(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-3592
(P2017-3592A)
(43)公開日　平成29年1月5日(2017.1.5)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
G01N	1/28	(2006.01)	G01N	1/28	J	2G052
C09K	3/00	(2006.01)	G01N	1/28	X	
			C09K	3/00	Z	

審査請求 有　請求項の数 14　ＯＬ　（全 52 頁）

(21)出願番号　特願2016-127840 (P2016-127840)
(22)出願日　平成28年6月28日 (2016.6.28)
(62)分割の表示　特願2014-98574 (P2014-98574)の分割
原出願日　平成22年2月12日 (2010.2.12)
(31)優先権主張番号　61/152,585
(32)優先日　平成21年2月13日 (2009.2.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

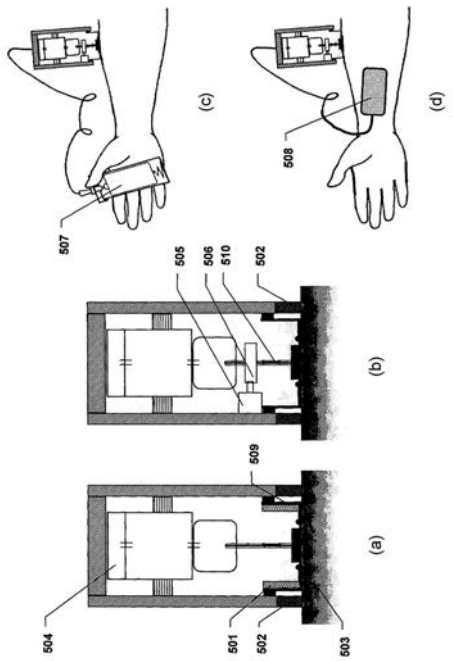
（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．テフロン

(71)出願人　506115514
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４６０７　オークランド　フランクリン　ストリート　１１１１　トゥエルフス　フロア
(74)代理人　100091443
弁理士　西浦　▲嗣▼晴
(72)発明者　ミトラゴトリ，サミル
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９３１１１、サンタバーバラ、ドラド　ドライブ　８１６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組織に基づいた診断のためのシステム、方法及びデバイス

(57)【要約】　（修正有）
【課題】迅速な組織のサンプリング、組織の汚染除去、組織成分の一部とすることができる分析物の定性的及び／または定量的検出のために、エネルギー及び／または液化促進媒体を対象となる組織に付与して組織成分を有する液化サンプルを試製することを含むデバイス、方法及びシステムを提供する。
【解決手段】液化の容易化、液化組織成分の維持及び組織内への分子の送達を可能にするような液化促進媒体の特別な組成を提供する。組織の液化サンプル中の組織成分の決定は、局部または全身病の診断または予後診断、薬物投与の後の異なる組織の治療の生物学的利用能の評価薬物乱用の法医検出、有害物に曝露後の組織微小環境の変化の評価、組織の汚染除去及び様々な他のアプリケーションを含む種々のアプリケーションで使用可能である。本発明の方法、デバイス及びシステムは、液化される組織を通ってまたは組織内に一以上の薬物を送達するために使用される。
【選択図】図５



【特許請求の範囲】
【請求項１】
緩衝液に溶解した非イオン界面活性剤及び両性イオン界面活性剤からなる組成物。
【請求項２】
前記非イオン界面活性剤は、ポリエチレングリコールドデシルエーテル、ポリオキシエチレン２３－ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン２－セチルエーテル、ポリオキシエチレン１０－セチルエーテル、ポリオキシエチレン２０－セチルエーテル、ポリオキシエチレン２－ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン１０－ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン２０－ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン２－オレイルエーテル、ポリオキシエチレン１０－オレイルエーテル、ポリオキシエチレン１００－ステアリルエーテル、または、ポリオキシエチレン２１－ステアリルエーテルのうち１つまたは１つ以上を含む請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記両性イオン界面活性剤は、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート、３－（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート、ミリスチルジメチルアンモニオプロパンスルホナート、ヘキサデシルジメチルアンモニオプロパンスルホナート、ＣｈｅｍＢｅｔａｉｎｅ Ｃ、ＣｈｅｍＢｅｔａｉｎｅ Ｏｌｅｙｌ、ＣｈｅｍＢｅｔａｉｎｅ ＣＡＳ、または、３－（３－コラミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－１－プロパンスルホナートのうち１つまたは１つ以上を含む請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記非イオン界面活性剤及び前記両性イオン界面活性剤の合計濃度（ｗ／ｖ）は、０．０１％から２０％、０．０１％から１０％、０．５％から１０％、０．５％から１％、約０．５％、約１％、約１．５％、約２％、約２．５％、または、約３％のうち１つまたは１つ以上である請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記非イオン界面活性剤と前記両性イオン界面活性剤との比は、２５：７５から７５：２５の間の範囲である請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
前記非イオン界面活性剤は、ポリエチレングリコールドデシルエーテルからなり、
前記両性イオン界面活性剤は、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナートからなる請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
界面活性剤の合計濃度は、０．０１％から１０％（ｗ／ｖ）の間の範囲である請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
界面活性剤の合計濃度は、０．５％から１％（ｗ／ｖ）の間の範囲である請求項６に記載の組成物。
【請求項９】
前記ポリエチレングリコールドデシルエーテルと前記３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナートとの比は、５０：５０である請求項６に記載の組成物。
【請求項１０】
さらに、研磨材を有している請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
前記研磨材は、ダイアモンド、シリカ、アルミニウム派生物、酸化アルミニウム、シリコンカーバイド、クオーツ、または、金属のうち少なくとも１つを含む研磨結晶またはダストからなる請求項１０に記載の組成物。
【請求項１２】
前記緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、トリス－ＨＣＬ、または、ＥＤＴＡのうち少なくとも１つからなる請求項１に記載の組成物。
【請求項１３】

無菌である請求項１に記載の組成物。
【請求項１４】
さらに、薬物を含む請求項１に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［関連出願の相互参照］
本出願は、２００９年２月１３日付けで提出された米国仮特許出願第６１／１５２５８５号の利益を要求する。本明細書では、この開示の全体を参照として援用する。
【背景技術】
【０００２】
［発明の背景］
多くの脂質、タンパク質、核酸及び他の種々の分子に代表される人間組織の生体分子組成（biomolecular composition）は、心臓血管疾患（cardiovascular disease）、アルツハイマー病及び糖尿病のようないくつかの全身病と同様に、癌、アレルギー及び湿疹のような局所病理（local pathologies）の好感度指標（sensitive indicator）である。さらに、組織の分子組成はまた、外因性の化学または生物物質への人体の暴露（exposure）について重要な情報を保持している。しかしながらこれらの情報は、組織からルーチンでサンプルを採取するには、患者への優しさがなく、かつ、標準化されていない方法であるので、診断法において現在使用されていない。代わりに臨床診断（clinical diagnosis）は、組織生検（tissue biopsies）の病理組織学的分析（histopathological analysis）及び目視観察（visual observation）により常に行われる。臨床検診は、定性的な特徴により誤診及び誤用の増大を招くため極度に制限される。進入性に加えて、現在の方法では、完全な病気の分子の発生の説明が達成できず、さらに、病気と区別できない。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
組織液を評価する物理的及び化学的方法を使用する従来の手法では、カルシウム及びグルコースのような間質液に自由に存在する少量の低分子量分子の抽出に主に焦点が合わせられてきた。表面的に存在する組織成分を粘着テープで物理的に採取するテープストリッピング（tape stripping）の使用が報告されている。しかしながら、この技術は、無効果、標準的プロトコル（standardized protocol）の欠落及び組織サンプルの高い不均一性により制限されることが示されている。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本発明は、組織成分（tissue constituents）（例えば数種類の生体分子、薬物及び微生物）の一部であるかもしれない分析物の定性的及び／または定量的検出と同時に、迅速な組織のサンプリングを提供するように、対象（interes）の組織にエネルギーを付与して組織成分を有する液化サンプル（liquefied sample）を生成することを含むシステム、方法およびデバイス並びにこのシステム、方法及びデバイスに有効な組成に関するものである。組織組成の決定は、病気の診断（diagnosis）及び予後診断（prognosis）、薬物投与の後の異なる組織の治療の生物学的利用能（bioavailability）の評価、薬物乱用の法医検出、有害物に曝露後の組織微小環境（the tissue microenvironment）の変化の評価、組織の汚染除去及び様々な他の用途を含む種々の用途で使用することができる。
【０００５】
本発明は、正常なまたは病気の対象者から液化組織サンプルを生成する方法及びデバイスを提供する。このデバイス及び方法には、対象者の対象とする組織にエネルギー及び液化促進媒体を付与して、付与により液化組織サンプル（liquefied tissue sample）を生成すること、及び液化組織サンプルを収集することが含まれる。いくつかの実施の形態では、液化組織サンプル内の少なくとも一つの分析物の存在の有無を分析することを実行す

る。分析は対象となる状態の診断を容易にする。いくつかの実施の形態では、分析することには、液化組織サンプルから分析物プロファイル（analyte profile）を生成し、分析物プロファイルと、参照分析物プロファイル（analyte profile）とを比較し、比較することにより、対象となる状態の診断を容易にすることが含まれる。

【０００６】

いくつかの実施の形態では、組織の液化の目的は、望ましくない物質から組織を除去または除染することである。このような望ましくない物質の限定されない例には、薬品（chemicals）、環境汚染物質（environmental contaminants）、生物毒素（biological toxins）及び身体に有毒または危険と考えられる物質が含まれる。いくつかの実施の形態では、除染する方法は、望ましくない物質の除去が好ましいレベルに到達するまで、対象の組織上を組織液化デバイスを連続的に移動させることにより実行される。

【０００７】

いくつかの実施の形態では、液化促進剤には、塩化ナトリウム（sodium chloride）、塩化カリウム（potassium chloride）、リン酸水素二ナトリウム（sodium phosphate dibasic）、リン酸二水素カリウム（potassium phosphate monobasic）、３－｛［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］アミノ｝プロパンスルホン酸（3-[[tris(hydroxymethyl)methyl]amino]propanesulfonic acid）、Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）グリシン（N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine）、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン（tris(hydroxymethyl) methylamine）、Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（N-tris(hydroxyrnethyl)methylglycine）、４－(２－ヒドロキシエチル)－１－ピペラジンエタンスルホン酸（4-2-hydroxyethyl-l-piperazineethanesulfonic acid）、２－｛［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］アミノ｝エタンスルホン酸（2- [[tris(hydroxymethyl)methyl]amino]ethanesulfonic acid）、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（3-(N-morpholino)propanesulfonic acid）、ピペラジン－Ｎ,Ｎ’－ビス（２－エタンスルホン酸）（piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)）、ジメチルアルシン酸（dimethylarsinic acid）、クエン酸ナトリウム食塩緩衝溶液（saline sodium citrate）、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid）の一以上が含まれる。いくつかの実施の形態においては、液化促進剤には、プロテアーゼ阻害剤（protease inhibitor）、Ｒｎａｓｅ（リボヌクレアーゼ）阻害剤（RNase inhibitor）またはＤｎａｓｅ（デオキシリボヌクレアーゼ）阻害剤（DNase inhibitor）の一以上が含まれる。いくつかの実施の形態では、液化促進剤には、フリーラジカルスカベンジャー（free radical scavenger）、消泡剤（defoaming agent）及びタンパク質安定剤（protein stabilizer）の少なくとも一つが含まれる。いくつかの実施の形態では、液化促進剤には、Ｂｒｉｊｉ－３０、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＰＳ）、３－（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Dodecyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＤＰＳ）、Ｎ－ラウロイルサルコシン（N-lauroyl sarcosine）（ＮＬＳ）、トリトンＸ－１００（Triton X-I00）、ドデシル硫酸ナトリウム（Sodium Dodecyl Sulfate）、ＤＭＳＯ（ジメチルスルホキシド）、脂肪酸（fatty acids）、アゾン（azone）、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）または水酸化ナトリウムの少なくとも一つが含まれている。いくつかの実施の形態では、液化促進剤は、研磨粒子の懸濁液を有している。いくつかの実施の形態では、研磨粒子は、シリカ（silica）または酸化アルミニウム（aluminum oxide）を有している。

【０００８】

いくつかの実施の形態では、エネルギーは、超音波エネルギー、機械的エネルギー、光学的エネルギー、熱的エネルギーまたは電気的エネルギーの形で付与される。いくつかの実施の形態では、機械エネルギーは、研磨材により付与される。いくつかの実施の形態では、熱エネルギーは、高周波エネルギーの形で付与される。いくつかの実施の形態では、光学的エネルギーは、レーザの形で付与される。

【０００９】

いくつかの実施の形態では、液化組織サンプルは、対象者の対象の正常組織（healthy tissue）及び対象者の対象の疑わしい病変組織（suspected diseased tissue）ごとに生成される。そして分析には、正常組織のサンプルの分析結果を、疑わしい病変組織のサンプルの分析結果と比較することが含まれる。比較により対象組織の状態の診断が容易になる。いくつかの実施の形態では、液化組織サンプルは、複数の組織部位で生成され、分析には複数の組織部位の分析結果の比較が含まれる。比較により対象組織の状態の診断が容易になる。いくつかの実施の形態では、液化組織サンプルは、複数の組織部位から収集され、サンプルは診断を行うために組み合わされる。

【００１０】

いくつかの実施の形態では、液化組織サンプルは、吸い出しにより収集される。いくつかの実施の形態では、収集は、組織と接触するように配置されたハウジング内に液化剤を保持することにより行われる。いくつかの実施の形態では、収集は、デバイス内に配置されたハウジング内の液化組織サンプルを機械化された移送により行われる。

【００１１】

いくつかの実施の形態では、液化組織サンプルは、貯蔵または輸送のために対象となる分析物のさらなる液化及び安定化を補助する物質と混合される。いくつかの実施の形態では、サンプルコンテナから移送された組織サンプルは、予めコンテナに貯蔵された物資と混合される。一例としては、プロテアーゼ阻害剤（protein stabilizer）のようなタンパク質安定剤（protease stabilizer）、ＥＤＴＡのような核酸安定剤（nucleic-acid stabilizer）、フェノール、非特異プロテイナーゼ（nonspecific proteinase）、ＲＡａｓｅ阻害剤（RNase inhibitor）及びＤＮａｓｅ阻害剤（DNase inhibitor）、変形剤（defoaming agent）、トリトンＸ－１００（Triton X-I00）、ドデシル硫酸ナトリウム（Sodium Dodecyl Sulfate）、ＤＭＳＯのような界面活性剤及び／またはシリカまたはアルミナのような研磨粒子が挙げられる。

【００１２】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、液化処理前、液化処理中または液化処理後に対象の組織を評価する。いくつかの実施の形態では、評価は、電気化学的、生化学的、または光学的手段により実行される。いくつかの実施の形態では、評価には、組織の導電率の測定が含まれる。典型的な実施の形態においては、導電率は、対象となる組織に交流電気信号を印加する手段により計測される。この電気信号は、０．１ｍＶと１０Ｖの間の電圧及び１Ｈｚと１００ｋＨｚの間の周波数を有している。

【００１３】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、疾病マーカー（disease marker）のような、対象となる分析物の分析の前に液化組織サンプル中の特定の組織成分を検出することを含む。いくつかの実施の形態では、検出は、電気化学的、生化学的または光学的手段によって実行される。いくつかの実施の形態では、検出の電気化学的手段は、イオン選択電極である。いくつかの実施の形態では、検出の光学的手段は、溶液の吸収係数または散乱係数の測定である。

【００１４】

いくつかの実施の形態では、エネルギーは、０．１と５０の間のメカイカルインデックス（mechanical index）を有する超音波の形態で組織に付与される。いくつかの実施の形態では、エネルギーは、移動研磨面に組織を接触させることにより組織に付与される。いくつかの実施の形態では、エネルギーは、複数の剛毛(bristles)を有する移動ブラシ装置（brushing device）に組織を接触させることにより組織に付与される。いくつかの実施の形態では、エネルギーは、複数のマイクロニードル（micro-needles）を有するパッチを組織内に機械的な挿入及びマイクロニードルを通じた組織内への液化媒体の注入により組織に付与される。いくつかの実施の形態では、組織内への挿入後のマイクロニードルの移動により付与される。いくつかの実施の形態では、エネルギーは、液化剤の機械的攪拌（mechanized stirring）により組織に付与される。いくつかの実施の形態では、エネルギーは、組織を液化促進媒体を含む高速噴流に接触させることにより組織に付与される。

液化促進媒体は、異なる実施の形態では、研磨粒子を含むことができる。

【００１５】

いくつかの実施の形態では、組織には、胸（breast）、前立腺（prostate）、目（eye）、膣（vagina）、膀胱（bladder）、爪（nail）、髪（hair）、結腸（colon）、精巣（testicles）または腸（intestine）が含まれる。いくつかの実施の形態では、組織には、皮膚（skin）または粘膜（mucosal membrane）が含まれる。いくつかの実施の形態では、組織には、肺（lung）、脳（brain）、膵臓（pancreas）、肝臓（liver）、心臓（heart）、骨（bone）または大動脈壁（aorta wall）が含まれる。

【００１６】

いくつかの実施の形態では、分析物は、小分子（small molecule）、薬物もしくは薬物代謝物（drug or metabolite thereof）、ポリペプチド（polypeptide）、脂質（lipid）、核酸（nucleic acid）または微生物（microbe）を有している。いくつかの実施の形態では、分析物は、抗体（antibody）、サイトカイン（cytokine）、違法薬物（illicit drug）または癌バイオマーカー（cancer biomarker）を有している。

【００１７】

いくつかの実施の形態では、液化組織サンプルは、コンテナ内に保持され、液体コンテナを一以上の分析装置と一体化することにより分析物プロファイル（alyte profile）が生成される。いくつかの実施の形態では、組織液化装置には、分析物の分析を較正する手段を提供するために較正分析物（calibrator analyte）の濃度を計測する手段が含まれる。

【００１８】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、対象者のアレルギー疾患（allergic disease）の診断が含まれる。デバイスは、液化組織サンプルに、ＩｇＥ抗体及びＩｇＧ抗体、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ１０、ＩＬ－１２、ＩＬ１３、ＩＬ－１６、ＧＭ－ＣＳＦ、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＰ－４、ＣＴＡＣＫ／ＣＣＬ２７、ＩＦＮ－ｇ、ＴＮＦａ、ＣＤ２３、ＣＤ－４０、エオタキシン－２及びＴＡＲＣのようなサイトカイン（cytokines）が存在するか否かを分析する手段を有している。分析は、対象者のアレルギー疾患の診断を容易にする。

【００１９】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、対象者の癌の診断が含まれる。デバイスは、液化組織サンプルに、１以上の癌マーカー（cancer markers）が存在するか否かを分析する手段を有している。分析は、対象者の癌の診断を容易にする。いくつかの実施の形態では、対象と成る組織は、胸（breast）、結腸（colon）、前立腺（prostate）、皮膚（skin）、睾丸（testicle）、腸（intestine）または口（mouth）である。

【００２０】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、対象者の心臓疾患（heart disease）の診断が含まれる。デバイスは、液化組織サンプルに、１以上のコレステロール（cholesterol）、トリグリセリド（triglycerides）、リポタンパク質（lipoproteins）、遊離脂肪酸（free fatty acids）及びセラミド（ceramides）が存在するか否かを分析する手段を有している。分析は、対象者の心臓疾患の診断を容易にする。

【００２１】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、対象者内の違法薬物またはその代謝物（illicit drug, or metabolite thereof）の存在を検出することを含む。デバイスは、液化組織サンプルに、違法薬物またはその代謝物が存在するか否かを分析する手段を有している。分析は、対象者内の違法薬物の検出を提供する。

【００２２】

いくつかの実施の形態では、デバイスは、対象者内の微生物（microorganism）の存在を検出することが含まれる。デバイスは、対象者の対象となる組織にエネルギー及び液化媒体を付与し且つ微生物が存在するか否かを分析するために液化媒体を分析する手段を有している。分析は、微生物の存在の有無の検出を提供する。

【００２３】
本発明の他の目的は、組織の全域または内部への薬剤の移送を容易にするために、対象者の組織を液化するための方法及びデバイスを提供することにある。上記方法及びデバイスは、組織成分の収集だけでなく、薬物送達にも適用することが可能である。デバイス及び方法には、対象者の対象となる組織へのエネルギー及び液化媒体の付与、及び液化される組織の部位を通るまたは部位の内部への薬物の送達が含まれる。本発明を利用する利点は、１）組織内部へ薬物を高流速提供すること、及び２）組織内への流速の優れた制御ができることである。皮膚のような組織を単純に通過することができない薬剤であっても、本発明を適用した場合には、組織を通って押し出される。
【００２４】
いくつかの実施の形態では、本発明は、液化される組織を介して循環系（circulatory system）に１以上の薬物を送達する方法を提供する。この方法は、消化管での分解及び経口または注射で定常的に投与される薬物の肝臓による急速な代謝を回避する。いくつかの実施の形態では、本発明は、対象となる組織に局部的に一以上の薬物を送達する方法及びデバイスを提供する。従って、正常な組織への副作用（side effects）が制限される。本発明の方法及びデバイスはまた、細胞膜（cellular membranes）への移送の増強にも適用することもできる。
【００２５】
特に、本発明のデバイスは、以下の主要部品、１）エネルギー発生器、２）液化促進媒体、３）送達される薬剤を保持し、及び／または液化組織サンプルを収集するリザーバーにより構成される。
【００２６】
投与される薬物は、組織液化処理前または処理中に液化媒体内に添加することができる。代わりの実施の形態では、エネルギーの付与は、組織の液化に使用できない薬物を含まない液化媒体と、続いて液化される組織の部位に適用することができるパッチのような適切なキャリア内の薬物との組合せである。
【００２７】
組織内への薬物の移送は、化学的透過性または輸送エンハンサー（chemical permeability or transport enhancers）、対流（convection）、浸透圧勾配（osmotic pressure gradient）、濃度勾配（concentration gradient）、イオントフォレーゼ（iontophoresis）、エレクトロポレーション（electroporation）、磁場（magnetic field）、超音波（ultrasound）または機械的圧力（mechanical pressure）のような第２の駆動力を同時にまたは続けて付与することによりさらに高めることができる。駆動力は、ある期間に渡って連続的に付与してもよく、液化の期間中間隔を開けて付与してもよい。
【００２８】
いくつかの実施の形態では、投与される組織には、生体表面（biological surfaces）と同様に器官（organs）が含まれる。いくつかの実施の形態では、生体表面には、生体膜（biological membrane）及び細胞膜（cellular membrane）が含まれる。いくつかの実施の形態では、生体膜には、皮膚または粘膜が含まれる。いくつかの実施の形態では、生体膜には、頬粘膜、膣、結腸または腸が含まれる。いくつかの実施の形態では、組織には、病変組織（diseased tissue）が含まれる。
【００２９】
一実施の形態では、液化サンプルを得るために組織で使用されるデバイスであって、組織に操作可能に連結されたエネルギー源と、組織に操作可能に連結されて組織への液化促進媒体の送達及び／または組織から液化サンプルを収集可能なチャンバー（chamber)とを備えるデバイスが提供される。
【００３０】
他の実施の形態では、デバイスは、生体（living organism）の一部の組織で使用することができ、組織は、診断の前に生体（organism）から切り出される。
【００３１】

他の実施の形態では、請求項１のデバイスで、液化組織サンプルは、少なくとも一つの分析物の有無を監視するためのアッセイ（assay）に移送される。

【００３２】

さらに他の実施の形態では、デバイスのチャンバーは、スポンジ－ベローアセンブリ（sponge-bellow assembly）であり、スポンジは、液化促進媒体及び／または液化サンプルを貯蔵可能である。

【００３３】

他の実施の形態においては、デバイスは、組織に操作可能に連結されたエネルギー源と、組織に操作可能に連結されて組織への液化促進媒体の送達及び／または組織からの液化サンプルの収集が可能なチャンバーとを備え、またチャンバーに接続されるチューブ／ニードル（tube/needle）を備え、チューブ／ニードルは、組織への液化促進媒体の送達及び／または組織からの液化組織サンプルの吸い出しが可能である。

【００３４】

さらに他の実施の形態では、組織に操作可能に連結されたエネルギー源と、組織に操作可能に連結されて組織への液化促進媒体の送達及び／または組織からの液化サンプルの収集が可能なチャンバーとを備え、チャンバーに操作可能に接続されたサンプルコンテナ（sample container）を備えたデバイスが提供される。サンプルコンテナは、分析物を保持する吸い出された液化組織サンプルの貯蔵（storing）または吸い出された（aspirated）液化組織サンプルの補助チャンバー（ancillary chamber）への移送が可能である。チャンバーは、液化促進媒体が移送されるためのみに使用される。

【００３５】

他の実施の形態では、液化促進媒体及び／または液化組織サンプルの移送を容易にする加圧コンテナ及び／または真空コンテナがデバイスの一部である。

【００３６】

一実施の形態では、デバイスのエネルギー源から放出されるエネルギーは、超音波エネルギー、機械的エネルギー、光学的エネルギー、熱的エネルギーまたは電気的エネルギーの形である。詳細な実施の形態では、機械エネルギーは、研磨材、真空力、圧力または剪断力によって組織に付与される。他の実施の形態では、熱エネルギーは、高周波エネルギーの形で組織に付与される。他の実施の形態では、光学的エネルギーは、レーザの形で組織に付与される。

