

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7630836号  
(P7630836)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
C 1 2 M 1/28 (2006.01)	C 1 2 M 1/28	
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	Z
C 1 2 M 1/32 (2006.01)	C 1 2 M 1/32	
請求項の数 27 (全28頁)		

(21)出願番号	特願2021-575960(P2021-575960)	(73)特許権者	507044516 プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 , ケンブリッジ , クインシー ストリート 1 7
(86)(22)出願日	令和2年6月22日(2020.6.22)	(74)代理人	110001210 弁理士法人Y K I 国際特許事務所
(65)公表番号	特表2022-537396(P2022-537396 A)	(72)発明者	ルロ スコット アメリカ合衆国 マサチューセッツ ポス トン ロングウッド アベニュー 2 0 0 アルバート 4 2 5 ビー
(43)公表日	令和4年8月25日(2022.8.25)	(72)発明者	オクムス ブラク アメリカ合衆国 カリフォルニア フォス ター シティ リンカーン センター ドラ 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/US2020/038867		
(87)国際公開番号	WO2020/257746		
(87)国際公開日	令和2年12月24日(2020.12.24)		
審査請求日	令和5年6月19日(2023.6.19)		
(31)優先権主張番号	62/864,091		
(32)優先日	令和1年6月20日(2019.6.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 ハイスルーブット長期タイムラプス顕微鏡検査後の生細胞の分離

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞を分析し、1つ以上の目的細胞を抽出するのに使用されるマイクロ流体デバイスであって、

基材と、

前記基材に連結された細胞流動レイヤであって、

主要部分、および入口弁部分を有する増殖チャネルであって、前記増殖チャネルの前記入口弁部分が、前記増殖チャネルの前記主要部分内に向けて流れを選択的に制御するのを補助するように構成されている増殖チャネル、

主要部分、および出口弁部分を有する採集チャネルであって、前記採集チャネルの前記出口弁部分が、前記採集チャネルの前記主要部分から外に向けて流れを選択的に制御するのを補助するように構成されている採集チャネル、

前記増殖チャネルの前記主要部分と前記採集チャネルの前記主要部分とを連結する1つ以上のブリッジチャネルであって、前記1つ以上のブリッジチャネルのそれぞれが、前記増殖チャネルと前記採集チャネルとの間の流れを選択的に制御するのを補助するように構成されたブリッジ弁部分を含む1つ以上のブリッジチャネル、を含む細胞流動レイヤと、

前記細胞流動レイヤに連結された制御レイヤであって、(i)前記1つ以上のブリッジチャネルのそれぞれの前記ブリッジ弁部分、(ii)前記増殖チャネルの前記入口弁部分、および(iii)前記採集チャネルの前記出口弁部分を作動させるのを補助するように

10

20

構成されている制御レイヤと、  
を備え、

前記増殖チャンネルの前記主要部分に流体連結された1つ以上の細胞増殖トレンチを更に含み、

前記1つ以上の細胞増殖トレンチのそれぞれは、前記増殖チャンネルの前記主要部分の第1の側に隣接して配置され、

前記採集チャンネルの前記主要部分は、前記増殖チャンネルの前記主要部分の第1の側の反対側にある、前記増殖チャンネルの前記主要部分の第2の側に隣接して配置され、前記1つ以上の細胞増殖トレンチのそれぞれが、その中に1つ以上の細胞を含むように構成されることを特徴とする、マイクロ流体デバイス。

10

【請求項2】

それぞれの前記ブリッジ弁部分が第1の位置にあるとき、前記1つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれは開いているため、流体は前記増殖チャンネルと前記採集チャンネルとの間を流れることができ、

前記1つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれの前記ブリッジ弁部分が第2の位置にあるとき、前記1つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれは閉じられているため、流体は前記増殖チャンネルと前記採集チャンネルとの間を流れることが妨げられることを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項3】

前記増殖チャンネルの前記入口弁部分が第1の位置にあるとき、流体は前記増殖チャンネルの前記主要部分内に流入することが妨げられ、

前記増殖チャンネルの前記入口弁部分が第2の位置にあるとき、流体は前記増殖チャンネルの前記主要部分内に流入できることを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

20

【請求項4】

前記採集チャンネルの前記出口弁部分が第1の位置にあるとき、流体は前記採集チャンネルの前記主要部分から外に流出することが妨げられ、

前記採集チャンネルの前記出口弁部分が第2の位置にあるとき、流体は前記採集チャンネルの前記主要部分から外に流出できることを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

30

【請求項5】

前記増殖チャンネルは、第1の入口開口部および第2の入口開口部を有する入口部分を含み、

前記増殖チャンネルの前記入口弁部分が第1の位置にあるとき、流体は、前記増殖チャンネルの前記入口部分を通じて前記第1の入口開口部と前記第2の入口開口部との間を流れることができる一方で、前記増殖チャンネルの前記入口部分と前記増殖チャンネルの前記主要部分との間を流れることはできないことを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項6】

前記細胞流動レイヤは、上壁を含み、前記上壁は、前記基材から離間されており、かつ前記増殖チャンネルのそれぞれの上壁、前記1つ以上の細胞増殖トレンチ、前記採集チャンネル、および前記1つ以上のブリッジチャンネルは、前記細胞流動レイヤの前記上壁によって形成されており、

40

前記制御レイヤは、(i)前記1つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれの前記ブリッジ弁部分を作動させるのを補助するように構成された第1の制御チャンネルと、(ii)前記増殖チャンネルの前記入口弁部分および前記採集チャンネルの前記出口弁部分を作動させるのを補助するように構成された第2の制御チャンネルとを更に含むことを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項7】

前記1つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれの前記ブリッジ弁部分は、前記1つ以上の

50

ブリッジチャンネルのそれぞれの前記上壁の少なくとも一部によって少なくとも部分的に形成されていることを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 8】

前記制御レイヤの前記第 1 の制御チャンネルは、前記 1 つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれの前記上壁と少なくとも部分的に重なっており、

前記 1 つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれの前記上壁は、前記第 1 の制御チャンネルが加圧されることにより、前記基材に向かって潰れて、流体が前記 1 つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれを通じて流れることを妨げるように構成されていることを特徴とする、請求項 7 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 9】

前記増殖チャンネルの前記入口弁部分は、前記増殖チャンネルの前記主要部分に隣接する前記増殖チャンネルの前記上壁の少なくとも一部によって少なくとも部分的に形成されていることを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 10】

前記制御レイヤの前記第 2 の制御チャンネルは、前記増殖チャンネルの前記入口弁部分を形成する前記増殖チャンネルの前記上壁の前記一部と少なくとも部分的に重なっており、

前記増殖チャンネルの前記入口弁部分を形成する前記増殖チャンネルの前記上壁の前記部分は、前記第 2 の制御チャンネルが加圧されることにより、前記基材に向かって潰れて、流体が前記増殖チャンネルの前記主要部分に流入することを妨げるように構成されていることを特徴とする、請求項 9 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 11】

前記採集チャンネルの前記出口弁部分は、前記採集チャンネルの前記主要部分に隣接する前記採集チャンネルの前記上壁の少なくとも一部によって少なくとも部分的に形成されていることを特徴とする、請求項 6 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 12】

前記制御レイヤの前記第 2 の制御チャンネルは、前記採集チャンネルの前記出口弁部分を形成する前記採集チャンネルの前記上壁の前記一部と少なくとも部分的に重なっており、

前記採集チャンネルの前記出口弁部分を形成する前記採集チャンネルの前記上壁の前記部分は、前記第 2 の制御チャンネルが加圧されることによって、前記基材に向かって潰れて、流体が前記採集チャンネルの前記主要部分から流出することを妨げるように構成されていることを特徴とする、請求項 11 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 13】

( i ) 前記細胞流動レイヤおよび前記制御レイヤがポリジメチルシロキサン ( P D M S ) から形成される、もしくは ( i i ) 前記基材がガラスから形成される、または ( i i i ) ( i ) 前記細胞流動レイヤおよび前記制御レイヤがポリジメチルシロキサン ( P D M S ) から形成され、かつ ( i i ) 前記基材がガラスから形成されることを特徴とする、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 14】

( i ) 前記増殖チャンネルの前記主要部分、および前記採集チャンネルの前記主要部分はそれぞれ、略正方形の断面を有し、( i i ) 前記増殖チャンネルの前記入口弁部分、前記 1 つ以上のブリッジチャンネルの少なくとも一部、および前記採集チャンネルの前記出口弁部分はそれぞれ、略ドーム形状の断面を有することを特徴とする、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 15】

前記増殖チャンネルは、前記 1 つ以上のブリッジチャンネルを通らずに前記増殖チャンネルの前記主要部分から外に向かう流れを選択的に実現する出口弁部分を含み、前記採集チャンネルは、前記 1 つ以上のブリッジチャンネルを通らずに前記採集チャンネルの前記主要部分に向かう流れを選択的に実現する入口弁部分を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記1つ以上の細胞増殖トレンチのそれぞれは、約25.0 μmの長さおよび約1.5 μmの幅を有することを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項17】

前記1つ以上の細胞増殖トレンチのそれぞれは、前記1つ以上の細胞増殖トレンチのうちの隣接するものから約4.0 μmの距離で離間されていることを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項18】

前記1つ以上のブリッジチャンネルのそれぞれは、約200.0 μmの長さ、ならびに約50.0 μmおよび約100.0 μmの幅を有することを特徴とする、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項19】

マイクロ流体デバイスを使用して細胞を分析し、1つ以上の目的細胞を抽出する方法であって、

前記マイクロ流体デバイスは、

主要部分、および入口弁部分を有する増殖チャンネル、

前記増殖チャンネルに流体連結された1つ以上の細胞増殖トレンチ、

前記増殖チャンネルに流体連結され、主要部分、および出口弁部分を有する採集チャンネル、

前記増殖チャンネルと前記採集チャンネルとを連結する1つ以上のブリッジチャンネル、

を有し、

前記1つ以上の細胞増殖トレンチのそれぞれは、前記増殖チャンネルの前記主要部分の第1の側に隣接して配置され、

前記採集チャンネルの前記主要部分は、前記増殖チャンネルの前記主要部分の第1の側の反対側にある、前記増殖チャンネルの前記主要部分の第2の側に隣接して配置され、

前記1つ以上の細胞増殖トレンチのそれぞれが、その中に1つ以上の細胞を含むように構成され、

1つ以上の細胞および増殖培地を前記増殖チャンネルの入口部分に注入することで、前記1つ以上の細胞および前記増殖培地を前記増殖チャンネルの前記主要部分に流入させ、前記1つ以上の細胞増殖トレンチのうちの少なくとも1つを満たすことと、

前記増殖チャンネルの前記入口弁部分を閉じることと、

前記1つ以上の細胞増殖トレンチのうちの前記少なくとも1つにおいて前記1つ以上の細胞を分析して、1つ以上の目的細胞を特定することと、

1つ以上のブリッジ弁部分を開いて、流体を前記1つ以上のブリッジチャンネルを通じて前記増殖チャンネルの前記主要部分と前記採集チャンネルの前記主要部分との間で流通させることと、

前記1つ以上の目的細胞を、前記1つ以上の細胞増殖トレンチのうちの前記少なくとも1つから、前記増殖チャンネルの前記主要部分および前記1つ以上のブリッジチャンネルのうちの1つ以上を経由して、前記採集チャンネルの前記主要部分に移動させることと、

前記1つ以上のブリッジ弁部分を閉じることと、

前記採集チャンネルの前記出口弁部分を開くことと、

前記1つ以上の目的細胞を、前記採集チャンネルの前記主要部分から前記採集チャンネルの出口部分へと移動させることと、

前記1つ以上の目的細胞を前記採集チャンネルの前記出口部分から採集することと、を含むことを特徴とする、方法。

【請求項20】

前記1つ以上の細胞および増殖培地を前記増殖チャンネルの前記入口部分に注入する前に、

前記マイクロ流体デバイスの前記1つ以上のブリッジ弁部分を閉じて、流体が前記1つ以上のブリッジチャンネルを通じて前記増殖チャンネルの前記主要部分と前記採集チャンネルの前記主要部分との間で流通するのを妨げること、

を更に含むことを特徴とする、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

10

20

30

40

50

前記増殖チャネルの前記入口部分を洗浄して、前記増殖チャネルの前記入口部分から汚染物質を除去することを更に含むことを特徴とする、請求項 1.9 に記載の方法。

【請求項 2.2】

前記増殖チャネルの前記入口部分は、第 1 の入口開口部および第 2 の入口開口部を有し、ここで、前記第 1 の入口開口部および前記第 2 の入口開口部の両方は、前記増殖チャネルの前記入口部分を通じて前記増殖チャネルの前記主要部分と流体連通しており、かつ前記増殖チャネルの前記入口部分を洗浄することは、洗浄流体を前記増殖チャネルの前記入口部分の前記第 1 の入口開口部に注入することで、前記洗浄流体を前記増殖チャネル入口の前記入口部分を通じて流し、前記増殖チャネルの前記入口部分の前記第 2 の入口開口部で前記増殖チャネル入口の前記入口部分から退出させることを含むことを特徴とする、請求項 1.9 に記載の方法。

