

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6110484号
(P6110484)

(45) 発行日 平成29年4月5日(2017.4.5)

(24) 登録日 平成29年3月17日(2017.3.17)

(51) Int.Cl.

G01N 15/14 (2006.01)

F 1

G01N 15/14
G01N 15/14A
D

請求項の数 22 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2015-518392 (P2015-518392)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (65) 公表番号 特表2015-524070 (P2015-524070A)
 (43) 公表日 平成27年8月20日 (2015.8.20)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/032025
 (87) 國際公開番号 WO2013/191772
 (87) 國際公開日 平成25年12月27日 (2013.12.27)
 審査請求日 平成28年3月14日 (2016.3.14)
 (31) 優先権主張番号 61/662,541
 (32) 優先日 平成24年6月21日 (2012.6.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 503128320
 エスティーシー、ユーエヌエム
 S T C. U N M
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ 871
 06, アルバカーキ, ユニバーシティ
 ブールバード サウスイースト 801
 , スイート101
 (74) 代理人 100079980
 弁理士 飯田 伸行
 (74) 代理人 100167139
 弁理士 飯田 和彦
 (72) 発明者 グレーブス, スティーブン, ウェイド
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ 875
 08, サンタ フエ, ディーンズ コ
 ート 12ビ
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラインフォーカシング式光源で励起した多数のサンプル流れからの空間相関集光

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多数のフローストリーム中に流れている粒子の検出システムにおいて、音響変換器で生成された多数のフローストリームで構成されるサンプルストリームのアレイと、

前記多数のフローストリームを分析するために構成する光ビームであって、ストリーム間に介在する空間および前記多数のフローストリームの全てを横切る前記光ビームであり、同時に且つ一様に空間的に連続的な励起を発生させる前記光ビームと、

前記多数のフローストリームの中で流れる粒子のデータを同時に引き出すために、前記サンプルストリームの中を流れる励起粒子の出射光を集光する光学的対物レンズであって、この出射光をアレイ検出器に結像する前記光学的対物レンズと、

を備えたシステムであって、

夫々の前記フローストリームからの出射光は個々に同定されるとともに、その他の任意のフローストリームからの出射光とは前記アレイ検出器での位置によって差別化される出射光であることを特徴とする検出システム。

【請求項2】

さらに、単独のチャネル内で前記サンプルストリームのアレイに少なくとも2つのストリームを含む、少なくとも一つのチャネルを有する請求項1に記載の検出システム。

【請求項3】

前記チャネルに対して十分に近接させた範囲内に前記音響変換器を設けてこのチャネル

10

20

内に音響波を発生する請求項 2 に記載の検出システム。

【請求項 4】

前記チャネルを基体に形成した請求項 2 に記載の検出システム。

【請求項 5】

前記音響変換器を前記基体に接続した請求項 4 に記載の検出システム。

【請求項 6】

第 2 音響変換器を前記基体に接続した請求項 5 に記載の検出システム。

【請求項 7】

多数のチャネルを有する請求項 2 に記載の検出システム。

【請求項 8】

前記基体がウィンドウを有し、このウィンドウを介して入射する光ビームが前記サンプルストリームのアレイ中の前記サンプルストリームのすべてを横断する請求項 4 に記載の検出システム。

10

【請求項 9】

前記光ビームがベッセルビームである請求項 8 に記載の検出システム。

【請求項 10】

前記基体の少なくとも一部を光学的に透明な材質から形成した請求項 4 に記載の検出システム。

【請求項 11】

前記アレイ検出器が P M T アレイであり、各フローストリームが個々の P M T に相關する請求項 1 に記載の検出システム。

20

【請求項 12】

前記アレイ検出器がデジタルカメラであり、各フローストリームがこのカメラ内の画素位置に相關する請求項 1 に記載の検出システム。

【請求項 13】

さらに、光路のサイズを調節する一つかそれ以上の望遠鏡を有する請求項 1 に記載の検出システム。

【請求項 14】

前記アレイ検出器がさらにマスクを有する請求項 1 に記載の検出システム。

【請求項 15】

30

多数のサンプルストリームの中で流れる粒子を検出する方法において、

粒子を含有するサンプルを音響変換器で生成された多数のサンプルストリームに通して流し、

これら多数のサンプルストリームを横切って光を導き、その光によって、前記サンプルストリーム間に介在する空間の中も含めて全てのサンプルストリームにわたって横切り、同時に且つ一様に空間的に連続的な励起を発生させて、

前記多数のサンプルストリームの中で流れる粒子のデータを同時に引き出すために、前記サンプルストリームの中に流れる前記粒子の前記励起によって前記サンプルストリームの出射光を集光し、検出器に向けて前記出射光を導き、そして、

各サンプルストリームの出射光を、個別に同定するとともにその他の任意のサンプルストリームからの出射光とは前記検出器での位置によって差別化することを特徴とする方法

40

。

【請求項 16】

前記多数のサンプルストリームがチャネルに流れ、そしてさらにこのチャネルを介して音響波場を入射させて、前記サンプルの前記粒子の経路を拘束する請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記サンプルについて対象となるターゲットを含有するものと考え、さらに前記サンプルを、機能的に安定な生物分子がこのターゲットを捕獲できる十分な条件下においてこれら生物分子を付着させた、複数の負の音響コントラスト粒子に暴露し、前記音響波場が前

50

記負の音響コントラスト粒子を最大圧力ポテンシャルまでフォーカシングすることからなる請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記音響定在波が多数の節を発生し、各節が離散的なサンプルストリームにする請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記介在する空間から背景情報を収集する請求項 1 に記載の検出システム。

【請求項 2 0】

さらに、前記サンプルストリーム間の前記介在する空間からの出射光を集光する請求項 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 1】

前記多数のフローストリームの粒子を高濃度のフロー形状にすることで分析速度を最大化する請求項 1 に記載の検出システム。

【請求項 2 2】

前記多数のサンプルストリームの粒子を高濃度のフロー形状にすることで高速の流れにする請求項 1 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願に関する相互参照】

