

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4387305号
(P4387305)

(45) 発行日 平成21年12月16日 (2009. 12. 16)

(24) 登録日 平成21年10月9日 (2009. 10. 9)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 1/10 (2006. 01)	GO 1 N 1/10 H
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 D
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 M
	GO 1 N 33/48 P
	GO 1 N 33/53 Y

請求項の数 85 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2004-542038 (P2004-542038)	(73) 特許権者	501284217
(86) (22) 出願日	平成15年10月2日 (2003. 10. 2)		バッテル メモリアル インスティテュー
(65) 公表番号	特表2006-502388 (P2006-502388A)		ト
(43) 公表日	平成18年1月19日 (2006. 1. 19)		アメリカ合衆国 オハイオ 43201-
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/031204		2693 コロンバス キング アベニュー
(87) 国際公開番号	W02004/030826		505
(87) 国際公開日	平成16年4月15日 (2004. 4. 15)	(73) 特許権者	505411479
審査請求日	平成18年8月22日 (2006. 8. 22)		スティフェン シィ. ウォードロー
(31) 優先権主張番号	10/263, 974		アメリカ合衆国、コネチカット州 063
(32) 優先日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)		71、ライム、ハイロック
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096862
			弁理士 清水 千春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バフィーコート分離フロートシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗凝固処理全血の試料の拡張されたバフィーコート層における目標分析物の分離および分析を行うための装置であって、

内面を有する細長い側壁を備え、前記試料を保持するための可撓管と、
赤血球の比重と血漿の比重との中間の比重を有する細長い硬質の容量占有フロートとを備え、

前記フロートは、
前記側壁の前記内面に間隔をおいて取り囲まれて、前記内面との間に環状空間を形成する本体部と、

前記本体部から突出し、前記内面と係合して、前記側壁を支持する 1 または複数の支持部材と、

遠心分離減速時に、前記可撓管が収縮するに連れて圧力が上昇しようとする前記フロートの下方の前記試料を当該フロート内に形成した穴または通路に流入させて前記拡張されたバフィーコート層における過度の流体の流れを抑制する緩和手段とを備え、

前記側壁は、遠心分離時に、管内におけるフロートの軸方向移動と、その周囲の流体の流れを可能にするために、遠心力に応答して弾性的に半径方向に拡張可能となっていることを特徴とする装置。

【請求項 2】

血液試料中の目標分析物の分離および分析を行うための装置であって、

内面を有する細長い側壁を備え、前記試料を保持するための透明な可撓管と、
赤血球の比重と血漿の比重との中間の比重を有する細長い硬質の容量占有フロートとを
備え、

前記フロートは、

前記側壁の前記内面に間隔をおいて取り囲まれて、前記内面との間に環状空間を形成する
本体部と、

前記本体部から突出し、前記内面と係合して、前記側壁を支持する１または複数の支持
部材と、

前記本体部を軸方向に貫通することにより、遠心分離減速時に、前記可撓管が収縮する
に連れて圧力が上昇しようとする前記フロートの下方の前記試料を流入させて前記拡張さ
れたバフイーコート層における過度の流体の流れを抑制する内部流路とを備え、

10

前記側壁は、遠心分離時に、管内におけるフロートの軸方向移動と、その周囲の流体の
流れを可能にするために、遠心力に応答して弾性的に半径方向に拡張可能となっているこ
とを特徴とする装置。

【請求項３】

前記内部流路は、開放穴を備えることを特徴とする請求項２に記載の装置。

【請求項４】

前記内部流路内に摺動可能に受け入れられる可動部材をさらに備えることを特徴とする
請求項２に記載の装置。

【請求項５】

20

前記可動部材の軸方向移動を一方向に制限する手段をさらに備えることを特徴とする請
求項４に記載の装置。

【請求項６】

前記可動部材は、前記可動部材の第１の端部を押しつける流体圧力に応答して、前記本
体部に対して第１の方向に入れ子状に伸縮自在（Telescopically）に移動することを特徴
とする請求項４に記載の装置。

【請求項７】

前記可動部材の前記本体部に対する第２の方向への伸縮移動を制限する当接部材をさら
に備えることを特徴とする請求項６に記載の装置。

【請求項８】

30

前記可動部材は、

前記内部流路に受け入れられるピストン部材と、

前記第１の端部の反対側に位置する前記可動部材の第２の端部に形成され、前記本体部
の隣接部分に当接するフランジとを備えることを特徴とする請求項７に記載の装置。

【請求項９】

前記フランジは、前記管の前記側壁内面に係合することを特徴とする請求項８に記載の
装置。

【請求項１０】

前記フランジは、前記側壁内面に間隔をおいて取り囲まれていることを特徴とする請求
項８に記載の装置。

40

【請求項１１】

前記可動部材の前記第１の端部は、第１の径を有し、前記第１の端部の反対側に位置す
る前記可動部材の第２の端部は、前記第１の径よりも大きい第２の径を有し、さらに前記
内部流路は、前記可動部材に対して相補的な内部周壁を備えることを特徴とする請求項６
に記載の装置。

【請求項１２】

前記内部流路は、プロファイル穴（Profiled Bore）により構成されていることを特徴
とする請求項１１に記載の装置。

【請求項１３】

前記内部流路は座ぐりを備え、

50

前記可動部材は、前記第 1 の端部の反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部に形成されて、前記座ぐりに受け入れられる大径部を備えることを特徴とする請求項 12 に記載の装置。

【請求項 14】

前記内部流路は、内方向に延びて、前記可動部材の前記第 1 の端部に係合する環状台座を備えることを特徴とする請求項 7 に記載の装置。

【請求項 15】

前記可動部材の前記第 1 および第 2 の端部は、軸方向に沿って先細になっていることを特徴とする請求項 6 に記載の装置。

【請求項 16】

前記可動部材は、前記本体部よりも比重が大きいことを特徴とする請求項 6 に記載の装置。

【請求項 17】

前記血液試料管は、閉鎖された第 1 の端部と、密封装置を受けるように構成された開放された第 2 の端部とを備えることを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 18】

前記試料管は、約 10 ミリリットルの血液試料を受けるように容積が設定されていることを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 19】

前記フロートは、軸方向の両端に、軸方向に沿って先細りする端部を備えることを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 20】

前記 1 または複数の支持部材は、1 または複数の環状隆起を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 21】

前記 1 または複数の支持部材は、2 つの環状隆起を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 22】

前記 2 つの環状隆起は、前記フロートの軸方向の両端に配置されていることを特徴とする請求項 21 に記載の装置。

【請求項 23】

前記 1 または複数の支持部材は、軸方向に間隔をおいて配置された 3 つ以上の環状隆起を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 24】

前記 1 または複数の支持部材は、螺旋状隆起を備えることを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 25】

前記 1 または複数の支持部材は、放射状に間隔をおいて配置された複数のスプラインを含むことを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 26】

前記 1 または複数の支持部材は、前記フロートの軸方向の両端に配置された環状隆起をさらに含むことを特徴とする請求項 25 に記載の装置。

【請求項 27】

前記 1 または複数の支持部材は、放射状に間隔をおいて配置された複数のスプラインを含み、それらスプラインが、軸方向に間隔をおいて配置されたスプラインと交差することを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 28】

前記 1 または複数の支持部材は、前記本体部の表面に間隔をおいて配置された複数の凸部を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

前記凸部は、円形突起および小面形突起から選択されることを特徴とする請求項 28 に記載の装置。

【請求項 30】

前記管は、可撓性を有し透明な高分子材料で形成され、前記フロートは硬質の高分子材料で形成されていることを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 31】

前記フロートは、約 1.029 ~ 約 1.089 の範囲の比重を有することを特徴とする請求項 2 に記載の装置。

【請求項 32】

血液試料中のバフィーコート構成成分を分離し、軸方向に拡張させる方法であって、
内周面を有する細長い側壁が設けられた可撓試料管に、前記血液試料を導入する工程と

10

、
赤血球と血漿の中間の比重を有する細長い硬質の容量占有フロートを、前記可撓試料管に導入する工程と、を備え、

前記フロートは、前記側壁の前記内面に間隔をおいて取り囲まれて、前記内面との間に環状空間を形成する本体部と、前記本体部から突出し、前記内面と係合して、前記側壁を支持する 1 または複数の支持部材と、前記本体部を軸方向に貫通する内部流路とを備え、

当該方法はさらに、

前記試料管に遠心力を作用させることにより、前記管内の前記フロートの軸方向移動を可能にするのに十分な大きさを有する径まで前記側壁を弾性的に拡大させるような回転速度にして、当該回転速度で、前記血液試料を個別の層に、密度に基づいて分離する工程と

20

、
前記血液の遠心分離するときに生成される遠心力により、前記フロートを移動させて、前記血液試料の少なくとも前記バフィーコート構成成分と軸方向に整列させる工程と、

その後、前記回転速度を低下させて、前記側壁内面に前記フロートを拘束させるとともに、前記可撓管が収縮するに連れて圧力が上昇しようとする前記フロートの下方の前記血液試料を前記内部流路に流入させて前記拡張されたバフィーコート層における過度の流体の流れを抑制する工程と、を備えることを特徴とする方法。

