

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-191190  
(P2019-191190A)

(43) 公開日 令和1年10月31日(2019.10.31)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 2 G O 4 5
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	M 4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	GO 1 N 33/48	Z 4 B O 6 3
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
C 1 2 Q 1/04	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A

審査請求 有 請求項の数 29 O L 外国語出願 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-123063 (P2019-123063)  
 (22) 出願日 令和1年7月1日(2019.7.1)  
 (62) 分割の表示 特願2016-524322 (P2016-524322) の分割  
 原出願日 平成26年7月1日(2014.7.1)  
 (31) 優先権主張番号 61/843, 252  
 (32) 優先日 平成25年7月5日(2013.7.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/894, 788  
 (32) 優先日 平成25年10月23日(2013.10.23)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)  
 (特許庁注：以下のものは登録商標)  
 1. プルロニック

(71) 出願人 513111938  
 ユニバーシティ オブ ワシントン スル  
 ー イッツ センター フォー コマーシ  
 ャライゼーション  
 アメリカ合衆国 ワシントン 98105  
 -4990, シアトル, 11ティーエ  
 イチ アベニュー ノースイースト 43  
 11, スイート 500, キャンパス  
 ボックス 354990  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

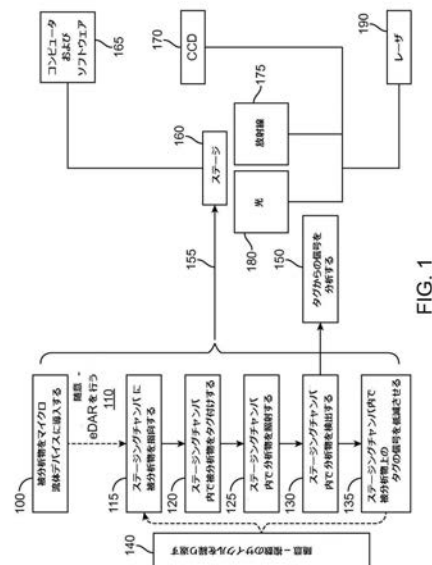
(54) 【発明の名称】 マイクロ流体アッセイのための方法、組成物およびシステム

(57) 【要約】

【課題】 マイクロ流体アッセイのための方法、組成物およびシステムの提供。

【解決手段】 本明細書では、いくつかある側面の中でも、サンプル中の粒子を分析するための方法および装置が提供される。いくつかの側面では、粒子は、被分析物、細胞、核酸、またはタンパク質であり得、タグと接触し、アリコートに分割し、ランク付けデバイスによって検出し、単離することができる。本明細書で提供される方法および装置は、マイクロ流体チップを含んでもよい。いくつかの側面では、本方法および装置は、疾患の診断、予後、または治療のために癌細胞および他の希少細胞等のサンプル中の希少粒子を定量化するように使用されてもよい。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

流体サンプル中の第 1 の細胞型を検出するための装置であって、前記流体サンプルは、前記第 1 の細胞型と第 2 の細胞型とを含み、前記装置は、

入力チャンネルと、第 1 の出力チャンネルと、第 2 の出力チャンネルと、前記第 1 の出力チャンネルと流体連通しているチャンバと、指向性流チャンネルとを備えるマイクロ流体チップと

弁であって、前記弁は、前記マイクロ流体チップから分離可能であり、前記弁は、前記指向性流チャンネル中の第 1 の流体の流動を調節し、前記指向性流チャンネル中の前記第 1 の流体の流動は、前記入力チャンネルから前記第 1 の出力チャンネル、前記第 2 の出力チャンネル、または、それらの組み合わせへ第 2 の流体の流動を指向する、弁と、

前記入力チャンネル中の前記第 2 の流体の一部分から発せられる信号を検出するように構成された検出器と、

プロセッサと

を備え、

前記プロセッサは、

前記第 1 の細胞型を第 1 のタグに取り付けられた第 1 の構造に接触させることであって、前記第 1 の細胞型は、第 1 のマーカーを含み、前記第 1 の構造は、前記第 1 のマーカーに対する親和性を有する、ことと、

前記一部分中の前記第 1 の細胞型の存在または不存在を検出することであって、前記一部分中の前記第 1 の細胞型の存在または不存在を検出することは、放射線源を使用して前記第 1 のタグによって発せられる第 1 の信号を検出することを含み、前記第 1 の信号は、前記第 1 のマーカーの存在を示す、ことと、

前記信号に基づいて値を前記一部分に割り当てることと、

前記弁を操作することによって前記割り当てられた値に基づいて前記一部分の流動を指向することであって、前記一部分の流動を指向することは、前記第 1 のタグの存在に基づいて前記第 1 の細胞型を分割することを含む、ことと、

前記放射線源を使用して前記第 1 の信号の強度を低減させることと、

前記第 1 の細胞型を、前記第 1 のマーカーとは異なる第 2 のマーカーに対する親和性を有する第 2 の構造に接触させることであって、前記第 2 の構造は、第 2 のタグに結合されている、ことと、

前記第 2 のタグによって発せられる第 2 の信号を検出することであって、前記第 2 の信号は、前記第 1 の信号に重複する、ことと

を行うように構成されている、装置。

## 【請求項 2】

前記第 1 の細胞型は、希少細胞である、請求項 1 に記載の装置。

## 【請求項 3】

前記一部分は、アリコートであり、前記アリコートは、3次元空間を通して無作為に分布された複数の細胞を含む、請求項 1 に記載の装置。

## 【請求項 4】

前記第 1 の出力チャンネルと流体連通しているフィルタをさらに備える、請求項 1 に記載の装置。

## 【請求項 5】

一式の管類をさらに備え、前記マイクロ流体チップは、前記一式の管類に流体的に接続された少なくとも 1 つのチャンネルを備える、請求項 1 に記載の装置。

## 【請求項 6】

前記フィルタは、開口のレイを備える、請求項 4 に記載の装置。

## 【請求項 7】

前記チャンバは、管類を介して前記第 1 の出力チャンネルと流体連通している、請求項 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8】

前記フィルタは、希少細胞が前記フィルタを通過することができないように構成されている、請求項 4 または 6 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 9】

前記チャンバは、バイアル、微小遠心管、または、ウェルプレート内のウェルである、請求項 1 ~ 8 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 10】

前記第 1 の細胞型から発せられる信号を低減させるように構成された放射線源をさらに備える、請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 11】

前記弁は、前記アリコートに割り当てられた前記値に依存して、前記第 1 の出力チャンネルまたは前記第 2 の出力チャンネルへ前記アリコートの流動を指向する、請求項 3 に記載の装置。

## 【請求項 12】

マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコートを単離するための方法であって、前記マイクロ流体チップは、第 1 の出力チャンネルと流体連通しているチャンバを備え、前記アリコートは、3次元空間を通して無作為に分布された複数の細胞の中の第 1 の細胞型を含み、前記複数の細胞は、前記第 1 の細胞型と第 2 の細胞型とを含み、前記方法は、

前記第 1 の細胞型を第 1 のタグに結合された第 1 の構造に接触させるステップであって、前記第 1 の細胞型は、第 1 のマーカを含み、前記第 1 の構造は、前記第 1 のマーカ

に対する親和性を有する、ステップと、  
前記アリコート中の前記第 1 の細胞型の存在または非存在を検出するステップであって、前記アリコート中の前記第 1 の細胞型の存在または非存在を検出するステップは、放射線源を使用して前記第 1 のタグによって発せられる第 1 の信号を検出することを含み、前記第 1 の信号は、前記第 1 のマーカの存在を示す、ステップと、

前記第 1 の細胞型の存在または非存在に基づいて、値を前記アリコートに割り当てるステップと、

電子作動型弁を開放することによって、前記割り当てられた値に基づいて前記アリコートの流動を指向するステップであって、前記アリコートの流動を指向するステップは、前記第 1 のタグの存在に基づいて前記第 1 の細胞型を分割することを含み、前記電子作動型弁は、前記マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップと、

前記第 1 の信号の強度を低減させるステップと、

前記第 1 の細胞型を、前記第 1 のマーカとは異なる第 2 のマーカに対する親和性を有する第 2 の構造に接触させるステップであって、前記第 2 の構造は、第 2 のタグに結合されている、ステップと、

前記第 2 のタグによって発せられる第 2 の信号を検出するステップであって、前記第 2 の信号は、前記第 1 の信号に重複する、ステップと

を含む、方法。

## 【請求項 13】

(a) 前記サンプルを前記マイクロ流体チップに導入することと、

(b) 入力チャンネルを通して前記サンプルの一部分を流動させることであって、前記一部分は、複数の前記第 1 の細胞型、複数の前記第 2 の細胞型、または、それらの組み合わせを含む、ことと、

(c) 検出器を使用して、前記一部分内の前記第 1 の細胞型の存在または非存在を検出することと、

(d) 前記第 1 の細胞型が前記一部分内に存在する場合、前記一部分を前記チャンバの中へ指向することと、

(e) 前記チャンバが、前記サンプル内に存在する前記第 1 の細胞型の総数の 80% 超を含み、かつ、前記サンプル内に存在する前記第 2 の細胞型の総数の 5% 未満を含むように、(b)、(c)、(d) を十分な回数繰り返すことと

10

20

30

40

50

をさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記マイクロ流体チップは、サンプル入力チャネルと、少なくとも 2 つの出力チャネルと、少なくとも 1 つの指向性流チャネルとを備え、前記電子作動型弁は、前記指向性流チャネル内の流体の流動を制御する、請求項 1 2 ~ 1 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記少なくとも 2 つの出力チャネルのうちの少なくとも 1 つと流体連通しているフィルタを使用して前記第 1 の細胞型を捕捉することをさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記フィルタは、開口のアレイを備える、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記第 1 の細胞型は、希少細胞であり、前記フィルタは、前記希少細胞が前記フィルタを通過することができないように構成されている、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記第 1 の細胞型または前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、癌細胞である、請求項 1 2 ~ 1 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記希少細胞は、癌細胞である、請求項 1 7 または 1 8 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記第 1 の細胞型または前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、循環腫瘍細胞である、請求項 1 2 ~ 1 9 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記第 1 の細胞型または前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または、幹細胞である、請求項 1 2 ~ 2 0 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 1 の細胞型または前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、前記サンプル中の全細胞集団の 1 % 未満を含む希少細胞である、請求項 1 2 ~ 2 1 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記サンプルは、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、尿生殖路の分泌物から成る群から選択される、請求項 1 2 ~ 2 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記弁は、電子作動型弁であり、前記電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャネル中の前記流体の前記流動を制御するソレノイド弁である、請求項 1 ~ 1 1 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 2 5】

少なくとも 1 つの指向性流チャネルは、少なくとも 2 つのポートを備え、前記弁は、電子作動型弁であり、前記弁は、前記ポートのうちの 1 つを通る前記流体の流動を制御する、請求項 1 ~ 1 1 または 2 4 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 2 6】

前記弁は、電子作動型弁であり、前記弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャネル中の流体の流動を直接制御する、請求項 1 ~ 1 1 または 2 4 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

前記弁は、電子作動型弁であり、前記弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する、請求項1～11または24～26のうちのいずれか1項に記載の装置。

【請求項28】

前記弁は、電子作動型弁であり、前記弁は、出力チャンネル中の流体の流動を直接制御する、請求項1～11または24～27のうちのいずれか1項に記載の装置。

【請求項29】

前記検出器は、出力チャンネルではない少なくとも1つのチャンネルの上に位置している、請求項1～11または24～28のうちのいずれか1項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

10

【背景技術】

【0001】

(相互参照)

本願は、2013年7月5日に出願された米国仮出願番号第61/843,252号および2013年10月23日に出願された米国仮出願番号第61/894,788号の利益を主張しており、これら出願は、すべての目的のためにそれらの全体が参考として本明細書中に援用される。

【0002】

(連邦政府によって後援された研究に関する陳述)

本発明は、National Institutes of Healthによって授与されたCA147831の下で政府支援とともになされた。政府は本発明において特定の権利を有している。

20

【0003】

(背景)

循環腫瘍細胞(CTC)は、原発腫瘍から血流に流され、癌転移の重要な側面である。CTCは、乳、肺、前立腺、および膵臓癌等の多くの異なる種類の癌で検出されてきた。CTCの数は、転移患者における臨床転機と直接相関し、臨床診療を管理するために役立つ、貴重な予後情報を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0004】

(要旨)

本明細書では、粒子を単離して分析し、検定(アッセイ)を行うための方法、装置、システム、およびデバイスが説明される。

【0005】

種々の側面では、流体内の被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するために方法が提供され、本方法は、(a)放射線源を使用して、第1のタグから信号を検出するステップであって、第1のタグは、被分析物上の第1のマーカーに結合する第1の構造に取り付けられる、ステップと、(b)第1のタグの存在に基づいて被分析物を分割するステップと、(c)第1のタグの信号の強度を低減させるステップと、(d)被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに取り付けられる、ステップと、(e)第2のタグを検出するステップとを含む。

40

【0006】

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカーを検出するために方法が提供され、本方法は、被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第1のマーカーを含み、第1のタグは、第1のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、第1の信号の存在は、第1のマーカーの存在を示す、ステップと、第1の信号の存在に基づいて、被分析物を含む流体を分割するステップと、第1の信号の強度を低減させるステップと、被分析物を第2のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第2のマーカーを備え、

50

第2のタグは、第2のマーカ-に対する親和性を有する、ステップと、第2のタグによって発せられる第2の信号を検出するステップであって、第2の信号の存在は、第2のマーカ-の存在を示す、ステップとを含む。

**【0007】**

種々の側面では、第1の細胞型および第2の細胞型を含むサンプルから細胞を単離するために方法が提供され、本方法は、(a)一式の管類を介してサンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、マイクロ流体チップは、(i)一式の管類に流体的に接続される少なくとも1つのチャンネルと、(ii)少なくとも1つのチャンネル内の細胞の信号を検出するように構成される検出器と、(iii)少なくとも1つのチャンネルに流体的に接続される少なくとも1つのチャンバとを備える、ステップと、(b)検出器を通り過ぎてサンプルの一部分を流動させるステップと、(c)サンプルの一部分内の第1の細胞型の存在または非存在を検出するために、検出器を使用するステップと、(d)第1の細胞型がサンプルの一部分内で検出される場合、サンプルのアリコートチャンバの中へ指向するステップであって、アリコートは、第1の細胞型を含む、ステップと、(e)ステップ(b)、(c)、および(d)を繰り返し、それによって、チャンバが、サンプル内の第1の細胞型の総数の80%超、およびサンプル内の第2の細胞型の総数の5%未満を含むように、チャンバ中の複数のアリコートを単離するステップとを含む。

10

**【0008】**

種々の側面では、サンプルから細胞を単離するために方法が提供され、本方法は、(a)サンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、サンプルは、第1の細胞型と、第2の細胞型とを含み、マイクロ流体チップは、チャンネルと、チャンネル内で発せられる信号を検出するように構成される検出器と、チャンネルと流体連通しているチャンバとを備える、ステップと、(b)チャンネルを通してサンプルの一部分を流動させるステップであって、一部分は、複数の第1の細胞型、複数の第2の細胞型、またはそれらの組み合わせを含む、ステップと、(c)検出器を使用して、一部分内の第1の細胞型の存在または非存在を検出するステップと、(d)第1の細胞型が一部分内に存在する場合、一部分をチャンバの中へ指向するステップと、(e)チャンバが、サンプル内に存在する第1の細胞型の総数の80%超、およびサンプル内に存在する第2の細胞型の総数の5%未満を含むように、十分な回数で(b)、(c)、および(d)を繰り返すステップとを含む。

20

**【0009】**

種々の側面では、流体に由来するサンプルから特定のバイオマ-プロファイルを発現する細胞を分割するために装置が提供され、本装置は、少なくとも1つのチャンネル、およびチャンバを有する、マイクロ流体チップに接続される一式の管類を備え、本装置は、チャンバ中の細胞を単離することが可能であり、単離後、チャンバは、特定のバイオマ-プロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の80%超を含み、単離後、チャンバは、異なるバイオマ-プロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の5%未満を含む。

30

**【0010】**

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカ-を識別するために方法が提供され、本方法は、(a)複数の微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を經由して被分析物を流動させることによって、複数の被分析物を分割するステップであって、微小空洞またはマイクロパッチの大部分は、多くても1つの被分析物を含有することが可能であり、微小空洞またはマイクロパッチは、マイクロ流体デバイスの中に位置する、ステップと、(b)微小空洞またはマイクロパッチの中で、各被分析物を、第1のマーカ-に結合することが可能である第1の構造と接触させるステップであって、第1の構造は、第1のタグに接続される、ステップと、(c)第1のタグから信号を検出するステップと、(d)第1のタグの信号のレベルを低減させるステップと、(e)被分析物を、第2のマーカ-に結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに接続される、ステップと、(f)第2のタグを検出するステップとを含む。

40

**【0011】**

50

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカ-を検出するために方法が提供され、本方法は、微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を經由して流体を流動させることによって、微小空洞中またはマイクロパッチ中の被分析物を単離するステップであって、流体は、被分析物を含む、ステップと、被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第1のマーカ-を含み、第1のタグは、第1のマーカ-に対する親和性を有する、ステップと、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、第1の信号の存在は、第1のマーカ-の存在を示す、ステップと、第1の信号の強度を低減させるステップと、被分析物を第2のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第2のマーカ-を含み、第2のタグは、第2のマーカ-に対する親和性を有する、ステップと、第2のタグによって発せられる第2の信号を検出するステップであって、第2の信号の存在は、第2のマーカ-の存在を示す、ステップとを含む。

10

## 【0012】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を検出するためにシステムが提供され、本システムは、入力チャンネル、第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、および指向性流チャンネルを備える、マイクロ流体チップと、弁であって、弁は、マイクロ流体チップから分離可能であり、弁は、指向性流チャンネル中の第1の流体の流動を調節し、指向性流チャンネル中の第1の流体の流動は、入力チャンネルから第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ第2の流体の流動を指向する、弁と、入力チャンネル中の第2の流体の一部分から発せられる信号を検出するように構成される、検出器と、信号に基づいて値を一部分に割り当て、弁を操作するように構成される、プロセッサとを備える。いくつかの側面では、弁は、電子作動型弁である。

20

## 【0013】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を検出するためにシステムが提供され、本システムは、(a)少なくとも1つのサンプル入力チャンネル、少なくとも1つの指向性流チャンネル、および少なくとも2つの出力チャンネルを備える、マイクロ流体チップであって、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、サンプル入力チャンネルに交差する、マイクロ流体チップと、(b)マイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する、電子作動型弁であって、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルまたは少なくとも2つの出力チャンネルのうちの少なくとも1つに交差する入力チャンネルを制御することによって、流体の流動を制御する、電子作動型弁と、(c)流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る被分析物を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)アリコート中の被分析物の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることが可能なプロセッサであって、プロセッサは、検出器および電子作動型弁と通信している、プロセッサとを備える。

30

## 【0014】

種々の側面では、マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコートを単離するために方法が提供され、アリコートは、希少粒子を含み、本方法は、(a)アリコート中の希少粒子の存在または非存在を検出するステップと、(b)希少粒子の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てると、(c)電子作動型弁を開放することによって、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向するステップであって、電子作動型弁は、マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップとを含む。いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、サンプル入力チャンネルと、少なくとも2つの出力チャンネルと、少なくとも1つの指向性流チャンネルとを備え、電子作動型弁は、指向性流チャンネル内の流体の流動を制御する。

40

## 【0015】

種々の側面では、流体サンプル中の希少粒子を検出するためにデバイスが提供され、本デバイスは、入力チャンネルと、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルと、流体サンプルの一部分中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、検出器と、粒子の存在または非存在に基づいて、入力チャンネルから第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ一部分の流動を指向するための機構と、第1の出力チ

50

チャンネルと流体連通しているフィルタとを備える。

【0016】

種々の側面では、流体サンプル中の希少粒子を検出するためにデバイスが提供され、本デバイスは、(a)少なくとも1つのサンプル入力チャンネルと、(b)少なくとも2つの出力チャンネルであって、2つの出力チャンネルのうちの少なくとも1つは、開口のアレイと流体連通している、出力チャンネルと、(c)流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)第1の出力チャンネルを通して、1つまたはそれを上回る希少粒子を含有するアリコートの流動を指向することによって、1つまたはそれを上回る希少粒子を選別するための機構とを備える。

10

【0017】

種々の側面では、検定を行うために統合システムが提供され、本システムは、粒子を含む流体サンプルであって、粒子は、マーカーを含む、流体サンプルと、入力チャンネルと、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルと、流体サンプルの一部分中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、第1の検出器であって、一部分は、入力チャンネル内に配置される、第1の検出器と、粒子の存在または非存在に基づいて、入力チャンネルから第1の出力チャンネルへ一部分の流動を指向するための機構と、第1の出力チャンネルと流体連通し、粒子を捕捉するように構成される、微小空洞と、微小空洞中のマーカーの存在または非存在を検出するように構成される、第2の検出器とを備える。  
本願明細書は、例えば、以下の項目も提供する。

20

(項目1)

流体内の被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するための方法であって、

a. 放射線源を使用して、第1のタグから信号を検出するステップであって、前記第1のタグは、前記被分析物上の第1のマーカーに結合する第1の構造に取り付けられる、ステップと、

b. 前記第1のタグの存在に基づいて前記被分析物を分割するステップと、

c. 前記第1のタグの前記信号の強度を低減させるステップと、

d. 前記被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、前記第2の構造は、第2のタグに取り付けられる、ステップと、

e. 前記第2のタグを検出するステップと、

を含む、方法。

30

(項目2)

ステップ(b)の前記分割は、前記第1のタグおよび第3のタグの存在に基づく、項目1に記載の方法。

(項目3)

ステップ(b)の前記分割は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる、項目1~2のいずれか1項に記載の方法。

(項目4)

ステップ(b)の前記分割およびステップ(b)またはステップ(e)のうちの少なくとも1つにおける前記検出は、同一のマイクロ流体デバイス内で起こる、項目1~3のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目5)

被分析物上に存在する複数のマーカーを検出するための方法であって、

前記被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、前記被分析物は、第1のマーカーを含み、前記第1のタグは、前記第1のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、

前記第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、前記第1の信号の存在は、前記第1のマーカーの存在を示す、ステップと、

前記第1の信号の存在に基づいて、前記被分析物を含む流体を分割するステップと、

前記第1の信号の強度を低減させるステップと、

50

前記被分析物を第 2 のタグと接触させるステップであって、前記被分析物は、第 2 のマーカーを含み、前記第 2 のタグは、前記第 2 のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、

前記第 2 のタグによって発せられる第 2 の信号を検出するステップであって、前記第 2 の信号の存在は、前記第 2 のマーカーの存在を示す、ステップと、

を含む、方法。

(項目 6)

前記第 1 のタグの前記信号は、50%超低減させられる、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7)

前記流体を分割するステップは、前記第 1 の信号および第 3 の信号の存在に基づく、項目 5 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8)

前記第 1 の信号を検出するステップ、前記第 2 の信号を検出するステップ、前記流体を分割するステップ、またはそれらの組み合わせは、マイクロ流体デバイスを使用して行われる、項目 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

前記被分析物は、細胞である、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 10)

前記細胞は、癌細胞である、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

前記癌細胞は、希少細胞である、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記被分析物は、循環腫瘍細胞である、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 13)

前記細胞は、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である、項目 9 に記載の方法。

(項目 14)

前記細胞は、前記流体中の全細胞集団の 1%未満を占める、希少細胞である、項目 9 に記載の方法。

(項目 15)

前記流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される、項目 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 16)

前記流体は、全血である、項目 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 17)

前記流体は、分画全血である、項目 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 18)

前記第 1 のタグは、フルオロフォアである、項目 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 19)

前記第 1 のタグは、抗体である、項目 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 20)

前記第 1 のタグは、核酸を含むプローブである、項目 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 21)

前記信号の前記強度を低減させるステップは、放射線を前記被分析物に印加することに

10

20

30

40

50

よって達成される、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 22)

白色光が、前記信号の前記強度を低減させるために使用される、項目 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 23)

レーザが、前記信号の前記強度を低減させるために使用される、項目 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 24)

発光ダイオードが、前記信号の前記強度を低減させるために使用される、項目 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 25)

前記信号の前記強度を低減させるステップは、化学物質を前記第 1 のタグに適用することによって達成される、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 26)

前記化学物質は、還元剤である、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

前記還元剤は、ジチオスレイトールである、項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記第 1 のタグおよび前記第 2 のタグから前記信号を撮像するステップをさらに含む、項目 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 29)

前記被分析物は、流体中に存在し、前記流体は、より大きい体積の流体のアリコートである、項目 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 30)

前記分割は、半自動的または自動的に行われる、項目 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 31)

前記分割は、アンサンプル決定アリコートランク付けによって行われる、項目 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 32)

前記被分析物は、複数のマーカを含む、項目 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 33)

前記複数のマーカのそれぞれは、バイオマーカーである、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

前記被分析物は、発現プロファイルを含み、前記発現プロファイルは、前記複数のマーカーによって定義される、項目 32 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 35)

前記被分析物を緩衝剤と接触させるステップをさらに含む、項目 1 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 36)

前記緩衝剤は、固定剤を含有する、項目 35 に記載の方法。

(項目 37)

前記緩衝剤は、透過化剤を含有する、項目 35 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 38)

前記緩衝剤は、洗浄緩衝剤である、項目 35 に記載の方法。

(項目 39)

フローサイトメータが、前記被分析物を分割するために使用されない、項目 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 40)

前記被分析物は、解離細胞である、項目 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## (項目 4 1)

前記第 1 のタグによって発せられる前記第 1 の信号を検出するステップは、複数の被分析物上で同時に行われる、項目 5 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

## (項目 4 2)

第 1 の細胞型および第 2 の細胞型を含むサンプルから細胞を単離する方法であって、

a . 一式の管類を介して前記サンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、前記マイクロ流体チップは、( i ) 前記一式の管類に流体によって接続される少なくとも 1 つのチャンネルと、( i i ) 前記少なくとも 1 つのチャンネル内の細胞の信号を検出するように構成される検出器と、( i i i ) 前記少なくとも 1 つのチャンネルに流体によって接続される少なくとも 1 つのチャンバとを備える、ステップと、

b . 前記検出器を通り過ぎて前記サンプルの一部分を流動させるステップと、

c . 前記サンプルの前記一部分内の前記第 1 の細胞型の存在または非存在を検出するために、前記検出器を使用するステップと、

d . 前記第 1 の細胞型が前記サンプルの前記一部分内で検出される場合、前記サンプルのアリコートの前記チャンバの中へ指向するステップであって、前記アリコートは、前記第 1 の細胞型を含む、ステップと、

e . ステップ ( b )、( c )、および ( d ) を繰り返し、それによって、前記チャンバが、前記サンプル内の第 1 の細胞型の総数の 8 0 % 超、および前記サンプル内の第 2 の細胞型の総数の 5 % 未満を含むように、前記チャンバ中の複数のアリコートを単離するステップと、

を含む、方法。

## (項目 4 3)

サンプルから細胞を単離する方法であって、

a . 前記サンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、前記サンプルは、第 1 の細胞型と、第 2 の細胞型とを含み、前記マイクロ流体チップは、チャンネルと、

前記チャンネル内で発せられる信号を検出するように構成される検出器と、

前記チャンネルと流体連通しているチャンバと、

を備える、ステップと、

b . 前記チャンネルを通して前記サンプルの一部分を流動させるステップであって、前記一部分は、複数の前記第 1 の細胞型、複数の前記第 2 の細胞型、またはそれらの組み合わせを含む、ステップと、

c . 前記検出器を使用して、前記一部分内の前記第 1 の細胞型の存在または非存在を検出するステップと、

d . 前記第 1 の細胞型が前記一部分内に存在する場合、前記一部分を前記チャンバの中へ指向するステップと、

e . 前記チャンバが、前記サンプル内に存在する前記第 1 の細胞型の総数の 8 0 % 超、および前記サンプル内に存在する前記第 2 の細胞型の総数の 5 % 未満を含むように、十分な回数で ( b )、( c )、および ( d ) を繰り返すステップと、

を含む、方法。

## (項目 4 4)

前記第 1 の細胞型および前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、癌細胞である、項目 4 2 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## (項目 4 5)

前記癌細胞は、希少細胞である、項目 4 4 に記載の方法。

## (項目 4 6)

前記第 1 の細胞型および前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、循環腫瘍細胞である、項目 4 2 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## (項目 4 7)

前記第 1 の細胞型および前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、細菌細胞、免疫

10

20

30

40

50

細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である、項目 4 2 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記第 1 の細胞型および前記第 2 の細胞型のうちの少なくとも 1 つは、前記サンプル中の全細胞集団の 1 % 未満を占める、希少細胞である、項目 4 2 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記サンプルは、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される、項目 4 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 5 0)

前記サンプルは、全血である、項目 4 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記サンプルは、分画全血である、項目 4 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記チャンバは、前記マイクロ流体チップの外部にある、項目 4 2 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 3)

20

前記チャンバは、バイアル、微小遠心管、またはウェルプレート内のウェルである、項目 4 2 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記チャンバは、管類を介して前記チャンバと流体連通している、項目 4 2 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 5)

前記チャンバは、毛細管を介して前記チャンネルと流体連通している、項目 4 2 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 6)

流体に由来するサンプルから特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞を分割するための装置であって、

30

a . 前記装置は、少なくとも 1 つのチャンネル、およびチャンバを有する、マイクロ流体チップに接続される一式の管類を備え、

b . 前記装置は、前記チャンバ中の前記細胞を単離することが可能であり、単離後、前記チャンバは、前記特定のバイオマーカープロファイルを発現する前記サンプル中の細胞の全集団の 8 0 % 超を含み、単離後、前記チャンバは、異なるバイオマーカープロファイルを発現する前記サンプル中の細胞の全集団の 5 % 未満を含む、装置。

(項目 5 7)

特定のバイオマーカープロファイルを発現する前記細胞の前記単離は、2 0 分未満で起こる、項目 5 6 に記載の装置。

40

(項目 5 8)

前記特定のバイオマーカープロファイルは、前記流体のサンプル中の前記細胞の 5 % 未満上に存在する、項目 5 6 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

(項目 5 9)

前記流体は、血液である、項目 5 6 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の装置。

(項目 6 0)

前記流体は、分画全血である、項目 5 6 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の装置。

(項目 6 1)

前記流体は、全血の有核細胞分画である、項目 5 6 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の装置

50

## (項目62)

被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するための方法であって、

a. 複数の微小空洞またはマイクロパッチを備える基板上で複数の被分析物を流動させることによって、前記複数の被分析物を分割するステップであって、微小空洞またはマイクロパッチの大部分は、多くても1つの被分析物を含有することが可能であり、前記微小空洞またはマイクロパッチは、マイクロ流体デバイスの中に位置する、ステップと、

b. 前記微小空洞またはマイクロパッチの中で、各被分析物を、第1のマーカーに結合することが可能である第1の構造と接触させるステップであって、前記第1の構造は、第1のタグに接続される、ステップと、

c. 前記第1のタグから信号を検出するステップと、

d. 前記第1のタグの前記信号のレベルを低減させるステップと、

e. 前記被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、前記第2の構造は、第2のタグに接続される、ステップと、

f. 前記第2のタグを検出するステップと、

を含む、方法。

10

## (項目63)

ステップbの前記接触は、前記微小空洞またはマイクロパッチと流体連通しているチャンネルを通して、前記第1の構造を備える流体を流動させることによって達成される、項目62に記載の方法。

## (項目64)

ステップbの前記接触させるステップに続いて、前記方法はさらに、前記被分析物を洗浄緩衝剤と接触させるステップを含む、項目62～63のいずれか1項に記載の方法。

20

## (項目65)

被分析物上に存在する複数のマーカーを検出するための方法であって、

微小空洞またはマイクロパッチを備える基板上で流体を流動させることによって、前記微小空洞中または前記マイクロパッチ中の被分析物を単離するステップであって、前記流体は、前記被分析物を含む、ステップと、

前記被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、前記被分析物は、第1のマーカーを含み、前記第1のタグは、前記第1のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、

30

前記第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、前記第1の信号の存在は、前記第1のマーカーの存在を示す、ステップと、

前記第1の信号の強度を低減させるステップと、

前記被分析物を第2のタグと接触させるステップであって、前記被分析物は、第2のマーカーを含み、前記第2のタグは、前記第2のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、

前記第2のタグによって発せられる第2の信号を検出するステップであって、前記第2の信号の存在は、前記第2のマーカーの存在を示す、ステップと、

を含む、方法。

## (項目66)

前記方法は、複数の微小空洞またはマイクロパッチ内で単離される複数の被分析物に対して行われる、項目63に記載の方法。

40

## (項目67)

前記第1のタグの前記信号は、50%超低減させられる、項目62～66のいずれか1項に記載の方法。

## (項目68)

少なくとも1つの被分析物は、細胞である、項目62～67のいずれか1項に記載の方法。

## (項目69)

被分析物は、流体流動によって生成される力、重力、または接着力によって、前記微小

50

空洞内の固定位置で保持される、項目 6 2 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 0)

被分析物は、分子相互作用を通して微小空洞またはマイクロパッチに接続される、項目 6 2 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 1)

被分析物は、非共有結合によって微小空洞に接続される、項目 6 2 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記非共有結合は、ファン・デル・ワールス相互作用、静電結合、疎水結合、または非特異的吸着である、項目 7 1 に記載の方法。

10

(項目 7 3)

流体サンプル中の粒子を検出するためのシステムであって、

入力チャンネル、第 1 の出力チャンネル、第 2 の出力チャンネル、および指向性流チャンネルを備える、マイクロ流体チップと、

弁であって、前記弁は、前記マイクロ流体チップから分離可能であり、

前記弁は、前記指向性流チャンネル中の第 1 の流体の流動を調節し、

前記指向性流チャンネル中の前記第 1 の流体の流動は、前記入力チャンネルから前記第 1 の出力チャンネル、前記第 2 の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ第 2 の流体の流動を指向する、弁と、

前記入力チャンネル中の前記第 2 の流体の一部分から発せられる信号を検出するように構成される、検出器と、

20

前記信号に基づいて値を前記一部分に割り当て、前記弁を操作するように構成される、プロセッサと、

を備える、システム。

(項目 7 4)

前記弁は、電子作動型弁である、項目 7 3 に記載のシステム。

(項目 7 5)

流体サンプル中の粒子を検出するためのシステムであって、

a . 少なくとも 1 つのサンプル入力チャンネル、少なくとも 1 つの指向性流チャンネル、および少なくとも 2 つの出力チャンネルを備える、マイクロ流体チップであって、前記少なくとも 1 つの指向性流チャンネルは、前記サンプル入力チャンネルに交差する、マイクロ流体チップと、

30

b . 前記マイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する、電子作動型弁であって、前記電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルまたは前記少なくとも 2 つの出力チャンネルのうちの少なくとも 1 つに交差する入力チャンネルを制御することによって、流体の流動を制御する、電子作動型弁と、

c . 前記流体サンプルのアリコート中の 1 つまたはそれを上回る被分析物を検出することが可能な少なくとも 1 つの検出器と、

d . 前記アリコート中の被分析物の存在、非存在、識別、組成、または量に基づいて、値を前記アリコートに割り当てることが可能なプロセッサであって、前記プロセッサは、前記検出器および前記電子作動型弁と通信している、プロセッサと、

40

を備える、システム。

(項目 7 6)

前記電子作動型弁は、ソレノイド弁である、項目 7 4 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 7 7)

前記電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャンネル中の前記流体の前記流動を制御する、項目 7 5 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 7 8)

前記電子作動型弁は、常時閉であり、前記電子作動型弁は、前記プロセッサから信号を

50

受信した後に開放する、項目 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 7 9)

前記電子作動型弁は、常時開であり、前記電子作動型弁は、前記プロセッサから信号を受信した後に閉鎖する、項目 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 0)

少なくとも 1 つの指向性流チャンネルは、少なくとも 2 つのポートを備え、前記電子作動型弁は、前記ポートのうちの 1 つを通る前記流体の流動を制御する、項目 7 4 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 1)

前記電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する、項目 7 4 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載のシステム。

10

(項目 8 2)

前記電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する、項目 7 4 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 3)

前記電子作動型弁は、1 つだけの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する、項目 7 4 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 4)

前記電子作動型弁は、出力チャンネル中の流体の流動を直接制御する、項目 7 4 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載のシステム。

20

(項目 8 5)

前記電子作動型弁は、出力チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する、項目 7 4 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 6)

前記電子作動型弁は、圧電弁である、項目 7 4 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 7)

指向性流チャンネルは、合流点で出力チャンネルに交差する、項目 7 3 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 8 8)

前記検出器は、出力チャンネルではない、少なくとも 1 つのチャンネルの上に位置する、項目 7 3 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載のシステム。

30

(項目 8 9)

前記デバイスは、確認レーザを備える、項目 7 3 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 9 0)

前記確認レーザは、入力チャンネルではない、少なくとも 1 つのチャンネル上に位置する、項目 8 9 に記載のシステム。

(項目 9 1)

前記システムは、第 2 の検出器を備える、項目 7 3 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載のシステム。

40

(項目 9 2)

少なくとも 1 つのチャンネルは、フィルタと流体連通している、項目 7 3 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載のシステム。

(項目 9 3)

マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコート単離するための方法であって、前記アリコートは、希少粒子を含み、

a . 前記アリコート中の前記希少粒子の存在または非存在を検出するステップと、

b . 前記希少粒子の存在または非存在に基づいて、値を前記アリコートに割り当てるステップと、

50

c. 電子作動型弁を開放することによって、前記割り当てられた値に基づいて前記アリコートの流れを指向するステップであって、前記電子作動型弁は、前記マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップと、  
を含む、方法。

(項目 9 4)

前記マイクロ流体チップは、サンプル入力チャンネルと、少なくとも 2 つの出力チャンネルと、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルとを備え、前記電子作動型弁は、前記指向性流チャンネル内の流体の流れを制御する、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

流体サンプル中の希少粒子を検出するためのデバイスであって、  
入力チャンネルと、  
第 1 の出力チャンネルと、  
第 2 の出力チャンネルと、

10

前記流体サンプルの一部分中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、  
検出器と、

前記粒子の存在または非存在に基づいて、前記入力チャンネルから前記第 1 の出力チャンネル、前記第 2 の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ前記一部分の流れを指向するための機構と、

前記第 1 の出力チャンネルと流体連通しているフィルタと、  
を備える、デバイス。

20

(項目 9 6)

前記フィルタは、開口のアレイを備える、項目 9 5 に記載のデバイス。

(項目 9 7)

前記アレイ内の各開口の最小寸法は、前記粒子の最小寸法より小さい、項目 9 6 に記載のデバイス。

(項目 9 8)

