

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5296054号
(P5296054)

(45) 発行日 平成25年9月25日(2013.9.25)

(24) 登録日 平成25年6月21日(2013.6.21)

(51) Int.Cl.

G01N 35/08 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)

F 1

G01N 35/08
G01N 37/00A
1 O 1

請求項の数 21 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2010-506358 (P2010-506358)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月14日 (2008.3.14)
 (65) 公表番号 特表2010-526293 (P2010-526293A)
 (43) 公表日 平成22年7月29日 (2010.7.29)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/056983
 (87) 國際公開番号 WO2008/137212
 (87) 國際公開日 平成20年11月13日 (2008.11.13)
 審査請求日 平成23年2月22日 (2011.2.22)
 (31) 優先権主張番号 60/915,450
 (32) 優先日 平成19年5月2日 (2007.5.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507269175
 シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド
 SIEMENS HEALTHCARE
 DIAGNOSTICS INC.
 アメリカ合衆国、ニューヨーク 1059
 1、タリータウン、ベネディクト・アベニュー 511
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】診断用液体のマイクロ流体装置内への圧電ディスペンシング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの試料入口ポートと、少なくとも1つの通気口と、少なくとも1つの試薬を含むチャンバとを有するマイクロ流体装置で、生体液中の分析対象物量を検定する方法であって、

(a) 前記マイクロ流体装置の前記少なくとも1つの試料入口ポート内に、前記生体液の、毛管力によって前記少なくとも1つの試料入口と連通している毛管通路を通って毛管止めまで移動する試料を計量分配することと、

(b) 前記試料に前記毛管止めを通過させるために十分であり、前記試料が導入された後に所定の時間で加えられる(a)の前記試料と異なる一部の液体を、液滴が計量分配されないときは時間間隔によって区切られ、0.05~1mmの範囲内の直径を有する液滴群の形で、(a)の前記少なくとも1つの入口ポート内に計量分配することと、
10
を含む方法。

【請求項 2】

前記毛管止めを越えてすべての前記試料を前記マイクロ流体装置内の位置に押し退けるのに十分な量の、(b)の前記異なる液体が導入される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

請求項2の前記押し退けられた試料が、前記少なくとも1つの試薬を含むチャンバに計量分配された試薬に接触し、前記少なくとも1つのチャンバ内にある空気を押し退ける、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記試料及び前記試薬が反応して、前記試料中の前記分析対象物量に関連する検出可能な結果をもたらす、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記押し退けられた試料が、調整剤又はキャリア剤に接触して、試料が続いて試薬と接触する準備をする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

(b) の前記異なる液体の前記液滴群が、約 3 万 ~ 15 万滴 / 秒の割合で、マイクロディスペンシングノズルによって供給される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記マイクロ流体装置が、総容量約 0.1 ~ 200 μL を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

最小液滴群が、体積約 100 pL を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記計量分配のタイミング精度が、約 0.01 ミリ秒である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの試料入口ポートと、少なくとも 1 つの通気口と、少なくとも 1 つの試薬を含むチャンバとを有するマイクロ流体装置で、前記少なくとも 1 つの入口ポート内に前記生体液の試料を計量分配することと、前記少なくとも 1 つの入口ポート内に前記試料と異なる液体を計量分配して前記試料を押し退けることを含む、生体液中の分析対象物量を検定する方法において、改善点が、前記異なる液体を、0.05 ~ 1 mm の範囲内の直径を有し、液滴が計量分配されないときに時間間隔によって区切られる液滴群の形で計量分配することを含む方法。

【請求項 11】

前記生体液の試料が、毛管力によって、少なくとも 1 つの試料入口と連通している毛管通路内の毛管止めまで移動し、前記異なる液体が、前記試料に前記毛管止めを通過させるために十分な量で計量分配される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記生体液の試料が、前記毛管止めを通過して、前記少なくとも 1 つの試薬を含むチャンバ内に送り込まれる、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記試料及び前記試薬が反応して、前記試料中の前記分析対象物量に関連する検出可能な結果をもたらす、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

前記押し退けられた試料が、調整剤又はキャリア剤に接触して、試料が続いて試薬と接触する準備をする、請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

前記異なる液体の前記液滴群が、約 3 万 ~ 15 万滴 / 秒の割合で、マイクロディスペンシングノズルによって計量分配される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

前記マイクロ流体装置が、総容量約 0.1 ~ 200 μL を有する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 17】

