

(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
2020年12月24日(24.12.2020)



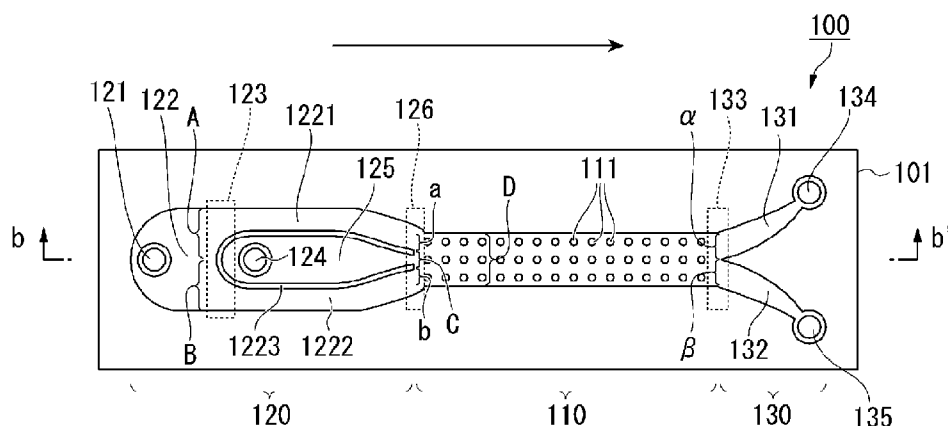
(10) 国際公開番号

WO 2020/255753 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 1/04* (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/022295
- (22) 国際出願日: 2020年6月5日(05.06.2020)
- (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 2019-115558 2019年6月21日(21.06.2019) JP
- (71) 出願人: 凸版印刷株式会社(TOPPAN PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 新井 憲彰 (ARAI Noriaki); 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 松沼 泰史, 外 (MATSUNUMA Yasushi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) Title: SEPARATION DEVICE AND SEPARATION METHOD

(54) 発明の名称: 分離デバイス及び分離方法



(57) Abstract: This separation device is for separating target particles from a fluid sample and comprises a separation flow path, a fluid introduction section, and a recovery section. The fluid introduction section comprises: a first introduction port for introducing a buffer; a first flow path through which the buffer flows; a first branching section at which the first flow path is made to branch into a first bypass flow path and a second bypass flow path; a second introduction port that is positioned downstream from the first branching section and that is for introducing a fluid sample; a second flow path that is connected to the second introduction port and through which the fluid sample flows; and a merging section at which the first bypass flow path, the second flow path, and the second bypass flow path merge. The cross-sectional area A of the first bypass flow path and the cross-sectional area B of the second bypass flow path in the first branching section and the cross-sectional area a of the first bypass flow path and the cross-sectional area b of the second bypass flow path in the

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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

merging section satisfy formula (1). Formula (1): $(A/B) \leq (a/b)$

(57) 要約: 流体試料から標的粒子を分離する分離デバイスであって、分離流路と、流体導入部と、回収部とを有し、流体導入部は、バッファを導入する第1の導入口と、バッファが流れる第1の流路と、第1の流路を第1のバイパス流路及び第2のバイパス流路に分岐する第1の分岐部と、第1の分岐部の下流側に位置し、流体試料を導入する第2の導入口と、第2の導入口に接続され、流体試料が流れる第2の流路と、第1のバイパス流路、第2の流路及び第2のバイパス流路が合流する合流部とを有し、第1の分岐部における、第1のバイパス流路の断面積A及び第2のバイパス流路の断面積Bと、合流部における、第1のバイパス流路の断面積a及び第2のバイパス流路の断面積bとが、下記式(1)を満たす、分離デバイス。 $(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$

明 細 書

発明の名称：分離デバイス及び分離方法

技術分野

[0001] 本発明は、分離デバイス及び分離方法に関する。

本願は、2019年6月21日に日本に出願された特願2019-115558号について優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 決定論的横置換法（Deterministic Lateral Displacement、DLD）とは、わずかにずらしながら配置された微小なピラーのアレイに粒子を含む流体の層流を通過させた際に、大きい粒子は、ピラー周囲に生じる流れの変化により斜めに流れるのに対し、小さい粒子は、層流に乗って直線的に進む性質を利用して、粒子を大きさにより分離する方法である（例えば、非特許文献1を参照）。例えば、特許文献1には、DLDの原理を利用した細胞の分離方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2016/136273号

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Inglis D. W., et al., Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement, Lab on a Chip, 6, 655-658, 2006.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 発明者らは、DLDにより粒子を分離する際に、粒子を含む流体の層流が意図しない位置に移動してしまい、粒子の分離能が低下してしまう場合があることを見出した。そこで、本発明は、流体試料中の標的粒子を精度よく分離する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 閾値以上の大きさを有する標的粒子及び閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む流体試料から、前記標的粒子を分離する分離デバイスであって、流体中の粒子を大きさにより分離する分離流路と、前記分離流路の上流側に接続され、前記分離流路に前記流体試料及びバッファを導入する流体導入部と、前記分離流路の下流側に接続され、前記標的粒子を含む流体及び前記非標的粒子を含む流体をそれぞれ回収する回収部と、を有し、前記流体導入部は、前記バッファを導入する第1の導入口と、前記第1の導入口に接続され、前記バッファが流れる第1の流路と、前記第1の流路を第1のバイパス流路及び第2のバイパス流路に分岐する第1の分岐部と、前記第1の分岐部の下流側に位置し、前記流体試料を導入する第2の導入口と、前記第2の導入口に接続され、前記流体試料が流れる第2の流路と、前記第1のバイパス流路、前記第2の流路及び前記第2のバイパス流路が合流する合流部と、を有し、前記第1の分岐部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Aと、前記第1の分岐部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Bと、前記合流部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積aと、前記合流部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積bとが、下記式(1)を満たし、前記回収部は、前記非標的粒子を含む流体が流れる第1の回収流路と、前記標的粒子を含む流体が流れる第2の回収流路と、を有し、前記第1の回収流路は前記分離流路の前記第1のバイパス流路側に接続しており、前記第2の回収流路は、前記分離流路の前記第2のバイパス流路側に接続している、分離デバイス。

$$(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$$

[2] 前記断面積a及び前記断面積bが、下記式(2)を満たす、[1]に記載の分離デバイス。

$$a \leq b \cdots (2)$$

〔３〕前記回収部は、前記分離流路を第１の回収流路及び第２の回収流路に分岐する第２の分岐部を有し、前記第２の分岐部における前記第１の回収流路の流れ方向に垂直な面における断面積 α と、前記第２の分岐部における前記第２の回収流路の流れ方向に垂直な面における断面積 β が、下記式（３）を満たす、〔１〕又は〔２〕に記載の分離デバイス。

$$(a/b) < (\alpha/\beta) \cdots (3)$$

〔４〕前記合流部における前記第２の流路の流れ方向に垂直な面における断面積が、前記分離流路の流れ方向に垂直な面における断面積の５～３０％である、〔１〕～〔３〕のいずれか一つに記載の分離デバイス。

