

(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2020-519305  
(P2020-519305A)

(43) 公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 M 1/26 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/26	2 G O 4 3
<b>C 1 2 Q 1/24 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/24	2 G O 4 5
<b>G O 1 N 37/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 37/00 1 0 1	2 G O 5 9
<b>G O 1 N 15/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 15/00 C	4 B O 2 9
<b>G O 1 N 15/14 (2006.01)</b>	G O 1 N 15/14 C	4 B O 6 3

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-504477 (P2020-504477)  
 (86) (22) 出願日 平成30年4月5日 (2018.4.5)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月4日 (2019.12.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IN2018/050194  
 (87) 国際公開番号 WO2018/185781  
 (87) 国際公開日 平成30年10月11日 (2018.10.11)  
 (31) 優先権主張番号 201741012180  
 (32) 優先日 平成29年4月5日 (2017.4.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 インド (IN)

(71) 出願人 519360844  
 インディアン インスティテュート オブ  
 テクノロジー マドラス (アイアイテ  
 ィー マドラス)  
 INDIAN INSTITUTE OF  
 TECHNOLOGY MADRAS  
 (I I T MADRAS)  
 インド共和国 チェンナイ 600036  
 、インド、チェンナイ-600 03  
 6、アイアイティー ピー. オー、インデ  
 ィアン インスティテュート オブ テク  
 ノロジー マドラス、インダストリアル  
 コンサルタンシー アンド スポンサー  
 リサーチ [アイシーエスアール]、ザ  
 ディーン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的細胞の検出と単離のための MicroFACS

(57) 【要約】

本発明は、マイクロ流体工学および細胞選別技術 (MicroFACS) に基づく標的細胞の検出および単離に関する。この方法では、生体細胞と微粒子が流体力学的に生成された液滴内にカプセル化され、蛍光および散乱信号に基づいた適切な光学系を使用して分析される。標的細胞が検出されると、光学系は電気合体をトリガーして、標的細胞を水性流中に選別する。

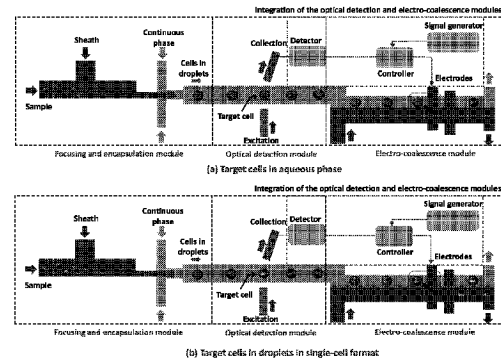


FIGURE 6

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- a . 集束およびカプセル化モジュール、
- b . 光学検出モジュール、
- c . 電気合体モジュール

を含む、複雑な混合物からの生体細胞および微粒子の分析、選別、および解乳化のためのマイクロ流体デバイスであって、

細胞に損傷を与えることなく、液滴から標的細胞または微粒子を水性相の共流動流にまたは単一細胞形式で迅速に抽出し、

流体力学的集束およびカプセル化モジュールは、サンプル流体を導入するための1つの入口、細胞または微粒子を1列の流れに集束するためのシース流体を導入するための第2の入口、および不混和性相を導入するための第3の入口で構成され、

サンプル、シースおよび連続相の流速は、液滴合流部への細胞または微粒子の到達速度が液滴生成速度と一致して空の液滴の数が減少するように、カプセル化モジュールにおいて調整され、

光学検出モジュールは、流体チャネル、流体チャネルと所定の角度で配置された多数の光学溝、レーザー光源、ファイバー、フィルターおよび高速検出器で構成され、

標的細胞または微粒子は、蛍光、前方散乱、および側方散乱の特徴の組み合わせを使用して検出され、

電気合体モジュールは、細胞を含む水性液滴が、電場領域に入る前に連続相と共流動水性相との間の界面と連続的に接触することで、非常に低い電圧および電場を必要とする、2つの入口を備えたマイクロチャネルで構成されている、

