

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-521456
(P2021-521456A)

(43) 公表日 令和3年8月26日(2021.8.26)

(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 5 8
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	4 B O 2 9
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B O 6 3
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 35/08 B	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-557192 (P2020-557192)
 (86) (22) 出願日 平成31年4月18日 (2019. 4. 18)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月8日 (2020. 12. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/060210
 (87) 国際公開番号 W02019/202135
 (87) 国際公開日 令和1年10月24日 (2019. 10. 24)
 (31) 優先権主張番号 18168084. 4
 (32) 優先日 平成30年4月18日 (2018. 4. 18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 519328604
 ハイファイバイオ エスアエス
 フランス国 75014 パリ, リュ
 ド フォーブール サンジャック 29
 (74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子
 (74) 代理人 100185384
 弁理士 伊波 興一朗
 (74) 代理人 100137811
 弁理士 原 秀貢人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一細胞の分析のためのマイクロ流体方法

(57) 【要約】

本発明の第1の態様は、マイクロ流体システムにおける目的化合物の検出のための方法に関する。本発明の第2の態様は、生物学的イベントを監視するための第1の態様に係る方法の使用に関する。本発明のさらなる態様は、第1の態様に係る方法を実施するためのマイクロ流体システムおよびその使用に関する。

【選択図】 図1A - 1B

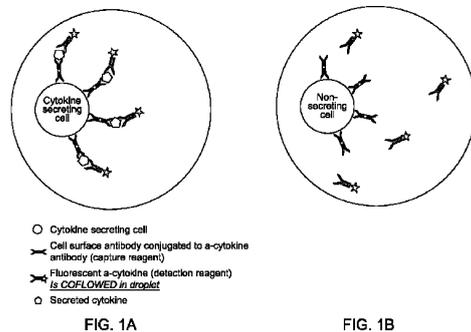


FIG. 1A

FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロ流体システムにおける目的化合物の検出のための方法であって、以下のステップを含む：

a．前記マイクロ流体システムにおいて少なくとも 1 つの液滴を作製するステップ、前記少なくとも 1 つの液滴は以下を含む：

i．少なくとも 1 つの単一細胞、

ii．1 または複数の第 1 の捕捉試薬、

ここで前記 1 または複数の第 1 の捕捉試薬は、前記単一細胞および前記目的化合物に結合することが可能である、

10

iii．標識を含んでいる 1 または複数の第 2 の捕捉試薬、

ここで前記 1 または複数の第 2 の捕捉試薬は、前記目的化合物に結合することが可能である、

b．検出可能なイベントを生じさせることが可能な前記少なくとも 1 つの液滴をインキュベートするステップ、

c．前記少なくとも 1 つの液滴を直接検出に供するステップ、

ここで、前記少なくとも 1 つの液滴内での前記検出可能なイベントの存在または再局在化は、前記目的化合物の存在を決定する、方法。

【請求項 2】

20

請求項 1 に記載の方法であって、

前記 1 または複数の第 1 の捕捉試薬は、前記の少なくとも 1 つの単一の液滴の作製前または作製後に、前記少なくとも 1 つの単一細胞の表面に結合する、方法。

【請求項 3】

請求項 1 および 2 のいずれかに記載の方法であって、

前記 1 または複数の第 1 の捕捉試薬は、 $10^1 \sim 10^8$ 分子 / 細胞の範囲の密度で前記単一細胞に結合する、方法。

【請求項 4】

30

請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法であって、

前記目的化合物は、 $10 \text{ pM} \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ の濃度で前記液滴において生産される、方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法であって、

前記液滴は、 $2 \text{ pL} \sim 10 \text{ nL}$ の範囲の容量を有する、方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法であって、

前記方法は、インキュベーション後に液滴における細胞生存能力を測定するステップをさらに含む、方法。

40

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法であって、

前記標識は、蛍光標識、アミノ酸に基づく標識または核酸に基づく標識、またはバーコード標識を含む群から選択される、方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法であって、

前記第 1 の捕捉試薬および前記第 2 の捕捉試薬は、タンパク質、ペプチド、オリゴヌク

50

レオチド、核酸、蛍光コンジュゲート、酵素コンジュゲート、合成ポリマー、またはそれらの組み合わせを含む群から独立に選択される、方法。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法であって、

前記第 1 の捕捉試薬は抗体であり、前記第 2 の捕捉試薬は、蛍光性の抗 - 目的化合物抗体である、方法。

【請求項 10】

請求項 9 の方法であって、

前記第 1 の捕捉試薬は二官能性抗体である、方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法であって、

ここで前記目的化合物は、細胞によって分泌される化合物であり、制限されないが、抗体 (I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、I g E、I g A (I g A 1、I g A 2)、I g M、サイトカイン (I L - 1 様、I L - 1、I L - 1、I L - 1 R A、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6 様、I L - 6、I L - 7、I L - 9、I L - 10 様、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 20、共通 b 鎖 (C D 13 1)、L I F、O S M、インターフェロン類 (I F N -、I F N -、I F N -)、T N F、T N F -、T N F -、C D 15 3、C D 15 4、L T -、4 - 1 B B L、A P R I L、C D 7 0、C D 13 2、C D 17 8、G I T R L、L I G H T、O X 4 0 L、T A L L - 1、T R A I L、T W E A K、T R A N C E、T G F -、T p o、F l t - 3 L、S C F、M - C S F、M S P)、ケモカイン (C C L 1、C C L 2、C C L 3、C C L 4、C C L 5、C C L 6、C C L 7、C C L 8、C C L 9 / C C L 10、C C L 11、C C L 12、C C L 13、C C L 14、C C L 15、C C L 16、C C L 17、C C L 18、C C L 19、C C L 20、C C L 21、C C L 22、C C L 23、C C L 24、C C L 25、C C L 26、C C L 27、C C L 28、C X C L 1、C X C L 2、C X C L 3、C X C L 4、C X C L 5、C X C L 6、C X C L 7、C X C L 8、C X C L 9、C X C L 10、C X C L 11、C X C L 12、C X C L 13、C X C L 14、C X C L 15、C X C L 16、C X C L 17、X C L 1、X C L 2、C X 3 C L 1)、ホルモン類 (エストロゲン、プロゲステロン類、チロキシン、ステロイド、インスリン、アドレナリンエピネフリン、メラトニン、トリヨードチロニン、チロキシン、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類、プロスタサイクリン、セロシス (T h e r o c i s)、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン (またはコルチコトロピン)、アミリン (または膵島アミロイドポリペプチド)、アンジオテンシノーゲンおよびアンジオテンシン、抗ミューラー管ホルモン (または、ミューラー管阻害因子もしくはホルモン)、抗利尿ホルモン (または、バソプレシン、アルギニンバソプレシン)、心房性ナトリウム利尿ペプチド (またはアトリオペプチン)、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトロピン放出ホルモン、コルチスタチン、エンドセリン、エンケファリン、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、ガラニン、胃抑制ポリペプチド、ガストリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド - 1、ゴナドトロピン分泌ホルモン、グアニリン、ヘブシジン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、インヒピン、インスリン、インスリン様増殖因子 (またはソマトメジン)、レプチン、リポトロピン、メラニン細胞刺激ホルモン、モチリン、オレキシン、オステオカルシン、オキシトシン、リラキシン、レニン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポエチン、ウログアニリン、血管作用性小腸ペプチド、ステロイド、エストロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン、セコステロイド)、増殖因子 (G - C S F、G M - C S F、F a s - リガンド、アドレノメデュリン (A M)、アンジオポエチン (A n g)、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質 (B M P)、毛様体神経栄養因子ファミリー、毛様体神経栄養因

10

20

30

40

50

子 (CNTF)、白血病抑制因子 (LIF)、インターロイキン - 6 (IL - 6)、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子 (m - CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、上皮増殖因子 (EGF)、エフリン (A1 - A5、B1 - B3)、エリスロポエチン (EPO)、線維芽細胞増殖因子 (FGF1 - FGF23)、ウシ胎児ソマトトロピン (Foetal Bovine Somatotrophin) (FBS)、リガンドのGDNFファミリー、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、ニューロツリン、パーセフィン、アルテミン、増殖分化因子 - 9 (GDF9)、肝細胞増殖因子 (HGF)、肝癌由来増殖因子 (HDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子、インスリン様増殖因子 - 1 (IGF - 1およびIGF - 2)、インターロイキン類；IL - 1 - すなわち、IL - 3およびIL - 6の補因子、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、遊走刺激因子 (MSF)、肝細胞増殖因子様タンパク質 (HGFLP)としても知られるマクロファージ刺激タンパク質 (MSP)、ミオスタチン (GDF - 8)、ニューレグリン類 (NRG1 - NRG4)、ニューロトロフィン類、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン - 3 (NT - 3)、ニューロトロフィン - 4 (NT - 4)、胎盤増殖因子 (PGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、レナラーゼ (Renalase) (RNL5) - 抗 - アポトーシス生存因子、T細胞増殖因子 (TCGF)、トロンボポエチン (TPO)、形質転換増殖因子 (TGF - 、TGF - (TGF - 1、TGF - 2、TGF - 3))、腫瘍壊死因子 - (TNF -)、血管内皮増殖因子 (VEGF))を含む群から選択される、

【請求項12】

請求項1から11のいずれかに記載の方法の使用であって、
生物学的イベントを監視するための、
使用。

【請求項13】

請求項12に記載の方法の使用であって、
前記生物学的イベントは免疫応答またはその調節である、
使用。

【請求項14】

液滴における目的化合物の検出のための方法であって、
以下のステップ：

a . 以下を備えるマイクロ流体システムを提供するステップ：

- i . 少なくとも1つの入口、
- ii . 少なくとも1つの出口、
- iii . 1または複数のチャネル、

b . 前記マイクロ流体システム内に液滴の流れを注入するステップ、
ここで少なくとも1つの液滴は以下を含む：

i . 少なくとも1つの単一細胞

ii . 前記単一細胞および前記目的化合物に結合することが可能な複数の第1の捕捉試薬、および

iii . それぞれが標識を含んでいる複数の第2の捕捉試薬、

ここで前記複数の第2の捕捉試薬は前記目的化合物に結合することが可能である、

c . 目的化合物の生産を可能にする条件下で複数の液滴をインキュベートするステップ、
それにより、目的化合物が単一細胞によって生産される場合は、前記複数の第1の捕捉試薬および第2の捕捉試薬によって捕捉される、

d . 前記標識の存在または再局在化を検出するステップを用いて、目的化合物の存在を
判定するステップ、

を含む、

方法。

【請求項 15】

マイクロ流体システムであって、

- a . 少なくとも 1 つの入口、
 - b . 少なくとも 1 つの出口、
 - c . 1 または複数のチャネル、
 - d . 以下を含んでいる少なくとも 1 つの液滴を作製するためのモジュール：
 - i . 1 または複数の単一細胞、
 - i i . 第 1 の捕捉試薬、
 - i i i . 第 2 の捕捉試薬、
 - e . 目的化合物を産生している細胞を含む液滴を検出する検出モジュール、および
 - f . シグナルの分析のために構成された分析モジュール、
- を備える、

