

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第5905317号  
(P5905317)

(45) 発行日 平成28年4月20日 (2016. 4. 20)

(24) 登録日 平成28年3月25日 (2016. 3. 25)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 15/14 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 P

GO 1 N 21/64 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 C

GO 1 N 21/64 Z

請求項の数 14 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2012-80755 (P2012-80755)	(73) 特許権者	000002185
(22) 出願日	平成24年3月30日 (2012. 3. 30)		ソニー株式会社
(65) 公開番号	特開2013-210287 (P2013-210287A)		東京都港区港南1丁目7番1号
(43) 公開日	平成25年10月10日 (2013. 10. 10)	(74) 代理人	100112874
審査請求日	平成26年12月26日 (2014. 12. 26)		弁理士 渡邊 薫
		(72) 発明者	外石 満
			東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株 式会社内
		審査官	渡邊 勇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法及び該装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロチップ又はフローセルに形成された流路にサイズ及び蛍光強度が異なる2種以上のキャリブレーション粒子を含む流体を通流する送液手順と、  
レーザ照射により前記マイクロチップ又は前記フローセルから発生する光を前記マイクロチップ又は前記フローセル上の複数の位置から検出する第一の信号取得手順と、  
全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる位置を特定する手順と、を含み、

前記検出強度として、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値のエリア平均値を用い、

前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる第一の最適位置を特定する手順を含む微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法。

【請求項 2】

前記第一の最適位置は、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値がより大きくなる位置である請求項1記載のキャリブレーション方法。

【請求項 3】

前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値の変動係数が

より小さくなる第二の最適位置を特定する手順を含む請求項 1 又は 2 記載のキャリブレーション方法。

【請求項 4】

前記レーザに対する前記マイクロチップ又は前記フローセルの相対位置を、前記第一の最適位置又は前記第二の最適位置に設定する手順を含む請求項 3 記載のキャリブレーション方法。

【請求項 5】

前記第一の最適位置と前記第二の最適位置が異なる場合に、前記相対位置を前記第二の最適位置に設定する請求項 4 記載のキャリブレーション方法。

【請求項 6】

前記流路の一端に形成されたオリフィスから吐出される液滴に対して、前記流路を流通する前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出時刻から所定時間経過後にレーザを照射し、前記液滴から発生する光を検出する第二の信号取得手順と、  
全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値、あるいは前記キャリブレーション粒子のうちサイズが大きい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値、がより大きくなる経過時間を特定する手順と、を含む請求項 1 ~ 5 のいずれか記載のキャリブレーション方法。

【請求項 7】

前記経過時間をディレイタイムとして設定する手順を含む請求項 6 記載のキャリブレーション方法。

【請求項 8】

前記キャリブレーション粒子として、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子と、サイズが大きく蛍光強度が高い粒子と、の 2 種を用いる請求項 1 ~ 7 のいずれか記載のキャリブレーション方法。

【請求項 9】

前記キャリブレーション粒子中のサイズが大きく蛍光強度が高い粒子のポピュレーションが、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子のポピュレーションよりも大きい請求項 8 記載のキャリブレーション方法。

【請求項 10】

前記サイズが小さく蛍光強度が低い粒子の粒径が 2 ~ 4  $\mu\text{m}$  であり、前記サイズが大きく蛍光強度が高い粒子の粒径が 8 ~ 12  $\mu\text{m}$  である請求項 8 又は 9 記載のキャリブレーション方法。

【請求項 11】

サイズ及び蛍光強度が異なる 2 種以上のキャリブレーション粒子を含む流体が流路に流通されたマイクロチップ又はフローセルにレーザを照射して発生する光を検出する照射検出部と、

該照射検出部に対する前記マイクロチップ又は前記フローセルの相対位置を変更する位置調整部と、

全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる位置への移動信号を前記位置調整部に出力する制御部と、を備え、

前記検出強度が、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値のエリア平均値であり、

前記制御部は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる第一の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する微小粒子分取装置。

【請求項 12】

前記制御部は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値の変動係数がより小さくなる第二の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する請求項 11 記載の微小粒子分取装置。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 3】

前記制御部は、前記第一の最適位置と前記第二の最適位置が異なる場合に、前記第二の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する請求項 1 2 記載の微小粒子分取装置。

## 【請求項 1 4】

前記流路の一端に形成されたオリフィスから吐出される液滴に対して、前記照射検出部による前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出時刻から所定時間経過後にレーザを照射する光源と、

前記液滴から発生する光を検出する検出部と、を備え、

前記制御部は、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値、あるいは前記キャリブレーション粒子のうちサイズが大きい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値、がより大きくなる経過時間をディレイタイムとして設定する請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか記載の微小粒子分取装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本技術は、微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法、該装置及びキャリブレーション粒子に関する。より詳しくは、マイクロチップ又はフローセルの光学位置及びディレイタイムを自動で最適化し、高精度な分析を可能とする微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法等に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞などの微小粒子の特性を光学的に検出し、所定の特性を有する微小粒子のみを分別して回収する微小粒子分取装置（例えばフローサイトメータ）が知られている。

## 【0003】

フローサイトメータでは、フローセル又はマイクロチップに形成された流路に細胞を含むサンプル液を送液し、流路を通流する細胞にレーザを照射して細胞から発生する蛍光又は散乱光を検出器で検出することにより、細胞の光学特性を測定している。また、フローサイトメータでは、光学特性の測定の結果、所定の条件を満たすと判定されたポピュレーション（群）を、細胞中から分別回収することも行われている。

## 【0004】

フローサイトメータにおける細胞分別（ソーティング）では、フローセル又はマイクロチップに形成されたオリフィスから細胞を含むサンプル液とシース液とを液滴化して吐出させることにより、流体ストリーム（液滴の流れ）を発生させる。サンプル液とシース液の液滴化は、振動素子によって所定周波数の振動をオリフィスに印加することにより行われる。細胞を含む液滴は電荷を付与されて吐出され、各液滴の移動方向を電氣的に制御することで所望の特性を有する目的細胞とそれ以外の非目的細胞とを別々の回収容器に回収する。

## 【0005】

例えば、特許文献 1 には、マイクロチップ型のフローサイトメータとして、「微小粒子を含む液体が通流される流路と、この流路を通流する液体をチップ外の空間に排出するオリフィスと、が配設されたマイクロチップと、オリフィスにおいて液体を液滴化して吐出するための振動素子と、吐出される液滴に電荷を付与するための荷電手段と、流路を通流する微小粒子の光学特性を検出する光学検出手段と、チップ外の空間に吐出された液滴の移動方向に沿って、移動する液滴を挟んで対向して配設された対電極と、対電極間を通じた液滴を回収する二以上の容器と、を備える微小粒子分取装置」が開示されている。

## 【0006】

また、特許文献 2 には、オリフィスから射出されるサンプル液とシース液とが液滴化される位置（以下「ブレイクオフポイント」と称する）を制御することが記載されている（当該文献請求項 1 参照）。各液滴は、このブレイクオフポイントにおいて該液滴に含まれる細胞の特性に応じた電荷を付与される。フローセル又はマイクロチップに形成された流

10

20

30

40

50

路で細胞の特性が検出されてから、当該細胞がブレイクオフポイントに到達し、当該細胞を含む液滴に電荷が付与されるまでの時間は、「ディレイタイム」と称される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2010-190680号公報

【特許文献2】特表2007-532874号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

10

微小粒子の光学特性を正確に測定するため、微小粒子分取装置では、フローセル又はマイクロチップに形成された流路内の微小粒子の通流位置と、レーザの光軸と、を高精度に位置合わせする必要がある。この位置合わせは、従来、キャリブレーション用の粒子（キャリブレーションビーズ）を用いてユーザが手動で行っており、習熟を要し、信頼性や安定性に問題があった。特に、マイクロチップ型の微小粒子測定装置では、マイクロチップの交換の都度あるいは分析の都度に光学位置の調整が必要となり、非常に煩雑であった。

【0009】

また、微小粒子分取装置では、正確なソーティングを行うため、液滴に当該液滴に含まれる細胞の特性に応じた適切な電荷を付与し得るディレイタイムを設定する必要がある。従来、ユーザは、ソーティングされる液滴をプレパレート上に受け、目視で観測しながら良好なソーティングが達成されるようなディレイタイムを手動で設定していた。この操作も非常に煩雑で、習熟を要し、信頼性や安定性において不十分であった。