前記マイクロ流体デバイス。

**【請求項 2】**

- a . 液滴でカプセル化した標的細胞を検出すること、

b . 電気合体を使用した下流分析のために、液滴でカプセル化した標的細胞を液滴内に単一細胞形式でまたは水性相に抽出すること

を含む、複雑な混合物からの生体細胞および微粒子の分析、選別、および解乳化のための方法であって、

細胞を含む水性液滴は、電場に入る前に連続相と共流動水性相との間の界面と連続的に接触しており、

電気合体に必要な電圧が20 ~ 25 Vの範囲で低く、

前記方法は、標的細胞または微粒子を含む水性液滴と、別個の液滴から細胞および微粒子を抽出するための水性相とのオンデマンド合体であり、

電極は、標的細胞、微粒子、または液滴が光学検出モジュールで検出されたときにのみ活性化される、

前記方法。

**【請求項 3】**

細胞がカプセル化された液滴が、非慣性揚力によりチャネルの中心に向かって自己整列し、一列として検出モジュールに移動する、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

光学検出モジュールの前方散乱信号が、カプセル化された細胞または微粒子のサイズに関する情報を提供する、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 5】**

細胞または微粒子の内部構造を表す光学検出モジュールにおける側方散乱信号が、収集され、検出のために細胞または微粒子の区別で使用される、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 6】**

水性液滴と水性相の流れとが、液滴安定化のために界面活性剤の非常に薄い膜によって分離されている、請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7】

カプセル化された液滴と水性流との合体が、非常に低い電圧、好ましくは 2.5 V の電圧を印加することにより発生する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 8】

光学検出モジュールが、電気合体モジュールと統合されている、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 9】

標的細胞または微粒子が、光学的に検出され、電気合体モジュールにおける電極をトリガーすることにより共流動水性相流中に選別される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 10】

細胞に損傷を与えることなく、単一細胞形式で標的細胞を単離するために使用される、請求項 2 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、マイクロ流体技術の分野における進歩を用いることにより、医学的診断および生物学的研究で使用される細胞選別システムに関する。最も具体的には、細胞に損傷を与えることなく液滴から標的細胞を迅速に抽出することに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

蛍光活性化セルソーター (FACS) は、少量の流体を識別して、サンプル流体中に存在する生体細胞を検出および選別する機器である [J. S. Kim, et al., PAN Stanford Publishing, Singapore, 2010]。詳細な分析が可能のため、現在 FACS は生体サンプル分析の最先端にある [R. B. L. Gwatkin., et al., Practical flow cytometry, 1994; Mol. Reprod. Dev., 1995]。FACS は、免疫学、単一細胞分析、分子生物学の生物医学研究を含む多くの用途を見出している。しかしながら、従来の FACS システムは非常に高価であるため、中央の研究施設と主要なヘルスケアセンターでのみ利用可能である [R. B. L. Gwatkin., et al., Practical flow cytometry, 1994; Mol. Reprod. Dev., 1995]。

## 【0003】

同様に、その複雑性のため、機械の操作、データの分析、レポートの作成には、定期的なメンテナンスと熟練した専門知識が必要である。さらに、いかなる機能障害の修正やトラブルシューティングには、熟練した技術者が必要である。これらの要因は、機械のメンテナンスにかなりのコストを追加し、従来の FACS を使用した診断のテストごとのコストを増加させる。ここ数年において、マイクロ流体技術分野での進歩を用いて、費用対効果の高いポータブル MicroFACS を設計するための研究が行われてきた。しかしながら、MicroFACS の開発における主な障害の 1 つは、マイクロチャンネル内を流れる生体細胞の 3 次元集束と光学窓における細胞間の相互距離の制御に必要な複雑な技術である [P. K. Shivhare, et al., Microfluid. Nanofluidics, 2016]。

## 【0004】

MicroFACS の開発におけるもう 1 つの課題は、検出後に標的細胞を下流で単離することである。文献では、流体力学 [A. Wolff et al., Lab Chip, 2003]、誘電泳動 [D. Holmes et al., Micro Total Anal. Syst, 2004]、光学 [M. M. Wang et al., Nat. Biotechnol 2005] および圧電 [A. Wolff et al., Lab Chip, 2003] などの標的細胞の単離を達成するための様々な技術が報告されている。しかしながら、かかる技術は、高電圧または高せん断を必要とするため、細胞の生存率と細胞特性に影響を与え、低スループットを招き、複雑な機器を用いるため、マイクロ流体ソーターの開発には適さない [S. H. Cho et al., Biomicrofluidics, 2010]。また、これらの技術はいずれも、単一細胞形式での標的細胞の抽出および単離には適していない。

