

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成26年3月13日 (2014.3.13)

【公表番号】特表2011-518320(P2011-518320A)

【公表日】平成23年6月23日 (2011.6.23)

【年通号数】公開・登録公報2011-025

【出願番号】特願2011-503120(P2011-503120)

【国際特許分類】

G 0 1 N 1/30 (2006.01)

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 1/28 (2006.01)

G 0 2 B 21/34 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 1/30

G 0 1 N 33/48 P

G 0 1 N 1/28 J

G 0 2 B 21/34

【誤訳訂正書】

【提出日】平成26年1月14日 (2014.1.14)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料の反復染色の自動化された方法であって、

(a) 生体試料を含む小容積フローセルを用意する段階と、

(b) 染色剤を添加する段階と、

(c) 活性化脱染色剤を形成するための 2 種以上の前駆体試薬を混合する段階であって、前記活性化脱染色剤の分解速度が脱染色反応速度と同じかそれよりも大きい段階と、

(d) 前記脱染色剤を前記生体試料の上に前記活性化脱染色剤の分解速度よりも大きい流速で流す段階と、

(e) 任意で段階 (b) ~ (d) を 1 回以上繰返す段階と

を含む方法。

【請求項 2】

染色された生体試料によって生成した信号を画像取得ウインドウを通して観察する段階と、前記生成した信号の強度の値を任意で測定する段階と、前記信号をバイオマーカーの特定標識と関連付ける段階とをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記活性化脱染色剤が酸化剤を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記酸化剤が、過酸化水素、臭素水溶液、ヨウ素 - ヨウ化カリウム及び t - ブチルヒドロペルオキシドの緩衝液から選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

一方の前駆体試薬が過酸化水素を含んでおり、もう一方の前駆体試薬が水酸化ナトリウムである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記活性化脱染色剤が、前記フローセルと流体連通した混合チャンバ内で形成される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記活性化脱染色剤が、各前駆体試薬の流体流を前記フローセルと流体連通した流路を通して合流させることによって形成され、前記流路が各前駆体試薬の流体流の混合を増大させるための物理的障害を任意で含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記染色剤がルミフォアである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

混合を促進するために前記フローセルを振動させる段階をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記振動が、前記フローセルに取り付けられた圧電素子を用いて加えられ、電気エネルギーを音響エネルギーに変換させる、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

染色又は脱染色を促進するために、前記フローセルの内部温度を周囲温度よりも高く上昇させる段階をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記フローセルの真空排気によって、前記フローセル内部での気泡形成を低減する段階をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

前記活性化脱染色剤の前駆体試薬を 1 つ以上の試薬容器からプレミキサーへと移す段階をさらに含んでいて、前記前駆体試薬が所定の濃度で前記プレミキサーに移送される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

段階 (b) ~ (e) の 1 以上がプロセッサによって制御される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

プレミキサーと流体連通したフローセルを備える、生体試料の反復染色のための自動化デバイスであって、前記プレミキサーの容積容量が前記フローセルの容積容量の約 5 倍よりも小さい、デバイス。

【請求項 16】

前記フローセルの容積容量が $1 \mu\text{L} \sim 1000 \mu\text{L}$ であり、前記プレミキサーの容積容量が $5 \mu\text{L} \sim 5000 \mu\text{L}$ よりも小さい、請求項 15 記載のデバイス。

【請求項 17】

前記フローセルの容積容量が $50 \mu\text{L} \sim 500 \mu\text{L}$ であり、前記プレミキサーの容積容量が $250 \mu\text{L} \sim 2500 \mu\text{L}$ よりも小さい、請求項 15 記載のデバイス。

【請求項 18】

前記プレミキサーが、2 種以上の前駆体試薬の混合を増大させるためのポンプ及び乱流発生器をさらに含む、請求項 15 記載のデバイス。

【請求項 19】

前記乱流発生器が混合ノズル、多孔質フィルタ、球状障害物又はマイクロメッシュである、請求項 18 記載のデバイス。

【請求項 20】

前記フローセルが、組織試料を受けるように構成された基部と、熱電素子と、前記基部と前記熱電素子との間のガasket位置と、前記プレミキサーと流体連通した入口ポートと、出口ポートとを含み、前記基部及び熱電素子の一方又は両方が画像取得ウインドウを含む、請求項 15 記載のデバイス。

