

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-533952

(P2014-533952A)

(43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2014-542481 (P2014-542481)	(71) 出願人	309023416
(86) (22) 出願日	平成24年11月16日 (2012.11.16)		リーアニクス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月26日 (2014.6.26)		R h e o n i x , I n c .
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/065452		アメリカ合衆国14850ニューヨーク州
(87) 国際公開番号	W02013/074885		イサカ、ソーンウッド・ドライブ22番
(87) 国際公開日	平成25年5月23日 (2013.5.23)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	61/561,007		弁理士 鮫島 睦
(32) 優先日	平成23年11月17日 (2011.11.17)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100138863
			弁理士 言上 恵一
		(74) 代理人	100145403
			弁理士 山尾 憲人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小流体装置、方法および応用

(57) 【要約】

微小流体装置、方法および関連した応用は、ホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)組織サンプルに利用し、適用されるものであり、核酸精製工程の前に組織サンプルからパラフィンを除去するために、液液抽出を行う。微小流体デバイスは、液液抽出工程専用容器、核酸精製工程用部品、および、核酸増幅反応装置を含む。液液抽出および核酸精製用キットは、液液抽出工程専用容器、該容器に入れられた非混和性液体またはその前駆相、核酸精製工程用部品、および、核酸増幅反応装置を含む、液液抽出工程および核酸精製工程の双方を行うことができる、微小流体デバイス、ならびに、液液抽出工程および核酸精製工程を行うのに適した反応剤の供給を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

容器に、ある密度および沸点を有する水溶液中のホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)組織サンプルを提供する；

容器に、水溶液の密度より小さい密度を有し、水溶液の沸点より高い沸点を有する、非混和性液体またはその前駆相を提供する；そして

液液抽出を行って、核酸精製工程の前に組織サンプルからパラフィンを除くことを含む、核酸精製方法。

【請求項 2】

1 個の微小流体デバイス中で、液液抽出工程および核酸精製工程を行うことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

非混和性液体としてシリコンオイルを提供することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

非混和性液体としてミネラルオイルを提供することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

非混和性液体またはその前駆相として、固体シリコンオイル/蠟混合物を提供することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

液液抽出工程が、パラフィン包埋組織サンプルの融点より高い温度まで、容器中の水溶液の温度を上げることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

溶液が、カオトロピック緩衝液および界面活性剤の混合物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

タンパク質消化酵素を溶液に加え、次に組織サンプルからパラフィンを除くことをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 個の液液抽出工程専用容器；
第 1 微小流体チャネルを介して容器に流体的に結合している核酸精製工程用部品；および
第 1 微小流体チャネルと異なる第 2 微小流体チャネルの少なくとも 1 個を介して核酸精製工程用部品に流体的に結合している少なくとも 1 個の核酸増幅反応装置
を含む、微小流体デバイスであって、
少なくとも 1 個の液液抽出工程専用容器および少なくとも 1 個の核酸増幅反応装置の間に、直接微小流体連結部が存在しない、微小流体デバイス。

【請求項 10】

少なくとも 1 個の液液抽出工程専用容器、少なくとも 1 個の容器に入れられた非混和性液体またはその前駆相、容器に流体的に結合した核酸精製工程用部品、および、核酸精製工程用部品と流体的に結合した少なくとも 1 個の核酸増幅反応装置を含む、液液抽出工程および核酸精製工程の双方を行うことができる、微小流体デバイス；および
液液抽出工程および核酸精製工程を行うのに適した反応剤の供給
を含む、液液抽出および核酸精製用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

< 関連出願データ >

本出願は、米国仮特許出願第 S/N 61/561,007 号(2011 年 11 月 17 日出願)に基づく優先権を主張しており、その対象を言及することによってその全体を本明細書に組み込む。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

< 背景 >

本発明の分野

本発明の態様は、生物学の分野を対象とする。より具体的には、本発明の態様は、分子生物学の研究において、ホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)組織サンプルを処理するのに使用する系を対象とする。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

関連技術の説明

組織学の一面は、その後の試験または研究のために、組織を腐敗させずに保存することに依存している。このような組織は、しばしば、組織の自己分解および/または腐敗の双方から腐敗を防ぐ化学薬品(しばしばホルマリン溶液)でそれらを処理することによって保存される。化学固定剤はまた、組織のタンパク質のアミン基間に化学架橋を導入することによって、組織の構造を保存し得る。同組織は、次いでより簡便にそれらを固相で貯蔵し、かつ、より確実に顕微鏡試験するための固定化された組織の薄いスライスを得るために、炭化水素マトリックス(しばしばパラフィン蠟)に埋め込まれる。このように保存された組織は、一般に、ホルマリン固定パラフィン包埋(formalin fixed paraffin embedded (F F P E))と呼ばれる。分子生物学の導入で、F F P E組織は、顕微鏡分析の目的のためのみならず、組織中に保存された遺伝的物質の試験のためにもしばしば興味深い。このような場合において、パラフィン蠟は、組織から取り除かれる必要があり、固定剤から生じた架橋は、F F P E組織から遺伝的物質を分離して、組織の分子生物学的試験に必要とされる化学に適合させるために、戻す必要がある。F F P E組織サンプルは、従来は、包埋組織サンプルをキシレン溶液中に入れることによって、パラフィン蠟から脱蠟される。パラフィン蠟はキシレンに溶解し、その後、組織サンプルは、キシレンから取り出され、連続希釈工程で、エタノール/キシレン混合物で再水和される。あるいは、キシレンを組織サンプルにスプレーし、新しいキシレンを組織サンプルに適用したとき、溶解したパラフィンを“洗い流せ”る。キシレンはサンプルの脱蠟に有効な溶媒であるが、組織処理工程に導入すると、分子生物学に用いられる化学を困難にする。すなわち、それは、研究技術者にとって、扱うのに有害な化学薬品であり(一般的に換気フードと特別な廃液廃棄手段を必要とする)、その有機的性質は、多くの水性緩衝液工程自動化を困難とする。キシレンを使用しないパラフィン蠟の除去を達成できる系は有益である。さらに、次の核酸アッセイのための分子生物学的工程に適合した水性の系ならば、その技術は、キシレンの使用に対して著しい改善である。

