(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102539484 B
(45)授权公告日 2015.09.09

(21)申请号 201110324803.9
(22)申请日 2011.10.21
(30)优先权数据
2010-243765 2010.10.29 JP
(73)专利权人 索尼公司
地址 日本东京
(72)发明人 大森真二 佐藤一雅 胜本洋一
梅津友行 林义人
(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
代理人 余刚 吴孟秋
(51)Int.Cl.
G01N 27/02(2006.01)
B07C 5/344(2006.01)
(56)对比文件
US 2003178310 A1,2003.09.25,
CN 1346053 A,2002.04.24,
CN 1644250 A,2005.07.27,
JP 2010181399 A,2010.08.19,
审查员 黄俞

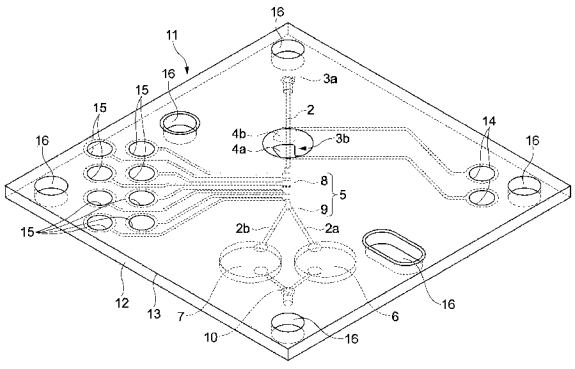
权利要求书1页 说明书15页 附图15页

(54)发明名称

介电细胞仪装置和介电细胞仪的细胞分选方法

(57)摘要

本文提供了一种能够在不采用光学分析法情况下分析和分选细胞的介电细胞仪装置和用于所述装置的介电细胞仪的细胞分选方法。在用作介电细胞仪装置的一部分的微流道装置的细胞注入部上形成允许单个细胞流动的狭窄道。在狭窄道上形成一对测量电极，并且连接至测量电极的分析器测量通过狭窄道的每个细胞的复介电常数。设置在狭窄道下游侧的电场施加部根据关于测出的复介电常数的信息施加电场以改变流道内细胞的流动，从而可通过利用支道分选细胞。



CN 102539484 B

1. 一种介电细胞仪装置，包括：

流道，所述流道包括单个细胞能够流过的狭窄道和设置在所述狭窄道下游侧的支道，所述支道作为用于对包含在流过所述流道的流体中的细胞进行分选的支道；

第一电极对，所述第一电极对能够在所述狭窄道上产生交流电场；

分析单元，被配置为通过向所述第一电极对施加交流电压而在所述狭窄道上产生所述交流电场，以对流过所述狭窄道的各个所述细胞，测量取决于所述细胞的复介电常数；

第二电极对，所述第二电极对能够在处于所述狭窄道的下游侧且所述支道的上游侧的流道部分上产生电场，其中，所述第二电极对中的一个电极被构造为具有沿朝向所述第二电极对中的另一个电极的方向突出的多个电极指；以及

细胞分选单元，被配置为基于由所述分析单元测出的所述复介电常数，通过驱动所述第二电极对产生所述电场来向所述细胞施加介电泳力，以通过利用所述支道来分选所述细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的介电细胞仪装置，其中，所述分析单元产生叠加了具有多个频率的交流电压的叠加电压信号作为施加到所述第一电极对上的所述交流电压的信号，并且对所述单个细胞通过所述狭窄道时测出的电压和电流的信号进行傅里叶变换，以针对所述多个频率中的每个频率计算所述复介电常数。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的介电细胞仪装置，其中：

所述分析单元预先存储用作针对每个所述细胞测出的所述复介电常数的基准的基准信息；以及

所述细胞分选单元实时地将由所述分析单元测出的所述复介电常数和所述基准信息进行对照并且根据指示所述复介电常数是否在所述基准信息的范围内的信息来产生所述电场。

4. 一种介电细胞仪的细胞分选方法，包括：

使包括细胞的流体流过具有狭窄道和支道的流道；

通过第一电极对在所述狭窄道上产生交流电场；

对通过所述狭窄道的每个所述细胞，测量取决于所述细胞的复介电常数；以及

根据测出的所述复介电常数，通过第二电极对在处于所述狭窄道的下游侧且所述支道的上游侧的流道部分上产生电场来将介电泳力施加至所述细胞，以通过利用所述支道分选所述细胞，其中，所述第二电极对中的一个电极被构造为具有沿朝向所述第二电极对中的另一个电极的方向突出的多个电极指。

介电细胞仪装置和介电细胞仪的细胞分选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于分析和分选细胞的介电细胞仪装置以及介电细胞仪的细胞分选方法。

背景技术

[0002] 在生命科学和医学研究领域或在诸如临床实践的医疗护理领域中，采用被称为流式细胞术的分析方法。在该流式细胞术中，采用由彼此游离的细胞组成的流体作为样本。在细胞间的平均距离充分大于细胞尺寸的稀释条件下，用作样本的流体被驱动为流过流道管的内部。安装在流道管内的信号检测部对流过信号检测部的各个细胞进行特定的分析 / 测量。测出的信号彼此相近的细胞被视为相同类型的细胞。因此，对关于包含在样本流体中的大量细胞测出的信号进行分析，以识别包含在用作样本的细胞集团中的细胞的类型，并且计算表示包含在该细胞类型中的细胞数目的该细胞类型的细胞数量。除了计算包含在细胞类型中的细胞数目，还能够计算该细胞类型的细胞数目与细胞总数的比。在流式细胞术中采用的分析方法分为两大类，即，光学分析法和电学分析法。

[0003] 对于光学分析法，采用仅荧光检测法和光散射检测法的结合。下面将说明荧光检测法的原理。

[0004] 在细胞的表面上，存在均被称为表面抗原的蛋白分子。表面抗原绝不仅限于一种类型。因此，通过识别表面抗原的类型和包括在该类型抗原中的表面抗原的数目，能够识别细胞所属的细胞类型。如果表面抗原分子是已知的，则能够将可特异结合至表面抗原分子的分子合成。可特异地结合至表面抗原分子的分子被称为表面抗原的抗体分子。此外，还能够将荧光标识分子化学结合至抗体分子。荧光标识分子是一种如果具有特定波长带内的波长的光照射至分子时产生荧光的分子。也就是说，产生具有不同波长的荧光束的荧光标识抗体均与用于表征被假定为包含在用作分析对象的细胞集团中的细胞类型的表面抗原分子合成。采用所有这些荧光标识抗体的混合物作为标识检测试剂。如果将这种标识检测试剂添加到流体溶液，则该标识检测试剂中的每种细胞标记有荧光分子，其中荧光分子在细胞所属的细胞类型间是不同的。

[0005] 在安装在还称为流式细胞仪的流式细胞仪装置中的流道管中的信号检测部中，激光照射到正在通过信号检测部的细胞上。当激光照射到这种细胞时，各个细胞的表面抗原分子和结合至抗体分子（特异结合至表面抗原分子）的荧光标识分子被激发，产生荧光标识分子特有的波长的荧光。对于大量细胞，检测荧光以计算每种细胞类型的细胞数目。这种方法被广泛采用。事实上，所谓的流式细胞仪要指的实质上就是这种方法。

[0006] 市场上的流式细胞仪不仅用于得到表面抗原分子的存在状态而且还得到诸如细胞大小和细胞的内部密度的其它信息。因此，流式细胞仪同时用于测量被细胞散射的激光的强度。

[0007] 电学方法已经投入实践应用的是库尔特 (Coulter) 计数器的方法。对于关于该库尔特计数器的更多信息，建议读者参阅例如美国专利 No. 2656508 的文献。在库尔特计数器

中，在流道管内的信号检测部上设置一对电极。在电极间施加电压。当单个细胞通过电极之间的空间时，空间的电阻改变。测量电阻改变的频率以计算通过信号检测部的细胞数目。此外，电阻的改变量与细胞的体积近似成正比。因此，如果用作分析对象的细胞集团包括具有彼此差异很大尺寸的不同类型的细胞，那么可对各个细胞类型进行细胞数目的计数操作。

[0008] 对于库尔特计数器的改进技术，已经提出了将具有几十 MHz 频率的 AC（交流）电压叠加在施加于电极间的 DC（直流）电压的技术。对于关于该改进技术的更多信息，建议读者参阅例如美国专利 No. 3502974 和 No. 6204668 的文献。已经公知的是，几十 MHz 频率下细胞的 AC 电阻和细胞的内部密度之间的相互关系。通过获得关于 AC 电阻和 DC 电阻每一个的测量数据，相比于现有技术可进行详细的分析。

[0009] 基于仅仅 DC 电阻或 DC 电阻和 AC 电阻的结合的电学分析法用在将电学分析法和光学分析法结合的一些流式细胞仪中。此外，在临床检查领域中，使用自动血细胞计数装置来对特别是红血球数、白血球数和血小板数进行计数。通常，自动血细胞计数装置不同于流式细胞仪。然而，从自动血细胞计数装置的工作原理的角度看，自动血细胞计数装置可以说是更宽泛意义上的流式细胞仪。在本说明书中，在不对自动血细胞计数装置和流式细胞仪进行彼此区分的条件下，技术术语“流式细胞仪”用于表示流式细胞仪和作为更宽泛意义上的流式细胞仪的自动血细胞计数装置两者。

[0010] 如上所述，在该技术的现状中，采用电学分析法的流式细胞仪也通过采用光学分析法来实现。

[0011] 接下来，将说明流式细胞仪采用的细胞分选技术。

[0012] 用途不仅包括对包含在流体溶液中的细胞进行分析，而且通过利用分析的结果还能够将仅仅是特定细胞类型中所含的细胞从其它细胞分选出。例如，存在由于血癌导致而存在细胞类型出现在末梢血中的情形。在这种情形下，仅分选这种细胞并且对这种细胞进行基因分析和蛋白分析。通过进行这些分析，完全能够得到引起血癌疾病的病因的线索的可能性范围。例如，该线索可指出血癌疾病是由基因异常等引起的。作为另一示例，尝试从人类细胞诱导 iPS 细胞，不是人类的每个细胞都能够被诱导成 iPS 细胞。因此需要从培养的细胞中仅分选 iPS 细胞。

[0013] 在这些情形下，需要设置用于根据由设置在信号检测部上游侧的流道管中的信号检测部产生的信号仅分选特定细胞的机构。这种机构被称为分选器。分选器设置在已投入市场的流式细胞仪中的上层机型中。

[0014] 如果由荧光流式细胞仪分选的细胞用于研究目的，那么出现了一大的问题。在这种情形下，荧光流式细胞仪是基于在光学分析法中选择的荧光检测法的流式细胞仪。大的问题在于，严格地讲，用作控制对象的细胞的原始状态与荧光标识细胞的状态是不同的。如果抗体分子结合至表面抗原分子，则将化学刺激物加入到细胞内，会使得极可能地发生多阶段信号传输反应。然而，这种小变化的影响可视为小影响，以使用该细胞正常地用于研究目的。

[0015] 应当注意，作为与本发明有关的技术，已经提出用于测量每个细胞的介电谱并根据测量的结果分选细胞的技术。对于关于该技术的更多信息，建议读者参阅例如日本专利公开 No. 2010-181399 的文献。此外，建议读者参阅例如 JP-T-2003-507739 的文献。

发明内容

[0016] 在再生医疗领域和细胞医疗领域中，在对从患者的血液中分选的细胞进行一些生化处理后，得到的细胞系统可为了治疗目的而再植入患者的体内。生化处理的典型示例是培养处理、活性化处理和分化诱导处理。然而，不能确保将荧光标识抗体分子已再结合至表面抗原分子的细胞的再植入或从这种细胞得到的细胞系统的再植入患者体内的操作的安全性。因此期望提供一种能够通过将细胞的本来存活状态保持原样而不标识细胞来分析细胞和分选细胞的技术。

[0017] 电学分析法不需要标识物质。因此，通过在分选装置中采用电学分析法，细胞分选装置可用于再生医疗和细胞医疗的目的。然而，在现有的库尔特计数器中，仅能够根据仅仅 DC 电阻或 DC 电阻与 AC 电阻的结合得到有限的测量数据。因此，将库尔特计数器表现的能力作为分选不同细胞类型的能力是不足的。事实上，不存在仅采用电学分析法而不采用光学分析法的细胞分选器。

[0018] 在本领域的这些情形下，希望提供一种在不采用光学分析法就能够分析和分选细胞的介电细胞仪装置和该介电细胞仪装置所采用的介电细胞仪的细胞分选方法。

[0019] 为了实现上述的期望目标，根据本发明的实施方式，提供了一种介电细胞仪装置，其采用流道、第一电极对、分析单元、第二电极对和细胞分选单元。

[0020] 流道包括单个细胞能够流过的狭窄道和设置在狭窄道下游侧的支道，所述支道作为用于对包含在流过流道的流体中的细胞进行分选的支道。

[0021] 施加有 AC 电压的第一电极对能够在狭窄道上产生 AC 电场。

[0022] 通过由施加至第一电极对的 AC 电压在狭窄道上产生的 AC 电场，分析单元能够对流过狭窄道的各个细胞测量取决于细胞的复介电常数。

[0023] 施加有电压的第二电极对能够在处于狭窄道的下游侧且支道的上游侧的流道部分上产生电场。

[0024] 通过由施加至第二电极对的电压在流道部分上产生的电场，细胞分选单元基于由分析单元测出的复介电常数，能够向细胞提供介电泳力并通过利用支道分选细胞。

[0025] 如上所述，对于通过流道的狭窄道的每个细胞，分析单元测量取决于细胞的复介电常数，细胞分选单元根据基于复介电常数的信号，通过利用由形成于狭窄道下游侧的电场产生的介电泳力分选细胞。也就是说，介电细胞仪装置能够在不采用光学分析法的条件下电学分析（或测量）细胞和电学分选细胞。