10

【請求項 2.3】

前記洗浄流体を前記第 1 の入口開口部に注入することは、漂白剤を前記第 1 の入口開口部に注入して、前記増殖チャネルの前記入口部分から汚染物質を除去することと、エタノールまたは水を前記第 1 の入口開口部に注入して、前記増殖チャネルの前記入口部分から残留漂白剤を除去することと、増殖培地を前記第 1 の入口開口部に注入して、前記増殖チャネルの前記入口部分から残留エタノールまたは水を除去することと、を含むことを特徴とする、請求項 2.2 に記載の方法。

20

【請求項 2.4】

前記増殖チャネルの前記入口弁部分が閉じているとき、流体は前記増殖チャネルの前記入口部分と前記増殖チャネルの前記主要部分との間を流れることが妨げられ、前記採集チャネルの前記出口弁部分が閉じているとき、流体は前記採集チャネルの前記主要部分と前記採集チャネルの前記出口部分との間を流れることが妨げられることを特徴とする、請求項 1.9 に記載の方法。

【請求項 2.5】

( i ) 前記 1 つ以上の目的細胞を移動させることは、前記 1 つ以上の目的細胞を光ピンセットで捉え、前記 1 つ以上の目的細胞を前記光ピンセットで移動させることを含む、( i i ) 前記 1 つ以上の細胞増殖トレンチのうちの前記少なくとも 1 つにおける前記 1 つ以上の細胞は、同質遺伝子系統の細胞に増殖するように構成される、( i i i ) 前記 1 つ以上の細胞を分析することは、前記 1 つ以上の細胞に対して顕微鏡検査を実施することを含む、または( i v ) ( i ) から ( i i i ) の任意の組み合わせであることを特徴とする、請求項 1.9 に記載の方法。

30

【請求項 2.6】

前記採集チャネルの前記出口部分から前記 1 つ以上の目的細胞を採集した後に、前記 1 つ以上の細胞増殖トレンチのうちの前記少なくとも 1 つにおいて追加の目的細胞を特定することと、前記採集チャネルをフラッシングすることと、前記 1 つ以上の細胞増殖トレンチのうちの前記少なくとも 1 つから前記追加の目的細胞を採集することと、を更に含むことを特徴とする、請求項 1.9 に記載の方法。

40

【請求項 2.7】

前記追加の目的細胞を採集することは、前記採集チャネルの前記出口弁部分を閉じることと、前記 1 つ以上のブリッジ弁部分を開くことと、前記追加の目的細胞を、前記 1 つ以上の細胞増殖トレンチのうちの前記少なくとも 1 つから、前記増殖チャネルの前記主要部分および前記 1 つ以上のブリッジチャネルのうちの 1 つ以上を経由して、前記採集チャネルの主要部分に移動させることと、

50

前記1つ以上のブリッジ弁部分を閉じることと、  
 前記採集チャネルの前記出口弁部分を開くことと、  
 前記1つ以上の追加の目的細胞を、前記採集チャネルの前記主要部分から前記採集チャネルの前記出口部分へと移動させることと、  
 前記1つ以上の追加の目的細胞を前記採集チャネルの前記出口部分から採集することと、を含むことを特徴とする、請求項2.6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

10

本出願は、2019年6月20日に出願された発明の名称「ISOLATING LIVE CELLS AFTER HIGH-THROUGHPUT, LONG-TERM, TIME-LAPSE MICROSCOPY」の米国仮特許出願第62/864,091号明細書の利益およびその優先権を主張するものであり、引用することによりその全体が本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、アメリカ国防高等研究計画局により与えられた助成番号HR0011-16-2-0049、アメリカ国立科学財団により与えられた助成番号1615487、およびアメリカ国防高等研究計画局により与えられた助成番号DARPA-BAA-16-17による政府支援によりなされたものである。アメリカ合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

20

【0003】

本開示は、マイクロ流体デバイスに関する。具体的には、本開示は、細胞集団を長期モニタリングし、目的細胞を効率的に抽出することを可能にするマイクロ流体デバイスに関する。

【背景技術】

【0004】

遺伝学的スクリーニングは、どの遺伝子または遺伝子部分が表現型特性を決定するかを特定することにより、生物学における基本的役割を果たす。それらの能力は、考慮され得る突然変異体ライブラリの幅、測定され得る特性の種類、時空間的均一性を保証しながら増殖条件を制御する能力、および（多くの突然変異は表現型の分布を変えるだけであるので）これらの分布が突然変異体ごとにどれだけ確実にサンプリングされるかに依存する。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】米国特許第8691164号明細書

【文献】米国特許第6767706号明細書

【文献】米国特許第8075748号明細書

【文献】米国特許第9149806号明細書

【文献】米国特許出願公開第2019/0271634号明細書

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

現在の技術は、エンドポイントの低解像度スナップショットを提供するにすぎず、増殖、細胞内ダイナミクス、および環境変化への応答に関する情報をほとんど提供しない。さらに、各細胞は一度しかプロービングされないため、現在の技術は、遺伝的に安定した特性を一過性の表現型異質性から区別するのに苦労している。したがって、細胞を画像化および分析する新しいデバイスおよび方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

50

細胞を分析し、1つ以上の目的細胞を抽出するのに使用されるマイクロ流体デバイスは、基材と、基材に連結された細胞流動レイヤと、細胞流動レイヤに連結された制御レイヤとを備えている。細胞流動レイヤは、増殖チャンネルと、複数の細胞増殖トレンチと、採集チャンネルと、複数のブリッジチャンネルとを含んでいる。増殖チャンネルは、入口部分と、出口部分と、主要部分と、入口弁部分と、出口弁部分とを有する。増殖チャンネルの入口弁部分は、増殖チャンネルの入口部分と増殖チャンネルの主要部分との間の流れを選択的に制御するのに補助するように構成される。増殖チャンネルの出口弁部分は、増殖チャンネルの主要部分と増殖チャンネルの出口部分との間の流れを選択的に制御するのに補助するように構成される。複数の細胞増殖トレンチが、増殖チャンネルの主要部分に流体連結されている。採集チャンネルは、入口部分と、出口部分と、主要部分と、入口弁部分と、出口弁部分とを有する。採集チャンネルの入口弁部分は、採集チャンネルの入口部分と採集チャンネルの主要部分との間の流れを選択的に制御するのに補助するように構成される。採集チャンネルの出口弁部分は、採集チャンネルの主要部分と採集チャンネルの出口部分との間の流れを選択的に制御するのに補助するように構成される。複数のブリッジチャンネルのそれぞれは、増殖チャンネルの主要部分と採集チャンネルの主要部分とを連結する。複数のブリッジチャンネルのそれぞれは、増殖チャンネルと採集チャンネルとの間の流れを選択的に制御するのに補助するように構成されたブリッジ弁部分を含む。制御レイヤは、(i) 複数のブリッジチャンネルのそれぞれのブリッジ弁部分、(ii) 増殖チャンネルの入口弁部分、(iii) 増殖チャンネルの出口弁部分、(iv) 採集チャンネルの入口弁部分、及び(v) 採集チャンネルの出口弁部分を作動させるのを補助するように構成される。

10

20

#### 【0008】

増殖チャンネルと、増殖チャンネルに流体連結された複数の細胞増殖トレンチと、増殖チャンネルに流体連結された採集チャンネルとを有するマイクロ流体デバイスを使用して細胞を分析し、1つ以上の目的細胞を抽出する方法は、1つ以上の細胞および増殖培地を増殖チャンネルの入口部分に注入して、1つ以上の細胞および増殖培地を増殖チャンネルの主要部分へと流入させ、複数の細胞増殖トレンチのうちの少なくとも1つを満たすことと、増殖チャンネルの入口弁部分および増殖チャンネルの出口弁部分を閉じることと、増殖チャンネルの入口部分を洗浄して、増殖チャンネルの入口部分から汚染物質を除去することと、複数の細胞増殖トレンチのうちの少なくとも1つにおける1つ以上の細胞を分析して、1つ以上の目的細胞を特定することと、複数のブリッジ弁部分を開いて、複数のブリッジチャンネルを通じて増殖チャンネルの主要部分と採集チャンネルの主要部分との間で流体を流通可能にすることと、1つ以上の目的細胞を、複数の細胞増殖トレンチのうちの少なくとも1つから、増殖チャンネルの主要部分および複数のブリッジチャンネルのうちの1つ以上を経由して、採集チャンネルの主要部分へと移動させることと、複数のブリッジ弁部分を閉じることと、採集チャンネルの入口弁部分および採集チャンネルの出口弁部分を開くことと、1つ以上の目的細胞を、採集チャンネルの主要部分から採集チャンネルの出口部分へと移動させることと、1つ以上の目的細胞を採集チャンネルの出口部分から採集することとを含む。

30

#### 【0009】

上記の概要は、本開示の各実装形態または全ての態様を表すことを意図するものではない。本開示の追加の特徴および利点は、以下に示される詳細な説明および図面から明らかである。

40

#### 【0010】

本開示は、添付の図面を参照するとともに、例示的な実装形態の以下の説明からより良く理解されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0011】

【図1A】本開示の態様による、細胞を分析し、1つ以上の目的細胞を抽出する例示的なマイクロ流体デバイスの斜視図である。

【図1B】本開示の態様による、図1Aの例示的なマイクロ流体デバイスの分解図である。

【図2A】本開示の態様による、図1Aの例示的なマイクロ流体デバイスのチャンネルのレ

50

イアウトの上面図である。

【図 2 B】本開示の態様による、図 2 A のチャンネルのレイアウトの一部の拡大図である。

【図 3 A】本開示の態様による、開状態における図 1 A の例示的なマイクロ流体デバイスの 2 つの弁部分の断面図である。

【図 3 B】本開示の態様による、開状態から閉状態に動いているときの図 3 A の 2 つの弁部分の断面図である。

【図 3 C】本開示の態様による、閉状態における図 3 A の 2 つの弁部分の断面図である。

【図 4 A】本開示の態様による、細胞および増殖培地の注入中の図 1 A の例示的なマイクロ流体デバイスの入口部分の上面図である。

【図 4 B】本開示の態様による、細胞および増殖培地の注入後の図 4 A の入口部分の上面図である。

10

【図 4 C】本開示の態様による、洗浄して残留汚染物質を除去しているときの図 4 A の入口部分の上面図である。

【図 5 A】本開示の態様による、図 1 A の例示的なマイクロ流体デバイスの細胞増殖トレんチの上面図である。

【図 5 B】本開示の態様による、バックチャンネルに連結された図 1 A の例示的なマイクロ流体デバイスの細胞増殖トレんチの上面図である。

【図 6】本開示の態様による、細胞増殖トレんチ内での細胞の増殖を示すカイモグラフである。

【図 7】本開示の態様による、細胞を分析し、1 つ以上の目的細胞を抽出する方法のフローチャートである。

20

【図 8 A】本開示の態様による、細胞および増殖培地が増殖チャンネルへと注入されるときの、図 1 A の例示的なマイクロ流体デバイスの増殖チャンネルおよび採集チャンネルの上面図である。

【図 8 B】本開示の態様による、増殖チャンネルの入口部分が洗浄されるときの図 8 A の増殖チャンネルおよび採集チャンネルの上面図である。

【図 8 C】本開示の態様による、細胞が増殖チャンネルから採集チャンネルへと移動させるときの図 8 A の増殖チャンネルおよび採集チャンネルの上面図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

30

本開示には様々な変更および代替形態が可能であるが、具体的な実装形態が例として図面に示されており、本明細書に詳細に記載される。しかしながら、本開示は、開示された特定の形態に限定されることを意図するものではないことを理解されたい。むしろ、本開示は、添付の特許請求の範囲によって規定される本開示の趣旨および範囲内に含まれる全ての変更、同等物、および代替物を網羅すべきである。

【0013】

本開示には多くの種々の形態が可能であるものの、図面に示されており、本明細書には本開示の詳細な例示的な実装形態において記載されるが、これは、本開示が本開示の原理の一例としてみなされるべきであり、本開示の広い態様を図示された実装形態に限定することを意図するものではないという理解に基づいている。

40

【0014】

図 1 A は、細胞を分析し、1 つ以上の目的細胞を抽出することができるマイクロ流体デバイス 100 の斜視図を示す。図 1 B は、マイクロ流体デバイス 100 の分解図を示す。幾つかの実装形態において、デバイス 100 は、多世代のタイムラプス顕微鏡検査法に使用される。これらの実装形態において、同質遺伝子の細胞集団をデバイス 100 内に閉じ込めて増殖させることができることにより、細胞を何世代にもわたって画像化することが可能となる。その後、1 つ以上の目的細胞をデバイス 100 から抽出して、様々な下流の用途で使用することができる。