【００３７】

さらに他の実施の形態では、組織に操作可能に連結されたエネルギー源と、組織に操作可能に連結されて組織への液化促進媒体の送達及び／または組織からの液化サンプルの収集が可能なチャンバーとを備え、チャンバーに操作可能に接続されたサンプルコンテナ（sample container）を備えたデバイスが提供される。サンプルコンテナは、分析物を保持する吸い出された液化組織サンプルの貯蔵（storing）または吸い出された（aspirated）液化組織サンプルの補助チャンバー（ancillary chamber）への移送が可能である。チャンバーは、液化促進媒体が移送されるためのみに使用される。

【００３８】

他の実施の形態では、組織に操作可能に連結されたエネルギー源と、組織に操作可能に連結されて組織への液化促進媒体の送達及び／または組織からの液化サンプルの収集が可能なチャンバーとを備えるデバイスが提供される。エネルギー源は、シャフトに接続されたパッドを備えている。

【００３９】

より詳細な実施の形態では、シャフトは、接触状態で所定の圧力プロファイル（pressure profile）を組織上に維持する圧力検出ユニットを有している。

【００４０】

他の実施の形態では、パッドは、複数のマイクロニードルを有するパッチ（patch）及び研磨面（abrasive surface）よりなる群から選択される。

【００４１】

さらに他の実施の形態では、デバイスは、チャンバーの頂部に操作可能に接続されたプランジャーをさらに有する。

【００４２】

他の実施の形態では、デバイスは、上部ユニットと下部ユニットとに分割可能であり、下部ユニットは、上部ユニットから取り外し可能であり、上部ユニットはエネルギー源を備え、下部ユニットはチャンバーを備える。

【００４３】

さらに他の実施の形態では、デバイスは、チャンバーに操作可能に接続された分析ユニットをさらに備えている。分析ユニットは、電気化学的、生化学的または光学的手段により組織サンプルの時間的監視を実行可能であるか、または分析ユニットは、液化組織サンプル中の分析物を分析することが可能である。

【００４４】

いくつかの実施の形態においては、デバイスは診断プローブ（diagnostic probe）またはカテーテル（catheter）と接続されている。診断プローブは、内視鏡（endoscope）、結腸鏡（colonoscope）及び腹腔鏡（laparoscope）よりなる群から選択される。

【００４５】

さらに他の実施の形態においては、デバイスの使用により、組織サンプルは生体内原位置(in situ)で液化される。

【００４６】

他の実施の形態においては、デバイスは、タンパク質、脂質及び核酸の検出を維持及び向上させる液化促進媒体を含んでいる。液化促進媒体には、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＰＳ）及びポリエチレングリコールドデシルエーテル（polyethylene glycol dodecyl ether）（Ｂｒｉｊ３０）を緩衝液に溶解したものが含まれる。３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）及びポリエチレングリコールドデシルエーテル （polyethylene glycol dodecyl ether ）（Ｂｒｉｊ３０）の濃度は、０．０１乃至１０％（ｗ／ｖ）の間であり、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）及びポリエチレングリコールドデシルエーテル（polyethylene glycol dodecyl ether）は、５０：５０の比で存在している。

【００４７】

さらに他の実施の形態においては、デバイス内の液化促進媒体は、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline）、トリス緩衝生理食塩水（Tris-buffered saline）、トリス－ＨＣｌ（Tris-HCL）、ＥＤＴＡのいずれかを有する緩衝液である。

【００４８】

他の実施の形態においては、デバイス内の液化促進媒体は、ブリジ系界面活性剤（Brij series surfactant）、トリトン－Ｘ界面活性剤（Triton-X surfactant）及びソルビタン界面活性剤（Sorbitan surfactant）よりなる群から選択される非イオン界面活性剤と、陰イオン界面活性剤または両性イオン界面活性剤と、親水性溶媒とを備えている。液化促進媒体は、約０．０１％乃至１０％（ｗ／ｖ）の合計濃度の界面活性剤を有している。

【００４９】

本発明のこれらの及び他の特徴は、以下に十分に説明するように組織に基づいた診断のためのシステム、方法及びデバイスの詳細を読んだ当業者に明らかになるであろう。

【００５０】

本発明は、以下の詳細な説明を添付図面と合わせ読めば最もよく理解される。一般の慣行に従って、図面の様々な形状は原寸に比例していないことを強調しておく。そうではなく、見やすいように、様々な形状の寸法は任意に拡大縮小されている。以下の図が図面に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００５１】

【図１ａ－１ｃ】パネルａ－ｇは、種々の研磨エネルギーに基づいた組織液化デバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。パネルａ－ｃ及びパネルｅ－ｇは、２つの分離された液化デバイスの一連の動作を示している。
【図１ｄ】パネルａ－ｇは、種々の研磨エネルギーに基づいた組織液化デバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。パネルｄは、研磨ヘッドを支持する圧力検知電動シャフトを概略的に示す図である。
【図１ｅ－１ｇ】パネルａ－ｇは、種々の研磨エネルギーに基づいた組織液化デバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。パネルａ－ｃ及びパネルｅ－ｇは、２つの分離された液化デバイスの一連の動作を示している。
【図２】パネルａ－ｂは、組織の広い領域から連続的にサンプリングする移動可能な組織液化デバイスの断面図である。
【図３ａ】パネルａは、種々の垂直研磨動作に基づいて組織を液化するデバイスの構造及び部品の断面図である。
【図３ｂ】パネルｂは、種々の垂直研磨動作に基づいて組織を液化するデバイスの構造及び部品の断面図である。
【図３ｃ】パネルｃは、種々の垂直研磨動作に基づいて組織を液化するデバイスの構造及び部品の断面図である。ギアを保持する圧力検知支持シャフトの概略を示す図である。
【図４】パネルａ－ｇは種々タイプの研磨ヘッドの断面図である。
【図５】パネルａ－ｄはデバイスの断面図及び組織の導電性の計測の概略を示す図である。
【図６ａ】パネルａは、種々のマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。
【図６ｂ－６ｃ】パネルｂ及びｃは、種々のマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。
【図６ｄ】パネルｄは、種々のマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。
【図６ｅ】パネルｅは、種々のマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。
【図６ｆ】パネルｆは、種々のマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。
【図６ｇ】パネルｇは、種々のマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能を示す断面図である。
【図７ａ】パネルａ－ｅは典型的な研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスの断面図である。パネルａはデバイスの種々のアセンブリ部品を示している。
【図７ｂ】パネルａ－ｅは典型的な研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスの断面図である。パネルｂは、一連の動作ステップのうち、組織と接触するように配置された液化媒体の移送を示している。
【図７ｃ】パネルａ－ｅは典型的な研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスの断面図である。パネルｃは、一連の動作ステップのうち、組織と接触するように配置された液化媒体の移送、及び、液化によるサンプルの生成を示している。
【図７ｄ】パネルａ－ｅは典型的な研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスの断面図である。パネルｄは、一連の動作ステップのうち、コンテナ内へのサンプルの収集を示している。
【図７ｅ】パネルａ－ｅは典型的な研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスの断面図である。パネルｅは液化後のデバイスからのサンプルコンテナの復帰を示す図である。
【図８】パネルａ－ｄは、典型的なマイクロニードルに基づく組織液化デバイスの一連の動作ステップを示す断面図である。パネルａ－ｂは組織に接触するように配置された液化媒体の移送を示しており、パネルｃは液化によるサンプルの生成を示しており、パネルｄはコンテナ内へのサンプルの収集を示している。

【図９】パネルａ－ｄは、サンプルコンテナを示す図である。パネルａ－ｄは、生成したサンプルの移送及び／または分析を一連の動作ステップを示す。パネルａは、対象となる分析物に選択的に結合された基質がコンテナの内周面で覆われた図である。組織の液化したサンプル内の分析物は、コートされた基質により選択的に捕捉される（パネルｂ）。組織サンプルが十分に培養されるとサンプルは分析物がコンテナ内に保持されている間に廃棄される（パネルｃ）。分析物は次の分析のために緩衝液により溶出される（パネルｄ）。

【図１０】ＬＭＰｓの特有の界面活性剤配合物を特定するためのスクリーニング方法を示す図である。パネルａは、１５０の界面活性剤配合物を、タンパク質の生物活性を維持する能力で並べている。パネルｂは、パネルａから最もよい配合を組織可溶化能力で並べている。パネルｃは完全なスクリーニングから最も良いＬＰＭ－０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂｒｉｊ３０と他の従来の界面活性剤との皮膚組織からの機能性タンパク質を収集する能力を比較している。

【図１１】超音波曝露の機械的ストレス下での種々のタンパク質（ＩｇＥ－パネルａ：ＩｇＥ、ＬＤＨ及びＢ－ゲル－パネルｂ）の生物活性のＬＰＭ支援維持を示すグラフである。

【図１２】組織から種々の機能性疾病バイオマーカー（ＩｇＥ－パネルａ、コレステロール－パネルｂ、バクテリア－パネルｃ）をサンプルしてＬＰＭ（０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０の生理食塩水）の存在下での超音波曝露したものの能力結果を示すグラフである。

【図１３】ＬＰＭ中の緩衝液と定量ＰＣＲとの適合性の示すグラフである。

【図１４】界面活性剤混合物と定量ＰＣＲとの適合性の効果を示すグラフである。

【図１５】Ｅ．Ｃｏｌｉ生存能力への超音波の濃度及び時間の効果を示すグラフである。サンプルは、１．７Ｗ／ｃｍ^2（●）及び２．４Ｗ／ｃｍ^2（■）の濃度で超音波に曝露された。各点は、３つの独立したサンプルの平均値を示す。

【図１６】トリス－ＨＣｌ中のＥ．Ｃｏｌｉセルから異なる条件で超音波処理して得たゲノムＤＮＡについてのアガロースゲル－電気泳動の写真である。レーン１は標準分子、レーン２は非処理セル、レーン３は１．７Ｗ／ｃｍ^{2}で２分超音波処理、レーン４は１．７Ｗ／ｃｍ^{2}で３分超音波処理、レーン５は２．４Ｗ／ｃｍ^{2}で３分超音波処理したものである。

【図１７】トリス－ＨＣｌと結合した超音波、スワビング及び界面活性剤スクラブ手法によってサンプルされたバクテリアの数を示すグラフであり、（ａ）は培養試験、（ｂ）は量的ＰＣＲにより測定した。各点は、５つの独立したサンプルの平均値を示す。

【図１８】モデル分析物－ヒトＩｇＥ抗体（human IgE antibody）の検出を高めるためにＬＰＭ中に種々の感度エンハンサーを追加する効果を示すグラフである。分析に使用した感度エンハンサーは、１０％ｗ／ｖＢＳＡ及び０．５％ｗ／ｖＴｗｅｅｎ２０の混合物を含むリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline）（ＰＢＳ）（白抜きのダイヤモンド形）、及び１０％ｗ／ｖのＢＳＡ及び０．５＆ｗ／ｖのＴｗｅｅｎ２０をの混合物含むトリス緩衝生理食塩水（tris-buffered saline）（黒い丸）である。分析の前に、各感度エンハンサーを１：１０の比でモデル分析物を含むＬＰＭで希釈した。制御のために、モデル分析物を含むＬＰＭ（白抜きの四角）、及び１％ＢＳＡ及び０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０の混合物を含むトリス緩衝生理食塩水からなり一般的に使用される分析溶剤（黒い四角）が使用された。ＬＰＭは、ＮＬＳとＢｒｉｊ３０との１％ｗ／ｖ混合物を含むＰＢＳ溶液からなる。 エラーバーは、標準偏差を示す。

【図１９】パネルａは超音波を付与した後、パネルｂは複数の毛を有で研磨した後、インビトロでのブタの皮膚中へのイヌリン及びアシクロビルの送達を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００５２】

［定義］

本明細書で使用する「エネルギー（Energy）」とは、本明細書で開示する方法の目的（

例えば組織の液化）を行うために組織に付与することができる適当なエネルギーを意味する。典型的なエネルギーのタイプには、機械的エネルギー（例えば摩耗、剪断、真空、加圧、吸引）、超音波エネルギー、光学的エネルギー（例えばレーザー）、磁力的エネルギー、熱的エネルギー、電気的エネルギーが含まれる。

【００５３】

本明細書において使用する「分析物（analyte）」とは、生体分子（biomolecule）（例えばポリペプチド（polypeptide）、核酸（nucleic acid）、脂質（lipid）等）、薬物（drug）（例えば治療薬物（therapeutic drugs）、乱用薬物等（drugs-of-abuse））、小分子（small molecule ）（小分子は薬物でもあるという理解の下で例えば天然保湿因子（natural moisturizing factors）、ニコチン等）、兵器剤（warfare agent）、環境汚染物質（environmental contaminant）（例えば農薬（pesticides）等）、微生物（microbe）（例えばバクテリア、ウイルス、真菌（fungus）、酵母菌（yeast）等）及び組織内または組織上に存在し、対象とする組織（例えば皮膚、粘膜等）から抽出可能であるとともに、検出、分析及び／または定量化可能なものを意味する。

【００５４】

「液化（liquefaction）」とは、組織及び／または組織成分を、十分なエネルギー、追加的には液化促進媒体への曝露を通じて十分な溶解状態に変換する処理の説明に使用し、対象とする組織構造の少なくとも一部の液体状態への変換を含むことができる。液化組織サンプルは、本明細書では「液化（liquefed）」サンプルとして言及することがある。

【００５５】

「液化促進媒体（liquefaction-promoting agent）（ＬＰＭ）」とは、一以上の組織成分の可溶化を容易にする、エネルギーに曝露された場合に組織構造の少なくとも一部を液体に変換することを容易にする、及び／または、一以上の可溶化した組織成分の生物活性の維持を容易にする物質の説明に使用される。

【００５６】

「液化促進剤（liquefaction-promoting agent）（ＬＰＡ）」とは、液化促進媒体の成分、詳細には一以上の組織成分の少なくとも可溶化及び／または生物活性（bioactivity）の維持、及び／または、次の診断分析を促進する薬剤の説明に使用される。

【００５７】

本明細書で使用する「キャリブレーション分析物（calibration analyte）」とは、対象となる組織内に既知濃度で天然的に存在する分子を意味する。「キャリブレーション分析物」は、（例えば液化が所望の程度まで達成されることを確実にする正の制御（positive control）のような）参照分析物として機能する。

【００５８】

本明細書で使用する「生体分子（biomolecule）」とは、生物学的起点または機能（biological origin or function）を有する適当な分子またはイオンを意味する。限定されない生体分子の例には、タンパク質（proteins）（例えば癌バイオマーカー（cancer biomarkers）のような疾病バイオマーカー（disease biomarkers）、抗体（antibodies）：ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、またはＩｇＭ、等）、ペプチド（peptides）、脂質（lipids）（例えばコレステロール（cholesterol）、セラミド（cholesterol）、または脂肪酸（fatty acids））、核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ）、小分子（small molecule）（例えばグルコース、尿素、クレアチン（creatine））、小分子薬物（small molecule drugs）またはこの代謝物、微生物、無機分子、元素またはイオン（例えば鉄、Ca^{2+}、K^{+}、Na^{+}等）が含まれる。いくつかの実施の形態では、生体分子は、グルコース以外であり、及び／または癌マーカー以外である。

【００５９】

「乱用薬物（abused drug）」または「薬物の乱用（drug-of-abuse）」または「違法薬物（illicit drug）」という語は、本明細書では同じ意味で使用され、人間組織内に存在すること及び／または人間組織内にあるレベルを超えて存在することが違法であるまたは人間に有害であるとして政府によって規制（例えば連邦政府または州による規制）される

物質について言及するために交互に使用される。乱用薬物の例には、コカイン（cocaine）、ヘロイン（heroin）、メチルアンフェタミン（methyl amphetamine）及び投薬量を超えた処方薬の服用または処方箋のない処方薬の服用（例えばオピオイド（opioids）のような鎮痛剤（painkillers））が含まれる。

【００６０】

本明細書で使用する「兵器剤（warfare agent）」とは、兵器として使用することが可能な生物または化学由来の分子、化合物または合成物について言及するために使用される。兵器剤の例には、神経ガス（nerve gases）（例えばＶＸ、サリン）、ホスゲン（phosgene）、トキシン、胞子（spores）（例えば炭疽菌（anthrax））等が含まれる。

【００６１】

本明細書で使用する「環境汚染物質（environmental contaminant）」には、例えば危険閾値（risk threshold）を超える高い濃度の場合に個人に有害である分子、化合物または合成物が含まれる。例としては、水質汚染物質（water pollutants）（例えば肥料、農薬、殺菌剤、殺虫剤、除草剤、重金属、ハロゲン）、土壌汚染物質（soil pollutants）（例えば、肥料、農薬、殺菌剤、殺虫剤、除草剤、重金属、ハロゲン）、大気汚染物質（air pollutants）（例えばNO_X、SO_X、温室効果ガス、残留性有機汚染物質（persistent organic pollutants）（ＰＯＰｓ）、粒状物質（particulate matter）、スモッグ）が含まれる。

【００６２】

本明細書で使用する「汚染除去（decontamination）」には、個人に有害である無用なまたは不要（unwanted or undesired）な分子、化合物または合成物の組織からの除去が含まれる。例としては、（上述の定義のような）環境汚染物質、有毒化学物質及（toxic chemicals）び生体毒素（biological toxins）が含まれる。

【００６３】

本明細書で使用する「天然保湿成分（natural moisturizing factor）（ＮＭＦｓ）」とは、フィラグリン（fillagrin）の誘導体である遊離アミノ酸（free amino acids）、乳酸塩（lactate）及び尿素を含むがこれらに限定されない数種類のタイプの小分子（small molecules）の一つを意味するものである。ＮＭＦｓは、一般的な皮膚の健康（例えば乾燥肌（dry skin）、ぱさぱさの肌（flaky skin）、通常の肌等）の評価を容易にする分析物として使用することができる。本明細書で使用する「メカニカルインデックス（mechanical index）」とは、超音波音場（ultrasonic field）における負圧のピークの振幅と超音波周波数の平方根との比を意味するものである（メカニカルインデックス＝（圧力（ＭＰａ））／（周波数（ＭＨｚ）Λ０．５）。

【００６４】

本明細書で使用する「薬物送達（drug delivery）」とは、一以上の薬物の血液、リンパ液（lymph）、間質液（interstitial fluid）、細胞または組織の内部への送達を意味するものである。

【００６５】

本明細書で使用する「感度エンハンサー（sensitivity enhancer）」とは、液化した組織の分析物を安定化するためにＬＰＭと混合された物質または物質の混合物を意味するものであり、診断分析試験（diagnostic analytical tests）の感度及び特異性（sensitivity and specificity）を高めてその分析を容易にする。

【００６６】

「遮断試薬（blocking reagent）」とは、診断分析で使用される基質（substrates）との分析物の非特異性結合（non specific binding）の防止に使用される成分の説明に使用される。

【００６７】

本発明及び本発明の具体的な典型的な実施の形態について説明する前に、本発明は説明する特定の実施の形態に限定されず、当然に、変更できるものとして、理解されるべきである。また、本明細書で用いられている専門用語は、特定の実施形態のみを記載するため

に用いられているのであって、限定を意図していないことを理解されたい。なお、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【００６８】

値の範囲を提供する場合、別段の定めがない限り、その範囲の上限及び下限の間に入る各値は、下限の単位の１０分の１まで、特に開示されていると理解される。記載されているあらゆる値又は記載されている範囲内にある値と、記載されているその他のあらゆる値又はその記載されている範囲内にある値との間の範囲は、本発明に含まれる。記載されている範囲において特に除外されているすべての限界に制限されることを条件に、これらのより小さい範囲の上限及び下限は、範囲に独立して含まれていてもよいし又は除外されていてもよく、そのより小さい範囲に限界のいずれか若しくは両方が含まれているか又はいずれも含まれていない各範囲も本発明に含まれる。記載されている範囲が１つ又は両方の限界を含む場合、含まれているこれらの限界のいずれか又は両方を除外する範囲も本発明に含まれる。

【００６９】

別段の定めがない限り、本明細書で用いられている技術用語及び科学用語のすべては、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施又は試験においては、本明細書に記載されているものに類似の又は均等なあらゆる方法及び材料も用いることができるが、有力な好ましい方法及び材料を以下に記載する。本明細書で言及されている刊行物のすべては、参照することによって本明細書に組み込まれており、引用されているその刊行物が関連する方法及び／又は材料を説明している。矛盾が存在する範囲については、組み込まれている刊行物のあらゆる開示よりも本開示が優先することは理解されるであろう。

【００７０】

本明細書内および添付の特許請求の範囲の中で用いられるような、単数形の形式である「１つ（ａ）」、「１つ（ａｎ）」および「その（ｔｈｅ）」が、本文が反対のことを明確に要求しない限り、複数の参照を含むことは留意されたい。従って、例えば、「一つの組織」への参照は、このような組織の複数を含むものであり、「その液体」への参照は、一以上の液体への参照を含むものであり、以下同様である。特許請求の範囲が、任意の選択的な要素を排除するために書かれていることもさらに留意されたい。したがって、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙と関連して、「単に」、「唯一の」などのような排他的専門用語を使用するための、または「消極的な」限定を使用するための前提として働くように意図される。

【００７１】

本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前の刊行物の開示のためにのみ提供され、本発明が先行発明を理由として前記開示に先行しないと解されるべきではない。さらに、提供された刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、独立して確認する必要がある場合もある。

【００７２】

本発明は、組織成分（例えば数種類の生体分子、薬物及び微生物－組織成分が意味するものを形式的に定義した段落を参照するとよい）の一部とすることができる分析物の定性的及び／または定量的検出及び迅速な組織のサンプリングを提供するように、対象の組織にエネルギーを付与して組織成分を有する液化サンプルを生成することを含むシステム、方法およびデバイス及びこのシステム、方法及びデバイスに有効な組成を提供する。組織組成及び成分の決定は、局部の病気及び全身病の診断及び予後診断、薬物投与の後の異なる組織の治療の生物学的利用能の評価、薬物乱用の法医検出、有害物への曝露後の組織微小環境の変化の評価、組織の汚染除去及び様々な他の用途を含む種々の用途で使用することができる。

【００７３】

本発明の他の目的は、組織を通るまたは組織内への分子の通過を容易にするために対象者の組織を液化する方法及びデバイスを提供することである。上述した方法及びデバイス

は、組織成分の収集だけでなく、薬物送達にも適用することができる。デバイス及び方法には、エネルギー及び液化媒体を対象者の対象となる組織に付与すること及び液化する組織の部位を通ってまたは内部に薬物を送達することが含まれる。本発明を使用する利点は、１）組織の内部へ薬物を高速提供できる。２）組織への流速を大きく制御することができる。皮膚または循環システムの内部のような組織を単純に通過することができない薬物であっても、本発明の方法を適用すれば、組織を通って押し出される。

【００７４】

本発明は人間への適用に関連して説明することができるが、獣医学への適用が本発明の意図及び範囲に含まれる。

【００７５】

［組織診断］

［エネルギー付与装置］

本明細書で開示する組織液化装置（tissue liquefaction devices）は一般的に、リザーバーユニット／ハウジング（reservoir unit/housing）と操作可能に連結されたエネルギー源／発生器（energy sorce /generator）を有するものとして説明される。リザーバーユニット／ハウジングは、分析物が収集される媒体（medium）を収容する。媒体は、多くの実施の形態においては対象とする組織にエネルギーを伝達することを容易にするので、所望の場合には、組織サンプルの液化を容易にする。使用時にリザーバーハウジングは、対象者の対象とする組織と接触するように配置されて、媒体と組織との間の接触を形成する。そしてエネルギー源が作動する。デバイスは、追加のエネルギー源（例えば研磨アクチュエータ、圧電変換器、吸引または加圧）と操作可能に連結することができる。追加のエネルギー源もまた、組織へのエネルギーの伝達を容易にするために、組織にエネルギーを付与することができる。組織にエネルギーが付与されると、組織の成分はエネルギーにより可溶化して、媒体内に収集される。媒体は、リザーバーハウジング内に保持することができる。代わりに、媒体を分離コンテナ（separate container）に移送してもよい。リザーバーハウジングまたはコンテナは、検出装置に操作可能に連結することができる。検出装置は、媒体中に存在する組織成分を定量的に測定することができる。