最小液滴群が、体積約 100 pL を有する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 18】

前記計量分配のタイミング精度が、約 0.01 ミリ秒である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 19】

計量分配された異なる液体の体積が約 5 nL である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

少なくとも1つの入口ポートと、少なくとも1つの通気口と、少なくとも1つのチャンバとを有するマイクロ流体装置を作動させる方法であって、

(a) 前記少なくとも1つの入口ポート内に、第1の液体を、0.05~1mmの範囲内の直径を有する液滴群の形で所定量を計量分配することと、

(b) 前記第1の液体を導入した後に所定時間で加えられ、前記少なくとも1つの入口ポートから前記第1の液体を押し退けるのに十分な所定量の第2の液体を、液滴が計量分配されないとときは時間間隔によって区切られ、0.05~1mmの範囲内の直径を有する液滴群の形で、前記少なくとも1つの入口ポート内に計量分配することと、

を含む方法。

【請求項21】

10

前記マイクロ流体装置が、前記少なくとも1つの入口ポートと、前記少なくとも1つのチャンバとの間で連通している毛管通路を含み、前記第1の液体が、前記入口ポートから前記少なくとも一つのチャンバの入口の毛管止めまで、毛管力によって移動する、請求項20記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分析対象物と、検出可能な反応を起こすための試薬との反応によって、生体試料中の分析対象物量を測定するために用いられる試薬及び器具に関する。

【背景技術】

20

【0002】

[試薬を含む基材上への液体の付着]

生体試料、たとえば尿、血液、唾液、又は粘液又は組織の抽出物中の分析対象物量を測定するための多くの器具が開発されてきた。一般的には、試料液体は、分析対象物と反応する試薬を含む表面に適用される。試薬は、分析対象物量が測定され、それに関連性のある検出可能な反応を起こす。表面は、普通は本質的に親水性あるいは疎水性であり、たとえばポリスチレンと比較したる紙である。いくつかの装置は表面の組み合わせを用い、たとえば尿検査片試験で、疎水性のポリスチレンのハンドルの先端に親水性のろ紙を用いる。一般的な試験では、未反応の試薬を含む細片が、液体試料中に浸漬され、すなわち十分に浸されて、試料中の分析対象物と試薬との間の反応が、普通は任意の方法によって測定される。未反応の試薬自体は、水溶性又は不水溶性であってもよい。これらを付着させるか又は固定化して、多孔質基体内で乾燥させる。基体は、支持面上に取り付けられるか又は設置される。加えて、試薬を含むか又は含まない液体を検定中に用いることができる。乾燥させた試薬をすでに含む基体の表面に、液体試薬を分析対象物との反応の前、後又は最中に適用することができるが、一般的には試料が適用された後に加えられる。試料及び試薬の量をできるかぎり少なくすべきなのは、費用及び利便性に関する明白な理由からである。あまり明白でないのは、試薬を含む表面に、少量の液体試薬又は生体試料を適用した場合、均一で正確な反応を得ることが困難であることが多いことである。分析対象物の試薬との反応は、より少量の分析対象物での反応領域が存在する場合よりも小さい。

30

【0003】

40

基体を用いて反応応答を増幅させることができる。薄いフィルム、たとえば膜を親和性試薬で固定化させて、反応物を読み取りゾーンで捕捉及び凝縮させることを可能にすることができる。液体の流れを所望の方向に、たとえば縦ではなく横に向けることは、液体試料又は試薬と、反応ゾーンとの間で流体の交換回数を増加させることによって、効率を向上させることができる。さらに各交換は、分析対象物の反応を生じさせることを可能にし、これにより信号が増幅される。基体の表面の改良は、試薬が読み取りゾーン内で分離されることを可能にする。さらに、表面自体の性質を用いて、たとえば試薬の可溶化を高めることによって分析対象物の反応性を高めるか、又は表面上の試薬との反応を促進することができる。

