

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5389782号  
(P5389782)

(45) 発行日 平成26年1月15日 (2014. 1. 15)

(24) 登録日 平成25年10月18日 (2013. 10. 18)

|                         |                |
|-------------------------|----------------|
| (51) Int. Cl.           | F I            |
| GO 1 N 15/14 (2006. 01) | GO 1 N 15/14 A |
| GO 1 N 21/64 (2006. 01) | GO 1 N 21/64 F |
| GO 1 N 21/47 (2006. 01) | GO 1 N 21/47 Z |

請求項の数 7 (全 44 頁)

|               |                               |           |                         |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2010-504170 (P2010-504170)  | (73) 特許権者 | 506030734               |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年4月11日 (2008. 4. 11)      |           | セルラ・インコーポレイテッド          |
| (65) 公表番号     | 特表2010-525325 (P2010-525325A) |           | C e l l u l a , I n c . |
| (43) 公表日      | 平成22年7月22日 (2010. 7. 22)      |           | アメリカ合衆国92121カリフォルニア     |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2008/060015             |           | 州サン・ディエゴ、スウィート100、ナ     |
| (87) 国際公開番号   | W02008/130871                 |           | ンシー・リッジ・ドライブ5820番       |
| (87) 国際公開日    | 平成20年10月30日 (2008. 10. 30)    | (74) 代理人  | 100108855               |
| 審査請求日         | 平成23年4月8日 (2011. 4. 8)        |           | 弁理士 蔵田 昌俊               |
| (31) 優先権主張番号  | 60/925, 563                   | (74) 代理人  | 100091351               |
| (32) 優先日      | 平成19年4月20日 (2007. 4. 20)      |           | 弁理士 河野 哲                |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       | (74) 代理人  | 100088683               |
| (31) 優先権主張番号  | 11/781, 848                   |           | 弁理士 中村 誠                |
| (32) 優先日      | 平成19年7月23日 (2007. 7. 23)      | (74) 代理人  | 100109830               |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 福原 淑弘               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セルソーティングシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

流体ソータースイッチングシステムであって、  
 流体媒体中の一つ以上のセルを受け取るのに適したセル入口と、  
 前記ソーターへのバッファ溶液を提供するために前記セル入口に流体的に連結された第一および第二のバッファ入口と、  
 前記セル入口と前記第一および第二のバッファ入口とに流体的に連結されたメイン流体チャンネルと、  
 前記メイン流体チャンネルに流体的に連結された第一の側方フローチャンネルであり、前記第一および第二のバッファ入口の下流に配置されている第一の側方フローチャンネルと、  
 前記メイン流体チャンネルに流体的に連結された第二の側方フローチャンネルであり、前記第一および第二のバッファ入口の下流に配置されている第二の側方フローチャンネルと、  
 前記メイン流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の出力であり、前記第一および第二の側方フローチャンネルの下流に配置されている出力と、  
 所定状態のセルを検知し、それに応じて信号を生成するのに適した検出器であり、前記第一の側方フローチャンネルの上流に位置でセルを検知するように配置されている検出器と、  
 前記検出器と前記第一および第二の側方フローチャンネルに連結された、前記信号に応

10

20

じて流体を前記側方フローチャンネル内に移動させる空気パルスを生成するように動作可能な空気側方カススイッチとを備え、前記空気側方カススイッチは、

前記第一の側方フローチャンネルに連結された第一の空気圧バルブと、

前記第二の側方フローチャンネルに連結された第二の空気圧バルブと、

前記第一および第二の空気圧バルブを連続手法で動作させる時間制御信号を提供する制御システムとを備えており、

それにより、所定状態のセルが検知されたときに、前記空気側方カススイッチが動作されて前記セルを移動させるように前記セルへの側方力を提供し、前記セルが第一または第二の出力内へ選択的に出る流体ソータースイッチングシステム。

【請求項 2】

10

前記流体チャンネルを通る流体フローは層流である請求項 1 の流体ソータースイッチングシステム。

【請求項 3】

前記第一および第二のバッファ入口は異なる大きさである請求項 1 の流体ソータースイッチングシステム。

【請求項 4】

前記第一および第二の出力は異なる大きさである請求項 1 の流体ソータースイッチングシステム。

【請求項 5】

前記第一の出力は前記第二の出力よりも大きい容量の流体フローを有している請求項 4 の流体ソータースイッチングシステム。

20

【請求項 6】

前記第二のバルブが開かれたのち前記第二のバルブが閉じる前に前記第一のバルブが閉じられることを特徴とする請求項 1 の流体ソータースイッチングシステム。

【請求項 7】

前記第一の側方フローチャンネルに連結された第一の空気圧バルブと第二の空気圧バルブをさらに有し、前記第一のバルブは前記フローチャンネルに隣接して配置されており、前記第二のバルブは前記第一のバルブに隣接して配置されており、さらに、前記第一および第二の空気圧バルブを動作させる時間制御信号を提供する制御システムを有し、前記第二のバルブが開かれたのち前記第二のバルブが閉じる前に前記第一のバルブが閉じられることを特徴とする請求項 1 の流体ソータースイッチングシステム。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、ネットワークを介したターゲットセルの選択的ルーティングを可能にして非ターゲットセルからそれらをソートしてそれらを集めるスイッチを提供するマイクロ流体チャンネルネットワーク中の力の使用のための方法と装置に関する。特別の関心事は光または流体スイッチング力である。

【背景技術】

【0002】

40

従来の蛍光標識セルソーター (FACS) が研究と臨床用途に広く使用されている。これらの機器は、非常に速い多重パラメーター分析およびソーティングが可能であるが、一般に大きい標本容積、操作と保守のための熟練オペレーターを必要とし、また殺菌するのが難しい。FACS 機器は、10,000 と同じ程度の少数の、また幾千万と同じ程度の多数のセルを分析することができる。しかしながら、100,000 セル未満ではソーティングを実施する能力が縮小する。磁気ビーズなどの他の分離方法は FACS ほど多くのセルを必要としないが、それらは、非特異性の結合、セルおよびビーズの凝集に、またビーズそれ自体が次の処理ステップと干渉することがある可能性に苦しむ。したがって、最初の組織から貴重な少量の標本またはセルをソートするために、低いセル番号で少量の標本容積を扱うことができ、ソートされた母集団の効率的な回収を可能にするセルソーター

50

は、ユニークな科学的な分野を扱う。

【 0 0 0 3 】

マイクロ製造血球計は、使いやすい閉システムでいっそう少ない試薬を付随的に消費しながら 1, 0 0 0 と同じ程度の少数のセルでソートする可能性を有している。後者は重要である。それは、従来の F A C S 機器と異なり、エアゾールが作り出されず、ソートされたセルの汚染およびバイオハザード物質での作業の危険を減らすからである。いくつかのマイクロ製造セルソーターは説明されたが、ほとんど「概念実証」としてである。フー(Fu)らは、17セル/sのスループットで大腸菌の30倍濃縮を報告した。バクテリアの20%だけがソーティング後に生存可能だった。また、ターゲット貯槽のソート純度は30%だった。次の研究では、スループットは44のセル/sに増加したが、ターゲット純度は10%未満に減少し、回収は39%と報告された。ヴォルフ(Wolff)らは、100倍濃縮で、12,000イベント/sのスループットで鶏赤血球からビーズをソートすることができた。しかしながら、ターゲットウェル中の純度は約1%だった。これらの研究では、濃縮は、開始濃度と比較して、収集ウェル中のターゲット母集団の濃度の増加として定義された。純度は、ソートの精度に関連し、収集ウェル内にソートされたすべてのセルに対するターゲットセルのパーセンテージだった。回収は、蛍光検出器によって計数されたセル対収集ウェルから回収されたセルの数として定義された。後者の二つの研究は、流体フローバス全体を切り替えるマイクロ流体デバイスに圧力スイッチを使用し、したがって流体プラグ内に収容されたあらゆる粒子を使用した。これらのスイッチ中の機械コンプライアンスは、流体スイッチ速度をスループットのためのステップを制限する速度にさせた。動電フロー制御も報告された、たとえば電気浸透または誘電泳動、しかし、バッファのイオン強度に対する高電界グラディエントおよび物理化学的制限は、セルにとって非理想的条件である。

【 0 0 0 4 】

ブイカン(Buican)らは、最初に流体チャンネルを通る粒子の偏向のための光学的力の使用を提案した。光学ビームによって粒子に及ぼされた力は、光学パワーと、粒子およびその周囲の流体媒体の相対的な光学特性との関数である。1 pN/mWの桁の力が、約10 μmの直径の生物セルに対して達成され得る。光学的力は小さいが、セルを隣接するフローストリーム内へ偏向するのに必要な力も小さく、たとえば、10 μm直径セルを数ミリ秒間にフローを横切って側方に20 ~ 40 μm移動させるには900 pNである。これは、この側方運動によって意味される速度におけるセルの粘性抵抗力を解消するのに必要な力である。

【 0 0 0 5 】

光学的力および一般的な背景技術に潜む原理は米国特許第6,744,038号に見つけられ得、それは、あたかも完全にここに述べられるかのように参照によってここに組み込まれる。

【 0 0 0 6 】

マイクロ流体デバイス中の粒子ソーティングのためのさまざまな空気圧力変調システムと方法は、先行技術に知られている。マイクロ流体デバイスに接続する空気圧力を交互にすることによって、マイクロ流体チャンネル中を流れるセルを含む粒子は所望のブランチに方向付けることができ、その結果、低価格ソーティング機能性は達成することができる。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

以下に説明するように、これらの力は、セルソーティングシステムとして動作可能な、マイクロ流体チャンネルネットワーク中のスイッチを実現するために使用される。スイッチは、スイッチ位置の上流でマイクロ流体チャンネルネットワーク中を流れるターゲットセルからの蛍光信号の検出によって作動(トリガー)されるが、光散乱などの他の検出形態を等しくスイッチの作動に使用することができるであろう。スイッチは、基礎フローを変更することなく、複数の出力チャンネルフローストリームの一つへセルまたは粒子を方

向付けるために使用され、それにより所望のセルがさらなる使用のために収集される。マイクロ流体チャンネルのフローは、非常に低いレイノルズ数において一般的な層流であることが望ましい。したがって、特定の層流またはフローストリーム中を流れる任意のセルは、層流を横切る任意の力がないときはそのフローストリーム中にとどまる。スイッチはセルへの力を利用して、単にこれ、一つの出力チャンネルを通して分岐ジャンクションを出るフローストリームから、第二の出力チャンネルを通して分岐ジャンクションを出るフローストリームへセルを移動させる、薄層を横切るセルの輸送を遂行する。

【 0 0 0 8 】

一実施形態では、セルソーターは、流体媒体中の一つ以上のセルを受け取るのに適したセル入口と、前記ソーターへのバッファ溶液を提供するために前記セル入口に流体的に連結された第一および第二のバッファ入口と、前記セル入口と前記第一および第二のバッファ入口とに流体的に連結された流体チャンネルと、前記流体チャンネルに流体的に連結された第一の側方フローチャンネルと、前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の出力であり、前記側方フローチャンネルを下流に配置されている出力と、所定状態のセルを検知し、それに応じて信号を生成するのに適した検出器であり、前記第一の側方フローチャンネルの上流に位置でセルを検知するように配置されている検出器と、前記検出器に連結された、前記信号に応じて流体を前記側方フローチャンネル内に移動させるように動作可能な側方力スイッチとを備え、それにより、所定状態のセルが検知されたときに、前記側方力スイッチが動作されて前記セルを移動させるように前記セルへの側方力を提供し、前記セルが第一または第二の出力内へ選択的に出る。

【 0 0 0 9 】

続く段落に説明される発明は、スイッチを作り出すために使用される方法論と、向上したソーティング性能を達成するために、スイッチと、マイクロ流体チャンネルネットワークの設計と、マイクロ流体ネットワーク中のセルまたは粒子のフローの特性を最適化するために使用されるアプローチとを詳述する。光学スイッチの場合には、光学スイッチは一般に、マイクロ流体チャンネル中のエスタブリッシュドフロー中のセルの軌道の近くにマイクロ流体チャンネルネットワーク中へ光学照明場を投射することにより作動する。光学場とのセルの相互作用は、セルを捕らえたり、最初のフロー中のその運動を著しく変更したりすることなく、エスタブリッシュドフロー中の一つのフローストリームから別のフローストリームへセルが移動するような、エスタブリッシュドフローを横切ってセルを輸送する力をセルに生成する。

【 0 0 1 0 】

続くテキストでは、セルおよび粒子という用語は共に、生物セル、生物粒子、自然有機または無機粒子および人工有機または無機粒子を意味するものと理解されるべきである。マイクロ流体チャンネルネットワーク中でソートされるセルの粒径範囲は一般に、約  $1\ \mu\text{m}$  から約  $50\ \mu\text{m}$  までに及ぶ直径の生物セルである。より一般に、約  $100\ \text{nm}$  から約  $100\ \mu\text{m}$  までに及ぶ直径のセルは、マイクロ流体チャンネルネットワーク中のスイッチによるソーティングの候補である。

【 0 0 1 1 】

一実施形態では、光学スイッチが利用される。一般に、光学スイッチ中で使用される光学ビームを生成するためにレーザーが使用された。光学スイッチに現在使用されるレーザーは、光学スイッチングを実施するために使用されるパワー密度と露光時間では生物セルの生存可能性を傷つけないと知られている近IR連続波レーザーである。粒子への損傷が問題ない場合には可視または近UV波長レーザー、または粒子を非常に速く移動させるために大きい光束を使用することができる場合にはパルスレーザーを含め、代替のレーザー源が異なる用途のために考慮され得る。しかしながら、発明の議論は光学スイッチを生成するためにレーザーを使用しているけれども、光学ビームの源はレーザーに限定される必要はない。

【 0 0 1 2 】

また別の実施形態では、流体スイッチが利用され得る。好ましくは、空気ベース流体ス

10

20

30

40

50

イチが利用され得る。別の実施形態では、セルソーターのためのマイクロ流体チップ設計は空気圧力変調を使用する。フロースイッチングまたはセルソーティングのための単一のサイドチャンネルがマイクロ流体デバイス中で使用され得る。説明のチャンネル幾何学は、マイクロ流体デバイス中に効率的空気フロースイッチングを提供する。また別のアスペクトでは、単一のサイドチャンネル上への二つのスイッチングバルブの連結は、空気スイッチング応答時間を最小にする。また別のアスペクトでは、カートリッジホルダーがマイクロ流体チップの空気制御のために提供される。

【 0 0 1 3 】

流体スイッチングシステムへの特定用途では、流体ソータースイッチングシステムは、流体媒体を受け取るのに適した入口と、前記入口に流体的に連結された流体チャンネルと、前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の側方フローチャンネルと、前記第一および第二の側方フローチャンネルに連結された第一および第二の空気圧バルブと、前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の出力であり、前記側方フローチャンネルの下流に配置されている出力と、制御システムであり、前記第一および第二のバルブに連結され、前記第一および第二の空気圧バルブを動作させる時間制御信号を提供する制御システムとを備えており、前記第二のバルブが開かれる前に前記第一のバルブが開かれることを特徴とする。また別のアスペクトでは、第二のバルブが開かれたのち第二のバルブが閉じる前に第一のバルブが閉じられることを特徴とする。また別のアスペクトでは、第二の側方フローチャンネルおよび第二の空気圧バルブが除去され、一つまたは二つの空気バルブを備えた単一の側方チャンネルを使用してソーティングを達成し得る。

【 0 0 1 4 】

また別の実施形態では、マイクロ流体セルソーターは光学スイッチと空気圧力変調の両方を使用する。光学および光機械的設計も提供される。好ましくは二つのレーザー照明モジュールおよび暗照明モジュールが利用される。蛍光を集めるために好ましくは高機能高NA（開口数）対物レンズが使用される。

【 0 0 1 5 】

発明のまた別のアスペクトでは、蛍光信号検出および処理システムおよび方法が利用される。アナログ信号をデジタル信号に変換するために好ましくはADCが使用される。一実施形態では、デジタル信号処理アルゴリズムがFPGAで実施される。

【 0 0 1 6 】

追加的に、カートリッジの自動アライメントが提供される。この発明は、システムに装填するカートリッジについての自動アライメント問題を解決する。

【 0 0 1 7 】

また別のアスペクトでは、発明はマイクロ流体ソーター機器のアプリケーションソフトウェア設計に関する。外部装置からの生データを多重実行可能アプリケーションおよびプロセス間で記録可能無損失高速（秒あたり10メガビット以上）であるフォーマットでストリーミングする。

【 0 0 1 8 】

また別の実施形態では、マイクロ流体カートリッジプライミングステーションが提供される。発明は、マイクロ流体デバイスのプライミングのためのプライミングステーションを説明する。

【 0 0 1 9 】

また別のアスペクトでは、セル（たとえば胎児のセル）の成長モニタリングおよび選択のためのダイリユーショニングクローニングが提供される。発明は、そのようなセルの成長モニタリングおよび選択のためのダイリユーショニングクローニング方法を説明する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図1】マイクロ流体チャンネルネットワーク中の「Y」形状ソーティングジャンクションの平面図である。

【図 2】総体として 50 / 50 光学スイッチネットワークと呼ばれる、フロー中のセルの 50 / 50 分割の、シースフローピンチジャンクションと「Y」形状ソーティングジャンクションの両方をメインチャンネルによって合体させているマイクロ流体チャンネルネットワークの平面図である。

【図 3 a】光学スイッチを備える、総体としてシースフローズキュー光学スイッチネットワークと呼ばれる、異なるシースフローを介するフロー中のスキュー分割の、メインチャンネルによって連結されたシースフローピンチジャンクションと「Y」形状ソーティングジャンクションの両方を合体させているマイクロ流体チャンネルネットワークの平面図である。

【図 3 b】光学スイッチを備える、総体としてシースフローズキュー光学スイッチネットワークと呼ばれる、異なるシースフローを介するフロー中のスキュー分割の、メインチャンネルによって連結されたシースフローピンチジャンクションと「Y」形状ソーティングジャンクションの両方を合体させているマイクロ流体チャンネルネットワークの平面図である。

【図 4 a】光学スイッチを備える、総体として出口フローズキュー光学スイッチネットワークと呼ばれる、異なる出口チャンネル幅を介するフロー中のスキュー分割の、メインチャンネルによって連結されたシースフローピンチジャンクションと「Y」形状ソーティングジャンクションの両方を合体させているマイクロ流体チャンネルネットワークの平面図である。

【図 4 b】光学スイッチを備える、総体として出口フローズキュー光学スイッチネットワークと呼ばれる、異なる出口チャンネル幅を介するフロー中のスキュー分割の、メインチャンネルによって連結されたシースフローピンチジャンクションと「Y」形状ソーティングジャンクションの両方を合体させているマイクロ流体チャンネルネットワークの平面図である。

【図 5】双方向レーザー線光学スイッチを備えた 50 / 50 光学スイッチネットワークである。

【図 6】双方向レーザースポット光学スイッチを備えた 50 / 50 光学スイッチネットワークである。

【図 7 a】二つを超える出口チャンネルを備えた、より大きいマイクロ流体チャンネルネットワーク中のレーザー線光学スイッチの平面図である。

【図 7 b】二つを超える出口チャンネルを備えた、より大きいマイクロ流体チャンネルネットワーク中のレーザー線光学スイッチの平面図である。

【図 7 c】二つを超える出口チャンネルを備えた、より大きいマイクロ流体チャンネルネットワーク中のレーザー線光学スイッチの平面図である。

【図 8】光学スイッチの変調および/または遮断のための光学設計を示す。

【図 9 a】セルフフローと平行に、またはセルフフローに角度をもって移行されるレーザースポット光学スイッチを備えたシースフローズキュー光学スイッチネットワークの平面図である。

