

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成19年9月20日(2007.9.20)

【公表番号】特表2007-502979(P2007-502979A)

【公表日】平成19年2月15日(2007.2.15)

【年通号数】公開・登録公報2007-006

【出願番号】特願2006-523888(P2006-523888)

【国際特許分類】

G 0 1 N	35/08	(2006.01)
B 0 1 F	3/08	(2006.01)
B 0 1 F	5/00	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
B 8 1 B	1/00	(2006.01)
G 0 1 N	35/02	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	35/08	A
B 0 1 F	3/08	Z
B 0 1 F	5/00	A
B 0 1 F	5/00	D
G 0 1 N	37/00	1 0 1
B 8 1 B	1/00	
G 0 1 N	35/02	D

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月2日(2007.8.2)

【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】

マイクロ流体装置中で液体を混合する方法であつて、

(a)少なくとも第一の液体及び第二の液体を第一のチャンバに供給して、合わせた液体を形成することと、

(b)(a)の前記合わせた液体を、前記第一のチャンバから、前記第一のチャンバと液体連通した少なくとも一つの毛管通路を介して第二のチャンバに放出して、前記合わせた液体の混合を完了することとを含む方法。

【請求項2】

(a)の前記合わせた液体を二つ以上の毛管通路に通して前記第二のチャンバに放出する、請求項1記載の液体混合方法。

【請求項3】

(a)の前記合わせた液体を少なくとも二つの毛管通路に通して前記第二のチャンバに放出する、請求項2記載の液体混合方法。

【請求項4】

前記第二のチャンバが少なくとも一つの毛管通路を介して少なくとも第三のチャンバと液体連通している、請求項1記載の液体混合方法。

【請求項5】

(a) の前記合わせた液体を小滴の形態で前記第二のチャンバに放出する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記第一のチャンバが、(a) の合わせた液体の量の少なくとも約 2 倍の容積を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記第二のチャンバが、(a) の合わせた液体の量の少なくとも約 2 倍の容積を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記第一のチャンバが、(a) の合わせた量を保持するために必要な深さの少なくとも約 2 倍の深さを有する、請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

前記第二のチャンバが、(a) の合わせた量を保持するために必要な深さの少なくとも約 2 倍の深さを有する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

第一のチャンバ中の液位の上に少なくとも $100 \mu\text{m}$ の空間がある、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

第二のチャンバ中の液位の上に少なくとも $100 \mu\text{m}$ の空間がある、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記少なくとも一つの毛管通路が $1 \sim 2000 \mu\text{m}$ の断面寸法を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

前記少なくとも一つの毛管通路が $200 \sim 1000 \mu\text{m}$ の断面寸法を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

前記少なくとも一つの毛管通路が $0.5 \sim 100 \text{ mm}$ の長さを有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも一つの毛管通路が $1 \sim 50 \text{ mm}$ の長さを有する、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

三つ以上の毛管通路が前記第一及び第二のチャンバの間で液体連通している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

前記第一及び第二のチャンバの少なくとも一方が、前記合わせた液体の混合を支援するための段又は斜面を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

(a) の前記合わせた液体の前記少なくとも一つの毛管通路中の速度が少なくとも 1 mm/sec である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 19】

前記第一及び第二の液体をウェルから毛管通路に通して前記第一のチャンバに提供する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 20】

合わせた液体を完全混合したのち、さらなる処理のために下流のチャンバに移す、請求項 1 記載の方法。

【請求項 21】

(a) 少なくとも第一の液体及び第二の液体を受け、合わせるための第一のチャンバと

(b) 前記少なくとも第一及び第二の液体の完全混合のための、少なくとも一つの毛管

通路を介して前記第一のチャンバと液体連通している第二のチャンバとを含むマイクロ流体装置。

【請求項 2 2】

前記第一及び第二のチャンバが二つ以上の毛管通路を介して液体連通している、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 3】

前記第一及び第二のチャンバが少なくとも二つの毛管通路を介して液体連通している、請求項 2 2 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 4】

前記第二のチャンバが少なくとも一つの毛管通路を介して少なくとも第三のチャンバと液体連通している、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 5】

前記第一のチャンバが、前記第一及び第二の容器の合わせた容積の少なくとも約 2 倍の容積を有する、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 6】

前記第二のチャンバが、前記第一及び第二の容器の合わせた容積の少なくとも約 2 倍の容積を有する、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 7】

前記第一のチャンバが、前記第一及び第二の容器の合わせた容積を保持するために必要な深さの少なくとも約 2 倍の深さを有する、請求項 2 5 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 8】

前記第二のチャンバが、前記第一及び第二の容器の合わせた容積を保持するために必要な深さの少なくとも約 2 倍の深さを有する、請求項 2 6 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 2 9】

第一のチャンバ中の液位の上に少なくとも $100 \mu\text{m}$ の空間がある、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 0】

第二のチャンバ中の液位の上に少なくとも $100 \mu\text{m}$ の空間がある、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 1】

前記少なくとも一つの毛管通路が $1 \sim 2000 \mu\text{m}$ の断面寸法を有する、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 2】

前記少なくとも一つの毛管通路が $200 \sim 1000 \mu\text{m}$ の断面寸法を有する、請求項 3 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 3】

前記少なくとも一つの毛管通路が $0.5 \sim 100 \text{ mm}$ の長さを有する、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 4】

前記少なくとも一つの毛管通路が $1 \sim 50 \text{ mm}$ の長さを有する、請求項 3 3 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 5】

三つ以上の毛管通路が前記第一及び第二のチャンバの間で液体連通している、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 6】

前記少なくとも一つの通路が、合わせた液体の少なくとも 1 mm/sec の速度を提供するサイズである、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 7】

前記第一及び第二のチャンバの少なくとも一方が、前記第一及び第二の液体の混合又は除去を支援するための段又は斜面を含む、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 8】

前記第一のチャンバが、毛管通路を介して、前記少なくとも第一及び第二の液体を収容するウェルと液体連通している、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【請求項 3 9】

前記第二のチャンバが、混合が完了する前の前記液体の早期移動を防ぐための手段を含む、請求項 2 1 記載のマイクロ流体装置。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】**【発明の詳細な説明】**

【発明の名称】マイクロ流体装置における混合

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本発明は、一般にマイクロ流体装置に関し、特に、血液、尿などのような生物学的試料の分析に使用される装置に関する。このようなマイクロ流体装置は、少量の液体試料を試薬と接触させて、分析対象物の有無の定性的又は定量的計測を提供する。通常、計量された試料が、試薬又は試薬との接触に備えて試料を準備するために使用されるコンディショニング剤を含有する1個以上のチャンバを通過する。試料の量は普通、 $10 \mu L$ 未満であり、チャンバは同程度のサイズである。チャンバは毛管通路によって相互接続され、これらの毛管通路中を試料が毛管力又は加えられる力、たとえば遠心力によって移動する。