【請求項 33】

前記血液を前記血液試料管に導入する前に、前記フロートを前記血液試料管に導入することを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 34】

前記フロートを前記血液試料管に導入する前に、前記血液試料を前記血液試料管に導入することを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記血液試料は、抗凝固処理全血であることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

前記内部流路は、中心穴を備えることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

前記内部流路内に摺動可能に受け入れられる可動部材をさらに備えることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記可動部材の軸方向移動を一方向に制限する手段をさらに備えることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記可動部材は、前記可動部材の第 1 の端部を押しつける流体圧力に応答して、前記本体部に対して第 1 の方向に入れ子状に伸縮自在に移動することを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記可動部材の前記本体部に対する第 2 の方向への伸縮移動を制限する当接部材をさら

50

に含むことを特徴とする請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記可動部材は、前記内部流路に受け入れられたピストン部材と、前記第 1 の端部の反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部に形成され、前記本体部の隣接部分に当接するフランジとを備えることを特徴とする請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記フランジは、前記管の前記側壁内面に係合することを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記フランジは、前記側壁内面に間隔をおいて取り囲まれていることを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 4】

前記可動部材の前記第 1 の端部は第 1 の径を有し、前記第 1 の端部と反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部は、前記第 1 の径よりも大きい第 2 の径を有し、さらに前記内部流路は、前記可動部材に対して相補的な内部周壁を備えることを特徴とする請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記内部流路は、プロファイル穴 (Profiled Bore) により構成されていることを特徴とする請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

20

前記内部流路は座ぐりを備え、

前記可動部材は、前記第 1 の端部の反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部に形成されて、前記座ぐりに受け入れられる大径部を備えることを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記内部流路は、内方向に延びて、前記可動部材の前記第 1 の端部に係合する環状台座を備えることを特徴とする請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記可動部材の前記第 1 および第 2 の端部は、軸方向に沿って先細になっていることを特徴とする請求項 3 9 に記載の方法。

30

【請求項 4 9】

前記可動部材は、前記本体部よりも比重が大きいことを特徴とする請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記血液試料管は、閉鎖された第 1 の端部と、密封装置を受けるように構成された開放された第 2 の端部とを備えることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記試料管は、約 1 0 ミリリットルの血液試料を受けるように容積が設定されていることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 2】

40

前記フロートをさらに移動させて、分離赤血球層の部分および分離血漿層の部分の少なくとも一方と軸方向に整列させることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 3】

対応する可撓試料管とともに遠心分離に使用されるように構成された容量占有セパレータフロートであって、

硬質本体部と、

前記本体部から半径方向に外部に延び、前記試料管の内壁に係合するようにサイズ設定され、前記本体部と前記内壁の間に隙間を維持するように構成された 1 または複数の硬質管支持部材と、

前記本体部を軸方向に貫通する内部流路と、

50

前記内部流路内に摺動可能に受け入れられる可動部材と、
前記可動部材の下方への軸方向移動を制限する手段とを備えることを特徴とするセパレータフロート。

【請求項 5 4】

対応する試料管とともに遠心分離に使用されるように構成された容量占有セパレータフロートであって、

前記試料管の内径より小さい断面径を有する硬質本体部と、

前記本体部から半径方向に外部に延び、前記試料管の内壁に係合するようにサイズ設定され、前記本体部と前記内壁の間に隙間を維持するように構成された 1 または複数の硬質管支持部材と、

前記本体部を軸方向に貫通する内部流路と、

前記内部流路内に摺動可能に受け入れられる可動部材と、
前記可動部材の下方への軸方向移動を制限する手段とを備えることを特徴とするセパレータフロート。

【請求項 5 5】

前記内部流路は、中心穴を備えることを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 5 6】

前記可動部材は、前記可動部材の第 1 の端部を押しつける流体圧力に応答して、前記本体部に対して第 1 の方向に入れ子状に伸縮自在に移動することを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 5 7】

前記可動部材の前記本体部に対する第 2 の方向への伸縮移動を制限する当接部材をさらに含むことを特徴とする請求項 5 6 に記載のセパレータフロート。

【請求項 5 8】

前記可動部材は、前記内部流路に受け入れられたピストン部材と、前記第 1 の端部の反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部に形成され、前記本体部の隣接部分に当接するフランジとを備えることを特徴とする請求項 5 7 に記載のセパレータフロート。

【請求項 5 9】

前記フランジは、前記対応する試料管の内面に係合するようにサイズ設定されていることを特徴とする請求項 5 8 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 0】

前記フランジは、前記対応する試料管の内面に間隔をおいて取り囲まれるようにサイズ設定されていることを特徴とする請求項 5 8 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 1】

前記可動部材の前記第 1 の端部は第 1 の径を有し、前記第 1 の端部の反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部は、前記第 1 の径よりも大きい第 2 の径を有し、さらに前記内部流路は、前記可動部材に対して相補的な内部周壁を備えることを特徴とする請求項 5 6 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 2】

前記内部流路は、プロファイル穴を備えることを特徴とする請求項 6 1 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 3】

前記内部流路は座ぐりを備え、

前記可動部材は、前記第 1 の端部の反対側に位置する前記可動部材の第 2 の端部に形成されて、前記座ぐりに受け入れられる大径部を備えることを特徴とする請求項 6 2 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 4】

前記内部流路は、内方向に延びて、前記可動部材の前記第 1 の端部に係合する環状台座を備えることを特徴とする請求項 5 7 に記載のセパレータフロート。

10

20

30

40

50

【請求項 6 5】

前記可動部材の前記第 1 および第 2 の端部は、軸方向に沿って先細になっていることを特徴とする請求項 5 6 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 6】

前記可動部材は、前記本体部よりも比重が大きいことを特徴とする請求項 5 6 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 7】

前記本体部と、前記 1 または複数の支持部材とは一体形成されていることを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 8】

前記隙間は、約 5 0 ミクロンの半径範囲を有することを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 6 9】

約 1 0 ミリリットルの血液試料を受け入れるように容積が設定された試料管に使用されるように構成されていることを特徴とする請求項 6 8 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 0】

前記フロートは、軸方向の両端に、軸方向に沿って先細りする端部を備えることを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 1】

前記 1 または複数の支持部材は、1 または複数の環状隆起を含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 2】

前記 1 または複数の支持部材は、2 つの環状隆起を含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 3】

前記 2 つの環状隆起は、前記フロートの軸方向の両端に配置されていることを特徴とする請求項 7 2 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 4】

前記 1 または複数の支持部材は、軸方向に間隔をおいて配置された 3 つ以上の環状隆起を含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 5】

前記 1 または複数の支持部材は、螺旋状隆起を備えることを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 6】

前記 1 または複数の支持部材は、放射状に間隔をおいて配置された複数のスプラインを含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 7】

前記スプラインは、前記フロートの軸に平行に整列されていることを特徴とする請求項 7 6 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 8】

前記 1 または複数の支持部材は、前記フロートの軸方向の両端に配置された環状隆起をさらに含むことを特徴とする請求項 7 6 に記載のセパレータフロート。

【請求項 7 9】

前記 1 または複数の支持部材は、放射状に間隔をおいて配置された複数のスプラインを含み、それらスプラインが、軸方向に間隔をおいて配置されたスプラインと交差することを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 8 0】

前記 1 または複数の支持部材は、前記本体部の表面に間隔をおいて配置された複数の凸部を含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載のセパレータフロート。

【請求項 8 1】

10

20

30

40

50

前記凸部は、円形突起および小面形突起から選択されることを特徴とする請求項 8 0 に記載のセパレータフロート。

【請求項 8 2】

抗凝固処理全血試料中の循環目標細胞を検出するための方法であって、

前記血液試料中の他の細胞から目標細胞を識別できるように、前記血液試料を 1 または複数の標識剤と組み合わせる工程と、

内周面を有する可撓側壁を備えた透明試料管に、前記血液試料を導入する工程と、

容量占有セパレータフロートを前記試料管内に挿入する工程とを有し、

前記セパレータフロートは、前記試料管の内径よりも小さい断面径を有する硬質本体部と、前記本体部から半径方向に外部に延び、前記試料管の内壁に係合するようにサイズ設定され、前記本体部と前記内壁の間に隙間を維持するように構成された 1 または複数の硬質管支持部材と、内部流路とを備え、

当該方法はさらに、前記試料管内の前記血液試料およびセパレータフロートに遠心力を作用させて、前記隙間内の前記血液試料中に存在する各目標細胞を遠心力によって局在化させる工程と、遠心力の減衰時に前記可撓管が収縮するに連れて圧力が上昇しようとする前記フロートの下方の前記血液試料を前記内部流路に流入させて前記拡張された上記隙間での過度の流体の流れを抑制する工程とを有し、