[0026] 此外，能够提供一种构造，其中作为施加到第一电极对的 AC 电压的信号，分析单元产生包括具有多个频率的叠加 AC 电压的叠加电压信号并且对单个细胞通过狭窄道时测出的电压和电流的信号进行傅里叶变换，以计算每一频率下的复介电常数。在本发明中，将包括具有多个频率（即，多点频率）的叠加 AC 电压的叠加电压信号施加到第一电极对并且进行傅里叶变换，以得到每个细胞的频谱分布。

[0027] 此外，能够提供一种构造，其中分析单元预先存储用作针对每个细胞测出的复介电常数的基准的基准信息。在该构造中，细胞分选单元实时地将由分析单元测出的复介电常数和基准信息进行对照并且根据指示复介电常数是否在基准信息的范围内的信息来产生电场。通过预先存储基准信息，在存储基准信息之后，能够根据测出的复介电常数向细胞

分选单元提供用作用于通过开环（前馈环）控制的执行来分选细胞的信号的信号。

[0028] 根据本发明另一实施方式的介电细胞仪的细胞分选方法包括使含有细胞的流体流过包括狭窄道和支道的流道的步骤。

[0029] 在狭窄道上产生 AC 电场。

[0030] 对通过狭窄道的每个细胞，测量取决于细胞的复介电常数。

[0031] 根据测出的复介电常数，在处于狭窄道的下游侧且支道的上游侧的流道部分上产生电场，以将介电泳力施加至细胞，从而通过利用支道分选细胞。

[0032] 如上所述，对通过狭窄道的每个细胞，测量复介电常数，并且根据测出的复介电常数，由处于狭窄道的下游侧且支道的上游侧的流道部分上所产生的电场产生介电泳力并将该介电泳力施加至细胞，从而通过利用支道分选细胞。也就是说，能够在不采用光学分析法的条件下进行电学分析（或测量）和电学分选细胞的处理。

[0033] 根据本发明的实施方式，能够在不采用光学分析法的条件下进行电学分析（或测量）和电学分选细胞的处理。

附图说明

[0034] 图 1 是表示复介电常数的分布的形式的曲线图。

[0035] 图 2 是示出根据本发明一个模型的介电谱细胞仪装置的整体构造的框图。

[0036] 图 3 是示出了包含在图 2 中所示的介电谱细胞仪装置中的流道系统的构造的框图。

[0037] 图 4 是示出了微流道装置的构造的框图。

[0038] 图 5 是示出了用于执行用于测量复电阻的 IV 方法的电路的示图。

[0039] 图 6 是示出了用于实现测量单个细胞的复电阻的测量电路的实施方式的示图。

[0040] 图 7 示出了描绘频率特性的多个示图；图 7 中上侧的曲线图表示由介电谱细胞仪装置进行测量的结果，而图 7 中下侧所示的曲线图表示 K562 和 Jurkat 细胞的复介电常数的分布。

[0041] 图 8 是示出了通过使单个细胞的复介电常数分布符合 (adaption) 弛豫函数所得到的介电变量的一组柱状图；也就是说，图 8 是示出了 ΔC 表示弛豫幅度和发生弛豫的临界频率 fc 的一组柱状图。

[0042] 图 9 是示出了细胞分选系统的构成的框图。

[0043] 图 10 是示出了根据本发明实施方式的介电谱细胞仪装置的模型的示图。

[0044] 图 11 是示出了包括在图 10 中所示的介电谱细胞仪装置中的微流道装置的透视图。

[0045] 图 12 是示出了图 11 中所示的微流道装置中所采用的细胞分选部的构造的顶视图。

[0046] 图 13 是示出了沿图 12 中所示的细胞分选部的构造的线 A-A 截取的截面图。

[0047] 图 14 是示出了向电场施加部施加电场以改变细胞流动方向的状态的示图。

[0048] 图 15 是示出了根据另一实施方式的细胞分选部的构造的示图。

[0049] 图 16 是示出了用于对流过流道系统内部的流体进行压力控制的压力控制装置的示图。

[0050] 图 17 是示出了微流道装置中所采用的注入部的周边区域的截面的模式的示图。

具体实施方式

[0051] 首先，将以以下的顺序说明本发明：

[0052] [1] 细胞的复介电常数的分布的说明

[0053] [2] 介电谱细胞仪装置和通过利用该装置基于多点频率进行分析的概念或原理的说明

[0054] [3] 介电谱细胞仪装置的具体实施方式的说明

[0055] [1] 细胞的复介电常数的分布的说明

[0056] 将含有细胞的悬浮液注入到形状类似由一对彼此相对的电极板构成的平行平板电容器的测量容器中。在电极板之间施加 AC 电压并且测量由于 AC 电压的施加导致流动的电流以得到电极板之间的复电阻（或复阻抗）。如果 AC 电压的频率变化，则测出的复电阻也变化。可利用已投放市场的精确阻抗分析器测量复电阻。

[0057] 通过校正诸如与测量容器的形状有关的因素和与将复电阻测量装置连接至测量容器的电线的传输特性有关的因素的一些因素，可将以此方式得到的作为与频率有关的复电阻的复电阻转换成含有细胞的悬浮液的复介电常数。对于关于这种转换的更多信息，建议读者参阅 Tetsuya Hanai 授权由 Yoshioka Bookstore 公布的题为“Heterogeneous Structures and Dielectric Constants（非均质构造和介电常数）”的公开论文。将与频率有关的复电阻的特性称为复电阻的分布或介电常数谱。图 1 是表示复介电常数的分布的形式的曲线图。

[0058] 对于不高于约 0.1MHz 的范围内的频率，细胞悬浮液的复介电常数的弛豫的实部具有与频率无关的近似恒定值。随着频率增加，在约 1MHz 的频率区域中该实部显著减小（所谓的介电弛豫现象）。如果频率进一步增加，实部具有完全恒定但较小的值。另一方面，复介电常数的弛豫的虚部在发生介电弛豫现象的频率区域中具有含有峰值的频率特性。

[0059] 众所周知的，悬浮液的复介电常数的分布可由单个弛豫函数（例如 Cole-Cole 函数）表达或由多个弛豫函数的叠加表达。对于以实验方式得到的复介电常数的分布，通过执行非线性拟合而将弛豫函数的待定系数对待为变量，可将所述变量最优化。例如，在 Cole-Cole 函数的情形下，表征分布曲线的变量包括弛豫强度和弛豫频率。这些介电变量与细胞的构造和物性密切相关。日本专利公开 No.2009-42141 披露了用于从复介电常数推算构成细胞的方面（facet）的电气物性值的方法。在这种情形下，构成细胞的方面尤其表示细胞膜和细胞质。

[0060] [2] 介电谱细胞仪装置和通过利用该装置基于多点频率进行分析的概念或原理的说明

[0061] [介电谱细胞仪装置的整体构成]

[0062] 图 2 是示出了作为根据本发明的介电细胞仪装置的实施方式的介电谱细胞仪装置 300 的整体构造的框图。

[0063] 概念上，介电谱细胞仪装置 300 被构造成具有三个阶层。首先，最上方的阶层是用户界面 301。用户界面 301 设置于用户和介电谱细胞仪装置 300 的主体之间。用户界面 301 起将由用户输入的信息接收到介电谱细胞仪装置 300 并且向用户显示由介电谱细胞仪

装置 300 产生的测量结果的作用。由用户输入的信息的典型示例是测量条件。通过计算机终端和计算机中执行的程序物理上实现用户界面 301。

[0064] 在用户界面 301 下方，设置硬件控制系统 302 和软件控制系统 303。

[0065] 硬件控制系统 302 是用于控制介电谱细胞仪装置 300 的构成要素并进行测量和记录测量数据的硬件。硬件控制系统 302 还包括用于控制介电谱细胞仪装置 300 的构成要素、进行测量和记录测量数据要执行的程序。更具体地，硬件控制系统 302 是用于控制流道系统 304、细胞分选系统 305、分选信号发生器 306 和分析器 307 的硬件。流道系统 304 的主要目的是将用作样本的细胞导入信号检测部。分析器 307 是用于测量由导入的细胞所引起的信号的分析器。概念上，分析器 307 包括稍后将描述的复分析器 AN。分选信号发生器 306 是用于产生分选细胞所使用的信号的发生器，而细胞分选机构 305 是用于根据由分选信号发生器 306 产生的信号分选细胞的机构。

[0066] 另一方面，软件控制系统 303 具有分析软件 308 和数据管理系统 309。数据管理系统 309 是用于管理和保存从分析器 307 接收到的所记录的测量数据的系统。数据管理系统 309 包括数据管理程序和数据服务器。分析软件 308 是用于从测量数据提取有意义的信息的软件。

[0067] 硬件控制系统 302、软件控制系统 303 和分析器 307 彼此协作而具有分析单元的功能。此外，硬件控制系统 302 和分选信号发生器 306 彼此习作而具有细胞分选单元的功能。

[0068] [流道系统]

[0069] 图 3 是示出了包含在图 2 中所示的介电谱细胞仪装置 300 中的流道系统 304 的构造的框图。

[0070] 如图 3 所示，流道系统 304 具有用于检测信号的微流道装置 MF 和称为流体控制机构 V1、V2 和 V3 的其它部分。由于流体控制机构 V1、V2 和 V3 的作用而将流体溶液从外部源导入微流道装置 MF，并且在通过信号检测部测量复电阻后将流体溶液排出回外部源。用作样本，流体溶液是含有细胞的流体。应当注意，概念上，流体溶液包括分散液或悬浮液。在以下描述中所使用的技术术语“流体溶液”概念上包括分散液或悬浮液。

[0071] 构成各流体控制机构 V1、V2 和 V3 的要素典型地包括容器（或罐）、压缩空气供给器（或压缩机）、泵、阀门和管。容器（或罐）是用于贮存分散液和 / 或清洗液的元件，而压缩空气供给器（或压缩机）是用于压送流体溶液的元件。泵是用于将样本流体溶液吸入并且将样本流体溶液导入微流道装置 MF 的元件。阀门是用于控制流体溶液的流动的元件，而管是用于使元件彼此连接的元件。

[0072] 流道系统 304 的目的是将样本顺利地导入微流道装置 MF。然而，构成流道系统 304 的要素绝不仅限于上述的元件。也就是说，其它的元件可用于构造流道系统 304，只要其它的元件能够实现流道系统 304 的目的即可。将细胞流体溶液注入设置在介电谱细胞仪装置 300 内部的样本罐 ST 内。

[0073] 当开始测量时，首先调整用于接纳样本的流道管。流体溶液罐 T1、T2 和 T3 通常包括纯水、PBS 缓冲液或诸如 SDS 流体溶液的清洗液。罐的数目和溶液的类型绝不限于这些示例。溶剂送液机构 P1 输送液体以适当地驱动流体控制机构 V1 和 V3。因此，对包括安装在存放冶金装置 FH 上的微流道装置 MF 的流道管进行清洗，然后使用 PBS 缓冲液填充。

[0074] 接着，自动样本分选机构 AS 从样本罐 ST 吸取合适量的样本。将样本抽入称作所

谓的样本环管的样本收集器 SL。样本收集器 SL 不是特别设置的元件，而实际上是流道管的一部分。样本送液机构 P2 将样本收集器 SL 中的样本输送到微流道装置 MF。通过适当地操作流体控制机构 V1 和 V3，样本能够流过微流道装置 MF 并且排出至废液处理装置 D。

[0075] 在测量结束后，根据与样本注入前对流道管执行的调整相同的调整的流体控制步骤清洗管。

[0076] 图 4 是示出了微流道装置 MF 的构造的框图。

[0077] 微流道装置 MF 流体地连接至外部流道管并且电气地连接至外部复电阻分析器。复电阻分析器可以是图 2 中所示的介电谱细胞仪装置 300 中所采用的分析器 307 的一部分或整个。如上所述，微流道装置 MF 安装在用于执行微流道装置 MF 和外部流道管之间以及在微流道装置 MF 和外部复电阻分析器之间的连接的存放冶金装置 FH 中。

[0078] 本实施方式中所使用的微流道装置 MF 的合适构造和用于制造微流道装置 MF 的合适方法分别在日本专利公开 No. 2010-181399 和日本专利公开 No. 2008-279382 中记载。在尺寸均充分大于细胞的尺寸的各流道 FC1 和 FC2 中，形成一对电极 EL1 和 EL2。在成对电极 EL1 和 EL2 之间，设置具有与细胞的尺寸约相同量级的尺寸的元件 NC。元件 NC 是前面所述的狭窄道。由于狭窄道 NC 的电阻与流道 FC1 和 FC2 的电阻相比非常大，所以在成对的电极 EL1 和 EL2 之间的施加的电压的大部分实际上仅施加至狭窄道 NC。因此，尽管成对的电极 EL1 和 EL2 彼此空间分离，但狭窄道 NC 具有前面提到的信号检测部的功能。在日本专利公开 No. 2010-181399 中记载了该原理的详细内容。稍后也将说明该原理。

[0079] 流道 FC1 通过合适的接合部 J2 连接至形成于存储金相装置 FH 中的流道管。采用相同方式，流道 FC2 通过合适的接合部 J3 连接至形成于存储金相装置 FH 中的流道管。合适的接合部 J2 和 J3 的典型示例是 O 型环。通过合适的接合部 J1 和 J4 将存储金相装置 FH 连接至外部管。合适的接合部 J1 和 J4 的典型示例是液相色谱法的管接合部件。此外，成对的电极 EL1 和 EL2 分别通过抽出线 L1 和 L2 连接至微流道装置 MF 的外部。成对的电极 EL1 和 EL2 通过合适的连接部件还连接至复电阻分析器。

[0080] [测量系统 (分析器)]

[0081] 用于测量复电阻的基本电路是广泛公知的。图 5 是示出了用于执行用于测量复电阻的 IV 方法的电路的示图。

[0082] 图中所示的电路中所采用的振荡器 OSC 是用于产生具有正弦波形的电压的部分。施加至样本的电压由电压测量电路 V1 测量。由于不能直接测量流过样本的电流 I，所以电压测量电路 V2 用于测量出现在具有已知低电阻的电阻器 R 的两端间的电压。因此，可根据出现在电阻器 R 两端间的电压算出流过样本的电流 I。为了消除低电阻电阻器 R 对测量的影响，可由产生小损耗的器件替代低电阻电阻器 R。可从下面的式子得到样本的复电阻 Zx ：

