

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5994337号  
(P5994337)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl. F 1  
**GO 1 N 15/14 (2006.01)**  
 GO 1 N 15/14 K  
 GO 1 N 15/14 G

請求項の数 13 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2012-80192 (P2012-80192)	(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2013-210264 (P2013-210264A)		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27年1月28日 (2015.1.28)		弁理士 渡邊 薫
		(72) 発明者	村木 洋介
			東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株
			式会社内
		(72) 発明者	辻 明子
			東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株
			式会社内
		(72) 発明者	宮田 隆志
			東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株
			式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小粒子分取装置及びディレイタイム決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

流路内を通流する微小粒子を検出する検出部と、  
 前記流路の端部に設けられたオリフィスから吐出された前記微小粒子を含む液滴を撮像する撮像素子と、  
 前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像される画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを暫定ディレイタイムとしてディレイタイムを仮決定する制御部と、  
 を備える微小粒子分取装置。

【請求項2】

前記撮像素子は、異なる複数の時間に複数の前記液滴の画像を撮像し、  
 前記制御部は、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像された複数の前記液滴毎の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを前記暫定ディレイタイムとして前記ディレイタイムを仮決定する請求項1記載の微小粒子分取装置。

【請求項3】

前記撮像素子は、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から前記暫定ディレイタイム経過後、前記液滴夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間内に、複数の前記液滴の画像を撮像し、  
 前記制御部は、

10

20

前記画像情報中において前記液滴の吐出方向に対して前記基準領域に隣接する２つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域における輝点の数に関する隣接情報を参照することにより、前記暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定する請求項２記載の微小粒子分取装置。

【請求項４】

前記２つの比較領域のうち、第１の比較領域と第２の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、

前記制御部は、

前記第２の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第２の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる時刻を算出し、該時刻を前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻として決定する請求項３記載の微小粒子分取装置。

10

【請求項５】

前記２つの比較領域のうち、第１の比較領域と第２の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、

前記制御部は、

前記第１の比較領域において、輝点数を最大とする時刻から輝点数が減少していく過程で、前記第１の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第１の時刻を算出し、前記第２の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第２の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第２の時刻を算出し

20

、  
前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻を（前記第１の時刻＋前記第２の時刻）／２として決定する請求項３又は４に記載の微小粒子分取装置。

【請求項６】

前記制御部は、

前記液滴の吐出周波数を調整し、前記液滴の吐出方向において前記液滴が形成されはじめるブレイクオフポイントが前記オリフィスに最も近くなる場合の吐出周波数を前記液滴の最適吐出周波数として決定する請求項１～５のいずれか１項に記載の微小粒子分取装置。

【請求項７】

前記オリフィスから吐出された微小粒子を含む液滴に電荷を付与する荷電部と、  
前記液滴を挟んで対向して配置され、前記電荷に応じて前記液滴の進行方向を変化させる一対の偏向板と、を更に備え、

30

前記制御部は、前記検出部により前記微小粒子が検出されてから予め決定された前記ディレイタイム後に前記微小粒子に電荷を付与するよう前記荷電部を制御する請求項１～６のいずれか１項に記載の微小粒子分取装置。

【請求項８】

前記オリフィス及び前記流路がマイクロチップに設けられたマイクロチップ型フローサイトメータである請求項１～７のいずれか１項に記載の微小粒子分取装置。

【請求項９】

流路内を通流する微小粒子を検出し、

40

前記流路の端部に設けられたオリフィスから吐出された前記微小粒子を含む液滴を撮像し、

前記微小粒子が検出された時刻から、撮像される前記液滴の画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを暫定ディレイタイムとしてディレイタイムを仮決定する手順を含む、微小粒子分取装置におけるディレイタイム決定方法。

【請求項１０】

前記手順は、異なる複数の時刻に複数の前記液滴の画像を撮像し、

前記微小粒子が検出された時刻から、撮像された複数の前記液滴の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを前記暫定ディレイタイムとして前記ディレイタイムを仮決定する手順を含む請求項９記載のディレイタ

50

イム決定方法。

【請求項 1 1】

前記手順は、前記微小粒子が検出された時刻から前記暫定ディレイタイム経過後、前記液滴夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間内に、複数の前記液滴の画像を撮像し、画像情報中において前記液滴の吐出方向に対して前記基準領域に隣接する 2 つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域における輝点の数に関する隣接情報を参照することにより、前記暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定する手順を含む請求項 1 0 記載のディレイタイム決定方法。

【請求項 1 2】

前記 2 つの比較領域のうち、第 1 の比較領域と第 2 の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、

前記手順は、

前記第 2 の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第 2 の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる時刻を算出し、該時刻を前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻として決定する手順を含む請求項 1 1 記載のディレイタイム決定方法。

【請求項 1 3】

前記 2 つの比較領域のうち、第 1 の比較領域と第 2 の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、

前記手順は、

前記第 1 の比較領域において、輝点数を最大とする時刻から輝点数が減少していく過程で、前記第 1 の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第 1 の時刻を算出し、前記第 2 の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第 2 の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第 2 の時刻を算出し、

前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻を（前記第 1 の時刻 + 前記第 2 の時刻）/ 2 として決定する手順を含む請求項 1 1 又は 1 2 に記載のディレイタイム決定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本技術は、微小粒子分取装置及び微小粒子分取装置におけるディレイタイム決定方法に関する。より詳しくは、ディレイタイムを自動で決定する微小粒子分取装置等に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞等の微小粒子の特性を光学的、電気的あるいは磁氣的に検出し、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における細胞分別では、まず、フローセルに形成されたオリフィスから流体ストリーム（細胞を含むサンプル液とシース液の層流）を発生させ、オリフィスに振動を印加して流体ストリームを液滴化し、液滴に電荷を付与する。そして、オリフィスから吐出される細胞を含む液滴の移動方向を電氣的に制御して、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している。

【0004】

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、対電極間を通過

10

20

30

40

50

し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。

【0005】

また、特許文献2には、液滴が流体からブレイクオフする位置（以下、ブレイクオフポイントと記す）に補助の照明と検出ユニットを配置することにより、液滴が意図された流路に分取されたか否かを確認することができるフローサイトメータの動作を制御する方法が開示されている。このようにブレイクオフポイントを把握することで、細胞等の微小粒子が検出されてから、当該細胞等を含む液滴がブレイクオフポイントに到達するまでの遅延時間（以下、ディレイタイムと記す）を把握し、ディレイタイムに基づいて検出された微粒子を含有する液滴に電荷を付与することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【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】

【0007】

しかしながら、ブレイクオフポイントは液滴の吐出条件等により変動し、それによりディレイタイムも変化する。また、ブレイクオフポイントを把握するのみでは、微粒子を含有する液滴に電荷を付与すべき正確なタイミングを十分に把握できないでいた。そのため、微粒子を含有する液滴に正確に電荷が付与され、液滴が所望の回収容器内に振り分けられうるかどうかは、結局のところ、電荷が付与された液滴をプレパレート上で観測すること等により、ユーザの目視で判定する方法が多く用いられていた。このような方法は、ユーザに技術の習熟を求めるものであり、信頼性や安定性に問題があった。