【請求項 21】

前記フローセル内部に存在する気体を除去するための脱気装置をさらに含む、請求項 20 記載のデバイス。

【請求項 2 2】

前記フローセルに取り付けられた圧電素子をさらに含み、前記圧電素子が電気エネルギーの音響エネルギーへの変換によって前記フローセル内部に振動を生じさせることができる、請求項 2 0 記載のデバイス。

【請求項 2 3】

前記プレミキサーと流体連通した試薬容器をさらに含む、請求項 1 5 記載のデバイス。

【請求項 2 4】

プレミキサー制御装置及び試薬流制御装置をさらに含む、請求項 2 3 記載のデバイス。

【請求項 2 5】

前記プレミキサー制御装置、前記試薬流制御装置、及び任意で前記熱電素子に取り付けられた温度制御装置がプロセッサと一体化されており、前記プロセッサが前記デバイスの 1 以上の動作パラメータを制御するように構成されている、請求項 2 4 記載のデバイス。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】生体試料の反復染色

【背景技術】

【0 0 0 1】

多重化用途では、タンパク質発現又は空間分布を定量的又は定性的に調べるために、組織試料又は組織マイクロアレイ (TMA) を複数の分子プローブで染色する必要がある。染色プロセスは一般に、誤差を生じやすい時間のかかる技術を用いて実施される。染色プロセスで使用される試薬は、多くの場合、高価であり、保管期限が限られており、そのため特別な取扱い技術が必要とされる。

【0 0 0 2】

顕微鏡フローセルを組織試料の反応チャンバとして或いは流動条件下での細胞の活動をモニタするために利用する自動化システムが存在する。しかし、かかるシステムは、組織試料の処理に使用するのには十分に適合しておらず、フローセル内部での試料の環境制御が欠けており、手作業を必要とする。

【0 0 0 3】

フローセルを通る試薬 (例えば、発光試薬) の流体速度は、流体が小容積チャンバ内部で乱流を生じたり、試料を押し出したり、損傷するおそれがあるので、制御が困難である。また、周辺の外部加熱 (例えば、加熱された顕微鏡ステージによるもの) によって、封入された試料の不均一な加熱を生じるおそれもある。そのため、試料に温度変化が生じる。さらに、試薬の調製、試料の除去及び画像取得のためのステージへの置換の繰返しによって、試料の再位置合わせが必要になり、再現性が低下する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 4】

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 3 8 7 3 8 号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

本発明は一般に、イメージング用途からの生体試料の反復染色を容易にする自動化された方法及びデバイスに関する。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

いくつかの実施形態では、方法は、生体試料を含む小容積フローセルを用意する段階と

、生体試料に染色剤を添加する段階と、活性化脱染色剤を形成するための２種以上の前駆体試薬を混合する段階であって、活性化脱染色剤の分解速度が脱染色反応速度と同じかそれよりも大きい段階と、脱染色剤を生体試料の上に活性化脱染色剤の分解速度よりも大きい流速で流す段階とを含む。染色、混合、流すプロセスは、逐次繰返すことができる。

【０００７】

いくつかの実施形態では、生体試料の反復染色のためのデバイスを提供するが、本デバイスは、プレミキサーと流体連通したフローセルを備えており、プレミキサーの容積容量はフローセルの容積容量の約５倍よりも小さい。

【０００８】

いくつかの実施形態では、フローセルは、組織試料を受けるように構成された基部と、熱電素子と、基部と熱電素子との間のガスケット位置と、プレミキサーと流体連通した入口ポートと、出口ポートとを備えており、基部及び熱電素子の一方又は両方が画像取得ウインドウを含む。フローセルはさらに、脱気装置及び圧電素子を含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】代表的なフローセルデバイスを示す図である。