【0001】

本出願は、2012年6月21日に出願された米国仮出願第61/662,541号の優先権を主張する出願であり、その内容全体を援用する出願である。

20

【技術分野】

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所（N I H）から与えられた認可第R R 0 2 0 0 6 4号政府支援による発明である。米国政府は本発明に一定の権利を有するものである。

【背景技術】

【0003】

フローサイトメトリ（flow cytometry）は、その分析力によって細胞数の計数および多細胞モデルシステムまたは生体組織の分析を必要とする数多くの生医学用途においてきわめて貴重なものである。ところが、代表的なフローサイトメータの場合、サンプル分析フローが $250 \mu\text{L}/\text{min}$ 未満に制限され、分析速度が $70,000$ 細胞/秒に制限され、また粒子直径が $70 \mu\text{m}$ 未満に制限されている。これら制限は、流体流れの高速の線速度によって誘導される圧力、広いチャネル内の乱流および確率的に到着する粒子の単点分析を始めとする多数のファクターによってよりタイトになる。従って、フローサイトメトリの場合、きわめて希少な細胞集団の分析に効果を示すためにはサンプル準備工程を相当多くする必要があり、またオフラインの粒子濃度を使用すると大容量サンプル内の粒子を分析でき、かつ低い分析速度（200粒子/秒）において直径が $70 \mu\text{m}$ より大きい粒子を分析するためには広いチャネルにフォーカシングする（focusing: 絞り込み）低い線速度の流体力学を使用する特別な用途を対象とする大流量フローチャネルサイトメータが必要である。このような制限があると、希少な血球集団の検出、液体サンプルにおける病原体の検出、および大きな粒子の高スループット分析モデルシステム（例えば多細胞モデル生体組織、細胞スフェロイドおよび一つのビーズに一つの化合物が固定されている化合物ライブラリーなど）を始めとする多くの臨床用途におけるフローサイトメトリの効能が大幅に低下する。

30

【0004】

従って、フローサイトメトリを細胞分析および粒子分析の好ましい技術とする、フローサイトメトリの分析特性（感度、自由対拘束プローブの解像度、相関多パラメータ分析など）を保持した状態で、高い分析速度、サンプルの容量流量および使用可能な粒子サイズをもつ合理的なフローサイトメトリシステムに対する大きな需要がある。

【先行技術文献】

40

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許出願第13/103,756号

【特許文献2】米国特許出願第13/320,476号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Edwards et al. (2001) HTPSフローサイトメトリ：“a novel platform for automated high throughput drug discovery and characterization” Journal of biomolecular screening 6 10, 83 - 90.

【非特許文献2】Edwards et al. (2009) High-content screening: flow cytometry analysis. Methods Mol Biol 486, 151 - 165 and Edwards et al. Cluster cytometry for high-capacity bioanalysis. Cytometry, Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology 81, 419 - 429

【発明の概要】

【0007】

20

本発明は、上記のフローサイトメトリシステムと比較した場合、分析速度がより速く、サンプルの容量流量が可能で、かつ使用可能な粒子サイズをもつ合理的なフローサイトメトリシステムを提供するものである。本発明の各種実施態様は、多数のフローストリームにおいて粒子を検出するシステムを提供するものである。このシステムは多数のフローストリームからデータを引き出し (interrogates) 、フローストリーム全体に対して励起作用を与える光ビーム、サンプルストリームから集光し、光をアレイ検出器にイメージングする光学的対物レンズを有する。一般的に、各フローストリームから出射した光は、その他のフローストリームから出射した光からアレイ検出器のその位置によって個別に確認でき、かつ差別化できる。一部の実施態様によれば、多数のフローストリームは音響波の使用によって得ることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本発明の一実施態様による例示的なシステムを示す概略図である。

【図2】本発明の別な実施態様による例示的なシステムを示す概略図である。

【図3】本発明のさらに別な実施態様による例示的なシステムを示す概略図である。

【図4】音響フォーカシングを使用して多数のサンプルストリームを発生する状態を示す概略図である。

【図5】負の音響コントラスト粒子の使用を説明する概略図である。

【図6】本発明の一実施態様における多数のサンプルストリームを示す概略図である。

40

【図7】本発明の別な実施態様における多数のサンプルストリームを示す概略図である。

【図8】本発明のさらに別な実施態様における多数のサンプルストリームを示す概略図である。

【図9】粒子を上下方向に位置させるためにマッチングされた音響波あるいは2つの変換器のいずれかを利用したチャネルの縦正面図である。

【図10】上下方向の粒子位置を制御する手段として浅いチャネルを使用することを説明する概略図である。

【図11】本発明の一実施態様においてデータを提示することができる方法を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

50

一実施態様の場合、本発明は上記のフローサイトメトリシステムと比較した場合、分析速度がより速く、サンプルの容量流量が可能で、かつ使用可能な粒子サイズをもつ合理的なフローサイトメトリシステムを提供するものである。一般的には、本明細書に開示するシステムの場合、50 mL/分以下の流量および 1×10^6 粒子/秒以下の速度で直径が1~1,000 μm の細胞又は粒子を分析できる。一つの具体的な実施態様の場合、本発明システムは音響共振する微細作成チャネルおよび多節(multi node)音響定在波の両者を使用して粒子の300に達するフォーカシング平行ストリームを発生できる。これらフロー細胞は容量流量が25 mL/分もの高速で200 μm に達するまで粒子をフォーカシングする。

【0010】

10

なお、以下の説明の多くはフローサイトメトリ用途に向けられるが、本明細書に記載する機構の大多数は経時的に粒子フローを測定または検出することを目的とする任意のシステムに適用可能である。他の好適なシステムの実例はHPLCであり、また毛細管電気泳動である。同じように、本発明システムはフローストリーム中の粒子を検出するものであるが、このフローストリームは必ずしも液体中にある必要はなく、ゲルマトリックスやその他の一部の等価なものに存在するものでもよい。

