

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6691053号  
(P6691053)

(45) 発行日 令和2年4月28日(2020.4.28)

(24) 登録日 令和2年4月13日(2020.4.13)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 15/14 (2006.01)

GO 1 N 15/14 D

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 15/14 C

GO 1 N 21/64 (2006.01)

GO 1 N 33/48 M

GO 2 B 21/06 (2006.01)

GO 1 N 21/64 E

GO 1 J 9/04 (2006.01)

GO 1 N 21/64 F

請求項の数 16 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-556971 (P2016-556971)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月18日(2015.3.18)  
 (65) 公表番号 特表2017-516073 (P2017-516073A)  
 (43) 公表日 平成29年6月15日(2017.6.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/021264  
 (87) 国際公開番号 W02015/143041  
 (87) 国際公開日 平成27年9月24日(2015.9.24)  
 審査請求日 平成30年3月15日(2018.3.15)  
 (31) 優先権主張番号 61/955,137  
 (32) 優先日 平成26年3月18日(2014.3.18)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 304056899  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 THE REGENTS OF THE  
 UNIVERSITY OF CALIF  
 ORNIA  
 アメリカ合衆国, 94607-5200  
 カリフォルニア州, オークランド, フラン  
 クリン ストリート 1111  
 1111 Franklin Stree  
 t, Oakland, CA 9460  
 7-5200, United Stat  
 es of America

(74) 代理人 100074332  
 弁理士 藤本 昇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無線周波数多重化を用いた並行フローサイトメーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の集束された粒子ストリーム内における粒子の物理的特性及び化学的特性を同時に分析するための装置であって、

(a) 複数のフローチャンネルを備えたフローセルと、  
 (b) 少なくとも1つの光励起源と、  
 (c) 第1の無線周波数出力を有する第1の無線周波数源と、  
 (d) 第2の無線周波数出力を有する第2の無線周波数源と、  
 (e) 前記第1の無線周波数出力と前記第2の無線周波数出力とを結合して、空間的に分布しているビート周波数を有する光学問い合わせビームとするよう構成された光学又は音響光学結合デバイスであって、前記光学問い合わせビームが、それぞれが前記複数のフローチャンネルのそれぞれへと導かれる複数の別々のビームを備えている、光学又は音響光学結合デバイスと、

(f) 前記空間的に分布しているビート周波数が前記装置により物理的特性及び化学的特性について分析されている前記フローチャンネル内の複数の集束された粒子ストリームに同時に及ぶように、前記光学問い合わせビームを前記複数の集束された粒子ストリームと交差するように導くよう構成された光学システムと、

(g) 前記複数の集束された粒子ストリーム内における粒子の蛍光を、前記空間的に分散しているビート周波数以内における種々異なる変調周波数において記録するよう構成された光学検出器であって、前記フローチャンネル内の前記複数の集束された粒子ストリームか

10

20

らの蛍光が、前記光学検出器により並行して記録される、光学検出器とを備えている、装置。

【請求項 2】

少なくとも第 1 の周波数シフトされた光のビーム及び第 2 の周波数シフトされた光のビームを生成するように構成された光ビーム発生器コンポーネントであって、前記光ビーム発生器コンポーネントが、

音響光学偏向器 (AOD) 及び音響光学周波数シフタ (AOF S) のうち 1 つ以上と

、

無線周波数コム発生器と

を備えており、前記第 1 の周波数シフトされた光のビーム及び前記第 2 の周波数シフトされた光のビームは、振幅変調されていて空間的に分離されている、光ビーム発生器コンポーネントと、

前記第 1 の周波数シフトされた光のビームを第 1 のフローチャネルに、かつ、前記第 2 の周波数シフトされた光のビームを第 2 のフローチャネルに、同時に導くように構成された光学装置と、

光検出器と

を備えている、装置。

【請求項 3】

前記光ビーム発生器コンポーネントが、

第 1 の無線周波数出力を有する第 1 の無線周波数源と、

第 2 の無線周波数出力を有する第 2 の無線周波数源と、

前記第 1 の無線周波数出力と前記第 2 の無線周波数出力とを結合して、前記第 1 の周波数シフトされた光のビームと前記第 2 の周波数シフトされた光のビームとを備えた光学問合わせビームを生成するように構成された光学結合デバイスとを備えている、請求項 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記第 1 の周波数シフトされた光のビームが、前記第 2 の周波数シフトされた光のビームとは空間的に分離されている、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 5】

前記光検出器が、前記第 1 のフローチャネルを通じて移動する第 1 の変調周波数における粒子からの蛍光と、前記第 2 のフローチャネルを通じて移動する第 2 の変調周波数における粒子からの蛍光と同時に検出するように構成されている、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 6】

前記第 1 の変調周波数が、前記第 2 の変調周波数とは異なる、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

前記光検出器が、前記第 1 のフローチャネル及び前記第 2 のフローチャネルを通じて  $1\text{ m/s}$  の速度で移動する粒子からの蛍光を同時に検出するように構成されている、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 8】

前記光学結合デバイスが、前記第 1 の周波数シフトされた光のビームの強度及び前記第 2 の周波数シフトされた光のビームの強度を独立して制御するように構成された音響光学結合デバイスである、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 9】

前記第 1 のフローチャネル及び前記第 2 のフローチャネルが、実質的に同一の光感度を有している、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 10】

前記第 1 の周波数シフトされた光のビーム及び前記第 2 の周波数シフトされた光のビームが、前記第 1 のフローチャネルの幅及び前記第 2 のフローチャネルの幅に及ぶのに十分な空間幅を有している、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

複数の並行フローチャネルを備えたマイクロ流体デバイスをさらに備えており、  
 前記光ビーム発生器コンポーネントは、複数の空間的に分布されている周波数シフトされた光のビームを備えた問い合わせビームを発生させるように構成されており、  
 前記光学装置は、複数の周波数シフトされた光のビームのそれぞれを前記複数の並行フローチャネルに導くように構成されている、請求項 2 に記載の装置。

