

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第6571694号  
(P6571694)

(45) 発行日 令和1年9月4日 (2019.9.4)

(24) 登録日 令和1年8月16日 (2019.8.16)

|                       |               |
|-----------------------|---------------|
| (51) Int. Cl.         | F I           |
| GO 1 N 1/28 (2006.01) | GO 1 N 1/28 F |
| GO 1 N 1/04 (2006.01) | GO 1 N 1/28 J |
| GO 1 N 1/30 (2006.01) | GO 1 N 1/04 G |
|                       | GO 1 N 1/04 J |
|                       | GO 1 N 1/30   |

請求項の数 17 (全 15 頁)

|   |   |
|---|---|
| (21) 出願番号 特願2016-575376 (P2016-575376)  | (73) 特許権者 590000248                             |
| (86) (22) 出願日 平成27年6月29日 (2015.6.29)    | コーニンクレッカ フィリップス エヌ<br>ヴェ                        |
| (65) 公表番号 特表2017-524923 (P2017-524923A) | KONINKLIJKE PHILIPS<br>N. V.                    |
| (43) 公表日 平成29年8月31日 (2017.8.31)         | オランダ国 5656 アーエー アイン<br>ドーフエン ハイテック キャンパス 5      |
| (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/064677           | High Tech Campus 5,<br>NL-5656 AE Eindhove<br>n |
| (87) 国際公開番号 W02016/001126               | (74) 代理人 100107766                              |
| (87) 国際公開日 平成28年1月7日 (2016.1.7)         | 弁理士 伊東 忠重                                       |
| 審査請求日 平成30年6月27日 (2018.6.27)            | (74) 代理人 100070150                              |
| (31) 優先権主張番号 14175012.5                 | 弁理士 伊東 忠彦                                       |
| (32) 優先日 平成26年6月30日 (2014.6.30)         |   |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関<br>欧州特許庁 (EP)        |   |
| 早期審査対象出願                                |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体試料用の試料ホルダ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生検である生体試料のマイクロトミングを必要とせずに前記生体試料を検査するためのシステムであって、試料ホルダと、少なくとも1つの補助部品とを含み、前記試料ホルダは、管状部材を含み、前記管状部材は、少なくとも部分的に透明材料からなり、前記少なくとも1つの補助部品の各々は、前記試料ホルダの前記管状部材の少なくとも一部に結合することができる支持構造を有し、前記管状部材を構成する壁は、試薬を透過する領域を含むことを特徴とする、システム。

【請求項 2】

前記管状部材は、0.2mm～2mmの内径を有することを特徴とする、請求項1に記載のシステム。

【請求項 3】

前記管状部材は、少なくとも部分的に膜、又は多孔質高分子膜からなる、及び/又は、前記管状部材は、前記管状部材の前記壁に形成される流体チャネルを含み、前記管状部材内の試料は、前記流体チャネルを通じてアクセス可能であることを特徴とする、請求項1又は2に記載のシステム。

【請求項 4】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、コア針である抽出デバイスから前記試料ホルダに試料を移送する移送デバイスであり、該移送デバイスは、前記試料ホルダを接続可能な第1の端部と、前記抽出デバイスを接続可能な第2の端部とを備える、

移送チャネルを含み、又は、当該システムは、被検体から試料を抽出する抽出デバイスを含み、前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、コア針である抽出デバイスから前記試料ホルダに試料を移送する移送デバイスであり、該移送デバイスは、前記試料ホルダを接続可能な第1の端と、前記抽出デバイスを接続可能な第2の端部とを備える、移送チャネルを含むことを特徴とする、請求項1乃至3のうちのいずれか1項に記載のシステム。

【請求項5】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、被検体から前記生体試料を抽出する抽出デバイスであり、該抽出デバイスは、抽出された試料が前記試料ホルダにより取り込まれるように前記試料ホルダを収容する支持構造を有することを特徴とする、請求項1乃至3のうちのいずれか1項に記載のシステム。

10

【請求項6】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、前記試料ホルダを交換可能に又は永久的に収容する支持構造を備える容器であることを特徴とする、請求項1乃至3のうちのいずれか1項に記載のシステム。

【請求項7】

前記支持構造は、前記試料ホルダに対する前記移送デバイスの密閉接続を可能にすることを特徴とする、請求項4に記載のシステム。

【請求項8】

前記試料ホルダ内の試料の画像を生成する光学装置を含むことを特徴とする、請求項1乃至7のうちのいずれか1項に記載のシステム。

20

【請求項9】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、前記試料ホルダを交換可能に又は永久的に収容する支持構造を備える容器であり、前記試料ホルダは、前記容器に回転可能に収容され得る又は収容される、及び/又は、前記試料ホルダは、前記容器内で軸方向に移動可能であることを特徴とする、請求項1乃至8のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項10】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、前記試料ホルダを交換可能に又は永久的に収容する支持構造を備える容器であり、前記容器の前記支持構造は、少なくとも部分的に流体で満たされる、並びに、前記流体に浸漬されている前記試料ホルダを取り込む、空洞を定めることを特徴とする、請求項1乃至9のいずれか1項に記載のシステム。

30

【請求項11】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、前記試料ホルダを交換可能に又は永久的に収容する支持構造を有する容器であり、該容器は、前記試料ホルダの前記管状部材の形状を有する穴を定める支持構造を備える基板を含むことを特徴とする、請求項1乃至10のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項12】

前記少なくとも1つの補助部品のうちの少なくとも1つは、前記試料ホルダを交換可能に又は永久的に収容する支持構造を備える容器であり、該容器は、前記試料ホルダの前記管状部材の周りの流体の流れを制御する流体系を含むことを特徴とする、請求項1乃至11のいずれか1項に記載のシステム。