当該方法はさらに、前記遠心分離後に、前記隙間に存在する前記血液試料を検査して、そこに含まれる各目標細胞を識別する工程を有することを特徴とする方法。

【請求項 8 3】

前記 1 または複数の標識剤は蛍光標識リガンドを含み、

前記血液試料を検査する工程では、照明および拡大下で、前記分析領域に存在する前記血液試料を画像化することを特徴とする請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記血液試料を染色剤と組み合わせる工程をさらに含むことを特徴とする請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記目標細胞には、癌細胞、幹細胞、細胞断片、ウイルス感染細胞またはトリパノソーマが含まれることを特徴とする請求項 8 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、密度に基づく流体分離に関し、詳細には、遠心分離によって層状化された流体構成成分の分離および軸方向拡張のための改良型試料管およびフロート設計、並びにそれを利用した方法に関する。本発明は、血液分離およびバフィーコート (Buffy Coat) 層の軸方向拡張を具体的な用途とし、その用途を特に参照しながら本発明を説明する。しかし、本発明は、他の同様の用途にも適用可能であることが認識されるであろう。

【0002】

なお、2002 年 10 月 3 日に出願された同時係属米国出願第 10 / 263,975 号 (代理人整理番号 B A T Z 2 00007 号) は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【背景技術】

【0003】

定量バフィーコート (Q B C : Quantitative Buffy Coat) 分析は、全血を評価するために、臨床試験室において日常的に実施されている。Q B C 分析技術では、一般に、抗凝固処理全血を含む毛細管の遠心分離を利用して、血液を 6 つの異なる層、すなわち (1) 濃縮赤血球、(2) 網状赤血球、(3) 顆粒球、(4) リンパ球 / 単球、(5) 血小板、(6) 血漿に分離する。管の検査に基づいて、実質的に各層の長さまたは高さを求め、細胞計測値に変換することで、各層の定量測定が可能になる。長さは、手動読取り装置、すなわち拡大接眼鏡および手動ポインティングデバイスを使用して、または管の長さ方向に

10

20

30

40

50

沿って光透過率および蛍光発光を測定することにより層を確認する自動光学式走査装置によって光学的に測定することが可能である。広く使用されている一連のＱＢＣ計測器が、ニュージャージー州フランクリン・レークスのベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー（Becton-Dickinson and Company）によって製造されている。

【０００４】

パフィーコート層は非常に小さいので、多くの場合、正確な視覚的または光学的測定を行うために、管内にプラスチックシリンダまたはフロートが挿入されて、パフィーコートが管内で拡張される。フロートは、赤血球の密度（ 1.090 g/ml ）より小さく、血漿の密度（約 1.028 g/ml ）より大きい密度を有し、管の断面積のほぼすべてを占める。したがって、この容量占有フロートは、濃縮赤血球層上に静止して、分析に向けて、管内のパフィーコート層の軸方向長さを拡張させる。

10

【０００５】

当該技術分野では、血液を分離したり、あるいは血液試料中のパフィーコート層や他の層内の流血中癌や他の希少細胞、生体、粒子または物体（すなわち幹細胞、細胞断片、ウイルス感染細胞、トリパノソーマ等）を識別したりするための改良型試料管、フロートシステムおよび方法が必要とされている。しかしながら、パフィーコートに一般的に存在すると想定される細胞の数は、血液の量に比べて極めて小さく、例えば血液１ミリメートル当たり１～１００個の範囲であるため、特に従来のＱＢＣ毛細管およびフロートに採用される微小試料サイズでは、測定が困難である。

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明は、上述の問題等を克服する新規で改良された血液分離アセンブリおよび方法を意図するものである。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明の第１の態様において、抗凝固処理全血の試料中の目標分析物の分離および分析を行うための装置が提供される。この装置は、試料を保持するための透明または半透明な可撓管と、赤血球と血漿の中間の比重を有する細長い硬質の容量占有フロートとを含む。フロートは、管の側壁の内周面に間隔をおいて囲まれて、その間に環状の空間を形成する本体部を備える。１または複数の支持部材が本体部から突出して、側壁に係合して側壁を支える。内部流路が、フロートの本体部分を軸方向に貫通して延びる。管の側壁は、遠心分離時に、管内におけるフロートの軸方向移動と、その周囲の流体の流れを可能にするために、遠心力に応答して弾性的に半径方向に拡張可能となっている。内部流路は、試料管の外壁の潰れによって分離パフィーコート層に過度の破壊的な流体の流れが生じるのを防止して、遠心分離の減速時の分析領域を形成するために存在する。

30

【０００８】

第２の態様において、血液試料中のパフィーコート構成成分を分離し、軸方向に拡張させる方法は、内周面を備えた細長い側壁を有する可撓試料管に血液試料を導入する工程を有する。細長い硬質の容量占有フロートは、赤血球と結晶の中間の比重を有し、可撓試料管内に導入される。フロートは、管の側壁の内周面に間隔をおいて囲まれて、その間に環状の空間を形成する本体部を備える。１または複数の支持部材はフロートの本体部から突出して、側壁に係合して側壁を支える。内部流路は本体部を軸方向に貫通して延びる。血液試料は、遠心力が付与されて、管内のフロートの軸方向移動を可能にするのに十分な大きさを有する径まで側壁を弾性的に半径方向に拡張させる回転速度で、密度に基づいて個別の層に遠心分離される。フロートは、遠心力に応答して、血液試料の少なくともパフィーコート層と軸方向に整列する位置に移動し、その後、回転速度が減じられて、フロートは壁内周面に拘束される。

40

【０００９】

第３の態様において、容量占有セパレータフロートが提供される。フロートは、対応す

50

る試料管に使用するように構成され、硬質の本体部と、本体部から半径方向に外側に延びる１または複数の硬質管支持部材とを備える。管支持部材は、試料管の内壁に係合するようにサイズ設定され、本体部と試料管の内壁との間に隙間を維持するように構成される。フロートは、遠心分離時に隙間に存在する拡張細胞層での、過度の流れを緩和する手段をさらに備える。

【 0 0 1 0 】

第４の態様において、抗凝固処理全血試料中の循環上皮癌細胞を検出するための方法は、血液試料中の他の細胞から上皮癌細胞を識別できるように、血液試料を１または複数の上皮細胞の抗原決定基特有標識剤（Epitope-Specific Labeling Agents）と組み合わせる工程を有する。血液試料は、内周面を有する可撓側壁を備えた透明試料管に導入され、容量占有セパレータフロートは試料管に挿入される。セパレータフロートは、断面径が試料管の内径より小さい硬質本体部と、本体部から半径方向に外側に延びる１または複数の硬質管支持部材とを備える。支持部材は、試料管の内壁に係合するようにサイズ設定され、本体部と内壁の間に隙間を維持するように構成される。セパレータフロートは、遠心分離によるフロートの軸方向両端における圧力差を自動的に緩和するための圧力緩和システムをさらに備える。血液試料およびセパレータフロートに遠心力が付与されることにより、隙間内の血液試料中に存在する任意の上皮癌細胞が遠心力により局在化する。遠心分離後、隙間、すなわち分析領域に含まれる上皮癌細胞の存在について血液試料が検査される。

10

【 0 0 1 1 】

さらに他の態様においては、可撓試料管と硬質フロートの圧縮性および／または剛性を逆にすることが可能である。この態様では、フロートは、より高圧で径が収縮するように設計され、硬質の管内、また場合によっては半硬質の管内で、自由に移動する。圧縮性フロートを使用すると、場合によってはポリマー管よりも優れた光学的特性を示す透明ガラス管の利用が可能になる。また、この態様は、一般には、（フロートは、圧力減少後に管壁に抗して拡張することになるため）ガラス管に対する精度要件を緩和し、全範囲のフロート設計が可能になる。

20

【 0 0 1 2 】

他の態様では、遠心分離工程を必要としない。このような態様では、単に圧力を管の内側に加えること、または単に管を拡張させること（またはフロートを圧縮すること）が必要とされる。例えば、管の外側の真空源を使用して、上記圧力を生成することができる。このような応用例によれば、試料管の頂部を開放状態に維持することができ、容易にアクセスできるようになる。また、真空源を使用することは、ある状況では、遠心力を適用するより容易である。

30

【 0 0 1 3 】

さらに、機械的、電気的および磁気的方法等の任意の管拡張／収縮（またはフロート圧縮）方法を実施することが可能である。管を拡張すると（またはフロートを圧縮すると）、フロートは、試料内の密度変化によって生成された浮遊力により適正な位置に移動することになる。

【 0 0 1 4 】

さらなる態様において、フロートは、可撓回収管システムまたはアセンブリの一部を備える。この態様では、回収容器から分析管に試料を移送する必要はない。血液または試料流体を直ちに回収して試験することができる。このようなシステムは、幾分高速で、バイオハザードの観点から安全である。例えば、このシステムは、いかなるタイプの血液汚染も最小限にする必要があるような極めて接触伝染性の強い状況（すなわちエボラウイルス、ＨＩＶ等）において、望ましいものである。

40

【 0 0 1 5 】

本発明の１つの利点は、比較的大量の血液試料のパフィーコート全体を血液量の残りから分離可能な血液分離装置において見いだされる。

【 0 0 1 6 】

本発明の他の利点は、１つの簡単な操作、すなわち遠心分離により、パフィーコート層

50

を視覚化または画像化に利用できるようになることにある。

【 0 0 1 7 】

本発明のさらに他の利点は、パフィーコートの分離、保持、また必要な場合には、後処理のための試料管からの抽出がより一層改善されることにある。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の利点は、低い遠心分離速度で血液試料を沈降させることができ、これにより、起こりうる管の破損を低減できることにある。