マイクロ流体システム。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のマイクロ流体システムの使用であって、

請求項 1 から 11 または 14 のいずれかに記載の方法を実施するための、
使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞生物学および分子生物学の分野であり、液滴内において、単一細胞によって生産された目的化合物を検出するための方法に基づく。本発明はまた、マイクロ流体の分野にも関し、マイクロ流体デバイスおよび生物学的アッセイを実施するためのその使用を包含する。

【背景技術】

【0002】

薬物発見プログラムにおけるステップの 1 つは、その期待される生物学的効果に基づく薬物候補の検証に関する。その目的で、インビボまたはインビトロのいずれかのモデルを用いることができる。一方で、インビボ実験は、生体全体に対する疑問を対処するという利点を有する。しかしながら、動物モデルは必ずしもヒトで起こることの予測とはならない。さらに、インビボ試験は高価であり、その使用は倫理規定によって制限される。他方で、インビトロ系は、生物の正確な細胞状態を模写することはできないが、ヒト細胞に対して実施することができ、ハイスループットが必要とされるスクリーニング工程の場合に特に適切である。これらの細胞に基づくアッセイは通常、目的の細胞に対してバルクで実施される。しかしながら、特定の状況においては、免疫細胞に関する場合のように、それぞれが独特であり、単一細胞レベルでの機能的な細胞に基づくアッセイの必要性が非常に興味深い。実際に、混合集団において免疫応答を測定することは、特に、免疫応答が非常に不均一である場合または稀な細胞集団によるものである場合に、それぞれの単一細胞の独特な挙動または寄与を隠してしまうリスクを増大させる。したがって、細胞間の潜在的変動をより理解するためには、個々の細胞表現型を考慮した単一細胞に基づくアッセイが必要である。

【0003】

単一細胞の分析方法における最近の進展は、集団内の細胞間の関係を特性化することによって単一細胞内での生物学的理解を改善させた。したがって、稀な細胞イベントまたは個々の細胞間の小さな変化を決定することにより、癌、免疫学、感染性疾患、幹細胞および発生生物学および神経学の分野における未解明の疑問を対処することが可能である。

【0004】

免疫細胞は、抗体、ケモカインおよびサイトカインを産生することによって、疾患に対して宿主生物を防御している。この前者の分子クラスは、化学的メッセンジャーとして作

10

20

30

40

50

用している、先天性および適応性の免疫細胞によって分泌されるタンパク質のグループである。免疫細胞によるそれらの産生は、免疫応答を引き起こす体の能力に起因していて、したがって高い臨床診断価値を有する。したがって、抗体およびサイトカイン分泌の動態学の両方とも調べることは、疾患の診断および個別化治療に重大な情報を与え得る。

【0005】

しかしながら、個々の分泌細胞を分析するための定量的な単一細胞のハイスループットのシステムが存在しないため、免疫応答の動態学に関する研究は制限されている。

【0006】

最近になって、液滴に基づくマイクロ流体システムが、細胞生物学へ向けたその適用範囲のため、および、機械的、生物学的および流動的な環境を単一細胞レベルで制御するその能力に基づき、大きな興味を惹きつけている。この技術は、アッセイが非常に急速に行われるのを可能にする（1秒あたり何千もの細胞および/または液滴）。さらに、このシステムは、マクロスケール（ピコまたはナノリットルの容量のサンプルおよび試薬）の細胞培養実験を提供し、生物学的サンプルは液滴内に収容されていて、高濃度の化合物（pM ~ μMの範囲）の迅速な検出を可能にする。さらに、そのシステムは、迅速な混合、熱伝導、および化学反応を可能にするが、サンプル喪失および相互汚染を最小にする。興味深いことに、この技術は、単一細胞レベルでの大スケールの遺伝子型および表現型スクリーニングの実施の可能性を提供する。

10

【0007】

ここ数年間で、単一細胞分析のための異なるマイクロ流体デバイスおよびシステムが提案されている（Gross et al., 2015, Int. J. Mol. Sci. 16 (8): 16897 - 16919; Reece et al., 2016, Curr. Opin. Biotechnol. 40: 90 - 96）。

20

【0008】

マイクロ流体における細胞ソーティングのための異なる方法および技術が提案されている。ソーティングの原理は、主に2つのカテゴリー：サイズ、変形能、電気的または光学的特性のような細胞の物理的特性に基づく方法、および、生体分子特性、とりわけ特異的な表面抗原に基づく方法に分類される。

【0009】

高純度の細胞分離およびソーティングは、細胞の構成要素に結合するモノクローナル抗体を用いて達成され得る。広く用いられている抗体に基づいた細胞分析および/または分離技術には、細胞パンニング、磁気細胞ソーティング（MACS）、および、蛍光活性化液滴ソーティング（FADS）を含む蛍光活性化セルソーティング（FACS）が含まれる。

30

【0010】

細胞パンニング技術では、特異的な抗原を発現している細胞は、抗体によって覆われた表面上に選択的に付着することができる。この技術は高い純度を提供することができるにもかかわらず、高い細胞損失または細胞生存能力に対する影響などのいくつかの制限によって影響を受ける。

【0011】

フローサイトメトリーによる単一細胞ソーティングのような他の細胞パンニング技術では、特異的な分子を分泌している細胞は、抗体によって覆われた表面のように細胞表面または細胞外マトリックスに結合した抗体によって選択的に捕捉され得る（Campbell et al., 2010, J. Immunol. 185: 28 - 32; Manz et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1921 - 1925）。この技術は、フローサイトメーターと組み合わせた場合に単一細胞レベルで分泌分子を検出することができるにもかかわらず、細胞濃度に起因した高いバックグラウンド（したがって細胞純度に影響する）、および分泌に基づいた定量的分離ができないこと、およびリアルタイムで定量的な分泌速度の測定ができないことなどの、いくつかの制限によって影響を受ける。

40

50

【0012】

MACSは、細胞表面上の特異的な抗原を捕捉するために抗体コンジュゲート磁気ビーズを用いる。磁気ビーズでラベルされた細胞集団は、永久磁石によって生じた磁場の下で選択的に回収することができる。MACSは、大いにハイスループットを可能にするが、単一細胞ソーティングではなく、FACSよりも純度が低い。別の顕著な制限は、分離後のビーズの解離および除去が難しいことであり、そのことは後の分析を妨げ得る。

【0013】

細胞分離の別の例示は、ビーズライン (bead line) として用いられる、磁気ビーズ粒子の使用に基づくマイクロ流体方法の使用である。その方法は国際特許出願WO2016/059182A1に開示されていて、各液滴は、分泌分子の発生を検出することを目的とする、磁気ビーズのカラムを形成している粒子の凝集体の存在によって特徴付けられ、ビーズライン上に前記分子を捕捉して前記ヘッドラインの上にエレメントを検出するシステムを用いるものである。WO2016/059182A1に提案されるこの方法の利点は、単一細胞レベルで分泌分子を評価することが可能である点である。しかしながら、WO2016/059182A1に開示される方法は、粒子凝集体の存在に依存した方法であり、したがって、同一区画内の様々な細胞を必要とする精巧なアッセイを妨げる。このアッセイは、内因性の柔軟性の制限に悩まされる。さらに、粒子凝集体の結合能力によって感度が本質的に制限される。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0014】

一般に、分泌された分子に基づいて単一細胞を分析および/分離するために現在利用可能な方法に影響を及ぼす制限には、低い効率または低い収率/回収、分離工程における細胞生存能力/機能の劣化、信頼性の低さ、柔軟性の低さおよび/または1秒あたりに単離される単一細胞の観点からの低スループットが含まれる。したがって、上述の問題を対処するためには、化合物を分泌している単一細胞を分析および分離するための改善されたマイクロ流体方法が非常に必要とされることが明らかである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の第1の態様は、マイクロ流体システムにおける目的化合物の検出のための方法に関し、その方法は以下のステップを含む：

30

a. 前記マイクロ流体システムにおいて少なくとも1つの液滴を作製するステップであって、前記少なくとも1つの液滴は以下を含む：

i. 少なくとも1つの単一細胞、

ii. 1または複数の第1の捕捉試薬、ここで前記1または複数の第1の捕捉試薬は、前記単一細胞および前記目的化合物に結合することが可能である、

iii. 標識を含んでいる1または複数の第2の捕捉試薬、ここで前記1または複数の第2の捕捉試薬は、前記目的化合物に結合することが可能である、

b. 検出可能なイベントを生じさせることが可能な前記少なくとも1つの液滴をインキュベートするステップ、

40

c. 前記少なくとも1つの液滴を直接検出に供するステップ、

ここで、前記少なくとも1つの液滴内での前記検出可能なイベントの存在または再局在化は、前記目的化合物の存在を決定する。

【0016】

本発明の第2の態様は、生物学的イベントを監視するための、第1の態様に係る方法の使用に関する。

【0017】

本発明の第3の態様は、液滴内の目的化合物の検出のための方法に関し、その方法は以下のステップを含む：

a. 以下を備えるマイクロ流体システムを提供するステップ：

50

- i . 少なくとも1つの入口、
- i i . 少なくとも1つの出口、
- i i i . 1または複数のチャネル、
- b . 前記マイクロ流体システム内に液滴の流れを注入するステップ、ここで少なくとも1つの液滴は以下を含む：
 - i . 少なくとも1つの単一細胞
 - i i . 前記単一細胞および前記目的化合物に結合することが可能な複数の第1の捕捉試薬、および
 - i i i . それぞれが標識を含んでいる複数の第2の捕捉試薬、ここで前記複数の第2の捕捉試薬は前記目的化合物に結合することが可能である、
- c . 目的化合物の生産を可能にする条件下で複数の液滴をインキュベートするステップ、それにより、目的化合物が単一細胞によって生産される場合は、前記複数の第1の捕捉試薬および第2の捕捉試薬によって捕捉される、
- d . 前記標識の存在または再局在化を検出するステップを用いて、目的化合物の存在を判定するステップ。

