(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年11月2日(02.11.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/188065 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01)　　*B81B 1/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2017/015594

(22) 国際出願日：　2017年4月18日(18.04.2017)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-087745　2016年4月26日(26.04.2016)　JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 澤井 哲(SAWAI, Satoshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 中島 昭彦(NAKAJIMA, Akihiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

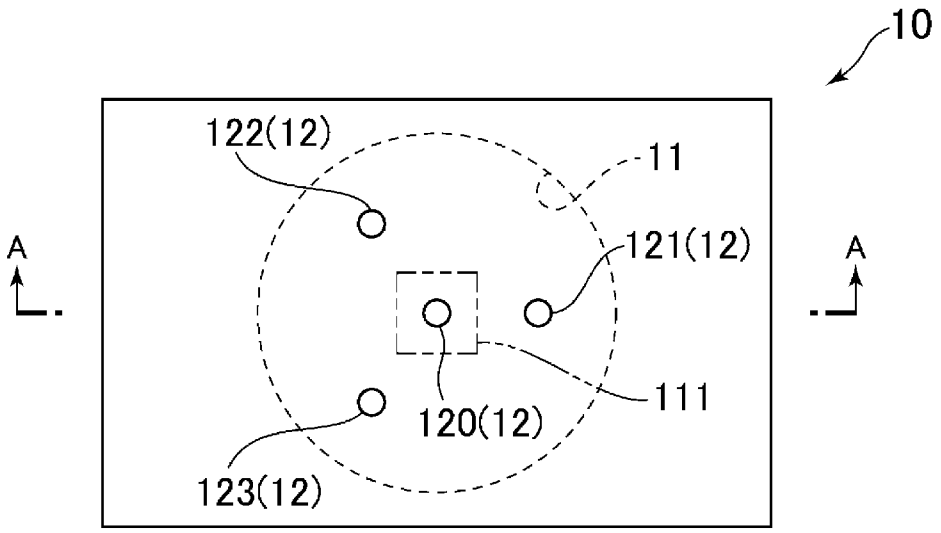
(74) 代理人: 成瀬 重雄(NARUSE, Shigeo); 〒1040061 東京都中央区銀座８丁目１６番１０号 中銀本社ビル３階 成瀬・清水特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) **Title:** FLUID FLOW CONTROL DEVICE AND FLUID FLOW CONTROL METHOD

(54) 発明の名称： 流体流制御装置及び流体流制御方法



(57) **Abstract:** The present invention provides a technique such that the flow of a fluid and a concentration gradient formed by the flow can be controlled in a desired direction. A chamber 11 is a closed space extending in a two-dimensional direction. The chamber 11 includes a specific region 111 in a part thereof. Both a first port and second port 121, 122 deliver the fluid into the chamber 11 in a direction crossing the extension direction of the chamber 11. Thus, a combined flow having a velocity component in at least one direction is generated at or near the specific region 111. Discharge ports 13 allow the fluid to be discharged from an edge part in the extension direction of the chamber 11 or the vicinity thereof.

WO 2017/188065 A1

［続葉有］

TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：本発明は、流体の流れと、それにより形成される濃度勾配を、所望の方向に制御することができる技術を提供するものである。チャンバ１１は、二次元方向に延長された閉鎖空間となっている。チャンバ１１は、その一部に特定領域１１１を含んでいる。第１ポート及び第２ポート１２１及び１２２は、いずれも、チャンバ１１内に流体を、チャンバ１１の延長方向に交差する方向に向けて供給する。これにより、特定領域１１１又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流が形成される。排出ポート１３は、チャンバ１１の延長方向における端部又はその近傍から流体を排出させる。

明　細　書

発明の名称 ： 流体流制御装置及び流体流制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、流体の流れを制御するための技術に関するものである。

背景技術

[0002] マイクロ流体デバイスの発展によって、いわゆる濃度勾配形成の手法が発展したことで、細胞が濃度勾配をいかに検知しているかについての研究が進展した。しかしながら従来のマイクロ流体デバイスでは、細胞の任意の箇所にたいして、任意の方向に薬剤刺激および濃度勾配を加えることや、その向きを時間的になめらかに切り替えることが困難である。以下に、問題点を具体的に述べる。

[0003] 1. 微小流路内の細胞への薬剤刺激の投与法としては、Ｔ字型流路を用いる方法（下記特許文献１及び非特許文献１参照）、階段状のミキサーやクリスマスツリー型の分岐流路によって層流を分配することで濃度勾配を形成する手法（下記特許文献２及び非特許文献２参照）がある。これらの手法では、層流の方向、したがって刺激物質の濃度勾配の向きが一意的に決定されてしまっている。同様の問題は、刺激物質の投与口をチャンバの天井に設けた方式（下記特許文献３参照）についてもあてはまる。

[0004] 2. 勾配の時間的な切替については、３分岐型の流路において、刺激の投入口の切替による勾配の向きの切替（下記非特許文献３参照）、ならびに流速変化による勾配の位置の移動を行う技術（下記非特許文献４参照）が提案されている。また、クリスマスツリー型の分岐流路を二層式にし、これらの層の間を切り替える手法（下記非特許文献５参照）もある。これらの方法では、勾配の向きの制御は１８０度の反転に限られており、また、切り替えの際に刺激濃度の一過的な乱れが不可避的に生じてしまう。

[0005] 3. 直線状の流路を３つ重ね合わせた形状の放射状流路の末端部にもうけた複数の流入、流出口によって層流を形成させることにより刺激角度を変化

させる方式（下記非特許文献６参照）も存在する。しかしながら、この技術では、流入・流出口の位置とその離散性のため、刺激角度の連続可変的な調節ができない。同様の問題は、層流を用いない、パッシブ方式（円形チャンバの周縁部にもうけた複数の染み出し口から刺激物質を加える方式、下記特許文献４参照）においても同様である。

[0006] 4. マニピュレータに取り付けて可動させる方式のデバイスでは、流入、流出口を対としてダイポール型に配置し（下記非特許文献７参照）、細胞の直上に層流を与えることを可能にしている。このデバイスを任意の方向に配置することで、刺激が投入される角度を変化させることが可能であるが、装置の配置や移動により生じる速度場の不安定化によって、層流の方向が一過的に乱れてしまう。

[0007] ホルモンや増殖因子、誘引物質などの生理活性分子の刺激は、多くの場合、細胞のどの場所にどの側面から刺激が加えられるかという点が重要である。たとえば神経であれば軸索のどの箇所にどの側面から誘引物質を与えるかによって軸索が伸びる方向が変わる。白血球のように動く細胞では、細胞前端、後端の違い、またどの角度から刺激を加えるのかなどで動く方向が決定される。刺激物質の濃度勾配へ向かう又はそれから離れる運動は走化性（chemotaxis; 化学走性）運動と呼ばれる。マイクロ流体デバイスを用いたいわゆる勾配形成装置の発展と応用によって、刺激物質の濃度勾配により細胞の形態や運動がいかに制御されるかについての理解が進展した。しかしながら一方で、細胞の方向転換がいかにしておこなわれるかは、ほとんど手がつけられていない問題である。

[0008] 前記したように、細胞が刺激によってどのように動く向きを変えるのか、もしくは細胞の伸張方向の向きを変化させるのかを精密に観察したいという要望がある。走化性誘引物質の濃度勾配の向きの変化にたいして、細胞運動の向きの変化を調べるためのアッセイは、従来、刺激物質をマイクロピペットに充填し、マニピュレータでその位置を変えることでおこなわれてきた（下記非特許文献８及び９参照）。この方法では、任意の方向に刺激物質の濃

度勾配を与えることができるが、濃度勾配の角度を正確に切り替えるためには、作業者の熟練した手作業を必要とする。しかも、この方法では、勾配の除去をパッシブな拡散にまかせているため、素早い切り替えが原理的に困難である。また、溶液中のマイクロピペットの移動による溶液の流れが不可避的に生まれるため、細胞程度の大きさ（マイクロメートルスケール）での安定な濃度勾配の形成は困難であった。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：米国特許第７１１２４４４号公報

特許文献2：米国特許第７３１４０７０号公報

特許文献3：米国特許第７４７０４０３号公報

特許文献4：米国特許第８２１６５２６号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Beebe, D. J., Mensing, G. A. & Walker, G. M. 2002 Physics and applications of microfluidics in biology. Annual review of biomedical engineering 4, 261-286. (doi:10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916)

非特許文献2：Jeon, N. L., Dertinger, S. K. W., Chiu, D. T., Choi, I. S., Stroock, A. D. & Whitesides, G. M. 2000 Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems. Langmuir 16, 8311-8316. (doi:10.1021/la000600b)

非特許文献3：Meier, B., Zielinski, A., Weber, C., Arcizet, D., Yousseff, S., Franosch, T., Radler, J. O. & Heinrich, D. 2011 Chemotactic cell trapping in controlled alternating gradient fields. Proc Natl Acad Sci USA 108, 11417-11422. (doi:10.1073/pnas.1014853108)

非特許文献4：Nakajima, A., Ishihara, S., Imoto, D. & Sawai, S. 2014 Rectified directional sensing in long-range cell migration. Nat Commun 5, 5367. (doi:10.1038/ncomms6367)

非特許文献5：Irimia, D., Liu, S.-Y., Tharp, W. G., Samadani, A., Toner, M. & Poznansky, M. C. 2006 Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients. Lab Chip 6, 191-198. (doi:10.1039/b511877h)

非特許文献6：Moorjani, S., Nielson, R., Chang, X. A. & Shear, J. B. 2010 Dynamic remodeling of subcellular chemical gradients using a multi-directional flow device. Lab Chip 10, 2139-2146. (doi:10.1039/c004627b)

非特許文献7：Qasaimeh, M. A., Gervais, T. & Juncker, D. 2010 Microfluidic quadrupole and floating concentration gradient. Nat Commun 2, 464-464. (doi:10.1038/ncomms1471)

非特許文献8：Swanson, J. A. & Taylor, D. L. 1982 Local and spatially coordinated movements in Dictyostelium discoideum amoebae during chemotaxis. Cell 28, 225-232.

非特許文献9：Andrew, N. & Insall, R. H. 2007 Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. Nat Cell Biol 9, 193-200. (doi:10.1038/ncb1536)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] したがって、任意の方向に刺激物質の濃度勾配を加え、およびその角度を時間的になめらかに、もしくは不連続的に切り替えることができる新たな方法が必要であった。

[0012] 本発明は、前記した状況に基づいてなされたものである。本発明の主な目的は、流体の流れと、それにより形成される濃度勾配を、所望の方向に制御することができる技術を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 前記した課題を解決する手段は、以下の項目のように記載できる。

[0014] （項目１）

流体の流れを制御するための装置であって、

デバイス本体を備えており、

前記デバイス本体は、チャンバと、流入ポートと、排出ポートとを備えており、

前記チャンバは、二次元方向に延長された閉鎖空間となっており、

かつ、前記チャンバは、その一部に特定領域を含んでおり、

前記流入ポートは、少なくとも第１ポートと第２ポートとを備えており、

前記第１ポート及び第２ポートは、いずれも、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給することにより、前記特定領域又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成する構成となっており、

前記排出ポートは、前記チャンバの前記延長方向における端部又はその近傍から前記流体を排出させる構成となっている

流体流の制御装置。

[0015] （項目２）

前記第１ポートと前記第２ポートとは、前記特定領域を中心として、約１２０度の位相差となる位置又はその近傍に配置されている

項目１に記載の制御装置。

[0016] （項目３）

前記流入ポートは、第３ポートをさらに備えており、

前記第３ポートは、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給する構成となっており、

かつ、前記第３ポートは、前記特定領域を中心として、前記第１及び第２ポートとそれぞれ約１２０度の位相差となる位置又はその近傍に配置されている

項目２に記載の制御装置。

[0017] （項目４）

前記流入ポートは、被制御流ポートをさらに備えており、

前記被制御流ポートは、前記特定領域又はその近傍に被制御流を供給する構成となっている

項目１～３のいずれか１項に記載の制御装置。

[0018] （項目５）

さらに制御部を備えており、

前記制御部は、前記流入ポートから前記チャンバ内に流入する前記流体の流量又は流速を制御する構成となっており、

さらに、前記制御部は、前記流入ポートから前記チャンバへの前記流体の流入量又は流速を制御することにより、前記合成流の向きを制御する構成となっている

項目１～４のいずれか１項に記載の制御装置。

[0019] （項目６）

前記制御部は、前記合成流の向きを、角速度が一定となるように回転させる構成となっている

項目５に記載の制御装置。

[0020] （項目７）

前記制御部は、前記合成流における濃度勾配プロファイルが一定となるように前記流体の流入量又は流速を制御する構成となっている

項目５又は６に記載の制御装置。

[0021] （項目８）

さらに刺激入力部を備えており、

前記流入ポートから前記チャンバ内に流入する流体としては、ケージド物質が用いられており、

前記刺激入力部は、前記チャンバ内に流入して前記合成流を構成する前記ケージド物質に、アンケージのための刺激を加える構成となっている

項目１～７のいずれか１項に記載の制御装置。

[0022] （項目９）

前記特定領域は、前記チャンバの前記二次元方向における中央部分またはその近傍の位置とされている

項目１～８のいずれか１項に記載の制御装置。

[0023] （項目１０）

前記流入ポートは、第４ポートをさらに備えており、

前記チャンバは、その一部に第２特定領域をさらに含んでおり、

前記第２領域は、前記特定領域とは異なる位置とされており、

前記第４ポートは、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給することにより、前記第２特定領域又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成する構成となっている

項目１～９のいずれか１項に記載の制御装置。

[0024] （項目１１）

前記排出ポートは、前記チャンバの延長方向端部において、前記流体を、ほぼ一様な速度で排出する構成となっている

項目１～１０のいずれか１項に記載の制御装置。

[0025] （項目１２）

さらに流体供給部と流体排出部とを備えており、

前記流体供給部は、前記流入ポートに前記流体を供給する構成となっており、

前記流体排出部は、前記排出ポートから前記流体を回収する構成となっている

項目１～１１のいずれか１項に記載の制御装置。

[0026] （項目１３）

項目１～１２のいずれか１項に記載の制御装置を用いて流体の流れを制御するための方法であって、

前記第１ポート及び第２ポートから、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給することにより、前記特定領域

又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成するステップと、

前記第１ポート及び第２ポートのうちの一方又は両方における、前記流体の流速又は流量を変更することにより、前記合成流の方向又は流速を変更するステップと

を備える流体流の制御方法。

発明の効果

[0027] 本発明によれば、流体の流れと、それにより形成される濃度勾配を、所望の方向に制御することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]本発明の第１実施形態における流体流制御装置の概略的な構成を示すためのブロック図である。

[図2]図１の流体流制御装置に用いられるデバイス本体を平面視した状態での概略的な説明図である。

[図3]図２のＡ－Ａ線に沿う概略的な断面図である。

[図4]図１のデバイス本体に設けられる流入ポートと排出ポートとの配置状態を説明するための説明図である。この図では、流入ポート部分を上側に、排出ポート部分を下側に、分離した状態で記載しており、第１～第３ポートの位置を、下側のチャンバにおいて、破線を用いて対応して記載している。

[図5]図４の説明図を斜視により立体的に表示した説明図である。

[図6]第１実施形態の装置を用いた刺激流の方向制御を説明するための説明図である。図６Ａは、チャンバ内の各チャンネルの配置と観察領域（矩形で囲まれた領域）を概略的に示している。図６Ｂは、チャンネル２から送液した場合の刺激流の方向を示している。図６Ｃは、チャンネル２と３から等量を送液した場合を示している。図６Ｄは、チャンネル３から送液した場合を示している。

[図7]刺激流の方向制御の原理を示すための説明図である。i番目のチャンネル（ここではチャンネル２）とj番目のチャンネル（ここではチャンネル３）

からの送液を制御することでチャンネル４からの刺激流の方向を制御する。チャンネル２とチャンネル３からのそれぞれの送液がチャンネル４の位置で作る流れ（調節流）の速度（すなわちv_2とv_3）の重ね合わせ（v）によって、チャンネル４からの刺激流の方向が決まる。

[図8]チャンバ内の調節流の様子を説明するための説明図である。図８Ａ及び８Ｂは、直径1μmの蛍光ビーズ（Fluoresbrite(R) YG Carboxylate Microspheres 1.00μm (15702), Polyscience）を混合したバッファ溶液を送液し、ビーズの蛍光によって調節流の様子を可視化した写真を示す。この写真は、共焦点顕微鏡による6秒間の連続撮影像の最大輝度値の重ね合わせにより作成された。写真中の小さい白丸領域はチャンネル１，２，３の位置を示す。チャンバ中心（白点）の天井のチャンネル４はこの例では閉じている。図８Ａは、調節送液量一定制御の方法で、チャンネル２と３からの送液量の比p = 0.2の場合を示す。図８Ｂは、チャンネル２と３からの送液量の比pがp = 0, 0.2, 0.5の場合の、チャンバ中心付近の調節流の様子を示す。図８Ｃ及び８Ｄは、粒子画像流速測定法（Particle image velocimetry、PIV）による調節流層流の方向および流速の評価を示すグラフであり、調節流の方向（図Ｃ）と流速（図Ｄ）のp依存性について、調節送液量一定制御の場合（白丸）、調節流速一定制御の場合（×）の実測値を用いて示している。チャンバ中心での70μm × 70μmの範囲の調節流の方向および流速の平均を、30ミリ秒間隔で2秒間にわたり計測し、時間平均 ± 標準偏差を算出した。図８Ｃには、調節流の角度θのp依存性に関する理論曲線（式（１））を示し、図８Ｄには、流速のp依存性に関する理論曲線（式（２））を示す。p = 0と1での流速の平均を、理論曲線（式（２））のv_{max}とした。図８Ｄの破線は、送液量比pによらず流速がv_{max}に一致する場合を示す。送液には、Fluigent社の微小流制御装置MFCSを用いた。p = 0, 1のときの単位時間あたりの送液量Q_cは10μL/minとした。

[図9]刺激流の実測値を示すグラフである。図９Ａは、調節送液量一定制御にて、チャンネル２および３からの送液量比pをp = 0, 0.3, 0.7, 1としたときの刺激流（蛍光測定のためフルオレセイン溶液を用いた）の共焦点顕微鏡像

である。図９Ｂは、送液量比pに対する刺激流の方向依存性を示すグラフである。図中で丸は実測値、図中曲線はθのp依存性に関する理論曲線（式（１））を示す。図９Ｃ及びＤは、刺激流に対する垂直方向において形成される濃度プロファイルを示すグラフである。図９Ｃは調節送液量一定制御の場合を示し、図９Ｄは調節流速一定制御の場合を示す。これらの図において、横軸は、チャンネル４の中心から半径400μmの円周上における位置を示し、縦軸は、フルオレセイン（刺激流）の蛍光値を示す。また、これらの図における左側のグラフは、送液量比pを0から1まで変化させた時の、円周上での濃度の空間プロファイルであり、右側のグラフは、濃度の極大値を揃えた場合（つまり、極大値の比較のために、同じ位置に濃度勾配曲線を配置したグラフ）である。チャンネル１，２，３からの送液には、微小流制御装置（MFCS、Fluigent社）を用い、チャンネル４からの送液にはシリンジポンプ（Pump 11 Elite、 Harvard Apparatus社）を用いた。

[図10]回転波刺激の実例を示す説明図である。図１０Ａは、チャンネル１、２、３（CH１、２、３）の送液量を時間的に変化させた際の回転波の共焦点顕微鏡像である。この図では、刺激流の向きが3分間で360度回転している。ここでは、刺激溶液に蛍光物質を混合し、その蛍光強度によって刺激流の様子を可視化している。図１０Ｂは、刺激流の濃度勾配プロファイルを示すグラフである。このグラフは、刺激の送液口中心から半径300 μmの円周上での蛍光強度（幅50μm中の平均蛍光強度）を表示している。また、このグラフでは、時刻3:12、3:42、4:12、4:42、5:12、5:42、6:12（分:秒）でのプロファイルをそれぞれ示している。図１０Ｃ及びＤは、刺激流の角度変化の様子とその評価を示している。これらの図は、チャンネル４の中心から半径 300μmの円周上での、刺激流の時間的な方向変化（上側の図）と、刺激流の角度と角速度の関係（下側のグラフ）を示す。図１０Ｃでは、送液量比pを時間に比例して変化させた場合を示しており、図１０Ｄでは、導出した関係式に従ってｐを時間変化させた場合を示している。図１０Ｃ及びＤの上側の図は蛍光強度を濃淡でしめしている。図１０Ｅは、送液量を時間に比例して変化させ

た場合と、導出した関係式に従って時間変化させた場合における、角速度のばらつきを示すためのヒストグラムである。

[図11]単位時間あたりの刺激溶液の送液量によって刺激流の幅を変えることを示す、刺激流の共焦点顕微鏡像である。刺激溶液に混合した蛍光物質（フルオレセイン）の蛍光によって刺激流を可視化している。ここで、明るい部分が蛍光物質を示す。チャネル１から30μL/minで送液し、視野上方右側から下方左側に向かう調節流を形成した。チャンネル４からの刺激溶液の送液量は、左側の図から、1.0μL/min, 0.5μL/min, 0.2μL/min, 0.1μL/minとした。スケールバーは500μmを示す。

[図12]ケージド化合物の光アンケージングによる刺激流の形成を説明するための説明図である。図１２Ａは、光アンケージングによる刺激流形成の模式図、図１２Ｂは共焦点顕微鏡像の測定例、図１２Ｃは濃度勾配プロファイルの測定例を示す。視野下方左側から上方右側に向かう蛍光物質のケージド化合物（CMNBケージドフルオレセイン、F7103、Invitrogen社）の調節流を基本モジュールによって形成させ、視野中心付近の円形領域（図１２Ｂ）に紫外光を照射した。アンケージングによって遊離したフルオレセインの蛍光輝度を可視化した。遊離したフルオレセインの濃度勾配を、紫外光照射領域の中心から半径100μmの円周上において、幅10μmの領域中の平均蛍光輝度の空間分布によって評価した（図１２Ｃ）。光照射には、光刺激形成装置（Mosaic, Photonic Instruments社）を用いた。

[図13]光アンケージングによる刺激投入で形成した刺激物質濃度の空間プロファイルとその制御を説明するための説明図である。ここでは、ケージドフルオレセイン溶液を刺激溶液として用い、光照射によって遊離したフルオレセインの蛍光を共焦点顕微鏡によって測定した。図１３Ａは、調節流速一定制御の方法において、チャンネル２と３からの送液量の比がp = 0, 0.3, 0.7, 1の場合の、刺激流のスナップショットである。図１３Ｂは、刺激流の方向のp依存性を示すグラフであり、図中の丸は実測値、曲線はθのp依存性に関する理論曲線（式（１））を示す。図１３Ｃは、調節送液量一定制御の場合

の、刺激流の方向に垂直方向に形成される刺激物質濃度の空間プロファイルを示すグラフである。図中左側のグラフは、送液量比pを0から1まで変化させた時の、円周上での濃度の空間プロファイルであり、右側のグラフは、濃度の極大値の位置を同じとした場合のグラフである。図１３Ｄは、調節流速一定制御の場合の、刺激物質濃度の空間プロファイルを示すグラフである。ここでは、チャンバの中心に位置する半径34μmの円領域に光照射をおこない、チャンバの中心から半径100μmの円周上で、フルオレセインの蛍光を評価した。図１３Ｅは、光アンケージング位置をチャンバ中心からずらした場合の、刺激流方向の送液量比pへの依存性を説明するための説明図である。ここでは、チャンネル１と２からの送液量の比pを制御した。図１３Ｅにおいて左側の図は、アンケージングを行う位置を説明するための説明図であり、右側の図は、形成された刺激流の方向と送液比ｐとの関係を、アンケージングの位置ごとに示すグラフである。

[図14]ケージド化合物の光アンケージングによる刺激流の制御を説明するための図である。図１４Ａは、刺激流の幅を制御する例（共焦点顕微鏡像）である。これらの図における円形は、光照射領域を示しており、その直径を134μm，67μm，34μm，17μmとした。模擬的な刺激物質ケージド化合物としてケージドフルオレセインを用い、基本モジュール内で、視野上方右側から下方左側に向かう調節流を形成させ、視野中心付近の円形領域に紫外光を照射した。ここでは、アンケージングによる蛍光物質フルオレセインの遊離が蛍光輝度の上昇として可視化されている。光照射する領域の大きさに応じて、形成される刺激流の幅が変わっていることがわかる。図１４Ｂは、光アンケージングによって形成した比較的細い刺激流（半値幅83μm）を回転させた例を示す。ここでは、直径67μmの円形領域への紫外光照射によってアンケージングされたケージドフルオレセインの蛍光輝度の様子（共焦点顕微鏡像）が示されている。アンケージングによって遊離した蛍光物質の蛍光を計測することによって刺激を可視化している。また、ここでは、刺激流が３分間で一回転するように制御している。図中のスケールバーは１００μｍを示す。

[図15]ケージド化合物の光アンケージング位置を変えることにより、観察領域に異なる方向から刺激流とその勾配刺激を提示できることを説明するための図である。図１５Aは、刺激流制御の模式図である。図１５Bは、観察領域に異なる方向から与えた刺激流(アンケージングにより遊離したフルオレセイン)の共焦点顕微鏡像である。この図において丸は光アンケージング領域を示す。図１５Ｂにおける観察領域の位置はチャンネル１、２、３で囲まれた三角形の中心にとっている（図１５Ａの四角領域）。図１５Cは、図１５Ｂの画像中の矩形領域を拡大して表示したものであり、刺激流の拡大画像を示す。図１５Ｃにおける画像配列の順序は図１５Ｂに対応している。図１５Dは、刺激流の勾配プロファイルを示すグラフである。図１５Ｄは、右下へ向かって濃度上昇する勾配（図１５Cの上側の図における矩形領域）での輝度値プロファイル（図１５Ｄの上側の図）と、右上へ向かって濃度上昇する勾配（図１５Cの下側の図における矩形領域）での輝度値プロファイル（図１５Ｄの下側の図）である。