40

【請求項13】

試薬を透過する前記管状部材の前記壁の前記領域は、複数の開口又は孔を含む、請求項1乃至12のうちのいずれか1項に記載のシステム。

【請求項14】

前記管状部材の前記壁は、光学的に透過性の膜材料で作られる、請求項1乃至13のうちのいずれか1項に記載のシステム。

【請求項15】

50

生検である生体試料のマイクロトミングを必要とせずに前記生体試料を検査するための方法であって、管状部材を有する試料ホルダに生体試料を移送するステップであって、前記管状部材は、少なくとも局所的に透明である壁を備え、該壁は、該壁が液体を透過する領域を含み、前記管状部材は、少なくとも部分的に透明材料からなる、ステップと、少なくとも1つの試薬が前記管状部材内の前記生体試料に到達できるように、前記試料ホルダを液体である少なくとも1つの試薬に暴露するステップとを含む、方法。

【請求項16】

前記試料ホルダ内の前記生体試料の光学的検査を行うステップと、前記試料ホルダから前記生体試料の関心領域を抽出するステップとのうちの少なくとも1つをさらに含むことを特徴とする、請求項15に記載の方法。

10

【請求項17】

前記試薬は、固定剤、透過化剤、洗浄剤、アンチクエンチング剤、及び/又は染色剤を含むことを特徴とする、請求項15又は16に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば光学的検査の際に生体試料を保持するための試料ホルダに関する。さらに、本発明は、生体試料を処理するためのシステム及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

20

一般に、組織生検等の生体試料は、試料をパラフィンに埋め込み、これをスライスし、顕微鏡スライドに配置することにより作られる。この手順は時間と手間がかかるため、生検から顕微鏡スライドへの試料の移送がスライド上の接着剤を用いて行われる代替的な手法が文献に提案されている(D. L. Troyer et al., "A Novel Method for Preparing Histology Slides Without a Microtome", Anat. Histol. Embryol. 31, 129-131, 2002)。

【0003】

特開2006-047191号公報は、一様な外径を有するストロー状細管により形成され、その細管の一方又は両方の開口端部が圧着により閉塞されたサンプル容器にあって、ハンドリング性を良好にするとともに、凍結保存のための冷却処理を適正かつ再現性良く行うことを可能にすることを開示する。

30

【0004】

英国特許出願公開第2289222号は、ヒト又は動物被検体から腸内ガスを採取するデバイスであって、当該デバイスは、被検体の直腸に挿入される気密の採取管と、被検体の括約筋間溝に取り付け可能な一対のリングを有し、デバイスをリングにより被検体内に保持し、気密密封する保持手段とを有する。被検体に挿入される管の端部は、開口部を備え、固体物質の侵入を防ぐガーゼフィルタで覆われる。採取管のこの端部は、ガス透過性ブラダーでも覆われ、管の遠位端は、気密の採取バッグに接続される。

【0005】

40

米国特許第5,919,356号は、流体をサンプリングするための携帯用デバイスを開示する。デバイスは、内壁及び外壁を有するハウジングに取り付けられた穿刺デバイスを有する。ハウジングは、シリンジと流体連結し、少なくとも1つのU字型の中空ファイバ膜からなる濾過デバイスを含む。デバイスはまた、収集チャンバを含む。デバイスにはまた、別の中空ファイバ膜を含む検知デバイスがあり、第1及び第2の端部が第1及び第2のプラグにそれぞれ接続される。各プラグは、ハウジングの内壁に接触する。別の中空ファイバ膜は、検知剤を含む。デバイスは、試料が穿刺デバイスを使用して採取され、1つ以上のU字型の中空ファイバ膜を通過させる濾過デバイスを通して収集チャンバに移動するように構成される。試料は、収集チャンバから検知剤を含む中空ファイバ膜を通過した後、シリンジに移動する。

50

## 【 0 0 0 6 】

米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 6 3 9 4 2 号は、円筒形容器に含まれる多数の中空ファイバ膜を有する中空ファイバ膜モジュールを開示し、各中空ファイバ膜の開かれた一端は、円筒形容器に固定される一方、中空ファイバ膜の他端は、2 つ以上の小束に分割され、別々の小束に含まれる端はまとめられ、塞がれる。

## 【 0 0 0 7 】

米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 7 0 2 9 5 号は、フィクサーをベースとする細胞学的懸濁液を調製するためのフラスコを開示する。フラスコは、懸濁液に少なくとも部分的に浸漬された濾過手段を装備する。濾過手段は、バスケットを形成する濾過材料から成るウェブの形態をしており、濾過手段の周辺部はフラスコに固定され、かつ濾過手段の中心はフラスコの開口に向かって延在し、フラスコの所定位置に保持するための手段と協働し、ピペットを通じて懸濁液を抜き取り可能に構成されたチューブに連結されている。

10

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 8 】

以上のような背景から、生検等の生体試料の代替的で好ましくはより簡単な取り扱いを可能にする手段を提供することが本発明の課題である。

## 【 0 0 0 9 】

この課題は、独立請求項に規定される発明により対処される。好適な実施形態は、従属請求項に規定される。

20

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

本出願の第 1 の態様は、何らかの処理を受けることになる組織切片及び / 又は細胞凝集塊等の生体試料を保持する試料ホルダに関する。例えば、当該処理には、試料の固定、染色及び / 又は検査が含まれる。試料ホルダは、少なくとも局所的に透明で、さらに試薬に対して少なくとも局所的に透過性である壁を備える管状部材を有する。管状部材は、少なくとも部分的に透明材料からなる。

## 【 0 0 1 1 】

試料ホルダは、生体試料の簡単かつ迅速な処理を可能にするという利点を有する。これは、目視検査可能であると同時に、試薬への暴露を行いやすい状態にするために、試料を試料ホルダの管状部材により取り込むだけでよいためである。さらに、試料ホルダにより、セクショニングやマイクロトミングの必要がなく、試料処理中の試料物質の損失がなくなるため、生体試料の効率的な処理が可能になる。また、試料ホルダにより、パラフィン化の必要がなく、環境被害が減るため、環境に優しい生体試料の処理が可能になる。