〔５〕前記分離流路は、決定論的横置換法により前記標的粒子を分離する、〔１〕～〔４〕のいずれか一つに記載の分離デバイス。

〔６〕前記閾値以上の大きさを有する標的粒子及び前記閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む前記流体試料から、前記標的粒子を分離する方法であって、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の分離デバイスの前記第１の導入口から前記バッファーを導入し、前記第２の導入口から前記流体試料を導入することと、前記回収部から前記標的粒子を含む流体又は前記非標的粒子を含む流体を回収することと、を含む、方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、流体試料中の標的粒子を精度よく分離する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1A]本発明の一態様における分離デバイスの構造を説明する上面図である。

[図1B]図１Ａのｂ－ｂ’線における矢視断面図である。

[図2]決定論的横置換法（DL D）の基本原理を説明する図である。

[図3]実験例１におけるシミュレーション結果を示す図である。

[図4]実験例１におけるシミュレーションにより算出された、流体試料の層流の移動距離を示すグラフである。

[図5]実験例2において、分離デバイスの分離流路の先頭部分、中間部分、及び尾部部分を撮影した写真である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、場合により図面を参照しつつ、本発明の実施形態について詳細に説明する。なお、図面中、同一又は相当部分には同一又は対応する符号を付し、重複する説明は省略する。なお、各図における寸法比は、説明のため誇張している部分があり、必ずしも実際の寸法比とは一致しない。

[0010] [分離デバイス]

一実施形態において、本発明は、閾値以上の大きさを有する標的粒子及び閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む流体試料から、前記標的粒子を分離する分離デバイスであって、流体中の粒子を大きさにより分離する分離流路と、前記分離流路の上流側に接続され、前記分離流路に前記流体試料及びバッファを導入する流体導入部と、前記分離流路の下流側に接続され、前記標的粒子を含む流体及び前記非標的粒子を含む流体をそれぞれ回収する回収部と、を有し、前記流体導入部は、前記バッファを導入する第1の導入口と、前記第1の導入口に接続され、前記バッファが流れる第1の流路と、前記第1の流路を第1のバイパス流路及び第2のバイパス流路に分岐する第1の分岐部と、前記第1の分岐部の下流側に位置し、前記流体試料を導入する第2の導入口と、前記第2の導入口に接続され、前記流体試料が流れる第2の流路と、前記第1のバイパス流路、前記第2の流路及び前記第2のバイパス流路が合流する合流部と、を有し、前記第1の分岐部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Aと、前記第1の分岐部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Bと、前記合流部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積aと、前記合流部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積bとが、下記式(1)を満たし、前記回収部は、前記非標的粒子を含む流体が流れる第1の回収流路と、前記標的粒子を含む流体が流れる第2の回収流路と、を有し、前記第1の回収流路は前記分離

流路の前記第 1 のバイパス流路側に接続しており、前記第 2 の回収流路は、前記分離流路の前記第 2 のバイパス流路側に接続している、分離デバイスを提供する。

$$(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$$

[0011] 図 1 A は、本実施形態の分離デバイスの構造を説明する上面図である。図 1 A 中、矢印は、流体が流れる方向を示す。図 1 B は、図 1 A の b-b' 線における矢視断面図である。図 1 A 及び図 1 B に示すように、分離デバイス 100 は、分離流路 110 と、流体導入部 120 と、回収部 130 とを有する。流体導入部 120 は、分離流路 110 の上流側に接続され、分離流路 110 に流体試料及びバッファを導入する。回収部 130 は、分離流路 110 の下流側に接続され、標的粒子を含む流体及び非標的粒子を含む流体をそれぞれ回収する。

[0012] 流体導入部 120 は、第 1 の導入口 121 と、第 1 の流路 122 と、第 1 の分岐部 123 と、第 2 の導入口 124 と、第 2 の流路 125 と、合流部 126 とを有する。第 1 の導入口 121 から、バッファが導入される。第 1 の流路 122 は、第 1 の導入口 121 に接続されており、バッファが第 1 の流路 122 内を流れる。第 1 の分岐部 123 は、第 1 の流路 122 を第 1 のバイパス流路 1221 及び第 2 のバイパス流路 1222 に分岐する。第 2 の導入口 124 は、第 1 の分岐部 123 の下流側に位置する。第 2 の導入口 124 から、流体試料が導入される。第 2 の流路 125 は、第 2 の導入口 124 に接続されており、流体試料が第 2 の流路 125 内を流れる。第 1 のバイパス流路 1221、第 2 の流路 125 及び第 2 のバイパス流路 1222 は、合流部 126 で合流する。

[0013] 第 1 の分岐部 123 における第 1 のバイパス流路 1221 の流れ方向に垂直な面における断面積 A と、第 1 の分岐部 123 における第 2 のバイパス流路 1222 の流れ方向に垂直な面における断面積 B と、合流部 126 における第 1 のバイパス流路 1221 の流れ方向に垂直な面における断面積 a と、合流部 126 における第 2 のバイパス流路 1222 の流れ方向に垂直な面に

おける断面積 b とは、下記式 (1) を満たす。

$$(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$$

[0014] 回収部 130 は、非標的粒子を含む流体が流れる第 1 の回収流路 131 と、標的粒子を含む流体が流れる第 2 の回収流路 132 と、を有している。第 1 の回収流路 131 は、分離流路 110 の流れ方向に垂直な方向において、第 1 のバイパス流路 1221 側に接続している。つまり、第 1 の回収流路 131 は、分離流路 110 の流れ方向に垂直な方向において、第 2 のバイパス流路 1222 より第 1 のバイパス流路 1221 の近くに配置されている。第 2 の回収流路 132 は、分離流路 110 の流れ方向に垂直な方向において、第 2 のバイパス流路 1222 側に接続している。つまり、第 2 の回収流路 132 は、分離流路 110 の流れ方向に垂直な方向において、第 1 のバイパス流路 1221 より第 2 のバイパス流路 1222 の近くに配置されている。また、第 1 の回収流路 131 は、排出口 134 に接続している。第 2 の回収流路 132 は、排出口 135 に接続している。

[0015] 上記式 (1) を満たすことにより、第 2 のバイパス流路 1222 から分離流路 110 に吐出される流体の速度が、第 1 のバイパス流路 1221 から分離流路 110 に吐出される流体の速度と同じ、若しくは、第 1 のバイパス流路 1221 から分離流路 110 に吐出される流体の速度よりも速くなると考えられる。この結果、第 2 の流路 125 から合流した流体試料が形成する層流が、第 2 のバイパス流路 1222 側つまり、第 2 の回収流路 132 側に流れにくくなる。すなわち、流体試料が、標的粒子が回収される第 2 の回収流路 132 に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。本明細書において、標的粒子の回収を精度よく行うことができるとは、標的粒子の分離能が高いことを意味する。

[0016] 実施例において後述するように、本実施形態の分離デバイスによれば、流体試料中の標的粒子を精度よく分離することができる。断面積 A 及び B は、分岐部 123 において、第 1 の流路が第 1 のバイパス流路 1221 及び第 2 のバイパス流路に初めて分岐する位置における断面積をいう。いいかえると

、断面積A及びBは、分岐部123において、第1の流路122を第1のバイパス流路1221及び第2のバイパス流路1222に分岐させるための隔壁1223の、上流側の端部における断面積である。

[0017] 同様に、断面積a及びbは、合流部126において、第1のバイパス流路1221及び第2のバイパス流路1222が初めて合流する位置における断面積をいう。いいかえると、断面積a及びbは、隔壁1223の下流側の端部における断面積である。

