

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-162664

(P2009-162664A)

(43) 公開日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 35/08 A	2 G 0 5 8
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14 A	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 1	

審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2008-1626 (P2008-1626)
(22) 出願日 平成20年1月8日(2008.1.8)

(71) 出願人 000002185
ソニー株式会社
東京都港区港南1丁目7番1号
(74) 代理人 100112874
弁理士 渡邊 薫
(72) 発明者 篠田 昌孝
東京都港区港南1丁目7番1号
ソニー株式会社内
Fターム(参考) 2G058 EA03 GA01

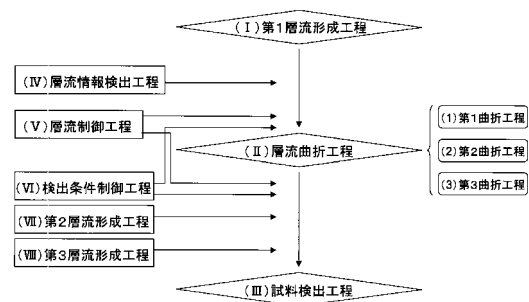
(54) 【発明の名称】 流路を用いた検出方法及び相互作用検出方法、並びに検出装置

(57) 【要約】

【課題】試料の検出と同時に、試料を含有する層流の状況を検出することが可能な検出方法を提供すること。

【解決手段】流路内を通流する試料の検出方法であって、前記試料を含有するサンプル流をシース流で挟み込むことにより、検出方向に面する前記流路の壁面に対して垂直に積層された状態の層流を形成する第1層流形成工程と、該第1層流形成工程を経た後に、前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させる層流曲折工程と、該層流曲折工程を経た後に、前記試料の検出を行う試料検出工程と、を少なくとも行う検出方法を提供する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

流路内を通流する試料の検出方法であって、

前記試料を含有するサンプル流をシース流で挟み込むことにより、検出方向に面する前記流路の壁面に対して垂直に積層された状態の層流を形成する第 1 層流形成工程と、

該第 1 層流形成工程を経た後に、前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させる層流曲折工程と、

該層流曲折工程を経た後に、前記試料の検出を行う試料検出工程と、
を少なくとも行う検出方法。

【請求項 2】

10

前記第 1 層流形成工程を経た後に、該第 1 層流形成工程において形成された前記層流の層流幅及び / 又は位置を検出する層流情報検出工程を行うことを特徴とする請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

前記試料検出工程では、前記層流情報検出工程において検出された層流情報に基づいて、前記試料の検出を行うことを特徴とする請求項 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

前記層流曲折工程では、下記 (1) 工程と、(2) 工程とを少なくとも行うことを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の検出方法。

(1) 前記層流の通流方向を X 方向とすると、前記層流を Y 軸方向に略 90 度曲折させる第 1 曲折工程。

20

(2) 前記層流を Z 軸方向に略 90 度曲折させる第 2 曲折工程。

【請求項 5】

前記試料検出工程を行う前に、前記層流の層流幅及び / 又は位置を制御する層流制御工程を行うことを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 6】

前記試料検出工程を行う前に、前記試料検出工程における検出条件を制御する検出条件制御工程を行うことを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 7】

前記層流曲折工程を経た後に、前記層流を、前記積層状態の両側方向からシース流で更に挟み込む第 2 層流形成工程を行うことを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の検出方法。

30

【請求項 8】

第 2 層流形成工程を経た 2 以上の層流を合流させることにより、複数の層流を形成する第 3 層流形成工程を行うことを特徴とする請求項 7 記載の検出方法。

【請求項 9】

前記層流情報検出工程では、光学的な検出を行うことを特徴とする請求項 2 から 8 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 10】

前記試料検出工程では、光学的な検出を行うことを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の検出方法。

40

【請求項 11】

流路内を通流する物質 A と物質 B 間の相互作用を検出する方法であって、

物質 A を含有するサンプル流を、少なくとも一部に物質 B を含有するシース流で挟み込むことにより、検出方向に面する前記流路の壁面に対して垂直に積層された状態の層流を形成する第 1 層流形成工程と、

該第 1 層流形成工程を経た後に、前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させる層流曲折工程と、

該層流曲折工程を経た後に、前記物質 A と物質 B 間の相互作用の検出を行う相互作用検出工程と、

50

を少なくとも行う相互作用検出方法。

【請求項 1 2】

前記第 1 層流形成工程を経た後に、該第 1 層流形成工程において形成された前記層流の層流幅及び / 又は位置を検出する層流情報検出工程を行うことを特徴とする請求項 1 1 記載の相互作用検出方法。

【請求項 1 3】

前記相互作用検出工程では、前記層流情報検出工程において検出された層流情報に基づいて、前記物質 A と物質 B 間の相互作用の検出を行うことを特徴とする請求項 1 2 記載の相互作用検出方法。

【請求項 1 4】

前記層流曲折工程では、下記 (1) 工程と、(2) 工程とを少なくとも行うことを特徴とする請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の相互作用検出方法。

(1) 前記層流の通流方向を X 方向とすると、前記層流を Y 軸方向に略 90 度曲折させる第 1 曲折工程。

(2) 前記層流を Z 軸方向に略 90 度曲折させる第 2 曲折工程。

【請求項 1 5】

前記相互作用検出工程を行う前に、前記層流の層流幅及び / 又は位置を制御する層流制御工程を行うことを特徴とする請求項 1 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の相互作用検出方法。

【請求項 1 6】

前記相互作用検出工程を行う前に、前記相互作用検出工程における検出条件を制御する検出条件制御工程を行うことを特徴とする請求項 1 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の相互作用検出方法。

【請求項 1 7】

前記層流曲折工程を経た後に、前記層流を、前記積層状態の両側方向からシース流で更に挟み込む第 2 層流形成工程を行うことを特徴とする請求項 1 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の相互作用検出方法。

【請求項 1 8】

第 2 層流形成工程を経た 2 以上の層流を合流させることにより、複数の層流を形成する第 3 層流形成工程を行うことを特徴とする請求項 1 7 記載の相互作用検出方法。

【請求項 1 9】

前記層流情報検出工程では、光学的な検出を行うことを特徴とする請求項 1 2 から 1 8 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 2 0】

前記相互作用検出工程では、光学的な検出を行うことを特徴とする請求項 1 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の相互作用検出方法。

【請求項 2 1】

流路内を通流する試料の検出装置であって、

前記通流方向を X 方向とした場合に、Y 軸方向に略 90 度に流路が曲折する第 1 曲折部と、Z 軸方向に略 90 度に流路が曲折する第 2 曲折部と、を少なくとも備える流路と、

前記第 1 曲折部及び第 2 曲折部の少なくとも上流側の流路において、前記試料を含有する層流の層流幅及び / 又は位置を検出する第 1 検出部と、

前記第 1 曲折部及び第 2 曲折部の少なくとも下流側の流路において、前記試料の検出を行う第 2 検出部と、

を少なくとも備える検出装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、流路を用いた検出方法に関する。より詳しくは、流路内を通流する試料を検出する検出方法、流路内における物質間の相互作用を検出する相互作用検出方法、並びに

10

20

30

40

50

、前記検出方法及び相互作用検出方法に適した検出装置に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、流路やキャピラリー、あるいは2次元又は3次元のプラスチックやガラス等の基板上に形成した流路中に、細胞や微生物等の生体微小粒子、マイクロビーズなどの微小粒子等を通流させ、これらを物理的手段や光学的手段等によって検出し、解析や分離等を行ったり、前記流路中で、物質間の相互作用や反応を進行させて、これらを物理的手段や光学的手段等によって検出を行ったりする技術が進展している。

【0003】

当該技術は、疾病診断、薬物等の化合物スクリーニング、法医学、遺伝情報の網羅的解析、生体物質の機能解析、プロテオーム解析、生体内反応の解析、食品分野、農業分野、工学分野、犯罪鑑識分野などでは、既に重要な基幹技術となりつつある。このような流路を用いた微小粒子等の解析又は分離の手法の代表的な一例としては、フローサイトメトリーと呼ばれる分析手法がある。

10

【0004】

フローサイトメトリーとは、解析の対象となる微小粒子等を流体中に流し込み、該微小粒子の列を形成し、整列した該微小粒子にレーザ光等を照射することにより、各微小粒子から発せられた蛍光や散乱光を検出することで微小粒子の解析を行い、更には、解析結果に基づいて、微小粒子の分取を行う分析手法である。

20

【0005】

フローサイトメトリーのように、流路等に通流させた試料の検出等を行う場合には、一般的に、試料を含有させた層流を形成することにより、該層流中で検出対象となる細胞等を整然と搬送しながら、物理的手段や光学的手段等による検出が行われる。

【0006】

層流の形成方法について、フローサイトメトリーを例に挙げて、より具体的に説明すると、例えば、三叉路形の流路などでは、その両側の流路にシース流と呼ばれる細胞等のサンプルの整流を促すための流体媒体を一定の流量で流入させ、更に、三叉路流路の中央流路に検出対象となる細胞等を含むサンプル流を一定の流量で注入する。この時、流路内のレイノルズ数が比較的小さいために、流路中のlaminar flow（層流）の原理によりそれぞれの流れは互いに混合されず、層を成した流れ（層流）が形成される。

30

【0007】

このように、流路等に通流させた試料の検出や分取等を精度良く行うには、層流をいかに制御できるか否かが重要である。例えば、特許文献1には、簡便に精度高く細胞等の微小粒子を分別するために、微小粒子の移動方向を制御できるマイクロチップとして、基板上に、微小粒子含有溶液導入流路と、当該流路の少なくとも一方の側部に配置されたシース流形成流路と、導入された微小粒子を計測するための微小粒子計測部位と、該微小粒子計測部位の下流に設置された微小粒子を分別回収するための2以上の微小粒子分別流路と、微小粒子計測部位から微小粒子分別流路への流路口付近に設置された微小粒子の移動方向を制御するための2以上の電極を有する微小粒子分別マイクロチップが開示されている。

40

【0008】

また、特許文献2には、微小流動の流体の流れを効率良く制御又は集束させる方法として、中央チャンネル（流路）内にサンプル流体を流し、集束チャンネル（流路）内にシース流を流し、シース流体の流速を制御することにより、サンプル流体の流れを制御または集束させる方法が開示されている。

【0009】

更に、特許文献3では、非安定なフロー（層流）を安定させるための技術として、シース流に水の粘度よりも高い粘度を与えるために、粘度増加剤を添加したシース流を使用する技術を提案している。

【特許文献1】特開2003-107099号公報

【特許文献2】特開2004-93553号公報

50

【特許文献3】特表2004-500562号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

流路等に通流させた試料の検出や分取等を精度良く行うには、層流をいかに制御できるか否かが重要であり、前記の様に、従来から、層流を制御する技術や層流を安定させる技術が開発されている。

