

(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2014-66729

(P2014-66729A)

(43) 公開日 平成26年4月17日(2014.4.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 35/08 A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	2 G O 5 8
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 I O 1	4 B O 6 3
GO 1 N 35/00 (2006.01)	GO 1 N 35/00 D	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2013-257655 (P2013-257655)	(71) 出願人	508289486 ディグニティー ヘルス
(22) 出願日	平成25年12月13日 (2013.12.13)		アメリカ合衆国 アリゾナ 85013, フェニックス, ウェスト トーマス ロード 350
(62) 分割の表示	特願2011-553054 (P2011-553054) の分割	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成22年3月2日 (2010.3.2)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/156,717	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成21年3月2日 (2009.3.2)	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(31) 優先権主張番号	61/156,734		
(32) 優先日	平成21年3月2日 (2009.3.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療デバイスおよび使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】組織サンプルに対して診断的分析を行う方法、および微少流体デバイスおよびマイクロフィルターデバイスを提供する。

【解決手段】サンプルを診断する方法、および様々な微少流体、微量遠心およびマイクロフィルターデバイスに関連する。1つの実施態様において、ミトコンドリアサンプルおよび/または血小板サンプルを用いて、神経変性性疾患を診断する方法を提供する。別の実施態様において、望ましい量の標的生物学的粒子を選択的に捕捉および分析する微少流体デバイスを提供する。他の実施態様は、微少流体診断デバイス、および使用のための説明書を含む、アルツハイマー病および/または軽度認知機能障害の診断のための微少流体キットを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書において記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織サンプルに対して診断的分析を行う方法、および微少流体デバイスおよびマイクロフィルタデバイスに関連する。

【背景技術】

【0002】

本明細書中の全ての出版物は、個々の出版物および特許出願それぞれが、明確におよび個々に参考文献に組み込まれると示されたかのように同じ程度に、参考文献に組み込まれる。以下の記載は、本発明の理解に有用であり得る情報を含む。本明細書中で提供されたあらゆる情報が、先行技術であるかまたは現在請求されている発明に関連することを認めない、および明確にまたは暗に言及されたあらゆる出版物が先行技術であることを認めない。

【0003】

もともと大規模な統合された回路を産生するために開発された、微細加工技術はまた、複雑な生物学的流体を、ナノリットルおよびマイクロリットルスケールで操作および分析する研究および開発の努力を刺激した。血液および他の体液の臨床的分析のための、小型化診断デバイスの開発は、この出現しつつある技術の重要な適用である。¹⁻⁶ 例えば、使用点の (point-of-use) 血中グルコースモニタリングシステムは、小型化臨床化学技術の、患者ケアおよびヘルスケア送達方法を改善する能力を示した。^{7、8}

現在の診断技術の多くは、分析の前にサンプルの調製を必要とし、そして微少流体デバイス (microfluidic device) は、被検体検出領域の上流に、統合された単離プロセスを含んで設計製作し得る。例えば、グルコーステストストリップは、ガラスファイバーフィルターまたは微細孔性膜によって全血から血漿を単離する。⁹ 研究者らは、多くのラボオンチップ診断の進歩を報告したが、サンプルの微少流体分画に関する結果は少数しか報告されていない。¹⁰ 例えば、Brodyら¹¹ は、微細加工したフィルターデバイスを用いて全血から血漿を分離することを示唆し、そしてマイクロスフイアの懸濁液の濾過を報告した。Wildingら¹² は、遺伝子分析のために、マイクロフィルターを用いて白血球を測定することを証明し、そしてDuffyら¹³ は、回転する「ラボディスク」上での遠心を提案した。それでも、現在の技術水準は、液体生物学的サンプルから、望ましい数または数値範囲の生物学的粒子を、光学的視覚化のために単離し得るデバイスを欠く。そのようなデバイスは、迅速で、低コストの診断を可能にすることによって、ポイントオブケア診断の環境において非常に有用である。

【0004】

微少流体デバイスの1つの可能性のある適用は、状態および疾患の診断および治療のための、新規および信頼できるバイオマーカーと組み合わせて使用することである。例えば最近の研究は、アルツハイマー病のような神経学的状態に特異的な特定の機能的低下を、血小板を含む末梢細胞において検出し得ることを示した。最近の結果はまた、これらの同じ変化を、多くの場合最も悪化したADの疾患初期の前兆であり、最も多くの場合軽度の記憶喪失（「単一症候性進行性健忘症」）が特色である、軽度認知機能障害（MCI）と診断された被験体由来の血小板においても検出し得ることも示した。

【0005】

マイクロフィルターは、現在の微細加工技術と適合しているので、微少流体サンプルの調製によく適合し、そしてろ過を加圧、キャピラリー作用、または他の誘起流によって達成し得る。さらに、マイクロマシンによって与えられる正確な寸法および幾何学的コントロールは、従来膜ろ過によっては可能でない、最適なフィルターデザインの開発を可能にする。例えば、中空ファイバー膜（通常血漿分離に使用される）は、200から400

10

20

30

40

50

μm の大きい流動チャンネル (bulk flow channel) 径を有するが、微少流体チャンネルは、血液細胞と釣り合った寸法で容易に構築される (赤血球は典型的には直径6から7 μm 、血小板は1 - 2 μm)。また、マイクロフィルターデバイスを、正確な孔の寸法および幾何学的配置で製作し得る；対照的に、微細孔性膜の孔サイズおよび幾何学的配置は、多くの場合不均一である。最後に、光学的に透明な材料で製作されたマイクロフィルターデバイスは、標的病理の直接的な視覚化またはその標識化を可能にし得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

様々な実施態様が、1つ以上のフィルターチャンネルを含む下部プレートと連動した、光学的測定チャンバーと流体的に連絡した注入口を含む上部プレートを含む、微少流体デバイスを含み、ここで下部プレートに隣接する光学的測定チャンバーの表面は、1つ以上のフィルターチャンネルと流体的に連絡している。別の実施態様において、上記上部プレートは、1より多い注入口を含む。別の実施態様において、上記上部プレートは、1より多い光学的測定チャンバーを含む。別の実施態様において、前記1つ以上のフィルターチャンネルが、任意の2つの隣接する列において、反対方向に傾斜している平行なラインの列に配置される。別の実施態様において、上記1つ以上のフィルターチャンネルは、幅1.0 μm 未満である。別の実施態様において、上記下部プレートは、毛管力 (capillary force) を介するフィルターの流動 (filter flow) を増強する、キャピラリー溶離剤チャンバー (capillary eluent chamber) と連動している。別の実施態様において、流動チャンネルは、注入口を光学的測定チャンバーにつなげる。別の実施態様において、上記下部プレートはガラスでできている。別の実施態様において、上記上部プレートはガラスでできている。別の実施態様において、1つ以上の温度制御装置を、光学的測定チャンバー内の温度を調節するために適合させる。別の実施態様において、上記光学的測定チャンバーを、親和性、サイズ、電荷または移動性に基づいて分子を保持するように構成する。別の実施態様において、上記光学的測定チャンバーを、生物学的粒子の標的数の5%以内を保持するように構成する。別の実施態様において、上記光学的測定チャンバーを、生物学的粒子の標的数の2%以内を保持するように構成する。別の実施態様において、上記光学的測定チャンバーを、生物学的粒子の標的数の1%以内を保持するように構成する。別の実施態様において、上記デバイスを、注入口から光学的測定チャンバーまでの流体の流動を、圧力、バルブ、または他の同様の構成要素によって調節するように適合させる。

【0007】

他の実施態様は、微少流体診断デバイス；および使用のための説明書を含む、アルツハイマー病および/または軽度認知機能障害の診断のための微少流体キットを含む。

【0008】

他の実施態様は、光学的微量遠心チューブの挿入物および/またはキュベットを含む遠心診断デバイス；および使用のための説明書を含む、神経変性性疾患の診断のためのキットを含む。別の実施態様において、上記神経変性性疾患は、アルツハイマー病および/または軽度認知機能障害である。

【0009】

様々な実施態様が、被験体からサンプルを得ること；本明細書中の請求項1に記載されたデバイスに上記サンプルを移すことによって、上記サンプル中の標的部分の量または活性を定量すること；および上記サンプル中の標的部分の量または活性を、標準物質中の標的部分の量または活性と比較することを含む、神経変性性疾患を診断する方法を含み、ここで上記標準物質と比較した上記標的部分の量または活性の変化は、上記被験体が神経変性性疾患を有する、または神経変性性疾患を発症することを示す。別の実施態様において、上記サンプルは、未処理のサンプルを含む。別の実施態様において、上記サンプルは未梢組織サンプルを含む。別の実施態様において、上記標的部分は、ミトコンドリアタンパク質を含む。別の実施態様において、上記サンプルは、ミトコンドリア単離物および/ま

10

20

30

40

50

たは選択物を含まない。別の実施態様において、上記サンプルは、高エネルギー破壊技術にさらされていない。別の実施態様において、上記サンプルは、超音波処理、窒素キャビテーション、および/または溶解手順にさらされていない。別の実施態様において、標的部分の量または活性を定量することは、組織サンプルにおけるチトクロム酸化酵素活性を決定することを含む。別の実施態様において、標的部分の量または活性を定量することは、未処理のサンプル中に存在するアミロイド前駆体タンパク質の量を決定することを含む。別の実施態様において、上記サンプルは血漿を含む。別の実施態様において、上記サンプルは多血小板血漿（PRP）を含む。別の実施態様において、上記被験体は哺乳類である。別の実施態様において、上記被験体はヒトである。別の実施態様において、上記神経変性疾患は、アルコール依存症、アレキサンダー病、アルパーズ病、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症（ALS）、毛細管拡張性運動失調、バッテン病、ウシ海綿状脳症（BSE）、キャナヴァン病、脳性麻痺、コケーン症候群、皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration）、ハンチントン病、HIV関連認知症、ケネディ病、クラッベ病、レビー小体型認知症、神経ボレリア症、マチャド・ジョセフ病、多系統委縮症、多発性硬化症、ナルコレプシー、ニーマン・ピック病、PD、ペリツェーウス・メルツバッヒャー病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性核上性麻痺、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血に二次的な脊髄亜急性連合変性、シュピールマイアー・フォクト・シェーグレン・バッテン病、脊髄小脳失調、脊髄性筋委縮症、スティーレル・リチャードソン・オルスゼフスキー病、および脊髄ろうのうちの少なくとも1つである。別の実施態様において、上記標的部分は、ミトコンドリアトランスロカーゼサブユニットを含む。別の実施態様において、上記標的部分は、ミトコンドリアタンパク質と複合体化した、アミロイド前駆体タンパク質、または上記断片を含む。

【0010】

他の実施態様は、被験体からサンプルを得ること；上記サンプルを遠心デバイスへ移すことによって、サンプル中の標的部分の量または活性を定量すること；およびサンプル中の上記標的部分の量または活性を、標準物質中の標的部分の量または活性と比較することを含む、神経変性疾患を診断する方法を含み、ここで上記標準物質と比較した上記標的部分の量または活性の変化は、被験体が神経変性疾患を有する、または神経変性疾患を発症することを示す。別の実施態様において、上記遠心デバイスは、光学的微量遠心チューブ挿入物および/またはキュベットを含む。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