【0011】

一般的に、レーザーやその他の好適な光源からの光はラインとして整形、指向および/または収束し、このラインは個々にデータを引き出すことができるサンプルストリームのアレイ全体にわたって延長し、ストリーム全体を励起する。光はサンプルストリーム中を移動し、この間に光によって励起された粒子から発光する光は、次に集光され、一つかそれ以上のアレイ検出器に結像(イメージング)する。光のラインによってデータを引き出す粒子の像は、アレイ検出器中の個々の要素または少数の要素に写像される。このため、アレイ検出器の各要素を具体的なサンプルストリームに相関させることができる。また、粒子の光学的な特性によって粒子を収集でき、その間ある粒子がどのサンプルストリームに存在するかを記録できる。さらに、サンプルストリーム間の空間に相関するアレイ検出器中の要素からの信号の連続収集によって、信号処理アルゴリズムに使用できる背景信号をモニターする機会を確保できる。

20

【0012】

また、マルチストリーム毛細管電気泳動の場合、個々のストリームを横断して光ビームを移動させることによってサンプルストリームのアレイから順次データを引き出し、データ引き出しゾーン(interrogation zone)の処理時にこのゾーンがたまたま移動する場合にのみこれら粒子が検出されるが、本発明のシステムの場合、これとは対照的に、すべてのサンプルストリームについて同時にデータ引き出し処理を行い、常時あらゆるストリームにおけるすべての検出可能な粒子を明確に記録し、かつどのストリームに粒子が現れているかを通知するシステムである。この能力のため、感度が高くなり、また事象ベースの検出性などの特性が高くなる。

30

【0013】

さらに、以下に詳細に説明するように、本発明システムはより大きな粒子および大きな流量に容易に対処できるサンプルストリームを流すことができるように設計することができる。同時データ引き出し処理および大きなサンプルストリームキャパシティを組み合わせると、粒子分析の分野に対して強力なツールが得られる。

40

【0014】

ここで図1について説明すると、システム10の第1実施態様が示されている。図示のように、システム10はレーザー12、ビームシェーパー14、光学的対物レンズ16、サンプルストリーム18、ビームスプリッター20および一つかそれ以上のアレイ検出器22を有する。図示のように、レーザー12は標準的な円形レーザービームまたは橢円形レーザービームを発生するようになっている。次に、レーザー12からの光はビームシェーパー14に向かいこれを通過する。このレーザーシェーパー14としては例えばパウエルレンズ(Powell lens) (例えばカナダオンタリオ州にあるLaser L

50

ine Optics, Inc から市販されている) の形を取ればよく、光をラインに整形する。次に、光のラインは二色ビームスプリッターを介して光学的対物レンズ 16 に向かい、サンプルストリームアレイ 18 の幅全体にわたって光のラインをフォーカシングし、各サンプルストリームについて同時にデータ引き出し処理を行う。図 1 に示す実施態様の場合、光学的対物レンズ 16 はサンプルから光を集光し、集光された光をアレイ検出器(複数の場合もある) 22 に結像する。図示のように、集光された光は一つかそれ以上のビームスプリッター 20 に通してからアレイ検出器(複数の場合もある) に入射させてもよい。

【 0 0 1 5 】

レーザー 12 としては任意のタイプのレーザーを使用することができ、あるいはレーザーダイオードバーを使用してもよい。さらに、発光ダイオードやアーケランプなどの任意の強力な光源も使用可能である。 10

【 0 0 1 6 】

アレイ検出器(複数の場合もある) 22 としては、マルチアノード P M T 、 e m C C D 、 C M O S 、 C C D やその他の光学的検出器などの検出器の任意のアレイを使用することができる。

【 0 0 1 7 】

なお図示のように、本発明における各種の光ビームの方向を曲げるか変更するために各種の鏡やその他の光学的素子を使用すれば、各種の構成部材に対して各種の構成が可能になり、また各種の相対位置を取ることが可能になる。なお、本明細書に記載するか添付図面に示す各種素子の相対的位置に関しては、図示の、あるいは記載した具体的な位置および相対的な位置に制限をされるものではない。さらに、当業者ならば、光ビームの方向を曲げるか変更するために使用できる広い範囲の素子について熟知しているはずである。従って、必ずしも実質的な細部にわたって説明しないが、本発明にはこのような機構および/またはこのような各種の素子を使用することが意図されている。例えば、本明細書に記載する各種の構成部材および素子については、使用するスペース量を最小化するように、あるいは具体的な位置または領域にフィットするように構成することができる。また、ほぼ無限数の構成や相対的位置が可能である。 20

【 0 0 1 8 】

一部の実施態様では、光学的対物レンズ 16 は N A が 0.45 で、倍率が 10 倍の無限補正式対物レンズの形を取ることができる。これら仕様に適合する対物レンズは市販のサイトメータに使用されている対物レンズに匹敵し、幅が 10 μ m 、長さが 1.6 mm のレーザーラインの発生を有効に維持することが判明している。例えば Sinclair et al (2004) 、ハイパースペクトルマイクロアレイスキヤナーの設計、構成、特徴化および用途を参照。 Applied Optics 42, 2079 - 2088. 幾何学的により長いレーザーラインおよびより広い視野を目的とする場合には、直径が 75 mm 、 N A が 0.62 で焦点長さが 60 mm の A L 7560 - A (Thor Labs, Inc (米国ニュージャージー州ニュートン) 製) などの非球面レンズを使用することができる。この対物レンズは無限補正光路、大きな直径および高い N A をもつため、適切なパウエルレンズとペアで使用した場合に長さが数十 mm のレーザーラインを発生することができる。さらに、 N A が高いため、広い視野にわたって感度よく光学的集光を確保できる。これらレンズの場合実行可能な実施例が得られるが、単独素子レンズ(非球面レンズなど)、多数の素子レンズや異なる仕様をもつ対物レンズなどの任意の対物レンズも使用可能である。 30

