

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4889642号
(P4889642)

(45) 発行日 平成24年3月7日(2012.3.7)

(24) 登録日 平成23年12月22日(2011.12.22)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 15/14	(2006.01)	GO 1 N 15/14	A
GO 1 N 15/00	(2006.01)	GO 1 N 15/00	C
GO 1 N 1/04	(2006.01)	GO 1 N 1/04	M

請求項の数 9 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2007-527430 (P2007-527430)
(86) (22) 出願日	平成17年5月18日 (2005.5.18)
(65) 公表番号	特表2007-538259 (P2007-538259A)
(43) 公表日	平成19年12月27日 (2007.12.27)
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/017503
(87) 國際公開番号	W02005/116642
(87) 國際公開日	平成17年12月8日 (2005.12.8)
審査請求日	平成20年5月14日 (2008.5.14)
(31) 優先権主張番号	10/849,715
(32) 優先日	平成16年5月19日 (2004.5.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	510248604 エービー サイエックス エルエルシー アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01 701, フラミングム, オールド コ ネチカット パス 500
(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(72) 発明者	レークストロー, デビッド, ジェイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 50, リヴァーモア, ソーンヒル ド ライブ 3620

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】粒子の処理方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体中に分散した粒子を含むサンプルの処理方法であって、
(A) 細長い粒子受容器を含む処理チャンバ内にサンプルを供給するステップ；
(B) 少なくとも一部の粒子を前記細長い粒子受容器によって受容することにより、受容された粒子の全てを同一平面内に位置させるステップ；及び
(C) 前記細長い粒子受容器により受容された粒子の少なくとも一部を処理するステップを含み、

前記細長い粒子受容器が、細長い障壁部材を有し、

前記細長い障壁部材が、液体を通過させるが処理対象の粒子を通過させない堰であり、
液体が前記細長い障壁部材を通過するための唯一の方法は堰を越えることあり、

前記細長い粒子受容器の頂部が、前記細長い障壁部材に対向して、それぞれ粒子を1つ受容できる、複数のポケットを備え、

サンプル中の粒子が前記細長い障壁部材と前記ポケットとの間に集められることを特徴とする方法。

【請求項 2】

ステップ(B)において、液体サンプルの流れにより粒子を前記細長い粒子受容器の方向へ導くことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

入口導管から流入する前記液体サンプルを前記細長い粒子受容器へ供給する細長い粒子

保持流路が、

(i) 1 以上 の 粒子が該細長い粒子保持流路に流入するとともに長軸方向に沿って通過することができるような断面をその全長にわたって有し、；かつ

(i i) 粒子が前記入口導管から前記細長い粒子保持流路内へ移動できるように、前記入口導管の軸に対して 30 度ないし 60 度の角度を成す軸を有することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

粒子が放射線源に曝露された時に生成する信号を観察することを含み、放射線の軸と観察の軸とが同一であることを特徴とする請求項 2 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

粒子が放射線源に曝露された時に生成する信号を観察することを含み、放射線源の強度特性に対する信号の依存度を低減するために、フラットフィールド補正が使用されることを特徴とする請求項 2 ないし請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

原サンプルから粒子を分離して、分離された粒子を液体中に 1 マイクロリットル当たり 5 ないし 25000 粒子が含まれる濃度で分散させることにより、前記処理チャンバに供給される前記サンプルが調製されることを特徴とする請求項 2 ないし請求項 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (B) において、前記処理チャンバを通して粒子を前記細長い粒子受容器の方向へ導くために、ポンプを使用して位置決め液を流通させることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

入口導管から流入する前記液体サンプルを前記細長い粒子受容器へ供給する細長い粒子保持流路が、約 40 μm ないし約 100 μm の幅及び約 10 μm ないし約 50 μm の深さを有することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

粒子を含有する液体サンプルを処理するための処理チャンバであって、

(i) サンプル流入口；

(i i) 該サンプル流入口から流入する液体を流通させ、第 1 端及び第 2 端を有する細長い粒子保持流路；および

(i i i) 前記細長い粒子保持流路の前記第 1 端と前記第 2 端との間に位置し、細長い障壁部材を備える細長い粒子受容器を有して構成され、

前記細長い障壁部材が、液体を通過させるが処理対象の粒子を通過させない堰であり、液体が前記細長い障壁部材を通過するための唯一の方法は堰を越えることであり、

前記細長い粒子受容器の頂部が、前記細長い障壁部材に対向する、それぞれが約 2 ミクロンないし約 20 ミクロンの最大深さ及び約 3 ミクロンないし約 50 ミクロンの幅を有する複数のポケットを備えることを特徴とする処理チャンバ。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【 0 0 0 1 】

関連出願との相関関係

本出願は、Arnold, Rakestraw, Paul 及び Leung を発明者として 2004 年 5 月 19 日に本出願人により出願された同時継続出願である米国特許出願番号 10 / 849715 号の一部継続出願である。この出願は、米国特許出願番号 10 / 295482 の優先権を主張しており、且つ本出願人により 2003 年 11 月 14 日に出願された国際特許出願番号 PCT / US03 / 36533 に関連する。米国特許出願番号 10 / 295482 は、2004 年 5 月 20 日に US2004 - 0096977 号として公開され、PCT / US03 / 36533 は 2004 年 6 月 3 日に WO2004 / 046695 として公開された（即ち、両方とも本出願の優先日以降に公開された）。これらの出願及び公開の各々の開示内

10

20

30

40

50

容全体を、参照によりあらゆる目的のために本明細書に包含する。

【0002】

背景

本発明は粒子の処理に関し、従来細胞数測定により試験される粒子の試験を含むがそれに限定されない。

フローサイトメトリは生命科学研究及び臨床的診断の分野において、細胞及び分析物の付着したビーズを含む粒子の分析に広範に用いられている。細胞数測定の短所は、各粒子を個々に試験しなければならないことである。粒子試験のその他の方法は、例えば、WO 00/12123、WO 01/38865、WO 03/085379、米国特許第6406848号、及びNature Biotechnology (2000), 18, 630-634, Brenner, S等及びAnal. Chem. (2000), 72, 1144-1147, Kitamori, T.等に開示されている。