【0008】

そこで、本技術は、自動で簡便に且つ精度良く液滴に電荷を付与することができる微小粒子分取装置を提供することを主目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題解決のため、本技術は、流路内を通流する微小粒子を検出する検出部と、前記流路の端部に設けられたオリフィスから吐出された前記微小粒子を含む液滴を撮像する撮像素子と、前記液滴に電荷を付与する荷電部と、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像される画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までをディレイタイムとして決定し、前記検出部により前記微小粒子が検出されてから前記ディレイタイム後において前記荷電部による前記微小粒子に対する電荷の付与を可能にする制御部と、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では、ユーザによる設定を必要とせずに、基準領域内における輝点数に基づいて自動でディレイタイムを決定することができる。

前記撮像素子は、異なる複数の時間に複数の前記液滴の画像を撮像し、前記制御部は、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像された複数の前記液滴毎の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを暫定ディレイタイムとして前記ディレイタイムを仮決定してもよい。

この微小粒子分取装置では、撮像素子は、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から前記暫定ディレイタイム経過後、前記液滴夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間内に、複数の前記液滴の画像を撮像し、前記制御部は、前記画像情報中において前記液滴の吐出方向に対して前記基準領域に隣接する2つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域における輝点数の数に関する隣接情報を参照することにより、前記暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定してもよい。

この微小粒子分取装置では、前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較

10

20

30

40

50

領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記制御部は、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる時刻を算出し、該時刻を前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻として決定してもよい。

この微小粒子分取装置では、前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記制御部は、前記第1の比較領域において、輝点数を最大とする時刻から輝点数が減少していく過程で、前記第1の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第1の時刻を算出し、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第2の時刻を算出し、前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻を（前記第1の時刻＋前記第2の時刻）／2として決定してもよい。

10

この微小粒子分取装置では、前記制御部は、前記液滴の吐出周波数を調整し、前記液滴の吐出方向において前記液滴が形成されはじめるブレイクオフポイントが前記オリフィスに最も近くなる場合の吐出周波数を前記液滴の最適吐出周波数として決定してもよい。

また、この微小粒子分取装置は、前記撮像素子により撮像された前記液滴を挟んで対向して配置され、前記電荷との間に作用する電気的な力によって前記液滴の進行方向を変化させる一対の偏向板を備えていてもよい。

また、この微小粒子分取装置は、前記オリフィス及び前記流路がマイクロチップに設けられたマイクロチップ型フローサイトメータであってもよい。

20

【0010】

なお、ここでいう、「ディレイタイム」とは、検出部により微小粒子が検出された時刻から、当該微小粒子を含有する流体から液滴が形成されるまでの遅延時間を指す。すなわち、検出部により微小粒子が検出された時刻から、当該微小粒子を含有する液滴が電荷を付与されるまでに必要な時間を指す。本技術では、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像される画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までの時間を指す。

また、「暫定ディレイタイム」とは、ディレイタイムを決定するまでの暫定的なディレイタイムである。より具体的には、異なる複数の時刻に撮像素子により撮像された複数の液滴の画像に基づいて、前記検出部により微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像された複数の液滴の画像情報を比較することにより算出される基準領域内における輝点数を最大とする時刻までの時間を指す。また、撮像素子としては、ドロップレットカメラ等が挙げられる。

30

【0011】

また、本技術は、流路内を通流する微小粒子を検出し、前記流路の端部に設けられたオリフィスから吐出された前記微小粒子を含む液滴を撮像し、前記微小粒子が検出された時刻から、撮像される前記液滴の画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までをディレイタイムとして決定する手順を含む、微小粒子分取装置におけるディレイタイム決定方法も提供する。

また、前記手順では、異なる複数の時間に複数の前記液滴毎の画像を撮像し、前記微小粒子が検出された時刻から、撮像された複数の前記液滴毎の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを暫定ディレイタイムとして前記ディレイタイムを仮決定する手順を含んでもよい。

40

また、前記手順は、前記微小粒子が検出された時刻から前記仮想ディレイタイム経過後、前記液滴夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間内に、複数の前記液滴の画像を撮像し、画像情報中において前記液滴の吐出方向に対して前記基準領域に隣接する2つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域における輝点の数に関する隣接情報を参照することにより、前記暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定する手順を含んでもよい。

また、前記手順では、前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域と

50

が前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる時刻を算出し、該時刻を前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻として決定する手順を含んでいてもよい。

また、前記手順では、前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記手順は、前記第1の比較領域において、輝点数を最大とする時刻から輝点数が減少していく過程で、前記第1の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第1の時刻を算出し、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第2の時刻を算出し、前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻を(第1の時刻+第2の時刻)/2として決定する手順を含んでいてもよい。

10

#### 【0012】

本技術において、「微小粒子」には、細胞や微生物、リボ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、リボソーム、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。

20

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本技術により、自動で簡便に且つ精度良く液滴に電荷を付与することができる微小粒子分取装置が提供される。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【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の実施形態に係る微小粒子分取装置1(フローサイトメータ1)の分取系の構成を説明するための模式図である。

【図2】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模式図である。

【図3】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模式図である。

【図4】フローサイトメータ1においてディレイタイムを決定する方法を説明するためのフロー図である。

40

【図5】フローサイトメータ1のドロップレットカメラ4により撮像された液滴の画像の一例を示す写真であり、暫定ディレイタイム決定ステップS<sub>5</sub>を説明するための説明図である。

【図6】フローサイトメータ1におけるディレイタイム決定ステップS<sub>6</sub>を説明するための説明図である。

【図7】フローサイトメータ1のドロップレットカメラ4により撮像された液滴の画像の一例を示す写真であり、ディレイタイム決定ステップS<sub>6</sub>を説明するための説明図である。

【図8】横軸をフェーズとし、縦軸をフローサイトメータ1のドロップレットカメラ4により撮像された液滴の画像の輝点数としたグラフであり、ディレイタイム決定ステップS

50

6 の一例（第 1 のディレイタイム決定方法）を説明するための説明図である。

【図 9】横軸をフェーズとし、縦軸をフローサイトメータ 1 のドロップレットカメラ 4 により撮像された液滴の画像の輝点数としたグラフであり、ディレイタイム決定ステップ S<sub>6</sub> の一例（第 1 のディレイタイム決定方法）を説明するための説明図である。

【図 10】横軸をフェーズとし、縦軸をフローサイトメータ 1 のドロップレットカメラ 4 により撮像された液滴の画像の輝点数としたグラフであり、ディレイタイム決定ステップ S<sub>6</sub> の一例（第 2 のディレイタイム決定方法）を説明するための説明図である。

【図 11】横軸をフェーズとし、縦軸をフローサイトメータ 1 のドロップレットカメラ 4 により撮像された液滴の画像の輝点数としたグラフであり、ディレイタイム決定ステップ S<sub>6</sub> の一例（第 2 のディレイタイム決定方法）を説明するための説明図である。

【図 12】フローサイトメータ 1 において微小粒子を分取する方法（微小粒子分取ステップ S<sub>7</sub>）を説明するためのフロー図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