【請求項 1 2】

第 1 のフローチャネルを通じて移動する粒子を備えた第 1 のサンプル成分に、光ビーム発生器コンポーネントによって生成された第 1 の周波数シフトされた光のビームを照射すると共に、第 2 のフローチャネルを通じて移動する粒子を備えた第 2 のサンプル成分に、前記光ビーム発生器コンポーネントによって生成された第 2 の周波数シフトされた光のビームを照射するステップと、

10

前記第 1 のフローチャネルを通じて移動する粒子及び前記第 2 のフローチャネルを通じて移動する粒子からの光を検出するステップと  
 を備えている方法であって、

前記光ビーム発生器コンポーネントは、

音響光学偏向器 (AOD) 及び音響光学周波数シフタ (AOF S) のうち 1 つ以上と

無線周波数コム発生器と

を備えており、

前記第 1 の周波数シフトされた光のビーム及び前記第 2 の周波数シフトされた光のビームは、振幅変調されていて空間的に分離されている、方法。

20

【請求項 1 3】

前記第 1 のフローチャネルを通じて移動する粒子及び前記第 2 のフローチャネルを通じて移動する粒子から、同時に蛍光が検出される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記第 1 の周波数シフトされた光のビームが、前記第 2 の周波数シフトされた光のビームとは異なる変調周波数を備えている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

レーザーと、

周波数シフタ要素であって、

30

音響光学偏向器 (AOD) 及び音響光学周波数シフタ (AOF S) のうち 1 つ以上と

、  
 振幅変調されていて空間的に分離されている複数の周波数シフトされた光のビームであって、同一の光感度を有する光のビームを生成するように構成された無線周波数コム発生器と

を備えている、周波数シフタ要素と  
 を備えている、装置。

【請求項 1 6】

音響光学偏向器 (AOD) 及び音響光学周波数シフタ (AOF S) のうち 1 つ以上と、  
 振幅変調されていて空間的に分離されている複数の周波数シフトされた光のビームであって、同一の光感度を有する光のビームを生成するように構成された無線周波数コム発生器とを備えている周波数シフタ要素に、レーザーを照射するステップを備えている、方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年3月18日出願の米国仮特許出願第 61 / 955 , 137 号の優先権及びその利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

50

適用なし

【 0 0 0 3 】

コンピュータプログラム付属物による提出材料の参照による組み込み

適用なし

【 0 0 0 4 】

著作権保護の対象となる題材の通知

本特許文書中の題材の一部は、米国及びその他の国の著作権法の下における著作権保護の対象となる。本著作権の権利保有者は、特許文書又は特許開示のいずれかにより、米国特許商標庁において公的に利用可能な書類又は記録に現れるように複製されることに対しては異議を持たないが、それ以外においては、著作権に係る権利の一切を留保する。これにより、本著作権者は、本特許文書の秘密を保持するための一切の権利であって、37 C. F. R. § 1.14に基づく権利を制限されることなく含む一切の権利を放棄しない。

10

【 0 0 0 5 】

技術分野

本技術の開示は、フローサイトメトリーに関し、より詳細には、各フローチャネルに対して固有に変調された光学ビームを利用する並行フローサイトメーターに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 6 】

フローサイトメトリーは、流体中の粒子の物理的特性及び化学的特性を分析するために利用されるバイオテクノロジーである。フローサイトメトリーは、細胞計数、細胞選別、バイオマーカー検出、並びに他の微生物学的及び医学的プロセスにおいて利用されている。細胞は、光学検出装置の付近を通るチャネル（複数可）内における流体ストリーム中に懸濁される。細胞の様々な物理的特性及び化学的特性が分析される（マルチパラメトリック分析）。

20

【 0 0 0 7 】

フローサイトメトリーの用途には、診断、臨床、研究が含まれており、これらには免疫学、ウイルス学、血液学、創薬などが含まれる。ここで、創薬は非常に費用及び時間のかかるプロセスであり、そのようなプロセスでは高速サイトメトリーが重要な役割を果たすことに注目する。開発費用は数十億ドルとなり、その期間は10年以上にも及ぶ。一つ一つの薬の開発に見積もられる平均費用は50億ドルを超えるが、その理由の一端としては、開発が成功した薬のそれぞれについて数多くの失敗があることが挙げられる。それ以上に問題と考えられるのは、創薬費用及び開発費用は着実に増加し続けているにもかかわらず、新薬発見における効率が低下していることである。報告によれば、費やされた数十億ドルあたりの発見された薬の数は、およそ9年毎に半減し続けている。そのため、創薬プロセス等における全ての面を改善する強い動機が存在する。

30

【 0 0 0 8 】

創薬パイプライン全体において、最終的に薬となるリード化合物を発見するための最も一般的な技術は、ハイスループットスクリーニング（HTS）である。HTSでは、数十万の（又は数百万もの）化合物が、疾患標的に対してアッセイされる。今日では、この費用及び時間のかかるプロセスは、多くの場合、大規模な実験室にて行われており、このような実験室は、多くの場合、ハイパフォーマンスコンピューティングと併せて、自動化されたロボット技術や計装を必要とする。HTSの分野では、創薬費用及び新規治療薬が市場に出るまでの時間を低減するための、正確かつハイコンテンツなデータを迅速に生み出す安価な化合物スクリーニングアッセイ及びツールに対し、普遍的かつ差し迫った要求があることが広く認められている。この分野において進歩をもちたすことができる技術であれば、それがたとえ控えめな進歩であったとしても、費用を劇的に低減すると共に全体的な効率を飛躍的に向上させる大変な可能性を有している。

40

【 0 0 0 9 】

フローサイトメトリーは、細胞生物学における多くの分野で用いられる確立された研究

50

ツールでもあり、光散乱測定と多色蛍光測定との組み合わせを用いて、ハイコンテンツな単一セルのデータを提供する。ハイスループット化合物スクリーニングにおいてまだ広くは使用されていないが、フローサイトメトリーによって得られるマルチパラメータの表現形質情報は、いくつかの個別の単一パラメータを用いた集団平均測定による従来の手法よりも、標的に対する候補化合物の効果を決定するのに遥かに優れている。フローサイトメトリーを用いて単一細胞の集団から多くのパラメータを同時に測定することにより、細胞内又は細胞集団内における複雑な細胞内相互作用及び細胞間相互作用を、ウェルレベルのスクリーニング（例えば、発光、吸光度、E L I S A、N M R、時間分解蛍光、F R E T など）に比べてより迅速に解明することができる。このハイコンテンツなマルチパラメータデータは、臨床試験中に化合物が患者上に最終的に有する効果に対するより深い洞察を本質的にもたらし、また、（例えば、受容体結合アッセイまたはレポーター遺伝子アッセイを、細胞生存率/アポトーシスアッセイと同時にを行うことにより）創薬パイプラインにおけるさらに下流のアッセイの必要性を削減又は排除し得る可能性がある。