流体サンプル中の希少粒子を検出するためのデバイスであって、

a. 少なくとも 1 つのサンプル入力チャンネルと、

b. 少なくとも 2 つの出力チャンネルであって、前記 2 つの出力チャンネルのうちの少なくとも 1 つは、開口のアレイと流体連通している、出力チャンネルと、

30

c. 前記流体サンプルのアリコート中の 1 つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも 1 つの検出器と、

d. 第 1 の出力チャンネルを通して、前記 1 つまたはそれを上回る希少粒子を含有するアリコートの流れを指向することによって、前記 1 つまたはそれを上回る希少粒子を選別するための機構と、

を備える、デバイス。

(項目 9 9)

第 1 の出力チャンネルと、第 2 の出力チャンネルとを備える、項目 9 8 に記載のデバイス。

(項目 1 0 0)

前記機構は、前記アリコートが希少粒子を含有しない場合、前記アリコートの前記流れを前記第 2 の出力チャンネルの中へ指向する、項目 9 9 に記載のデバイス。

40

(項目 1 0 1)

前記開口のアレイは、入力チャンネルと出力チャンネルとの間に配置される、項目 9 6 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

(項目 1 0 2)

前記開口のアレイは、入力チャンネルおよび出力チャンネルと同一の平面内にある、項目 9 6 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

(項目 1 0 3)

前記開口のアレイは、前記第 1 の出力チャンネル内に配置される、項目 9 6 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

50

(項目104)

前記開口のアレイは、前記第1の出力チャネルと流体連通しているチャンバの中に配置される、項目96～100のいずれか1項に記載のデバイス。

(項目105)

前記開口のアレイは、前記希少粒子が前記開口を通過することができないが、少なくとも1つの他の粒子が前記開口を通過することが可能であるように構成される、項目98～104のいずれか1項に記載のデバイス。

(項目106)

前記開口のアレイは、前記希少粒子が前記開口を通過することが可能であるが、少なくとも1つの他の粒子が前記開口を通過することができないように構成される、項目98～104のいずれか1項に記載のデバイス。

10

(項目107)

前記開口のアレイは、1000個超の開口を備える、項目96～106いずれか1項に記載のデバイス。

(項目108)

前記選別のための機構は、電極、磁気要素、音響要素、または電子作動型要素を備える、項目95～107いずれか1項に記載のデバイス。

(項目109)

前記検出器は、カメラ、電子倍增管、電荷結合素子(CCD)画像センサ、光電子倍增管(PMT)、アバランシェフォトダイオード(APD)、単光子アバランシェダイオード(SPAD)、シリコン光電子倍增管(SiPM)、および相補型金属酸化膜半導体(CMOS)画像センサから成る群から選択される、項目95～108いずれか1項に記載のデバイス。

20

(項目110)

検定を行うための統合システムであって、

粒子を含む流体サンプルであって、前記粒子は、マーカを含む、流体サンプルと、  
入力チャネルと、

第1の出力チャネルと、

第2の出力チャネルと、

前記流体サンプルの一部分中の前記粒子の存在または非存在を検出するように構成される、第1の検出器であって、前記一部分は、前記入力チャネル内に配置される、第1の検出器と、

30

前記粒子の存在または非存在に基づいて、前記入力チャネルから前記第1の出力チャネルへ前記一部分の流動を指向するための機構と、

前記第1の出力チャネルと流体連通し、前記粒子を閉じ込めるように構成される、微小空洞と、

前記微小空洞中の前記マーカルの存在または非存在を検出するように構成される、第2の検出器と、

を備える、システム。

【0018】

40

参照による組み込み

本明細書で記述される全ての出版物、特許、および特許出願は、各個別出版物、特許、または特許出願が、参照することにより組み込まれるように具体的かつ個別に示された場合と同程度に、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0019】

本開示の新規の特徴は、添付の請求項で詳細に記載される。本開示の特徴および利点のより深い理解は、本開示の原理が利用される、例証的实施形態を記載する以下の発明を実施するための形態および添付図面を参照することによって得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

50

【図 1】図 1 は、本開示の側面による、流体マイクロ流体チップを使用した免疫染色および光退色の概観である。

【図 2】図 2 は、本開示の側面による、e D A R 装置を使用した免疫染色および光退色の概観である。

【図 3】図 3 は、本開示の側面による、単一被分析物アレイを使用した免疫染色および光退色の概観である。

【図 4】図 4 は、本開示の側面による、e D A R の概観である。

【図 5】図 5 は、本開示の側面による、e D A R マイクロ流体チップの微細加工のためのプロセスフローの実施例を図示する。

【図 6】図 6 は、8 つの例示的な流体力学的選別方式を図示する。

【図 7】図 7 は、本開示の側面による、アンサンプル e D A R のマイクロ流体チップおよび流体力学的切替方式を示す。

【図 8】図 8 は、本開示の側面による、高速カメラによって記録された現在の流体方式の切替時間の実施例を描写する。

【図 9】図 9 は、本開示の側面による、e D A R の特性評価および分析性能を示す。

【図 10】図 10 は、本開示の側面による、捕捉された C T C のマルチスリットおよびマルチカラー蛍光画像を示す。

【図 11】図 11 は、本開示の側面による、「二重捕捉」 e D A R の一般構造を描写する。

【図 12】図 12 は、血流の 3 つの状態の明視野像を示す。

【図 13】図 13 は、本開示の側面による、逐次免疫染色および光退色試験の一般方式および手順を提供する。

【図 14】図 14 は、本開示の側面による、e D A R マイクロ流体チップ上に閉じ込められた 6 つの癌細胞の逐次免疫染色および光退色結果を示す。

【図 15】図 15 は、本開示の側面による、光源の異なる出力に暴露される抗 E p C A M - P E で標識された M C F - 7 細胞の光退色曲線の実施例を描写する。

【図 16】図 16 は、本開示の側面による、H e r 2 <sup>+</sup> / M U C 1 <sup>-</sup> 特性を伴う e D A R で捕捉された 4 つの癌細胞の蛍光画像を示す。

【図 17】図 17 は、本開示の側面による、単一被分析物アレイの略図である。

【図 18】図 18 は、本開示の側面による、閉じ込め密度および寸法を伴うデバイスの概略図である。

【図 19】図 19 は、本開示の側面による、並列流抵抗トラップを描写する。

【図 20】図 20 は、本開示で説明されるデバイスのうちのいくつかを構築するために使用される手順の概略図である。

【図 21】図 21 は、本開示の側面による、並列流抵抗トラップを生産するために使用することができる微細加工方法の実施例である。

【図 22】図 22 は、本開示の側面による、直列流抵抗トラップおよび並列流抵抗トラップが生物学的由来サンプルを収集し、離散化し、読み出すことができる、ステップを描写する。

【図 23】図 23 は、本開示の側面による、明視野および蛍光顕微鏡検査法に基づくマイクロウェルおよび側方チャンバのアレイの検出および読出方式を示す。

【図 24】図 24 は、本開示の側面による、分析および放出のために生物学的粒子 / 細胞のアレイを閉じ込めるための順序を図示する。

【図 25】図 25 は、本開示の側面による、本明細書で報告される方法によって分析することができる、15 個の対照サンプルおよび 10 個の膵臓癌サンプルの分布を示す。

【図 26】図 26 は、本開示の側面による、膵臓癌サンプルからの低い上皮細胞接着マーカー ( E p C A M ) 発現を伴う C T C 集合を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

( 開示の詳細な説明 )

10

20

30

40

50

本開示は、多くの場合、マイクロ流体装置の使用とともに、流体サンプル（例えば、血液）中の粒子（例えば、細胞）を検出、分離、および分析するための方法、システム、およびデバイスを提供する。粒子は、希少粒子（例えば、希少細胞）であり得る。本明細書で提供されるマイクロ流体装置の多くは、アンサンプル決定アリコートランク付け（e D A R）を流体サンプルに行うために使用することができ、これは、流体サンプルがアリコートに分割された後に流体サンプルの分析を可能にする。

#### 【0022】

いくつかの側面では、（i）流体サンプルのアリコート中の希少粒子（例えば、希少細胞）の存在または非存在を検出し、（i i）例えば、非ゼロまたはヌル等の項をアリコートに割り当てることによって、希少粒子の存在または非存在に従ってアリコートをランク付けし、（i i i）流体力学的切替方式等の方式を使用して、割り当てられたランク付けに基づいてアリコートの流動または集合を指向するために、e D A R装置を使用することができる。アリコートは、分析される流体サンプルの全体積の一部であり得る。いくつかの側面では、アリコートは、3次元空間を占有し、アリコート内の粒子は、無作為に分配することができる。

10

#### 【0023】

いくつかの側面では、本開示は、非常に高い効率、感度、および/または回収率でe D A Rを流体サンプルに行うための装置および方法を提供する。例えば、本明細書で提供されるe D A R装置は、流体サンプル（例えば、血液、全血、尿等）から特定の希少細胞型の95%超を回収することができる。e D A R装置は、10%未満、5%未満、またはさらに0%の偽陽性率で機能することができる。偽陽性率は、10個超のサンプル、または15個超のサンプル等のいくつかのサンプルを上回り得る。e D A R装置の速度はまた、非常に速くあり得る。例えば、サンプル全体を、25分未満、20分未満等で処理することができる。

20

#### 【0024】

多くの場合、本明細書で提供されるe D A R装置は、（a）チャネル、（b）チャンバ、（c）フィルタ、（d）検出器、および/または（e）弁を含有する、マイクロ流体チップを備える。マイクロ流体チップは、（a）緩衝剤を保持するための容器、（b）オフチップ弁（例えば、ソレノイド弁）、（c）光源および検出器、（d）管類、（e）サンプルポート、（f）デジタルプロセッサ、および/または他の特徴も含む、より大型のシステムの一部であり得る。フィルタおよびマイクロスリットまたは微小開口（例えば、マイクロスリットのアレイ）は、サンプルをさらに精製するために使用することができる。本明細書で、「マイクロスリット」および「微小開口」という用語は、同義的に使用され、マイクロスリットまたは微小開口はまた、支柱間間隔が濾過を実行するために使用される、支柱のアレイを含むこともできる。支柱間間隔は、一様または可変であり得る。いくつかの側面では、サンプルがe D A R装置に導入され、これは、次いで、流体力学的切替方式によって細胞の能動的選別を行う。流体力学的切替方式は、本明細書でさらに説明されるような特定の幾何学形状を伴うチャネルを含むことができる。

30

#### 【0025】

いくつかの側面では、本開示は、1つより多くの種類の被分析物（例えば、希少細胞）またはサンプル内の被分析物（例えば、希少細胞）の集団中の被分析物（例えば、希少細胞）の1つより多くの亜集団を捕捉するための方法および装置を提供する。サンプルは、複数の被分析物（例えば、希少細胞）が検出されるように、複数の検出試薬で標識することができる。例えば、サンプルは、混合サンプルであり得、希少細胞の混合集団を含有することができる。希少細胞の混合集団は、いくつかある細胞型の中でも、上皮細胞および間葉細胞を含むことができる。複数の検出試薬内で、1つの検出試薬が、上皮細胞上の上皮マーカーに結合することができる一方で、異なる試薬は、間葉細胞上の間葉マーカーに結合することができる。

40

#### 【0026】

混合サンプルは、入力チャネルにおいてマイクロ流体チップ装置に導入することができ

50

る。混合サンプルの流動の流体力学的切替を制御するために、本装置上の側方チャンネルを使用することができる。流体の流動は、複数の被分析物がマイクロ流体チップの2つの異なる領域に分離されるように、2つのソレノイドによって制御することができる。いくつかの側面では、被分析物はさらに、フィルタまたはマイクロスリットのアレイに流体を通過させることによって等、マイクロ流体チップ上で精製される。被分析物は、フィルタにおいて、またはマイクロスリットのアレイ上で収集することができる。

#### 【0027】

本開示はさらに、eDARと併用することができる、または他のマイクロ流体デバイスとともに使用することができる、染色および洗浄システムのための方法を提供する。染色および洗浄システムの方法は、インラインであり得る。インライン染色および洗浄方法は、個々の被分析物（例えば、細胞）を単離してバイオマーカーを検出する自動プロセスを提供する。本方法は、被分析物上の異なるマーカーを検出するために必要とされる、検出試薬（例えば、抗体）の量を低減させることもできる。本方法はさらに、本システムの死容積を最小限化することができる。加えて、本装置は、本装置への気泡の導入を回避する機構を含むことができる。

10

#### 【0028】

eDARは、特性評価および分析の下流方法と併用することができる。本方法は、希少細胞の細胞および分子分析を含むことができる。いくつかの側面では、希少細胞上のあるバイオマーカーの発現を判定するために、免疫染色を使用することができる。免疫染色のための半自動方法およびシステムが本明細書で説明される。

20

#### 【0029】

本開示はさらに、流体サンプルとともに単一被分析物アレイを使用するためのシステム、方法、および装置を提供する。単一被分析物アレイは、流体サンプル中の多くても1つの被分析物が特定のウェルを占有するように構成される、複数のウェルまたはマイクロウェルを備えることができる。いくつかの側面では、マイクロウェルは、微小空洞であり得る。単一被分析物アレイはまた、流体サンプル中の多くても1つの被分析物が特定のパッチを占有するように構成される、複数のパッチまたはマイクロパッチを備えることもできる。被分析物を含む流体サンプルをアレイに導入することができ、被分析物（例えば、細胞）は、デバイスのマイクロウェルまたはマイクロパッチの少なくとも80%がわずかに1つの被分析物を含有するように分割することができる。いくつかの側面では、単一被分析物アレイは、マイクロ流体システムとともに使用することができる。いくつかの側面では、マイクロ流体システムは、eDARデバイスであり得る。

30

#### 【0030】

単一被分析物アレイは、いくつかの側面では、細胞が液相で輸送される際の単一細胞の格納または物理的閉じ込めのステップと、この相の流路を辿って、物理的に画定された位置まで通過するステップと、次の流動ベースの力または表面接着力により、画定された位置に存在するステップとを含む、方法を伴う。別の場合において、細胞は、流体流路が入口から出口に対して直列であるため連続的に閉じ込められる。別の場合において、複数の流体流路および同等の複数の単一細胞が、入口と出口との間で細胞によって同時に体験することができる多数の流路により、並行して閉じ込められ/隔離される。

40

#### 【0031】

本開示で説明される方法、システム、装置、およびデバイスは、被分析物（例えば、希少細胞）の分離、濃縮、および/または単離のために、生物学および病理学における多種多様の用途で使用することができる。例えば、いくつかの用途は、疾患の診断および予後のための流体（例えば、体液）からの希少細胞（例えば、癌細胞、癌幹細胞、マラリアに感染した赤血球、幹細胞、胎児細胞、免疫細胞、感染細胞）の捕捉、水質管理のための単細胞寄生生物（例えば、ジアルジア、クリプトスポリジウム）の単離、疾患予後（例えば、HIV、AIDS、癌）を監視するための感染細胞（例えば、リンパ球、白血球）の単離、（例えば、疾患、遺伝学的異常の）スクリーニングのための母体血中の胎児細胞、治療用途で使用するための幹細胞、プリオン関連（例えば、狂牛病）疾患スクリーニングのた

50

めのプリオンに感染した細胞、およびその他を含むことができるが、それらに限定されない。

【0032】

特定の側面では、希少粒子は、希少細胞である。希少細胞は、有核または非有核であり得る。希少細胞は、悪性表現型を発現する細胞、母体末梢血中の胎児細胞等の胎児細胞、腫瘍から血液または他の体液に流された腫瘍細胞等の腫瘍細胞、HIVに感染した細胞等のウイルスに感染した細胞、着目遺伝子が移入された細胞、および自己反応障害に罹患した対象の末梢血中に存在するT細胞またはB細胞の異常サブタイプを含むが、それらに限定されない。

【0033】

本明細書で使用されるように、「アンサンプル決定」とは、粒子の集合または群内の特性の存在または非存在の検出に基づいて行われる決定を指す。群は、少なくとも3つの粒子、被分析物、および/または細胞を含むことができる。いくつかの側面では、アンサンプル決定は、複数の粒子を含有する流体サンプルのアリコート中の単一の特異的な粒子の存在または非存在に基づいて行われるであろう。重要なことには、単一の粒子の存在または非存在に基づいて行われるアンサンプル決定は、アリコート全体に（すなわち、アリコート中に存在する粒子の全てに）適用されるであろう。

【0034】

本明細書で使用されるように、「アリコート」とは、分析される流体サンプルの全体積の一部分を指す。アリコートは、少なくとも1つの粒子、被分析物、または細胞を含有することができる。アリコートは、粒子、被分析物、または細胞の群を含有することができる。アリコートは、3次元空間を占有し、粒子は、その内側で組織化を伴わずに無作為に分布する。アリコートは、有限深度を有し、粒子は、識別できる層を伴わずに深度に沿って分布することができる。本願の文脈で、アリコートは、細分化を伴わずに、その全体で分析される。

【0035】

本明細書で使用されるように、「流体を分割すること」という語句は、流体サンプルの全体積から流体の一部分またはアリコートを分離すること、または別様に再指向することを指す。

【0036】

ある側面では、アリコートは、より大きい流体サンプルの分数、例えば、流体サンプルの約1/2、または流体サンプルの約1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、あるいはそれ未満から成ることができる。ある側面では、アリコートは、例えば、流体サンプルの約10%、または流体サンプルの約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%、あるいはそれ未満から成ることができる。したがって、本明細書で提供されるeDAR方法によって検査または処理される流体は、例えば、少なくとも約2つのアリコート、または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,750、2,000、2,250、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、17,500、20,000、22,500、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000、175,000、200,000、225,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、1,100,000、1,200,000、1,300,000、1,400,000、1,500,000、1,750,000、2,000,000、2,250,000、2,500,000、3,000,000、3,500,000、4,000,000、4,500,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、10,000,000、11,000,000、12,000,000、13,000,000、14,000,000、15,000,000、17,500,000、20,000,000、22,500,000、25,000,000、30,000,000、35,000,000、40,000,000、45,000,000、50,000,000、60,000,000、70,000,000、80,000,000、90,000,000、100,000,000、あるいはそれより多くのアリコートに分割することができる。当業者であれば、流体サンプル

10

20

30

40

50

が分割されるであろうアリコートの数、流体中で期待される希少粒子の数および流体サンプルの全体積に依存するであろうと理解するであろう。

【0037】

ある側面では、アリコートは、より大きい流体サンプルの分数、例えば、流体サンプルの $1/2$ 、または流体サンプルの $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、あるいはそれ未満を含むことができる。ある側面では、アリコートは、例えば、流体サンプルの10%、または流体サンプルの9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%、あるいはそれ未満を含むことができる。したがって、本明細書で提供されるeDAR方法によって検査または処理される流体は、例えば、少なくとも約2つのアリコート、または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、10,000,000、あるいはそれより多くのアリコートに分割することができる。当業者であれば、流体サンプルが分割されるであろうアリコートの数、流体中で期待される希少粒子の数および流体サンプルの全体積に依存するであろうと理解するであろう。

10

20

【0038】

ある側面では、アリコートは、例えば、約0.1 nL ~ 約10 mL、または約1 nL ~ 約1 mL、または約1 nL ~ 約100  $\mu$ L、または約1 nL ~ 約10  $\mu$ L、または約1 nL ~ 約1  $\mu$ L、または約1 nL ~ 約100 nL、または約0.1 nL ~ 約10 nLの体積を有することができる。

30

【0039】

ある側面では、アリコートは、例えば、0.1 nL ~ 10 mL、または1 nL ~ 1 mL、または1 nL ~ 100  $\mu$ L、または1 nL ~ 10  $\mu$ L、または1 nL ~ 1  $\mu$ L、または1 nL ~ 100 nL、または0.1 nL ~ 10 nLの体積を有することができる。

【0040】

本明細書で使用されるように、「ランク付け」という用語は、カテゴリ化によってアリコートの定量的性質、定性的性質、または重要性を査定することを指す。一側面では、アリコートをヌル（例えば、希少粒子がアリコート中で検出されない）または非ゼロ（例えば、少なくとも1つの希少粒子がアリコート中で検出される）のいずれかとしてランク付けすることができる。一側面では、ランク付けは、二元であり得る。他の側面では、例えば、アリコート中の希少粒子の濃度、アリコート中の希少粒子の識別、アリコート中の複数の異なる希少粒子の識別、および同等物と関連する、付加的なカテゴリに従って、アリコートをランク付けすることができる。このようにして、濃度の範囲、例えば、約1 ~ 10、約11 ~ 20、約1 ~ 50、約51 ~ 100、約1 ~ 100、約101 ~ 201等に基づいて、任意の数のカテゴリを割り当てることができる。いくつかの側面では、カテゴリの数は、濃度の範囲、例えば、1 ~ 10、11 ~ 20、1 ~ 50、51 ~ 100、1 ~ 100、101 ~ 201等に基づいて割り当てることができる。これらのランク付けには、いくつかの所定の定量的または定性的カテゴリのうちの1つに対応する恣意的な数（例えば、0、1、2、3、4、5等）、またはアリコート中の希少粒子の数または概数の実際の値に対応する数を割り当てることができる。

40

50

## 【 0 0 4 1 】

本明細書で使用されるように、「マイクロ流体チップ」という用語は、チップ、流体チップ、マイクロチップ、または流体マイクロチップという用語と同義的に使用される。

## 【 0 0 4 2 】

本明細書で使用されるように、「コンピュータ」とは、少なくともデジタルプロセッサを指す。デジタルプロセッサは、フィールドプログラマブルゲートアレイ ( F G P A )、特定用途向け集積回路 ( A S I C )、またはリアルタイム ( R T ) プロセッサであり得るが、それらに限定されない。

## 【 0 0 4 3 】

検定を行うためのデバイス、装置、および方法

10

本開示で説明される方法は、流体サンプルからの被分析物の単離および検出に使用することができる。いくつかの側面では、本方法は、第1のタグまたはタグの第1のセットを使用した被分析物上の分子の検出、タグによって発せられる信号の低減、および第2のタグまたはタグの第2のセットを使用した被分析物上の別の分子のセットの検出を含むことができる。いくつかの側面では、本方法は、サンプルから分離される被分析物を使用することができる。いくつかの側面では、本方法は、マイクロ流体デバイスと組み合わせることができる。マイクロ流体デバイスは、サンプルから被分析物を単離するために使用することができる。いくつかの側面では、免疫染色および退色と称される本方法は、サンプルから被分析物を単離するために使用されるマイクロ流体デバイスに行うことができる。

20

## 【 0 0 4 4 】

免疫染色および光退色方法の例示的な場合を図示する概念図が、図1に示されている。免疫染色および光退色の方法は、検出方式155とともにマイクロ流体デバイス100に行うことができる。マイクロ流体デバイス100は、光源180および放射線源175の上方または下の顕微鏡のステージ160上に配置することができる。被分析物をマイクロ流体デバイス100に導入することができ、流体サンプルから被分析物を単離するように e D A R を行うことができる110。単離された被分析物は、被分析物が免疫染色および光退色方法の持続時間にわたってとどまることができる、ステージチャンバ115に指向することができる。被分析物は、1つまたはそれを上回るタグ120と接触させることができる。放射線源175は、被分析物125上の1つまたはそれを上回るタグを照射することができる130。放射線源175は、レーザ、または発光ダイオード ( L E D )、あるいはランプ190から生じることができる。タグによって発せられる信号は、光源180を使用して低減させることができる135。信号の低減135中に、タグによって発せられる信号の持続時間を検出する130のために、デジタルプロセッサ (例えば、コンピュータ) およびソフトウェア165ならびに電荷結合素子 ( C C D ) 170を使用することができる。いくつかの側面では、照明源へのタグ付けされた被分析物の暴露時間は、タグによって発せられる信号が排除されるまで持続することができる。ステップ120、125、130、および135は、免疫染色および光退色の1つのサイクルを含む。免疫染色および光退色のサイクル140は、複数のサイクルが完了するまで繰り返すことができる。最終回の光退色135は、最終サイクル中に行われる場合もあり、行われない場合もある。被分析物の検出130後、最終サイクルは、続けてタグによって発せられる信号を分析することができる150。

30

40

## 【 0 0 4 5 】

免疫染色および光退色方法290と組み合わせて使用することができる、e D A R 装置200の例示的な場合を図示する概念図が、図2に示されている。流体サンプルリザーバ225およびチャンネル230は、流体サンプル入口245に接続することができる。緩衝剤リザーバ215は、ライン235を通して加圧ガス源205に接続することができる。緩衝剤入口250は、流体サンプル入口245に接続することができる。濾過領域270は、緩衝剤入口250、流体サンプル入口245、出口275、および廃棄物チャンバ2

50

80に接続することができる。流体サンプルがeDAR装置200に進入することができる、被分析物または複数の被分析物を濾過ステージ270上に閉じ込めることができる。濾過ステージは、各チャンバが単一の被分析物を含有することができる、複数のチャンバを含有することができる。免疫染色および光退色方法290は、濾過ステージ270を含有することができる、マイクロ流体チップ260の一区分で行うことができる。

#### 【0046】

本開示は、単一被分析物アレイを使用して行うことができる、逐次免疫染色および光退色のための方法を提供する。単一被分析物アレイは、単一被分析物（例えば、細胞）の隔離、閉じ込め、操作、および検出を可能にする。多くの場合、細胞は、流体流動から生成される力、重力、表面接着力、化学力、または光学力によって閉じ込められる。いくつかの側面では、単一被分析物アレイウェルは、閉じ込められた細胞に（例えば、共有、イオン等）結合することができる要素を伴って機能化される。閉じ込められた細胞は、化学剤と接触させることができる。化学剤は、外部分子を検出するか、または細胞膜を透過して細胞内分子を標識するために使用される、標識であり得る。標識細胞を撮像し、さらに分析することができる。

10

#### 【0047】

免疫染色方法と組み合わせた単一被分析物アレイの例示的な場合を図示する概念図が、図3に示されている。流体単一被分析物アレイ315は、マイクロ流体チップまたは構造の一部であり得、マイクロ流体ステージ310上に配置することができる。免疫染色の方法は、検出方式350とともに流体単一被分析物アレイ315で行うことができる。マイクロ流体チップステージ310は、光源370および放射線源375の上方または下方の顕微鏡のステージ355上に配置することができる。流体サンプル中の被分析物は、流体単一被分析物アレイ300に導入することができる。単離された被分析物は、閉じ込められた単一被分析物が免疫染色方法の持続時間にわたってとどまることができる、流体単一被分析物アレイ320の領域に指向することができる。被分析物は、透過化および/または固定を含むことができるが、それに限定されない、種々の方法を使用して調製することができる325。被分析物は、1つまたはそれを上回るタグ330と接触させることができる。放射線源375は、被分析物上の1つまたはそれを上回るタグを照射することができる335、1つまたはそれを上回るタグによって発せられる信号を検出することができる340。放射線源375は、レーザ380から生じることができる。被分析物は、さらなる処理および分析345を受けることができる。タグによって発せられる信号を検出するために、デジタルプロセッサ（例えば、コンピュータ）およびソフトウェア360、ならびに電荷結合素子（CCD）365を使用することができる。

20

30

#### 【0048】

逐次免疫染色および光退色について、光源370を使用して、タグによって発せられる信号を低減させることができる。信号の低減中に、タグによって発せられる信号の強度を検出するために、コンピュータおよびソフトウェア360、ならびに電荷結合素子（CCD）365を使用することができる。照明源へのタグ付けされた被分析物の暴露時間は、タグによって発せられる信号が排除されるまで持続することができる。ステップ330、335、340、および345は、免疫染色および光退色の1つのサイクルを含む。サイクルは、複数のサイクルが完了するまで繰り返すことができる。

40

#### 【0049】

eDAR装置は、被分析物（例えば、希少細胞）の識別および単離に使用することができる。eDARは、アリコート中のサンプルを処理することができ、かつ流体力学的切替方式によって制御される能動的選別ステップによって、チャンネルまたはチャンバ中で希少細胞を収集することができる。チャンネルおよびチャンバを伴う、本明細書ではマイクロ流体チップと称される「一体型マイクロ流体チップ」は、希少細胞を選別するために使用することができる。マイクロ流体チップは、部分的に、機能的領域、すなわち、微細加工フィルタから成ることができる。高い回収率（例えば、90%超またはそれに等しい）および低い偽陽性率（例えば、ゼロに近い）で被分析物（例えば、1ミリメートル超またはそ

50

れに等しい全血)の混合集団を含有する流体を急速に(例えば、1 mLにつき12.5分未満またはそれに等しい)分析するために、eDARを使用することができる。

【0050】

マイクロ流体チップの一般構造およびeDARの例示的構成が、図8で描写されている。左下のチャンネルは、選別されたアリコートを集めるために使用することができ、かつそれらを後続の精製(例えば、精製チャンバ)領域(例えば、20,000個のマイクロスリット)に移送するために使用することができる。鎖線付きのボックスで印付けられた領域が、図8B-Dでさらに描写されている。陽性アリコートがランク付けられなかったときの例示的流動条件が、図8Bに示されている。血流は、収集チャンネルに切り替えることができ、選別されたアリコートは、図8Cの第2のウィンドウによって確認することができる。図8Dは、アリコートを選別した後に血流を切り替えて戻すことができることを示す。

10

【0051】

本装置は、いくつかの流速を有することができる。流速とは、流体がeDAR装置および本装置に取り付けられた任意の構成要素を通して流動する、流速を指すことができる。いくつかの側面では、例示的な流速は、約5  $\mu$ L/分、10  $\mu$ L/分、20  $\mu$ L/分、25  $\mu$ L/分、30  $\mu$ L/分、35  $\mu$ L/分、40  $\mu$ L/分、41  $\mu$ L/分、42  $\mu$ L/分、43  $\mu$ L/分、44  $\mu$ L/分、45  $\mu$ L/分、46  $\mu$ L/分、47  $\mu$ L/分、48  $\mu$ L/分、49  $\mu$ L/分、50  $\mu$ L/分、51  $\mu$ L/分、52  $\mu$ L/分、53  $\mu$ L/分、54  $\mu$ L/分、55  $\mu$ L/分、56  $\mu$ L/分、57  $\mu$ L/分、58  $\mu$ L/分、59  $\mu$ L/分、60  $\mu$ L/分、61  $\mu$ L/分、62  $\mu$ L/分、63  $\mu$ L/分、64  $\mu$ L/分、65  $\mu$ L/分、66  $\mu$ L/分、67  $\mu$ L/分、68  $\mu$ L/分、69  $\mu$ L/分、70  $\mu$ L/分、71  $\mu$ L/分、72  $\mu$ L/分、73  $\mu$ L/分、74  $\mu$ L/分、75  $\mu$ L/分、76  $\mu$ L/分、77  $\mu$ L/分、78  $\mu$ L/分、79  $\mu$ L/分、80  $\mu$ L/分、81  $\mu$ L/分、82  $\mu$ L/分、83  $\mu$ L/分、84  $\mu$ L/分、85  $\mu$ L/分、86  $\mu$ L/分、87  $\mu$ L/分、88  $\mu$ L/分、89  $\mu$ L/分、90  $\mu$ L/分、91  $\mu$ L/分、92  $\mu$ L/分、93  $\mu$ L/分、94  $\mu$ L/分、95  $\mu$ L/分、96  $\mu$ L/分、97  $\mu$ L/分、98  $\mu$ L/分、99  $\mu$ L/分、100  $\mu$ L/分、105  $\mu$ L/分、110  $\mu$ L/分、115  $\mu$ L/分、120  $\mu$ L/分、125  $\mu$ L/分、130  $\mu$ L/分、140  $\mu$ L/分、150  $\mu$ L/分、160  $\mu$ L/分、170  $\mu$ L/分、180  $\mu$ L/分、190  $\mu$ L/分、200  $\mu$ L/分、225  $\mu$ L/分、250  $\mu$ L/分、275  $\mu$ L/分、300  $\mu$ L/分、350  $\mu$ L/分、400  $\mu$ L/分、450  $\mu$ L/分、500  $\mu$ L/分、600  $\mu$ L/分、700  $\mu$ L/分、800  $\mu$ L/分、900  $\mu$ L/分、または1000  $\mu$ L/分未満であり得る。

20

30

【0052】

いくつかの側面では、流速は、約5  $\mu$ L/分~30  $\mu$ L/分、15  $\mu$ L/分~50  $\mu$ L/分、25  $\mu$ L/分~75  $\mu$ L/分、40  $\mu$ L/分~80  $\mu$ L/分、50  $\mu$ L/分~90  $\mu$ L/分、60  $\mu$ L/分~100  $\mu$ L/分、80  $\mu$ L/分~160  $\mu$ L/分、90  $\mu$ L/分~180  $\mu$ L/分、100  $\mu$ L/分~200  $\mu$ L/分、150  $\mu$ L/分~300  $\mu$ L/分、200  $\mu$ L/分~400  $\mu$ L/分、300  $\mu$ L/分~500  $\mu$ L/分、400  $\mu$ L/分~600  $\mu$ L/分、500  $\mu$ L/分~700  $\mu$ L/分、600  $\mu$ L/分~800  $\mu$ L/分、700  $\mu$ L/分~900  $\mu$ L/分、または800  $\mu$ L/分~1000  $\mu$ L/分の範囲内であり得る。

40

【0053】

いくつかの側面では、例示的な流速は、5  $\mu$ L/分、10  $\mu$ L/分、20  $\mu$ L/分、25  $\mu$ L/分、30  $\mu$ L/分、35  $\mu$ L/分、40  $\mu$ L/分、41  $\mu$ L/分、42  $\mu$ L/分、43  $\mu$ L/分、44  $\mu$ L/分、45  $\mu$ L/分、46  $\mu$ L/分、47  $\mu$ L/分、48  $\mu$ L/分、49  $\mu$ L/分、50  $\mu$ L/分、51  $\mu$ L/分、52  $\mu$ L/分、53  $\mu$ L/分、54  $\mu$ L/分、55  $\mu$ L/分、56  $\mu$ L/分、57  $\mu$ L/分、58  $\mu$ L/分、59  $\mu$ L/分、60  $\mu$ L/分、61  $\mu$ L/分、62  $\mu$ L/分、63  $\mu$ L/分、64  $\mu$ L/分、65  $\mu$ L/分、66  $\mu$ L/分、67  $\mu$ L/分、68  $\mu$ L/分、69  $\mu$ L/分、70  $\mu$ L/分、71  $\mu$

50

L / 分、72  $\mu$ L / 分、73  $\mu$ L / 分、74  $\mu$ L / 分、75  $\mu$ L / 分、76  $\mu$ L / 分、77  $\mu$ L / 分、78  $\mu$ L / 分、79  $\mu$ L / 分、80  $\mu$ L / 分、81  $\mu$ L / 分、82  $\mu$ L / 分、83  $\mu$ L / 分、84  $\mu$ L / 分、85  $\mu$ L / 分、86  $\mu$ L / 分、87  $\mu$ L / 分、88  $\mu$ L / 分、89  $\mu$ L / 分、90  $\mu$ L / 分、91  $\mu$ L / 分、92  $\mu$ L / 分、93  $\mu$ L / 分、94  $\mu$ L / 分、95  $\mu$ L / 分、96  $\mu$ L / 分、97  $\mu$ L / 分、98  $\mu$ L / 分、99  $\mu$ L / 分、100  $\mu$ L / 分、105  $\mu$ L / 分、110  $\mu$ L / 分、115  $\mu$ L / 分、120  $\mu$ L / 分、125  $\mu$ L / 分、130  $\mu$ L / 分、140  $\mu$ L / 分、150  $\mu$ L / 分、160  $\mu$ L / 分、170  $\mu$ L / 分、180  $\mu$ L / 分、190  $\mu$ L / 分、200  $\mu$ L / 分、225  $\mu$ L / 分、250  $\mu$ L / 分、275  $\mu$ L / 分、300  $\mu$ L / 分、350  $\mu$ L / 分、400  $\mu$ L / 分、450  $\mu$ L / 分、500  $\mu$ L / 分、600  $\mu$ L / 分、700  $\mu$ L / 分、800  $\mu$ L / 分、900  $\mu$ L / 分、または1000  $\mu$ L / 分未満であり得る。

10

【0054】

いくつかの側面では、流速は、5  $\mu$ L / 分 ~ 30  $\mu$ L / 分、15  $\mu$ L / 分 ~ 50  $\mu$ L / 分、25  $\mu$ L / 分 ~ 75  $\mu$ L / 分、40  $\mu$ L / 分 ~ 80  $\mu$ L / 分、50  $\mu$ L / 分 ~ 90  $\mu$ L / 分、60  $\mu$ L / 分 ~ 100  $\mu$ L / 分、800  $\mu$ L / 分 ~ 160  $\mu$ L / 分、90  $\mu$ L / 分 ~ 180  $\mu$ L / 分、100  $\mu$ L / 分 ~ 200  $\mu$ L / 分、150  $\mu$ L / 分 ~ 300  $\mu$ L / 分、200  $\mu$ L / 分 ~ 400  $\mu$ L / 分、300  $\mu$ L / 分 ~ 500  $\mu$ L / 分、400  $\mu$ L / 分 ~ 600  $\mu$ L / 分、500  $\mu$ L / 分 ~ 700  $\mu$ L / 分、600  $\mu$ L / 分 ~ 800  $\mu$ L / 分、700  $\mu$ L / 分 ~ 900  $\mu$ L / 分、または800  $\mu$ L / 分 ~ 1000  $\mu$ L / 分の範囲内であり得る。

20

【0055】

本装置は、いくつかの選別効率を有することができる。選別効率は、着目被分析物の回収を指すことができる。いくつかの側面では、例示的な選別効率は、約5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%超であり得る。いくつかの側面では、選別効率は、約5% ~ 30%、15% ~ 50%、25% ~ 75%、40% ~ 80%、50% ~ 90%、または60% ~ 100%の範囲内であり得る。

30

【0056】

いくつかの側面では、例示的な選別効率は、5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%超であり得る。いくつかの側面では、選別効率は、5% ~ 30%、15% ~ 50%、25% ~ 75%、40% ~ 80%、50% ~ 90%、または60% ~ 100%の範囲内であり得る。

40

【0057】

eDAR装置は、いくつかの回収率を有することができる。回収率は、着目被分析物の回収を指すことができる。いくつかの側面では、回収率は、約5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、7

50

7 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %超であり得る。いくつかの側面では、回収率は、約5 % ~ 30 %、15 % ~ 50 %、25 % ~ 75 %、40 % ~ 80 %、50 % ~ 90 %、または60 % ~ 100 %の範囲内であり得る。

【0058】

いくつかの側面では、回収率は、5 %、10 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %超であり得る。

10

【0059】

いくつかの側面では、回収率は、5 % ~ 30 %、15 % ~ 50 %、25 % ~ 75 %、40 % ~ 80 %、50 % ~ 90 %、または60 % ~ 100 %の範囲内であり得る。

【0060】

いくつかの側面では、eDAR装置または方法が、第2の細胞型から第1の細胞型を分離するために使用される。いくつかの側面では、単離されたサンプルは、第1の細胞型の総数の5 %、10 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %超を含む。いくつかの側面では、単離されたサンプルは、第2の細胞型の総数の1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または90 %未満を含む。