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. 本技術に係る微小粒子分取装置の装置構成

(1-1) 荷電部

(1-2) マイクロチップ

(1-3) 検出部

(1-4) ドロップレットカメラ

(1-5) 偏向板

(1-6) 回収容器

(1-7) 制御部等

## 2. 本技術に係る微小粒子分取装置におけるディレイタイム決定方法

(2-1) 微小粒子検出ステップ S<sub>1</sub>

(2-2) 液滴吐出ステップ S<sub>2</sub>

(2-3) 液滴撮像ステップ S<sub>3</sub>

(2-4) 吐出周波数決定ステップ S<sub>4</sub>

(2-5) 暫定ディレイタイム決定ステップ S<sub>5</sub>

(2-6) ディレイタイム決定ステップ S<sub>6</sub>

(2-6-1) 第 1 のディレイタイム決定方法

(2-6-2) 第 2 のディレイタイム決定方法

(2-7) 微小粒子分取ステップ S<sub>7</sub>

(2-7-1) 微小粒子検出ステップ S<sub>7-1</sub>

(2-7-2) 液滴吐出・電荷付与ステップ S<sub>7-2</sub>

【0016】

## 1. 本技術に係る微小粒子分取装置の装置構成

図 1 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）の分取系の構成を説明する模式図である。

【0017】

(1-1) 荷電部

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 から吐出される液滴に電荷を付与する荷電部 11 を備える。液滴のチャージは、荷電部 11 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 に挿入される電極 12 によって行われる。なお、電極 12 は、マイクロチップ 2 のいずれかの箇所に、流路を送

10

20

30

40

50

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ればよいものとする。

【 0 0 1 8 】

フローサイトメータ 1 では、サンプル液に含まれる微小粒子が後述する検出部 3 により検出されてから、ディレイタイム経過した後に荷電部 1 1 が上記微小粒子を含有する液滴にチャージすることができる。ここでいう、ディレイタイムとは、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から、当該微小粒子を含有する流体から液滴が形成されるまでの遅延時間を指す。すなわち、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から、当該微小粒子を含有する液滴が荷電部 1 1 により電荷を付与されるまでに必要な時間を指す。本技術では、ディレイタイムとは、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から、後述するドロップレットカメラ 4 により撮像される画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までの時間を指す。

10

【 0 0 1 9 】

( 1 - 2 ) マイクロチップ

図 2 及び図 3 に、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 2 ( 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 3 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 ) は上面模式図、( B ) は断面模式図、( C ) は正面図を示す。図 3 ( B ) は、図 2 ( A ) 中 P - P 断面に対応する。

20

【 0 0 2 0 】

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 ( P M M A )、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メチルジシラザン ( P D M S ) 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 2 1 】

サンプル液は、送液コネクタ部からサンプルインレット 2 3 に導入され、送液コネクタ部からシースインレット 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。

30

【 0 0 2 2 】

符号 2 5 は、サンプル流路 2 2 に詰まりや気泡が生じた際に、サンプル流路 2 2 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 2 5 の一端には、送液コネクタ部を介して真空ポンプ等の負圧源に接続される吸引アウトレット 2 5 1 が形成され、他端は連通口 2 5 2 においてサンプル流路 2 2 に接続している。

【 0 0 2 3 】

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 2 6 1 ( 図 2 参照 )、2 6 2 ( 図 3 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 2 1 から流体ストリーム ( 図 1 参照 ) となって排出される。図 1 中、オリフィス 2 1 からの流体ストリームの排出方向を Y 軸正方向によって示す。

40

【 0 0 2 4 】

サンプル流路 2 2 のオリフィス 2 1 への接続部は、直線状に形成されたストレート部 2 7 とされている。ストレート部 2 7 は、オリフィス 2 1 から流体ストリームを Y 軸正方向に真っ直ぐ射出するために機能する。

【 0 0 2 5 】

50



オリフィス 2 1 から射出される流体ストリームは、チップ加振部によりオリフィス 2 1 に印加される振動によって液滴化される。オリフィス 2 1 は基板層 2 a、2 b 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 2 1 1 が設けられている。切欠部 2 1 1 は、オリフィス 2 1 の開口位置と基板端面との間の基板層 2 a、2 b を、切欠部 2 2 1 の径 L がオリフィス 2 1 の開口径 1 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 3（C）参照）。切欠部 2 1 1 の径 L は、オリフィス 2 1 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 2 1 の開口径 1 よりも 2 倍以上大きく形成することが望ましい。

#### 【0026】

##### （1-3）検出部

図 1 中符号 3 は、光源 3 1 から発せられるレーザ L 1 の照射によって細胞等の微小粒子から発生する測定対象光を検出する検出部を示す。検出部 3 は、サンプル流路 2 2 の絞込部 2 6 1（図 2 参照）と絞込部 2 6 2（図 3 参照）との間で、細胞の特性検出を行う。当該特性検出は特に限定されるものではないが、例えば光学的検出の場合、サンプル流路 2 2 中を 3 次元層流の中心に一直列に配列して送流される細胞に対するレーザ L 1（図 1 参照）の照射により、細胞から発生する散乱光や蛍光が検出部 3 によって検出される。

#### 【0027】

この光照射及び検出では、レーザ光源の他に、細胞に対してレーザを集光・照射する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の照射系も構成されていてもよい。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等によって構成される。

#### 【0028】

検出部 3 の検出系により検出される測定対象光は、測定光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。これらの測定対象光は電気信号に変換され、制御部 7 に出力され、細胞の光学特性判定に供される。

#### 【0029】

なお、検出部 3 は、磁気的あるいは電氣的に細胞の特性を検出するものであってもよいものとする。この場合には、マイクロチップ 2 のサンプル流路 2 2 に微小電極を対向させて配設し、抵抗値、容量値（キャパシタンス値）、インダクタンス値、インピーダンス、電極間の電界の変化値、あるいは、磁化、磁界変化、磁場変化等を測定する。

#### 【0030】

##### （1-4）ドロップレットカメラ

図 1 中符号 4 は、本技術の撮像素子の一例であり、マイクロチップ 2 のオリフィス 2 1 から吐出される液滴 D を撮像するための CCD カメラ、CMOS センサ等のドロップレットカメラである。ドロップレットカメラ 4 は、撮像した液滴 D の画像の焦点調節を行うことが可能に設計されている。フローサイトメータ 1 では、細胞等の微小粒子が含まれている液滴に光源 4 1 から発せられるレーザ L 2 を照射し、微小粒子を励起しつつドロップレットカメラ 4 により液滴 D を撮像することで、表示部から液滴 D に微小粒子が含有されていることをユーザが確認できるように設計されている。

#### 【0031】

また、フローサイトメータ 1 では、マイクロチップを新しいものに交換したり、外部の環境（気温等）が変化したりすることで、液滴形成のパラメータ（シース圧、液滴周波数、ピエゾ駆動圧等）を変更する必要がある場合がある。この場合、微小粒子が検出部 3 により検出されてから微小粒子を含有する液滴にチャージをかけるまでの時間（以下、当該時間をディレイタイムと記すこともある）を調整する必要がある。後述する制御部 7 がこのディレイタイムを決定することを可能にするように液滴 D を撮像するためにもドロップレットカメラ 4 が機能する。

#### 【0032】

より具体的には、後述するように制御部 7 が暫定ディレイタイムをディレイタイムと仮

10

20

30

40

50

決定することができるように、ドロップレットカメラ 4 は異なる複数の時間に複数の液滴 D の画像を撮像することができるように設計されている。なお、暫定ディレイタイムとは、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から、ドロップレットカメラ 4 により撮像された複数の前記液滴の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを指す。また、ここでいう異なる複数の時刻とは、例えば、振動素子 13 がオリフィス 21 に印加する振動の周波数の逆数の時間（すなわち、液滴 D 夫々の吐出間隔時間）の間隔を空けた各時刻を指す。