【0002】

多くの場合、後続の反応に備えて試料を希釈又は他の方法で準備するため、試料をコンディショニング液と接触させることが必要である。たとえば、試験は、多くの場合、干渉を最小限にし、反応条件、たとえばpH、補因子又はイオン強度を制御し、複合体、たとえば多座配位子、タンパク質、たとえば抗体-抗原複合体、核酸、ポリ炭水化物、脂質又は金属を形成し、細胞、たとえばバクテリア、赤血球又は白血球を溶解させ、分析対象物及び代謝産物を検出可能な形態に反応させるために、試料を接触させることを要する。試料とコンディショニング液との混合は、マイクロ流体装置の小さなサイズに関連する問題を呈する。毛管力によって狭い通路を通過する少量の液体の移動は、液体と通路壁との相互作用を伴う。生物学的試料で一般的であるように液体が水性であり、通路壁が親水性で狭い、たとえば幅 $200 \sim 200 \mu m$ 、深さ $1 \sim 200 \mu m$ であるならば、液体の界面エネルギーが、液体を通路中で移動させることができる力を発生させる。大きな表面対容積比は、液体に対する表面効果が大きいことを意味する。液流の特性に関する無次元単位であるレイノルズ数は非常に低く、液流が層流であり、乱流ではないことを示す。層流は、その速度が壁からの距離とともに増大するストリームライン流である。

【0003】

層流が優勢である場合、試料とコンディショニング液との混合は困難である。混合は普通、乱流状態を発生させることによって実施される。マイクロフュイディックスに関する従来技術の多くでは、層流中の液体は、一つの液層から別の液層への分子の拡散によって密接して液体の混合物を形成する。マクロスケール技術、たとえば機械的攪拌を使用するアクティブマイクロミキサでは、活動的要素を含めることが、非常に複雑で高価な装置を要することがある。

【0004】

米国特許第6,136,272号で、Weiglらは、二つ以上の浅い層流層を形成して一つの層から隣接層への分子の拡散を促進する装置を開示している。特許権者らは、彼らの装置は、レイノルズ数が1未満、好ましくは0.1未満になるように設計されたものであると述べている。特許権者らは、レイノルズ数が1を超えると、流れは層流になるが、そ

のようなシステムは、流動パターンが乱れたとき、乱流を発生させやすいということを観測した。したがって、特許権者らのシステムは、拡散混合によって層流を保証するように設計されたものである。もう一つの米国特許出願公開公報第2002/0076300号(Weiglら)では、層流中の平行な流れの間で増強された拡散を発生させている。

【0005】

米国特許出願公開公報第2002/0097532号は、多くの流路を有するディスクを開示している。ディスクを回転させる間に二つの液体を層流としてジグザグ流路に通すと、拡散によって混合が起こるといわれている。

【0006】

米国特許出願公開公報第2001/0042712号には、Tセンサが示されている。センサが液体試料を指示薬液と接触させると、流れは、平行な層流として、それらの間に拡散を起こしながら流れる。

【0007】

米国特許出願公開公報第2001/0048637号は、平行な層流の流れの中央よりも壁で大きい拡散によって生じる「バタフライ効果」を解消する同様な装置を開示している。

【0008】

米国特許出願公開公報第2002/0076350号は、層流の流れの間の拡散を改善するもう一つの方法を開示している。平行な層流の流れを90°方向転換させながら移動させて流れのアスペクト比を変化させ、それによって流れの間の拡散を改善している。

【0009】

マイクロミキサがU.S.6,190,034B1及びU.S.6,241,379B1号に記載されている。液体は、薄い層を発生させて拡散によって混合を促進することによって混合される。

【0010】

先に論じた特許及び出願は、試薬流を試料流に隣接させて通過させ、拡散によって反応を起こさせたのち、それを計測することに関する。他の特許及び出願では、液体が層流であるにもかかわらず、様々な手段によって混合を試みている。

【0011】

米国特許出願公開公報第2001/0048900号では、チャンバ内で渦流を発生させることによって別々の流れを混合している。一部の実施態様では、発明者らは、320のレイノルズ数が達成され、第一及び第二の流体が1~2000のレイノルズ数を有するということを指摘している。したがって、流れは、層流と乱流との間の領域にある。

【0012】

米国特許第5,921,678号は、入口流路から90°方向転換した流路中で液体の二つの流れが正面衝突し、いっしょに出る液体ミキサを開示している。流れのレイノルズ数は2000~6000であるといわれている。エッジの鋭いピラーが、混合流の交点で乱流を発生させるのに役立つと示されている。

【0013】

米国特許出願公開公報第2002/0048535号は、装置を回転させて液体を一つの容器から別の容器に移す間に二つの液体を合わせる装置を示している。

【0014】

米国特許第6,264,900号は、速やかな化学反応を実施するための平行な層流の流れの混合を提供している。

【0015】

米国特許第6,065,864号は、混合チャンバ内で循環流を発生させるために気泡制御ポンプ及び弁を含むマイクロ混合システムを開示している。

【0016】

本発明者らは、マイクロ流体装置中の液体試薬又はコンディショニング液と試料流体との効果的な混合を提供することを望んだ。このような混合は、混合される液体の粘度及

び量の間の不適合によって困難になる。この問題に対する本発明者らの解決方法を以下で詳細に記載する。

【0017】

発明の概要

液体は、マイクロ流体装置中、少なくとも二つの液体を第一のチャンバに小出しして液体どうしを合わせる方法によって混合される。好ましい実施態様では、液体は、液体が入っているウェルから第一のチャンバに小出しされる。第二工程で、合わせた液体を第一のチャンバから少なくとも一つの毛管通路を介して第二のチャンバに放出して液体どうしを混合する。一部の実施態様では、二つ以上の平行な毛管通路が使用される。もう一つの実施態様では、第二のチャンバは、少なくとも一つの毛管通路を介して少なくとも第三の混合チャンバと液体連通している。

【0018】

液体の混合は、液体が入り、通過し、出る狭い流路に対して大きいチャンバに入り、そこを出る結果として起こる。液体の流動パターンにおける乱れが、発生することが観測される混合の原因であると考えられる。場合によっては、液体が毛管通路を出て大きなチャンバに入るとき小滴が形成することが観測されている。このような小滴が、チャンバ内で凝集するとき、混合に貢献するのかもしれない。