【図２】フローセルデバイスで使用するための脱気装置を示す図である。

【図３】プレミキサーとして圧電素子を使用し、脱色剤の反応時間の改善を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

以下の詳細な説明は例示的であり、本発明の用途及び使用を限定するものではない。さらに、以下の図面の詳細な説明の従来の発明の背景技術に記載されたいかなる理論によっても限定されるものではない。

【００１１】

本発明で特許請求する主題をより明確かつ簡潔に説明し指摘するために、以下の説明及び添付の特許請求の範囲で使用される、特定の用語を以下の通り定義する。

【００１２】

単数形「a」、「an」及び「the」は、他に特段の記載がない限り、複数形を含む。本明細書及び特許請求の範囲を通して使用される場合、類似の用語は、関連する基本的機能を変えることなく、許容範囲内で変化することができる定量的表現を修正するために適用することができる。したがって、「約」などの用語で修飾された値は、正確な指定値に制限されない。他に特段の記載がない限り、明細書及び特許請求の範囲で使用される、分子量、反応条件等の、成分の量、特性を表すすべての数字は、すべての場合において「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。したがって、特に反対の記載がない限り、以下の明細書及び添付の特許請求の範囲に記載された数値パラメータは、本発明によって取得しようとする所望の特性に応じて変化することができる近似値である。最下位の各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数に照らして、及び通常の丸め方法を適用して、解釈されるべきである。

【００１３】

本明細書で用いる「生体試料」という用語は、生体内又は生体外で得られた生体組織又は流体由来の試料を始めとする、生体から得られた試料をいう。かかる試料は、限定はされないが、ヒトを含む哺乳類から単離された組織、画分及び細胞とすることができる。

【００１４】

本明細書で用いる「ルミフォア」という用語は、化学発光、生物発光、リン光及びフォトルミネセンスを始めとする発光を呈する化合物をいう。代表的な例には、限定はされないが、ルミノール、ルシゲニン、アクリダン、アクリジニウムエステル及びジオキセタン、並びにフルオロフォアが含まれる。

【００１５】

本明細書で用いる「オキシダント」又は「酸化剤」という用語は、実質的にルミフォア

を不活性化する脱色剤をいう。代表的な酸化剤には、活性酸素種、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化水素、或いは過酸化水素、過マンガン酸カリウム、二クロム酸ナトリウム、臭素水溶液、ヨウ素 - ヨウ化カリウム又はt - ブチルヒドロペルオキシドのようなオゾンが含まれる。

【0016】

本発明は、試料（例えばフローセル内部のスライド上の試料）の移送の必要性をなくすことにより、オペレータの最小限の介入で動作する、自動化システム及び方法に関する。開示されたシステム及び方法はさらに、染色部品とイメージング部品との間で試料を移動させる必要がなくなる。

【0017】

染色部品の自動化によって、試薬の容積とシステム内での試薬滞留時間とが最小限になり、蛍光標識抗体などの高価な試薬が節約され、試薬の分解又は副反応が最小限になる。また、試薬測定値のバラツキが減少し、試薬間の相互汚染の発生を低減することができる。イメージング部品の自動化によって、画像の位置合わせ及び染色後の試料の再装着に伴う段階が排除又は減る。画像登録の改良によって、正確な合成画像の形成が容易になる。

【0018】

自動化は、染色剤及び酸化剤の添加など、逐次染色に係るプロセス段階の1つ以上をコンピュータ制御することによって達成することができる。フローセルシステムが、試料処理及び画像取得統合システムに組み込まれている場合、画像取得部品（例えば、顕微鏡又はカメラ）は、LabVIEW又はCで書かれたプログラムのようなソフトウェアによって制御することもできる。