10

【0018】

本発明の第4の態様は、以下を備えるマイクロ流体システムに関する：

- a . 少なくとも1つの入口、
- b . 少なくとも1つの出口、
- c . 1または複数のチャネル、
- d . 以下を含んでいる少なくとも1つの液滴を作製するための、モジュール：
 - i . 1または複数の単一細胞、
 - i i . 第1の捕捉試薬、
 - i i i . 第2の捕捉試薬。
- e . 目的化合物を産生している細胞を含む液滴を検出する検出モジュール
- f . シグナルの分析のために構成された分析モジュール。

20

【0019】

本発明の第5の態様は、第1または第3の態様に係る方法を実施するための、第4の態様に係るマイクロ流体システムの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

30

【0020】

【図1】サイトカイン分泌検出に適用された、液滴内単一細胞の分泌アッセイ。ここに示される例では、蛍光検出試薬を用いたサイトカインおよび/または抗体の分泌検出に注目しているが、示されるアッセイは、任意の目的化合物の分泌検出に対して、任意の標識検出試薬を用いて適用することができる。P B M Cは、オンチップ（すなわち液滴内）またはオフチップ（すなわち液滴外、別個のコンテナ内）で、（特異的な抗原で標識された抗原提示細胞を用いて特異的に、または例えば架橋抗体またはホルボールエステルの使用により非特異的に）刺激されて、捕捉試薬によって（オンチップまたはオフチップで）事前標識されて、そして、サイトカイン分泌を妨げる条件下で蛍光検出試薬と一緒に液滴内に単一細胞として封入される。サイトカイン分泌を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後、細胞上の検出試薬の存在または再局在化によって分泌細胞を検出する。A）サイトカイン分泌細胞：細胞は、捕捉試薬に結合する目的サイトカインを分泌している。分泌されたサイトカインに検出試薬が結合して、その結果、細胞上の蛍光シグナルの存在または再局在化をもたらす。B）非分泌細胞：分析された細胞は目的サイトカインを分泌しておらず、検出試薬は液滴内に均一に留まる。蛍光の存在または再局在化は観察されない。

40

【図2】液滴内単一細胞のI F N 分泌検出は、感度が高く、特異的である。A）非活性化T細胞と比較した、活性化T細胞によって特異的に分泌されたI F N の単一細胞液滴に基づく検出。実験前に死滅した細胞または目的サイトカインの分泌前もしくは分泌後に液滴内で死滅した細胞は、実質的な非特異的結合物を表わし得る任意の非特異的なイベ

50

ントを防ぐために、NucRed（登録商標）またはNucGreen（登録商標）インターカレート試薬を液滴内に添加することによって分析から除外される。液滴において、IFNの分泌は、非活性化細胞および活性化細胞を含む液滴においてそれぞれ0.14%および16.7%について検出される。B) 活性化T細胞によるIFN分泌のフローベース検出。フローサイトメトリーにおいて、IFNの分泌は、非活性化細胞および活性化細胞のそれぞれ0%および16%について検出される。細胞集団のシフトは、染色中、近くの細胞による分泌分子の非特異的な捕捉のバックグラウンドが高いことに起因する、フローベースシステムの重大な制限である。

【図3】液滴内単一細胞のIFN分泌検出は、感度が高く（ $< 1 \text{ nM}$ ）、効率的であり（ $> 80\%$ ）、100%特異的である。捕捉試薬で事前標識されていて、異なる濃度の精製IFN存在下で検出試薬とともに流されている（*co-flowed with*）、単一の非活性化CD8+ T細胞を含んでいる液滴を、マイクロ流体デバイス内に再注入して、所有権を主張できるソフトウェアを用いて各液滴の蛍光を分析した。A) 適切な幅を有する液滴の選択および異なるエマルジョン/濃度条件の属性。B) 細胞標識に基づいた、CD8+ T細胞を含む液滴の選択。C) 試験された各濃度のサイトカインに関する液滴内のIFNの検出。D) 試験された各濃度のIFNについて、検出された陽性液滴のパーセンテージを決定して、ネガティブコントロール（ 0 nM ）と比較した。液滴において 1 nM という小さなサイトカインが検出可能であり、約80%の細胞が、液滴に基づく単一細胞分泌アッセイを用いて検出された。 0 nM のIFNを含む条件下で陽性として観察される細胞/液滴が0%である場合に偽陽性なしと選択された。

【図4】抗原提示細胞による、液滴内単一細胞の抗原特異的なT細胞活性化。A) 特異的なペプチドプールでパルスされた抗原提示細胞（APC）および一次CD8+ T細胞（捕捉試薬で事前標識）を、液滴内に一緒に封入した。APCによるT細胞の活性化を可能にする条件下で液滴を一晩インキュベートして、それはサイトカイン分泌によって検出された。後日、マイクロ流体デバイス内に液滴を再注入して、IFNを分泌していた活性化T細胞およびIFNを分泌している活性化T細胞の検出のために蛍光シグナルを分析した。B) 目的の液滴は、一緒に封入された1つのT細胞および1つの抗原提示細胞からなるものであった。両方の細胞を含んでいる液滴の効果的な選択を可能にするために、両方の細胞を異なる色で蛍光標識することができる。C) 蛍光死滅細胞マーカーを用いて、液滴内の細胞の生存能力を制御して、実験/活性化の前またはその過程の細胞死に起因する任意の偽陽性を除外した。液滴内に封入された細胞は、一晩のインキュベーション後、その94%が生存可能と検出されたように、高い生存能力を示した。D) 液滴分泌アッセイを用いて、液滴における、APCによる抗原特異的なT細胞活性化を検出した。予想されたとおり、応答性T細胞の頻度に基づき、生存可能T細胞および生存可能APCの両方を含む液滴の1.2%が、IFNを分泌しているものとして検出されて、成功的な、高い生存能力、抗原特異的な活性化、および、液滴における単一T細胞のIFN分泌に基づく活性化細胞の検出が示された。

【図5】任意の分泌された分子の検出に適用された、液滴内単一細胞の分泌アッセイ。本発明に係る方法は、非常に調整可能であり、様々な生物学的イベントを検出するために適用することができる。ここに示される例では、蛍光検出試薬を用いたサイトカインおよび/または抗体の分泌検出に注目しているが、示されるアッセイは、任意の目的化合物の分泌検出に対して、任意の標識検出試薬を用いて適用することができる。（A）多重化アッセイの可能性を含む、調べている細胞による様々な目的化合物の分泌の液滴内検出の例。ここでは、抗体およびサイトカインの分泌の多重化アッセイが示されるが、本発明は任意の言及された目的化合物に適用可能である。オフチップまたはオンチップで刺激されたPBMCをサイトカイン特異的な捕捉試薬で事前標識して、B細胞を抗体特異的な捕捉試薬で事前標識する。両方の細胞集団を、個々の細胞として封入される前にサイトカインおよび抗体の分泌を妨げる条件下で、サイトカイン特異的な蛍光検出試薬および抗体特異的な蛍光検出試薬と一緒に液滴内に単一細胞として共封入する。両方の検出試薬の標識（この例では蛍光だが任意の手段によるものであってよい）は、アッセイに従って適切に選択

10

20

30

40

50

される。サイトカインおよび抗体の分泌を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後、細胞上の検出試薬の存在または再局在化によって分泌細胞を検出する。分泌されたサイトカインは、サイトカイン分泌細胞に特異的に結合した捕捉試薬に結合して、蛍光抗 - サイトカイン検出試薬の存在または再局在化を通して検出される。分泌された抗体は、抗体分泌細胞に結合した捕捉試薬に結合して、細胞上の蛍光抗 - 抗体検出試薬の存在または再局在化を通して検出される。抗体特異的な捕捉試薬は、全ての免疫グロブリンに特異的であってよく、それにより、包括的な抗体応答が検出されるのを可能にし、または、抗体特異的な捕捉試薬は、目的抗原からなるものであってよく、それにより、抗原特異的な抗体応答が検出されるのを可能にする。(B)共に流されている(c o f l o w e d)捕捉試薬および検出試薬による、液滴内サイトカイン分泌検出の例。オフチップまたはオンチップで刺激されたP B M Cを、サイトカイン分泌を妨げる条件下で、捕捉試薬および検出試薬(ここに例示されるように蛍光であってよく、または任意の他の手段であってよい)と一緒に液滴内に単一細胞として封入する。サイトカイン分泌を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後、細胞上の検出試薬の存在または再局在化によって分泌細胞を検出する。捕捉試薬および検出試薬の濃度は両方とも、最も高いシグナル/バックグラウンド比を生じさせるように適合されて、調べている細胞に対する最大の蛍光シグナルを可能にする。(C)2以上の分子からなる細胞に結合した第1の捕捉試薬による液滴内サイトカイン分泌検出の例。オフチップまたはオンチップで刺激されたP B M Cを、2以上の分子からなるサイトカイン特異的な捕捉試薬で事前標識する。2以上の分子は、目的細胞膜に特異的な抗体であってリガンドAにコンジュゲートされた抗体、および、目的サイトカインに特異的な抗体であってリガンドBにコンジュゲートされた抗体からなり;ここで、リガンドAとリガンドBは相互作用することができ、安定した関連性を形成する。細胞は、サイトカイン分泌を妨げる条件下で、蛍光検出試薬と一緒に液滴内に単一細胞として封入される。サイトカイン分泌を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後、細胞上の検出試薬の存在または再局在化によって分泌細胞を検出する。(D)共に流されていて(c o f l o w e d)、2以上の分子からなる、第1の捕捉試薬による液滴内サイトカイン分泌検出の例。オフチップまたはオンチップで刺激されたP B M Cを、サイトカイン分泌を妨げる条件下で、捕捉試薬および蛍光検出試薬と一緒に液滴内に単一細胞として封入する。共に流されている(c o f l o w e d)サイトカイン特異的な捕捉試薬は、2以上の分子からなる。2以上の分子は、目的細胞膜に特異的な抗体であってリガンドAにコンジュゲートされた抗体、および、目的サイトカインに特異的な抗体であってリガンドBにコンジュゲートされた抗体からなり;ここで、リガンドAとリガンドBは相互作用することができ、安定した関連性を形成する。サイトカイン分泌を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後、細胞上の検出試薬の存在または再局在化によって分泌細胞を検出する。捕捉試薬および検出試薬の濃度は両方とも、最も高いシグナル/バックグラウンド比を生じさせるように適合されて、調べている細胞に対する最大の蛍光シグナルを可能にする。(E)第1の捕捉試薬による液滴内サイトカイン分泌検出の例は、2つの分子からなり、その一方は細胞に結合していて、他方は共に流されている(c o f l o w e d)。オフチップまたはオンチップで刺激されたP B M Cを、リガンドAにコンジュゲートされた細胞膜に特異的な抗体からなる捕捉試薬の第1の部分で事前標識する。サイトカイン分泌を妨げる条件下で、リガンドBにコンジュゲートされた目的サイトカインに特異的な抗体からなる捕捉試薬の第2の部分および蛍光検出試薬と一緒に、細胞を液滴内に単一細胞として封入する。リガンドAおよびリガンドBは相互作用することができ、安定した関連性を形成する。サイトカイン分泌を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後、細胞上の検出試薬の存在または再局在化によって分泌細胞を検出する。捕捉試薬の第2の部分および検出試薬の濃度は両方とも、最も高いシグナル/バックグラウンド比を生じさせるように適合されて、調べている細胞に対する最大の蛍光シグナルを可能にする。