【0004】

50

多くの生体試料及び液体試薬は、かなりの含有水分を有しているため、親水性の基体に適合し、疎水性面には適合しない。試料及び試薬液は、計量分配されると親水性基全体にわたってすばやく広がり、疎水性基体にははじかれる。計量分配された液体及び試薬は、反応又は部分的反応領域上に直接計量分配することによって表面上で接触する。しかし、基体が比較的疎水性である場合、計量分配された液体は、基体面上でピーズを形成して表面との接触を最小限にしようとするため、試薬全体に均一に広がらない。液体の計量分配に関する別の問題は、乾燥した試薬が本質的に水溶性であるあるいは不水溶性である場合があることである。不水溶性の乾燥試薬は、液体試料に容易にアクセスできない場合があり、また水溶性試薬は基体上の液体と溶解してともに移動する場合がある。試薬は、試料に均一に接触すべきことが理想的であるのは、試料に対する試薬の測定可能な反応、たとえば発色が、試料中の分析対象物量の正確な読み取りを得るためにには均一であるべきだからである。

【0005】

計量分配された液体と試薬との表面上での良好な接触を得ることに関する別の課題は、試料の物理的性質に関する。これらは、その物理的性質、たとえば表面張力、粘度、全固形分、粒子サイズ及び接着力が変化する。したがって、これらは容易には、試薬に覆われた基体全体に一定量で均一に付着しない。また、液体試料量が減少するにつれ、試薬に対して変化する性質を有する一定量の試料を適用することがいっそう困難になる。一方、インクジェット印刷等は、その使用のために開発され、一定の物理的性質を有する液体に依存する。

【0006】

液滴の付着はよく知られた作業である。具体例は、圧電又は気泡で作動するインクジェットプリンタを含み、これは、数フェムトリットル～数十ナノリットルを含む直径約2～300μm（通常50μm）の複数の小液滴の制御された付着から印刷物を形成する。小液滴を付着させる他の方法が提案され、通常は圧電の原理が使用されて小液滴を作り出すが、これらは一般的なインクジェットプリンタとは異なる。米国特許第5,063,396号、5,518,179号、6,394,363号及び6,656,432号に具体例が見出される。シリンジ型のピペットを通して、より大きな液滴の付着（3～100μm）は、診断システムで再現可能であることが既知である。これは、一つの液滴の直径約2～6mmに相当する。そのようなピペットシステムの市販例は、CLINITEK ALTATAS（登録商標）尿検査アナライザである。液滴のサイズは、ノズルの形状、ポンプタイプ及び加えられる圧力に依存して、ノズルサイズよりも大きいか又は小さくすることができる。

【0007】

上述の課題は、試薬を含むパッド上に液体試料が液滴として提供された場合に、特に認められる。パッド面と試薬との相互作用は、試料が、よく行われているような試薬パッドを液体試料に浸す（浸漬する）ことによって試薬パッドを完全に覆うのではなく、液滴として加えられた場合、不正確な反応が起こっていたことがわかっている。およそ3～100μLの大きな液滴は、基体があまりに疎水性である場合は試薬内に移動せず、表面上に気泡を形成する。これらは、表面が親水性である場合、試薬に過剰な液体を与える。数フェムトリットル～数十ナノリットルのより小さな液滴もまた、あまりに疎水性である基体上に付着すると、表面領域を完全に覆うような量に欠け、不均一なパターンでランダムに集まるために問題となる可能性がある。また、小さな液滴は、水溶性の試薬の移行のために空いた空間を可能にする。これらの微小な液滴はまた、液体蒸発してエアゾールを形成しがちであり、尿又は血液検体を含む場合、生物学的に有害であると考えられる。このように、液体が試験パッド上に液滴として付着する場合、試料中にパッドを浸す場合よりも、改善が必要とされていた。

【0008】

計量分配された液体と試薬との接触が完了した後、いくつかの方法のうち一つを用いて結果を読み取ることができる。光学的方法がよく用いられ、これは反応を起こすための分

10

20

30

40

50

光信号に依存する。結果は、有用であるように再生可能でなければならない。光学測定は、目に見える試薬領域と、計量分配された液体と試薬とが反応するために考慮された時間とによって影響される。視野内で不均一な領域が形成され、反応時間量が変化することによって、誤差の増大が生じる。たとえば、基体全体に不均一に広がる試料又は試薬でなされる測定は、読み取られるたびに異なる結果をもたらす。

【0009】

本発明の譲受人に譲渡された同時継続中の米国特許出願第11/135,928号は、U.S.2006/0263902A1として公開されており、その中で発明者らは、試薬を備える基体上に、生体試料及び試薬を微細な液滴として付着させる方法を報告している。
試薬を備える基体が、試薬の水溶解度及び基体の表面エネルギーに依存して、すなわち試薬を備える基体が親水性か疎水性かに依存して、異なる挙動をすることが実証された。大きな液滴、たとえば1.7~20.4μLの付着が示され、試薬を備える表面上に、約50pL~1μLの小さな液滴を付着させた場合よりも精度の低い結果がもたらされた。発明者らはまた、小液滴が疎水性基体によって吸収された一方、大きな液滴は容易には吸収されなかつたことを発見した。