[0083] $Zx = (V1/I) = (V1/V2)R$

[0084] 然而，通过利用这个公知常识不能立即实现介电谱细胞仪的原理。这是因为对于多点频率范围，必须在短时间段内测量非常小的电阻变化的幅度和变化的相位两者。非常小的电阻变化是由单个细胞通过作为信号检测部的狭窄道 NC 引起的变化。

[0085] 以下的描述将说明由本发明提供的用作实现影响复电阻测量的这种限制的实施方式。

[0086] 图 6 是示出了用于实现测量单个细胞的复电阻的测量电路的实施方式的示图。

[0087] 图中所示的电路是基于 IV 方法的。为了实现在短时间段内进行多点频率测量，通过将具有彼此不同频率的多个输入电压彼此叠加而将这些输入电压彼此合成并且施加在电极之间。依次对输出电压和输出电流应用傅里叶变换以测量各频率的复电阻。图 6 中所示的电路中所采用的电极 EL 和接地电极 G 分别相当于图 4 中所示的微流道装置 MF 的电极对 EL1 和 EL2。实际上，接地电极 G 用作共用电极。

[0088] 如前所述，为了测量样本的复电阻，需要测量样本两端间的电压和流过样本的电流。样本的电压由图 6 中所示的电压接收部 VR 测量，而样本的电流由同一图中所示的电流接收部 IR 测量。

[0089] 通过放大器将这些电压和电流信号中的每一个放大。由于根据需要将放大器与带通滤波器组合，因此各信号不必须表示单个细胞。通过分配器 D1 或 D2 将含有频率彼此不同的多种成分的信号分配成 n 个子频带。这是因为难以利用一个模拟电路来处理用于掌握细胞的介电弛豫现象的整个频带。在任一单个的子频带 i（其中 i ＝ 1，…，n）中，通过由具有适于所述频带特性的器件构成的模拟滤波器 AFVi 或 AFIi 的模拟信号被模拟 / 数字转换器 ADi 转换成数字信号。通过数字 - 信号处理电路 Dpi 来处理作为转换结果所获得的数字信号。最后，通过将所有子频带中的信号合成，测出遍布所有子频带的复电阻的分布。

[0090] ［数据分析］

[0091] 所测出的复电阻的分布通常以如下描述的五个阶段进行分析。

[0092] (1) 测出数据的转换

[0093] 通过考虑测量系统的传输特性来校准测出的复电阻。在校准的复电阻中，获得样本的电容 C 和样本的电导 G。在下面的描述中，电容 C 和电导 G 被称为样本的 CG 数据。

[0094] (2) 起源于细胞的信号的提取

[0095] 在特定的频率点，从与时间有关的 CG 数据提取细胞的信号。也就是说，从 CG 数据提取峰值，而根据峰前和峰后的数据计算基线。然后，计算峰值和基线之间的差，以得到所有频率点处电容 C 的变化量 ΔC 和电导 G 的变化量 ΔG。在以下的描述中，变化量 ΔC 和变化量 ΔG 被称为 ΔCΔG 数据。

[0096] (3) 介电变量的计算

[0097] 通过采用考虑到作为信号检测部的狭窄道 NC 的构造的数值计算方法，将每个细胞的 ΔCΔG 数据的分布转换成介电常数 ε 和特定电导率 κ 的频率分布。在以下的描述中，将介电常数 ε 和特定电导率 κ 称为 ε κ 数据。ε κ 数据的频率分布是介电分布。通过对每个细胞的介电分布应用介电函数，可算出介电变量。

[0098] (4) 细胞构成方面的电气物性值的计算

[0099] 参照预先算出的关系表来根据介电变量计算细胞构成方面的电气物性值。

[0100] (5) 基于电气物性值的细胞分类

[0101] 将检出的细胞的电气物性值的分布分类为分别表示一种细胞类型的合适细胞集团且小细胞集团。然后，对于每种细胞类型，计算例如电气物性值的平均值和方差的统计值。

[0102] ［测量数据］

[0103] 对于测量数据，将 K562 细胞和 Jurkat 细胞的数据作为示例。K562 细胞是由人类红海蕾型白血病引起的培养细胞株，而 Jurkat 细胞是人类白血病 T 的淋巴肿瘤引起的培养

细胞株。

[0104] 图 7 中上侧的曲线图表示由介电谱细胞仪装置 300 进行测量的结果。图上由不同的符号所表示的数据点与不同的细胞有关。也就是说，绘制曲线图以表示单个细胞在八个频率点处的数据片段。该曲线图示出了符合弛豫函数的数据点的结果。

[0105] 图 7 的上侧的曲线图的纵轴表示从测出的复电阻算得的电容变化量。根据前面已经描述的数据分析方法，电容变化量可转换成复介电常数的实部。然而，仅通过改变纵轴的比例，本质上没有差别。因此，电容的变化量 ΔC 如图中所示出的。还得到了从复介电常数的虚部算得的数据作为代表电导 G 的数据，但在图中未示出。复介电常数的虚部是复电阻。

[0106] 另一方面，图 7 中下侧所示的曲线图以与上侧的曲线图相同的方式表示 K562 和 Jurkat 细胞的流体溶液的复介电常数的分布的实部。该流体溶液包括约 10^8 细胞。也就是说，图 7 上侧的曲线图表示单个细胞的数据，而同一图中下侧的曲线图表示多个细胞的数据的平均值。因此，得到符合弛豫函数的数据，明显地，能够实现单个细胞的介电常数的量化测量。也就是说，能够实现介电谱细胞仪现在是显而易见的。

[0107] 图 8 是示出了通过使单个细胞的复介电常数分布适合于弛豫函数所得到的介电变量的一组柱状图。也就是说，图 8 是示出了 ΔC 表示弛豫幅度和发生弛豫的临界频率 fc 的一组柱状图。该附图示出了作为如上所述的 K562 和 Jurkat 细胞的不同培养细胞的介电变量的不同分布。因此，该图指示介电谱细胞仪能够将细胞分类成不同的细胞类型。

[0108] [细胞分选系统]

[0109] 图 9 是示出了细胞分选系统的构成的框图。

[0110] 当作为图 2 中所示的分选信号发生器 306 的分选信号发生器 TR 从作为图 2 中所示的分析器 307 的复分析器 AN 接收到复电阻（或复介电常数）时，将每个频率点处测出的值与预先设定的基准信息进行比较。预先设定的基准信息是包括过去在各频率点测出的各细胞的复电阻的信息。可替换地，预先设定的基准信息是包括根据这种复电阻得到的复介电常数的信息。根据比较的结果，分选信号发生器 TR 产生用作用于分选细胞的触发信号的分选信号。

[0111] 例如，分选信号发生器 TR 确定测出的复电阻或测出的复介电常数是否落在集中于预先设定的基准信息的范围内，从而作为分别对应于测出的复电阻或测出的复介电常数的信息。如果测出的复电阻或测出的复介电常数落在该范围内，则分选信号发生器 TR 产生触发信号。具体地，分选信号发生器 TR 根据作为比较的结果得到的信息的逻辑积，确定是否将细胞作为分选的对象。如果细胞是要被分选的，则分选信号发生器 TR 产生触发信号并且将该触发信号输出至作为图 2 中所示的细胞分选机构 305 的细胞分选机构 CS。

[0112] 接收触发信号的细胞分选机构 CS 确定细胞通过微流道装置 MF 的细胞分选部的合适时机。在稍后将描述的实施方式的情形下，接收触发信号的细胞分选机构 CS 确定细胞通过支道的直前部分的合适时机并且在合适的时机产生诸如介电泳力或流体力的驱动力，从而改变细胞流动所经由的通道。因此，细胞流过与其它细胞流过的通道不同的通道并且保持在细胞收集器 Si（其中 i ＝ 1，…，n）中。

[0113] [3] 介电谱细胞仪装置的具体实施方式的说明

[0114] [介电谱细胞仪装置]

[0115] 图 10 是示出了根据本发明实施方式的介电谱细胞仪装置 300 的模型的示图，而图

11 是示出了包括在图 10 中所示的介电谱细胞仪装置 300 的微流道系统 304 中的微流道装置 MF 的透视图。如图 2 中所示，流道系统 304 包括在介电谱细胞仪装置 300 中。

[0116] 如图 11 中所示，微流道装置 MF 包括注入部 3、测量部 4、细胞分选部 5、细胞提取部 6 和 7 以及形成于微流道装置 MF 中的流道 2 上的流出部 10。注入部 3、测量部 4、细胞分选部 5、细胞提取部 6 和 7 以及流出部 10 在流道 2 的上游侧到流道 2 的下游侧的方向上沿着流道 2 排列。

[0117] 注入部 3 是用于通过利用稍后将参照典型的图 16 和图 16 之后的附图描述的压力控制装置注入包括采样的细胞的液体（或流体）的部分。

[0118] 注入部 3 注入的流体流过流道 2。

[0119] 测量部 4 是用于对流过流道 2 的各个细胞测量在通常 0.1MHz ～ 50MHz 的频率范围内的所有频率点处细胞的复介电常数的部分。频率范围是发生细胞的介电弛豫现象的范围。测量部 4 通常测量三个以上频率点处的细胞的复介电常数。例如，测量部 4 测量 10 到 20 个频率点处细胞的复介电常数。根据测出的细胞的复介电常数，包括测量部 4 的分析器 307 采用前面所述的技术确定测出的细胞是否是要从微流道装置 MF 提取的且在例如检查或循环利用的应用中使用的细胞。如果分析器 307 确定测出的细胞是要从微流道装置 MF 提取并且在这种应用中使用的细胞，则测量部 4 产生分选信号。

[0120] 应当注意，测量部 4 概念上具有前面所述的分析器 307 的主要功能并且包括同样在前面所述的流道系统 304 的一部分机构。

[0121] 细胞分选部 5 从由注入部 3 注入的大量细胞中选择所需的细胞作为不同类型的细胞，并且将所需要的细胞提供给细胞提取部 6 而将其它细胞提供给细胞提取部 7。

[0122] 应当注意，细胞分选部 5 概念上具有前面所述的分选信号发生器 306 的主要功能，并且还包括同样在前面所述的流道系统 304 的一部分机构。

[0123] 设置在细胞分选部 5 中的电场施加部 8 是能够施加具有在与流体流动的 X 方向不同的方向上的梯度的电场的部分。例如，电场施加部 8 能够施加具有垂直于 X 方向的 Y 方向上的梯度的电场。通常，当作为触发信号的细胞分选信号未被接收为产生的操作信号时，电场施加部 8 不施加电场。另一方面，当作为触发信号的细胞分选信号被接收为产生的操作信号时，电场施加部 8 施加电场。当然，能够提供相逆的构造，其中作为触发信号的细胞分选信号被接收为产生的操作信号时，电场施加部 8 不施加电场，相反，当作为触发信号的细胞分选信号未被接收为产生的操作信号时，电场施加部 8 施加电场。

[0124] 细胞分选部 5 的分流部 9 是用于通过支道 2b 将电场施加部 8 未向其施加电场的细胞引导至细胞提取部 7 和通过支道 2a 将经受电场施加部 8 产生的电场的细胞引导至细胞提取部 6。

[0125] 细胞提取部 6 和 7 通过流道 2 连接到流出部 10。通过泵将通过细胞提取部 6 和 7 的流体从流出部 10 排出到外部的指定部分。

[0126] [微流道装置]

[0127] 如图 11 中所示，微流道装置 MF 具有基板 12 以及由高分子膜等制成的形成片状的部件 13。在基板 12 上，设置有流道 2、均作为流道 2 的部分的支道 2a 和 2b、具有注入部 3 的功能的流体注入部 3a、作为流道 2 的部分的分流部 9、细胞提取部 6 和 7 以及流出部 10。通过在基板 12 的表面上形成沟槽等并且通过部件 13 覆盖表面来构造设置在基板 12 上的

构造：流道 2、支道 2a 和 2b、注入部 3a、分流部 9、细胞提取部 6 和 7 以及流出部 10。通过这种方式，形成流道 2。

[0128] 通过在部件 13 上设置微细的孔用作狭窄道来构造含有细胞的流体所注入的细胞注入部 3b。当通过利用滴管将含有细胞的流体滴在细胞注入部 3b 上时，流体流过流道 2 而到达流道 2 的下游侧，使得流体与沿着流道 2 而流过狭窄道的流体混合。由于狭窄道是微细的孔，多个细胞不能作为集团流过狭窄道到达流道 2。相反，单个细胞能够一个接一个的依次通过狭窄道到达流道 2。

[0129] 设置用于测量复电阻或复介电常数的一对测量电极 4a 和 4b 而将狭窄道夹在中间。设置所述一对测量电极 4a 和 4b 用作第一电极对。作为电极中具体一个的测量电极 4a 设置在片状部件 13 的正面上，而作为另一电极的测量电极 4b 设置在片状部件 13 的背面上。

[0130] 构成电场施加部 8 的电极对也设置在片状部件 13 的背面上。稍后将描述该电极对。

[0131] 通过设置在细胞提取部 6 和 7 上方的片状部件 13 覆盖细胞提取部 6 和 7。然而，可通过用滴管刺穿片状部件 13 经由滴管来提取细胞。

[0132] 电极焊盘 14 是用于将由测量电极 4a 和 4b 检出的信号提取并且将提取的信号输出至外信号接收部的部分。提取的信号还被输出至分析器 307。电极焊盘 15 是用于接收基于分析器 307 的复介电常数的测量信息由触发信号作为触发所产生的操作信号的部分。触发信号是由分选信号发生器 306 产生的触发信号。接收到的操作信号被传输至构成如上所述的电场施加部 8 的电极对。

[0133] 通孔 16 是用于确定微流道装置 MF 连接到具有分析器和装置中的其它部分的主体的位置的孔。

[0134] [细胞分选部]

[0135] 图 12 是示出图 11 中所示的微流道装置 MF 中所采用的细胞分选部 5 的构造的顶视图，而图 13 是示出沿图 12 中所示的细胞分选部 5 的构造的线 A-A 截取的截面图。