【0033】

また、制御部 7 が暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定することができるように、ドロップレットカメラ 4 は、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から暫定ディレイタイム経過後、所定時間内に、複数の液滴 D の画像を撮像することができるように設計されている。なお、ここでいう所定時間とは、液滴 D 夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間を指す。

【0034】

また、ドロップレットカメラ 4 は、制御部 7 が後述する液滴 D の最適吐出周波数を決定することを可能にするように Y 軸正方向又は負方向に移動可能に設計されている。

【0035】

また、ドロップレットカメラ 4 により撮像された画像は、ディスプレイ等の表示部に表示されて、ユーザがオリフィス 21 における液滴 D の形成状況（液滴の大きさ、形状、間隔等）を確認するためにも利用できる。

【0036】

（1-5）偏向板

図 1 中符号 51, 52 は、オリフィス 21 から射出され、ドロップレットカメラ 4 により撮像された液滴 D を挟んで対向して配置された一対の偏向板を示す。偏向板 51, 52 は、オリフィス 21 から吐出される液滴の移動方向を、液滴に付与された電荷との電気的な作用力によって制御する電極を含んで構成される。また、偏向板 51, 52 は、オリフィス 21 から発生する液滴 D の軌道も、液滴 D に付与された電荷との電気的な作用力によって制御する。図 1 中、偏光板 51, 52 の対向方向を X 軸方向によって示す。

【0037】

（1-6）回収容器

フローサイトメータ 1 において、液滴 D は、偏向板 51, 52 の対向方向（X 軸方向）に一列に配設された複数の回収容器 611、612、62、63 のいずれかに受け入れられる。回収容器 611、612、62、63 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。回収容器 611、612、62、63 の数は特に限定されないが、ここでは 4 本設置する場合を図示した。オリフィス 21 から発生する液滴 D は、偏向板 51, 52 との間の電気的な作用力の有無あるいはその大小によって、4 本の回収容器 611、612、62、63 のいずれか一つに誘導され、回収される。

【0038】

回収容器 611、612、62、63 は、回収容器用コンテナ（不図示）に交換可能に設置される。回収容器用コンテナ（不図示）は、オリフィス 21 からの液滴 D の排出方向（Y 軸方向）及び偏光板 51, 52 の対向方向（X 軸方向）に直交する方向（Z 軸方向）に移動可能に構成された Z 軸ステージ（不図示）上に配設されている。

【0039】

（1-7）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、検出部 3 により検出された細胞等の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上述した各構成を制御するための制御部 7 等を備える。

【0040】

制御部 7 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

10

20

30

40

50

って構成でき、ハードディスク内にはOSと次に説明するディレイタイム決定方法に関する各ステップを実行するプログラムなどが格納されている。

【0041】

2. 本技術に係る微小粒子分取装置におけるディレイタイム決定方法

(2-1) 微小粒子検出ステップS<sub>1</sub>

図4は、フローサイトメータ1におけるディレイタイム決定ステップを説明するフローチャートである。ディレイタイム決定ステップは、「微小粒子検出ステップS<sub>1</sub>」、「液滴吐出ステップS<sub>2</sub>」、「液滴撮像ステップS<sub>3</sub>」、「吐出周波数決定ステップS<sub>4</sub>」、「暫定ディレイタイム決定ステップS<sub>5</sub>」、及び「ディレイタイム決定ステップS<sub>6</sub>」の手順を含む。また、上記のディレイタイム決定ステップ後に、「微小粒子分取ステップS<sub>7</sub>」の手順が実行されてもよい。以下、各手順について説明する。

10

【0042】

まず、微小粒子検出ステップS<sub>1</sub>では、制御部7が、送液コネクタ部に信号を出力し、サンプル液及びシース液の送液を開始させる。そして、検出部3が、例えば、レーザLを照射することにより、サンプルに含有される微小粒子をサンプル流路22で検出する。なお、本ステップS<sub>1</sub>及び後述するステップS<sub>2</sub>～S<sub>6</sub>は、検出部3が対象となる細胞等を検出してから、荷電部11が該細胞等を含有する液滴Dに電荷を付与(チャージ)するまでのディレイタイムを決定するためのキャリブレーション工程である。そのため、上記微小粒子としては、予め形状等が明らかである工業用粒子等のキャリブレーションビーズを用いることが好ましい。

20

【0043】

(2-2) 液滴吐出ステップS<sub>2</sub>

液滴吐出ステップS<sub>2</sub>では、振動素子13がオリフィス21に振動を印加し、オリフィス21から液滴Dを吐出し、該液滴Dを廃液口に回収し、廃液することができる(図4参照)。

【0044】

(2-3) 液滴撮像ステップS<sub>3</sub>

液滴撮像ステップS<sub>3</sub>では、制御部7がドロップレットカメラ4に信号を出力し、該信号を受けたドロップレットカメラ4が吐出され、レーザL1により励起された液滴Dを撮像する(図4参照)。ドロップレットカメラ4は、後述するドロップレットクロックの間隔以下の間隔で画像を撮像することができる。

30

【0045】

このとき、例えば、制御部7はドロップレットカメラ4に信号を出力し、該信号を受けたドロップレットカメラ4をX軸方向又はY軸方向に移動させることができる。なお、制御部は、ドロップレットカメラ4による液滴Dの画像の撮像においてZ軸方向に焦点調節を行うこともできる。例えば、制御部7は、ドロップレットカメラ4により撮像された画像におけるコントラスト比が所定の範囲内になるまで焦点調節を行うことができる。

【0046】

(2-4) 吐出周波数決定ステップS<sub>4</sub>

吐出周波数決定ステップS<sub>4</sub>では、制御部7が、ドロップレットカメラ4を所定位置まで移動させ、ドロップレットカメラ4により撮像された画像情報に基づいて液滴Dの吐出周波数を調整する(図4参照)。上記所定位置は、特に限定されるものではないが、オリフィス径や駆動圧等の吐出条件に応じて予め設定された位置とすることができる。

40

【0047】

そして、制御部7は、Y軸正方向において液滴Dが形成されはじめる位置(以下、ブレイクオフポイントと記す。)がオリフィス21に最も近くなる場合の吐出周波数を液滴Dの最適吐出周波数として決定する。なお、本ステップS<sub>4</sub>は、後述するステップS<sub>5</sub>の後に実行されてもよい。

【0048】

このように、フローサイトメータ1では、ブレイクオフポイントに基づいて、制御部7

50

により最適吐出周波数が決定されるため、ユーザが手で液滴周波数を設定するという煩雑さを解消することができる。

【 0 0 4 9 】

( 2 - 5 ) 暫定ディレイタイム決定ステップ  $S_5$

暫定ディレイタイム決定ステップ  $S_5$  では、制御部 7 が、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から、ドロップレットカメラ 4 により撮像された複数の液滴 D の画像情報を比較することで、液滴 D の暫定ディレイタイムを決定する ( 図 4 参照 ) 。

【 0 0 5 0 】

ここで、暫定ディレイタイムとは、後述するディレイタイムステップ  $S_6$  によりディレイタイムを決定するまでの間、本ステップ  $S_5$  により暫定的にディレイタイムとして扱う時間を指す。より具体的には、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻から、異なる複数の時刻にドロップレットカメラ 4 により撮像された複数の液滴 D の画像情報を比較することにより算出される、後述の基準領域内における輝点数を最大とする時刻までの時間を指す。なお、異なる複数の時刻とは、特に限定されるものではないが、例えば、振動素子 13 がオリフィス 21 に印加する振動の周波数の逆数の時間 ( すなわち、液滴 D 夫々の吐出間隔時間を指す。以下、ドロップレットクロックと記す。 ) の間隔を空けた各時刻を指す。