## 【0005】

多くの出版物は、微粒子抽出と液滴選別のために液滴の合体に電場が用いられているこ

10

20

30

40

50

とを示している[K. Ahn C et al., Appl. Phys. Lett., 2006; L. M. Fidalgo et al., Angew. Chemie, 2008; L. Mazutis et al., Lab Chip, 2012; T. Szymborski et al., Appl. Phys. Lett, 2011; A. R. Thiam et al., Phys. Rev. Lett, 2009]。流れの方向に沿ったエマルジョンにおける液滴の合体が調査されている[Keunho Ahn et al., Appl. Phys. Lett, 2006]。流れの方向に垂直な方向における水性相の平行流と水性液滴との合体も調査されている[V. Chokkalingam et al., Lab Chip, 2014]。しかしながら、後者のデバイスは非常に高い電圧(数千ボルト)と電場( $10^7$  V/m)とを必要とするため、細胞生存率の問題のため、生物学的用途には適していない。

#### 【0006】

したがって、本発明は、細胞が一流れに集束され、続いてチャネル合流部(junction)で液滴内にカプセル化される技術に関する。細胞をカプセル化した液滴は、非慣性揚力によりチャネルの中心に向かって自己整列し、一列として検出窓に移動するため、上記の課題を解決する。液滴でカプセル化した標的細胞が検出されると、電気合体を使用して、これらの細胞を液滴内に単一細胞形式でまたは下流の分析のために水性相に抽出する。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

本発明は、マイクロ流体技術分野の進歩を用いることによる細胞選別システムに関する。最も具体的には、細胞に損傷を与えることなく液滴から標的細胞を迅速に抽出することに関する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

検出された液滴でカプセル化した標的細胞は、これらの細胞を液滴内の単一細胞形式で、または下流での分析のために水性相に抽出するために電気合体される。ここで、細胞を含む水性液滴は、電場領域に入る前に連続相と共流動水性相との間の界面と連続的に接触しているため、著しく低い電圧と電場とが必要である。このアプローチにより、細胞を損傷することなく、液滴から標的細胞と微粒子を水性相の共流動流中にまたは単一細胞形式に迅速に抽出できる。

#### 【0009】

一実施態様では、本発明は、標的細胞を単離するためのMicroFACSを開発し、MicroFACSは、様々な用途に独立して、生体細胞および微粒子の分析および選別に一緒に使用することができる3つの異なるモジュールを有する。3つの異なるモジュールは、(i)集束およびカプセル化モジュール、(ii)光学検出モジュール、および(iii)電気合体モジュールである。

他の実施態様では、本発明は、細胞が一流れに集束され、その後、チャネル合流部で液滴内にカプセル化される技術を提供する。カプセル化された液滴は、非慣性揚力によりチャネルの中心に向かって自己整列し、一流れの流れとして検出窓に移動する。

#### 【0010】

さらに他の実施態様において、本発明は、カプセル化された液滴が、検出モジュールに向かって移動し、ラベル付けされた細胞およびラベル付けされていない細胞からそれぞれ受信される蛍光信号および散乱信号を使用して標的細胞が検出されることを示す。検出された液滴は、電気合体モジュールに向かって移動する。電気合体は、標的細胞を選別するために使用される。このモジュールは、2つの入口：1つは液滴(細胞または微粒子を含む)を含む不混和性の連続相(オイル)を導入するもの、もう1つは共流動水性流を導入するもの、を備えたマイクロチャネル、および交流電源に接続される1以上の電極対で構成されている。液滴を流体流中に合体するために、電気的な圧力が必要である。ここで、不混和性の連続相(オイル)を流れる液滴は、水性流の配置により界面と接触する。必要な電圧は25Vであるか、対応する電場( $10^5$  V/m)は既存の方法と比較して少なくとも2桁小さくなる。

