

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6200419号
(P6200419)

(45) 発行日 平成29年9月20日(2017.9.20)

(24) 登録日 平成29年9月1日(2017.9.1)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 35/00	(2006.01) GO 1 N 35/00 D
GO 1 N 33/53	(2006.01) GO 1 N 33/53 T
GO 1 N 35/08	(2006.01) GO 1 N 35/08 A
GO 1 N 37/00	(2006.01) GO 1 N 37/00 1 O 1
B 0 1 J 19/00	(2006.01) B 0 1 J 19/00 3 2 1

請求項の数 16 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2014-513307 (P2014-513307)
(86) (22) 出願日	平成24年6月5日(2012.6.5)
(65) 公表番号	特表2014-518374 (P2014-518374A)
(43) 公表日	平成26年7月28日(2014.7.28)
(86) 國際出願番号	PCT/IE2012/000026
(87) 國際公開番号	W02012/164552
(87) 國際公開日	平成24年12月6日(2012.12.6)
審査請求日	平成27年6月1日(2015.6.1)
(31) 優先権主張番号	11168702.6
(32) 優先日	平成23年6月3日(2011.6.3)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁(EP)
(31) 優先権主張番号	61/493,234
(32) 優先日	平成23年6月3日(2011.6.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	513304116 ラディセンス ダイアグノスティクス リ ミテッド アイルランド国 コーク, シーアイティ ー キャンパス ビショップズタウン, ザ ルビコン センター
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ビーズベースの免疫アッセイで使用するための微小流体ディスク

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的試料を処理するための微小流体システムであって、該システムは、回転式モータと、該モータを制御するための手段と、該回転式モータに結合されたプラットフォームであって、該プラットフォームは、少なくとも1つの粒子洗浄構造と、該粒子洗浄構造の中で洗浄された粒子を受容するように適合された粒子受容構造とを提供するように適合されている、プラットフォームと、該プラットフォームが回転する間、該粒子受容構造の中で洗浄された粒子を検出するための検出ゾーンと

を備え、

該粒子受容構造は、ペレット化チャンバを備え、該ペレット化チャンバは、該検出ゾーンが該ペレット化チャンバの最外点において画定されるように、1つの端部における一点にテーパ状にされており、該粒子洗浄構造は、分岐された出口チャネルを備え、該分岐された出口チャネルは、廃棄物リザーバおよび該粒子受容構造の両方に通じており、該出口チャネルは、回転の中心から遠位の該粒子洗浄構造の壁の半径方向内側に接続されていることを特徴とする、システム。

【請求項 2】

前記粒子は、前記生物学的試料の特性を表す免疫修飾されたビーズおよび/または蛍光標識された免疫修飾されたビーズである、請求項1に記載の微小流体システム。

【請求項 3】

前記検出ゾーンは、前記プラットフォームが回転する間、光学系と協働するように適合されている、請求項 1 または 2 に記載の微小流体システム。

【請求項 4】

前記テープ状の端部は、1つの端部が閉鎖された細長薄型チャネル部分をさらに備え、これにより、遠心分離力の下で粒子を該チャネルの中で沈殿させることができ、請求項 1 に記載の微小流体システム。

【請求項 5】

前記検出ゾーンは、前記粒子が遠心分離によるペレット化に応じて小領域へと凝縮されるように成形されている、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の微小流体システム。 10

【請求項 6】

前記粒子は、粒子洗浄構造の中で洗浄され、該粒子洗浄構造は、遠心分離力の影響下において、回転の中心から遠位の壁に対して、前記粒子を沈殿させるように適合されている、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の微小流体システム。

【請求項 7】

前記粒子受容構造は、流動チャネルを備える、請求項 1 に記載の微小流体システム。

【請求項 8】

ポートまたは他のチャネルによって終端されるポートまたはチャネルは、前記粒子受容構造を通って流動する流体によって、前記廃棄物リザーバから置換される空気を排出するように適合されている、請求項 1 に記載の微小流体システム。 20

【請求項 9】

前記出口チャネルの分岐点内の毛細管規模の幾何学的狭窄および拡張は、前記粒子洗浄構造が流体を含有するとき、前記プラットフォームの第 1 の回転速度において流動に抵抗するように作用するが、第 2 のより高い回転速度においては、流体を流動させるように構成されている、請求項 8 に記載の微小流体システム。

【請求項 10】

前記出口チャネルは、前記粒子洗浄構造の回転の中心から半径方向遠位壁の最大半径方向位置未満である半径において、該粒子洗浄構造から出現し、これにより、画定された体積が、遠心分離力に応答して前記廃棄物リザーバの中へ流れ込むとき、該洗浄構造内に滞留させられる、請求項 8 または 9 に記載の微小流体システム。 30

【請求項 11】

前記滞留させられた流体は、粒子を含む、請求項 10 に記載の微小流体システム。

【請求項 12】

前記廃棄物リザーバは、所望の試料体積にほぼ等しい画定された廃棄物体積を備える、請求項 10 または 11 に記載の微小流体システム。

【請求項 13】

チャネルが、前記廃棄物リザーバから置換される空気を搬送するために提供される、請求項 12 に記載の微小流体システム。

【請求項 14】

前記チャネルは、前記廃棄物リザーバから半径方向内側に方向付けられ、該チャネルは、前記プラットフォームが回転中であり、かつ、前記粒子洗浄構造が動作流体の最大体積によって充填されている間、前記粒子洗浄構造内で達成されるべき液体レベルの半径方向内側においてポートまたは他のチャネルで終端する、請求項 13 に記載の微小流体システム。 40

【請求項 15】

前記粒子洗浄構造の内部体積は、動作流体の最大設計体積のそれよりも大きく、これにより、回転加速および減速の下にある間、該流体を混合する際に、該粒子洗浄構造内の空気の使用を可能にする、請求項 13 または 14 に記載の微小流体システム。

【請求項 16】

生物学的試料を処理するための方法であつて、該方法は、

プラットフォームを回転式モータに結合することと、
該プラットフォームを少なくとも1つの粒子洗浄構造および粒子受容構造とともに構成することと、

該粒子洗浄構造の中で洗浄された粒子を該粒子受容構造の中に受容することと、
該プラットフォームが回転する間、該粒子受容構造の中で洗浄された粒子を検出することと
を含み、

該粒子受容構造は、ペレット化チャンバを備え、該ペレット化チャンバは、該検出ゾーンが該ペレット化チャンバの最外点において画定されるように、1つの端部における一点にテーパ状にされており、該粒子洗浄構造は、分岐された出口チャネルを備え、該分岐された出口チャネルは、廃棄物リザーバおよび該粒子受容構造の両方に通じており、該出口チャネルは、回転の中心から遠位の該粒子洗浄構造の壁の半径方向内側に接続されていることを特徴とする、方法。
10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、免疫アッセイ診断またはポータブル診断分析器において使用するための微小流体ディスク、装置、システム、および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

フローサイトメトリーは、種々のタイプの試料、特に、生体細胞を含有する試料の細胞／生物学的内容物を決定するための強力な分析方法である。臨床用途では、フローサイトメーターは、リンパ球計数および分類、白血病およびリンパ腫の免疫学的特性評価、白血球計数および分類、ならびにビーズベースの免疫アッセイ診断を含む、多数の用途のために有用である。

【0003】

大部分のフローサイトメトリー技法では、流体溶液中の細胞は、通常、レーザ光源または単色でフィルタリングされたLED源によって產生される、光ビームを通して、個々に流動させられる。光が、各細胞に衝打するにつれて、光は、散乱され、結果として生じる散乱光が、細胞のタイプを決定するために分析される。細胞はまた、隨意に、蛍光分子に関連付けられたマーカーで標識され得、光がそれに衝打すると、蛍光を発し、それによって、細胞上のマーカーの存在を露呈させる。この方式では、細胞の表面成分に関する情報が、取得され得る。

【0004】

蛍光ビーズは、多重化された免疫アッセイを行うための便宜的かつ強力な方法を提供する。例えば、多重化は、別の異種色で均一に染色される検体と連結された異なる色のビーズを使用することによって達成され得る（散乱または蛍光放出のいずれか）。このように、アッセイ同定は、ビーズ色／蛍光から読み取られ得る一方、分析結果は、ビーズに結合された蛍光染料の量から読み取られ得る。ビーズはまた、免疫アッセイの固相が、バルクで製造され得る形式を提供し、アッセイのロバスト性を向上させる。典型的には、フローサイトメーターは、粒子から蛍光を検出および定量化するその能力を用いて、多重化されたビーズベースの免疫アッセイを行うために使用される。

【0005】

現在実装されている免疫蛍光ビーズアッセイに関する有意な問題の1つは、広範囲な手動またはロボット試料処理を要求することである。サンドイッチ式免疫アッセイの場合、この試料処理は、以下のステップの一部または全部から成り得る：

- ・全血からの血漿の分離
- ・既知の体積の開始試料を提供するための血漿の計測

10

20

30

40

50

- ・血漿の希釈
- ・検体の結合を助長するための希釈試料と免疫蛍光ビーズの混合
- ・十分な時間および結合に適切な温度における培養
- ・ビーズの洗浄
- ・結合を促進するための洗浄されたビーズと標識された二次抗体との混合
- ・十分な時間および結合に適切な温度における培養
- ・未結合二次抗体の洗浄
- ・フローサイトメトリー流動チャネル内へのビーズの注入。

【0006】

手動処理は、多くの用途において、コストが非常にかかり、また、誤差を生じやすい。
自動化もまた、多くの用途において、コストが非常にかかり、ポイント・オブ・ケアまたは医師の診療室分析等の用途の場合、例えば、液体操作ロボットを使用して現在実践されているように、不適切である。その結果、現在の自動化または手動処理より安価かつ誤差を生じにくい、多重化されたビーズベースの免疫アッセイのための試料処理を提供するという満たされていない必要性が存在する。

10

【0007】

ポイント・オブ・ケア診断アッセイシステムの短所は、典型的には、種々のアッセイタイプの多重化が不可能であることである。これらのシステムは、側方流動アッセイまたは電気化学反応アッセイ等の種々の類似アッセイタイプを行う際は非常に良好であるが、免疫アッセイ対比色血液化学反応等の異なる種類のアッセイが要求されるアッセイ条件は、これらの異なるアッセイタイプを多重化するためには不適切となる。この場合もやはり、中心研究所は、試料を分割し、異なるデバイスにおいて、アッセイを行うことによって、そのような統合を達成し得る。光学検出を伴う遠心分離微小流体プラットフォームは、種々のアッセイ技術が、単一計器および消耗品を使用して、並行して実装されることを可能にする。

20

【0008】

現在実装されている免疫蛍光ビーズアッセイのさらに有意な問題は、それらが、血液学的フローサイトメトリーのために開発された計器上で稼働されるということである。これらの計器は、これらのアッセイを行うことが可能であるが、高価かつ複雑であって、有意な保守および較正を要求する。その結果、そのようなアッセイを行うための低コストかつ低保守計器類の必要性が存在する。

30

【0009】

さらに、免疫蛍光ビーズアッセイは、典型的には、シース流動を使用して実装され、ビーズは、希釈され、ビーズ液体流の周囲の緩衝液の集束流動と整合される。これは、計器の検出体積内に同時に存在しないように、粒子を相互から分離し、かつ光学系内のほぼ同一の場所に位置付けるという二重効果を有する。これは、血液学的アッセイのために非常に有用であるが、蛍光ビーズ等の多数の本質的に同じ物体の検出に対して、いかなる利点ももたらさず、システムの機能を大幅に複雑化する。ビーズ試料が、例えば、その蛍光標識の放出スペクトルによって区別化された2つ以上の明確に規定された母集団から成る場合、同様のことが該当する。

40

【0010】

シース流動が所望され得る場合（免疫アッセイシステムと同一のシステム上で稼働される非常に高度に多重化された免疫アッセイまたは血液学的アッセイ）、遠心分離形式は、従来のポンプベースのシステムに勝る有利な利点を提供する。後者の場合、典型的には、複数のポンプが、試料およびシース流体流動のために使用され、ポンプの拍動性を最小にし、規定された平滑流動および試料とシース流動との間の比率を維持するために、多大な注意が払われなければならない。遠心分離力による圧送は、無拍動であるため、そのような変動は、本質的に、システム内に存在しない。

【0011】

いくつかの方法およびデバイスが、ビーズベースの免疫アッセイを行うために存在する

50

。

【0012】

特許文献1(Anderson et al.)は、「洗浄された」捕捉ビーズを伴うシステムについて説明しているが、本米国特許公開に関する弱点の1つは、ある点から別の点にビーズを移動させるための手段を提供せず、単一ビーズ検出を不可能にすることである。さらなる弱点は、固相を形成する捕捉されたビーズを伴うシステムが、要求が厳しい製造技法を要求することである。例えば、検体分子および蛍光標識の高度に再現性のある結合を提供するために、充填されたビーズの「層」が、再現可能に構築されなければならない。すなわち、ビーズの充填不良は、ビーズ層内のチャネルにつながり、結合のための十分な時間がなく、検体を高速で通過させ、低結合効率をもたらし得る。

10

【0013】

PCT特許出願第WO2006/110098号(Gyros Patent AB)は、微小チャネル構造を備える、遠心分離ベースの微小流体デバイスを開示しており、その中に、上流方向に、検出微小空洞への液体の輸送のための入口微小導管(輸送微小導管)に取着され、検出微小空洞または検出微小空洞の上流に位置付けられた反応微小空洞内で生じた反応の結果を検出するために使用される、検出微小空洞が存在する。本願は、主に、流体「栓」流を生成させ、気泡または閉塞を伴わずに、流体を合流させるための手段の提供を対象とし、弁のための疎水性表面処理を要求する。そのような構造の特徴サイズは、コンパクトディスク圧縮/射出成形技術のための延伸を使用して実現されており、臨床的に関連のあるより大きな体積(例えば、数10~数100μL)を保持することができる構造を生産することは不可能である。Gyrosによって製造されたディスクは、典型的には、深さ0.5mmの特徴を有し、少量または微量体積の場合、動作しない。

20

【0014】

特許文献2(Gamera Bioscience Corp)では、微小流体ディスク上における競合免疫アッセイの実施のためのデバイスが、開示される。これらは、ディスク上のチャンバ内で乾燥された定常固相、例えば、抗体を使用して行われる。さらに、検出は、結合に特異的基質による色形成を介する。

【0015】

ディスク材料への抗体の直接結合は、製造上の難点を呈するが、これは、代わりに、抗体をビーズ等の「移動」固相に結合することによって回避され得る。ディスク構造をコーティングし、有意な反応時間の間、それらを湿潤状態に維持する必要はない。ビーズはまた、捕捉抗体とのその共役の間、反応動態を向上させるための激しい攪拌を含め、最適条件下、何十万もの消耗品のために十分なバルク量で処理され得る。

30

【0016】

比色基質を介した検出は、色の蓄積を生じさせる酵素反応を通じたシグナルの増幅を可能にするという点において魅力的であるが、単純蛍光結合アッセイよりはるかに温度変動に敏感である。この温度敏感性はまた、長期間(長期保存期間)の酵素ベースの試薬の保管を困難にする。