[図16]マルチプレックス流路系の模式図である。図１６Aは、マルチプレックス流路系の刺激送液口（Stimulus inlet、S）とバッファ送液口（Buffer inlet、B）の、いくつかの配置例を示す。第１実施形態における送液口（流入ポート）の位置関係を一つのモジュール（1S/3B、図１６A左側の図）として、それを複数配置することで任意の位置に刺激を与えることができる（左から順に、2S/4B、3S/9Bおよび3S/6B、4S/4Bおよび6S/6B）。図１６Bは、マルチプレックス流路系（3S/6B）を使った、細胞の方向転換実験の模式図である。

[図17]デュープレックス（2S/4B型）の流路の実装例を示す説明図である。図１７Aは概略的な流路を示す説明図である。図１７Bは、チャンネル５とチャンネル６からの刺激流（蛍光観察のためのフルオレセイン溶液）をチャンネル１、２、３からの送液によって方向付け、乗用車のフロント窓ワイパーのようにサンプル（観察領域、四角で表示）にたいして交互に投入する状態を示す（上側の図）。下側の図は、共焦点顕微鏡像であり、ここでは、２分ごとに観察領域（上側の図における四角）を通過する刺激流が切り替わり、こ

れが４分周期で繰り返される。図中のスケールバーは200μmを示す。図１７Ｃは、サンプルチャンバ内の観察位置によって（左側の図中の四角）、交代する勾配刺激のなす角度を０度から約180度までの間で選ぶことができる例を示す（右側の図におけるパネルROI１、ROI２、ROI３は左側の図における四角形の観察領域１、２、３に対応している）。右側の図における上段と下段は、それぞれチャンネル５、６からの刺激流に対応する。図中のスケールバーは100μmを示す。

[図18]走化性誘引物質サイクリックAMP(cAMP)の回転波刺激に対する細胞性粘菌Dictyostelium discoideum細胞の遊走を説明するための図である。左側の図は、cAMP溶液の刺激流(蛍光可視化のためにフルオレセインを含む)のスナップショットを示す。右側の図は、代表的な細胞の５０分間にわたる移動軌跡を示す（異なる濃度は異なる細胞を示す）。図中の破線は、刺激送液口である天井部の開口位置を示す。刺激流を回転させることで、cAMPの勾配が移動し、細胞がそれに向かって移動していることがわかる。

[図19]好中球様細胞株HL60の方向転換運動を説明するための図である。細菌性ペプチドfMLPに向かうHL60の細胞遊走の軌跡を下側の図の実線で示している。刺激は、上側の図に示すように、視野左上から右下に向かってfMLPの濃度が上昇する勾配と、視野左下から右上へとfMLPの濃度が上昇する勾配の二つを交互に繰り返している。

発明を実施するための形態

[0029] 以下、本発明の第１実施形態に係る流体流制御装置（以下単に「制御装置」又は「装置」と略称することがある）を、添付の図面を参照しながら説明する。

[0030] （第１実施形態の構成）

本実施形態の制御装置は、デバイス本体１０を備えている。さらに、この装置は、流体供給部（「送液部」と称することがある）２０と、流体排出部（「排液部」と称することがある）３０と、制御部４０とを追加的に備えている（図１参照）。

[0031] （デバイス本体）

デバイス本体１０は、チャンバ１１と、流入ポート１２と、排出ポート１３とを備えている（図２及び図３参照）。さらに、このデバイス本体１０は、流入チャネル１４と排出チャネル１５とを備えている（図４参照）。

[0032] （チャンバ）

チャンバ１１は、二次元方向に延長された閉鎖空間となっている（図３参照）。より具体的には、チャンバ１１は、デバイス本体１０の内部に形成された、扁平かつ略円柱状の空間となっている。

[0033] チャンバ１１は、その一部に特定領域１１１を含んでいる（図２参照）。特定領域とは、この実施形態では、観察の対象となる領域である。また、この実施形態では、チャンバ１１のほぼ中央部が、特定領域１１１とされている。特定領域１１１は、仕切られた領域という意味ではなく、チャンバ１１内の空間の一部をそのように把握するという意味であり、目的に応じて適宜の位置を特定領域１１１として認識できる。

[0034] （流入ポート）

この実施形態の流入ポート１２は、第１ポート１２１と、第２ポート１２２と、第３ポート１２３とを備えている（図２及び図３参照）。

[0035] 第１ポート～第３ポート１２１～１２３は、いずれも、チャンバ１１内に流体を、チャンバ１１の延長方向（図３においては例えば左右方向）に交差する方向（図３においては下向き）に供給することにより、特定領域１１１又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成する構成となっている。合成流の形成手法においては後述する。ここで、本明細書においては、流体とは、液体に限らず、本発明の対象となりうる流動性を有する流体、例えばゾル状やゲル状などの、流動性物質であってもよい。ただし、以下の説明では、基本的に、流体としては液体を仮定する。

[0036] 第１ポート１２１と第２ポート１２２とは、特定領域１１１を中心として、約１２０度の位相差となる位置又はその近傍に配置されている。さらに、本実施形態の第３ポート１２３は、特定領域１１１を中心として、第１及び

第２ポート１２１及び１２２とそれぞれ約１２０度の位相差となる位置又はその近傍に配置されている。つまり、第１ポート１２１～第３ポート１２３は、一つの仮想的な円周上に、等間隔で配置されている。

[0037] 本実施形態の流入ポート１２は、被制御流ポート１２０をさらに備えている。被制御流ポート１２０は、特定領域１１１又はその近傍に被制御流を供給する構成となっている（図２及び図３参照）。より具体的には、本実施形態の被制御流ポート１２０は、図３において下向きに、つまり第１～第３ポート１２１～１２３と平行な向きで、被制御流をチャンバ１１の内部に供給できるようになっている。ここで、本実施形態では、被制御流は、いわゆる刺激物質の流れである刺激流が用いられている。刺激物質とは、例えば細胞の走化性を調べる目的の場合は、走化性誘引物質である。

[0038] （排出ポート）

排出ポート１３は、チャンバ１１の延長方向における端部又はその近傍から前記流体を排出させる構成となっている。また、排出ポート１３は、チャンバ１１の延長方向端部において、流体を、ほぼ一様な速度で排出する構成となっている。

[0039] より具体的には、本実施形態の排出ポート１３は、チャンバ１１の側面（図３における左右の面）に、ほぼ全周にわたって、離散的に形成されている。したがって、実際は、複数の排出ポート１３が存在しているが、この明細書では、各排出ポートについて、同じ符号１３を付す。排出ポート１３間の間隔は、ほぼ均一となっている。また、特定領域１１１と排出ポート１３との距離は、できるだけ長くすることが好ましい。

[0040] （流入チャネル）

流入チャネル１４（図４及び図５参照）は、流体供給部２０から供給される流体を、流入ポート１２を構成する各ポート１２０～１２３にそれぞれ個別に供給するための経路である。この明細書では、各流入チャネルに対して同じ符号１４を付す。各流入チャネル１４は、この実施形態では、デバイス本体１０に形成された溝により形成されている。しかし、流入チャネル１４

の具体的構成としてはこれに制約されず、例えばマイクロ流体を搬送可能な配管を用いてもよい。

[0041] （排出チャネル）

排出チャネル１５（図４参照）は、チャンバ１１内に供給された流体を、排出ポート１３から回収して流体排出部３０に送るための経路である。排出チャネル１５は、この実施形態では、流入チャネル１４と同様に、デバイス本体１０に形成された溝により形成されている。しかし、排出チャネル１５としては、例えばマイクロ流体を送液可能な配管を用いてもよい。また、この実施形態では、各排出ポート１３から流体排出部３０までの経路長がほぼ等しくなるように（つまり各排出ポート１３での吸引圧力がほぼ等しくなるように）、排出チャネル１５の形状を設定している。

[0042] （流体供給部）

流体供給部２０は、流入ポート１２に流体を供給する構成となっている。

[0043] 具体的には、流体供給部２０としては、シリンジポンプ又は送液用圧力制御装置のように、マイクロ流体の供給のために使用可能な各種の機器を用いることができる。流体供給部２０は、流入チャネル１４における端部（流入ポート１２とは反対側の端部）に接続されており、流入チャネル１４に流体を供給できるようになっている。本実施形態の流体供給部２０は、制御部４０からの制御に従って、各流入チャネル１４への流体の流量又は流速をポートごとに設定することができるようになっている。

[0044] （流体排出部）

流体排出部３０は、チャンバ１１内に供給された流体を、排出ポート１３から、排出チャネル１５を介して回収する構成となっている。具体的には、流体排出部３０としては、排液用の各種のポンプを使用することができる。ここで、流体排出部３０としては、チャンバ１１にすでに供給された流体が、その後にチャンバ１１に供給される流体の流れを乱さないように、流体をチャンバ１１から等方的に回収することが好ましい。なお、流体排出部３０としては、ポンプのように能動的に排出する手段に限らず、例えば、排出さ

れる流体を受動的に（つまり積極的な吸引を行わずに）回収する手段であってもよい。

[0045] （制御部）

制御部４０は、流入ポート１２からチャンバ１１内に流入する流体の流量又は流速をポートごとに制御する構成となっている。より具体的には、本実施形態の制御部は、流入ポート１２からチャンバ１１への流体の流入量又は流速を制御することにより、チャンバ内での合成流の向きを制御する構成となっている。制御部４０での動作については後述する。

[0046] （本実施系の動作）

以下、本実施形態の動作原理と制御方法を説明する。

[0047] まず、一例として、細胞などの接着性のある観察対象を、チャンバ１１の中央付近の特定領域（図６Ａにおける矩形領域）１１１に接着させて固定する。なお、観察対象の固定方法は特に制約されず、観察可能であれば固定されていなくともよい。また、以下の説明では、特定領域を「観察領域」と称することがある。

[0048] ついで、制御部４０は、流体供給部２０により、チャンバ１１中心の天井（つまり被制御流ポート１２０）より、被制御流（以下では「刺激」又は「刺激流」と称することがある）を投入する。

[0049] これと同時に又は前後して、制御部４０は、被制御流ポート１２０を取り囲む第１～第３ポート１２１～１２３からの送液量を、流体供給部２０から各流入チャネル１４への送液量を調節することにより調節する。これにより、チャンバ内に形成される層流の方向と幅、すなわち刺激流の方向と濃度の空間プロファイルを制御する。このための方法は以下のように表現できる。

・各ポートからの送液の流速の制御によって、ビーム状の刺激流およびそれによって形成される濃度勾配を、２次元上で任意の方向にむける方法。

・送液量を動的に変化させ、刺激流の方向を時間的に変動させる方法。

・この場合において刺激流方向の変化速度を一定に保つための送液量の調節方法。

[0050] （基本原理）

以下の説明では、デバイス本体１０の天井に設けた４個の流入ポート（以下「送液口」ということがある）１２のうち、第１～第３ポート１２１～１２３（以下単に「チャンネル１、２、３」と称することがある）は、バッファ送液口を構成し、被制御流ポート１２０（以下単に「チャンネル４」と称することがある）は、刺激溶液の送液口を構成するものとする。

[0051] チャンネル４からの送液量を一定に保ちながら、チャンネル１、２、３からの送液を切り替える。チャンネル１、２、３からの送液は、チャンバ１１の周縁部に設けた排出ポート（以下「廃液口」と称することがある）１３（図４参照）にむけて、流れ場を形成する。

[0052] ここでは特に、観察対象とする細胞を置くこととなるチャンバ１１の中央付近（図６Ａの特定領域１１１）に着目し、そこにもうけているチャンネル４付近の流れの方向を考察する。チャンネル１、２、３のどれか一つのみから送液する場合、刺激流の方向は、層流調整用の送液チャンネル（図６Ｂの例ではチャンネル２）からの流れ（調節流）によってのみ定まる。つぎに、チャンネル２、３の両方から送液すると、両チャンネルからの送液量の比によって、チャンネル２と４を通る直線とチャンネル３と４を通る直線とがなす角（１２０度）の間の任意の方向に向かせることができる（図６Ｃ）。この場合、チャンネル２、３の送液量の比によって任意の方向に合成流を向けることができる。チャンネル３のみから送液した場合には、チャンネル２のみからの場合に形成される方向から１２０度回転した方向に流れが向く（図３Ｄ）。このような操作をチャンネル（２、３）の組み合わせだけでなく、チャンネル（３、１）とチャンネル（１、２）においても同様に行うことで、チャンネル４からの刺激流を１２０度×３＝３６０度の全方向に向けられることが期待される。なお、この明細書において合成流とは、一つのチャンネルのみからの送液によって形成される流れである場合も含む。

[0053] （調節流および刺激流の速度の方向と大きさの決定方法）

層流調整用のi番目とj番目のポート（この例では第１～第３ポートうちの

任意の二つ）からの流れ（調節流）を、被制御流ポート１２０（図７のチャンネル４）の近傍で合成することで、速度ベクトルvをもった調節流を実現したいとする（図７）。チャンネル４の位置における、それぞれのチャンネルからの流速の寄与をベクトルv_iおよびv_jで表すこととし、これらの絶対値を0からv_{max}に変化させながら、その合計を一定（v_{max}）に保つこととする。いまj番目の流速の相対比をp、すなわち

[0054]

$$\frac{|\mathbf{v}_j|}{v_{\max}} = p$$

とおくと、流速の合計が一定より

$$\frac{|\mathbf{v}_i|}{v_{\max}} = (1-p)$$

と書ける。ベクトルの重ね合わせにより、チャンネル４の位置における調節流の速度 $\boldsymbol{v}$は、

$$\frac{\boldsymbol{v}}{v_{max}} = (1-p)\frac{\boldsymbol{v}_i}{|\boldsymbol{v}_i|} + p\frac{\boldsymbol{v}_j}{|\boldsymbol{v}_j|}$$

と書ける。いま便宜上、i 番目の送液口からチャンネル４に向かう方向に x 軸をとり、j番目の送液口からチャンネル４に向かう直線となす角度を ϕ とおく。

$$\frac{\mathbf{v}_i}{|\mathbf{v}_i|} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix},\ \frac{\mathbf{v}_j}{|\mathbf{v}_j|} = \begin{pmatrix} \cos\phi \\ \sin\phi \end{pmatrix}$$

より

$$\frac{\boldsymbol{v}}{v_{max}} = \begin{pmatrix} 1-p(1-\cos\phi) \\ p\sin\phi \end{pmatrix}$$

と書ける。$\boldsymbol{v}$ と x 軸がなす角度 θ は、

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{p\sin\phi}{1-p(1-\cos\phi)}\right)$$

となる。また、$\boldsymbol{v}$ の大きさは、

[0055]

$$|\boldsymbol{v}| = v_{max}\sqrt{1-2(1-\cos\phi)p+2(1-\cos\phi)p^2}$$

で与えられる。ここで、$\tan^{-1}$は[0,180]度、流速比pは[0, 1]を定義域とする。ϕ＝１２０度（基本モジュール）の場合、調節流を目的の方向θ（図７）

に向けるには、

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{\sqrt{3}p}{2-3p}\right) \qquad \text{式 （1）}$$

にしたがって p を制御すればよい。v の大きさは、

$$|v| = v_{max}\sqrt{1-3p(1-p)} \qquad \text{式 （2）}$$

となる。

[0056] このように調節流を形成することによって、チャンネル４からの刺激流の方向を決定できることが期待される。実際の操作としては、送液量の相対比（ j番目のチャンネルからの送液量 Q_j ）／（ i番目と j番目のチャンネルからの送液量の和 $Q_i + Q_j$ ）を制御することで流速比（$p = Q_j/(Q_i + Q_j)$）を調節することになる。ただしここで、Q_iおよびQ_j はi番目とj番目のチャンネルからの単位時間あたりの送液量である。流速比、すなわち送液量比pを変化させるには主に以下の二つの方法がある。

[0057] １）i番目とj番目のチャンネルからの送液量の和、つまり調節送液量 Q_{sum} (= $Q_2 + Q_3$）を一定値 Q_c に保ちながらpを制御する（「調節送液量一定制御」、$Q_{sum} = Q_c$）。この場合、チャンバ中心での調節流の流速は式（２）で表される。

[0058] ２）チャンバ１１の中心での調節流の流速を一定に保つように、送液量比pとともに調節送液量 Q_{sum}を制御する（「調節流速一定制御」）。この制御を実現するためには、式（２）における送液量比pへの依存性を打ち消すように、調節送液量 Q_{sum} を、pに対応して、

[0059]

$$Q_{sum} = Q_c/\sqrt{1-3p(1-p)}$$

を保つように制御する。

[0060] なお、いずれの制御方法においても、送液量比pがp = 0およびp = 1では、$Q_{sum} = Q_c$ となる。以上の議論は、チャンネル（２、３）、チャンネル（３、１）とチャンネル（１、２）の組み合わせのいずれにおいても同様に成立す

る。

[0061] 上述の送液制御は、送液速度がプログラム可能な市販のシリンジポンプや、圧力制御型の微小流制御装置を流体供給部２０として用いることにより、比較的簡便におこなうことができる。チャンバ１１内に形成される実際の流れ（合成流）の例を図８に示す。この例では、圧力制御型の微小流制御装置を流体供給部２０として用いて、デバイス本体１０（基本モジュール）のチャンネル２と３から、蛍光ビーズを含んだバッファを送液し、チャンバ１１（サンプルチャンバ）内の調節流の様子を可視化した。ここではチャンネル４の送液口（被制御流ポート１２０）は閉じている。送液量の相対比p（（チャンネル3からの送液量 Q_3）／（チャンネル2とチャンネル3からの送液量の和 $Q_2 + Q_3$））がp = 0のとき、上述の議論で期待されたように、チャンネル４の位置（チャンバ１１の中心であり、図８において白点で示す）での調節流（つまり特定領域１１１での合成流）は、図８において右方向を向き、p = 0.2や0.5では右上方向へと向きを変える。粒子画像流速測定法（Particle image velocimetry、PIV）をもちいて、蛍光ビーズ（Fluoresbrite(R) YG Carboxylate Microspheres 1.00μm (15702), Polyscience）の位置の時間変化から、調節流の方向と流速を評価した（図８ＣおよびＤ）。調節送液量一定制御の方法にしたがい、送液量比pを0から１まで変化させると、調節流の方向は120度変わる（図８Ｃ）。調節流の方向θのp依存性は、実測値と理論値（式（１））によい一致がみられる（図８Ｃ）。また、流速は、pに対して非単調な依存性を示し、p = 0.5で極小値をとる（図８Ｄ）。流速のp依存性についても、理論式（式（２））とのよい一致がみられる（図８Ｄ）。調節流速一定制御の方法においても、調節流の方向のp依存性は、さきほどと同様に理論式（式（１））とのよい一致がみられる（図８Ｃ）。またそのときの流速は、期待されるように、pの値によらずほぼ一定に保たれる（図８Ｄ）。調節送液量一定制御の場合、pを0から1まで変化させたときの流速の平均は240 μm/secであり、平均のばらつき（標準偏差／平均）は25%であるのに対して、調節流速一定制御では、流速の平均値は330 μm/sec、平均のばらつきは2%と

、流速のばらつきを大きく抑えることができる。前記した例における流体供給部２０としては、Fluigent社の微小流制御装置MFCSを用いた。本例におけるp = 0, 1のときの単位時間あたりの送液量Q_cは10 μL/minであった。

[0062] つぎに、基本モジュールのチャンネル２と３からバッファを送液して調節流の方向を制御しながら、チャンネル４から刺激物質溶液を送液したときの様子を図９に示す。図８で確認した基本的な振る舞いから期待されるように、送液量の相対比がp = 0のとき、刺激流は右の方向を向き、p = 0.3で右上、p = 0.7で上方向へ、p = 1では左上方向へと向きを変える（図９Ａ）。送液量比pを0から１まで変化させると、刺激流の方向は120度変わる（図９Ｂ）。実測した刺激流の方向θのp依存性は、図８での基本動作と同様、理論式（式（１））とのよい一致がみられる（図９Ｂ）。調節送液量一定制御の場合は、刺激流とそこからの刺激物質の拡散によって形成される山型の濃度勾配プロファイルは、pによって大きく変化してしまう（図９Ｃ）。pが0か1に近い値では、極大値が低く、pが0.5かそれに近い値では、極大値が高い（図９Ｃ）。一方、調節流速一定制御の場合、刺激物質濃度の空間プロファイルが角度にほとんど依存しなくなる（図９Ｄ）。調節送液量一定制御の場合、pを0から1まで変化させたときの濃度プロファイルの極大値（蛍光輝度値）は、平均値が0.49で、平均のばらつき（標準偏差／平均値）は14%であり、ピークの蛍光輝度の20%から80%範囲での濃度勾配の平均は0.021 μm^{-1}、傾きのばらつき（標準偏差／平均値）は18%となった。それに対して、調節流速一定制御の場合には、極大値濃度の平均が0.40でそのばらつきは9%、勾配の傾きの平均は0.0018 μm^{-1}、傾きのばらつきは11%となった。このように、調節流速一定制御の場合に、濃度のピーク値、濃度勾配いずれにおいても、濃度勾配の空間プロファイルのばらつきを抑えることができる。なお、前記の例において、チャンネル１，２，３からの送液には、微小流制御装置（MFCS、Fluigent社）を用い、チャンネル４からの送液にはシリンジポンプ（Pump 11 Elite、 Harvard Apparatus社）を用いた（以下同様）。すなわち、本実施形態の制御部４０により、合成流における濃度勾配プロファイルが一定となるよう

に流体の流入量又は流速を制御することができる。

[0063] （刺激流の方向を一定速度で変化させる方法）

チャンネル１、２、３からの送液速度の組み合わせを連続的に時間変化させることで、刺激流の方向を回転させ、進行波型の刺激を実現できる。またこの際、以下の考察に基づき送液量を制御部４０により動的に制御することで、進行波の移動速度を勾配の法線方向にたいして一定に保てることを示す。

[0064] 上述の基本原理での議論に基づくと、pの微小変化にたいするチャンネル４付近の流体の流れの方向は

[0065]

$$\frac{d\theta}{dp}=\frac{\sin\phi}{2(1-\cos\phi)p^2-2(1-\cos\phi)p+1}$$

によって変化することが期待される。いま、送液量比pを変えることで、θを時間的に変化させたとすると、角速度は

$$\omega(\theta)=\left(\frac{dp}{dt}\right)\left(\frac{d\theta}{dp}\right)$$

と表される。したがって、$\omega(\theta)=\omega_0$＝一定とするには、基本モジュール（$\phi=120$度）では

$$\left(\frac{dp}{dt}\right)=\omega_0\cdot\left(\frac{d\theta}{dp}\right)^{-1}$$
$$=\omega_0\cdot 2\sqrt{3}\left(p^2-p+\frac{1}{3}\right) \quad \text{式（３）}$$

にしたがうように、pを時間的に制御することで達成される。

[0066] 上述の議論にしたがい、チャンネル（１、２）、チャンネル（２、３）、チャンネル（３、１）の組み合わせの順に、送液量比pを時間的に変化させることによって、角速度を保ちながらチャンネル４からの刺激流の方向を１回転できることを図１０に示す。チャンネル１、２、３の送液を制御することで、はじめ右下方向へ向いた刺激を反時計回りに１回転させた（図１０Ａ）。また、刺激流およびその勾配が作る生理活性物質の濃度分布は、流れの垂

直方向にみると、山型の形状を持つ。刺激流の向きが回転するのに対応して、山型の濃度勾配の向きが変化する（図１０Ｂ）。送液量比pを時間に比例するように変化させた場合と、導出された関係式（式（３））にしたがって変化させた場合について、刺激流の方向変化の比較を示す（図１０ＣとＤ）。送液量比pを時間的に線形に変化させた場合、刺激流の方向を回転できるものの、方向によって回転速度が変化し、一定でない（図１０Ｃ）。一方、導出した関係式に従って送液量を変化させた場合、理論式からの予想通りに、一定の角速度で回転する刺激流が実現される（図１０Ｄ）。それぞれの方法における角速度のばらつきを比較すると（図１０Ｅ）、時間に比例してpを変化させた場合には、期待される平均速度よりも高いところと低いところにそれぞれピークをもつ２峰的な分布を持ち、角速度は2.02 ± 0.64 rad/分（平均 ± 標準偏差）と30%程度ばらつく。その一方、導出した関係にしたがって時間変化させた場合、期待される角速度付近にピークをもつ分布をとり、2.05 ± 0.17 rad/分と、ばらつきを10%以下まで抑えられている。以上のように、本実施形態の制御部によれば、制御部４０により、合成流の向きを、角速度が一定となるように回転させることができる。

[0067] （刺激流の大きさが異なる場合の制御方法）

チャンネル４の送液口からの単位時間あたりの送液量を変えることで、刺激流の幅を調節できる（図１１）。視野の上方右側から下方左側に向かう調節流による流体の絞り込みによって、ビーム状の刺激流が形成されている。刺激流の送液量をおおきくすると幅の広い刺激流が形成でき、送液量を小さくすると幅の広い刺激流が形成される。このように異なる幅の刺激流にたいしても、上述の方法によって刺激流の方向を制御できる。

[0068] （第２実施形態：光アンケージングによる刺激投入を用いる場合）

次に、本発明の第２実施形態に係る制御装置を、図１２をさらに参照しながら説明する。この第２実施形態の説明においては、前記した第１実施形態の装置と基本的に共通する要素については、同一符号を付することにより、説明の重複を避ける。