【００７６】

エネルギーは、一つのエネルギー源から、またはエネルギー源の組合せとして組織に付与することができる。典型的なエネルギー源には、機械的（例えば研磨、剪断、真空、加圧等）、圧電変換器、超音波、光学的（例えばレーザー）、熱的及び電気的エネルギーが含まれる。付与するエネルギーの強度は、エネルギーを付与する時間と同様に、対象とする個々の組織及び個々の方法の適用ごとに適宜に調整することができる。付与するエネルギーの強度及び時間もまた、エネルギーと関連して使用される個々の液化促進媒体（ＬＰＭ）に基づいて適宜に調整することができる。いくつかの実施の形態では、適当な組織の液化したサンプルを製造するために、エネルギー曝露時間（energy exposure time）は、１分より長い、９０秒より長いまたは２分より長い。エネルギーの大きさは、対象とする分析物及びＬＰＭの選択に依存する。ＬＰＭ中に界面活性剤または粒子が存在しない場合には、組織の液化に高エネルギーが必要となる。高エネルギーの使用は、組織及びその構成成分への悪影響により制限される。重大な悪影響は、有害な組織損傷（injurious tissue damage）である。それ故、いくつかの実施の形態では、エネルギー曝露の安全限界に達したときにデバイスを停止することができるように、組織特性（tissue properties）の変化または組織の液化の範囲（extent）の時間的監視（理想的にはリアルタイムで）をするためのいくつかのデバイス部品を組み込む必要がある。時間的評価は、組織の液化前、液化中及び液化後に行うことができる。いくつかの実施の形態では、時間的評価は、電気化学的（例えば組織の導電率（electrical conductivity）、イオン選択電極によるいくつかのイオンの計測）、生化学的（例えばＥＬＩＳＡのような酵素アッセイ（enzymatic assays）により、ＬＰＮ中のいくつかの組織組成の計測等）、または光学的（例えば分光光度計によるＬＰＭ混濁度（LPM turbidity）の計測）手段により行うことができる。典型的な実施の形態では、組織の時間的導電率は、信号発生器により組織に予め定められ

た交流電圧を印加し、結果として流れる電流をマルチメーターで分析することにより測定される。高エネルギーへの曝露の他の重大な悪影響は、組織の温度上昇に起因し、熱的効果として知られている。それ故、いくつかの実施の形態では、組織及び／またはＬＰＭの温度を監視することができる温度検知素子（例えば熱電対（thermocouple））を組み込んで、組織のエネルギー曝露の安全量の判定を容易にする必要がある。

【００７７】

必要なエネルギーレベルは、ＬＰＭの適切な選択により大きく下げることができる。例えば、超音波と一緒に食塩水（saline）のみを使用すると、皮膚１平方センチメートル（cm^2）当たり０．１ｍｇよりも低い回収の結果となる。一方、ＬＰＭ中に１％ｗ／ｖの濃度でＤＰＳ、ＮＬＳ及びＢｒｉｊ－３０のような界面活性剤を組み込むと、皮膚１平方センチメートル当たり０．６ｍｇよりも高い回収の結果となる。

【００７８】

いくつかの実施の形態では、組織を液化するためのエネルギーの使用は、可溶化した組織成分の生物活性（biological activity）を減少させるので、組織の可溶化及び組織分子の生物活性（bioactivity）を適切に維持するＬＰＭの選択を必要とする。例えば、ＬＰＭ中に１％ｗ／ｖの濃度でＤＰＳ、ＮＬＳ及びＢｒｉｊ－３０のような一以上の界面活性剤を組み込むと、超音波エネルギーの曝露下で可溶化したタンパク質及び核酸の生物活性の完全な維持が容易となる。

【００７９】

いくつかの実施の形態では、エネルギーは、エネルギー発生エレメント（energy producing element）を有するエネルギー送達チャンバー（delivery chamber）を使用して組織に付与することができる。チャンバーは、組織上に置かれると、組織をエネルギー発生エレメントに曝露して、最小限の干渉で組織にエネルギーを付与することができる。このようなチャンバーは、ＬＰＭを含むことができるとともに、エネルギーが付与されたときに、組織成分が溶液内に直接収集されるようにＬＰＭを組織と接触させることができる。

【００８０】

いくつかの実施の形態では、ＬＰＭを含むエネルギー送達チャンバーは、ＬＰＭ中に存在することができる分析物の検出、追加的には定量化のための診断装置、例えば分析センサー（analyte sensor）を備えることができる。これらの診断装置は、化学センサー、バイオセンサーとして機能することができ、また完全なサンプル及び測定システムを形成する他の測定器を提供することができる。流体輸送の内部チャンネル（internal channel）を有する部材は、使い捨てユニットを形成するようにセンサーと一緒に製造することができる。デバイスは、分析のためにＬＰＭ中の分析物を収集する使い捨てユニットを含むように構成または使い捨てユニットとして提供することができる。

【００８１】

代わりに、診断部は、他の場所（例えばエネルギー装置から分離した場所）に配置することができる。組織と接触するエネルギー送達チャンバーの内容物は、機械力、毛管力（capillary forces）、超音波，真空または電気浸透力（electroosmotic forces）を使用して検出チャンバー内に送り出されて分析される。

【００８２】

いくつかの実施の形態では、例えば、局所製剤（topical formulations）の評価または薬理的パラメータ（pharmacological parameters）の決定の場合に、ユニットは、薬物送達手段（drug delivery means）、分析物回収手段（analyte recovery means）、分析物を測定する検出手段及び薬物送達手段に信号を与える制御手段を備える閉ループ薬物送達(closed loop drug delivery)として機能するように構成することができる。

【００８３】

エネルギーが補助される分析物装置の一般的な操作の一例をここに説明する。携帯型の使い捨て可能なユニットを、携帯型または卓上型エネルギー発生器内に挿入する。エネルギー発生器は、組織の抵抗測定、分析物の濃度測定及び分析物の濃度測定の表示用の電気回路を備えている。システム（例えばエネルギー付与器または使い捨てユニット）は、組

織に寄せて配置され、エネルギーは、一定期間、単独でまたは他の物理的、機械的、電気的及び化学的力とともに付与される。対象となる組織は液化され、液化した組織からの分析物が使い捨てユニット内に収集されて、適切な試験を使用して測定される。

【００８４】

本発明の好ましい実施の形態及びその利点は、図１乃至１９の図面を参照することによりもっともよく理解される。これらの図の同じまたは対応する部材には、同じ符号が使用されている。

【００８５】

図１ａ乃至図１ｇを参照すると、研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスの構造、部品及び機能が示されている。図１ａ乃至図１ｃには、液化のための組織にエネルギーを付与する手段として回転研磨部材１０１を利用するデバイスの一連の動作が示されている。液化は、研磨部材１０１を対象となる組織１０７に寄せて動作させることにより達成される。研磨部材１０１は、シャフト１０２に取り付けられており、シャフト１０２はデバイスの回転モータ１０３にさらに接続されている。いくつかの実施の形態では、シャフト１０２は、研磨部材１０によって組織１０７に付与される圧力を検知して制御するように設計されている。典型的な実施の形態では、シャフト１０２は、圧力検知ばね１０２３（図１ｄ）により互いに接続されるシャフト１０２１及びシャフト１０２２により構成されている（図１ｄ）。他の実施の形態では、シャフト１０２１及びシャフト１０２２は、組織１０７に付与される圧力を監視及び制御するための圧力検知圧電結晶をそれらの間に挟んでいる。バッテリーパック１０４は、モータ１０３に電力を供給して、デバイスのオペレータにより指示された場合には、その後に研磨部材１０１を回転動作させる。液化の前に、研磨部材１０１は、ハウジング１０５、より詳細には、ハウジング１０５の基部に配置された薄いシート１０６を使用して組織１０７に対して分離するように設計することができる（図１ａ）。液化が開始されると、カートリッジ１０８に貯蔵されたＬＰＭは、ハウジング１０５に移送され（図１ａ）、すぐにＬＰＭはシート材料１０６の表面と接触し、続けて研磨部材１０１をシート１０６に対して作動させる。シート１０６の材料は、研磨部材１０１によってすぐに摩耗し、ＬＰＭ及び研磨部材１０１が組織１０７と接触して組織を液化できるように選択される（図１ｂ）。シート１０６の限定されない例には、紙のシート、ラバーシート、金属箔、プラスチックシートまたは水溶性シートが含まれる。液化処理が完了すると、モータ１０３が停止し、組織成分を含むＬＰＭは、サンプルコンテナ１１０に移送される（図１ｃ）（図面の修正が必要なので、部材１１０内には液化されていないサンプルは明確に示されていない）。または、ＬＰＭは、予め真空化したコンテナ内に直接移送される（従って吸引ポンプ１０９及びコンテナ１１０の必要性を回避できる）。予め真空化したコンテナがない場合には、サンプルの収集は、吸引ポンプ１０９により容易に行われる。

【００８６】

いくつかの実施の形態では、デバイスの使用後毎に、いくつかのデバイス部品の交換を可能にして無菌で使用できるように、いくつかのデバイス部品は使い捨て可能に設計される。このようなデバイス部品には、ハウジング１０５、研磨部材１０１、カートリッジ１０８、サンプルコンテナ１１０及びデバイスを無菌に維持するのに必要と考えられるような流体を処理するデバイスの他の部品を含むことができる。代わりにいくつかの実施の形態では、デバイス全体を使い捨て可能にしてもよい。

【００８７】

いくつかの実施形態では、ＬＰＭ貯蔵カートリッジ１０８は、ＬＰＭを貯蔵及び放出するスポンジ－ベローアセンブリ（sponge-bellow assembly）と交換することができる。図１ｅ乃至ｇには、このようなデバイスの一連の動作が示されている。フレキシブルなベロー形ハウジング１１２は、ＬＰＭが充填されたスポンジ１１を有している（図１ｅ）。デバイスを組織１０７に対して押すと、スポンジ－ベローハウジングが圧縮されてＬＰＭを放出するとともに、研磨部材１０１が動作をする（図１ｆ）。液化処理が完了すると、モータ１０３が停止し、組織成分を含むＬＰＭは、サンプルコンテナ１１０に移送される（

図１ｇ）。サンプルの収集は、吸引ポンプ１０９により容易に行われる。代わりに、いくつかの実施の形態では、吸引ポンプ１０９及びコンテナ１１０は、デバイスを持ち上げて初期位置に戻してサンプルをスポンジ内に収集することで回避できる。

【００８８】

図２ａ及び２ｂを参照すると、組織の広い領域から連続的にサンプリングするように設計された移動可能な組織液化デバイスの構造及び部品が示されている。図２には、液化のために組織にエネルギーを付与する手段としての回転研磨部材２０１を利用するデバイスが示されている。液化は、対象となる組織２０７に寄せて研磨部材２０１を配置して対象となる組織２０７に対して研磨部材２０１を動作させることにより行われる。研磨部材２０１は、シャフト２０２に取り付けられており、シャフト２０２はデバイスの回転モータ２０３にさらに接続されている。いくつかの実施の形態では、シャフト２０２は、研磨部材２０１によって組織２０７に付与される圧力を検知して制御するように設計されている。典型的な実施の形態では、組織２０７に付与される圧力を監視及び制御するために、シャフト２０２は、圧力検知ばねまたは圧力検知圧電結晶により互いに接続される２つの異なるシャフトにより構成されている。バッテリーパック２０４は、モータ２０３に電力を供給して、デバイスのオペレータにより指示された場合には、その後研磨部材２０１を回転動作させる。デバイスが組織に対して設置されると、３つのキープロセス－カートリッジ２０８に貯蔵されたＬＰＭがデバイス－組織の境界でハウジング２１２に連続的に送達され、研磨部材２０１を組織２０７に対して動作させ、組織の液化サンプルを吸引ポンプ２０９を使用してサンプルコンテナ２１０内に連続して供給することを実行することにより連続した液化処理が開始する。デバイスは、追加の組織の表面がデバイスに曝露されて液化するように周囲を移動することができる。必要な場合には、モータ２０３のスイッチを切ることにより液化処理を停止し、蓄積した組織サンプルは、コンテナ２１０から入手できる。

【００８９】

いくつかの実施の形態では、デバイスの動作が組織の表面を超えることによりハウジング２１２からＬＰＭが漏れることを防止するために追加のデバイス部品を使用することができる。典型的な実施の形態では、デバイスの周りのフランジハウジング２０５内に配置されたチャンバー２０６と組織２０７との間に吸引補助シールを作成するために吸引ポンプ２０９を使用することができる。

【００９０】

図２ｂには、液化のために組織に機械的エネルギーを付与する手段として圧電素子２５１を使用するデバイスが示されている。圧電素子２５１は、対象となる組織２５９と結合されたハウジング２５２内に配置される。液化は、組織２５９と圧電素子２５１との間を結合する液体としてＬＰＭを存在させて、圧電素子２５１を動作させることにより行われる。圧電素子２５１は、電気エネルギーの変換器である。電気エネルギーは、フレキシブルチューブ２５３内に配置された回路手段によって供給される。液化の間、ＬＰＭは、オペレータにより制御される噴射システム装置２５６を用いて、フレキシブルチューブ２５４によってハウジング２５２に供給される。組織の液化サンプルは、フレキシブルチューブ２５５を使用することにより、ハウジング２５２からサンプルコンテナ２５７に同時に収集することができる。サンプルの収集は、サンプルコンテナに連続的に接続される吸引ポンプ２５８により容易に行うことができる。いくつかの実施の形態では、吸引ポンプ２５８によりハウジング２５２内に形成される吸引圧力により、液化の間ハウジング２５２からＬＰＭが漏れることを防止するためにハウジング２５２と組織２５９との間に効果的なシールを提供する。いくつかの実施の形態では、吸引ポンプ２５８によりハウジング２５２内に形成される吸引圧力は、液化のための追加のエネルギー源を提供する。

【００９１】

いくつかの実施の形態では、追加の組織表面を液化及び種々の組織表面から蓄積された組織成分を表すサンプルを収集するようにハウジング２５２は移動することができる。このようなデバイスにおいては、ＬＰＭはチューブ２５４によりハウジング２５２に連続的

に供給され、サンプルはチューブ２５５により連続的に収集される。

【００９２】

いくつかの実施形態では、図２ｂのデバイスを、圧電素子２５１無しで動作させることができる。この実施の形態では、チューブ２５４からハウジング２５２に流れるＬＰＭは、組織と接触して組織を液化する。液化した組織はチューブ２５５によりハウジングから収集される。ハウジングは、組織の広い領域からサンプルを収集するために連続的または間欠的に移動させることができる。デバイスは、組織上でのデバイスの移動、組織の液化及び液化組織の収集を物上におけるデバイスの移動を可能にするために実質的に必要な追加の手段を有することができる。いくつかの実施の形態では、圧力または真空力のどちらか一方のみを、組織に向かってのＬＰＭの移動及び液化した組織の収集に使用することができる。

【００９３】

いくつかの実施形態では、液化デバイスは、 内視鏡、結腸鏡及び腹腔鏡のような診断プローブと一体化することができる。

【００９４】

図３ａ乃至３ｃを参照すると、液化のために組織にエネルギーを付与する手段として振動研磨部材を利用する液化デバイスの構造及び部品が示されている。直線運動は、例えばラックとピニオンの配置により生じる（図３ａ）。詳細には、研磨部材３０１は、ラック３０２に取り付けられている。ラック３０２は、環状のギア３０３（ピニオン）を使用して、往復直線運動でスライドする。ギア３０３は、モータ３０４により往復回動運動するように駆動される。バッテリーパック３０５はモーター３０４に電力を供給する。いくつかの実施の形態では、モータ３０４は、往復回動運動を生じさせるための電子マイクロチップコントローラが必要となるサーボモータである。液化の前に、研磨部材３０１は、ハウジング３０７、より詳細には、ハウジング３０７の基部に配置された薄いシート３０８を使用して組織３１１に対して分離するように設計することができる。ＬＰＭは、ハウジング３０７内に予め貯蔵しておくことができるので、例えば、薄いシート３０８と接触している。いくつかの実施の形態では、ＬＰＭは、デバイスの他の部分に配置されたカートリッジからハウジング３０７内に移送することができる。液化処理は、研磨部材３０１をシート３０８に対して直線運動させることにより開始する。シート３０８の材料は、研磨部材３０１によってすぐに摩耗し、ＬＰＭ及び研磨部材３０１が組織３１１と接触して組織を液化できるように選択される。シート３１１の限定されない例には、紙のシート、ラバーシート、金属箔、プラスチックシートまたは水溶性シートが含まれる。液化処理が完了すると、モータ３０４が停止し、組織成分を含むＬＰＭは、サンプルコンテナ３０９に移送される。サンプルの収集は、吸引ポンプ３１０により容易に行われる。いくつかの実施形態では、サンプルは、予め真空化したコンテナ内に直接収集することができ、吸引ポンプ３１０及びコンテナ３０９の必要性を回避できる。

【００９５】

いくつかの実施の形態では、デバイスの使用後毎に、いくつかのデバイス部品の交換を可能にして無菌で使用できるように、いくつかのデバイス部品は使い捨て可能に設計される。このような部品には、ハウジング３０７、研磨部品３０１、サンプルコンテナ３０９及びデバイスを無菌に維持するのに必要と考えられるような流体を処理するデバイスの他の部品を含むことができる。代わりにいくつかの実施の形態では、デバイス全体を使い捨て可能にしてもよい。

【００９６】

いくつかの実施の形態では、研磨部品３０１の直線往復運動は、リニアモータ、直線運動アクチュエータ、ボールねじアセンブリ、送りねじアセンブリ、ジャッキねじアセンブリ及び回転運動を直線運動に変換する他の装置を使用するような他の機構により生じさせることができる。

【００９７】

いくつかの実施形態では、図３ａに示したひとつのラック及びピニオンのシステムは、

図３ｂに例示されるような複数のギア及びベルトの配置構成と交換することができる。詳細には、ベルト３２７（図面の改訂が必要なので、図面にはベルトは明確に示されていない）は、ギア３２１，３２２，３２３，３２４，３２５及び３２６に取り付けられている。研磨部材３２８は、ベルト３２７に取り付けられており、ギア３２１がモータ３０４により駆動されて往復回転運動をしたときに、直線往復運動をはじめる。ギア３２１，３２２及び３２６はデバイスのハウジングに固定されている。一方、ギア３２３，３２４及び３２５はシャフト３２８に設けられている。シャフト３２８は、デバイスのハウジングに固定されている。いくつかの実施の形態では、研磨部材３２８が平坦でない組織の表面に対して押されたときに、平坦でない組織の表面に研磨部材３２８の輪郭を形成するためにギア３２３，３２４及び３２５が取り付けられたシャフトの長さを調整できるように、シャフト３２８は、長さを変更することができる。さらに、シャフト３２８は、研磨部材３２８によって組織の表面に付与される圧力を検知して制御するように設計することができる。典型的な実施の形態では、シャフト３２８は、圧力検知ばねにより互いに接続されたシャフト３２８１及びシャフト３２８２から構成されている（図３ｃ）。

【００９８】

図４ａ乃至４ｇを参照すると、本発明で開示するデバイス、方法及びシステムで使用される研磨部材の種々のデザインが示されている。図４ａには、均一の厚さを有する研磨材のシートを備える研磨部材が示されている。均一の厚さを有する研磨材の限定されない例には、布、研磨結晶（例えばクオーツ、金属、シリカ、炭化珪素、アルミニウムのダストまたは派生物（例えばアルミナ）、ダイアモンドダスト、高分子及び天然のスポンジ等）等が含まれる。いくつかの実施の形態では、例えば研磨性の空間的な変動があるように不均一な研磨性のある研磨部材を設計する利点がある。典型的な実施の形態では、研磨部材は、研磨性に傾斜を有するディスクであり、ディスクの中心の研磨性が高く、ディスクの周縁部の研磨性が低い（図４ｂ）。いくつかの実施の形態では、研磨部材の形状は、平坦でない形状に変更することができる。典型的な実施の形態では、図４ｃには、滑らかで丸い組織対向面を有する研磨部材が示されており（高さと幅との比として定義するアスペクト比は、１０乃至０．１で変更可能である。）、図４ｄには、円環形状の研磨部材が示されている。図４ｅ乃至図４ｇには、組織摩耗手段としてのブラシを使用する研磨部材の実施の形態が示されている。図４ｅには、均一の高さ及び摩耗性の剛毛(bristles)を有するブラシを備えた研磨部材が示されている。いくつかの実施の形態では、研磨部材は、異なる高さ及び／または研磨性の剛毛を有するブラシを備えている。図４ｆには、ディスクの周縁部の低い研磨性の剛毛によって囲まれた中心の高い摩耗性の剛毛を有する円板形状のブラシの典型的な実施の形態が示されている。図４ｇには、滑らかで丸い組織対向面を形成する異なる長さの剛毛を有するブラシの典型的な実施の形態が示されている（高さと幅との比として定義するアスペクト比は、１０乃至０．１で変更可能である。）

図５ａ乃至５ｄを参照すると、組織の導電性を測定するデバイス部品が記載されている。高エネルギー曝露は組織の液化に好ましいが、有害な組織の損傷のような重大な悪影響を引き起こすことがある。それ故、いくつかの実施の形態では、エネルギー曝露の安全限界に達したときにデバイスを停止することができるような、例えば組織の導電性のような組織特性の変化の時間的監視を（理想的にはリアルタイムで）するためのいくつかのデバイス部品を組み込む必要がある。液化処理中の組織の導電性の時間的測定及び監視は、組織５０３に配置された測定電極５０１及び液化される組織５０３に隣接する領域に配置された参照電極５０２を使用して、予め定められた交流電圧を、対象となる組織５０３に印加することにより行うことができる。電流計５０４により測定された２つの電極間を流れる電流は、組織の導電性の測定として受け入れることができる。いくつかの実施の形態では、測定電極５０１は、ＬＰＭとのまたは液化される組織５０３の領域との直接的な電気的接触で維持される。一実施の形態では、測定電極５０１は、ＬＰＭハウジング５０９の裏の内面に配置される（図５ａ）。いくつかの実施形態では、測定電極は、ＬＰＭに浸された電動シャフト５１０に固定されたスライドコンタクト５０６である。電流は、スライドコンタクト５０６により、デバイスハウジングに固定された絶縁スタッド５０５に伝達

される。いくつかの実施の形態では、参照電極５０２は、ＬＰＭハウジング５０９の延長であり、液化される組織５０３の領域の周辺近傍に配置される（図５ａ及び図５ｂ）。いくつかの実施の形態では、参照電極は、液化デバイス内に配置された導電性測定部品と電気的に接続された手持ち式の円筒電極５０７である（図５ｃ）。いくつかの実施の形態では、参照電極は、液化デバイス内に配置された導電性測定部品と電気的に接続されたパッチ電極５０８である（図５ｄ）。

【００９９】

図６ａ乃至６ｇを参照すると、マイクロニードルに基づく組織の液化を使用するデバイスの構造、部品、機能が開示されている。マイクロニードルに基づくデバイスは、組織内にマイクロニードルを押し込むことにより主に行われる組織成分の機械的破壊を介して組織にエネルギーを付与する。図６ａには、ＬＰＭ６１３が充填された多くのマイクロニードル６０２を保持するマイクロニードルパッチ６０１の基本的な構造が示されている。マイクロニードルパッチ６０１は、ＬＰＭ６１３中の組織成分を破壊(disruption)及び溶解できるように対象となる組織内に挿入させることができる。ＬＰＭは、診断分析のためにパッチ６０１から吸引することができる。

【０１００】

組織の内部へのマイクロニードルの次の挿入動作により、液化のための追加エネルギーを付与することができる。図６ｂには、マイクロニードルパッチ６０１に固定することができる振動コンポーネント６０３が示されている。振動コンポーネント６０３は、組織内へのパッチ６０１の挿入後、組織の内側でマイクロニードル６０２を激しく振動させるように作動する。振動コンポーネント６０３は、多くの機械的バイブレータ６０３１と、電力の供給及び所望の方向への機械的バイブレータの動作の制御をするバッテリー式の電子回路ボード６０３２とを有している。典型的な実施の形態では、機械的バイブレータ６０３１は、マイクロニードル６０２の軸に平行及び垂直な方向に振動させることができる。

【０１０１】

いくつかの実施の形態では、挿入後のマイクロニードルの動作は、パッチ６０１に対する各マイクロニードル６０２の動作により生じる。図６ｆには、パッチ６０１の頂部に配置された電磁石６１２が示されている。電磁石６１２は、各マイクロニードルをその軸に沿って振動運動させるのに使用することができる。このことは、マイクロニードル６０２が往復直線運動するように、磁石６１１が電磁石６１２の交流極性プロファイルと応答するように、各マイクロニードル６０２の頂部に磁石６１１を固定することにより行われる。いくつかの実施形態では 、マイクロニードルの回転運動が望まれる。電磁石６１２１，６１２２，６１２３及び６１２４は、パッチ６０１の周囲に対称的に配置される（図６ｇ）。マイクロニードル６０２の頂部に設けられた磁石６１１は、マイクロニードル６０２を回動運動させるために電磁石６１２１，６１２２，６１２３及び６１２４の交流極性プロファイルに応答する。