10

#### 【 0 0 1 0 】

創薬及び他の用途におけるフローサイトメトリーのこのような疑いようのない利益にもかかわらず、現代のフローサイトメトリーのスループット（例えば、約 1 0 , 0 0 0 細胞/秒）は、製薬企業及びバイオテクノロジー企業において今日利用可能な大規模な化合物ライブラリーのスクリーニングを行うには不十分である。短期間で妥当な数を的中させるハイスループットスクリーニングを行うには、数十万の化合物を毎日スクリーニングしなければならない。さらに、既に時間及び費用のかかるものである、そのような候補薬を待っている後のテスト及び臨床試験を考慮すれば、スクリーニングアッセイの開発及び実行における莫大な費用は、該スクリーニングアッセイが妥当な時間内に完了することを必要とする。

20

#### 【 0 0 1 1 】

サイトメトリー速度及びサンプル操作速度を改善するための取組が行われており、そのような取組としては、例えば、Intellicyt社（R）によるHyperCyt（R）オートサンプラーの開発が挙げられる。これらの取組により、フローサイトメトリーを改善された速度で使用することができるようになり、384ウェルプレートで1マイクロリットルのサンプルを用いて約20分でスクリーニングすることが可能になった。このような進歩により、薬物スクリーニングにおけるフローサイトメトリーの使用への門戸が開かれたものの、この技術では、未だに蛍光プレート又はマイクロアレイリーダーに比べて少なくとも一桁以上は遅い。

30

#### 【 0 0 1 2 】

HyperCytオートサンプラーは化合物スクリーニングを実行するフローサイトメトリーの能力を大幅に向上させた一方で、計器はプレートウェルからのサンプルを逐次的に多重化して単一のストリームとしている。これにより同時に問い合わせる（interrogate）ことができるのは1つのウェルのみであり、そのためスクリーニングシステム全体のスループット（ウェル/時間）が制限される。従来のフローサイトメーターは、各ウェル期間中にHyperCytによってサンプル採取されたマイクロリットル単位の体積の細胞全てを問い合わせるのに十分なスループット（約 1 0 , 0 0 0 細胞/秒）を提供するため、オートサンプラーがスクリーニング速度のボトルネックである。384ウェルプレートあたり20分のとき、このシステムは1日あたり約 2 5 , 0 0 0 ウェルを検査することができる。これは実際のスループットを表しているが、それは業界標準のH T S目標である1日あたり 1 0 0 , 0 0 0 ウェル（またはそれ以上）の4倍遅い。マルチプローブオートサンプラーから並行して複数のフローサイトメーターを実行することにより、この数を改善するための取組が続けられているが、これらの複数計器システムの費用はすぐにとてつもない大きくなる。加えて、複数の独立した計器を較正及び制御する複雑さのためにデータが信頼できないものとなり、アッセイデータの解釈が困難になる。

40

#### 【 0 0 1 3 】

これらの困難にもかかわらず、ノバルティス研究財団（G N F）ゲノミクス研究所は、最

50

近、数百万ドルのハイスループットフローサイトメトリースクリーニングシステムを構築した。該システムは、その中核が、3つの独立したBeckman-Coulter CyAnフローサイトメーターに取り付けられた3プロブオートサンプラーにより構成されている。このシステムの提供するリッチなアッセイデータのため、GNFの職員はこのシステムを熱心を使用していることが伝えられている。この例は、創薬におけるフローサイトメトリーが有用であること、及び、これらのシステムの費用及び単純さを改善する必要があることをはっきりと示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

従って、スループットを顕著に増加させることが可能な並行フローサイトメトリー装置及び方法が必要とされている。本開示は、従来の手法の欠点を克服しつつ、この増加させられたスループットを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

開示の並行フローサイトメトリーは、新しい方法における並行フローチャネルの同時フローピングを採用することによって、現在の計装に見られる多数の制限を克服する。例示であって限定するものではないが、本開示は、無線周波数標識放射(FIRE)光学検出機構を用いた光電子増倍管(PMT)に基づく蛍光分析を、マイクロ流体デバイスと組み合わせる。

【0016】

光学エンジンは、高並行フローサイトメーターのために開示される。このようなフローサイトメーターは、サンプルのスクリーニングスループットを一桁改善させ、例えば、毎分200ウェルとする。少なくとも一実施形態では、開示の装置及び方法は、市販のマルチプロブオートサンプラーと統合することができる。

【0017】

開示の技術は、フローサイトメトリーを用いたハイスループット化合物スクリーニングに必要な時間及び費用の両方を大幅に低減する。本質的に、マルチパラメータフローサイトメトリーを使用できれば、ハイコンテンツな細胞レベルの情報が提供されると共に、サンプルウェル内のサブ集団を測定することができるため、プレートリーダーのような計器に比べてさらにリッチな情報が得られる。ハイコンテンツなイメージングもまたこれらの利点の多くを提供するが、そのようなイメージングは、懸濁細胞と共に利用される場合にはあまり効果的でなく、サンプルから意味のあるパラメータを抽出するには高度な画像処理やデータ操作が必要となる。

【0018】

提示された技術のさらなる態様は、明細書の以下の部分において明らかにされる。詳細な説明は、本技術を限定することなく、本技術の好ましい実施形態を詳細に開示することを目的とする。