微少流体デバイスであって、該微少流体デバイスは、

（a）光学的測定チャンバーと流体的に連絡した注入口を含む上部プレート；

を含み、該上部プレートは、

（b）1つ以上のフィルターチャンネルを含む下部プレート；

と連動し、ここで、

（c）該下部プレートに隣接する該光学的測定チャンバーの表面は、該1つ以上のフィルターチャンネルと流体的に連絡している、微少流体デバイス。

（項目2）

前記上部プレートが、1より多い注入口を含む、項目1に記載のデバイス。

（項目3）

前記上部プレートが、1より多い光学的測定チャンバーを含む、項目1に記載のデバイス。

（項目4）

前記1つ以上のフィルターチャンネルが、任意の2つの隣接する列において反対方向に傾斜している平行なラインの列に配置される、項目1に記載のデバイス。

（項目5）

前記1つ以上のフィルターチャンネルが、幅1.0 μm未満である、項目1に記載のデバイ

ス。

(項目 6)

前記下部プレートが、毛管力を介するフィルターの流動を増強する、キャピラリー溶離剤チャンバーと連動している、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 7)

流動チャンネルが、前記注入口を前記光学的測定チャンバーにつなげる、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 8)

前記下部プレートが、ガラスでできている、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 9)

前記上部プレートが、ガラスでできている、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 10)

1 つ以上の温度制御装置を、前記光学的測定チャンバー内の温度を調節するように適合させる、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 11)

前記光学的測定チャンバーを、親和性、サイズ、電荷または移動性に基づいて分子を保持するように構成する、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 12)

前記光学的測定チャンバーを、生物学的粒子の標的数の 5 % 以内を保持するように構成する、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 13)

前記光学的測定チャンバーを、生物学的粒子の標的数の 2 % 以内を保持するように構成する、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 14)

前記光学的測定チャンバーを、生物学的粒子の標的数の 1 % 以内を保持するように構成する、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 15)

前記注入口から前記光学的測定チャンバーまでの流体の流動を、圧力、バルブ、または他の同様の構成要素によって調節するように適合させる、項目 1 に記載のデバイス。

(項目 16)

(a) 微少流体診断デバイス；および

(b) 使用のための説明書

を含む、アルツハイマー病および/または軽度認知機能障害の診断のための微少流体キット。

(項目 17)

(a) 光学的微量遠心チューブの挿入物および/またはキュベットを含む遠心診断デバイス；および

(b) 使用のための説明書

を含む、神経変性性疾患の診断のためのキット。

(項目 18)

前記神経変性性疾患が、アルツハイマー病および/または軽度認知機能障害である、項目 17 に記載のキット。

(項目 19)

神経変性性疾患を診断する方法であって、該方法は、
被験体からサンプルを得る工程；

項目 1 に記載のデバイスに該サンプルを移すことによって、該サンプル中の標的部分の量または活性を定量する工程；および

該サンプル中の該標的部分の量または活性を、標準物質中の該標的部分の量または活性と比較する工程

を含み、ここで該標準物質と比較した該標的部分の量または活性の変化は、該被験体が神

10

20

30

40

50

経変性性疾患を有する、または神経変性性疾患を発症することを示す、方法。

(項目 20)

前記サンプルが、未処理のサンプルを含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記サンプルが、末梢組織サンプルを含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

前記標的部分が、ミトコンドリアタンパク質を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 23)

前記サンプルが、ミトコンドリア単離物および/または選択物を含まない、項目 19 に記載の方法。

(項目 24)

前記サンプルが、高エネルギー破壊技術にさらされていない、項目 19 に記載の方法。

(項目 25)

前記サンプルが、超音波処理、窒素キャピテーション、および/または溶解手順にさらされていない、項目 19 に記載の方法。

(項目 26)

標的部分の量または活性を定量する工程が、前記組織サンプルにおけるチトクロム酸化酵素活性を決定する工程を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 27)

標的部分の量または活性を定量する工程が、前記未処理のサンプル中に存在するアミロイド前駆体タンパク質の量を決定する工程を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 28)

前記サンプルが血漿を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 29)

前記サンプルが多血小板血漿 (PRP) を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 30)

前記被験体が哺乳類である、項目 19 に記載の方法。

(項目 31)

前期被験体がヒトである、項目 19 に記載の方法。

(項目 32)

前記神経変性性疾患が、アルコール依存症、アレキサンダー病、アルパーズ病、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症 (ALS)、毛細管拡張性運動失調、バッテン病、ウシ海綿状脳症 (BSE)、キャナヴァン病、脳性麻痺、コケーン症候群、皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、前頭側頭葉変性症、ハンチントン病、HIV 関連認知症、ケネディ病、クラッペ病、レビー小体型認知症、神経ボレリア症、マチャド・ジョセフ病、多系統委縮症、多発性硬化症、ナルコレプシー、ニーマン・ピック病、PD、ペリツェーウス・メルツパッヒャー病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性核上性麻痺、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血に二次的な脊髄亜急性連合変性、シュピールマイアー-フォークト-シェーグレン-バッテン病、脊髄小脳失調、脊髄性筋委縮症、スティール-リチャードソン-オルスゼフスキー病、および脊髄ろうのうちの少なくとも 1 つである、項目 19 に記載の方法。

(項目 33)

前記標的部分が、ミトコンドリアトランスロカーゼサブユニットを含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 34)

前記標的部分が、ミトコンドリアタンパク質と複合体化した、アミロイド前駆体タンパク質、またはその断片を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 35)

神経変性性疾患を診断する方法であって、該方法は、被験体からサンプルを得る工程；

10

20

30

40

50

該サンプルを遠心デバイスへ移すことによって、該サンプル中の標的部分の量または活性を定量する工程；および

該サンプル中の該標的部分の量または活性を、標準物質中の該標的部分の量または活性と比較する工程を含み、ここで該標準物質と比較した該標的部分の量または活性の変化は、該被験体が神経変性性疾患を有する、または神経変性性疾患を発症することを示す、方法。

(項目36)

前記遠心デバイスが、光学的微量遠心チューブ挿入物および/またはキュベットを含む、項目35に記載の方法。

【0011】

本発明の他の特徴および利点が、例として本発明の様々な実施態様を例証する、付随する図面と合わせて、以下の詳細な記載から明らかになる。

【0012】

代表的な実施態様を、参照図面で例証する。本明細書中で開示された実施態様および図面は、制限ではなく例証と考えられることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本明細書中の実施態様によって、染色した懸濁細胞サンプルの濃度測定を可能にする、微量流体デバイスの概略図を示す。一般的なデザインは、表面に刻んだ形体が、組み立てたときに内部の形体になるサンドイッチデザインを含む、微細加工技術であり得る。このデバイスは、組み立ておよび結合したときに、相互接続したチャンネルおよびチャンパーの内部ネットワークを形成する、2つの刻んだガラスプレートを含み得る。(A)は上部プレートを、上面図100および側面図101の両方で開示する。上部プレートは、バッファ中に懸濁したサンプルを注入するための注入口102、下部プレートに刻まれたフィルターチャンネル107の上にある光学的測定チャンパー104へつながる流動チャンネル103を含む。(B)は、下部プレートを、上面図105および側面図106の両方で開示する。1つの実施態様において、6から8個のこれらのデバイスを、標準的なマイクロプレートリーダーで読み取るために、96穴プレートの形式にデザインしたチップ上に整列させ得る。

【図2】図2は、本明細書中の実施態様によって、染色した懸濁細胞サンプルの濃度測定を可能にする、微量流体デバイスの概略図を示す。一般的なデザインは、表面に刻んだ形体が、組み立てたときに内部の形体になるサンドイッチデザインを含む、微細加工技術であり得る。(A)は上部プレートを、上面図100および側面図101の両方で開示する。上部プレートは、穴をあけた(例えば21G=0.8mm外径の針)注入口102を含む。上部プレートはまた、長さが可変の横断流のフィルターチャンネル107を覆う、光学的測定チャンパー104に至る、幅1mm×高さ500μmの流動チャンネル103を含む。(B)は、下部フィルタープレートを、上面図105および側面図106の両方で開示し、下部フィルタープレートは寸法的に上部プレートより小さい。下部フィルタープレートのフィルターチャンネル107は、幅1.0μm未満、深さ不定の、浅い横断流フィルターチャンネルの魚骨形状である。1つの実施態様において、下部キャッピングプレートまたは吸い上げる(wicking)吸収材によって形成される、キャピラリー溶離剤チャンパー108を含む、特徴がなく、そして上部プレートと寸法的に同一である、下部キャッピングプレートも存在し得る。

【図3】図3は、本明細書中の実施態様によって、微量遠心を用いた染色懸濁細胞サンプルの濃度測定を可能にする挿入物のデザインを示す。上記挿入物は、血小板のような染色された粒子が、標準化された光学的測定のために、挿入物の光学的ポケットに信頼性高くペレット化し得る、微量遠心チューブ挿入物と同様に作用し得る。上記図は、1.5mLのチューブの典型的な寸法を有するチューブ110、例えば幅2mm×14mmの内側寸法、0.5-1.0mmの直径を有し得る、挿入物のための光学的測定チャンパー104を示す。上記図はまた、例えば厚さ約0.85mmであり得る支持フィン109を示す。

10

20

30

40

50

本明細書中でさらに詳細に記載される1つの実施態様において、血小板の染色強度は、アルツハイマー病患者、および前兆の被験体において減少し、そしてこの減少を信頼性高く測定し得る。

【図4】図4は、本明細書中の実施態様によって、標準的な分光光度計における挿入読み取りを可能にするための、付属品としての挿入キュベット111デザインを示す。1つの実施態様において、上記キュベットはキュベット光学ウィンドウ112を含み得る。別の実施態様によって、上記デザインはまた、挿入物の支持フィン109を捕捉および方向付けるためのマウンティングスロット113を含み得る。別の実施態様において、付属品は標準的なマイクロプレートリーダーにおける読み取りを可能にし得る。

【図5】図5は、本明細書中の実施態様によって、サンプルからの標的部分の定量方法全体のフローチャートを示す。1つの実施態様において、上記サンプルを被験体から得ることができ200、続いてサンプルを染色し201、次いで微量流体デバイスに移し202、ここで染色サンプルが保持される間にキャリア溶液 (solution) が通過し得る203、そして次いで最後に光学密度を測定し、そして標準物質とその密度を比較する204。別の実施態様において、上記サンプルを被験体から得ることができ200、続いてサンプルを染色し201、次いで遠心デバイスに移し205、遠心して染色サンプルの沈降を誘導し206、そして次いで最後に光学密度を測定し、そして標準物質とその密度を比較する207。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書中で引用される全ての参考文献は、完全に述べられたかのように、その全体として参考文献に組み込まれる。他に定義されなければ、本明細書中で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第3版、J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第5版、J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); および Sambrook および Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) は、当業者に、本出願において使用される多くの用語についての一般的な指針を提供する。

【0015】

当業者は、本明細書中で記載されたものと同様の、または同等の多くの方法および材料を認識し、それを本発明の実施において使用し得る。実際、本発明は、決して記載された方法および材料に制限されない。

【0016】

本明細書中で使用される場合、「診断する」または「診断」という用語は、状態または疾患の性質または実体 (identity) を決定することを指す。診断には、疾患の重症度に関する決定も付随し得る。

