

(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2020-525779

(P2020-525779A)

(43) 公表日 令和2年8月27日(2020.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 15/02 (2006.01)	GO 1 N 15/02 A	2 G O 5 9
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 I O 1	
GO 1 N 21/17 (2006.01)	GO 1 N 21/17 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2019-571635 (P2019-571635)
 (86) (22) 出願日 平成30年6月26日 (2018. 6. 26)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年2月19日 (2020. 2. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/067100
 (87) 国際公開番号 W02019/002286
 (87) 国際公開日 平成31年1月3日 (2019. 1. 3)
 (31) 優先権主張番号 17178099.2
 (32) 優先日 平成29年6月27日 (2017. 6. 27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 514159690
 メディツィーニシェ・ユニフェルジテート
 ・グラーツ
 MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ
 オーストリア8036グラーツ、アウエンブルッガープラッツ2番
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 ヒル, クリスティアン
 オーストリア、8053 グラーツ、グラ
 ーザーベーク、16・アー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分散された粒子を有する流体試料を分析するための方法および装置

(57) 【要約】

分散された粒子(24a~24p)を有する流体試料(20)を分析する方法であって、試料に光を照射するステップであって、結果、光の光子(a~d)が粒子(24a~24p)に運動量を伝達する、照射するステップと、上記運動量の伝達によって変化している粒子(24a~24p)の少なくとも1つの特性を測定するステップとを含み、光が、伝播方向(3a)に沿って安定的に変化している間に、伝播方向(3a)に対して垂直な各平面(36)内の2つ以上の点を指す勾配(31a~31p)を有する強度分布(31)を有する伝播ビーム(3)、および/または、高い強度勾配によって3次元ボリューム内に粒子(24a~24p)を閉じ込めるように構成された3D渦トラップビームである、方法。

本発明による方法を実行する装置(1)であって、軸(2a)に沿って細長い試料(20)を保持し、上記軸(2a)に沿って光のビーム(3)を通過させるように構成されているチャンバ(2)を備え、チャンバ(2)が、ビーム(3)の伝播方向(3a)において実質的に拡大する円錐形の内側断面を有する、装置(1)。

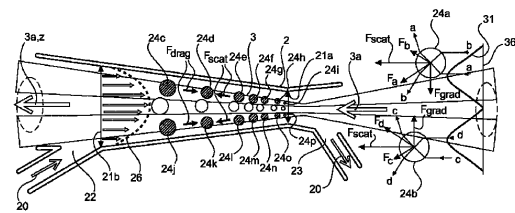


Fig.3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分散された粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) を有する流体試料 (2 0) を分析する方法であって

、
光の光子 (a ~ d) が前記粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) に運動量を伝達するように、前記試料に光を照射するステップと、

前記運動量の伝達によって変化された前記粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) の少なくとも 1 つの特性を測定するステップとを含み、

前記光が、伝播方向 (3 a) に沿って安定的に変化している間に、前記伝播方向 (3 a) に対して垂直な各平面 (3 6) 内の 2 つ以上の点を指す勾配 (3 1 a ~ 3 1 p) を有する強度分布 (3 1) を有する伝播ビーム (3)、および / または、高い強度勾配によって 3 次元ボリューム内に前記粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) を閉じ込めるように構成された 3 D 渦トラップビームであることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記ビーム (3) は、TEM00 以外の横電磁モードを有するレーザビームである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記横電磁モードが、伝播軸 (3 a) の周りに環状である、前記伝播方向 (3 a) に対して垂直な平面 (3 6) 内に少なくとも 1 つの極大値 (3 4) を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記横電磁モードが円筒形 TEM01* モードである、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) が照射されている間に到達する定常速度、前記照射の中断もしくは開始後の粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) の速度の減衰もしくは構築挙動、または前記照射によって誘発される軌道角運動量もしくは回転の少なくとも 1 つを測定するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記伝播方向 (3 a) と実質的に平行または実質的に反対の方向に前記流体試料 (2 0) を流動させるステップをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記流量の空間分布 (2 6) は、所定の連続方程式を満たすように構成される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記流量が放物線状に流れの断面 (2 1 a、2 1 b) 上で変化し、前記断面 (2 1 a、2 1 b) の中心において最高である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記粒子のうちの残余 (2 4 f ~ 2 4 h) とは異なる速度で前記伝播方向 (3 a) に移動する粒子 (2 4 a ~ 2 4 e) を、前記粒子のうちの前記残余 (2 4 f ~ 2 4 h) から分離するステップをさらに含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) によって前記伝播方向 (3 a) に対して実質的に垂直な方向に散乱された光を捕捉するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記光の波長よりも大きい少なくとも 1 つの粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) を不均一に照射するステップと、

前記不均一な照射によって引き起こされた前記粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) の圧縮を検出するステップとをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法を実行するための装置 (1) であって、軸 (2 a) に沿って細長く、前記軸 (2 a) に沿って光のビーム (3) を通過させるように構成された、試料 (2 0) を保持するためのチャンバ (2) を備え、

前記チャンバ (2) は、前記ビーム (3) の前記伝播方向 (3 a) に実質的に拡大する円錐形の内側断面を有することを特徴とする、装置 (1) 。

【請求項 1 3】

ビーム (3) を前記チャンバ (2) へと通過させるように構成されたレーザ (4) をさらに備える、請求項 1 2 に記載の装置 (1) 。

【請求項 1 4】

前記ビーム (3) は、前記チャンバ (2) の前記内側断面 (2 1 a 、 2 1 b) が拡大するにつれて、前記伝播方向 (3 a) に拡大する、請求項 1 3 に記載の装置 (1) 。

【請求項 1 5】

前記レーザ (4) と前記チャンバ (2) との間の光路内に回折光学素子 (6) と列をなした半波長板 (5) をさらに備える、請求項 1 3 または 1 4 に記載の装置 (1) 。

【請求項 1 6】

前記試料 (2 0) 中の粒子 (2 4 a ~ 2 4 p) によって前記伝播方向 (3 a) に対して実質的に垂直に散乱された光のための少なくとも第 1 の位置感知検出器 (1 0) と、

前記伝播方向 (3 a) に沿って前記試料 (2 0) を完全に横切った光のための第 2 の検出器 (1 2) とをさらに備える、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の装置 (1) 。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分散された粒子を有する流体試料を分析するための光学的方法、およびこの方法を実施するのに特に適した装置に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