【 0 0 0 4 】

パラフィン蠟に包埋された組織サンプルは、しばしば、包埋前に、化学的に“固定”されている。この固定は、アミノ基の間の架橋メチレン架橋の形成によって達成される。このポリマーネットワーク構造は、タンパク質骨格中の高分子の浸透性を下げるが、タンパク質分子の構造的特徴はよく保存される。化学的架橋は、組織免疫の減衰を防ぐ。従って、環境条件で長期間貯蔵できる。固定化された組織において、分子生物学的調査に適した核酸を得るためには、核酸を組織サンプルから精製できるように、化学的に誘導された架橋を戻す必要がある。脱架橋は、洗浄剤または界面活性剤を含んでもよい適当な緩衝液で、架橋を戻すに適当な高温で、組織サンプル(パラフィンを取り除いたもの)を処理することによって達成できる。従って、組織からパラフィン蠟を容易に除いて、高分子の脱架橋を進め、組織サンプルを、典型的な水をベースとするサンプル調製、精製および核酸増幅に適合した状態にできる系および方法は、非常に有用であり、また、系が自動的に行われるならば、いっそう有益である。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 5 】

< 概要 >

本明細書に記載された本発明の態様は、標準的な試験物質および試験法に適合させた液

10

20

30

40

50

液抽出系である。また、これは、核酸抽出を行うのに用いられる、多くの確立された自動化手順に適合している。水性緩衝溶液に含まれる F F P E サンプルをパラフィンの融点より高い温度まで加熱するとき、脱蠟が起こる。水溶液より密度が低く、かつ水溶液の沸点より高い沸点を有する混合しない液体、例えばシリコンオイルまたは他の油で、水溶液を覆う。このような場合、パラフィン水溶液と混和せず、水溶液より密度が低いため、融解したパラフィンは水溶液の表面に浮遊し、パラフィンが混和できる油相に入り、それによって、組織サンプルが存在する水溶液から永久に分離する。

【 0 0 0 6 】

本発明の態様は、水性緩衝液中の F F P E 組織サンプルから核酸を精製する方法に関する。本方法は、反応容器中の液液抽出、すなわち、水性緩衝液より密度の低い油層を、F F P E 組織サンプルを含む水溶液である下層の上端に浮遊させることを含む。処理される F F P E 組織サンプルは水溶液中に入れられ、全工程の間、その中に残る。水溶液を、組織サンプル中のパラフィン蠟の融点より高い温度まで加熱し、パラフィン蠟は水溶液より密度が低いため、融解したパラフィン蠟は水溶液の表面に浮遊し、表面上に浮遊した油に接触する。パラフィンは油と混和できるため、それは油と混合し、それによって、水溶液および組織サンプルから永久に分離する。組織サンプルの遺伝子物質についてさらなる分析の準備ができるように、組織サンプルは反応容器中の水相に残っており、脱架橋、細胞溶解および核酸精製などのさらなる処理に利用可能である。抽出反応容器(以後、“チューブ”と呼ぶ)に使用する組成物は、室温で、および予測される貯蔵温度および条件下で、チューブ中で固体であってもよく、抽出反応中の温度まで最初に上昇した際に、チューブ中の溶液曝露表面を覆う液体となるものである。あるいは、組織サンプルおよび水性緩衝液を添加する前、添加中または添加後の何れかで、シリコンオイルなどの油を、チューブに加えることができる。ここで、水溶液より密度が低い油は、水溶液から分離し、組織サンプルを含む水溶液の表面上に浮遊するものである。

【 0 0 0 7 】

本発明の態様は、高純度シリコンオイルおよび蠟の制御混合物の形態の、直前に記載された組成物である。また、混合物は、典型的な室温で、および予測される貯蔵条件(温度など)下で、固体である。混合物は、抽出チューブの内部表面上、チューブ開口部より下で、固体物質の層として、チューブ中に存在する組織サンプルと共に、またはサンプル無しで配置される。組織および水溶液をチューブに導入した後、シリコンオイル蠟混合物の融点より高い温度まで温度が上昇したとき、混合物は融解し、溶液の表面を覆う。あるいは、組織サンプルおよび水溶液をチューブに添加する前、添加中または添加後の何れかで、高純度シリコンオイルなどの油を、チューブに加える。それぞれの場合において、浮遊する非混和性層は、延長された加熱時間の間で、水溶液の蒸発を防ぐ。本処理は、パラフィン蠟を含まない組織サンプルを、チューブ中の溶液の水相内に残す。パラフィン蠟に埋め込まれる前に組織が“固定化”された場合、チューブ中の組織を含む水溶液は、カオトロピック緩衝液および界面活性剤の混合物であり得る。カオトロピック緩衝液および界面活性剤混合物中の組織サンプルは、脱蠟の際、上昇温度で組織のタンパク質ネットワーク中の化学固定剤によって形成された化学結合を水和するカオトロピック緩衝液および界面活性剤混合物の作用によって、脱架橋する。一方で、油またはシリコンオイル蠟混合物(組織サンプルから添加されたパラフィン蠟を伴う)は、溶液のための蒸発バリアとして作用し続ける。脱蠟および抽出完了後、核酸を含む組織サンプルを溶解し、チューブ、管腔(lumen)またはピペットを溶液に挿入して、チューブ、管腔またはピペットで溶液を抽出することによって、ライセートを油層シールの下から取り出す。一つの局面によると、混合物は、蠟 = 1 体積% ~ 20 体積%と、残りのシリコンオイルからなる。一つの局面によると、混合物は、約 5 %の蠟および 95 %のシリコンオイルからなる。蠟は、標準的な P C R 蠟(例えば融点 58 ~ 62 を有する Sigma Aldrich パラフィン蠟)であってもよい。あるいは、何れかの高純度パラフィン蠟(融点 46 ~ 68 を有する C₂₀H₄₂ ~ C₄₀H₈₂)を用いてもよい。あるいは、液体油は、何れかの高純度シリコンオイルであっても、高純度炭水化物、例えばミネラルオイルであってもよい。

