

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6318094号
(P6318094)

(45) 発行日 平成30年5月9日(2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(51) Int.Cl.	F 1	
GO 1 N 1/30 (2006.01)	GO 1 N 1/30	
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 35/08	A
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 1
BO 1 J 19/00 (2006.01)	BO 1 J 19/00	3 2 1
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
請求項の数 12 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-558234 (P2014-558234)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月15日(2013.2.15)
 (65) 公表番号 特表2015-517088 (P2015-517088A)
 (43) 公表日 平成27年6月18日(2015.6.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/051245
 (87) 国際公開番号 W02013/128322
 (87) 国際公開日 平成25年9月6日(2013.9.6)
 審査請求日 平成28年2月9日(2016.2.9)
 (31) 優先権主張番号 00256/12
 (32) 優先日 平成24年2月27日(2012.2.27)
 (33) 優先権主張国 スイス(CH)

(73) 特許権者 514211806
 エコール ポリテクニク フェデラーレ
 ドゥ ローザンヌ(エペエフエル)
 Ecole Polytechnique
 Federale de Lausan
 ne (EPFL)
 スイス連邦 セーアシュー1015 ロー
 ザンヌ, エペエフエル イノヴェイション
 パーク ジ, エペエフエル-テテオ
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者
 チフトリック, アタ トゥナ
 スイス連邦 セーアシュー1006 ロー
 ザンヌ, シュマン ドゥ ラ ジョリエッ
 ト 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スライドが着脱可能な試料処理デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物および化学試料処理デバイスであって、
固定化された成分、生物試料または分子などの試料を含有する着脱可能なスライドを受け取るように構成されたマイクロ流体デバイスを具え、

前記マイクロ流体デバイスが、前記マイクロ流体デバイスの上部側と底部側との間に延在する複数のマイクロ流体アクセス穴のうち第1の複数のマイクロ流体アクセス穴の配置および第2の複数のマイクロ流体アクセス穴の配置とを具え、前記マイクロ流体デバイスの前記底部側には封止リングが配置されており、前記第1の複数のマイクロ流体アクセス穴の配置は、試料処理の間、前記マイクロ流体デバイス及び前記スライドが前記封止リングと接触することにより形成される単一のマイクロ流体チャンバへ流体を注入するために構成され、前記第2の複数のマイクロ流体アクセス穴の配置は前記マイクロ流体チャンバからの流体の回収を行うために構成され、前記底部側が前記マイクロ流体チャンバに面し、前記第1の複数のマイクロ流体アクセス穴の配置および第2の複数のマイクロ流体アクセス穴の配置は前記マイクロ流体チャンバの縁部に沿って分布され、かつ前記マイクロ流体チャンバに均一に流体物質および試薬を移流輸送するように構成されており、

前記マイクロ流体デバイスがさらに、前記マイクロ流体チャンバの外部に形成されている入口ポート、出口ポート、およびマイクロ流体チャネルを具え、当該マイクロ流体チャネルは前記第1および第2の配置の複数のマイクロ流体アクセス穴に連結されて前記マイクロ流体デバイスの上部側に分布した網状チャネルを構成する、

ことを特徴とするデバイス。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記マイクロ流体チャンバ内に流体の流れを生じさせるために入口と出口との間に圧力差を生じさせる、圧力駆動流発生手段を備えることを特徴とするデバイス。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記マイクロ流体チャンバ、前記マイクロ流体チャンネルおよび前記マイクロ流体アクセス穴の任意の 2 箇所以上の間に電位差を印加することにより、前記マイクロ流体チャンバ内に流体の流れを生じさせるための動電流発生手段を備えることを特徴とするデバイス。

10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記マイクロ流体チャンバ内に流体の流れを生じさせるための、前記マイクロ流体チャンバ、前記マイクロ流体チャンネルおよび前記マイクロ流体アクセス穴の任意の 2 箇所以上の間に温度差を発生させることにより流体の流れを生じさせることによる、熱誘起流れ発生手段を備えることを特徴とするデバイス。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記マイクロ流体チャンバ、前記マイクロ流体チャンネルおよび前記マイクロ流体アクセス穴に閉じ込められた前記流体の温度を調節および制御するための加熱素子および温度センサを備えることを特徴とするデバイス。

20

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、明視野を得るためにまたは蛍光検出を行うためにスライドガラス上に固定化された成分をデジタル画像化するため、シリコンマイクロエレクトロニクス技術で製造された光検出器および光源または光検出器および光源のアレイを組み込むことを特徴とするデバイス。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、光検出器および光源または光検出器および光源のアレイの前に配置される、マイクロレンズアレイ、偏光フィルタおよび/または蛍光フィルタを備えることを特徴とするデバイス。

30

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記チャンバの高さが 100 μm 未満であることを特徴とするデバイス。

【請求項 9】

請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記第 1 のマイクロ流体アクセス穴の配置が前記マイクロ流体チャンバの一方の縁部に沿って配置され、前記第 2 のマイクロ流体アクセス穴の配置が前記マイクロ流体チャンバの反対側の縁部に沿って配置されていることを特徴とするデバイス。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の生物および化学試料処理デバイスにおいて、前記第 1 のマイクロ流体アクセス穴の配置が前記マイクロ流体チャンバの一方の縁部に沿って分布され、前記第 2 のマイクロ流体アクセス穴の配置が前記マイクロ流体チャンバの反対側の縁部に沿って分布されていることを特徴とするデバイス。

40

【請求項 11】

請求項 1 乃至 10 の何れか 1 項に記載の生物および化学試料処理デバイスを使用して行われる生物および化学試料処理方法において、

- 1 つ以上の側に成分を有する前記スライドを手動でまたは自動的に得る工程と、
- 前記スライドを前記マイクロ流体デバイスに手動でまたは自動的に組み込むことにより前記形成される前記マイクロ流体チャンバを確立する工程と、
- 所定の時間中に、所定の温度で前記スライド上の成分を順次適切な流体物質または反

50

応性物質に曝す工程と、

- 検出を表示するため、所定の時間中に、所定の温度で前記スライド上の成分を順次適切な流体物質または反応性物質に曝す工程と、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

所定の時間中に前記スライドの表面上の成分を適切な流体物質もしくは反応性物質または任意の一連の適切な流体反応性物質に曝すための、請求項 1 乃至 1 0 の何れか 1 項に記載のデバイスの使用において、次の操作：

i . 組織化学法

i i . 細胞化学法

i i i . 免疫組織化学法

i v . 免疫細胞化学法

v . 免疫組織蛍光法

v i . 免疫細胞蛍光法

v i i . i n s i t u ハイブリダイゼーション法

v i i i . 蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション法

i x . 抗原賦活化法

x . エピトープ賦活化法

x i . 熱誘導抗原賦活化法

x i i . 熱誘導エピトープ賦活化法

x i i i . パラフィン溶解法またはエッチング法

x i v . 染色法

の少なくとも 1 つを含むことを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

最近の腫瘍学において、バイオマーカー分析は、癌診断および予後に不可欠な手段である。免疫組織化学 (IHC) は、臨床検査室で組織の日常的な病理検査を行う時に重要な癌バイオマーカー分析手段として使用されてきた。IHC は、アメリカ食品医薬局 (Food and Drug Administration) のような多くの地方機関および国際機関により認可された、組織標本のバイオマーカー分析を行う方法である。一般的に、特定のバイオマーカー (実際には抗原である) は、標的バイオマーカーに対する親和性を有する特異的二次抗体を用いて探索される。後で、標識を結合させており、一次抗体に対する親和性を有する特異的二次抗体が特異的標識に使用される。この標識は、一般的に、蛍光マーカーまたは有色マーカーであり、蛍光の場合、その方法は、免疫組織蛍光 (IHF) と称される。

【技術分野】

【0002】

他方、IHC および IHF は、試料組織に直接適用することはできず、幾つかの前処理段階が必要である。前処理は、固定工程から開始するが、ここでは患者から採取した疑わしい組織学的試料に、まず、組織内のタンパク質および抗原、ならびに組織の形態を保存する処理を施す。多くの固定法が存在するが、一般的に、固定工程は、液体窒素の使用を含む非常に急速な冷却工程である凍結固定、またはホルムアルデヒド固定のいずれかにより行われる。後で、組織を薄片 (4 μm ~ 10 μm) に薄切するマイクロトーム法で組織を処理し、標準的なスライドガラス上に固定化する。その後、比較的長く保存するために、凍結固定 (CF) 組織切片は凍結しておくが、ホルムアルデヒド固定組織はパラフィンワックス層により保存される。後者は、「ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)」組織切片と称される。固定工程の後、凍結固定組織は、周囲温度に戻した後、IHC 法を直接行うことができるが、FFPE 組織は、さらに幾つかの処理を必要とする。これらには、パラフィンの化学的除去および抗原賦活化¹ と称される別の工程が含まれる。抗原賦活

10

20

30

40

50

化工程は、加熱や酵素反応を含む様々な手段を使用して、ホルムアルデヒドで架橋された抗原を回復するのに役立つ。

¹ 抗原賦活化は、多くの資料で「エピトープ賦活化」とも称されている。さらに、抗原賦活化中に試料の加熱が含まれる場合、それは、熱誘導抗原賦活化または熱による抗原賦活化と称されることもある。

【 0 0 0 3 】

検査室での手動処理の他に、この方法の重要性および日常的な診断の必要性から、IHC法を自動化するために市販の組織処理装置の開発が行われてきた。これらの機器は、抗原賦活化から染色まで組織切片の処理を行うことができ、それらは診断および予後のために臨床検査室で日常的に使用される。従来の機器では、工程時間は3時間～24時間であり、それらは一般的に複数のスライドを処理することができる。