[0136] 如图 12 和 13 中所示，细胞分选部 5 具有电场施加部 8。细胞分选部 5 是由前面说明的细胞分选单元的一部分构成的部分。

[0137] 电场施加部 8 具有均设置在流道 2 上预先确定的位置处的电极 16 和 17。例如，电极 16 和 17 以在与流体流过流道 2 的 X 方向不同的 Y 方向将流道 2 夹在中间的方式通常设置在彼此相对的位置。

[0138] 电极 16 和 17 设置在片状部件 13 的背面。部件 13 的背面是流道 2 内的顶面。电极 16 通常是施加有信号的电极。电极 16 被构造成具有沿朝向电极 17 的方向突出的多个电极指 16a。电极 17 通常是共用电极。电极 17 被构造成在电极 17 面向电极 16 的方向上既不具有突出部也不具有凹部。在下面的描述中，一个电极指 16a 和电极 17 的组合被称为用作第二电极对的操作电极对 18。

[0139] 通过如上所述构造的操作电极对 18，当向电极 16 和 17 施加信号时，具有 Y 方向梯度的电场施加至每个操作电极对 18。通常通过将 DC 偏压叠加在 AC 电压上来获得用于产生这种电场的电压信号。

[0140] 在流道 2 的电场施加部 8 的下游侧预先确定的位置处，其流动方向被由电场施加

部 8 施加的电场所产生的介电泳力改变的细胞 C 通过利用支道 2a 而导向至细胞提取部 6。

[0141] 例如，在注入部 3 处，细胞注入到偏向细胞提取部 7 侧的位置。注入到偏向细胞提取部 7 侧位置的该细胞以非活性的状态投入，并在流道 2 中通过保持其原来的流动方向经由偏向细胞提取部 7 侧的位置而流向细胞提取部 7 并且经由分流部 9 而进入连接至图 12 中所示的细胞提取部 7 的支道 2b，如图 12 中所示。非活性状态是用作细胞分选对象的细胞不经历细胞通过电场施加部 8 时电场施加部 8 处的电场的状态。

[0142] 如果以活性状态将注入到偏向细胞提取部 7 侧位置的细胞投入，然而，由于其流动方向改变而使得细胞在流道 2 内经由偏向细胞提取部 7 侧位置后流向细胞提取部 6 并经由分流部 9 而进入连接至细胞提取部 6 的支道 2a，如图 14 中所示。活性状态是用作细胞分选对象的细胞受到细胞通过电场施加部 8 时由电场施加部 8 施加的电场所产生的介电泳力的状态。

[0143] 在如上所述构造的电场施加部 8 中，每个操作电极对 18 施加具有 Y 方向梯度的电场。因此，通过操作电极对 18 的细胞逐渐改变其流道并且通过流过支道 2a 而分支到细胞提取部 6 侧。

[0144] [电场施加部的其它实施方式]

[0145] 在具有不使细胞受到致命伤害的强度的电场下施加至细胞的介电泳力与对在约几 mm/s 量级的速度的水中流过的细胞施加的粘性阻力相比，通常是极其小的。因此，需要设置多个均用于主动地产生在与流动方向垂直的方向上的介电泳力的多个非均匀电场，或者由均用于产生这种电场的操作电极对 18 构成的多个电极对列。在这种情形下，多个列均设置在 X 方向上。如图 12 和 14 中所示，如果同时对多个操作电极对 18 施加电压，必须专门使用操作电极对 18 的电极列分选区域，从而在一些情形下通过量不增加。

[0146] 为了解决上述问题，将操作电极对 18 分成多个组，例如图 15 中所示的沿 X 方向排列的组 G1 到 G5，并控制分别施加至各个组 G1 到 G5 的电压以允许通过操作电极对 18 的细胞的多重化。以这种方式，增加了通过量。也就是说，在具有图 12 和 14 中所示的构造的电场施加部 8 中，需要以直至特定的细胞通过电场施加部 8 而跟随特定细胞后的细胞被阻止流向流道 2 的定时使细胞流向流道 2。另一方面，在具有图 15 中所示的构造的电场施加部 8 中，能够执行向例如正在通过组 G5 的细胞施加电场但不向正在通过组 G4 的细胞施加电场的控制。结果，能够对各个组 G1 ～ G5 进行分选控制。

[0147] [流道系统的压力控制]

[0148] 下面的描述说明用于对流道系统 304 内流动的流体进行压力控制的压力控制装置。

[0149] 图 16 是示出用于对流过流道系统 304 内部的流体进行压力控制的压力控制装置的示图。图 16 还示出了流道系统 304 中各个位置处的表压。图 17 是示出微流道装置 MF 中所采用的注入部 3 的周边区域的截面的模式的示图。

[0150] 如图 16 中所示，压力控制装置具有第一压力调整机构 112a 和第二压力调整机构 112b。第一压力调整机构 112a 是用于调整流道 2 上游侧的载液 F 的压力的机构，而第二压力调整机构 112b 是用于调整流道 2 下游侧的载液 F 的压力的机构。载液 F 是从流体注入部 3a 注入的流体部分。

[0151] 此外，压力控制装置还具有用于控制第一压力调整机构 112a 和第二压力调整机

构 112b 的控制器 111。

[0152] 第一压力调整机构 112a 包括高压流体罐 113a、第一压缩机 115a 和设置在高压流体罐 113a 和第一压缩机 115a 之间的第一空气阀 116a。同样，第二压力调整机构 112b 包括低压流体罐 113b、第二压缩机 115b 和设置在低压流体罐 113b 和第二压缩机 115b 之间的第二空气阀 116b。

[0153] 高压流体罐 113a 是用于将载液 F 存储在其内作为要供给流道 2 的载液 F 的部件。另一方面，低压流体灌 113b 是用于将从流道 2 排出的载液 F 收集在其内的部件。高压流体罐 113a 设置有用于检测高压流体罐 113a 内的气压的压力传感器 114a。同样，低压流体罐 113b 设置有用于检测低压流体罐 113b 内的气压的压力传感器 114b。

[0154] 第一阀门 117a 设置在高压流体罐 113a 的下游侧，而第二阀门 117b 设置在低压流体罐 113b 的上游侧。

[0155] 流量计 118 设置在第一阀门 117a 的下游侧。此外，压力传感器 119a 和压力传感器 119b 分别设置在微流道装置 MF 的流体注入部 3a 和微流道装置 MF 的流出部 10 上。压力传感器 119a 和压力传感器 119b 均用于检测载液 F 的压力。

[0156] 控制器 111 经由接线板 121 和 A/D 转换器 122 电连接至其中包括在压力调整机构 112 内的部件、流量计 118 以及压力传感器 119a 和 119b。

[0157] 控制器 111 控制驱动第一压缩机 115a 的操作和调整第一空气阀 116a 的打开程度的操作以调整高压流体罐 113a 内的气压。同样，控制器 111 还控制驱动第二压缩机 115b 的操作和调整第二空气阀 116b 的打开程度的操作以调整低压流体罐 113b 内的气压。通过这种方式，能够调整流道 2 的上游和下游的载液 F 的压力。

[0158] 此外，控制器 111 还控制调整第一阀门 117a 打开程度的操作和调整第二阀门 117b 的打开操作以调整载液 F 从高压流体罐 113a 的排出和载液 F 向低压流体罐 113b 的注入。如果需要，例如，在将微流道装置 MF 安装在压力控制装置上和从压力控制装置拆下时，可用新的替换第一阀门 117a 和第二阀门 117b。

[0159] 如图 11 中所示，微流道装置 MF 的注入部 3 形成于片状部件 13 的表面上比其它部件所在的层低的一层上（处于凹的状态）。图 17 中所示的注入部 3 中的样本流体 S 是含有细胞的流体的一部分。样本流体 S 的典型示例是血液。利用如上所述形成的微流道装置 MF，当通过利用滴管 8 等将样本流体 S 注入注入部 3 时，能够防止样本流体 S 不期望地从注入部 3 溢出。

[0160] 用作狭窄道的狭窄孔 1 设置在注入部 3 的约中心处。狭窄孔 1 是在上下方向贯通片状部件 13 而形成的微细孔。

[0161] 介电谱细胞仪装置 300 还可具有用于搅拌注入到注入部 3 中的样本流体 S 的搅拌部。在图中未示出搅拌部本身。搅拌部是用于产生气流 L 并且将气流 L 吹送至流过狭窄孔 1 的样本流体 S 的表面的部分，如图 17 中所示。因此，由于包括在样本流体 S 中的细胞 C 被搅拌，所以能够防止细胞 C 不希望地沉入样本流体 S。

[0162] 测量部 4 的一对测量电极 4a 和 4b 位于将注入部 3 上的狭窄孔 1 夹在中间的位置。测量电极对的测量电极 4a 设置在片状部件 13 的背面，而测量电极对的测量电极 4b 设置在部件 13 的前面上。

[0163] 接着，以下的描述将说明根据载液 F 的压力的控制进行的调整，如主流流量 Q 和样

本流入流量 Qs 的调整。主流流量 Q 是流过流道 2 的载液 F 的流量，而样本流入流量 Qs 是经由狭窄孔 1 流入流道 2 内的样本流体 S 的流量。

[0164] 首先，需要读者假设样本流体 S 未注入注射部 3 并且在狭窄孔 1 上方不存在样本流体 S（即，在空气侧不存在样本流体 S）的情形。如果高压流体罐 113a 和低压流体罐 113b 内的气压分别保持在 AP1 和 AP2，其中关系 AP1 ＞ AP2 适用，则载液 F 从高压流体罐 113a 流出并且通过流道 2 流向低压流体罐 113b。此时流动的载液 F 的流量是主流流量 Q。

[0165] 假设微流道装置 MF 的流体注入部 3a 和微流道装置 MF 的流出部 10 测出的压力分别为 FP1 和 FP2。在这种情形下，由压力 FP1 和 FP2 确定狭窄孔 1 正下方位置 s 处的静压 Ps。根据由反映微流道装置 MF 内的流道 2 的形状的管线电阻引起的压力损失确定静压 Ps。

[0166] 应当注意，此时，在静压 Ps 相对小的幅度范围内，只要狭窄孔 1 上方不存在样本流体 S（即，只要在空气侧不存在样本流体 S），则由于表面张力，载液 F 不从狭窄孔 1 流出。此外，没有气体流进流道 2。

[0167] 需要读者假设在这种状态下，诸如血液的样本流体 S 的液滴以具有约 10 μL 大小的液滴滴在注入部 3 上的情形。在这种情形下，样本流体 S 依然接触空气并且注入部 3 的高度是约 1mm。因此狭窄孔 1 上方的样本流体 S 的静压力可视作 0，即为气压的大小。此外，最早时在狭窄孔 1 上不存在表面张力。因此，由于在狭窄孔 1 正下方位置 s 处的静压力是 Ps，因此 (0-Ps) 的压力差促使样本流体 S 流进流道 2。如果将狭窄孔 1 正下方位置 s 处的静压力 Ps 保持成负值，则样本流体 S 被拉入微流道装置 MF 的流道 2 中。

[0168] 通常，静压力 Ps 是管线电阻的函数。因此，适用下面给出的式子 (1)：

[0169] $Ps = f(FP1, FP2)$...(1)

[0170] 因此，可通过下面给出的式子 (2) 表达样本流入流量 Qs，只要雷诺数具有足够小的值就可。在式子 (2) 中，符号 Rs 表示比例常数。

[0171] $Qs = Rsf(FP1-FP2)$...(2)

[0172] 应当注意，对于微流道装置 MF 内的流道 2，如果将上游侧和下游侧制成相对于狭窄孔 1 正下方位置 s 是流体力学对称的，那么位置 s 处的静压力 Ps 可变的更简单，因此可通过下面的式子 (3) 表达。

[0173] $Ps = (FP1+FP2)/2$...(3)

[0174] 此外，在这种情形下，样本流入流量 Qs 通过如下的式子 (4) 表达。

[0175] $Qs = Rs(FP1+FP2)/2$...(4)

[0176] 除此之外，根据压力 FP1 和 FP2 可得到主流流量 Q，并且根据下面给出的式子 (5) 可得到关于主流的管线电阻 R。

[0177] 如上所述，调整高压流体罐 113a 中的压力 AP1 和低压流体罐 113b 中的压力 AP2，以适当地调整流道 2 上游侧的载液 F 的压力 FP1 和流道 2 下游侧的载液 F 的压力 FP1，使得可将主流流量 Q 和样本流入流量 Qs 都控制成适宜的值。此外，调整高压流体罐 113a 中的压力 AP1 和低压流体罐 113b 中的压力 AP2，以适当地调整流道 2 上游侧的载液 F 的压力 FP1 和流道 2 下游侧的载液 F 的压力 FP1，使得可彼此独立地控制主流流量 Q 和样本流入流量 Qs。

[0178] [其它实施方式]

[0179] 本发明的实现绝不限制于上述的实施方式。也就是说，可实现各种其它的实施方

式。

[0180] 例如，在上述的实施方式中，采用基于多点频率的方法作为测量复电阻的方法。然而，不是必须采用基于多点频率的方法来作为用于测量复电阻的方法。

[0181] 在上述的实施方式中，采用频率叠加方法作为通常的多点频率测量。然而，存在下面所述的三种其它的多点频率测量方法。与频率叠加方法很像，在三种其它多点频率测量方法的每一个中，能够实时地每次确定单个细胞通过狭窄道 NC 的分布。

[0182] (1) 频率扫描法

[0183] 频率扫描法是一种在扫描频率时在每个频率点测量复电阻的方法。

[0184] (2) 时域测量法

[0185] 时域测量法是一种通过将具有脉冲或阶梯波形的电压施加到测量电极上、测量电压和电流变化量并且进行傅里叶变换来计算每个频率点处的复电阻的方法。

[0186] (3) 其它的多点频率测量方法

[0187] 根据另一种多点频率测量方法，将测量电极对分成多个对组，并且当细胞顺次通过对组时进行测量。这种其它的多点频率测量方法不是一种像上面所述的频率叠加方法的情形一样以成批的操作测量所有测量频率点处的复电阻的方法。相反，在其它的多点频率测量方法中，对于每组测量电极对，在诸如一个到三个频率点的几个频率点处进行测量。通过在组与组间不同数目的频率点上进行测量，整体上能够实现多点频率方法。