【0017】

特許文献3(Keelogg et al.)では、全血中の糖化ヘモグロビン、総ヘモグロビン、およびグルコースの評価のための微小流体ディスクが開示される。微小流体ディスクの一部分は、溶解された希釈血液の流路内のフリット間に滞留させられるアガロースビーズから成る、親和性母材を使用する。糖化画分は、流動するにつれて、ビーズに結合され、非糖化画分は、キュベット内で光度的に測定される。別のキュベット内での総ヘモグロビンの測定と組み合わせて、これは、糖化ヘモグロビン画分を提供する。この形式の親和法には、いくつかの問題が存在する。第1に、ビーズの滞留は、a)フリット等の挿入要素、またはb)固相ビーズを滞留させるための1次元(「堰」、ビーズの通過には狭過ぎる)または2次元におけるチャネル狭窄のいずれかを要求する。いずれの場合も、製造要件は、有意であって、数ミクロンから10ミクロン程度の特徴の生産のために、特殊な方法を要求する。射出成形ツールの機械加工後の射出成形等、より従来の方法を使用

40

50

して、デバイスを製造することが好ましい。

【0018】

したがって、本発明の目的は、前述の問題のうちの少なくとも1つを克服する、免疫アッセイ診断デバイス、システム、および／または方法を提供することである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】米国特許出願公開第2004/096867号明細書

【特許文献2】国際公開第98/53311号

【特許文献3】米国特許出願公開第2004/0089616号明細書

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明によると、添付の請求項に記載のように、生物学的試料を処理するための微小流体システムであって、

回転式モータと、

該モータを制御するための手段と、

回転式モータに連結され、少なくとも1つの粒子洗浄構造および粒子洗浄構造内で洗浄された粒子を受容するために適合される粒子受容構造を提供するように適合される、プラットフォームと、

20

プラットフォームが回転する間、粒子受容構造内で洗浄された粒子を検出するための検出ゾーンと

を備える、システムが提供される。

【0021】

本発明は、シース流動の複雑性を除去する、免疫アッセイのために適切なシースレス流動方法を提供する。

【0022】

本発明は、自動化され、かつ手動処理より誤差が生じにくい、試料処理システムを提供する。ロボットシステムと比較して、費用効果的である。これは、高品質ビーズベースの免疫蛍光アッセイを行うために、未加工の生物学的試料（例えば、血液、痰、尿）を処理することができる、遠心分離微小流体プラットフォームを使用して達成される。本発明は、単純回転式モータおよびカスタム設計されたプラスチックディスクを使用して、單一プラットフォーム上で新規粒子洗浄構造および粒子受容構造の組み合わせを使用して、プロセスを行う。

30

【0023】

本発明はまた、回転を受けている間、微小流体ディスク上の流動チャネル内におけるビーズの検出のための手段を提供する。一実施形態では、ビーズ（または、粒子）が、シース、磁力、慣性力、または他の集束手段による付加的流動集束の使用を伴わずに、流動チャネル内に注入される。これは、アッセイを行うために要求されるデバイスアーキテクチャを大いに単純化する。

40

【0024】

一実施形態では、粒子は、該生物学的試料の特性を表す、免疫修飾されたビーズおよび／または蛍光標識された免疫修飾されたビーズである。

【0025】

一実施形態では、検出ゾーンは、プラットフォームが回転する間、光学系と協働するように適合される。

【0026】

一実施形態では、粒子受容構造は、ペレット化チャンバを備える。一実施形態では、ペレット化チャンバは、検出ゾーンが、その最外点に画定されるように、1つの端部における一点にテーパ状にされる。

50

【0027】

一実施形態では、テーパ状端部はさらに、1つの端部が閉鎖された細長薄型チャネル部分を備え、遠心分離力下、チャネル内にビーズを沈殿させる。

【0028】

一実施形態では、検出ゾーンは、粒子が、遠心分離によるペレット化に応じて、小領域に凝縮されるように成形される。

【0029】

一実施形態では、粒子は、遠心分離力の影響下において、回転中心から遠位の壁に対して、ビーズを沈殿せるように適合されるリザーバ内で洗浄される。

【0030】

一実施形態では、粒子受容構造は、流動チャネルを備える。

10

【0031】

他の実施形態では、シース流動が採用される。これらの場合、単純な1次元シースが、遠心分離力および容易に作成される微小流体ディスクトポロジを使用して作成され得、複数の計数の確率を大いに低下させる。

【0032】

他の実施形態では、多重化アッセイタイプが行われる。例えば、ビーズのフローサイトメトリー検出を使用した免疫アッセイが、反射またはバルク光学密度(OD)測定を使用して行われる酵素アッセイの比色検出と組み合わせられ得る。

【0033】

別の実施形態では、生物学的試料を処理するための微小流体システムであって、

回転式モータと、

該モータを制御するための手段と、

回転式モータに連結され、粒子を受容するために適合される、プラットフォームと、
プラットフォームが回転する間、流動チャネル内の試料の粒子を検出するための手段と
を備える、システムが提供される。

20

【0034】

一実施形態では、粒子は、免疫修飾されたビーズである。

【0035】

一実施形態では、粒子は、遠心分離力の影響下、回転中心から遠位の壁に対して、ビーズの沈殿物のために適合される、リザーバ内で洗浄される。

30

【0036】

一実施形態では、洗浄リザーバは、廃棄物リザーバおよび流動チャネルの両方に通じる、分岐された出口チャネルを有する。

【0037】

一実施形態では、出口チャネルの分岐点内の毛細管規模の幾何学的狭窄および拡張は、洗浄リザーバが流体を含有するとき、プラットフォームの第1の回転速度において、流動に抵抗するように作用するが、第2のより高い回転速度では、流体を流動させることができる。

【0038】

40

一実施形態では、流動チャネルに通じる分岐点に対する狭窄の半径方向位置および狭窄の直径の割合は、廃棄物リザーバに通じる分岐点に対する狭窄の半径方向位置および狭窄の直径の割合より小さい。

【0039】

一実施形態では、出口チャネルは、遠心分離力に応答して、廃棄物リザーバに流れ込むとき、画定された体積が、洗浄リザーバ内に滞留させられるように、洗浄リザーバの半径方向遠位壁の最大半径方向位置未満である半径において、洗浄リザーバから出現する。

【0040】

一実施形態では、滞留させられた流体は、粒子を含有する。

【0041】

50

一実施形態では、廃棄物リザーバは、所望の試料体積から滞留させられた体積を引いたものに等しい画定された体積を有する。

【0042】

一実施形態では、チャネルは、廃棄物リザーバから置換される空気を搬送するために提供される。

【0043】

一実施形態では、チャネルは、廃棄物リザーバから半径方向内側に方向付けられ、プラットフォームが回転下にあって、洗浄チャンバが、動作流体の最大体積で充填される間、洗浄構造内で達成されるべき最内液体レベルの内部の半径方向位置において、ポートまたは他のチャネルで終端する。

10

【0044】

一実施形態では、リザーバの内部体積は動作流体の最大設計体積より大きく、回転加速および減速下にある間、流体を混合する際、リザーバ内の空気の使用を可能にする。

【0045】

一実施形態では、流動チャネルは、直接、さらなるチャネル分岐点／合流点を伴わずに、洗浄リザーバから廃棄物リザーバに通じる。

【0046】

一実施形態では、流動チャネルは、分岐点または合流点を伴わずに、第2の廃棄物リザーバに通じる。

【0047】

一実施形態では、ポートまたは他のチャネルによって終端されるポートまたはチャネルを使用して、流動チャネルを通して流動する流体によって、廃棄物リザーバから置換される空気を排出する。

20

【0048】

一実施形態では、流動チャネルは、プラットフォーム上において、実質的に方位角配向に構成される。

【0049】

一実施形態では、流動チャネル長さおよび直径は、チャネルの中心における流体流線の速度が、プラットフォームの回転周期によって乗算され、チャネルの長さによって除算され、各粒子が、回転あたり少なくとも1回、検出されることが確実になるように保証されるように選定される。

30

【0050】

一実施形態では、粒子を洗浄するための方法であって、

少なくとも1つの粒子洗浄リザーバおよび洗浄された粒子を受容するための1つの流動チャネルを提供するように適合される、請求項1に説明されるプラットフォームを構成するステップと、

画定された体積において、洗浄リザーバ内に粒子および溶液の混合物を提供するステップと、

緩衝液リザーバ内に第1の溶液を上回る体積の第2の溶液を提供するステップと、

洗浄リザーバの遠位壁に対して、粒子を沈殿させるために十分な時間の間、第1の回転速度においてプラットフォームを回転させるステップと、

圧力が、廃棄物チャネルを通して、第1の廃棄物リザーバに流体を送達するために要求される毛細管圧を超えるように、回転速度を増加させ、それによって、沈殿された粒子を含有する画定された量を除き、全流体を廃棄物リザーバ中に排水させるステップと、

第2の溶液によって付与される圧力が、リザーバから混合チャンバに溶液を送達するために要求される毛細管圧を克服するように、回転速度を一時的に増加させるステップと、

回転速度が規定された値を超えないことを確実にしながら、沈殿された粒子を第2の流体中に再懸濁させるために、プラットフォームを周期的に加速および減速させ、それによって、元の流体が実質的でない粒子の懸濁液をもたらすステップと

のうちの1つ以上を含む、方法が提供される。

40

50

【0051】

一実施形態では、回転プラットフォーム上で粒子を検出するための方法であって、

回転周期で乗算され、チャネルの長さで除算される、中心流線の速度が、1未満であるような速度でプラットフォームを回転させることによって、粒子を含有する流体を実質的に方位角的に配向された流動チャネルを通して流動させるステップと、

流動チャネルの半径方向位置に照明を提供するステップと、

照明点のサイズが、方位角方向において、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 未満であって、横断方向において、流動チャネルの幅以上であるように画定するステップと、

照明点を通過する、流動チャネル内の粒子によって放出される散乱または蛍光照射のいずれかを検出するステップと

のうちの1つ以上を含む、方法が提供される。

10

【0052】

一実施形態では、粒子を洗浄し、次いで、検出するための方法であって、

少なくとも1つの粒子洗浄リザーバおよび洗浄された粒子を受容するための1つの流動チャネルを提供するように適合される、プラットフォームを構成するステップと、

画定された体積において、洗浄リザーバ内に粒子および溶液の混合物を提供するステップと、

洗浄リザーバの遠位壁に対して、粒子を沈殿させるために十分な時間の間、第1の回転速度において、プラットフォームを回転させるステップと、

圧力が、廃棄物チャネルを通して、第1の廃棄物リザーバに流体を送達するように要求される毛細管圧を超えるように、回転速度を増加させ、それによって、沈殿された粒子を含有する画定された量を除き、全流体を廃棄物リザーバ中に排水するステップと、

20

溶液中の粒子の初期体積を上回る第2の体積の流体を添加するステップと、

回転速度が、規定された値を超えないことを確実にしながら、沈殿された粒子を第2の流体中に再懸濁させるために、プラットフォームを周期的に加速および減速させ、それによって、元の流体が実質的でない粒子の懸濁液をもたらすステップと、

圧力が、流動チャネルを通して、第2の廃棄物リザーバに流体を送達するために要求される毛細管圧を超えるような第1の規定された値を上回る速度において、プラットフォームを回転させるステップと、

中心流線の速度が、回転周期で乗算され、チャネルの長さによって除算されるように、回転速度を調節するステップと、

30

流動チャネルの半径方向位置に照明を提供するステップと、

照明点のサイズが、方位角方向において、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 未満であって、横断方向において、流動チャネルの幅以上であるように規定するステップと、

照明点を通過する、流動チャネル内の粒子によって放出される散乱または蛍光照射のいずれかを検出するステップと

のうちの1つ以上を含む、方法が提供される。

【0053】

一実施形態では、回転式モータに連結されるように適合される、プラットフォームであって、

40

少なくとも1つの粒子洗浄構造および粒子洗浄構造内で洗浄された粒子を受容するため適合される粒子受容構造と、

プラットフォームが回転する間、粒子受容構造内で洗浄された粒子を検出するための検出ゾーンと

を備える、プラットフォームが提供される。

【0054】

さらなる実施形態では、生物学的試料を処理するための方法であって、

プラットフォームを回転式モータに連結するステップと、

プラットフォームを少なくとも1つの粒子洗浄構造および粒子受容構造とともに構成するステップと、

50

粒子洗浄構造内で洗浄された粒子を粒子受容構造内に受容するステップと、
プラットフォームが回転する間、粒子受容構造内で洗浄された粒子を検出するステップ
であって、粒子は、該生物学的試料の特性を表す、免疫修飾されたビーズおよび／または
蛍光標識された免疫修飾されたビーズである、ステップと
を含む、方法が提供される。

本願明細書は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

生物学的試料を処理するための微小流体システムであって、該システムは、
回転式モータと、

該モータを制御するための手段と、

該回転式モータに連結されたプラットフォームであって、該プラットフォームは、少な
くとも1つの粒子洗浄構造および該粒子洗浄構造の中で洗浄された粒子を受容するよう
に適合される粒子受容構造を提供するように適合される、プラットフォームと、

該プラットフォームが回転する間、該粒子受容構造の中で洗浄された粒子を検出するた
めの検出ゾーンと

を備える、システム。

(項目2)

前記粒子は、前記生物学的試料の特性を表す免疫修飾されたビーズおよび／または蛍光
標識された免疫修飾されたビーズである、項目1に記載の微小流体システム。

(項目3)

前記検出ゾーンは、前記プラットフォームが回転する間、光学系と協働するように適合
される、項目1または2に記載の微小流体システム。

(項目4)

前記粒子受容構造は、ペレット化チャンバを備える、項目1～3のいずれかに記載の微
小流体システム。

(項目5)

前記ペレット化チャンバは、その最外点における前記検出ゾーンが画定されるように、
1つの端部における一点にテープ状にされる、項目4に記載の微小流体システム。

(項目6)

前記テープ状端部は、1つの端部が閉鎖された細長薄型チャネル部分をさらに備え、そ
れにより、遠心分離力の下で、ビーズを該チャネルの中で沈殿させる、項目5に記載の微
小流体システム。

(項目7)

前記検出ゾーンは、前記粒子が、遠心分離によるペレット化に応じて、小領域へと凝縮
されるように成形される、項目1～6のいずれかに記載の微小流体システム。

(項目8)

前記粒子は、リザーバの中で洗浄され、該リザーバは、遠心分離力の影響下において、
回転中心から遠位の壁に対して、前記ビーズが沈殿するように適合される、項目1～7の
いずれかに記載の微小流体システム。

(項目9)

前記粒子受容構造は、流動チャネルを備える、項目1に記載の微小流体システム。

(項目10)

前記流動チャネルは、さらなるチャネル分岐点／合流点を伴わずに、前記洗浄構造から
廃棄物リザーバまで直接通じている、項目9に記載の微小流体システム。

(項目11)

前記洗浄構造は、分岐された出口チャネルを備え、該分岐された出口チャネルは、廃棄
物リザーバおよび前記粒子受容構造の両方に通じている、項目1～10のいずれかに記載
の微小流体システム。

(項目12)

ポートまたは他のチャネルによって終端されるポートまたはチャネルは、前記粒子受容

10

20

30

40

50

構造を通って流動する流体によって、前記廃棄物リザーバから置換される空気を排出するように適合される、項目11に記載の微小流体システム。

(項目13)

前記出口チャネルの分岐点内の毛細管規模の幾何学的狭窄および拡張は、前記洗浄構造が流体を含有するとき、前記プラットフォームの第1の回転速度において流動に抵抗するように作用するが、第2のより高い回転速度においては、流体を流動させるように構成されている、項目11または12に記載の微小流体システム。

(項目14)

前記出口チャネルは、前記洗浄構造の半径方向遠位壁の最大半径方向位置未満である半径において、該洗浄構造から出現し、それにより、画定された体積が、遠心分離力に応答して前記廃棄物リザーバの中へ流れ込むとき、該洗浄構造内に滞留させられる、項目11～13に記載の微小流体システム。

10

(項目15)