【0011】

しかし、従来の方法では、目的の試料を流路に通流させる前に、予め、目的の試料に対応した参照スペクトルピーズや参照直径ピーズ等を流路内に通流させ、最適な層流の位置、層流の量、光照射位置、受光位置、光源パワー、印加電圧等を決定する必要があり、煩雑であった。

10

【0012】

また、流路中は、流路壁側での通流抵抗や流路壁の表面張力等の影響により、層流の幅や位置が、検出中に変化する場合がある。また、サンプル液中には、大きさや性質の異なる試料が存在することが多いため、検出中に、対象の試料に最適な層流の位置、層流の量、光照射位置、受光位置、光源パワー、印加電圧等を変化させたい場合もある。

【0013】

この場合、従来の方法では、検出中に、試料を含有する層流の状況を検出することができないため、検出中に、層流の位置、層流の量、光照射位置、受光位置、光源パワー、印加電圧等を制御することは難しかった。

20

【0014】

更に、従来は、流路内を通流する流体の層流形状を、検出方向に対して平行若しくは垂直方向に制御することが難しく、精度の高い検出を行うことが難しかった。

【0015】

そこで、本発明では、目的の試料の検出と同時に、試料を含有する層流からの情報を検出することが可能な検出方法を提供することを主目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明では、まず、流路内を通流する試料の検出方法であって、
前記試料を含有するサンプル流をシース流で挟み込むことにより、検出方向に面する前記流路の壁面に対して垂直に積層された状態の層流を形成する第1層流形成工程と、
該第1層流形成工程を経た後に、前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させる層流曲折工程と、
該層流曲折工程を経た後に、前記試料の検出を行う試料検出工程と、
を少なくとも行う検出方法を提供する。

30

本発明に係る検出方法では、前記第1層流形成工程を経た後に、該第1層流形成工程において形成された前記層流の層流幅及び／又は位置を検出する層流情報検出工程を更に行うことも可能である。

前記試料検出工程では、前記層流情報検出工程において検出された層流情報に基づいて、前記試料の検出を行うとより好適である。

40

前記層流曲折工程では、前記層流を、検出方向に面する前記流路の壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させれば、その方法は特に限定されないが、例えば、(1)前記層流の通流方向をX方向とすると、前記層流をY軸方向に略90度曲折させる第1曲折工程と、(2)前記層流をZ軸方向に略90度曲折させる第2曲折工程と、を少なくとも行えば、確実に前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させることができる。

本発明に係る検出方法では、前記試料検出工程を行う前に、前記層流の層流幅及び／又は位置を制御する層流制御工程を行うことも可能である。

また、本発明に係る検出方法では、前記試料検出工程を行う前に、前記試料検出工程に

50

おける検出条件を制御する検出条件制御工程を行うことも可能である。

本発明に係る検出方法では、前記第 1 層流形成工程において積層状態の層流を形成するが、更に、前記層流曲折工程を経た後に、前記層流を、前記積層状態の両側方向からシース流で更に挟み込む第 2 層流形成工程を行うと好適である。

また、前記第 2 層流形成工程を経た 2 以上の層流を合流させることにより、複数の層流を形成する第 3 層流形成工程を行うとより好適である。

前記層流情報検出工程及び前記試料検出工程における具体的な検出方法は、層流の情報及び試料の情報が検出できれば特に限定されないが、例えば、光学的方法を用いて検出を行うことが可能である。

【 0 0 1 7 】

本発明では、次に、流路内を通流する物質 A と物質 B 間の相互作用を検出する方法であって、

物質 A を含有するサンプル流を、少なくとも一部に物質 B を含有するシース流で挟み込むことにより、検出方向に面する前記流路の壁面に対して垂直に積層された状態の層流を形成する第 1 層流形成工程と、

該第 1 層流形成工程を経た後に、前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させる層流曲折工程と、

該層流曲折工程を経た後に、前記物質 A と物質 B 間の相互作用の検出を行う相互作用検出工程と、

を少なくとも行う相互作用検出方法を提供する。

本発明に係る相互作用検出方法では、前記第 1 層流形成工程を経た後に、該第 1 層流形成工程において形成された前記層流の層流幅及び / 又は位置を検出する層流情報検出工程を更に行うことも可能である。

前記相互作用検出工程では、前記層流情報検出工程において検出された層流情報に基づいて、前記物質 A と物質 B 間の相互作用の検出を行うとより好適である。

前記層流曲折工程では、前記層流を、検出方向に面する前記流路の壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させれば、その方法は特に限定されないが、例えば、(1) 前記層流の通流方向を X 方向とすると、前記層流を Y 軸方向に略 90 度曲折させる第 1 曲折工程と、(2) 前記層流を Z 軸方向に略 90 度曲折させる第 2 曲折工程と、を少なくとも行えば、確実に前記層流を、前記壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させることができる。

本発明に係る相互作用検出方法では、前記相互作用検出工程を行う前に、前記層流の層流幅及び / 又は位置を制御する層流制御工程を行うことも可能である。

また、本発明に係る相互作用検出方法では、前記相互作用検出工程を行う前に、前記相互作用検出工程における検出条件を制御する検出条件制御工程を行うことも可能である。

本発明に係る相互作用検出方法では、前記第 1 層流形成工程において積層状態の層流を形成するが、更に、前記層流曲折工程を経た後に、前記層流を、前記積層状態の両側方向からシース流で更に挟み込む第 2 層流形成工程を行うと好適である。

また、前記第 2 層流形成工程を経た 2 以上の層流を合流させることにより、複数の層流を形成する第 3 層流形成工程を行うとより好適である。

前記層流情報検出工程及び前記相互作用検出工程における具体的な検出方法は、層流の情報及び物質 A と物質 B 間の相互作用が検出できれば特に限定されないが、例えば、光学的方法を用いて検出を行うことが可能である。

【 0 0 1 8 】

本発明では、更に、流路内を通流する試料の検出装置であって、

前記通流方向を X 方向とした場合に、Y 軸方向に略 90 度に流路が曲折する第 1 曲折部と、Z 軸方向に略 90 度に流路が曲折する第 2 曲折部と、を少なくとも備える流路と、

前記第 1 曲折部及び第 2 曲折部の少なくとも上流側の流路において、前記試料を含有する層流の層流幅及び / 又は位置を検出する第 1 検出部と、

前記第 1 曲折部及び第 2 曲折部の少なくとも下流側の流路において、前記試料の検出を

10

20

30

40

50

行う第 2 検出部と、

を少なくとも備える検出装置を提供する。

【0019】

ここで、本発明で用いる技術用語の定義付けを行う。本発明における「試料」とは、細胞や微生物、リボソーム、DNA、タンパク質などの生体関連微小粒子、あるいはラテックス粒子やゲル粒子、工業用粒子などの合成粒子、あるいは、固体に限らず液体状の物質など、流路 1 内を通流可能な物質であれば、全て包含する。

【0020】

本発明における「シース流」とは、試料を含有するサンプル流の整流を促すための流体媒体をいい、サンプル流の整流を損なわなければ、何らかの物質を含有するものも含む概念である。

10

【発明の効果】

【0021】

本発明に係る検出方法では、目的の試料の検出を行うと同時に、試料を含有する層流からの情報を検出することが可能である。そのため、目的の試料の検出を行う前段階の準備工程を省略でき、また、検出中に個々の検出条件を制御することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

20

【0023】

< 検出方法 >

図 1 は、本発明に係る検出方法のフロー図である。

【0024】

本発明に係る検出方法は、流路内を通流する試料を検出するための方法であって、第 1 層流形成工程 (I) と、層流曲折工程 (II) と、試料検出工程 (III) と、を少なくとも行う方法である。また、必要に応じて、層流情報検出工程 (IV) を行うことが可能である。以下、それぞれの工程について、詳細に説明する。

【0025】

30

(I) 第 1 層流形成工程

第 1 層流形成工程 (I) は、試料を含有するサンプル流 F 1 をシース流 F 2 1、F 2 2 で挟み込むことにより、検出方向 D 1 に面する流路 1 の壁面 1 d₁ に対して垂直に積層された状態の層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) を形成する工程である (図 1 フロー図参照)。図 2 を用いて詳しく説明する。

【0026】

図 2 は、本発明に係る検出方法に用いることができる流路 1 の斜視模式図である。

【0027】

本発明に係る検出方法を行い得る流路 1 の形態は、層流を形成し得る形態であれば特に限定されず、自由に設計することができる。例えば、図 2 に示す形態に限らず、2 次元又は 3 次元のプラスチックやガラス等の基板上に形成した流路 1 においても、本発明に係る検出方法を行うことが可能である。

40

【0028】

また、前記流路 1 の流路幅、流路深さ、流路断面形状も、層流を形成し得る形態であれば特に限定されず、自由に設計することができる。例えば、流路幅 1 mm 以下のマイクロ流路においても、本発明に係る検出方法を行うことが可能である。特に、流路幅 10 μm 以上 1 mm 以下程度のマイクロ流路を用いれば、本発明に係る検出方法をより好適に行うことができる。

【0029】

流路 1 には、図 2 中符号 D 1 で示す検出方向 D 1 に面した流路 1 の壁面 1 d₁ に対して

50

、垂直に積層された状態の層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を形成する。層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の形成は、図 2 に示すように、試料を含有するサンプル流 F 1 をシース流 F 2 1、F 2 2 で挟み込むことにより行う。

【0030】

サンプル流 F 1 をシース流 F 2 1、F 2 2 で挟み込む具体的方法は、流路 1 の壁面 1 d₁ に対して垂直に積層された状態の層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を形成できれば特に限定されず、公知のあらゆる方法を採用することができる。好適な一例としては、図 3 に示すように、流路 1 に、サンプル流用流路 1 1 とシース流用流路 1 2 とを設け、サンプル流用流路 1 1 の両側からシース流用流路 1 2 を合流させることにより、サンプル流用流路 1 1 から導入されるサンプル流 F 1 を、シース流用流路 1 2 から導入されるシース流 F 2 1、F 2 2 で両側から挟み込むことができる。

10

【0031】

（II）層流曲折工程

層流曲折工程（II）は、第 1 層流形成工程（I）を経た後に、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を、検出方向 D 2 に面する流路 1 の壁面 1 d₂ に対して平行な積層状態となるように曲折させる工程である（図 1 フロー図参照）。

【0032】

層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を、検出方向 D 2 に面する流路 1 の壁面 1 d₂ に対して平行な積層状態とすることで、後述する試料検出工程（III）を好適に行うことができる。図 4 を用いて詳しく説明する。

