

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-534714
(P2016-534714A)

(43) 公表日 平成28年11月10日(2016.11.10)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 M 1/34 (2006.01)	C 12 M 1/34	B 2 G 04 3
G 01 N 33/86 (2006.01)	G 01 N 33/86	B 2 G 04 5
G 01 N 37/00 (2006.01)	G 01 N 37/00	1 O 1 4 B 02 9
G 01 N 33/483 (2006.01)	G 01 N 33/483	C
G 01 N 33/50 (2006.01)	G 01 N 33/50	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-524024 (P2016-524024)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月16日 (2014.10.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月14日 (2016.6.14)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2014/060956
 (87) 國際公開番号 WO2015/102726
 (87) 國際公開日 平成27年7月9日 (2015.7.9)
 (31) 優先権主張番号 61/891,732
 (32) 優先日 平成25年10月16日 (2013.10.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 507044516
 プレジデント アンド フェローズ オブ
 ハーバード カレッジ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 3 8, ケンブリッジ, クインシー
 ストリート 1 7
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 ジャイン, アビシェーク
 アメリカ合衆国、O 2 4 4 5 マサチュー
 セツツ州、ブルックライン、ハイ・ストリ
 ート、2 3 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】全血凝固のリアルタイムの臨床モニタリングおよび定量的評価

(57) 【要約】

ある側面に従い、複数のマイクロチャネルを定めたマイクロ流体凝固装置が提供され、血液サンプルは、マイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で駆動され、コントローラは、タイマーおよび圧力検知装置と組合されて、流れ始めたときの第1の圧力値(または流量値)、第2の圧力値が求めた第1の圧力値の約2倍となる第1の時間($T_{p,g}$)、および第3の圧力値が求めた第1の圧力値の約($1 + e$)倍となる第2の時間($T_{p,f}$)を求め、そこからチャネル閉塞を予測する被験者凝固モデルを定めるように構成される。別の側面において、血液サンプルはマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で駆動され、コントローラは、タイマーおよび流量検知装置と組合されて流量に基づいて上記判断を行なうように構成される。

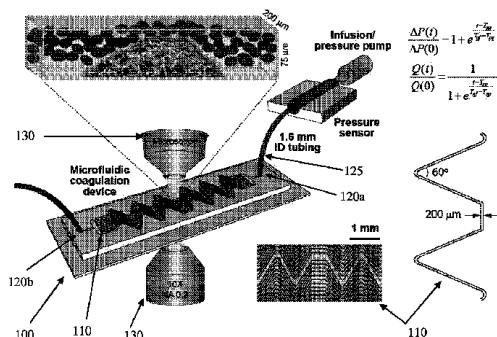


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミクロ流体凝固装置であって、
 複数のマイクロチャネルを定める少なくとも 1 つの基板と、
 前記基板の第 1 の端部にある第 1 のポートとを備え、前記第 1 のポートは前記複数のマイクロチャネルそれぞれの第 1 の端部に接続し、
 前記基板の第 2 の端部にある第 2 のポートを備え、前記第 2 のポートは前記複数のマイクロチャネルそれぞれの第 2 の端部に接続し、
 前記複数のマイクロチャネル内の圧力値または前記複数のマイクロチャネル全体の圧力に関連する圧力値を求めるように構成された第 1 の検知装置と、

10

タイマーと、

前記第 1 の検知装置および前記タイマーと組合されて、流れ始めたときの第 1 の圧力値、第 2 の圧力値が求めた前記第 1 の圧力値の約 2 倍と判断される第 1 の時間、および、第 3 の圧力値が求めた前記第 1 の圧力値の約 $(1 + e)$ 倍となる第 2 の時間を求めるように構成され、かつさらに、以下の関係に従ってチャネル閉塞を予測する被験者凝固モデルを定めるように構成された、コントローラとを備え、

【数 1】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t - T_{pg}}{T_{pf} - T_{pg}}}$$

20

式中、 T_{pf} は前記第 2 の時間、 T_{pg} は前記第 1 の時間であり、

前記第 1 のポートを通して与えられる差圧または流量 / せん断が、血液サンプルを、前記複数のマイクロチャネルを通して、実質的に一定の流量で駆動する、ミクロ流体凝固装置。

【請求項 2】

前記第 1 のポートを通して与えられる差圧または流量 / せん断によって、血液サンプルを前記複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で駆動させる装置をさらに備え、

前記差圧または流量を発生する前記装置はポンプである、請求項 1 に記載のミクロ流体凝固装置。

30

【請求項 3】

前記装置はシリンジポンプである、請求項 2 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 4】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかの断面表面積は、約 $1.25 \mu m^2$ ~ $1.75 mm^2$ の間である、請求項 1 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 5】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかの最大水力直径は、約 $2.5 \mu m$ ~ $5 mm$ の間である、請求項 1 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 6】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかの最大寸法は、約 $7.5 \mu m$ ~ $200 \mu m$ の間である、請求項 5 に記載のミクロ流体凝固装置。

40

【請求項 7】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つは第 1 の断面積を有し、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つは前記第 1 の断面積と異なる第 2 の断面積を有する、請求項 1 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 8】

第 1 のマイクロチャネルの少なくとも一部分は第 1 の表面処理を有する、請求項 1 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 9】

50

第2のマイクロチャネルの少なくとも一部分は前記第1の表面処理と異なる第2の表面処理を有する、請求項8に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項10】

前記第1の表面処理および前記第2の表面処理のうちの少なくとも一方は、自然発生または合成試薬、コラーゲン、血栓形成誘発材料、血栓形成阻害材料、血小板活性化材料、血小板阻害材料、フィブリンネットワーク形成材料、フィブリンネットワーク破壊材料、細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、セグメント化ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、またはポリメタクリル酸メチルのうちの1つを含む、請求項9に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項11】

前記せん断の速度は75sec⁻¹と5000sec⁻¹の間である、請求項1に記載のミクロ流体凝固装置。 10

【請求項12】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの少なくとも一部分を撮像するように構成された撮像システムをさらに備える、請求項1に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項13】

前記撮像システムは自動撮像プロトコルを含む、請求項12に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項14】

前記撮像システムは共焦点撮像またはオンチップフローサイトメトリを含む、請求項13に記載のミクロ流体凝固装置。 20

【請求項15】

前記撮像システムは、血小板凝集体を測定するように、または、凝固に対する、血小板アクティベータ、血液の細胞成分、または細胞の効果を撮像するように、構成される、請求項13に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項16】

前記第1のポートを通して与えられて血液サンプルを前記複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で駆動する前記差圧は、患者の血圧を含む、請求項1に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項17】

ミクロ流体凝固装置であって、

複数のマイクロチャネルを定める少なくとも1つの基板と、

前記基板の第1の端部にある第1のポートとを備え、前記第1のポートは前記複数のマイクロチャネルそれぞれの第1の端部に接続し、

前記基板の第2の端部にある第2のポートを備え、前記第2のポートは前記複数のマイクロチャネルそれぞれの第2の端部に接続し、

前記複数のマイクロチャネル内の流量または前記複数のマイクロチャネルに関連する流量を求めるように構成された第1の検知装置と、

タイマーと、

前記第1の検知装置および前記タイマーと組合されて、(i)流れ始めたときに対応する第1の時間における第1の流量値、(ii)第2の流量値が求めた前記第1の流量値の約二分の一と判断される第2の時間、(iii)第3の流量値が求めた前記第1の流量値の約(1+ε)分の1と判断される第3の時間、および、(iv)以下の関係によって支配されるチャネル閉塞を予測する血液凝固モデルを求めるように構成された、コントローラとを備え、 40

【数2】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t - T_{q,f}}{T_{q,g} - T_{q,f}}}}$$

式中、T_{q,f}は前記第3の時間、T_{q,g}は前記第2の時間であり、

10

20

30

40

50

差圧が前記第1のポートに与えられて血液サンプルを前記複数のマイクロチャネルを通して駆動する、ミクロ流体凝固装置。

【請求項18】

差圧を前記第1のポートに与えるように構成され、かつ、血液サンプルを前記複数のマイクロチャネルを通して駆動するように構成された装置をさらに備え、

前記差圧はポンプによって生成される、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項19】

前記ポンプは、シリンジポンプ、または蠕動ポンプ、またはその他の一定流量送達ポンプである、請求項18に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項20】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかの断面表面積は、約125μm²～1.75mm²の間である、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項21】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかの最大寸法は、約25μm～5mmの間である、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項22】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかの最大寸法は、約75μm～200μmの間である、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項23】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは第1の断面積を有し、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記第1の断面積と異なる第2の断面積を有する、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項24】

前記複数のマイクロチャネルのうちの1つのマイクロチャネルの少なくとも一部分は第1の表面処理を有する、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項25】

前記複数のマイクロチャネルのうちの別の1つのマイクロチャネルの少なくとも一部分は前記第1の表面処理と異なる第2の表面処理を有する、請求項24に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項26】

前記第1の表面処理および前記第2の表面処理のうちの少なくとも一方は、自然発生または合成試薬、コラーゲン、血栓形成誘発材料、血栓形成阻害材料、血小板活性化材料、血小板阻害材料、フィブリンネットワーク形成材料、フィブリンネットワーク破壊材料、細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、セグメント化ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、またはポリメタクリル酸メチルのうちの1つを含む、請求項25に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項27】

前記せん断の速度は75sec⁻¹と5000sec⁻¹の間である、請求項18に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項28】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの少なくとも一部分を撮像するように構成された撮像システムをさらに備える、請求項17に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項29】

前記撮像システムは自動撮像プロトコルを含む、請求項28に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項30】

前記撮像システムは共焦点撮像またはオンチップフローサイトメトリを含む、請求項29に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項31】

前記撮像システムは、血小板凝集体を測定するように、または、凝固に対する、血小板アクティベータ、血液の細胞成分、または細胞の効果を撮像するように、構成される、請

10

20

30

40

50

求項 2 9 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 3 2】

前記第 1 のポートに与えられて血液サンプルを前記複数のマイクロチャネルを通して駆動する前記差圧は、患者の血圧を含む、請求項 1 7 に記載のミクロ流体凝固装置。

【請求項 3 3】

被験者から採取した血液サンプルから被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法であって、

ミクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で被験者からの血液サンプルを駆動することと、

前記実質的に一定の流量で前記複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルが移動している間に、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、

流れ始めたときの第 1 の圧力値を求めることと、

第 2 の圧力値が求めた前記第 1 の圧力値の約 2 倍と判断される第 1 の時間を求めるここと、

第 3 の圧力値が求めた前記第 1 の圧力値の約 (1 + e) 倍と判断される第 2 の時間を求めるここと、

前記第 1 の時間と前記第 2 の時間を用いて、以下の関係によって、前記被験者のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることとを含み、

【数 3】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{p_f}}{T_{p_f}-T_{p_g}}}$$

式中、 T_{p_f} は前記第 2 の時間、 T_{p_g} は前記第 1 の時間であり、

被験者特有の前記定めた凝固モデルを物理記憶媒体に記録することを含む、方法。

【請求項 3 4】

前記被験者からの血液サンプルを、直接接続を通して、カテーテルまたは体外装置を通して、患者から前記ミクロ流体装置に駆動することをさらに含む、請求項 3 3 に記載の被験者の血液の凝固を評価する方法。

【請求項 3 5】

被験者特有の前記定めた凝固モデルに応じて、前記被験者に対する治療薬の投与量、前記被験者に対する治療薬の濃度、または前記被験者に対する治療薬の投与の頻度のうちの少なくとも 1 つを決定することをさらに含む、請求項 3 3 に記載の被験者の血液の凝固を評価する方法。

【請求項 3 6】

凝固の過程の間に前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの少なくとも一部分を撮像して前記凝固の過程に関連する情報を提供することをさらに含む、請求項 3 3 に記載の被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法。

【請求項 3 7】

被験者から採取した血液サンプルから被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法であって、

ミクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルを駆動することと、

前記実質的に一定の圧力で前記複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルが移動している間に、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、

流れ始めたときの第 1 の流量値を求めることと、

第 2 の流量値が求めた前記第 1 の流量値の約 2 倍と判断される第 1 の時間を求めるここと、

10

20

30

40

50

第3の流量値が求めた前記第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間用いて、以下の関係によって、前記被験者のチャネル閉塞を予測する被験者特有の凝固モデルを定めることとを含み、

【数4】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{q_f}}{T_{q_f}-T_{q_g}}}}$$

式中、 T_{q_f} は前記第2の時間、 T_{q_g} は前記第1の時間であり、

10

前記定めた被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することを含む、方法。

【請求項38】

前記定めた被験者特有の凝固モデルに応じて、前記被験者に対する治療薬の、投与量、濃度、または投与の頻度のうちの少なくとも1つを調整することをさらに含む、請求項37に記載の被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法。

【請求項39】

前記定めた被験者特有の凝固モデルに応じて、前記被験者に対する治療薬の投与量、前記被験者に対する治療薬の濃度、または前記被験者に対する治療薬の投与の頻度のうちの少なくとも1つを決定することをさらに含む、請求項37に記載の被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法。

20

【請求項40】

凝固の過程間に前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの少なくとも一部分を撮像して前記凝固の過程に関連する情報を提供することをさらに含む、請求項36に記載の被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法。

【請求項41】

被験者からの血液サンプルから被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法であって、

第1のミクロ流体装置の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で被験者からの血液サンプルの第1の部分を駆動することと、

30

前記実質的に一定の流量で前記第1の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルの前記第1の部分が移動している間に、前記第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、

流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、

第2の圧力値が求めた前記第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求めること、

第3の圧力値が求めた前記第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間用いて、以下の関係によって、チャネル閉塞を予測する第1の被験者特有の凝固モデルを定めることとを含み、

【数5】

40

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{p_f}}{T_{p_f}-T_{p_g}}}$$

式中、 T_{p_f} は前記第2の時間、 T_{p_g} は前記第1の時間であり、

前記定めた第1の被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することと、

前記第1のミクロ流体装置の基板内にまたは第2のミクロ流体装置の基板内に形成された複数の第2のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で前記被験者の血液サンプルの第2の部分を駆動することと、

50

前記実質的に一定の圧力で前記複数の第2のマイクロチャネルを通して前記血液サンプ

ルの第 2 の部分が移動している間に、前記複数の第 2 のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、

流れ始めたときの第 1 の流量値を求ることと、

第 2 の流量値が求めた前記第 1 の流量値の約 2 倍と判断される第 1 の時間を求ることと、

第 3 の流量値が求めた前記第 1 の流量値の約 (1 + e) 倍と判断される第 2 の時間を求ることと、

前記第 1 の時間と前記第 2 の時間を用いて、以下の関係によって、チャネル閉塞を予測する第 2 の被験者特有の凝固モデルを定めることとを含み、

【数 6】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{q_f}}{T_{q_f}-T_{q_g}}}}$$

式中、 T_{q_f} は前記第 2 の時間、 T_{q_g} は前記第 1 の時間であり、

前記定めた第 2 の被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することとを含む、方法。

【請求項 4 2】

被験者からの血液サンプルから被験者の凝固の少なくともいくつかの側面を評価する方法であって、

マイクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で血液サンプルを駆動することと、

前記実質的に一定の流量で前記複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルが移動している間に、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、

流れ始めたときの第 1 の圧力値を求ることと、

第 2 の圧力値が求めた前記第 1 の圧力値の約 2 倍と判断される第 1 の時間を求ることと、

第 3 の圧力値が求めた前記第 1 の圧力値の約 (1 + e) 倍と判断される第 2 の時間を求ることと、

チャネル閉塞を予測する被験者特有の凝固モデルを定めることと、

以下の関係を用いて前記被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することとを含み、

【数 7】

$$(T_{pg}, T_{pf}) = A_{(T_{pg}, T_{pf})} e^{B_{(T_{pg}, T_{pf})} C_{uh} - C_{(T_{pg}, T_{pf})} Y}$$

式中、A、B および C は、以下の関係をカーブフィッティングすることによって実験的に求められる血液の特性に関連する被験者特有の変数であり、

【数 8】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

式中、 T_{p_f} は前記第 2 の時間、 T_{p_g} は前記第 1 の時間である、方法。

【請求項 4 3】

被験者の血液サンプルの凝固を評価する方法であって、

マイクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルを駆動することと、

10

20

30

40

50

前記実質的に一定の圧力で前記複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルが移動している間に、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、

流れ始めたときの第1の流量値を求ることと、

第2の流量値が求めた前記第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、

第3の流量値が求めた前記第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

以下の関係を用いて被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することとを含み、
【数9】

10

$$(T_{qg}, T_{qf}) = A_{(T_{qg}, T_{qf})} \gamma^{\omega} e^{B_{(T_{qg}, T_{qf})} C_{uh} - C_{(T_{qg}, T_{qf})} \gamma}$$

式中、A、B、およびCは、以下の関係をカーブフィッティングすることによって実験的に求められる血液の特性に関連する被験者特有の変数であり、

【数10】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t - T_{pg}}{T_{qf} - T_{qg}}}}$$

20

式中、 T_{pf} は前記第2の時間、 T_{pg} は前記第1の時間である、方法。

【請求項44】

血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法であって、

マイクロ流体装置の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で血液サンプルの第1の部分を駆動することと、

前記実質的に一定の流量で前記第1の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルの前記第1の部分が移動している間に、前記第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、

前記血液サンプルの前記第1の部分が流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、

前記血液サンプルの前記第1の部分の第2の圧力値が前記血液サンプルの前記第1の部分の求めた前記第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、

前記血液サンプルの前記第1の部分の第3の圧力値が前記血液サンプルの前記第1の部分の求めた前記第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間用いて、前記血液サンプルの前記第1の部分についての以下の関係によって、前記血液サンプルの前記第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることとを含み、

【数11】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t - T_{pg}}{T_{pf} - T_{pg}}}$$

30

式中、 T_{pf} は前記第2の時間、 T_{pg} は前記第1の時間であり、

前記マイクロ流体装置の基板または別のマイクロ流体装置の基板内に形成された第2の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で血液サンプルの第2の部分を駆動することと、

モディファイアを前記血液サンプルの前記第2の部分または前記第2の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することと、

前記実質的に一定の流量で前記第2の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルの前記第2の部分が移動している間に、前記第2の複数のマイクロチャネルのうちの少

40

50

なくとも 1 つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、

前記血液サンプルの前記第 2 の部分が流れ始めたときの第 1 の圧力値を求めるのことと、

前記血液サンプルの前記第 2 の部分の第 2 の圧力値が前記血液サンプルの前記第 2 の部分の求めた前記第 1 の圧力値の約 2 倍と判断される第 1 の時間を求めるのことと、

前記血液サンプルの前記第 2 の部分の第 3 の圧力値が前記血液サンプルの前記第 2 の部分の求めた前記第 1 の圧力値の約 (1 + e) 倍と判断される第 2 の時間を求めるのことと、

前記第 1 の時間と前記第 2 の時間用いて、前記血液サンプルの前記第 2 の部分についての以下の関係によって、前記血液サンプルの前記第 2 の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることとを含み、

【数 1 2】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t - T_{pg}}{T_{pf} - T_{pg}}}$$

式中、 T_{pf} は前記第 2 の時間、 T_{pg} は前記第 1 の時間であり、

前記血液サンプルの前記第 1 の部分のチャネル閉塞を予測する前記凝固モデルを、前記血液サンプルの前記第 2 の部分のチャネル閉塞を予測する前記凝固モデルと比較することにより、前記モディファイアの効果を判断することを含む、方法。

【請求項 4 5】

前記モディファイアは抗凝固剤を含む、請求項 4 4 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 4 6】

