

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-509143

(P2009-509143A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 35/08 A	2 G O 4 5
GO 1 N 1/10 (2006.01)	GO 1 N 1/10 V	2 G O 5 2
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 1/10 P	2 G O 5 8
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 B	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-531396 (P2008-531396)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月15日 (2006. 9. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月7日 (2008. 5. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/036202
 (87) 国際公開番号 W02007/035585
 (87) 国際公開日 平成19年3月29日 (2007. 3. 29)
 (31) 優先権主張番号 11/229, 336
 (32) 優先日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/229, 332
 (32) 優先日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/228, 462
 (32) 優先日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508074815
 アルテミス ヘルス, インク.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 4 7 2, ウォータータウン, スイート 1
 3 0, アーセナルストリート 4 8 0
 (71) 出願人 503046334
 ザ・ゼネラル・ホスピタル・コーポレーシ
 ョン
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州 O 2 1
 1 4, ボストン, フルート・ストリート
 5 5
 (74) 代理人 100096024
 弁理士 柏原 三枝子
 (74) 代理人 100125520
 弁理士 高橋 剛一

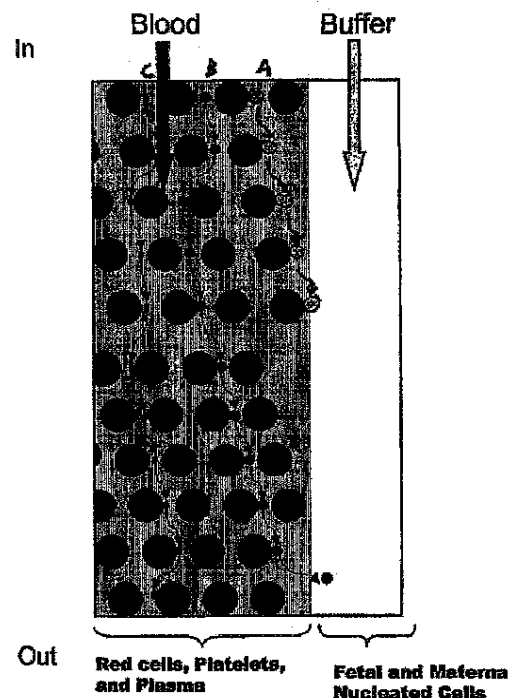
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析改善システムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、サンプル中の第 1 の検体を少なくとも 1 0 , 0 0 0 倍の濃度に高めるのに適合した 1 またはそれ以上のサイズ式選別モジュールに関し、前記第 1 の検体はサンプル中の初期濃度が 1×10^{-3} 検体 / μL 以下であり、そして、濃縮された媒体中の前記第 1 の検体を分析する分析器に関する。この選別モジュールを用いて患者の状態すなわち胎児の異常に関連する特性を同定する方法も提供される。

【選択図】 なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の第 1 の検体を少なくとも 10,000 倍の濃度が高めるのに適合した 1 またはそれ以上のサイズ式選別モジュールを具備、前記第 1 の検体はサンプル中の初期濃度が 1×10^{-3} 検体 / μL 以下であり、

前記第 1 の検体を濃縮した媒体中の第 1 の検体を分析するコンピュータ実行可能なロジックを具備する分析器を具備することを特徴とするシステム。

【請求項 2】

請求項 1 のシステムにおいて、前記分析器がさらに、顕微鏡、マイクロアレイ、またはセルカウンタを具備することを特徴とするシステム。

10

【請求項 3】

請求項 1 のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、胎児のヘモグロビン、グロビン、グロビン、グロビン、GPA、i 抗原、CD36、セレクチン、CD71、またはこれらの組合せの存在による変色を検出することを特徴とするシステム。

【請求項 4】

請求項 1 のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、第 1 の検体を選択的に結合するプローブの強度を検出することを特徴とするシステム。

【請求項 5】

請求項 1 のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、前記第 1 の検体の三次元分析を実行することを特徴とするシステム。

20

【請求項 6】

請求項 1 のシステムにおいて、前記分析器はデュアルスキャン機能を有することを特徴とするシステム。

【請求項 7】

請求項 1 のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、前記第 1 の検体を描写することを特徴とするシステム。

【請求項 8】

請求項 1 のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、三染色体性、胎児の性別、関心ある細胞の遺伝子または染色体異常、またはこれらの組合せを検出することを特徴とするシステム。

30

【請求項 9】

請求項 1 のシステムにおいて、前記サイズ式選別モジュールがそれぞれ、前記第 1 の検体を第 1 の方向へ決定論的に案内し、前記第 1 の検体より流体力学的サイズが小さな第 2 の検体を第 2 の方向へと案内する二次元障害物アレイを具備することを特徴とするシステム。

【請求項 10】

請求項 9 のシステムにおいて、前記第 1 の検体が有核赤血球であることを特徴とするシステム。

【請求項 11】

請求項 9 のシステムにおいて、前記前記第 1 の検体が胎児有核赤血球であることを特徴とするシステム。

40

【請求項 12】

請求項 1 のシステムにおいて、前記システムが、互いに並列に液体的に接続された 2 またはそれ以上のサイズ式選別モジュールを具備することを特徴とするシステム。

【請求項 13】

請求項 1 のシステムにおいて、少なくとも前記液体サンプルの 10 mL / 時間の高スループット分析に適合していることを特徴とするシステム。

【請求項 14】

請求項 1 のシステムにおいて、さらに、前記サイズ式選別モジュールに液体接続された

50

1 またはそれ以上の捕獲モジュールを具備し、前記捕獲モジュールは前記サンプルから選択的に前記第1の検体または第2の検体を捕獲することを特徴とするシステム。

【請求項15】

請求項14のシステムにおいて、前記捕獲モジュールがそれぞれ、二次元障害物アレイを具備することを特徴とするシステム。

【請求項16】

請求項14のシステムにおいて、前記捕獲モジュールがそれぞれ、1またはそれ以上の抗体に結合される二次元障害物アレイを具備することを特徴とするシステム。

【請求項17】

請求項16のシステムにおいて、前記抗体は選択的に、赤血球、白血球、胎児血液細胞、胎児有核血液細胞、癌細胞、上皮細胞、幹細胞、前駆細胞、泡沫細胞、または血小板、を結合することを特徴とするシステム。

10

【請求項18】

請求項16のシステムにおいて、前記抗体は、抗CD71、抗CD36、抗CD451、抗GPA、抗セクチン、抗炭水化物、抗抗原I、および抗EpCamからなる群から選択されることを特徴とするシステム。

【請求項19】

請求項1のシステムにおいて、前記液体サンプルは血液サンプルであり、前記第1の検体は、上皮細胞、内皮細胞、前駆細胞、幹細胞、泡沫細胞、または癌細胞からなる群から選択されることを特徴とするシステム。

20

【請求項20】

請求項1のシステムにおいて、前記液体サンプルは血液サンプルであり、5mL以下であることを特徴とするシステム。

【請求項21】

請求項1のシステムにおいて、前記液体サンプルは妊娠12週以下の女性の血液サンプルであることを特徴とするシステム。

【請求項22】

請求項1のシステムにおいて、前記選別領域の障害物の間の隙間は1000ミクロン以下であることを特徴とするシステム。

【請求項23】

請求項1のシステムにおいて、さらに、前記選別領域または捕獲領域に液体的に接続され磁気粒子を含んだリザーバを具備することを特徴とするシステム。

30

【請求項24】

請求項1のシステムにおいて、前記システムがさらに、選択的に前記第1の検体または前記第2の検体を結合するよう構成された磁気ビードを具備することを特徴とするシステム。

【請求項25】

請求項24のシステムにおいて、前記磁気ビードが、特に前記第1の検体を結合する抗体に結合されることを特徴とするシステム。

【請求項26】

請求項1のシステムにおいて、さらに、前記サイズ式選別モジュールに液体接続されたリザーバを具備し、当該リザーバが基第1の検体を優先的に結合するよう構成された磁気粒子を具備することを特徴とするシステム。

40

【請求項27】

請求項2のシステムにおいて、前記分析器が、前記第1の検体中の1またはそれ以上のSNPを検出するよう構成されたマイクロアレイを具備することを特徴とするシステム。

【請求項28】

請求項2のシステムにおいて、前記分析器が、前記第1の検体中のmRNAレベルを検出するよう構成されたマイクロアレイを具備することを特徴とするシステム。

【請求項29】

50

請求項 9 のシステムにおいて、前記障害物は、サンプルの流れを不均一に次の隙間へと案内する隙間により隔てられていることを特徴とするシステム。

【請求項 30】

血液サンプルから除核細胞の 99.5% 以上を取り除き、血液サンプルから有核細胞の 99% 以上を保持するのに適合した選別モジュールを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 31】

請求項 31 のシステムにおいて、さらに、前記選別モジュールに液体接続され 1 またはそれ以上の有核細胞を分析するよう構成された分析器と、分析データを保存するデータベースとを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 32】

1 またはそれ以上の第 1 の濃縮領域であって、第 1 の検体用の第 1 の流体流路と第 2 の検体用の第 2 の流体流路とを規定する複数の二次元障害物を具え、前記第 1 の検体および第 2 の検体の流体力学的直径が異なる濃縮領域と、前記 1 またはそれ以上の濃縮領域に液体接続され前記第 1 の検体または第 2 の検体のデータを取得するための分析器と、前記データを格納するデータベースとを具えことを特徴とするシステム。

10

【請求項 33】

請求項 32 のシステムにおいて、前記第 1 の検体が、赤血球 (RBC)、有核赤血球 (NRBC)、胎児の RBC、胎児有核 RBC (fNRBC)、栄養膜、胎児の繊維芽細胞、白血球 (WBC)、感染 WBC、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、癌細胞、ウイルス細胞、バクテリア細胞、および原生動物からなる群から選択されることを特徴とするシステム。

20

【請求項 34】

請求項 32 のシステムにおいて、前記細胞種類が生体内で 1×10^{-3} 細胞 / μL 以下の濃度で見られることを特徴とするシステム。

【請求項 35】

請求項 32 のシステムにおいて、前記第 1 の濃縮領域における障害物間の隙間は最大 1000 ミクロンであることを特徴とするシステム。

【請求項 36】

請求項 32 のシステムにおいて、さらに、1 またはそれ以上の第 2 の濃縮領域を具え、前記第 2 の濃縮領域は前記第 1 の検体または第 2 の検体を捕獲し、前記第 2 の濃縮領域は前記第 1 の濃縮領域に液体接続していることを特徴とするシステム。

30

【請求項 37】

請求項 32 のシステムにおいて、前記 1 またはそれ以上の第 1 の濃縮領域は、前記第 1 の検体の 99% 以上を保持するよう構成されることを特徴とするシステム。

【請求項 38】

請求項 32 のシステムにおいて、前記 1 またはそれ以上の第 1 の濃縮領域は、前記第 1 の検体の濃度を少なくとも 100,000 の係数で増大させるよう構成されることを特徴とするシステム。

【請求項 39】

患者の状態に関連する特性を同定する方法であって、
 複数の対照試料を取得するステップと、
 複数の症例試料を取得するステップと、
 前記サンプルをそれぞれ、前記サンプルから第 1 の検体を前記血液サンプルから第 2 の検体とは別の方向へ偏向させる複数の障害物を具える装置にかけるステップであって、前記第 1 の検体と第 2 の検体の直径が異なるステップと、
 前記サンプルから前記第 1 の検体を分析して前記第 1 の検体の特性を特定するステップと、
 前記特性に基づいて関連する研究を行うステップとを具えることを特徴とする方法。

40

【請求項 40】

請求項 39 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の存在または不存在であること

50

を特徴とする方法。

【請求項 4 1】

請求項 3 9 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の数であることを特徴とする方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 9 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の形態 (morphology) または前記第 1 の検体の表現型であることを特徴とする方法。

【請求項 4 3】

請求項 3 9 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の遺伝子型であることを特徴とする方法。

【請求項 4 4】

請求項 3 9 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の蛋白代謝であることを特徴とする方法。

【請求項 4 5】

請求項 3 9 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の RNA 構造であることを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

請求項 3 9 の方法において、前記特性は前記第 1 の検体の遺伝子発現レベルであることを特徴とする方法。

【請求項 4 7】

請求項 3 9 の方法において、前記複数の対照試料は、少なくとも 1 0 0 の対照試料を含むことを特徴とする方法。

【請求項 4 8】

請求項 3 9 の方法において、前記複数の症例試料は、少なくとも 1 0 0 の症例試料を含むことを特徴とする方法。

【請求項 4 9】

請求項 3 9 の方法において、前記対照試料および症例試料は、血液サンプルであることを特徴とする方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 の方法において、前記各血液サンプルの血液は 1 0 0 m L 以下であることを特徴とする方法。

【請求項 5 1】

請求項 3 9 の方法において、前記検体は細胞型 (cell type) であることを特徴とする方法。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 の方法において、前記検体は上皮細胞、癌細胞、または胎児細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 5 3】

請求項 3 2 の方法において、前記障害物は、前記第 1 および第 2 の検体の液体の流れを決定論的に導くことを特徴とする方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 3 の方法において、前記障害物アレイは、前記サンプルの流れを導く隙間を次の隙間へと不均一に規定することを特徴とする方法。

【請求項 5 5】

サンプル中のバイオハザード検体を検出する方法であって、前記バイオハザード検体はサンプルにおいて濃度 1×10^{-3} 検体 / μL 以下に見られ、前記サンプルを、前記検体の濃度を少なくとも 1 0 , 0 0 0 倍増大させるよう構成されたフロースルー濃縮装置にかけるステップと、前記濃縮されたバイオハザード検体を分析するステップとを具えることを特徴とする方法。

【請求項 5 6】

10

20

30

40

50

請求項 55 の方法において、前記濃縮装置は、前記バイオハザード検体の 99% 以上を保持するよう構成されることを特徴とする方法。

【請求項 57】

請求項 55 の方法において、前記濃縮装置は、前記バイオハザード検体を、少なくとも 100,000 の係数で濃縮するよう構成されることを特徴とする方法。

【請求項 58】

請求項 55 の方法において、前記濃縮装置は、98% 以上の特異性と 98% 以上の感度を有することを特徴とする方法。

【請求項 59】

請求項 55 の方法において、前記バイオハザード検体が、バクテリア、原生動物、およびウイルスを含む群から選択される病原体であることを特徴とする方法。

10

【請求項 60】

請求項 55 の方法において、前記バイオハザード検体は、ペスト菌、炭疽菌、ボツリヌス菌、野兔病菌、コキシエラ菌、ブルセラ種、ブルクホルデリアついで骨、ブルクホルデリア仮性ついで骨、連鎖球菌、エボラウイルス、ラッサウイルス、SARS、大痘瘡、アルファウイルス、発疹チフスリケッチア、オウム病クラミジア、サルモネラ種、大腸菌 O157:H7、コレラ菌、クリプトスポリジウムパルバム、ニパウイルス (Nipah virus)、ハンタウイルスからなる群から選択される病原体であることを特徴とする方法。

【請求項 61】

請求項 55 の方法において、前記サンプルは水サンプル、空気サンプル、植物または動物サンプル、あるいは土壌サンプルであることを特徴とする方法。

20

【請求項 62】

請求項 55 の方法において、前記サンプルは流体サンプルであることを特徴とする方法。

【請求項 63】

請求項 55 の方法において、さらに、前記サンプルを融解させて流体サンプルとするステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 64】

請求項 55 の方法において、前記濃縮装置は、前記サンプルから第 2 の検体を 99% 以上除去することを特徴とする方法。

30

【請求項 65】

請求項 55 の方法において、前記バイオハザード検体は細胞型であることを特徴とする方法。

【請求項 66】

請求項 55 の方法において、前記前記バイオハザード検体は毒素であることを特徴とする方法。

【請求項 67】

請求項 55 の方法において、前記一連の分析はコンピュータ実行可能なロジックにより行われることを特徴とする方法。

【請求項 68】

請求項 55 の方法において、前記濃縮装置は、前記バイオハザード検体を決定論的に第 1 の方向に案内し、サンプル中の第 2 の検体を第 2 の方向に案内する複数の障害物の二次元アレイを具えることを特徴とする方法。

40

【請求項 69】

胎児の異常を同定する方法であって、妊婦から母体の血液サンプルを、当該サンプル中の胎児細胞を決定論的に分離させるフロースルーモジュールに通し、ここで分離した胎児細胞を、前記血液サンプルから濃縮された 1 またはそれ以上の胎児細胞の画像を撮像するよう構成された分析器に供給するステップと、胎児の核酸を結合する 1 またはそれ以上の核酸プローブからの信号を分析するステップと、前記信号を分析するステップと、前記分析ステップに基づいて診断出力を生成するステップとを具えることを特徴とする方法。

50

- 【請求項 70】
請求項 69 の方法において、前記プローブは、染色体用であることを特徴とする方法。
- 【請求項 71】
請求項 70 の方法において、前記染色体は、X 染色体、Y 染色体、染色体 21、染色体 13、および染色体 18 からなる群から選択されることを特徴とする方法。
- 【請求項 72】
請求項 70 の方法において、前記分析は、前記プローブ信号の数を特定するステップ、前記プローブ信号のサイズを特定するステップ、前記プローブ信号の形を特定するステップ、前記プローブ信号のアスペクト比を特定するステップ、または前記プローブ信号の分布を特定するステップを含むことを特徴とする方法。 10
- 【請求項 73】
胎児の状態を検出するコンピュータプログラム製品において、
サンプル中の胎児の有核赤血球 (fnRBC) を検出するコンピュータコードと、
関心ある核酸を結合する 1 またはそれ以上の核酸プローブからプローブ信号を受け取るコンピュータコードと、
前記プローブ信号を分析して 1 またはそれ以上の胎児細胞を検出するコンピュータコードと、
前記プローブ信号を分析して前記 1 またはそれ以上の胎児細胞の状態を検出するコンピュータコードと、
前記コンピュータコードを保存するコンピュータ読み取り可能な媒体とを具備することを特徴とするコンピュータプログラム製品。 20
- 【請求項 74】
請求項 73 に記載のコンピュータプログラム製品において、前記コンピュータ読み取り可能な媒体は、メモリ、ハードドライブ、フロッピーディスク、CD-ROM、フラッシュメモリ、またはテープであることを特徴とするコンピュータプログラム製品。
- 【請求項 75】
請求項 73 に記載のコンピュータプログラム製品において、前記プローブは、染色体専用であることを特徴とするコンピュータプログラム製品。
- 【請求項 76】
請求項 75 に記載のコンピュータプログラム製品において、前記染色体は、X 染色体、Y 染色体、染色体 21、染色体 13、および染色体 18 からなる群から選択されることを特徴とするコンピュータプログラム製品。 30
- 【請求項 77】
請求項 73 に記載のコンピュータプログラム製品において、前記プローブは測色プローブであることを特徴とするコンピュータプログラム製品。
- 【請求項 78】
請求項 73 に記載のコンピュータプログラム製品において、前記プローブは蛍光プローブであることを特徴とするコンピュータプログラム製品。
- 【請求項 79】
請求項 69 に記載の方法において、前記妊婦の妊娠期間は 12 週以下であることを特徴とする方法。 40
- 【請求項 80】
請求項 69 に記載の方法において、前記フロースルーモジュールは 1 またはそれ以上の二次元障害物アレイを具備し、前記障害物が、前記サンプルの流れを次の隙間へと不均一に導く隙間を規定していることを特徴とする方法。
- 【請求項 81】
出産前試験キットであって、
母体血液サンプルから 1 またはそれ以上の第 1 の種類の細胞を分離するよう構成されたサイズ式選別モジュールを具備し、前記第 1 の種類の細胞は妊婦の生体内ですべての血液細胞中 1% 未満の濃度で見られ、前記 1 またはそれ以上の濃縮した細胞を分析して胎児の出 50

産前診断を行うための一連の説明書を用意することを特徴とするキット。

【請求項 8 2】

出産前試験キットであって、

新生児の血液サンプルから 1 またはそれ以上の第 1 の種類の細胞を分離するよう構成されたサイズ式選別モジュールを用意、前記第 1 の種類の細胞は生体内ですべての血液細胞中 1 % 未満の濃度で見られ、前記 1 またはそれ以上の濃縮した細胞を分析して胎児の出産前診断を行うために一連の説明書を用意することを特徴とするキット。

【請求項 8 3】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、さらに、PCR 試薬、リーシス試薬、核酸プローブ、およびラベリング試薬からなる群から選択される 1 またはそれ以上の試薬を用意することを特徴とするキット。

10

【請求項 8 4】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、ラベリング試薬は、FISH 試薬であることを特徴とするキット。

【請求項 8 5】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、前記 FISH 試薬は、X 染色体、Y 染色体、染色体 13、染色体 18、染色体 21 からなる群から選択された染色体と特に結合することを特徴とするキット。

【請求項 8 6】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、さらに、マイクロアレイを用意することを特徴とするキット。

20

【請求項 8 7】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、前記サイズ式選別モジュールは、前記 1 またはそれ以上の第 1 の種類の細胞を第 1 の方向へと決定論的に案内し、1 またはそれ以上の第 2 の種類の細胞を第 2 の方向へ案内する二次元障害物アレイを用意することを特徴とするキット。

【請求項 8 8】

請求項 8 7 に記載のキットにおいて、前記第 1 の種類の細胞は、胎児の細胞であることを特徴とするキット。

【請求項 8 9】

請求項 8 7 に記載のキットにおいて、前記第 2 の種類の細胞は除核赤血球であることを特徴とするキット。

30

【請求項 9 0】

請求項 8 9 に記載のキットにおいて、前記サイズ式選別モジュールは 前記第 1 の種類の細胞の 99 % 以上を保持し、前記除核赤血球の 99 % を除去することを特徴とするキット。

【請求項 9 1】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、さらに、障害物アレイを用意、前記障害物は、抗 CD71、抗 CD36、抗セクチン、抗 GPA、抗 CD45、および抗抗体 i からなる群から選択される抗体に結合されていることを特徴とするキット。

40

【請求項 9 2】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、前記出産前診断は、胎児の性別を判定することを含むことを特徴とするキット。

【請求項 9 3】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、前記出産前診断は、染色体 13、染色体 18、染色体 21 (ダウン症)、ターナー症候群 (X 染色体の損傷)、クラインフェルター症候群 (XXY)、または他の性染色体あるいは常染色体の数の異常の存在の判定を含むことを特徴とするキット。

【請求項 9 4】

請求項 8 1 に記載のキットにおいて、前記出産前診断は、Wolf-Hirschho

50

r n 症候群 (4 p -)、猫鳴き症候群 (5 p -)、ウィリアムス症候群 (7 q 1 1 . 2 3)、プラダー・ウィリ症候群 (1 5 q 1 1 . 2 - q 1 3)、アンジェルマン症候群 (1 5 q 1 1 . 2 - q 1 3)、Miller - Dieker 症候群 (1 7 q 1 3 . 3)、Smith - Magenis 症候群 (1 7 p 1 1 . 2)、ディジョージ症候群および膜 - 心臓 - 顔面症候群 (2 2 q 1 1 . 2)、カルマン症候群 (X p 2 2 . 3)、ステロイドサルファターゼ不全 (S T S) (X p 2 2 . 3)、X連鎖魚鱗癬 (X p 2 2 . 3)、および網膜芽腫からなる群から選択される状態の判定を含むことを特徴とするキット。

【請求項 9 5】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、前記選別モジュールは、前記第 1 の検体を第 1 の方向へ、前記第 2 の検体を第 2 の方向へ決定論的に案内することを特徴とするキット。

10

【請求項 9 6】

請求項 8 1 または 8 2 に記載のキットにおいて、前記選別モジュールは、流れを続く隙間へと不均一に案内する複数の隙間を規定する 1 またはそれ以上の二次元障害物アレイを具備することを特徴とするキット。

【請求項 9 7】

請求項 8 1 に記載のキットにおいて、前記出産前診断は、前記胎児の性別の判定を含むことを特徴とするキット。

【請求項 9 8】

請求項 8 1 に記載のキットにおいて、前記出産前診断は、染色体 1 3 の存在の判定を含むことを特徴とするキット。

20

【請求項 9 9】

請求項 8 2 に記載のキットにおいて、前記出産後診断は、循環する有核赤血球の存在または数の判定を含むことを特徴とするキット。

【請求項 1 0 0】

出産前診断を試験するビジネス方法であって、
妊娠したあるいは或いはしている哺乳動物から血液サンプルを取得するステップと、
前記血液サンプルから 1 またはそれ以上の胎児細胞を濃縮するステップと、
前記胎児細胞を分析して胎児の状態を判断するステップと、
前記状態のレポートをサービス料金と引き換えに提供するステップとを含むことを特徴とするビジネス方法。

30

【請求項 1 0 1】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記ビジネスは C L I A 研究所に前記分析ステップの実行を委託することを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 0 2】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記濃縮ステップは、前記細胞をサイズによって異なる方向へ案内することにより前記胎児細胞を母体細胞から分離するよう構成された流体システムで行われることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 0 3】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記ビジネスは前記サービスを行うことを特徴とするビジネス方法。

40

【請求項 1 0 4】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記状態は、トリソミー 1 3、トリソミー 1 8、トリソミー 2 1 (ダウン症)、ターナー症候群 (X 染色体損傷)、クラインフェルター症候群 (X X Y)、および性染色体または常染色体の数の異常からなる群から選択されることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 0 5】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記状態は、Wolf - Hirschhorn 症候群 (4 p -)、猫鳴き症候群 (5 p -)、ウィリアムス症候群 (7 q 1 1 . 2 3)、プラダー・ウィリ症候群 (1 5 q 1 1 . 2 - q 1 3)、アンジェルマン症候群 (1