ナノ粒子は、特にバイオテクノロジーおよび医薬品の分野において、将来の用途に大きい可能性を有する。しかし、不確定かつ異原性の粒子集団は、焦点が合わされ制御された用途のための分析ツールおよび高度な操作ならびに分離機器を必要とする。運動量の伝達を通じてナノサイズからマイクロサイズ領域の粒子を操作するために光子を使用することができることが発見されたため、研究の取り組みは、この手法を使用した種々の応用および革新に焦点を当ててきた。この分野の特別な方法論の 1 つである光学力クロマトグラフィ (OFC) が、(T . I m a s a k a 著「Optical chromatography . A new tool for separation of particles .」(Analysis 26 . 5 : 53 ~ 53 (1998))) に開示されている。この方法は、毛細管内で明確に規定された流体抗力に反作用する光学力を適用することによって、液体媒体中の不均一混合物の特性評価および分離を実現する。それ以来、この技術は成熟して多くの実験機器に結実しており、その一例が、LumaCytte Inc . が販売しており、例えば米国特許第 8 , 7 5 3 , 8 9 1 号において特許を取得したレーザ力細胞診装置である。

【0003】

これまでのところ、OFC の欠点は、濃度およびスループットに限界があることである。すべての粒子は、レーザビームに対応する 1 本の線に沿って並んでいる必要がある。これによって、分離領域内での粒子間相互作用に関するダイナミックレンジの限界および深刻な問題が発生する。最終的に、OFC の用途は、高く希釈された試料および特定の単一粒子の用途に限定される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0004】

発明の目的

したがって、本発明の目的は、OFCにおける粒子間相互作用の問題を軽減し、より希釈度の低い試料においてもOFCの使用を可能にすることである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

この目的は、主請求項に記載の方法およびさらなる独立請求項に記載の装置によって達成される。さらなる有利な実施形態が、従属請求項に詳述されている。

【0006】

発明の開示

本発明者らは、分散された粒子を有する流体試料を分析するための方法を開発した。試料に光が照射され、結果、光の光子が粒子に運動量を伝達する。上記運動量の伝達によって変化する粒子の少なくとも1つの特性が測定される。

【0007】

本発明によれば、光は、

- 伝播方向に沿って安定的に変化しながら、伝播方向に対して垂直な各平面内の2つ以上の点を指す勾配を有する強度分布を有する伝播ビーム、および/または、
- 高強度勾配によって、粒子を3次元ボリューム内に閉じ込めるように構成された3D渦トラップビームである。

【0008】

本発明者らは、OFCの前述の限界の根本原因は、Imasakaによる方法の当初の概念以来使用されていたビームのタイプにあることを発見した。この光学構成は、力の誘導に標準のTEM00レーザビームプロファイルを使用する。伝播方向に対して垂直な断面では、TEM00ビームはビームの中心に1つのみの極大値を有する。この単一の極大値は、伝播軸に沿って1本の線を規定し、ここで、運動量の伝達を受ける場合、単一の極大値を指す勾配力に起因してすべての粒子が整列する。作用空間は基本的に1次元に制限される。

【0009】

対照的に、本発明によるビームプロファイルは、粒子が運動量の伝達を受けることができる作用空間として機能することができる3次元ボリュームメトリック領域において高い強度を提供する。作用空間は、例えば、円錐形であり得る。粒子は、この3次元作用空間内でより自由度が高く、作用空間内でほぼ自由に動き、他の粒子を追い抜く場合さえある。これによって、運動量の伝達によって変化する特性の測定のダイナミックレンジ、感度およびスループットが向上する。例えば、この妨げられない運動を通じて、レーザ力によって誘導される、平衡位置に向かう粒子速度軌道が測定され得、これは、対応する粒子サイズに直接起因し得る。

【0010】

伝播方向に対して垂直な各平面内の2つ以上の点を指す勾配を有するビームは、例えば、TEM00以外の横方向電磁モードを有するレーザビームであり得る。そのようなモードが、断面全体に分布するいくつかの異なる極大値を有する強度プロファイルを有する場合、すなわち、粒子が1つの極大値から次の極大値に移動することができない場合であっても、これらの極大値の各々は粒子にボリュームメトリック作用空間を直ちに与える。

【0011】

そのようなビームは、伝播方向に沿った成分を有する好ましい方向で、粒子に正味の力を及ぼすことができる。流体抗力などの反作用力が一切ない場合、粒子は、流体試料を保持している容器の壁に最終的に当たるまで、この好ましい方向に安定的に移動することができる。対照的に、3D渦トラップビームは、高強度の勾配から構成される「非材料壁」によって粒子を閉じ込める。粒子は、渦トラップビームによって画定される3次元ボリューム内を自由に移動することができるが、このボリュームから出ることはできない。このボリュームは、コンテナの任意の壁から遠く離れるように構成することができ、そのため

10

20

30

40

50

、コンテナ壁に起因する構造物が一切ない状態で粒子を調べることができる。

【0012】

横電磁モードが使用される場合、本発明の特に有利な実施形態では、このモードは、伝播軸を中心として環状である伝播方向に対して垂直な平面内に、少なくとも1つの極大値を有する。この環状の極大値が（ビームの可能な拡大を含む）伝播軸に沿って「押し出される」と、3次元作用空間が形成され、ここで、粒子は環の周に沿った方位角方向に追加の自由度を有する。例えば、照射はまた、粒子に角運動量も伝達することができ、例えば、3次元作用空間内のらせん経路上に粒子を送る。

【0013】

粒子に角運動量を伝達するビームの一例は、円筒形TEM₀₁*モードである。したがって、本発明の特に有利な実施形態では、このようなモードを使用して、3次元作用空間の構築と、粒子への角運動量の伝達の両方を同時に行う。

10

【0014】

本発明の主な利点は、粒子への運動量の伝達の効果が研究される測定セットアップから、粒子間相互作用の効果が排除されることである。これによって、特に運動量の伝達に応じて粒子が行う運動の解析から、主な誤差の原因が排除される。したがって、本発明のさらに特に有利な実施形態では、方法は、粒子が照射されている間に到達する定常速度、照射の中断もしくは開始後の粒子の速度の減衰もしくは構築挙動、または照射によって誘発される軌道角運動量もしくは回転の少なくとも1つを測定することをさらに含む。