【0019】

デバイス

本明細書では、開示された方法を実施するためのデバイスを提供する。例えば、本明細書では、フローセル並びにフローセル及びプレミキサーを含むシステムを提供する。

【0020】

図1に示す1つの実施形態では、フローセルは、組織試料上に位置するように構成された、閉鎖フローチャンバを含むことができる。フローセルは、固体支持体 - 受け部材10、スライド12上に配置された組織試料を受けるように構成された中央開口を有するガスケット11、蓋14、入口ポート15及び出口ポート16を含むことができ、スライドをスライド受け部材に配置して、ガスケットをスライドと蓋との間に挟み込むと、フローセルは閉鎖チャンバを画成する。フローチャンバはフローセル内部に閉じ込められるので、流体の蒸発、及び試薬の損失が最小限になる。また、閉じられた構成によって温度制御が改善される。

【0021】

フローセルは、標準的な顕微鏡ステージ上に嵌め込むように適合されたモジュラー式ユニットとすることができる。或いは、フローセルは、顕微鏡ステージを含む一体型ユニットとすることもできる。いくつかの実施形態では、フローセルは、イメージングプロセスのために顕微鏡ステージ上に固定することができる。これにより、手作業を介さずに、試料を完全な一連の試薬に曝露させることができ、それにより、画像取得又は登録のための顕微鏡ステージ上での試料の再位置合わせをなくすことができる。各染色段階後に取得される画像は、合成画像を形成するために重ね合わせることができるので、これは特に多重染色及びイメージングにとって有用である。

【0022】

フローセルは、フローセルのチャンバ内部の流体の送液及び溶液温度を制御するための流体及び温度制御サブシステムを含むシステムで使用することができる。1つの実施形態では、流体制御システムはさらに、フローセルに注入する前に1種以上の試薬を調製するための容器、フローセンサー、混合チャンバ及び脱気装置を含むことができる。かかるシステムの利点は、安定性又は保管期限が限られていることがある試薬を、予混合し保存する必要がなくなることである。流体制御システムは、流体の入口ポート及び出口ポート

と流体連通している。

【0023】

スライド受け部材

いくつかの実施形態では、フローセルは、ガラススライドなどの固体支持体上に配置された組織試料を受けるように構成されたスライド受け部材を含むことができる。スライド保持器は、ある範囲の化学及び温度変動に対して適合性がある。1つの実施形態では、スライド保持器は、基部及びスライドをチャンバ内に固定するためのピン又はタブシステムからなることができる。

【0024】

ガスケット

フローセルは、スライド上に配置された組織試料を受けるように構成された中央開口を有するガスケットを含む。ガスケットは、フローチャンバに加えられた液体を保持する変形可能で化学的に不活性なゴム又はプラスチックから形成することができる。ガスケットは、任意で、入口及び出口ポートのための開口を含んでいてもよい。ガスケットの中央開口は、画像取得ウインドウの視野を最大限にするサイズとすることができる。フローセル内に配置されたときのガスケットの幅、長さ及び深さは、それぞれ、フローセルの所定の内部容積を達成するように変更できる。いくつかの実施形態では、ガスケットの幅及び長さは、標準的な組織切片スライド又はマイクロアレイ基板に適合するサイズとすることができる。例えば、1つの実施形態では、ガスケットの中央開口は、幅20mm及び長さ30mmの組織マイクロアレイに適合させることができる。

【0025】

入口及び出口ポート

入口及び出口ポートは、好ましくは、画像取得ウインドウから離れて置かれている。例えば、入口及び出口ポートは、ガスケット内又は蓋の上に配置することができる。入口及び出口ポートは一般に、流入速度及び流出速度が協調して試料で流体の所望の速度が達成されるように、サイズが一致している。

【0026】

温度制御

図1をさらに参照すると、温度制御ユニットはさらに、温度制御のための熱電気ステージ17及び温度測定のためのRTD/サーミスタを含むことができる。温度制御ユニットの底面が流体に直接接触する構成では、接触面18は、ステンレス鋼又はチタンなど、耐薬品性材料から形成することができる。温度制御ユニットの部品を配置するためにフレーム19を使用することもできる。