50

5 q 1 1 . 2 - q 1 3)、M i l l e r - D i e k e r 症候群 (1 7 q 1 3 . 3)、S m i t h - M a g e n i s 症候群 (1 7 p 1 1 . 2)、ディジョージ症候群および膜 - 心臓 - 顔面症候群 (2 2 q 1 1 . 2)、カルマン症候群 (X p 2 2 . 3)、ステロイドサルファターゼ不全 (S T S) (X p 2 2 . 3)、X 連鎖魚鱗癬 (X p 2 2 . 3)、および網膜芽腫 (1 3 q 1 4) からなる群から選択されることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 0 6】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記レポートは、医療提供者または医療保険会社用に作成されることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 0 7】

請求項 1 0 0 に記載のビジネス方法において、前記ビジネスは、C L I A 研究所に前記濃縮ステップの実行を委託することを特徴とするビジネス方法。

10

【請求項 1 0 8】

胎児の遺伝子欠陥についての出産前検査を実行するための診断製品の商業化を含むビジネスであって、前記診断製品は母体の血液サンプルから胎児細胞を濃縮することを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 0 9】

請求項 1 0 8 に記載のビジネス方法において、前記ビジネスは、前記診断製品を製造することを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 1 0】

請求項 1 0 8 に記載のビジネス方法において、前記診断製品はポリマ材料から製造されることを特徴とするビジネス方法。

20

【請求項 1 1 1】

請求項 1 0 8 に記載のビジネス方法において、前記診断製品は使い捨てであることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 1 2】

請求項 1 0 8 に記載のビジネス方法において、前記診断製品は、選択的に除核赤血球から胎児有核赤血球 (f n R B C) を分離させることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 1 3】

請求項 1 0 8 に記載のビジネス方法において、前記診断製品は、前記胎児細胞から遺伝子異常を検出することを特徴とするビジネス方法。

30

【請求項 1 1 4】

請求項 1 1 3 に記載のビジネス方法において、前記遺伝子異常は、核酸を結合するラベルを用いて検出されることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 1 5】

請求項 1 1 4 に記載のビジネス方法において、前記ラベルは蛍光ラベルであることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 1 6】

請求項 1 1 5 に記載のビジネス方法において、前記ラベルは比色ラベル (colorimetric label) であることを特徴とするビジネス方法。

【請求項 1 1 7】

40

母体血液から胎児細胞を分離するビジネス方法であって、胎児を妊娠したあるいはしている哺乳動物から血液サンプルを取得するステップと、前記血液サンプルから 1 またはそれ以上の胎児細胞を費用と交換に濃縮するステップとを具えることを特徴とするビジネス方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

特異性細胞の分析により、様々な疾病の洞察が可能となる。このような分析により、疾病の検出、診断、および予測についての被侵略性の試験が可能となり、侵略性の診断によるリスクが排除された。例えば、社会進化により胎児期の検査の数が増えた。しかしなが

50

ら、今日利用可能な方法である羊水穿刺 (amniocentesis) と絨毛膜 (chorionic) ウィルスサンプリング (CVS) は、潜在的に母体と胎児に有害である。羊水穿刺を受けた妊婦の流産率は 0.5 - 1% 程上昇し、この数字は CVS で僅かに高くなる。羊水穿刺と CVS にリスクが内在するため、これらの処置は第 1 に高齢、すなわち統計的に先天性障害のある子供を授かる可能性が高い 35 才以上の女性に適用される。結果として、35 才の妊婦は、この年齢における 0.3% 以下の 21 トリソミーの確率に対し、流産の原因となる羊水穿刺の平均 0.5 - 1% のリスクを考量せねばならなかった。

【背景技術】

【0002】

いくつかの非侵略性の方法が、特定の先天性疾病の診断に開発されている。例えば、母体血漿アルファ-フェトプロテイン、非結合エストリオールのレベルやヒト絨毛性腺刺激ホルモンを、胎児のダウン症の可能性を特定するのに用いることができるが、これらの試験は 100% 正確ではない。同様に、神経管疾患や手足異常などの先天性疾患を検査するのに超音波検査法が用いられているが、これは妊娠期間 15 週以降でのみ有用である。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

妊婦の血液中の胎児細胞の出現は、羊水穿刺に代わる胎児期の診断の機会を与え、今日では侵略性診断のリスクを除去することとなった。しかしながら、胎児細胞は背景となる多数の血液中の母体の細胞に対する少数の細胞で標本するため、時間がかかり間違いが多かった。

20

【0004】

細胞の個体数を選別する工夫がいくつかなされている。このような細胞選別技術は、2つのカテゴリに分けられる：(1) 例えば蛍光活性化細胞選別 (FACS) や磁気活性細胞選別 (MACS) などの様々な細胞特定マーカーを用いて染色した細胞の選別に基づく方法と、(2) 関心ある個体に特有の生物物理学的パラメータを用いて生体細胞を隔離する方法である。これらの方法は、例えばコスト高、低生産高、熟練が必要、特異性の欠如といった様々な制限がある。結果として、臨床診断に十分な、少ない細胞特に胎児細胞を周囲の血液サンプルから個体選別する改良方法であって臨床的に許容可能な改良方法はなかった。したがって、混合物から特定種類の細胞を選別する改良方法であって従来技術の制限を解消する方法が望まれていた。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、サンプル中の第 1 の検体を少なくとも 10,000 倍の濃度にも高めるのに適合した 1 またはそれ以上のサイズ式選別モジュールを具えるシステムに関し、前記第 1 の検体はサンプル中の初期濃度が 1×10^{-3} 検体 / μL 以下であり、分析器は選択的に前記第 1 の検体を濃縮した媒体中の第 1 の検体を分析するコンピュータ実行可能なロジックを具える。

【0006】

いくつかの実施例では、分析器がさらに、顕微鏡、マイクロアレイ、またはセルカウンタを具える。

40

【0007】

いくつかの実施例では、前記コンピュータ実行可能なロジックは、胎児のヘモグロビン、グロビン、グロビン、GPA、i 抗原、CD46、セレクチン、CD45、またはこれらの組合せの存在による変色を検出する。

【0008】

いくつかの実施例では、前記コンピュータ実行可能なロジックは、第 1 の検体を選択的に結合するプローブの強度を検出する。いくつかの実施例では、前記コンピュータ実行可能なロジックは、前記第 1 の検体の三次元分析を実行する。

【0009】

50

いくつかの実施例では、分析器はデュアルスキャン機能を有する。

【0010】

いくつかの実施例では、前記コンピュータ実行可能なロジックは、前記第1の検体を描写する。

【0011】

いくつかの実施例では、特に第1の検体が母体血液から得た胎児細胞である場合、前記コンピュータ実行可能なロジックは、前記胎児細胞について、胎児の性別、三染色体、または1以上の胎児細胞における染色体異常を検出する。

【0012】

いくつかの実施例では、1またはそれ以上のサイズ式選別モジュールが、前記第1の検体を第1の方向へ決定論的に案内し、前記第1の検体より流体力学的にサイズの小さな第2の検体を第2の方向へと案内する二次元障害物アレイを具える。

10

【0013】

いくつかの実施例では、2またはそれ以上のサイズ式選別モジュールが、互いに並列に液体的に接続されている。

【0014】

いくつかの実施例では、前記システムは、少なくとも流体10mL/時間の高スループット分析に適合している。

【0015】

いくつかの実施例では、前記システムはさらに、流体サンプルから前記第1の検体または第2の検体を選択的に抽出する選別領域に接続された1またはそれ以上の抽出領域を具える。

20

【0016】

いくつかの実施例では、前記システムは1またはそれ以上の捕獲モジュールを備え、当該抽出モジュールの1つが二次元障害物アレイを具える。

【0017】

いくつかの実施例では、捕獲モジュールの障害物は、抗体に結合される。このような抗体は選択的に、サンプル中の第2の検体にわたって、赤血球、白血球、胎児血液細胞、胎児核血液細胞、癌細胞、上皮細胞、幹細胞、前駆細胞、泡沫細胞、血小板、を拘束する。

いくつかの実施例では、前記抗体は、抗CD71、抗CD46、抗炭水化物、抗セレクチン、抗CD451、抗GPA、抗抗原I、抗EpCamからなる群から選択される。

30

【0018】

いくつかの実施例では、前記液体サンプルは妊婦の血液サンプルであり、前記第1の検体は有核胎児赤血球である。

【0019】

いくつかの実施例では、前記液体サンプルは血液サンプルであり、前記第1の検体は、上皮細胞、内皮細胞、前駆細胞、幹細胞、泡沫細胞、または癌細胞からなる群から選択される。

【0020】

いくつかの実施例では、前記サンプルは血液サンプルであり、5mL以下である。

40

【0021】

いくつかの実施例では、前記液体サンプルは妊娠12週以下の女性の血液サンプルである。

【0022】

いくつかの実施例では、サイズ式選別モジュールまたは抽出モジュールの障害物間は1000ミクロン以下である。

【0023】

いくつかの実施例では、前記システムがさらに、磁気粒子を含んだリザーバを具える。このリザーバは、前記サイズ式選別モジュールまたは抽出モジュールに液体的に接続されている。

50

【 0 0 2 4 】

別の実施例では、本発明は、血液サンプルから除核細胞の 99.5% 以上を取り除き、血液サンプルから有核細胞の 99% 以上を保持するのに適した選別モジュールを具える。いくつかの実施例では、前記システムはさらに、前記選別モジュールに液体接続され 1 またはそれ以上の有核細胞を分析するよう構成された分析器と、分析によるデータを保存するデータベースとを具える。

【 0 0 2 5 】

本発明はさらに、例えばサンプル中で選択した種類の細胞検体を濃縮するのに有用なシステムと、症例および対照試料の検体に基づいて患者の状態を分析する方法を提供する。特に、本発明にかかるシステムは、1 またはそれ以上の第 1 の濃縮領域であって、第 1 の検体用の第 1 の流体流路と第 2 の検体用の第 2 の流体流路とを規定する複数の障害物を具え、前記第 1 の検体および第 2 の検体の流体力学的直径が異なる濃縮領域と、前記 1 またはそれ以上の濃縮領域に液体接続され前記第 1 の検体または第 2 の検体のデータを取得するための分析器と、前記データを格納するデータベースとを具える。

10

【 0 0 2 6 】

本発明は、前記第 1 の検体が、赤血球 (RBC)、胎児の RBC、栄養膜、胎児の繊維芽細胞、白血球 (WBC)、感染 WBC、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、癌細胞、ウイルス細胞、バクテリア細胞、および原生動物からなる群から選択される実施例と、さらに、前記細胞種類が 1×10^{-3} 細胞 / μL 以下の濃度で生きている実施例とを含む。

20

【 0 0 2 7 】

特定の実施例では、前記システムの前記第 1 の濃縮領域における障害物間の隙間は約 1000 ミクロンである。さらなる実施例では、前記システムは、1 またはそれ以上の第 2 の濃縮領域を具え、前記第 2 の濃縮領域は前記第 1 の検体または第 2 の検体を捕獲し、前記第 2 の濃縮領域は前記第 1 の濃縮領域に液体接続している。

【 0 0 2 8 】

実施例において、前記 1 またはそれ以上の第 1 の濃縮領域は、前記第 1 の検体の 99% 以上を保持するよう構成され、前記 1 またはそれ以上の第 1 の濃縮領域は、前記第 1 の検体の濃度を少なくとも 100,000 の係数で増大させるよう構成される。

【 0 0 2 9 】

本発明はまた、患者の状態に関連する特性を特定する方法に関し、複数の対照試料を取得するステップと、複数の症例試料を取得するステップと、前記サンプルをそれぞれ、前記サンプルから第 1 の検体を前記血液サンプルから第 2 の検体とは別の方向へ偏向させる複数の障害物を具える装置にかけるステップであって、前記第 1 の検体と第 2 の検体の直径が異なるステップと、前記サンプルから前記第 1 の検体を分析して前記第 1 の検体の特性を特定するステップと、前記特性に基づいて関連する研究を行うステップとを具える。

30

【 0 0 3 0 】

実施例において、前記特性は前記第 1 の検体の出現または消滅であり、別の実施例では、前記特性は前記第 1 の検体の数である。様々な企図する実施例において、前記特性は前記第 1 の検体の形態 (morphology)、前記第 1 の検体の遺伝子型、前記第 1 の検体の蛋白質代謝、前記第 1 の検体の RNA 構造、および / または前記第 1 の検体の遺伝子発現である。

40

【 0 0 3 1 】

特定の実施例において、前記複数の対照試料は、少なくとも 100 の対照試料を含む。特定の実施例において、前記複数の症例試料は、少なくとも 100 の症例試料を含む。別の実施例では、前記対照試料および症例試料は、血液サンプルである。また、実施例の核血液サンプルの血液は 100 mL 以下である。

【 0 0 3 2 】

本発明の実施例において、前記検体は細胞種であり、特定の実施例では、前記検体は上皮細胞、癌細胞、または胎児細胞である。

50

【 0 0 3 3 】

別の実施例では、本発明は、限定しないが環境や他のサンプル中のバクテリア、原生動物、ウィルスウイルス病原体、毒素を含むバイオハザード検体を検出する方法に関する。

【 0 0 3 4 】

特に、本発明はサンプル中のバイオハザード検体を検出する方法に関し、前記バイオハザード検体はサンプルの 1×10^{-3} 検体 / μL の濃度以下に見られ、前記サンプルを濃縮装置 / モジュールに適用するステップと、前記濃縮したバイオハザード検体を分析するステップとを具える。

【 0 0 3 5 】

前記濃縮装置は、いくつかの実施例において、前記バイオハザード検体を決定論的に第 1 の方向に、1 またはそれ以上の非バイオハザード検体を第 2 の方向に案内する障害物の二次元アレイを具える。上記障害物のアレイに付加的あるいは代替的に、いくつかの実施例では、前記濃縮装置は前記バイオハザード検体を選択的に捕捉する障害物の二次元アレイを具える。上述した前記アレイにおける障害物間のギャップは好ましくは 1000 ミクロン、500 ミクロン、100 ミクロン、50 ミクロン、あるいは 10 ミクロンである。

10

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施例において、前記濃縮装置は、前記バイオハザード検体の 99% 以上を保持するよう構成される。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施例において、前記濃縮装置は、前記バイオハザード検体を、少なくとも 10,000 の係数で濃縮するよう構成されている。

20

【 0 0 3 8 】

本発明は、前記濃縮装置が当該濃縮装置で得られる特異性の約 98% と感度の 98% 以上を有する実施例を実現する。

【 0 0 3 9 】

本発明は、前記バイオハザード検体が、バクテリア、原生動物、およびウィルスを含む群から選択される病原体である実施例を含む。より具体的には、本発明の実施例では、前記バイオハザード検体は、ペスト菌、炭疽菌、ボツリヌス菌、野兔病菌、コキシエラ菌、ブルセラ種、ブルクホルデリアつい骨、ブルクホルデリア仮性つい骨、連鎖球菌、エボラウィルス、ラッサウィルス、SARS、大痘瘡、アルファウィルス、発疹チフスリケッチア、オウム病クラミジア、サルモネラ種、大腸菌 O157:H7、コレラ菌、クリプトスポリジウムパルバム、ニパウィルス (Nipah virus)、ハンタウィルス、およびこれらのキメラを含む群から選択される病原体である。

30

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施例では、バイオハザード検体は、細胞型または毒素である。

【 0 0 4 1 】

本発明の特定の実施例では、前記サンプルは水サンプル、空気サンプル、植物または動物サンプル、あるいは土壌サンプルである。特定の実施例では、前記サンプルは流体サンプルである。関連する実施例では、本発明はさらに、サンプルを融解して流体サンプルとするステップを含む。

40

【 0 0 4 2 】

本発明のさらなる実施例では、本発明は前記濃縮が前記サンプルから第 2 の検体を 99% 以上除去する方法が実現される。

【 0 0 4 3 】

一態様では、本発明は、妊婦から母体の血液サンプルを、当該血液サンプルから濃縮された 1 またはそれ以上の胎児細胞の画像を撮像するよう構成された分析器に供給するステップと、胎児の核酸をつなぐ 1 またはそれ以上の核酸プローブからの信号を分析するステップと、前記信号を分析するステップと、前記分析ステップに基づいて診断出力を生成するステップにより、母体の血液サンプルから胎児の異常を特定する方法に関する。このようなプローブは、例えば X 染色体、Y 染色体、染色体 21、染色体 13、および染色体 1

50

8などの染色体専用であってよい。

【0044】

いくつかの実施例では、分析が、前記プローブ信号数を特定するステップ、前記プローブ信号のサイズを特定するステップ、前記プローブ信号の形を特定するステップ、前記プローブ信号のアスペクト比を特定するステップ、または前記プローブ信号の分布を特定するステップを含む。いくつかの実施例では、分析は、前記母体の血液サンプルから取得した胎児の赤血球の画像を撮像するステップと、関心のある胎児の核酸をつなぐ複数の核酸プローブ用のプローブ強度を入力するステップと、前記プローブ強度を分析するステップと、前記分析の結果に応じて診断出力を生成するステップを具える。一実施例では、前記プローブは染色体専用である。一実施例では、前記プローブは、X染色体、Y染色体、染色体21、染色体13、および染色体18からなる群から選択される。一実施例では、分析ステップは、プローブ数を特定するステップを含む。

10

【0045】

一態様において、本発明は、胎児の状態を検出するコンピュータプログラム製品に関し、サンプル中の胎児の有核赤血球(f n R B C)を検出するコンピュータコードと、関心のある胎児の核酸をつなぐ1またはそれ以上の核酸プローブからプローブ強度を受け取るコンピュータコードと、前記受け取った強度を分析するコンピュータコードと、前記プローブ強度の分析結果に応じて信号(call)を生成するコンピュータコードと、前記コンピュータコードを保存するコンピュータ読み取り可能な媒体とを具える。一実施例では、前記コンピュータ読み取り可能な媒体は、メモリ、ハードドライブ、フロッピーディスク、C D = R O M、フラッシュメモリ、またはテープである。一実施例では、前記プローブは、染色体専用である。一実施例では、前記染色体は、X染色体、Y染色体、染色体21、染色体13、および染色体18からなる群から選択される。一実施例では、前記プローブは測色プローブである。一実施例では、前記プローブは蛍光プローブである。

20

【0046】

本発明は、出産前試験キットを提供し、母体の血液サンプルから1またはそれ以上の第1の種類の細胞を分離するよう構成されたサイズ式選別モジュールを具え、前記第1の種類の細胞は妊婦の生体内ですべての血球中1%未満の濃度で見られ、出産前診断を行うために前記1またはそれ以上の濃縮した細胞を分析する一連の命令を具える。

【0047】

いくつかの実施例では、前記キットはまた、(瓶または容器に入った)1またはそれ以上の試薬を具える。このような試薬は、P C R試薬、リーシス試薬、核酸プローブ、およびラベリング試薬からなる群から選択することができる。ラベリング試薬の一例は、F I S H試薬またはF I S Hプローブである。好ましくは、前記F I S Hプローブは、X染色体、Y染色体、染色体13、染色体18、染色体21からなる群から選択された染色体を選択的につなぐ。いくつかの実施例では、前記キットはマイクロアレイを具えてもよい。

30

【0048】

一態様では、サイズ式選別モジュールは、前記1またはそれ以上の第1の種類の細胞を第1の方向へと決定論的に案内し、1またはそれ以上の第2の種類の細胞を第2の方向へ案内する二次元障害物アレイを具えてもよい。この第1の種類の細胞は、胎児の細胞としてもよい(癌の診断に用いるキットでは、この第1の周囲の細胞は上皮細胞または循環癌細胞となる)。いくつかの実施例では、前記第2の種類の細胞は除核赤血球または血小板である。

40

【0049】

ここにおける実施例のいずれも、サイズ式選別モジュールは前記第1の種類の細胞の99%以上を保持し、前記除核赤血球の99%を除去しうる。

【0050】

本発明はさらに、サイズ式選別モジュールが障害物アレイに液体接続されてもよく、前記障害物が、抗C D 7 1、抗C D 3 6、抗セレクトリン、抗G P A、抗C D 4 5、および抗抗体iからなる群から選択される抗体に接続されている。

50

【0051】

前記胎児の診断は、胎児の性別、染色体13・染色体18・染色体21（ダウン症）の存在、ターナー症候群（X染色体の損傷）、クラインフェルター症候群（XXY）、または他の性染色体あるいは常染色体の数の異常の発現、あるいはWolf-Hirschhorn症候群（4p-）、猫鳴き症候群（5p-）、ウィリアムズ症候群（7q11.23）、プラダー・ウィリ症候群（15q11.2-q13）、アンジェルマン症候群（15q11.2-q13）、Miller-Dieker症候群（17q13.3）、Smith-Magenis症候群（17p11.2）、ディジョージ症候群および膜-心臓-顔面症候群（22q11.2）、カルマン症候群（Xp22.3）、ステロイドサルファターゼ不全（STS）（Xp22.3）、X連鎖魚鱗癬（Xp22.3）、および網膜芽腫（13q14）からなる群から選択される条件の出現とすることができる。

10

【0052】

本発明は、動物の健康状態を診断する方法に関し、これは前記動物から流体サンプルを取得するステップと、前記サンプルから 1×10^{-3} 検体/ μL 以下の濃度の第1の検体を少なくとも10,000倍の係数で濃縮するステップと、1またはそれ以上の濃縮した第1の検体を分析して前記動物の健康状態を決定するステップとを具える。濃縮は、1またはそれ以上のサイズ式選別モジュールを用いて実行することが望ましい。サイズ式選別モジュールが、前記流体サンプルから第1の検体の決定論的流路と前記流体サンプルから第2の検体の決定論的流路とを生成する二次元障害物アレイを具え、前記第1の検体は前記第2の検体とは流体力学的サイズが異なる。いくつかの実施例では、前記第1の流路は第1の出口に延び、第2の流路は第2の出口に延びる。この方法は、1またはそれ以上の濃縮した第1の検体を分析して前記動物の健康状態を決定するステップを具える。いくつかの実施例では、前記第1の検体は癌細胞、胎児細胞、または病原体である。

20

【0053】

いくつかの実施例では、前記動物は家畜である。いくつかの実施例では、前記家畜は、牛、鶏、豚、馬、魚、兔、犬、猫、および山羊からなる群から選択される。一実施例では、前記第1の検体は癌細胞である。いくつかの実施例では、前記第1の検体は胎児細胞である。いくつかの実施例では、前記第1の検体は病原菌である。一実施例では、前記病原菌は、バクテリア、ウイルス、または原生動物である。いくつかの実施例では、前記分析ステップが、DNA分析を実行するステップを具える。いくつかの実施例では、前記分析ステップは、RNA分析を実行するステップを具える。いくつかの実施例では、前記分析ステップは、蛋白質分析を実行するステップを具える。一実施例では、前記流体サンプルは血液サンプルである。

30

【0054】

いくつかの実施例では、前記方法はさらに、サンプルに試薬を適用するステップを具え、前記試薬は第1の検体のサイズを少なくとも10%増大させる。一実施例では、試薬適用ステップは、前記サンプルを障害物アレイに適用する前に発生する。いくつかの実施例では、試薬適用ステップは、前記試薬は、量子ドット、抗体、ファージ、アプタマー、フルオロフォア、酵素、またはビードを含む。

【0055】

いくつかの実施例では、前記分析ステップは、濃縮した第1の検体の数を数えるステップを含む。いくつかの実施例では、この条件（condition）は動物の胎児の性別である。いくつかの実施例では、前記条件は動物の微生物感染を含む。いくつかの実施例では、前記条件は癌を含む。いくつかの実施例では、前記第1の出口は、選択的に前記第1の検体を捕獲する複数の障害物を含む1またはそれ以上の捕獲領域に液体接続している。いくつかの実施例では、選択的に捕獲する前記複数の障害物は、赤血球、胎児細胞、癌細胞、または上皮細胞を選択的に拘束する1またはそれ以上の結合部分（binding moieties）に結合されている。いくつかの実施例では、前記捕獲部分は抗体またはその断片を具える。

40

【0056】

本発明はまた、胎児の状態を分析するスクリーニングサービスおよび診断が提供される

50

ビジネス方法に関する。特に、本発明は、妊娠したあるいは或いはしている哺乳動物から血液サンプルを取得するステップと、前記血液サンプルをスクリーニングし、前記哺乳動物の胎児からの胎児細胞を特定するステップと、前記胎児細胞を分析して前記胎児の状態を判断するステップと、前記状態のレポートをサービス料金と引き換えに提供するステップとを含む胎児のスクリーニングサービスを提供するビジネスのビジネス方法に関する。関連する実施例では、前記ビジネスは前記サービスを実施する。

【0057】

別の実施例では、前記ビジネスはC L I A研究所に前記分析ステップを実行する許可する。本発明はまた、前記レポートが医療提供者または健康保険会社用に行われる実施例を含む。

10

【0058】

本発明の特定の実施例では、前記スクリーニングは、前記細胞をサイズによって異なる方向へ案内することにより前記胎児細胞を母体細胞から分離するよう構成された流体システムで行われる。

【0059】

別の実施例では、決定される胎児の状態は、トリソミー13、トリソミー18、トリソミー21（ダウン症）、ターナー症候群（X染色体損傷）、クラインフェルター症候群（XXY）、および性染色体または常染色体の数異常が生じた他の状態からなる群から選択される。特定の実施例では、前記状態は、Wolf-Hirschhorn症候群（4p-）、猫鳴き症候群（5p-）、ウィリアムズ症候群（7q11.23）、プラダー・ウイリ症候群（15q11.2-q13）、アンジェルマン症候群（15q11.2-q13）、Miller-Dieker症候群（17q13.3）、Smith-Magenis症候群（17p11.2）、ディジョージ症候群および膜-心臓-顔面症候群（22q11.2）、カルマン症候群（Xp22.3）、ステロイドサルファターゼ不全（STS）（Xp22.3）、X連鎖魚鱗癬（Xp22.3）、および網膜芽腫（13q14）からなる群から選択される。

20

【0060】

本発明はまた、胎児の遺伝子欠陥についての出産前検査を実行する商業的診断を含む診断を提供するビジネスのビジネス方法に関し、前記診断は母体血液を分析する。関連する実施例では、前記ビジネスは、前記診断を製造する。別の関連する実施例では、前記診断はポリマ材料から製造される。特定の実施例では、前記診断は使い捨てである。