30

## 【 0 0 1 2 】

試料ホルダは、基本的に或いは完全に、単純かつ費用効果の高いデザインを提供する管状部材からなる。試料ホルダはまた、ハウジング又は管状部材を操作するための手段の一部といった追加の部品を備える。これにより、試料ホルダの他のデバイスへの統合、及び / 又は試料ホルダのより便利な取り扱いが可能となる。

## 【 0 0 1 3 】

管状部材は、一般に、生体試料を収容可能な空洞が設けられる限り任意の形状を有する。典型的には、管状部材は、ほぼまっすぐな細長い空洞、特に円筒空洞を有し、管状部材及び / 又は空洞は、円形、楕円形、多角形又は任意の断面を有する。まっすぐなチャンバを、例えば押出成形により容易に製造することができ、これにより試料材料の充填が容易になる。管状部材の外形は、空洞の形状に対応し（壁の厚さだけ寸法が大きい）、即ち、例えばこれも円筒形である。管状部材の空洞は、通常、試料を取り込むことができるように少なくとも一端が外に開かれている。好ましくは、空洞は、管状部材を生体試料で満たしている間に空気を放出できるように他端も開かれている。

40

## 【 0 0 1 4 】

管状部材の壁（の一部）が透明であることにより、内部の、即ち試料ホルダに収容され

50

る試料の目視検査が可能になる。光学的歪みを最小にするために、壁は、好ましくは透明な領域が規則正しい及び／又は単純な形状、例えば平面や円筒形状を有するべきである。

【0015】

管状部材の壁（の一部）が透過性であることにより、試料が暴露されるべき試薬が外部から壁を貫通し、管状部材の内部空洞内の試料に到達することが可能になる。実際に関連する試薬の多くは流体であるという理由から、透過性は、好ましくは、気体試薬や溶液に溶解された試薬、例えば染色用抗体等の流体試薬が（一方向又は両方向に）壁を貫通できるようなものである。壁は、複数の開口又は孔、具体的には、直径が約10nm未満、約100nm未満、約1μm未満、約10μm未満、又は100μm未満の複数の開口又は孔を有する。前述の直径には、壁を通過する成分の選択が実現されるという利点がある。追加的又は代替的に、開口又は孔の空間密度は、好ましくは、少なくとも約1開口/mm<sup>2</sup>、少なくとも約100開口/mm<sup>2</sup>、少なくとも約10000開口/mm<sup>2</sup>、又は最も好ましくは少なくとも約1000000開口/mm<sup>2</sup>である。前述の密度には、壁を通過する流量が増大すると同時に、壁の安定性が十分に維持されるという利点がある。

10

【0016】

管状部材の壁が透明な領域及び透過性である領域は、異なる、又は（少なくとも部分的に）重なってもよい。好ましくは、壁の同じ領域が、同時に透明かつ透過性である。最も好ましくは、管状部材全体が透明かつ試薬に対して透過性である壁で構成される。これには、管状部材全体のデザインが単純で、単一材料で作ることができるという利点がある。

【0017】

20

試料ホルダは、オプションで、例えば単一試料の処理に1回だけ使用される使い捨て要素である。したがって、異なる使用における試料間及び／又は試薬間の汚染を防ぐことができる。

【0018】

本出願の第2の態様は、生体試料を処理するためのシステムに関し、システムは、本出願の第1の態様の管状部材と、それぞれが試料ホルダの管状部材の少なくとも一部に結合可能な支持構造を有する少なくとも1つの「補助部品」とを有する。

【0019】

システム及び試料ホルダは、オプションで、特に独立に製造、保管、及び／又は販売できる場合には、独立に特許請求される異なる要素とみなされる。

30

【0020】

システムの利点は、その「補助部品」が、例えば外部源から試料ホルダへの試料及び／又は試薬の移送等の追加機能を提供することである。システムのさらなる利点は、本出願の第1の態様による試料ホルダに関する上記の利点と同じである。

【0021】

システムの支持構造を試料ホルダの管状部材に「結合すること」は、機械的な相互連結を含む。追加的又は代替的に、管状部材及び補助部品間の物質（試料、試薬等）の交換を可能にする機能的結合を含む。

【0022】

補助部品は、好ましくは経済的及び生態学的に有利な再使用可能な要素又はデバイスである。

40

【0023】

本出願の第3の態様は、生体試料を処理するための方法に関し、方法は、少なくとも局所的に透明で、試薬に対して少なくとも局所的に透過性のある壁を有する管状部材を有する、好ましくは本出願の第1の態様の試料ホルダに試料を移送するステップと、管状部材の透過性壁を貫通して試料ホルダ内の試料に到達可能な少なくとも1つの試薬に試料ホルダを暴露するステップとを含む。

【0024】

方法は、生体試料の簡単かつ迅速な処理を可能にするという利点を有する。方法はまた、生体試料の効率的で環境に優しい処理を可能にする。これらの利点は、本出願の第1の

50

態様で既に考察されている。

【0025】

本出願の第4の態様は、第1及び/又は第2の態様による試料ホルダ及び/又はシステムの、分析法又は診断法における使用に関する。

【0026】

第1及び/又は第2の態様による試料ホルダ及び/又はシステムの使用は、簡単で迅速な分析法又は診断法を可能にする。使用はまた、効率的で環境に優しい分析法又は診断法を可能にする。同様の利点は、本出願の第1の態様において考察される。