10

【 0 0 0 4 】

長い工程所要時間

既存の組織処理装置は、技術の進歩というよりむしろ、ある一定の程度までスルーブットおよび再現性を向上させるために手動の方法を自動化および並列処理しているに過ぎないと言える。目下の問題の1つは、処理サイクルの所要時間が長いことである。一般的に、この方法は終夜行われ、処理、染色された組織は翌日にならないと得ることができない。このように所要時間が長く、外科的介入中に分析を完了することができないため、これは現在のIHC法の大きな障害となっている。しかし、介入中にIHCを完了することができれば、IHCの結果を直ちに使用することにより外科的処置プロトコルを微調整することができる。非常に重要な例の1つは、癌診断およびその後の治療工程である。患者が癌と診断された場合、通常の処置では、一般的に、疑わしい組織の組織生検を実施する。次いで、これらの試料のIHC分析を行い、癌の疑いが真であるかどうか調べる。答えがイエスの場合、2回目の手術を行い、身体から全ての腫瘍を除去するが、生きた癌細胞が1個でもあると増殖して再度腫瘍になり得るため、これは重要な工程である。残念ながら、現在まで、腫瘍を完全に除去することが立証された方法はない。従って、時折、患者は、残存し得るこれらの細胞を除去するために、追加の手術または化学療法を必要とすることがある。数えると、手術の回数は1回～3回となり、それにより患者のリスク、費用および不安、ならびに、医師の時間および手術室の利用可能性などの医療資源の著しい損失が増加する。

20

30

【 0 0 0 5 】

術中と称される処理の公式な時間は20分未満である。現在まで、IHCに必要な時間を短縮するIHCシステムは1つしか紹介されなかった。この技術は、「波動 (the wave) 」機構と称される現象に基づいており、隣接する2枚のスライドの「波状の」ヒンジ運動を採用し、その1枚は組織薄片を有する (PCT / 米国特許出願公開第2006 / 015020号明細書および国際公開第2006 / 116037号パンフレット)。この方法は、凍結固定されたスライドの染色時間を15分に短縮することができ、従って、術中と称することができる。他方、これらの15分には、固定、観察および画像化時間が含まれず、その場合、決定を行うために、これらは少なくともさらに約15分を必要とする可能性があり、それは術中の条件を超える。従って、全IHC法を「術中」とするためには、染色プロトコル所要時間を5分未満に短縮しなければならない。さらに、凍結固定組織の処理の方が容易であるが、幾つかの理由で、FFPE組織の方が一般的である。まず、凍結固定法では、装置を必要とするため、組織の保存および保管により多くの費用がかかる。より顕著には、凍結固定組織は、FFPE組織よりも偽陰性または偽陽性を示すことが多い。従って、FFPEの方が好都合であるが、凍結固定の方が速く結果を得ることができる。「波動」機構を使用するFFPE組織切片について報告された処理時間は70分であり、従来の自動組織処理装置の処理時間に近い時間となっている。

40

【 0 0 0 6 】

定量分析における限られた正確度

術中の態様の他に、特定のアッセイを行う時に必要な免疫組織化学により得られるシグ

50

ナルの程度を使用する定量的なバイオマーカー発現分析を必要とする事例を扱う場合、現在までどの技術を用いても、得られる結果の正確度は限られている。従来の方法では、このような半定量分析を必要とする事例の最大20%で不明瞭な結果が得られることがあり、免疫組織化学だけを使用して最終的な診断結果を得ることはできない。従って、現在の標準では、最終的な診断結果を得るために、その後これらの事例の遺伝分析 (in situハイブリダイゼーション) を行うため、診断法にかなりの費用と時間(数日)が嵩む。

【0007】

定量的な免疫組織化学的分析の不正確さは、免疫組織化学的シグナルの強度に起因し、それは、非特異的結合反応、ならびに組織変性の予測不能な影響、組織固定、パラフィン包埋、および熱誘発エピトープ賦活化におけるばらつきのため、必ずしも抗原発現の程度に比例しない。従来のIHCは、マクロスケールの操作であり、バイオ試薬への表面抗原の均一な曝露および結果の再現性を達成するために30分~数時間の範囲の反応時間を要する。これは、長い拡散時間、試薬の制御および投与における精度の欠如、ならびに遅い流体交換速度に起因する。さらに、アッセイ時間や抗体曝露時間が長いため、抗体の顕著な吸着および非特異的結合が起こる可能性があり、このため、得られる免疫組織化学的シグナルはもはや組織上の標的バイオマーカー濃度の一次関数とならない。これらの定性的バイオマーカー発現レベルの評価は、病理学者の解釈や経験によって変わることが多かった。

【0008】

しかし、バイオマーカー発現レベルと免疫組織化学的シグナルとの比例関係を確保できれば、免疫組織化学的シグナルは定量的になり、陽性試料と陰性試料との区別をずっと高い正確度で行うことができる。

【0009】

實際上、標的抗原とイムノアッセイにより得られるシグナルとの間にこのように比例関係がないのは、一般的に、診断免疫組織化学または免疫組織化学だけに特有なことではない。この問題は、固定化された標的が表面に存在し、この標的に1種以上の検出試薬が、検出試薬の拡散速度により制限された速度で結合する全ての状況で存在する。これらには、免疫細胞化学、DNAハイブリダイゼーション、RNA定量化、アプタマーおよびオリゴマープローブを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。さらに、立体障害機構もこのように比例関係がないことの一因となり得、最終的な定量的アッセイを損なう。

【0010】

インフラストラクチャー、装置および熟練した職員に対する投資の必要性

最新式の自動装置には、工程所要時間が長く正確度が限られているという本質的な問題に加えて、他の幾つかの欠点がある。最近の市販の自動IHCは、嵩張り、実験台に組み込まれて供給されるかまたは実験台上に載置される。従って、それらは持ち運び可能で手持ち式であるのとは程遠い。持ち運び可能であることは、例えば、術中動作の要件ではないが、これにより、検査室環境または電気がない遠隔地でも利用し易くなる。

【0011】

一般的に、低予算のクリニックや遠隔地にあるクリニックには、このような種類の診断を行うのに必要なインフラストラクチャー、装置および専門的技術がない。實際上、規模の小さいクリニックには、このような検査室の設置および維持は非常に費用がかかり、インフラストラクチャーおよび装置に約1M CHFの投資、ならびに熟練した職員に毎年300K CHF超が必要となる。従って、免疫組織化学を行うことができる検査室を設置するのに必要な投資は、世界中の多くの患者がこの診断技術を利用できるようにすることを妨げる大きな障害の1つとなっている。

【0012】

最新式の装置に左右される検査室の現在の構造によって生じる他の大きな障害の1つはカスタム化の問題であり、これは、特に、新しいバイオマーカーの発見や関連する研究の

10

20

30

40

50

ために使用する際に出現する。既存の大規模な診断装置を新しく発見された分子やバイオマーカーに使用できるようにするには費用も時間もかかる。これは、研究及び発見に必要な柔軟性と、中央診断検査室が必要とする並列処理やスルーポットの程度との矛盾に起因する。さらに、中央施設は、現在の診断作業で多忙である、またはこのようなカスタム化が後の再現性に影響を及ぼし得るという理由で、このようなカスタム化に反対する。従って、免疫組織化学を含む研究作業は、一般的に手動で行われる。しかし、結果や再現性の要件を検証するのに多くの試行が必要な場合、このような研究を手動で行うのに必要な全時間は数年にわたる可能性があり、バイオマーカー発見の全研究開発費用に大きな影響を及ぼし得る。

【0013】

従来技術は、(a) IHCを行うラボオンチップ(Lab-on-a-chip)デバイス、(b) 工程時間を短縮する前述の自動マイクロIHC処理装置、および(c) 類似のマイクロ流体設計を有する他の用途用に製造されたラボオンチップデバイスの3つの異なる項で要約することができる。ここで、これらを要約し、性能指数に関して比較を行う。

【0014】

IHCを行うラボオンチップデバイス

現在まで、拡散時間の短縮および流体交換制御の改善により有利となり得る、従来のIHCの特定の態様を改良するためのマイクロ流体IHC法が幾つかあった。これらには全分析時間の短縮を目的とするものもあれば、比較的高い抗体希釈度で、空間的に離れた位置にある異なる標的バイオマーカーを探索するために複数の平行な小さいチャンネルを使用して多重IHCを行うことを目的とするものもある。しかし、これらの研究のいずれにおいても、マイクロ流体法により、定量分析の正確度が向上し、このような分析によって得られる不明瞭な診断結果が減少することは示唆されなかった。

【0015】

本発明者らは、結果が得られるまでの時間を短縮するために、IHC用に設計された幾つかのラボオンチップデバイスを開示した。比較的速い組織分析(従来の2時間に対して20分)を可能にするPDMS製の第1世代LOCを示した[V. Fernandez-Moreira et al. Analyst, no: 135, pp. 42-52, 2010]。残念ながら、このデバイスは、分析速度および検出面積が限られていることが分かった。このシステムは高圧を保つことができず、そのため、最大動作体積流量は約50 nL/sであった。システムの厄介な組み立てや分解(手動での一体化)のため、分析時間およびデッドボリュームが顕著に増加した。また、組織薄片の一部(表面の数10%未満)しか曝露することができず、それによりTS検出面積が限定された。

【0016】

後に、PDMSで再度製造され、面積を増加し、インキュベーション時間を3.5分に短縮する第2世代デバイスを示した(A. T. Ciftlik et al., Proc. of 14th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS '10), pp. 699-701, October 2010)。他方、このデバイスには、定量分析の正確度およびその低コストでの製品化を大きく損なう幾つかの問題があった。低い正確度は、チャンバ内で起こる最終的な抗原-抗体反応が拡散によって制御されることに起因し、それにより時間分解蛍光の使用も不可欠となる。チャンバおよびそれに接続されたマイクロ流体チャンネルの断面構造は、図1に示す構造を形成する。断面で、チャンバは幅広で浅い長方形であり、組織切片は幅広の底部側を形成する。マイクロ流体チャンネルは高さ約50 μmの管であり、これらのチャンネルは、組織切片の反対側にある幅広の上部側に比較的近い右手側および左手側の浅い縁部でチャンバに接続されている。このような設計では、浅い側にあり、幅広の上縁部に比較的近いところに画定された入口と出口を使用することにより流体の流れが生じる場合、流体の流れの大きさが顕著なのは上面の周囲だけであり、組織切片の周囲ではずっと小さい。従って、組織表面へのIHCプロトコル試薬の輸送は、依然として、上面からの分子の遅い直交流拡散に大きく依存