【0017】

本明細書中で使用される場合、「予後の」または「予後」は、疾患の転帰を予測することを指す。

【0018】

本明細書中で使用される場合、「AD」はアルツハイマー病を意味する。

【0019】

本明細書中で使用される場合、「MCI」は軽度認知機能障害を意味する。

【0020】

本明細書中で使用される場合、「PD」という用語はパーキンソン病を意味する。

10

20

30

40

50

【0021】

本明細書中で使用される場合、「流体的な連絡 (fluid connection)」は、例えば水、血液、血漿等のような液体の連絡物を含む連絡を意味する。

【0022】

本明細書中で使用される場合、「未処理のサンプル」は、超音波処理または窒素キャビテーションのような、高エネルギー破壊技術にさらされていないサンプルを指す。例として、その用語は決してそのように制限されないが、多血小板血漿を含む未処理サンプルは、ミトコンドリア酵素機能不全に関して分析する前に、ミトコンドリア自体のろ過、精製、および/または単離にさらされ得ない。

【0023】

本明細書中で使用される場合、「魚骨形」パターンという用語は、どの2つの隣接する列も、反対方向に傾斜した、平行な線の列でできたパターンを指す。

【0024】

本明細書中で使用される場合、微少流体デバイスの上部および下部プレートはまた、単一の結合したデバイスの異なる側または領域を指し得る。例えば、決して制限しないが、上部および下部プレートを有する微少流体デバイスは、注入口を含む1つの面、および様々なチャネルを含む反対の面を有する、単一の結合したデバイスを指し得る。

【0025】

本明細書中で使用される場合、「マイクロフルイディクス」は、様々な寸法およびサイズのスケールで、流体、懸濁液、または懸濁した粒子の流動を可能にするデバイスを指す。

【0026】

マイクロフルイディクスおよび流動デバイス

本明細書中で開示されるように、本発明書中の様々な実施態様によって、本発明者らは、構成要素を組み立てた場合に、光学的測定チャンバー104と流体的に連絡するように位置する、フィルターチャネル107を有する微少流体デバイスを作製した。上記フィルターチャネル107は、例えば懸濁血液細胞の流動を遮断しながら、光学的測定チャンバー104からの流体の流動を可能にし得る。別の実施態様において、上記微少流体デバイスを、本明細書中の図1、2、3および/または4で説明する。

【0027】

本発明の実施態様は、微少流体診断デバイスを含む。特定の実施態様において、上記デバイスは、液体サンプルから生物学的粒子を単離し得る。特定の実施態様において、上記粒子は、例えば赤血球、白血球、血小板、線維芽細胞、培養細胞等であり得る。同様に、特定の実施態様において、上記液体サンプルは、全血、全血画分、血漿、尿、リンパ液、プロス、培地等であり得る。

【0028】

本発明の実施態様を、例えばプラスチック、ガラス、シリカ、複合材等のような、あらゆる適当な材料から製作し得る。

【0029】

プラスチック材料を含む実施態様において、上記プラスチック材料は、例えば、例えばアクリロニトリルブタジエンスチレンプラスチック (ABS)、アセタール、アクリル (Perspex)、アクリロニトリル (ナイロン)、セルロース系物質 (cellulose)、フッ素樹脂、高密度ポリエチレン (HDPE)、低密度ポリエチレン (LDPE)、ノリル、ポリアリレート、ポリアリーールスルホン、ポリブチレン、ポリブチレンテレフタレート (PBT)、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエチレン (ポリテン)、ポリプロピレン、ポリアロマー、ポリエチレンテレフタレート、ポリイミド、ポリアミド-イミド、ポリ酢酸ビニル (PVA)、ポリ塩化ビニル (PVC)、ポリスチレン、ポリスルホン、スチレン、ABS PTFE (テフロン (登録商標)) 等のような、熱可塑性物質を含み得る。

【0030】

10

20

30

40

50

プラスチック材料を含む実施態様において、上記プラスチック材料は、例えば、例えばアルキドポリエステル、アリル、ベークライト、エポキシ、メラミン、フェノール類、ポリブタジエン、ポリエステル、ポリウレタン、シリコン、尿素等のような、熱硬化性物質であり得る。同様に、上記プラスチック材料は、バイオプラスチックを含み得る。バイオプラスチックは、多くの場合石油由来である従来のプラスチックではなく、植物油、コーンスターチ、エンドウデンプン、または微生物叢のような、再生可能なバイオマス供給源由来のプラスチックの形態である。本発明の実施態様で使用するために適当なバイオプラスチックの型は、例えばポリ乳酸(PLA)プラスチック、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(PHB)、ポリアミド11(PA11)、生物由来ポリエチレン等を含む。

【0031】

特定の実施態様において、上記デバイスは例えば単一の構成要素から成り得る。特定の実施態様において、上記デバイスは、例えば上部プレートおよび下部プレートのような、複数の構成要素から成り得る。いくつかの実施態様において、上記複数の構成要素を、同じまたは異なる材料から作製し得る。特定の実施態様において、上記構成要素は均一または不均一であり得、そして例えばチャンネル、管、チャンパー、空間、口等を含み得る。不均一な実施態様において、上記チャンネル、管、チャンパー、空間、口等は、例えば深さまたは直径が1 μ m、または深さまたは直径が2 μ m、または深さまたは直径が4 μ m、または深さまたは直径が10 μ m、またはそれを超える等のような、一貫したサイズであり得る。同様に、不均一な実施態様において、上記チャンネル、管、チャンパー、空間、口等は、例えば深さまたは直径が1および3 μ mの間、深さまたは直径が3および6 μ mの間、深さまたは直径が6および10 μ mの間、またはそれを超える、または深さまたは直径が1および2mmの間、または深さまたは直径が2および5mmの間、または深さまたは直径が5および10mmの間、またはそれを超える等のような、サイズの範囲であり得る。

【0032】

複数の構成要素から成るいくつかの実施態様において、上記複数の構成要素を、単一のユニットを形成するために密封し得る。特定の実施態様において、上記デバイスのチャンパーは、前もって決定した数、量、または体積の標的生物学的粒子を捕捉し得る。同様に、上記デバイスの特定の実施態様は、前もって決定した数または量の標的生物学的粒子の捕捉を維持し得る。同様に、特定の実施態様において、上記デバイスのチャンパーは、前もって決定した数または量の粒子の、0.1%、0.5%、1%、2%、4%、7%、10%、15%、または20%以内、または他のあらゆる望ましい量を捕捉し得る。

【0033】

特定の実施態様において、その前もって決定した数または量は、例えば0から100粒子、または100から1000粒子、または1000から10,000粒子、または10,000から100,000粒子、または100,000から1,000,000粒子、または1,000,000から5,000,000粒子、またはこれらの範囲のいずれかが以内、またはそれを超える等のような範囲内であり得る。

【0034】

いくつかの実施態様において、その光学的測定チャンパー104は、チャンパー内の生物学的粒子を可視化し得るように、光学的に透明であり得る。特定の実施態様において、その可視化を、例えば濃度測定/分光光度的リーダー、発光/蛍光リーダー等のような、あらゆる適当な方法で達成し得る。特定の実施態様において、上記測定チャンパーのサイズおよび配置を、特定の標的生物学的粒子について最適化し得る。

【0035】

本発明の実施態様は、光学的測定チャンパー104から流体を排出するために配置された、少なくとも1つのフィルターチャンネル107を含み得る。

【0036】

ある実施態様において、本発明は、以下のものを含むデバイスを提供する：

(a) 光学的測定チャンパー104と流体的に連絡した注入口102を含む上部プレー

10

20

30

40

50

ト；および；

(b) 少なくとも1つのフィルターチャンネル107を含む下部プレート；

(c) ここで下部プレートに隣接する光学的測定チャンバー104の表面は、少なくとも1つのフィルターチャンネル107と流体的に連絡している。

【0037】

ある実施態様において、本発明は、例えば疾患の存在、欠如、または重症度を診断する方法を提供する。同様に、いくつかの実施態様において、本発明は、疾患を発症する、または発症しない可能性を診断する方法を提供する。特定の実施態様において、上記疾患は、例えばAD、PD、他の神経変性性疾患等であり得る。特定の実施態様において、上記方法は、生物学的サンプルを提供すること、上記サンプルの特定の特徴を可視化し得るよう

10

【0038】

そのデザインの利点は、容易に達成可能な、小容量の血液サンプルの利用を含み、それは2時間未満で処理および測定し得る。また、新規マイクロフルイディクス測定デバイスは、標識サンプルの迅速な濃度（または蛍光または発光）測定を可能にする。デバイス中の反応産物は、単純な反応工程の後、マイクロプレートリーダーで測定可能である - 基礎臨床実験室における、基本的なデバイスによる、最低訓練を受けた研究室人員による可能性のある使用のためにデザインされる。様々な実施態様が、アルツハイマー病の脳において欠損していることが繰り返し発見された細胞機能、例えば血小板および他の組織を測定し得、そして全体の、溶解していない細胞 - 言い換えると、未処理のサンプルにおいて、従来のETC酵素研究における最も大きな混乱であるミトコンドリアの単離に頼らずに、高い感度で測定し得る。上記デバイスは特に、抗体に基づく技術を含む、広い範囲の色素、反応、およびプローブに関して使用可能であり、そして臨床および研究の適用において異なる細胞型（例えばリンパ球、培養系統）のために改変し得るので、他の疾患において広い適用を有する。

20

【0039】

ミトコンドリアを用いた診断方法

本明細書中で開示されたように、最近の研究は、ミトコンドリア電子伝達系（ETC）酵素は、ADおよび軽度認知機能障害（MCI）において機能的に欠損していることを示した。これらの特異的欠損（特に酵素チトクロム酸化酵素における）が、AD患者の脳および血小板、および他の末梢組織（それはいくらか受け入れがたい；例えば筋肉）において見出された。本発明者らは、MCIを有する被験体から単離された血小板ミトコンドリアにおいて、チトクロム酸化酵素（C.O.）の機能の有意な減少を見出し、それはミトコンドリア機能との干渉が、疾患のバイオマーカーとして利用され得る、ADの病態生理における初期の、そして検出可能な全身性イベントであるという見方を支持する。

30

【0040】

ある実施態様において、本発明は、以下のものを含む神経変性性疾患を診断する方法を提供する：

(a) 被験体から組織サンプルを提供すること；

40

(b) 当該サンプルの細胞において、標的部分の量または活性を定量すること；および

(c) サンプルの細胞における標的部分の量または活性を、標準物質における標的部分の量または活性と比較すること、ここで標準物質と比較して、サンプルの細胞における標的部分の量または活性の変化は、上記被験体が神経変性性疾患を有することを示す。

【0041】

特定の実施態様において、上記神経変性性疾患は、例えばアルコール依存症、アレキサンダー病、アルパーズ病、AD、ALS、毛細管拡張性運動失調、バッテン病（シュピールマイアー - フォークト - シェーグレン - バッテン病としても知られる）、ウシ海綿状脳症（BSE）、キャナヴァン病、脳性麻痺、コケーン症候群、皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、前頭側頭葉変性症、HD、HIV関連認知症、ケネディ病、クラ

50

ッベ病、レビー小体型認知症、神経ボレリア症、マチャド・ジョセフ病（脊髄小脳失調3型）、多系統萎縮症、多発性硬化症、ナルコレプシー、ニーマン・ピック病、PD、ペリツェーウス・メルツパッヒャー病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性核上性麻痺、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血に二次的な脊髄亜急性連合変性、シュピールマイアー-フォクト-シェーグレン-バッテン病（バッテン病としても知られる）、脊髄小脳失調（様々な特徴を有する複数の型）、脊髄性筋萎縮症、スティール-リチャードソン-オルスゼフスキー病、脊髄ろうであり得る。