【図6】分泌された受容体特異的な抗体によるT細胞活性化の検出。

【図7】細胞傷害性因子の分泌検出および抗原特異的な抗体の分泌により誘導されるA D C Cの二重陽性検出。

10

20

30

40

50

【図 8】抗原特異的抗体の分泌により誘導される A D C C の二重陽性検出。

【図 9】本発明に係るマイクロ流体システムおよび方法の説明。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明に係る方法は、単一細胞分析のための現行のマイクロ流体技術に影響を及ぼす上述の問題を解決することを目的としている。特に、本発明の方法は、目的化合物の生産を単一細胞レベルで検出、分析および/または定量化する改善された性能を提供する。

【0022】

本明細書中に開示される方法の第 1 の利点は、その高い感度によって示される。そのような特性は、液滴における、目的化合物を産生する単一細胞の空間的制約に起因するものであり、ここで前記単一細胞は自由に動くことができ、それにより高い生存能力を可能にし、その結果、高く、なおも生理学的である代謝活性を可能にする。さらに、液滴における、目的化合物を産生している単一細胞の空間的制約は（ここで前記の分泌産物は、制約された数ピコ～数ナノリットルの容量内に制限される）、生産される分子に応じて数分～数時間のインキュベーションで高濃度に到達するのを可能にする。

【0023】

その結果として、本発明の方法を使用することによって現れる第 2 の利点は、検出可能なイベントの再局在化および/または強度における変化をリアルタイムで監視するおかげで、動態分析を実施する可能性によって示される。拡張することによって、標識が異なる検出試薬を用いることによって、多様な分泌化合物の検出への拡張を想起することが容易である。

【0024】

その結果として、本発明の方法を使用することによって現れる第 3 の利点は、2 以上の細胞を液滴内に一緒に封入して、1 または 2 以上の細胞による前記化合物の産生に関する細胞間相互作用の役割を監視するおかげで、複雑だが柔軟性のあるアッセイセットを実施する可能性によって示される。2 以上の細胞を一緒に封入するこれらの複雑なアッセイはまた、2 以上の目的化合物の分泌の検出も可能にする。

【0025】

本発明の方法を使用することによって現れる第 4 の利点は、前記分子の産生の検出の高い特異性によって示される。そのような特性は、液滴における、目的化合物を産生する単一細胞の空間的制約に起因するものであり、ここで、前記の分泌された産物は、制約された容量内に制限されて、前記単一細胞に特異的に捕捉されて、したがって、分泌された産物は、分泌細胞によってのみ捕捉される。

【0026】

この点について、本発明者らは、液滴内で細胞上の検出試薬の存在または再局在化を監視することによって分泌細胞が有利に検出されること、および、細胞密度/濃度は検出の特異性に影響しないことを見いだした。

【0027】

さらに、非分泌細胞または目的化合物を分泌しない細胞が存在する場合は、検出試薬は、液滴内に均一に留まり、したがって偽陽性が生じる割合を最小にする。

【0028】

第 1 の態様では、本発明は、マイクロ流体システムにおける目的化合物の検出のための方法に関し、前記方法は以下のステップを含む：

a . 前記マイクロ流体システムにおいて少なくとも 1 つの液滴を作製するステップであって、前記少なくとも 1 つの液滴は以下を含む：

i . 少なくとも 1 つの単一細胞、

i i . 1 または複数の第 1 の捕捉試薬、ここで前記 1 または複数の第 1 の捕捉試薬は、前記単一細胞および前記目的化合物に結合することが可能である、

i i i . 標識を含んでいる 1 または複数の第 2 の捕捉試薬、ここで前記 1 または複数の第 2 の捕捉試薬は、前記目的化合物に結合することが可能である、

10

20

30

40

50

b. 検出可能なイベントを生じさせることが可能な前記少なくとも1つの液滴をインキュベートするステップ、

c. 前記少なくとも1つの液滴を直接検出に供するステップ、

ここで、前記少なくとも1つの液滴内での前記検出可能なイベントの存在または再局在化は、前記目的化合物の存在を決定する。

【0029】

本発明の文脈において、用語「マイクロ流体システム」は、本明細書中に開示される方法を実施するための1または複数の組み込まれたユニットまたはチップを指してよい。前記マイクロ流体システムは、一般に、1または複数のマイクロチャネルおよび1または複数のマイクロ流体デバイス（例えばマイクロポンプ、マイクロバルブ）を備えるマイクロ流体チップの形態で表される。

10

【0030】

本発明の文脈において、「マイクロ流体チップ」は、一般に、材料（高分子材料、例えば、ポリジメチルシロキサン（PDMS）またはポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、エポキシ、COC（特に光重合性エポキシ、例えばNorland Optical Adhesives（NOA）によって市販されるもの）、ガラス、シリコン、プラスチック）への、ミリング、エッチング、アブレーションまたは成形によって作られるマイクロチャネルのセットを指す。マイクロ流体チップは、基板および支持体（共に少なくとも1つのチャネルを規定する）を備えてよい。

20

【0031】

本明細書において用いられる用語「液滴」は、周囲と非混和性である流体の隔離された部分を指す。本発明の文脈において、前記「液滴」は、球状であってよく、実質的に球状であってよく、または球状でない形状であってよい。前記形状は、外的環境などの異なるパラメーターに依存し得る。

【0032】

マイクロ流体システムにおいて液滴を調製、作製および注入するための方法は、当業者に公知である。例示的な方法はUS 2015/0057163 A1に開示されている。各液滴内の単一細胞の存在に関しては、当業者は、ポアソン分布を用いてこのパラメーターを制御および/または推定することができることを理解している。

30

【0033】

本発明の文脈において、「少なくとも1つの単一細胞」という表現は、生存可能および生存不可能な単一細胞を指す。前記少なくとも1つの単一の生存可能な細胞の生存能力の状態は、本発明に係る方法のステップに従って改変または変更することができる。本発明の方法に係る液滴のインキュベーションのステップ後に、前記液滴において検出可能なイベントが生じる可能性は、液滴内に少なくとも1つの生存可能な単一細胞を有する可能性を指すということは、注意する価値がある。

【0034】

本明細書において用いられる用語「直接検出」は、液滴において、固体支持体の不存在的下で、単一細胞によって生産された目的化合物を検出する可能性を指し、ここで、固体支持体とは、目的化合物を捕捉するために用いられるものである。本発明の文脈において、用語「固体支持体」は、標的分子を前記支持体上に固定化することができるように標的分子に関して所定の特異性を有していて、それにより液滴内に含まれる内容物からの標的分子の分離を可能にする、任意の非生物学的マトリックス、例えば磁気ビーズ、ゲルマトリックスまたはアフィニティマトリックスを指す。

40

【0035】

本発明の第1の態様の一実施態様によれば、単一細胞は、液滴内での自由な可動性を示す。

【0036】

本発明の文脈において、目的化合物の検出は、液滴における前記目的化合物を産生する細胞の配向性（orientation）に非依存性である。

50

【0037】

本発明の第1の態様の別の実施態様によれば、単一細胞は固体支持体上に捕捉されない。

【0038】

本発明者らは、固体支持体上に束縛されていない高度の可動性を有する単一細胞の存在は、細胞の表面上の第1の捕捉試薬の改善された分布のため、細胞によって分泌された目的化合物の存在を検出するのに優れた感度を与えることを見いだした。

【0039】

本明細書において用いられる用語「捕捉試薬」は、目的化合物への親和性を示す試薬、核酸、タンパク質またはペプチドを指す。本発明の文脈において、当該方法は第1の捕捉試薬および第2の捕捉試薬の存在を要する。

10

【0040】

本発明の文脈において、用語「第1の捕捉試薬」および/または「第2の捕捉試薬」は、単一の二官能性化合物を指してよく、または、特異的な官能性によってそれぞれ特徴づけられる2以上の異なる化合物を含む複合体を指してよい。本発明に係る方法に関して考えられる第1の捕捉試薬および第2の捕捉試薬の例は、抗体、抗原、サイトカイン、ケモカイン、ホルモンもしくは増殖因子、またはこれらの組み合わせの形態の化合物または複合体であってよい。

【0041】

本明細書において用いられる用語「再局在化」は、検出可能なイベントの密度および/または濃度の液滴内の空間的配置における変化を指す。本明細書において用いられる用語「存在」は、検出可能なイベントの発生またはその強度の変化を指す。

20

【0042】

本発明に係る方法の重要な態様は、液滴における検出可能なイベントの再局在化に関する。この点について、当技術分野で知られている方法は、本明細書において意図される「再局在化」を達成することはできないが、フローサイトメトリー分析を行なう前に、過剰分としての局所濃度 - 結合のみ洗い流される。したがって、この特徴の効果は、現行の方法よりも高い効率を本発明に係る方法に与える。

【0043】

液滴に基づくマイクロ流体アッセイにおける別の重要なステップは、液滴作製、ピコ注入、マーキングおよびソーティングとともに、液滴のインキュベーションによって示される。本発明の文脈において、インキュベーションは、オフチップまたはオンチップで生じてよい。インキュベーションステップは、液滴を正確な時間インキュベートするのに必要な遅延ライン (delay line) において生じてよく、細胞生存能力および目的化合物の産生を可能にする。遅延ラインにおけるインキュベーションの例示的な方法は、US 2012/0121480 A1に開示される。封入前の典型的なインキュベーション温度は0 ~ 16 の範囲であり、封入後は16 ~ 38 の範囲であり、インキュベーション後の分泌分子の分析のための再注入は0 ~ 38 の範囲である。典型的なインキュベーション時間は、ミリ秒 (動態分析) ~ 24時間以上 (細胞間相互作用によって仲介される化合物産生の調節分析) である。