10

【0003】

発明の概要

WO 2004/046695は、液体中に分散した粒子を全ての粒子が同一平面内に位置するような形状に集め、集めた粒子をそのままの形状で処理する方法、装置及びシステムを開示している。例えば、殆ど全ての粒子を同時に電磁放射線に曝露して、粒子に関する情報を含む応答を粒子から引き出す。

本明細書は、WO 2004/046695には開示されていないが、WO 2004/046695に開示された方法、装置及びシステムを改善するか又は修正するために用いることが可能な多数の新規の特徴を開示する。これら新規の特徴は以下の項目を含むがこれらに限定されない。

20

(1) 粒子を処理した後で粒子を含む処理チャンバを廃棄することにより、処理チャンバの再使用を妨害する残留物質の危険を全て回避する。

(2) サンプルは1マイクロリットル当り、5個ないし約35,000個、例えば5,000個ないし25,000個、又は10,000個ないし25,000個、又は15,000個ないし25,000個の粒子を含むことができる。

(3) サンプル中の粒子は処理チャンバに送達する前に洗浄するか、そうでない場合は変更する。

(4) 障壁部材と障壁部材に隣接する保持部材との間に粒子を集め、保持部材は、個々の粒子の位置決めを補助して所望の形状を形成するような形状に形成される。例えば、保持部材は、各々が1つの粒子を受容できる複数のポケットを備える。

30

(5) 位置決め液を用いる代わりに又は位置決め液を用いることに加えて、液体サンプル自体の流れを使用して粒子を所望の形状に方向付ける。

(6) 粒子の処理は、放射線源に曝露された時に粒子が生成する信号を観察することを含み、放射線源の強度特性を少なくとも部分的に補正するステップを実行する。

(7) 粒子の処理は、放射線源に曝露された時に粒子が生成する信号を観察することを含み、放射線の軸と観察の軸とは同一である(本明細書では共焦点試験と称する)。

(8) 液体サンプルを送液するため、及び必要に応じて除去するため、並びに位置決め液を用いる場合は位置決め液の流れを制御するためにポンプを使用し、ポンプのうちの1又は複数は、作動流体により移動し且つサンプル又は位置決め液と接触する軟質膜(隔膜としても知られる)を備える。

40

(9) 複数の処理チャンバは直列に配置されるか、又は直列と並列とに配置され、異なる処理チャンバのうちの複数、好ましくは全てに受容された粒子は同一平面内に並び、同時に又はほぼ同一の方法で順次試験される。

(10) 処理チャンバは約40 μmないし約100 μmの幅及び約10 μmないし約50 μmの奥行きを有する及び/又は処理チャンバの幅及び奥行きの各々が粒子サイズの2.5倍以上15倍未満、例えば4倍以上10倍未満である。

上記特徴(1)ないし(10)のうち2つ以上の特徴を組み合わせて用いることができる。

【0004】

50

1 以上の国内特許出願を行なう際に、WO 2004 / 046695 及びこの出願明細書の一方又は両方に基づいて、WO 2004 / 046695 に開示された方法及び装置、並びに同出願に開示された新規な特徴の優先権を主張する際の方法に関する各国の法律及び手続き、並びにヨーロッパ特許条約による同様の法律及び手続きは様々に異なっている。本明細書において、本発明は、任意に選択できる特徴である特徴(1)ないし(10)によって、WO 2004 / 046695 に基づいて広義に定義及び特許請求されている。WO 2004 / 046695 に基づく国内出願又はヨーロッパ出願に特許付与される開示内容及び/又は特許請求項に関して、これが許可されない国では、本出願人は、本明細書の本発明と同様の方法で、しかしながら上記国内出願又はヨーロッパ出願に適用される法律及び慣例に則って、(1)本発明が、本明細書に開示された新規の特徴の1以上に限定されない限りにおいて、それまでに規定及び特許請求された本発明の「限定修正」、及び/又は(2)WO 2004 / 046695 に基づく対応国内出願又はヨーロッパ出願に許可された特許請求項の「限定修正」、及び/又は(3)WO 2004 / 046695 中に明示的に開示された主題の「限定修正」、及び/又は(4)最終的「限定修正」に従って、本明細書の本発明を規定及び特許請求する。

【0005】

第1の好ましい態様において、本発明は粒子処理方法を提供し、本方法は：

(A) 液体中に分散した粒子を含むサンプルを、粒子受容器を含む処理チャンバ内へ配置するステップ；

(B) 配置されたサンプル中の粒子の少なくとも一部を粒子受容器によって受容させることにより、受容された粒子の全てが同一平面内に位置させるステップ；及び

(C) 粒子受容器により受容された粒子の少なくとも一部を処理するステップを含む。

方法は(D) 処理チャンバから粒子を除去することにより、処理チャンバの再使用を可能にするステップを含むことができる。代替的に、粒子を含む処理チャンバをステップ(C)の後で廃棄することができる。ステップ(D)における「粒子の除去」という用語を使用する場合、元の状態又は変化した状態の粒子の除去を含む。

【0006】

第2の好ましい態様において、本発明は新規の処理チャンバを提供し、本チャンバは：

(i) サンプル流入口；

(ii) 流入口から流体が流れ込む、第1端及び第2端を有する細長い粒子保持流路(EPRP)；及び

(iii) 液体は通過させるが、処理粒子、例えば0.1ミクロンないし50ミクロンの範囲から選択されたサイズより大きいサイズを有する粒子、好ましくは1ミクロンないし20ミクロンの範囲から選択されたサイズより大きいサイズを有する粒子は通過させない細長い障壁部材を備えた、EPRPの第1端と第2端との間の細長い粒子受容器；を備える。

このような処理チャンバにおいて、粒子を含む液体を障壁部材の方へ向かわせることができ、それによって粒子は粒子受容器に受容され、液体は障壁部材を通過する。

【0007】

第3の好ましい態様において、本発明は、本発明の第1の態様の方法を実行する装置を提供し、本装置は、本発明の第2の態様による処理チャンバ及び受容器により受容された粒子を処理する手段、好ましくは粒子に関する情報を含む応答を粒子から引き出す電磁放電線源を備える。用語「装置」は広義に使用され、複数の共働する部分を備えるあらゆるシステムを含む。