【0042】

いくつかの実施態様において、上記組織サンプルは、例えば羊水、血液、脳脊髄液、血漿、血清、滑液、他の生体液等を含み得る。特定の実施態様は、例えば血液画分、血漿画分等のような、分画したサンプルを利用し得る。いくつかの実施態様は、多血小板血漿（PRP）を利用し得る。分画したサンプルを利用する実施態様において、上記分画を、例えば分画遠心分離等を用いて達成し得る。特定の実施態様において、上記組織サンプルを、例えば羊水穿刺、採血、脊椎穿刺等によって、被験体から得ることができる。

10

【0043】

いくつかの実施態様において、上記組織サンプルは、例えば筋肉細胞、筋肉線維、または心筋組織、平滑筋組織、または骨格筋組織のような筋肉組織等を含み得る。特定の実施態様において、上記組織サンプルを、例えば生検等によって得ることができる。

【0044】

特定の実施態様において、上記被験体は、例えば有袋類、単孔類、有胎盤哺乳類等のような哺乳類であり得る。有胎盤哺乳類を利用する実施態様において、上記有胎盤哺乳類は、例えばヒト等であり得る。いくつかの実施態様において、標的部分の量または活性を定量することを、例えば組織化学的技術、免疫化学的技術、その組み合わせ等によって達成し得る。

20

【0045】

特定の実施態様において、標的部分の量または活性を定量することは、例えば、例えばアミロイドベータ（A β ）、アミロイド前駆体タンパク質（APP）、ミトコンドリアトランスロカーゼ（サブユニットTOMM40）、APP-TOMM40複合体等のような、タンパク質の存在を定量することを意味し得る。いくつかの実施態様において、定量を、標的部分に反応性の抗体の使用によって達成し得る。

30

【0046】

特定の実施態様において、標的部分の量または活性を定量することは、例えば酵素活性を評価することを意味し得る。いくつかの実施態様において、これは、例えば濃度測定/分光光度評価、蛍光光度評価、組織化学的標識等を含み得る。

【0047】

特定の実施態様において、標的部分の標準的な量または活性を、例えば患者サンプル、文献、コンピューターデータベース、またはその組み合わせ等から決定し得る。いくつかの実施態様において、標的部分の量または活性の変化は、例えば増加または減少であり得る。

【0048】

特定の実施態様において、標的部分の量または活性を試験する細胞は、例えば血小板（thrombocyte）のような、あらゆるミトコンドリアを含む細胞等であり得る。

40

【0049】

本発明の特定の実施態様は、例えばキュベット、マルチウェルプレート、マイクロフィルターデバイス等のような、診断テスト形式を利用する。いくつかの実施態様において、上記マルチウェルプレートは、例えば4穴、6穴、12穴、24穴、48穴、96穴、192穴、384穴、768穴、1536穴、またはそれを超えるもの等を含み得る。いくつかの実施態様において、上記マイクロフィルターデバイスは、例えば充填口、必要に応じて透明な測定チャンパー、および少なくとも1つの排水チャンネルを含み得る。いくつかの実施態様において、上記マイクロフィルターデバイスを、プラスチック、ガラス、シリ

50

力等で製作し得る。

【0050】

キット

本発明の実施態様はまた、神経変性性疾患の存在、欠如、重症度、またはそれを発症するまたは発症しない可能性の診断、および微小流体および遠心デバイスの調製および使用の両方のためのキットに向けられる。上記キットは、本発明の方法を実施するために適当な材料または構成要素の集合体である。従って、いくつかの実施態様において、上記キットは、上記または以下の実施例で記載するような、本発明の方法を説明する。

【0051】

本発明のキットにおいて構成される構成要素の正確な性質は、その意図される目的に依存する。例えば、いくつかの実施態様は、神経変性性疾患を診断する目的のために構成される。1つの実施態様において、上記キットは、特にADを診断する目的のために構成される。別の実施態様において、上記キットは、特にPDを診断する目的のために構成される。または、いくつかの実施態様において、上記キットは、上記で記載したように、光学的測定チャンパー104と流体的に連絡した注入口102を有する、上部プレートおよび下部プレートを含むデバイスを含む。

【0052】

使用のための説明書をキットに含み得る。「使用のための説明書」は、典型的には、ヒトにおいてADの存在を診断することのような、望ましい結果を得るためにキットの構成要素を使用することにおいて採用される技術を説明する、具体的な表現を含む。必要に応じ、上記キットはまた、希釈剤、バッファー、薬剤学的に許容可能なキャリア、シリンジ、カテーテル、アプリケーター、ピペット操作ツールまたは測定ツール、包帯材料または当業者によって容易に認識されるような他の有用な装備のような、他の有用な構成要素を含む。

【0053】

キットに集められた材料および構成要素を、その操作性および有用性を維持するあらゆる簡便なおよび適当な方法で保存して、実務者に提供し得る。例えば、上記構成要素は、溶解した、脱水した、または凍結乾燥形態であり得る；それらを、室温、冷蔵温度、または冷凍温度で提供し得る。上記構成要素は、典型的には適当な包装材料（複数可）に含まれる。本明細書中で採用される場合、「包装材料」という語句は、発明デバイス等のような、キットの内容物を収納するために使用される、1つ以上の物理的構造を指す。上記包装材料は、好ましくは無菌の、混入物を含まない環境を提供するために、周知の方法によって構築される。キットにおいて採用される包装材料は、診断アッセイにおいて習慣的に利用されるものである。本明細書中で使用される場合、「包装」という用語は、個々のキット構成要素を保持し得る、ガラス、プラスチック、紙、ホイル等のような、適当な固体マトリックスまたは材料を指す。従って、例えば包装は、適当な量の発明デバイスを含むために使用されるプラスチック容器であり得る。上記包装材料は一般的に、キットおよび/または上記構成要素の内容物および/または目的を示す、外部のラベルを有する。

【0054】

診断プロトコール

本明細書中で開示されるように、様々な実施態様が、以下の工程の1つ以上の組み合わせによって、被験体の疾患および/または状態を診断する方法を含む：(1)被験体からサンプルを得る200；(2)サンプルを染色する201；(3)微小流体デバイスへ移す202、ここで(4)染色サンプルが保持される間にそのキャリア溶液(solution)が通過し得る203；および次いで(5)光学密度を測定し、そしてその密度を標準物質と比較することによって、被験体を診断する204。

【0055】

1つの実施態様において、サンプルの染色201は、抗凝固剤を含む遠心チューブに被験体からの血液を採取することを含む。別の実施態様において、その血液を遠心し、続いてPRP(多血小板血漿)層を吸引し、最初にACDを加え、次いでPRPのpHをチェ

ックしながら A C D を 1 滴ずつ加えることによって P R P を酸性化する。別の実施態様において、上記 P R P を、リン酸塩緩衝化生理食塩水 (P B S) で希釈し、遠心し、そして次いで上清を移す。別の実施態様において、上記上清を遠心して血小板をペレット化し、そして次いで改変タイロッドバッファに再懸濁する。別の実施態様において、改変タイロッドバッファ中の血小板を、等容量の 2 倍反応染色溶液を含むチューブへ加える。別の実施態様において、上記チューブをインキュベートし、遠心し、できたペレットを再懸濁し、そして次いで定量のために微量流体デバイスおよび/または遠心デバイスへ移す。

【 0 0 5 6 】

1 つの実施態様において、染色サンプルの、定量のための微量流体デバイスの注入口 1 0 2 への移動は、シリンジによるような、手動の注入によることでよい。別の実施態様において、その移動は、注入ポンプまたは他のデバイスによるような、自動化方式であってよい。別の実施態様において、その染色血小板懸濁液は、適用 (例えばシリンジまたはポンプ) の圧力下で、内部チャネル (複数可) を貫流し、ろ過チャネル 1 0 7 の上にある光学的測定チャンパー 1 0 4 へ流れる。本明細書中で記載されるように、上記ろ過チャネル 1 0 7 を、血小板を光学的測定チャンパー 1 0 4 へ保持しながら、血小板キャリア溶液 (すなわちバッファ) の通過を最大にするように並べ得る。別の実施態様において、上記ろ過チャネル 1 0 7 を、毛管力によってキャリア溶液の通過を増強し、そしてそれによって光学的測定チャンパー 1 0 4 内の血小板充填密度を増強するためにデザインする。従って、別の実施態様において、そのキャリア溶液の排出および同時に起こる血小板充填は、2 つの力 : 適用の力および排出チャネル中の毛管力によって達成され得る。キャリア溶液が光学的測定チャンパー 1 0 4 から引かれると、血小板充填密度は、続く血小板中の染色密度の測定のコントロールに適当な、最大の、そして従って一定の値に達する。

【 0 0 5 7 】

別の実施態様において、光学的測定チャンパー 1 0 4 の光学密度を、確立した波長で測定し、そして結果を表にした値と比較し得る。別の実施態様において、光学的測定チャンパー 1 0 4 の光学密度を、含まれている標準参考物質と共同で測定し得る。この測定を、例えば、光学的測定チャンパー 1 0 4 をマルチウェルマイクロプレートの標準的な座標で並べて、標準的なマイクロプレート (例えば 9 6 穴マイクロプレート) の寸法を有する製造されたプレートまたはフレームに、マイクロフルイデクス装置、またはより高い経済性のために複数の装置を収めることによって達成し得る。従って、別の実施態様において、それらが慣れているような特定のウェル座標および特定の波長を選択し、そして測定を実施するために、標準的なマイクロプレートリーダーを使用し得る。別の実施態様は、上記光学的測定チャンパー 1 0 4 が、分光光度計の標準的なビームと並ぶように、垂直におよび標準的な分光光度計キュベットの寸法を有するフレームに収めて、マイクロフルイデクス装置を組み込み得る。分光光度計またはマイクロプレート分光光度リーダー (s p e c t r o p h o t o m e t r i c m i c r o p l a t e r e a d e r) における測定を標的としたデザインにおいて、指定の波長における分光光度測定を、濃度測定の代理として使用する。従って、別の実施態様において、代替の波長を指定し得、そして非モノクロメーター装備 (n o n - m o n o c h r o m a t o r - e q u i p p e d) 分光光度デバイスにおいて使用するために、またはそうでなければ指定された波長を使用できない場合に、様々な補正因子を組み込み得る、または組込み得ない。別の実施態様は、同様のマイクロフルイデクスデザインの特徴を組込み得るが、光学的濃度計における直接的な測定を可能にする。記載された実施態様それぞれは、同等に有効であり、そしてそれぞれ使用者の利用可能なデバイスを標的としてキットとして提供され得る (例えば、「マイクロプレートリーダー用診断キット」、「分光光度計用診断キット」) 。

【 0 0 5 8 】

本明細書中でさらに開示されるように、様々な実施態様が、以下の工程の 1 つ以上の組み合わせによって、被験体の疾患および/または状態を診断する方法を含む : (1) サンプルを被験体から得ることができる 2 0 0 ; (2) 続いてサンプルを染色する 2 0 1 ; および (3) 染色サンプルを遠心デバイスへ移す 2 0 5 ; (4) 遠心して染色サンプルの沈

10

20

30

40

50

降を誘導する 206 ; および次いで (5) 光学密度を測定し、そしてその濃度を標準物質と比較する 207。

【0059】

別の実施態様において、遠心デバイスへの染色サンプルの移動は、本明細書中の図3に記載したような、チューブ挿入物への移動を含み得る。別の実施態様において、上記チューブ挿入物を、標準的な 1.5 ml 微量遠心チューブ 110 中に置き、染色した血小板懸濁液をチューブ挿入物に移動し (例えばピペットによって)、そしてチューブおよび挿入物を、決定したスピードで (例えば 2000 x g) 決定した時間 (例えば 15 分) 遠心して、染色した血小板の光学的測定チャンパー 104、または「光学ポケット」への沈降を誘導する。従って、一定の遠心力の下で、測定チャンパー内の染色血小板充填密度は、続

