

(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2021-500012

(P2021-500012A)

(43) 公表日 令和3年1月7日 (2021. 1. 7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/6837 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/6837 Z	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2020-518547 (P2020-518547) (86) (22) 出願日 平成30年10月17日 (2018. 10. 17) (85) 翻訳文提出日 令和2年5月22日 (2020. 5. 22) (86) 国際出願番号 PCT/US2018/056221 (87) 国際公開番号 W02019/079399 (87) 国際公開日 平成31年4月25日 (2019. 4. 25) (31) 優先権主張番号 62/574, 865 (32) 優先日 平成29年10月20日 (2017. 10. 20) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(71) 出願人 507189666 デューク ユニバーシティ アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7705, ダラム, アーウィン ロード 2812 スイート 306 (74) 代理人 100107364 弁理士 斉藤 達也 (72) 発明者 イエレン, ベンジャミン アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7705, ダラム, アーウィン ロード 2812 スイート 306 デューク ユニバーシティ内
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高スループット単一細胞分析のためのデバイス、システム、及び方法

(57) 【要約】

本開示は、細胞をアレイへと編成し、短又は長期間に渡る画像に基づく分析に依って其れ等を表現型解析し、及び各細胞の傍に存在するDNAバーコードに依る超並列のバーコード化されたゲノム分析を実施する為のデバイス、システム、及び方法を含む。

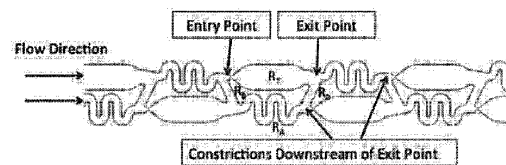


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロ流体デバイスであって、

a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

i) 各トラップ堰は、物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい少なくとも 1 つの寸法の狭窄部を含み、

i i) トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の流体抵抗の比が少なくとも 0.4 である、

マイクロ流体デバイス。

【請求項 2】

流体抵抗の比が少なくとも 0.75 である、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 3】

流体抵抗の比が少なくとも 1.0 である、請求項 1 又は 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 4】

流体抵抗の比が少なくとも 1.25 である、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 5】

マイクロ流体デバイスであって、

a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

i) 各トラップ堰は入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、流体抵抗 R_T を有するトラップ堰を通る内側流体流路を構成し、

i i) トラップ堰の大多数の各トラップ堰は、流体抵抗 R_A を有する 1 つの長いバイパス流体流れチャンネルと、且つ夫々 R_A よりも小さい流体抵抗を有する 1 又は 2 つの短いバイパス流体流れチャンネルと流体連通し、各バイパス流体流れチャンネルはトラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続し；

i i i) 比 R_A / R_T が少なくとも 1.0 である、

マイクロ流体デバイス。

【請求項 6】

マイクロ流体デバイスであって、

a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、

i) 各トラップ堰は入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、流体抵抗 R_T を有するトラップ堰を通る内側流体流路を構成し、

i i) トラップ堰の大多数の各トラップ堰は、流体抵抗 R_A を有する 1 つの長いバイパス流体流れチャンネルと、且つ夫々 R_A よりも小さい流体抵抗を有する 1 又は 2 つの短いバイパス流体流れチャンネルと流体連通し、各バイパス流体流れチャンネルは、トラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続し、

i i i) 流体は、トラップ堰が未占有である場合には第 1 の方向に、トラップ堰が物体に依って占有される場合には第 2 の方向に、隣り合う短いバイパスチャンネルを流れる、

マイクロ流体デバイス。

【請求項 7】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.1 である、請求項 5 又は 6 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 8】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.2 である、請求項 5～7 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 9】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.3 である、請求項 5～8 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 10】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.4 である、請求項 5～9 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 11】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.45 である、請求項 5～10 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

10

【請求項 12】

各トラップ堰が、物体の最も小さい寸法の約 2 分の 1 よりも小さい空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、請求項 5～11 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 13】

各トラップ堰が、懸濁物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、請求項 5～12 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 14】

各トラップ堰が、約 1.5 μm から約 6 μm の範囲である空間寸法を有する少なくとも 1 つの狭窄部を含む、請求項 5～13 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

20

【請求項 15】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.2 であり、個々のトラップ堰が第 1 の接触時に懸濁物体を保持する捕捉確率が少なくとも 0.36 である、請求項 5～14 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 16】

比 R_A / R_T が少なくとも 1.45 であり、個々のトラップ堰が第 1 の接触時に懸濁物体を保持する捕捉確率が少なくとも 0.60 である、請求項 5～15 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

30

【請求項 17】

各トラップ堰が出口領域にフリット構造を含み、フリット構造は、懸濁物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する 1 つ以上の狭窄部を含む、請求項 5～16 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 18】

複数のトラップ堰が少なくとも 100 個のトラップ堰を含む、請求項 1～17 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 19】

複数のトラップ堰が少なくとも 1,000 個のトラップ堰を含む、請求項 1～18 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

40

【請求項 20】

複数のトラップ堰が少なくとも 10,000 個のトラップ堰を含む、請求項 1～19 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 21】

複数のトラップ堰が少なくとも 100,000 個のトラップ堰を含む、請求項 1～20 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 22】

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも 20% である、請求項 1～21 の何れか 1 項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 23】

50

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも50%である、請求項1～21の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項24】

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも80%である、請求項1～23の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項25】

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも90%である、請求項1～24の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項26】

懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率が少なくとも95%である、請求項1～25の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

10

【請求項27】

更にb) 取り外し可能な蓋を含む、請求項1～26の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項28】

1つ以上のトラップ堰の内側領域が、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る固有の分子識別子を含む、請求項1～27の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項29】

方法が、

20

a) 請求項1～27の何れか1項に記載のマイクロ流体デバイスを提供する事と、

b) 物体を含む流体をマイクロ流体デバイスに流して、物体を複数のトラップ堰の1つ以上にトラップする事と、

を含む、流体中の懸濁物体をトラップする為の方法。

【請求項30】

各トラップ堰が出口領域にフリット構造を含み、フリット構造が、物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

(b)の流す事が第1の流体力学的圧力で行われ、其れに依って、1つ以上のトラップ堰の入口領域の狭窄部に物体をトラップする、請求項29又は30に記載の方法。

30

【請求項32】

物体が変形可能な物体を含み、方法が、1つ以上のトラップ堰の入口領域（単数又は複数）の狭窄部にトラップされた物体（単数又は複数）に第1の流体力学的圧力よりも高い第2の流体力学的圧力を掛ける事を更に含み、其れに依って、変形可能な物体（単数又は複数）を1つ以上のトラップ堰の入口領域（単数又は複数）の狭窄部から内側領域に押し込む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

第1の流体力学的圧力が約1から約100mbarの範囲である、請求項31又は32に記載の方法。

【請求項34】

40

第2の流体力学的圧力が約100mbarから約1,000mbarの範囲である、請求項32又は33に記載の方法。

【請求項35】

第1の流体力学的圧力に対する第2の流体力学的圧力の比が約10×から約20×の範囲である、請求項32～34の何れか1項に記載の方法。

【請求項36】

物体が細胞又はビーズである、請求項29～35の何れか1項に記載の方法。

【請求項37】

(b)の流す事が少なくとも1回反復され、其れに依って、少なくとも2つの物体が1つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められる事を許す、請求項32

50

～ 36 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

(b) の流す事が、第 1 の場合に用いられた物と同じ物体を含む流体を用いて少なくとも 1 回反復される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

(b) の流す事が、第 1 の場合に用いられた物とは異なる物体を含む流体を用いて少なくとも 1 回反復される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められた少なくとも 2 つの物体が、少なくとも 2 つの同じ細胞、少なくとも 2 つの異なる細胞、少なくとも 2 つの同じビーズ、少なくとも 2 つの異なるビーズ、又は少なくとも 1 つの細胞及び 1 つのビーズを含む、請求項 37～39 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 41】

非混和性の流体をマイクロ流体デバイスに流す事に依って複数のトラップ堰をシールする事を更に含む、請求項 29～40 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

非混和性の流体が油又は空気である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

物体が細胞であり、細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 日以上に渡って培養される、請求項 32～42 の何れか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 44】

細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 週以上の期間に渡って培養される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

細胞が 1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於いて 1 ヶ月以上の期間に渡って培養される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 46】

物体が細胞であり、方法が、1 つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）の細胞を表現型解析する為のイメージング技術の使用を更に含む、請求項 32～45 の何れか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 47】

イメージング技術が、明視野イメージング、蛍光イメージング、2 光子蛍光イメージング、又は其れ等の何れかの組み合わせから成る群から選択される、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

複数のトラップ堰の内側領域が夫々固有の分子識別子を含み、此れ等は、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る、請求項 32～47 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

分子コンポーネントが蛋白質、ペプチド、DNA 分子、RNA 分子、mRNA 分子、又は其れ等の何れかの組み合わせを含む、請求項 48 に記載の方法。

40

【請求項 50】

固有の分子識別子が、DNA シーケンシング、遺伝子発現分析、又はクロマチン分析を行う為に用いられる、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

外部から適用される電場が、固有の分子識別子に対する核酸分子コンポーネントのハイブリダイゼーションを容易化する為に用いられる、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

マイクロ流体デバイスが更に取り外し可能な蓋を含む、請求項 32～51 の何れか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 5 3】

変形可能な物体が細胞であり、1つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に於ける細胞（単数又は複数）のトラップ後に、生体適合性のハイドロゲルがマイクロ流体デバイス内に灌流され、重合する事を許される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ハイドロゲルの重合後に、マイクロ流体デバイスの蓋が取り外されて、トラップされた細胞へのアクセスを許す、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

生体適合性のハイドロゲルが、細胞のリシス時にトラップされた細胞のゲノム材料を閉じ込める為に用いられる、請求項 5 3 ～ 5 4 の何れか 1 項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

此の発明は、高スループット単一細胞分析の為のデバイス、システム、及び方法に関する。

【0002】

相互参照

本願は 2017 年 10 月 20 日出願の米国仮出願第 62 / 574, 865 号の利益を主張し、此の出願は参照に依って本願に組み込まれる。

【0003】

20

連邦政府資金に依る研究の記載

本発明は、国立衛生研究所から授与された連邦助成金第 R2GM111584 号及び第 R01GM123542 号に依る米国政府の支援に依って為された。連邦政府は本発明に或る種の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

単一細胞分析技術は種々の基礎研究及び臨床適用に於ける革新的な進歩を可能化し得る。例えば、従来の細胞培養技術が数週又は数ヶ月の実験作業を要求するケースに於いて、単一細胞分析は稀な薬剤耐性細胞の迅速な同定を可能化するポテンシャルを有する。然し乍ら、何れの既存の単一細胞分析プラットフォームも、大きいデータセットが効率的に分析される事を許す長期的な細胞培養、高スループット顕微鏡法、自動画像処理、生化学的アッセイ、及びゲノム分析技術と適合性である細胞トラップアーキテクチャに依る高い捕捉効率を提供しない。其れ故に、爾後の表現型的、生化学的、生理学的、遺伝学的、ゲノム的、及び／又はプロテオーム的分析の為に単一細胞をトラップ及び区画化する改善された方法の必要がある。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本願に於いてはマイクロ流体デバイスが開示され、a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 各トラップ堰は、物体の最も小さい寸法の約 3 分の 1 よりも小さい少なくとも 1 つの寸法の狭窄部を含み、ii) トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の流体抵抗の比は少なくとも 0.4 である。

40

【0006】

幾つかの実施形態では、流体抵抗の比は少なくとも 0.5 である。幾つかの実施形態では、流体抵抗の比は少なくとも 0.75 である。幾つかの実施形態では、流体抵抗の比は少なくとも 1.0 である。幾つかの実施形態では、流体抵抗の比は少なくとも 1.25 である。

【0007】

50

又、本願に於いてはマイクロ流体デバイスが開示され、a) 少なくとも1つの流体注入口及び少なくとも1つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 各トラップ堰は入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、流体抵抗 R_T を有するトラップ堰を通る内側流体流路を構成し、i i) トラップ堰の大多数の各トラップ堰は、流体抵抗 R_A を有する1つの長いバイパス流体流れチャンネルと、且つ夫々 R_A よりも小さい流体抵抗を有する1又は2つの短いバイパス流体流れチャンネルと流体連通し、各バイパス流体流れチャンネルは、トラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続し、i i i) 比 R_A / R_T は少なくとも1. 0である。

【0008】

加えて、マイクロ流体デバイスが本願に於いて開示され、a) 少なくとも1つの流体注入口及び少なくとも1つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み、各トラップ堰はマイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 各トラップ堰は、入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、流体抵抗 R_T を有するトラップ堰を通る内側流体流路を構成し、i i) トラップ堰の大多数の各トラップ堰は、流体抵抗 R_A を有する1つの長いバイパス流体流れチャンネルと、且つ夫々 R_A よりも小さい流体抵抗を有する1又は2つの短いバイパス流体流れチャンネルと流体連通し、各バイパス流体流れチャンネルは、トラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続し、i i i) 流体は、トラップ堰が未占有である場合には第1の方向に、トラップ堰が物体に依って占有される場合には第2の方向に、隣り合う短いバイパスチャンネルを流れる。

【0009】

幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 1である。幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 2である。幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 3である。幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 4である。幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 45である。幾つかの実施形態では、各トラップ堰は、物体の最も小さい寸法の約2分の1よりも小さい空間寸法を有する少なくとも1つの狭窄部を含む。幾つかの実施形態では、各トラップ堰は、懸濁物体の最も小さい寸法の約3分の1よりも小さい空間寸法を有する少なくとも1つの狭窄部を含む。幾つかの実施形態では、各トラップ堰は、約1. 5 μm から約6 μm の範囲である空間寸法を有する少なくとも1つの狭窄部を含む。幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 2であり、個々のトラップ堰が第1の接触時に懸濁物体を保持する捕捉確率は少なくとも0. 36である。幾つかの実施形態では、比 R_A / R_T は少なくとも1. 45であり、個々のトラップ堰が第1の接触時に懸濁物体を保持する捕捉確率は少なくとも0. 60である。幾つかの実施形態では、各トラップ堰は出口領域にフリット構造を含み、フリット構造は、懸濁物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む。幾つかの実施形態では、複数のトラップ堰は少なくとも100個のトラップ堰を含む。幾つかの実施形態では、複数のトラップ堰は少なくとも1, 000個のトラップ堰を含む。幾つかの実施形態では、複数のトラップ堰は少なくとも10, 000個のトラップ堰を含む。幾つかの実施形態では、懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率は少なくとも20%である。幾つかの実施形態では、複数のトラップ堰は少なくとも100, 000個のトラップ堰を含む。幾つかの実施形態では、懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率は少なくとも50%である。幾つかの実施形態では、懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率は少なくとも80%である。幾つかの実施形態では、懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率は少なくとも90%である。幾つかの実施形態では、懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率は少なくとも95%である。幾つかの実施形態では、懸濁物体をトラップする飽和前トラップ効率は少なくとも98%である。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは更にb) 取り外し可能な蓋を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上のトラップ堰の内側領域は固有の分子識別子（又はバーコード）を含み、此れ等は、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネント

10

20

30

40

50

に結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る。

【0010】

流体中の懸濁物体をトラップする為の方法が本願に於いて開示され、方法は、a) 本願に記載される何れかの実施形態のマイクロ流体デバイスを提供する事と、b) 物体を含む流体をマイクロ流体デバイスに流して、物体を複数のトラップ堰の1つ以上にトラップする事と、を含む。

【0011】

幾つかの実施形態では、各トラップ堰は出口領域にフリット構造を含み、フリット構造は、物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む。幾つかの実施形態では、(b)の流す事は第1の流体力学的圧力で行われ、其れに依って、1つ以上のトラップ堰の入口領域の狭窄部に物体をトラップする。幾つかの実施形態では、物体は変形可能な物体を含み、方法は、1つ以上のトラップ堰の入口領域(単数又は複数)の狭窄部にトラップされた物体(単数又は複数)に第1の流体力学的圧力よりも高い第2の流体力学的圧力を掛ける事を更に含み、其れに依って、変形可能な物体(単数又は複数)を入口領域(単数又は複数)の狭窄部から1つ以上のトラップ堰の内側領域に押し込む。幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力は約1から約100 mbarの範囲である。幾つかの実施形態では、第2の流体力学的圧力は約100 mbarから約1,000 mbarの範囲である。幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力に対する第2の流体力学的圧力の比は約10×から約20×の範囲である。幾つかの実施形態では、物体は細胞又はビーズである。幾つかの実施形態では、(b)の流す事は少なくとも1回反復され、其れに依って、少なくとも2つの物体が1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)に閉じ込められる事を許す。幾つかの実施形態では、(b)の流す事は、第1の場合に用いられた物と同じ物体を含む流体を用いて少なくとも1回反復される。幾つかの実施形態では、(b)の流す事は、第1の場合に用いられた物とは異なる物体を含む流体を用いて少なくとも1回反復される。幾つかの実施形態では、1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)に閉じ込められた少なくとも2つの物体は、少なくとも2つの同じ細胞、少なくとも2つの異なる細胞、少なくとも2つの同じビーズ、少なくとも2つの異なるビーズ、又は少なくとも1つの細胞及び1つのビーズを含む。幾つかの実施形態では、方法は、非混和性の流体をマイクロ流体デバイスに流す事に依って複数のトラップ堰をシールする事を更に含む。幾つかの実施形態では、非混和性の流体は油又は空気である。幾つかの実施形態では、物体は細胞であり、細胞は、1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)に於いて1日以上に渡って培養される。幾つかの実施形態では、細胞は、1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)に於いて1週以上の期間に渡って培養される。幾つかの実施形態では、細胞は、1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)に於いて1ヶ月以上の期間に渡って培養される。幾つかの実施形態では、物体は細胞であり、方法は、1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)内の細胞を表現型解析する為のイメージング技術の使用を更に含む。幾つかの実施形態では、イメージング技術は、明視野イメージング、蛍光イメージング、2光子蛍光イメージング、又は其れ等の何れかの組み合わせから成る群から選択される。幾つかの実施形態では、複数のトラップ堰の内側領域は夫々固有の分子識別子を含み、此れ等は、トラップ堰の内側領域内の細胞のリシス時に細胞の分子コンポーネントに結合又はハイブリダイゼーションさせられ得る。幾つかの実施形態では、分子コンポーネントは蛋白質、ペプチド、DNA分子、RNA分子、mRNA分子、又は其れ等の何れかの組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、固有の分子識別子(又はバーコード)は、DNAシーケンシング、遺伝子発現分析、又はクロマチン分析を行う為に用いられる。幾つかの実施形態では、外部から適用される電場が、固有の分子識別子に対する核酸分子コンポーネントのハイブリダイゼーションを容易化する為に用いられる。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは更に取り外し可能な蓋を含む。幾つかの実施形態では、変形可能な物体は細胞であり、1つ以上のトラップ堰の内側領域(単数又は複数)に於ける細胞(単数又は複数)のトラップ後に、生体適合性のハイドロゲルがマイクロ流体デバイス内に灌流され、重合する事を許され

10

20

30

40

50

る。幾つかの実施形態では、ハイドロゲルの重合後に、マイクロ流体デバイスの蓋が取り外されて、トラップされた細胞へのアクセスを許す。幾つかの実施形態では、生体適合性のハイドロゲルは細胞のリシス時にトラップされた細胞のゲノム材料を閉じ込める為に用いられる。

【0012】

参照に依る組み込み

本明細書に於いて挙げられる全ての公開物、特許、及び特許出願は、各個々の公開物、特許、又は特許出願の全体が参照に依って組み込まれる事を具体的且つ個々に指示される場合と同じ程度に、其れ等の全体が参照に依って本願に組み込まれる。本願の用語と組み込まれる参照の用語との間に不一致がある場合には、本願の用語が優先される。

10

【0013】

本発明の新規の特徴は添付の請求項に於いて特定して記される。本発明の原理が利用されている例示的な実施形態を記す次の詳細な記載と付随する図面とを参照して、本発明の特徴及び利点のより良好な理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、トラップフィーチャ（狭窄部）及び相互接続するバイパス流体チャネルのラダー様ネットワークを含むマイクロ流体デバイスを例示している。

【図2】図2（a）及び2（b）は、トラップフィーチャ及び相互接続する流体バイパスチャネルのラダー様ネットワークを含む類似の設計のマイクロ流体デバイスに於ける、2つの異なる流れのレジームを例示している。此の限定しない例では、トラップフィーチャは其れ等の出口領域にフリットを含む。図2（a）は、トラップフィーチャを通る内部流路が蛇行するバイパス流体チャネルの物よりも高い流体力学的流れ抵抗を有する時の、デバイスを通る流れを例示している。図2（b）は、トラップフィーチャを通る内部流路が蛇行するバイパス流体チャネルの物よりも低い流体力学的な流れ抵抗を有する時の、デバイスを通る流れを例示している。

20

【図3】図3は、図1並びに図2（a）及び2（b）に示されているトラップフィーチャ及び相互接続する流体チャネルのラダー様ネットワークについて、等価の抵抗回路を例示している。

【図4】図4（a）及び4（b）は、トラップフィーチャ及び相互接続する流体チャネルのメッシュ様ネットワークを含む類似の設計のマイクロ流体デバイスに於ける、2つの異なる流れのレジームを例示している。図4（a）は、トラップフィーチャを通る内部流路が蛇行するバイパス流体チャネルの物よりも高い流体力学的流れ抵抗を有する時の、デバイスを通る流れを例示している。図4（b）は、トラップフィーチャを通る内部流路が蛇行するバイパス流体チャネルの物よりも低い流体力学的な流れ抵抗を有する時の、デバイスを通る流れを例示している。

30

【図5】図5は、図4（a）及び4（b）に示されているトラップフィーチャ及び相互接続する流体チャネルのメッシュ様ネットワークについて、等価の抵抗回路を例示している。

【図6】図6は、 $R_A/R_T = 0.42$ と近似計算されるトラップ比を有するメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。

40

【図7】図7は、 $R_A/R_T = 1.2$ と近似計算されるトラップ比を有するメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。

【図8】図8は、 $R_A/R_T = 1.2$ と近似計算されるトラップ比を有するラダーネットワークトラップジオメトリを例示している。

【図9】図9は、 $R_A/R_T = 1.45$ と近似計算されるトラップ比を有するメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。

【図10】図10は、 $R_A/R_T = 1.45$ と近似計算されるトラップ比を有するラダーネットワークトラップジオメトリを例示している。

【図11】図11は、トラップ堰が小さい体積の内側流路を含む（即ち、トラップは有意

50

な「内側領域」を有さない)メッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。

【図12】図12は、後ろ側にフリットを有さない内側流路を有するラダーネットワークトラップジオメトリの1つの限定しない例を例示している。

【図13】図13は、後ろ側にフリットを有さない内側流路を有するメッシュネットワークトラップジオメトリの1つの限定しない例を例示している。

【図14】図14は人工ニューラルネットワークの模式的な例示を提供している。

【図15】図15は、人工ニューラルネットワークの層内のノードの機能性の模式的な例示を提供している。

【図16】図16(a)~16(d)は、4つの異なるマイクロ流体デバイスについて捕捉パーセンテージ v_s 、行番号のプロットを示しており、トラップフィーチャの内部流路及び蛇行するバイパス流体チャネルの流れ抵抗の異なる比を含む。図16(a):トラップフィーチャを通る流路の物に対する蛇行するバイパスチャネルの流体力学的な流れ抵抗の比 $(R_A/R_T)=0.25$ のマイクロ流体デバイスのプロット。図16(b): $R_A/R_T=0.42$ のマイクロ流体デバイスのプロット。図16(c): $R_A/R_T=1.20$ のマイクロ流体デバイスのプロット。図16(d): $R_A/R_T=1.45$ のマイクロ流体デバイスのプロット。

【図17】図17(a)~17(d)は、図16(a)~16(d)に示されている捕捉パーセンテージ曲線を見せる4つのマイクロ流体デバイスについて、占有されたトラップの分布のヒートマップを示している。図17(a): $R_A/R_T=0.25$ のマイクロ流体デバイスのヒートマップ。図17(b): $R_A/R_T=0.42$ のマイクロ流体デバイスのヒートマップ。図17(c): $R_A/R_T=1.20$ のマイクロ流体デバイスのヒートマップ。図17(d): $R_A/R_T=1.45$ のマイクロ流体デバイスのヒートマップ。

【図18】図18はマイクロ流体チャンバー内で成長する単一細胞コロニーの一連のタイムラプス画像を示している。細胞の中心は機械学習に基づく画像処理アルゴリズムを用いて同定され、小さいドットとして図示されている。

【図19】図19は、本開示のマイクロ流体デバイス内で成長した細胞の画像の機械学習に基づく分析を用いて得られた、成長曲線の限定しない例を提供している。

【図20】図20は、本開示のマイクロ流体デバイス内で成長したK562細胞の成長速度データのプロットを示しており、コントロール及び0.1 μ M、0.3 μ M、及び0.5 μ Mイマチニブの存在下で成長した細胞のデータを包含する。

【図21】図21は、隣り合うマイクロ流体チャンバー内で成長する4つの細胞コロニーの一連のタイムラプス画像を示している。

【図22】図22(a)及び22(b)は、キザルチニブ(図22(a))又はコントロール培地(図22(b))の存在下で成長したMOLM13細胞の画像を示している。単一のクローンが薬物の存在下で外生する事が観察される。

【図23】図23(a)及び23(b)は、マイクロ流体チップ上の個々の細胞並びに識別子及びマーカーを同定する為の、画像セグメント化に基づく機械学習アルゴリズムの使用を例示している。図23(a):明視野画像。図23(b):コンピュータ生成カラー画像が明視野画像上にオーバーレイされており、チップ上のマーカーの同定、機械学習に基づく分析を用いて分類された細胞の異なる場合、個々の細胞の境界、及び検出される物体が細胞であるかどうかの予測の信頼度のクオリティスコアを示している。