10

20

30

40

50

【0008】

本発明の態様は、組織サンプルから融解したパラフィンを混合し、抽出反応の水相から分離するための選択的な相を提供すると同時に、抽出反応チューブ中の溶液の蒸発を減らすまたは防ぐ方法である。本方法は、反応チューブの内壁の少なくとも一部を、抽出反応前に固体形態のシリコンと蠟の制御混合物でコートする工程を含む。あるいは、本方法は、組織サンプルおよび水相緩衝液をチューブに添加する前、添加中または添加後、液体油を加える工程を含む。反応は、チューブを加熱して、固体混合物をチューブ中の溶液の表面に浮遊した(非混和性)液体に変換した状態を作り、それによって、蒸発を防ぐためにチューブを密封し、組織サンプルから融解したパラフィンを混合する液相を提供することを含む。あるいは、液体油は、水溶液の上端に浮遊し、溶液を加熱する間、油が、蒸発を防ぐためにチューブを密封し、組織サンプルから融解したパラフィンと混合するための液相を提供する。一つの局面において、固体混合物を液体に変換する条件は、加熱工程であるが、これに限定されない。一つの局面において、本方法は、1体積%~20体積%の蠟と、残りのシリコンオイルの混合物でチューブの内壁の少なくとも一部をコートすることを含む。一つの局面において、本方法は、約5%の蠟および95%のシリコンオイルの混合物を用いることを含む。一つの局面において、本方法は、水層表面を、低密度の非混和性油の液体混合物の層によって覆う、液液抽出法を用いることをさらに含む。

10

【0009】

本発明の例示的態様は、核酸精製方法である。本方法は、容器に、ある密度および沸点を有する水溶液中のホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)組織サンプルを提供する；容器に、水溶液の密度より小さい密度を有し、水溶液の沸点より高い沸点を有する、非混和性液体またはその前駆相を提供する；および、液液抽出を行って、核酸精製工程の前に組織サンプルからパラフィンを除くことを含む。様々な非限定的例示的局面において、具体的な本発明は、下記の特徴および/または特性を含んでもよい：

20

- ・ 1個の微小流体デバイス(microfluidic device)中で、液液抽出工程および核酸精製工程を行うことをさらに含む；
- ・ 非混和性液体としてシリコンオイルを提供することをさらに含む；
- ・ 非混和性液体としてミネラルオイルを提供することをさらに含む；
- ・ 非混和性液体またはその前駆相として、固体シリコンオイル/蠟混合物を提供することをさらに含む；
- ・ 液液抽出工程が、パラフィン包埋組織サンプルの融点より高い温度まで、容器中の水溶液の温度を上げることをさらに含む；
- ・ 溶液が、カオトロピック緩衝液および界面活性剤の混合物である；
- ・ タンパク質消化酵素を溶液に加え、次に組織サンプルからパラフィンを除去することをさらに含む。

30

【0010】

本発明の例示的な態様は、微小流体デバイスである。本デバイスは、少なくとも1個の液液抽出工程専用容器；第1微小流体チャネルを介して容器に流体的に結合している核酸精製工程用部品；および、第1微小流体チャネルと異なる第2微小流体チャネルの少なくとも1個を介して核酸精製工程用部品に流体的に結合している少なくとも1個の核酸増幅反応装置を含み、少なくとも1個の液液抽出工程専用容器および少なくとも1個の核酸増幅反応装置の間に、直接微小流体連結部が存在しない。

40

【0011】

本発明の例示的な態様は、液液抽出および核酸精製用キットである。本キットは、少なくとも1個の液液抽出工程専用容器、少なくとも1個の容器に入れられた非混和性液体またはその前駆相、容器に流体的に結合した核酸精製工程用部品、および、核酸精製工程用部品と流体的に結合した少なくとも1個の核酸増幅反応装置を含む、液液抽出工程および核酸精製工程の双方を行うことができる、微小流体デバイス；および液液抽出工程および核酸精製工程を行うのに適した反応剤の供給を含む。

【0012】

50

本発明の全ての態様および局面は、特に、微小流体系、方法および応用に適用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】図1Aは、流体を導入する前に、FFPE組織サンプルをチューブに導入する前に、そしてチューブを加熱する前に、付随するチューブヒーターに挿入される、チューブの内部表面の下部に在る固体の蠟/シリコン混合物を示す、液液抽出工程のためだけに用いられる容器(以降、チューブと記載)の断面図である。本チューブはまた、本発明の例示的な態様に従って、流体をチューブに導入するための、および、反応完了後に蠟/シリコン層の下から流体を抽出するための管腔を含む。

10

【図1B】図1Bは、流体を導入する前に、FFPE組織サンプルをチューブに導入する前に、そしてチューブを加熱する前に、付随するチューブヒーターに挿入されるチューブの内部表面の上部に在る固体蠟/シリコン混合物を示すチューブの断面図である。本チューブはまた、本発明の例示的な態様に従って、流体をチューブに導入するための、および反応完了後に蠟/シリコン層の下から流体を抽出するための、管腔を含む。

【図1C】図1Cは、流体を導入する前に、FFPE組織サンプルをチューブに導入する前に、そしてチューブを加熱する前に、付随するチューブヒーターに挿入されるチューブの内部表面の一部にリングとして在る固体蠟/シリコン混合物を示すチューブの他の配置の断面図である。本チューブはまた、本発明の例示的な態様に従って、流体をチューブに導入するための、および、反応完了後に蠟/シリコン層の下から流体を抽出するための、管腔を含む。

20

【図2A】図2Aは、流体およびFFPE組織サンプルをチューブに導入した後、チューブを加熱する前に、付随するチューブヒーターに挿入されるチューブの内部表面の下部に在る固体の蠟/シリコン混合物を示す、チューブの断面図である。本チューブはまた、本発明の例示的な態様に従って、流体をチューブに導入するための、および、反応完了後に蠟/シリコン層の下から流体を抽出するための、管腔を含む。

【図2B】図2Bは、チューブを加熱した後の、付随するチューブヒーターに挿入されたチューブ中の液体の表面上に在る蠟/シリコン混合物を示すチューブの断面図である。あるいは、図2Bは、FFPE組織サンプルを含む水性液体がチューブに添加される前、添加中または添加後に、チューブに加えられる液体の表面に在る油層を示す。例示的な局面において、高純度シリコンオイルは、FFPE組織サンプルを含む水溶液に前負荷されたチューブに入れ、シリコンオイルに浮遊している組織サンプル中の蠟を融解するために、チューブは、上昇温度まで加熱される。本チューブはまた、本発明の例示的な態様に従って、流体および/または液体油を導入するための、および、反応完了後に蠟/シリコン層の下から流体を抽出するための、管腔を含む。