20

【0010】

そこで、本技術は、レーザの光軸に対するマイクロチップ又はフローセルの位置調整及びディレイタイムの最適化を自動で高精度に行うことが可能な微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記課題解決のため、本技術は、マイクロチップ又はフローセルに形成された流路にサイズ及び蛍光強度が異なる2種以上のキャリブレーション粒子を含む流体を通流する送液手順と、レーザ照射により前記マイクロチップ又は前記フローセルから発生する光を前記マイクロチップ又は前記フローセル上の複数の位置から検出する第一の信号取得手順と、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度、好適には該検出強度の積算値のエリア平均値、がより大きくなる位置を特定する手順と、を含む微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法を提供する。

30

このキャリブレーション方法は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度、好適には該検出強度の積算値又は平均値、がより大きくなる第一の最適位置を特定する手順と、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値の変動係数がより小さくなる第二の最適位置を特定する手順と、を含む。

40

また、このキャリブレーション方法は、前記レーザに対する前記マイクロチップ又は前記フローセルの相対位置を、前記第一の最適位置又は前記第二の最適位置に設定する手順を含む。前記第一の最適位置と前記第二の最適位置が異なる場合には、前記相対位置は前記第二の最適位置に設定される。

このキャリブレーション方法では、照射検出部に対するマイクロチップの相対位置をこれらの位置に設定することで、レーザの光軸に対するマイクロチップの位置を自動で最適化できる。

さらに、このキャリブレーション方法は、前記流路の一端に形成されたオリフィスから吐出される液滴に対して、前記流路を通流する前記キャリブレーション粒子から発生する

50

光の検出時刻から所定時間経過後にレーザを照射し、前記液滴から発生する光を検出する第二の信号取得手順と、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値、あるいは前記キャリブレーション粒子のうちサイズが大きい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値、がより大きくなる経過時間を特定する手順と、を含んでいてもよい。この場合、前記経過時間は、最適なディレイタイムとして前記マイクロチップ型微小粒子分取装置に設定され得る。

このキャリブレーション方法では、前記キャリブレーション粒子として、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子と、サイズが大きく蛍光強度が高い粒子と、の2種を用いることが好ましい。この場合、前記キャリブレーション粒子中のサイズが大きく蛍光強度が高い粒子のポピュレーションが、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子のポピュレーションよりも大きいことが好適となる。

10

#### 【0012】

また、本技術は、サイズ及び蛍光強度が異なる2種以上のキャリブレーション粒子を含む流体が流路に流通されたマイクロチップ又はフローセルにレーザを照射して発生する光を検出する照射検出部と、該照射検出部に対する前記マイクロチップ又は前記フローセルの相対位置を変更する位置調整部と、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度、好適には該検出強度の積算値のエリア平均値、がより大きくなる位置への移動信号を前記位置調整部に出力する制御部と、を備える微小粒子分取装置を提供する。

この微小粒子分取装置において、前記制御部は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度、好適には該検出強度の積算値又は平均値、がより大きくなる第一の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する。

20

あるいは、前記制御部は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値の変動係数がより小さくなる第二の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する。

前記制御部は、前記第一の最適位置と前記第二の最適位置が異なる場合には、前記第二の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する。

この微小粒子分取装置は、前記流路の一端に形成されたオリフィスから吐出される液滴に対して、前記照射検出部による前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出時刻から所定時間経過後にレーザを照射する光源と、前記液滴から発生する光を検出する検出部と、を備えることが好ましい。この場合、前記制御部は、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値、あるいは前記キャリブレーション粒子のうちサイズが大きい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値、がより大きくなる経過時間をディレイタイムとして設定するように構成される。

30

#### 【0013】

さらに、本技術は、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子と、サイズが大きく蛍光強度が高い粒子と、の2種を含む微小粒子分取装置用のキャリブレーション粒子をも提供する。

このキャリブレーション粒子は、前記サイズが大きく蛍光強度が高い粒子のポピュレーションが、前記サイズが小さく蛍光強度が低い粒子のポピュレーションよりも大きくされていることが好ましい。

40

また、このキャリブレーション粒子において、前記サイズが小さく蛍光強度が低い粒子の粒径は例えば2～4  $\mu\text{m}$ 、前記サイズが大きく蛍光強度が高い粒子の粒径は例えば8～12  $\mu\text{m}$ とされる。

#### 【0014】

本技術において、「微小粒子」には、細胞や微生物、リポソーム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が広く含まれるものとする。

生体関連微小粒子には、各種細胞を構成する染色体、リポソーム、ミトコンドリア、オルガネラ(細胞小器官)などが含まれる。細胞には、動物細胞(血球系細胞など)および植物

50

細胞が含まれる。微生物には、大腸菌などの細菌類、タバコモザイクウイルスなどのウイルス類、イースト菌などの菌類などが含まれる。さらに、生体関連微小粒子には、核酸やタンパク質、これらの複合体などの生体関連高分子も包含され得るものとする。また、工業用粒子は、例えば有機もしくは無機高分子材料、金属などであってもよい。有機高分子材料には、ポリスチレン、スチレン・ジビニルベンゼン、ポリメチルメタクリレートなどが含まれる。無機高分子材料には、ガラス、シリカ、磁性体材料などが含まれる。金属には、金コロイド、アルミなどが含まれる。これら微小粒子の形状は、一般には球形であるのが普通であるが、非球形であってもよく、また大きさや質量なども特に限定されない。

【発明の効果】

【0015】

10

本技術により、レーザの光軸に対するマイクロチップ又はフローセルの位置調整及びディレイタイムの最適化を自動で高精度に行うことが可能な微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】マイクロチップ型フローサイトメータとして構成された本技術に係る微小粒子分取装置1（フローサイトメータ1）の構成を説明するための図である。

【図2】フローサイトメータ1の構成を説明するための図である。

【図3】フローサイトメータ1に搭載可能なマイクロチップ2の一例の構成を説明するための図である。

20

【図4】マイクロチップ2のオリフィス21の構成を説明するための図である。

【図5】フローサイトメータ1における光学位置の最適化のための制御ステップを説明するためのフローチャートである。

【図6】信号取得ステップ $S_2$ ～エリア平均値最大位置判定ステップ $S_3$ における制御を説明するための図である。

【図7】信号取得ステップ $S_2$ 及び $S_5$ において、各検出位置Dで一定時間内に得られる検出信号のヒストグラムである。

【図8】エリア平均値最大位置移動ステップ $S_4$ ～積算値最大位置判定ステップ $S_6$ における制御を説明するための図である。

【図9】変動係数判定ステップ $S_7$ における制御を説明するための図である。

30

【図10】フローサイトメータ1におけるディレイタイムの最適化のための制御ステップを説明するためのフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本技術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、本技術の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本技術の範囲が狭く解釈されることはない。説明は以下の順序で行う。

## 1. 微小粒子分取測定装置

(1) 照射検出部

40

(2) 位置調整部

(3) 振動素子

(4) 荷電部

(5) 液滴検出部

(6) 偏向板

(7) 回収容器

(8) 制御部等

(9) マイクロチップ

## 2. 本技術に係る微小粒子分取測定装置におけるキャリブレーション方法

(A) 光学位置の最適化制御

50

- ( 1 ) キャリブレーションビーズ送液ステップ  $S_1$
- ( 2 ) 信号取得ステップ  $S_2$
- ( 3 ) エリア平均値最大位置判定ステップ  $S_3$
- ( 4 ) エリア平均値最大位置移動ステップ  $S_4$
- ( 5 ) 信号取得ステップ  $S_5$
- ( 6 ) 積算値最大位置判定ステップ  $S_6$
- ( 7 ) 変動係数判定ステップ  $S_7$
- ( 8 ) 位置最適化ステップ  $S_8$
- ( B ) デイレイタイムの最適化制御
  - ( 1 ) キャリブレーションビーズ送液ステップ  $S_{11}$
  - ( 2 ) 信号取得ステップ  $S_{12}$
  - ( 3 ) 最適経過時間探索ステップ  $S_{13}$
  - ( 4 ) デイレイタイム設定ステップ  $S_{14}$

10

# 【 0 0 1 8 】

## 1 . 微小粒子分取測定装置

図 1 及び図 2 は、マイクロチップ型フローサイトメータとして構成された本技術に係る微小粒子分取装置 1 ( 以下「フローサイトメータ 1 」とも称する ) の構成を説明する模式図である。また、図 3 及び図 4 は、フローサイトメータ 1 に搭載可能なマイクロチップ 2 の一例を示す。図 3 ( A ) は上面模式図、( B ) は ( A ) 中 P - P 断面に対応する断面模式図を示す。また、図 4 は、マイクロチップ 2 のオリフィス 2 1 の構成を模式的に説明する図であり、( A ) は上面図、( B ) は断面図、( C ) は正面図を示す。図 4 ( B ) は、図 3 ( A ) 中 P - P 断面に対応する。