【 0 0 5 1 】

図 5 は、フローサイトメータ 1 のドロップレットカメラ 4 により撮像された液滴の画像の一例を示す写真であり、異なる時刻に撮像された画像を示すものである ( 図 5 ( a ) ~ ( d ) 参照 ) 。より具体的には、図 5 は、検出部 3 により微小粒子が検出された時刻 (  $T_0$  ) にドロップレットカメラ 4 により撮像される液滴 D を 1 番目の液滴としたとき、何番目の液滴に検出された微小粒子が含まれているのかを説明するための写真図である。なお、各写真図は複数の撮像画像を積算したものとすることもできる。

【 0 0 5 2 】

図 5 中、「 S e c t i o n 1 」は、画像 P 中の予め設定された基準領域のことを指す。制御部 7 は、ドロップレットカメラ 4 がドロップレットクロックの間隔で撮像した複数の液滴 D の画像を比較し、 $T_0$  から、「 S e c t i o n 1 」内の輝点 B の数が最大となる時刻までを暫定ディレイタイムとして仮決定する。なお、上記輝点とは、ドロップレットカメラ 4 により撮像される液滴 D の画像中において所定の閾値より高い輝度を有する画素のことを指し、レーザ L2 によって照射され、励起された液滴 D に含有される微小粒子の画像情報である。

【 0 0 5 3 】

図 5 では、本技術の一例として、 $T_0$  にオリフィス 21 から吐出され、ドロップレットカメラ 4 により撮像される液滴 D を 1 番目の液滴としたとき、30 ~ 33 番目の液滴が吐出された際にドロップレットカメラ 4 により撮像された画像を示す。例えば、30 番目の液滴は、 $N = 30$  と示す写真図である ( 図 5 ( a ) 参照 ) 。

【 0 0 5 4 】

図 5 に示す例では、制御部 7 は、「 S e c t i o n 1 」内の輝点 B の数が最大となる  $N = 32$  ( 図 5 ( c ) 参照 ) の画像情報に基づいて、32 番目の液滴に微小粒子が含まれていると制御部 7 は判定できる。すなわち、制御部 7 は、ドロップレットカメラ 4 がドロップレットクロックの間隔で撮像した複数の液滴 D の画像を比較し、微小粒子が検出された時刻から 32 番目の液滴が吐出される時刻までを暫定ディレイタイムとしてディレイタイムを仮決定することができる。

【 0 0 5 5 】

このように、フローサイトメータ 1 では、異なる複数の時刻において「 S e c t i o n 1 」内の画像情報における輝点数を比較し、粗調整を実行することにより、暫定ディレイタイムをディレイタイムとして仮決定することができる。そのため、ユーザによる煩雑な操作を要求せず、簡便に且つ精度良く液滴に電荷を付与することができる。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

## ( 2 - 6 ) ディレイタイム決定ステップ $S_6$

図 4 に示すディレイタイム決定ステップ  $S_6$  では、まず、 $T_0$  から暫定ディレイタイム経過後、ドロップレットクロックよりも狭い時間内に、ドロップレットカメラ 4 により撮像された複数の液滴 D の画像に基づいて、制御部 7 が後述する隣接情報を参照する。そして、制御部 7 は隣接情報を参照することにより、上述した暫定ディレイタイム決定ステップ  $S_5$  で仮決定した暫定ディレイタイムを更新し、より精度良くディレイタイムを決定することができる。その方法について図 6 ~ 図 11 を参照しながら以下で説明する。なお、隣接情報とは液滴の吐出方向に対して基準領域に隣接する 2 つの比較領域における輝点の数に関する情報である。

### 【 0 0 5 7 】

10

図 6 は、微小粒子が検出部 3 により検出されてから、微小粒子が含まれる液滴 D がドロップレットカメラ 4 により撮像されるまでの推移を示す模式図である。

### 【 0 0 5 8 】

図 6 ( a ) はドロップレットクロック ( Drop l e t C L K ) のグラフを示す。ここで、図 6 ( b ) は、検出部 3 により検出されるマイクロチップ 2 の流路内を通流する微小粒子 A 1、A 2 を示す。そして、図 6 ( c ) では、微小粒子 A 1、A 2 が夫々含まれる液滴 D 1、D 2 を示す。

### 【 0 0 5 9 】

図 6 に示す例では、微小粒子 A 1、A 2 が同一のドロップレットクロックに含まれていても、位相が ( 2 - 1 ) だけずれる ( 図 6 ( b ) 参照 )。そのため、微小粒子 A 1、A 2 が異なる液滴 D 1、D 2 に含まれる場合には、暫定ディレイタイムをディレイタイムとすると、所望の液滴への電荷付与のタイミングがずれる場合もある ( 図 6 ( c ) 参照 )。そこで、より精度良く液滴に電荷を付与するタイミングを決定するには、ドロップレットクロックよりも狭い間隔 ( 以下、位相と記す。 ) でディレイタイムを調整する必要がある。

20

### 【 0 0 6 0 】

図 7 は、ドロップレットカメラ 4 により、同一のドロップレットクロックにおいて、異なる位相で撮像された画像を示す。より具体的には、図 7 は、同一のドロップレットクロックにおいて各位相 ( ( a ) P H Y = 0、( b ) P H Y = 9 0、( c ) P H Y = 2 7 0 ) におけるドロップレットカメラ 4 により撮像された微小粒子の画像を示す。図 7 ( a )、( b )、( c ) の夫々は、同一のドロップレットクロックの時間を 3 6 0 個の位相に分割したもののうち、時系列で 0 番目の位相 ( ( a ) P H Y = 0 )、9 0 番目の位相 ( ( b ) P H Y = 9 0 )、2 7 0 番目の位相 ( ( c ) P H Y = 2 7 0 ) における画像を示したものである。

30

### 【 0 0 6 1 】

図 6 を参照しながら説明したように、同一ドロップレットクロック内の微小粒子 A 1、A 2 が異なる液滴 D 1、D 2 に含まれる場合があるため、図 7 ( a ) に示す例では、制御部 7 により、基準領域 ( S e c t i o n 1 ) に隣接する比較領域 ( S e c t i o n 0 ) においても輝点 B が検出されうる。すなわち、制御部 7 により、比較領域 ( S e c t i o n 0 ) 内に微小粒子が存在しているものと判定される。また、図 7 ( c ) に示す例では、基準領域 ( S e c t i o n 1 ) に隣接する他の比較領域 ( S e c t i o n 2 ) においても輝点 B が検出される。すなわち、制御部 7 により比較領域 ( S e c t i o n 2 ) 内に微小粒子が存在しているものと判定される。

40

### 【 0 0 6 2 】

この点、本ステップ  $S_6$  では、制御部 7 が位相のズレ ( ディレイフェーズ ) を判定し、暫定ディレイタイムを更新し、ディレイタイムを決定することができる。より具体的には、制御部 7 は、画像情報中において液滴 D の吐出方向に対して基準領域に隣接する 2 つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域の輝点 B の数に関する隣接情報を参照することにより、暫定ディレイタイムを更新し、ディレイタイムを決定する。以下、図 8 ~ 図 11 を参照しながら、ディレイタイムの具体的な決定方法として、第 1 のディレイタイ