30

【図2C】図2Cは、管腔を示し、かつ、他の体積の水性緩衝液をチューブに加えた後の蠟/シリコン混合物の層を示す、付随するチューブヒーターに挿入されたチューブの断面図である。加えられた水溶液は、管腔の底より上に体積を増やして、蠟/シリコン層の下から水溶液のフラクションを移すのを容易にする。加えられた体積は、チューブに元から在った水溶液と同一の水溶液であっても、他の水溶液であってもよい。何れの場合でも、水溶液は、溶解剤、洗剤、界面活性剤、タンパク質消化酵素、または、本発明の例示的な態様に従って核酸精製のためにサンプルを調製するために用いられる当技術分野で既知の他の反応剤を含んでもよい。

40

【図2D】図2Dは、本発明の例示的な態様に従って、管腔を示し、かつ、液体フラクションをチューブから除いた後の蠟/シリコン混合物の凝固した層を示す、付随するチューブヒーターに挿入されたチューブの断面図である。

【図2E】図2Eは、本発明の例示的な態様に従って、管腔を示し、かつ、抽出後および追加の溶液が最初に加えられ管腔を介してチューブから移した後の、液体形態の蠟/オイル層を示す、付随するチューブヒーターに挿入されたチューブの断面図である。

【図3】図3は、2つの並んだ液液抽出系および核酸精製系を示す、自動化微小流体系に

50

使用するための微小流体デバイスの透視図である。2つの系はそれぞれ、本発明の例示的な態様に従って、パラフィン包埋組織サンプルを移して、微小流体チャネルを介してチューブに結合している系の核酸精製用部品において組織サンプルを分析するのに用いられる典型的な核酸自動化精製のために組織を調製するために、FFPE組織サンプルについて液液抽出工程を行うための少なくとも1個のチューブを含む。

【図4】図4は、本発明の例示的な態様に従って図3に示した例示的な微小流体デバイスの分解図である。

【図5】図5は、本発明の例示的な態様に従って図3に示した例示的な微小流体デバイスの平面図である。

【図6】図6は、本発明の例示的な態様に従って図3に示した例示的な微小流体デバイスのための、自動化微小流体系の平面図である。

【図7】図7は、具体的な系/方法から回収した溶出DNAについて、紫外線(= 260 nm; = 280 nm)による分析を行った定量的な結果を示す。

【図8】図8は、本発明の例示的な態様に従って具体的な系/方法から回収した溶出DNAの定量的な結果(ng/ μ l)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

< 本発明の非限定的例示的態様の詳細な説明 >

図1A~1Cに示した通り、チューブ(液液抽出工程専用容器)(100)は、閉じた底の末端(114)に向かって細くなる円錐形アンプルの形態である。チューブは、図1Aにあるようにチューブの内部表面の低い位置(底の方)で、または、図1Bにあるようにチューブの内部表面の高い位置(トップの方)で、または、図1Cにあるようにチューブの内部表面の一部(低い位置または高い位置の何れか)でリング状コーティングとして、シリコンオイル(95%) / 蠟(5%)混合物(104)を含み得る。

【0015】

図2Aに示した通り、FFPE組織サンプル(120)および水溶液(以後、“溶液”とする)(102)は、チューブに導入され、付随するチューブヒーター(108)によって加熱される。工程の間で、チューブ中の少量の溶液(102)は、上昇した温度のために蒸発する。蒸発は、キャップが緩むのを防ぐために、チューブのトップを加圧蓋で固く封じたキャップを据え付けることによって回避できる。しかし、自動化ワークフローがチューブ中の流体にアクセスできる必要があるため、このタイプのキャップの配置は、自動化ワークフローシステム設計の要件を満たさない。従って、本発明では、シリコンオイル(95%) / 蠟(5%)混合物(104)が、チューブを加熱する際に融解して、溶液の表面を覆うよう設計されるか、または、高純度シリコンオイルまたは他の高純度ミネラルオイルが、キャッピングシステムの代わりに蒸発を防ぐために溶液の表面を覆うよう提供され得る。シリコンオイル(95%) / 蠟(5%)混合物(104)または高純度オイルは、FFPE組織サンプルを含む溶液を加熱中に、FFPE組織サンプルから融解するパラフィンのための好都合な抽出媒体として選択される。管腔(106)は、工程の上昇温度時間中にチューブから蒸発するのを最少にする一方で、チューブへおよびチューブから、および、系の他のリザーバー(例えば精製系(125), 図3)へおよび他のリザーバーから溶液を輸送するための、チューブへおよびチューブからの流体経路を提供する。

【0016】

図2Bに示した通り、非混和性液体、例えばシリコンオイル(95%) / 蠟(5%)混合物(104)の層が、溶液(102)の表面上を浮遊し、溶液の蒸発を有効に防ぐことができると同時に、FFPE組織サンプルからパラフィンが融解した後、溶液からパラフィン蠟を選択的に抽出するための層を形成する。あるいは、高純度液体油は、FFPE組織サンプルの導入後に、チューブに入れられてもよい。チューブ、ならびに、FFPE組織サンプル、水溶液および油または蠟 / オイル混合物を含むその内容物を加熱する。パラフィンは、FFPE組織サンプルから融解し、それが水相と混和せず、水相の密度より低い密度を有するために、水相表面上を浮遊する油または蠟 / オイル混合物に移動し、それによって、抽出

10

20

30

40

50

されて、水相から永久に分離する。非混和性液化蠟 / シリコン混合物は、チューブを冷却したとき、再度凝固して、溶液表面の高さで存在する。溶液または幾つの場合では油でチューブが充填されているために、チューブに管腔(106)またはピペットチップを差し込んで、抽出完了後、油またはシリコンオイル / 蠟の層の下から反応した溶液を移す。

【 0 0 1 7 】

図 2 C に関連して示した通り、液液抽出工程完了後、水相反応剤をさらにチューブに加える。反応剤は、第 1 体積の溶液と同一または異なる溶液、溶解剤、洗剤、界面活性剤、タンパク質消化酵素、または、核酸精製用に生物学的サンプルを調製するために用いられる当技術分野で既知の他の反応剤を含んでもよい。添加された水溶液は、蠟 - オイル層(104)の下から水溶液のフラクションを移すのを容易にするために、管腔(106)の底より上の体積を増大させる。