20

# 【 0 0 1 9 】

## ( 1 ) 照射検出部

フローサイトメータ 1 は、マイクロチップ 2 にレーザー  $L_1$  を照射する光源 6 1 と、レーザー  $L_1$  の照射により発生する検出対象光を検出する検出器 6 2 とを含んでなる照射検出部を備える。マイクロチップ 2 に対するレーザー  $L_1$  の照射方向 ( レーザ  $L_1$  の光軸 ) を図 1 中 Z 軸正方向で示す。光源 6 1 は、LD、LED などであってよい。

# 【 0 0 2 0 】

レーザー  $L_1$  は、マイクロチップ 2 のサンプル流路 2 2 を通流する細胞に照射される。検出器 6 2 は、細胞によるレーザー  $L_1$  の散乱光、及び、細胞又は細胞に標識された蛍光色素がレーザー  $L_1$  により励起されて生じる蛍光を検出する。図 1 中、サンプル流路 2 2 を通流する細胞から発生する蛍光を符合  $F_1$  で示す。

30

# 【 0 0 2 1 】

照射検出部は、光源 6 1 から出射されたレーザー  $L_1$  を細胞に導光して集光するための集光レンズやダイクロイックミラー、バンドパスフィルター等からなる照射系を含む。また、照射検出部は、レーザー  $L_1$  の照射によって細胞から発生する検出対象光を集光して検出器 6 2 に導光する検出系と、によって構成される。検出系は、例えば、PMT ( photo multiplier tube ) や、CCD や CMOS 素子等のエリア撮像素子などによって構成される。

40

# 【 0 0 2 2 】

照射検出部の検出系により検出される検出対象光は、レーザー  $L_1$  の照射によって細胞から発生する光であって、例えば、前方散乱光や側方散乱光、レイリー散乱やミー散乱等の散乱光や蛍光などとしてすることができる。蛍光は、細胞又は細胞に標識された蛍光色素から発生するものであってよい。これらの検出対象光は電気信号に変換され、細胞の光学特性判定及び後述する光学位置の自動調整に供される。

# 【 0 0 2 3 】

## ( 2 ) 位置調整部

フローサイトメータ 1 は、照射検出部に対するマイクロチップ 2 の相対位置を変更する

50

位置調整部 9 を備える。位置調整部 9 は、マイクロチップ 2 の位置及び / 又は照射検出部の位置を、レーザ  $L_1$  の光軸に対する垂直平面 (XY 平面) 上で移動させる。これにより、位置調整部 9 は、レーザ  $L_1$  の光軸に対するマイクロチップ 2 の位置を調整して、レーザ  $L_1$  がサンプル流路 22 内の細胞の通流位置に照射されるように最適化する。

【0024】

位置調整部 9 は、マイクロチップ 2 の位置、又は、光源 61 及び検出器 62 を含む照射検出部の位置の少なくとも一方を、X 軸方向及び Y 軸方向に移動可能なものであればよい。位置調整部 9 は、例えばステッピングモータなどにより構成される。なお、位置調整部 9 は、照射検出部に対するマイクロチップ 2 の相対位置を Z 軸方向 (レーザ  $L_1$  の焦点方向) においても移動させるものであってよい。

10

【0025】

(3) 振動素子

フローサイトメータ 1 は、マイクロチップ 2 に形成されたオリフィス 21 に振動を印加して、オリフィス 21 から排出される、細胞を含むサンプル液とシース液との層流を液滴化して吐出させる振動素子 3 を備える。振動素子 3 は、例えば piezo 素子とできる。吐出された液滴は、流体ストリーム S となって図中矢印 Y 軸正方向に射出される。なお、フローサイトメータ 1 において、マイクロチップ 2 は交換可能に搭載されるものである。

【0026】

フローサイトメータ 1 において、振動素子 3 は、マイクロチップ 2 と一体に構成されたものであってもよく、搭載されたマイクロチップ 2 と接触可能のように装置側に配設されたものであってもよい。

20

【0027】

(4) 荷電部

オリフィス 21 から吐出される液滴は、荷電部 41 によって正又は負の電荷を付与される。一部の液滴は、電荷を付与されず、チャージなしとされていてもよい。液滴のチャージは、荷電部 41 と電氣的に接続され、マイクロチップ 2 に設けられたサンプルインレット 23 に挿入されている電極 42 によって行われる。なお、電極 42 は、マイクロチップ 2 のいずれかの箇所、流路を送液されるサンプル液又はシース液に電氣的に接触するように挿入されていけばよいものとする。

【0028】

30

液滴への電荷の付与は、照射検出部により細胞が検出された時刻 ( $T_0$ ) から、所定のディレイタイム ( $T$ ) が経過し、当該細胞がブレイクオフポイントに到達した時点 ( $T_0 + T$ ) で行われる。

【0029】

(5) 液滴検出部

また、フローサイトメータ 1 は、オリフィス 21 から吐出される液滴にレーザ光  $L_2$  を照射する光源 71 と、レーザ  $L_2$  の照射により発生する検出対象光を検出する検出器 72 とを含んでなる液滴検出部を備える。流体ストリーム S に対するレーザ  $L_2$  の照射方向 (レーザ  $L_1$  の光軸) を図 2 中 Z 軸正方向で示す。光源 71 は、LD、LED などであってよい。また、検出器 72 は、PMT (photo multiplier tube) や、CCD や CMOS 素子等のエリア撮像素子などであってよい。

40

【0030】

レーザ  $L_2$  は、流体ストリーム S 中の液滴に照射される。検出器 72 は、該液滴に含まれる細胞によるレーザ  $L_2$  の散乱光、及び、細胞又は細胞に標識された蛍光色素がレーザ  $L_2$  により励起されて生じる蛍光を検出する。図 2 中、液滴から発生する蛍光を符号  $F_2$  で示す。

【0031】

光源 71 は、照射検出部により細胞が検出された時刻 ( $T_0$ ) から、ディレイタイム ( $T$ ) を模擬する所定時間 ( $t$ ) の経過後の時点 ( $T_0 + t$ ) で、液滴にレーザ光  $L_2$  を照射する。そして、発生する検出対象光が検出器 72 により電気信号に変換され、後

50



述するディレイタイムの最適化のために利用される。

【 0 0 3 2 】

( 6 ) 偏向板

さらに、フローサイトメータ 1 は、流体ストリーム S を挟んで対向して配置された一对の偏向板 5 1 , 5 2 を備える。偏向板 5 1 , 5 2 は、液滴に付与された電荷との間に作用する電氣的な力によって流体ストリーム S 中の各液滴の進行方向を変化させる。偏向板 5 1 , 5 2 は、通常使用される電極であってよい。図 1 中、偏光板 5 1 , 5 2 の対向方向を X 軸方向によって示す。

【 0 0 3 3 】

( 7 ) 回収容器

偏向板 5 1 , 5 2 の間を通過した流体ストリームは、回収容器 8 1、回収容器 8 2 又は回収容器 8 3 のいずれかに受け入れられる。例えば、偏向板 5 1 を正、偏向板 5 2 を負に帯電させる場合、荷電部 4 1 により負にチャージされた液滴は回収容器 8 2 に、正にチャージされた液滴は回収容器 8 3 にそれぞれ回収される。また、荷電部 4 1 によりチャージされていない液滴は、偏向板 5 1 , 5 2 からの電氣的な作用力を受けずに真っ直ぐ飛行し、回収容器 8 1 に回収される。フローサイトメータ 1 では、各液滴に含まれる細胞の特性に応じて該液滴の進行方向を制御することで、所望の特性を有する目的細胞とそれ以外の非目的細胞とを別々の回収容器に回収できる。

【 0 0 3 4 】

回収容器 8 1 , 8 2 , 8 3 は、実験用として汎用のプラスチック製チューブあるいはガラス製チューブであってよい。これらの回収容器は、交換可能にフローサイトメータ 1 に配置されるものであることが好ましい。また、回収容器のうち非目的細胞を受け入れるものには、回収した液滴の排液路を接続してもよい。なお、フローサイトメータ 1 において、配置される回収容器の数は特に限定されないものとする。回収容器を 3 つよりも多く配置する場合には、各液滴が、偏向板 5 1 , 5 2 との間の電氣的な作用力の有無及びその大小によっていずれか一つの回収容器に誘導され、回収されるようにする。