20

30

【0061】

eDAR装置は、励起および検出モードのための放射線源（例えば、レーザ）を装備した顕微鏡と、光源（例えば、光退色）と、タイマと、管類と、廃棄物収集デバイスと、タグ付けされた被分析物（例えば、細胞）を撮像するためのカメラと、マイクロ流体チップの中および外への流体の流動を制御するポンプと、能動的選別ステップを制御するデジタルプロセッサと、画像を処理するためのデジタルプロセッサ（例えば、コンピュータシステム）とを含むことができる。デジタルプロセッサは、コンピュータであり得る。

【0062】

いくつかの側面では、eDARプラットフォームは、1つより多くの被分析物（例えば、希少細胞）の捕捉のための装置を含むことができる。「二重捕捉」eDARは、混合サンプルから複数の希少細胞を分離することができる。混合サンプル（例えば、流体サンプル）は、検出試薬で標識し、主要チャンネルにおいて「二重捕捉」装置の最上部に進入させることができる。混合サンプルの流動の流体力学的切替を制御するために、2つの側方チャンネルを使用することができる。いくつかの側面では、2つのマイクロ流体チップソレノイドを使用して、流動を制御することができる。希少細胞の2つの亜集団を分離し、同一マイクロ流体チップの上の2つの異なる濾過領域上に閉じ込めることができる。

40

【0063】

種々の側面では、流体に由来するサンプルから特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞を分割するために装置が提供され、本装置は、少なくとも1つのチャンネル、お

50

よびチャンバを有する、マイクロ流体チップに接続される一式の管類を備え、本装置は、チャンバ中の細胞を単離することが可能であり、単離後、チャンバは、特定のバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の80%超を含み、単離後、チャンバは、異なるバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の5%未満を含む。

【0064】

いくつかの側面では、特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞の単離は、20分未満で起こる。いくつかの側面では、特定のバイオマーカープロファイルは、流体のサンプル中の細胞の5%未満の上に存在する。ある側面では、流体は、血液である。さらなる側面では、流体は、分画全血である。なおもさらなる側面では、流体は、全血の有核細胞分画である。

10

【0065】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を検出するためにシステムが提供され、本システムは、入力チャンネル、第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、および指向性流チャンネルを備える、マイクロ流体チップと、弁であって、弁は、マイクロ流体チップから分離可能であり、弁は、指向性流チャンネル中の第1の流体の流動を調節し、指向性流チャンネル中の第1の流体の流動は、入力チャンネルから第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ第2の流体の流動を指向する、弁と、入力チャンネル中の第2の流体の一部分から発せられる信号を検出するように構成される、検出器と、信号に基づいて値を一部分に割り当て、弁を操作するように構成されるプロセッサとを備える。いくつかの側面では、弁は、電子作動型弁である。

20

【0066】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を検出するためにシステムが提供され、本システムは、(a)少なくとも1つのサンプル入力チャンネル、少なくとも1つの指向性流チャンネル、および少なくとも2つの出力チャンネルを備える、マイクロ流体チップであって、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、サンプル入力チャンネルに交差する、マイクロ流体チップと、(b)マイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する、電子作動型弁であって、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルまたは少なくとも2つの出力チャンネルのうち少なくとも1つに交差する入力チャンネルを制御することによって、流体の流動を制御する、電子作動型弁と、(c)流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る被分析物を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)アリコート中の被分析物の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることが可能なプロセッサであって、プロセッサは、検出器および電子作動型弁と通信している、プロセッサとを備える。

30

【0067】

いくつかの側面では、電子作動型弁は、ソレノイド弁である。ある側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の流体の流動を制御する。さらなる側面では、電子作動型弁は、常時閉であり、電子作動型弁は、プロセッサから信号を受信した後に開放する。なおもさらなる側面では、電子作動型弁は、常時開であり、電子作動型弁は、プロセッサから信号を受信した後に閉鎖する。

40

【0068】

いくつかの側面では、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、少なくとも2つのポートを備え、電子作動型弁は、ポートのうち1つを通る流体の流動を制御する。ある側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する。ある側面では、電子作動型弁は、1つだけの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する。さらなる側面では、電子作動型弁は、出力チャンネル中の流体の流動を直接制御する。なおもさらなる側面では、電子作動型弁は、出力チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、圧電弁である。

50

## 【 0 0 6 9 】

いくつかの側面では、指向性流チャンネルは、合流点で出力チャンネルに交差する。ある側面では、検出器は、出力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。いくつかの側面では、本デバイスは、確認レーザを備える。ある側面では、確認レーザは、入力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。さらなる側面では、本システムは、第2の検出器を備える。なおもさらなる側面では、少なくとも1つのチャンネルは、フィルタと流体連通している。

## 【 0 0 7 0 】

種々の側面では、流体サンプル中の希少粒子を検出するためにデバイスが提供され、本デバイスは、入力チャンネルと、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルと、流体サンプルの一部分中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、検出器と、粒子の存在または非存在に基づいて、入力チャンネルから第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ一部分の流動を指向するための機構と、第1の出力チャンネルと流体連通しているフィルタとを備える。いくつかの側面では、フィルタは、開口のアレイを備える。ある側面では、アレイ内の各開口の最小寸法は、粒子の最小寸法より小さい。

10

## 【 0 0 7 1 】

種々の側面では、流体サンプル中の希少粒子を検出するためにデバイスが提供され、本デバイスは、(a) 少なくとも1つのサンプル入力チャンネルと、(b) 少なくとも2つの出力チャンネルであって、2つの出力チャンネルのうちの少なくとも1つは、開口のアレイと流体連通している、出力チャンネルと、(c) 流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d) 第1の出力チャンネルを通して、1つまたはそれを上回る希少粒子を含有するアリコートの流動を指向することによって、1つまたはそれを上回る希少粒子を選別するための機構とを備える。

20

## 【 0 0 7 2 】

いくつかの側面では、本デバイスは、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルとを備える。ある側面では、機構は、アリコートが希少粒子を含有しない場合、アリコートの流動を第2の出力チャンネルの中へ指向する。ある側面では、選別のための機構は、電極、磁気要素、音響要素、または電子作動型要素を備える。

30

## 【 0 0 7 3 】

いくつかの側面では、開口のアレイは、入力チャンネルと出力チャンネルとの間に配置される。ある側面では、開口のアレイは、入力チャンネルおよび出力チャンネルと同一の平面内にある。さらなる側面では、開口のアレイは、第1の出力チャンネル内に配置される。なおもさらなる側面では、開口のアレイは、第1の出力チャンネルと流体連通しているチャンバの中に配置される。いくつかの側面では、開口のアレイは、希少粒子が開口を通過することができないが、少なくとも1つの他の粒子が開口を通過することが可能であるように構成される。ある側面では、開口のアレイは、希少粒子が開口を通過することが可能であるが、少なくとも1つの他の粒子が開口を通過することができないように構成される。さらなる側面では、開口のアレイは、1000個超の開口を備える。

40

## 【 0 0 7 4 】

ある側面では、検出器は、カメラ、電子倍增管、電荷結合素子(CCD)画像センサ、光電子倍增管(PMT)、アバランシェフォトダイオード(APD)、単光子アバランシェダイオード(SPAD)、シリコン光電子倍增管(SiPM)、および相補型金属酸化膜半導体(CMOS)画像センサから成る群から選択される。

## 【 0 0 7 5 】

種々の側面では、検定を行うために統合システムが提供され、本システムは、粒子を含む流体サンプルであって、粒子は、マーカーを含む、流体サンプルと、入力チャンネルと、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルと、流体サンプルの一部分中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、第1の検出器であって、一部分は、入力チャネ

50

ル内に配置される、第1の検出器と、粒子の存在または非存在に基づいて、入力チャンネルから第1の出力チャンネルへ一部分の流動を指向するための機構と、第1の出力チャンネルと流体連通し、粒子を閉じ込めるように構成される、微小空洞と、微小空洞中のマーカの存在または非存在を検出するように構成される、第2の検出器とを備える。

#### 【0076】

##### マイクロ流体チップ設計および加工

マイクロ流体チップは、効率的かつ能動的選別方式および後続の精製（例えば、精製チャンバ）方式を提供するように加工することができる。マイクロ流体チップは、シリコンマスタ上の2つの層から成ることができ、かつポリジメチルシロキサン（PDMS）への1段階複製成形で加工することができる。マイクロ流体チップは、ガラス基板への結合で仕上げることができる。

10

#### 【0077】

いくつかの側面では、2つのフォトリソグラフィプロセスを使用して、シリコンマスタを加工することができる（図5）。特徴は、標準ソフトウェア（例えば、Autodesk社（San Rafael, CA）製AutoCAD）を使用して設計することができ、かつクロムマスク上に書き込むことができる。これらの場合において、第1の層を形成するために、ポジ型レジストリソグラフィおよび深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）を使用することができる（図5）。第1の層は、マイクロフィルタ特徴であり得る。いくつかの側面では、DRIEプロセスを含むことができるプロセスによって、ポジ型フォトリソグラフィ（例えば、AZ 1512）が達成される。DRIEプロセスは、種々の特徴に好適な深度（例えば、 $4.5\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$ ）を達成することができる。

20

#### 【0078】

いくつかの側面では、ネガ型フォトリソグラフィ（例えば、MicroChem, Newton, MA製SU-8-3050）を使用して、eDARマイクロ流体チップ特徴の第2の層を加工することができ、特徴の高さを制御することができる（例えば、 $50\ \mu\text{m}$ ）。マスタは、例えば、トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル-1-トリクロロシラン（Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)）を使用して、シラン化することができる。シラン化マスタおよびシリコンウエハは、未硬化PDMSでコーティングし、（例えば、70 で2時間）焼き付けることができる。いくつかの側面では、所望の微小特徴を伴うPDMS片をシリコンマスタから剥離し、次いで、eDARマイクロ流体チップの加工を完了するように、プラズマ酸化の標準プロセスを使用してカバーガラス片と結合することができる。

30

#### 【0079】

マイクロ流体チップは、染色領域、光退色領域、撮像領域、および付加的な領域を含む、特殊領域を含有することができる。いくつかの側面では、領域は、少なくとも1つの目的で使用される同一の領域であり得る。他の場合において、領域は、1つの目的で使用される異なる領域であり得る。他の場合において、領域は、少なくとも1つの目的で使用される異なる領域であり得る。各領域は、1つより多くの目的で使用することができる。いくつかの側面では、eDARマイクロ流体チップは、標準リソグラフィ方法によって加工される統合濾過領域を含む。いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、2つの統合機能領域、すなわち、eDAR選別領域およびスリット構造ベースの濾過ユニットを有することができる。

40

#### 【0080】

##### マイクロ流体チップ内のチャンネル

本明細書で提供される本開示は、流体サンプル中の被分析物（例えば、希少粒子）を検出するための装置を説明し、本装置は、（a）少なくとも第1の入力チャンネルと、（b）少なくとも2つの出口チャンネルと、（c）生物学的流体のアリコート中の1つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、（d）アリコートの流動を指向するための機構と、（e）アリコート中の希少粒子の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることが可能なランク付けデバ

50

イスとを備え、デジタルプロセッサ（例えば、コンピュータ）は、検出器およびアリコーットの流動を指向するための機構と通信している。

【0081】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、被分析物（例えば、希少細胞）への不慮の損傷を最小限化する設計特徴とともに、壁によって取り囲まれ、および/または基板上に微細加工された流動チャンネルを備えることができる。希少細胞の不慮の損傷を低減させることにより、誤った患者診断または予後を引き起こす偽陰性率を低減させることができる。流動チャンネルはさらに、最小限の応力または損傷を伴って生体細胞を除外するように流体力学的に設計された開口を伴うチャンネルを備えることができる。流動チャンネルは、米国特許出願第2007/0037172号および第2008/0248499号で説明される通りである。前述の特許出願では1次元（「1D」）開口を伴うチャンネルと称される、そのようなチャンネルは、細胞除外プロセス中に細胞によって被られる流体力学的圧力を低減させ、したがって、細胞溶解の可能性を低減させる。1D開口を伴うチャンネルは、流動をさらに再指向し、分割し、抑制し、または分散させ、その結果として、除外の瞬間に細胞によって被られる衝撃の力を低減させるように、米国特許第2008/0318324号で説明されるような「流出濾過」構成に従って、方略的にアレイで配列することができる。流動チャンネルを取り囲む壁は、eDAR装置が医療デバイス製造を統制する規制に準拠し得るように、医療デバイスグレードポリマーである生体適合性基板材料から、第PCT/US2009/02426号で説明される手順に従って紫外線硬化プロセスを使用して加工することができる。

10

20

【0082】

選別合流点に流体を導入するために使用することができる、選別領域内の主要チャンネルは、特定の高さ（例えば、50 $\mu\text{m}$ ）および特定の幅（例えば、150 $\mu\text{m}$ ）を有することができる。大抵の場合、他のチャンネル（例えば、4つ）は、特定の高さ（例えば、50 $\mu\text{m}$ ）および特定の幅（例えば、200 $\mu\text{m}$ ）を有することができる。濾過ユニット内のスリット構造ベースのフィルタは、特定の高さ（例えば、5 $\mu\text{m}$ ）および特定の幅（例えば、5 $\mu\text{m}$ ）を有することができる。マイクロ流体チップは、最大50,000個のスリットを含有することができ、かつそれらをスリット構造に含むことができる。

【0083】

いくつかの側面では、eDAR装置はさらに、該ランク付けに基づいて、該アリコーットを導くためのチャンネルを備えることができる。チャンネルは、抗凝固化合物、被分析物（例えば、希少生体粒子）に優先的に結合する化合物、希少生体粒子の凝集を防止する化合物、またはそれらの組み合わせで処理することができる。

30

【0084】

いくつかの側面では、本明細書で提供されるeDAR装置は、1つまたはそれを上回る入力流チャンネル（例えば、アリコーットを検出容積に運ぶチャンネル）、および1つまたはそれを上回る出力チャンネル（例えば、検出容積からアリコーットを運び去るチャンネル）を含む、複数の流動チャンネルを備えることができる。いくつかの側面では、本明細書で提供されるようなeDAR装置は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る入力チャンネル、および少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る出力チャンネルの組み合わせを備えることができる。いくつかの側面では、本明細書で提供されるようなeDAR装置は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る入力チャンネル、および少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、ま

40

50

たはそれを上回る出力チャネルの組み合わせを備えることができる。いくつかの側面では、装置は、付加的な流体を注入して局所速度を変化させるように、主要チャネルに接続する複数の流動チャネルを備えることができる。

【0085】

いくつかの側面では、流体は、マイクロ流体チップの一部であるチャネルから、チャネルと流体連通しているがマイクロ流体チップの外部にあるチャンバへ送達される。いくつかの側面では、チャンバは、バイアルである。他の側面では、チャンバは、単一のウェルまたはウェルプレート内のウェルである。さらなる側面では、チャンバは、微小遠心管である。さらなる側面では、チャンバは、微小遠心管であり、微小遠心管は、エッペンドルフ型管である。任意の好適な構造をバイアルに使用することができ、当業者であれば、本開示とともに使用するための好適なチャンバを容易に識別することができる。

10

【0086】

いくつかの側面では、流体は、流体を輸送するための管または他の好適な構造を介して、チャネルからチャネルと流体連通しているチャンバへ送達される。管は、生体適合性ポリマーから構築された材料を含むことができる。他の側面では、チャンバは、例えば、キャピラリ電気泳動を行うために使用されるような溶融石英毛细細管等の毛细細管を介して、チャネルと流体連通することができる。チャネルをチャンバと流体連通させるために好適な他の種類の管類が、当業者に容易に明白となるであろう。

【0087】

本明細書で使用されるように、「と流体連通している」という用語（およびその変形例）は、構成要素間の流体経路の存在を指す。流体連通していることは、任意の中間構造または構成要素の存在を示唆することも除外することもない。2つの構成要素は、たとえ場合によってはそれらの間の経路が遮断され、および/または流体がそれらの間で流動していなくても、流体連通することができる。したがって、流体連通がある、ある側面では、断続的な流体流が考慮される。

20

【0088】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、ポリマー材料（ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリウレタンメタクリレート（PUMA）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリエチレン、ポリエステル（PET）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリカーボネート、パリレン、ポリ塩化ビニル、フルオロエチルプロピレン、レキサン、ポリスチレン、環状オレフィン共重合体、ポリウレタン、炭酸ポリエステル、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリアクリレート、ポリカプロラクトン、ポリケトン、ポリフタルアミド、酢酸セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリスルホン、エポキシポリマー、熱可塑性物質、フッ素重合体、およびポリフッ化ビニリデン、ポリアミド、ポリイミド）、無機材料（ガラス、石英、シリコン、GaAs、窒化ケイ素）、溶融石英、セラミック、ガラス（有機）、金属および/または他の材料、ならびにそれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない材料から加工される、壁によって取り囲まれた流動チャネルまたはチャンバを備えることができる。

30

【0089】

いくつかの側面では、壁材料は、多孔質膜、羊毛の織物または不織繊維（布またはメッシュ等）、金属（例えば、ステンレス鋼またはモネル）、ガラス、紙、または合成物質（例えば、ナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、パリレン、および種々のポリエステル）、焼結ステンレス鋼および他の金属、ならびにアルミナ、シリカ、または炭素等の多孔質無機材料で加工することができる。

40

【0090】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、化学または生体分子で前処理された流動チャネルまたはチャンバを備えることができる。例えば、チャネルまたはチャンバは、流体サンプル中の被分析物（例えば、希少粒子または細胞）の関連を防止または低減させる抗凝固化合物、被分析物（例えば、希少粒子または細胞）に優先的に結合する化合物、または流体サンプル中の被分析物（例えば、希少粒子または細胞）の凝集または集合

50

を防止または低減させる化合物で処理することができる。

【0091】

いくつかの側面では、チャンネルまたはチャンバ表面は、抗凝固化合物、循環腫瘍細胞に優先的に結合する化合物、または細胞の付着を防止する化合物で処理することができる。

【0092】

いくつかの側面では、チャンネルまたはチャンバ表面は、湿潤を増進するように、または選択細胞、粒子、あるいは分子の吸着を支援するように、化学的に修飾することができる。表面修飾化学物質は、トリメチルクロロシラン (TMCS)、ヘキサメチルジシラザン (HMDS)、(トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル)トリクロロシラン、クロロジメチルオクチルシラン、オクタデシルトリクロロシラン (OTS)、または -メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン等のシラン、アクリル酸、アクリルアミド、ジメチルアクリルアミド (DMA)、2-ヒドロキシエチルアクリレート、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリ(ビニルピロリドン) (PVP)、ポリ(エチレンイミン) (PEI)、ポリエチレングリコール (PEG)、エポキシポリ(ジメチルアクリルアミド) (EPDMA)、またはPEG-モノメトキシシランアクリレート等のポリマー、プルロニック界面活性剤、ポリ(エチレングリコール)系 (PEG) 界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTAC)、臭化セチルトリエチルアンモニウム (CTAB)、または Polybrene (PB) 等の界面活性剤、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)、またはヒドロキシプロピルメチルルコース (HPMC) 等のセルロース誘導体、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、またはトリエタノールアミン等のアミン、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) を含有するものまたは Teflon 等のフッ素含有化合物を含むことができるが、それらに限定されない。

10

20

【0093】

濾過

本明細書で提供される eDAR 装置はさらに、フィルタ要素を備えることができる。いくつかの側面では、フィルタ要素は、微小支柱、微小障壁、微小衝突体、微小篩、生体粒子より小さい開口を伴うチャンネル、生体粒子が開口に進入することを防止することができるが、開口(「1Dチャンネル」)を通して生体粒子の周囲で流体を流動し続けさせることができるような開口を伴うチャンネル、マイクロビーズ、多孔質膜、壁からの突出部、接着コーティング、羊毛の織物または不織繊維(布またはメッシュ等)、金属(例えば、ステンレス鋼またはモネル)、ガラス、紙、または合成物質(例えば、ナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、パリレン、およびポリエステル)、焼結ステンレス鋼または他の金属、あるいはアルミナ、シリカ等の多孔質無機材料の形態であり得る。

30

【0094】

いくつかの側面では、フィルタ要素内の開口のアレイは、希少粒子または細胞等の着目粒子がフィルタ要素の開口を通過することができない一方で、少なくとも1つの他の粒子がフィルタ要素の開口を開くことが可能であるように構成される。他の側面では、フィルタ要素内の開口のアレイは、希少粒子または細胞等の着目粒子がフィルタ要素の開口を開くことが可能である一方で、少なくとも1つの他の粒子がフィルタ要素の開口を通過することができないように構成される。

40

【0095】

いくつかの側面では、eDAR マイクロ流体チップは、マイクロスリットを伴って加工することができる(図10a)。マイクロスリットは、いかなる付加的な非特異的粒子(例えば、赤血球、RBC)も保持することなく、希少細胞を捕捉するために使用することができる。マイクロスリットのサイズは、変動し得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ約0.1 μm、0.5 μm、1 μm、5 μm、10 μm、15 μm、20 μm、25 μm、30 μm、35 μm、40 μm、50 μm、75 μm、あるいは100 μm未滿、またはそれに等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ約0.1 μm~5 μm、1 μm~10 μm、5 μm~15 μm、10 μm

50

~ 30  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$  ~ 40  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$  ~ 50  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$  ~ 75  $\mu\text{m}$ 、および 50  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  の範囲内であり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ約 0.1  $\mu\text{m}$ 、0.5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$ 、25  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ 、35  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、75  $\mu\text{m}$ 、あるいは 100  $\mu\text{m}$  未満、またはそれに等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ約 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$  ~ 10  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$  ~ 15  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$  ~ 30  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$  ~ 40  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$  ~ 50  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$  ~ 75  $\mu\text{m}$ 、および 50  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  の範囲内であり得る。例えば、マイクロスリットは、5  $\mu\text{m}$  の高さおよび 5  $\mu\text{m}$  の幅を有することができる (図 10 b)。

#### 【0096】

いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ 0.1  $\mu\text{m}$ 、0.5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$ 、25  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ 、35  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、75  $\mu\text{m}$ 、あるいは 100  $\mu\text{m}$  未満、またはそれに等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$  ~ 10  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$  ~ 15  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$  ~ 30  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$  ~ 40  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$  ~ 50  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$  ~ 75  $\mu\text{m}$ 、および 50  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  の範囲内であり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ 0.1  $\mu\text{m}$ 、0.5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$ 、25  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ 、35  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、75  $\mu\text{m}$ 、あるいは 100  $\mu\text{m}$  未満、またはそれに等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 5  $\mu\text{m}$ 、1  $\mu\text{m}$  ~ 10  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$  ~ 15  $\mu\text{m}$ 、10  $\mu\text{m}$  ~ 30  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$  ~ 40  $\mu\text{m}$ 、20  $\mu\text{m}$  ~ 50  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$  ~ 75  $\mu\text{m}$ 、および 50  $\mu\text{m}$  ~ 100  $\mu\text{m}$  の範囲内であり得る。

#### 【0097】

いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、5000、20,000、30,000、40,000、または 50,000 個の開口またはマイクロスリットを伴って製作することができる。他の側面では、マイクロ流体チップは、100 個超、200 個超、300 個超、400 個超、500 個超、600 個超、700 個超、800 個超、900 個超、1000 個超、5000 個超、20,000 個超、30,000 個超、40,000 個超、または 50,000 個超の開口またはマイクロスリットを伴って製作することができる。いくつかの側面では、圧力は、より多くのマイクロスリットを伴うマイクロ流体チップにとって、より低くあり得る。例えば、20,000 個のスリットを伴う eDAR マイクロ流体チップは、流体力学的切替プロセスの平衡を保つために、2つの側方緩衝剤チャンネルに 4 psi 未満の圧力を必要とした。いくつかの側面では、マイクロフィルタにわたるより低い圧力が、単離された希少細胞への応力およびその変形を最小限化することができる。

#### 【0098】

マイクロスリットは、濾過源として使用することができる。いくつかの側面では、マイクロスリットは、選別を可能にし、撮像中に収差を引き起こさない任意の材料 (例えば、PDMS) から加工し、撮像システムとともに使用するためのカバースリップ片と結合することができる (図 10 c および 10 d)。いくつかの側面では、マイクロスリットは、マイクロフィルタであり得る。

#### 【0099】

いくつかの側面では、濾過目的でのマイクロスリットの使用は、撮像精度および閉じ込められた細胞の計数を向上させることができる。いくつかの側面では、マイクロスリットは、閉じ込められた希少細胞上の 2 回目の標識の速度および効率を増加させることができる。例えば、抗 EpCAM - PE で標識された 2 つの癌細胞をマイクロスリット上に閉じ込めることができる (図 10 e)。細胞は、固定し、透過化し、抗サイトケラチン - Alexa488、抗 CD45 - Alexa700、抗 Her2 - Alexa647、および Hoechst で標識することができる。

10

20

30

40

50

## 【0100】

## 流体力学的選別

e D A Rプラットフォームの特徴および性能に寄与する、2つの主要な要因は、(1) 効率的かつ能動的選別方式、および(2) 後続の効率的な精製(例えば、精製チャンバ)方式である。マイクロ流体チップおよび流体力学的切替機構の分析性能は、特定の回収効率(例えば、95%)、特定の偽陽性率(例えば、0)、および特定のスループット(例えば、1時間につき4.8 mLの全血)のために最適化することができる。

## 【0101】

いくつかの側面では、流動を指向するための機構は、希少粒子の識別、組成、または数量に応じて、希少粒子を含有するアリコートの流動を複数の出口チャネルのうちの1つの中へ指向する。アリコートの流動を指向するための機構は、アリコートが希少粒子を含有する場合は第1の出口チャネル、またはアリコートが希少粒子を含有しない場合は第2の出口チャネルのいずれかの中へ入り得る。

10

## 【0102】

いくつかの側面では、アリコートの流動を指向するための機構は、電極、磁気要素、音響要素、電子作動型要素、電場、圧電弁、または磁場を備えることができる。他の場合において、アリコートの流動を指向するための機構は、1つまたはそれを上回る電子作動型弁またはピストンを備えることができ、弁またはピストンは、第1の合流点で第1の入力チャネルおよび2つの出口チャネルに交差する、少なくとも第1の指向性流チャネル中の液体流を制御することができる。

20

## 【0103】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、粒子、アリコート、または流体サンプルの軌道または流動を追跡および/または操作するための1つまたはそれを上回る電極を備えることができる。いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、粒子またはアリコートの集合または群の軌道または流動を追跡および/または操作するための1つまたはそれを上回る電極を備えることができる。この場合、電極は、そのような誘電泳動またはエレクトロウェッティング現象に基づいて、アリコートの分離を増進することができる。

## 【0104】

他の場合において、本明細書で提供される装置はさらに、磁気粒子に結合された、または磁気粒子によって結合された希少粒子(例えば、細胞)の分離のための磁気要素を備えることができる。他の場合において、本明細書で提供される装置はさらに、少なくとも1つの磁気粒子に結合された、または少なくとも1つの磁気粒子によって結合された希少粒子(例えば、細胞)の集合または群の分離のための磁気要素を備えることができる。いくつかの側面では、磁気要素は、細胞、あるいは粒子または細胞に付着したマイクロ磁気またはナノ磁気粒子の磁化率に基づいて、アリコート、粒子、または細胞の分離を増進することができる。いくつかの側面では、磁気要素は、細胞、あるいは少なくとも1つの粒子または細胞に付着したマイクロ磁気またはナノ磁気粒子の磁化率に基づいて、粒子または細胞の集合または群の分離を増進することができる。

30

## 【0105】

e D A R装置は、リアルタイムで流体力学的切替の効率を監視するように、収集側に位置する第2線共焦点検出窓を有することができる。いくつかの側面では、e D A R装置は、共焦点撮像と対合することができる。

40

## 【0106】

いくつかの側面では、流体力学的切替は、ソレノイドおよび2つの側方緩衝剤ライン内の圧力降下によって制御することができる。ソレノイドは、希少細胞収集チャネルの中に位置することができる。いくつかの側面では、このソレノイドは、左側の閉鎖位置にあり、「陰性」アリコートは、右側の廃棄物チャネルに流入する(図4A)。ソレノイドが開放されるとき、緩衝剤を含有する2つの側方チャネル間の圧力降下は、廃棄物チャネルから収集側に血流を切り替える。この切替は、希少粒子(例えば、細胞)を収集するように

50

、10ミリ秒未満（例えば、2～3ミリ秒）で起こることができる。

【0107】

いくつかの側面では、種々の流体力学的選別方式を使用することができる。本開示は、8つの異なる流体力学的選別方式を提供する（図6）。流体サンプル（例えば、血液）は、黒色の流動として示される、主要チャンネルから注入することができる。緩衝剤（マイクロ流体チップ内の薄い灰色）は、2つの側方チャンネルに流入することができ、希少細胞は、左下のチャンネルに収集することができ、廃棄物は、右下のチャンネルに指向することができる。長方形のブロックは、ソレノイドを表す（「ソレノイド」参照）。ソレノイドは、それぞれ、濃い灰色または薄い灰色のブロックによって示されるように、常時開（N.O.）または常時閉（N.C.）に設定することができる（図6）。

10

【0108】

マイクロ流体チップのチャンネルは、合流点で交差してもよい。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点で1つより多くの異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つより多くのチャンネルが、合流点で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルが、合流点で1つの異なるチャンネルと交差する。

20

【0109】

マイクロ流体チップのチャンネルは、合流点で交差しなくてもよい。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で、1つより多くの異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つより多くのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で1つの異なるチャンネルと交差する。

30

【0110】

ソレノイドおよび流動の調節

eDAR装置は、流体の流動および流体力学的選別方式を制御するようにソレノイドを含む。いくつかの側面では、ソレノイドは、ピストンであり得る。例えば、ソレノイドピストンは、電子作動型ソレノイド弁の副次構成要素である。いくつかの側面では、電子作動型ソレノイド弁は、圧電弁であり得る。いくつかの側面では、ソレノイドピストンは、成形によって装置に組み込むことができる。いくつかの側面では、ソレノイドは、弁であり得る。例えば、組み込みソレノイドピストンは、管類を介して流体連通しているソレノイド弁によって置換されてもよい。

40

【0111】

いくつかの側面では、eDAR装置は、1つのソレノイドを含有することができる。他の場合において、eDAR装置は、1つより多くのソレノイドを含有することができる。例えば、eDAR装置は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26

50

、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドを含有することができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、開放し得る。例えば、開放ソレノイドは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過することを可能にするために使用することができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドが、開放し得る。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、常時開(N.O.)であり得る。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドが、常時開であり得る。

10

**【0112】**

いくつかの側面では、ソレノイドを閉鎖することができる。例えば、閉鎖ソレノイドは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過することを防止するために使用することができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドを閉鎖することができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドを閉鎖することができる。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、常時閉(N.C.)であり得る。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドが、常時閉であり得る。

20

**【0113】**

いくつかの側面では、ソレノイドを開放から閉鎖に切り替えることができる。例えば、開放ソレノイドを閉鎖することは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過することを防止するために使用することができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドを開放から閉鎖に切り替えることができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドを開放から閉鎖に切り替えることができる。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。

30

**【0114】**

いくつかの側面では、ソレノイドを閉鎖から開放に切り替えることができる。例えば、閉鎖ソレノイドを開放することは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過することを可能にするために使用することができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドを閉鎖から開放に切り替えることができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個超のソレノイドを閉鎖から開放に切り替えることができる。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。

40

50

## 【 0 1 1 5 】

いくつかの側面では、e D A Rに使用することができる、流体マイクロ流体チップの構造および流体力学的選別の対応する方式が、図6に示されている。ソレノイドの位置は、単一のチャンネル上に出口または入口があるときに印付けることができる。例えば、図6Fでは、第2のソレノイドの位置は、廃棄物収集チャンネルの中心出口の上にあることを意味する、「中心廃棄物」であり得る。図6Gに示されるものを除く全方式では、「陽性」事象を検出することができるときに、選別をトリガするように、ソレノイドに印加されるDC電圧を変化させることができ、ある期間後に通常状態に戻すことができる。いくつかの側面では、選別を制御するために、4つの個々のステップを使用することができる（例えば、図6Gに示される方式）。両方のソレノイドを閉鎖することができ、流体が廃棄物チャンネルへ流動することができる。スイッチオーバーステップを行うように収集側のソレノイドを開放することができる、選別をトリガすることができる。他のソレノイドは、細胞が収集された後にスイッチバックステップを行うように開放することができる。通常状態に戻るよう流体流を完全に切り替えて戻した後に、両方のソレノイドを同時に閉鎖することができる。本明細書で説明される8つの異なる流体力学的選別方式の流体構成および性能の概要が、表1（以下）で描写されている。いくつかの側面では、2つのソレノイドを使用することができる（例えば、図6C、6E、および6Gに示される方式）。

## 【 表 1 】

方式	位置	通常状態	左圧力 psi)	右圧力 psi)	スイッチ オーバー 時間 ミリ秒)	スイッチ バック 時間 ミリ秒)
a	収集	閉	低	高	~2-3	~15-25
b	廃棄物	開	高	低	~15-20	~2-3
c	収集	閉	低	高	~4-5	~10
	廃棄物	開				
d	右緩衝	閉	低	高	~3	~40
e	廃棄物	開	高	低	~25	~2
f	収集	閉	低	高	~25	~5-6
	中心 廃棄物	開				
g	収集	閉	低	高	~2-3	~2-3
	中心 廃棄物	閉				
h	中心 右緩衝	閉	低	高	~2-3	~2-3

表1. 8つの異なる流体力学的選別方式の流体構成および性能の概要

## 【 0 1 1 6 】

いくつかの側面では、オフチップソレノイドを使用することができる。オフチップソレノイドは、方法の大半で閉鎖することができる。オフチップソレノイドを開放するために、電圧（例えば、5VDC電圧）を印加することができる。オフチップソレノイドは、急速に（例えば、3ミリ秒未満またはそれに等しい）開放することができる。オフチップソレノイドが使用される場合、マイクロ流体チップの製作を修正することができ、ソレノイドをマイクロチャンネルと接続することができる。いくつかの側面では、オンチップソレノイドを使用することができる。オンチップソレノイドは、方法の大半で閉鎖することができる。オンチップソレノイドを開放するために、電圧（例えば、5VDC電圧）を印加することができる。オンチップソレノイドは、急速に（例えば、3ミリ秒未満またはそれに

等しい)開放することができる。オンチップソレノイドが使用される場合、マイクロ流体チップの製作を修正することができ、ソレノイドをマイクロチャンネルと接続することができる。

#### 【0117】

例えば、この方式では、オフチップソレノイドが使用される。シリンジポンプを使用して、標識流体サンプルをマイクロ流体チップの上部チャンネルに注入することができる(図7a)。能動的選別ステップを制御するために、緩衝剤が通って流動する、2つの側方チャンネルを使用することができる。2つのポートが、右側チャンネル上に位置し、両方が、加圧緩衝剤源に接続される。オフチップソレノイドは、流体力学的切替を制御するように、選別合流点付近のポートに接続することができる。オフチップソレノイドを使用する切替プロセスは、安定し得、 $10^5$ のオン・オフサイクルを通して安定性を維持することができる。

10

#### 【0118】

いくつかの側面では、流体サンプルがソレノイドに接触することを防止するように、インラインソレノイドを緩衝剤ライン上に配置することができる。これは、サンプルの腐敗および二次汚染の可能性を排除することができる。eDAR装置および方法の使用中に、希少細胞収集チャンネルの中に一定流量の緩衝剤があり得る。オンチップソレノイドは、後続の精製(例えば、精製チャンバ)ステップの効率を向上させることができ、かつ細胞の凝集体の形成を防止することができる。

20

#### 【0119】

いくつかの側面では、eDAR装置内の流体の流動は、検出容積の上流または下流のいずれかにある、ソレノイド、弁、気泡、電場、磁場、光場、空気圧源、固体粒子、膜、不混和液滴、重力差、またはチャンネルの表面張力を変化させるコーティングのうちの1つを用いて調節することができる。流動は、細胞が検出容積を通して横断するにつれて、停止させ、減速し、または加速することができる。

30

#### 【0120】

いくつかの側面では、流動チャンネルを通る流体サンプルの連続流を検出中に維持することができる。いくつかの側面では、個々のアリコートは、物理的に分離されなくてもよいが、むしろ光学検出ステップおよび/または選別ステップによって定義することができる。

40

#### 【0121】

例えば、流動は、廃棄物を収集するために使用することができるチャンネルの中へ指向することができる(図7b)。選別合流点の後に、2つのチャンネルがあり得る。左のチャンネルは、陽性アリコートを収集し、それらをさらなる精製(例えば、精製チャンバ)のための濾過および収集領域に送達することができる。右のチャンネルは、廃棄物(例えば、陰性アリコート)を収集する。この場合、アリコートが「陰性」としてランク付けされ、閉鎖されたままであるときに、いかなる電圧もソレノイドに印加されない(図7b)。第1および第3緩衝剤源の間の初期圧力降下後に、流動パターンの変化が起こり得る(図7a)。第1の検出窓によって、陽性事象を検出することができる。この場合、緩衝剤リザーバ(例えば、2番)から緩衝剤流を開放するように、DC電圧(例えば、5V)をソレノイドに印加することができる。右側の緩衝剤チャンネルの減少した流動抵抗が、より速い流速を生成することができる。流体流は、陽性アリコートを収集するように右側から左側に押送することができる(図7c)。アリコートは、収集し、第2の検出窓によって確認することができる。いくつかの側面では、ソレノイドは、流体流を廃棄物収集チャンネルに戻して切り替えるように閉鎖することができる(図7d)。スイッチオーバーおよびバックに必要なとされる時間は、20ミリ秒未満であり得、例示的な場合において、時間は、2~3ミリ秒またはその間である(表1および図8、フレームレート=毎秒1,918フレーム)。いくつかの側面では、使用される条件は、 $10^5$ 超のオン・オフサイクルに繰り返すことができる。

50

#### 【0122】

50

いくつかの側面では、流動は、例えば、機械的原理（例えば、外部シリンジポンプ、空気圧膜ポンプ、振動膜ポンプ、真空デバイス、遠心力、および毛管作用）、電気または磁気的原理（例えば、電気浸透流、動電ポンプ、圧電/超音波ポンプ、強磁性流体プラグ、電気流体力学的ポンプ、および電磁流体力学的ポンプ）、熱力学的原理（例えば、気泡生成/位相変化誘導型体積膨張）、表面湿潤原理（例えば、エレクトロウエットング、化学、熱、および放射性誘導型表面張力勾配）に基づいて動作するものを含むが、それらに限定されない、流体力学的流体圧力を誘導する方法およびデバイスによって送達することができる。

#### 【0123】

さらに他の場合において、流体は、重力送給によって提供される流体駆動力、（毛管作用のような）表面張力、静電力（動電流）、遠心力流（コンパクトディスク上に配置され、回転させられる基板）、磁力（振動するイオンが流動を引き起こす）、電磁流体力学的力、および真空または圧力差によって送達するか、または導くことができる。

10

#### 【0124】

いくつかの側面では、流体力学的流体圧力または流体駆動力を誘導するための方法およびデバイスに関して列挙されるもの等の流体流制御デバイスを、本主題の入力ポートまたは出力ポートに連結することができる。いくつかの側面では、複数のポートが、入口および出口のいずれか一方または両方で提供され、1つまたはそれを上回るポートが、流体流制御デバイスに連結される。