【図 9 b】セルフフローと平行に、またはセルフフローに角度をもって移行されるレーザースポット光学スイッチを備えたシースフローズキュー光学スイッチネットワークの平面図である。

【図 10 a】セル検出およびトリガー決定方法に単一のレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング/トリガー図を示す。

【図 10 b】セル検出およびトリガー決定方法に単一のレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング/トリガー図を示す。

【図 10 c】セル検出およびトリガー決定方法に単一のレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング/トリガー図を示す。

【図 10 d】セル検出およびトリガー決定方法に単一のレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング/トリガー図を示す。

【図 11 a】セル検出およびトリガー決定方法に二つのレーザー源を使用する検出器装置

10

20

30

40

50

およびタイミング／トリガー図を示す。

【図 1 1 b】セル検出およびトリガー決定方法に二つのレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング／トリガー図を示す。

【図 1 1 c】セル検出およびトリガー決定方法に二つのレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング／トリガー図を示す。

【図 1 1 d】セル検出およびトリガー決定方法に二つのレーザー源を使用する検出器装置およびタイミング／トリガー図を示す。

【図 1 2】互いに接合されて単一のネットワークを形成したときにメインチャンネルにセルフフローの 2 次元のシースフローピンチを提供する底部および上部ガラス基板の両方のマイクロ流体チャンネルネットワークのためのフォトリソグラフィーマスクの代表的設計のモデルである。

10

【図 1 3】図 1 2 に説明された設計の 3 次元図を示す。

【図 1 4】垂直方向に、それから水平方向にセルフフローの連続シースフローピンチを提供し、メインチャンネル中のセルの完全 2 次元シースフローピンチとなるマイクロ流体チャンネルネットワークの側面図の例証である。

【図 1 5】図 1 4 に説明されたマイクロ流体チャンネルネットワークの 3 次元図である。

【図 1 6】一緒に接合されたときに図 1 4 と 1 5 に例証されたマイクロ流体チャンネルネットワークを形成する底部および上部ガラス基板の両方のための代表的フォトリソグラフィーマスク設計のモデルである。

【図 1 7】光学スイッチベースセルソート方法を実施する、出口チャンネルに T ピンチジャンクションと T 分岐ジャンクションを備えた、完全マイクロ流体チャンネルネットワークのためのフォトリソグラフィーマスクの代表的実施形態である。

20

【図 1 8】光学スイッチベースのセルソート方法を実施する、出口チャンネルに三角形ピンチジャンクションと Y 分岐ジャンクションを備えた、完成マイクロ流体チャンネルネットワークのためのフォトリソグラフィーマスクの代表的実施形態である。

【図 1 9】完成マイクロ流体セルソーティングチップ中のマイクロ流体チャンネルネットワークの好適な実施形態を示す。

【図 2 0】光学スイッチベースマイクロ流体チャンネルネットワークセルソーターのための自給式使い捨てカートリッジについての好適な実施形態を示す。

【図 2 1】光学スイッチベースマイクロ流体チャンネルネットワークセルソーターのための光学系の好適な実施形態を示す。

30

【図 2 2】光学スイッチのさまざまな実施について光学スイッチベースマイクロ流体チャンネルネットワークセルソーターの代表的性能を示す。

【図 2 3】空気ベース流体スイッチングについての軌道を示すマイクロ流体チャンネルネットワーク中の従来技術「Y」形状ソーティングジャンクションの平面図である

【図 2 4 a】さまざまな空気差圧力における可能な粒子軌道を示す 2 チャンネル流体スイッチを備えたマイクロ流体チャンネル中の「Y」形状ソーティングジャンクションの平面図である。

【図 2 4 b】さまざまな空気差圧力における可能な粒子軌道を示す 2 チャンネル流体スイッチを備えたマイクロ流体チャンネル中の「Y」形状ソーティングジャンクションの平面図である。

40

【図 2 5 a】さまざまな空気差圧力における可能な粒子軌道を示す 1 チャンネル流体スイッチを備えたマイクロ流体チャンネル中の「Y」形状ソーティングジャンクションの平面図である。

【図 2 5 b】さまざまな空気差圧力における可能な粒子軌道を示す 1 チャンネル流体スイッチを備えたマイクロ流体チャンネル中の「Y」形状ソーティングジャンクションの平面図である。

【図 2 6】1 チャンネル流体スイッチを備えたマイクロ流体チャンネル中の「Y」形状ソーティングジャンクションの好適な実施形態を示す。

【図 2 7】空気スイッチング応答時間を最小にし、1 チャンネル流体スイッチ中の空気特

50

性を制御する二つのスイッチングバルブの結合を示す。

【図28a】空気スイッチング応答時間を最小にし、2チャンネル流体スイッチ中の空気特性を制御する二つのスイッチングバルブの結合と時間の関数としてチャンネルを横切るフローカレントのグラフとを示す。

【図28b】空気スイッチング応答時間を最小にし、2チャンネル流体スイッチ中の空気特性を制御する二つのスイッチングバルブの結合と時間の関数としてチャンネルを横切るフローカレントのグラフとを示す。

【図29】マイクロ流体チップの空気制御のためのカートリッジホルダーである。

【図30】ここに説明する機器で実施される蛍光キャリブレーションビーズの測定を示す。

10

【図31a】DAP1着色Jurkatセルの蛍光顕微鏡画像を示す。

【図31b】CellTrackerグリーンを備えたターゲットJurkatセルの蛍光顕微鏡画像を示す。

【図32】マイクロ流体カートリッジプライミングステーションを示す。発明は、マイクロ流体デバイスのプライミングのためのプライミングステーションを説明する。

【図33】胎児のセルの成長モニタリングおよび選択のためのダイリューションクローニングを示す。発明は、胎児のセルの成長モニタリングおよび選択のためのダイリューションクローニング方法を説明する。

【図34】一次元フロー集中のための浅いマイクロ流体チャンネルである。発明は、マイクロ流体フローサイトメトリまたはソーティングのための一次元フロー集中に固有の速度分散を解決する方法を説明する。

20

【図35】多相マイクロ流体液滴の内部のセル/粒子検出を示す。発明は、多相マイクロ流体液滴の内部のセル/粒子計数のためのいくつかの検出方法を説明する。

【図36】効率的標本収集のためのマイクロ流体出口ポート構成である。発明は、マイクロ流体デバイスを使用するセルまたは粒子ソーティング後のいくつかの標本収集方法を説明する。

【図37】多重標本分析またはソーティングのためのマイクロ流体デバイスである。発明は、多重標本分析またはソーティングのためのいくつかのマイクロ流体デバイスを説明する。

【図38】標本分析と回収のためのマイクロ流体分析チップである。発明は、ダイリューションのより少ない標本分析と回収のためのいくつかのマイクロ流体デバイスを説明する。

30

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

図1は、1×2マイクロ流体チャンネルネットワークすなわち一つのメイン入力チャンネル11と分岐ジャンクションから延びている二つの出力チャンネル12と13とを備えたネットワーク中のセルをソートする役目をする光学スイッチ10の一実施形態を示す。分岐ジャンクションのための「Y」幾何学が図1に示されるが、「T」幾何学などの他の分岐も使用され得る。一般に、これらのマイクロ流体チャンネルは、チャンネル中への光学スイッチおよび他のセル検出光学の投射を可能にするために、光学的透明基板中に作製される。この基板は、これに限定されないが、一般にガラス、石英、プラスチックたとえばポリメチルメタクリレート(PMMA)ほか、および成型可能または加工可能なポリマー(たとえばポリジメチルシロキサン、PDMSまたはSU8)である。マイクロ流体チャンネルの深さは、これに限定されないが、一般に10μmないし100μm範囲内にある。マイクロ流体チャンネルの幅は、これに限定されないが、一般に深さの1ないし5倍である。断面は一般に長方形か、チャンネルの等方性エッチングが後続するガラス基板のフォトリソグラフィックマスキングによって作製されるマイクロ流体チャンネルの場合には四半円形角を備えた長方形である。

40

【0022】

50



フロー条件は、ビームがジャンクション領域にあたらないように（この場合レーザーからの）光学ビームがオフにされるか遮断されると、すべてのセルが出力チャンネルの一つ、たとえば右の出力チャンネル13へ優先的に流れるように設定される。光学ビームがオンにされるか遮断解除されると、ビームがジャンクション領域に当たり、光学ビームとのセルの相互作用によって生成された光学的力がセルを左の出力チャンネル12へ方向付ける。この例では、セルの方向付けのために選ばれた光学パターンは、流体フローの方向に対してある角度をもつレーザー照明の長く細い線である。光学的グラディエント力はセルを、セルのメインストリーム線から側方へ遠ざけて変位させ、切り替えられたセルがそれから一つの出力チャンネルたとえば12へメインチャンネルを出るいっぽう、セルのメインストリームからの切り替えられていないセルが他の出力チャンネルたとえば13へ出る。マイクロ流体チャンネルネットワーク中のフロー条件の設定と制御は、直接駆動ポンピング、空気ポンピング、電気動力学、毛細管作用、重力または流体フローを生成する他の手段によって達成することができる。

#### 【0023】

スループット（分岐ジャンクションの上部においてソーティング領域に入るセルの時間的な割合）に関するソーティング機構の性能、産出効率（ターゲット出力チャンネル12中のターゲットセルのフラクション）、および純度（ターゲット出力チャンネル12中のセルの総数に対するターゲットセルの数の比）は、さまざまな要因によって影響を受け、それらのおおのは光学スイッチの実施に影響する。光学スイッチは、マイクロ流体チャンネルネットワークのソーティングジャンクション領域内に投射される光学パターンの形状、分岐ジャンクションに対するパターンの位置、その初期位置および形状に対する光パターンの任意の運動、光学スイッチの動作の期間、光学スイッチパターンを生成するために使用されるレーザー源の波長とパワー、その他などのいくつかのパラメーターによって特徴づけることができる。光学スイッチに対するこれらのパラメーターの特定の値の選択は、数ある中でも、マイクロ流体チャンネルシステムのトポロジーと幾何学、マイクロチャンネルシステム内のフローレート（セル速度）、メインチャンネル中を流れるセルの位置（メインチャンネルの中央を流れるか片側へのオフセットを流れるか）を制御する能力、信頼できるスイッチングを達成するために必要なセルの変位の量、チャンネルの深さ、チャンネルの形状、および光スイッチとのセルの相互作用によって生成される力の臨界関数である。

#### 【0024】

一般に、セルがメインチャンネル中のフロー内へ導入されると、それらはフロー内の任意の側方位置においてチャンネルを下方に移動し得る。したがって、セルは、マイクロ流体チャンネル中の圧力駆動フローの周知の（円筒状マイクロ流体チャンネルに対して）放物線または（より一般的な断面に対して）疑似放物線の速度分布図によるそれらの側方位置に依存して、異なる速度で移動し得る。図1に示されるように、これは、一つの出力チャンネルたとえば13へすべてのセルのフローを偏らせるのを困難にするであろう。このフロー幾何学を備えた光学スイッチの任意の実施は必然的に、低いスループットと、光学スイッチを生成するために入手可能なレーザーパワーの非能率的な使用とに帰着するであろう。このフロー幾何学を備えた流体スイッチの任意の実施は、検出領域とスイッチング領域との間の変わりやすいセル飛行時間のために、低いスループット、純度および産出に帰着するであろう。適正フロー条件の使用は、光学または流体スイッチの性能に対するこれらの制限を緩和するのを支援することができる。

#### 【0025】

適正フロー条件の確立は多くの手法によって行なうことができる。一実施形態では、メインチャンネルの中央にある単一の縦列への（示された平面図中の水平への）セルの1次元集中は、図2に示されるようなシースフローアプローチを使用して、左21および右22の側の両方からのバッファの追加フローでセル入力チャンネルフロー20をはさむことによって達成される。メインチャンネルの中央にセルを維持することは、各側からの等しいフローを有することによって達成される。図2に示されるように、このフローは流体

分割平面 2 3 を効果的に作り出し、これは最終的に、分岐ジャンクションにおける流体およびセルの 5 0 / 5 0 分割に帰着する。このマイクロ流体チャンネル設計およびフロー条件を使用してセルの混成母集団からのターゲットセルをソートする光学スイッチの実施は、ターゲットセルを図 1 に示されるような一つの出力チャンネルたとえば 1 2 へ、非ターゲットセルを他の出力チャンネルたとえば 1 3 へ積極的に切り替える光学スイッチを必要とする。このマイクロ流体チャンネル設計およびフロー条件を使用してセルの混成母集団からのターゲットセルをソートする流体スイッチの実施は、ターゲットセルを図 1 に示されるような一つの出力チャンネルたとえば 1 2 へ、非ターゲットセルを他の出力チャンネルたとえば 1 3 へ積極的に切り替える流体スイッチを必要とする。図 2 4 の 2 チャンネル流体スイッチはそのような実施形態の例である。

10

#### 【 0 0 2 6 】

あるいは、セルの集中線は、サイドシースフローチャンネル内に不等なフローを置くことによってメインチャンネルの中央からオフセットして配置され得る、図 3 a ~ b。これは、入力チャンネル 3 0 からメインチャンネル内の分割平面 3 3 の片側へのセルのスクューフローを効率的に引き起こす。セルフローが傾けられるメインチャンネルの側は、シースフローがより高いフローレートをもつ側の反対側になる。すなわち、右のシースバッファ 3 2 が左のシースバッファ 3 1 よりも速く流れるとき、図 3 a ~ b に示されるように、セルの線はメインチャンネルのフローの左の方へ傾けられる。しかしながら、左のシースフローはまた、メインチャンネルの右側の方へセルの線を押す、より高いフローを有することがある。図 3 a ~ b にはまた、蛍光検出器 3 4 と光学スイッチ 3 5 が示される。蛍光検出器は、どのセルをソートするか決定する手段として使用され、後でさらに詳細に論じられる。効果的なソートは、負蛍光非ターゲットセルマイクロ流体チャンネル 3 6 へ分岐ジャンクションを出るフローストリームから正蛍光ターゲットセルマイクロ流体チャンネル 3 7 へ分岐ジャンクションを出るフローストリーム内へ分割平面を横切ってセルを移動させることを含んでいることが図 3 b から明白である。直接駆動ポンピング、空気ポンピング、電気動力学、毛細管作用、重力、または流体フローを生成する他の手段を使用してそれぞれの側のチャンネルのフローレートを別々に制御することによってか、マイクロ流体チャンネルのおおの圧力低下を注意深く釣り合わせることを介して、中央フロー ( 5 0 / 5 0 分割 ) またはオフセットフローが生じることを保証するようにマイクロ流体シースネットワークを特に設計することによってかのいずれかで達成することができる。

20

30

#### 【 0 0 2 7 】

蛍光検出 4 4 の前にメインチャンネル中の入力フロー 4 0 から一つの出力マイクロ流体チャンネルたとえば蛍光負チャンネル 4 6 内へのすべてのセルの優先的フローを達成する代替アプローチは、等しいシースバッファフローレート 4 1 と 4 2 を使用して中央ではさむことを得ることであるが、それから、蛍光正出力チャンネル 4 7 に対する蛍光負出力チャンネル 4 6 内への分岐ジャンクションからのより大きい容量の流体フローを有することにより、蛍光負チャンネル内へセルフローを優先的に偏らせる。これは図 4 a ~ b に示され、左の出力チャンネル 4 6 が右の出力チャンネル 4 7 よりも広い。この構成は、分割平面 4 3 を中央配置セルストリームの右に効果的に置く。したがって、所望位置にあるセルに対して、光学または流体スイッチ 4 5 は、ターゲットセルを分割平面を横切ってターゲットセル・蛍光正・右出力チャンネル内へ移行するために使用される。このアプローチは、左の出力チャンネルよりも広い右の出力チャンネルを有することにより等しく有効であり、それによりターゲットセルは、光学または流体スイッチによって、中央配置セルストリームの左にいま配置されている分割平面を横切って移行され、したがって左の出力チャンネル内へソートされる。したがって、マイクロ流体チャンネル出口ネットワークを特に設計することによって、またはそれぞれの出口チャンネルの出口バック圧力を積極的に制御することによって、所望出力チャンネル内へのセルのフローを制御することができる。

40

#### 【 0 0 2 8 】

50

中央フローまたはオフセットフローのいずれかの使用、および流体分割平面からの集中セルフローのそれぞれの距離は、信頼できるスイッチングを達成するために必要なセルの変位の大きさを最終的に要求する。これはさらに、信頼できる光学スイッチングを達成するために必要とされるレーザー線の長さやレーザーパワー、または信頼できる流体スイッチングを達成するために必要とされる空気パルスの振幅と持続時間を要求する。セルストリームが分割平面に近ければ近いほど、必要とされる変位は短く、ソーティング処理はより効率的になる。ソートされた母集団の向上された純度および高スループットのために、単方向配置中の光学または流体のいずれかの単一のスイッチは、標本ストリームが分割平面からオフセットされること必要とする。この手法では、誤ったソートの発生は最小にされる。セルとデブリが直径で  $1\ \mu\text{m}$  から  $50\ \mu\text{m}$  まで変化し得る最初の組織の単一のセル浮遊液などの大きさが種々雑多な標本に対して、スループットを犠牲にしてより大きいオフセットを奨励することは有利である。より均質の標本、たとえばセル線またはポリスチレンビーズに対しては、より小さいオフセットが増加したスループットを可能にするために選択され得る。

#### 【0029】

この設計の代替案は、二つのレーザー線を利用する双方向光学スイッチを使用することである。このアプローチでは、一方のレーザー線が所望のセルを一方の出力チャンネルへソートし、他方のレーザー線が他のすべてのセルを他方の出力チャンネル内へソートする。このアプローチは、 $50/50$ 、図2、またはオフセット、図3と4、分割構成のいずれかと共に使用することができる。後者の場合、セルがスイッチングゾーンにないとき、一つがレーザーをその二つの位置状態のいずれかにしておくように選択し得る、または一つがまたこの時間のあいだレーザーを遮断し得る。光学スイッチはまた、分岐ジャンクションのちょうど上に配置されたスイッチング領域にあたる二つの鏡像レーザー線を有することにより双方向にすることができ、それらは独立につけられて分岐ジャンクションから生じる二つの出力のいずれかにセルを方向付ける。

#### 【0030】

$1 \times 2$  マイクロ流体ネットワーク中でレーザー線を使用する双方向光学スイッチの模型が図5に示される。図6に示されるように、同様の双方向光学スイッチがまた、チャンネルのいずれかの側に方向付けられたレーザースポットで達成された。単方向光学スイッチでのように、単一のレーザー源を双方向光学スイッチ中で使用することができ、または代替的に双方向光学スイッチが二つの独立したレーザー源を使用することができる。双方向設計は単方向設計に対していくつかの性能の利点を潜在的に提供する。第一は、すべてのセルがレーザーによって方向付けられるので、純度が潜在的に最大にされるということである。第二に、フローのいくつかの所定比率の代わりに、二つの出力ポートのおおのに等しいフローを方向付けることができるので、流体フローが単純化される。

