

(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
2014年3月20日(20.03.2014)



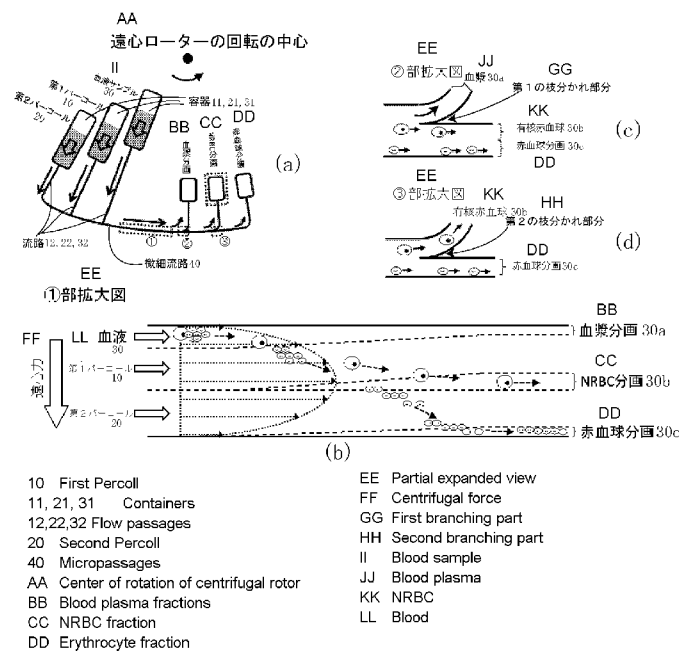
(10) 国際公開番号
WO 2014/042177 A1

- (51) 国際特許分類:
B01J 19/00 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
B03B 5/32 (2006.01) C12N 1/02 (2006.01)
B04B 5/00 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/074496
 - (22) 国際出願日: 2013年9月11日(11.09.2013)
 - (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 2012-199476 2012年9月11日(11.09.2012) JP
 - (71) 出願人: 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学(JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 Ishikawa (JP).
 - (72) 発明者: 浮田 芳昭(UKITA Yoshiaki); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 高村 禪(TAKAMURA Yuzuru); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 小黒 崇之(OGURO Takayuki); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP).
 - (74) 代理人: 海野徹(UMINO, Toru); 〒9200201 石川県金沢市みずき1丁目230番地 Ishikawa (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, UZ, VC, VN, 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, 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:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: LIQUID SUPPLY METHOD, CENTRIFUGAL SEPARATION METHOD, LIQUID SUPPLY DEVICE AND CENTRIFUGAL SEPARATION DEVICE

(54) 発明の名称: 送液方法、遠心分離法、送液装置及び遠心分離装置



(57) Abstract: Provided is a liquid feed method and the like which use a centrifugal method, and which can stabilize the laminar flow within micropassages provided to microdevices and the like. By layering two or more different liquids having different densities in order from the liquid having smaller densities, moving towards the outside in the radial direction of the centrifugal rotor, within micropassages positioned in the direction of rotation of the centrifugal rotor, the density gradient within the micropassages is varied into a stepped form. A density gradient is formed within the micropassages, and by matching the direction of gradient of the density and the the direction in which the centrifugal force acts, a secondary flow generated by a Coriolis force is suppressed using the centrifugal force that acts on the liquid, making it possible to stabilize the laminar flow.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2014/042177 A1



-
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正を受理した際には再公開される。(規則48.2(h))

マイクロデバイス等に設けた微細流路内の層流の安定化を実現できる遠心方式による送液方法等を提供する。遠心ローターの回転方向に沿って配置した微細流路内に、密度が異なる2種類以上の液体を密度が小さい方から順に遠心ローターの半径方向外側に積層することで、微細流路内の密度勾配を階段状に変化させる。微細流路内にあえて密度勾配を形成すると共に、密度の勾配方向と遠心力の作用方向とを一致させることで、液体に作用する遠心力を利用してコリオリの力による2次流れを抑制して、層流を安定化させることができる。

明 細 書

発明の名称：送液方法、遠心分離法、送液装置及び遠心分離装置 技術分野

[0001] 本発明は、微細流路内の送液方法等に関し、具体的には、マイクロデバイス等に設けた微細流路内の層流の安定化を実現できる遠心方式による送液方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、試料分析の各工程の手間を省き、作業時間を短縮するための技術として、マイクロ統合分析システム (Micro Total Analysis System: μ TAS) あるいはラボチップ (Lab-on-a-chip) と呼ばれる数センチないし数ミリ程度の超小型の生化学分析デバイス (マイクロデバイス) が登場している。

マイクロデバイスはこれまで人手で行っていた各オペレーションやオペレーション間の試料の移動など、分析に関わる一連の工程を1つの基板上で再現するものであり、従来と比較して試料や試薬の必要量が少ない、反応時間が短い、廃棄物が少ないなどのメリットがあり、医療診断、環境や食品のオンサイト分析、医薬品や化学品の生産等、広い分野での利用が期待されている。

[0003] 通常、マイクロデバイスは、一つの基板上にリアクタやリザーバー等の各種容器及びこれらを繋ぐ微細流路、微細流路を通る液体の流れを制御するためのバルブ等が形成されており、液体の混合、加熱、冷却などによる反応制御や、分光学的あるいは電気的作用を応用した検出作業を可能としている。

マイクロデバイスで用いる液体としては、たとえば血液・蛋白・遺伝子などを含む溶液、微生物・動植物細胞などの固体成分を含む溶液、各種化学物質を含む環境水、土壌抽出水など、さらにはそれらの分析に使用する各種の試薬、バッファ液、洗浄水などが挙げられる。以下、本明細書中ではこれらマイクロデバイスで用いる各種液体をまとめて単に「液体」と表記する。

[0004] 微細流路の中に複数の液体を流すことで、界面における物質・物体の移動

現象を利用した新規な化学プロセスや微粒子の分離プロセスを実現できるため、微細流路内において層流を安定化させ、界面を保持する技術が求められている。

例えば特許文献1には、サンプル液導入流路とシース液導入流路との合流流路を部分的にテーパさせることで、サンプル液層流を流路の中心に集束させて送液できるマイクロチップが開示されている。