【 0 0 1 9 】

さらに他の利点は、試料の画像化を向上させるために管を支持することができ、画像化のためのより反復性の高い深さを提供できることにある。

10

【 0 0 2 0 】

本発明のさらに他の利点は、比較的構造が単純で、製造が容易で、低コストなことにある。

【 0 0 2 1 】

他の利点は、フロートの下方の圧力が自動的に緩和されることにより、赤血球が混入することによる分離パフィーコートのコンタミネーションが低減されることにある。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の利点および有益性は、好ましい実施形態の以下の詳細な説明を読んで理解することで、当業者に明らかなものとなるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【 0 0 2 3 】

以下、図面に基づいて説明する。なお、各図面の記載は、本発明の好ましい実施形態を例示することのみを目的とし、それを制限することを目的とはしていない。図 1 は、血液分離管およびフロート・アセンブリ 1 0 0 を示す図で、このアセンブリは、本発明のセパレータフロートまたはボバー (Bobber) 1 1 0 を内部に有する試料管 1 3 0 を備えている。

【 0 0 2 4 】

試料管 1 3 0 は、描かれた実施形態では全体的に円筒形であるが、多角形および他の幾何学断面形状を有する管も考えられる。試料管 1 3 0 は、第 1 の閉鎖端 1 3 2 と、ストップパまたはキャップ 1 4 0 を受ける第 2 の開放端 1 3 4 とを有する。他の密封手段として、例えばパラフィルム (Parafilm) などと考えられる。代替的な実施形態 (不図示) では、試料管を各端部で開放し、各端部が適切な密封装置を受けるようにすることができる。

30

【 0 0 2 5 】

管は、全体的に円筒形として描かれているが、特に射出成形法によって製造する場合は、開放端 1 3 4 に向けて僅かに拡大するように、管 1 3 0 に最小限のテーパを付けることができる。このテーパまたは抜き勾配は、管を射出成形具から容易に取り除くのに一般に望ましいものである。

【 0 0 2 6 】

管 1 3 0 は、透明または半透明の材料で形成されている。管 1 3 0 の側壁 1 3 6 は、十分にフレキシブルにまたは変形可能に構成され、遠心分離時には、遠心荷重下での試料の静水圧により、半径方向に拡張する。そして、遠心力が取り除かれると、管側壁 1 3 6 は、実質的に本来のサイズおよび形状に戻る。

40

【 0 0 2 7 】

管は、任意の透明または半透明の可撓性材料 (有機および無機)、例えばポリスチレン、ポリカーボネート、スチレン - ブタジエン - スチレン (S B S)、スチレン / ブタジエン共重合体 (例えば、オクラホマ州バートルズビルのフィリップス 6 6 社から入手可能な K - R e s i n (登録商標)) などで形成することが可能である。管は透明であることが好ましいが、試料検体中の対象となる細胞または物体を探す受信計が、管内のこれらの物体を「確認」または検出できるのであれば、管は必ずしも透明でなくてもよい。例えば、バルク試料内で検出できない極めて低放射活性レベルの物体を、以下により詳細に説明す

50

るように、本発明の方法により分離して、フロート 110 により壁付近にトラップした後で、不透明または半透明の壁を通じて検出することが可能である。

【0028】

好ましい実施形態において、管 130 は、少なくとも約 5 ミリリットルの血液または試料流体、より好ましくは少なくとも約 8 ミリリットルの血液または流体、最も好ましくは少なくとも約 10 ミリリットルの血液または流体を、フロート 110 と共に収容できるようにサイズ設定される。特に好ましい実施形態において、管 130 は、約 1.5 cm の内径 138 を有し、少なくとも約 10 ミリリットルの血液をフロート 110 と共に収容する。

【0029】

フロート 110 は、本体部 112 と、フロート 110 の軸方向の両端にそれぞれ配置された 2 つの密封リングまたはフランジ 114 とを含む。フロート 110 は、1 または複数の全体的に硬質の有機または無機材料、好ましくは硬質プラスチック材料、例えば、ポリスチレン、アクリロニトリルブタジエンスチレン (ABS) 共重合体、芳香族ポリカーボネート、芳香族ポリエステル、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、エチレン酢酸ビニル共重合体、ナイロン、ポリアセタール、ポリアセテート、ポリアクリロニトリルおよび他のニトリル樹脂、ポリアクリロニトリル - 塩化ビニル共重合体、ポリアミド、芳香族ポリアミド (アラミド)、ポリアミド - イミド、ポリアリレート、ポリアリレン酸化物、ポリアリレン硫化物、ポリアリルスルホン、ポリベンズイミダゾール、ポリブチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエステルイミド、ポリエーテルスルホン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレンテレフタレート、ポリイミド、ポリメタクリレート、ポリオレフィン (例えばポリエチレン、ポリプロピレン)、ポリアロマー、ポリオキサジアゾール、ポリパラキシレン、ポリフェニレン酸化物 (PPO)、改質 PPO、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリテトラフルオリエチレンの如きフッ素含有重合体、ポリウレタン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリ塩化ビニルの如きポリハロゲン化ビニル、ポリ塩化ビニル - 酢酸ビニル共重合体、ポリビニルピロリドン、ポリ塩化ビニリデン、特殊重合体等で形成され、最も好ましくはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、アクリロニトリルブタジエ - スチレン共重合体 (ABS) 等で形成される。

【0030】

この点において、本発明の目的の 1 つは、検出または走査法に干渉する材料および / または添加剤の使用を避けることである。例えば、検出を目的として蛍光を利用する場合は、フロート 110 を構成するのに利用される材料は、対象となる波長で多くのバックグラウンド (Background) 蛍光を有するものであってはならない。

【0031】

フロート 110 の本体部 112 および密封リングまたは支持部材 114 は、加圧下または遠心力下で、試料管 130 の内径 138 より小さい外径 118 を有するようにサイズ設定される。フロート 110 の本体部 112 も密封または支持リング 114 より小さく設定され、これにより、フロート 110 と管 130 の側壁 136 との間に環状溝または間隙 150 が形成されるようになっている。本体部は、管の断面積の多くを占め、環状の間隙 150 は、管が曲がっていない状態のときにバフィーコート層の細胞成分および関連する目標細胞を収容するのに十分な大きさを有する。寸法 118 および 138 は、環状の間隙 150 が好ましくは約 25 ~ 250 ミクロン、最も好ましくは約 50 ミクロンの半径方向厚さを有するように、設定される。

【0032】

穴または通路 152 は、フロート 110 を軸方向に貫通して延びる。管 / フロート・システムが遠心分離されているときは、管が拡張し、血液試料中のフロートを解放する。遠心分離の速度が遅くなると、管が本来の径に戻って、管の壁 136 がフロートを拘束する。管が収縮するに連れて、フロートの下方でトラップされた血液分、主に赤血球内の圧力が上昇する可能性がある。この圧力によって、赤血球は、バフィーコート層が捕収容さ

10

20

30

40

50

れた環状溝 1 5 0 内に押し込まれる可能性があり、その場合、バフィーコートの内容物を画像化するのがより困難になる。また、減速時に試料管の側壁が潰れると、分離されたバフィーコート層を介して過度のまたは破壊的な流体の流れが発生する可能性がある。穴 1 5 2 は、フロート 1 1 0 の下方でトラップされた高密度の部分における過剰な流体の流れまたは生成圧力を緩和することを可能にする。過剰な流体は穴 1 5 2 に流れ込むこととなるため、バフィーコート試料の劣化が防止される。

【 0 0 3 3 】

描かれた実施形態では、好ましい構成、すなわち中央に設けられ軸方向に延びる穴 1 5 2 を示しているが、一端から他端に完全に貫通する穴であれば、他の構成も考えられることが認識されるであろう。好ましい実施形態においては、穴 1 5 2 は、中央に位置し、軸方向に延びる。

10

【 0 0 3 4 】

場合によっては、フロート 1 1 0 の本体部 1 1 2 の外径 1 1 8 は、管 1 3 0 の内径 1 3 8 より小さくてもよいが、この関係は必須ではない。なぜなら管 1 3 0 に遠心力が付与（加圧）されると、管 1 3 0 が拡張して、フロート 1 1 0 が自由に移動できるようになるからである。遠心分離（加圧）工程が終了すると、管 1 3 0 は収縮して、再び密封リングまたは支持隆起（Support Ridges）1 1 4 を押し付ける。その結果、環状間隙または溝 1 5 0 が形成され、そのサイズが支持隆起または密封リング 1 1 4 の高さによって設定される（すなわち、貯留部（Pool）の深さは、管径に関係なく、支持隆起 1 1 4 の高さと同しくなる）。

20

【 0 0 3 5 】

特に好ましい実施形態において、フロート寸法は、高さ 3 . 5 c m、直径 1 . 5 c m で、本体部は、血液のバフィーコート層を捕捉するために 5 0 ミクロンの間隙を提供するようにサイズ設定される。したがって、バフィーコート層の捕捉に利用可能な体積は約 0 . 0 8 ミリリットルである。バフィーコート層全体は、通常は全血試料の約 0 . 5 % よりも小さいため、好ましいフロートは、8 ~ 1 0 ミリリットルの血液試料において分離されるバフィーコート層の全量を収容する。