本発明を添付図面に例示する。これらの図面は、図11及び図12を除いて概略図であり、実際の縮尺に対応するものではない。

WO 2004 / 046695 の図1ないし図15及び明細書は本発明をさらに説明する。

【0008】

10

20

30

40

50

本発明の詳細な説明

上記の発明の概要、本発明の詳細な説明、特許請求の範囲、及び添付図面において、例えば構成要素、成分、機器、装置、システム、ステップ、及び実施形態を含む本発明の特定の特徴を参照する。本明細書の本発明の開示には、それら特定の特徴の全ての可能な組み合わせが含まれることを理解されたい。例えば、本発明の1つの特定の態様又は実施形態、1つの特定の図面、或いは1つの特定の特許請求項に関連して1つの特定の特徴が開示される場合、その特徴は、本発明の他の特定の態様及び実施形態と組み合わせて、及び／又はそれらとの関連で、及び本発明に汎用的に、可能な限りの程度まで用いることができる。本明細書において特許請求される本発明には、本明細書中に特に記載されていないけれども、本明細書中に特に記載された特徴と同一、同等又は同様の機能を提供する特徴の使用も含まれる。

本明細書で使用される用語「備える」、「含む」及びそれらの文法的同意語は、用語「備える」、「含む」の後に特に列挙される構成要素、成分、ステップに加えて、場合によつては他の構成要素、成分、ステップ等が存在することを意味する。例えば、構成要素A、B及びCを「備える」（又は「含む」）システムは、構成要素A、B及びCだけを含むことができるか、又は構成要素A、B及びCだけでなく1以上のその他の構成要素を含むことができる。本明細書において2つ以上の規定されたステップを含む方法に言及する場合、文脈上矛盾しない限り、規定されたステップはいかなる順序ででも又は同時に実行することができ、方法は規定されたステップのいずれかの前に、規定されたステップのうちの2つのステップの間に、又は全ての規定されたステップの後に実行される1以上のその他のステップを含むことができる。表現「少なくとも」の後に数字が続く場合、本明細書では、その数字で始まる範囲の始めが示される（この範囲は、規定される変数によって、上限を有しても有さなくてもよい）。例えば、「少なくとも1」は、1又は1を超える数量を意味し、「少なくとも80%」は80%又は80%を超える割合を意味する。「多くとも」の後に数字が続く場合、本明細書では、その数字で終わる範囲の終わりが示される（この範囲は、規定される変数によって、その下限値として1又は0を有する範囲でも下限値を有さない範囲でもよい）。例えば、「多くとも4」は4又は4未満の数量を意味し、「多くとも40%」は40%又は40%未満の割合を意味する。本明細書において、ある範囲が「（第1の数字）ないし（第2の数字）」又は「（第1の数字）～（第2の数字）」で与えられる場合、これはその範囲の下限が第1の数字であり、上限が第2の数字であることを意味する。本明細書中の数字は、文脈上及び表現上適切な許容範囲を伴うものと解釈されるべきである。本明細書で使用される「複数の」又は「複数」という用語は、2以上を意味する。「細長い」という表現は、本明細書では、1つの寸法（長さ）が、その他の寸法の各々より有意に大きい寸法、好ましくは少なくとも4倍、例えば6倍である寸法を有する物品又は流路を指すために用いる。本明細書で使用される略語「EPRP」は、細長い粒子保持流路を指す。

【0009】

本明細書において「1つの」又は「その」特徴を指す場合、文脈上矛盾しない限り、そのような特徴は单一である場合も、複数である場合もある。例えば、本明細書で特徴のリストから選択された特徴を指す場合、文脈上矛盾しない限り、特徴は列挙された特徴内の单一の特徴であるか又は2つ以上の特徴であり得ることを理解されたい。

本明細書において第1の特徴及び／又は第2の特徴に言及する場合、文脈上矛盾しない限り、そのような用語はそれらの特徴を便宜上識別するために用いられているのであり、それらの特徴の一方又は両方が存在し得ることを意味し、両方の特徴が存在する場合、それらは同一であっても異なることを理解されたい。

本明細書において2つ以上の構成要素（又は部分）に言及する場合、文脈上矛盾しない限り、それらの構成要素は互いに分離しているか、或いは单一の構造又は2つ以上の特定の構成要素として作用する单一の構成要素の一部であり得ることを理解されたい。

【0010】

WO 2004 / 046695 の 3 ページ 24 行目から 4 ページ 14 行目に、本発明に用いることが可能な粒子が詳細に開示されている。

【0011】

サンプルの調製、前処理及び希釈又は濃縮

サンプルはサンプル源からいかなる方法によっても調製することができる。例えば、マルチポートロータルバルブをサンプル源、ポンプ、サンプルループ、廃液溜め、及び送液導管に接続することができる。バルブの第 1 位置において、粒子を含む液体をサンプル源からサンプルループ中へポンピングする（液体の量は、サンプルループを確実に満たすため、サンプルループを満たすのに必要な量より大きいことが好ましい）。余剰の液体流は廃液溜めへ流れる。バルブの第 2 位置において、サンプルは、送液導管内を処理チャンバへ向かってポンピングされる。

場合によっては、サンプルを処理チャンバへ送達する前に、サンプル中の粒子を洗浄する及び／又は修正することが望ましい。このような場合、サンプルは、例えば、液体は通過できるが粒子は保持される前処理チャンバへ送達することができ、この前処理チャンバは、例えば処理チャンバ中に用いられる種類の障壁部材を含む細長い前処理チャンバである。粒子は単一の液体に接触させることができるか、又は 2 つ以上の液体に連続的に接触させることができる。液体は、単に粒子を洗浄して原サンプル中の望ましくない構成要素、例えば分析用混合物の過剰な構成要素を除去することができる、及び／又は粒子中に何らかの望ましい変化、例えば化学反応を生じさせることができ、この場合、洗浄液は反応が完了するために必要な時間に亘って粒子全体に流される。単一反応又は一連の反応を実行することができる。場合によっては、粒子からの信号を観察することにより反応の進行をモニタリングすることができる（例えば、反応連鎖の一部として適切な蛍光体を添加する場合）。処理された粒子は適切な液体を逆流させることにより前処理チャンバから除去することができる。