[0005] 微細流路内の液体の流れを制御するには大型かつ高価な制御機やシリンジポンプを用いるのが一般的であるが、その他に、回転するディスク上に微細流路を形成し、遠心力を利用して液体を流すという簡便な液体ポンピング法も知られている。この方法ではディスクを回転させるだけで、回転中心から半径方向外向きに均一な遠心力が得られるため、複数の液体の制御を同時に実行できる送液系を簡便に実現できるという利点がある。

[0006] しかし、回転する微細流路内を流れる液体には遠心力と共にコリオリの力も作用する。コリオリの力は液体の移動速度とローターの回転数に比例し、微細流路の中央を流れる液体は移動速度が速く、微細流路の壁面近傍を流れる液体は移動速度が遅いため、微細流路中央の液体と壁面近傍の液体に作用するコリオリの力に差が生じてしまう。その結果、微細流路内において液体をひねるような渦挙動（2次流れ）が生じてしまい、層流の安定性が失われるという問題が知られている（特許文献2～4、非特許文献1及び2）。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特開2011-179945号公報
特許文献2：特許第4836270号公報
特許文献3：特許第4247390号公報
特許文献4：特開2011-218348号公報

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Jens Ducree et al., Multilamination of flows in planar networks of rotating microchannels, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2,

78-84, (2006).

非特許文献2 : Jens Ducree, et al., Patterning of flow and mixing in rotating radial microchannels, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2, 97-105, (2006).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 特許文献2～4のなかで（例えば特許文献2の[0006]参照。）、一般的な遠心分離に於いて遠心チューブ内の液相の擾乱を連続的な密度勾配が抑制する効果に関して言及されているが、上記の流れを伴う液体に対して作用するコリオリの力により生じる2次流れを抑制する手段としては必ずしも十分なものとはいえなかった。

また、特許文献2～4に記載された発明はいずれも液相内の擾乱をある程度抑制した上で沈降速度法によって微粒子の分級（遠心分離）を行うものであり、沈降平衡法によって微粒子の分級を実現した技術は未だ存在していないのが現状である。

[0010] 本発明はこのような問題に鑑み、マイクロデバイス等に設けた微細流路内の層流の安定化を実現できる遠心方式による送液方法、遠心分離法、送液装置及び遠心分離装置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

[0011] 本発明の送液方法は、遠心ローターの回転方向に沿って配置した微細流路内に、密度が異なる2種類以上の液体を密度が小さい方から順に遠心ローターの半径方向外側に積層することで、微細流路内の密度勾配を連続的ではなく階段状に変化させることを特徴とする。

また、液体に対して上記半径方向内側又は外側に向かって作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めることを特徴とする。

また、階段状に変化させた前記2種類以上の各液体の密度の勾配方向（密度小から密度大に向かう方向）と遠心力の作用方向とを一致させることで、各液体に対して作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めて層流

を安定化させることを特徴とする。

また、微細流路の幅を $10\mu\text{m}$ 以上、 1mm 以下としたことを特徴とする。

また、各液体の密度が $0.9\text{g/cc}\sim 1.2\text{g/cc}$ の範囲内であり、積層された2種類の液体の密度差が 0.01g/cc 以上であることを特徴とする。

[0012] また、本発明の遠心分離法は、前記複数の液体のうち少なくとも一つの液体中に微粒子試料が含有されており、当該微粒子試料を密度勾配遠心分離法によって分離することを特徴とする。

また、前記微粒子が細胞、微生物、リポソームその他の生体関連微粒子、ラテックス粒子、ゲル粒子、工業用粒子その他の合成粒子のうちの少なくとも一つであることを特徴とする。

[0013] 本発明の送液装置は、遠心ローターの回転方向に沿って配置した微細流路を備えており、当該微細流路内に、密度が異なる2種類以上の液体を密度が小さい方から順に遠心ローターの半径方向外側に積層することで、微細流路内の密度勾配を連続的ではなく階段状に変化させることを特徴とする。

また、前記各液体に対して上記半径方向内側又は外側に向かって作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めることを特徴とする。

また、階段状に変化させた前記2種類以上の各液体の密度の勾配方向（密度小から密度大に向かう方向）と遠心力の作用方向とを一致させることで、各液体に対して作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めて層流を安定化させることを特徴とする。

また、微細流路の幅を $10\mu\text{m}$ 以上、 1mm 以下としたことを特徴とする。

また、各液体の密度が $0.9\text{g/cc}\sim 1.2\text{g/cc}$ の範囲内であり、積層された2種類の液体の密度差が 0.01g/cc 以上であることを特徴とする。

[0014] 本発明の遠心分離装置は、上記送液装置を利用するものであり、前記複数の液体のうち少なくとも一つの液体中に微粒子試料が含有されており、当該微粒子試料を密度勾配遠心分離法によって分離することを特徴とする。

また、前記微粒子が細胞、微生物、リポソームその他の生体関連微粒子、ラテックス粒子、ゲル粒子、工業用粒子その他の合成粒子のうちの少なくとも

も一つであることを特徴とする。

発明の効果

[0015] 本願発明者らは微細流路内を流れる液体に対して具体的にどのような大きさ、方向及び位置でコリオリの力が作用しているのかを実験及びシミュレーションで解明し、得られた知見に基づいて、上記コリオリの力による2次流れを抑制し、微細流路内を流れる液体の安定化を実現できる本発明を完成させた。

本発明の送液方法によれば、密度が異なる2種類以上の液体を密度が小さい方から順に遠心ローターの半径方向外側に積層することで、微細流路内の密度勾配を階段状に変化させる。

例えば2種類の液体を用いる場合、図1(a)の流速分布に示すように、微細流路の中央P1(幅方向及び上下方向の中央)を流れる液体は移動速度が最も速く、流路の壁面P2~P5(幅方向の壁面及び上下方向の壁面)近傍を流れる液体は移動速度が相対的に遅い。コリオリの力は液体の流速に比例するので、図1(b)に示すように、微細流路の縦断面(遠心ローターの半径方向に沿った断面)を見た場合、微細流路の中央P1から外向きに大きなコリオリの力が作用し、上下方向の壁面P4及びP5近傍には外向きに相対的に小さなコリオリの力が作用することになる。したがって、遠心ローターの半径方向内側の液体(液体1)は点P1近傍において大きなコリオリの力によって外側の液体(液体2)内に侵入することになり、液体2はコリオリの力が相対的に弱い点P4及び点P5近傍から液体1の方向に押し出される。その結果、流路断面内に液体1及び液体2の流れをひねるような渦拳動(2次流れ)が生じ、微細流路内において層流の安定性が失われてしまう。