【 0 0 3 6 】

密封または支持フランジ端部 1 1 4 は、管の内径 1 3 8 にほぼ等しいか、それより僅かに大きくなるようにサイズ設定される。フロート 1 1 0 は、全体的に硬質で、可撓管壁 1 3 6 を支持することもできる。また、大径部 1 1 4 は、血液構成層の分離を維持するシール機能を提供する。フロートの径領域 1 1 4 と管の壁 1 3 6 との間に形成されたシールは、流体密封シールであってもよいが、必ずしもそうである必要はない。本明細書に用いられている「シール」という用語は、多くの場合は本発明の目的に適した実質的なシールを提供するもの、すなわちフランジ 1 1 4 と管壁 1 3 6 の間のほぼゼロの隙間またはわずかな干渉を包含することを意図したものである。

30

【 0 0 3 7 】

密封リング 1 1 4 は、最も好ましくは連続隆起で、この場合は、試料をより低速度で遠心分離することができ、分離層のスランピング（Slumping）が抑制される。しかし、代替的な実施形態において、密封隆起は、環状間隙 1 5 0 の内外に流路を提供する 1 または複数の開口部を有する不連続または分割帯でありうる。密封リングまたは隆起 1 1 4 は、個別に形成して、本体部 1 1 2 に取り付けのようにしてもよい。しかし、密封隆起 1 1 4 および本体部 1 1 2 は、単一または一体構造を形成するのが好ましい。

40

【 0 0 3 8 】

セパレータフロート 1 1 0 の全体比重は、赤血球の比重（約 1 . 0 9 0 ）と血漿の比重（1 . 0 2 8 ）との間に設定する必要がある。好ましい実施形態において、上記比重は、約 1 . 0 8 9 ~ 1 . 0 2 9 の範囲、より好ましくは約 1 . 0 7 0 ~ 約 1 . 0 4 0 の範囲、最も好ましくは約 1 . 0 5 である。

【 0 0 3 9 】

フロートの構成比重が所望の範囲内にあれば、異なる比重を有する複数の材料でフロ-

50

トを形成できる。フロート 110 の全体比重および環状間隙 150 の体積を、パフィーコート層と共にある程度の赤血球および / または血漿が環状間隙内に保持されるように選択することができる。遠心分離すると、フロート 110 は、パフィーコート層および目標細胞と同じ軸方向位置を占め、濃縮赤血球層上に留まる。パフィーコートは、フロート 110 と管 130 の内壁 136 との間の狭い環状間隙 150 に保持される。その際に、拡張されたパフィーコート領域を例えば照明および拡大下で検査して、流血中上皮癌もしくは腫瘍細胞または他の目標分析物を識別することができる。

【0040】

1つの好ましい実施形態において、フロート 110 の密度は、血液試料の顆粒球層に浮遊するように選択される。顆粒球は、濃縮赤血球層上または真上に沈殿し、約 1.08 ~ 1.09 の比重を有する。この好ましい実施形態において、フロートの比重はこの約 1.08 ~ 約 1.09 の範囲にあり、遠心分離するとフロートが顆粒球層内に留まることとなる。顆粒球の量は、患者によって約 20 倍も変動しうる。したがって、フロートが顆粒球層内に留まるようにフロート密度を選択することは、顆粒球の真上に存在するリンパ球 / 単球層のいずれかの損失が回避されるため、特に有利である。遠心分離時には、顆粒球層が増加するにつれて、フロートは顆粒球内のより高い位置に浮遊するようになり、リンパ球と単球をフロートと実質的に同じ位置に維持する。

【0041】

米国特許第 6,197,523 号に開示されている被験者の血流中の循環上皮癌または幹細胞を検出するための方法は、本件発明の試料管およびフロートシステムを採用するようにモディファイすることが可能である。上記米国特許第 6,197,523 号は、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれている。

【0042】

本発明の管 / フロートシステム 100 を使用する好ましい例示的な方法においては、抗凝固処理血液の試料が提供される。例えば、標準バキュティナー (Vacutainer: 登録商標)、または抗凝固剤が予め仕込まれたタイプの他の同様の血液採取装置を使用して、分析すべき血液を引き込むことができる。

【0043】

目標上皮細胞または他の対象分析物に特有の蛍光標識抗体 (Fluorescently Labeled Antibody) を血液試料に添加し、培養することが可能である。例示的な実施形態において、上皮細胞は、蛍光標識が付された Anti-EpCAM 抗体で標識される。Anti-EpCAM 抗体は、血流中に通常見いだされる他の細胞に存在しないと想定される上皮細胞特有部位に結合する。アクリジン・オレンジの如き染色剤または着色剤を試料に添加して、それぞれの細胞型に異なる色を帯びさせることにより、照明下でのパフィーコート層の識別を容易にすることができ、また試料の検査時に上皮細胞の形態を強調または明確化することができる。

【0044】

その後、血液は、遠心分離を行うためにアセンブリ 100 に移送される。フロート 110 は、血液試料が試料管 130 内に導入された後に試料管 130 内に嵌入するようにしても、あるいは試料管 130 内に予め配置しておくようにしてもよい。その後、試料を含んだ管およびフロートアセンブリ 100 は、遠心分離にかけられる。この管 / フロートシステム 100 によって血液を遠心分離するのに必要な動作は、従来の場合と顕著に変わらないが、上述したように、遠心速度を減速させることが可能で、スランピングの問題を緩和することができる。場合によってはロータにアダプタを利用して、応力による可撓管の破壊を防止することができる。

【0045】

遠心分離が開始されると、生じた水圧が、管の径を拡大するように壁 136 を変形または屈曲させる。このため、血液成分およびフロート 110 は、遠心力の下で管 130 内を自由に移動する。血液試料は、密度に応じて、下から順に濃縮赤血球、網状赤血球、顆粒球、リンパ球 / 単球、血小板および血漿の 6 つの異なる層に分離する。画像化の対象とす

10

20

30

40

50

る上皮細胞は、密度により、パフィーコート層、すなわち顆粒球、リンパ球／単球および血小板層に集まる。フロートは、その密度に基づいて、パフィーコート層と同じ軸方向位置を占め、その結果、パフィーコートの内容物は、場合によっては少量の赤血球および／または血漿と共に、狭い環状間隙 150 を占める。

【0046】

遠心分離が終了して遠心力が除かれると、管 130 は本来の径に戻って、環状間隙 150 内のパフィーコート層および目標分析物を分析用に捕捉または保持する。必要な場合には、管／フロートシステム 100 は顕微鏡または光学式リーダーに移送されて、血液試料中の各目標分析物の識別が行われる。

【0047】

一実施形態において（図3を参照のこと）、本体部 312 は、管の内径より小さい直径を有し、これにより本体部 312 と管の内壁の間には、複数の環状溝 350 が形成される。必要に応じて先細り状の端部 316 を設けるようにしてもよく、これによって、遠心分離時にフロート 310 および密封隆起 314 を通過する細胞の流れを促進・誘導することができる。破線で示される中心穴 352 は、管壁の収縮によって下部流体層に生じる圧力を緩和するための圧力逃し口を提供する。例示の実施形態は、連続的なリブを示しているが、支持リブを同様に分断または分割して、隣り合う環状溝 350 間の流路を増強できることが認識されるであろう。

【0048】

次に図4を参照すると、スプライン加工セパレータフロート 410 が示されている。このセパレータフロート 410 は、軸方向を向く複数のスプラインまたは隆起 424 を有し、それらスプラインまたは隆起 424 は、中央本体部 412 の回りに間隔を設けて放射状（Radially）に配置されている。各密封隆起 414 と、随意に選択して取り付けられる先細り状端部 416 とによって、遠心分離時にフロート 410 および密封隆起 414 を通過する細胞の流れが促進・誘導される。スプライン 424 および端部密封隆起 414 は本体 412 から突出し、遠心分離が終了したときには、可変管に係合して可変管を支持する。軸方向の凸部 424 は、管の内壁と本体部 412 との間に流体保持溝 450 を形成する。本体部 412 が円筒形である場合に、凸部 424 の間に配置された本体部の表面 413 を湾曲させることができるが、平坦な表面 413 も考えられる。例示の実施形態は、フロート 410 の軸方向の全長に沿って連続するスプライン 424 を示しているが、分割されたスプラインまたは不連続のスプラインも考えられる。圧力逃し穴 452 は、フロート 410 の中心を軸方向に貫通している。他の実施形態において、同様または異なる形状の 1 または複数の圧力逃し穴をフロートの本体に設けることができる。

【0049】

図5は、本発明の好ましい実施形態による二体構成（Two-Piece）フロート 510 を示す分解図である。第1の本体部またはスリーブ 512 は、第2のピストン状中心部 554 を摺動可能に受けるようにサイズ設定された中心穴 552 を有する。外部本体部材 512 は、その下端部または底端部に、フランジまたは密封リング 514 を有する。密封隆起またはフランジ 515 は、使用時には、ピストン部 554 の上端に配置される。必要に応じてピストン部 554 の上端または下端（使用時）に先細り状端部 517 を設けることが好ましく、そうすることで、遠心分離時に密封隆起 514, 515 を通る細胞の流れを促進・誘導することができる。