【図24】図24はマイクロ流体チャンバー内にトラップされた単一細胞のアレイの画像を示している。此の後に、チャンバーをシールする為に空気が流体チャネルに吹送される。

【図25】図25は、マイクロ流体チップ内にパターンニングされているオリゴヌクレオチド捕捉プローブに対する蛍光標識された標的プローブのハイブリダイゼーションを示す、蛍光及び明視野画像のオーバーレイを示している。

【図26】図26(a)~26(c)は単一細胞アレイを形成する為のプロセスを例示している。単一細胞アレイは細胞を硬化性のハイドロゲルと併せてアレイに流す事に依って

10

20

30

40

50

形成される（図 26（a））。此の後に、蓋が剥がされて（図 26（b））、サンプルへのアクセスを提供し得る（図 26（c））。

【図 27】図 27（a）及び 27（b）は、流体中の懸濁された単一細胞又は他の物体の捕捉の為に複数のトラップフィーチャを含むマイクロ流体デバイスの限定しない例を提供している。図 27（a）：トラップフィーチャ及びマイクロ流体チャンバーの 100×100 アレイを含むマイクロ流体デバイスの写真。図 27（b）：本開示のマイクロ流体デバイス内のトラップフィーチャ及び流体チャンバーの顕微鏡写真。

【図 28】図 28（a）～28（d）は、原理証明作業に用いられた低効率トラップデバイスのトラップを通る流れプロファイルの例と、単一細胞トラップ効率のデータとを提供している。図 28（a）：デバイスの単一のトラップを通る計算上の流体流速。図 28（b）：デバイスの単一のトラップを示す顕微鏡写真。図 28（c）：デバイス内の $10,000$ 区画について単一細胞トラップ効率を示すヒートマップ。図 28（d）：0、1、2、若しくは 3、又はより多くの細胞がトラップされたマイクロ流体チャンバーの分布を示す円グラフ。

【図 29】図 29 は細胞アレイの繋ぎ合わせた蛍光画像を示している（細胞は FITC 細胞トラッキング色素に依って標識されている）。挿入図：デバイス内にトラップされた個々の細胞を示す蛍光及び明視野画像の拡大オーバーレイ。

【図 30】図 30（a）～30（c）は、アレイ中の特定の細胞に化学物質を印刷する能力を実証する画像の限定しない例を示しており、これはマイクロ流体デバイスの開放的なアーキテクチャに依って可能にされる。図 30（a）：蛍光標識を用いる単一細胞アレイ中の印刷された 2 つの並べられたパターン。図 30（b）：蛍光標識を用いる細胞アレイ中の特定の細胞に印刷されたパターン。図 30（c）：蛍光標識を用いる細胞アレイ中の特定の細胞に印刷されたパターン。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本開示は、細胞トラップフィーチャ及び相互接続する流体チャネルのメッシュ様ネットワークに基づく新規のマイクロ流体デバイス設計を提供し、此れ等は流体中の懸濁された単一細胞又は他の物体の高度に効率的なトラップを可能化し、且つ此れ等はオンチップ細胞区画化及び培養技術、高スループット顕微鏡法、及び自動画像処理技術、並びに生化学的アッセイ又はゲノム分析技術と適合性がある。

【0016】

1 つの態様では、開示されるマイクロ流体デバイスは、ラダー及びメッシュ流体ネットワークの先には認識されていない形質を活用する設計を使用する事に依って、単一細胞又は他の物体の高度に効率的なトラップを可能化する。複数のトラップフィーチャ及び少なくとも 2 つの異なる型の相互接続するバイパスチャネルを含む流体力学的流体回路の流路の相対的な流体抵抗をチューニングする事に依って、最も近いバイパスチャネル内の流体の流れの方向は細胞トラップ（から離れるよりも寧ろ）に向かい、其の結果、毎細胞又は物体は其れが遭遇する第 1 のトラップに押し込まれる。

【0017】

別の態様では、開示されるマイクロ流体デバイスは、集合的にトラップ堰を通る内側流体流路を構成する入口領域、任意の内側領域、及び出口領域を含むトラップ堰設計を使用する事に依って、単一細胞の区画化及び短期的又は長期的なオンチップ細胞培養を可能化する。幾つかの態様では、内側領域は、トラップされるべき細胞又は物体よりも大きい寸法及び／又は体積を有し、其れ故に単一細胞の区画化及び／又は培養の為に用いられ得る。細胞又は物体を複数のトラップの入口領域にトラップし（例えば、デバイスの比較的低い流体力学的圧力損失を用いて、流体流れを駆動する）、爾後にトラップされた細胞又は物体を複数のトラップの内側領域に押し込む（例えば、比較的高い流体力学的圧力のパルスを用いる）為の方法も又記載される。

【0018】

本開示の幾つかの態様では、トラップ堰の入口領域又は内側領域にトラップされた単一

細胞又は物体は、トラップステップ後に非混和性の流体（例えば、油又は空気）をデバイスに流す事に依って更に単離又は区画化され得る。幾つかの態様では、斯かる単離ステップは、トラップされた細胞の爾後の生化学的、生理学的、遺伝学的、ゲノムの、及び／又はプロテオーム的分析を更に容易化する為に用いられ得る。

【0019】

本開示の幾つかの態様では、開示されるマイクロ流体単一細胞トラップデバイスは、取り外し可能な蓋を含み得、トラップ堰の入口領域又は内側領域にトラップされた単一細胞又は物体は、半多孔質ハイドロゲルの形成の為に要求される可溶性のコンポーネントをデバイスに流す事と、其れから重合ステップをトリガーする事に依って、更に単離又は区画化され得る。其れから、蓋の取り外しは、トラップのアレイ内の個々の細胞（又は他の物体）への直接的なアクセスを可能化して、爾後の生化学的、生理学的、遺伝学的、ゲノムの、及び／又はプロテオーム的分析を容易化する。幾つかの態様では、トラップのアレイ内の個々の細胞（又は他の物体）への直接的なアクセスを可能化する為の蓋の取り外しは、アレイからの選択された細胞（又は他の物体）の取り出しを容易化する為に用いられ得る。

10

【0020】

本開示の幾つかの態様では、機械学習に基づく画像分析が、表現型的な形質に基づいて、トラップ堰のアレイ内にトラップされた個々の細胞を同定及び分類する為に用いられ得る。

【0021】

本開示の幾つかの態様では、マイクロ流体単一細胞トラップデバイス内のトラップ堰の内側領域は、トラップ堰内にテザリング、固定化、合成、又は印刷された、予め選択された捕捉若しくは検出試薬（例えば、特異的な細胞表面抗原を対象とする抗体）又はバーコード化試薬（例えば、オリゴヌクレオチドバーコード）のセットを含み得る。例えば、幾つかの態様では、下でより詳細に論じられる通り、開示されるマイクロ流体デバイスは、各細胞の傍にDNAバーコードを印刷する事に依って単一細胞のゲノム分析の為に超並列バーコード化を可能化し得る。

20

【0022】

其れ故に、本願に於いて提供されるマイクロ流体デバイス並びに関連する方法及びシステムは、各ステップに於ける並列的な単一細胞分析を許し、（１）高密度の細胞（及び／又は他の物体）のアレイを編成し、デバイスに移入された細胞の大多数を捕捉する為の方法、（２）全透性若しくは半透性容器内に於いて単一細胞を区画化するか、又は其れ等を半多孔質ハイドロゲル内にトラップする為の方法、（３）短い又は長い時間の期間に渡る高解像度画像に基づく分析に依って細胞を表現型解析する為の方法、並びに（４）爾後の生化学的、生理学的、遺伝学的、ゲノムの、及び／又はプロテオーム的分析を行う為の方法を包含するが、此れ等に限定されない。開示される方法、デバイス、及びシステムは、種々の基礎研究及び臨床適用を可能化しようとする。例えば、其れ等は、可能性として、薬物安全性及び有効性を確認する為の新たなアプローチ又はより良好な特許治療を選択する為の新たな方法を実装する為に用いられ得る。開示される方法、デバイス、及びシステムは、細胞挙動の不均一性を同定及び分析する為に必要である高度並列実験を実施する事、特に臨床的意義を有する稀な外れ値の同定に用いられ得る。例えば、薬物に対して耐性である稀な割合の細胞は、薬剤耐性クローンの外生を可能化し腫瘍再発に至る其の薬物処置の傾向の強い指標である。同様に、開示される方法、デバイス、及びシステムは、異なる生化学的シグナル伝達分子及び他の化学的薬剤に対する暴露下での幹細胞分化の不均一性を研究する為に用いられ得る。開示される方法、デバイス、及びシステムは、異なる型の細胞間の相互作用、例えば、チェックポイント阻害剤及び他の抗体治療の存在下で癌細胞と相互作用する免疫細胞を研究する為にも又用いられ得る。開示される方法、デバイス、及びシステムは、所望の蛋白質、酵素、又は他の生物学的産物を産生する事に特に秀でた細胞を素早く同定する為にも又用いられ得る。開示される方法、デバイス、及びシステムは、上に記載されている機能計測両方を包含し且つ其れ等の同じ細胞又は単一細胞由来

30

40

50

コロニーからのゲノム計測にリンクされる、マルチパラメータデータセットを確立する為にも又用いられ得る。此れ等の細胞に対して実施され得るゲノム計測の型は、mRNA発現分析、抗体受容体分析、DNA変異分析、スプライシングバリエーション分析、クロマチン制限、メチル化状態、及び高次染色体構成に基づくエピジェネティックアッセイを包含する。

【0023】

本願に記載される方法、デバイス、及びシステムの種々の態様は、下に記されている具体的な適用の何れかに、又は何れかの他の型の単一細胞分析適用の為に適用され得る。本開示の異なる態様が個々に、集合的に、又は互いの組み合わせで理解され得ると言う事は理解されるであろう。

【0024】

定義：別様に定義されない限り、本願に於いて用いられる全ての技術用語は、本開示が属する分野の業者に依って普通に理解される同じ意味を有する。

【0025】

文脈が明瞭に別様に述べていない限り、本明細書及び添付の請求項に於いて用いられる単数形「a」、「an」、及び「the」は複数の参照を包含する。別様に申し立てられていない限り、本願に於ける「又は」の何れかの参照は「及び／又は」を包摂する事が意図される。

【0026】

本願に於いて用いられる用語「約」或る数は、其の数プラス又はマイナス其の数の10%を言う。用語「約」は、範囲の文脈で用いられる時には、其の範囲マイナス其の最も低い値の10%及びプラス其の最も多大な値の10%を言う。

【0027】

本願に於いて用いられる用語「トラップ」、「トラップフィーチャ」、「細胞トラップ」、及び「トラップ堰」は交換可能に用いられ、流体中の懸濁された細胞又は他の物体を保持又はトラップする様に設計されている流体チャネル内の1又は2つの寸法の狭窄部を含むフィーチャを言い得る。幾つかの場合には、トラップは入口領域、任意に内側領域、及び出口領域を含み得、此れ等の少なくとも1つは狭窄部を含む。幾つかの場合には、トラップの内側領域は少なくとも1つ又は2つの寸法が入口領域及び／又は出口領域よりも有意に大きくあり得、トラップされた個々の細胞を区画化する様に構成され得る。

【0028】

一般的に、本願に於いて用いられる用語「物体」は、細胞又は其の断片（例えば細胞のオルガネラ、例えば細胞核、ミトコンドリア、又はエキソソーム）、生物（例えば細菌）、ビーズ、粒子、ドロップレット（例えば、液滴）を言い、又は複数の形態で、其れ等の何れかの組み合わせを言い得る。

【0029】

一般的に、本願に於いて用いられる用語「細胞」は当業者に公知の種々の細胞の何れかを言う。幾つかの態様では、用語「細胞」は、何れかの接着及び非接着真核細胞、哺乳類細胞、初代若しくは不死化ヒト細胞若しくは細胞株、初代若しくは不死化齧歯類細胞若しくは細胞株、癌細胞、種々の異なる臓器若しくは組織型の何れかに由来する正常若しくは疾患ヒト細胞（例えば、白血球、赤血球、血小板、上皮細胞、内皮細胞、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、線維芽細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、配偶子、若しくは心臓、肺、脳、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胸腺、膀胱、胃、結腸、小腸からの細胞）、個別の細胞サブセット、例えば免疫細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、CD44^{high}/CD24^{low}癌幹細胞、Lgr5⁺/6⁺幹細胞、未分化ヒト幹細胞、分化する様に誘導されたヒト幹細胞、稀な細胞（例えば、循環腫瘍細胞（CTC）、循環上皮細胞、循環内皮細胞、循環子宮内膜細胞、骨髓細胞、前駆体細胞、泡沫細胞、間葉系幹細胞、若しくはトロホブラスト）、動物細胞（例えば、マウス、ラット、豚、犬、牛、若しくは馬）、植物細胞、酵母細胞、真菌細胞、細菌細胞、藻類細胞、接着若しくは非接着原核細胞、又は複数の形態で、其れ等の何れかの組み合わせを言い得る。幾つかの態様では、用語「

10

20

30

40

50

細胞」は、免疫細胞、例えば、T細胞、細胞傷害性（キラー）T細胞、ヘルパーT細胞、アルファベータT細胞、ガンマデルタT細胞、T細胞前駆体、B細胞、B細胞前駆体、リンパ系幹細胞、骨髓前駆体細胞、リンパ球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞、形質細胞、メモリー細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞、及び／若しくはマクロファージ、又は複数の形態で、其れ等の何れかの組み合わせを言い得る。

【0030】

本願に於いて用いられる用語「ビーズ」は、一般的には、何れかの型の中実、多孔質、又は中空の球状、非球状、又は不規則形状の物体を言い、ガラス、プラスチック、セラミック、金属、ポリマー材料、又は其れ等の何れかの組み合わせから成る。幾つかの態様では、用語「ビーズ」は、シリカビーズ、シリカゲルビーズ、コントロールドポアガラスビーズ、磁性ビーズ（例えば、ダイナビーズ）、ワング樹脂ビーズ、メリフィールド樹脂ビーズ、アガロースビーズ、セファデックスビーズ、セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ等を言い得、又は複数の形態で、其れ等の何れかの組み合わせを言い得る。幾つかの態様では、ビーズは、テザリング又は固定化された捕捉、検出、又はバーコード化試薬、例えば、抗体、サイトカイン特異的抗体、ケモカイン特異的抗体、成長因子特異的抗体、酵素、酵素基質、アビジン若しくはストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、他の蛋白質、小分子、糖蛋白質、薬物分子、多糖、フルオロフォア、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアプタマー、オリゴヌクレオチドバーコード、又は其れ等の何れかの組み合わせを含み得る。幾つかの場合には、ビーズは、サイトカイン検知ビーズ、例えばサーモフィッシャー（Thermo Fischer）（ウォルサム，MA）に依

10

20

【0031】

単一細胞の効率的なトラップの為のマイクロ流体デバイス設計：上で指摘されている通り、1つの態様では、本開示は、メッシュ流体ネットワークの先には認識されていない形質を活用する設計を使用する事に依って、単一細胞又は他の物体の高度に効率的なトラップを可能化するマイクロ流体デバイスを提供する。複数のトラップフィーチャ及び少なくとも2つの異なる型の相互接続するバイパスチャネルを含む流体力学的流体回路の流路の相対的な流体抵抗をチューニングする事が、全ての流体流れストリームラインがトラップを通過して行くと言う事を保証し、其れに依って、毎細胞が其れが遭遇する第1のトラップに押し込まれると言う事を保証する。此の現象は、トラップの流体力学的抵抗 R_T （即ち、単一のトラップの入口点から出口点迄の距離に跨るトラップジオメトリ全体の流体抵抗）を、1つ以上の短いバイパスチャネルセクションの流体抵抗 R_B 及び長いコミュナルバイパスチャネルセクションの流体抵抗 R_A に対して相対的に、 $R_T < R_A$ の要件で調整する事に依って達成される。細胞がトラップされた後には、隣同士のバイパスチャネルの流体流れの方向が逆転し、細胞トラップから離れて流れる様な様式で、流体抵抗のローカルな比が変化し、其れに依って、次にアプローチする細胞が次の利用可能なトラップに向かって移動する事を引き起こす。此の様式で、アレイ内のトラップは、細胞が導入される順に次々に仕込まれる。此れは、原理的には、開示されるデバイスが単一細胞をトラップする完璧に近い効率を達成する事を許す。其れ故に、開示されるデバイスは、高いトラップ効率が肝要である小さい細胞サンプルを取り扱う事に理想的に適する。

30

40

【0032】

開示されるデバイス設計は流体チャネルのメッシュ様ネットワークに基づく。幾つかの態様では、デバイスは、a) 少なくとも1つの注入口及び少なくとも1つの排出口を有するマイクロ流体ネットワーク、b) 複数のマイクロ流体狭窄部（又は「トラップ」）を含み、狭窄部の寸法は、流体に含有される懸濁物体の寸法よりも小さく、狭窄部に流れる懸

50

濁物体を捕捉する様に配設され、c) 各マイクロ流体狭窄部は、入口点又は領域及び出口点又は領域と任意に内側領域とを含み、d) 前記のマイクロ流体狭窄部の出口点は少なくとも2つの追加のマイクロ流体狭窄部と直接的に流体接続し、e) 前記マイクロ流体狭窄部が懸濁物体を未だ捕捉していない時には、前記マイクロ流体狭窄部の出口点の圧力は何れの下流のマイクロ流体狭窄部の入口点の圧力よりも高く、f) 前記マイクロ流体狭窄部が懸濁物体を捕捉した時には、前記マイクロ流体狭窄部の出口点の圧力は下流のマイクロ流体狭窄部の少なくとも1つの入口点の圧力よりも低い。幾つかの態様では、狭窄部又はトラップの出口領域は、フリット、例えば、細胞又は他の物体が狭窄部又はトラップの内側領域から出て行く事を防止する為に十分に小さい間隔を有する一連のカラム状フィーチャを含み得る。

10

【0033】

図1は、トラップフィーチャ（夫々、狭窄した入口点（又は入口領域）、内側領域、及び出口点を含む）及びバイパス流体チャネルの相互接続するセットの「無限」ラダー様ネットワークを含む、マイクロ流体デバイスを例示している。図2（a）及び2（b）は、トラップフィーチャが夫々出口点（又は出口領域）にフリットを含む類似のラダー様流体ネットワークを例示している。トラップを通る流路の流体抵抗 R_T は、トラップの入口点から内側領域を通してトラップの出口点迄の距離に跨るトラップジオメトリ全体の流体抵抗を含む。2つの型のバイパス流体チャネル、流体抵抗 R_A を含む長いコミュナルバイパスチャネル（此处で、任意に、バイパスチャネルは蛇行するレイアウトを有する）及び流体抵抗 R_B を含むより短い相互接続するバイパスチャネルが、図1及び図2（a）～（b）に指示されている。流体抵抗 R_A を含む長いバイパスチャネルは、一般的に、デバイスを通る正味の流れの方向と整列させられ、流体抵抗 R_B を含む短いバイパスチャネルは、一般的に、デバイスを通る正味の流れの方向に対して直角に整列させられる。幾つかの場合には、 R_{B1} 、 R_{B2} 、...の流体抵抗を含む1つよりも多くの型の短いバイパスチャネルがあり得る。 R_{B1} 、 R_{B2} 、...は互いとは異なり得るが、夫々 R_A よりも小さいであろう。図1及び図2（a）～（b）に例示されている流体デバイスの等価の抵抗回路が図3に示されており、流体抵抗 R_T 、 R_A 、及び R_B に依ってリンクされた一連の圧力ノード $P_{i,j}$ を含む。

20

【0034】

図3に図示されている無限ラダー流体抵抗ネットワークについて、電流連続方程式は、

30

【数1】

$$\begin{bmatrix} (R_A^{-1} + R_B^{-1} + R_T^{-1}) & -R_B^{-1} & -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) & 0 \\ -R_B^{-1} & (R_A^{-1} + R_B^{-1} + R_T^{-1}) & 0 & -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) \\ -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) & 0 & (R_A^{-1} + R_B^{-1} + R_T^{-1}) & -R_B^{-1} \\ 0 & -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) & -R_B^{-1} & (R_A^{-1} + R_B^{-1} + R_T^{-1}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_{i,0} \\ P_{i,1} \\ P_{i+1,0} \\ P_{i+1,1} \end{bmatrix} = \Delta P \begin{bmatrix} R_A^{-1} \\ R_T^{-1} \\ -R_A^{-1} \\ -R_T^{-1} \end{bmatrix} \quad (1)$$

に依って与えられ、式中、 ΔP はラダーの1つの周期（ $P_{i-1,1}$ から $P_{i+1,1}$ 又は $P_{i-1,0}$ から $P_{i+1,0}$ ）に依る圧力損失である。此の方程式の解は点 $P_{i-1,0}$ の圧力を用いて与えられる。

40

【数2】

$$\begin{aligned} P_{i,0} &= P_{i,0} \\ P_{i,1} &= P_{i,0} - \frac{1}{2} \frac{R_A^{-1} - R_T^{-1}}{R_A^{-1} + R_B^{-1} + R_T^{-1}} \Delta P \\ P_{i+1,0} &= P_{i,0} - \frac{1}{2} \frac{R_B^{-1} + 2R_A^{-1}}{R_A^{-1} + R_B^{-1} + R_T^{-1}} \Delta P \\ P_{i+1,1} &= P_{i,0} - \frac{1}{2} \Delta P \end{aligned} \quad (2)$$

【0035】

此の方程式系は流体流れの2つのレジームを有する。全てのストリームラインが長いチ

50

チャンネルセクション（流体抵抗 R_A を含む）を通過し、ストリームラインの或る割合がマイクロ流体狭窄部（流体抵抗 R_T を含む）を通過し、残りは短いチャンネルセクション（流体抵抗 R_B を含む）を流れ、マイクロ流体狭窄部から離れる方向に流れるレジームがある（図 2（a））。此の条件は、マイクロ流体狭窄部入口点の圧力（ $P_{i,0}$ ）が $P_{i,1}$ の圧力よりも高い時に達成され、此れは $R_A < R_T$ の時に起こる。

【0036】

$R_A > R_T$ の別のレジームでは、状況は逆転し、全てのストリームラインがマイクロ流体狭窄部（ R_T ）を通過し、流体は短いチャンネルセクション（ R_B ）を流れ、マイクロ流体狭窄部の方に向けられる（図 2（b））。其れ故に、トラップ及びバイパスチャンネルの相対的抵抗を調整する事に依って、細胞が狭窄部に移動させられ、先行のアプローチで典型的に達成される通り細胞の何らかの割合がバイパスに於いて失われる事なしにトラップされるであろう事を保証する事が可能である。

【0037】

2Dメッシュネットワーク設計（例えば、図 4（a）～（b）に例示されている通り。此れは図 5 に示されている等価の抵抗回路に依って代表され得る）の分析は、無限ラダーネットワークについて此处で論じられる物に類似であり、下の例 1 でより詳細に論じられる。同じ条件 $R_A > R_T$ は、全てのストリームラインがマイクロ流体狭窄部を通過すると言う事を保証する。此の知見は、アレイを流れる第 1 の細胞が第 1 の利用可能なトラップに依って捕捉され、次の細胞は次の利用可能なトラップに仕込むであろうと言う事等を示唆している。細胞は未占有のトラップを逃さず、全てのトラップが順に仕込まれるであろう。

【0038】

各トラップが単一細胞のみを捕捉すると言う事を保証する為には、一旦其れが細胞に依って占有される様に成ると、如何にトラップ抵抗が変化するか、及び如何なる型の流れバランスが次にアプローチする細胞に依って経験されるかを理解する事も又重要である。理想的には、占有されたトラップは、短いバイパス（ R_B ）を通る流れが今やトラップを通る流れよりも大きい、流れプロファイルを提供するであろう。流れの比は条件 $R_T \geq 2R_A + 2R_B$ を与え、此れは短いチャンネルセクションが非常に低い抵抗を有する場合に容易に達成され得、トラップされた懸濁物体の存在はトラップ抵抗（ R_T ）が倍よりも多く成る事を引き起こす。此の知見は、チャンネルの深さが細胞直径よりも有意に大きくあるべきではないと言う事を意味しており、其の結果、トラップされた細胞はマイクロ流体狭窄部の有意な断面積パーセンテージを塞ぎ、トラップ抵抗の最大限の変化を引き起こす。

【0039】

開示されるラダー様及びメッシュ様流体ネットワーク設計は、先行のマイクロ流体に基づく細胞トラップデバイスからの新規の且つ非自明の改善を構成する。良好な細胞トラップデバイスはトラップを通る高い体積流量とトラップの周りの低い体積流量とを有するであろうと言う事が良く確立されている。然し乍ら、先に発表された設計とは対照的に、我々は、重要な設計考慮事項がトラップに依る総圧力損失ではなく、寧ろ、条件 $R_A > R_T$ を維持する為のコミュナルバイパスチャンネルの流れ及びトラップを通る流れの相対的な流体抵抗のチューニングであると言う事を認識した。

【0040】

図 2（a）、2（b）、4（a）、4（b）、及び 6～13 は本開示のラダー様及びメッシュ様流体ネットワーク設計の数個の異なる限定しない例を提供する。上で指摘されている通り、図 2（a）及び 2（b）はトラップ堰（出口領域にフリットを含む）及び相互接続するバイパス流体チャンネルのラダー様ネットワークを例示している。トラップ堰を通る内部流路の抵抗がバイパスチャンネルの抵抗よりも高い時には（ $R_T > R_A$ ；流れのレジーム 1）、流れはトラップ堰の入口に於いて分岐する（図 2（a））。此のジオメトリは、トラップ堰を通る内部流路がバイパスチャンネルの流路よりも低い抵抗を有する（ $R_A > R_T$ ）流れのレジーム 2 の物よりも低いトラップ効率を有する。此のケースでは、全ての流体はトラップ堰を流れる（図 2（b））。