10

【0010】

水溶性の試薬は、試薬を備える表面上に広がると、液体と溶解してともに移動することが示されている。発明者らは、そのような移動を生じる不均一な試薬反応は、小液滴を提供することによって緩和されることを発見した。

【0011】

20

小液滴の提供は、多数の小さな開口を有するノズルか、又は単一のノズルによって行われ、これらは所望の領域をカバーするように、試薬を備える基体を基準とするか又はその逆に移動する。液体試薬の基体上の試薬との反応は、試薬によって覆われた領域の平均として、又は好ましくは反応領域を1スポットずつ走査して結果を平均することによって読み取られる。

【0012】

[マイクロ流体装置内の付着液体]

生体試料とそれに関連する液体とを、生体試料の検定に用いられるマイクロ流体装置に加えることは、さまざまな手法によって行うことができる。血液、尿等の非常に少ない試料は、そのような装置内に導入され、そこで試料内に発見される分析対象物の存在及び量を示すことが可能である試薬と接触する。

30

【0013】

生体試料及び試料を検定するために必要な場合がある他の液体を付着させることに関連する課題は、米国特許出願第10/608,671号で述べられ、U.S.2004/0265172A1で公開されている。特に重要な要件は、液体が導入されるときに装置から空気を除去し、検定される試料の量及び関連する液体、たとえば試薬、緩衝剤、希釈剤等を計量することである。

【0014】

ここで述べられた課題がマイクロ流体装置の適切な設計によって解消された後でも、生体試料内の分析対象物量の測定は、そうあるべき繰り返し精度をもたらさないかもしれないことがわかった。一つには、この課題は、この設計固有のばらつきに関連する。第1に、表面コーティングのばらつきは、液体に毛管止めを越えて、又は試薬領域付近でクリープを生じさせる可能性がある。このことは、液体の移動タイミング及び反応量にばらつきを生じさせる。第2に、経験の浅いユーザは、正しくない量の試料又は試薬を適用する可能性がある。第3に、これらのマイクロ流体装置の内部寸法は、低コストな方法で大量に作られた場合、チップごとに異なる可能性がある。本発明者らは、そのような課題を解消することができることを発見し、結果の精度及び繰り返し精度を有意に改善する。

40

【発明の概要】

【0015】

本発明の1つの態様は、生体液に含まれる分析対象物量を測定検査する改善された方法

50

である。本方法は、生体液試料及び／又は関連する液体を、直径 0.05 ~ 1 mm を有する液滴で、マイクロ流体装置の入口ポートに計量分配することを含む。生体試料及び／または関連する液体の提供を所定回数行って、マイクロ流体装置の動作を制御する。関連する液体は、液体が計量分配されていないときに、間隔によって区切られた液滴群として付着し、これにより試料はマイクロ流体装置内の所望の位置に、測定検査を最適化するよう選択されたときに移動する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】実施例1のマイクロ流体装置を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0017】

[定義]

本明細書で用いられる以下の用語は、次のように定義される。

【0018】

「分光画像」は、試薬を含む領域上に付着した生体試料に対する、試薬を含む領域の光学的な反応の詳細な図を意味し、たとえば色、反射率、透過度又は吸収度もしくはその他、たとえばラマン、蛍光、化学ルミネセンス、りん光又は電気化学インピーダンス分光法を用い、これにより試薬を含む全領域のサブユニットの検査が可能になる。この画像は、光学的反応に加えられた位置（すなわち x - y ）を備える多次元にすることができる。

【0019】

20

「親水性」面は、その面と、その上に配置された水滴との間に 90° 未満の接触角を有するものである。

【0020】

「疎水性」面とは、その面と、その上に配置された水滴との間に 90° 以上の接触角を有するものである。

【0021】

[液体と多孔質基体の相互作用]

本発明は、多孔質基体（「パッド」）内部で生じる反応の改善された制御を提供し、基体は乾燥した試薬を含み、マイクロ流体装置内部に位置付けられる。反応は、試料液体と、試薬を含むパッドとの間の相互作用によって起こる。