前記モディファイアは、ヘパリン、低分子量ヘパリン、直接要因阻害剤、直接トロンビン阻害剤、アンチトロンビンタンパク質、リバーロキサバン、アピキサバン、ダビガトラン、クマリン、ヒルジン、レピルジン、ビバリルジン、アルガトロバン、ダビガトラン、バトロキソビン、ヘメンチンのうちの 1 つを含む、請求項 4 5 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 4 7】

前記モディファイアは補助食品誘導体を含む、請求項 4 4 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 4 8】

前記モディファイアは抗血小板薬を含む、請求項 4 4 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 4 9】

前記モディファイアは、不可逆性シクロオキシゲナーゼ阻害剤、アデノシンニリン酸 (ADP) 受容体阻害剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤、糖タンパク質 I I b / I I I a 阻害剤、アデノシン再取込み阻害剤、またはトロンボキサン阻害剤を含む、請求項 4 8 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 5 0】

前記血液サンプルの前記第 1 の部分および前記血液サンプルの前記第 2 の部分各々から凝固成分を除去することによって凝固反応の特定の側面の分離性を高めることをさらに含む、請求項 4 4 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 5 1】

前記血液サンプルの前記第 1 の部分および前記血液サンプルの前記第 2 の部分各々から血小板を除去することによってフィブリン形成の分離性を高めることをさらに含む、請求項 5 0 に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項 5 2】

前記ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第 3 の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で前記血液サンプルの第 3 の部分を駆動することと、

10

20

30

40

50

第2のモディファイアを前記血液サンプルの第3の部分または前記第3の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することと、

前記実質的に一定の流量で前記第3の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルの第3の部分が移動している間に、前記第2の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、

前記血液サンプルの第3の部分が流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、

前記血液サンプルの第2の部分の第2の圧力値が求めた前記血液サンプルの第3の部分の第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、

前記血液サンプルの第2の部分の第3の圧力値が求めた前記血液サンプルの第3の部分の第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間を用いて、前記血液サンプルの前記第3の部分についての以下の関係によって、前記血液サンプルの前記第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることとを含み、

【数13】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

式中、 T_{pf} は前記第2の時間、 T_{pg} は前記第1の時間であり、

前記血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを、前記血液サンプルの第3の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルと比較することにより、前記第2のモディファイアの効果を判断することとを含み、

前記第2のモディファイアは前記モディファイアと異なる、請求項46に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項53】

前記第2のモディファイアは、前記モディファイアと同一の物質であるが、量または濃度が異なる、請求項52に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項54】

血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法であって、

ミクロ流体装置の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルの第1の部分を駆動することと、

前記実質的に一定の圧力で前記第1の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルの前記第1の部分が移動している間に、前記第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、

前記血液サンプルの前記第1の部分が流れ始めたときの第1の流量値を求ることと、

前記血液サンプルの前記第1の部分の第2の流量値が前記血液サンプルの前記第1の部分の求めた前記第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、

前記血液サンプルの前記第1の部分の第3の流量値が前記血液サンプルの前記第1の部分の求めた前記第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間を用いて、以下の関係によって、前記血液サンプルの前記第1の部分のチャネル閉塞を予測する第1の凝固モデルを定めることとを含み、

【数14】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qg}}{T_{qf}-T_{qg}}}}$$

式中、 T_{qf} は前記第2の時間、 T_{qg} は前記第1の時間であり、

前記ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第2の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルの第2の部分を駆動する

10

20

30

40

50

ことと、

モディファイアを前記血液サンプルの前記第2の部分または前記第2の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することと、

前記実質的に一定の圧力で前記第2の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプルの前記第2の部分が移動している間に、前記第2の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、

前記血液サンプルの前記第2の部分が流れ始めたときの第1の流量値を求ることと、

前記血液サンプルの前記第2の部分の第2の流量値が前記血液サンプルの前記第2の部分の求めた前記第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、

前記血液サンプルの前記第2の部分の第3の流量値が前記血液サンプルの前記第2の部分の求めた前記第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間用いて、前記血液サンプルの前記第2の部分についての以下の関係によって、前記血液サンプルの前記第2の部分のチャネル閉塞を予測する第2の凝固モデルを定めることとを含み、

【数15】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t - T_{q_f}}{T_{q_f} - T_{q_g}}}}$$

式中、 T_{q_f} は前記第2の時間、 T_{q_g} は前記第1の時間であり、

前記血液サンプルの前記第1の部分のチャネル閉塞を予測する前記凝固モデルを、前記血液サンプルの前記第2の部分のチャネル閉塞を予測する前記凝固モデルと比較することにより、前記モディファイアの効果を判断することを含む、方法。

【請求項55】

前記モディファイアは抗凝固剤を含む、請求項54に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項56】

前記モディファイアは、ヘパリン、低分子量ヘパリン、直接要因阻害剤、直接トロンビン阻害剤、アンチトロンビンタンパク質、リバーロキサバン、アピキサバン、ダビガトラン、クマリン、ヒルジン、レピルジン、ビバリルジン、アルガトロバン、ダビガトラン、バトロキソビン、ヘメンチンのうちの1つを含む、請求項55に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項57】

前記モディファイアは補助食品誘導体を含む、請求項55に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項58】

前記モディファイアは抗血小板薬を含む、請求項54に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項59】

前記モディファイアは、不可逆性シクロオキシゲナーゼ阻害剤、アデノシンニリン酸(ADP)受容体阻害剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤、糖タンパク質IIb/IIa阻害剤、アデノシン再取込み阻害剤、またはトロンボキサン阻害剤を含む、請求項58に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項60】

前記ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第3の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で前記血液サンプルの第3の部分を駆動することと、

第2のモディファイアを前記血液サンプルの第3の部分または前記第3の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することと、

前記実質的に一定の圧力で前記第3の複数のマイクロチャネルを通して前記血液サンプ

10

20

30

40

50

ルの第3の部分が移動している間に、前記第3の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、

前記血液サンプルの第3の部分が流れ始めたときの第1の流量値を求ることと、

前記血液サンプルの第3の部分の第2の流量値が求めた前記血液サンプルの第3の部分の第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、

前記血液サンプルの第3の部分の第3の流量値が前記血液サンプルの第3の部分の求めた前記第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることと、

前記第1の時間と前記第2の時間を用いて、前記血液サンプルの前記第3の部分についての以下の関係によって、前記血液サンプルの第3の部分のチャネル閉塞を予測する第3の凝固モデルを定めることとを含み、

10

【数16】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qf}}{T_{qf}-T_{qg}}}}$$

式中、 T_{qf} は前記第2の時間、 T_{qg} は前記第1の時間であり、

前記血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを、前記血液サンプルの第3の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルと比較することにより、前記第2のモディファイアの効果を判断することとを含み、

前記第2のモディファイアは前記モディファイアと異なる、請求項54に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

20

【請求項61】

前記第2のモディファイアは、前記モディファイアと同一の物質であるが、量または濃度が異なる、請求項60に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項62】

前記血液サンプルの前記第1の部分および前記血液サンプルの前記第2の部分各々から凝固成分を除去することによって凝固反応の特定の側面の分離性を高めることをさらに含む、請求項54に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

30

【請求項63】

前記血液サンプルの前記第1の部分および前記血液サンプルの前記第2の部分各々から血小板を除去することによってフィブリン形成の分離性を高めることをさらに含む、請求項62に記載の血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法。

【請求項64】

インピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置であって、

入口端と出口端を有する複数のマイクロチャネルを定める少なくとも1つの基板を備え、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは少なくとも第1の部分と第2の部分と第3の部分とを含み、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記第1の部分において収束部分を含み、前記第1の部分において前記マイクロチャネルの断面積は、第1の断面積から、より小さい第2の断面積に減少し、前記マイクロチャネルの断面積は前記第2の部分において少なくとも実質的に維持され、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記第3の部分において発散部分を含み、前記発散部分は、前記マイクロチャネルの断面積の、前記第2の断面積からより大きな第3の断面積への移行を定め、前記第3の断面積は前記第1の断面積と同一でも異なっていてもよく、前記装置は、

40

前記基板の第1の端部における第1のポートを備え、前記第1のポートは前記複数のマイクロチャネルのそれぞれの入口端に接続し、

前記基板の第2の端部における第2のポートを備え、前記第2のポートは前記複数のマイクロチャネルのそれぞれの出口端に接続し、

50

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記収束部分において第1の壁

せん断勾配を生じさせるように構成され、

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記発散部分において第2の壁せん断勾配を生じさせるように構成され、

前記第1の壁せん断勾配および前記第2の壁せん断勾配は、任意のマイクロチャネル血栓形成促進もしくは抗血栓形成アンタゴニストまたは任意のマイクロチャネル表面処理と組合せて、インピトロ凝固時間が約2～60分の間になるように選択される、インピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項65】

前記インピトロ凝固時間は2～20分の間である、請求項64に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項66】

前記収束部分における前記第1の壁せん断勾配または前記発散部分における前記第2の壁せん断勾配のうちの少なくとも一方は、平均壁せん断の倍数の最大壁せん断勾配をもたらす、請求項64に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項67】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つはヒトコラーゲンIでコーティングされる、請求項64に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項68】

前記ヒトコラーゲンIの濃度は約10～250μg/mlの範囲に含まれる、請求項67に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項69】

前記第2の部分における前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つのチャネル幅は約200μmである、請求項64に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項70】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの少なくとも一部分を撮像するように構成された撮像システムをさらに備える、請求項64に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項71】

前記撮像システムは自動撮像プロトコルを含む、請求項70に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項72】

前記撮像システムは共焦点撮像またはオンチップフローサイトメトリを含む、請求項71に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項73】

前記撮像システムは、血小板凝集体を測定するように、または、凝固に対する、血小板アクティベータ、血液の細胞成分、または細胞の効果を撮像するように、構成される、請求項71に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項74】

前記第1のポートと前記第2のポートのうちの一方は、カテーテルまたは体外装置を介して患者に接続される、請求項64に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項75】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは複数のマイクロチャネルを含む、請求項64～74のいずれか一項に記載のインピトロ血液分析アッセイミクロ流体凝固装置。

【請求項76】

インピトロ血液分析アッセイの方法であって、

入口端と出口端を有する複数のマイクロチャネルを定める少なくとも1つの基板を備えたミクロ流体凝固装置を与えることを含み、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なく

10

20

30

40

50

とも1つは第1の部分と第2の部分と第3の部分とを含み、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記第1の部分において収束部分を含み、前記第1の部分において前記マイクロチャネルの断面積は、第1の断面積から、より小さい第2の断面積に減少し、前記マイクロチャネルの断面積は前記第2の部分において少なくとも実質的に維持され、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記第3の部分において発散部分を含み、前記発散部分は、前記マイクロチャネルの断面積の、前記第2の断面積からより大きな第3の断面積への移行を定め、前記第3の断面積は前記第1の断面積と同一でも異なっていてもよく、前記ミクロ流体装置はさらに、前記基板の第1の端部における第1のポートを備え、前記第1のポートは前記複数のマイクロチャネルそれぞれの入口端に接続し、前記基板の第2の端部における第2のポートを備え、前記第2のポートは前記複数のマイクロチャネルのそれぞれの出口端に接続し、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記収束部分において第1の壁せん断勾配を生じさせるように構成され、前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは前記発散部分において第2の壁せん断勾配を生じさせるように構成され、

前記方法はさらに、

患者の血管を、カテーテルまたは体外装置を介して前記ミクロ流体凝固装置の第1のポートと第2のポートのうちの一方に接続することと、

患者から前記ミクロ流体凝固装置を通して血液を送ることと、

前記ミクロ流体凝固装置において前記患者からの血液の血液学的挙動を分析することとを含み、

前記第1の壁せん断勾配および前記第2の壁せん断勾配は、任意のマイクロチャネル血栓形成促進もしくは抗血栓形成アンタゴニストまたは任意のマイクロチャネル表面処理と組合せて、インピトロ凝固時間が約2～60分の間になるように選択される、方法。

【請求項77】

前記インピトロ凝固時間は2～20分の間である、請求項76に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項78】

前記収束部分における前記第1の壁せん断勾配または前記発散部分における前記第2の壁せん断勾配のうちの少なくとも一方は、平均壁せん断の倍数の最大壁せん断勾配をもたらす、請求項76に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項79】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つはヒトコラーゲンIでコーティングされる、請求項76に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項80】

前記ヒトコラーゲンIの濃度は約10～250μg/mlの範囲に含まれる、請求項79に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項81】

前記第2の部分における前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つのチャネル幅は約200μmである、請求項76に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項82】

撮像システムを用いて前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの少なくとも一部分を撮像することをさらに含む、請求項76に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項83】

前記撮像システムは自動撮像プロトコルを含む、請求項82に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項84】

前記撮像システムは共焦点撮像またはオンチップフローサイトメトリを含む、請求項83に記載のインピトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項85】

10

20

30

40

50

前記撮像システムは、血小板凝集体を測定するように、または、凝固に対する、血小板アクティベータ、血液の細胞成分、または細胞の効果を撮像するように、構成される、請求項 8 3 に記載のインビトロ血液分析アッセイの方法。

【請求項 8 6】

前記複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つは複数のマイクロチャネルを含む、請求項 7 6 ~ 8 5 のいずれか一項に記載のインビトロ血液分析アッセイの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2013年10月16日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 8 9 1 , 7 3 2 号に基づく利益を主張し、その内容全体を本明細書に引用により援用する。

【0 0 0 2】

合衆国政府の助成による研究に関する陳述

本開示のいくつかの側面は、国防高等研究計画局 (Defence Advanced Research Projects Agency (DARPA)) から授与された助成金 N o . N 6 6 0 0 1 - 1 1 - 1 - 4 1 8 0 および H R 0 0 1 1 - 1 3 - C - 0 0 2 5 を受けて政府の支援の下でなされ、政府は本開示のこのような側面に対する権利を共有する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

発明の分野

本発明は、概してミクロ流体診断装置、システム、および方法に関し、より具体的には、全血凝固のリアルタイム評価のためのミクロ流体診断装置、システム、および方法に関する。

【0 0 0 4】

発明の背景

ヘパリンまたはクマジン等の抗凝固剤による血栓症の予防は、多くの病気および症状（たとえば、心房細動、敗血症、外傷、人工弁、さまざまな凝固障害、またはその他の出血障害）の治療にとって重要であり、また、透析、血液濾過、体外酸素化 (ECMO)、血管形成術、静脈内流体送達、アフェレーシス、および解析または培養のための血液サンプルの収集を含む、多くの救命処置にとって重要である。血栓症は、血小板の活性化および凝固カスケードが原因である可能性があるので、抗凝固療法は一般的に抗血小板療法によって補われる。したがって、診療室において包括的な抗凝固をリアルタイムでモニタリングできることが、極めて有用であろう。なぜなら、抗凝固剤レベルおよび血小板数の変動に対する凝固の反応は、患者によって大きく異なる可能性があり、同じ患者でも時間が異なれば大きく異なる可能性があるからである。しかしながら、現在、血液の抗凝固および抗血小板療法全体の程度および効率を迅速に定量的に確認することは困難であり、それを、患者本人の血液を使用することが可能な臨床で素早く行なう確実な方法はない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

現在、出血および血液の凝固に問題がある患者は、プロトロンビン時間 (Prothrombin Time (PT)) および活性化全凝固時間 (Activated Clotting Time (ACT)) / 活性化部分凝固時間 (Activated Partial Clotting Time (APTT)) を使用して定期的にモニタリングされており、これは、外因系または内因系の凝固経路の半定量的な測定値をそれぞれ提供する。しかしながら、これらアッセイによって得られた結果は、サンプルの調製、抗凝固管、アクティベータの追加、機器、およびユーザの能力によって、大きなばらつきがある。結果として、異なる部位でまたは異なる日に行なわれた同一サンプルに対する測定が、異なる結果をもたらすことが多い。また、これらテストの特異度および感度が良くないので、診療所において陽性症例または陰性症例が間違いであることが多い。加

10

20

30

40

50

えて、P T、A C T、およびA P T T アッセイは、血小板機能に関する情報は提供しないので、包括的な凝固テストとして機能しない。従来の血液凝固時間テストには限界があるので、トロンボエラストグラフィ (T E G) および回転トロンボエラストメトリ (R O T E M) 装置等の新たなポイントオブケアモニタリングシステムを臨床研究室に統合することが開始されている。これら装置は、止血に関するより多くの情報を提供できる。なぜなら、これら装置は、凝固反応に対する、血漿、血小板、白血球、および赤血球の累積的な寄与を測定するからである。しかしながら、これらテストは、静止条件（流れなし）下で凝固特性を測定するので、圧力および流量を含む物理的な力に対する感度が高い血小板および内皮細胞機能に対する臨床的有用性に限界がある。たとえば、血液における流体せん断応力およびせん断応力の勾配は、血小板活性化および血栓症に対して大きな影響力があるので、流体力学と取入れていない凝固モニタは、生体患者の脈管構造内で血液凝固生理機能が生じるときにこれを正確に評価できない。

10

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

発明の概要

関連する血行力学の力学的作用（せん断応力および勾配）を取り入れ、サンプル調製またはオペレータの訓練を最小に（またはなしに）してインビボまたはエクスピボで実施することができ、体外血液かん流システム（たとえば透析、血液濾過、E C M O）と統合された、凝固モニタリング技術は、止血評価を大幅に向上させるとともに、診療所または研究室における患者または被験者の治療（たとえばヒト患者／被験者、動物患者／被験者）能力を大幅に向上させるであろう。本明細書に開示されるミクロ流体装置、システム、および方法は、血栓症の力学の解明と、生理学的流体せん断応力条件および病理学的流体せん断応力条件双方の下でのクロット形成の定量分析の支援双方に役立ち得る、生理学的に関連するベッドサイドまたはラボベンチテストを開発することにより、このまだ満たされていない臨床要求を満たす機会を提供し、装置は患者の血管に直接装着することができる。

20

【0 0 0 7】

一例として、以下でより詳細に説明するように、このコンセプトのうちの少なくともいくつかの一実施形態は、矩形マイクロチャネル（ $75 \times 200 \mu\text{m}$ ）のネットワークが中に確定されたポリジメチルシロキサン（P D M S）を含むミクロ流体装置を含み、これらマイクロチャネルのサイズは、直径 $125 \mu\text{m}$ の生体小動脈（図1）にほぼ等しい。このミクロ流体装置およびシステムは、臨床またはポイントオブケア用途（たとえばベッドサイド対応）に適しており、全血液（たとえばヒトの血液、動物の血液）の血栓の可能性および血小板凝集をリアルタイムで測定するように構成される。

30

【0 0 0 8】

このコンセプトに従い、クロット形成を原因とする装置内のマイクロチャネルの全閉塞を、たとえば、動的に測定し、その一方で、抗凝固剤（たとえば未分画ヘパリン）の濃度または加えられる壁せん断応力およびせん断応力の勾配を独立して制御する。

【0 0 0 9】

インビボにおける血管の血栓症が、血流が血液の循環においてどのように維持されるかに依存する（たとえば、ヒトの心臓は動脈循環において比較的一定の流量が維持されるように血液を送出し、一方、静脈循環ではほぼ一定の圧力が維持される）ことを無視する現在の静止凝固評価装置とは異なり、開示されている凝固モニタリングミクロ流体装置の少なくともいくつかの側面は、シリングポンプまたは一定圧力ポンプいずれかを用いて、実質的に一定の流量の動作モードおよび／または実質的に一定の圧力の動作モードにおいて、血液を送出するように構成される。実質的に一定の流量または実質的に一定の圧力のパラメータはまた、必要に応じて独立して変化させることができる。