[0016] そこで、本発明のように液体2の密度を液体1の密度よりも相対的に大きくして、微細流路内に階段状の密度勾配を形成することで、図1(c)に示すように、液体2に作用する遠心力を、液体1に作用する遠心力よりも相対的に大きくする。この場合、微細流路の縦断面を見ると、液体2には液体1に作用するよりも大きな遠心力が上下方向に均一に作用することになり、液

体2は遠心力によって微細流路の外側の壁面W1に押し付けられることになる。

その結果、上述したような、コリオリの力に起因する液体2を点P4及び点P5近傍から液体1の側に押し出す力を、液体2に作用する遠心力が弱めることになり、上記渦挙動（2次流れ）が生じにくくなるため、層流の安定化を実現できる。

すなわち、本発明は微細流路内にあえて密度勾配を形成すると共に、密度の勾配方向（密度小から密度大に向かう方向）と遠心力の作用方向とを一致させることで、液体に作用する遠心力を利用してコリオリの力による2次流れを抑制して、層流を安定化させるものである。

なお、本明細書中において密度勾配が「階段状」に変化するとは、微細流路内の液体に関して、遠心ローターの半径方向に沿った方向への密度変化が空間的に連続していないことを指すものとする。

[0017] また、図2に示すように、液体に対してコリオリの力が作用する方向は、液体が流れる方向を一定にした場合、遠心ローターの回転方向によって変化する。すなわち、図2（a）に示すように液体が流れる方向と遠心ローターの回転方向を共に反時計回りにした場合、コリオリの力は遠心ローターの半径方向外側に向かって作用する。一方、図2（b）に示すように液体が流れる方向を反時計回り、遠心ローターの回転方向を時計回りにした場合、コリオリの力は遠心ローターの半径方向内側に向かって作用する。本発明ではコリオリの力が遠心ローターの半径方向内側に向かって作用する場合と外側に向かって作用する場合のいずれであっても、そのコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めて層流を安定化させることができる。

本発明の送液方法では、微細流路に流す複数の液体の密度を同一にしていた従来法と比較して、遠心ローターの回転数や流速を速めた場合でも界面の安定性を維持できる。例えば流速であれば従来法よりも100倍程度速くできるケースがあるため、処理時間を大幅に短縮できる。

[0018] 本発明は、従来コリオリの力によって複数の液体が微細流路内で混ざって

しまうために利用できなかった種々のプロセスに適用することができる。

例えば、細胞膜を溶かすことを目的とする液体（溶解液）の密度を細胞と細胞の核の密度の中間に調整し、これが微細流路内の外周側を流れるように細胞懸濁液と共に流すと、遠心中に細胞は溶解液に押し付けられ、界面において核が取り出される反応が進行する。細胞より取り出された核は、溶解液中に取り込まれるが、溶解されなかった細胞は溶解液中に侵入しない為に、核のみを選択して溶解液中に回収できる。

また、有機溶媒中の水溶性物質（イオン等）を水系に抽出するような場合には、これらの液体を微細流路中で接触させることで、微細流路中で物質の拡散距離が短い事を利用して高効率に有機溶媒から水溶性物質を液液抽出するなどのプロセスが実現できる。また、この逆に水系から疎水性物質を有機溶媒等に抽出する事も可能である。

[0019] なお、微細流路の幅は $10\mu\text{m}$ 以上、 1mm 以下とするのが好ましい。一般的な分離処理では遠心ローターは $3,000\text{rpm}$ で回転させることが多く、この条件において微細流路の幅を上記範囲内に設計すると、レイノルズ数はおよそ 100 以下となり、液体の粘性や流速等を総合的に考慮して最も分離能を高めることができる。

本発明の遠心分離法によれば、従来試験管サイズで行っていた密度勾配遠心法をマイクロデバイス化できるので分離装置を安価で構成できるという利点や、液体（試料）が少量で済むと共に試料を貯蔵するためのタンクを遠心ローター上に実装できるという利点もある。更に、連続方式にすれば遠心分離作業を自動化できるので、従来のように遠心管の中に密度勾配を形成する作業や、密度媒体界面に濃縮された分画を回収する作業等、人手による作業が最小限になり、再現性及び分離精度が向上するという利点がある。

また、本発明の遠心分離法は単分散性シリカ微粒子、単分散性ポリマー微粒子、磁気記録媒体、トナー、顔料、シリコンナノ粒子など、種々の微粒子の製造方法として利用することもできる。

[0020] なお、本明細書において液体中に微粒子が含まれる場合、微粒子としては

例えば細胞、微生物、リポソームなどの生体関連微粒子、ラテックス粒子、ゲル粒子、工業用粒子などの合成粒子などが挙げられる。

生体関連微粒子には各種細胞を構成する染色体、リポソーム、ミトコンドリア、オルガネラ(細胞小器官)なども含まれる。細胞には動物細胞(血球系細胞など)や植物細胞が含まれる。微生物には大腸菌などの細菌類、タバコモザイクウイルスなどのウイルス類、イースト菌などの菌類などが含まれる。さらに、生体関連微粒子には、核酸、タンパク質、これらの複合体などの生体関連高分子も含まれる。

また、工業用粒子は、例えば有機もしくは無機高分子材料、金属などであってもよい。

有機高分子材料には、ポリスチレン、スチレン・ジビニルベンゼン、ポリメチルメタクリレートなどが含まれる。無機高分子材料には、ガラス、シリカ、磁性体材料などが含まれる。金属には、金コロイド、アルミなどが含まれる。これら微小粒子の形状は、一般には球形であるが、非球形であってもよく、また大きさや質量なども特に限定されない。

図面の簡単な説明

- [0021] [図1]微細流路内の液体に作用するコリオリの力と遠心力を示す概略図 (a) ~ (c)
- [図2]液体に対してコリオリの力が作用する方向を説明するための図 (a) 及び (b)
- [図3]送液方法を説明するための概略図 (a) ~ (d)
- [図4]実施例1における微細流路内の状態を示す図 (a) 及び (b)
- [図5]実施例2における送液装置及び遠心分離装置の構成を示す図
- [図6]液体として水とPercollを用いた場合に形成されるパターンをPercoll密度及び流速を変えて比較した結果を示す図。
- [図7]サンプル回収口L2及びR2で回収した各液体の混合状態を示す図。
- [図8]遠心ローターの回転数を変化させた場合の結果を示す図。
- [図9]血液に微粒子を懸濁したサンプルを密度勾配遠心法により分離した結果