30

【0061】

特定の実施例では、前記診断製品は、除核赤血球から胎児有核赤血球（fnRBC）を分離させることにより母体血液を分析する。実施例では、前記診断は、前記fnRBCの遺伝子異常を検出する。関連する実施例では、核酸を結合するラベルを用いた前記遺伝子異常が検出されるビジネスモデルが含まれる。さらなる関連する実施例では、前記ラベルが蛍光ラベルまたは比色ラベル（colorimetric label）である。

【0062】

本発明はまた、料金またはクロスライセンスの交換により行われる、母体血液から胎児細胞を分離するビジネス方法に関する。このようなビジネス方法は、妊娠したまたはしている哺乳動物（例えば人間）から血液サンプルを取得するステップと、前記血液サンプルから1またはそれ以上の胎児細胞を濃縮するステップとを具える。このサービスは、料金またはクロスライセンスの交換により行われる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0063】

本発明の好適な実施例がここに図示および開示されるが、当業者であればこのような実施例は単なる例示に過ぎないことを理解するであろう。当業者は本発明を逸脱するおおなく様々な変更例、変形例、および置換を想起しうる。ここに開示する発明の実施例の様々な代替例が、本発明を實踐する際に生じうる。添付のクレームが本発明の範囲を規定することを意図し、これらのクレームの範囲内の方法や構造およびその均等物はここに包含さ

50

れる。

【 0 0 6 4 】

本発明は、サンプル、流体サンプル、またはより好ましくは全血液サンプルから稀有の検体（例えば、組織、細胞、および細胞成分）を分離、選別、および濃縮するシステム、装置、および方法を提供する。

【 0 0 6 5 】

表 1 血液細胞の細胞種類、濃度、および細胞

Cell Types, Concentrations, and Sizes of Blood Cells.		
CELL TYPE	CONCENTRATION (CELLS/ μ L)	SIZE (μ M)
Red blood cells (RBC)	$4.2 - 6.1 \times 10^6$	4-6
Segmented Neutrophils (WBC)	3600	> 10
Band Neutrophils (WBC)	120	> 10
Lymphocytes (WBC)	1500	> 10
Monocytes (WBC)	480	> 10
Eosinophils (WBC)	180	> 10
Basophils (WBC)	120	> 10
Platelets	500×10^3	1-2
Fetal Nucleated Red Blood Cells	$2 - 50 \times 10^3$	8-12

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施例において、本装置は、混合流体から検体または細胞を選別または濃縮するのに用いられ、前記検体または細胞は、流体サンプルの 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、または 1×10^{-6} 細胞 / μ L 以下の濃度である。いくつかの実施例では、本装置は、混合流体から検体または細胞を選別または濃縮するのに用いられ、前記検体または細胞は、サンプル中の総ての細胞の 1 : 100、1 : 1000、1 : 10,000、1 : 100,000、1 : 1,000,000、1 : 10,000,000、1 : 100,000,000、1 : 1,000,000,000 以下の濃度である。

【 0 0 6 7 】

好適な実施例では、本発明は、血液サンプルから 1 またはそれ以上の細胞を選別および濃縮するシステムおよび装置を提供する。例えば、母体血液サンプルから本システムおよび方法により胎児細胞が濃縮または分離される。また、上皮、内皮、原種、泡沫、幹、癌の細胞が、血液サンプルから濃縮され得る。流体サンプルからこれらの、および / または他の検体または稀有な細胞を選別および / または濃縮した後、本システムはこのような検体を検出してこの検体を分析するのに用いられる。検体の分析は、ここに開示する様々なアプリケーションに利用することができる。

【 0 0 6 8 】

I. サンプル収集 / 準備

本システムおよび方法は、分析すべきソースからの 1 またはそれ以上のサンプルを取得するステップを含む。サンプルは、水源、食品、土壌、空気、動物、その他から得ることができる。固体サンプル（例えば、組織サンプルまたは土壌サンプル）が得られた場合、このような固体サンプルは後続する濃縮および / または分析の前に融解または溶解させてもよい。気体サンプルが得られた場合、同様に溶解または融解させてもよい。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施例では、動物からサンプルが供給される場合、それは動物から、より好ましくは人間から供給されたものであることが望ましい。動物から得られる液体サンプルの例は、限定しないが、全体血液、汗、涙、唾液、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、膿液、脳髄液、脳液 (brain fluid)、腹水、母乳、呼吸分泌液、腸管お

よび尿生殖器系、および羊膜液を含む。好適には、動物から得られる液体サンプルは血液サンプルである。動物からの液体サンプルを分析する場合、その動物は、例えば、牛、鶏、豚、馬、兔、犬、猫、山羊などの家畜である。好適な実施例では、前記動物は人間であり、前記血液サンプルは全体血液サンプルである。動物から得られる血液サンプルは、例えば、動物の状態の検査/診断や、妊娠した動物から出産前検査を行うのに用いることができる。好適な実施例では、本システムは、妊娠した人間から血液サンプルを取得して胎児の状態や異常性を検査する。

【0070】

液体サンプルは、この分野の様々な公知技術を用いて取得することができる。例えば、血液を採取するには、シリンジまたは他の吸引器具を用いる。血液のような液体サンプルは、好適に吸引管または袋に採取される。

10

【0071】

いくつかの実施例では、動物から得られる液体サンプルは、直接的に本装置に供給され、別の実施例では、本発明の装置に供給される前に予め処置または加工される。例えば、動物から採取した血液は、本発明の装置に供給する前に1またはそれ以上の試薬で処置されてもよいし、予めこのような試薬が入った容器に集められてもよい。ここで用いる試薬は、限定しないが、安定剤、保存薬、固定薬、溶融剤、希釈剤、抗アポトーシス剤、抗血栓剤、磁性調整剤、および/または交差結合剤を含む。

【0072】

液体サンプルを処理し分析装置へ供給する方法の例が、2004年3月3日出願の米国出願番号11/071,270「Sytem For Delivering a Diluted Solution」と、2005年9月15日出願の米国出願番号未付与の「Methods and Systems for Fluid Delivery」に記載されており、これらは両方ともすべての目的において参照により組み込まれている。

20

【0073】

動物から血液サンプルを取得する場合、動物のサイズ、妊娠期間、検査状態などにより血液量に変化する。いくつかの実施例では、50 mL、40 mL、30 mL、20 mL、10 mL、9 mL、8 mL、7 mL、6 mL、5 mL、4 mL、3 mL、2 mL、または1 mL以下の液体サンプル(例えば血液)が動物から採取される。いくつかの実施例では、個体から1-50 mL、2-40 mL、3-30 mL、または4-20 mLの血液が採取される。別の実施例では、5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, または100 mL以上の液体サンプルが動物から採取される。

30

【0074】

収集されたサンプル全体が、胎児細胞や上皮細胞といった希少な検体の濃縮および/または選別のために、本装置に適用される。いくつかの実施例では、サンプルは連続的な時間間隔で取得され、本装置に適用されてさらに分析される。

【0075】

いくつかの実施例では、本システムおよび方法は、10 mL、5 mL、または3 mL以下の血液サンプルから希少な細胞(例えば、胎児細胞、上皮細胞、または癌細胞)の濃縮、選別、および分析を実現する。いくつかの実施例では、本システムおよび方法は、20 mL、50 mL、または100 mLより多い大量の血液サンプルから希少な細胞を濃縮するのに利用できる。上記いずれかの能力は、例えば、1日未満、または12, 10, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2時間以内、または60, 50, 40, 30, 20, 10分以内で生じうる。

40

【0076】

いくつかの実施例では、血液サンプルは、胎児細胞や血液細胞の成分といった血液サンプル中の1またはそれ以上の細胞または成分を選択的に溶解する溶解物と化合される。例えば、胎児細胞を含む母体の血液サンプルは、水または他の浸透圧重量モル濃度調整剤と化合され、本システムによる胎児細胞の細胞成分の選別や濃縮の前に、胎児細胞を選択的

50

に溶解させてもよい。

【0077】

好適には、血液サンプルは、血液が採取されてから1週間、6日間、5日間、4日間、3日間、2日間、1日、12時間、6時間、3時間、2時間、または1時間以内に本システムに供給される。いくつかの実施例では、血液サンプルは、動物から採取してすぐに本システムに供給される。好適には、サンプルは4 - 37 °Cの温度で本システムに供給される。

【0078】

II 濃縮

本発明は、サンプルからの希少な検体の濃縮を組み入れている。いくつかの実施例では、希少な検体は細胞または細胞成分である。希少な細胞の例は、限定しないが、血小板、白血球、母体血液からの胎児有核赤血球、上皮細胞、内皮細胞、前駆細胞、癌細胞、腫瘍細胞、バクテリア、ウイルス、原生細胞、およびこれらのキメラを含む。細胞成分の例は、限定しないが、ミトコンドリア、リボザイム、小胞体、ゴルジ体、蛋白質、蛋白質複合体、および核酸を含む。これらの選別は、好適にはサイズにより達成される。本発明のサンプルは、固体、気体、または液体サンプルである。固体サンプルは、濃縮ステップの前に溶解または融解されるのが好ましい。

【0079】

濃縮は、この分野で公知の1またはそれ以上の方法および装置で行うことができ、特に国際公開番号2004/029221と2004/113877、米国公開番号2004/0144651、米国特許番号5,641,628、5,837,115、および6,692,952、米国出願番号60/703,833、60/704,067、60/668,415、10/778,831、11/071,679、および11/146,581で開示されており、これら総てが総ての目的のためここに参照により組み込まれる。好適な実施例では、検体の濃縮または選別は、1またはそれ以上のサイズ式選別モジュール（例えば、網目、マトリクス、電気泳動モジュール）や、選択的に1またはそれ以上の捕獲モジュール（例えば、親和式選別モジュール、抗体、および磁気ビード）を用いて実現する。

【0080】

1. サイズ式選別

サイズ式選別モジュールは、サンプル中の検体の流体力学的サイズに基づいて、液体サンプルから検体を選別する。好適な実施例では、サイズ式選別モジュールは、隙間アレイを構成する1またはそれ以上の障害物の二次元アレイを具える。障害物アレイは好適には二次元であり、好適にはジグザグ配列のアレイを構成する。これらのアレイは、アレイの隙間を通る液体が連続する隙間に不均等に散らばるよう構成されている。偏向角は、例えば、少なくともピッチの10, 20, 30, 40, 50, 60, 70%である。好適には、選別モジュールは、基準サイズより大きい検体を障害物アレイから離してバイパスチャネルへと偏向させるよう構成されうる。いくつかの実施例では、サイズ式選別モジュールは、10、100、1,000、10,000、100,000以上の障害物を含む。障害物が二次元アレイに整列される場合、このアレイは、例えば2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 400, 600, 800, 1000以上の障害物の列を有する。

【0081】

好適な実施例では、隙間、障害物、またはその両方が中規模（一方向において1mm以下）である。図1は、サイズ式選別モジュールの例を示す。障害物（様々な形であってよい）が、平坦な基板に取り付けられて隙間のアレイを構成している。透明カバーまたは蓋がアレイを覆うのに用いられる。障害物は二次元アレイを構成し、連続する各列が上下でジグザグ配列されている。平均流量は、このフィールドアレイにより設計される。いくつかの実施例では、障害物アレイは、少なくとも時間ごとに1mL、2mL、5mL、10mL、20mL、50mL、100mL、200mL、または500mLの液体サンプル

10

20

30

40

50

を通過させ処理するよう設計される。サイズ式選別モジュールのサンプル流は、アレイの見通し線 (line of sight) に対し小さな角度 (流れる角度) で配列されてもよい。選択的に、サイズ式選別モジュールを注入ポンプに結合して、サンプルを障害物に通してもよい。

【0082】

このサイズ式選別モジュールは、流体力学的サイズが基準サイズより大きな検体 (例えば細胞) がアレイの見通し線に沿って移動し、一方で流体力学的サイズが基準サイズより小さなものが流れを異なる方向へ流れるよう構成してもよい。検体の流体力学的サイズは、検体の物理的な寸法、液体媒質の浸透性、および検体の形状および変形能に依存する。

【0083】

図2はこの実施例を示しており; 第1の検体用の第1の流路Aが第1の流体力学的サイズである。障害物内でより曲がりくねった第2の流路は、前記第1の検体より流体力学的サイズが小さな第2の検体用の決定論的流路 (deterministic path) である。第2の検体は、アレイ中で第1の検体より平均流内でより多く流れるのが見られる。これは決定論的流路Bを流れる。また、第1および第2の検体より流体力学的サイズが小さい第3の検体が、もっぱらアレイの障害物および平均流路内の流路Cを流れる。

【0084】

多重化

ここにおける実施例のいずれかで、1またはそれ以上の障害物アレイは直列または並列に液体接続している。いくつかの実施例では、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100以上の選別モジュールが並列に液体接続される。好適には約10-20のこのようなモジュールが並列に液体接続される。1より多い選別モジュールを並列に液体接続すると、検査されるサンプルの高スループット分析が達成される (例えば、毎時1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, または100 mLの液体サンプル、またはより望ましくは毎時5 mLの流体サンプル)。

【0085】

図3は、多重化の一実施例を示す。図3では、2つの障害物アレイが隣り合わせに、すなわちミラーイメージで配置されている。この構成では、2つのアレイの臨界サイズ (critical size) は同じであっても異なってもよい。さらに、これらのアレイは、主たる流れが2つのアレイの境界、各アレイの縁部、またはその組合せを流れるよう構成される。このような二重アレイはまた、2つのアレイの間に設けられ基準サイズより大きな粒子を回収したりサンプルを改質 (例えば、緩衝剤交換、反応、またはラベリングによる) するための中央領域を具える。図3では、中央領域またはバイパスチャネルが、チーズ片形状の障害物内に設けられ逆流を不正でいる。

【0086】

1のデバイスで並列に複数のアレイを設けると、サンプル処理のスループットが増大し、複数種のサンプルや、断片または操作が異なるサンプル部分の並行処理が可能となる。また、選別モジュールで処理される液体の流量が増大する。同じサンプルを並列処理する場合、出口は液体接続され、あるいはされなくてもよい。例えば、複数のアレイが同じ基準サイズである場合、出口を連結して高スループットサンプル処理を実現する。別の例では、アレイの基準サイズがすべて同じではなく、あるいはアレイ内の粒子がすべて同じ方法で処理されないと、その出口は液体接続されない。いくつかの実施例では、多重化は複数の二重アレイを単一のデバイスに搭載することにより実現する。二重または単一が複数あるアレイは、互いに様々な可能な三次元関係で配置しうる。いくつかの実施例では、多重デバイスは、直列に液体接続された2またはそれ以上の障害物アレイを具える。例えば、1のデバイスの主たる流れからの出口が、第2のデバイスの入口に接続されてもよい。あるいは、1のデバイスの小さな流れの出口が、第2のデバイスに接続されてもよい。

【0087】

10

20

30

40

50

別の実施例では、複数のアレイを用いて広いサイズ範囲の検体を選別してもよい。例えば、あるデバイスは直列に液体接続された3つのアレイを具えるが、他の様々な数のアレイを用いてもよい。通常、第1のアレイ（最上流のアレイ）におけるカットオフサイズは、第2のアレイ（前記第1のアレイの下流側の次のアレイ）のカットオフより大きく、第1のアレイのカットオフサイズは第2のアレイの通過サイズより小さく構成される。後続のアレイでも同じである。第1のアレイは、第2のアレイで滞る検体を偏向させる（取り除く）。同様に、第2のアレイは第3のアレイで滞る検体を偏向させる（取り除く）。

【0088】

上述したように、複数ステージのアレイ（多重アレイ）では、例えば下流の詰まりの原因となる細胞などの大きな粒子を最初に偏向するが、これらの偏向された粒子を下流ステージをバイパスさせて詰まるのを防止する必要がある。したがって、本発明のデバイスは、アレイからのアウトプットを取り除くバイパスチャネルを具える。ここでは基準サイズより大きい粒子を取り除く場合を説明するが、バイパスチャネルはまた、アレイの様々な部分からのアウトプットを取り除くのに用いることができる。

10

【0089】

いずれの実施例においても、選別モジュールは好適に、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%以上の特異性で、液体サンプルから関心ある検体（特に胎児細胞や上皮細胞）を選別する。いずれの実施例でも、選別モジュールは好適に、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%以上の感度で、液体サンプルから関心ある検体（特に胎児細胞や上皮細胞）を選別する。

20

【0090】

さらに、いずれの実施例でも、関心ある検体は、5, 2, 1, 5×10^{-1} , 2×10^{-1} , 1×10^{-1} , 5×10^{-2} , 2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 2×10^{-5} , 1×10^{-5} , 5×10^{-6} , 2×10^{-6} , 1×10^{-6} , 5×10^{-7} , 2×10^{-7} , または 1×10^{-7} 検体/ μL 液体サンプル以下の初期濃度から濃縮できる。また、いずれの実施例でも、選別モジュールは、サンプル中の全検体の1%未満の検体（例えば細胞）、またはサンプル（例えば人間などの動物から取得された血液サンプル）中の全検体（例えば細胞）の1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.02%、0.01%、0.005%、0.002%、0.001%、0.0005%、0.0002%、0.0001%、0.00005%、0.00002%、0.00001%以下を選別しうる。この選別モジュールは、液体サンプルから濃縮サンプルへ変化させることにより（ときには緩衝液などの新たな液状媒体内で）このような関心のある検体の濃度を増大しうる。この濃縮サンプル中の検体の新たな濃縮は、少なくとも本のサンプルから10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、200,000,000、500,000,000、1,000,000,000、2,000,000,000、5,000,000,000、10,000,000,000、20,000,000,000、50,000,000,000、100,000,000,000、200,000,000,000、500,000,000,000、1,000,000,000,000、2,000,000,000,000、5,000,000,000,000、または5,000,000,000,000倍以上濃縮されている。

30

40

【0091】

入口/出口

さらに、入口および/または出口の数は、デバイスの使用目的により変化してもよい。好適な実施例では、単一の障害物アレイは、2またはそれ以上の出口を有する。このようなアレイの例が図4に示されており、サンプル処理の高スループット用に14対のアレイ

50

が連結されている。各アレイは、サンプルを供給する第1の入口と、アレイに緩衝液などの試薬を供給する第2の入口を有する。各アレイはまた、廃棄物（不要な生産物）用の第1の出口と、生産物（関心ある検体）用の第2の出口を有する。

【0092】

いくつかの実施例では、サイズ式選別モジュールは、大きな検体を除去するため普通の流れの方向から離して向けられる第1の出口と、障害物アレイを通る普通の流れの方向に流れる小さな検体を取り出す第2の出口とを有する。選別処理の様々なポイントで断片を回収するためにさらなる出口を設けてもよい。さらに、いくつかの実施例では、単一の二次元アレイに1以上の入口が設けられる。この入口は、例えば安定化剤、保存剤、固定剤、溶解剤、希釈剤、抗アポトーシス剤、ラベル剤、抗凝固剤、抗血栓剤、緩衝液、浸透圧重量モル調整剤、pH調整剤、安定剤、PCR試薬、洗浄剤、および/またはクロスリンク剤などの追加のサンプルおよび/または試薬を供給しうる。

10

【0093】

いくつかの実施例では、関心ある検体（例えば胎児細胞）は、選択的に溶解され、その後に関心ある細胞の細胞成分を含む液体サンプルが選別モジュールにかけられる。細胞中の関心ある細胞成分は、ここに開示した方法または公知の技術を用いて、サイズに基づいて血液サンプル中の他の細胞から分離される。選別器にサンプルと同時に溶解剤を供給したり、サンプルを最初に溶解剤に混合してから選別器に供給する場合、選別器は例えば核、ミトコンドリア、リボザイム、リソソーム、小胞体、またはゴルジ体などの1またはそれ以上の細胞小器官を偏向/分離するよう構成される。例えば、いくつかの実施例では、母体の血液サンプルは、選択的に胎児有核赤血球を溶解する溶解剤と混合される。このような溶解剤は、例えば、水や胎児細胞を選択的に溶解するこの分野で公知の薬剤である。血液サンプルはその後本訴打ちに供給され、血液サンプルから選択的に総ての検体またはほぼ総ての他の検体が偏向され、これにより胎児赤血球の細胞小器官（例えば核）の濃度が濃縮される。このような実施例では、核は「廃棄物」出口から排出される。別の実施例では、溶解剤は第2の入口から血液サンプルとともに供給される。この実施例では、溶解は選別と同時に行われる。

20

【0094】

いくつかの実施例では、1またはそれ以上の検体が、検体を選択的に結合させそのサイズ（流体力学的サイズ）を増大させる結合材部分（例えば、磁気ビード）と接触されてもよい。結合が解かれた部分はサイズが小さくなるため（「廃棄物」出口から）取り除かれ、結合した検体はサイズにより変更され別の出口から取り出される。

30

【0095】

装置の構成および/または形状は、様々な方法で設計されてもよい。例えば、環形の利井口と出口を用いてもよい（図4の環形入口を参照）。障害物がない入口領域が設計に組み込まれており、障害物が設けられた領域に到達した血液細胞が均一に分配されるようにしている。同様に、出口には存在する細胞を均一にダメージなく回収できるよう障害物がない出口領域が設けられている。

【0096】

バイパスチャネル

液体サンプルの検体および/または細胞が障害物アレイを流ると、基準サイズより流体力学的サイズが大きいものがバイパスチャネルに偏向される。バイパスチャネルは、障害物間の平均的な隙間より広いチャネルを有する。さらに、バイパスチャネルの幅は、サンプルから分離される最も大きな要素（最も大きな細胞）と等しいかこれより大きい。例えば、いくつかの実施例では、選別モジュール内のバイパスチャネルの幅は、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150ミクロン以上である。いくつかの実施例では、主チャネルの幅は100、90、80、70、60、50、40、30、20ミクロン以下である。

40

【0097】

バイパスチャネルは、障害物の周囲またはその外側縁部を形成するようにしてもよい。

50

このような障害物は、好適にバイパスチャネルに到達した大きな細胞の逆流または乱流を防止する。いくつかの実施例では、バイパスチャネルの障害物は断面チーズ片形状であり、くさび形の尖った端部が下流側に向いている（図3参照）。

【0098】

いくつかの実施例では、単一のバイパスチャネルを用いて、1またはそれ以上のステージ（アレイ）でこのバイパスチャネルを共有する。いくつかの実施例では、複数のバイパスチャネルが用いられる。例えば、複数ステージのそれぞれが自身のバイパスチャネルを有してもよい。一実施例では、大きな検体（例えば胎児細胞、上皮細胞、腫瘍細胞）は、主流へ、その後バイパスチャネルへと偏向され詰まりが防止される。詰まりを生じない小さな細胞は第2ステージへと進み、ここでさらにサイズにより選別される。この設計は、所望するステージ数だけ繰り返される。各ステージで、バイパスチャネルは出口に液体接続され、したがってサンプルから複数の偏向を回収できる。バイパスチャネルはまた、デバイスを通る流れを一定に維持したり、一定量の流れを取り除いてアレイの流れが乱れないようにしたり、または特定の領域で流量を増やすよう設計されてもよい。土曜に、アレイの境界部分は唯一の流れパターンを形成するよう設計されてもよい（例えば流れを供給したり流れを抽出する等）。

10

【0099】

いずれの実施例でも、各アレイは最大通過サイズがカットオフサイズの数倍大きい。この結果は、大きな隙間と小さな分岐比を組み合わせ得ることができる。いくつかの実施例では、このはほぼ1/2、1/3、1/10、1/30、1/100、1/300、1/1000である。また、このような実施例では、障害物の形状は隙間を通る流れの形に影響するが、アレイを短くするために障害物は流れ方向に狭まってもよい。単一ステージのアレイはここに述べるバイパスチャネルを具えてもよい。

20

【0100】

障害物の形状

サイズ式選別モジュールの障害物の寸法および形状は均一であってもよいし、均等または不均等なパターンを構成するよう変化してもよい。例えば、障害物は、筒状、月形、または正方形の断面をとりうる。好適な実施例では、障害物が丸い断面形状をとるように筒状である。好適には、障害物の直径（最も長い断面長さ）は4 - 40ミクロン、5 - 30ミクロン、6 - 20ミクロン、または7 - 10ミクロンである。いくつかの実施例では、選別用渉外部の直径は、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50ミクロン以上である。いくつかの実施例では、障害物の直径は100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10ミクロン以下である。この選別用障害物間の距離は変化してもよい。いくつかの実施例では、障害物間の距離は少なくとも10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 μmである。いくつかの実施例では、障害物間の距離は最大で1000, 750, 500, 250, 100, 75, 50, 25 μmである。さらに、障害物の直径、幅、長さは、少なくとも5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 μmであり、最大で500, 250, 100, 75, 50, 25, 10 μmである。障害物の高さも様々であってもよいが、好適には選別される最も大きな検体と同等かこれ以上である。いくつかの実施例では、選別用障害物の高さは10 - 500ミクロン、20 - 200ミクロン、30 - 100ミクロン、40 - 50ミクロンである。いくつかの実施例では、選別用障害物は1500, 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10ミクロン以下である。

30

40

【0101】

検体サイズ

いくつかの実施例では、選別モジュールは、液体サンプルから検体（稀有な細胞）を分離するのに適合した第1の選別領域を具え、この検体の流体力学的サイズは20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1ミクロン以上である。より好適には選別モジュールは、液体サンプルから検体を

50

選別するのに適合した第1の選別領域を具え、この検体の流体力学的サイズは15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4ミクロンより大きい。より好適には、液体サンプルから検体を選別するのに適合した第1の選別領域を具え、この検体の流体力学的サイズは10, 9, 8, 7, 6, ミクロンより大きい。