【 0 0 1 9 】

図 2 に第 2 実施態様を示す。この実施態様では、ベッセルビーム 24 を使用してサンプルストリーム 16 の多数のストリームから同時にデータを引き出す。ベッセルビームは非屈折性で自己修復性のレーザービームであり、アキシコンとして知られている円錐レンズを介して光をフォーカシングすることによって発生できる。ベッセルビームが光路中の障害物から散乱すると、散乱光および非散乱光が干渉し、元の波面を再度形成する。従って 40

10

20

30

40

50

、フロー・チャネルの幅全体に対して直交した状態でサンプルストリームからデータを引き出すようにベッセルビーム 24 を設定すると、このビームの自己修復特性によって相互に干渉する粒子の隣接ストリームの励起に対する影響を最小限に抑えることが可能になる。

【 0 0 2 0 】

図 3 に第 3 実施態様を示す。この実施態様では、望遠鏡 26 を使用して、入ってくる光路または出でていく光路のサイズを調節する。以下により詳しく説明するように、アレイ検出器 22 の焦点面内の像面またはスリット 92 にマスク 90 を配置し、光学的対物レンズ 16 およびサンプルストリームアレイ 18 の構成/角度を各種の設計要件または目的に応じて変更することができる。

【 0 0 2 1 】

以上説明したように、本発明のシステムはサンプルストリームアレイを有する。一部の実施態様では、このアレイによって一つのサンプルを多数のストリームに、場合によっては数百のストリームに分離することができる。これらストリームは多くの方法：1. 流体力学的なフォーカシング(hydrodynamic focusing)を利用して粒子の位置を設定するミクロな流体チャネルを使用する方法、2. 誘電泳動を利用して粒子の位置を設定する誘電泳動合焦 (Dielectrophoretic focusing) 方法、3. 定在超音波または表面音波を使用して粒子の位置を設定する音響フォーカシング(Acoustic focusing) 方法、4. “慣性フォーカシング(inertial focusing)”、即ち微細構造体からの誘導フローを使用して粒子の位置を設定するミクロな流体チャネル(Microfluidic channels) 方法によって発生することができる。これらの方法うち任意の方法を使用して、励起ラインを越えて流れる粒子ストリームの正則アレイを発生することができる。

【 0 0 2 2 】

ストリームアレイを実現する一つの機構では、多数のサンプルストリームを発生する音響定在波を使用する音響フォーカシングの使用によって実現できる。フローサイトメトリーやその他の用途に好適な多数のサンプルストリームを発生するために音響フォーカシングを使用することは、例えば本出願人によって 2011 年 7 月 29 日に出願された米国特許出願第 13/103,756 号明細書に記載されている。手短に説明すると、図 4 に示すように、音響波発生装置 30 が毛細管またはフロー細胞 34 の幅全体にわたって音響波場 32 を発生する。この音響波場の各種節 (node) 40 に毛細管 (フローの方向は矢印 38 によって示す) を介して流れるサンプル中の粒子 36 が、同じ毛細管において多数の平行な粒子ストリーム 42 を発生する。また、音響波場は圧電素子などによって発生することができる。一部の実施態様の場合、第 2 圧電素子 44 を第 1 素子の対向側に設けて、フィードバック信号を取得することができる。

【 0 0 2 3 】

なお、音響波場を使用すると、一つのチャネルに多数のストリームを発生できる。例えば、一つのチャネルに 37 の音響的に分離したストリームを発生することができた。本明細書において、“チャネル”は分割を行う物理的な構造体を意味するものとし、また“ストリーム”または“フローストリーム”は移動流体サンプル内部の粒子が取る具体的で、かつ判別可能な移動路を意味するものとする。

【 0 0 2 4 】

さらに、本発明のシステムは多数のチャネル内の音響フォーカシングによって多数の平行粒子ストリームを発生することによって多重化できる。チャネルに音響フォーカシングしたストリームを併用すると、データを引き出すために数百のストリームを得ることができる。

【 0 0 2 5 】

各チャネル内において、チャネル当たりの節数は下記の式 1 によって定義される。式 1 中、 C_m は媒体中の音速であり、N は目的の節数であり、そして W は周波数 の一次元音波が伝搬する方向におけるチャネルの幅である。一例として、微細作成したチャネル数が 100 で、各チャネルの音響フォーカシングしたストリーム数が 3 で、従って合計で個々のストリーム数が 300 のシステムを構築することができる。

10

20

30

40

50

$$\text{式 1 : } = \frac{C_m N}{2 W}$$

【0026】

速度および効率をより高くするためには、サンプルストリームは Edwards et al. (2001) HTTPS フローサイトメトリ：“a novel platform for automated high throughput drug discovery and characterization” Journal of biomolecular screening 6, 83-90. に記載されているシステムなどの高スループットサンプリングシステムを併用すればよい。このシステムの場合、10 単フローサイトメータに接続すると 384 - ウェルプレートを 10 分以内で処理できる（例えば Edwards et al. (2009) High-content screening: flow cytometry analysis. Methods Mol Biol 486, 151-165 and Edwards et al. Cluster cytometry for high-capacity bioanalysis. Cytometry, Part A: the journal of the international Society for Analytical Cytology 81, 419-429 を参照）。

【0027】

具体的な実例として、上記フローセルを採用して単サンプリングプローブから一つかそれ以上のフローストリームを誘導することによって、また Edwards システムのサンプリングプローブ数を 16 まで増数することによって、サンプルの処理数に関してサンプルスループットを、そして各サンプルの単位時間当たりの分析容量を柔軟に高くすることができた。例えば、16 のサンプリングプローブを使用すると、システム単独で、サンプリングアームの一回の位置決めで 384 - ウェルプレートのカラム全体を処理できることになる。また、これによってプレート処理時間が 16 分の 1 に短縮することになる。あるいは、4 - プローブ構成の場合には、単サイトメータプレートのサンプリング時間が 4 分の 1 に短縮し、これに対応して分析サンプル容量が 4 倍大きくなる。これは分析対象のセルがセル全体のごく一部であるか、あるいはセル濃度が不可避的に低いサンプルに対して重要な特徴になる。20