【0015】

同様の誤差の原因が、運動量の伝達に起因する力が流体抗力によって増大または相殺される測定から排除される。したがって、本発明のさらに特に有利な実施形態では、この方法は、伝播方向と実質的に平行または実質的に反対の方向に流体試料を流動させることをさらに含む。

20

【0016】

粒子の挙動の定量的な分析のために、流体試料を保持しているチャンバ内のすべての粒子の流体抗力が既知であることが最良である。この目的のために、好ましくは、流量の空間分布は、所定の連続方程式を満たすように構成される。例示的な実施形態では、流量は流れの断面上で放物線状に変化し得、同時に上記断面の中心で最も高い。

【0017】

運動量の伝達によって及ぼされる力を流体抗力に対して平衡させることは、例えば、伝播の方向において、粒子のうちの残余とは異なる速度で動く粒子を、粒子のうちの上記残余から分離するために使用され得る。例えば、伝播方向に正味の動きをする粒子が、或る割合のみ存在し得、一方で、他の粒子は静止したまま、または反対方向に移動し得る。この粒子分離は、前述のOFCと同様に機能するが、重要な差異がある。それは、粒子間の実際の違いによって引き起こされる粒子間の動きの違いが、もはや粒子間相互作用の効果と畳み込まれないために、例えば異なるサイズといった粒子を互いに区別できる精度が大幅に改善されることである。

30

【0018】

粒子を追跡するために、好ましくは、粒子によって伝播方向に対して実質的に垂直な方向に散乱された光が捕捉される。散乱光は個々の粒子に直接起因し得、粒子を保持する領域の画像を取得することによって、多数の粒子を同時に監視することができる。

40

【0019】

サイジングおよび特性評価方法は、大まかに、アンサンブル法、カウント法、および分離法に分類することができる。分離と追跡の両方を提供することによって、本発明は、組み合わせ分離 - カウント法を提供する。今日使用されている主要なアンサンブル手法は、動的散乱DLSであり、これには以下の利点がある。

【0020】

- それを使いやすい方法であること。
- 必要な試料情報量が最小限であること。

50

- 【0021】
- 非常に柔軟な試料濃度範囲にわたって使用することができること。
 - 非常に小さい試料サイズ(0.3nmまで)を測定することができること。
- 【0022】
- 標準化されたプロトコルが利用可能な既知の技法であること。
- ただし、以下の点が犠牲となる。
- 【0023】
- 高い多分散指数、PDI (polydispersity index) を有する試料は、散乱強度の差が大きいことに起因して小さい粒子をカバーする傾向があること。
- 【0024】
- 高PDI試料では、平均化によって方法誤差が大きくなること。
 - 材料の混合が測定に影響を与え、誤差を引き起こすこと。
- 【0025】
- 濃度の低い粒子集団はほとんど検出することができないこと。
 - 濃度測定は、例えば試料透過を介してなど、間接的な方法でのみ可能であること。
- 【0026】
- 「ユーザーが観察可能な」測定原理ではない。
- DLSと比較して、本発明による分離と追跡との組み合わせには以下のいくつかの利点がある。
- 【0027】
- 高PDIの影響は無視することができ、そのため、すべてのサイズピンを通じた走査が可能である。
- 【0028】
- 測定は直接的かつリアルタイムで観測可能な測定値であり、顧客の信頼度が増大する。
- 【0029】
- 検出感度は、各サイズピンにおいて単一粒子検出まで調整することができること。
 - 少なくとも20nm~100μmの広い範囲の粒子サイズが測定可能であること。
- 【0030】
- 必要な試料ボリュームが、例えば5μl~100μlと少量であること。
 - 総粒子濃度および各サイズピンの粒子濃度を直接的に導出することができること。
- 【0031】
- 粒子を同じ測定ステップにおいて分離およびサイジングすることができること。
 - トラップ、選別、または蛍光測定などの追加の動作を、同じプラットフォーム上で実行することができること。
- 【0032】
- 粒子の固有の特性が検出可能かつ選別可能になる(例えば、タンパク質と脂質との複数の異なる比率)こと。
- 【0033】
- これらの利点に対する些細な代償は、測定の物理的経路がより複雑ということである。サイズ分布は、ブラウン運動を介して直接得られるのではなく、光学的運動量の伝達によって誘発される力の差を介して得られる。また、試料に関してやや多くの情報(すなわち、屈折率)が必要である。
- 【0034】
- 今日使用されている主なカウント法は、ナノ粒子追跡分析NTAであり、これは、ブラウン運動の速度を粒子サイズと関連させる方法である。この方法には以下の利点がある。
- 【0035】
- 粒子を直接視覚化することによって、顧客の高い信頼および視覚的な予備試料評価が可能になること。
- 【0036】

10

20

30

40

50

- ブラウン運動のみが検出されるため、散乱強度はサイズ測定に一切影響を与えないこと。

【0037】

- 「ワンバイワン（1つずつ）」アプローチが、多分散性をより良好に解決すること。
- 屈折率による寄与のない純粋なサイズ測定が可能であること。

【0038】

- 粒子の凝集および軟凝集がリアルタイムで観察可能であること。
- 濃度測定が可能であること。

【0039】

ただし、以下の点が犠牲となる。

- この方法は、広いサイズ分布に限定されること。「ワンバイワン（1つずつ）」アプローチに起因して、すべてのサイズピンを測定することができるとは限らないため、PDIは完全に推定可能ではない。

【0040】

- 3次元ブラウン運動の2次元検出は、固有の測定誤差をもたらすこと。
- 追跡間隔が短いと、精度がさらに低下すること。

【0041】

- ガウスビームプロファイルが、異なるサイズの粒子の測定に影響し、さらなる誤差をもたらすこと。

【0042】

- 高PDI試料は、散乱強度の差が大きいことに起因して、小さい粒子をカバーすることができること。

【0043】

NTAと比較して、本発明による分離と追跡との組み合わせには以下のいくつかの利点がある。

【0044】

- 粒子が測定ウィンドウを通じて自動的に輸送され、高い粒子測定統計を可能にすること。

【0045】

- 濃度比に関係なく、大小の粒子の検出が可能であり、そのため、すべてのサイズピンを評価することができ、完全なPDIを推定することが可能であること。

【0046】

- 光学的に誘導される力が、好ましい方向を有することができ、結果、3次元における統計的ブラウン運動と比較して、明確な1次元測定パラメータが利用可能であること。したがって、距離、速度、および加（減）速度を、追跡アルゴリズムによって導き出すことができること。