【0050】

本体 512 の直径と密封リング 514, 515 の直径との差は、図1を参照して説明した通りである。使用時には、ピストン部 554 は、本体部材 512 の中心穴 552 内に完全に嵌め込まれる。上述したように、フロート 510 は、密封隆起 515 が上部に位置して、密封隆起 514 が管の下部の方に位置するように、管内の向きが設定される。それら2つの部分は、フロート 510 の全体比重がパフィーコートの捕捉に適した範囲になるのであれば、同じ材料で形成されていても、異なる材料で形成されていてもよい。特に好ましい実施形態において、中心ピストン部 554 は、外側部分 512 よりも僅かに比重が大

10

20

30

40

50

きい材料で形成される。この場合、遠心分離時に２つの部分が一体に保持される。あるいは、それら２つのフロート部材を同じ材料で形成し、かつ／または遠心分離時にフロート部材を一体に保つのに十分な摩擦嵌合を提供するようにしてもよい。

【００５１】

血液試料とフロート５１０を含んだ管が遠心分離されると、２つの部分５１２，５５４は合体し、一体構成フロートと同様に作用して、バフィーコート層を軸方向に拡張する。血液成分の分離および層状化が完了し、遠心分離が減速すると、フロートの下方でトラップされた赤血球部分の圧力が徐々に高まり、例えばその部分では、管壁によってフロートが最初に拘束された後も管の収縮が継続する。このトラップされた赤血球領域内の圧力は、中心部分５５４を押し上げるため、圧力が緩和され、赤血球が密封リング５１４と管壁間のシールを破るのが防止される。

10

【００５２】

図６～図１２は、本発明のさらなる二体構成フロートの実施形態を示す図である。これら実施形態においては、密封リングが外部スリーブの各端部に配置され、上方に移動可能なピストン部材によって圧力が緩和されるようになっている。

【００５３】

図６は、第２のピストン状中心部６５４を摺動可能に受ける中心穴６５２が形成された第１の本体部またはスリーブ６１２を有する二体構成フロート６１０を示す図である。外部本体部材６１２は、各端部に密封リングまたは隆起６１４を有し、この密封リングまたは隆起６１４は、管１３０に係合するようにサイズ設定され（図１）、管１３０との間に環状凹部６５０を形成する。ピストン６５４は、径が中心穴６５２よりも大きく密封隆起６１４よりも小さい鉤付端部６５６を有する。

20

【００５４】

動作中、ピストン部材６５４は、中心穴６５２の中に完全に受け入れられ、フランジ６５６はスリーブ６１２の上端に当接する。使用に際して、フロート６１０は、フランジ６５６が管１３０の上部、すなわちストッパ１４０側に位置するように、管内でその向きが設定される。ここでも、フロート６１０の全体比重がバフィーコートの捕捉に適した範囲にあれば、それら２つの部分を同じ材料で形成してもよいし、異なる材料で形成してもよい。特に好ましい実施形態において、中心部６５４は、外部６１２より比重が僅かに大きい材料で形成されるため、遠心分離時に２つの部分が一体に保持される。また、それら２つのフロート部の間に摩擦嵌合が生じるようにしてもよい。遠心分離が完了すると、トラップされた赤血球領域に生じた圧力が、中心部分６５４を押し上げることによって緩和される。

30

【００５５】

図７は、図６を参照して示し説明したものと同様の二体構成フロート７１０を示す図である。この二体構成フロート７１０は、遠心分離時にフロート７１０の回りの血液の流れを円滑にするために先細状の端部をさらに有している。第１の本体部またはスリーブ６１２は、第２のピストン状中心部７５４を摺動可能に支える中心穴６５２を有する。外部本体部材６１２は、上述したように、両端部に密封リングまたは隆起６１４を有する。ピストン７５４は、フランジ７５７が形成された先細状端部７５６を有し、フランジ７５７は、ピストン７５４の挿入時にスリーブ６１２に当接して、ピストン７５４のさらなる下方移動を制限するようにサイズ設定されている。ピストン部材７５４の下部７５８も流れを円滑にするように先細になっている。遠心力および／または摩擦嵌合を利用して、遠心分離時に２つの部分を一体に保つことができる。

40

【００５６】

図８は、第１の本体部またはスリーブ８１２を有する二体構成フロート８１０を示す図である。第１の本体部またはスリーブ８１２は、第２のピストン状中心部８５４を摺動可能に受ける中心穴８５２および座ぐり８６２を有している。外部本体部材８１２は、上述したように、密封リングまたは隆起８１４を備える。ピストン８５４は、中心穴８５２の中に受け入れられるようにサイズ設定された第１の小径部と、座ぐり８６２の中に受け入

50

れられるようにサイズ設定された第2の大径部とを有する。小径部分853および大径部分855の軸方向範囲は、大きく変化させることが可能であり、それぞれ穴852および座ぐり862に対して相補的なものとなる。

【0057】

フロート810は、全体的に平坦な端部を有するものとして示されているが、遠心分離時にフロートの回りの流体の流れを円滑にするために、ピストン部材854および/またはスリーブ部材812の端部を先細にできることが認識されるであろう。図9は、先細状端部を有する、図8に示されるものと同様の実施形態を示す図である。二体構成フロート910は、第2のピストン状中心部54を摺動可能に受ける中心穴952および座ぐり962が形成された第1の本体部またはスリーブ912を有する。外部本体部材912は、密封リングまたは隆起914を備える。ピストン954は、中心穴952の中に受け入れられるようにサイズ設定された第1の小径部と、座ぐり962の中に受け入れられるようにサイズ設定された第2の大径部とを含む。先細状端部956および958は、相補的な端部隆起と協働して、全体的に円錐形の端部を形成する。

【0058】

図8および9を参照すると、遠心分離時に、フロート(810, 910)は、座ぐりおよび大径部が管130の上部の方に位置するように、管内の向きが設定されている(図1)。上述したように、それら2つの部分を同じ材料で形成してもよいし、異なる材料で形成してもよく、好ましい実施形態では、中心部(854, 954)を、比重が外部スリーブ(812, 912)より僅かに大きい材料で形成し、遠心分離時に2つの部分が合体するようにする。遠心分離が完了すると、トラップされた赤血球領域内に生じた圧力が、中心部分(854, 954)を押し上げる。

【0059】

図10は、第1の本体部またはスリーブ1012を有するさらに他の二体構成フロートの実施形態1010を示す図である。第1の本体部またはスリーブ1012は、中心穴1052と、管の上端に向かって開放する拡大部または皿穴1062とからなるプロファイル穴(Profiled Bore)を備えている。第2のピストン状可動部材1054は、それぞれ中心穴1052および皿穴1062に対して相補的で、その中に摺動可能に受け入れられるシャフト1053および拡大ヘッド1055を備える。外部スリーブ1012は、上述のように、密封リングまたは隆起1014を有する。フロート1010は、先細状端部1056および1058を有するものとして示されているが、フロート1010の端部は平坦であってもよいことが認識されるであろう。上述のように、それら2つの部分1012および1054を同じ材料で形成しても、異なる材料で形成してもよく、好ましい実施形態では、外部スリーブ1012より比重が僅かに大きい材料で可動部材1054を形成し、遠心分離時に2つの部分が合体するようにする。

【0060】

図11は、フロートの上端1156に向かって広くなるテーパ状内部流路1152が設けられた第1の本体部またはスリーブ1112を有するさらなる二体構成セパレータフロートの実施形態1110を示す図である。穴1152に対して相補的な中心可動部材1154が、穴1152に摺動可能に受け入れられる。外部スリーブ1112は、密封リングまたは隆起1114を有する。セパレータフロート端部1156, 1158は、先細り状として示されているが、平坦の端部も考えられる。ここでも、それら2つの部分1112, 1154を同じ材料で形成しても、異なる材料で形成してもよく、遠心分離時にフロート部分を一体に維持するために、可動部材1154を僅かに比重の大きい材料で形成するのが好ましい。

【0061】

図12は、第1の本体部またはスリーブ1212を有するさらなる二体構成セパレータフロートの実施形態1210を示す図である。第1の本体部またはスリーブ1212は、フロート1210の下端に形成された環状台座1219で終端する中央流路または穴1252を備えるとともに、この穴1252への開口部1221を備えている。ピストン状可

動部材 1 2 5 4 は、穴 1 2 5 2 の中に摺動可能に受け入れられ、環状台座 1 2 1 9 に当接している。外部スリーブ 1 2 1 2 は、密封リングまたは隆起 1 2 1 4 を有する。セパレータフロート 1 2 1 0 は、平坦な端部を有するものとして描かれているが、先細状端部も考えられる。可動部材 1 2 5 4 は、その下端に、開口 1 2 2 1 に受け入れられるようにサイズ設定された狭径部（不図示）を備えるものであってよく、この狭径部により、面一および／または先細状の表面を提供することによって、例えば遠心分離時にそこでの流れを円滑にすることができる。それら 2 つの部分 1 1 1 2 , 1 2 5 4 を同じ材料で形成してもよいし、異なる材料で形成してもよく、遠心分離時にフロート部分を一体に維持するために、比重が僅かに大きい材料で可動部材 1 2 5 4 を形成するのが好ましい。