[0069] 前記した第１実施形態では、被制御流をチャンバ１１に送り出すための被制御流ポートを有していた。これに対して、第２実施形態では、被制御流ポートが省略されており、代わりに、刺激入力部５０がデバイス本体１０に備えられている。なお、図１２では、チャンバ１１の図示を省略しており、また、チャンネル１～３をつなぐ仮想的な円を、説明の便宜のために記載している。

[0070] 第２実施形態における流入ポート１２からチャンバ１１内に流入する流体としては、ケージド物質が用いられている。

[0071] 刺激入力部５０は、チャンバ１１内に流入して合成流を構成するケージド物質に、アンケージのための刺激を加える構成となっている。具体的には、刺激入力部５０は、ケージド物質に光刺激を与えるためのミラーや光ファイバ（図示せず）である。第２実施形態のより具体的な動作を以下においてさらに説明する。

[0072] （刺激投入の方法と、刺激流の形成および方向制御）

第１実施形態において説明した刺激流の形成および方向制御は、生理活性物質を光分解性の保護基と結合させたケージド化合物を光照射によって活性化（アンケージング）することで形成させた刺激流にたいしても適用できる。この場合、基本モジュールのチャンネル４は閉じたまま、チャンネル１、２、３から、刺激物質のケージド化合物を混合した溶液を導入し、第１実施形態で説明した方法にしたがい調節流（合成流）の方向を制御する（図１２Ａ参照）。アンケージングのための光照射領域の設定は、ピンホールを用いた方法や、光照射領域を変更可能な市販のナノミラー系などによっておこなうことができる。サンプルチャンバ中央部において光照射をおこない、ケージド化合物をアンケージングすることで、照射位置から調節流の下流方向へ向かうビーム状の刺激流およびその濃度勾配を形成できる（図１２Ｂ及びＣ参照）。

[0073] 第２実施形態により刺激流の方向を制御した実例を図１３に示す。チャンバ中央（特定領域１１１に対応）において（チャンネル４は閉じておく）光

アンケージングし、上述の第１実施形態の説明において示した基本動作をおこなった。送液量の相対比がp = 0では刺激流が右の方向を向き、p = 0.3で右上、p = 0.7で上へ、p = 1では左上方向へと向きを変える（図１３Ａ）。送液量の比pを0から１まで変化させると、刺激流の方向は120度変わり、実測した刺激流の方向θのp依存性は、理論式（式（１））とのよい一致がみられた（図１３Ｂ）。調節送液量一定制御の場合の刺激物質濃度の空間プロファイルは、p = 0、1で極大が小さい値を示し、pが0.5に近づくにしたがって、極大が大きい値を示す（図１３Ｃ）。調節流速一定制御の場合、刺激物質濃度の空間プロファイルはより一定に保たれる（図１３Ｄ）。調節送液量一定制御の場合、p を0から1まで変化させた場合の濃度プロファイルのピークの蛍光輝度の値は、平均値は2.94で、平均のばらつき（標準偏差／平均値）は39%であり、ピークの蛍光輝度の20%から80%範囲での勾配の傾きの平均は0.045 μm^{-1}、傾きのばらつき（標準偏差／平均値）は41%となった。一方、調節流速一定制御の場合には、ピークの蛍光輝度の平均値は1.76、ばらつきは5%で、勾配の傾きの平均は0.027 μm^{-1}、傾きのばらつきは6%となった。このように、調節流速一定制御の場合には、濃度のピーク値、濃度勾配どちらの観点からも、濃度の空間プロファイルのばらつきを大きく抑えることができる。また、光アンケージングの位置を中心からずらした場合においても、すくなくとも中心から距離が300 μmまでの範囲においては、理論値から大きくずれることなく刺激流の方向を制御できる（図１３Ｅ、チャンバ中心からの距離100 μm、140、200、300）。

[0074] アンケージングによる刺激投入の方法では、光照射領域の大きさによって刺激流の幅が決定される（図１４Ａ）。この方法では、単一デバイス内において、1 μmから１ mmの範囲で任意の幅をもった刺激流を形成することができる。また、第２実施形態では、第１実施形態と同様に、刺激流の方向を経時的に制御できる（図１４Ｂ）。このように、アンケージングをもちいた刺激投入においても、調節流の方向を制御する上述の方法にもとづき、刺激流の回転波を形成できる。

[0075] （複数箇所の光アンケージングによる任意の方向からの刺激流およびその勾配の提示）

基本モジュールにおいて形成される刺激流は常にチャンバの中心から外側に向いているため、刺激流の方向はチャンバ内のそれぞれの場所において一意的に定まる。これに対し、光アンケージングによる刺激投入をチャンバ中心から離れた複数の位置（領域）からおこなうことによって、注目している場所（すなわち特定領域１１１）に異なる方向からの刺激流を投入することが可能である。図１５Ａは基本モジュール内の２箇所で光アンケージングを切り替えながらおこない、それぞれの箇所から形成させた刺激流方向を制御する場合の操作手順をしめす。実行例として、チャンバ左下側から右上側へ向かう刺激流と、チャンバ１１の左上側から右下側へ向かう刺激流をチャンバ中央部へ投入した場合を示す（図１５Ｂ～Ｄ）。光照射位置を２箇所以上にすることもできるため、注目している位置に任意の方向からの刺激流および勾配を提示することができる。

[0076] 第２実施形態の制御装置における他の構成及び利点は、前記した第１実施形態と基本的に同様なので、これ以上の説明は省略する。

[0077] （第３実施形態：マルチプレックス流路系）

次に、本発明の第３実施形態に係る制御装置を説明する。この第３実施形態の説明においては、前記した第１実施形態の装置と基本的に共通する要素については、同一符号を付することにより、説明の重複を避ける。

[0078] 上述の第２実施形態では、光アンケージングをもちいて、注目している位置に任意の方向から刺激流および勾配を提示する方法について述べた。この方法の適応範囲は、生理活性物質のケージド化合物が使用でき、かつ光アンケージング位置を顕微鏡観察領域内に設定できる場合に限定される。これらの要件が満たされない場合や、光照射が好ましくない場合の代替方法として、基本モジュールを複数配置するマルチプレックス方式が考えられる（図１６Ａ）。上述のとおり、基本モジュール（第１実施形態）は、ひとつの刺激送液口（Stimulus inlet、S）と、それを中心として取り囲む三角形の頂点に

配置された、制御用の３つのバッファ送液口（Buffer inlet、B）から構成される（図１６Ａ左、1S/3B）。この三角形をひとつのモジュールとし、それをチャンバ１１内に２つ並べた菱型状のデュープレックス流路系（図１６Ａ左から２番目、2S/4B）、３つ並べたトリプレックス流路系（図１６左から３番目、3S/9Bおよび3S6B）、さらに多くのモジュールをもつ流路系（図１６右、4S/4Bおよび6S6B）の構成を考えることができる。これらマルチプレックス流路系では、それぞれのモジュールにおいて上述の刺激流の方向制御をおこない、これを複数組み合わせることによって、チャンバ１１内の注目している位置に異なる方向から刺激流およびその勾配を提示できる（図１６Ｂ）。

[0079] マルチプレックス流路系の実例として、基本モジュールを二つ組み合わせたデュープレックス(2S/4B型)流路を示す（図１７）。このデュープレックス流路は、基本モジュールの制御用送液口（この例では第２ポート１２２と第３ポート１２３）を２つのモジュール（第１～第３ポート及び被制御流ポートの単位で形成されるモジュール）の間で共有する形をとり、菱型状に送液口が配置されている（図１７Ａ）。この流路をもちいて、前述の刺激流の方向の制御をおこなうことによって、異なる方向から交代して現れる勾配刺激を形成させた（図１７Ｂ）。さらに、図１７Ｃに示すように、サンプルチャンバ内の三つの観察位置１～３（第１～第３特定領域１１１～１１３に対応）を適切に選択することによって、２つの勾配刺激の現れる方向が０度から１８０度までの任意の角度をもつ刺激系を実現することができる。図１７ＣのＲＯＩ１～３は、第１～第３特定領域１１１～１１３で観察された濃度勾配（つまり勾配刺激）を示す。なお、図１７Ｃにおける第２特定領域１１２の位置は、図１７Ｂにおける第１特定領域１１１とほぼ同じ位置に設定されているが、これはあくまで一例である。各特定領域の位置は、各ポートやチャンバ形状や観察目的などの種々の要因に対応して適宜に設定可能である。

[0080] なお、図１７Ｂの例では、チャンネル１，２，４が第１～第３ポート１２１～１２３に対応し、チャンネル５が被制御ポート１２０に対応している。同様に、チャンネル３，２，４が第１～第３ポート１２１～１２３に対応し

、チャンネル６が被制御ポート１２０に対応している。ここで、チャンネル３を第４ポート１２４と認識することもできる。

[0081] なお、第３実施形態における前記以外の構成及び利点は、基本的に第１実施形態と同様なので、これ以上詳しい説明は両略する。

[0082] （利点）

第１実施形態の構成（基本モジュール）においては、チャンバ１１の中心の刺激送液口（被制御流ポート１２０）を取り囲むように配置されたバッファ送液口（第１～第３ポート１２３）からの送液量を制御することによって、チャンバ１１の中心から周縁部に向かう層流（合成流）の方向を、３６０度の範囲で、任意の方向へ向けることができる。さらに、各ポートからの送液量を角度依存的に時間制御することによって、円形チャンバ１１の中央から周縁部へと向かう刺激流の方向を、角速度を一定に保ちながら変化させることができる。刺激流の方向が変化することは、刺激流によって形成される刺激物質の濃度勾配の向きが変えられることを意味する。刺激流およびその勾配が作る生理活性物質の濃度分布は、流れの垂直方向にみると、一山型の形状を持つ（図９ＣおよびＤ）。このため、刺激流を繰り返し３６０度回すことで、一山型の進行波刺激を周期的に細胞に与えることができる。図１８に、６分で１回りする回転波刺激を、動く細胞の代表例である細胞性粘菌にたいして与えた例を示す。細胞性粘菌は、回転波の進行方向とは逆向きに移動している。粘菌細胞では、集団の中で自己組織化的に形成される誘引物質の回転波をたよりに集合し、多細胞化することがしられている。それを模した場を人工的に生成することで、細胞の誘引場の知覚や走化性メカニズムを詳細に解析することができる。また、一般には、組織中における誘引物質や生理活性物質のつくる場は時間的にも空間的にも動的であるとかんがえられる。そのような動的で複雑な場は、数理的には特定の波長と時間周期をもつ波の重ね合わせとして表すことができる。前記した各実施形態の装置で生成可能である、特定の波長と周期をもった回転波は、そのような場のもっともシンプルな場合と捉えることができる。さまざまな波長と周期の回転波刺激

に対する細胞の走化性や応答特性を解析することによって、細胞性粘菌や好中球、さらにはがん細胞などの走化性について、濃度勾配の時間空間変化にたいする応答性を評価し、いかにして動くタイミングと方向を細胞が決定しているかを解析することができる。これらの解析は、組織中の生理活性物質の場における細胞の情報処理や走性のメカニズムを理解するために有益な知見を与えると期待される。

[0083] 第３実施形態のように、基本モジュールを２個以上組み合わせることで、異なる方向を向いた複数の層流を互い違いに投入することができる。これによって、はじめとは異なる方向から勾配刺激が与えられたときに、細胞がいかにその伸張方向や移動方向を変化させるかを解析することが可能となる。このようなマルチプレックス流路系の応用例として、細胞を取り囲む複数の位置に刺激投入位置を用意し、細胞からみてさまざまな向きへの勾配刺激をあたえるような細胞の方向転換実験が考えられる（図１６Ｂ）。図１９に、デュープレックス流路をもちいて、異なる方向を向いた２つの勾配刺激を交互に細胞に与えた実験例を示す。免疫系の好中球様細胞（HL60）が、刺激流によって形成された濃度勾配を登る方向へと移動しながら、かつ、勾配の向きの変化に追随しながら、ジグザグ状に方向転換しながら動いていく様子が捉えられている。細胞のこのような方向転換は免疫細胞では炎症反応時の損傷部位への移動、がん細胞では浸潤転移の理解に重要と考えられ、そうした原理の解明およびそれに関わる因子群の機能解析を推進するうえで有用な手段を提供する。顕微鏡下の生細胞イメージングと組み合わせることによって、各実施形態の装置を細胞内の分子動態解析や変異体の解析に用いることができる。

[0084] なお、本発明の内容は、前記実施形態に限定されるものではない。本発明は、特許請求の範囲に記載された範囲内において、具体的な構成に対して種々の変更を加えうるものである。

符号の説明

[0085] １０ デバイス本体

１１　チャンバ

１１１　特定領域

１２　流入ポート

１２０　被制御流ポート

１２１　第１ポート

１２２　第２ポート

１２３　第３ポート

１２４　第４ポート

１３　排出ポート

１４　流入チャネル

１５　排出チャネル

１１１　特定領域

２０　流体供給部

３０　流体排出部

４０　制御部

５０　刺激入力部

請求の範囲

[請求項1] 流体の流れを制御するための装置であって、

デバイス本体を備えており、

前記デバイス本体は、チャンバと、流入ポートと、排出ポートとを備えており、

前記チャンバは、二次元方向に延長された閉鎖空間となっており、

かつ、前記チャンバは、その一部に特定領域を含んでおり、

前記流入ポートは、少なくとも第１ポートと第２ポートとを備えており、

前記第１ポート及び第２ポートは、いずれも、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給することにより、前記特定領域又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成する構成となっており、

前記排出ポートは、前記チャンバの前記延長方向における端部又はその近傍から前記流体を排出させる構成となっている

流体流の制御装置。

[請求項2] 前記第１ポートと前記第２ポートとは、前記特定領域を中心として、約１２０度の位相差となる位置又はその近傍に配置されている

請求項１に記載の制御装置。

[請求項3] 前記流入ポートは、第３ポートをさらに備えており、

前記第３ポートは、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給する構成となっており、

かつ、前記第３ポートは、前記特定領域を中心として、前記第１及び第２ポートとそれぞれ約１２０度の位相差となる位置又はその近傍に配置されている

請求項２に記載の制御装置。

[請求項4] 前記流入ポートは、被制御流ポートをさらに備えており、

前記被制御流ポートは、前記特定領域又はその近傍に被制御流を供

給する構成となっている

請求項１～３のいずれか１項に記載の制御装置。

[請求項5] さらに制御部を備えており、

前記制御部は、前記流入ポートから前記チャンバ内に流入する前記流体の流量又は流速を制御する構成となっており、

さらに、前記制御部は、前記流入ポートから前記チャンバへの前記流体の流入量又は流速を制御することにより、前記合成流の向きを制御する構成となっている

請求項１～４のいずれか１項に記載の制御装置。

[請求項6] 前記制御部は、前記合成流の向きを、角速度が一定となるように回転させる構成となっている

請求項５に記載の制御装置。

[請求項7] 前記制御部は、前記合成流における濃度勾配プロファイルが一定となるように前記流体の流入量又は流速を制御する構成となっている

請求項５又は６に記載の制御装置。

[請求項8] さらに刺激入力部を備えており、

前記流入ポートから前記チャンバ内に流入する流体としては、ケージド物質が用いられており、

前記刺激入力部は、前記チャンバ内に流入して前記合成流を構成する前記ケージド物質に、アンケージのための刺激を加える構成となっている

請求項１～７のいずれか１項に記載の制御装置。

[請求項9] 前記特定領域は、前記チャンバの前記二次元方向における中央部分またはその近傍の位置とされている

請求項１～８のいずれか１項に記載の制御装置。

[請求項10] 前記流入ポートは、第４ポートをさらに備えており、

前記チャンバは、その一部に第２特定領域をさらに含んでおり、

前記第２特定領域は、前記特定領域とは異なる位置とされており、

前記第４ポートは、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給することにより、前記第２特定領域又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成する構成となっている

請求項１～９のいずれか１項に記載の制御装置。

[請求項11] 前記排出ポートは、前記チャンバの延長方向端部において、前記流体を、ほぼ一様な速度で排出する構成となっている

請求項１～１０のいずれか１項に記載の制御装置。

[請求項12] さらに流体供給部と流体排出部とを備えており、

前記流体供給部は、前記流入ポートに前記流体を供給する構成となっており、

前記流体排出部は、前記排出ポートから前記流体を回収する構成となっている

請求項１～１１のいずれか１項に記載の制御装置。

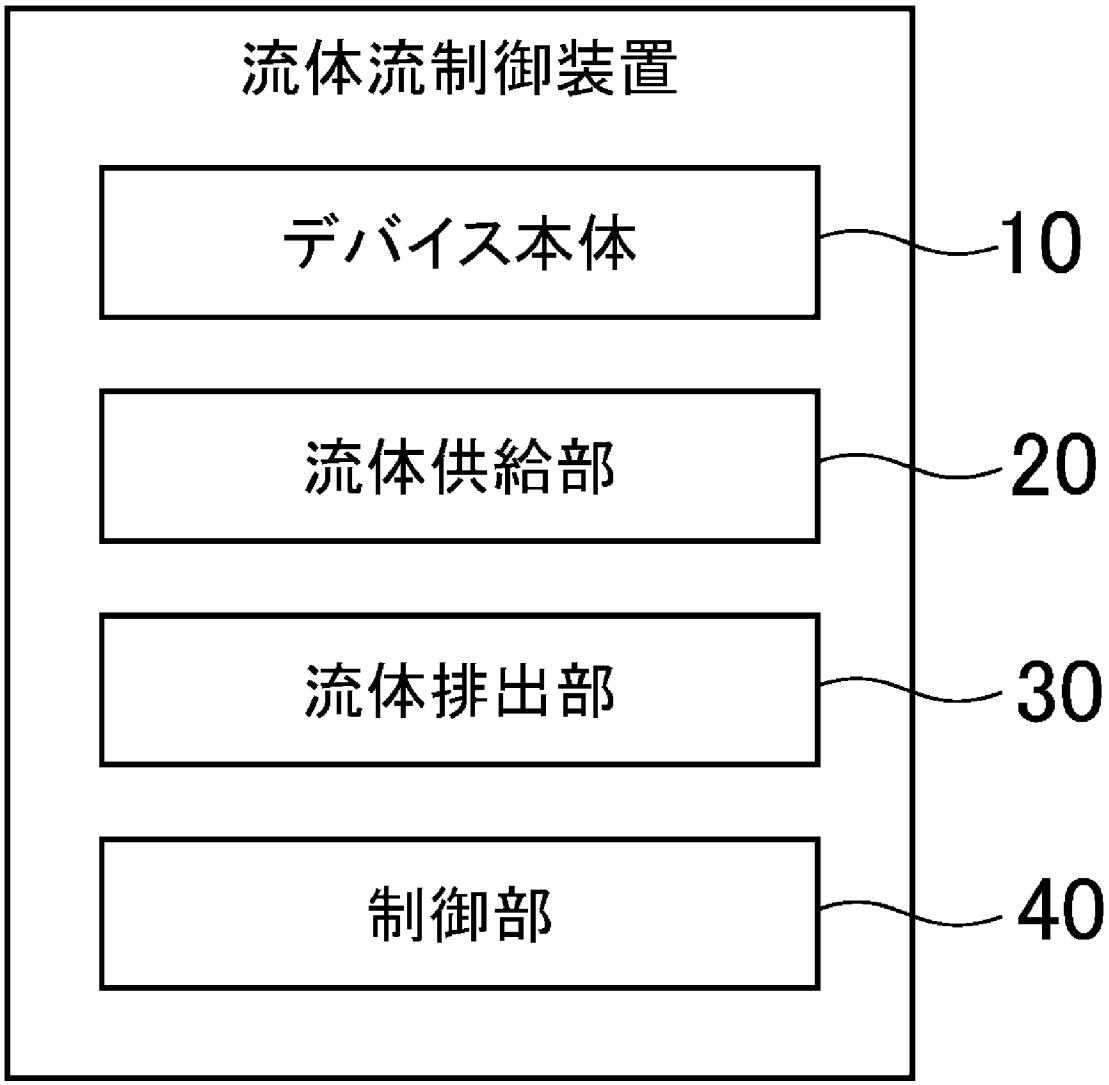
[請求項13] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の制御装置を用いて流体の流れを制御するための方法であって、

前記第１ポート及び第２ポートから、前記チャンバ内に流体を、前記チャンバの延長方向に交差する方向に向けて供給することにより、前記特定領域又はその近傍において、少なくとも一方向への速度成分を持つ合成流を形成するステップと、

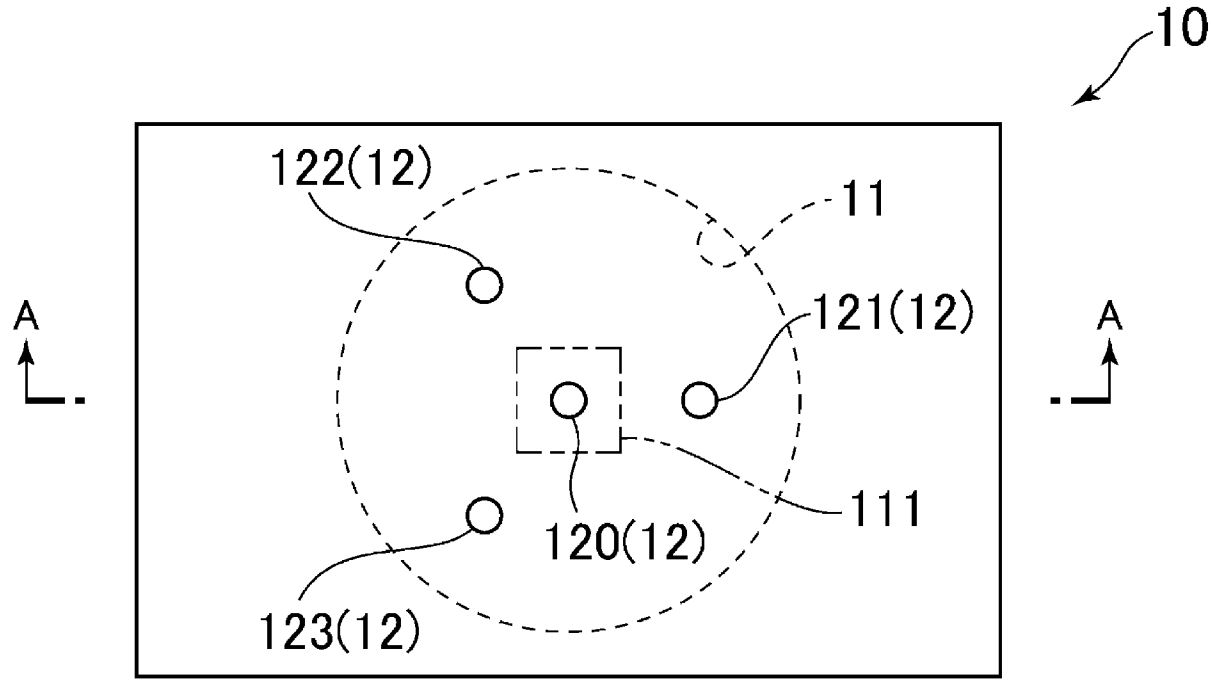
前記第１ポート及び第２ポートのうちの一方又は両方における、前記流体の流速又は流量を変更することにより、前記合成流の方向又は流速を変更するステップと

を備える流体流の制御方法。

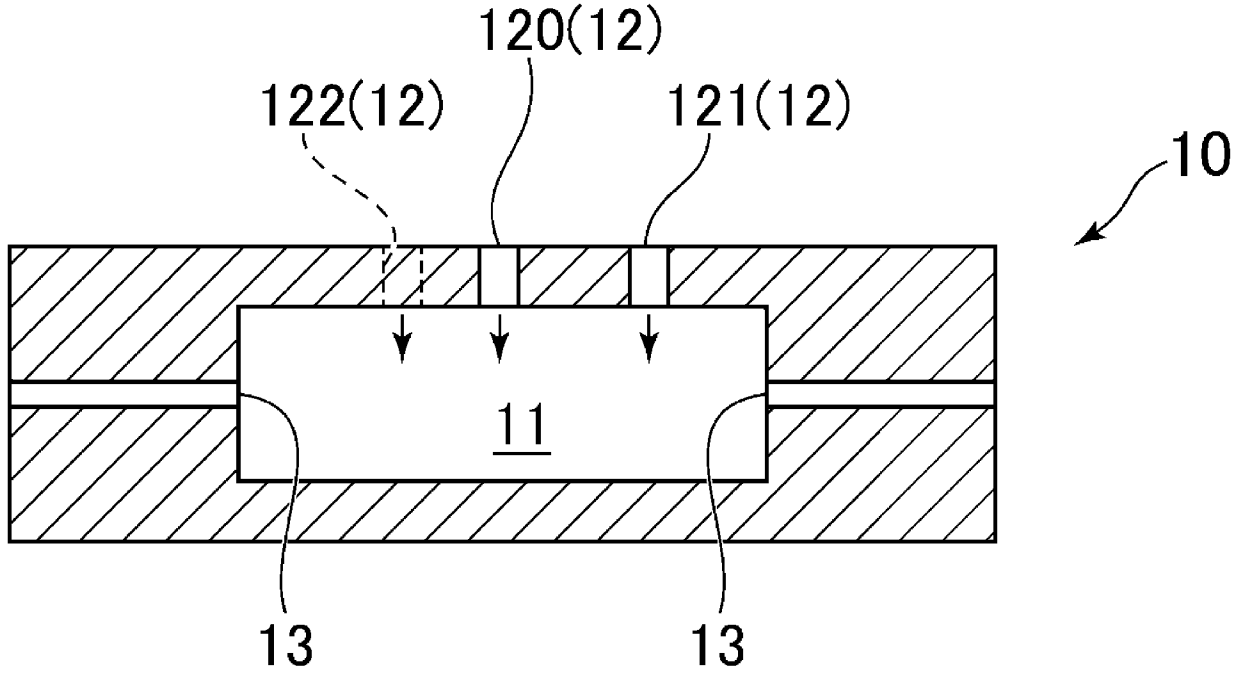
[図1]