[0018] 本実施形態の分離デバイスにおいて、回収部130は、分離流路110を第1の回収流路131及び第2の回収流路132に分岐する第2の分岐部133を有する。

[0019] 分離流路110における分離の原理は、層流を形成する分離方法であれば特に限定されない。例えば、決定論的横置換法（以降、DL Dと称することがある）、サイズによる分離、又は磁気による分離等であってよい。図1A及び図1Bに示す分離デバイス100の例では、分離流路110における分離の原理は、DL Dである。DL Dについては後述する。

[0020] 第1の導入口121から導入されたバッファー及び第2の導入口124から導入された流体試料は、合流部126の下流側において層流を形成する。この層流は、分離流路110の内部に形成された微小なピラー111のアレイを通過する。その結果、DL Dの原理により、閾値以上の大きさを有する粒子は、バイパス流路1222側の方向に斜めに流れる。そして、回収部130において第2の回収流路132を通過し、排出口135から回収される。一方、閾値未満の大きさを有する粒子は、層流に乗って直線的に進む。そして、回収部130において第1の回収流路131を通過し、排出口134から回収される。バッファー及び流体試料の送液は、例えば、シリンジポンプ、ダイヤフラムポンプ、又はローラーチューブポンプ等により行うことができる。

[0021] 本実施形態の分離デバイスにおいて、上記の断面積a及び上記の断面積bは、下記式（2）を満たすことが好ましい。

$$a \leq b \cdots (2)$$

[0022] 断面積 a 及び上記の断面積 b が上記式 (2) を満たすということは、合流部 126 における第 1 のバイパス流路 1221 及び第 2 のバイパス流路 1222 の高さが一定であれば、合流部 126 における第 2 の流路 125 の開口部が分離流路 110 の幅方向（流体の流れ方向に垂直な方向）における中心又は第 1 のバイパス流路 1221 側に位置することを意味する。つまり、合流部 126 における第 2 の流路 125 の開口部が分離流路 110 の幅方向における中心又は第 2 のバイパス流路 1222 より第 1 のバイパス流路 1221 の近くに位置することを意味する。一般的に、分離デバイスを構成する各流路の高さは、一定である。

[0023] この結果、流体試料の層流が第 1 のバイパス流路側に移動し、流体試料が、回収部 130 において第 1 の回収流路 131 に回収されやすくなる。このため、流体試料が、標的粒子が回収される第 2 の回収流路 132 に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。

[0024] 断面積 b に対する断面積 a の比である a/b は、0.05 以上 0.8 以下であることが好ましく、0.08 以上 0.75 以下であることがより好ましく、0.1 以上 0.7 以下であることがより好ましく、0.15 以上 0.65 以下であることが更に好ましい。 a/b が 0.05 以上 0.8 以下であると、流体試料の層流が第 1 のバイパス流路側に移動するよう制御しやすくなる。その結果、流体試料が、回収部 130 において第 1 の回収流路 131 に回収されやすくなる。また、流体試料が、標的粒子が回収される第 2 の回収流路 132 に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。

[0025] 本実施形態の分離デバイスにおいて、第 2 の分岐部 133 における第 1 の回収流路 131 の流れ方向に垂直な面における断面積 α と、第 2 の分岐部 133 における第 2 の回収流路 132 の流れ方向に垂直な面における断面積 β は、下記式 (3) を満たすことが好ましい。

$$(a/b) < (\alpha/\beta) \cdots (3)$$

[0026] 断面積 α 及び β は、分岐部133において、分離流路110が、第1の回収流路131及び第2の回収流路132に初めて分岐する位置における断面積をいう。断面積 a 、 b 、 α 、及び β が上記式(3)を満たすということは、合流部126における第2のバイパス流路1222の幅に対する第1のバイパス流路1221の幅の比よりも、合流部133における第2の回収流路132の幅に対する第1の回収流路131の幅の比のほうが大きいことを意味する。

[0027] その結果、流体試料が、回収部130において第1の回収流路131に回収されやすくなる。このため、流体試料が、標的粒子が回収される第2の回収流路132に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。

[0028] あるいは、断面積 a 及び b の大きさとは関係なく、 α が β 以上の大きさを有していてもよい。すなわち、 α 及び β は、下記式(4)を満たすことが好ましい。

$$\alpha \geq \beta \cdots (4)$$

[0029] 断面積 α 及び β が上記式(4)を満たすということは、合流部133における回収流路131の幅が合流部133における回収流路132の幅よりも大きいことを意味する。その結果、流体試料が、回収部130において第1の回収流路131に回収されやすくなる。このため、流体試料が、標的粒子が回収される第2の回収流路132に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。

[0030] 本実施形態の分離デバイスにおいて、合流部126における第2の流路125の流れ方向に垂直な面における断面積 C が、分離流路110の流れ方向に垂直な面における断面積 D に対して5～30%であることが好ましい。

[0031] 実施例において後述するように、上記の断面積 C 及び D が上記の範囲にある分離デバイスによれば、回収部130において、流体試料を第1の回収流路131に確実に回収することができる傾向にある。断面積 C が大きいほど、単位時間あたりに分離デバイスに導入することができる流体試料の体積が

大きくなり、標的粒子を分離する処理速度を向上させることができる。分離流路 110 において、断面積 D が一定でない場合には、分離流路 110 の流れ方向に垂直な面における断面積の平均値を断面積 D としてもよい。

[0032] 本明細書における分離流路 110 の流れ方向に垂直な面における断面積の平均値は、以下の方法で算出される。分離流路 110 の流れ方向に垂直な面における断面積における最も小さい断面積の部分と最も大きい断面積の部分との間の 10 点を等間隔に選択し、それぞれの断面積を測定する。10 点の断面積の値の総和を測定点、即ち 10 で割った値を平均値とする。

[0033] 本明細書において、分離対象となる粒子としては、例えば、ビーズ、又は細胞等が挙げられる。ビーズは、その表面に、標的タンパク質等を特異的に認識する特異的結合物質を結合したものであってもよい。特異的結合物質としては、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。ビーズの材質は、特に限定されず、シリカ、ポリスチレン、ラテックス、又は金属等が挙げられる。ビーズは、磁気粒子であってもよい。

[0034] このようなビーズを流体試料に混合することにより、流体試料中の標的タンパク質等をビーズに結合させることができる。更に、当該ビーズを上述した分離デバイスで回収することにより、流体試料中の標的タンパク質等を回収することができる。

[0035] また、特異的結合物質として、特定の細胞又はエクソソーム等の粒子の表面に存在するタンパク質を特異的に認識する抗体等を結合したビーズを用いることにより、当該細胞又はエクソソーム等をビーズに結合させることができる。そして、このようなビーズを上述した分離デバイスで回収することにより、流体試料中の特定の細胞又はエクソソーム等を回収することができる。

[0036] 細胞としては、特に限定されず、特異的なマーカータンパク質を細胞表面に発現したあらゆる細胞が挙げられる。細胞は、例えば血液中の循環腫瘍細胞（以降、CTC と称することがある）であってもよい。

[0037] また、例えば、目的細胞と目的外細胞の大きさが近似している場合、両者

を分離することが困難であることがある。このような場合、適切な大きさのビーズを目的細胞のみに特異的に結合させて、目的細胞を見かけ上大きな粒子にすることにより、目的外細胞との大きさの差を大きくし、分離デバイスで分離しやすくすることができる。