10

【0060】

別の実施態様において、光学的測定チャンパーの吸光度を、確立した波長 (例えば 330 nm) で測定し、そして結果を表にした値と比較する、または含まれている標準参考物質と共同で測定する。別の実施態様において、この測定を、例えば、チューブ挿入物のフレームへの挿入を提供するために、測定チャンパーをマルチウェルマイクロプレートの標準的な座標で並べて、標準的なマイクロプレート (例えば 96 穴マイクロプレート) の寸法を有する製造されたプレートまたはフレームを提供することによって達成し得る。従って、あらゆる標準的なマイクロプレートリーダーにおいて、使用者は、彼らが慣れたよう

特定のウェル座標および特定の波長を選択し、そして測定を行い得る。別の実施態様は、その光学的測定チャンパー 104 が挿入の際に分光光度計の標準的なビームと並ぶように、標準的な分光光度計キュベット 111 の寸法を有するフレームを組み込み得る。分光光度計またはマイクロプレート分光光度リーダーにおける測定を標的としたデザインにおいて、指定の波長における分光光度測定を、濃度測定 of 代理として使用する。従って、別の実施態様において、代替の波長を指定し得、そして非モノクロメーター装備分光光度測定デバイスにおいて使用するために、またはそうでなければ指定された波長を使用できない場合に、様々な補正因子を組み込み得る、または組み込み得ない。別の実施態様は、同様のマイクロフルイディクスデザインの特徴を組み込み得るが、光学的濃度計における直接的な測定を可能にする。記載された実施態様それぞれは、同等に有効であり、そしてそれぞれ使用者の利用可能なデバイスを標的としたキットとして提供され得る (例えば、「マイクロプレートリーダー用診断キット」、「分光光度計用診断キット」)。

20

30

【0061】

当業者は、本明細書中で記載されたものと同様のまたは同等の多くの方法および材料を認識し、それらを本発明の実施において使用し得る。実際、本発明は決して記載された方法および材料に制限されない。本発明の目的のために、以下の用語を下記で定義する。

【実施例】

【0062】

以下の実施例が、請求された発明をより良く説明するために提供され、そして本発明の範囲を制限すると解釈されない。特定の材料が言及される範囲内で、それは単に説明の目的のためであり、そして本発明を制限することを意図しない。当業者は、発明能力を働かせることなく、および本発明の範囲から逸脱することなく、同等の手段または反応物を開発し得る。

40

【0063】

実施例 1

単純および低コストの組織化学評価を提供するキットデザイン

最近の研究は、特定の神経学的減退 (アルツハイマー病におけるような) を、血小板のような末梢細胞において検出し得ることを示した。血小板を活性化することなく (すなわち、手順の間血小板全体を懸濁液中に維持する)、関心のある酵素の活性を組織化学的に染色することによって、活性化および接着のために必要な複雑な方法に依存することなく

50

、微小流体デバイスを用いた反応産物の濃度測定のために、血小板を組織様の方向 (*tissue-like orientation*) に強制し得る。これは次に二次的なコントロールアッセイの必要性を排除し、そして別々の試薬および他の必要な供給物の数の抑制が存在し、全体的なコストおよびアッセイの複雑さを抑制する。例えば、本発明者らは、分離媒体を有する市販の分離チューブ (例えば、Sigma-Aldrich Accuspin、Vacutainer CPT) を必要とするのではなく、一般的な低コストのチューブ (例えば空のACDチューブ ; 混入に関して染色によって試験および確認した) における分画遠心分離を用いて、純粋な血小板調製物を達成し得る。本発明者らは、酸-クエン酸塩-デキストロース抗凝固剤のみに依存して、通常の抗血小板活性化因子プロスタグランジン-1およびアピラーゼを試験および排除した。

10

【0064】

本発明者らは、キャリアバッファの通過を可能にしながら、最も高い感度で染色産物を測定する、光学的測定チャンバー中の均一なアレイにおいて、染色した血小板を捕捉/ろ過するマイクロフルイディクスデバイスをデザインした。上記デバイスは、染色産物の測定において前例のない感度を、そして従って酵素活性自体の測定において前例のない感度および正確さを提供する。上記デバイスをまた、多くの型の懸濁細胞 (例えばリンパ球、癌細胞) にわたって、あらゆる数の様式 (例えば蛍光、発光) の光学的測定のために、単純な改変ありまたは無しで、高品質の細胞フィルターとして使用し得る。従って、診療所および研究室の両方において、この型のデバイスの可能性のある適用の数は、ほとんど無限である。

20

【0065】

実施例2

マイクロフルイディクスプレートデザイン

一般的なマイクロフルイディクスプレートデザインは、染色した懸濁細胞サンプルの濃度測定を可能にする。一般的なデザインは、表面に刻まれた形体が組み立てたときに内部の形体になるサンドイッチデザインを含む、微細加工技術を組み込む。そのデバイスは、例えば、組み立ておよび結合した場合に、相互接続したチャンネルおよびチャンバーの内部ネットワークを形成する、2つの刻んだガラスプレートを有し得る。上部プレートは、バッファに懸濁したサンプルの注入のための入口、および測定チャンバーへ至る通過チャンネルを含み得る。上記測定チャンバー、または光学的測定チャンバーは、下部プレートに刻まれた微量ろ過チャンネルの上にある。6から8個のこれらのデバイスを、例えば、標準的なマイクロプレートリーダーで読み取るために、96穴プレートの形式にデザインされたチップ上に並べ得る。

30

【0066】

実施例3

マイクロフルイディクスプレートデザインのデザイン特徴

デザインは主に単純な通過の適用であり、重要な試験パラメータは流動およびろ過、すなわち「目詰まり」の欠如および均一な測定野を生ずる能力である。血小板の組織化学の試験において、抗凝固の維持は、組織化学的手順の間、血小板の凝集および活性化をうまく防止した。さらなるパラメータは、血小板が濃度測定を受けられる均一な層を形成するような、測定チャンバーからのキャリアバッファのろ過である。これは、このデザインの最も単純な変形の1つにとって重要である：測定チャンバー内で血小板の均一な配列を得るために、使用者は、内部コントロールとして「血小板密度」のみに依存して、二次的なコントロールアッセイの使用を無しですませ得る。

40

【0067】

a. 入口は微細加工デザインにおいて通常使用される型であり得る。

【0068】

b. 流動チャンネル。流動チャンネル (*flow channel*) は、測定チャンバーへの懸濁液の妨げられない流動を可能にする。例えば、血小板充填密度の一貫性を確立するために有用であることを証明し得る、微細加工圧力制御弁の組み込みのような、流動チャネ

50

ルへの改変を利用し得る。

【0069】

c. 測定チャンバー。1つの実施態様において、測定チャンバーの寸法は、2つの主な理由のために、高い剛性の材料（例えば、通常微細加工されるプラスチックではなくガラス）からデバイスを製造することを必要とする：1）信頼性の高い血小板充填密度は、柔軟なチャンバーにおいて達成し得ない、2）提案された寸法（直径：高さ/深さ）は、軟らかい材料ではチャンバーの崩壊を引き起こし得る。1つの実施態様において、チャンバーの直径は、最大3mmであり得る。視覚スペクトルにおける反応産物の測定は、サンプルの上および下に光学的清澄性を必要とし、従ってガラスを使用し得る。吸光度評価または濃度測定評価における重要な要素は、不規則な表面（すなわち組織）からの光の散乱である；本明細書中で記載された組織染色の適用において、これはガラススライドおよびカバーガラスの使用によって最低限にされ、そして典型的に行われるマクロスケールの評価（例えば脳領域分析）は、あらゆる残存散乱に比較的非感受性である。染色産物の光学密度を、末端使用者が購入しなければならない光源、光学（optics）、および検出器の新規組み立てではなく、標準的な、しかしより感度の高い、マイクロプレートリーダーのような研究室デバイスで測定したいと望むと、不規則なサンプル表面による光散乱は、はるかにより重要になる。1つの実施態様において、これは2つの方法のうち1つで取り組み得る：1）ビームが通過しなければならない組織の厚さ（チャンバーの深さ）を最小限にする、および2）本発明者らのデバイスのガラス表面を利用して、サンプルをビームに対してほとんど完全に垂直および規則的な整列に強制する。

10

20

【0070】

d. 微量ろ過。微量ろ過チャンネルデバイスを、下流の化学のために、毛管作用のみを用いて、血漿を全血から受動的にろ過するようにデザインする。そのデザインは、懸濁液中の血小板の信頼性高いろ過を可能にし、適用のいかなる所定のユニットにおいても、均一に目詰まりなく、測定チャンバーにそれらを捕捉する。また、細胞の充填を促進するために、前側の適用圧力（注射力）のみに依存するのではなく、血小板懸濁液をチャンバーへ「引き」、そして充填均一性を最大限にするために、後側の毛管力にも影響力を行使し得る。従って、単純な溝をつけたドレーンまたはフィルターとして単に存在するのではなく、下部プレートのろ過チャンネルは、目詰まりを防止し、そして細胞密度の均一性を増加させることにおいて、積極的な役割を果たし得る。

30

【0071】

実施例4

技術の適用可能性を証明する研究

まず、懸濁液中の血小板の維持について評価した。活性化および結合無しに血小板を維持するために必要な抗凝固の程度を評価し、そしてアピラーゼおよびプロスタグランジン（PGE1）のような、血小板阻害因子の重複した適用をやめた。これはさらにこのアッセイの複雑性およびコストの両方を抑制する。2番目に、非チトクロムc酸化酵素によるDAB反応性を評価した。ほとんどのDAB標識適用において、ペルオキシダーゼ活性がバックグラウンドDAB反応性の最も大きな原因であるが、本発明者らが、他の反応メカニズムを明らかにするために、チトクロムc酸化酵素のシアン化カリウム阻害を利用して試験したことは、その活性は比較的低い（および血小板洗浄を増加させることによって低下する）ことを示した。

40

【0072】

実施例5

チトクロムC酸化酵素活性の測定 - 未処理サンプルの染色

10mLの全血を、テスト被験体から、抗凝固剤を含む遠心チューブまたはチューブへ採取する。血液を300RCFで15分間遠心し、次いでPRP（多血小板血漿）層を15mLチューブ（複数可）へ吸引する。

【0073】

【表 1】

ACD抗凝固剤の調製	
工程番号	作業
1	1. 32gのクエン酸ナトリウムを、85mlの蒸留水に溶解する。
2	0. 48gのクエン酸を、工程1からの溶液に溶解する。
3	1. 47gのデキストロースを、工程2からの溶液に溶解する。
4	蒸留水を加えて100mlにする。
5	0. 2 μ mのフィルターを通してろ過滅菌する。

10

そのPRPを、最初に300 μ LのACDを加え、次いでPRPのpHをチェックしながらACDを1滴ずつ加えることによって、pH6.5に酸性化する。次に、上記PRPをリン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)で5mLに希釈する。上記PRPを次いで600RCFで、室温で10分間遠心する。次いでその上清を新しい15mLチューブに移し、そしてペレットを廃棄する。