20

【0033】

図 4 は、層流曲折工程（II）の前後の流路 1 内を比較する図であり、図 4 中符号（i）で示す図は、図 2 中検出方向 D 1、D 2 から見た流路 1 を示す断面模式図であり、符号（ii）で示す図は、検出方向 D 1、D 2 に対して側方 S 1、S 2 から見た流路 1 を示す断面模式図であり、符号（i - 1）、（ii - 1）で示す図は、それぞれ層流曲折工程（II）を行う前の流路 1 を示す断面模式図であり、符号（i - 2）、（ii - 2）で示す図は、それぞれ層流曲折工程（II）を行った後の流路 1 を示す断面模式図である。

【0034】

図 4（i - 1）に示す通り、層流曲折工程（II）を行う前は、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）が、検出方向 D 1 に面する流路 1 の壁面 1 d₁ に対して垂直に積層された状態になっているため、検出方向 D 1 から見た場合、各層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の層流幅（サンプル流幅 f 1、シース流幅 f 2 1、f 2 2）及び位置を、正確に検出することができる。

30

【0035】

しかし、図 4（ii - 1）の側方 S 1 から見た図に示す通り、検出方向 D 1 からサンプル流 F 1 中の試料 C の情報を検出しようとしても、検出軸上 D 1 1 に試料 C が複数重なっているため、試料 C からの情報を別個に精度良く検出することは難しい。

【0036】

そこで、層流曲折工程（II）を行うことにより、図 4（ii - 2）に示すように、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を、検出方向 D 2 に面する流路 1 の壁面 1 d₂ に対して平行な積層状態とすることで、検出軸上 D 2 1 上に試料 C が複数重なることを防げるため、後述する試料検出工程（III）において、試料 C からの情報を正確に検出することが可能となる。

40

【0037】

また、後述する層流情報検出工程（IV）で得た層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の層流幅（サンプル流幅 f 1、シース流幅 f 2 1、f 2 2）及び、流路 1 における位置が、層流曲折工程（II）後には、検出方向 D 2 から見た流路 1 内の深さ方向の位置情報になるため、後述する試料検出工程（III）において、試料 C からの情報を精度良く検出することが可能となる。

【0038】

50

なお、層流曲折工程(II)を行った後は、検出方向D2から視ると、図4(i-2)に示すように、試料Cを含有するサンプル流F1が、流路1の全面に渡って観察されてしまうため、各層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)の層流幅(サンプル流幅f1、シース流幅f21、f22)及び位置を検出することは難しい。

【0039】

このように、層流曲折工程(II)を設け、更に、該層流曲折工程(II)の前後において、各検出を行うことで、層流曲折工程(II)の前には、後述する層流情報検出工程(IV)において、各層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)の層流幅(サンプル流幅f1、シース流幅f21、f22)及び位置を検出することができ、層流曲折工程(II)の後には、後述する試料検出工程(III)において、試料Cからの情報を正確に検出することができ。

10

【0040】

層流曲折工程(II)では、層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を、検出方向D2に面する流路1の壁面1d₂に対して平行な積層状態となるように曲折させれば、その方法は特に限定されず、任意の方法を用いて自由に曲折させることができる。

【0041】

例えば、図2及び図3に示すように、(1)層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)の通流方向をX方向とすると、層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)をY軸方向に略90度曲折させる第1曲折工程と、(2)層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)をZ軸方向に略90度曲折させる第2曲折工程と、を少なくとも行えば、層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を、確実に、壁面1d₂に対して平行な積層状態とすることができる。

20

【0042】

なお、第1曲折工程(1)と第2曲折工程(2)を行う順番は特に限定されず、第1曲折工程(1)を経た後に第2曲折工程(2)を行っても、第2曲折工程(2)を行った後に第1曲折工程(1)を行ってもよい。

【0043】

また、第1曲折工程(1)は、層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)をY軸方向に曲折できれば、図5及び図6に示すように、流路の深さH分程度の曲折であっても、その後に第2曲折工程(2)を行うことにより、壁面1d₂に対して平行な積層状態とすることができる。

30

【0044】

また、図7に示すように、(1)層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)をY軸方向に略90度曲折させる第1曲折工程と、(2)層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)をZ軸方向に略90度曲折させる第2曲折工程と、(3)層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)をX軸方向に略90度曲折させる第2曲折工程と、を少なくとも行うことにより、層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を、壁面1d₂に対して平行な積層状態とすることができる。この場合、流路1全体がほぼ同一軸上に形成されるため、特に、流路1を、2次元又は3次元のプラスチックやガラス等の基板上に形成する場合など面積が限られている場合などに有効である。

40

【0045】

なお、前記の層流曲折方法の例示では、第1曲折工程(1)、第2曲折工程(2)、及び第3曲折工程(3)のいずれも層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を、ほぼ直角に曲折しているが、90度±20度程度は許容範囲である。また、これに限定されず、例えば、図8に示すように、流路1を略螺旋状にすることで、層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を曲折させることも可能である。

【0046】

以上説明した層流曲折工程(II)は、図示しないが、2次元又は3次元のプラスチックやガラス等の基板上に形成した流路1において行うことも可能である。この場合、層流曲折工程(II)では、基板に対して垂直に積層された状態の層流(サンプル流F1、シース

50

流 F 2 1、F 2 2) を、基板に対して平行な積層状態となるように曲折させることとなる。

【 0 0 4 7 】

(III) 試料検出工程

試料検出工程 (III) は、層流曲折工程 (II) を経た後に、試料 C からの情報を検出する工程である (図 1 フロー図参照) 。

【 0 0 4 8 】

試料検出工程 (III) では、サンプル流 F 1 に含有される試料 C の検出ができれば、その検出方法は特に限定されず、公知の方法を自由に採用することができる。例えば、光学的方法、電気的方法、磁気的方法などを挙げることができ、特に、本発明においては、光学的方法が好適である。

10

【 0 0 4 9 】

光学的方法としては、例えば、蛍光測定、散乱光測定、透過光測定、反射光測定、回折光測定、紫外分光測定、赤外分光測定、ラマン分光測定、F R E T 測定、F I S H 測定その他各種スペクトラム測定等の方法が挙げられる。また、電荷結合素子 (C C D) や Complementary Metal Oxide Semiconductor (C M O S) などのエリア撮像素子を用いて検出を行えば、一画面全体の試料 C から発せられるイメージを光電変換することができる。

【 0 0 5 0 】

具体的な一例を挙げると、図 2 中矢印 D 2 方向から光照射を行い、該光照射によってサンプル流 F 1 中の試料 C から発生される蛍光や散乱光を、光検出器により検出することにより、試料 C を検出することができる。

20

【 0 0 5 1 】

光学的方法を採用する場合における光照射の種類は特に限定されないが、試料から蛍光や散乱光を確実に発生させるためには、光方向、波長、光強度が一定の光が望ましい。一例としては、レーザや L E D (Light Emission Diode : 発光ダイオード) を挙げることができる。

【 0 0 5 2 】

また、光学的方法を採用する場合における光照射方法は特に限定されないが、例えば、図 2 中符号 W 2 で示すように、照射スポットを流路 1 幅方向に走査させながら光学的情報を検出しても、図 2 中符号 L 2 で示すように、照射スポットを流路 1 通流方向に走査させながら光学的情報を検出してもよい。

30

【 0 0 5 3 】

電気的方法としては、例えば、サンプル流 F 1 に含有される試料 C に関する抵抗値、容量値 (キャパシタンス値) 、インダクタンス値、インピーダンス、電極間の電界の変化値等の測定を行う方法が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

磁気的方法としては、例えば、サンプル流 F 1 に含有される試料 C の表面に磁性体を修飾し、磁化、磁界変化、磁場変化等の測定を行う方法が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

なお、後述する層流情報検出工程 (IV) を行う場合には、層流情報検出工程 (IV) において検出された層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) の層流幅 (サンプル流幅 f 1、シース流幅 f 2 1、f 2 2) 及び / 又は位置情報に基づいて、試料 C の検出を行うことが望ましい。層流情報検出工程 (IV) では、層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) の層流幅 (サンプル流幅 f 1、シース流幅 f 2 1、f 2 2)、及び流路 1 における位置情報が検出されるため、サンプル流 F 1 に含有される試料 C を確実に精度良く検出することが可能となるからである。

40

【 0 0 5 6 】

(IV) 層流情報検出工程

層流情報検出工程 (IV) は、第 1 層流形成工程 (I) において形成された層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) の層流幅及び流路 1 における位置を検出する工程で

50

ある（図１フロー図参照）。

【００５７】

具体的には、第１層流形成工程（Ⅰ）において、積層状態に形成された層流（サンプル流Ｆ１、シース流Ｆ２１、Ｆ２２）の層流幅及び流路１における位置を、積層状態の断面側（図２中符号Ｄ１参照）から検出する。

【００５８】

層流情報検出工程（Ⅳ）では、層流（サンプル流Ｆ１、シース流Ｆ２１、Ｆ２２）の層流幅及び流路１における位置が検出できれば、その検出方法は特に限定されず、公知の方法を自由に採用することができる。例えば、光学的方法、電気的方法、磁気的方法などを挙げることができ、特に、本発明においては、光学的方法が好適である。

10

【００５９】

光学的方法としては、例えば、蛍光測定、散乱光測定、透過光測定、反射光測定、回折光測定、紫外分光測定、赤外分光測定、ラマン分光測定、ＦＲＥＴ測定、ＦＩＳＨ測定その他各種スペクトラム測定等の方法が挙げられる。また、電荷結合素子（ＣＣＤ）やComplementary Metal Oxide Semiconductor（ＣＭＯＳ）などのエリア撮像素子を用いて検出を行えば、一画面全体の流路１から発せられるイメージを光電変換することができる。

【００６０】

具体的な一例を挙げると、図２中矢印Ｄ１方向から光照射を行い、該光照射によってサンプル流Ｆ１やシース流Ｆ２１、Ｆ２２に含有される試料Ｃ等の物質から発生される蛍光や散乱光を、光検出器により検出することにより、サンプル流Ｆ１、シース流Ｆ２１、Ｆ２２の層流幅及び流路１における位置を検出することができる。

20

【００６１】

光学的方法を採用する場合における光照射の種類は特に限定されないが、試料から蛍光や散乱光を確実に発生させるためには、光方向、波長、光強度が一定の光が望ましい。一例としては、レーザやＬＥＤ（Light Emission Diode：発光ダイオード）を挙げることができる。

【００６２】

また、光学的方法を採用する場合における光照射方法は特に限定されないが、例えば、図２中符号Ｗ１で示すように、照射スポットを流路幅方向に走査させながら光学的情報を検出してもよい。

30

【００６３】

電気的方法としては、例えば、サンプル流Ｆ１やシース流Ｆ２１、Ｆ２２に含有される試料Ｃ等の物質に関する抵抗値、容量値（キャパシタンス値）、インダクタンス値、インピーダンス、電極間の電界の変化値等の測定を行う方法が挙げられる。

