されることが好ましく、血小板の付着と凝集が発生する部分である。参考に、マイクロチャンネル12の端部には封止のための栓部16が備えられる。

【0057】

図3及び図4を参照すると、計測チャンバ14には、血小板の付着と凝集を促進し、これによる流動の減少を誘導するためのマイクロフィラー17が備えられる。マイクロフィラー17は、究極的に血液往復流動の流路がやすく閉鎖されるようにする。また、計測チャンバ14には複数の玉19が備えられる。

30

【0058】

また、計測チャンバ14には、血液の流動速度が低減されるように流路の急拡張部（図示せず）が形成されることができる。

【0059】

計測チャンバ14には、薬物が提供されることができ、薬物はフィブリノゲン、アラキドン酸、コラーゲン、エピネフリン、ADP、PGE1、TRAP、P2Y1レセプターアンタゴニスト、P2Y12レセプターアンタゴニストの中から選択される単独または2種以上の組み合わせであることができる。

【0060】

40

薬物の組み合わせは、例えば、フィブリノゲンとアラキドン酸、コラーゲンとエピネフリン、コラーゲンとADP、コラーゲンとアラキドン酸、コラーゲンとADP及びPGE1（P2Y12 assay）、コラーゲンとMRS 2179、コラーゲンとMRS 2395、コラーゲンとTRAP、コラーゲンとP2Y1アンタゴニスト、コラーゲンとP2Y12アンタゴニストの組み合わせが可能である。

【0061】

また、計測チャンバ14には、血小板の凝集抑制薬物としてアスピリン、P2Y12レセプターアンタゴニスト、クロピドグレル、チクロピジンに構成された試薬の中のいずれかが供給されることができる。

【0062】

50

一方、上述した計測チャンバ14に提供される薬物の供給方法では、計測チャンバ14の表面に薬物をコーティングする方法、薬物がコーティングされたマイクロフィラー17および／または玉19を計測チャンバ14に添加する方法、薬物を液体の形で計測チャンバ14に注入する方法の中の少なくとも一つの方法を使用するか、2種以上の方法を組み合わせることができる。

【0063】

次に、計測チャンバ14にさまざまなセンサで血小板の付着と凝集を計測するセンサ部18が設けられる。センサ部18では、電気インピーダンスを測定する電極センサ、濁度を測定する光センサ、揺れ圧力を測定する圧力センサ、前記血液サンプルの往復移動距離を測定するイメージセンサの中の少なくとも一つを用いることができる。そして、センサ部18はA/D変換器30と接続され、計測された信号は変換されることができる。

10

【0064】

センサ部18の具体的な実施形態を説明する前に、図1を参照して、流体駆動装置20について以下で説明する。

【0065】

流体駆動装置20は、マイクロチャンネル12に流入される血液サンプルに直線往復運動を発生させるための装置として、リニアアクチュエータ21と、リニアアクチュエータ21の駆動により直線往復運動するピストン22と、ピストン22の直線往復運動が可能ないように設置されるシリンダ24を含む。

【0066】

20

そして、計測装置10と流体駆動装置20の間にはバルブ26が連結される。バルブ26は、実質的にマイクロチャンネル12に連結されて駆動圧力の伝達および遮断を制御する役割をはたす。また、バルブ26は、効果的に駆動圧力を伝達するために、周期的な開閉により脈動(Pulsatile)の流動を作ることができる。

【0067】

マイクロチャンネル12に発生する流動は、血液サンプル内に存在する血小板とフォンヴィレブラント因子(vWF)などの要素を力学的に刺激して活性化するのに十分な臨界せん断力および／または臨界せん断率の以上を提供するように設計することができる。この時、最小せん断力は8Paであり、最小せん断率は5000(s⁻¹)であることが望ましい。

30

【0068】

このような臨界せん断流動を提供するために、流体の速度とマイクロチャンネルを精密に設計および制御する必要がある。また、前記せん断流動により血小板とフォンヴィレブラント因子(vWF)に十分な活性化時間が提供されるように往復流動の印加時間を精密に制御することができる。