10

20

30

40

50

する。さらに、この設計のため、チャンバの高さは常にマイクロ流体チャンネルの高さより高くなければならず、この条件は抗体の輸送における拡散の制限的役割をさらに一層顕著にする。この従来の設計では、チャンバを250 μm未満にすることができず、高さ50 μmのチャンバと比較して拡散時間が25倍長くなる(段落0029参照)。より顕著には、組織表面へのプロトコル試薬の輸送は遅い拡散によって制限されるため、得られるシグナルと組織表面での抗原の発現の程度との比例関係が損なわれ、それにより免疫組織化学的シグナルの定量的な評価の成功が不可能となる。

【0017】

拡散により制限されるこのようなシステム(段落0016および引用文献に記載)に短いインキュベーション時間を使用することは、先端の画像化装置および材料を使用する場合しか可能でなかった。拡散時間がこのように長いと、プロトコルに短い試薬インキュベーション時間を使用すると、一次抗体および二次抗体の極一部しか組織切片表面に達することができず、時間分解蛍光でしかこのような低いシグナルを検出することができなかった。時間分解蛍光は、励起後にかなり長時間発光し続けることができる特殊な時間分解マーカーで標識された抗体(ランタニド)を使用することにより、重複しない複数の時間帯に蛍光体の励起および発光の記録を行う、先端の画像法である。励起および発光プロセスの時間多重化により、組織および周囲物質に起因する自家蛍光バックグラウンドシグナルが大部分なくなり、組織に結合した極少量の(一次および二次)抗体を容易に検出することができる。標準的な蛍光画像化装置および市販の蛍光体を使用しても、このシグナルを検出することはできないであろう。それにもかかわらず、時間分解マーカー(ランタニド)用の蛍光体と鏡検装置は両方とも非常に高価であり、標準的ではなく、マーカーで標識された診断用抗体は市販されていない。そのため、時間分解鏡検法の必要性が、このデバイスの低コストでの商品化の成功を妨げる別の障害となっており、従って、デバイスは、蛍光体および色原体のような標準的染色試薬を使用しても動作することができない。

【0018】

前述の設計(段落0016~0017および引用文献)に関連する問題の他に、PDMSを構造材料として使用することによる幾つかの欠点もある。PDMSはヤング率が比較的低いと、チャンネルは、比較的高い流体圧がかかると大きく変形し易い。即ち、プロトコルに含まれる圧力および流量が変わると流動特性が変化し得る。さらに、この従来の設計では、一体化される組織切片スライドの封止は、下にある入口/出口マイクロチャンネルの壁を形成するPDMSを使用して行われる。ここでも、PDMSのヤング率が低いと、組織スライドの封止の向上に必要な力により、これらのチャンネルが閉塞されてデバイスの動作が不可能になる程度まで、これらのチャンネルは容易に変形し得る。チャンネルが容易に変形することによりこのように設計寸法および流量のばらつきが生じ、得られるIHCシグナルのばらつきを招くおそれがあり、診断に使用される場合、結果の再現性が大きく損なわれるおそれがある。さらに、PDMSの熱特性のため70°Cを超える温度を使用することができず、PDMSは、IHCプロトコルに含まれ得る多くの試薬、ラインキシレンと化学的な適合性がない。このデバイスの別の欠点は、デバイスが非標準的な組織切片スライド形状しか受け入れないことであり、それは、診断デバイスとしてのこの構造の製品化に際するカスタム化の問題、従って費用の問題となる。

【0019】

結論として、段落0016~0018に記載したシステムは、免疫組織化学的アッセイのプロトコル時間を改善するに過ぎず、これは、必要な材料およびインフラストラクチャーに関して費用がかかり、ほとんど利用不可能な方法である時間分解蛍光を使用するという代償を払って行われる。さらに、アッセイ時間の最小化は、組織表面への試薬の輸送が拡散によって制御されることをなくすものではなく、このシステムで行うことができる定量分析を行う能力は従来の状況と変わらず、組織バイオマーカーの定量化は可能ではない。最後に大切なことを述べるが、このシステムはヤング率が低いことから、システムを形成するマイクロ流体構造が変形し得るため、再現性が大きく損なわれる。

【0020】

文献に示されている別の方法は、空間的に異なる位置にある異なるマーカーを探索するための複数の小さいチャンネルを有する、いわゆる多重化マイクロ流体IHCである(MMIC)プラットフォームである(M. S. Kim et al, Biomaterials, Vol: 32, Iss: 5, pp. 1396-1403, 2011、およびM. S. Kim et al. PLoS ONE, vol: 5(5): pp. e10441, 2010)。90分の応答時間を有するため、このデバイスは依然として、自動IHC処理装置の応答時間の時間範囲にある。さらに、このデバイスが染色し得るのはTS面積の約1.5%であり、それはこの方法の一般化に関する欠点となっている。著者らは、乳癌の特定の事例に関して、この小さい面積についても、全部染色されたTSと約85%の相関があることを示したが、十分な相関を達成することはできない。また、それぞれの異なる事例についてこの相関試験を実施するのは厄介な作業である。他方、著者らは、一次抗体濃度を10倍低くすることができることを示したが、それは高価な抗体の消費を削減するために重要な工程である。

10

【0021】

工程時間を短縮する市販の自動マイクロIHC処理装置

前述したように、上市されている処理装置でIHC工程時間が短いのは、「波動」システム(PCT/US2006/015020号明細書および国際公開第2006/116037号)だけである。この技術は、「波動」機構と称される現象に基づいており、隣接する2枚のスライドの「波状の」ヒンジ運動を採用し、その一方が組織薄片を有する(Celerus Diagnostics)。それは、凍結固定されたスライドの染色時間を15分に短縮することができ、従って、術中と称することができる。他方、これらの15分には、固定、観察および画像化時間は含まれず、決定を行うために、これらはさらに少なくとも約15分を要し得、それは術中の条件を超える。

20

【0022】

類似のマイクロ流体設計を有する他の用途用に製造されたラボオンチップデバイス

標本が固定化されているスライドを受け入れる、縦穴をベースにするデバイスが文献に記載されている。Mcneelyら(PCT/US2002/07113号明細書および国際公開第2002/072264号)は、DNAマイクロアレイ処理用に製造されたこのようなデバイスを紹介した。IHCに必要なとされるような面積の広いチャンバではなく、このDNAマイクロアレイ処理デバイスは、DNAマイクロアレイの要素が存在する小さい場所それぞれに試薬を送達するための複数の縦穴と網目状のマイクロ流体チャンネルとを有する。組織または細胞単層の特定の箇所を染色するために非常に小さい場所(対角線で約100um)に縦方向のマイクロ流体穴が配置されている、「マイクロ流体プローブ」と称される類似のデバイスも開示され(A. Queval et al. Lab Chip, vol: 10, pp. 326-334, 2010ならびに特許文献PCT/IB2010/052018および国際公開第2010/128483号)、このプローブヘッドは空間的に移動させることができる。Delamarcheらによる別の特許(PCT/IB2003/005350および国際公開第2004/050246号)では、表面上で液体を流動させるデバイスが紹介されたが、ここでは縦穴およびスペーサを使用して表面にチャンバが形成されている。

30

40

【0023】

類似の方法で製造されたその他のDNAハイブリダイゼーション(米国特許出願公開第2006/0003440号明細書)および配列決定デバイス(PCT/US2010/047392号明細書および国際公開第2011/026136号)も存在し、ここでは、それらはまた、DNAが固定化されているマイクロ流体チャンネルに接続する縦穴からなっている。Adey(PCT/US02/24616号明細書および国際公開第2003/015922号)は、用途に応じてチャンバ高さが変えられるように柔軟な可撓性の膜を備えるDNAおよびRNAプロセッシング用の小容量チャンバを有する別のデバイスを記載した。Kimら(PCT/US2008/074865号明細書および国際公開第2009/029845号)はまた、半円形の入口穴および三角形の形状の出口穴の均一な分

50

布を有する面積の広いマイクロ流体工学用デバイスを記載している。

【0024】

縦方向のマイクロ流体穴を用いた研究の中で、高耐圧性を有し、非常に短時間で動作する、面積が広く試薬を均一に分配するデバイスは開示されなかった。上記デバイスおよび研究のいずれにおいても、マイクロ流体法により、固定化された標的の定量分析の正確度が向上し、このような分析によって得られる不明瞭な結果が減少することは示唆されなかった。さらに、チップ上で一次抗体インキュベーションしか行わないMMIHCの場合のような半手動のラボオンチップIHC処理装置は、ある一定の割合のTSしか染色できないか、または高い試薬費用がかかる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、チャンバとそれに接続されたマイクロ流体チャンネルとを有する従来技術のデバイスの断面構造を示す図である。

【図2】図2は、マイクロ流体アクセス穴を有する本発明のデバイスの断面図である。

【図3】図3は、最上層に形成された、分布した網状チャンネルおよびマイクロ流体アクセス穴配置の上面図である。

【図4】図4は、網状チャンネルが分布した組織チャンバ内の対流の有限要素法(FEM)によるシミュレーションを示す図である。

【図5】図5は、アダプタとチップとから構成されている、一体化されたデバイスの断面図である。

【図6】図6は、マイクロ流体デバイスの製造方法を示す図である。

【図7】図7aは、加工およびダイシング後のデバイスの最上層のマイクロ流体チャンネルを示す図である。図7bは、デバイスの底部側にある、マイクロ流体アクセス穴とO-リングが配置されている切り欠きとを示す図である。図7cは、一体化システムへの標準的な組織スライドの組み込みを示す図である。図7dは、組織チャンバが形成されている一体化システムを示す図である。

【図8】図8aは、試薬濃度の対数プロットを示す図である。図8bは、1 - 試薬濃度の対数プロットを示す図である。図8cは、チャンバの入口、中央、および出口の周囲に配置された異なる組織チャンバ領域の濃度応答を示す図である。図8dは、充填された状態のチャンバのピクセルヒストグラムを示す図である。