#### 【0031】

この説明ではこれまで、一つの入力メインチャンネルを通過して二つの出力チャンネルへの分岐内へのフローの  $1 \times 2$  マイクロ流体チャンネル設計だけを考慮したが、 $1 \times N$  または  $M \times N$  出力を備えたマイクロ流体ネットワークを利用することができる。任意な多数の独立変調レーザー線または独立側方フローチャンネルを有することにより、これらのより大きいネットワーク中で光学または流体スイッチングを達成することができる。いくつかの実施形態が図7a~cで示される。さらに、ソートの純度を高めるために同一ソーターを介してセルを複数回フィードバックすることもでき、または代替的に、複数レベルのソーティングのためにチャンネルを縦つなぎに配置することもできる。

#### 【0032】

単方向または双方向配置で光学スイッチを運転するとき、二つの異なる動作モードを考慮することができる、パッシブモードまたはアクティブモード。パッシブモードは、どんなセルがチャンネルを通過して流れているかにかかわらず、光学スイッチの状態がオンまたはオフのいずれかをとりものである。この場合、いつまたはどれくらい多くのセルがスイッチング領域に入るか

についての知識は必要とされず、したがって、レーザーの状態に依存して、スイッチング領域内のすべてのセルが切り替えられる。一方、アクティブモードでは、セルは、まず、検出／選択領域に入ると検出され、それから、ある決定処理に基づいて切り替えられる。図3a～bと図4a～bは、ちょうどスイッチング領域の直前に置かれた蛍光検出器を使用するこのモードの例を示す。この場合、すべての蛍光セルが一方の出力チャンネルへ方向付けられ、すべての非蛍光セルが他方の出力チャンネルへ方向付けられた。決定処理のための他の非蛍光検出／選択技術は、飛行時間、散乱、結像、キャパシタンス、または所望のセルを識別することができる任意の検出様式を含んでいる。検出／選択方法にかかわらず、アクティブモードを使用するスイッチングは、ある決定処理に基づいてセルの一つの母集団を他からソートするために利用することができる。

10

#### 【0033】

アクティブモードを利用するために、光学ビームは、決定処理に応じてオンまたはオフに変調されなければならない。使用するレーザーの数、または光学スイッチが単方向または双方向のどちらであるかにかかわらず、レーザーは、電気光学変調器を使用すること、レーザーパワーを変調すること、レーザーを遮断すること、液晶変調器を使用すること、ガルバノメーターを使用すること、音響光学変調器を使用することを含め、多くの手法によって変調することができる。二つのレーザーを備えた双方向光学スイッチについては、別々のレーザーは独立にオンおよびオフすることができる。しかしながら、単一のレーザー源を使用するとき、光学スイッチ線の二つの異なる配向は、(液晶変調器などの)偏光回転子を使用して、二つの異なる線パターンのおのおのを二つの別々の偏光のおのおの

20

#### 【0034】

図8は、光学スイッチの変調および／または遮断を実施するための三つの異なる可能な光学設計を示す。図8aでは、液晶変調器(LCM)に向けて方向づけられ通過する単一の光学ビーム(レーザー)から双方向光学スイッチが作り出される。LCMは偏光回転子であり、したがって、ビームが一方向に偏光されると、それは直進し、偏光ビームスプリッター(PBS)を通り、線形状を作り出すシリンドリカルレンズを通り、別のPBSを通り、それから線をマイクロ流体スイッチング領域に集光するいくつかの集光光学部品を通る。これは、分岐チャンネル出力の一方内へセルを切り替えるために使用される双方向光学スイッチの一方の線を効果的に作り出す。他方の出力チャンネル内へセルを切り替えるため、鏡像線が作り出されなければならない。これはビームの偏光を変更するLCMを回転させることにより遂行される。したがって、ビームが最初のPBSに当たると、それは代替パスに方向付けられ、(線形状を作り出す)異なるシリンドリカルレンズを通り、他方のPBSを通り、それはビームを方向づけ、鏡像線をマイクロ流体スイッチング領域上に集光する集光光学部品を通る。双方向光学スイッチのための線形状を作り出すためにシリンドリカルレンズを使用した

30

代替的に、シリンドリカルレンズを除去して光学スイッチのために使用されるスポットとすることができることに注意された。図8bでは、LCMとPBSの組み合わせを使用するのではなく、シリンドリカルレンズありまたはなしで、双方向光学スイッチに使用される線またはスポットを作り出すために音響光学変調器(AOM)を使用することができる。これは、必要とされる所望の線形状を得るためにAOMを構成することによって達成される。また、オン／オフ様式で光学ビームを遮断するためにAOMを使用して、光学スイッチオフ状態のためのビームストップへビームを方向付けることができる。図8cは、図8aと図8bに説明したシステムの組み合わせを示す。AOMを使用してビームの方向を変更する任意の構成では、所望のビーム運動に依存して一軸または二軸のいずれかのガルバノミラーがAOMの代わりに使用され得る。

40

#### 【0035】

50

単または双方向光学スイッチについてのスイッチング効率を最適化するとき光学パターンのための多くの変形を考慮することができる。上述したように、レーザー線は光学スイッチパターンとして使用した。線は、シリンドリカルレンズによって、ガルバノミラーまたは音響光学変調器を走査することによって、回折光学部品によって、カスタム屈折光学部品によって、または任意の他の技術によって生成され得る。これまで、線は、シリンドリカルレンズによって、ガルバノミラーを走査することによって、または音響光学変調器を使用することによって生成された。線の長さは任意に長く、または単一の点と同じくらい短くすることができる。線は、線の頂上においてより高い強度を有し、線の端に向けて強度が徐々に減少するようにすることができる。付加的に、線は、セルの出力方向を最適化する曲がった弓形であってもよい。付加的に、リアルタイムで、線の角度または線の形状が変化してもよい（すなわち出力を最適化するスイベル）。複数の出力チャンネルを備えた実施については、各出力セルの方向を最適化するために2D空間のあらゆる任意のパターンの線が生成されてもよい。あるいは、線は、離散スポットのアレイによって作り出されてもよい。

#### 【0036】

スループット、産出効率および純度の点からソーティング機構の性能をさらに改善するために、光学スイッチは、選択セルが分岐ジャンクションに向かってメインチャンネルを下方へ流れるとき、レーザースポットがその横側に掃引され、それによりセルとレーザーの間の総相互作用時間を増大するように構成された。光学スイッチは、分岐ジャンクションに向かってメインチャンネルの長さを下方へ直線的に移行されるレーザースポットを利用する。スポットによって掃引された線は、メインチャンネル（図9a）の壁と平行とすることができ、またはセルフフローストリーム（図9b）に対して角度をもたせることができる。したがって、角度は0～90度に及ぶことができる。スポットを掃引する能力はAOMまたは走査ガルバノミラーのいずれかを使用して達成される。光学スイッチは、所望のセルを識別することができる蛍光または他の検出様式、たとえば飛行時間、散乱、結像またはキャパシタンス、を使用する所望のセルの検出に基づいた決定によって掃引するように作動される。セル位置は、メインチャンネル中でオフセットまたは中央配置することができ、それは、効率的なスイッチング/ソーティングを達成するために使用される、スポットによって掃引される線の長さおよびレーザーパワーを要求する。したがって、所望のセルが検知されると光学スイッチがオンにされ、スポットが所望のセルの横側に現われる。それから、スポットは選択セルの横側に追跡し、光学的力を使用して選択セルを所望の出力チャンネル内へ方向付ける。

#### 【0037】

光学または流体スイッチの効率的なトリガリングを容易にする二つのアプローチを以下に述べる。両方の方法に典型的なのは、動いているセルを分析する一時的な信号の使用であり、切り替えるか切り替えないかの決定を生成するためにこの情報を使用する。この一時的な信号は本質的に時間の関数としての信号の測定であり、それはピーク強度とピーク幅の両方の点から特殊な一時的な指紋を産出することができる。信号は蛍光、散乱（たとえば前方散乱）、キャパシタンス、結像、または所望のセルを識別することができる任意の検出様式であってよい。一つのアプローチは、セル検出とセル識別の両方を遂行するために二つ以上の検出器に結合された単一のレーザー源を利用することである。図10a～dは、蛍光検出器と前方散乱検出器を組み合わせた一つのレーザー源を使用するこのアプローチを示す。これらの検出器からの一時的な信号は切り替え決定の情報として使用される。セルの存在は、前方散乱信号と、この信号が所定の範囲内にある蛍光信号強度といつ結合されるかによって確認され、それから、この「ゲーティング」情報が光学スイッチを作動させるために使用される。単一の蛍光検出器だけが示されるが、さらに洗練されたセル識別のために複数の蛍光検出器を使用することができることに注意されたし。その場合、等しいフローレートシースバッファを使用することによって、セルストリームは中央に配置され、出力チャンネルは、セルストリームの右に分割平面を作り出すために使用される異なる幅を有する。しかしながら、上述したようにセルストリームおよび分割平面の

位置を操作ために使用される任意の構成を使用することができる。また、両方の構成に共通のことは、エラーチェック検出器の存在であり、それはセルが切り替えられたか否かを確認する。この場合の検出は、蛍光、散乱（たとえば前方散乱）、キャパシタンス、結像、または所望のセルを識別することができる任意の検出様式に基づくことができる。

#### 【0038】

図10a～bは、ソートパラメーターが負で光学または流体スイッチが作動されないときの検出器装置とタイミング/トリガー図を示す。セルは、メイン流体チャンネルに入り、両側から流れるシースバッファによって単一の縦列に集中される。セルが検出/選択領域のレーザーを通過するとき、蛍光および前方散乱信号の両方が同時にまたはほとんど同時に検知される。（時刻 $t_1$ の）前方散乱信号によってセルの存在が首尾よく検知されるが、蛍光信号はゲーティングレベル未満であり、光学スイッチは（時刻 $t_2$ に）作動されない。したがって、セルが切り替えられなかったので、（時刻 $t_3$ の）エラーチェック信号が得られない。一方、図10c～dは、ソートパラメーターが正で光学または流体スイッチが作動されるとき検出器装置とタイミング/トリガー図を示す。ここで、セルが検出/選択領域のレーザーを通過するとき、蛍光および前方散乱信号の両方が同時にまたはほとんど同時に検知されるが、蛍光信号はゲーティングレベル内にあり、光学または流体スイッチは（時刻 $t_2$ に）作動される。セルが切り替えられたので、（時刻 $t_3$ の）エラーチェック信号が得られる。このアプローチでは、（時刻 $t_2$ の）トリガー時刻は、初期検知時刻（ $t_1$ ）から測定されたプリセット値（ $t$ ）であり、この $t$ 値は、セルの速度と、検出/選択領域に対する光学スイッチの位置とによって決定される。このアプローチは満足に、効率的なソーティングを達成するものであるが、トリガリング精度をさらに改善する手段として第二のアプローチが使用される。

#### 【0039】

図11a～dはこの第二のアプローチを示し、二つのレーザー源が一つの代わりに使用される。また、上述した単一のレーザーアプローチのように、これらの検出器からの一時的な信号はスイッチ決定のための情報として使用される。識別/選択領域の前でセル検出を別に遂行するために、一つのレーザーが検出ゾーンの中で使用される。この場合の検出は、蛍光、散乱（たとえば前方散乱）、キャパシタンス、結像、または所望のセルを識別することができる任意の検出様式に基づくことができる。第二のレーザーは二つ以上の検出器と結合され、セル検出とセル識別を遂行するために使用される。再び、この場合の識別は、蛍光、散乱（たとえば前方散乱）、キャパシタンス、結像、または所望のセルを識別することができる任意の検出様式に基づくことができる。二つの連続するセル検出ステップの目的は、（時刻 $t_1$ の）第一の検出と（時刻 $t_2$ の）第二の検出の間の時間差（ $t$ ）からセルフフローレートを得ることができるようにするものである。検出器窓（ $d$ ）間の間隔を知ることはフローレート（ $v = d / t$ ）を与え、識別窓（ $x$ ）から光学または流体スイッチがある既知の値と組み合わせられたこの値は次に光学スイッチ（ $t_3 = x / v$ ）のためのトリガリング時刻を計算するために使用される。特定のゲーティングレベルがセル識別ステップの間に到達されるときにだけ、再び切り替えが起こる。識別のために単一の蛍光検出器だけが示されるが、複数の蛍光検出器を使用することができる。描写の場合では、等しいフローレートシースバッファを使用することによってセルストリームは中央に配置され、セルストリームの右に分割平面を作り出すために出力チャンネルは異なる幅を有する。しかしながら、上述したようにセルストリームおよび分割平面の位置を操作するために使用される任意の構成を使用することができる。また、両方の構成に共通のことは、エラーチェック検出器の存在であり、それはセルが切り替えられたか否かを確認する。この場合の検出は、蛍光、散乱（たとえば前方散乱）、キャパシタンス、結像、または所望のセルを識別することができる任意の検出様式に基づくことができる。

#### 【0040】

図11a～bは、ソートパラメーターが負で光学または流体スイッチが作動されないときの検出器装置とタイミング/トリガー図を示す。セルは、メイン流体チャンネルに入り、両側から流れるシースバッファによって単一の縦列に集中される。セルが検出窓領域

を通過するとき、(時刻  $t_1$  の) 前方散乱信号によってその存在が確認される。セルが識別/選択窓を通過するとき、(時刻  $t_2$  に) 第二の前方散乱信号が得られるが、この信号は、ゲーティングレベル内にない(時刻  $t_2$  の) 蛍光信号強度と結合され、光学または流体スイッチは(時刻  $t_3$  に) 作動されない。セルが切り替えられなかったので、(時刻  $t_4$  の) エラーチェック信号は得られない。セルをソートすることせずに、( $t_1$ )、( $t_2$ ) と、検出および識別窓間の既知の距離 ( $d$ ) を使用してセルストリームのフローレート ( $v$ ) が得られる。これは、 $t = (t_2) - (t_1)$  および  $v = d / t$  の関係を使用して得られる：

#### 【0041】

一方、図11c~dは、ソートパラメーターが正で光学または流体スイッチが作動されるとき、図11c~dは、ソートパラメーターが正で光学または流体スイッチが作動されるとき、(時刻  $t_1$  の) 前方散乱信号によってその存在が再び確認される。セルが識別/選択窓を通過するとき、(時刻  $t_2$  に) 第二の前方散乱信号が得られ、この信号は、ゲーティングレベル内にある(時刻  $t_2$  の) 蛍光信号強度と結合され、光学または流体スイッチが(時刻  $t_3$  に) 作動される。セルが切り替えられたので、(時刻  $t_4$  の) エラーチェック信号がいま得られる。このアプローチでは、トリガー時刻( $t_3$ )はプリセット値ではなく、セルストリームフローレート( $v$ )と、光学スイッチと識別ウィンドウの間の既知の距離( $x$ )とを使用して計算される。これは、 $t = (t_2) - (t_1)$ 、 $v = d / t$ 、( $t_3$ ) =  $x / v$  の関係を使用して得られる。このアプローチは、セルフローレートの変動を明らかにし、それにより、より正確に光学または流体スイッチを作動させることができるより効率的なソーティングを与える。光学スイッチングのためのこのアプローチの付加利益は、個々のセルについて、上述したように決定されるセルの速度と一致するようにレーザースポットがチャンネルを下方に移行されるレートを調節し、したがってセルと光学スイッチのレーザースポットとの間の相互作用時間の最大にすることの可能性である。レーザースポットの移行速度は、AOMのためのドライバーを変えることによって変えられる。

#### 【0042】

上述したトリガリングアプローチを包含するが、ソーティング効率を改善する別のアプローチは、正確な標本コアを作り出すチャンネル設計を使用してセルをメインチャンネルの中央に配置することであり、それにより、コアはシースバッファによって完全に囲まれる。チャンネル高さに沿ったセルの位置の変化性は、セル検出および蛍光強度の変化性を引き起こすことがある。メインチャンネルの中央を流れるコア中にセルがあることを確実にすることは、セルの放射状分布のためにあらゆる変化性を最小にし、効率的なソーティングを達成するために移動されるためにセルが必要とする距離を制御するので、ソーティング効率を改善し得る。そのようなコアフローは、シースバッファでの入力フローストリームの2次元のピンチで達成することができる。

#### 【0043】

このアプローチは底部基板と上部基板を必要とし、それらはそれぞれそれらの中に形成されたマイクロ流体チャンネルネットワークを備えている。図12a~bと図13は、これを遂行する方法を示し、一方の基板上のチャンネル設計は他方の基板上の設計の鏡像である。したがって、二つの基板がチャンネル設計を対向させて接合されると、チャンネルネットワークは完成した流体の流路を覆い形成する。図12a~bは、このアプローチで使用される設計の一種を示し、標本チャンネルは破線として示される。このアプローチの重要な特徴は、標本チャンネルがシースチャンネルよりも浅く、その結果、基板が接合されたときに、標本流路が穴としてジャンクションに入るように見えることを確実にすることである。これは図13に示され、セルがジャンクションに入るのを見ることができ、次に、すべての側からはさまれて、メインチャンネルの中央に流れる標本コアを作り出す。チャンネルは、ガラスまたは石英のウェット化学エッチまたはレーザーエッチによって、またはプラスチックまたはポリマーに成型または浮き彫りすることによって形成することができることに注意されたし。

## 【 0 0 4 4 】

別の方法は、一連の交差チャンネルを、第一のジャンクション / 交差においてセルがメインチャンネルの一つの壁に向けて垂直に押され、次のジャンクション / 交差がこのセルストリームをメインチャンネルの中央に垂直に押しやり、それから第三のジャンクション / 交差における両側からの最後のピンチフローが、メインチャンネルを流れる標本コアの周りに完成シースバッファー覆いを作り出すように配置することを含んでいる。これは図 1 4 と図 1 5 に示され、一つの可能なチャンネル模型が図 1 6 に示される。この例では、ジャンクション ( A ) において、標本は、上部基板からジャンクション内へ、底部基板中のチャンネル内へ下方へ流れ、そこではサイドシースバッファーがサイドからジャンクション内へ流れる。標本は、わずかに集中され、底部チャンネルの上壁に押し付けられ、次のジャンクション ( B ) に向かって流れ続ける。ジャンクション ( B ) において、標本は、ジャンクション A からジャンクション ( B ) へ、底部チャンネルの上部に沿って流れる。ここで、第二のシースバッファーが上部基板からジャンクション ( B ) 内へ流れ込み、標本は底部基板中のチャンネルの真ん中まで押し下げられる。標本は、次のジャンクション ( C ) に向かって底部チャンネルの真ん中に沿って流れ続ける。ここで、第三のシースバッファーが両サイドからジャンクション ( C ) 内に流れ込み、標本は単一の縦列へと含まれる。標本はいまシースバッファーに取り囲まれ、メイン入力チャンネル内で水平と垂直の両方の中央に配置されて標本コアとして流れ続ける。