【０１０２】

図６ｂ－６ｅでは、マイクロニードルを通るＬＰＭの積極的な注射及び引き抜きを使用して組織内のＬＰＭを強制的に運動させることにより、液化のための追加のエネルギーをさらに付与することができる。デバイス内に配置されたハウジング６０４は、組織の内部に流れるようにパッチ６０１に含まれるＬＰＭを押し出すのに使用することができる圧縮空気コンテナ６０５を有している。ハウジング６０４内の吸引ポンプ６０６は、組織からＬＰＭを引き抜くための真空力の付与に使用することができる。いくつかの実施の形態では、圧縮空気コンテナ６０５及び吸引ポンプ６０６は、液化を促進するために組織からのＬＰＭの引き抜き及び注射に繰り返して使用するために代わりに使用される。ハウジング６０４内のバッテリー式の電子回路ボード６０７は、圧縮空気コンテナ６０５及び吸引ポンプ６０６への電力の供給及び制御に使用される。いくつかの実施の形態では。吸引ポンプ６０６は、組織の液化サンプルをパッチ６０１から吸引してサンプルコンテナに伝達するためにサンプルコンテナに追加的に接続することができる。いくつかの実施の形態では、ハウジング６０４は、パッチ６０１の頂部に取り付けられたフレキシブルゴムキャップ

（図６ｄ参照）と置き換えることができる。フレキシブルキャップ６０８は、ＬＰＭがマイクロニードル６０２を通って組織から繰り返して注射及び引き抜きされるように、例えば指で押すことにより、繰り返し押し込み及び押し戻すことができる。

【０１０３】

マイクロニードル６０２は、組織の液化を高めるために物質６１０で被覆することができる（図６ｅ）。いくつかの実施の形態では、物質６１０は、組織成分の破壊及び破壊した組織成分のＬＰＭへの加速的な溶解を高めることを補助することができる研磨材である。いくつかの実施の形態では、物質６１０は、組織の液化を高めるために細胞外マトリクスのような特定の組織の組成を切断する酵素である。いくつかの実施の形態では、物質６１０は、組織からの分析物の回収を高めることにつながる対象となる組織の分析物と特異的に結合する分子である。典型的な実施の形態では、物質６１０は抗体である。

【０１０４】

図６を参照すると、いくつかの実施の形態では、デバイスの使用後毎に、いくつかのデバイス部品の交換を可能にして無菌で使用できるように、いくつかのデバイス部品を使い捨て可能に設計することができる。このような部品には、マイクロニードルパッチ６０１、マイクロニードル６０２、圧縮空気コンテナー６０５、吸引ポンプ６０６及びデバイスを無菌に維持するのに必要と考えられるような流体を処理するデバイスの他の部品を含むことができる。代わりにいくつかの実施の形態では、デバイス全体を使い捨て可能にしてもよい。

【０１０５】

［液化促進媒体（ＬＰＭ）］

ＬＰＭは、以下の４つの目的の一以上を果たすように設計することができる。ａ）成分内への組織の分散を容易にする。ｂ）液化した組織成分を収集する媒体として作用する。ｃ）（例えば種々の分子の構造の維持によって及びサンプルした微生物の増殖能力の維持によって）生物活性及び化学活性を保持するようにサンプルした成分の分解を阻止する。ｄ）次の分析技術との互換性の確保。

【０１０６】

一般的にＬＰＭは、水溶液（例えばトリス－ＨＣｌ（Tris-HCl）、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline）等）または有機（非水）液体（例えばＤＭＳＯ、エタノール等）のような溶媒を有している。ＬＰＭには、種々の液化促進剤を追加的に含めることができる。液化促進剤には、界面活性剤（非イオン、陰イオンまたは陽イオン）、脂肪酸、アゾン状分子（azone-like）、キレート剤（例えばＥＤＴＡ等）、無機化合物及び摩耗物質が含まれるがこれに限定されない。本明細書で使用する「液化促進剤」は、組織サンプルの液化及び／または組織成分の可溶化を容易にすることができるＬＰＭの成分である。対象となる組織及び分析物のタイプに応じて、ＬＰＭの成分は、上述した基準に基づいて合理的に選択することができる。例えば、粘膜のような繊細な組織は、最小限のまたは界面活性剤のない食塩水で液化が可能であるのに対して、皮膚のような角化組織には、界面活性剤のような追加の成分が必要となる。

【０１０７】

ＬＰＭ中の液化促進剤は、種々の適切な成分を含むことができる。種々の適切な成分には、水、トリス－ＨＣｌ（tris-HCl）、食塩水（リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline）（ＰＢＳ）及びトリス緩衝生理食塩水（tris-buffered saline）（ＴＢＳ））、アルコール（エタノール及びイソプロパノールを含む（例えば１０－１００％の濃度範囲の水溶液））、シリカ、酸化アルミニウムまたはシリコンカーバイド（silicon carbide）のダストまたは派生物のような摩耗物質（例えば０．０１－９９％の濃度範囲の水性溶液）、Ｂｒｉｊ（例えばＢｒｉｊ３０のような種々の鎖長）、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＰＳ）、３－（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Dodecyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＤＰＳ）、Ｎ－ラウロイルサルコシン（N-lauroyl sarcosine）（ＮＬＳ）、トリトンＸ－１００（Triton X-100）、ドデシル硫酸

ナトリウム（Sodium Dodecyl Sulfate）（ＳＤＳ）及びラウリル硫酸ナトリウム（Sodium Lauryl Sulfate）（ＳＬＳ）、ＨＣＯ６０界面活性剤（HCO-60 surfactant）、ヒドロキシポリエトキシドデカン（Hydroxypolyethoxydodecane）、ラウロイルサルコシン（Lauroyl sarcosine）、ノノキシロール（Nonoxynol）、オクトキシノール（Octoxynol）、フェニルスルホナート（Phenylsulfonate）、プルロニック（Pluronic）、ポリオレアート（Polyoleates）、ラウリン酸ナトリウム（Sodium laurate）、オレイン酸ナトリウム（Sodium oleate）、ジラウリン酸ソルビタン（Sorbitan dilaurate）、ジオレイン酸ソルビタン（Sorbitan dioleate）、モノラウリン酸ソルビタン（Sorbitan monolaurate）、モノオレイン酸ソルビタン（Sorbitan monooleates）、トリラウリル酸ソルビタン（Sorbitan trilaurate）、トリオレイン酸ソルビタン（Sorbitan trioleate）、スパン２０（Span 20）、スパン４０（Span 40）、スパン８５（Span 85）、シンペロニックＮＰ（Synperonic NP）、Ｔｗｅｅｎｓ、アルキル硫酸ナトリウム（Sodium alkyl sulfates）及びアルキルアンモニウムハライド（alkyl ammonium halides）のような界面活性剤（例えば０．０１－２０％の濃度範囲の水性溶液）、ＤＭＳＯ（例えば０．０１－２０％の濃度範囲の水性溶液）、リノール酸（linoleic acid）のような脂肪酸（fatty acids）（例えば０．１－２％の濃度範囲のエタノールと水が５０：５０の溶液）、アゾン（azone）（例えば０．１－１０％の濃度範囲のエタノールと水が５０：５０の溶液）、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol）（例えば１０－５０％の濃度範囲の水性溶液）、ヒスタミン（histamine）（例えば１０－１００ｍｇ／ｍｌの濃度範囲の水性溶液）、ＥＤＴＡ（例えば１－１００ｍＭの濃度範囲）及び水酸化ナトリウム（例えば１－１００ｍＭの濃度範囲）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施の形態では、ＬＰＭは、ＴＷＥＥＮ、ＣＴＡＢ、ＳＰＡＮまたはアルキル硫酸ナトリウム以外の界面活性剤を含むことができる。いくつかの実施の形態では、ＬＰＭは、陽イオン界面活性剤以外の界面活性剤を含むことができる。ＬＰＭが界面活性剤を有する場合には、ＬＰＭ中の界面活性剤の合計濃度は、少なくとも０．５％乃至１０％の範囲とすることができ、例えば約０．５％、約１％、約１．５％、約２％、約２．５％または約３％である。

【０１０８】

ＬＰＭは、対象となる分析物の生物活性の維持を容易にする薬剤を有することができる。例えば、ＬＰＭは、フリーラジカルスカベンジャー（free radical scavengers）（例えば抗酸化物質（例えばポリフェノール、ベータカロチン、ルテイン、リコピン、セレニウム等）、ビタミンＡ、ビタミンＣ、ビタミンＥ、アルファトコフェロール（alpha-tocopherol）、ブチルヒドロキシトルエン、安息香酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム等）、消泡剤（例えばジメチルポリシロキサン（dimethylpolysiloxane）、炭化水素油（hydrocarbon oil）、低脂肪酸ジクリセリド等のようなシリコンまたは非シリコン消泡剤）及び剪断保護剤（例えばポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、プルロニックＦ６８等）を含むことができる。分析物の文脈で使用される「生体活性」とは、（例えば特別な抗体または変性に敏感な他の構造的特徴によってバインドされたエピトープのような）検出を容易にする構造コンフォーメーションについて言及するものであり、分析物の生物活性（例えば酵素活性）を含むものである。

【０１０９】

特に対象となるＬＰＭは、本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムに接続した場合に、ＬＰＭ中の分析物の生体活性の維持の提供、特には分析物の構造コンフォメーションの保持（例えばタンパク質分析物の変性の回避）の提供と同時に、ＬＰＭ中に所望のレベルの組織成分を提供する界面活性剤の組合せを有している。

【０１１０】

ＬＰＭ中に非イオン界面活性剤、両性界面活性剤、陰イオン界面活性剤の組み合わせを含む界面活性剤の異なる組み合わせを使用することにより、本明細書で説明するデバイス、方法及びシステムにおいて以下に使用する、ＬＰＭ中への高レベルの組織成分及びＬＰＭ中に含まれる分析物の生物活性の保存の両方を提供することができる。

【０１１１】

対象となる非イオン界面活性剤の限定されない例には、ブリジ系界面活性剤（例えばポリエチレングリコールドデシルエーテル（Polyethylene glycol dodecyl ether）（Ｂｒｉｊ３０）、ポリオキシエチレン２３－ラウリルエーテル（Polyoxyethylene 23-lauryl ether）（Ｂｒｉｊ３５）、ポリオキシエチレン２－セチルエーテル（Polyoxyethylene 2-cetyl ether）（Ｂｒｉｊ５２）、ポリオキシエチレン１０－セチルエーテル（Polyoxyethylene 10-cetyl ether）（Ｂｒｉｊ５６）、ポリオキシエチレン２０－セチルエーテル（Polyoxyethylene 20-cetyl ether）（Ｂｒｉｊ５８）、ポリオキシエチレン２－ステアリルエーテル（Polyoxyethylene 2-stearyl ether）（Ｂｒｉｊ７２）、ポリオキシエチレン１０-ステアリルエーテル（Polyoxyethylene 10-stearyl ether）（Ｂｒｉｊ７６）、ポリオキシエチレン２０－ステアリルエーテル（Polyoxyethylene 20-stearyl ether）（Ｂｒｉｊ７８）、ポリオキシエチレン２－オレイルエーテル（Polyoxyethylene 2-oleyl ether）（Ｂｒｉｊ９２）、ポリオキシエチレン１０－オレイルエーテル（Polyoxyethylene 10-oleyl ether）（Ｂｒｉｊ９６）、ポリオキシエチレン１００－ステアリルエーテル（Polyoxyethylene 100-stearyl ether）（Ｂｒｉｊ７００）、ポリオキシエチレン２１－ステアリルエーテル（Polyoxyethylene 21-stearyl ether）（Ｂｒｉｊ７２１）等）、トリトンＸ（Triton X）（例えばトリトンＸ－１５（Triton X-15）、トリトンＸ－４５（Triton X-45）、トリトンＸ－１００（Triton X-100）、トリトンＸ－１１４（Triton X-114）、トリトンＸ－１６５（Triton X-165）、トリトンＸ－２００（Triton X-200）、トリトンＸ－２０７（Triton X-207）、トリトンＸ－３０５（Triton X-305）、トリトンＸ－４０５（Triton X-405）等）及びソルビタン（例えばスパン－２０（Span-20）、スパン－４０（Span-40）、スパン－６０（Span-60）、スパン－６５（Span-65）、スパン－８０（Span-80）、スパン－８５（Span-85）等）が含まれる。

【０１１２】

対象となる両性界面活性剤の限定されない例には、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）、３－（ドデシルジメチルアンモニ）オプロパンスルホナート（3-(Dodecyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）、ミリスチルジメチルアンモニオプロパンスルホナート（Myristyldimethyl ammonio propane sulfonate）、ヘキサデシルジメチルアンモニオプロパンスルホナート（Hexadecyldimethyl ammonio propane sulfonate）、ＣｈｅｍＢｔｅｔａｉｎｅ　Ｃ、ＣｈｅｍＢｔｅｔａｉｎｅ　Ｏｌｅｙｌ、ＣｈｅｍＢｔｅｔａｉｎｅ　ＣＡＳ及び３－（３－コラミドプロピル）－ジメチルアンモニオ－１－プロパンスルホナート（3-(3-cholamidopropyl)-d imethylammonio- 1 -propanesulfonate）が含まれる。

【０１１３】

対象となる陰イオン界面活性剤の限定されない例には、Ｎ－ラウロイルサルコシン（N-lauroyl sarcosine）、ココイルサルコシン酸ナトリウム（Sodium Cocoyl Sarcosinate）、ミリストイルサルコシン酸ナトリウム（Sodium Myristoyl Sarcosinate）、イソプロピルラウロイルサルコシン（Isopropyl Lauroylsarcosinate）、パルミトイルサルコシン酸ナトリウム（Sodium Palmitoyl Sarcosinate）及びラウロアンフォジアセテートラウロイルサルコシ酸ジナトリウム（Disodium Lauroamphodiacetate Lauroyl Sarcosinate）が含まれる。

【０１１４】

いくつかの実施の形態では、非イオン界面活性剤は、両性イオン界面活性剤と組み合わされる。いくつかの実施の形態では、非イオン界面活性剤は、陰イオン界面活性剤と組み合わされる。これらの実施の形態において、ＬＰＭ中に存在する非イオン界面活性剤と両面界面活性剤または陰イオン界面活性剤との比は、所望の結果を達成するために調整することができる。限定されない対象となる比には、非イオン界面活性剤：両性イオン界面活性剤が２５：７５、非イオン界面活性剤：両性イオン界面活性剤が５０：５０、非イオン界面活性剤：両性イオン界面活性剤が７５：２５、非イオン界面活性剤：陰イオン界面活性剤が２５：７５、非イオン界面活性剤：陰イオン界面活性剤が５０：５０、非イオン界面活性剤：陰イオン界面活性剤が７５：２５が含まれる。特に対象となる混合物は、ブリ

ジ系界面活性剤（Brij series surfactant）（例えばＢｒｉｊ－３０）とＮ－ラウロイルサルコシン（N-lauroyl sarcosine）（ＮＬＳ）とが５０：５０の界面活性剤混合物である。特に対象となる他の混合物は、ブリジ系界面活性剤（Brij series surfactant）（例えばＢｒｉｊ－３０）と３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＰＳ）とが５０：５０の界面活性剤混合物である。以下の例に示すように、これらの界面活性剤の組み合わせは、ＬＰＭ中に界面活性剤の合計濃度が０．５－１％（ｗ／ｖ）で含まれる場合には、タンパク質の合計濃度によって評価されるように高いレベルでの組織成分の安定化のために提供されるとともに、（ＥＬＩＳＡ法によって評価されるように）生物活性の保持のために提供される。

【０１１５】

いくつかの特殊のケースでは、例えば、生きた病原体の収集のため、様々なＬＰＭの組成を所望の結果を達成するために使用することができる。食塩水及びトリス－ＨＣｌは、幅広い種類の皮膚常住バクテリアを収集するためのＬＰＭとして使用され、追加的にはこれらの微生物は、生体外での増殖及び成長のために強く残存する。いくつかの実施の形態では，サンプルされた微生物の増殖を補助するためにＬＰＭは濃縮ブロス媒体を含むことができる。いくつかの嫌気性バクテリアは、酸素雰囲気に対して敏感である。従って、嫌気性バクテリアを収集するためのＬＰＭは、窒素または水素雰囲気を含むことができる。成分の異なるＬＰＭ組成物を特別な応用で使用するために容易に製造することが可能であることは本明細書を読んだ当業者に明かとなる。

【０１１６】

ＬＰＭは、プロテアーゼ－阻害剤（protase-inhibitors）、ＲＮａｓｅ－阻害剤（RNase-inhibitors）、ＤＮａｓｅ－阻害剤（DNase-inhibitors）のような対象となる分析物の安定剤を含むこともできる。安定剤は、最小限のまたは検出不可能な分解または生物活性の減少で分析物を収集及び少なくとも一時的に収容することを可能にする。他の典型的な液化促進剤は、米国特許第５９４７９２１号に開示されており、本出願では、全体を参照することにより、本明細書に組み込む。例えば、液化促進剤には、界面活性剤、研磨粒子及び生体分子安定剤を含めることができる。

【０１１７】

一つの典型的な実施の形態では、ＬＰＭは、無菌のＰＢＳ中にＮＬＳ及びＢｒｉｊ－３０の混合物１％ｗ／ｖを含む溶液から構成される。 他の典型的な実施の形態では、ＬＰＭは、無菌のＰＢＳ中にＤＰＳとＢｒｉｊ－３０の混合物０．５％ｗ／ｖを含む溶液で構成される。いくつかの実施の形態では、特に分析物は一以上のタンパク質であり、ＬＰＭは、１－１０％ｖ／ｖのプロテアーゼ阻害剤の混合物（例えば、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ，Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから提供されるカタログ番号がＰ８３４０のもの）を含む。いくつかの実施の形態では、ＬＰＭは食塩水である。 いくつかの実施の形態では、ＬＰＭはトリスＨＣｌ溶液である。

【０１１８】

ＬＰＭはまた、「感度エンハンサー」として定義した薬剤を含むことができる。感度エンハンサーは、診断分析試験の感度及び特異性を高めることに関して、液化した組織の分析物を安定させる及び分析を容易にするために使用される。これらの目的を達成するために必要とされるため、感度エンハンサーは、組織の液化処理前、処理中、処理後または診断分析前または分析中にＬＰＭ中に加えておくことができる。例えば、感度エンハンサーは、コンテナ内に予め収容しておくことができ、後に組織の液化サンプルと混ぜることもできる。

【０１１９】

典型的な実施の形態では、感度エンハンサーは、対象となる分析物の検出感度及び特異性を増強するためにＬＰＭの（上述の）特異成分と相乗的に作用する物質から配合される。典型的な実施の形態では、感度エンハンサーは、組織サンプル中に存在するタンパク質分析物が、感度及び特異性の原因となる種々の診断アッセイ基質との非特異性結合を防止する物質から配合される。いくつかの実施の形態では、感度エンハンサーは、プロテアー

ゼ、ＲＮａｓｅ及びＤＮａｓｅのような不活性化分子によって対象とする分析物を安定化するように配合される。いくつかの実施の形態では、感度エンハンサーは、 対象となる分析物の液化されたサンプルに存在するタンパク質との非特的な結合を防止するためにプロテアーゼを活性化する物質から配合することができる。いくつかの実施の形態では、感度エンハンサーは、対象とある分析物の加硫での分析を容易にするために液化されたサンプルの生理状態（例えばｐＨ）を調整するために使用される。

【０１２０】

いくつかの実施の形態では、感度エンハンサーは、水溶液（例えばリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline）、トリス緩衝生理食塩水（tris-buffered saline）等）または（「非水の」）有機液体（例えばＤＭＳＯ、エタノール、フェノール等）のような溶媒を含むことができる。感度エンハンサーは、限定されない例として、遮断試薬（例えばＴｗｅｅｎ２０、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin）、脱脂粉乳（non-fat dry milk）、カゼイン（casein）、カゼイン塩（caseinate）、アイシングラス（fish gelatin）、超音波で切断した精液の核酸（sonicated-sperm-nucleic acids）等）、プロテアーゼ（protease）、プロテアーゼ阻害剤（protease-inhibitors） 、ＲＡａｓｅ阻害剤（RNase-inhibitors）、ＤＮａｓｅ阻害剤（DNase-inhibitors）、ブロス媒体（broth medium）のような安定剤を追加的に含むことができる。対象となる組織及び分析物のタイプに応じて、感度エンハンサーの成分は、合理的に選択することができる。典型的な実施の形態では、液化した皮膚のような角化組織の核酸を検出するために、感度エンハンサーには、１００ｍＭの塩化ナトリウム、１０ｍＭのトリスＣｌ（ｐＨ８）、２５ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ８）、０．５％ＳＤＳ、及び０．１ｍｇ／ｍｌのプロテアーゼＫが含まれている。ここで、プロテアーゼＫには、皮膚の液化を容易にすることが可能なだけでなく、組織の分析物としてサンプル中に存在するＲＡａｓｅ及びＤＮａｓｅを分解することにより核酸を安定化させることも可能である。

【０１２１】

免疫測定法による分析物の検出が含まれるいくつかの実施の形態では、感度エンハンサーには、種々の適当な成分を含めることができる。適当な成分には、溶剤（例えば水、緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水、トリス－ＨＣｌ、トリス緩衝生理食塩水）等）、プロテアーゼ阻害剤のような安定剤、Ｔｗｅｅｎ２０、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、ウシ血清アルブミン（例えば１－５％の濃度範囲）、脱脂粉乳（例えば０．１－０．５％の濃度範囲）、カゼインまたはカゼイン塩（例えば１－５％の濃度範囲）、アイシングラス例えば１－５％の濃度範囲）のような遮断試薬が含まれるがこれに限定されない。典型的な実施の形態では、免疫測定法の感度エンハンサーは、１０％のＢＳＡ及び０．５％のＴｗｅｅｎ２０をトリス緩衝生理食塩水に溶解させた溶液で構成されて、組織サンプルと１：１０の比で混合される。

【０１２２】

対象となる分析物として核酸の検出を含むいくつかの実施の形態では、感度エンハンサーには、種々の適当な成分を含めることができる。適当な成分には、水、緩衝液（例えばＴＥ、ＴＡＥ、クエン酸ナトリウム等）、ＥＤＴＡのようなキレート剤、安定剤（例えばＲＡａｓｅ阻害剤、ＤＮａｓｅ阻害剤、プロテアーゼ、フェノール、硫酸アンモニウム、グアニジンイソチオシアネート等）、ドデシル硫酸ナトリウムのような界面活性剤、及び超音波で切断した精液の核酸、Ｔｗｅｅｎ２０、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、ウシ血清アルブミン（例えば１－５％の濃度範囲）、脱脂粉乳（例えば０．１－０．５％の濃度範囲）、カゼインまたはカゼイン塩（例えば１－５％の濃度範囲）、アイシングラス（例えば１－５％の濃度範囲）のような遮断試薬が含まれるがこれに限定されない。いくつかの実施の形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術の使用により、核酸の検出が望まれる。ＬＰＭは、ＬＰＡとしてＰＣＲ阻害剤を含有することを回避するように選択される。典型的な実施の形態では、ＰＣＲと相性の良いＬＰＭは、トリス－ＨＣｌ緩衝液またはＥＤＴＡ緩衝液である。

【０１２３】

対象となる分析物として微生物の検出を含むいくつかの実施の形態では、感度エンハンサーは、生体外での微生物の成長を促進するように、濃縮ブロス媒体を有することができる。いくつかの嫌気性バクテリアは、酸素雰囲気に対して敏感である。従って、嫌気性バクテリアを収集するための感度エンハンサーは、窒素または水素雰囲気を含むことができる。

【０１２４】

対象となる特定の定量システムまたは特定の分析物の感度エンハンサーの他の配合は、本明細書を読んだ当業者に明かとなる。

【０１２５】

いくつかの実施の形態では、ＬＰＭの熱特性（例えば温度、熱容量等）は、組織及び／または組織成分のエネルギー曝露の熱的悪影響を減少させるように組織の液化前または液化中に調節される。一実施の形態では、ＬＰＭの温度は、組織成分の溶解物を含まないように十分に低く維持される。他の典型的な実施の形態では、環境温度（約２５℃）よりも低い温度に予め冷却されたＬＰＭを超音波液化で使用することができる。他の典型的な実施の形態では、ＬＰＭの温度は、ＬＰＭ収容リザーバーに連結された熱伝達ジャケットを通る予め冷却された流動液体に熱を伝達することによりエネルギー曝露の間、継続的に下げることができる。

【０１２６】

［分析物］

本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムにより種々の分析物を（定性的にまたは定量的に）検出することができ、追加的には、問題となる組織の分析プロファイルを提供することに特徴がある。限定されない例には、構造タンパク質及び信号伝達タンパク質（例えばケラチン（keratins）（例えば塩基性のケラチン、酸性のケラチン）、β－アクチン（β-actin）、インターロイキン（interleukins）、ケモカイン（chemokines）、増殖因子（growth factors）、コロニー刺激因子（colony-stimulating factors）、インターフェロン（interferons）、抗体（ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＭ）、癌バイオマーカー（cancer biomarkers）（例えばＣＥＡ等）、熱ショックタンパク質（heat shock proteins）（例えばＨｓｐ－６０、Ｈｓｐ－７０、Ｈｓｐ－９０等）等）、脂質（例えばコレステロール）、セラミド（ceramides）（例えばセラミド１－６）、脂肪酸、トリグリセリド、パラフィン炭化水素（paraffin hydrocarbons）、スクアレン（squalene）、コレステリルエステル（cholesteryl esters）、コレステリルジエステル（cholesteryl diesters）、遊離脂肪酸、ラノステロール（lanosterol）、コレステロール、極性脂質（polar lipids）（例えばグルコシルの派生物及びリン脂質）、核酸（例えばＲＮＡ及びＤＮＡ）、小分子（例えば遊離アミノ酸、乳酸塩、体外から送達された薬物分子、環境汚染物、兵器剤等）及び微生物（例えばバクテリア、菌類、ウイルス等）が含まれる。これらの分析物は、組織自体の内部に見つけられるが、組織の周囲の間質液に単独で存在することはできない。分析物は、腫瘍マーカーのような、間質液を伴うマーカー以外とすることができる。従って、本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムは、組織構造内に存在する腫瘍マーカーの検出に適用することができるが、間質液内に存在するものについては不明である。