【0069】

一方、リニアアクチュエータ21はマイクロプロセッサ40と連結され、駆動を制御することができる。

【0070】

以下では、上述したセンサ部18の様々な実施形態について図5乃至図8を参照して、詳細に説明する。

40

【0071】

まず、電氣的な計測方法は、図5Aに示すように、計測チャンバ14の内部の両端に2つの電極14a、14bを備えて、電極14a、14bとの間の電気インピーダンスを測定する。もちろん、計測チャンバ14の表面には複数のアゴニスト候補物質の中の少なくとも1つがコーティングされることができる。

【0072】

計測チャンバ14に血液サンプルが高速に往復流動しながら、血液内に高せん断力と高せん断率が加わると、これにさらされた血小板とフォンヴィレブラント因子(vWF)は活性化され、付着性が増加してチャンバ内の表面に付着され、徐々に凝集が起こるように

50

なる。

【0073】

ほとんどの血球は電気的非伝導体である反面、血漿は電解質で構成される液体で優れた伝導体であるため、血小板が電極14a、14bの表面に付着するとインピーダンスが大幅に増加するが、計測チャンバ14の表面に付着すると電気インピーダンスはむしろ減少することができる。

【0074】

したがって、計測チャンバ14の内部構造の設計とコーティング面の構成に応じて、電気インピーダンス値が増加または減少するように設計することができる。図5Bに示されたのは、電極14a、14bとの間の電気抵抗が増加することを概略的に描いた図である。

10

【0075】

図5Bを参照すると、時間の経過に応じて、電気インピーダンスが漸近的に最大値に近づくことになるのに、この時、変化幅の95%に到達する時間を閉鎖時間(closure time)で定義することができる。

【0076】

他の計測方法で図6Aを参照すると、計測チャンバ14を透明な材質からなり、計測チャンバ14の外部の上下面にそれぞれ光源15aと光センサ15bを対向するように構成して、計測チャンバ14内部の濁度変化を測定することができる。

【0077】

アゴニストのコーティング面が光源15aと光センサ15bとの間に構造的に構成される方法に応じて、血小板の付着及び凝集によって計測される光信号は時間に応じて増加または減少することができる。

20

【0078】

光源15aと光センサ15bが装着された面の計測チャンバ14の内部表面にアゴニストがコーティングされた場合、図6Bに示すように、光度は時間に応じて減少する。しかし、光の通路に大きく影響を与えない他の部分に設置された表面やマイクロフィラー17の部分で血小板の付着と凝集が発生すると、光度は時間に応じて増加する。また、閉鎖時間はインピーダンスの場合と同様に、変化幅の95%に相当する時点で決定することができる。

30

【0079】

他の計測方法でも図7Aを参照すると、計測チャンバ14を中心にして両側に連結されたマイクロチャンネル12の上下部にCCDセンサアレイなどの光計測センサ13b及びLEDなどの光源13aがそれぞれ備えられる。

【0080】

不透明な血液サンプルが往復運動するときに光計測センサ13bで計測された計測長さは長く一定であるが、徐々に血小板が計測チャンバ14に付着され凝集されることによって、血液サンプルの計測される距離は減少し、計測チャンバ14が完全に詰まりながら、血液サンプルの計測距離は血液の体積が満たされたマイクロチャンネル12の長さと同じで、一定の大きさを有する(図7B参照)。また、閉鎖時間はインピーダンスの場合と同様に、変化幅の95%に相当する時点で決定することができる。

40

【0081】

他の計測方法で図8Aを参照すると、シリンダ24と連結されたバルブ26の片方に連結された導管に圧力センサ28が備えられる。

【0082】

圧力センサ28は、ピストン22によって往復運動が加えられるとき揺れ圧力を計測する手段として、初期にはピストン22の往復運動によって発生した揺れ圧力は血液サンプルの往復流動運動によって多少減少された幅に揺動するが、計測チャンバ14に血小板が付着され凝集され、最終的には流路が詰まった場合には、閉鎖されたチャンネルに揺れ圧力が緩衝されず、元の揺れ圧力が記録される。

50

【0083】

このような実施形態により、時間に応じて記録された揺れ圧力のグラフが図8Bに示されている。

【0084】

しかし、圧力センサ28と連結された導管が血液サンプルの注入されるサンプル貯留室11側の上部に連結され、注入口が血液注入後に密封された場合、計測される揺れ圧力のグラフは、図8Cに示すように、時間の経過に応じて徐々に減少することになるだろう。