【図9】図9aは、HER2/neu陽性組織薄片に関する、一次抗体および二次抗体の様々なインキュベーション時間(t_{inc})について得られた蛍光強度を示す図である。図9bは、インキュベーション時間に対するシグナル対バックグラウンド比(SBR)を示す図である。図9cは、追加のインキュベーション時間当たりのSBRの変化率を示す図である。図9dは、標的抗原を発現する同じ組織薄片上の異なる領域について算出されたシグナル値のレベルの変動係数(CV)に関する試験を示す図である。

【図10】図10aは、DAPIが結合した核の対比染色を表す青色のチャンネルを示す図である。図10bは、モノクローナルウサギ抗ヒト一次抗体により検出され、赤色のチャンネルに示されているAlexa-Fluor 594標識ヤギ-抗ウサギポリクローナルIgG二次抗体により視覚化されたHER2/neuを示す図である。図10cは、モノクローナルマウス抗ヒト一次抗体(Clone 6F11)により検出され、緑色のチャンネルに示されているAlexa-Fluor 647標識ヤギ抗マウスポリクローナルIgG二次抗体により視覚化されたエストロゲン受容体(ER)を示す図である。図10dは、3つのチャンネルを一緒に示す図である。

【図11】図11は、従来のIHCとMTP-IHCとの診断結果の比較を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、特許請求の範囲に記載のデバイスおよび方法に関する。

【0027】

10

20

30

40

50

それは、特に、臨床免疫組織化学において正確なバイオマーカー検出を行うためのマイクロ流体組織処理装置(MTP)に言及する。乳癌組織薄片を有する標準的な顕微鏡スライドをガラス/シリコン微細機械加工構造と共にクランプすることにより、面積が大きく(256mm^2)浅い($<100\mu\text{m}$)チャンバが形成され、その構造には、組織薄片をイムノアッセイバイオ試薬に迅速かつ均一に曝露するためのアクセス穴が設けられている。マイクロ流体流動パターンと、チャンバを浅くして縦方向の拡散長さ小さくすることとを組み合わせることにより、2分という短いバイオ試薬インキュベーション時間の使用が可能となる。このため、表面の標的量と得られるシグナルとの比例関係を維持することにより正確な定量分析が可能となった。

【0028】

マイクロ流体デバイス設計

組織切片が固定化されている単なる標準的な顕微鏡スライドである組織スライド(TS)をマイクロ流体チャンネルに迅速に組み立てることは極めて重要であるが、その理由は全アッセイ時間が重要なパラメータとなるからである。迅速な組み立ての他に、TSしか変える必要がなく、他の態様(マイクロ流体回路)は変えないシステムが考えられる。図2は、(a)流入および流出用に組織チャンバの縁部に沿って、ならびに(b)流入用にチャンバの中心に、および流出用にチャンバの縁部に配置されているマイクロ流体アクセス穴を有するデバイスの断面図を示す。デバイスは、マイクロ流体最上層を使用して、TSに送達される流体の案内および事前調整を行うための横方向のマイクロ流体チャンネルと、O-リングを使用してマイクロ流体チャンネルデバイス部分にTSを封止することにより形成される薄いチャンバに到達するための縦方向のマイクロ流体アクセス穴とを有する。

【0029】

側方からチャンバに直接到達する前述のシステム(段落0016~0019参照)とは異なり、これらのマイクロ流体チャンネルは、縦方向のマイクロ流体アクセス穴により組織チャンバに接続されている。この配置により、組織チャンバの構成および構造とは無関係な最上層マイクロ流体チャンネルパラメータ(厚み、構造、圧力保持能力等)の調節が可能となる。組織チャンバの圧力保持能力もアッセイ時間の決定要因となるため、マイクロ流体チャンバとTSとの封止は非常に重要である。ここで、封止は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)成形物を使用するカスタム化されたO-リングで行われた。この設計で、印加される封止力はチャンバ厚みおよびチャンバ自体の圧力保持能力にしか影響を及ぼさず、この封止機構はマイクロ流体システムの他の部分から機械的に切り離されている。

【0030】

さらに、この設計により、チャンバ高さを以前のシステム(段落0016~0019参照)よりずっと低くすることが可能となる。特に、組織チャンバの高さは、O-リング切り欠きに対するO-リングの厚みの選択およびまたTSに印加される封止力だけで決定される。実際上、比較的大きい抗体分子の遅い拡散に左右される、IHC法に使用される試薬のインキュベーション時間にチャンバの厚みが直接影響を及ぼすため、チャンバの厚みは重要なパラメータとなる。デバイスがTSと一体化されると、厚み $50\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ の組織チャンバが形成される。マウス抗ヒトIgG分子のような一般的に使用されている抗体について、1分のインキュベーション時間には $100\mu\text{m}$ 未満のチャンバ高さでよいと算出された。他方、チャンバ高さを $50\mu\text{m}$ 未満に低減することは可能であるが、高圧での充填および洗浄サイクル中にTSから組織の剥離が起り、全流動所要時間が増加するおそれがある。

【0031】

主な輸送機構を拡散から移流に移行させるためには、このような浅い流体チャンバを形成できることが重要である。チャンバ内での試薬の主要な輸送機構を変更することは、反応が拡散によって制御されることを防ぐのに重要であり、反応が拡散によって制御されると固定化された標的の比例染色が損なわれ、定量分析が不正確になる。最小限のチャンバ高さだけでなくマイクロ流体アクセス穴設計も、図2に示すような一体化されたTSの表面に流体の流れを向けることにより正確な定量化に寄与する。このように流体の流れを向

10

20

30

40

50

けることにより、移流によって行われる組織表面への試薬の輸送が可能となり、反応によって制御される状態 (r e g i m e) で免疫組織化学的反応が起こり得る。

【 0 0 3 2 】

デバイスの使用可能な染色面積を 1 0 0 % に増加させるために、1 6 m m × 1 6 m m の寸法を有する大きいチャンバを実現しなければならない。組織の各部分に単位時間当たり等量の試薬および洗浄溶液を送達するためには、このようなチャンバ内に流体を均一に分配することが重要である。従って、チャンバ全体で流量を均等化する、分布したマイクロ流体チャンネル網状構造を採用した。図 3 は、最上層に形成された、分布した網状チャンネルおよびマイクロ流体アクセス穴配置の上面図を示す。マイクロ流体アクセス穴の配置は、チャンバ内での試薬の均一な分配の実現を目的とする。他方、分布したマイクロ流体チャンネル網状構造により、確実に、試薬が組織チャンバ全体に均等に送達される。原則として、チャンバ、マイクロ流体チャンネルおよび穴の配置のサイズを相応に変更することにより、チャンバ面積を 2 5 m m × 5 0 m m に増大することができる。

10

【 0 0 3 3 】

図 4 は、チャンバ高さ 5 0 μ m (C O M S O L (登録商標) M u l t i p h y s i c s)、流量 1 0 μ L / s での、網状チャンネルが分布した組織チャンバ内の対流の有限要素法 (F E M) によるシミュレーションを示す。このシミュレーションから、バッファ洗浄の 2 . 5 秒後に、最低の場合、以前の試薬の達成濃度はその初期濃度の $1 0^{-12}$ しかないことが示唆される。従って、何桁も高い洗浄および充填時間を必要とする無駄な (d e a d) 表面位置がないと考えられる。分布した網状のチャンネルが、図 4 に F E M シミュレーションにより示されるように有効に機能するのは、2 次元と見なされるほど十分薄い組織チャンバと組み合わせられる場合だけである。以前の研究で、類似のマイクロ流体チャンネル網状構造 (段落 0 0 1 6 ~ 0 0 1 9 および図 1 参照) が示されたが、それらの断面構造は、移流により T S 表面に直接試薬が供給されることを妨げた。即ち、試薬は、組織表面の位置と反対側にあるチャンバの最上面に送達され、組織表面への試薬の輸送は完全に拡散に支配された。対照的に、機械的に切り離された組織チャンバと、マイクロ流体アクセス穴を介してチャンバに接続されたマイクロ流体チャンネル網とを有する本デバイスは、シミュレートされた移流輸送の利点を全て示す (段落 0 0 3 7 ~ 0 0 3 8 および図 8 参照)。

20

【 0 0 3 4 】

一体化されたデバイスの断面を図 5 に示し、そこでは、システムは一体化を容易にするためのマクロ機械加工されたアダプタと、マイクロ流体工学および組織染色用の微細機械加工されたチップとから構成されている。マイクロ流体デバイスは、アダプタ部分と永久的に一体化されているが、T S だけは分析毎に組み立ておよび分解を行う。この構成は、標準的な市販の流体アダプタを用いてマイクロ流体デバイスを利用するために必要である。さらに、このように外部の配管を一体化することにより、2 0 0 b a r 超の流体圧の利用が可能となる。

30

【 0 0 3 5 】

試薬間の相互汚染を生じることなく逐次的処理を行うことができるシステムは、生物医学的染色プロトコルを高信頼性で実現するために極めて重要である。本発明の場合、各標的について 3 種類の試薬を用いた I H C アッセイが必要である。この目的のために、マイクロ流体入口路をアダプタ構造内に形成したが、それは市販の一方向逆止弁を併せ持つこともできる。これらの逆止弁は、相互汚染、並びに T S の組み立ておよび分解中の外部流体システムの閉塞の防止に極めて重要である。動作中、必要な試薬のシリンジに圧力を印加し、それにより対応する逆止弁が開放し、組織チャンバ内に流体が放出されるが、他のシリンジは、非加圧状態、従って、組織チャンバから封止された状態に保たれる。取り替える毎に外部マイクロ流体システムの大きいデッドボリュームを再充填するということが防止されるため、このような一体化によりスループットも改善される。他方、小型化された逆止弁をデバイスに組み込むと、デッドボリュームおよび流動時間をさらに低減することができる。