20

【0074】

上記上清を2000RCFで10分間遠心して血小板をペレット化し、それを次いで8mLの採血物あたり、300 μ Lの以下のように調製した改変タイロッドバッファーに再懸濁する：

【0075】

【表 2】

改変タイロッドバッファの調製	
工程番号	作業
1	0.8gのNaClを、85mlの蒸留水に溶解する。
2	0.02gのKClを、工程1からの溶液に溶解する。
3	0.02gのCaCl ₂ を、工程2からの溶液に溶解する。
4	0.01gのMgCl ₂ ・6H ₂ Oを、工程3からの溶液に溶解する。
5	0.005gのNaH ₂ PO ₄ を、工程4からの溶液に溶解する。
6	0.1gのNaHCO ₃ を、工程5からの溶液に溶解する。
7	0.1gのグルコースを、工程6からの溶液に溶解する。
8	蒸留水を加えて100mlにする。
9	0.2μmのフィルターを通してろ過滅菌する。

10

20

30

染色溶液（2倍）を、以下のように調製する：

【0076】

【表 3】

2倍染色溶液の調製	
工程番号	作業
1	8mLの20mM PBSを計量する。
2	0.0012gのチトクロムcを、工程1からの液体に溶解する。
3	40 μ Lのジメチルスルホキシド(DMSO)を、工程2からの溶液に加える;よく混合する。この溶液をコントロール反応のために使用する。
4	4mLの工程3からの溶液に、0.004gのジアミノベンジジン(DAB)を加える;よく混合する。

10

20

反応染色溶液を次いで37 に加熱する。

【0077】

タイロード液中の血小板を、等容量の2倍反応染色溶液を含むチューブに加える。上記チューブを閉め、そして37の水浴で1時間インキュベートする。次いでチューブを1600RCFで、室温で10分間遠心する。

【0078】

できたペレットを再懸濁し、そして次いで定量のために微量流体デバイスまたは遠心デバイスのいずれかに移し得る。

【0079】

実施例6

チトクロムC酸化酵素活性の測定 - 微量流体デバイスへの移動

上記の実施例5で概略を述べたようなプロトコールに従った後、できたペレットを再懸濁し、そして本明細書中で記載された微量流体デバイスへ移す。染色血小板の適用は、例えばシリンジによる手動の注入、または注入ポンプまたは他のデバイスによるような自動化様式により得る。その染色血小板懸濁液は、適用(例えばシリンジまたはポンプ)の圧力下で、内部チャンネル(複数可)を通して、微量ろ過チャンネルの上にある測定チャンパーまで流れる。上記微量ろ過チャンネルを、血小板を測定チャンパーに維持しながら、血小板キャリア溶液(すなわちバッファー)の通過を最大限にするよう並べる。上記微量ろ過チャンネルを、毛管力によるキャリア溶液の通過を増強し、そしてそれによって測定チャンパー内の血小板充填密度を増強するようにデザインする。従って、上記キャリア溶液の排出および同時に起こる血小板の充填を、2つの力:適用の力および排出チャンネルの毛管力によって達成する。従って、キャリア溶液が測定チャンパーから引かれるにつれて、血小板充填密度は、続く血小板内の染色密度の測定のコントロールのために適当な、最大の、そして従って一定の値に達する。

30

40

【0080】

次に、光学的測定チャンパーの光学密度を、確立した波長(例えば330nm)で測定し、そしてその結果を、表にした値に対して比較する、または含まれた標準参考物質と共同して測定する。この測定を、例えば、測定チャンパーをマルチウェルマイクロプレートの標準的な座標で並べて、マイクロフルイディクス装置、またはより高い経済性のために

50

複数の装置を、標準的なマイクロプレート（例えば96穴マイクロプレート）の寸法を有する製造されたプレートまたはフレームに収めることによって、達成し得る。従って、あらゆる標準的なマイクロプレートリーダーにおいて、使用者は、彼らが慣れた、特定のウェル座標および特定の波長を選択し、そして測定を実施し得る。別の実施態様は、測定チャンバーが、分光光度計の標準的なビームと並ぶように、垂直に、および標準的な分光光度計キュベットの寸法を有するフレームに収めたマイクロフルイデクス装置を組み込み得る。分光光度計またはマイクロプレート分光光度リーダーにおける測定を標的としたデザインにおいて、指定された波長における分光光度測定を、濃度測定の代理として使用する。代替の波長を指定し得、そして非モノクロメーター装備分光光度測定デバイスにおいて使用するために、またはそうでなければ指定された波長を使用できない場合に、様々な補正因子を組み込み得る、または組込み得ない。別の実施態様は、同様のマイクロフルイデクスデザインの特徴を組み込み得るが、光学的濃度計における直接的な測定を可能にする。記載された実施態様それぞれは、同等に有効であり、そしてそれぞれ使用者の利用可能なデバイスを標的としたキットとして提供され得る（例えば、「マイクロプレートリーダー用診断キット」、「分光光度計用診断キット」）。

10

20

30

40

50

【0081】

実施例7

チトクロムC酸化酵素活性の測定 - 遠心デバイスへの移動

上記の実施例5において概略を述べたようなプロトコールに従った後、再懸濁したペレットを、本明細書中で記載した微量遠心チューブ挿入物に移す。上記チューブ挿入物を、標準的な1.5mlの微量遠心チューブに入れる。染色した血小板懸濁液を挿入物に移し（例えばピペットによって）、そしてチューブにふたをする。上記チューブおよび挿入物を、決定したスピードで（例えば2000×g）決定した時間（例えば15分）遠心して、染色した血小板の測定チャンバー、または「光学ポケット」への沈降を誘導する。従って、一定の遠心力の下で、測定チャンバー内の染色血小板充填密度は、続く血小板内の染色濃度の測定のコントロールに適切な、最大、および従って一定の値に達する。

【0082】

次に、光学的測定チャンバーの光学密度を、確立した波長（例えば330nm）で測定し、そして結果を表にした値と比較する、または含まれている標準参考物質と共同で測定する。この測定を、例えば、チューブ挿入物のフレームへの挿入を提供するために、測定チャンバーをマルチウェルマイクロプレートの標準的な座標で並べて、標準的なマイクロプレート（例えば96穴マイクロプレート）の寸法を有する製造されたプレートまたはフレームを提供することによって達成し得る。従って、あらゆる標準的なマイクロプレートリーダーにおいて、使用者は、彼らが慣れたような特定のウェル座標および特定の波長を選択し、そして測定を行い得る。別の実施態様は、その測定チャンバーが挿入の際に分光光度計の標準的なビームと並ぶように、標準的な分光光度計キュベット（本明細書中の図4で示すような）の寸法を有するフレームを組み込み得る。分光光度計またはマイクロプレート分光光度リーダーにおける測定を標的としたデザインにおいて、指定の波長における分光光度測定を、濃度測定の代理として使用する。代替の波長を指定し得、そして非モノクロメーター装備分光光度測定デバイスにおいて使用するために、またはそうでなければ指定された波長を使用できない場合に、様々な補正因子を組み込み得る、または組込み得ない。別の実施態様は、同様のマイクロフルイデクスデザインの特徴を組み込み得るが、光学的濃度計における直接的な測定を可能にする。記載された実施態様それぞれは、同等に有効であり、そしてそれぞれ使用者の利用可能なデバイスを標的としたキットとして提供され得る（例えば、「マイクロプレートリーダー用診断キット」、「分光光度計用診断キット」）。

【0083】

実施例8

アッセイの最適化

本明細書中で記載されたアッセイの最適化は、1) シグナル対ノイズ比を増加させるこ

と（バックグラウンドを低下させる、測定の感度を増加させる）、2）コストを低下させること（重複または不必要な化学物質の追加を排除する）、および3）時間を減少させること（反応速度を速くする）を含み得る。

【0084】

a．染色基質および時間の最適化へ向けた反応の直線性。酵素の局在化のためのDAB染色および酵素活性の定量のためのDAB染色の適用の間の1つの決定的な差は、染色を進める強度である。日常的な組織の組織化学評価のような、あらゆる信頼性の高い定量に関して、DAB染色の程度を非飽和レベルに維持する。対照的に、多くの研究者は、免疫学的技術と類似の、単に酵素の存在を示すためのDAB染色を最大限にする。本明細書中で記載されたようなDABの使用は、単に定性的ではなく、連続的および定量的なマーカーとして使用することを可能にする；得られた濃度測定結果を、酵素ターンオーバー（すなわち、例えば酵素的に還元されたチトクロムcのモル）に、直線的に変換し得る。この前提に基づいて、そのアッセイを、染色パラメーターに対するあらゆる重要な改変の後に、時間に伴う反応の直線性に関して試験し得る。飽和せずにシグナルを最大限にすることを求め得る；時間につれて光学密度の傾きが「プラトーになる」または減少することは、飽和を示し、そして染色時間を縮小する。強化のための塩化コバルトまたは他の金属も、DAB増感剤として試験し、そしてもしそれがシグナルおよび時間に伴う光学密度の直線性を維持/増加させながら染色時間を短縮するなら、プロトコールに組み込み得る。

10

【0085】

b．細胞透過処理。DABによる組織化学的染色を、DMSOの使用によって強化し、膜の完全性を維持しながら細胞透過性の増加を可能にする。DMSOが必要かどうか、および染色の間にDMSOを増加させることが、より短いインキュベーション時間を可能にするかどうかを評価し得る。そのような変化のあと、上記のように反応の直線性も評価し得る。

20

【0086】

c．酵素特異性。これを、シアン化カリウム（KCN）による特異的チトクロムc酸化酵素阻害によって試験し得る。比較アッセイにおいてKCNをDABと同時に加え、そしてあらゆる残存DAB反応性を、バックグラウンド、非特異的活性とみなす。

【0087】

実施例9

30

デザインの選択肢および改変

a．細胞数または含有量に関する内部コントロールアッセイ。もし均一な細胞充填密度を信頼性高く達成できないなら、ミトコンドリア含有量または同様の変数の測定のために、デバイスの様々な実施態様と組み合わせ、同時に適用される2次的なアッセイも使用し得る。その選択は多数ある。コハク酸デヒドロゲナーゼ/チトクロムc酸化酵素染色の組み合わせは、多くの場合筋線維におけるミトコンドリア疾患の決定において使用されるので、コハク酸デヒドロゲナーゼの組織化学的染色は当然の選択である。コハク酸デヒドロゲナーゼを、典型的には、青色の染色を生じるニトロブルーテトラゾリウムで染色し、それはチトクロムc酸化酵素から産生される褐色のジアミノベンジジン反応と、分光光度測定で区別し得る。しかし、他の選択は、調製物の全体的な光学密度に干渉しない、蛍光または発光のような別の様式である。例えば、Mitotracker Green FM (Invitrogen)を、この適用において信頼性高く採用し得る。それを懸濁液中の細胞に迅速に適用し得、ここでそれは血小板を一般的に染色し（おそらく密集した血小板内部膜システムのために）、そして従って潜在的に細胞密度の尺度を提供し得ることが見出された。他の細胞型において、ミトコンドリアにおいてのみ蛍光を発する可能性が高く、そして従って妥当なミトコンドリア濃度の尺度を提供する。これらは考慮したほんの2つの例であるが、もし細胞密度がコントロールとして不十分であるなら、いかなる大きな遅延もなく、適当なコースにおいて別のコントロールを代わりに用いることができることを予期し得る。