【0027】

試料ホルダ、システム、方法、及び使用は、試料が、少なくとも局所的に透明で、壁を通して試薬が試料に到達できるように、少なくとも局所的に透過性である管状部材に収容されるという概念に基づいている。したがって、これらの態様の1つに与えられる説明及び利点は、他の態様にも同様に当てはまる。

【0028】

第1の好適な実施形態では、試料ホルダの管状部材は、約0.2mm~約2mm、好ましくは約0.5mm~約1.5mmの内径を有する(当該径は、定義により管状部材の空洞の、空洞の伸長軸に垂直な断面の直径とされる。非円形断面の場合には、その「径」は、断面の境界上の2点間の最大距離と定義される)。前述の好適な直径の値により、光学的方法による管状部材内の試料の詳細な検査が可能になる。(直径に垂直な方向に計測した)管状部材の長さは、通常、約2mm~約50mmである。

【0029】

管状部材は、一般に、例えば十分な安定性、生体物質との適合性、透明性及び/又は透過性等の、現在の使用に必要な特性を有する1つ以上の任意の材料から構成される。好ましくは、管状部材は、膜、特に多孔質高分子膜から少なくとも部分的に構成される。膜は、複数の孔、及び/又は約0.2mm未満、好ましくは約100µm未満、又は好ましくは約50µm未満の厚さを有する。

【0030】

好適な材料は、細孔性材料、濾過膜、トラックエッチングされた材料、相分離(例えば熱又は反応誘起相分離)により形成された材料、又は明確に定義された標準の孔径を有する微小成形された膜材料を含む。かかる材料は、ポリマー、セラミック、ガラス及び/又はシリコンであり得る。ガラス及びシリコン多孔質材料は、エッチングにより製造され得るが、高分子膜は、複製により又は相分離により形成される。膜一般及び具体的に挙げられた膜には、所望の孔径及び孔寸法を有するように容易に製造できるという利点がある。さらに、これらは一般に生体試料に適合する。

【0031】

別の実施形態によれば、試料ホルダは、管状部材内の試料に到達可能な少なくとも1つの流体チャネルを有する。流体チャネルは、具体的には約1µm~約1mmの直径を有する。流体チャネルは、例えば管状部材の壁の開口である。最も好ましくは、管状部材は、試薬が実質的に1つの領域を通して試料に到達可能な複数の流体チャネル(開口)を有する。

【0032】

前述の実施形態では、管状部材の壁に(微小)流体チャネルが人工的に形成された様々な材料を使用することができる。この目的のための適当な材料は、ガラス、シリコン、シリコンゴム、例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリアミド、ポリウレタン、シクロオレフィン(コ)ポリマー、ポリエーテルエステル、アミド、又はオレフィンベースの熱可塑性エラストマーのような熱可塑性ポリマー、及び、例えば、シリコン、アクリレート、ウレタン、エポキシ、ポリイミド、シクレン、メタクリレート、アクリルアミドのような架橋ポリマー等である。(微小)流体チャネルを有する前述の材料を製造するための考えられる手順には、鋳込成形、押出成形、熱成形、射出成形、微小成形、反応射出成形、レーザー加工、ラミネ

10

20

30

40

50

ーションが含まれる。流体チャネルを有する材料一般及び具体的に挙げられた実施形態には、例えばハウジング等の他のデバイス及び部品との一体化及び／又は一体製造が容易にできるという利点がある。

【0033】

本出願の第2の態様による生体試料を処理するためのシステムでは、少なくとも1つの「補助部品」の少なくとも1つは、抽出デバイスから試料ホルダに試料を移送するための移送デバイスである、又はこれを有し、移送デバイスは、試料ホルダを接続可能な第1の端部（「支持構造」）と、抽出デバイスを接続可能な第2の端部とを有する移送チャネルを有する。システムは、生体試料を被検体から抽出する抽出デバイスを備える、又は備えない。抽出デバイスは、生体試料を被検体から抽出するために当該技術分野で慣用的に使用されているデバイスである。生検針等の針を含む多種類の抽出デバイスを使用することができる。最も好ましくは、材料の漏れを防ぐために試料ホルダと第1の端部との間、及び／又は抽出デバイスと第2の端部との間を密封接続することができる。抽出デバイスが第2の端部に接続され、試料ホルダが第1の端部に接続されると、デバイスの移送チャネルを介して試料材料を抽出デバイスから試料ホルダに移送することができる。このような移送の後、試料ホルダは、移送デバイスから切り離され、現在の使用の要望通りに使用される。移送デバイスの使用には、試料を抽出デバイスから試料ホルダに移送するための手段を何回も再使用できる一方、試料ホルダのデザインを単純で費用効果の高いものにできるという利点がある。

10

【0034】

前述の移送チャネルの第1の端部及び／又は第2の端部は、特に試料ホルダ（より具体的には、その管状部材）又は抽出デバイスの形状にそれぞれ対応する開口を有する。さらに、これらの端部は、好ましくは公差を補償し密封接続をもたらす得る、例えばゴム等の弾性材料から作られる。

20

【0035】

別の実施形態によれば、システムの少なくとも1つの「補助部品」の少なくとも1つは、被検体から試料を抽出するための抽出デバイス（例えば、生検針）である、又はこれを有し、抽出デバイスは、抽出された試料が試料ホルダに取り込まれるように試料ホルダを収容する支持構造を備える。したがって、試料（例えば生検）を抽出デバイスからホルダに追加的に移送する必要がない。好ましくは、（試料を含んだ）試料ホルダを、さらなる処理（例えば、染色、光学的検査等）のために抽出手順後に抽出デバイスから取り外すことができる。

30

【0036】

別の実施形態によれば、システムは、（追加的又は代替的に）試料ホルダ内の試料の画像を生成する光学装置を有する。光学装置は、例えばユーザによる目視検査のための顕微鏡、特に試料の画像を生成する手段を備えたデジタル走査型顕微鏡を有する。固定又は移動試料ホルダ内の試料の画像は、例えば共焦点顕微鏡法により生成される。試料ホルダにかかる光学システムと接続して使用することは、管状部材が透明であることから可能である。