#### 【0011】

別の実施態様では、本発明は、別個の液滴から細胞および微粒子を抽出し、かかる細胞または微粒子を下流でさらに処理するために、標的細胞または微粒子を含む水性液滴を水性相と連続的またはオンデマンドで合体させる方法を提供する。細胞または微粒子を含む液滴または液滴（細胞または微粒子なし）の連続的な合体は、連続的な電場を使用して実現することができる。しかしながら、オンデマンドの電気合体では、光学検出モジュールで標的細胞、微粒子、または液滴が検出されたときにのみ電極を活性化する必要がある。

【0012】

さらに別の実施態様では、本発明は、光学検出と電気合体モジュールとの統合によるMicroFACS方法を提供する。標的細胞または微粒子は光学的に検出され、これらの標的細胞または微粒子の共流動水性相流中への選別は、電気合体モジュールの電極をトリガーすることにより達成される。この方法は、標的流体を含む液滴または特定のサイズの液滴のオンデマンド合体に使用される。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、(a)集束およびカプセル化モジュールの概略図(b)細胞の集束を示す実験画像(c)液滴中の微粒子および細胞のカプセル化を示す実験画像を描いている。

【図2】図2は、(a)光学検出モジュールの概略図(b)FSC、SSCおよび蛍光データに基づく細胞の検出を示す実験結果を描き、光学窓を通過する細胞をカプセル化した液滴の画像も示している。

【図3】図3は、(a)電気合体モジュールの概略図(b)細胞が液滴内にカプセル化される合体の前、水性流において細胞を合体した後、電圧25V、細胞をカプセル化した液滴の電気合体を示す実験結果を示している。

20

【図4】図4は、平坦な界面と接触している水性液滴を示し、ここで、平坦な界面と水性液滴とは共に界面活性剤分子を含む。

【図5】図5は、平坦な界面と接触している液滴を示している。

【図6】図6は、MicroFACS(a)水性相に選別された標的細胞(b)単一細胞形式の液滴中の標的細胞の概略図を示している。

【0014】

図面を参照して、本発明の実施態様をさらに説明する。図面は必ずしも縮尺通りに描かれているわけではなく、場合によっては、図面は例示の目的のみのために誇張または簡略化されている。当業者は、本発明の可能性のある実施態様の以下の例に基づいて、本発明の多くの可能性のある用途および変形を理解するであろう。

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下の詳細な説明では、本明細書の一部を形成する添付図面が参照され、実施される特定の実施態様が例示として示されている。実施態様は、当業者が実施態様を実施できるように十分詳細に説明されており、実施態様の範囲から逸脱することなく、論理的、機械的、および他の変更を行うことができることを理解されたい。したがって、以下の詳細な説明は、限定的な意味で解釈されるべきではない。

【0016】

40

提案された発明は、マイクロ流体技術の分野における進歩を用いることによる細胞選別システムに関する。最も具体的には、細胞に損傷を与えることなく液滴から標的細胞を迅速に抽出することに関する。本発明は、標的細胞を単離するためのMicroFACSを開発し、MicroFACSは、様々な用途に独立して、生体細胞および微粒子の分析および選別に一緒に使用することができる3つの異なるモジュールを有する。3つの異なるモジュールは、(i)集束およびカプセル化モジュール、(ii)光学検出モジュール、および(iii)電気合体モジュールである。

【0017】

集束およびカプセル化モジュール

流体力学的集束およびカプセル化モジュール(図1)は、サンプル流体(細胞または微

50

粒子を含む水性流体)を導入するための1つの入口、細胞または微粒子を一系列の流れに集束するためのシース流体(水性流体)を導入するための第2の入口、および流れ集束またはT型合流部で安定した液滴を生成するための不混和性相(適合性界面活性剤を備えた生体適合性オイル)を導入するための第3の入口で構成されている。流体力学的集束では、シース対サンプルの流速比を調整して、液滴生成合流部の詰まりを防ぎ、単一の液滴に複数の細胞がカプセル化されないようにすることにより、2つの隣接する細胞または微粒子の間の必要な相互距離を確保する。

#### 【0018】

不連続相(discrete phase)(すなわち、サンプル+シース)と不混和性の連続相(生体適合性オイル)との流速比は、細胞または微粒子のサイズのオーダーに等しい液滴のサイズを制御するために調整される。サンプル、シース、連続相の流速は、細胞または微粒子の液滴接合部への到達速度が、液滴生成速度と一致するように調整されるため、空の液滴(細胞または微粒子を含まない)の数が減少する。