を示す図。

[図10]流路出口を3本に分岐した構造を用いて行なった血液と樹脂微粒子の分離実験の結果を示す図。

発明を実施するための形態

[0022] 本発明の送液方法の実施の形態について説明する。

図3(a)に示すように、本実施の形態では、液体として密度が異なる2種類のパーコール10、20(第1パーコール10(密度小)及び第2パーコール20(密度大))と、微粒子試料を含有する液体として血液30を使用し、血液30中に含まれる血漿30a、有核赤血球(NRBC)30b及び赤血球30cを分離、回収するものとする。第1パーコール10の密度は血漿30aの浮遊密度より大きく、且つ有核赤血球30bの浮遊密度より小さくなるように調整されており、第2パーコール20の密度は有核赤血球30bの浮遊密度より大きく、且つ赤血球30cの浮遊密度より小さくなるように調整されている。

[0023] 第1パーコール10、第2パーコール20及び血液30が入った各容器11、21、31から流路12、22、32が遠心ローターの半径方向にのびており、各流路は遠心ローターの周縁部において、回転方向に沿って配置された一本の微細流路40の上流側端部に連結されている。また、微細流路40の下流側端部は3本に枝分かれしており、各枝部分において血漿30a、有核赤血球30b及び赤血球30cが回収されることになる。

図3(b)に示すように、微細流路40内において、2種類のパーコールのうち密度が小さい第1パーコール10を遠心ローターの回転中心に近い方に配置し、密度が大きい第2パーコール20を外側に積層することで密度勾配を階段状にしている。また、血液30は第1パーコール10よりも更に回転中心に近い側に配置している。

[0024] 遠心ローターを回転させながら微細流路40内に2種類のパーコール10、20及び血液30を流すと、遠心力によって血漿30aは微細流路40内の最も回転中心に近い側に移動し、有核赤血球30bは第1パーコール10と

第2パーコール20の間に移動し、赤血球30cは第2パーコール20よりも外側に移動する。

そして、図3(c)及び(d)に示すように、第1の枝分かれ部分において血漿30aのみが回収され、第2の枝分かれ部分において有核赤血球30bのみが回収され、最後に赤血球30cが回収される。

[0025] 一般的に微粒子を回収する方式としては回分(バッチ)方式と連続方式がある。回分方式では少量ずつの処理しか行えず、かつ回転開始から加速、一定回転、回転減速、停止までの一回の運転ごとに諸条件が微妙に異なってしまうことから、バッチ間で回収精度にばらつきが出る等の問題がある。一方、連続方式では回分方式よりも試料処理量を増大させることができ、また回収精度を均一にすることが可能である。本発明は両方式に適用できるが、連続方式に適用することが好ましい。

[0026] なお、微細流路の材質は特に限定されるものではなく、有機材料では例えばシリコーン樹脂、アクリル樹脂、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリエステル、ポリカーボネート、フッ素樹脂、シリコーンゴムやフッ素ゴムなどのエラストマーなどが挙げられ、無機材料では例えばガラス、石英、アルミナ、ジルコニアなどが挙げられる。また、各容器及び流路の内壁に濡れ性等の物性を調節するための処理を施していてもよい。

[0027] また、第1パーコール、第2パーコール及び血液が入った各容器から遠心ローターの半径方向にのびる各流路12、22、32に関して、その材質、長さ、形状等を調節することで、微細流路内の各液体の流速を調節することができる。例えば流路をS字状に蛇行させて、流路内を各液体が流れにくくすることで流速を抑えることができる。

また、本実施の形態では密度が異なる3種類の液体(第1パーコール、第2パーコール及び血液)を微細流路に流すものとしたが、4種類以上の液体を流すことにしてもよく、これにより多段の密度勾配を形成でき、分離能をより高精度にすることができる。

また、微細流路の一部に流れの障害となるような構造物(フィルター、支

柱等) を設けることで、液体に含まれる不要物を除去したり、複数の液体を微細流路内の所定位置で攪拌するような機能を持たせてもよい。あるいは、微細流路を遠心ローターの回転方向に沿って複数本配置してもよい。

実施例 1

[0028] 溶液として、リン酸バッファー (PBS、密度 1.006g/cc) とパーコールによる層流安定化効果を検証した。曲率半径 55 mm のマイクロ流路をコンパクトディスク (遠心ローター) の同心円上に配置し、隣接する二つの入り口から、PBSが内周側、パーコールが外周側を流れるようにしてセットし、コンパクトディスクを回転させる事で遠心力による送液を行った。送液時の回転数は 2000 rpm とし、この際のマイクロ流路内の流れはおよそ 40 mm/sec (1.5 ul/sec) である。パーコールの密度を 1.075g/cc から徐々にPBSの密度に近づけると、密度 1.02g/cc までは2次流れの影響は表れなかった (図4 (a) 参照)。

また、同実験系を同じ密度の液体 (着色水) に置き換えると、2次流れの影響により40%の流れが混合する事が分かっている。このため、密度差にして 0.014g/cc 、比率にして1.5%程度の密度差があれば層流を安定化する効果がある事が分かる。

また、上記PBS中にポリスチレンラテックス粒子 (密度 1.075g/cc 以下) を懸濁し上記実験系においてパーコールの密度を 1.075g/cc とした場合には、PBSとパーコールの合流直後においては粒子がPBSの中に分散していた状態であったのに対し、合流後数 cm の箇所においては粒子が遠心力により界面に収束され、パーコールとPBSの界面に維持されることが確認できた (図4 (b) 参照)。

実施例 2

[0029] 図5に示すように、サンプル注入口L1及びR1から周縁部に至る途中に流路を蛇行させることで液体の流れやすさを調節できる流路抵抗調整部を設けた送液装置を用いた。

サンプル注入口L1には青に着色したパーコール (Percoll、密度大)、サンプル注入口R1には赤に着色した水 (密度小) を注入し、遠心ローターを反

時計回りに回転させることで本発明の層流の安定化効果を検証した。

図6は水とPercollを同時に流し形成されるパターンをPercoll密度及び流速を変えて比較した結果である。

各写真の下にはPercollと水との密度差（パーコール密度－水密度）を示している。最も左側の写真は両者が水の場合であり、縞パターンが形成出来ていないが、Percollの密度が高くなり、密度差が大きくなるにつれて縞パターンが明瞭になっていく。なお、上段と下段では回転数を等しくして流量を異ならせている。