40

【0 0 1 0】

このコンセプトの少なくともいくつかの側面に従い、ミクロ流体チャンネル内の凝固は、圧力上昇（流量が一定流量の動作モードにおいて実質的に一定のとき）、または、流量低下（圧力が一定圧力の動作モードにおいて実質的に一定のとき）を記録することによっ

50

て特徴付けられ、実験によって実証された本明細書に記載の現象論的数学的モデルを用いて、特定患者用または特定被験者用の、全血液凝固の時間的な力学についての1つ以上の予測モデルを開発する。これらのモデルそれぞれの特徴的な時定数は、せん断流の下での血液の凝固時間を表わす。これら時定数は、患者特有または被験者特有のものなので、臨床医が、生理学的に関連する条件下で、血栓形成性、血小板機能、出血障害、および抗凝固治療を、定量、モニタリング、および追跡する、通常の診断テストとして、求めることができる。

【0011】

現在の凝固モニタリング機器は、ばらつきが大きく、信頼性を欠いた非生理学的な凝固時間を報告することが多い。本発明者らは、これら現在の凝固モニタリング機器の精度は低いと判断した。なぜなら、これら機器は、患者ごとに異なり得るものであって、かつ日によっても異なり得る、血液流動学および流体力学的せん断応力とその勾配の、止血および血栓症に対する寄与を測定しないからである。したがって、本コンセプトは、関連する流動血行力学を取り入れた、ミクロ流体装置、システム、および方法に関連し、血液凝固の臨床評価を著しく改善することができる凝固作用の定量測定を提供する。これは、体外血液かん流装置等のその他のシステムと好都合に統合することができる。

【0012】

本コンセプトのある側面に従う、ミクロ流体凝固装置は、複数のマイクロチャネルを定める少なくとも1つの基板と、基板の第1の端部にある第1のポートとを備え、第1のポートは複数のマイクロチャネルそれぞれの入口端部に接続する。ミクロ流体凝固装置は、基板の第2の端部にある第2のポートを備え、第2のポートは複数のマイクロチャネルそれぞれの出口端部に接続する。差圧または流量/せん断が第1のポートを通して与えられるようにする装置が設けられて血液サンプルを複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で駆動する。第1の検知装置が、複数のマイクロチャネル内の圧力値または複数のマイクロチャネル全体の圧力に関連する圧力値を求めるように構成され、時間を計測するタイマーが設けられる。さらに、ローカルおよび/またはリモートプロセッサでもよい1つ以上のプロセッサを含み得るコントローラが、第1の検知装置およびタイマーと組合されて、流れ始めたときの第1の圧力値、第2の圧力値が求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間、および、第3の圧力値が求めた第1の圧力値の約(1+e)倍となる第2の時間を求めるように構成され、かつさらに、以下の関係に従ってチャネル閉塞を予測する被験者凝固モデルを定めるように構成される。

【0013】

【数1】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t - T_{p2}}{T_{p1} - T_{p2}}}$$

【0014】

式中、 T_{p1} は第2の時間、 T_{p2} は第1の時間である。

本コンセプトの別の側面において、ミクロ流体凝固装置は、複数のマイクロチャネルを定める少なくとも1つの基板と、基板の第1の端部にある第1のポートとを備え、第1のポートは複数のマイクロチャネルそれぞれの入口端部に接続する。ミクロ流体凝固装置は、基板の第2の端部にある第2のポートを備え、第2のポートは複数のマイクロチャネルそれぞれの出口端部に接続する。差圧を第1のポートを通して与える装置が第1のポートに装着されて血液サンプルを複数のマイクロチャネルを通して駆動する。第1の検知装置は、複数のマイクロチャネル内の流量または複数のマイクロチャネルに関連する流量を求めるように構成され、時間を計測するタイマーが設けられる。ローカルおよび/またはリモートプロセッサでもよい1つ以上のプロセッサを含み得るコントローラが、第1の検知装置およびタイマーと組合されて、(i)流れ始めたときに対応する第1の時間における第1の流量値、(ii)第2の流量値が求めた第1の流量値の約二分の一と判断される第

10

20

30

40

50

2の時間、(i i i)第3の流量値が求めた第1の流量値の約(1+e)分の1と判断される第3の時間、および、(i v)以下の関係によって支配されるチャネル閉塞を予測する患者血液凝固モデルを求めるように構成される。

【0015】

【数2】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qg}}{T_{qf}-T_{qg}}}}$$

【0016】

式中、 T_{q_f} は第3の時間、 T_{q_g} は第2の時間である。

本コンセプトの他の側面において、被験者の血液の凝固を評価する方法は、ミクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で被験者からの血液サンプルを駆動することと、実質的に一定の流量で複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルが移動している間に、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することとを含む。この方法はまた、流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、第2の圧力値が求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、第3の圧力値が求めた第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることとを含む。この方法はさらに、第1の時間と第2の時間を用いて、以下の関係によって、被験者のチャネル閉塞を予測する被験者特有の凝固モデルを定めることとを含む。

【0017】

【数3】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

【0018】

式中、 T_{p_f} は第2の時間、 T_{p_g} は第1の時間である。この方法はさらに、定めた被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することとを含む。

【0019】

本コンセプトのさらに他の側面において、被験者の血液の凝固を評価する方法は、ミクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で被験者の血液サンプルを駆動することと、実質的に一定の圧力で複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルが移動している間に、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することとを含む。この方法はさらに、流れ始めたときの第1の流量値を求ることと、第2の流量値が求めた第1の流量値の約二分の一と判断される第1の時間を求ることと、第3の流量値が求めた第1の流量値の約(1+e)分の一と判断される第2の時間を求ることと、第1の時間と第2の時間を用いて、以下の関係によって、被験者のチャネル閉塞を予測する被験者特有の凝固モデルを定めることとを含む。

【0020】

【数4】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qg}}{T_{qf}-T_{qg}}}}$$

【0021】

式中、 T_{q_f} は第2の時間、 T_{q_g} は第1の時間である。この方法はまた、定めた被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することとを含む。

10

20

30

40

50

【0022】

本コンセプトのさらに他の側面において、被験者の血液の凝固を評価する方法は、第1のミクロ流体装置の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で被験者の第1の血液サンプルを駆動することと、実質的に一定の流量で第1の複数のマイクロチャネルを通して第1の血液サンプルが移動している間に、第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することとを含む。この方法はまた、流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、第2の圧力値が求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、第3の圧力値が求めた第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることとを含む。この方法はさらに、第1の時間と第2の時間を用いて、以下の関係によって、チャネル閉塞を予測する第1の被験者凝固モデルを定めることを含む。

10

【0023】

【数5】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

【0024】

式中、 T_{pf} は第2の時間、 T_{pg} は第1の時間である。この方法はさらに、定めた第1の被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することを含む。加えて、この方法は、第1のミクロ流体装置の基板内にまたは第2のミクロ流体装置の基板内に形成された複数の第2のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で被験者の第2の血液サンプルを駆動することと、実質的に一定の圧力で複数の第2のマイクロチャネルを通して血液サンプルが移動している間に、複数の第2のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することとを含む。この方法はさらに、流れ始めたときの第1の流量値を求ることと、第2の流量値が求めた第1の流量値の約二分の一と判断される第1の時間を求ることと、第3の流量値が求めた第1の流量値の約(1+e)分の一と判断される第2の時間を求ることと、第1の時間と第2の時間を用いて、以下の関係によって、チャネル閉塞を予測する第2の被験者特有の凝固モデルを定めることを含む。

20

【0025】

【数6】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qg}}{T_{qf}-T_{qg}}}}$$

【0026】

式中、 T_{qf} は第2の時間、 T_{qg} は第1の時間である。この方法はさらに、定めた第2の被験者特有の凝固モデルを物理記憶媒体に記録することを含む。

30

【0027】

本コンセプトのさらに他の側面において、被験者の血液の凝固を評価する方法は、ミクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で血液サンプルを駆動することと、実質的に一定の流量で複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルが移動している間に、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することとを含む。この方法はさらに、流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、第2の圧力値が求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、第3の圧力値が求めた第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることとを含む。この方法はまた、チャネル閉塞を予測する被験者の凝固モデルを定めることと、以下の関係を用いて凝固時間を物理記憶媒体に記録することとを含む。

40

50

【 0 0 2 8 】

【 数 7 】

$$(T_{pg}, T_{pf}) = A_{(T_{pg}, T_{pf})} e^{B_{(T_{pg}, T_{pf})} C_{uh} - C_{(T_{pg}, T_{pf})} \gamma}$$

【 0 0 2 9 】

式中、A、B および C は、以下の関係をカーブフィッティングすることによって実験的に求められる血液の特性に関連する被験者特有の変数であり、

【 0 0 3 0 】

10

【 数 8 】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

【 0 0 3 1 】

式中、 T_{pf} は第 2 の時間、 T_{pg} は第 1 の時間である。

本コンセプトのさらに他の側面において、被験者の血液の凝固を評価する方法は、ミクロ流体装置の基板内に形成された複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルを駆動することと、実質的に一定の圧力で複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルが移動している間に、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の流量または流量に関連する変数を測定することとを含む。この方法はまた、流れ始めたときの第 1 の流量値を求ることと、第 2 の流量値が求めた第 1 の流量値の約二分の一と判断される第 1 の時間を求ることと、第 3 の流量値が求めた第 1 の流量値の約 $(1 + e)$ 分の一と判断される第 2 の時間を求ることとを含む。この方法はまた、以下の関係を用いて凝固時間を物理記憶媒体に記録することを含む。

20

【 0 0 3 2 】

【 数 9 】

$$(T_{qg}, T_{qf}) = A_{(T_{qg}, T_{qf})} \gamma^{\omega} e^{B_{(T_{qg}, T_{qf})} C_{uh} - C_{(T_{qg}, T_{qf})} \gamma}$$

30

【 0 0 3 3 】

式中、A、B、C および ω は、以下の関係をカーブフィッティングすることによって実験的に求められる血液の特性に関連する被験者特有の変数であり、

【 0 0 3 4 】

【 数 1 0 】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qg}}{T_{qf}-T_{qg}}}}$$

40

【 0 0 3 5 】

式中、 T_{pf} は第 2 の時間、 T_{pg} は第 1 の時間である。

本コンセプトのさらに他の側面において、血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法は、ミクロ流体装置の基板内に形成された第 1 の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で血液サンプルの第 1 の部分を駆動することと、実質的に一定の流量で第 1 の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第 1 の部分が移動している間に、第 1 の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第 1 の部分が流れ始めたときの第 1 の圧力値を求ることと、血液サンプルの第 1 の部分の第 2 の圧力値

50

が血液サンプルの第1の部分の求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求めるることとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分の第3の圧力値が血液サンプルの第1の部分の求めた第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求めるることと、第1の時間と第2の時間を用いて、血液サンプルの第1の部分についての以下の関係によって、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることとを含む。

【0036】

【数11】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

10

【0037】

式中、 T_{pf} は第2の時間、 T_{pg} は第1の時間である。この方法はさらに、ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第2の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の流量で血液サンプルの第2の部分を駆動することと、モディファイアを血液サンプルの第2の部分または第2の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することとを含む。この方法はさらに、実質的に一定の流量で第2の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第2の部分が移動している間に、第2の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、血液サンプルの第2の部分が流れ始めたときの第1の圧力値を求めることと、血液サンプルの第2の部分の第2の圧力値が血液サンプルの第2の部分の求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求めるることとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第2の部分の第3の圧力値が血液サンプルの第2の部分の求めた第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求めるることと、第1の時間と第2の時間を用いて血液サンプルの第2の部分についての以下の関係によって、血液サンプルの第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることとを含む。

20

【0038】

【数12】

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}$$

30

【0039】

式中、 T_{pf} は第2の時間、 T_{pg} は第1の時間である。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを、血液サンプルの第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルと比較することにより、モディファイアの効果を判断することとを含む。

【0040】

本コンセプトの別の側面において、血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する方法は、ミクロ流体装置の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルの第1の部分を駆動することと、実質的に一定の圧力で第1の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第1の部分が移動している間に、第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の流量または流量に関連する変数を測定することとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分が流れ始めたときの第1の流量値を求めることがと、血液サンプルの第1の部分の第2の流量値が求めた第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求めることがと、血液サンプルの第1の部分の第3の流量値が求めた第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求めることがとを含む。この方法はさらに、第1の時間と第2の時間を用いて、以下の関係によって、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する第1の凝固モデルを定める

40

50

こととを含む。

【0 0 4 1】

【数 1 3】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t - T_{qg}}{T_{qf} - T_{qg}}}}$$

【0 0 4 2】

式中、 T_{q_f} は第 2 の時間、 T_{q_g} は第 1 の時間である。この方法はさらに、ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第 2 の複数のマイクロチャネルを通して実質的に一定の圧力で血液サンプルの第 2 の部分を駆動することと、モディファイアを血液サンプルの第 2 の部分または第 2 の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することとを含む。この方法はさらに、実質的に一定の圧力で第 2 の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第 2 の部分が移動している間に、第 2 の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも 1 つの中の流量または流量に関連する変数を測定することと、血液サンプルの第 2 の部分が流れ始めたときの第 1 の流量値を求ることとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第 2 の部分の第 2 の流量値が血液サンプルの第 2 の部分の求めた第 1 の流量値の約 2 倍と判断される第 1 の時間を求ることと、血液サンプルの第 2 の部分の第 3 の流量値が血液サンプルの第 2 の部分の求めた第 1 の流量値の約 $(1 + e)$ 倍と判断される第 2 の時間を求ることとを含む。この方法はさらに、第 1 の時間と第 2 の時間を用いて、血液サンプルの第 2 の部分についての以下の関係によって、血液サンプルの第 2 の部分のチャネル閉塞を予測する第 2 の凝固モデルを定めることとを含む。

【0 0 4 3】

10

20

【数14】

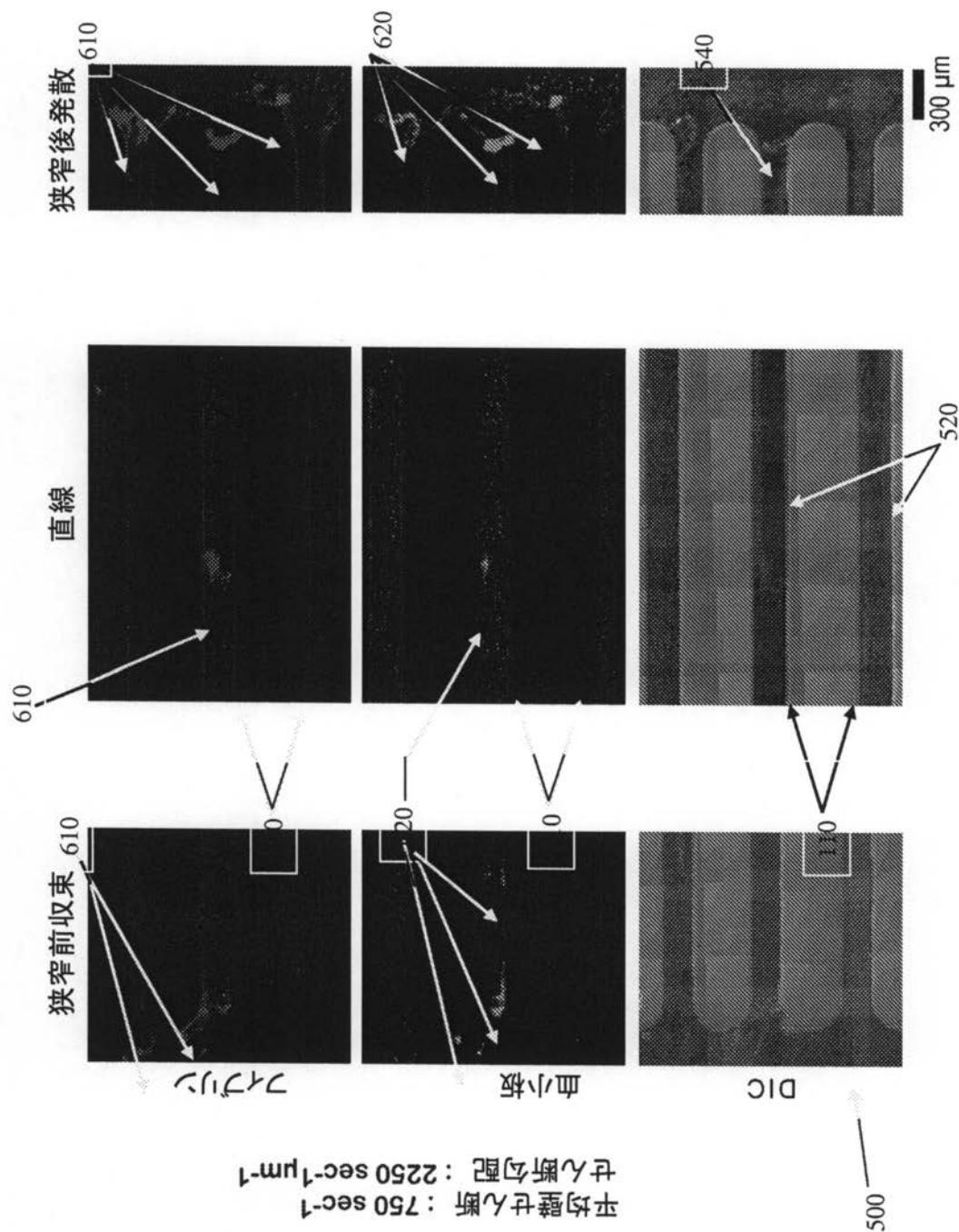


FIGURE 14

【0044】

式中、 T_{q_f} は第 2 の時間、 T_{q_g} は第 1 の時間である。この方法はさらに、血液サンプルの第 1 の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを、血液サンプルの第 2 の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルと比較することにより、モディファイアの効果を判断することを含む。

【0045】

本発明の他の側面は、当業者にとって、さまざまな実施形態の詳細な説明に鑑みれば明らかであろう。詳細な説明は図面を参照しながらなされ、図面の簡単な説明は次の通りである。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従うミクロ流体凝固装置の図を示す。

【図2】図2A～図2Bは、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、図1のミクロ流体凝固装置を利用した、標識フィブリノゲンの蛍光タイムラプス顕微鏡検査法を用いた血栓形成の力学を示す。

【図3】図3A～図3Dは、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、注入または圧力ポンプモード下で動作させる図1に従うミクロ流体装置における全血液凝固の定量的評価を示す。

【図4】図4A～図4Dは、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、未分画ヘパリン濃度およびせん断速度の関数としての現象論的解析モデルから得られた凝固時間10を示す。

【図5】図5A～図5Cは、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、ミクロ流体凝固測定装置を用いた血小板凝集の解析を示す。

【図6】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、装置動作の注入モードおよび圧力モード双方について、さまざまなせん断速度およびヘパリン濃度で、凝固力学の数学的関係である式(1)および式(2)から得られた、それぞれのカーブフィットの適合度パラメータ R^2 を示す表である。

【図7】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、装置動作の注入モードおよび圧力モード双方について、さまざまなせん断速度およびヘパリン濃度で、凝固時間の数学的関係から得られた、それぞれのカーブフィットの適合度パラメータ R^2 を示す表である。

【図8】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、凝固時間対ヘパリン濃度の数学的モデルのパラメータの平均最良適合値を示す表である。

【図9】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、凝固時間対せん断速度の数学的モデルのパラメータの平均最良適合値を示す表である。

【図10】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、注入ポンプモードまたは圧力ポンプモードで動作するミクロ流体装置における全血液凝固の定量的評価の解析モデルを示し、注入モードでは流量の減衰はS字傾向を示し、圧力モードでは圧力の増加は指数関数的であり、凝固時間は、解析モデルの等式をそれぞれの測定値に適合させることによって得ることができる。