【００６４】

磁気的方法としては、例えば、サンプル流Ｆ１やシース流Ｆ２１、Ｆ２２に含有される試料Ｃ等の物質の表面に磁性体を修飾し、磁化、磁界変化、磁場変化等の測定を行う方法が挙げられる。

【００６５】

このように、本発明に係る検出方法では、前記第１層流形成工程（Ⅰ）を行うことにより、検出方向Ｄ１に面する流路１の壁面１ｄ_１に対して垂直に積層された状態の層流（サンプル流Ｆ１、シース流Ｆ２１、Ｆ２２）を形成するため、続いて行う層流情報検出工程（Ⅳ）において、層流サンプル流Ｆ１、シース流Ｆ２１、Ｆ２２の層流幅及び流路１における位置などを、正確に検出することが可能となる。

40

【００６６】

本発明に係る検出方法は、以上説明した第１層流形成工程（Ⅰ）、層流曲折工程（Ⅱ）、試料検出工程（Ⅲ）、を少なくとも行い、必要に応じて、層流情報検出工程（Ⅳ）を行う方法であるが、以下の層流制御工程（Ⅴ）、検出条件制御工程（Ⅵ）、第２層流形成工程（Ⅶ）、第３層流形成工程（Ⅷ）を、更に必要に応じて、適宜行うことが可能である。以下、各工程について、詳しく説明する。

50

【 0 0 6 7 】

(V) 層流制御工程

層流制御工程 (V) は、試料検出工程 (III) を行う前に、層流 (サンプル流 F 1 、シース流 F 2 1 、 F 2 2) の層流幅 (サンプル流幅 f 1 、シース流幅 f 2 1 、 f 2 2) 及び / 又は流路 1 における位置を制御する工程である (図 1 フロー図参照) 。

【 0 0 6 8 】

層流制御工程 (V) は、試料検出工程 (III) を行う前に行えばよく、例えば図 1 のフロー図に示すように、層流曲折工程 (II) を行う前に行っても、層流曲折工程 (II) を行った後に行っても良い。ただし、層流情報検出工程 (IV) を行う場合には、層流情報検出工程 (IV) を経た後に行うことが望ましい。層流情報検出工程 (IV) において検出された層流情報に基づいて、層流制御を行うことができるからである。以下、層流制御方法の具体例を、図 9 から 1 2 を用いて説明する。

10

【 0 0 6 9 】

図 9 は、層流情報検出工程 (IV) を経た後の層流 (サンプル流 F 1 、シース流 F 2 1 、 F 2 2) を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図 9 中符号 (i) で示す図は、層流制御工程 (V) を行う前を、符号 (ii) で示す図は、層流制御工程 (V) を行った後を示している。

【 0 0 7 0 】

層流情報検出工程 (IV) において、図 9 (i) に示すように、シース流幅 f 2 1 がシース流幅 f 2 2 に比べて狭く、サンプル流 F 1 の位置が流路 1 の中央部からずれていることが、検出された場合、例えば、シース流 F 2 1 の送液量を増量することにより、図 9 (ii) に示すように、シース流幅 f 2 1 とシース流幅 f 2 2 をほぼ同一にし、サンプル流 F 1 の位置を流路 1 の中央部へ制御することができる。

20

【 0 0 7 1 】

なお、本実施形態では、サンプル流 F 1 の位置を流路 1 の中央部へ制御しているが、これに限定されず、サンプル流 F 1 、シース流 F 2 1 、 F 2 2 の送液量を必要に応じて増減し、サンプル流 F 1 の位置を流路 1 の任意の位置に自由に制御することが可能である。

【 0 0 7 2 】

図 1 0 は、層流情報検出工程 (IV) を経た後の図 9 とは異なる層流 (サンプル流 F 1 、シース流 F 2 1 、 F 2 2) を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図 1 0 中符号 (i) で示す図は、層流制御工程 (V) を行う前を、符号 (ii) で示す図は、層流制御工程 (V) を行った後を示している。

30

【 0 0 7 3 】

層流情報検出工程 (IV) において、図 1 0 (i) に示すように、サンプル流 F 1 の流路幅 f 1 が、試料 C の粒径より大きいことが検出された場合、例えば、流路 1 幅方向に 2 つ以上の試料 C が重なった状態で通流されてしまったり、ひいては試料 C の順番が入れ替わってしまったりすることもあり、試料検出工程 (III) における検出精度が低下してしまう恐れがある。

【 0 0 7 4 】

そこで、シース流 F 2 1 、 F 2 2 の送液量を増量することにより、図 1 0 (ii) に示すように、サンプル流 F 1 の流路幅 f 1 を試料 C の粒径に合わせるように、層流 (サンプル流 F 1 、シース流 F 2 1 、 F 2 2) を制御することで、例えば、試料 C を光学的に検出する際などには、検出スポット内に細胞や微小粒子等の試料 C を 1 個ずつ配列させることができ、別個に検出を行うことが可能となるなど、試料検出工程 (III) における検出精度を向上させることができる。

40

【 0 0 7 5 】

図 1 1 は、層流情報検出工程 (IV) を経た後の図 9 及び図 1 0 とは異なる層流 (サンプル流 F 1 、シース流 F 2 1 、 F 2 2) を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図 1 1 中符号 (i) で示す図は、層流制御工程 (V) を行う前を、符号 (ii) で示す図は、層流制御工程 (V) を行った後を示している。なお、図 1 1 符号 V で示す破線曲線は、流路

50

1 内の流体速度分布を示すハーゲンポアズイユ(Hagen-Poiseuille)速度曲線である。

【0076】

流路1内は、流路壁側での通流抵抗や流路壁の表面張力等の影響により、流体速度分布曲線Vが示すように、流路1中央部の流速が最も早く、流路壁へ近づくに従って流速が遅くなる。

【0077】

そのため、図11(i)に示すように、サンプル流F1が流路1の中央部を通流すると、サンプル流F1中の試料Cの流速も早くなり、試料検出工程(III)における検出感度が低下する場合が生じる。

【0078】

そこで、例えば、図11(ii)に示すように、シース流F21の送液量を減らし、シース流F22の送液量を増量することで、サンプル流F1をシース流F21側へ偏らせるように制御することにより、サンプル流F1の流速を遅くし、試料検出工程(III)における検出感度を向上させることができる。

【0079】

なお、本実施形態では、サンプル流F1の流速を遅くする制御を行っているが、特にこれに限定されず、例えば、試料検出工程(III)における検出速度を速めるために、サンプル流F1を流路1の中央部を通流させるように制御し、サンプル流F1の流速を早めることも可能である。

【0080】

このような流体速度の制御は、図12に示す方法によっても実現させることが可能である。図12は、層流情報検出工程(IV)を経た後の図9から図11とは異なる層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図12中符号(i)で示す図は、層流制御工程(V)を行う前を、符号(ii)で示す図は、層流制御工程(V)を行った後を示している。

【0081】

一般に、流路1へ同一圧で流体を導入した場合、流路幅Hが2倍になると、流速は1/4倍に減速する。そこで、図12(ii)に示すように、流路幅Hを2倍にすることで、サンプル流F1の流速VをV/4へ減速するように制御することができ、試料検出工程(III)における検出感度を向上させることができる。

【0082】

なお、本実施形態では、サンプル流F1の流速を遅くする制御を行っているが、特にこれに限定されず、例えば、試料検出工程(III)における検出速度を速めるために、流路幅Hを狭くして、サンプル流F1の流速Vを加速させるように制御することも可能である。また、流路幅Hに限らず、流路の深さや断面形状等を変化させることで、サンプル流F1の流速Vを変化させることも可能である。

【0083】

(VI) 検出条件制御工程

検出条件制御工程(VI)は、試料検出工程(III)を行う前に、試料検出工程(III)における検出条件を制御する工程である(図1フロー図参照)。

【0084】

検出条件制御工程(VI)は、少なくとも試料検出工程(III)を行う前に行えばよく、例えば図1のフロー図に示すように、層流曲折工程(II)を行う前に行っても、層流曲折工程(II)を行った後に行っても良い。また、図示しないが、後述する第2層流形成工程(VII)及び第3層流形成工程(VIII)を行う前に行っても、第2層流形成工程(VII)及び第3層流形成工程(VIII)を行った後に行っても良い。ただし、層流情報検出工程(IV)を行う場合には、層流情報検出工程(IV)を経た後に行うことが望ましい。層流情報検出工程(IV)において検出された層流情報に基づいて、検出条件制御を行うことができるからである。

【0085】

10

20

30

40

50

検出条件制御工程 (VI) では、試料検出工程 (III) における検出条件の制御を行うが、制御を行う検出条件は特に限定されない。例えば、光照射スポットの位置、照射スポットの形状、光照射強度、パルス幅、パルス比率、焦点位置、光検出器の増幅率、光照射器の増幅率等を制御することができる。

【0086】

検出条件制御の一例について図13を用いて説明する。図13は、層流情報検出工程 (IV) を経た後の層流 (サンプル流 F1、シース流 F21、F22) を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図13中符号 (i) で示す図は、検出条件制御工程 (VI) を行う前を、符号 (ii) で示す図は、検出条件制御工程 (VI) を行った後を示している。

【0087】

例えば、層流情報検出工程 (IV) において、図13 (i) に示すように、シース流幅 f21 がシース流幅 f22 に比べて狭く、サンプル流 F1 の位置がシース流 F21 側へ偏っていることが検出された場合、図13 (ii) に示すように、光照射スポットの位置をサンプル流 F1 の通流位置に制御することで、試料検出工程 (III) における検出精度を向上させることができる。

【0088】

従来、流路1を通流する試料Cの検出を行う場合には、流路1の中央部に目的の試料Cを含む層流 (サンプル流 F1) を形成させ、該試料Cに向かって光照射等を行い、試料C検出を行っていた。しかし、この方法では、検出中は、試料Cからの情報のみしか得ることができないため、検出等に最適な検出条件を、検出中に制御することが困難であった。そのため、予め、試料Cに対応した参照スペクトルピーズや参照直径ピーズ等を流通させ、検出に最適な検出条件を特定した後に、実際に試料Cを通流させて検出を行うという、前準備工程が必要であった。

【0089】

しかし、本発明に係る検出方法では、実際に試料Cを流路1内に通流させた状態で、層流情報検出工程 (IV) を行い、この情報を検出条件制御に用いることができるため、予め、試料Cに対応した参照スペクトルピーズや参照直径ピーズ等を流通させるような前準備工程を行う必要がない。そのため、検出時間の短縮や検出精度の向上が実現できる。

【0090】

(VII) 第2層流形成工程

第2層流形成工程 (VII) は、層流曲折工程 (II) を経た後に、積層状態の層流 (サンプル流 F1、シース流 F21、F22) を、積層状態の両側方向からシース流 F23、F24 で更に挟み込む工程である (図1フロー図参照)。図14及び図15を用いて詳しく説明する。