30

【0022】

未知量の分析対象物を含む液体試料が、試薬を含むパッドに接触すると、液体は試薬を溶解して分析対象物との反応を生じることができ、これにより検出可能な結果、たとえば色等の、分光写真手段によって検出される特質的な光信号を発生させる。反応が生じる速度及び結果が検出可能である程度は、要因の数に影響される。そのような要因は、試薬のアクセシビリティ、液体中のその溶解度、及び液体が配置される領域での試薬と液体との相対量を含む。一定かつ正確な結果を得ようとする場合、多孔質パッドに液体を均一に適用することは重要である。同様に、パッドの特徴、たとえばその疎水性／親水性、多孔度及び毛管現象、及び厚さもまた、検定結果を決定する要因である。パッド特徴は、吸収される液体量のみならず、パッド上で乾燥させる試薬の可溶化及び表面相互作用にも影響する。また、これらは液体が流れる方向及び特定の場所に試薬を固定する能力にも影響する。たとえば、パッドは多くの場合、フィルム、たとえば液体を縦ではなく横に流すことが可能である膜とともに用いられる。このように、液体の交換回数を、定義された反応ゾーンで行うことができる。反応ゾーンが固定化された生物親和性分子、たとえば抗体及び核酸を含む場合、捕獲効率は流体の交換回数によって増大する。実際には、当業者においては、パッド自体、試薬及び試料液体の物理的特徴はすべて、有用な検定システムの設計において考慮されるべきであることが分かる。

40

【0023】

試薬を含むパッドに試料（及び関連する液体）を直接付着させることとは反対に、マイクロ流体装置では、試料は入口ポートに加えられて、その後介在する壁及び毛管通路を通

50

って、試薬を含むパッドを含むチャンバに移送される。多くの場合、試料は別の液体、たとえば液体試薬と混合されるか又はそれに希釈される。試料は、液体試薬と同時に、又はその前後にマイクロ流体装置に加えられることができる。1つ又は複数の入口ポートを用いることができる。試料、液体試薬、及び混合物は別々に流れることができるが、それでも液体を均一に分布することが重要である。

【0024】

本発明では、試料液体及び/又は他の関連する液体を、厳密なパターンで特定の時にわずかずつ、対象の領域に定期的に適用することにより、液体と、試薬を含むパッドとの相互作用の改善された制御を提供して、さらに正確で均一な結果を提供する。

【0025】

多くの検定では、試薬は多孔質基体又は「パッド」に配置され、細片状の基体は、試験される生体流体中に浸漬される。そのような検定は有用であるが、必ずしも所望のように正確又は繰り返し可能ではない。前に示されているが、大きな試料液滴（すなわち $1.7 \mu\text{L} \sim 20.4 \mu\text{L}$ ）を付着させることは、細片を液体中に浸漬するほどには十分でない。しかし、小液滴（たとえば $50 \mu\text{L} \sim 1 \mu\text{L}$ ）は、数多くの生物学的検定で優れた結果をもたらしている。

【0026】

2つのタイプの計量分配ノズルが以前から述べられている。1つは、単一のノズルを用いて、試薬を含む基体上に一滴の液滴を連続して計量分配する。ノズル又は基体のどちらかが移動して、所望の領域に均一な被覆を提供する。第2のタイプのノズルは、一連の穴があけられた板を用い、複数の連続した液滴が一度に提供されるようとする。どちらのタイプも、最小液滴サイズは約 $50 \mu\text{L}$ と考えられており、これは穴の直径約 $45 \sim 50 \mu\text{m}$ に対応する。ノズルは、さまざまなソースからの圧力によって作動することができる。圧電駆動を用いることは、小液滴を計量分配する一つの好ましい方法である。

【0027】

[マイクロ流体装置]

米国特許出願第10/608,671号は、US2004/0265172A1で公開され、マイクロ流体装置に含まれた試薬と生体試料との接触への参入及び移動について述べている。そのような装置は、一般的には総容量約 $0.1 \sim 200 \mu\text{L}$ を有するが、その用途に依存して、大容量又は小容量を有していてもよい。通常、マイクロ流体装置は、毛管止めまでか、又は第2の液体の必要量を誘導するまで、所定量の第2の液体で第1の液体を動かすことによって動作することができる。本発明の方法は、マイクロ流体装置内の液体のより正確な動きを提供する。