50

ム決定方法及び第2のディレイタイム決定方法を挙げて詳細に説明する。

【0063】

なお、ここでは、輝点Bが2つの領域（「Section1」と、「Section0」又は「Section2」との2つの領域）で検出される場合を例に説明するが、輝点が「Section1」、「Section0」、及び「Section2」の3つの領域で検出される場合であっても、以下で説明する第1のディレイタイム決定方法又は第2のディレイタイム決定方法で同様にディレイタイムを決定できる。

【0064】

（2-6-1）第1のディレイタイム決定方法

まず、2つの比較領域のうち、「Section2（S2）」のみの輝点を参照することによりディレイタイムを決定する第1のディレイタイム決定方法について図8及び図9を参照しながら説明する。図8及び図9は、横軸を位相値（フェーズ値）とし、縦軸をフローサイトメータ1のドロップレットカメラ4により撮像された液滴の画像の輝点数としたグラフである。より具体的には、グラフでは、図8に示すように、「Section0（S0）」、「Section1（S1）」、及び「Section2（S2）」の3領域における輝点数を示す。

10

【0065】

まず、制御部7は、2つの比較領域のうち、「Section1（S1）」に対し、前記液滴の吐出方向の正方向側に位置する「Section2（S2）」における輝点数の最大値を算出する（図9中、（1a）参照）。

20

【0066】

次に、制御部7は、「Section2（S2）」において、最大の輝点数に向けて増加していく過程で、上述した輝点数の最大値の10%になる時刻を算出する（図9中、点（1b）及び点（1c）参照）。

【0067】

最後に、制御部7は、輝点数の最大値の10%になる時刻を基準領域内における輝点数を最大とする時刻とし、ディレイタイムを決定する。すなわち、制御部7は、上記点（1b）及び点（1c）における位相値を算出し、当該位相値に基づいてディレイタイムを決定する。

【0068】

30

以上より、フローサイトメータ1では、制御部7が画像情報中において液滴の吐出方向に対して基準領域に隣接する2つの比較領域のうち、液滴の吐出方向の正方向側に位置する比較領域における輝点数に関する隣接情報を参照しディレイタイムを算出する。このようにして、フローサイトメータ1では、同期している液滴とチャージ信号の位相ずれを懸念することなく、液滴に精度良く且つ自動で電荷を付与することが可能になる。

【0069】

なお、本ステップS<sub>6</sub>における一例である第1のディレイタイム決定方法は、サンプルに含有される微小粒子の検出がマイクロチップ2内で行われ、液滴Dへの電荷の付与が空気中で行われる場合に好適に用いられる。すなわち、サンプルの速度がマイクロチップ2内と空気中とで変化するために、サンプルに電荷をかけるタイミングを調整する必要がある場合に、第1のディレイタイム決定方法によりディレイタイムを決定することが特に有効である。

40

【0070】

また、第1のディレイタイム決定方法では、制御部7は、比較領域における最大の輝点数の10%になる値に基づいて位相値を計算する場合を説明したが、本技術はかかる例に限定されない。例えば、制御部7は、最大の輝点数のX%（Xは例えば、5や20等の任意の値とする）を計算することで、適宜ディレイタイムを決定することもできる。

【0071】

（2-6-2）第2のディレイタイム決定方法

次に、Section0（S0）及びSection2（S2）の2つの比較領域の輝

50

点を参照することによりディレイタイムを決定する第2のディレイタイム決定方法について図10及び図11を参照しながら説明する。図10及び図11は、横軸を位相値（フェーズ値）とし、縦軸をフローサイトメータ1のドロップレットカメラ4により撮像された液滴の画像の輝点数としたグラフである。より具体的には、グラフでは、図10に示すように、Section0 (S0)、Section1 (S1)、及びSection2 (S2)の3領域における輝点数を示す。

【0072】

まず、制御部7は、2つの比較領域のうち、Section1 (S1)に対し、前記液滴の吐出方向の負方向側に位置するSection0 (S0)における輝点数の最大値と最小値の平均値を算出する（図11中、(2a)参照）。すなわち、図11に示すように、最小値が0になる場合には、制御部は、Section0 (S0)における輝点数の最大値を1/2倍した値（以下、Section0における中間値と記す）を算出する。

10

【0073】

次に、Section0 (S0)の場合と同様にして、制御部7は、2つの比較領域のうち、Section1 (S1)に対し、前記液滴の吐出方向の正方向側に位置するSection2 (S2)における輝点数の最大値と最小値の平均値を算出する（図11中、(2b)参照）。すなわち、図11に示すように、最小値が0になる場合には、制御部7は、Section2 (S2)における輝点数の最大値を1/2倍した値（以下、Section2における中間値と記す）を算出する。

【0074】

20

次に、制御部7は、Section0 (S0)において、最大の輝点数から減少していく過程で、前記最大の輝点数の1/2になる第1の時刻を算出する。すなわち、制御部7は、上記Section0における中間値を取り、グラフの横軸に平行な直線を算出し、当該直線がSection0 (S0)のプロットと交わる点（図11中、点(2c)参照）の位相値を算出する。

【0075】

次に、制御部7は、Section2 (S2)において、最大の輝点数に向けて増加していく過程で、前記最大の輝点数の1/2になる第2の時刻を算出する。すなわち、制御部7は、Section0 (S0)の場合と同様にして、制御部は、上記Section0における中間値を取り、グラフの横軸に平行な直線を算出し、当該直線がSection0 (S0)のプロットと交わる点（図11中、点(2d)参照）の位相値を算出する。

30

【0076】

最後に、制御部7は、上記第1の時刻及び上記第2の時刻に基づいて、ディレイタイムを（第1の時刻+第2の時刻）/2として決定する。すなわち、制御部7は、上記点(2c)及び点(2d)における位相値の中間点（図11中、点(2e)参照）を算出し、当該中間点の位相値を基準領域内における輝点数を最大とする時刻として、ディレイタイムを決定する。

【0077】

以上より、フローサイトメータ1では、制御部7が画像情報中において液滴の吐出方向に対して基準領域に隣接する2つの比較領域における輝点数に関する隣接情報を参照しディレイタイムを算出する。このようにして、フローサイトメータ1では、同期している液滴とチャージ信号の位相ずれを懸念することなく、液滴に精度良く且つ自動で電荷を付与することが可能になる。

40

【0078】

なお、本ステップS<sub>6</sub>における一例である第2のディレイタイム決定方法は、サンプルに含有される微小粒子が検出される位置から微小粒子への電荷の付与が行われる位置（S<sub>0</sub>やS<sub>2</sub>の値が算出されるポイント）までサンプルが空気中にある場合に好適に用いられる。

【0079】

また、第2のディレイタイム決定方法では、制御部7は、比較領域における最大の輝点

50

数の  $1/2$  になる値を中間値として位相値を計算する場合を説明したが、本技術はかかる例に限定されない。例えば、制御部 7 は、比較領域における最大の輝点数の  $X\%$  ( $X$  は例えば、90 や 80 等の任意の値とする) の値の  $1/Y$  ( $Y$  は例えば、2 や 3 や 4 等の任意の値とする) を中間値として計算することで、ディレイタイムを決定することもできる。