10

#### 【0019】

##### 光学検出モジュール

光学検出モジュールは、流体チャンネル、流体チャンネルと所定の角度で配置された多数の光学溝、レーザー光源、ファイバー、フィルターおよび高速検出器で構成されている(図2)。マイクロチャンネルは、集束されて自己整合方式で流れる細胞および微粒子をカプセル化する液滴を含む。細胞をカプセル化した液滴は、流体力(非慣性揚力を含む)と自己整列のためにチャンネルの中心に向かって移動する。液滴内の細胞のカプセル化とそれらの自己整列により、MicroFACSの開発を制限することの多い複雑な3次元集束技術の必要性がなくなる。液滴内にカプセル化された細胞または微粒子を識別するには、レーザー(または他の適切な光源)を励起のために使用する。

20

#### 【0020】

ファイバーは、レーザー光源とデバイスの検出領域との間で光を結合する。レーザービームのスポットサイズは、必要なコリメーションに適した異なるサイズのファイバーを使用して制御される。細胞(または微粒子)をカプセル化した液滴がレーザービームを横切ると、光信号が生成され、受信ファイバーによって収集され、高速検出器(単一光子計数モジュール-SPCM、光電子増倍管-PMT)を使用して補足される。細胞または微粒子が適切な蛍光物質でラベル付けまたはタグ付けされている場合、蛍光信号は、カプセル化された細胞または微粒子の光学的特徴として検出器によって捕捉される。

30

#### 【0021】

細胞と蛍光物質に応じて、適切な光学フィルターが収集光学系と結合されて、蛍光信号を最大化する。蛍光信号に基づいて、異なる細胞または微粒子が検出される。細胞が蛍光物質でラベル付けまたはタグ付けされていない場合、散乱信号が受信される。検出器は、カプセル化された細胞または微粒子だけでなく、カプセル化した液滴の前方散乱信号も受信する。カプセル化された細胞または微粒子の散乱信号のみを取得するために、液滴の前方散乱信号が全散乱信号から差し引かれる。

#### 【0022】

前方散乱信号は、カプセル化された細胞または微粒子のサイズに関する情報を提供する。細胞または微粒子の内部構造を表す側方散乱信号は、収集され、検出のために細胞または微粒子を区別するために使用される。蛍光、前方散乱、および側方散乱の特徴の組み合わせを使用することにより、標的細胞または微粒子が検出される。

40

検出モジュールは、液滴内に含まれる流体の蛍光特徴に基づいて、目的の流体を含む標的液滴(細胞または微粒子なし)を検出することに使用することができる。

#### 【0023】

##### 電気合体モジュール

電気合体モジュールは、2つの入口を備えたマイクロチャンネルで構成されており、1つは液滴(細胞または微粒子を含む)を含む不混和性の連続相(オイル)を導入し、もう1つは共流動水性流を導入し、1以上の組の電極が交流(AC)電源に接続されている(図

50

3)。

共流動水性流の流速の比率は、不混和性の連続相（オイル）を流れる液滴が界面と接触するように調整される。液滴のサイズにばらつきがある場合、最小の液滴でも接触し、より大きな液滴が自動的に界面に接触するように、界面の位置が調整される。

#### 【0024】

この場合、水性液滴と水性相の流れは、液滴の安定化のために界面活性剤の非常に薄い膜によって分離され（図4）、システムは電場にさらされる。報告された文献では、同じ相（水性）の液滴と流体流とが第2相（界面活性剤を含まないオイル）によって分離されており、システムが電場にさらされるとき、結果として生じるマックスウェル応力が、競合する界面張力に対して液滴と流体流の界面を変形させる傾向がある。変形した液滴と流体流の界面が互いに接触するとすぐに、合体が起こる。しかしながら、この場合、液滴は界面活性剤（オイル相）によって安定化されるため、合体が起こる界面活性剤の存在により生じる分離圧力に打ち勝つための電氣的な圧力が必要であり、必要とされる液滴または界面の変形はない。