【 0 0 6 2 】

図 1、図 2 および図 6 ~ 図 1 2 のフロートの実施形態の各々は、端部密封リングを有するものとして示し、説明を容易にするために追加的な管支持部材を省略するようにしたが、これらフロートは、上記米国出願第 1 0 / 2 6 3 , 9 7 5 (代理人整理番号第 B A T 2 0 0 0 7 号) に示され、かつ／または記載されている管支持機構のいずれか、例えば環状帯、分割帯、螺旋帯、軸方向スプライン、円形凸部、スパイク、小面およびそれらの組合せを、さらに組み込むことによって一部変更することができる。同様に、セパレータフロートの実施形態は、平坦または好ましい円錐形の端部を有するものとして描かれているが、上記米国出願第 1 0 / 2 6 3 , 9 7 5 (代理人整理番号第 B A T 2 0 0 0 7 号) に示され、かつ／または記載されているように、湾曲状、傾斜状および／またはテーパ状の表面を与える多くの他の幾何学的形状も考えられ、これら形状によって、遠心分離時に細胞およびフロートの密度に基づく移動を促進することも可能である。端部形状の変形例としては、例えば、円錐台形、凸形またはドーム形、および他の先細形状が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

使用中は、管の破損や可塑変形等の不具合の原因となる管の過度の拡張を防ぎながらも、可撓管を十分に拡張させてセパレータフロートの自由な移動を促進する管アダプタを使用できる。したがって、アダプタと管の外径との間に特定の間隙を設けるようにサイズ設定された内径を有する管を保持する配管アダプタが、遠心分離時に好適に用いられる。この間隙は、フロートが管内を自由に移動することを可能にするのに十分であるが、管が破損するほど大きくない程度に、管の拡張を制限する。

【 0 0 6 4 】

好適な管を商業的に入手することは可能であるが、それらの管を製造するための例示の好ましい方法は、パフイーコートを維持し、視覚化するのに必要な性能特性に対応するものである。第 1 に、試験管内の欠陥は、環状間隙内に保持された分離パフイーコートに侵入する赤血球用通路を提供することが確認された。商業的に入手可能な試験管に見られる最も激しい典型的な欠陥は、試験管の長さ方向に延びる成形分割線である。そこで、管／フロート／血液の相互作用の動態に影響を及ぼさない底部に分割線を有する試料管が開発された。この方法は、分割線を生成させる金型の分割ではなく、射出成形金型から管を引き抜くことを必要とするため、試験管の上部を厚くして外側に広がるようにすることにより、抜取板を使用して管を除去することを容易にすることができる。継目のない管を形成するための他の周知の方法を採用することもできる。

【 0 0 6 5 】

また、使用される金型は、試料管の中心に対応する長いコアで構成されていた。このため、成形時に射出プロセスの圧力によってコアが変形しやすく、管の厚さが不均一になる。このため、コアの自由端と結合する金型の本体部からの機構が加えられ、その機構がプラスチックのインジェクタにより構成されていた。その結合作用は、コアを固定して、射出時の撓みを防止する。射出プロセスの後半になると、射出時に、その機構が引き抜かれ、プラスチックが管の残りを埋める。

【 0 0 6 6 】

また、フロートを製造するための効率的な方法も開発された。一体構成フロートの場合

は、フロートの厚さがプラスチック部分の収縮の制御を困難にし、収缩量はその部分の厚さに比例するため、射出成形は困難である。この問題は、二体構成フロートの場合、より薄い2つの部分を別々に成形できるため、ある程度は対処できる。すなわち、これらの部分の厚さは、高精度な成形の厚さの一般的な限界である約0.5インチ未満に維持される。任意の特定部分、特に一体構成または二体構成フロートの外寸法に対してさらなる精度が必要な場合は、オーバーモルディング(Over Molding)を採用することが可能である。このプロセスでは、部品を二工程で成形する。第1の工程は、所望の部分より小さい部分の大半を成形し、後に追加する薄い層を残す。第2の工程で成形される薄層の収縮をより厳密に制御することができるため、より厳密に寸法決めされた部分を成形することが可能になる。

10

【0067】

バフィークート層を分離したら、管を画像化および分析のための自動検査システムに引き渡すのが望ましい。これには、管を厳密に位置決めすることが必要になる。そのため、例えば自動制御または予めプログラム化された制御下での管の係合、操作および位置決めを容易にするための機構を、試料管、例えば管の底部に付加するようにしてもよい。

【0068】

以上、好ましい実施形態を参照しながら本発明を説明した。当然のことながら、上述した詳細な説明を読み、これを理解すれば、幾つかの修正や変更が思い付くことであろう。本発明は、添付の請求項またはその同等物の範囲内にある限り、それら全ての修正および変更を包含するものであると見なされる。

20

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】血液分離管およびフロート・アセンブリを示す図である。

【図2】本発明に係るセパレータフロートの一実施形態を示す図である。

【図3】本発明に係るセパレータフロートの他の実施形態を示す図である。

【図4】本発明に係るセパレータフロートの他の実施形態を示す図である。

【図5】本発明の好ましい実施形態による二体構成フロートを示す分解図である。

【図6】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

【図7】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

【図8】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

30

【図9】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

【図10】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

【図11】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

【図12】本発明に係る二体構成フロートの他の実施形態を示す図である。

【符号の説明】

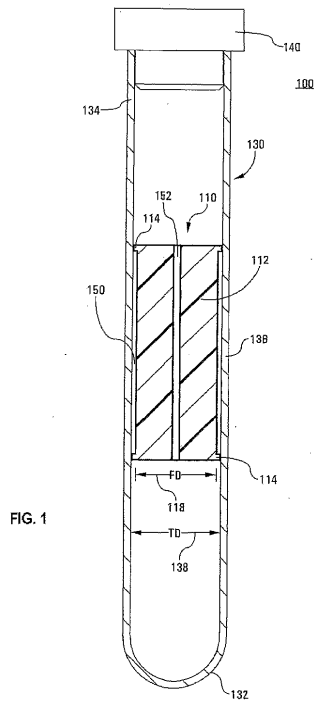
【0070】

100 血液分離管およびフロート・アセンブリ

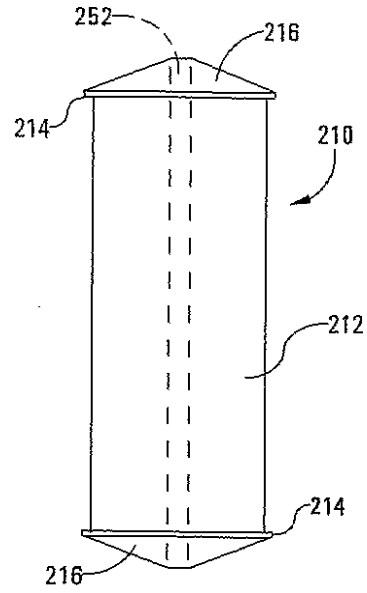
110 セパレータフロート

130 試料管

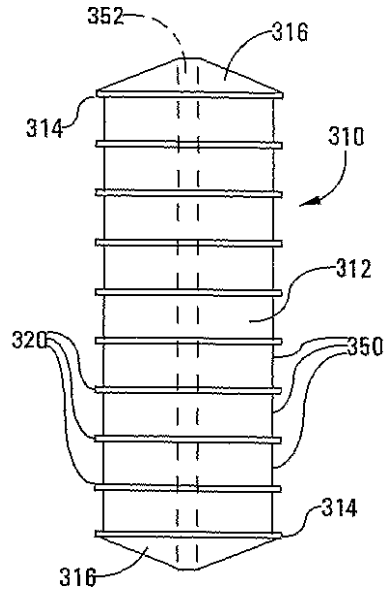
【図 1】



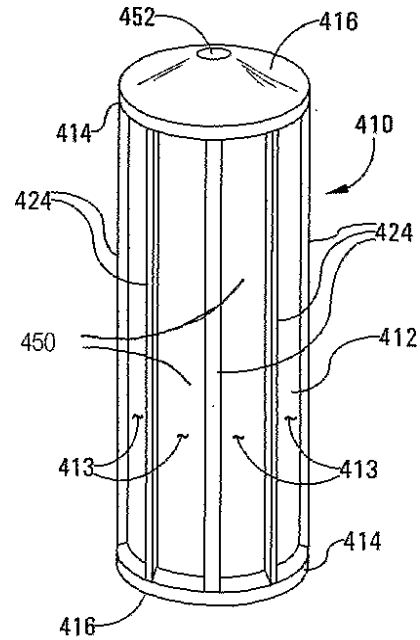
【図 2】



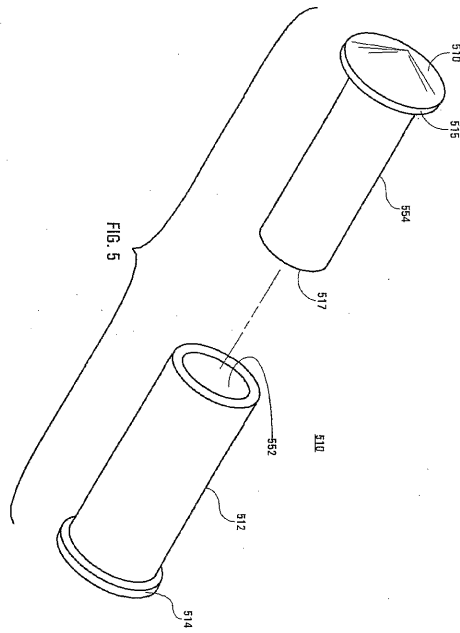
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