前記滞留させられた流体は、粒子を含む、項目14に記載の微小流体システム。

(項目16)

前記廃棄物リザーバは、所望の試料体積にほぼ等しい画定された廃棄物体積を備える、項目14または15に記載の微小流体システム。

(項目17)

チャネルが、前記廃棄物リザーバから置換される空気を搬送するために提供される、項目16に記載の微小流体システム。

20

(項目18)

前記チャネルは、前記廃棄物リザーバから半径方向内側に方向付けられ、該チャネルは、前記プラットフォームが回転中であり、前記洗浄チャンバが動作流体の最大体積によって充填されている間、前記洗浄構造内で達成されるべき最内液体レベルの内側の半径方向位置において、ポートまたは他のチャネルで終端する、項目17に記載の微小流体システム。

(項目19)

前記リザーバの内部体積は、動作流体の最大設計体積のそれよりも大きく、それにより、回転加速および減速の下にある間、該流体を混合する際に、該リザーバ内の空気の使用を可能にする、項目17または18に記載の微小流体システム。

30

(項目20)

生物学的試料を処理するための方法であって、該方法は、

プラットフォームを回転式モータに連結することと、

該プラットフォームを少なくとも1つの粒子洗浄構造および粒子受容構造とともに構成することと、

該粒子洗浄構造の中で洗浄された粒子を該粒子受容構造の中に受容することと、

該プラットフォームが回転する間、該粒子受容構造の中で洗浄された粒子を検出することと

を含む、方法。

【0055】

40

本発明は、付隨の図面を参照して、単なる一例として与えられる、その実施形態の以下の説明からより明確に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】図1は、遠心分離微小流体ディスク上において、免疫アッセイおよび臨床化学反応アッセイを行うデバイスの例示的プロセスフローを図示する。

【図2】図2は、希釈または洗浄プロセス後、流動チャネル内へのビーズの注入を提供する、ディスク構造を図式的に図示する。

【図3a】図3a～3bは、図2の洗浄の流体プロセスを図示する。

【図3b】図3a～3bは、図2の洗浄の流体プロセスを図示する。

50

【図4】図4は、代替希釈または洗浄プロセス後、流動チャネル内へのビーズの注入を提供する、ディスク構造を図式的に図示する。

【図5a】図5a～5cは、図4の洗浄の流体プロセスを図示する。

【図5b】図5a～5cは、図4の洗浄の流体プロセスを図示する。

【図5c】図5a～5cは、図4の洗浄の流体プロセスを図示する。

【図6】図6は、粒子を洗浄するためのフィルタを使用する、ディスクベースの構造を図示する。

【図7a】図7a～7bは、図6のこの洗浄および流動チャネル内への注入の流体プロセスを図示する。

【図7b】図7a～7bは、図6のこの洗浄および流動チャネル内への注入の流体プロセスを図示する。 10

【図8】図8は、堰またはダムを提供するための正確な幾何学形状とともに形成される、本発明の層を図示する。

【図9】図9は、1次元シース流動に好適なチャネル構成を図示する。

【図10】図10は、代替1次元シース流動に好適なチャネル構成を図示する。

【図11】図11は、液体回転を使用する集束方法を図示する。

【図12】図12は、慣性集束を図示する。

【図13a】図13a～13cは、本発明の好ましい実施形態による、ビーズが、体積中に沈殿され、次いで、検出される、代替検出方式を図示する。

【図13b】図13a～13cは、本発明の好ましい実施形態による、ビーズが、体積中に沈殿され、次いで、検出される、代替検出方式を図示する。 20

【図13c】図13a～13cは、本発明の好ましい実施形態による、ビーズが、体積中に沈殿され、次いで、検出される、代替検出方式を図示する。

【図14】図14は、比色（「臨床」）化学反応アッセイのための乾燥した化学反応用多孔性パッドの構造および使用を図示する。

【図15】図15は、一実施形態による、微小流体ディスクの可能性として考えられる構造を図示する。

【図16】図16は、一実施形態による、本発明のディスクを図示する。

【図17】図17は、一実施形態による、ある試料処理アッセイ構造の詳細な構造を図示する。 30

【図18-1】図18は、微小流体アッセイ構造の機能を図示する。

【図18-2】図18は、微小流体アッセイ構造の機能を図示する。

【図18-3】図18は、微小流体アッセイ構造の機能を図示する。

【図19】図19は、図5の関連するシース流動の作成に適切な微小流体ディスクを図示する。

【図20】図20は、流動チャネル、次いで、廃棄物リザーバへの試料およびシース流体の流動を図示する。

【図21】図21は、そのような10：1シース流動を提供するようにレイアウトされたディスクを示す。

【図22】図22は、流体が、図9にも図示されるチャネルの「床」を通して、第2の層から第1の層内に流入する、本発明の具体的実施形態を図示する。 40

【発明を実施するための形態】

【0057】

遠心分離微小流体ディスク上で免疫アッセイおよび臨床化学反応アッセイを行うデバイスのための例示的プロセスフローが、図1に図示される。これらのプロセスはユーザによって行われるものと、消耗品、試薬、および計器システムによって行われるものとに分けられる。ユーザプロセスは、

- ・全血をデバイスに適用する。これは、ヘパリン添加試料採取デバイスから、または直接指に針を刺すことによって、抗凝血剤を含有するポート内に行われてもよい；

- ・微小流体デバイスを計器内に設置する。ユーザはまた、入口ポートを密閉し、エアロ 50

ゾル等の生成を防止してもよい；

- ・試験プロセスを開始する；

である。

【0058】

システムによって実施されるプロセスは、次いで、完全に自動化され、

- ・全血を計測する；
- ・血漿を分離する；

・免疫アッセイ処理チャネルおよび臨床化学反応処理チャネルのための血漿分割量を分割および計測する；

から構成される。

10

【0059】

単一免疫アッセイおよび単一臨床化学反応処理チャネルが図示されるが、より多くのアッセイが存在してもよく、試料のサイズおよび微小流体ディスクのサイズによってのみ限定されることを認識されたい。

【0060】

臨床化学反応チャネルにおけるプロセスは、

・臨床化学反応のための血漿体積をさらに画定するために、必要に応じて、付加的計測ステップを行う；

- ・微小流体ディスク内に埋め込まれた乾燥した試薬パッドデバイスに血漿を送達する；
- ・パッド上で血漿を培養し、蛍光生成物の色生成をもたらす；
- ・検出する；

から構成される。

20

【0061】

免疫アッセイチャネルにおけるプロセスは、

・臨床化学反応のための血漿体積をさらに画定するために、必要に応じて、付加的計測ステップを行う；

・血漿の混合チャンバへの送達。この混合チャンバは、競合またはサンドイッチアッセイにおいて、検体およびビーズ基質と係合する、免疫修飾されたビーズおよび蛍光標識された抗体等の乾燥した試薬を含有してもよい。試薬はまた、液体状態で保管され、混合チャンバに送達されてもよいことを認識されたい；

30

・試料および試薬の混合。これは、a) 搅拌、b) 往復運動、c) 同時注入を含む、以下に詳述されるいくつかの方法で生じ得る；

・完全免疫化学反応を確実にするために十分な温度において、および十分な時間の間、混合物を培養する；

・ビーズを洗浄し、非結合蛍光標識を除去する。ある場合には、洗浄は、ビーズの沈殿、上清の除去、および緩衝液によるビーズ（および、残りの取り込まれない標識）の再懸濁および希釈と置換され得る；

- ・検出のために、流動チャネル内にビーズを注入する；

から構成される。

【0062】

（遠心分離プラットフォーム上の流体プロセス）

3つの基礎機能によって、大部分のディスクベースのプロセスが可能となる：

・事前に規定された回転速度での具体的設計のディスクの回転によって、チャネルを通して、流体をポンプ圧送する。

40

【0063】

- ・受動的手段を使用して、弁調整を行う。

【0064】

・密度差および遠心分離力に基づいて、分離を行う（例えば、血漿分離、ビーズの沈殿）。

【0065】

50

これらのプロセスの詳細な説明は、以下に提供される。具体的な設計考慮点（微小流体ディスクの幾何学的設計および回転プロファイルの両方）が説明されることによって、上で詳述された全体的な試料処理ステップの実装を可能にする。

【0066】

（圧送）

流動の生成（シース流体の使用の有無にかかわらず）は、遠心分離形式において容易に達成され得る。実質的に直線のチャネルの場合、層流域（レイノルズ数 < ~ 2200）において、流量 Q を幾何学的、流体、および動作パラメータと関連付ける基礎式は、

【0067】

【数1】

10

$$Q = \frac{Ad_H^2 \rho \omega_R^2 \Delta R \bar{R}}{32\eta L}$$

式 1

である。

20

【0068】

この式において、 Q は流量である。幾何学的パラメータは、 A = チャネルの断面積 = $h \times w$ (h および w は、長方形チャネルの深さおよび幅である) であり、 d_H は、水力直径 (断面積の 4 倍をチャネルの周縁によって除算したものとして規定される) であり、 R は、流体の「水頭」(R_0 における流体の内側メニスカスと R_1 における外側メニスカスとの間の半径方向位置の差 $R = R_1 - R_0$ として規定される) であり、

【0069】

【化1】

$$\bar{R}$$

30

は、液体の平均位置であって、

【0070】

【化2】

$$\bar{R} = 0.5(R_1 + R_0)$$

であり、 L は、チャネルの長さである。流体パラメータは、 ρ = 流体の密度および η = 流体の動粘性係数である。最後に、動作パラメータは、角速度 $\omega_R = 2\pi f_R$ であって、式中、 f_R は毎秒の回転数であり、それ自体、要求される回転プロファイルに対する時間の関数となるであろう。この表現は、レイノルズ数 < 2200 (層流) を有する流量に対して正確である。

式 1 から、平均速度

【0071】

【化3】

$$\bar{u}$$

は、

【0072】

40

【数2】

$$\bar{u} = \frac{Q}{A} = \frac{d_H^2 \rho \omega_R^2 \Delta R \bar{R}}{32 \eta L}$$

である。

10

【0073】

最大速度（チャネルの中心に生じる）は、

【0074】

【化4】

$$2\bar{u}$$

である。いくつかの用途において、この速度は、重要なパラメータであり、すなわち、流動チャネル内の各粒子が、回転毎に少なくとも1回だけ検出されることを確実にするという観点から重要である。

20

【0075】

（弁調整）

遠心分離流体プラットフォームの中の液体を制流または弁調整するための種々の手段が存在し、それらは、サイフォン機構、表面張力効果に基づく受動的単回使用弁（毛細管弁、疎水性弁）、固相／液相転移あるいは接触ヒータまたは光源によって印加される熱による「栓」の融解に基づく単回使用弁、および同一の原理に基づく複数回使用弁の使用を含むが、それらに限定されない。

【0076】

サイフォン等、これらの弁調整機構のうちのいくつかは、当技術分野において公知であって、パブリックドメインに属する。

30

【0077】

受動的「毛細管」弁機構は、特に、有用であって、試験されるほぼ全流体に有効であることが示されている。毛細管弁機構では、表面または毛細管力が、チャネルの断面変化において、流体を滞留させるよう作用する。0度を上回る液体／固体接触角度の場合、特に、断続を伴う合流点を横断しての狭いチャネルからより大きいチャネル内への出現は、界面をわたる圧力差の印加を介して、液体側により高い圧力を伴う正の曲率半径の液体－蒸気界面の作成を要求する。この圧力は、微小流体ディスクの回転を介して生成され得る。一般に、親水性表面に対して界面にわたって流動を生成するために要求される圧力は、流体の表面張力および接触角度のコサインに正比例し、毛細管の直径に反比例する。毛細管弁の有用なおよび容易に加工される寸法は、50 - 500 μm の幅 × 50 - 500 μm の深さのチャネルセグメントであって、典型的には、より深いチャネルまたはポケットと交差する。

40

【0078】

流体は、回転による静水圧が、この毛細管圧未満である場合、毛細管合流点に滞留せられる。回転プラットフォーム上では、この静水圧は、流体の平均位置（前縁と後縁メニスカスとの間または液体体積の半径方向外側と内側メニスカスとの間で測定される）、メニスカスの位置の差、および回転数の2乗に正比例する。

【0079】

液体特性（表面張力、密度）、材料特性（接触角度）、ディスク上の流体の毛細管規模および構成等の幾何学的パラメータの操作が、毛細管圧が「打破」され、液体が受動的弁

50

を通して「突破」する、明確に規定された回転速度をもたらすことは、当技術分野において認識されている。これらの関係を使用して、広範囲の関連生物学的流体および試薬が、数 1 0 0 R P M (回転数毎分) から 5 0 0 0 R P M 超の回転速度で制流され得る。これらの関係は、以下の式

【 0 0 8 0 】

【 数 3 】

$$RPM_C = \frac{60\omega_c}{2\pi} \approx \frac{30}{\pi} \left[\frac{\gamma \sin \theta_c}{\rho R \Delta R d_H} \right]^{1/2}$$

10

に要約され得る。

式中、 RPM_C は、限界 R P M であって、それを下回ると、流体は、毛細管弁を通って流動せず、それを上回ると流動し、 γ は、液体表面張力であり、 θ_c は、ディスクの材料上の液体の接触角度であり、

【 0 0 8 1 】

【 化 5 】

\overline{R}

、 d_H 、および ρ は、上記のように規定される。

【 0 0 8 2 】

20

(密度差および遠心分離力に基づく分離)

遠心分離プラットフォームに固有であるのは、遠心分離力の印加状態において、成分間の密度差に基づいて、流体を分離する能力である。球状粒子の場合、粒子が「沈殿」する速度の有用な式は、

【 0 0 8 3 】

【 数 4 】

$$V_s = 5.448 \times 10^{-5} \cdot (\rho_p - \rho_L) \times (\eta_w / \eta_L) \times d^2 \times acc$$

である。式中、 V_s は、 c m / 秒単位の粒子速度であり、 ρ_p は、粒子密度であり、 ρ_L は、液体密度であり、 η_w は、水の動粘性係数であり、 η_L は、液体の動粘性係数であり、 d は、ミクロン単位の粒子直径であり、 acc は、重力単位の加速である ($9.82 \text{ cm} / \text{秒}^2 = 9.82 \text{ m} / \text{秒}^2 = 1 \text{ 重力}$)。

30

【 0 0 8 4 】

(混合)

種々の方法が、遠心分離ディスク上で流体を混合するために可能である。第 1 に、攪拌が採用され得、混合されるべき液体または可溶化されるべき液体および固体が、空気が含まれるチャンバ内に定置される。交互する加速および減速が、混合作用を提供する。本方法は、以下の実施形態および実施例において採用される。

【 0 0 8 5 】

40

さらなる混合手段は、捕捉された空気に対する流体の往復運動である。本方法では、流体混合チャンバは、狭小チャネルによって、通気ポートを有していない、捕捉された空気体積「バラスト」に接続される。その結果、低回転速度では、流体は、捕捉された空気によって停止される。回転速度が増加されるにつれて、流体は、捕捉された空気体積の中へ侵入し、流体に起因する遠心分離で生成された圧力に応答して、空気を圧縮する。回転速度の低下は、バラストチャンバからの流体の後退につながる。このように、交互する高回転速度 / 低回転速度サイクルは、「ピペット」混合に類似する往復運動を提供する。

【 0 0 8 6 】

最後に、混合は、例えば、流体をチャネルの両側の毛細管弁にもたらすことによって、混合されるべき 2 つの流体をリザーバからチャネルの中に注入することによって行われて