10

#### 【0025】

液滴と流体流の界面が互いに接触しているとき、液滴を流体流中に合体するために必要な電氣的な圧力は、安定化された液滴と流体流の界面がある程度離れているときよりもはるかに小さい。これは、後者の場合、電氣的な圧力が最初に液滴と流体流の界面を変形させ、液滴と流体流を互いに接触させ、その後界面活性剤による分離圧力に打ち勝つ必要があるからである。本件では、水性流の配置により液滴がすでに界面に接触しているため、必要な電圧（25 V）または対応する電場（ $10^5$  V/m）は、既存の方法（数千ボルト、 $10^7$  V/m）と比較して少なくとも2桁小さくなる[V. Chokkalingam, Y. et al., Lab Chip, 2014]。

20

#### 【0026】

界面活性剤によって液滴と平坦な界面が安定すると、図5に示すように互いに接触し、2つの液滴の界面活性剤分子が互いに反発するため、合体しない。液滴を合体させるには、最初に界面活性剤分子によって生じる反発的な分離圧力に打ち勝つ必要がある。

#### 【0027】

合体を実現するには、電場が液滴と平坦な界面を変形させ、界面間で接触させる必要がある。接触が確立されると、電場は界面活性剤分子によって生成される反発的な分離圧力に打ち勝たなければならない。液滴の変形に必要な電場強度は、分離圧力に打ち勝つために必要な電場強度と比較して非常に高い。そのため、他の界面と接触していない液滴を合体させるのに必要な電場（ $\sim 10^7$  V/m）は、他の界面と接触している液滴（ $\sim 10^5$  V/m）と比較して1～2桁大きくなる[Liu, Z, et al., Lab on a Chip, 2014] [V. Chokkalingam Y, et al., Lab Chip, 2014]。液滴が他の液滴または平坦な界面と接触している場合、より低い電場（ $\sim 10^5$  V/m）を印加することで簡単に合体することができる。細胞損傷の問題は、 $5 \times 10^5$  V/m未満の電場強度で完全に回避される[Gascoyne P. R. C, et al., Cancers, 2014]。

30

#### 【0028】

ここで提案する方法は、個別の液滴から細胞および微粒子を抽出し、かかる細胞および微粒子をさらに下流で処理するために、標的細胞または微粒子を含む水性液滴と水性相との連続的またはオンデマンドの合体に使用することができる。この方法は、様々な用途において重要な液滴の解乳化または選別のために、水性相と不混和性の連続オイル相に存在する液滴（細胞または粒子なし）の連続的またはオンデマンドの合体に使用することができる。細胞または微粒子を含む液滴または液滴（細胞または微粒子なし）の連続的な合体は、連続的な電場を使用して達成することができる。しかしながら、オンデマンドの電気合体では、光学検出モジュールで標的細胞、微粒子、または液滴が検出されたときにのみ電極を活性化する必要がある。

40

#### 【0029】

光学検出と電気合体モジュールとの統合

50

MicroFACSを提供するために、光学検出と電気合体モジュールとが統合されている(図6)。標的細胞または微粒子が光学的に検出されると、これらの標的細胞または微粒子の共流動水性相流中の選別は、電気合体モジュールにおいて電極をトリガーすることにより達成される(図6a)。電気合体領域の電極のオン/オフの切り替えを制御するマイクロコントローラーを使用して、光学検出と電気合体ユニットとが同期される。標的細胞または微粒子が光学検出器で検出されるとすぐに、信号がマイクロコントローラー中に送られ、信号を処理して電極をトリガーする。

【0030】

マイクロチャンネル内の液滴の速さは既知であるため、光学信号の捕捉と電極のトリガーとの間のタイムラグは、標的細胞または微粒子を含む液滴を正確に合体するように調整される。ここで提案する方法は、標的流体を含む液滴または特定のサイズの液滴のオンデマンド合体に使用することができる。かかる液滴が光学検出モジュールで検出されると、電極は、これらの標的液滴と共流動水流との電気合体のために活性化することができる。

10

【0031】

同様に、単一細胞分析を必要とする用途では、単一細胞形式で液滴内にカプセル化された標的細胞をデバイスの出口で取得できる(図6b)。この場合、電場を連続的に印加することにより、細胞(標的細胞以外)を連続的に合体させることができる。標的細胞が検出されたとき、検出モジュールは電気合体モジュールに信号を送信して場をオフにすることで、標的細胞は合体せず、液滴内にカプセル化されて下流に流れ、単一細胞形式で出口に収集される。

