

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成23年4月21日(2011.4.21)

【公表番号】特表2010-526293(P2010-526293A)

【公表日】平成22年7月29日(2010.7.29)

【年通号数】公開・登録公報2010-030

【出願番号】特願2010-506358(P2010-506358)

【国際特許分類】

G 0 1 N 35/08 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 35/08 A

G 0 1 N 37/00 1 0 1

【手続補正書】

【提出日】平成23年2月22日(2011.2.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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

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

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

【請求項2】

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

【請求項3】

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

【請求項4】

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

【請求項5】

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

【請求項6】

(b) の前記異なる液体の前記液滴群が、約3万~15万滴/秒の割合で、マイクロデ

イスペンシングノズルによって供給される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記マイクロ流体装置が、総容量約  $0.1 \sim 200 \mu\text{L}$  を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

最小液滴群が、体積約  $100 \text{ pL}$  を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

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

【請求項 10】

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

【請求項 11】

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

【請求項 12】

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

【請求項 13】

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

【請求項 14】

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

【請求項 15】

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

【請求項 16】

前記マイクロ流体装置が、総容量約  $0.1 \sim 200 \mu\text{L}$  を有する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 17】

最小液滴群が、体積約  $100 \text{ pL}$  を有する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 18】

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

【請求項 19】

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

【請求項 20】

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

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

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

を含む方法。

【請求項 2 1】

前記マイクロ流体装置が、前記少なくとも 1 つの入口ポートと、前記少なくとも 1 つのチャンバとの間で連通している毛管通路を含み、前記第 1 の液体が、前記入口ポートから前記少なくとも一つのチャンバの入口の毛管止めまで、毛管力によって移動する、請求項 2 0 記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 2】

[試薬を含む基材上への液体の付着]

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

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

[マイクロ流体装置内の付着液体]

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

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 3】

生体試料及び試料を検定するために必要な場合がある他の液体を付着させることに関連する課題は、米国特許出願第 10 / 608,671 号で述べられ、U.S. 2004 / 0265172 A1 で公開されている。特に重要な要件は、液体が導入されるときに装置から空

気を除去し、検定される試料の量及び関連する液体、たとえば試薬、緩衝剤、希釈剤等を計量することである。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

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

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

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

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

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

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

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

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

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

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

上記の表では、「%過充填又は%充填不足」は、図 1 のマイクロ流体装置を試験して、

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

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

(実施例2)

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