【0091】

図14及び図15は、本発明に係る検出方法に用いることができる図2、図3、図5から図8とは異なる流路1の斜視模式図である。

【0092】

層流曲折工程 (II) を経ると、流路1には、図14及び図15中符号 D2 で示す検出方向 D2 に面した流路1の壁面 1d₂ に対して、平行に積層された状態の層流 (サンプル流 F1、シース流 F21、F22) が形成されている。そこへ、積層状態の両側方向からシース流 F23、F24 で更に挟み込むと、図14及び図15に示すように、サンプル流 F1 が流路1の中心部に収束された状態の層流を形成することができる。

【0093】

層流 (サンプル流 F1、シース流 F21、F22) をシース流 F23、F24 で挟み込む具体的方法は、サンプル流 F1 が流路1の中心部に収束された状態の層流を形成することができれば特に限定されず、公知のあらゆる方法を採用することができる。好適な一例としては、図14及び図15に示すように、層流曲折工程 (II) を経た後の流路1の両側からシース流用流路13を合流させることにより、サンプル流 F1 が流路1の中心部に収束された状態の層流を形成することができる。

【 0 0 9 4 】

このように、第 2 層流形成工程 (VII) を行うことで、サンプル流 F 1 を流路 1 の中心部に収束された状態に形成すれば、検出方向 D 2 及び側方 S 2 のいずれから見た場合も、試料 C を整然と列を成した状態で検出することができる。

【 0 0 9 5 】

(VIII) 第 3 層流形成工程

第 3 層流形成工程 (VIII) は、第 2 層流形成工程 (VII) を経た 2 以上の層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) を合流させることにより、複数の層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) を形成する工程である (図 1 フロー図参照)。図 1 6 を用いて詳しく説明する。

10

【 0 0 9 6 】

図 1 6 中符号 (i) で示す図は、本発明に係る検出方法に用いることができる基板 T 上に形成した流路 1 の上方視平面模式図であり、符号 (ii) で示す図は、図 1 6 (i) 中符号 R 1 で示す破線円部分の流路 1 の断面模式図である。符号 1 1 1 は、サンプル流導入口を、符号 1 2 1 及び 1 3 1 は、シース流導入口をそれぞれ示す。なお、本実施形態では、基板 T 上に流路 1 を設けているが、特にこの形態に限定されず、例えば、図 1 4 又は図 1 5 に示す流路 1 を複数合流させた流路を用いることも可能である。

【 0 0 9 7 】

第 2 層流形成工程 (VII) を経ると、流路 1 には、サンプル流 F 1 が流路 1 の中心部に収束された状態の層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2、F 2 3、F 2 4) が形成されている (図 1 6 (ii) 参照)。この層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2、F 2 3、F 2 4) を図 1 6 (i) に示すように 2 以上合流させると、図 1 7 に示すような複数の層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2、F 2 3、F 2 4) が形成される。

20

【 0 0 9 8 】

図 1 7 中符号 (i) で示す図は、図 1 6 (i) 中符号 R 2 で示す破線円部分の流路 1 を、検出方向 D 2 から見た断面模式図であり、符号 (ii) で示す図は、図 1 6 (i) 中符号 R 2 で示す破線円部分の流路 1 を、通流方向から見た断面模式図である。

【 0 0 9 9 】

第 3 層流形成工程 (VIII) を行うと、図 1 7 に示すように、検出方向 D 2 から見て、複数のサンプル流 F 1 を、形成することができる。そのため、例えば、それぞれのサンプル流 F 1 に含有させる試料 C の種類を変えることにより、一度に何種類もの試料 C の検出を行うことができ、検出時間の大幅な短縮が実現できる。

30

【 0 1 0 0 】

以上説明した検出方法で検出することが可能な試料 C は、細胞や微生物、リボソーム、DNA、タンパク質などの生体関連微小粒子、あるいはラテックス粒子やゲル粒子、工業用粒子などの合成粒子、あるいは、固体に限らず液体状の物質など、流路 1 内を通流可能な物質であれば、全て包含する。

【 0 1 0 1 】

< 相互作用検出方法 >

本発明に係る相互作用検出方法は、流路内を通流する物質 A と物質 B 間の相互作用を検出するための方法であって、第 1 層流形成工程 (I) と、層流曲折工程 (II) と、相互作用検出工程 (III) と、を少なくとも行う方法である。また、必要に応じて、層流情報検出工程 (IV)、を行うことが可能である。更に必要に応じて、層流制御工程 (V)、検出条件制御工程 (VI)、第 2 層流形成工程 (VII)、第 3 層流形成工程 (VIII) を行うことも可能である。それぞれの工程は、前述した検出工程のそれぞれの工程と同様であるので、以下、相互作用検出方法特有の事項について、図 1 8 及び図 1 9 を用いて説明する。

40

【 0 1 0 2 】

図 1 8 は、本発明に係る相互作用検出方法を行う際の流路 1 内の様子を説明するための図であり、層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) を、積層状態の側方から見

50

た断面模式図である。

【0103】

本発明に係る相互作用検出方法では、サンプル流 F 1 に物質 A を含有させ、シース流 F 2 1、F 2 2 の少なくとも一方に物質 B を含有させ、これら物質 A と物質 B 間で進行する相互作用を検出する。なお、本実施形態では、シース流 F 2 1 に物質 B を含有させているが、これに限定されず、シース流 F 2 2 に物質 B を含有させても、シース流 F 2 1 及びシース流 F 2 2 の両方に物質 B を含有させても良い。

【0104】

また、シース流 F 2 1 とシース流 F 2 2 に、異なる種類の物質 B を含有させて、異なる相互作用を同時に検出することも可能である。

10

【0105】

物質 A は、流路 1 内を通流可能な物質であれば、特に限定されない。例えば、細胞や微生物、リポソーム、DNA、タンパク質などの生体関連微小粒子、あるいはラテックス粒子やゲル粒子、工業用粒子などの合成粒子などを挙げることができる。なお、サンプル流 F 1 に含有させる物質 A は、単一の物質に限らず、複数の物質を同時に含有させて、異なる複数の相互作用を検出することも可能である。

【0106】

物質 B は、流路 1 内を通流可能な物質であり、かつ、物質 A と相互作用し得る物質であれば特に限定されず、例えば、蛍光色素等の蛍光物質、抗体、放射性物質、マイクロビーズ、pH 調整液、濃度調整液、溶血液、生理食塩水などあらゆる試薬や調製液、薬液などが挙げられる。蛍光物質としては、例えば、Cascade Blue、Fluorescein isothiocyanate (FITC)、Phycoerythrin (PE)、Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5)、Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7)、Texas Red、Allophycocyanin (APC)、Allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7) 等が挙げられる。なお、シース流 F 2 1、F 2 2 に含有させる物質 B は、単一の物質に限らず、複数の物質を同時に含有させて、異なる複数の相互作用を検出することも可能である。

20

【0107】

これらの物質 A 及び物質 B を流路 1 内で相互作用させることにより、物質 A 及び物質 B を流路 1 内に通流させながら、物質 A を物質 B で化学的又は物理的に修飾することができる。

【0108】

また、この場合、図 18 中符号 L 3 で示すように、相互作用検出を流路 1 の通流方向に走査させながら行うことにより、物質 A の物質 B による修飾量を、流路 1 の任意の位置毎に検出することができ、この修飾量をフィードバックすることにより、物質 B の種類やシース流 F 2 1 の流量等を制御することも可能である。即ち、流路 1 内の流体の速度を予め設定しておけば、相互作用が検出された位置から、その物質の反応時間を算出することが可能である。

30

【0109】

更に、本発明に係る相互作用検出方法を用いれば、流路 1 内での相互作用の有無を検出することにより、物質 B と相互作用を行う物質 A をスクリーニングする方法、例えば、HIV (Human Immunodeficiency Virus) の陽性反応などに応用することができる。

40

【0110】

図 19 は、本発明に係る相互作用検出方法を行う際の流路 1 内の様子を説明するための図であり、図 18 とは異なる層流 (サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2) を積層状態の側方から見た断面模式図である。

【0111】

本実施形態では、シース流 F 2 1 の流速 v_1 をシース流 F 2 2 の流速 v_2 より早く設定している。このようにサンプル流 F 1 の両側のシース流 F 2 1 とシース流 F 2 2 の流速 v_1 及び v_2 を異ならせることで、図 19 に示すように、サンプル流 F 1 中の物質 A が回転する。

【0112】

50

この場合、例えば、シース流 F 2 2 に生理食塩水等を用いることにより、物質 A に結合した不純物質や、修飾不完全な物質 B などを洗浄することも可能である。

【0113】

以上説明した相互作用検出方法を、図 1 6 及び図 1 7 に示すように、複数の層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）が形成された流路 1 内で行う場合、例えば、それぞれのサンプル流 F 1 に異なる種類の物質 A を含有させたり、それぞれのシース流 F 2 1、F 2 2、F 2 3、F 2 4 に異なる種類の物質 B を含有させたりすることで、一度に複数の修飾や、スクリーニングを行うことが可能となる。

【0114】

< 検出装置 >

図 2 0 は、本発明に係る検出装置 2 の一実施形態に係る概念を示す斜視模式である。本発明に係る検出装置 2 は、大別すると、流路 1 と、第 1 検出部 3 1 と、第 2 検出部 3 2 と、を少なくとも備える。以下、それぞれの構成、機能等について詳細に説明する。

【0115】

(1) 流路 1

本発明に係る検出装置 2 に用いることができる流路 1 は、前記試料の検出を行う第 2 検出部と、前記第 1 検出部によって検出が行われる流路位置と、前記第 2 検出部によって検出が行われる流路位置と、の間に、前記流路の前記第 1 検出部側の壁面に対して垂直に積層された状態の層流を、前記第 2 検出部側の壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させる曲折部を少なくとも備える。

【0116】

本発明に係る検出部に備える前記曲折部は、前記層流を、前記第 1 検出部側の壁面に対して垂直に積層された状態から、前記第 2 検出部側の壁面に対して平行な積層状態となるように曲折させることができれば、その構造は特に限定されないが、本実施形態では、一例として、前記通流方向を X 方向とした場合に、Y 軸方向に略 90 度に流路が曲折する第 1 曲折部 1 0 1 と、Z 軸方向に略 90 度に流路が曲折する第 2 曲折部 1 0 2 と、を少なくとも備えた曲折部を挙げて以下説明する。

【0117】

本実施形態では、このような第 1 曲折部 1 0 1、第 2 曲折部 1 0 2 を備えることで、流路 1 内に形成された層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の積層方向を変更することができる。