20

本明細書の図面、実施例、および詳細な説明は、限定的な方法ではなく例示的なものと見なされるべきであることを当業者は理解することができる。

【図1】

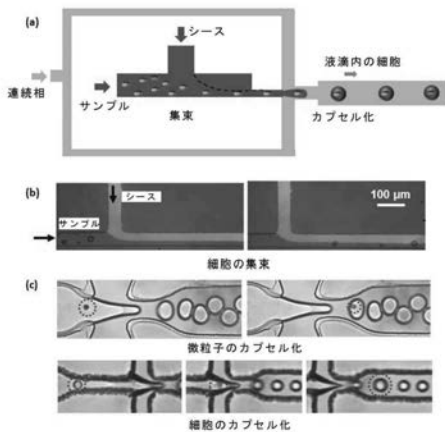


図 1

【図2】

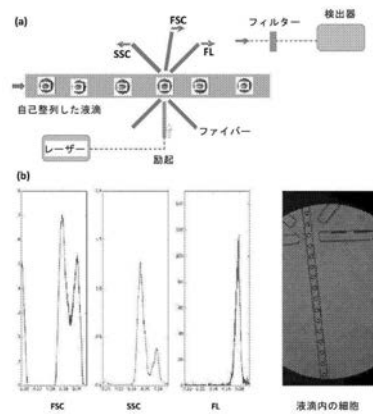


図 2



【 図 3 】

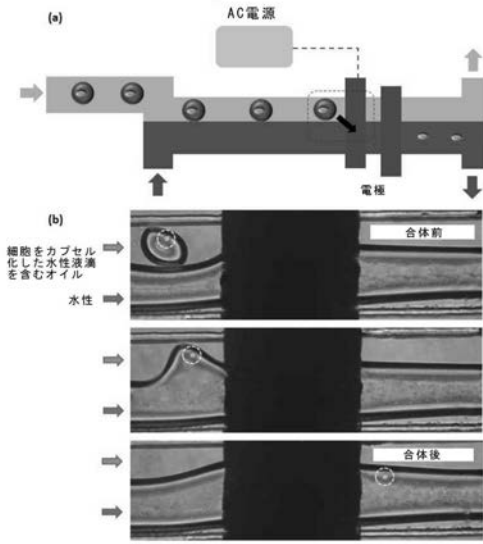


図 3

【 図 4 】

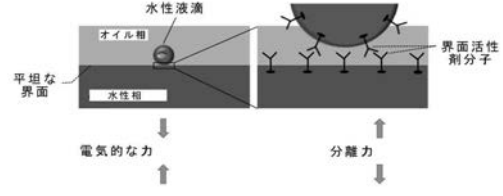


図 4

【 図 5 】

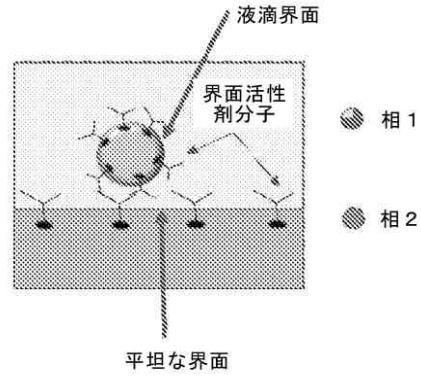


図 5

【 図 6 】

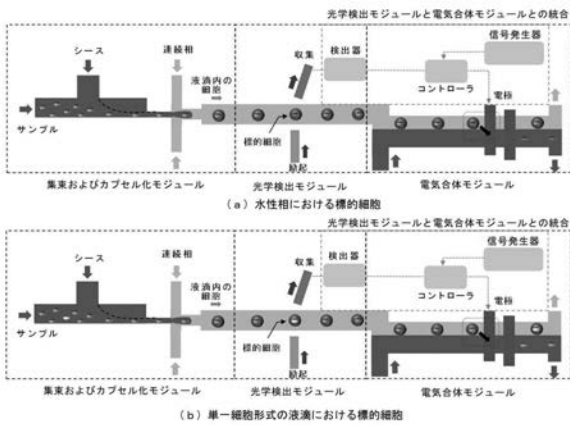


図 6

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IN2018/050194
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/00,G01N21/00,B01L3/00 Version=2018.01  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N,B01L  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) Databases: TotalPatent One, IPO Internal Database,Google Patent Keywords: microfluidic,optical,electrocoalescence,laser,sorting		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP2047910A2 (RAINDANCE TECHNOLOGIES INC[US])15-04-2009 (15 April 2009) Paragraphs [0003]-[0007], [0008-0013],[0024],[0025],[0153],	1,2,5,6,7,9,10
Y	[0099],[0128],[0212],[0134],0106],[0199],[0054]	3,4,8
Y	"Single-Cell Analysis and Sorting Using Droplet-Based Microfluidics." Nature protocols 8.5 (2013): 870-891. Whole document	3,4,8
A	"Human mammalian cell sorting using a highly integrated micro-fabricated fluorescence-activated cell sorter (microFACS)." Lab Chip.21 June 2010;10(12):1567-73. doi: 10.1039/c000136h. whole document	1-10
A	"Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels"30 September 2005 https://doi.org/10.1002/elps.200500109 whole document	1-10
<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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24-07-2018		24-07-2018
Name and mailing address of the ISA/ Indian Patent Office Plot No.32, Sector 14,Dwarka,New Delhi-110075 Facsimile No.		Authorized officer Devendra Kumar Deshmukh Telephone No. +91-1125300200

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/IN2018/050194

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/IN2018/050194

Citation	Pub.Date	Family	Pub.Date