【0019】

混合工程は、第一のチャンバ中の液体を一つ以上の毛管通路に通して第二のチャンバに押し込むことによって完了する。本発明の方法を使用するマイクロ流体装置では、毛管通路は、液体の性質によって求められるように、 $1 \sim 2000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $200 \sim 1000 \mu\text{m}$ の断面寸法を有する。二つのチャンバの間の毛管の長さは、 $0.5 \sim 100 \text{ mm}$ 、好ましくは $1 \sim 50 \text{ mm}$ である。毛管通路の断面形状が決定的に重要であるとは考えられない。通常、通路は長方形の断面を有するが、形状は、通路を形成するために使用される方法によって決まる。典型的な設計における寸法は、液体の粘度及び加えられる力を考慮しつつ通路中で 1 mm/sec 以上の液速度を提供するように選択される。

【0020】

二つのチャンバそれぞれは、液体どうしを混合した合計量よりも大きい。好ましくは、各チャンバの容積は、合わせた液体の量の約2倍以上の大きさである。各チャンバの深さは、液体がチャンバに入ったのち液体の上方に自由空間を提供するのに十分な深さである。好ましくは、液体の上方の空間は、チャンバに入る液体が、たとえば約 $100 \mu\text{m}$ 以上の小滴に分離することを可能とするのに十分な空間である。より好ましくは、チャンバの深さは、混合される合わせた液体の量を保持するために必要な深さの約2倍である。毛管通路は、好ましくは、チャンバ中の液体の上方の自由空間中に位置する。

【0021】

好ましい実施態様の詳細な説明

マイクロチャネル中の流れ

本発明を使用するマイクロ流体装置は通常、約 $1 \sim 2000 \mu\text{m}$ 、好ましくは約 $200 \sim 1000 \mu\text{m}$ の範囲の断面寸法を有する流路を使用する。一般的に長方形である断面を流路が有する場合、寸法とは、長方形の対角線をいうことができる。小さめの流路が分析される試料中の成分を効果的にろ別することができるため、このような流路の最小寸法は、多くの実際の用途で、約 $5 \mu\text{m}$ であると考えられる。問題なければ、より小さな寸法を使用してもよい。好ましい範囲の流路は、毛管力だけで液体試料を移動させることを可能にする。また、試料流体に対して疎水性になるように処理された毛管壁によって、又は流路寸法の顕著な変化によって移動を止めることも可能である。流れに対する抵抗には、たとえばポンピング、真空、電気浸透、加熱、吸収材、追加的な毛管力又は遠心力によって圧力差を加えることによって打ち勝つことができる。その結果、マイクロ流体装置中で実施される分析のための要求に応じて、液体を計量し、装置の一つの領域から別の領域に移動させることができる。

【0022】

圧力差（たとえば遠心力）、流体物性、流体表面張力、毛管壁の界面エネルギー、毛管サイズ及び分析される流体に含まれる粒子の界面エネルギーを関連させるためには、数学モデルを使用することができる。毛管を通過する流体の流量及び所望の疎水性又は親水性の程度を予測することが可能である。これらの要因の関係から以下の一般原則を導くことができる。

【0023】

所与の通路の場合、液体と通路表面との相互作用が液体の移動に対して有意な影響を及ぼすこともあるし、及ぼさないこともある。通路の表面对容積比が大きい、すなわち断面積が小さい場合、液体と通路壁との間の相互作用が非常に有意になる。これは、約200 μm 未満の呼び径の通路に関して、液体試料及び壁の界面エネルギーに対して毛管力が優勢である場合に特に当てはまる。壁が液体で濡れている場合、液体は、外力を受けることなく、通路中を移動する。逆に、壁が液体で濡れていない場合、液体は、通路から抜けようとする。これらの一般的な傾向を利用すると、液体を通路を通して移動させたり、異なる断面積を有する別の通路との接合部で移動を止めたりすることができる。液体が静止しているならば、圧力差によって、たとえば遠心力を加えることによって動かすことができる。異なる断面積又は界面エネルギーを有する通路どうしの接合部で必要な圧力差を加えることができる、空気圧、真空、電気浸透、加熱、吸収材、さらなる毛管力などをはじめとする他の手段を使用してもよい。本発明では、高い毛管力が利用可能であり、毛管ストップに打ち勝たなければならない短い期間を除いて、外力を要することなく、毛管力だけで液体を移動させることを可能にする。しかし、より小さな通路は本来、生物学的試料又は試薬の中の粒子による閉塞を受ける可能性がより高い。その結果、通路壁の界面エネルギーは、試験される試料流体、たとえば血液、尿などとの使用に関する要求に応じて調節される。この特徴は、より融通の利く分析装置設計を可能にする。

【0024】

マイクロ流体分析装置

本発明の分析装置は「チップ」と呼ぶこともできる。チップは一般に小さく平坦であり、典型的には約1～2平方インチ（25～50平方mm）であるか、半径が約40～80mmのディスクである。試料の量は小さくなる。たとえば、試験ごとに約0.1～10 μL しか含まないが、試料の総量は10～200 μL の範囲であることができる。試料流体及び試薬を保持するチャンバは、試料を容易に見ることができ、試料の反応から生じる変化を適当な器具によって計測することができるよう、比較的幅広く浅くなる。相互接続する毛管通路は通常、1～2000 μm 、好ましくは200～500 μm の範囲の断面寸法を有する。形状は、通路を形成するために使用される方法によって決まるが、長方形の断面を有する通路が好ましい。通路の深さは、試料が粒子を含有する多くの実際の用途では、少なくとも5 μm であるが、試料の性質が許すならば、より小さくてもよい。

【0025】

毛管及びチャンバを形成することができるいくつかの方法、たとえば射出成形、レーザ融食、ダイヤモンドミリング又はエンボス加工があるが、チップのコストを下げるために射出成形を使用することが好ましい。一般に、チップのベース部が、チャンバ及び毛管の所望のネットワークを含む。試薬化合物を所望のチャンバに配置したのち、ベースの上にトップ部を取り付けてチップを完成させる。

【0026】

チップは普通、1回の使用ののち廃棄処分されることになっている。したがって、チップは可能な限り廉価であると同時に、試薬及び分析される試料と適合する材料で製造される。大部分の場合、チップは、プラスチック、たとえばポリカーボネート、ポリスチレン、ポリアクリレート又はポリウレタンで製造されるが、代替的に、ケイ酸塩、ガラス、口ウ又は金属から製造することもできる。