40

【0088】

50

b. 染色強度に関する内部コントロールアッセイ。もし単一の染色様式（例えばD A B）を信頼できるとしても、依然として、ほとんどの状況において操作者の誤りによる染色結果の可変性を考慮しなければならない。不正確なインキュベーション温度は、おそらく最もよくある誤りであり、それはアッセイの絶対的な失敗、そして従って不正確な結果の迅速な検出を必ずしも引き起こさない。可能性のある光学密度の値の範囲の極値は、誤りとして容易に除外し得るが（すなわち、非常に薄い染色 = 低温；非常に濃い染色 = 高温）、より軽度の誤りは、偽陰性または偽陽性を生じ得る。従って、修正を可能にするために、アッセイの真の温度感受性を評価し得る（それに対してインキュベーターノ水浴温度の記録を適用し得る）。さらに、適当な条件の指標として、またはアッセイ結果の内部補正因子として、患者サンプルと並行して染色し得る、温度感受性の人工反応物（例えば、透過性マトリックスに含まれたペルオキシダーゼ）を含み得る。しかしこれは、アッセイの複雑性およびコストを増加させる。

10

【0089】

実施例10

96穴プレートを用いたチトクロムC酸化酵素活性の組織化学的測定

10 mLの全血を、テスト被験体から遠心チューブへ採取する。上記血液を300 RCFで15分間遠心し、次いでPRP（多血小板血漿）層を15 mLチューブ（複数可）へ吸引する。

【0090】

【表4】

20

ACD抗凝固剤の調製	
工程番号	作業
1	1. 32gのクエン酸ナトリウムを、85mlの蒸留水に溶解する。
2	0. 48gのクエン酸を、工程1からの溶液に溶解する。
3	1. 47gのデキストロースを、工程2からの溶液に溶解する。
4	蒸留水を加えて100mlにする。
5	0. 2 μmのフィルターを通してろ過滅菌する。

30

最初に300 μLのACDを加え、次いでPRPのpHをチェックしながらACDを1滴ずつ加えることによって、PRPをpH 6.5に酸性化する。次に、上記PRPをリン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）で5 mLに希釈する。次いでPRPを500 RCFで、室温で10分間遠心する。次いでその上清を新しい15 mLチューブに移し、そしてペレットを廃棄する。

40

【0091】

上記上清を2000 RCFで10分間遠心して血小板をペレット化し、それを次いで、8 mLの採血物あたり300 μLの以下のように調製した改変タイロッドバッファーに再懸濁する：

【0092】

【表 5】

タイロッドバッファの調製	
工程番号	作業
1	0.8gの塩化ナトリウムを、85mlの蒸留水に溶解する。
2	0.02gの塩化カリウムを、工程1からの溶液に溶解する。
3	0.02gの塩化カルシウムを、工程2からの溶液に溶解する。
4	0.01gの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ を、工程3からの溶液に溶解する。
5	0.005gの NaH_2PO_4 を、工程4からの溶液に溶解する。
6	0.1gの $NaHCO_3$ を、工程5からの溶液に溶解する。
7	0.1gのグルコースを、工程6からの溶液に溶解する。
8	蒸留水を加えて100mlにする。
9	0.2 μ mのフィルターを通してろ過滅菌する。

10

20

30

染色溶液（2倍）を、以下のように調製する：

【0093】

【表 6】

2倍染色溶液の調製	
工程番号	作業
1	8mLの20mM PBSを計量する。
2	0.0012gのチトクロムcを、工程1からの液体に溶解する。
3	40 μ Lのジメチルスルホキシド(DMSO)を、工程2からの溶液に加える;よく混合する。この溶液をコントロール反応のために使用する。
4	4mLの工程3からの溶液に、0.004gのジアミノベンジジン(DAB)を加える;よく混合する。

10

20

次いで反応染色溶液を37 に加熱する。タイロード液中の血小板を、等容量の2倍反応染色溶液を含むチューブに加える。チューブを閉め、そして37 の水浴で1時間インキュベートする。次いで上記チューブを1600RCFで、室温で10分間遠心する。

【0094】

できたペレットを再懸濁し、そして40 μ lを96穴プレートの丸底マイクロプレートのウェルに移す。上記マイクロプレートを冷蔵し、そして個々のウェルを一晩沈殿させる。

【0095】

次に、決定した波長(例えば330nm)でODを測定し、そしてその結果を表にした値と比較する。

30

【0096】

実施例11

マイクロフィルターデバイスを用いたチトクロムC酸化酵素活性の組織化学的測定

8.5mLの全血を、テスト被験体から遠心チューブへ採取する。上記チューブを300RCFで15分間遠心し、次いでPRP(多血小板血漿)層を15mLチューブへ吸引する。

【0097】

【表 7】

ACD抗凝固剤の調製	
工程番号	作業
1	1. 32gのクエン酸ナトリウムを、85mlの蒸留水に溶解する。
2	0. 48gのクエン酸を、工程1からの溶液に溶解する。
3	1. 47gのデキストロースを、工程2からの溶液に溶解する。
4	蒸留水を加えて100mlにする。
5	0. 2 μ mのフィルターを通してろ過滅菌する。

10

最初に 300 μ L の ACD を加え、次いで PRP の pH をチェックしながら ACD を 1 滴ずつ加えることによって、PRP を pH 6.5 に酸性化する。次に、上記 PRP をリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) で 5 mL に希釈する。次いで上記 PRP を 600 RCF で、室温で 10 分間遠心する。次いで上記上清を新しい 15 mL チューブに移し、そしてペレットを廃棄する。

20

【0098】

上記上清を 2000 RCF で 10 分間遠心して血小板をペレット化し、それを次いで、8 mL の採血物あたり 300 μ L の以下のように調製した改変タイロッドバッファーに再懸濁する：

【0099】

【表 8】

改変タイロッドバッファの調製	
工程番号	作業
1	0.8gのNaClを、85mlの蒸留水に溶解する。
2	0.02gのKClを、工程1からの溶液に溶解する。
3	0.02gのCaCl ₂ を、工程2からの溶液に溶解する。
4	0.01gのMgCl ₂ ・6H ₂ Oを、工程3からの溶液に溶解する。
5	0.005gのNaH ₂ PO ₄ を、工程4からの溶液に溶解する。
6	0.1gのNaHCO ₃ を、工程5からの溶液に溶解する。
7	0.1gのグルコースを、工程6からの溶液に溶解する。
8	蒸留水を加えて100mlにする。
9	0.2μmのフィルターを通してろ過滅菌する。

10

20

30

染色溶液（2倍）を、以下のように調製する：

【0100】

【表 9】

2倍染色溶液の調製	
工程番号	作業
1	8mLの20mM PBSを計量する。
2	0.0012gのチトクロムcを、工程1からの液体に溶解する。
3	40 μ Lのジメチルスルホキシド(DMSO)を、工程2からの溶液に加える;よく混合する。この溶液をコントロール反応のために使用する。
4	4mLの工程3からの溶液に、0.004gのジアミノベンジジン(DAB)を加える;よく混合する。

10

20

次いで反応染色溶液を37 に加熱する。

【0101】

タイロード液中の血小板を、等容量の2倍反応染色溶液を含むチューブに加える。チューブを閉め、そして37 の水浴で1時間インキュベートする。次いで上記チューブを1600RCFで、室温で10分間遠心する。

【0102】

できたペレットを再懸濁し、そして40 μ lを前に記載したような微量ろ過デバイスに移す。上記40 μ lを、デバイスの充填口に加える。

【0103】

次に、決定した波長(例えば330nm)でODを測定し、そしてその結果を表にした値と比較する。

30

【0104】

本発明の様々な実施態様を上記の詳細な説明で説明する。これらの説明は上記の実施態様を直接的に説明するが、当業者は本明細書中で示されたおよび説明された特定の実施態様に対して改変および/または変形を考え得る。本説明の範囲内に入るあらゆるそのような改変または変形は、同様にそこに含まれることが意図される。明確に述べなければ、本明細書および特許請求の範囲における用語および語句は、適用される分野(複数可)における当業者にとって通常のおよび慣習的な意味を与えられることが、本発明者の意図である。

40

【0105】

本出願を出願するこの時点で本出願者に公知である、本発明の様々な実施態様の前記の説明が提示され、そして例証および説明の目的のために意図される。本説明は、網羅的であることも、本発明を開示された正確な形態に制限することも意図せず、そして上記の教示を考慮して多くの改変および変形が可能である。記載された実施態様は、本発明の原理およびその実用的な適用を説明するために、および他の当業者が、様々な実施態様で、および企図される特定の使用のために適当な様々な改変をして本発明を利用することを可能にするために役立つ。従って、本発明が、本発明を実施するために開示された特定の実施態様に制限されないことが意図される。

【0106】

50

本発明の特定の実施態様が示され、そして説明されたが、本明細書中の教示に基づいて、本発明およびそのより広い局面から逸脱することなく変化および改変を行い得ること、そして従って、添付の特許請求の範囲が、本発明の真の精神および範囲内であるように、その範囲内にそのような変化および改変を全て含むことが、当業者に明らかである。さらに、本発明は、添付の特許請求の範囲によって単独で定義されることが理解される。一般的に、本明細書中で、および特に添付の特許請求の範囲（例えば添付の特許請求の範囲の本文）において使用される用語は、一般的に「オープンな」用語として意図される（例えば、「含む（including）」という用語は、「含むがそれに限らない」と解釈されるべきである、「有する」という用語は、「少なくとも～を有する」と解釈されるべきである、「含む（includes）」という用語は、「含むがそれに限らない」と解釈されるべきである等）。もし紹介されたクレームの詳述の特定の数が意図されるなら、そのような意図はそのクレームにおいて明確に詳述される、およびそのような詳述がない場合には、そのような意図は存在しないことが、当業者によってさらに理解される。例えば、理解の補助として、以下の添付の特許請求の範囲は、クレームの詳述を紹介するために、前置きの語句「少なくとも1つの」および「1つ以上の」の使用を含み得る。しかし、そのような語句の使用は、同じクレームが前置きの語句「1つ以上の」または「少なくとも1つの」および「a」または「an」のような不定冠詞を含む場合でも、不定冠詞「a」または「an」によるクレームの詳述の紹介が、そのような紹介されたクレームの詳述を含むあらゆる特定のクレームを、ただ1つのそのような詳述を含む発明に制限することを意味すると解釈されるべきではない（例えば、「a」および/または「an」は、典型的には「少なくとも1つの」または「1つ以上の」を意味すると解釈されるべきである）；クレームの詳述を紹介するために使用される定冠詞の使用に関しても同じことがあてはまる。それに加えて、紹介されたクレームの特定の数に詳述が明確に詳述されるとしても、当業者は、そのような詳述は典型的には少なくとも詳述された数を意味すると解釈されるべきであることを認識する（例えば、他の修飾語句のない「2つの詳述」のそれだけの詳述は、典型的には少なくとも2つの詳述、または2つ以上の詳述を意味する）。