50

もよい。流体は、次いで、受容リザーバの中に堆積される。2つの同時に流動する溶液が、チャネルの中に存在する時間量が十分である場合は、流体の拡散混合が生じる。そうでない場合、乱流運動が、受容リザーバの中への流入に応じて、流体を効果的に混合させる。

【0087】

(検出要件 - 免疫アッセイ検出 : 回転流動チャネル)

従来のフローサイトメーターでは、シース流が、測定されるべき粒子を希釈し、それらをチャネルの中心に「1列」に定置するために使用され、ここで、粒子は、計器の光源によって調べられる。これは、流動方向に狭い、典型的には、 $10 \mu\text{m}$ であるが、横断方向におけるシース流の「コア」流よりもはるかに広い光学検出体積を用いて行われる。シース流は、粒子を光源からの実質的に均質照射野内に定置し、それによって、光源による検出された照射内での変動を最小にし、および一度に単一の粒子のみが、光源によって照明されるように粒子を希釈する二重機能を有する。10

【0088】

免疫アッセイ用途の場合、ビーズ濃度は、さらなる希釈が要求されないように確立され得る。例えば、チャネル $250 \mu\text{m}^2$ を通って流動する $10 \mu\text{L}$ 中の 200 個の粒子の濃度(典型的免疫アッセイ濃度)は、平均粒子間隔 $800 \mu\text{m}$ をもたらす。その結果、2つ以上の粒子を一度に計数する確率は、ほとんどゼロに等しい。流動チャネル全体を横断し、実質的に均一であるビームを使用することによって、全粒子が、同時に検出されることなく、かつ光源によって誘発される有意な変動を伴わずに計数され得る。これは、シース流の必要性を回避する。20

【0089】

固定検出器を使用しながら、回転ディスク上の移動粒子を検出する際、検出システムの試料採取速度が、粒子を検出するために適正であることが重要である。速度は、流動チャネルの半径である、半径 R_F 時のディスク速度によって左右されるため、試料の総数は、単純に、ディスクの方位角(回転)方向における検出体積の幅(ここでは、 w_1)、速度 = R 、および Hz 単位の試料採取速度 f_s に比例する：

【0090】

【数5】

$$N_s = \frac{w_1}{\omega R_F} \times f_s$$

$f_s = 10^6$ 、 $w_1 = 80 \mu\text{m}$ 、ならびに回転速度 500 RPM および半径方向位置 R_F 50 mm を使用して、 $N_s \sim 31$ が、良好な統計的試料採取のための適正な数であると判断する。30

【0091】

(実施形態：)

検出ステップとして、流動ビーズを用いた遠心分離形式のための多くの形態の免疫アッセイが、本発明を組み込んで実装され得る。例えば、一実施形態では、以下となる：40

1. $50 \mu\text{L}$ の官能化ビーズ(～6000個のビーズ)を $50 \mu\text{L}$ の試料および $50 \mu\text{L}$ の標識試薬(フィコエリトリン、PE) ($V_S = 150 \mu\text{L}$)と混合する
2. 3時間培養する
3. $1000 \mu\text{L}$ の洗浄緩衝液(VW)を添加する
4. 遠心分離し、ビーズをペレット化する
5. 上清を廃棄する
6. $300 \mu\text{L}$ の緩衝液(VE)中に再懸濁させる
7. フローサイトメトリーを行う。

【0092】

基本的に、ビーズ洗浄は、ビーズ蛍光性の検出に干渉しないレベルまで、過剰な取り込50

まれなかった染料(PE)を除去することである(すなわち、背景は、ビーズ蛍光性にほとんど関係しない)。

【0093】

(洗浄の実施形態)

洗浄の好ましい実施形態は、以下を含む：

- ・ペレット化+傾瀉+希釈：遠心分離を行い、ビーズをペレット化する；上清を除去(傾瀉)し、溶液の残留量を残す；および緩衝液中にビーズを再懸濁させ、残留材料の濃度の十分な低下を達成する

- ・ペレット化による洗浄：前述のように、但し、ビーズの第2のペレット化および上清の除去後、緩衝液中にビーズを再懸濁させる。これは、繰り返されてもよい

- ・フィルタを用いた濾過：ビーズを含有する溶液が、濾過要素に対して駆動され、ビーズが、洗浄される

- ・トラップを用いた濾過：ビーズを含有する溶液が、ビーズまたは堰より小さい寸法のチャネル(1次元に閉じ込められるが、横断寸法がより大きいチャネル)等、ディスクの基質内に形成されたトラップに対して駆動される。これは、ビーズを捕捉し、洗浄をもたらす。

【0094】

全ての場合において、廃棄物は、以下により詳細に説明されるように、流動チャネルまたはペレット化チャンバ等、再懸濁および検出構造へのビーズの注入に先立って、1つ以上のリザーバに方向付けられなければならない。

【0095】

ペレット化+傾瀉+希釈。このプロセスは、本質的に、前述のB e c t o n D i c k i n s o n (BD)によるプロトコルに説明される実験室規模のプロセスを小型化する。BDプロセスでは、試料は、最初に、洗浄によって希釈され、次いで、過剰洗浄液が除去される。緩衝液中の再懸濁は、第1の溶液の可溶性成分の全体的濃度低下をもたらす一方、ビーズの数は、保存される。

【0096】

代替として、本発明は、ビーズを最初に沈殿させ、上清を傾瀉後、ある体積の緩衝液中に再研削させる。

【0097】

ディスクベースのプロセスは、以下によって実装され得る：

1. 試料体積VSから開始する
2. 遠心分離を通して、ビーズを沈殿させる
3. 上清の体積VS - VRRを廃棄する
4. 体積VE > VSの溶出/洗浄緩衝液を添加し、緩速攪拌を通して、ビーズを再懸濁させる
5. フローサイトメトリーを行う。

【0098】

これは、元の試薬の希釈計数DFCをもたらし、したがって、以下となる：

【0099】

【数6】

$$DFC = \left(\frac{VRR}{VE + VRR} \right)$$

VRR、VEの適切な選択は、この希釈係数が、残留汚染材料の背景に対して、ビーズの検出のために要求されるもの以下であることを確実にする。

【0100】

10

20

30

40

50

図2は、この希釈または洗浄プロセス後の流動チャネル内へのビーズの注入を提供するディスク構造を図式的に図示する。図示されない他のディスク構造も、試料の調製（例えば、血漿分離）および混合チャンバ（図示される）への液体試薬および試料の送達のために使用されることを理解されたい。混合チャンバ内において、ビーズ、試料、および試薬が培養され、洗浄プロセスの開始時に溶液中に存在する。2つの廃棄物チャンバが、これに接続される。廃棄物1は、混合チャンバに適用される溶液の体積にほぼ等しい体積を有し、毛細管弁V1を介して、混合チャンバに接続される。廃棄物2は、流動チャネル内で検出される、ビーズ含有「注入液」を受容し、毛細管弁V3によって接続される。加えて、溶離液チャンバが、毛細管弁V2によって、混合チャンバに接続される。

【0101】

10

図3a - 3bは、この洗浄の流体プロセスを図示する：

a. 試料体積VSが、混合チャンバに添加される。溶液は、ビーズを含有してもよく、または混合チャンバ内に存在するビーズおよび試薬を再水和する試料であってもよい。必要に応じて、システムは、次いで、加速および減速によって攪拌され、ビーズおよび液体を混合させる；

b. 周波数W1での高速スピンを使用して、ビーズを沈殿させる；

c. 回転速度は、W2 > W1まで増加される。これは、混合チャンバの出力における毛細管弁V1を打破し、チャネルが混合チャンバを第1の廃棄物リザーバに合流する点の半径方向内側にある溶液を傾瀉する。本実施形態では、設計体積VSに対する内側メニスカスの半径方向位置は、弁V3の位置の半径方向外側にある。その結果、弁V3は、任意の回転速度において、初期試料によって打破され得ない。速度は、弁V1が打破された後、W2を下回る値まで低減され得る。滞留させられた流体VRRは、チャネルから半径方向外側にあるものとして規定される。この流体流動は、ゆっくりであって、外側壁近傍の流体を有意に妨害しないため、以前のステップで沈殿されたビーズは、混合チャンバの最外表面に残留する。第1の廃棄物チャンバは、混合チャンバから除去された液体の体積VS - VR Rにほぼ等しいサイズを有すると規定される。さらに、第1の廃棄物チャンバからの空気排気チャネルは、均一回転速度下、任意の想定される流体メニスカス位置の半径方向内側のポートで終端する、またはチャネルに合流する；

d. 回転は、W3 > W2に急増され、毛細管弁V2を打破することによって、ある体積の溶出緩衝液を混合チャンバに送達する。全体積が送達される前に回転を減速することによって、毛細管弁V3を打破するために十分な静水圧が付与されないように確実にする；

e. 溶出流体は、低RPMにおける緩速攪拌を通して、ビーズを再懸濁させる；

f. 回転は、W4まで急増され、流動チャネルに通じる毛細管弁V3を打破し、ビーズの沈殿を防止するために、急減速される。これは、廃棄物1が、流体で充填されており、加えて、廃棄物1からの通気チャネルが、廃棄物流体で充填され、流動チャネル内に流動するにつれて、溶出緩衝液によって生成されるものに逆圧を提供し、ビーズ含有注入液が、廃棄物1に流入しないよう確実にし得るため、ビーズ含有溶液を流動チャネルを通して廃棄物2に搬送する。必要に応じて、混合チャンバ内のビーズの濃度が、均質のままであることを確実にするために、試料が流動するにつれて、付加的攪拌ステップが存在してもよい。

【0102】

20

ペレット化による洗浄：好ましい方法は、以下のステップを使用して、真の多段階洗浄を行うことである：

1. 試料体積VSから開始する；

2. 遠心分離を通して、ビーズを沈殿させる；

3. 上清の体積VS - VR R1を廃棄し（VR R1は、合理的に大きい（例えば、0.2VS）、VR R1を残す；

4. 体積VWの洗浄緩衝液を添加し、総体積VW + VR R1を作成し、緩速攪拌を通して、ビーズを再懸濁させる；

40

50

- 5 . 遠心分離を通して、ビーズを沈殿させる；
- 6 . 体積 $VW + VRR1 - VRR2$ の希釈溶液を廃棄し、 $VRR2$ を残す；
- 7 . 体積 VE の溶出 / 洗浄緩衝液を添加し、総体積 $VE + VRR2$ を作成し、ビーズ緩速攪拌を通して、再懸濁させる；
- 8 . フローサイトメトリーを行う、またはビーズを検出する。

【0103】

希釈係数は、この場合、

【0104】

【数7】

$$DFC = \frac{(VRR1)(VRR2)}{(VW + VRR1)(VE + VR2)}$$

10

である。

【0105】

図4は、この希釈または洗浄プロセス後に、流動チャネルの中へのビーズの注入を提供するディスク構造を図式的に図示する。培養および洗浄されるべきビーズが、溶液中に定位される混合チャンバから構成される。2つの直列廃棄物チャンバが、これに接続される。廃棄物1aは、混合チャンバに適用されるべき溶液の体積にほぼ等しい体積を有し、毛細管弁V1を介して、混合チャンバに接続される。第2の直列に接続された廃棄物チャンバ廃棄物1bは、毛細管弁V3を介して、第1のものの出口に接続され、初期試料体積（廃棄物1a + 洗浄緩衝液体積）に幾分満たない体積を有する（洗浄緩衝液は、最初、洗浄チャンバ内に保持される）。この洗浄チャンバは、弁V2によって、混合チャンバに接続される。第3の廃棄物チャンバである廃棄物2は、流動チャネル内で検出されるビーズ含有「注入液」を受容し、毛細管弁V5によって、廃棄物チャンバに接続される。加えて、溶離液チャンバは、毛細管弁V4によって、混合チャンバに接続される。

20

【0106】

図5a - 5dは、この洗浄の流体プロセスを図示する：

a . 試料体積 VS が、混合チャンバに添加される。溶液は、ビーズを含有してもよく、または混合チャンバ内に存在するビーズおよび試薬を再水和する試料であってもよい。必要に応じて、システムは、次いで、加速および減速によって攪拌され、ビーズおよび液体を混合させる；

30

b . 周波数 $W1$ における高速スピントンを使用して、ビーズを沈殿させる；

c . 回転速度は、 $W2 > W1$ まで増加される。これは、混合チャンバの出力における毛細管弁V1を打破し、溶液を廃棄物リザーバである廃棄物1a内に傾瀉させる。溶液は、廃棄物1の出力における弁V3によって停止されるまで流動し、体積 $VRR1$ を残す。試料のメニスカスの半径方向位置は、V4の外側であって、弁V4が、このプロセスの間に、試料体積 VS によって打破されることを確実にする；

d . 回転は、 $W3 > W2$ に急増され、毛細管弁V2を打破することによって、ある体積の洗浄緩衝液を混合チャンバに送達する；

40

e . 洗浄緩衝液流体は、低 RPMにおける緩速攪拌を通して、ビーズを再懸濁させる；

f . 示されるように、ビーズは、再懸濁される；

g . 回転は、 $W1$ まで増加され、再度、この混合溶液中に粒子を沈殿させる；

h . 回転は、 $W4$ まで急増され、廃棄物1aと廃棄物1bを接続する毛細管弁V3を打破する。混合された洗浄および残留初期試料溶液は、傾瀉され、最初に、廃棄物1aを通って、次いで、廃棄物2a内へと通過する。体積 $VRR2 = VRR1 + VWASH - VWAS$ TE1bが、混合チャンバ内に滞留させられる；

i . 回転は、 $W5$ まで急増され、毛細管弁V4を打破し、溶出緩衝液を混合チャンバに接続し、溶出緩衝液が、送達される；

j . 緩速攪拌によって、粒子を再懸濁させる；

50

k - 1 . 回転は、W 6まで急増され、毛細管弁V 6を打破し、混合チャンバを流動チャネルに接続し、ビーズの沈殿を防止するために急減速される。これは、廃棄物1が、流体で充填されているため、ビーズ含有溶液を流動チャネルを通して廃棄物2に搬送する。必要に応じて、混合チャンバ内のビーズの濃度が均質のままであることを確実にするために、試料が流動するにつれて、付加的攪拌ステップが存在してもよい。

【0107】

これらの2つの実施例は、洗浄をもたらすための毛細管弁、サイフォン、およびペレット化の使用を組み合わせる、いかなる概念の限定でもない。

【0108】

埋込フィルタが、微小流体デバイス内に容易に組み込まれ得、典型的には、同一の材料が、より従来の製品において使用されるのと同一の方法で使用される。いくつかの用途として、微粒子を除去される濾過製品、さらなる使用のために、粒子を捕捉するためのフィルタ、疎水性通気フィルタ、またはS P Eを支援する固相結合が挙げられる。多くのフィルタ材料が、利用可能であって、材料選択は、用途に依存する。挿入のための結合方法として、締まり嵌め、Oリング、接着剤、および熱結合（熱溶解結合）が挙げられる。方法は、フィルタ選択に依存する。すなわち、シリカ膜は、脆弱であって、多くの場合、締まり嵌め部材による圧縮を使用して、デバイス内に保持される。ポリプロピレンフィルタは、結合のために138まで加熱されなければならない、熱的に結合される環状オレフィン（環状オレフィンポリマー[C O P]または環状オレフィンコポリマー[C O P]）部分には不適切であろう。「マクロ」の世界における実施例として、M i l l i p o r eおよびP a l l 製のフィルタベースの製品が挙げられる。フリットは、着目媒体を濾過するための機械的支援を提供するために使用され得る。