【0027】

毛管通路は、液体試料又は試薬によって固体面に形成される接触角に関して定義される疎水性又は親水性に調節される。通常、表面は、表面に対する水の接触角が90°未満で

あるならば親水性とみなされ、その接触角が90°よりも大きいならば疎水性とみなされる。好ましくは、通路表面でのプラズマ重合によって界面エネルギーを調節する。本発明の分析装置はまた、毛管壁の界面エネルギーを制御するために使用される他の方法、たとえば親水性又は疎水性材料による被覆、グラフト又はコロナ処理によって製造することもできる。意図する試料流体との使用に備えて毛管壁の界面エネルギーを調節してもよい。たとえば、疎水性通路の壁への沈着物を防ぐため、又は液体が通路中に残らないことを保証するためにである。本発明のマイクロ流体装置における大部分の通路の場合、液体が表面を濡らす傾向にあり、表面張力が液体を通路中で流れさせるため、表面は一般に親水性である。たとえば、毛管通路の界面エネルギーは、表面に対する水の接触角が、通路が全血と接触する場合には10°～60°になり、通路が尿と接触する場合には25°～80°になるように調節される。

【0028】

毛管を通過する液体の移動は、その名が示すように液体が毛管を通過して流れることを防ぐ毛管ストップによって阻止することができる。毛管通路が親水性であり、液流を促進するならば、疎水性の毛管ストップ、すなわち、疎水性の壁を有する小さめの通路を使用することができる。小さなサイズと非湿潤性の壁との組み合わせが液体の進入に対抗する表面張力を生じさせるため、液体は疎水性ストップを通過することができない。あるいはまた、毛管が疎水性であるならば、チャンバと毛管との間にストップは必要ない。チャンバ中の液体は、液体によって対抗する表面張力に打ち勝ち、液体を疎水性通路に通すのに十分な力、たとえば遠心力が加えられるまでは、毛管に入ることを阻止される。しかし、液体の流れを開始させるために遠心力しか要らない。ひとたび疎水性通路の壁が液体と完全に接触すると、液体の存在が疎水性表面に関連するエネルギー障壁を下げるため、対抗力は減少する。その結果、液体はもはや流れるために遠心力を要しない。必要ではないが、速やかな分析を促進するため、液体が毛管通路を通って流れる間、遠心力を加え続けることが好都合であるかもしれない。

【0029】

疎水性ストップが親水性毛管中に位置している場合、疎水性ストップの効果に打ち勝つために、圧力差が適用されなければならない。一般に、必要な圧力差は、液体の表面張力、親水性毛管とのその接触角のコサイン及び毛管の寸法の変化の関数である。すなわち、高い表面張力を有する液体は、低い表面張力を有する液体よりも疎水性ストップに打ち勝つために必要な力が少なくて済む。親水性毛管の壁を濡らす、すなわち低い接触角を有する液体は、より高い接触角を有する液体よりも疎水性ストップに打ち勝つために必要な力が大きくなる。疎水性流路が小さければ小さいほど、加えなければならない力が大きくなる。

【0030】

毛管通路が親水性である場合、試料液体（水性であると仮定する）は当然、さらなる力を要することなく、毛管を通って流れる。毛管ストップが必要であるならば、一つの代替方法は、上記のようにストップとして働くことができる狭めの疎水性区分を使用することである。毛管が親水性であるとしても親水性ストップを使用することもできる。このようなストップは毛管よりも幅広かつ深く、「毛管ジャンプ」を形成し、したがって、液体の表面張力が、液体の流れを促進する低めの力を発生させる。毛管と幅広のストップとの間の寸法の差が十分であるならば、液体は、毛管ストップへの入口で停止する。液体は、最終的にはストップの親水性壁に沿って徐々に進入するが、適切な形状設計により、壁が親水性であるとしてもストップが効果的になるようこの動きを十分に遅らせることができる事がわかった。

【0031】

親水性又は疎水性ストップに打ち勝つために遠心力が加えられるチップを設計するためには、実験又は計算機フローシミュレーションを使用して、回転速度を調節することによって必要な力を提供することによって液体試料を必要に応じて動かすことができるよう、チップ上の液収容チャンバの位置を設計し、相互接続毛管通路の大きさを決めることを可

能にするのに有用な情報を提供することができる。

【0032】

マイクロ流体装置は、分析対象物を計測する分析手法の必要性に応じて多くの形態をとることができる。マイクロ流体装置は通常、乾燥又は液状の試薬又はコンディショニング物質を含有するチャンバを接続する毛管通路のシステムを用いる。分析手法は、試料を希釈し、分析対象物を後続の反応への用意のために予め反応させ、干渉性化合物を除去し、試薬を混合し、細胞を溶解し、生体分子を捕捉し、酵素反応を実施し、又は結合イベント、染色もしくは析出のためにインキュベートすることによる、計量された試料の準備を含むこともある。このような準備工程は、試料の計量の前、最中又は後に、ただし、分析対象物の計測を提供する反応を生ずる前に実施することができる。

【0033】

このような分析手法では、試料をコンディショニング液又は試薬液と合わせ、混合チャンバに移したのち、後続の処理に送る。試料と試薬又はコンディショニング液との密な混合が正確かつ再現精度の高い結果にとって重要であることは明白である。周知であるとおり、マイクロ流体装置中の流れは通常、層流であり、すなわち、液体の粘度が流動する液体の慣性よりも大きな影響を及ぼして、液体が乱れることなく線形に流れになる。層流状態の一つの結果は、二つ以上の液体の混合が、主に分子拡散から生じるため、ゆっくりであるということである。先に論じたように、一部のマイクロ流体装置は、層流中の液層と液層との間の拡散を改善するように設計されている。これらの装置の多くは、完全混合を起こすことを意図したものではないが、他の装置では、液流どうしの密接のための備えが設けられている。

【0034】

本発明では、完全混合が望まれる。装置の適切な設計によって徹底的な混合を達成することができ、それにより、液体試料を異なる粘度及び量を有する液体試薬又はコンディショニング剤と混合した均一な混合物が作られるということがわかった。