【0015】

デバイス 100 は、カバースリップ 102 と、カバースリップに連結された細胞流動レ

50

イヤ110と、細胞流動レイヤ110に連結された制御レイヤ150とを含む。一般に、細胞流動レイヤ110は、カバースリップ102上に取り付けられ、制御レイヤ150は、細胞流動レイヤ110上に取り付けられる。細胞流動レイヤ110は、細胞（ならびに増殖培地および洗浄流体または洗浄溶液などの他の流体）が使用中に流通し得る様々な種々のチャンネルを含む。制御レイヤ150は、流体で満たされた種々のチャンネルを含むことで、細胞流動レイヤ110の様々な種々の弁を作動させることができる。本明細書でより詳細に論じられるように、弁を作動させることで、細胞流動レイヤ110の様々なチャンネルを通じて細胞および他の流体の流れを選択的に制御することができる。

#### 【0016】

幾つかの実装形態において、細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150は、両方ともポリジメチルシロキサン（PDMS）のブロックから構成され、別々の型から注型される。幾つかの実装形態において、カバースリップ102はガラスから作られている。細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150の様々なチャンネルは、任意の適切な製造技術（複数を含む）を使用して形成され得る。幾つかの実装形態において、細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150は、多層ソフトリソグラフィを使用して作製される。これらの実装形態において、最初にUVリソグラフィ技術を使用してシリコンウェハから型が形成される。次に、シリコン型内に液体PDMSを流し込むことによってPDMS層を注型した後に、引き続き硬化させてPDMSを固まらせる。2つのPDMS層をともに接合させ（例えば、硬化または部分硬化を介して）、カバースリップ102に（例えば、プラズマ接合を介して）接合した後に、さらに焼き付けることができる。したがって、細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150のチャンネルのネガ型の空間は、ポジ型のシリコンウェハの型からインプリントされる。

#### 【0017】

作製方法の成果物は、三次元デバイス100である。幾つかの実装形態において、細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150は、約20.0mmから約40.0mmの間、または約30.0mmの長さを有し、細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150は、約10.0mmから約20.0mmの間、または約17.0mmの幅を有し、細胞流動レイヤ110は、約40.0μmから約60.0μmの間、または約50.0μmの高さを有し、かつ制御レイヤ150は、約2.0mmから約10.0mmの間、または約6.0mmの高さを有する。

#### 【0018】

細胞流動レイヤ110の様々なチャンネルは、細胞流動レイヤ110の下面に画成されている。したがって、細胞流動レイヤ110は、細胞流動レイヤ110内に画成された様々なチャンネルの上壁（例えば、天井部）を形成する上壁113Aを含む。細胞流動レイヤ110がカバースリップ102に接合されると、カバースリップ102が、細胞流動レイヤ110の様々なチャンネルの下壁（例えば、床部）を形成する。同様に、制御レイヤ150の様々なチャンネルは、制御レイヤ150の下面に画成されている。制御レイヤ150の上壁113Bは、制御レイヤ150の様々なチャンネルの上壁（例えば、天井部）を形成する。細胞流動レイヤ110の上壁113Aが、制御レイヤ150の様々なチャンネルの下壁（例えば、床部）を形成する。細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150のチャンネルはそれぞれ、細胞流動レイヤ110および/または制御レイヤ150を貫通して上方に延びる複数の垂直チャンネルと、制御レイヤ150の上壁内に画成される複数の開口部とを介して大気に流体連結されている。

#### 【0019】

図2Aは、細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150の様々なチャンネルの二次元レイアウトを示すデバイス100の上面図である。図2Bは、1セットの増殖チャンネルおよび採集チャンネルを示すデバイス100の拡大上面図である。細胞流動レイヤ110は、4対の分析チャンネルを含む。それぞれの分析チャンネルの対は、増殖チャンネル112および採集チャンネル122を含む。デバイス100の使用中に何らかのモニタリング過程および画像化過程が行われている間は、細胞は一般に増殖チャンネル112内に位置している。目的

10

20

30

40

50

細胞が特定されたら、目的細胞を採集チャンネル 1 2 2 に移動させることができ、そこからその細胞を採集することができる。一般に、任意の 1 つ以上の増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 の対がデバイス 1 0 0 の動作中に使用され得る。例えば、4 つの全ての対を同時に使用して、同じ種類の細胞を分析することができ、4 つの全ての対を同時に使用して、異なる種類の細胞を分析することができ、4 つ全てより少ない対を同時に使用して、同じ種類または異なる種類の細胞を分析することができる。4 つの対の増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 を有するデバイス 1 0 0 が図 2 A には示されているが、デバイス 1 0 0 は、1 つ以上を含むあらゆる個数の増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 を有することができる。

#### 【0020】

増殖チャンネル 1 1 2 は、異なる部分から形成され、入口部分 1 1 4 A と、入口弁部分 1 1 6 A と、主要部分 1 1 8 と、出口弁部分 1 1 6 B と、出口部分 1 1 4 B とを含む。増殖チャンネル 1 1 2 の異なる部分は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の長さに沿った異なる位置に位置している。例えば、入口部分 1 1 4 A および入口弁部分 1 1 6 A は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の第 1 の端部 1 1 1 A に位置しており、一方、出口弁部分 1 1 6 B および出口部分 1 1 4 B は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の第 2 の端部 1 1 1 B に位置している。主要部分 1 1 8 は、第 1 の端部 1 1 1 A と第 2 の端部 1 1 1 B との間に位置している。一般に、増殖チャンネル 1 1 2 の各部分は、細胞および流体が流通し得るチャンネルである。

#### 【0021】

細胞流動レイヤ 1 1 0 は、少なくとも増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に流体連結されている複数の細胞増殖トレンチ 1 2 0 を更にも含む。細胞増殖トレンチ 1 2 0 は、増殖チャンネル 1 1 2 の第 1 の側に配置されており、増殖チャンネル 1 1 2 がデバイス 1 0 0 の第 1 の端部 1 1 1 A とデバイス 1 0 0 の第 2 の端部 1 1 1 B との間に延びる方向に対して垂直な方向で増殖チャンネル 1 1 2 から延びるように構成されている。

#### 【0022】

細胞増殖トレンチ 1 2 0 は、デバイス 1 0 0 の使用中に細胞で満たされるように構成されている。細胞増殖トレンチ 1 2 0 は、デバイス 1 0 0 の使用中に分析される細胞の幅とほぼ等しいか、またはわずかに大きい幅を有する。こうして、細胞増殖トレンチ 1 2 0 のいずれか 1 つ内の細胞は、直線的な一次元のグループにまとめて配置される（例えば、細胞は、幾何学的に一直列に拘束される）。細胞増殖トレンチ 1 2 0 を最初に満たす細胞が分裂し始めると、該細胞は最終的に細胞増殖トレンチ 1 2 0 の終端を同質遺伝子の細胞系統で満たす。これらの細胞は一般に同じ遺伝子構成を有し、単一の一次元の列で配置される。細胞増殖トレンチ 1 2 0 の長さ（例えば、細胞増殖トレンチ 1 2 0 が増殖チャンネル 1 1 2 から延びる距離）は、約  $1.0 \mu\text{m}$  から約  $100.0 \mu\text{m}$  の間であり得る。細胞増殖トレンチ 1 2 0 の幅は、約  $0.1 \mu\text{m}$  から約  $50.0 \mu\text{m}$  の間であり得る。細胞増殖トレンチ 1 2 0 の高さは、約  $0.1 \mu\text{m}$  から約  $50.0 \mu\text{m}$  の間であり得る。一般に、細胞増殖トレンチ 1 2 0 の寸法は、ウェハ作製過程の間に、必要とされる顕微鏡検査感度（例えば、より狭く離間した細胞増殖トレンチは、例えば、光の点広がり関数のため、より遠く離して配置された細胞増殖トレンチよりも大きなトレンチ間信号スピルオーバーを有することとなる）、デバイス 1 0 0 で使用される細胞のサイズ、所要スループットなどに応じて調整され得る。細胞増殖トレンチ 1 2 0 の隣接する対間の距離は、約  $0.1 \mu\text{m}$  から約  $10.0 \mu\text{m}$  の間であり得る。

#### 【0023】

採集チャンネル 1 2 2 は、細胞増殖トレンチ 1 2 0 の反対側の増殖チャンネル 1 1 2 の第 2 の側に配置されている。こうして、細胞増殖トレンチ 1 2 0 と採集チャンネル 1 2 2 との間に増殖チャンネル 1 1 2 が配置される。採集チャンネル 1 2 2 はまた、デバイス 1 0 0 の第 1 の端部 1 1 1 A とデバイス 1 0 0 の第 2 の端部 1 1 1 B との間で、増殖チャンネル 1 1 2 に対して平行であり、かつ細胞増殖トレンチ 1 2 0 に対して垂直な方向に延びている。増殖チャンネル 1 1 2 と同様に、採集チャンネル 1 2 2 は、入口部分 1 2 4 A と、入口弁部分 1 2 6 A と、主要部分 1 2 8 と、出口弁部分 1 2 6 B と、出口部分 1 2 4 B とを含む。採集チ

10

20

30

40

50

チャンネル 1 2 2 の異なる部分は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の長さに沿った異なる位置に位置している。例えば、入口部分 1 2 4 A および入口弁部分 1 2 6 A は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の第 1 の端部 1 1 1 A に位置しており、一方、出口弁部分 1 2 6 B および出口部分 1 2 4 B は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の第 2 の端部 1 1 1 B に位置している。主要部分 1 2 8 は、第 1 の端部 1 1 1 A と第 2 の端部 1 1 1 B との間に位置している。一般に、採集チャンネル 1 2 2 の各部分は、細胞および流体が流通し得るチャンネルである。

#### 【 0 0 2 4 】

図示された実装形態において、細胞流動レイヤはまた、採集チャンネル 1 2 2 の主要部分 1 2 8 に流体連結された複数の細胞増殖トレンチ 1 3 0 を含み得る。細胞増殖トレンチ 1 3 0 は、増殖チャンネル 1 1 2 とは反対側の採集チャンネル 1 2 2 の側に配置されている。細胞増殖トレンチ 1 3 0 は、採集チャンネル 1 2 2 がデバイス 1 0 0 の第 1 の端部 1 1 1 A とデバイス 1 0 0 の第 2 の端部 1 1 1 B との間に延びる方向に対して垂直な方向で採集チャンネル 1 2 2 から延びるように構成されている。一般に、細胞増殖トレンチ 1 3 0 は、細胞増殖トレンチ 1 2 0 と同じ寸法または同様の寸法を有し得る。

10

#### 【 0 0 2 5 】

細胞流動レイヤ 1 1 0 は、増殖チャンネル 1 1 2 と採集チャンネル 1 2 2 との間に配置された複数のブリッジチャンネル 1 3 2 を更に含む。ブリッジチャンネル 1 3 2 は、ブリッジ突出部 1 3 3 の隣接する対間に画成される空所であり、このブリッジ突出部 1 3 3 は、一般に細胞流動レイヤ 1 1 0 の全高さで細胞流動レイヤ 1 1 0 の上壁まで延びている。幾つかの実装形態において、ブリッジチャンネル 1 3 2 は、増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 と採集チャンネル 1 2 2 の主要部分 1 2 8 との間にのみ位置している。他の実装形態においては、ブリッジチャンネル 1 3 2 が更に拡張することで、細胞流動レイヤ 1 1 0 は、他の部分の増殖チャンネル 1 1 2 と採集チャンネル 1 2 2 との間に位置するブリッジチャンネル 1 3 2 を含み得る。ブリッジチャンネル 1 3 2 は、細胞および流体が増殖チャンネル 1 1 2 と採集チャンネル 1 2 2 との間を流れることができるように構成されている。

20

#### 【 0 0 2 6 】

本明細書に示されるように、増殖チャンネル 1 1 2 は、入口弁部分 1 1 6 A および出口弁部分 1 1 6 B を含み、採集チャンネル 1 2 2 は、入口弁部分 1 2 6 A および出口弁部分 1 2 6 B を含む。これらの弁部分は、増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 を通じた細胞および流体の流れを選択的に制御するのを補助するように作動され得る。増殖チャンネル 1 1 2 の入口弁部分 1 1 6 A は、増殖チャンネル 1 1 2 の入口部分 1 1 4 A と増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 との間の流れを制御する。採集チャンネル 1 2 2 の入口弁部分 1 2 6 A は、採集チャンネル 1 2 2 の入口部分 1 2 4 A と採集チャンネル 1 2 2 の主要部分 1 2 8 との間の流れを制御する。増殖チャンネル 1 1 2 の出口弁部分 1 1 6 B は、増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 と増殖チャンネル 1 1 2 の出口部分 1 1 4 B との間の流れを制御する。採集チャンネル 1 2 2 の出口弁部分 1 2 6 B は、採集チャンネル 1 2 2 の主要部分 1 2 8 と採集チャンネル 1 2 2 の出口部分 1 2 4 B との間の流れを制御する。