30

40

【0044】

本発明の第1の態様の別の実施態様では、当該方法は、インキュベーション後に液滴における細胞生存能力を測定するステップをさらに含む。本発明の文脈において、細胞生存能力を測定するのに好ましい方法は、液滴内で死滅細胞が検出される場合にのみ蛍光を放射するインターカレート色素、例えば Nuc Red (登録商標) Dead 647 Ready Probes (登録商標) を用いることによって行われる。

【0045】

本発明の第1の態様の別の実施態様によれば、1または複数の第1の捕捉試薬は、前記の少なくとも1つの単一の液滴の作製前または作製後に、前記少なくとも1つの単一細胞の表面に結合する。

50

【 0 0 4 6 】

本発明の第1の態様の一実施態様では、1または複数の第1の捕捉試薬は、 $10^1 \sim 10^8$ 分子/細胞の範囲の密度で前記単一細胞に結合する。

【 0 0 4 7 】

本発明の第1の態様の別の実施態様によれば、目的化合物は、 $10 \text{ pM} \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ の濃度で液滴において生産される。

【 0 0 4 8 】

本発明の第1の態様の別の実施態様では、液滴は、 $2 \text{ pL} \sim 10 \text{ nL}$ の範囲の容量を有する。

【 0 0 4 9 】

本発明の第1の態様の別の実施態様では、標識は、蛍光標識、ポリマー、タンパク質、ペプチド、ハプテン、化学物質、核酸、またはバーコード標識を含む群から選択される。本明細書において用いられる用語「バーコード」は、分析物に関する情報を伝達するために前記分析物に付着され得る標識を指す。本発明の文脈において、バーコード標識は、標識、ポリマー、蛍光標識、ペプチド、ハプテン、タンパク質、化学物質、核酸の混合物であってよい。

10

【 0 0 5 0 】

本発明の第1の態様の別の実施態様では、第1の捕捉試薬および前記第2の捕捉試薬は、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、ハプテン、核酸、蛍光コンジュゲート、酵素コンジュゲート、合成ポリマー、もしくはバーコード、またはそれらの組み合わせを含む群から独立に選択される。バーコード標識は、標識、前記ポリマー、蛍光標識、ペプチド、ハプテン、タンパク質、化学物質、核酸の混合物であってよい。

20

【 0 0 5 1 】

本発明の第1の態様の別の実施態様では、第1の捕捉試薬は抗体であり、前記第2の捕捉試薬は蛍光性の抗-目的化合物抗体である。

【 0 0 5 2 】

本発明の第1の態様の別の実施態様によれば、第1の捕捉試薬は二官能性抗体である。

【 0 0 5 3 】

本発明の第1の態様の別の実施態様では、目的化合物は、細胞によって分泌される化合物であって、制限されないが、抗体 (I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、I g E、I g A (I g A 1、I g A 2)、I g M、サイトカイン (I L - 1 様、I L - 1、I L - 1、I L - 1 R A、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6 様、I L - 6、I L - 7、I L - 9、I L - 10 様、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 20、共通b鎖 (C D 131)、L I F、O S M、インターフェロン類 (I F N -、I F N -、I F N -)、T N F、T N F -、T N F -、C D 153、C D 154、L T -、4 - 1 B B L、A P R I L、C D 70、C D 132、C D 178、G I T R L、L I G H T、O X 40 L、T A L L - 1、T R A I L、T W E A K、T R A N C E、T G F -、T p o、F l t - 3 L、S C F、M - C S F、M S P)、ケモカイン (C C L 1、C C L 2、C C L 3、C C L 4、C C L 5、C C L 6、C C L 7、C C L 8、C C L 9 / C C L 10、C C L 11、C C L 12、C C L 13、C C L 14、C C L 15、C C L 16、C C L 17、C C L 18、C C L 19、C C L 20、C C L 21、C C L 22、C C L 23、C C L 24、C C L 25、C C L 26、C C L 27、C C L 28、C X C L 1、C X C L 2、C X C L 3、C X C L 4、C X C L 5、C X C L 6、C X C L 7、C X C L 8、C X C L 9、C X C L 10、C X C L 11、C X C L 12、C X C L 13、C X C L 14、C X C L 15、C X C L 16、C X C L 17、X C L 1、X C L 2、C X 3 C L 1)、ホルモン類 (エストロゲン、プロゲステロン類、チロキシン、ステロイド、インスリン、アドレナリンエピネフリン、メラトニン、トリヨードチロニン、チロキシン、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類、プロスタサイクリン、セロシス (T h e r o c i s)、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン (またはコルチコトロピン)、

30

40

50

アミリン（または豚島アミロイドポリペプチド）、アンジオテンシノーゲンおよびアンジオ
 テンシン、抗ミューラー管ホルモン（または、ミューラー管阻害因子もしくはホルモン）、
 抗利尿ホルモン（または、バソプレシン、アルギニンバソプレシン）、心房性ナトリウム
 利尿ペプチド（またはアトリオペプチン）、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコ
 トロピン放出ホルモン、コルチスタチン、エンドセリン、エンケファリン、エリスロポエ
 チン、卵胞刺激ホルモン、ガラニン、胃抑制ポリペプチド、ガストリン、グルカゴン、グ
 ルカゴン様ペプチド - 1、ゴナドトロピン分泌ホルモン、グアニリン、ヘプシジン、ヒト
 絨毛性ゴナドトロピン、インヒピン、インスリン、インスリン様増殖因子（またはソマト
 メジン）、レプチン、リポトロピン、メラニン細胞刺激ホルモン、モチリン、オレキシン
 、オステオカルシン、オキシトシン、リラキシン、レニン、セクレチン、ソマトスタチン
 、トロンボポエチン、ウログアニリン、血管作用性小腸ペプチド、ステロイド、エストロ
 ゲン、グルココルチコイド、プロゲストゲン、セコステロイド）、増殖因子（G - C S F
 、GM - C S F、F a s - リガンド、アドレノメデュリン（A M）、アンジオポエチン（
 A n g）、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質（B M P）、毛様体神経栄養
 因子ファミリー、毛様体神経栄養因子（C N T F）、白血病抑制因子（L I F）、インタ
 ーロイキン - 6（I L - 6）、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子（m
 - C S F）、顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺
 激因子（GM - C S F）、上皮増殖因子（E G F）、エフリン（A 1 - A 5、B 1 - B 3
 ）、エリスロポエチン（E P O）、線維芽細胞増殖因子（F G F 1 - F G F 2 3）、ウシ
 胎児ソマトトロピン（F o e t a l B o v i n e S o m a t o t r o p h i n）（F
 B S）、リガンドのG D N Fファミリー、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ニュー
 ルツリン、パーセフィン、アルテミン、増殖分化因子 - 9（G D F 9）、肝細胞増殖
 因子（H G F）、肝癌由来増殖因子（H D G F）、インスリン、インスリン様増殖因子、
 インスリン様増殖因子 - 1（I G F - 1およびI G F - 2）、インターロイキン類；I L
 - 1 - すなわち、I L - 3およびI L - 6の補因子、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I
 L - 5、I L - 6、I L - 7、ケラチノサイト増殖因子（K G F）、遊走刺激因子（M S
 F）、肝細胞増殖因子様タンパク質（H G F L P）としても知られるマクロファージ刺激
 タンパク質（M S P）、ミオスタチン（G D F - 8）、ニューレグリン類（N R G 1 - N
 R G 4）、ニューロトロフィン類、脳由来神経栄養因子（B D N F）、神経成長因子（N
 G F）、ニューロトロフィン - 3（N T - 3）、ニューロトロフィン - 4（N T - 4）、
 胎盤増殖因子（P G F）、血小板由来増殖因子（P D G F）、レナラーゼ（R e n a l a
 s e）（R N L S） - 抗 - アポトーシス生存因子、T細胞増殖因子（T C G F）、トロン
 ボポエチン（T P O）、形質転換増殖因子（T G F - 、T G F - （T G F - 1、
 T G F - 2、T G F - 3）、腫瘍壊死因子 - （T N F - ）、血管内皮増殖因子（
 V E G F）を含む群から選択される。

【0054】

本発明の第2の態様は、1つまたはいくつかの、潜在的に同時の、生物学的イベント（
 単数または複数）を監視するための、前記発明の第1の態様に係る方法の使用を包含する
 。本明細書において用いられる用語「生物学的イベント」は、対象の体内で生じて生細胞
 の生理学的状態に影響を及ぼす生理学的な過程および/または状態の変更を説明するた
 めに使われる。典型的な例は、誘導される死（非限定的な例として、A D C C、C D C、A
 D C P、サイトカイン誘導される細胞溶解、アポトーシス、クロム放出）を伴う、化合物
 の関係する分泌であり、別の例は、分泌された化合物（非限定的な例として、Gタンパク
 質共役型受容体活性化、B - アレスチン、カスパーゼ活性化、P K C / N F K Bパスウェイ、
 M A Pキナーゼ、P i 3 K、A K Tパスウェイ、R a s / M e k / E r k、P L C /
 C a ⁺⁺）による、細胞パスウェイの活性化および/または阻害である。

【0055】

本発明の第2の態様の一実施態様では、生物学的イベントは免疫応答である。典型的な
 例は、化合物分泌を誘導するT細胞による抗原認識の検出であり、化合物分泌を誘導する
 B細胞による抗原認識を含み、T細胞からの分泌化合物によって監視され第2の分泌化合

物によって誘導される T 細胞活性化も同様に含み（この例は、2つの異なる細胞型による分泌化合物の検出および各々に特異的なバーコードを用いてこれらを区別することを含む）、B 細胞からの分泌化合物によって監視され第 2 の分泌化合物によって誘導される B 細胞活性化を含む。

【0056】

本発明の第 3 の態様では、以下のステップを含む、液滴における目的化合物の検出のための方法が提供される：

- a. 以下を備えるマイクロ流体システムを提供するステップ：
 - i. 少なくとも 1 つの入口、
 - ii. 少なくとも 1 つの出口、
 - iii. 1 または複数のチャネル、
- b. 前記マイクロ流体システム内に液滴の流れを注入するステップ、ここで少なくとも 1 つの液滴は以下を含む：
 - i. 少なくとも 1 つの単一細胞
 - ii. 前記単一細胞および前記目的化合物に結合することが可能な複数の第 1 の捕捉試薬、および
 - iii. それぞれが標識を含んでいる複数の第 2 の捕捉試薬、ここで前記複数の第 2 の捕捉試薬は前記目的化合物に結合することが可能である、
- c. 目的化合物の生産を可能にする条件下で複数の液滴をインキュベートするステップ、それにより、目的化合物が単一細胞によって生産される場合は、前記複数の第 1 の捕捉試薬および第 2 の捕捉試薬によって捕捉される、
- d. 前記標識の存在または再局在化を検出するステップを用いて、目的化合物の存在を判定するステップ。