20

#### 【0125】

##### 経過時間

被分析物（例えば、希少細胞または循環腫瘍細胞（CTC））は、第1の検出窓から第2の検出窓へ流動することができる。第1の窓での決定APDピークの記録と確認信号の検出との間で経過し得る時間は、被分析物を選別するための経過時間であり得る。いくつかの側面では、経過時間は、変動し得る。いくつかの側面では、線形流速が、経過時間に影響を及ぼし得る。いくつかの側面では、マイクロチャネルの層流が、経過時間に影響を及ぼし得る。いくつかの側面では、体積流速を40  $\mu\text{L}/\text{分}$ に設定することができる（図9b）。いくつかの側面では、体積流速は、約1  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、2  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、4  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、6  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、7  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、8  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、9  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、11  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、12  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、13  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、14  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、16  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、17  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、18  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、19  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、21  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、22  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、23  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、24  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、25  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、35  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、45  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、50  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、55  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、60  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、65  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、70  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、75  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、80  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、85  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、90  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、95  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、100  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または200  $\mu\text{L}/\text{分}$ であり得る。

30

#### 【0126】

いくつかの側面では、流速は、約1  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 5  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 10  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 15  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 20  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 30  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 40  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 50  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 60  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、50  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 70  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、60  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 80  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、70  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 90  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、80  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 100  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、90  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 100  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または90  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 200  $\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲内であり得る。他の場合において、体積流速は、80  $\mu\text{L}/\text{分}$ に設定することができる（図9b）。

40

#### 【0127】

いくつかの側面では、体積流速は、1  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、2  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、4  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、6  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、7  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、8  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、9  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、11  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、12  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、13  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、14  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、16  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、17  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、18  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、19  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、21  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、22  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、23  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、24  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、25  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、35  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、45  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、50  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、55  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、60  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、65  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、7

50

0  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、75  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、80  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、85  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、90  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、95  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、100  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または200  $\mu\text{L}/\text{分}$ であり得る。

【0128】

いくつかの側面では、流速は、1  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 5  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 10  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 15  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 20  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 30  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 40  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 50  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 60  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、50  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 70  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、60  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 80  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、70  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 90  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、80  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 100  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、90  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 100  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または90  $\mu\text{L}/\text{分}$  ~ 200  $\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲内であり得る。より少ない経過時間を達成するために、より速い流速を使用することができる(図9c)。

10

【0129】

検出

本開示は、検出システムを装備することができるマイクロ流体チップを使用する、e D A R用の装置を提供する。いくつかの側面では、検出システムは、線共焦点検出方式を含むことができる。線共焦点検出方式では、2つのレーザ源(例えば、488および633 nm)は、一連のダイクロイックミラー、円柱レンズ、およびビームスプリッタを使用して、(例えば、2つの)検出窓を形成する。第1の検出窓は、同時に重複する2つのレーザビームを有することができる、かつ標識希少細胞(例えば、CTC)から蛍光信号を検出するために使用することができる。第2の検出窓は、選別されたアリコート中で、希少細胞の識別または希少細胞の欠如を確認するために使用することができる。第2の検出窓はさらに、選別効率を監視するために使用することができる。

20

【0130】

いくつかの側面では、2つの希少粒子を同時に検出することができる。各希少粒子を一意の検出試薬と接触させることができ、各検出試薬を2つの検出デバイスのうちの1つによって検出することができる。さらに、検出試薬は、蛍光部分を含み、異なる蛍光部分の励起波長に対応する異なる波長で放射線を生成する、2つの調査デバイス(例えば、2つのレーザ)を使用することができる。それぞれの蛍光放射線は、2つの異なる検出デバイスによって検出することができる。いくつかの側面では、検出試薬は、異なる波長における蛍光によって区別可能であり得る。

【0131】

いくつかの側面では、2つまたはそれを上回る希少粒子を連続して検出することができる。例えば、本方法は、e D A R装置の第1の場所で第1の希少粒子を検出するステップと、e D A R装置の第2の場所で第2の希少細胞を検出するステップとを含むことができる。この場合、第1および第2の粒子が存在するアリコートを、第1の検出ステップの後、第2の検出ステップの後、または両方の検出ステップの後に、新しい場所へ導くことができる。

30

【0132】

ある側面では、検出事象は、規則的な周波数で起こり得る。周波数は、検出容積のサイズおよび流体サンプルの流速に関し得る。特定の装置の検出容積は、0.1  $\mu\text{L}$  ~ 100  $\mu\text{L}$ であり、かつその限界を含む範囲内(例えば、10  $\mu\text{L}$ )であり得、流体サンプルは、1  $\mu\text{L}/\text{秒}$  ~ 1000  $\mu\text{L}/\text{秒}$ であり、かつその限界を含む範囲内の速度(例えば、100  $\mu\text{L}/\text{秒}$ )で、装置を通して流動することができ、0.001秒 ~ 1秒であり、かつその限界を含む範囲内(例えば、0.1秒)で1回、または1 Hz ~ 100 Hzであり、かつその限界を含む範囲内の速度(例えば、10 Hz)で、異なるアリコートを検出することができる。

40

【0133】

いくつかの側面では、装置の幾何学形状および処理される流体の体積が、速度に影響を及ぼし得る。例えば、アリコートは、0.1 kHz ~ 100 MHzであり、かつその限界を含む範囲内の速度で、検出容積を通して横断することができる。いくつかの側面では、アリコートは、10 Hz ~ 10 MHzまたは約10 MHzであり、かつその限界を含む範

50

囲内の速度で、検出容積を通過して横断する。いくつかの側面では、アリコートは、0.1 kHz ~ 100 MHz または約 100 MHz であり、かつその限界を含む範囲内、あるいは 1 kHz または約 1 kHz ~ 10 MHz または約 10 MHz であり、かつその限界を含む範囲内の周波数で、あるいは約 1 kHz ~ 5 MHz または約 5 MHz であり、かつその限界を含む範囲内の周波数で、あるいは 1 kHz または約 1 kHz ~ 1 MHz または約 1 MHz であり、かつその限界を含む範囲内の周波数で、検出容積を通過して横断してもよい。いくつかの側面では、アリコートが検出容積を通過して横断する周波数は、少なくとも約 0.1 kHz、または少なくとも約 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、400、500、600、700、800、あるいは 900 kHz、または少なくとも約 1 MHz、または少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、あるいは 100 MHz であり得る。いくつかの側面では、アリコートが検出容積を通過して横断する周波数は、少なくとも 0.1 kHz、または少なくとも 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、400、500、600、700、800、あるいは 900 kHz、または少なくとも 1 MHz、または少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、あるいは 100 MHz であり得る。

10

20

#### 【0134】

いくつかの側面では、流体サンプルのアリコート中の被分析物（例えば、細胞）の集合からの特性の検出は、同時または経時的に累積的であり得る。例えば、特性の検出は、被分析物の集合を含有する、大きいアリコートから同時であり得る。同時モード中に、粒子は、可変速度の流動によって搬送することができる。他の場合において、粒子は、検出容積を通過して横断するにつれて定常流によって搬送することができる。

#### 【0135】

種々の側面では、eDAR 装置および方法は、信号が複数の被分析物（例えば、複数の細胞）から同時に検出されることを可能にする。いくつかの側面では、アリコート内に存在する複数の被分析物から同時に検出される信号に基づいて、アリコートがランク付けされる。

30

#### 【0136】

他の場合において、細胞の集合からの特性の検出のための本明細書で提供される方法は、複数の細胞が流動を用いて検出容積を通過して横断するが、およそ 1 つの単一細胞である小さい検出容積から、経時的に（「累積的」）発生し得る。eDAR の累積モードは、単一の生体粒子から発生する連続信号またはフレームの時間経過オーバーレイとは明確に異なり、単一の生体粒子の時間経過オーバーレイは、生体粒子の集合を構成しない。同時および累積の両方で、細胞の集合からの特性が検出された後のみ、決定が下される。

40

#### 【0137】

いくつかの側面では、検出器は、カメラ、電子倍增管、電荷結合素子（CCD）画像センサ、光電子倍增管（PMT）、アパランシェフォトダイオード（APD）、単光子アパランシェダイオード（SPAD）、シリコン光電子倍增管（SiPM）、および相補型金属酸化膜半導体（CMOS）画像センサから成る群から選択される。いくつかの側面では、本明細書で提供される eDAR 装置は、選択細胞の運動を追跡するように、またはアリコート中に存在する選択粒子あるいは細胞を計数するように、光、電気、音響、または磁気検出器を備えることができる。

#### 【0138】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置または方法は、明視野、落射、共焦点、透過、DIC（微分干渉コントラスト）、暗視野、ホフマン、または位相差を含むが、

50

それらに限定されない、種々の構成において、蛍光（単または多色）顕微鏡検査法を組み込むことができる。

#### 【0139】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、複数の検出デバイス、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれを上回る検出デバイスを備えることができる。複数の検出デバイスが、本開示の方法を行うために有用であり得、例えば、1つより多くの希少粒子または細胞が、流体サンプル中に存在し、1つより多くの細胞マーカーが、異なる細胞型を区別するために使用されており、または複数の検出試薬が同時に検出されている。いくつかの側面では、検出デバイスは、確認レーザを含むことができる。例えば、確認レーザは、選別されたアリコートを検査するために使用することができる。いくつかの側面では、確認レーザによって検出される、選別されたアリコートは、陽性アリコートであり得、選別後に保持することができる。いくつかの側面では、確認レーザによって検出される、選別されたアリコートは、陰性アリコートであり得、選別後に廃棄することができる。例えば、確認レーザは、e D A R選別方式の精度を制御するために第2の検出方法として使用することができる。

10

#### 【0140】

##### 放射線源およびデバイス

本開示は、検出デバイスまたは撮像デバイスと、ランク付けデバイス（例えば、コンピュータ）を含むことができる、e D A R用の装置を提供する。いくつかの側面では、レーザ（または1つより多くのレーザ）が、調査デバイスとしての機能を果たすことができる。フォトダイオード、光電子増倍管、またはカメラを伴う倒立顕微鏡を、検出デバイスとして使用することができる。マスクをチャンネルと検出デバイスとの間の経路に配置することができる。

20

#### 【0141】

いくつかの側面では、調査デバイス（例えば、488 nm 固体ダイオード励起レーザおよび633 nm HeNeレーザ）を倒立顕微鏡の中へ指向することができる。顕微鏡対物レンズに進入することに先立って、10対1の縦横比を伴う平行楕円ビームを形成するように、円柱光学部または回折光学部を使用して、2つのレーザビームを成形することができる。半波長板および偏光ビームスプリッタの組み合わせを使用して、各ビームの強度を調整することができる一方で、鏡が、空間的に共局在化した励起領域を作成するように独立して光を操縦する。生体粒子からの蛍光は、帯域通過フィルタを通過する前に、2つのダイクロイックミラーによって3つの波長帯に分割し、3つの単光子アバランシェダイオード（SPAD）上に再集束することができる。1つのSPADは、560 nm ~ 610 nmの波長範囲内の蛍光を収集することができ、第2のSPADは、645 nm ~ 700 nmの範囲内の蛍光を収集することができ、第3のSPADは、500 nm ~ 540 nmの範囲内で収集することができる。SPAD出力は、カウンタ/タイマボードを伴うデジタルプロセッサ（例えば、コンピュータ）に指向され、いくつかのアルゴリズムで分析される。

30

#### 【0142】

いくつかの側面では、デジタルプロセッサは、アリコートをランク付けするように、検出デバイスからアルゴリズムを通して信号を受容する。デジタルプロセッサは、ランク付けの値（例えば、流体サンプル中の希少粒子の存在、非存在、数量、識別、または組成）に基づいて、アリコートを適切なチャンネルの中へ指向することができる。e D A Rは、1、2、3、4、5、または6個の検出デバイス、および1、2、3、4、5、または6個の調査デバイス、あるいは多数の検出デバイスおよび調査デバイスから成ることができる。

40

#### 【0143】

##### 二重捕捉 e D A R

本開示はさらに、e D A Rの「二重捕捉」バージョン用の装置を提供する。二重捕捉装置は、混合流体の同一のサンプルから、希少細胞の2つの異なる亜集団を分離することが

50

できる。これは、単一のマイクロ流体チップ上で同時に行うことができる。2つの亜集団はさらに、マイクロ流体チップ上の2つの異なる領域上で別々に閉じ込めることができる。

#### 【0144】

マイクロ流体 e D A R デバイスの二重捕捉バージョンの一般構造が、図 1 1 で描写されている。サンプルは、一意の蛍光タグに共役される少なくとも2つの一意の抗体で標識することができる。例えば、サンプル（例えば、血液）は、サンプル内の被分析物上のマーカー（例えば、上皮、抗 E p C A M - P E ）に結合する一意のフルオロフォアと共役される第 1 のタグ、およびサンプル内の被分析物上のマーカー（例えば、間葉、抗 E G F R 、または抗ビメンチン）に結合する一意のフルオロフォアと共役される第 2 のタグで標識することができる。各フルオロフォアは、異なる発光波長を有することができる（例えば、F I T C ）。標識血液サンプルは、マイクロ流体チップに注入することができる。E p C A M を発現する希少細胞は、（以前に説明された）線共焦点方式を使用して検出ことができ、ピークを黄色チャンネル内で検出することができる。収集チャンネル（例えば、収集チャンネル # 1 ）の中へその特定のアリコートを集めるように、選別事象をトリガすることができる。いくつかの側面では、アリコートは、間葉マーカーに対して陽性としてランク付けすることができる。次いで、希少細胞は、異なる収集チャンネル（例えば、収集チャンネル # 2 ）の中へ選別することができる。希少細胞の2つの亜集団は、別々に二重捕捉 e D A R マイクロ流体チップ上に閉じ込めて濃縮することができる。

10

#### 【0145】

二重捕捉 e D A R 装置は、流体切替方式（図 1 1 ）を使用することができる。標識サンプルは、最上部の主要チャンネルに導入することができる。緩衝剤は、2つのソレノイドを使用して、血流の流体力学的切替を制御するように、2つの側方チャンネルに流入することができる。いくつかの側面では、二重捕捉 e D A R の濾過領域は、（以前に説明された）マイクロスリットを使用して構築することができる。C T C の2つの亜集団を分離し、同一のマイクロ流体チップ上の2つの異なる濾過領域上で閉じ込めることができる。

20

#### 【0146】

二重捕捉 e D A R 装置は、ソレノイドを含むことができる。いくつかの側面では、アリコートが陰性としてランク付けされるときに、ソレノイドの両方を閉鎖することができる（図 1 2 ）。サンプルは、圧力が両方のチャンネル内で平衡を保たれた場合に、廃棄物として収集するように底部中心チャンネルへ流動することができる。他の場合において、アリコートが2つのマーカーのうちの1つだけ（例えば、上皮）に対して陽性としてランク付けされるとき、次いで、サンプルが左側の収集チャンネルに流入するために、ソレノイド # 2 を開放することができる（図 1 2 B ）。アリコートが収集された後、ソレノイド # 2 を再度閉鎖することができる。サンプル流が中心チャンネルに戻される。いくつかの側面では、アリコートを1つだけのマーカー（例えば、上皮）に対して陽性としてランク付けことができ、サンプル流が右チャンネルへ流動することを可能にするように、ソレノイド # 1 を開放することができる（図 1 2 C ）。いくつかの側面では、二重捕捉 e D A R 装置における2種類の選別事象の応答時間は、迅速である（例えば、3ミリ秒未満またはそれに等しい）。

30

40

#### 【0147】

マイクロ流体チップ内の免疫染色および退色

本開示は、マイクロ流体デバイスを使用する、逐次免疫染色および退色方法のための方式を提供する。本方法は、第 P C T W O 2 0 1 0 / 1 2 0 8 1 8 号で引用される e D A R 装置、本明細書で提供される装置、または当技術分野で公知である他の装置を使用することができる。いくつかの側面では、本方式は、e D A R と併用することができる。いくつかの側面では、本方式は、死容積を最小限化し、使用される抗体の量を減少させ、気泡を導入することを回避し、希少細胞を単離し、染色し、および退色させるプロセスを自動化するように、インライン染色および洗浄システムと併用することができる。

#### 【0148】

50

被分析物（例えば、希少細胞）を捕捉するために、eDARを使用することができる。希少細胞は、マイクロ流体チップ上の小さい領域（例えば、チャンバ）に濃縮することができる。小さい領域は、標識細胞を急速に撮像し、使用される試薬（例えば、抗体、緩衝剤等）の量を最小限化するために使用することができる。マイクロ流体チップは、開放したアクセス可能構造を伴って設計することができる。開放構造は、単一細胞のさらなる操作（例えば、着目細胞を取り出す、またはある試薬を細胞に送達する）を可能にすることができる。

#### 【0149】

いくつかの側面では、レーザ検出ビーム、体積流速、および選別速度の組み合わせによって、仮想アリコートを取得することができる。これらの要因に基づいて、事実上、標識サンプルをアリコートに分割することができる（例えば、アリコートにつき2 nLで1 mLのサンプルにつき500,000）。いくつかの側面では、線共焦点検出方法は、各細胞からの蛍光発光を検出することができる。仮想アリコートは、標識方式に従ってランク付けすることができる。標識された場合、アリコートは「陽性」であり、標識されていない場合、アリコートは「陰性」である。いくつかの側面では、陰性アリコートを破棄することができる（図4A）。

10

#### 【0150】

いくつかの側面では、アリコートランク付けに続いて、自動フィードバック機構が、流動の流体力学的切替をトリガすることができる。切替は、「陽性」アリコートを収集し、さらなる精製（例えば、精製チャンバ）および分析のためのマイクロ流体チップの領域に移送することができる。いくつかの側面では、選別されたアリコートは、希少細胞（例えば、循環腫瘍細胞）を閉じ込めることができ、血液細胞を破棄することができる、マイクロ流体チップの領域に移送することができる（図4A）。いくつかの側面では、閉じ込められた細胞は、撮像し、バイオマーカーを認識する1つまたはいくつかのタグ（例えば、標識抗体）で標識することができる。

20

#### 【0151】

被分析物（例えば、希少細胞）の標識および撮像は、マイクロ流体チップ（例えば、eDAR装置）上で起こることができる。いくつかの側面では、灌流標識および洗浄ステップを行うように、マイクロ流体チップ上の2つのポートを開放位置に配置することができる（図13A）。残りの3つのポートは、閉鎖されたままとなることができる。蠕動ポンプは、洗浄緩衝剤（例えば、Isoton (Beckman Coulter Inc. (Chino, CA))）および標識試薬をマイクロ流体チップに送達することができる。6方向弁を使用して、加圧緩衝剤源を、ポンプおよびマイクロ流体チップに連結することができる。いくつかの側面では、漏出および/または汚染を防止するように、弁上の他の3つのポートを閉鎖することができる。

30

#### 【0152】

本方法は、単離された被分析物（例えば、希少細胞）上のマーカーの染色を提供する（図13B）。本方法は、抗体（例えば、10ナノグラム未満またはそれに等しい）およびインキュベーションステップ（例えば、30分未満またはそれに等しい）を使用して行うことができる。免疫染色および光退色の方法を行うために、6方向弁は、流体力学的切替の安定した制御のために、加圧緩衝剤に向かって回転させて開放することができる。弁は、特定の量の試薬をマイクロ流体チップに注入するように、蠕動ポンプに向かって回転させることができる。蠕動ポンプは、標識試薬および洗浄試薬を送達するために使用することができる（図13）。クロスバーは、対応するポートを閉鎖できることを示す。いくつかの側面では、弁は、気泡がマイクロ流体チップシステムに進入することを防止することができる。

40

#### 【0153】

いくつかの側面では、本方法は、細胞内マーカー染色を行うために使用することができる。本方法では、捕捉された細胞を固定し、免疫染色に先立って、マイクロ流体チップ上で洗剤（例えば、トリトン、サーフィノール465界面活性剤等）等の透過化剤を使用し

50

て透過化することができる。本方法はさらに、複数回の個々の細胞の免疫染色、染色細胞の洗浄、細胞内のマーカーの撮像、および個々の細胞に結合されるマーカーの光退色を説明する。ステップは、複数回にわたって連続的に繰り返すことができる。

**【0154】**

いくつかの側面では、単離された細胞を固定することができる。固定は、灌流（例えば、手動または自動）または拡散（例えば、手動または自動）方法を使用して行うことができる。いくつかの側面では、固定は、マイクロ流体チップ上で、またはサンプルがマイクロ流体チップから除去された後にマイクロ流体チップ外で行うことができる。いくつかの側面では、サンプルまたは単離された粒子は、固定されなくてもよい。この場合、サンプルは、生体粒子（例えば、哺乳類細胞、細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞等）を含んでもよい。サンプルは、固定によって損傷され得る構造を含んでもよい。

10

**【0155】**

いくつかの側面では、単離された粒子を透過化することができる。透過化は、灌流（例えば、手動または自動）または拡散（例えば、手動または自動）を使用して行うことができる。いくつかの側面では、透過化は、マイクロ流体チップ上で、またはサンプルがマイクロ流体チップから除去された後にマイクロ流体チップ外で行うことができる。いくつかの側面では、サンプルまたは単離された粒子は、透過化されなくてもよい。この場合、サンプルは、マーカー（例えば、細胞外、細胞関連等）を含んでもよい。サンプルは、透過化によって損傷され得る構造を含んでもよい。

20

**【0156】**

タグと接触させられている被分析物を光退色させることができる。光退色のプロセスは、被分析物と接触させられるタグから発せられる信号を低減させることができる。いくつかの側面では、光退色に使用することができるデバイスは、レーザ、発光ダイオード、発電アーク灯、白熱灯、蛍光灯、紫外線ランプ、またはハロゲンランプを含むことができる。いくつかの側面では、発電アーク灯は、以下の種類のアーク灯、すなわち、ネオン、アルゴン、キセノン、クリプトン、ナトリウム、金属ハロゲン化物、水銀、または炭素から選択することができるが、それらに限定されない。

30

**【0157】**

いくつかの側面では、被分析物をタグと接触させることができ、タグを化学的に退色させることができる。いくつかの側面では、タグは、検出器によって可読である信号を生成することができる。例えば、信号は、フルオロフォアによって発することができる。いくつかの側面では、信号は、酸化試薬、ハロゲンイオン、還元剤、または任意の他の適切な蛍光消光剤を含むが、それらに限定されない化学物質を使用して、化学的に消光または退色させることができる。いくつかの側面では、還元剤は、ジチオスレイトールである。他の場合において、抗体等のバイオマーカーを認識することができるタグは、適切な試薬を使用して、高い効率で結合部位から化学的に解離することができる。いくつかの側面では、脱染試薬は、2% SDS、20 mM ジチオスレイトール (DTT)、および pH 6.8 の 60 mM トリスを伴うトリス系緩衝剤であり得る。

40

**【0158】**

本方法は、各撮像ステップ後に光退色を含むことができる。使用されるパラメータは、高度に効率的かつ急速なスループット光退色プロセスを実現することができる（図14および表2）。光退色光源の異なる出力への標識細胞の暴露後に、バイオマーカー（例えば、抗EpCAM-PE）を対象とするタグで標識された細胞（例えば、MCF-7）の光退色曲線を生成することができる（図15A）。同一の抗体への複数の共役（例えば、Alexa 647、Alexa 488、FITC、PE）を使用して、付加的な曲線を生成することができる（図15B）。

40

**【0159】**

標識および光退色のステップは、バイオマーカーのいくつかの群を研究するように複数回繰り返すことができる。例えば、群を生成するように、2つの着目バイオマーカーを陽性対照マーカー（例えば、核染色）および陰性対照マーカー（例えば、CD45）と組み

50

合わせることができる。各回で一群を研究することができ、2回目の免疫染色が起こる前に光退色が続く。いくつかの側面では、逐次免疫染色および光退色の方法は、被分析物上の異なるタンパク質マーカーの発現を判定するために使用することができる。例えば、マイクロ流体チップ上に閉じ込められた被分析物（例えば、希少細胞、癌細胞等）は、EpCAM、サイトケラチン、およびHoescht陽性であるが、CD45陰性である（以下の表2）。

【表2】

黄色 チャンネル	抗-EpCAM-PE □ツト 515776 (1:50 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	MUC1-PE □ツト B160021 (1:50 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	抗-CD24 PE □ツト B159732 (1:50 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	抗-CD166 PE □ツト B139297 (1:10 希釈, Biolegend, San Diego, CA)
赤色 チャンネル	(PAN) サイトケラチン-AlexaFluro647 □ツト 4528S-14 (1:10 希釈, CellSignalling, Danvers, MA)	HER2-AlexaFluro647 □ツト B110523 (1:50 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	抗-CD44-AlexaFluro647 □ツト B124953 (1:66 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	EGFR-APC □ツト B161059 (1:40 希釈, Biolegend, San Diego, CA)
青色 チャンネル	Hoechst □ツト 1249542 (1:500 希釈, Life technologies, Carlsbad, CA)	Hoechst □ツト 1249542 (1:500 希釈, Life technologies, Carlsbad, CA)	Hoechst □ツト 1249542 (1:500 希釈, Life technologies, Carlsbad, CA)	Hoechst □ツト 1249542 (1:500 希釈, Life technologies, Carlsbad, CA)
緑色 チャンネル	抗-CD45-FITC □ツト B116314 (1:66 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	抗-CD45-FITC □ツト B116314 (1:66 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	抗-CD45-FITC □ツト B116314 (1:66 希釈, Biolegend, San Diego, CA)	抗-CD45-FITC □ツト B116314 (1:66 希釈, Biolegend, San Diego, CA)

表2.4回の免疫染色および光退色の実験詳細を示す

## 【0160】

いくつかの側面では、バイオマーカーを対象とする1つだけの第1のタグを1回目の免疫染色で使用することができる。この場合、第1のタグは、光退色させることができる。異なるバイオマーカーを対象とする異なる第2のタグは、次回の免疫染色で使用することができる。異なる第2のタグは、光退色させることができる。

## 【0161】

いくつかの側面では、バイオマーカーを対象とする1つだけの第1のタグを1回目の免疫染色で使用することができる。この場合、第1のタグは、光退色させることができる。異なるバイオマーカーを対象とする同一の第2のタグは、次回の免疫染色で使用することができる。第2の同一のタグは、光退色させることができる。

## 【0162】

いくつかの側面では、バイオマーカーを対象とする1つだけの第1のタグを1回目の免疫染色で使用することができる。この場合、第1のタグは、光退色させることができる。異なるバイオマーカーを対象とする異なる第2のタグは、次回の免疫染色で使用することができる。第2の異なるタグは、光退色させることができる。

## 【0163】

いくつかの側面では、バイオマーカーを対象とする1つだけの第1のタグを1回目の免疫染色で使用することができる。この場合、第1のタグは、光退色させることができる。同一のバイオマーカーを対象とする異なる第2のタグは、次回の免疫染色で使用することができる。第2の異なるタグは、光退色させることができる。

## 【0164】

いくつかの側面では、複数のタグは、1回目の免疫染色で使用することができる、それぞれが一意のバイオマーカーを対象とする第1のセットを含む。この場合、複数のタグの第1のセットは、光退色させられる。一意のバイオマーカーの異なるセットを対象とする、複数のタグの異なる第2のセットは、次の免疫染色で使用することができる。異なるタグの第2のセットは、光退色させることができる。いくつかの側面では、第1のセットで使用されるタグのうちいくつかはまた、第2のセットで使用することもできる。いくつかの側面では、第1のセットの中のタグによって標的にされるバイオマーカーのうちいくつかはまた、第2のセットの中のタグによって標的にすることもできる。いくつかの側面では、バイオマーカーの第2のセットは、バイオマーカーの第1のセットと同一であり得る。いくつかの側面では、タグの第2のセットは、タグの第1のセットと同一であり得る。いくつかの側面では、タグの第2のセットは、タグの第1のセットと重複するタグを含有することができる。いくつかの側面では、バイオマーカーの第2のセットは、バイオマーカーの第1のセットに重複するバイオマーカーを含有することができる。

10

20

30

40

50

**【0165】**

別の場合において、6つの（例えば、複数の）個々の細胞（例えば、癌細胞）をマイクロ流体チップ上に閉じ込めることができる（図14）。8つのバイオマーカーは、2つの対照バイオマーカー（例えば、1つの陽性対照および1つの陰性対照）を含むことができ、4つのバイオマーカー（例えば、EpCAM/サイトケラチン、MUC1/Her2、CD44/CD24、およびCD166/EGFR）を1回につき観察することができる。いくつかの側面では、陽性対照バイオマーカー（例えば、Hoechst核染色）は、光退色させられなくてもよい。陰性対照バイオマーカー（例えば、CD45）は、光退色させることができ、新しいタグを各回の免疫染色で含むことができる。1回あたりの4つのバイオマーカーは、両方の対照および2つの付加的なマーカーを含むことができる。各回は、免疫染色、撮像、および光退色を含むことができる（表2）。

**【0166】**

インライン免疫染色および光退色システムは、被分析物（例えば、希少細胞）の標識および蛍光撮像のために、免疫染色および光退色の方法と併用することができる。インラインシステムは、複数回が使用されるときに、免疫染色および光退色方法の速度および効率を増加させることができる。本システムは、異なるフルオロフォアに共役される抗体の群で希少細胞（例えば、CTC）を標識することを含むことができ、その後光退色が続く。光退色後、希少細胞は、付加的なバイオマーカーに対する異なる蛍光抗体で再標識することができる。

**【0167】**

いくつかの側面では、緩衝剤を使用して、eDARマイクロ流体チップ装置を使用して単離される希少細胞を洗浄することができる。緩衝剤は、本用途に好適な任意の緩衝剤であり得る。単離された細胞は、マイクロ流体チップ上にとどまることができ、インライン弁をオフにすることによって、主要、側方、および廃棄物チャネルを閉鎖することができる。

**【0168】**

本方法は、デバイスを使用して、タグによって発せられる信号またはいくつかのタグによって発せられる信号の検出を提供する。いくつかの側面では、本デバイスは、顕微鏡であり得る。顕微鏡（例えば、共焦点、倒立等）は、蛍光用の光源および検出器を装備することができる。他の場合において、本デバイスは、タグによって発せられる信号の検出のために、当業者に公知であるいくつかのデバイスのうちの1つであり得る。

**【0169】**

いくつかの側面では、検出は、光退色と併せて、光退色が完了した後に、または光退色が開始する前に起こることができる。検出は、タグからの検出可能な信号の放出の終点を判定するために使用することができる。いくつかの側面では、検出は、免疫染色と併せて起こることができる。検出はまた、洗浄ステップの後に、洗浄ステップの前に、洗浄ステップの間に、または洗浄ステップがない場合に起こることもできる。いくつかの側面では

、検出はまた、透過化ステップの後に、透過化ステップの前に、透過化ステップの間に、または透過化ステップがない場合に起こることもできる。いくつかの側面では、検出はまた、固定ステップの後に、固定ステップの前に、固定ステップの間に、または固定ステップがない場合に起こることもできる。

#### 【0170】

本方法は、タグによって発せられる信号の撮像を含む。撮像に使用されるデバイスは、上記で説明されている、第PCT WO20120/120818号に含まれる、または当業者に公知である。例えば、光退色ステップの前および後に蛍光画像を収集することができる。画像は、全ての発光チャンネルからのデータを含むことができる。いくつかの側面では、発光チャンネルは、黄色(555nm~605nm)、青色(435nm~485nm)、緑色(510nm~540nm)、および赤色(665nm~695nm)を含むことができる。いくつかの側面では、単離された被分析物は、明視野またはノマルスキー顕微鏡検査法を使用して撮像することができる。

10

#### 【0171】

いくつかの側面では、複数のバイオマーカーの発現について画像を分析することができる。eDARによって捕捉され、バイオマーカー(例えば、Her2およびMUC1)および陽性対照バイオマーカー(例えば、Hoechst)を検出するようにタグと接触せられる、個々の細胞(例えば、4つ)は、蛍光を使用して撮像することができる(図16)。複数の画像を単一の多色画像にマージするために、デジタルプロセッサ(例えば、コンピュータ)およびソフトウェアを使用することができる(図16D)。

20

#### 【0172】

本方法はさらに、被分析物(例えば、粒子)の収集を提供する。収集される粒子(例えば、希少細胞)は、免疫染色および光退色を受けていてもよい。いくつかの側面では、閉じ込められた希少細胞は、付加的な回の免疫染色およびマイクロ流体チップからの光退色を受けることができる。いくつかの側面では、希少細胞は、さらなる処理のために収集することができる。収集は、リザーバ(例えば、管、プレート、アレイ等)の中への希少細胞の配置を伴うことができる。希少細胞は、収集後に固定することができる。いくつかの側面では、希少細胞は、生体細胞であり得、細胞培養で維持することができる。

#### 【0173】

いくつかの側面では、本明細書で提供される方法はさらに、被分析物の単離に続いて、検定プロトコルと併用することができる。本明細書で提供される方法と併用することができる検定の非限定的実施例は、RNA抽出(増幅を伴う、または伴わない)、cDNA合成(逆転写)、遺伝子マイクロアレイ、DNA抽出、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(単一、ネスト化、定量的リアルタイム、またはリンカ・アダプタ)、またはDNAメチル化分析等の核酸ベースの方法、蛍光原位ハイブリダイゼーション(FISH)、レーザキャプチャマイクロダイセクション、フローサイトメトリ、蛍光活性化細胞選別(FACS)、細胞培養、または比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)研究等のサイトメトリ方法、電気泳動、サザンブロット分析、または酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)等の化学検定方法、マイクロRNAおよびsiRNA含有量を判定する検定、DNA/RNA含有量を判定する検定、脂質含有量を判定する検定、炭水化物含有量を判定する検定、代謝産物含有量を判定する検定、タンパク質含有量を判定する検定、および機能的細胞検定(例えば、アポトーシス検定、細胞移動検定、細胞増幅検定、細胞分化検定等)、ならびに同等物を含む。

30

40

#### 【0174】

##### 標識の種類

免疫染色および光退色の方法は、閉じ込められた被分析物(例えば、粒子)上に位置するバイオマーカーを識別するためのタグまたは標識の使用を含むことができる。いくつかの側面では、タグは、本明細書で説明されるeDAR装置、または当業者に公知であるタグの検出のために構成される他の装置を使用して、検出することができる。いくつかの側面では、タグは、本明細書で説明される装置の構成要素を使用して、または当業者に公知

50

である光退色デバイスを使用して、光退色させることができる。いくつかの側面では、タグは、粒子に損傷を引き起こし得る装置を使用して、光退色させることができる。他の場合においては、タグを光退色させることができない。

#### 【0175】

いくつかの側面では、タグは、免疫染色のための標識として使用することができる。タグは、分光、光化学、生化学、免疫化学、化学、または他の物理的手段によって検出可能であり得る。例えば、有用なタグは、限定ではないが、放射性核種、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green<sup>TM</sup>、ローダミン、テキサスレッド、テトラロージミンイソチオシアネート（TRITC）、Cy3、Cy5等）、蛍光マーカー（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）  
10、フィコエリトリン（PE）等）、腫瘍関連プロテアーゼによって活性化される自己消光蛍光化合物、酵素（例えば、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン、および同等物を含むことができる。いくつかの側面では、タグは、画像内で色として検出可能なスペクトルで発光することができる。色は、赤、青、黄、緑、紫、橙、および同等物を含むことができる。

#### 【0176】

いくつかの側面では、タグは、単離された細胞を選択的に標識または強調するように灌流させることができる。そのような試薬の実施例は、限定ではないが、蛍光、免疫蛍光、色素共役分子（抗体、fab断片、アプタマー、ポリマー、リガンド、作動物質、拮抗物質、またはそれらの組み合わせ等）、磁気、電気活性、生物活性、または光活性化化合物を  
20含む。実施例は、上皮癌細胞内の細胞骨格の一体的構成要素である、サイトケラチンと反応する染色を使用することである。他の色素例は、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）共役マウス抗ヒト上皮抗体（HEA）およびフィコエリトリン（PE）共役抗CD45を含む。色素共役抗体の他の実施例は、汎サイトケラチン抗体A45B/B3、AE1/AE3、またはCAM5.2（サイトケラチン8（CK8）、サイトケラチン18（CK18）、またはサイトケラチン19（CK19）を認識する汎サイトケラチン抗体、および乳癌抗原NY-BR-1に対するもの（B726P、ANKRD30A、アンキリン反復ドメイン30Aとしても知られている）、B305DアイソフォームAまたはC（B305D-AまたはB305D-C、抗原B305Dとしても知られている）、  
30Hermes抗原（抗原CD44、PGP1としても知られている）、E-カドヘリン（ウボモルリン、カドヘリン-1、CDH1としても知られている）、癌胎児性抗原（CEA、CEACAM5または癌胎児性抗原関連細胞接着分子5としても知られている）、  
-ヒト絨毛性ゴナドトロピン（-HCG、CGβ、慢性ゴナドトロピン、ポリペプチドとしても知られている）、カテプシン-D（CTSDとしても知られている）、神経ペプチドY受容体Y3（NPY3Rとしても知られている、リポ多糖関連タンパク質3、LAP3、融合、ケモカイン（CXCMチーフ、受容体4）、CXCR4）、癌遺伝子ERBB1（c-erbB-1、上皮細胞成長因子受容体、EGFRとしても知られている）、Her-2 Neu（c-erbB-2またはERBB2としても知られている）、GABA受容体A、パイ（ ）ポリペプチド（GABARAP、GABA-A受容体、パイ（ ）ポリペプチド（GABA A（ ）、 -アミノ酪酸型A受容体パイ（ ）サブユ  
40ニット）、またはGABRPとしても知られている）、ppGalNac-T（6）（ -1-4-N-アセチル-ガラクトサミン-6-トランスフェラーゼ6、GalNAcトランスフェラーゼ6、GalNAcT6、UDP-N-アセチル-d-ガラクトサミン：ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン-6-トランスフェラーゼ6、またはGALNT6としても知られている）、CK7（サイトケラチン7、サルコレクチン、SCL、ケラチン7、またはKRT7としても知られている）、CK8（サイトケラチン8、ケラチン8、またはKRT8としても知られている）、CK18（サイトケラチン18、ケラチン18、またはKRT18としても知られている）、CK19（サイトケラチン19、ケラチン19、またはKRT19としても知られている）、CK20（サイトケラチン20、ケラチン20、またはKRT20としても知られている）、Mage（メラノーマ抗原族  
50