【0028】

米国特許出願公開US2006/0263902A1は、試薬を含む多孔質基体に小液滴を付着させることの利点を記載している。本方法は、毛管力を用いて液体試料を動かして、マイクロ流体装置内部の試薬と接触させるマイクロ流体装置には適さない。

【0029】

マイクロ流体装置を用いた経験から、検定結果は、試薬と反応する生体試料量に影響されることが示された。このことは、結果の解釈、たとえば発色から分析対象物量を判定することは、測定器具を較正するために用いられる生体試料中の分析対象物量に基づくことが予測される。生体試料量が、既知の容量の溜め又は毛管を用いて定められる一方で、これらの小型装置群間のばらつきは、結果に望ましくない変動性を生じさせるのに十分であることがわかっている。容量の差異は一つの要因であるが、特に重要な要因は、「毛管止め」と呼称してきたものの性能に関連する。これらは装置内に配置され、ここで毛管通路のサイズの変化を用いて、液体が毛管力のもとで流れ続けることを阻止する。実際には、生体試料及び液体、たとえば緩衝剤、洗浄液、付加的な試薬等は、毛管止めを乗り越える量で加えられてもよく、これにより液体は装置内で前進する。たとえば、生体試料がマイクロ流体装置内に導入されて、毛管力によって、試薬を含むチャンバの入口に移動した場合、ここで毛管止めで一時停止し、その後毛管止めを乗り越えてチャンバ内

10

20

30

40

50

に試料を移動させる必要がある。このことは、液体、たとえば洗浄液を入口ポート内に導入することによってなされることがあり、これにより毛管止めが乗り越えられて、生体試料が試薬を含むチャンバ内に移動する。毛管力の強さのばらつき及び毛管止めは、マイクロ流体装置の性能に不利な影響を有することがわかっている。本装置がその変動性にもかかわらず有用な情報を提供する一方で、改善が求められている。

【0030】

マイクロ流体装置の入口ポートに生体試料及び他の液体を小液滴で適用することは、そのような装置を通した液体移動の制御に著しい利点を提供することがわかった。マイクロ流体装置内部の毛管通路は、非常に少ない液体容量、たとえば 5 nL/mm を含む。このように、わずかずつ液体のみを用いて、毛管止めを乗り越える。計量分配の開始及び停止をナノ秒内で制御して毛管止めを引き起こすためには、液滴の的確な計量分配が必要とされる。この正確な計量分配は、分光手段によって測定された、試薬の反応によって決定された時間で行われる。計量分配イベントのパターンは、均一な流れを維持するために重要であることがわかっている。特に、液体を既知の量で、液体が計量分配されない間隔で区切られて計量分配することにより、連続する液体の移動を、以前は達成できなかつた方法で制御することが可能になることがわかった。このことは以下に続く実施例で例証され、ここではマイクロ流体装置に生体試料（全血）、続いて溶解液及び洗浄液が加えられた。

10

【0031】

(実施例1)

20

以下の略語が用いられる。

PBS - リン酸緩衝生理食塩水

BSA - ウシ血清アルブミン

FITC - フルオレセインイソチオシアネート

【0032】

ニトロセルロース基体（細孔 $5.0 \mu\text{m}$ ）でHbA_{1c}免疫測定法を行い、その上には2つの幅 4 mm の捕獲バンドを配置した。第1のバンドは、HbA_{1c}凝集剤（分析対象物HbA_{1c}の模倣体；PBS中で 1 mg/mL 、pH 7.4）を含むものであった。第2のバンドは、モノクローナル抗FITC抗体（ホウ酸0.05中 3 mg/mL 、pH 8.5）を含むものであった。

30

【0033】

分析対象物HbA_{1c}を結合するための結合体は、FITC及びHbA_{1c}抗体で標識付けされたBSAに付着した青ラテックス粒子を含むものを作製した。2つの濃度を調製し、高濃度（8～15%のHbA_{1c}）及び低濃度（3～8%のHbA_{1c}）検定で用いた。BSAで標識付けした材料を、青ラテックス粒子（300nm、COOH/g、67μeq.）に、負荷 $30\text{ }\mu\text{g}$ のBSA-FITC抗HbA_{1c}/ラテックス 1 mg で付着させた。 0.1% BSAを含むPBS洗浄液を、高濃度範囲及び低濃度範囲に、抗FITC抗体ラテックス結合体の希釈 $1:10$ で用いた。抗FITC抗体を、抗体 $10\text{ }\mu\text{g}$ /青ラテックス粒子 1 mg で調製した。結合体を、カゼインプロッキング緩衝液で希釈したガラス繊維紙内で乾燥させた。高濃度では、結合体を $1:4$ の割合で希釈し、低濃度では、 $1:400$ の希釈を用いた。生体試料内にHbA_{1c}が存在する場合、この場合は血液であるが、結合体と結合した。次に、結合した結合体は、凝集剤バンドと結合しないが、第2のバンドに進み、ここで抗FITC抗体と結合した。余剰結合体は第1のバンドによって結合するが、これは結合体中のHbA_{1c}抗体と結合するためである。2つの捕獲バンド上で発見されたFITCの相対量を測定することによって、試料中のHbA_{1c}量を判定することができた。