【0027】

いくつかの実施形態では、温度制御ユニット（例えば、Peltierスタック）とスライドとの間に形成された内部チャンバが、組織スライドを通してではなく、温度制御ユニットによって直接加熱されるように、温度制御ユニットが蓋に組み込まれている。この構成によって、イメージングのための組織スライドの後面が解放される。

【0028】

脱気装置

いくつかの実施形態では、本発明はさらに、フローセルからの気体の除去を助けるための方法を含む。図2に示すように、非晶質フルオロポリマー又はポリジメチルシロキサン(PDMS)のような気体透過性フィルム20を使用して、通気路21と試料23を含む流体チャンバ22とを分離してもよい。かかる構成では、逆圧又は真空にすることによってシステムを通気し、チャンバ内の過剰な気体を除去する。

【0029】

攪拌

いくつかの実施形態では、本発明はさらに、フローチャンバに連結され、低電圧電気信号を音響エネルギーへと変換することによってフローチャンバ内部で振動を生じさせることができる圧電素子を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、圧電素子は、セラミッ

ク、石英 (SiO_2) 又はチタン酸バリウム (BaTiO_3) から構成することができる。圧電素子の構成は超音波攪拌をもたらし、流体チャンバを通る試薬の流動プロファイルに影響を及ぼす。これは、所望の染色反応が拡散律速であってフローセルの形状のため従来の機械的混合ができない場合に、特に有利である。

コンピュータ処理ユニット

コンピュータは、例えば、熱制御ユニット、プレミキサー、振動ユニット及びポンプを含めて、フローセルシステムの様々な部品を制御することができる。フローセルシステムが、試料処理及び画像取得統合システムに組み込まれている場合、画像取得部品 (例えば、顕微鏡又はカメラ) を、コンピュータによって制御することもできる。

【0030】

方法

本明細書ではまた、固体支持体に付着した生体試料 (例えば、顕微鏡スライドに固定された組織切片) から画像を処理し取得する方法を提供する。本方法は、具体的用途に合わせた選択されたデバイスの様々な代替実施形態を使用する段階を含む。生体試料の反復処理の代表的な方法は、本願出願人の米国特許出願公開第2008-0118944号に記載されており、本願に援用する。

【0031】

1つの代表的な方法は、(a) 生体試料 (顕微鏡スライド上の組織切片など) をフローセル内に配置する段階と、(b) ルミフォアと試料との十分な接触時間 (典型的には、使用する標識の濃度及びタイプに応じて30~60分間) が得られるように蛍光標識又はルミフォアを試料に添加する段階と、(c) 結合していない蛍光標識又はルミフォアを洗い流すための洗浄液 (例えば適切な緩衝液など) を添加する段階と、(d) 標識試料の画像を取得する段階と、(e) ルミフォアを実質的に不活性化する酸化剤を添加することによって段階(b)のルミフォアを破壊するための化学試薬を添加する段階であって、酸化剤溶液を、連続流プロセスを用いて試料に添加して、フローセル内の非層流及び滞留時間を最小限にして平均滞留時間が1~5分間となるようにする段階と、(f) 任意で試料の画像を取得する段階と、(g) 段階(b)~(f)を1回以上繰返す段階とを含む。

【0032】

添加段階はそれぞれ、特定の試薬を含む溶液をフローセル内部に配置された生体試料上に流すことによって達成することができる。反応性を高めて試薬の消費量を減らすために以下のパラメータ：(1) フローセルの内部容積、(2) フローセルの内部温度、(3) 酸化溶液の成分 (例えば、過酸化水素及び重炭酸ナトリウム) の混合のタイミング、(4) 試料を通過するときの溶液の攪拌の程度及び(5) フローセルの脱泡又は脱気を制御することができる。これらのパラメータを適切に調整すると、試料の劣化を低減することができる。単一の試料でより多くのデータを得ることができる。