【図11】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、図1のミクロ流体装置を通してかん流させた、クエン酸ナトリウムに入れられた全血液を示し、動作の注入モードおよび圧力モードそれぞれにおける $P(0)$ および $Q(0)$ を予測するための P - Q 応答曲線が示される。

【図12】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、せん断速度/応力の関数として凝固モニタリングミクロ流体装置における全血液の凝固時間を予測するための解析モデルを示す。

【図13A】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、せん断速度とせん断速度の勾配を示す、バイオミメティック血管網における血流の計算モデリングを示す。

【図13B】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、せん断速度とせん断速度の勾配を示す、バイオミメティック血管網における血流の計算モデリングを示す。

【図13C】本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、せん断速度とせん断速度の勾配を示す、バイオミメティック血管網における血流の計算モデリングを示す。

【図14】フィブリンおよび血小板付着に対するせん断およびせん断勾配の効果を示し、図13A～図13Cに示されるミクロ流体装置の狭窄後/発散部分においてフィブリンおよび血小板付着が最大であることが示される。

【図15】図13A～図13Cに示されるミクロ流体装置で利用されるコラーゲンコーティングが、凝固モニタリングアッセイ時間を2～20分以内に短縮することを示す。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0047】

本発明では多くの異なる形態の実施形態が可能であるが、図面に示され本明細書で詳細に説明されるのは、本発明の好ましい実施形態であり、本開示は本発明の原理を例示するものとみなされるべきものであって本発明の広い側面を示されている実施形態に限定することは意図されていないことが理解される。

【0048】

発明の詳細な説明

本明細書に記載のように、発明者らは凝固力学がS字状であることを見出し、この観察に基づいて、発明者らは、抗凝固剤（ヘパリン）濃度または適用するせん断速度のいずれかを変化させたときの、注入モード双方における、全血凝固の時間的力学を正確に予測する、現象論的数学的モデルを開発し実験によって検証した。開発したモデルは2つの凝固時間を示す。一方は、凝固が始まる時間を示し、他方は、全血管閉塞が発生する時間を決定する。これらモデルはまた、フィブリノゲンの拡散的運搬および血小板凝集の生物物理学的効果を取り入れる。発明者らはさらに、ミクロ流体装置を、たとえば、自動蛍光撮像と統合することにより、凝固および血小板凝集の定量を同時に実行なえることを示した。したがって、本明細書に記載の多機能凝固解析システムは、ベッドサイドであっても研究室内であっても、患者または被験者（たとえば動物またはヒト）における凝固をモニタリングするための、定量的基準を提供することができる。

10

【0049】

本明細書に記載の、本コンセプトの一実施形態は、例として図1に示されるミクロ流体装置100である。この装置は、複数の平行なマイクロチャネル110を含み、これらマイクロチャネルは、直径125μmの血管を模倣したものであり、一定の流量でまたは一定の圧力でヒトの全血のうち少量（2～5mL）を注入したときの凝固力学をリアルタイムで解析できるようにする。本明細書に記載のデータを取得するために使用されるミクロ流体装置100は、図1に示されるように、幅200μm高さ75μmの12個の平行なレーンを含む。これらのレーンは、50mmの長さに亘って繰り返し60°曲げられ、高い流体力学抵抗をもたらすが、層流を維持する。

20

【0050】

以下で述べるように、このテスト構成において、ヒト全血のうちの2～5mLを、注入または圧力ポンプを通して、次に、適切な医療グレードの管（たとえば1.6mmID）を介してミクロ流体装置100のポート120a、120bに接続されているインライン圧力センサを通して、送出した。注入モードにおいて、クロットが形成されると、結果として圧力が増す。一方、一定圧力モードでは、流量が時間とともに低下する。これら結果を解析する際、現象論的数学的モデルとフィット回帰曲線を、それぞれ圧力または流量の変化に適用した。これらモデルの特徴的な定数は、2つの段階における凝固時間を示す。それは、クロット形成が加速するときと、クロットがチャネルを完全に閉塞したときである。凝固時間は、抗凝固剤（たとえばヘパリン）の濃度と加えられたせん断によって決まる。フィブリノゲンおよび血小板の蛍光顕微鏡検査により、フィブリン形成と血小板凝集を同時にリアルタイムでモニタリングすることができる。

30

【0051】

図1のミクロ流体装置100を用いて実施したテストにおいて、5mLのシリンジ（slip-tip Plastipak, BD, Franklin Lakes, NJ）に入れられた新鮮なヒトの血液を、インラインの使い捨て可能な圧力センサ（PREPS-N-000, PendoTECH, Princeton, NJ）を通して、次にPDMS装置を通して、血液を入れてから15分以内に、シリンジポンプ（PHD Ultra CP, Harvard Apparatus, Holliston, MA）を介して押出した。流量を一定に保ったとき、シリンジポンプは「注入」モードで動作し、チャネル閉塞を、データ取得および解析ソフトウェア（Winwedge Pro, TALtech, Philadelphia, PA）を用いて、時間の経過に伴なう圧力の上昇を記録することによって測定した。一定圧力動作モードにおいて、シリンジポンプを、圧力センサからのフィードバックを処理しモータ速度および流量を調節して設定圧力を維持する「圧力」モードで使用した。2.5インチおよび6インチの、3.2m

40

50

m O D、1.58 mm I Dの、医療グレード管 (Tygon S-50-HL, Saint Gobain Plastics, Merrimack, NH) を、装置のポート 120a、120b に接続した。構成された、入口側の管 125 の一端は圧力センサに接続され、この管の出力側は 3.8% クエン酸ナトリウムに浸される。シリنج、センサ、および管の内部でのクロット形成をさらに減じるために、血液に接触する面を、必要に応じて、滑りやすい液体を含浸した多孔質表面 (slippery liquid-infused porous surface) (SLIPS) 技術で処理した。低圧高周波プラズマ露出を用いて表面を活性化し、続いて、不活性シラン層の共有結合と、血液代用品で使用される医療グレードの液体パーフルオロカーボンの追加があった。シリنجポンプ内のシリنجは、2~3分ごとに手動で動かして、血中の赤血球が沈殿しないようにした。蛍光標識されたフィブリノゲン (150 mg / ml, Alexa Fluor 488, Invitrogen, Grand Island, NY) の撮像装置 130 のタイムラプス撮影を用いて、血栓形成を観察した。テスト機構において、使用した撮像装置 130 は蛍光撮像構成の Carl Zeiss の Axio 3 Observer 顕微鏡 (10 倍、NA 0.3 の対物レンズ) であったが、本コンセプトに従い他の撮像装置を容易に使用することができる。
10

【0052】

血小板を、2つの遠心分離 (200 g、次に 500 g) によって全血から単離し、10 分間、カルセインオレンジ (2 μM, Invitrogen, Grand Island, NY) で標識した。複数の蛍光顕微鏡画像を、近傍領域から、自動スキャンを用いて記録し、つなぎ合わせて大領域パノラマを形成した。次に、大きな蛍光血小板凝集体の存在とサイズを、自動画像取込および画像解析プロトコルを用いて解析した。これらの実験において、ヘパリン濃度と壁せん断速度は独立して変化した。壁せん断応力 / 速度は、矩形マイクロチャネル 110 について得られた解析公式から求めた。
20

【0053】

本明細書に記載のテストで使用するミクロ流体装置 100 (図 1) は、フォトリソグラフィ、より具体的にはポリジメチルシロキサン (PDMS) のソフトリソグラフィを用いて Si ウェハ (University Wafer Corp., Boston, MA) 上に作成された SU8 2075 (MicroChem. Corp., Newton, MA) マスター・テンプレートを含む。27 Sylgard 184 PDMS プレポリマー (Dow Corning, Midland, MI) を、シラン処理されたマスタ上に与え、これは、SU-8 フォトレジストによって形成されたチャネル特徴のポジ型レリーフを有していた。次に、PDMS を、対流オープン内で 60 で 120 分間硬化させた。硬化した PDMS をマスタから剥がし、いずれも酸素プラズマ (Plasma Etch, Carson City, NV) で処理した後に、500 μm の高 PDMS コートガラスライドに結合した。ミクロ流体装置 100 は、使用前に、医学的に許容されている潤滑剤であるパーフルオロデカリ (PFD, Sigma-Aldrich) で満たした。
30

【0054】

説明を受け、Partners Healthcare および Harvard University の治験審査委員会 (Institutional Review Board) (IRB) の倫理ガイドラインに基づいた同意書を作成した、非喫煙者で健康なボランティアから、血液サンプルを、標準的な 6 ml の無添加血液バキュテナー (BD and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に採取し、直後に 1000 U / ml の未分画ヘパリンを必要な濃度になるように加えた。血液を取ってから 15 分以内に凝固実験を開始した。実験において、ヘパリン濃度は 0.25 U / ml 未満であり、血液は最初に 3.2% の 5 ml のクエン酸ナトリウムバキュテナー (BD and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に入れた。クエン酸塩添加血 (Research Blood Components, Brighton, MA, USA) も、いくつかの研究のために購入し、これらサンプルの凝固作用を、75 μl / ml の 100 mM 塩化カルシウム / 75 mM 塩化カルシウム溶液を加えることによって復元した。アスピリン (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を濃度を 20 mM になるようにリン酸緩衝液 (PBS) に溶かし、最終濃度が 500 μM になるように血液に加えた。プラスグレル (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を 1 mg / ml でジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かし、最終濃度が 25 μg / ml となるように血液に加えた。
40

【0055】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の統計解析では、特に指定しない限り、すべてのデータは平均 \pm S D で示される。両側の P 値は、平均を比較するために統計 t テストから得た。データ解析およびカーブフィッティングは、Graphpad Prism V6 (Graphpad Software, San Diego, CA) を用いて行なった。

【0056】

図 2 A ~ 図 2 B は、図 1 のミクロ流体凝固装置 100 を用いる本コンセプトの一側面に従う標識フィブリノゲンの蛍光タイムラプス顕微鏡検査を使用した、血栓形成の力学を示す。図 2 A において、最大値によって正規化された蛍光強度は、マイクロチャネル 110 内において時間の経過とともに S 字状傾向を示し、マイクロチャネルは結果として閉塞する。データは、3 パラメータ S 字状方程式を用いてフィットさせることができる。点線とシェーディングされたグレー領域は、フィットさせた曲線の 95 % の信頼区間を示し、n = 3, R² = 0.99 である。図 2 B は、0.75 U / m¹ のヘパリン抗凝固剤を含み与えられたせん断速度が 1250 sec⁻¹ である全血流について、蛍光フィブリノゲンのタイムラプス撮影から得られた、異なる 4 つの期間における標識フィブリノゲンの蛍光顕微鏡写真を、積重ねて示す。各図は、4 × 1 タイル (10 倍対物レンズ) をつなぎ合わせてスキャンしたものである。一番下の顕微鏡写真の右下にある白いスケールバーは 500 μ m である。

10

【0057】

図 3 A ~ 図 3 D は、注入または圧力ポンプモードで動作させた図 1 に従うミクロ流体装置 100 における全血凝固の定量的評価を示す。所与のせん断速度 / 応力 350 sec⁻¹ (14 ダイン / cm²) としてヘパリン濃度を変化させたとき、注入モードでは、圧力が時間とともに指数関数的に増し (図 3 A)、圧力モードでは、流量が時間とともに S 字状に低下している (図 3 B)。図 3 A ~ 図 3 B において、参照番号 300 a は流量 0 U / m¹ に対応するプロットを示し、参照番号 300 b は流量 0.25 U / m¹ に対応するプロットを示し、参照番号 300 c は流量 0.5 U / m¹ に対応するプロットを示し、参照番号 300 d は流量 1 U / m¹ に対応するプロットを示す。同様に、ヘパリン濃度 0.5 U / m¹ としてせん断速度 / 応力を変化させたとき、注入モードでは、圧力が時間とともに指数関数的に増し (図 3 C)、圧力モードでは、流量が時間とともに S 字状に低下している (図 3 D)。図 3 C ~ 図 3 D において、参照番号 310 a は流量 150 sec⁻¹ に対応するプロットを示し、参照番号 310 b は流量 350 sec⁻¹ に対応するプロットを示し、参照番号 310 c は流量 750 sec⁻¹ に対応するプロットを示し、参照番号 310 d は流量 1500 sec⁻¹ に対応するプロットを示す。図 3 A ~ 図 3 D において、実線は測定した量であり、点線は、本明細書で説明する解析モデルの式 (1) および式 (2) を用いた回帰曲線フィットの 95 % の信頼空間を示す。適合度パラメータ R² は図 6 の表に示されている。

20

30

【0058】

図 4 A ~ 図 4 D は、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、未分画ヘパリン濃度およびせん断速度の関数としての現象論的解析モデルから得られた凝固時間を示す。ヘパリン濃度を 0 ~ 1 U / m¹ の範囲で変化させ、せん断速度を 350 sec⁻¹ (14 ダイン / cm²) と 1250 sec⁻¹ (50 ダイン / cm²) に設定したとき、注入モード (図 4 A) における凝固時間 (T_{pg} および T_{pf}) と、圧力モード (図 4 B) における凝固時間 (T_{qg} および T_{qf}) は、ヘパリン濃度とともに指数関数的に増加している。図 4 A ~ 図 4 B において、参照番号 400 a は 350 sec⁻¹ における T_{pg}、T_{qg} に対応するプロットを示し、参照番号 400 b は 350 sec⁻¹ における T_{pg}、T_{qg} に対応するプロットを示し、参照番号 400 c は 1250 sec⁻¹ における T_{pg}、T_{qg} に対応するプロットを示し、参照番号 400 d は 1250 sec⁻¹ における T_{pg}、T_{qg} に対応するプロットを示す。せん断速度を 75 ~ 2500 sec⁻¹ (3 ~ 100 ダイン / cm²) の範囲で変化させ、ヘパリン濃度を 0.25 と 0.5 U / m¹ に設定したとき、注入モード (図 4 C) における凝固時間 (T_{pg} および T_{pf}) は指数関数的に減衰し、圧力モード (図 4 D) における凝固時間 (T_{qg} および T_{qf}) は、せ

40

50

ん断速度 / 応力に対して次の関係、凝固時間 = $Z_0 e^{-\gamma}$ に従っている。図 4 C ~ 図 4 Dにおいて、参考番号 410 a は 0.25 U/m l のときの T_{pg} 、 T_{qg} に対応するプロットを示し、参考番号 410 b は 0.25 U/m l のときの T_{pf} 、 T_{qf} に対応するプロットを示し、参考番号 410 c は 0.5 U/m l のときの T_{pg} 、 T_{qg} に対応するプロットを示し、参考番号 410 d は 0.5 U/m l のときの T_{pf} 、 T_{qf} に対応するプロットを示す。点線は解析関係にフィットさせた回帰曲線であり、 $n = 3$ の実験を各ケースにおいて実施した。各ケースの R^2 適合度パラメータは図 7 のグラフに示されている。

【0059】

図 5 A ~ 図 5 C は、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従うミクロ流体凝固測定装置 100 を用いた血小板凝集の解析を示す。図 5 A において、ミクロ流体装置 100 の蛍光画像を積重ねたものは、 $500 \mu \text{M}$ のアスピリンと $25 \mu \text{g/m l}$ のプラスグレルなしで（対照）、または $500 \mu \text{M}$ のアスピリンと $25 \mu \text{g/m l}$ のプラスグレルを用いて（薬剤）、図 1 のミクロ流体装置にヒトの全血を流したときの、蛍光標識された血小板の凝集体の形成を示す。図 5 A の中央の画像は、上下の画像よりも倍率設定が高い。スケールバー（図 5 の最も上のスライドの右上）は 5 mm である。図 5 B は、血小板抑制薬剤の組合せ（薬剤）を加えたことにより、装置を一定のせん断速度 1250 sec^{-1} ($n = 4$) で動作させた時と比較して凝固時間が延びることを示している。黒丸は対照を表わし、白丸は（線分の右側）は薬剤を表わす。図 5 C において、薬剤の組合せを追加することにより、対照の非処理のサンプルと比較して血液中の血小板凝集体の数が大幅に減少している (* $P < 0.05$ 、 $n = 5$)。

【0060】

ミクロ流体凝固装置 100 は、約 75 sec^{-1} ~ 2500 sec^{-1} (3 ~ 100 ダイン / cm^2) の範囲のせん断速度で、対応する流量を約 $5 \sim 150 \mu \text{l/min}$ の範囲に維持できるように、設計された。望ましくは、せん断速度は、設定されたせん断速度から所定の量を超えて変化しないように（たとえば設定値から 10% 以内、より好ましくは設定値から約 5% 以内、さらに好ましくは設定値から 2% 以内）実質的に一定に保たれる。使用される特定のミクロ流体凝固装置 100 について、上記範囲の外の流量は、結果として赤血球が頻繁に沈降することになるか、またはヒトの血液が大量に必要となるので、望ましくないことが分かった。しかしながら、異なるマイクロチャネル 110 の構成（たとえば異なる断面積）および/または異なる臨床パラメータ（たとえば患者のより多くの量の血液）の場合、確かに、約 75 sec^{-1} ~ 5000 sec^{-1} (3 ~ 200 ダイン / cm^2) の範囲のせん断速度で動作するために上記範囲外の流量となる可能性がある。一例として、図 13 A および図 14 のミクロ流体装置 100 におけるマイクロチャネル 110 の構成は、湾曲部分と直線部分を有し実質的に一定の断面積 520 のマイクロチャネルからなる複数のレーンに、流体を、収束ゾーン 500 (流速加速、狭窄前) を通して流入させる形状を与える。この流体は次に、発散部 540 (流速減速、狭窄後) を通って出て共通の出口に入る。ミクロ流体装置 100 の直線部のマイクロチャネル 110 のサイズは、低倍率 (10 倍、 0.3 N.A.) の対物レンズを用いてリアルタイムで光学顕微鏡撮影を行なえるサイズとした。これらの実用上の理由から、図 1 のミクロ流体装置 100 は、各々が幅が約 $200 \mu \text{m}$ で高さが約 $75 \mu \text{m}$ の 12 の平行なマイクロチャネル 110 を含む。マイクロチャネル 110 の矩形の断面表面積は直径 $125 \mu \text{m}$ の円形の小動脈に匹敵する。図 1 の構成で利用される圧力センサから良好な信号対雑音比を得るために、チャネル長を、可能な最大流体力学抵抗に対して最適化する一方で、ミクロ流体装置 10 の全長を制限して標準的なガラスの顕微鏡スライド ($50 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$) に合うようにした。これは、チャネルに、光学撮像を実施する装置の中心の 1 cm の直線部分を除いて、一連の 60° の屈曲部を入れることによって実現した（図 1）。マイクロチャネル 110 の特定の曲線構造は、標準のガラススライドを使用するという任意の形状の制約を想定して、使用するセンサ（たとえば圧力測定に使用する圧力センサ）から最良の信号対雑音比が得られるように、設計した。すなわち、これは流体力学抵抗のより小さな変化を測定

10

20

30

40

50

できる。より高額のまたはより高感度の圧力センサを用いる場合は、たとえば、マイクロチャネル 110 についての設計 - エンベロープが変わり、適切な信号対雑音比で異なる形状（たとえば直線状）を使用できるようになる。