【図面の簡単な説明】

【0019】

開示の技術は、以下の図面を参照することによって、より詳細に理解される。該図面は、例示のみを目的とする。

【0020】

【図1A】図1Aは、本開示の実施形態に係る単一の光学システムを使用した、並行チャネルの無線周波数標識化を用いた並行フローサイトメトリーのブロック図である。

【図1B】図1Bは、本開示の実施形態に係る単一の光学システムを使用した、並行チャネルの無線周波数標識化を用いた並行フローサイトメトリーのブロック図である。

【図1C】図1Cは、本開示の実施形態に係る単一の光学システムを使用した、並行チャネルの無線周波数標識化を用いた並行フローサイトメトリーのブロック図である。

【図1D】図1Dは、本開示の実施形態に係る単一の光学システムを使用した、並行チャ

10

20

30

40

50

ネルの無線周波数標識化を用いた並行フローサイトメトリーのブロック図である。

【図 2 A】図 2 A は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

【図 2 B】図 2 B は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

【図 2 C】図 2 C は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

【図 2 D】図 2 D は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

【図 2 E】図 2 E は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

10

【図 2 F】図 2 F は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

【図 2 G】図 2 G は、本開示の実施形態に係る高速イメージングフローサイトメトリーを用いて撮影した画像である。

【図 3】図 3 は、本開示の実施形態に従い実行されるようなフローサイトメトリーの画像である。

【図 4 A】図 4 A は、本開示の実施形態に従い実行されるように、粒子上の 1 つ以上の別個の部位にて収集されたデータの散布図である。

【図 4 B】図 4 B は、本開示の実施形態に従い実行されるように、粒子上の 1 つ以上の別個の部位にて収集されたデータの散布図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0021】

#### 1. イノベーション

本開示は、創薬等の用途において利用されるようなフローサイトメトリーのスループットを向上させるために、複数のウェル（例えば、10 個）に対し並行してサンプル採取及び読取を行うことが可能なサイトメーターを提供する。並行して液体サンプルのシッピング（sipping）/ 吸引及び操作を行う多くの商業的な選択肢があるにも関わらず、十分な光感度で高速に複数のセルを並行して問い合わせることが可能な計器は存在しない。並行フローサイトメトリーに対するいくつかのマイクロ流体手法が実証試験されてきたが、これらのシステムは、光検出器として、レーザー走査照明又はシリコン高速カメラを採用していた。これらの実証試験は、2 つの主な制限を有していた。（1）各チャネルのレーザー露光における限られたデューティサイクルのために、レーザー走査はメーター / 秒の速度で流れる細胞の並行分析をサポートしていない。（2）シリコンカメラは、明るく照明されたシーンを高速でイメージングするのに有用であるが、（i）画像ボケを回避するのに十分なシャッター速度、（ii）フローサイトメトリーにおける高いイベント率に対する十分な読み出し速度、（iii）光学問い合わせ（interrogation）領域を通るマイクロ秒の通過時間の間に、細胞によって放射される少数の蛍光光子を正確に検出するための、必要なだけショットノイズの限定された光感度をいずれも備えていない。本開示のシステムは、これらの欠点を有していない。

30

40

【0022】

一実施形態のフローサイトメトリーシステムは、多色蛍光（F I T C、P E）及び前方及び側方の散乱検出を用いて、複数（例えば、2 ~ 10 個又はそれ以上）の別々の集束された細胞ストリームを問い合わせるように構成されている。本実施形態では、F I R E 光学エンジンが慣性により集束されるマイクロ流体チップと組み合わせて好適に利用される。しかしながら、本開示は、流体力学的集束、シースフロー集束、音響集束、他の種類の粒子集束方法及びそれらの組合せを用いて集束される細胞により実施されてもよいことが当然に理解される。加えて、細胞により利用されるものとして説明されるが、本発明の装置は、細胞、ビーズ、細胞片などを含む様々な粒子ストリームを分析するために利用することができることも当然に理解される。

50

## 【 0 0 2 3 】

別の実施形態は、複数の個別のフローマイクロチャンネル上における励起／放射光の入射の周波数標識化を含むことにより前述の事項を実現し、低コストな単一の光学システムにおける検出及び分析を可能にする。これにより、多くの平行光路、フィルター、及び高価な検出器が必要でなくなる。それぞれのフローチャンネルが異なる変調周波数にて照射される結果、単一のPMT検出器は、得られる電気信号を信号処理を使用して分析した際に、複数の点から（蛍光フィルターが使用される場合、単一色の）光を検出するために利用することができる。これにより、各フローチャンネル内における粒子からの信号が、周波数ドメインにおいて符号化される。

## 【 0 0 2 4 】

開示の技術を利用することにより、システム内のそれぞれのストリームは、昨今のフローサイトメーターに匹敵する測定スループット（例えば、10,000イベント／秒を超える）が可能となり、このとき、システム全体は、複数の（この実施例では10の）独立したサンプルを同時に操作することが可能になり、したがって、フローサイトメトリーを用いることによってHTSが一桁分も高速化される。別のマイクロ流体チップを用いることにより、開示の技術はまた、希少細胞の検出（循環腫瘍細胞、がん幹細胞、循環内皮細胞など）のような他の用途のために、又は単に大規模なサンプルからのデータ取得を高速化するために、100,000イベント／秒を超える速度で単一のサンプルを操作するよう適合されることができる。

## 【 0 0 2 5 】

このようなシステムにおけるこれらのイノベーションの組み合わせによる利点は、次のように要約することができる：（a）FIREは、それぞれの並行フローストリームの照明を独立して制御するようにシステム上に構成される。このことは、それぞれの並行フローチャンネルを同一の光感度で確立するためのシステム較正にとって重要である。（b）FIREは、それぞれの蛍光測定又は散乱測定のための単一のPMTを利用するようにシステム上に構成される。これにより、低速で感度の低いカメラの使用が避けられる。このことは、PMTの数は、システムのサンプルスループットとは直線的に対応しておらず、むしろ測定されたパラメータの数と対応していることを意味する。各PMTは、該PMTの手前に蛍光放射フィルターを有しており、それによって蛍光放射の1つの色を全てのフローチャンネルから同時に検出する。技術の動作原理は、以下でより詳細に説明される。

## 【 0 0 2 6 】

A．無線周波数標識放射（FIRE）を用いた蛍光イメージング

FIREは、ハイスループットの蛍光イメージングフローサイトメトリー及びサブミリ秒の蛍光顕微鏡検査法についての速度要求を満たすために、UCLAで開発された超高速蛍光イメージング技術である。FIRE顕微鏡検査法の中心となる特徴は、別々の無線周波数にてサンプルのそれぞれ個々の点で蛍光を励起する能力であり、それによって、単一の光検出器を用いた複数の点からの蛍光検出が可能になる。この励起は、2つの干渉する周波数シフトされた光のビーム間におけるビート周波数において発生する。