【0012】

場合によっては、サンプルを処理チャンバに送達する前に、サンプル中の粒子の濃度を増減させることができ。このような場合、希釈チャンバにサンプルを送達し、サンプルに追加の液体を添加することができる。粒子を洗浄するか、又は前処理した場合、粒子は、望ましい濃度に対応する容積を有する希釈チャンバへと、前処理チャンバから流し出すことができる。

例えば、EPRP が 100 ないし 500 の粒子滞留部位を含み、4 nL ないし 20 nL の容積を有する場合、好ましいサンプルは 1 マイクロリットル当たり約 25,000 個の粒子を含む。25 マイクロリットルの容積中に約 300 個の粒子を含む原サンプルを用いてその濃度を達成するため、原サンプル中の粒子を、例えば粒子を保持する堰に原サンプル中の液体を通過させることにより分離し、その後適切な容積（例えば、EPRP の設計により、数 10 nL の容積）を有する希釈チャンバに流し込む。

【0013】

細長い粒子保持流路（EPRP）

EPRP は直線状であるか、或いは直線部分と曲線部分とを含み、従って例えば蛇行しているか、又は連続的な曲線状とすることができます。EPRP の断面は一定であることが好ましいが、部分的に丸いか、又は長方形（正方形を含む）であるなど、いかなる形状であってもよい。流路は、例えば約 10 ミクロンないし約 100 ミクロンの長さ、例えば約 40 ミクロンないし約 100 ミクロンの幅及び 10 ミクロンないし 50 ミクロンの深さを有していてよく、よって粒子を含む液体は流路を自由に流れることができ、その際サンプルの容積を最小化することができる。好ましくは、各 EPRP の長さは、粒子サイズの少なくとも約 2.5 倍、特に少なくとも約 4 倍である。

処理チャンバは単一の EPRP 又は、同一平面内にあって好ましくは互いに平行な複数の EPRP を備えることができる。処理チャンバが複数の EPRP を備える場合、隣接する EPRP は、それら EPRP の一方又は両方に細長い粒子受容器を提供する細長い壁を共有することができる。処理チャンバが複数の EPRP を備える場合、それら全てが單一

10

20

30

40

50

の流入口との間に液体を流通させることができるか、又は各々が 1 以上の E P R P と連絡する複数の異なる流入口を設けることができる。

E P R P に関する更なる情報は、WO 2004 / 046695 の 4 ページ 16 行目から 6 ページ 21 行目に提供されている。

【 0 0 1 4 】

補助チャンバ

処理チャンバは少なくとも 1 つの細長い補助チャンバを含むことができ、この補助チャンバは E P R P と並んで動作し、(i) 障壁部材を越えた又は通過した液体を受容するか、又は(i i) E P R P に送達される液体の貯槽として機能する。隣接する細長い壁を共有する複数の平行な E P R P が存在する場合、補助チャンバは最も外側の E P R P と並んで動作する。補助チャンバは E P R P の長さ方向に沿って処理の均一性を改善する。10

障壁部材

本発明の好ましい実施形態において、障壁部材は堰であり、堰の上の隙間は保持される粒子のサイズより小さい。粒子は堰に当たると堰の上端の線の位置で受容される。障壁部材に関する更なる情報は、WO 2004 / 046695 の 4 ページ 30 行目から 5 ページ 24 行目に提供されている。

【 0 0 1 5 】

粒子受容用のポケット

障壁部材及び / 又は保持部材は、任意で個々の粒子を所望の形状に配置するのを補助するような形状にすることができ、例えば複数のポケットを備え、各ポケットに 1 つのみの粒子を受容することができる。ポケットに関する更なる情報は、WO 2004 / 046695 の 5 ページ 10 行目から 20 行目に提供されている。20

処理チャンバの製造

処理チャンバは、WO 2004 / 046695 の 6 ページ 12 行目から 21 行目に記載されているように、簡単に製造することができる。

一部の実施形態において、処理チャンバの頂部部材及び底部部材は、互いに封着されているが、分離できる。このとき、多数の異なる頂部部材から選択された 1 つと、単一の底部部材とを用いることができるか、又は多数の異なる底部部材から選択された 1 つと、単一の頂部部材とを用いることができる。このようにして、頂部部材及び底部部材のうちの一方のみが粒子の位置決めを行うためのポケットを含む場合、処理される粒子のサイズが変化するとき、粒子の位置決めを行うためのポケットを含む部材を、違うサイズのポケットを有する別の部材で置き換えることができる。加えて、いずれかの部材が汚染されたか又は損傷した場合、それを交換することができる。30

【 0 0 1 6 】

受容器による粒子の受容

一部の実施形態では、例えば WO 2004 / 046695 の 6 ページ 23 行目ないし 30 行目に記載されているように、位置決め液を用いて粒子を受容器の方へ向ける。粒子を処理した後、位置決め液の流れの方向を反転させて E P R P からの粒子の除去を補助することができる。

位置決め液を使用する代わりに又は位置決め液の使用に加えて、E P R P 内を通る液体サンプル自体の流れを使用して、粒子受容器へ粒子を方向付けることができる。これは、例えば処理チャンバの流入口から流出口へのサンプルの流れの方向に対して E P R P を適切に配置することにより及び / 又は処理チャンバ内の液体のポンピングを適切に制御することにより、実行することができる。40

【 0 0 1 7 】

液体サンプル自体の流れを使用して粒子受容器の方へ粒子を方向付ける一実施形態において、処理チャンバは流入口及び流出口を備え、流入口は同一平面内に位置する平行な複数の E P R P が接続された入口導管に接続されている。複数の E P R P の各々は、

(i) その全長に亘って同じ断面を有するので、E P R P に流入した 1 以上の粒子は長軸方向に沿って E P R P を通り抜けることができ、且つ50

(i i) 入口導管の軸に対して一定の角度を形成する軸を有し、よって粒子が導管から E P R P 内へ移動することができ、この場合角度は広範囲、例えば $30^\circ \sim 150^\circ$ の間で変化させることができるが、 $30^\circ \sim 60^\circ$ 、例えば 45° が便利であることが多いので、粒子は入口導管から E P R P 中へ流入するとき鈍角の流路を流れる。