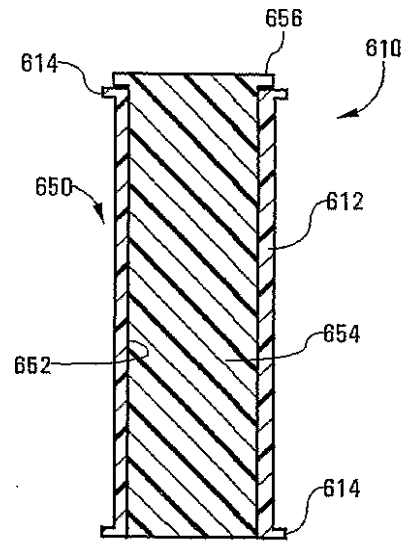


FIG. 6

【図 7】

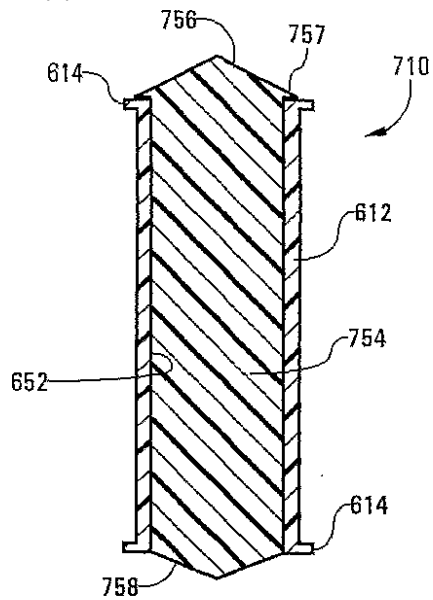


FIG. 7

【図 8】

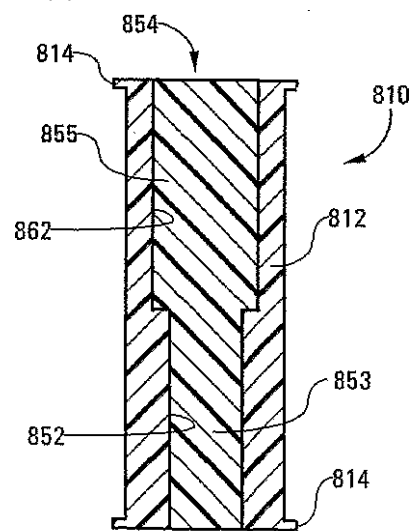


FIG. 8

【図 9】

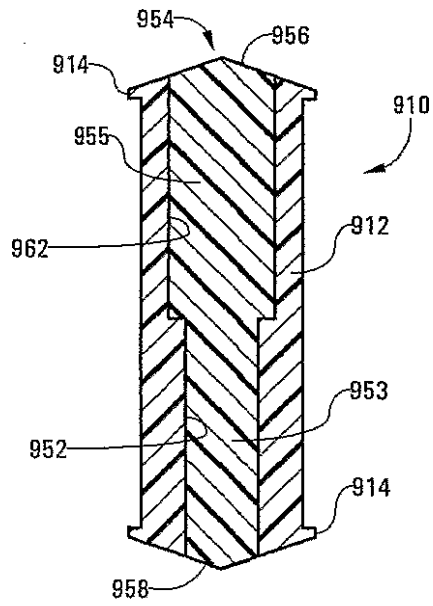


FIG. 9

【図 10】

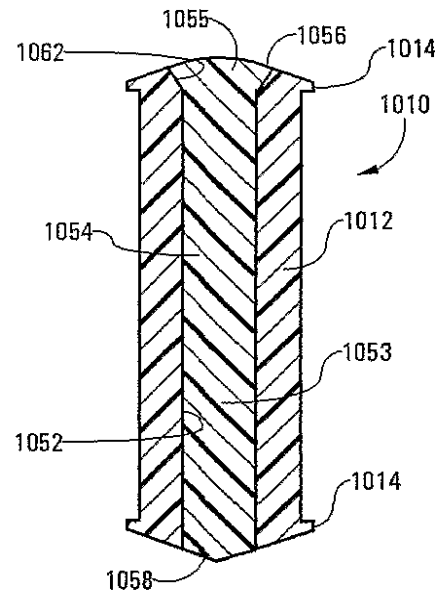


FIG. 10

【図 11】

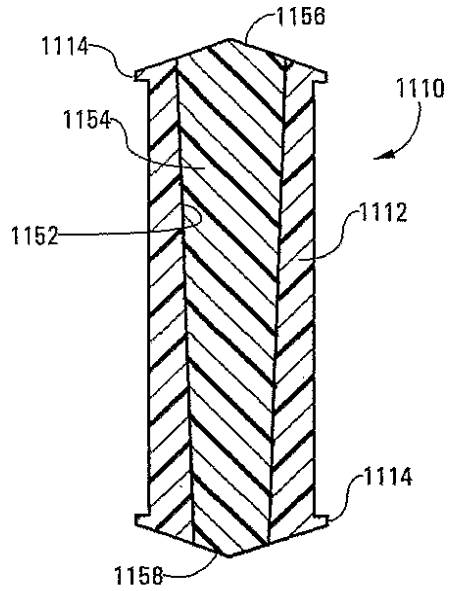


FIG. 11

【図 12】

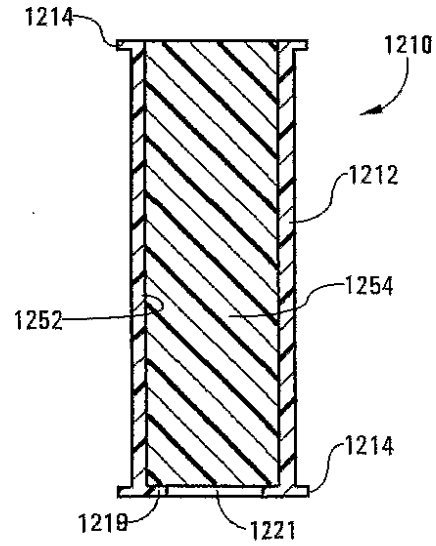


FIG. 12

フロントページの続き

- (72)発明者 コンティーニ、ヴィンセント
アメリカ合衆国、オハイオ州 43214、パウエル、ジェームズタウン ドライブ 3007
- (72)発明者 ハウバート、トーマス
アメリカ合衆国、オハイオ州 43214、コロンバス、ウインスロップ ロード 274
- (72)発明者 グライムス、スティーブ
アメリカ合衆国、オハイオ州 43081、ウェスタービル、ニコル ドライブ 19
- (72)発明者 ジョーンズ、ランディー
アメリカ合衆国、オハイオ州 43015、デラウェア、ベルリン ステーション ロード 279
- (72)発明者 ウォードロー、スティフェン
アメリカ合衆国、コネチカット州 06371、ライム、ハイロック

審査官 ▲高▼見 重雄

- (56)参考文献 特表2005-524451(JP, A)
米国特許第03814248(US, A)
特開2000-199760(JP, A)
特公昭57-015698(JP, B1)
国際公開第2004/031770(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 1/10

G01N 33/48

G01N 33/53

专利名称(译)	Buffy涂层分离浮选系统和方法		
公开(公告)号	JP4387305B2	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	JP2004542038	申请日	2003-10-02
[标]申请(专利权)人(译)	巴特勒记忆研究所		
申请(专利权)人(译)	巴特尔纪念研究所		
当前申请(专利权)人(译)	巴特尔纪念研究所 留芬后果.沃画		
[标]发明人	コンティーニヴィンセント ハウバートトーマス グライムススティーブ ジョーンズランディー ウォードロースティフェン		
发明人	コンティーニ、ヴィンセント ハウバート、トーマス グライムス、スティーブ ジョーンズ、ランディー ウォードロー、スティフェン		
IPC分类号	G01N1/10 G01N33/48 G01N33/53 B01L3/14 G01N33/50		
CPC分类号	B01L3/50215 G01N33/491 G01N33/5094 Y10T436/111666 Y10T436/25 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N1/10.H G01N33/48.D G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.Y		
代理人(译)	清水千春		
优先权	10/263974 2002-10-03 US		
其他公开文献	JP2006502388A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于血沉棕黄层的分离和轴向扩张的管和浮子系统 (100) 包括透明或半透明的柔性样品管 (130) 和刚性分离器浮子 (110) , 其具有比红细胞和血浆。浮子 (110) 包括直径减小的主体部分 (112) , 以在样品管 (130) 的内壁和浮子 (110) 之间提供间隙 (150) 。主体部分 (112) 上的一个或多个突起 (114) 用于支撑柔性管 (130) 。在离心期间 , 离心力增大管 (130) 的直径以允许浮子 (110) 在管 (130) 中基于密度的轴向移动。浮子 (110) 还包括减压系统 (152) , 以减轻在浮子 (110) 下面的捕获的红细胞血液部分中的压力积聚 , 从而防止红细胞被迫进入环形间隙 (150) 血沉棕黄层。