【0102】

一実施例では、選別モジュールは、第1の選別領域と、第2の選別領域を具え、前記第1の選別領域は流体力学的サイズが少なくとも15, 20, 25, 30, 35, 40ミクロン以上の検体を選別するよう構成され、前記第2の選別領域は流体力学的サイズが少なくとも10, 15, 20, 25, 30, 35ミクロン以上の検体を選別するよう構成され、前記第1の領域の基準サイズは、第2の領域の基準サイズより大きい。この第1および第2の選別領域は、互いに液体接続（液通）しており、第2の選別領域は第2の選別領域の下流に連続して設けられる。いくつかの実施例では、この選別領域はまた、流体力学的サイズが少なくとも5, 10, 15, 20, 25, 30ミクロン以上の成分を選別するよう構成された第3の選別領域を具えてもよく、ここで第2の領域の基準サイズは第1の領域の基準サイズより大きい。この第3の選別領域は、前記第2の選別領域の下流に液体接続されている。この選別モジュールは選択的に、それぞれサンプルからごく小さな成分を選別する上述したような追加の領域を具えてもよい。

10

【0103】

一実施例では、選別モジュールは、流体力学的サイズ（例えば直径）が15ミクロン以上の検体を、これ以下の成分の流れる方向から離れて主チャンネルに案内するよう構成され；第2の選別領域はサンプル中の流体力学的サイズ（例えばサイズ）が7.5ミクロン以上の成分を、これ以下の成分の流れる方向から離れて主チャンネルに案内するよう構成され；第3の選別領域はサンプル中の流体力学的サイズ（例えばサイズ）が5ミクロン以上の成分を、これ以下の成分の流れる方向から離れて主チャンネルに案内するよう構成される。上記実施例は特に、血液サンプルから赤血球を選別するのに有用である。

20

【0104】

もちろん、上記の選別モジュールは液体サンプルからより小さな、あるいはより大きな成分を選別するよう構成されてもよい。例えば、いくつかの実施例では、選別モジュールは直径4ミクロン以上のすべての成分を選別するよう構成される（例えば、胎児有核赤血球、有核赤血球、白血球）。いくつかの実施例では、選別モジュールは血液サンプル中の有核細胞を非核細胞から分離するよう構成される。

30

【0105】

いくつかの実施例では、選別デバイスは液体サンプル（例えば、血液サンプル、尿サンプル、他の身体サンプル）の細胞種類または関心ある成分を濃縮するのに用いられ、ここでは細胞種類または関心ある成分は生体内で全血液細胞の50, 40, 30, 20, 10%以下の濃度で見られ、あるいはより好ましくは全血液細胞の0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1%以下であり、より好ましくは全血液細胞の0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01以下、より好ましくは全血液細胞の0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002, 0.001以下、より好ましくは全血液細胞の0.0009, 0.0008, 0.0007, 0.0006, 0.0005, 0.0004, 0.0003, 0.0002, 0.0001以下、より好ましくは全血液細胞の0.00009, 0.00008, 0.00007, 0.00006, 0.00005, 0.00004, 0.00003, 0.00002, 0.00001以下である。

40

【0106】

特異性 / 感度

いずれの実施例においても、サイズ式選別装置は、向上させた有効性をもって混合された細胞集団（例えば全体血液）から1またはそれ以上の細胞種類を選別するのに用いることができる。例えば、サイズ式選別装置は、選別後に全体血液サンプルから総ての有核細

50

胞の 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%を確保し、より好ましくは母体血液サンプルから総ての有核胎児赤血球の 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%を確保する。同様に、上記装置は選別後に全体血液サンプルから総ての上皮細胞の 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%を確保し、あるいは血液サンプルから総ての癌細胞の 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%を確保する。同時に、本選別モジュールはまた、液体サンプルから望まない検体（例えば赤血球や血小板）の選別後に全体血液サンプルから総ての有核細胞の 95%、96%、97%、98%、99%、99.9%を取り除く。図8は、このサイズ式選別モジュールの一実施例で得られる特異性および感度のいくつかの例を示す。

【0107】

上述したステップのいずれかまたは総てが、生成物の最低限の希釈で生じうる。いくつかの実施例では、関心ある所望の検体は元のサンプルの50, 40, 30, 20, 10, 9.0, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5倍以下の溶剤内で確保され分離される。いくつかの実施例では、上記ステップのいずれかまたは総てが、所望の生成物を濃縮しつつ生じうる。例えば、濃縮された関心ある検体は、最終的な濃縮溶液で元のサンプルより少なくとも1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 100,000, 100,000, 500,000, 1,000,000倍濃縮されている。例えば、血液サンプルから第1の細胞種類を10倍濃縮すると、本装置にかけた後にサンプル中の全細胞における第1の細胞種類の比率が10倍大きくなる。このような濃縮は、関心ある希少な成分を含む総量10mLまたは20mL以上の液体サンプル（例えば血液サンプル）に用いられ、このような関心ある希少な成分を総量5mL以下に濃縮することができる。

【0108】

一実施例では、選択的または非選択的にサンプル中の検体の流体力学的サイズを増大させる試薬がサンプルに加えられる。この調整されたサンプルは、本発明の障害物アレイに通される。検体が肥大され、流体力学的サイズが大きくなると、大きな障害物アレイで隙間サイズをより簡単に製造することが可能となる。好適な実施例では、肥大化ステップおよびサイズによる濃縮は、装置の統合した方法で達成される。適切な試薬は様々な低浸透圧溶剤を含み、例えば脱イオン水、2%糖液、または非水系溶剤がある。他の試薬は、例えば選択的（例えば抗体やアビジンビオチンを通して）または非選択的に結合する磁気またはポリマなどのビードを含む。

【0109】

別の実施例では、選択的または非選択的にサンプル中の検体の流体力学的サイズを減少させる試薬がサンプルに加えられる。サンプル中の粒体サイズを非均一に減少させると、検体間で粒体力学的サイズの差が大きくなる。例えば、有核細胞は、高浸透圧で細胞を収縮させることにより除核細胞から分離される。この除核細胞は非常に小さな粒体へと収縮するが、有核細胞は核サイズ以下には収縮しない。収縮剤の例は、高浸透圧溶剤がある。

【0110】

代替的な実施例では、親和性機能ビードを用いて、関心ある粒体の体積をサンプル中にある他の粒体に比べて増大させ、これによりより大きくより製造が簡単な隙間サイズの障害物の運用を可能とする。

【0111】

いずれの実施例でも、液体は装置に動的または静的に通されてもよい。液体は、電界、遠心力、圧力駆動流、電気浸透流、毛細管現象を用いて送り出してもよい。好適な実施例では、フィールドの平均の方向はアレイを含むチャンネルの壁に平行である。

【0112】

捕獲による分離

本システムは、選択的に1またはそれ以上の捕獲モジュールを具えてもよい。捕獲モジュールは、その移動または動きを制限または禁ずることにより、あるいは捕獲部分と多重化することにより、液体サンプルから関心ある検体（例えば細胞）を濃縮する。いくつかの実施例では、前記捕獲モジュールは親和性に基づく選別を用いるが、親和性を用いる選別は単なる選択肢である。

10

【0113】

この捕獲モジュールは、高度に独特であり選択的である。いずれの実施例でも捕獲モジュールは好適に、液体サンプルから関心ある検体（例えば胎児細胞や上皮細胞）の分離において50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%以上の特異性を有する。いずれの実施例でも、捕獲モジュールは好適に、液体サンプルから関心ある検体（例えば胎児細胞や上皮細胞）の分離において50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%以上の感度を有する。

20

【0114】

さらに、いずれの実施例でも、関心ある検体は捕獲モジュールにより、 $5, 2, 1, 5 \times 10^{-1}, 2 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-1}, 5 \times 10^{-2}, 2 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-2}, 5 \times 10^{-3}, 2 \times 10^{-3}, 1 \times 10^{-3}, 5 \times 10^{-4}, 2 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-6}, 2 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-7}, 2 \times 10^{-7}$ 、または 1×10^{-7} 検体/ μL 液体サンプル以下の初期濃度から濃縮（すなわち分離）できる。また、いずれの実施例でも、捕獲モジュールは、サンプル中の全検体の1%未満の検体（例えば細胞）、またはサンプル（例えば人間などの動物から取得された血液サンプル）中の全検体（例えば細胞）の1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.02%、0.01%、0.005%、0.002%、0.001%、0.0005%、0.0002%、0.0001%、0.00005%、0.00002%、0.00001%以下を選別しうる。捕獲モジュールは、このような関心ある検体の濃度を、少なくとも元のサンプルから10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、200,000,000、500,000,000、1,000,000,000、2,000,000,000、5,000,000,000、10,000,000,000、20,000,000,000、50,000,000,000、100,000,000,000、200,000,000,000、500,000,000,000、1,000,000,000,000、2,000,000,000,000、または5,000,000,000,000倍以上増大できる。

30

40

【0115】

いくつかの実施例では、捕獲モジュールは、障害物アレイを有するチャンネルを具える。これらの渉外部は1またはそれ以上の形状であってもよい。アレイは好適には二次元であり、障害物は順番に均一でも非均一でもよい。好適な実施例では、あるいは二次元で均一のアレイであり、障害物がジグザグ配置されている。

【0116】

捕獲モジュールの例が、国際公開番号2004/029221と、米国特許番号5,641,628、5,837,115、6,692,952に開示されており、これらは総

50

ての目的においてここに参照により組み込まれている。

【0117】

形状およびサイズ

結合量を増大させるには、障害物の表面積を増大するか、サンプルと障害物の接触空き数を増やすのが望ましい。したがって、本発明の捕獲障害物は、様々な形状および形態としてその表面積および/またはサンプルとの接触回数を増やしてもよい。さらに、障害物の形状およびサイズは、捕獲される検体や、サンプル濃度によって変化してもよい。捕獲モジュールで捕獲される検体が大きくなれば、障害物の捕獲も多くなる。いくつかの実施例では、障害物の高さは、1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100マイクロン以下である。いくつかの実施例では、障害物の高さは20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500マイクロン以上である。

10

【0118】

同様に、障害物間の隙間のサイズも、捕獲される障害物のサイズにより変化する。いくつかの実施例では、障害物間の隙間は50, 40, 30, 20, 10マイクロン以下である。いくつかの実施例では、障害物間の隙間は、関心ある検体の粒体力学的サイズの10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2倍以下である。いくつかの実施例では、障害物間の隙間は、関心ある検体の粒体力学的サイズ以下である。このような実施例では、関心ある検体は障害物間に捉えられる。本発明は、関心ある検体より隙間が幅広いアレイと、関心ある検体より狭いアレイの双方を企図している。いくつかの実施例では、制限された隙間（関心ある検体と幅が同じか少ないもの）が、障害物アレイにわたって均一または非均一に分散されている。好適には、制限された隙間は非均一に障害物アレイにわたって分散されている。

20

【0119】

いくつかの実施例では、各障害物の直径は1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20マイクロン以下である。別の実施例では、各障害物の直径は5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100マイクロン以上である。

【0120】

いくつかの実施例では、捕獲アレイ内の障害物は、選択的（そして選択的に可逆的）に液体サンプルの1またはそれ以上の成分を可逆的あるいは非可逆的に結合する。1の障害物は、例えば、選択的に液体サンプル中の細胞または成分に親和力を有する1またはそれ以上の捕獲部分を具える。このような捕獲部分は、例えば胎児細胞、赤血球、白血球、血小板、上皮細胞、癌細胞、内皮細胞、または他の稀有な細胞などの関心ある細胞または成分を特に結合する。例えば、いくつかの実施例では、捕獲部分は、赤血球または上皮細胞を特に結合する抗体（またはその断片）を具える。このような抗体は、例えば、それぞれ抗CD71およびEpCAM抗体を含む。好適な実施例では、このような抗体は単一細胞である。捕獲部分となりうる他の抗体は、限定しないが、抗CD235a、抗CD36、抗セクチン、抗炭水化物、抗CD45、抗GPA、抗抗原iを含む。図6は、本発明の一実施例を示し、胎児細胞が結合部分（抗CD71）に結合された障害物に結合されている。図7Aは、ポストアレイを通る第1の検体のパスを示し、ここで特にポストに結合していない検体はアレイを通過して移動を続け、ポストを結合していないアレイはアレイに捕獲される。図7Bは、抗体で覆われたポストの写真である。図7Cは、本発明により実装される、基板（例えば障害物や側壁等）への抗体の結合を示す。

30

40

【0121】

選別モジュールとともに、捕獲モジュールは、それぞれが選択的に異なる関心ある細胞および/または成分を結合する複数の領域を有してよい。複数の捕獲領域を有するモジュールを具えるシステムは、互いに直列に液体接続された2またはそれ以上の捕獲領域を具える。さらに、1のシステムが並列に液体接続された複数の選別モジュールを具え、同時

50

に分析されるサンプル量を増大させてもよい。

【0122】

混合された細胞の集合（例えば血液）から第1の種類（例えば細胞）を濃縮する場合、好適には捕獲モジュールの表面に結合しうる少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%の細胞が、混合物から取り除かれる。捕獲モジュールの表面コーティングは好適に、細胞の非特異性の結合を最小限にするよう設計される。例えば、結合部分との結合が不可能な細胞または検体の99%、98%、95%、90%、80%、70%は、捕獲モジュールの表面に結合されない。捕獲モジュールの選択的な結合により、特定の検体（活性細胞の集合）を細胞の混合物から分離しうる。装置には、検体（例えば細胞）が相互作用するよう装置の表面積を増やすよう障害物が設けられ、障害物を含むチャンバ内では結合の可能性が上昇する。流れの状態は、検体細胞が装置内で非常に優しく扱われ、障害物間を通るために機械的に変形する必要がない。正の圧力または負の圧力の送り出しもしくは流体の列からの流れを用いて、本発明のマイクロ流体デバイス（例えば捕獲モジュール）内またはその外へ細胞を移動させる。

10

【0123】

好適には、この方法は、最初の混合物に比べて所望の検体（例えば細胞）の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%を確保し、所望の検体の集合をサンプル中の検体量と比較して100、1000、10,000、100,000、1,000,000の係数で濃縮する可能性を有している。

20

【0124】

いくつかの実施例では、捕獲モジュールは、10、100、1,000、10,000、100,000以上の障害物を有する。このような障害物を二次元アレイに整列させる場合、このアレイは、例えば、2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 400, 600, 800, 1000列の障害物を有する。

【0125】

磁気

いくつかの実施例では、捕獲モジュールが、1またはそれ以上の検体を分離および/または濃縮する目的で、磁気粒子、磁界、および/または磁気装置/装置部品を用いる。

30

【0126】

本発明の磁気粒子は、様々なサイズおよび/または形状であってもよい。いくつかの実施例では、磁気粒子の直径は500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm以下である。いくつかの実施例では、磁気粒子の直径は10-1000nm、20-800nm、30-600nm、40-400nm、50-200nmの間である。いくつかの実施例では、磁気粒子の直径は、10nm、50nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、5000nm以上である。磁気粒子は乾燥しても液体に浸されてもよい。磁気粒子を含む液体サンプルと第2の液状媒体との混合物は、2005年9月15日出願の米国出願番号未付与の名称「Methods and Systems for Fluid Delivery」を含む様々な公知の手段で実現することができる。

40

【0127】

いくつかの実施例では、サンプル中の検体（関心ある、あるいはない検体）は、強磁性かそうでなくても磁性を有し、このような検体は磁界を利用して1またはそれ以上の他の検体（関心ある、あるいはない検体）から分離あるいは取り除くことができる。図8はこの捕獲メカニズムの実施例を示し、第1の検体が、この第1の検体を特に結合する抗体に結合され、この抗体もまたナノビードに結合されている。第1の検体-ナノビード複合体を含む検体の混合物と、第2の検体とが時価以内に供給された場合、前記第1の検体-ナノビード複合体が捕獲され、他の細胞は磁界内で移動を続ける。第1の検体は磁界を取り

50

去ると解放される。

【0128】

磁界は、本装置の内部または外部にあってもよい。外部磁界は、ここにおけるデバイス（例えば容器、チャンネル、障害物）外をソースとするものである。内部磁界は、ソースがここにおけるデバイス内にあるものである。

【0129】

いくつかの実施例では、選別される検体（例えば、関心あるまたは関心ない検体）が強磁性でない、あるいは磁性がない場合、磁気粒子はこのような検体を選択的に結合する結合部分と結合されてもよい。結合部分の例としては、限定しないが、ポリペプチド、抗体、核酸等がある。好適な実施例では、結合部分は関心ある検体（例えば赤血球、癌細胞、上皮細胞）と選択的に結合する抗体である。したがって、いくつかの実施例では、磁気粒子は、抗CD71、抗CD45、抗EpCAM、またはここに開示する様々な抗体でなる群から選別される抗体（好適には単クローン抗体）で覆われる。

10

【0130】

磁気粒子は、サンプルとの接触前に本明細書中の1またはそれ以上のデバイスと結合されてもよいし、サンプルをデバイスに供給する前にサンプルに混合されてもよい。

【0131】

いくつかの実施例では、このシステムは、捕獲されあるいは捕獲されない検体の磁性を変化させる試薬（例えば磁気粒子）を収容するリザーバを具えてもよい。このリザーバは好適には1またはそれ以上の本デバイス/モジュールに液通している。例えば、いくつかの実施例では、磁気リザーバがサイズ式選別モジュールに接続され、別の実施例では、磁気リザーバが捕獲モジュールに接続されている。

20

【0132】

試薬の正確な性質は、検体の性質に依存する。試薬の例は、遷移金属の酸化剤または還元剤、ヘモグロビンを酸化または還元する試薬、検体に結合する磁気ビード、あるいは、鉄または他の磁気材料や粒子をキレート化させ、酸化させ、あるいは結合する試薬を含む。この試薬は、検体の磁性を変化させるよう作用し、磁界への吸着力を付与あるいは強化するか、磁界への反発力を付与あるいは強化するか、検体が磁界から影響を受ける磁性を除去する。

【0133】

磁界に反応する磁気粒子を、本発明の装置および方法に適用することができる。望ましい粒子は、表面の化学的性質が、例えば化学反応、物理的吸着、からみ合い、または静電相互作用により、化学的または物理的に変更可能なものである。

30

【0134】

捕獲部分は、この分野で公知の様々な手段で磁気粒子に結合されてもよい。例として、化学反応、物理的吸着、からみ合い、または静電相互作用がある。磁気粒子に結合される捕獲部分は、対象とする検体の性質に依存する。捕獲部分の例は、限定しないが、蛋白質（例えば抗体、アビジン、細胞表面レセプタ）、荷電または非荷電のポリマ（例えばポリペプチド、核酸、合成ポリマ）、疎水性または親水性のポリマ、小細胞（例えばビオチン、受容体リガンド、キレート剤）、炭水化物、イオンなどがある。このような捕獲部分は特に、細胞（例えば細菌性、病原性、胎児細胞、胎児血液細胞、癌細胞、血液細胞）細胞小器官（例えば核）、ウイルス、ペプチド、蛋白質、炭水化物、ポリマ、核酸、超分子複合体、その他の生物学的分子（例えば、有機あるいは無機分子）、小分子、イオン、またはこれらの組合せ（キメラ）が断片を含む。特に胎児細胞に用いる捕獲部分の例は、抗CD71、抗CD36、抗セレクチン、抗GPA、抗炭水化物、および完全トランスフェリン（holotransferrin）を含む。したがって、別の実施例では、捕獲部分は胎児細胞に特化している。

40

【0135】

検体の磁性が変化したら、サンプルの他の構成物と比較した検体の分離または濃縮に作用させるのに用いることができる。この分離または濃縮は、磁界を用いたポジティブ選択

50

により所望の検体を磁界に引き寄せたり、ネガティブ選択で関心ない検体を引き寄せることを含む。いずれの場合でも、所望の検体を含む検体の集合は回収されて分析またはさらなる処理が行われる。

【0136】

この磁気選別を行う装置は、磁界を生成する様々な装置（例えば、ここに記載するいずれかの装置またはリザーバ）であってよい。一実施例では、M A C S列を用いて磁気改質検体の選別に作用させる。（例えば、ここに記載するいずれかの試薬を用いて）検体が試薬により磁気反応するようになった場合、前記M A C S列に結合され、これによりサンプルの他の成分と比較した所望のサンプルの濃縮が実現する。

【0137】

別の実施例では、選別は、好適には複数の磁気障害物を用いるマイクロ流体デバイスなどの装置を用いて達成される。（例えば、検体が本来有する磁性を強化するか、検体に磁気反応する粒子を結合することにより）サンプル中の検体が磁気反応するよう改変された場合、検体は障害物と結合し、これにより結合した検体の濃縮が達成される。代替的に、ネガティブ選択を用いてもよい。この例では、所望の検体が磁気反応しないようにして、あるいは所望しない検体に磁気反応粒子を結合する。この場合、所望しない検体が障害物に保持される一方で所望の検体は保持されず、これにより所望の検体が濃縮される。

【0138】

装置の磁気領域は、限定しないが、例えば希土類材料、ネオジミウム - 鉄 - ボロン、鉄 - クロミウム - コバルト、ニッケル - 鉄、コバルト - プラチナ、およびストロンチウムフェライトなどの硬磁性または軟磁性材料で作成することができる。装置の一部は、磁気材料から直接製造でき、あるいは磁気材料を別の材料に適用してもよい。硬磁性材料を用いると、他の作動を必要とせず磁界が生成されるため、装置の設計を単純化することができる。しかしながら軟磁性材料は、材料を消磁することにより結合した検体を簡単に解放して下流へ送ることができる。磁気材料によっては、適用プロセスは、陰極スパッタリング、焼結、電着、またはポリマ結合磁気粉体の合成物の薄膜フィルムコーティングを含む。好適な実施例は、ポリイミド - ストロンチウムフェライト（ポリイミドが結合剤として、ストロンチウムフェライトが磁気フィラーとして作用する）などのポリマ複合体を用いた回転成形によりマイクロ加工した障害物（例えばシリコンポスト）の薄膜コーティングである。コーティング後、ポリマ磁気コーティングが硬化して安定した機械的特性が得られる。硬化後、装置は短期間外部の誘導電磁界にさらされ、これが装置内の永久磁石の方向付けを好適に決定する。ポストからの磁界の磁束密度と固有の保磁力は、磁気フィラーの%量によって制御できる。

【0139】

別の実施例では、封入されたマイクロ流体装置の外側面に導電材料がマイクロパターン加工される。このパターンは、空間周期が約100ミクロンである単一の電気回路からなる。この電気回路の設計と、回路を流れる電流の大きさを制御することにより、風刺されたマイクロ流体装置内の高低磁気強度の周期的範囲を改善することができる。

【0140】

磁気粒子は、装置全体に均一に配分されてもよいし、空間的に分散した領域に配分されてもよい。さらに、磁気粒子は装置内で構造体を生成するのに用いることができる。例えば、チャンネルの反対側に2つの磁気領域を用いて磁気粒子を引き付け、これら2つの領域を繋ぐ「ブリッジ」を形成してもよい。

【0141】

上述したように、本発明は、バクテリア、ウイルス、菌、細胞、細胞成分、ウイルス、核酸、蛋白質、蛋白質複合体、炭水化物、これらの断片または組合せ（キメラ）などの検体を濃縮する分析装置を構成する。さらに、磁気特性に代えて、本装置はサンプル中の検体に様々な操作を加えるのに用いることができる。このような操作は、粒子の肥大化または集中、サイズ式の細分化、あるいは、粒子自体または粒子を運ぶ液体の改質を含む。好適には、本装置は異成分からなる混合物から稀有な検体（稀有な細胞）を濃縮したり、例

10

20

30

40

50

えば懸濁液内の液体を交換したり検体に試薬を接触させたりすることにより稀有な検体を改質したりするのに用いる。このような装置は、例えば細胞の機械的溶解や細胞内活動が少なく、細胞に与えるストレスを限定しつつ高度の濃縮が可能である。

【0142】

最初に細胞の例を説明したが、本発明の装置は、本発明の装置で選別可能なサイズの様々な検体に用いることができる。

【0143】

本発明の装置は、例えば検体が接触しており、互いに流体力学的に相互作用し、あるいは別の検体の周囲で流量配分に影響を与える、濃縮されたサンプルに用いることができる。例えば、この方法は、人間のドナーの全体血液の赤血球から白血球を選別することができる。人間の血液は通常、体積の45%以下の細胞を含む。細胞は、アレイを通ると粒体力学的に互いに物理的に接触および/または結合される。

10

【0144】

本発明の方法は、サンプルから1またはそれ以上の検体を、当該1またはそれ以上の検体の磁気特性に基づいて選別するステップを含む。一実施例では、サンプルに、検体の磁気特性を改質する試薬が加えられる。この改質は、磁気粒子により達成される。一実施例では、粒子(例えば磁気粒子)が装置の表面に結合され、装置内でサンプル中の所望の検体(例えば胎児細胞、病原体の細胞、癌細胞、または細菌性の細胞などの稀有な細胞)が確保される。したがって、検体または関心ある検体は、その後装置の表面に結合する。別の実施例では、所望の検体は装置内でサイズ、形状、変形能に基づく機構を通して確保される。別の実施例では、ネガティブ選択が採用され、ここでは所望の検体は磁気粒子に結合されない。いずれの実施例でも、MACS列を用いて検体(例えば、磁気粒子に結合した検体)を保持するようにしてもよい。ポジティブ選択の場合、少なくとも検体の60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%が装置内に確保されることが望ましい。装置の表面は、対象でない検体の非特異的な結合を最小限にするよう望ましく設計される。例えば、対象でない検体の少なくとも99%、98%、95%、90%、80%、70%が装置内に留まらない。この装置内の選択的な保持により、例えば血液、唾液、尿、土壌、空気、または水サンプルなどの混合物から特定の検体の集合の選別を達成することができる。