EP 2047910 A2	15-04-2009	AT 540750 T	15-01-2012
		EP 2021113 A2	11-02-2009

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G 0 1 N 15/14	A
<b>G 0 1 N 21/64 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/48	M
<b>G 0 1 N 21/49 (2006.01)</b>	G 0 1 N 21/64	F
	G 0 1 N 21/49	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

(71) 出願人 519360844

インディアン インスティテュート オブ テクノロジー マドラス (アイアイティー マドラス)

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY MADRAS (IIT MADRAS)

インド共和国 チェンナイ 600036、インディア、チェンナイ - 600 036、アイアイティー ピー . オー、インディアン インスティテュート オブ テクノロジー マドラス、インダストリアル コンサルタンシー アンド スポンサーード リサーチ [アイシーエスアール]、ザ ディーン

The Dean, Industrial Consultancy & Sponsored Research (ICSR), Indian Institute of Technology Madras, IIT P.O, Chennai - 600 036, India, Chennai 600036, INDIA

(74) 代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72) 発明者 セン, アシス クマール

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー .、アイアイティー マドラス、デパートメント オブ メカニカル エンジニアリング

(72) 発明者 スリヴァスタヴァ, アビシェク

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー .、アイアイティー マドラス、デパートメント オブ メカニカル エンジニアリング

(72) 発明者 ガイクワード, ラヴィンドラ

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー .、アイアイティー マドラス、デパートメント オブ メカニカル エンジニアリング

(72) 発明者 エス, カーシック

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー .、アイアイティー マドラス、デパートメント オブ メカニカル エンジニアリング

(72) 発明者 ケー エス, ジャヤプラカシュ

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー .、アイアイティー マドラス、デパートメント オブ メカニカル エンジニアリング

(72) 発明者 ディー, アビシェク ラジュ

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー .、アイアイティー マドラス、デパートメント オブ メカニカル エンジニアリング

(72) 発明者 エム, スネハ マリア

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー . 、アイアイティー マ  
ドラス、デパートメント オブ バイオテクノロジー

(72)発明者 シヴァーレ , プリヤンカー

インド共和国 チェンナイ 600036、アイアイティー ピー . オー . 、アイアイティー マ  
ドラス、デパートメント オブ エレクトリカル エンジニアリング

F ターム(参考) 2G043 AA01 AA03 AA04 BA16 CA04 CA06 DA05 DA06 EA01 EA14  
HA05 JA03 KA09 LA02  
2G045 AA24 CB01  
2G059 AA01 AA05 BB06 BB09 BB14 DD12 DD13 EE02 EE07 GG01  
JJ03 JJ17 KK02  
4B029 AA07 AA09 BB01 CC01 DG08 FA04 GB05 HA05 HA09  
4B063 QA18 QQ01 QS10 QS36 QS39 QX02 QX04