10

## 【 0 0 4 5 】

別の方法は、1 D シースバッファーに直交の軸の浅いチャンネルを使用して放物線状速度分散の影響を最小にする。マイクロ流体チャンネル中の一次元フロー集中では、入口中央ストリーム中の粒子またはセルは一方向だけに沿っては含まれる。はさみとフローの方向に垂直な方向に、放物線状速度特性が残る。チャンネルの中央に近い粒子は速く流れるが、チャンネル壁に近いものは遅く流れる。その結果、粒子またはセルは速度の分散を伴ってフローチャンネルを下方へ移動し、これは検出とスイッチング事象の同期を複雑にする。図 3 4 は、1 D マイクロ流体フロー集中の固有の問題を解決する方法を示すが、直交方向の粒子またはセルの大きさに匹敵するチャンネル深さを使用する。たとえば 1 0 マイクロメートルの直径の粒子またはセルでは、チャンネル深さは 1 5 マイクロメートルである。この場合、粒子またはセルは深さ方向にチャンネルの大部分を占め、その結果、それらは、速度分散を平均しチャンネルの速度分散を狭める速度を経験する。

20

30

## 【 0 0 4 6 】

図 1 ~ 1 6 に説明したすべてのマイクロ流体チャンネルネットワーク設計はガラス基板で、従来のフォトリソグラフィックマスキングと、マスクしたガラス基板の等方性エッチングとを利用して作製した。等方性エッチは一般に、チャンネルの中央に深さ  $d_c$  を、またチャンネルの上部に幅  $w = w_p + 2 \times d_c$  を有するマイクロ流体チャンネルを作り出す。ここで、 $w_p$  はチャンネルを規定するフォトリソグラフィの幅である。チャンネルの底部輪郭は、等方性エッチのために各角に四半円形輪郭を、またエッチされたチャンネルの上部に開口を有する。ガラス基板、一般にガラス蓋スリップが、エッチされたマイクロ流体チャンネルを備えた基板に熱的に接合されて、チャンネルの上部を密閉し、マイクロ流体チャンネルネットワークを完成させる。熱的接合の前に上部基板に穴が一般にドリルで空けられてマイクロ流体チャンネルネットワークへの流体フローの進入と退出のためのピアを提供するが、代わりに、上部基板にではなくエッチされた底部基板に穴がドリルで空けることもできる。チャンネルの深さ  $d_c$  は、化学エッチ工程のレートとエッチステップの期間に依存する。マイクロ流体チャンネルの深さは、これに限定されないが、一般に 1 0  $\mu m$  ないし 1 0 0  $\mu m$  範囲内にある。マイクロ流体チャンネルの幅は、これに限定されないが、一般に深さの 2 ~ 5 倍である。これは、これに限定されないが、一般に 5  $\mu m$  ないし 4 0 0  $\mu m$  範囲内にあるフォトリソグラフィ上の線を使用することによって達成される。前述したように、プラスチックまたはモールド可能または成型可能なポリマーなど、他の基板が使用され得る。これらの場合、マイクロ流体チャンネルは一般に矩形断面を有するが、そのほかはガラス基板のチャンネルと同様である。マイクロ流体チャンネル

40

50



ネットワークが作製されるガラス基板の大きさは、これに限定されないが、一般に  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$  ないし  $25\text{ mm} \times 50\text{ mm}$  の範囲内にあり、総厚さは、これに限定されないが、 $500\text{ }\mu\text{m}$  ないし  $2\text{ mm}$  範囲内にある。上部基板は一般に同じ大きさで、厚さは、これに限定されないが、 $300\text{ }\mu\text{m}$  ないし  $1\text{ mm}$  範囲内にある。ビアは、これに限定されないが、直径が一般に  $200\text{ }\mu\text{m}$  ないし  $600\text{ }\mu\text{m}$  である。マイクロ流体チャンネルネットワークと、流体フローの進入と退出のための流体ポートのためのビアを備えた接合カバープレートとを備えた完成基板は、マイクロ流体ソーティングチップまたは簡潔にチップと呼ばれる。

#### 【0047】

図1～16に示されたマイクロ流体チャンネルネットワークは、マイクロ流体チャンネルと、シースバッファープinchジャンクションチャンネル、セル識別および光学スイッチメインチャンネル、出口チャンネルへのメインチャンネルの分岐との局所的な幾何学を一般的に説明しただけである。この説明は、ネットワークからの流体フローの進入と退出を提供する上述したビアへのインターフェースを提供するマクロスケール流体デバイスまたはカートリッジの貯槽への連結を各チャンネルに作る領域を提供するように拡張される必要がある。これらのマイクロ流体チャンネルのおおの断面および長さは一般に、チャンネル中のフローを達成するために選択される技術に依存して、マイクロ流体チャンネルネットワーク全体内の適当に制御されたフローを確実にするように調節される必要がある。これらのチャンネルの断面と長さの両方は、フォトリソグラフィーマスクを作製するために使用されるパターンによって決定される。

#### 【0048】

図17は、入口チャンネルと、Tピンチジャンクションへの二つのシースチャンネルと、T分岐ジャンクションからの二つの出口チャンネルとを有する完成マイクロ流体チャンネルネットワークのためのマスクの一実施形態を示す。このマスクは、7:1容量ピンチ比（シースフローレートがセル入口フローレートよりも七倍大きい）を提供するように設計された。チャンネルの長さは、フローを確立するために標準的低フローシリンジポンプまたは低圧空気制御器のいずれかの使用を可能にする十分な圧力低下を共に提供するように設計された。設計はまた、出口が大気圧に維持された状態で、二つだけのポンプ（一つがセル入口チャンネル用で一つが二つのシースチャンネル用）の使用を可能にするために必要とされる圧力平衡をもたらす。シースチャンネル入口は設計の上部の終端にあり、セル入口チャンネルは、これの下方で二つのシースチャンネルの中央で始まり、7:1容量ピンチ比を設定する適当な圧力低下を提供するように十分に長く、二つの出口は底部左右の終端に配置されている。

#### 【0049】

図18は、10:1容量ピンチ比を提供する設計におけるピンチジャンクションのための三角形ジャンクションとY分岐ジャンクションとを包含した別の実施形態を示す。そのほかは、設計は図17と幾何学的に同様である。他の多くの設計が明白に可能であるが、それらはすべて、流体進入および退出を提供することと、流体フローを確立するために選択された方法のための適当な圧力低下および圧力平衡を提供することを必要とする共通の特徴を共有する。同様の設計条件が、先に説明した2次元ピンチフローネットワークのためのマイクロ流体チャンネルネットワークを作るために使用されるフォトリソグラフィーマスクを作製するために使用される。

#### 【0050】

図19は、完成したマイクロ流体ソーティングチップ中のマイクロ流体チャンネルネットワークの好適な実施形態を示す。二つの入口ポートはセル標本フロー用とシースバッファ用であり、二つの出口ポートは蛍光正ターゲットセル用と蛍光負非ターゲットセルつまり廃棄物ストリーム用である。チップは  $24\text{ mm} \times 40\text{ mm}$  である。エッチされた基板の厚さは  $1.1\text{ mm}$  である。接合されたカバープレートの厚さは  $550\text{ }\mu\text{m}$  である。マイクロ流体チャンネルは深さ  $50\text{ }\mu\text{m}$  である。セル入口マイクロ流体チャンネルは  $110\text{ }\mu\text{m}$  幅である。シースフローおよび出口マイクロ流体チャンネルは  $150\text{ }\mu\text{m}$  幅であり、メイ

ンマイクロ流体チャンネルである。シースフローピンチジャンクションは、各辺 300  $\mu$ m の倒立した正三角形で、ジャンクションの上部において、各サイドからの二つのシースフローピンチチャンネルを備えた三角形の底辺を介してセル入口チャンネルを、ジャンクションの底部において、三角形の頂点を介してメインチャンネルに連結している。このマイクロ流体チャンネルネットワーク設計は、ネットワークフローを確立するために四つのすべてのポートにフローの空気制御を使用するように最適化される。

#### 【0051】

チップへのマイクロ流体連結はさまざまな方法でなされ得る。一つの方法は、ポートにおいてチップの表面に取り付けることができるさまざまなチュービングアダプターを使用するか固着するかのいずれかによって、ポートに直接連結された可撓性マイクロ流体チュービングを使用することである。このチュービングは、セル標本とシースバッファの両方をハンドリングするための容量を提供し、チップを介してこれらの容積を流すために圧力を提供するシリンジポンプまたは同様のシステムに直接連結することができる。標本容量をハンドリングするためにシリンジポンプを使用することは、ポンプが各標本のために洗浄され再装填されることを必要とし、一つの標本から次への持ち越しまたは汚染の可能性を導入する。

#### 【0052】

チップへのマイクロ流体連結のための改善された方法は、UV硬化性接着剤、PSA（感圧接着剤）のボンディングシート、または伝熱ボンディングなどの他の従来のボンディング方法を使用して、チップに直接接着されるカートリッジを利用することである。カートリッジは、セル入口チャンネルと、（一つの貯槽からの）二つのシースチャンネルと、二つの出口チャンネルのおのおのへのインターフェース連結を別々に提供する四つの内蔵の貯槽を有する。そのようなカートリッジは、セル標本とソートされたターゲットセルおよび廃棄物ストリームの両方を、セルソートの前後でカートリッジの容量に完全に制限することができるので、それらの無菌のハンドリングの可能性を提供する。そのようなカートリッジとチップのシステムのためのフローは、チップのマイクロ流体チャンネルネットワークを介して大気圧にある出口貯槽へフローを誘導するためにセル入口とシースバッファ貯槽を別々に圧力調節する二つの空気圧力制御器を使用することによって提供することができる。

#### 【0053】

改善されたフロー制御方法は、セル入口とシースバッファとターゲットセル収集および廃棄物貯槽のおのおのを別々に圧力調節する四つの空気制御器を使用することによって提供される。そのようなフロー制御システムは、先に説明したように、シースピンチジャンクションにおける容量ピンチ比と、蛍光分析および光学スイッチのためのメインマイクロ流体チャンネル中のセルのフロー速度と、偏ったフローを可能にするスイッチング分岐での分割比とを別々に調節する能力を提供する。

#### 【0054】

図20は、セル標本容量と、シースバッファ容量と、それぞれターゲットセルおよび廃棄物のための二つの出口収集容量とのための流体貯槽を提供する自給式使い捨てカートリッジの好適な実施形態を示す。カートリッジはアクリル酸プラスチックから製造され、機械加工または成型され得る。適当ならば、他のプラスチックまたは好適な物質がアクリル樹脂の代わりに用いられ得る。セル標本容量は、一般に形状が円錐であり、入口マイクロ流体チャンネルへのポートに向かって先細になっている。好適な実施形態では、入口貯槽は、セル接着を最小にし、したがってセル産出を最大にするためにポリプロピレンインサートを収容する。チップはUV接着剤で光学窓領域に接合され、チップからの出口ポートはそれぞれの貯槽容量と連結する。貯槽容量は、空気制御器と個々の貯槽との間の連結のためのポートをドリルで空けたスナップ方式の蓋で密閉される。蓋は、カートリッジ本体に対して密閉することを助けるためにシリコーンガスケットを包含している。それはまた、カートリッジ容量と外部環境との間に気体性・液体不透過性インターフェースを作り出す0.1mのポリプロピレンフィルターを包含する。これはカートリッジ上の無菌状態

を維持し、ユーザーまたは機器への任意のバイオハザード汚染を最小にする。

【 0 0 5 5 】

カートリッジは、luer フィッティング (luer fitting) を備えた通常の注射器を使用して、シースバッファ溶液でシースポートを介してマイクロ流体チャンネルネットワークを最初に準備することによってセルソーティング運転のために用意される。この方法では、チャンネルが準備され、シース貯槽は  $800\ \mu\text{l}$  充てんされ、各出口貯槽は  $200\ \mu\text{l}$  充てんされる。セル標本貯槽は超過バッファ液体を吸引され、それから  $5\sim 25\ \mu\text{l}$  のセル標本がピペットを使用して標本入力貯槽に入れられる。それからカートリッジ蓋が適所に当てられ留められ、セルソーティング運転を実施する自給式システムを提供する。

10

【 0 0 5 6 】

カートリッジは、チャンネル中に光学スイッチビームを投射する光学結像系が適切に整列されチャンネル内に集光されるようにチップのメインチャンネルを位置決めするホルダーに配置されるように設計されている。カートリッジホルダーはまた、外部チューピングによって空気制御器に連結された、四～六つのポートを有する圧力マニホールドプレートを有している。各マニホールドポートは、そのそれぞれのカートリッジ蓋ポートにリングで密閉され、これらのシールは、マニホールドをカートリッジ蓋にカムロック機構で押し付けることによって漏れなしにされる。図 29 は、空気パルスの容量およびパス長さを短くするためにマニホールド上の二つの空気圧バルブを一体化する流体スイッチングのためのカートリッジホルダーの好適な実施形態を示す。源から空気圧ポートまで空気圧力を連結しているマニホールドが、配管を介在することなくなされている。これは、より高い性能のためのより速いスイッチング速度を可能にし、図 27～28 に示されたスイッチ構成からの性能利得を補足する。

20

【 0 0 5 7 】

光学スイッチのための光学系の好適な実施形態が図 21 に示される。カートリッジは、空気のマニホールドがスナップ方式の蓋に連結している状態で、光学スイッチ領域がカートリッジの上方からのレンズ系視野と下方からのレンズ系視野の両方の焦点にあるように配置される。図 3～7 と 9～11 に示されるように、 $488\ \text{nm}$  レーザーからの出力ビームは、ソーティング領域のちょうど上流でメインチャンネル内に結像系を介して投射され、蛍光正ターゲットセルからの蛍光の検出のための励起を提供する。蛍光発光は同じレンズによって集められ、ダイクロイックミラーと適当な蛍光発光フィルターとを介して光電子増倍管に結像される。光電子増倍管からの信号は、セルからの蛍光のレベルを測定し、メインチャンネル中のフローストリーム中の蛍光正ターゲットセルの存在を決定する電子機器によって処理される。蛍光励起は  $488\ \text{nm}$  波長に限定されないが、ターゲットセルを識別するために使用される蛍光団に適切な任意の波長とすることができる。異なる励起照明が使用される場合、蛍光発光フィルターの波長は適宜に変更されなければならない。蛍光正セルが識別されると、電子機器は、AOM を作動させて IR レーザー、一般に  $5\ \text{W}$  と  $20\ \text{W}$  出力間の  $1070\ \text{nm}$  レーザー作用、からのビームをメインチャンネル内へ光学スイッチ位置に方向付ける。好適な実施形態では、AOM は、図 9b に説明したような光学スイッチパターンを生成するように制御されるが、先に説明した光学スイッチ方法のいずれも実施することができる。カートリッジの下方のレンズは、 $488\ \text{nm}$  励起照明をフォトダイオード上に結像する。このフォトダイオードによって検知された信号は、蛍光標識を運び得るより小さいデブリから蛍光標識セルを区別するのを手伝えるために、また作られたかもしれないセルの集塊を識別するために使用される。これらの出来事は、ターゲット出力チャンネルへのソーティングに対する候補として拒絶される。

30

40

【 0 0 5 8 】

また別の好適な実施形態は、蛍光を励起するために使用される  $488\ \text{nm}$  レーザーによるセルの照明に基づいて前方散乱信号を提供するために適当に結像およびフィルタリングすることを包含するであろう。光学部品は、前方散乱信号の検出のためのに、この範囲に限定されないが、 $0\sim 8^\circ$  ないし  $10^\circ$  などの角度感度の範囲を提供するであろう。この

50

信号は、セルとデブリを区別するのを手伝うほかに、蛍光信号に加えてセルを特徴づけるのを手伝うことができる。前方散乱照明は蛍光励起レーザーに限定されないが、メインチャンネル内に適切に結像される追加光源によって提供される任意の他の波長にあってもよい。

#### 【 0 0 5 9 】

また別の好適な実施形態は、これに限定されないが、488 nmなどの単一の励起波長を一般に使用する、異なる波長の蛍光発光に高感度な追加蛍光検出チャンネルを包含するであろう。各検出チャンネルは、追加蛍光団の蛍光発光波長用の適当なダイクロイックミラーおよび発光フィルターと共にPMTを包含するであろう。二ないし四つの蛍光検出チャンネルが、このように容易に設けられる。このように一つ以上の蛍光団に使用することは、ソーティングのためのターゲットセルを光学スイッチで識別する多重検出基準のための能力を提供する。

10

#### 【 0 0 6 0 】

また別の好適な実施形態は、蛍光検出と前方散乱検出に使用される波長の範囲の外にあるが、一般に1070 nmである光スイッチ波長よりも短い、おそらく、これに限定されないが、固体レーザーからの785 nmの、一般により長い波長であり、また、一般にネットワーク中のチャンネルの一つを横切る細線としての光学的照明を提供するエラー検査能力を包含するであろう。この源は、マイクロ流体チャンネルネットワーク内に適切に結像され、ネットワークに任意の鉛直平面を通して粒子の通過を検出するために使用することができる線を提供することができる。これは、図11に説明されるように、光学スイッチ性能の性能をチェックする追加能力を提供し、光学スイッチのトリガーのタイミングについての追加能力を提供する。

20

#### 【 0 0 6 1 】

光学系のまた別の好適な実施形態は、たとえばLEDからの光をバンドパスフィルタリングし、その光でマイクロ流体チャンネルの領域を照明することによって生成される、これに限定されないが、750 nmの追加光学照明パスを包含するであろう。その領域は、750 nmのパスフィルターを介してCCDカメラ上に結像され、分岐ジャンクションおよび/またはピンチジャンクションにおけるマイクロ流体チャンネルネットワーク中を流れるセルの性能の視覚化を提供するであろう。カメラの前のフィルターは、励起または蛍光の検出に、また前方/サイド散乱光学とエラー検出光学に関連した任意のより短い波長放射を遮断するのに適切である。フィルターはまた、光学スイッチからのより長い波長の1070 nm光を遮断するであろう。

30

#### 【 0 0 6 2 】

図20に示されるカートリッジの好適な実施形態は、マイクロ流体チャンネルネットワークを水平な外形に保持するように設計されており、チャンネルおよび入口/出口ポートはすべて同じ鉛直レベルにある。これは、マイクロ流体チャンネルを介する圧力低下に対する重力の影響を最小にし、ネットワーク中のより安定かつ制御可能なフローをもたらす。しかしながら、重力はまた、特にセルがセル標本貯槽からセル入口へマイクロ流体チャンネル内へ通過するとき、フロー中のセルへの影響を有する。ソーターの別の好適な実施形態は、この貯槽中のセルの安定化と、セルフローがピンチジャンクションで速度を上げる前の入口マイクロ流体チャンネル中の比較的より遅いフロー中のそれらの安定化とに対する重力の影響を制御するのを手伝うために、セルの浮力を高めることであり、セルの整定が最小にされる。浮力を高めることは、標本バッファー中に添加剤を使用することによって達成することができる。これらのレオロジー制御添加剤の例、特に擬塑性またはずり減粘のいずれかまたは両方であるものは、キサンタンガム、カラゲナン、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ハイドロオキシプロメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルガール、アラビアゴム、トラガカントゴム、アルギナート、ポリアクリレート、カルボマーである。他の添加剤は、ポリスクロースとジアトリゾア酸ナトリウムの混合物であるHistopaque（登録商標）と、水中のイオジキサノールの60% w/v溶液であるOpt

40

50

i p r e p (登録商標)を含んでいる。使用する添加剤の濃度は、ソートされているセルの密度に依存する。たとえば、O p t i p r e p (登録商標)の場合には、濃度は5%から40%までの範囲にわたることができる。最後に、塩分の標本バッファーとしょ糖の追加も、セルの浮力を調節するために使用することができる。