20

【0145】

検体の選択的な確保は、本発明の装置内に磁気粒子を導入することにより達成できる。捕獲部分を磁気粒子に結合させ、対象とする検体の特異的な結合に作用させてもよい。別の実施例では、選択されたサイズ、形状、または変形能の検体のみが装置を通過できるように磁気粒子が配備される。これらの実施例の組合せも想起しうる。例えば、1の装置はサイズに基づいて特定の検体を保持するように構成し、他の装置は結合度(binding)に基づくようにしてもよい。さらに、1の装置が例えば直列的、並列的、あるいは装置内で領域が散在するように、1より多い関心ある検体を拘束するよう設計され、あるいは2またはそれ以上の捕獲部分が同じ磁気粒子または例えば同じ障害物または領域に結合された隣接する粒子に分配される。さらに、同じ検体(例えば抗CD71および抗Cd36)に特化した複数の捕獲部分を、同じか異なる磁気粒子に、例えば同じか異なる障害物または領域に適用してもよい。

30

40

【0146】

磁気粒子を装置内に存在する障害物に取り付け(あるいは、障害物を成形するよう操作し)、検体と相互作用する面を増やして結合が生じやすくしてもよい。流れの状態は通常、ダメージが生じないよう検体が装置内で非常に優しく扱われるようにされている。正の圧力または負圧の付与あるいは柱(column)からの流れを適用して、本発明のマイクロ流体装置へ、またはここから検体を送ってもよい。この装置は穏やかな処理が可能であり、かつ各検体が1またはそれ以上の磁気粒子と衝突する頻度を最大化する。対象とする検体は磁気粒子と衝突し、様々な捕獲部分と相互作用する。この捕獲部分は、装置内で磁気吸着するよう設計された障害物と共存しうる。この相互作用により、規定された場所の対象

50

とする検体が捕獲され保持される。代替的に、検体は、例えばサイズ、形状、または変形能に基づく装置の通りにくさにより保持される。捕獲された検体は、磁気粒子を保持している磁気領域を消磁することにより解放される。選択的に検体を領域から解放するには、消磁は選択された障害物または領域に限定してもよい。例えば、磁界は電磁的に設計され、個々の領域または障害物で磁界のオンとオフが自在に可能であってもよい。別の実施例では、検体は、例えば化学的分離または非共有結合性の相互作用の解除により、検体と捕獲部分との結合を解除することにより解放されてもよい。例えば、いくつかの鉄粒子をDNA環を介して単一細胞の抗体に結合(link)させ、DNAseを使用すると鉄粒子から検体を付着および脱着することができる。代替的に、抗体を破片にするプロテアーゼ(例えばパパイン)を用いて、技師が選択的に解放してもよい。特に強い磁気領域では、磁気粒子を磁気領域から解放するために磁気粒子の反発力を増大させてもよい。別の実施例では、捕獲された検体は解放されず、確保されたまま分析されさらなる処理が行われる。

10

【0147】

一実施例では、装置は複合混合物からトランスフェリンレセプタを表す(expressing)細胞を捉え分離させるよう構成されている。CD71レセプタへの単一細胞の抗体は、例えば、限定しないが、ポリスチレンにドープした鉄と鉄粒子または鉄コロイド(例えば、Milternyi and Dynal社から)などの磁気材料と電子共有結合した既製品である。磁気粒子に結合したCD71のmAbが、装置に流し込まれる。抗体でコートした粒子が障害物(例えば、ポスト)、床、壁に供給され、粒子と磁界の間の磁界作用の強度により保持される。障害物間の粒子と、障害物から離れて局所的な磁界の作用範囲にゆるく保持されたものが、すすぎにより除去される(この流量は、障害物から離れた検体にかかる流体力学的剪断ストレスが磁界強度より大きくなるよう調整される)。

20

【0148】

上記実施例に加え、本装置は、食品産業における病原体検査、化学的および生物学的な危険性に関する環境サンプリングにおける、血液由来の病原体、細菌性およびウイルス性の荷重(load)、水性媒体に可溶性の風媒の病原体の分離と検出に利用可能である。さらに、磁気粒子を捕獲部分や混成候補薬剤と共存させる。関心ある細胞の捕獲はさらに、捕獲した細胞を固定化混成薬剤と相互作用させるため分析される。したがって本装置は、高スループットで薬剤開発プロセスに用いるため、および二次的に細胞ベースの候補薬剤の検査のために、細胞の部分母集団を複合混合物から分離し、これらの混成候補薬剤との反応を検査することの双方に利用可能である。別の実施例では、例えば磁気粒子上や候補リガンド(または作用薬あるいは拮抗薬)の複合混合物内を流れるレセプタなどの捕獲部分を局所化することにより受容体リガンド作用の研究を本装置で実施可能である。関心あるリガンドは捕獲され、例えば二次的に蛍光プローブで染めることにより結合を検出可能である。本実施例は、組織や細胞の消化(digest)から抽出した複合混合物からの公知のリガンドの存在または不在を迅速に特定することができ、または候補薬剤化合物を特定できる。

30

【0149】

サイズ式選別と組み合わせた捕獲

ここにおける実施例では、サイズ式選別モジュールと、捕獲モジュールが好適に液体接続されている。例えば、選別モジュールの第1の出口が捕獲モジュールと液体接続される。捕獲モジュールを通るサンプルの平均流量は、選別モジュールと同じであっても異なってもよい。いくつかの実施例では、捕獲モジュールを通るサンプルの平均流量は、1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mL/時間より大きい。

40

【0150】

いくつかの実施例では、選別モジュールと捕獲モジュールが一体構成され、複数の障害物は、特定の検体をサイズによって偏向させて関し成る検体の方向と異なる流路へと導くのと、特定の検体をサイズ、親和性、磁気、または他の物理特性に基づき捕獲するのとの両方として作用する。

50

【 0 1 5 1 】

I I I 検出 / 分析

いずれの実施例でも、濃縮した検体（例えば稀有な細胞）やその成分（他と e b あ、各や染色体）の検出および / または分析は、その全体または一部を人間または分析器で行うことができる。濃縮した検体が細胞の場合、検出 / 分析の前に浸透または溶解される。本発明の分析器は、高スループットの濃縮検体（例えば、血液や危険な検体からの稀有な細胞）の検出 / 分析用に自動化されている。分析器による検出および分析は、連続的なステップで行ってもよいし、1のステップに組み合わされてもよい。好適には、検出と分析は単一のステップで行われる。

【 0 1 5 2 】

分析器は、公知の様々なサンプル分析装置を含んでもよく、例えば、顕微鏡、マイクロアレイ、細胞カウンタ等である。分析器はさらに、コンピュータ、データベース、メモリシステム、システム出力（例えばコンピュータ画面またはプリンタ）の1またはそれ以上を具えてもよい。好適な実施例では、分析器はコンピュータ読み出し可能な媒体、例えばフロッピーディスク、CD-ROM、ハードドライブ、フラッシュメモリ、テープ、または濃縮検体に検出または分析を行う一連の命令を含むプログラムコードを具える他のデジタル保存媒体、を具えてもよい。いくつかの実施例では、コンピュータ実行可能なロジックまたは分析器のプログラムコードが記憶媒体に保存され、これがコンピュータにロードされおよび / または実行され、あるいは電気配線やケーブル、光ファイバ、電磁放射などの伝送媒体を介して伝送される。汎用のマイクロプロセッサに実装される場合、コンピュータ実行可能なロジックは、このマイクロプロセッサに特定の論理回路を生成するよう構成する。好適には、このコンピュータ実行可能なロジックは、サンプル提供、濃縮、検出および / または分析を含むここに記載されたタスクの一部または全部を実行する。

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施例では、分析器は、サイズし基線別モジュールまたは捕獲モジュールと液体接続される。いくつかの実施例では、濃縮検体（例えば関心ある細胞）が捕獲モジュール / サイズ式選別モジュールから取り出され、ガラススライドまたは細胞分類装置に供給されて分析される。好適な実施例では、この細胞分類装置は複数の検体（例えば細胞）をアドレス可能な場所に保持する。このような実施例の例が、米国特許番号 6,692,952 に開示されており、すべての目的においてここに参照により組み込まれる。このようなモジュールは、アドレス可能な場所からの細胞を選択的に解放するよう構成されたアクチュエータを具えてもよい。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施例では、分析器は、関心ある1またはそれ以上の検体を視覚化するという検出ステップを実行するよう構成される。関心ある検体の視覚化は、サイズ式選別モジュールおよび / または捕獲モジュールの障害物を覆う透明なカバーまたは蓋を通じて実現する。いくつかの実施例では、分析器は、例えば光学顕微鏡、明視野光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡などの顕微鏡を具える（好適には捕獲モジュールに液体接続される）。いくつかの実施例では、分析器はデュアルスキャン機能（例えば、光学顕微鏡と蛍光顕微鏡を用いる）を有する。好適には、分析器は濃縮検体（関心ある検体を含む）の三次元画像を提供する。例えば、コンピュータコードで、濃縮サンプル中の胎児有核赤血球を含む総ての有核赤血球を検出可能である。いくつかの実施例では、分析器は、カメラやビデオカメラといった画像装置を具える。このような画像装置は、（関心ある検体を含む）検体の画像を取得するのに用いられる。例えば、画像装置は、母体の血液サンプルから取得される1またはそれ以上の f n R B C の画像を取得可能である。上記のいずれも、濃縮検体を描写し保存するコンピュータ実行可能なロジックにより制御可能である。

【 0 1 5 5 】

いくつかの実施例では、分析器は、例えば癌細胞、内皮細胞、上皮細胞などの関心ある検体を計数する分析ステップを実行するよう構成される。このような分析器は、例えば、細胞カウンタを具える。サンプル中で検出される関心ある検体の数は、（例えば癌の）診

10

20

30

40

50

断または状態予測を行うのに用いることができる。いくつかの実施例では、分析器は既知のデータポイントから収集されるデータを比較する（および選択的に保存する）。いくつかの実施例では、分析器は、ケースサンプルおよび対照試料から収集したデータを比較し（および選択的に保存し）、付随する研究を実行する。

【0156】

いくつかの実施例では、分析器は、濃縮検体、関心ある検体、またはその成分を選択的に結合する1またはそれ以上のプローブからプローブ信号を検出する、コンピュータ実行可能なロジックを具える。いくつかの実施例では、このコンピュータ実行可能なロジックはまた、このような信号の強度、サイズ、形状、アスペクト比、および/または分布を分析する。このコンピュータ実行可能なロジックは、プローブ信号の分析結果に基づいてその後命令を生成しうる。

10

【0157】

検出器で検出/分析可能な信号のプローブの例は、限定しないが、蛍光プローブ（例えば、胎児細胞内のX、Y、13、18、21といった染色体を染色する）、発色プローブ、間接免疫剤（例えば、二次酵素と結合された未分類の一次抗体）、量子ドット、またはフォトン放出する他のプローブである。いくつかの実施例では、本分析器は、蛍光プローブよりリード時間がかかり早い発色プローブを検出する。いくつかの実施例では、分析器は、核型、その場ハイブリダイゼーション（*in situ hybridization*: I S H）（例えば、蛍光その場ハイブリダイゼーション（F I S H）、クロモゲンその場ハイブリダイゼーション（C I S H）、ナノゴールドその場ハイブリダイゼーション（N I S H））、制限酵素断片長多型（R F L P）分析、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術、フローサイトメトリー、電子顕微鏡法、量子ドット、および、単ヌクレオチド多形性（S N P）またはRNAレベルを検出する核酸アレイ、を実行するコンピュータ実行可能なロジックを具える。いくつかの実施例では、2またはそれ以上のプローブを使用する。例えば、複数のF I S Hプローブまたは他のDNAプローブを用いて単一の細胞および関心ある成分を分析してもよい。希少な細胞を検出するためにF I S Hを用いる方法が、Zhen, D. K., et. al. (1999) *Prenatal Diagnosis*, 18(11), 1181-1185, Cheung, MC., (1996) *Nature Genetics* 14, 264-268に開示されており、すべての目的においてここに参照により組み込まれる。C I S Hを用いる方法は、Arnould, L. et al *British Journal of Cancer* (2003), 88, 1587-1591、および米国特許公開2002/0019001に開示され、すべての目的においてここに参照により組み込まれる。

20

30

【0158】

例えば、母体血液からの濃縮された胎児細胞を分析する場合、分析器は、胎児細胞またはその成分を検出するよう構成される。いくつかの実施例では、胎児細胞またはその成分の分析が、胎児の性別特定、遺伝子異常（例えば、染色体/DNA/RNAの異常）の存在/不存在、1またはそれ以上のS N Pを検出するのに用いられる。本分析装置で検出する染色体異常の例は、限定しないが、アンジェルマン症候群（15q11.2-q13）、猫鳴き症候群（5p-）、ディジョージ症候群および膜-心臓-顔面症候群（22q11.2）、Miller-Dieker症候群（17q13.3）、プラダー・ウィリ症候群（15q11.2-q13）、網膜芽腫（13q14）、Smith-Magenis症候群（17p11.2）、トリソミー13、トリソミー16、トリソミー18、トリソミー21（ダウン症）、三倍体性、ウィリアムズ症候群（7q11.23）、Wolf-Hirschhorn症候群（4p-）がある。本分析器で検出可能な性染色体異常の例としては、限定しないが、カルマン症候群（Xp22.3）、ステロイドサルファターゼ不全（STS）（Xp22.3）、X連鎖魚鱗癬（Xp22.3）、クラインフェルター症候群（XXY）、脆弱X染色体症候群、ターナー症候群（X染色体の損傷）、超雌または三染色体X、一染色体Xなどを含む。本分析器で検出/分析可能な他のあまり有名でない染色体異常は、限定しないが、欠失（小さな欠如部分）、微少欠失（単一の遺伝子のみを含む物質の微量の欠如）、転座（染色体の一部が他の染色体と結合）、逆位（染色体の一部が切除され逆向きに挿入）を含む。

40

50

【0159】

いくつかの実施例では、検出器は、および グロビン、グリコホリン A (GPA)、I 抗体、CD35 からなる群から選択される抗体用に染色された検体 (例えば細胞) を検出する。特に、本分析器は、抗 または抗 グロビン抗体あるいはその組合せで染めた細胞を検出できる。と グロビンの組合せは、妊娠 10 - 24 週の fNRBC に 95 - 100% 見られる。A1 Mufti et al., (2001) Haematologica 85, 357-362; Choolani et al., (2003) Mol. Hum. Reprod., 9, 227-235。この の組合せ、または グロビン単独が、fNRBC を染色するのに示されている。Bohmer, (1998); Choolani et al. (2003); Christensen et al., (2005) Fetal Diagn. Ther. 20, 106-112; Hennerbichler et al., (2002) Cytometry, 48, 87-92 参照。両グロビンの抗体は当業者に知られており、様々なベンダから取得可能である。染色は、正または負の二値スコアで、または検体内の抗体量を示す様々な度合いで実現可能である。

10

【0160】

いくつかの実施例では、分析器は、GPA および / または CD71 用に染色された検体 (例えば細胞) を検出する。GPA は赤血球系統を通して存在する。したがって、成熟度に拘わらず、各赤血球を特定するのに用いることができる。GPA は赤血球系統細胞でのみ見られると考えられ、通常は循環細胞で殆ど見つからず、妊娠期間に増大する。FACS 検査は、妊娠中は CD71 と GPA の組合せが少なくとも単核細胞の 0.15% 現れることを示す。Price et al., (1991) Am. J. Obstet Gynecol., 165, 1713-1717; Sohda et al., (1997) Prenat. Diagn., 17, 743-752。いくつかの実施例では、分析器は CD71 と GPA に特化したプローブを検出するよう構成される。

20

【0161】

いくつかの実施例では、検出器は I 抗体用に染色された検体 (例えば細胞) を検出する。この I 抗体は、患者の多クローン性の漿液を用いて 1950 年代に最初に開示された。連続的なデータは、抗原の 2 つの形態「I」または「i」がそれぞれ大人と胎児の細胞を示すことを表している。より最近の構造上の証拠により、これらの抗原が N アセチルアクトサミンの線形または分岐した繰り返しとして規定された。「i」構造は、2 つの酵素、- 1, 3 - N - アセチルグルコサミン転位酵素と、- 1, 4 - ガラクトシル基転位酵素の作用で現れる。「i」抗原の「I」への転位は、酵素 (- 1, 6 - N - アセチルグルコサミン転位酵素) を介して生じる。これらの酵素用の遺伝子と染色体の座が近年特定された。Yu et al., (2001) Blood, 98, 3840-3845。より最近では、i 抗原用の抗体が、胎児細胞の分野で古くから用いられてきた。Kan et al., (1974) Blood 43, 411-415。これらは近年でも、分画密度遠心分離で取得された胎児細胞の検査に用いられている。Sitar et al. (2005) Exp. Cell. Res., 203, 153, 161。このように、特に i 抗原と結合する抗体および抗体の断片は、本方法および合成物により胎児細胞を濃縮、分離、および検出するのに利用可能である。さらに、i 抗原は母体血液サンプル中の多くの胎児細胞を特定し (Sitar et al.)、読み込み結果の速度を改善する。

30

【0162】

いくつかの実施例では、分析器は、濃縮サンプル中の稀有な細胞などの稀有な検体を特定 / 特性を表す一連の命令を提供するコンピュータ実行可能なロジックまたはコンピュータプログラムコードを具える。このコードはさらに、これらの稀有な検体を描写しこれらの画像を保存する命令を提供する。一実施例では、コンピュータ実行可能なロジックは、顕微鏡が稀有な細胞 (例えば、胎児細胞や上皮細胞) を同定するように導く、コードはさらに、例えば、 グロビン、 グロビン、胎児ヘモグロビン、GPA、i 抗原、CD71、EpCAM、またはこれらの組合せに特に結合する抗体などの、選択的に稀有な細胞またはその成分を結合するプローブを童貞する一連の命令を提供する。

40

【0163】

例えば、いくつかの実施例では、コンピュータ実行可能なロジックが、サンプル中の胎児有核赤血球を特定し、染色体などの稀有な細胞の成分特定および計数し、特に染色体 13, 18, 21, X および / または Y と結合するプローブを検出し、1 またはそれ以上の

50

単ヌクレオチド多形性 (SNP) を検出し、遺伝子配列の突然変異を検出し、mRNA レベルを検出し、マイクロRNA のレベルを検出するなどの命令を提供する。このコンピュータ実行可能なロジックはまた、例えば関心ある胎児核酸 (例えば、染色体 X、Y、13、18、21) と結合した 1 またはそれ以上の核酸プローブからのプローブの強度を検出および / または比較するコードと、プローブ強度の分析結果に関連するコールを生成するコードとを含む。

【0164】

図 9 A - D は、本発明の一実施例を示す図である。図 9 A は、スライドおまたは細胞アレイ装置に接続された顕微鏡に接続されたコンピュータを示す。図 9 B は、明視野顕微鏡で視覚化した細胞を示す。図 9 C は、XXY 細胞を示す。図 9 D は、視野内の細胞の画像を示す。これはまた、様々なプローブ強度レベルを検出するコードの様々な特徴を示している。

10

【0165】

いずれの実施例でも、分析器は、ここに開示する様々なモジュールの 1 またはそれ以上を通るサンプルの流量を制御するコンピュータ実行可能なロジックを具える。

【0166】

IV 応用例

この装置 / モジュールおよび方法は、限定しないが、既述した様々な応用例に用いることができる。

【0167】

出産前検診

いくつかの実施例では、このシステムおよび方法は、出産前検診を実施するのに利用することができる。例えば、妊娠した動物 (好適には人間) からの末梢血液サンプルを取得して、ここに開示した前記方法および装置の 1 またはそれ以上を利用して濃縮する。好適には、母体血液サンプルは最初に 1 またはそれ以上のサイズ式モジュールを用いて濃縮し、血液サンプルから 4 ミクロンより大きい粒体力学的サイズの検体 (すなわち胎児有核赤血球および母体白血球) を他の検体から分離する。次いで、胎児有核赤血球と母体白血球とを含む濃縮サンプルはさらに、1 またはそれ以上の捕獲モジュールを用いて選別される。好適には、捕獲モジュールはポジティブに胎児血液細胞を白血球から選別する (選択的かつ開放可能に結合する)。この捕獲モジュールは、磁気粒子を用いないことが望ましい。いくつかの実施例では、捕獲モジュールは、抗 CD71 単一細胞抗体で覆われた 1 またはそれ以上の障害物アレイを具える。このような装置に捕獲された細胞は、次に、FISH 検査、PCR 増幅、RNA 分析、DNA 分析等の 1 またはそれ以上を用いて遺伝子分析される。いくつかの実施例では、FISH 検査を用いて異数性の存在または不在を検出する。いくつかの実施例では、DNA または RNA 分析を用いて、濃縮した胎児細胞中の SNP または mRNA レベルの 1 またはそれ以上を分析する。胎児細胞の寿命分析を検出するコンピュータ実行可能なロジックを具える分析器は、システムの自動化に用いることができる。この分析器はさらに、顕微鏡やマイクロアレイを具えてもよい。

20

30

【0168】

b. 癌診断

いくつかの実施例では、このシステムおよび方法は、癌診断を実施するのに利用することができる。例えば、癌の疑いのあるまたは癌の動物から周辺血液サンプルまたは他の液体を取得する。このサンプルは 1 またはそれ以上のサイズ式モジュールを通して流され、サンプルから 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ミクロンより粒体力学的サイズが大きい検体が分離される。いくつかの実施例では、濃縮される細胞は、感染した WBC、幹細胞、前駆細胞、上皮細胞、内皮細胞、子宮内膜細胞、腫瘍細胞、癌細胞からなる群から選別される 1 またはそれ以上の細胞である。いくつかの実施例では、濃縮検体は選択的に、1 またはそれ以上の上述した捕獲モジュールに通されてもよい。

40

【0169】

濃縮された細胞はその後分析され、例えばサンプル中の上皮細胞数、サンプル中の内皮

50

細胞数、サンプル中の上皮/内皮の比、基準サイズより大きい全細胞のプロファイル、基準サイズより大きい全細胞の移動パターン、同時に異なる地点で同じ動物から採取した1以上の第2のサンプルに基づく特性の変化などが決定される。

【0170】

いくつかの実施例では、分析は、濃縮細胞を、特定のサイズ範囲の細胞を選択的に捕獲するか、関し成る細胞（例えば表面に1またはそれ以上のガンマーを示す癌細胞や上皮細胞）を選択的に捕獲する1またはそれ以上の捕獲モジュールに適用することを含む。いくつかの待史sレ委では、濃縮された細胞はさらに分析され、細胞間のガンマーの存在または不在が決定される。いずれの実施例でも、さらに分析器を用いて細胞の検出、計数、分析を行ってもよい。

10

【0171】

本発明による診断または予測が実施される新生物の基準 (neoplastic condition) は、乳癌、骨癌、前立腺癌、肝臓癌、舌癌、脳癌、喉頭癌、胆嚢癌、膵臓癌、直腸癌、上皮小体癌、甲状腺癌、腎臓癌、神経細胞癌、頭部癌、頸部癌、大腸癌、胃癌、気管支癌、腎臓癌、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、腫瘍性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、*veticulum*細胞癌、骨髄腫、巨細胞腫、小細胞肺癌、胆石腫瘍、島細胞腫瘍、原発性脳腫瘍、急性および慢性のリンパ腺および顆粒球性腫瘍、ヘアリーセル腫瘍、アデノーマ、過形成、髓様癌、クロム親和性細胞腫、粘膜神経腫、*interstitial*神経節性過形成 *comeal*神経細胞腫、マルファン症候群体型腫瘍、ウィルムス腫瘍、精上皮腫、卵巣腫瘍、平滑筋肉腫、子宮頸部異形成およびその腫瘍、神経芽腫、網膜芽腫、軟部肉腫、悪性カルチノイド、局所皮膚障害、菌状息肉腫、横紋筋肉腫、カボジ肉腫、悪性カルシウム過剰血症、腎臓細胞腫、真性多血球血症、腺癌、多形神経膠芽腫、急性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、リンパ腫、悪性黒色腫、および類表皮癌からなる群から選択されるものを含む。

20

【0172】

いくつかの実施例では、このシステムおよび方法は、獣医学的診断を実施するのに利用される。獣医学的診断は、好ましくは家畜化した動物から液体サンプル（例えば血液サンプル）を取得することを含む。家畜化した動物の例は、限定しないが、牛、鶏、豚、馬、兔、犬、猫、魚、山羊を含む。サンプルはその後1またはそれ以上のサイズ式モジュールを用いて濃縮され、例えば4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20ミクロンより大きな、または粒体力学的サイズ範囲（例えば6 - 12ミクロンまたは8 - 10ミクロンなど）の唯一の粒体力学的サイズの検体が分離される。濃縮された検体は、分析の前に、選択的に1またはそれ以上の追加の濃縮ステップにかけてもよい。例えば、いくつかの実施例では、濃縮検体は選択的に1またはそれ以上の上述した捕獲モジュールを通して流される。

30

【0173】

いくつかの実施例では、サンプルから濃縮される検体は胎児細胞である。このような細胞はその後、胎児の性別や胎児の状態を判定すべく検査される。

【0174】

いくつかの実施例では、サンプルから濃縮される検体は病原体である。動物から濃縮される病原体の例は、限定しないが、バクテリア、ウイルス、原生動物を含む（もちろん、このような応用例は家畜動物に限らず人間にも適用可能である）。濃縮したら、細胞はここに実現する検出/分析器を用いて分析される。このような分析器は、病原体感染種類、そのソース、治療処置等を特定するために、グラム陽性試験、ウイルス量試験、FISH検査、PCR検査等を実施可能である。

40

【0175】

いくつかの実施例では、サンプルから濃縮される検体は、内皮細胞または循環癌細胞である。このような細胞はさらに分析され、動物がかかった癌の出所、状態のひどさ、治療処置の有効性などが判定される。