流体流制御装置
デバイス本体
10
流体供給部
20
流体排出部
30
制御部
40

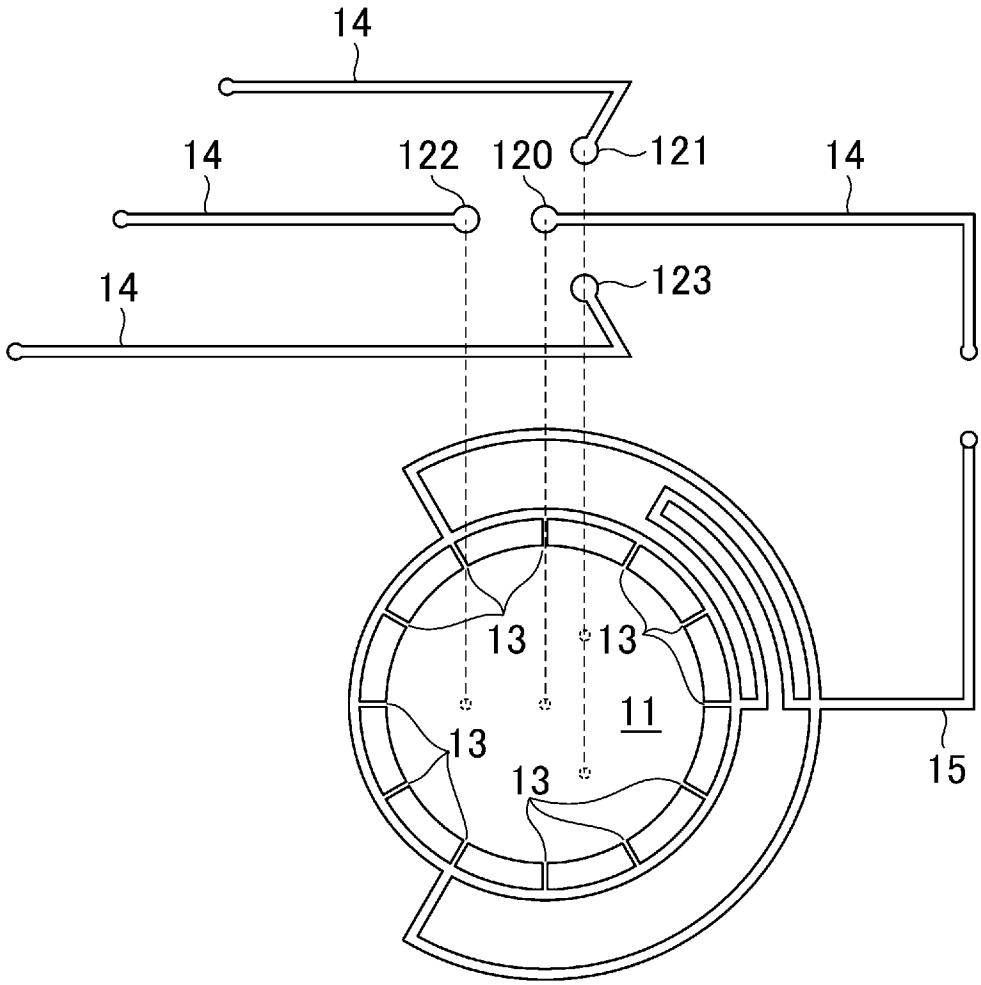
[図2]


10
122(12)
11
121(12)
A
A
111
120(12)
123(12)

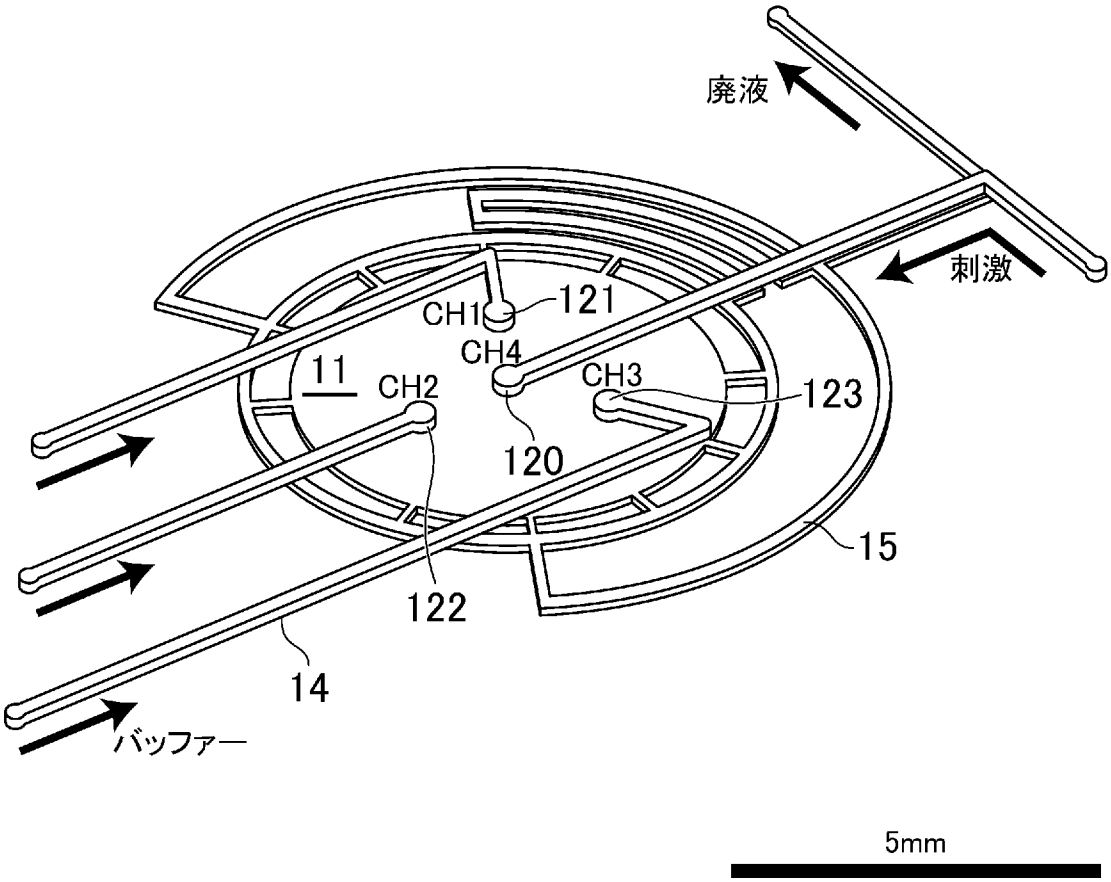
[図3]


120(12)
122(12)
121(12)
10
11
13
13

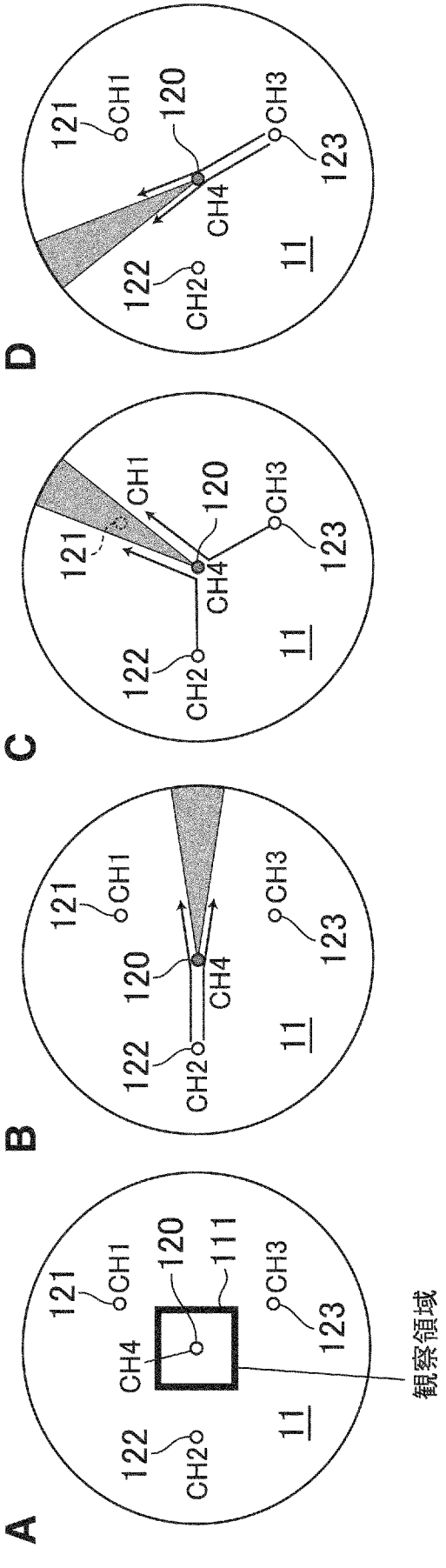
[図4]


14
14
122
120
121
14
14
123
13
13
11
13
13
15

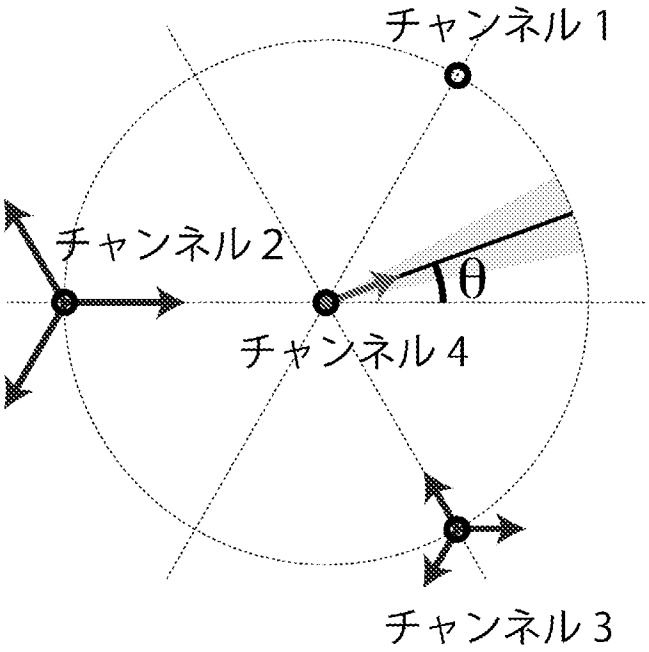
[図5]

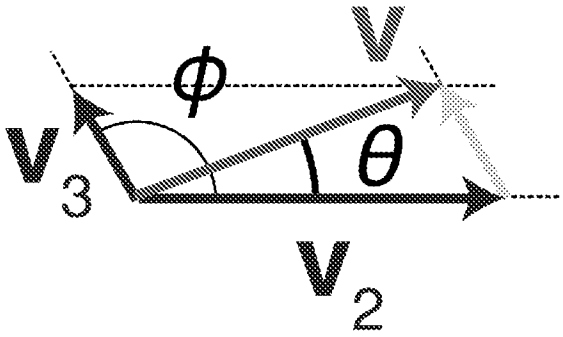


[図6]



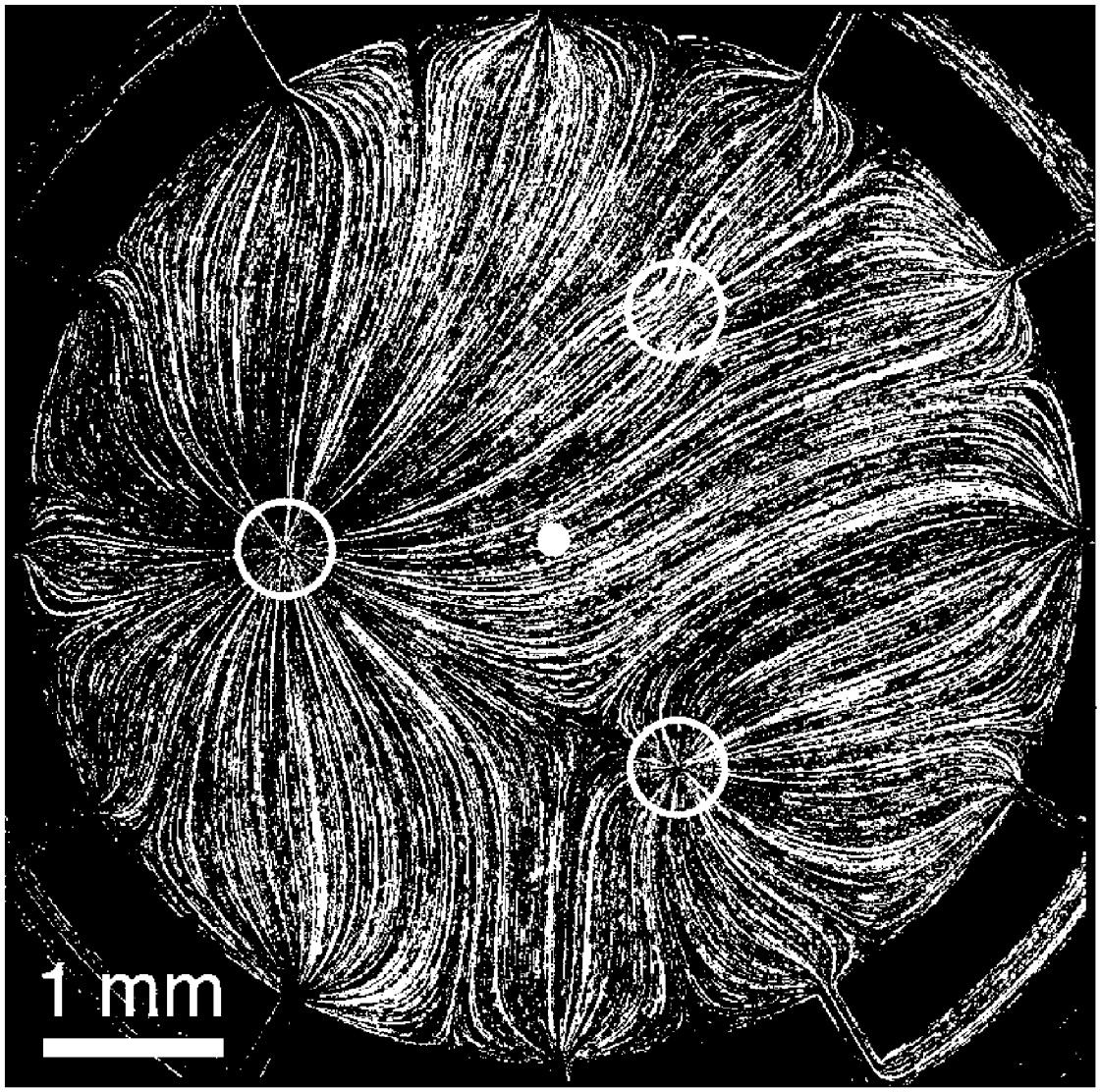
[図7]



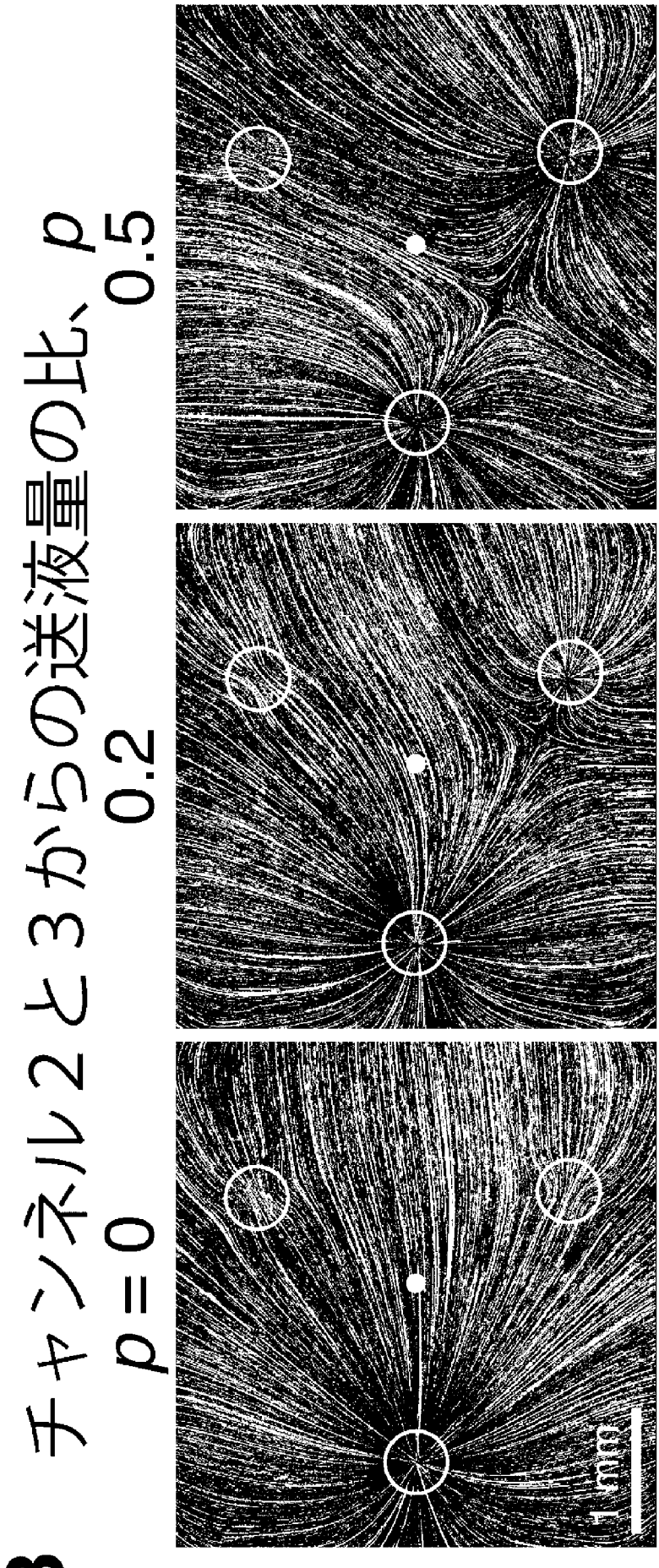


[図8A]

A

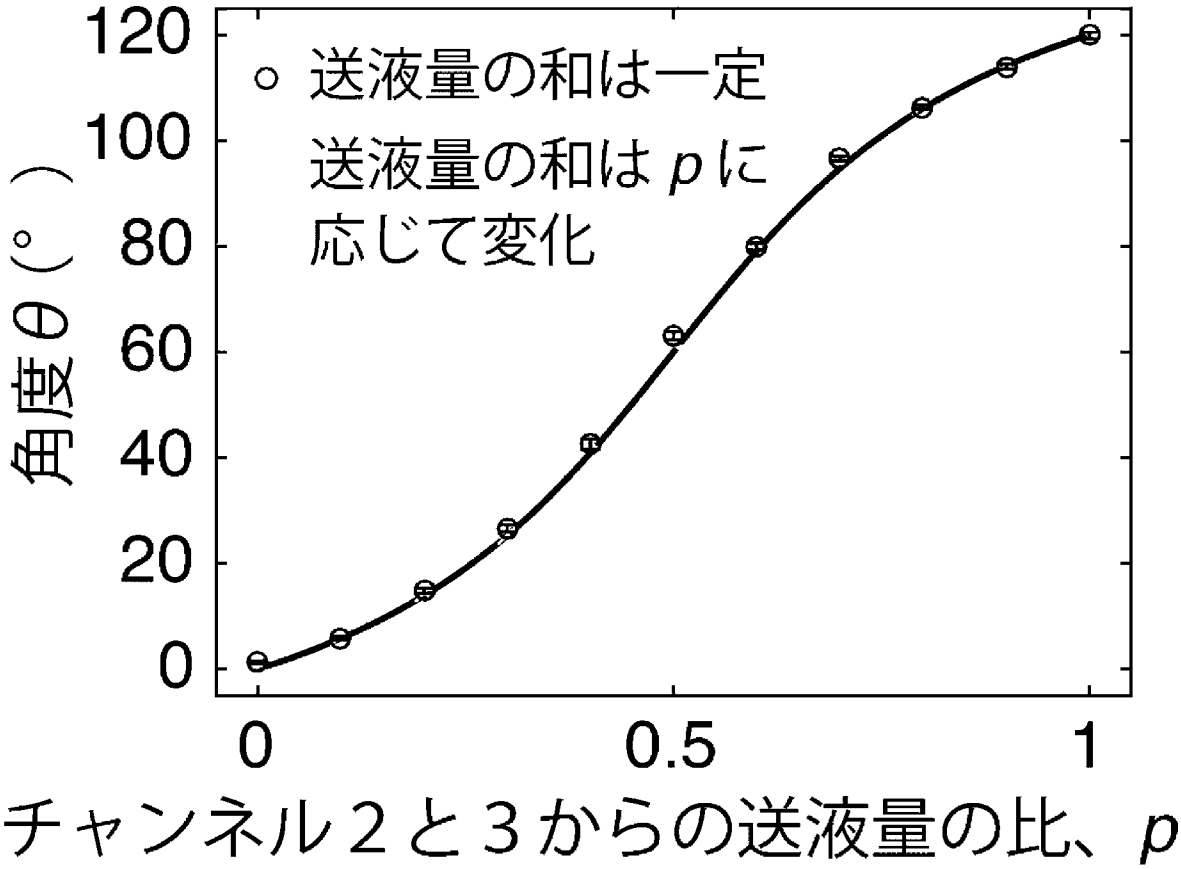


[図8B]

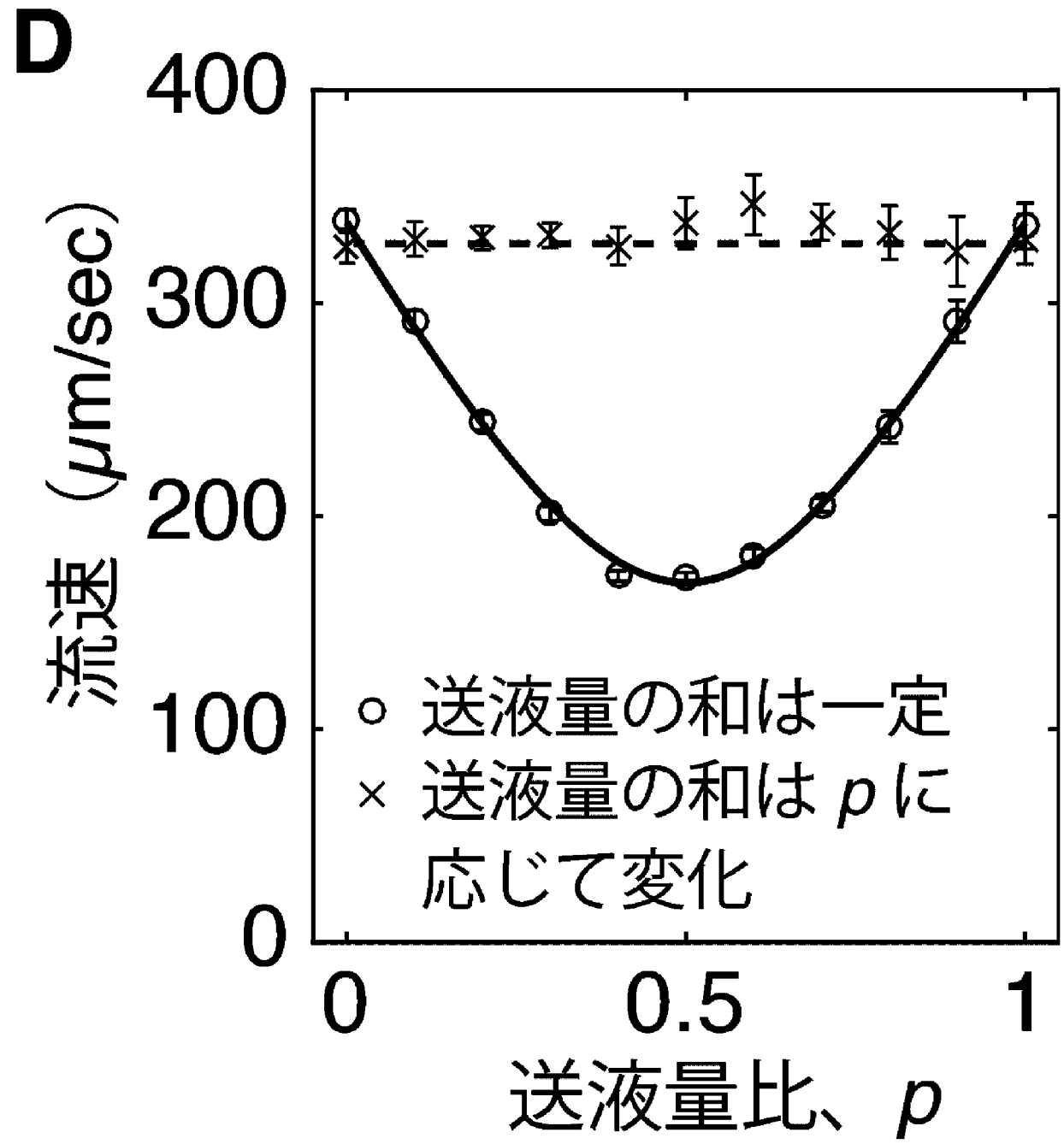


[図8C]