【0047】

- 検出感度は、単一粒子の検出まで、各サイズピンにおいて調整することができること。

【0048】

- 粒子の固有の特性が検出可能であり、選別可能である（タンパク質と脂質との比率など）こと。

【0049】

- トラップ、選別、または蛍光測定などの追加の操作を、同じプラットフォーム上で実行することができること。

【0050】

DLSとの比較と同様に、主な代償は、試料の屈折率が分かっていることが必要であり、測定の物理的経路がより複雑ということである。

【0051】

現在使用されている主な分離方法は、非対称フロー式フィールドフロー分別（AF4）

10

20

30

40

50

、およびサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）であり、ゲル浸透クロマトグラフィ（GPC）が最も顕著な実施形態である。これらの分離方法には、以下の利点がある。

【0052】

- GPC / SEC は非常に小さい粒子（少数のDA分子）を分離可能であること。
- GPC / SEC は、はるかに高いスループットに拡張可能であること。

【0053】

- AF4 は、1 nm ~ 50 μm の広い分離範囲を提供すること。
- AF4 には固定相がなく、そのため、マトリックス相互作用が一切ないこと。

【0054】

- これらの技術は十分に確立されており、そのため、承認された規格およびプロトコルが利用可能であること。 10

【0055】

ただし、以下の点が犠牲となる。

- 高度な訓練を受けたオペレータが必要であること。

【0056】

- せん断劣化、カラムの目詰まり、および固定相との望ましくない相互作用によって、GPC / SEC 測定にアーチファクトがもたらされること。

【0057】

- マトリックス相互作用が回復の問題を引き起こすこと。
- 分離と検出とは別個の装置によって実行する必要があり、分析がより複雑になること 20

【0058】

- GPC / SEC は、より大きい分子とポリマーとをほとんど分離することができない（範囲は約 20 nm において終端する）こと。

【0059】

- AF4 では、膜相互作用および初期分離開始条件が非常に厳密であること。
- AF4 膜は消耗部品であり、設置が難しく、細孔サイズの製造ばらつきに起因して再現性が低いこと。

【0060】

- GPC / SEC は非常にコストがかかること。 30
GPC / SEC および AF4 と比較して、本発明による分離と追跡との組み合わせには、以下のいくつかの利点がある。

【0061】

- 同種および異種試料に適用可能であること。粒子は、溶液中に存在することもでき、または、エマルジョンもしくは分散液などのコロイド系として存在することもできること。

【0062】

- GPC / SEC とは対照的に、固定相は不要であること。
- AF4 とは対照的に、膜は不要であること。

【0063】

- この方法は非常に感度が高く、単一粒子ろ過まで、非常に低濃度の試料に使用可能であること。 40

【0064】

- 動作を直接観察し、性能を評価することができること。

些細な代償として、分離ボリュームは溶媒の屈折率に依存し、分離は光学コントラストに依存する（光学コントラストが高いほど分離性能が向上する）。

【0065】

本発明のさらに特に有利な実施形態では、光の波長よりも大きい少なくとも1つの粒子が不均一に照明され、不均一な照明によって引き起こされる粒子の圧縮が検出される。この圧縮はより正確に測定することもでき、3次元作用ボリューム内で利用可能な空間がよ 50

り多いため、問題の粒子に対する照明パターンは、光を遮る他の粒子によって意図せずに変更されることはなく、問題の粒子はまた、他の粒子と直接相互作用することもない。

【0066】

本発明による方法の主な利点は以下のとおりである。

粒子はビーム内で妨げられずに移動することができるため、光学的に誘導された力と流体抗力との間の単なる平衡位置に加えて、粒子の非平衡速度追跡が可能になる。

【0067】

3次元作用空間のボリュームは、TEM00モードによって形成される単なる1次元チャンネルの「ボリューム」よりも何倍も大きいいため、それに応じて大きい分離領域を使用して、粒子をろ過、分離、濃縮することができる。これによって、 10^8 粒子/m¹程度の粒子濃度を使用することができるようになるが、従来技術では、低濃度試料中の単一粒子の研究しかできなかった。

10

【0068】

試料のマイクロ流体流を円錐粒子閉じ込めに合わせて調整することによって、測定は高強度領域と低強度領域の両方で高感度となり、ダイナミックレンジをさらに改善することができる。

【0069】

粒子が互いに整列する必要がないため、はるかに大きい3次元作用空間が、はるかに高いスループットを可能にする。 10^6 粒子/分程度のスループットに到達可能である。

【0070】

3次元作用空間では、粒子が凝集する傾向が大幅に減少する。

本発明は、本発明による方法を実行するための装置も提供する。この装置は、試料を保持するためのチャンバを備える。チャンバは軸に沿って細長く、上記軸に沿ってビームを通過させるように構成される。

20

【0071】

本発明によれば、チャンバは、ビームの伝播方向において実質的に拡大する円錐形の内側断面を有する。

【0072】

本発明者らは、この設計が、光の光子から粒子への運動量の伝達によって誘発される力に対して、チャンバ内のマイクロ流体抗力を有利に適合させることを発見した。ビームの伝播軸に沿った異なる平衡位置が、この伝播軸に対して垂直な軸に沿った異なる距離に対応する。その結果、マイクロ流体工学的に決定される流れプロファイルに起因して、大きい粒子ほど、低光学強度領域において小さい抗力を受ける。これによって、明確で効率的かつ高感度の作用空間が作成され、感度およびダイナミックレンジがさらに向上する。

30

【0073】

チャンバは、例えば、計算流体力学を使用して設計され、対応する微細加工技術を使用して製造されてもよい。

【0074】

本発明の特に有利な実施形態では、装置は、ビームをチャンバに通過させるように構成されたレーザをさらに備える。好ましくは、チャンバの内側断面が拡大するにつれて、ビームは伝播方向に拡大する。このとき、チャンバの形状は、その中に作成された3次元作用空間の形状に最適に適合される。

40

【0075】

本発明のさらに特に有利な実施形態では、レーザとチャンバとの間の光路は、回折光学素子と列をなした半波長板を備える。このセットアップを使用して、上記の方法のコンテキストにおいて最も有用であるTEM01*モードを形成することができる。