これらを比較すると、より高い流量の場合に縞パターンを明瞭にするには、すなわち2次流れを抑制して層流を安定化させるには2つの液体間で大きな密度差が必要である事が分かる。

[0030] 図7はサンプル回収口L2及びR2で回収した各液体を分光し、混合状態を求めたものである。流路はサンプル回収口直前で2本に分岐しており、2つの液体の界面が明瞭な場合は混じりけの無い色素が回収される。

図7に示す様に、青色のPercollの密度を大きくする事でサンプルの混合が少なく、より明瞭な界面が形成されることが分かる。また、密度差が無い場合には $0.1 \mu\text{l/s}$ 程度に流量を抑えなければ明瞭な界面を形成する事が出来ないことが分かっているが、本発明の階段状の密度勾配を適用することで、100倍程度高い $11.8 \mu\text{l/s}$ の条件に於いても界面が維持されていることが分かる。

図8は、同程度の流量条件において遠心ローターの回転数を変化させた場合の結果を示している。この場合、回転数に対する顕著な依存性はなく、回転数のばらつきに対しても安定的に効果を発揮しているといえる。

実施例 3

[0031] 図9は、血液（非蛍光性）に微粒子（蛍光性）を懸濁したサンプルを密度勾配遠心法（沈降平衡法）により分離した結果である。血球細胞の密度はPercollの密度よりも大きいため、血液細胞はサンプル溶媒とPercollとの界面を通過して沈降する。一方、蛍光画像からわかる様に、微粒子の密度はPercollの密度よりも小さいため、微粒子は界面を通過する事がない。

図10は、流路出口を3本に分岐した構造を用いて血液と樹脂微粒子の分離実験を行ったものである。各グラフに示されるように、下段（図9参照）に流れるサンプルにはビーズが混入する事は無く、血球細胞のみを分離したサンプルを得る事が出来ており、沈降平衡法により粒子が分離出来ている事が分かる。

産業上の利用可能性

[0032] マイクロデバイス等に設けた微細流路内の層流の安定化を実現できる遠心方式による送液方法等であり、産業上の利用可能性を有する。

符号の説明

- [0033] 10 第1パーコール
- 20 第2パーコール
- 30 血液
 - 30a 血漿
 - 30b 有核赤血球
 - 30c 赤血球
- 11 容器
- 21 容器
- 31 容器
- 12 流路
- 22 流路
- 32 流路
- 40 微細流路

請求の範囲

- [請求項1] 遠心ローターの回転方向に沿って配置した微細流路内に、密度が異なる2種類以上の液体を密度が小さい方から順に遠心ローターの半径方向外側に積層することで、微細流路内の密度勾配を連続的ではなく階段状に変化させることを特徴とする送液方法。
- [請求項2] 液体に対して上記半径方向内側又は外側に向かって作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めることを特徴とする請求項1に記載の送液方法。
- [請求項3] 階段状に変化させた前記2種類以上の各液体の密度の勾配方向（密度小から密度大に向かう方向）と遠心力の作用方向とを一致させることで、各液体に対して作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めて層流を安定化させることを特徴とする請求項1又は2に記載の送液方法。
- [請求項4] 微細流路の幅を $10\mu\text{m}$ 以上、 1mm 以下としたことを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の送液方法。
- [請求項5] 各液体の密度が 0.9g/cc ～ 1.2g/cc の範囲内であり、積層された2種類の液体の密度差が 0.01g/cc 以上であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の送液方法。
- [請求項6] 前記複数の液体のうち少なくとも一つの液体中に微粒子試料が含有されており、当該微粒子試料を密度勾配遠心分離法によって分離することを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の送液方法を利用した遠心分離法。
- [請求項7] 前記微粒子が細胞、微生物、リポソームその他の生体関連微粒子、ラテックス粒子、ゲル粒子、工業用粒子その他の合成粒子のうちの少なくとも一つであることを特徴とする請求項6に記載の遠心分離法。
- [請求項8] 遠心ローターの回転方向に沿って配置した微細流路を備えており、当該微細流路内に、密度が異なる2種類以上の液体を密度が小さい方から順に遠心ローターの半径方向外側に積層することで、微細流路内

の密度勾配を連続的ではなく階段状に変化させることを特徴とする送液装置。

[請求項9] 前記各液体に対して上記半径方向内側又は外側に向かって作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めることを特徴とする請求項8に記載の送液装置。

[請求項10] 階段状に変化させた前記2種類以上の各液体の密度の勾配方向（密度小から密度大に向かう方向）と遠心力の作用方向とを一致させることで、各液体に対して作用するコリオリの力による2次流れを遠心力で弱めて層流を安定化させることを特徴とする請求項8又は9に記載の送液装置。

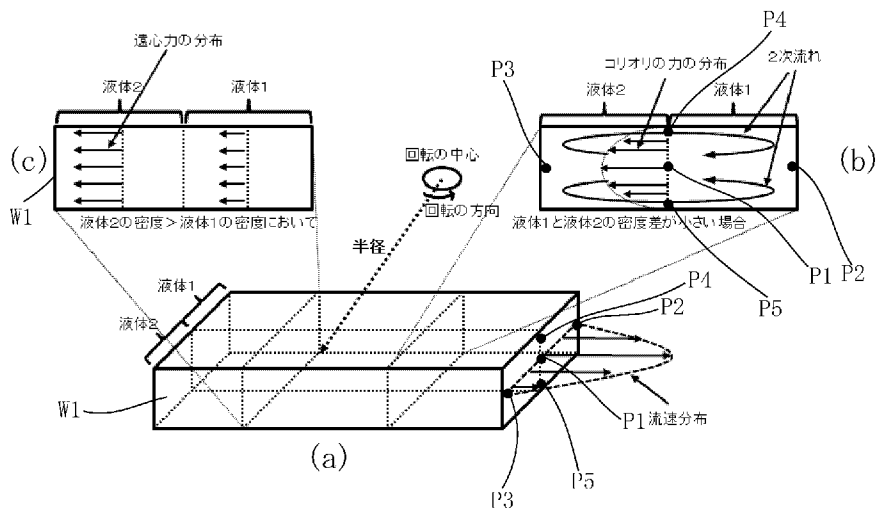
[請求項11] 微細流路の幅を $10\mu\text{m}$ 以上、 1mm 以下としたことを特徴とする請求項8～10のいずれか一項に記載の送液装置。