【0028】

また、音響波場を使用すると、音響場の存在によって確保される特性を活用できる評価および実験を行うことができる機会も得られる。例えば、正および/または負の音響コントラスト粒子を使用すると、分別用途、分離用途や精製用途に使用可能になる。本発明システムとともに使用するのに好適な音響コントラスト粒子の実例は、2010 年 5 月 11 に出願された PCT/US10/34415 の米国移行出願である米国特許出願第 13/320,476 号に開示されている粒子である。30

【0029】

図 5 は、強力な生化学分析技術の一部として単分散性を示す負の音響コントラスト粒子を使用することができる方法を説明する概略図である。例えば、予め生物学的サンプル 122 を混合しておいた生物特異性を示す負の音響コントラスト粒子 120 は、音響圧力放射場（音響定在波場、円筒波場や球面波場など）を使用すると、他の（正の音響コントラスト）粒子 124 から分離できる。音響圧力放射場（例えば音響ダイポール励起場）は、正の音響コントラスト粒子を最小圧力ポテンシャル（pressure potential minima）（例えば、圧力節：pressure nodes）にフォーカシングでき、また負の音響コントラスト粒子をフローセル内の最大圧力ポテンシャル（pressure potential maxima）（例えば、圧力波腹：pressure antinodes）にフォーカシングできる。（負のコントラスト粒子を含有する）波腹および（セルおよびその他の正のコントラスト粒子を含有する）節の相対位置がアレイ検出器の全体にわたる特異位置に写像することになる。従って、この分析方法を使用すると、負のコントラスト粒子を直ちに直接測定でき、また同時に正のコントラスト粒40子を測定することができる。

子およびセルを分析できる。

【0030】

図1～図3に戻って説明すると、（音響フォーカシング機能をもつ、あるいはこれをもたない）各種タイプのチャネルを使用すると、標準的なフローサイトメトリを使用する流体力学的フォーカシングチャネルを始めとする目的数のフローストリームを発生できる。好適なチャネルの実例を挙げると、光学的に薄い壁の矩形ガラス毛細管から形成したチャネル、シリコンチップ製の機械加工フローセル内のチャネルをエッティング処理して形成したチャネルや、これらの併用チャネルがある。

【0031】

一つの具体的な実施態様では、本発明のシステムは、具体的な壁寸法に対処できるように設計された圧電素子に結合した壁の厚い、光学的に透明な矩形毛細管から構成したチャネルを有する。この方法は光学的アクセス性にすぐれているが、場合によっては、例えばチャネルを音響フォーカシングと併用した場合には、壁の厚い毛細管が音響エネルギーを有効に伝達できないことがある。この場合には、システムにマッチしたインピーダンスをもつPZTドライブを使用することが望ましい。

10

【0032】

図6は、チャネルをエッティングによりガラス基体に形成した別な具体的な実施態様を示す図である。図示の実施態様では、多数のチャネル52を有するエッティング処理したガラス50の上部にガラス54を被覆する。図示のように、エッティング処理したガラスの下に音響変換器56を適宜設けることができる。この実施態様は、レーザーライン58をアレイに向けた図1に示すシステムなどのシステムに使用するのに好適である。

20

【0033】

図7は、シリコン層60中全体にチャネル61をエッティング処理したさらに別な具体的な実施態様を示す概略図である。この実施態様では、チャネルは上部ガラス62および下部ガラス64の両方を有する。図示のように、エッティング処理したガラスの下に音響変換器65を適宜設けることができる。この実施態様は、レーザーライン66をアレイに向けた図1に示すシステムなどのシステムに使用するのに好適である。

20

【0034】

図8は、さらに別な具体的な実施態様を示す概略図である。この実施態様では、機械加工したフローセル70は上部および下部にガラス製の側部72を有するため、図1に示すシステムなどのシステムに使用する好適な落射蛍光励起および検出が可能になる。これに変えて、あるいはこれに加えて、機械加工したフローセル70にさらにレーザーウィンドウ74を設けてもよく、こうすると、（図2に示す実施態様に例示するように）ベッセルビーム76を粒子励起手段として使用するさいにこのチャネルを使用することが可能になる。

30

【0035】

なお、音響フォーカシングを使用して単チャネルに多数のフローストリームを発生する場合、この音響フォーカシングに対処できるように、あるいはこれを強化できるように、あるいはこれを可能にするようにチャネルを修正することが望ましい。例えば、チャネル側壁にさらにチャネルの幅に対してテーパリングする幅の広いPZT取り付け領域を設定すると、音響エネルギーを水性媒体にフォーカシングする（focus）ことができる。これに変えて、あるいはこれに加えて、例えば粒子の上下（垂直）方向位置を制御することが望ましく、この制御を行うと、一定に維持された粒子速度を確保でき、また光学的にデータを引き出し、容量サイズを最小限に抑えることができる。このためには、例えば、2つの変換器（図9）を使用してチャネル高さに対して周波数マッチングを行えばよく、あるいはチャネル高さが粒子直径の2～5倍程度（図10）の場合には浅いチャネルを使用すればよい。

40

【0036】

図9は、粒子の上下方向位置を設定するためにマッチングした音響波を使用するか、あるいは2つの変換器を使用するチャネルを示す縦正面図である。この図において、チャネ

50

ルのフローは図から出る方向にある。この実施態様の場合、マッチングした音響波 80 が上下方向に拘束された節を形成する。あるいは、2 つの変換器を使用して一つの垂直節 84 を構成すればよい。これらの垂直拘束方法は特に深いチャネルを使用する場合に望ましい。

【 0 0 3 7 】

これに変えて、あるいはこれに加えて、図 10 に示すように、チャネルの天井および床によって上下方向に粒子を拘束する場合には、上下方向位置制御手段として深いチャネルを使用することができる。音響定在波が粒子を左右方向に拘束すると、上下方向のフロー形状によって誘導される慣性揚力が高い粒子濃度において一様に均一な粒子間隔で流れを誘導し駆動するものと考えられる。この間隔があると、分析領域で粒子が一致することを排除することによって分析速度が最大化する。これら“慣性効果”は、粒子がフローチャネルの横断面のかなりの部分を占める場合に発揮されるものであり、狭い慣性チャネル内においては実証されているが、狭いチャネル内で粒子濃度が高くなると、チャネル詰まりが生じる。ところがこの実施態様の場合、左右方向に物理的なバリヤがないため、チャネル詰まりが発生せず、フローが速くなり、また粒子サイズも大きくなる。