【０１２７】

詳細な実施の形態においては、アレルゲン及びサイトカインの抗体が液化される（これらは液化されてまたは組織が液化されてこれらの可溶性分析物を生成する。）。アレルゲン及びサイトカインの抗体の液化は、問題となる組織及び目的物のアレルギープロファイルの生成に特徴がある。抗体の詳細なタイプには、ＩｇＥ、及びＩｇＧ抗体が含まれるがこれらに限定されない。サイトカインの詳細なタイプには、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ１０、ＩＬ－１２、ＩＬ１３、ＩＬ－１６、ＧＭ－ＣＳＦ、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＰ－４、ＣＴＡＣＫ／ＣＣＬ２７、ＩＦＮ－ｇ、ＴＮＦａ、ＣＤ２３、ＣＤ－４０、エオタキシン－２及びＴＡＲＣが含まれるがこれらに限定されない。

【０１２８】

分析物は種々の方法で分析される。分析方法は、評価される分析物に従って当業者が容易に選択することができる。リザーバーまたは収集コンテナは、サンプルを収集する場所として適用することができる。エネルギーの付与は、分析物の回収が最大となるように最適化することができる。サンプルの他の成分に対する分析物の相対的水準の維持のために確かな適用が望まれる。典型的な分析方法には、ゲル電気泳動、寒天平板培養試験、酵素試験、抗体に基づいた試験（例えばウエスタンブロット試験、酵素免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、横流型アッセイ等）、薄層クロマトグラフィー、ＨＰＣＬ、質量分光測定、放射線に基づく試験、ＤＮＡ／ＲＮＡ電気泳動、（ＵＶ／Ｖｉｓ）吸光分光分析、フローアッセイ等が含まれるがこれに限定されない。

【０１２９】

組織の液化サンプル中の組織成分の存在の定量的測定により、組織の液化の程度を評価することができる。このような内部較正は、吸光度、透過率、散乱または電磁波の放射源から放射される蛍光放射のような組織の液化サンプルの一以上の光学的性質を測定することにより行うことができる。重量測定の重量、合計タンパク質含有量、ｐＨ及び電気伝導度のような追加的なサンプルパラメータは、液化の程度の較正に使用することができる。さらに、厚さ、水分損失率及び導電率のような組織の性質の測定を使用することができる。β－カロチン、β－チューブリン、ＧＡＰＤＨ（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase）（グリセルアルデヒド３リン酸脱水素酵素 ）、ＬＤＨ（lactate dehydrogenase）（乳酸脱水素酵素）または他の豊富に存在する生体分子のような濃度が組織内に一定に残存していることが期待される一以上のサンプルされた分析物の濃度の直接的な測定は、液化の程度の較正に使用することができる。分析物はまた、免疫学に基づく分析（例えば放射免疫、Ｅｌｉｚａ、ＦＡＣｓ）を使用して定量化される。

【０１３０】

［組織細胞及び微生物］

上述の分析物に加えて、分析中の組織の全細胞及び種々の微生物を、本明細書で開示するデバイス、方法、システムを使用することにより対象となる組織内から検出することができる。組織細胞及び大部分の微生物は、上述の分析物よりも非常に大きく、対象となる組織からのこれらの抽出は、本発明の種々の実施の形態を使用することにより行うことができる。病原性及び非病原性のバクテリア、ウイルス、原生動物及び菌類は、種々の伝染病のよく知られた一因であり、これらの検出は、微生物によって生じる病気（例えば 結核、ヘルペス、マラリア、白癬等）の診断を容易にする。病状は、新種の微生物の存在または寄生微生物の割合の変化を表す。対象物が微生物のような感染病を有することが疑われる場合には、本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムは、微生物の定量化または存在の有無の検出に使用することができ、状態の診断を容易にする。

【０１３１】

非病原性の微生物は、正常組織中に標準的に存在し（正常フローラ）、多くの身体機能及び対象物の健康の維持の役割を果たしている。対象となる組織内のこれらのノーマルフローラ微生物（例えばバクテリア）の検出もまた、本発明の方法及びデバイスにより行うことができる。対象者の組織は、本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムを使用してサンプリング及び分析され、天然で存在する種々の微生物を分析することができる。対象者に異常状態の疑いがある場合には、対象者の組織を本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムに従ってサンプリングし、非病理性微生物のプロファイルが通常の、健康な対象者のプロファイルに対して変化しているか否かを検出する。この微生物プロファイルの変化は、対象者の対象となる状態の診断を容易にすることができる。

【０１３２】

いくつかの実施の形態では、組織を液化して、内部に存在する細胞または微生物を回収することができる。エネルギーを使用する本発明のデバイス、方法及びシステムを適用することにより、対象者の皮膚からのバクテリアをＬＰＡ内に追加的に含むことができる収集媒体内に収集することができる。例えば、トリス－ＨＣｌまたはＰＢＳを使用して対象となる組織に超音波エネルギーを付与すると、細菌性微小動物を十分に収集することがで

きる。一般的に、本発明の方法を使用するデバイスは、微生物を組織から除去して収集媒体内に入れるように、十分なレベルの超音波エネルギーを付与することを含む。収集媒体は、次の分析のために集められる。次の分析には、媒体を培養し特定の微生物が存在するか否かの検出、媒体の直接分析（例えばＥＬＩＳＡ法を使用し、例えば微生物特異性抗体を含み、例えばラテックス凝集試験を含み、例えばポリメラーゼ連鎖反応ハイブリダイゼーションを含む核酸に基づいた診断分析の使用、ＤＮＡシークエンシング法）、またはこれらの方法の組合せを含むことができる。媒体内の微生物の決定は、対象となる状態の診断を容易にする。さらに微生物の収集の高収率により、診断のための核酸の数を増やす処理を短縮または排除することができる。

【０１３３】

本明細書で説明する本発明は、組織からの細胞の収集にも使用することができる。細胞膜を破壊することなく組織を液化する適切なＬＰＭとともにエネルギーを付与することは、生存している全細胞を含む全細胞を組織から採取することに使用できる。この場合のＬＰＭは、細胞を除去するためにＥＤＴＡのようなイオンキレート剤またはトリプシンのような酵素を含むがこれに限定されない化学物質を含むことができる。同様に、上述したエネルギー及び／またはＬＰＭのパラメータを変更することで、本明細書のデバイス、方法及びシステムは、各または他の細胞器官の収集に使用することができる。

【０１３４】

［対象となる組織］

種々の組織が本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムに適している。これらの組織には、皮膚、粘膜（鼻、腸、結腸、頬、膣等）または粘液、胸、前立腺、目、腸、膀胱、胃、食道、爪、精巣、髪、肺、脳、膵臓、肝臓、心臓、骨または大動脈壁が含まれるがこれに限定されない。一実施の形態では、組織は、顔、腕、手、脚、背中または他の部位の皮膚とすることができる。皮膚及び粘膜面は、液化の実行を非常に利用しやすいが、本明細書で開示するデバイス、方法及びシステムは、上記した種々の細胞内膜に容易に適用できるように設計することが可能である。本明細書で開示する方法を使用することができる細胞内膜に特有の典型的なデバイスは、米国特許第５７０１３６１号公報及び米国特許５８９５３９７号公報に開示されており、本出願では、全体を参照することにより、本明細書に組み込む。

【０１３５】

いくつかの実施の形態では、対象となる組織は、腫瘍または腫瘍と疑われる組織以外である。本明細書で開示するデバイス、方法、およびシステムが微生物の検出に適用される場合には、対象となる組織は、微生物を含むと疑われるものである（例えば感染症を有している疑いのある組織、詳細には深部組織感染、例えば粘膜の層が含まれる皮膚の真皮層及び／または皮下層の感染症。）。

【０１３６】

［方法の使用］

本明細書で開示する方法は、幅広い組織の評価で使用することができ、対象物の状態の診断を容易にするために、対象となる分析物の存在の有無を評価することが含まれる。いくつかの実施の形態では、本発明の方法は、本明細書で開示する方法が鑑別診断を容易にする一以上の状態の臨床的兆候及び一以上の状態を示唆する症状を患者が呈しているかに使用することができる。

【０１３７】

いくつかの実施の形態では、本発明は、患者のサンプルから生成される試験分析物プロファイルと参照分析物プロファイルとの比較を含む方法を提供する。「参照分析物プロファイル」及び「参照組織の分析物プロファイル」とは、選択された分析物または１，２，３，４，５，６，７，８，９，１０またはそれ以上の分析物のセットの定性的または定量的基準を一般的に示すものであり、対象物の状態の特性を示す。対象物の典型的な状態が与えられた参照分析物プロファイルには、正常参照分析物プロファイル（例えば正常組織（例えば病気のない）、一般的組織健康、分析物の許容または耐性レベル(例えば薬物、

環境汚染物等))、疾病参照分析物プロファイル（例えば、微生物感染（例えば細菌性の、ウイルス性の、真菌性のまたは他の微生物感染）、組織の限局性疾患（例えば皮膚炎、乾癬、癌（前立腺、乳、肺等）、蕁麻疹等）、組織に表れる全身性疾患（例えばアレルギー、糖尿病、アルツハイマー病、心血管疾患等）等の存在の特性を示す分析物プロファイル）、環境汚染物参照分析物プロファイル（例えば許容できない高いレベルの環境汚染物（例えば兵器剤、花粉、微粒子、農薬等）の存在の特性を示す分析物プロファイル）、薬物参照分析物プロファイル（例えば治療レベルの薬物または乱用薬物（例えば薬物乱用の評価を容易にする）等の特性を示す分析物プロファイル）等が含まれるが、これらに限定されない。参照分析物プロファイルは、一以上の分析物のクラスのメンバー（例えばタンパク質（例えば抗体、癌バイオマーカー、サイトカイン、細胞骨格／細胞質／細胞外タンパク質等）、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ）、脂質（セラミド、コレステロール、リン脂質等を含む）、生物学的に誘導された小分子、薬物（例えば治療薬物、乱用薬物）、環境汚染物、兵器剤等）または分析物のサブクラスのメンバー（例えば抗体、リン脂質））を有することができる。対象物の状態が与えられた参照分析物プロファイルは、既に本技術分野で公知であり、本発明で説明した方法を使用することにより組織から得ることができる。参照分析物プロファイルは、分析及び診断を容易にするために試験分析物プロファイルと即座に比較できるように電子的形態（例えばデータベース）で記憶することができる。

【０１３８】

「試験分析物プロファイル」及び「対象となる組織の分析物プロファイルとは、選択された分析物または１，２，３，４，５，６，７，８，９，１０またはそれ以上の分析物のセットの定性的または定量的基準を示すものであり、対象物の状態の診断及び予後診断を容易にする。試験分析物プロファイルは、一以上の分析物のクラスのメンバー（例えばタンパク質、核酸、脂質、生物学的に誘導された小分子、薬物（例えばタンパク質（例えば抗体、癌バイオマーカー、サイトカイン、細胞骨格／細胞質／細胞外タンパク質等）、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ）、脂質（セラミド、コレステロール、リン脂質等を含む）、生物学的に誘導された小分子、薬物（例えば治療薬物、乱用薬物）、環境汚染物、兵器剤等）または分析物のサブクラスのメンバー（例えば抗体、リン脂質））を有することができる。一般的には、試験分析物プロファイルを生成する分析のために選択される分析物は、所望の参照分析物プロファイルの分析物に従って選択される。試験分析物プロファイルの適切な参照分析物プロファイルとの比較は、試験分析物プロファイル及び参照分析物プロファイルとの間の実質的な一致が存在するかを評価することにより、対象となる状態または調子の存在の有無の決定を容易にする。

【０１３９】

選択された分析物または分析物のセットの参照及び試験分析物プロファイルを生成する方法は、本技術分野で利用可能な方法を使用することができ、評価される分析物に従って選択することができる。

【０１４０】

本発明の方法は、幅広い組織の評価で使用することができる。エネルギーが支援された組織の液化は、正常組織の定量的評価及びプロファイルを提供する。正常組織プロファイルと分析中の組織のプロファイルとの比較は、組織微小環境（例えばいくつかのタンパク質、脂質、核酸、小分子、薬物等のアップ／ダウンレギュレーション）の変化の診断を容易にする。組織微小環境は、アレルギー、心臓血管疾患、皮膚炎等のような種々の病理状態を示す。本発明の方法は、組織回収の監視及び種々の治療の治療効果を評価（治療の監視として、望まれるまたは必要な場合には治療に組み込むことができる）するツールとして使用することもできる。分析プロファイル法はまた、局所製剤（例えば化粧品）の評価のためのするパーソナルケア産業のツールを提供することができる。この手法は、組織を液化及び組織内の薬物分子の検出により薬理的パラメータの決定に使用することができる。同じような方法で、化学薬品、生体に有害な汚染物質及び薬物乱用の迅速かつ定期的な試験を定量的に行うことができる。本発明の方法はまた、病原性微小植物の高感度な検出及び診断にも使用することができる。

【０１４１】
いくつかの実施形態では、本発明の方法は、正常組織のプロファイルを提供する。正常組織とは、対象とする組織の異常な状態がないこととして定義される。例えば液化促進剤の存在下で超音波曝露または摩耗することにより正常組織にエネルギーが付与される。
【０１４２】
いくつかの実施の形態では、本発明の方法は、組織微小環境の変化の定量的評価にっよて特徴付けられる種々の組織病の診断を容易にするために適用することができる。この評価は、参照組織（例えばデータベースに記憶することができる参照分析物プロファイル）の分析物プロファイルを対象となる組織の分析物プロファイル（試験分析物プロファイル）と比較することにより行うことができる。分析中の組織に存在する特定の分析物または分析物のセットの定量的存在の有無は、参照組織中の同じ分析物の定量的存在の有無と比較した場合には、特定の病気の有無を示すので、状態の診断を容易にする。参照分析物プロファイルは、問題となる病気に感染しないことが知られている組織の一つの特性を示す。参照分析物プロファイルはまた問題となる組織の問題となる病気の特性を示す参照分析物ファイルである。
【０１４３】
一実施の形態では、分析中の組織は、皮膚及び／または粘膜であり、定量的試験分析物プロファイルは、参照分析物プロファイルと比較されて、アレルギー、蕁麻疹、微生物感染、自己免疫疾患、心臓血管疾患または癌のような病気の存在の有無を決定する。
【０１４４】
いくつかの実施の形態では、 本発明の方法は、組織回収の監視に使用することができる。この監視は、参照組織の分析物プロファイルを分析中の組織の分析物プロファイルと比較することにより行うことができる。分析中の組織に存在する特定の分析物または分析物の組成の定量的存在の有無は、参照組織中の同じ分析物の定量的存在の有無と比較した場合には、組織が正常状態に戻ったか否かを示す。参照組織は、通常は正常状態の組織である。
【０１４５】
いくつかの実施の形態では、本発明の方法は、対象となる組織内における治療の生体利用性を含む、種々の治療の治療効果の評価に使用することができる。組織の液化サンプル中の分析物は、組織中に存在する分析物の程度を示すように定量化することができる。分析中の組織に存在する特定の分析物または分析物の組成の定量的存在の有無は、参照組織中の同じ分析物の定量的存在の有無と比較した場合には、投与された治療薬が特殊な組織内または体内に所望の効果を達成するのに十分長く留まっているか否かを示す。参照組織は、通常は正常状態の組織である。
【０１４６】
いくつかの実施の形態では、本明細書で開示する方法は、皮膚のような組織の治療製剤の評価、詳細には、製剤の成分（例えばローション、クリーム、軟膏等）が組織によって吸収されたか及び送達された量に治療効果があるかの評価に使用することができる。いくつかの実施形態では，本明細書で開示する方法には、閉ループシステムが含まれる。同じシステムは、治療製剤、分析物の液化、分析物プロファイルの分析及び製剤の送達の調製に適宜に適用することができる。この場合の参照組織は、正常組織、または、治療製剤が扱われた状態からの種々のレベルに回復した組織とすることができる。
【０１４７】
いくつかの実施の形態では、本発明は、薬理的パラメータ及び医薬品の効果の決定に使用する分析物プロファイルの決定に使用することができる。特定の分析物（例えば免疫システムレスポンダー、サイトカイン）の存在の有無は、特定の医薬品の投与を、生体利用性、ＡＵＣ、クリアランス及び半減期を含むがこれに限定されない生物学的パラメータと関連付けるために使用することができる。
【０１４８】
いくつかの実施の形態では、本明細書で開示する方法は、生体に有害な汚染物質、兵器

剤、違法薬物、公知の医薬品等が含まれるがこれらに限定されない特定の化学薬品の検出に使用することができる。このような方法は、法的処置、競技スポーツのドーピングの規則、曝露の評価及び／または毒または汚染物質への曝露の病気のリスク等に使用することができる。

【０１４９】

いくつかの実施の形態では、本発明の方法は、病原性微生物（例えばバクテリア、菌類、ウイルス等）の検出または診断に使用することができる。レプリカ平板培養、スワビング、ウォッシングのような組織中の微生物の診断法のための本発明の手法は、抽出物の高い変動性及び低い分散性により、感度が低くなるとともにプロトコル依存性が高くなるので魅力的ではない。種々の試験は、組織中に存在する微生物の分析物を分離して特定するために組織の液化サンプルで行うことができる。いくつかの実施形態では、これらの試験には寒天平板での培養を含む。

【０１５０】

［薬物送達］

本発明は、組織を通るまたは組織内への薬物の流量を制御及び高めるために組織の液化を含む方法及びデバイスを提供する。本発明の方法は、１）送達が望まれる対象者の組織へのエネルギー及び液化促進媒体の付与、及び２）連続的にまたは繰り返し液化される組織内にまたは組織を通して一以上の薬物を送達する、というステップを含んでいる。本発明の方法はさらに、移送が行われている間にわたる組織の液化を含むことができる。本発明の方法は、組織または生体表面のバリア性を不安定にさせて薬物の通過の抵抗を減らすことができる組織の液化を有している。本発明の利点は、移動の比率及び効率が改善及び制御されることである。生体表面を単純に通過することができない、または不十分な割合または時間とともに変化する割合で通過する薬物は、ＬＰＭと組み合わせてエネルギーが付与されると、生体表面内に押される。付与するエネルギーの方式、強度および時間並びにＬＰＭの配合を制御することにより、移送の比率は制御される。

【０１５１】

薬物の移送は、化学的透過性または移送エンハンサー、対流、浸透圧勾配、濃度勾配、イオントフォレーゼ、エレクトロポレーション、磁場、超音波または機械的圧力のような第２の駆動力を同時にまたは続けて付与することにより変調または高めることができる。

【０１５２】

開示した方法の増強は、^{3}Ｈ標識アシクロビル及びイヌリンを用いる限定しない例により実証される。エネルギーのタイプ、時間の長さ及び強度並びにＬＰＭの配合は、組織のタイプ及び薬物の性質を含む多くの要因に依存し、年齢、負傷または病気、及び身体の部位によって種々に異なる。

【０１５３】

［投与される薬物］

投与される薬物には、種々の生物活性剤が含まれるが、タンパク質またはペプチドであることが好ましい。詳細な例には、インシュリン（insulin）、エリスロポエチン（erythropoietin）及びインターフェロン（interferon）が含まれる。アンチセンス（antisense）、ｓｉＲＮＡ及び治療用タンパク質をコードする遺伝子のような核酸分子（nucleic acid molecules）、抗炎症薬、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗生剤、局部麻酔薬及びサッカリドを含む合成有機及び無機分子を含む他の物質を投与することができる。薬物は、水性ゲルのような水と同様の吸収係数を有する適切な薬剤許容キャリアで典型的に投与される。代わりに、パッチをキャリアとして使用することができる。薬物は、ゲル、軟膏、ローションまたはサスペンションで投与することができる。

【０１５４】

一実施の形態では、薬物は、リポソーム、脂質小胞、エマルジョンまたはポリマーナノ粒子、微小粒子、マイクロカプセルまたはマイクロスフェアのような送達デバイス（特に明記しない限り微小粒子と言う）内にカプセル化されまたはカプセルの形態である。これらは、ポリヒドロキシ酸（polyhydroxy acids）、ポリオルトエステル（polyorthoesters

）、ポリ無水物（polyanhydrides）及びポリフォスファゼン（polyphosphazenes）のようなポリマー、またはコラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミン及び他のプロテイン、アルジネート（alginate）及び他のポリサッカリド（polysaccharides）のような天然高分子及びこれらの組合せから形成することができる。微小粒子は、例えばポリアルキレンオキサイドポリマー（polyalkylene oxide polymers）及びポリエチレングリコール（polyalkylene oxide polymers）のような複合体である親油性材料または親水性分子のような貫通性を高める材料で被覆または形成することができる。

【０１５５】

［薬物の投与］

薬物は、上記した液化デバイスを使用して、所望の治療結果の達成と同様に患者への利便性に基づいて組織の選択された部位に投与されることが好ましい。生体表面を有する種々の組織は、本発明の方法によく適している。これらの組織には、皮膚、粘膜（鼻、腸、結腸、頬、膣等）が含まれるがこれに限定されない。一実施の形態では、本発明の方法は、顔、腕、手、脚、背中または他の部位の皮膚に投与されるのが好ましい。皮膚は、液化の実行を非常に利用しやすいが、本明細書で開示するデバイスは、上記した種々の細胞内膜に容易に適用できるように設計することが可能である。

【０１５６】

いくつかの実施の形態では、投与される組織は、感染器官、炎症をおこした組織及び固形腫瘍のような病変組織である。いくつかの実施の形態では、本発明は、病変組織に隣接する正常組織に及び／または病変組織にデバイスを使用すること、及び正常組織を通って及び／または疾病した部位の内部に薬物を送達することを含む。コルチステロイドのようなステロイド及びリン酸エストラムスチン、パクリタキセル及びビンブラスチンを含む多くの化学療法剤は、重大な副作用を潜在的に有している。従って、全身に与えた場合には、望ましくない副作用を引き起こす可能性が高い。この問題は、これらの薬物を病変組織に局部的に送達することにより解決される。他の適用には、乾癬、アトピー性皮膚炎、瘢痕のような以上皮膚内への薬剤の送達が含まれる。

【０１５７】

いくつかの実施の形態では、本発明は、皮膚、粘膜（鼻、腸、結腸、頬、膣等）のような組織を通る高分子量分子または極性分子のような化合物の通過を高めるために使用される。大きな制御及び薬物の使用は、適用される薬物の割合を高めること及び直接的に制御することにより行われる。血流に迅速に入る薬物の割合が高まるので、望ましくない副作用は回避される。上記した組織を通過する薬物は、最適速度で血流に注入される。

【０１５８】

［薬物送達のための液化促進媒体（ＬＰＭ）］

ＬＰＭもまた、薬物送達に重要な要素である。薬物送達用のＬＰＭの設計は、サンプル収集用のＬＰＭの設計と多少重複する。ＬＰＭは、以下の５つの目的の一以上を果たすように設計することができる。ａ）エネルギーを組織と連結する。ｂ）組織の液化を容易にする。ｃ）組織内に送達される薬物を貯蔵する。ｄ）薬物の溶解度を高める。ｅ）生物活性及び化学活性を保持するように薬物の分解を阻止する。

【０１５９】

ＬＰＭは、組織の液化処理前または処理中に薬物を含むようにすることもできる。代わりの実施の形態では、エネルギー及びドラッグを含むＬＰＭの付与は、組織の液化のため及び後にパッチのような適切なキャリア中の薬物を液化される組織の部位に付与可能にするために使用することができる。

【０１６０】

［キット］

本発明はまた、本発明の方法を実施するためのエンコンパスキットを開示する。対象のキットには、例えば、エネルギー付与装置及び対象となる組織を液化する液化促進剤の全部、本明細書で開示する方法で生成する組織の液化サンプル内における組織分析物の存在の有無の検出及び（定性的または定量的）分析する導電率アッセイの試薬を含むことがで

きる。キットの種々の部品は、コンテナ内に分離して存在させてもよく、また所望の場合には、いくつかの適合する部品を一つのコンテナ内に予め組み込んでおくことができる。

【０１６１】

上述した部品に加え、キットは典型的には、本発明の方法を実行するためにキットの部品を使用するインストラクションをさらに有している。対象とする方法を実行するインストラクションは、一般的に適切な記録媒体に記録されている。例えば、インストラクションは、紙またはプラスチックのような基体に印刷することができる。よって、インストラクションは、添付文書、キットのコンテナのラベルまたはその部品（例えばパッケージまたはサブパッケージに使用される）としてキット内に存在させることができる。他の実施の形態では、インストラクションは、例えばＣＤ－ＲＯＭ、ディスケット等のような適切なコンピュータで読み取り可能な記憶媒体の電子的記憶データファイルとして表すことができる。さらに他の実施の形態では、実際のインストラクションはキットに表されておらず、例えばインターネットを介してリモートソースからインストラクションを得る手段が提供される。本実施の形態の例では、インストラクションを見ることができる及び／またはインストラクションをダウンロードできるウェブアドレスを含むキットである。インストラクションと同様に、インストラクションを得ることができる手段は、適当な基板に記録される。