【0076】

本発明のさらに特に有利な実施形態では、装置は、試料中の粒子によって伝播方向に対して実質的に垂直に散乱された光のための少なくとも第1の位置感知検出器と、伝播方向に沿って試料を完全に横切った光のための第2の検出器とをさらに備える。このとき、個

50

々の粒子が光子からの運動量の伝達とマイクロ流体抗力との組み合わせの下でチャンバを通じて移動しているときにそれらを追跡するために、第1の検出器を使用することができる。同時に、第2の検出器を使用して、チャンバの状態を制御し、ビームプロファイルを評価することができる。

【0077】

3次元作用空間は、試料チャンバのマイクロ流体設計とともに用いて、OFCを「特殊な用途のためのニッチな存在」から、マルチパラメータ粒子特性評価、分離、および操作プラットフォームにする。このプラットフォームは、

- 粒子特性評価、
- 粒子分離、ならびに、
- トラップおよび単一粒子分析、

の3つの主要な操作モードにおいて操作することができる。

【0078】

これらのすべての動作モードは、ラベルフリー、無接触（すなわち、固定相なし）、かつ非侵襲的に、高価な医薬品または希少な生物学的抽出物向けの5 μ lまでの極めて低い試料ボリュームを許容する連続フローまたは液体環境におけるパッチセットアップとして動作する。以下に、3つの動作モードを要約し、現在市販されている競合技術を参照する。

【0079】

粒子特性評価は、例えばDLS、NTAおよびMALSと競合する。粒子サイズおよびサイズ分布は、「粒子速度追跡」および増強された「平衡距離検出」によって、20nm~100 μ mの範囲内で測定することができる。粒子散乱によって、任意の選択した「サイズピン」の粒子を単一粒子感度まで視覚化することができる。

【0080】

粒子分離は、例えばAF4、GPC/SEC、FPLC、FACSおよびAUCと競合する。粒子は、サイズを参照するか、または、粒子組成の差などの固有の特性を参照して分離することができる。このように、例えば、細胞集団を、FACSまたは超遠心分離と同様に選別することができる。したがって、本方法は、調整可能な膜サイズを有する機械的フィルタと同様に機能する光学フィルタを提供し得る。

【0081】

トラップおよび単一粒子分析は、例えば、AFM、マイクロピペット吸引、光ストレッチャ、光トラップ、マイクロ流体ラポオンチッププラットフォームと競合する。3次元作用空間内での粒子の妨げられない運動に起因して、粘弾性粒子の特性および細胞剛性が、粒子の観察される挙動から推定可能である。赤血球などの粒子の変形性を調べることができる。トラップされた、または他の状態で分離された単一の細胞または粒子は、透過光および蛍光顕微鏡法、またはラマン分光法などの他の光学的方法を使用して分析することもできる。

【0082】

本方法および装置は、例えば、製薬産業において、

- 薬物設計（例えば、ワクチン特性評価、抗体およびタンパク質ベースの薬物開発）、
 - ヒト免疫ワクチン接種のためのピーナツアレルゲンによってコーティングされたプロタミンオリゴヌクレオチドなどの薬学的に活性なナノ粒子の特性評価および分離、
 - ワクチン開発（例えば、ワクチン接種の可能性を提供する外膜小胞の形成のサイズ測定および時間関連定量化）、
 - 製剤開発（例えば、治療薬投与のための乳化制御、またはマイクロエマルジョンの物理的パラメータ）、
 - オンライン品質管理（例えば、微粒子形成制御、充填密度評価、産業用マイクロ流体スタックのバイパス評価、または化学療法用のドキシル-リボソーム製剤）、
- のために使用されてもよい。

【0083】

10

20

30

40

50

本方法および装置は、例えば、

- 赤血球の変形能（例えば、糖尿病診断のためのヘモグロビンのグリコシル化）、または、

- 細胞粘弾性特性の測定（例えば、がん細胞は正常細胞に対して細胞軟化を示す）、を研究するための医学的および臨床的診断に使用されてもよい。

【0084】

本方法および装置は、例えば、ナノサイズの食品添加物の開発（例えば、立体安定性測定を介した香料料および栄養素のナノカプセル化）のために食品産業で使用されてもよい。

【0085】

本方法および装置は、例えば、化粧品および香水産業において、

- リポソームクリーム製剤の特性評価（例えば、ニオソームの研究開発）、
- 日焼け止め、化粧品およびクリームに使用される粒子の特徴、または、
- 香りの保持に使用されるナノ粒子の特性評価、
のために使用されてもよい。

【0086】

本方法および装置は、例えば、バイオテクノロジーにおいて、

- 細菌の細胞外膀胱の研究（例えば、検出、定量化およびサイジング）、または、
- 微生物叢の研究および特性評価、
のために使用されてもよい。

【0087】

図面の説明

以下では、本発明を、範囲を限定することを一切意図することなく、図を使用して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】装置1のプロトタイプ実施形態の概略図である。

【図2】いくつかの使用可能な横電磁モードの図である。

【図3】3D円錐形状作用空間の光線光学モデルの図である。

【図4】粒子分離中に予想され得る顕微鏡写真の例示的な図である。

【図5】粒子の速度を追跡することができる顕微鏡写真の例示的な図である。

【発明を実施するための形態】

【0089】

図1は、装置1のプロトタイプの実施形態を示している。装置1は、流体試料20を収容するためのチャンバ2を備えている。試料20は、マイクロ流体シリンジポンプ15によって、1mlシリンジから0.1~10 μ l/分の速度で20 μ l試料ループ16を通り、直径約600 μ mの10 μ l溶融シリカ毛細管チャンバ2へと圧送され、チャンバ2を右から左へと横切る。チャンバ2を横切った後、試料20は試料収集器17によって収集される。チャンバ2は、軸2aで細長くなっている。

【0090】

532nm DPSSレーザ4から放出される光が、対物レンズ8aと絞り8bとを備える空間フィルタ8を通過する。第1のレンズ7aによって、光は、第2のレンズ7bによって再集束される前に、溶融シリカ半波長板5および回折光学素子6を通過する平行ビームに変換される。このようにして、規定の環サイズを有する円筒形のTEM01*モードから実質的になるビーム3が形成され、言い換えれば、対物レンズ8aの焦点領域におけるレーザビームプロファイルは、渦変換されて環状モードになる。