[0188] 本发明包含于 2010 年 10 月 29 日向日本专利局提交的日本在先专利申请 JP 2010-243765 中披露的相关主题，其全部内容结合于此作为参考。

[0189] 尽管已经使用具体的术语描述了优选实施方式，但这些说明仅用于示意性目的，并且应当理解，在不背离所附权利要求的精神或范围的前提下可进行修改和变形。

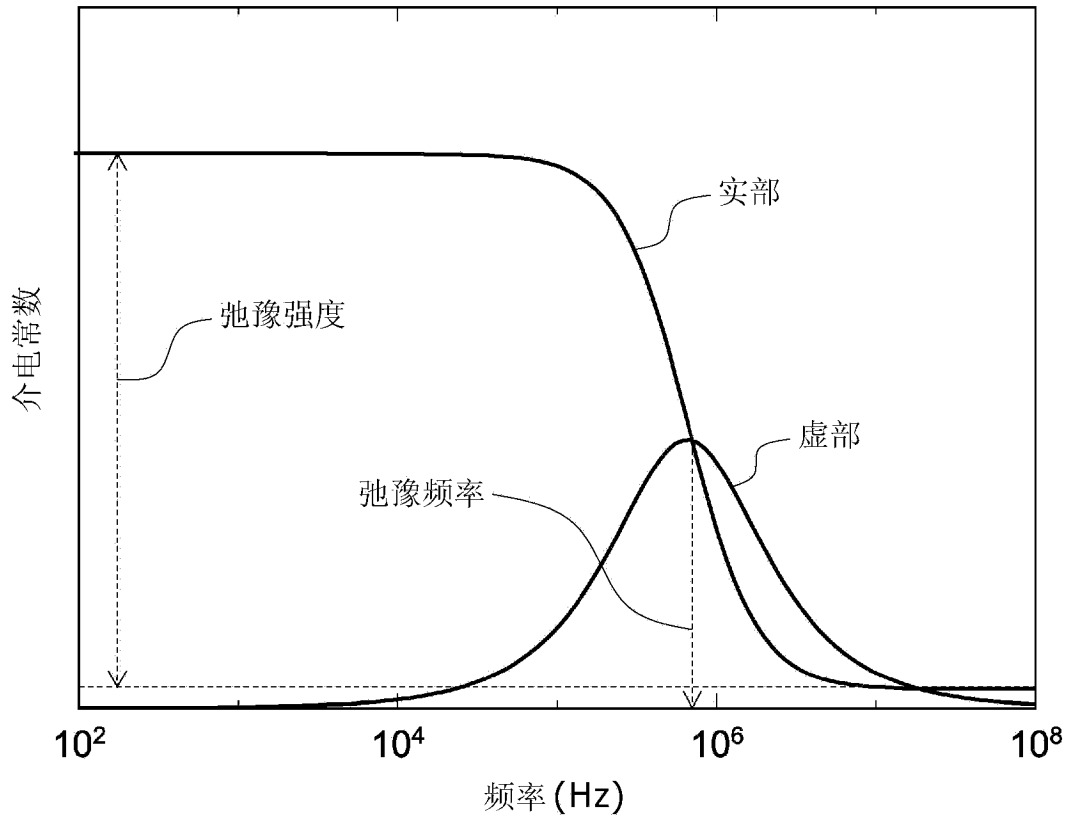


图 1

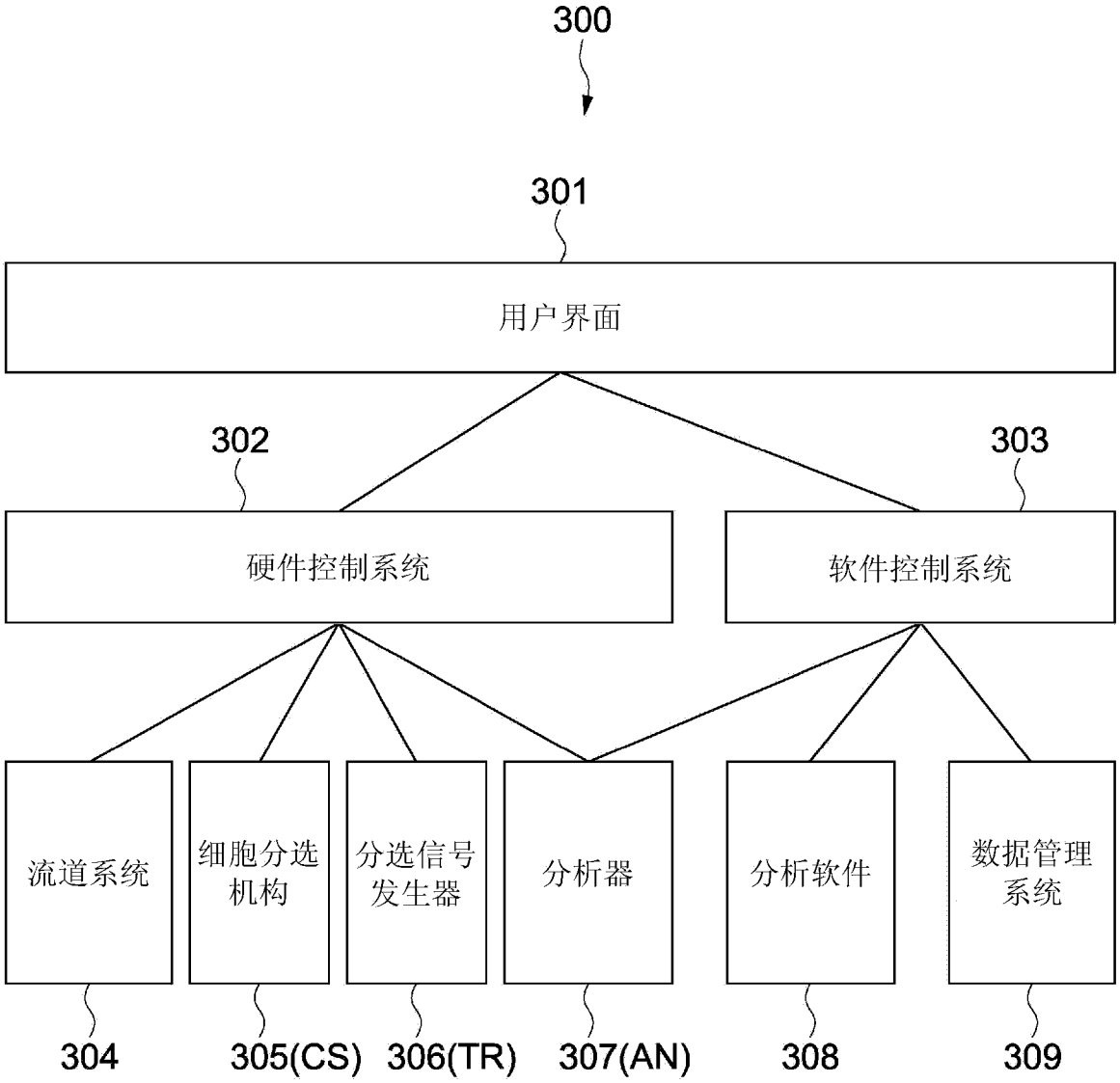

300
301
用户界面
302
303
硬件控制系统
软件控制系统
流道系统
细胞分选机构
分选信号发生器
分析器
分析软件
数据管理系统
304
305(CS)
306(TR)
307(AN)
308
309

图 2

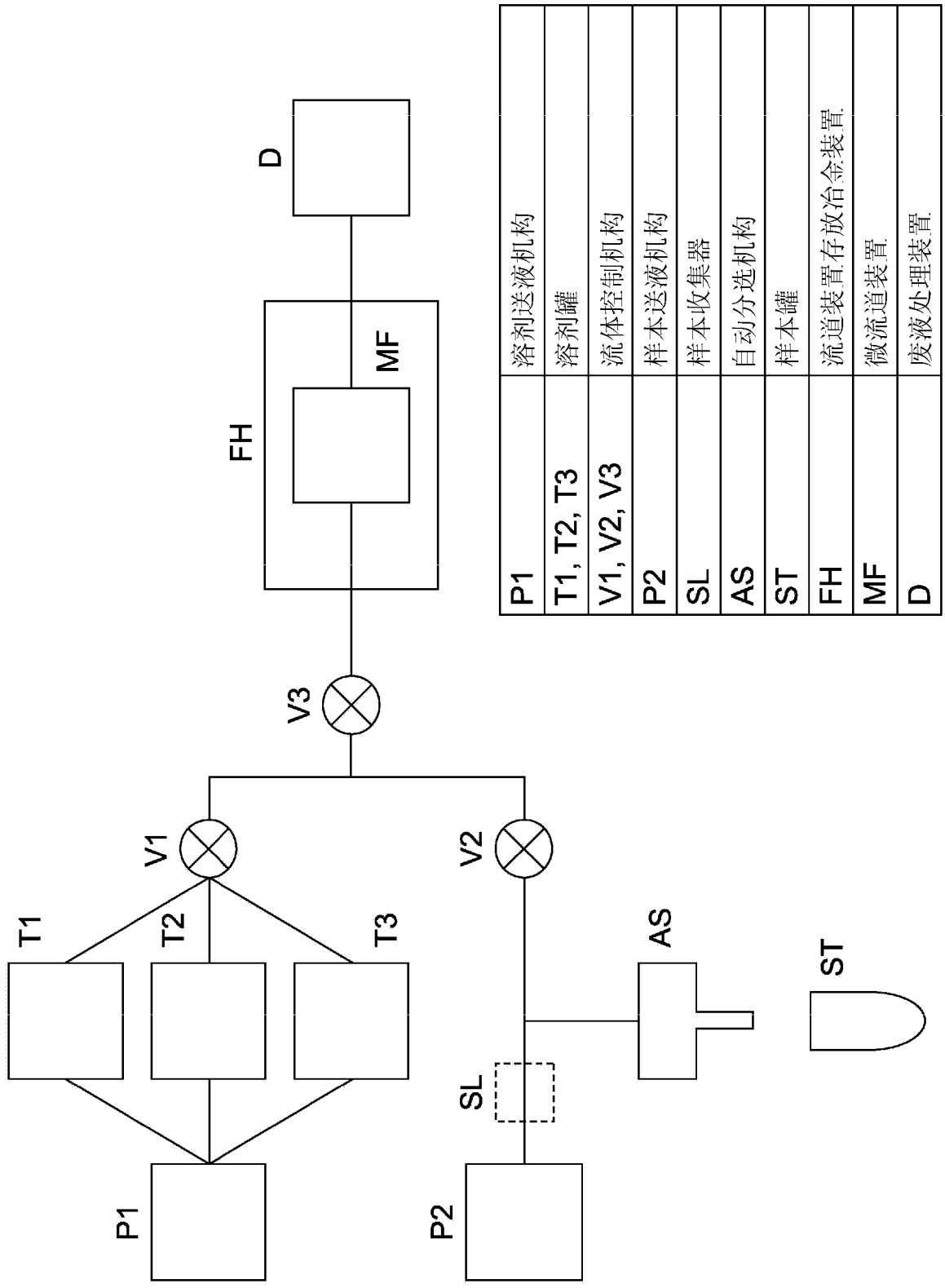
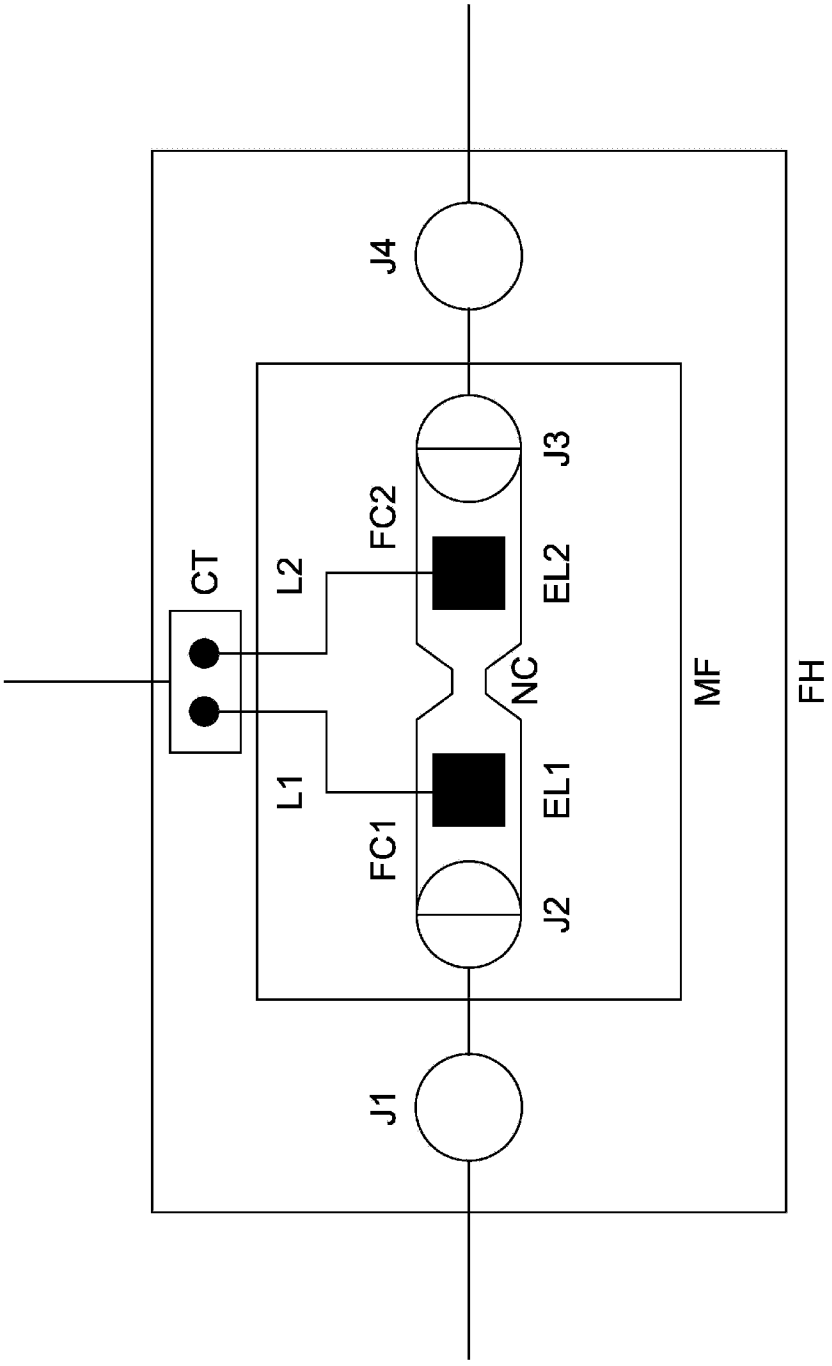
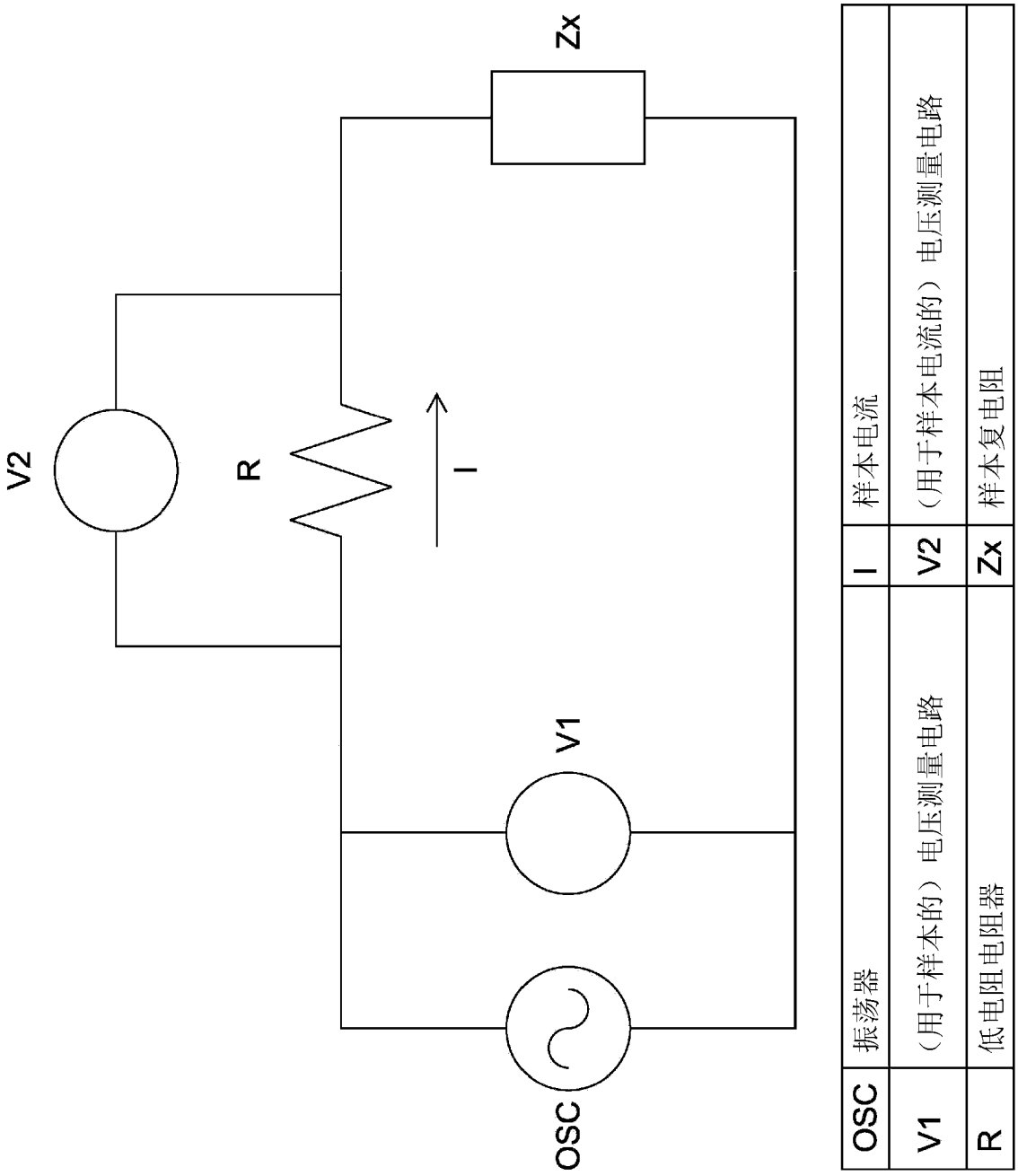