40

50

【0036】

微細加工

本発明では、マイクロ流体デバイスは、より高い精密さおよび破壊圧力を達成するために、図6に示されるように、マイクロ流体溝の多段階深掘り反応性イオンエッチング(DRIE)を行った後、Parylene-Cが塗工されたPyrexウエハと結合させることにより製造される。1) 2.5 μmの湿潤酸化膜(wet oxide)を有する4インチのシリコンウエハを出発点とした。2) 次いで、5 μmのAZ9260フォトレジストをスピコートし、DNCマスクを被せて露光し、現像してチャンネルを形成した。下にある酸化物をRIE(Alcatel 601E)でエッチングした。3) レジストを剥離し、5 μmのAZ9260フォトレジスト(Microchemicals GmbH, Germany)およびチャンバマスクを使用して追加のリソグラフィ工程を実施した。リソグラフィ後、前面を2段階でDRIEエッチングする(Alcatel 601E)。これは、チャンネルおよびチャンバを異なる高さに形成するために行う。まず、チャンバを深さ100 μmにエッチングし、レジストを剥離した。4) レジストを剥離した後、第一段階でパターニングされた硬質マスクを介してチャンネルをエッチングした。エッチング深さは、設計に応じて、50から200 μmまで様々であった。5) 後で、このウエハを、2 μmのparyleneが塗工されたPyrexウエハに低応力parylene-C結合法で結合させる。この工程にアノード結合も使用できるが、これにより比較的高い応力および亀裂が生じ得ることに留意されたい。6) 結合後、結合した積層体に、シリコン側から厚み8 μmのAZ9260レジストを用いて追加のリソグラフィ工程を適用した。後で、チャンバに達するまでDRIEをもう一段階行うが、それは、O-リングを取り付けるための切り欠きを形成するのにも使用された。最後に、レジストを剥離する。ウエハをダイシングすることにより加工は完了する。図7(a)は、加工およびダイシング後のデバイスの最上層のマイクロ流体チャンネルを示す。図7(b)は、デバイスの底部側にある、マイクロ流体アクセス穴とO-リングが配置されている切り欠きを示す。

10

20

【0037】

本発明に使用される材料および微細加工方法は、PDMSの使用による以前の欠点をなくす。SiおよびSiO₂はPDMSよりヤング率がずっと高いため、マイクロ流体チャンネルは比較的高い流体圧下でも変形に耐え、16 MPaまでの流体圧の印加が可能となる(A.T.Ciftlik et al. Lab Chip, vol:12 pp.396-400)。比較すると、PDMS製のシステムは、約0.7 MPaの圧力に限定される(M.A.Eddings et al. J. Micromech. Microeng., 18, pp.067001)。従って、本発明の設計では、IHCプロトコルに含まれ得る、ずっと高い圧力および流量下でも流動特性が安定になる。さらに、使用する材料の剛性が高く、前述のように機械的に切り離されている(段落0028参照)ため、組織スライドの封止の向上に必要な力により制約が課されることがなく、マイクロ流体チャンネルはインタクトなままである。従って、チャンネルの変形による設計寸法および流量のばらつきは、無視できる程度に留まる。従って、精密なプロトコルの適用が可能であり、診断に使用される場合、この精密さにより再現性が確保される。さらに、本デバイスは、200 μmまで機能することができ、IHCプロトコルに含まれ得る試薬との化学的適合性に関してずっと堅牢である。さらに、それは標準的な組織切片スライド形状を受け入れるため、カスタム化を必要とせず、診断デバイスとしてのこの構造の製品化は、臨床診療で使用される標準規格品を直接使用できるように行われる。図7(c)は、一体化システムへの標準的なTSの組み込みを示し、図7(d)は、組織チャンバが形成されている一体化システムを示す。

30

40

【0038】

デバイス性能および臨床結果

濃度応答時間および均一性のキャラクタリゼーション

オープンソースのImageJソフトウェアを使用して得られる画像から組織チャンバ

50

の強度プロファイルを解析することにより、濃度のキャラクタリゼーションを行った。分析を行うため、1秒当たりのフレーム数が5のビデオをグレースケールに変換する。まず、 $40 \mu\text{L}/\text{s}$ の流量で長時間(数100分間)にわたりチャンバ全体での平均強度を算出することにより、最大濃度での強度($M \times C I$)を実験的に求めた。同様に、PBS緩衝液を流した後、最小濃度での強度($M \times n C I$)を実験的に求めた。これらの2つの値を使用して、実験で記録された強度を正規化し、正規化された値を試薬濃度、 C として使用するが、それは0~1の範囲となる。後で、共に16秒の周期と50%のデューティサイクルを有するが、 180° 位相シフトさせた矩形波の形態で適用される試薬および緩衝液を適用した。得られたビデオから、組織チャンバの異なる領域における濃度変化の応答時間、および平均挙動を調べた。生成した応答時間曲線を使用して、本デバイスの可能な時間性能を評価する。そのため、 C および $1 - C$ の対数プロットに直線フィッティングを使用した。これらのフィッティングにより、所与の充填/洗浄純度に必要な洗浄および充填時間を算出するための指標である、1秒当たりのディケード($d e c / s$)に関する充填および洗浄性能が得られる。他方、組織染色面積のピクセルヒストグラムの標準偏差を完全な充填および洗浄の時点でのカメラピクセル深度で除することにより、組織チャンバ全体での濃度均一性を算出した。

【0039】

応答時間および均一性の測定値のプロットを図8に記載する。図8(c)は、表示するように、チャンバの入口、中央、および出口の周囲に配置された異なる組織チャンバ領域の濃度応答を示す。入口と出口の間には明らかな濃度応答の遅延があるが、総試薬適用時間は同じである。組織の特定の領域を抗体に長時間または短時間曝露し、染色した結果、誤った標的発現レベルが得られるおそれがあるため、これは結果の再現性に極めて重要である。また、チャンバ全体での平均強度がチャンバの中央での測定値に非常に近いことも認められた。従って、組織薄片の特定の部分の高い光学倍率が必要な状況では、チャンバの中央を使用することができるが、その理由は、いずれにせよその他の部分は監視できないからである。組織チャンバ全体の平均を取ることにより算出した C および $1 - C$ の対数プロットを図8(a)および(b)に記載し、そこに、洗浄および充填サイクルに関する最良線フィッティングの傾きの平均を示している。 $-0.40 d e c / s$ の充填性能が認められ、それは、シリンジ内で試薬濃度99%を達成するためには、5秒の充填を必要とすることを意味する。同様に、洗浄性能は $-0.32 d e c / s$ であり、濃度を初期値の1%未満に低下させるのにバッファ7秒で十分であることが分かった。2つの間の不一致は、分子の拡散によるものと考えられ、それは充填サイクルには好都合であるが、洗浄には不都合である。図8(d)は、充填された状態のチャンバのピクセルヒストグラムを示し、それは、5秒充填した後のチャンバ全体での濃度不均一性が2%であることを示している。

【0040】

癌性組織上のバイオマーカーが比例検出されるようにするためのインキュベーション時間の最適化

マイクロ流体チャンバの時間応答について示したが、次にヒト乳癌組織上の診断バイオマーカーの分析について記載する。以前の分析に基づき、逐次的プロトコルを開発し、陽性の場合に、再現性よく高いシグナル対バックグラウンド($S B R$)比を有する蛍光画像を生成する最適なインキュベーション時間を求める必要がある。この最適化試験では、同じ腫瘍摘出術試料から隣接して切除された強い発現を有する7つのHER2/neu陽性組織薄片を一次抗体および二次抗体の様々なインキュベーション時間($t_{i n c}$)について使用して、インキュベーション条件を確立し、インキュベーション時間は対数的に変え、 2^n 分(式中、 $n = -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4$ である)のインキュベーションを行って、得られるシグナルに対するインキュベーション時間の影響を15秒から16分まで評価した。これは、充填後、中心から組織薄片表面まで1分の拡散所要時間を示すデバイス設計に関連しており、上記の組のインキュベーション時間は、理論値を中心に対数的に分布した事例となる。

【 0 0 4 1 】

図9は、プロトコル時間の最適化を示す。(a) 同じ腫瘍摘出術試料から隣接して切除されたHER2/neu陽性組織薄片に関する、一次抗体および二次抗体の様々なインキュベーション時間(t_{inc})について得られた蛍光強度。(b) (a)のシグナル値とバックグラウンド値の比を取ることで得られる、インキュベーション時間に対するシグナル対バックグラウンド比(SBR)。SBRの大部分はインキュベーションの最初の2分間で直線的に進展し、免疫反応がこの時間尺度では速度論的状態にあることを示唆している。(c) 追加のインキュベーション時間当たりのSBRの変化率。この変化率は $t_{inc} = 2$ 分で最大となり、組織薄片がそれより長いインキュベーション時間を経ると、減少し始める。(d) 標的抗原を発現する同じ組織薄片上の異なる領域について算出されたシグナル値のレベルの変動係数(CV)に関する試験。2~8分のインキュベーション時間(t_{inc})では、変動係数(CV)が約2%の、再現性のあるシグナル均一性が認められる。

10

【 0 0 4 2 】

組織の前処理および抗原賦活化後、表1に示すプロトコルを組織薄片に適用し、試薬充填時間およびバッファー洗浄時間はそれぞれ5秒および7秒であった。プロトコルをMTPに適用した後、顕微鏡スライドを取り出し、カバーガラスで覆い、走査型蛍光顕微鏡を用いて画像取得を行った。後で、これらの画像を使用して、癌細胞の細胞膜中にあるHER2/neu発現領域に対応する画像ピクセル上の蛍光強度の平均を取ることで、シグナル値を得る。同様に、ピクセルの他の部分での蛍光強度の平均を取ることで、バックグラウンド値を得る(図9(a))。図9(c)に示す、各インキュベーション時間について算出されたSBRのプロットから、 $n = -2$ のプロトコルでもシグナルが検出可能であり、HER2/neuに関してインキュベーション時間を64倍に延長してもSBRは1.2から1.90にしか改善しないことが分かる。SBRの大部分は、インキュベーションの最初の2分間で直線的に進展し、免疫反応はこの時間尺度では速度論的(反応によって制御された)状態にあり、後で、拡散によって制御されることを示唆している。また、標的抗原を発現する同じ組織薄片上の異なる領域について算出されたシグナル値のレベルの変動係数(CV)についても調べた。再現性のあるシグナル均一性が認められ、CVは、時間と共に低減するが、 $n = 1$ の後、安定化する(図9(d))。