【0033】

自動化された脱染色段階によって、操作者がオリジナルの登録を維持しながら単一の試料をリプロブすることが可能になる。酸化剤を追加すると、ルミフォアによって生成された信号がほとんど除去されるため、生体試料が脱染色される。ルミフォアの化学変化によって、又は除去によって、脱染色が完了すると、80%以上、好ましくは90%超の信号の低下が起きる。この信号の低下は、背景信号の同時低下又は脱染色段階による自己蛍光を調整するための、染色された生体試料の当初の絶対強度に対する特定の波長での染色後の強度として測定することができる。

【0034】

フローセルの内部チャンバ容積

小容積フローセルは高価な試薬を保存する。試薬の拡散が律速段階である場合、フローセルは内部チャンバ容積と相互関連するはずである。例えば、チャンバを急速に完全に洗浄することができるように、フローセルへの流体の送り込みをチャンバの容積容量に基づいて調整することができる。

【0035】

フローセルは、試験の試料のための固体支持体を提供する。フローセルの寸法は使用される固体支持体に基づいて制限される。フローセルの高さは試料の厚さに基づいている。試料が組織切片であるとき、その厚さは約 $5\ \mu\text{m}$ ~ 約 $100\ \mu\text{m}$ となり得る。組織切片は、 $20\text{mm} \times 30\text{mm}$ の面積を占め得る。これにより、 $10\ \mu\text{L}$ ~ $1000\ \mu\text{L}$ 、好ましくは $50\ \mu\text{L}$ ~ $200\ \mu\text{L}$ の小さい内部チャンバ容積となる。

【0036】

分解は、試薬がフローセルから実質的に除去される前に起きる可能性がある。フローチャンバ内での乱流によって表面反応性が改善され、試薬の副産物（例えば、酸素ガス）の除去が容易になる。したがって、いくつかの実施形態では、チャンバは、乱流を生成する攪拌要素（例えば、音響圧電部品）を含むことができる。

【0037】

内部チャンバ温度

多くのマイクロアレイ染色プロセスは 200 ~ 1000 で行うが、いくつかのシステムは、狭い許容差で、著しく高い、又は低い温度を必要とする場合がある。染色に関連する吸着及び脱着プロセスは温度依存性であり、したがって、いくつかの実施形態では、化学的相互作用が起きる試料表面にわたって温度の均一性がもたらされる。

【0038】

例えば、積層された熱電素子を、チャンバ内又はチャンバ上へと導入することができ、素子を通して流れる電流が、チャンバ内部での流体の放射加熱によって、チャンバ温度を指定の温度範囲内で調節することができる。いくつかのシステムは、 $+/-5$ の温度許容差を必要とすることがあり、他のシステムは、著しく狭い、又はより厳しくない温度許容差を有することがある。いくつかの実施形態では、熱電素子は、温度調節を容易にするように、熱を吸収し放散するヒートシンクを任意で含むことができる。

【0039】

プレミキサー及び混合タイミング

多重染色で使用される試薬は保管期限が限られていることがあり、試薬の有効性が時間の経過とともに減少する。これは、化学反応を起こさせる2つ又はそれ以上の溶液の混合によって生成された試薬の一部が分解又は沈降し得るときに起きる。これにより、気体及び他の望ましくない副産物の形成につながる。いくつかの実施形態では、試薬をフローセルへと導入する直前に、反応物質を散在させるように、プレミキサーを使用して溶液を分子レベルで完全に混合する。混合時間は、試薬を生成するのに十分な長さであり、かつ分解を防ぐのに十分に限られた長さとする。

【0040】

フローセルの上流に配置されたプレミキサーは、チャンバ設計又は管設計に基づくことができる。チャンバ設計は、入口及び出口ポートを備え、機械的ミキサーを含む小容器を含むことができる。管設計は、所定の流速で化学試薬が駆動されるYアダプタを含むことができる。或いは、管設計は、物理的障害（例えば、管内部に配置されるマイクロメッシュ又は球状膜）又は乱流を生成するノズルを含むことができる。

【0041】

プレミキサーは、フローセルに導入する前に化学試薬の混合を可能にする。フローセルの容積容量は、化学試薬の分解速度及び化学試薬の所望の流速又はフローチャンバを通るそれらの反応生成物に基づいて決定される。