【0037】

さらに別の実施形態では、システムの少なくとも1つの「補助部品」の少なくとも1つは、試料ホルダを交換可能に又は永久的に収容する支持構造を有する容器である、又はこれを有する。そして、試料ホルダのサイズ及び設計特性を、試料を収容する機能に必要な最低限まで減らすことができる一方、容器により追加機能性を提供することができる。この機能性には、例えば、ユーザが掴むことができる部品を提供することによる試料ホルダの良好な操作が含まれる。追加的又は代替的に、機能性には、顕微鏡等の検査手段に対する試料ホルダの光学的適応が含まれる。容器は、ただ1つの試料ホルダを収容する、又は2つ以上の試料ホルダを同時に収容するように設計される。さらに、試料ホルダは、すなわち、ユーザが意図的に導入する及び／又は容器から取り外すことができるように交換可能に収容され得る。代替的に、試料ホルダは、例えば容器の一体部分である場合には容器

40

50

に永久的に収容される。

【 0 0 3 8 】

上記実施形態の任意のさらなる発展形態では、試料ホルダは、容器に対してその伸長軸周りに回転できるように容器に収容される。追加的又は代替的に、試料ホルダは、容器内を軸方向に（すなわち伸長軸の方向に）移動可能である。このような場合、容器が固定された（例えば顕微鏡テーブルに取り付けられた）状態で、試料ホルダを容器に対して回転及び／又は移動させることにより試料ホルダ内の試料の全ての部分を検査することができる。

【 0 0 3 9 】

容器を備えたシステムの別の好適な実施形態では、容器の支持構造は、空洞であって、空洞（の残部）を満たす流体に埋め込まれた試料ホルダを取り込むための空洞を有する。空洞の流体で満たされた空間は、例えば試料ホルダ内の試料が暴露される試薬を含むため、試料ホルダとの試薬交換を適切に管理することが可能になる。この場合、好ましくは、（未使用の）試薬を空洞に導入する手段及び／又は（使用済みの）試薬を空洞から除去する手段を有する。好適な実施形態では、試薬流体は、試料の浸透を促進するためにポンプ手段で作動される。流体回路は、微小流体デバイスとして設計され、試薬を少量しか使わずに高対流を得ることができる。別の実施例では、空洞は、試料の光学的検査が促進されるように、管状部材及び／又は容器の壁（すなわち壁の透明な部分）の光の屈折率を適合させるのに使用される屈折率整合流体で満たされる。

【 0 0 4 0 】

容器は、一般に試料ホルダを収容するのに適した任意の形状を有する。容器は、例えばある距離だけ離れて配置され、（好ましくは屈折率整合流体で満たされた空間内で）試料ホルダを間に挟む（少なくとも一方が少なくとも部分的に透明とされる）2つの平板を有する。これにより、通常は標準部品で実現され得る容器の単純なデザインが提供される。別の実施形態では、容器は、試料ホルダの管状部材の形状及びサイズ（遊びを許容し、試料ホルダの寸法公差を補償する適切なオーバーサイズを含む）を有する穴を有する支持構造を備えた基板を有する。管状部材の外側と穴の壁との間の残っている隙間は、オプションで、流体、特に屈折率整合流体で満たされる。これにより、部品がわずかしかない（特に一体成形の）容易な取り扱いを可能にする容器デザインが提供される。

【 0 0 4 1 】

別の実施形態では、容器は、試料ホルダの管状部材周りの流体の流れを制御する流体系を有する。したがって、例えば、様々な試薬の連続的な提供の制御を達成でき、強制対流が加わることで試薬の輸送が促進される。

【 0 0 4 2 】

生体試料を処理するための方法に関する本出願の第3の態様では、方法は、オプションで、試料ホルダ内の試料を光学的に検査するステップをさらに含む。この検査は、例えば顕微鏡を使用して行われ、試料ホルダは、顕微鏡の真下、又は上記の種類の容器内に間接的に配置される。

【 0 0 4 3 】

試料ホルダが暴露される試薬は、固定／透過化剤、洗浄液及び／又は染色剤、及び／又はアンチクエンチング液を含む。固定、透過化及び染色は、さらなる分析、特に顕微鏡下の光学的分析のために生体試料を調製する重要なステップである。試料ホルダ内の試料は、例えば、試料における生物学的プロセスを「凍結させ」、生体分子の分解を回避するために固定剤に暴露される。その後、試料はさらに透過化され、関心組織成分、例えば腫瘍細胞を検出できるように1つ以上の染色剤に暴露される。一般に、染色は、例えば癌細胞や細胞内のバイオマーカーの特定のような、特に腫瘍診断のための組織病理学、細胞病理学、免疫組織化学及び *in-situ* ハイブリッド形成法で使用されるような試薬及びプロトコルにより行われる。

【 0 0 4 4 】

方法はさらに、オプションで、試料ホルダ内の試料から関心領域を抽出するステップを



含む。この各関心領域は、例えば試料ホルダの検査が行われる顕微鏡を使用して特定される。そして、試料の抽出された部分は、例えば試料の癌細胞等、細胞内の分子変化を特定するためにシーケンシングのような分子診断法により検査される。試料からの関心領域の抽出には、試料の関心領域の位置及び軸方向の伸長を特定するステップと、当該領域の縁にマークを付けるステップと、試料を所定の位置で切断することにより当該領域を物理的に除去するステップとが含まれ得る。そして、分離された関心領域を容器に配置し、核酸抽出、精製、増幅及び検出のための手順の対象にすることができる。切断は、試料を保持する管状部材と共に行われ得る。これは、管状部材を支持する保持デバイスにより促進され得る。切断は、外科用メスや類似のデバイスを用いて行われ得る。