20

【 0 0 4 3 】

本臨床試験に使用する最終的なプロトコルとして、 $n = 1$ (インキュベーション時間2分)のプロトコルを選択した。主な理由は、 $n = 1$ では、免疫反応は速度論的状態にあると考えられ、従って、この時間尺度のインキュベーションでは、組織薄片上に発現した抗原の量に正比例した蛍光シグナルが得られる。次に、SBR増加率は $n = 1$ まで最大であり、組織薄片がそれより長いインキュベーション時間を経ると減少し始め、従って、インキュベーション時間当たりのSBRは、 $n = 1$ を使用するとき最大に保たれる(図9(c))。 $n = 1$ のプロトコルは、免疫反応が速度論的状態にあり、最大のSBR増加と達成可能な最小のシグナルレベルCVとを有するものとなるため、最適なプロトコルであると結論付けることができる。それは、直ちに、全プロトコル時間が4 1/2分ということになる。

30

40

【 0 0 4 4 】

以前のIHC法との定量的な技術的性能比較を行うために、試薬容量当たりの染色面積、分析時間および試薬費用と定義される性能指数を設計した。表4は結果を表にまとめたものであり、それから、従来の方に対して、時間の改善がほぼ100倍、全体的な改善が1000倍となっていることが分かる。

【 0 0 4 5 】

標的当たり費やされる全時間を短縮する目的で、多重プロトコルの実現可能性も調べた。一次抗体と二次抗体との混合物を使用して、2つ以上の受容体を標的化すると、それによりIHCアッセイで標的当たりの全時間が短縮される。表2は、本発明の乳癌組織薄片に適用されるこのようなプロトコルのタイミングを示す。全時間は同じであるが、標的当

50

たりの時間は非多重化プロトコルの半分に短縮された。図10は、本システムを用いた免疫組織化学を使用する、乳癌バイオマーカーであるヒト上皮成長因子受容体(HER2/neu)およびエストロゲン受容体(ER)の例示的な多重蛍光検出を示す。マイクロ流体組織処理装置を用いた免疫組織化学を使用する、乳癌バイオマーカーであるヒト上皮成長因子受容体(HER2/neu)およびエストロゲン受容体(ER)の多重蛍光検出。検出は、インキュベーション時間が2分(n=1)であり、各抗原に対して標的化された一次抗体とび二次抗体との混合物を使用する最適化されたプロトコルで行った。(a)青色のチャンネルは、DAPIが結合した核の対比染色を表し、細胞の核を視覚化するのに役立つ。(b)HER2/neuは、モノクローナルウサギ抗ヒト一次抗体により検出され、ここでは赤色のチャンネルに示されているAlexa-Fluor 594標識ヤギ-抗ウサギポリクローナルIgG二次抗体により視覚化された。(c)エストロゲン受容体(ER)は、モノクローナルマウス抗ヒト一次抗体(Clone 6F11)により検出され、ここでは緑色のチャンネルで示されているAlexa-Fluor 647標識ヤギ抗マウスポリクローナルIgG二次抗体により視覚化された。(d)は、3つのチャンネルを一緒に示している。画像の幅は600µmに相当し、走査型蛍光顕微鏡を使用して高解像度画像を6×6でつなぎ合わせるにより得られる。

10

【0046】

臨床試験

開発されたMTPシステムを実際の場合で試験するために、病理学研究所のアーカイブから取り出された76の浸潤性乳管癌1組について一連の免疫組織化学的反応を行った。一次および二次抗体のインキュベーション時間を2分(n=1)にして、MTPでのHER2/neu免疫組織化学に最適な実験条件を確立した後、本プロトコルを76の浸潤性乳管癌に適用した。従来のIHCとMTP-IHCとの診断結果の比較を図11に示す。MTP-IHCでは、従来のIHCと比較して、不明瞭な結果が90%少なくなり、ISH増幅結果が正確に予測される。挿入された表は、試験した76例に関する、従来のIHCのスコアとMTP-IHCのスコアとの相互相関を示す。MTP-IHC法を使用した場合、それぞれスコア(0)および(+)の事例ならびにスコア(+++)の事例に関して、偽陽性または偽陰性結果は1つも得られなかった。さらに重要なことには、スコア(+++)の不明瞭な事例の数は、27例から3例に顕著に減少した(ほぼ90%の減少)。従来のIHCで診断されたスコア(+++)の不明瞭な事例24例は、MTP-IHCにより(0)/+または(+++)のいずれかに評価され、これらの24例ではそれぞれ、割り当ては遺伝子増幅状態に対応している。最初に(+++)の事例と診断された一例には、(+++)のスコアが再割り当てされた。従って、従来のIHCの代わりに前述のMTP-IHCを使用すると、最終的な診断HER2/neu結果がさらにずっと正確に予測される。

20

30

【0047】

代替および拡張された使用分野

本発明の流体動作は、圧力駆動流の発生だけに限定されるものではない。本デバイスの進歩性(インキュベーション時間の同時短縮、プロトコル反応が速度論的状态に維持されること、得られる読み取りシグナルと標的抗原量が示された比例関係になること、および流体の迅速かつ均一な交換による高い均一性)はまた、流体の流れが、動電流または熱誘起流れを含むがこれに限定されるものではない他の作動機構により生じる場合にも適用される。例えば、動電流または熱誘起流れを採用する他の発明も存在する(国際公開第2011/102801号および欧州特許第1974814号明細書)が、これらの文献では、進歩性は、流れを生じさせる特定の電極の特定の配置(または設計、形状等)自体にある。このような以前の請求項は、従って、前記マイクロチャンネルおよび前記組織チャンパ内の流体の流れを生じさせる他の方法と組み合わせても、本発明の使用を限定することはできない。

40

【0048】

同様に、本デバイスの進歩性はまた、限定されるものではないが、好ましくは組み込ま

50

た（金属またはポリマー）電極およびセンサによりおよび／または予備加熱された素子と接触させることにより行われる温度制御システムを、本発明に記載のマイクロ流体デバイスおよび一体化システム内に併せ持つ場合にも適用される。例えば、マイクロ流体システムに組み込まれたおよび／または追加された温度制御システムを採用する他の発明も存在する（米国特許出願公開第2005/009101号明細書）が、これらの文献では、進歩性は、温度制御システムを構成する加熱素子および検出素子の特定の特性、設計および／または形状にある。従って、このような以前の請求項は、前記マイクロチャンネルおよび前記組織チャンバ内の温度制御を実現する方法と組み合わせても、本発明の使用を限定しない。

【0049】

温度制御を必要とする例示的な用途には、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片の直接処理がある。FFPE組織切片の処理は、パラフィンワックス除去（脱蠟）工程、再水和工程および抗原賦活化工程をチップ上で行うことを必要とする。抗原賦活化法は一般的に組織を約95℃で加熱することを必要とするため、デバイス上にマイクロヒーターを作製することができれば、實際上、これは可能である。染色プロトコルに必要な既知の時間に基づいて、このようなチップ上での試料前処理を実現するのに必要な時間を推定することができる。表3には、チップ上での脱蠟および抗原賦活化プロトコルを要約しており、このような前処理はさらに5分で実現可能であることが示唆されている。従って、染色に必要な2.5分と合わせて、デバイスはFFPE組織切片の完全な処理を7.5分で実現できる可能性を有するが、現在まで報告されている最速の完全な処理は、70分のプロトコル時間を有する「波動」機構（PCT/US2006/015020号明細書および国際公開第2006/116037号）である。

【0050】

同様に、本デバイスの進歩性はまた、チャンバ内に固定化された成分を画像化するための画像化システム（限定されるものではないが、好ましくは、シリコンマイクロエレクトロニクス技術を使用して製造することができる光検出器もしくは光源、または光検出器のアレイを含む）を本発明に記載のマイクロ流体デバイスおよび一体化システムと組み合わせる場合にも適用される。例えば、マイクロ流体に関してこのような画像化システムを採用する他の発明（国際公開第2010/148252号）も存在するが、これらの文献では、進歩性は、画像化システムを構成しているこれらの素子および／または構造の特定の特性、設計および／または形状にある。このような以前の請求項は、従って、マイクロチャンネルおよび組織チャンバ内に画像化システムを組み込む方法と組み合わせた本発明の使用を限定するものではない。

【0051】

同様に、本デバイスの進歩性はまた、光学部品（限定されるものではないが、好ましくは、光検出器および光源またはこれらの光検出器および光源のアレイの前に配置される、レンズ、対物レンズ、マイクロレンズアレイ、偏光フィルタおよび／または蛍光フィルタを含む）が本発明に記載のマイクロ流体デバイスおよび一体化システムと組み合わせられる場合にも適用される。例えば、マイクロ流体に関してこのような光学素子を採用する他の多くの発明（国際公開第2010/148252号）が存在するが、これらの文献では、進歩性は、光学システムを構成しているこれらの素子および／または構造の特性、設計および／または形状にある。このような以前の請求項は、従って、マイクロチャンネルおよび組織チャンバ内に光学素子を組み込む方法と組み合わせた本発明の使用を限定しない。

【0052】

本発明に記載のデバイスは、癌バイオマーカーの免疫組織化学的検出に有用であることが判明し、従来の免疫組織化学と比較して、診断結果（遺伝子増幅により確認する場合）に関して判別力がずっと改善された（図11）。これは、著しく短縮されたインキュベーション時間により説明され、初期の最初の数分のインキュベーション時間を支配する比例関係から有利となり得、そこでは、抗体が抗原に非常によく比例して結合し、抗体濃度と抗原濃度との一次関数として一定の結合率を有する。従って、本発明の適用は、IHCに

10

20

30

40

50

限定されるものではなく、固体支持体上に固定化されている標的の程度に正比例する反応を達成するために、比例した速度論的状态で機能するように調整できるどのような表面反応にも使用することができる。