【０１６２】

［実施例］

下記実施例は、本発明をいかに実施し使用するかの完全な開示および説明を当業者に提供するように示されており、本発明者らが自身の発明とみなす範囲を限定することを意図するものではなく、本発明者らが下記実験は実施された実験の全てであることもしくは唯一の実験であることを表すことを意図するものでもない。使用した数字(例えば、量、温度など)に関して精度を確実にするよう努力したが、若干の実験誤差および偏差は考慮されなければならない。別に記さない限りは、部は質量部であり、分子量は質量平均分子量であり、温度は摂氏であり、および圧力は大気圧またはその近傍である。

【０１６３】

本発明を特定の実施例について説明したが、 当業者であれば、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく種々の変更を加え、本発明の要素を等価物に置換できることが理解される。さらに、修正は、特定の状況、材料、組成物、プロセス、プロセスステップまたは複数のプロセスステップを本発明の目的、趣旨または範囲に適合させるように行うことができる。このようなすべての改良は、添付特許請求の範囲の範囲内であることを意図している。

【０１６４】

［例１］

［研磨エネルギーに基づく装置による皮膚のサンプリング］

図７ａ乃至図７ｅを参照すると、皮膚組織をサンプリングするために研磨エネルギーに基づいて組織を液化するデバイスが示されている。デバイスは、３つの部品７５１（モータ７０４を収容するデバイスハウジング７０１と導電性部材７０５及び７０６のアセンブリ）、部品７５２（ＬＰＭカートリッジ７０８、収集コンテナ７０７及びニードル７０９の使い捨てアセンブリ）及び部品７５３（ＬＰＭハウジング７１２、研磨パッド７１１及びシャフト７１０の使い捨てアセンブリ）から構成されている（図７ａ）。構成されたデバイスは、研磨パッド７１１が皮膚７１３と対向するように、皮膚７１３の対象となる予め特定した領域に対して配置される（図７ｂ）。デバイスの頂部に配置されたスライドプランジャー７０２は、皮膚に向かって押されて、ニードル７０９をＬＰＭカートリッジ７０８内に押し込み、滅菌シールを破って、ＬＰＭをハウジング７１２内に移送する。スライドプランジャー７０２はまた、バッテリーパック７０３を介してモータ７０４にエネルギーを与えて、シャフト７１０及び研磨パッド７１１を皮膚組織７１３に対して回動運動させる。皮膚組織が液化されると、皮膚成分は、ハウジング７１２に収容されたＬＰＭに溶解する。皮膚組織７１３の導電性はまた、シャフト７１０に固定された測定電極として

のスライドコンタクト７０５と基準電極７０６とを使用することにより測定される。導電率の閾値によって決定されるネルギー曝露の安全限界に達したときに、モータ７０４は停止する。スライドプランジャー７０２は、ニードル７０９が予め真空化されたサンプルコンテナ７０７を破壊するように皮膚に向かってさらに押される。サンプルコンテナ７０７は、ハウジング７１２から内部にサンプルを吸引する（図７ｄ）。デバイスは、皮膚から外されて解体される。デバイス部品７５２はさらに解体され、サンプルコンテナは、分析物の検出のために処理される。

【０１６５】

［例２］

［マイクロニードルに基づく装置による皮膚のサンプリング］

図８ａ乃至図８ｄを参照すると、皮膚組織をサンプリングするためにマイクロニードルに基づいて組織を液化するデバイスが示されている。デバイスは、マイクロニードル担持パッチ８０５が皮膚８０７に対向するように、皮膚８０７の予め特定された対象となる領域に対して配置される（図８ａ）。デバイスの頂部に配置されたスライドプランジャー８０１は、ＬＰＭが染みこんだスポンジ８０４が圧縮されてハウジング８０３内にＬＰＭを放出するように皮膚８０７に向かって押される。（図８ｂ）。次にパッチ８０５のマイクロニードル及び皮膚境界面にあるハウジング８０３をＬＰＭで充填する。液化処理が開始すると、スライドプランジャー８０１は皮膚組織８０７の内部にさらに押されて、マイクロニードル８０５は皮膚組織８０７の内部に挿入される（図８ｃ）。皮膚組織が液化されると、皮膚成分は、ハウジング８０３に収容されたＬＰＭに溶解する。皮膚の液化が完了すると、ニードル８０６がサンプルコンテナ８０２を破壊するように皮膚組織８０７に向かって予め真空化されたサンプルコンテナ８０２が押されて、ハウジング８０３から内部にサンプルを吸引する（図８ｄ）。デバイスは、皮膚から外されて解体される。サンプルコンテナ８０２は、分析物の分析のために回収される。残りのデバイス部品は、廃棄される。

【０１６６】

［例３］

［組織の分析物を捕捉するリザーバーハウジング］

図９（パネルａ－ｄ）を参照すると、液化組織サンプルから組織の分析物を捕捉するリザーバハウジングが示されている。リザーバハウジング（９０１）は、液化組織サンプルを収集するコンテナとして、本明細書で説明するエネルギー付与装置とともに使用されることを意図している。ハウジングは、サンプル中に存在する組織の分析物（９０３）と選択的に結合する捕捉基質（９０２）で覆われている。組織サンプルが十分に培養すると、分析物（９０３）はハウジング内に保持されるが、サンプルは廃棄される。分析物は、分離サンプル（９０４）のような次の分析物の捕捉のためにハウジング内の溶出緩衝液によって溶出する。代わりに、ハウジングは、結合した分析物（９０３）を分析する分析ツールに組み込まれていてもよい。

【０１６７】

［例４］

［組織の溶解度及びタンパク質の機能的保存を向上させる界面活性剤の配合］

特有の表面活性剤の配合は、本明細書で開示した定義に従った液化促進媒体（ＬＰＭ）を構成することで特定される。１５３の二元界面活性剤の配合のライブラリは４つの異なるカテゴリー（ｉ） 陰イオン界面活性剤（ラウリル硫酸ナトリウム（sodium lauryl sulfate）（ＳＬＳ）、ラウレス硫酸ナトリウム（sodium laureth sulfate）（ＳＬＡ）、トリデシルリン酸ナトリウム（sodium tridecyl phosphate）（ＴＤＰ）、デオキシコール酸ナトリウム（sodium deoxycholate）（ＳＤＣ）、デカノイルサルコシ酸ナトリウム（sodium decanoyl sarcosinate）（ＮＤＳ）、ラウロイルサルコシ酸ナトリウム（sodium lauroyl sarcosinate）（ＮＬＳ）、パルミトイルサルコシ酸ナトリウム（sodium palmitoyl sarcosinate）（ＮＰＳ））、（ｉｉ）陽イオン界面活性剤（オクチルトリメチル塩化アンモニウム（octyl trimethyl ammonium chloride）（ＯＡＴＢ）、ドデシルトリメチ

ル塩化アンモニウム（dodecyl trimethyl ammonium chloride）（ＤＤＴＡＢ）、テトラデシルトリメチル塩化アンモニウム（tetradecyl trimethyl ammonium chloride）（ＴＴＡＢ））、（ｉｉｉ）両性界面活性剤（３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］１－プロパンスルホナート（3-[(3-Cholamidopropyl) dimethyl ammonio]l -propane sulfonate）（ＣＨＡＰＳ）、３－（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Decyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＰＳ）、３－（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホナート（3-(Dodecyl dimethyl ammonio) propane sulfonate）（ＤＤＰＳ））、（ｉｖ）非イオン界面活性剤（ポリエチレングリコールドデシルエーテル（Polyethylene glycol dodecyl ether）（Ｂ３０）、ポリオキシエチレン２３－ラウリルエーテル（Polyoxyethylene 23-lauryl ether）（Ｂ３５）、ポリオキシエチレン１０－セチルエーテル（Polyoxyethylene 10-cetyl ether）（Ｂ５６）、ポリオキシエチレン２－ステアリルエーテル（Polyoxyethylene 2-stearyl ether）（Ｂ７２）、ポリエチレングリコールオレイルエーテル（Polyethylene glycol oleyl ether）（Ｂ９３）、ノニルフェノールポリエチレングリコールエーテル（Nonylphenol polyethylene glycol ether）（ＮＰ９））に属する１９の界面活性剤を使用することにより製造される。これらのカテゴリー（例えば非イオン界面活性剤）からの界面活性剤の一握りのみが、機能的組織プロテオームの抽出に従来は使用されている。さらに、これらの界面活性剤は、組織成分を効率よく可溶化する能力が高く制限される。よって、全ての界面活性剤の種類にわたって、組織成分の抽出潜在力及び生物活性保存は、相互に対立する性質であると考えられている。非イオン界面活性剤を、上述の他のタイプの界面活性剤（陰イオン、陽イオン及び両性界面活性剤）とその高い溶解能のために組み合わせることにより、高い可溶化及び非変性能を同時に有する新しい界面活性剤の配合の集まりを発明者は発見した。

【０１６８】

界面活性剤のライブラリはまず、抽出物内のタンパク質の生物活性を維持する非変位界面活性剤の配合物を特定することにより分けられる。次に、組織のタンパク質を可溶化する配合物の能力でランク分けされる。図１０（ａ）は、１５３の界面活性剤の配合物について、モデルタンパク質－ＩｇＥ抗体の特異機能性を維持する有効性を示している。詳細には、ＩｇＥ抗体のオボアルブミンとの結合能を試験した。図中のＸ軸は、各２成分配合に特有のフォーミュレーションインデックスを表している。Ｙ軸は、ＩｇＥ生物活性保持率（％）を示している。ＩｇＥ生物活性保持率は、純粋な溶媒（リン酸緩衝生理食塩水、ＰＢＳ）中の界面活性剤の場合のＩｇＥ結合性活性に対する界面活性剤配合物のＩｇＥ結合性活性の割合として定義される。配合物は幅広い変性潜在能力に及ぶ。驚くべきことに、穏やかな非イオン界面活性剤と組み合わせると、変性界面活性剤の増加により、ＩｇＥの機能性の保持と高い相互的な増加が得られた。全ての二元界面活性剤配合物について平均した非変性潜在能力は、その成分の単体界面活性剤配合物よりも著しく高い（ｐ＜０．００６；両側ヘテロ分散スチューデントｔ－検定）ことがわかり、さらに特有の共同相互作用が明らかとなった。

【０１６９】

高い生物活性維持（＞９０％）を示す界面活性剤の配合物は、簡単な超音波処理とともに組織のタンパク質を抽出する能力でさらに分けられる。ブタの皮膚がこれらの実験のモデル組織として使用された。半分以上の配合物の抽出能力は、皮膚組織１ｃｍ^{2}当たりのタンパク質が０．１ｍｇに近いことが明らかとなったが、２つの配合物は、０．３ｍｇ／ｃｍ^{2}を超えるタンパク質抽出を達成した（図１０ｂ）。

【０１７０】

界面活性剤のライブラリから分けられる最有力候補は、非常に高い非変性を示すが、論文等で報告され、抽出で最も広く使用される界面活性剤抽出よりも組織の可溶化に効果的な配合物となるのが一般的である。図１０ｃは、この最有力候補の界面活性剤の配合物－皮膚サンプルの０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０と１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳを比較した図である。中程度の抽出能力は、（０．１６±０．０７ｍｇ／ｃｍ^2）であるにもかかわら

ず、ＳＤＳは高い変性を示し、機能性タンパク質（部分的生物活性の維持する合計抽出タンパク質の生成物）の回収は低い結果となった。これに対して、０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０の配合物は、皮膚タンパク質を多く抽出（０．４８±０．１２ｍｇ／ｃｍ^2）するだけでなく、タンパク質活性を維持する。期待される機能性タンパク質の回収率の改善は、ＳＤＳの１００倍超に達する。同様に一般的に使用される非変性界面活性剤である１％（ｖ／ｗ）トリトンＸ－１００及びＰＢＳに対して、１０倍を超えるタンパク質回収率となった。

【０１７１】

［例５］

［ストレス下での生物活性の維持］

特有の界面活性剤配合物またはＬＰＭ（例１に記載した方法で特定されるような）がストレス下で種々の分析物を追加的に保護することを示す。超音波曝露のような機械的エネルギーの変性効果（生体分子の変性としてよく知られる）は、特有の界面活性剤配合物の使用により中和できることを時に示す。

【０１７２】

別の実験では、球状タンパク質（ＩｇＥ）及び２つの代表的な酵素－乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）及びベータガラクトシターゼ（β－Ｇａｌ）を０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０界面活性剤配合物に溶解させて、超音波分解してタンパク質の生物活性の維持を長い時間をかけて測定した。食塩水（ＰＢＳ）に溶解したタンパク質は、比較制御として作成した。ＰＢＳに溶解したＩｇＥでは、徐々に機能性が激減していくことが観察された。しかしながら、０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０配合物では、驚くことに、超音波変性ストレスからのＩｇＥの保護が拡張された（図１１ａ）。超音波処理に関係なく、ＳＤＳに溶解させたＩｇＥは、完全に変性した状態を示した。同様の傾向は、０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０配合物中に調製したＬＤＨ及びＢ－Ｇａｌの酵素活性の維持の拡張が観察された（図１１ｂ）。ＰＢＳ中でのタンパク質の調製は、生物活性を大きく損失する結果となり（ｐ＜０．００６；両側ヘテロ分散スチューデントｔ－検定）、超音波処理の３分後には１６．７％（ＩｇＥ）、７０．８％（ＬＤＨ）、６８．７％（Ｂ－Ｇａｌ）に達する部分生物活性となった。

【０１７３】

［例６］

［組織のサンプリング及び分子診断］

ＬＰＭ（０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０の食塩水）の存在下での超音波曝露の、種々の機能的疾病バイオマーカーを組織からサンプルする能力について実証した。

【０１７４】

卵アレルギーのマウスの皮膚からアレルギー特異性ＩｇＥ抗体のサンプリングを行った。生後６週齢から８週齢の雌形ＢＡＬＢ／ＣＬマウスをＣｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｓ（Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）から購入し、病原体フリー状態下で維持した。アレルギー反応は、経皮曝露プロトコルによってマウスに誘発された。酸素中に１．２５－４％のフルオランで麻酔した後、マウスの背中の皮膚を剃り、１０回テープストリッピング（Ｓｃｈｏｔｃｈ Ｍａｇｉｃ Ｔａｐｅ，3Ｍ Ｈｅａｌｔｈ Ｃａｒｅ，Ｓｔ Ｐａｕｌ，ＭＮ）をして、標準的な皮膚損傷を形成した。１００μＬの０．１％ＯＶＡに浸されたガーゼパッチ（１ｃｍ×１ｃｍ）を背中の皮膚上に置き、通気性のゴム布ベースの粘着テープで固定した。パッチは１週間貼り付けた。全実験は、１週間の曝露と、各曝露の週の間の２週間の間隔の全部で３週間からなる。サンプリングは、最小限のシアノアクリレートベースの接着剤で、特注のフランジチャンバー（１．３３ｃｍ^{2}の皮膚曝露領域）を剃った皮膚領域に接着することにより行った。チャンバーは、１．８ｍｌの０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＳ－Ｂ３０界面活性剤配合物で充填し、２０ｋＨｚの超音波を、２．４Ｗ／ｃｍ^{2}で５分間、５０％のデューティサイクルで付与した。超音波処理されたまたはされていない湿疹皮膚部位の皮膚生体組織が得られた。皮膚ホモジネートサンプルは、正の制御で調製された。図１２ａは、超音波援助サンプリングにより、健常マウスに比べてアレルギーマウス

から十分に多い量のアレルギー特異性ＩｇＥ抗体がうまくサンプルされたことを示している。予期されたように、アレルギーマウス及び健常マウスからのサンプル中のＩｇＧ抗体の量の差は見られなかった。

【０１７５】

マウスの皮膚からのコレステロールのサンプリングを行った。上記段落の記載と同様の手順で、超音波処置した皮膚のサンプルを収集した。皮膚ホモジネートは、処理していない皮膚から収集した生体組織から正の制御で調製した。皮膚のコレステロールは、心臓血管疾患の診断に重要なバイオマーカーである［１］。図１２ｂには、超音波援助サンプリングにより、皮膚からコレステロールがうまくサンプルされたこと及びサンプルされた量が皮膚ホモジネート中に存在するコレステロールの量に匹敵することを示している。

【０１７６】

最後に、ブタの皮膚から細菌ゲノムのサンプリングを行った。組織、詳細には皮膚及び粘膜には、バクテリア、真菌類及びウイルスを含む微生物の多様な集合を定着させた［２－５］。細菌性感染の正確な診断は、適切な患者管理をもたらし、予後診断の情報を提供すると共に狭域抗生物質の使用を可能とする［６－８］。それ故、確定的な微生物検出は、感染症の治療の診断及び微生物感染に関連する病気の発生のトレースバックに必須である。しかしながら皮膚上に微生物が存在するサンプルを正確に得ることは、大きな課題である［２］。多くの実用的な収集の方法は、シンプルで、速くしかも非侵襲性であるので、スワビングである［３，９］。しかしながらスワビングには、皮膚上の微生物を正確に示さず、定量的データを提供しないことを示す微生物の低い回収率及び標準的プロトコルの欠如を含む種々の制限がある。超音波支援サンプリングは、これらの制限を効果的に解決する。詳細には、切り出されたブタノ皮膚を、食塩水（ＰＢＳ）に浸したコットンボールでスワビングしてサンプリングし、別の実験ではＬＰＭとしての０．５％（ｗ／ｖ）ＤＰＭ－Ｂｒｉｊ３０とともに超音波支援サンプリングでサンプリングした。細菌ゲノムは、標準的なフェノールクロロホルム抽出法により各サンプルから精製される。簡潔には、サンプルはまず、ｐＨ８．０で２０ｍＭのトリス（ＢＰ１５４－１，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、２ｍＭのＥＤＴＡ（ＢＰ１２０－５００，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、１．２％のトリトンＸ－１００（ＢＰ１５１－１００，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び２０ｍｇ／ｍｌのリゾチーム（６２９７０－１Ｇ－Ｆ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃ）からなる溶液内で、３０分間３７℃で培養される［９］。次にサンプルは、３時間３７℃で、０．１ｍｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫ（ＰｒｉｔｅｉｎａｓｅＫ）（Ｐ２３０８－２５ＭＧ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、０．５％（ｗ／ｖ）のラウリル硫酸ナトリウム（Ｓ５２９，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び１００ｍＭの塩化ナトリウム（ＢＰ３５８－１，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）からなる溶液内で培養した。ゲノムＤＮＡは、同量のフェノール（Ｐ４５５７，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｅｒｉｃｈ）で抽出され、続いて２５：２４：１のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール液（Ｐ２０６９，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｅｒｉｃｈ）で抽出される。ＤＮＡは、エタノールで培養して、２０分間の遠心分離により沈殿する。ＤＮＡペレットは、７０％エタノールで２回洗浄され、乾燥され、８０μｌのトリス緩衝液に再懸濁される。各方法によりサンプルされた細菌の量は、定量ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）を使用して各サンプル中の保存された１６Ｓ細菌遺伝子の存在を決定することにより評価される。図１２ｃには、超音波支援サンプリングでは、従来のコットンスワビング法よりも７倍高い量の細菌遺伝子がサンプルされたことを示している。

【０１７７】

［例７］

［核酸に基づく試験と適合するＬＰＭの緩衝液の設計］

組織の液化サンプルのその後の分析との適合性を確保するために、ＬＰＭの成分は、注意深く選択する必要がある。種々のＬＰＭ成分の核酸に基づく分析法との適合性を試験した。詳細には、ＬＰＭ成分のｑＰＣＲとの適合性は、最も一般的な遺伝子に基づく試験である、異なるＬＰＭｓに加えられたプラスミドＤＡＮを増幅する試験の能力の測定のによ

り評価される。

【０１７８】

ルシフェラーゼプラスミド（Ｅ１７４１，Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ.）の１０００万のコピーを、１０μｌの異なる溶液（ｉ）水、（ｉｉ）水に０．９１％（Ｗ／Ｖ）塩化ナトリウム（ＢＰ３５８－１，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、（ｉｉｉ）ＰＢＳ（Ｐ４４１７，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、（ｉｖ）ｐＨ７．９の１０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ＢＰ１５４－１，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、（ｖ）リン酸二水素ナトリウム一水和物及び二塩基性リン酸水素ナトリウム（Ｓ９６３８－２５Ｇ，Ｓ７９０７－１００Ｇ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）からの誘導体でありｐＨ７．９の０．０７５Ｍリン酸ナトリウム緩衝液、（ｖｉ）水に０．５ｍＭのＥＤＴＡ（ＢＰ１２０－５００，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に入れた。溶液は、１０μｌのＰＣＲ反応用緩衝液と混合した。ルシフェラーゼ増殖プライマーは、５’－ＧＣＣ ＴＧＡ ＣＴＣ ＴＧＡ ＴＴＡ ＡＧＴ－３’をフォワードプライマーとし、５’－ＡＣＡ ＣＣＴ ＧＣＧ ＴＣＧ ＡＡＧ－３’をリバースプライマーとして、９６ｂｐのアンプリコン（単位複製配列）を作成した［１０］。増殖反応は、１．５ｍＭの$MgCl_2$及び０．２μＭの各プライマーと、ＰＣＲ中の０．２ｍＭのｄＮＴＰｓ、タックポリメラーゼ（１０９６６－０３４，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の０．０２５ｕｎｉｔｓ／μｌ及びＳＹＢＲ－グリーン（Ｓ－７５６３，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とを１：４５０００の比で含む２０μｌ溶液で行った。プラスミドＤＮＡのアリコートは、標準曲線を描くように水で希釈される。分析は、光学グレード９６ウェルプレートを使用して、ｉＣｙｃｌｅｒＰＣＲマシーンで行った。反応の熱サイクルは、以下のように定めた。最初に９５℃で３分間変性させ、次に９５℃で３０秒間の変性を４０サイクル行い、６０℃で３０秒間アニーリングし、７２℃で３０秒間伸長し、最後に７２℃で１０分間伸展させた。各緩衝液について、対象（水中プラスミドＤＮＡ）と比較することにより適合性を計算した。

【０１７９】

図１３には、塩化ナトリウム、ＰＢＳ及びリン酸ナトリウム緩衝液は、対象と比較すると、定量ＰＣＲ分析の検出緩衝液として適当でないことが示されている。しかしながら、トリス－ＨＣｌまたはＥＤＴＡを緩衝液として使用すると、分析物分析の検出能が高まっている。

【０１８０】

［例８］

［核酸に基づく試験とのＬＰＭの適合性］

種々のＬＰＭｓ（例１に開示）について既存の核酸に基づく試験との適合性について試験を行った。詳細には、プラスミドＤＮＡを異なるＬＰＭｓに混合して、ｑＰＣＲのＤＮＡ増幅能について評価した。ＬＰＭは、１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ緩衝液に種々の濃度で界面活性剤を加えることにより調製した。本明細書で開示するような組織の液化処理を模倣するように、各ＬＰＭは、ブタの皮膚ホモジネート０．２ｍｇ／ｍｌと混合されて、ルシフェラーゼプラスミド（Ｅ１７４１，Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ.）の１０００万のコピーが１０μｌのＬＰＭに入れられる。この溶液は、１０μｌのＰＣＲ反応用緩衝液と混合される。ｑＰＣＲは、例４で説明するプロトコルに従って行われる。精製されたプラスミドＤＮＡは、標準曲線を描くようにトリス－ＨＣｌ溶液で希釈される。各ＬＰＭの適合性は、ｑＰＣＲによるプラスミドの増幅量を決定することにより計算した。

【０１８１】

図１４は、トリトンＸ－１００、Ｂｒｉｊ３０、ＤＭＳＯ、ＯＴＡＢ、ＯＴＡＢ－Ｂｒｉｊ３０及びＤＰＳ－Ｂｒｉｊ３０が定量ＰＣＲと高く適合していることを示している。しかしながら、ＮＬＳまたはＮＬＳ－Ｂｒｉｊ３０からなるＬＰＭｓでは、ＤＮＡは増幅していない。特に、ＤＰＳ－Ｂｒｉｊ３０をＬＰＭとして使用すると、組織から生体分子を効果的にサンプリングし、タンパク質活性を維持しており、ＥＬＩＳＡ、クロマトグラフィー及びｑＰＣＲを含む分析方法と適合している。そのため、ＤＰＳ－Ｂｒｉｊ３０は、タンパク質、脂質及び核酸を分析する液化促進媒体として最も望ましい。ＰＣＲを容易

にすることが知られている［１１］トリトンＸ－１００及びＤＭＳＯは、常に効果的にポリメラーゼ連鎖反応することが示されている。しかしながらこれらは、十分な組織の抽出物が得られていない。