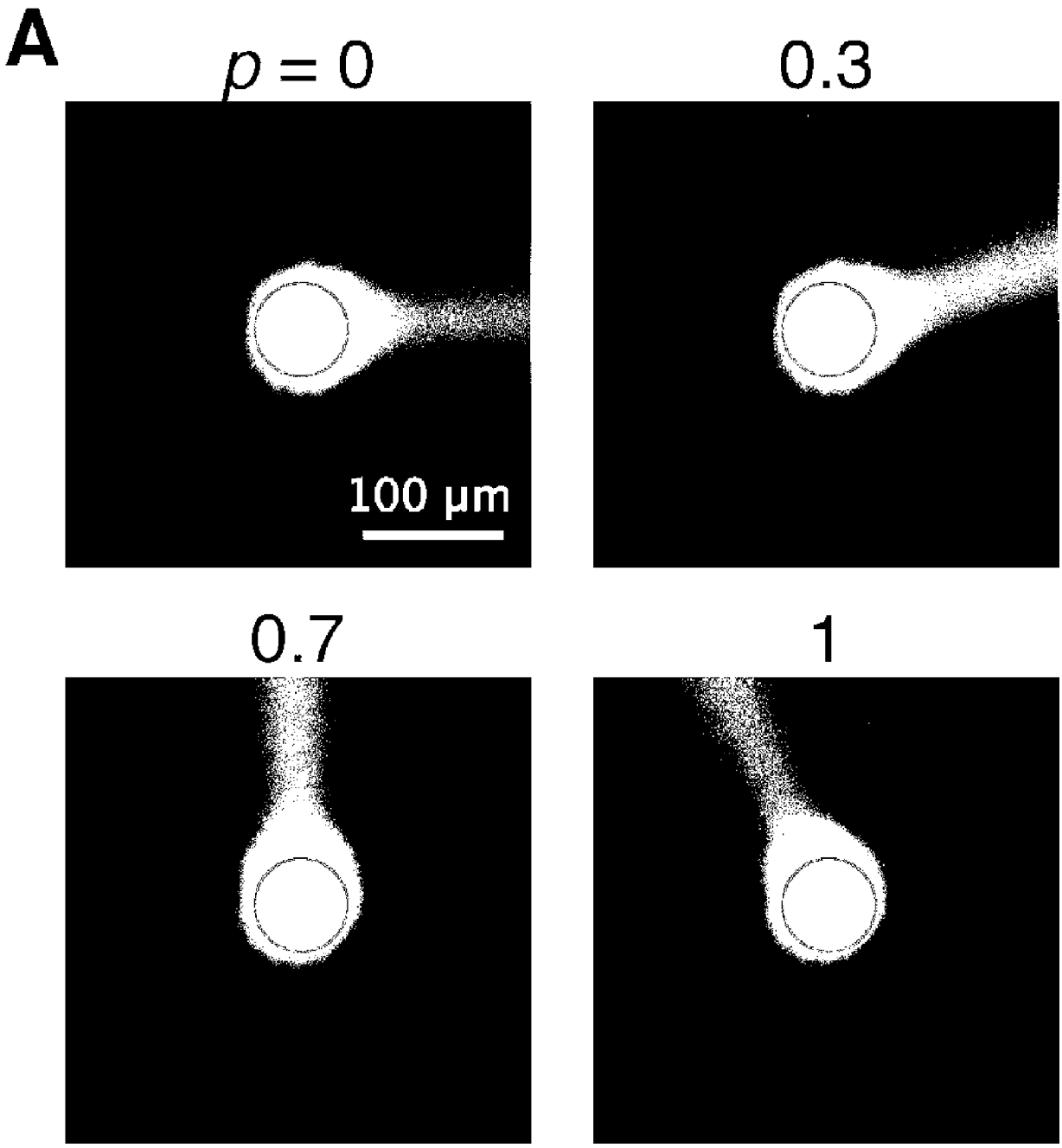
C


120
100
80
60
40
20
0
角度θ（°）
○ 送液量の和は一定
送液量の和は p に
応じて変化
0
0.5
1
チャンネル２と３からの送液量の比、p

[図8D]

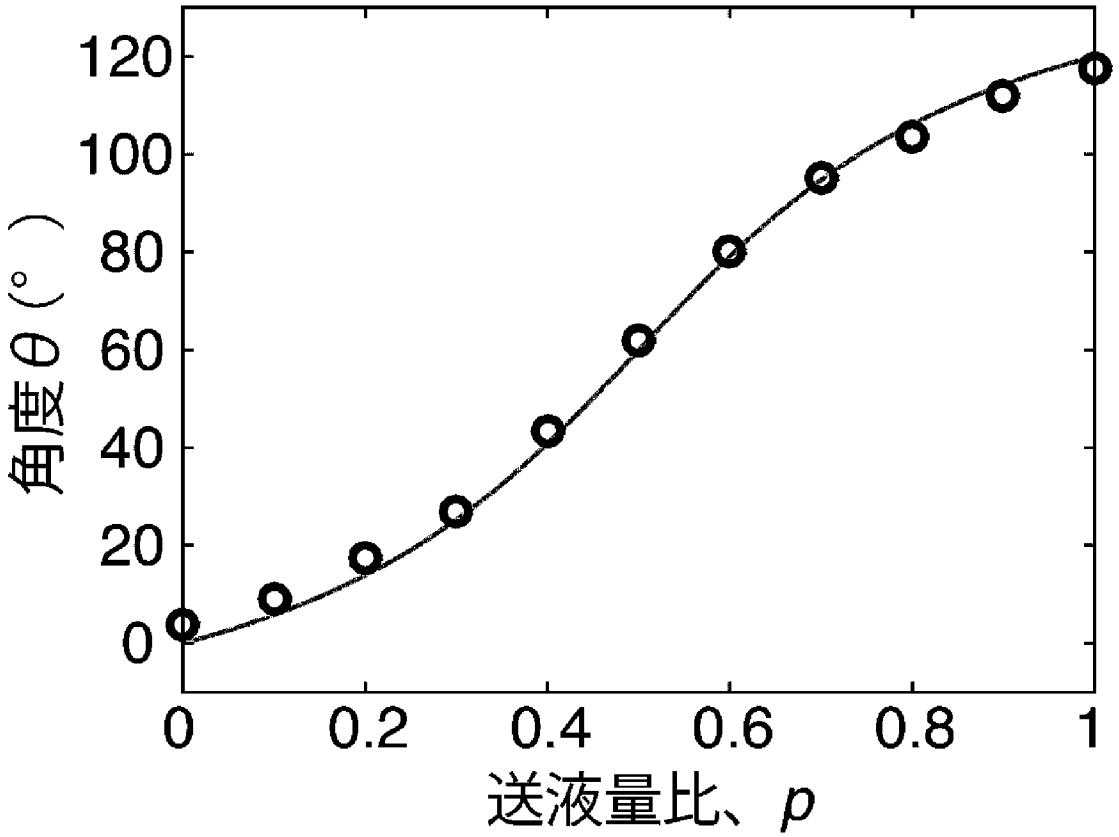

D
400
300
200
100
0
流速（μm/sec）
○ 送液量の和は一定
× 送液量の和は p に
応じて変化
0
0.5
1
送液量比、p

[図9A]

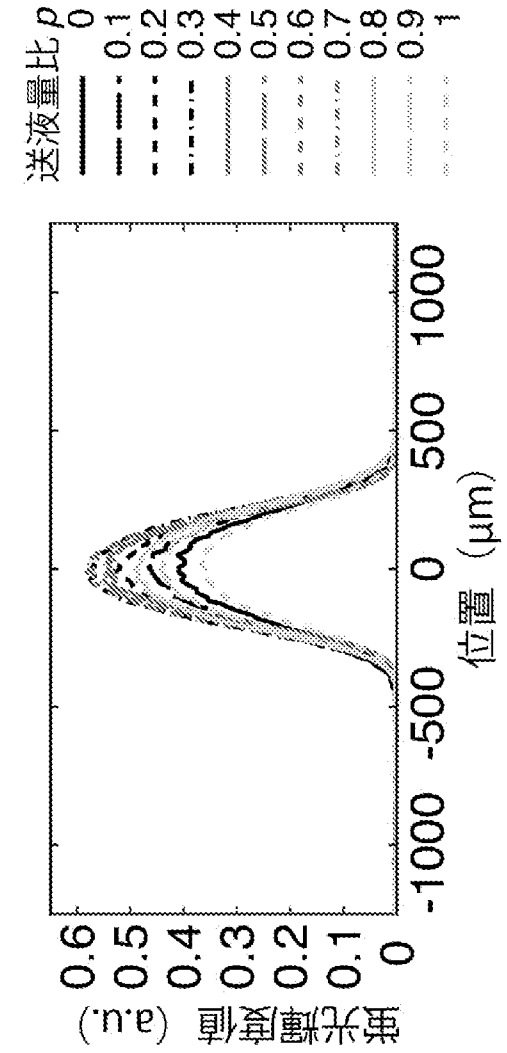


[図9B]

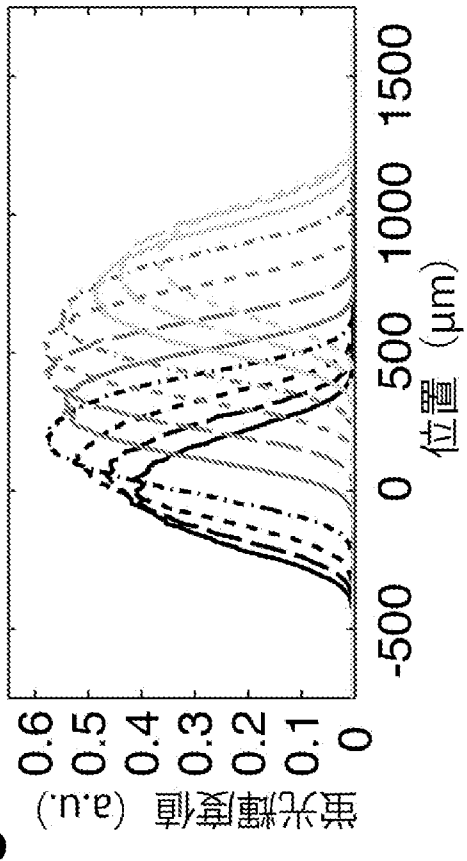
B



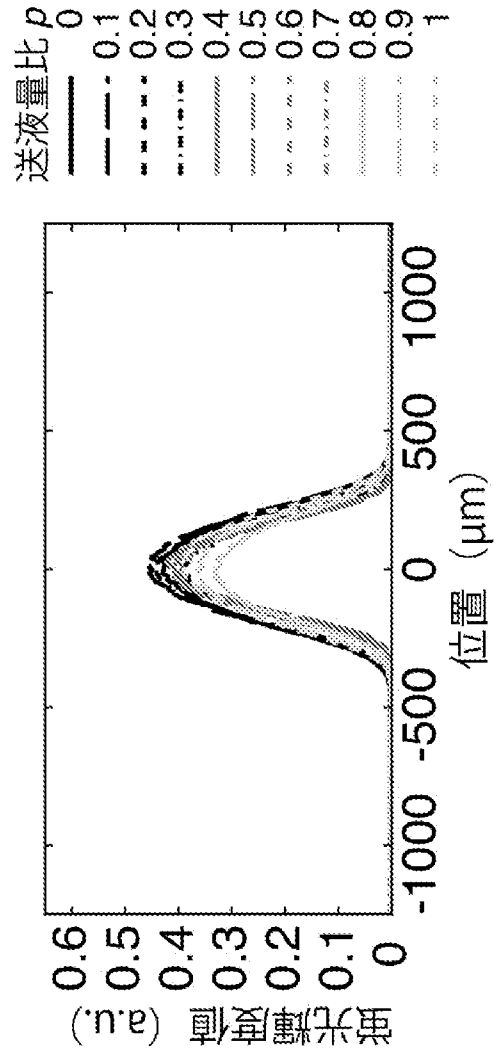
[図9C]


送液量比 p
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
蛍光輝度値 (a.u.)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
-1000
-500
0
500
1000
位置 (μm)

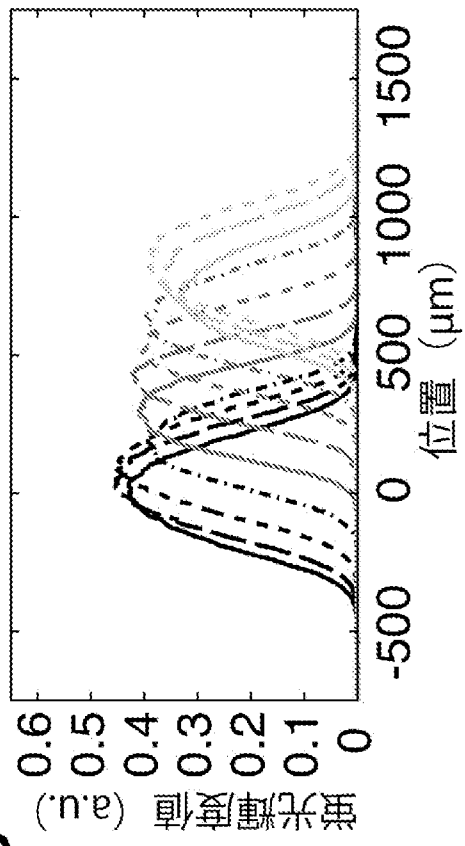
C


蛍光輝度値 (a.u.)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
-500
0
500
1000
1500
位置 (μm)

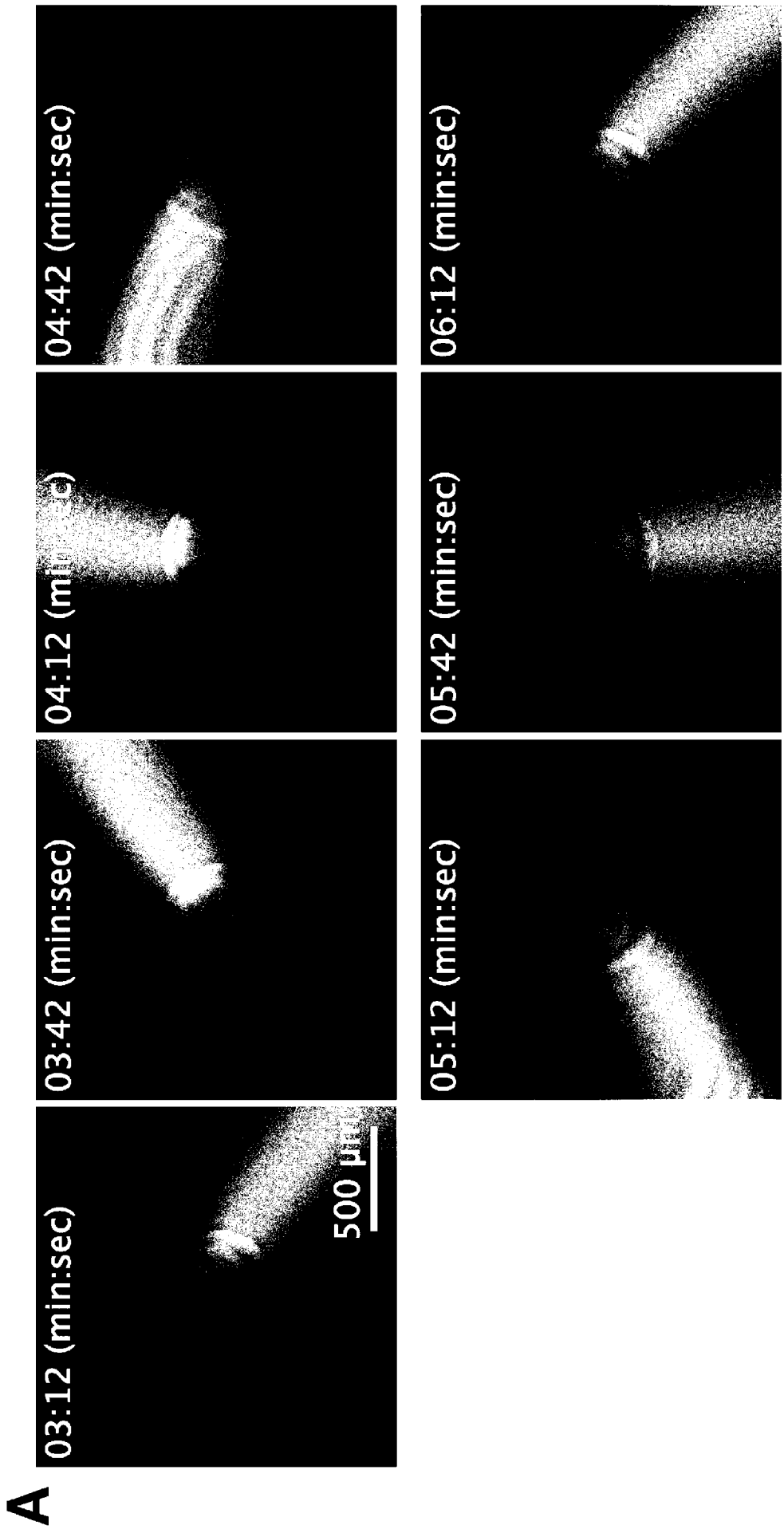
[図9D]


送液量比 p
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
蛍光輝度値 (a.u.)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
-1000
-500
0
500
1000
位置 (μm)

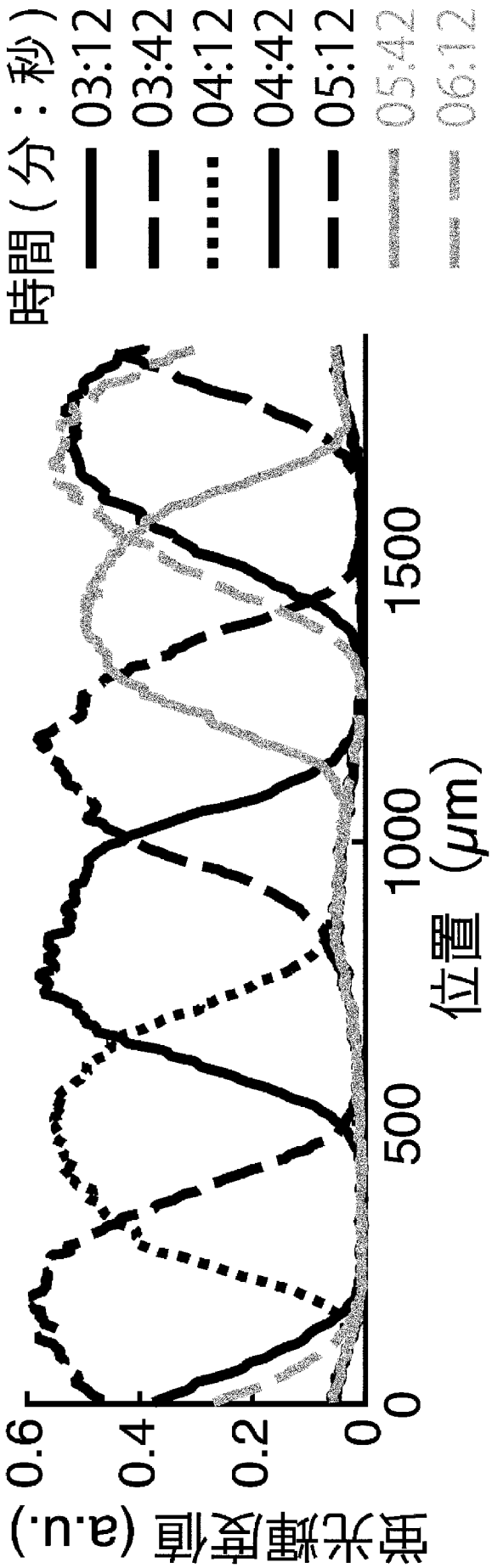
D


蛍光輝度値 (a.u.)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
-500
0
500
1000
1500
位置 (μm)

[図10A]

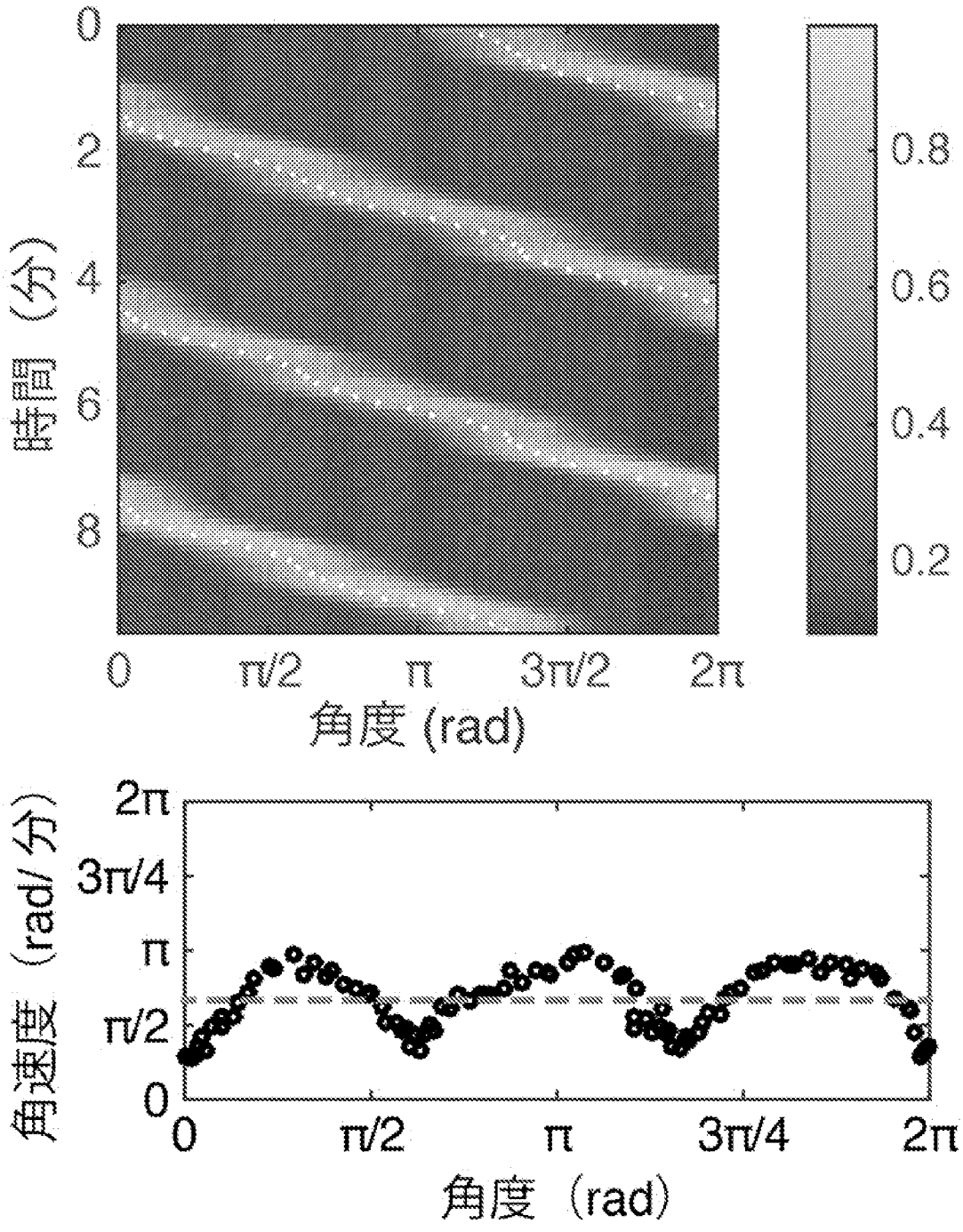

A
03:12 (min:sec)
500 μm
03:42 (min:sec)
04:12 (min:sec)
04:42 (min:sec)
05:12 (min:sec)
05:42 (min:sec)
06:12 (min:sec)

[図10B]

