

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】令和 1 年 6 月 13 日 (2019.6.13)

【公表番号】特表 2018-523118 (P2018-523118A)

【公表日】平成 30 年 8 月 16 日 (2018.8.16)

【年通号数】公開・登録公報 2018-031

【出願番号】特願 2017-567746 (P2017-567746)

【国際特許分類】

G 0 1 N 35/08 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 35/08 A

G 0 1 N 33/53 K

G 0 1 N 37/00 1 0 1

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 5 月 9 日 (2019.5.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液細胞を分離するための方法であって、

血液試料の赤血球を溶解し、前記試料を希釈する工程と；

少なくとも第 1 の端部および第 2 の端部を有するスパイラル形状フローチャネルを含むマイクロ流体デバイスであって、前記スパイラル形状フローチャネルは、前記第 1 の端部もしくはその付近の 2 つの入口ポートと前記第 2 の端部もしくはその付近の少なくとも 2 つの出口ポートとを有し、前記 2 つの入口ポートの一方は前記スパイラル形状フローチャネルの内壁に位置し、かつ他方の入口ポートは前記スパイラル形状フローチャネルの外壁に位置し、前記出口ポートの少なくとも 1 つは血液細胞の貯蔵を可能にする容器に接続され、前記スパイラル形状フローチャネルが 1 1 0 ～ 1 3 0 μm の高さを有する、マイクロ流体デバイスを提供する工程と；

溶解赤血球を含む希釈した前記試料を前記スパイラル形状フローチャネルの前記外壁に位置する前記入口ポートに導入し、シース液を前記スパイラル形状フローチャネルの前記内壁に位置する前記入口ポートに導入する工程と；

前記試料および前記シース液を、前記スパイラル形状フローチャネルを通すように駆動する工程と；

前記少なくとも 1 つの出口ポートに接続された前記少なくとも 1 つの容器内の前記血液細胞を回収する工程と、
を含む、方法。

【請求項 2】

遠心分離工程、標識工程、またはその両方を含まず、少なくとも 1 つのタイプの血液細胞がマーカー分子で標識される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が指穿刺から提供されるまたは静脈穿刺から生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 2 つの出口ポートが少なくとも 4 つの出口ポートを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記スパイラル形状フローチャネル内を流れる前記試料のレイノルズ数 (Re) が 50 ~ 100 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記スパイラル形状フローチャネルが、
ポリジメチルシロキサン (PDMS) ;
300 ~ 600 μm の幅 ;
110 ~ 130 μm の高さ ;
7 ~ 13 cm の全長 ; および
それらの組み合わせ、のうちの 1 つ以上を含む、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記スパイラル形状フローチャネルが前記出口ポートの分岐部で 800 ~ 1200 μm の幅まで徐々に拡大する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

拡大した前記幅が約 1000 μm である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

第 1 の出口ポートが、前記内壁から前記外壁にかけて形成される前記スパイラル形状フローチャネルの 0 ~ 100 μm の幅をカバーし、第 2 の出口ポートが 101 ~ 250 μm の幅をカバーし、第 3 の出口ポートが 251 ~ 650 μm の幅をカバーし、かつ第 4 の出口ポートが 651 ~ 1000 μm の幅をカバーする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記血液細胞が、好中球、単球、リンパ球、血小板、赤血球、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 11】

前記好中球および前記単球を第 2 の前記出口ポートから回収する工程か、前記リンパ球を第 3 の前記出口ポートから回収する工程か、またはその両方をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記シース液の流速が、希釈した前記試料の流速よりも少なくとも 5 倍高い ;
希釈した前記試料の流速が 120 ~ 130 μL / 分である、またはその両方である、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記血液細胞が緩衝液で回収される ;
前記血液試料が緩衝液で少なくとも 1 : 5 に希釈される、またはその両方である、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

回収された前記血液細胞が好中球であり、
被験者の前記試料の単離された前記好中球が、少なくとも 1 名の健常者との比較可能な対照試料の単離された好中球と比べて、糖尿病または炎症性疾患を示す、増加した平均ローリング速度を有するか否か ;
前記被験者の前記試料の単離された前記好中球が、少なくとも 1 名の健常者との比較可能な対照試料の単離された好中球と比べて、糖尿病または炎症性疾患を示す、減少した好中球真円度 (NC) 指数を有するか否か、
前記被験者の前記試料の単離された前記好中球が、少なくとも 1 名の健常者との比較可能な対照試料の単離された好中球と比べて、糖尿病、前記炎症性疾患、またはその両方を示す、細胞内反応性酸素種 (ROS) の増加した発現と、CD11b の増加した発現と、

PSGL-1の低下した発現とのうちの1つ以上を有するか否か、
を判定する工程を含む、方法。

【請求項15】

前記増加した平均ローリング速度が少なくとも $5.30\mu\text{m}/\text{秒}$ である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記増加した平均ローリング速度の測定がE-セレクションでコーティングされたチャンネル内で行われる、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記減少した好中球真円度(NC)指数が、少なくとも0.85の好中球真円度(NC)を有する被験好中球の76%未満と定義される、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