【0118】

例えば、図 2 0 に示すように、検出方向 D 1 に面する流路 1 の壁面 1 d₁ に対して垂直に積層された状態の層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を、第 1 曲折部 1 0 1 及び第 2 曲折部 1 0 2 を通流させることにより、検出方向 D 2 に面する流路 1 の壁面 1 d₂ に対して平行に積層された状態へ変更することができる。

【0119】

なお、第 1 曲折部 1 0 1 と第 2 曲折部 1 0 2 は、図 2 0 に示す形態に限定されず、例えば、図 2 1 に示すように、第 1 曲折部 1 0 1 は、流路 1 の深さ H 分程度の曲折であっても、その後第 2 曲折部 1 0 2 を通流させることにより、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を、壁面 1 d₂ に対して平行な積層状態とすることができる。

【0120】

流路 1 の流路幅、流路深さ、流路断面形状は、層流を形成し得る形態であれば特に限定されず、自由に設計することができる。例えば、流路幅 1 mm 以下のマイクロ流路 1 を、本発明に係る検出装置に用いることが可能である。特に、流路幅 10 μm 以上 1 mm 以下程度のマイクロ流路を用いれば、本発明に係る検出方法及び相互作用検出方法をより好適に行うことができる。

【0121】

流路 1 の第 1 曲折部 1 0 1 及び第 2 曲折部 1 0 2 の上流には、図 2 2 に示すように、サンプル流用流路 1 1 と該サンプル流用流路 1 1 の両側から合流するシース流路 1 2 を設け

10

20

30

40

50

ることにもできる。サンプル流用流路 1 1 とシース流用流路 1 2 を設けることにより、サンプル流用流路 1 1 から導入されるサンプル流 F 1 を、シース流用流路 1 2 から導入されるシース流 F 2 1、F 2 2 で両側から挟み込んだ状態の層流を簡単に形成することができる。

【0122】

また、流路 1 の第 1 曲折部 1 0 1 及び第 2 曲折部 1 0 2 の下流には、図 2 2 に示すように、流路 1 の両側から合流するシース流路 1 3 を設けることもできる。シース流用流路 1 3 を設けることにより、サンプル流 F 1 が流路 1 の中心部に収束された状態の層流を形成することができる。

【0123】

10

なお、図 2 2 に示す検出装置 2 の場合も、第 1 曲折部 1 0 1 と第 2 曲折部 1 0 2 は、図 2 2 に示す形態に限定されず、例えば、図 2 3 に示すように、第 1 曲折部 1 0 1 は、流路 1 の深さ H 分程度の曲折であっても、その後第 2 曲折部 1 0 2 を通流させることにより、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を、壁面 1 d₂ に対して平行な積層状態とすることができる。

【0124】

流路 1 は、図 2 0 から図 2 3 の形態に限定されず、自由に設計することができる。例えば、図 2 4 に示すように、2 次元又は 3 次元のプラスチックやガラス等の基板 T 上に形成した流路 1 を、本発明に係る検出装置に用いることも可能である。更に、図 2 5 に示すように、複数の流路 1 を合流させて用いることも可能である。

20

【0125】

なお、符号 1 1 1 は、サンプル流導入口を、符号 1 2 1 及び 1 3 1 は、シース流導入口をそれぞれ示す。シース流導入口 1 2 1、1 3 1 は、それぞれのシース流用流路 1 2、1 3 に、各 1 つずつ個別に設けているが、特にこの形態に限定されない。例えば、各シース流用流路 1 2、1 3 のシース流導入口 1 2 1 a、1 3 1 a と、シース流導入口 1 2 1 b、1 3 1 b（図 2 6（i）参照）とを、図 2 6（ii）、（iii）、（iv）に示すようにそれぞれ共通のシース流導入口 1 2 1、1 3 1 とすることで、基板 T 上のシース流導入口 1 2 1、1 3 1 の数を削減することができ、シース流導入の作業効率を上げることが可能となる。

【0126】

30

（2）第 1 検出部 3 1

第 1 検出部 3 1 では、流路 1 の第 1 曲折部 1 0 1 及び第 2 曲折部 1 0 2 の少なくとも上流において、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の層流幅及び流路 1 における位置を検出する。

【0127】

第 1 検出部では、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の層流幅及び流路 1 における位置が検出できれば、その検出方法は特に限定されず、公知の方法を自由に採用することができる。例えば、光学的方法、電気的方法、磁気的方法などを挙げることができ、特に、本発明においては、光学的方法が好適である。

【0128】

40

光学的方法としては、例えば、蛍光測定、散乱光測定、透過光測定、反射光測定、回折光測定、紫外分光測定、赤外分光測定、ラマン分光測定、FRET 測定、FISH 測定その他各種スペクトラム測定等の方法が挙げられる。また、電荷結合素子（CCD）や Complementary Metal Oxide Semiconductor（CMOS）などのエリア撮像素子を用いて検出を行えば、一画面全体の試料 C から発せられるイメージを光電変換することができる。

【0129】

光学的方法を採用する場合における光照射の種類は特に限定されないが、試料から蛍光や散乱光を確実に発生させるためには、光方向、波長、光強度が一定の光が望ましい。一例としては、レーザや LED（Light Emission Diode：発光ダイオード）を挙げることができる。

50

【 0 1 3 0 】

また、光学的方法を採用する場合における光照射方法は特に限定されないが、例えば、図 2 0 中符号 W 1 で示すように、照射スポットを流路幅方向に走査させながら光学的情報を検出してよい。

【 0 1 3 1 】

電気的方法としては、例えば、サンプル流 F 1 やシース流 F 2 1、F 2 2 に含有される試料 C 等の物質に関する抵抗値、容量値（キャパシタンス値）、インダクタンス値、インピーダンス、電極間の電界の変化値等の測定を行う方法が挙げられる。

【 0 1 3 2 】

磁気的方法としては、例えば、サンプル流 F 1 やシース流 F 2 1、F 2 2 に含有される試料 C 等の物質の表面に磁性体を修飾し、磁化、磁界変化、磁場変化等の測定を行う方法が挙げられる。

10

【 0 1 3 3 】

本発明に係る検出装置 2 に備える第 1 検出部 3 1 の個数は、特に限定されず、図 2 5 に示すように、流路 1 を複数設ける場合などには、第 1 検出部 3 1 も複数備えることも自由である。

【 0 1 3 4 】

なお、図 2 5 に示す実施形態の場合でも、1 つの第 1 検出部 3 1 を走査させることにより、複数の流路 1 内の層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の層流幅及び流路 1 における位置を検出することも可能である。

20

【 0 1 3 5 】

（ 2 ）第 2 検出部 3 2

第 2 検出部 3 2 では、流路 1 の第 1 曲折部 1 0 1 及び第 2 曲折部 1 0 2 の少なくとも下流において、試料 C から発せられる情報を検出する。なお、検出方法は、第 1 検出部 3 1 と同様に自由に選択することができる。

【 0 1 3 6 】

第 2 検出部 3 2 における検出条件は、第 1 検出部 3 1 で得た層流情報に基づいて、制御することが可能である。例えば、光照射スポットの位置、照射スポットの形状、光照射強度、パルス幅、パルス比率、焦点位置、光検出器の増幅率、光照射器の増幅率等を制御することができる。

30

【 0 1 3 7 】

本発明に係る検出装置 2 に備える第 2 検出部 3 2 の個数も、特に限定されず、複数備えることも自由である。例えば、図示しないが、流路 1 内での相互作用などの反応量の違いを、流路 1 の位置毎に検出したい場合など、流路 1 の通流方向に複数の第 2 検出部 3 2 を備えることもできる。

【 0 1 3 8 】

なお、この場合、1 つの第 2 検出部 3 2 を走査させることにより、流路 1 の位置毎に反応量の違いを検出することも可能である。

【 0 1 3 9 】

以上のように、本発明に係る検出装置 2 は、実際に試料 C を検出する第 2 検出部 3 2 とは別に、流路 1 内の層流情報を検出する第 1 検出部 3 1 を備えているため、試料 1 を流路 1 内に通流させた状態で、層流情報の検出を行い、この情報を第 2 検出部 3 2 による試料 C の検出条件制御に用いることができる。そのため、予め、試料 C に対応した参照スペクトルピーズや参照直径ピーズ等を流通させるような前準備工程を行う必要がなく、検出時間の短縮や検出精度の向上が実現できる。

40

【 0 1 4 0 】

また、本発明に係る検出装置 2 は、第 1 曲折部 1 0 1 と第 2 曲折部 1 0 2 とを備える流路 1 を備えているため、第 1 検出部 3 1 による層流情報検出後に、流路 1 内の層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）の積層方向を変更することができる。そのため、第 1 検出部 3 1 と第 2 検出部 3 2 からの検出を、同一方向から行うことが可能である。従

50

って、装置の小型化等を実現することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】本発明に係る検出方法のフロー図である。

【図2】本発明に係る検出方法に用いることができる流路1の斜視模式図である。

【図3】本発明に係る検出方法に用いることができる図2とは異なる流路1の斜視模式図である。

【図4】層流曲折工程(II)の前後の流路1内を比較する図であり、図4(A)は、検出方向Dから見た流路1を示す断面模式図であり、図4(ii)は、検出方向Dに対して側方から見た流路1を示す断面模式図であり、図4(i-1)、(ii-1)は、それぞれ層流曲折工程(II)を行う前の流路1を示す断面模式図であり、図4(i-2)、(ii-2)は、それぞれ層流曲折工程(II)を行った後の流路1を示す断面模式図である。

10

【図5】本発明に係る検出方法に用いることができる図2及び図3とは異なる流路1の斜視模式図である。

【図6】本発明に係る検出方法に用いることができる図2、図3及び図5とは異なる流路1の斜視模式図である。

【図7】本発明に係る検出方法に用いることができる図2、図3、図5及び図6とは異なる流路1の斜視模式図である。

【図8】本発明に係る検出方法に用いることができる図2、図3、図5から図7とは異なる流路1の斜視模式図である。

20

【図9】層流情報検出工程(IV)を経た後の層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図9(i)は、層流制御工程(V)を行う前を、図9(ii)は、層流制御工程(V)を行った後を示す断面模式図である。

【図10】層流情報検出工程(IV)を経た後の図9とは異なる層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図10(i)は、層流制御工程(V)を行う前を、図10(ii)は、層流制御工程(V)を行った後を示す断面模式図である。

【図11】層流情報検出工程(IV)を経た後の図9、及び図10とは異なる層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図11(i)は、層流制御工程(V)を行う前を、図11(ii)は、層流制御工程(V)を行った後を示す断面模式図である。

30

【図12】層流情報検出工程(IV)を経た後の図9から図11とは異なる層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図12(i)は、層流制御工程(V)を行う前を、図12(ii)は、層流制御工程(V)を行った後を示す断面模式図である。