10

20

【0107】

よって、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外には制限されない。

【0108】

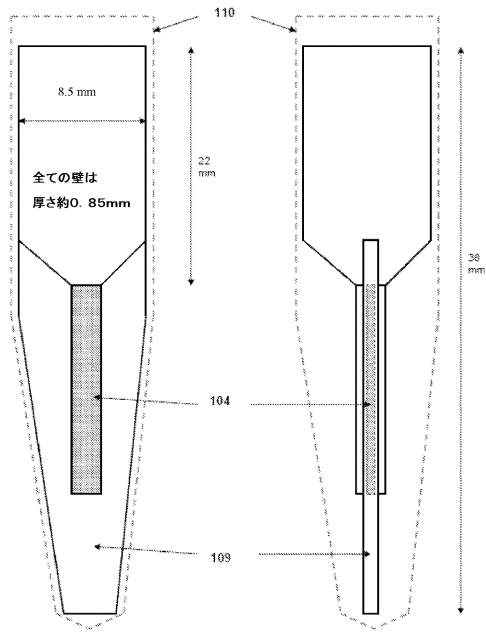
【表 1 0】

参考文献

- 1 P. Connolly, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, 10, 1–6.
- 2 D. Figeys and D. Pinto, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 330A–335A.
- 3 L. J. Kricka, *Clin. Chim. Acta*, 2001, 307, 219–223.
- 4 J. Tudos, G. A. J. Besselink and R. B. M. Schasfoort, *Lab Chip*, 2001, 1, 83–95.
- 5 T. H. Schulte, R. L. Bardell and B. H. Weigl, *Clin. Chim. Acta*, 2002, 321, 1–10. 10
- 6 D. Erickson and D. Li, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 507, 11–26.
- 7 P. H. Sonksen, S. L. Judd and C. Lowy, *Lancet*, 1978, April 8, 729.
- 8 S. Walford, E. A. M. Gale, S. P. Allison and R. B. Tattersall, *Lancet*, 1978, April 8, 732–735.
- 9 D. D. Cunningham, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 429, 1–18.
- 10 J. Lichtenberg, N. F. de Rooij and E. Verpoorte, *Talanta*, 2002, 56, 233–266.
- 11 J. P. Brody, T. D. Osborn, F. K. Forster and P. Yager, *Sens. Actuators A*, 1996, 54, 704–708. 20
- 12 P. Wilding, L. J. Kricka, J. Cheng, G. Hvichia, M. A. Shoffner and P. Fortina, *Anal. Biochem.*, 1998, 257, 95–100.
- 13 D. C. Duffy, H. L. Gillis, J. Lin, N. F. Sheppard and G. J. Kellogg, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 4669–4678.
- 14 T. Crowley and V. Pizziconi, *Lab Chip*, 2005, 5, 922–929.

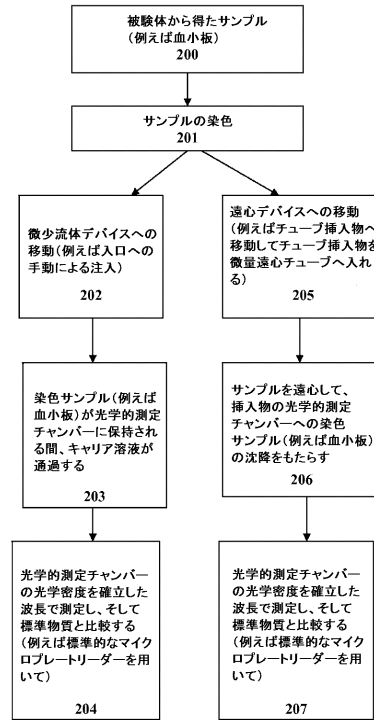
【 図 3 】

Figure 3.



【 図 5 】

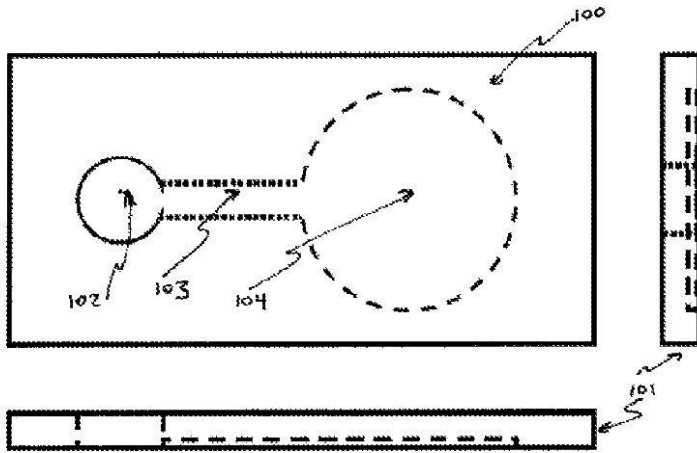
Figure 5.



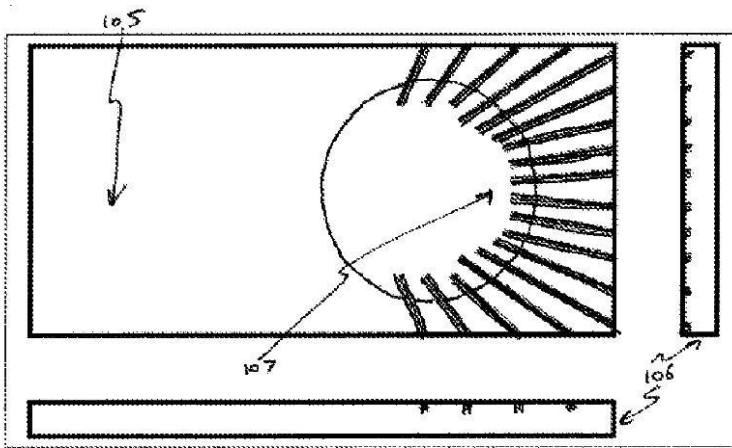
【 図 1 】

Figure 1.

A.



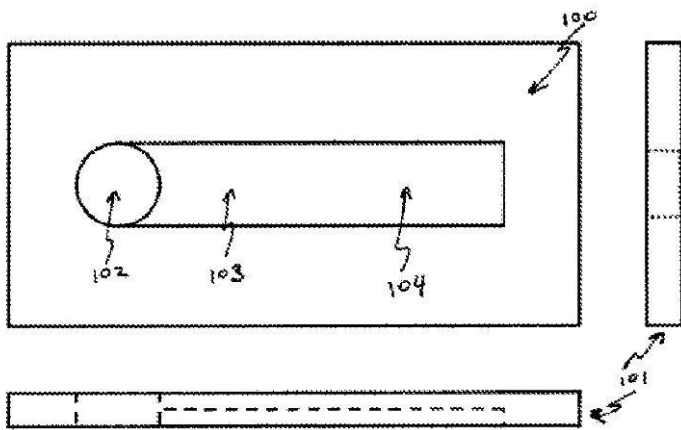
B.



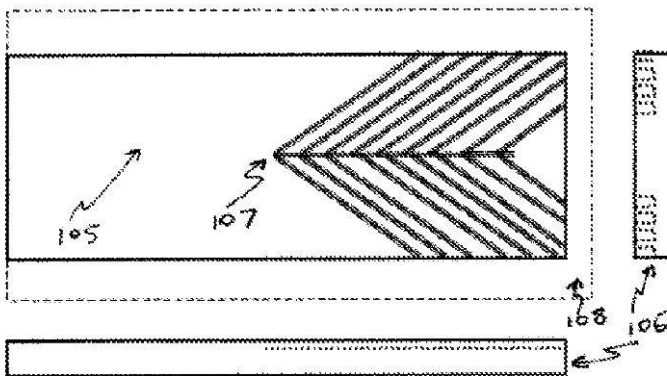
【 図 2 】

Figure 2.

A.

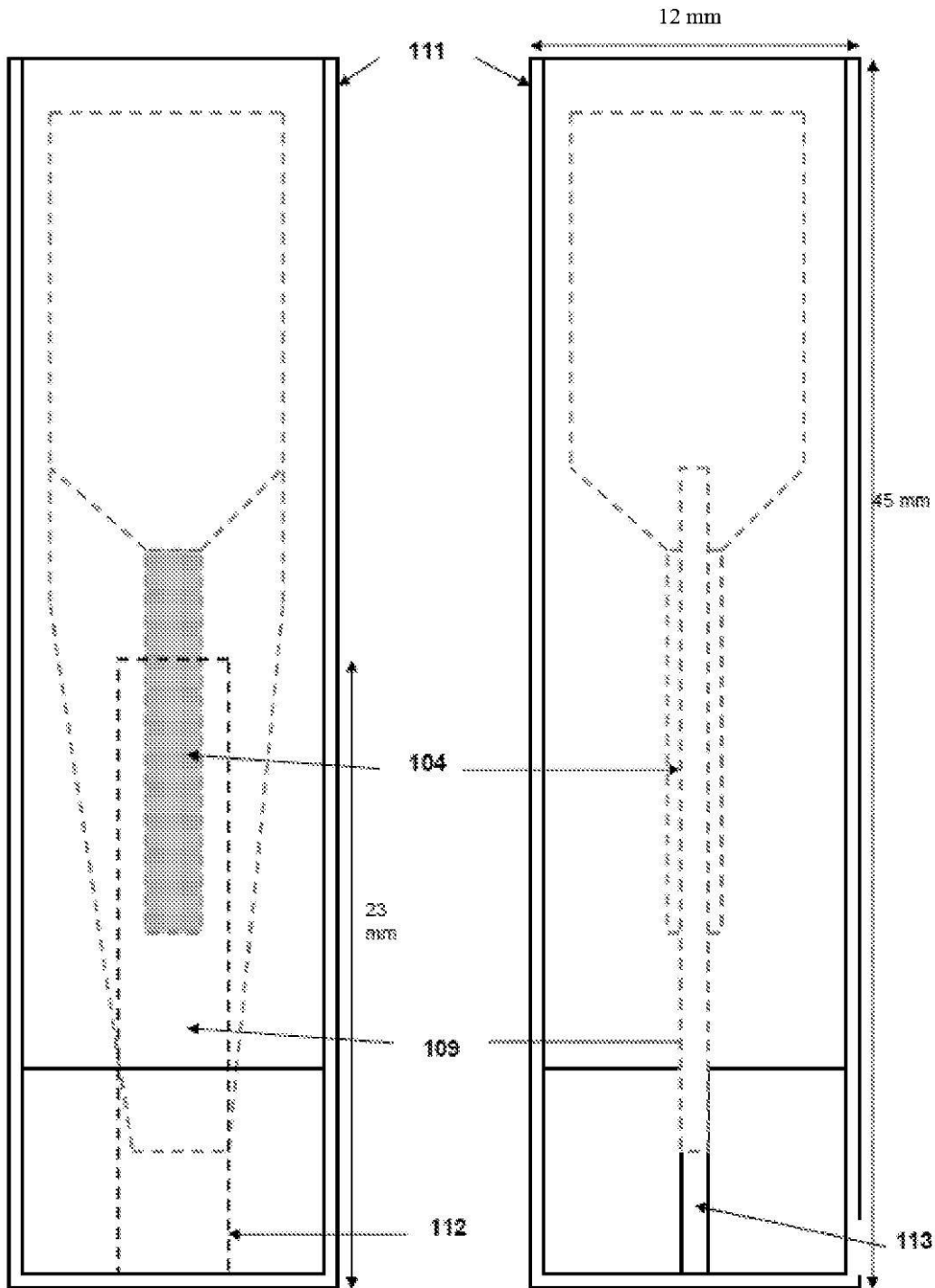


B.



【 図 4 】

Figure 4.



フロントページの続き

(72)発明者 ジョン イー . パラ

アメリカ合衆国 アリゾナ 85004, フェニックス, イースト ポートランド ストリート 615, ナンバー132

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB10 DA36 FA11 HA14

2G058 BA06 CC05 GA01

4B063 QA01 QA05 QA08 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ79 QR02 QS02

QX01

【外国語明細書】

2014066729000001.pdf