【 0 0 3 5 】

( 8 ) 制御部等

フローサイトメータ 1 は、上述の構成に加え、通常のフローサイトメータが備える、細胞の光学特性判定のためのデータ解析部、サンプル液及びシース液を貯留するタンク部及びこれらの各構成を制御するための制御部 1 0 などを備える。

【 0 0 3 6 】

制御部 1 0 は、CPU、メモリ及びハードディスクなどを備える汎用のコンピュータによって構成でき、ハードディスク内には OS と次に説明する制御ステップを実行するプログラムなどが格納されている。

【 0 0 3 7 】

( 9 ) マイクロチップ

マイクロチップ 2 は、サンプル流路 2 2 が形成された基板層 2 a , 2 b が貼り合わされてなる。基板層 2 a , 2 b へのサンプル流路 2 2 の形成は、金型を用いた熱可塑性樹脂の射出成形により行うことができる。熱可塑性樹脂には、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル樹脂 ( PMMA )、環状ポリオレフィン、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン及びポリジメチルシロキサン ( PDMS ) などの従来マイクロチップの材料として公知のプラスチックを採用できる。

【 0 0 3 8 】

サンプル液は、サンプルインレット 2 3 に導入され、シースインレット 2 4 に導入されるシース液と合流して、サンプル流路 2 2 を送液される。シースインレット 2 4 から導入されたシース液は、2 方向に分かれて送液された後、サンプルインレット 2 3 から導入されたサンプル液との合流部において、サンプル液を 2 方向から挟み込むようにしてサンプル液に合流する。これにより、合流部において、シース液層流の中央にサンプル液層流が位置された 3 次元層流が形成される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

符号 25 は、サンプル流路 22 に詰まりや気泡が生じた際に、サンプル流路 22 内に負圧を加えて流れを一時的に逆流させて詰まりや気泡を解消するための吸引流路を示す。吸引流路 25 の一端には、真空ポンプ等の負圧源に接続される吸引アウトレット 251 が形成され、他端は連通口 252 においてサンプル流路 22 に接続している。

## 【 0 0 4 0 】

3次元層流は、送液方向に対する垂直断面の面積が送液方向上流から下流へ次第にあるいは段階的に小さくなるように形成された絞込部 261 (図3参照)、262 (図4参照)において層流幅を絞り込まれる。その後、3次元層流は、流路の一端に設けられたオリフィス 21 から排出される。

10

## 【 0 0 4 1 】

サンプル流路 22 の絞込部 261 と絞込部 262 との間では、細胞の特性検出が行われる。照射検出部によって、サンプル流路 22 中を 3次元層流の中心に一直列に配列して送液される細胞に対してレーザ  $L_1$  が照射され、細胞から発生する蛍光  $F_1$  及び散乱光が検出される (図3参照)。

## 【 0 0 4 2 】

サンプル流路 22 のオリフィス 21 への接続部は、直線状に形成されたストレート部 27 とされている。ストレート部 27 は、オリフィス 21 から流体ストリーム  $S$  を  $Y$  軸正方向に真っ直ぐ射出するために機能する。

## 【 0 0 4 3 】

オリフィス 21 から排出される 3次元層流は、振動素子 3 によりオリフィス 21 に印加される振動によって液滴化され、流体ストリーム  $S$  として射出される (図1参照)。オリフィス 21 は基板層 2a, 2b の端面方向に開口しており、その開口位置と基板層端面との間には切欠部 211 が設けられている。切欠部 211 は、オリフィス 21 の開口位置と基板端面との間の基板層 2a, 2b を、切欠部 211 の径  $L$  がオリフィス 21 の開口径  $l$  よりも大きくなるように切り欠くことによって形成されている (図4(C)参照)。切欠部 211 の径  $L$  は、オリフィス 21 から吐出される液滴の移動を阻害しないように、オリフィス 21 の開口径  $l$  よりも 2 倍以上大きく形成することが望ましい。

20

## 【 0 0 4 4 】

2. 本技術に係る微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法

30

## (A) 光学位置の最適化制御

図5は、フローサイトメータ 1 におけるマイクロチップ 2 の光学位置の最適化のための制御ステップを説明するフローチャートである。制御ステップは、「キャリブレーションビーズ送液ステップ  $S_1$ 」、「信号取得ステップ  $S_2$ 」、「エリア平均値最大位置判定ステップ  $S_3$ 」、「エリア平均値最大位置移動ステップ  $S_4$ 」、「信号取得ステップ  $S_5$ 」、「積算値最大位置判定ステップ  $S_6$ 」、「変動係数判定ステップ  $S_7$ 」及び「位置最適化ステップ  $S_8$ 」の手順を含む。以下、各手順について説明する。

## 【 0 0 4 5 】

(1) キャリブレーションビーズ送液ステップ  $S_1$ 

ユーザにより分析の開始信号が入力されると、制御部 10 は位置調整部 9 へ移動信号を出力し、位置調整部 9 が照射検出部に対するマイクロチップ 2 の相対位置を予め設定された初期位置 (図6、原点  $O$  を参照) に移動させる。相対位置が原点  $O$  にあるとき、照射検出部から出射されたレーザ  $L_1$  はマイクロチップ 2 上の原点  $O$  に照射される。相対位置の変更は、マイクロチップ 2 の位置、又は、光源 61 及び検出器 62 を含む照射検出部の位置の少なくとも一方を、 $X$  軸方向及び  $Y$  軸方向に移動することによって行い得るが、以下ではマイクロチップ 2 の位置を移動する場合を例に説明する。

40

## 【 0 0 4 6 】

次に、制御部 10 は、サンプル液及びシース液を貯留するタンク部のポンプを駆動して、マイクロチップ 2 のサンプルインレット 23 及びシースインレット 24 へのサンプル液及びシース液の送液を開始する。サンプル液には、サイズ及び蛍光強度が異なる 2 種以上

50

のキャリブレーション用の粒子（ビーズ）が含まれる。さらに、制御部 10 は、振動素子 3 によるオリフィス 21 への振動印加を開始する。これにより、オリフィス 21 から射出されるサンプル液及びシース液の 3 次元層流が液滴化して吐出され、流体ストリーム S が発生する。

#### 【0047】

キャリブレーションビーズは、蛍光色素を含む樹脂組成物を粒子形状に成形したもの又は粒子形状に成形された樹脂の表面に蛍光色素を固着させたものなどを用いることができる。蛍光色素には、PB, FITC, PE, PE-TR, APCCH などの汎用の色素を用いればよい。一般に、サイズの大きいビーズほど蛍光強度が高くなるが、サイズ及び蛍光強度のばらつきが大きくなる。逆に、サイズの小さいビーズほど蛍光強度は低くなるが、サイズ及び蛍光強度のばらつきも小さくなる。

10

#### 【0048】

キャリブレーションビーズは、サイズが小さく蛍光強度が低いビーズ A と、サイズが大きく蛍光強度が高いビーズ B と、の 2 種を含むことが好ましい。また、ビーズ B のポピュレーションが、ビーズ A のポピュレーションよりも大きいことが好ましい。

#### 【0049】

ビーズ A としては、例えば粒径が  $2 \sim 4 \mu\text{m}$  であり、流体（サンプル液）中の濃度が  $5.0 \times 10^5 / \text{ml}$  程度で、蛍光強度のばらつき（変動係数）が 1.5 % 以下のものを使用できる。また、ビーズ B としては、例えば粒径が  $8 \sim 12 \mu\text{m}$  であり、流体中の濃度が  $5.0 \times 10^6 / \text{ml}$  程度で、蛍光強度のばらつき（変動係数）が 2.5 % 以下のものを使用できる。

20

#### 【0050】

キャリブレーションビーズには、ビーズ A とビーズ B との中間のサイズ及び蛍光強度を有するビーズが含まれていてもよい。以下では、ビーズ A とビーズ B の 2 種のビーズが混合されたキャリブレーションビーズを用いる場合を例に説明する。

#### 【0051】

サンプル液及びシース液の送液開始後、制御部 10 は、位置調整部 9 へ移動信号を出力し、位置調整部 9 がマイクロチップ 2 の位置を原点 O から基準点  $D_0$  に移動させる（図 6 矢印参照）。照射検出部に対するマイクロチップ 2 の相対位置が基準点  $D_0$  にあるとき、照射検出部から出射されたレーザ  $L_1$  はマイクロチップ 2 上の基準点  $D_0$  に照射される。