【0041】

図4(a)及び4(b)は、トラップ堰及び相互接続するバイパス流体チャネルのメッシュ様ネットワークを例示している。再び、トラップ堰を通る内部流路の抵抗がバイパスチャネルの抵抗よりも高い時には($R_T > R_A$; 流れのレジーム1)、流れはトラップ堰の入口に於いて分岐する(図4(a))。トラップ堰を通る内部流路がバイパスチャネルの流路よりも低い抵抗を有する時には($R_A > R_T$; 流れのレジーム2)、流体の全てはトラップ堰を通して流れる(図4(b))。

【0042】

図6は、 $R_A / R_T = 0.42$ と近似計算されるトラップ比を有するメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。此の例では、各トラップ堰の出口領域は内側領域の境界を形成するフリットを含み、トラップ堰の内側領域は、流体中の懸濁された細胞又は物体をトラップする為に用いられる狭窄部を含む入口領域と比較して可成り大きい。

10

【0043】

図7は、 $R_A / R_T = 1.2$ と近似計算されるトラップ比を有するメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。再び、此の例のトラップ堰はトラップの出口領域にフリットを含む。

【0044】

図8は、 $R_A / R_T = 1.2$ と近似計算されるトラップ比を有するラダーネットワークトラップジオメトリを例示している。再び、此の例のトラップ堰はトラップの出口領域にフリットを含む。

20

【0045】

図9は、 $R_A / R_T = 1.45$ と近似計算されるトラップ比を有するメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。再び、此の例のトラップ堰はトラップの出口領域にフリットを有する。

【0046】

図10は、 $R_A / R_T = 1.45$ と近似計算されるトラップ比を有するラダーネットワークトラップジオメトリを例示している。再び、此の例のトラップ堰はトラップの出口領域にフリットを含む。

【0047】

図11は、トラップ堰が小さい体積の内側流路を含み(即ち、トラップは有意な「内側領域」を有さない)、且つトラップ堰がトラップの出口領域にフリットを欠くメッシュネットワークトラップジオメトリを例示している。

30

【0048】

図12は、排出口又は出口領域にフリットを有さない内側流路を有するラダーネットワークトラップジオメトリの1つの限定しない例を例示している。

【0049】

図13は、排出口又は出口領域にフリットを有さない内側流路を有するメッシュネットワークトラップジオメトリの1つの限定しない例を例示している。

【0050】

幾つかの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは、a)少なくとも1つの流体注入口及び少なくとも1つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み得、各トラップ堰は、マイクロ流体デバイスを通して流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i)各トラップ堰は入口領域、任意の内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、トラップ堰を通る内側流体流路を構成し、i i)トラップ堰の大多数(即ち、少なくとも1つの流体注入口又は少なくとも1つの流体排出口に最も近い物を例外として、トラップ堰の全て)の各トラップ堰が、トラップ堰の出口領域を別のトラップ堰の入口領域に接続する2又は3つの外側流体流路(バイパス流体チャネル)と流体連通し、i i i)トラップを通る内側流体流路の物に対する1つの外側流体流路(例えば、より長いコミュナル流体バイパスチャネル)の流体抵抗の比(即ち、 R_A / R_T)は少なくとも0.4である。幾つかの実施形態では、トラップ堰の全て又は或る部分の出

40

50

口領域は、細胞又は他の物体がトラップの内側領域（又はチャンバー）から外に流れる事を防止する為のフリットを含み得る。幾つかの実施形態では、2又は3つの外側流体流路（バイパス流体チャネル）は、 R_A よりも小さい流体抵抗 R_B を含む1又は2つのより短い流体バイパスチャネルを含み得る。2つのより短い流体バイパスチャネルがあるケースでは、其れ等の流体抵抗は互いと同じか又は互いと異なり得るが、何れのケースでも R_A より小さいであろう。

【0051】

幾つかの実施形態では、比 R_A/R_T は約0.2から約2.0の範囲であり得る。幾つかの実施形態では、比 R_A/R_T は、少なくとも0.2、少なくとも0.3、少なくとも0.4、少なくとも0.5、少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.9、少なくとも1.0、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、又は少なくとも2.0であり得る。幾つかの実施形態では、比 R_A/R_T は、多くても2.0、多くても1.9、多くても1.8、多くても1.7、多くても1.6、多くても1.5、多くても1.4、多くても1.3、多くても1.2、多くても1.1、多くても1.0、多くても0.9、多くても0.8、多くても0.7、多くても0.6、多くても0.5、多くても0.4、多くても0.3、又は多くても0.2であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、比 R_A/R_T は約0.4から約1.6の範囲であり得る。比 R_A/R_T が、此の範囲内の何れかの値、例えば約1.25を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0052】

開示されるマイクロ流体デバイスのトラップ堰は、一般的に、少なくとも1つの寸法の狭窄部、例えば、トラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法よりも小さい狭窄部を含む入口点又は入口領域を含むであろう。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの寸法の狭窄部は、サイズが、トラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の約10%から約90%の範囲であり得る。幾つかの実施形態では、狭窄部は、トラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%であり得る。幾つかの実施形態では、狭窄部は、トラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の多くても90%、多くても80%、多くても70%、多くても60%、多くても50%、多くても40%、多くても30%、多くても20%、又は多くても10%であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、狭窄部は、サイズがトラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の約20%から約70%の範囲であり得る。狭窄部が、此の範囲内の何れかの値、例えばトラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の約33%を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0053】

一般的に、開示されるマイクロ流体デバイスのトラップ堰は、少なくとも1つの寸法の狭窄部、例えば、トラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法よりも小さい狭窄部を含む入口点又は入口領域を含むであろう。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの寸法の狭窄部はサイズが約 $1\mu\text{m}$ から約 $100\mu\text{m}$ の範囲であり得る。例えば、幾つかの実施形態では、少なくとも1つの寸法の狭窄部は、少なくとも $1\mu\text{m}$ 、少なくとも $2\mu\text{m}$ 、少なくとも $3\mu\text{m}$ 、少なくとも $4\mu\text{m}$ 、少なくとも $5\mu\text{m}$ 、少なくとも $6\mu\text{m}$ 、少なくとも $7\mu\text{m}$ 、少なくとも $8\mu\text{m}$ 、少なくとも $9\mu\text{m}$ 、少なくとも $10\mu\text{m}$ 、少なくとも $20\mu\text{m}$ 、少なくとも $30\mu\text{m}$ 、少なくとも $40\mu\text{m}$ 、少なくとも $50\mu\text{m}$ 、少なくとも $60\mu\text{m}$ 、少なくとも $70\mu\text{m}$ 、少なくとも $80\mu\text{m}$ 、少なくとも $90\mu\text{m}$ 、又は少なくとも $100\mu\text{m}$ の寸法を有し得る。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの寸法の狭窄部は、多くても $100\mu\text{m}$ 、多くても $90\mu\text{m}$ 、多くても $80\mu\text{m}$ 、多くても $70\mu\text{m}$ 、多く

ても $60\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $50\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $40\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $30\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $20\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $10\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $9\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $8\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $7\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $6\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $5\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $4\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $3\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $2\text{ }\mu\text{m}$ 、多くても $1\text{ }\mu\text{m}$ の寸法を有し得る。此の paragraphs に記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、少なくとも 1 つの寸法の狭窄部はサイズが約 $3\text{ }\mu\text{m}$ から約 $6\text{ }\mu\text{m}$ の範囲であり得る。狭窄部が、此の範囲内の何れかの寸法、例えば約 $4.5\text{ }\mu\text{m}$ を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0054】

幾つかの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは、a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み得、各トラップ堰は、マイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 各トラップ堰は、入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、トラップ堰を通る内側流体流路を構成し、ii) トラップ堰の内側領域の体積は入口領域又は出口領域の体積よりも多大である。

10

【0055】

幾つかの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは、a) 少なくとも 1 つの流体注入口及び少なくとも 1 つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み得、各トラップ堰は、マイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 各トラップ堰は、入口領域、内側領域、及び出口領域を含み、此れ等は、集合的に、トラップ堰を通る内側流体流路を構成し、ii) 内側領域は物体の最も大きい寸法よりも多大である少なくとも 2 つの寸法を有する。

20

【0056】

開示されるマイクロ流体デバイスのトラップ堰設計は、入口領域（又は入口点）、任意に内側領域（又はチャンバー）、及び出口領域（又は出口点）を含み得る。存在する場合には、内側領域（又はチャンバー）は、マイクロ流体デバイスの平面内に種々の断面形状の何れかを有し得る。例えば、内側領域は、大きくは円形状、楕円形状、正方形形状、長方形形状、三角形形状、六角形状、不規則な形状、又は其れ等の何れかの組み合わせを有し得る。幾つかの場合には、トラップ堰の全て又は或る部分の出口領域はフリットを含み得る。

【0057】

幾つかの場合には、内側領域は、トラップの入口及び／又は出口領域の物に対して相対的に僅かに小さい寸法又は体積を有し得る。幾つかの実施形態では、内側領域（又はチャンバー）は、入口領域、出口領域、又はトラップされるべき細胞若しくは物体の物の $1\times$ から約 $1,000\times$ の範囲である体積を含み得る。例えば、幾つかの実施形態では、内側領域は、入口領域、出口領域、又はトラップされるべき細胞若しくは物体の少なくとも $1\times$ 、少なくとも $10\times$ 、少なくとも $20\times$ 、少なくとも $30\times$ 、少なくとも $40\times$ 、少なくとも $50\times$ 、少なくとも $60\times$ 、少なくとも $70\times$ 、少なくとも $80\times$ 、少なくとも $90\times$ 、少なくとも $100\times$ 、少なくとも $200\times$ 、少なくとも $300\times$ 、少なくとも $400\times$ 、少なくとも $500\times$ 、少なくとも $600\times$ 、少なくとも $700\times$ 、少なくとも $800\times$ 、少なくとも $900\times$ 、又は少なくとも $1,000\times$ である体積を含み得る。幾つかの実施形態では、内側領域は、入口領域、出口領域、又はトラップされるべき細胞若しくは物体の物の多くても $1,000\times$ 、多くても $900\times$ 、多くても $800\times$ 、多くても $700\times$ 、多くても $600\times$ 、多くても $500\times$ 、多くても $400\times$ 、多くても $300\times$ 、多くても $200\times$ 、多くても $100\times$ 、多くても $90\times$ 、多くても $80\times$ 、多くても $70\times$ 、多くても $60\times$ 、多くても $50\times$ 、多くても $40\times$ 、多くても $30\times$ 、多くても $20\times$ 、多くても $10\times$ 、又は多くても $1\times$ である体積を含み得る。此の paragraphs に記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、内側領域は、サイズが入口領域、出口領域、又はトラップされるべき細胞若しくは物体の物の約 $50\times$ から約 $200\times$ の範囲である体積を含み得る。内側領域が、此の範囲内の何れかの値、例えば入口領域、出口領域、又はトラップされるべき細胞若

30

40

50

しくは物体の物の約250×を有する体積を含み得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0058】

幾つかの実施形態では、内側領域（又はチャンバー）は、サイズがトラップされるべき細胞又は物体の最も大きい寸法の物の約1×から約1,000×の範囲である少なくとも1つ又は少なくとも2つの寸法を含み得る。例えば、幾つかの実施形態では、内側領域は、トラップされるべき細胞又は物体の最も大きい寸法の物の少なくとも1×、少なくとも10×、少なくとも20×、少なくとも30×、少なくとも40×、少なくとも50×、少なくとも60×、少なくとも70×、少なくとも80×、少なくとも90×、少なくとも100×、少なくとも200×、少なくとも300×、少なくとも400×、少なくとも500×、少なくとも600×、少なくとも700×、少なくとも800×、少なくとも900×、又は少なくとも1,000×である少なくとも1つ又は少なくとも2つの寸法を含み得る。幾つかの実施形態では、内側領域は、トラップされるべき細胞又は物体の最も大きい寸法の物の多くても1,000×、多くても900×、多くても800×、多くても700×、多くても600×、多くても500×、多くても400×、多くても300×、多くても200×、多くても100×、多くても90×、多くても80×、多くても70×、多くても60×、多くても50×、多くても40×、多くても30×、多くても20×、多くても10×、又は多くても1×である少なくとも1つ又は少なくとも2つの寸法を含み得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、内側領域は、サイズがトラップされるべき細胞又は物体の最も大きい寸法の物の約50×から約200×の範囲である少なくとも1つ又は少なくとも2つの寸法を含み得る。内側領域が、此の範囲内の何れかの値を有する少なくとも1つ又は少なくとも2つの寸法、例えば、トラップされるべき細胞又は物体の最も大きい寸法の物の約125×を含み得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0059】

開示されるデバイスの個々のトラップ堰が第1の接触時（即ち、細胞又は物体がデバイス内のトラップ堰に遭遇する第1回）に懸濁細胞又は物体を保持する捕捉確率は、約0.05から約0.99までの範囲であり得る。例えば、幾つかの実施形態では、捕捉確率は少なくとも0.05、少なくとも0.1、少なくとも0.2、少なくとも0.3、少なくとも0.4、少なくとも0.5、少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.9、少なくとも0.95、又は少なくとも0.99であり得る。幾つかの実施形態では、捕捉確率は多くても0.99、多くても0.95、多くても0.9、多くても0.8、多くても0.7、多くても0.6、多くても0.5、多くても0.4、多くても0.3、多くても0.2、多くても0.1、又は多くても0.05であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、捕捉確率は約0.2から約0.8の範囲であり得る。捕捉確率が、此の範囲内の何れかの値、例えば約0.66を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0060】

開示されるトラップ堰アレイデバイスを通過する流体中の懸濁された細胞又は他の物体をトラップする飽和前トラップ効率は、約10%から約100%の範囲であり得る。例えば、幾つかの実施形態では、開示されるデバイスの飽和前トラップ効率は少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%であり得る。幾つかの実施形態では、飽和前トラップ効率は多くても99%、多くても98%、多くても95%、多くても90%、多くても80%、多くても70%、多くても60%、多くても50%、多くても40%、多くても30%、多くても20%、又は多くても10%であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合

わせられ得る。例えば、飽和前トラップ効率は約40%から約99%の範囲であり得る。飽和前トラップ効率が、此の範囲内の何れかの値、例えば約97%を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0061】

幾つかの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは、a) 少なくとも1つの流体注入口及び少なくとも1つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み得、各トラップ堰は、マイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 各トラップ堰は、物体の最も小さい寸法よりも小さい少なくとも1つの寸法の狭窄部を含み、ii) トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の流体抵抗の比は少なくとも0.4である。幾つかの場合には、上で指摘されている通り、少なくとも1つの寸法の狭窄部は、サイズがトラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の約10%から約90%の範囲であり得る。少なくとも1つの寸法の狭窄部が、サイズがトラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法の約10%から約90%の範囲である此れ等の場合の何れかでは、トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の抵抗 (R_A / R_T) は約0.4から約2.0の範囲であり得る。本開示に包含される狭窄部寸法 (トラップされるべき細胞又は物体の最も小さい寸法のパーセンテージに換算して定められる) 及び抵抗比 (R_A / R_T) の組み合わせの限定しない例は、

(10%, 0.5)	(10%, 0.6)	
(10%, 0.7)	(10%, 0.8)	
(10%, 0.9)	(10%, 1.0)	
(10%, 1.1)	(10%, 1.2)	
(10%, 1.3)	(10%, 1.4)	
(10%, 1.5)	(10%, 1.6)	
(10%, 1.7)	(10%, 1.8)	
(10%, 1.9)	(10%, 2.0)	
(20%, 0.5)	(20%, 0.6)	
(20%, 0.7)	(20%, 0.8)	
(20%, 0.9)	(20%, 1.0)	
(20%, 1.1)	(20%, 1.2)	
(20%, 1.3)	(20%, 1.4)	
(20%, 1.5)	(20%, 1.6)	
(20%, 1.7)	(20%, 1.8)	
(20%, 1.9)	(20%, 2.0)	
(30%, 0.5)	(30%, 0.6)	
(30%, 0.7)	(30%, 0.8)	
(30%, 0.9)	(30%, 1.0)	
(30%, 1.1)	(30%, 1.2)	
(30%, 1.3)	(30%, 1.4)	
(30%, 1.5)	(30%, 1.6)	
(30%, 1.7)	(30%, 1.8)	
(30%, 1.9)	(30%, 2.0)	
(40%, 0.5)	(40%, 0.6)	
(40%, 0.7)	(40%, 0.8)	
(40%, 0.9)	(40%, 1.0)	
(40%, 1.1)	(40%, 1.2)	
(40%, 1.3)	(40%, 1.4)	
(40%, 1.5)	(40%, 1.6)	
(40%, 1.7)	(40%, 1.8)	
(40%, 1.9)	(40%, 2.0)	
(50%, 0.5)	(50%, 0.6)	
(50%, 0.7)	(50%, 0.8)	
(50%, 0.9)	(50%, 1.0)	
(50%, 1.1)	(50%, 1.2)	
(50%, 1.3)	(50%, 1.4)	
(50%, 1.5)	(50%, 1.6)	
(50%, 1.7)	(50%, 1.8)	
(50%, 1.9)	(50%, 2.0)	
(60%, 0.5)	(60%, 0.6)	
(60%, 0.7)	(60%, 0.8)	
(60%, 0.9)	(60%, 1.0)	
(60%, 1.1)	(60%, 1.2)	
(60%, 1.3)	(60%, 1.4)	
(60%, 1.5)	(60%, 1.6)	
(60%, 1.7)	(60%, 1.8)	
(60%, 1.9)	(60%, 2.0)	
(70%, 0.5)	(70%, 0.6)	
(70%, 0.7)	(70%, 0.8)	
(70%, 0.9)	(70%, 1.0)	
(70%, 1.1)	(70%, 1.2)	
(70%, 1.3)	(70%, 1.4)	
(70%, 1.5)	(70%, 1.6)	
(70%, 1.7)	(70%, 1.8)	
(70%, 1.9)	(70%, 2.0)	
(80%, 0.5)	(80%, 0.6)	
(80%, 0.7)	(80%, 0.8)	
(80%, 0.9)	(80%, 1.0)	
(80%, 1.1)	(80%, 1.2)	
(80%, 1.3)	(80%, 1.4)	
(80%, 1.5)	(80%, 1.6)	
(80%, 1.7)	(80%, 1.8)	
(80%, 1.9)	(80%, 2.0)	
(90%, 0.5)	(90%, 0.6)	

、(90%、0.7)、(90%、0.8)、(90%、0.9)、(90%、1.0)、
 (90%、1.1)、(90%、1.2)、(90%、1.3)、(90%、1.4)、
 (90%、1.5)、(90%、1.6)、(90%、1.7)、(90%、1.8)、
 (90%、1.9)、及び(90%、2.0)である。

【0062】

幾つかの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは、a) 少なくとも1つの流体注入口及び少なくとも1つの流体排出口の間に其れ等と流体連通して配設される複数のトラップ堰を含み得、各トラップ堰は、マイクロ流体デバイスを通過する流体中の懸濁物体を保持する様に構成され、i) 第1の接触時に懸濁された細胞又は物体を保持する個々のトラップ堰の捕捉確率は少なくとも0.05であり、ii) トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の流体抵抗の比は少なくとも0.4である。幾つかの場合には、上で指摘されている通り、捕捉確率は約0.05から約0.99の範囲であり得る。捕捉確率が約0.05から約0.99の範囲である幾つかの場合には、トラップ堰を通過する流体流路の物に対するトラップ堰をバイパスする流体流路の抵抗(R_A/R_T)は、約0.4から約2.0の範囲であり得る。一般的には、捕捉確率は抵抗比の関数であるので、捕捉確率及び抵抗比の幾つかの組み合わせは達成可能ではない。本開示に包含され得る捕捉確率及び抵抗比(R_A/R_T)の組み合わせの限定しない例は、

(0.05、0.4)、(0.05、0.5)、(0.05、0.6)、(0.05、0.7)、(0.05、0.8)、(0.05、0.9)、(0.05、1.0)、(0.05、1.1)、(0.05、1.2)、(0.05、1.3)、(0.05、1.4)、(0.05、1.5)、(0.05、1.6)、(0.05、1.7)、(0.05、1.8)、(0.05、1.9)、(0.05、2.0)、(0.1、0.4)、(0.1、0.5)、(0.1、0.6)、(0.1、0.7)、(0.1、0.8)、(0.1、0.9)、(0.1、1.0)、(0.1、1.1)、(0.1、1.2)、(0.1、1.3)、(0.1、1.4)、(0.1、1.5)、(0.1、1.6)、(0.1、1.7)、(0.1、1.8)、(0.1、1.9)、(0.1、2.0)、(0.2、0.4)、(0.2、0.5)、(0.2、0.6)、(0.2、0.7)、(0.2、0.8)、(0.2、0.9)、(0.2、1.0)、(0.2、1.1)、(0.2、1.2)、(0.2、1.3)、(0.2、1.4)、(0.2、1.5)、(0.2、1.6)、(0.2、1.7)、(0.2、1.8)、(0.2、1.9)、(0.2、2.0)、(0.3、0.4)、(0.3、0.5)、(0.3、0.6)、(0.3、0.7)、(0.3、0.8)、(0.3、0.9)、(0.3、1.0)、(0.3、1.1)、(0.3、1.2)、(0.3、1.3)、(0.3、1.4)、(0.3、1.5)、(0.3、1.6)、(0.3、1.7)、(0.3、1.8)、(0.3、1.9)、(0.3、2.0)、(0.4、0.4)、(0.4、0.5)、(0.4、0.6)、(0.4、0.7)、(0.4、0.8)、(0.4、0.9)、(0.4、1.0)、(0.4、1.1)、(0.4、1.2)、(0.4、1.3)、(0.4、1.4)、(0.4、1.5)、(0.4、1.6)、(0.4、1.7)、(0.4、1.8)、(0.4、1.9)、(0.4、2.0)、(0.5、0.4)、(0.5、0.5)、(0.5、0.6)、(0.5、0.7)、(0.5、0.8)、(0.5、0.9)、(0.5、1.0)、(0.5、1.1)、(0.5、1.2)、(0.5、1.3)、(0.5、1.4)、(0.5、1.5)、(0.5、1.6)、(0.5、1.7)、(0.5、1.8)、(0.5、1.9)、(0.5、2.0)、(0.6、0.4)、(0.6、0.5)、(0.6、0.6)、(0.6、0.7)、(0.6、0.8)、(0.6、0.9)、(0.6、1.0)、(0.6、1.1)、(0.6、1.2)、(0.6、1.3)、(0.6、1.4)、(0.6、1.5)、(0.6、1.6)、(0.6、1.7)、(0.6、1.8)、(0.6、1.9)、(0.6、2.0)、(0.7、0.4)、(0.7、0.5)、(0.7、0.6)、(0.7、0.7)、(0.7、0.8)、(0.7、0.9)、(0.7、1.0)、(0.7、1.1)、(0.7、1.2)、(0.7、1.3)、(0.7、1.4)、(0

10

20

30

40

50

. 7、1. 5)、(0. 7、1. 6)、(0. 7、1. 7)、(0. 7、1. 8)、(0. 7、1. 9)、(0. 7、2. 0)、(0. 8、0. 4)、(0. 8、0. 5)、(0. 8、0. 6)、(0. 8、0. 7)、(0. 8、0. 8)、(0. 8、0. 9)、(0. 8、1. 0)、(0. 8、1. 1)、(0. 8、1. 2)、(0. 8、1. 3)、(0. 8、1. 4)、(0. 8、1. 5)、(0. 8、1. 6)、(0. 8、1. 7)、(0. 8、1. 8)、(0. 8、1. 9)、(0. 8、2. 0)、(0. 9、0. 4)、(0. 9、0. 5)、(0. 9、0. 6)、(0. 9、0. 7)、(0. 9、0. 8)、(0. 9、0. 9)、(0. 9、1. 0)、(0. 9、1. 1)、(0. 9、1. 2)、(0. 9、1. 3)、(0. 9、1. 4)、(0. 9、1. 5)、(0. 9、1. 6)、(0. 9、1. 7)、(0. 9、1. 8)、(0. 9、1. 9)、(0. 9、2. 0)、(0. 95、0. 4)、(0. 95、0. 5)、(0. 95、0. 6)、(0. 95、0. 7)、(0. 95、0. 8)、(0. 95、0. 9)、(0. 95、1. 0)、(0. 95、1. 1)、(0. 95、1. 2)、(0. 95、1. 3)、(0. 95、1. 4)、(0. 95、1. 5)、(0. 95、1. 6)、(0. 95、1. 7)、(0. 95、1. 8)、(0. 95、1. 9)、(0. 95、2. 0)、(0. 99、0. 4)、(0. 99、0. 5)、(0. 99、0. 6)、(0. 99、0. 7)、(0. 99、0. 8)、(0. 99、0. 9)、(0. 99、1. 0)、(0. 99、1. 1)、(0. 99、1. 2)、(0. 99、1. 3)、(0. 99、1. 4)、(0. 99、1. 5)、(0. 99、1. 6)、(0. 99、1. 7)、(0. 99、1. 8)、(0. 99、1. 9)、及び(0. 99、2. 0)である。