【 0 0 1 8 】

図 2 D に示した通り、添加された油および F F P E サンプルから抽出された全ての蠟は、低温で凝固した蠟 / シリコン層(104)となってもよく、または、層は、液体のままであってもよい(水相フラクション除去後の図 2 E に記載されたもの)が、何れの場合においても、溶液(102)のフラクションを移した後、チューブ中に残る。

【 0 0 1 9 】

図 3、4 および 5 は、自動化微小流体系(例えば Rheonix Encompass platform)に用いられ得る例示的な微小流体デバイス(10)(例えば Rheonix CARD Consumable)の様々な図を示す。さらなる情報は、US 2012/0045799 および US 2012/0129714 で提供され、これららの主題を言及することによって、その全体を適用される法則および規則に許容される最大範囲で、本明細書に組み込む。例示的な二重系(並列 / 上下)の微小流体デバイスの平面図は、模式的に、図 5 に示される。図 5 には “ トップ - ハーフ ” 系を記載し、図 4 に分解図を記載しており、デバイス(10)は、少なくとも 1 個のチューブ(液液抽出工程専用容器)(100)および付随する管腔(106)、少なくとも 1 個の核酸増幅反応装置(105)および付随する管腔(106a)、少なくとも 1 個のチューブを加熱するために配置された各チューブに付随する少なくとも 1 個のヒーター(108)、および少なくとも 1 個の核酸増幅反応装置、および、微小流体チャネル(20a)によって少なくとも 1 個のチューブ(100)に、および異なる微小流体チャネル(20b)によって少なくとも 1 個の反応装置(105)に流体的に結合している核酸精製系(125)を含む。また、微小流体デバイス(10)は、図 5 の左端に、マイクロアレイチャンパーおよび核酸分析用部品を示すが、分析は、1 個以上の増幅反応装置中で行うことができる。このデバイス(10)は、液液抽出工程および核酸精製工程の双方を行うことができる。デバイス(10)はまた、自動化液液抽出および核酸精製キットのベースを形成してもよく、これはさらに本明細書に記載した液液抽出工程および核酸精製工程を行うのに適した反応剤の供給を含む。

【 0 0 2 0 】

図 3 は、より具体的に、概略的に、各系に、1 個のチューブ(100)、3 個の増幅反応チューブ(105)、リザーバー(15)、精製装置(125)および微小流体チャネル(20a, 20b)を組み込んだ二重系微小流体デバイス(10)を示しており、これは、F F P E サンプルから遺伝子増幅生成物のマイクロアレイ分析までの完全統合分子アッセイを完了するために利用できる。

【 0 0 2 1 】

図 4 に示した通り、微小流体系(10)は、リザーバー層(30)を取り付けた、チャネル層(25a)およびフィルム層(25b)から構成される 2 層微小流体チャネル系(25)から組み立てられる(リザーバー層(30)およびチャネル層(25a)は同じ基板から形成されてもよいが、明確にするために、別個のものとして示す)。チャネルネットワークは、チャネル層(25a)に選択的に結合しているフィルム層(25b)からなる。チャネル(20)は、始めに、一連の連結していない長いくぼみ(開放チャネル)を、フィルム層(25b)に向かい合うチャネル層(25a)の基

板表面に作ることによって製造される。チャンネル(20)は、フィルム層を選択的に結合させることによって閉じられると同時に、装置インターフェイス(50)(図6)を用いて作動させるときにチャンネル(20)のための連絡手段を提供する隔壁(35)を作り、この隔壁(35)の協調的な作動で、アッセイを完了する目的のために、系(10)中の1つの場所から他の場所へ流体を送ることができる。フィルム層(25b)を貫通してチャンネル(20)にアクセスしているのが、管腔(106)および(106a)である。フィルム層に接続して、チューブ(100)は、管腔(106)にアクセスし、一方、管腔(106a)は増幅反応装置(105)にアクセスする。リザーバー層に存在するのは、1個以上の精製装置(125)であり、これは、核酸を細胞ライセートから分離するために核酸を選択的に結合できる何れかの既知の物質からなり得る。精製装置(125)は、シリカマトリックスからなり得る。他の配置において、シリカマトリックスは、シリカビーズからなり得る。

10

【0022】

さらに図5に示した通り、チューブ(100)は、管腔(106a)によってアクセスされる増幅反応装置(105)のためのチャンネルネットワーク(20b)とは別のチャンネルネットワーク(20a)に組み込まれた管腔(106)によってアクセスされる。上記の通り、FFPE組織サンプルは、最初にチューブ(100)に入れられ、次にチューブ(100)および増幅反応装置(105)を含むチューブストリップが微小流体系(10)に組み込まれる。その後、液液抽出に必要な反応剤が提供され、液液抽出が達成され、次にサンプルの化学的脱架橋および溶解を行うために、管腔(106)を通してチューブに特定の反応剤が加えられる。その後、処理した溶液のフラクションを管腔(106)を通して取り出し、系の他の成分を用いて、元の液体フラクションから取り出された全ての核酸を得るために、さらに精製する。元の組織サンプルから精製した核酸は、精製系から溶出して、元の組織サンプルから増幅反応装置に送られた核酸に含まれる可能性がある選択された配列の核酸増幅を行うのに必要な反応剤と共に、管腔(106a)を通して1個以上の増幅反応装置(105)に送られる。

20

【0023】

図6は、自動化微小流体系に用いられる多重反応系のための装置インターフェイス(50)の平面図を示す。隔膜(35)(図5)は、微小流体系(10)を選択的に通して流体を送る隔膜(35)の空気圧式作動のためのガスケット層(60)と並んでいる。FFPE組織サンプルを処理し、パラフィン包埋組織サンプルを移し、サンプルを分析するために用いられる組織サンプル中の細胞から核酸を自動化精製するために組織を調製するために、少なくとも2個の抽出反応装置(100)が、ヒーター(108)(増幅反応装置(105)を加熱するために用いられるものと同じヒーターアセンブリの一部であってもよい。または、ヒーター(108)は別のヒーターアセンブリであってもよい)に据え付けられている。