【0042】

所定の温度での過酸化物溶液の分解速度は $-dC/dt = kC$ と等しく、 C は過酸化物の濃度、 t は時間、 k は一次速度定数である。一次反応の半減期は、初期濃度とは関係なく、 $t_{1/2} = \ln(2)/k$ として計算される。 n 次反応の半減期はまた、 $t_{1/2} = 2^{n-1} - 1 / (n-1)k[A_0]^{n-1}$ として決定し表すことができる。

【0043】

フローセル内部での滞留時間は、試薬の半減期よりも短いように制限される。したがって、フローセルの容積容量は次の通り決定される： $V_p < (V/t)(t_{1/2})$ 。ここで

(V_p) はフローセルの容積容量、(V/t) は流速である。

【0044】

ヒドロペルオキシドアニオンを生成する過酸化水素溶液などの酸化剤は、調整後5分以内に分解し酸素ガスを発生する。一般に、フローセルの容積容量は、1～1000 μ L、好ましくは50 μ L～500 μ Lとすることができる。フローセル内の試薬の平均滞留時間を確実に5分未満にするために、流速は好ましくは50 μ L/分～500 μ L/分である。 $V_p < (V/t)(t_{1/2})$ を適用するとき、プレミキサーの容積容量は5～5000 μ L、好ましくは250 μ L～2500 μ Lに制限される。

【0045】

試薬容器

プレミキサーは1つ以上の試薬容器と流体連通している。試薬容器は、プレミキサーへ送り込む前の試薬の保存デバイスとして働く。フロー制御装置によって、計量された量の試薬をプレミキサーへと移すことが可能になる。複数の試薬の送り込みは連続的順序で又は平行して行うことができ、試薬の正確な計量及び試薬の相互汚染の低減が可能になる。

画像取得ウインドウ

開示された方法は、画像取得ウインドウを通して試料へのアクセスを高めることができるように構成されたフローセルを含む、システムで実施することができる。画像取得ウインドウは、試料をセットする基板（例えば、顕微鏡スライド）によって画成することができ、又は、スライド受け部材の下側に光透過性材料を含むことができる。

【0046】

したがって、本発明の方法は、処理の様々な段階中、カメラに接続された顕微鏡が試料の画像を取得することができる画像取得ウインドウから離れたところに加熱要素又は攪拌要素（例えば、音響圧電部品）などの付属デバイスが配置された、フローセルを使用して実施することができる。

【0047】

反応速度の制御

1つの実施形態では、3mlの過酸化水素緩衝液（3% H_2O_2 、pH10）をプレミキサー内で調製する。プレミキサーは、連続流を使用して、新しく調整された過酸化水素緩衝液がフローチャンバへと導入され、チャンバ内の滞留時間は5分未満であるように、フローセルと物理的に連通するように設計されている。一般的な流速は250 μ L/分であり、フローチャンバの容積は250 μ L未満である。チャンバはさらに圧電素子を含む。

【0048】

図3に示すように、これらの条件によって、試料をコンテナ内で処理し、滞留時間5分ごとに約10秒間攪拌する手動の脱染色プロセスと比較して、反応時間が約3倍短縮される。反応性の増加は、活性化脱染色剤の新鮮な（より分解の少ない）調製及び平衡反応における副産物の連続除去に起因し得る。インライン予混合及び最適な流速によって、塩基性溶液で過酸化水素の分解を通してその場で生成される酸素気泡の量が低減される。

【0049】

以上、本発明を特定の実施形態に関して説明したが、当業者には明らかであるように、添付の特許請求の範囲に記載されている趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明には多くの修正及び変形を行うことが可能である。

【符号の説明】

【0050】

- 10 受け部材
- 11 ガスケット
- 12 スライド
- 14 蓋
- 15 入口ポート
- 16 出口ポート
- 17 熱電気ステージ

- 1 8 接 触 面
- 1 9 フ レ ー ム
- 2 0 気 体 透 過 性 フ ィ ル ム
- 2 1 通 気 路
- 2 3 試 料