30

#### 【0052】

基準点  $D_0$  は、マイクロチップ 2 の細胞の特性検出が行われるべき位置（すなわち、以下に説明するステップにより決定される最適位置）の近傍に予め設定される。より具体的には、基準点  $D_0$  は、サンプル流路 22 の絞込部 261 と絞込部 262 との間（図 3 及び図 4 参照）の近傍とされる。

#### 【0053】

（2）信号取得ステップ  $S_2$ （第一の信号取得ステップ）

本ステップ  $S_2$  では、照射検出部により、基準点  $D_0$  を含むマイクロチップ 2 上の複数の位置から発生する蛍光又は散乱光（以下、単に「蛍光」と称する）の検出が行われる。本ステップ  $S_2$  において、蛍光の検出が行われるマイクロチップ 2 上の位置を図 6 中符号 D により示す。図では、基準点  $D_0$  を含めて 24 箇所の検出位置 D を設定し、X 軸方向に 8 列、Y 軸方向に 3 列に配列した検出位置 D からの蛍光を検出する場合を例に示した。

40

#### 【0054】

検出位置 D が設定される領域にはサンプル流路 22 が含まれるようにされ、この限りにおいて検出位置 D の数及び配列態様は特に限定されず任意に設定される。検出位置 D は、図に示すように X 軸方向及び Y 軸方向に格子状に配列されることが好ましい。この場合、検出位置 D の X 軸方向及び Y 軸方向の配列間隔 W 及び H は、サンプル流路 22 の流路幅（流路幅）と X 軸方向及び Y 軸方向における検出位置 D の配列数  $M_1$ ,  $N_1$  に応じて適宜設定され得る。サンプル流路 22 の流路幅が  $70 \sim 100 \mu\text{m}$  であり、配列数  $M_1$  が 8,  $N_1$  が 3 である場合、配列間隔 W 及び H は、例えばそれぞれ  $25$ 、 $75 \mu\text{m}$  に設定される。

50

## 【 0 0 5 5 】

蛍光の検出は、一つの検出位置  $D$  について一定時間行われる。一定時間に検出された蛍光は積算されて電気信号に変換され制御部 10 に出力される。蛍光の検出は、レーザ  $L_1$  を  $X$  軸方向及び  $Y$  軸方向に走査して各検出位置  $D$  に順次照射して、発生する蛍光を検出することによって行い得る。あるいは、レーザ  $L_1$  の照射により各検出位置  $D$  から蛍光をエリア撮像素子によって一括検出してもよい。

## 【 0 0 5 6 】

( 3 ) エリア平均値最大位置判定ステップ  $S_3$ 

本ステップ  $S_3$  では、制御部 10 は、各検出位置  $D$  について検出強度の積算値のエリア平均値を算出し、エリア平均値がより大きくなる検出位置  $D$ 、好ましくは最大値となる検出位置  $D$  を自動判定する。

10

## 【 0 0 5 7 】

「エリア平均値」とは、一つの検出位置  $D$  と、それから所定の距離範囲内にある複数の検出位置  $D$  と、で得られた検出強度の積算値の平均を意味する。図 6 では、エリア平均値を、一つの検出位置  $D_1$  と、検出位置  $D_1$  から  $X$  軸方向に  $2W$ 、 $Y$  軸方向に  $2H$  の距離範囲内にある検出位置  $D_2 \sim D_9$  と、で得られた検出強度の積算値の平均とする場合を示した。

## 【 0 0 5 8 】

一つの検出位置  $D$  からどれくらいの距離範囲内をエリア平均値として設定するかは、サンプル流路 22 の流路幅（流路幅）、配列間隔  $W$  及び  $H$  に応じて適宜決定され得るものとする。

20

## 【 0 0 5 9 】

制御部 10 は、各検出位置  $D$  について算出されたエリア平均値を比較し、エリア平均値がより大きくなる検出位置  $D$ 、好ましくは最大値となる検出位置  $D$ 、を決定する。ここでは、検出位置  $D_1$  においてエリア平均値が最大値となるものとして説明する。

## 【 0 0 6 0 】

エリア平均値の算出は、各検出位置  $D$  について一定時間内に検出された蛍光のうち、キャリアレーションピーズから発生する蛍光に基づいて行われる。各検出位置  $D$  において一定時間内に検出信号のヒストグラムを図 7 に示す。ピーズ  $B$  は、ピーズ  $A$  に比して蛍光強度が高く、蛍光強度のばらつきが大きい。エリア平均値は、ピーズ  $A$  及びピーズ  $B$  から発生する蛍光の検出強度の和として算出される。

30

## 【 0 0 6 1 】

蛍光はキャリアレーションピーズが通流されるサンプル流路 22 で強く発生するため、エリア平均値が最大値となる検出位置  $D_1 \sim D_9$  を結んで形成される領域  $R_1$  は、サンプル流路 22 が位置する領域とみなし得る。なお、「エリア平均値」に替えて、各検出位置  $D$  で得られた検出強度そのもの（ピーク強度）、又は該検出強度の平均値あるいは積算値を用いてもよい。ピーク強度、平均値又は積算値が最大値となる検出位置  $D$  は、サンプル流路 22 に近接する点とみなし得る。

## 【 0 0 6 2 】

( 4 ) エリア平均値最大位置移動ステップ  $S_4$ 

40

エリア平均値が最大値となる検出位置  $D_1$  が特定されると、制御部 10 は、位置調整部 9 へ移動信号を出力し、位置調整部 9 がマイクロチップ 2 の位置を基準点  $D_0$  から検出位置  $D_1$  に移動させる（図 8 矢印参照）。

## 【 0 0 6 3 】

( 5 ) 信号取得ステップ  $S_5$  （第一の信号取得ステップ）

本ステップ  $S_5$  では、照射検出部により、エリア平均値が最大値となる領域  $R_1$  内の複数の位置から発生する蛍光の検出が行われる。本ステップ  $S_5$  における蛍光の検出位置  $D$  を図 8 の拡大図中に示す。図では、エリア平均値が最大値となる検出位置  $D_1$  を含めて  $X$  軸方向に  $M_2$  列、 $Y$  軸方向に  $N_2$  列配列した（ $M_2 \times N_2$ ）の検出位置  $D$  から蛍光を検出する場合を例に示した。

50

## 【 0 0 6 4 】

検出位置 D の X 軸方向及び Y 軸方向の配列間隔  $w$  及び  $h$  は、サンプル流路 2 2 の流路幅（流路幅）と X 軸方向及び Y 軸方向における配列数  $M_2$  及び  $N_2$  に応じて適宜設定され得る。配列数  $M_2$  ,  $N_2$  は、例えばそれぞれ 1 1、7 個とされる。列間隔  $w$  及び  $h$  は、例えばそれぞれ 5、25  $\mu\text{m}$  に設定される。なお、本ステップ  $S_5$  においても、検出位置 D の数及び配列態様は特に限定されないものとする。なお、「エリア平均値」に替えて、各検出位置 D で得られたピーク強度、平均値又は積算値を用いる場合、これらの値が最大値となる検出位置 D を含む領域内に適当数の検出位置 D を設定する。

## 【 0 0 6 5 】

蛍光の検出は、一つの検出位置 D について一定時間行われる。一定時間に検出された蛍光は電気信号に変換され制御部 1 0 に出力される。蛍光の検出は、レーザ  $L_1$  を X 軸方向及び Y 軸方向に走査して各検出位置 D に順次走査し、発生する蛍光を検出する。あるいは、エリア撮像素子によって、レーザ  $L_1$  の照射により各検出位置 D から蛍光を一括検出してもよい。

## 【 0 0 6 6 】

( 6 ) 積算値最大位置判定ステップ  $S_6$ 

本ステップ  $S_6$  では、制御部 1 0 は、各検出位置 D について、検出強度の積算値又は平均値のどちらか一方又は両方と、それらの変動係数（C V 値）とを算出する。以下では、検出強度の積算値とその C V 値とを用いた処理を例に説明する。

## 【 0 0 6 7 】

制御部 1 0 は、各検出位置 D について算出された検出強度の積算値を比較し、積算値がより大きくなる検出位置 D、好ましくは最大値となる検出位置 D（第一の最適位置）、を決定する。ここでは、検出位置  $D_{11}$  において積算値が最大値となるものとして説明する（図 8 参照）。

## 【 0 0 6 8 】

検出強度の積算値及び変動係数の算出は、各検出位置 D について一定時間内に検出された蛍光のうち、ピーズ A から発生する蛍光に基づいて行われる（図 7 のヒストグラムを参照）。ピーズ A から発生する蛍光とピーズ B から発生する蛍光との区別は、蛍光波長の違いによって区別してピーズ A の蛍光波長に一致する蛍光のみを検出すればよい。あるいは、サイズの違いによってピーズにゲーティングをかけて、選択されたサイズの範囲（ゲート）内のピーズから発生する蛍光のみを検出することで、ピーズ A から発生する蛍光とピーズ B から発生する蛍光とを区別することもできる。