30

#### 【 0 0 2 7 】

図示された実装形態において、増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 の弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の上壁の部分によって少なくとも部分的に形成される。細胞流動レイヤ 1 1 0 の上壁は、増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 の上壁を形成するので、弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B は同様に、増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 の上壁の部分自体によって少なくとも部分的に形成される。弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B が作動されると、弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B の上壁がカバーリップ 1 0 2 に向かって下向きに圧縮されて、増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2 が弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B でせき止められる。弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B が圧縮され、細胞流動レイヤ 1 1 0 のチャンネルがせき止められて、流体の流れが妨げられるときに、弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B は、開状態にある。弁部分 1 1 6 A、1 1 6 B、1 2 6 A、1 2 6 B が圧縮されておら

40

50

ず、細胞流動レイヤ 110 のチャンネルが開いて、流体の流れが可能となるときに、弁部分 116 A、116 B、126 A、126 B は、閉状態にある。

【0028】

増殖チャンネル 112 の入口弁部分 116 A は、入口部分 114 A と主要部分 118 との間に位置している。したがって、入口弁部分 116 A の上壁が下向きに圧縮されると、入口部分 114 A と主要部分 118 との間の増殖チャンネル 112 の上壁の部分が下向きに圧縮されて、細胞および流体が増殖チャンネル 112 において入口部分 114 A と主要部分 118 との間を流れることが妨げられる。採集チャンネル 122 の入口弁部分 126 A は、入口部分 124 A と主要部分 128 との間に位置している。したがって、入口弁部分 126 A の上壁が下向きに圧縮されると、入口部分 124 A と主要部分 128 との間の採集チャンネル 122 の上壁の部分が下向きに圧縮されて、細胞および流体が採集チャンネル 122 において入口部分 124 A と主要部分 128 との間を流れることが妨げられる。

10

【0029】

増殖チャンネル 112 の出口弁部分 116 B は、主要部分 118 と出口部分 114 B との間に位置している。したがって、出口弁部分 116 B の上壁が下向きに圧縮されると、主要部分 118 と出口部分 114 B との間の増殖チャンネル 112 の上壁の部分が下向きに圧縮されて、細胞および流体が増殖チャンネル 112 において主要部分 118 と出口部分 114 B との間を流れることが妨げられる。採集チャンネル 122 の出口弁部分 126 B は、主要部分 128 と出口部分 124 B との間に位置している。したがって、出口弁部分 126 B の上壁が下向きに圧縮されると、主要部分 128 と出口部分 124 B との間の採集チャンネル 122 の上壁の部分が下向きに圧縮されて、細胞および流体が採集チャンネル 122 において主要部分 128 と出口部分 124 B との間を流れることが妨げられる。

20

【0030】

細胞流動レイヤ 110 はまた複数のブリッジ弁部分 134 を含み、この複数のブリッジ弁部分 134 は、ブリッジチャンネル 132 を通じた流れを選択的に制御するのを補助するように構成されている。したがって、ブリッジ弁部分 134 は、細胞および流体が増殖チャンネル 112 と採集チャンネル 122 との間を流れることが妨げられるように作動され得る。弁部分 116 A、116 B、126 A、および 126 B と同様に、ブリッジ弁部分 134 は、細胞流動レイヤ 110 の上壁の部分によって少なくとも部分的に形成される。細胞流動レイヤ 110 の上壁は、ブリッジチャンネル 132 の上壁を形成するので、ブリッジ弁部分 134 は同様に、ブリッジチャンネル 132 の上壁の部分自体によって少なくとも部分的に形成される。ブリッジ弁部分 134 が作動されると、ブリッジチャンネル 132 の上壁の少なくとも一部がカバースリップ 102 に向かって下向きに圧縮されて、ブリッジチャンネル 132 がせき止められる。

30

【0031】

ブリッジ弁部分 134 は、ブリッジチャンネル 132 と少なくとも部分的に重なっている。それというのも、ブリッジ弁部分 134 は、下向きに圧縮され得るブリッジチャンネル 132 の上壁の部分であるからである。ブリッジチャンネル 132 を通じた細胞および流体の流れを妨げるために、(隣接するブリッジ突出部 133 の間の)各ブリッジチャンネル 132 の上壁の全幅がそれぞれのブリッジ弁部分 134 を形成する。したがって、ブリッジ弁部分 134 が作動されると、ブリッジチャンネル 132 の上壁の全幅が下向きに圧縮されて、ブリッジチャンネル 132 が遮断される。

40

【0032】

幾つかの実装形態において、ブリッジ弁部分 134 は、増殖チャンネル 112 と採集チャンネル 122 との間のブリッジチャンネル 132 の全長に沿って延びている。これらの実装形態において、各ブリッジチャンネル 132 の上壁全体がブリッジ弁部分 134 を形成する。他の実装形態において、ブリッジ弁部分 134 は、増殖チャンネル 112 と採集チャンネル 122 との間のブリッジチャンネル 132 の長さの一部だけに沿って延びている。これらの実装形態において、各ブリッジチャンネル 132 の上壁の一部だけがブリッジ弁部分 134 を形成する。しかしながら、ブリッジ弁部分 134 はなおも、ブリッジ突出部 133 の隣接

50

する対間のブリッジチャンネル 1 3 2 の全幅にわたって延びているので、ブリッジ弁部分 1 3 4 はなおも、ブリッジチャンネル 1 3 2 を通じた流れを制御することができる。

【 0 0 3 3 】

一般に、各ブリッジ弁部分 1 3 4 は、1 つ以上のブリッジチャンネル 1 3 2 を通じた細胞および流体の流れを制御するように構成されている。幾つかの実装形態において、各ブリッジ弁部分 1 3 4 は、ブリッジチャンネル 1 3 2 のそれぞれの 1 つを通じた流れを制御する。他の実装形態において、ブリッジ弁部分 1 3 4 の少なくとも 1 つは、2 つ以上のブリッジチャンネル 1 3 2 を通じた流れを制御する。

【 0 0 3 4 】

制御レイヤ 1 5 0 は 1 つ以上の制御チャンネルを含み、この制御チャンネルは、加圧により細胞流動レイヤ 1 1 0 の様々な弁部分を作動させることができる。制御レイヤ 1 5 0 の制御チャンネルは、細胞流動レイヤ 1 1 0 の様々な弁部分を形成する細胞流動レイヤ 1 1 0 の上壁の部分と重なっている。制御チャンネルが加圧されると、弁部分の上壁が下向きに圧縮されてそれらの閉状態に動き、制御チャンネルは拡張する。次に、制御チャンネルを減圧して弁部分をそれらの開状態に戻すことができ、制御チャンネルは収縮する。

10

【 0 0 3 5 】

図示された実装形態において、制御レイヤ 1 5 0 は、第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A および第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B を画成する。第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A は、入口弁部分 1 1 6 A および 1 2 6 A の全て、ならびに出口弁部分 1 1 6 B および 1 2 6 B の全てを制御するように構成されている。第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B は、ブリッジ弁部分 1 3 4 の全てを制御するように構成されている。したがって、第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A は、制御レイヤ 1 5 0 内に、第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A が、入口弁部分 1 1 6 A および 1 2 6 A の全て、ならびに出口弁部分 1 1 6 B および 1 2 6 B の全ての上壁を形成する細胞流動レイヤ 1 1 0 の上壁の部分と重なるように延びている。図示された実施形態において、第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A は、U 字形を有し得る。U 字形の基部 1 5 4 A は、細胞流動レイヤ 1 1 0 の第 1 の端部 1 1 1 A と第 2 の 1 1 1 B との間に延びている。一方の U 字形の脚部 1 5 4 B は、増殖チャンネル 1 1 2 の入口部分 1 1 4 A の全て、および採集チャンネル 1 2 2 の入口部分 1 2 4 A の全てにわたって延びている。同様に、もう一方の U 字形の脚部 1 5 4 C は、増殖チャンネル 1 1 2 の出口部分 1 1 4 B の全て、および採集チャンネル 1 2 2 の出口部分 1 2 4 B の全てにわたって延びている。他の実装形態において、第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A は、第 1 の制御チャンネル 1 5 2 A が細胞増殖レイヤ 1 1 0 の必要とされる弁部分の全てと重なっている限り、他の形状および / または構成を有することができる。

20

30

【 0 0 3 6 】

第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B はまた、制御レイヤ 1 5 0 内に、第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B が、ブリッジ弁部分 1 3 4 の全ての上壁を形成する細胞流動レイヤ 1 1 0 の上壁の部分と重なるように延びている。図示された実装形態において、第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B は、第 1 の部分 1 5 8 A と、第 2 の部分 1 5 8 B と、第 3 の部分 1 5 8 C とを含む。部分 1 5 8 A は、増殖チャンネルおよび採集チャンネル 1 1 2、1 2 2 の上位の対のブリッジ弁部分 1 3 4 の全てと重なっている。部分 1 5 8 B は、増殖チャンネルおよび採集チャンネル 1 1 2、1 2 2 の中位の対のブリッジ弁部分 1 3 4 の全てと重なっている。部分 1 5 8 C は、増殖チャンネルおよび採集チャンネル 1 1 2、1 2 2 の下位の対のブリッジ弁部分 1 3 4 の全てと重なっている。第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B はまた、第 1 の部分 1 5 8 A と第 2 の部分 1 5 8 B とを接続する第 1 の介在部分 1 6 0 A と、第 2 の部分 1 5 8 B と第 3 の部分 1 5 8 C とを接続する第 2 の介在部分 1 6 0 B とを含む。他の実装形態において、第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B は、第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B が細胞増殖レイヤ 1 1 0 の必要とされる弁部分の全てと重なっている限り、他の形状および / または構成を有することができる。

40

【 0 0 3 7 】

図 3 A ~ 図 3 C は、加圧により細胞流動レイヤ 1 1 0 の 2 つの例示的な弁部分 3 0 4 A および 3 0 4 B を作動させ、下にあるチャンネルをせき止めるときの制御レイヤ 1 5 0 の例

50

示的な制御チャンネル302の断面図を示す。2つの例示的な弁部分304A、304Bは、入口弁部分116Aおよび126A、2つの出口弁部分116Bおよび126B、または2つの隣接するブリッジ弁部分134であり得る。図3Aでは、制御チャンネル302は、蒸留水などの非圧縮性または実質的に非圧縮性の流体で満たされている。図3Aでは、制御チャンネル302は流体で満たされているが、まだ加圧されていない。したがって、弁部分304Aおよび304Bの上壁306Aおよび306Bは圧縮されておらず、弁部分304Aおよび304Bはそれらの開状態にある。

#### 【0038】

図3Bでは、制御チャンネル302内の流体は加圧され始めている（例えば、制御チャンネル302に圧力が加えられている）。したがって、弁部分304Aおよび304Bの上壁306Aおよび306Bは、カバースリップ102に向かって圧縮して動き始めている。弁部分304Aおよび304Bは完全に閉じられていないため、流体はまだ弁部分304Aおよび304Bを通じて流れることができる。図3Cでは、より高い圧力が制御チャンネル302にかけられて、弁部分304Aおよび304Bの上壁306Aおよび306Bは、カバースリップ102まで押し付けられている。この圧縮が行われると、弁部分304Aおよび304Bはそれらの閉状態に動いて、流体は弁部分304Aおよび304Bを通じて流れることができない。弁部分304Aおよび304Bをそれらの開状態に戻すには、制御チャンネル302から圧力を除去する。上壁306Aおよび306Bを形成する材料（幾つかの実装形態においてPDMSであり得る）は一般に弾性であるため、制御チャンネル302から圧力が除去されると、上壁306Aおよび306Bはそれらの非圧縮状態（図3A）に戻る。

#### 【0039】

図3Aに示されるように、弁部分304Aおよび304Bは一般に、ドーム形状の断面を有し、弁部分304Aおよび304Bでの細胞流動レイヤ110の上壁の厚さは、異なる位置の細胞流動レイヤ110の上壁の厚さと比べて薄い。弁部分304Aおよび304Bでの上壁の厚さは薄いので、その上壁は柔軟であり、図3Bおよび図3Cに示されるように圧縮することができる。さらに、ドーム形状の断面は、弁部分304Aおよび304Bの上壁が圧縮し、制御チャンネル302からの圧力に抵抗しないことを保証するのに役立つ。したがって、入口弁部分116A、126A、出口弁部分116B、126B、およびブリッジ弁部分134の断面は全てドーム形状である。これらの位置はまた、増殖チャンネル112、採集チャンネル122、およびブリッジチャンネル132内の他の位置と比べて薄い上壁を有し、弁部分の上壁の圧縮を可能にするのに役立つ。弁部分を有しない増殖チャンネル112、採集チャンネル122、およびブリッジチャンネル132内の位置では、上壁は比較的厚く、チャンネルは略正方形または略長方形の断面を有する。