【0053】

本発明に記載のデバイスは、縦方向のアクセス穴およびチャンバの周囲に分布したマイクロ流体チャンネル網の高機能構成 (intelligent architectural) 配置 (図3) および高圧を使用して、組織薄片上にある大きい (16mm×16mm) が非常に浅い (100μm未満) 低容量のインキュベーションチャンバ内での迅速で、完全且つ均一なバイオ試薬交換を保証する (図2~8)。このようにして、組織薄片上へのバイオ試薬の洗浄および充填時間は、得られる対流のため、5~7秒の最小限に保たれるが、実際のインキュベーション時間中は非流動状態が確保される。その他に、初期の反応により制限された直線状態にある時はインキュベーション時間の関数としてのSBR比の増加がさらに顕著であることが認められ (図9(c))、一般的に、本デバイスでは、必ずしも検出抗体濃度を増加させることなく、十分に強い読み取りシグナルを達成するのに短いインキュベーション時間で十分であることが分かった。

10

【0054】

FFPE組織から完全に処理する時間が10分であるということはまた、方法の術中利用の時間尺度ならびに独立型の小型自動診断IHCシステムの使用とよく適合する。デッドボリュームの減少、システム圧力の上昇、ならびに組織試料上への試薬およびバッファの均一な流れの実現がアッセイ時間の短縮を助けたが、それは、手術中の即時のフィードバックと見なされるほど十分短い。標準的なスライドガラス上に固定化された組織薄片をマイクロ流体構造に機械的にクランプし、それを1分以内に取り替えることができるが、これはTSの交換に必要な唯一の組み立て工程である。性能指数の比較 (表4) から、既存の方法と比較して本発明は1000倍の改善を示し得ることが判明した。

20

【0055】

小型顕微鏡を組み込むことにより、前述の技術を独立型の完全な免疫組織化学的診断の解決策に容易に変えることができる。従って、追加のインフラストラクチャーや熟練した職員がなく、事実上維持管理なしでも、診断を行うことができる。

【0056】

しかし、本発明は、前述の実施例に限定されるものではない。

30

【0057】

参考文献

Vanesa Fernandez - Moreira, Bo Song, Venkataragavalu Sivagnanam, Anne - Sophie Chauvin, Caroline D. B. Vandevyver, Martin Gijjs, Ilkka Hemmilae, Hans - Anton Lehr, and Jean - Claude G. Buenzli. Bioconjugated lanthanide luminescent helicates as multilabels for lab-on-a-chip detection of cancer biomarkers. Analyst, number 135, p. 42 - 52, 2010. B

40

Ata Tuna Ciftlik, Bo Song, Caroline Vandevyver, Jean - Claude Buenzli, Hans - Anton Lehr, and Martinus Gijjs. Fast immunohistochemical biomarker detection device for cancer tissue slices. Proceedings of 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen, Netherlands, October 3 - 7, 2010, 2010.

50

Minseok S. Kim, Seyong Kwon, Taemin Kim, Eun Sook Lee, Je-Kyun Park. Quantitative proteomic profiling of breast cancers using a multiplexed microfluidic platform for immunohistochemistry and immunocytochemistry, *Biomaterials*, Volume 32, Issue 5, February 2011, p. 1396 - 1403

Kim MS, Kim T, Kong S-y, Kwon S, Bae CY, et al. Breast cancer diagnosis using a microfluidic multiplexed immunohistochemistry platform. *PLoS ONE* 5(5): e10441. doi: 10.1371/journal.pone.0010441, 2010

10

Page Erickson, Michael Everman, Michael Bell, Kevin Edberg, Matthew Botke. Enhanced fluidic method and apparatus for automated rapid immunohistochemistry. PCT/米国特許出願公開第2006/015020号明細書, 国際公開第2006/116037号パンフレット, 2011

20

Micheal Mcneely, Nis Adey, Mark Spute, Edward Ayliffe, et al., Method and system for microfluidic interfacing to array. PCT/米国特許出願公開第02/07113号明細書, 国際公開第2002/072264号パンフレット, 2002

Arthur Queval, Nageswara R. Ghattamaneni, Cecile M. Perrault, Raminder Gill, Maryam Mirzaei, R. Anne McKinney and David Juncker. Chamber and microfluidic probe for microperfusion of organotypic brain slices. *Lab Chip*, 2010, 10, 326 - 334

30

Emmanuel Delamarche, Ute Dreschsler, and Robert Lovchik. Multilayer microfluidic probe head and method of fabrication thereof. PCT/IB2010/052018, 国際公開第2010/128483号, 2010

40

Emmanuel Delamarche, David Juncker, Bruno Michel, and Heinz Schmid. Method and device for flowing a liquid on a surface. PCT/IB2003/005350, 国際公開第2004/050246号, 2004

Lamprecht Waltraud, Mathes Anton, Wenczel Gyoergy, and Streit Wolfgang. Device and process unit for providing a hybridization chamber. 米国特許出願公開第2006/0003440号明細書, 2006

50

Jon Hoshizaki, Joon Mo Yang, Maryam Shariati, David Cox, Kirk Hirano et al., Low-volume sequencing system and method of use. PCT/US2010/047392号明細書, 国際公開第2011/026136号, 2011

Nils Adey. Laminated microarray interface device. PCT/US02/24616号明細書, 国際公開第2003/015922号, 2003. 10

Gibum Kim, Todd Schwoerer. Microfluidic apparatus for wide area microfluidics. PCT/US2008/074865号明細書, 国際公開第2009/029845号, 2009

Ata Tuna Ciftlik and Martin A.M. Gijs, Polyene to silicon nitride bonding for post-integration of high pressure microfluidics to CMOS devices, Lab on a Chip, 2012, 12(2), 396-400. doi:10.1039/c1lc20727j. 20

Mark A Eddings, Michael A Johnson and Bruce K Gale, Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices, Journal of Micromechanics and Microengineering, 2008, 18, 067001.

Nathaniel Robinson and Per Erlandsson, An electrokinetic fluidic system, 国際公開第2011/102801号, 2011. 30

Koninklijke Philips Electronics NV, A microfluidic device based up on active matrix principles, 欧州特許第1974814号明細書, 2008

Gary Blackburn, Microfluidic devices comprising biochannels, 米国特許出願公開第2005/009101号明細書, 2005.

Jody Vykoukal, Daynene M. Vykoukal, Gregory P. Stone, Eckhard U. Alt, method and apparatus for quantitative microimaging, 国際公開第2010/148252号, 2010. 40

【表 1】

表1-インキュベーション時間最適化試験のためにマイクロ流体デバイスで適用されたIHCアッセイのタイミング。prAbおよびsdAbはそれぞれ、一次抗体および二次抗体に対応する。各バイオマーカーに関して、 $n=-2, -1, 0, 1, 2, 3, 4$ に対応する様々なインキュベーション時間について調べる。

試薬	流動時間(秒)	インキュベーション時間(分)	工程時間(秒)
バッファー	7	-	7
prAb	5	2^n	$60(2^n)+5$
バッファー	7	-	7
蛍光標識を有するsdAb+DAPI	5	2^n	$60(2^n)+5$
バッファー	7	-	-
標的当たりの合計	31	2^{n+1}	$60(2^n)+31$

10

【表 2】

表2-マイクロ流体デバイスに適用された多重化IHCアッセイのタイミング

試薬	流動時間(秒)	インキュベーション時間(秒)	工程時間(秒)
バッファー	7	-	7
prAb ₁ +prAb ₂	5	120	125
バッファー	7	-	7
蛍光標識を有するsdAb ₁ +sdAb ₂	5	120	125
バッファー	7	-	7
合計	31	240	271
陰性対照を含まない標的当たりの合計	16	120	136

20

【表 3】

表3-マイクロ流体デバイスに適用されたFFPE TSのIHC前処理の仮タイミング

試薬	流動時間(秒)	インキュベーションまたは加熱(秒)	工程時間(秒)
脱蠟 (キシレン流)	30	-	7
再水和 (DI&エタノール)	60	-	65
抗原賦活化溶液および加熱	15	45	7
抗原賦活化	-	120	65
バッファー	30	-	-
合計	135	165	300

30

40

【表 4】

表4-従来のIHCアッセイと本システムを有する前述のラボオンチップとの比較

システム	スライドの種類	標的当たりの染色面積	試薬 (μL)	試薬 単位費用	標的当たりの最短時間 (分)	性能係数 面積/(容量*分*費用)
従来	標準	100%	1000	2	120	4.15
本発明の第1世代	標準	38%	33	0	20	52.34
MMIHC	標準	1.5%	30~60	0.1	90~154	55
「波動」	標準	100%	250~350	2	15	132.5
本発明の第2世代	非標準	100%	180	10	3 1/2	158
本システム、非多重化	標準	100%	200	1	2 1/2	2000
本システム、多重化	標準	100%	100	1	1 1/4	8000