## 【 0 0 6 9 】

( 7 ) 変動係数判定ステップ  $S_7$ 

次に、制御部 1 0 は、積算値が最大値となる検出位置  $D_{11}$  と隣接する検出位置  $D_{12} \sim D_{19}$  との間で C V 値を比較し、検出位置  $D_{11}$  に比してより小さい C V 値を与える検出位置 D（第二の最適位置）の存在の有無を自動判定する（図 9 参照）。

## 【 0 0 7 0 】

( 8 ) 位置最適化ステップ  $S_8$ 

ステップ  $S_7$  において、積算値が最大値となる検出位置  $D_{11}$  に比してより小さい C V 値を与える検出位置 D が、検出位置  $D_{11}$  と隣接する検出位置  $D_{12} \sim D_{19}$  のいずれにもみつからなかった場合、制御部 1 0 は、マイクロチップ 2 の位置を検出位置  $D_{11}$  から検出位置  $D_{11}$  に移動させる。このとき、積算値が最大値となる検出位置（第一の最適位置）と C V 値が最小値となる検出位置（第二の最適位置）はいずれも検出位置  $D_{11}$  で一致している。

## 【 0 0 7 1 】

また、ステップ  $S_7$  において、検出位置  $D_{12} \sim D_{19}$  のいずれかに検出位置  $D_{11}$  に比してより小さい C V 値を与える検出位置 D がみつかった場合、制御部 1 0 は、マイクロチップ 2 の位置を検出位置  $D_{11}$  から当該検出位置 D（例えば検出位置  $D_{18}$ ）に移動させる。このとき、積算値が最大値となる検出位置（第一の最適位置）と C V 値が最小値とな

10

20

30

40

50

る検出位置（第二の最適位置）は不一致である。

【0072】

積算値が最大値となる検出位置 $D_{11}$ は、蛍光が最も強く発生する位置であり、サンプル流路22のキャリブレーションビーズの通流位置とみなすことができる。すなわち、照射検出部に対するマイクロチップ2の相対位置が検出位置 $D_{11}$ にあるとき、照射検出部から出射されたレーザー $L_1$ はサンプル流路22のキャリブレーションビーズの通流位置に照射されることとなる。

【0073】

例外的に、積算値が最大値となる検出位置 $D_{11}$ が、サンプル流路22のキャリブレーションビーズの通流位置ではないにもかかわらず、蛍光強度の積算値が最大値となる場合がある。例えば、検出位置 $D_{11}$ が、マイクロ流路22の流路壁に一致する場合には、蛍光の反射や散乱などによって異常に高い蛍光強度が散発的に検出されてしまう場合がある。この場合、当該位置において検出される蛍光強度にばらつきが生じ、蛍光強度の積算値のCV値が大きくなる。

【0074】

検出位置 $D_{11}$ がマイクロ流路22の流路壁に一致する場合などでは、検出位置 $D_{11}$ と隣接する検出位置のうちより小さいCV値を与える検出位置 $D_{18}$ が、サンプル流路22のキャリブレーションビーズの通流位置とみなすことができる。すなわち、照射検出部に対するマイクロチップ2の相対位置が検出位置 $D_{18}$ にあるとき、照射検出部から出射されたレーザー $L_1$ はサンプル流路22のキャリブレーションビーズの通流位置に照射されることとなる。

【0075】

以上のように、フローサイトメータ1では、レーザー $L_1$ の照射によりマイクロチップ2から発生する蛍光の検出強度の積算値あるいは平均値がより大きくなる位置、又はCV値がより小さくなる位置に、レーザー $L_1$ に対するマイクロチップ2の相対位置を設定する。これにより、フローサイトメータ1では、マイクロチップ2のサンプル流路22の細胞の通流位置と、レーザー $L_1$ の光軸と、を自動で高精度に位置決めし、簡便に高精度な測定を行うことが可能とされている。

【0076】

また、フローサイトメータ1では、蛍光検出強度の積算値のエリア平均値がより大きくなる位置を特定する粗調整（ステップ $S_2 \sim S_3$ ）と、エリア平均値がより大きくなる領域内において積算値あるいは平均値がより大きくなる位置、又はCV値がより小さくなる位置を特定する微調整（ステップ $S_5 \sim S_7$ ）との2段階の手順によって、マイクロチップ2の光学位置を最適化している。これにより、マイクロチップ2の光学位置の最適化を小さい処理負荷で迅速に行うことが可能とされている。

【0077】

さらに、フローサイトメータ1では、粗調整（ステップ $S_2 \sim S_3$ ）を、全種のキャリブレーションビーズ（ここではビーズA及びビーズB）から発生する光の検出強度に基づいて行い、微調整（ステップ $S_5 \sim S_7$ ）は、サイズが小さい種のビーズ（ビーズA）のみから発生する光の検出強度に基づいて行っている。これにより、粗調整では、強い検出信号を用いて制御を行うことができ、微調整では、サンプル流路22の細胞の通流位置とレーザー $L_1$ の光軸との位置合わせを高精度に行うことができる。ここでは、流路をマイクロチップに形成したマイクロチップ型フローサイトメータを例に説明したが、フローセルに流路が形成されたフローセル型フローサイトメータにおいても、同様の効果を得ることができる。

【0078】

（B）ディレイタイムの最適化制御

図10は、フローサイトメータ1におけるディレイタイムの最適化のための制御ステップを説明するフローチャートである。制御ステップは、「キャリブレーションビーズ送液ステップ $S_{11}$ 」、「信号取得ステップ $S_{12}$ 」、「最適経過時間探索ステップ $S_{13}$ 」

10

20

30

40

50

及び「ディレイタイム設定ステップ  $S_{14}$ 」の手順を含む。以下、各手順について説明する。

【0079】

(1) キャリブレーションビーズ送液ステップ  $S_{11}$

ユーザにより分析の開始信号が入力されると、制御部 10 は、サンプル液及びシース液を貯留するタンク部のポンプを駆動して、マイクロチップ 2 のサンプルインレット 23 及びシースインレット 24 へのサンプル液及びシース液の送液を開始する。サンプル液には、上述のキャリブレーションビーズが含まれる。さらに、制御部 10 は、振動素子 3 によるオリフィス 21 への振動印加を開始する。これにより、オリフィス 21 から射出されるサンプル液及びシース液の 3 次元層流が液滴化して吐出され、流体ストリーム S が発生する。

10

【0080】

(2) 信号取得ステップ  $S_{12}$  (第二の信号取得ステップ)

本ステップ  $S_{12}$  では、オリフィス 21 から吐出される液滴に、光源 71 からレーザー  $L_2$  を照射して、液滴から発生する蛍光の検出が行われる。レーザー  $L_2$  は、照射検出部によりキャリブレーションビーズが検出された時刻 ( $T_0$ ) から所定時間 ( $t$ ) の経過後に光源 71 から液滴に照射され、液滴から発生する蛍光が検出器 72 により検出される。

【0081】

制御部 10 は、時刻  $T_0$  から異なる時間の経過後に光源 71 からレーザー  $L_2$  を出射させる。具体的には、制御部 10 は、時刻 ( $T_0 + t_1$ )、( $T_0 + t_2$ )、 $\dots$  ( $T_0 + t_N$ ) において光源 71 からレーザー  $L_2$  を出射させる。ここで、 $N$  は 3 以上の整数を示す。各時刻において、検出器 72 により検出された蛍光の検出強度は、制御部 10 に出力されて保持される。

20

【0082】

時刻 ( $T_0 + t_N$ ) における検出強度は、キャリブレーションビーズが照射検出部により検出された時刻  $T_0$  から時間  $t_N$  経過後に、レーザー  $L_2$  をオリフィス 21 から吐出される液滴に照射して得られる検出強度を、例えば  $M$  個のビーズについて積算した値とされる。

【0083】

(3) 最適経過時間探索ステップ  $S_{13}$

本ステップ  $S_{13}$  では、制御部 10 は、液滴から発生する蛍光の検出強度の積算値がより大きくなる (好ましくは最大値となる) 経過時間  $t_s$  を決定する。具体的には、時刻 ( $T_0 + t_1$ ) ~ ( $T_0 + t_N$ ) において取得された検出強度の積算値を比較し、積算値がより大きくなる経過時間  $t_s$  を特定する。