D
MF
FH
V3
V1
V2
T1
T2
T3
AS
ST
SL
P1
P2
P1 溶剂送液机构
T1, T2, T3 溶剂罐
V1, V2, V3 流体控制机构
P2 样本送液机构
SL 样本收集器
AS 自动分选机构
ST 样本罐
FH 流道装置.存放冶令装置.
MF 微流道装置.
D 废液处理装置

图 3



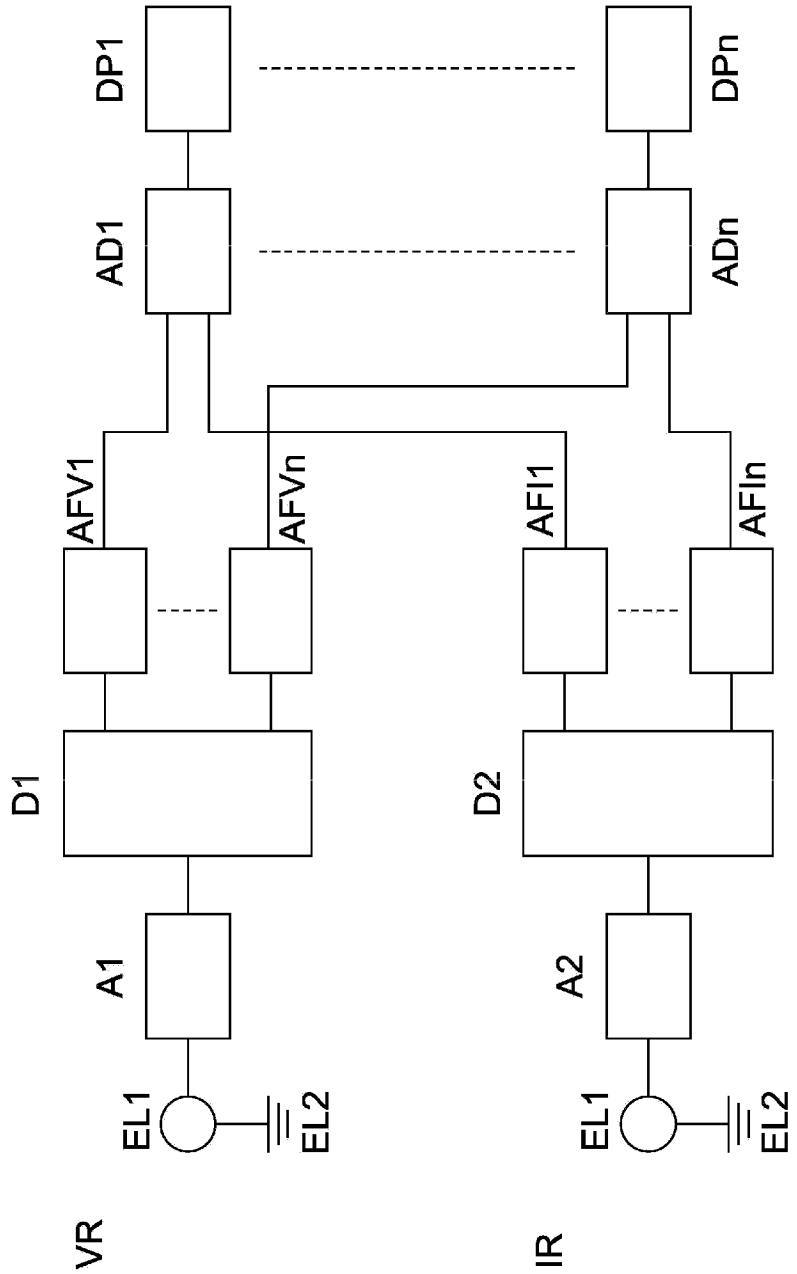
FH	流道装置.存放冶金装置	NC	流道接合部
MF	狭窄道	EL1, EL2	电线
J1, J2, J3, J4	微流道装置.	L1, L2	流道
FC1, FC2	电极	CT	电线接合部（连接器）

图 4



OSC	振荡器	I	样本电流
V1	（用于样本的）电压测量电路	V2	（用于样本电流的）电压测量电路
R	低电阻电阻器	Zx	样本复电阻

图 5



VR	电压接收部	AFV1, ... , AFVn	(用于电压的) 模拟滤波器
IR	电流接收部	AFI1, ... , AFIn	(用于电流的) 模拟滤波器
G1, G2	接地	AD1, ... , ADn	A/D 转换器
A1, A2	放大器	DP1, ... , DPn	数字信号处理电路
D1, D2	分配器		分配器

图 6

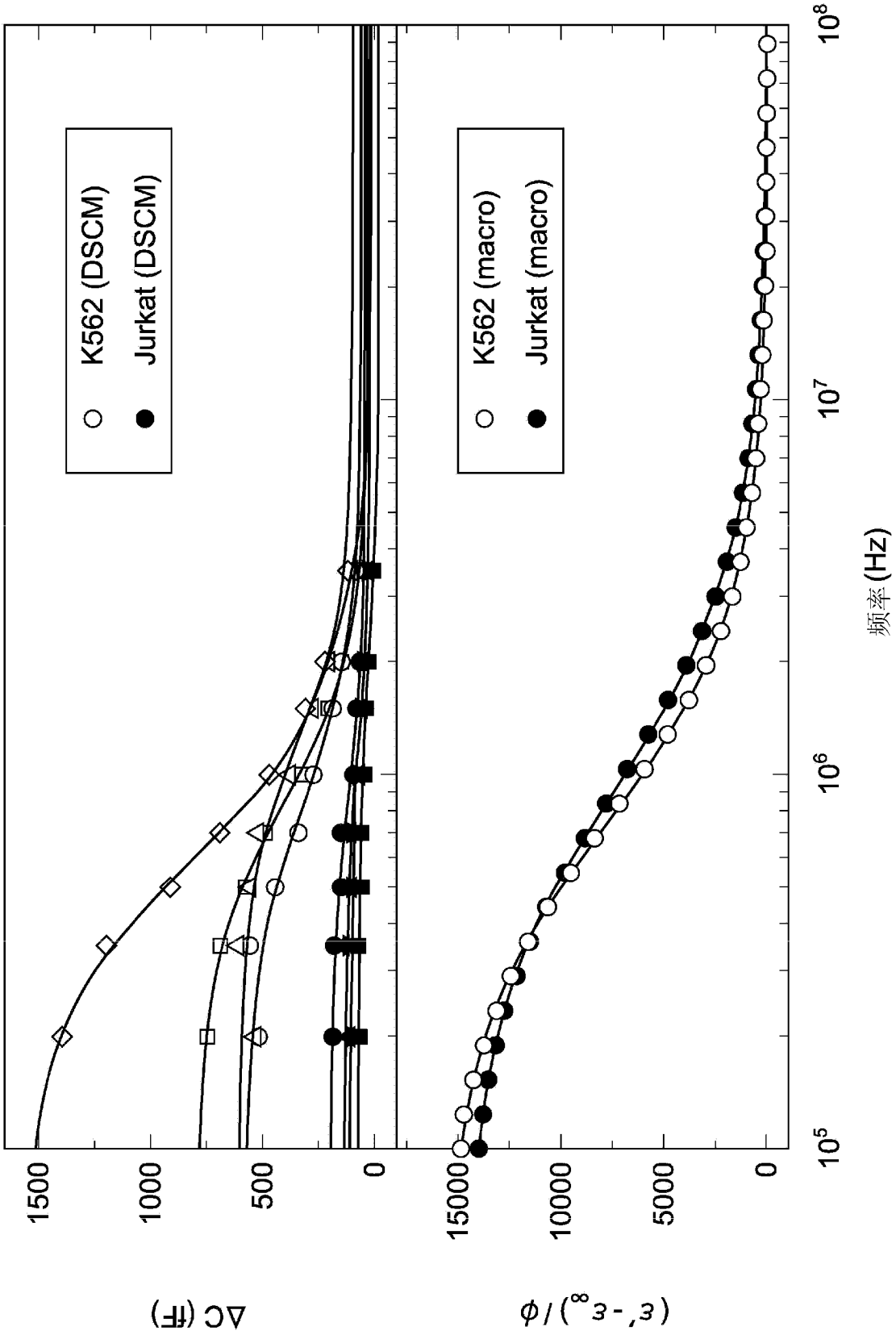

K562 (DSCM)
Jurkat (DSCM)
K562 (macro)
Jurkat (macro)
1500
1000
500
0
15000
10000
5000
0
10^5
10^6
10^7
10^8
频率 (Hz)
ΔC (fF)
$\phi/(\varepsilon'_\infty-\varepsilon')$