【 0 0 4 5 】

10

上記の分析法又は診断法における試料ホルダ及び／又はシステムの使用に関する本出願の第4の態様では、分析法又は診断法は、例えば、生体試料分析、分子診断、化学試料分析、食品分析、及び／又は法医学的分析である。生体試料分析、好ましくは分子診断の際には疾患又は好ましくは癌が診断される。

【 0 0 4 6 】

生体試料が生検である実施形態では、診断法の間に生検の損失がない。したがって、被検体から採取される生検の量が減るため、生検採取による痛みが軽減される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 7 】

本発明のこれら及びその他の態様が、以下に記載される実施形態を参照して明らかになる。図面は以下の図を含む。

20

【 0 0 4 8 】

【図1】生検試料を含む針の断面を概略的に示す。

【図2】図1の針及び本発明の一実施形態による試料ホルダが結合された移送デバイスの断面を概略的に示す。

【図3】試料ホルダの回転及び段階的軸方向運動により試料を光学的に検査するためのシステムの一実施形態を概略的に示す。

【図4】顕微鏡検査の際に試料ホルダを収容する容器を備えたシステムの一実施形態を概略的に示す。

【図5】顕微鏡による共焦点走査の際の試料ホルダを含む容器の断面を概略的に示す。

30

【図6】試薬流体の対流を発生させる流体系を有する容器を概略的に示す。

【図7】流体系及び永久的に一体化された試料ホルダを有する容器を概略的に示す。

【図8】試料の取り込みの際に図2の試料ホルダを収容可能な抽出デバイスを備えたシステムの一実施形態を概略的に示す。

【図9】図9は、その後の試料ホルダの排出の際の図8のシステムを示す。

【 0 0 4 9 】

図において、同じ参照番号又は100の整数倍だけ異なる参照番号は、同一又は同様の構成要素を指す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 0 】

40

患者材料（例えば組織及び細胞等）の病理診断調査は、特に腫瘍学において、多くの治療方針決定の基礎である。一般に、生検からの薄いスライスが顕微鏡スライド上に提示され、例えばヘマトキシリン - エオシン染色（H & E）によって、特定のプロトコルに従って染色されて、組織の形態を可視化する。最近になって、疾患特異的バイオマーカーに対する *in situ* 染色が、抗原、例えば組織上に存在するタンパク質への抗体の特異的結合、いわゆる免疫組織化学的検査（IHC）、及び、染色体又は遺伝子の一部に対する設計されたヌクレオチドの配列のハイブリダイゼーション（*in situ* ハイブリダイゼーション、ISH）等に基づき、標的薬物のコンパニオン診断に対して開発されている。

【 0 0 5 1 】

50

癌細胞における遺伝子突然変異の役割の理解が増すにつれて、分子診断（「MDx」）が、標的療法を選択すること及び治療反応を予測することに対して必要不可欠な病理学の一部になっている。これは、q-PCRマイクロアレイ及び／又は組織に対する（サンガー若しくは次世代）シーケンシングによって行われる。MDx分析の感度及び特異性のために、組織スライスの関連領域のみを選択することは極めて重要である。非癌性組織／細胞による希釈は、誤診につながる。十分な腫瘍材料の欠如は、偽陰性又は無効な結果をもたらす関連問題である。

#### 【0052】

染色後の目視検査のためにミクロトームで生検を切断することは、病理検査室における多大な労力を生み出し、有益（で一般に量の少ない）組織の損失をもたらす。検査後、分子診断法によるさらなる分析のために切片の選択が必要である。試料選択には、腫瘍細胞含有量について十分な量の試料と試料純度とが必要とされる。スライスから出発することは、十分な情報を得るために複数の切片から選択することを意味する。生検のサイズの減少、患者1人当たりの生検数の増加、試料1個あたりのMDxテスト数の増加に伴い、問題は大きくなりつつある。特に、コア針からの小生検又は極細針吸引物からの細胞は、ミクロトームによる所要の切断中に比較的大量の試料が失われたり浪費されたりするという問題をもたらす。これにより、多数のMDxテストが行われる可能性及び／又はMDxテストの質が制限され、投入材料を採取する労力が増す。代替案として、より大きい生検コアの使用が考えられるが、例えば痛みを伴う等、患者に与える影響力が非常に強い。組織をミクロトーム切断する必要性は、凍結又は代替的にパラフィン包埋の必要性を生じさせる。どちらの手順も、特殊な技能を要し、より長期の保管のために組織を保存しない凍結、又は多大な労力及び有害な溶媒を使用するという環境影響を生み出すパラフィン包埋のような実際の性質の不都合な点を有し、また、例えば外科手術に直結するフィードバックを与えない長いスループットタイムをもたらす。また、例えばデジタル病理システムを使用している場合に、（定量的に）染色を解釈するためにアルゴリズムが使用されている時、固定／透過化及び染色手順は標準化されるべきであり、さもなければ、アルゴリズムによる分析結果が信頼性を欠くものとなる。

#### 【0053】

上記の問題に対処するために、ここでは、具体的な実施形態において次のステップを含む手法が提案される。関心のある生検が、針又は他の抽出デバイスから、流体に対して透過性である「試料ホルダ」の壁の薄い円筒管状部材に移送される。次に、内部に生検を含む試料ホルダが、固定液等の試薬に浸漬される、又は代替的に、流体が結合マイクロ流体チャネルにより流通される。固定は、固定剤が管状部材の壁を通り、試料内部に拡散することにより達成される。固定の後、試料ホルダは、所望の染色ステーションに移送される。染色プロトコル及びプローブは、用途に依存する。一般に、この手順は、癌の診断のための通常の生検手順に加えて、先端的染色及び／又は分子診断検査を含む先端的癌診断のために従われる。染色プロトコルは、通常、プローブを用いた培養を含み、その後洗浄ステップが続く。