【0080】

(2-7) 微小粒子分取ステップ  $S_7$

図 12 は、フローサイトメータ 1 において細胞等の微小粒子を分取するステップ  $S_7$  を説明するフローチャートである。微小粒子分取ステップ  $S_7$  では、上述したステップ  $S_1 \sim S_6$  により決定されたディレイタイムに基づいて、フローサイトメータ 1 が細胞等の微小粒子を含有する液滴の分取を行う。軌道方向判定ステップは、「微小粒子検出ステップ  $S_{71}$ 」及び「液滴吐出・電荷付与ステップ  $S_{72}$ 」の手順を含む。以下、各手順について説明する。

【0081】

(2-7-1) 微小粒子検出ステップ  $S_{71}$

まず、本ステップ  $S_{71}$  では、検出部 3 が微小粒子を検出する。検出方法については、上述したステップ  $S_1$  における工程と同様にして行うことができる。

【0082】

(2-7-2) 液滴吐出・電荷付与ステップ  $S_{72}$

次いで、本ステップ  $S_{72}$  では、検出部 3 により細胞等の微小粒子が検出された時刻から、決定したディレイタイム後に、制御部 7 が荷電部に上記微小粒子を含有する液滴への電荷付与を行うための信号を出力する(図 12 参照)。そして、荷電部 11 は上記液滴に電荷を付与する。

【0083】

これにより、フローサイトメータ 1 では、所望の細胞等の微小粒子に精度良く且つ自動で電荷を付与することができる。また、上記ディレイタイムが決定された状態で、フローサイトメータ 1 では電荷を付与することになる。そのため、検出部 3 により細胞等の微小粒子が検出されてから、暫定ディレイタイム後にのみレーザ L2 により液滴 D を照射することで、レーザの使用量を低減させつつ精度よく液滴 D に微小粒子が含有されていることを確認することもできる。

【0084】

本技術に係る微小粒子分取装置及びディレイタイム決定方法は以下のような構成をとることもできる。

(1) 流路内を通流する微小粒子を検出する検出部と、前記流路の端部に設けられたオリフィスから吐出された前記微小粒子を含む液滴を撮像する撮像素子と、前記液滴に電荷を付与する荷電部と、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像される画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までをディレイタイムとして決定し、前記検出部により前記微小粒子が検出されてから前記ディレイタイム後において前記荷電部による前記微小粒子に対する電荷の付与を可能にする制御部と、を備える微小粒子分取装置。

(2) 前記撮像素子は、異なる複数の時間に複数の前記液滴の画像を撮像し、前記制御部は、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から、前記撮像素子により撮像された複数の前記液滴毎の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを暫定ディレイタイムとして前記ディレイタイムを仮決定する上記(1)記載の微小粒子分取装置。

(3) 前記撮像素子は、前記検出部により前記微小粒子が検出された時刻から前記暫定ディレイタイム経過後、前記液滴夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間内に、複数の前記液滴の画像を撮像し、前記制御部は、前記画像情報中において前記液滴の吐出方向に対して前記基準領域に隣接する 2 つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域における輝点数に関する隣接情報を参照することにより、前記暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定する上記(2)記載の微小粒子分取装置。



(4) 前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記制御部は、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる時刻を算出し、該時刻を前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻として決定する上記(3)記載の微小粒子分取装置。

(5) 前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記制御部は、前記第1の比較領域において、輝点数を最大とする時刻から輝点数が減少していく過程で、前記第1の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第1の時刻を算出し、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第2の時刻を算出し、前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻を(前記第1の時刻+前記第2の時刻)/2として決定する上記(3)又は(4)に記載の微小粒子分取装置。

10

(6) 前記制御部は、前記液滴の吐出周波数を調整し、前記液滴の吐出方向において前記液滴が形成されはじめるブレイクオフポイントが前記オリフィスに最も近くなる場合の吐出周波数を前記液滴の最適吐出周波数として決定する上記(1)~(5)のいずれか1つに記載の微小粒子分取装置。

(7) 前記撮像素子により撮像された前記液滴を挟んで対向して配置され、前記電荷との間に作用する電氣的な力によって前記液滴の進行方向を変化させる一対の偏向板を備える上記(1)~(6)のいずれか1つに記載の微小粒子分取装置。

20

(8) 前記オリフィス及び前記流路がマイクロチップに設けられたマイクロチップ型フローサイトメータである上記(1)~(7)のいずれか1つに記載の微小粒子分取装置。

(9) 流路内を通流する微小粒子を検出し、前記流路の端部に設けられたオリフィスから吐出された前記微小粒子を含む液滴を撮像し、前記微小粒子が検出された時刻から、撮像される前記液滴の画像情報中の予め設定された基準領域内における輝点数を最大とする時刻までをディレイタイムとして決定する手順を含む、微小粒子分取装置におけるディレイタイム決定方法。

(10) 前記手順は、異なる複数の時刻に複数の前記液滴の画像を撮像し、前記微小粒子が検出された時刻から、撮像された複数の前記液滴の画像情報を比較することにより算出される前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻までを暫定ディレイタイムとして前記ディレイタイムを仮決定する手順を含む上記(9)記載のディレイタイム決定方法。

30

(11) 前記手順は、前記微小粒子が検出された時刻から前記仮想ディレイタイム経過後、前記液滴夫々の吐出間隔時間よりも狭い時間内に、複数の前記液滴の画像を撮像し、画像情報中において前記液滴の吐出方向に対して前記基準領域に隣接する2つの比較領域のうち少なくとも何れか一方の比較領域における輝点数に関する隣接情報を参照することにより、前記暫定ディレイタイムを更新し前記ディレイタイムを決定する手順を含む上記(10)記載のディレイタイム決定方法。

(12) 前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記手順は、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる時刻を算出し、該時刻を前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻として決定する手順を含む上記(10)記載のディレイタイム決定方法。

40

(13) 前記2つの比較領域のうち、第1の比較領域と第2の比較領域とが前記液滴の吐出方向に順に並んでおり、前記手順は、前記第1の比較領域において、輝点数を最大とする時刻から輝点数が減少していく過程で、前記第1の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第1の時刻を算出し、前記第2の比較領域において、輝点数を最大とする時刻に向けて輝点数が増加していく過程で、前記第2の比較領域における輝点数の最大値の所定比率になる第2の時刻を算出し、前記基準領域内における輝点数を最大とする時刻を(前記第1の時刻+前記第2の時刻)/2として決定する手順を含む上記(11)又は(12)に記載のディレイタイム決定方法。