40

【0034】

2つの捕獲バンドを含むニトロセルロース片を、図1に図示されるマイクロ流体装置に配置した。本装置は、毛管チャネルによって接続された4つのチャンバを有し、総容積約 $20\text{ }\mu\text{L}$ を有する。第1のチャンバは、本装置の入口ポートである。周囲に向けて開口し

50

ている。チャンバ2は、ガラス纖維紙上の結合体を含み、マイクロポスト上に支持される。ニトロセルロース捕獲片はチャンバ3内にあり、その入口は、マイクロポスト列を含み、液体を分配する。チャンバ4は、チャンバ3から液体を除去するための多孔質パッドを含む。

【0035】

使用において、チャンバ1に試料(全血)を加え、試料量を判定した。試料は毛管を通って流れ、チャンバ2の入口で停止する。溶解溶液(Cetylytic-M, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を加えて試料をチャンバ2内に押し込み、ここで結合体に接触する。試料を結合体粒子と反応させた後、チャンバ1に洗浄液を加えて、試料及び結合体をチャンバ3の入口にある止めを通して押し込み、希釈された試料が細片上の捕獲バンドを超えて通過するようとする。捕獲バンドのFITCから色が生じ、光学検出器としてのCCDカメラで読み取り、次に適当なソフトウェアによって較正データと比較される。チャンバ1内にさらなる液体が供給されて、吸収パッドを含むチャンバ4に残留試料を移動させる。

【0036】

このマイクロ流体装置によって試験が実行され、3つの方法を用いてチャンバ1に液体を加えた。約0.3~2mmの開口を有し、充填長に依存して約0.3~100μLの液滴を計量分配する従来の毛管ピペットを用いて、試料及びその他の液体を入口ポートに配置した。約50μmの開口を有するマイクロディスペンシングヘッドは、一時停止することなく連続的な方法で、試料及び液体を計量分配した。また、同じマイクロディスペンシングヘッドを、液体が計量分配されない間隔を置いて断続的に用いて、時間を決めて精密に移動させて毛管止めを乗り越えさせた。以下の表に示すように、小液滴を反応に最適な時間で計量分配することは、明らかに優れた結果をもたらすことがわかった。

【0037】

【表1】

計量分配方法	%過充填	%充填不足	%不均一な色	反応のタイミング
大きいピペット	32%	23%	18%	10-20秒
マイクロ ディスペンシング (継続的)	16%	9%	17%	~3-6秒
時間決められた群 のマイクロ ディスペンシング	0.1%	0.3%	1.2%	~> 0.01秒

【0038】

上記の表では、「%過充填又は%充填不足」は、図1のマイクロ流体装置を試験して、反応に必要とされるよりも多いか又は少ない液体を加えたことが見出された一連の試験を意味する。「%不均一な色」は、チャンバ3で発生した色を意味し、これは捕獲された結合体の量を示し、試料中のHbA_{1c}の量の計算を可能にする。「反応のタイミング」は、液体がマイクロ流体装置のチャンバ2からチャンバ3に流れ始める経験から見出された最短時間を意味する。これらの検定は、一般的には1~10分間で行われ、インキュベーションと色の発生との両方を含む。インキュベーション及び色の発生時間での誤差は、予想よりも多いか又は少ない試薬が反応するため、反応の誤差につながる。

【0039】

(実施例2)