#### 【0054】

図1 - 図6、図8及び図9は、上記の種類の試料ホルダ110の一実施形態を含むシステム100を概略的に示す。

#### 【0055】

特に、図1は、関心組織から採取された生検等の生体試料Sを含むコア針1の伸長軸に沿った断面を示す。試料Sは、ピストン2の運動により針1の空洞内を移動され得る。

#### 【0056】

図2は、コア針1から本発明の一実施形態による試料ホルダ110への試料Sの移送を示す。移送は、第1の端部123及び第2の端部124を有する移送チャネル122を備える本体121を有する「移送デバイス」120を用いて行われる。第1の端部123は、試料ホルダ110（より具体的には、かかる試料ホルダの管状部材111）との密封接続を可能にする支持構造として設計される。第2の端部124は、コア針1等の外部抽出

手段との流体密封接続を可能にするように設計される。

【0057】

コア針1及び試料ホルダ110の両方が各端部に接続されると、試料Sは、ピストン2を押すことにより、コア針1から移送チャネル122を介して試料ホルダ110の管状部材111の内部空洞に移送され得る。この移送が終了した後、試料ホルダ110は移送デバイスから切り離され得る。

【0058】

管状部材111の壁は、液体に対して透過性である。壁は、光学的に透明な膜材料から作られ得る。1つの例は、トラックエッチングされたポリカーボネート（例えば米国EMD Millipore社のIsopore）である。光透過性は、光学的検査の際の湿潤状態でのみ必要とされる。透過性を向上させるために、屈折率整合液を導入することができる。膜の透過性は、処理中に使用される試薬に対して高くなければならない。試薬の試料標本への浸透は、主として拡散により決定される。膜材料の透過性は、処理時間が著しく増加しないように、試料内部の拡散速度と同程度でなければならない。細孔性材料が好ましい。異なる厚さ、孔径及び細孔密度の濾過膜が使用可能である。トラックエッチングされた材料の代替品は、相分離、例えば熱又は反応誘起相分離により作られる膜、又は明確に定義された標準の孔径を有する微小成形された膜材料である。

【0059】

試料ホルダ110内の生検Sは、形態を保存し、生体分子プロセスを凍結させるために、固定緩衝剤（緩衝ホルマリン水溶液）に直接浸漬され得る。固定は、容量が小さいために短時間である。固定の後、試料ホルダ内の生検は、病理学的染色に直接送られ得る。試料ホルダ内部の生検全体について検査が行われ、マイクロトミングは行われなため、パラフィン包埋は必要ない。4～8ミクロンの標準スライスと形状が異なる結果として、染色手順を関連する培養及び洗浄ステップに対して調整する必要がある。厚さの増加は、プロセスにより長い時間スケールをもたらす。しかし、顕微鏡検査の種類によって、染色の浸透深さも数ミクロンに制限され得る。好適な実施形態では、試料は、ライン照明及び試料の回転により円筒試験片として検査される。これは、一例として図3に示される。

【0060】

図3は、試料ホルダ110と、試料ホルダ110内部の試料Sを光学的に検査する顕微鏡140とを有するシステム100を概略的に示す。本実施形態では、試料ホルダ110は、伸長軸A周りに回転されると同時に、ある点において又はある線に沿って光学的に監視され得る。さらに、試料ホルダ110は、試料の異なる軸方向断面の連続的検査を可能にするように軸方向Aに段階的に移動され得る。

【0061】

焦点深度を変化させることにより、試料Sの3次元画像を作成することができる。画像の解析は、分子診断のための関心領域又は体積、すなわちROIを提供し得る。これは、通常、切断により管状部材111から容易に摘出可能な軸方向の切片である。このように、どんなに生検が小さくても、MDx分析のための試料は失われない。複合分析のためにサブ切片を形成することができる。生検の全体的完全性を維持することにより、画像を生検が採取された腫瘍の位置に正確にマッピングすることが可能になる。追加的又は代替的に、試料ホルダは、オプションで左端と右端との間の中間位置に窓（図示せず）を有する。そして、関心領域ROIは、試料全体を軸方向に適切に移動させることによってこの窓に配置され、試料の残りの部分に影響を与えることなく、窓から摘出される。

【0062】

前述のように、画像の取得は、染色の後、管状部材111上で直接行われ得る。しかし、この部材の曲がった形状は、直接観察の焦点画質に影響を与え得る。この影響を軽減するために、管状部材111は、間に屈折率整合液を含む2つの平坦基板の間に、又は代替的に、管の直径と一致する開口（穴）を有する支持構造を備える基板に挿入され得る。このように、従来型の顕微鏡又はデジタルスキャナを画像取得に使用することができ、x、y - 走査が行われる、より従来型の共焦点配置で顕微鏡検査を実行することができる。

10

20

30

40

50

## 【0063】

図4は、顕微鏡140を用いた検査のために試料ホルダ110を挿入可能な円筒穴を有する支持構造132を備える平面基板131により形成される容器130を有するシステム100の拡張を示す。基板131は、好ましくは透明材料、特に試料ホルダ110の管状部材111と同様の屈折率を有する材料から作られる。最も好ましくは、試料ホルダ110と支持構造132の穴の間の隙間は、光学的品質を向上できるように屈折率整合流体で満たされる。

## 【0064】

図5は、試料ホルダの伸長軸Aに垂直な方向から見た、試料ホルダ110を含む容器130の断面を概略的に示す。図5は、円筒形生検Sの考えられる焦点面Pを示す共焦点走査を示す。複数の焦点面が、生検の準3次元画像を取得するために走査され得る。画像から、例えば高濃度の腫瘍細胞を示す関心領域を取得することができる。この関心領域は、容器内部の円筒形生検から容易に摘出可能な関心体積又は関心区域に容易に転換され得る。この手法の利点は、従来の顕微鏡スライド上の個々のスライスからの選択と対照的に、関心体積から材料が失われないことである。