30

【0024】

図1~6に記載されたそれぞれの場合において、チューブ中の溶液は、当分野に既知の他の反応剤の中でも、溶解緩衝液および界面活性剤の混合物であり得る。水性混合物は、上昇温度では、組織サンプル中の高分子を脱架橋するよう作用する。溶解および脱架橋の完了時に、反応した溶液中の核酸を精製およびその後の分析のためにさらに調製するために、タンパク質消化酵素を溶液に加えてもよい。あるいは、水性混合物中の組織サンプルは、上昇温度でタンパク質消化酵素を用いて溶解し、続いて、脱架橋のために、より高い温度でインキュベートしてもよい。

40

【実施例】

【0025】

実施例1

1. 3つの10mgのホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織サンプルを、10 μ lのシリコンオイル/蠟混合物小滴で予めコートしたチューブに入れるか、または、微小流体系にチューブを取り付ける前に、または微小流体系にチューブを取り付けた後に管腔で、高純度オイルを供給する；
2. チューブを微小流体系に取り付ける；
3. 15 μ lのTween 20 + 15 μ lの溶解緩衝液を、サンプルチューブに供給する；

50

4. 加熱して、反応温度を 95 で 10 分間維持する；
5. チューブの温度を 56 に下げる；
6. 5 μ l の Tween 20 + 5 μ l の溶解緩衝液 + 4 μ l のプロテイナーゼ K をチューブに供給する；
7. 反応温度を 56 で 30 分間維持する；
8. 15 μ l の EtOH をチューブに供給する；
9. チューブの温度を 35 に下げる；
10. サンプル溶液を、チューブから、微小流体系精製装置(125)(図 5；シリカビーズをベースとするか、またはシリカフィルターをベースとする系)に直接移す；
11. 反応溶液を精製装置から廃液リザーバーに移す；
12. 精製装置を 2 \times 50 μ l の洗浄緩衝液で洗浄する；
13. 精製装置を 2 \times 50 μ l の洗浄緩衝液で再度洗浄する；
14. 50 μ l の水を精製装置に入れる；
15. 精製装置のサイドチャネルから廃液リザーバーに水を移す；
16. 14 ~ 15 を繰り返す；
17. 精製装置から廃液リザーバーに残りの水を移す；
18. 20 μ l の溶出溶液を精製装置に入れる；
19. 30 秒間インキュベートする；
20. 溶出溶液のフラクションを精製装置から取り出し、増幅反応装置に直接入れる；
21. 適切な増幅マスターミックスを増幅装置に入れる(増幅反応装置に充填する前に溶出液をマスターミックスと混合してもよい)；
22. 溶出液を増幅する；
23. 増幅産物を分析する。

10

20

30

40

50

【0026】

図 7 は、液液抽出、続いて脱架橋、溶解および従来のシリカをベースとした核酸のアフィニティー捕捉、その後に溶出を行う微小流体系を用いて回収して得られた DNA の純度を示す。純度の概算は、UV 測定の従来の A260/A280 法を用いて達成される。結果は、種々の緩衝液および界面活性剤を用いた液液抽出系を、従来のキシレン抽出法と比較する。

【0027】

図 8 は、液液抽出、続いて脱架橋、溶解および従来のシリカをベースとした核酸のアフィニティー捕捉、その後に溶出を行う微小流体系を用いて回収した DNA の量を示す。結果は、種々の緩衝液および界面活性剤を用いた液液抽出系を、従来のキシレン抽出法と比較する。

【0028】

単数表現および類似の記載の使用は、本発明を記載する文脈において(特に下記の請求項の文脈において)、本明細書で特記しない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数および複数の双方をカバーすると解釈されるべきである。用語“含む”および“有する”は、特に断りのない限り、制約のない用語(すなわち“～を含むが、これらに限定されない”ことを意味する)と解釈されるべきである。用語“結合した”は、たとえ何か中断するものがあったとしても、部分的にまたは完全にそれに含まれるか、それに取り付けられているか、または、それと連結していると解釈されるべきである。

【0029】

本明細書の値の範囲の記載は、本明細書において特にことわらない限り、範囲内の各々別個の値についての個別の記載の省略方法として提供することのみを意図しており、各々の別個の値は、本明細書で個別に記載されたように、本明細書に組み込まれる。

【0030】

本明細書に記載された全ての方法は、本明細書において特にことわらない限り、または文脈に明らかに矛盾しない限り、任意の適当な順序で行うことができる。本明細書で提供された何れかのおよび全ての例または例示的表現(“例えば”など)は、本発明の態様をよりよく明らかにすることのみを意図しており、別途クレームされない限り、本発明の範囲

に限定を課すものではない。

本明細書の表現は、本発明の実施に本質的なものとして、何らかのクレームされない要素を示すと解釈されるべきではない。

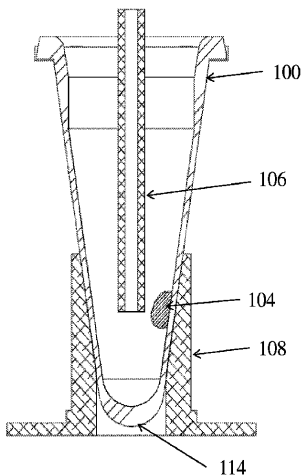
【 0 0 3 1 】

本発明の精神および範囲を逸脱することなく、様々な修飾および変更が本発明に為され得ることは、当業者に明らかである。開示された具体的な形態は本発明を限定することを意図せず、それどころか、本発明は、添付の請求の範囲で定義された本発明の精神および範囲内の全ての修飾、代替物、および等価物を含む。従って、添付の請求の範囲およびその等価物の範囲内であるならば、本発明は、本発明の修飾および変法を含むことを意図される。