【0085】

以上で説明した構成で、血液に接触する部分はプラスチックやガラスなどで非常に低コストで製作することができ、これを使い捨てで製作することができる。本発明の一実施形態で、前記マイクロチャンネル12はヘマトクリットを測定する毛細管に切り替えられる。このように使い捨てで製作された試験キットは、使用後に廃棄することができ、ユーザーの利便性と血液感染などの危険から脱する効果を得ることができる。

10

【0086】

また、使い捨てキットは透明な材質からなることができる。これにより、血液の移動度を光計測センサ13bで測定することができるだけでなく、計測チャンバ14の内部に血小板の付着と凝集される現象をリアルタイムで顕微鏡を介して観察することができる。

【0087】

これらの顕微鏡の観察は、計測チャンバ14にコーティングするし、注入する様々な薬物に対する薬理動学的反応検査を定性的に観察し、検査することができる研究のツールとしても使用することができる。

20

【0088】

前記薬物は、血小板が付着することに役立つアゴニスト、すなわちコラーゲン、アデノシンニリン酸(ADP)、エピネフリンなどがあり、逆に血小板の凝集を妨害したり抑制したりするアンタゴニストではアスピリン、P2Y1レセプターアンタゴニスト、P2Y12レセプターアンタゴニストなどが含まれる。

【0089】

P2Y1レセプターアンタゴニストはMRS2179、MRS2279、MRS2500、A2P5P、A3P5P、A3P5PSなどの候補物質の中の少なくとも一つであることができる。P2Y12レセプターアンタゴニストは、クロピドグレル、チクロピジン、プラスグレル、AR-C67085MX、カングレロル、C1330-7、MRS2395、2-methylthioadenosine-5'-monophosphateなどの候補物質の中の少なくとも一つであることができる。

30

【0090】

特に、前記関連薬物服用者での血小板凝集機能と薬物に対する抵抗性の測定が本発明に係る検査装置により実施することができる。

【0091】

血小板の機能の測定のために、健常者、またはアスピリン及びクロピドグレル服用者の血液をcitratedチューブに採取した後、約50~100 microliterの全血液を取り、それぞれアデノシンニリン酸(ADP)、プロスタグランジンE(Prostaglandin E)、フィブリノーゲン、アラキドン酸の最適濃度で37℃の温度で10~30分間反応させることができる。反応の後、血液をマイクロチャンネル12を有するマイクロチップで圧力を加えて移動させるのに、対象者の血小板の機能が正常であれば、短い時間内に計測チャンバ14の流路が詰まって流動が止まって、逆に血小板の機能に異常がある場合、正常に比べて閉鎖時間が増える。

40

【0092】

薬物耐性を検査する場合、つまりアスピリン、クロピドグレル、チクロピジンなどを服用した場合、血小板の凝集機能が低下するため、計測チャンバ14内部の流路がやすく詰まらなくて閉鎖時間が増加する。健常者の場合、薬物によく反応して、この閉鎖時間が短く表し、このような閉鎖時間の割合が健常者よりも大幅に減らすと、アスピリンとクロピ

50

ドグレルの薬物耐性と判断する。判断基準では、Verify NOWの場合アスピリンは一定cut off OD値(550 ARU-aspirin reaction unit)を定め、それ以下は耐性、それ以上は正常の薬物反応と判断する。また、クロピドグレルの場合、正常対比40～60%は抑制薬物耐性で、20%以下は抑制と判断する。

【0093】

前記薬物の投入方法は、計測チャンバ14の表面にコーティングする方法が代表的であるが、計測チャンバ14の内部に構成されたマイクロフィラー17の表面コーティングを異種の薬剤として供給することができ、また、液相の薬剤がチャンバ内に直接投入されることができる。また、異種の薬剤がマイクロチャンネル12の表面にコーティングされて供給されることができる。