10

20

30

【0109】

フィルタは、付加的な製造上の複雑性を呈するが、これらは、克服できないわけではない。フィルタは、形成（例えば、ダイカット）され、定置され（例えば、自動化された機械によって）、潜在的に、最終結合に先立って、適所に鋲留めされなければならない。プロトタイプ段階では、これは、比較的に単純である。すなわち、大規模製造では、フィルタは、典型的には、ピック＆プレース自動化操作を使用して切断され、次いで、定置されるであろう。M i l l i p o r eは、フィルタユニットの大規模「ホットプレート」溶接を行う。

【0110】

適切な細孔サイズの小型フィルタ、例えば、0.4 μm等のP E S（ポリエーテルスルホン）フィルタが、一般に、実験室での濾過のために使用される（混合チャンバと廃棄物チャンバに通じるチャネルとの間に結合される）。その結果、流体は、ディスクのある構成要素から、別の構造化された構成要素（漏出防止結合のために要求される中間層を用いて、「底部」に「蓋」をする）に通過しなければならない。このアプローチの利点は、洗浄ステップの間、試料の濃縮を容易に可能にすることである。すなわち、適用される試料の体積は、溶出緩衝液の体積より大きくあり得る。また、粒子の沈殿が要求されないので、回転速度および幾何学形状の観点から、要件を緩和させる。

【0111】

40

図6は、粒子の洗浄のためのフィルタを使用する、ディスクベースの構造を図示する。ディスクは、2または3層から構成される。構造の大部分は、黒色で示される主要層上有る。フィルタは、この層と单一チャネルから成る第2の層との間に結合される。加えて、時として、上側および下側層が接続する貫通孔から成る中間層を使用することが有用である。すなわち、フィルタ領域内の貫通孔は、漏出防止「リング」が、フィルタの周囲に形成されることを確実にする。このディスク上の特徴は、培養および洗浄されるべきビーズが、溶液中に定置される、第1の層内に混合チャンバを含む。廃棄物チャンバである廃棄物1は、廃棄物1で終端し、埋込フィルタの真下に位置付けられる、第2の層内のチャネルによって、混合チャンバに接続される。毛細管弁V 1は、低回転速度における、このチャネルおよび廃棄物1内への流動に抵抗するために使用される。廃棄物1は、適用され

50

る試料とほぼ同一の体積であるように定寸される。また、弁 V 2 によって、混合チャンバに接続される溶離液 / 緩衝液リザーバも存在する。第 2 の廃棄物チャンバである廃棄物 2 は、流動チャネル内で検出される、ビーズ含有「注入液」を受容し、毛細管弁 V 3 によって、廃棄物チャンバに接続される。

【 0 1 1 2 】

図 7 a - 7 b は、この洗浄および流動チャネル内への注入の流体プロセスを図示する：
a . 試料体積 V 5 が、混合チャンバに添加される。溶液は、ビーズを含有してもよく、または混合チャンバ内に存在するビーズおよび試薬を再水和する試料であってもよい。必要に応じて、システムは、次いで、加速および減速によって攪拌され、ビーズおよび液体を混合させる；

b . 周波数 W 1 における高速スピンは、弁 V 1 を打破し、試料液体が、埋込フィルタを通して、廃棄物 1 内に駆動される；

c . 全上清は、廃棄物 1 に輸送される。全粒子は、混合チャンバに暴露されるフィルタの表面上に捕捉される；

d . 回転速度は、一時的に、W 2 > W 1 まで増加される。これは、毛細管弁 V 2 を打破し、溶出緩衝液が、混合チャンバに流入することを可能にする；

e . 低 R P M における緩速攪拌を使用して、溶液中に粒子を再懸濁させる；

f . 再懸濁された粒子は、ここで、流動チャネル内の検出に備える；

g . 回転は、W 3 > W 2 まで急増され、弁 V 3 を打破し、粒子含有溶液を流動チャネルに送達する。回転は、急減速され、ビーズの沈殿を防止する。これは、ビーズ含有溶液を流動チャネルを通して廃棄物 2 に搬送する。必要に応じて、混合チャンバ内のビーズの濃度が均質のままであることを確実にするために、試料が流動するにつれて、付加的攪拌ステップが存在してもよい。

【 0 1 1 3 】

チャネル狭窄；堰およびダム。粒子は、狭窄チャネルによって捕捉され得る。すなわち、チャネル寸法が、粒子直径未満である。

【 0 1 1 4 】

粒子は、狭窄に対して凝縮されると、粒子間の空間によって形成される非常に小さい平均「チャネル直径」を伴う、凝縮された粒子層を形成する。狭窄チャネルに接近するようには「円錐」状に粒子を凝縮することは、凝縮された層を通してチャネルに通じる長い蛇行性流体路によって形成される流動に非常に大きなインピーダンスをもたらすであろう。

【 0 1 1 5 】

好みのアプローチは、1 次元における狭窄である堰またはダムを使用することである。典型的には、これは、微小流体ディスクの平面に、例えば、チャンバの端部に、垂直に形成される。ディスクの 2 つの構成要素間に形成される 5 μm の間隙は、そのような堰を作成し、5 μm を上回る直径の粒子を捕捉するために使用される。これは、凝縮された層の長さ、ひいては、蛇行性チャネルの長さおよび結果として生じる圧力降下（流動を減少させるように作用する）が、最小にされるように、比較的に広いことが好み。

【 0 1 1 6 】

微小加工法を使用して、そのようなシステムを作成することができる。典型的には、2 つの構成要素（例えば、一方の層内のチャンバおよび別の層内の「扇形状」のチャネル入口およびチャネル）を合流することによって作成される。正確な幾何学形状を伴って形成された層の結合は、堰を提供する。これは、図 8 に示される。

【 0 1 1 7 】

（粒子受容構造の実施形態）

粒子受容構造の好みの実施形態は、前述のように設計されたシースレス流チャネルを含み、粒子の濃度は、横断方向（流動チャネルを横断する）に実質的に均一である励起ビームを用いて、有意な同時検出を防止するようなレベルに維持される。チャネルの長さおよび直径は、比較的に低回転速度を使用することができる一方、適正な試料採取時間を持って、流動チャネル内にある間、少なくとも 1 回、各粒子を検出することを確実にするよ

10

20

30

40

50

うに選定される。

【0118】

(流動集束システム)

血液学用途等のいくつかの用途では、前述の議論は、流動集束が望ましくあり得ることを示す。そのような流動集束が提供され得る2つの方法は、シース流（従来の方法の拡張）および慣性集束を通したものである。

【0119】

(シース流)

種々のシース流実装が、採用され得る。好ましい方法として、以下が挙げられる：

・非同軸シース流

10

・1次元シース

・チャネル壁内の特徴による液体回転

それぞれが、以下においてより詳細に記載される。

【0120】

非同軸シース流。非同軸シース流では、試料流が、チャネル床からシース流体内に注入される。その結果、試料流は、チャネル床に「くっつき」、チャネル内の中心にはない。しかしながら、有意な集束が生じる。流量の比率は、集束の程度を決定する。これは、図12に示されるように、図示される。ディスク構造は、好ましくは、3つの部分となるであろう。すなわち、流体およびシースチャネルを担持するベース部分と、小開口または貫通孔を伴う密閉中間層と、貫通孔を通して注入されるべき試料を搬送する下側層である。開口の寸法が小さい場合は、毛細管弁として作用するであろう。

20

【0121】

動作時、試料流体は、初期回転速度W1において、毛細管力によって滞留させられるので、開口に対して駆動されるが、それを通って主要流動チャネルの中へ流動しない。W2までの付加的加速（潜在的に、回転速度の減速を伴う）は、上流リザーバからシース流体を解放する。シース流体が、空気を置換させるにつれて、流動チャネルを通過し、そのメニスカスは、最終的に、貫通孔における滞留させられた試料流体のメニスカスに合流する。この時点では、シースおよび試料流体の両方が流動する。下流プロファイルに示されるように、シース流体内の試料ブルームのサイズは、貫通孔および流動チャネル幅の相対的サイズならびに流量の比率に依存して、非常に小さくあり得る。

30

【0122】

シースおよび試料流量の比率は、3つの要因によって決定され得る。すなわち、流動チャネルにおけるその合流に先立ったそのリザーバ内のシースおよび試料メニスカスの半径方向位置による駆動「圧力」と、シースおよび試料リザーバの断面積と、これらのリザーバからシースおよび試料流体が合流される合流点に通じるチャネルのインピーダンスである。インピーダンスは、シースチャネルと試料チャネルのインピーダンスの比率が、試料流とシース流の所望の比率に等しいように、チャネルの長さおよび直径を変動させることによって、選定され得る。これは、所与の回転速度において、シースリザーバおよび試料リザーバによって生成される圧力水頭が、同一であるであろうということを意味する。所望の流動比は、次いで、

40

【0123】

【数8】

$$\frac{Q_{sheath}}{Q_{sample}} = \frac{A_{sheath}(r)}{A_{sample}(r)}$$

を確実にすることによって達成される。

【0124】

所望の流動比を前提として、試料のメニスカスが降下する（半径方向位置において外側に移動する）各drに対して、体積A_{sample}*drが流動し、同様に、体積A_{sh}

50

$e_{a t h}^* d r$ が流動する。その結果、2つの流体がともにチャネル内に注入されるであろう全ての r に対して、 $A_{sheath} / A_{sample} =$ 所望のシース / 試料流比となるはずである。

【0125】

図に示されるように、試料流は、半径に沿った内側に連続流を伴って、1つのチャネルを通して、貫通孔に通じ得る。これは、捕捉された空気を送給チャネルから追い出すという所望の目的を達成する。

【0126】

側方および垂直方向の両方における更なる集束は、図に示されるように、下流の断面を減少させることによって達成され得ることに留意されたい。

10

【0127】

1次元シース。1次元シース流は、試料流を2つの対称シース流と接触させ、試料流に対して、シースの流量を操作することによって作成され得る。流動チャネル内の結果として生じる試料流は、流動チャネルの床から天井に延在するが、流動比によって、側方方向に閉じ込められる。例えば、シース流体の総流量が、2つのシース間で均一である Q_{sheath} であって、試料流が、 Q_{sample} である場合、シース化された試料流の側方サイズは、

【0128】

【数9】

$$w_C = \left(\frac{Q_{sample}}{Q_{sheath}} \right) \times w$$

20

であり、式中、 w は、チャネル幅である。250 μm 幅の流動チャネルの使用は、25 μm 幅の1次元シースをもたらし得る。

【0129】

遠心分離形式における実装は、図10に示されるように、単純である。シース1および2は、单一シース流体リザーバから送給され、シースチャネルを流動チャネルに接続する2つの毛細管弁で停止し得る。試料は、次いで、上流位置から、流動チャネルを下方に駆動され、メニスカスがシースの暴露されたメニスカスを通過すると、全3つの流体が流動する。相対的インピーダンスは、容易に操作され得る。例えば、試料チャネルの上流部分は、合流点近傍より寸法がはるかに小さく、シースチャネルより高いインピーダンスを作成し得る、または蛇行し、そのより長い長さのため、はるかに大きいインピーダンスを有し得る。

30

【0130】

チャネル壁内の特徴（ストライプ）による液体回転。本方法では、試料およびシース流は、標準的「T」合流点において合流され、試料流の流量は、シースより有意に低い。そのような場合、試料は、最初、薄型リボン形状内の一方の壁に優先的にくっつく。チャネルの床および天井に定置された流動に対して45度に角度付けられた「ストライプ」の定置は、循環運動を生じさせるよう作用する。これは、試料流を壁から引き離し、チャネルの中心に向かわせる。ほぼ橜円形のコア流動は、その位置および面積が、相対的流量およびストライプの数の関数であるように形成される。ストライプの幅、深さ、および間隔は、チャネルの深さとほぼ同一の大きさである。典型的には、チャネルはまた、その幅より浅い。

40

【0131】

遠心分離形式における実装は、図11に示されるように、単純である。シースおよび試料流体が、毛細管弁に提示される。十分な RPMまでの加速に応じて、両弁は、屈服し、液体は、ともにもたらされる。シースおよび試料流を組み合わせる他の場合におけるように、上流インピーダンスおよび圧力は、所望の流動比を作成するように容易に操作され得る。

50

【 0 1 3 2 】

完全 2 次元シース流。また、完全 2 次元シース流を導入することも可能であるはずである。本方法では、1 次元シース流が、最初に、生成される。下方および上方からのシース流の導入が、次いで、試料流を垂直方向に圧縮するように作用し、眞の 2 次元シースを作成する。

【 0 1 3 3 】**(慣性集束)**

「慣性」と称される多数の方法が存在する。これらは、集束を作成するために、単に、前述のような液体の流線内で生成される流路にではなく、様々な程度において粒子自体の離散性に依拠する。いくつかの慣性方法はまた、同様に、集束流線の作成による集束成分を有する。これらの方法はほぼ全て、超低流量で動作し、明らかに、迅速な分析のために要求される範囲（例えば、数 $100 \mu\text{L}$ の液体の流動を 1 分未満以内に）に拡張することはできない。これらの流動方法の大部分の二次的問題は、構造のサイズが、ほぼ集束されるべき粒子のサイズであるため、加工要求が、短中期的に見て、大量製造において合理的に見込まれるものを超えることである。

10

【 0 1 3 4 】

微小流体ディスク内に実装され得る慣性集束方法は、図 15 に図示される。本方法は、流動流における拡張および収縮を使用して、渦を誘発し、試料流を集束させる効果を有する。総流量 5.5 mL / 時間 および試料 : シース比 $1 : 10$ の場合、チャネル $50 \mu\text{m W} \times 53 \mu\text{m D}$ および $300 \mu\text{m}$ 長によって接続される複数の収縮 / 拡張を伴う構造 $350 \mu\text{m}^2$ および $53 \mu\text{m}$ 深さは、試料をほぼ円筒形のコア（直径 $\sim 18 - 20 \mu\text{m}$ ）に集束させる効果を有する。

20

【 0 1 3 5 】

これは、加工および実装の観点から非常に魅力的である。すなわち、全特徴が、1 つの部分内にあって、蓋で密閉され得る。シースおよび試料流体は、毛細管弁を使用して、典型的「T」合流点にもたらされ得る。

【 0 1 3 6 】**(検出実施形態)**

ビーズベースの免疫アッセイ等のいくつかの用途では、フローサイトメトリー検出によって与えられる各粒子に関する詳細な情報は、必要ない。一重免疫アッセイの場合、単一パラメータのみ、重要である。すなわち、直接、ビーズ表面への蛍光標識の結合に依存し、検体濃度を定量的に反映する、蛍光強度である。これらの場合、全ビーズは、原則として、同じであって（当然ながら、その間に統計的変動は存在する）、個々に測定される必要はない。ビーズが、全体として測定され得る場合、いくつかのパラメータは、全体的システム設計において緩和される。すなわち、デバイスは、検出の間、もはや回転する必要はなく、濃度およびビーズ / 検出体積サイズは、複数の計数を最小にするために調整される必要はなく、検出器の試料採取速度は、もはや高速である必要はない。これらの制約の除去に加え、バルク検出は、シグナル対ノイズ比の増加をもたらす。すなわち、多くのビーズをディスクの小領域内で同時に検出することによって、全体的蛍光シグナルが、増加され、蛍光シグナル対背景比は、流動内の单一粒子検出を用いたものよりはるかに大きい。