图 7

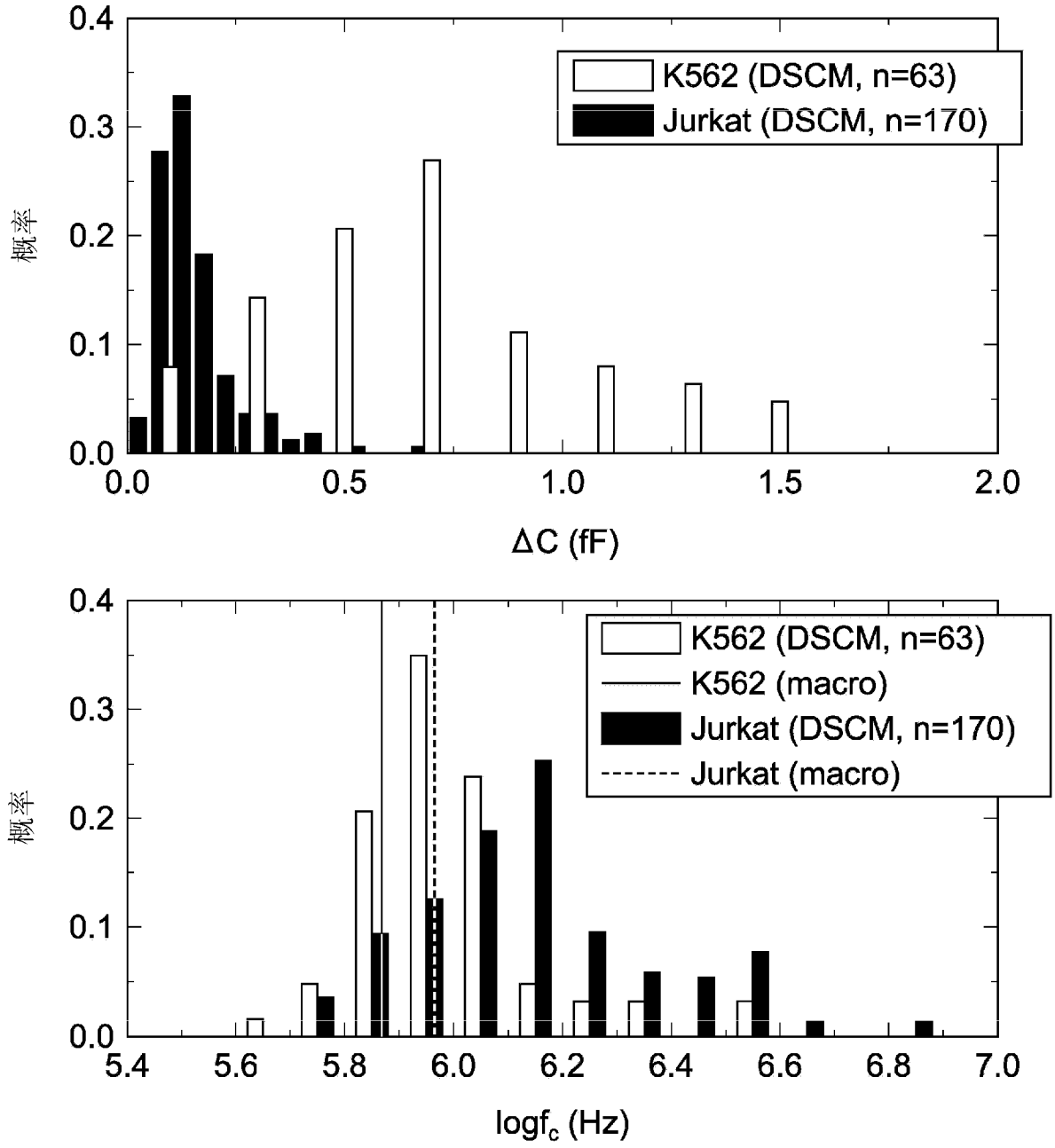
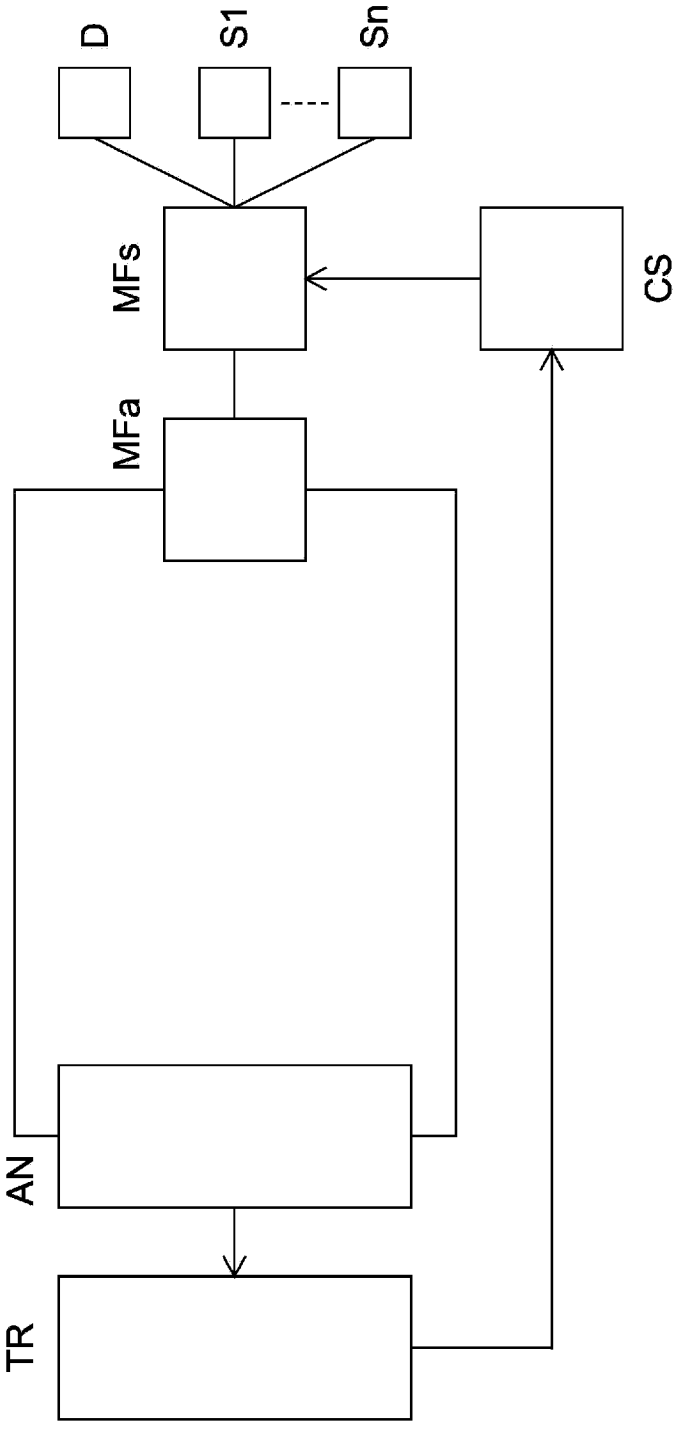

0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
概率
K562 (DSCM, n=63)
Jurkat (DSCM, n=170)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
ΔC (fF)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
概率
K562 (DSCM, n=63)
K562 (macro)
Jurkat (DSCM, n=170)
Jurkat (macro)
5.4
5.6
5.8
6.0
6.2
6.4
6.6
6.8
7.0
logf$_c$ (Hz)