10

20

【0057】

本発明の第 4 の態様は、以下を備えるマイクロ流体システムに関する：

- a. 少なくとも 1 つの入口、
- b. 少なくとも 1 つの出口、
- c. 1 または複数のチャネル、
- d. 以下を含んでいる少なくとも 1 つの液滴を作製するためのモジュール：
 - i. 1 または複数の単一細胞、
 - ii. 第 1 の捕捉試薬、
 - iii. 第 2 の捕捉試薬、
- e. 目的化合物を産生している細胞を含む液滴を検出する検出モジュール。
- f. シグナルの分析のために構成された分析モジュール。

30

【0058】

本発明の第 4 の態様の一実施態様によれば、マイクロ流体システムは、液滴生産のためのモジュール、液滴検出のためのモジュール、液滴分析のためのモジュール、液滴をソーティングするためのモジュール、液滴をタグ化するためのモジュール、および液滴を回収するためのモジュールを含む群から選択される、互いと連絡している少なくとも 2 つのモジュールの存在によって特徴付けられる。本発明の文脈において、液滴を回収するためのモジュールは、さらなるプロセス（例えば遺伝子型決定、さらなる機能性分析）を行なうことが意図される。

40

【0059】

本発明に係るマイクロ流体システムおよびプロセスの理想的なスキームを図 9 に示す。

【0060】

2 以上の前述のモジュールの組み合わせは、本明細書中に開示されるマイクロ流体システムが、ハイスループット（毎秒、数千液滴が処理され得る）の観点から改善された結果を達成するのを可能にする。

【0061】

本発明のマイクロ流体システムの重要な態様は、本発明の第 1 の態様の方法に係る分泌

50

および検出ステップがマイクロ流体システムの同一モジュールにおいて実施され得ることである。

【0062】

第5の態様によれば、第4の態様に係るマイクロ流体システムは、本発明の第1または第3の態様に開示される方法を実施するために用いられる。

【実施例】

【0063】

原理説明

健康ドナーのヒトPBM Cを、「キャッチ試薬」と呼ばれる過剰の二官能性抗体を用いて、マイクロチューブ内で事前標識する。キャッチ試薬は、白血球特異的な膜タンパク質(CD45)および目的サイトカインの両方に特異的である。サイトカイン分泌を妨げる条件下(すなわち4)で5分インキュベーションした後に、全ての白血球をキャッチ試薬で均等に標識化して、広範囲の洗浄によって過剰分を洗い流す。事前標識された細胞を、サイトカイン分泌を妨げる条件下で、1% v/vの最終濃度の蛍光標識抗-サイトカイン抗体とともに、ピコリットルの液滴内に単一細胞として封入する(図1)。単一細胞を含む液滴を、5% CO₂制御インキュベーター内で37 にて1h20インキュベートして、サイトカイン分泌を可能にさせる。液滴を再注入して、細胞上の検出試薬の蛍光シグナルの再局在化によって検出される(t r a d u c e d)サイトカインの分泌を、各液滴について分析する。サイトカイン分泌細胞を含む液滴では、検出試薬シグナルは細胞上に再局在化して、液滴において蛍光の局所的な増大をもたらす。それとは対照的に、非分泌細胞を含む液滴では、検出試薬の蛍光シグナルは液滴内に均一に留まり、蛍光の局所的な増大は観察されない。

10

20

【0064】

液滴内分泌アッセイを、PMA/イオノマイシンによって活性化されたPBM Cによる、非活性化PBM Cと比較した、IFN (およびTNF 、示されない)分泌の検出に適用した(図1)。液滴に基づくマイクロ流体システムおよびソフトウェアを用いて観察された結果を、同一の細胞および条件でマイクロプレートにおいて生産されたフローサイトメトリーデータと比較した(図2)。フローサイトメトリーにおける分泌細胞の100%が、液滴分泌アッセイにおいて陽性として検出された。ネガティブコントロールの0.15%未満が偽陽性細胞にカウントされた。活性化T細胞によるサイトカイン分泌の液滴検出は、フローサイトメトリー検出と比較して非常に効率的かつ特異的である。

30

【0065】

サイトカイン分泌の感度および効率の定量化

非活性化および非分泌CD8+ T細胞を、液滴分泌アッセイ手順に従って、様々な濃度の精製IFN とともに液滴内に封入した。4つのエマルションが生産されて、単一細胞として単離された細胞および異なる濃度の精製サイトカイン: 0 nM、1 nM、5 nMまたは10 nM最終濃度のIFN (図3)を液滴中にそれぞれ含んでいた。4つのエマルション全ての液滴を再注入して、蛍光シグナルを分析した。液滴分泌アッセイを用いて、1 nMという小さなサイトカイン濃度が偽陽性イベントなしに検出されて、高い感度および100%特異的なアッセイを示した。分泌アッセイはまた、80%よりも多い陽性細胞が液滴において検出されるように、効率的であることも示した。

40

【0066】

これらの実施例は、検量線サンプルの条件を作ることにより、液滴における定量的なりアルタイムのサイトカイン分泌の定量化のためにアッセイ検出を校正する可能性を示す。

【0067】

液滴における共に封入されたAPC/T細胞からのサイトカイン分泌に基づく、抗原特異的なT細胞同定

共に培養されると、特異的なペプチドがローディングされた抗原提示細胞(APC)は、応答性T細胞のサブセットを特異的に活性化することができ、サイトカイン分泌をもたらす。液滴分泌アッセイを、液滴におけるAPCによるT細胞の特異的な活性化の検出に

50

適用した(図4)。APCおよびT細胞を、サイトカイン分泌を妨げる条件下で液滴内に単一細胞として共に流した(c o - f l o w e d)。5%CO₂制御インキュベーター内で液滴を37℃で一晩インキュベートして、後日、再注入した。T細胞およびAPCの両方の生存能力を、NucRed(登録商標)(インターカレート色素)を用いて、液滴内で一晩インキュベーションした後に測定した。そのような死滅細胞蛍光マーカーを用いて、封入された細胞の94%が生存可能として検出された。APCによるT細胞の特異的な活性化を、IFN γ 分泌に適用された液滴分泌アッセイを用いて検出した。生存可能なT細胞およびAPCを含む液滴において、1.2%がIFN γ を分泌し、液滴におけるT細胞の効果的な抗原-特異的活性化が示された。

【0068】

抗原特異的かつ全体的な抗体分泌検出

捕捉試薬によって事前標識されたB細胞を検出試薬と一緒に液滴内に共封入することによって、示された液滴内分泌アッセイを用いて抗体分泌を評価することができる。捕捉試薬の第1の部分は、B細胞表面マーカーを認識することが可能であり、Pan-Bマーカーまたは特異的なB細胞マーカーであってよく、典型的な例は、免疫グロブリン分泌形質細胞に関するCD138マーカーである。捕捉試薬の第2の部分は、抗体を特異的に捕捉し、または目的抗原からなる。1つめの場合では、捕捉試薬は抗体を捕捉する部分からなり、検出試薬は検出可能な標識化抗原からなる。2つめの場合では、捕捉試薬は目的抗原からなり、検出試薬は検出可能な標識化抗-二次抗体からなる。B細胞上の蛍光シグナルの再局在化は(標識はここでは蛍光であるが、当業者にとって任意の手段によって検出され得る)、調べている液滴内に存在するB細胞による抗原特異的抗体の分泌を示す。ここに説明される方法は、捕捉試薬の事前インキュベーションを伴って、または伴わずに、適用することができる(図5A~E)。ここに説明される方法は、以前に言及された任意の目的化合物に適用することができる。

【0069】

分泌された受容体特異的抗体によるT細胞活性化の検出

所定のT細胞受容体への特異的な抗体の結合は、T細胞を活性化することができ、例えば、サイトカイン分泌をもたらす。液滴分泌アッセイは、液滴において、免疫グロブリン発現細胞によって分泌されたT細胞受容体特異的抗体によるT細胞活性化を検出することができる(図6)。典型的な例は、捕捉試薬で事前標識されて、免疫グロブリン発現細胞と一緒に液滴内に封入されたPBM Cを含む。液滴は、標識された検出試薬を含みながら(標識はここでは蛍光であるが、任意の手段によるものであってよい)、抗体産生を妨げる条件下で生産される。抗体産生を可能にする条件下で液滴をインキュベートした後に、例えば、サイトカイン分泌の検出を通してT細胞活性化が検出される。T細胞受容体特異的抗体の結合は、続いてT細胞を活性化して、その結果、例えばサイトカインを分泌する。分泌されたサイトカインは、T細胞に結合した捕捉試薬上に再局在化し、蛍光検出試薬は目的サイトカイン上に再局在化する。分泌された抗体によって活性化されたT細胞を含む液滴は、その結果、活性化T細胞上の検出試薬の再局在化に起因して検出可能なシグナルを示す。ここに説明される方法は、捕捉試薬の事前インキュベーションを伴って、または伴わずに、適用することができる。上述の方法の典型的な例は、T細胞活性化をトリガーする抗-CD3抗体の検出である。拡張することによって、このシステムは、抗-チェックポイント抗体の同定に用いることができる。

【0070】

細胞傷害性因子の分泌検出および抗原特異的抗体の分泌によって誘導されるADCCの二重陽性検出

液滴内分泌アッセイを用いて、ADCC活性を有する抗原特異的抗体が分泌される場合における、誘導される死を評価することができる(図7)。ここに示される二重陽性アッセイは、死滅化細胞(例として、一次ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球および樹状細胞、ならびに細胞培養細胞株が含まれる)による細胞傷害性因子の分泌、および、死滅化細胞により分泌された化合物によって誘導される標的

10

20

30

40

50

細胞の死滅化の両方の検出を可能にする。目的の細胞傷害性因子に特異的なキャッチ試薬を不飽和状態で用いて、死滅化細胞を事前標識する。捕捉試薬の不飽和条件状態は、死滅化細胞による分泌された目的化合物の分泌物の捕捉および検出の両方を可能にするのに必須であり、標的細胞上にまだ捕捉されていない分泌化合物の効果は、最終的に細胞死を誘導する。それから、標的細胞が、免疫グロブリン産生細胞および死滅化細胞とともに液滴内に共封入される。封入された細胞は、目的の細胞傷害性因子に特異的な検出試薬とともに、封入前は抗体産生を妨げる条件下で共に流される (c o f l o w e d)。産生後、抗体産生を可能にする条件下で液滴をインキュベートする。特異的抗体は標的細胞上に再局在化し、死滅化細胞は F c 受容体を介して抗体に結合する。A D C C 活性を有する抗体に結合した時点で、死滅化細胞は細胞傷害性因子を放出して、標的細胞を死滅させる。分泌された細胞傷害性因子の一部は、死滅化細胞上の捕捉試薬によって捕捉されて、検出試薬を再局在化して、細胞傷害性因子の産生の検出を可能にする。細胞死は、目的抗原を発現している死滅中の標的細胞からの化合物の放出によって監視される。あるいは、細胞死は、細胞表面マーカー、または当業者に公知の任意の他の適切なマーカーによって監視される。拡張することによって、液滴内アッセイを、補体依存性細胞傷害およびオプソニン化貪食作用または任意の他の上述のアッセイに適用することができる。