【０１８２】

［例９］

［組織から生存可能かつ遺伝的に無傷の微生物をサンプリングするための超音波パラメータの特定］

この例では、組織から生きた微生物を効率よく収集するための超音波の非致死条件について説明する。微生物は、種々の形態のエネルギーを組織に付与することにより組織から収集することができる。しかしながら、高エネルギーの使用は、微生物の生存能力に非常に有害である。従って、生きた微生物を収集するためのエネルギー付与の非致死条件を見つけることが必要である。皮膚から生存可能かつ遺伝的に無傷のバクテリアをサンプリングするための超音波の非致死条件を説明する。

【０１８３】

Ｅ．Ｃｏｌｉ Ｓｔｒａｉｎ ＤＨ１０α（１８２９０－０１５，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のバクテリア培養は、３７℃、２５０回転のＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＢＰ１４２６，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）またはＡｇｅｒプレート上の固体培養（３７℃）で成長する。培養物は、遠心分離によって採取される。得られたペレットは、ｐＨ７．９の１０ｍＭのトリス－ＨＣｌからなるＬＰＭに、10^9ｃｅｌｌ／ｍｌの濃度で懸濁される。Ｅ．Ｃｏｉｌセルは、分光光度計（暗順応計、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）で定量化される。０．２５×10^9ｃｅｌｌ／ｍｌのバクテリア培養は、吸光度値が０．２５で波長６００ｎｍの光学密度に対応していると考えられる。１ｍｌの再懸濁セルを滅菌した円筒コンテナ（内径２０ｍｍ、フラットな基部、壁厚１．３ｍｍ、高さ３１ｍｍ）内に配置した。全ての実験は、周波数２０ｋＨｚ、デューティーサイクル５０％の６００－Ｗａｔｔ Ｓｏｎｉｃａｔｏｒ（Ｓｏｎｉｃｓ＆Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＣＴ）で行った。超音波曝露のパワーセッティング及び時間は、この実験において変化させた。トランスデューサーは、プローブが底部から５ｍｍの間隔で液体に浸されるまで、コンテナの下方にある。トランスデューサーは、異なるサンプルの超音波処理の間に７０％エタノールで滅菌される。超音波処理の後、各サンプルの１０倍連続希釈を１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．９）で調製した。各希釈段階から１００μｌのサンプルをＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ寒天培地プレートにのせて、滅菌スプレッダーで広げた。プレートは、３７℃で２４時間培養され、生存バクテリアのコロニー計数が、寒天プレートの表面で行われた。結果は、非超音波制御に対する減少率で表した。超音波曝露したサンプル中の細菌ゲノムを完全に評価するために、電気泳動を行った。全てのサンプルは、プロテイナーゼＫ（１９１３１，Ｑｉａｇｅｎ）及び０．５％（ｗ／ｖ）ラウリル硫酸ナトリウム（Ｓ５２９，Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）内で５６℃で培養された。培養の１時間後、全てのゲノムＤＮＡは、ＤＮｅａｓｙＤＮＡ抽出キット（６９５０４，Ｑｉａｇｅｎ）を使用して抽出された。キットの標準プロトコルは、以下の全ての後続ステップに付随する。精製されたゲノムＤＮＡは、４００μｌの緩衝液ＡＥで再懸濁され、－２０℃で分析まで保存される。精製されたＤＮＡを、２％（ｗ／ｖ）のトリス－アセテートＥＤＴＡ－アガロースゲル中で９０分間１００Ｖで電気泳動した。ゲルは、ＳＹＢＲゴールド（ＳＩ１４９４，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で着色し、紫外線下で目視可能にした。

【０１８４】

図１５は、１．７Ｗ／cm^2の濃度で２分間超音波曝露したＥ．Ｃｏｉｌの生存能力が、非処理のＥ．Ｃｏｉｌの生存能力に対して統計的に有意でないことを示している。このことは、これらの超音波液化条件が大きな生存能力の損失なしにサンプリングに使用可能であることを示している。しかしながら、より高出力で超音波処理されたサンプルは、付与時間と共に、生存能力が急速に減少する。セルの生存能力は、非処理のセルと比較すると大きく異なる。高密度での曝露の１分後であっても、３．６％に減少している（ｐ＜０．０５）。この観察結果は、電気泳動により評価した細菌ゲノムの完全性と一致している

（図１６）。１．７Ｗ／ｃｍ^{2}の濃度で２分間超音波処理（セルの生存能力の維持を示す条件）をしても、細菌ゲノムは、損傷しないことが観察された。しかしながら、対称的に、１．７Ｗ／ｃｍ^{2}の濃度（３２％の生存能力）及び２．４Ｗ／ｃｍ^{2}の濃度（８％の生存能力）のゲノムＤＮＡで３分間超音波処理したＥ．Ｃｏｉｌのゲノム ＤＮＡは、低分子量の一部のゲルにマイグレーションしたことからわかるように、高度に崩壊した。これらの結果は、生きたバクテリアの収集は、１．７Ｗ／ｃｍ^{2}の濃度で２分間超音波処理を行うべきことを示している。

【０１８５】

［例１０］

［組織からの生きている微生物の検出］

ＬＰＭ（トリス－ＨＣｌ緩衝液）に加えて超音波エネルギーに短時間曝露させることにより、皮膚から生菌をサンプルすることができる。超音波でサンプリングした皮膚のバクテリアは、従来のアッセイコロニー計数法及びリアルタイムの定量的ＰＣＲによって定量化され、スワビング及び他の界面活性剤スクラビング法のような標準的なサンプルリング方法と比較することにより評価される。

【０１８６】

皮膚常住バクテリアのサンプリングを評価するために、ブタの皮膚でインビトロ試験を行った。予めカットされ冷凍された全層ブタ皮膚であってヨークシャーブタの側腹部から採取されたものを、Ｌａｍｐｉｒｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｉｎｃ．,ＰＡから入手し、１０ｃｍ×２５ｃｍストリップとした。皮膚は、実験まで－７０℃で保管した。かき傷及び擦り傷のような目に見える傷のない皮膚の一部は、室温で解凍され、小片（２．５×２．５ｃｍ）に切り分けられ、フランツ拡散セル（ＰｅｒｍｅＧｅａｒ， Ｉｎｃ．,ＰＡ， ＵＳＡ）に取り付けられた。拡散セルのレシーバーチャンバーは、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（Ｐ４４１７， Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ， ＭＯ）で充填し、ドナーチャンバー（１．７７ｃｍ^{2}の皮膚曝露領域）を、超音波トランスデューサーと皮膚との間を結合する液体としても機能する１０ｍＭトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．９）１ｍｌで充填した。超音波トランスデューサーは、皮膚表面から５ｍｍのところに配置され、１．７Ｗ／ｃｍ^{2}の密度の超音波が２分間付与された。プローブは、異なるサンプルの実験の間に７０％エタノールで滅菌した。比較対象としてのサンプルは、皮膚のスワビングで得られる。コットンスワブ（Ｂ４３２０１１５， ＢＤ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）は、使用前に、滅菌されたリン酸緩衝生理食塩水に浸した。サンプル部位の領域は、３．３ｃｍ^{2}の領域を囲う滅菌された金属リングを皮膚表面に保持することにより規格化される。皮膚表面は、穏やかに且つ繰り返して約２０秒間擦られる。各スワブには、１ｍｌのＰＢＳが抽出される。皮膚バクテリアはまた、Ｗｉｌｌｉａｍｓｏｎ及びＫｌｉｇｍａｎの界面活性剤スクラブ手法によりサンプリングされる［２，１２］。滅菌金属リングは、皮膚表面に対してしっかり保持される。０．１％トリトンＸ－１００を含む０．０７５Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ７．９）の１ｍｌが、ピペット内に入れられる。金属リングがつけられた皮膚表面は、テフロンセルスクレイパーで１分間しっかりと擦られる。得られたサンプルは、滅菌された遠心分離管に収集される。この手順は、同じ皮膚に追加で２回繰り返され、サンプルは一緒に貯留される。各サンプルの１０倍連続希釈で調製し、各希釈サンプルから１００μｌの分量をＴｒｙｐｔｉｃ Ｓｏｙ ａｇａｒプレート（９０００２， ＢＤ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）に置いた［１２］。プレートは次に、３７℃の好気状態下で２４時間培養された。コロニーが計数されて、サンプリングした皮膚の単位領域あたりのコロニー形成ユニット（ＣＦＵ／ｃｍ^2）を計算することにより、抽出効率の評価を得た。全てのバクテリアを定量化するために、１６ＳｒＲＮＡ遺伝子のアンプリコンに基づいてリアルタイムの定量的ＰＣＲを行った。全ての生体試料は、酵素溶解緩衝液（ｐＨ８．０で２０ｍＭのトリス、２ｍＭのＥＤＴＡ、１．２％のトリトンＸ－１００）及びリゾチーム（２０ｍｇ／ｍＬ）の調製液内で３０分間３７℃で培養された［９］。サンプルは次に、ＤＮｅａｓｙＤＮＡ抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）から得られるプロテイナーゼＫ及び緩衝液ＡＬ内で１時間５６℃で培養

された。キットの標準プロトコルは、以下の全ての後続ステップに付随する。緩衝液ＡＥにより培養したＤＮＡは、等量の完全なイソプロパノールで培養して２０分間の遠心分離することにより沈殿させた。ＤＮＡペレットは、７０％エタノールで１回洗浄され、乾燥され、８０μｌの緩衝液ＡＥに再懸濁される。負の制御はまた、ＰＢＳ内で超音波処理され滅菌されたコットンスワブを使用することにより調製される。１６Ｓ遺伝子の分析は、光学グレード９６ウェルプレートを使用して、ｉＣｙｃｌｅｒＰＣＲマシーン（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ）で行った。１６Ｓ細菌遺伝子の一部を、フォワードプライマー６３Ｆ（５’－ＡＧＡＧＴＴＴＧＡＴＣＣＴＧＧＣＴＣＡＧ－Ｓ’）及びリバースプライマー３５５Ｒ（５’－ＧＡＣＧＧＧＣＧＧＴＧＴＧＴＲＣＡ－３’）を使用して増殖させた［９，１３］。標準曲線は、１０μｌ緩衝液ＡＥ中で、既知量のＥ．Ｃｏｉｌセルから得た連続希釈したゲノムＤＮＡを増幅することにより構成される。１０μｌの精製ＤＮＡは、２ｐｍｏｌの各プライマー及びプラチナＰＣＲスーパーミックス（１１７８４，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と混合して、２０μｌの最終反応物とした。熱サイクルは、以下のように定めた。最初に９４℃で５分間変性させ、次に９４℃で３０秒間の変性を３２サイクル行い、６６℃で３０秒間アニーリングし、７２℃で３０秒間伸長し、最後に７２℃で１０分間伸展させた。各サンプルについて、３つのレプリカについて行った。

【０１８７】

図１７は、異なる手法のサンプリングの有効性の比較を示している。図１７ａは、超音波サンプリングで皮膚からバクテリアを回収した数が、コットンスワビング（ｐ＜０．０５）の約１７倍よりも高いことを示している。特に、超音波で収集されたバクテリアの合計量の数は、正の制御（界面活性剤スクラッピング法）と大きく変わらない。超音波サンプリングの有効性は、１６ＳｒＲＮＡの細菌遺伝子の増殖に基づくリアルタイムの定量的ＰＣＲを使用することによりさらに試験を行った（図１７ｂ）。超音波での収集は、1.7×10^{4}ｂａｃｔｅｒｉａ／cm^{2}であり、スワビング（4.5×10^{3}ｂａｃｔｅｒｉａ／cm^{2}）よりも十分に高く、スクラビング手法（1.6×10^{4}ｂａｃｔｅｒｉａ／cm^{2}）と同等である。

【０１８８】

［例１１］

［ＬＰＭ中のヒトのＩｇＥの検出を容易にする感度エンハンサーの使用］

モデル分析物としてヒトＩｇＥ抗体の検出を容易にする感度エンハンサーの能力をテストした。ヒトＩｇＥ抗体は、モデルＬＰＭである１％ｗ／ｖのＮＬＳ－Ｂｒｉｊ３０の混合物を含むＬＰＭに溶解させた。ＥＬＩＳＡアッセイは、ＬＰＭ中に感度エンハンサーの存在下または非存在下でのヒトＩｇＥ抗体の検出の評価に使用された。詳細には、ヒトＩｇＥ抗体と特異性結合した１μｇの抗体（Ａ８０－１０８Ａ，Ｂｅｔｈｙｌ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，　ＴＸ）を９６ウェルＥＬＩＳＡプレートのウェルで被覆した。ヒトＩｇＥ（ＲＣ８０－１０８，Ｂｅｔｈｙｌ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，ＴＸ）は、０－１００ｎｇ／ｍｌの濃度で感度エンハンサーとともにまたは感度エンハンサーなしでＬＰＭに溶解した。正の制御のときには、ヒトＩｇＥサンプルは、１％ｗ／ｖＢＳＡ及び０．０５％／ｖＴｗｅｅｎ２０（Ｐ７９４９，Ｓｉｇｍａ－ａｌｄｒｉｃｈ，　ＭＯ）を含む標準的な希釈剤を免疫測定法で一般的に使用される５０ｍＭトリス緩衝生理食塩水（Ｔ６６６４，Ｓｉｇｍａ－ａｌｄｒｉｃｈ，　ＭＯ）に溶解することにより調製した。２種類の感度エンハンサーが配合される：１０％ＢＳＡ及び０．５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ並びに１０％ＢＳＡ及び０．５％Ｔｗｅｅｎ２０を含む５０ｍＭトリス緩衝生理食塩水である。これらの感度エンハンサーはそれぞれ、ＩｇＥを含むＬＰＭに１：１０の比で別々に加えられる。標準的なブロック緩衝液を有するＥＬＩＳＡプレートの３０分間の培養後、これらのサンプルは、個別のウェルで１時間培養された。ウェルの洗浄後、１μｇ／ｍｌの濃度のＨＲＰ標識二次抗体が各ウェルで１時間培養された。洗浄後、ＥＬＩＳＡによるＩｇＥ抗体の検出能力を示す（基質５４－６１－００，ＫＰＬ，ＭＤによって誘発される）ＨＲＰに基づく化学発光信号を分光光度計を使用して各テストケースについて測定した。

【０１８９】
図１８には、分析物の濃度に応じた種々の試験ケースからの化学発光シグナルの強度がプロットされている。ＬＰＭ自身は、正の制御と比較して、ＥＬＩＳＡ分析の適切な検出試薬でないことが結果として示されている。しかしながら、ＬＰＭに感度エンハンサーを加えることにより、分析アッセイの検出能力が向上している。さらに、トリス緩衝生理食塩水は、感度エンハンサーの調整の溶媒として使用した場合には、リン酸緩衝生理食塩水と比べた場合に、信号強度を上げることが示されている。これらの結果は、ＬＰＭ自身は、ＥＬＩＳＡでの分析物の検出の容易化に有効でないが、感度エンハンサーの追加により、ＥＬＩＳＡでの分析物の検出能力を十分に高めることができることを証明した。
【０１９０】
上記説明は、単に本発明の原理を示したものにすぎない。したがって、当業者は、本明細書においては明確に記述または図示されていないが、本発明の原理を具体化する様々な構造を工夫することができることは理解されよう。これらはすべて本発明の精神および範囲の範疇である。さらに、本明細書において記載されているすべての実施例および条件付き言語には、主として、当分野をさらに発展させるべく、読者による本発明の原理および本発明者による寄与の概念の理解を補助するにすぎないことが明確に意図されており、また、これらの実施例および条件付き言語は、記載されているこのような特定の実施例および条件に限定されるものとして解釈してはならない。さらに、本明細書における、本発明の原理、態様および実施形態ならびにそれらの特定の実施例を記述しているあらゆる供述には、それらの構造的および機能的等価物の両方が包含されることが意図されている。また、このような等価物には、現在知られている等価物ならびに将来的に開発される等価物の両方、つまり、開発される、構造には無関係に同じ機能を実行するあらゆる構成要素が含まれることが意図されている。したがって、本発明の範囲は本明細書に図示され記載された例示的な実施の形態に限定されることは意図されていない。むしろ、本発明の範囲および精神は特許請求の範囲によって表現されている。
【０１９１】
［例１２］
［ブタの皮膚内へのイヌリン及びアシクロビルの送達］
薬物送達の実験をブタの皮膚でインビトロで行った。予めカットされ冷凍された全層ブタ皮膚であってヨークシャーブタの側腹部から採取されたものを、Ｌａｍｐｉｒｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｉｎｃ．,ＰＡから入手した。皮膚は、実験の前に－８０℃の冷凍庫に保管されていた。皮膚は室温で解凍され、かき傷及び擦り傷のような目に見える傷のない皮膚を小片（２．５×２．５ｃｍ）に切り分けた。皮膚片をフランツ拡散セル（Ｆｒａｎｚ ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ ｃｅｌｌ）（ＰｅｒｍｅＧｅａｒ，Ｉｎｃ．,ＰＡ）に取り付けた。各試験の前に、レシーバーコンパートメントをＬＰＭまたはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で充填した。１％（ｗ／ｖ）ＮＬＳ及びＢｒｉｊ３０の混合物を含むＰＢＳをＬＰＭのモデル配合として選択した。各実験の前に、皮膚の導電率を完全性を確保して測定した。皮膚は、初期導電率が２．２μＡ／ｃｍ^{2}を超える場合には、ダメージを負っていると考えられる。超音波は、周波数２０ｋＨｚ、強度２．４Ｗ／ｃｍ^{2}で５分間作動する超音波発生装置（ＶＣＸ４００，Ｓｏｎｉｃｓ ａｎｄ Ｍａｔｅｒｉａｌ）を使用して付与される。ＬＰＭまたはＰＢＳを除去した後に、ドナーコンパートメントを１０μＣｉ／ｍｌのイヌリン溶液（ＮＥＴ０８６Ｌ００１ＭＣ，ＰｅｒｋｉｎＥｌｉｍｅｒ Ｌｉｆｅ ａｎｄ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｓｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．， ＭＡ）を含むＰＢＳで充填した。サンプルは、超音波付与の２４時間後にレシーバコンパートメントから取り出した。別の実験では、皮膚サンプルと直接接触するように、回転研磨面（プラスチックの剛毛を有する円形ブラシ）がドナーチャンバーに導入された。１０μＣｉ／ｍｌのアシクロビル溶液が、２４時間皮膚上に置かれた。皮膚は、食塩水によって洗浄されて、Ｓｏｖｌｖａｂｌｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ ＭＡ）に溶解される。これらのサンプルの濃度は、シンチレーションカウンター（Ｔｒｉ－Ｃａｒｂ２１００ ＴＲ， Ｐａｃｋａｒｄ， ＣＴ）によって測定される。全ての実験は、室温

２２℃で行われた。超音波装置及び研磨装置のどちらにも制御は加えていない。エラーバーは、標準偏差を示している。

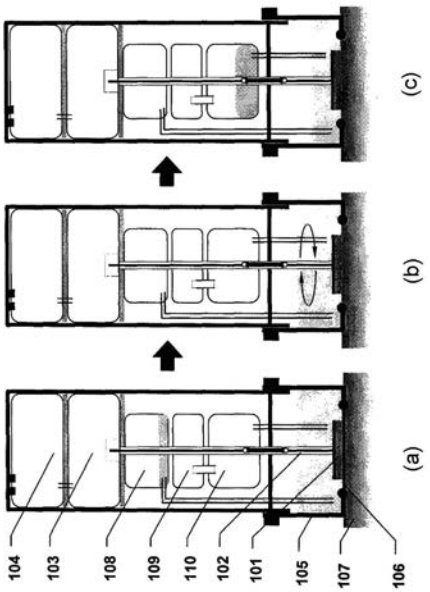
【０１９２】

図１９（ａ）に示すように、ＬＰＭと一緒に５分間超音波を照射することにより、超音波のみ及び無傷の皮膚での受動拡散の両方の場合と比較して、薬物輸送が増大した。同じ効果は、皮膚を複数の剛毛を有する移動ブラシ装置で摩耗させた場合でも認められた（図１９（ｂ））。手短に言えば、ＬＰＭと共にエネルギーを付与してインビトロで実証されたブタの皮膚を使用した例では、組織を通ったまたは組織内への分子の通過を高める効果がある。付与の力、時間及びＬＰＭの配合のようなパラメータは、組織のタイプ及び輸送される物質の両方に対する個別の状況に適合するように最適化することができる。

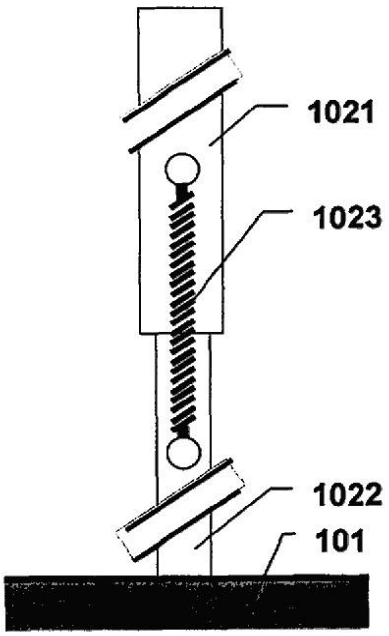
【０１９３】

本発明を好ましい実施の形態に関して説明したが、当業者であれば容易に理解できるように、本発明の本質及び範囲から逸脱することなく改良及び変更が可能であることが理解される。従って、以下のクレームの範囲内で変更が可能である。