【0035】

液体の混合

正確な分析結果を得なければならないならば、試料と多量の液体試薬又はコンディショニング剤との混合が重要である。本明細書で記載するチャンバと毛管との組み合わせで徹底的な混合が起こることは証明されているが、混合が起こる過程は十分には解明されていない。従来技術の多くは、層流が効率的な混合を阻止すると仮定し、したがって、平行に流れる薄い液層を形成して拡散混合を促進することを重視している。本発明者らは、彼らの方法で、混合に有利な局在性効果が起こるが、それを測ることは困難であると考えている。液体は毛管を通過するが、それは層流としてであり、したがって、ほとんど混合は起こらないと予想するであろう。しかし、液体が、比較的大きなチャンバと接続する毛管に入り、そこを出るとき、液体が加速又は減速し、別個の縁の周囲を流れると何らかの局在性の渦流又は乱流が発生するということは考えられる。したがって、流れは名目上層流性であるかもしれないが、毛管及びチャンバの壁と液体との交わるところで生じる効果が液体の混合に貢献するのかもしれない。さらには、遠心（又は他の）力の適用によって液体にエネルギーを加えて、液体を付勢して毛管ストップに打ち勝たせる。液体は、その初期位置から毛管を通過して大きなチャンバに入るとき、加速し、減速する。液体が毛管から出るとき小滴がしばしば形成することが観測されている。異なる液体を合わせる小滴の形成が液体の混合を誘発するのかもしれない。個々の小滴を合わせることが、層状化と類似した過程でさらなる混合を提供すると推測される。すなわち、二つの不相溶性の液体が、それらを連続的に分割し、層状化することによって合わされるならば、最終的に、層は、区別不可能であるほど薄くなる。したがって、何千もの小滴が合わされるならば、二つの液体の分離ははっきりせず、液体は実質的に完全に混合する。また、液体の細分化が進み、分子が移動しなければならない距離が減るにつれ、分子拡散によってある程度の混合が起こると推測される。混合が起こったのち混合の程度を決定することができるが、必要なマイクロ流体機構の設計は、混合される液体の相対量及びそれらの物性に依存して異な

り、実験的確認を要するかもしだい。

【0036】

混合過程のこの概説は様々な液体に当てはまる。しかし、使用される条件は、混合される液体の粘度及び相対量に依存して変更を要する。粘稠な液体を粘度がはるかに低い液体と混合することが、同様な低い粘度を有する二つの液体を混合するよりも困難であるということは明白である。また、二つの粘稠な液体の混合は、均一に実施することが困難であろう。著しく異なる量を有する二つの液体を合わせることは、等しい量の液体を混合するよりも困難であると予想されよう。

【0037】

特定のパラメータを使用して、本発明にしたがって液体の混合を起こすのに必要な条件を決定することができることがわかった。一般に、二つ以上の液体を第一のチャンバの中で合わせ、それを、少なくとも一つの接続する毛管通路を介して第二のチャンバに出すと、そこで液体が混合工程を完了する。一つのそのような工程が、以下に論じる図1の簡略図で示されている。液体の移動は通常、小さな通路の使用に固有の流れに対する抵抗及び液体を流れから阻止するために加えられる毛管ストップから生じる抵抗に打ち勝つための力の適用を要する。多くの場合、遠心力がこの目的に使用されるが、必要な力を発生させることができ、空気圧、真空、電気浸透、吸収材、さらなる毛管力などをはじめとする他の方法を使用してもよい。加えられる力は、毛管通路中で1mm/sec以上の液流を発生させるのに十分な力である。これらの通路は、液体の物性によって決まるよう、1μm~2000μm、好ましくは200~1000μmの断面寸法を有する。通路は、チップ上のチャンバ及び通路の配置に依存して、0.5~100mm、好ましくは1~50mmの長さを有する。毛管通路の寸法と対応するチャンバの寸法との違いが大きいため、一つのチャンバから別のチャンバへの液体の移動が乱流を発生させる。さらには、液体の表面張力が、液体が毛管通路を出て、混合のためのより大きなチャンバに入る地点で形成することが観測されている小滴の原因であると考えられる。小滴は、遠心力(一般的な場合)によって受けチャンバの外に押し出され、そこで再び合わさる。

【0038】

チャンバは、様々な形状であることができるが、通常、ほぼ円形又は正方形である。チャンバは、段又は斜面のような内部構造を含むことができる。このような構造は、液体の混合に対して小さな影響しか有しないと考えられるが、他の理由で含めることができる。混合チャンバ中、混合される液体の上方に十分な空間を設けることが重要であると考えられる。約0.1~50μLを収容する一般的なチャンバの中では少なくとも100μmの自由空間が必要であると考えられている。好ましくは、チャンバは、混合される液体の合計量の約2倍の容積を有し、チャンバの深さは、チャンバ中の液位の深さの約2倍であろう。大きめのチャンバ及び大きめの深さが混合を改善すると推測されるが、最適ではないかもしれない。小さめのチャンバ及び小さめの深さは、満足な結果を提供することができるが、液体の上方に小さめの空間しか得られないため、混合が損なわれると予想される。

【0039】

図1a及びbは、マイクロ流体装置中で起こるような本発明の混合を簡略形態で示す。容器10中の試料液は、毛管ストップ12に打ち勝つための力、たとえば遠心力を加えることによって解放されるまで、容器10中に保持される。同様に、液体試薬又はコンディショニング液、たとえば緩衝溶液は、必要な力が加えられるまで、毛管ストップ16によって容器14中にとどまる。二つの液は毛管を通じて第一のチャンバ18に流れ込む。チャンバ18は、試料及び第二の液を同時に受けて、それらの液がチャンバ18に入るとき予備的混合が起こるようにする。大部分の場合、混合は十分ではなく、第二のステップが必要である。合わさった液体は、少なくとも一つの毛管通路20を通じて第一のチャンバ18を離れ、第二の混合チャンバ22に入る。液体は、毛管20を離れ、混合チャンバに入るととき小滴を形成することができ、それにより、小滴が形成されたとき小滴内で液体が混合する。小滴が混合チャンバ22の底で再び合わさるととき、さらなる混合が達成される。

【 0 0 4 0 】

図1のもう一つの実施態様では、三つの毛管通路、たとえば20、20a及び20bを使用して、第一のチャンバ18を第二のチャンバ22に接続している。以下、実施例1におけるように、四つ以上の毛管を使用してもよい。好ましくは、毛管は、各毛管中の速度が異なって、異なるサイズの小滴を作り、混合をさらに改善するよう、同じ直径を有しない。多数の毛管が使用されるならば、それらは、出て行く液体どうしがチャンバ22内で出合うように配設することができる。

【 0 0 4 1 】

図2A及び2Bに示すもう一つの代替態様は、異なる粘度を有する液体どうしを混合する場合に特に有用である。毛管20等は、予備混合チャンバ24中に放出し、そこからさらなる毛管21等が合わさった液体を混合チャンバ22に運ぶ。さらなる予備混合チャンバを設けて混合をさらに改善してもよい。両方の断面図1B及び2Bでは、毛管通路20及び21が通常、より深いチャンバを含むチップの上部に配置されるということが見てとれる。したがって、液体に力が加えられると、液体は、通路まで上昇したのち、次のチャンバに入る。