【0063】

マイクロ流体デバイス作製：幾つかの実施形態では、本願に於いて開示されるマイクロ流体デバイスは、少なくとも2つの別々に作製された部品（例えば、(i)エッチング、エンボス加工、又はアブレーション加工された流体チャネルを組み込む基板、及び(ii)カバー又は蓋）を含み得、此れ等は爾後に一緒に機械的にクランプされるか、一時的に一緒に接着されるか、又は永久的に一緒に結合されるか何れかである。幾つかの実施形態では、本願に於いて開示されるマイクロ流体デバイスは、3つ以上の別々に作製された部品（例えば、(i)基板、(ii)流体チャネル層、及び(iii)カバー又は蓋）を含み得、此れ等は爾後に一緒に機械的にクランプされるか、一時的に一緒に接着されるか、又は永久的に一緒に結合されるか何れかである。幾つかの実施形態では、本願に於いて開示されるマイクロ流体デバイスは取り外し可能なカバー又は蓋を含み得る。好適な作製技術の例は、従来のマシニング、CNCマシニング、射出成型、3D印刷、レーザー若しくはダイカット加工されたポリマーフィルムの1つ以上の層の整列及び積層、又は幾つもの微細加工技術の何れか、例えばフォトリソグラフィ及びウェットケミカルエッチング、ドライエッチング、深堀り反応性イオンエッチング(DRIE)、又はレーザーマイクロマシニングを包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの全て又は或る部分はエラストマー材料から3D印刷され得る。

【0064】

本願に於いて開示されるマイクロ流体デバイスは、当業者に公知の種々の材料の何れかを用いて作製され得る。一般的に、用いられる材料の選択肢は作製技術の選択肢に依存し、逆も又同様であろう。好適な材料の例は、シリコン、溶融シリカ、ガラス、種々のポリマーの何れか、例えば、ポリジメチルシロキサン(PDMS；エラストマー)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリカーボネート(PC)、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレン(PP)、ポリエチレン(PE)、高密度ポリエチレン(HDPE)、ポリイミド、シクロオレフィンポリマー(COP)、シクロオレフィンコポリマー(COC)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、エポキシ樹脂、ノンステック材料、例えばテフロン(登録商標)(PTFE)、種々のフォトレジストの何れか、例えばSU8若しくは何れかの他の厚膜フォトレジスト、又は此れ等の材料の何れかの組み合わせを包含するが、此れ等に限定されない。

【0065】

幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの全て又は或る部分（例えば、カバー又は蓋）は光学的に透明な材料から作製されて、デバイス内にトラップされた細胞又は物体の観察及びモニタリングを容易化し得る。幾つかの実施形態では、複数の層を含むマイクロ流体デバイスの異なる層は異なる材料から作製され得る。例えば、流体チャンネル層がエラストマー材料から作製され得、デバイス基板及びカバープレートはガラス又は別の好適な材料から作製され得る。

【0066】

幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは、基板と複数のトラップ堰を含む流体チャンネル層とカバープレートとを包含する3層構造を含み得、此れに依って、マイクロ流体チャンバー（即ち、トラップの内側領域）の体積はチャンバーの断面積及び流体チャンネル層の厚さに依って決まる。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは合計で2つの層、3つの層、4つの層、5つの層、又は5つよりも多くの層を含み得る。

【0067】

上で指示されている通り、幾つかの実施形態では、流体チャンネル層の厚さは、デバイス内の流体チャンネル及びマイクロ流体チャンバー（例えば、「マイクロチャンバー」、「トラップチャンバー」、又はトラップの内側領域）の深さを決め、其れ故にトラップチャンバーの体積に影響するであろう。幾つかの実施形態では、例えば、流体チャンネル及びトラップフィーチャが基板にエッチング、エンボス加工、又はアブレーション加工される所では、デバイス内の流体チャンネル及びトラップチャンバーの深さはエッチング深さ、エンボス加工深さ、又はアブレーション加工深さに依って決まり、其れ故にトラップチャンバーの体積に影響するであろう。幾つかの実施形態では、例えば、流体チャンネル及びトラップフィーチャが基板にエッチング、エンボス加工、又はアブレーション加工される所では、流体チャンネル及びトラップチャンバーは同じ深さ又は異なる深さを有し得る。

【0068】

一般的に、開示されるデバイス内の流体チャンネル及び／又はトラップチャンバーの深さは約1 μm 及び約1 mmからの範囲であり得る。幾つかの実施形態では、流体チャンネル及び／又はトラップチャンバーの深さは少なくとも1 μm 、少なくとも5 μm 、少なくとも10 μm 、少なくとも20 μm 、少なくとも30 μm 、少なくとも40 μm 、少なくとも50 μm 、少なくとも100 μm 、少なくとも200 μm 、少なくとも300 μm 、少なくとも400 μm 、少なくとも500 μm 、少なくとも600 μm 、少なくとも700 μm 、少なくとも800 μm 、少なくとも900 μm 、又は少なくとも1 mmであり得る。幾つかの実施形態では、流体チャンネル及び／又はトラップチャンバーの深さは多くても1 mm、多くても900 μm 、多くても800 μm 、多くても700 μm 、多くても600 μm 、多くても500 μm 、多くても400 μm 、多くても300 μm 、多くても200 μm 、多くても100 μm 、多くても50 μm 、多くても40 μm 、多くても30 μm 、多くても20 μm 、多くても10 μm 、多くても5 μm 、又は多くても1 μm であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、流体チャンネル及び／又はトラップチャンバーの深さは約50 μm から約100 μm の範囲であり得る。流体チャンネル及び／又はトラップチャンバーの深さが、此の範囲内の何れかの値、例えば約95 μm を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0069】

一般的に、開示されるデバイス設計の流体チャンネル及びマイクロ流体チャンバーの寸法は、（i）デバイスを通ずる流体中の懸濁された細胞又は他の物体の一樣且つ効率的な送達及びトラップを提供する様に且つ（ii）細胞サンプル及び／又はアッセイ試薬消費を最小化する様に最適化されるであろう。一般的に、流体チャンネル又はマイクロ流体チャンバーの幅は約10 μm 及び約2 mmの間であり得る。幾つかの実施形態では、流体チャンネル又はマイクロ流体チャンバーの幅は少なくとも10 μm 、少なくとも25 μm 、少なくとも50 μm 、少なくとも100 μm 、少なくとも200 μm 、少なくとも300 μm 、少なくとも400 μm 、少なくとも500 μm 、少なくとも750 μm 、少なくとも1

mm、少なくとも1.5mm、又は少なくとも2mmであり得る。他の実施形態では、流体チャネル又はマイクロ流体チャンバーの幅は多くても2mm、多くても1.5mm、多くても1mm、多くても750 μm 、多くても500 μm 、多くても400 μm 、多くても300 μm 、多くても200 μm 、多くても100 μm 、多くても50 μm 、多くても25 μm 、又は多くても10 μm であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、流体チャネルの幅は約100 μm から約1mmの範囲であり得る。流体チャネルの幅が、此の範囲内の何れかの値、例えば約80 μm を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0070】

一般的に、開示されるデバイスに用いられるマイクロ流体チャンバー（例えば、トラップチャンバー）の体積は約1,000 μm^3 から約1 mm^3 の範囲であり得る。幾つかの実施形態では、マイクロ流体チャンバー体積は少なくとも1,000 μm^3 、少なくとも10,000 μm^3 、少なくとも100,000 μm^3 、少なくとも1,000,000 μm^3 、少なくとも0.2 mm^3 、少なくとも0.5 mm^3 、又は少なくとも1 mm^3 であり得る。幾つかの実施形態では、マイクロ流体チャンバー体積は多くても1 mm^3 、多くても0.5 mm^3 、多くても0.2 mm^3 、多くても1,000,000 μm^3 、多くても100,000 μm^3 、多くても10,000 μm^3 、又は多くても1,000 μm^3 である。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、マイクロ流体チャンバー体積は約100,000 μm^3 から約0.2 mm^3 の範囲であり得る。チャンバー体積が、此の範囲内の何れかの値、例えば約8,000 μm^3 を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0071】

幾つかの実施形態では、本開示のデバイス内に含有される複数のトラップ及び／又はチャンバーのトラップ堰及び／又はマイクロ流体チャンバーの数は、約1から約10⁶、又はより多くの範囲であり得る。幾つかの実施形態では、デバイス内のトラップ及び／又はチャンバーの数は少なくとも1、少なくとも10、少なくとも100、少なくとも1,000、少なくとも10⁴、少なくとも10⁵、又は少なくとも10⁶であり得る。幾つかの実施形態では、デバイス内のトラップ及び／又はチャンバーの数は多くても10⁶、多くても10⁵、多くても10⁴、多くても1,000、多くても100、又は多くても1であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、デバイス内のトラップ及び／又はチャンバーの数は約100から約10,000の範囲であり得る。デバイス内のトラップ及び／又はチャンバーの数が、此の範囲内の何れかの値、例えば約1,200を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0072】

幾つかの実施形態では、トラップ堰間のピッチ（又は間隔）は約100 μm から約1,000 μm 、又はより多くの範囲であり得る。幾つかの実施形態では、トラップ堰間のピッチは少なくとも100 μm 、少なくとも200 μm 、少なくとも300 μm 、少なくとも400 μm 、少なくとも500 μm 、少なくとも600 μm 、少なくとも700 μm 、少なくとも800 μm 、少なくとも900 μm 、又は少なくとも1,000 μm であり得る。幾つかの実施形態では、トラップ堰間のピッチは多くても1,000 μm 、多くても900 μm 、多くても800 μm 、多くても700 μm 、多くても600 μm 、多くても500 μm 、多くても400 μm 、多くても300 μm 、多くても200 μm 、又は多くても100 μm であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、トラップ堰間のピッチは約200 μm から約400 μm の範囲であり得る。トラップ堰間のピッチが、此の範囲内の何れかの値、例えば約220 μm を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0073】

別々の部品のセットとして作製される場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは、例えば適当な固定具及び留め具を用いて2つ以上の部品と一緒にクランプする事に依って（ガasketの使用あり若しくはなし）機械的に組み立てられ得るか、或いは、部品は、当業者に公知の種々の技術の何れか（用いられる材料の選択肢に依存する）を用いて、例えば陽極接合、熱接合、又はエポキシ系、アクリル系、シリコン系、UV硬化性、ポリウレタン系、若しくはシアノアクリレート系接着剤を包含する種々の接着剤又は接着フィルムの何れかの使用に依って一緒に組み立てられ、結合され得る。

【0074】

ポンプ又はバルブを含むマイクロ流体デバイス：多くの実施形態では、開示されるマイクロ流体デバイスは、デバイスの流体流れをコントロールする為の外部のポンプと共に用いられ得る。幾つかの実施形態では、開示されるマイクロ流体デバイスは、アクティブな流体コンポーネント、例えばポンプ（例えばマイクロポンプ）又はバルブ（例えばマイクロバルブ）を更に含んで、流体流れの追加のコントロールを提供して、例えば、特定の流体区画への流体送達のアドレス可能なコントロールを可能化し及び／又は特定の流体区画内の細胞、ビーズ、若しくは他の物体の単離を可能化し得る。幾つかの実施形態では、1つ以上のマイクロポンプ又はマイクロバルブがマイクロ流体デバイス其れ自体の内に作製されるか、又は其れと直接的に一体化させられ得る（例えば、マイクロ流体デバイスが、プレパッキングされたアッセイ緩衝液、アッセイ試薬、磁気ビーズにコンジュゲーションされた捕捉抗体又は捕捉プローブ、及び同類、又はデバイスの操作に用いられる他の流体をも又含む実施形態）。幾つかの実施形態では、上で指摘されている通り、1つ以上の従来のポンプ又はバルブが、デバイスの外部に、例えばマイクロ流体デバイスが接続する装置モジュールに包含されるコンポーネントとして在り、適当な配管を介してデバイスに接続され得る。本開示のデバイスへの使用に好適なマイクロポンプ（又は流体アクチュエーションメカニズム）の例は、電気機械的に若しくは空圧的にアクチュエーションされるミニチュアシリンジ若しくはプランジャーメカニズム、空圧的に若しくは外部のピストンに依ってアクチュエーションされる膜ダイアフラムポンプ、空圧的にアクチュエーションされる試薬及び緩衝液パウチ若しくはブラッダー、又は電気浸透流ポンプを包含するが、此れ等に限定されない。本開示のデバイスへの使用に好適なマイクロバルブの例は、変形可能な膜又はチューブ及び空圧的、磁氣的、電磁氣的、又は電気機械的（ソレノイド）アクチュエーションを用いて構築されたピンチバルブ、変形可能な膜フラップを用いて構築されたワンウェイバルブ、ミニチュアチェックバルブ、及びゲートバルブ、融解若しくは溶解し得るワックス若しくはポリマープラグ又は穿刺され得るポリマー膜を用いて作製されたワンショット「バルブ」、及び同類を包含するが、此れ等に限定されない。開示されるマイクロ流体デバイスの幾つかの実施形態では、デバイス内の複数のマイクロチャンバーの各マイクロチャンバーは各マイクロチャンバーの注入口（単数又は複数）及び／又は排出口（単数又は複数）に位置した1つ以上のマイクロバルブに依って個々にアドレス可能且つ単離可能であり、其れに依って、個々のマイクロチャンバーがアドレス可能な様式で可逆的にシールされる事を許すであろう。幾つかの実施形態では、複数のマイクロチャンバーの1つ以上のサブセットが、1つ以上のサブセットの為の共通の注入口（単数又は複数）及び／又は排出口（単数又は複数）に位置した1つ以上のマイクロバルブに依って、群としてアドレス可能且つ単離可能であろう。幾つかの実施形態では、デバイスの注入口及び排出口又は其の中の流体チャネルは、流体流れの方向性をコントロールする為の一体化されたチェックバルブを包含し得る。

【0075】

センサーを含むマイクロ流体デバイス：幾つかの実施形態では、本開示のマイクロ流体デバイス、又は其の中に含有される複数のチャンバーの1つ以上の個々のチャンバーは、デバイス内の細胞又は他の物体の微小環境を制御する事及び細胞生存能を維持する事への使用の為の1つ以上の追加のコンポーネントを更に含み得る。例は、加熱素子、冷却素子、温度センサー、pHセンサー、ガスセンサー（例えば、O₂センサー、CO₂センサー

10

20

30

40

50

）、電極等、又は其れ等の何れかの組み合わせを包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの実施形態では、本開示のマイクロ流体デバイスは、追加のコンポーネント又はフィーチャ、例えば、顕微鏡観察、顕微鏡イメージング、及び／又は分光モニタリング技術を容易化する為の透明な光学窓、灌流システムへの接続を為す為の注入口及び排出口ポート、電極又はセンサーを外部のプロセッサ又は電源に接続する為の電氣的接続等を更に含む得る。

【0076】

マイクロ流体デバイス内の細胞及び／又はビーズの区画化：下でより詳細に論じられる単一細胞分析法の幾つかでは、一旦其れ等が開示されるデバイス内のトラップフィーチャのアレイに依ってトラップされると、細胞を区画化する事が望ましくあり得る。第1に比較的低い流体力学的圧力を用いて細胞、ビーズ、又は他の物体をデバイス内のトラップ堰の全て又は或る部分の入口狭窄部にトラップし、爾後に、より高い流体力学的圧力のパルスを用いて細胞、ビーズ、又は他の物体（但し、其れ等は少なくとも幾らか変形可能である）をトラップの入口狭窄部から内側領域（又はチャンバー）に押し込む為の方法が本願に於いて開示される。細胞、ビーズ、又は他の物体をトラップの入口狭窄部から押し込む為に要求される圧力の大きさは様々であり得、種々の実験パラメータに依存し、細胞の型、細胞の成長ステージ（即ち細胞周期ステージ）、ビーズの型（サイズ及び組成）、狭窄部の寸法、細胞トラップデバイスの流体レイアウト等を包含するが、此れ等に限定されない。此の方法に依る使用に好適なデバイスの例は図2（a）及び2（b）、図4（a）及び4（b）、並びに図6～10に示されている。幾つかの場合には、用いられるトラップ堰設計は、トラップの内側領域に於けるトラップされた細胞又は物体の封じ込めを容易化する為のフリットをトラップの出口領域に含む得、フリット構造は、トラップされた細胞又は物体の最も小さい寸法よりも小さい空間寸法を有する1つ以上の狭窄部を含む。

【0077】

開示される方法の幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力（又はトラップ圧力）は約1 mbarから約200 mbarの範囲であり得る。幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力（又はトラップ圧力）は、少なくとも1 mbar、少なくとも5 mbar、少なくとも10 mbar、少なくとも20 mbar、少なくとも30 mbar、少なくとも40 mbar、少なくとも50 mbar、少なくとも60 mbar、少なくとも70 mbar、少なくとも80 mbar、少なくとも90 mbar、少なくとも100 mbar、少なくとも150 mbar、又は少なくとも200 mbarであり得る。幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力（又はトラップ圧力）は多くても200 mbar、多くても150 mbar、多くても100 mbar、多くても90 mbar、多くても80 mbar、多くても70 mbar、多くても60 mbar、多くても50 mbar、多くても40 mbar、多くても30 mbar、多くても20 mbar、多くても10 mbar、多くても5 mbar、又は多くても1 mbarであり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力は約10 mbarから約80 mbarの範囲であり得る。第1の流体力学的圧力が、此の範囲内の何れかの値、例えば約92 mbarを有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0078】

開示される方法の幾つかの実施形態では、第2の流体力学的圧力（又は区画化圧力）は約50 mbarから約1,000 mbarの範囲であり得る。幾つかの実施形態では、第2の流体力学的圧力（又は区画化圧力）は少なくとも50 mbar、少なくとも100 mbar、少なくとも200 mbar、少なくとも300 mbar、少なくとも400 mbar、少なくとも500 mbar、少なくとも600 mbar、少なくとも700 mbar、少なくとも800 mbar、少なくとも900 mbar、又は少なくとも1,000 mbarであり得る。幾つかの実施形態では、第2の流体力学的圧力（又は区画化圧力）は多くても1,000 mbar、多くても900 mbar、多くても800 mbar、多くても700 mbar、多くても600 mbar、多くても500 mbar、多くても4

00 mbar、多くても300 mbar、多くても200 mbar、多くても100 mbar、又は多くても50 mbarであり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、第2の流体力学的圧力は約200 mbarから約800 mbarの範囲であり得る。第1の流体力学的圧力が、此の範囲内の何れかの値、例えば約860 mbarを有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0079】

開示される方法の幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力（又はトラップ圧力）に対する第2の流体力学的圧力（又は区画化圧力）の比は約5×から約20×の範囲であり得る。幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力に対する第2の比は少なくとも5×、少なくとも10×、少なくとも12×、少なくとも14×、少なくとも16×、少なくとも18×、又は少なくとも20×であり得る。幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力に対する第2の比は多くても20×、多くても18×、多くても16×、多くても14×、多くても12×、多くても10×、又は多くても5×であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、第1の流体力学的圧力に対する第2の比は約12×から約16×の範囲であり得る。第1の流体力学的圧力に対する第2の比が、此の範囲内の何れかの値、例えば約13.5×を有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0080】

幾つかの実施形態では、細胞、ビーズ、又は他の物体をトラップ及び区画化する為の開示される方法は、少なくとも1回、2回、3回、4回、又はより多く反復され得、其れに依って、2つ以上の細胞、ビーズ、又は物体が1つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められる事を許す。幾つかの場合には、低圧力トラップ及び高圧力区画化ステップは、第1回に用いられた物と同じ細胞、ビーズ、又は他の物体を含む流体を用いて少なくとも1回反復される。幾つかの場合には、低圧力トラップ及び高圧力区画化ステップは、第1回に用いられた物とは異なる細胞、ビーズ、又は他の物体を含む流体を用いて少なくとも1回反復され、其の結果、1つ以上のトラップ堰の内側領域（単数又は複数）に閉じ込められた少なくとも2つの物体は、少なくとも2つの同じ細胞、少なくとも2つの異なる細胞、少なくとも2つの同じビーズ、少なくとも2つの異なるビーズ、若しくは少なくとも1つの細胞及び1つのビーズ、又は細胞、ビーズ、若しくは他の物体の何れかの他の組み合わせを含む。

【0081】

マイクロ流体デバイス内で細胞を培養する：幾つかの実施形態では、開示される方法、デバイス、及びシステムは、一旦其れ等がデバイス内のトラップ堰の全て又は或る部分に於いてトラップ及び区画化されると、単一細胞（又は細胞の群）を培養する為に用いられ得る。例えば、トラップ及び区画化ステップ後に、マイクロ流体デバイスの注入口は灌流システムに接続され得、此れが連続的に又は周期的に区画化された細胞に成長培地の供給を供給し、定められた温度は、一体化された又は外部の加熱／冷却メカニズムを用いて維持され、温度、pH、O₂濃度、CO₂濃度等が一体化された又は外部のセンサーを用いてモニタリングされ得る。

【0082】

幾つかの場合には、トラップ及び区画化された細胞は、開示されるデバイス内に於いて、1日から数ヶ月の範囲である時間の期間に渡って培養され得る。幾つかの場合には、デバイス内の細胞は、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも1週、少なくとも2週、少なくとも3週、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、又は少なくとも6ヶ月に渡って培養され得る。幾つかの場合には、デバイス内の細胞は、多くても6ヶ月、多くても5ヶ月、多くても4ヶ月、多くても3ヶ月、多くても2ヶ月、多くても1ヶ月、多くても3週、多くても2週、多くても1週、多くても6

日、多くても5日、多くても4日、多くても3日、多くても2日、又は多くても1日に渡って培養され得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、デバイス内の細胞は、1週から1ヶ月の範囲である時間の期間に渡って培養され得る。細胞がデバイスに依って、此の範囲内の何れかの値を有する時間の期間、例えば約2.5週に渡って培養され得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0083】

マイクロ流体デバイス内の細胞及び／又はビーズの単離：下でより詳細に論じられる単一細胞分析法の幾つかでは、一旦其れ等が開示されるデバイス内のトラップフィーチャのアレイに依ってトラップされると、細胞を区画化し及び単離する事両方が望ましくあり得る。其れ故に、一旦其れ等がデバイス内のトラップ堰の全て又は或る部分の入口領域又は内側領域に於いてトラップ、区画化、及び／又は培養されると、個々の細胞、ビーズ、若しくは他の物体、又は其れ等の組み合わせを単離する為の方法も又本願に於いて開示される。例えば、幾つかの場合には、トラップ堰（又は其れ等の内側領域）は、単離された細胞のリシス時に放出されたコンポーネントの拡散又は混合を防止する為に、非混和性の流体をデバイスに流す事に依ってシールされ得る。幾つかの場合には、非混和性の流体は油を含み得る。幾つかの場合には、非混和性の流体は空気を含み得る。

【0084】

非混和性の流体の使用：流体を今にマイクロ流体チャンネルから押し込む為に要求される圧力がチャンネルの最も小さい寸法に依って支配されると言う事実が原因で、油等の非混和性の流体を用いるトラップ及び／又は区画化された細胞の単離が可能化される。より小さい寸法は流体流れを誘導する為により高い圧力を要求する。更に其の上、開示されるデバイス内のマイクロ流体チャンネルは典型的には親水性であるので、もっとより大きい外部圧力が疎水性の油をチャンネルに押し込む為に要求される。油は、外部圧力が毛細管圧力を克服する為に要求される臨界値を超える時に流れるであろう。

$$P_{ext} = \gamma (w^{-1} + h^{-1})$$

式中、 γ は油／水界面の表面張力であり、 w 及び h は流体チャンネルの幅及び高さである。油／水界面について $\gamma \sim 50 \text{ mJ/m}^2$ 、且つバイパスチャンネルの幅及び高さが夫々 $25 \mu\text{m}$ 及び $20 \mu\text{m}$ の寸法を有すると仮定すると、バイパスチャンネルの流れを誘導する為に要求される臨界圧力は約 4.5 kPa (45 mbar)である。逆に、流体トラップの $5 \mu\text{m}$ 狭窄部を通る流れを誘導する為の臨界圧力は約 12.5 kPa (125 mbar)である。此れは、油に依ってマイクロウェルをシールする為の最適圧力が、図6に示されている物に類似のデバイスでは $5 \sim 10 \text{ kPa}$ ($50 \sim 100 \text{ mbar}$)の範囲であると言う事を指示している。空気シールはより高い差圧さえも用い得る。其れ故に、人は、油又は空気等の非混和性の流体がトラップ堰ではなくバイパスチャンネルを流れるであろうデバイス設計依存的な圧力の範囲を同定し得る。此のプロセスは、デバイス内のトラップされた区画化された各細胞又は細胞群が油又は空気界面に依って囲まれた水滴中にシールされる事を許す。

【0085】

マイクロ流体デバイスの流体力学的抵抗をチューニングして、トラップフィーチャを通る親水性の流体の高い流量を達成し、其れに依って、細胞又は他の物体が高い効率でマイクロ流体狭窄部にトラップされる事を許し乍ら、疎水性流体の流れを防止し、其れに依って、混合及びコンタミネーションを防止し且つ例えば単一細胞cDNAライブラリーの超並列調製の為の効率的な技術を可能化する媒体に依ってトラップされた細胞が単離される事を許す能力は、本開示の新規の特徴を構成する。本願に於いて開示される高トラップ効率デバイス並びに細胞単離及びバーコード化方法（後者は下で論じられる）の組み合わせは、ランダムなポアソン統計、例えばマイクロウェルへの沈降又は油に依って囲まれた水滴への封入に依拠する単一細胞分析技術について、不良な細胞トラップ効率の問題を克服する。本開示の方法及びデバイスは、フローサイトメーターを用いる細胞ソーティングに基づく既存の低スループットテクノロジー、又は既存のマイクロ流体に基づく単一細胞ト

ラップ及びバーコード化アプローチ、例えば、流体相中に分散されたバーコードを各細胞トラップに送達する為にポンプ及びバルブを用いるフリューダ임 (Fluidigm) コーポレーション (サウスサンフランシスコ, CA) に依って製造されるシステムの問題をも又克服する。