30

【 0 1 3 7 】

ビーズをバルクで測定する際に、ビーズは、ディスクの内部表面に対して固定化され得る。これは、いくつかの方法で行われ得る：

- 1 . 遠心分離を通したペレット化
- 2 . チャネルの狭窄における捕捉
- 3 . フィルタ上での捕捉
- 4 . 磁力。

【 0 1 3 8 】

図 13a は、バルクでのビーズの検出に先立った、遠心分離を通したペレット化の実装

40

50

を示す。

【0139】

前述の免疫アッセイプロトコルのパラメータを使用して、アッセイは、サイズ $7.5 \mu m$ の1000個のビーズを提供し得る。球状粒子の凝縮層によって占有される最小面積は

、

【0140】

【数10】

$$V \approx N_p \left(\frac{\sqrt{18}}{\pi} \right) \left(\frac{4}{3} \right) \pi \left(\frac{d}{2} \right)^3 = \frac{\sqrt{18} d^3}{6} N_p$$

10

である。

【0141】

サイズ $d = 7.5 \mu m$ の $N_p = 1000$ 個の粒子の場合、この体積は、 $\sim 3 \times 10^{-5} \mu m^3$ である。これらの粒子が、小体積 $60 \mu m$ の深さへとペレット化される場合、ビーズによって占有される面積（約7-8個のビーズの深さ）は、 $\sim 5 \times 10^{-3} \mu m^2$ または1辺が $\sim 71 \mu m$ である。これは、低成本光学を使用して容易に調べることができる。

【0142】

図13aでは、アッセイが、図5の洗浄システムを使用して行われる。洗浄されたビーズを流動チャネル内に注入するのではなく、ビーズは、第2のペレット化チャンバまたは粒子受容構造に輸送される。ペレット化チャンバは、その最外点に小さく浅い検出ゾーンが存在するように成形される。このように、蛍光ビーズは、遠心分離によるペレット化に応じて、小領域中に凝縮され、単一ビーズと比較して、1000倍の蛍光シグナルの得られた増幅を伴って、全体として、光学系によって調べられ得る。本発明は、はるかに大きなサイズのビーズを伴う用途において使用され得ることが想定される。10の増幅（10個のビーズ）さえ、シグナル／ノイズ改良が、より大きなビーズ／より多くのビーズに伴って改善するように有意となるであろう。

20

【0143】

ビーズの損失に対する制御は、その最外50%等、ある体積の画分を調べることによって行われ得る。

30

【0144】

多重化されたアッセイは、明確に分離される放出ピークを伴う異なる染色を通して対応され得る。例えば、フィコエリトリン（PE）およびFITCは両方とも、488 nm時の吸収によって活性化され得る。PE放出ピークは、575 nmであって、FITC放出ピークは、520 nmである。これらは、当業者に公知の光学フィルタリング方法を使用して、スペクトル的に分解され得る。

【0145】

フィルタの使用は、前述同様に単純であって、ビーズは、フィルタ上に凝集され、次いで、光学系を使用して、バルクで調べられる。磁石もまた、ビーズを单一検出点に引き付けるために使用され得ることを理解されるであろう。

40

【0146】

図13bおよび13cは、図13のバルクペレット化および検出チャンバの平面図および横断面図をより詳細に示す。構造は、リザーバ502の本体に流入するチャネル501を介して充填される。すなわち、置換される空気は、チャネルおよび通気口503を通して通気される。リザーバの本体から下方（半径方向外側）には、ビーズを流し込むように設計された円錐形構造があつて、ビーズを高回転速度においてディスク上の外側に沈殿させる。これは、可変寸法のいくつかの「円錐」から構成され得る。例えば、「急峻」円錐504は、バルク厚から数100ミクロンの厚さに体積がテーパ状になり得、その後、はるかに緩やかな勾配505が続く。この急峻と浅部の組み合わせは、可変ビーズ数が、ディスクの上方（「平面」図）から見て、ほぼ同一の面積を占有することを確実にする。蛍

50

光シグナルは、ビーズの視認される面積に比例する。すなわち、入射照射は、ビーズの最初の数層を下方に浸透するにつれて、ビーズによって大幅に散乱されるため、表面の下方のビーズ層のバルクは、測定可能な蛍光シグナルを提供しない。

【0147】

この特徴（凝縮されたビーズによる強力な光散乱）のため、示される検出構造はまた、さらなる超薄型最終沈殿「フインガ」506を有する。これは、典型的には、50であって、 $60\text{ }\mu\text{m}$ に満たない深さおよび~ $100\text{ }\mu\text{m}$ 幅×~ $300\text{ }\mu\text{m}$ 長である。精密な寸法は、重要であるが、平滑縁は、空気（チャンバ内に最初に存在する）が、領域506内に気泡として捕捉されないように防止する際、有用である。

【0148】

（臨床化学反応用途）

標準的臨床化学反応アッセイは、デバイスに適用されるような全血または全血試料から分離された血漿のいずれかに関して行われ得る。

【0149】

着目検体の存在または不在のいずれかにおいて、酵素系を利用して、基質から着色または蛍光生成物を生成する発色または蛍光発生化学反応を含む、種々のアッセイ化学反応が、採用され得る。これらのアッセイシステムは、バルク蛍光測定、微小流体ディスク上の光学キュベットを通した、または反射媒体の存在下における、透過の光学密度または吸収測定あるいは試薬に含浸され、検出に適切な生成物を放出する、母材からの反射測定を含む、種々の方法で使用され得る。

【0150】

本発明による母材の調製では、有利には、生物学的流体試料の成分を検出し、より好ましくは、その量を定量化するために使用される、試薬は、母材中に含浸される。非限定的実施例として、クレアチニンが、一連の結合反応を使用して、本発明に従って検出され、そこでは、クレアチニンは、最初に、クレアチニンイミノ加水分解によって、N-メチルヒダントインおよびアンモニアに変換される。カスケード反応の最終ステップは、水素ペルオキシダーゼと、例えば、テトラメチルブルーを基質として使用しての生成された過酸化水素の検出可能生成物への変換である。反射母材の加工は、微小流体ディスク内への挿入に先立って、複数の浸漬および乾燥ステップを伴う。

【0151】

該母材を調製するために使用される材料として、限定されないが、誘導体化されたナイロン、ニトロセルロース、ガラス纖維、およびポリエステルが挙げられ、最も好ましくは、細孔サイズ $0.2 - 2.0\text{ }\mu\text{m}$ を有し、典型的には、細孔サイズ約 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ を有する正の電荷を帯びたナイロン母材を含む。母材の細孔サイズの上限は、血液細胞が、母材に流入するのを阻害または防止するように選定される。母材は、試料計測チャンバから通じるチャネルと流体接触する、アッセイチャンバ内に位置付けられる。母材はさらに、血液試料中の検体の量に比例して検出可能生成物を產生する、固定化試薬で含浸される。最も好ましくは、検出可能生成物は、着色生成物、すなわち、検出可能波長、最も好ましくは、可視波長における光を吸収する生成物である。

【0152】

試薬パッドは、図14におけるように設置され得る。ディスクの流体表面内に形成される陥凹は、試料を搬送するチャネルならびに試料によって置換される空気の除去のための1つ以上の空気置換チャネルとともに形成される。パッド担体は、陥凹内に圧入されると、液密締まり嵌めが得られるように、この陥凹と実質的に、同一の側方寸法を有して形成される。ディスクのチャネルおよび空気置換チャネルは、パッド担体の下面の対応するチャネルおよび空気置換チャネルとシールを形成する。パッド担体の下面是また、その上面に連通する大きな貫通孔とともに、試料のための「ボウル」を含有する。この上面に対して、試薬含浸反射パッドが接着される。

【0153】

（実施例）

10

20

30

40

50

本発明による微小流体ディスクの可能性として考えられる構造が、図15に示される。この微小流体ディスクは、3つの主要構成要素から成る。すなわち、リザーバ、チャネル、受動弁、および液体試薬または乾燥した試薬の形態における試薬等の流体構造の大部分を含有する、流体層100と、主に、貫通孔を含有する、薄型中間層200と、下側またはチャネル層300である。100と300との間の連通は、200における貫通孔を介する。そのような構造は、チャネルが相互にわたって通過しなければならない液体「交差路」を要求する、3次元アーキテクチャを作製するときに有用である。

【0154】

この構造は、いかようにも限定するものではないことを認識されたい。微小流体ディスクは、付加的チャネルまたは貫通孔を伴わずに、本質的に、無特徴層または薄型フィルムを用いて、流体層を密閉することによって形成され得る。ある構造では、無特徴密閉フィルムおよびディスクが提供される。10

【0155】

(免疫アッセイおよび臨床化学反応デバイス)

本発明のディスクは、図16に示されており、ここでは、流体層100のみ、図示される。このディスク構造は、構造化された基質および無特徴密閉フィルムから成る。このディスクは、2つのタイプのアッセイを行うように設計される。すなわち、1つは、多色ビーズまたは多色標識の使用を通して多重化され得る、免疫アッセイであって、もう1つは、反射検出のために開発された臨床化学反応アッセイである。ディスクは、ディスクを回転式モータのハブに確動的に係止するように設計された孔または他の特徴であり得る、中心搭載特徴101を有する。このディスクは、3つの独立試料において、アッセイを行うように設計される。ある試料は、アッセイ構造102のセット内で測定される。20

【0156】

中心特徴101は、ディスクが回転式モータに取着され得る1つの方法にすぎないことに留意されたい。他の半径における取着特徴が、使用されてもよく、例えば、回転子上に対称的に定置されたピンが、微小流体ディスク上の孔と噛合してもよい。

【0157】

このディスクは、手動でピペットで取られた緩衝液および液体試薬ならびに全血試料と併用するために設計されるが、プリスター・パウチまたはバッグあるいは他の液体試薬手段の使用が、採用されてもよく、全血の適用は、血液採取および適用デバイスを使用して、または指を刺し、得られた血液液滴をディスクのポートに適用することによって、行われてもよいことを認識されたい。30

【0158】

図17は、ある試料処理アッセイ構造の詳細構造を図示する。指定される特徴は、その機能に関連して説明されるであろう。図18は、微小流体アッセイ構造の機能を図示する。

【0159】

ディスクは、リザーバ138内に存在する再懸濁緩衝液と、リザーバ145内の溶出緩衝液とを含有する。プロトタイプでは、これらの緩衝液は、ディスク上にピペットで取られ得る。生産時、これらの緩衝液は、プリスター・パウチ内に存在してもよい。プリスター・パウチは、種々の方法で開放され得る：40

- ・回転によって開放される脆弱シール。試薬容器内に生成された圧力が、パウチ内の脆弱シールを開放するように作用する；

- ・計器による破裂。ディスクは、計器の回転式ハブ上の構造が、プリスターを穿刺可能となる機構とともに設計され得る；

- ・埋込ピン／鋭利表面による破裂。埋込ピン（製造時に追加されるか、または直接プラスチック内に成形されるかのいずれか）が、リザーバの外側縁内に存在してもよい。十分な速度におけるスピンドルに応じて、これらのピンに対するパウチの力が、パウチを破裂させる。

【0160】

10

20

30

40

50

血液は、ユーザによって、血液が、回転に先立って、さらなるチャネルおよび構造内に偶発的に流動しないよう防止するように設計されたテクスチャ表面を有し得る、血液流入構造 103 のポート 104 に適用される。これらの構造は、所望の流路に垂直な狭小「溝」を含んでもよく、回転に先立って、表面の偶発的湿潤を防止するように作用する。空気排気ポートが、流入構造内に存在してもよく、または代替として、置換される空気は、さらなる流体チャネルを通して通気される。

【0161】

ディスクは、回転式モータ上に設置され、スピンドルファイルが、開始される。

【0162】

初期回転速度 W1 (典型的には、200 - 400 RPM) では、血液は、遠心分離力によって駆動され、流入構造を充填し、次いで、(パネル d) チャネル 105 に流入する。
隨意に、チャネル 105 は、103 内に残留する内側メニスカスが、半径に垂直な形状に安定するまで、血液のさらなる流動を停止するために、その中に配置される毛細管弁 106 を有してもよい。W2 > W1 への回転速度の増加は、弁 106 を打破する。すなわち、回転速度は、再び、低下し得る。

10

【0163】

ここで、血液は、チャネル 108 を介して、溢流チャンバ 109 に接続される、分離ラム 107 内に遠心分離で圧送される。チャンバ 109 は、置換される空気を通気するための手段を有し、ディスクの中心近位の分離構造 107 の領域もまた、通気手段を有してもよい。(パネル e - f)。同時に、138 内に存在する再懸濁緩衝液は、毛細管弁 139 を通して、チャネル 140 および 141 内に解放される。チャネル 141 内の毛細管弁 142 は、そのチャネルを通してさらなる流動を妨害する。すなわち、140 を通る流動は、溢流リザーバ 143 内に続く。これは、リザーバ 138 内の緩衝液の残りの体積を精密に決定するために有用である。これは、パネル e - f に図示される。

20

【0164】

回転速度は、血漿および凝縮された細胞画分への血液の分離を行うために、W3 > (W1、W2) まで増加される (典型的には、1000 - 3000 RPM の範囲内)。分離構造内のいかなる過剰血液も、溢流体積 109 内に完全に駆動される。パネル g は、分離プロセスの開始を図示し、血液細胞は、107 の外側表面に向かって凝縮する。

30

【0165】

血漿分離プロセスの間、毛細管弁 142 は、再懸濁緩衝液を解放し、これは、チャネル 144 を通して、混合チャンバ 126 に送達される。混合チャンバ内に存在するのは、乾燥した試薬、例えば、乾燥した免疫修飾されたビーズ 127 および乾燥した蛍光染料 128 であり得る。

【0166】

血漿分離は、継続する。この分離の間、血液および血漿は、分離体積 107 に接続されたサイドアームチャネル 110 内に存在するが、毛細管弁 111 によって滞留させられる。

【0167】

また、分離の間、溶出緩衝液のための毛細管弁 146 は、遠心分離によって開始された圧力によって打破され、再懸濁緩衝液と同様に、チャネル 147 を通して、過剰緩衝液の溢流をリザーバ 148 内につなげる。

40

【0168】

パネル j では、回転速度は、一時的に、W4 > W3 まで増加され、典型的には、より適度なレベルまで減速される。これは、毛細管弁 111 を打破し、血漿が、107 の内側部分から、チャネル 110 がチャンバに合流するレベルまで傾瀉されることを可能にする (その時点では、空気は、110 内に引き込まれ、血漿分割量を滞留させられた凝縮された血液細胞から分離する)。血漿は、最初に、計測リザーバ 114 内に流动し、通路 115 を通して、第 2 の計測リザーバ 121 および溢流体積 122 内に溢流する。リザーバ 114 は、反射ベースのアッセイの性能に適切な血漿を計測する一方、リザーバ 121 は、免疫

50

アッセイに適切な体積を計測する。各計測された体積は、毛細管弁（それぞれ、117および124）によって滞留させられる。

【0169】

パネル1では、回転速度は、W5まで急増され、次いで、減速され、毛細管弁117および124を打破する。

【0170】

弁117を通過する血漿は、チャネル118を介して、血漿内の検体に基づいて、蛍光または着色生成物を生成するために適切な試薬が埋め込まれた反射構造119へと移動する。置換される空気は、通気口120を通して通気される。

【0171】

弁124を通過する血漿は、チャネル125を介して、混合チャンバ126に流入する。

【0172】

回転は、減速される。緩速搅拌が、パネルnに示されるように、ディスクを減速および加速することによって（典型的には、加速1000-10,000 RPM / 秒であるが、全体的減速速度では、100-500 RPM）行われる。この搅拌は、「一方向性」であってもよく、すなわち、ディスクは、停止するために、その500 RPMから停止まで急減速され、次いで、ゆっくりと500 RPMに逆加速され、次いで、再び停止され、このようにして、循環されてもよい。または、搅拌は、双方向であってもよく、ディスクは、半サイクル毎に、回転方向を変更する。一方向性搅拌は、チャネル129および131がチャンバから出射する反対の接線方向に高加速または減速を適用することによって、チャネル129および131によって混合チャンバの出口（底部）に取着された毛細管弁上の圧力過渡を最小にするために、特に有用である。