【0091】

チャンバ2は透明であり、対物レンズ10aおよびカメラ10bを備える位置感知検出器10によって観察することができる。この位置感知検出器10は、チャンバ2内の試料20によって伝播方向3aに対して垂直な方向に散乱された光、および、補助光源9から

10

20

30

40

50

チャンバ 2 を通過し同じ方向に透過した補助光を捕捉することができる。

【 0 0 9 2 】

チャンバ 2 を通過した後、ビーム 3 の一部分は、ビームスプリッタ 1 1 によって分割され、レンズ 1 2 a とカメラ 1 2 b とを備える第 2 の検出器 1 2 に供給される。ビームスプリッタ 1 1 は、レーザ 4 が非常に強い（例えば、3 W の CW 出力）ため、強度を低減する役割を果たす。したがって、ほとんどの強度は、ビームダンプ 1 3 において破棄される。

【 0 0 9 3 】

カメラ 1 0 b およびカメラ 1 2 b の両方からの画像情報は、コンピュータ 1 4 によって記録され、コンピュータ 1 4 はまた、レーザ 4 およびマイクロ流体シリンジポンプ 1 5 も制御する。

【 0 0 9 4 】

図 2 は、本発明のコンテキストにおいて使用可能な 2 つの例示的なモードについて、伝播方向 3 a に対して垂直な平面 3 6 におけるレーザビーム 3 の強度分布 3 1 を示している。

【 0 0 9 5 】

図 2 a は、円筒形 TEM₀₁* モードを示している。断面の様々な領域の強度が、各領域を埋めるドットの密度によって示される。円 3 2 の内側および円 3 5 の外側では、強度が消失するため、これらの領域はドットで埋められていない。円 3 2 から半径方向外側に移動すると、比較的低い強度の領域に行き当たり、この領域から、円 3 3 a および円 3 3 b によって境界付けられる比較的高い強度の領域に移行することになる。後者の領域内で、環状強度極大値が円 3 4 によって示される。円 3 3 b と円 3 5 との間には、比較的強度の低いさらなる領域がある。より低い強度からより高い強度を指す様々な例示的な勾配 3 1 a ~ 3 1 p を図 2 a に示す。

【 0 0 9 6 】

円 3 3 a と円 3 3 b との間の高強度領域が、図面の平面に対応する平面 3 6 から伝播方向 3 a に沿って「押し出される」と、この領域は、流体試料 2 0 に含まれる粒子 2 4 a ~ 2 4 p がビーム 3 からの運動量の伝達によって駆動されて移動し得る連続的な 3 次元作用空間を形成する。具体的には、この空間内で、粒子 2 4 a ~ 2 4 p は互いに追い越し合い、環の円周を回って方位角方向にも（例えば、極大値を表す円 3 4 に沿って）移動する可能性がある。したがって、伝播方向 3 a に沿った前進運動と組み合わせさせて、粒子 2 4 a ~ 2 4 p の運動は、例えばらせん運動になり得る。

【 0 0 9 7 】

図 2 b は、本発明のコンテキストにおいて使用可能な別のモードを示している。これは円筒形 TEM₀₂ モードである。強度プロファイル 3 1 は、基本的に、低強度領域 3 7 a および高強度領域 3 8 a が埋め込まれた第 1 のローブと、低強度領域 3 7 b および高強度領域 3 8 b が埋め込まれた第 2 のローブと、低強度領域 3 7 c および高強度領域 3 8 c が埋め込まれた第 3 のローブと、低強度領域 3 7 d および高強度領域 3 8 d が埋め込まれた第 4 のローブとに分割される。

【 0 0 9 8 】

各高強度領域 3 8 a ~ 3 8 d は、平面 3 6 から伝播方向 3 a に押し出されると、試料 2 0 に含まれる任意の粒子 2 4 a ~ 2 4 p に対するそれ自体の作用空間を形成する。しかしながら、粒子 2 4 a ~ 2 4 p は、そのような領域 3 8 a ~ 3 8 d から別の領域に移動することはできない。

【 0 0 9 9 】

図 3 は、散乱力 F_{scat} がチャンバ 2 内の流体抗力 F_{drag} とどのように平衡するかを示しており、散乱力 F_{scat} を理解するために、光線光学モデルが使用される。強度プロファイル 3 1 を有するビーム 3 の伝播方向 3 a に沿って、チャンバ 2 の断面 2 1 a、2 1 b は、ビーム 3 が拡大するにつれて実質的に拡大する。これによって、ビーム 3 の伝播方向 3 a とは反対の方向に左側の入口 2 2 から右側の出口 2 3 に流れる試料 2 0 の流量 2 6 が、断面 2 1 a、2 1 b の中心で最大となる放物線状に変化し、一方、強度プロフ

10

20

30

40

50

ファイル 3 1 を有するビーム 3 の強度は断面 2 1 a、2 1 b の中心で最小となる。

【 0 1 0 0 】

粒子 2 4 c ~ 2 4 p は様々なサイズを有し、それらは、両方とも粒子サイズとともに増加する散乱力 $F_{sca t}$ および抗力 $F_{dra g}$ を受ける。その結果、両方の力が平衡状態にあるチャンバ 2 内の位置は、異なるサイズの粒子 2 4 c ~ 2 4 p に対して異なる。これを使用して、粒子をそれらのサイズに従って分離することができる。

【 0 1 0 1 】

図 3 の右側には、4 つの例示的な光子 a ~ d からの運動量の伝達によって、ビーム 3 の強度プロファイル 3 1 が例示的な粒子 2 4 a および 2 4 b に力を及ぼす様子が概略的に示されている。光子 a ~ d がプロセス中に散乱される方向、および衝突時に各光子 a ~ d が粒子 2 4 a ~ 2 4 b に及ぼす力が示される。厳密に言えば、レーザビーム 3 の強度が高いということは、1 秒あたりより多くの光子が粒子 2 4 a、2 4 b に衝突することを意味する。図 3 の部分光線光学モデルでは、これは、より強い力を及ぼす強度分布 3 1 のより高い強度の領域から入来する光子によってモデル化される。