#### 【0040】

図2Aおよび図2Bを参照し戻すと、弁部分116A、116B、126A、および126Bを作動させるために、第1の制御チャンネル152Aを加圧することで、弁部分116A、116B、126A、および126Bの上壁がカバースリップ102まで圧縮されて、流体は弁部分116A、116B、126A、および126Bを通じて流れることができない。第1の制御チャンネル152Aから圧力を除去すると、弁部分116A、116B、126A、および126Bはそれらの開状態に戻るため、流体は再び弁部分116A、116B、126A、および126Bを通じて流れることができる。同様に、ブリッジ弁部分134を作動させるために、第2の制御チャンネル152Bを加圧することで、ブリッジ弁部分134の上壁は、カバースリップ102まで圧縮され、流体はブリッジ弁部分134を通じて流れることができない。第2の制御チャンネル152Bから圧力を除去すると、ブリッジ弁部分134はそれらの開状態に戻るため、流体は再びブリッジチャンネル132を通じて流れることができる。幾つかの実装形態において、第1の制御チャンネル152Aおよび152Bは、使用中は（弁部分が開いたままであるか閉じたままであるかにかかわらず）常に非圧縮性流体で満たされており、満たされた制御チャンネル152A、152Bに圧力を加えて、弁を作動させることができる。これらの実装形態において、各制御

チャンネルによって制御される弁部分の全てを同時にまたはほぼ同時に作動させることができる。他の実装形態において、非圧縮性流体は、弁部分がそれらの開状態に戻るときに、制御チャンネル 152A、152B から部分的または全体的に除去される。

#### 【0041】

図2Aおよび図2Bを参照し戻すと、幾つかの実装形態において、細胞流動レイヤ110は、細胞増殖トレンチ120に隣接して配置された複数のバックチャンネル142を含み得ることで、それぞれの一連の細胞増殖トレンチ120は、増殖チャンネル112の1つとバックチャンネル142の1つとの間に配置される。細胞増殖トレンチ120のそれぞれは、バックチャンネル142の1つに対して開いている場合がある。一般に、各細胞増殖トレンチ120の開口部は十分に狭いため、増殖培地および他の流体は開口部を通じてバックチャンネル142へと流れることができるが、細胞増殖トレンチ120に集合している細胞は開口部を通過することができない。本明細書で更に論じられるように、バックチャンネル142を使用して、細胞増殖トレンチ120に細胞を集合させることができる。

10

#### 【0042】

細胞流動レイヤ110および制御レイヤ150の様々なチャンネルは、流体が内外に流通することができる開口部を含む。幾つかの実装形態において、増殖チャンネル112の入口部分114Aは、図2Aの上位の2つの増殖チャンネル112に示されるように、第1の入口開口部115Aおよび第2の入口開口部115Bを含む。他の実装形態において、増殖チャンネル112の入口部分114Aは、下位の増殖チャンネル112に示されるように、第1の入口開口部115Aのみを含む。各採集チャンネル122の入口部分124Aは、入口開口部125を含む。幾つかの実装形態において、入口部分114Aは、3つ以上の入口開口部を有し得る。幾つかの実装形態において、入口部分124Aは、2つ以上の入口開口部を有し得る。

20

#### 【0043】

出口部分は、同様に、流体が内外に流通することができる出口開口部を含む。増殖チャンネル112の出口部分114Bはそれぞれ、出口開口部117を含む。採集チャンネル122の出口部分124Bはそれぞれ、出口開口部127を含む。第1の制御チャンネル152Aおよび第2の制御チャンネル152Bはそれぞれ、開口部を含み、それを介して制御チャンネル152A、152Bを流体で満たし、加圧することができる。第1の制御チャンネル152Aは、開口部153Aを含み、第2の制御チャンネル152Bは、開口部153Bを含む。それぞれの一連の細胞増殖トレンチ120に隣接するバックチャンネル142はそれぞれ、バックチャンネル出口開口部143を含む。

30

#### 【0044】

様々な入口開口部、出口開口部、および制御チャンネル開口部は、一般に全て三次元であり、図1Aおよび図1Bに示されるように、制御レイヤ150の上壁まで垂直に昇っている。制御レイヤ150の上壁内の開口部に様々な装置、機構などを接続することで、開口部へと細胞、流体などを注入することができる。幾つかの例において、ポンプ（例えば、蠕動ポンプ、シリンジポンプ、圧力管など）を開口部に連結して、細胞、増殖培地、洗浄流体などを注入し、制御チャンネル152Aおよび152Bを（流動した非圧縮性流体を介して）加圧および減圧することができる。図示された実装形態において、バックチャンネル出口開口部143は、デバイス100の外部の大気を開いている。しかしながら、その他の実装形態において、バックチャンネル出口開口部143は、完全に細胞流動レイヤ110内に配置されている場合があり、バックチャンネル142を増殖チャンネル112の主要部分118に流体連結することができる。

40

#### 【0045】

ここで図4A～図4Cを参照すると、増殖チャンネル112の入口部分114Aは、2つの入口開口部115Aおよび115Bを使用して洗浄され得る。図4Aに示されるように、入口開口部115A、115Bの一方または両方を使用して、細胞および増殖培地を増殖チャンネル112の主要部分118に注入することができる。第1の制御チャンネル152Aは加圧されていないため、増殖チャンネル112の入口弁部分116Aはその開状態にあ

50

る。第1の入口開口部115Aに注入された細胞、増殖培地、または他の物質は、増殖チャンネル112の主要部分118に流入することができる。その後、図4Bに示されるように、或る特定量の材料が入口部分114Aに残留する場合がある（例えば、バイオフィルム、細胞がPDMSの亀裂および/または隙間にしっかりと留まり、増殖培地の強力なフラッシングによって除去できず、または細胞増殖によって置き換えられない）。デバイス100の使用中に、入口弁部分116Aは一般に開状態のままであるため、デバイス100の使用中に増殖チャンネル112が過剰な細胞および破片で汚染されないように、この余分な材料を入口部分114Aから除去する必要がある。

#### 【0046】

図4Cに示されるように、第1の制御チャンネル152Aを加圧して、増殖チャンネル112の入口弁部分116Aを閉じることができる。入口弁部分116Aが閉じられると、入口部分114Aに注入された全ての流体は、入口弁部分116Aを通じて主要部分118に流ることができない。次に、洗浄流体を第1の入口開口部115Aに注入することができる。入口弁部分116Aが閉じられ、入口部分114Aが第2の入口開口部115Bを含むので、洗浄流体は、入口部分114Aを通じて流れ、第2の入口開口部115Bから出ることができる。洗浄流体は、入口部分114Aから余分な細胞および他の材料を除去することができるため、入口弁部分116Aは、増殖チャンネル112を汚染することなく、デバイス100の使用中に開状態にすることができる。

#### 【0047】

様々な異なる種類の流体を使用して入口部分114Aを洗浄することができる。幾つかの実装形態において、洗浄流体は非希釈の漂白剤である。幾つかの実装形態において、洗浄流体は希釈された漂白剤（例えば、10%（容量/容量）の漂白剤）である。幾つかの実装形態において、複数の異なる洗浄流体を要する多段階洗浄過程を使用することができる。例えば、最初に漂白剤（希釈または非希釈）または別の強力な洗浄流体を使用して入口部分114Aを洗浄して、入口部分114Aに残留する全ての材料を除去することができる。次に、エタノール（希釈（10%（容量/容量））または非希釈であり得る）を入口部分114Aに注入して、入口部分114Aから余分な漂白剤を除去する。最後に、増殖培地を入口部分114Aに注入して、余分なエタノールを除去し、栄養バランスを元に戻す。幾つかの実装形態において、エタノールの代わりに水が使用される。

#### 【0048】

デバイス100の多くの用途において、増殖培地を、使用中に増殖チャンネル112へと流入（注入、ポンプ圧送等）させるので、この多段階洗浄過程は有益であり得る。したがって、多段階洗浄過程は、（1）漂白剤などの強力な洗浄流体を利用して、余分な細胞および他の材料を全て確実に除去し、（2）使用中に漂白剤が不用意に増殖チャンネル112に流入しないように、洗浄後に余分なまたは残りの漂白剤が入口部分114Aに残留しないことを保証することができる。

#### 【0049】

図5Aおよび図5Bは、細胞増殖トレンチおよびバックチャンネルの様々な寸法を示している。細胞増殖トレンチのそれぞれの幅502は、約0.1 $\mu$ mから約50.0 $\mu$ mの間である。細胞増殖トレンチのそれぞれの高さは、約0.1 $\mu$ mから約50.0 $\mu$ mの間である。同じ増殖チャンネルから延びる異なる細胞増殖トレンチは、異なる幅を有し得る。例えば、図5Aは、細胞増殖トレンチ120A、120B、120C、および120Dを含む、複数の細胞増殖トレンチを示している。トレンチ120Aは、これら4つのトレンチの中で最も小さい幅を有し、120B、120C、および120Dを通してサイズが大きくなる。一般に、細胞増殖トレンチは、用途に応じて、任意の所望の幅を有し得る。細胞増殖トレンチの隣接する対は、距離504だけ離間されている。この距離は、約0.1 $\mu$ mから約20.0 $\mu$ mの間であり得る。

#### 【0050】

図5Bは、後端でバックチャンネル142に対して開いている一連の細胞増殖トレンチ（細胞増殖トレンチ120A、120B、120C、および120Dを含む）を示す。細胞

10

20

30

40

50

増殖トレンチ 1 2 0 A は、開口部 1 2 1 A を含む。細胞増殖トレンチ 1 2 0 B は、開口部 1 2 1 B を含む。細胞増殖トレンチ 1 2 0 C は、開口部 1 2 1 C を含む。細胞増殖トレンチ 1 2 0 D は、開口部 1 2 1 D を含む。これらの開口部 1 2 1 A ~ 1 2 1 D のそれぞれは、約 1 . 0  $\mu\text{m}$  から約 3 0 0 . 0  $\mu\text{m}$  の間の幅 5 0 6、および約 0 . 1  $\mu\text{m}$  から約 2 0 . 0  $\mu\text{m}$  の間の高さを有し得る。バックチャネル 1 4 2 は、約 1 . 0  $\mu\text{m}$  から約 3 0 0 . 0  $\mu\text{m}$  の間の幅 5 0 8、および約 0 . 1  $\mu\text{m}$  から約 5 0 . 0  $\mu\text{m}$  の間の高さを有し得る。

【 0 0 5 1 】

図 6 は、同質遺伝子系統の単一の出発細胞の増殖を示す細胞増殖トレンチ 1 2 0 のうちの 1 つの時系列を示している。ゼロ時間では、細胞増殖トレンチ 1 2 0 は単一の細胞を含む。9 時間後に、単一の細胞が 2 つの細胞に増殖した。1 8 時間で、細胞増殖トレンチ 1 2 0 は 3 つの細胞を含む。2 7 時間で、細胞増殖トレンチ 1 2 0 は 4 つの細胞を含む。最後に、3 6 時間で、細胞増殖トレンチ 1 2 0 は、6 つの細胞を含む。図 6 に示されるように、狭い細胞増殖トレンチ 1 2 0 により、細胞集団が直線的な一次元のグループにまとまって、例えば、細胞増殖トレンチ 1 2 0 内で一列に増殖することが可能となる。この一次元のまとまりにより、個々の細胞を画像化、分析、モニタリングすることなどが可能となり、細胞の系統を追跡するのにも役立つ。

10

【 0 0 5 2 】

図 6 に示されるように、細胞集団が増殖するにつれ、細胞は、増殖チャネル 1 1 2 に最も近い細胞増殖トレンチ 1 2 0 の端部に近づき始める。細胞増殖トレンチ 1 2 0 が一杯になると、次の分裂により最後の細胞が増殖チャネル 1 1 2 へと押し出されることとなる。細胞集団は  $2^n$  の速度で増殖し、ここで、 $n$  は細胞の世代数である。一般に、細胞増殖トレンチ 1 2 0 は、約 5 個の細胞から約 1 0 個の細胞の間を収容するのに十分な長さであり、同質遺伝子系統は、約 2 世代から約 1 0 世代の増殖の間で達成され得る。同質遺伝子系統は、細胞増殖を通じて非常に素早く、頑健に、かつ受動的に達成されるので、細胞増殖トレンチ 1 2 0 に、同じ系統からの単一の細胞または複数の細胞を個別に装入する必要はない（例えば、プールされた混合系統集団は、本明細書で更に論じられるように、細胞トレンチ内でランダムに播種され得る）。