【0173】

パネルoでは、試薬は、完全に可溶化され、試料および再懸濁緩衝液と混合され、ビーズは、ここで、溶液中に均質に分散されている。反射構造では、検出可能生成物につながる化学反応が継続する。ディスクは、免疫アッセイが、混合チャンバ内で培養されるため、継続的に搅拌され得る。

【0174】

回転速度は、パネルpに示されるように、混合チャンバ内のビーズをペレット化するために、W5（典型的には、500-2500 RPM）まで増加される。

【0175】

パネルqでは、反射パッド内で検出可能反応生成物を産生する化学反応が、完了している。検出は、ディスクが低速で回転している間、1～複数の波長における反射の測定によって生じ得る。

【0176】

W6までの回転速度の急増は、回転速度の後続減速とともに、毛細管弁130を打破し、混合チャンバ内の沈殿されたビーズの上清が、チャネル133を通して、狭小チャネル135およびポート136によって通気される、廃棄物リザーバ134に進行することを可能にする。パネルrに示されるように、リザーバ134は、上清の小体積が、混合チャンバ内に滞留させられるように定寸され得る。すなわち、134が充填するにつれて、最終的に、液体は、チャネル135内に上昇し、この液体のメニスカスが、126内の滞留させられた流体のメニスカスと同一の半径方向位置になると、流体運動が停止する。

【0177】

パネルrでは、回転速度は、速度W7まで急増され、溶出緩衝液が、毛細管弁150を通して、チャネル151内、次いで、混合チャンバ内に解放される。廃棄物チャンバは、満杯であって、空気排気チャネル135が、狭小直径であって、混合チャンバの半径方向内側に延在するため、流体は、チャネル133を通して、廃棄チャンバに進行せず、初期試料+再懸濁体積を上回る溶出体積が、収容され得る。これは、パネルtに示される。

【0178】

10

20

30

40

50

緩速攪拌は、ビーズを再懸濁させ、ビーズが、パネルuにおける混合チャンバ内に溶出緩衝液が均質に分散された最終状態につながる。

【0179】

最後に、回転速度は、速度W7まで急増され、次いで、減速され、毛細管弁132を打破し、ビーズ搬送流体をチャネル152内にもたらす。152のあるセクションは、検出システムによる検査のために、固定半径に接線方向に配列された流動チャネル領域153である。この流体はさらに、通気ポートを伴う、廃棄物リザーバ154内に駆動される。検出は、流体が、153を通して流動するにつれて生じる。必要に応じて、さらに攪拌ステップが使用され、混合チャンバ内の残留溶液内のビーズの過度の沈下を防止してもよい。また、回転速度は、このステップの間、変動してもよく、低速から開始し、実質的に、一定流量を維持するために、増加することを認識されたい。10

【0180】

その廃棄物チャンバを伴う流動チャネルと、統合されたバルクペレット化チャンバ（その独自の廃棄物チャンバとして作用する）の置換は、単純であって、検出ステップは、高速遠心分離（例えば、7200 RPMで30秒間）後に、検出を伴うことを理解されるであろう。

【0181】

（シース流）

図19は、シース流の作成に適切な微小流体ディスクを図示する。ここでは、図5の洗浄方法と併せて図示される。既に論じられた混合チャンバ、溶離液チャンバ、廃棄物チャンバ、ならびに毛細管弁およびチャネルに加え、シース流体を含有するリザーバが、存在し、毛細管弁V4によって、流動チャネルおよび混合チャンバから分離される。シース流体は、統合されたディスクの動作の早期段階における、このシース流体リザーバへの駆動に先立って、大型の試薬パウチまたはプリスター内に存在してもよいことを理解されたい。20

【0182】

洗浄ステップは、前述の実施例におけるように行われる。回転速度は、急増され、弁V3を通して、ビーズ含有溶液を混合チャンバから流動チャネル内に解放する。同時に、シース流体は、弁V4を越えて、駆動され、流動チャネル内の試料溶液に合流する。これは、図20に図示される。シース流のための流体合流点の構造の詳細は、以下に与えられる。30

【0183】

前述のように、シース流に対する所望の流動比は、

【0184】

【数11】

$$\frac{Q_{sheath}}{Q_{sample}} = \frac{A_{sheath}(r)}{A_{sample}(r)}$$

によって決定される。40

【0185】

図20は、そのような10：1シース流を提供するためにレイアウトされたディスクを示す。シースリザーバは、混合チャンバの深さの2倍である。これは、混合チャンバが狭小化するのと同様に、半径方向位置の増加に伴って、狭小化する（断面積が減少する）ように成形され、したがって、流動比を維持する。

【0186】

微小流体ディスク上におけるシース流の実装は、前述の方法を使用することができ、シースと試料溶液との間の合流点の詳細は、シースのタイプを決定する。例えば、図2に示される全体的構造と、図12の非同軸シースの組み合わせは、図15におけるように、350

つの部分から成るディスクを作成することによって行われ得る。これは、図21に示される。分析されるべき溶液は、混合チャネルから、中間層内の貫通孔を通して、主要流動チャネルに合流する点まで、下側チャネル層内を進行する。この貫通孔は、図22における弁V3として作用することができる。弁V4を通して、シース流体を解放する、速度急増は、試料の流動を引き起こすために使用され、集束されたシース流が生じる。

【0187】

これらの基本概念に関して、多くの変形例が存在することを認識されたい。例えば、サイフォンの使用は、毛細管弁を補完してもよい。サイフォンはまた、毛細管弁と併用されてもよい。毛細管弁は、望ましくない低回転速度におけるサイフォンの「呼水を差す」ステップを防止することができる。弁の突破は、ディスク上の別のステップの一部であってもよい。ディスクの後続減速は、サイフォンの呼水を差すステップ後、流動につながる。10

【0188】

図面を参照して説明される本発明における実施形態は、コンピュータ装置および/またはコンピュータ装置内で行われるプロセスを備える。しかしながら、本発明はまた、コンピュータプログラム、特に、本発明を実践させるように適合された担体上または内に記憶されたコンピュータプログラムにも拡張する。プログラムは、ソースコード、オブジェクトコード、またはコード中間ソースおよびオブジェクトコードの形態、例えば、部分的にコンパイルされた形態または本発明による方法の実装に使用するために好適な任意の他の形態であってもよい。担体は、ROM、例えば、CD-ROM、または磁気記録媒体、例えば、フロッピー（登録商標）ディスクまたはハードディスク等の記憶媒体を備えてもよい。担体は、電気または光学ケーブルを介して、あるいは無線または他の手段によって伝送され得る、電気または光学シグナルであってもよい。20

【0189】

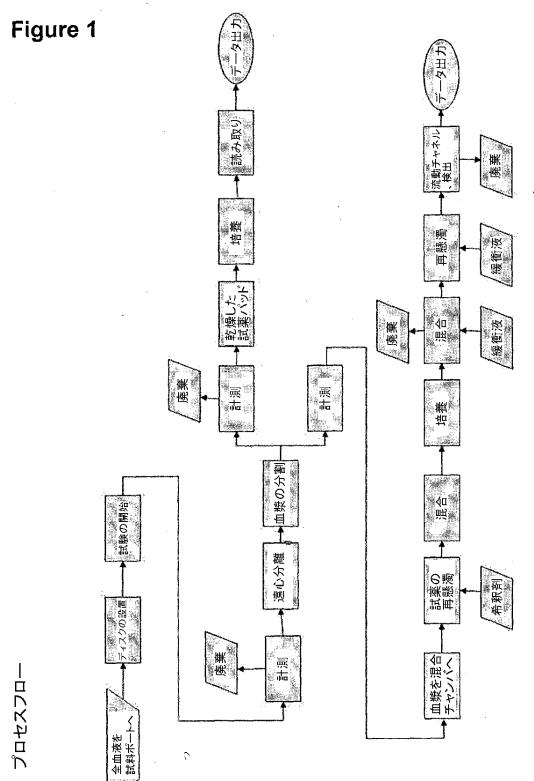
本明細書では、用語「備える（comprise、comprises、comprised、およびcomprising）またはその任意の変動および用号「含む（include、includes、included、およびincluding）またはその任意の変動は、完全に互換可能であると見なされ、全て、最も広範な可能性として考えられる解釈が与えられるべきであって、その逆も然りである。

【0190】

本発明は、前述の実施形態に限定されず、構造および詳細の両方において変更され得る。30

【図1】

Figure 1



【図2】

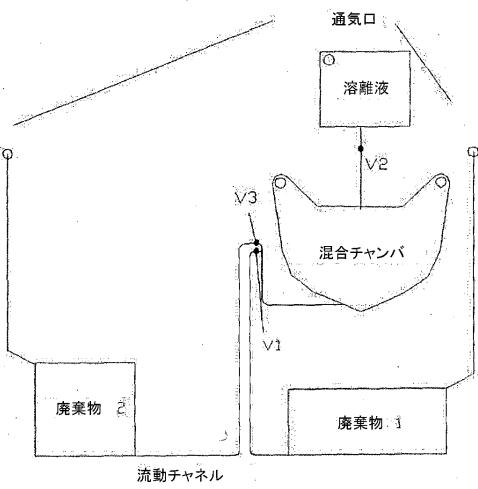


Figure 2

【図3a】

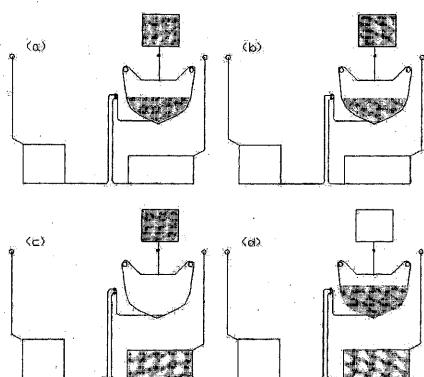


Figure 3a

【図3b】

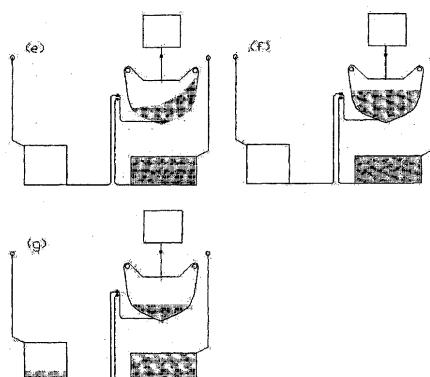


Figure 3b

【図4】

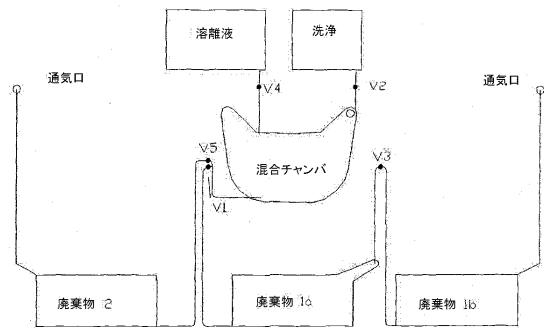


Figure 4

【図5a】

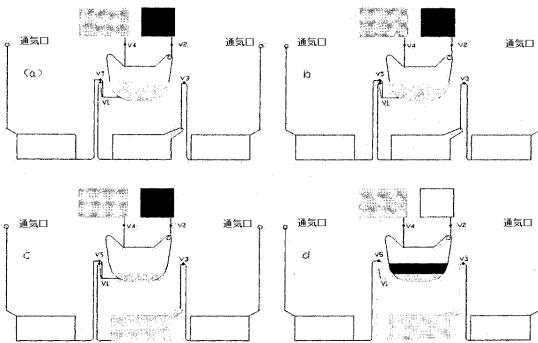


Figure 5a

【図5b】

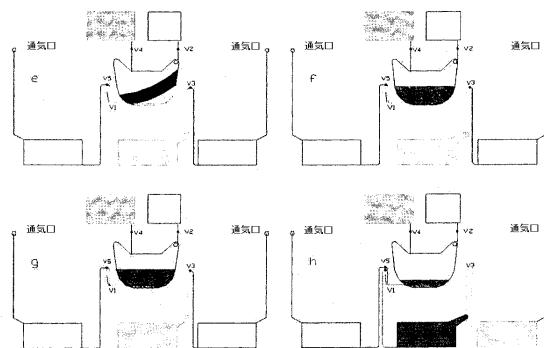


Figure 5b

【図5c】

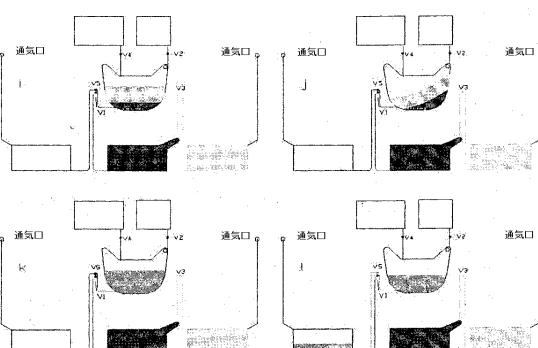
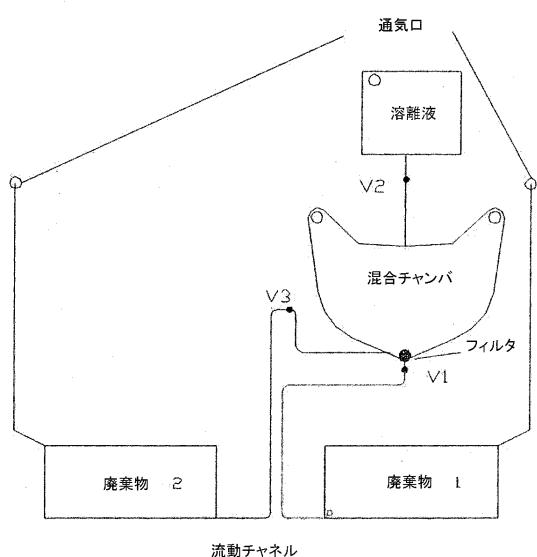