10

【 0 0 3 8 】

従って、本発明のシステムも直径が 70 μm (従来のフローサイトメトリシステムで分析されていた粒子の代表的な粒子直径) 未満の粒子を分析できるが、本発明のシステムでは直径が 1,000 μm 以下の粒子、例えば 1 ~ 1,000 μm 、70 ~ 1,000 μm 、70 ~ 500 μm 、70 ~ 200 μm やこれらの間にある粒子を容易に分析できる。さらに、本発明システムは (従来のフローサイトメトリシステムに見られる) 250 $\mu\text{L}/\text{分}$ 未満の流量に対処可能であるが、50 $\text{mL}/\text{分}$ 以下 の流量、例えば 0 ~ 50 $\text{mL}/\text{分}$ 、250 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 25 $\text{mL}/\text{分}$ 、1 $\text{mL}/\text{分}$ ~ 10 $\text{mL}/\text{分}$ やこれらの間にある流量にも対処できる。加えて、従来のフローサイトメトリシステムの分析速度は 70,000 粒子/秒またはそれ以下 (従来の小粒子を分析するフローサイトメトリシステムにおいて見られる分析速度) であるが、本発明システムの分析速度は 1×10^6 粒子/秒以下、例えば 1 粒子/秒 ~ 1×10^6 粒子/秒、 1×10^4 ~ 1×10^6 粒子/秒、 1×10^5 ~ 1×10^6 粒子/秒かこれらの間にある分析速度である。

20

【 0 0 3 9 】

なお、以上のチャネル設計のうち任意の設計またはすべての設計を組み合わせて使用しても、対象となる具体的な領域に適切に対処できるチャネルを製作することができる。例えば、具体的に例示する実施態様では、高いスループットのフローセルはエッティング処理した 8 つのチャネルを有することができ、その幅は 148 μm で、その深さ 40 μm である。10 MHz 駆動の場合、各チャネルは 2 つの音響的にフォーカシングしたフローストリームを支持する。チャネル間に 46 μm の壁を使用すると、8 つのチャネルが得られ、1.6 mm の全幅にわたるフローストリームの合計数は 16 になる。MHz 駆動周波数は、音響定在波の放射力が駆動周波数に比例するため、フォーカシングに対してきわめて効果的になる。さらに、1 MHz 以上の音響定在波の場合でもキャビテーションは発生せず、またセルの損傷も生じない。さらに、チャネル深さを 40 μm にすると、セルの上下方向位置を設定できるとともに、慣性間隔を設定できるため、分析精度および分析速度を改善できることになる。チャネル数およびチャネル寸法は容量スループットを高くする必要があるが、分析速度については低くする必要がある用途、あるいは粒子の大きい用途に応じて変更できる。これらの場合、多数のチャネルを使用することが望ましい。例えば、間隔が 50 μm で、1.48 MHz で駆動する 500 × 500 μm の正方形チャネルを 3 つ使用すると、各チャネルの上下方向中心かつ左右方向中心に一つの節が発生することになる。

30

【 0 0 4 0 】

別な具体的に例示する実施態様では、幅が 1.6 mm で駆動周波数が 7.4 MHz の、深さが 40 μm のチャネルを有するようにフローセルを設計すると、1.6 mm のチャネル全体にわたって 16 のストリームが発生することになる。特に、これらチャネルの場合

40

50

、高さが $40 \mu m$ と低いため乱流が発生するが、高い線速度 ($\sim 10 m/秒$) で効果的に利用できることになる。

【0041】

さらに別な具体的に例示する実施態様では、大きな粒子の用途を対象として、フローセルは幅が $2,000 \mu m$ で深さが $400 \mu m$ のチャネルをもつように設計できる。1.48 MHz で駆動すると、これらチャネルは4つのフローストリームを発生し、第1ストリームおよび第4ストリームは最も近い側壁から $250 \mu m$ 離れ、各ストリームは他の各ストリームから $500 \mu m$ 離れることになる。このようなシステムの場合、直径がほぼ $350 \mu m$ 以下の粒子を使用することができ、粒子が大きく、かつ容量が大きい用途において効果的である。

10

【0042】

上記に説明したように、フローストリームアレイ中の粒子が一旦励起すると、この励起から生じる光が集光され、一つかそれ以上アレイ検出器にイメージングされる。各種実施態様では、集光は落射蛍光集光路によって行う。図3に戻って説明すると、ビーム拡大器 (beam expander) として望遠鏡26を使用すると、最適な画像サイズをアレイ検出器に設定することができる。さらに、マスク90をアレイ検出器の像面に設けると、フローセルからの散乱および隣接ストリーム間のクロストークを制限することができる。解像度が $20 \mu m$ のマスクは、例えば、深淵反応性イオンエッティングを使用して $500 \mu m$ の厚さのシリコンウェーファから製作することができる。あるいは、各検出器の焦点面にスリット92を形成してもよい。さらに図3に関して説明を続けると、図示のように、落射蛍光、SSC (側方散乱光) や直交蛍光を始めとする各種タイプの集光路に対処できるようにサンプルストリームアレイおよび/または光学的対物レンズに角度を付けてもよい。

20

【0043】

上記に説明した図1、図2および図3に示すように、各種の構成部材の特定の構成に関係なく、本発明のシステムでは励起粒子からの光が集光され、フローストリーム当たり一つの検出器の相關関係で一つかそれ以上のアレイ検出器に照射される。当業者ならば、本発明のシステムに使用するのに好適な広い範囲から選択されるアレイ検出器について知悉しているはずである。