[請求項12] 各液体の密度が 0.9g/cc ～ 1.2g/cc の範囲内であり、積層された2種類の液体の密度差が 0.01g/cc 以上であることを特徴とする請求項8～11のいずれか一項に記載の送液装置。

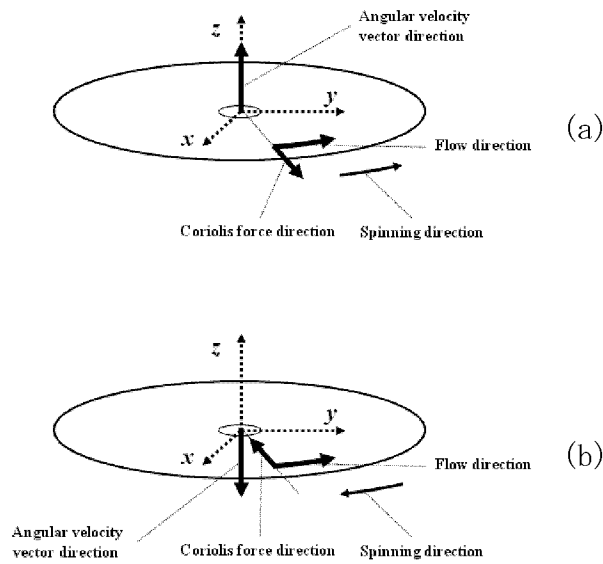
[請求項13] 前記複数の液体のうち少なくとも一つの液体中に微粒子試料が含有されており、当該微粒子試料を密度勾配遠心分離法によって分離することを特徴とする請求項8～12のいずれか一項に記載の送液装置を利用した遠心分離装置。

[請求項14] 前記微粒子が細胞、微生物、リポソームその他の生体関連微粒子、ラテックス粒子、ゲル粒子、工業用粒子その他の合成粒子のうちの少なくとも一つであることを特徴とする請求項13に記載の遠心分離装置。

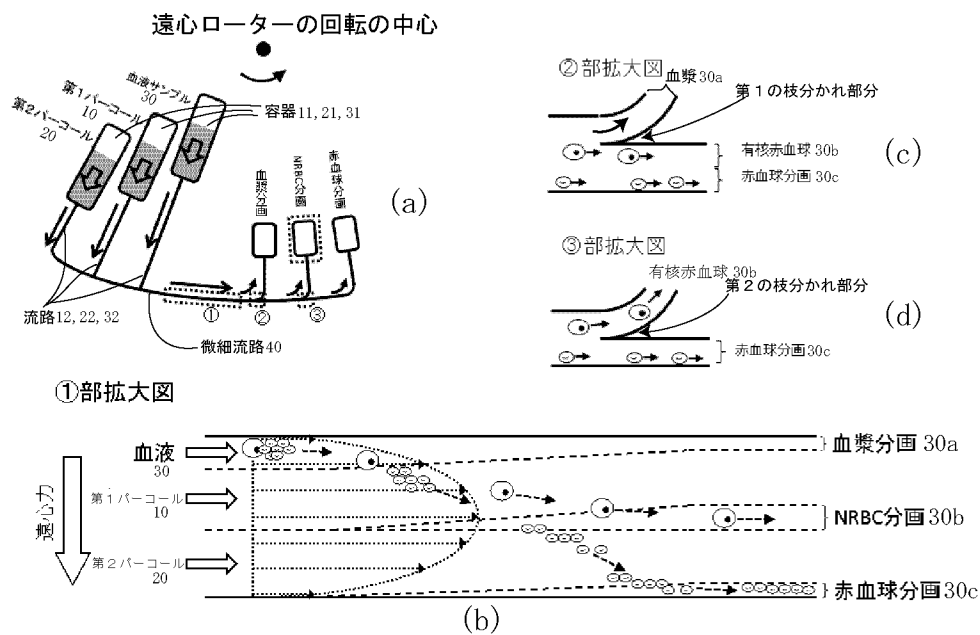
[図1]



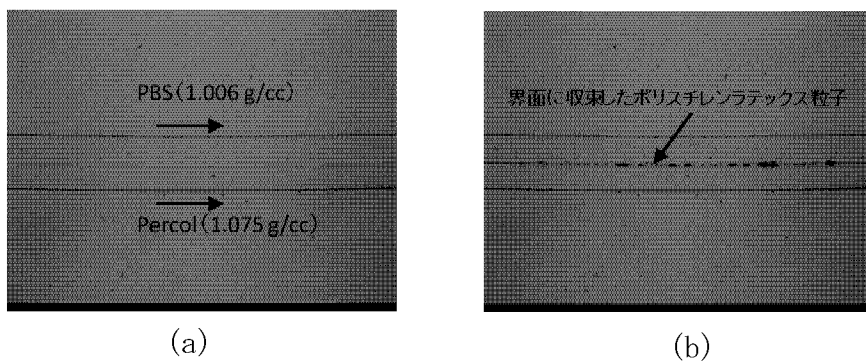
[図2]



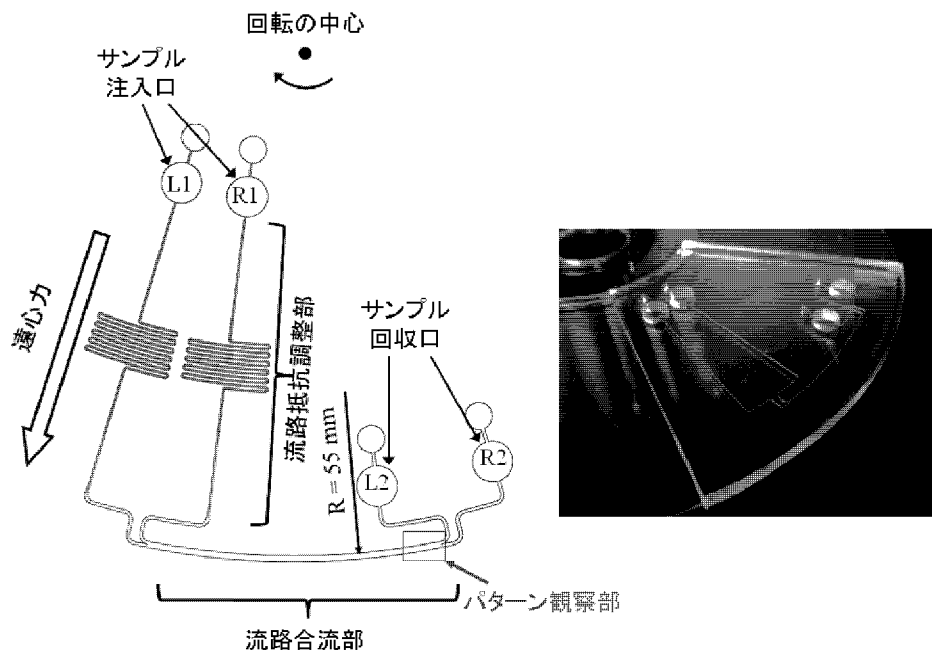
[図3]