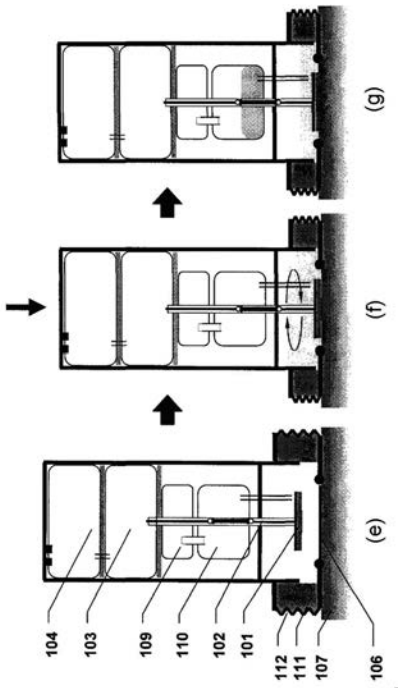
【図１ａ－１ｃ】



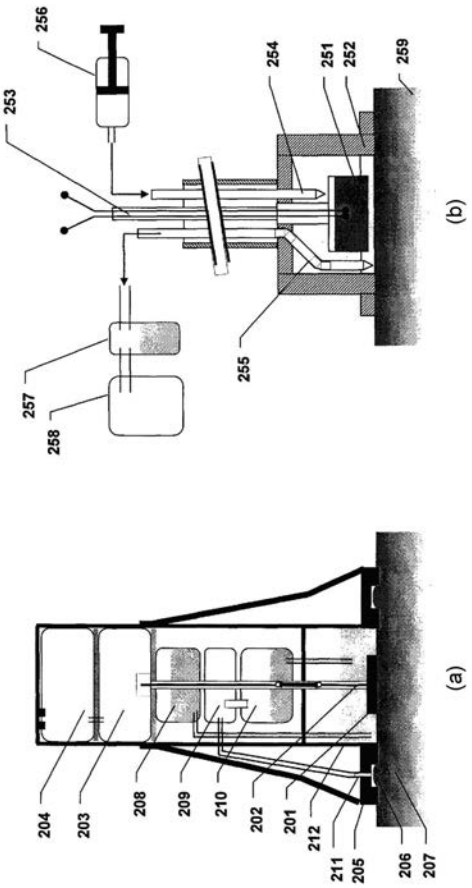
【図１ｄ】



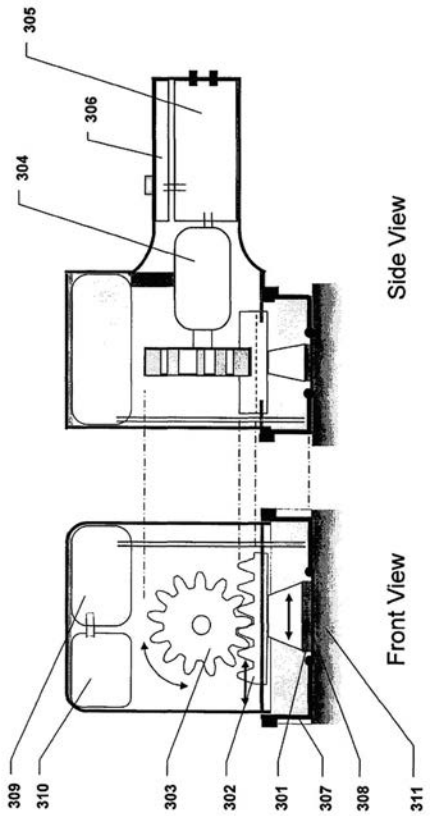
【図１ｅ－１ｇ】



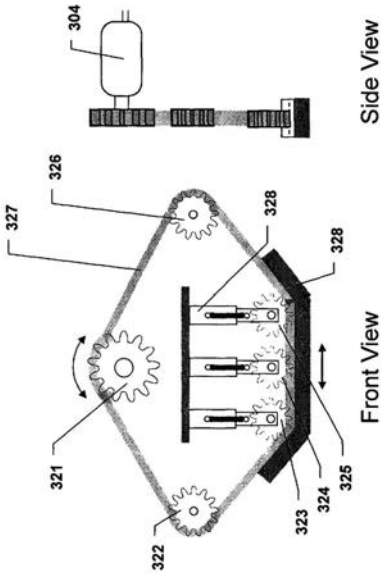
【図２】



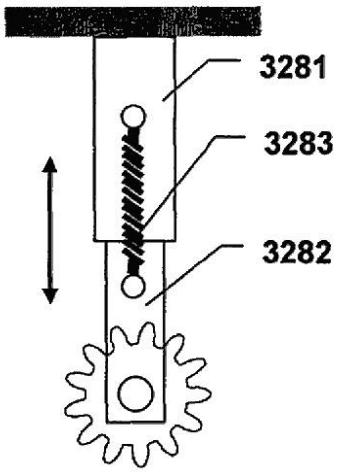
【図３ａ】



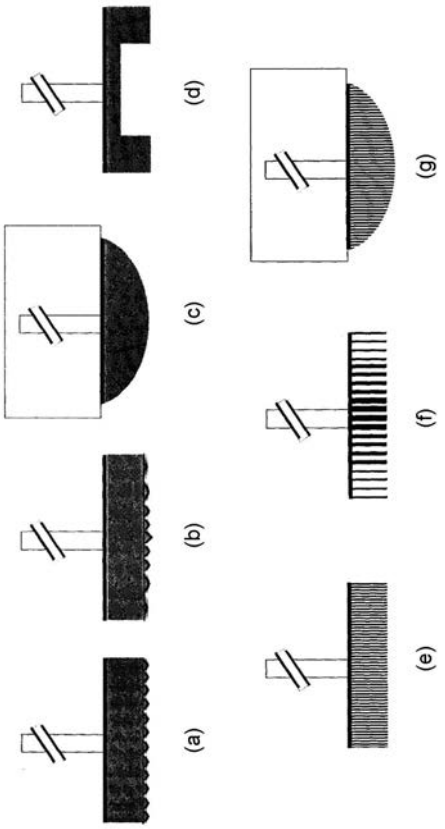
【図３ｂ】



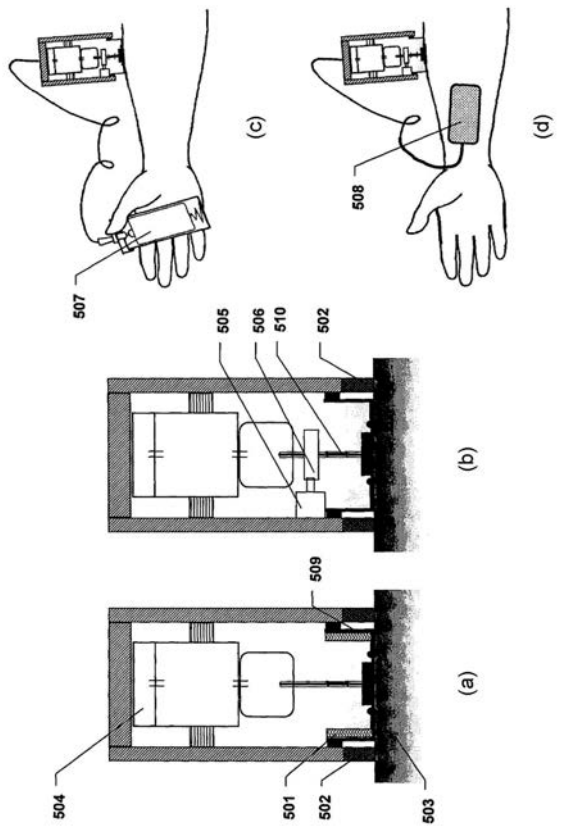
【図３ｃ】


3281
3283
3282

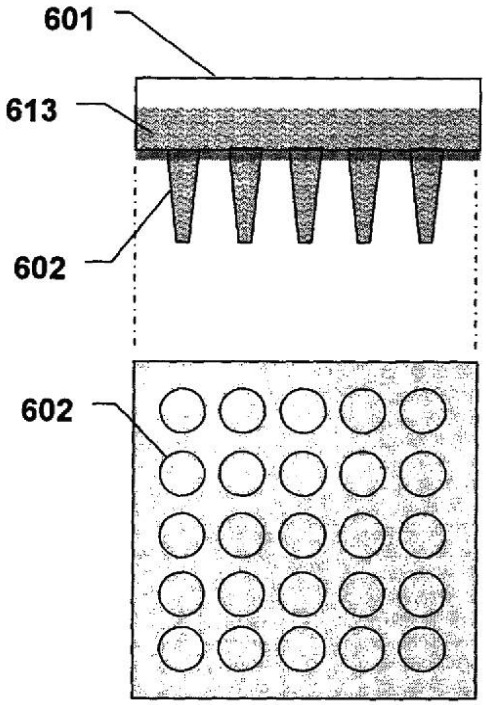
【図４】


(d)
(g)
(c)
(f)
(b)
(e)
(a)

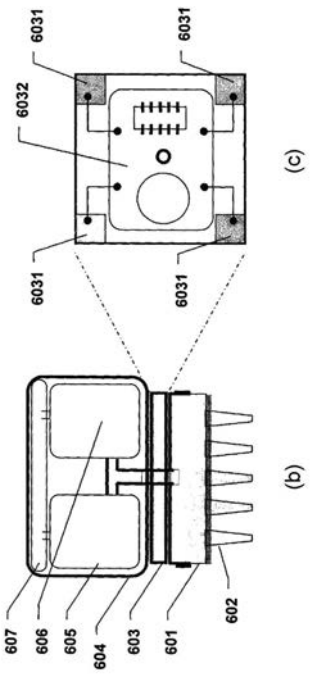
【図５】


(c)
(d)
507
508
505
506
510
502
(b)
509
(a)
504
501
502
503

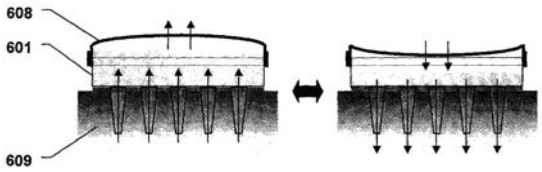
【図６ａ】


601
613
602
602

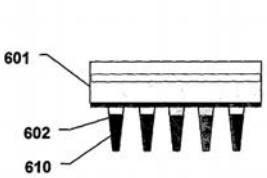
【図６ｂ－６ｃ】



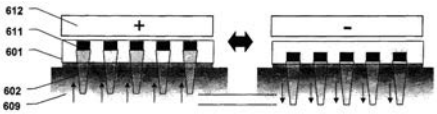
【図６ｄ】



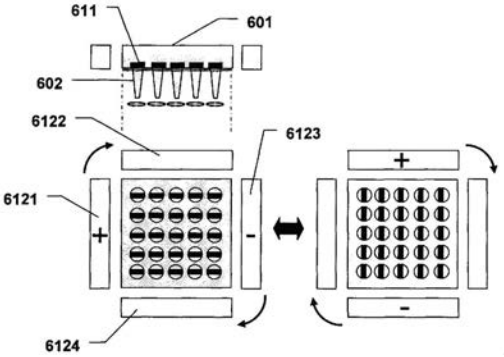
【図６ｅ】



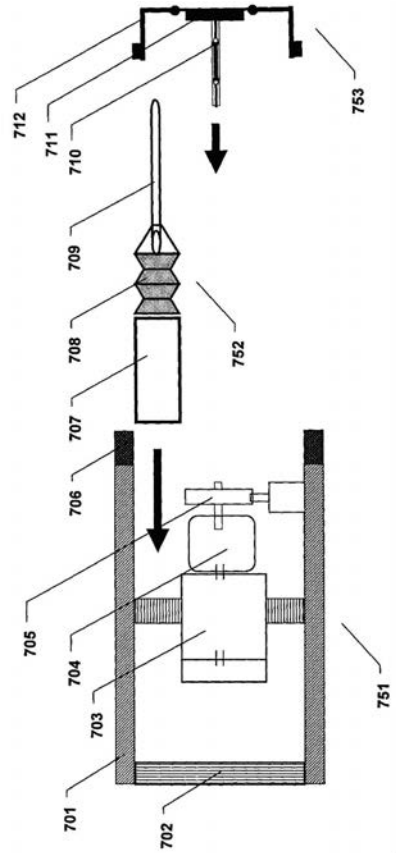
【図６ｆ】



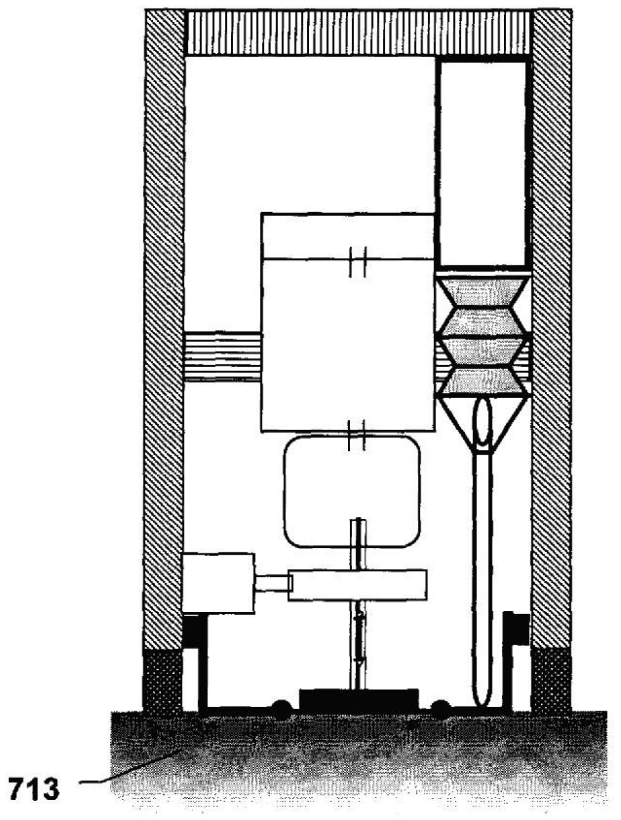
【図６ｇ】



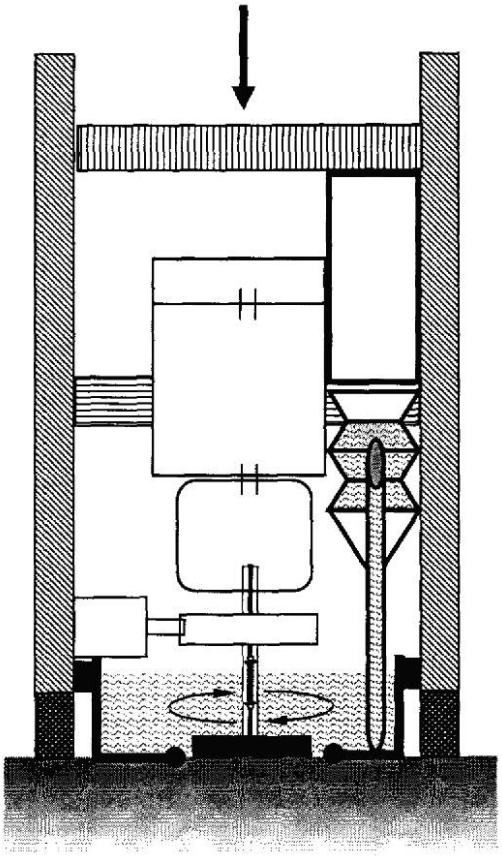
【図７ａ】



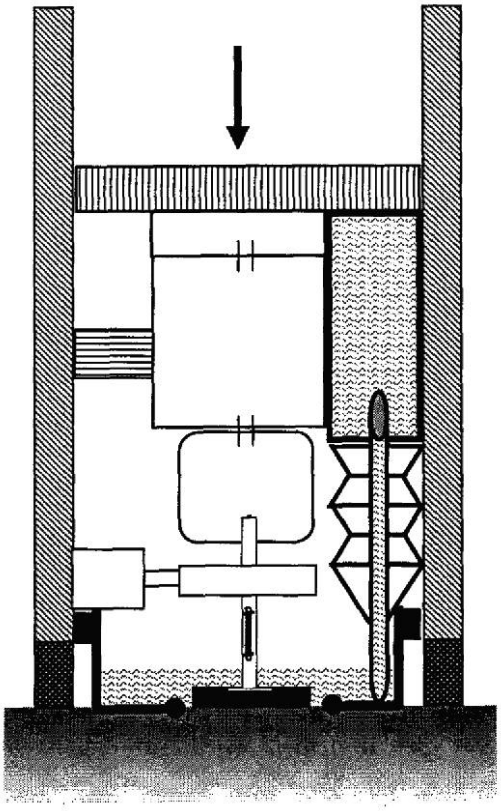
【図７ｂ】



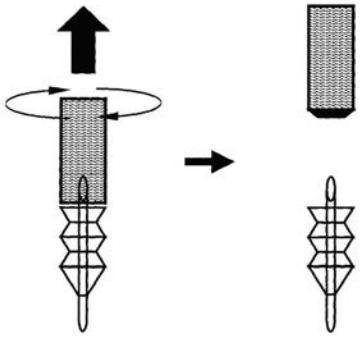
【図７ｃ】



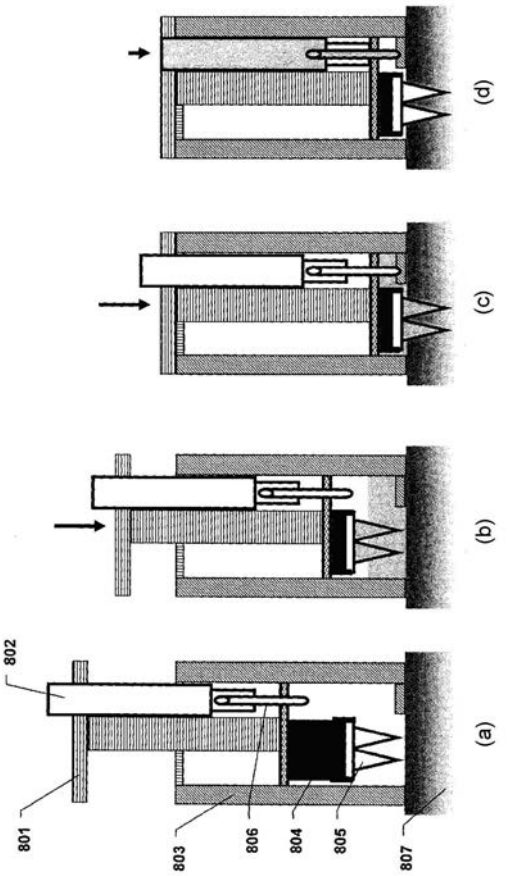
【図７ｄ】



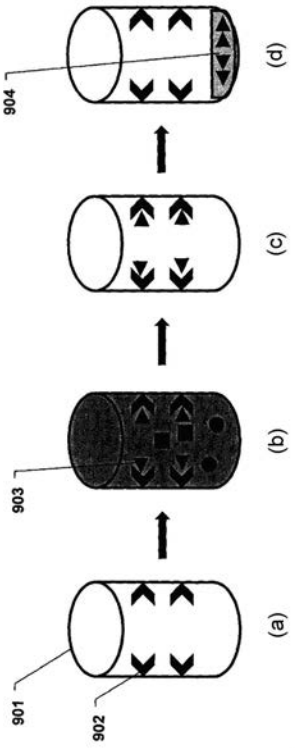
【図７ｅ】



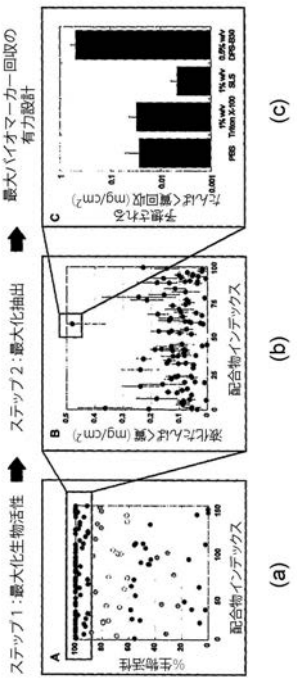
【図８】



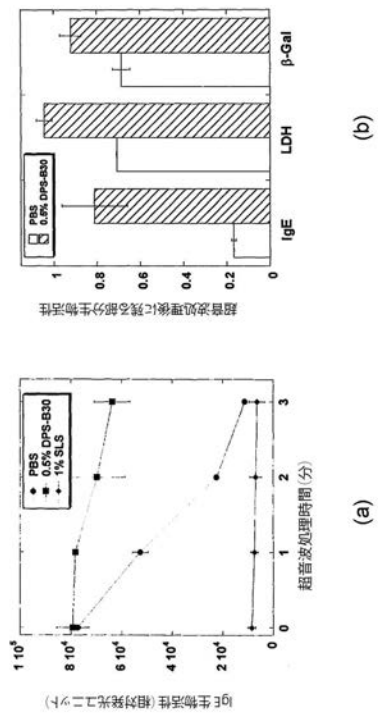
【図９】



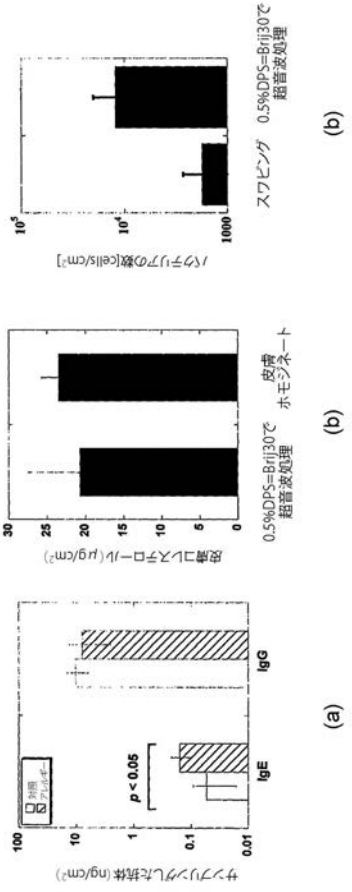
【図１０】



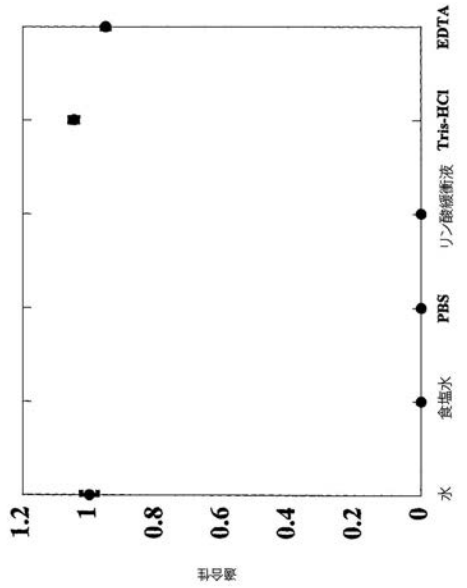
【図１１】



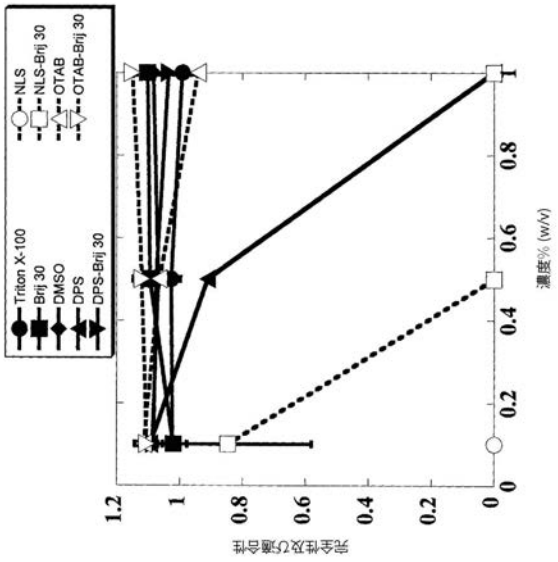
【図１２】



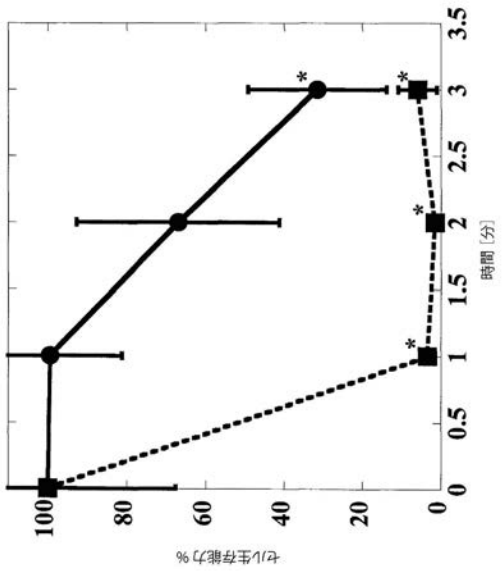
【図１３】



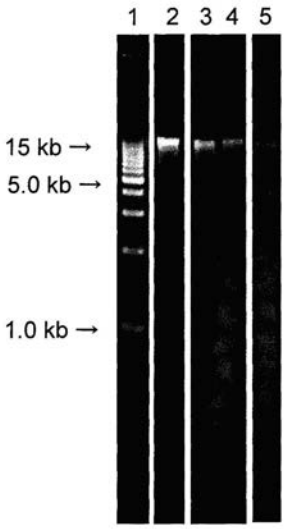
【図１４】



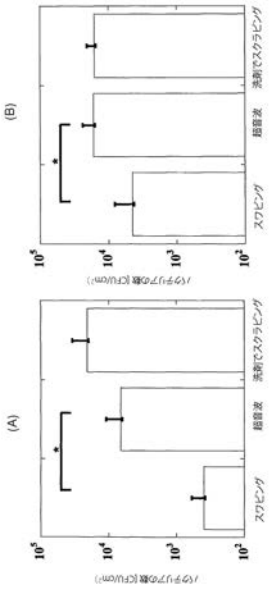
【図１５】



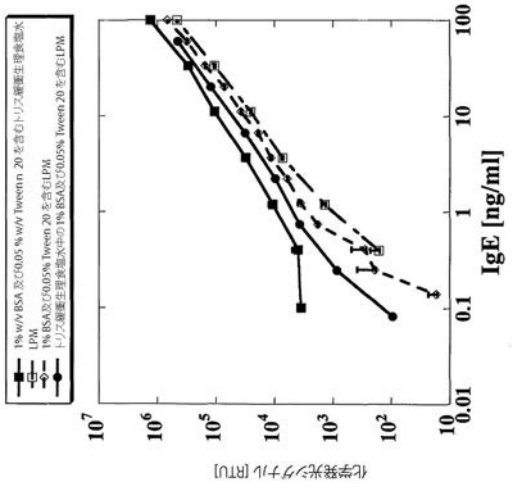
【図１６】



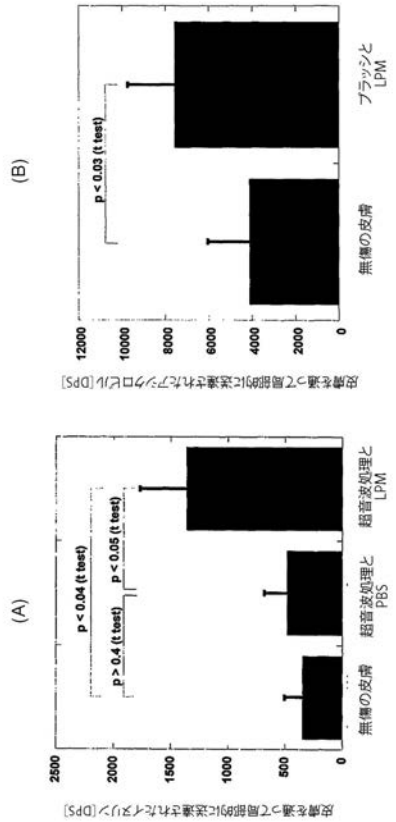
【図１７】


(A)
(B)
スワビング
超音波
洗剤でスクラビング

【図１８】


1% w/v BSA 及び0.05 % w/v Tween 20 を含むトリプス緩衝生理食塩水
LPM
1% BSA及び0.05% Tween 20 を含むLPM
トリプス緩衝生理食塩水中の1% BSA及び0.05% Tween 20 を含むLPM
IgE [ng/ml]

【図１９】


(A)
(B)
無傷の皮膚
超音波処理と PBS
超音波処理と LPM
p < 0.04 (t test)
p < 0.05 (t test)
p > 0.4 (t test)
p < 0.03 (t test)
ブラッシと LPM

フロントページの続き

(72)発明者　小倉　誠
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９３１１７、ゴレタ、エンシナ　ロード　５６５１、アパートメント　２０５
(72)発明者　パリワル, スミット
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９３１１７、ゴレタ、アカシア　ウォーク　７８０、アパートメント　エル.

Ｆターム(参考) 2G052 AA28　AD06　AD46　BA14　BA19　EC11　FB10　FD10