[0038] 本明細書において、粒子が球体である場合には、粒子の大きさとは、当該球体の直径であってよい。また、粒子が球体でない場合には、当該粒子と同じ体積の球体を想定し、当該球体の直径を粒子の大きさとしてもよい。

[0039] 以下、DL Dについて説明する。DL Dとは、わずかにずらしながら配置された微小なピラーのアレイに粒子を含む流体の層流を通過させた際に、大きい粒子はピラー周囲に生じる流れの変化により斜めに流れるのに対し、小さい粒子は層流に乗って直線的に進む性質を利用して、粒子を大きさにより分離する方法である。

[0040] 非特許文献1に記載のDL D原理に基づいて、分離したい粒子、つまり標的粒子の粒径により、斜方向に変位する粒子直径の閾値 (D_c) を設定することができる。より具体的には、閾値 D_c の設定は、下記式 (5) から求めることができる。

$$D_c = 2 \eta G \varepsilon \quad \dots (5)$$

[式 (5) 中、 D_c は斜方向に変位する粒子の直径の閾値であり、 η は変数であり、 G はピラー間ギャップであり、 ε : ピラーのずれ角度 ($\tan \theta$) である。]

[0041] そして、上記式 (5) を解くと、下記式 (6) に示す近似式が得られる。

$$D_c = 1.4 G \varepsilon^{0.48} \quad \dots (6)$$

そして、経験則から、 $0.06 < \varepsilon < 0.1$ 程度の場合に標的粒子の良好な分離を行うことができることから、 $\varepsilon = \tan \theta = 1/15 = 0.067$ を用いて、下記式 (7) を導くことができる。

$$G \div 2.62057 D_c \quad \dots (7)$$

[0042] そして、上記の式 (7) から、斜方向に変位する粒子直径の閾値 D_c に基づいて、ピラー間ギャップ G を算出する。そして、ピラー間ギャップ G のピラ

一群（以降、障害物構造と称することがある）が設置された基本構造部分を有する細胞分離デバイスを作製することができる。このようにして、目的の閾値 D_c を有するDLDMマイクロ流路を有する分離デバイスを作製することができる。

[0043] 図2は、決定論的横置換法（DLDM）の基本原理を説明する図である。図2は、DLDMマイクロ流路の基本構造20（以降、分離エリアと称することがある）を示す。図2中、矢印方向に向かう流体の流れ方向に対し、一定の規則にしたがって斜めに配列した障害物構造（以降、ピラーと称することがある）21が設けられている。矢印方向に向かう流体中において、障害物構造21周辺部においては流れ速度の変化が生じる。この連続して配列された障害物構造21による流れ速度の変化を利用し、流体中に含まれる粒子の直径が閾値以上である場合、その粒子の進行方向を変化させることができる。

[0044] 進行方向の変化について、閾値以上の大きさを有する粒子22は、連続して配列された障害物構造21の配置にしたがい斜め方向に変位していく。一方、閾値未満の大きさを有する粒子23は、流れ方向に沿って障害物構造21を迂回しながら概ね直進する。

[0045] このように、目的とする大きさの粒子を分離可能な閾値設定を行った障害物構造21の配列パターンを公知の方法（非特許文献1）にしたがって設計することにより、流体中に含まれる標的粒子の大きさに依存して分離することができる。また、流れ方向下流部にそれぞれ異なる回収流路を設けることにより、分離した粒子をそれぞれ回収することができる。

[0046] なお、障害物構造21の形状は、図2に示すような円柱構造に限定されない。障害物構造21は、目的とする流れ速度変化を生じさせることのできる形状であれば、例えば三角柱、四角柱等の多角柱構造とすることも可能である。

[0047] 本実施形態の分離デバイスの各流路及びDLDMの微小なピラーのアレイは、公知の方法を適宜選択して作製することができる。また、分離デバイスの材質としては、例えば、ガラス、シリコン、ジメチルポリシロキサン、又

はプラスチック等を用いることができる。

[0048] [分離方法]

一実施形態において、本発明は、閾値以上の大きさを有する標的粒子及び閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む流体試料から、前記標的粒子を分離する方法であって、上述したいずれかの分離デバイスの前記第1の導入口から前記バッファを導入し、前記第2の導入口から前記流体試料を導入することと、前記回収部から前記標的粒子を含む流体又は前記非標的粒子を含む流体を回収することを含む方法を提供する。

[0049] 上述した分離デバイスにおいて、回収部は、第1の回収流路と、第2の回収流路とを有している。第1の回収流路は、分離流路の第1のバイパス流路側に接続している。第2の回収流路は、分離流路の前記第2のバイパス流路側に接続している。非標的粒子は、第1の回収流路が接続する排出口から回収される。標的粒子は、第2の回収流路が接続する排出口から回収される。

[0050] 本実施形態の方法により、閾値以上の大きさを有する標的粒子及び閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む流体試料から、標的粒子を精度よく分離することができる。本実施形態の方法において、粒子は上述したものと同様である。

[0051] 本発明は、別の側面として以下の態様を含む。

[7] 閾値以上の大きさを有する標的粒子及び閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む流体試料から、前記標的粒子を分離する分離デバイスであって、流体中の粒子を大きさにより分離する分離流路と、前記分離流路の上流側に接続され、前記分離流路に前記流体試料及びバッファを導入する流体導入部と、前記分離流路の下流側に接続され、前記標的粒子を含む流体及び前記非標的粒子を含む流体をそれぞれ回収する回収部と、を有し、前記流体導入部は、前記バッファを導入する第1の導入口と、前記第1の導入口に接続され、前記バッファが流れる第1の流路と、前記第1の流路を第1のバイパス流路及び第2のバイパス流路に分岐する第1の分岐部と、前記第1の分岐部の下流側に位置し、前記流体試料を導入する第2の導入口と、前記

第2の導入口に接続され、前記流体試料が流れる第2の流路と、前記第1のバイパス流路、前記第2の流路及び前記第2のバイパス流路が合流する合流部と、を有し、前記第1の分岐部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Aと、前記第1の分岐部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Bと、前記合流部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積aと、前記合流部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積bとが、下記式(1)を満たし、前記断面積bに対する前記断面積aの比である a/b が、0.05以上0.8以下であり、前記回収部は、前記非標的粒子を含む流体が流れる第1の回収流路と、前記標的粒子を含む流体が流れる第2の回収流路と、を有し、前記第1の回収流路は前記分離流路の前記第1のバイパス流路側に接続しており、前記第2の回収流路は、前記分離流路の前記第2のバイパス流路側に接続している、分離デバイス。

$$(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$$

[8] 前記断面積bに対する前記断面積aの比である a/b が、0.08以上0.75以下である、[7]に記載の分離デバイス。

[9] 前記断面積bに対する前記断面積aの比である a/b が、0.1以上0.7以下である、[7]に記載の分離デバイス。

[10] 前記断面積A、前記断面積B、前記断面積a、及び前記断面積b、が $(A/B) = (a/b)$ を満たす、[7]～[9]のいずれか一つに記載の分離デバイス。