AサブタイプまたはMAGE - Aサブタイプとしても知られている)、M age 3 (メラノーマ抗原族A3またはMAGA3としても知られている)、肝細胞成長因子受容体(HGFR、腎細胞乳頭状癌2、RCCP2、癌原遺伝子met、またはMETとしても知られている)、ムチン-1(MUC1、癌抗原15.3、(CA15.3)、癌抗原27.29(CA27.29)、CD227抗原、エプシアリン、上皮膜抗原(EMA)、多型上皮ムチン(PEM)、ピーナッツ反応性尿中ムチン(PUM)、腫瘍関連糖タンパク質12(TAG12)としても知られている)、肉眼的嚢胞性疾患流体タンパク質(GCDFP-15、プロラクチン誘導タンパク質、PIPとしても知られている)、ウロキナーゼ受容体(uPR、CD87抗原、プラスミノゲン活性化因子受容体ウロキナーゼ型、PLAURとしても知られている)、PTHrP(副甲状腺ホルモン関連タンパク質、PTHrPとしても知られている)、BS106(B511S、小乳房上皮ムチン、またはSBEMとしても知られている)、プロスタテイン様リポフィリンB(LPB、LPHB、抗原BU101、分泌グロビン族1-D要素2、SCGB1-D2としても知られている)、マンマグロビン2(MGB2、マンマグロビンB、MGBB、ラクリグロビン(LGB)リポフィリンC(LPC、LPHC)、分泌グロビン族2A要素1、またはSCGB2A1としても知られている)、マンマグロビン(MGB、マンマグロビン1、MGB1、マンマグロビンA、MGBA、分泌グロビン族2A要素2、またはSCGB2A2としても知られている)、乳房セリンプロテアーゼ阻害剤(マスピン、セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤クレードB(オポアルブミン)要素5、またはSERPINB5としても知られている)、前立腺上皮特異的Ets転写因子(PDEF、無菌アルファモチーフ指向性ドメイン含有ets転写因子、またはSPDEFとしても知られている)、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質1(結腸直腸癌抗原CO17-1A、上皮糖タンパク質2(EGP2)、上皮糖タンパク質40kDa(EGP40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、上皮特異的抗原(ESA)、胃腸腫瘍関連抗原733-2(GA733-2)、KS1/4抗原、染色体膜成分4表面マーカー1(M4S1)、MK-1抗原、MIC18抗原、TROP-1抗原、またはTACSTD1としても知られている)、テロメラーゼ逆転写酵素(テロメラーゼ触媒サブユニットまたはTERTとしても知られている)、トレフォイル因子1(乳癌エストロゲン誘発性配列、BCEI、胃腸トレフォイルタンパク質、GTF、pS2タンパク質、またはTFF1としても知られている)、葉酸塩、またはトレフォイル因子3(胃腸トレフォイル因子、ITF、p1.B、またはTFF3としても知られている)、あるいは同等物を含むが、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0177】

##### マーカー/バイオマーカー

本方法は、被分析物(例えば、閉じ込められた粒子)によって発現する、その上に位置する、またはその付近に位置することができる、複数のバイオマーカーを提供する。本開示によって検出することができる複数のバイオマーカーは、閉じ込められた粒子に行うことができる、数回の免疫染色および光退色を受ける。各回の免疫染色は、0個のタグ、1個のタグ、2個のタグ、3個のタグ、4個のタグ、5個のタグ、6個のタグ、7個のタグ、8個のタグ、9個のタグ、または10個のタグを含むことができる。各回の免疫染色のためのタグの範囲は、1~10個のタグ(例えば、4つ)を含むことができる。

#### 【0178】

いくつかの側面では、バイオマーカー等のマーカーの存在は、タグによって発せられる信号によって示され、タグは、マーカーに対する親和性を有する。本明細書で使用されるように、「~に対する親和性を有する」という語句は、タグによるマーカーに対する直接分子結合親和性、ならびに1つまたはそれを上回る他の構造を伴う分子錯体を介して相互作用するタグおよびマーカーの能力等の間接親和性の両方を広義に包含する。例えば、いくつかの側面では、タグは、マーカーに対する直接親和性を伴う一次抗体であってもよい一方、他の側面では、タグは、マーカーに対する間接親和性を伴う二次抗体であってもよい。

#### 【0179】

いくつかの側面では、細胞は、所与の細胞が一意および/または識別可能なマーカーまたはバイオマーカープロファイルを呈するように、特定のマーカーまたはバイオマーカープロファイルに従って単離される。ある側面では、マーカーまたはバイオマーカープロファイルは、細胞または細胞型を定義して識別するために使用することができる、1つまたはそれを上回る、2つまたはそれを上回る、3つまたはそれを上回る、4つまたはそれを上回る、5つまたはそれを上回る、6つまたはそれを上回る、7つまたはそれを上回る、8つまたはそれを上回る、9つまたはそれを上回る、あるいは10個またはそれを上回るマーカーまたはバイオマーカーの特定の組み合わせである。いくつかの側面では、マーカーまたはバイオマーカープロファイルは、特定の一式の性質を有する細胞の特定の集団の一部として、細胞を識別するために使用することができる。

10

**【0180】**

いくつかの側面では、バイオマーカーは、細胞外である。他の場合において、バイオマーカーは、細胞内、細胞質、細胞質内、細胞表面、核外、核内、リソソーム、ミトコンドリア、小胞体、および同等物であり得る。他の場合において、バイオマーカーは、粒子に付着することができるが、粒子に移行しない。

**【0181】**

いくつかの側面では、バイオマーカーは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、変性タンパク質であり得る。これらの場合において、構造は、天然または変性であり得る。

**【0182】**

いくつかの側面では、バイオマーカーは、核酸、オリゴ核酸、リボ核酸、転移リボ核酸、メッセンジャーリボ核酸、マイクロリボ核酸、またはデオキシリボ核酸であり得る。これらの場合において、酸は、一本または二本鎖であり得る。

20

**【0183】**

他の場合において、希少粒子は、細胞、タンパク質、タンパク質錯体、核酸、核タンパク質錯体、炭水化物、代謝産物、異化代謝産物、および同等物であり得る。いくつかの側面では、希少粒子は、細胞である。いくつかの側面では、細胞は、癌細胞、循環腫瘍細胞(CTC)、癌幹細胞、癌表面抗原を表示する癌細胞、例えば、CD44、CD2、CD3、CD10、CD14、CD16、CD24、CD31、CD45、CD64、CD140b、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される1つであり得る。

30

**【0184】**

いくつかの側面では、細胞は、胎児細胞である。いくつかの側面では、胎児細胞は、母体流体中にあり得る。母体流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物を含むことができる。

**【0185】**

いくつかの側面では、被分析物は、他の細胞または細胞外基質に接続されていない、または組織に埋め込まれていない解離細胞である。

40

**【0186】**

いくつかの側面では、癌幹細胞は、CD44、CD2、CD3、CD10、CD14、CD16、CD24、CD31、CD45、CD64、CD140b、またはCD166を含むことができるが、それらに限定されないバイオマーカーに選択的に結合する、他の試薬を灌流させることによって、通常のカンサー細胞と区別することができる。

**【0187】**

例えば、タグは、EGFRおよびCD166の発現を検出して腫瘍細胞の間葉特性を実証するように設計することができる。ビメンチンおよびカドヘリン等の他の関連マーカーをこの群で使用することができる。

**【0188】**

50

他の場合において、粒子の生存能力を示すバイオマーカーを使用することができる。これらの場合において、アポトーシス、壊死、有糸分裂、有糸分裂の段階、減数分裂、および同等物を示す、バイオマーカーを使用することができる。

【0189】

いくつかの側面では、各一式のマーカーは、陽性対照バイオマーカーとして核染色 (Hoechst)、陰性対照バイオマーカーとしてFITCと共役したCD45、およびPEまたはAlexa647と共役した2つのタンパク質バイオマーカーを含むことができる。いくつかの側面では、Hoechst染色は、光退色させられなくてもよい。この場合、Hoechstは、陽性対照である。この場合、Hoechstは、標準光源で光退色させられなくてもよい。この場合、染色を退色させるために、紫外線暴露が使用されてもよい。

10

【0190】

光退色

本方法は、免疫染色後に光退色を提供する。光退色は、被分析物からタグの検出可能部分によって発せられる信号の強度を除去するか、または低減させるための光の使用を伴うことができる。タグは、タグまたは標識が発する信号を消光することによって除去することができる。いくつかの側面では、光退色は、1回の免疫染色後に、または逐次的な回数回の免疫染色後に起こることができる。

【0191】

いくつかの側面では、光源としてLEDまたはキセノンアーク灯 (Sutter instrument (Novato, CA)) を使用して、光退色を行うことができる。キセノンアーク灯を使用して、各光退色ステップは、1~59秒、1~30分、または15分にわたって起こることができる。

20

【0192】

いくつかの側面では、LEDキセノンアーク灯の最大出力は、光源の出力密度 (例えば、 $W/m^2$ ) に応じて、1mW~20mWの範囲内で、または10mWで、または100mWあるいは1Wで、安全性のためにロックすることができる。保護眼鏡を装着すること、または黒い箱で光退色領域を覆うこと等の保護方法の使用を考慮することができる。

【0193】

いくつかの側面では、フルオロフォア (例えば、PE、FITC、およびAlexa488) の蛍光発光を退色させることができる。(例えば、10%未満まで) 信号を退色させることは、短い時間量で (例えば、5分未満で) 起こることができる。より長い波長 (例えば、610nm~660nm) を伴うレーザの使用は、より短い波長のものより長い光退色の持続時間を有し得る (図17B)。いくつかの側面では、種々の波長での複数のレーザの使用が関与するとき、退色時間は、容認可能なスループットで高い退色効率を達成するように、レーザのうちの1つに対する最小限の要件 (例えば、15分) より長くあり得る。

30

【0194】

例えば、抗EpCAM-PEで標識され、2番のカバースリップ上に配置されたMCF-7細胞を使用する、異なる暴露を使用した光退色の曲線が、図15Aに示されている。細胞を退色させるために、異なる出力設定 (例えば、3つ) を使用することができる。いくつかの側面では、高い出力 (例えば、2mW超) で、暴露時間は、高い (例えば、95%) 退色効率を達成するように短縮させられてもよい (例えば、10分未満)。

40

【0195】

サンプル

本明細書で提供される本開示では、サンプルは、流体サンプルを含むことができる。流体サンプルは、種々の発生源を起源とすることができる。いくつかの側面では、発生源は、ヒト、哺乳類、動物、微生物、細菌、真菌、酵母、ウイルス、齧歯類、昆虫、両生類、および魚類であってもよい。

【0196】

50

本開示で提供される流体サンプルは、着目希少粒子を含有する場合もあり、含有しない場合もある液体であり得る。いくつかの側面では、サンプルは、例えば、湖、川、海、池、小川、泉、沼地、貯水池、または同等物からの環境流体サンプルであってもよい。さらに他の場合において、サンプルは、例えば、脱塩工場、水処理工場、貯水池、泉、小川、氷河水流、給水塔、または飲料水源と見なされ得る他の水源からの水サンプルであってもよい。

#### 【0197】

いくつかの側面では、本開示は、希少粒子である被分析物を含む、被分析物である。希少粒子は、低レベルで流体サンプル中に存在する細胞または巨大分子であり得る。ある側面では、希少粒子は、細胞、タンパク質、タンパク質錯体、核酸、核タンパク質錯体、炭水化物、代謝産物、異化代謝産物、および同等物であり得る。ある側面では、粒子は、流体中の全粒子集団の約10%未満の濃度で、または流体中の全粒子集団の約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%未満で、あるいはそれより少なく、流体サンプル中に存在する場合に希少と見なすことができる。さらに他の場合において、希少粒子は、流体中の全粒子集団の約 $10^3$ 分の1未満で、または流体中の全粒子集団の約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 分の1未満で、あるいはそれより少なく、流体サンプル中に存在し得る。ある側面では、粒子は、流体中の全粒子集団の10%未満の濃度で、または流体中の全粒子集団の9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%未満で、あるいはそれより少なく、流体サンプル中に存在する場合に希少と見なすことができる。さらに他の場合において、希少粒子は、流体中の全粒子集団の $10^3$ 分の1未満で、または流体中の全粒子集団の $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 分の1未満で、あるいはそれより少なく、流体サンプル中に存在し得る。

10

20

#### 【0198】

いくつかの側面では、流体サンプルは、ある割合の水および/または他の要素を含有することができる。例えば、流体サンプルは、いくつかある物質の中でも血漿を含有する、血液であり得る。概して、血漿は、大部分が水であり、タンパク質、イオン、ビタミン、酵素、ホルモン、および体内の他の化学物質を含有することができる。

30

#### 【0199】

いくつかの側面では、流体サンプルは、体液であり得る。体液は、多くの場合、液体中の生物学的粒子の複合懸濁液である。例えば、体液は、血液であり得る。いくつかの側面では、血液は、血漿および/または細胞（例えば、赤血球、白血球、循環希少細胞）、ならびに血小板を含むことができる。いくつかの側面では、血液の液量の55%は、細胞であり得る。いくつかの側面では、血液サンプルは、血液の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%が細胞であるように、濃縮することができる。いくつかの側面では、血液サンプルは、1つまたはそれを上回る細胞型が奪われた血液を含有する。いくつかの側面では、血液サンプルは、1つまたはそれを上回る細胞型が豊富にされた血液を含有する。いくつかの側面では、血液サンプルは、血液の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%が細胞であるように、希釈することができる。いくつかの側面では、血液サンプルは、細胞の異質、均質、または近均質混合を含有する。

40

#### 【0200】

体液は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物を含むことができるが、それらに限定されない。いくつかの側面では、体液は、細胞および生体粒子の混合物を含有する種々の臓器（例えば、肺）と接触することができる。

50

【0201】

いくつかの側面では、体液は、希少粒子を含有することができる。いくつかの側面では、希少粒子は、希少細胞である。希少細胞は、有核または非有核であり得る。希少細胞は、悪性表現型を発現する細胞、母体末梢血中の胎児細胞等の胎児細胞、腫瘍から血液または他の体液に流された腫瘍細胞等の腫瘍細胞、HIVに感染した細胞等のウイルスに感染した細胞、着目遺伝子が移入された細胞、および自己反応障害に罹患した対象の末梢血中に存在するT細胞またはB細胞の異常サブタイプを含むが、それらに限定されない。

【0202】

いくつかの側面では、体液は、血液であり得、希少細胞を含有することができる。希少細胞は、赤血球、白血球細胞、白血球、リンパ球、B細胞、T細胞、肥満細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、樹状細胞、幹細胞、赤血球系細胞、癌細胞、腫瘍細胞、または内胚葉、中胚葉、外胚葉、あるいは神経堤組織を起源とする任意の細胞から単離された細胞であり得る。希少細胞は、一次発生源または二次発生源（例えば、細胞株）に由来し得る。

10

【0203】

特定の体液（例えば、血液）中に存在する細胞および生体粒子の種類および量は、生物の健康についての情報を明らかにすることができる。例えば、癌に罹患している対象は、体液中に癌細胞を有し得る。感染に罹患している対象からのサンプルは、感染を示す増加した数の免疫細胞（例えば、リンパ球、好中球、B細胞、T細胞、樹状細胞等）を含有し得るか、または微生物細胞あるいは核酸等の病原性物質を含有し得る。妊婦からのサンプルは、胎児の遺伝子型または核型を示す胎児細胞を含有し得る。

20

【0204】

いくつかの細胞または生体粒子は、通常数量と比較して希少数量で体液中に存在し得る。そのような希少細胞は、循環腫瘍細胞、癌幹細胞等を含むことができる。これらの細胞は、身体領域中で発生する事象（例えば、癌）の結果として、体液中に出現することができる。細胞は、体液を含有する臓器または体液の付近の臓器を起源とすることができる。例えば、希少乳癌細胞は、乳腺の付近に位置する血液またはリンパ液中に存在し得る。いくつかの側面では、細胞は、より遠隔の臓器を起源とする。例えば、精巣腫瘍を起源とする細胞は、腕から採取された血液サンプル中に存在し得る。

【0205】

分析

本開示はさらに、分析を行うことができる方法を提供する。いくつかの側面では、分析は、アリコートを検査するための発生源を含むことができる。アリコートが化学発光または生物発酵を本質的に呈することができる被分析物（例えば、希少粒子）を含有する、他の場合において、本装置は、アリコートを検査するための発生源を必要としなくてもよい。

30

【0206】

いくつかの側面では、ランク付けデバイスを、コンピュータ、プロセッサ、コントローラ、集積回路を伴うチップ、回路基板、電子要素、ソフトウェア、アルゴリズム、またはそれらの組み合わせから選択することができる。いくつかの側面では、プロセッサは、デジタルプロセッサ（例えば、FPGA、ASIC、またはRT）であり得る。いくつかの側面では、コンピュータは、検出デバイスから信号を受け取り、アルゴリズムを通してアリコートをランク付けする。ランク付けデバイスは、ランク付けの値（例えば、流体サンプル中の希少粒子の存在、非存在、数量、識別、または組成）に基づいて、アリコートを適切なチャンネルの中へ指向することができる。

40

【0207】

いくつかの側面では、第1の検出器に由来する情報を分析することができる。第1の検出器からの情報を分析することができ、結果は、被分析物が陽性であることを示すことができる。いくつかの側面では、検出器からの情報を分析することができ、結果は、被分析物が陰性であることを示すことができる。いくつかの側面では、ランク付けデバイスは、

50

被分析物を選別するように、陽性または陰性被分析物を読み取る信号を流体力学的切替要素（例えば、ソレノイド弁）に送信する。いくつかの側面では、陽性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンネルへ移動させることができる。いくつかの側面では、陽性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンネルへ移動させることができる。いくつかの側面では、陽性被分析物は、マイクロ流体チップの廃棄物チャンバへ移動させることができる。いくつかの側面では、陰性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンネルへ移動させることができる。いくつかの側面では、陰性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンネルへ移動させることができる。いくつかの側面では、陰性被分析物は、マイクロ流体チップの廃棄物チャンバへ移動させることができる。いくつかの側面では、陽性被分析物は、陰性被分析物から分割される。

10

**【0208】**

いくつかの側面では、第2の検出器から中継される情報を使用して、分析を行うことができる。第2の検出器は、第1の検出器を使用して取得される情報を確認するために使用することができる。いくつかの側面では、第2の検出器は、マイクロ流体チップ上に位置することができる。いくつかの側面では、第2の検出器は、マイクロ流体チップ上に位置しなくてもよい。いくつかの側面では、第2の検出器は、第1の検出器によって検出される信号に基づいて選別することができる細胞から信号を取得する。いくつかの側面では、第2の検出器は、選別された細胞から検出信号を受信し、信号についての情報をコンピュータに送信することができる。コンピュータは、適切な細胞が選別されたかどうかを判定するために使用することができる。

20

**【0209】**

いくつかの側面では、免疫染色の方法中に取得される情報の分析を行うことができる。被分析物の免疫染色の方法は、マイクロ流体チップのチャンバ中で起こる。チャンバでは、検出器が1回目の染色から1つまたは複数の信号を検出することができる。いくつかの側面では、1つまたは複数の信号を光退色させることができる。検出器は、発せられる信号の持続時間および強度を監視することができる。いくつかの側面では、被分析物は、2回目の染色を受けることができる。検出器は、2回目の染色に続いて、被分析物によって発せられる信号を検出することができる。いくつかの側面では、1つまたは複数の信号を光退色させることができる。検出器は、発せられる信号の持続時間および強度を監視することができる。いくつかの側面では、免疫染色および光退色のサイクルは、複数のサイクルで繰り返すことができる。例えば、免疫染色被分析物の1つまたはそれを上回る信号を1回目の免疫染色と比較して、光退色が起こったことを確実にするために、コンピュータを使用することができる。

30

**【0210】****単一被分析物アレイデバイスおよび方法**

本開示は、液相から単一被分析物を捕捉するための方法および装置を提供する。いくつかの側面では、被分析物は、粒子であり得る。他の場合において、被分析物は、細胞であり得る。被分析物は、チャンバの中に閉じ込めることができる。他の場合において、被分析物は、ウェルの中に閉じ込めることができる。いくつかの側面では、チャンバまたはウェルは、線形形式で配列することができる。他の場合において、チャンバまたはウェルは、アレイ形式で配列することができる。

40

**【0211】**

本デバイスは、種々の形式で設計することができる。例えば、2次元（2D）デバイスを作成することができる。いくつかの側面では、2Dデバイスは、軸方向線形流を有することができる（図17B）。軸方向線形流は、直列流設計であり得る。いくつかの側面では、3次元（3D）デバイスを作成することができる。例えば、3Dデバイスは、グリッドに配列されたチャンバを有することができる（図17C）。必要であれば、2Dまたは3D方略のいずれかに使用することができる、いくつかの代替的な設計がある。

50

**【0212】**

2 D デバイスは、種々の潜在的な寸法を伴うチャンネルおよびチャンバを有することができる。寸法は、直列流抵抗トラップ設計に影響を及ぼし得る。潜在的な閉じ込め密度および寸法を伴うデバイスの概略図が、図 1 8 および差し込み図内のデバイスの拡大領域に示されている。いくつかの側面では、潜在的な寸法は、主要チャンネルの幅、収縮部の幅、主要チャンネル収縮入口から主要チャンネル収縮出口までの長さ、収縮部を横断する長さ、ならびに主要チャンネル、収縮部、および収縮チャンバの高さを含むことができる。

#### 【 0 2 1 3 】

いくつかの側面では、直列流抵抗トラップは、マイクロ流体デバイスと対合することができる。本デバイスは、サンプルを導入することができる入口（左側）、ならびに過剰な液相を除去することができる出口（右側）から成ることができる。デバイスの中心は、組み込むことができる流動抵抗トラップの高い密度を有することができる。図 1 8 B は、図 1 8 C の拡大領域を示す。いくつかの側面では、流動抵抗トラップは、デバイスの機能的部分を構成することができる。

10

#### 【 0 2 1 4 】

3 D デバイスは、種々の潜在的な寸法および形状を伴うチャンバを有することができる。寸法および形状は、並列流抵抗トラップ設計に影響を及ぼし得る。いくつかの側面では、3 D デバイスのチャンバは、ウェルであり得る。デバイスは、溶液から単一粒子 / 細胞（例えば、ビーズ、細胞等）を閉じ込めることができ、本デバイスを形成するように、複数のウェルを並列に配列することができる。3 D デバイス上のウェルの断面側面図は、潜在的な形状変形例を図示することができる（図 1 9）。いくつかの側面では、ウェル設計は、らせん、楕円形、放物線、双曲線、多角形、無限角形、千角形、十角形、九角形、1 0 の 1 0 0 乗角形、百角形、七角形、十一角形、六角形、百万角形、一万角形、八角形、五角形、四角形、三角形、台形、円柱、超平面、平面、プラトンの立体、十二面体、六面体、二十面体、八面体、四面体、環状体、二次曲面、半球体、円柱、球体、双曲面、放物面、多胞体、正百二十胞体、正六百胞体、正十六胞体、正二十四胞体、正五胞体、正八胞体、球錐、または半球体を含むことができる。いくつかの側面では、ウェルの寸法は、 $h_1$  = ウェルの深度、 $h_2$  = 収縮部の深度、 $r_1$  = ウェルの半径、および  $r_2$  = 収縮部の半径によって画定することができる。

20

#### 【 0 2 1 5 】

いくつかの側面では、デバイスの物理的材料は、ガラス、ポリマー（例えば、P D M S、マイラー、D y m a x、ポリウレタン）を含むが、それらに限定されない、光学的透明材料から成ることができる。他の場合において、デバイスの物理的材料は、複数の層から構築することができる。いくつかの側面では、複数の層は、前述の材料の種々の層を備えることができる。

30

#### 【 0 2 1 6 】

本開示で説明されるデバイスは、本明細書で説明される方法を使用して構築することができる。例えば、図 2 0 は、デバイスのうちのいくつかを構築するために使用することができる方法の概略的描写である。いくつかの側面では、本方法は、層毎にデバイス層を構築するステップを含むことができる。第 1 の層については、固体基板（例えば、シリコンウエハ）をフォトレジストでスピニングすることができる。コーティングされた基板は、紫外線透明および不透明領域で描写される所望の設計で刻み込まれたフォトリソグラフィックマスクとしっかり接触して配置することができる。マスクおよび基板は、紫外線に暴露させることができる。紫外線は、フォトレジスト内の光化学物質を架橋するために使用することができる。加工されたデバイスの第 1 の層は、フォトレジストの非架橋部分を溶解させる、結果として生じた架橋パターンを現像することによって完成することができる。いくつかの側面では、第 2 の層は、金型を使用して構築することができる。金型は、フォトレジストの別の層をコーティングし、暴露し、現像することによって製作することができる。いくつかの側面では、金型は、硬化性（例えば、P D M S）またはエンボス加工可能材料にチャンネル、チャンバ、およびウェル構造を形成するために使用することができる。例えば、金型は、皿の中に配置することができる。いくつかの側面では、P

40

50

DMSは、金型に注ぎ入れて硬化させることができる。PDMSは、金型から解放することができ、入口および出口を開けることができる。いくつかの側面では、チャンネルおよびチャンパまたはウェルを取り囲むように、パターン形成されたPDMSを平坦ガラスまたはPDMS片に密閉することができる。

#### 【0217】

本開示で説明されるデバイスは、本明細書で説明される方法を使用して構築することができる。例えば、並列流抵抗トラップを生産するために、微細加工方法を使用することができる(図21)。本デバイスは、ポリマー材料、フォトレジスト、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリメチルウレタン(PUMA)等を含むことができるが、それらに限定されない、フォトレジスト(例えば、SU-8)以外の材料で加工することができる。いくつかの側面では、微細加工方法は、(1)シリコン(Si)ウエハ上に犠牲層をスピンコーティングするステップ、(2)最上部にフォトレジスト(SU-8)を堆積させるステップ、(3)フォトマスクをマイクロアレイパターンと整合させ、ウエハを紫外線に暴露させるステップ、(4)非架橋フォトレジストを処理して除去し、必要であれば、フォトレジストの第2の層をスピンコーティングして処理するステップ、および最終的に、(5)SiウエハからSU-8層を解放し、多孔質ポリカーボネートフィルタ(経路1のみ)および/または管類を挿入するための単一の出口を伴うPDMSマウント(経路1-2)上に組み立てるステップを含むことができる。

10

#### 【0218】

いくつかの側面では、単一細胞を流体力によって閉じ込めることができる。流体力は、細胞を保持することができる。いくつかの側面では、流体力は、デバイスの表面上の分子との相互作用によって増進することができる。いくつかの側面では、分子は、特異的結合(例えば、アプタマー、抗体、1級アミン、スクシンイミジルエステル)または非特異的結合(例えば、高分子電解質)を呈することができる。他の場合において、流体力は、光学力によって増進することができる。光学力は、引力(例えば、単一ビーム勾配光学トラップ、渦トラップ)、反発力(例えば、散乱)、界面張力(例えば、マランゴニ力)、静電力(反発力、引力)、または磁力(例えば、固有の磁氣的に影響を受けやすい内部種との印加された磁場の相互作用によって及ぼされる)を含むことができるが、それらに限定されない。

20

30

#### 【0219】

本開示は、サンプルの隔離または閉じ込め、操作、および検出を行うことができる、デバイス、方法、およびシステムを提供する。いくつかの側面では、サンプルは、マイクロ流体デバイスの中に閉じ込められている(例えば、流体流から生成される力、重力、光学力、または分子相互作用、あるいは共有結合の形成によって固定位置で保持される)被分析物から成ることができる。

#### 【0220】

いくつかの側面では、被分析物は、マイクロ流体デバイス内のウェルまたはコンパートメント等の微小空洞で閉じ込められ、固定化され、保持され、または別様にそれに取り付けられる。さらなる側面では、被分析物は、微小空洞内にある。いくつかの側面では、被分析物は、マイクロ流体デバイス内の基板でコーティングされたパッチ等のマイクロパッチで閉じ込められ、固定化され、保持され、または別様にそれに取り付けられる。さらなる側面では、被分析物は、流体流から生成される力および/または重力を通して、微小空洞またはマイクロパッチで閉じ込められ、固定化され、保持され、または別様にそれに取り付けられる。いくつかの側面では、被分析物は、接着力、分子相互作用、および/または共有結合を通して、微小空洞またはマイクロパッチで閉じ込められ、固定化され、保持され、または別様にそれに取り付けられる。いくつかの側面では、被分析物は、限定ではないが、ファン・デル・ワールス相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、および/または非特異的吸着を含む、非共有結合を通して、微小空洞またはマイクロパッチで閉じ込められ、固定化され、保持され、または別様にそれに取り付けられる。

40

50

## 【0221】

いくつかの側面では、被分析物は、単一細胞である。被分析物は、タグと接触させることができる。いくつかの側面では、タグは、被分析物上の標的を認識することができる。タグは、標的に結合することができる。いくつかの側面では、標的は、被分析物の分子成分であり得る。いくつかの側面では、分子成分は、被分析物の外部にあり得る。他の場合において、分子成分は、被分析物の内部にあり得る。タグは、種々の検出方法を使用して検出することができる。

## 【0222】

本開示は、単一被分析物の格納または物理的閉じ込めのための方法を提供する。いくつかの側面では、被分析物は、細胞であり得る。細胞は、液体が流路を辿ることができ、かつ物理的に画定された位置へ移行することができる、液相で輸送することができる。いくつかの側面では、細胞は、画定された位置にとどまることができる。細胞を画定された位置に閉じ込めるように、流動ベースの力を細胞に加えることができる。別の場合において、流体流路が入口から出口に対して直列であるため、細胞を連続的に閉じ込めることができる。さらに別の場合において、複数の流体流路およびそれらの同等の複数の単一細胞を、並行して閉じ込める／隔離することができる。いくつかの側面では、並行して閉じ込めることは、入口と出口との間で細胞によって同時に被られ得る多数の流路によるものであり得る。

10

## 【0223】

好ましい場合において、本方法は、流体経路を辿ってチャンバに進入する流体サンプル中の各被分析物（例えば、細胞）を提供することができる。被分析物は、チャンバに進入し、流体経路を遮断して、流体経路を通る流動を停止させることができる。この場合、別の被分析物は、チャンバに進入しなくてもよい。流体サンプル中の残りの細胞は、チャンバのうちのいくつかまたは全てが被分析物を含有するまで、残りの空のチャンバに進入することができる。

20

## 【0224】

いくつかの側面では、直列流抵抗トラップが生物学的由来サンプルを収集し、離散化し、読み出すように機能する方法が、本明細書で開示される。例えば、図22Aは、どのようにしてサンプルが画定された場所を連続的に充填することができるかを示す。本プロセスは、サンプルの臨界寸法（直径）が（1）主要チャンネルの高さおよび幅より小さい、および（2）収縮部の高さまたは幅より大きいときに起こることができる。いくつかの側面では、流動に対する抵抗差が、サンプルを画定された領域の中へ指向することができ、そうするとすぐに、収縮部を閉塞することができ、流動を停止させることができる。後続のサンプルは、全てのトラップが充填されるまで、次の閉じ込め場所まで主要チャンネルを通る流路を辿ることができる。例えば、図22Bは、どのようにしてサンプル入口を通して不混和液相を導入することができるかを示す。不混和液相は、閉じ込められたサンプルを連続的に離散化することができる。いくつかの側面では、不混和液体は、サンプル領域に流入しなくてもよい。不混和液体の流体流の不足は、閉塞制約に起因し得る。いくつかの側面では、流体流の不足は、チャンネル材料および閉じ込め領域の寸法との不混和相の接触角度差によって生成される界面障壁に起因し得る。いくつかの側面では、各サンプルに関する時間的情報を各場所で物理的に符号化することができる。離散化サンプルの様々な化学的性質を検出することができる（図22C）。

30

40

## 【0225】

いくつかの側面では、並列流抵抗トラップが生物学的由来サンプルを収集し、離散化し、読み出すように機能する方法が、本明細書で開示される。例えば、図22Aおよび22Dは、どのようにしてサンプルが並列流抵抗トラップを充填することができるかを示す。いくつかの側面では、サンプル粒子は、デバイスの最上部からウェルの中へ流動を辿ることができる。複数のサンプルを並列流抵抗トラップの中に同時に閉じ込めることができる。いくつかの側面では、サンプル収集の速度は、直列流抵抗トラップよりもむしろ並列流抵抗トラップを使用すると、より速くあり得る。例えば、図22Dは、どのようにして閉

50

じ込めウェルの平面の上方または下方で不混和相を置換できるかを示す。いくつかの側面では、閉じ込めウェルの平面の上方または下方の不混和相は、離散化サンプルを生成することができる。いくつかの側面では、各サンプルに関する時間的情報を各場所で物理的に符号化することができる。離散化サンプルの様々な化学的性質を検出することができる（図 2 2 C）。

#### 【 0 2 2 6 】

いくつかの側面では、閉じ込められた被分析物を単一被分析物アレイから解放し、分析することができる。例えば、図 2 4 は、分析および放出のために生物学的被分析物のアレイを閉じ込めるための可能な順序を図示する。いくつかの側面では、順序は、( 1 ) トラップを通して流体流を移動させるように、管類から流体を適用すること、( 2 ) いったん被分析物が閉じ込められると、局所的領域中の流動を停止させること、および( 3 ) 緩衝剤を使用して過剰な流体および粒子を洗い流すことを含むことができる。

10

#### 【 0 2 2 7 】

いくつかの側面では、単一被分析物アレイの中に閉じ込められた被分析物は、さらなる分析を受けることができる。いくつかの側面では、単一被分析物アレイは、逐次免疫染色および光退色の方法とともに使用することができる。

#### 【 0 2 2 8 】

いくつかの側面では、単一被分析物被分析物アレイは、核酸の分析のための当業者に公知である方法とともに使用することができる。いくつかの側面では、核酸の分析は、ポリメラーゼ連鎖反応( PCR )を含むことができる。単一被分析物アレイを使用して PCR を行う場合( 図 1 7 )、全てのチャンバを流体中の単一の被分析物で充填することができる。各チャンバを( 例えば、油を使用して ) 密閉することができ、並行して各単一の被分析物に PCR を行うことができる。

20

#### 【 0 2 2 9 】

単一被分析物アレイの個々のウェルまたはチャンバに含有される被分析物は、種々の技法を使用して検出することができる。例えば、ウェルまたはチャンバ中の被分析物は、顕微鏡検査法を使用して撮像することができる。いくつかの側面では、顕微鏡検査法は、明視野顕微鏡検査法を含むことができる。いくつかの側面では、顕微鏡検査法は、蛍光顕微鏡検査法を含むことができる。顕微鏡検査法のいずれの場合でも、サンプルをステージ上に配置することができる。いくつかの側面では、ステージは、手動で操作することができる。他の場合において、ステージは、コンピュータプログラムによって制御することができる、自動平行移動ステージであり得る。顕微鏡検査法のいずれの場合でも、CCDカメラによって画像を取得することができる。

30

#### 【 0 2 3 0 】

##### 用途

本開示は、種々の用途で使用される方法を提供する。いくつかの側面では、本方法は、流体サンプル、例えば、血液サンプル等の生物学的流体中の希少粒子の存在と関連付けられる条件の診断または予後を対象に提供することができる。

#### 【 0 2 3 1 】

本明細書で説明される方法および装置は、( a ) タグを、該タグおよび被分析物を含む錯体に変換するために好適な条件下で、対象からの生物学的流体をタグと接触させるステップと、( b ) 生物学的流体のアリコート中で、ステップ( a ) で形成された錯体の存在または非存在を検出するステップと、( c ) ステップ( a ) で形成された錯体の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、( d ) 単離されたアリコートの分析に基づいて、診断または予後を対象に提供するステップとを含むことができる。いくつかの側面では、ステップ( b ) は、放射線源でアリコートを調査し、被分析物に結合されたタグによって発せられる信号を検出するステップを含むことができる。

40

#### 【 0 2 3 2 】

種々の側面では、流体内の被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するために方法が提供され、本方法は、( a ) 放射線源を使用して、第 1 のタグから信号を検出するステ

50

ップであって、第1のタグは、被分析物上の第1のマーカ-に結合する第1の構造に取り付けられる、ステップと、(b)第1のタグの存在に基づいて被分析物を分割するステップと、(c)第1のタグの信号の強度を低減させるステップと、(d)被分析物を、第2のマーカ-に結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに取り付けられる、ステップと、(e)第2のタグを検出するステップとを含む。

【0233】

いくつかの側面では、ステップ(b)の分割は、第1のタグおよび第3のタグの存在に基づく。さらなる側面では、ステップ(b)の分割は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる。なおもさらなる側面では、ステップ(b)の分割およびステップ(b)またはステップ(e)のうちの少なくとも1つにおける検出は、同一のマイクロ流体デバイス内で起こる。

10

【0234】

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカ-を検出するために方法が提供され、本方法は、被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第1のマーカ-を含み、第1のタグは、第1のマーカ-に対する親和性を有する、ステップと、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、第1の信号の存在は、第1のマーカ-の存在を示す、ステップと、第1の信号の存在に基づいて、被分析物を含む流体を分割するステップと、第1の信号の強度を低減させるステップと、被分析物を第2のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第2のマーカ-を含み、第2のタグは、第2のマーカ-に対する親和性を有する、ステップと、第2のタグによって発せられる第2の信号を検出するステップであって、第2の信号の存在は、第2のマーカ-の存在を示す、ステップとを含む。

20

【0235】

いくつかの側面では、第1のタグの信号は、50%超低減させられる。ある側面では、信号の強度を低減させるステップは、放射線を被分析物に印加することによって達成される。さらなる側面では、白色光が、信号の強度を低減させるために使用される。なおもさらなる側面では、レーザが、信号の強度を低減させるために使用される。他の側面では、発光ダイオードが、信号の強度を低減させるために使用される。いくつかの側面では、信号の強度を低減させるステップは、化学物質を第1のタグに適用することによって達成される。ある側面では、化学物質は、還元剤である。さらなる側面では、還元剤は、ジチオスレイトールである。

30

【0236】

いくつかの側面では、流体を分割するステップは、第1の信号および第3の信号の存在に基づく。さらなる側面では、第1の信号を検出するステップ、第2の信号を検出するステップ、流体を分割するステップ、またはそれらの組み合わせは、マイクロ流体デバイスを使用して行われる。

【0237】

いくつかの側面では、被分析物は、細胞である。ある側面では、細胞は、癌細胞である。さらなる側面では、癌細胞は、希少細胞である。いくつかの側面では、被分析物は、循環腫瘍細胞である。ある側面では、細胞は、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である。さらなる側面では、細胞は、流体中の全細胞集団の1%未満を含む、希少細胞である。ある側面では、被分析物は、解離細胞である。

40

【0238】

いくつかの側面では、流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される。ある側面では、流体は、全血である。他の側面では、流体は、分画全血である。

【0239】

50

いくつかの側面では、第1のタグは、フルオロフォアである。さらなる側面では、第1のタグは、抗体である。他の側面では、第1のタグは、核酸から成るプローブである。ある側面では、本方法はさらに、第1のタグおよび第2のタグから信号を撮像するステップを含む。いくつかの側面では、被分析物は、流体中に存在し、流体は、より大きい体積の流体のアリコートである。さらなる側面では、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップは、複数の被分析物上で同時に行われる、

【0240】

ある側面では、分割は、半自動的または自動的に行われる。ある側面では、分割は、アンサンプル決定アリコートランク付けによって行われる。いくつかの側面では、フローサイトメータが、被分析物を分割するために使用されない。