30

【0084】

経過時間  $t_s$  の決定は、液滴に含まれるビーズ A 及びビーズ B から発生する蛍光の検出強度の和に基づいて行われる。より好ましくは、経過時間  $t_s$  の決定は、ビーズ B から発生する蛍光の検出強度に基づいて行われる (図 7 のヒストグラムを参照)。ビーズ A から発生する蛍光とビーズ B から発生する蛍光との区別は、蛍光波長の違いによって区別してビーズ B の蛍光波長に一致する蛍光のみを検出すればよい。あるいは、サイズの違いによってビーズにゲーティングをかけて、選択されたサイズの範囲 (ゲート) 内のビーズから発生する蛍光のみを検出することで、ビーズ B から発生する蛍光とビーズ B から発生する蛍光とを区別することもできる。

40

【0085】

(4) ディレイタイム設定ステップ  $S_{14}$

本ステップ  $S_{14}$  では、最適経過時間探索ステップ  $S_{13}$  で特定された経過時間  $t_s$  からディレイタイム ( $T$ ) の算出が行われる。経過時間  $t_s$  は、時刻  $T_0$  において照射検出部により検出されたキャリブレーションビーズが光源 71 から出射されるレーザー  $L_2$  の照射位置を通過するまでの時間とみなすことができる。従って、経過時間  $t_s$  に基づけば、照射検出部により検出されたキャリブレーションビーズがブレイクオフポイント

50

に到達するまでの時間であるディレイタイム（ $T$ ）を算出できる。制御部 10 は、算出されたディレイタイム（ $T$ ）を荷電部 41 に設定し、最適なディレイタイムにおいて液滴に電荷が付与されるようにする。

【0086】

以上のように、フローサイトメータ 1 では、全種のキャリブレーションビーズ（ここではビーズ A 及びビーズ B）から発生する光、あるいは蛍光強度が高い種のビーズ（ビーズ B）のみから発生する光の検出強度に基づいて、ディレイタイムの最適化を行っている。これにより、強い検出信号を用いてディレイタイムの最適化制御を行うことができる。キャリブレーションビーズ中のサイズが大きく蛍光強度が高いビーズ（ビーズ B）のポピュレーションを、サイズが小さく蛍光強度が低いビーズ（ビーズ A）のポピュレーションより大きくしておくことで、より強い検出信号を用いたディレイタイムの最適化制御が可能となる。

10

【0087】

また、フローサイトメータ 1 では、上述した光学位置の最適化制御とディレイタイムの最適化制御とを、キャリブレーションビーズを入れ替えることなく行うことができる。従来、レーザの光軸に対するマイクロチップの位置調整はサイズの小さいビーズを用いて行い、別個に、蛍光強度の高いビーズを用いてディレイタイムの最適化を行う必要があった。これに対して、フローサイトメータ 1 では、サイズ及び蛍光強度が異なる 2 種以上のビーズを含むキャリブレーションビーズを用いてマイクロチップの光学位置調整とディレイタイムの最適化とをキャリブレーションビーズを入れ替えることなく簡便に行うことが可能とされている。

20

【0088】

本技術に係る微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法は以下のような構成もとることができる。

（1）マイクロチップ又はフローセルに形成された流路にサイズ及び蛍光強度が異なる 2 種以上のキャリブレーション粒子を含む流体を通流する送液手順と、レーザ照射により前記マイクロチップ又は前記フローセルから発生する光を前記マイクロチップ又は前記フローセル上の複数の位置から検出する第一の信号取得手順と、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値のエリア平均値がより大きくなる位置を特定する手順と、を含む微小粒子分取装置におけるキャリブレーション方法。

30

（2）前記検出強度として、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値のエリア平均値を用いる上記（1）記載のキャリブレーション方法。

（3）前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる第一の最適位置を特定する手順を含む上記（2）記載のキャリブレーション方法。

（4）前記第一の最適位置は、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値がより大きくなる位置である上記（3）記載のキャリブレーション方法。

（5）前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値の変動係数がより小さくなる第二の最適位置を特定する手順を含む上記（2）～（4）のいずれかに記載のキャリブレーション方法。

40

（6）前記レーザに対する前記マイクロチップの相対位置を、前記第一の最適位置又は前記第二の最適位置に設定する手順を含む上記（5）記載のキャリブレーション方法。

（7）前記第一の最適位置と前記第二の最適位置が異なる場合に、前記相対位置を前記第二の最適位置に設定する上記（6）記載のキャリブレーション方法。

（8）前記流路の一端に形成されたオリフィスから吐出される液滴に対して、前記流路を通流する前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出時刻から所定時間経過後にレーザを照射し、前記液滴から発生する光を検出する第二の信号取得手順と、

全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値、あるいは前記キ

50



ャリブレーション粒子のうちサイズが大きい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値、がより大きくなる経過時間を特定する手順と、を含む上記(1)～(7)のいずれかに記載のキャリブレーション方法。

(9) 前記経過時間をディレイタイムとして設定する手順を含む上記(8)記載のキャリブレーション方法。

(10) 前記キャリブレーション粒子として、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子と、サイズが大きく蛍光強度が高い粒子と、の2種を用いる上記(1)～(9)のいずれかに記載のキャリブレーション方法。

(11) 前記キャリブレーション粒子中のサイズが大きく蛍光強度が高い粒子のポピュレーションが、サイズが小さく蛍光強度が低い粒子のポピュレーションよりも大きい上記(10)記載のキャリブレーション方法。

10

#### 【0089】

また、本技術に係る微小粒子分取装置は以下のような構成をとることもできる。

(1) サイズ及び蛍光強度が異なる2種以上のキャリブレーション粒子を含む流体が流路に通流されたマイクロチップ又はフローセルにレーザを照射して発生する光を検出する照射検出部と、該照射検出部に対する前記マイクロチップ又は前記フローセルの相対位置を変更する位置調整部と、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる位置への移動信号を前記位置調整部に出力する制御部と、を備える微小粒子分取装置。

(2) 前記検出強度が、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値のエリア平均値である上記(1)記載の微小粒子分取装置。

20

(3) 前記制御部は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度がより大きくなる第一の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する上記(2)記載の微小粒子分取装置。

(4) 前記制御部は、前記エリア平均値がより大きくなるエリア内において、前記キャリブレーション粒子のうちサイズが小さい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値又は平均値の変動係数がより小さくなる第二の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する上記(2)又は(3)記載の微小粒子分取装置。

(5) 前記制御部は、前記第一の最適位置と前記第二の最適位置が異なる場合に、前記第二の最適位置への移動信号を前記位置調整部に出力する上記(4)記載の微小粒子分取装置。

30

(6) 前記流路の一端に形成されたオリフィスから吐出される液滴に対して、前記照射検出部による前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出時刻から所定時間経過後にレーザを照射する光源と、前記液滴から発生する光を検出する検出部と、を備え、前記制御部は、全種の前記キャリブレーション粒子から発生する光の検出強度の積算値、あるいは前記キャリブレーション粒子のうちサイズが大きい種の粒子から発生する光の検出強度の積算値、がより大きくなる経過時間をディレイタイムとして設定する上記(1)～(5)のいずれかに記載の微小粒子分取装置。

#### 【0090】

40

さらに、本技術に係るキャリブレーション粒子は以下のような構成をとることもできる。

(1) サイズが小さく蛍光強度が低い粒子と、サイズが大きく蛍光強度が高い粒子と、の2種を含む微小粒子分取装置用のキャリブレーション粒子。

(2) 前記サイズが大きく蛍光強度が高い粒子のポピュレーションが、前記サイズが小さく蛍光強度が低い粒子のポピュレーションよりも大きい上記(1)記載のキャリブレーション粒子。

(3) 前記サイズが小さく蛍光強度が低い粒子の粒径が2～4 μmであり、前記サイズが大きく蛍光強度が高い粒子の粒径が8～12 μmである上記(1)又は(2)記載のキャリブレーション粒子。