【0061】

標準のガラスの顕微鏡スライド、低レイノルズ数の流れの所望の制約、および高い信号対雑音比に合うようにミクロ流体装置 100 のサイズを定める（たとえばマイクロチャネルの最小寸法を約 15 μm 最大寸法を約 1.5 ~ 2.0 mm に限定する）ことをただ優先するのでなければ、ミクロ流体装置 100 および / またはマイクロチャネル 110 のサイズの決定に制限はない。よって、ミクロ流体装置 100 は、本明細書に記載のものよりも寸法が大きくてはまたは小さくてもよく、さらに、マイクロチャネル 110 の数および / またはマイクロチャネルの構成を、自由に変化させてもよい（たとえば、マイクロチャネル 110 を直線状にしてもよく、立体形状で規定してもよい、等）。さらに、図示されていないが、マイクロチャネル 110 のうちの 1 つ以上は、任意で、この 1 つ以上のマイクロチャネルのうちのいずれかにさらに流体を導入できるよう、1 つ以上のさらに他のマイクロチャネル入口を有していてもよい。さらに導入される流体とは、たとえばマイクロチャネル内に流れに混入される薬剤である）。加えて、示されているミクロ流体装置 100 は、本明細書に記載のテストおよび解析を支援するように設計されたものであり、顕微鏡または撮像装置（たとえば図 1 の 130）の使用は本明細書に記載のミクロ流体装置に基づいた凝固システムに必要な側面ではないことを、強調しておかねばならない。本明細書に記載の、本発明者らによって導き出された関係のため、凝固の力学は圧力または流量の測定のみによって判断可能である。したがって、開示されている図 1 のミクロ流体装置 100 は凝固を撮像し易くするために透明基板を含むが、代わりに不透明の基板を用いてよい。血小板の凝集が同時に測定される場合に限り、顕微鏡検査が必要である。

10

20

30

40

【0062】

インビポの血管またはインビトロの中空チャネルにおけるフィブリンクロット形成の力学は、次の 3 つの段階で構成される。すなわち、安定した反応時間、成長相、および飽和（完全な狭窄） - 結果として S 字状曲線になる - である。矩形のチャネルを含む図 1 のミクロ流体装置 100 におけるクロット形成の S 字状力学を検証するために、ヒトの全血に、蛍光標識されたフィブリノゲンと中間レベルの治療用量（0.75 U / mL ）のヘパリン抗凝固剤を加えたものに対する、タイムラプス顕微鏡解析を実施し、一方、一定流量モードにおいてせん断速度を 1250 sec^{-1} （50 ダイン / cm^2 ）に限定した。完全に閉塞した領域の強度（ I_{max} ）によって正規化された平均蛍光強度 $I(t)$ を時間に対してグラフに表わしたときに、発明者らは、ミクロ流体チャネルの線形部分内の固定部位で、凝固が、クロット形成の 3 段階を示す S 字状傾向に従っていると判断した（図 2A、図 2B）。

【0063】

過去の研究は、インビトロで測定された成長する血栓の大きさが、測定された光の強度と線形的な相関関係があることを示している。このため、ミクロ流体装置 100 においては、 $I(t) / I_{max} A_{max} / A(t)$ であると想定した。 $A(t)$ は所与の時間において閉塞しているチャネルを通る血流のための断面積であり、 A_{max} はマイクロチャネル 110 の最初の断面積である。

【0064】

閉塞しているマイクロチャネル 110 の流体力学抵抗（ R_h ）の大きさはおよそ次の通りである。

【0065】

【数 15】

$$R_h(t) \approx \frac{1}{A(t)^2}$$

50

【0066】

図1のミクロ流体装置100は平行なマイクロチャネル110を有し各マイクロチャネルが同時に等しく閉塞することはないので、装置全体の流体力学抵抗の大きさは次の通りである。

【0067】

【数16】

$$R_h(t) \cong \frac{1}{A(t)^k}, \quad k \leq 2$$

10

【0068】

単純にするために、 k は単位元であると想定する。そうすると、結論として、閉塞しているマイクロチャネル110の $R_h(t)$ は単純なS字状になる。層流のハーゲン・ポアズイユの法則($Q = P / R_h$ 、 Q は流量、 P は圧力降下)に基づくと、動作の注入モードを用いて標準的なシリングポンプで一定の流量を与えたとき($Q = \text{一定}$)、本発明者らは、閉塞時間および閉塞力学(たとえばチャネルの閉塞)を予測するためのモデルを提案した。 P の増加は以下の関係に従う(図S1)。

【0069】

【数17】

20

$$\frac{\Delta P(t)}{\Delta P(0)} = 1 + e^{\frac{t-T_{pg}}{T_{pf}-T_{pg}}}; Q(t) = Q(0) \quad (1)$$

【0070】

式中、 T_{pg} および T_{pf} は、フィットさせた指数成長曲線の特徴パラメータであり、それぞれ、圧力がその初期値の二倍および $(1 + e)$ 倍になる時間を表わす。生理学的に、これらの時間は、それぞれ、一定の流量下での凝固の成長相と飽和相を表わし、これはインビボの動脈における高血圧の進展に類似する。

【0071】

これに代えて、圧力ポンプによる血液注入($P = \text{一定}$)に対する凝固時間と凝固力学を予測するための解析モデルを拡張し、本発明者らは、閉塞しているチャネルの流量(Q)の低下が、逆S字状の以下の関係に従うと予測した(図S1)。

30

【0072】

【数18】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{qg}}{T_{qf}-T_{qg}}}}; \Delta P(t) = \Delta P(0) \quad (2)$$

【0073】

式中、 T_{qg} および T_{qf} は、フィットさせたS字状減衰曲線の特徴パラメータであり、それぞれ、流量がその初期値の二分の一および $(1 + e)$ 分の1に低下する時間を表わす。生理学的に、これらの時間は、それぞれ、凝固の成長相と飽和相を表わし、これは、結果として、たとえば、インビボにおける静脈循環の血管内で生じ得る血行停止につながる可能性がある。

40

【0074】

数学的モデルの初期値 $P(0)$ および $Q(0)$ を求めるために、本発明者らは、血液の物理的パラメータが凝固モニタリングの開始時は一定でありしたがって異なる流量で装置にかん流したクエン酸血の $P - Q$ 較正曲線から得られると、想定した。実際得られたデータは、層流である抗凝固血流について、圧力変化と適用した流量との間に線形の関係があることを明らかにし、したがって、線形回帰の線は $P - Q$ 較正曲線を表わす(図1)

50

1)。流量一定のときの圧力上昇(図3A)および圧力一定のときの流量減衰(図3B)は、一定の生理学的せん断速度 350 sec^{-1} (14ダイン/ cm^2)で異なるヘパリン濃度にして実験で求めた。また、数学的モデル(1)および(2)に基づく回帰曲線が高レベルの精度でデータとフィットすることがわかった(図6)。同様に、ヘパリン濃度が一定(0.5U/mL)で流体せん断応力を変化させたとき、上記解析モデルを、一定流量における圧力上昇(図3C)または一定圧力における流量減衰(図3D)の実験測定値にフィットさせると、フィットさせた曲線が極めて正確であることがわかった(図6)。全回帰曲線フィットから得た、図6に示される適合度パラメータ(R^2)によっても、上記数学的モデルが非常に信頼性が高いことが確認された。したがって、モデルパラメータの最適値、すなわち、凝固時間(T_{pg} および T_{pf} 、 T_{qg} および T_{qf})は、0~1U/mLの範囲のヘパリン濃度で $75\sim2500\text{ sec}^{-1}$ (6~100ダイン/ cm^2)の範囲のせん断速度のときの、このバイオミメティックなミクロ流体装置100におけるヒトの全血の凝固力学を表わす。

10

20

30

40

【0075】

次に発明者らが着手したのは、血液凝固時間(注入の場合の T_{pg} および T_{pf} 、圧力の場合の T_{qg} および T_{qf})の診断上および臨床上の有用性のテストであった。これらの時間は、上記回帰モデルから、未分画ヘパリン濃度および加えられたせん断の変化に対するこれらの反応を検証し、これらの結果を既知のシステムからの結果と比較することによって、求められた。標準凝固テストは、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)および活性化全凝固時間(ACT)を含み、臨床的に関連する濃度(0~1U/mL)でテストしたときの凝固時間と未分画ヘパリンの濃度との指數関数的関係を示した。この関係は、凝固時間 = $T_0 e^{-C^h}$ として説明できる。式中、 T_0 はヘパリンなしの血液の凝固時間であり、 C はヘパリン感受性の値である。この指數関数的関係を検証し診療所での抗凝固治療を解析するためのミクロ流体装置100の有用性を評価するために、関連する濃度範囲(0~1U/mL)におけるヘパリン感受性を測定し、特徴凝固パラメータ T_{pg} および T_{pf} (注入モード)と T_{qg} および T_{qf} (圧力モード)を評価した。これは、上記のようにミクロ流体装置100内でヒトの全血流を凝固させるための、式(1)および(2)にそれぞれ基づく回帰曲線をフィッティングすることにより、求められた。注入モードでは、 T_{pg} および T_{pf} のいずれも、適合度パラメータ(図4A、図7)によって報告されるように、生理学的(350 sec^{-1} 、14ダイン/ cm^2)および病理学的(1250 sec^{-1} 、50ダイン/ cm^2)な流体せん断レベルで、ヘパリン濃度を0から1U/mLに高めたとき、指數関数的な増加を正確に示した。一定圧力モードを使用する指數関数的傾向も検証した。 T_{qg} および T_{qf} はいずれも、同じ2つのせん断速度(図4B、図7)を用いてヘパリン濃度を上昇させたときに、指數関数的に増大し、すべてのケースにおいて、凝固時間は、高せん断対低せん断として低減された(図4A、図4B)。加えて、このモデルは、抗凝固剤なし(T_0)の健康な患者からの血液の凝固時間をおよそ2~12分と予測し、ヘパリン感受性の値()を $1.75\sim3.5(\text{U}/\text{mL})^{-1}$ の範囲と予測し、これは、図8に示される、標準凝固テストによって報告されている典型的な値に一致する。

【0076】

診療所で適用される現在の凝固テストは、血行力学的せん断応力の生理学的寄与を取り入れていない。これは結果として、たとえば、低せん断応力(生理学との比較)での静脈の凝固の増加、および、高せん断応力での小動脈となる。加えて、標準的な凝固時間の機器は、血流が可変でありかつ凝固の主要な決定因子でもある体外回路(たとえばECMO、透析、血液濾過)を採用した処置を受ける患者では、不正確になり得る、血行停止時の凝固時間の1つの値しか報告しない。よって、本発明者らは、ミクロ流体装置100を用いて数学的モデルを開発してテストし、せん断が変動する時の凝固時間を予測することに、着手した。低せん断での凝固は、フィブリノゲン等の凝固因子の拡散-反応による運動に支配されるので、べき乗則の動力学のモデル()が使用され、 C はべき乗則定数である。高せん断での凝固は血小板活性化によって支配され、血液凝固時間に対するその影響

50

を、指数関数的関係 (e^{-}) を用いてモデル化した。 γ は減衰定数である。単純にするために、フィブリノゲン拡散と血小板凝集は互いに独立していると想定し、発明者らは、凝固時間の数学的モデルを開発した。それは、凝固時間 = $Z_0 e^{-\gamma t}$ であり、 Z_0 はモデル定数である（この解析モデルのべき乗則項および指数項の個別および結合挙動は図 8 に示される）。

【0077】

注入モードを用いて血液凝固を測定したとき、凝固時間 (T_{p_g} および T_{p_f}) の減少は、せん断速度を約 150 sec^{-1} から約 250 sec^{-1} （約 $6 \sim 100$ ダイン/ cm^2 ）に増加させたときにのみ、観察された（図 4 C）。注入モードでは、せん断速度を 75 sec^{-1} に低下させたとき、血液は凝固しなかった。60 分の注入時間の間圧力上昇は観察されなかったからである。したがって、ミクロ流体装置 100（図 1）とテスト条件のこの組合せについて、発明者らは、数学的モデルを正確にフィットさせることができなかった、または、凝固時間を抽出できなかった。テスト構成に適用できる最低せん断速度において凝固時間の減少が観察されなかったので、この数学的モデルにおいて提案される凝固酵素の拡散的運搬の寄与は、この装置においてせん断速度が 75 sec^{-1} を上回るときには無視できると思われる。よって、べき乗定数 (Z_0) を想定することにより、凝固時間を、より単純な指数関数的減衰関係、すなわち凝固時間 = $Z_0 e^{-\gamma t}$ に、正確にフィットさせることができる（図 7、図 9）。

10

【0078】

しかしながら、同様の測定を一定圧力モードで行ったとき、凝固時間 (T_{q_g} および T_{q_f}) は、2つの異なるヘパリン濃度（ 0.25 U/ml および 0.5 U/ml 、図 4 D）において、せん断速度が 350 sec^{-1} （14 ダイン/ cm^2 ）を下回ったとき、減少した。 350 sec^{-1} を超えるせん断で、指数関数的な減少が観察され、我々の数学的モデルはべき乗定数、 $\gamma > 0$ と、正確にフィットした（図 7 および図 9）。興味深いことに、このモデルはまた、最大凝固時間が、せん断速度が $200 \sim 500 \text{ sec}^{-1}$ （8 ~ 20 ダイン/ cm^2 ）のときに生じると予測した。これは、小さな（ $\sim 100 \mu\text{m}$ ）血管について予想される生理学的せん断範囲に十分対応する。これらの結果は、動作の一定圧力モードで研究したとき、ミクロ流体装置 100 内の血液凝固を、低せん断での凝固タンパク質の拡散によって判断できることを示唆している。加えて、このモデルは、血小板凝集が、いずれの動作モードにおいても、高せん断での血栓症に大きく寄与し得ると予測する（図 9）。

20

【0079】

血小板は血栓形成において重要な役割を果たし、このミクロ流体装置 100 の利点の1つは、これを自動光学顕微鏡と任意で一体化して、研究室での診断のために血小板凝集を定量化し、診療所において抗血小板療法を案内することも、可能であることである。概念の実証として、2つの血小板活性化阻害剤として、アスピリン（ $500 \mu\text{M}$ ）とプラスグレル（ $25 \mu\text{g/ml}$ ）を、蛍光標識した自己血小板とともに、ヒトの再石灰化クエン酸塩添加血に加えた。これら2つの薬剤は、急性冠症候群の治療に臨床使用される。次に、この血液を、ミクロ流体装置 100 のマイクロチャネル 110 を通して、一定のせん断速度 1250 sec^{-1} （50 ダイン/ cm^2 ）で送出し、閉塞が検出された直後に、1つのマイクロチャネル 110 の領域（ $24.8 \times 7.5 \text{ mm}$ ）をスキャンした（図 5 A、図 5 B）。実施した各実験（ $n = 4$ ）において、この薬剤の組合せによる治療により、凝固時間 T_{p_g} および T_{p_f} が増した。これは、他の凝固アッセイを用いた過去の研究と一致する。平均で、凝固時間は、ミクロ流体装置 100 において、それぞれ 13.02% と 6.79% 増加した（図 5 C）。これらの研究から、この薬剤の組合せを加えたことにより、大きな血小板凝集体の数が約 45% 減少したことも明らかになった（ $p < 0.05$ 、 $n = 5$ ）（図 5 D）。

30

【0080】

周知のように、血液凝固の病態生理学は、現在ウィルヒョウの三要素（Virchow's triad）として良く知られている、血液成分、付着面、および流体力学間の、相互作用に關係

40

50

がある。明らかに、止血は、血液表面の相互作用の結果血栓症が生じフィブリン溶解現象が血流の存在下で発生するという点において、動的な性質のものである。より具体的には、可溶性の凝固アゴニストとは無関係に、血栓形成および血小板凝集は、狭窄領域の流量の加速および減速から生じるせん断勾配が原因で増加し、凝固は、流量が減速する狭窄後に最も顕著である。しかしながら、コラーゲンまたはウォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor) (vWf) 等のアゴニストは、クロットの安定化にも寄与し得る。

【0081】

このミクロ流体装置100を用いて、明確なせん断速度、せん断の勾配、および関連する血行力学を作り出すことができ、これにより、より多くの生理学的条件下で正常なおび異常な凝固反応を測定することが可能になり、これは潜在的に、血液学研究室またはそれ以外の診療所、医師の診察室、または患者のベッドサイド等で行なうことができる。この装置は動作に柔軟性がある。なぜなら、せん断速度、マイクロチャネルのトポロジ(たとえば固定されたどのせん断速度でも表面積と体積の所望の比率が得られるようにする、幅と高さと長さの組合わせ)、および使用する独立したマイクロチャネルの数を左右する、血液添加剤(抗凝固剤、薬剤、アクティベータ等)の重要なパラメータを、医師または臨床医が予め選択できるようにしているからである。これらの判断は、調査中に、病状、疾病、または症状(いずれかがわかっている場合)に基づいて行なうことができる。(たとえば、血小板の機能不全は、より高いせん断での動作を有利に示すであろう。なぜならその場合に血小板が最も反応するからである。疑われる静脈の血栓症は、結果に対する血小板の影響を最小にするより低いせん断で有利に作用するであろう。)本コンセプトに従い、血液凝固のリアルタイムの進展を記録し定量化することができる。これは現在の代表的なテストでは不可能である。血液は、2つの動作モードのうちの1つ(一定圧力または一定流量)で送出することができ、この動作モードを選択することによって、インビボでの脈管構造の機能を模倣することができる。一定の流量すなわち注入の場合、圧力の指數関数的増加が記録され、これに代わる一定の圧力の場合、流量のS字状の減衰が記録される。さらに他の側面において、一定圧力モードと一定流量モードを互いに関連付けて機能させることも可能であろう。

10

20

30

40

【0082】

このバイオミメティックな手法を凝固の測定に適用することにより、本発明者らは、血液注入のいずれの動作モードにおいても、血栓形成の力学を予測する包括的な現象論的数学的モデルを示し経験的に検証した(図1、図2)。凝固生物学は、複雑でまだ完全には説明されていないが、血小板とともに、複数の凝固前およびフィブリン溶解因子間の非線形の相互作用に関係がある。この複雑さが血行力学のせん断力の影響と組み合わさるので、凝集する血栓は時折、インビボにおいて壊れて塞栓を形成することがある。これは、ミクロ流体装置100において、血液凝固時に圧力上昇または流量減衰が時折変動することに基づいて測定できる(図2)。しかしながら、本明細書に示す、包括的である解析モデルは、凝固プロセス全体のデータが記録されている場合は経験的観察を正確に予測し(図6)、これらの異なる生理学的条件下での血液の凝固時間を定量的に定める関連の特徴的なパラメータをユーザが抽出できるようにする(図3)。最終的な凝固時間として出力を1つしか提供しない現在の診断テストと異なり、本コンセプトは、凝固カスケードの2つの特徴的な凝固時間を提供する。すなわち、凝固が能動的に加速している時間とクロットが流れを完全に閉塞した時間である(図3)。

【0083】

抗凝固剤の濃度とせん断速度(および勾配)は、血栓形成性を測定しモニタリングするときの、これら凝固時間の2つの主要な決定要因である。本発明者らは、凝固時間が未分画ヘパリンの濃度とともに指數関数的に増加すること、およびその感受性の値が他の標準テストで決定されるものに一致することを見出した(図4A~図4B、図8)。よって、このデータは、抗凝固モニタリングのための代替のより定量的な機器としてミクロ流体装置100を診療所で使用できることを強く示唆している。