10

【0241】

さらなる側面では、被分析物は、複数のマーカを含む。いくつかの側面では、複数のマーカのそれぞれは、バイオマーカーである。ある側面では、被分析物は、発現プロファイルを含み、発現プロファイルは、複数のマーカーによって定義される。

【0242】

さらなる側面では、本方法はさらに、被分析物を緩衝剤と接触させるステップを含む。なおもさらなるいくつかの側面では、緩衝剤は、固定剤を含有する。ある側面では、緩衝剤は、透過化剤を含有する。他の側面では、緩衝剤は、洗浄緩衝剤である。

【0243】

種々の側面では、第1の細胞型および第2の細胞型を含むサンプルから細胞を単離するために方法が提供され、本方法は、(a)一式の管類を介してサンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、マイクロ流体チップは、(i)一式の管類に流体的に接続される少なくとも1つのチャンネルと、(ii)少なくとも1つのチャンネル内の細胞の信号を検出するように構成される検出器と、(iii)少なくとも1つのチャンネルに流体的に接続される少なくとも1つのチャンバとを備える、ステップと、(b)検出器を通り過ぎてサンプルの一部を流動させるステップと、(c)サンプルの一部内の第1の細胞型の存在または非存在を検出するために、検出器を使用するステップと、(d)第1の細胞型がサンプルの一部内で検出される場合、サンプルのアリコートをチャンバの中へ指向するステップであって、アリコートは、第1の細胞型を含む、ステップと、(e)ステップ(b)、(c)、および(d)を繰り返し、それによって、チャンバが、サンプル内の第1の細胞型の総数の80%超、およびサンプル内の第2の細胞型の総数の5%未満を含むように、チャンバ中の複数のアリコートを単離するステップとを含む。

20

30

【0244】

種々の側面では、サンプルから細胞を単離するために方法が提供され、本方法は、(a)サンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、サンプルは、第1の細胞型と、第2の細胞型とを含み、マイクロ流体チップは、チャンネルと、チャンネル内で発せられる信号を検出するように構成される検出器と、チャンネルと流体連通しているチャンバとを備える、ステップと、(b)チャンネルを通してサンプルの一部を流動させるステップであって、一部分は、複数の第1の細胞型、複数の第2の細胞型、またはそれらの組み合わせを含む、ステップと、(c)検出器を使用して、一部分内の第1の細胞型の存在または非存在を検出するステップと、(d)第1の細胞型が一部分内に存在する場合、一部分をチャンバの中へ指向するステップと、(e)チャンバが、サンプル内に存在する第1の細胞型の総数の80%超、およびサンプル内に存在する第2の細胞型の総数の5%未満を含むように、十分な回数で(b)、(c)、および(d)を繰り返すステップとを含む。

40

【0245】

いくつかの側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、癌細胞である。ある側面では、癌細胞は、希少細胞である。さらなる側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、循環腫瘍細胞である。なおもさらなる側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である。いくつかの側

50

面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、サンプル中の全細胞集団の1%未満を含む、希少細胞である。

【0246】

いくつかの側面では、サンプルは、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される。ある側面では、サンプルは、全血である。他の側面では、サンプルは、分画全血である。

【0247】

いくつかの側面では、チャンバは、マイクロ流体チップの外部にある。ある側面では、チャンバは、バイアル、微小遠心管、またはウェルプレート内のウェルである。さらなる側面では、チャンバは、管類を介してチャンバと流体連通している。なおもさらなる側面では、チャンバは、毛細管を介してチャンネルと流体連通している。

【0248】

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するために方法が提供され、本方法は、(a)複数の微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を經由して被分析物を流動させることによって、複数の被分析物を分割するステップであって、微小空洞またはマイクロパッチの大部分は、多くても1つの被分析物を含有することが可能であり、微小空洞またはマイクロパッチは、マイクロ流体デバイスの中に位置する、ステップと、(b)微小空洞またはマイクロパッチの中で、各被分析物を、第1のマーカーに結合することが可能である第1の構造と接触させるステップであって、第1の構造は、第1のタグに接続される、ステップと、(c)第1のタグから信号を検出するステップと、(d)第1のタグの信号のレベルを低減させるステップと、(e)被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに接続される、ステップと、(f)第2のタグを検出するステップとを含む。

【0249】

いくつかの側面では、ステップ(b)の接触は、微小空洞またはマイクロパッチと流体連通しているチャンネルを通して、第1の構造を備える流体を流動させることによって達成される。ある側面では、ステップ(b)の接触させるステップに続いて、本方法はさらに、被分析物を洗浄緩衝剤と接触させるステップを含む。

【0250】

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカーを検出するために方法が提供され、本方法は、微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を經由して流体を流動させることによって、微小空洞中またはマイクロパッチ中の被分析物を単離するステップであって、流体は、被分析物を含む、ステップと、被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第1のマーカーを含み、第1のタグは、第1のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、第1の信号の存在は、第1のマーカーの存在を示す、ステップと、第1の信号の強度を低減させるステップと、被分析物を第2のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第2のマーカーを含み、第2のタグは、第2のマーカーに対する親和性を有する、ステップと、第2のタグによって発せられる第2の信号を検出するステップであって、第2の信号の存在は、第2のマーカーの存在を示す、ステップとを含む。

【0251】

いくつかの側面では、本方法は、複数の微小空洞またはマイクロパッチ内で単離される複数の被分析物で行われる。ある側面では、第1のタグの信号は、50%超低減させられる。さらなる側面では、少なくとも1つの被分析物は、細胞である。

【0252】

いくつかの側面では、被分析物は、流体流動によって生成される力、重力、または接着力によって、微小空洞内の固定位置で保持される。ある側面では、被分析物は、分子相互

10

20

30

40

50

作用を通して微小空洞またはマイクロパッチに接続される。さらなる側面では、被分析物は、非共有結合を通して微小空洞に接続される。なおもさらなる側面では、非共有結合は、ファン・デル・ワールス相互作用、静電結合、疎水結合、または非特異的吸着である。

#### 【0253】

種々の側面では、マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコート単離のために方法が提供され、アリコートは、希少粒子を含み、本方法は、(a)アリコート中の希少粒子の存在または非存在を検出するステップと、(b)希少粒子の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)電子作動型弁を開放することによって、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向するステップであって、電子作動型弁は、マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップを含む。いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、サンプル入力チャンネルと、少なくとも2つの出力チャンネルと、少なくとも1つの指向性流チャンネルとを備え、電子作動型弁は、指向性流チャンネル内の流体の流動を制御する。

10

#### 【0254】

##### 疾患の診断

いくつかの側面では、本方法を使用して単離される被分析物(例えば、細胞)はさらに、標的治療を開発するように(例えば、遺伝子型または表現型に従って)亜集団分析を受けることができる。例えば、単離された細胞(例えば、腫瘍細胞)は、薬剤標的の発現の存在または程度を判定するように、特定のバイオマーカー(例えば、薬剤標的)に結合するタグ(例えば、蛍光抗体)とともに培養することができる。いったん薬剤標的の発現が確認されると、特定の薬剤標的の発現を標的にするように特異的に開発される薬剤を治療のために選択することができる。一実施例では、単離された腫瘍細胞は、CTCを流す乳房腫瘍がHer2陽性であるかどうかを判定するように、Her2受容体に特異的に結合する蛍光抗体とともに培養することができる。単離された腫瘍細胞が高いHer2発現を呈する場合、Herceptin(トラスツズマブ)が、HER2タンパク質過剰発現の機能を標的にして遮断するように設計されているため、この薬剤を治療として使用することができる。BCR-ABLまたはPDGFR(薬剤Gleevecによって標的にされる)、ERBB2(Herceptinによって標的にされる)、EFGF(Iressa、Tarcevaによって標的にされる)、RARアルファ(ATRAによって標的にされる)、エストロゲン受容体(タモキシフェンによって標的にされる)、アロマターゼ(レトロゾールによって標的にされる)、アンドロゲン受容体(フルタミド、ピカルタミドによって標的にされる)、CD20(リツキシマブによって標的にされる)、VEGF受容体(Avastinによって標的にされる)を含む、他の既知の薬剤標的もまた、適切な化学療法計画を処方する前に単離された腫瘍細胞から同様に選抜することができる。

20

30

#### 【0255】

いくつかの側面では、被分析物は、希少粒子(例えば、癌細胞または循環腫瘍細胞(CTC))であり得る。他の場合において、希少粒子は、寄生細胞または生物、例えば、ジアルジアまたはクリプトスポリジウムの種、原虫の種に感染した赤血球、HIVに感染したリンパ球または白血球、母体血中の胎児細胞、幹細胞、プリオンに感染した細胞、CD4+T細胞、および同等物であり得る。

40

#### 【0256】

いくつかの側面では、本方法は、対象からの血液サンプル中の循環腫瘍細胞を検出するステップを含むことができる。本方法は、eDARを含むことができる。ある側面では、対象は、癌と診断された患者であり得る。いくつかの側面では、癌は、ステージI、ステージII、ステージIII、またはステージIVであり得る。いくつかの側面では、循環腫瘍細胞(CTC)を、癌と以前に診断された患者からの血液サンプル中で検出することができる。これらの場合において、患者はさらに、転移癌と診断され得る。

#### 【0257】

いくつかの側面では、本方法は、固形腫瘍と以前に診断された対象で転移癌を診断するために使用することができる。本方法は、(a)対象からの血液サンプルのアリコート中の

50

CTCの存在または非存在を検出するステップと、(b) CTCの存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c) 割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップとを含む。

【0258】

いくつかの側面では、血液サンプル中のCTCの非存在は、転移癌を有していない対象と相関することができる。血液サンプル中の少なくとも1つのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関することができる。いくつかの側面では、血液中の少なくともいくつかのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関することができる。本方法はさらに、(d) CTCが血液サンプル中で検出されない場合には転移癌を有していないものとして対象を診断し、または少なくとも1つのCTCが血液サンプル中で検出される場合には転移癌を有するものとして対象を診断するステップを含むことができる。

10

【0259】

本開示はまた、癌と診断された対象を監視するための方法も提供する。本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法を使用して、対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップを含むことができる。いくつかの側面では、規則的な間隔で、例えば、1年に少なくとも1回、1年に少なくとも2回、1年に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、あるいは少なくとも1年に約3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、転移癌への癌の進行について患者を監視することができる。いくつかの側面では、1ヶ月に1回、あるいは1ヶ月に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、対象を監視することができる。いくつかの側面では、1ヶ月に約1回、あるいは1ヶ月に少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、対象を監視することができる。血液サンプル中のCTCの非存在は、転移癌を有していない対象と相関することができる。血液サンプル中の少なくとも1つのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関することができる。血液中の少なくともいくつかのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関することができる。

20

【0260】

CTCが血液サンプル中で検出される場合において、本方法はさらに、1つまたは複数のCTC細胞の1つまたはそれを上回る特性を識別するように、CTCを含有するものとして識別される1つまたはそれを上回るアリコートにさらなる分析を受けさせるステップを含むことができる。例えば、CTCを含有するアリコートまたはアリコートのプールを、1つまたはそれを上回る癌特異的表面抗原に対して特異的な1つまたはそれを上回る検出試薬と接触させることができる。解析することができる、癌特異的表面抗原の非限定的実施例は、限定ではないが、BCR-ABLまたはPDGFR(薬剤Gleevecによって標的にされる)、ERBB2(Herceptinによって標的にされる)、EFGFR(Iressa、Tarcevaによって標的にされる)、RARアルファ(ATRAによって標的にされる)、エストロゲン受容体(タモキシフェンによって標的にされる)、アロマターゼ(レトロゾールによって標的にされる)、アンドロゲン受容体(フルタミド、ピカルタミドによって標的にされる)、CD20(リツキシマブによって標的にされる)、VEGF受容体(Avastinによって標的にされる)、および同等物を含む。いくつかの側面では、表面抗原は、本明細書で説明される逐次免疫染色および光退色方法を使用して解析することができる。

30

40

【0261】

本明細書で提供される方法およびデバイスは、癌以外の疾患を診断するために使用することができる。いくつかの側面では、マラリアを診断することができる。本方法は、原虫に感染した赤血球を検出するステップを含む。別の場合において、HIV感染を診断するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、HIVウイルスに感染したリンパ球または白血球を検出するステップを含む。さらに別の場合において、プリオンと関連付けられる疾患を診断するための方法が提供され、本方法は、ヒトまたは他の動物からの生物学的流体中でプリオンを検出するステッ

50

ブを含む。

【0262】

いくつかの側面では、被分析物は、希少細胞であり、希少細胞は、細菌細胞である。いくつかの側面では、細菌細胞は、全血サンプル中に存在する。他の側面では、全血中の希少細菌細胞の存在を検出するために、デバイス、方法、システム、または装置が使用される。いくつかの側面では、細菌感染または敗血症を特性評価または管理することに関係付けられる診断、予後、または他の治療パラメータを提供するために、全血サンプル中の希少細菌細胞の存在を検出するように、デバイス、方法、システム、または装置が使用される。

【0263】

疾患の予後

本開示は、流体中の被分析物の存在と関連付けられる疾患または症状の予後のための方法を提供する。いくつかの側面では、被分析物は、生物学的粒子であり得る。いくつかの側面では、流体は、生物学的流体であり得る。いくつかの側面では、本方法は、(a)対象からのサンプルのアリコート中の被分析物の存在または非存在を検出するステップと、(b)被分析物の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップと、(d)被分析物がサンプル中で検出されない場合に良好な予後、または被分析物がサンプル中で検出される場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含む。

【0264】

いくつかの側面では、アリコート中の被分析物の数量または識別に基づいて、アリコートに値を割り当てることができる。いくつかの側面では、サンプル中の被分析物の数量に基づいて、良好または不良な予後を提供することができる。例えば、サンプル中の被分析物の数量が所定の参照値より少ない場合に、良好な予後を提供することができ、サンプル中の被分析物の数量が参照値に等しいか、またはそれより大きい場合に、不良な予後を提供することができる。いくつかの側面では、所定の参照値を、特定の治療に应答する可能性、またはある期間、例えば、少なくとも6ヶ月、あるいは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年、またはそれを上回る期間にわたる全または無病生存率の可能性と関連付けることができる。

【0265】

いくつかの側面では、希少粒子と関連付けられる任意の疾患の予後を提供するために、本明細書で提供される方法を使用することができる。いくつかの側面では、マラリアの予後を提供するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、個人からの血液サンプル中の原虫に感染した赤血球の数を判定するステップを含むことができる。いくつかの側面では、血液サンプル中で検出される感染赤血球の総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、あるいはサンプル中で検出される感染赤血球の総数が参照値に等しいか、またはそれより大きい場合に不良な予後のいずれかを提供することができる。いくつかの側面では、HIV感染の予後を提供するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、個人からの血液サンプル中のHIVウイルスに感染したリンパ球または白血球の数を判定するステップと、血液サンプル中で検出される感染細胞の総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、あるいはサンプル中で検出される感染細胞の総数が所定の参照値に等しいか、またはそれより大きい場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含むことができる。いくつかの側面では、プリオンと関連付けられる疾患の予後を提供するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、対象からの生物学的流体サンプル中のプリオンの数を判定するステップと、サンプル中で検出されるプリオンの総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、あるいはサンプル中で検出されるプリオンの総数が所定の参照値に等しいか、またはそれより大きい場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【0266】

いくつかの側面では、本開示は、固形腫瘍と診断された対象の予後を提供するための方法を提供する。いくつかの側面では、本方法は、(a)対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップと、(b)CTCの存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップと、(d)CTCが検出されない場合に良好な予後、またはCTCが検出される場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含む。

## 【0267】

いくつかの側面では、転移癌と診断された対象の予後を提供するために方法が提供される。いくつかの側面では、本方法は、(a)対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップと、(b)アリコート中で検出されるCTCの数に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップと、(d)血液サンプル中で検出されるCTCの総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、あるいはサンプル中で検出されるCTCの総数が参照値に等しいか、またはそれより大きい場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含む。

10

## 【0268】

いくつかの側面では、所定の参照値を、特定の治療に応答する可能性、またはある期間、例えば、少なくとも6ヶ月、あるいは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年、またはそれを上回る期間にわたる全または無病生存率の可能性と関連付けることができる。

20

## 【0269】

## 治療への疾患の応答

本開示は、疾患の進行または治療への応答を監視するための方法を提供することができる。いくつかの側面では、本方法は、流体サンプル中の被分析物を検出するステップを含むことができる。いくつかの側面では、本方法は、(a)第1の時間に対象から採取された第1の生物学的サンプルの複数のアリコート中の被分析物の存在または非存在を検出するステップと、(b)希少粒子の存在、非存在、数量、または識別に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)第1のサンプルからの全てのアリコートの合計値を判定するステップと、(d)第2の時間に対象から採取された第2の生物学的サンプルの複数のアリコート中の被分析物の存在または非存在を検出するステップと、(e)被分析物の存在、非存在、数量、または識別に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(f)第2のサンプルからの全てのアリコートの合計値を判定するステップと、(g)第1のサンプルに割り当てられた合計値を第2のサンプルに割り当てられた合計値と比較するステップとを含み、第1のサンプルと比較して、第2のサンプルに割り当てられた増加値は、疾患の進行および/または治療への不良な応答と相関し、および/または第1のサンプルと比較して、第2のサンプルに割り当てられた減少値は、疾患の退行および/または治療への良好な応答と相関する。いくつかの側面では、アリコートはさらに、収集、さらなる濃縮、またはさらなる分析のために割り当てられた値に基づいて、特定のチャンネルまたはチャンバ(チャンネル付き)の中へ指向することができる。

30

40

## 【0270】

いくつかの側面では、疾患の診断または治療計画の開始後に定期的に、疾患の進行または治療への応答を監視する方法を採用することができる。例えば、1年に少なくとも1回、1年に少なくとも2回、1年に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、あるいは1年に少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、サンプルを対象から収集することができる。いくつかの側面では、1ヶ月に1回、あるいは1ヶ月に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、対象を監視することができる。いくつかの側面では、1ヶ月に約1回、あるいは1ヶ月に少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10回、また

50

はそれを上回って、対象を監視することができる。

【0271】

疾患の進行または治療への不良な応答が見出される、いくつかの側面では、本方法はさらに、治療を割り当てるステップ、投薬計画を増加させるステップ、治療計画を変更するステップ、および同等物を含むことができる。いくつかの側面では、希少粒子と関連付けられる疾患または症状は、癌、マラリア、HIV/AIDS、プリオン関連疾患、または同等物であり得る。

【0272】

範囲は、本明細書では「約」1つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして表すことができる。そのような範囲が表されるとき、別の実施形態は、一方の特定の値から、および/または他方の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表されるとき、「約」という先行詞の使用によって、特定の値が別の実施形態を形成することが理解されるであろう。さらに、範囲のそれぞれの終点が、他方の終点に関連して、および他方の終点から独立して、両方で重要であることが理解されるであろう。本明細書で使用されるような「約」という用語は、特定の使用法の文脈内で規定数値からプラスまたはマイナス15%である範囲を指す。例えば、約10は、8.5から11.5までの範囲を含むであろう。

10

【0273】

本発明の好ましい実施形態が本明細書で示され、説明されているが、そのような実施形態は一例のみとして提供されることが当業者に明白となるであろう。ここで、本発明から逸脱することなく、多数の変形例、変更、および置換が当業者に想起されるであろう。本明細書で説明される本発明の実施形態の種々の代替案が、本発明を実践する際に採用され得ることを理解されたい。以下の請求項は、本発明の範囲を定義し、これらの請求項およびそれらの均等物の範囲内の方法および構造がそれによって対象とされることが意図される。

20

【0274】

本明細書で示される詳細は、一例として、および本発明の好ましい実施形態の例証的議論の目的のためにすぎず、本発明の種々の実施形態の原理および概念的側面の最も有用で容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示される。この点に関して、本発明、図面とともに解釈される説明、および/または本発明のいくつかの形態がどのようにして実践で具現化され得るかを当業者に明白にする実施例の基本的理解のために、本発明の構造的詳細を必要以上に詳細に示す試行は行われない。以下の定義および説明は、以下の実施例で明瞭かつ明確に修正されない限り、または意味の適用が任意の構造を無意味あるいは本質的に無意味にするときに、任意の将来の構造を統括するように意図および意向されている。用語の構造がそれを無意味または本質的に無意味にする場合において、定義は、Webster's Dictionary第3版、またはOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)等の当業者に公知である辞書から取られるべきである。

30

40

【0275】

本明細書で使用されるように、かつ別様に指示されない限り、「1つの(「a」および「an」)」という用語は、「1つ」、「少なくとも1つ」、あるいは「1つまたはそれを上回る」を意味すると解釈される。文脈によって別様に要求されない限り、本明細書で使用される単数形の実語は、複数を含むものとし、複数形の実語は、単数形を含むものとする。

【0276】

文脈が明確に別様に要求しない限り、説明および請求項の全体を通して、「備える」(comprise)、「を備える」(comprising)」という言葉、および同等物は、排他的または包括的な意味とは対照的に包含的な意味で解釈されるものである。すな

50

わち、「を含むが、限定されない(including, but not limited to)」という意味である。

【0277】

別様に特定されない限り、現在説明されている方法およびプロセスは、任意の順序で行うことができる。例えば、ステップ(a)、(b)、および(c)を説明する方法は、最初にステップ(a)、それに続いてステップ(b)、次いで、ステップ(c)で行うことができる。または、本方法は、例えば、最初にステップ(b)、それに続いてステップ(c)、次いで、ステップ(a)等の異なる順序で行うことができる。さらに、これらのステップは、詳細に別様に規定されない限り、同時に、または別々に行うことができる。

【0278】

単数または複数を使用する言葉はまた、それぞれ、複数および単数も含む。加えて、「本明細書で」、「上記で」、および「以下で」という用語、ならびに類似する趣旨の言葉は、本願で使用されるときに、本願の任意の特定の部分ではなく、本願を全体として指すものとする。

【実施例】

【0279】

以下の実施例は、本発明のいくつかの側面をさらに説明するように含まれ、本発明の範囲を限定するために使用されるべきではない。

(実施例1)

循環腫瘍細胞の大容量閉じ込めのためのマイクロ流体構成要素に基づくアンサンプル決定アリコートランク付け

【0280】

本実施例は、本開示の側面による、細胞を含む粒子を単離するための新規のeDARプラットフォームを説明し、その正当性を立証する。

【0281】

eDARプラットフォームの特徴および性能を判定した2つの要因は、効率的かつ能動的選別方式、および後続の効率的な精製(例えば、精製チャンバ)方式である。本eDARプラットフォームは、これら2つの構成要素を最適化する。一実施例では、eDARプラットフォームは、標準リソグラフィ方法によって加工される統合濾過領域を含むことができる。マイクロ流体チップは、シリコンマスタ上の2つの層から成ることができ、かつポリジメチルシロキサン(PDMS)への1段階複製成形で加工することができる。マイクロ流体チップは、ガラス基板への結合で仕上げることができる。システム全体は、能動的選別方式を含むことができる。マイクロ流体チップおよび流体力学的切替機構の分析性能は、特定の回収効率(例えば、95%)、特定の偽陽性率(例えば、0)、および特定のスループット(例えば、1時間につき4.8mLの全血)のために最適化することができる。

【0282】

マイクロ流体チップ

本実施例で使用されるマイクロ流体チップは、同一の設計で統合される2つの機能的領域、すなわち、eDAR選別領域およびスリット構造に基づく濾過ユニットを有していた。選別合流点に血液を導入した、選別ユニット内の主要チャネルは、50 $\mu$ mの高さおよび150 $\mu$ mの幅を有し、全ての他の4つのチャネルは、高さ50 $\mu$ mおよび幅200 $\mu$ mであった。スリットフィルタは、高さ5 $\mu$ mおよび幅5 $\mu$ mであった。試験されたスリットの最大数は、20,000であった。

【0283】

シリコンマスタは、2つのフォトリソグラフィプロセスを使用して加工された(図5、20、および21)。特徴は、AutoCAD(Autodesk(San Rafael, CA))を使用して設計され、クロムマスク(TRICR Corporation(SF, CA))上に書き込まれた。ポジ型レジストリソグラフィおよび深掘り反応性イオンエッチング(DRIE)が、マイクロフィルタ特徴である第1の層を形成するた

10

20

30

40

50

めに選択された。ワシントン大学 (The University of Washington) の微細製造施設 (Micromanufacturing Facility; MMF) によって提供された AZ 1512 が、ポジ型フォトレジストとして使用された。DRIEプロセスは、 $4.5\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$  の範囲内の深度を達成するように最適化された。eDAR特徴の第2の層は、ネガ型フォトレジストとしてSU-8-3050 (MicroChem (Newton, MA)) を使用して加工され、特徴の高さは、 $50\ \mu\text{m}$  であるように制御された。トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル-1-トリクロロシラン (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)) を使用して、マスタがシラン化された後、未硬化PDMSがシリコンウエハ上に注がれ、 $70^\circ\text{C}$  で2時間焼き付けられた。所望の微小特徴を伴うPDMS片が、シリコンマスタから剥離され、次いで、プラズマ酸化の標準プロセスを使用してカバーガラス片と結合された。

10

#### 【0284】

##### 生物学および臨床サンプル

3つの乳癌細胞株、すなわち、SKBr-3、MCF-7、およびMDA-MB-231細胞 (American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA)) が、eDARシステムを特性評価して最適化するために使用された。SKBr-3細胞は、マッコイ5培地で培養され、MCF-7は、イーグル最小必須培地 (EMEM) で培養され、MDA-MB-231は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (ATCC (Manassas, VA)) で培養された。全ての細胞培地はまた、 $2\ \text{mM}$  L-グルタミン、 $10\%$  ウシ胎仔血清 (FBS) (ATCC (Manassas, VA))、および $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  ペニシリン/ストレプトマイシン (ATCC (Manassas, VA)) も含有していた。培養は、加湿環境内で $5\% \text{CO}_2$  を伴って $37^\circ\text{C}$  で行われた。MDA-MB-231-GFP細胞株は、タフツ大学 (Tufts University) のGail Sonenshein教授によって提供され、 $10\% \text{FBS}$  および $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  ピューロマイシン (Life Technologies (Carlsbad, CA)) を伴うDMEM培地で培養された。健康なドナーからの対照血液が、Plasma International Lab (Everett, WA) から購入され、皮膚細胞からの任意の起こり得る汚染を防止するように、採血の第1の管が廃棄された。全血サンプルが、Fred Hutchinson Cancer Research Centerの施設内倫理委員会によって承認されたプロトコルに基づいて、転移臓器癌がある患者から採取された。患者サンプルが、抗凝固剤としてEDTAを含有するVacutainer管 (BD (Franklin Lakes, NJ)) を使用して、Seattle Cancer Care Alliance (SCCA) で収集され、 $4^\circ\text{C}$  で貯蔵され、4時間以内に分析された。

20

30

#### 【0285】

##### サンプル調製およびeDAR分析

別様に特定されない限り、Isoton (Beckman Coulter Inc. (Chino, CA)) が全ての実験用の緩衝剤として使用された。典型的なeDAR実験については、 $1\ \text{mL}$  の全血サンプルが、暗室にて室温で30分間、フィコエリトリン (PE) (ロット番号515776、Abnova (Walnut, CA)) と共役した抗EpCAMで標識された。全ての標識パラメータが最適化されている。標識サンプルは、 $14\ \text{mL}$  まで希釈され、次いで、遊離抗体を除去するように遠心分離された。最終体積は、初期体積と同一であるように調整された。調製されたサンプルは、次に、シリンジポンプを使用してマイクロ流体チップに注入された。ファイバ連結アバランシェフォトダイオード (APD) (Excelitas Technologies (Waltham, MA)) からのトレースが、PCIデータ取得カード (PCI 6602、National Instruments (Austin, TX)) によって収集された。eDARの選別プロセスは、施設で書かれたLabVIEW (National Instruments (Austin, TX)) スクリプトおよび施設内で構築されたフィー

40

50

ルドプログラマブルゲートアレイ ( F P G A ) デバイスを使用して、自動的に制御された。選別されたアリコートを集めた流体力学的切替は、Lee Company ( Westbrook , CT ) から購入されたソレノイド ( I N K A 1 2 2 6 2 1 2 H ) によって制御された。

#### 【 0 2 8 6 】

全ての陽性アリコートが濾過領域上に収集された後、濾過領域を1分未満で迅速に洗浄するために isoton が使用された。任意の細胞質マーカーが二次標識に使用された場合、細胞を固定するように、4%のパラホルムアルデヒド ( P F A ) が濾過領域の中へ充填された。Surfynol ( 登録商標 ) 465 ( Air product ( Allentown , PA ) ) が、固定された細胞を透過化するために使用された。抗 E p C A M - P E および抗サイトケラチン - A P C ( ロット番号 M A B 5 1 3 1 , Abnova ( Walnut , CA ) )、ならびに抗 C D 4 5 - フルオレセインイソチオシアネート ( F I T C ) ( ロット番号 B 1 1 6 3 1 4 , BioLegend ( San Diego , CA ) ) が、典型的には、二次標識のための抗体として使用された。Hoechst ( Life Technologies ( Carlsbad , CA ) ) もまた、標識標的が実際に有核細胞であったことを検証するために核染色として使用された。

10

#### 【 0 2 8 7 】

e D A R の方法は、以下の通りであり、血液サンプルがマイクロ流体チップに注入され、アリコートに分割された。次いで、標識方式によって判定された「陽性」または「陰性」としてアリコートをランク付けするように、線共焦点検出方式が適用された。例えば、多くの用途では、血液が抗 E p C A M - P E で標識されたため、その抗体に共役した特定の色素からの蛍光信号を有していたアリコートが、陽性事象としてランク付けされた。陽性アリコートが迅速に収集されることを可能にした、血流の方向の切替を生成するように、自動フィードバック方式が適用された。C T C の非常に低い濃度により、アリコートの 9 9 . 9 9 9 % 超が、所望の蛍光信号の非存在のため廃棄された。陽性蛍光信号を生じた、これらのアリコートは、さらに精製され、次いで、数えられるように、マイクロ流体チップ上の別の領域に移送された。二次免疫染色ステップ、より複雑な染色 / 退色プロセス、または単一被分析物レベルでの操作および培養等の一連の下流分析を、閉じ込められた細胞に行うことができる。

20

#### 【 0 2 8 8 】

##### 再設計された流体力学的選別方式

以前に、e D A R は、電気浸透流またはゾル・ゲル変換等の他の報告された切替機構と比較して、高速 ( 約 2 ミリ秒の応答時間 ) かつ堅調であった、能動的選別ステップを制御する機械弁を有していた。有望であるが、この機械弁方式のいくつかの設計要因は、e D A R の潜在的用途を潜在的に制約した。マイクロ流体チップ上で機械弁を形成するために、3つの個々の構造層、すなわち、ソレノイド、その P D M S スレッド、および 1 5 0 μ m P D M S フィルム上のマイクロチャネルが必要とされた。これは、マイクロ流体チップの製作を複雑で時間がかかるものにするであろう。別の欠点は、C T C の損失または損傷のリスクを潜在的に増加させた、捕捉された血液アリコートと機械弁との間の直接接触であった。本実施例では、ソレノイドは、常時閉であるが、5 V D C 電圧が印加されるときに 2 ~ 3 ミリ秒で開放することができる、オフチップモデルと置換された。このインラインソレノイドがマイクロ流体チップの一部ではなかったため、マイクロ流体デバイスの製作は、有意に簡略化された。ソレノイドは、流体力学的選別方式を試験するように、任意のマイクロチャネルと容易に接続することができる。8つの異なる方式が、流体切替を駆動するように設計および試験された ( 図 6 )。この種類のソレノイドの構造、および P D M S の弾性的性質により、流体性能が変動し ( 表 1 )、各方式が最良性能のために特性評価された。

30

40

#### 【 0 2 8 9 】

特性評価および最適化後に、プラットフォームの構造および流体力学的選別の対応する方式が、e D A R のために選択された ( 図 7 )。標識血液サンプルが、シリンジポンプを

50

使用して、マイクロ流体チップの上部チャンネルに注入された(図7a)。能動的選別ステップを制御するために、緩衝剤が通って流動した、2つの側方チャンネルが使用された。右側チャンネル上に配置された2つのポートがあり、それらの両方が加圧緩衝剤源に接続された。常時閉ソレノイドは、流体力学的切替を制御するように、選別合流点付近のポートに接続された。選別合流点の後に、2つのチャンネルがあった。左側の1つは、陽性アリコートを集め、それらをさらなる精製(例えば、精製チャンバ)のために濾過および収集領域に送達するために使用され、右側の1つは、全ての陰性アリコートが通って流動した、廃棄物収集チャンネルであった。

#### 【0290】

これらのアリコートが「陰性」としてランク付けられたとき(図7b)、ソレノイドに印加された電圧がなかったため、それが閉鎖された。初期圧力降下が1番および3番の緩衝剤源の間で設定されたため、血液は廃棄物を収集したチャンネルのみに流入することができ、これは、図7bの明視野像にも示されている。陽性事象が第1の検出窓によって検出されたとき、2番の緩衝剤リザーバから緩衝剤流を開放するように、5VDC電圧が即時にソレノイドに印加された。これは、右側の緩衝剤チャンネルの流動抵抗を減少させ、そこでより速い流速を生成した。血流は、陽性アリコートを収集するように右側から左側に押動された(図7c)。このアリコートが収集され、第2の検出窓によって確認された後、ソレノイドは、血流を廃棄物収集チャンネルに戻して切り替えるように閉鎖された(図7d)。スイッチオーバーおよびバックに必要なとされる時間は、それぞれについて2~3ミリ秒であると判定された(図8)。本プロセスは、 $10^5$ 超のオン・オフサイクルが試験された後でさえもeDARのために十分に安定していた。インラインソレノイドが緩衝剤ライン上に配置されたため、血液はソレノイドと接触することができず、これは、血液凝固および二次汚染の可能性を排除した。また、本方式では、eDARプロセス中にCTC収集チャンネルの中に一定流量の緩衝剤があった。これは、後続の精製(例えば、精製チャンバ)ステップの効率を向上させ、細胞の凝集体の形成を防止した。

#### 【0291】

本実施例のいくつかの側面では、陽性アリコートを濾過領域上に収集することができ、濾過領域を1分未満で洗浄するために、Isotonを使用することができる。細胞質マーカーは、二次標識に使用することができ、細胞を固定するように、濾過領域の中への4%パラホルムアルデヒドの装填を伴うことができる。固定された細胞を透過化するために、Surfynol(登録商標)465(Air product(Allentown, PA))を使用することができる。抗EpCAM-PEおよび抗サイトケラチン-APC(Abnova(Walnut, CA))、ならびに抗CD45-フルオレセインイソチオシアネート(FITC)(BioLegend(San Diego, CA))を、二次標識に使用することができる。有核細胞を検証するために、核染色としてHoechst(Life Technologies(Carlsbad, CA))を使用することができる。

#### 【0292】

精製(例えば、精製チャンバ)機構の設計

本実施例のさらに別の側面は、PDMsで作製することができ、付加的な層を必要としない場合がある、オンチップ濾過ベースのマイクロスリット構造の新しい方式を含むことができる(図10a)。図10aは、いかなる赤血球(RBC)も保持することなくCTCを捕捉するために使用された、これらのマイクロスリットの実施例の基本構造を示す。スリットのサイズは、いかなる小さいCTCの損失も回避するために、高さ5 $\mu$ mおよび幅5 $\mu$ m(図10b)であるように最適化された。濾過に基づくCTC方法の大部分で使用されるものより小さい、このサイズのフィルタを使用して、多くの白血球が捕捉されなかった。マイクロフィルタがPDMsで作製され、カバースリップ片と結合されたため、完全に透明ではなく、散乱および収差を生成し得る、ポリカーボネートフィルタと比較して、画質が有意に向上させられた(図10cおよび10d)。また、細胞をスリットのアレイに沿って捕捉することのみできたため、それらを容易に参照して追跡することができ

、多くの他の方法では、細胞は、表面上に無作為に分配される。スリットに沿ったこの閉じ込めは、撮像手技をより高速にし、計数の結果をより正確にした。スリットはまた、閉じ込められたCTCに二次標識を行うことをより高速かつ効率的にした。図10eは、抗EpCAM-PEで標識された2つの癌細胞がマイクロスリット上に閉じ込められたことを示す。抗サイトケラチン-Alexa488、抗Her2-Alexa647、およびHoechstを使用して、細胞が固定、透過化、および標識された。蛍光画像は、これら2つの細胞上のこれらのマーカーの発現を明確に示し、明視野像もまた、それらの形態を確認した。2つの細胞はまた、陰性対照マーカーとして抗CD45-Alexa700で標識され、カラーチャネルからのいかなる信号も、このタグに対応しなかった。

【0293】

eDARの特性評価および分析性能

能動的選別ステップの効率が、リアルタイムで監視された。図9は、膵臓癌患者サンプルからのAPDデータのごく一部分を示す。「決定APDトレース」は、アリコートをクリック付けし、選別を制御した第1の検出窓に由来した。978および1298ミリ秒における2つのピークは、アリコート選別をトリガした、抗EpCAM-PEで標識された2つのCTCを表した。「確認APDトレース」の2つのピークは、2つの癌細胞が収集チャンネル上に位置する第2の検出窓を通過して流動したことを示し、2つの陽性アリコートが実際に選別されたことを確認する。第2の検出器からの背景変化(図9a)がまた、血液のごく一部分のみがeDARによって収集され、CTCの高い濃縮比(典型的な臨床サンプルについて最大100万倍)に寄与したことを指摘する価値がある。

【0294】

標識CTCが第1の検出窓から第2の検出窓へ流動する必要があったため、決定APDピークとその確認信号との間の時間差が観察された。この時間差は、マイクロチャンネル中の層流の性質により、CTCが異なる線流速を有することができるため変動し得る、選別されたCTCの経過時間として定義された。図9bは、40および80 $\mu$ L/分の流速での経過時間の分布ヒストグラムを示す。概して、血液のより高い体積流速は、選別されたCTCの短縮した経過時間をもたらした(図9c)。流速が90 $\mu$ L/分であったとき、平均経過時間は、選別方式の切替時間(2~3ミリ秒)に非常に近い、4ミリ秒まで低減させられ、これがeDARのための設計の本特定実施形態のためのスループットの限界であることを示唆する。他の実施形態では、本eDAR設計は、2ミリ秒未満の経過時間をもたらしてもよい。