【0176】

50

d . バイオディフェンス

いくつかの実施例では、このシステムおよび方法は、バイオディフェンスまたは生物学的危険物質（例えば、バイオハザード検体）の存在を検出するのに利用することができる。バイオハザード検体は、限定しないが、人間、動物、植物に感染する有機体（例えば、パラサイト、ウィルス、バクテリア、菌類、プリオン、リケッチア）、細胞成分（例えば、組み換えDNA）、他の生物の病気の原因となるか環境または社会に有意な衝撃を与える生物学的活性剤（トキシン、アレルゲン、毒物）がある。バイオハザード検体となりうる病原体の例は、ペスト菌、炭疽菌、ボツリヌス菌、野兔病菌、コキシエラ菌、ブルセラ種、ブルクホルデリアつい骨、ブルクホルデリア仮性つい骨、連鎖球菌、エボラウィルス、ラッサウィルス、SARS、大痘瘡、アルファウィルス、発疹チフスリケッチア、オウム病クラミジア、サルモネラ種、大腸菌O157:H7、コレラ菌、クリプトスポリジウムパルバム、ニパウィルス（Nipah virus）、ハンタウィルス、およびこれらのキメラを含む群から選択されるものを含む。バイオハザード物質は、本方法およびシステムを用いて検出可能であり、例えば例えば食品サンプル、水サンプル、空気サンプル、土壌サンプル、あるいは動植物からの生化学的サンプルである。

10

【0177】

いくつかの実施例では、本方法およびシステムで分析されたサンプルは、サンプル中の全検体の1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%、0.000001%以下のバイオハザード検体を有しうる。さらに、いずれの実施例でも、バイオハザード検体は、初期濃度が5, 2, 1, 5×10^{-1} , 2×10^{-1} , 1×10^{-1} , 5×10^{-2} , 2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 2×10^{-5} , 1×10^{-5} , 5×10^{-6} , 2×10^{-6} , 1×10^{-6} , 5×10^{-7} , 2×10^{-7} , または 1×10^{-7} バイオハザード検体 / μL 液体サンプル以下であってもよい。液体でないサンプルを分析する場合、様々な公知の手段でサンプルを溶解または液化することが望ましい。

20

【0178】

バイオハザード物質が分析されるサンプルは、1またはそれ以上のサイズ式選別モジュールに流される。好適には、このようなサイズ式選別モジュールは、バイオハザード検体の濃度を少なくとも1, 000または10, 000倍増大させる。濃縮された検体は、これも選択的に1またはそれ以上の上述した捕獲モジュールに通してもよい。

30

【0179】

e . 研究

本システムおよび方法はさらに、研究を行うのに利用することができる。例えば、いくつかの実施例では、本システムおよび方法は、複数の対照試料と複数のケースサンプルから収集したデータに基づいて関連する研究を行うのに利用される。例えば、液体サンプル（例えば血液サンプル）は、10, 20, 50, 100以上の個体（病気発現（phenotypic condition）がある個体）と、10, 20, 50, 100以上の対照試料（病気発現がない個体）とから収集される。各個体からのサンプルはその後、第1または複数の検体について濃縮される。このような検体は次に計数され、および/または特徴付けられる。上記ステップによるデータは続いて、関連する研究を行うために利用される。データは好適には電子データベースに保存される。関連する研究は、ケースサンプルまたは対照試料に関連する1またはそれ以上の特徴を同定するコンピュータ実行可能なロジックを用いて行われる。

40

【0180】

好適な実施例では、関連する研究のため個体から採取された液体サンプルは、血液サンプルである。好適な実施例では、このようなサンプルから濃縮される検体は、流体力学的サイズが4ミクロンより大きく、あるいは6, 8, 10, 12, 14, 16ミクロンより大きいものである。いくつかの実施例では、個体から採取されるサンプルは、RBC、胎児RBC、栄養膜、胎児栄養膜、赤血球（WBC）、感染したWBC、幹細胞、上皮細胞

50

、内皮細胞、子宮内膜細胞、前駆細胞、癌細胞、ウイルス性細胞、バクテリア細胞、および厳正動物からなる群から選択される1またはそれ以上の細胞が濃縮される。好適には、濃縮される細胞は、生体内での濃度が 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、または 1×10^{-3} 細胞/ μL 以下のものである。好適には、(濃縮された)関心ある細胞の99%以上がサンプルから確保される。関連する研究を行うための濃縮により、関心ある第1の細胞腫類を少なくとも10,000倍濃縮できる。

【0181】

濃縮された検体は次に、1またはそれ以上の特性を判定するために分析される。このような特性としては、例えば、サンプル中の検体の存在または不存在、検体の量、2つの検体の比(例えば内皮細胞と上皮細胞)、1またはそれ以上の検体の形態、検体の遺伝子型、検体のプロテオーム、検体のRNA構造、検体内の遺伝子発現、マイクロRNAレベル、あるいは濃縮検体の他の特性を含み、これが続いて関連する研究を行うために利用される。

10

【0182】

特性が対照試料に関連する場合、続いてこの特性は試験される患者の病気発現の不在を診断するのに用いられる。特性がケースサンプルに関連する場合、続いてこの特性は試験される患者の病気発現の存在を診断するのに用いられる。

【0183】

本発明が企図する病気発現の例は、限定しないが、癌、子宮内膜症、感染(例えばHIV、細菌性など)、炎症、虚血、外傷、胎児異常などを含む。

20

【0184】

V. キット

本発明は、液体サンプルから検体を濃縮するキットを企図している。

【0185】

いくつかの実施例では、このようなキットは、選択的に母体血液サンプルから胎児細胞を濃縮するよう構成された捕獲モジュールに連結された1またはそれ以上の選別モジュールを具える。

【0186】

選別モジュールは高感度であり、98%以上または99%以上の感度で胎児細胞を濃縮することが望ましい。いくつかの実施例では、1またはそれ以上の捕獲モジュールが選別モジュールに液体接続されている。キットはさらに、濃縮された胎児細胞を分析して出産前検診を行う一連の説明を具えてもよい。このキットで行える出産前検診は、限定しないが、胎児の性別、染色体13・染色体18・染色体21(ダウン症)の存在、ターナー症候群(X染色体の損傷)、クラインフェルター症候群(XXY)、または他の性染色体あるいは常染色体の数の異常の発現、あるいはWolf-Hirschhorn症候群(4p-)、猫鳴き症候群(5p-)、ウィリアムズ症候群(7q11.23)、ブラダー・ウィリ症候群(15q11.2-q13)、アンジェルマン症候群(15q11.2-q13)、Miller-Dieker症候群(17q13.3)、Smith-Magenis症候群(17p11.2)、ディジョージ症候群および膜-心臓-顔面症候群(22q11.2)、カルマン症候群(Xp22.3)、ステロイドサルファターゼ不全(STS)(Xp22.3)、X連鎖魚鱗癬(Xp22.3)、および網膜芽腫がある。

30

40

【0187】

いくつかの実施例では、このキットは、選択的に血液サンプルから上皮細胞または癌細胞を濃縮する捕獲モジュールに連結された、1またはそれ以上の選別モジュールを具える。このようなモジュールは高感度であり、98%以上または99%以上の感度で胎児細胞を濃縮することが望ましい。好ましくは、選別モジュールと捕獲モジュールがともに同じ基板上にある。このキットはさらに、癌の出所、癌の転移、処置の有効性、予後などを検出する1またはそれ以上のラベリング試薬を具えてもよい。このような試薬は、細胞表面のガンマーを特に結合する抗体を具える。このキットはさらに、癌診断を行うために濃縮細胞を分析する一連の説明を具えてもよい。

50

【0188】

この方法を用いて診断できる癌の例は、限定しないが、乳癌、骨癌、前立腺癌、肝臓癌、舌癌、脳癌、喉頭癌、胆嚢癌、膵臓癌、直腸癌、上皮小体癌、甲状腺癌、腎臓癌、神経細胞癌、頭部癌、頸部癌、大腸癌、胃癌、気管支癌、腎臓癌、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、腫瘍性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、*veticulum*細胞癌、骨髄腫、巨細胞腫、小細胞肺癌、胆石腫瘍、島細胞腫瘍、原発性脳腫瘍、急性および慢性のリンパ腺および顆粒球性腫瘍、ヘアリーセル腫瘍、アデノーマ、過形成、髄様癌、クロム親和性細胞腫、粘膜神経腫、*intestinal*神経節性過形成 *comeal*神経細胞腫、マルファン症候群体型腫瘍、ウィルムス腫瘍、精上皮腫、卵巣腫瘍、平滑筋肉腫、子宮頸部異形成およびその腫瘍、神経芽腫、網膜芽腫、軟部肉腫、悪性カルチノイド、局所皮膚障害、菌状息肉腫、横紋筋肉腫、カポジ肉腫、悪性カルシウム過剰血症、腎臓細胞腫、真性多血球血症、腺癌、多形神経膠芽腫、急性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、リンパ腫、悪性黒色腫、および類表皮癌を含む。

10

【0189】

VI. ビジネス方法

このシステムおよび方法は、診断サービスおよび/または細胞診断用製品に用いることができる。診断用製品は、例えば、1またはそれ以上の選別モジュール、1またはそれ以上の捕獲モジュール、検出器、分析器、またはこれらの組合せを具えてもよい。

20

【0190】

出産前診断サービス

いくつかの実施例では、このビジネス方法は、出産前検査サービスを提供する。このようなビジネスは、胎児を診断しようとする哺乳動物からの血液サンプルを取得する。いくつかの実施例では、このビジネスは妊娠した患者（動物）から血液を採取するか、妊娠患者から直接血液を受けるかの双方が可能である。このビジネスは、血液サンプルの胎児細胞を濃縮し、胎児細胞に1またはそれ以上のスクリーニング試験を行って胎児の状態を判定する。判定される状態の例は、限定しないが、胎児の性別、染色体13、18、21、X、Yなどの遺伝子異常、既知のSNPに関連する状態、Wolf-Hirschhorn症候群（4p-）、猫鳴き症候群（5p-）、ウィリアムズ症候群（7q11.23）、プラダー・ウィリ症候群（15q11.2-q13）、アンジェルマン症候群（15q11.2-q13）、Miller-Dieker症候群（17q13.3）、Smith-Magenis症候群（17p11.2）、ディジョージ症候群および膜-心臓-顔面症候群（22q11.2）、カルマン症候群（Xp22.3）、ステロイドサルファターゼ不全（STS）（Xp22.3）、X連鎖魚鱗癬（Xp22.3）、および網膜芽腫（13q14）がある。本発明は他のすべての遺伝子疾患に対処させてもよい。

30

【0191】

このビジネス方法は、その後サービス料金と引き換えに状態のレポートを提供する。このレポートは、試験された患者に直接提供されてもよいし、医療提供施設、患者の保険会社、または政府に提供されてもよい。

40

【0192】

いくつかの実施例では、このビジネスは、CLIA研究所に濃縮および分析を委託してもよい。別の実施例では、このビジネスは濃縮ステップを行い、分析ステップを第三者（例えばCLIA研究所）に委託してもよい。

【0193】

図10Aは、ここに開示するビジネス方法の一例を示す図である。このビジネスまたはCLIA研究所、患者の医療提供者により、血液サンプル（例えば血液16-20mL）が妊娠女性から採取される。このビジネスまたはCLIA研究所は、以下の1またはそれ以上のステップを実行する：（a）サンプルから赤血球と血小板を除去するよう構成されたサイズ式選別モジュールにサンプルを流すステップ；（b）抗CD71抗体に結合され選択的に白血球を超えて赤血球を結合する捕獲モジュールに通すステップ；（c）磁気ビ

50

ードを用いてサンプルを濃縮するステップ（例えば、CD71でコーティングして前に行った濃縮ステップを繰り返す）；（d）濃縮した細胞を配列する（例えば、サイトスピン2Dスライドに）；（e）濃縮細胞に、Xおよび/またはY染色体を特に結合する1または2のFISHプローブを加える；（f）分析/検出モジュールを用いてFISHプローブを検出する；（g）濃縮された細胞から有核赤血球またはより好ましくは胎児有核赤血球を同定し、選択的にこれらを特徴付ける；（h）胎児異常の検出の有無に関するレポートを、例えば試験した患者、医療施設、保険会社に提供する。

【0194】

図10は、ここに開示するビジネス方法の別の実施例を示す図である。32-40mLの血液を妊娠した女性から採取する。このサンプルは自動化されたサイズ式選別モジュールを通して流され、サンプルから赤血球と血小板が除去される。この自動選別モジュールは、供給装置に接続されている。このサンプルは次に、抗GPA抗体に接続された捕獲モジュールを通して流される。このサンプルは次に、磁気ビードを用いて濃縮される（例えば、CD71でコートして前に行った濃縮ステップを繰り返す）。残った濃縮細胞は、染色体X、Y、13、18、21用のFISHプローブを有するサイトスピン2Dスライドに配列される。続いて上述した分析/検出モジュールか、好適には多スペクトル感応性画像システムを用いてFISHプローブが読み取られ、有核RBCが特定され類別される。最後に、胎児異常の存在または不存在により胎児を診断する、試験された患者、医療提供者、または保険会社用のレポートが作成される。

10

【0195】

診断サービス - 腫瘍学

いくつかの実施例では、このビジネス方法は、腫瘍学検査サービスを提供する。この方法により、診断される患者から液体サンプル（例えば血液）が採取される。このビジネスは次に1またはそれ以上の濃縮ステップを実施し、サンプルから癌細胞、腫瘍細胞、上皮細胞、内皮細胞、または癌の存在を示す多くの細胞のいずれか1以上を濃縮する。上記の細胞は、ここに開示するいずれかのシステムおよび方法を用いて液体サンプルから濃縮される。濃縮後、細胞はさらに分析され（例えば、計数、特定の生体マーカ検査等）、この患者が癌を有するか否か、癌の出所、この患者に有効な治療法、癌の転移などが判定される。このビジネスにより作成されたレポートが、患者に直接、あるいは患者の医療提供者または保険会社に提供される。

20

30

【0196】

診断サービス - 感染

いくつかの実施例では、このビジネス方法は、感染検査サービスを提供する。このサービスでは、感染が診断される哺乳動物から液体サンプル（例えば尿や血液）が採取される。いくつかの実施例では、このビジネスは患者（動物）から直接血液を採取しサンプルを取得してもよい。いくつかの実施例では、サンプルがこのビジネスに配送される。このビジネスは次に、サンプルのスクリーニング試験を行い、1またはそれ以上の感染した細胞（例えば感染した白血球）または細菌性細胞、ウイルス、原生動物などの感染性組織を濃縮する。感染性組織はこのビジネスにより、ここに開示されたシステムおよび方法で濃縮可能である。この方法により選別/濃縮しうる循環性の病原体の例としては、ウイルス（例えばHIV、インフルエンザ、SARS）、バクテリア（大腸菌、Hインフルエンザ、S肺炎、M髄膜炎など）、原生動物（マラリア原虫、トリパノソーマ、brusei等）がある。いくつかの実施例では、この方法は血液サンプル中のHIB感染細胞の分離および検出に用いられる。このビジネスにより作成されたレポートが、患者に直接、あるいは患者の医療提供者または保険会社に提供される。

40

【0197】

診断用製品

いくつかの実施例では、本発明のビジネス方法は、血液サンプルから1またはそれ以上の検体を濃縮するのに適合した診断用製品を商業化する。例えば、1のビジネス方法は、ここにおける胎児細胞を選別し選択的に分析する1またはそれ以上の装置/モジュールを

50

個々に、あるいは選択的に1またはそれ以上の試薬（例えばラベル試薬）とともにキットとして、販売することを企図している。このようなキットは、出産前検診用の説明を含んでもよい。別のビジネス方法は、循環する癌細胞を選別し選択的に分析する1またはそれ以上の装置/モジュールを個々に、あるいは選択的に1またはそれ以上の試薬（例えばラベル試薬）とともにキットとして、販売することを企図している。このようなキットは、癌検診を行うための説明書を有してもよい。別のビジネス方法は、循環する上皮細胞を選別し選択的に分析する1またはそれ以上の装置/モジュールを個々に、あるいは選択的に1またはそれ以上の試薬（例えばラベル試薬）とともにキットとして、販売することを企図している。このようなキットは、癌検診を行うための説明書を有してもよい。

【0198】

好適な実施例では、診断用製品は、1またはそれ以上の選別モジュールと、選択的に1またはそれ以上の捕獲モジュールを具える。この診断用製品は選択的に、状態検出のための検出/分析ツール（例えばコンピュータコードまたはソフトウェア）を具えてもよい。

【0199】

いくつかの実施例では、このビジネス方法は、診断ツールを製造する。いくつかの実施例では、このビジネス方法は、診断ツールの製造を第三者に委託する。いずれの実施例でも、診断ツールは好適に重合材料で製造され、選択的に使い捨て可能である。

【0200】

検体の隔離

いくつかの実施例では、ビジネス方法は、費用と交換あるいはクロスライセンスで、ここにおけるシステムと方法を用いて1またはそれ以上の検体を隔離する。サンプルは例えば、血液サンプルまたは他の身体サンプルである。いくつかの実施例では、CLIA研究所または他の第三者機関が血液サンプルをこのビジネスに提供し、例えば胎児細胞、上皮細胞、癌細胞などの稀有な細胞を血液サンプルからこのシステムおよび方法を用いて隔離する。いくつかの実施例では、このビジネスは1またはそれ異常の個体から血液サンプルを取得し、このような血液サンプルから1またはそれ以上の治療的な血液成分、例えば血小板、白血球、循環幹細胞などを分離する。このような血液成分は次に、このビジネスにより料金をとって販売される。このような血液製品は、研究および/または治療目的を有する。

【0201】

VII. 製造

本例では、標準的な写真石版術を用いて、絶縁体上シリコン(SOI)ウェハに障害物のフォトレジストパターンを形成する。SOIウェハは、500 μ m厚のSi(100)ウェハの上の1 μ m厚のSiO₂層の頂上の100 μ m厚のSi(100)ウェハから構成されている。フォトレジスト接着を最適化すべく、このSOIウェハをフォトレジスト皮膜の前にヘキサメチルジシラザンの蒸気にさらしてもよい。UV反応性フォトレジストはウェハ上にスピンコートされ、90 $^{\circ}$ Cで30分間焼かれ、クロム接触マスクを通してUV光に300秒当てられ、現像液で5分間現像され、90 $^{\circ}$ Cで30分間後焼成される。このプロセスパラメータは、フォトレジストの性質および厚さにより変化してもよい。クロム接触マスクのパターンはフォトレジストに転写され、障害物の輪郭を決定する。

【0202】

障害物と同じフォトレジストパターンを形成したら、エッチングを開始する。SiO₂はエッチングプロセスのストッパとして作用する。このエッチングはまた、ストッパ層を用いることなく与えられた深さで止まるよう制御されてもよい。フォトレジストパターンは、プラズマエッチングにおいて100 μ m厚Si層に転写される。複合的なディープエッチングを用いて、均一な障害物を得るようにしてもよい。例えば、基板をSF₆が流れるフッ素高純度プラズマ(fluorin-rich plasma)に15秒間あて、次にシステムはC₄F₈のみが流れる過フッ化炭化水素高純度プラズマに10秒間切り替わり、ここで全面的に保護フィルムで覆われる。続くエッチングサイクルで、イオン衝撃にあてると水平面から優先的にポリマが除去され、例えばSiO₂層に達するまでこのサイクルが複数回行わ

10

20

30

40

50

れる。

【0203】

障害物表面に結合部分を結合させるには、結合部分が吸着するシリコン二酸化層を生成すべく表面変化させる前に、基板を酸素プラズマにあてる。基板はその後、蒸留した脱イオン化した水で2度すすいで空気乾燥される。サンプルを直前に準備した3-[(2-アミノエチル)アミノ]プロピルトリメトキシシランの2%v/v水溶液に30秒間浸すことにより露出したガラスの上にシラン固定がなされ、その後さらに蒸留した脱イオン化水で洗浄される。基板はその後、窒素ガス内で乾燥され焼かれる。次に、リン酸燐酸塩でバッファしたサリン中の2.5%グルタルアルデヒド溶液に基板を常温で1時間浸す。基板はその後再びすすがれ、例えば抗CD71などの結合部分を蒸留した脱イオン水の0.5mg/mL溶液に15分間常温で浸し、結合剤が障害物に結合するのを待つ。その後基板は再び蒸留した脱イオン水ですすがれ、70%エタノールに一晩浸して滅菌する。

10

【0204】

固定部分を障害物上および装置の表面に固定するには、上述した方法以外の複数の技術がある。表面上に単に物理吸着させることが、単純化とコスト面での選択となる。他のアプローチは、様々な結合部分で官機能を持たせた自己集合型単分子層(例えば金の上のチオール)を用いることである。結合される結合部分や装置を構成するのに用いられる材料によってはさらなる方法を用いてもよい。表面改質方法はこの分野で周知である。さらに、特定の細胞が材料の改質された表面に優先的に結合する。例えば、いくつかの細胞は、陽電荷を持たせた、負電荷を持たせた、あるいは疎水性の面、または特定のポリマに現れる化学薬品群に優先的に結合する。

20

【0205】

次のステップは、障害物を含む微細製造されたシリコンに最上層を接着することによりフロー装置を製造することを含む。最上部の基板はガラスであり、捕獲中およびその後細胞を視認できるようになっている。熱接着またはUV硬化性エポキシを用いて、フローチャンバを形成する。頂部と底部は例えばシリコンガセットを用いて圧迫結合(compression fit)される。このような圧迫結合は解除可能である。他の接着方法(例えばウェハ接合)がこの分野で公知となっている。どの方法を用いるかは、使用する材料の性質による。

【0206】

細胞の消耗装置(the cell depletion device)は、異なる材料で製造することができる。材料の選択に応じて、異なる製造技術を用いてもよい。この装置は、例えばポリスチレンなどのプラスチックで熱エンボス技術を用いて作成することができる。障害物や必要な他の構造体は、プラスチックに型押しされ、底面が形成される。その後最上層が底部層と接着される。射出形成は、このような装置を作成しうる別のアプローチである。ポリ(脱メチルシロキサン)(PDMS)からなるチャンバ全体をソフトな石版印刷を用いてもよいし、障害物のみをPDMSで成形してからガラス構造体と接着して閉じたチャンバを作成してもよい。さらなる他のアプローチはエポキシキャスト技術を用いた障害物形成であり、所望の構造体の反対のレプリカをもつマスターにUVまたは温度硬化型エポキシを用いる。レーザまたは他の種類のマイクロ加工アプローチを用いてフローチャンバを形成してもよい。装置を製造するのに利用可能な他の適切なポリマは、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリ(メチルメタクリレート)である。さらに、鉄やニッケルなどの金属を用いて、例えば従来の金属加工により、本発明の装置を製造してもよい。三次元製造技術(例えば、ステレオリソグラフィ)を用いて装置を1ピースで製造してもよい。他の製造方法も知られている。

30

40

【実施例1】

【0207】

実施例1. シリコンデバイス多重14トリプルステージ複式アレイ

図11A-11Fは、本発明のサイズ式選別モジュールの例であり、以下のように特徴付けられる：

50

大きさ：90 mm × 34 mm × 1 mm

アレイデザイン：3ステージ、隙間サイズ = 第1、第2、第3ステージでそれぞれ18, 12, 8 μm。分岐比 = 1 / 10。複式 (duplex)：単一バイパスチャネル

装置デザイン：多重14アレイ複式；流れの安定のためのフローレジスタあり

装置の製造：アレイとチャネルは、標準的な写真石版術とシリコン反応平凹版技術を用いてシリコンで製造される。エッチング深度は150 μmである。液体アクセス用の貫通口がKOH湿式エッチングを用いて設けられる。シリコン基板はエッチング面がシールされ、血液と反応しない感圧接着剤 (9795, 3M、St Paul、MN) を用いて封止された流体チャネルが形成される。

装置パッケージ：本装置は、血液と緩衝液を装置に供給し生成された画分を取り出すための外部流体リザーバを有するプラスチックマニホールドと機械的に連結されている。

装置の動作：外部圧力源を用いて緩衝液と血液のリザーバに2.4 PSIの圧力をかけ、液体供給を調節しパッケージ装置から取り出す。

試験状況：承諾した人間の大人の血液を、K2EDTAヴァキュテナー (366643、ベクトンディッキンソン、フランクリンレイクス、NJ) で採取する。生の血液は、上述した実施例の装置を用いて常温で9時間以内で処理される。血液からの有核細胞は、除核細胞 (赤血球と血小板) から分離され、1%ウシ血清アルブミン (BSA) (A8414-100ML、Sigma-Aldrich、St Louis、MO) を含みカルシウムとマグネシウムを除去したDulbeccoリン酸緩衝食塩水 (14190-144、Invitrogen、カールスバッド、CA) の緩衝液の流れにプラズマが供給される。

計測技術：Coulterインピーダンス血液分析器 (COULTER (R) Ac·T diff (TM)、Beckman Coulter、Fullerton、CA) を用いて完全な血液計数が確定される。

パフォーマンス：図12A - 12Fは、血液分析器が血液サンプルと廃棄物 (緩衝液、プラズマ、赤血球、血小板) と装置が生成する製品 (緩衝液と有核細胞) 画分とから作成した典型的なヒストグラムを示す。

a) サンプル番号	b) スループット	パフォーマンス測定基準		
		RBC 除去	血小板 除去	WBC損失
1	4 mL/hr	100%	99%	<1%
2	6 mL/hr	100%	99%	<1%
3	6 mL/hr	100%	99%	<1%
4	6 mL/hr	100%	97%	<1%
5	6 mL/hr	100%	98%	<1%

【実施例2】

【0208】

実施例2. シリコンデバイス多重14シングルステージ複式アレイ

図13A - 13Dは、本発明の装置の例であり、以下のように特徴付けられる：

大きさ：90 mm × 34 mm × 1 mm

アレイデザイン：1ステージ、隙間サイズ = 24 μm。分岐比 = 1 / 60。複式 (duplex)：二重バイパスチャネル

装置デザイン：多重14アレイ複式；流れの安定のためのフローレジスタあり

装置の製造：アレイとチャネルは、標準的な写真石版術とシリコン反応平凹版技術を用いてシリコンで製造される。エッチング深度は150 μmである。液体アクセス用の貫通口がKOH湿式エッチングを用いて設けられる。シリコン基板はエッチング面がシールされ、血液と反応しない感圧接着剤 (9795, 3M、St Paul、MN) を用いて封止された流体チャネルが形成される。