#### 【0063】

セル標本容量とシースフローに使用されるバッファーは、ソートされているセルと生物学的に互換性があり、蛍光検出様式と光学スイッチの両方に使用される光学的照明と互換性がある任意のバッファーとすることができる。すなわち、バッファーは、蛍光励起/検出波長と光学スイッチ波長において十分に低い吸収度を有する。シースバッファーの好適な実施形態は、P B S / B S A すなわち1%のウシ血清アルブミン ( B S A ) フラクシオン5を含むp H 7 . 2 のリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) を使用する。セルバッファの好適な実施形態は、生きたセル標本に対して14 . 5 % の O p t i p r e p と、さまざまなホルマリン固定セル標本に対して27%のO p t i p r e p を含むP B S / B S A を使用する。

#### 【0064】

マイクロ流体チャンネルネットワーク中のセルソーティングの光学スイッチ方法の性能は、先に説明したようにソートのスループット、純度および回収によって評価される。図20に説明されたカートリッジは性能の測定を可能にするように最適化される。それはアクリル樹脂で作られているので、ターゲットおよび廃棄物収集貯槽の底部は透明であり、これらの貯槽内にソートされたセルは倒立蛍光顕微鏡を使用して数と蛍光標識の両方について定量することができる。図3~11に説明したいくつかのスイッチング構成が評価された。これらの評価は、1または2サイドの静止レーザースポットまたは0°または8°の1サイドレーザー掃引のいずれかを使用してソートされた生きたH e L a : H e L a - G F P セルの50 : 50混合物を使用して実施された。レーザーは240Hzで掃引された。レーザーオン時間は4ミリ秒とした。またレーザーパワーはすべてのスイッチモードで20Wとした。掃引スポット方法において、集光I R レーザースポットは、メインチャンネルに沿って約70m移行された。

#### 【0065】

図22に示されるように、図6に説明された、レーザースポットを備えた双方向光学スイッチは、ターゲット：非ターゲットセルの50 : 50混合物に対して50のセル/sのスループットまで純度と回収について好結果を与えた。しかしながら、低い部分母集団濃度(データは図示しない)では、非ターゲットセルを切り替えるためのレーザーパワーの使用は効率的でなく、より高いセルスループットレートでコインシデンスエラーが増えた。そのうえに、切り替えられなかった微粒子はターゲット貯槽を汚染するであろう。

#### 【0066】

図22はまた、静止レーザースポット、またはフローに平行またはわずかな角度のいずれかでフローの方向に移行されるスポットを用いる、図9に説明された、1サイドスイッチング方法の性能を示す。標本コアフローストリームは、光学スイッチが存在しないデフォルトにおいてセルがすべて廃棄物へ行くように廃棄物出口へ偏らされる。プロットによって示されるように、これらの方法は両方とも改善された性能を与えた。二つの方法の性能が交差することは、光学スイッチのトリガリングが最適ではなかったことを示唆し、また図10と11に説明された光学スイッチのアクティブトリガリングが性能を改善することを示唆する。

#### 【0067】

図23は、1×2マイクロ流体チャンネルネットワークすなわち一つのメイン入力チャンネルと分岐ジャンクションから延びている二つの出力チャンネルとを備えたネットワーク中のセルまたは粒子をソートする役目をする空気流体スイッチの例を示す。分岐ジャンクションのための「Y」幾何学が図23に示されるが、「T」幾何学などの他の分岐も使用され得る。一般に、これらのマイクロ流体チャンネルは、チャンネル内へのセル検出光学の射影を可能にするために、光学的透明基板中に作製される。この基板は、これに限定

されないが、一般にガラス、石英、プラスチックたとえばポリメチルメタクリレート（PMMA）ほか、および成型可能または加工可能なポリマー（たとえばポリジメチルシロキサン、PDMSまたはSU8）である。マイクロ流体チャンネルの深さは、これに限定されないが、一般に10 μmないし100 μm範囲内にある。マイクロ流体チャンネルの幅は、これに限定されないが、一般に深さの1ないし5倍である。断面は一般に長方形か、チャンネルの等方性エッチングが後続するガラス基板のフォトリソグラフィックマスキングによって作製されるマイクロ流体チャンネルの場合には四半円形角を備えた長方形である。

#### 【0068】

フロー条件は、空気圧力が $P_0 > P_1 > P_2$ となり、流体中のセルが最高圧力から最低圧力へ優先的に流れるように設定される。圧力 $P_1$ が $P_0 > P_2 > P_1$ となるように増大されると、それから流体フローは乱され、「Y」ジャンクションの反対側の分岐へ流体が優先的に流れると平衡を再確立する。システムは、 $P_0 > P_1 > P_2$  関係を回復することによって元の状態に戻ることができる。

#### 【0069】

スループット（分岐ジャンクションの上部においてソーティング領域に入るセルの時間的な割合）に関するソーティング機構の性能は、図23に示されるような流体の後方伝達によって制限される。流体スイッチが作動されると、粒子運動は、新しいフローパスを確立する前に方向が反転し上流に流れるように見える。この運動によって引き起こされる時間遅れは、受理可能な産出効率（ターゲット出力チャンネル中のターゲットセルのフラクション）と純度（ターゲット出力チャンネル中のセルの総数に対するターゲットセルの数の比）を達成するスイッチの速度とイベントの周波数を制限する。

#### 【0070】

図24は、1×2マイクロ流体チャンネルネットワークすなわち一つのメイン入力チャンネルと分岐ジャンクションから延びている二つの出力チャンネルとを備えたネットワーク中のセルをソートする役目をする2チャンネル流体スイッチの一実施形態を示す。分岐ジャンクションのための「Y」幾何学が図24に示されるが、「T」幾何学などの他の分岐も使用され得る。一对の側方フローチャンネルが分析領域と分岐ジャンクションの間に配置されている。側方フローチャンネルは寸法で対称的であってもよく、または一方の側が他方よりも大きく一方向に速いスイッチングを支持してもよい。一般に、これらのマイクロ流体チャンネルは、チャンネル内へのセル検出光学の射影を可能にするために、光学的透明基板中に作製される。この基板は、これに限定されないが、一般にガラス、石英、プラスチックたとえばポリメチルメタクリレート（PMMA）ほか、および成型可能または加工可能なポリマー（たとえばポリジメチルシロキサン、PDMSまたはSU8）である。マイクロ流体チャンネルの深さは、これに限定されないが、一般に10 μmないし100 μm範囲内にある。マイクロ流体チャンネルの幅は、これに限定されないが、一般に深さの1ないし5倍である。断面は一般に長方形か、チャンネルの等方性エッチングが後続するガラス基板のフォトリソグラフィックマスキングによって作製されるマイクロ流体チャンネルの場合には四半円形角を備えた長方形である。

#### 【0071】

フロー条件は、ジャンクション領域で圧力 $P_3 = P_4$ となるように流体スイッチがこの場合空気圧力からオフにされたときに、すべてのセルが出力チャンネルの一つ、たとえば右の出力チャンネルへ優先的に流れるように設定される。流体スイッチがオンにされて圧力が $P_3 > P_4$ となると、流体のプラグがフローストリームを、流体プラグに近接のセルが左の出力チャンネルへ方向付けられるように変位させる。マイクロ流体チャンネルネットワーク中のフロー条件の設定と制御は、直接駆動ポンピング、空気ポンピング、電気動力学、毛細管作用、重力または流体フローを生成する他の手段によって達成することができる。

#### 【0072】

スループット（分岐ジャンクションの上部においてソーティング領域に入るセルの時間

10

20

30

40

50

的な割合)に関するソーティング機構の性能、産出効率(ターゲット出力チャンネル12中のターゲットセルのフラクション)、および純度(ターゲット出力チャンネル12中のセルの総数に対するターゲットセルの数の比)は、さまざまな要因によって影響を受け、それらのおおのは光学スイッチの実施に影響する。光学スイッチは、マイクロ流体チャンネルネットワークのソーティングジャンクション領域内に投射される圧力差( $P_4$ 対 $P_3$ )、分岐ジャンクションに対するスイッチングチャンネルの位置、流体スイッチの作動の期間、流体変位を生成するために使用される最大圧力、その他などのいくつかのパラメータによって特徴づけることができる。流体スイッチに対するこれらのパラメータの特定の値の選択は、数ある中でも、マイクロ流体チャンネルシステムのトポロジーと幾何学、マイクロチャンネルシステム内のフローレート(セル速度)、メインチャンネル中を流れるセルの位置(メインチャンネルの中央を流れるか片側へのオフセットを流れるか)を制御する能力、信頼できるスイッチングを達成するために必要なセルの変位の量、チャンネルの深さ、チャンネルの形状、および光スイッチとのセルの相互作用によって生成される力の臨界関数である。

#### 【0073】

図25は、 $1 \times 2$ マイクロ流体チャンネルネットワークすなわち一つのメイン入力チャンネルと分岐ジャンクションから延びている二つの出力チャンネルとを備えたネットワーク中のセルをソートする役目をする1チャンネル流体スイッチの一実施形態を示す。分岐ジャンクションのための「Y」幾何学が図25に示されるが、「T」幾何学などの他の分岐も使用され得る。単一の側方フローチャンネルが、分析領域と分岐の間のメインチャンネルの一方の側に配置されてもよい。一般に、これらのマイクロ流体チャンネルは、チャンネル内へのセル検出光学の射影を可能にするために、光学的透明基板中に作製される。この基板は、これに限定されないが、一般にガラス、石英、プラスチックたとえばポリメチルメタクリレート(PMMA)ほか、および成型可能または加工可能なポリマー(たとえばポリジメチルシロキサン、PDMSまたはSU8)である。マイクロ流体チャンネルの深さは、これに限定されないが、一般に $10\mu\text{m}$ ないし $100\mu\text{m}$ 範囲内にある。マイクロ流体チャンネルの幅は、これに限定されないが、一般に深さの1ないし5倍である。断面は一般に長方形か、チャンネルの等方性エッチングが後続するガラス基板のフォトリソグラフィックマスキングによって作製されるマイクロ流体チャンネルの場合には四半円形角を備えた長方形である。

#### 【0074】

フロー条件は、ジャンクション領域内が自然になるように流体スイッチがこの場合空気圧力からオフにされたときに、すべてのセルが、側方チャンネルこの場合たとえば右の出力チャンネルと同じ側の出力チャンネルへ優先的に流れるように設定される。流体スイッチがオンにされて圧力が $P_3 > P_2$ となると、流体のプラグがフローストリームを、流体プラグに近接のセルが左の出力チャンネルへ方向付けられるように変位させる。マイクロ流体チャンネルネットワーク中のフロー条件の設定と制御は、直接駆動ポンピング、空気ポンピング、電気動力学、毛細管作用、重力または流体フローを生成する他の手段によって達成することができる。

#### 【0075】

1チャンネル流体スイッチの好適な実施形態が図26に示される。オフセットフローは、右チャンネルを左チャンネルよりも広くすることによって達成される。スイッチチャンネルはまた、そのパス長さに大部分に沿う最初のチャンネルよりも広く、流体挿入の点で先細になっている。これは、より小さい断面領域に集中することにより、ソーティングを達成するために必要な供給空気圧力のピーク振幅を低くする。これは、高速動作と改善されたスループットを与える。

#### 【0076】

スループット(分岐ジャンクションの上部においてソーティング領域に入るセルの時間的な割合)に関するソーティング機構の性能、産出効率(ターゲット出力チャンネル12中のターゲットセルのフラクション)、および純度(ターゲット出力チャンネル12中の

10

20

30

40

50

セルの総数に対するターゲットセルの数の比)は、さまざまな要因によって影響を受け、それらのおおのは光学スイッチの実施に影響する。流体スイッチは、マイクロ流体チャンネルネットワークのソーティングジャンクション領域内に投射される最大圧力、分岐ジャンクションに対するスイッチングチャンネルの位置、流体スイッチの動作の期間、その他などのいくつかのパラメーターによって特徴づけることができる。流体スイッチに対するこれらのパラメーターの特定の値の選択は、数ある中でも、マイクロ流体チャンネルシステムのトポロジーと幾何学、マイクロチャンネルシステム内のフローレート(セル速度)、メインチャンネル中を流れるセルの位置(メインチャンネルの中央を流れるか片側へのオフセットを流れるか)を制御する能力、信頼できるスイッチングを達成するために必要なセルの変位の量、チャンネルの深さ、およびチャンネルの形状の臨界関数である。哺乳類セルに対して、20~50mmのパス長さにわたって0.5ないし1.0psiの圧力低下を示す約50 $\mu$ m $\times$ 150 $\mu$ mの断面を備えたチャンネルは毎分1~3 $\mu$ Lのフロー速度を達成し、1~3psiのスイッチング圧力の使用は、毎秒何百ものイベントのスイッチングレートを達成するのに十分である。100nmないし100 $\mu$ mの粒子への一般的応用に対して、標本およびシースフローの一般的圧力低下は、10ないし100mmのパス長さにわたって0.1ないし10psiの範囲内にある。シース対ターゲット圧力について2:1の比が、標本ストリームの適当なピンチを確実にするために、現在のチップ設計で選択される。チャンネル断面は、チップを通して走るセルまたは粒子のタイプに依存して、5ないし150 $\mu$ m深さかける10ないし1,000 $\mu$ m幅の範囲内で作ることができる。

#### 【0077】

図27は、最大圧力、空気圧パルスの立ち上がり時間、減衰時間および合計時間に対する制御が流体スイッチを正確に動作させることを可能にする2バルブスイッチ構成を示す。三つのポートが、空気圧源、環境空気または真空中に連結され得る。迅速なスイッチングのために、P1は環境空気よりも大きい高圧に保持され、P2とP3は環境空気にある。自然位置では、両バルブは閉じられ、つまりオフになっている。スイッチングイベントが望まれると、第一のバルブが開き、空気圧をスイッチチャンネルへ供給する。短時間の遅れ(たとえば5~10ミリ秒未満)のち第二のバルブが開き、P1からの超過圧力をポートP3から急速に出す。第一のバルブが閉じられてスイッチチャンネルの残存圧力を環境レベルへ出し、それから第二のバルブが閉じてシステムをその自然位置に戻す。これは、空気パルスが、単一のバルブのオフ・オン・オフのサイクル時間(たとえば約5ないし10ミリ秒)よりも短くなるのを可能にする。ポートP2とP3の環境空気または真空と組み合わせることで所望の最大圧力より数倍大きい圧力P1を選択するので、流体スイッチの最大性能のための空気圧パルスが形作られ得る。

#### 【0078】

図28は、図24の2チャンネル流体スイッチのための二つのバルブ構成を示す。第一の構成では、単一のバルブが高圧源を変調し、第二のチャンネルが環境空気にある。この構成では、できるだけ短いパルスが、バルブのオフ・オン・オフのサイクル時間(たとえば5~10ミリ秒)によって決定される。第二の構成では、バルブが、流体スイッチの各側方チャンネルに置かれる。この場合、外部圧力源を変調するために両方のバルブが使用され得る。第一のバルブの後に第二のバルブが、バルブのオフ・オン・オフのサイクル時間よりも短い可変時間遅れを伴って開かれ得る。この方法では、空気圧パルスが短くされて流体スイッチの速度と性能を高め得る。

#### 【0079】

完成流体スイッチベースセルソーティング機器が構築された。この機器を使用して得られた測定の例を図30~31に示す。図31では、蛍光キャリブレーションビーズ(たとえばSpherotech SPHEROビーズまたはBD Quantibriteビーズ)が測定された、そして六つの強度の明瞭な分離を示す。平均強度、標準偏差およびCVの統計はメーカー推奨値と一致している。図31は、セル母集団をソートする例を示す。この例では、Cell Tracker(登録商標)グリーン(Invitrogen



社)で染色された1%のJurkatセルのターゲット母集団が、染色されていないJurkatセル母集団内に加えられた。標本に対して0.3psi、シースバッファに対して0.6psi、スイッチングバルブに対して1.5psiの圧力を使用してセルがソートされた。約3万5000のセルが分析され、336のターゲットセルが識別され、ターゲット貯槽内にソートされた。ターゲット貯槽の検査は、総数369のセルのうちの331のターゲットセルを見つけた。これは、99%の算出回収と90%の純度となる。

#### 【0080】

マイクロ流体チップを操作するために、すべてのマイクロ流体チャンネルの初期流体プライミングは、フローを妨害するバブルを捕らえたりダスト粒子を導入したりしない手法が必要とされる。これは、清潔な高い加圧空気源からの安定した空気圧力における空気の再生可能容量の供給を必要とする。一般に、マイクロ流体デバイスを準備するためにクリーンベンチまたは層流フードのようなダストフリーシステムが必要である。図32に示されたデバイスプライミングステーションは、単純かつ経済的な方法でそれらの要求を満たす。プライミングステーション上のクランプがカートリッジを物理的に保持し、高圧アクセスのための密閉を提供する。ダストのない流体充填貯槽に高圧空気を供給するために、小さいサブミクロン多孔フィルターがクランプに取り付けられる。空気の制御可能容量を提供するために、取り外し可能な注射器が使用され得るか、高圧源に連結された自動バルブが使用され得る。これは、所定容量のバブルフリー流体をマイクロ流体チャンネルの至る所に一様に分配する。

#### 【0081】

図33は、成長をモニターしクローン母集団を分離するためのセルのダイリジョンクローニングのための方法を示す。これに限定されないが、ガラス、石英、プラスチックたとえばポリメチルメタクリレート(PMMA)ほか、および成型可能または加工可能なポリマー(たとえばポリジメチルシロキサン、PDMSまたはSU8)を含むさまざまな物質を使用して数ナノリットルの容量のマイクロウェルがマイクロ製造され得る。マイクロ流体チャンネルの深さは、これに限定されないが、一般に10μmないし100μm範囲内にある。マイクロ流体チャンネルの幅は、これに限定されないが、一般に深さの1ないし5倍である。断面は一般に長方形か、チャンネルの等方性エッチングが後続するガラス基板のフォトリソグラフィックマスキングによって作製されるマイクロ流体チャンネルの場合には四半円形角を備えた長方形である。ナノウェルのアレイの一例が図33に示される。この場合、ウェルは、70μmの深さの100μm×100μmの正方形であり、PDMSソフトリソグラフィーを使用して製造される。ウェルはプラズマ中で殺菌され、24ウェル組織培養プレートに挿入される。媒体中に浮遊するセルが各ナノウェル内に入れられ、ナノウェル内で重力によって安定化され、成長動力学を観察するために、または単一の時点で好ましいクローンの群体を収穫するために、それらが周期的にモニターされる。これらのウェルはまた、固定素子として、または取り外し可能なインサートとして、ソーティングデバイスの出力貯槽内に包含されてもよい。

#### 【0082】

図35は、多相マイクロ流体液滴(たとえばマイクロ流体チャンネル内の液滴中に閉じ込められたセル/粒子)内のセル/粒子計数のための光学検出方法を示す。好適な信号処理を適用することによって、液滴内のセル/粒子の数は、セル/粒子からの信号ピークに基づいて検知することができる。一つの方法では、チャンネル全体が照明され、単一の検出器が、液滴中のセルの存在または不在を示す前方散乱などの信号を測定を測定する。より精巧な検出は、液滴内のセル/粒子を計数または局所化するためのより良い空間分解能を提供するためにチャンネルを横切ってフロー方向に直交して配置された前方散乱検出器のアレイを使用する。また別のアプローチでは、暗視野照明および結像を単一の検出器散乱測定に加えることができる。前方散乱信号が液滴の先端を検知すると、CCDカメラが同期して液滴の暗視野像を取ることができる。セル/粒子は画像中の輝点になり、計数のために処理および識別することができる。