## 【 0 0 2 7 】

図1A～図1Dは、本発明に係る無線周波数多重化を用いて、FIREを並行フローサイトメトリーに利用する一実施形態10を示す。レーザー12（例えば、488nm励起）はビーム14を出力し、該ビーム14は、ビームスプリッタ16（例えば、非偏光）によってマッハツェンダー干渉計の2つのビーム18a, 18bに分割される。第一のアーム部18aにおける光は、信号のピーク出力に対する平均出力の比を最小にするように設計されている位相操作された無線周波数コム24によって駆動される音響光学偏向器（AOD）22により、周波数シフトされる。図1Bに見られるように、このRFコムは、AOD22に、出力角及び周波数シフトの両方の範囲を有する複数の偏向光学ビーム24を発生させる。AODからの出力24は、他方のアームと組み合わせるため、ミラー26によって反射される。複数の流体チャンネルを備えた励起ビーム間の相互利用には、RFコム発生器が、空間的に異なる振幅変調されたビームを発生させるように構成されていること

10

20

30

40

50



を必要とすることは、当然に理解される。画像を収集するために構成されている場合、個別のフローストリームを分析するにはコム周波数の間隔が近すぎる。RFコム発生器のこの構成は、「疎」の周波数モードと称することができる。

#### 【0028】

干渉計の第2のアームは、ビーム18bを有し、該ビーム18bはミラー20から、続いて音響光学周波数シフタ(AOFS)28を用いて周波数がシフトされるように反射される。AOFS28は、直接デジタル合成(DDS)無線周波数(RF)トーン発生器30から信号を受信して、局部発振器(LO)ビーム32を発生させる。

#### 【0029】

AOFSの後に配置されているシリンドリカルレンズ33は、LOアームの発散角をRFコムビームの発散角に合わせる。第2のビームスプリッタ34にてビーム27及び32を結合した後、2つのビームは、従来のレーザー走査型顕微鏡レンズシステムを用いて、サンプル上の線に一致する36に集束される。周波数シフトされたビームの一致する対を発生させるための1つ又は複数の音響光学デバイスについての他の構成もまた開示される。あるいは、複数の電気光学変調器、液晶変調器又は他の光変調器のような他のシステム構成は、複数の独立した励起光ビームを1つより多くの固有の周波数で振幅変調するために採用することができ、それにより、単一のPMT検出器を、すべてのフローチャネルからの蛍光放射又は散乱放射を同時に分析するように使用することができる。

#### 【0030】

顕微鏡レンズシステムは、2つの異なる波長にて異なる反射/透過特性を提供するダイクロイックミラー(DM)38を用いて示される。ダイクロイックミラー38は、ポンピングレーザ光を反射すると共により長い波長の光を透過する。このとき、ダイクロイックミラー50は、それぞれのPMTが異なるスペクトル帯域における光量を分析できるように、蛍光放射の異なる色を分割する。また、ダイクロイックミラー50は、蛍光放射の異なる色を分離するための手段として、フィルター46, 48と共同して動作することを理解されたい。周波数帯域について光学分離を行うための多くの技術が知られているように、本発明は、蛍光放射の帯域を分離するためのミラーフィルターの組み合わせを使用することに限定されるものではない。DM38からのビーム54は、ミラー56からレンズシステム58, 60を通過して対物部62へと反射され、ここで、複数のフローチャネル64が読み取られるために結合される。なお、図示の構成における光学系は、画像を撮影する際に利用され得るような、走査ミラーをミラー56に使用する等の角度走査機構によって構成されていないことが当然に認識される。本開示では、分析が行われるサンプルの幅方向における離散点(又はいくつかの離散点)上にデータが集められる。

#### 【0031】

対物部62から反射された光学信号は、レンズ58, 60、ミラー56及びDM38を通過し、ビーム52として、第2のDM50に衝突して複数のビームに分離し、該複数のビームは、蛍光放射フィルター(EF)46, 48を通過して光電子増倍管42, 44へと向かい、アナログ-デジタル変換器、デジタイジングオシロスコープ、多チャンネルロックイン増幅器又は他の高速データ収集システムのようなデジタル化記憶システム40によって読み取られる。

#### 【0032】

なお、光電子増倍管は、それらの通常用途におけるイメージングデバイスではないが、ソースビームからの光子活性を多重化して電気出力に変換するように動作することが当然に理解される。それぞれのPMTは、分析される粒子の特定の特性についての情報を収集するために利用される。このことは、これらの異なる特性が異なる波長で作用する蛍光体で標識されているという理由による。蛍光体は、特定の波長(範囲)における光エネルギーを吸収して、より長い波長の光を再放射することが認識される。

#### 【0033】

図1Cでは、ビームスプリッタ34での光波相互作用が示されており、この光波相互作用では、第1の信号27( $\omega_0 + \omega_{LO}$ )と第2の信号32( $\omega_0 + \omega_{RFN}$ )とが相互作用

10

20

30

40

50

して、結合された信号 36 ( $R_{FN} - L_O$ ) を出力する。これらの出力ビームは、図 1 D に示されるように、並行フローチャンネル 70 内の粒子を励起する振幅変調されたビームに含まれる周波数の範囲を表す。

#### 【0034】

上記試料中の蛍光分子は 2 乗検波器として機能する（それらの励起は電場全体の 2 乗に応じる）ため、その結果生じる蛍光は、上記干渉計の 2 つのアームの周波数の差によって規定される様々なビートにおいて放出される。音響光学デバイスは本質的に共振デバイスであるため、該干渉計の第 2 のアームにおける周波数シフタ (A O F S) 28 は、所与の蛍光体に使用可能な帯域幅を最大化する目的で、ビート周波数を基底帯域にヘテロダインするように選択される。この場合には A O F S が利用されるが、他の実装は、第 2 の A O D 又は他の音響光学デバイスを利用して、単一の電子トーン又は周波数コムによって駆動され得る。