装置パッケージ：本装置は、血液と緩衝液を装置に供給し生成された画分を取り出すた

めの外部流体リザーバを有するプラスチックマニホールドと機械的に連結されている。

装置の動作：外部圧力源を用いて緩衝液と血液のリザーバに2.4PSIの圧力をかけ、液体供給を調節しパッケージ装置から取り出す。

試験状況：承諾した大人のドナーの人体血液を、K2EDTAヴァキュテナー(366643、ベクトンディッキンソン、フランクリンレイクス、NJ)で採取する。生の血液は、上述した実施例の装置を用いて常温で9時間以内で処理される。血液からの有核細胞は、除核細胞(赤血球と血小板)から分離され、1%ウシ血清アルブミン(BSA)(A8414-100ML、Sigma-Aldrich、St Louis、MO)を含みカルシウムとマグネシウムを除去したDulbeccoリン酸緩衝食塩水(14190-144、Invitrogen、カールスバッド、CA)の緩衝液の流れにプラズマが供給される。

計測技術：Coulterインピーダンス血液分析器(COULTER(R)Ac·Tdiff(TM)、Beckman Coulter、Fullerton、CA)を用いて完全な血液計数が確定される。

パフォーマンス：この装置は、17mL/時間で動作し、99%以上の赤血球の取り出しが達成され、95%以上の有核細胞が確保され、98%以上の血小板が取り出される。

【実施例3】

【0209】

実施例3. 胎児臍帯血の分離

図14A-14Dは、胎児臍帯血から有核細胞を分離するのに用いる装置の概略図である。

大きさ：100mm×28mm×1mm

アレイデザイン：3ステージ。隙間サイズ=第1、第2、第3ステージでそれぞれ18, 12, 8μm。分岐比=1/10。複式(duplex)：単一バイパスチャネル

装置デザイン：多重10アレイ複式；流れの安定のためのフローレジスタあり

装置の製造：アレイとチャネルは、標準的な写真石版術とシリコン反応平凹版技術を用いてシリコンで製造される。エッチング深度は140μmである。液体アクセス用の貫通口がKOH湿式エッチングを用いて設けられる。シリコン基板はエッチング面がシールされ、血液と反応しない感圧接着剤(9795, 3M、St Paul、MN)を用いて封止された流体チャネルが形成される。

装置パッケージ：本装置は、血液と緩衝液を装置に供給し生成された画分を取り出すための外部流体リザーバを有するプラスチックマニホールドと機械的に連結されている。

装置の動作：外部圧力源を用いて緩衝液と血液のリザーバに2.0PSIの圧力をかけ、液体供給を調節しパッケージ装置から取り出す。

試験状況：人体の臍帯血を、クエン酸ブドウ糖抗凝結剤を含むリン酸緩衝食塩水中に供給する。1mLの血液を、上述の装置を用いて常温で3mL/時間で48時間以内に処理する。血液からの有核細胞は、除核細胞(赤血球と血小板)から分離され、1%ウシ血清アルブミン(BSA)(A8414-100ML、Sigma-Aldrich、St Louis、MO)と2mM EDTA(15575-020、Invitrogen、カールスバッド、CA)とを含みカルシウムとマグネシウムを除去したDulbeccoリン酸緩衝食塩水(14190-144、Invitrogen、カールスバッド、CA)の緩衝液の流れにプラズマが供給される。

計測技術：細胞の塗沫標本と、廃棄画分(図15A-15B)が準備され、改良ライト・ギムザ染色が行われる(WG16、SigmaAldrich、St. Louis、MO)。

パフォーマンス：胎児有核赤血球が製品画分で観測され(図15A)、廃棄画分では不在である(図15B)。

【実施例4】

【0210】

実施例4. 母体血液からの胎児細胞の分離

実施例 1 で詳細に説明した装置およびプロセスを、免疫磁気親和性濃縮技術とともに用いて、母体血液から胎児細胞を分離する可能性が示された。

【0211】

試験状況：男の胎児をもつ承諾した妊婦ドナーからの血液を、人工中絶の直後に、K2 EDTA ヴァキュテナー（366643、ベクトンディッキンソン、フランクリンレイクス、NJ）で採取する。生の血液は、上述した実施例 1 の装置を用いて常温で 9 時間以内で処理される。血液からの有核細胞は、除核細胞（赤血球と血小板）から分離され、1%ウシ血清アルブミン（BSA）（A8414-100ML、Sigma-Aldrich、St Louis、MO）を含みカルシウムとマグネシウムを除去した Dulbecco リン酸緩衝食塩水（14190-144、Invitrogen、カールスバッド、CA）の緩衝液の流れにプラズマが供給される。次いで、有核細胞の画分が抗 CD71 マイクロビード（130-046-201、Miltenyi Biotech Inc.、Auburn、CA）でラベルされ、MiniMACS（TM）列（130-046-201、Miltenyi Biotech Inc.、Auburn、CA）を用いて製造者の指示書に従い濃縮される。最後に、CD71 陽性画分をガラススライドに置かれる。

10

計測技術：スポットされたスライドは、蛍光その場ハイブリダイゼーション（FISH）技術を用いて、製造者の指示書に従い Vysis プローブ（Abbott 研究所、Downer's Grove、IL）を用いて染色される。サンプルは、X および Y 染色体の発現により染色される。あるケースでは、既知のトリソミー 21 妊婦から得たサンプルも、染色体 21 で染められる。

20

パフォーマンス：有核細胞の画分（図 16）から用意された CD71 陽性集団内の男性細胞の確実な出現により、胎児細胞の分離が確認された。単一の異常症例試験では、トリソミー 21 病状もまた同定された（図 17）。

【0212】

以下の例は、本発明の装置の特定の実施例を示す。各装置の説明は、連続したステージの数、各ステージの隙間のサイズ、（フロー角度）、装置毎のチャンネル数（アレイ/チップ）を提供する。各装置は、DRIER を用いたシリコンで製造され、各装置は熱酸化層を具える。

【実施例 5】

30

【0213】

この装置は、単一のアレイに 5 つのステージを具える。

アレイ設計	5 ステージ 非対称アレイ	
隙間サイズ	ステージ 1	8 μm
	ステージ 2	10 μm
	ステージ 3	12 μm
	ステージ 4	14 μm
	ステージ 5	16 μm
フロー角度	1/10	
アレイ/チップ	1	

40

【実施例 6】

【0214】

この装置は複数ステージを具え、各ステージがバイパスチャンネルを有し二重化されている。装置の高さは 125 μm である。

アレイ設計	中央収集チャンネルを具える 対称3ステージアレイ	
隙間サイズ	ステージ1	8 μm
	ステージ2	12 μm
	ステージ3	18 μm
フロー角度	1/10	
アレイ/チップ	1	
その他	中央集中チャンネル	

10

【0215】

図18Aは、サイズ式選別装置の製造に用いるマスクを示す。図18B - 18Dはこのマスクの拡大図であり、入口、アレイ、出口が規定されている。図19A - 19Gは、サイズ式選別モジュールのSEMが示されている。

【実施例7】

【0216】

この装置は複数ステージを具え、各ステージがバイパスチャンネルを有し二重化されている。バイパスチャンネルの側面に「フィン」が設けられバイパスチャンネルからの液体がアレイに再び入らないようにしている。このチップはまた、オンチップチップフローレジスタ、すなわちアレイより流体抵抗が大きい入口と出口を具える。装置の高さは117 μmである。

20

アレイ設計	3ステージ対称アレイ	
隙間サイズ	ステージ1	8 μm
	ステージ2	12 μm
	ステージ3	18 μm
フロー角度	1/10	
アレイ/チップ	10	
その他	ラージフィン中央収集チャンネル オンチップフローレジスタ	

30

【0217】

図20Aは、サイズ式選別装置の製造に用いるマスクを示す。図20B - 20Dはこのマスクの部分の構成を示し、入口、アレイ、出口が規定されている。図21A - 21Fは、この例で用いられているサイズ式選別モジュールのSEMが示されている。

【実施例8】

【0218】

この装置は複数ステージを具え、各ステージがバイパスチャンネルを有し二重化されている。バイパスチャンネルの側面に「フィン」が設けられバイパスチャンネルからの液体がアレイに再び入らないようにしている。このチップはまた、オンチップチップフローレジスタ、すなわちアレイより流体抵抗が大きい入口と出口を具える。装置の高さは117 μmである。

40

アレイ設計	3ステージ対称アレイ	
隙間サイズ	ステージ1	8 μm
	ステージ2	12 μm
	ステージ3	18 μm
フロー角度	1/10	
アレイ/チップ	10	
その他	交互のラージフィン 中央集中チャンネル オンチップフローレジスタ channel	

50

【0219】

図14Aは、装置の製造に用いるマスクを示す。図14B - 14Dはこのマスクの部分の構成を示し、入口、アレイ、出口が規定されている。図22A - 22Fは、上記装置のSEMが示されている。

【実施例9】

【0220】

この装置は複数ステージを具え、各ステージがバイパスチャネルを有し二重化されている。Femlabを用いて「フィン」が最適化され、バイパスチャネルからの液体がアレイに再び入らないようにしている。フィンのアレイに最も近い縁部は、アレイの形状に倣っている。このチップはまた、オンチップチップフローレジスタ、すなわちアレイより流体抵抗が大きい入口と出口を具える。装置の高さは139 - 142 μm である。

10

アレイ設計	3ステージ対称アレイ	
隙間サイズ	ステージ1	8 μm
	ステージ2	12 μm
	ステージ3	18 μm
フロー角度	1/10	
アレイ/チップ	10	
その他	Femlab最適化中央集中チャネル (Femlab I) オンチップフローレジスタ	

20

【0221】

図23Aは、装置の製造に用いるマスクを示す。図23B - 23Dはこのマスクの部分拡大図であり、入口、アレイ、出口が規定されている。図24A - 24Sは、上記装置のSEMが示されている。

【実施例10】

【0222】

この装置は、単一ステージの、両アレイの端部からのアウトプットを受けるよう設けられたバイパスチャネルを有する複式装置を具える。この装置の障害物は楕円形である。アレイの境界はFemlabモデルである。このチップはまた、オンチップチップフローレジスタ、すなわちアレイより流体抵抗が大きい入口と出口を具える。装置の高さは152 μm である。

30

アレイ設計	単一ステージ対称アレイ	
隙間サイズ	ステージ1	24 μm
フロー角度	1/60	
アレイ/チップ	14	
その他	中央バリア 楕円形ポスト オンチップレジスタ Femlabモデルアレイ境界	

40

【0223】

図13Aは、装置の製造に用いるマスクを示す。図13B - 13Dはこのマスクの部分拡大図であり、入口、アレイ、出口が規定されている。図25A - 25Cは、実際の装置のSEMが示されている。

【0224】

上記明細書に記載したすべての公開、特許、および特許出願は、参照によりここに組み込まれる。当業者であれば、本発明の開示された方法およびシステムの様々なさまざまな変更や変形例を、本発明の意図および範囲を逸脱することなく理解することができる。本

50

発明を特定の実施例に関連して説明したが、クレームにある本発明は、このような特定の実施例に限定されるべきではない。とりわけ、本発明を実施するのに開示したモードの様々な変形例は、当業者であれば本発明の範囲に収まることを理解するであろう。

【0225】

他の実施例はクレームにある。

【図面の簡単な説明】

【0226】

【図1】図1は、サイズ式選別モジュールの一実施例を示す図である。

【図2】図2は、それぞれ流体力学的サイズが異なる個別の検体を通るサイズ式選別モジュールの一実施例を示す図である。

10

【図3】図3は、チーズ片形状のバイパス障害物を具えるサイズ式選別モジュールの一実施例を示す図である。

【図4】図4は、互いに平行な複数のサイズ式選別モジュールの一実施例を示す図である。

【図5】図5は、サイズ式選別モジュールの一実施例の選別能力を示すテーブルである。

【図6】図6は、捕獲モジュールで捕獲された細胞を示す写真である。

【図7】図7A - 7Cは、捕獲モジュールの様々な実施例を示す図である。

【図8】図8は、捕獲モジュールの一実施例を示す図である。

【図9】図9A - 9Dは、検出モジュールの様々な態様を示す図である。

【図10】図10A - Bは、ここに開示されるビジネス方法の実施例を示す図である。

20

【図11】図11A - 11Fは、本発明のサイズ式選別モジュール一例を示す図である。

【図12】図12A - 12Fは、装置で生成される血液サンプルからの血液学的検体により生成される典型的なヒストグラムである。

【図13】図13A - 13Dは、サイズ式選別モジュールの様々な実施例を示す図である。

【図14】図14A - 14Dは、サイズ式選別モジュールの様々な実施例を示す図である。

【図15】図15A - 15Bは、製品の細胞の塗沫標本 (cell smear) と無駄な部分 (waste fraction) を示す図である。

【図16】図16A - 16Fは、製品の細胞の塗沫標本 (cell smear) と無駄な部分 (waste fraction) を示す図である。

30

【図17】図17は、分離された胎児有核赤血球のトリソミー21病状を示す図である。

【図18】図18A - 18Dは、サイズ式選別モジュールを製造するのに用いるマスクの例を示す図である。

【図19】図19A - 19Gは、サイズ式選別モジュールのSEMの例を示す図である。

【図20】図20A - 20Dは、サイズ式選別モジュールを製造するのに用いるマスクの一実施例を示す図である。

【図21】図21A - 21Fは、サイズ式選別モジュールのSEMの例を示す図である。

【図22】図22A - 22Fは、サイズ式選別モジュールのSEMの例を示す図である。

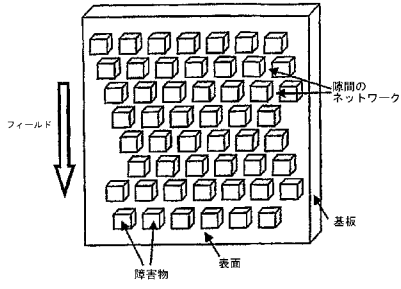
【図23】図23A - 23Dは、サイズ式選別モジュールのマスクと部分を示す図である。

40

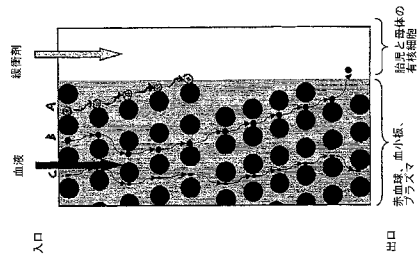
【図24】図24A - 24Sは、サイズ式選別モジュールのSEMの例を示す図である。

【図25】図25A - 25Cは、サイズ式選別モジュールの例を示す図である。

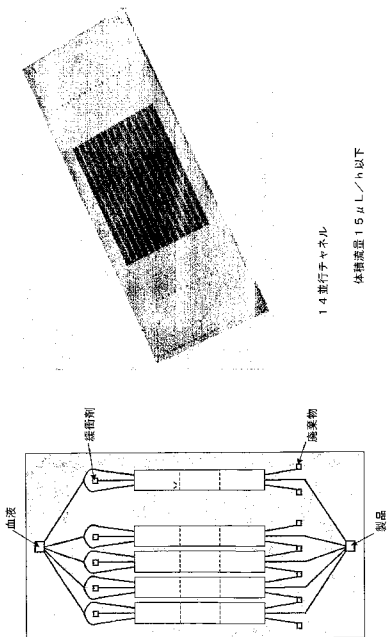
【 図 1 】



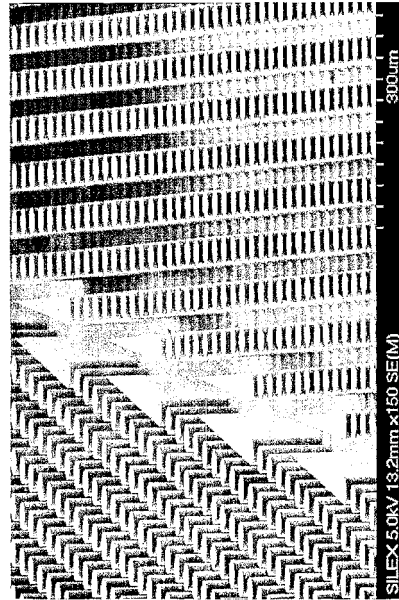
【 図 2 】



【 図 4 】



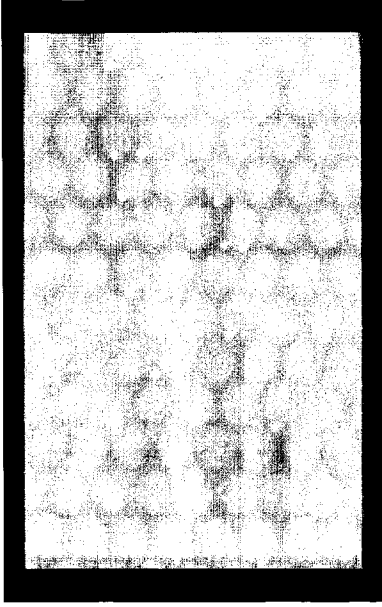
【 図 3 】



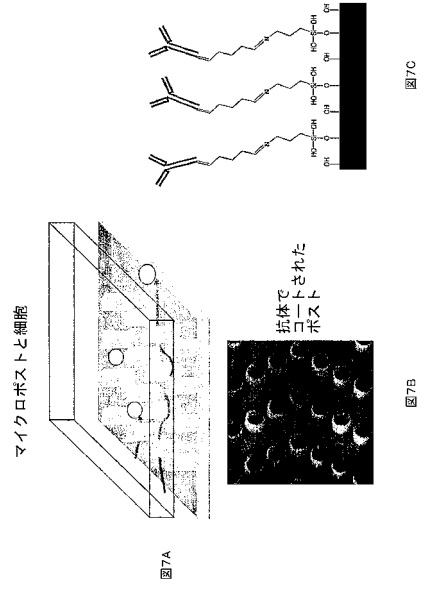
【 図 5 】

	平均	S.E.M	S.D.	N
% 有核細胞の保持率	98.14	1.80	23.76	174
% 新血球除去	99.60	0.03	0.37	167
% 血小板除去	98.67	0.73	8.54	138
% 生着力	98.92	1.00	0.29	12
流量 (mL/h)	5.85	0.14	1.83	172

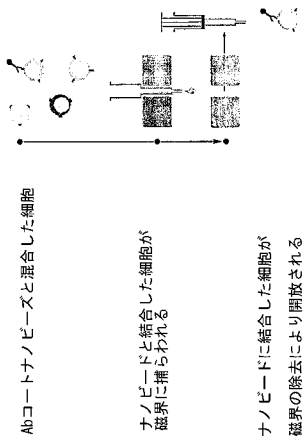
【 図 6 】



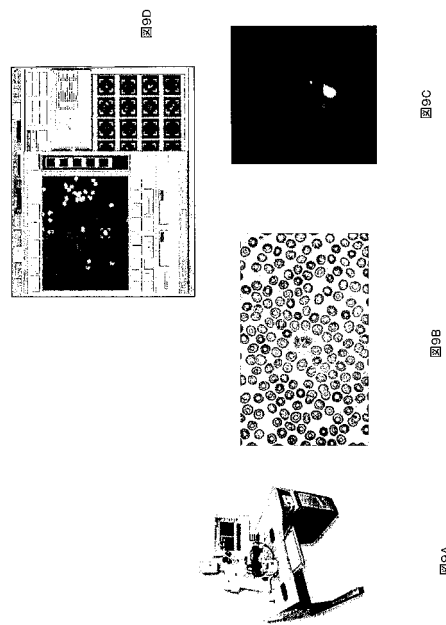
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】

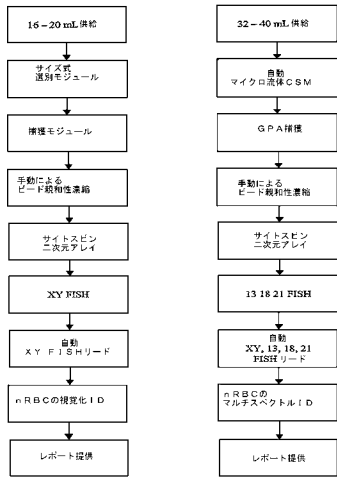


図10A

図10B

【 図 1 1 B 】

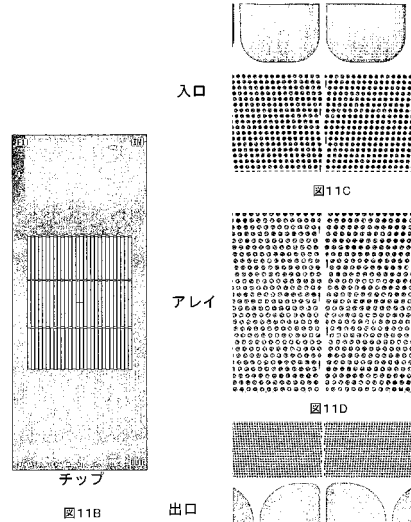


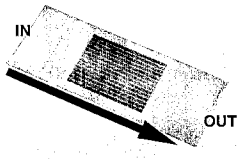
図11B

図11C

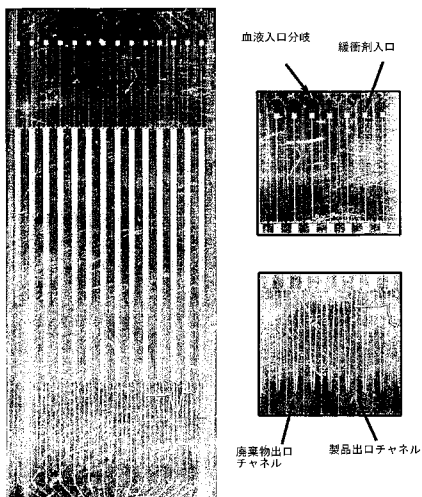
図11D

図11E

【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 F 】



【 図 1 2 】

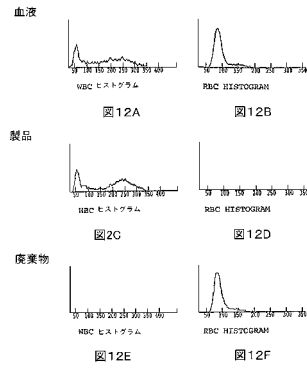


図12A

図12B

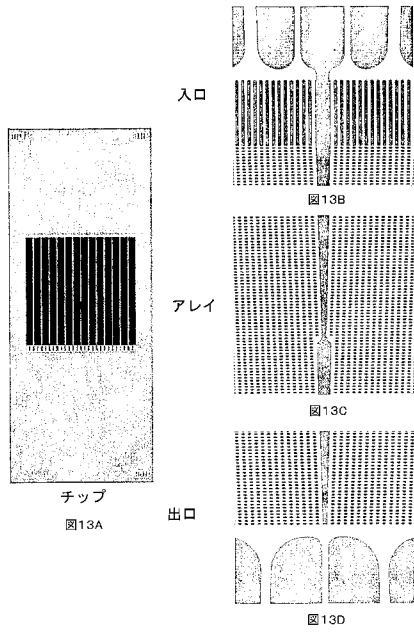
図12C

図12D

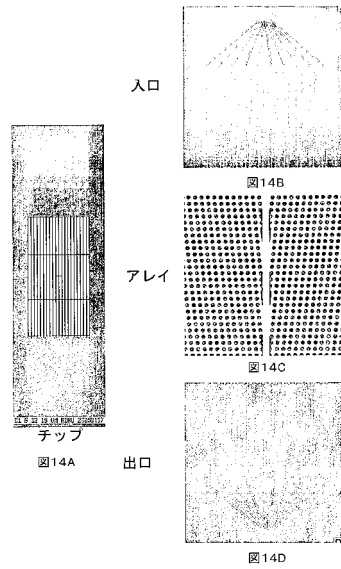
図12E

図12F

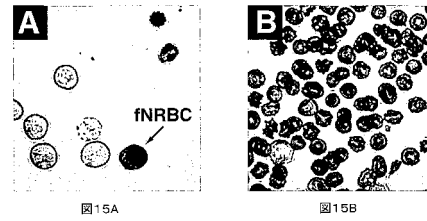
【 図 1 3 】



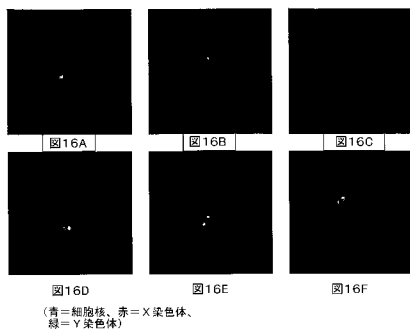
【 図 1 4 】



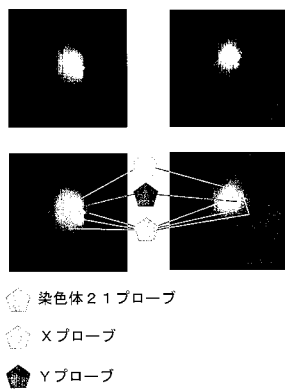
【 図 1 5 】



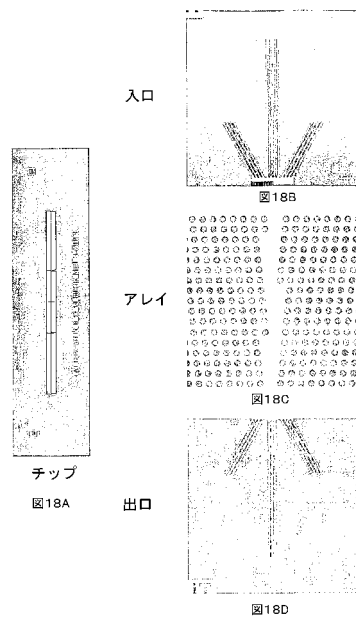
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 A 】