【0086】

ハイドロゲルの使用：一旦其れ等がデバイス内のトラップ堰の全て又は或る部分の入口領域又は内側領域に於いてトラップ、区画化、及び／又は培養されると、個々の細胞、ビーズ、若しくは他の物体、又は其れ等の組み合わせを単離する為の本願に於いて開示される別の方法は、半透性の生体適合性のハイドロゲルの使用を含む。幾つかの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスは取り外し可能な蓋を含み得、此れはデバイスの流体チャネル層に機械的にクランプ又は別様に接着される (即ち、細胞又は他の物体をデバイス内のトラップ堰のアレイに導入する為に要求される程程の流体力学的圧力に耐える様に、十分な力で)。開示されるデバイス内のトラップ又は区画化された細胞、ビーズ、又は他の物体は、半透性のハイドロゲル中にシールされ得、例えば、爾後に重合して流体層をハイドロゲルへと変換する架橋性の溶液をデバイスに流す事に依る。此れの後には、マイクロ流体デバイス蓋が取り外されて、トラップされた細胞、ビーズ、又は他の物体へのアクセスを許し得る。用いられ得るゲルの例は、ポリエチレングリコールゲル、ヒアルロン酸ゲル、ゼラチンメタクリレート、UV硬化性ゲル、チオール架橋性のゲル、アルギン酸ゲル、アガロースゲル等を包含するが、此れ等に限定されない。

【0087】

此のアプローチの有意な利点は、ハイドロゲルの半透性の性質を活用する能力である。此れは、小分子 (例えば、DNA 又は RNA 短鎖、リシス化学物質、酵素、及び他の逆転写試薬) の速い拡散を許し乍ら、長い DNA 又は RNA 分子、ウイルス粒子、大きい蛋白質、抗体、又は他の大きい高分子の拡散は妨げる。此の特徴は、例えば細胞ライセートが下でより詳細に論じられる通り爾後の DNA バーコード化ステップの間にハイドロゲル中にトラップされた儘に留まる事を許し、其れに依って細胞コンポーネントが固有の分子識別子と関連する事を許し、此れは爾後の核酸シーケンシング分析の間に特定の個々の細胞迄トレースされ得る。幾つかの場合には、デバイスの蓋を取り外し、ハイドロゲル中の固定化された細胞 (又は他の物体) に直接的にアクセスする能力は、細胞がハイドロゲル中に導入及びシールされた後に、人が DNA バーコード、細胞リシス緩衝液、及び／又は他の試薬 (例えば、インクジェット印刷又はディップペン・ナノリソグラフィー技術を用いる) を特定の細胞に印刷する事を許す。

【0088】

単一細胞及び細胞コンポーネントの分子バーコード化：単一細胞に由来する細胞コンポーネントの分子バーコード化の為に開示される高効率細胞トラップデバイスを用いる為の方法も又本願に於いて開示され、例えば、ファン (Fan) 等著 (2015 年), 「遺伝子発現サイトメトリーの為の単一細胞のコンビナトリアル標識 (Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry)」, サイエンス (Science), 第 347 巻 (第 6222 号): p. 1258367 に依って記載されている方法論を用いる。油中に封入された水滴中の DNA バーコードと併せて単一細胞ライセートを区画化する為の数個の既存のアプローチがある。此れ等は、殆どが、ポアソン統計に基づく細胞及びバーコード分子のランダムな分布に基づいており、細胞及びバーコードは油／水ドロップレット中にランダムに封入されるか (Drop-Seq 及び其の変形として公知)、又は細胞及びバーコードはマイクロ流体鋳型上にランダムに堆積させられ、油中にシールされる (Seq-Well 及び其の変形として公知)。此れ等のアプローチのどちらも、何れの液滴 (又はマイクロウェル) が何れの DNA バーコードを含有するのかをアприオリに決める事は出来ず、其れ故に、此れ等の技術は各細胞について画像に基づく表現型データをゲノムデータにリンクする事は出来ない。

【0089】

DNA バーコードを既知の場所に意図的に置く他のプラットフォーム、例えば、アルミ

ニウムプレートにマシニングされたマイクロウェルのアレイの底に固有のDNAバーコードを堆積させるウェーハジェン（WaferGen）（フリーモント，CA）プラットフォーム、又、96又は384ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルの底に固有のDNAバーコードを堆積させ、其れから単一細胞を各ウェルにソーティングするベクトン・ディッキンソン（Becton Dickinson）Resolve（商標）プラットフォームがある。最後に、上で指摘されている通り、フリーダigm（Fluidigm）プラットフォームは空圧ポンプを用いて流体分散液中のDNAバーコードを各マイクロ流体トラップに送達する。然し乍ら、此れ等のシステムは、ポアソンに基づくアプローチのトラップされた細胞密度、又は本開示の方法及びデバイスの物を達成する事が出来ない。

【0090】

上に記載されている新規のマイクロ流体デバイス内に単一細胞のアレイを編成する為の方法が本願に於いて開示され、此れは、（1）トラップフィーチャ及び相互接続するバイパスチャンネルのアレイを含むマイクロ流体デバイスに水系懸濁液中の細胞を流し、其れに依って単一細胞がアレイ内にトラップされる事を許す事と、（2）流体をリシス緩衝液及び他の生化学試薬に依って置き換える事と、（3）油又は空気等の非混和性の流体をマイクロ流体デバイスに流す事に依ってトラップされた細胞又は細胞ライセートを単離する事と、（4）其れ等が従来若しくは次世代シーケンシング技術又は其れ等の何れかの組み合わせを用いてプール及び分析された後に其れ等がトレースされる事を許す固有の分子バーコードに、細胞ライセートコンポーネントを取り付ける事とを含み得る。下でより詳細に論じられる通り、当業者に公知の種々の細胞リシス技術の何れかが用いられ得る。

【0091】

幾つかの場合には、固有の分子バーコードはパターンニングされたDNAバーコードを含み、此れ等は、トラップされた細胞の画像に基づく表現型解析と、其れから、単一細胞ライセートのmRNAを各トラップのDNAバーコードに添付されるcDNAに変換する事に依る各トラップされた細胞の分子的な転写物に基づくジェノタイピングとを両方許すであろう。

【0092】

幾つかの場合には、デバイスの組み立てに先行し、細胞トラップへの其の使用に先行して、固有の分子バーコードの複数コピーがデバイスの各トラップ堰内に其の場合成され得る（例えば光制御型合成技術、例えば、フォーダー（Fodor）等著（1991年），「光制御型の空間的にアドレス可能な並列化学合成（Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis）」，サイエンス（Science），第251巻（第4995号）：p. 767-773又はマクガル（McGall）等著（1996年），「半導体フォトレジストを用いる高密度オリゴヌクレオチドアレイの光制御型合成（Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists）」，米国科学アカデミー紀要，第93巻（第24号）：p. 13555-13560に依って記載されている物を用いる）。幾つかの場合には、各トラップ堰内で合成される固有の分子バーコード、例えばオリゴヌクレオチドバーコードは、当業者に公知の種々の光切断性の又は化学的に切断可能なリンカーの何れかを用いて、トラップ堰内の表面（例えば、トラップ堰の内側領域の基板表面）に共有結合的にテザリングされ得る。

【0093】

幾つかの場合には、デバイスの組み立てに先行し、細胞トラップへの其の使用に先行して、固有の分子バーコードの複数コピーがデバイスの各トラップ堰に印刷され得る（例えば、インクジェット印刷又はディップペン・ナノリソグラフィー技術を用いる）。幾つかの場合には、各トラップ堰に印刷される固有の分子バーコード（例えば、オリゴヌクレオチドバーコード）は、トラップ堰内の表面に非特異的に吸着させられ得るか、又は当業者に公知の種々の光切断性の又は化学的に切断可能なリンカーの何れかを用いてトラップ堰の表面に共有結合的にテザリングされ得るか何れかである。

【0094】

開示される方法は、細胞を導入する事に先行して、DNAバーコードを直接的にマイク

10

20

30

40

50

ロ流体デバイス内に印刷又は合成する為の方法と、細胞がハイドロゲル中に導入及びシールされた後にDNAバーコード、細胞リシス緩衝液、及び／又は他の試薬を特定の細胞に印刷する為の方法とを包含する。第1の技術（細胞編成に先行してバーコードを印刷する）の利点は、各細胞が既に正しい場所に位置した固有のバーコードを有するであろうと言う事である。第2の技術（細胞編成後にバーコードを印刷する）の利点は、例えばハイコンテント画像に基づくアッセイの使用に依って同定され得る興味深い細胞表現型を見せる細胞にDNAバーコード化を限定する事が可能であると言う事である。

【0095】

幾つかの場合には、固有の分子バーコードの複数コピーがビーズのライブラリー中の各ビーズにテザリングされ得る。ビーズは、例えば細胞あたり1つのビーズで、開示されるデバイス内に於いて細胞と共にトラップ及び区画化され得る。其の結果、リシス時に、細胞ライセートの各コンポーネントは、下流のシーケンシング分析後に起源の細胞を同定する分子バーコードに依ってタグ付けされ得る。幾つかの場合には、ビーズは磁気ビーズであり得る。

【0096】

幾つかの場合には、分子バーコードは、例えばmRNA分子のポリ（A）尾部に対するハイブリダイゼーションに依って、特異的な分子コンポーネントにハイブリダイゼーション又は結合する標的認識配列又は素子を含み得る。幾つかの場合には、バーコードは、抗原又は他の分子コンポーネントに特異的に結合する抗体又は他の分子認識素子にコンジュゲーションされたオリゴヌクレオチドバーコードを含み得る。

【0097】

幾つかの場合には、個々の細胞のアイデンティティをコードする固有の分子バーコード（各細胞が固有のバーコードとペアリングされる事を保証する為に、 $\sim 10^6$ 又はより多大なオーダーのバーコードライブラリーの総多様性）は、 $\sim 10^5$ 又はより多大なオーダーの多様性を含む分子計数機領域をもまた含み得る。其の結果、細胞内の各個々のmRNA分子（又は他のオリゴヌクレオチド標的分子、蛋白質標的等。分子バーコードの標的認識部分に依って定義される）は特異的に標識される様に成り、固有の分子計数機に基づいて計数され得る。例えば好適なリシス緩衝液をトラップチャンバーのアレイに導入する事に依って細胞リシスが行われた後に、放出されたmRNA分子（又は他の標的分子）は分子バーコード（此れ等は、トラップチャンバー内のビーズ若しくは表面にテザリングされた儘に留まり得るか、又は此れ等は溶液中に放出されてい得る）にハイブリダイゼーションし（又は結合し）、爾後の逆転写、増幅、及び／又はシーケンシング反応が行われ得る。幾つかの場合には、分子バーコードはビーズにテザリングされた儘に留まり、此れ等は爾後にアレイから回収され、逆転写、増幅、及びシーケンシングの為にプールされる。単一細胞遺伝子発現プロファイリング研究では、各単一細胞に由来する全てのポリアデニル化転写物からの相補的なDNA鎖（cDNA）が各単一のビーズの表面上に共有結合的にアーカイブされ、故に、何れかの選択された遺伝子が分析され得る。各細胞の遺伝子発現プロファイルは再構築され、此の時には、バーコード化された転写物が起源の細胞に割り当てられ、計数される。幾つかの実施形態では、例えばビーズの回収に先行して、逆転写反応が細胞トラップアレイのチャンバー内で行われ得る。幾つかの実施形態では、増幅反応（例えば、PCR増幅若しくは等温増幅反応）及び／又はシーケンシング反応（例えば、合成反応に依るサイクリックシーケンシング）も又、細胞トラップアレイのチャンバー内で行われ得る。幾つかの実施形態では、複数のチャンバー又はビーズ内の各個々のチャンバー又はビーズは2つ以上の標的分子認識配列又は素子を含み得る。幾つかの実施形態では、2つ以上のビーズがアレイ中の各単一細胞と共に区画化され得、異なるビーズは、異なるオリゴヌクレオチド又は蛋白質標的分子（例えば、mRNA分子、tRNA分子、ゲノムDNAの断片、特異的な受容体蛋白質又は酵素、及び同類）を対象とする異なる標的認識配列又は標的認識素子を含む。其れから、ビーズの回収が、各単一細胞に関連した異なる型の標的分子を計数する為の分子バーコードの下流処理を許すであろう。幾つかの実施形態では、1つ以上の分子検知ビーズ、例えばサイトカイン検知ビーズ、及び分子バ

10

20

30

40

50

ーコード化ビーズが（同時に又は次々に）単一細胞と共に区画化されて、例えば、サイトカイン分泌パターン又は化学的刺激への暴露後のサイトカイン分泌パターンの変化をモニタリングし、次に、遺伝子発現プロファイルの変化を分泌パターンの変化と相関させる為の細胞のリシス及び放出されたmRNA分子の分子バーコード化をし得る。

【0098】

上に記載されている新規のマイクロ流体デバイス内に単一細胞のアレイを編成する為の方法も又本願に於いて開示され、此れは、（１）トラップフィーチャ及び相互接続するバイパスチャネルのアレイを含むマイクロ流体デバイスに水系懸濁液中の細胞を流し、其れに依って単一細胞がアレイ内にトラップされる事を許す事と、（２）流体層をハイドロゲルへと変換する架橋性の溶液をマイクロ流体デバイスに流す事に依って、アレイ内のトラップされた細胞を単離する事と、（３）マイクロ流体デバイスの蓋を取り外して、ハイドロゲルにトラップされた細胞（又は他の物体）のアレイへの直接的なアクセスを可能化する事と、（４）其れ等が従来若しくは次世代シーケンシング技術又は其れ等の何れかの組み合わせを用いてプール及び分析された後に其れ等がトレースされる事を許す固有のバーコードに、細胞ライセートを取り付ける事とを含み得る。此のアプローチは、人がハイドロゲルの生得の多孔性を活用してmRNA転写物、長いDNA鎖、大きい蛋白質、ウイルス粒子等の様な大分子をトラップする事を許し乍ら、リシス試薬、酵素、DNA短鎖（例えば、100～200bpよりも短い物）、及び分子生物学プロトコールに典型的に用いられる他の試薬を包含する小分子のゲル内への通過を許す。

【0099】

上で指摘されている通り、一旦其れ等がトラップされると、種々の技術の何れかが細胞のリシスを行う為に用いられ得る。例は、熱、音響パワー、光学レーザーパルス、電場パルス、凍結融解サイクル、及び化学試薬の使用を包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの場合には、細胞リシスは、トラップチャンバーの油若しくは空気シールに先行して水溶液中のリシス緩衝液を注入する事に依って又はリシス緩衝液を油シール媒体中に溶解する事に依って達成され得る。

【0100】

我々は、デバイス内のトラップチャンバーが実験の終わりにアンシールされ得るという事をも又実証した。此れは、例えばビーズ又はバーコード化されたcDNAが細胞トラップデバイスから回収される事を許す。

【0101】

当業者に公知の種々の核酸シーケンシング方法及びプラットフォームの何れかが本願に於いて開示される分子バーコード化方法と共に用いられ得る。例は、ペアエンドシーケンシング、ナノポアシーケンシング、高スループットシーケンシング、ショットガンシーケンシング、ダイターミネーターシーケンシング、マルチプライマーDNAシーケンシング、プライマーウォーキング、サンガーデオキシシーケンシング、マクサム・ギルバートシーケンシング、パイロシーケンシング、tSMSシーケンシング、又は其れ等の何れかの組み合わせを包含するが、此れ等に限定されない。

【0102】

幾つかの実施形態では、高スループットシーケンシング法、例えば、ロシュ（Roche）454、イルミナSolexa、ABI-SOLID、ION-Torrent、コンプリート・ゲノミクス（Complete Genomics）、パシフィック・バイオサイエンス（Pacific Bioscience）、ヘリコス（Helicos）等のプラットフォーム、又はPollonatorプラットフォームを用いるサイクリックアレイシーケンシングが利用され得る。幾つかの実施形態では、シーケンシングはイルミナMiSeq、HiSeq、又は他のシーケンシングプラットフォームの使用を含み得る。幾つかの実施形態では、シーケンシングは、オックスフォード・ナノポア（Oxford Nanopore）に依って商品化されているMinIon又は関連シーケンシングデバイスの使用、ジェナプシス（Genapsys）からのGeniusシステムの使用、又はナノストリング（Nanosttring）からのHyb & Seq（商標）1分子ダイレクトデジタルシーケンシングテクノロジーを含み得る。幾つかの実施形態では、シ

ーケンシングは、ナノストリング（Nanostring）から利用可能な物等のデジタル空間プロファイリング（DSP）テクノロジーの使用を含み得る。

【0103】

イメージングに基づく表現型分析&ゲノムデータとの相関：細胞及び他の物体のトラップの為の開示されるマイクロ流体デバイスは、細胞表現型的な形質の高解像度イメージングに基づく分析を容易化する様に設計されており、幾つかの場合には、此れは其れから上で論じられている通り得られたゲノムデータと相関させられ得る。

【0104】

開示されるマイクロ流体デバイス内のトラップされた細胞の表現型分析を行う際には、当業者に公知の種々のイメージング技術の何れかが使用され得る。例は、明視野イメージング、暗視野イメージング、蛍光イメージング、ルミネッセンスイメージング、化学発光イメージング、燐光イメージング、位相差イメージング、定量的位相差イメージング、共焦点顕微鏡法イメージング、超解像度顕微鏡法イメージング、又は時間分解蛍光イメージングを包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの実施形態では、二波長励起及び発光（又は多波長励起又は発光）蛍光イメージングが行われ得る。幾つかの実施形態では、二光子蛍光イメージングが行われ得る。幾つかの実施形態では、コヒーレントラマンイメージングが行われ得る。

【0105】

幾つかの場合には、高スループット顕微鏡法イメージングシステムを用いて取得された一連の1つ以上の画像が前処理されて、例えば、画像コントラスト及び明るさを補正する、不均一な照明を補正する、光学収差（例えば、球面収差、色収差等）を補正する、ノイズを除去する、画像の夫々から物体（例えば、細胞又はサブセラー構造）を同定する、画像の夫々をセグメント化して同定された物体を単離する、画像をタイルセグメント化してコンポジット画像を作る、フィーチャ抽出（例えば、観察可能な細胞表現型的な形質等の物体特性の同定及び／又は定量化）、又は其れ等の何れかの組み合わせを行い得る。幾つかの場合には、デバイス内の複数のチャンバーが単一の画像内でイメージングされ得る。幾つかの場合には、デバイス内の複数のチャンバーの全て又は或る部分の高解像度画像を作る為に、一連の画像は「タイル化」され得る。

【0106】

幾つかの場合には、自動又は半自動画像処理が利用されて、トラップチャンバー内の細胞又はビーズを同定及び計数し、トラップチャンバー内の細胞又はビーズをモニタリングして、細胞又はビーズの定められたサブセット、例えば、死細胞、生細胞、細胞のペア、活発に分裂している細胞、特定の細胞表面マーカールを見せる細胞、蛍光マーカールに依って標識された細胞内蛋白質、蛍光化学物質検知ビーズ等を同定し得る。開示される方法を実装する際に用いられ得る画像処理アルゴリズムの例は、キャニーエッジ検出法、キャニー・デリチェエッジ検出法、一階勾配エッジ検出法（例えばソーベルオペレータ）、2次微分エッジ検出法、位相一致（位相コヒーレンス）エッジ検出法、他の画像セグメント化アルゴリズム（例えば、強度閾値法、強度クラスタリング法、強度ヒストグラムに基づく方法等）、フィーチャ及びパターン認識アルゴリズム（例えば、任意の形状を検出する為の一般化ハフ変換、円形ハフ変換等）、並びに解析学アルゴリズム（例えば、フーリエ変換、高速フーリエ変換、ウェーブレット分析、自己相関等）、又は其れ等の何れかの組み合わせを包含するが、此れ等に限定されない。

【0107】

細胞表現型解析の為の機械学習に基づく画像処理：幾つかの好ましい実施形態では、機械学習に基づくアプローチが用いられて、個々の細胞の検出及び計数、細胞表現型的な形質の分析、及びゲノムデータとの相関の為に、開示される方法の全て又は或る部分を実装し得る。幾つかの場合には、画像処理への機械学習に基づくアプローチが用いられて、例えば、より大きい画像からマイクロ流体デバイスの個々のトラップチャンバーの画像を自動的に整列及びクロッピングする、各チャンバーの特定の行及び列アドレスを決める、各時点に於けるチャンバー内の各細胞を同定する、各細胞の蛍光シグネチャーを分析してレ

10

20

30

40

50

ポーター遺伝子、蛋白質、若しくは他の分子的特徴の存在を決める、及び／又は其れから各チャンパー又はコロニー内の細胞数を（任意に、其れ等の分子的特徴のリストを併せて）プロットし得る。幾つかの場合には、機械学習に基づく画像処理が用いられて、分類基準の予め定められたセットに従って其れ等の表現型的な形質に基づいて細胞を分類し得る。幾つかの場合には、機械学習に基づく画像処理が用いられて、機械学習アルゴリズムに依って導出された分類基準のセットに従って其れ等の表現型的な形質に基づいて細胞を分類し得る。

【0108】

当業者に公知の種々の機械学習アルゴリズムの何れかは開示される方法への使用に好適であり得る。例は、教師あり学習アルゴリズム、教師なし学習アルゴリズム、半教師あり学習アルゴリズム、強化学習アルゴリズム、深層学習アルゴリズム、又は其れ等の何れかの組み合わせを包含するが、此れ等に限定されない。

10

【0109】

教師あり学習アルゴリズム：本開示の文脈では、教師あり学習アルゴリズムは、ラベル付き訓練データのセット（例えば、細胞表現型的な形質及び対応する既知の細胞分類型）の使用に依拠して、所与の細胞又は細胞サンプルの表現型的な形質のセットと細胞又は細胞サンプルの分類との間の関係性を推論するアルゴリズムである。訓練データはペアリングされた訓練例のセットを含む。例えば、各例は、従来の方法に従う所与の細胞の表現型的な形質データ及び齎される分類のセットを含む。

【0110】

教師なし学習アルゴリズム：本開示の文脈では、教師なし学習アルゴリズムは、ラベル付き細胞分類データとペアリングされていない細胞表現型的な形質のデータセットから成る訓練データセットから推論する為に用いられるアルゴリズムである。最も普通に用いられる教師なし学習アルゴリズムはクラスター分析であり、多くの場合に、これはプロセスデータ中の隠れたパターン又はグループ分けを見出す為の探索的データ分析に用いられる。

20

【0111】

半教師あり学習アルゴリズム：本開示の文脈では、半教師あり学習アルゴリズムは、ラベル付き及びラベルなし細胞分類データ両方を訓練に用いるアルゴリズムである（典型的には、比較的小量のラベル付きデータを大量のラベルなしデータと共に用いる）。

30

【0112】

強化学習アルゴリズム：本開示の文脈では、強化学習アルゴリズムは、例えば、細胞分類報酬関数を最大化する様に取りられるべき細胞表現型データ処理ステップのセットを決める為に用いられるアルゴリズムである。強化学習アルゴリズムはマルコフ決定過程（即ち、将来の挙動が過去の挙動単独からは正確に予測され得ず、寧ろランダムな偶然又は確率にも又依存する広い範囲の最適化問題を研究する為に用いられる数理モデル）を最適化する為に普通に用いられる。Q学習は強化学習アルゴリズムの1つのクラスの例である。正しい訓練データインプット／アウトプットペアも提示されず、準最適行動も明示的には補正されないと言う点で、強化学習アルゴリズムは教師あり学習アルゴリズムとは異なる。此れ等のアルゴリズムは、アップデートされたインプットデータに基づく可能なアウトカムの探索と過去の訓練の活用との間のバランスを見出す事に依って、リアルタイム性を焦点にして実装される傾向がある。

40

【0113】

深層学習アルゴリズム：本開示の文脈では、深層学習アルゴリズムは、人工ニューラルネットワーク（ANN）と呼ばれる人間の脳の構造及び機能に触発されたアルゴリズムであり、複数の隠れ層を含む特別に大きいニューラルネットワークであり、此れ等はインプットデータセット（例えば、細胞表現型的な形質のデータセット）をアウトプット（例えば細胞型）分類決定に対してマッピングする為に用いられる。人工ニューラルネットワークは下でより詳細に論じられる。

【0114】

50

人工ニューラルネットワーク&深層学習アルゴリズム：1つの好ましい実施形態では、開示される方法に使用される機械学習アルゴリズムは人工ニューラルネットワーク（ANN）又は深層学習アルゴリズムであり得る。従来の画像処理アプローチに用いられる画像処理ステップの1つ以上は、1つ以上の人工ニューラルネットワーク又は深層学習アルゴリズムの使用に依って拡張されるか又は置き換えられ得る。人工ニューラルネットワークは、何れかの型のニューラルネットワークモデル、例えばフィードフォワードニューラルネットワーク、動径基底関数ネットワーク、リカレントニューラルネットワーク、又は畳み込みニューラルネットワーク、及び同類を含み得る。幾つかの実施形態では、開示される方法は訓練済みANN又は深層学習アーキテクチャを使用し得る。幾つかの実施形態では、開示される方法はANN又は深層学習アーキテクチャを使用し得、訓練データセットは、単一のローカルな細胞分析システム（即ち、開示されるデータ処理方法を含むソフトウェアプログラムを走らせるコンピュータシステム若しくはプロセッサ）からの、複数のローカルな細胞分析システムからの、又はインターネットを介して接続されている複数の地理的に分散した細胞分析システムからのリアルタイム細胞分類データに依って連続的にアップデートされる。