(a) 前記被験者の前記試料の単離された前記好中球における前記細胞内反応性酸素種(ROS)もしくはCD11bの発現が、前記比較可能な対照試料における前記発現と比べて少なくとも10%増加する；

(b) 前記被験者の前記試料の単離された前記好中球における前記PSGL-1の発現が、前記比較可能な対照試料における前記発現と比べて少なくとも10%減少する、またはその両方である、
請求項14に記載の方法。

【請求項19】

少なくとも第1の端部および第2の端部を有するスパイラル形状フローチャンネルを含むマイクロ流体デバイスであって、前記スパイラル形状フローチャンネルが、前記第1の端部もしくはその付近に2つの入口ポートおよび前記第2の端部もしくはその付近に少なくとも2つの出口ポートを有し、ここで前記2つの入口ポートの一方が前記スパイラル形状フローチャンネルの内壁に位置し、かつ他方の入口ポートが前記スパイラル形状フローチャンネルの外壁に位置し、かつ前記出口ポートの少なくとも1つが血液細胞の貯蔵を可能にする容器に接続され；ここで前記スパイラル形状フローチャンネルが $110\sim 130\mu\text{m}$ の高さを有する、マイクロ流体デバイス。

【請求項20】

血液細胞から微小粒子を分離するための方法であって、

血液試料の赤血球を溶解し、前記試料を希釈する工程と；

少なくとも第1の端部および第2の端部を有するスパイラル形状フローチャンネルを含むマイクロ流体デバイスであって、前記スパイラル形状フローチャンネルは、前記第1の端部もしくはその付近の2つの入口ポートと前記第2の端部もしくはその付近の少なくとも2つの出口ポートとを有し、前記2つの入口ポートの一方は前記スパイラル形状フローチャンネルの内壁に位置し、かつ他方の入口ポートは前記スパイラル形状フローチャンネルの外壁に位置し、前記出口ポートの少なくとも1つは血液細胞の貯蔵を可能にする容器に接続され、前記スパイラル形状フローチャンネルが $110\sim 130\mu\text{m}$ の高さを有する、マイクロ流体デバイスを提供する工程と；

溶解赤血球を含む希釈した前記試料を前記スパイラル形状フローチャンネルの前記外壁に位置する前記入口ポートに導入し、シース液を前記スパイラル形状フローチャンネルの前記内壁に位置する前記入口ポートに導入する工程と；

前記試料および前記シース液を、前記スパイラル形状フローチャンネルを通すように駆動する工程と；

前記少なくとも1つの出口ポートに接続された前記少なくとも1つの容器内の前記血液細胞から前記微小粒子を回収する工程であって、前記微小粒子が約 $0.1\mu\text{m}$ から約 $1\mu\text{m}$ までの範囲である平均粒径を有する、工程と、
を含む、方法。

专利名称(译)	使用微流体进行白细胞和微粒分级		
公开(公告)号	JP2018523118A5	公开(公告)日	2019-06-13
申请号	JP2017567746	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	南洋理工大学		
申请(专利权)人(译)	南洋理工盐湖城大学		
[标]发明人	ホウハンウェイ ベームベルンハルトオット テイファイミン ローセイチャイヨアヒム		
发明人	ホウ、ハン ウエイ ベーム、ベルンハルト オット テイ、ファイ ミン ロー、セイ チャイ ヨアヒム		
IPC分类号	G01N35/08 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	B01L3/502776 B01L3/502761 B01L2200/0636 B01L2200/0652 B01L2300/0864 B01L2300/0877 G01N33/491 G01N33/5029 G01N33/5091 G01N33/5094 G01N33/56972 G01N2800/042 G01N2800/7095		
FI分类号	G01N35/08.A G01N33/53.K G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G058/AA09 2G058/DA07 2G058/EA14 2G058/GB10		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳 中村美纪		
优先权	10201505259T 2015-07-02 SG 10201510460P 2015-12-18 SG		
其他公开文献	JP2018523118A		

摘要(译)

本发明是一种分离血细胞的方法，其包括：(a) 裂解血液样品的红细胞并稀释样品；(b) 至少第一端和第二端。一种包括螺旋形流动通道的微流体装置，该螺旋形流动通道的流动通道包括在第一端或第一端附近的两个入口和在第二端或第二端附近的至少两个出口。其中，两个入口之一位于螺旋形流动通道的内壁上，另一个入口位于螺旋形流动通道的外壁上，至少一个出口为血细胞储存器。提供一种微流体装置，该微流体装置连接到使以下容器能够进行的容器；(c) 将步骤(a)的样品引导至位于螺旋形流动通道的外壁上的入口。并将鞘液引入位于螺旋形流动通道内壁上的入口中；(d) 驱动样品和鞘液使其通过螺旋形流动通道；(e) 在至少一个与至少一个出口相连的容器中收集血细胞。本发明还提供了纯化天然状态中性粒细胞的上述方法，包括其滚动速率，中性粒细胞圆度(NC)指数和/或标记例如细胞内活性氧种类的步骤。本发明涉及与用于诊断受试者的糖尿病或炎症疾病的方法结合，该方法包括通过确定(ROS)，CD11b或PSGL-1的表达来进一步研究。