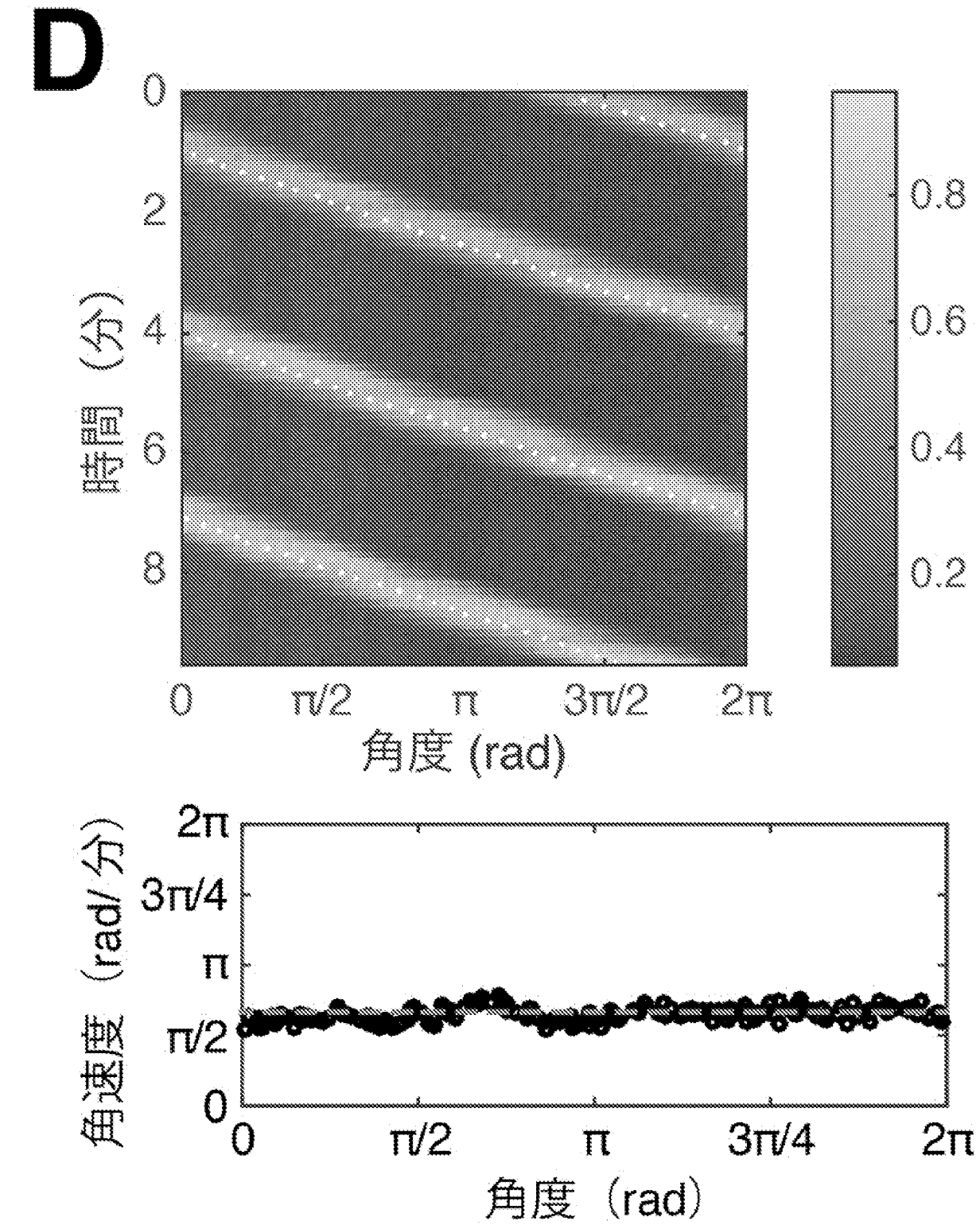

B
蛍光輝度値 (a.u.)
0.6
0.4
0.2
0
0
500
1000
1500
位置 (μm)
時間（分：秒）
03:12
03:42
04:12
04:42
05:12
05:42
06:12

[図10C]

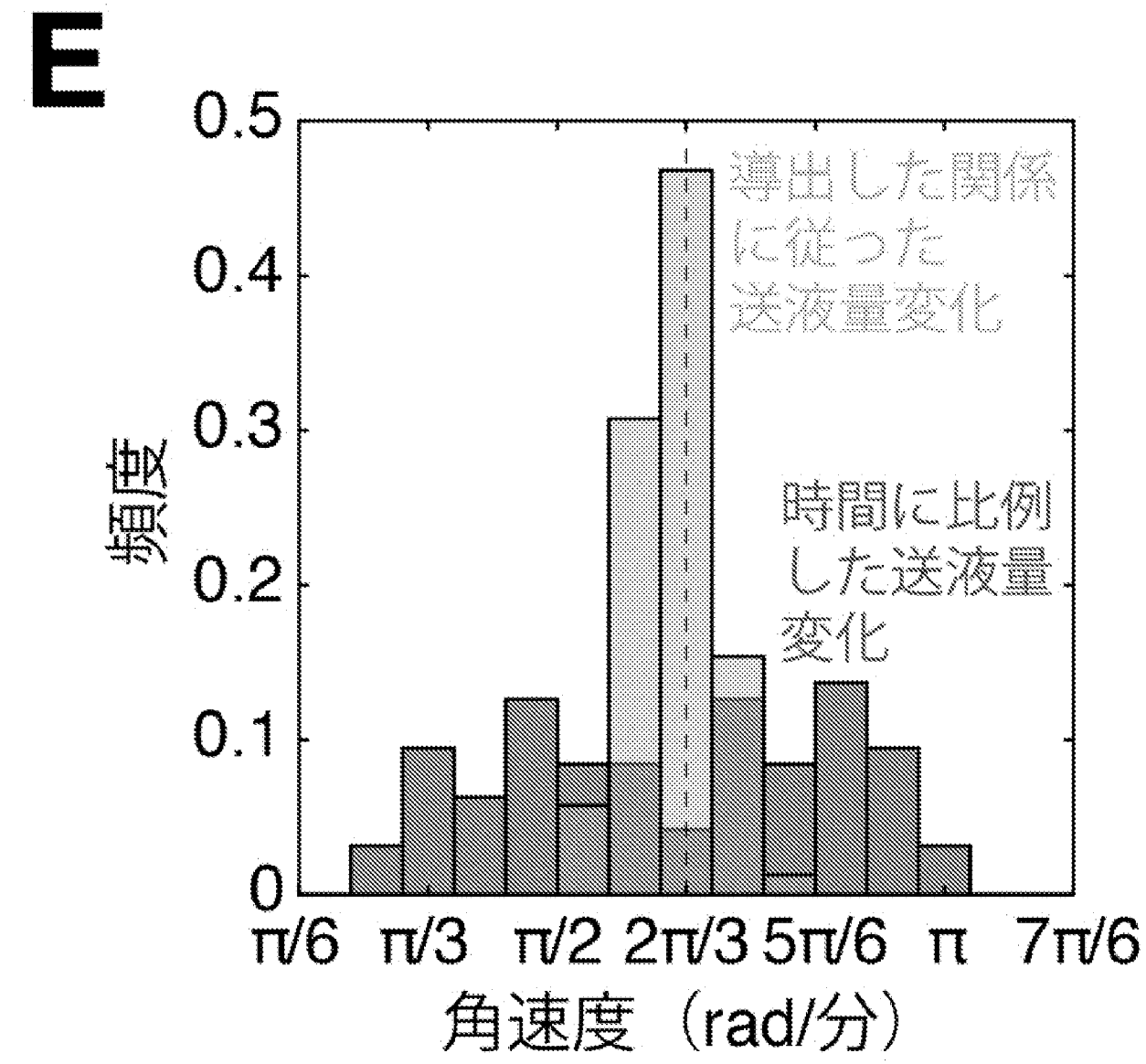
C


0
2
4
6
8
時間（分）
0.8
0.6
0.4
0.2
0
π/2
π
3π/2
2π
角度 (rad)
2π
3π/4
π
π/2
0
角速度（rad/分）
0
π/2
π
3π/4
2π
角度（rad）

[図10D]


D
0
2
4
6
8
時間（分）
0.8
0.6
0.4
0.2
0
π/2
π
3π/2
2π
角度 (rad)
2π
3π/4
π
π/2
0
角速度（rad/分）
0
π/2
π
3π/4
2π
角度（rad）

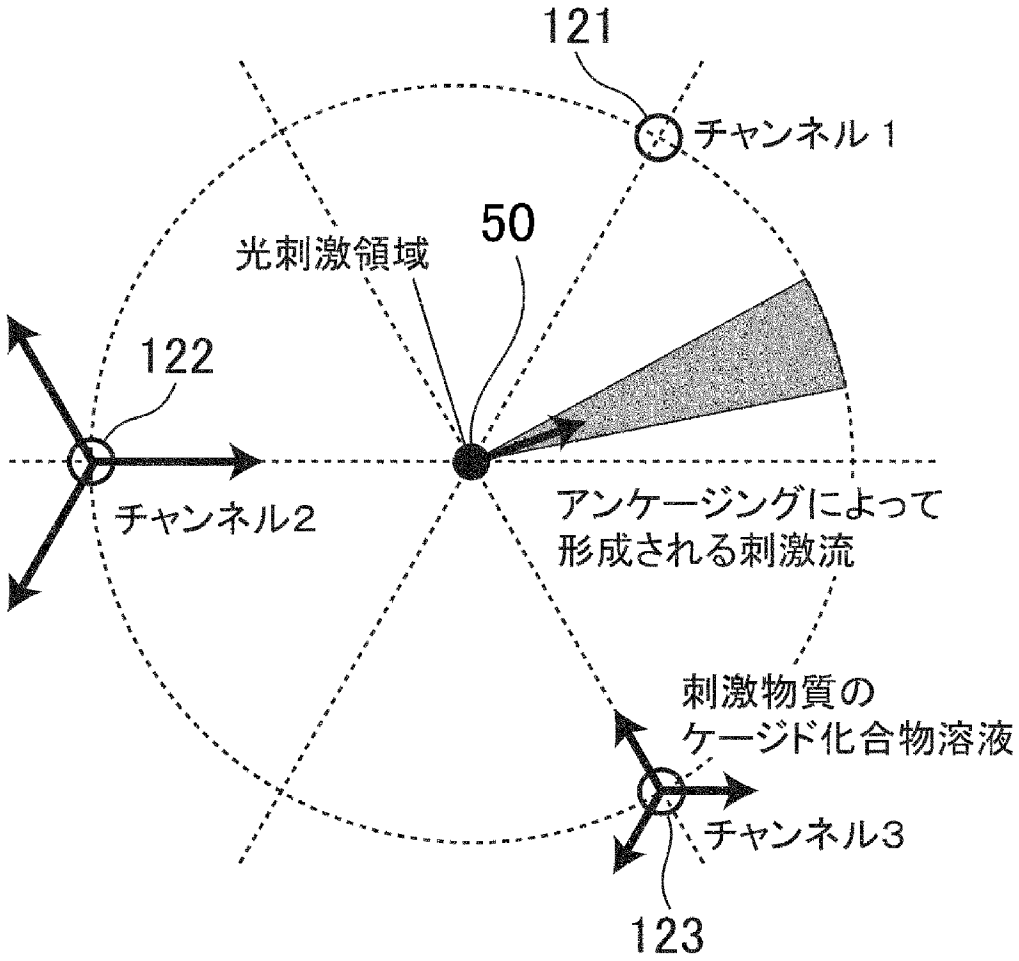
[図10E]


E
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
頻度
導出した関係
に従った
送液量変化
時間に比例
した送液量
変化
π/6 π/3 π/2 2π/3 5π/6 π 7π/6
角速度（rad/分）

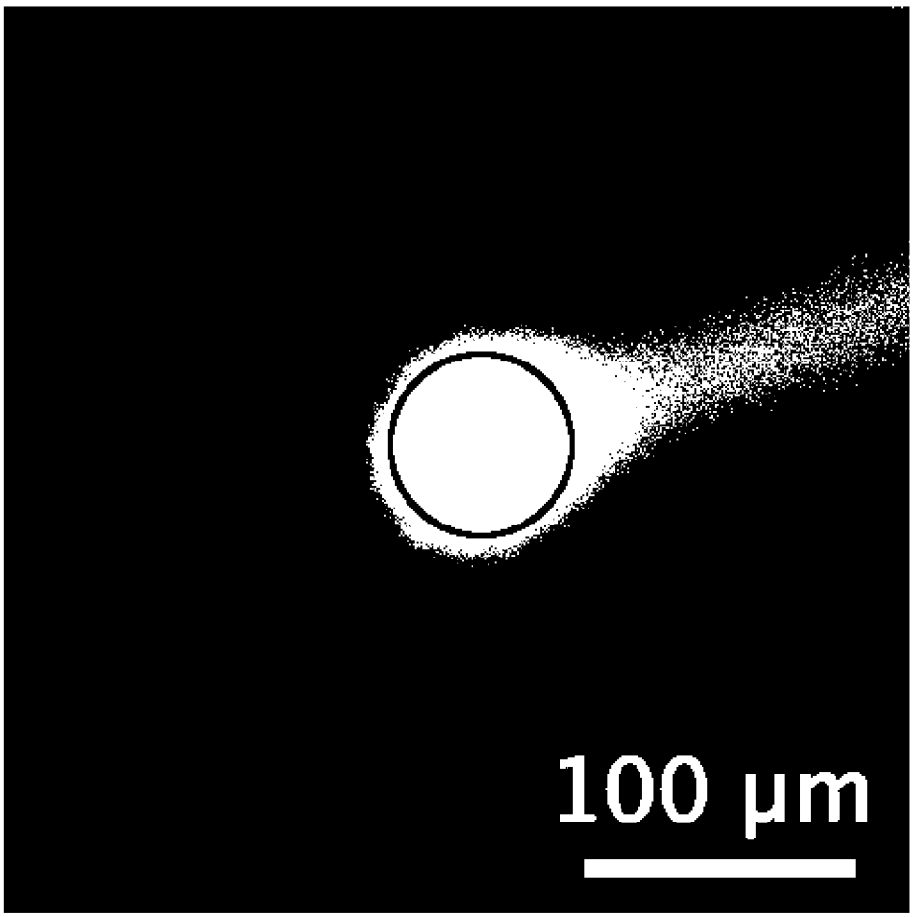
[図11]



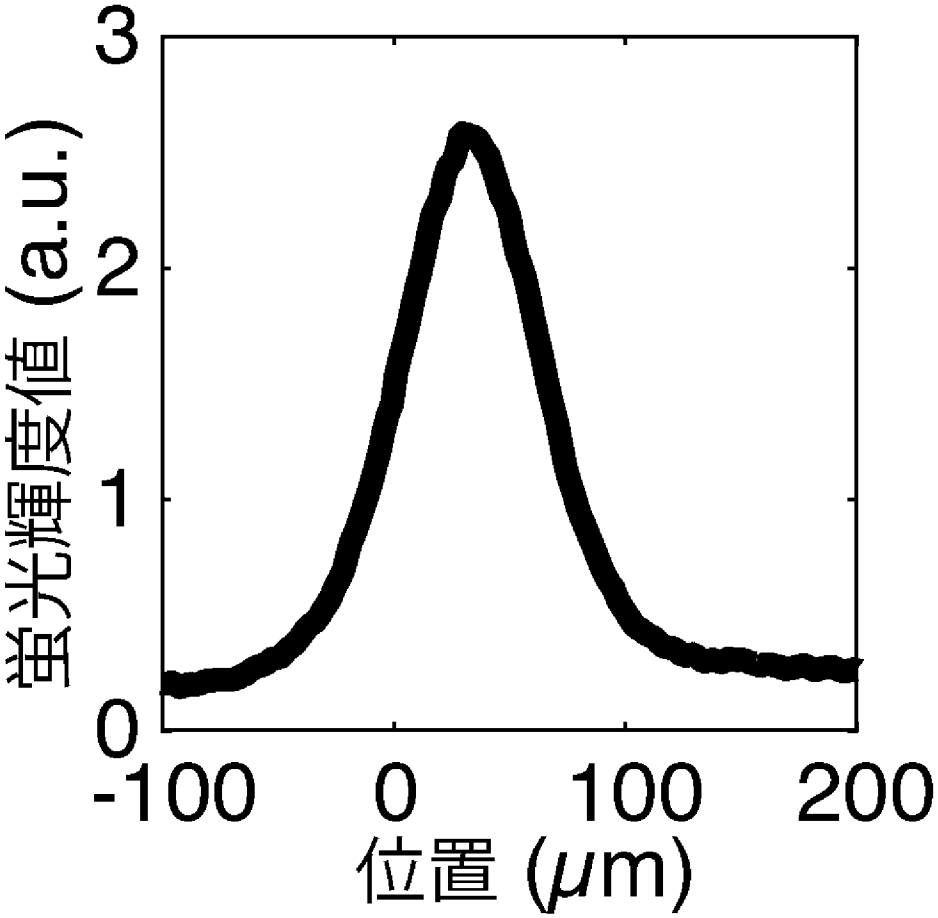
[図12A]


121
チャンネル１
50
光刺激領域
122
チャンネル2
アンケージングによって
形成される刺激流
刺激物質の
ケージド化合物溶液
チャンネル3
123

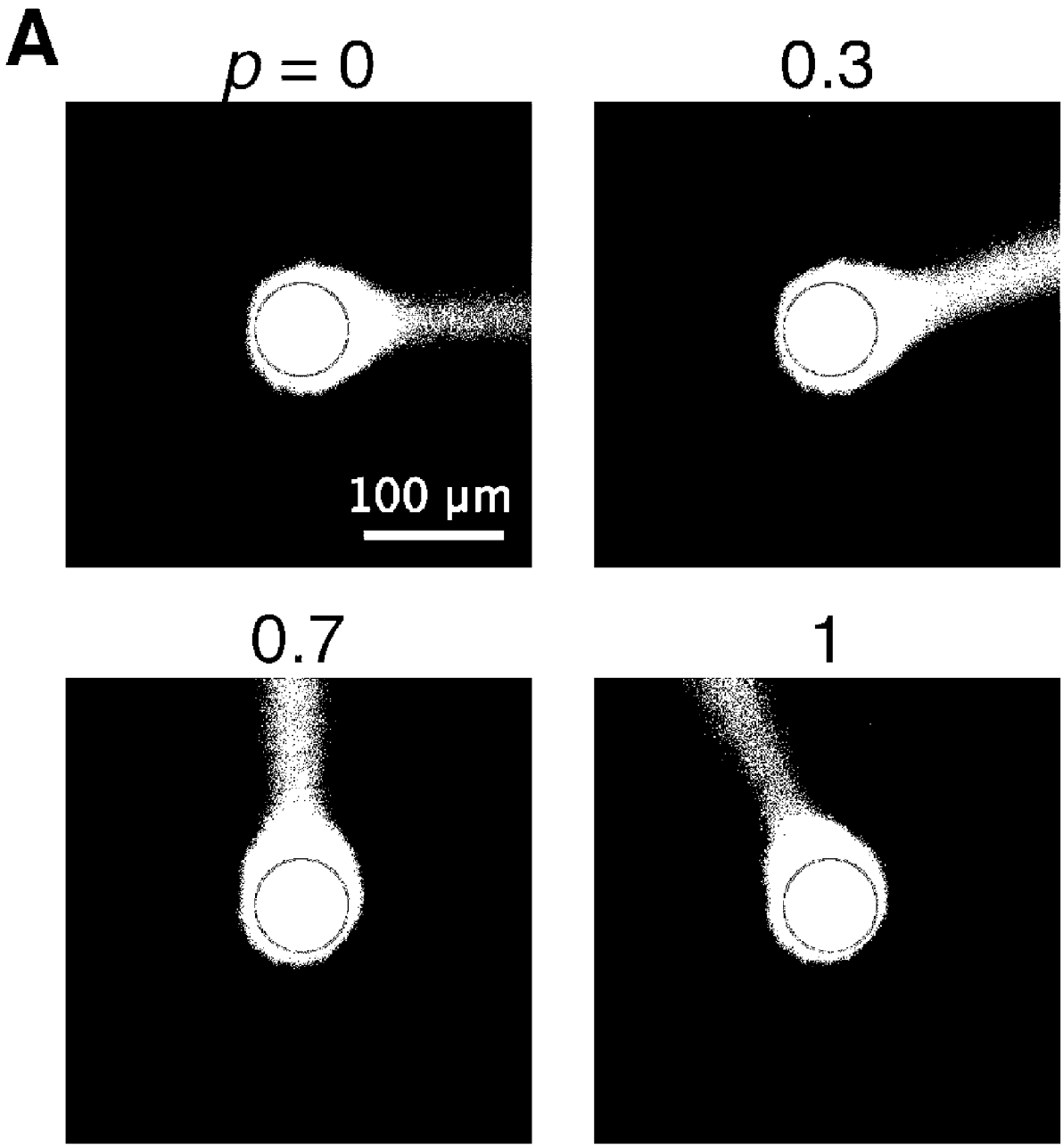
[図12B]



[図12C]

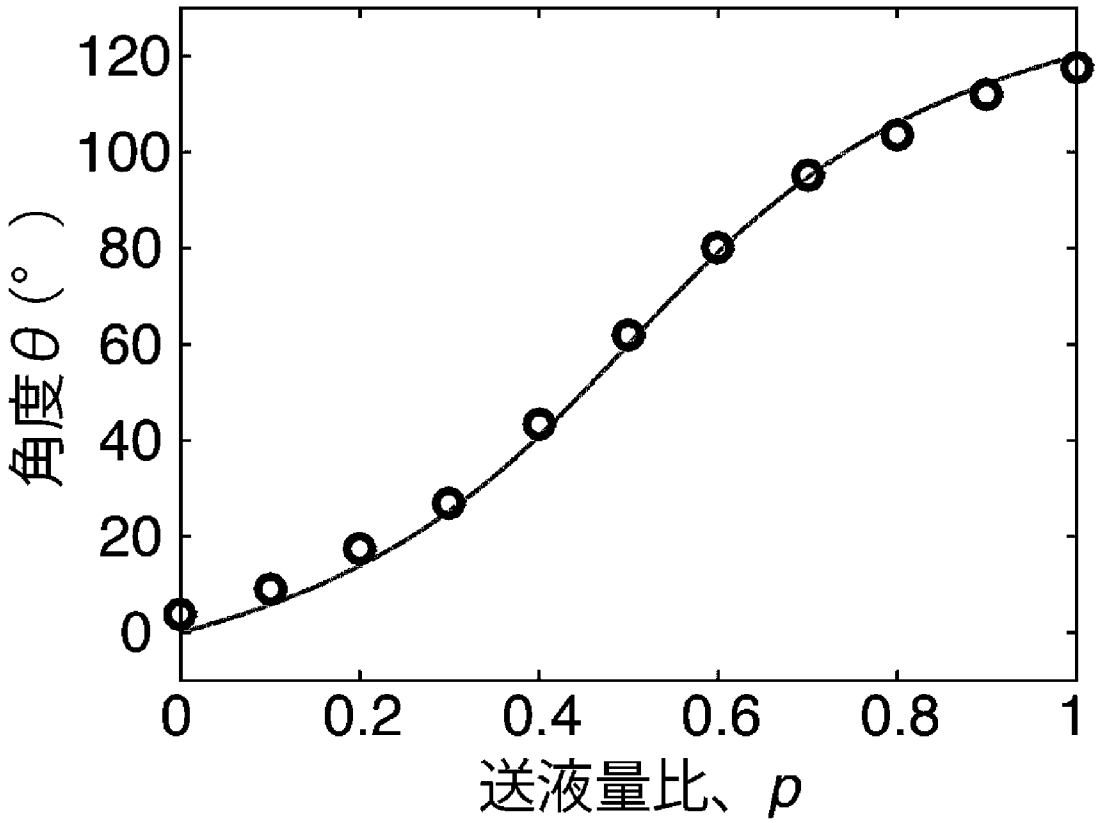


[図13A]

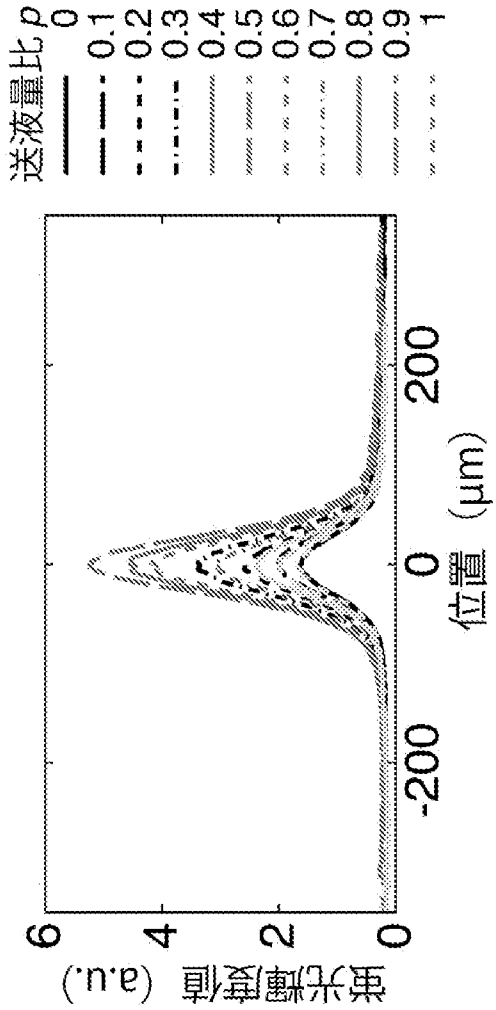


[図13B]

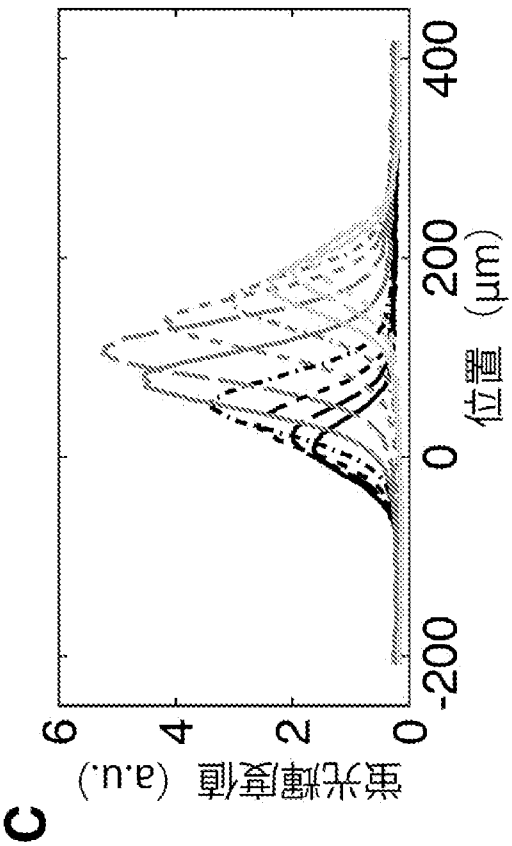
B



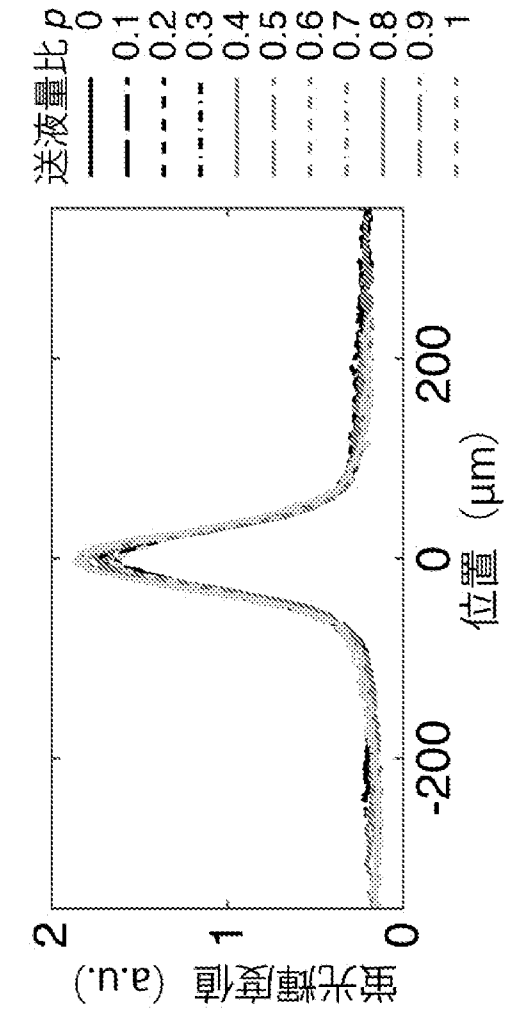
[図13C]