10

【0115】

一般的に、人工ニューラルネットワークは、複数のノード層へと編成された相互接続されたノード群を含む（図14）。例えば、ANNアーキテクチャは少なくともインプット層、1つ以上の隠れ層、及びアウトプット層を含み得る。ANNは何れかの総数の層及び何れかの数の隠れ層を含み得、隠れ層は、1つのアウトプット値又はアウトプット値のセットに対するインプットデータのセットのマッピングを許す訓練可能なフィーチャ抽出器として機能する。本願に於いて用いられる深層学習アルゴリズムは、複数の隠れ層、例えば2つ以上の隠れ層を含むANNである。ニューラルネットワークの各層は幾つものノード（又は「ニューロン」）を含む。ノードは、インプットデータ（例えば、細胞表現型データ）から直接的に来るインプット又は先の層のノードのアウトプット何れかを受け取り、特定の操作、例えば総和操作を行う。幾つかのケースでは、インプットからノードへの接続は重み（又は重み係数）と関連する。幾つかのケースでは、ノードはインプット x_i 及び其れ等の関連する重みの全てのペアの積を総和し得る（図15）。幾つかのケースでは、図15に例示されている通り、重み付けされた和はバイアス b に依ってオフセットされ得る。幾つかのケースでは、ノード又はニューロンのアウトプットは、線形又は非線形関数であり得る閾値又は活性化関数 f を用いてゲーティングされ得る。活性化関数は、例えば、正規化線形ユニット（ReLU）活性化関数、リーキーReLU活性化関数、又は他の関数、例えば飽和双曲線正接、アイデンティティ、バイナリストップ、ロジスティック、 $\arctan$ 、 softsign 、パラメトリック正規化線形ユニット、指数関数的線形ユニット、 softplus 、ベントアイデンティティ、 softexponential 、シヌソイド、サイン、ガウス、若しくはシグモイド関数、或いは其れ等の何れかの組み合わせであり得る。

20

30

【0116】

ニューラルネットワークの重み係数、バイアス値、及び閾値、又は他の計算パラメータは、訓練フェーズに於いて訓練データの1つ以上のセットを用いて「教えられ」又は「学習され」得る。例えば、ANNが計算するアウトプット値（単数又は複数）（例えば細胞分類結果）が訓練データセットに包含される例と一致する様に、パラメータは訓練データセットからのインプットデータ及び勾配降下法又はバックプロパゲーション法を用いて訓練され得る。パラメータはバックプロパゲーションニューラルネットワーク訓練プロセスから得られ得、此れは本願に於いて開示される細胞分析方法を行う為に用いられる物と同じコンピュータシステムハードウェアを用いて行われ得るか、又は行われずにあり得る。

40

【0117】

他の具体的な型の深層機械学習アルゴリズム、例えば畳み込みニューラルネットワーク（CNN）（例えば、多くの場合に、マシンビジョンシステムからの画像データの処理に用いられる）も又、開示される方法及びシステムに依って用いられ得る。普通には、CN

50

Nは、異なる型の層、畳み込み、プーリング、アップスケーリング、及び全結合ノード層から成る。幾つかのケースでは、正規化線形ユニット等の活性化関数が層の幾つかに用いられ得る。CNNアーキテクチャでは、行われる各型の操作について1つ以上の層があり得る。CNNアーキテクチャは、合計で何れかの数の層を、且つ行われる異なる型の操作について何れかの数の層を含み得る。最も単純な畳み込みニューラルネットワークアーキテクチャはインプット層から始まり、次に畳み込み層及びプーリング層のシーケンスであり、各畳み込み層は1つ以上のフィルターをも又含み得、此れ等は翻って1つ以上の重み係数又は他の調整可能なパラメータを含み得る。幾つかの場合には、パラメータはバイアス（即ち、活性化関数がシフトする事を可能にするパラメータ）を包含し得る。幾つかのケースでは、畳み込み層の次はReLU活性化関数の層である。他の活性化関数、例えば、飽和双曲線正接、アイデンティティ、バイナリストップ、ロジスティック、 $\arctan$ 、 softsign 、パラメトリック正規化線形ユニット、指数関数的線形ユニット、 softplus 、ベントアイデンティティ、 softExponential 、シヌソイド、サイン、ガウス、シグモイド関数、及び種々の他の物も又用いられ得る。畳み込み、プーリング、及びReLU層は学習可能なフィーチャ抽出器として機能し得、全結合層は機械学習に基づく分類器として機能し得る。

【0118】

他の人工ニューラルネットワークと同じく、CNNアーキテクチャの畳み込み層及び全結合層は典型的には種々の計算パラメータ、例えば、重み、バイアス値、及び閾値を包含し、此れ等は上に記載されている通り訓練フェーズに於いて訓練される。

【0119】

一般的に、ANNのインプット層に用いられるノード数（これはインプットデータセットのサイズを決める）は約10から約100,000ノードの範囲であり得る。幾つかの場合には、インプット層に用いられるノード数は、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1000、少なくとも5000、少なくとも10,000、少なくとも20,000、少なくとも30,000、少なくとも40,000、少なくとも50,000、少なくとも60,000、少なくとも70,000、少なくとも80,000、少なくとも90,000、又は少なくとも100,000であり得る。幾つかの場合には、インプット層に用いられるノード数は、多くても100,000、多くても90,000、多くても80,000、多くても70,000、多くても60,000、多くても50,000、多くても40,000、多くても30,000、多くても20,000、多くても10,000、多くても5000、多くても4000、多くても3000、多くても2000、多くても1000、多くても900、多くても800、多くても700、多くても600、多くても500、多くても400、多くても300、多くても200、多くても100、多くても50、又は多くても10であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、インプット層に用いられるノード数は500から2,000の範囲であり得る。インプット層に用いられるノード数が、此の範囲内の何れかの値、例えば約512ノードを有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

【0120】

何らかの場合には、ANNに用いられる層の総数（インプット及びアウトプット層を包含する）は約3から約20の範囲であり得る。何らかの場合には、層の総数は少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、又は少なくとも20であり得る。幾つかの場合には、層の総数は多くても20、多くても15、多くても10、多くても5、多くても4、又は多くても3であり得る。此のパラグラフに記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、層の総数は約5から約15の範囲であり得る。ANNに用いられる層の総数が、此の範囲内の何れかの値、例えば8層を有し得ると言う事を

当業者は認識するであろう。

【0121】

幾つかの場合には、ANNに用いられる学習可能な又は訓練可能なパラメータの総数、例えば、重み係数、バイアス、又は閾値は、約1から約10,000の範囲であり得る。幾つかの場合には、学習可能なパラメータの総数は少なくとも1、少なくとも10、少なくとも100、少なくとも500、少なくとも1,000、少なくとも2,000、少なくとも3,000、少なくとも4,000、少なくとも5,000、少なくとも6,000、少なくとも7,000、少なくとも8,000、少なくとも9,000、又は少なくとも10,000であり得る。代替的には、学習可能なパラメータの総数は、100よりも小さい何れかの数、100及び10,000の間の何れかの数、又は10,000よりも多大な数であり得る。幾つかの場合には、学習可能なパラメータの総数は多くても10,000、多くても9,000、多くても8,000、多くても7,000、多くても6,000、多くても5,000、多くても4,000、多くても3,000、多くても2,000、多くても1,000、多くても500、多くても100、多くても10、又は多くても1であり得る。此の paragraphs に記載される下側及び上側の値の何れかは、本開示に包含される範囲を形成する様に組み合わせられ得る。例えば、幾つかの実施形態では、学習可能な又は訓練可能なパラメータの総数は約100から約5,000の範囲であり得る。用いられる学習可能なパラメータの総数が、此の範囲内の何れかの値、例えば約2,200パラメータを有し得ると言う事を当業者は認識するであろう。

10

【0122】

訓練データセット：上で指摘されている通り、従来の画像処理方法の何れのステップ（単数又は複数）が置き換えられるかに依存して、ANN又は深層学習アルゴリズムの訓練の為にインプットデータは種々のインプット値を含み得る。一般的に、ANN又は深層学習アルゴリズムの訓練の為にインプットデータは、実際の試験細胞サンプルについて細胞分類結果を決める為に用いられる物と同じインプット値セット又は類似のインプット値セットを含むデータであろう。インプットデータ値は、数値（例えば、整数値、実数値、浮動小数点数、画像からの個々のピクセル若しくはビニング後のピクセルについてのRGB若しくはグレースケール強度値）、英数字値、ASCII値等、又は其れ等の何れかの組み合わせを含み得る。一般的に、ANN又は深層学習アルゴリズムは、インプット（例えば表現型的な形質）データ及びペアリングされたアウトプット（例えば細胞分類）データの同じか又は異なるセットを含む1つ以上の訓練データセットを用いて訓練され得る。

20

30

【0123】

装置システム：装置システムも又本願に於いて開示され、此れは、本願に記載されるマイクロ流体細胞トラップデバイス、光源、画像センサー、流体流れコントローラ、温度コントローラ、ガス及びpHコントローラ、並びにプロセッサ、又は其れ等の何れかの組み合わせを含み得る。

【0124】

光源：種々の光源の何れかが、励起及び／又はイメージング光を提供する為に用いられ得、タングステンランプ、タングステンハロゲンランプ、アークランプ、レーザー、発光ダイオード（LED）、又はレーザーダイオードを包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの場合には、1つ以上の光源、並びに追加の光学コンポーネント、例えば、レンズ、フィルター、アパーチャー、ダイアフラム、ミラー、及び同類の組み合わせが、照明サブシステム又はモジュールを含むであろう。

40

【0125】

画像センサー：種々の画像センサーの何れかがイメージング目的で用いられ得、光ダイオードアレイ、電荷結合素子（CCD）カメラ、又はCMOS画像センサー、マイクロレンズアレイ、スキャナー、又は他の光学的検出手段を包含するが、此れ等に限定されない。イメージングセンサーは1次元（線形）又は2次元アレイセンサーであり得る。幾つかの場合には、1つ以上の画像センサー、並びに追加の光学コンポーネント、例えば、レンズ、フィルター、アパーチャー、ダイアフラム、ミラー、及び同類の組み合わせが、イメ

50

ージングサブシステム又はモジュールを含むであろう。

【0126】

多くの場合には、イメージングモジュールは光線をステアリング、シェーピング、フィルタリング、又は集光する為の種々の光学コンポーネントを包含するであろう。好適な光学コンポーネントの例は、レンズ、ミラー、プリズム、回折格子、色ガラスフィルター、狭域干渉フィルター、広域干渉フィルター、ダイクロイックリフレクター、光ファイバー、光ウェーブガイド、及び同類を包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの場合には、イメージングモジュールは、照明及び／又はイメージングサブシステムに対して相対的にマイクロ流体デバイスを移動する目的で、1つ以上の並進ステージ又は他のモーションコントロールメカニズムを更に含み得、逆も又同様である。

10

【0127】

流体流れコントローラ：幾つかの場合には、開示される装置システム（又は細胞分析プラットフォーム）は流体流れコントローラ又は灌流システムを含み得、此れは、マイクロ流体デバイスの流体流れを駆動する為に用いられる1つ以上の流体アクチュエーションメカニズムのプログラマブルなコントロールを提供する。開示される方法、デバイス、及びシステムへの使用に好適な流体アクチュエーションメカニズムの例は、1つ以上のデバイス注入口又は排出口に接続された流体リザーバに対する正又は負の圧力、動電力、エレクトロウェッティング力、パッシブな毛細管現象、膜及び／又は吸収パッドの使用に依って容易化された毛細管現象、及び同類の適用を包含する。

【0128】

多くの場合には、開示されるマイクロ流体デバイスを通る流体流れのコントロールは、1つ以上のポンプ（又は他の流体アクチュエーションメカニズム）及び1つ以上のバルブの使用に依って行われるであろう。此れ等は、幾つかの実施形態では、デバイスの外部に於いて、ユーザーに依ってコントロールされる装置モジュール内に格納されるであろう。好適なポンプの例は、シリンジポンプ、プログラマブルシリンジポンプ、蠕動運動ポンプ、ダイヤフラムポンプ、及び同類を包含するが、此れ等に限定されない。幾つかの場合には、システムの流体流れは、マイクロ流体デバイスに接続された外部の試薬及び緩衝液容器の1つ以上の注入口に於いて、又はマイクロ流体デバイス其れ自体の1つ以上の注入口に於いて正の空圧を適用する事に依ってコントロールされ得る。幾つかの場合には、デバイスの流体流れは、デバイスに接続された廃液リザーバの1つ以上の排出口に於いて、又はデバイスの1つ以上の排出口に於いてバキュームを引く事に依ってコントロールされ得る。好適なバルブの例は、チェックバルブ、二方又は三方電気機械式バルブ、二方及び三方空圧バルブ、並びに同類を包含するが、此れ等に限定されない。

20

30

【0129】

異なる流体流量が、マイクロ流体デバイス操作シーケンスの異なる点に於いて利用され得る。例えば、開示される方法、デバイス、及びシステムの幾つかの場合には、マイクロ流体デバイスの全て又は或る部分の体積流量は約 -10 ml/sec から約 $+10\text{ ml/sec}$ まで様々であり得る。幾つかの実施形態では、体積流量の絶対値は少なくとも 0.00001 ml/sec 、少なくとも 0.0001 ml/sec 、少なくとも 0.001 ml/sec 、少なくとも 0.01 ml/sec 、少なくとも 0.1 ml/sec 、少なくとも 1 ml/sec 、若しくは少なくとも 10 ml/sec 、又はより多くであり得る。幾つかの実施形態では、体積流量の絶対値は多くても 10 ml/sec 、多くても 1 ml/sec 、多くても 0.1 ml/sec 、多くても 0.01 ml/sec 、多くても 0.0001 ml/sec 、又は多くても 0.00001 ml/sec であり得る。所与の時点に於ける体積流量は、此の範囲内の何れかの値、例えば 1.2 ml/sec の順向きの流量、 -0.07 ml/sec の逆向きの流量、又は 0 ml/sec の値（即ち、停止した流れ）であり得る。

40

【0130】

幾つかの実施形態では、開示される細胞分析プラットフォームは、マイクロ流体デバイス内のユーザーに依って定められた温度を維持して例えば細胞が連続的な顕微鏡観察下に

50

ある間に延長された期間に渡ってインキュベーション及び維持される事を可能化する為に、又は2つ以上の定められたタイムインターバルに渡って2つ以上の定められた温度の間で温度をランプする為に、温度コントローラを更に含み得る。マイクロ流体デバイスに又は装置システムに組み込まれ得る温度コントロールコンポーネントの例は、抵抗加熱素子（例えば、酸化インジウム錫抵抗加熱素子）、ペルティエ加熱又は冷却デバイス、ヒートシンク、サーミスタ、熱電対、赤外光源、及び同類を包含するが、此れ等に限定されない。此れ等は電子的フィードバックループを用いて制御される。

【0131】

幾つかの場合には、温度コントローラは、特定のデバイス操作ステップを行う事に先行して、1つ以上の定められた調整可能な時間に於けるプログラマブルな温度変更を提供し得る。幾つかの場合には、温度コントローラは、定められたタイムインターバルに渡ってプログラマブルな温度変更を提供し得る。幾つかの実施形態では、温度コントローラは、定められた頻度及びランプ・レートに依る2つ以上の設定温度間の温度サイクリングを更に提供し得、其の結果、増幅反応の為にサーマルサイクリングが行われ得る。

【0132】

ガス& pHコントローラ：幾つかの実施形態では、開示される細胞分析プラットフォームは、ガス、例えばCO₂のユーザーに依って定められたパーセンテージ、又はマイクロ流体デバイスに送達されようとする緩衝液、成長培地、若しくは他の流体のユーザーに依って定められたpHを維持する為に、ガス及びpHコントローラ並びに関連コンポーネント（例えば、センサー）を含み得る。好適なセンサーの例は、非分散赤外（NDIR）CO₂センサー（溶存CO₂検知の為に全反射計測（ATR）光学系と併せて用いられる）、溶存CO₂検知の為に金属絶縁体半導体電界効果トランジスタ（MOSFET）型センサー（例えば、ゲート電極上に堆積したアクティブなCO₂検知材料としてPt-NiO薄膜を有する）、CO₂応答電極（例えば、メトラ・トレド（Mettler Toledo）のInPro 5000i溶存CO₂センサーシリーズ）、pH応答電極、流体中の溶存CO₂量又はpHに対応する色変化を生ずる流体中に浸漬されるパッド、例えば商標Presence（登録商標）センサースポット〔プレセンス・プレジジョン・センシング（PreSens Precision Sensing）GmbH, レーゲンスブルク, ドイツ〕で販売されている物、及び同類を包含する。CO₂及びpHのコントロールの為に、好適なセンサーがフィードバックループに用いられ、酸塩基滴定及びCO₂注入をコントロールする。幾つかの実施形態では、CO₂若しくは他のガス濃度又はpHが、デバイス内に含有される流体中に於いて直接的にモニタリングされ得る。幾つかの実施形態では、CO₂又は他のガス濃度が、デバイス内の流体と平衡にあるガス又は雰囲気中に於いてモニタリングされ得る。

【0133】

プロセッサ及びコンピュータシステム：多くの場合には、開示される装置システム（細胞分析プラットフォーム）は、コンピュータ（又はプロセッサ）及びコンピュータ読み取り可能な媒体を含むであろう。此れは、ユーザーインターフェースを提供する為に、並びに全てのシステム機能のマニュアル、半自動、又は全自動コントロール、例えば、流体流れコントロールサブシステム、温度・ガスコントロールサブシステム、イメージングサブシステム、及び並進ステージが包含される場合にはモーションコントロールサブシステムのコントロールの為にコードを包含する。多くの場合には、開示される装置システムは、上に記載されている通り従来の及び／又は機械学習に基づく画像処理を行う為にコードを包含するコンピュータ読み取り可能な媒体をも又含むであろう。幾つかの実施形態では、システムコンピュータ又はプロセッサは、装置システムの一体化されたコンポーネントであり得る（例えば、装置に埋め込まれたマイクロプロセッサ、フィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）、又はマザーボード）。幾つかの実施形態では、システムコンピュータ又はプロセッサは、スタンドアロンモジュール、例えばパーソナルコンピュータ又はラップトップコンピュータであり得る。幾つかの場合には、画像データ、センサーデータ、及び／又は他のシステムデータはローカルに保存され得る。幾つかの場合には、画像データ、センサーデータ、及び／又は他のシステムデータの全て又は或る部分はクラ

10

20

30

40

50

ウド系データベースに保存され得る。幾つかの場合には、画像処理の全て又は或る部分はローカルに又はクラウドで行われ得る。

【0134】

装置コントロールソフトウェアに依って提供される流体コントロール機能の例は、流体体積流量、流体流速、細胞サンプル（単数又は複数）及び／又はビーズサンプルの導入のタイミング及び期間、アッセイ試薬追加、化学的又は物理的刺激の送達、バルブ切り替え、及びリンスステップを包含するが、此れ等に限定されない。

【0135】

装置コントロールソフトウェアに依って提供される温度コントロール機能の例は、温度設定点（単数又は複数）を定める事、並びに温度変更のタイミング、期間、及びランプ・レートのコントロールを包含するが、此れ等に限定されない。

10

【0136】

装置コントロールソフトウェアに依って提供されるガスコントロール機能の例は、CO₂濃度のコントロールを包含するが、此れ等に限定されない。

【0137】

装置コントロールソフトウェアに依って提供されるイメージングシステムコントロール機能の例は、オートフォーカス能、照明又は励起光暴露時間及び強度のコントロール、画像取得速度のコントロール、暴露時間、並びにデータ保存オプションを包含するが、此れ等に限定されない。

【0138】

20

装置コントロールソフトウェアに依って提供される並進ステージシステムコントロール機能の例は、ステージ位置、向き、並びに其れ等のタイミング及び時間の期間のコントロールを包含するが、此れ等に限定されない。

【0139】

幾つかの実施形態では、複数の独立コントロール型の流れチャンネル及び一体化された流体バルブを含むマイクロ流体コントロールシステムの使用は、トラップアレイ内の単一細胞の微小環境のより良好なコントロールを提供し、人が異なる刺激化合物に対するアレイ化された細胞の暴露レベル及びタイミングをコントロールする事を可能化し得る。幾つかの実施形態では、細胞分析プラットフォームは、マイクロ流体チャンバーを必要に応じて開閉する為に、例えば細胞分泌物に対するビーズに基づく検知試薬の暴露をコントロールする為に、微細加工されたバルブシステムを利用し得る。

30

【0140】

適用：開示される細胞分析プラットフォームは、流れに基づくソーティング及び既存の流体トラップアプローチからの100倍よりも多大なスループットの増大に依って、単一細胞の画像に基づく表現型解析及び分子バーコード化を可能化する。更に其の上、開示されるシステムのイメージングに基づく表現型解析能は、Drop-Seq又は他のポアソンに基づくライブラリー調製アプローチを用いては実装され得ない。開示される細胞分析プラットフォームは腫瘍生検等の小さいサンプルと適合性であり、腫瘍応答の精密ドラッグスクリーニングの為に将来の臨床適用に用いられ得る。幾つかの適用では、開示される細胞分析プラットフォームはクロマチン分析に用いられ得る。

40

【0141】

開示される方法、デバイス、及びシステムの幾つかの場合には、例えば、ハイドロゲル中に固定化された単一細胞をリシス化学物質及び逆転写試薬に暴露し乍ら、ハイドロゲルの小さいポアサイズに依拠して単一細胞ライセートからのmRNAをローカルに閉じ込め、其れからmRNA分子をローカルに置かれたDNAバーコードに添付する事に依って、単一細胞に基づくcDNAライブラリーを調製する為にロバストな超並列ワークフローが達成される。幾つかの場合には、DNAバーコードは、単一細胞トラップあたり1つの固有の細胞同定バーコードで、マイクロ流体デバイス内に直接的に印刷又は合成され得る。方法は、トラップ内の表面に向かって短い距離を拡散するmRNA分子の能力に依拠する。幾つかの場合には、DNAバーコードは、使用に先行してマイクロ流体デバイス内に直

50

接的に印刷又は合成され、其れから、例えば其れ等を表面に取り付けた光切断性の又は化学的に切断可能なリンカーを切断する事に依って、デバイス内の表面から放出され得る。他の場合には、取り外し可能な蓋を含むマイクロ流体デバイスを用いて、単一細胞がハイドロゲル中にトラップ及び固定化され得、其れから、DNA バーコードが目当ての細胞上に直接的に印刷され得、此れ等は画像に基づく表現型解析に依って同定される。更に別の適用では、単一細胞がハイドロゲル中にトラップ及び固定化され、其れから蓋を取り外す事に依って薬物に対して暴露されて、単一細胞の表現型的な応答を同定し得る。観察され得る表現型的な応答の例は、サイトカインの放出、ウイルス粒子の排出、成長サイクルの変化、又は細胞の増殖を包含するが、此れ等に限定されない。ハイドロゲルの小さいポアサイズは、細胞及び分泌される何れかの高分子を有効に固定化し乍ら、人が各細胞の表現型変化を経時的に追跡する事を許す。此のアプローチは接着及び懸濁細胞両方に適用可能である。開示される方法及びデバイスと併せての分子バーコード化技術の使用は、人が単一細胞に於いて表現型的な形質又は其れ等の変化をゲノムデータ（例えば、プロファイリングされた遺伝子発現の変化）と相関させる事を許す。

【実施例】

【0142】

此れ等の例は、本願に於いて提供される請求項の範囲を限定する為ではなく、例示的な目的でのみ提供する。

【0143】

例1 — メッシュ流体ネットワークに於ける2つの固有の流れのレジームの予測

ラダー及びメッシュネットワークから成る流体力学的システムは電気回路の様にモデル化され得、圧力、流量、及び流体力学的抵抗は電圧、電流、及び電気抵抗に相当する。上で指摘されている通り、本開示のメッシュ様流体ネットワークの例が図4(a)及び4(b)に示されている。等価の抵抗回路が図5に示されている。

【0144】

メッシュネットワークは2つの型の抵抗器から成り、主流路に対して平行に整列した物、即ち R_A 及び R_T と、主流路に対して直角に整列した物、即ち R_B とを包含する。流れ分布は、アレイの各分岐点に於いて連続方程式を立てる事に依って解かれ得る。其処から、我々は、流れ方向に対してラテラルな周期的境界条件と流れ方向に対して平行な一定の圧力損失 ΔP とを各アレイ周期について適用する。其れ故に、此の方程式系は、最小の単位セルの4つのノードの圧力を解く事に帰着し、此れ等は、

【数3】

$$\begin{bmatrix} (2R_B^{-1} + R_A^{-1} + R_T^{-1}) & -2R_B^{-1} & -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) & 0 \\ -2R_B^{-1} & (2R_B^{-1} + R_A^{-1} + R_T^{-1}) & 0 & -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) \\ -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) & 0 & (2R_B^{-1} + R_A^{-1} + R_T^{-1}) & -2R_B^{-1} \\ 0 & -(R_A^{-1} + R_T^{-1}) & -2R_B^{-1} & (2R_B^{-1} + R_A^{-1} + R_T^{-1}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_{i,j} \\ P_{i+1,j} \\ P_{i,j+1} \\ P_{i+1,j+1} \end{bmatrix} = \Delta P \begin{bmatrix} R_A^{-1} \\ R_T^{-1} \\ -R_A^{-1} \\ -R_T^{-1} \end{bmatrix} \quad (3)$$

に依って与えられ、式中、 $P_{i,j}$ 、 $P_{i,j+1}$ 、 $P_{i+1,j}$ 、及び $P_{i+1,j+1}$ は単位セルの4つの固有のノードである。類似に、「2」の全ての場合を「1」に置き換える事と、 j を0に、 $j+1$ を1に割り当てる事に依って、無限ラダーネットワークがモデル化され得る。

【0145】

各ノードの圧力は、Eq. (3)を反転して、此のケースでは $P_{i,j}$ として選ばれる任意の点の圧力を用いて一般解を与える事に依って解かれ得る。

【数 4】

$$P_{i,j} = P_{i,j}$$

$$P_{i+1,j} = P_{i,j} - \frac{1}{2} \frac{R_A^{-1} - R_T^{-1}}{R_A^{-1} + 2R_B^{-1} + R_T^{-1}} \Delta P$$

$$P_{i,j+1} = P_{i,j} - \frac{1}{2} \frac{R_B^{-1} + R_A^{-1}}{R_A^{-1} + 2R_B^{-1} + R_T^{-1}} \Delta P \quad (4)$$