10

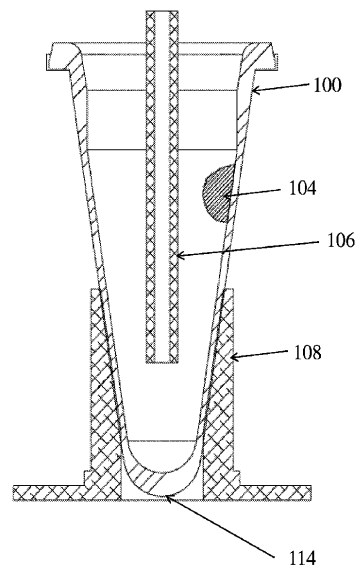
【 図 1 A 】

Figure 1A



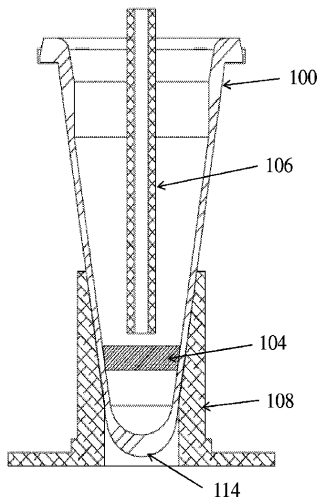
【 図 1 B 】

Figure 1B



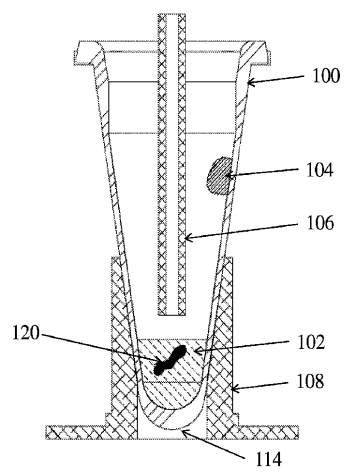
【図 1 C】

Figure 1C



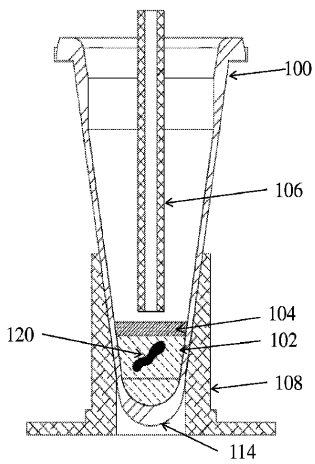
【図 2 A】

Figure 2A



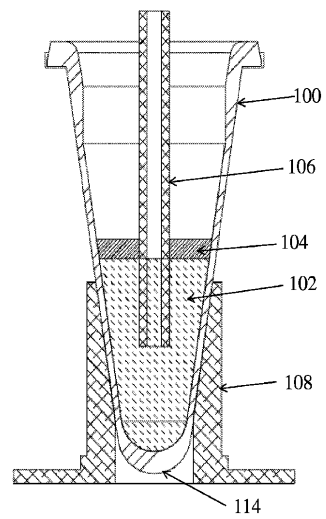
【図 2 B】

Figure 2B



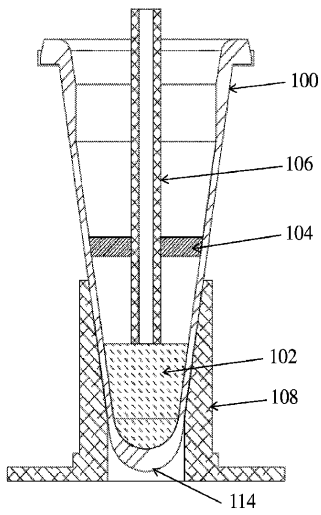
【図 2 C】

Figure 2C



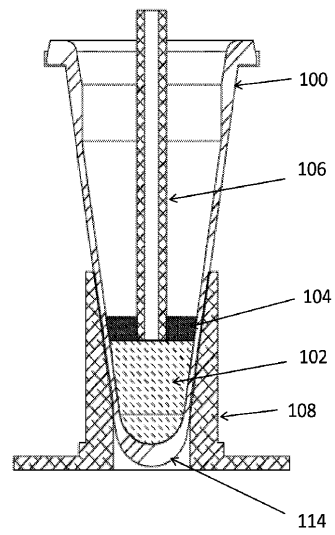
【 図 2 D 】

Figure 2D



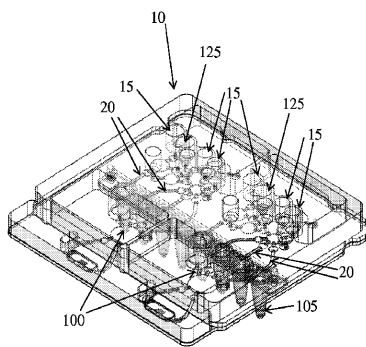
【 図 2 E 】

Figure 2E



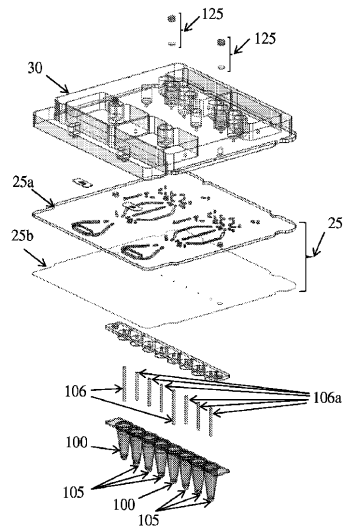
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



【手続補正書】

【提出日】平成26年10月8日(2014.10.8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

< 概要 >

本明細書に記載された本発明の態様は、標準的な試験物質および試験法に適合させた液液抽出系である。また、これは、核酸抽出を行うのに用いられる、多くの確立された自動化手順に適合している。水性緩衝溶液に含まれるFFPEサンプルをパラフィンの融点より高い温度まで加熱するとき、脱蠟が起こる。水溶液より密度が低く、かつ水溶液の沸点より高い沸点を有する混和しない液体、例えばシリコンオイルまたは他の油で、水溶液を覆う。このような場合、パラフィン水溶液と混和せず、水溶液より密度が低いため、融解したパラフィンは水溶液の表面に浮遊し、パラフィンが混和できる油相に入り、それによって、組織サンプルが存在する水溶液から永久に分離する。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