#### 【0035】

図示を簡略化するため、図 1 A は使用されている 2 つの P M T のみを示しているが、複数のフローチャンネルにわたる追加の粒子特性を同時に記録するために、より多くの P M T が追加され得る。一実施形態では、L O ビームの発散を R F ビームの発散に合わせるために A O F S の後ろに配置されたシリンドリカルレンズ 33 は、回折順序が逆である 2 つの A O D を使用することによって（A O F S の位置にて使用するが、シリンドリカルレンズは使用せずに）置き換えられる。これら 2 つの A O D は、サンプルにて個別の問い合わせビームを発生させるために使用される。

#### 【0036】

図 1 D は、本発明の多チャンネル問い合わせ手法の実施形態 62 についての拡大図である。複数のフローチャンネル 70 ( $w_1, w_2, w_3, \dots w_N$ ) 内の細胞は、固有のビート周波数で変調された対物部 64 及びレンズ 66 を通過するビーム 68 によって並行して励起される。少なくとも一つの実施形態（図示しない）では、前方散乱 P M T 検出器は、最終的なサイトメーター設計に含まれる。後方散乱検出は、光電子増倍管 42 及び 44 と同様の位置に P M T を使用することによって、従来の側方散乱検出チャンネルを置き換えることができる。

#### 【0037】

F I R E は、サンプル上の別々の点からの蛍光を固有の無線周波数にて同時に励起することによって動作する。それぞれの点からの励起（及び、それによる放射）が固有の周波数で標識化されているため、単一の P M T を複数の空間点からの落射蛍光を収集するために使用することができ、サンプルの蛍光放射、例えば並行フローチャンネルのアレイにおけるサンプルの蛍光放射を分析するために出力信号のフーリエ変換が使用される。複数の個別の細胞ストリーム中における予め規定された位置にて蛍光を励起するため、光学設計は、複数の離散点（例えば、10 の離散点）が振幅変調されたビーム又は周波数シフトされたビーム対によって照明されるように構成される。複数の離散点における照明は、A O F S 及びシリンドリカルレンズを使用する場合のように、フローチャンネル間の領域におけるレーザーパワーを無駄にすることなくそれぞれのフローチャンネルにおけるレーザーパワー入射量を最大化する構成であるが、該システムの本実施形態は、依然として単一のデバイス検出器を使用した複数のフローチャンネルの分析を可能にする。

#### 【0038】

図 2 A ~ 図 2 G は、ストリーム内の単一粒子から蛍光イメージングが表すものを示すイメージングフローサイトメトリーを実行するために、F I R E を用いた実験の結果を示す。この例では、1 m / s の速度でマイクロ流体チャンネル内に流れる M C F - 7 乳がん細胞が示される。全ての画像は、DNA 染色剤 S y t o 16 により染色された M C F - 7 乳がん細胞であり、これらは 60 倍、0.70 N A の対物レンズを用いて撮影されている。図 2 A には、1 m / s の速度で流れる細胞の代表的な F I R E 画像が見られる。これらの画像は、800 k H z のピクセル周波数間隔、及び、ピクセルあたり 54  $\mu$  W の 488 n m レーザーパワーを用いて撮影され、これらは対物部の前で測定された。図 2 B 及び図 2 C

は、比較のため、 $1\text{ m/s}$ の速度で流れる個々の細胞についての単一 $10\text{ }\mu\text{s}$ 露光のフレーム転送EMCCD画像を表す。電子増倍器のゲインは、最も大きな画像SNRを生成するように調整し、EMCCD垂直シフト時間は、 $564\text{ ns}$ の最小値に設定した。長い露光時間及びEMCCDのフレーム転送性のため、画像中にボケが見られる。図2D～図2Gには、形態学的な参照のため、静止したMCF-7細胞の広視野蛍光画像が表示される。全てのスケールバーは $10\text{ }\mu\text{m}$ である。しかしながら、本開示は、単一のストリームにおける細胞のイメージングを行うように構成されておらず、代わりに複数のフローストリームのそれぞれにおける少なくとも1つの離散点を同時に分析するように構成されていることが当然に理解される。提示の技術によって提供されるタイプの情報の例は、図3～図4Bに記載される。

10

#### 【0039】

これらの先行試験は、125の別々の空間ピクセルから高感度で（ピクセルあたり $54\text{ }\mu\text{W}$ のレーザー励起パワーが使用される）細胞蛍光を高速で同時に問い合わせるために単一のPMT検出器を使用するFIRE技術の能力を示すのに役立つ。ピクセルの数を（1つの約 $50\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ 「ピクセル」をフローストリームごとに使用して）125から10まで減らすことによって、システムの光学感度が劇的に（ $10\text{ dB}$ よりも大きく）改善する。このことは、（i）同一のPMTに多重化されるピクセルの数が減少すること、及び、（ii）典型的には画像内の複数の隣接するピクセルが同時に「オン」となるイメージングの場合とは対照的に、細胞がマイクロ流体チップ上の光学問い合わせ領域に到着する時刻はポアソン統計に従うため、同時に「オン」となる複数のピクセルを生じるショットノイズクロストークが劇的に減少することに起因する。しかしながら、複数のセルが同時に問い合わせられている場合に、このショットノイズクロストークを考慮して、デジタル後処理により蛍光強度の補強を行うことができる。補償の概念は、フローサイトメトリーでは至る所で見られるものであり、典型的には、蛍光体の広い放射スペクトルを占めるように使用される。実際のところ、ショットノイズ補償はスペクトル補償より簡単であり、このことは、補正值が検出器の平均出力電流の平方根に単純に比例することによる。