【0295】

選別されたCTCの経過時間が流体力学的切替時間より短かった場合、細胞は、本プラットフォーム上で確実に選別されなかった場合がある。したがって、選別効率は、選別をトリガした事象の総数と対比した、収集された事象の数として定義された。図9dは、30 $\mu$ L/分~100 $\mu$ L/分の流速での選別効率の値を示す。流速が30 $\mu$ L/分であったとき、その流速での平均経過時間が約10ミリ秒であったため(図9c)、選別効率はほぼ100%であった。この経過時間は、能動的選別ステップがCTCを収集するために十分に長かった。選別効率は、80 $\mu$ L/分の流速で90%まで減少し、次いで、流速が90 $\mu$ L/分であったときに49%まで降下した。図9dはまた、選別効率と比較して類似動向を有していた、異なる流速でのeDARの回収効率も示す。しかしながら、回収効率は、マイクロ流体チップ上で多色蛍光撮像を使用して数えられる、回収された細胞の数と対比した、混入細胞の数として定義された。この性能は、抗体標識効率、線共焦点検出効率、および選別効率を含む、多くの要因の組み合わせである。これは、同一の流速での回収および選別効率の間の差を説明する。結果として、この現世代のeDARについて、スループットの上限は、88%回収率で80 $\mu$ L/分であった(1mLの血液に12.5分)。このスループットは、全血の分析のためのほとんどのCTC技術より高いが、より広い血液入口チャンネルを設計すること、または第1の検出ビームをさらに上方に移動させることによって、さらに向上させることができる。

【0296】

10

20

30

40

50

3 ~ 975 個の MCF - 7 細胞が、50 μL / 分の流速での回収効率を分析するように、1 mL の健康な血液に混入された。低性能で細胞数の精度を確保するために、毛管計数方法が、濃度が 100 個の細胞 / mL より低かったときに培養細胞を正確に混入するように使用された。平均回収率は、第 1 世代の eDAR (93%) より少し高い、0.998 の R<sup>2</sup> 値で 95% であった (図 9 e)。CTC の濃度が、通常は非常に低いため、計数結果は、ポアソン分布の影響を受けた。この場合、容認可能なスループットおよび回収率でより大量の全血サンプルを分析する能力が非常に重要であった。同数の MCF - 7 細胞が、1、5、および 10 mL の健康な血液に混入され、次いで、これらの 3 つのサンプルが、50 μL / 分の流速で分析された。それらの回収率に有意な変化はなく (図 9 f)、本方法が高い効率およびスループットで大量の全血を流すことが可能であることを示す。

10

【0297】

EPCAM が腫瘍細胞を選択するために CTC 検査の大部分で使用されたが、ますます多くの研究は、低い EPCAM 発現を伴う CTC がより多くの間葉特性を有し、より活動的であることを報告している。最新の eDAR プラットフォームは、EPCAM 以外のバイオマーカーを使用して腫瘍細胞を捕捉するように希少細胞を選択する任意の標識方式を使用するために、十分に便宜的である。3 つの方式が、異なる培養乳癌細胞株を選択するように設計された (図 9 g)。EPCAM が MCF - 7 細胞を選択するために使用され、Her - 2 が SKBr - 3 細胞を選択するために使用され、EGFR が MDA - MB - 231 細胞を選択するために使用された。これら 3 つ全ての方式は、88% より高い回収率で標的細胞を単離して閉じ込めた。eDAR の別の一意の重要な特徴は、マーカーが位置する場所の独立性である。例えば、表面捕捉方法または免疫磁性方法等の他の技術では、細胞表面上の抗原のみを捕捉することができる。本方法は、GFP 等の細胞内マーカーを伴う細胞を選択することができる (図 9 d)。ヒト全血に混入された MDA - MB - 231 - GFP 細胞の回収率は、91% であった (図 9 g)。蛍光タンパク質が、転移の進行および機構を研究するために動物モデルで広く使用されるため、eDAR は、いかなる免疫染色ステップも伴わずに、これらのモデルで CTC を選択するための理想的なツールである。

20

【0298】

膵臓癌がある患者からのサンプルの高スループット分析

本方法の偽陽性率を評価するために、15 人の健康なドナーからの血液サンプルが使用され、それらのうちのいずれでも CTC が見出されなかった。26 個の血液サンプルが、膵臓癌がある患者から収集された。第 1 世代の eDAR を使用して、それらのうちの 16 個が分析され、より新しい eDAR プラットフォームを使用して、他の 10 個のサンプルが分析された。図 25 は、3 つのデータセット、すなわち、現在の方法によって分析された対照血液、第 1 世代の eDAR によって分析された膵臓癌サンプル、および現在の方法によって分析された膵臓癌サンプルの分布を示す。これらの臨床サンプルの未加工データが、表 3 (以下) 内にある。

30

【表 3 - 1】

サンプル	体積 mL)	CTC 数	サンプル	体積 mL)	CTC 数	サンプル	体積 mL)	CTC 数
対照 1	1	0	対照 15	1	0	患者	1	8

40

【表 3 - 2】

サンプル	体積 mL)	CTC 数	サンプル	体積 mL)	CTC 数	サンプル	体積 mL)	CTC 数
						14		
対照 2	1	0	患者 1	1	183	患者 15	1	2
対照 3	1	0	患者 2	1	9	患者 16	1	10
対照 4	1	0	患者 3	1	7	患者 17	1	872
対照 5	1	0	患者 4	1	3	患者 18	1	2
対照 6	1	0	患者 5	1	14	患者 19	1	5
対照 7	1	0	患者 6	1	6	患者 20	1	12
対照 8	1	0	患者 7	1	4	患者 21	1	22
対照 9	1	0	患者 8	1	0	患者 22	1	2
対照 10	1	0	患者 9	1	0	患者 23	1	0
対照 11	1	0	患者 10	1	27	患者 24	1	14
対照 12	1	0	患者 11	1	44	患者 25	1	0
対照 13	1	0	患者 12	1	5	患者 26	1	7
対照 14	1	0	患者 13	1	7			

表 3. 対照および膀胱癌サンプルの未加工データを示す

## 【0299】

本方法を用いて、CTCが、2～872個の細胞/mLに及ぶサンプルの80%（10のうち8）で検出された。以前の研究によって報告されたCTC集合もまた、患者血液サンプル中で検出された。実験で観察された集合の多くが低いEpCAM発現を有していたことを指摘することが興味深い。図26は、サイトケラチンの高い発現を有していたが、EpCAMの低い発現を有していた、CTC集合を示す。

## 【0300】

（実施例2）

逐次免疫染色および光退色による、捕捉された希少細胞中の複数のバイオマーカーの撮像

本実施例では、逐次免疫染色および光退色プロセスのための好ましい方式が開示される。好ましい実施例では、死容積を最小限化し、使用される抗体の量を減少させ、気泡を導入することを回避し、プロセスを自動化するために、インライン染色および洗浄システムがeDARと併用される。

## 【0301】

本実施例は、閉じ込められたCTC上のタンパク質マーカーの発現分析を行うための最適化された単純な半自動方法を説明する。インライン免疫染色および光退色システムは、選択されたCTC上で標識および蛍光撮像を可能にすることができる。本方法は、異なるフルオロフォアに共役される抗体の群でCTCを標識するステップを含むことができ、その後、光退色およびバイオマーカーの別の群に対する異なる蛍光抗体を用いた再標識が続く。本プロセスは、タンパク質バイオマーカーのいくつかの群を研究するように、複数回繰り返すことができる。例示的な場合において、群を生成するように、2つの着目タンパク質マーカーを陽性対照マーカー（例えば、核染色）および陰性対照マーカー（例えば

、CD45)と組み合わせることができる。各回で一群を研究することができ、その後、着目タンパク質マーカーの発現を見るように、2回目の前に光退色(例えば、4回の免疫染色および光退色)が続く。

#### 【0302】

マイクロ流体構成要素および線共焦点光学部

ポリジメチルシロキサン(PDMS)マイクロ流体チップは、以前に説明された方法を使用して加工された。簡潔には、本特徴は、AutoCAD(AutoDesk(San Rafael, CA))を使用して設計され、次いで、Fineline Imaging(Colorado Springs, CO)によって透明マスク上に書き込まれた。微小特徴が、陰性フォトレジストとしてSU-8-3050(Micro-Chem Corp.(Newton, MA))を使用してシリコンウエハ上で加工され、特徴の高さは、50 $\mu$ mであるように制御された。いったん特徴が開発されると、未硬化PDMSがシリコンマスタ上に注がれ、75 $^{\circ}$ Cで2時間培養され、剥離され、次いで、プラズマ酸化方法を使用してガラスカバースリップに結合された。

10

#### 【0303】

線共焦点検出方式は、一連のダイクロイックミラー、円柱レンズ、およびビームスプリッターを使用して、2つの検出窓を形成するために、488および633nmの2つのレーザー源を使用した。同時に重複した2つのレーザービームを有する、第1の検出窓は、標識CTCから蛍光信号を検出するために使用され、次いで、選別を自動的に制御した。第2の検出窓は、選別されたアリコートを確認し、選別効率を監視するために使用された。

20

#### 【0304】

生物学的物質およびeDARプロセス

別様に特定されない限り、Isoton(Beckman Coulter Inc.(Chino, CA))が全ての実験用の緩衝剤として使用された。乳癌細胞株、すなわち、MCF-7、SKBr-3、およびMDA-MB-231(American Type Culture Collection(ATCC)(Manassas, VA))が、本システムを特性評価するために使用された。細胞培養が、ベンダによって推奨される条件下で行われ、週に1回収穫された。MCF-7は、イーグル最小必須培地(EMEM)で培養され、SKBr-3細胞は、マッコイ5培地で培養され、MDA-MB-231は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ATCC(Manassas, VA))で培養された。全ての細胞培地はまた、2mM L-グルタミン、10%ウシ胎仔血清(FBS)(ATCC(Manassas, VA))、および50 $\mu$ g/mLペニシリン/ストレプトマイシンも含有していた。健康なドナーから採取されたヒト全血が、Plasma International Lab(Everett, WA)から購入され、到着時に4 $^{\circ}$ Cで貯蔵された。各20mL採血は、抗凝固剤としてEDTAでコーティングされた4本の5mL Vacutainer管で入荷した。皮膚細胞からの潜在的な汚染を回避するように、各採血の第1の管が廃棄された。

30

#### 【0305】

抗体が、任意の標識手技の前に起こり得る凝集体を除去するように、14,000rpmで5分間遠心分離された。各血液サンプルが、暗室でフィコエリトリン(PE)(Abnova(Taipei City, Taiwan))と共役した抗上皮細胞接着分子(EpCAM)で標識され、室温で30分間培養された。標識血液サンプルは、遊離抗体を除去するように洗浄および遠心分離(10分にわたって2,300rpm)された。サンプルは、シリンジポンプを使用して、即時にマイクロ流体チップに注入された。典型的には、流速は、eDARの操作のために50 $\mu$ L/分に設定されたが、以前の最適化方法に基づいて、より高くあり得る。APD信号トレースが、PCIデータ取得カード(PCI6602, National Instruments(Austin, TX))を使用して収集され、施設内で開発されたMATLAB(MathWorks(Natick, MA))スクリプトによって分析された。施設で構築された電子装置は、検出されたAPD信号に基づいて自動フィードバック制御を与え、マイクロ流体チップに接続さ

40

50

れたソレノイド (S - 10 - 38 - H - 40、Magnetic Sensor Systems (Van Nuys, CA)) に電圧を印加するようにプログラムされた。eDAR についてのさらなる詳細は、以前に説明されている。

#### 【0306】

##### 逐次免疫染色および光退色プロセス

eDAR によって単離された細胞を洗浄した後、インライン弁をオフにすることによって、主要、側方、および廃棄物チャネルが閉鎖された。細胞固定緩衝剤 (BioLegend (San Diego, CA)) の  $400 \mu\text{L}$  アリコートが、 $15 \mu\text{L}/\text{分}$  の流速で蠕動ポンプポンプ (Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)) によってマイクロ流体チップに導入された。緩衝剤で同一の流速にて5分間洗浄した後、 $250 \mu\text{L}$  の  $2.5\%$  surfynol 465 界面活性剤 (Air Products and Chemicals Inc (Allentown, PA)) を15分間流動させることによって、細胞が透過化された。本ステップ後、細胞の4回の免疫染色および光退色が行われた。各回の染色について、4つの異なる蛍光色素に共役した4つのバイオマーカーを伴う  $220 \mu\text{L}$  の染色溶液が調製された。各回で使用される抗体および核染色についての詳細が、表2に要約される。凝集体を除去する遠心分離ステップ (5分にわたって  $14,000 \text{rpm}$ ) 後、 $200 \mu\text{L}$  の上清が染色緩衝剤として収集された。上清は、 $20 \mu\text{L}/\text{分}$  の流速でマイクロ流体チップに注入された。抗体溶液が濾過領域全体を充填したとき、流動が停止された。培養は、全ての閉じ込められた細胞が抗体に効率的に接触したことを確実にするように、暗室で20分間行われた。本ステップ後、細胞は、任意の遊離抗体を除去し、蛍光背景を最小限化するように、10分間洗浄された。光源としてキセノンアーク灯 (Sutter instrument (Novato, CA)) を使用して、光退色が行われた。各退色ステップは、15分かかった。20倍対物レンズが、落射蛍光撮像および光退色に使用された。蛍光画像が、4つの異なる発光チャンネル、すなわち、黄色 (PEの場合、 $555 \text{nm} \sim 605 \text{nm}$ )、青色 (Hoechstの場合、 $435 \text{nm} \sim 485 \text{nm}$ )、緑色 (FITCまたはAlexa 488の場合、 $510 \text{nm} \sim 540 \text{nm}$ )、および赤色 (Alexa 647またはAPCの場合、 $665 \text{nm} \sim 695 \text{nm}$ ) から、光退色ステップの前および後に収集された。

10

20

#### 【0307】

##### 光退色プロセスのための安全性考慮

光退色試験を実行するときの安全性を確保するために、最高出力が  $10 \text{mW}$  にロックされた。サンプルが光源に暴露されるときに、保護眼鏡を装着すること、または黒い箱で光退色領域を覆うこと等のある保護方法が考慮されるべきである。

30

#### 【0308】

##### eDAR によって単離されたCTC

全血サンプルが、フルオロフォアに共役した抗体で事前標識され、次いで、マイクロ流体チップに導入された。多くの用途で、EpCAMが、陽性選択のためのバイオマーカーとして使用された。しかしながら、本方法は、異なる、またはより複雑な選択論理を使用することにおいて便宜的であり得る。

40

#### 【0309】

eDARでは、レーザ検出ビーム、体積流速、および選別速度の組み合わせによって、仮想アリコートが最初に定義された。これらの要因に基づいて、標識血液サンプルは、事実上、アリコートにつき  $2 \text{nL}$  で、 $1 \text{mL}$  につき最大50万アリコートに分割された。線共焦点検出方法は、単一被分析物選択性で蛍光発光を検出した。結果として、これらの仮想アリコートは、「陽性」または「陰性」として一次標識に基づいてランク付けされた。CTCの非常に低い濃度により、アリコートの  $99.999\%$  超が廃棄され (図10A)、 $100$  万倍超の濃縮比をもたらした。

#### 【0310】

アリコートのランク付けの結果に基づいて、「陽性」アリコートを収集し、さらなる精製 (例えば、精製チャンバ) および分析のための領域に移送することができるように、自動

50

フィードバック機構が、血流の流体力学的切替をトリガするように適用された。2つの設計要素、すなわち、ソレノイド、および2つの側方緩衝剤ライン内の圧力降下が、この流体力学的切替を制御した。「陰性」アリコートのみが右側の廃棄物チャンネルに流入するように、ソレノイドが、左側の閉鎖位置でCTC収集チャンネルの中に配置された(図4A)。また、ソレノイドが開放したときに、廃棄物チャンネルから収集側に血流を切り替えた、緩衝剤が流動した2つの側方チャンネルの間の圧力降下もあった。本単純方式は、最小量の血液細胞とともにCTCを収集するために、2~3ミリ秒で十分に高速であった。第2の線共焦点検出窓もまた、リアルタイムで流体力学的切替の効率を監視するように収集側に配置された。図4Bは、肺癌患者から採取されたサンプルからのデータのごく一部を示す。この図では、緑色の信号は、アリコート選別を制御した、第1の検出領域からのAPDトレースを示し、赤色の信号は、アリコートが実際に選別されたことを確認する、第2の検出領域からのAPDカウントであった。

10

#### 【0311】

これらの選別されたアリコートは、CTCを閉じ込め、血液細胞の大部分を廃棄することができる領域に移送された(図4A)。捕捉された細胞をさらに精製するための多くの可能な方法があるが、小さい一片のポリカーボネートフィルタ(5×5μm細孔径)がマイクロ流体チップ上に組み込まれた。閉じ込められた細胞は、撮像され、さらに、それらの識別を判定するようにマイクロ流体チップ上のより多くのバイオマーカーで標識された。例えば、図26aおよび図26bは、EpCAM、サイトケラチン、および核染色に対して陽性であったが、CD45に対して陰性であった、マイクロ流体チップ上に閉じ込められた癌細胞を示す。本細胞はまた、形態学的情報を提供した、明視野顕微鏡検査法によって観察された。

20

#### 【0312】

##### 逐次免疫染色および光退色

死容積を最小限化し、使用される抗体の量を減少させ、気泡を導入することを回避し、プロセスを自動化するために、インライン染色および洗浄システムが開発され、eDARと併用された。図13Aに示されるように、灌流標識および洗浄ステップを行うように、マイクロ流体チップ上の2つのポートが開かれたままにされた一方で、他の3つ全てのポートは完全に閉鎖された。蠕動ポンプが、洗浄緩衝剤および標識試薬をマイクロ流体チップに送達し、6方向弁を介して加圧緩衝剤源と連結された。この弁の上の他の3つのポートは、任意の起こり得る漏出または汚染を防止するように完全に遮断された。eDAR実験を実行するとき、6方向弁は、流体力学的切替の安定した制御を提供するように、加圧緩衝剤側に旋回させられた。これは、いかなる気泡も導入することなく、正確な量の試薬をマイクロ流体チップに注入するように、蠕動ポンプ側に旋回させられた。本方式を使用して、数ナノグラムの抗体が、5分未満で閉じ込められた細胞に導入され、典型的な培養ステップは、20分未満であった(図13B)。

30

#### 【0313】

細胞内マーカー試験を行う必要性があった場合、捕捉された細胞が、試験に先立ってマイクロ流体チップ上で固定および透過化された。次いで、複数回の染色、洗浄、撮像、および退色実験が、連続的に行われた。各回で、4色の蛍光、すなわち、黄色(PE)、赤色(Alexa 647またはAPC)、緑色(FITC)、および青色(核染色)が監視された。

40

#### 【0314】

研究のこの部分について、4回の逐次免疫染色および光退色プロセスに基づく、捕捉されたCTC上のタンパク質マーカーの発現の検定が設計された。落射蛍光顕微鏡検査法を使用して、4つの個々のチャンネルを通した各回で4つの異なるマーカーが監視された。マーカーの各セットは、陽性対照マーカーとして核染色(Hoechst)、陰性対照マーカーとしてFITCと共役したCD45、およびPEまたはAlexa 647と共役した2つのタンパク質マーカーを有していた。本システムは、2つの理由で、Hoechst染色を退色させないように設計された。すなわち、染色は、陽性対照マーカーとして使

50

用され、染色を退色させるために、有意な細胞損傷を引き起こし得る紫外線暴露を必要とするであろう。CD45は、CTCの分離において最大の妨害と見なされる、多くの種類の白血球(WBC)上で広く発現される。したがって、それらは、頻りに陰性対照マーカーとして使用される。

#### 【0315】

多くのタンパク質マーカーをCTC上で試験することができるが、概念実証として、8つの抗原が選択され、4つの群に分割された(表2)。第1のセットは、CTCを識別するための最も広く使用されているマーカーである、EpCAMおよびサイトケラチンを有していた。免疫染色試験セットは、上皮バイオマーカーを伴うCTCをさらに確認して計数するように、eDARによるCTCの捕捉の直後に適用された。表2は、Hoechst染色に対して陽性であるが、CD45に対して陰性である、マイクロ流体チップ上に閉じ込められた6つの腫瘍細胞があったことを示す。それらのうちの2つは、細胞が上皮特性を有していたことを示唆した、EpCAMおよびサイトケラチンの強い発現を有していた。

10

#### 【0316】

第2のセットは、臨床および生物学的研究のために重要である、他の上皮マーカーを調査するように設計された。Her2およびMUC1は、これら2つのバイオマーカーが癌の病因および薬剤に対する抵抗において重要な役割を果たすため、2つのタンパク質マーカーとして選択された。それらはまた、抗腫瘍薬剤および免疫療法の潜在的標的でもある。図14の2回目の標識は、マイクロ流体チップ上に閉じ込められた細胞の一部がMUC1発現を有していたが、それら全ては、Her2発現が非常に低かったことを示す。

20

#### 【0317】

癌幹細胞は、腫瘍の進行において重要な役割を果たすことが示されており、CTCの集団で観察されている。マーカーの第3のセットは、2つの癌幹細胞抗原、すなわち、CD44およびCD24を有していた。それらは、乳癌に対する、およびおそらく他の種類の癌にも対する幹細胞マーカーとして広範囲に研究されている。表2のデータは、4つの細胞がCD44+/CD24-の強い発現を有し、他の2つがCD44-/CD24+であることを示す。CD133およびCD105等の他の幹細胞マーカーもまた、原発癌の種類に基づいて、この群で使用することができる。

#### 【0318】

表2のマーカーの最後のセットは、EGFRおよびCD166の発現を見て、腫瘍細胞の間葉特性を実証するように設計された。EGFRは、EMTプロセスと関連付けられることが示されており、CD166は、骨髄中の間葉幹細胞を定義するために使用された。ビメンチンおよびカドヘリン等の他の関連マーカーも、この群で使用することができる。

30

#### 【0319】

##### 光退色の特性評価

光退色ステップの効率を判定することができる、2つの重要な要因、すなわち、細胞が潜在的な加熱によって損傷されないことを確実にしながら、効率およびスループットを向上させるように特性評価および最適化された暴露強度および時間があった。異なる暴露強度下の光退色曲線が、最初に研究された(図15A)。MCF-7細胞が、抗EpCAM-PEで標識され、2番のカバースリップ上に配置された。標識単細胞は、3つの異なる強度設定で退色させられた。退色曲線は、暴露強度が2mWより高かったときに95%超の退色効率を得るように、暴露時間を10分を下回って制御できることを示す。

40

#### 【0320】

これに基づいて、4つのフルオロフォア、すなわち、PE、FITC、Alexa 488、およびAlexa 647の退色曲線のうちのいずれかを、本方式で直接適用することができる。図15Bは、PE、FITC、およびAlexa 488の蛍光発光を5分未満で10%未満まで退色させることができ、部分的に、610nm~660nm(赤色励起)の光源の出力が黄色および緑色励起の範囲内の出力より低かったため、Alexa 647に対する光退色時間が、より長くかかったことを示す。結果として、退色時間

50

は、容認可能なスループットで高い退色効率を得るように、15分に設定された。これは、光源の出力を上昇させることによって向上させることができるが、これは、加熱および細胞損傷のリスクを潜在的に増加させ得る。

#### 【0321】

(実施例3)

逐次免疫染色および撮像のための単一被分析物閉じ込め

本実施例は、逐次免疫染色および撮像の方法と併用される、単一被分析物閉じ込め装置を説明する。

#### 【0322】

関連寸法は、効果的な直列流抵抗トラップ設計、ならびに恣意的な閉じ込め密度および寸法を有するデバイスの概略図(図17)を伴い、差し込み図は、拡大領域が図18で描写されていることを示す。図18Aの概略図は、主要チャンネルの幅、収縮部の幅、主要チャンネル収縮入口から主要チャンネル収縮出口までの長さ、収縮部を横断する長さ、ならびに主要チャンネル、収縮部、および収縮チャンバの高さ等のデバイスの相対寸法を示す。図18Cは、直列流抵抗トラップを利用する、例示的なマイクロ流体デバイス設計を示す。設計は、サンプルが導入される入口(左側)と、過剰な液相が除去される出口(右側)とを備える。デバイス設計の中心は、組み込まれる流動抵抗トラップの高い密度を描写する。図18Bは、図18Cの拡大領域を示し、デバイスの機能的部分を構成する流動抵抗トラップを示す。

10

#### 【0323】

図19は、並列流抵抗トラップを描写する。図19の上部パネルは、ウェルおよび収縮部の形状変形例を示す、デバイスからのウェルの3次元断面側面図を描写する。ウェル設計は、円柱、円錐、正方形、六角形、半球体等の形状の異なる、または類似する組み合わせにあり得る。ウェルの寸法は、 $h_1$  = ウェルの深度、 $h_2$  = 収縮部の深度、 $r_1$  = ウェルの半径、および $r_2$  = 収縮部の半径によって画定することができる。本側面によると、本デバイスは、溶液からビーズ、細胞等の単一粒子/細胞を閉じ込めることが可能である。本デバイスを形成するように、複数のウェルを並列に配列することができる。

20

#### 【0324】

図20は、本開示で説明されるデバイスのうちのいくつかを構築するために使用される手順の概略的描写である。本プロセスでは、固体基板(例えば、シリコンウエハ)が、フォトレジストでスピンコーティングされる。コーティングされた基板は、紫外線透明および不透明領域で描写される所望の設計で刻み込まれたフォトリソグラフィックマスクとしっかり接触して配置される。マスクおよび基板は、フォトレジスト内で光化学架橋反応を開始する、紫外線に暴露させられる。加工されたデバイスの第1の層は、フォトレジストの非架橋部分を溶解させる、結果として生じた架橋パターンを現像することによって完成させられる。加工の第2の層は、フォトレジストの第2の層をコーティングし、暴露し、現像することによって進展する。結果は、硬化性材料(例えば、PDMS)またはエンボス加工可能材料にチャンネル、チャンバ、およびウェル構造を形成するために使用される金型である。例えば、金型は、皿の中に配置される。第2に、PDMSが、金型に注ぎ入れられ、硬化させられる。第3に、PDMSは、金型から解放(剥離)され、この時点で、入口および出口が開けられる(描写せず)。最終的に、パターン形成されたPDMSが、チャンネルおよびチャンバ/ウェルを取り囲むように平坦ガラスまたはPDMS片に密閉される。

30

40

#### 【0325】

図21は、並列流抵抗トラップを生産するために使用される微細加工方法の実施例を示す。本デバイスは、上記で説明されるように、フォトレジスト(例えば、SU-8)以外の材料で加工される。利用可能な材料は、ポリマー材料、フォトレジスト、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリメチルウレタン(PUMA)等を含むことができるが、それらに限定されない。(1)犠牲層をシリコン(Si)ウエハ上にスピンコーティングすることができる。(2)フォトレジスト(SU

50

- 8) を最上部に堆積させることができる。(3) マイクロアレイパターンを伴うフォトマスクが整合させられ、ウエハが紫外線に暴露させられる。(4) 非架橋フォトレジストが処理され、シリコンウエハ上に所望のパターンを残して除去される。2層設計が一側面で使用される。その場合において、フォトレジストの第2の層がスピンコーティングおよび処理される。(5) SU-8層がSiウエハから解放され、多孔質ポリカーボネートフィルタ(経路1のみ)および/または管類を挿入するための単一の出口を伴うPDMSマウント(経路1-2)上に組み立てられる。

#### 【0326】

図22は、直列流抵抗トラップおよび並列流抵抗トラップが生物学的由来サンプルを収集し、分散化し、読み出すように機能する、一式のステップを描写する。部分Aは、どのようにしてサンプルが画定された場所を連続的に充填するかを示す。本プロセスは、サンプルの臨界寸法(直径)が、主要チャネルの高さおよび幅より小さいとともに、収縮部の高さまたは幅より大きいときに起こる。流動に対する抵抗差が、サンプルを画定された領域の中へ操縦し、そうするとすぐに、収縮部が閉塞され、流動が停止させられる。後続のサンプルは、全てのトラップが充填されるまで、次の閉じ込め場所まで主要チャネルを通る流路を辿る。部分Bは、どのようにして不混和液相がサンプル入口を通して導入され、閉じ込められたサンプルを連続的に分散化するかを示す。不混和液体は、閉塞制約による、ならびにチャネル材料および閉じ込め領域の寸法との不混和相の接触角度差によって生成される界面障壁による、流体流の不足のため、サンプル領域に流入しないであろう。部分Cは、どのようにして分散化サンプルの様々な化学的性質が検出されるかを実証する。充填の直列性質の結果として、各サンプルに関する時間的情報も各場所で物理的に符号化される。部分Dは、並列流抵抗トラップを充填するサンプルの第1のステップを図示する。サンプル粒子は、デバイスの最上部から画定された閉じ込めウェルの中へ流動を辿る。設計の並列性質により、複数のサンプルが、本明細書で提示されるある他の閉じ込め方式より速いサンプル収集のために同時に閉じ込められる。部分Eは、どのようにして不混和相が閉じ込めウェルの平面の上方または下方で置換され、それによって、分散化サンプルを生成するかを示す。部分Fは、どのようにして様々な化学的性質のサンプルが同時に検出されるかを表示する。

10

20

#### 【0327】

図23は、明視野顕微鏡検査法および蛍光顕微鏡検査法に基づくマイクロウェルおよび側方チャンバのアレイの検出および読出方式を示す。サンプルは、コンピュータプログラムによって制御される自動平行移動ステージ上に配置される。画像が高速CCDカメラによって取得される。

30

#### 【0328】

図24は、分析および放出のために生物学的粒子/細胞のアレイを閉じ込めるための順序を図示する。(1) 流動が、トラップを通じた流体流を促進するように管類から適用される。流体中の独立粒子/細胞が、開放ウェルの中への流動パターンを辿る。(2) いったん閉じ込められると、流動がその局所的領域中で停止する。(3) 溶液が、過剰な流体および粒子/細胞を洗い流すために使用される。本デバイスは、蛍光撮像、退色、および分析の反復サイクル等の以降の分析が粒子/細胞に行われることを可能にする。分析の完了時に、(4) 管類中の流動が粒子を放出するように逆転させられる。

40

#### 【0329】

(実施例4)

二重捕捉 e D A R

本実施例は、本開示の側面による、e D A Rの「二重捕捉」バージョンを説明する。二重捕捉 e D A Rは、同一のマイクロ流体デバイス上の同一のヒト血液サンプルからCTCの2つの異なる亜集団を同時に分離することができる。これら2つの亜集団は、それぞれ、高い回収率および純度で、マイクロ流体チップ上の2つの異なる領域上に別々に閉じ込めることができる。

#### 【0330】

50

図 1 1 は、マイクロ流体デバイスの一般構造を示す。血液サンプルが、異なる蛍光タグと共役した 2 種類の抗体で事前標識された。例えば、血液サンプルは、PE と共役した抗 EpCAM 等の上皮マーカー、ならびに FITC 等の PE と比較して異なる発光波長を有する別のフルオロフォアと共役した抗 EGFR または抗ビメンチン等の間葉マーカーで標識された。標識血液サンプルは、マイクロ流体チップに注入され、EpCAM 発現を伴う CTC は、黄色チャンネルにピークを伴って、線共焦点方式を使用して検出することができ、次いで、収集チャンネル # 1 の中へその特定のアリコートを集めるように、能動的選別事象がトリガされた。同様に、アリコートは、間葉マーカーに対して陽性としてランク付けされた場合、収集チャンネル # 2 に選別された。次いで、2 つの垂集団は、別々にマイクロ流体チップ上に閉じ込められて濃縮された。濾過領域は、第 2 世代の eDAR で使用される同一設計のマイクロスリット上に構築された。

10

## 【0331】

流体切替方式は、以下のように要約される。アリコートが適用される任意のマーカーに対して陰性としてランク付けされたとき、次いで、図 1 1 のソレノイドの両方が閉鎖された。2 つの側方チャンネルへの圧力が平衡を保たれた場合、血液は、廃棄物を収集するために使用された底部中心チャンネルへ流動した。アリコートが上皮マーカーのみに対して陽性としてランク付けされたとき、ソレノイド # 2 が即時に開放したため、血流が左側の収集チャンネルへ押動された (図 1 2 B)。アリコートが収集された後、ソレノイド # 2 が再度閉鎖したため、血流が中心に戻った。アリコートが上皮マーカーのみに対して陽性としてランク付けされたとき、ソレノイド # 1 が即時に開放したため、血流が右側へ押動された (図 1 2 C)。2 種類の eDAR 選別事象の応答時間は、約 2 ~ 3 ミリ秒であった。

20

## 【0332】

図 1 1 は、「二重捕捉」eDAR の一般構造を示す。標識血液が、最上部の主要チャンネルに導入された。緩衝剤が、2 つのソレノイドを使用して、血流の流体力学的切替を制御するように、2 つの側方チャンネルの中で流動していた。CTC の 2 つの垂集団が、分離され、同一のマイクロ流体チップ上の同一の異なる濾過領域上に閉じ込められた。

## 【0333】

図 1 2 は、血流の 3 つの状態の明視野像を描写する。A) アリコートがいずれか一方のマーカーに対して陰性としてランク付けされたため、血流は廃棄物収集チャンネルに流入した。B) 血液は、収集チャンネル # 1 に切り替えられ、CTC の第 1 の垂集団は、そこに移送された。C) 血液は、収集チャンネル # 2 に切り替えられ、CTC の第 2 の垂集団は、そこに移送された。

30

## 【0334】

## 付加的な側面

本明細書では、(1) 具体的には、被分析物上の少なくとも各マーカーにタグを使用し、各タグによって発せられる信号を除去することに先立って、各タグによって発せられる信号を検出し、信号を検出して低減させるプロセスを繰り返すことによって、流体内の被分析物上に存在する複数のマーカーを識別し、(2) 具体的には、一式の管類および少なくとも 1 つのチャンバに流体的に接続された少なくとも 1 つのチャンネルを備える、マイクロ流体チップにサンプルを導入することによって、細胞の第 1 および第 2 のサブタイプの混合物を含むサンプルから細胞を単離し、(3) 具体的には、少なくとも 1 つのチャンネルを有するマイクロ流体チップに接続された一式の管類を備える装置を使用して、流体サンプルから特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞を分割し、(4) 具体的には、各微小空洞またはマイクロパッチにわずか 1 つの被分析物を含有するよう、複数の微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を使用して、複数の被分析物を分割することによって、被分析物上に存在する複数のマーカーを識別し、(5) 具体的には、少なくとも 1 つのサンプル入力チャンネル、少なくとも 1 つの指向性流チャンネル、および少なくとも 2 つの出力チャンネルを伴うマイクロ流体チップ、およびマイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する電子作動型弁を使用することによって、流体サンプル中の粒子を検出し、(6) 具体的には、希少粒子の存在または非存在に基づいて値をアリコートに割り当

40

50

て、マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する電子作動型弁を開放することにより、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向することによって、マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコート単離し、(7)少なくとも2つの出力チャンネルを伴う、具体的には、微小開口のアレイと流体的に接続される2つの出力チャンネルのうち少なくとも1つを伴うデバイスを使用して、および1つまたはそれを上回る希少粒子を選別するためにデバイスを使用して、流体サンプル中の希少粒子を検出するために、粒子、具体的には、粒子が被分析物であり、被分析物が細胞である、流体サンプルのアリコート中の粒子を分析するための方法および装置が説明される。

#### 【0335】

いくつかの側面では、本開示は、流体中の被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するための方法を提供し、本方法は、(a)放射線源を使用して、第1のタグから信号を検出するステップであって、第1のタグは、被分析物上の第1のマーカーに結合する第1の構造に取り付けられる、ステップと、(b)第1のタグの存在に基づいて被分析物を分割するステップと、第1のタグの信号のレベルを低減させるステップと、(c)被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに取り付けられる、ステップと、(d)第2のタグを検出するステップとを含む。これらの側面のいくつかの実施形態では、第1のタグの信号は、50%超低減させられる。いくつかの側面では、ステップ(a)の分割は、第1のタグおよび第3のタグの存在に基づく。いくつかの側面では、ステップ(a)の分割は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる。いくつかの側面では、ステップ(a)の分割およびステップ(b)における検出は、同一のマイクロ流体デバイス内で起こる。いくつかの側面では、被分析物は、細胞である。いくつかの側面では、細胞は、癌細胞である。いくつかの側面では、癌細胞は、希少細胞である。いくつかの側面では、被分析物は、循環腫瘍細胞である。いくつかの側面では、細胞は、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である。いくつかの側面では、流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される。いくつかの側面では、流体は、全血である。いくつかの側面では、流体は、分画全血である。いくつかの側面では、第1のタグは、抗体である。いくつかの側面では、第1のタグは、フルオロフォアである。いくつかの側面では、第1のタグは、核酸から成るプローブである。いくつかの側面では、ステップ(c)における信号の低減は、放射線を被分析物に印加することによって達成される。いくつかの側面では、放射線は、白色光である。いくつかの側面では、ステップ(c)における信号の低減は、化学物質を第1のタグに適用することによって達成される。いくつかの側面では、化学物質は、還元剤である。いくつかの側面では、還元剤は、ジチオスレイトールである。いくつかの側面では、放射線は、レーザーを使用して印加される。いくつかの側面では、放射線は、発光ダイオード(LED)を使用して印加される。

#### 【0336】

いくつかの側面では、本方法はさらに、第1のタグおよび第2のタグから信号を撮像するステップを含んでもよい。いくつかの側面では、被分析物は、流体中に存在し、流体は、より大きい体積の流体のアリコートである。いくつかの側面では、分割は、半自動的または自動的に行われる。いくつかの側面では、分割は、アンサンプル決定アリコートラング付けによって行われる。いくつかの側面では、各マーカーは、バイオマーカーである。いくつかの側面では、複数のバイオマーカーは、発現プロファイルによって特性評価される。

#### 【0337】

いくつかの側面では、本方法はさらに、被分析物を緩衝剤と接触させるステップを含む。いくつかの側面では、緩衝剤は、固定剤を含有する。いくつかの側面では、緩衝剤は、透過化剤を含有する。いくつかの側面では、緩衝剤は、洗浄緩衝剤である。いくつかの側

10

20

30

40

50

面では、フローサイトメータが、被分析物を分割するために使用されない。いくつかの側面では、ステップ a)における検出時に、被分析物は、組織内の付加的な細胞に接続される細胞ではない。

#### 【0338】

本明細書では、細胞サンプルから細胞を単離するための方法および組成が説明され、いくつかの側面では、細胞サンプルから細胞を単離する方法は、第1の細胞サブタイプと、第2の細胞サブタイプとを含んでもよく、さらに、(a)一式の管類を介してサンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、マイクロ流体チップは、(i)一式の管類に流体的に接続される少なくとも1つのチャンネルと、(ii)少なくとも1つのチャンネル内の細胞の信号を検出するように構成される検出器と、(iii)少なくとも1つのチャンネルに流体的に接続される少なくとも1つのチャンバとを備える、ステップと、(b)検出器を通り過ぎてサンプルの一部分を流動させるステップと、(c)細胞サンプルの一部分内の第1の細胞サブタイプの存在または非存在を検出するために、検出器を使用するステップと、(d)第1の細胞サブタイプが細胞サンプルの一部分内で検出される場合、細胞サンプルのアリコートチャンバの中へ指向するステップであって、アリコートは、第1の細胞サブタイプを含む、ステップと、(e)ステップ(b)-(d)を繰り返し、それによって、チャンバが、サンプル内の第1の細胞サブタイプの総数の80%超、およびサンプル内の第2の細胞サブタイプの総数の5%未満を含むように、チャンバ中の複数のアリコートを単離するステップとを含んでもよい。