20

【 0 0 5 3 】

図 7 は、デバイス 1 0 0 を使用方法 7 0 0 のフローチャートを示している。図 8 A ~ 図 8 C は、方法 7 0 0 の異なるステップでのデバイス 1 0 0 の段階を示している。ステップ 7 0 2 において、細胞および増殖培地は、入口部分 1 1 4 A を介して増殖チャネル 1 1 2 に注入される。細胞および増殖培地は、入口開口部 1 1 5 A および 1 1 5 B の一方または両方を介して注入され得る。ブリッジ弁部分 1 3 4 が閉じている間に、細胞および増殖培地は注入される。図 8 A に示されるように、第 1 の制御チャネル 1 5 2 A は加圧されていないので、入口弁部分 1 1 6 A および 1 2 6 A は開いている。したがって、細胞および増殖培地は、入口弁部分 1 1 6 A を通じて増殖チャネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に流入することができる。ブリッジ弁部分 1 3 4 は閉じられているので、細胞および増殖培地は、ブリッジチャネル 1 3 2 を通じて採集チャネル 1 2 2 に流れない。

30

【 0 0 5 4 】

ステップ 7 0 4 では、第 1 の制御チャネル 1 5 2 A を加圧することによって、入口弁部分 1 1 6 A、1 2 6 A、および出口弁部分 1 1 6 B、1 2 6 B は閉じられる。図 8 B に示されるように、第 1 の制御チャネル 1 5 2 A が加圧されると、入口弁部分 1 1 6 A、1 2 6 A、および出口弁部分 1 1 6 B、1 2 6 B は閉状態に動く。これらの弁部分がそれらの閉状態にあるとき、細胞および増殖培地は、増殖チャネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 内に留まり、入口部分 1 1 4 A または出口部分 1 1 4 B に流入することが妨げられる。ブリッジ弁部分 1 3 4 は閉じたままであるため、細胞および増殖培地はブリッジチャネル 1 3 2 を通じて流れることはできない。

40

【 0 0 5 5 】

ステップ 7 0 6 では、第 1 の入口開口部 1 1 5 A または第 2 の入口開口部 1 1 5 B のいずれかに洗浄流体を注入することによって、入口部分 1 1 4 A が洗浄される。図 8 B に示

50

されるように、第1の制御チャネル152Aが加圧され、入口弁部分116Aが閉じられるので、洗浄流体は、入口部分114Aを通じて2つの入口開口部115Aと115Bとの間を流れる。したがって、洗浄流体により、残留細胞、増殖培地、細菌などの汚染物質が除去される。幾つかの実装形態において、入口部分114Aの洗浄は、本明細書に記載されるように、3段階法を使用することを含む。これらの実装形態において、最初に漂白剤を入口部分114Aを通じて流して、汚染物質を除去する。次に、エタノールを入口部分114Aを通じて流して余分の漂白剤を除去し、最後に増殖培地を入口部分114Aを通じて流して余分のエタノールを除去し、栄養バランスを元に戻すことができる。幾つかの実装形態において、エタノールの代わりに水が使用される。

#### 【0056】

細胞および増殖培地をデバイス100に注入する場合に、細胞を細胞増殖トレンチ120に集合させるのに使用され得る複数の技術が存在する。幾つかの実装形態において、細胞は、拡散を介して細胞増殖トレンチ120に集合する。これらの実装形態において、入口弁部分116Aおよび126A、出口弁部分116Bおよび126B、ならびにブリッジ弁部分134は、全て閉じたままである。次に、増殖チャネル112の主要部分118内の細胞は、細胞増殖トレンチ120内に拡散することができる。ブリッジ弁部分134を閉じることにより、細胞がブリッジチャネル132を通じて採集チャネル122に不用意に拡散しないことが保証される。入口弁部分116Aおよび126A、ならびに出口弁部分116Bおよび126Bを閉じることで、細胞が増殖チャネル112の主要部分118から不用意に拡散して出て行かないことが保証される。入口弁部分116Aおよび126A、ならびに出口弁部分116Bおよび126Bを閉じることで、全ての流体が増殖チャネル112の主要部分118に流入または流出することも妨げられ、これは、細胞の一部または全てが細胞増殖トレンチ120に拡散するのを遅らせ、または妨げることができる。この拡散過程は、入口弁部分116Aおよび126A、ならびに出口弁部分116Bおよび126Bが閉じられている限り、入口部分114Aが洗浄される前、その間、またはその後に行われ得る。

#### 【0057】

別の実装形態において、遠心分離を使用して、細胞増殖トレンチ120に装入することができる。この技術は、濃縮することができないため細胞増殖トレンチ120への拡散が困難となる希薄な培養物に有用であり得る。これらの実装形態において、細胞および増殖培地が増殖チャネル112に注入されると、デバイス100は、遠心分離機または他の回転機構を使用して回転され得ることで、細胞が細胞増殖トレンチに流入する。デバイス100は回転しているので、一般に、第1の制御チャネル152Aおよび第2の制御チャネル152Bを加圧することは不可能であり、遠心分離機に基づく装入過程の間は、全ての弁部分は開いたままである。したがって、一般的に、遠心分離機を使用した後は、入口部分114Aを洗浄しなければならない。遠心分離機を使用した後は、採集チャネル122も洗浄することが必要である。

#### 【0058】

細胞流動レイヤ110がバックチャネル142を含む実装形態においては、細胞増殖トレンチ120を通じた流体の分岐した対流を使用して、細胞を細胞増殖トレンチ120に引き込むことができる。これらの実装形態において、ブリッジ弁部分134は閉じたままである。分岐した対流を介した装入は、入口弁部分116Aおよび126A、ならびに出口弁部分116Bおよび126Bが入口洗浄過程の間に閉じられている限り、入口部分114Aが洗浄される前に行われ得る。

#### 【0059】

図7を参照し戻すと、入口部分114Aが洗浄されたら、ステップ708で、入口弁部分116Aおよび出口弁部分116Bが開かれ、追加の増殖培地が増殖チャネル112の主要部分118に流入され得る。ステップ710では、細胞増殖トレンチ120内の細胞を、画像化、モニタリング、分析することなどが可能である。方法700のこの段階では、デバイス100は、図8Aに示される構成にある。細胞を細胞増殖トレンチ120に集

10

20

30

40

50

合させることの一環として、追加の増殖培地を増殖チャンネル 1 1 2 に流入させることができる。しかしながら、増殖培地は一般的に、細胞増殖トレンチ 1 2 0 内の細胞の分析の間に、増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に連続的に流入される。したがって、増殖チャンネル 1 1 2 の入口弁部分 1 1 6 A および出口弁部分 1 1 6 B は、一般に、細胞増殖トレンチ 1 2 0 内の細胞の分析中は開いている。しかしながら、他の実装形態において、増殖チャンネル 1 1 2 の入口弁部分 1 1 6 A および出口弁部分 1 1 6 B は、追加の増殖培地が増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に流入した後に閉じられる。これらの実装形態において、画像化および/または分析は、増殖チャンネル 1 1 2 の入口弁部分 1 1 6 A および出口弁部分 1 1 6 B が閉じられている間に行われる。

#### 【 0 0 6 0 】

細胞が細胞増殖トレンチ 1 2 0 に集合したら、様々な異なる種類の分析を行うことができる。限定されるものではないが、蛍光、位相差、明視野、ライトシート、またはあらゆる種類の超解像画像診断法を含む任意の数の異なる顕微鏡技術を使用して、細胞を経時的に画像化することができる。細胞外分泌物をアッセイするために、抗体結合ビーズまたは他の分析物検出系を、増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に流入させることができる。さらに、油または水と非混和性の別の流体を増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に流入させて、細胞および水性媒体を細胞増殖トレンチ 1 2 0 内に閉じ込め、密閉された反応区画を効果的に生成することができる。そのような細胞外因子を画像化によってアッセイした後に、増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 から油を一掃し、増殖培地と交換して、細胞増殖トレンチ 1 2 0 内の全ての細胞の増殖を再開することができる。

#### 【 0 0 6 1 】

ステップ 7 1 2 において、入口開口部 1 2 5 を通じて採集チャンネル 1 2 2 に洗浄流体を流入させることによって、採集チャンネル 1 2 2 を洗浄することができる。目的細胞は最終的に採集チャンネル 1 2 2 に移動されるため、一般に、目的細胞が導入される前に潜在的な汚染物質を採集チャンネル 1 2 2 から除去する必要がある。採集チャンネル 1 2 2 の洗浄は、一般に、増殖チャンネル 1 1 2 の入口部分 1 1 4 A に適用される同じ 3 段階の洗浄過程を含む。最初に洗浄流体（例えば、希釈または非希釈の漂白剤）を、採集チャンネル 1 2 2 を通じて流すことができる。次に、エタノールを採集チャンネル 1 2 2 を通じて流して、残留漂白剤を除去する。最後に、増殖培地を採集チャンネル 1 2 2 を通じて流して、残留エタノールを除去する。幾つかの実装形態において、エタノールの代わりに水が使用される。

#### 【 0 0 6 2 】

図 8 A に示されるように、第 2 の制御チャンネル 1 5 2 B が加圧され、ブリッジ弁部分 1 3 4 が閉じられるので、洗浄過程の間に使用される流体は、増殖チャンネル 1 1 2 に入ることなく採集チャンネル 1 2 2 全体を通じて流れる。洗浄流体により、採集チャンネル 1 2 2 内、ならびに任意の上流および下流のコネクタ、チューブ内などに存在する非滅菌環境でのチップの組み立てにより付着した細胞および別の汚染物質が除去される。

#### 【 0 0 6 3 】

採集チャンネル 1 2 2 の洗浄は、一般に、細胞が細胞増殖トレンチ 1 2 0 中に装入された後の任意の時点で行われ得る。したがって、採集チャンネル 1 2 2 の洗浄は、ステップ 7 1 0 における細胞の画像化および/または分析の間またはその後に行われ得る。採集チャンネル 1 2 2 を洗浄する前に、採集チャンネル 1 2 2 の入口弁部分 1 2 6 A および出口弁部分 1 2 6 B を閉じなければならない。

#### 【 0 0 6 4 】

モニタリングおよび分析の段階の間に 1 つ以上の目的細胞が特定されたら、1 つ以上の目的細胞を、ブリッジチャンネル 1 3 2 および採集チャンネル 1 2 2 を使用してデバイス 1 0 0 から容易に抽出することができる。ステップ 7 1 4 では、図 8 C に示されるように、入口弁部分 1 1 6 A および 1 2 6 A、ならびに出口弁部分 1 1 6 B および 1 2 6 B が最初に閉じられ、ブリッジ弁部分 1 3 4 が開かれる。入口弁部分 1 1 6 A および 1 2 6 A、ならびに出口弁部分 1 1 6 B および 1 2 6 B を閉じた後に、ブリッジ弁部分 1 3 4 を開いて、入口弁部分 1 1 6 A および 1 2 6 A、ならびに出口弁部分 1 1 6 B および 1 2 6 B を通じ

10

20

30

40

50

た残留流によって細胞が影響を受けないことを保証する。ステップ716では、1つ以上の目的細胞を細胞増殖トレンチ120から採集チャンネル122に移動させる。1つ以上の目的細胞は、細胞増殖トレンチ120から、ブリッジチャンネル132を經由して、採集チャンネル122の主要部分128へと流れることができる。入口弁部分116A、126A、および出口弁部分116B、126Bは閉じているので、1つ以上の目的細胞は、入口部分114A、124A、または出口部分114B、124Bに不用意に流入し得ない。

#### 【0065】

1つ以上の目的細胞は、任意の適切な技術を使用して移動され得る。幾つかの実装形態においては、エレクトロウェットिंगまたは誘電泳動（光電子ピンセットを含み得る）を使用することができる。他の実装形態においては、光ピンセットを使用することができる。光ピンセットは、集束レーザービームを使用して小さな粒子に力を与える光学機器である。幾つかの実装形態において、光ピンセットは、レーザー（例えば、ネオジウムドープイットリウムアルミニウムガーネットレーザー）、ビームエキスパンダ、レーザービームを所望の位置に向ける様々な異なるレンズおよびミラー、ならびに所望のビーム形状および強度プロファイルを形成する顕微鏡対物レンズおよび集光器を使用して実装され得る。デバイス100と共に使用する間に、光ピンセットの構成要素は、一般に、デバイス100に対して任意の方向に配置され得る。光ピンセットのレーザービームは、細胞流動レイヤ110内に伝播し、移動される細胞を捉えるまたは掴む。静止した光ピンセットに対してデバイス100を動かすことができ、および/または光ピンセットのレーザービーム自体を操縦して、捉えた細胞を操作することができる。次に、光ピンセットは、目的細胞を、細胞増殖トレンチ120の1つから、ブリッジチャンネル132の1つを經由して、採集チャンネル122の主要部分128に移動させることができる。

#### 【0066】

入口弁部分116A、126A、および出口弁部分116B、126Bの閉鎖は、残留対流を防ぎ、細胞への抗力を最小限に抑えるため、低レーザー出力で光ピンセットを介して信頼性の高い細胞輸送が可能となる。さらに、光ピンセットのアレイを、ビーム分割、モード形成、および適応波面補正の実装を介して作製することができる（すなわち、ホログラフィック光トラッピング）。ホログラフィック光トラッピングは、複数の細胞を同時に輸送することができるという利点をもたらす。