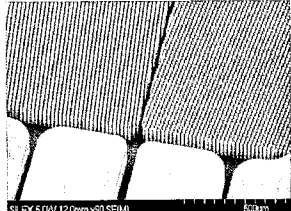


図21A

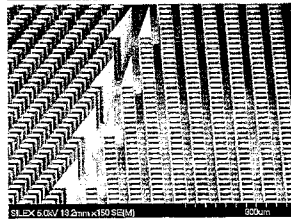


図21B

【 図 1 9 C 】



図19C



図19D

【 図 1 9 E 】



図19E



図19F

【 図 2 0 】

入口

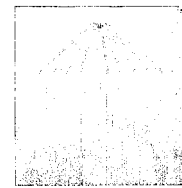


図20B

アレイ



チップ
図20A

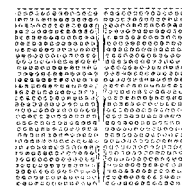


図20C

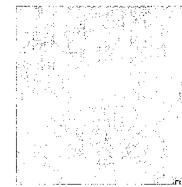
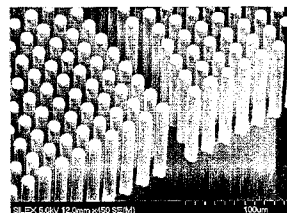


図20D

出口

【 図 1 9 G 】



【 図 2 1 A 】

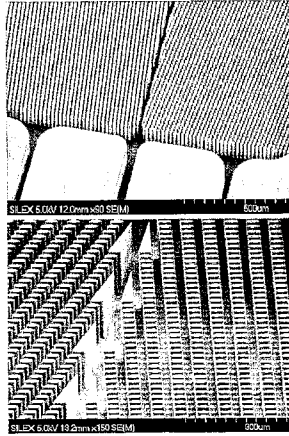


図21A

図21B

【 図 2 1 C 】

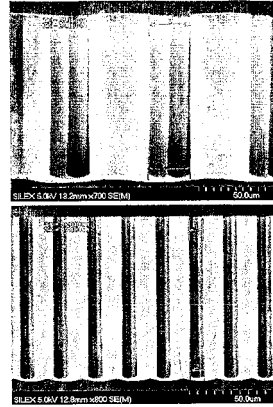


図21C

図21D

【 図 2 1 E 】

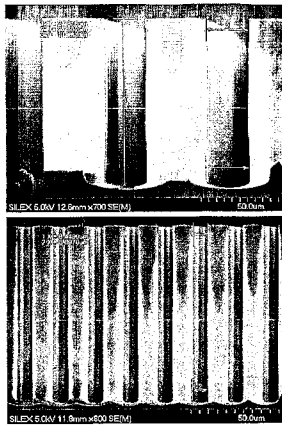


図21E

図21F

【 図 2 2 B 】

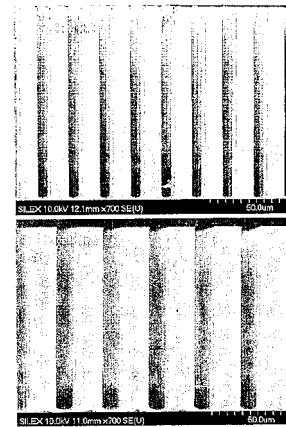
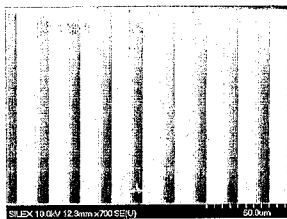


図22B

図22C

【 図 2 2 A 】



【 図 2 2 D 】

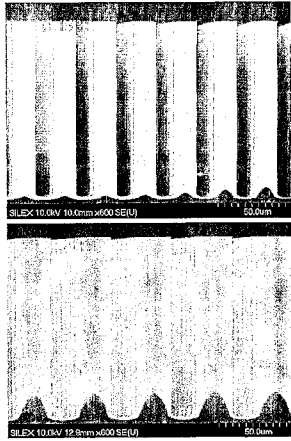
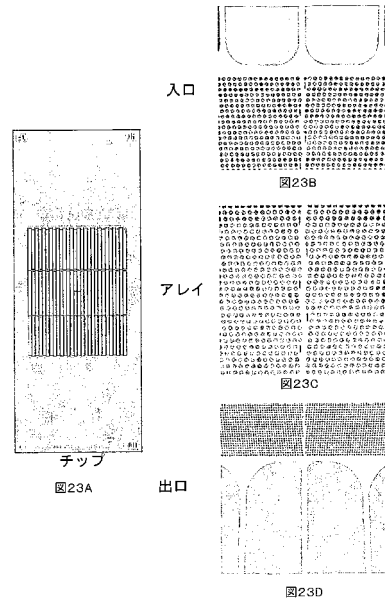


図22D

図22E

【 図 2 3 】



入口

図23B

アレイ

図23C

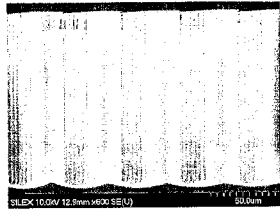
チップ

図23A

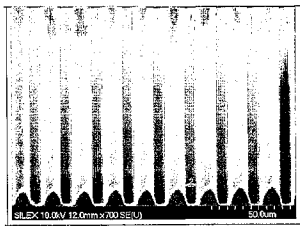
出口

図23D

【 図 2 2 F 】



【 図 2 4 A 】



【 図 2 4 D 】

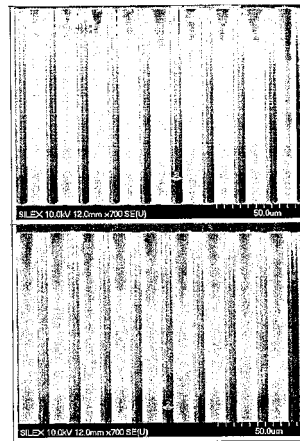


図24D

図24E

【 図 2 4 B 】

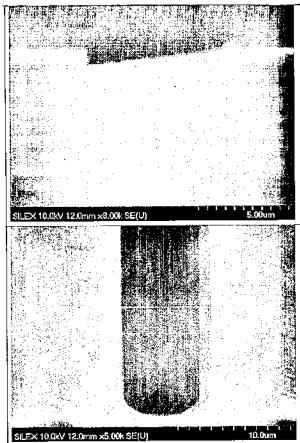


図24B

図24C

【 図 2 4 F 】

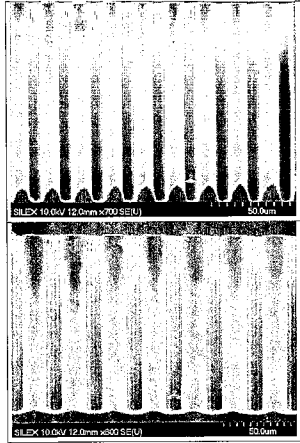


図24F

図24G

【 図 2 4 H 】



図24H

図24I

【 図 2 4 J 】

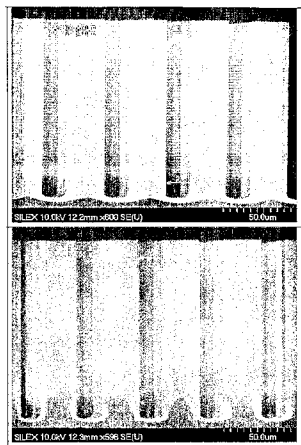


図24J

図24K

【 図 2 4 M 】

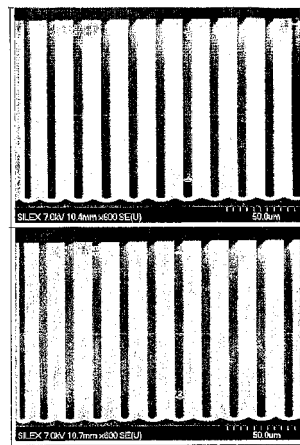
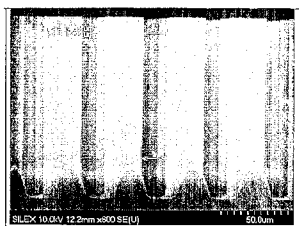


図24M

図24N

【 図 2 4 L 】



【 図 2 4 O 】

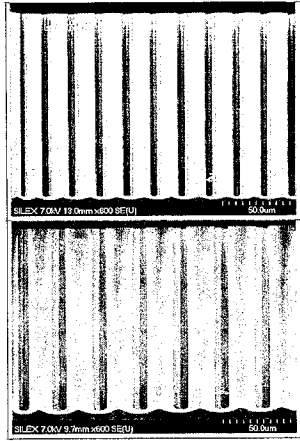


図24O

図24P

【 図 2 4 Q 】

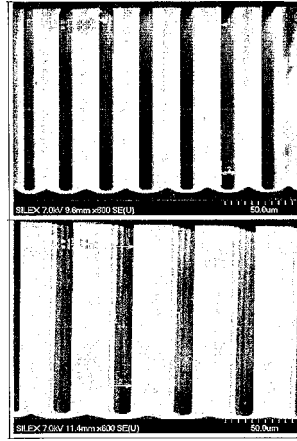
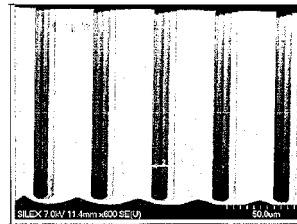


図24Q

図24R

【 図 2 4 S 】



【 図 2 5 A 】

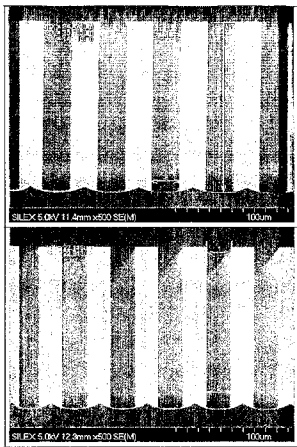


図25A

図25B

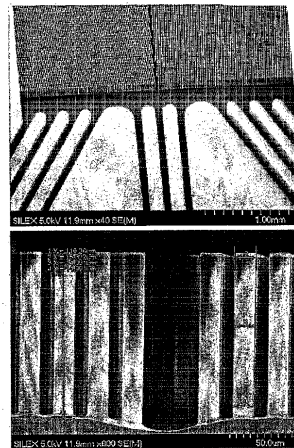
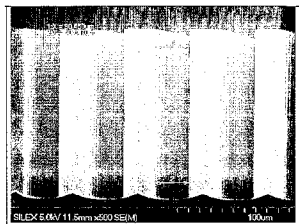


Fig. 19A

Fig. 19B

【 図 2 5 C 】



【手続補正書】

【提出日】平成20年5月12日(2008.5.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 第1の濃縮モジュールであって、

i) 第1の検体を第1の方向に、第2の検体を第2の方向に偏向させる障害物を含る1またはそれ以上の第1の流体力学的濃縮領域が、

i i) 主たる流れの中の第1の検体がアレイの縁部へ、第2の検体が小さい流れへと流れるよう構成された障害物アレイを含る1またはそれ以上の第1の流体力学的濃縮領域が、または、

i i i) 第1の検体用の第1の流路と第2の検体用の第2の流路とを規定する複数の二次元障害物アレイであって前記第1の検体と第2の検体は流体力学的直径が異なるアレイ、を含る第1の濃縮モジュールと、

b) 前記第1の濃縮モジュールと液体接続された第2の濃縮モジュールであって、

i) 前記第1の検体を濃縮する1またはそれ以上の磁気領域を含る、

a) 前記磁気領域がビード (beads) を含るか、

b) 前記磁気領域が障害物を含る、

i i) 酸化ヘモグロビンを還元する試薬を含む液体リザーバを含る、第2の濃縮モジュールと、

c) 選択的に、前記第2および第1の濃縮モジュールに連結されたセルカウンタを含ることを特徴とするシステム。

【請求項2】

請求項1のシステムにおいて、さらに、前記第1の検体を分析するためのコンピュータ実行可能なロジックを含る分析器を含ることを特徴とするシステム。

【請求項3】

請求項1のシステムにおいて、前記システムがさらに、データを保存するデータベースを含ることを特徴とするシステム。

【請求項4】

請求項2のシステムにおいて、前記分析器がさらに、顕微鏡、マイクロアレイ、またはセルカウンタを含ることを特徴とするシステム。

【請求項5】

請求項2のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、胎児のヘモグロビン、グロビン、グロビン、グロビン、G P A、i 抗原、C D 3 6、セレクチン、C D 7 1、またはこれらの組合せの存在による変色を検出することを特徴とするシステム。

【請求項6】

請求項2のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、第1の検体を選択的に結合するプローブの強度を検出することを特徴とするシステム。

【請求項7】

請求項2のシステムにおいて、前記コンピュータ実行可能なロジックは、トリソミー、胎児の性別、関心ある細胞の遺伝子または染色体異常、あるいはこれらの組合せを検出することことを特徴とするシステム。

【請求項8】

請求項1のシステムにおいて、前記サイズ式選別モジュールは、前記第1の検体を第1の方向へ決定論的に案内し、前記第1の検体より流体力学的サイズが小さな第2の検体を

第 2 の方向へと案内する二次元障害物アレイを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 9】

請求項 1 のシステムにおいて、互いに並列に液体接続された 2 またはそれ以上のサイズ選別モジュールを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 10】

請求項 1 のシステムにおいて、前記選別領域の障害物の間の隙間は 1000 ミクロン以下であることを特徴とするシステム。

【請求項 11】

請求項 1 のシステムにおいて、さらに、前記サイズ選別モジュールに液体接続され磁気粒子を含んだリザーバを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 12】

請求項 2 のシステムにおいて、前記分析器が、前記第 1 の検体中の 1 またはそれ以上の SNP を検出するよう構成されたマイクロアレイを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 13】

請求項 2 のシステムにおいて、前記分析器が、前記第 1 の検体中の mRNA レベルを検出するよう構成されたマイクロアレイを具えることを特徴とするシステム。

【請求項 14】

請求項 1 のシステムにおいて、前記障害物は、サンプルの流れを不均一に次の隙間へと案内する隙間により隔てられていることを特徴とするシステム。

【請求項 15】

請求項 1 のシステムにおいて、前記第 1 または第 2 のモジュールがさらに、1 またはそれ以上の抗体に結合された障害物を具えることを特徴とするシステム。

【請求項 16】

請求項 15 のシステムにおいて、前記抗体は選択的に、赤血球、白血球、胎児血液細胞、胎児有核血液細胞、癌細胞、上皮細胞、または幹細胞、前駆細胞、泡沫細胞、または血小板、を結合することを特徴とするシステム。

【請求項 17】

請求項 15 のシステムにおいて、前記抗体は、抗 CD71、抗 CD36、抗 CD45、抗 GPA、抗セレクトリン、抗炭水化物、抗抗原 I、および抗 E p C a m からなる群から選択されることを特徴とするシステム。

【請求項 18】

請求項 15 のシステムにおいて、前記第 1 の検体が、赤血球 (RBC)、有核赤血球 (NRBC)、胎児の RBC、胎児有核 RBC (fNRBC)、栄養膜、胎児の繊維芽細胞、白血球 (WBC)、感染 WBC、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、癌細胞、ウイルス細胞、バクテリア細胞、および原生動物からなる群から選択されることを特徴とするシステム。

【請求項 19】

請求項 1 のシステムにおいて、前記第 2 の濃縮モジュールは前記第 1 の検体または前記第 2 の検体を捕獲し、前記第 2 の濃縮領域は前記第 1 の濃縮領域と液体接続されていることを特徴とするシステム。

【請求項 20】

請求項 2 のシステムにおいて、前記分析器は PCR 増幅またはフローサイトメトリーに用いられることを特徴とするシステム。

【請求項 21】

請求項 1 のシステムにおいて、前記複数の二次元障害物はジグザグ配列 (staggered) であることを特徴とするシステム。

【請求項 22】

患者の状態に関連する特性を同定するシステムの製造における障害物の使用であって、請求項 1 のシステムにサンプルを適用するステップと、前記第 1 の検体を磁氣的に濃縮するステップと、

前記第 1 の検体の特性を判定するために前記サンプルからの前記第 1 の検体を分析するステップとを具えることを特徴とする使用。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 の使用において、前記第 1 の検体を磁氣的に濃縮するステップは、ヘモグロビンを酸化または還元する試薬を加えることにより、1 またはそれ以上の細胞を磁氣的にレンダリングするステップを具えることを特徴とする使用。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 の使用において、前記特性に基づいて関連する研究を実施するステップを具えることを特徴とする使用。

【請求項 2 5】

請求項 2 2 の使用において、前記特性は、前記第 1 の検体の数であることを特徴とする使用。

【請求項 2 6】

請求項 2 2 の使用において、前記特性は前記第 1 の検体の形態 (morphology) であることを特徴とする使用。

【請求項 2 7】

請求項 2 2 の使用において、前記特性は前記第 1 の検体の表現型であることを特徴とする使用。

【請求項 2 8】

請求項 2 2 の使用において、前記サンプルは血液サンプルであることを特徴とする使用。

【請求項 2 9】

請求項 2 2 の使用において、前記サンプルは妊娠 1 2 週以下の女性の血液サンプルであることを特徴とする使用。

【請求項 3 0】

請求項 2 2 の使用において、前記第 1 の検体は細胞型であることを特徴とする使用。

【請求項 3 1】

請求項 2 2 の使用において、前記第 1 の検体が、赤血球 (RBC)、有核赤血球 (NRBC)、胎児の RBC、胎児有核 RBC (fNRBC)、栄養膜、胎児の繊維芽細胞、白血球 (WBC)、感染 WBC、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、癌細胞、ウイルス細胞、バクテリア細胞、および原生動物であることを特徴とする使用。

【請求項 3 2】

請求項 2 2 の使用において、前記分析器は、染色体と結合した 1 またはそれ以上の核酸プローブからの信号を分析することを特徴とする使用。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 の使用において、前記染色体は、X 染色体、Y 染色体、染色体 2 1、染色体 1 3、および染色体 1 8 からなる群から選択されることを特徴とする使用。

【請求項 3 4】

請求項 2 2 の使用において、前記分析するステップは、顕微鏡、マイクロアレイ、またはセルカウンタで有核赤血球を分析するステップを具えることを特徴とする使用。

【請求項 3 5】

請求項 2 2 の使用において、前記分析ステップは、胎児の性別を分析するステップを具えることを特徴とする使用。

【請求項 3 6】

請求項 2 2 の使用において、前記特性は、染色体 1 3、染色体 1 8、染色体 2 1 (ダウン症)、ターナー症候群 (X 染色体の損傷)、クラインフェルター症候群 (XXY)、または他の性染色体あるいは常染色体の数の異常からなる群から選択されることを特徴とする使用。

【請求項 3 7】

請求項 2 2 の使用において、前記特性は、Wolf - Hirschhorn 症候群 (4

p -)、猫鳴き症候群 (5 p -)、ウィリアムズ症候群 (7 q 1 1 . 2 3)、プラダー・ウィリ症候群 (1 5 q 1 1 . 2 - q 1 3)、アンジェルマン症候群 (1 5 q 1 1 . 2 - q 1 3)、Miller - Dieker 症候群 (1 7 q 1 3 . 3)、Smith - Magenis 症候群 (1 7 p 1 1 . 2)、ディジョージ症候群および膜 - 心臓 - 顔面症候群 (2 2 q 1 1 . 2)、カルマン症候群 (X p 2 2 . 3)、ステロイドサルファターゼ不全 (S T S) (X p 2 2 . 3)、X連鎖魚鱗癬 (X p 2 2 . 3)、および網膜芽腫 (1 3 q 1 4) からなる群から選択されることを特徴とする使用。

【請求項 3 8】

サンプル中のバイオハザード検体を検出するフロースルー濃縮装置の製造における複数の障害物の使用であって、前記バイオハザード検体はサンプルにおいて濃度 1×10^{-3} 検体 / μL 以下に見られ、

前記サンプルを、前記検体の濃度を少なくとも 10,000 倍増大させるよう構成されたフロースルー濃縮装置にかけるステップと、

前記濃縮されたバイオハザード検体を分析するステップとを具備することを特徴とする使用。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 の使用において、前記バイオハザード検体が、バクテリア、原生動物、ウイルス、およびこれらのキメラを含む群から選択される病原体であることを特徴とする使用。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 の使用において、前記バイオハザード検体は、ペスト菌、炭疽菌、ボツリヌス菌、野兎病菌、コキシエラ菌、ブルセラ種、ブルクホルデリアついで骨、ブルクホルデリア仮性ついで骨、連鎖球菌、エボラウイルス、ラッサウイルス、SARS、大痘瘡、アルファウイルス、発疹チフスリケッチア、オウム病クラミジア、サルモネラ種、大腸菌 O 1 5 7 : H 7、コレラ菌、クリプトスポリジウムパルバム、ニパウイルス (Nipah virus)、ハンタウイルスからなる群から選択される病原体であることを特徴とする使用。

【請求項 4 1】

母体血液サンプルから第 1 の細胞型の 1 またはそれ以上の細胞を分離するよう構成されたサイズ式選別モジュールを具備し、前記第 1 の細胞型は妊婦の生体内ですべての血液細胞中 1 % 未満の濃度で見られ、

磁気的な濃縮により第 1 の細胞型の 1 またはそれ以上の細胞を分離するよう構成された第 2 の濃縮モジュールと、

ヘモグロビンを酸化または還元する試薬と、

前記 1 またはそれ以上の濃縮した細胞を分析して胎児の出産前診断を行うための一連の説明書を具備することを特徴とするキット。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載のキットにおいて、さらに、PCR 試薬、リーシス試薬、核酸プローブ、およびラベリング試薬からなる群から選択される 1 またはそれ以上の試薬を具備することを特徴とするキット。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 に記載のキットにおいて、前記 FISH 試薬は、X 染色体、Y 染色体、染色体 1 3、染色体 1 8、染色体 2 1 からなる群から選択された染色体と特に結合することを特徴とするキット。

【請求項 4 4】

請求項 4 1 に記載のキットにおいて、さらに、顕微鏡、マイクロアレイ、フローサイトメーターまたはセルカウンタを具備することを特徴とするキット。

【請求項 4 5】

請求項 4 1 に記載のキットにおいて、前記サイズ式選別モジュールは、前記第 1 の細胞型の 1 またはそれ以上の細胞を第 1 の方向へと決定論的に案内し、第 2 の細胞型の 1 またはそれ以上の細胞を第 2 の方向へ案内する二次元障害物アレイを具備することを特徴とする

キット。

【請求項 46】

請求項 41 に記載のキットにおいて、前記第 1 の細胞型が、赤血球 (RBC)、有核赤血球 (NRBC)、胎児の RBC、胎児有核 RBC (fNRBC)、栄養膜、胎児の繊維芽細胞、白血球 (WBC)、感染 WBC、幹細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、癌細胞、ウィルス細胞、バクテリア細胞、および原生動物からなる群から選択されることを特徴とするキット。

【請求項 47】

請求項 41 に記載のキットにおいて、前記第 2 の細胞型は除核赤血球であることを特徴とするキット。

【請求項 48】

請求項 41 に記載のキットにおいて、前記選別モジュールは、流れを続ける隙間へと不均一に案内する複数の隙間を規定する 1 またはそれ以上の二次元障害物アレイを具えることを特徴とするキット。

【請求項 49】

請求項 41 に記載のキットにおいて、さらに、前記胎児の性別を判定するよう構成されたプローブを含むことを特徴とするキット。

【請求項 50】

請求項 41 に記載のキットにおいて、さらに、染色体 13 の存在を判定するよう構成されたプローブを含むことを特徴とするキット。

【請求項 51】

請求項 41 に記載のキットにおいて、さらに、循環する有核赤血球の存在または数を判定するよう構成されたプローブを含むことを特徴とするキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/36202

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

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

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

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

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

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

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

Group 1) claims 1-38, 55-68, and 81-99, having independent claims 1, 30, 31, 55, 81, 82, are directed to a system comprising separation modules and an analyzer, where the modules use obstacles in the path of the analyte to concentrate the analyte.

Group 2) claims 39-54, 69-80, and 100-117, having independent claims 39, 69, and 100, are directed to a method for identifying a characteristic associated with a condition in a patient.

Groups 1 and 2 do not share a special technical feature that would otherwise provide a unifying contribution over the prior art. Therefore, unity is lacking.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group 1) claims 1-38, 55-68, and 81-99

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	A
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
	G 0 1 N 33/48	M
	G 0 1 N 37/00	1 0 1

- (31)優先権主張番号 11/229,328
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 11/228,454
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 11/229,037
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. フロッピー

- (74)代理人 100155310
 弁理士 柴田 雅仁
 (74)代理人 100156339
 弁理士 米村 道子
 (72)発明者 カブー, ラヴィ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2, ウォータータウン, スイート130, アーセナルストリート480
 (72)発明者 トナー, メメット
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 4, ボストン, フルーストリート55
 (72)発明者 ファン, ローティン, リチャード
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2, ウォータータウン, スイート130, アーセナルストリート480
 (72)発明者 バーバー, トム
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2, ウォータータウン, スイート130, アーセナルストリート480
 (72)発明者 カルヴァーリョ, ブルース
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2, ウォータータウン, スイート130, アーセナルストリート480
 (72)発明者 グレイ, ダレン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2, ウォータータウン, スイート130, アーセナルストリート480
 (72)発明者 バリス, ユリシス

- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 4 , ボストン , フルーストリート 5 5
 (72)発明者 ウォルシュ, ジョン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2 , ウォータータウン, スイート 1 3 0 , アーセ
 ナルストリート 4 8 0
 (72)発明者 グリシャム, マイケル
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2 , ウォータータウン, スイート 1 3 0 , アーセ
 ナルストリート 4 8 0
 (72)発明者 トンブキンス, ロン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 4 , ボストン , フルーストリート 5 5
 (72)発明者 シュミット, マーティン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2 , ウォータータウン, スイート 1 3 0 , アーセ
 ナルストリート 4 8 0

F ターム(参考) 2G045 AA03 AA24 AA28 BA13 BA14 BB24 CA02 CA11 CA25 CB02
 CB21 DA51 FA16 FA35 FB02 FB03 JA07
 2G052 AA30 ED01
 2G058 DA07
 4B029 AA07 BB11 CC01 FA03 FA04
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QS12 QS31 QS36 QS39
 QX02