各 E P R P の長さは(この実施形態及び他の一部の実施形態において)、粒子サイズの好ましくは少なくとも約 2.5 倍、好ましくは少なくとも約 4 倍、例えば 2.5 倍ないし 1.5 倍又は 4 倍ないし 1.0 倍である。E P R P の各々に流入する液体は障壁部材を越えて補助チャンバに流入し、全ての補助チャンバは、流出口に接続する出口導管に接続する。流出口は、必要に応じて、望ましい流量の維持を補助し、粒子の E P R P 内への引き込みを補助するポンプに接続する。同一平面内に位置し、互いに平行な E P R P の組が 2 つ以上存在することができる。例えば、それらは、各組の E P R P が互いに鏡像関係にあり、且つそれらの間に走る出口導管を共有する 2 組の E P R P 群とすることができます。補助チャンバの各々がそれに関連する E P R P とほぼ同一であるが鏡像関係にある場合、システムは逆方向の流れを有するように操作することができ、その場合出口導管が入口導管となり、入口導管が出口導管となり、補助チャンバが E P R P となり、E P R P が補助チャンバとなる。このような配置を図 4 ないし図 7 に示す。

【0018】

別の実施形態において、処理チャンバは複数のポンプに接続し、各々のポンプは処理チャンバ中の液体に正圧及び/又は負圧をかけて、粒子を粒子受容器の方へ又は粒子受容器とは反対の方向へ動かすことができる。好ましくは、処理チャンバは、(1)サンプルを処理チャンバの流入口へ送達するときの流量の主要な制御を行う送達ポンプ、及び(2)位置決め液が E P R P を通るときの流量及び方向の主要な制御を行う第 1 及び第 2 位置決めポンプに接続される。送達ポンプはまた、処理後の粒子を除去するときの流量の主要な制御を行うことができる。好ましくは、処理チャンバはまた、液体を E P R P から除去するときの流量の主要な制御を行う抽出ポンプに接続される。操作方法によっては他のポンプも液体流の流量及び方向に影響し得るため、上記の「主要な制御」という表現を使用した。

電空式アクチュエータを用いて複数の異なるポンプを制御することにより、処理チャンバ内の液体流を望ましい順序に並べることができる。正しい構成により、サンプルを供給し、次いで分析チャンバに同時に配置することができる。例えば、サンプルを E P R P に充填するとき、サンプルの流入口ラインに正の圧力低下がなければならず、流出口ラインに負の圧力低下(即ち、吸引)がなければならない。そうすることによって、サンプル中の粒子を粒子受容器の方へ押すことができる。この過程の間、サンプル流出口ラインを加圧することにより、E P R P から液が出て行くのを抑制又は防止することができる。種々のラインにおいて適切な圧力設定を選択することにより、サンプル微粒子の損失を最小限に抑えながら E P R P から不純物の除去を補助することができる。本発明者らは、特に E P R P の汚染の低減において、ステップ(A)ないしステップ(C)の内の 1 以上のステップの少なくとも一部の間に、E P R P から液体サンプルの少量を除去することが有用であることを見出した。除去の速度は、例えばステップ(A)の間のサンプル供給速度の 0.05 倍ないし 0.2 倍とすることができます。

【0019】

適切に圧力が制御された構成において、多数の電空式アクチュエータを用いることにより、広い操作圧力範囲、一般的に $0 \text{ psi} \sim 100 \text{ psi}$ ($0 \text{ kg/cm}^2 \sim 7 \text{ kg/cm}^2$) にわたる圧力水頭を提供することができ、それにより大容積のサンプルの処理及び/又は洗浄に高い流量を用いることが可能となる。例えば、種々のラインで圧力を $0 \text{ psi} \sim 60 \text{ psi}$ ($0 \text{ kg/cm}^2 \sim 4.2 \text{ kg/cm}^2$) に設定することにより、サンプル充填のために最大 60 psi (4.2 kg/cm^2) の圧力低下が可能となり、且つサンプル排出のための出水量を最大にするために流入口ライン及び位置決め流出口ラインにおいて最大 100 psi (7 kg/cm^2) の圧力低下が可能となる。比較的大量(例えば、 $10 \mu\text{L} \sim 20 \mu\text{L}$)のサンプル液を短時間(例えば、1 分未

10

20

30

40

50

満)で処理することができる。サンプル充填過程及びサンプル排出過程を循環式に繰り返すことにより、多数のサイクルで少量の処理をすることができる。別法では、全ての粒子を1回のサンプル充填過程で捕捉することができる。单一回捕捉モードでは、処理は単純であり、サンプル充填ステップが終了した後に单一の検出ステップのみを必要とする。しかしながら、サンプルの充填時間が長くなると、粒子及び粒子受容器に固着するサンプル中の小さい物質が捕捉される傾向にあり、その結果排出ステップにおける粒子の除去が困難になる場合がある。循環式充填モードにおいては、捕捉される小さな固着性物質の量が少なく、粒子は比較的容易に除去される。多数の充填サイクルに対して多数の検出ステップが必要であり、流体システムに重大な一時的遅延が生じた場合、循環式ステップの制御が複雑化する可能性がある。

10

一部の実施形態では、WO 2004 / 046695の6ページ31行目ないし7ページ2行目に記載されているように、粒子は電気的特性を有しており、この電気的特性を使用して粒子を受容器の方へ方向付けることができる。

【0020】

受容された粒子の処理方法

例えば、WO 2004 / 046695の7ページ4行目ないし8ページ9行目に開示されているように、粒子受容器によって受容された粒子は、あらゆる適切な技術を用いて処理することができる。

粒子の処理に粒子により生成された信号の強度測定を利用する場合、放射線源の強度特性を少なくとも部分的に補正するステップを実行することが望ましい。これは、例えば、別個の正規化手順により行うことができ、この手順では、(a)粒子を検査するために用いる(又は既に用いた)光源が、受容した粒子を含む面積と同等の面積、好ましくは受容した粒子を含む面積より幾分大きい面積、例えば25%大きい面積を照明し、且つ均一な蛍光材料、例えば液体又はゲルから成っており、且つ(b)粒子を検査するとき、使用する(又は既に使用した)検出システムにより、結果として得られる信号が観察される。蛍光領域は、例えば処理チャンバに物理的に取り付けられた別のチャンバにより、又は希釈チャンバのように、粒子処理の間に用いられるが、正規化過程実行のために分離されて蛍光材料で充填されるチャンバにより提供される。この正規化過程の結果は、受容されたサンプル粒子から得られる信号の正規化に用いられる。図11及び図12はこのようにして得ることが可能な改善を例示している。