[11] 前記回収部は、前記分離流路を第1の回収流路及び第2の回収流路に分岐する第2の分岐部を有し、前記第2の分岐部における前記第1の回収流路の流れ方向に垂直な面における断面積 α と、前記第2の分岐部における前記第2の回収流路の流れ方向に垂直な面における断面積 β が、下記式(3)を満たす、[7]～[10]のいずれか一つに記載の分離デバイス。

$$(a/b) < (\alpha/\beta) \cdots (3)$$

[12] 前記合流部における前記第2の流路の流れ方向に垂直な面における

断面積が、前記分離流路の流れ方向に垂直な面における断面積の5～30%である、[7]～[11]のいずれか一つに記載の分離デバイス。

[13] 前記分離流路は、決定論的横置換法により前記標的粒子を分離する、[7]～[12]のいずれか一つに記載の分離デバイス。

[14] 前記閾値以上の大きさを有する標的粒子及び前記閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む前記流体試料から、前記標的粒子を分離する方法であって、[7]～[13]のいずれか一つのいずれかに記載の分離デバイスの前記第1の導入口から前記バッファを導入し、前記第2の導入口から前記流体試料を導入することと、前記回収部から前記標的粒子を含む流体又は前記非標的粒子を含む流体を回収することと、を含む、方法。

実施例

[0052] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0053] [実験例1]

図1A及び図1Bに示す構造を有し、下記表1に記載の各断面積を有する試験例1～8の分離デバイスに流体試料及びバッファを導入した場合の、流体試料の層流の流れをシミュレーションした。

[0054] 表1中、Aは、図1A及び図1Bに示す第1の分岐部123における第1のバイパス流路1221の流れ方向に垂直な面における断面積(μm^2)である。また、Bは、図1A及び図1Bに示す第1の分岐部123における第2のバイパス流路1222の流れ方向に垂直な面における断面積(μm^2)である。また、aは、図1A及び図1Bに示す合流部126における第1のバイパス流路1221の流れ方向に垂直な面における断面積(μm^2)である。また、bは、図1A及び図1Bに示す合流部126における第2のバイパス流路1222の流れ方向に垂直な面における断面積(μm^2)である。また、Cは、図1A及び図1Bに示す合流部126における第2の流路1222の流れ方向に垂直な面における断面積(μm^2)である。また、Dは、図1A及び図1Bに示す分離流路110の流れ方向に垂直な面における断面積(μm^2)

である。表1には、 a/b 、 A/B 、及び C/D の値も示す。シミュレーションにおいて、 A 及び B の値は考慮しなかったが、 $A/B = a/b$ とした。

[0055] [表1]

	試験例1	試験例2	試験例3	試験例4	試験例5	試験例6	試験例7
a	17,000	12,500	8,000	5,000	15,000	10,500	5,000
b	28,000	28,000	28,000	28,000	30,000	30,000	31,000
a/b	0.61	0.45	0.29	0.18	0.50	0.35	0.16
A/B	0.61	0.45	0.29	0.18	0.50	0.35	0.16
C	3,000	7,500	12,000	15,000	3,000	7,500	12,000
D	51,000	51,000	51,000	51,000	51,000	51,000	51,000
C/D	0.059	0.147	0.235	0.294	0.059	0.147	0.235

[0056] シミュレーションにはF I o D E F（メンター・グラフィックス・コーポレーション製）を使用した。流体試料として比重1の流体を下記表2に示す流速で送液し、バッファーとして比重1の流体を下記表2に示す流速で送液した場合をそれぞれシミュレーションした。また、分離流路の長さは、無限遠とした。シミュレーションにより、分離流路における合流部から0.1 mmの領域における層流の流跡線、及び、合流部から1.8～1.9 mmの領域における流跡線を描画した。

[0057] [表2]

	試験例1	試験例2	試験例3	試験例4	試験例5	試験例6	試験例7
流体試料の流速 [μ L/分]	100	200	300	500	100	200	300
バッファーの流速 [μ L/分]	1,000	1,000	900	1,000	1,000	1,000	900

[0058] 図3の(a)～(g)は、それぞれ試験例1～7の分離デバイスのシミュレーション結果を示す図である。また、図4は、シミュレーションにより算出された、分離流路における合流部から1.8 mmの位置の流跡線のうち、最も上の位置（流れ方向に垂直な面における位置）の流跡線と、合流部における流跡線のうち、最も上の位置（流れ方向に垂直な面における位置）の流跡線の差、すなわち、流体試料の層流が、分離流路においてどれだけ移動したかを示すグラフである。

[0059] その結果、試験例1～7のいずれの流路においても、流体試料の層流が第

1のバイパス流路側に移動することが明らかとなった。移動量（ずれ量）は最大で約30 μm であった。流体試料の層流が第1のバイパス流路側に移動すると、流体試料は、回収部において第1の回収流路に回収されやすくなる。このため、流体試料が、標的粒子が回収される第2の回収流路に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。

[0060] [実験例2]

実験例1でシミュレーションした試験例1、4、5、7の分離デバイスを実際に製造した。また、比較のために試験例8の分離デバイスを製造した。製造した各試験例の分離デバイスの各断面積を下記表3に示す。表3中、A、B、a、b、 α 、 β 、C、Dは、分離デバイスにおいて、それぞれ表1におけるものと同様の位置の断面積（ μm^2 ）を表す。また、表3には、 a/b 、 A/B 、 C/D の値も示す。全ての分離デバイスにおいて、分離流路の長さは12mmであった。

[0061] [表3]

	試験例1	試験例4	試験例5	試験例7	試験例8
A	17,000	5,000	15,000	5,000	22,500
B	28,000	28,000	30,000	31,000	22,500
a	17,000	5,000	15,000	5,000	17,000
b	28,000	28,000	30,000	31,000	28,000
α	25,500	25,500	25,500	25,500	25,500
β	25,500	25,500	25,500	25,500	25,500
A/B	0.61	0.18	0.50	0.16	1.00
a/b	0.61	0.18	0.50	0.16	0.61
α/β	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
C	3,000	15,000	3,000	12,000	3,000
D	51,000	51,000	51,000	51,000	51,000
C/D	0.059	0.294	0.059	0.235	0.059

[0062] 続いて、これらの分離デバイスに流体試料及びバッファを導入し、流体試料の層流の流れを観察した。流体試料として、ヒトから採取した血液を、1%BSA、5mMEDTA含有PBSバッファで2倍希釈したサンプルを送液した。また、バッファとして、1%BSA、5mMEDTA含有PBSバッファを送液した。試験例1、4、5、7の分離デバイスにお

いては、流体試料及びバッファをそれぞれ上記表2と同じ流速で送液した。試験例8の分離デバイスにおいては、流体試料を流速100 μ L/分で送液し、バッファを流速1,000 μ L/分で送液した。

[0063] 図5の(a)～(e)は、それぞれ試験例1、4、5、7、及び8の各分離デバイスの分離流路の先頭部分、中間部分、及び尾部部分を撮影した写真である。

[0064] その結果、図5の(a)～(d)に示すように、試験例1、4、5、及び7の分離デバイスでは、いずれも流体試料の層流が流体試料の層流が第1のバイパス流路側に移動することが明らかとなった。上述したように、流体試料の層流が第1のバイパス流路側に移動すると、流体試料は、回収部において第1の回収流路に回収されやすくなる。このため、流体試料が、標的粒子が回収される第2の回収流路に混入しにくくなり、標的粒子の回収を精度よく行うことができる。