10

$$P_{i+1,j+1} = P_{i,j} - \frac{1}{2} \Delta P$$

【0 1 4 6】

其れから、我々は、トラップを通る流れ Q_T に対して相対的な 2 つのラテラル路の流れ Q_B の比を決め得、此れ等は、

【数 5】

$$\frac{Q_T}{2Q_B} = \frac{1}{2} \frac{R_B + R_A}{R_T - R_A} \quad (5)$$

20

に依って与えられる。

【0 1 4 7】

解は R_A 及び R_T の相対的な大きさの関数として符号を変化させるので、此の結果は流体流れの 2 つのレジームがあると言う事を指示している。先に研究されたトラップ設計の典型的なシナリオである $R_T > R_A$ の時には、流れ比は正であり、 R_T が殆ど R_A に等しい時には特異点にアプローチする。此の特異点は、ラテラル分岐を通るゼロ流れ R_B があり、流れの全てが専ら R_A 及び R_T 路を通して事実上直線移動する臨界点を定義する。此の現象を考える代替的な道は、 R_A 及び R_T が等しい抵抗を有する時には、隣り合うノード $P_{i,j}$ 及び $P_{i+1,j}$ の圧力が等しく、ラテラル分岐のゼロ流れに至ると言う事である。

30

【0 1 4 8】

$R_T < R_A$ の時には、先には報告されていない別の流れのレジームが起こり、此れは E_q 。(5) の比が負に成る事に至る。此の符号反転は、ラテラル分岐を通る流れ Q_B が実際には違った方向に割り当てられると言う事を指示している。其れ故に、此の流れのレジームでは、全ての流体分岐は合流してトラップを通して流れ、此れは理論上は完璧に近いトラップ効率に至る筈である。

【0 1 4 9】

例 2 — 細胞が複数のトラップフィーチャを含むメッシュ流体ネットワークに導入される充填プロセスのシミュレーション

40

マイクロ流体メッシュネットワーク内に捕捉された細胞の分布は、 m 個のトラップに依る n 個の細胞の捕捉を記述する条件付き確率ツリーとして、

- 1) 各トラップは 1 つの細胞のみを受け入れ得る
 - 2) 各細胞は永久的に其のトラップに捕捉される
 - 3) 細胞は注入口から排出口の方向（即ち、増大する行番号）で移動する
- と言う追加の制約に依って、モデル化され得る。

【0 1 5 0】

我々は、各試行投入について、未占有のトラップが細胞を捕捉する確率を記述する成功率 $q = [0, 1]$ があり、占有されたトラップが第 2 の細胞を捕捉するゼロ確率があると仮定する（少なくとも、此の一階モデルの目的の為に）。トラップアレイの各行は N 個の

50

行に配置されたM個のトラップを有すると仮定され、トラップアレイは $N \times M$ の寸法を有する。最後に、我々は、細胞が第 i 行に捕捉される確率が、其の行の占有されたトラップのパーセンテージ $C_i = [0, 1]$ に関係すると言う事を仮定する。式中、 $C_i = 1$ は完全に飽和している行を表し、 $C_i = 0$ は空である行である。また、表記の便宜の為に、我々は表記

【数 6】

$$C = 1 - C$$

を用いるであろう。

10

【0 1 5 1】

此处で、 P_i は細胞が第 i 行に依って捕捉される確率であり、一方で、細胞が第 $(i + 1)$ 行に依って捕捉される確率は、細胞が第 1 に先の i 行に依って捕捉されない確率、即ち $1 - \sum P_i$ に依って還元されると言う事を仮定する。其れから、各行に依る捕捉率は、

【数 7】

$$P_1 = q\bar{C}_1$$

$$P_2 = q\bar{C}_2(1 - P_1) = q\bar{C}_2(1 - q\bar{C}_1)$$

$$P_3 = q\bar{C}_3(1 - P_1 - P_2) = q\bar{C}_3(1 - q\bar{C}_1 - q\bar{C}_2(1 - q\bar{C}_1)) = q\bar{C}_3(1 - q\bar{C}_2)(1 - q\bar{C}_1)$$

20

...

$$P_N = q\bar{C}_N \left(1 - \sum_{i=1}^{N-1} P_i \right) = q\bar{C}_N \prod_{i=1}^{N-1} (1 - q\bar{C}_i) \quad (6)$$

としてモデル化され得る。

【0 1 5 2】

アレイの充填プロセスは近似速度式に依って解かれ得る。例えば、或る離散的なタイムインターバルの間に、 n 個の細胞が一定速度 γ でアレイに投入されると仮定する。其の結果、短いタイムインターバル Δt の間に、アレイに追加される細胞数は $n = \gamma \Delta t$ である。此のプロセスは、第 1 行について、

30

【数 8】

$$\begin{aligned} \Delta \bar{C}_1 &= -\frac{n}{M} P_1 = -\frac{n}{M} q\bar{C}_1 = -\frac{\gamma \Delta t}{M} q\bar{C}_1 \\ \frac{d\bar{C}_1}{dt} &= -\frac{\gamma}{M} q\bar{C}_1 \end{aligned} \quad (7)$$

に依って与えられる一次速度式に至り、式中、 M は各行のトラップ数である。類似に、 $i > 1$ の他の行の濃度 C_i の変化は、

【数 9】

40

$$\frac{d\bar{C}_N}{dt} = -\frac{\gamma}{M} q\bar{C}_N \prod_{i=1}^{N-1} (1 - q\bar{C}_i) \quad (8)$$

に依って与えられ、此れは上で導出された捕捉確率に基づく。此れ等の速度式は有限差分技術に依って数値的に解かれ、次の通り積分され得る。

【数 10】

$$\frac{d\bar{C}_j}{dt} \approx \frac{\bar{C}_j^{t+1} - \bar{C}_j^t}{\Delta t} = -\frac{\gamma}{M} q \prod_{i=1}^{j-1} (1 - q\bar{C}_i^t)$$

又は

$$\bar{C}_j^{t+1} = \bar{C}_j^t - \frac{\gamma \Delta t}{M} q \bar{C}_j^t \prod_{i=1}^{j-1} (1 - q\bar{C}_i^t) \quad (9)$$

【0153】

10

此の方程式系は反復的に解かれ、第1に $t = 1$ 時間ステップの解を見出し、其れからアレイの全ての行の濃度をアップデートする。其れから、時間ステップ $t = 2$ の各位置の濃度が反復的に決められる。数値的なアーチファクトを回避する為に、時間ステップは十分に小さく保つ。

【0154】

例3 — 細胞トラップ効率 v_s 、抵抗比を定量する

此れ等の予測を、 $0.25 > R_A / R_T > 1.5$ の範囲の異なる抵抗比を有する種々のマイクロ流体トラップアーキテクチャを設計及び作製する事に依って試験した。

【0155】

マイクロ流体デバイス作製：チャンネル壁を形成する為に深掘り反応性イオンエッチング (DRIE) を用いて、6" ウェーハ上にマイクロ流体チップを作製した。フォトレジスト (シップレイ (Shipley) 1813) を 500 rpm で 5 s 、 4000 rpm で 60 s に渡ってウェーハ上にスピンし、 115°C で 60 s に渡ってベーキングし、カールズス (Karl Suss) MA6 マスクアライナーに依って $80 \sim 100 \text{ mJ/cm}^2$ に暴露し、其れから *Micropos* MF319 デベロッパーに依って 30 s に渡って現像した。其れから、ウェーハを徹底的にクリーニングし、DRIE (SPTS の *Pegasus* ディープシリコンエッチング装置) に依って $15 \sim 20 \mu\text{m}$ の深さにエッチングした。其れから、フォトレジストマスクを剥し、ピラニア溶液 (200°C の $3:1$ の H_2SO_4 対 H_2O_2) 中でクリーニングした。次に、AZ9260 フォトレジストの $10 \mu\text{m}$ 厚層をウェーハの裏側に 500 rpm で 5 s 、 1800 rpm で 60 s に渡ってスピンし、 110°C で 60 s に渡ってベーキングし、 4000 mJ/cm^2 に暴露し、 300 s に渡って AZ400K 1:4 デベロッパーに依って現像した。此の層を用いて、シリコン貫通電極を作って、注入口及び排出口を確立し、チップをダイシングした。其れから、フォトレジストを剥がし、先に記載されている通り徹底的にクリーニングした。最後に、我々は硼珪酸ガラスをシリコンマイクロチャンネルに 300°C で3時間に渡って陽極接合した。合計で、各ウェーハは36個のデバイス (チップ) を与えた。此れ等は $30 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ の寸法を有する。

【0156】

マイクロ流体セットアップ：カスタムメイドのチップホルダーがアルミニウム (プロトラブズ (Protolabs), MN) にマシニングされ、底側ホルダー及び上側覗き窓を含んだ。底側ピースは $1/4" - 28$ ネジ穴を含有し、ねじ込み式ルアーロック (アイデックス (Idex), レークフォレスト, IL) に依ってチップへの接続が為される事を許した。チップホルダーも又アノダイズした (サートロニクス (Surtronics), ローリー, NC)。其の結果、其れ等は長期間に渡って細胞培養インキュベータ内に置かれ得る。チップホルダーを、モーター式 X-Y ステージ (ASI インストゥルメンツ (ASI Instruments), ユージーン, OR) にマウントされた3D印刷されたステージアダプターに固定した。此れは、自動フォーカスドライブ、対物レンズチェンジャー、及びフィルターチェンジャーを含有するライカ DM16000-B 倒立蛍光顕微鏡に締着した。排出口にマウントされ且つバキュームコントロールに依って駆動されるエルベシス (Elvesys) MK3 圧力コントローラ (パリ, フランス) に依って、流体をチップに導入した。

50

【0157】

高スループット顕微鏡法：我々は、マイクロ流体デバイス内の各チャンバーの画像を迅速に取る為のカスタムのMicro-Manager（オープンソース顕微鏡法ソフトウェア）コードを開発した。アルゴリズムは、第1にアレイの3つのコーナーを同定して平面の方程式を確立する事と、次に各チャンバーのXY位置及び最適な焦点面を含有するステージ位置リストを作る事と、其れから各チャンバーの画像をRetiga2000-Rカメラに依って取る事と、最後に画像をカスタムフォーマットでセーブ及び命名して、其れ等を機械学習に基づく画像処理アルゴリズムと適合性にする事とを包含した。

【0158】

結果：我々の実験では、アレイが部分的に充填された儘に留まる様に、我々は十分に少数の細胞を導入し、充填割合 v_s 、行番号の分析を可能化した。各トラップの占有をカスタムのコンピュータビジョンソフトウェアに依って同定した。其れから、2つの当てはめパラメータ、即ちトラップ効率 q 及び導入された細胞の総数に依って、実験データを E_q 、(9) に対して当てはめた。各マイクロ流体デバイス設計の1つの試行からの結果が、捕捉効率 v_s 、行番号として、増大する抵抗比の4つの異なるチップについて、 E_q 、(9) への最も良好な当てはめのオーバーレイと併せて図16(a)～16(d)に於いてプロットされている。 q の最も良好な当てはめ値が各図中に指摘されている。図17(a)～17(d)は、各設計のトラップ分布について、対応するヒートマップのプロットを提供している。 $R_A/R_T = 0.25$ 又は 0.42 と言う低い抵抗比では、トラップ効率は夫々6%及び16%である事が決まった。他方で、抵抗比が1を超えた時には、トラップ効率は劇的に増大し、此れ等の実験では70%程も高かった。

【0159】

例4 — マイクロ流体トラップアレイに依る長期的な細胞培養

次に、我々は、稀な細胞表現型を同定する為に十分に大きいスケールで個々のコロニーを成長させる能力を実証した。先に報告された方法に類似である穏やかなトラップ及び移入技術に依って、細胞をアレイに導入し、内側チャンバーに移入した（デュラ（Dura）等著（2014年），「変形性に基づくマイクロ流体細胞ペアリング及び融合（Deformability-based microfluidic cell pairing and fusion）」，ラボ・オン・ア・チップ（Lab on a Chip），第14巻：p. 2783）。具体的には、我々は第1に細胞をトラップの入口に捕捉し、次に、細胞が狭い狭窄部から掘り込み内側チャンバーに移動する事を引き起こす手短な圧力バーストに依って細胞をチャンバー内に移入した。デバイスが捕捉する様に設計された細胞型に依存して、狭窄部の幅は3～6ミクロンの範囲で調整した。一般則として、我々は、細胞の直径と比較してトラップ領域の幅の1：3比が理想的であり、細胞が確かにトラップされ、低圧（～20 mbar）では掘り込まれないが、より高圧（～300 mbar）では内側チャンバーに迅速に移入される事を許すと言う事を見出した。流れコントロールは排出口の負圧を調整する事に依って達成した。此れは、デッドボリュームに依る最小限の損失で、細胞が注入口リザーバに於いて直接的にピペッティングされる事を許した。加えて、一旦アレイが全く仕込まれると、此のアプローチは我々が注入口リザーバから細胞を洗浄する事を許した。アレイに仕込む為に要求される時間は細胞濃度及びチップの行数に依存する。然し乍ら、大抵の設計は～50行を有し、 10^6 細胞/mLのオーダーの細胞濃度を用いる事は、我々が5分以内にアレイに全く仕込む事を許した。

【0160】

一旦細胞がアレイ化されると、我々はMicro-Managerで書かれた我々の自動イメージングアルゴリズムを用いて、アレイ中の各チャンバーの高解像度明視野画像を取った。其の後に、チップを顕微鏡及び流れコントロール器具から取り外し、標準的な細胞培養インキュベータに移入し、細胞を7日及び以降に渡って其処に維持した。インキュベータ内にある間に、重力に依って駆動される流れに依って又はインキュベータ内に格納された圧力コントローラに依って何れかで、流れが連続的にチップ内に灌流された。重力流れのケースでは、我々は培地を充填された5 mL シリンジに注入口を接続し、排出口は

未充填のシリンジに接続した。我々は、チップの日あたり0.25～0.50 mLの流量を一貫して達成し、これは圧力ヘッドに依って生ずる～5 m b a rを誘導した。他の実験では、我々は圧力コントローラを用いて細胞培地を更新し、これは我々がチップを周期的に10分毎にリンスする事を許した。

【0161】

細胞を日あたり2回イメージングし、各イメージングサイクル後に直ちにインキュベータに戻した。各チップについて大体5～10分を要求した。7日後に、訓練済みのMask-RCNN画像セグメント化モデルを用いて、Pythonで書かれたカスタムのコンピュータビジョンソフトウェアに依ってイメージングデータセットを分析した。より大きい画像から個々のチャンバーを自動的に整列及びクロッピングし、其れから各チャンバーの特定の行及び列アドレスを決め、各時点に於けるチャンバー内の各細胞を選び出し、其れから各コロニーの細胞数をプロットする為に、我々はテンソルフロー（機械学習）に基づく画像セグメント化アルゴリズムを開発した。

10

【0162】

4日に渡るコントロール基剤に依るK562単一細胞クローンの増殖のタイムラプス画像が図18に示されており、赤いドットはコンピュータビジョンアルゴリズムに依って同定された細胞を示している。平均倍加時間は13.5時間であった。これはまとめた集団の～20時間と言う平均倍加時間よりも速い。より速く成長するクローンの一対の成長速度データが図19に示されている。

【0163】

此のアプローチに依って、我々は、各コロニーの成長速度の分布を自動的にアウトプットする事と此れ等をヒートマップ又は成長ヒストグラムの形態でプロットする事が出来た。1つの実証として、我々は、様々な濃度のイマチニブ[0.1 μ M、0.3 μ M、0.5 μ M]又はコントロールの存在下でK562細胞を成長させる実験を実施した。成長速度分布は図20にプロットされており、増大する薬物濃度に依って減少する成長速度と言う予想される傾向を示している。各分布について、外れ値薬剤耐性細胞は明瞭に此れ等のデータセットから拾われ得た。

20

【0164】

図21は隣り合うチャンバー内で成長する4つのコロニーの一連のタイムラプス画像を示している。

30

【0165】

図22(a)及び2(b)は、キザルチニブ（急性骨髄性白血病の処置について現在開発中の受容体チロシンキナーゼの小分子阻害剤）（図22(a)）又はコントロール培地（図22(b)）の存在下で成長したMOLM13細胞の画像を示している。単一のクローンが薬物の存在下で外生する事が観察される。

【0166】

例5 — 他の例

図23(a)及び23(b)は、マイクロ流体チップ上の個々の細胞並びに識別子及びマーカーを同定する為に機械学習アルゴリズムを用いて実施された画像セグメント化の使用を例示している。図23(a)：明視野画像。図23(b)：コンピュータ生成カラー画像が明視野画像上にオーバーレイされており、チップ上のマーカーの同定、機械学習に基づく分析を用いて分類された細胞の異なる場合、個々の細胞の境界、及び検出される物体が細胞であるかどうかの予測の信頼度のクオリティスコアを示している。

40

【0167】

図24はマイクロ流体チャンバー内にトラップされた単一細胞のアレイの画像を示している。此れの後、チャンバーをシールする為に空気が流体チャネルに吹送される。

【0168】

図25は、マイクロ流体チップ内にパターンニングされたオリゴヌクレオチド捕捉プローブに対する蛍光標識された標的プローブのハイブリダイゼーションを示す、蛍光及び明視野画像のオーバーレイを示している。

50

【0169】

図26(a)～26(c)は単一細胞アレイを形成する為のプロセスを例示している。単一細胞アレイは細胞を硬化性のハイドロゲルと併せてアレイに流す事に依って形成される(図26(a))。此の後に、蓋が剥がされて(図26(b))、サンプルへのアクセスを提供し得る(図26(c))。

【0170】

図27(a)及び27(b)は、流体中の懸濁された単一細胞又は他の物体の捕捉の為の複数のトラップフィーチャを含むマイクロ流体デバイスの限定しない例を提供している。図27(a)：トラップフィーチャ及びマイクロ流体チャンバーの100×100アレイを含むマイクロ流体デバイスの写真。図27(b)：本開示のマイクロ流体デバイス内のトラップフィーチャ及び流体チャンバーの顕微鏡写真。

10

【0171】

図28(a)～28(d)は、原理証明作業に用いられた低効率トラップデバイスのトラップを通る流れプロファイルの例と、単一細胞トラップ効率のデータとを提供している。図28(a)：デバイスの単一のトラップを通る計算上の流体流速。図28(b)：デバイスの単一のトラップを示す顕微鏡写真。図28(c)：デバイス内の10,000区画について単一細胞トラップ効率を示すヒートマップ。図28(d)：0、1、2、若しくは3、又はより多くの細胞がトラップされたマイクロ流体チャンバーの分布を示す円グラフ。

【0172】

20

図29は細胞アレイの繋ぎ合わせた蛍光画像を示している(細胞はFITC細胞トラッキング色素に依って標識されている)。挿入図：デバイス内にトラップされた個々の細胞を示す蛍光及び明視野画像の拡大オーバーレイ。

【0173】

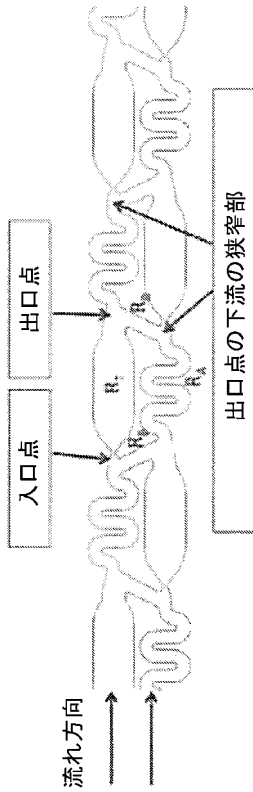
図30(a)～30(c)は、アレイ中の特定の細胞に化学物質を印刷する能力を実証する画像の限定しない例を示しており、これはマイクロ流体デバイスの開放的なアーキテクチャに依って可能にされる。図30(a)：蛍光標識を用いる単一細胞アレイ中の印刷された2つの並べられたパターン。図30(b)：蛍光標識を用いる細胞アレイ中の特定の細胞に印刷されたパターン。図30(c)：蛍光標識を用いる細胞アレイ中の特定の細胞に印刷されたパターン。

30

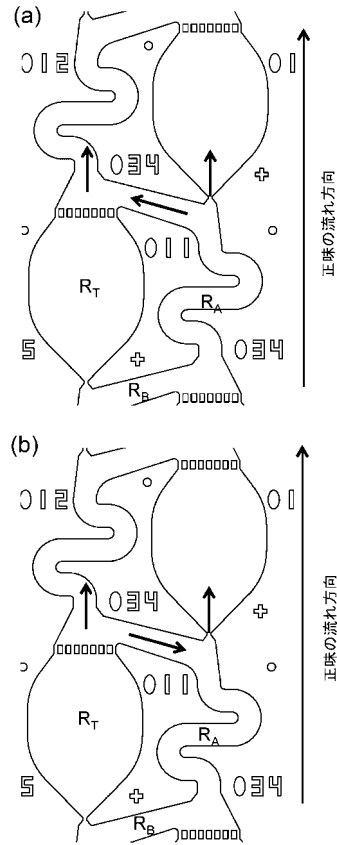
【0174】

本発明の好ましい実施形態を本願に示し記載したが、斯かる実施形態は例としてのみ提供されていると言う事は当業者には自明であろう。本発明から逸脱する事なしに、数々の変形、変更、及び置換が今や当業者には思い浮かぶであろう。本発明を実施する際には、本願に記載される本発明の実施形態の種々の代替が何れかの組み合わせで使用され得ると言う事は理解される筈である。次の請求項が本発明の範囲を定義すると言う事と、此れ等の請求項の範囲内の方法及び構造並びに其れ等の均等物が其れ等に依ってカバーされると言う事とが意図されている。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

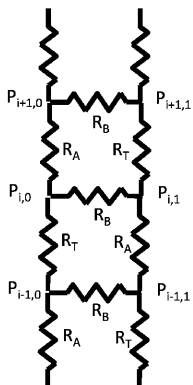
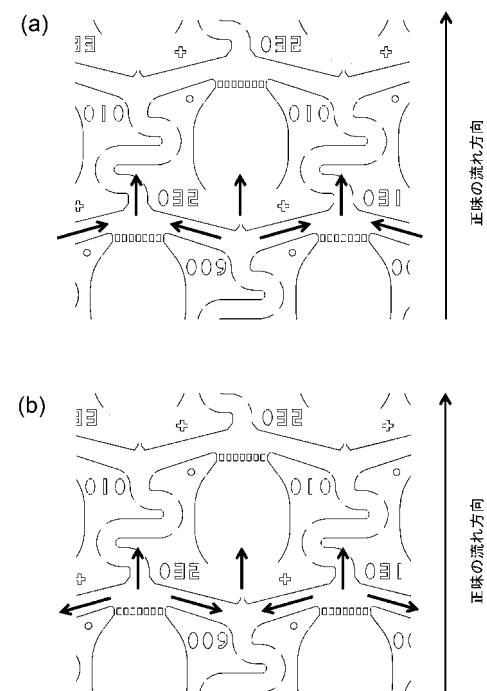


FIG. 3

【図 4】



【図 5】

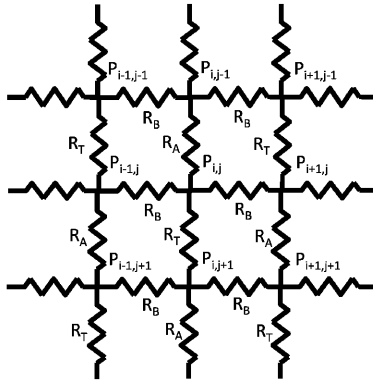


FIG. 5

【図 6】

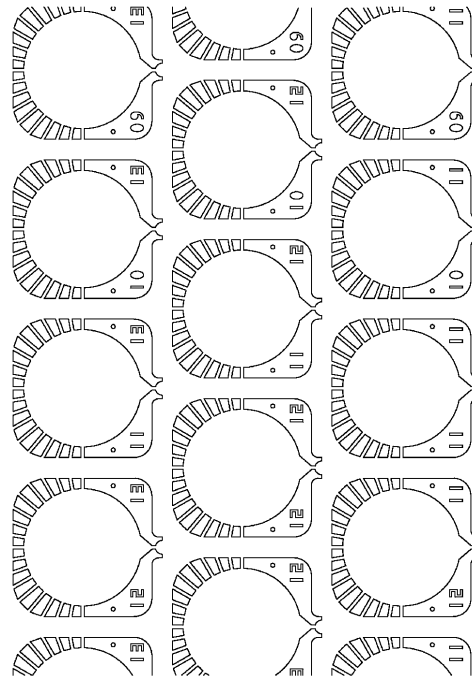


FIG. 6

【図 7】

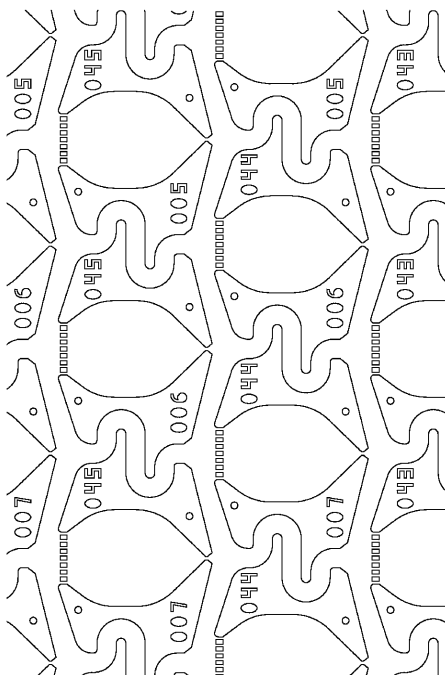
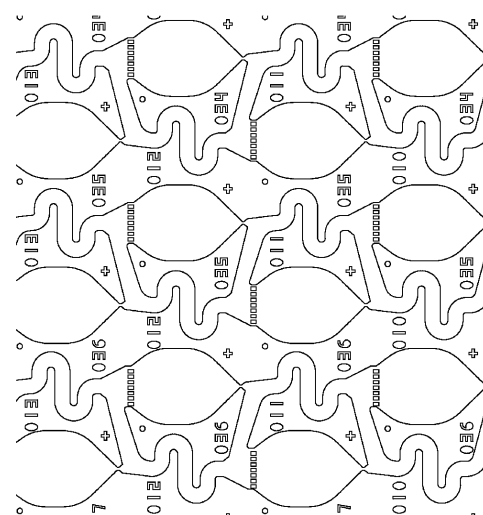