20

【0021】

いくつかの種類の試験において、例えばWO 2004 / 046695の図14及び図15に示されるように、照明の軸とは異なる軸に沿って粒子から蛍光が観察される。そのような試験を本明細書では軸外し試験と称する。他の種類の試験においては、例えば図8に示すように、観察の軸と照明の軸は同一である。そのような試験を本明細書では共焦点試験と称する。

軸外し試験の結果得られる画像では、粒子の一方の側に影ができてしまう。これに対して共焦点試験では影なしの画像が提供される。異なる画像を図9及び図10に例示する。これらの事実により、(a)放射線に対する応答が粒子(例えば、色素注入粒子)全体でほぼ均一であり、従って中心が最も明るいガウス特性を有する強度の画像を生成する粒子、及び(b)放射線に対する応答が粒子(例えば、複合化粒子)の表面だけで起こっており、従って中心より周辺が明るい画像を生成する粒子の識別のために、共焦点試験を用いることが可能となる。このことにより、コード化色素を注入された粒子であって、分析物と反応した場合に信号色素と複合化しており、よってコード化色素と信号色素が放射線に対して異なる応答を行う粒子、例えばレーザに暴露されたときに異なる蛍光信号を発生するような粒子を使用することが可能になる。そのような粒子は、第1フィルタによりコード化色素を識別し、次いで第2フィルタにより信号色素の濃度を同定することにより試験することができる。

30

【0022】

例えばWO 2004 / 046695の27ページ27行目ないし28ページ5行目に開

40

50

示されているように、受容された粒子を処理することにより、粒子（例えば、粒子の一部を形成する分析物断片）の一部又は全部を物理的及び/又は化学的に変化させることもできる。

処理チャンバを、サンプルの調製、前濃縮、抽出及び洗浄に用いることもできる。低濃度の標的分析物と、背景濃度の高い分析物との識別は、処理チャンバ内に配置した粒子捕捉にサンプルを通過させることにより達成することができる。

【0023】

ポンプ

ポンプは、通常、液体サンプルの送達及び除去に用いられ、位置決め液を用いる場合、位置決め液の流れを制御するために用いられる。好ましくは、ポンプは空圧式又は電気浸透式（動電式としても知られる）ポンプである。そのようなポンプは精密に制御することができ、非常に少量の液体、例えば1サイクル当たり約100ピコリットルないし約100ナノリットルの液体を正確に導入することができる。1以上のポンプがサンプル又は位置決め液に直接作用することができる。代替的に又は追加的に、1以上のポンプは、作動流体により移動し且つサンプル又は位置決め液と接触する軟質膜（隔膜としても知られる）を備えることができる。このことにより、位置決め液として用いるには不十分である作動流体を有するポンプ、或いはサンプル用又は位置決め液用には不十分なポンプを用いることが可能になる。また、ポンプ間にクロストークを生じさせること無くEPRP内の流れを直交方向に制御することができる。適切な電気浸透式ポンプが、例えば米国特許第6277257号、同第6013164号及び同第3923426号、米国特許出願第2004/0074768号及び第2004/0074784号、及びWO2004/03604に記載されており、それら特許文献の開示内容全体を、参照により本明細書に包含する。

方法

本発明の方法のステップに関する更なる情報が、WO2004/046695の8ページ21行目ないし28行目に提供されている。

【0024】

並列及び/又は直列に接続された処理チャンバ

複数の処理チャンバを並列及び/又は直列に配置することができ、よって、好ましくは、複数の異なる処理チャンバ、好ましくは全ての異なる処理チャンバに受容される粒子の一部、好ましくは全てが同一平面内に並ぶことにより、同時に又は順次にほぼ同じ方法で試験することができる。直列接続された処理チャンバは単一の流入口に接続されるので、それらはほぼ同一のサンプルを受容する。位置決め液を用いる場合、それは同一供給源から供給することができるが、分岐管を介して各処理チャンバに分かれるように供給することができるか、又は2つ以上の処理チャンバを順番に流れるように供給することができる。複数の処理チャンバの使用に関する更なる情報は、WO2004/046695の8ページ30行目ないし9ページ9行目により提供される。

【実施例】

【0025】

本発明を添付図面に例示する。図面中、同一又は同様の構成要素は同一の参照番号で示す。

図1及び図2は、堰15に隣接する頂部部材2中にポケット151を有する処理チャンバの部分断面図である。

【0026】

図3は、WO2004/046695の図15と同様であるが、はるかに多数の方向転換部を有し、1サイクル当たり多数の粒子を処理することができる。サンプルは流入口11から流入し、出口12から流出する。位置決め液は流入口16から流入し、出口17から流出する。

図4ないし図7は、液体サンプルの流れによって粒子の位置決めが行われる処理チャンバを示す。複数のEPRP12a1/a2、12b1/b2、…は、それらの間に平

10

20

30

40

50

行な堰 14a、14b、・・・を伴って2つ一組で配置される。EPRP12a2及び12b1、12b2及び12c1・・・の間にも、平行な堰14a/a'、14b/b'、・・・が存在する。各対の1番目のEPRPは、粒子を包含するサンプルの流入口11に接続する分岐管111に一定の角度で接続する。各対の2番目のEPRPは、堰を越えて2番目のEPRPに流入し、粒子を有さない液体の流出口13に接続する出口導管131に一定の角度で接続し、補助チャンバとして機能する。粒子はEPRP12a1、12b1、・・・に流入してそれらEPRPを通過し、堰に保持される。受容された粒子は、処理後、液体流を逆流させることにより除去することができる。液体の逆流は2番目の粒子を包むサンプルにより提供することができ、よって2番目のEPRPが2番目の粒子を保持し、このとき1番目のEPRPは補助チャンバとして機能する。