20

#### 【0040】

### 2. 方法及び材料

並行光学サイトメトリーエンジン及び並行マイクロ流体チップの設計及び実装

視界、細胞のフロー速度、慣性集束の空間分布、及び励起レーザーのスポットサイズは、最大のスループットと最大の信号対雑音比（SNR）との組み合わせを生じるように設計されている。設計の目標は、全て $1\text{ mm}$ の視界内における、複数の（例えば、10の）並行チャンネルのそれぞれにて、10,000イベント/秒を記録することである。例として限定されないが、励起のために $488\text{ nm}$ レーザーが利用され、データを収集するために（例えば、 $10^9$ 個を超える細胞からのデータを継続して記憶可能な16ビットのメモリ深度の）既存のデジタル化電子機器が利用される。所望により、さらに良好な強度分解能のために、より高いビット深度の市販のデジタイザーを使用することができる。光の励起及び収集に係る効率はチャンネル毎に異なるようになるため、信号の差異は、蛍光参照ビーズを使用して測定される。この差異をなくすために、各チャンネルに向けられるレーザーパワーは、例えばソフトウェアにて、音響光学系を駆動するために使用される波形であるMATLABに発生させられる波形を調節することにより調節される。 $0.8\text{ NA}$ （又はより高い開口数）、20倍の顕微鏡対物レンズが、（ $0.45\text{ NA}$ 、20倍のものに比べて）システムの検出感度を向上させるために利用される。このパラメータは、本発明のシステムにより標準的な技法を用いて測定することができ、この目標の達成が $100\text{ mW}$ の $488\text{ nm}$ レーザーでは不可能である場合には、この目標を達成するためにレーザーパワーを増加させることができる。より強力なレーザー（例えば、 $1\text{ W}$ よりも大きいレーザー）が存在し、これらは感度をさらに向上させることになる（パワーを10のスポットに分割すると、チャンネルあたりのパワーは、チャンネルあたり約 $50\text{ mW}$ にまで減少する）。

30

40

#### 【0041】

A. 並行フローチャンネルを備えたFIRE

50

先の試験テンプレートは、大規模並行マイクロ流体チップを製造するために評価される。本開示は、これらのチップを別々に利用することができ、これらのチップは各ストリームの間に壁を含有している。マイクロ流体チップの様々な設計は、FIRE並行フローサイトメーターの周波数多重化された性質によって動作することが想定され得る。また、変調された光学ビームを使用して問い合わせを行うため、フローチャンネルにおいて細胞を様々な位置に位置合わせするために、流体力学的集束、慣性集束又は他の技術、及びそれらの組み合わせを利用することができることも当然に理解される。

#### 【0042】

図3は、マイクロ流体チャンネルを通る並行フローを示しており、ここでは、これらのチャンネル内の粒子は、提示の技術に従い、全て同時に検出/撮影される。図中には、複数の並行フローチャンネルが見られ、該並行フローチャンネルのそれぞれが垂直なフローの矢印でマークされている。例として、画像は、チャンネル内の2つの粒子のみを伴って撮影した。この実証試験では、励起及び蛍光の応答の撮影は、開示の技術と同様の設定を使用して行った。別々のフローチャンネル上にフローサイトメトリ測定を行うFIREの能力を実証するために、シングルポイントフローサイトメトリ測定を蛍光ビーズ上に行った。図中に示されるFIREの設定により、ポリジメチルシロキサン(PDMS)モールドを用いて作製されたチップ上の2つの並行マイクロ流体チャンネルを励起させる。 $1.0\mu\text{m}$  ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} 515/585\text{nm}$ )及び $2.2\mu\text{m}$  ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} 490/520\text{nm}$ )の蛍光ビーズからなる単一のサンプルを、シリンジポンプを用いて並行チャンネル内に平均速度 $1\text{m/s}$ で流した。チャンネル1及び2は、それぞれ、 $10\text{MHz}$ 及び $50\text{MHz}$ のビート周波数で変調された $488\text{nm}$ レーザーを用いて励起させた。

#### 【0043】

図4A及び図4Bは、PE(赤)対FITC(緑色)の蛍光強度の散布図を作成するように生データが閾値処理されて蛍光パルスが統合された後の、 $10\text{MHz}$ 及び $50\text{MHz}$ のフローチャンネルのための散布図を示す。なお、これらのプロットは、特許出願の複写を簡易にするため、単色で示されていることに留意されたい。両チャンネル内の2つのビーズ集団は、データを収集するために使用されるデジタイザーの低い解像度(8ビット)にかかわらず、明瞭に解像されている(対数増幅は使用されていない)。この実験は、約 $70,000$ ビーズ/秒( $35,000$ ビーズ/秒/フローチャンネル)の合計スループットにて実行した。この予備的な結果は、単一の光電子増倍管検出器を使用して2色並行の従来のフローサイトメトリを行い、それにより複数のフローチャンネルから各蛍光色を同時に検出するFIREの能力を明確に示している。

#### 【0044】

本明細書の記載から、本開示は、複数の実施形態を包含することが理解される。そのような複数の実施形態は、以下を含むが、それらに限定されない。

#### 【0045】

1. 複数の粒子ストリーム内における粒子の物理的特性及び化学的特性を同時に分析するための装置であって、

- (a) 少なくとも1つの光励起源と、
- (b) 第1の無線周波数出力を有する第1の無線周波数源と、
- (c) 第2の無線周波数出力を有する第2の無線周波数源と、
- (d) 前記第1の無線周波数出力と前記第2の無線周波数出力とを結合して、空間的に分布しているビート周波数を有する光学問い合わせビームとするよう構成された光学又は音響光学結合デバイスであって、前記光学問い合わせビームが、複数の集束されたストリームのそれぞれへと導かれるよう構成された複数の別々のビームを備えている、光学又は音響光学結合デバイスと、
- (e) 前記空間的に分布しているビート周波数が前記装置により物理的特性及び化学的特性について分析されている前記複数の集束された粒子ストリームに同時に及ぶように、前記光学問い合わせビームを前記複数の集束されたストリームと交差するように導くよう構成された光学システムと、

(f) 前記複数の集束された粒子ストリーム内における粒子の蛍光を、前記空間的に分散しているビート周波数以内における種々異なる変調周波数において記録するよう構成された光学検出器であって、前記複数の集束された粒子ストリーム中にわたる蛍光が、前記光学検出器により並行して記録される、光学検出器とを備えている、装置。

【0046】

2. 前記光励起源がレーザーを備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0047】

3. 前記レーザーが連続波レーザーを備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0048】

4. 前記光学結合デバイス、前記光学システム又はそれらの組み合わせが、同一の光感度を備えた各フローチャネルを確立するように、各並行フローストリームに導かれる照明を独立して制御するよう構成されている、任意の前述の実施形態における装置。

【0049】

5. 前記複数の集束された粒子ストリームが、マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体チップ内に保持されている、任意の前述の実施形態における装置。