送液量比 p
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
蛍光輝度値 (a.u.)
0
2
4
6
-200
0
200
位置 (μm)

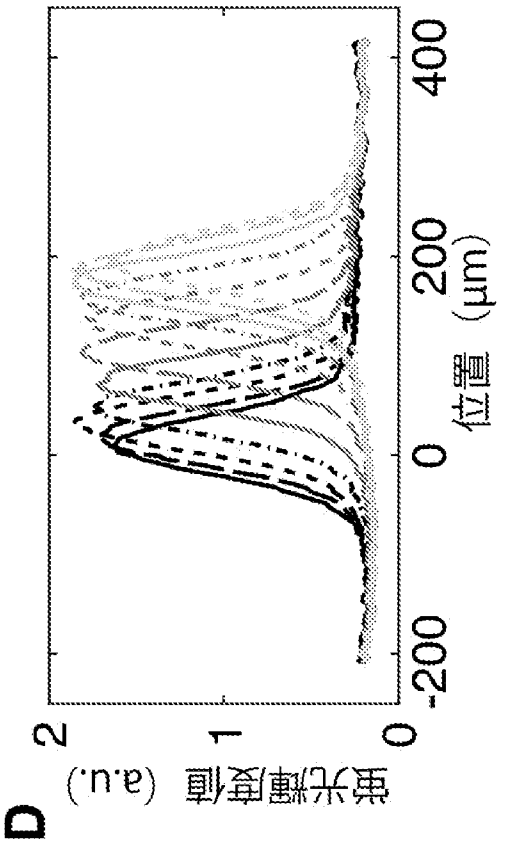
C


蛍光輝度値 (a.u.)
0
2
4
6
-200
0
200
400
位置 (μm)

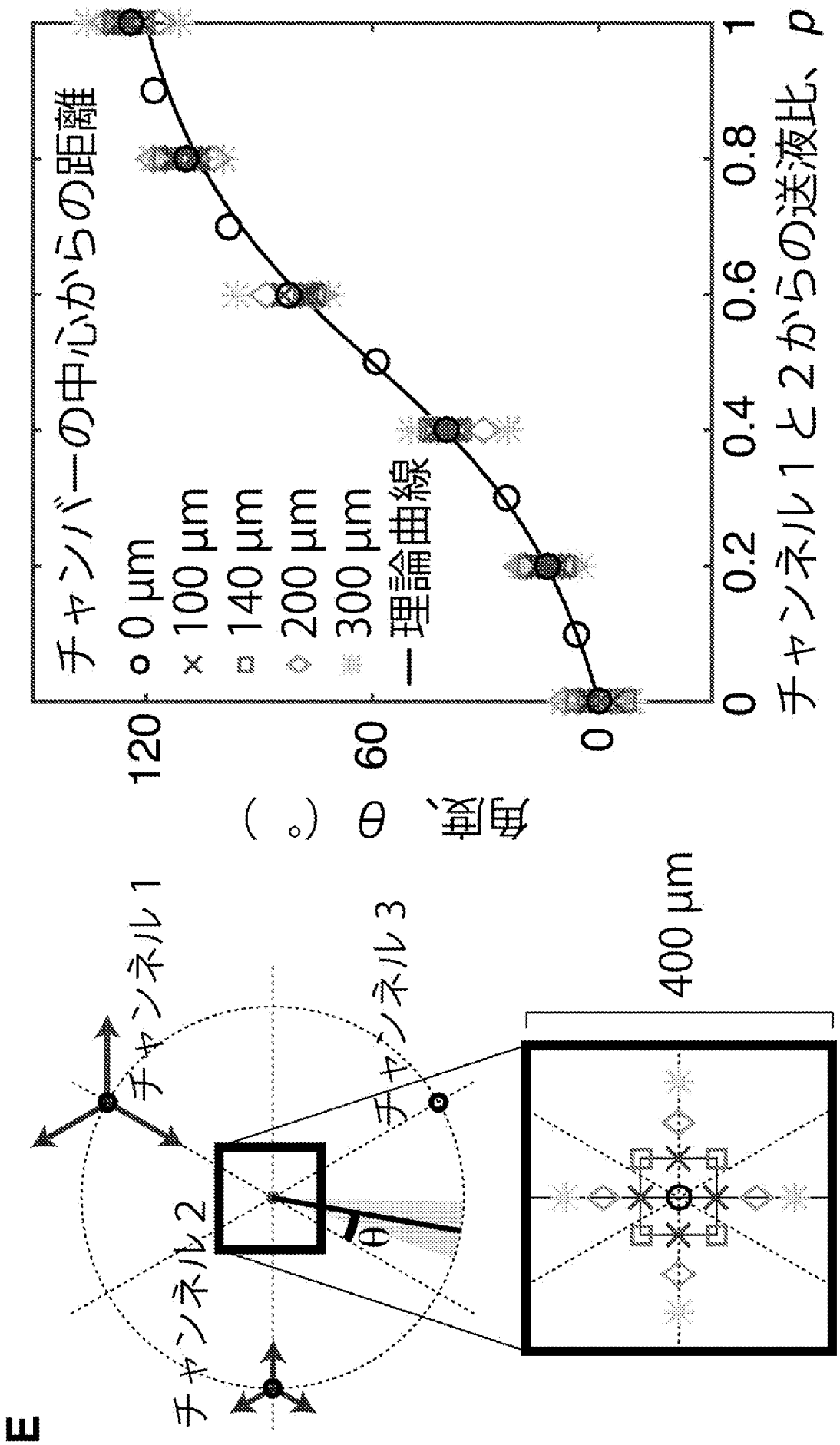
[図13D]


送液量比 p
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
蛍光輝度値 (a.u.)
0
1
2
-200
0
200
位置 (μm)

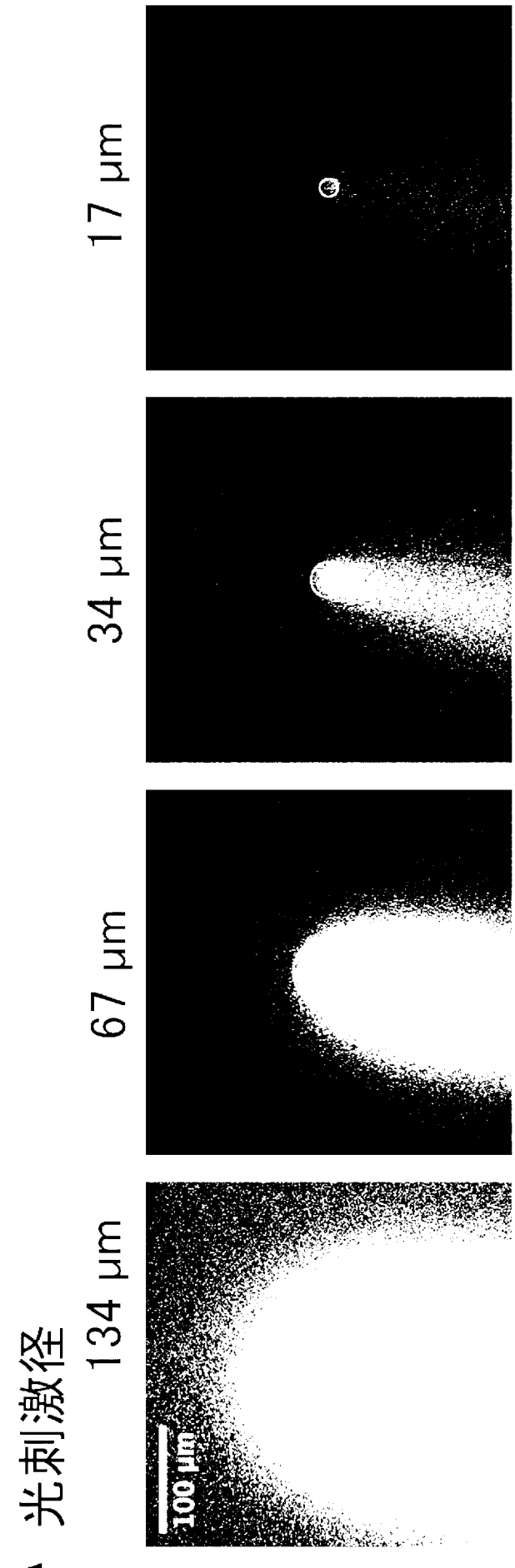
D


蛍光輝度値 (a.u.)
0
1
2
-200
0
200
400
位置 (μm)

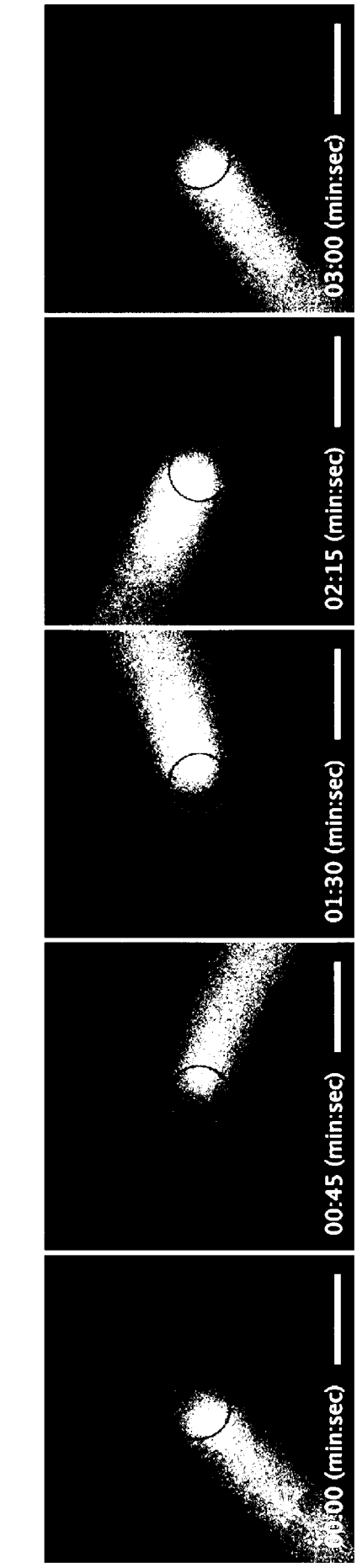
[図13E]


E
チャンネル1
チャンネル2
チャンネル3
θ
400 μm
角度、θ（°）
120
60
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
チャンネル1と2からの送液比、p
チャンバーの中心からの距離
0 μm
100 μm
140 μm
200 μm
300 μm
理論曲線

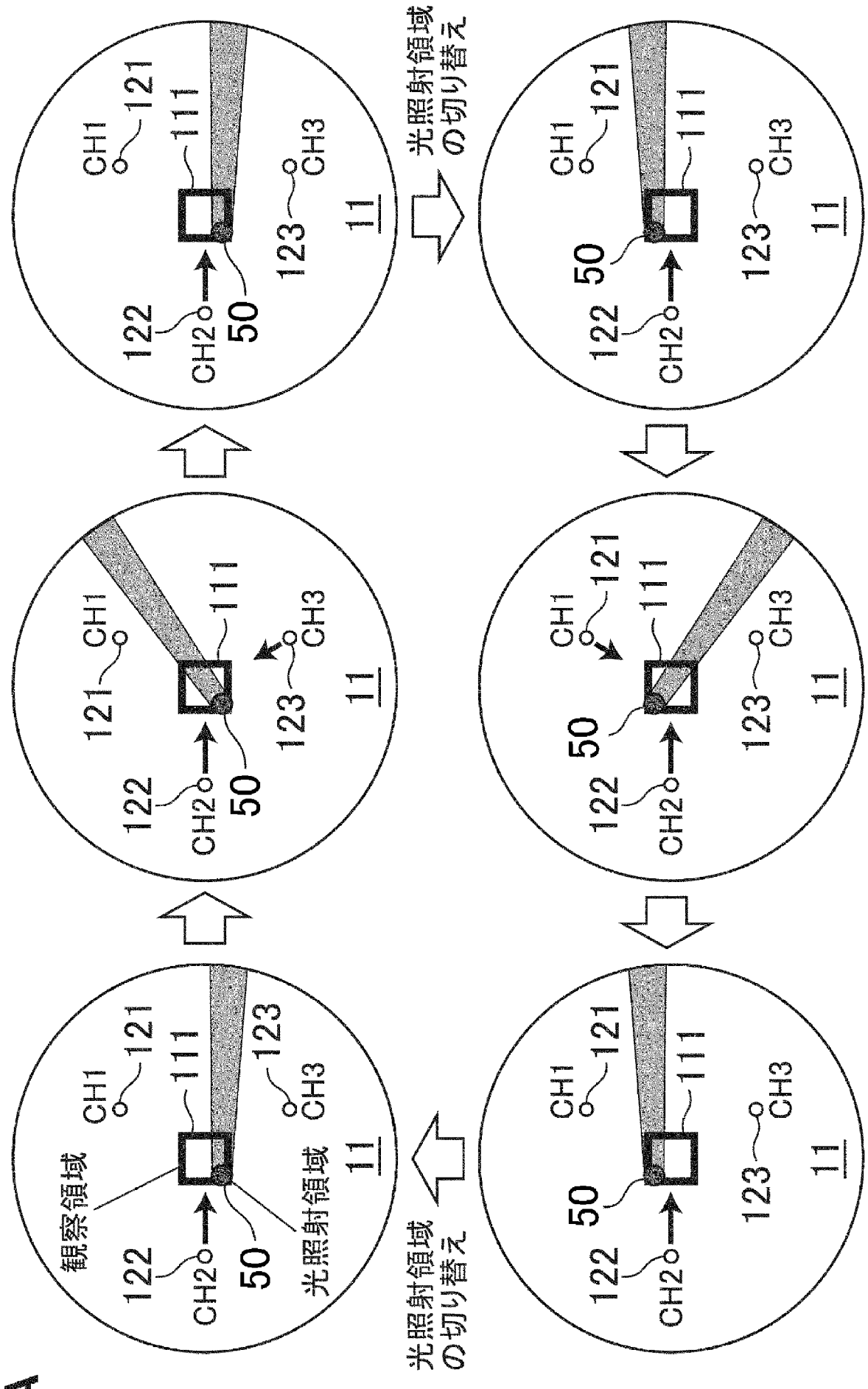
[図14A]



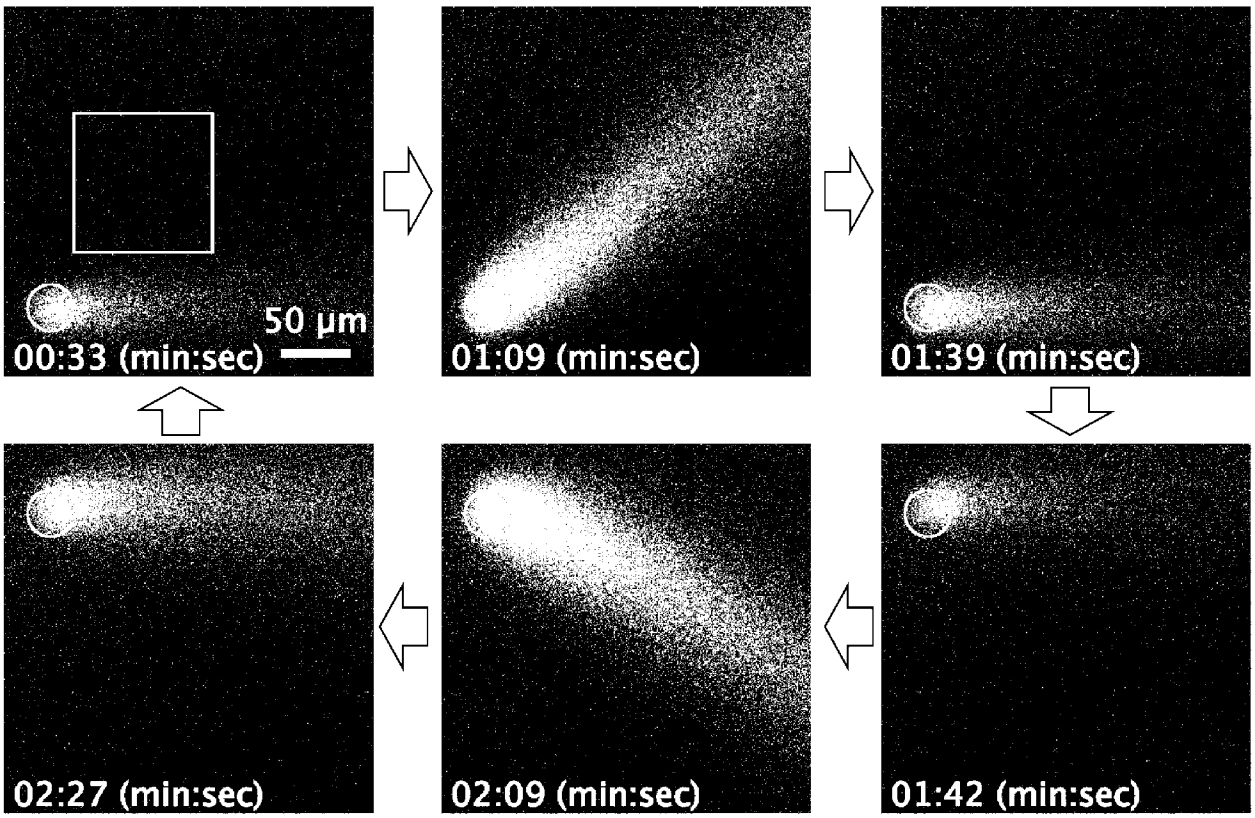
[図14B]


B
00:00 (min:sec)
00:45 (min:sec)
01:30 (min:sec)
02:15 (min:sec)
03:00 (min:sec)

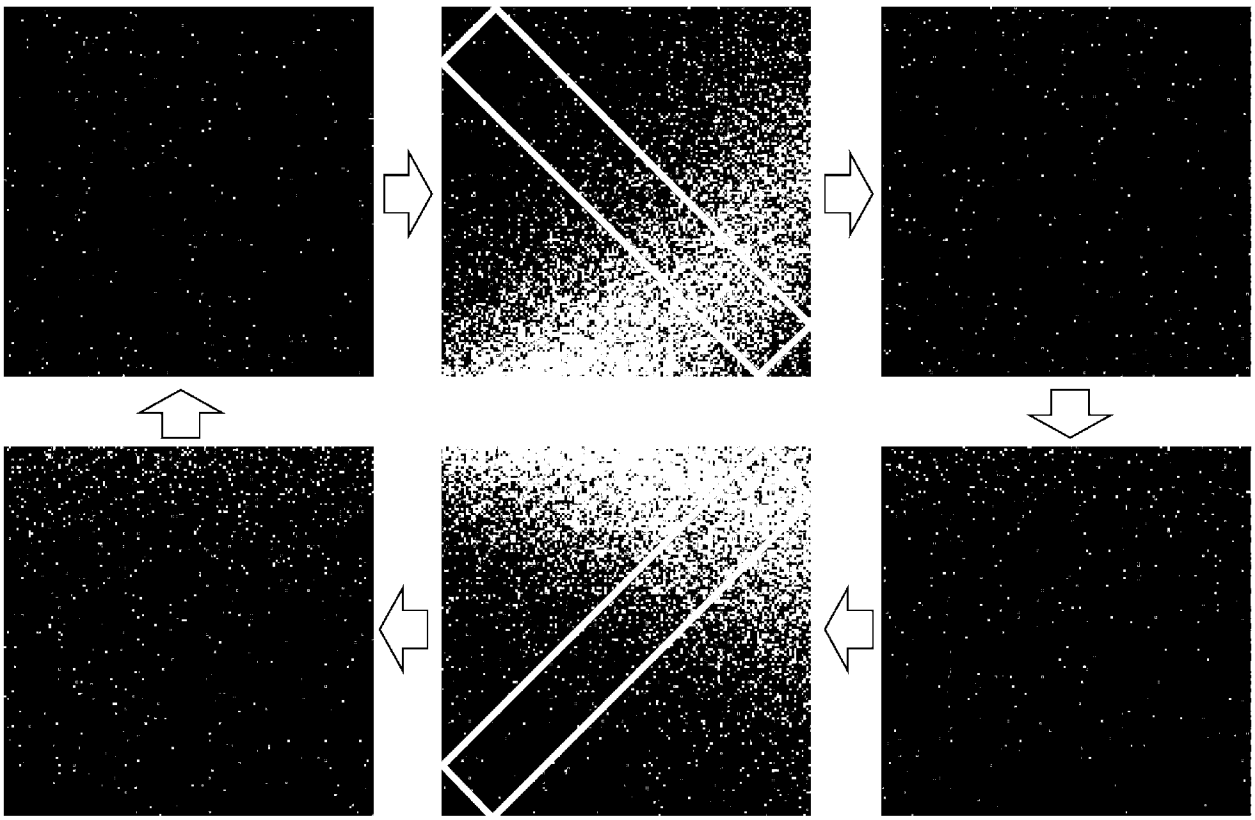
[図15A]


A
観察領域
光照射領域
光照射領域の切り替え
光照射領域の切り替え
CH1
CH2
CH3
121
122
123
111
50
11

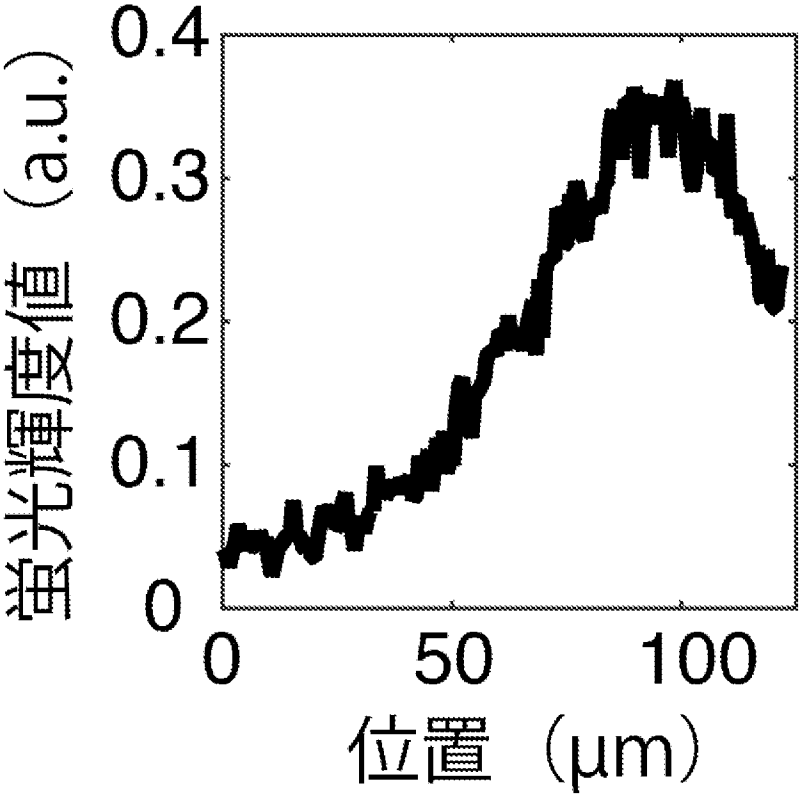
[図15B]

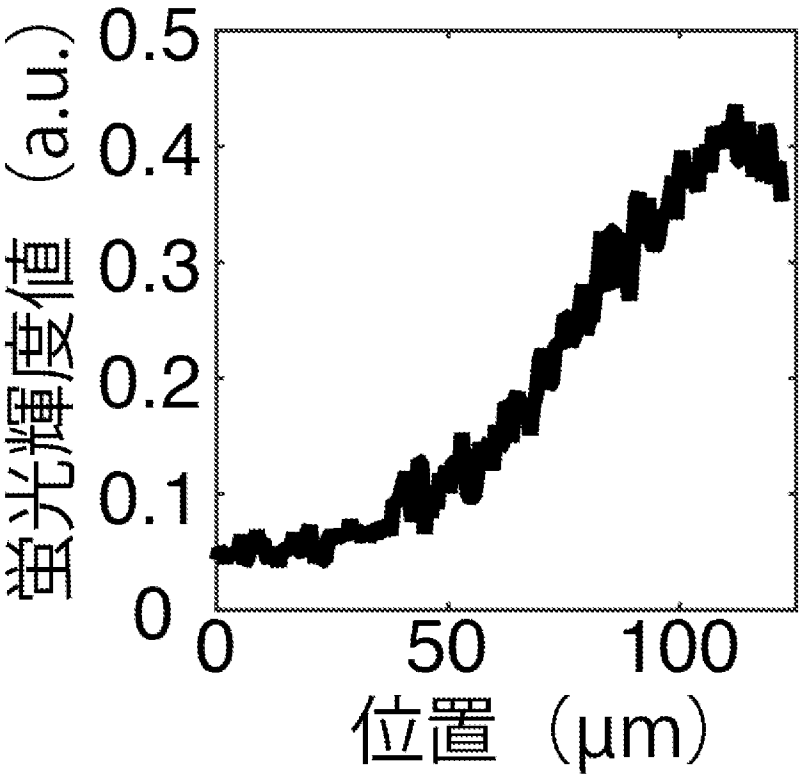

50 μm
00:33 (min:sec)
01:09 (min:sec)
01:39 (min:sec)
02:27 (min:sec)
02:09 (min:sec)
01:42 (min:sec)