10

#### 【0339】

いくつかの側面では、流体に由来するサンプルから特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞を分割するための装置が本明細書で提供され、本装置は、少なくとも1つのチャンネル、およびチャンバを有する、マイクロ流体チップに接続される一式の管類を備え、本装置は、チャンバ中の細胞を単離することが可能であり、単離後、チャンバは、特定のバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の80%超を含み、単離後、チャンバは、異なるバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の5%未満を含む。いくつかの側面では、特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞の単離は、20分未満で起こる。いくつかの側面では、特定のバイオマーカープロファイルは、流体のサンプル中の細胞の5%未満の上に存在する。いくつかの側面では、流体は、血液である。いくつかの側面では、流体は、分画全血である。いくつかの側面では、流体は、全血の有核細胞分画である。

20

30

#### 【0340】

いくつかの側面では、被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するための方法が本明細書で提供され、本方法は、(a)複数の微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を経由して被分析物を流動させることによって、複数の被分析物を分割するステップであって、微小空洞またはマイクロパッチの大部分は、多くても1つの被分析物を含有することが可能であり、微小空洞またはマイクロパッチは、マイクロ流体デバイスの中に位置する、ステップと、(b)微小空洞またはマイクロパッチの中で、各被分析物を、第1のマーカーに結合することが可能である第1の構造と接触させるステップであって、第1の構造は、第1のタグに接続される、ステップと、(c)第1のタグから信号を検出するステップと、第1のタグの信号のレベルを低減させるステップと、(d)被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに接続される、ステップと、(e)第2のタグを検出するステップとを含む。いくつかの側面では、第1のタグの信号は、50%超低減させられる。いくつかの側面では、ステップb)の接触は、微小空洞またはマイクロパッチと流体連通しているチャンネルを通して、第1の構造を備える流体を流動させることによって達成される。いくつかの側面では、ステップb)の接触させるステップに続いて、本方法はさらに、被分析物を洗浄緩衝剤と接触させるステップを含む。いくつかの側面では、被分析物は、細胞である。いくつかの側面では、被分析物は、流体流動によって生成される力、重力、または接着力によって、微小空洞内の固定位置で保持される。いくつかの側面では、各被分析物は、分子相互作用を通

40

50

して微小空洞またはマイクロパッチに接続される。いくつかの側面では、各被分析物は、非共有結合を通して微小空洞に接続される。いくつかの側面では、非共有結合は、ファン・デル・ワールス相互作用、静電結合、疎水結合、または非特異的吸着である。

#### 【0341】

いくつかの側面では、流体サンプル中の粒子を検出するためのデバイスが本明細書で提供され、本デバイスは、少なくとも1つのサンプル入力チャンネル、少なくとも1つの指向性流チャンネル、および少なくとも2つの出力チャンネルを備える、マイクロ流体チップであって、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、サンプル入力チャンネルに交差する、マイクロ流体チップと、マイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する、電子作動型弁であって、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルまたは少なくとも2つの出力チャンネルのうちの少なくとも1つに交差する入力チャンネルを制御することによって、液体の流動を制御する、電子作動型弁と、流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る被分析物を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、アリコート中の被分析物の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることのできるデジタルプロセッサであって、デジタルプロセッサは、検出器および電子作動型弁と通信している、プロセッサとを備える。いくつかの側面では、電子作動型弁は、ソレノイド弁である。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の液体の流動を制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、常時閉であり、電子作動型弁は、コンピュータから信号を受信した後に開放する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、常時開であり、電子作動型弁は、コンピュータから信号を受信した後に閉鎖する。いくつかの側面では、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、少なくとも2つのポートを備え、電子作動型弁は、ポートのうちの1つを通る流体の流動を制御する。いくつかの側面では、本デバイスは、第2の検出器を備える。いくつかの側面では、出力チャンネルのうちの少なくとも1つは、フィルタに流体的に接続される。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルに流れ込むチャンネル中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、1つだけの指向性流チャンネル中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも2つの出力チャンネルのうちの1つの中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも2つの出力チャンネルのうちの1つに流れ込むチャンネル中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、1つまたはそれを上回る合流点で少なくとも2つの出力チャンネルに交差する。いくつかの側面では、本デバイスは、検出器を備える。いくつかの側面では、本デバイスは、確認レーザを備える。いくつかの側面では、検出器は、出力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。いくつかの側面では、確認レーザは、入力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、圧電弁である。

#### 【0342】

いくつかの側面では、マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコートを単離するための方法が本明細書で提供され、アリコートは、希少粒子を含み、本方法は、アリコート中の希少粒子の存在または非存在を検出するステップと、希少粒子の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、電子作動型弁を開放することによって、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向するステップであって、電子作動型弁は、マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップとを含む。いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、サンプル入力チャンネルと、少なくとも2つの出力チャンネルと、少なくとも1つの指向性流チャンネルとを備え、電子作動型弁は、指向性流チャンネル内の流体の流動を制御する。

#### 【0343】

いくつかの側面では、流体サンプル中の希少粒子を検出するためのデバイスが本明細書で提供され、本デバイスは、少なくとも第1のサンプル入力チャンネルと、少なくとも2つ

10

20

30

40

50

の出力チャネルであって、2つの出力チャネルのうちの少なくとも1つは、微小開口のアレイと流体的に接続される、出力チャネルと、流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、第1の出力チャネルを通して、1つまたはそれを上回る希少粒子を含有するアリコートの流動を指向することによって、1つまたはそれを上回る希少粒子を選別するための機構とを備える。いくつかの側面では、機構は、アリコートが希少粒子を含有しない場合、アリコートの流動を第2の出力チャネルの中へ指向する。いくつかの側面では、開口のアレイは、第1のサンプル入力チャネルと少なくとも2つの出力チャネルとの間に配置される。いくつかの側面では、開口のアレイは、第1のサンプル入力チャネルおよび出力チャネルと同一の平面内にある。いくつかの側面では、開口のアレイは、希少粒子が開口を通過することができないが、少なくとも1つの他の粒子が開口を通過することが可能であるように構成される。いくつかの側面では、開口のアレイは、1000個超の開口を備える。いくつかの側面では、希少粒子を選別するための機構は、電極、磁気要素、音響要素、または電子作動型要素を備える。いくつかの側面では、検出器は、カメラ、電子増倍管、電荷結合素子(CCD)画像センサ、光電子増倍管(PMT)、アバランシェフォトダイオード(APD)、単光子アバランシェダイオード(SPAD)、シリコン光電子増倍管(SiPM)、および相補型金属酸化膜半導体(CMOS)画像センサから成る群から選択される。

10

#### 【0344】

種々の側面では、流体内の被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するために方法が提供され、本方法は、(a)放射線源を使用して、第1のタグから信号を検出するステップであって、第1のタグは、被分析物上の第1のマーカーに結合する第1の構造に取り付けられる、ステップと、(b)第1のタグの存在に基づいて被分析物を分割するステップと、(c)第1のタグの信号のレベルを低減させるステップと、(d)被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに取り付けられる、ステップと、(e)第2のタグを検出するステップとを含む。

20

#### 【0345】

いくつかの側面では、第1のタグの信号は、50%超低減させられる。他の側面では、ステップ(a)の分割は、第1のタグおよび第3のタグの存在に基づく。さらなる側面では、ステップ(a)の分割は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる。なおもさらなる側面では、ステップ(a)の分割およびステップ(b)における検出は、同一のマイクロ流体デバイス内で起こる。いくつかの側面では、被分析物は、細胞である。他の側面では、細胞は、癌細胞である。さらなる側面では、癌細胞は、希少細胞である。なおもさらなる側面では、被分析物は、循環腫瘍細胞である。いくつかの側面では、細胞は、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である。他の側面では、流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される。いくつかの側面では、流体は、全血である。さらなる側面では、流体は、分画全血である。なおもさらなる側面では、第1のタグは、抗体である。いくつかの側面では、第1のタグは、フルオロフォアである。いくつかの側面では、第1のタグは、核酸から成るプローブである。他の側面では、ステップ(c)における信号の低減は、放射線を被分析物に印加することによって達成される。さらなる側面では、放射線は、白色光である。なおもさらなる側面では、ステップ(c)における信号の低減は、化学物質を第1のタグに適用することによって達成される。いくつかの側面では、化学物質は、還元剤である。さらなる側面では、還元剤は、ジチオスレイトールである。いくつかの側面では、放射線は、レーザを使用して印加される。他の側面では、放射線は、発光ダイオード(LED)を使用して印加される。さらなる側面では、本方法はさらに、第1のタグおよび第2のタグから信号を撮像するステップを含む。なおもさらなる側面では、被分析物は、流体中に存在し、流体は、より大きい体積の流体のアリコートである。いくつかの側面では、分割は、半自動的また

30

40

50

は自動的に行われる。他の側面では、分割は、アンサンプル決定アリコートランク付けによって行われる。いくつかの側面では、各マーカーは、バイオマーカーである。さらなる側面では、複数のバイオマーカーは、発現プロファイルによって特性評価される。なおもさらなる側面では、本方法はさらに、被分析物を緩衝剤と接触させるステップを含む。いくつかの側面では、緩衝剤は、固定剤を含有する。他の側面では、緩衝剤は、透過化剤を含有する。さらなる側面では、緩衝剤は、洗浄緩衝剤である。なおもさらなる側面では、フローサイトメータが、被分析物を分割するために使用されない。いくつかの側面では、ステップ a) における検出時に、被分析物は、組織内の付加的な細胞に接続される細胞ではない。

#### 【0346】

種々の側面では、第1の細胞サブタイプおよび第2の細胞サブタイプを含む細胞サンプルから細胞を単離するために、(a)一式の管類を介してサンプルをマイクロ流体チップに導入するステップであって、マイクロ流体チップは、(i)一式の管類に流体的に接続される少なくとも1つのチャンネルと、(ii)少なくとも1つのチャンネル内の細胞の信号を検出するように構成される検出器と、(iii)少なくとも1つのチャンネルに流体的に接続される少なくとも1つのチャンバとを備える、ステップと、(b)検出器を通り過ぎて細胞サンプルの一部分を流動させるステップと、(c)細胞サンプルの一部分内の第1の細胞サブタイプの存在または非存在を検出するために、検出器を使用するステップと、(d)第1の細胞サブタイプが細胞サンプルの一部分内で検出される場合、細胞サンプルのアリコートをチャンバの中へ指向するステップであって、アリコートは、第1の細胞サブタイプを含む、ステップと、(e)ステップ(b)、(c)、および(d)を繰り返し、それによって、チャンバが、サンプル内の第1の細胞サブタイプの総数の80%超、およびサンプル内の第2の細胞サブタイプの総数の5%未満を含むように、チャンバ中の複数のアリコートを単離するステップとを含む、方法が提供される。

#### 【0347】

種々の側面では、流体に由来するサンプルから特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞を分割するために装置が提供され、(a)本装置は、少なくとも1つのチャンネル、およびチャンバを有する、マイクロ流体チップに接続される一式の管類を備え、(b)本装置は、チャンバ中の細胞を単離することが可能であり、単離後、チャンバは、特定のバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の80%超を含み、単離後、チャンバは、異なるバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の5%未満を含む。いくつかの側面では、特定のバイオマーカープロファイルを発現する細胞の単離は、20分未満で起こる。他の側面では、特定のバイオマーカープロファイルは、流体のサンプル中の細胞の5%未満の上に存在する。さらなる側面では、流体は、血液である。なおもさらなる側面では、流体は、分画全血である。いくつかの側面では、流体は、全血の有核細胞分画である。

#### 【0348】

種々の側面では、被分析物上に存在する複数のマーカーを識別するために方法が提供され、本方法は、(a)複数の微小空洞またはマイクロパッチを備える基板を經由して被分析物を流動させることによって、複数の被分析物を分割するステップであって、微小空洞またはマイクロパッチの大部分は、多くても1つの被分析物を含有することが可能であり、微小空洞またはマイクロパッチは、マイクロ流体デバイスの中に位置する、ステップと、(b)微小空洞またはマイクロパッチの中で、各被分析物を、第1のマーカーに結合することが可能である第1の構造と接触させるステップであって、第1の構造は、第1のタグに接続される、ステップと、(c)第1のタグから信号を検出するステップと、(d)第1のタグの信号のレベルを低減させるステップと、(e)被分析物を、第2のマーカーに結合する第2の構造と接触させるステップであって、第2の構造は、第2のタグに接続される、ステップと、(f)第2のタグを検出するステップとを含む。

#### 【0349】

いくつかの側面では、第1のタグの信号は、50%超低減させられる。他の側面では、

10

20

30

40

50

ステップ b の接触は、微小空洞またはマイクロパッチと流体連通しているチャンネルを通して、第 1 の構造を備える流体を流動させることによって達成される。さらなる側面では、ステップ ( b ) の接触させるステップに続いて、本方法はさらに、被分析物を洗浄緩衝剤と接触させるステップを含む。なおもさらなる側面では、被分析物は、細胞である。いくつかの側面では、被分析物は、流体流動によって生成される力、重力、または接着力によって、微小空洞内の固定位置で保持される。他の側面では、各被分析物は、分子相互作用を通して微小空洞またはマイクロパッチに接続される。

さらなる側面では、各被分析物は、非共有結合を通して微小空洞に接続される。なおもさらなる側面では、非共有結合は、ファン・デル・ワールス相互作用、静電結合、疎水結合、または非特異的吸着である。

#### 【 0 3 5 0 】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を検出するためにデバイスが提供され、本デバイスは、( a ) 少なくとも 1 つのサンプル入力チャンネル、少なくとも 1 つの指向性流チャンネル、および少なくとも 2 つの出力チャンネルを備える、マイクロ流体チップであって、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルは、サンプル入力チャンネルに交差する、マイクロ流体チップと、( b ) マイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する、電子作動型弁であって、電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルまたは少なくとも 2 つの出力チャンネルのうちの少なくとも 1 つに交差する入力チャンネルを制御することによって、液体の流動を制御する、電子作動型弁と、( c ) 流体サンプルのアリコート中の 1 つまたはそれを上回る被分析物を検出することが可能な少なくとも 1 つの検出器と、( d ) アリコート中の被分析物の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることのできるデジタルプロセッサであって、デジタルプロセッサは、検出器および電子作動型弁と通信している、プロセッサとを備える。いくつかの側面では、電子作動型弁は、ソレノイド弁である。他の側面では、電子作動型弁は、少なくとも 1 つの指向性流チャンネル中の液体の流動を制御する。

#### 【 0 3 5 1 】

さらなる側面では、電子作動型弁は、常時閉であり、電子作動型弁は、コンピュータから信号を受信した後に開放する。なおもさらなる側面では、電子作動型弁は、常時開であり、電子作動型弁は、コンピュータから信号を受信した後に閉鎖する。いくつかの側面では、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルは、少なくとも 2 つのポートを備え、電子作動型弁は、ポートのうちの 1 つを通る流体の流動を制御する。他の側面では、本デバイスは、第 2 の検出器を備える。さらなる側面では、出力チャンネルのうちの少なくとも 1 つは、フィルタに流体的に接続される。

#### 【 0 3 5 2 】

種々の側面では、マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコートを単離するために方法が提供され、アリコートは、希少粒子を含み、本方法は、( a ) アリコート中の希少粒子の存在または非存在を検出するステップと、( b ) 希少粒子の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、( c ) 電子作動型弁を開放することによって、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向するステップであって、電子作動型弁は、マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップとを含む。

#### 【 0 3 5 3 】

いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、サンプル入力チャンネルと、少なくとも 2 つの出力チャンネルと、少なくとも 1 つの指向性流チャンネルとを備え、電子作動型弁は、指向性流チャンネル内の流体の流動を制御する。

#### 【 0 3 5 4 】

種々の側面では、流体サンプル中の希少粒子を検出するためにデバイスが提供され、本デバイスは、( a ) 少なくとも第 1 のサンプル入力チャンネルと、( b ) 少なくとも 2 つの出力チャンネルであって、2 つの出力チャンネルのうちの少なくとも 1 つは、微小開口のアレイと流体的に接続される、出力チャンネルと、( c ) 流体サンプルのアリコート中の 1 つま

10

20

30

40

50

たはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)第1の出力チャンネルを通して、1つまたはそれを上回る希少粒子を含有するアリコートの流動を指向することによって、1つまたはそれを上回る希少粒子を選別するための機構とを備える。

【0355】

いくつかの側面では、機構は、アリコートが希少粒子を含有しない場合、アリコートの流動を第2の出力チャンネルの中へ指向する。いくつかの側面では、開口のアレイは、第1のサンプル入力チャンネルと少なくとも2つの出力チャンネルとの間に配置される。いくつかの側面では、開口のアレイは、第1のサンプル入力チャンネルおよび出力チャンネルと同一の平面内にある。いくつかの側面では、開口のアレイは、希少粒子が開口を通過することができないが、少なくとも1つの他の粒子が開口を通過することが可能であるように構成される。いくつかの側面では、開口のアレイは、1000個超の開口を備える。いくつかの側面では、希少粒子を選別するための機構は、電極、磁気要素、音響要素、または電子作動型要素を備える。いくつかの側面では、検出器は、カメラ、電子倍增管、電荷結合素子(CCD)画像センサ、光電子倍增管(PMT)、アバランシェフォトダイオード(APD)、単光子アバランシェダイオード(SPAD)、シリコン光電子倍增管(SiPM)、および相補型金属酸化膜半導体(CMOS)画像センサから成る群から選択される。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、1つだけの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも2つの出力チャンネルのうちの一つの中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも2つの出力チャンネルのうちの一つに流れ込むチャンネル中の液体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、1つまたはそれを上回る合流点で少なくとも2つの出力チャンネルに交差する。いくつかの側面では、本デバイスは、検出器を備える。いくつかの側面では、本デバイスは、確認レーザを備える。いくつかの側面では、検出器は、出力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。いくつかの側面では、確認レーザは、入力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、圧電弁である。

10

20

30





【 図 9 】

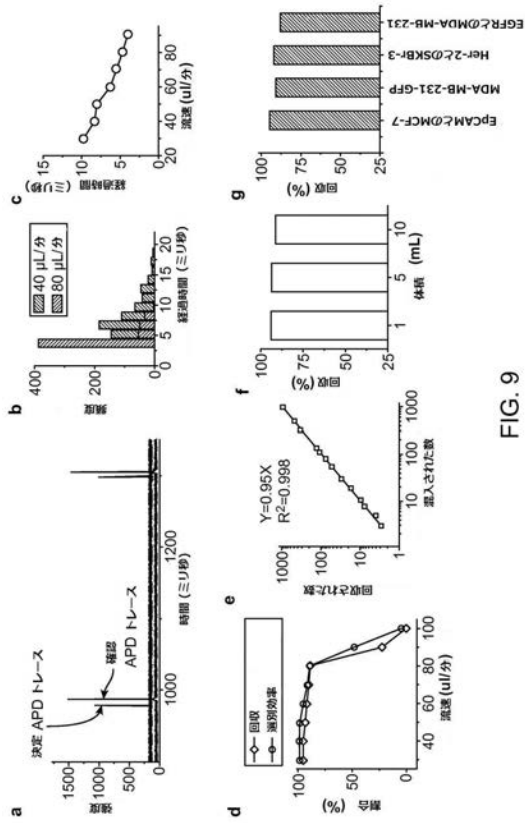


FIG. 9

【 図 1 0 】

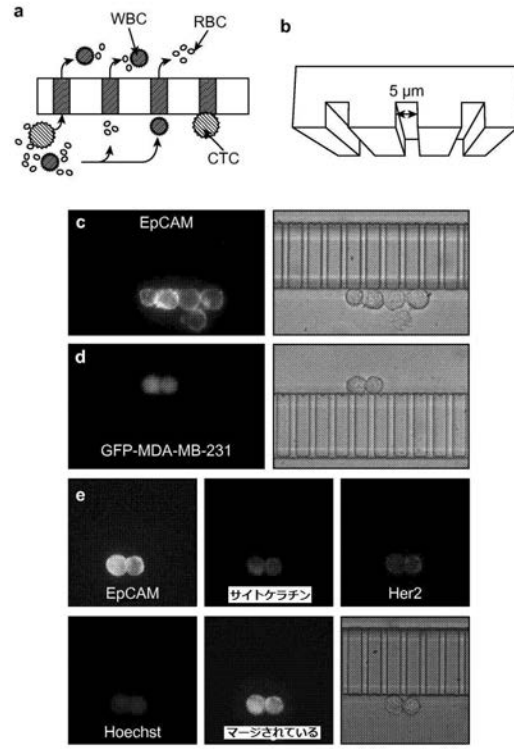


FIG. 10

【 図 1 1 】

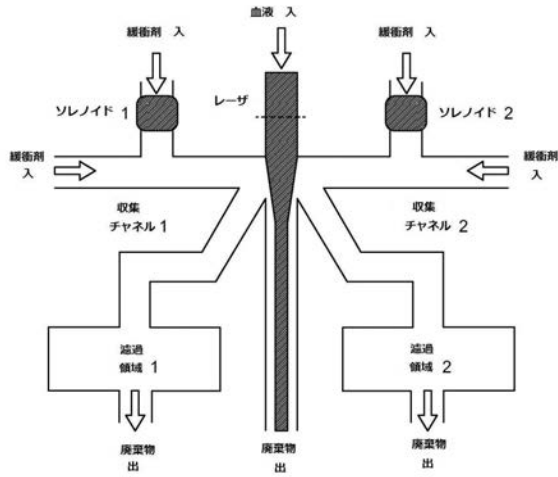


FIG. 11

【 図 1 2 】

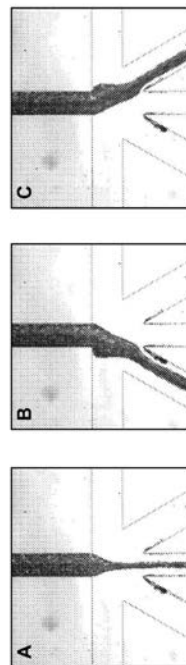


FIG. 12

【 図 1 3 】

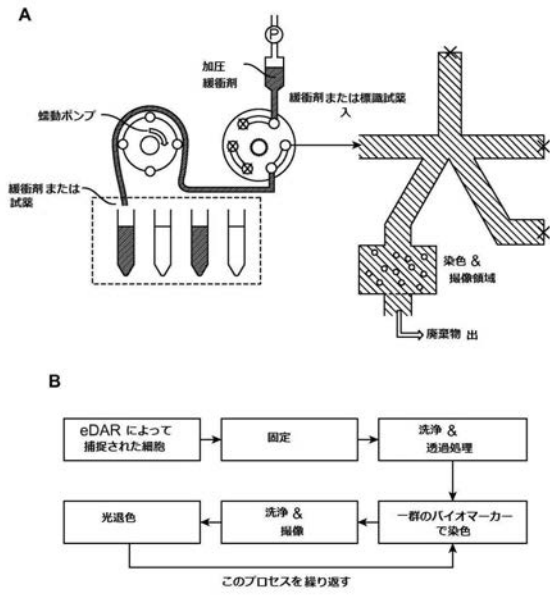
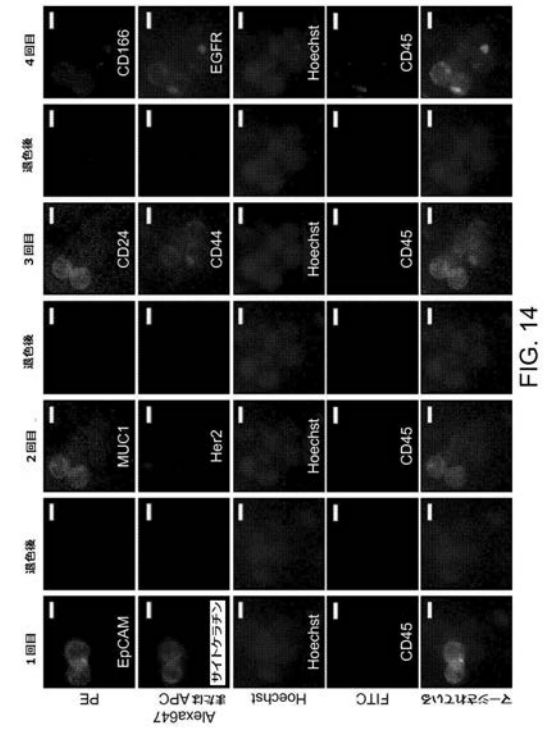


FIG. 13

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

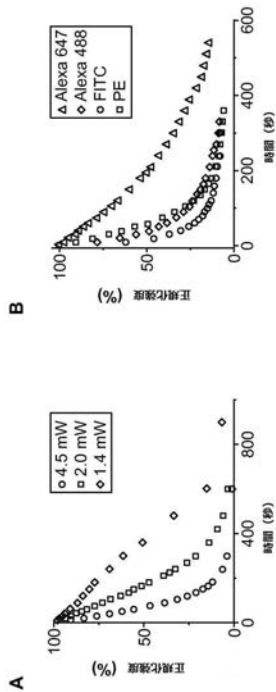


FIG. 15

【 図 1 6 】

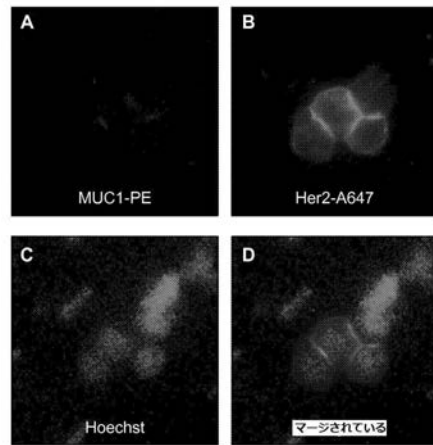


FIG. 16

【 図 17 】

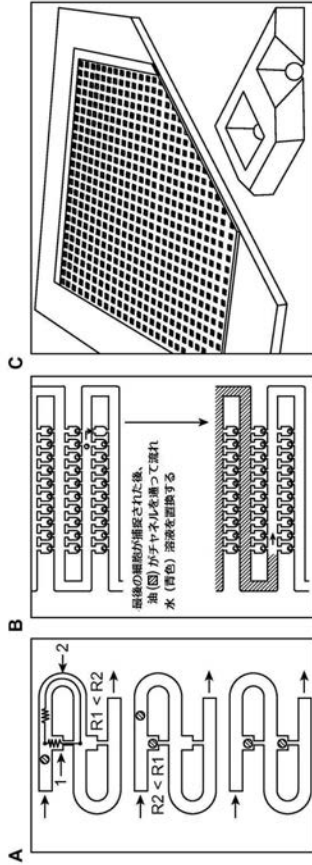


FIG. 17

【 図 18 】

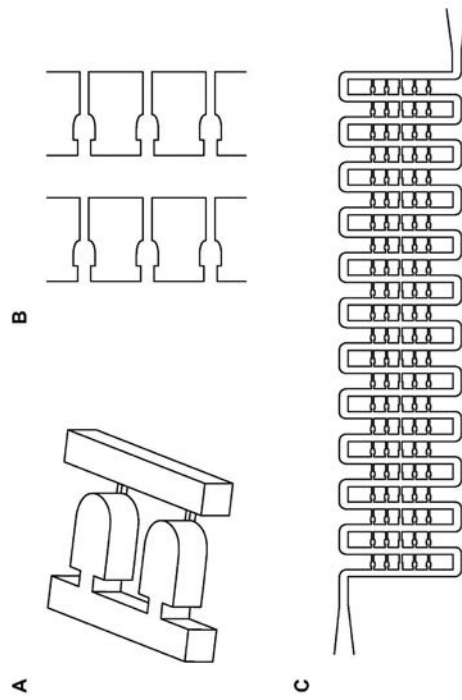


FIG. 18

【 図 19 】

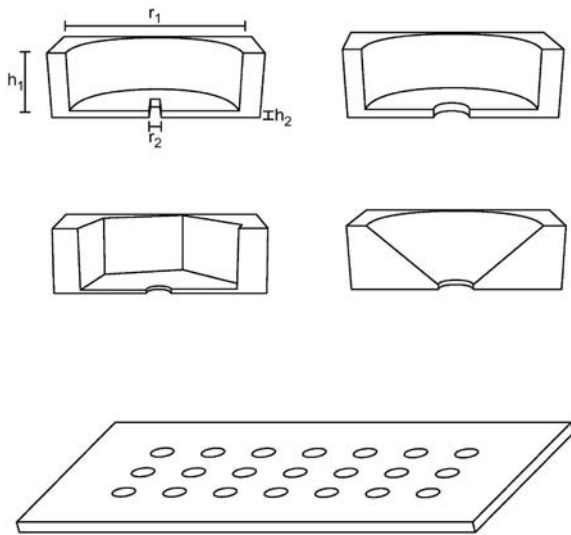


FIG. 19

【 図 20 】

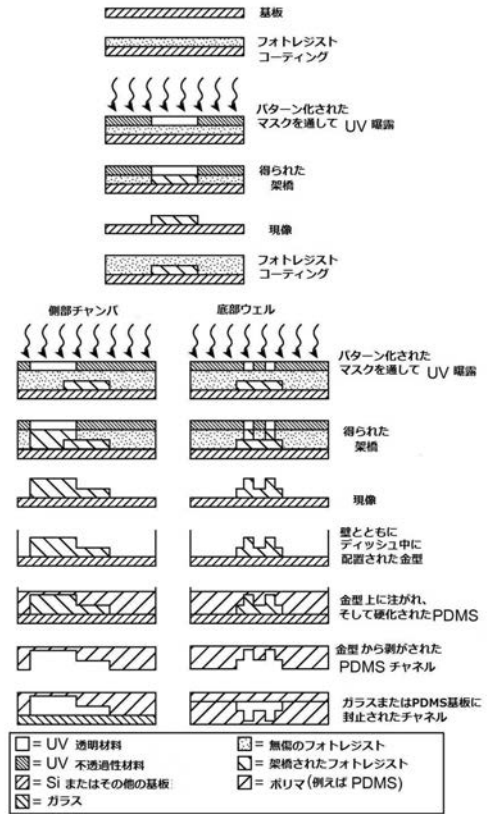


FIG. 20

【 図 2 1 】

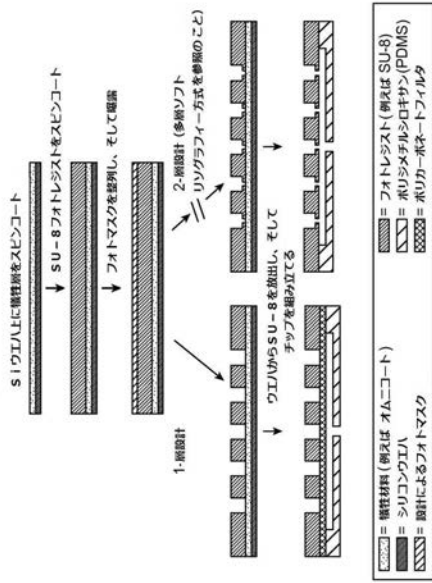


FIG. 21

【 図 2 2 】

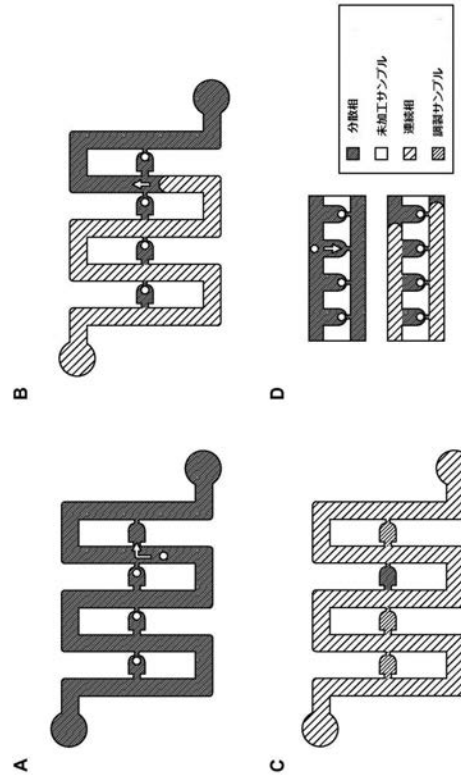


FIG. 22

【 図 2 3 】

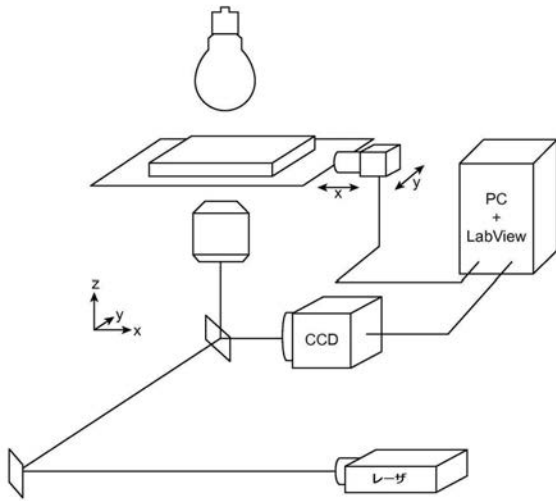


FIG. 23

【 図 2 4 】

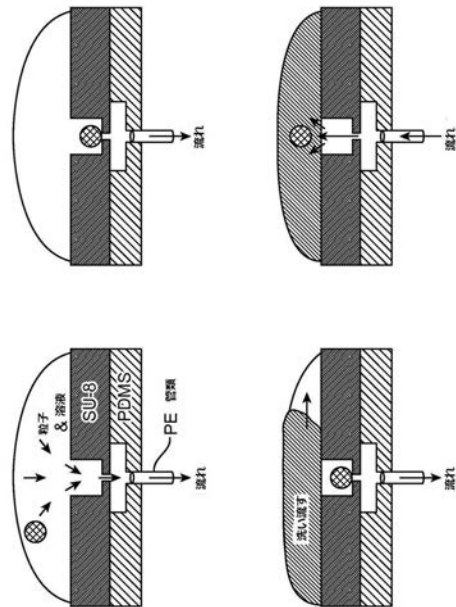


FIG. 24

【 図 2 5 】

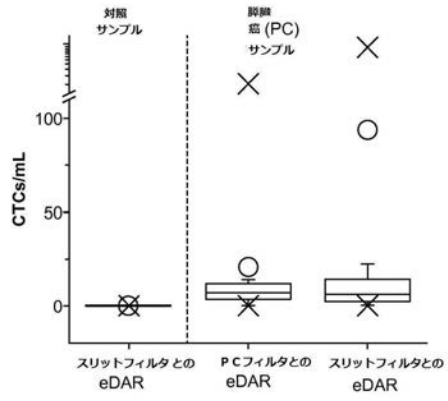


FIG. 25

【 図 2 6 】

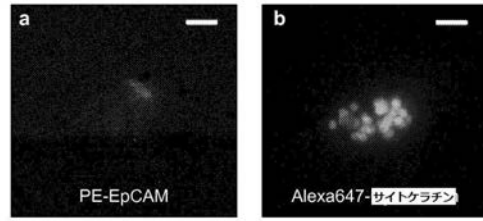


FIG. 26

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 Q 1/04

## 2 . T E F L O N

(74)代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332  
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ダニエル ティー . チウ  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 - 4 6 0 8 , シアトル , 1 1 ティーエイチ アベニ  
ュー エヌイー 4 3 1 1 , スイート 5 0 0

(72)発明者 メンシア ザオ  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 - 4 6 0 8 , シアトル , 1 1 ティーエイチ アベニ  
ュー エヌイー 4 3 1 1 , スイート 5 0 0

(72)発明者 ワИАット ネルソン  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 - 4 6 0 8 , シアトル , 1 1 ティーエイチ アベニ  
ュー エヌイー 4 3 1 1 , スイート 5 0 0

(72)発明者 ペリー ジー . スキロ  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 - 4 6 0 8 , シアトル , 1 1 ティーエイチ アベニ  
ュー エヌイー 4 3 1 1 , スイート 5 0 0

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB04 CB07 CB11 CB12 CB14  
4B029 AA07 BB02 BB11 BB15 BB20 CC01 DG08 FA01 FA15  
4B063 QA18 QQ02 QQ06 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR75 QR77 QS36  
QS39 QX01

【外国語明細書】

2019191190000001.pdf

专利名称(译)	用于微流体分析的方法，成分和系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019191190A</a>	公开(公告)日	2019-10-31
申请号	JP2019123063	申请日	2019-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	华盛顿大学		
申请(专利权)人(译)	华盛顿大学通过它的中心联合金属玛西娅		
[标]发明人	ダニエルティーチウ		
发明人	ダニエル ティー. チウ メンシア ザオ ワイアット ネルソン ペリー ジー. スキロ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C12M1/34 C12M1/00 C12Q1/04		
CPC分类号	B01L3/502738 B01L3/502761 B01L3/502776 B01L2200/0652 B01L2200/0668 B01L2200/0673 B01L2300/0816 B01L2300/0864 B01L2300/0883 B01L2400/0406 B01L2400/0415 B01L2400/0487 B01L2400/0633 G01N15/0612 G01N15/0618 G01N15/0656 G01N15/1456 G01N15/1484 G01N21 /6428 G01N21/6456 G01N33/49 G01N35/0098 G01N2015/0681 G01N2015/0693 G01N2015/1006 G01N2015/149 G01N2035/00237 G01N2035/00356 G01N2035/1034 B01L3/561 B01L3/567 B01L2200 /10 B01L2300/0636 B01L2300/0681 B01L2300/0832 B01L2400/06 B01L2400/086 G01N33/5304 G01N33/57492		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.M G01N33/48.Z C12M1/34.B C12M1/00.A C12Q1/04		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045 /CB12 2G045/CB14 4B029/AA07 4B029/BB02 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/DG08 4B029/FA01 4B029/FA15 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063 /QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/843252 2013-07-05 US 61/894788 2013-10-23 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供一种用于微流体分析的方法，组合物和系统。解决方案：在一些方面中，本文提供了一种用于分析样品中的颗粒的方法和设备。在一些方面，颗粒可以是分析物，细胞，核酸或蛋白质，并与标签接触，被分成等分试样，由分级装置检测并分离。本文提供的方法和设备可以包括微流体芯片。在某些方面，该方法和装置可用于量化样品中的稀有颗粒，例如癌细胞和其他稀有细胞，以进行疾病诊断，预后或治疗。选图：图1

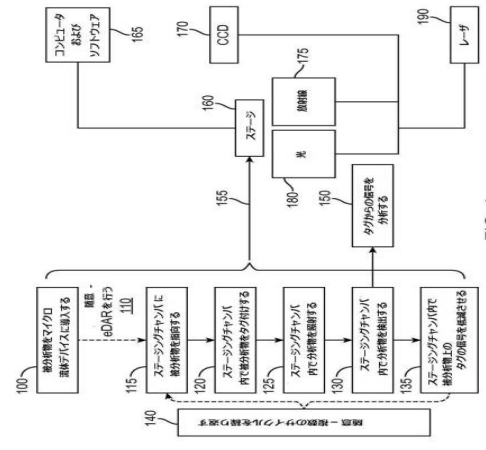


FIG. 1