[0065] 一方、図5の(e)に示すように、試験例8の分離デバイスでは、流体試料の層流が第2のバイパス流路側に移動する様子が観察された。この状態では、流体試料が第2の回収流路に混入し、標的粒子の分離能が低下してしまう場合がある。

[0066] 以上の結果から、上記断面積A、B、a、bが下記式(1)を満たす分離デバイスでは、流体試料中の標的粒子を精度よく分離することができることが明らかとなった。

$$(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$$

産業上の利用可能性

[0067] 本発明によれば、流体試料中の標的粒子を精度よく分離する技術を提供することができる。

符号の説明

[0068] 20…DL Dマイクロ流路の基本構造(分離エリア)、21…障害物構造(ピラー)、22…閾値以上の大きさを有する粒子、23…閾値未満の大きさを有する粒子、100…分離デバイス、110…分離流路、111…ピラ

一、120…流体導入部、121…第1の導入口、122…第1の流路、1221…第1のバイパス流路、1222…第2のバイパス流路、1223…隔壁、123…第1の分岐部、124…第2の導入口、125…第2の流路、126…合流部、130…回収部、131…第1の回収流路、132…第2の回収流路、134, 135…排出口、A, B, a, b, α , β , C, D…断面積。

請求の範囲

[請求項1]

閾値以上の大きさを有する標的粒子及び閾値未満の大きさを有する非標的粒子を含む流体試料から、前記標的粒子を分離する分離デバイスであって、

流体中の粒子を大きさにより分離する分離流路と、

前記分離流路の上流側に接続され、前記分離流路に前記流体試料及びバッファを導入する流体導入部と、

前記分離流路の下流側に接続され、前記標的粒子を含む流体及び前記非標的粒子を含む流体をそれぞれ回収する回収部と、を有し、

前記流体導入部は、

前記バッファを導入する第1の導入口と、前記第1の導入口に接続され、前記バッファが流れる第1の流路と、

前記第1の流路を第1のバイパス流路及び第2のバイパス流路に分岐する第1の分岐部と、

前記第1の分岐部の下流側に位置し、前記流体試料を導入する第2の導入口と、前記第2の導入口に接続され、前記流体試料が流れる第2の流路と、

前記第1のバイパス流路、前記第2の流路及び前記第2のバイパス流路が合流する合流部と、を有し、

前記第1の分岐部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Aと、

前記第1の分岐部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積Bと、

前記合流部における前記第1のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積aと、

前記合流部における前記第2のバイパス流路の流れ方向に垂直な面における断面積bとが、下記式(1)を満たし、

前記回収部は、

前記非標的粒子を含む流体が流れる第1の回収流路と、
前記標的粒子を含む流体が流れる第2の回収流路と、を有し、
前記第1の回収流路は前記分離流路の前記第1のバイパス流路側に
接続しており、前記第2の回収流路は、前記分離流路の前記第2のバ
イパス流路側に接続している、
分離デバイス。

$$(A/B) \leq (a/b) \cdots (1)$$

[請求項2] 前記断面積 a 及び前記断面積 b が、下記式 (2) を満たす、請求項
1 に記載の分離デバイス。

$$a \leq b \cdots (2)$$

[請求項3] 前記回収部は、前記分離流路を第1の回収流路及び第2の回収流路
に分岐する第2の分岐部を有し、

前記第2の分岐部における前記第1の回収流路の流れ方向に垂直な
面における断面積 α と、

前記第2の分岐部における前記第2の回収流路の流れ方向に垂直な
面における断面積 β が、下記式 (3) を満たす、請求項1又は2に記
載の分離デバイス。

$$(a/b) < (\alpha/\beta) \cdots (3)$$

[請求項4] 前記合流部における前記第2の流路の流れ方向に垂直な面における
断面積が、前記分離流路の流れ方向に垂直な面における断面積の5～
30%である、請求項1～3のいずれか一項に記載の分離デバイス。

[請求項5] 前記分離流路は、決定論的横置換法により前記標的粒子を分離する
、請求項1～4のいずれか一項に記載の分離デバイス。

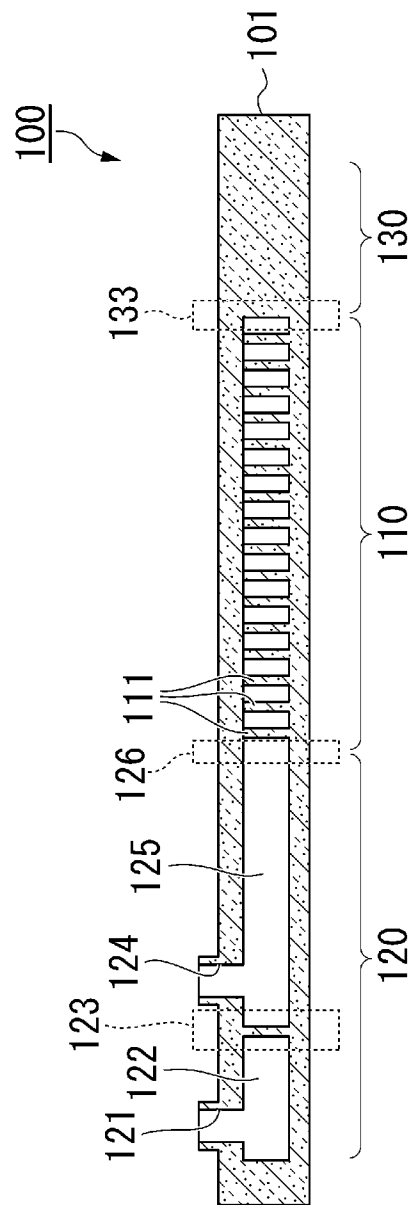
[請求項6] 前記閾値以上の大きさを有する標的粒子及び前記閾値未満の大きさ
を有する非標的粒子を含む前記流体試料から、前記標的粒子を分離す
る方法であって、