【0084】

50

変化するせん断に反応する凝固時間を解析したときに、開示されているべき数 - 指数関数の数学的モデルの正確性を確認した(図7)。しかしながら、血液注入において一定流量モードおよび一定圧力モードを使用したときに異なる凝固挙動が観察された(図4C~図4D)。これらの原因は、一定流量の下では、局所的せん断およびレイノルズ数が、クロットが形成される部位においてより高いレベルまで増す可能性があり、インビボにおいて部分的に閉塞する血管で生じるように、チャネルの管腔の閉塞が始まる可能性がある。これらの異常に高いせん断応力によって、血栓および血小板凝集が破壊されて塞栓として放出される可能性もある。凝固時間が、生理学上のものを下回るせん断法における圧力モードと比較して注入モードの方が長いという発見はしたがって、血小板の活性化および凝集が低せん断時の塞栓を支配しないのであれば、説明できる。また、一定圧力モードにおける低せん断時に、モデルが予測する静脈の血管におけるようにフィブリノゲン拡散が重要な可能性がある(図9)。重要なのは、これが、静脈の血栓症と動脈の血栓症を区別することができないインビトロの凝固アッセイと異なる点であるということである。これらの観察に基づくと、低いせん断速度におけるインビボの血栓症をより上手く模倣する圧力によって駆動される全血の流れは、深部静脈血栓症(deep vein thrombosis)(DVT)のモニタリングに特に適していると考えられる。一方、標準的な注入に基づくシリジポンプは、動脈血栓症(arterial thrombosis)(AT)のモニタリングに特に適していると考えられる。これは、さらに他のテストで(たとえば、DVTの顕著な特徴である、Dダイマーおよび好中球細胞外トラップ(neutrophil extracellular traps)(NET)等の、これらの状態の特定のバイオマーカを解析することにより)、検証してもよい。

10

20

30

【0085】

本明細書に開示される結果に基づいて、ヘパリン濃度およびせん断に対する凝固時間の関係を組合わせることによって、血液を送出するときの注入モードにおける凝固時間の解析的関係を得ることができる。

【0086】

【数19】

$$(T_{pg}, T_{pf}) = A_{(T_{pg}, T_{pf})} e^{B_{(T_{pg}, T_{pf})} C_{wh} - C_{(T_{pg}, T_{pf})} \gamma} \quad (3)$$

【0087】

同様に、圧力モードにおける関係は次の通りである。

【0088】

【数20】

$$(T_{qg}, T_{qf}) = A_{(T_{qg}, T_{qf})} \gamma^{\omega} e^{B_{(T_{qg}, T_{qf})} C_{wh} - C_{(T_{qg}, T_{qf})} \gamma} \quad (4)$$

【0089】

モデル式(3)および(4)をそれぞれ式(1)および(2)に組込むことにより、システム特性とは無関係に、抗凝固剤とせん断に依存する時間的力学を求めることができる。これらの式に見られる定数(A、B、Cおよび)は、患者特有のものであり、解析式(1)および/または(2)のカーブフィッティングによって経験的に求めることができる血液の特性に依存し得る。よって、式(3)および(4)における患者特有の定数は、患者の血液サンプルを凝固させたときに得た圧力曲線および/または流量曲線から得られ、結果としての圧力上昇および/または流量の減衰は、適用できるのであれば、式(1)および/または(2)に組込むことによって、凝固時間を抽出する。これら凝固時間は、たとえば、せん断およびヘパリン濃度の関数であり、実施するテストにおいてわかっているこれらパラメータにより、抽出された凝固時間を、標準的な較正された凝固時間曲線(たとえば患者のベースライン曲線、標準母集団曲線等)と比較することができる。診療所

40

50

では、臨床医がこれら定数を定期的にモニタリングして、抗凝固治療を受けている患者の、または通常の健康診断を受けている患者であっても、その凝固状態を判断すればよい。たとえば、患者の体内の変化に応じて、これら患者特有の定数を、時間の経過とともに増加または減少させることができる。なぜなら、これら患者特有の定数は、他の患者特有のマーカー（たとえば運動、コレステロール、食習慣等）の影響を受けるまたはこのマーカーに依存する可能性があるからである。よって、本コンセプトに従い、臨床医は、このような患者特有の定数の変化を、診断ツールとして利用して、このような変化を、たとえば、疾病（たとえば動脈硬化症等）の臨床症状、特定の罹病性の示唆、および／または追加のテストが望まれることと関連付けて、結果をより良く特徴付けてもよい。一例として、35歳の女性患者の「A」定数値が、その患者において（または35歳の女性を含む選択された母集団サンプルにおいて）通常観察されるであろうものと比較して、遙かに低いか高い（たとえば50%低いまたは高い）場合、このような偏差は何らかの疾患または罹病性と関連があるかもしれません、フォローアップテストを提案および／またはこのような偏差に応じて治療を決定してもよい。健康な患者の場合、ヘパリン濃度またはせん断速度を変化させたとき、クロット形成の成長および飽和を表わすいずれの凝固パラメータも、同様の傾向を示す。しかしながら、新規の抗凝固剤および抗血小板薬が、凝固力学において異なる挙動を生じさせる可能性があり、2つの凝固パラメータが、診断および治療の感度と特異性を高めるであろう。

10

【0090】

自動撮像プロトコルを追加することによってミクロ流体装置100を拡張して大きな血小板凝集体を同時に測定することができ、そうすれば、ミクロ流体装置100を補助抗血小板治療のモニタリングに使用することができる。また、この方法を、共焦撮像またはオンチップフローサイトメトリ（flow cytometry）等の他の顕微鏡技術と組合わせることもでき、そうすることによって、血小板の活動の、より高感度の解析を行なうことができ、かつ、他の血小板アクティベータ（たとえばコラーゲン、組織因子）の効果を調査することができる。そうすれば、フィブリノゲン・トロンビンによる血栓症から独立して、血小板の活性化による血栓症を解析することができる。これら現象論的解析モデルは、白血球および赤血球といった血液の他の細胞成分の、凝固時間に対する影響も取入れて、さらに進化させることができる。包括的で定量的な凝固テストなので、ミクロ流体装置100および本明細書に開示する関係（式（1）～式（4））は、敗血症およびかま状赤血球貧血症等のより複雑な疾患に取組むための可能な方法を提供する。この場合は他の細胞（たとえば細菌および鎌状赤血球）も凝固反応に寄与する。さらに、血栓モニタリング装置を、エクスピボで、カテーテルまたは体外装置に直に装着して、患者本人の血液を何らかの形態の抗凝固剤に入れないので場合の解析を行なえるように、操作することができる。

20

30

【0091】

上記説明に鑑みると、本明細書に示すミクロ流体凝固装置100は、操作が簡単で自動化されており、本明細書に開示される関係（式（1）～式（4））と組合わせて血小板凝集を解析するのにも使用することができ、かつ、患者のベッドサイドや臨床研究室内でまたは在宅治療ベースの評価ツールとしてでも、全血血栓形成性をモニタリングするための向上したリアルタイムの定量的アッセイを提供できるという点において、多機能である。

40

【0092】

本コンセプトの別の側面に従うと、血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する（たとえば図4A～図4D等に示されるようにヘパリンレベルを変えることによってヘパリン感受性を判断する）（インピボまたはインピトロで実行される）方法は、ミクロ流体装置100の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネル110を通して一定の流量で血液サンプルの第1の部分を駆動することと、上記一定の流量で第1の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第1の部分が移動している間に、第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中または全体の圧力または圧力に関連する変数を測定することとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分が流れ始めたときの第1の圧力値を求ることと、血液サンプルの第1の部分の第2の圧力値が求めた血液サ

50

ンブルの第1の部分の第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求めるなどを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分の第3の圧力値が求めた血液サンプルの第1の部分の第1の圧力値の約 $(1+e)$ 倍と判断される第2の時間を求めるなど、血液サンプルの第1の部分について、式(1)における関係に従い、第1の時間と第2の時間を用いて、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることなどを含む。上記式中 T_{p_f} は第2の時間、 T_{p_g} は第1の時間である。この方法はさらに、上記ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第2の複数のマイクロチャネルを通して一定の流量で血液サンプルの第2の部分を駆動することと、モディファイアを血液サンプルの第2の部分と第2の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することなどを含む。この方法はさらに、上記一定の流量で第2の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第2の部分が移動している間に、第2の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中の圧力または圧力に関連する変数を測定することと、血液サンプルの第2の部分が流れ始めたときの第1の圧力値を求めるなど、血液サンプルの第2の部分の第2の圧力値が求めた血液サンプルの第2の部分の第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求めるなどを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第2の部分の第3の圧力値が求めた血液サンプルの第2の部分の第1の圧力値の約 $(1+e)$ 倍と判断される第2の時間を求めるなど、血液サンプルの第2の部分について、式(1)における関係に従い、第1の時間と第2の時間を用いて、血液サンプルの第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることなどを含む。上記式中 T_{p_f} は第2の時間、 T_{p_g} は第1の時間である。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを、血液サンプルの第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルと比較することにより、モディファイアの効果(たとえば、全体的な凝固時間に対する効果、凝固について特定の構成要素に対する効果等)を判断することを含む。
10
20
20

【0093】

本コンセプトのさらに別の側面において、血液凝固に対するモディファイアの効果を評価する(たとえば図4A～図4D等に示されるようにヘパリンレベルを変えることによってヘパリン感受性を判断する)(インビボまたはインビトロで実行される)方法は、ミクロ流体装置100の基板内に形成された第1の複数のマイクロチャネル110を通して一定の圧力で血液サンプルの第1の部分を駆動することと、上記一定の圧力で第1の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第1の部分が移動している間に、第1の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中または全体の流量または流量に関連する変数を測定することなどを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分が流れ始めたときの第1の流量値を求めるなど、血液サンプルの第1の部分の第2の流量値が求めた血液サンプルの第1の部分の第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求めるなど、血液サンプルの第1の部分の第3の流量値が求めた血液サンプルの第1の部分の第1の流量値の約 $(1+e)$ 倍と判断される第2の時間を求めるなどを含む。この方法はさらに、式(2)の関係に従い、第1の時間と第2の時間を用いて、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する第1の凝固モデルを定めることを含み、上記式中 T_{q_f} は第2の時間、 T_{q_g} は第1の時間である。この方法はさらに、上記ミクロ流体装置の基板または別のミクロ流体装置の基板内に形成された第2の複数のマイクロチャネルを通して一定の圧力で血液サンプルの第2の部分を駆動することと、モディファイアを血液サンプルの第2の部分と第2の複数のマイクロチャネルのうちの一方に追加することなどを含む。
30
40
40

【0094】

モディファイアは、例として、抗凝固剤(たとえば、ヘパリン、低分子量ヘパリン、直接要因阻害剤、アンチトロンビンタンパク質、リバーコキサバン、アピキサバン、ダビガトラン、クマリン、ヒルジン、レピルジン、ビバリルジン、アルガトロバン、ダビガトラン、バトロキソビン、ヘメンチン等)、補助食品誘導体、抗血小板薬(たとえば、不可逆性シクロオキシゲナーゼ阻害剤、アデノシンニリン酸(ADP)受容体阻害剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤、糖タンパク質I IgG / IgA阻害剤、アデノシン再取込み阻害剤

、トロンボキサン阻害剤等)、または血栓溶解薬(組織プラスミノーゲンアクティベータ(tPA)、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ等)を含み得る。本コンセプトに従うと、モディファイアは、凝固カスケードの1つ以上の側面に影響し得る、または、実際に凝固カスケードの1つ以上の側面に影響する、何らかの物質または複数の物質の組合せであればよい。本コンセプトに従うと、モディファイアはまた、凝固カスケードの1つ以上の側面に影響し得る、または、実際に凝固カスケードの1つ以上の側面に影響する、何らかの物質または複数の物質の組合せを除去するという変形を含み得る。本コンセプトのさらに他の側面に従うと、モディファイアはまた、凝固カスケードの1つ以上の側面に影響し得る、または、実際に凝固カスケードの1つ以上の側面に影響する、1つ以上の物質(たとえばテスト中の薬剤)の追加と、凝固カスケードの1つ以上の側面に影響し得る、または、実際に凝固カスケードの1つ以上の側面に影響する、別の1つ以上の物質(たとえば細胞、細胞成分、タンパク質等)の除去(たとえば、血小板を除去してフィブリンに潜在的に影響する薬剤のテストにおけるフィブリンに集中する)双方を、含み得る。

10

【0095】

この方法はさらに、上記一定の圧力で第2の複数のマイクロチャネルを通して血液サンプルの第2の部分が移動している間に、第2の複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つの中または全体の流量または流量に関連する変数を測定することと、血液サンプルの第2の部分が流れ始めたときの第1の流量値を求めるることとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第2の部分の第2の流量値が求めた血液サンプルの第2の部分の第1の流量値の約2倍と判断される第1の時間を求ることと、血液サンプルの第2の部分の第3の流量値が求めた血液サンプルの第2の部分の第1の流量値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求ることとを含む。この方法はさらに、血液サンプルの第2の部分について、式(2)における関係に従い、第1の時間と第2の時間用いて、血液サンプルの第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを定めることを含み、上記式中 T_{q_f} は第2の時間、 T_{q_g} は第1の時間である。この方法はさらに、血液サンプルの第1の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルを、血液サンプルの第2の部分のチャネル閉塞を予測する凝固モデルと比較することにより、モディファイアの効果(たとえば、全体的な凝固時間に対する効果、凝固について特定の構成要素に対する効果等)を判断することを含む。

20

【0096】

30

より一般的に、ミクロ流体凝固装置100は、複数のマイクロチャネル110(たとえば2つのマイクロチャネル、3つのマイクロチャネル等)を定める少なくとも1つの基板を含む。マイクロチャネル110は任意で平行に配置され、2次元または3次元で形成されてもよい。各マイクロチャネル110の幅と高さを変えて、マイクロチャネルの断面の表面積が $1.25 \mu m^2 \sim 1.75 mm^2$ の範囲になるようにしてもよく、この面積は、複数のマイクロチャネル間で均一であってもよく、または、マイクロチャネルのうちの1つ以上の間で異なっていてもよく、または、同一のマイクロチャネルに沿っていながら変動してもよい。したがって、せん断勾配(流量の加速および減速)を生じさせる急な拡張をえることもできる。加えて、各マイクロチャネル110の長さ、形状、表面処理および/または経路を均一にする必要はなく、1つ以上のマイクロチャネルの長さ、形状、表面処理および/または経路が、それ以外の1つ以上のマイクロチャネルのものと異なっていてもよい。例として、複数のマイクロチャネルのうちの1つのマイクロチャネルの断面形状は高さ $7.5 \mu m$ 幅 $2.00 \mu m$ であり、一方、複数のマイクロチャネルのうちの別の1つのマイクロチャネル(または場合によっては同じマイクロチャネルの異なる部分)の断面形状は高さ $1.50 \mu m$ 幅 $4.00 \mu m$ である。このように、ミクロ流体装置100の一側面に従うと、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは第1の断面積を有し、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは第1の断面積と異なる第2の断面積を有する。別の例として、ミクロ流体凝固装置100の別の側面において、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは第1の表面処理(たとえば自然発生または合成試薬、コラーゲン、血栓形成誘発材料、血栓形成阻害材料、細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、セグメン

40

50

ト化ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、ポリメタクリル酸メチル等)を有し、複数のマイクロチャネルのうちの少なくとも1つは第1の表面処理と異なる第2の表面処理を有する。

【0097】

開示されているマイクロ流体装置100に従うと、第1のポートが基板の第1の端部(たとえば基板の近位端または遠位端)に設けられ、第1のポートは、複数のマイクロチャネルの入口端に、または、複数のマイクロチャネルの第1の端部に至るチャネルまたはマイクロチャネルに接続される。第2のポートが基板の第2の端部(たとえば基板の近位端または遠位端のうちの他方)に設けられ、第2のポートは、複数のマイクロチャネルの他方の端部に、または、複数のマイクロチャネルの第2の端部に至るチャネルまたはマイクロチャネルに接続される。図1に示されるシステムに基づくと、ポンプ(たとえばシリンジポンプ)が、ポート(たとえば第1のポート120a)に装着され、第1のポートを通して差圧を加えて血液サンプルを実質的に一定の流量または一定の圧力で複数のマイクロチャネルを通して駆動するように構成される。この実験機構において、ポンプをマイクロ流体装置100に接続する管125はマイクロ流体装置100に接着された。他の構成において、ポートおよび筒125は、限定されないが押して接続する部品またはLuer-Lock(登録商標)接続具等のクイックロックコネクタを含むのが有利であろう。

10

【0098】

第1の検知装置が、複数のマイクロチャネル内の圧力値または複数のマイクロチャネル全体の圧力に関連する圧力値を求めるように構成される。たとえば、この第1の検知装置は1つ以上の圧力検知装置を含み得る。別の例において、第1の検知装置は、複数のマイクロチャネル全体の圧力に関連する値(たとえばポンプのアンペア数)を求めるように構成されたセンサを含む。さらに別の例において、圧力検知装置は、ポンプが真空圧を与えている間の負圧を検知する。

20

【0099】

先に述べたように、図10は、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従い注入ポンプモードまたは圧力ポンプモードで動作するマイクロ流体装置100に対する全血凝固の定量的評価のための解析モデルを示す。注入モードでは圧力が指数関数的に増大し、圧力モードでは流量の減衰がS字状傾向を示し、凝固時間は解析モデルの式をこれら測定値にそれぞれフィットさせることによって抽出できる。また、ほぼ30分の位置に縦方向の点線で示されているのは時間 T_{pg} 、 T_{qg} であり、これらはそれぞれ、一定流量下および一定圧力下での凝固の成長相を生理学的に表わす。また、ほぼ50分の位置に縦方向の点線で示されているのは時間 T_{pf} 、 T_{qf} であり、これらはそれぞれ、一定流量下および一定圧力下での凝固の飽和相を生理学的に表わす。図10に重ね合されているのは、 $T=0$ (凝固なし)のときのマイクロチャネル110の断面、 $T=T_{pg}$ 、 T_{qg} のときのマイクロチャネル110の断面(成長相、部分的に閉塞した断面を示す)、および $T=T_{pf}$ 、 T_{qf} のときのマイクロチャネル110の断面(少なくとも実質的に完全な閉塞)を示す。

30

【0100】

図11は、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、図1のマイクロ流体装置100を通してかん流させた、クエン酸ナトリウムに入れられた全血液を示し、動作の注入モードおよび圧力モードそれぞれにおけるP(0)およびQ(0)を予測するためのP-Q応答曲線が示される。

40

【0101】

図12は、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、せん断速度/応力の関数として凝固モニタリングマイクロ流体装置における全血液の凝固時間を予測するための解析モデルを示す。

【0102】

図1に示されるマイクロ流体凝固装置100は、1つ以上のプロセッサを含むコントローラと、この1つ以上のプロセッサに結合され情報を伝達するためのバスまたはその他の通信機構と、このバスに結合され情報とプロセッサが実行する命令を格納するためのメイン