10

【0094】

前記に提供された薬剤は、本発明で提供した往復流動メカニズムと計測チャンバ14の構成を介して血液サンプルとやすく混合することができる特徴を持っている。したがって、液相と固相の様々なアゴニストおよびアンタゴニストの薬剤を血液と混合して反応を研究するためのツールとしても使用することができる。

【0095】

本発明の権利範囲は、上述した実施形態に限定されず、請求の範囲に記載されたところによって定義され、本発明の技術分野における通常の知識を有する者が請求の範囲に記載された権利の範囲内で種々の変形や改作を行うことができるということは自明である。

20

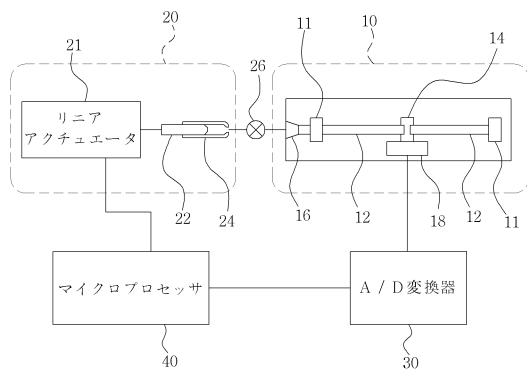
【符号の説明】

【0096】

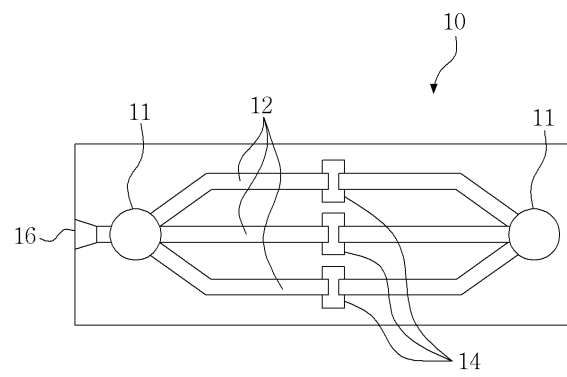
- 10：計測装置
- 11：サンプル貯留室
- 12：マイクロチャンネル
- 13a：光源
- 13b：光計測センサ
- 14：計測チャンバ
- 15a：光源
- 15b：光センサ
- 16：栓部
- 18：センサ部
- 20：流体駆動装置
- 21：リニアアクチュエータ
- 22：ピストン
- 24：シリンダ
- 30：A/D変換器
- 40：マイクロプロセッサ