【0044】

第1の例示的な実施態様の場合、多数のPMTからなるアレイ検出器を使用することができる。一つの例示的な検出器は浜松H7260-20PMTモジュール (浜松ホトニクス株式会社、日本) であり、このモジュールはチャネル数が32、幅 $800 \mu m \times$ 高さ $7 mm$ のセンサ間の間隙が $200 \mu m$ 、スペクトル範囲が $200 - 020 nm$ 、立ち上がり時間が $n s$ 、およびゲインが 10^6 倍である。これら特性によって32の密接PMTが必然的に得られ、その性能特性によってPMTがフローサイトメトリにおける主検出器になる。本発明のシステムの場合、各フローストリームがPMTの個々のチャネルに相關するように、フローストリームをこれらPMTにイメージングする。

30

【0045】

別な実施態様では、アレイ検出器はemCCDカメラ、CCDカメラ、またはCMOSカメラであればよく、あるいはこれらを利用した検出器であればよい。この場合、ストリームの位置がカメラ内の具体的な画素位置に相關する。emCCDカメラの一例はLucia S (Andor Technology、PLCベルファスト、北アイルランド) であり、 256×256 解像度におけるフレームレートは 217 フレーム/秒である。このカメラには2つの利点、即ち解像度がより高いため 100 までのフローストリームを測定できる第1の利点、そして光学的事象を定量化するためにオフラインで処理できる画像を直接ストリーミングすることによって、取得システムを使用する必要がない第2の利点がある。図11は、このようなシステムによって得られると考えられるデータのタイプを説明する図である。分析速度を高くするために、サンプリング速度の高い ($> 32,000$ フレーム/秒) のemCCDカメラ、CCDカメラ、またはCMOSカメラも使用できることはいうまでもない。

40

50

【0046】

本発明システムを使用して実施できる例示的な実験は、血液内に稀に見られる事象の検出であり、血液サンプルを単に希釈してから希釈血液をシステムに流せばよい。例えば循環する腫瘍細胞などの血液に稀に生じる事象を検出するには、本システムの場合、細胞数が 5×10^9 の血液の 1 立法センチメートル当たり 100 のターゲット細胞を検出する必要がある。この検出を行うためには、容量流量を分析速度に合わせることが臨界的に重要である。即ち、血液を 1,000 倍希釈し、1,000 立法センチメートルにする。チャネルの横断面積が $1,600 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ であり、そしてパラボリック特性のピークにおける線速度が 5 m/秒 (平均線速度: ~ 2.5 m/秒) であることを考慮すると、容量流量は ~ 10 立法センチメートル / in に設定することになる。この結果、容量分析時間は ~ 100 分になる。分析流量を容量流量と比較するために、サンプル中の細胞すべてを分析し、通常の血液の ~ 45 % ヘマトクリット値を想定するものとする (0.45 立法センチメートルには最初 5×10^9 の細胞が存在する)。従って、各細胞は 9×10^{-11} 立法センチメートルと推定でき、球状細胞の直径は ~ 6 μm になる。ここで考えられる音響フローセルの濃度ファクターはフローセルの横断面積のフォーカシングしたストリーム (~ $6 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m} \times 16$ ストリーム) に対する比によって算出でき、111 である。これによつて、フォーカシングしたストリーム中の血液細胞が正常血液と比較してわずかになる (~ 45 細胞容量 % * 111 / 1,000 = 5 % 細胞 (容量比))。従って、一様に均一な細胞分布を考えると、各細胞は 20 細胞 (1.8×10^{-9} 立法センチメートル) の等価容量だけ分離されることになる。また、直径が一つの細胞と等価な円筒形のフォーカシングしたストリームによって細胞間の距離が円筒の容量式 [距離 = 容量 / $\pi r^2 = 1.8 \times 10^{-9}$ 立法センチメートル / ($\pi (3 \times 10^{-6})^2$) 平方センチメートル] により算出でき、64 μm であると想定する。また本発明のモデルの場合、フォーカシングしたストリーム中の細胞速度が 5 m/秒、細胞直径が 6 μm 、中心/中心間隙が 64 μm (エッジ/エッジ間隙が 58 μm) であると想定する。従つて、幅が 20 μm のレーザーを使用した場合には、直径が 6 μm の細胞の (ビームが入射する入射エッジから出射エッジまで) 横断時間は ~ 5 μs になる。同様に、一つの粒子からビームが射出する出射エッジと次のビームが入射する入射エッジとの間の間隙は ~ 8 μs になる。これは、13 μs 当たり一つの細胞に相当する取得速度である。即ち、ストリーム当たり ~ 77,000 細胞/秒であり、16 のストリームに対して ~ 1.23×10^6 細胞/秒である。この速度では、 5×10^9 の細胞を分析するために ~ 70 分必要とし、ほぼ等しい分析速度および容量流量の目的の最適な性能を実現できることを意味する。これらモデルは、希釈してから分析するだけで、血液 1 mL 当たり 100 という少ない細胞を検出できることを説明するものである。この検出は、従来のフローサイトメトリを使用した場合には数日必要とする検出である。ストリーム数が 32 ~ 100 の検出器具の場合、流量の許容範囲がより広く、あるいは分析速度がより高速になる。

【0047】

以上記載してきた具体的な方法および組成は好ましい実施態様を示すもので、例示であり、発明の範囲を限定するものではない。これら以外の他の目的、態様および実施態様は本明細書の検討により当業者に明らかになるはずであり、特許請求の範囲に記載した発明の精神内に包摂されるものである。当業者ならば、発明の範囲および精神から逸脱することなく、本発明をさまざまに置換し、かつ修正できることを容易に理解できるはずである。以上説明してきた本発明は、具体的に本質的なものとして開示していない要素 (複数の場合もある)、限定 (複数の場合もある) がなくても実施可能である。以上説明してきた方法およびプロセスは異なるステップ順で実施してもよく、必ずしも本明細書および特許請求の範囲に記載したステップ順に限定されるものではない。

【0048】

以下に参考文献として挙げた、および/または本明細書で言及したすべての特許公報や刊行物は、本発明が対象とする分野の当業者の技術レベルを示すもので、それぞれは、あたかも全体が個々に援用されているように、あるいは全体が記載されているように本明細