10

【 0 1 0 2 】

すべての衝突する光子によって粒子 2 4 a、2 4 b に加えられる合計の力は、伝播方向 3 a に平行な方向の成分 $F_{sca t}$ 、および、伝播方向 3 a に対して垂直な、強度極大値に向かう方向における成分 $F_{gra d}$ を有すると理解することができる。

【 0 1 0 3 】

図 1 および図 3 において説明したセットアップでは、粒子への力の伝達は 1 p N ~ 1 n N 程度であり得る。試料 2 0 の液体は、例えば、水、E t O H、またはイソプロパノールであってもよい。濃度勾配によって、液体環境に追加の力が導入され得る。

20

【 0 1 0 4 】

図 4 は、試料 2 0 が異なるサイズの粒子 2 4 a ~ 2 4 g を含む場合に、図 1 に示される装置 1 のカメラ 1 0 b 上で予測され得る顕微鏡画像を示している。図 4 に示す例では、試料 2 0 は、ポリスチレンビーズが水の中で非常に高く希釈された試料である。ビーズは、図 4 において 5 つの例が 2 4 a ~ 2 4 e とラベル付けされている、各々が 9 4 0 n m のサイズのビーズの第 1 の部分と、図 4 において 3 つの例が 2 4 f ~ 2 4 h とラベル付けされている、各々が 2 0 0 n m のサイズのビーズの第 2 の部分とを含む。

【 0 1 0 5 】

より大きいビーズ 2 4 a ~ 2 4 e は、レーザビーム 3 による照射からより大きい力を受けるため、それらはチャンバ 2 の左側の第 1 の領域 2 5 a に蓄積する。一方、小さいビーズ 2 4 f ~ 2 4 h は、右側で、チャンバ 2 の右側の第 2 の領域 2 5 b に蓄積する。領域 2 5 a および 2 5 b の幅は、ビーズ群 2 4 a ~ 2 4 e および 2 4 f ~ 2 4 h における分散度の測度である。

30

【 0 1 0 6 】

図 4 に示される粒子のサイズは、相対的な縮尺では描かれていない。すなわち、2 0 0 n m サイズのビーズ 2 4 f ~ 2 4 h は、9 4 0 n m サイズのビーズ 2 4 a ~ 2 4 e のサイズの 4 分の 1 未満に描かれていない。この理由は、粒子 2 4 a ~ 2 4 h によって散乱される光の画像では、両方のタイプの粒子がほぼ同じサイズにされてしまうためである。

40

【 0 1 0 7 】

図 5 は、異なるサイズの 3 つの例示的な粒子 2 4 a ~ 2 4 c が、右から左に向けられるレーザビーム 3 からの散乱力、および、左から右に向けられる流体流からの抗力を受けている間に、いくつかの画像フレーム i) ~ i v) の期間にわたって追跡されるときに、図 1 に示す装置 1 のカメラ 1 0 b 上で予測され得る顕微鏡画像を示す。図 4 とは対照的に、粒子 2 4 a、2 4 b、および 2 4 c 間のサイズ差は、これらの粒子間の区別をよりよく視覚化するために、図 5 では誇張されたスケールで描かれている。

【 0 1 0 8 】

粒子 2 4 a は最大の粒子であり、フレーム i) ~ i v) のシーケンス内で右から左に最も速く移動する。粒子 2 4 b は最小の粒子であり、最も遅く移動する。粒子 2 4 c は、粒

50

粒子 2 4 a のサイズと粒子 2 4 b のサイズとの間のサイズを有する。粒子 2 4 c は粒子 2 4 a と同時にチャンバ 2 の左側に到達するが、フレーム i) 内で粒子 2 4 a よりも左側から移動し始めている。したがって、粒子 2 4 c は、粒子 2 4 a よりも低速に移動するが、粒子 2 4 b よりも高速に移動する。

【 0 1 0 9 】

粒子 2 4 a ~ 2 4 c の速度は、それらのサイズに数学的に関連させることができ、そのため、個々の粒子 2 4 a ~ 2 4 c を追跡することによって、それらのサイズを決定することができる。

【 0 1 1 0 】

参照記号のリスト

1	装置	
2	チャンバ	
2 a	チャンバ 2 の軸	
3	ビーム	
3 a	ビーム 3 の伝播方向	
4	レーザ	
5	半波長板	
6	回折素子	
7 a , 7 b	レンズ	
8	空間フィルタ	20
8 a	空間フィルタ 8 の対物レンズ	
8 b	空間フィルタ 8 の絞り	
9	補助光源	
1 0	位置感知検出器	
1 0 a	検出器 1 0 の対物レンズ	
1 0 b	検出器 1 0 のカメラ	
1 1	ビームスプリッタ	
1 2	透過光の検出器	
1 2 a	検出器 1 2 のレンズ	
1 2 b	検出器 1 2 のカメラ	30
1 3	ビームダンプ	
1 4	コンピュータ	
1 5	マイクロ流体シリンジポンプ	
1 6	試料ループ	
1 7	試料収集器	
2 0	流体試料	
2 1 a , 2 1 b	チャンバ 2 の断面	
2 2	チャンバ 2 の入口	
2 3	チャンバ 2 の出口	
2 4 a ~ 2 4 p	粒子	40
2 5 a , 2 5 b	サイズの異なる粒子 2 4 a ~ 2 4 h が集まる領域	
2 6	チャンバ 2 の流量の空間分布	
3 1	ビーム 3 の強度分布	
3 1 a ~ 3 1 p	強度分布 3 1 の勾配	
3 2	低強度領域の内部限界	
3 3 a	高強度領域の内部限界	
3 3 b	高強度領域の外部限界	
3 4	環状強度極大値	
3 5	低強度領域の外部限界	
3 6	伝播方向 3 a に対して垂直な平面	50

- 37a ~ 37d 低強度領域
- 38a ~ 38d 高強度領域
- a ~ d 光子
- $F_a \sim F_d$ 光子 a ~ d が及ぼす力
- F_{drag} 流体抗力
- F_{grad} 低強度に向かう勾配力
- F_{scat} 光誘導散乱力
- x, z 座標軸