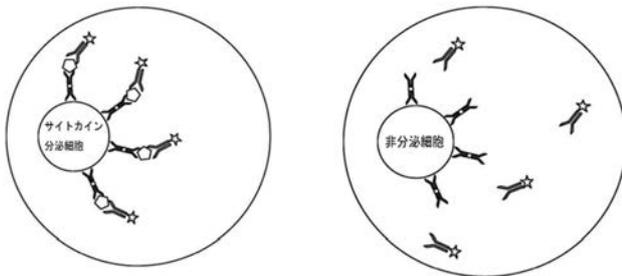
10

20

【 0 0 7 1 】

この実施例に対する代替および/または補完は、細胞死の検出と組み合わせるまたは用いずに、分泌された細胞傷害性因子の代わりに (および / または それに加えて)、抗体産生が検出される場合である (図 8)。

【 図 1 A - 1 B 】



- サイトカイン分泌細胞
- ✕ α-サイトカイン抗体にコンジュゲートされた細胞表面抗体 (捕捉試薬)
- ★ 蛍光α-サイトカイン (検出試薬) が液滴において共に流される (COFLOWED)
- 分泌されたサイトカイン

FIG. 1A

FIG. 1B

【 図 2 A 】

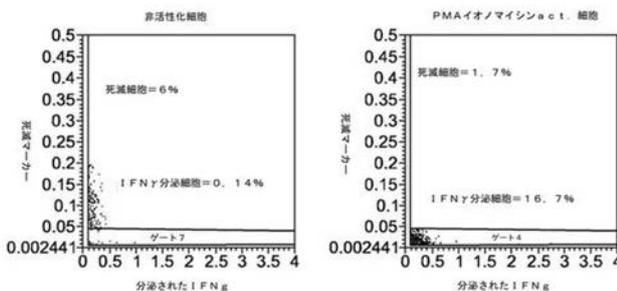


FIG. 2A

【 図 2 B 】

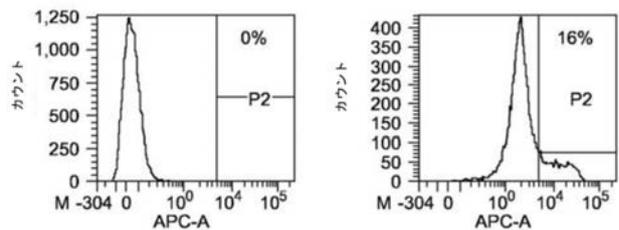


FIG. 2B

【 図 3 A - 3 D 】

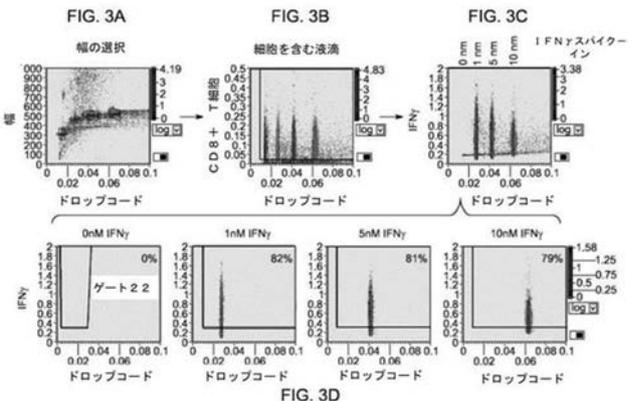


FIG. 3D

【 図 4 A 】

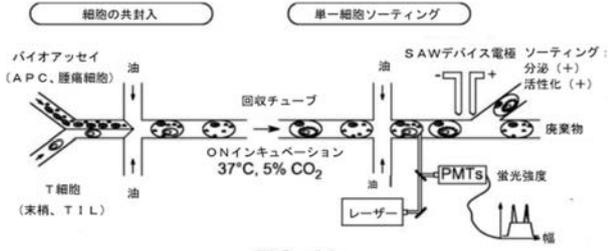


FIG. 4A

【 図 4 B 】

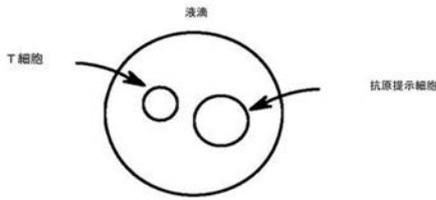


FIG. 4B

【 図 4 C 】

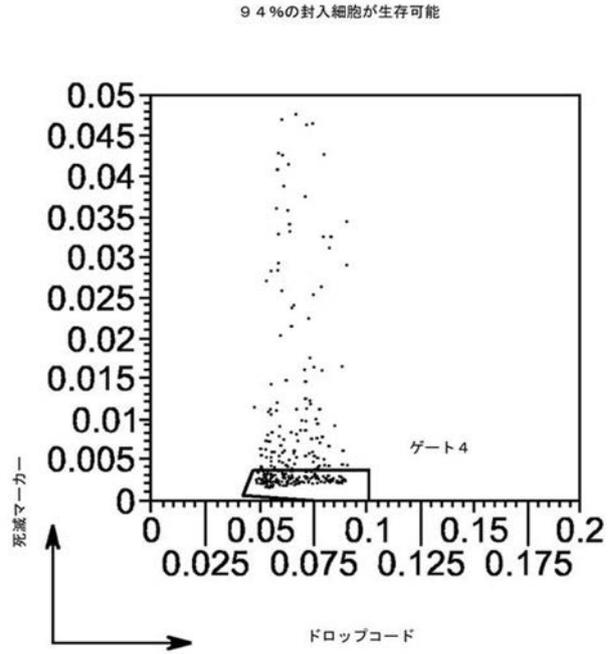


FIG. 4C

【 図 4 D 】

1, 2%の生存可能なT/APCを含む液滴の細胞がIFN γ を分泌

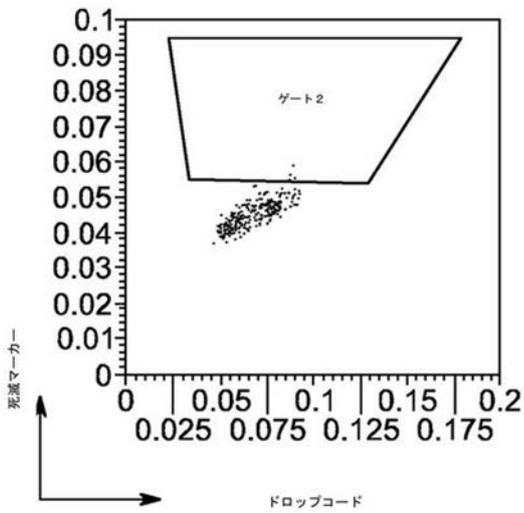


FIG. 4D

【 図 5 A 】

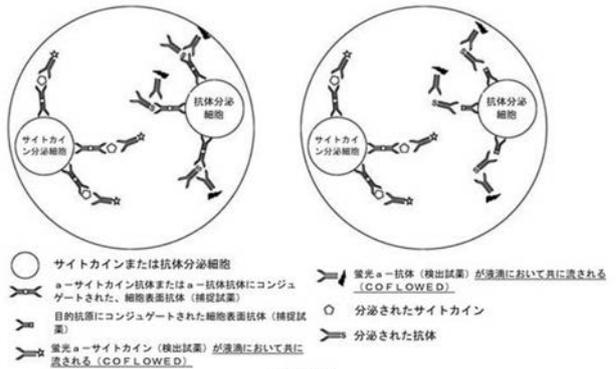


FIG. 5A

【図 5 B】

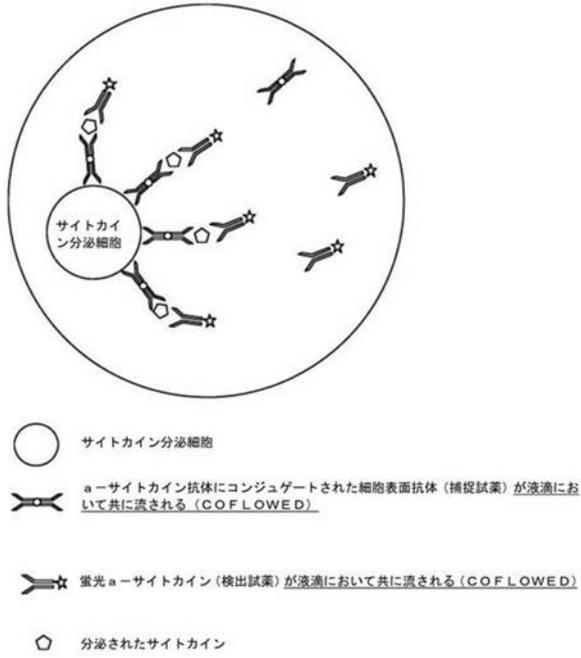


FIG. 5B

【図 5 C】

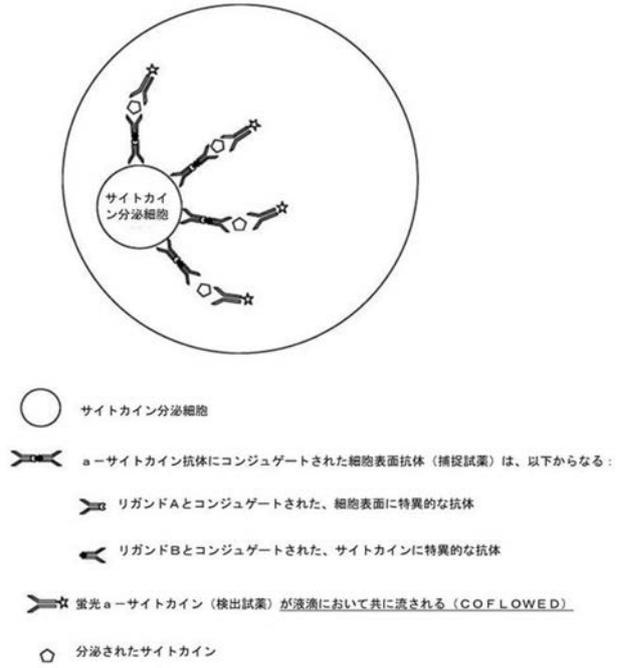


FIG. 5C

【図 5 D】

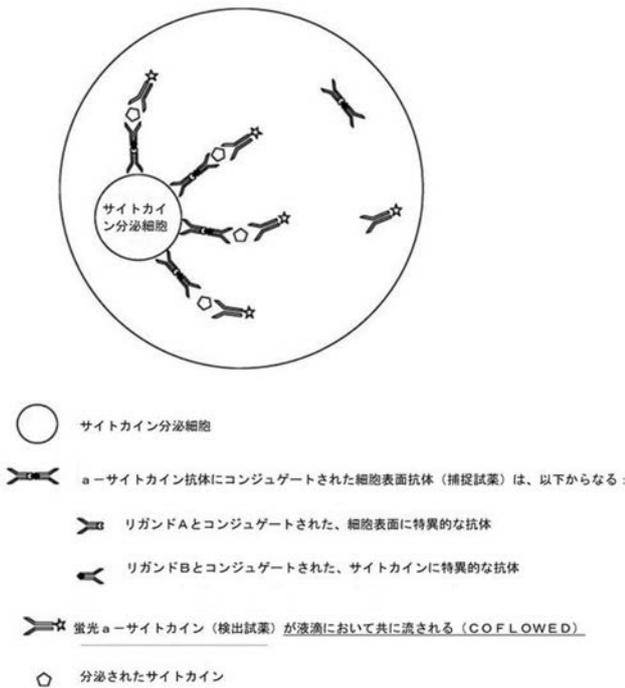


FIG. 5D

【図 5 E】

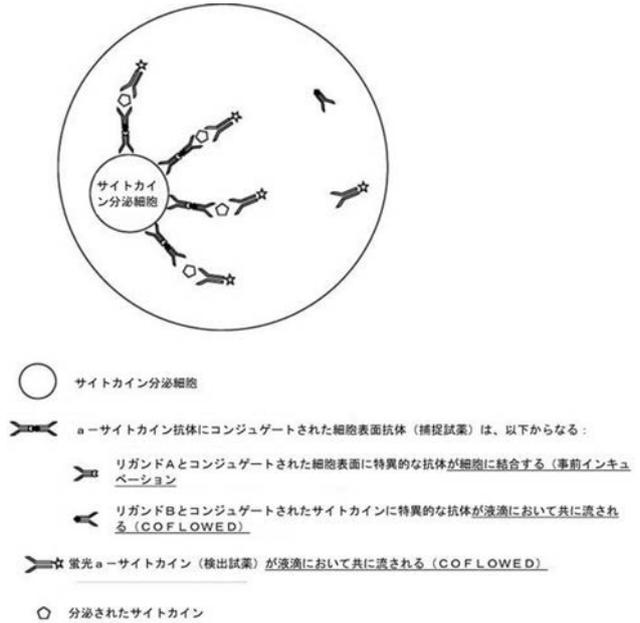


FIG. 5E

【 図 6 】

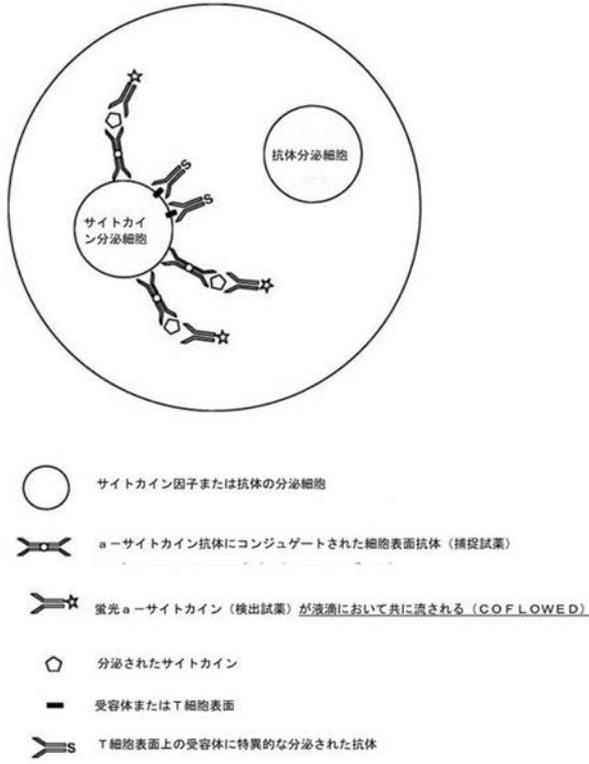


FIG. 6

【 図 7 】

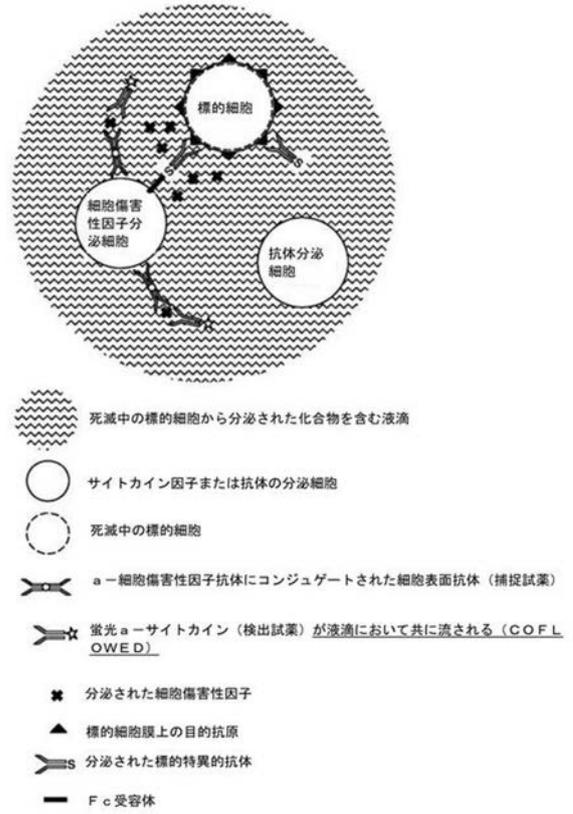


FIG. 7

【 図 8 】

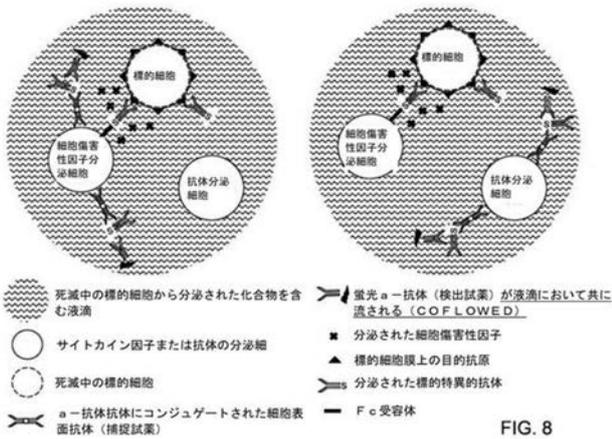


FIG. 8

【 図 9 】

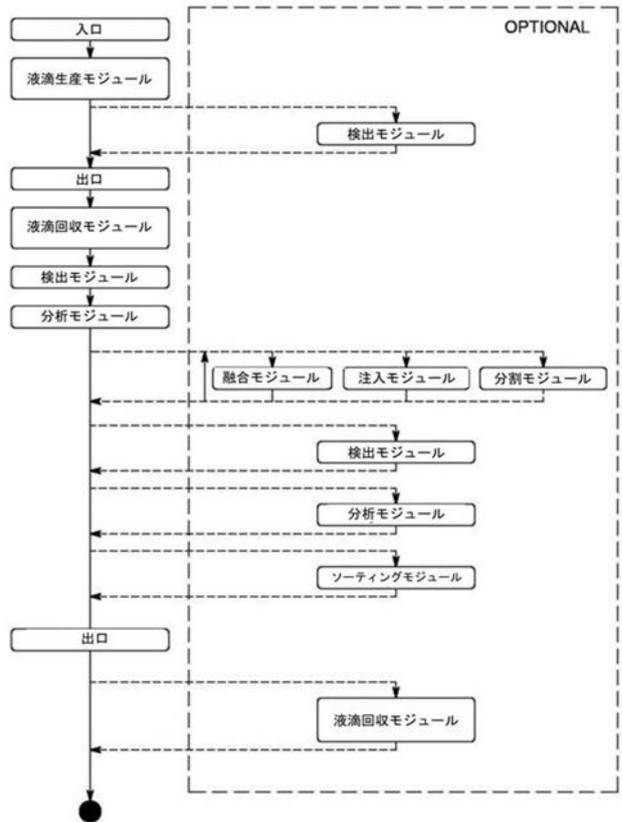


FIG. 9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/060210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01L3/00 G01N33/543 G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01L G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/307626 A1 (GRIFFITHS ANDREW DAVID [FR] ET AL) 26 October 2017 (2017-10-26) cited in the application the whole document example 5 figure 24 family member of W02016059182 cited in the application	1-16