10

20

30

40

50

前記の実施例で用いられたマイクロディスペンシングヘッドは、約 100 pL の液滴を 85 滴 / ミリ秒の割合で計量分配することが可能であった。液体が計量分配されないとときに間隔で区切られた計量分配期間に加え、各期間の計量分配量、すなわち各期間の液滴数を制御することができた。この能力は、マイクロ流体装置を通る試料及び希釈剤の移動をより正確に制御することを可能にするものであった。上記の H b A_{1c} 検定では、試料と結合体とのインキュベーションのための適切な時間と、検定片を洗浄する前に試料 / 結合体の反応を完了させることが重要であった。これには、試料の進行を監視して、希釈剤の追加のタイミングを制御することが求められる。試料及び試料 / 結合体を一定の速度で移動させて検定を最適化することが重要である。これは、試料及び試料 / 結合体の位置が連続的に監視されて、それによって希釈剤の追加が制御されているときに可能である。

10

【0040】

本実施例では、マイクロディスペンシングが制御されて、85 滴 / ミリ秒の群が、0.1 秒の間隔を置いて提供されるように制御された。ピペットと、連続的なマイクロディスペンシングとを比較して、以下の結果を得た。

【0041】

【表2】

計量分配方法	タイミング精度	最小付加量	体積公差
大きいピペット	~1秒	1.7 μL	0%
マイクロディスペンシング (継続的)	~0.5ミリ秒	5.0 nL	80%
時間決めされた群の マイクロディスペンシング	~0.01ミリ秒	100 pL	99.6%

20

【0042】

上記の表では、「タイミング精度」は、計量分配方法を稼働させるために必要とされる最小期間を意味する。「最小付加量」は、各計量分配方法を制御することができる程度を意味する。「体積公差」は、マイクロ流体装置の最適な動作に望ましい容積の変動値を意味する。本実施例では、チャンバ間の毛管は、容積約 50 nL を有し、これは毛管端の毛管止めが始動する前に加えることができる最小量である。体積公差は、計量分配された最小量が 50 nL を超える場合、大きなピペットではゼロである。毛管をピペットとして用いた場合でも、容積 0.3 μL (300 nL) は、依然として体積公差ゼロを有する。

30

【0043】

マイクロディスペンシングを増加させた液滴群で用いると、最小群は 1 滴である。本実施例では、液滴が 85 滴 / msec で計量分配されると、各液滴は体積 100 pL を有する。次に、体積は、約 0.1 μL / msec (8.5 nL / msec) である。これは、通常良好な動作範囲である。これにより高い体積公差が提供され、マイクロ流体装置は、99.996 % の割合で確実に供給される。本装置は分光写真画像によって監視されるため、マイクロ流体毛管の体積のミスファイア又はばらつきは、さらなる液滴群を加えることによって補正することができる。一般的な動作範囲は、30 ~ 150 滴 / msec であり、液滴体積は、30 pL ~ 1000 nL である。

40

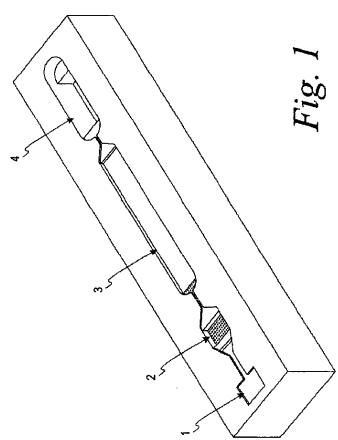
【0044】

連続的なマイクロディスペンシングを用いる場合、ディスペンサを電子的に停止させることができるが、一般的には 1 よりも多い液滴が供給される。本実施例では、「加えられる最小量」は、0.100 nL 又は 5 nL を 50 滴である。これは、本装置では体積公差がそれほど高くなく、80 % の割合 (5 のうち 4) であることを意味する。マイクロ流体装置は、5 nL のみを保持する毛管で動作できるため、この体積公差は、増加された群を

50

備えるマイクロディスペンシングで観察されたものよりも許容しがたい。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 プジア ,マイケル・ジー-

アメリカ合衆国、インディアナ 46530、グレンジャー、タッティントン・ドライブ 143
42

(72)発明者 プロフィット ,ジェームズ・エー

アメリカ合衆国、インディアナ 46528、ゴーシエン、パークレー・ドライブ 1805

審査官 高 見 重雄

(56)参考文献 国際公開第2005/003724 (WO, A1)

特表2004-521315 (JP, A)

国際公開第2006/127631 (WO, A1)

国際公開第2005/033713 (WO, A1)

米国特許出願公開第2003/0132112 (US, A1)

国際公開第2006/042838 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 35/00 - 37/00