【図13】層流情報検出工程(IV)を経た後の層流(サンプル流F1、シース流F21、F22)を積層状態の側方から見た断面模式図であり、図13(i)は、検出条件制御工程(VI)を行う前を、図13(ii)は、検出条件制御工程(VI)を行った後を示す断面模式図である。

【図14】本発明に係る検出方法に用いることができる図2、図3、図5から図8とは異なる流路1の斜視模式図である。

40

【図15】本発明に係る検出方法に用いることができる図2、図3、図5から図8、及び図14とは異なる流路1の斜視模式図である。

【図16】図16(i)は、本発明に係る検出方法に用いることができる基板T上に形成した流路1の上方視平面模式図であり、図16(ii)は、図16(i)中符号R1で示す破線円部分の流路1の断面模式図である。

【図17】図17(i)は、図16(i)中符号R2で示す破線円部分の流路1を、検出方向D2から見た断面模式図であり、図17(ii)は、図16(i)中符号R2で示す破線円部分の流路1を、通流方向から見た断面模式図である。

【図18】本発明に係る相互作用検出方法を行う際の流路1内の様子を説明するための図

50

であり、層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を積層状態の側方から見た断面模式図である。

【図 1 9】本発明に係る相互作用検出方法を行う際の流路 1 内の様子を説明するための図であり、図 1 8 とは異なる層流（サンプル流 F 1、シース流 F 2 1、F 2 2）を積層状態の側方から見た断面模式図である。