【 0 0 4 2 】

効果的な混合を実際に提供することがわかったいくつかの実施態様を記載したが、特定の変形が特定の場合に考慮されるということが理解されよう。一つの代替方法は、第一のチャンバに入る前に別々の液体を供給する毛管どうしを合わせる方法である。これは、液速度が増すにつれ、合わせた毛管中である程度の混合を発生させ、それが、それ以上の混合をチャンバへの進入によって発生させることにつながるという利点を有するであろう。さらに、局在性の渦流又は乱流を発生させるための微細構造を第一のチャンバに設けて混合を改善してもよい。もっとも簡単な場合には、液体を、はじめにウェル10及び14に入れのではなく、直接、第一のチャンバ18に入れることもできる。

【 0 0 4 3 】

多数の毛管を使用して液体を第二の混合チャンバに供給する場合、毛管が異なる直径を有してもよく、液流／小滴が混合チャンバに入るとき衝突するように毛管を配設してもよいということをすでに示唆した。もう一つの代替方法は、第二の混合チャンバに入る前でいくつかの毛管を複雑にして、進入によって発生する渦流及び液速度の変化に伴う利点を得ることであろう。また、混合を支援するための微細構造を第二の混合チャンバに設けてもよい。

【 0 0 4 4 】

図3に示すマイクロ流体装置は、特定の分析手法で使用されるものとして実施例3で詳細に説明する。装置は、チャンバ18中の液体を、毛管14及びチャンバ16に含まれる計量された試料と混合する。液体はチャンバ20に受けられ、混合チャンバ30に移され、そこから混合液が分析のために流出する。

【 0 0 4 5 】

本発明のもう一つの態様は、さらなる処理のための下流側チャンバへの混合液の移動に関する。混合は、液体が移される前に完了すべきであるということは明白である。混合が完了する前の液体の早期移動を防ぐために可能ないくつかの手段が考慮されている。一つの方法では、混合液は、混合ウェル中の液体の通常の深さよりも上に位置する毛管に入る。液体を混合チャンバ中で所定位置に保持する遠心力が減少したのち、液体は、チャンバの壁に沿ってはい上がり、出口毛管に達することができることがわかった。第二の方法では、出口毛管には、混合チャンバ中の液位よりも下から入るが、必要な力の適用によって水圧ストップの抵抗に打ち勝つまでは入らない。第三の方法では、出口毛管は混合チャンバ中の液体の深さよりも上に位置し、微細構造、たとえば出口毛管に通じる溝斜面を設けることにより、液体が毛管力によって移動する自然な傾向を支援する。

【 0 0 4 6 】

用途

マイクロ流体装置には数多くの用途がある。分析は、血液、尿、水、唾液、髄液、腸液

、食品及び血漿をはじめとする多くの生物学的流体の試料に対して実施することができる。血液及び尿が特に対象である。試験する流体の試料を試料ウェルに入れたのち、一つ以上の計量毛管又はウェルの中で分析量になるまで計量する。計量した試料を、タンパク質、細胞、小さな有機分子又は金属をはじめとする分析対象物に関して試験する。そのようなタンパク質の例は、アルブミン、HbA1c、プロテアーゼ、プロテアーゼ抑制因子、CRP、エステラーゼ及びBNPを含む。分析することができる細胞としては、大腸菌、シュードモナス、白血球、赤血球、ピロリ菌、A群連鎖球菌、クラミジア及び単核症がある。検出することができる金属としては、鉄、マンガン、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム及びマグネシウムがある。

【0047】

多くの用途では、試薬と試料との反応によって発する色を計測する。吸光度、反射率、透過率及び発光、たとえば蛍光、リン光、ルミネセンスならびに近及び遠赤外、ラマンならびに紫外線波長における他の変化を検出するために配置されたセンサを使用すると、試料の他の分光分析が可能である。また、装置中の小さなウェルに配置した電極を使用すると、試料の電気的計測を実施することも可能である。そのような分析の例は、電流滴定、インピーダンス測定、電位差検出法に基づく電気化学的シグナル変換器を含む。例えば、酸化及び還元化学反応の検出ならびに結合事象の検出を含む。

【0048】

マイクロ流体装置で使用することができる様々な試薬方法がある。試薬は、発されるシグナルの強さが臨床試料中で計測される分析対象物の濃度に比例するような変化を起こす。これらの試薬は、指示染料、金属、酵素、ポリマー、抗体、電気化学的に反応性の成分及び担体上に乾燥付着させた他の様々な化学物質を含有する。多くの場合に使用される担体は、様々な試料吸収性及び輸送性を有する紙、膜又はポリマーである。担体は、マイクロ流体装置の試薬チャンバに導入することができる。

【0049】

試薬に関して多数の用途が可能である。たとえば、分析対象物を第一のチャンバの中で試薬と反応させたのち、反応した試薬をさらなる反応のために第二のチャンバに送ることができる。また、試薬を第一のチャンバ中の液体に再懸濁させ、反応のために第二のチャンバに移すこともできる。分析対象物又は試薬を第一又は第二のチャンバに捕捉し、非結合試薬対結合試薬の判定を実施することができる。第三の液体試薬を使用して、第二のチャンバ中に捕捉された物質を洗浄し、物質を廃棄チャンバに移すことができる。

【0050】

非結合試薬対結合試薬の判定は、マルチゾーンイムノアッセイ及び核酸アッセイで特に有用である。これらの装置に適合させることができるマルチゾーンイムノアッセイには様々なタイプがある。免疫クロマトグラフィーアッセイへの適用の場合には、試薬とフィルタとが個別のチャンバの中に配置され、クロマトグラフィーカーが作用しないときには物理的に接触していなくてもよい。イムノアッセイ又はDNAアッセイは、バクテリア、たとえばグラム陰性種（たとえば大腸菌、エンテロバクター、シュードモナス、クレブシエラ）及びグラム陽性種（たとえば黄色ブドウ球菌、腸球菌）の検出のために開発することができる。イムノアッセイは、タンパク質及びペプチド、たとえばアルブミン、ヘモグロビン、ミオグロブリン、-1-ミクログロブリン、免疫グロブリン、酵素、糖タンパク、プロテアーゼ抑制因子、薬物及びサイトカインの完全なパネルのために開発することができる。たとえば、Greenquistの米国特許第4,806,311号「Multizone Analytical Element Having Labeled Reagent Concentration Zone」1989年2月21日、Liottaの米国特許第4,446,232号「Enzyme Immunoassay with Two-Zoned Device Having Bound Antigens」1984年5月1日を参照すること。