10

【0027】

図8は、EPRP中に保持された粒子の共焦点試験を示す。レーザ52が選択された波長を有する散乱光を二色性反射器59に当て、光学素子56を介して粒子に当てる。粒子により発せられた光(散乱光とは異なる波長、一般に散乱光より長い波長)を検出器60により集光して分析する。

図9ないし図10は、EPRPにより保持された粒子の軸外し照明により得られる一般的な結果(図9)及び共焦点照明による一般的な結果(図10)を示す。

【0028】

図11は、粒子から得られる信号が入射光の強度に依存するときの、信号のフラットフィールド補正が行われなかつた場合の、色素注入粒子からの信号強度の一般的な結果を示し、これは50%を超える偏差を伴う。図12は、フラットフィールド補正が行われた場合の、同様の試験データを示し、この場合偏差は約16%である。

20

図13は、隔膜含有ポンプを使用した、処理チャンバへのサンプル及び位置決め液送達の制御及び処理チャンバからの除去の制御を示す。サンプルポンプ2は、隔膜211及び212により閉じ込められたポンプ液210を含み、そのポンプ液の動きにより粒子を包含する液体215はEPRP12を含む処理チャンバまで送達される。サンプルポンプ4は隔膜411及び412により閉じ込められたポンプ液412を含み、そのポンプ液の動きによって位置決め液415は処理チャンバまで送達される。

【0029】

図14は、ポンプ2A及び2Bを使用した、EPRP12へのサンプルの送達及びEPRP12からの除去の制御、及びポンプ4A及び4Bを使用した、EPRPへの位置決め液の送達及びEPRPからの除去の制御を示す。ポンプは電気空圧式に制御することができるので、異なる時点でのシステムの異なる部分に望ましい流量を生み出すプログラムに従って、種々の圧力を異なる流入口及び流出口に同時に印加することができる。

30

図15は、処理前に粒子の前処理を行う本発明のシステムを示す。サンプルは、サンプル導入ポンプから処理チャンバへのライン上にあるサンプルループアセンブリ32を通して導入される。ループアセンブリは、サンプル流入ポート302、サンプルループ305を有するマルチポート回転バルブ304、及び廃液溜め303への廃液導管を備える。バルブが第1の(サンプル導入)位置にあるとき、ループはサンプルポート及び廃液ラインと一列に並ぶ。過剰量のサンプルが302からサンプルループ305に導入され、その際余分なサンプルは廃液溜め303に流れる。サンプルを導入したら、バルブを第2位置(運転位置)に切り替えて、サンプルループをサンプル導入ポンプと処理チャンバとの間のライン上に置くことにより、ポンプによってループ305から処理チャンバの方へ液体を押し出す。

40

【0030】

サンプルは導管32を介してチャンバ36に流入し、余分な流体は堰37(粒子を通さない)を越えて導管35を通して廃液溜めへ流れることができる。任意選択的な締切りバルブ39が図示されている。粒子が堰37に沿って集まつたら、導管34を通して洗浄液を導入し、アッセイ用混合液の余剰成分を洗い流す。洗浄液は例えばアッセイに必要な反応物質を含むことが可能で、この場合、洗浄液は反応を完了するのに必要な時間に亘って

50

粒子上を流れる。洗浄ラインは複数の反応混合物に接続する分岐管（図示しない）に接続することができ、よって一連の化学反応が行われる。一又は複数の反応の進行は、場合によっては粒子からの信号を観察することによりモニタリングすることができる（例えば、適切な蛍光体を反応連鎖の一部として添加する場合）。洗浄ラインはチャンバ36内の他の位置に配置することができる。再度、洗浄液溜めからの液体が、チャンバから第1堰を越えて導管35を通して廃液溜めへ流入する。

粒子を洗浄した後、洗浄液を、導管34を介してチャンバの第2の堰38を越えて導管20まで短時間に亘って流すことにより、粒子を堰37から第2の堰38へ移動させることができる。粒子が堰38に配置されたら、導管20を通して流体を送達することにより、粒子を処理チャンバの方へ移動させることができる。粒子は、処理チャンバの方へ移動するとき、希釈チャンバ301を通過し、流体が希釈チャンバ中で膨張するとき粒子が分散する。希釈チャンバの容量は、アッセイにおいて粒子分析システム内に受容される粒子密度と、EPRP中の粒子滞留部位の数に最適な粒子密度とを連絡させる役割を果たす。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】処理チャンバの操作の一ステップを示す断面図である。

【図2】処理チャンバの操作の、図1に連続するステップを示す断面図である。

【図3】複数の処理チャンバを備えるシステムを示す。

【図4】液体サンプルの流れによって粒子が位置決めされる処理チャンバの断面図である。

【図5】液体サンプルの流れによって粒子が位置決めされる処理チャンバの断面図である。

【図6】液体サンプルの流れによって粒子が位置決めされる処理チャンバの断面図である。

【図7】液体サンプルの流れによって粒子が位置決めされる処理チャンバの断面図である。

【図8】保持された粒子の共焦点試験を示す。

【図9】照明を用いて処理された粒子の画像を示す。

【図10】図9とは別の種類の照明を用いて処理された粒子の画像を示す。

【図11】光源の強度特性が補正されていないとき、信号が照明の強度に依存する場合の粒子により提供される信号を表す（縦軸は正規化された強度を表し、横軸は位置を表す）。