图 8



		MFs	分选流道
AN	复电阻分析器		
TR	分选信号发生器	D	废液处理装置
CS	分选机构	S1, … , Sn	细胞收集器
MFa	分析流道		

图 9

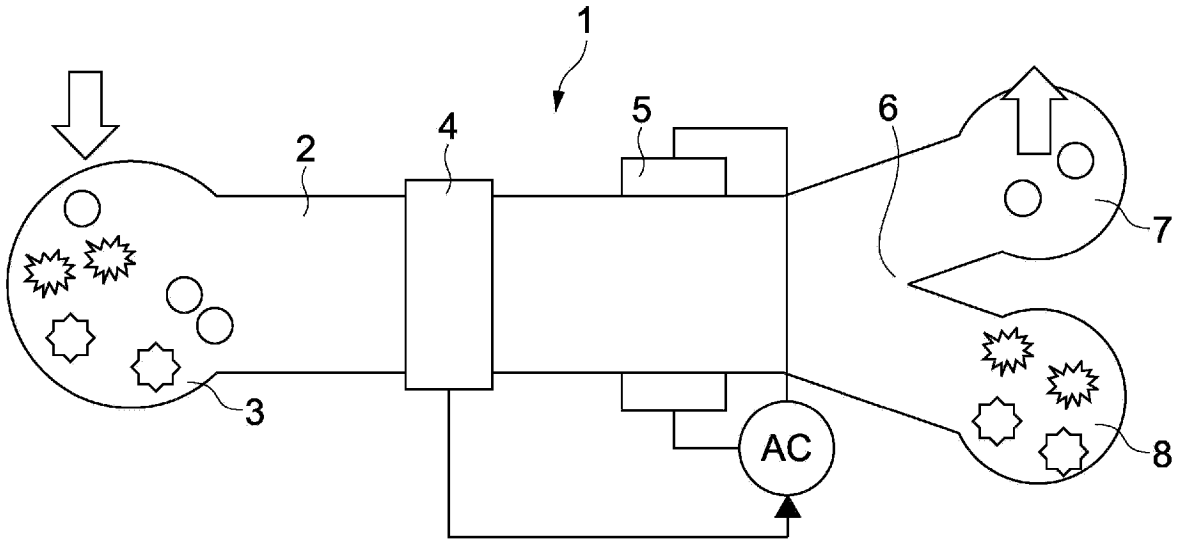


图 10

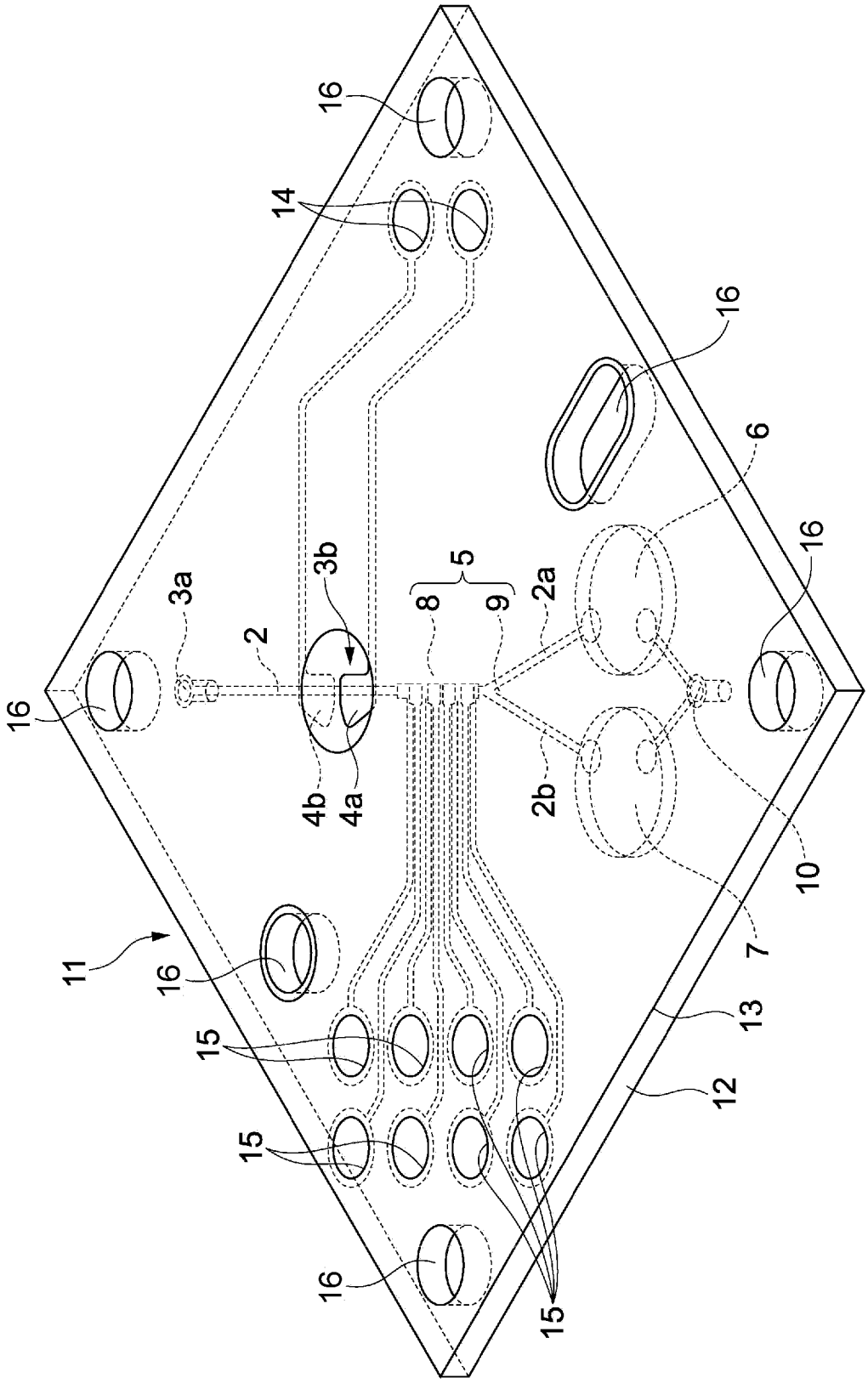


图 11

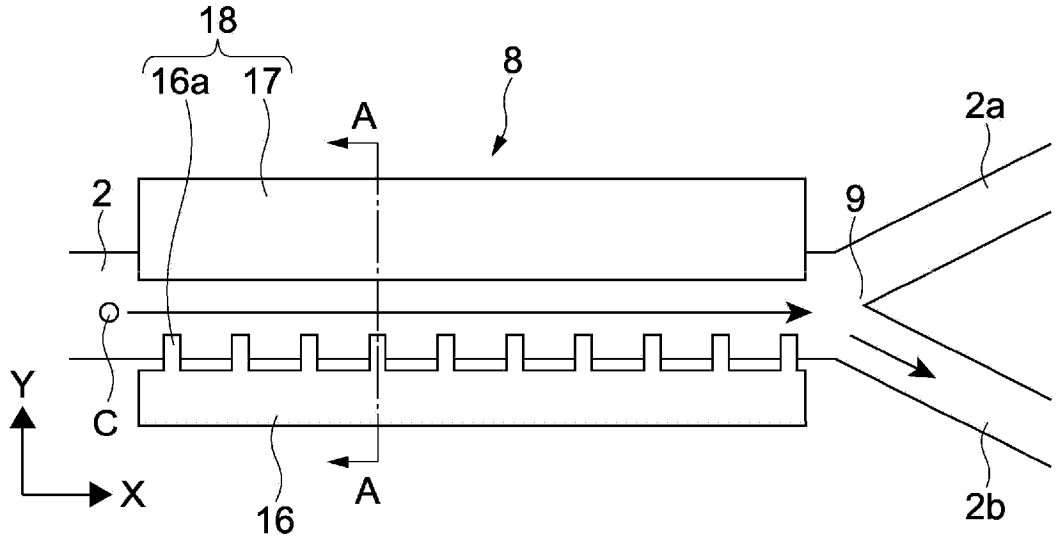


图 12

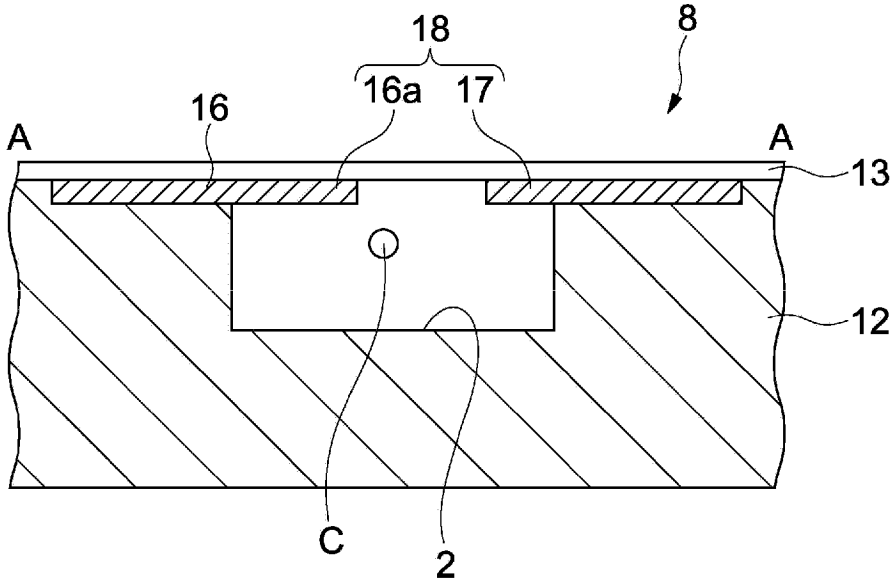


图 13

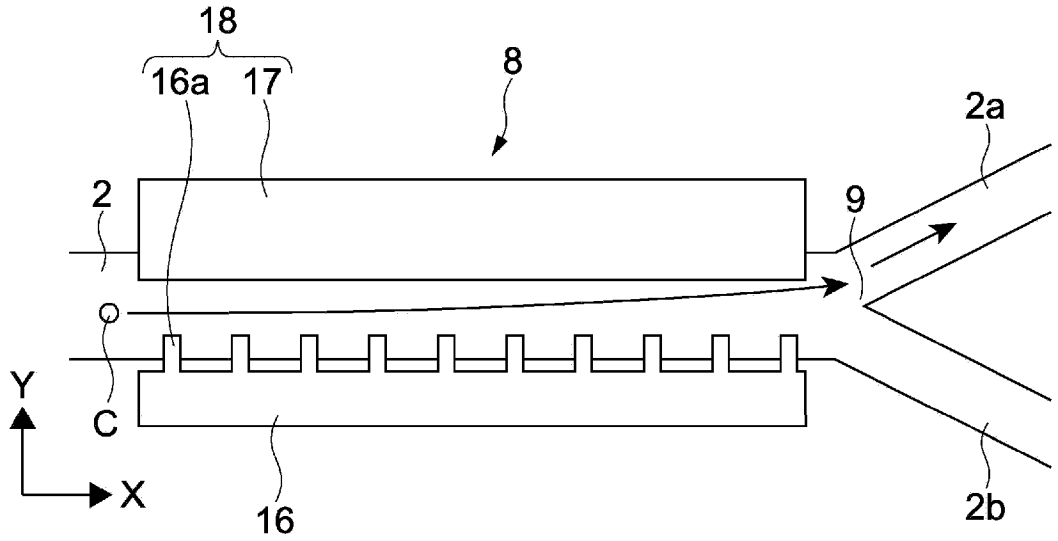


图 14

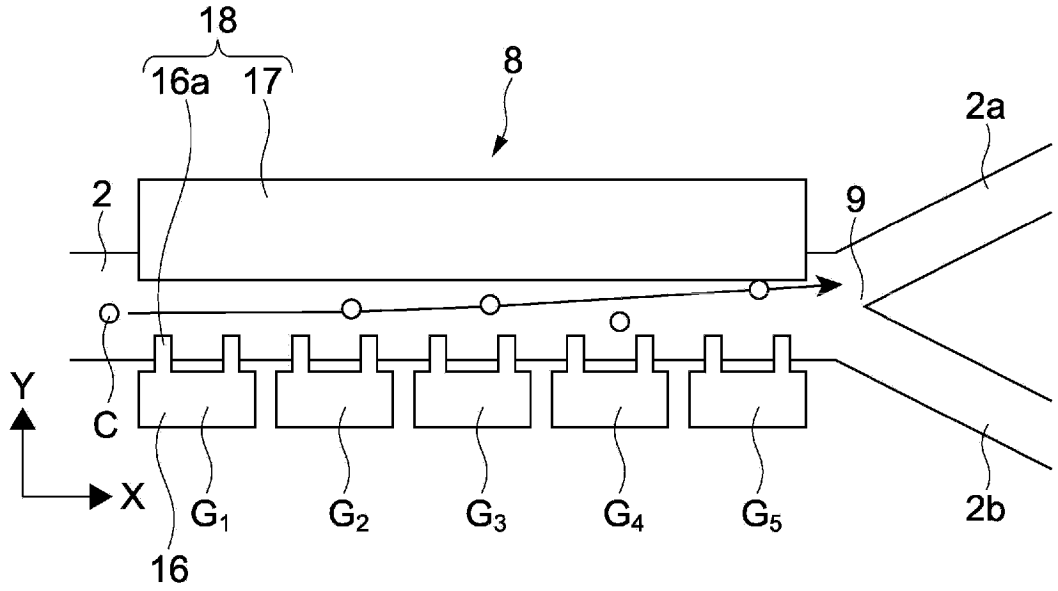
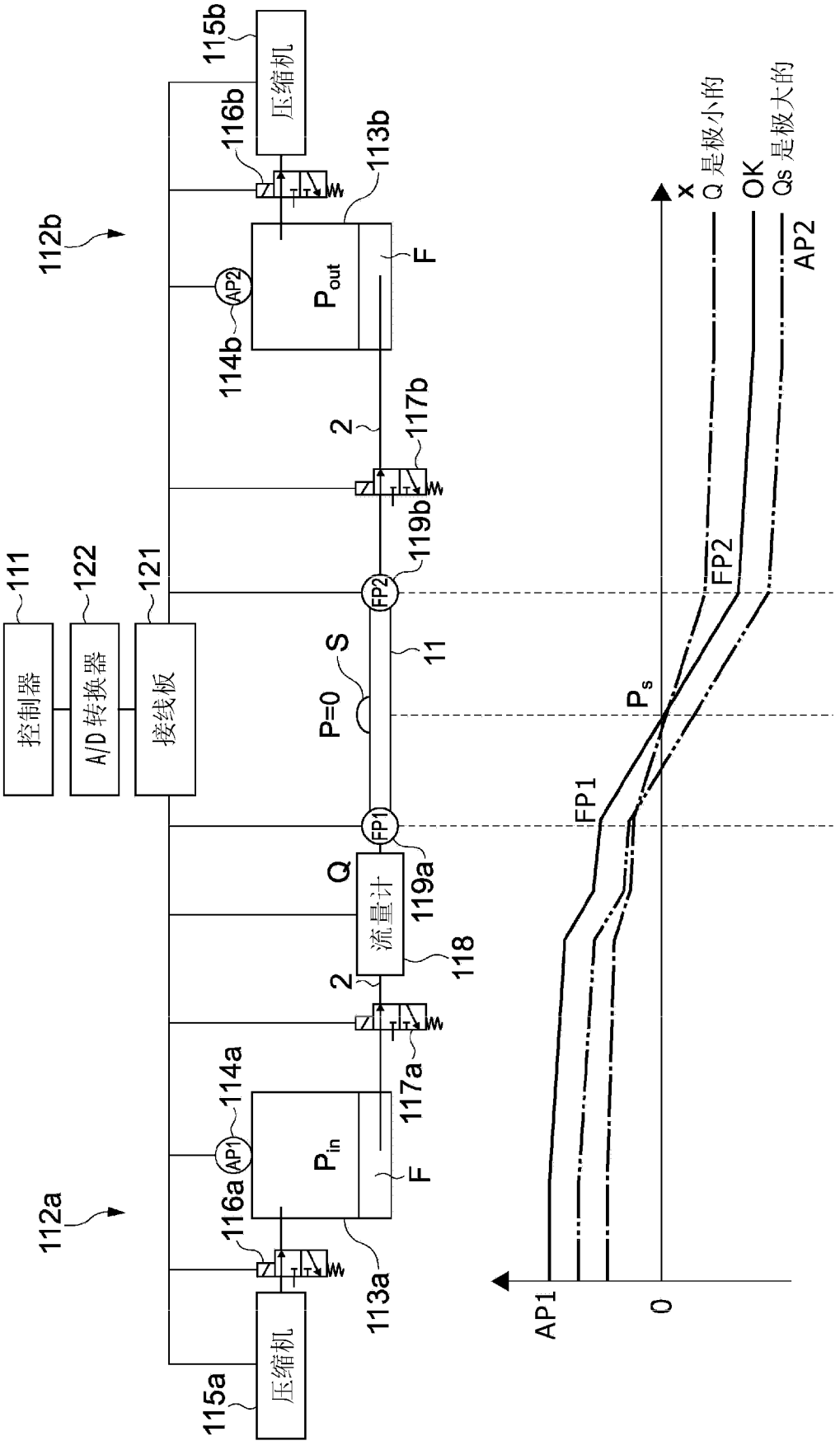


图 15



控制器
A/D 转换器
接线板
111
122
121
112a
112b
压缩机
115a
115b
116a
116b
113a
113b
114a
114b
AP1
AP2
P_{in}
P_{out}
F
117a
117b
118
119a
119b
2
11
S
P=0
Q
流量计
FP1
FP2
P_s
x
Q 是极小的
OK
Qs 是极大的
AP2
0

图 16

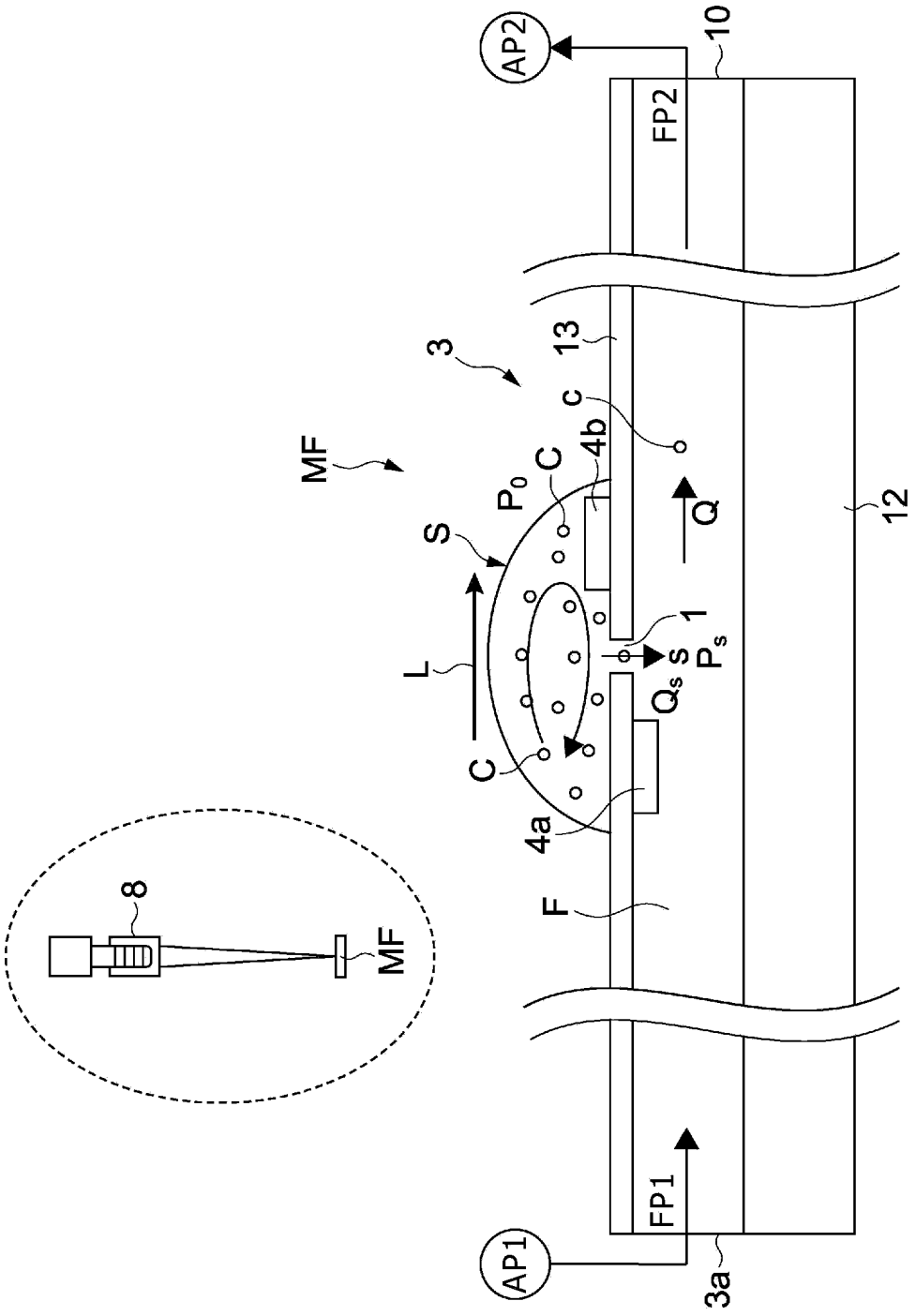


图 17