【0051】

乾燥試薬が再溶解される潜在的な用途としては、ろ過、沈降分析、細胞溶解、細胞選別（質量差）及び遠心分離がある。固相（たとえばマイクロビーズ）上での試料分析対象物の濃縮を使用して感度を改善することができる。濃縮したマイクロビーズは、連続遠心分

離によって分離することもできる。それぞれが別個の結果を出す多数の流路を可能にする多重化（たとえば、多様な試薬チャンバの同時平行及び／又は逐次的な計量）を使用することもできる。多重化は、入口と流動的に接続した多数の計量毛管ループを含む毛管配列、あるいは計量供給通路及び／又は各計量毛管ループに接続された毛管ストッパの配列によって実施することができる。二次的な力、たとえば磁力との組み合わせを装置設計で使用することができる。磁性ビーズのような粒子が、試薬のための、又は試料成分、たとえば分析対象物もしくは干渉性物質の捕捉のための担体として使用される。密度のような物性による粒子の分別（分留と同様）である。

【0052】

以下、実施例3は、糖尿病患者の状態を示すことができる患者血液中の糖化ヘモグロビン（HbA1c）含量を計測するための試験を実施する際に使用される本発明を例示する。使用した方法は、数多くの特許、最近のものとしては米国特許第6,043,043号の主題である。正常には、糖化ヘモグロビン濃度は3～6%の範囲である。しかし、糖尿病患者では、それが約3～4倍の高さに増大することがある。試験は、ヘモグロビンが約100日間にわたって暴露されていた平均血中グルコース濃度を計測する。ヘモグロビンA1c中の糖化N末端ペプチド残基に特異的に開発されたモノクロナール抗体を色付きラテックス粒子で標識し、血液試料と接触させて、その標識抗体を糖化ヘモグロビンに付着させる。標識抗体を付着させる前に、まず、Lewisの米国特許第5,258,311号に記載されているように、血液試料を変性剤／酸化剤、たとえばチオシアノ酸リチウムとの接触によって変性させる。次に、変性し、標識した血液試料を凝集試薬と接触させると、形成する濁りが、試料中に存在する糖化ヘモグロビンの量と比例する。また、糖化されているヘモグロビンの割合を提供するため、存在するヘモグロビンの総量を計測する。血液試料と変性剤／酸化剤との混合が本発明にしたがって実施される。

【0053】

実施例1

図1に示す全体構造を有する、チャンバ18及び22を接続する五つの平行な毛管20等を含むマイクロ流体装置を製造した。

【0054】

試料ウェル10にフェノールレッド溶液10μLを緩衝剤（pH4.0）とともに充填した。ウェル14にフェノールレッド溶液（pH7.0）10μLを充填した。長さ10mmの毛管によって試料及び試薬チャンバを第一のチャンバ18に接続した。各毛管は、深さ200μm、幅700μmであり、0.4μLを含有するものであった。第一のチャンバ18は、直径5.5mm、深さ1.5mmであり、容量が約36μLであった。第二のチャンバ22は、直径5.5mm、深さ1.1mmであり、容量が約26μLであった。装置をプラットフォームに載せ、約28mmの距離のところで2500rpmで回転させてストッパ12及び16の抵抗に打ち勝ち、ウェル10及び14から液体を同時に第一のチャンバ18に送った。混合液は、第一のチャンバ18と第二のチャンバ22とを接続する五つの毛管通路（20等）を直ちに通過した。各毛管は、長さ3.5mm、深さ200μm、幅200μmであった。第二のチャンバ22に収集された液体の色は一様な黄色であり、完全混合が起つたことを示した。

【0055】

ひとたび遠心力を解除されると、液体は第二の混合チャンバ22の側面に沿って上昇し、出口毛管（図1には示さず）を満たすことができることがわかった。

【0056】

実施例2

一つの毛管通路だけで第一のチャンバ18と第二のチャンバ22とを接続するという点で実施例1の装置とは異なるもう一つのマイクロ流体装置を製造した。また、第二のチャンバ22には、遠心力が加えられる方向に下がる5連続の段を設けた。第一のチャンバ18は、直径5.5mm、深さ1.5mmであり、容量が約36μLであった。第二のチャンバ22は、幅5mm、長さ7mm、平均深さ約1.2mmであり、容量が約46μLであった。一

つの毛管（長さ 3 mm、深さ 200 μm、幅 500 μm）が段付き斜面の上に出ていた。混合チャンバと、希釈チャンバに供給する二つの毛管とは、実施例 1 と同じ寸法であった。

【0057】

フェノールレッド溶液（pH 7.0）10 μLをウェル 10 に加え、フェノールレッド溶液 10 μLを緩衝剤（pH 4）とともにウェル 14 に加えた。装置を、毛管ストッパに打ち勝つのに十分な速度で回転させ、二つの溶液を斜面付き希釈チャンバに送り、さらに混合チャンバに送った。混合チャンバ中の液体の色は一様であり、完全混合が起こったことを示した。

【0058】

実施例 3

この実施例では、図 3 に示すタイプのマイクロ流体チップで HbA1c の試験を実施した。内部構造の界面エネルギーは、表面に対して 25° の水の接触角を提供するように調節し、ポリプロピレンフィルムのふた（Excel 2930）で覆った。血液試料を試料導入口 10 から導入すると、そこから毛管作用によってプレチャンバ 12 まで進み、さらに計量毛管 14 に達した。補助的な計量ウェル 16 があってもよいが、試料サイズがさらなる容積を要する場合だけ設けられる。毛管 14 及びウェル 16 中の試料の量は 0.3 μL であった。変性剤 / 酸化液（9.62 μL）（Sigma 哺乳動物細胞溶解 / 抽出剤）をウェル 18 に収容した。それを第一のチャンバ 20（18.84 μL）に出し、同時に、距離 29 mm のところで 1200 rpm で回転させることによる遠心力の適用によって毛管ストッパ（図示せず）に打ち勝つことにより、計量ウェル 16 及び対応する計量毛管 14 を空にした。第一のチャンバ 20 が血液試料及び変性剤 / 酸化剤のための空間を提供した。合わせた液を、30 × 30 μm の断面寸法を有する長さ 2000 μm の毛管通路 3 本のセットに通して移した。第二のチャンバ 30 が液体を受け、混合した。力を解除すると、流体がチャンバ 30 の上から出て、毛管通路 23 を通ってチャンバ 24 に入った。43 mm の距離のところで 2500 rpm で回転させることにより、過剰な液体を廃棄ウェル 31 に移した。