図3、4および5は、自動化微小流体系(例えばRheonix Encompass platform)に用いられ得る例示的な微小流体デバイス(10)(例えばRheonix CARD Consumable)の様々な図を示す。さらなる情報は、US 2012/0045799およびUS 2012/0129714で提供され、これらの主題を言及することによって、その全体を適用される法則および規則に許容される最大範囲で、本明細書に組み込む。例示的な二重系(並列/上下)の微小流体デバイスの平面図は、模式的に、図5に示される。図5には“トップ-ハーフ”系を記載し、図4に分解図を記載しており、デバイス(10)は、少なくとも1個のチューブ(液液抽出工程専用容器)(100)および付随する管腔(106)、少なくとも1個の核酸増幅反応装置(105)および付随する管腔(106a)、少なくとも1個のチューブを加熱するために配置された各チューブに付随する少なくとも1個のヒーター(108)、および少なくとも1個の核酸増幅反応装置、および、微小流体チャネル(20a)によって少なくとも1個のチューブ(100)に、および異なる微小流体チャネル(20b)によって少なくとも1個の反応装置(105)に流体的に結合している核酸精製系(125)を含む。また、微小流体デバイス(10)は、図5の左端に、マイクロアレイチャンバーおよび核酸分析用部品を示すが、分析は、1個以上の増幅反応装置中で行うことができると認識されるであろう。また、少なくとも1個のチューブ(100)と少なくとも1個の核酸増幅反応装置(105)の間に直接微小流体連結部が存在しないことに注意すべきである。このデバイス(10)は、液液抽出工程および核酸精製工程の双方を行うことができる。デバイス(10)はまた、自動化液液抽出および核酸精製キットのベースを形成してもよく、これはさらに本明細書で記載した液液抽出工程および核酸精製工程を行うのに適した反応剤の供給を含む。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更



【補正の内容】

【0020】

図3は、より具体的に、概略的に、各系に、1個のチューブ(100)、3個の増幅反応チ

ューブ(105)、リザーバー(15)、精製装置(125)および微小流体チャネル(20a, 20b)を組み込んだ二重系微小流体デバイス(10)を示しており、これは、F F P E サンプルから遺伝子増幅産物のマイクロアレイ分析までの完全統合分子アッセイを完了するために利用できる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/065452
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/10; C07H 21/04; C12P 19/34; B65G 47/22; C12Q 1/68; C07H 1/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: nucleic acid purification, liquid-liquid extraction, formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE, tissue, immiscible liquid, vessel, microfluid		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-104032 A1 (QIAGEN GMBH) 01 September 2011	1,3-8
A	See page 7, lines 5-6; page 26, lines 31-35; claims 1, 3, 8 and 17.	2,9-10
A	WO 2011-008217 A1 (CANON US LIFE SCIENCES INC.) 20 January 2011 See claim 29.	1-10
A	US 2011-0245483 A1 (EUTING, HEIKE et al.) 06 October 2011 See claims 1 and 10.	1-10
A	US 2004-0072305 A1 (ERLANDER, MARK G. et al.) 15 April 2004 See paragraphs [0079]-[0080]; claims 1 and 10.	1-10
A	US 2005-0142570 A1 (PARTHASARATHY, RANJANI V. et al.) 30 June 2005 See claims 1 and 12.	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March 2013 (28.03.2013)		Date of mailing of the international search report 29 March 2013 (29.03.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. 82-42-481-8150 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/065452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011-104032 A1	01.09.2011	CA 2790941 A1 WO 2011-104027 A1	01.09.2011 01.09.2011
WO 2011-008217 A1	20.01.2011	EP 2454378 A1	23.05.2012
US 2011-0245483 A1	06.10.2011	CA 2746489 A1 CN 102245770 A DE 102008061714 A1 EP 2356232 A1 WO 2010-066554 A1	17.06.2010 16.11.2011 17.06.2010 17.08.2011 17.06.2010
US 2004-0072305 A1	15.04.2004	AT 527377 T AU 2003-282608 A1 CA 2500603 A1 CN 1714157 A EP 1549769 A2 EP 1549769 A4 EP 1549769 B1 EP 2330217 A1 EP 2484777 A1 JP 2006-501857 A MX PA05003818 A NZ 539124 A US 2009-0082215 A1 US 2010-0197511 A1 US 2011-0034346 A1 US 7364846 B2 US 7723039 B2 US 7879555 B2 US 8012688 B2 WO 2004-033660 A2 WO 2004-033660 A3	15.10.2011 04.05.2004 22.04.2004 28.12.2005 06.07.2005 25.04.2007 05.10.2011 08.06.2011 08.08.2012 19.01.2006 05.10.2005 24.12.2008 26.03.2009 05.08.2010 10.02.2011 29.04.2008 25.05.2010 01.02.2011 06.09.2011 22.04.2004 26.08.2004
US 2005-0142570 A1	30.06.2005	AU 2004-303807 A1 AU 2004-313912 A1 AU 2004-313913 A1 AU 2004-313914 A1 CA 2549081 A1 CA 2551156 A1 CA 2551453 A1 CA 2551462 A1 CN 1906295 A CN 1918291 A CN 1922317 A CN 1922318 A EP 1692283 A2 EP 1697512 A1 EP 1697513 A1 EP 1697514 A2	07.07.2005 28.07.2005 28.07.2005 28.07.2005 07.07.2005 28.07.2005 28.07.2005 28.07.2005 31.01.2007 21.02.2007 28.02.2007 28.02.2007 23.08.2006 06.09.2006 06.09.2006 06.09.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/065452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2305809 A2	06.04.2011
		EP 2305809 A3	03.08.2011
		JP 2007-514163 A	31.05.2007
		JP 2007-516722 A	28.06.2007
		JP 2007-516723 A	28.06.2007
		JP 2007-516724 A	28.06.2007
		JP 2011-013237 A	20.01.2011
		JP 4673318 B2	28.01.2011
		JP 5118184 B2	26.10.2012
		US 2005-0126312 A1	16.06.2005
		US 2005-0130177 A1	16.06.2005
		US 2005-0142571 A1	30.06.2005
		US 2005-0142663 A1	30.06.2005
		US 2007-0148687 A1	28.06.2007
		US 2010-0167304 A1	01.07.2010
		US 7322254 B2	29.01.2008
		US 7939249 B2	10.05.2011
		US 8057758 B2	15.11.2011
		WO 2005-061709 A2	07.07.2005
		WO 2005-068626 A1	28.07.2005
		WO 2005-068627 A1	28.07.2005
		WO 2005-068628 A2	28.07.2005

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 ボン・ジョウ

アメリカ合衆国 1 8 9 4 0 ペンシルベニア州ニュータウン、スザンナ・ウェイ 4 4 番

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 GA30 HA20

4B029 AA09 AA23 BB01 BB20 CC03