[図15C]

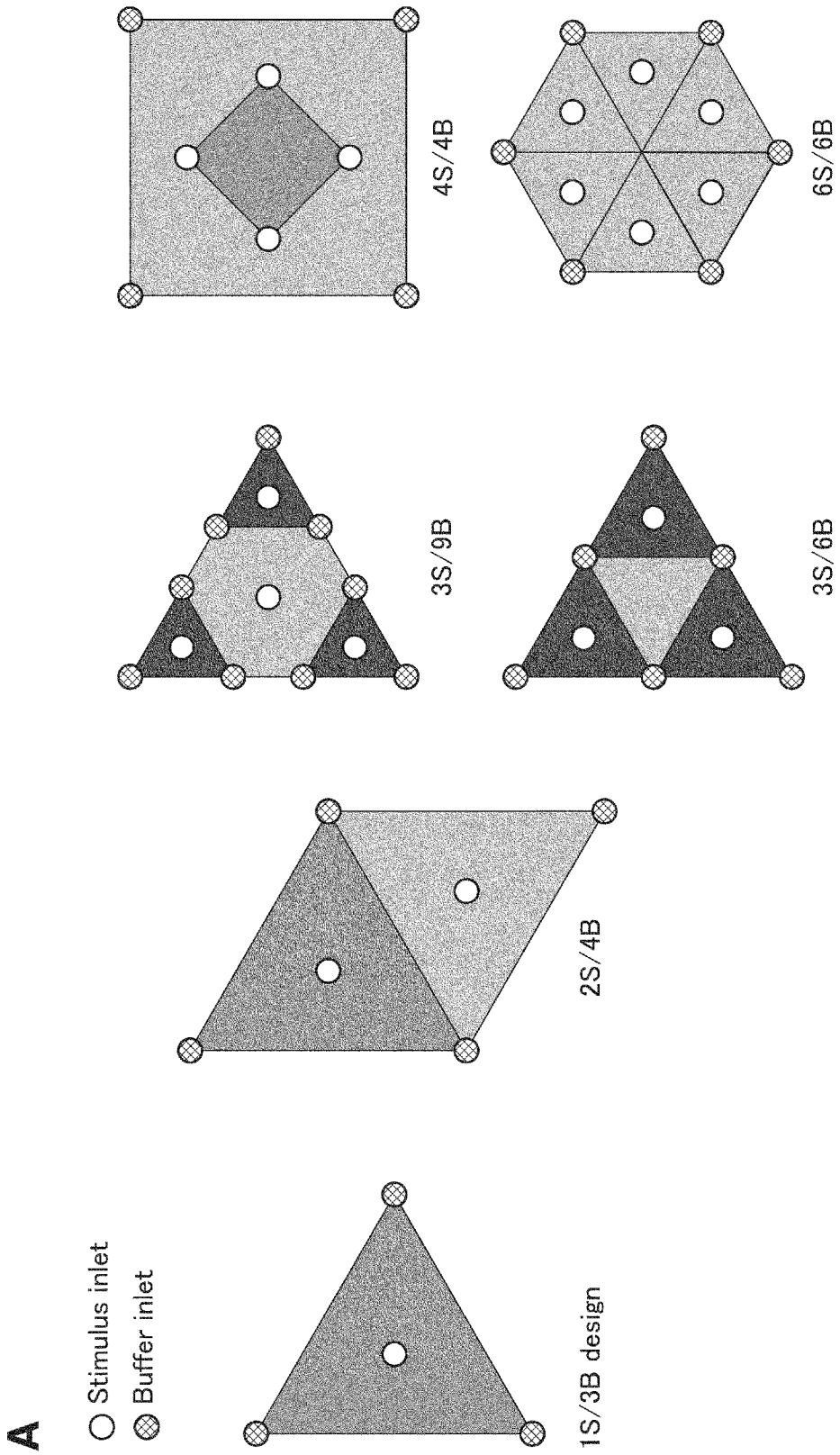


[図15D]

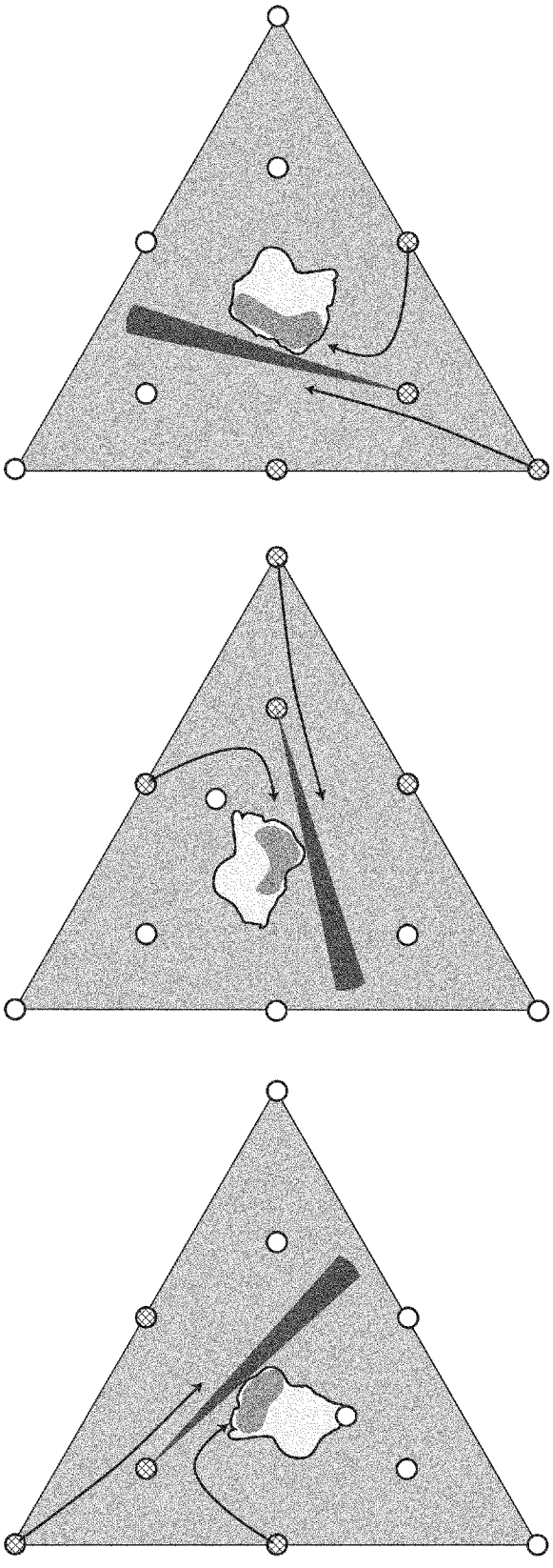

蛍光輝度値（a.u.）
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
50
100
位置（μm）


蛍光輝度値（a.u.）
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
50
100
位置（μm）

[図16A]

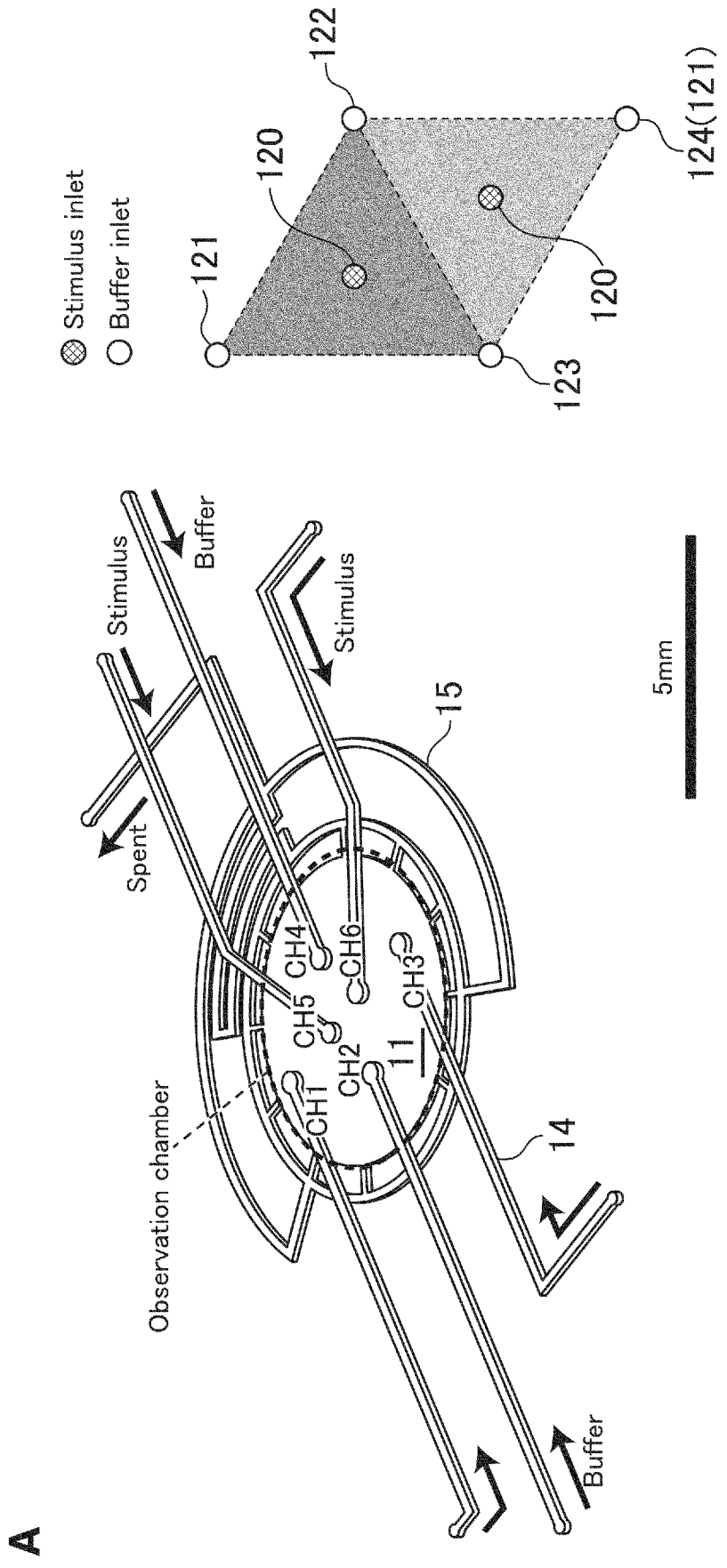

A
○ Stimulus inlet
⊗ Buffer inlet
1S/3B design
2S/4B
3S/9B
3S/6B
4S/4B
6S/6B

[図16B]

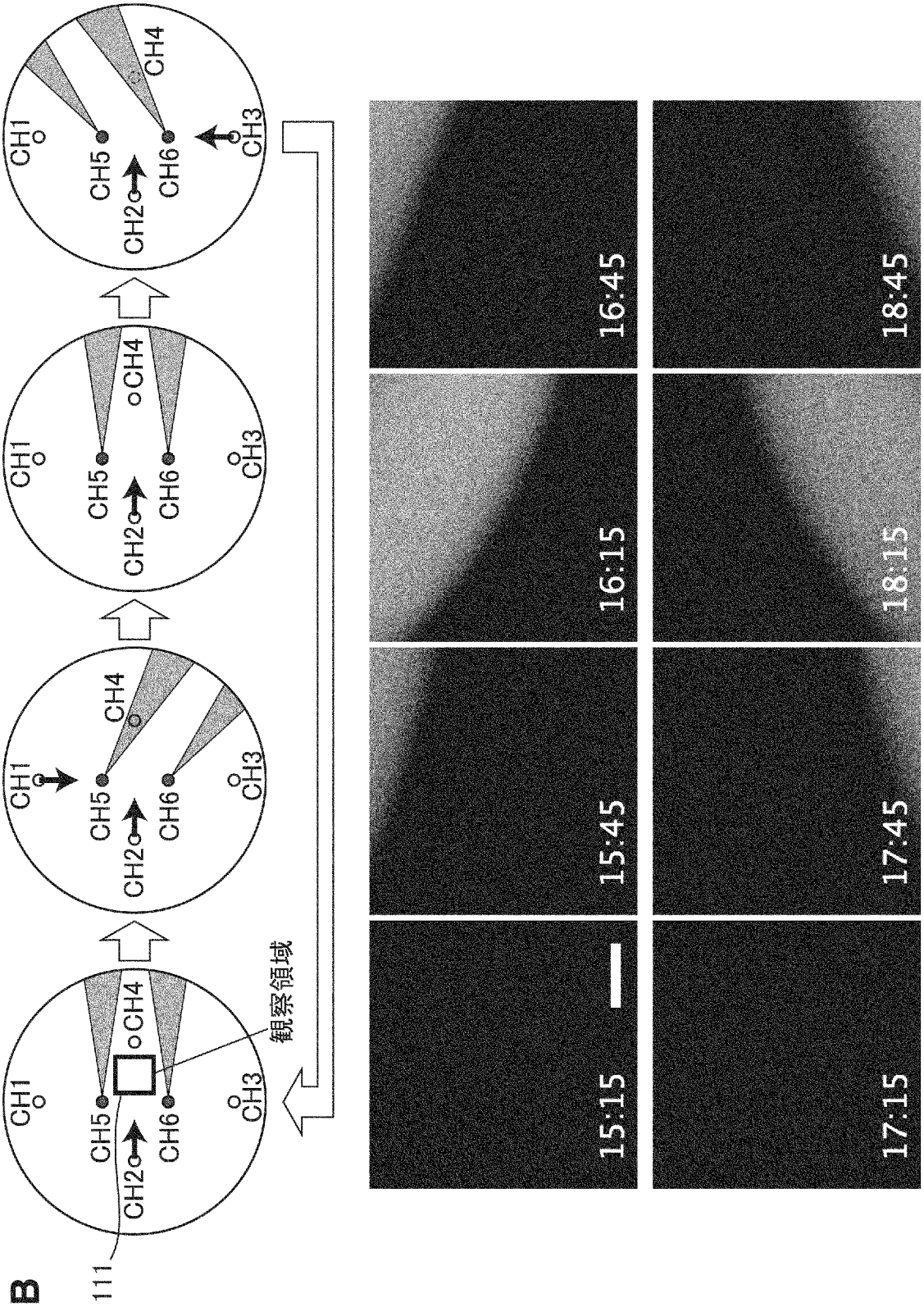


B

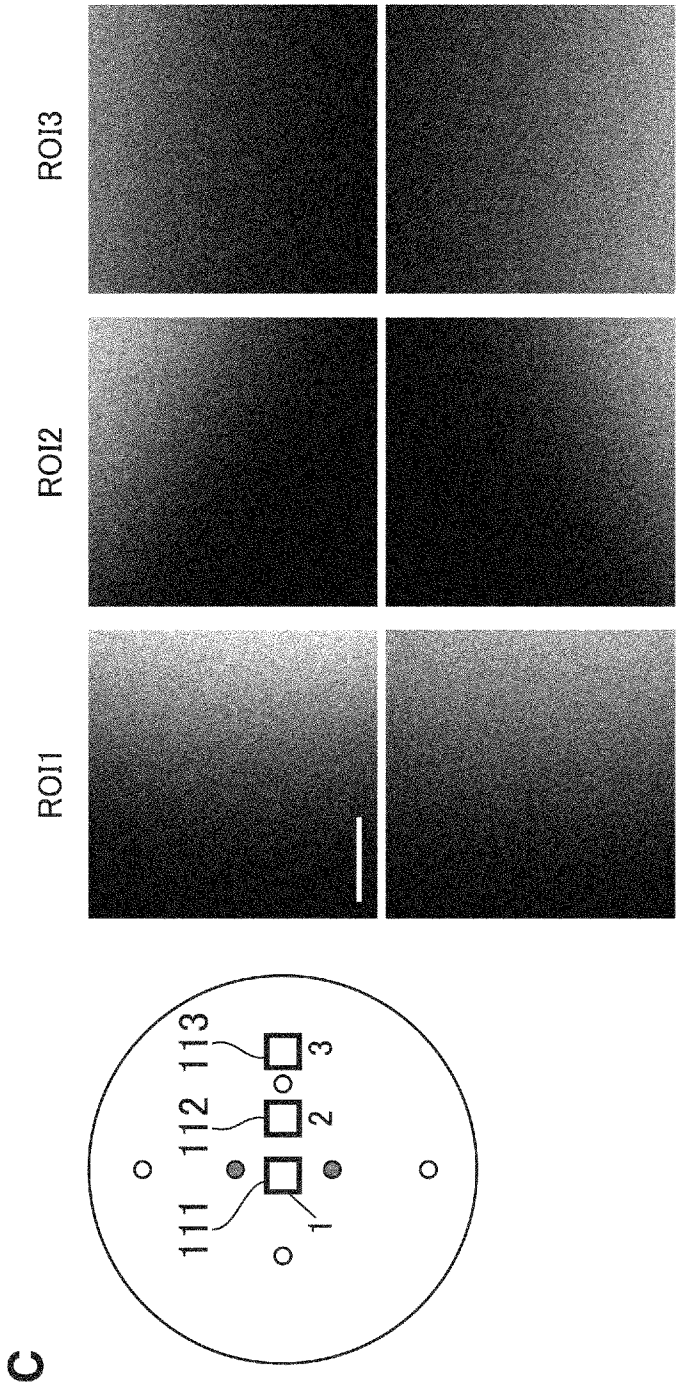
[図17A]


Stimulus inlet
Buffer inlet
121
120
122
124(121)
120
123
A
Buffer
Stimulus
Stimulus
Spent
15
5mm
CH4
CH6
CH5
CH3
CH2
11
CH1
Observation chamber
14
Buffer

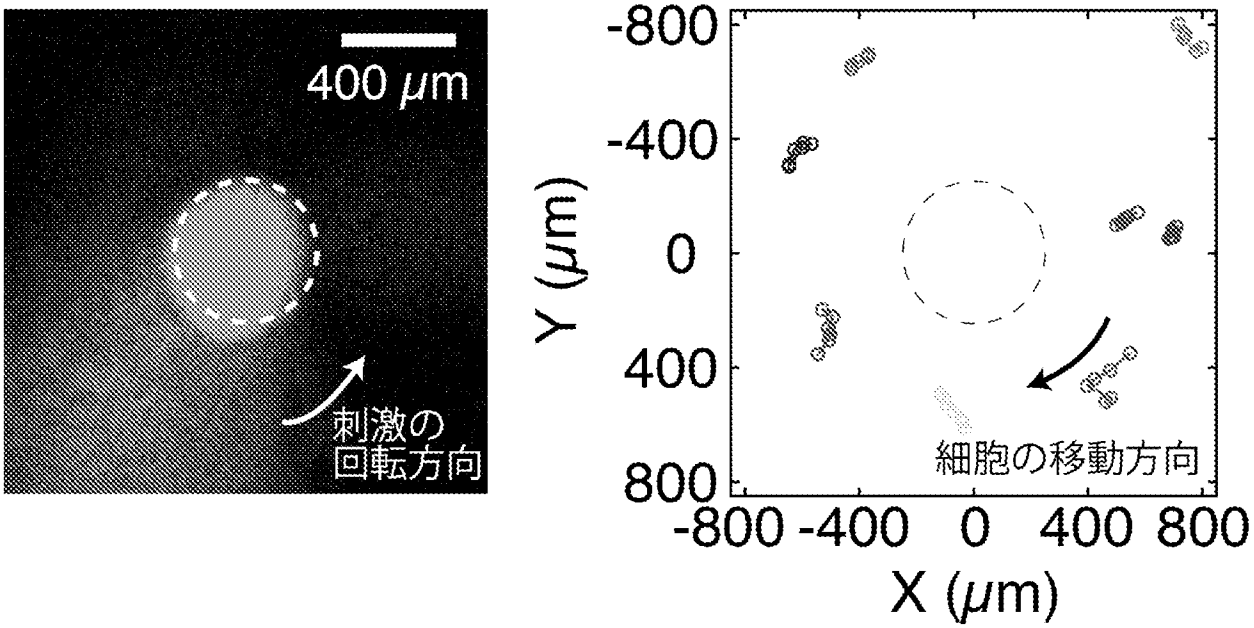
[図17B]


B
111
観察領域
CH1
CH2
CH3
CH4
CH5
CH6
15:15
15:45
16:15
16:45
17:15
17:45
18:15
18:45

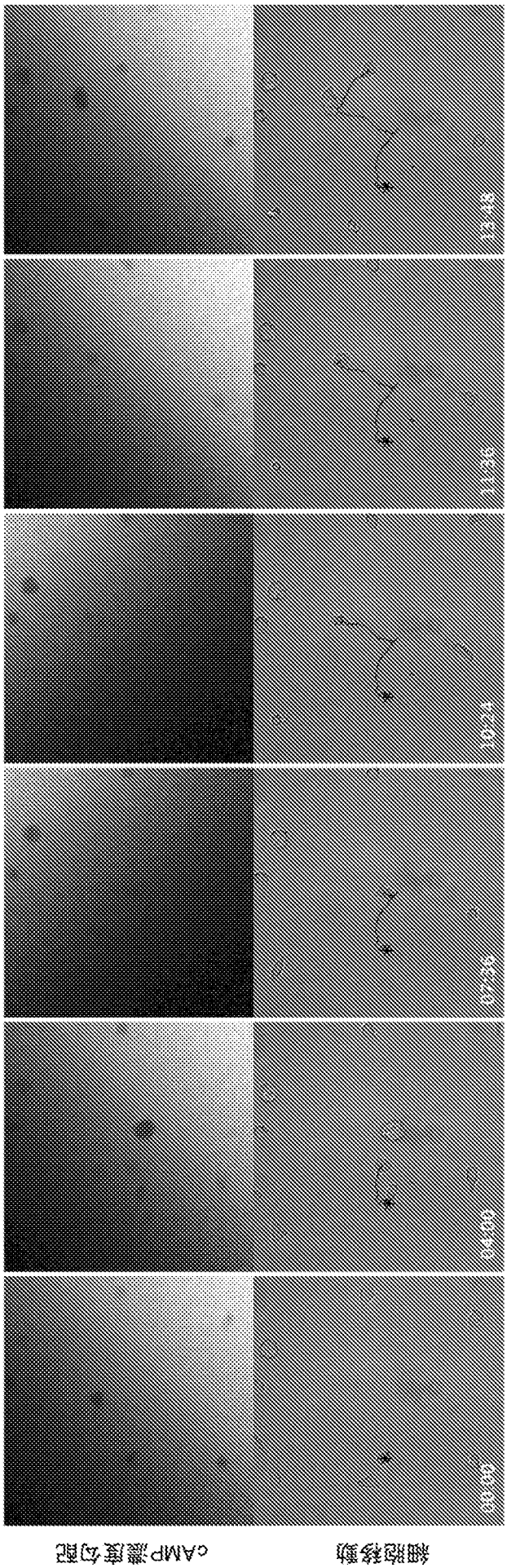
[図17C]



[図18]


400 μm
刺激の
回転方向
-800
-400
0
400
800
Y (μm)
-800 -400 0 400 800
X (μm)
細胞の移動方向

[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/015594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/00(2006.01)i, *B81B1/00*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12M1/00, B81B1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2004-53370 A (Canon Inc.), 19 February 2004 (19.02.2004), paragraphs [0022] to [0027]; fig. 3 to 5 & US 2004/0179427 A1 paragraphs [0037] to [0049]; fig. 3 to 5 & WO 2004/009226 A1	1-3,5,9, 11-13 4,6-8,10
A	JP 2008-278789 A (On-chip Biotechnologies Co., Ltd.), 20 November 2008 (20.11.2008), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2007-283301 A (Tosoh Corp.), 01 November 2007 (01.11.2007), entire text; all drawings & US 2003/0201022 A1 & EP 1358931 A2	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 May 2017 (26.05.17)	06 June 2017 (06.06.17)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/015594

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-26603 A (Yamatake Corp.), 02 February 2006 (02.02.2006), entire text; all drawings (Family: none)	1-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０１５５９４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00(2006.01)i, B81B1/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00, B81B1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2004-53370 A (キヤノン株式会社) 2004.02.19, [0022]-[0027], 図 3-5 & US 2004/0179427 A1, [0037]-[0049], 図 3-5 & WO	1-3, 5, 9, 11-13
A	2004/009226 A1	4, 6-8, 10
A	JP 2008-278789 A (株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ) 2008.11.20, 全文、全図, (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2007-283301 A (東ソー株式会社) 2007.11.01, 全文、全図, & US 2003/0201022 A1 & EP 1358931 A2	1-13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２６．０５．２０１７	０６．０６．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　３Ｐ　５２７１
細川　翔多
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３３６３

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2006-26603 A（株式会社山武）2006.02.02，全文、全図，（ファミリーなし）	1-13