FIG. 7

【図 8】



【図 9】

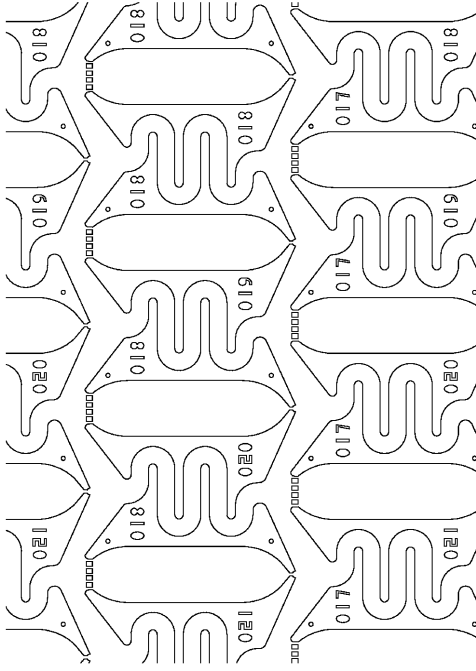


FIG. 9

【図 10】

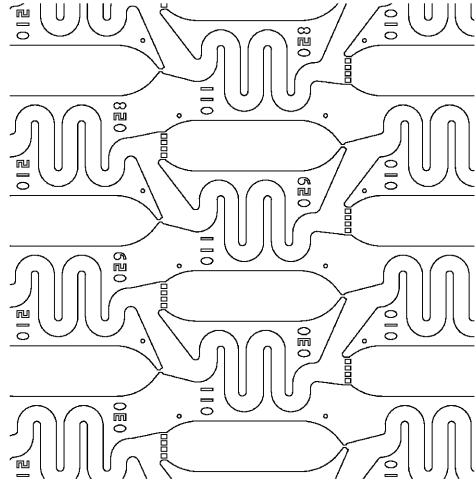


FIG. 10

【図 11】

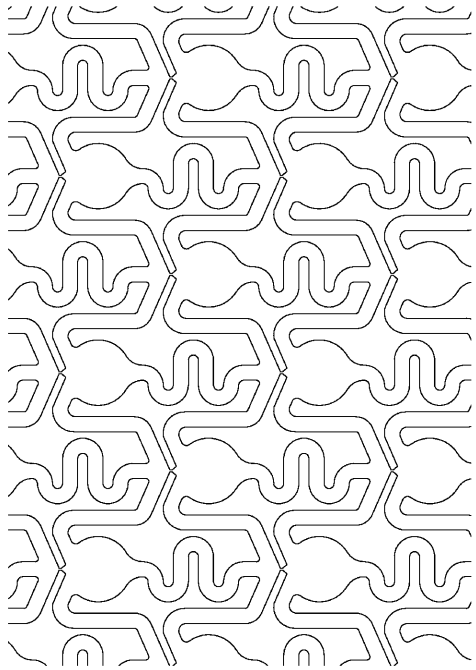


FIG. 11

【図 12】

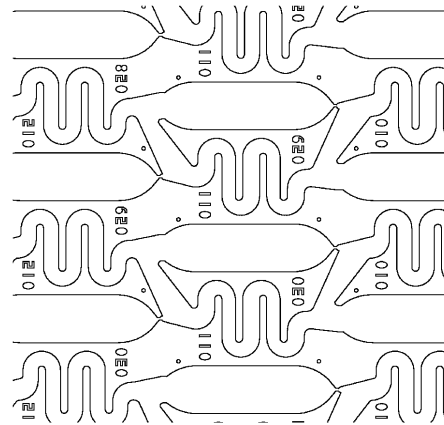


FIG. 12

【図 13】

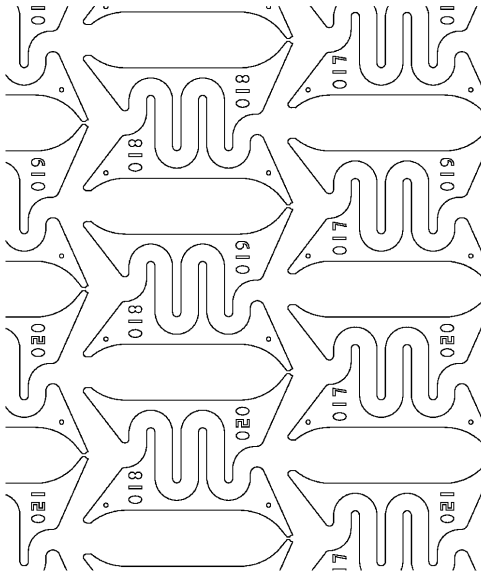
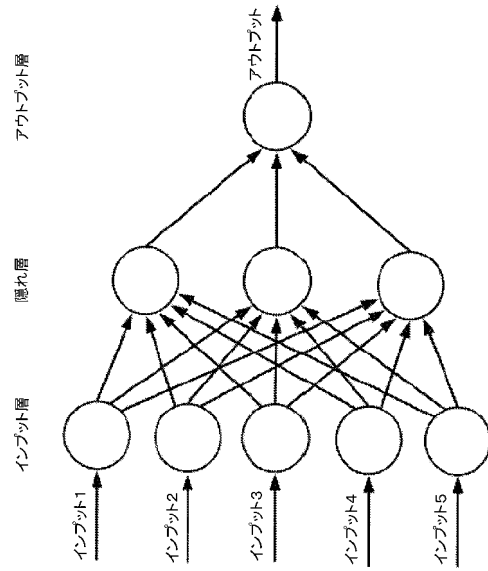
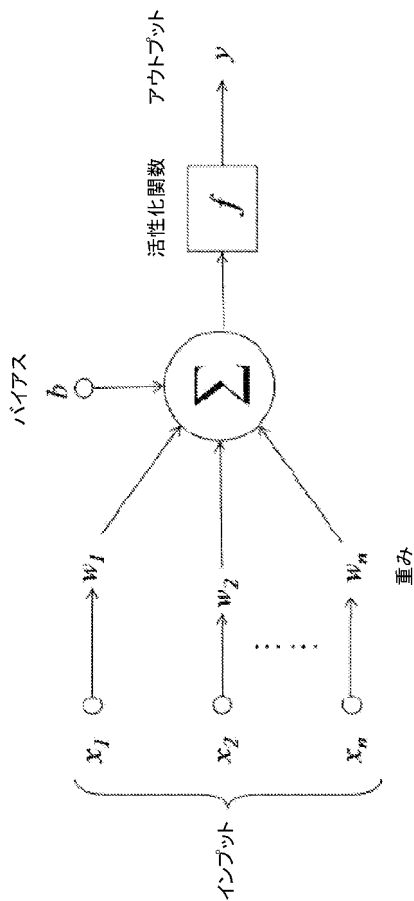


FIG. 13

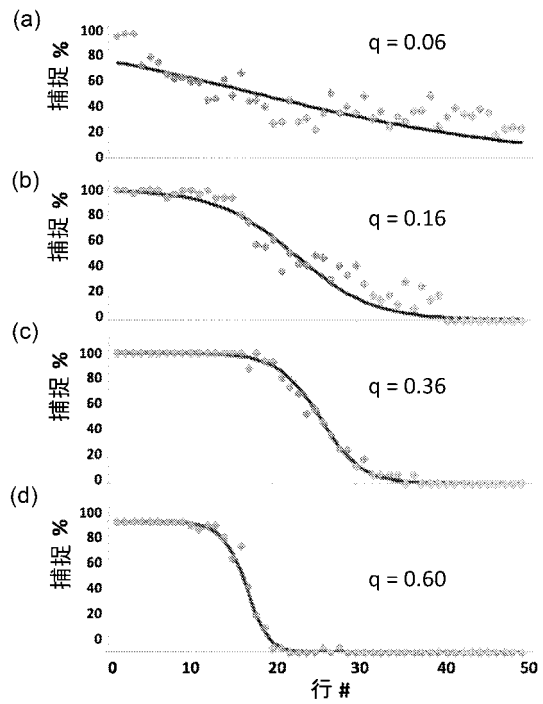
【図 14】



【図 15】



【図 16】



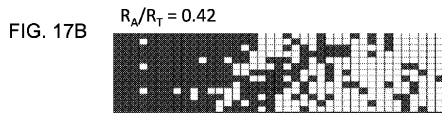
【図 17 A】

FIG. 17A

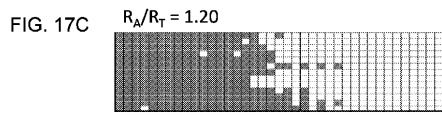
$R_A/R_T = 0.25$



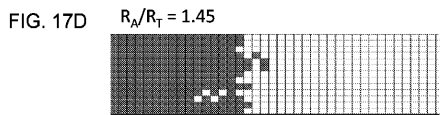
【図 17 B】



【図 17 C】



【図 17 D】



【図 18】

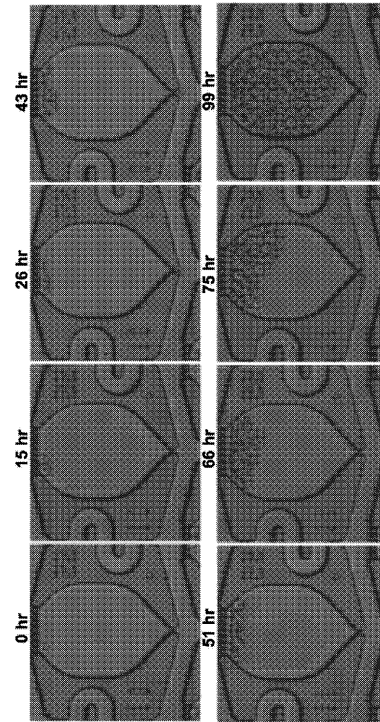
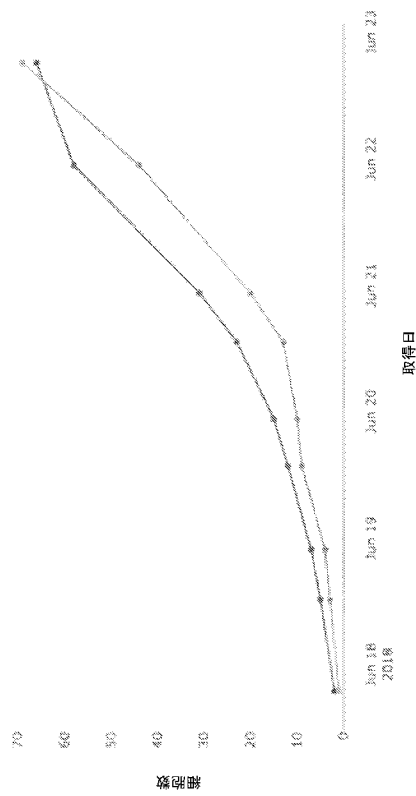
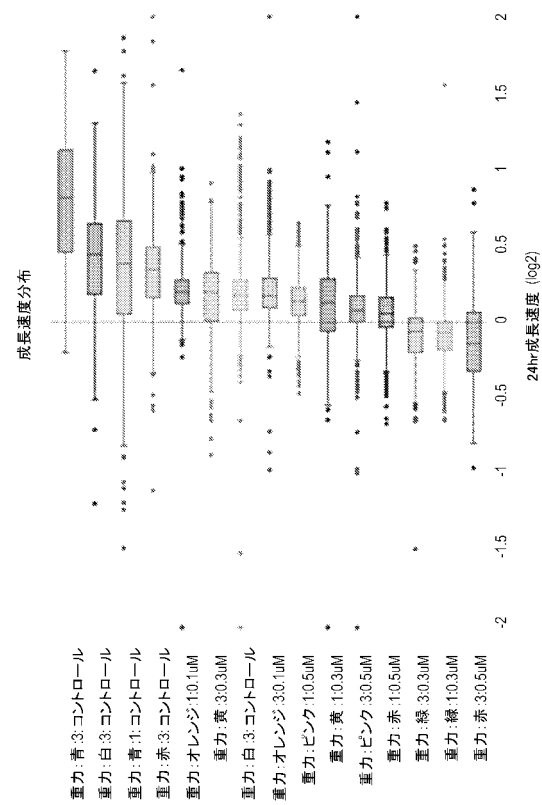


FIG. 18

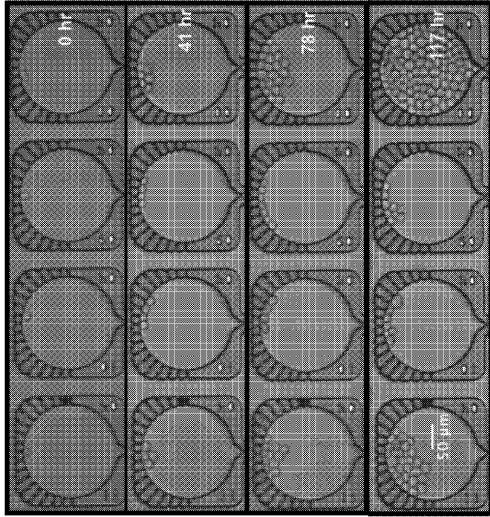
【図 19】



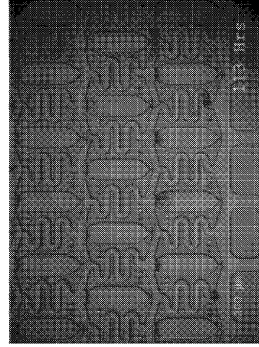
【図 20】



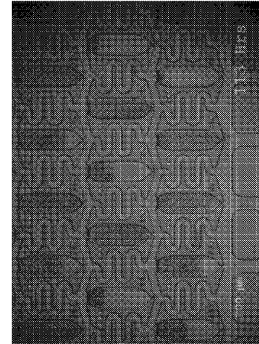
【図 2 1】



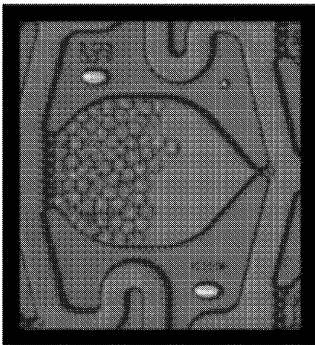
【図 2 2 A】



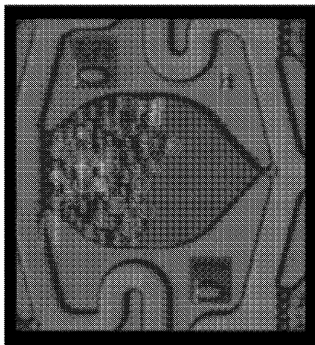
【図 2 2 B】



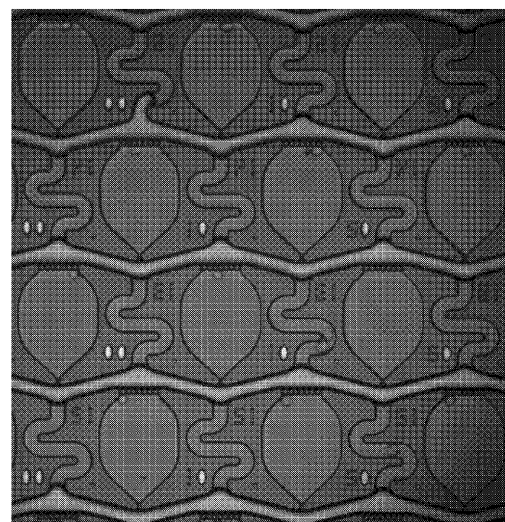
【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



【図 2 4】



【図 2 5】

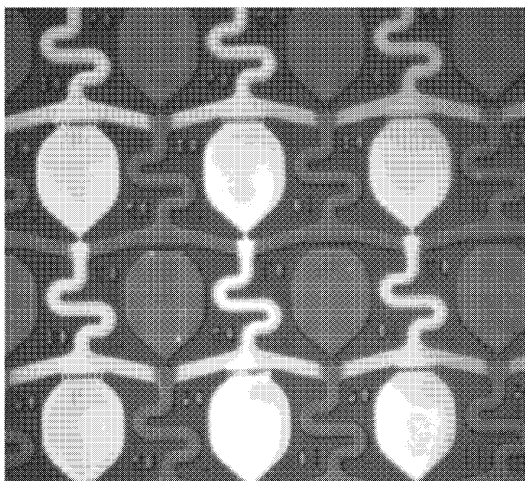
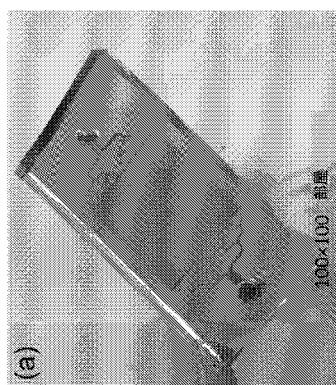
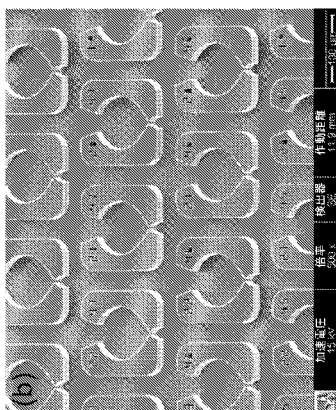
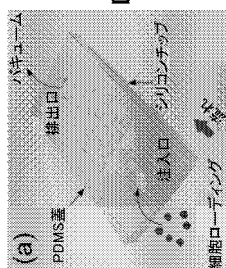
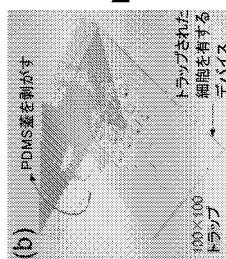
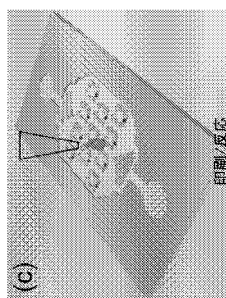


FIG. 25

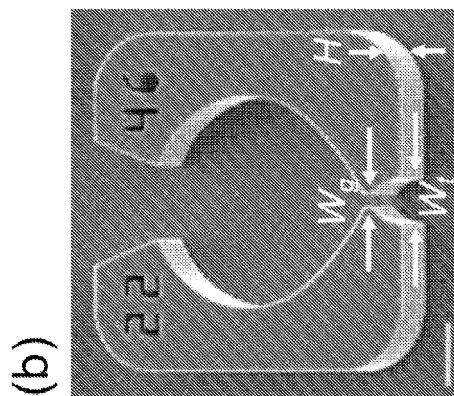
【図 2 7】



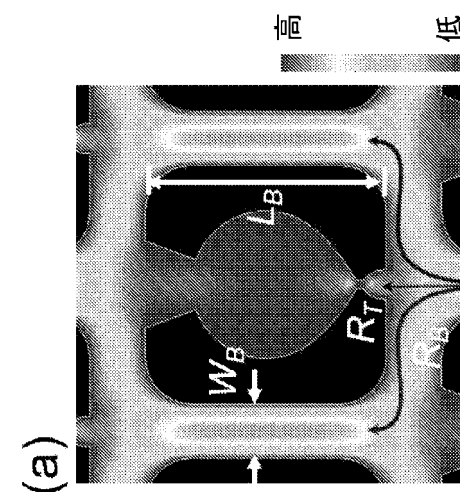
【図 2 6】



【図 2 8】

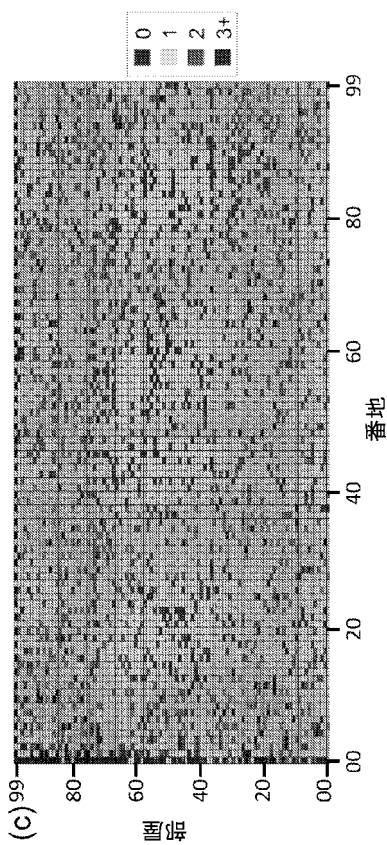


(b)

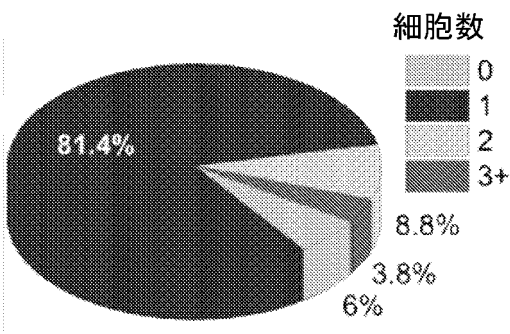


(a)

【図 2 8 (c) 】



【図 2 8 (d) 】



【図 2 9 】

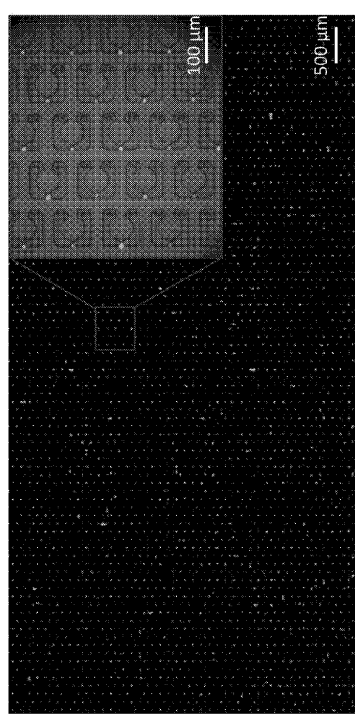


FIG. 29

【図 3 0 A 】

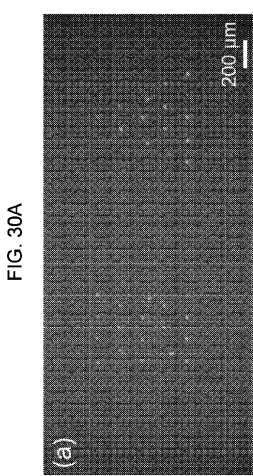


FIG. 30A

【図 30 B】

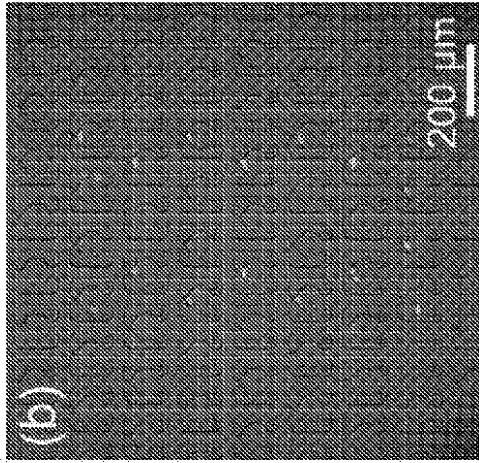


FIG. 30B

【図 30 C】

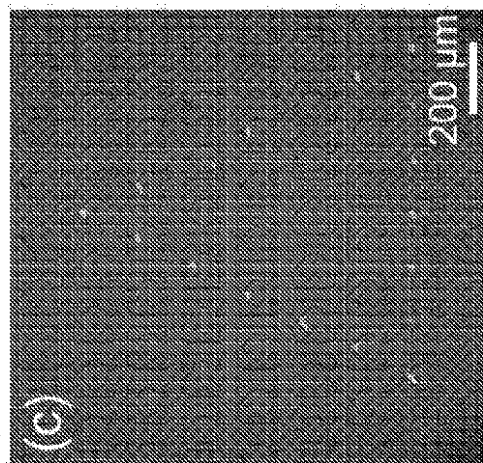


FIG. 30C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/56221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - B01L 3/00; B81B 1/00, 7/00 (2018.01) CPC - B01L 3/5027, 3/502715, 3/502746		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(DENG, B et al.) Parameter screening in microfluidics based hydrodynamic single-cell trapping. The Scientific World Journal. Vol. 2014. 2014; abstract; pages 2-3	1-2, 3/1-2
X	(KHALIL, AA et al.) Numerical Analysis of hydrodynamic flow in microfluidic biochip for single-cell trapping application. International Journal of Molecular Sciences. Vol. 16. No. 11. pp. 26770-26785. 09 November 2015; title; abstract; pages 26771, 26775, 26780	5-6, 7/5-6
A	(XU, X et al.) Optimization of microfluidic microsphere-trap arrays. Biomicrofluidics. Vol. 7. No. 1. January 2013; entire document	1-2, 3/1-2, 5-6, 7/5-6
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 another 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 24 November 2018 (24.11.2018)		Date of mailing of the international search report 13 DEC 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/56221

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4, 8-55
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 リ, イン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27705, ダラム, アーウィン ロード 2812 ス
イート 306 デューク ユニバーシティ内

(72)発明者 モッチマン, ジェフ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27705, ダラム, アーウィン ロード 2812 ス
イート 306 デューク ユニバーシティ内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB11 CC01 CC02 DG08 FA15

4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR72 QR77 QS34
QS36 QS39 QX01