【 図 1 】

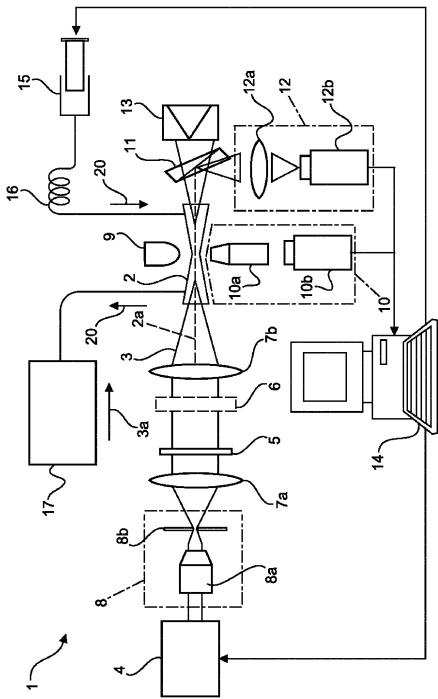


Fig. 1

【 図 2 a 】

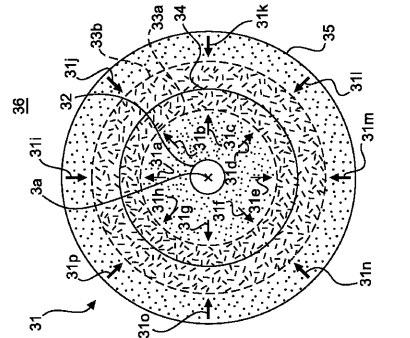


Fig. 2a

【 図 2 b 】

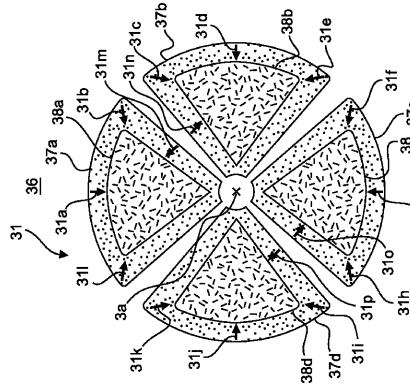


Fig. 2b

【 図 3 】

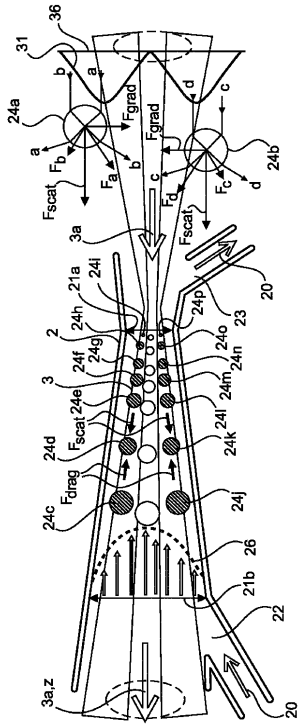


Fig.3

【 図 4 】

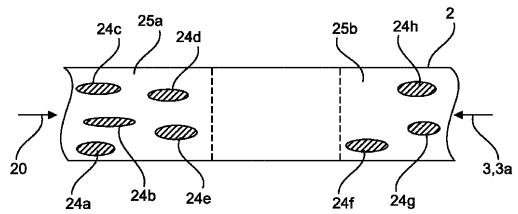


Fig.4

【 図 5 】

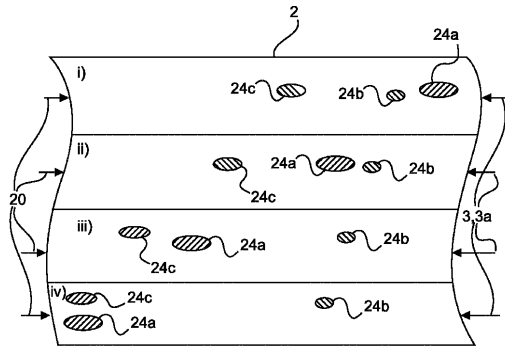


Fig.5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/067100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G21K1/00	G01N15/02 B01D21/00	
ADD. B01L3/00	G02B21/32 G01N21/03	
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) G21K B01L G02B G01N B01D		
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, 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	HIGURASHI E ET AL: "Optically induced rotation of dissymmetrically shaped fluorinated polyimide micro-objects in optical traps", JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS, US, vol. 82, no. 6, 15 September 1997 (1997-09-15), page 2773, XP012043390, ISSN: 0021-8979, DOI: 10.1063/1.366163 section: IIA Setup for optically induced rotation ----- -/--	1-11
<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 6 July 2018		Date of mailing of the international search report 27/07/2018
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 Mauritz, Jakob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/067100

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MILES PADGETT ET AL: "Tweezers with a twist", NATURE PHOTONICS, vol. 5, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 343-348, XP055433356, UK ISSN: 1749-4885, DOI: 10.1038/nphoton.2011.81 section: "Trapping with annular beams" -----	1-11
A	IMASAKA T ET AL: "Optical chromatography. A new tool for separation of particles", ANALYSIS MAGAZINE, EDP SCIENCES, LES ULIS, FR, vol. 26, no. 5, 1 January 1998 (1998-01-01), pages M53-M55, XP002992369, ISSN: 1293-2701 figures 1,5 -----	1-11
A	US 2009/032730 A1 (ERICKSON DAVID [US] ET AL) 5 February 2009 (2009-02-05) figure 2A -----	1-11
X	US 6 696 022 B1 (CHAN EUGENE Y [US] ET AL) 24 February 2004 (2004-02-24) figures 3,4 -----	12
A	figure 25 -----	13-16
A	WO 2013/018273 A1 (SONY CORP [JP]; AKIYAMA YUJI [JP]; AKIYAMA SHOJI [JP]; YAMASAKI TAKESH) 7 February 2013 (2013-02-07) figure 7 -----	12-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2018/067100**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2018/ 067100

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/067100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009032730	A1	05-02-2009	NONE

US 6696022	B1	24-02-2004	US 6696022 B1 24-02-2004
			US 2004166025 A1 26-08-2004

WO 2013018273	A1	07-02-2013	CN 103717308 A 09-04-2014
			EP 2739396 A1 11-06-2014
			JP 6003020 B2 05-10-2016
			JP 2013032994 A 14-02-2013
			US 2014174206 A1 26-06-2014
			US 2017028398 A1 02-02-2017
			WO 2013018273 A1 07-02-2013

フロントページの続き

(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

Fターム(参考) 2G059 AA03 AA05 BB06 DD13 EE01 EE02 EE07 FF01 FF03 GG01
JJ05 JJ11 JJ20 JJ22 KK03 KK04