30

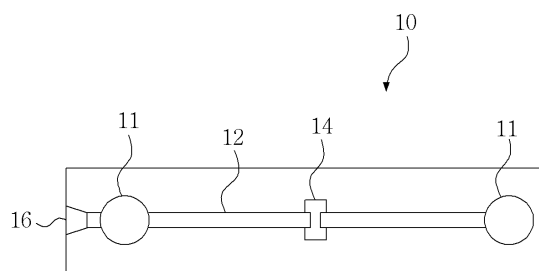
【図 1】



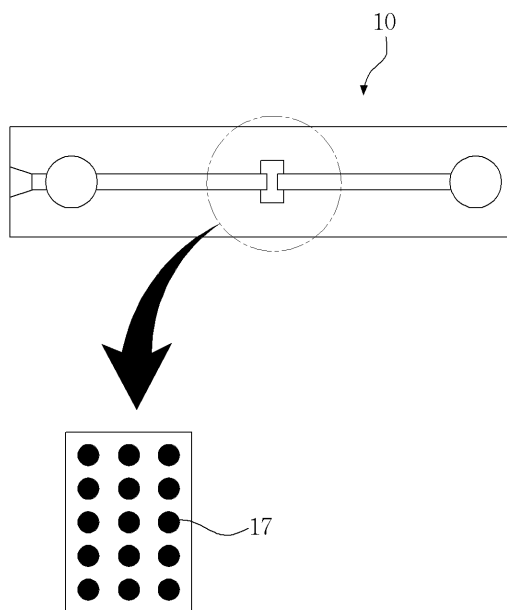
【図 2 B】



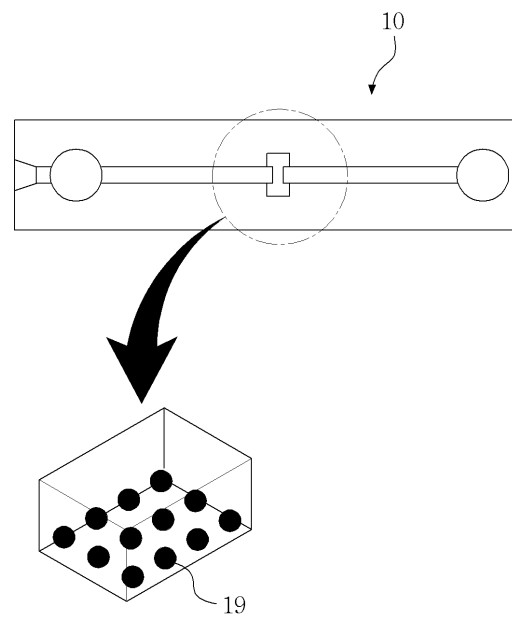
【図 2 A】



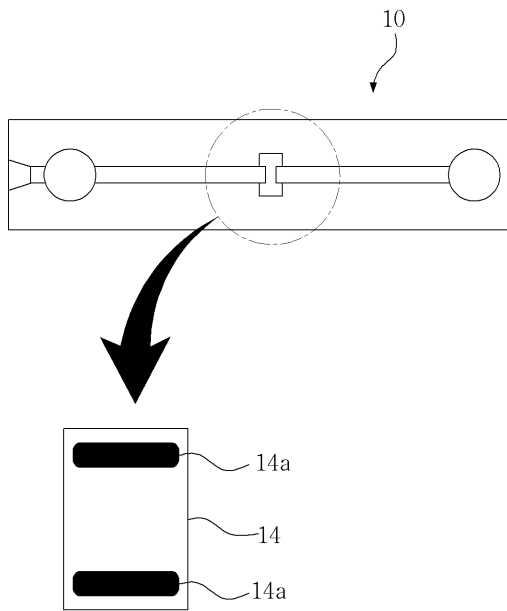
【図 3】



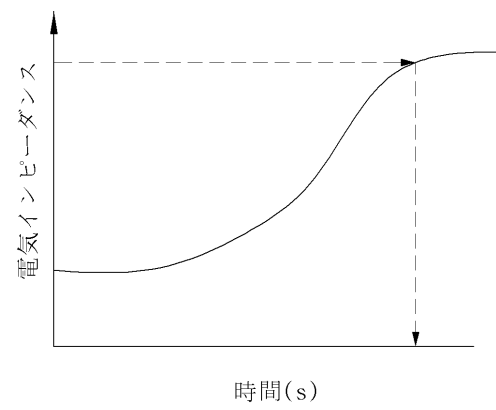
【図 4】



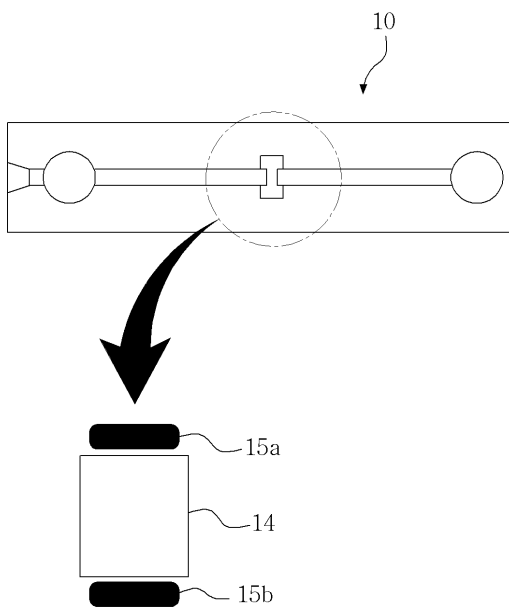
【図 5 A】



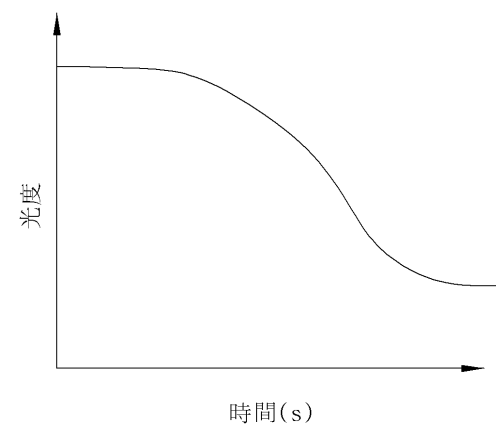
【図 5 B】



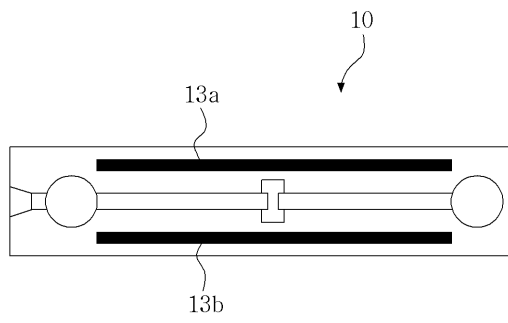
【図 6 A】



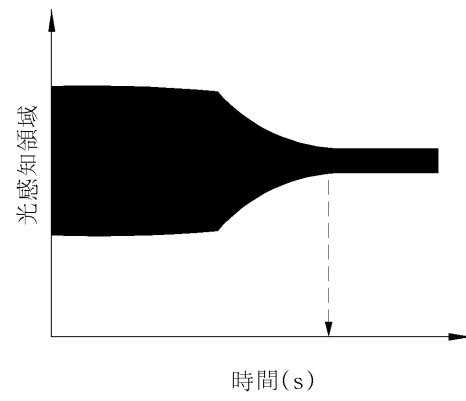
【図 6 B】



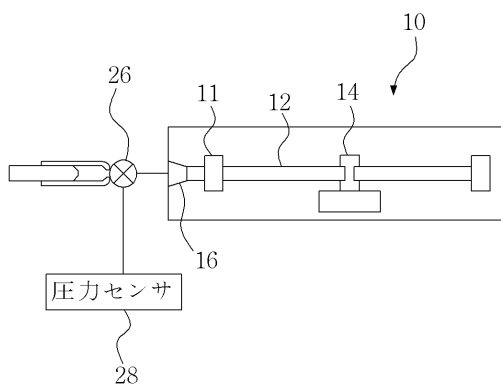
【図 7 A】