#### 【0083】

多くのソーティングの状況では、セルまたは粒子のターゲット母集団は小さくてよいが、収集貯槽の表面積は大きい。粒子は貯槽壁に突き当たり、収集率を低減し得る。図36は、表面とのセルまたは粒子の相互作用を最小にするアプローチを示す。一つの方法では、ソートされたターゲットセルは、セルと収集貯槽壁との間の接触を最小にするために流体よりも少ない容積に配置された限られた領域内に収集される。表面張力のために、収集された液体は、限られた領域上にウェット液滴を形成する。別の方法では、炭化水素または過フッ化炭化水素で被覆することによって収集貯槽の表面を疎水性にすることができる。疎水性コーティングのために、セルまたは粒子と共に収集された液体は、出口穴の近くの液滴に閉じ込められる。別の方法では、ソートされたセルの収集のために、別々の適当な取り外し可能なコンテナを使用することができる。この別々のコンテナは、セルのさらなる処理のために使用することができ、ソートされたセルを収集貯槽から別の貯槽（たとえば多ウェル培養皿）へ移す際のセルの損失を最小にする。収集コンテナは、マイクロ流体デバイス中の出口穴にアクセスするために底部に穴を有する。穴の直径は、表面張力がそれを介して漏れることを防止するように、1ミリメートル未満作られるとよい。柔軟な物質（たとえばシリコーンベースゴム、PDMS）で作られたガスケットが、密閉と接合のために収集コンテナとマイクロ流体デバイスの間に挿入される。

#### 【0084】

血球計算分析後に標本を回収することがしばしば望まれる。図38は、分析のためにセルフローをはさむが、より少ないダイリユーションでセルを回復するマイクロ流体デバイスを示す。図2と図38に示されるように、標本フローはシースバッファを使用して集中される。標本が分析領域を通過した後、マイクロ流体チャンネルは三つのチャンネルに分かれる。中央チャンネルは標本回収チャンネルであり、左右へのチャンネルは超過シースバッファを収集して標本ダイリユーションを低減する。チャンネル幅と供給圧力の適当な選択によって、標本ダイリユーションの程度が、1:1ダイリユーションからシースフローのダイリユーション（一般に1:20）に調節され得る。いくつかの条件すなわち非常に希釈な標本では、収集された標本は代わりに濃縮され得る。

#### 【0085】

図37は、複数の標本分析またはソーティングのためのマイクロ流体デバイス設計を示す。この設計は、蛍光背景に変化を引き起こし得る異なる標本を装填した後にカートリッジ交換または再調整を必要としない。この発明は、二つの標本を相互汚染から分離するために標本のために二つとバッファのために一つの三つの標本貯槽を有している。圧力を調節することによって、フロー血球計算分析のために各標本を注入しはさむことができる。たとえば、二つの標本AとBについて、Aの分析のために、標本Aの貯槽は最高圧力が供給され、標本Bの貯槽は最低圧力に維持されるなか、バッファの貯槽は中間圧力にある。どのチャンネルが最高圧力を有するを変えることによって、所望のチャンネルが分析領域（最高圧力）へ流れ、または流れること（最低圧力）を禁じられる。分析領域の信号の明瞭な分離を可能にするために、純粋なバッファが各標本間で導入されるとよい。装填して連続して運転することができる標本の数、マイクロ流体チップに追加された各独立分離バッファチャンネルについて二倍に増やすことができる。

#### 【0086】

図38はまた、調整可能なダイリユーションで二つの標本を多重化することができるマイクロ流体デバイスの例を示す。このデバイスは、二つの標本チャンネルAおよびBと、分離バッファとを利用する。標本Aを分析するために、次の圧力設定が使用される。 $P_{sw\_A} < P_{sw\_B} < P_B < P_{sb} < P_A < P_{sth}$ 。標本Bを分析するために、次の圧力設定が使用される。 $P_{sw\_B} < P_{sw\_A} < P_A < P_{sb} < P_B < P_{sth}$ 。標本間の相互汚染を防止するために、標本AおよびBの測定の間に分離バッファが流されるとよい。圧力ポートを追加することで、この設計は三つ以上の標本を測定可能である。図38は、二つの標本間で切り替えるこのデバイスの例を示す。

#### 【0087】

前述の発明は、明晰と理解の目的のために例証と実例によってかなり詳細に説明したが

、発明の趣旨と要旨から逸脱することなく変更と修正をなし得ることはこの発明の教示から通常の当業者には容易に明白であろう。

以下に、本願出願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[ 1 ] セルソーターであって、

流体媒体中の一つ以上のセルを受け取るのに適したセル入口と、

前記ソーターへのバッファ溶液を提供するために前記セル入口に流体的に連結された第一および第二のバッファ入口と、

前記セル入口と前記第一および第二のバッファ入口とに流体的に連結された流体チャンネルと、

前記流体チャンネルに流体的に連結された第一の側方フローチャンネルと、

前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の出力であり、前記側方フローチャンネルを下流に配置されている出力と、

所定状態のセルを検知し、それに応じて信号を生成するのに適した検出器であり、前記第一の側方フローチャンネルの上流に位置でセルを検知するように配置されている検出器と、

前記検出器に連結された、前記信号に応じて流体を前記側方フローチャンネル内に移動させるように動作可能な側方力スイッチとを備え、

それにより、所定状態のセルが検知されたときに、前記側方力スイッチが動作されて前記セルを移動させるように前記セルへの側方力を提供し、前記セルが第一または第二の出力内へ選択的に出るセルソーター。

[ 2 ] 前記流体チャンネルに流体的に連結された第二の側方フローチャンネルをさらに有している [ 1 ] のセルソーター。

[ 3 ] 前記第二の側方フローチャンネルは、前記第一の側方フローチャンネルから前記流体チャンネルの反対側に配置されている [ 2 ] のセルソーター。

[ 4 ] 前記第一および第二の側方フローチャンネルは、互いに向かい合って位置決めされている [ 3 ] のセルソーター。

[ 5 ] 前記第二の側方フローチャンネル中の流体動作を制御するように動作可能な第二の側方力スイッチをさらに有している [ 3 ] のセルソーター。

[ 6 ] 前記流体チャンネルを通る流体フローは層流である [ 5 ] のセルソーター。

[ 7 ] 前記第一および第二のバッファ入口は同じ大きさである [ 5 ] のセルソーター

。  
[ 8 ] 前記第一および第二のバッファ入口は異なる大きさである [ 5 ] のセルソーター。

[ 9 ] 前記第一および第二の出力は同じ大きさである [ 5 ] のセルソーター。

[ 10 ] 前記第一および第二の出力は異なる大きさである [ 5 ] のセルソーター。

[ 11 ] 前記第一の出力は前記第二の出力よりも大きい容量の流体フローを有している [ 10 ] のセルソーター。

[ 12 ] 前記第一の出力は前記廃棄物出力である [ 11 ] のセルソーター。

[ 13 ] 前記ソーターは、前記検出器と前記側方力スイッチを連結している制御システムを有している [ 1 ] のセルソーター。

[ 14 ] 前記セルは生物セルである [ 1 ] のセルソーター。

[ 15 ] 前記セルは生物粒子である [ 1 ] のセルソーター。

[ 16 ] 前記セルは自然有機粒子である [ 1 ] のセルソーター。

[ 17 ] 前記セルは自然無機粒子である [ 1 ] のセルソーター。

[ 18 ] 前記セルは人工有機粒子である [ 1 ] のセルソーター。

[ 19 ] 前記セルは人工無機粒子である [ 1 ] のセルソーター。

[ 20 ] 前記セルは、実質的に 100 nm から実質的に 100 ミクロンまでの直径を有している [ 1 ] のセルソーター。

[ 21 ] 流体ソータースイッチングシステムであり、

流体媒体を受け取るのに適した入口と、

10

20

30

40

50

前記入口に流体的に連結された流体チャンネルと、  
前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の側方フローチャンネルと、  
前記第一および第二の側方フローチャンネルに連結された第一および第二の空気圧バルブと、

前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の出力であり、前記側方フローチャンネルの下流に配置されている出力と、

制御システムであり、前記第一および第二のバルブに連結され、前記第一および第二の空気圧バルブを動作させる時間制御信号を提供する制御システムとを備えており、前記第二のバルブ前が開かれる前に前記第一のバルブが開かれることを特徴とする流体ソータースイッチングシステム。

10

[ 2 2 ] 前記第二のバルブが開かれたのち前記第二のバルブが閉じる前に前記第一のバルブが閉じられることを特徴とする [ 2 1 ] の流体ソーター。

[ 2 3 ] 流体ソータースイッチングシステムであり、  
流体媒体を受け取るのに適した入口と、  
前記入口に流体的に連結された流体チャンネルと、  
前記流体チャンネルに流体的に連結された第一の側方フローチャンネルと、  
前記第一の側方フローチャンネルに連結された第一の空気圧バルブと、  
前記流体チャンネルに流体的に連結された第一および第二の出力であり、前記側方フローチャンネルの下流に配置されている第一および第二の出力と、

制御システムであり、前記第一のバルブに連結されており、前記第一の空気圧バルブを動作させる時間制御信号を提供する制御システムとを備えている流体ソータースイッチングシステム。

20

[ 2 4 ] 前記第二のバルブが開かれたのち前記第二のバルブが閉じる前に前記第一のバルブが閉じられることを特徴とする [ 2 5 ] の流体ソーター。

[ 2 5 ] マイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造であり、  
カートリッジを備え、前記カートリッジは、

光学窓と、  
複数の貯槽とを備え、前記貯槽は少なくとも、  
標本貯槽と、  
流体貯槽と、  
廃棄物貯槽と、  
ターゲット収集貯槽とを含み、  
チップを備え、前記チップは少なくとも、  
標本入口チャンネルであり、前記標本貯槽に流体的に連結されている前記セル入口チャンネルと、

30

一つ以上の流体入口チャンネルであり、前記流体貯槽に流体的に連結されている前記流体入口チャンネルと、

検出領域と、  
枝分かれさせられたソーティング領域と、  
廃棄物チャンネルとターゲットチャンネルを少なくとも有し、廃棄物チャンネルは前記廃棄物貯槽に流体的に連結されており、前記ターゲットチャンネルは前記ターゲット収集貯槽に連結されている少なくとも二つの出口チャンネルと、

40

前記光学窓に隣接して配置されているチップとを有し、  
蓋を備え、前記蓋は少なくとも、  
空気圧ポートであり、入口を有し、前記標本貯槽と前記流体貯槽の少なくとも一つに連結されている前記ポートと、

前記空気圧ポートの前記入口と、前記標本貯槽と前記流体貯槽の少なくとも一つとの間に配置されたフィルターと、

マニホールドであり、配管を介在することなく源から前記空気圧ポートまで空気圧力を連結している前記マニホールドとを有しているマイクロ流体分析およびソーティング

50

のための集積構造。

[ 2 6 ] 前記標本貯槽は円錐形をしている [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 2 7 ] 前記標本貯槽は先細になっている [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 2 8 ] 前記標本貯槽はさらにインサートを有している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 2 9 ] 前記インサートはポリプロピレンインサートである [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 0 ] 前記蓋はプラスチックである [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 1 ] 前記蓋はアクリル酸プラスチックである [ 3 0 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 2 ] 前記蓋は、前記標本貯槽と前記流体貯槽のための別々の空気圧力ポートを有している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 3 ] 前記蓋は、前記廃棄物貯槽のための空気圧力ポートを有している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 4 ] 前記蓋は、前記ターゲット収集貯槽のための空気圧力ポートをさらに有している [ 3 3 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 5 ] 前記蓋は、前記廃棄物貯槽のための空気圧力ポートを有している [ 3 2 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 6 ] 前記蓋は、前記貯槽への光学的アクセスを提供する [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 7 ] 前記蓋は、前記カートリッジに連結するスナップ方式のアタッチメントを有している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 8 ] 前記フィルターは気体性である [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 3 9 ] 前記フィルターは流体不透過性である [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 0 ] 前記フィルターはポリプロピレンフィルターである [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 1 ] 硬化性接着剤が前記チップと前記カートリッジの間で配置される [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 2 ] 前記接着剤はUV硬化性である [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 3 ] 前記チップと前記カートリッジの間にボンディングシートをさらに有している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 4 ] 前記ボンディングシートは感圧接着剤である [ 4 3 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 5 ] 前記チップへの光学的アクセスが前記光学窓を介しておよび前記チップの裏側を介して提供される [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 6 ] 前記標本貯槽は10ないし30マイクロリットルを収容するのに適している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 7 ] 前記流体貯槽は500～1,500マイクロリットルを収容するのに適している [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 8 ] 前記蓋とカートリッジの間にガスを収容する [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 4 9 ] 前記廃棄物貯槽は非ターゲット物質を収容する [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

[ 5 0 ] 前記廃棄物貯槽は超過流体を収容する [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソー

10

20

30

40

50

ティングのための集積構造。

[ 5 1 ] 前記チップとカートリッジは二つの別々の構造を備えている [ 2 5 ] のマイクロ流体分析およびソーティングのための集積構造。

【図 1】

図1

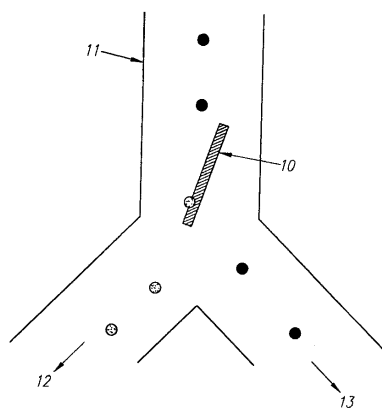


FIG. 1

【図 2】

図2

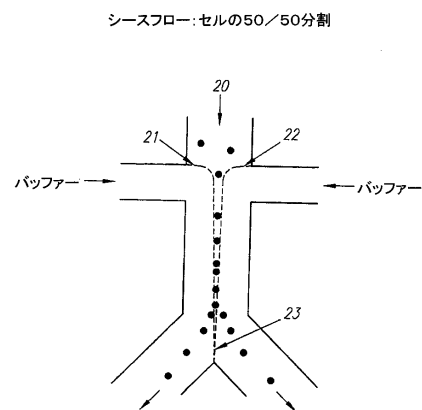


FIG. 2

## 【図 3 a】

図3a

異なるシースフローレートを介するスキュー粒子フロー  
蛍光負／光学スイッチ非作動

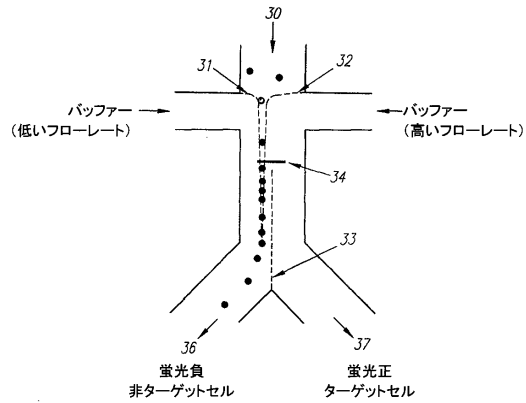


FIG. 3a

## 【図 3 b】

図3b

異なるシースフローレートを介するスキュー粒子フロー  
蛍光正／光学スイッチ作動

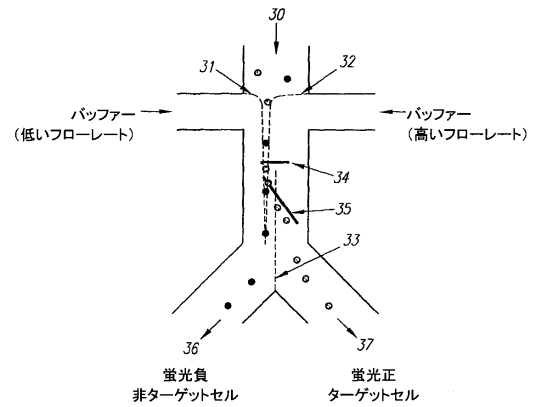


FIG. 3b

## 【図 4 a】

図4a

異なるチャンネル幅を介するスキュー粒子フロー  
蛍光負／光学スイッチ非作動

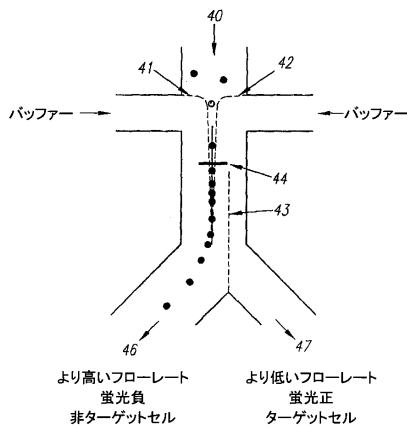


FIG. 4a

## 【図 4 b】

図4b

異なるチャンネル幅を介するスキュー粒子フロー  
蛍光正／光学スイッチ作動

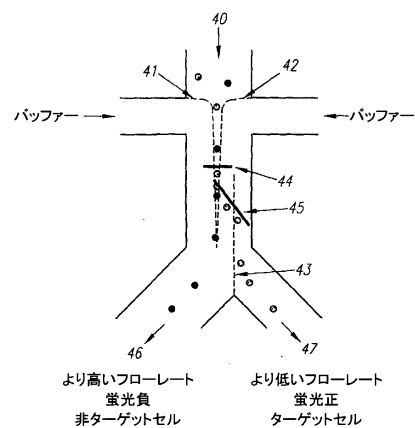


FIG. 4b

【図 5】

図5

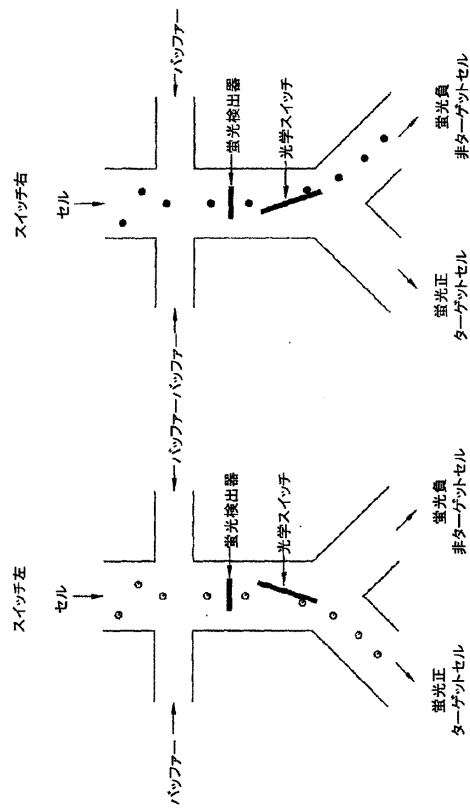


FIG. 5

【図 6】

図6

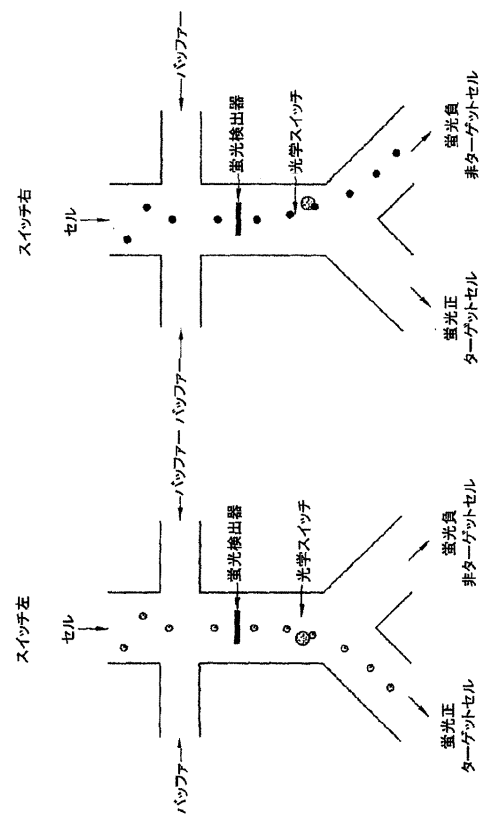


FIG. 6

【図 7 a】

図7a

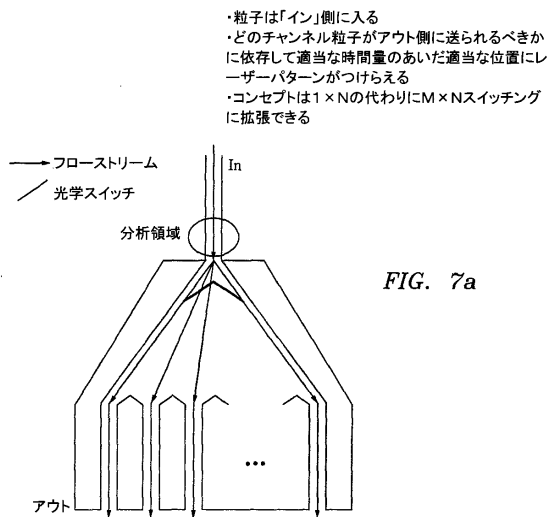


FIG. 7a

【図 7 b】

図7b

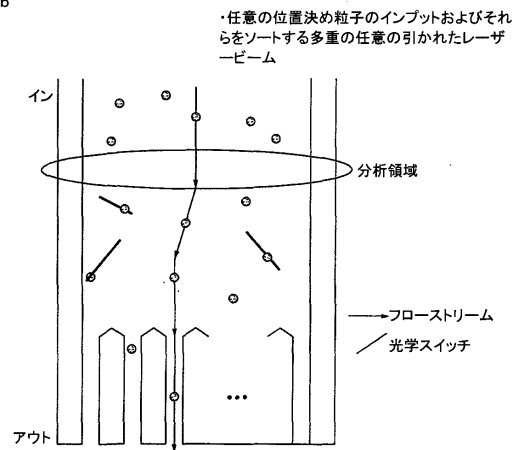


FIG. 7b



## 【図 7 c】

図7c

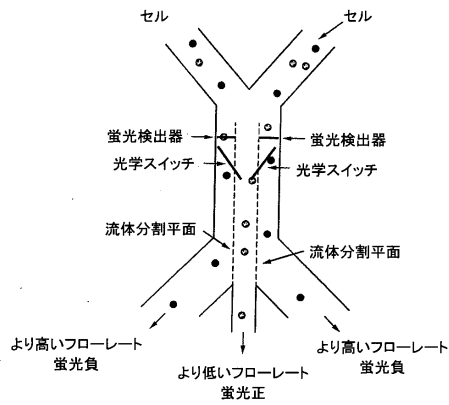


FIG. 7c

## 【図 8】

図8

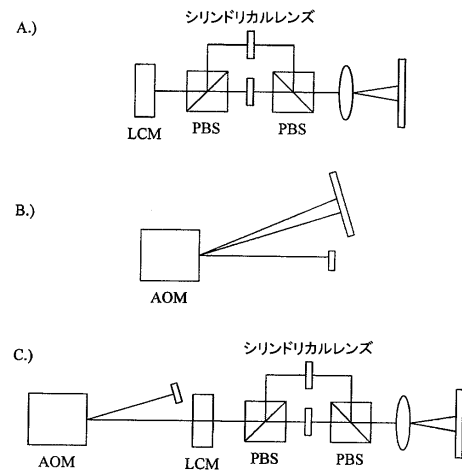


FIG. 8

## 【図 9 a】

図9a

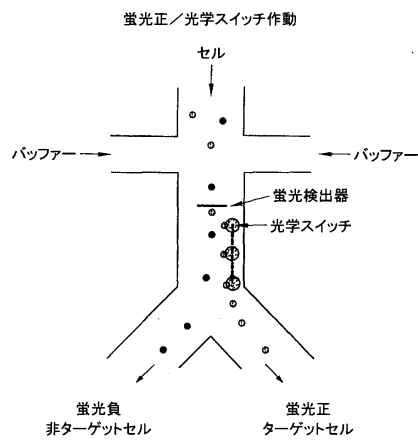


FIG. 9a

## 【図 9 b】

図9b

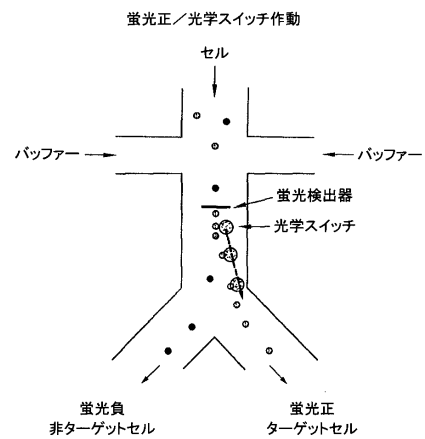


FIG. 9b

## 【図 10 a】

図 10a

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出しスイッチレーザーを作動するために使用される別々の検出器

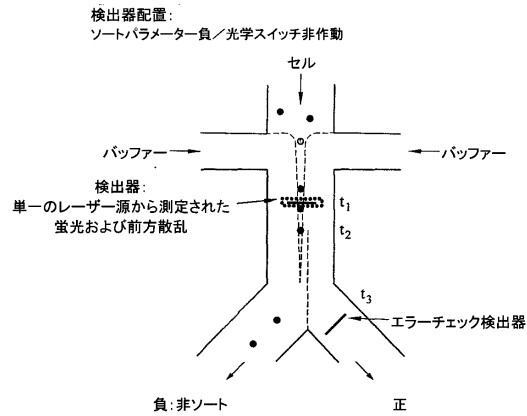


FIG. 10a

## 【図 10 b】

図 10b

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出しスイッチレーザーを作動するために使用される別々の検出器

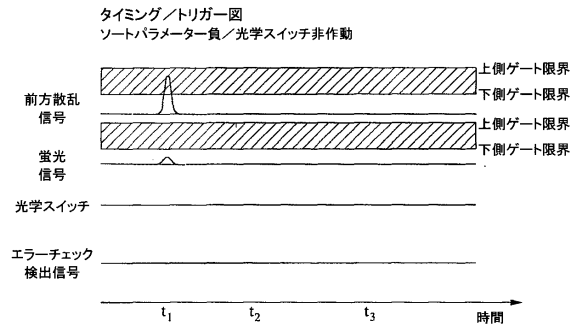


FIG. 10b

## 【図 10 c】

図 10c

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出しスイッチレーザーを作動するために使用される別々の検出器

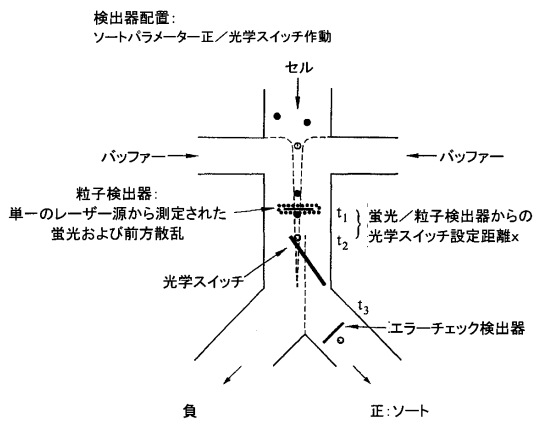


FIG. 10c

## 【図 10 d】

図 10d

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出しスイッチレーザーを作動するために使用される別々の検出器

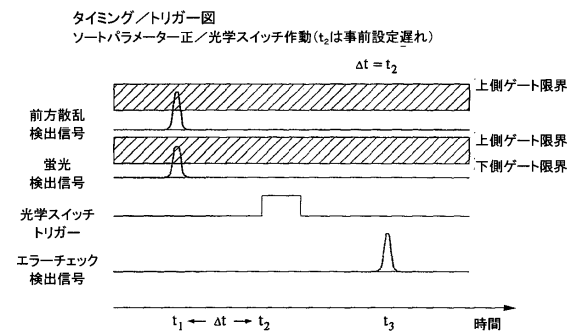


FIG. 10d

## 【図 11 a】

図 11a

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出し粒子フローレートを決定し  
スイッチレーザーを動作するために使用される検出器

検出器配置:  
ソートパラメーター負/光学スイッチ非作動

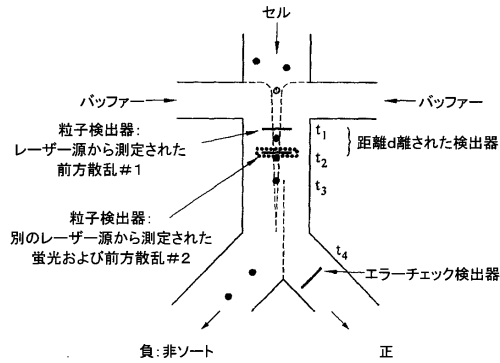


FIG. 11a

## 【図 11 b】

図 11b

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出し粒子フローレートを決定し  
スイッチレーザーを動作するために使用される検出器

タイミング/トリガー図  
ソートパラメーター負/光学スイッチ非作動

$$\Delta t = t_2 - t_1$$

$$v = d/\Delta t$$

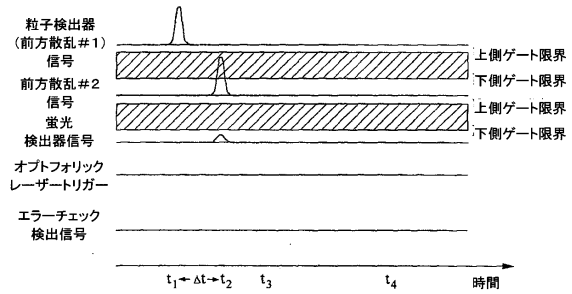


FIG. 11b

## 【図 11 c】

図 11c

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出し粒子フローレートを決定し  
スイッチレーザーを動作するために使用される検出器

検出器配置:  
ソートパラメーター正/光学スイッチ作動

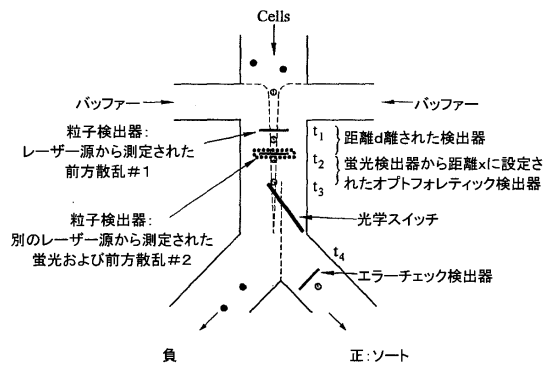


FIG. 11c

## 【図 11 d】

図 11d

光学スイッチレーザーをタイミングおよびトリガリングのための方法  
単一のレーザーおよび粒子を検出し粒子フローレートを決定し  
スイッチレーザーを動作するために使用される検出器

タイミング/トリガー図  
ソートパラメーター正/光学スイッチ作動

$$\Delta t = t_2 - t_1$$

$$v = d/\Delta t$$

$$t_3 = x/v$$

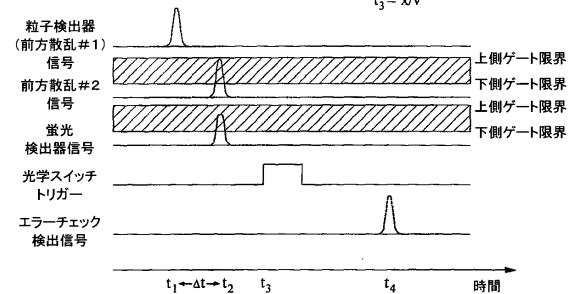


FIG. 11d

【図 12】

図12

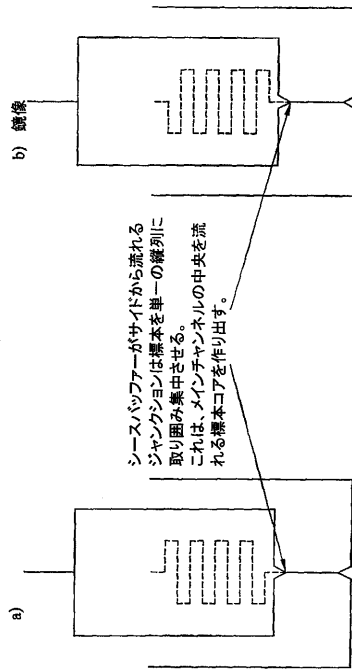
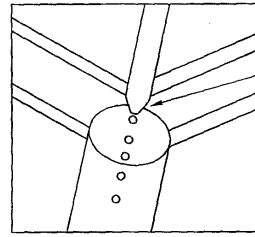


FIG. 12

【図 13】

図13



シースバッファがサイドから流れる  
ジャンクションは標本を単一の縦列に  
取り囲み集中させる。  
これは、メインチャンネルの中央を流  
れる標本コアを作り出す。

FIG. 13

【図 14】

図14

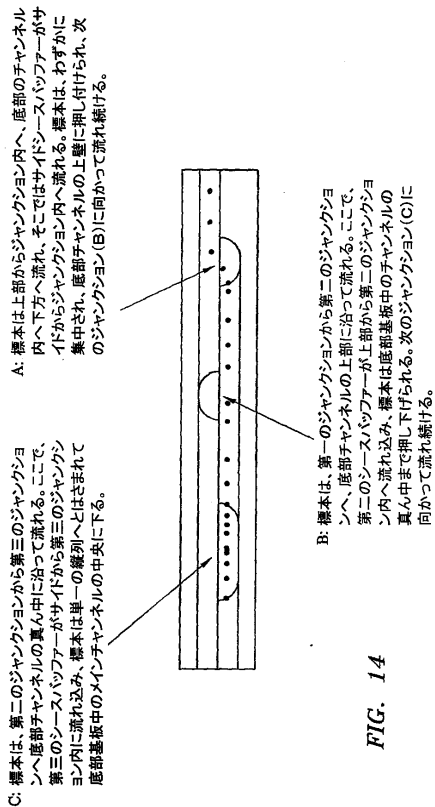


FIG. 14

【図 15】

図15

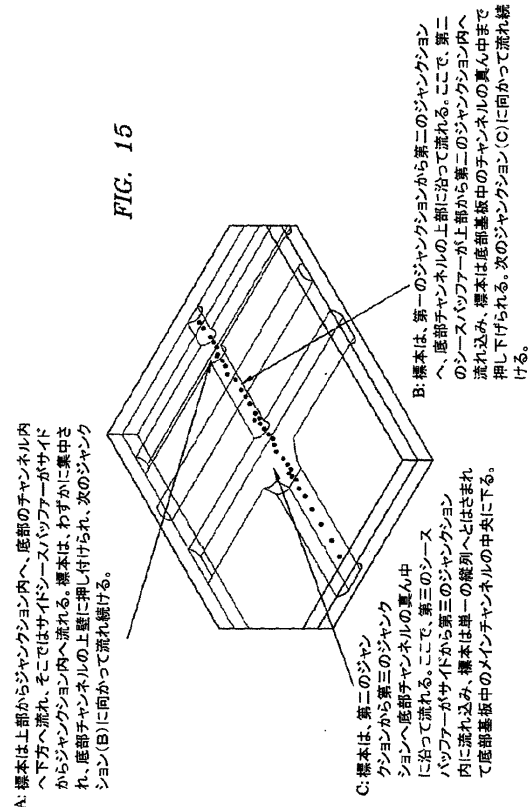
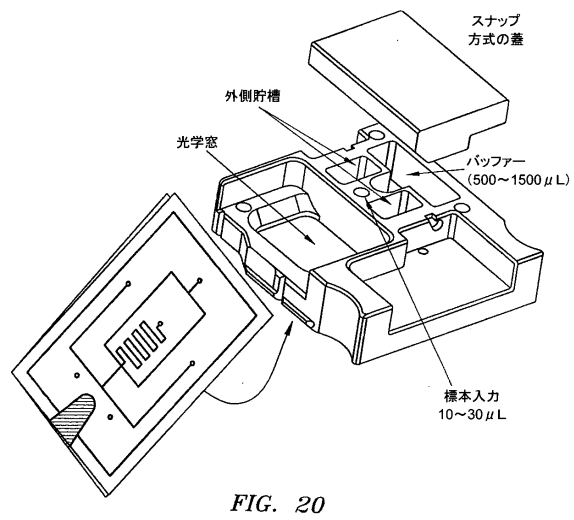