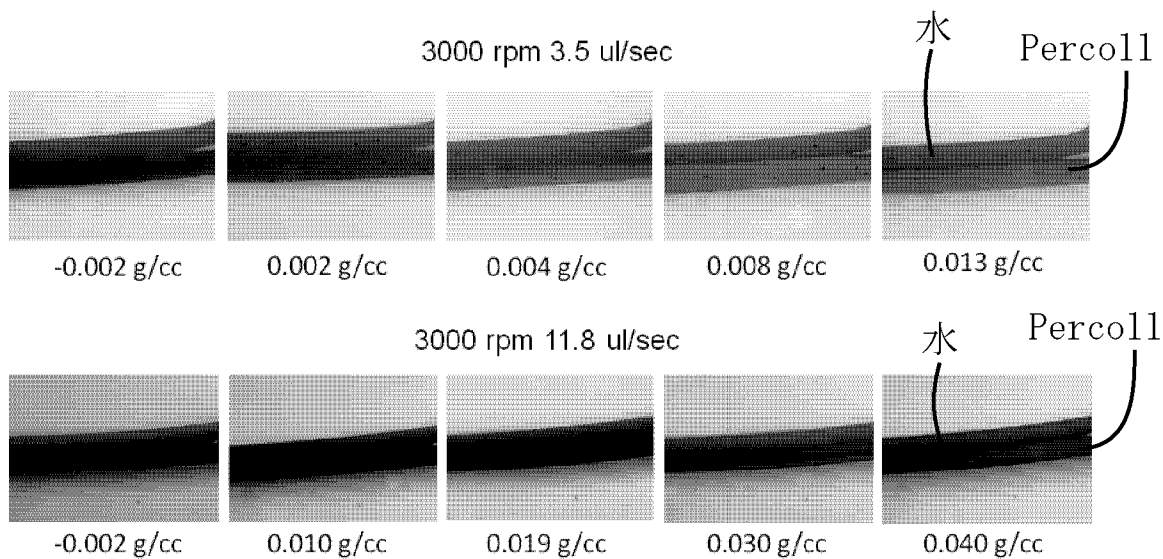
[図4]



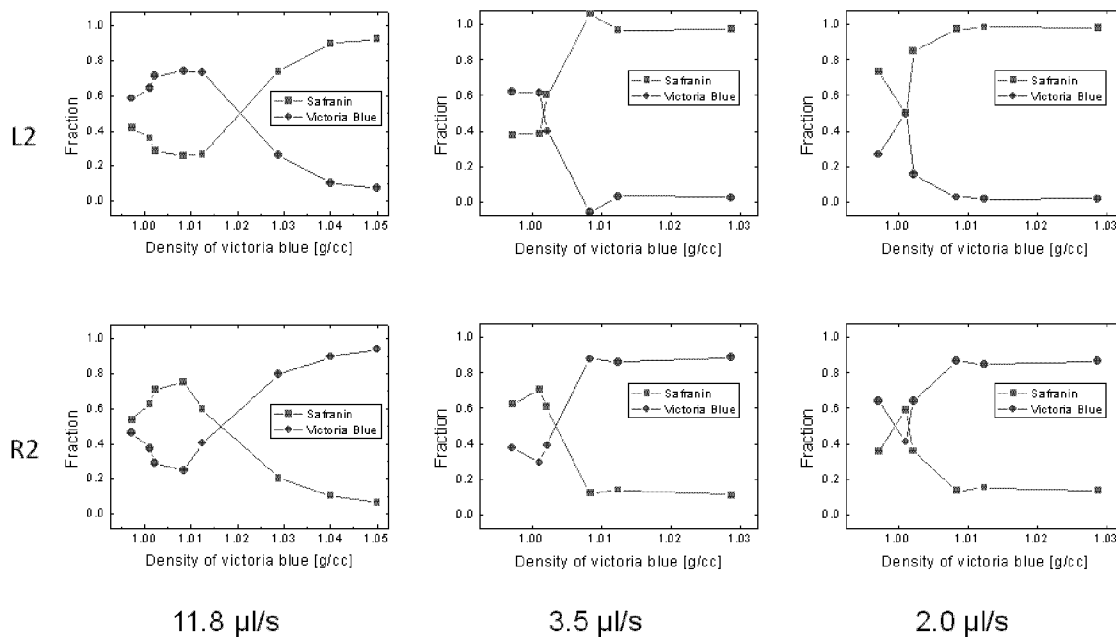
[図5]