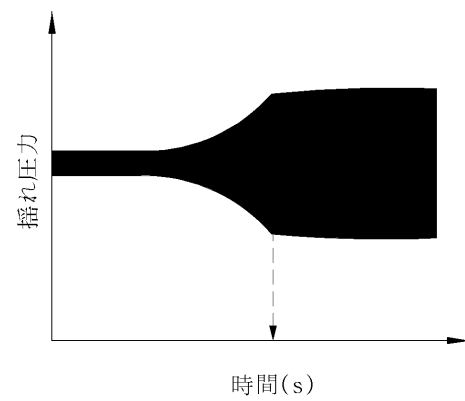
【図 7 B】



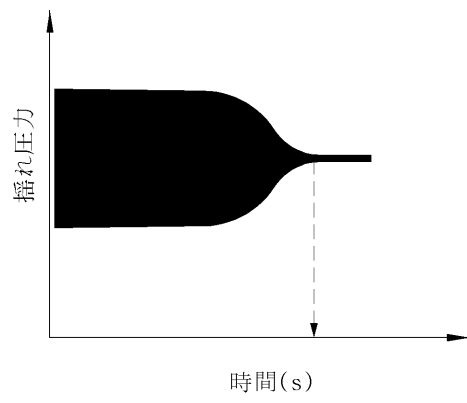
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



フロントページの続き

(72)発明者 シン ソヒョン

大韓民国 137-060 ソウル ソチョーグ バンベードン シンサンホ アパート バドン
-406

(72)発明者 イム チェソン

大韓民国 431-070 キョンギード アンヤンーシ ドンガンーグ ピョンチョンードン
399-6 クンヨン3ダンチ 302-804

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特表2008-539438 (JP, A)

特開平07-181178 (JP, A)

国際公開第2011/075614 (WO, A2)

特開2009-068874 (JP, A)

米国特許第05432084 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 37/00