10

20

30

40

50

書に援用されるものである。本出願人は、本明細書で引用した特許公報または刊行物の任意の、また全部のデータおよび情報を本明細書に物理的に利用する権利を有するものである。

【符号の説明】

【0049】

10 : システム

12 : レーザー

14 : ビームシェーパー

16 : 光学的対物レンズ

18 : サンプルストリームアレイ

10

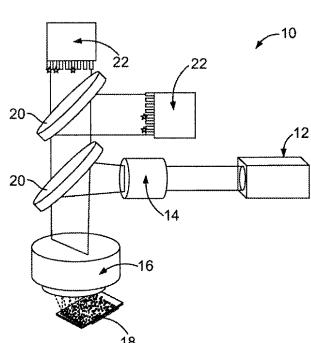
20 : ビームスプリッター

22 : アレイ検出器

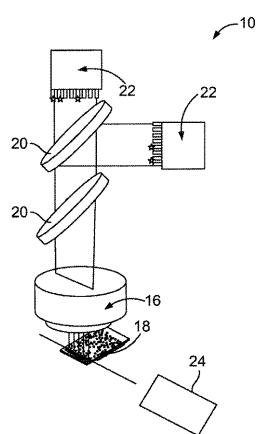
24 : ベッセルビーム

26 : 望遠鏡

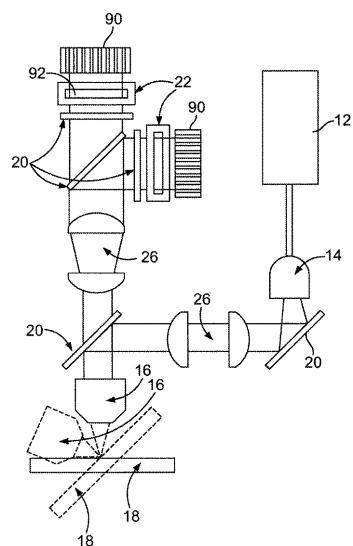
【図1】



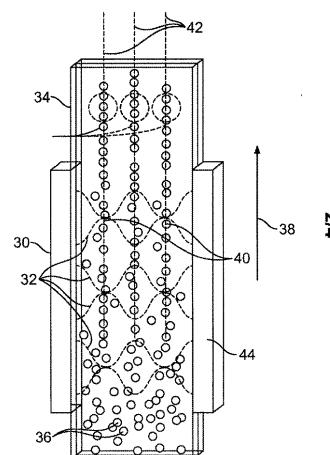
【図2】



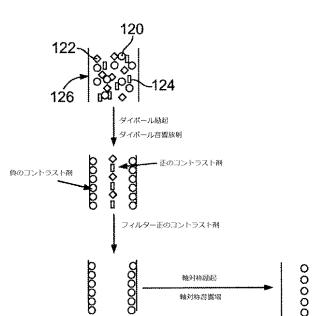
【図3】



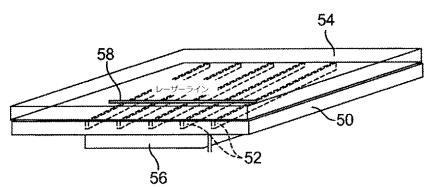
【図4】



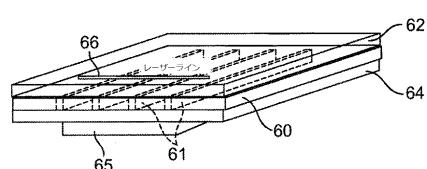
【図5】



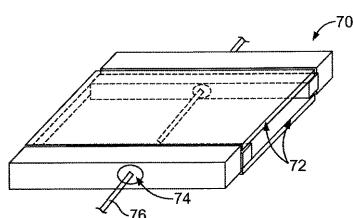
【図6】



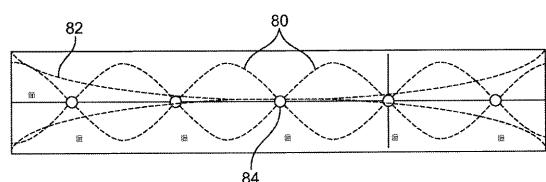
【図7】



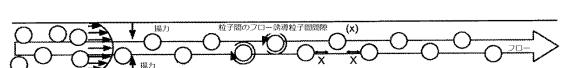
【図8】



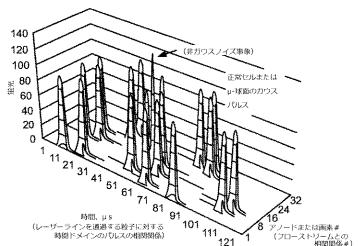
【図9】



【図10】



【図 1 1】



フロントページの続き

(72)発明者 オースティン サザンシララ, パールソン, プラシャンス
アメリカ合衆国 ニューメキシコ 87106, アルバカーキ, 222 メープル ストリー
ト エヌイー アパートメント #68

(72)発明者 シュリーブ, アンドリュー, ピー.
アメリカ合衆国 ニューメキシコ 87505, サンタ フェ, アルバラード, カレ 22
33

(72)発明者 ロペス, ガブリエル, ピー.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27705, ダラム, ライトウッド アヴェニュー
2510

審査官 渡邊 吉喜

(56)参考文献 特表平04-501462 (JP, A)
特表2007-503572 (JP, A)
米国特許第08083068 (US, B1)
米国特許第04759775 (US, A)
国際公開第2011/068764 (WO, A1)
AUSTIN, S.P.P. et al., One-dimensional acoustic standing waves in rectangular channels
for flow cytometry, Methods, 2012年 5月 3日, Volume 57, Issue 3, 第259-271頁
, U R L, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202312000370>
PIYASENA, M.E. et al., Multinode Acoustic Focusing for Parallel Flow Cytometry, Analytical chemistry, 2012年11月 2日, Vol.84, No.4, 第1831-1839頁, U R L, <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac200963n>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 15/00 - 15/14