10

【図 1】

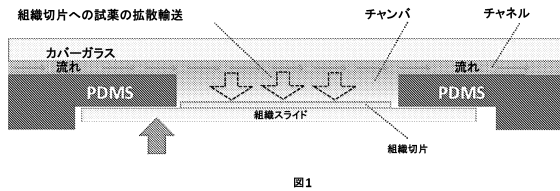


図1

【図 2】

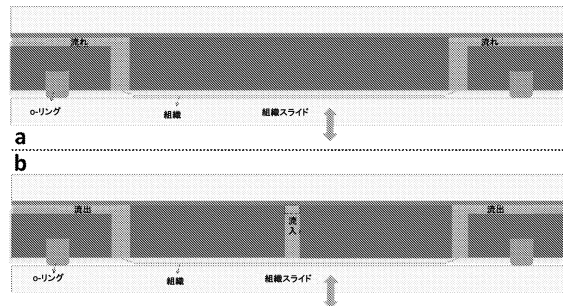


図2

【図 3】

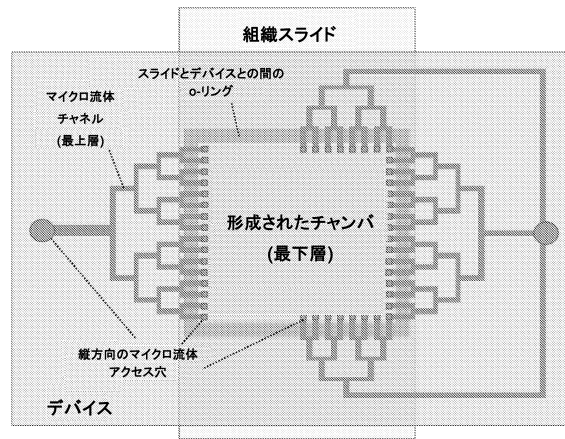


図3

【図 4】

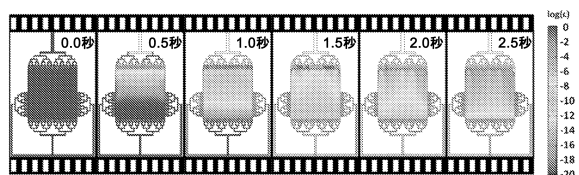


図4

【 図 5 】

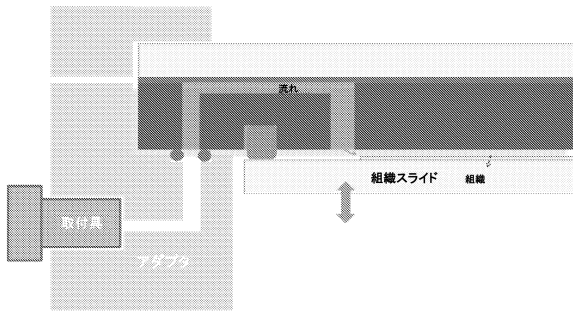


図5

【 図 6 】

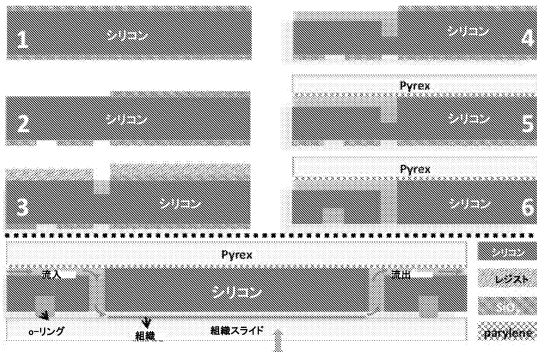


図6

【 図 8 】

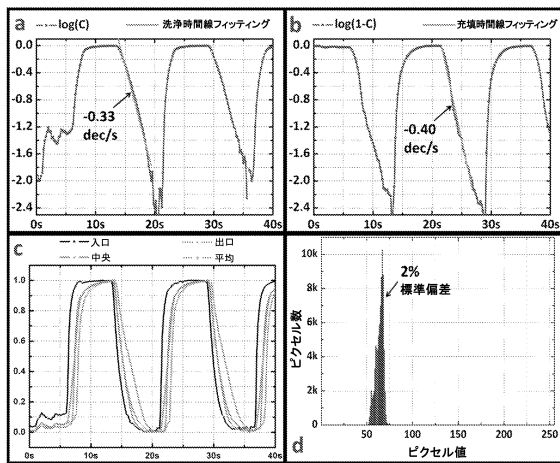


図8

【 図 7 】

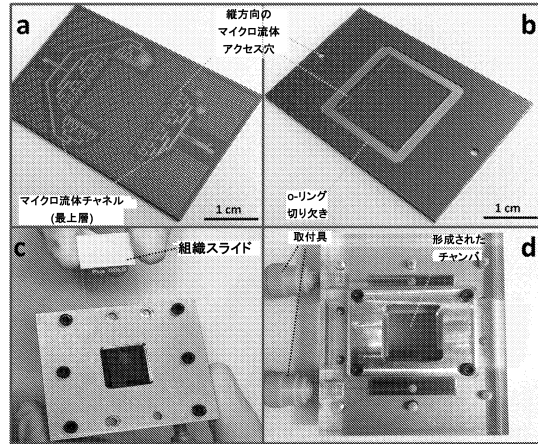


図7

【 図 9 】

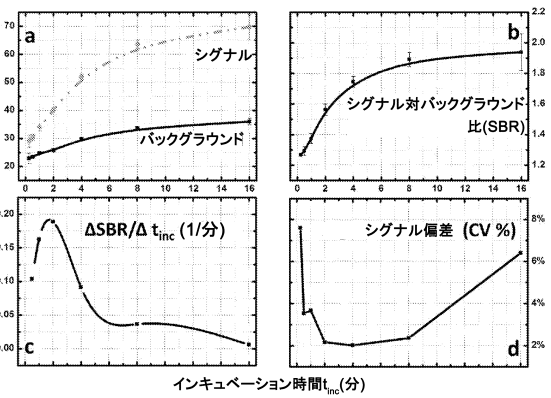


図9

【 10 】

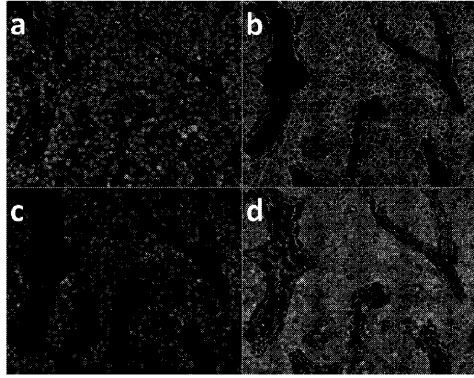


Figure 10

【 11 】

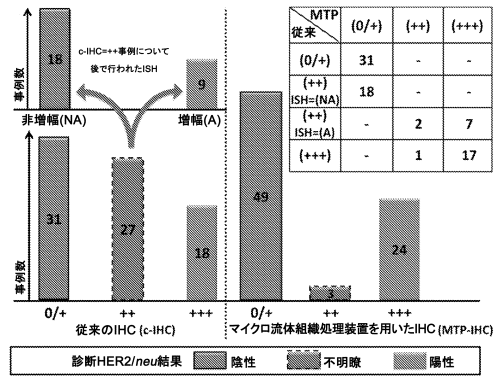


図 11

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	B
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/48	P
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y

(72)発明者 ジィズ, マルタン
 スイス連邦 セーアシュ - 1 0 2 4 エクブラン, シュマン ドウ ラ ドール 6

審査官 東松 修太郎

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0190265 (US, A1)
 特表2004-533605 (JP, A)
 米国特許出願公開第2004/0101870 (US, A1)
 国際公開第2010/148252 (WO, A1)
 国際公開第2010/042539 (WO, A1)
 国際公開第91/007486 (WO, A1)
 特表2007-536504 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 4 4
 G 0 1 N 3 5 / 0 0 - 3 7 / 0 0
 B 0 1 J 1 9 / 0 0
 C 1 2 M 1 / 0 0
 C 1 2 M 1 / 3 4
 C 1 2 Q 1 / 0 4

专利名称(译)	滑动可拆卸样品处理装置		
公开(公告)号	JP6318094B2	公开(公告)日	2018-05-09
申请号	JP2014558234	申请日	2013-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	洛桑联邦理工学院莱斯埃佩`F萨尔瓦多 洛桑联邦理工学院		
申请(专利权)人(译)	洛桑联邦理工学院莱斯 (Epeefueru)		
当前申请(专利权)人(译)	洛桑联邦理工学院莱斯 (Epeefueru)		
[标]发明人	チフトリックアタトゥナ ジイズマルタン		
发明人	チフトリック,アタトゥナ ジイズ,マルタン		
IPC分类号	G01N1/30 G01N35/08 G01N37/00 B01J19/00 C12M1/00 C12M1/34 C12Q1/04 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L3/50273 B01L2300/0636 B01L2300/0819 B01L2300/0822 B01L2300/0877 B01L2300/0887 B01L2400/0415 B01L2400/0442 G01N1/312 G01N33/57415 G01N33/57484 G01N2333/71 G01N2333/723 G01N2333/91205		
FI分类号	G01N1/30 G01N35/08.A G01N37/00.101 B01J19/00.321 C12M1/00.A C12M1/34.B C12Q1/04 G01N33/48.P G01N33/53.Y		
优先权	2012000256 2012-02-27 CH		
其他公开文献	JP2015517088A JP2015517088A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

生物和化学样品处理装置b。包括具有至少一个由包含样品例如固定化实体，生物样品或分子的可拆卸载玻片形成的壁的高耐压，浅且广域微流体腔室，c。包括用于注射到所述腔室并从中收集流体的微流体入口孔的布置，d。与在腔室外部形成的入口端口和微流体通道接口连接，构造成使得滑动件可以与装置接触以形成所述腔室，f。适于以快速的方式（优选在小于15秒内）以及以规则或均匀的方式递送和输送所述腔室内的流体物质和试剂，这是由于所述微流体通路孔的布置。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6318094号 (P6318094)
(45) 発行日 平成30年5月9日 (2018. 5. 9)	(24) 登録日 平成30年4月6日 (2018. 4. 6)	
(51) Int. Cl.	F 1	
GO 1 N 1/30 (2006. 01)	GO 1 N 1/30	
GO 1 N 35/08 (2006. 01)	GO 1 N 35/08	A
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 37/00	1 0 1
BO 1 J 19/00 (2006. 01)	BO 1 J 19/00	3 2 1
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00	A
請求項の数 12 (全 24 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-558234 (P2014-558234)	(73) 特許権者 514211806	
(86) (22) 出願日 平成25年2月15日 (2013. 2. 15)	エコール ポリテクニク フェアラール	
(65) 公表番号 特表2015-517088 (P2015-517088A)	ドゥ ローザンヌ (エペエフェル)	
(43) 公表日 平成27年6月18日 (2015. 6. 18)	Ecole Polytechnique	
(86) 国際出願番号 PCT/IB2013/051245	Federale de Lausanne (EPFL)	
(87) 国際公開番号 W02013/128322	スイス連邦 セーアシュー1005 ローザンヌ, エペエフェル, イノヴェイション	
(87) 国際公開日 平成25年9月6日 (2013. 9. 6)	パーク ジ, エペエフェル-ラチオ	
審査請求日 平成28年2月9日 (2016. 2. 9)	(74) 代理人 110001302	
(31) 優先権主張番号 00256/12	特許業務法人北青山インターナショナル	
(32) 優先日 平成24年2月27日 (2012. 2. 27)	チフトリック,アタトゥナ	
(33) 優先権主張国 スイス (CH)	(72) 発明者	
	スイス連邦 セーアシュー1006 ローザンヌ, シュマン ドゥ ラ ジョリエット 5	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 スライドが着脱可能な試料処理デバイス