50

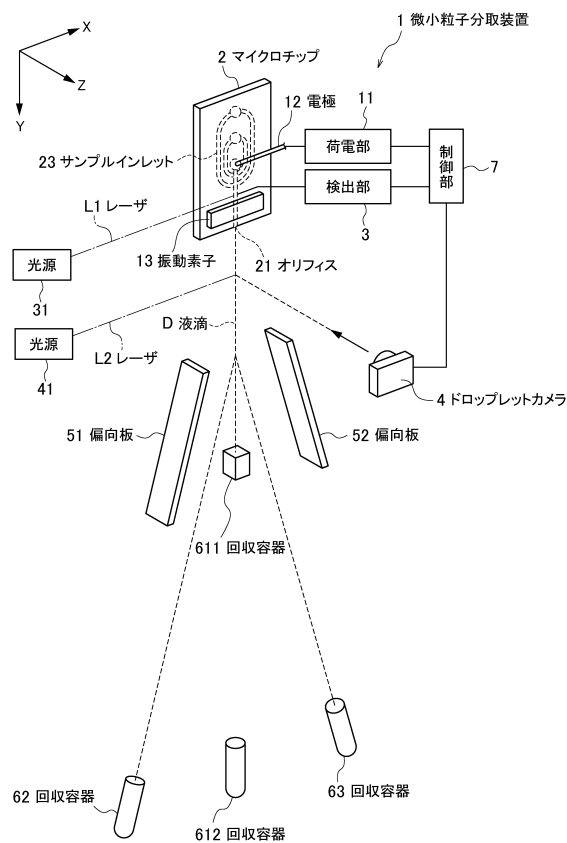
## 【符号の説明】

【 0 0 8 5 】

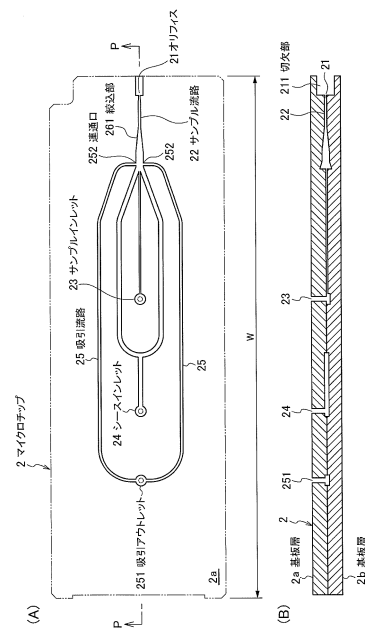
- 1：微小粒子分取装置（フローサイトメータ）、  
 11：荷電部  
 2：マイクロチップ、  
 21：オリフィス、  
 3：検出部  
 4：ドロップレットカメラ、  
 51、52：偏向板、  
 611、612、62、63：回収容器、  
 7：制御部  
 B：輝点  
 D：液滴

10

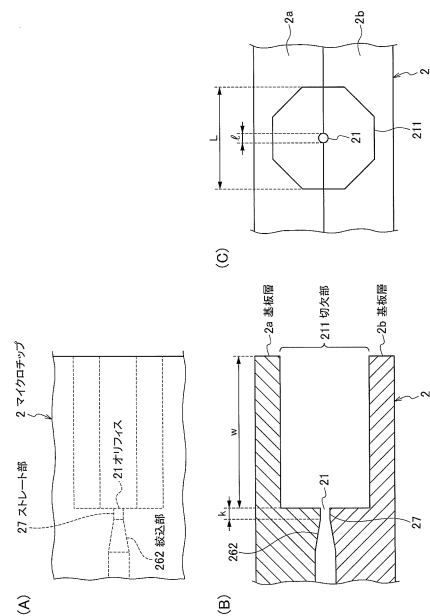
【図 1】



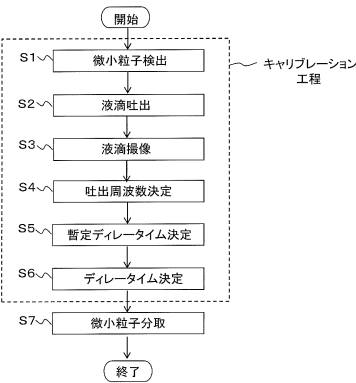
【図 2】



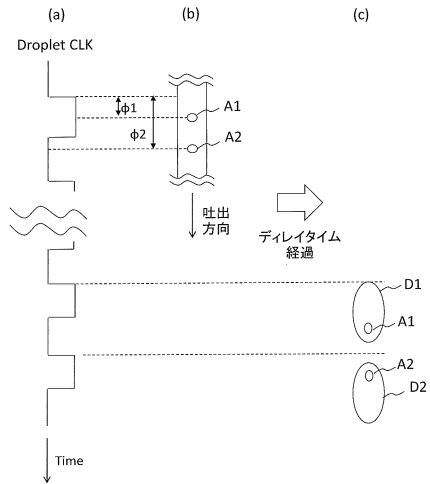
【図 3】



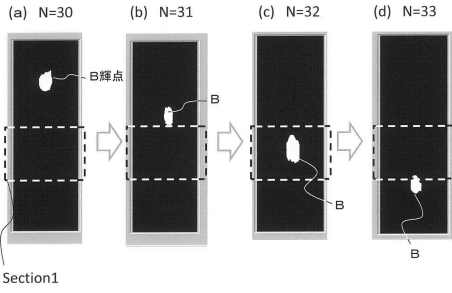
【図 4】



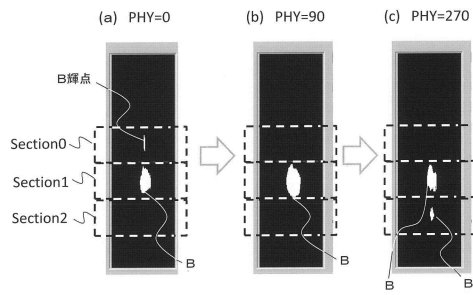
【図 6】



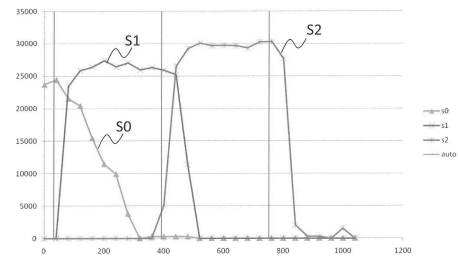
【図 5】



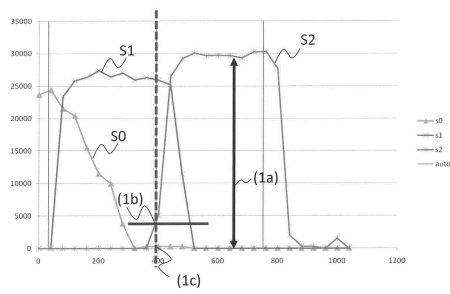
【図 7】



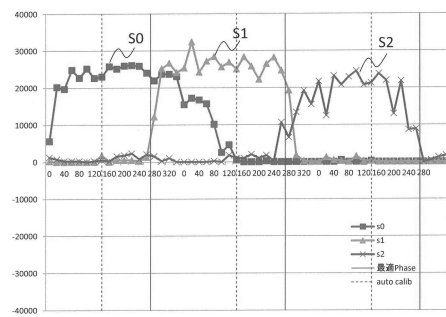
【図 8】



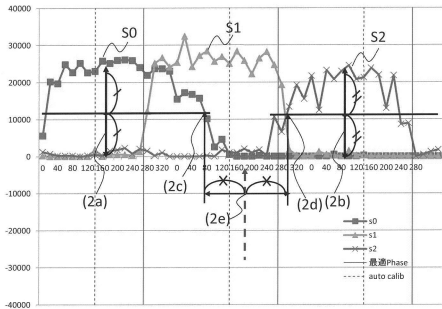
【図 9】



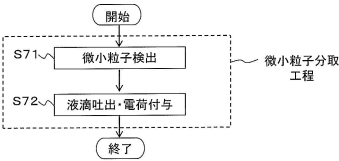
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



---

フロントページの続き

審査官 土岐 和雅

- (56)参考文献 特開平06-288896(JP,A)  
特開2010-025911(JP,A)  
特開2010-190680(JP,A)  
特開昭62-167478(JP,A)  
特開平04-048245(JP,A)  
特開昭56-033052(JP,A)  
特開昭60-139350(JP,A)  
特開昭61-052714(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N15/00~15/14  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)