【図 2 0】本発明に係る検出装置 2 の一実施形態に係る概念を示す斜視模式図である。

【図 2 1】本発明に係る検出装置 2 の図 2 0 とは異なる実施形態に係る概念を示す斜視模式図である。

【図 2 2】本発明に係る検出装置 2 の図 2 0 及び図 2 1 とは異なる実施形態に係る概念を示す斜視模式図である。

10

【図 2 3】本発明に係る検出装置 2 の図 2 0 から図 2 2 とは異なる実施形態に係る概念を示す斜視模式図である。

【図 2 4】本発明に係る検出装置 2 の図 2 0 及び図 2 2 とは異なる実施形態に係る概念を示す斜視模式図である。

【図 2 5】本発明に係る検出装置 2 の図 2 0 から図 2 4 とは異なる実施形態に係る概念を示す斜視模式図である。

【図 2 6】本発明に係る検出装置 2 に用いることが可能な流路 1 の構成例を示す上方視平面模式図である。

【符号の説明】

【0 1 4 2】

20

1 流路

D 1、D 2 検出方向

F 1 サンプル流

F 2 1、F 2 2、F 2 3、F 2 4 シース流

1 d₁、1 d₂ 流路壁

1 1 サンプル流用流路

1 2、1 3 シース流用流路

C 試料

f 1 サンプル流幅

f 2 1、f 2 2 シース流幅

30

T 基板

1 1 1 サンプル流導入口

1 2 1、1 3 1 シース流導入口

A 物質 A

B 物質 B

2 検出装置

1 0 1 第 1 曲折部

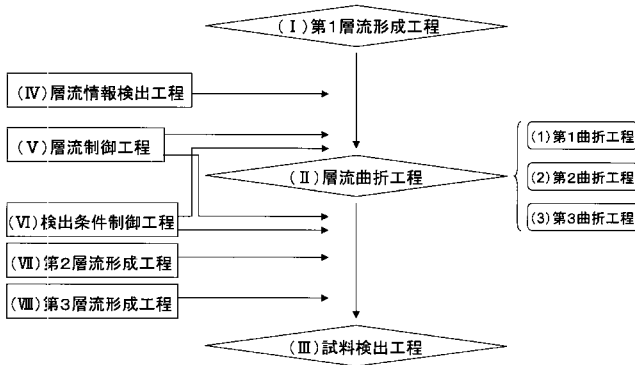
1 0 2 第 2 曲折部

3 1 第 1 検出部

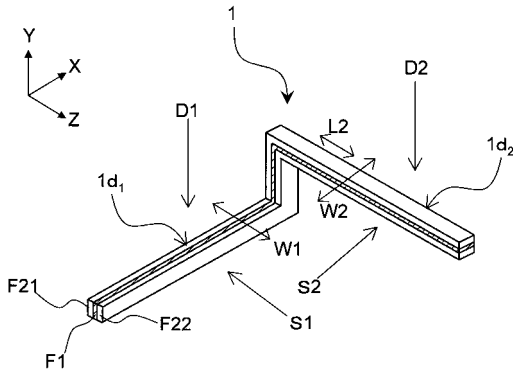
3 2 第 2 検出部

40

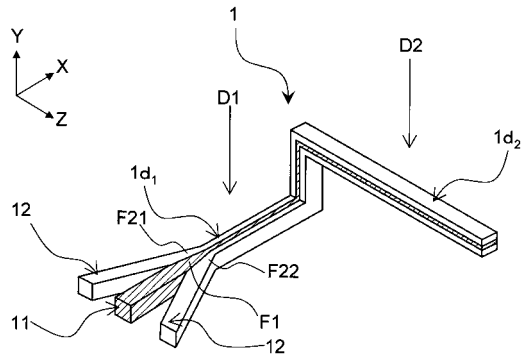
【図 1】



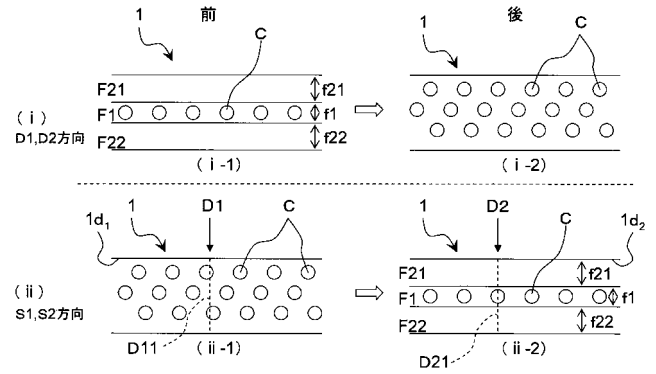
【図 2】



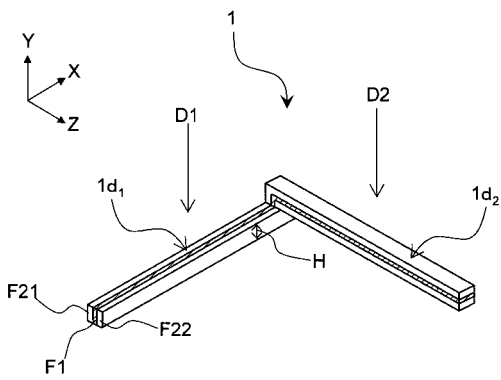
【図 3】



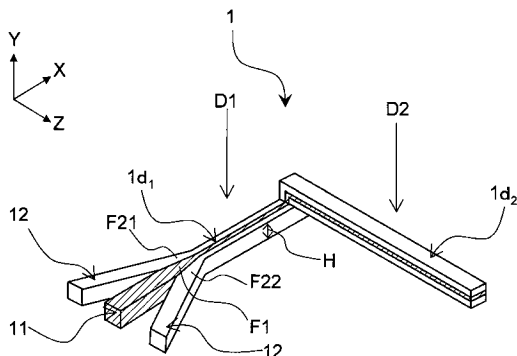
【図 4】



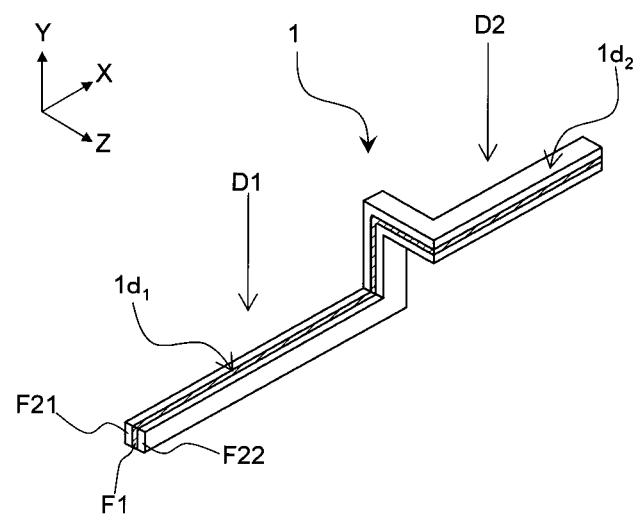
【図 5】



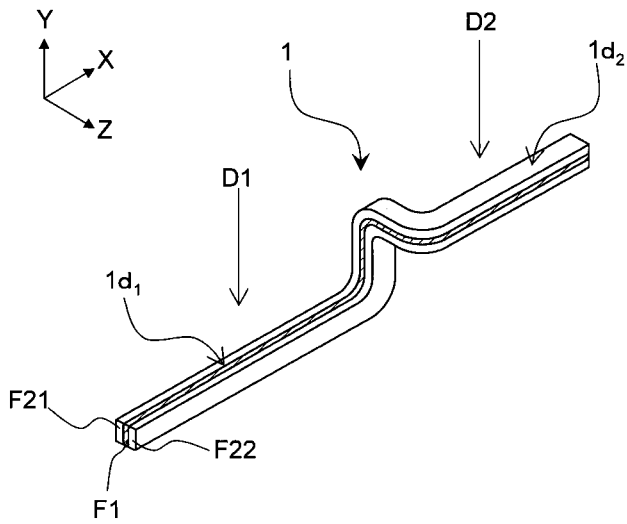
【図 6】



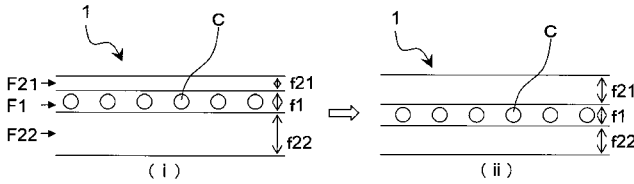
【図 7】



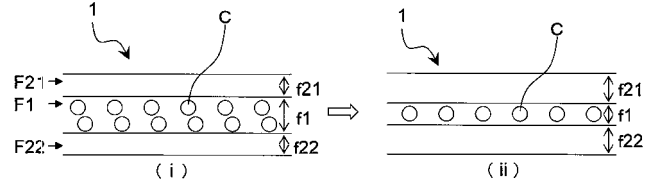
【図 8】



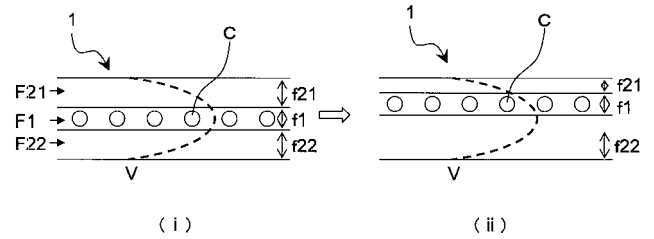
【図 9】



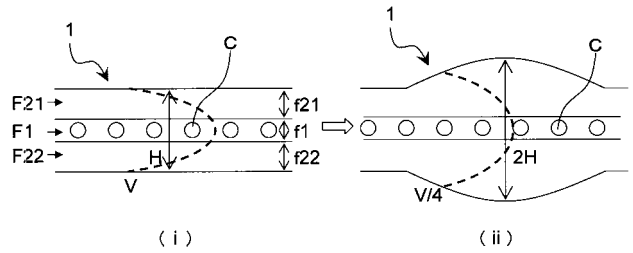
【図 10】



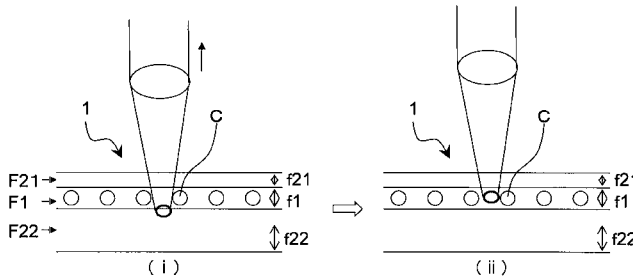
【図 11】



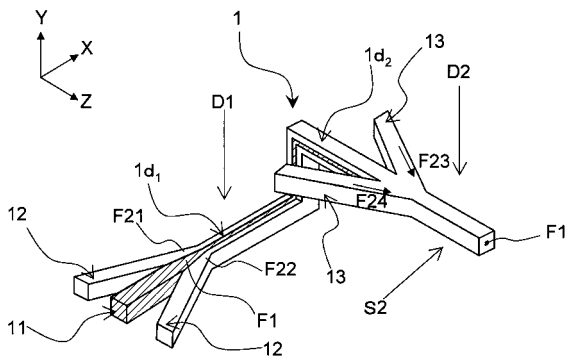
【図 12】



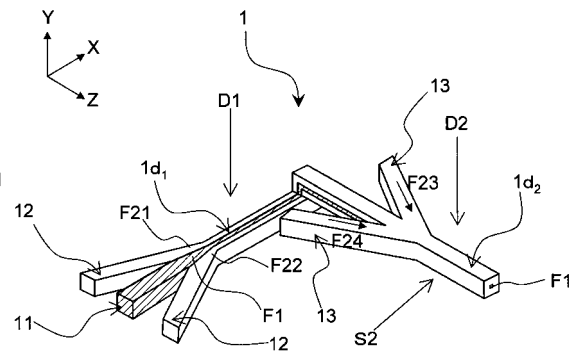
【図 13】



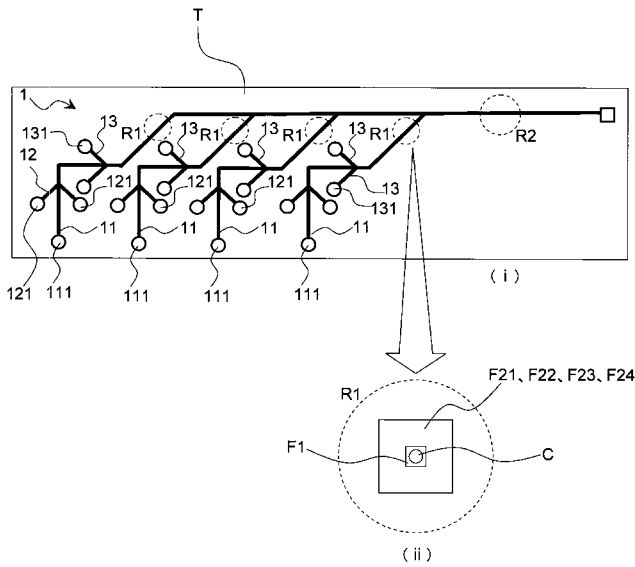
【図 14】



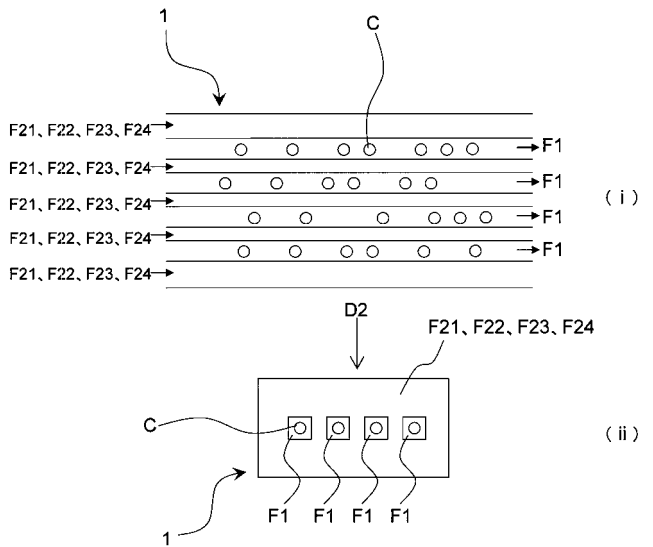
【図 15】



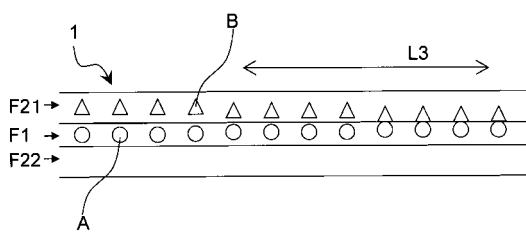
【図 16】



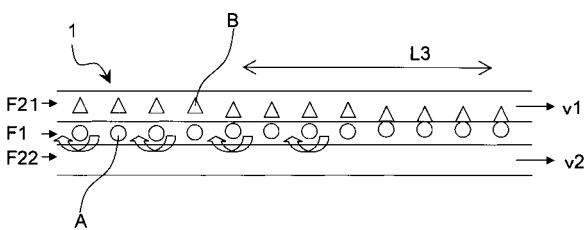
【図 17】



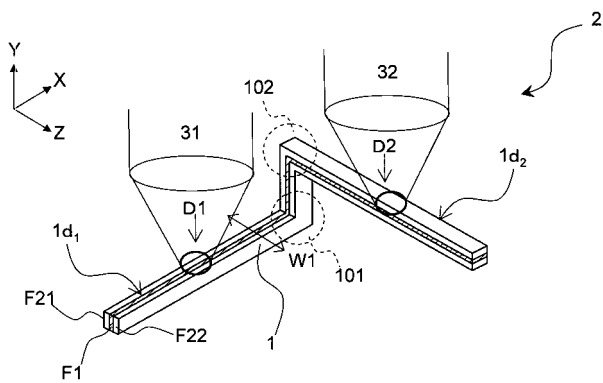
【図 18】



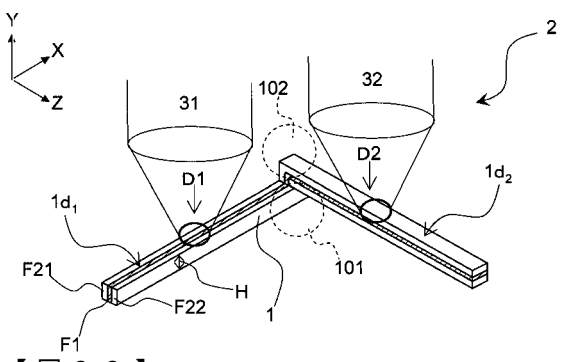
【図 19】



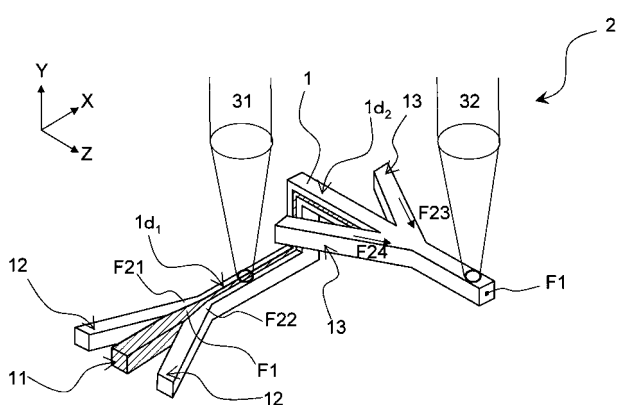
【図 20】



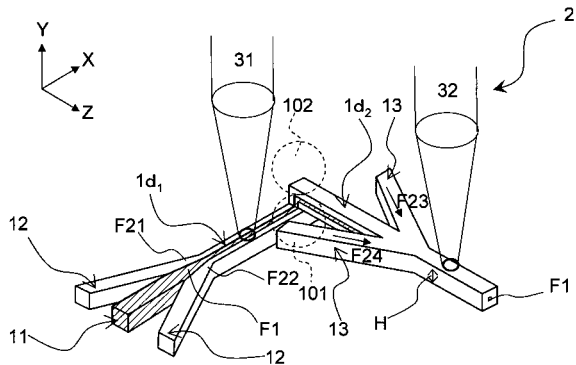
【図 21】



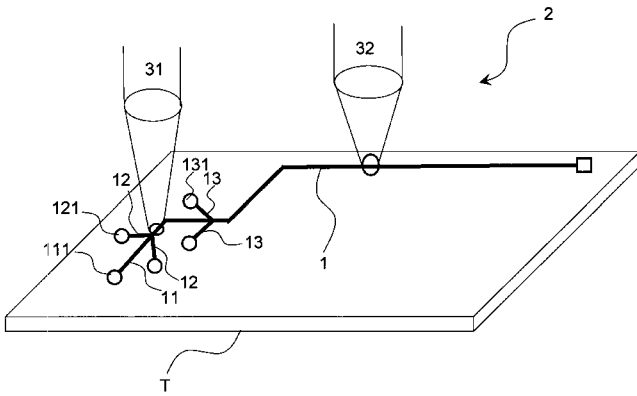
【図 22】



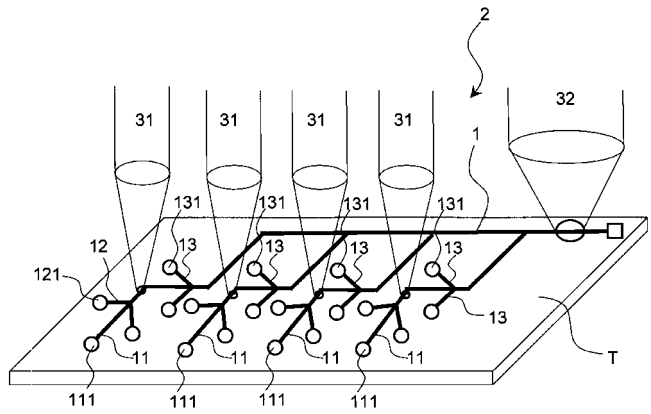
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】