Figure 5c

【図 6】



流動チャネル

【図 7 a】

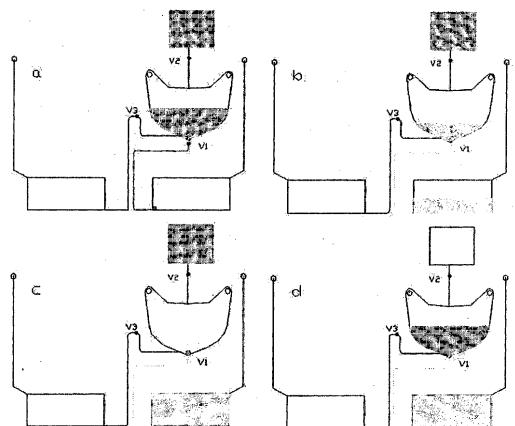


Figure 7a

Figure 6

【図 7 b】

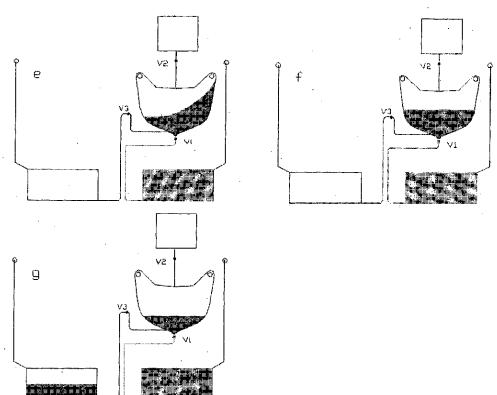


Figure 7b

【図 8】

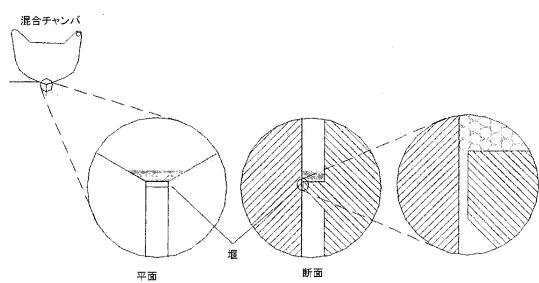


Figure 8

【図 9】

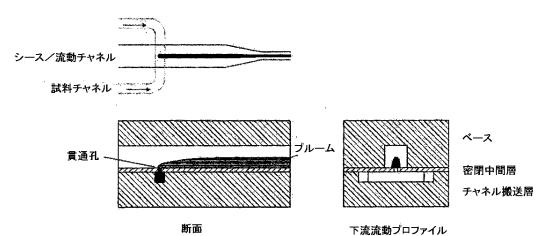


Figure 9

【図 10】

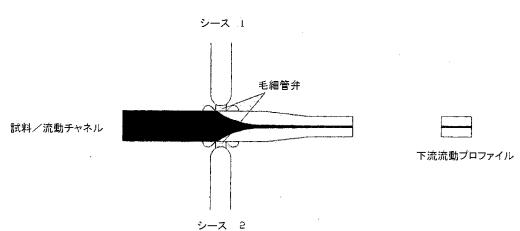


Figure 10

【図 1 1】

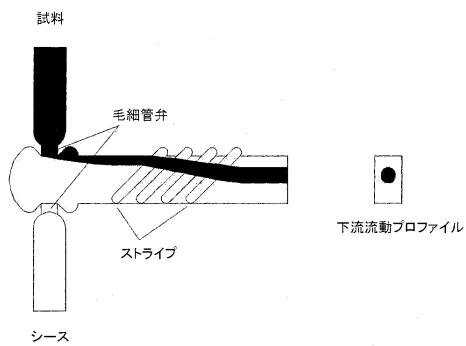


Figure 11

【図 1 3 a】

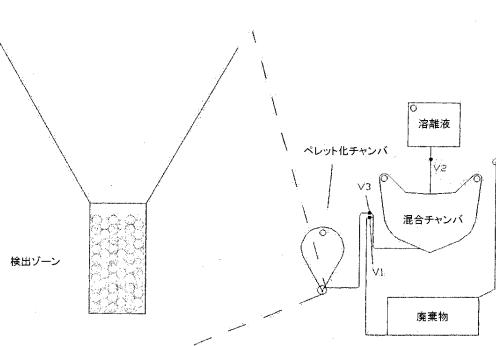


Figure 13a

【図 1 2】

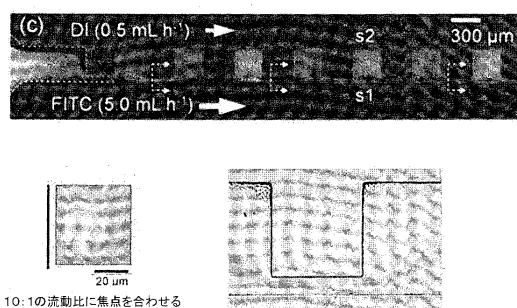
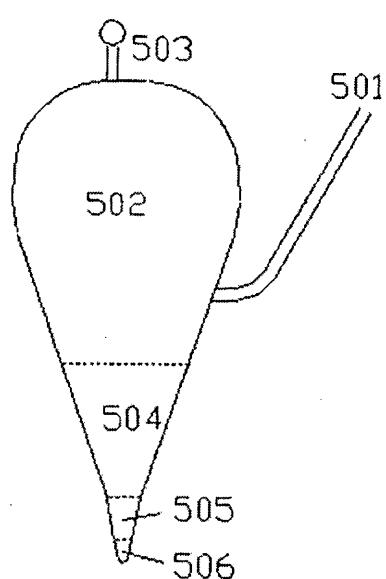


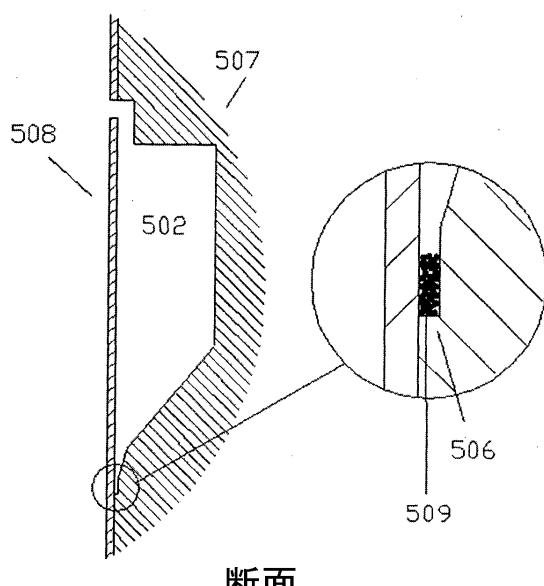
Figure 12

【図 1 3 b】



平面

【図 1 3 c】

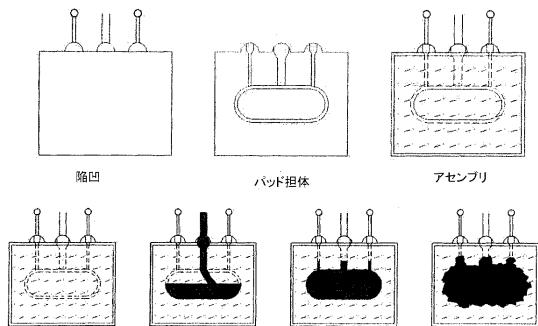


断面

Figure 13c

Figure 13b

【図14】



【図15】

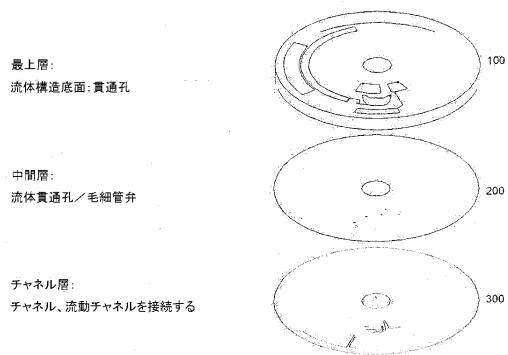


Figure 14

Figure 15

【図16】

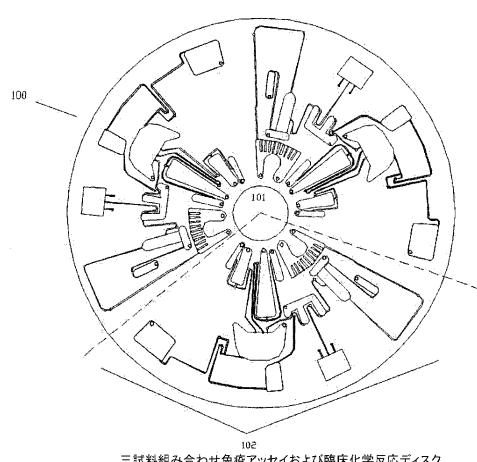


Figure 16

【図17】

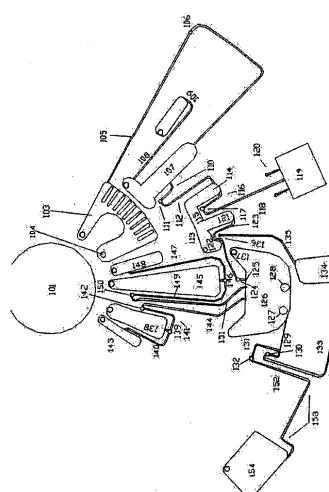
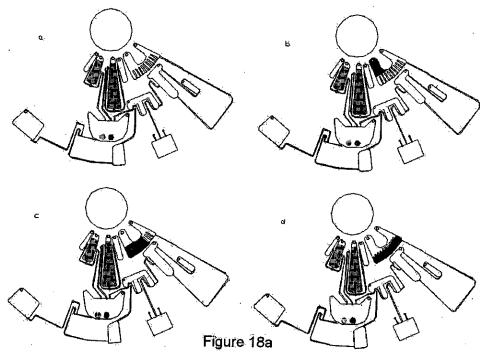
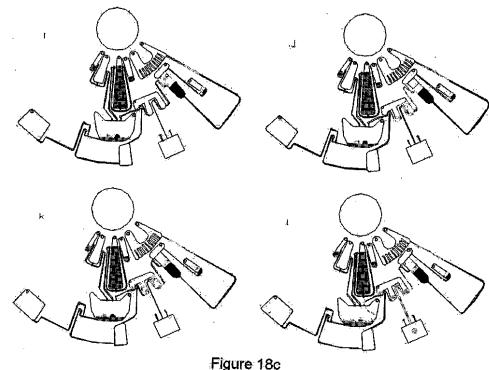


Figure 17

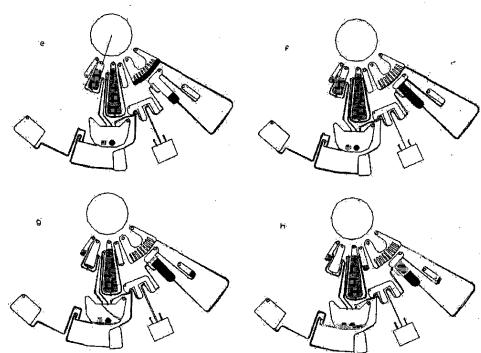
【図18a】



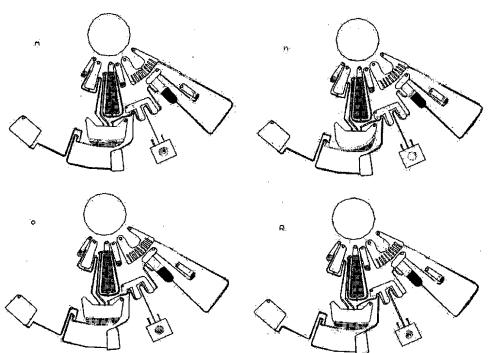
【図18c】



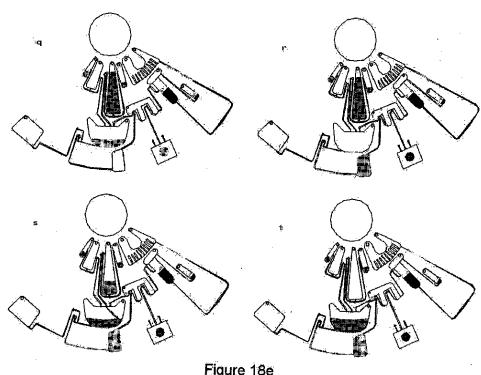
【図18b】



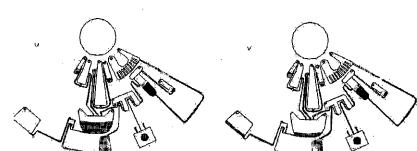
【図18d】



【図18e】



【図18f】



【図19】

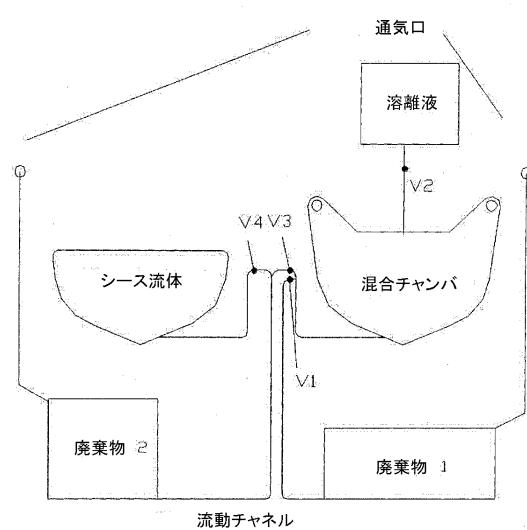


Figure 19

【図 2 0】

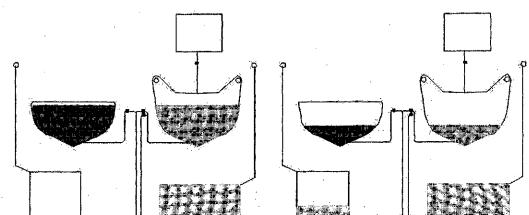


Figure 20

【図 2 1】

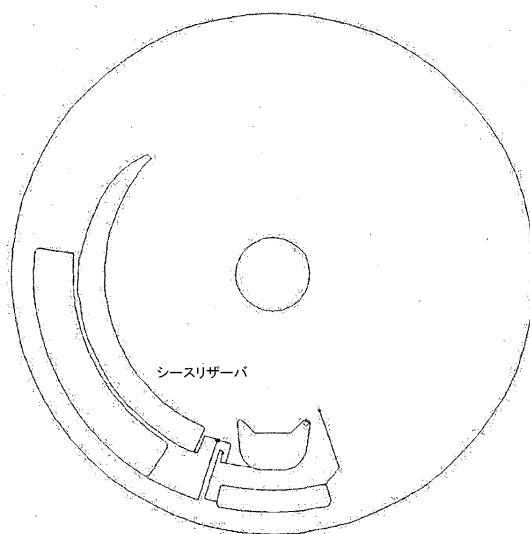


Figure 21

【図 2 2】

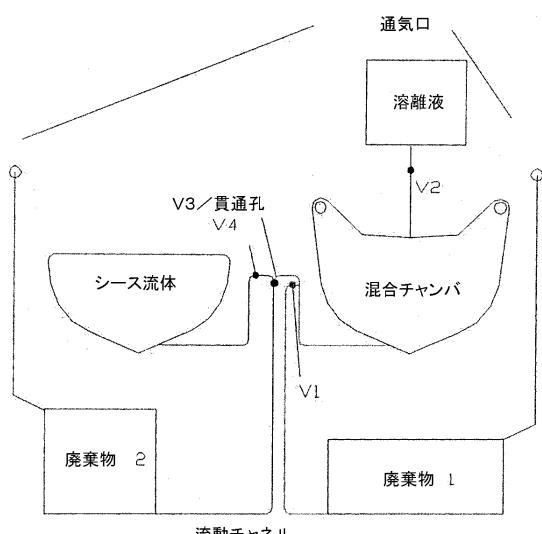


Figure 22

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ケロッグ， グレッグ

アイルランド国 コーク， シーアイティー キャンパス ビショップスタウン， ザ ルビコン
センター， ラディセンス テクノロジーズ リミテッド 気付

(72)発明者 オブライエン， ジェリー

アイルランド国 コーク， シーアイティー キャンパス ビショップスタウン， ザ ルビコン
センター， ラディセンス テクノロジーズ リミテッド 気付

(72)発明者 オーニューロン， オーエン

アイルランド国 コーク， シーアイティー キャンパス ビショップスタウン， ザ ルビコン
センター， ラディセンス テクノロジーズ リミテッド 気付

(72)発明者 カーティン， ダミアン

アイルランド国 コーク， シーアイティー キャンパス ビショップスタウン， ザ ルビコン
センター， ラディセンス テクノロジーズ リミテッド 気付

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特開2008-064753(JP, A)

国際公開第2011/032941(WO, A1)

特開2009-063590(JP, A)

特開2009-103575(JP, A)

特開2007-330857(JP, A)

特開2007-024851(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 35/00 - 37/00