FIG. 15



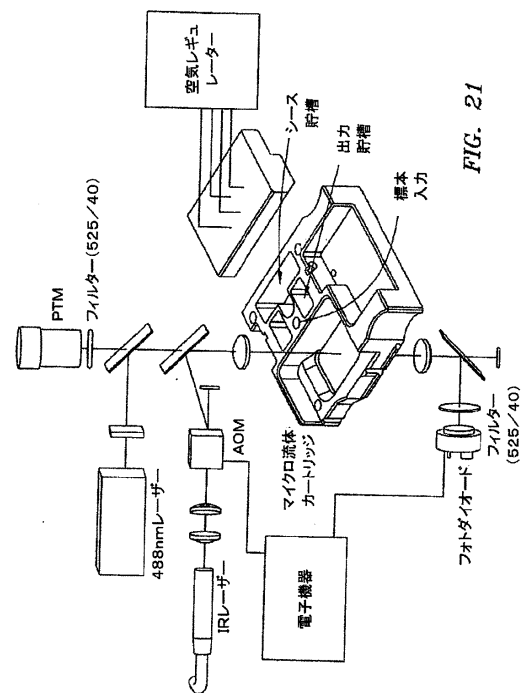
【図 20】

図20



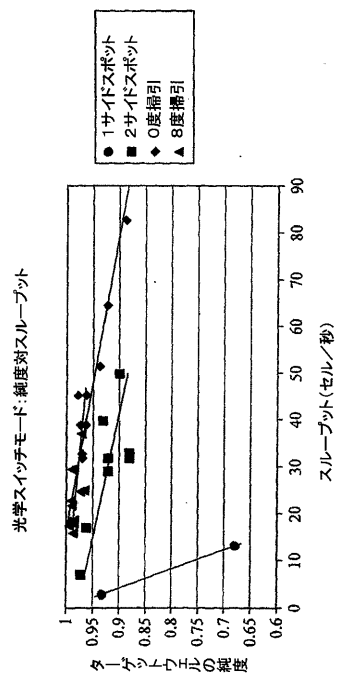
【図 21】

図21



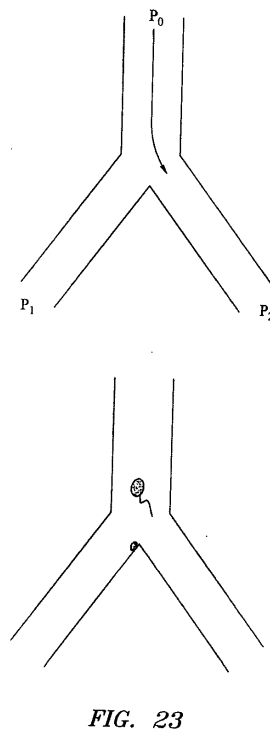
【図 22】

図22



【図 23】

図23



## 【図 24 a】

図24a

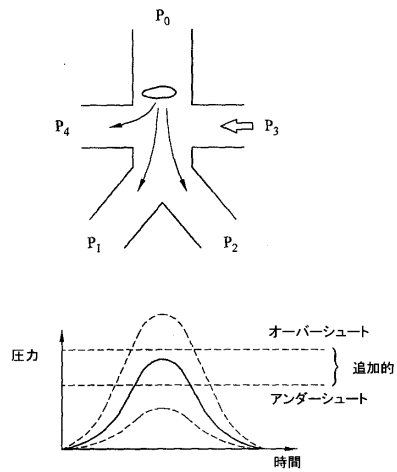
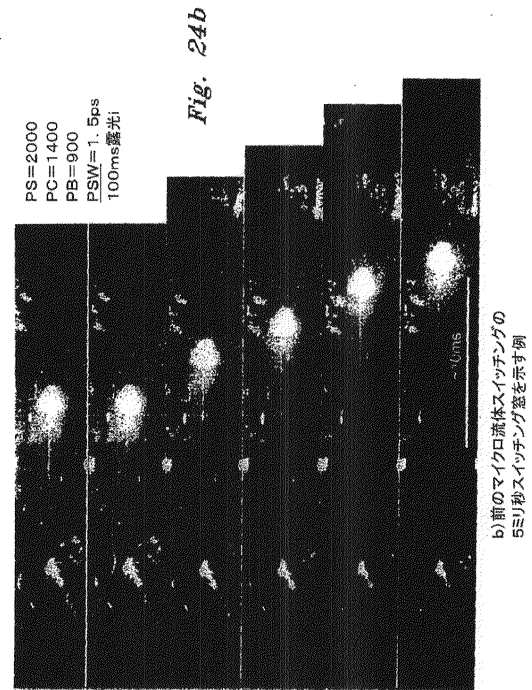


FIG. 24a

## 【図 24 b】

図24b



## 【図 25 a】

図25a

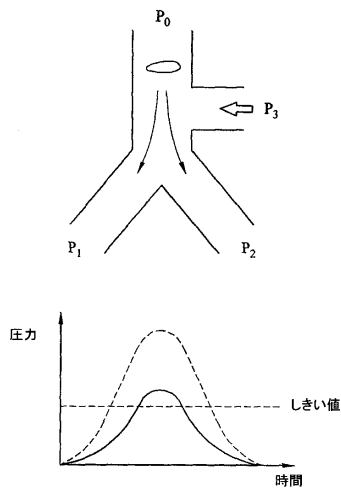
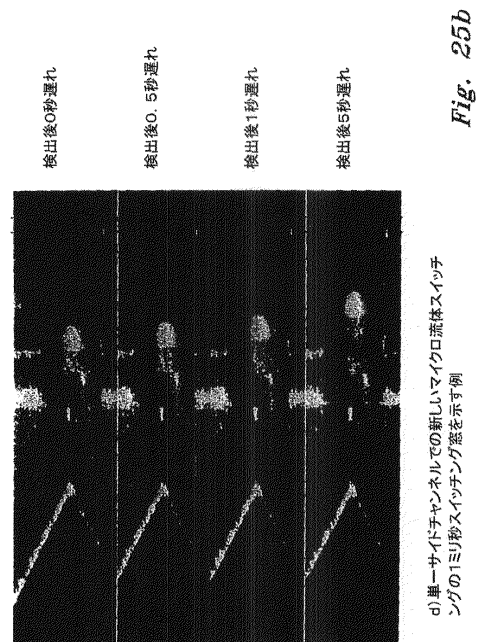


FIG. 25a

## 【図 25 b】

図25b



## 【図 26】

図26

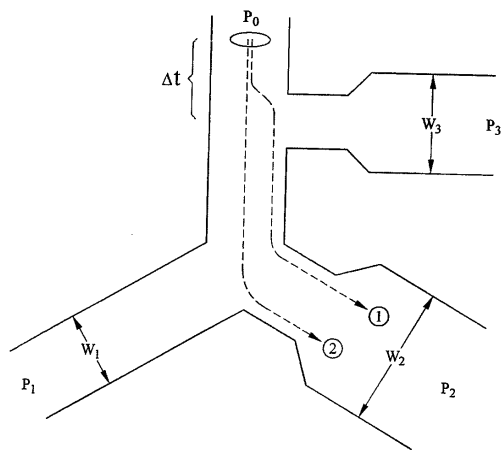


FIG. 26

## 【図 27】

図27

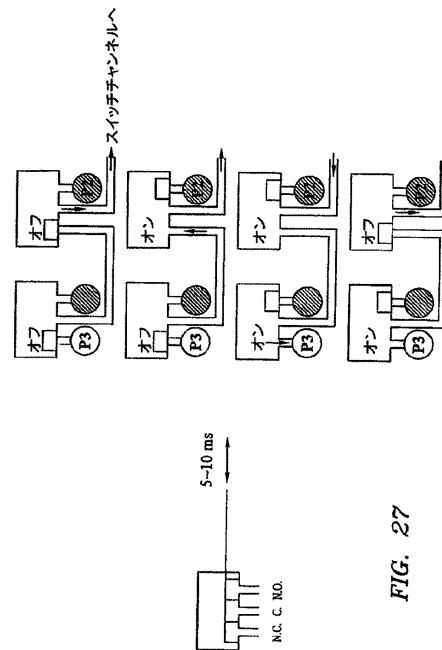
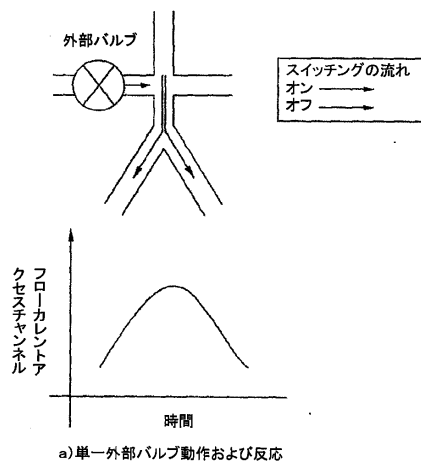


FIG. 27

## 【図 28 a】

図28a

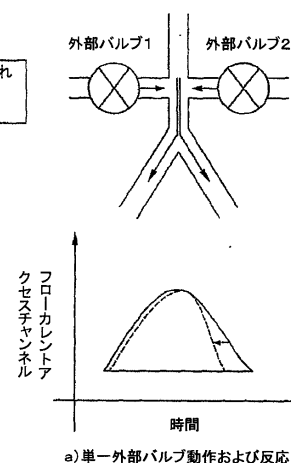


a) 単一外部バルブ動作および反応

FIG. 28a

## 【図 28 b】

図28b



a) 単一外部バルブ動作および反応

FIG. 28b



## 【図 29】

図29

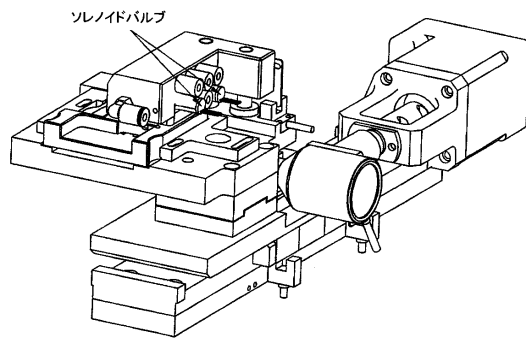
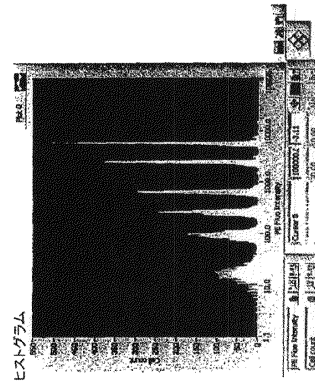
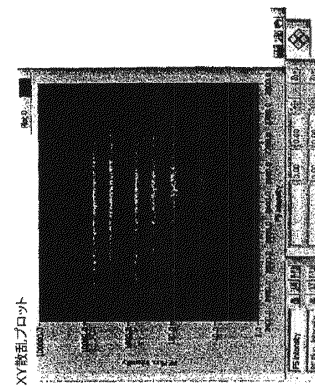


FIG. 29

## 【図 30】

図30



| R | X1   | X2   | 計数   | 総%    | 平均      | SD     | CV  |
|---|------|------|------|-------|---------|--------|-----|
| 1 | 1    | 50   | 1552 | 15.8% | 19.17   | 7.84   | 40% |
| 2 | 61   | 141  | 1761 | 17.5% | 93.64   | 13.99  | 15% |
| 3 | 193  | 325  | 1690 | 16.8% | 256.64  | 23.09  | 9%  |
| 4 | 501  | 793  | 1686 | 16.7% | 636.12  | 44.13  | 7%  |
| 5 | 1883 | 2900 | 1628 | 16.2% | 2388.84 | 131.18 | 5%  |
| 6 | 4460 | 6800 | 1718 | 17.1% | 5752.63 | 292.59 | 5%  |

Fig. 30

## 【図 31 a】

図31a

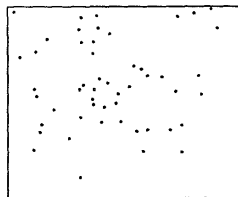


FIG. 31a

## 【図 31 b】

図31b

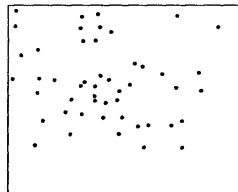


FIG. 31b

## 【図 32】

図32

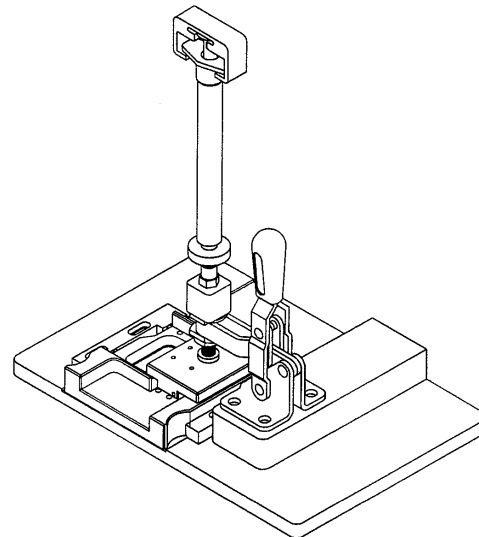


FIG. 32

【図 33】

図33

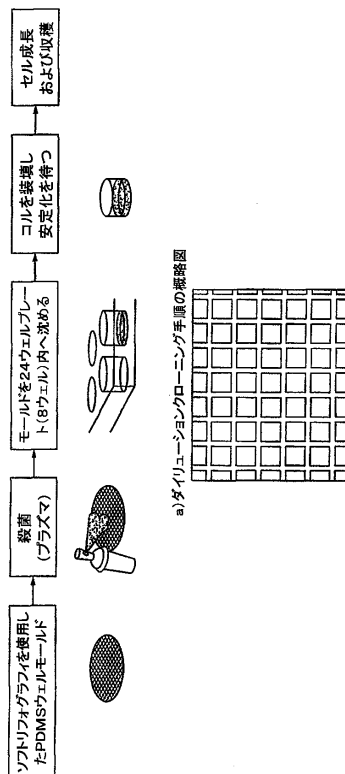


FIG. 33

【図 34】

図34

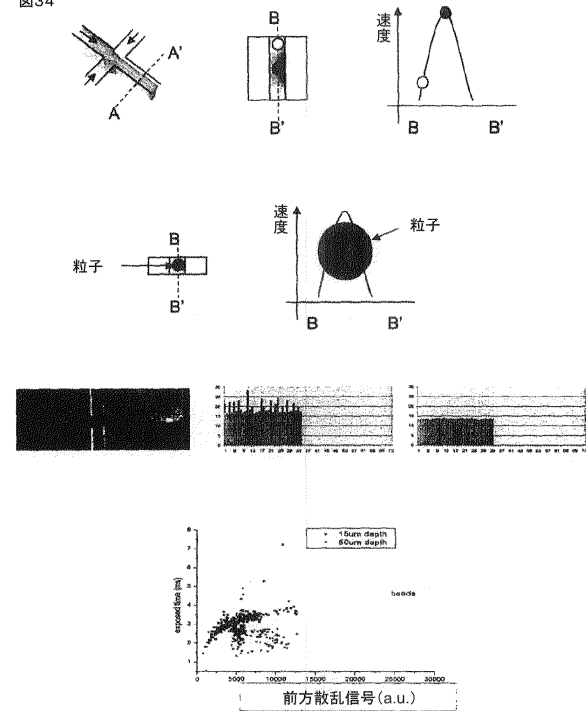


Fig. 34

【図 35】

図35

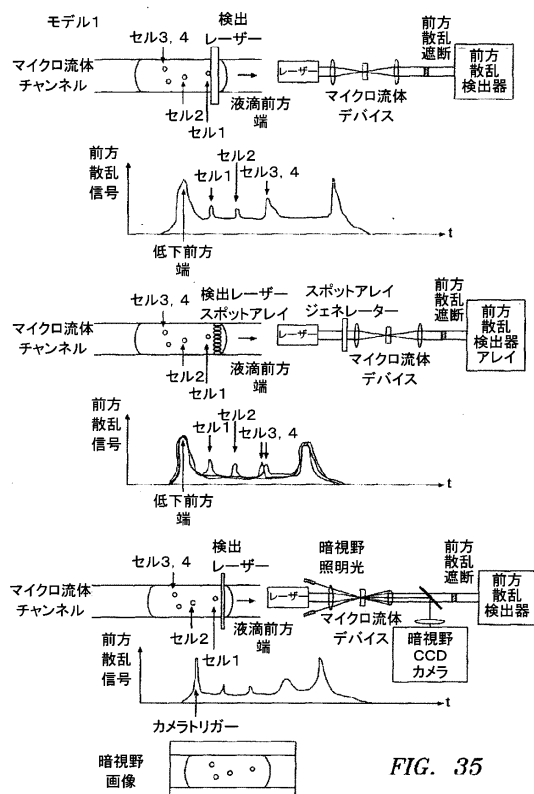


FIG. 35

【図 36】

図36

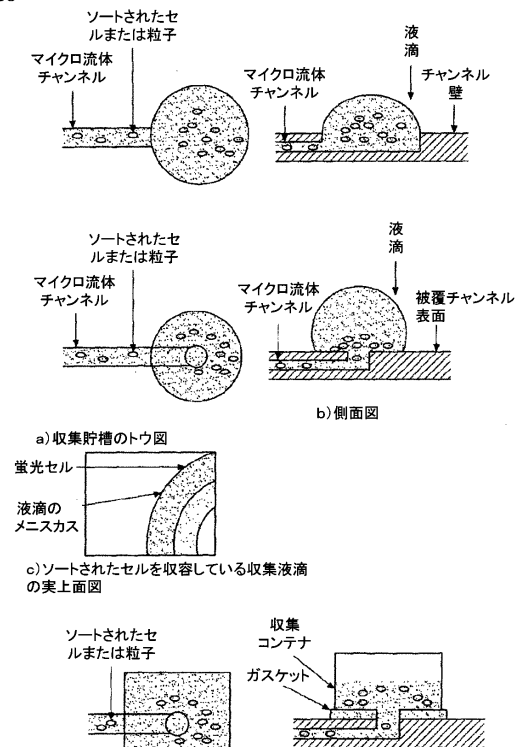


FIG. 36

## 【図 37】

図37

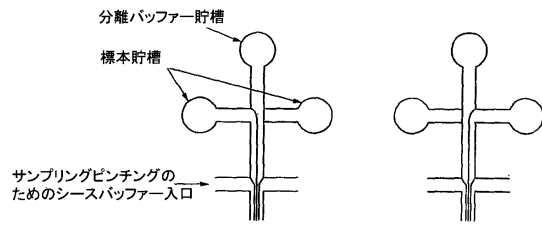


FIG. 37

## 【図 38】

図38

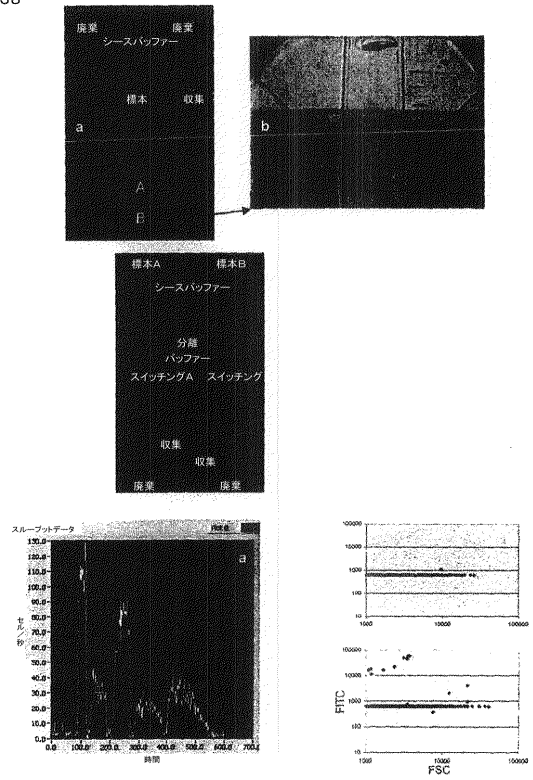


Fig. 38

## フロントページの続き

- (74)代理人 100075672  
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034  
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克
- (72)発明者 ブトラー、ウィリアム・エフ .  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 3 7、ラ・ジョラ、シュガーマン・ドライブ 8 5 1  
9
- (72)発明者 ジャン、ハイチュアン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 6、サン・ディエゴ、ウェストビュー・パークウェイ 1 1 8 8 1
- (72)発明者 マーチャンド、フィリップ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 6 4、ボウエイ、イーストフィールド・ロード 1 1  
7 1 3
- (72)発明者 アーン、クンホ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 3 7、ラ・ジョラ、リージェンツ・ロード 9 2 2 9  
、ナンバーエル 1 0 8
- (72)発明者 ジャン、イ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 2、サン・ディエゴ、コスタ・ベルド・ブルバード 8 7 3 0
- (72)発明者 フランシス、ジョン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 8、サン・ディエゴ、カーメル・リッジ・ロード  
1 4 7 3 2
- (72)発明者 ライ、ベンジャミン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 4、サン・ディエゴ、カミノ・ブラヤ・マラガ 5  
3 9 6
- (72)発明者 トゥ、ユージーン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 0 3、サン・ディエゴ、ラーク・ストリート 3 5 2  
7

審査官 渡邊 吉喜

- (56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 2 4 8 3 1 ( J P , A )  
特表 2 0 0 7 - 5 0 4 4 4 6 ( J P , A )  
特表 2 0 0 4 - 5 3 0 8 7 7 ( J P , A )  
米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 6 9 6 4 2 ( U S , A 1 )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
G 0 1 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 1 4