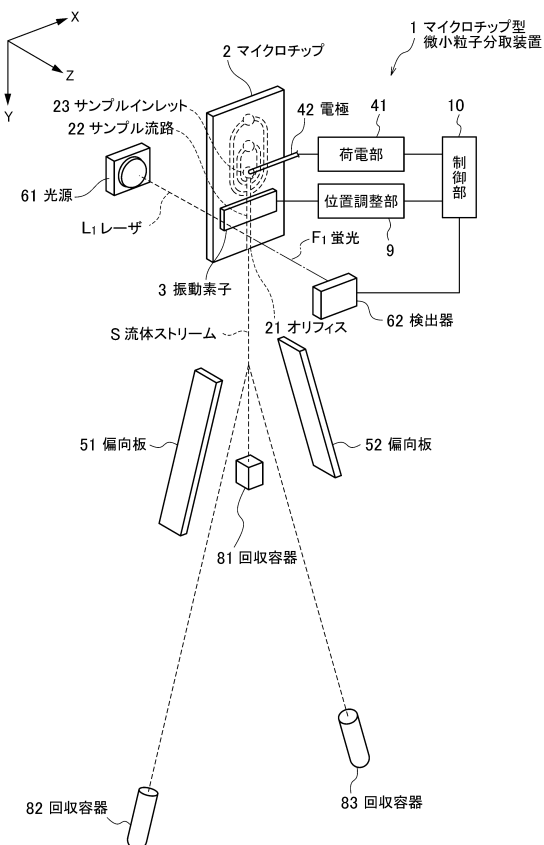
50

## 【符号の説明】

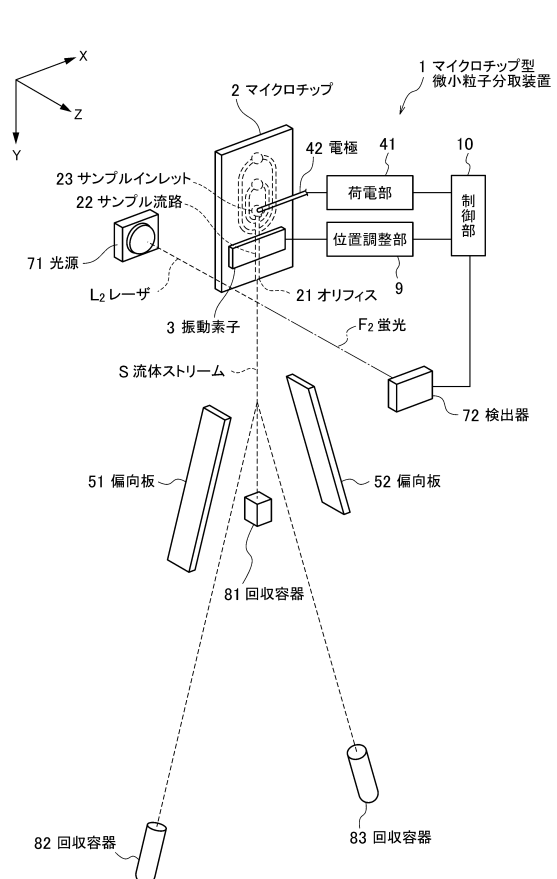
【 0 0 9 1 】

1：マイクロチップ型微小粒子分取装置、2：マイクロチップ、21：オリフィス、22：サンプル流路、23：サンプルインレット、3：振動素子、41：荷電部、42：電極、51、52：偏向板、61、71：光源、62、72：検出器、81、82、83：回収容器、9：位置調整部、10：制御部、D：検出位置、 $F_1$ 、 $F_2$ ：蛍光、 $L_1$ 、 $L_2$ ：レーザ

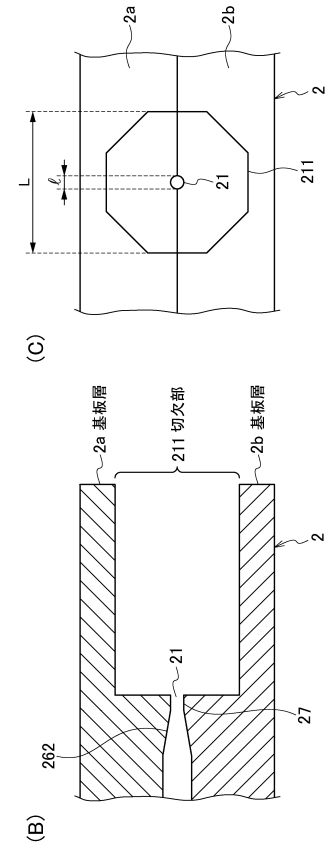
【図1】



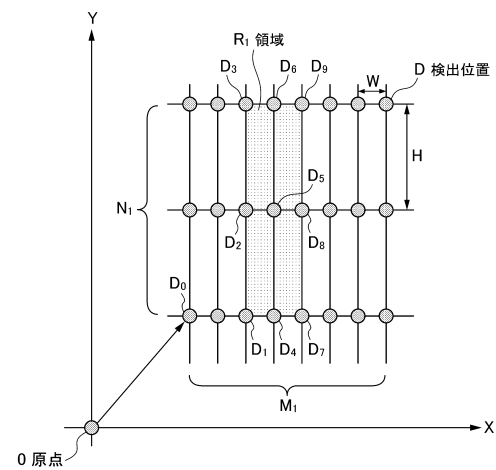
【図2】



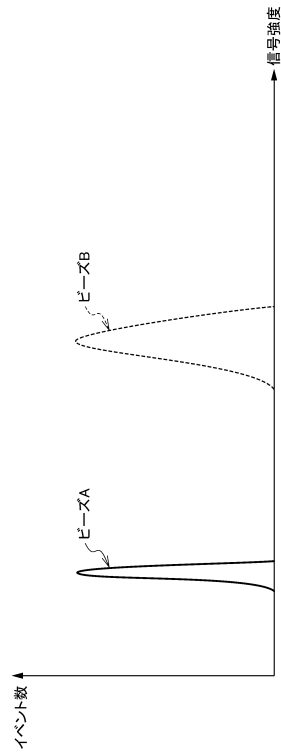
【 図 4 】



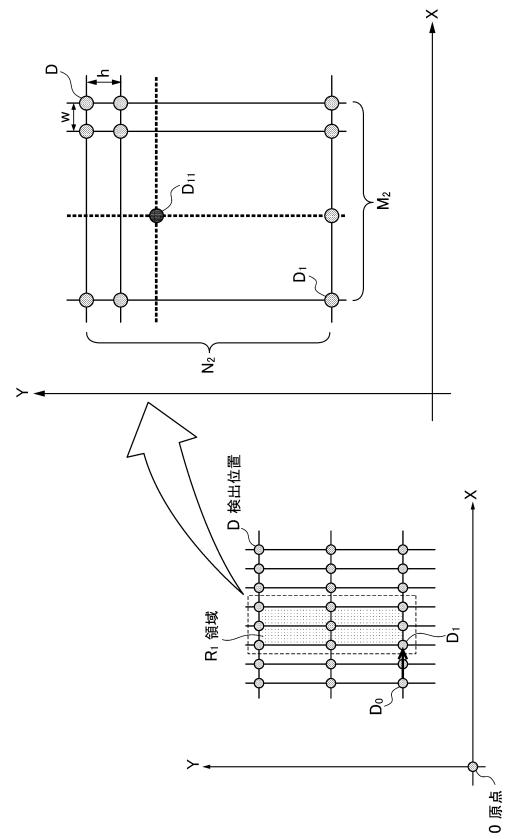
【 図 6 】



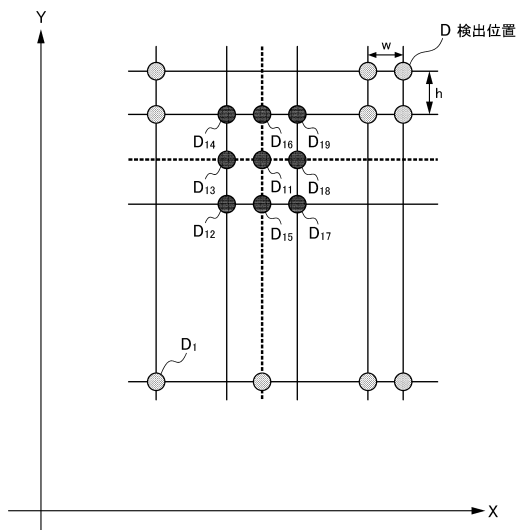
【図 7】



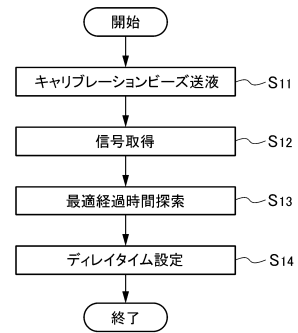
【図 8】



【図 9】



【図 10】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平09-196916(JP,A)  
特開2006-170687(JP,A)  
特開2010-286292(JP,A)  
特開2009-109197(JP,A)  
特開2004-257756(JP,A)  
特開平06-288896(JP,A)  
特開2010-190680(JP,A)  
特表2007-532874(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N	15/00	-	15/14
G01N	21/62	-	21/74