【0059】

チャンバ 24 が、プレコンディショニングされた試料と、乾燥基材上に配置された標識モノクロナール抗体との均一な接触を提供し、第二の計量区域として作用した。チャンバ 24 に通じる毛管中の試料の量は 2.0 μL であった。非結合標識試料と、基材上に配置された凝集剤との接触がチャンバ 26 中で起こって発色し、この色を計測して試料中の糖化ヘモグロビンの量を測定した。53 mm の距離のところで 2500 rpm で回転させることによって遠心力を適用して、チャンバ 24 中のインキュベートされた複合体及びチャンバ 22 中の洗浄緩衝剤をチャンバ 26 に出した。残りのウェルは、過剰な試料（28）、過剰な変性試料（31）及び試料をチャンバ 26 中の基材に引き込むために使用される吸上げ材（32）のための空間を提供した。

【0060】

試料 2 μL をピペットで試料導入口 10 に移すと、そこから、チップ（図示せず）内に位置する通路を通過し、プレチャンバ 12、計量毛管 14 及び補助的な計量チャンバ 16 に進入した。過剰な試料は、湿潤度検出器を含むあふれオーバーフロー ウェル 28 に通過した。遠心力は適用しなかったが、400 rpm までを使用してもよい。毛管 14 及び計量チャンバ 16 の容積によって試料サイズ（0.3 μL）を測定した。ウェル 16 と第一のチャンバ 20 とを接続する毛管の入口にある毛管ストッパが、この実施例ではチップを 1200 rpm で回転させることによって提供される遠心力によって打ち負かされるまで、血液試料のさらなる移動を阻止した。また、1200 rpm を使用して変性剤 / 酸化剤溶液 10 μL を計量された血液試料とともに第一のチャンバ 20 及びその後さらに第二の混合チャンバ 30 に移すまで、毛管ストッパにより、変性剤 / 酸化剤溶液（Sigma 哺乳動物細胞溶解 / 抽出剤）がウェル 18 から出ないようにした。第一のチャンバ 20 の容積は、変性剤 / 酸化剤溶液と血液試料とを合わせたサイズの約 2 倍であった。混合ののち、混合物 2 μL が第二のチャンバ 30 から毛管を通って出て、チャンバ 24 に進入し、その中で、微細構造が、HbA1c 用のラテックス標識モノクロナール抗体を含有する基材（纖維質 Wh

atmanガラス複合体剥離膜)の均一な湿润を保証する。インキュベーションは数分の内に完了し、その後、回転速度を2500 rpmに上げてチャンバ24の出口の毛管ストップ(図示せず)に打ち勝つことによって標識試料をチャンバ26に解放した。標識試料は、Whatmanの孔径5 μmニトロセルロース試薬上に0.1~3 mg/mLの濃度でストリップ状に付された凝集剤(ポリアミノアスパラギン酸HbA1cペプチド)と接触した。ウェル32中の吸收材(Whatmanガラス纖維膜)がストリップ上の標識試料の均一な通過を促進した。2500 rpmで標識試料をチャンバ26に解放する間、緩衝溶液(リン酸緩衝食塩水)がウェル22を離れ、チャンバ24を通過し、チャンバ26中のストリップの上を通過して、ストリップ上のバンドの読み取り精度を改善した。デジタルカメラを用いて反射率を読み取ることにより、発色を計測した。

【0061】

実施例4

図3のチップを2種類の溶液で試験した。第一の試験では、pH4のリン酸緩衝剤を試料導入口10に導入し、そこから試料毛管14及びウェル16に移した。次いで、この溶液を、第一の混合チャンバ20の中で、チャンバ18中のpH10のリン酸緩衝剤と合わせた。染料計測により、pH7のチャンバ30中で二つの緩衝溶液の混合が実質的に完了したことがわかった。緩衝剤よりも粘稠な液体である血液が試料である場合、チャンバ18からの溶解緩衝剤(チオシアノ酸リチウム)との混合は、図3の第一のチャンバ20及び第二のチャンバ30の両方の使用を要した。

【0062】

実施例5

図1の全体構造及び設計要素を有するマイクロ流体装置における血液と緩衝剤水溶液との混合をシミュレーションするため、25%のポリエチレングリコール(PEG20, 000 mw)を0.5 N NaOH溶液に加えた。粘度はほぼヒト血液の粘度であった。PEG / NaOH溶液10 μLをウェル10に加え、pH4の緩衝剤(50 mMリン酸)100 μLをウェル14に加えた。フェノールレッドpH指示薬を使用して、二つの溶液をチャンバ18及び22の中で合わせたときの混合の進行を示した。高めの遠心力を加えた場合、目視では、液体は別個の液体として見えるようであったが、遠心力を減らした場合、完全混合が起こっていることがわかった。

【0063】

一連の同様な試験から、一つの毛管を有するチップと四つの毛管を有するチップとの間、長方形の受けチャンバを有するチップと円柱形の受けチャンバを有するチップとの間、斜面構造を有するチップと斜面構造を有しないチップとの間で、混合効率における重大な差はなく、粘稠な流体の完全混合が可能であると結論づけられた。

【0064】

実施例6

混合した血液と緩衝剤との希釈試料を遠心分離し、混合した血液と緩衝剤をBayer潜血試薬パッドで試験することにより、緩衝剤で血液を溶解させる効率を試験した。溶解が不完全であるならば、遠心分離器中に赤い血液のペレットが形成するか、潜血パッド中に濃緑色のスポットが現れる。比較のため、血液50 μL及び希釈又は非希釈溶解緩衝剤(チオシアノ酸リチウム)500 μLの溶液を3分間インキュベートしたのち、1300 rpmで10分間、遠心分離器中で回転させた。次に、溶液をリン酸緩衝食塩溶液(pH7.0)中で100倍希釈し、再び1300 rpmで10分間遠心分離した。マイクロ流体装置中で溶解緩衝剤への血液の混合を実施し、その後、混合物を混合チャンバから取り出し、リン酸緩衝剤で100倍及び10,000倍に希釈し、遠心分離及び潜血試薬法によって試験した。血液がマイクロ流体装置中で実質的に完全に溶解していることがわかった。

【0065】

さらなる実験が、マイクロ流体装置中で提供される混合で、血液の溶解がほぼ即座に起こることを示した。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 6 】

【図1a】本発明による二つの液体の混合を示す図である。

【図1b】本発明による二つの液体の混合を示す図である。

【図2a】本発明の代替態様を示す図である。

【図2b】本発明の代替態様を示す図である。

【図3】マイクロ流体装置を示す図である。