#### 【0067】

一般に、任意の数の目的細胞を採集チャンネル122に移動させることができる。幾つかの実装形態においては、単一の目的細胞を単一の細胞増殖トレンチ120から抽出することができる。他の実装形態においては、単一の目的細胞を複数の細胞増殖トレンチ120のそれぞれから抽出することができる。追加の実装形態においては、複数の目的細胞を単一の細胞増殖トレンチ120から抽出することができる。なおも更なる実装形態においては、複数の目的細胞を複数の細胞増殖トレンチ120のそれぞれから抽出することができる。更に他の実装形態においては、1つ以上の細胞増殖トレンチ120の第1のセットのそれぞれから単一の細胞を抽出することができ、1つ以上の細胞増殖トレンチ120の第2のセットのそれぞれから複数の細胞を抽出することができる。

#### 【0068】

ステップ718では、ブリッジ弁部分134が閉じられ、採集チャンネル122の出口弁部分126Bが開かれる。ステップ720では、1つ以上の目的細胞が、採集チャンネル122の出口部分124Bから抽出される。任意の適切な技術を使用して、例えば、採集チャンネル122を通じて増殖培地を流すことによって、または光ピンセットを使用することによって、1つ以上の目的細胞を、採集チャンネル122の主要部分128から採集チャンネル122の出口部分124Bに移動させることができる。

#### 【0069】

幾つかの実装形態においては、1つ以上の目的細胞を、増殖チャンネル122から抽出した後、採集チャンネル122の細胞増殖トレンチ130に移動させることができる。目的細胞を細胞増殖トレンチ130内で維持およびモニタリングした後、出口部分124B

10

20

30

40

50

に移動させて抽出することができる。実施される分析の種類に応じて、増殖チャンネル 1 1 2 から目的細胞を抽出するが、目的細胞を採集チャンネル 1 2 2 から直ちに抽出しないことが有益である場合がある。これらの実装形態において、採集チャンネル 1 2 2 から抽出される目的細胞は、採集チャンネル 1 2 2 の細胞増殖トレンチ 1 3 0 に移動された目的細胞の子孫を含み得る。

**【 0 0 7 0 】**

幾つかの実装形態においては、目的細胞をデバイス 1 0 0 から抽出したら、採集チャンネル 1 2 2 をフラッシングして、全ての残りの細胞が採集チャンネル 1 2 2 から確実に除去されるようにすることができる。このフラッシングは、例えば、採集チャンネル 1 2 2 を通じて増殖培地を流すことによって達成され得る。

10

**【 0 0 7 1 】**

幾つかの実装形態においては、全ての目的細胞が細胞増殖トレンチ 1 2 0 から採集チャンネル 1 2 2 に移動されて、その後に抽出されるわけではない。これらの実装形態においては、細胞増殖トレンチ 1 2 0 内の細胞の一部が抽出される。次に、採集チャンネル 1 2 2 がフラッシングされ、採集チャンネル 1 2 2 の入口弁部分 1 2 6 A および出口弁部分 1 2 6 B が閉じられ、ブリッジ弁部分 1 3 4 が再び開かれるため、追加の目的細胞を細胞増殖トレンチ 1 2 0 から採集チャンネル 1 2 2 に移動させることができる。

**【 0 0 7 2 】**

方法 7 0 0 の幾つかの実装形態においては、入口弁部分 1 1 6 A、出口弁部分 1 1 6 B、入口弁部分 1 2 6 A、または出口弁部分 1 2 6 B のいずれか 1 つが開閉される時、これらの入口弁部分および出口弁部分の残りが開閉される。したがって、方法 7 0 0 のステップのいずれかが入口弁部分および出口弁部分のいずれか 1 つを開閉することについて言及する場合に、そのステップはまた、別の入口弁部分および出口弁部分を開閉することを含む。しかしながら、ブリッジ弁部分 1 3 4 は、一般に、入口弁部分 1 1 6 A、1 2 6 A、および出口弁部分 1 1 6 B、1 2 6 B とは別々に制御される。他の実装形態においては、入口弁部分 1 1 6 A、出口弁部分 1 1 6 B、入口弁部分 1 2 6 A、または出口弁部分 1 2 6 B のいずれか 1 つは、入口弁部分 1 1 6 A、出口弁部分 1 1 6 B、入口弁部分 1 2 6 A、または出口弁部分 1 2 6 B の残りとは独立して制御され得る。なおも他の実装形態においては、ブリッジ弁部分 1 3 4 は、入口弁部分 1 1 6 A、出口弁部分 1 1 6 B、入口弁部分 1 2 6 A、または出口弁部分 1 2 6 B のいずれか 1 つと一緒に制御され得る。

20

30

**【 0 0 7 3 】**

したがって、図 8 A ~ 図 8 C に示されるように、細胞流動レイヤ 1 1 0 の様々な弁部分により、細胞を長期間にわたって分析し、最小限の労力でデバイスから容易に抽出することができる。入口弁部分 1 1 6 A は、細胞が増殖チャンネル 1 1 2 の主要部分 1 1 8 に流入した後に、増殖チャンネル 1 1 2 の入口部分 1 1 4 A を洗浄することを可能にする。さらに、入口弁部分 1 1 6 A および出口弁部分 1 1 6 B は、細胞増殖トレンチ 1 2 0 内の細胞の分析の間に、増殖培地が増殖チャンネル 1 1 2 に流入することを可能にする。最後に、ブリッジ弁部分 1 3 4 は、分析が完了するまで、採集チャンネル 1 2 2 が増殖チャンネル 1 1 2 から隔離されたままとなることを可能にする。したがって、1 つ以上の目的細胞の移動経路（増殖チャンネル 1 1 2 および採集チャンネル 1 2 2）は、破片および汚染物質（例えば、残留細胞、細菌など）を実質的にまたは全く含まないように保たれる。さらに、ブリッジ弁部分 1 3 4 は、採集チャンネル 1 2 2 および採集チャンネル 1 2 2 に取り付けられた任意のチップ外の配管網を、増殖チャンネル 1 1 2 の入口部分 1 1 4 A と同様に洗浄することを可能にする。したがって、1 つ以上の目的細胞を、細胞増殖トレンチ 1 2 0 から採集チャンネル 1 2 2 の出口部分 1 2 4 B に容易に移動させ、汚染されずにデバイス 1 0 0 から抽出することができる。

40

**【 0 0 7 4 】**

増殖チャンネル 1 1 2 に対して垂直な直線的な細胞増殖トレンチ 1 2 0 の配置により、直交して流れる培地によって細胞系統の子孫を洗い流すことが可能となる。細胞増殖トレンチ 1 2 0 内に閉じ込められた細胞系統から子孫が継続的に排出されることにより、細胞が

50

局所的に蓄積しないため、細胞を何世代にもわたって（例えば、細胞トレんチの末端に位置する細胞に対して、哺乳動物細胞については10世代～100世代続けて、細菌についてはおそらく1000世代より長く続けて）モニタリングすることが唯一可能となる。入口部分114Aおよび採集チャネル122を洗浄することと相まって、デバイス100では、世代ごとに細胞が指数関数的に倍増するために起こり得る細胞の大量の蓄積が回避される。30世代の増殖の後に、10億を超える子孫が各初期細胞から蓄積し得る。この蓄積は、デバイス100では回避される。デバイス100の特徴の組合せにより、何世代にもわたって画像化された細胞集団から汚染されていない単一細胞を取得することが可能となる。これにより、以前は不可能であった幅広い用途が可能となる。

**【0075】**

デバイス100は、様々な異なる用途で使用され得る。1つ目の用途は、様々な細胞の広範囲の特性における小さいが遺伝的に安定した差異を検出することである。ほとんどの細胞挙動は、所与の遺伝子型が広範囲の異なる表現型を引き起こすように統計的に分布している。例えば、細胞内のタンパク質の発現は、同じ環境で増殖する遺伝的に同一の細胞間でさえも大幅に異なる場合がある。遺伝学的スクリーニングでは、その際、望ましい特性を有する稀な遺伝的変異が、望ましい表現型を一過性にしか示さない細胞よりも劣勢であることが多い。デバイス100は、複数の並列な細胞における何世代にもわたる増殖についての各遺伝的変異体の追跡を可能にするため、実質的な統計的サンプルを提供する。この統計サンプルは、遺伝的に受け継がれた形質を一過性の表現型多様性から切り離すことを可能にし、こうして興味深い挙動を一過性に模倣する細胞の大きな集団内での稀な目的変異体の特定が可能となる。

**【0076】**

顕微鏡検査によって直接的または間接的に観察され得る任意の特性を使用して、単一細胞における表現型異質性と比較して変異体間の遺伝的にコード化された差異が小さい場合でも、挙動を記録することができる。これにより、限定されるものではないが、遺伝子発現、細胞増殖速度、形態学、細胞局在パターン、酵素活性、DNA複製および修飾、染色体分離パターン、代謝状態、ならびに細胞エンベロープ、またはそれらの任意の組合せを含む広範囲の特性の範囲における小さいが遺伝的に安定した差異を検出することが可能となる。

**【0077】**

特性を追跡することにより、様々な生体材料の改善を得ることができる。生体材料としては、リボ核酸(RNA)および、限定されるものではないが、蛍光タンパク質または発光タンパク質を含むタンパク質、アクチベータおよびリプレッサなどの調節エレメント、光遺伝学的に活性化される制御タンパク質、酵素および抗体、mRNA、クラスタを形成し規則正しい間隔を持つ短いパンドロームリピート(CRISPR)用のスモールRNAおよびガイドRNAなどが挙げられる。

**【0078】**

遺伝的差異の追跡としては、経路および発現プログラムを評価するための細胞内の遺伝子発現および反応ネットワークの変化の追跡、細胞の生理学、形態学、および増殖速度だけでなく、細胞分裂時の娘細胞間の差異も測定するための全細胞アッセイの実施、細胞小器官または他の細胞内構造物の数または空間的分布の変化の検出、ならびに細胞間相互作用および各トレんチへの細胞分泌の検出が挙げられ得る。

**【0079】**

さらに、デバイス100では、目的遺伝的変異体をクローニングせずに目的遺伝的変異体を調査することが可能となる。クローニングは一般に非常に時間がかかり、リソースを必要とし、1つ以上の染色体、プラスミドなどにまたがる複雑な遺伝子突然変異の場合は不可能な場合さえもある。したがって、デバイス100により、目的細胞は、更なる増幅、貯蔵、下流の生細胞機能的アッセイ、および他の用途のために直ちに利用可能となる。

**【0080】**

2つ目の用途は、長い時間スケール（例えば、多世代）にわたるエピジェネティックな

10

20

30

40

50

挙動を特定することである。多くの細胞挙動はエピジェネティックであり、例えば、多世代の時間スケールで挙動が変化する。このような挙動を特定するには、複数世代、場合によっては数十世代、またはそれどころか数百世代の細胞増殖の観察範囲が必要である。デバイス100では、これらの長期的なエピジェネティックな変化を観察した後に、細胞の取得が可能となる。したがって、クロマチンリモデリング、細胞運命決定、双安定回路および多世代振動体 (multigenerational oscillator)、または長期画像化により観察される他のエピジェネティックな挙動についての遺伝学的スクリーニングを含む様々な方法が可能となる。

#### 【0081】

3つ目の用途は、種々の環境に対する細胞の反応を検出することである。多くの細胞挙動は、増殖条件に依存する。デバイス100では、多くの種々の環境下での多世代画像化が可能となり、これにより細胞および細胞過程の全ての観察可能な特性が環境間でどのように変化するかをスクリーニングし、初めて記録することが可能となる。多数の遺伝的変異体を並行してモニタリングした後に、目的変異体についての細胞を抽出することができる。

10

#### 【0082】

4つ目の用途は、実施される様々なアッセイを実施することである。細胞を物理的に抽出することにより、デバイス100では、ゲノムワイドなターミナルアッセイなどの、抽出された細胞に対してDNAシーケンシングを超えたアッセイを実施することが可能となる。各分裂で2つの娘細胞のうちの1つを抽出することによって、細胞系統にわたるゲノムワイドな時間経過 (例えば、ゲノムワイドな特性の追跡) を完了することができる一方で、デバイス100に残された娘細胞の特性を同時に観察することができる。

20

#### 【0083】

本開示を1つ以上の特定の実装形態を参照して記載してきたが、当業者は、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、そこに多くの変更を加えることができることを認識するであろう。これらの実装形態のそれぞれおよびそれらの明らかな変形形態は、本開示の趣旨および範囲内に含まれると考えられる。本開示の態様による追加の実装形態は、本明細書に記載された実装形態のいずれかからの任意の数の特徴を組み合わせることができることも考えられる。