50

メモリ（たとえばRAM）および／またはその他の動的記憶装置とを含む、付随コンピュータシステムを備えるのが好都合である。このコンピュータシステムはポンプおよび制御システムと一体化されてポンプ動作およびセンサデータ収集を制御できるようになるのがさらに好都合である。また、メインメモリは、一時的な変数（たとえば圧力、流量、時間等）を格納するために、または、コントローラが実行する命令の実行中の他の中間情報を格納するために使用されてもよい。このようなコンピュータシステムはまた、バスに結合されプロセッサのための静的情報および命令を格納するためのROMまたはその他の静的記憶装置を含む。固体状態記憶装置等の物理的なコンピュータ読取可能な記憶装置が、情報を格納するために設けられバスに結合される。コンピュータシステムはまた、バスを介して1つ以上の表示装置（たとえばフラットスクリーンディスプレイ、タッチスクリーン等）および1つ以上の入力装置（キーパッド、キー、マウス等）に結合される。開示されている方法に従うと、少なくともいくつかの側面において、この方法は、メインメモリ等のバスに装着された物理的記憶装置に含まれる1つ以上の命令の1つ以上のシーケンスをコントローラが実行するのに応じてコンピュータシステムを利用して実現される。この命令のシーケンスを実行することにより、コントローラは本明細書に記載のプロセスステップのうちの少なくともいくつかを実行する。例として、記憶装置は、検知装置およびタイマーからの入力を組合せて、流れ始めたときの第1の圧力値を求める、第2の圧力値が求めた第1の圧力値の約2倍と判断される第1の時間を求める、および、第3の圧力値が求めた第1の圧力値の約(1+e)倍と判断される第2の時間を求める、コントローラに実行させるように構成された命令を有する。記憶装置はまた、上記式(1)における関係に従いチャネル閉塞を予測する患者凝固モデルを定めることをコントローラに判断させるように構成された命令を有する。同様に、別の側面において、記憶装置は、検知装置およびタイマーからの入力に基づいて、流れ始めたときに応する第1の時間における第1の流量値を求める、第2の流量値が求めた第1の流量値の約二分の一と判断される第2の時間を求める、第3の流量値が求めた第1の流量値の約(1+e)分の一と判断される第3の時間を求める、および、上記式(2)における関係によって支配されるチャネル閉塞を予測する患者凝固モデルを決定することを、コントローラに実行させるように構成された命令を有する。

【0103】

本明細書で使用される「コンピュータ読取可能媒体」という用語は、実行する命令をプロセッサに提供することに関係する物理媒体（たとえば不揮発性媒体、揮発性媒体、磁気媒体、光媒体、固体状態媒体等）を指す。ミクロ流体装置100と組合せて使用されるコンピュータシステムはまた、好都合であるが任意で、バスに結合された通信インターフェイスを含む。このような通信インターフェイスは、ネットワークリンクに対する両方向データ通信結合を提供する（たとえば統合サービスデジタル通信網（ISDN）カード、モ뎀、ローカルエリアネットワーク（LAN）カード、無線リンク等）。ネットワークリンクは、他のデータ装置に対して1つ以上のネットワークを通してデータ通信を提供する（たとえば、ネットワークリンクは、インターネットサービスプロバイダ（ISP）によって操作されるホストコンピュータまたはデータ装置に対してローカルネットワークを通して接続を提供し得る）。コンピュータシステムは、ネットワーク、ネットワークリンク、および通信インターフェイスを通してデータを送受信するように構成される。

【0104】

さらに、本コンセプトが、所与の患者の治療（たとえば自己点滴、在宅治療、臨床所での治療、遠隔健康モニタリング等）をリアルタイムで修正することを可能にする点が注目される。医師、医療提供者、看護師（または場合によっては訓練された患者）は、開示されているミクロ流体凝固装置100および開発された式(1)～(4)を用いて治療の進行を追跡することができる。たとえば、患者が、特定の疾患（たとえば血友病B等）に対して治療効果をもたらす点滴（BeneFIX（登録商標）、Rixubis等）を受けている間、医師または看護師（または患者）は、正確度の低い母集団推定に頼るのではなく、点滴中の治療の進行を追跡することにより、その特定の患者について特定の時間における有効性を判

10

20

30

40

50

断することができる。特に高額治療プロトコル（たとえば因子IXの置換等）の場合、本コンセプトに従い提供されるリアルタイムの凝固評価は、潜在的に、必要な点滴量の大まかな推定（または過大推定）に頼るのではなく、実際に適切な止血バランスに達したときに治療を停止できるようにするので、治療コストを削減し（たとえば500iUは必要でなく250iUが治療上十分であると判断できる）、付隨し得る副作用のリスクを下げることができる。引き続き因子IXが欠損する患者の例において、（たとえば食事療法、摂取した栄養補助食品、薬剤等に反応して生じた）患者の因子IXのレベルのリアルタイムの変化によって、一般化された投与量の基準は不十分になる可能性がある、または、逆に、診療所において、（たとえば食事療法、摂取した栄養補助食品、薬剤等に反応して）患者の因子IXのレベルが典型的なベースラインから抑制されているときに患者の一般化された投与量の基準が決定された場合、処方された投与量は所望の治療効果を得るのに必要なものよりも多い場合がある。よって、本コンセプトは、特定の患者（たとえばヒトまたは動物）に合わせて治療をリアルタイムで調整できるようにする。

【0105】

これらのコンセプトには潜在的に多くの用途がある。一般的に、さまざまな種類の凝固モニタを、トロンボゲン異常（たとえば、アテローム性動脈硬化、深部静脈血栓症、出血異常等）の診断、直接血管内凝固（たとえば敗血症、鎌状赤血球疾患、障害等）、輸血、血液濾過、心臓治療（たとえばステント、血管形成術等）、および上記病状のいずれかに対する抗凝固治療の服用量のモニタリングにおいて、使用できる。加えて、凝固モニタリング装置は、血小板機能等を判断するための薬剤開発研究およびアッセイにおいて使用される。本明細書に開示されるミクロ流体装置100は、上記用途または状況のうちのいずれにおいても使用し得る。加えて、開示されているミクロ流体装置100ならびにそれに関連するシステムおよび方法を、このような用途または状況において、一定流量または一定圧力駆動流量で、または一定流量と一定圧力駆動流量双方で、実施することができる。

【0106】

例として、開示されているミクロ流体装置100ならびにそれに関連するシステムおよび方法は、（1）抗凝固治療、（2）抗血小板治療、（3）血小板機能テスト、（4）表面血栓形成性の判断、および（5）せん断応力反応という用途において、有利に利用し得る。抗凝固治療について、本コンセプトを、たとえば、ヘパリンおよびワルファリン等の従来の抗凝固剤と、限定されないがダビガトラン、レピルジン、アピキサバン、および／またはリバーコキサバン等の新たなまたは開発薬双方の、投与量と有効性のモニタリングに適用してもよい。抗血小板治療について、本コンセプトを、たとえば、アスピリン、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、クロピドグレル、プラスグレル、および／またはアブシキシマブ等の抗血小板薬の、投与量および／または有効性のモニタリングに適用してもよい。上記のように、ミクロ流体装置100ならびにそれに関連するシステムおよび方法により、投与量を、治療中に（たとえば、この装置および制御システムを体外治療に組込むことによって、この装置および制御システムをベッドサイドテスト装置において使用することによって等）、または、治療と実質的に同時に（たとえばテストを短い時間間隔で行なえばよい）、リアルタイムで調整し最適化することができる。

【0107】

血小板機能テストについて、開示されているミクロ流体装置100ならびにそれに関連するシステムおよび方法は、血小板の活性化および凝集の生物学および生物物理学を解明することができる。血小板のインテグリンは、コラーゲン、ラミニン、およびフィブリノゲンを接着できる。血小板の活性化は、ADPおよびセロトニンの放出、トロンボキサンの合成、およびホスファチジルセリンの露出にも関連があり、これはトロンビンを生成し易くする。フィブリノゲン、コラーゲン（I - VII II）、vWF、および脂質化組織因子等の止血活性タンパク質のマイクロパターンングされた表面を、選択的に、直列または並列に、装置の一部のまたは全部の面の上にコーティングすることができ、多重アッセイを行なうことができる。これは内皮細胞も含み得る。血小板凝集を、ADP、エピネフリン、コラーゲン、アラキドン酸、トロンビン、リストセチン等を含み得る、さまざまな血

10

20

30

40

50

小板アゴニストを、血液サンプルに加えることによってテストすることもできる。使用される表面パターンおよび／またはアゴニストは、症状に応じて何らかの形態の抗凝固薬剤を摂取する患者の投薬の判断に役立ち得る。

【0108】

開示されているミクロ流体装置100およびそれに関連するシステムおよび方法はさらに、表面血栓形成性の判断に使用することもできる。血小板は、生物医学装置の血液適合性を決定し得る、自然発生物質（内皮細胞、コラーゲン）または合成物質（たとえばポリエチレンジリコール（PEG）、PEO、POE、ポリ（1,8-オクタンジオールクエン酸塩）（POC）等）と相互作用し得る。ミクロ流体装置100を、さまざまなこのような天然および／または合成物質でコーティングすることができ、これら物質の血液適合性をこの装置を用いて判断することができる。

10

【0109】

さらに、上記説明に鑑みると、ミクロ流体装置100のマイクロチャネル110のうちの1つ以上またはその一部を、さまざまなこのような天然および／または合成物質でコーティングすることができ、これら物質の血液適合性をこの装置を用いて判断できることが、理解されるはずである。たとえば、ミクロ流体装置100の1つ以上のマイクロチャネル110またはその一部を、第1の自然発生物質（たとえばタイプ1コラーゲン）でコーティングすることができ、ミクロ流体装置の1つ以上のマイクロチャネルまたはその一部を、第2の自然発生物質（たとえばタイプ2コラーゲン）でコーティングすることができ、ミクロ流体装置の1つ以上のマイクロチャネルまたはその一部を、第3の自然発生物質（たとえばコラーゲン1（III）鎖）でコーティングすることができ、ミクロ流体装置の1つ以上のマイクロチャネルまたはその一部を、合成物質（たとえばPEG）でコーティングすることができる。別の例として、1つのマイクロチャネル110またはその一部をコラーゲンでコーティングし、別のマイクロチャネルまたはその一部をエピネフリンでコーティングし、さらに別のマイクロチャネルまたはその一部をトロンボキサンA2（TXA2）でコーティングすることにより、アッセイの特異性と感度を高める。本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従うと、1つ以上のマイクロチャネル110を制御として使用できる。これは既知のまたは標準化された結果をもたらす。この結果と、その他1つ以上のマイクロチャネル110の挙動を、容易に比較することができる。さらに他の側面において、ミクロ流体装置100のマイクロチャネルのうちの少なくともいくつかを、たとえば静脈血栓塞栓症（たとえば深部静脈血栓症（DVT）および／または肺塞栓症（PE））の存在を除外するためのマーカーとしてのD-ダイマーを検出するための診断ツールの提供、または、たとえば細胞外基質（ECM）により生じるクロット形成を研究するための研究ツールの提供に、適したものにする。

20

【0110】

したがって、ミクロ流体装置100は、たとえば、1つ以上の天然物質、1つ以上の合成物質、または1つ以上の天然物質（たとえば細胞、タンパク質、分子、酵素、受容体等）と1つ以上の合成物質との組合せを含み得る、1つ以上の異なるコーティングおよび／または表面処理を有する。

30

【0111】

加えて、開示されているミクロ流体装置100ならびにそれに関連するシステムおよび方法は、せん断応力反応の判断に使用することができる。凝固はせん断応力の関数であり、開示されているミクロ流体装置100により、 $75 \sim 2500 \text{ sec}^{-1}$ の範囲で関連するせん断応力を加えて血栓形成性を定量的に評価することができる。

40

【0112】

最近の反応機構研究は、インビボにおける血管損傷またはアテローム性動脈硬化病変の部位における血栓形成および血小板凝集が、血流の流体力学の変化によって生じることを示している。より具体的には、可溶性の凝固アゴニストとは無関係に、血栓形成および血小板凝集は、狭窄領域における流れの加速と減速から生じるせん断勾配（せん断応力の変化率）が原因で増加し、凝固は、流れが減速する狭窄後において最も顕著である。しかし

50

ながら、コラーゲンおよびウォン・ヴィレブランド因子(vWF)等のアゴニストは、クロットの安定化にも寄与し得る。図13Aは、本コンセプトの少なくともいくつかの側面に従う、ミクロ流体装置100の別の例を示し、このミクロ流体装置100に含まれるマイクロチャネル110の形状により、流体は、入口近くの収束ゾーン500(流れが加速、狭窄前)を通り、一定の幅を有し湾曲部分と直線部分を有するチャネルからなる複数のレーン520に入る。次に、流体は、発散部分540(流れが減速、狭窄後)を通って共通の出口に入る。

【0113】

図13A～図13Cに示されるように、COMSOL Multiphysics(登録商標)ソフトウェアを用いる非ニュートン血流の有限要素計算モデリングは、収束部分500で壁せん断速度が著しく増加すると予測する(図13Aの壁せん断速度[sec⁻¹]対距離×[mm]の参照番号600、および、図13Bの参照番号600の対応する拡大図参照)。この計算モデリングはまた、壁せん断速度が、幅が一定の部分520では安定した状態を保ち、発散部分540において著しく減少すると予測する。この計算モデルにおいて、課される入口境界条件はP=0(圧力なし)であり、出口境界条件は、特定された法線速度(チャネルを横断する流れはなく流れは長手方向/鉛直方向に沿う流れのみ)。

【0114】

図13Aの下部分および図13Bの壁せん断速度[sec⁻¹]対距離×[mm]のグラフに示されるプロットは(上から下に向かって)それぞれ、法線速度の値、u=0.5、0.2、0.1、0.05、0.025、および0.01[mm/sec]に対応する。

【0115】

したがって、図13Aに示されるミクロ流体装置100の実施形態では、外部血液ポンプから与えられ制御される平均壁せん断に応じて、せん断速度の勾配が発生する。しかしながら、血液に基づく解析装置を改善するために、アテローム性動脈硬化の病態生理学を模倣するまたは悪化させる所望の血行力学環境になるよう、形状を変更してもよい。

【0116】

図13Aのミクロ流体装置100について、図14は、フィブリン形成610および血小板付着620が、ミクロ流体装置の収束(上流)および発散(下流)部分500、540において増すことを示している。これら収束および発散領域では、装置の残りの一定幅部分520と比較して、せん断勾配が非常に高い(図13Cに示される)。興味深いことに、図13Cおよび図14に示されるように、血液凝固は、アテローム性動脈硬化の狭窄後形状を模倣した発散(下流)部分540において最大になる。したがって、開示しているミクロ流体装置100により、ヒトの血管のサイズを模倣したマイクロチャネル110の内側で、生理学または病理学のせん断およびせん断勾配の存在下において血液の凝固を発生させ容易に視覚化することができる。

【0117】

上述の通り、ミクロ流体装置100は、血栓形成促進材料でも抗血栓形成材料でもよい、さまざまな材料で作ることができる。たとえば、PDMSで作られ、マイクロチャネル110の表面変化がないミクロ流体装置100の内部における、達する最大勾配が平均壁勾配の3.5倍になるようにせん断勾配のみで活性化したときの、血栓形成の結果、凝固時間は、抗凝固剤の濃度、加えられるせん断等のパラメータに応じて、15～60分の範囲になる。しかしながら、ミクロ流体装置100のマイクロチャネル110を濃度100μg/mlのヒトコラーゲンIでコーティングしたときは、凝固時間を2～20分に減じることができ、したがって、必要に応じて図15に示されるように高速の解析にこのツールを用いることができることがわかった。

【0118】

血栓モニタリング装置を、エクスピボで、これをカテーテルまたは体外装置に直に装着して、患者本人の血液を何らかの形態の抗凝固剤に入れないので場合の解析を行なえるよう、操作することができる。

10

20

30

40

50

【0119】

血液を流すために使用され、何らかの種類の抗凝固管（EDTA、ヘパリン、PPACK等）を主として含む装置は、凝固時間テストを含む多くのインビトロ血液解析アッセイに影響し得る血液の化学的性質を変えることがわかっている。たとえば図13Aおよび14Aに示される、必要な血液量が非常に少なく装置の下流の機器が比較的単純な、開示されているミクロ流体装置100は、潜在的に、患者の血管に（たとえば標準カテーテルを介して）直接装着する、または、体外装置（たとえば心臓ポンプ、ECMO装置、透析機器等）と一体化することにより、血液の機能を変える、抗凝固管およびその他の解析前変数の影響を、最小にすることができる。よって、患者本人の全血を、外部ポンプ、中間保存または処理を必要とすることなく（たとえば抗血栓性コーティングは不要であり好都合に省略される）、ミクロ流体装置100に直接通すことができる。

10

【0120】

上記コンセプトに従うと、ミクロ流体装置100内の血液サンプルの凝固特性を、（たとえばせん断応力勾配等を変化させる）マイクロチャネル110の形状の選択、および/または任意のアゴニストの選択によって、調整することができる。一例として、図13Aのミクロ流体装置100は複数のマイクロチャネル（たとえば2つ以上のマイクロチャネル）を含み、複数のマイクロチャネルは各々、近位第1端（入口部分を含む）と、中央部分と、遠位第2端（出口部分を含む）とを定める。図13Aの例におけるマイクロチャネル110は各々、収束部分（たとえば、好ましくは第1の長さにわたって緩やかに収束する断面積を有するが場合によっては段階的に減少する）を含む。収束部分では、マイクロチャネルの断面積が、第1の断面積から、それよりも小さい第2の断面積に減少する。中央部分は、マイクロチャネル110の長さの相当部分を占めていてもよく、実質的に一定の断面積を維持する。発散部分（たとえば、好ましくは第3の長さにわたって緩やかに発散する断面積を有するが場合によっては段階的に増加する）も設けられ、発散部分では、マイクロチャネルの断面積が、第2の断面積から、それよりも大きい第3の断面積に増大する。第3の断面積は、第1の断面積と同一であっても異なっていてもよい。本明細書に記載のミクロ流体装置の他の実施形態と同様、複数のマイクロチャネル110は、その長さの少なくとも一部分にわたって第1の形状を有する1つ以上のマイクロチャネルからなる第1の組のマイクロチャネルと、その長さの少なくとも一部分にわたって第2の形状を有する1つ以上のマイクロチャネルからなる第2の組のマイクロチャネルとを含むことが好都合である。本明細書の他の場所で説明されているように、これらの、1つ以上のマイクロチャネルからなる第1の組および第2の組はさらに、任意で、同一のアゴニストおよび/または表面処理、または、異なるアゴニストおよび/または表面処理を含んでいてよい。

20

【0121】

本コンセプトの他の側面において、複数のマイクロチャネル110のうちの少なくとも一部において、収束部分または発散部分いずれかが省略されてもよく、壁せん断勾配は、収束部分または発散部分それぞれについて選択されるか、または、マイクロチャネル全体に対して一括して選択されて、所望の血行力学環境が得られるようにする。さらに、本明細書に示される例では、収束部分がマイクロチャネルの入口領域にあり発散部分がマイクロチャネルの出口領域にあるが、このような収束部分および発散部分はマイクロチャネルの周縁部に限定される訳ではなく、マイクロチャネルのどの場所に配置されてもよく（たとえばマイクロチャネルの中間部分）、含まれるこのような収束部分および発散部分の数はどのような数であってもよい（たとえば二組または三組の収束部分と発散部分）。

30

【0122】

本明細書に開示される、実質的に一定の流量および実質的に一定の圧力は、流量または圧力がそれぞれ、この実質的に一定の流量または圧力を設定するために使用される装置/設備の使用に応じて、+/-10%、+/-5%、+/-2%または+/-1%等の、平均または中間流量値または圧力値を中心とする範囲内で、変動し得ることを、意味する。