【図12】光源の強度特性が補正されているとき、信号が照明の強度に依存する場合の粒子により提供される信号を表す（縦軸は正規化された強度を表し、横軸は位置を表す）。

【図13】サンプル及び位置決め液を処理チャンバへ送達するためのポンプシステムを示す。

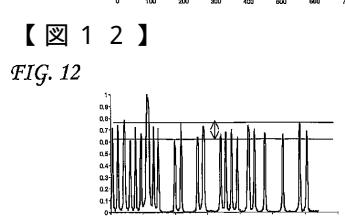
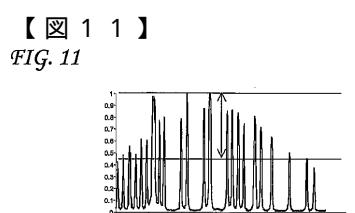
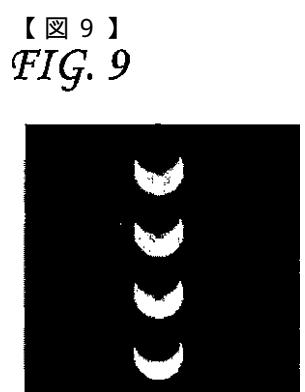
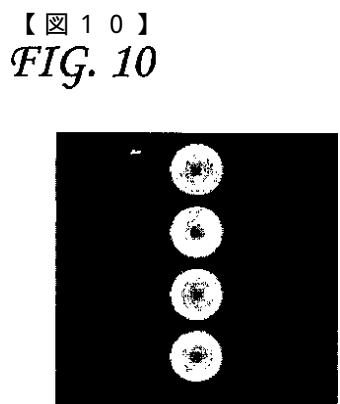
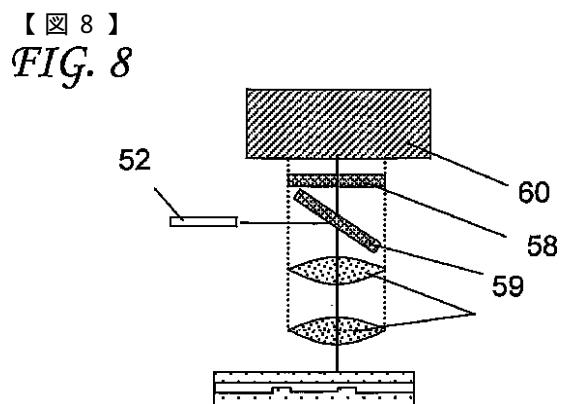
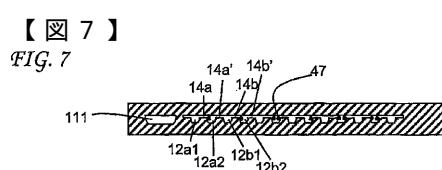
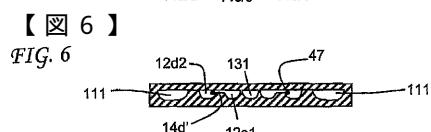
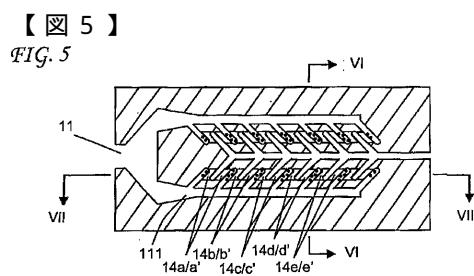
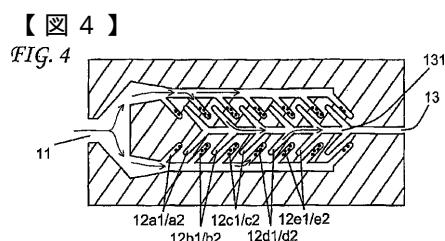
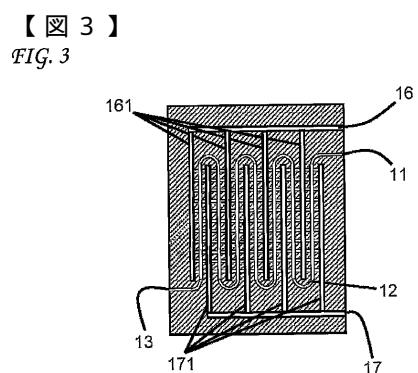
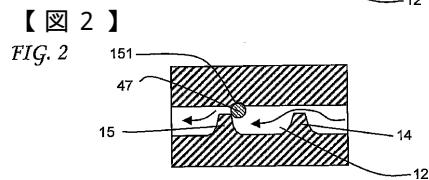
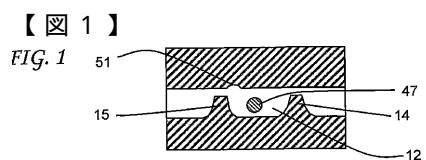
【図14】サンプル及び位置決め液を処理チャンバへ送達するためのポンプシステムを示す。

【図15】本発明のシステムを示す。

10

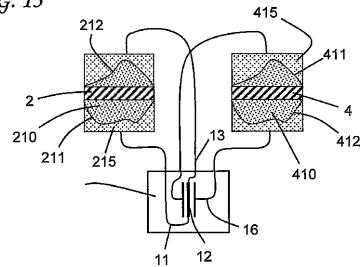
20

30



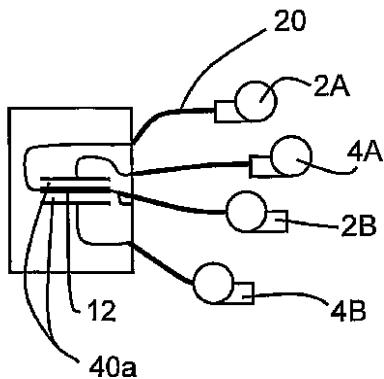
【図13】

FIG. 13



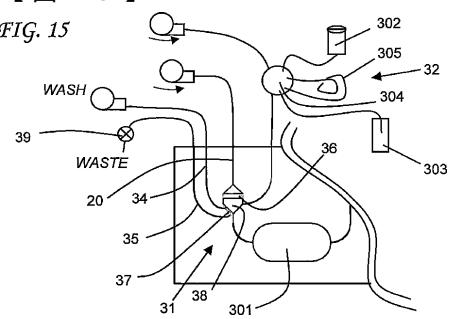
【図14】

FIG. 14



【図15】

FIG. 15



フロントページの続き

(72)発明者 ポール， フィリップ， エイチ .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94550， リヴァーモア， デイジーフィールド ドライ
ブ 258

(72)発明者 レオン， パトリック， ピー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002， ベルモント， ファーロング ストリート 1
060

審査官 土岐 和雅

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0072278 (US, A1)

特表平09-509498 (JP, A)

特表2002-507280 (JP, A)

国際公開第02/023180 (WO, A1)

特開2002-233792 (JP, A)

特表2001-527220 (JP, A)

特表2003-515167 (JP, A)

特開2004-045358 (JP, A)

国際公開第2004/046695 (WO, A1)

特開2004-283828 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N1/00 ~ 1/44, 15/00 ~ 15/14