30

40

50

【図面】  
【図 1 A】

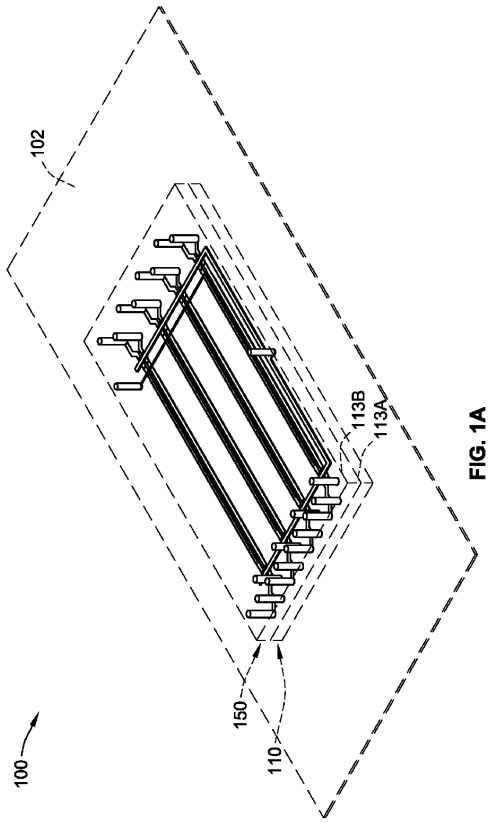


FIG. 1A

【図 1 B】

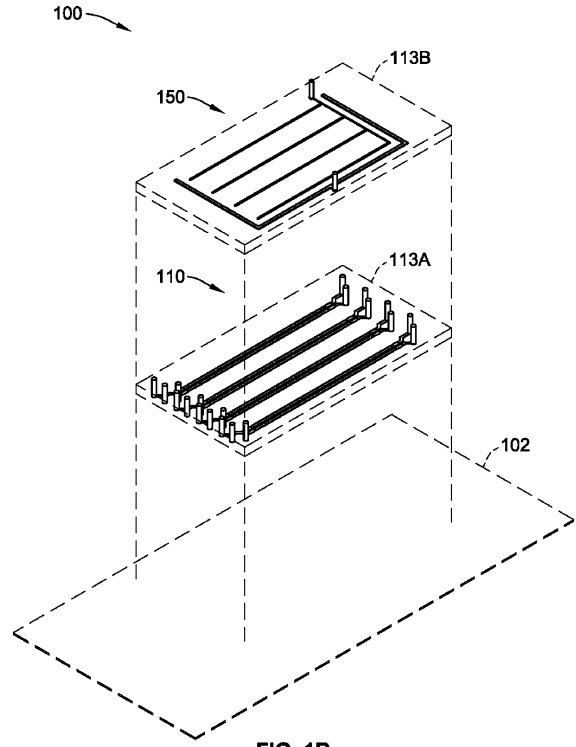


FIG. 1B

【図 2 A】

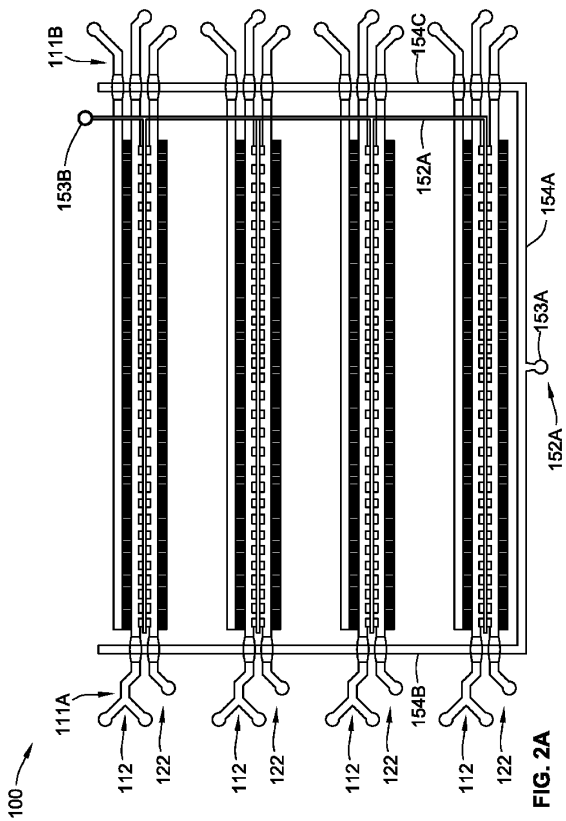


FIG. 2A

【図 2 B】

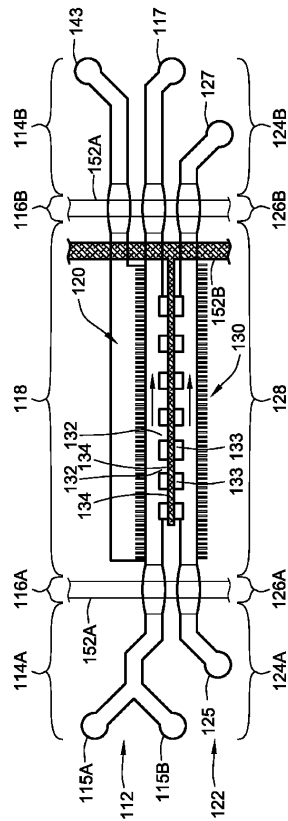


FIG. 2B

10

20

30

40

50

【 3 A 】

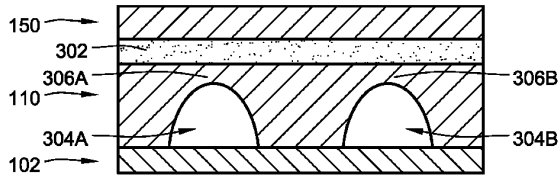


FIG. 3A

【 3 B 】

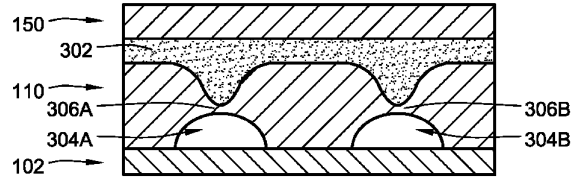


FIG. 3B

【 3 C 】

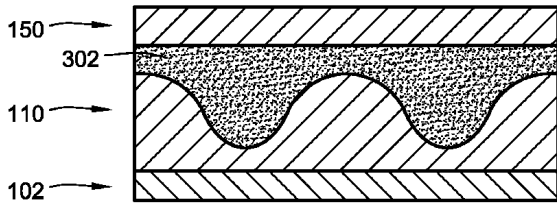


FIG. 3C

【 4 A 】

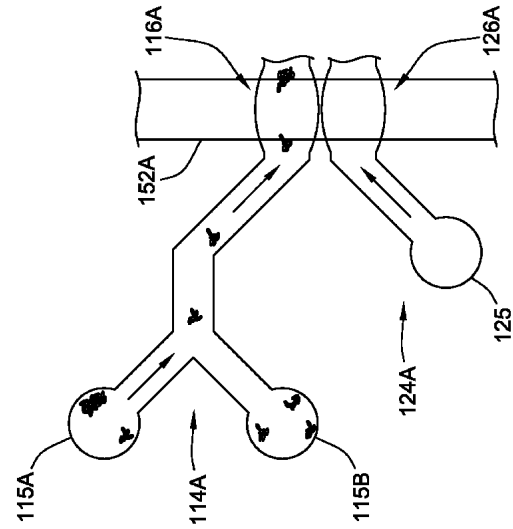


FIG. 4A

【 4 B 】

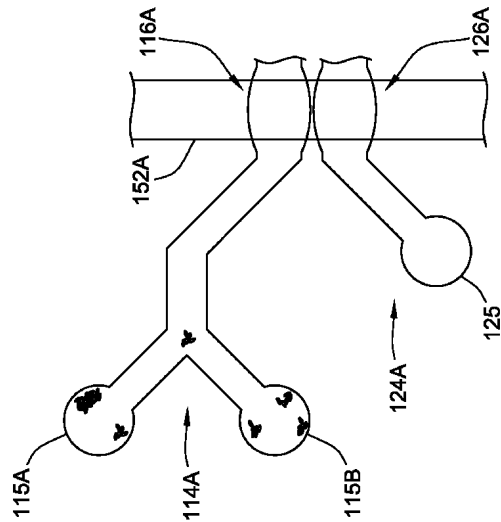


FIG. 4B

【 4 C 】

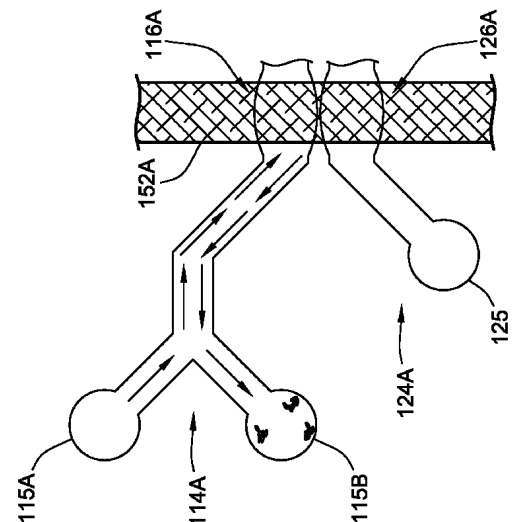


FIG. 4C

10

20

30

40

50

【図 5 A】

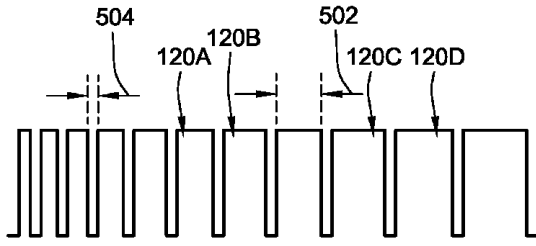


FIG. 5A

【図 5 B】

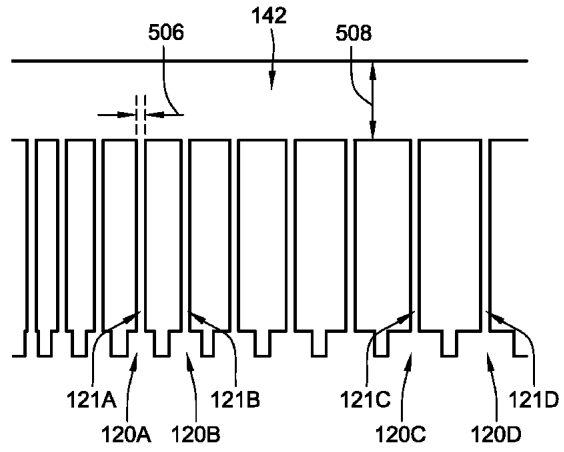


FIG. 5B

【図 6】

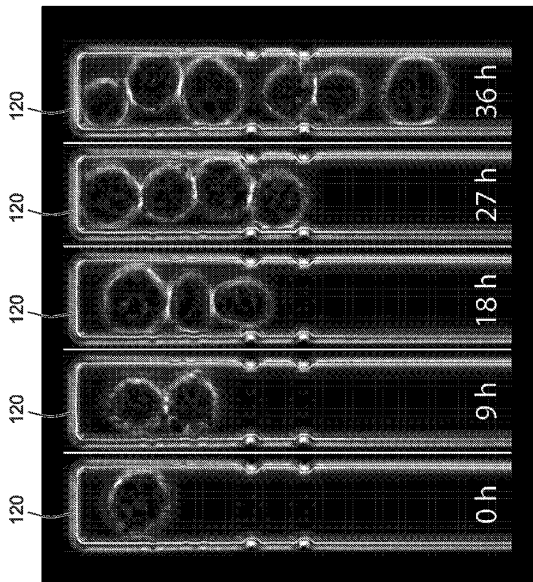
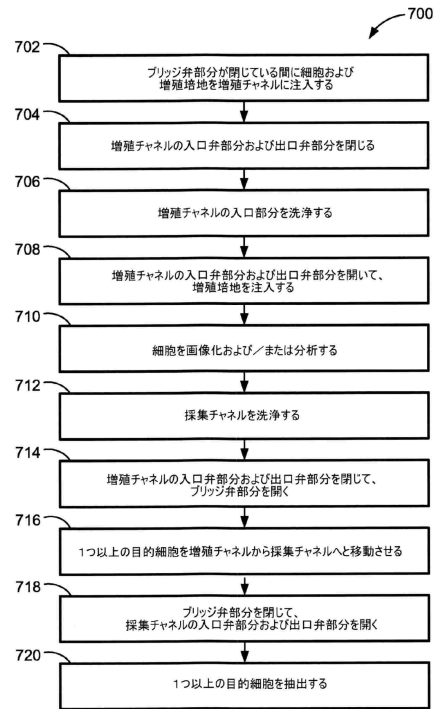


FIG. 6

【図 7】



10

20

30

40

50



## フロントページの続き

- イブ 200  
(72)発明者 ポールソン ジョアン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ボストン ロングウッド アベニュー 200  
審査官 高山 敏充  
(56)参考文献 特表2016-521350(JP, A)  
米国特許出願公開第2015/0247790(US, A1)  
国際公開第2018/140302(WO, A1)  
国際公開第2013/019491(WO, A1)  
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12M