請求項1～5のいずれか一項に記載の分離デバイスの前記第1の導
入口から前記バッファを導入し、前記第2の導入口から前記流体試

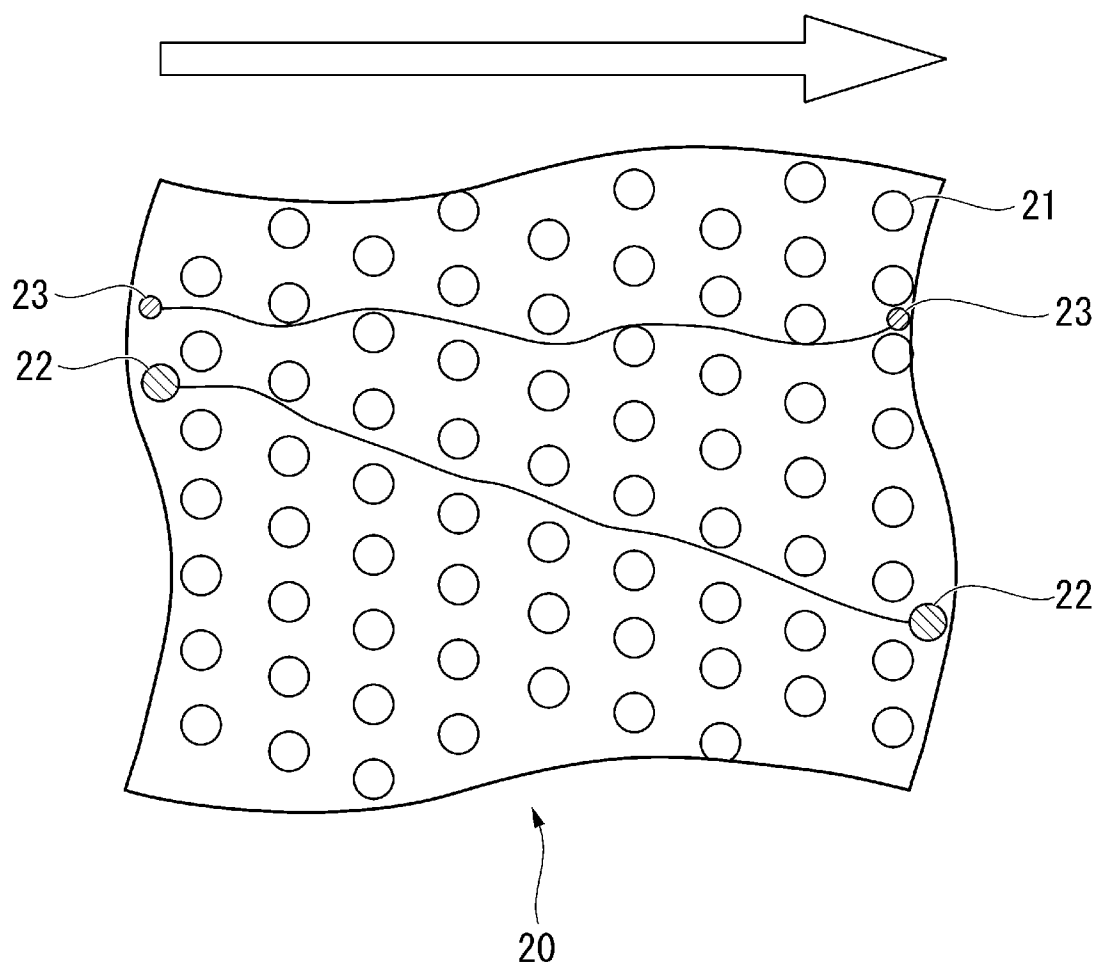
料を導入することと、

前記回収部から前記標的粒子を含む流体又は前記非標的粒子を含む流体を回収することと、を含む、方法。

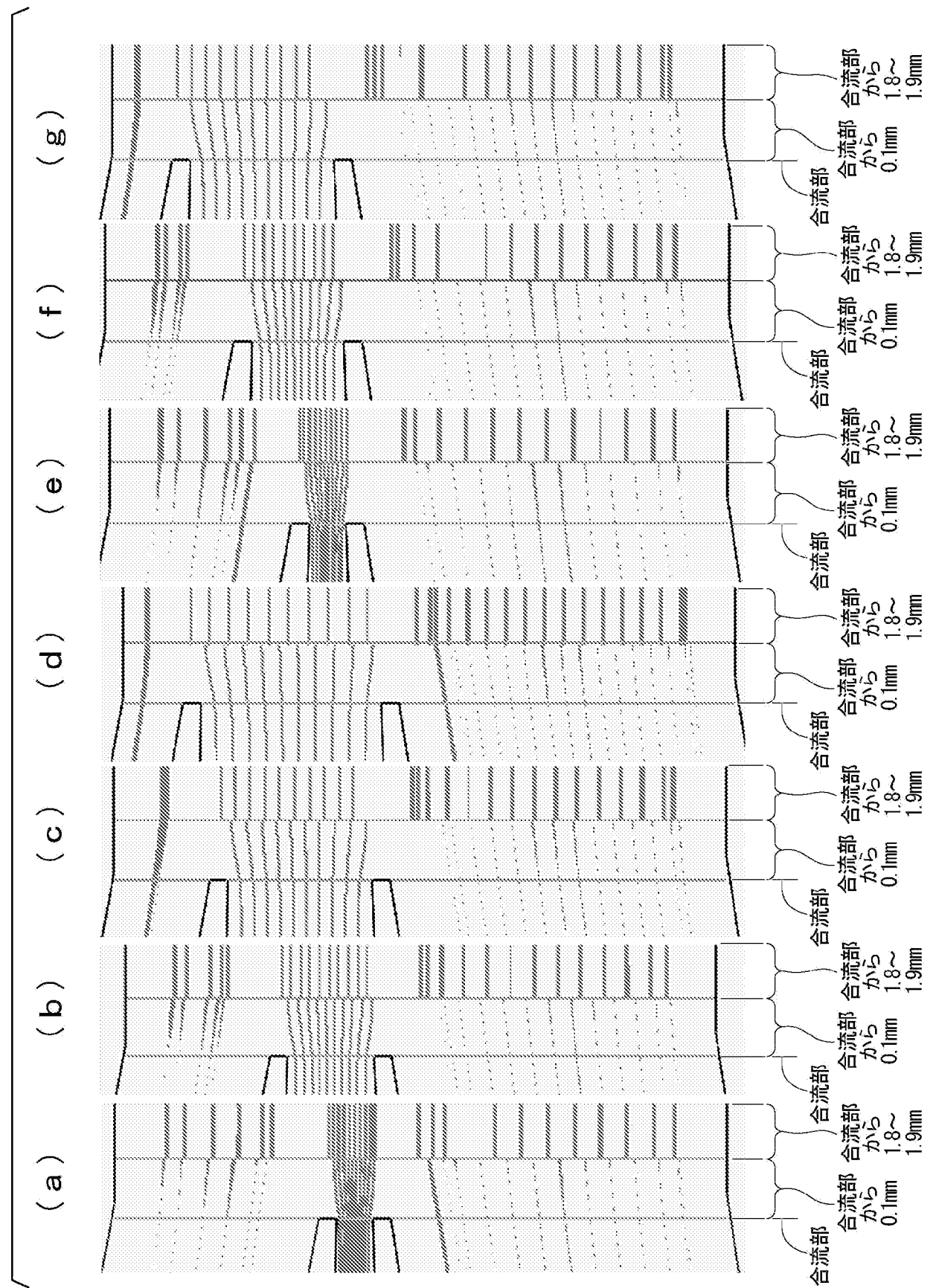
[図1B]