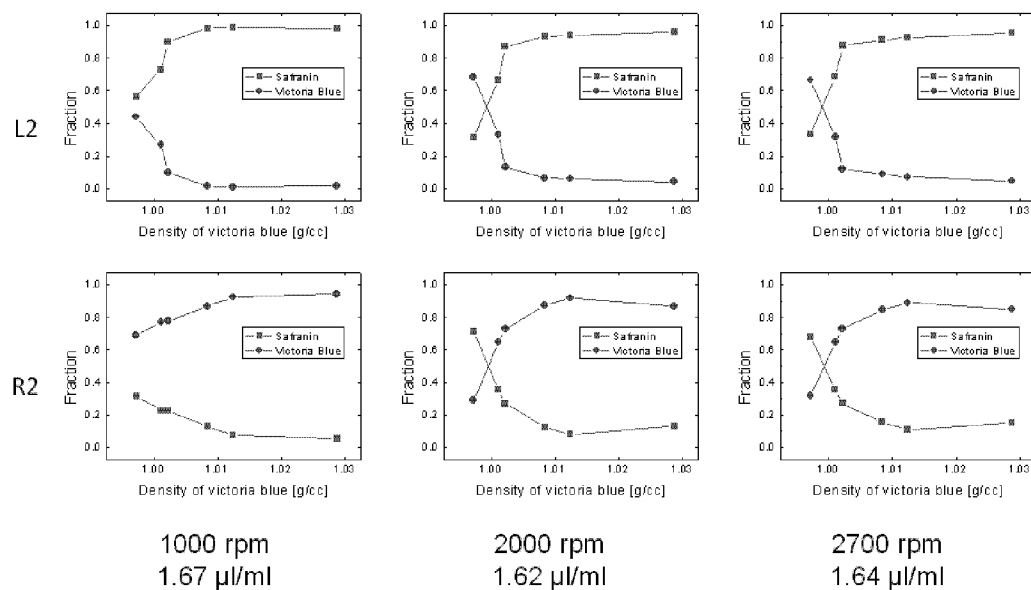
[図6]



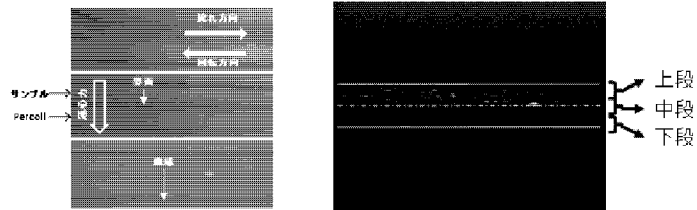
[圖7]



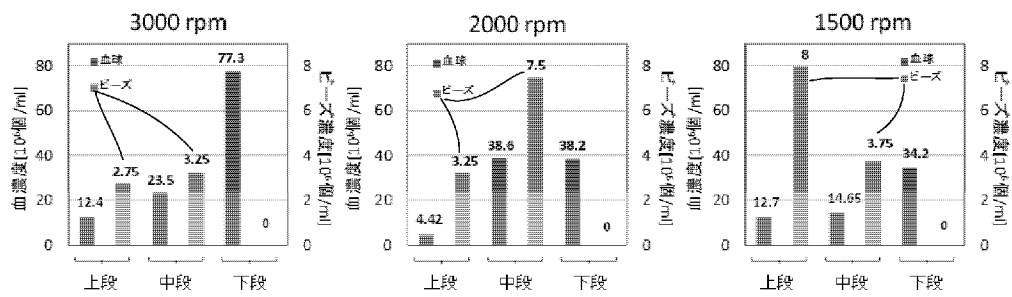
[圖8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/074496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
B01J19/00(2006.01)i, *B03B5/32*(2006.01)i, *B04B5/00*(2006.01)i, *C12N1/00*
 (2006.01)i, *C12N1/02*(2006.01)i, *G01N37/00*(2006.01)i

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)
B01J19/00, *B03B5/32*, *B04B5/00*, *C12N1/00*, *C12N1/02*, *G01N37/00*

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-158991 A (Onchip Cellomics Consortium), 22 June 2006 (22.06.2006), entire text & US 2007/59763 A1 & EP 1626278 A2	1-14
A	JP 2007-98223 A (Fujifilm Corp.), 19 April 2007 (19.04.2007), entire text & US 2007/77185 A1	1-14
A	JP 2008-531273 A (The Regents of the University of California), 14 August 2008 (14.08.2008), entire text & US 2008/190503 A1 & EP 1853697 A & WO 2006/93978 A2	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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 January, 2014 (21.01.14)	Date of mailing of the international search report 28 January, 2014 (28.01.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/074496

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-145420 A (Samsung Electronics Co., Ltd.), 26 June 2008 (26.06.2008), entire text & US 2008/135462 A1 & EP 1935492 A1	1-14
A	JP 2005-224787 A (Eiichi TAMIYA), 25 August 2005 (25.08.2005), entire text (Family: none)	1-14

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. B01J19/00(2006.01)i, B03B5/32(2006.01)i, B04B5/00(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/02(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. B01J19/00, B03B5/32, B04B5/00, C12N1/00, C12N1/02, G01N37/00</p>														
<p>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</p> <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>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014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	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2014年													
日本国実用新案登録公報	1996-2014年													
日本国登録実用新案公報	1994-2014年													
<p>国際調査で使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)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2006-158991 A (有限責任中間法人オンチップ・セラミクス・コンソーシアム) 2006.06.22, 全文&US 2007/59763 A1&EP 1626278 A2</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2007-98223 A (富士フイルム株式会社) 2007.04.19, 全文 &US 2007/77185 A1</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2008-531273 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2008.08.14, 全文&US 2008/190503 A1 &EP 1853697 A&WO 2006/93978 A2</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			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	JP 2006-158991 A (有限責任中間法人オンチップ・セラミクス・コンソーシアム) 2006.06.22, 全文&US 2007/59763 A1&EP 1626278 A2	1-14	A	JP 2007-98223 A (富士フイルム株式会社) 2007.04.19, 全文 &US 2007/77185 A1	1-14	A	JP 2008-531273 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2008.08.14, 全文&US 2008/190503 A1 &EP 1853697 A&WO 2006/93978 A2	1-14
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	JP 2006-158991 A (有限責任中間法人オンチップ・セラミクス・コンソーシアム) 2006.06.22, 全文&US 2007/59763 A1&EP 1626278 A2	1-14												
A	JP 2007-98223 A (富士フイルム株式会社) 2007.04.19, 全文 &US 2007/77185 A1	1-14												
A	JP 2008-531273 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2008.08.14, 全文&US 2008/190503 A1 &EP 1853697 A&WO 2006/93978 A2	1-14												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</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矛盾するものではなく、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>「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>「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>「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>「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>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献													
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
「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	「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													
「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)	「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													
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献													
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>21.01.2014</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>28.01.2014</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>原 賢一</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3421</p>	<table border="1"> <tr> <td>4D</td> <td>9062</td> </tr> </table>	4D	9062										
4D	9062													

C (続き) . 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
A	JP 2008-145420 A (三星電子株式会社) 2008. 06. 26, 全文 &US 2008/135462 A1&EP 1935492 A1	1-14
A	JP 2005-224787 A (民谷 栄一) 2005. 08. 25, 全文 (ファミリーなし)	1-14