40

【0123】

50

開示された実施形態各々とその明らかな変形はクレームされている発明の精神および範囲に含まれることが意図され、その実施形態の局面が以下の請求項に記載される。

【図 11】

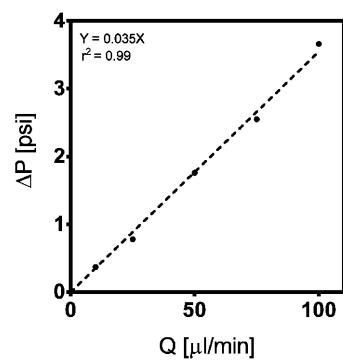


FIGURE 11

【図 1】

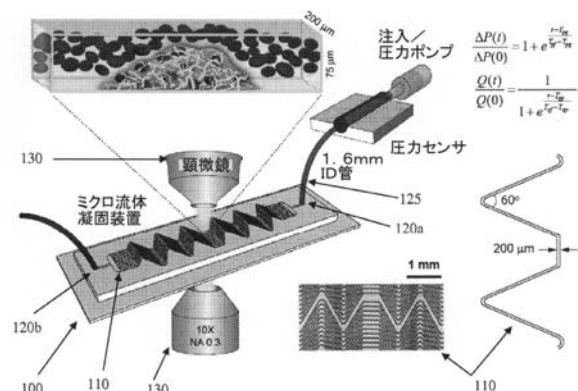
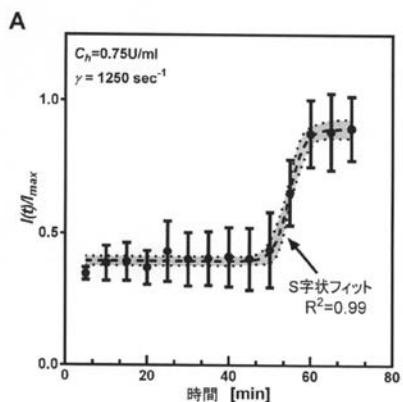


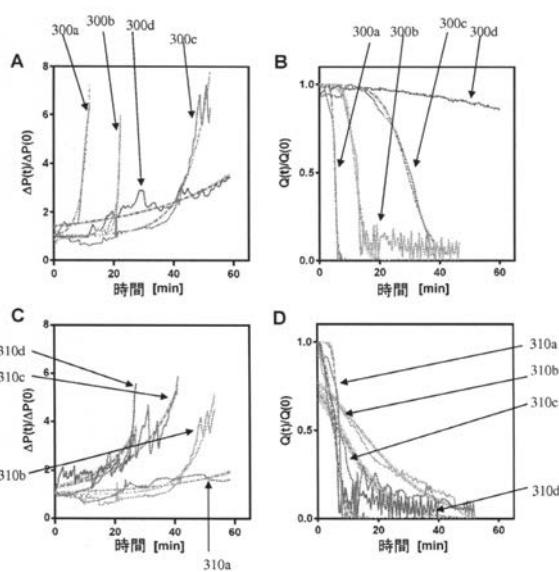
FIGURE 1

【図2】



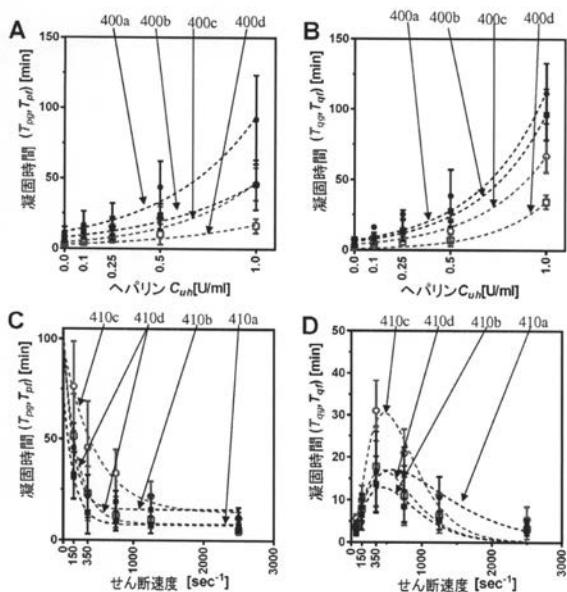
FIGURES 2A-2B

【図3】



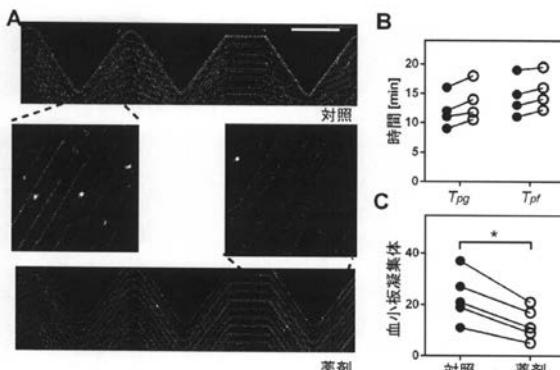
FIGURES 3A-3D

【図4】



FIGURES 4A-4D

【図5】



FIGURES 5A-5C

【図 6】

		75	150	350	750	1250	2500	圧力 [Pa]	
ヘパリン濃度 [U/ml]	0	NA	NA	0.99	NA	0.99	NA		
	0.1	NA	NA	0.98	NA	0.99	NA		
	0.25	0.79	0.89	0.97	0.97	0.96	0.89		
	0.5	0.65	0.84	0.86	0.92	0.93	0.83		
	1	NA	NA	0.94	NA	0.94	NA		
せん断速度 [sec ⁻¹]									
ヘパリン濃度 [U/ml]	75	150	350	750	1250	2500	圧力 [Pa]		
	0	NA	NA	0.99	NA	0.99	NA	圧力 [Pa]	
	0.1	NA	NA	0.99	NA	0.97	NA	圧力 [Pa]	
	0.25	NA	0.91	0.92	0.98	0.86	0.9	圧力 [Pa]	
	0.5	NA	0.77	0.76	0.88	0.83	0.82	圧力 [Pa]	
ヘパリン濃度 [U/ml]	1	NA	NA	0.84	NA	0.89	NA	圧力 [Pa]	

FIGURE 6

【図 7】

凝固時間	せん断速度 [sec ⁻¹]		ヘパリン [U/ml]	
	350	1250	0.25	0.5
T_{pq}	0.98	0.86	0.99	0.99
T_{pf}	0.97	0.91	0.96	0.97
T_{qg}	0.99	0.97	0.87	0.85
T_{qf}	0.98	0.96	0.94	0.89

FIGURE 7

【図 8】

最適値	一定流量		一定圧力		
	T_{pq}	T_{pf}	T_{qg}	T_{qf}	
350 sec ⁻¹	T_{qf}	8.1	12.23	6.19	7.35
	τ	1.76	2.06	2.78	2.98
1250 sec ⁻¹	T_{qf}	3.0	4.77	1.87	4.50
	τ	1.75	2.36	3.54	2.82

FIGURE 8

【図 9】

最適値	一定流量		一定圧力		
	T_{pq}	T_{pf}	T_{qg}	T_{qf}	
0.25 U/ml	T_{qf}	74.74	106.2	0.0057	0.058
	ω	0	0	1.516	1.053
	φ	0.0068	0.0073	0.0034	0.0018
0.5 U/ml	T_{qf}	98.90	96.96	0.0043	0.0018
	ω	0	0	1.628	1.889
	φ	0.0049	0.0022	0.0036	0.004

FIGURE 9

【図 10】

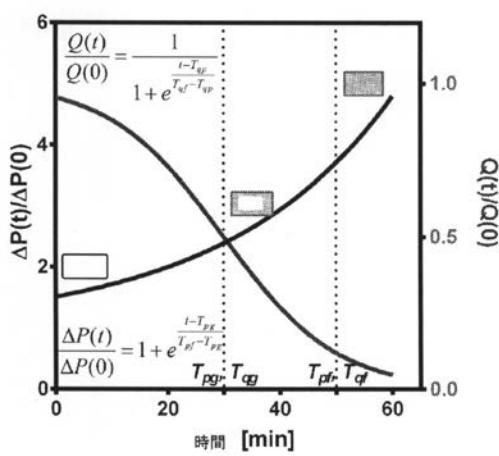


FIGURE 10

【図 12】

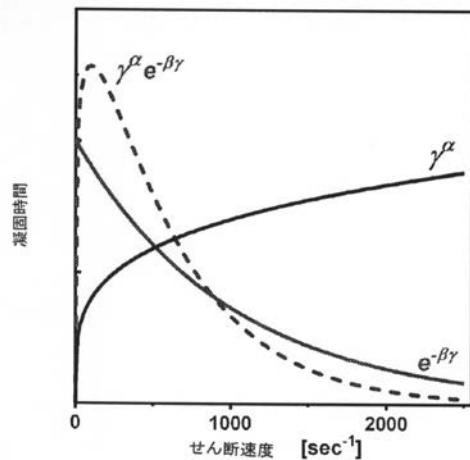


FIGURE 12

【図 13A】

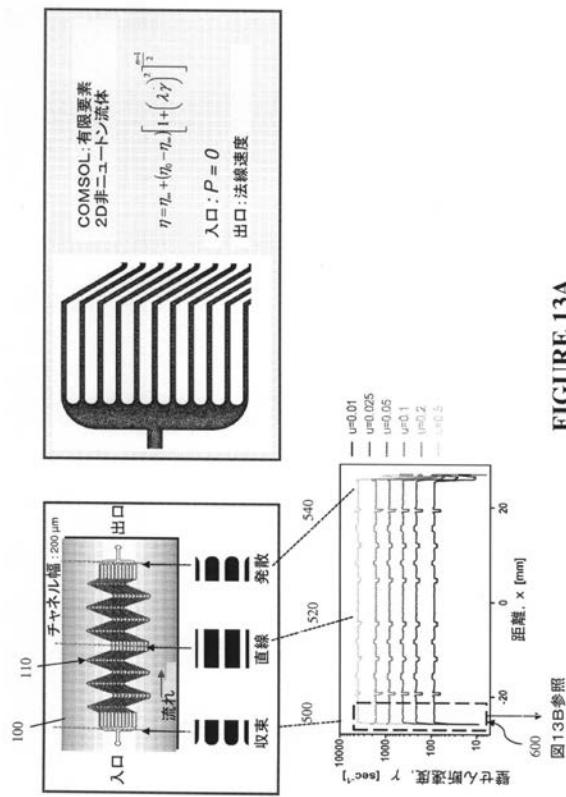


FIGURE 13A

【図 13B】

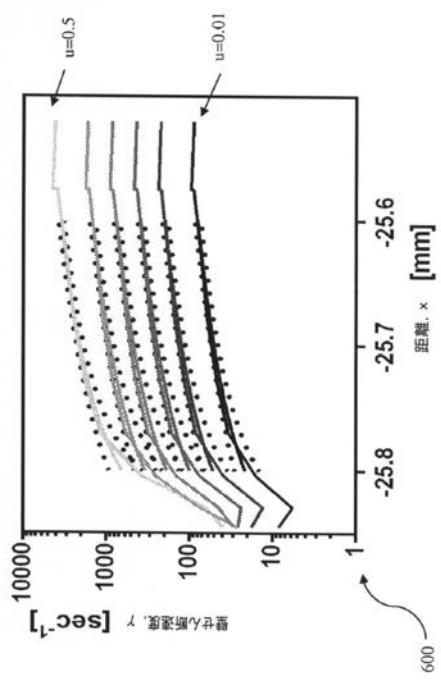


FIGURE 13B

【図 13C】

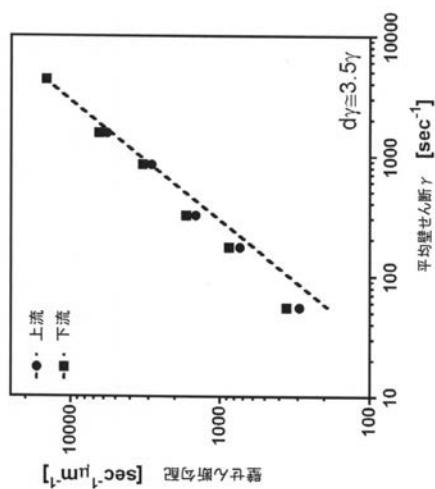


FIGURE 13C

【図 14】

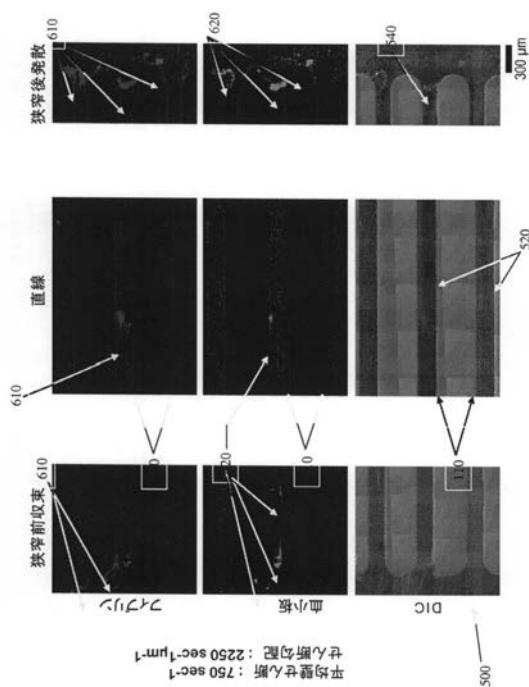


FIGURE 14

【図 15】

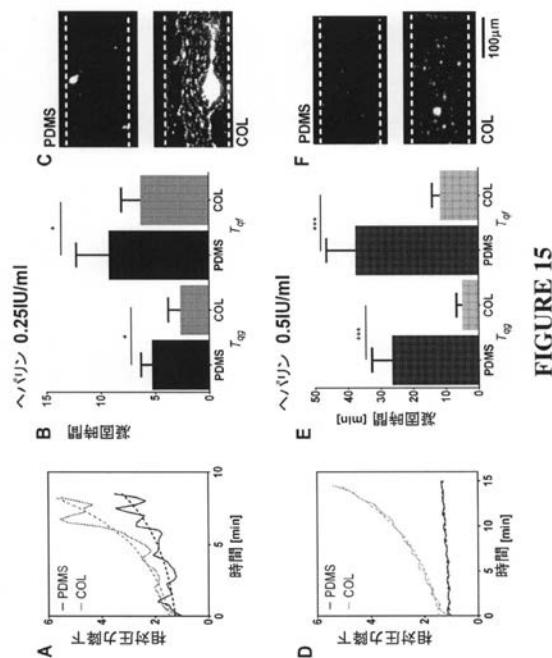


FIGURE 15

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月28日(2016.6.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 3】

【数14】

$$\frac{Q(t)}{Q(0)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{t-T_{eq}}{T_{eq}-T_{eq}}}}$$

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/60956
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/49, G01N 33/86 (2015.01) CPC - B01L 3/5027; G01N 33/49; G01N 33/80; G01N 33/86 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) IPC(8)- G01N 33/49, G01N 33/86 (2015.01) CPC- B01L 3/5027; G01N 33/49; G01N 33/80; G01N 33/86		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8)- G01N 33/49, G01N 33/86 (2015.01) CPC- B01L 3/5027; G01N 33/49; G01N 33/80; G01N 33/86; USPC- 422/68.1,73; 435/13,30; 435/69		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Proquest Dialog, Google Patents, Google Scholar Search terms used: microfluidic, microchannel, port, blood, coagulation, clot, occlusion, model, timer, first time, second time, pressure, flow, sensor, detector, monitor, measurement, exponential, 1+e, sigmoid		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7,439,069 B2 to (NIPPOLDT et al.) 21 October 2008 (21.10.2008), Fig 1-5, 11, 12, abstract, col 6, ln 10-26, col 7, ln 64-66, col 8, ln 10-14, col 8, ln 62-65, col 9, ln 40-57	1-63
A	US 5,504,011 A (GAVIN et al.) 02 April 1996 (02.04.1996), Fig 5, abstract, col 9, ln 37-53	1-63
A	US 2009/0054753 A1 (ROBINSON et al.) 26 February 2009 (26.02.2009), abstract	1-63
A	US 5,039,817 A (McDONALD et al.) 13 August 1991 (13.08.1991), abstract, col 8, ln 62-64	1-63
A	US 7,291,310 B2 (MARTIN et al.) 06 November 2007 (06.11.2007), abstract	1-63
A	WO 2010/077784 A1 (STEPHENNS et al.) 08 July 2010 (08.07.2010), abstract	1-63
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2015 (21.07.2015)		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/60956
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.		
Group I: claims 1-63: drawn to a microfluidic coagulation device and corresponding method comprising a plurality of micro-channels		
Group II: claims 64-86: drawn to an in vitro hemoanalytical assay microfluidic coagulation device, comprising at least one substrate —see supplemental sheet—		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	<input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. 1-63	
Remark on Protest <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. 		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 14/60956

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I requires the technical features of a sensing device, a timer and a controller for determining a blood coagulation model, not found in the other groups.

Group II requires the technical features of an in vitro hemoanalytical assay which includes a converging portion, wherein the at least one of the plurality of microchannels is configured to produce a second wall shear gradient in the diverging portion, and wherein the first wall shear gradient and second wall shear gradient are selected to, in combination with any optional microchannel prothrombogenic or anti-thrombogenic antagonist or any optional microchannel surface treatment, yield an in vitro clotting time of between about 2-60 minutes, not found in the other groups.

Shared Features:

The only technical features shared by Groups I and II that would otherwise unify the groups are a microfluidic coagulation device, comprising: at least one substrate defining a plurality of microchannels having an inlet end and an outlet end and a first port at a first end portion of the substrate, the first port connecting to inlet ends of the plurality of microchannels; a second port at a second end portion of the substrate, the second port connecting to outlet ends of the plurality of microchannels; wherein the at least one of the plurality of microchannels is configured to produce a first wall shear gradient.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are disclosed by WO 2010/077784 A1 to Stephens et al. (hereinafter 'Stephens') 08 July 2010 (08.07.2010), which discloses a device with at least one substrate ('the test channels will be formed in an upper surface of the body of the test cartridge,' para [0012]) defining a plurality of microchannels (para [0010]) having an inlet end and an outlet end ('the inlet and outlet ends of the test channels,' para [0012]), a first port at a first end portion of the substrate, the first port connecting to inlet ends of the plurality of microchannels ('where the inlet and outlet wells extend downwardly from the upper surface. The wells, in turn, are connected to the inlet and outlet ends of the test channels,' para [0012]); a second port at a second end portion of the substrate, the second port connecting to outlet ends of the plurality of microchannels ('where the inlet and outlet wells extend downwardly from the upper surface. The wells, in turn, are connected to the inlet and outlet ends of the test channels,' para [0012]); wherein the at least one of the plurality of microchannels is configured to produce a first wall shear gradient ('The wells, in turn, are connected to the inlet and outlet ends of the test channels by vertical "chimneys" which connect to the lower end of the inlet well and allow fluid to flow upward to the inlet end of the test channel under a pressure gradient,' para [0012]; shear gradient being flow acceleration/deceleration based on para [0077] of instant specification based on flow rate or pressure differential, para [0012] of instant specification).

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	F
	G 0 1 N 21/64	E

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T, TM), EP(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, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H, N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ウォーターハウス, アナ

アメリカ合衆国、0 2 4 4 6 マサチューセッツ州、ブルックライン、マーシャル・ストリート、5 4、アパートメント・1

(72)発明者 スーパー,マイク

アメリカ合衆国、0 2 4 2 1 マサチューセッツ州、レキシントン、コンコード・アベニュー、3 5 4

(72)発明者 イングバー,ドナルド・イー

アメリカ合衆国、0 2 1 1 8 マサチューセッツ州、ボストン、ウェスト・カントン・ストリート、1 6 2

(72)発明者 レスリー,ダニエル・シイ

アメリカ合衆国、0 2 4 4 5 マサチューセッツ州、ブルックライン、クラーク・ロード、1 7

F ターム(参考) 2G043 AA03 CA05 DA01 DA05 DA06 EA01 FA01 FA02 FA03 FA07

LA03 NA11

2G045 AA01 AA10 AA25 AA40 BA14 BB24 CA24 CA25 DA20 DA36

DA39 FA16 FA19 FA37 FB12

4B029 AA07 BB20 FA15