## 【0065】

試料ホルダ110の管状部材111は、通常、約0.2mm~約2mmの内径Dを有する。これは、スライド上の組織スライスと比較して拡散時間が長いことを意味する。しかし、管状部材111内の試料Sの染色を全深さまで行う必要はなく、画像取得に使用される焦点深度まででよい。

## 【0066】

図4及び図5に示された容器を含む構成はまた、屈折率整合液が固定又は染色液で置き換えられる標本の固定及び染色に使用され得る。

## 【0067】

ここで、図6は、容器130の好適な実施形態の内側面の断面を示す。前述のように、容器は、標本Sを含む試料ホルダ110が配置される穴を有する支持構造132を備える。さらに、容器は、試料ホルダ110（又は少なくともその一部）を収容する流体系133を有する。流体系133は、流体入口/出口135と、試料ホルダ110周りに試薬流体の対流を発生させるポンプデバイス134とを有する。支持構造132と流体系133との間の移行部は、好ましくは密封される（図示せず）。

## 【0068】

図7は、試料ホルダ210及び容器230を備えるシステム200の代替的な実施形態を示す。容器230は、入口/出口235と、ポンプデバイス234と、試料ホルダ210の管状部材211が永久的に一体化された空洞232とを備える流体系233を有する。管状部材211は、例えば、容器の材料と一体で、試薬の試料ホルダ210内部の試料Sへの到達を可能にする複数の開口又は流体チャネルを有する円筒壁を有する。したがって、永久壁211は、上記の実施形態において膜の役割を果たす。

## 【0069】

図8及び図9は、システム100の別の任意の実施形態を示す。本実施形態では、システム100は、追加的又は代替的に、ここでは図2~図6に示された試料ホルダ110を収容する支持構造152を有する生検針150である抽出デバイスを備える。したがって、抽出デバイスのピストン151を引くことにより、試料Sを試料ホルダ110に直接引き込むことができる。このプロセスは、図8に示される。

## 【0070】

図9は、続いて試料ホルダ110を試料Sと共に抽出デバイス150から排出する様子を示す。この排出は、例えばピストン151を用いて達成され得る。その後、試料ホルダ110は、例えば光学的検査のために容器130に移送される等、要望通りに使用される。

## 【0071】

溶液は、標本全体に流体チャネルの適切な構成を介して軸方向又は半径方向に活発に送

10

20

30

40

50

り出され得る。試薬の消費量を減らし、拡散を高める強い対流を得るために、チャンネル寸法を小さく保つことができる。容器 130 は、液体供給（例えば、管及びタンク）及び作動（例えば、空気圧作動やシリンジ）に必要なインターフェースを備えたマイクロ流体カートリッジとして設計され得る。

【0072】

要約すると、セクショニングを行わずに組織の病理学的検査を可能にする方法及びデバイスの実施形態が説明されている。生検は、形状を保存し、破損を回避するために、例えば針芯から専用管に移送される。管は、好ましくは、組織の固定及び染色を可能にするために化学試薬に対して透過性である光学的に透明な材料から作られる。染色反応は、完全無傷生検を用いて行われる。染色の後、生検は、明視野、蛍光又はデジタル走査型顕微鏡による光学顕微鏡法により検査され得る。これは、例えば大きな領域を検査するためにライン照明を当てながら円筒試料を回転させることにより行われるか、又は、管が、従来の手段を用いた光学的検査のために屈折率整合流体を含むほぼ平坦な基板に挿入され得る。生検の表面下の層から情報を取得するために、及び/又は、3次元情報を取得するために、焦点深度を変化させることができる。管に収納された生検を用いることにより、パラフィン化及びセクショニングの必要がないため、作業負荷、環境被害及び結果を得るまでの時間が減少し、小さい試料の使用効率が高まる。セクショニングによる材料損失がないため、次の分子診断検査のための試料選択がより効率的である。

10

【0073】

とりわけ、この手法は、組織病理学、生検採取、組織処理、分子病理学、特に癌細胞の分子変化の特定に基づいた癌患者の層別化に適用可能である。

20

【0074】

本発明は、図面及び前述の説明で詳細に例示及び説明されているが、そのような例示及び説明は、例示的なものとみなされるべきであり、限定的なものとはみなされるべきでない。本発明は、開示される実施形態に限定されない。開示される実施形態に対する他の変形形態は、図面、開示、及び添付の特許請求の範囲を検討することにより、特許請求される発明を実施する際に当業者によって理解されて実施され得る。特許請求の範囲において、用語「comprising（有する）」は、他の要素又はステップを除外せず、不定冠詞「a」又は「an」は、複数を除外するものではない。単一のプロセッサ又は他のユニットが、請求項に引用される幾つかのアイテムの機能を果たす。特定の手段が相互に異なる従属請求項に記載されることだけで、これらの手段の組み合わせを有利に使用することができないことを示すものではない。請求項における任意の参照符号は、範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

30



## フロントページの続き

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 ウィンベルガー フリードル レインホルド

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5

(72)発明者 ネアイゼン ヤコブス ヘルマヌス マリア

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5

(72)発明者 パン デ シュトルペ アンヤ

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5

審査官 北条 弥作子

(56)参考文献 特開2001-187058(JP, A)

特開2002-303568(JP, A)

特開2002-214093(JP, A)

国際公開第2007/074769(WO, A1)

特開平10-221228(JP, A)

特開平08-211047(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 1/28

G01N 1/04

G01N 1/30

G01N 1/36

G01N 33/48

A61B 10/02