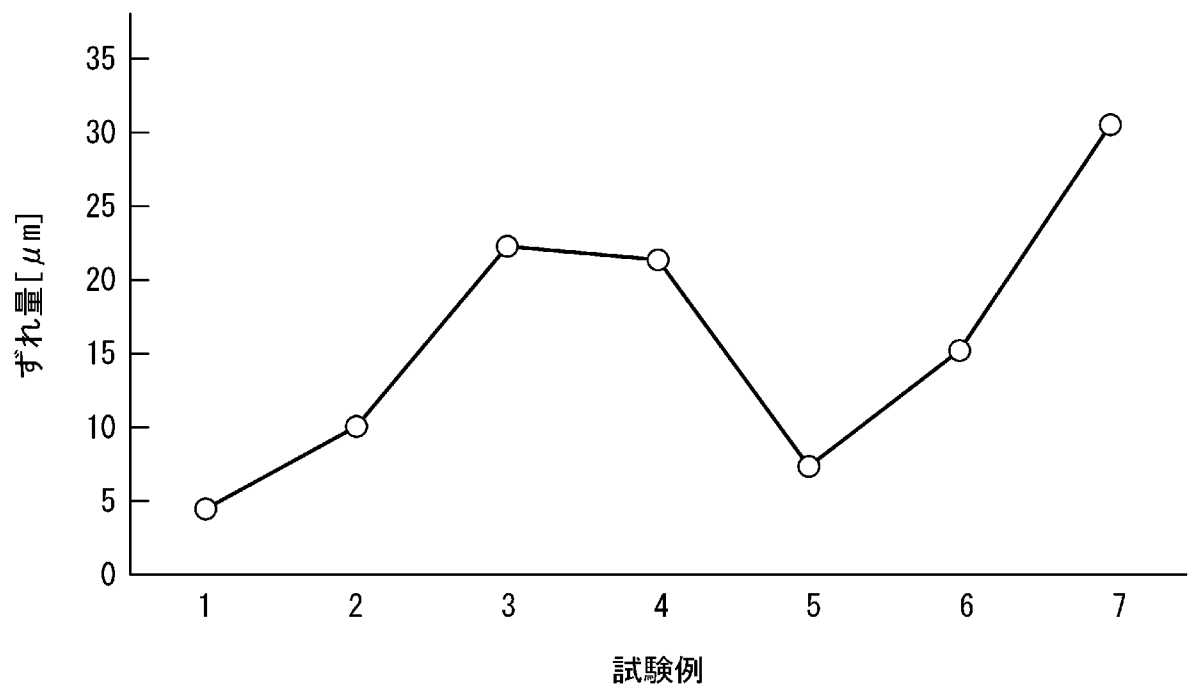
[図2]



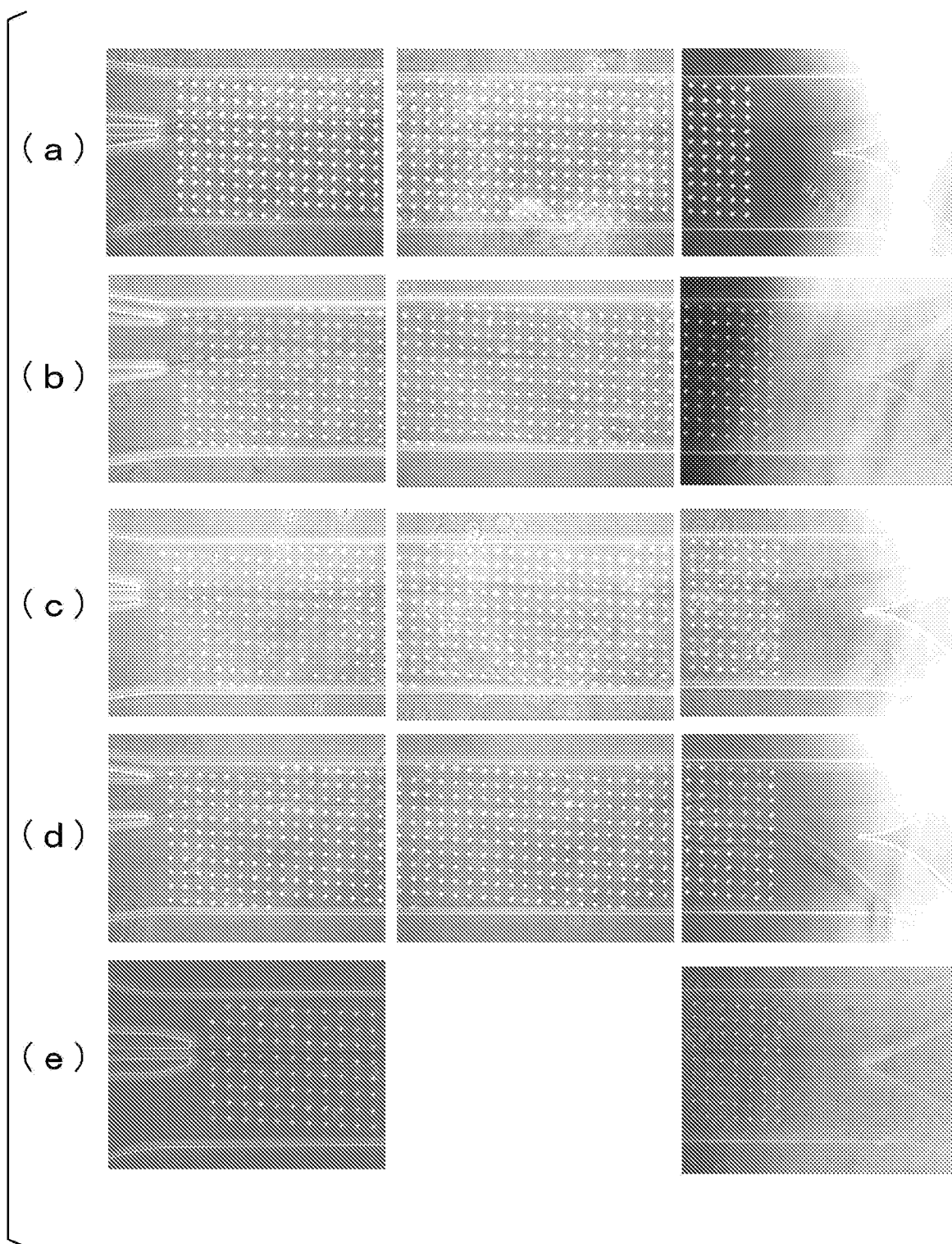
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/022295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12M1/00 (2006.01) i, C12M1/26 (2006.01) i, G01N1/04 (2006.01) i

FI: C12M1/26, C12M1/00 A, G01N1/04 H

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)

Int. Cl. C12M1/00, C12M1/26, G01N1/04

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 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/136273 A1 (TOPPAN PRINTING CO., LTD.) 01 September 2016, claims, paragraphs [0029], [0038]- [0041], fig. 2	1-6

☐ 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

"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
28.07.2020

Date of mailing of the international search report
11.08.2020

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
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/JP2020/022295

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2016/136273 A1	01.09.2016	US 2018/0038876 A1 claims, fig. 2, examples EP 3263693 A1 entire text CN 107250343 A entire text	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/26(2006.01)i; G01N 1/04(2006.01)i FI: C12M1/26; C12M1/00 A; G01N1/04 H														
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）） C12M1/00; C12M1/26; G01N1/04														
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年													
国際調査で利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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)														
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	WO 2016/136273 A1 (凸版印刷株式会社) 01.09.2016 (2016 - 09 - 01) 請求の範囲、段落0029, 0038-0041、図2	1-6												
☐ 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。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
* 引用文献のカテゴリー	“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													
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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													
“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	“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													
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“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														
国際調査を完了した日 28.07.2020	国際調査報告の発送日 11.08.2020													
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） 井関 めぐみ 4N 5574 電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

国際出願番号
PCT/JP2020/022295

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2016/136273	A1	01.09.2016	US 2018/0038876 A1 Claims, FIG.2, EXAMPLES EP 3263693 A1 全文 CN 107250343 A 全文	