Y	----- KLAUS EYER ET AL: "Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 35, no. 10, 11 September 2017 (2017-09-11), pages 977-982, XP055504042, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3964 the whole document ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 7 June 2019		Date of mailing of the international search report 17/06/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/066210

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LINAS MAZUTIS ET AL: "Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics", NATURE PROTOCOLS, vol. 8, no. 5, 4 April 2013 (2013-04-04), pages 870-891, XP055240820, GB ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2013.046 the whole document -----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/066210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2017307626 A1	26-10-2017	CN 107110854 A	29-08-2017
		DK 3207373 T3	03-06-2019
		EP 3207373 A1	23-08-2017
		FR 3027396 A1	22-04-2016
		JP 2017532560 A	02-11-2017
		US 2017307626 A1	26-10-2017
		WO 2016059182 A1	21-04-2016

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 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
			C 1 2 M	1/34
				Z

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

(72) 発明者 ジェラルド アナベル パトリシア ヴェロニク
 フランス国 9 1 1 2 0 パレゾー, アンパッサ ド ラ セリセ, 1 3

(72) 発明者 メンラス ヴェラ
 フランス国 9 1 4 1 0 サン シル ス ドゥルダン, リュ デ ロッジュ 1 0

Fターム(参考) 2G058 DA02 DA09

4B029 AA07 BB11 FA15

4B063 QA01 QA18 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR56 QR77 QS32 QS33

QS40