【0050】

6. 各集束されたストリーム中の粒子の種々異なる特徴が検出されるように、それぞれが異なる変調周波数にて蛍光を記録するよう構成されている1つ以上の追加の光学検出器をさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0051】

7. 複数の前記検出器が、各集束された粒子ストリーム中における粒子の種々異なる特性に関連する異なるスペクトル帯域にて蛍光を分析し得るように、蛍光放射の種々異なる色を分離するための光学手段をさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0052】

8. マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体チップの各チャネルが、ビート周波数変調器を用いることによって、該チャネルに固有の異なる変調周波数の励起に曝露される、任意の前述の実施形態における装置。

【0053】

9. ビート周波数変調器を用いることによって、各チャネル中にて別々の無線周波数で蛍光が励起され、それにより、単一の光検出器を用いて複数の点からの蛍光の検出が可能になる、任意の前述の実施形態における装置。

【0054】

10. 前記粒子が細胞又は細胞の一部を備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0055】

11. 前記光学又は音響光学結合デバイスが干渉計を備えており、該干渉計では、前記ビームが、第1の音響光学デバイスにて受信される前記ビームの第1アームと、第2の音響光学デバイスにて受信される前記ビームの第2アームとに分割され、その後、前記ビームのこれらのアームが、再結合されると共に前記光学システムを通して導かれる、任意の前述の実施形態における装置。

【0056】

12. 前記第1又は第2の音響光学デバイスが、音響光学偏向器(AOD)又は音響光学周波数シフタ(AOFS)を備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0057】

13. 前記音響光学偏向器を駆動し、それによって前記複数の集束された粒子ストリームに及ぶのに十分な空間幅を用いたビート周波数変調を通じて空間的に異なる振幅変調されたビームの組を発生させるよう構成された無線周波数(RF)コム発生器をさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0058】

10

20

30

40

50

14．粒子の特性の分析を可能にするために粒子の記録された蛍光のデータを記憶するよう構成されたデジタル化電子機器をさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0059】

15．複数の粒子ストリーム内における粒子の物理的特性及び化学的特性を同時に分析するための装置であって、

(a) 少なくとも1つの光励起源と、

(b) 第1の無線周波数出力を有する第1の無線周波数源と、

(c) 第2の無線周波数出力を有する第2の無線周波数源と、

(d) 干渉計を含んでいる光学又は音響光学結合デバイスであって、該干渉計は、前記光励起源を、第1の音響光学デバイスにて受信される第1アームと、第2の音響光学デバイスにて受信される第2アームとに分割し、その後、前記ビームのこれらのアームが再結合される、光学又は音響光学結合デバイスと、

(e) ここで、前記第1又は第2の音響光学デバイスは、音響光学偏向器(AOD)又は音響光学周波数シフタ(AOFS)を備えており、

(f) 前記音響光学偏向器を駆動し、それによって前記複数の集束された粒子ストリームに及ぶのに十分な空間幅を用いたビート周波数変調を通じて空間的に異なる振幅変調されたビームの組を発生させるよう構成された無線周波数(RF)コム発生器と、

(g) ここで、空間的に分布しているビート周波数を有する光学問い合わせビームは、前記光学又は音響光学結合デバイスから出力され、

(h) 前記空間的に分布しているビート周波数が前記装置により物理的特性及び化学的特性について分析されている複数の集束された粒子ストリームに同時に及ぶように、前記光学問い合わせビームを前記複数の集束された粒子ストリームと交差するように導くよう構成された光学システムと、

(i) 前記複数の集束された粒子ストリーム内における粒子の蛍光を、前記空間的に分散しているビート周波数以内における種々異なる変調周波数において記録するよう構成された光学検出器であって、前記複数の集束された粒子ストリーム中にわたる蛍光が、前記光学検出器により並行して記録され、前記光学検出器の出力が、粒子の特性の分析を可能にするために粒子の記録された蛍光のデータを記憶するよう構成されたデジタル化電子機器により受信されるよう構成されている、光学検出器と

を備えている、装置。

【0060】

16．前記光励起源がレーザーを備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0061】

17．前記レーザーが連続波レーザーを備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0062】

18．前記光学結合デバイス、前記光学システム又はそれらの組み合わせが、同一の光感度を備えた各フローチャネルを確立するように、各並行フローストリームに導かれる照明を独立して制御するよう構成されている、任意の前述の実施形態における装置。

【0063】

19．前記複数の集束された粒子ストリームが、マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体チップ内に保持されている、任意の前述の実施形態における装置。

【0064】

20．各集束されたストリーム中の粒子の種々異なる特徴が検出されるように、それぞれが異なる変調周波数にて蛍光を記録するよう構成されている1つ以上の追加の光学検出器をさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【0065】

21．複数の前記検出器が、各集束された粒子ストリーム中における粒子の種々異なる特性に関連する異なるスペクトル帯域にて蛍光を分析し得るように、蛍光放射の種々異なる

10

20

30

40

50

色を分離するための１つ又は複数の光学デバイスをさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【００６６】

２２．マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体チップの各チャンネルが、ビート周波数変調器を用いることによって、該チャンネルに固有の異なる変調周波数の励起に曝露される、任意の前述の実施形態における記載の装置。

【００６７】

２３．ビート周波数変調器を用いることによって、各チャンネル中にて別々の無線周波数で蛍光が励起され、それにより、単一の光検出器を用いて複数の点からの蛍光の検出が可能になる、任意の前述の実施形態における装置。

【００６８】

２４．前記粒子が細胞又は細胞の一部を備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【００６９】

２５．粒子の特性の分析を可能にするために粒子の記録された蛍光のデータを連続的に記憶するよう構成されたデジタル化電子機器をさらに備えている、任意の前述の実施形態における装置。

【００７０】

２６．複数の粒子ストリーム内における粒子の物理的特性及び化学的特性を同時に問い合わせるフローサイトメトリーを実行する方法であって、

（ａ）複数の流体粒子又は細胞を対象となる標的として複数の流体フローチャンネル内へと導入するステップと、

（ｂ）前記複数の標的が前記流体フローチャンネル中を流れる際に、前記複数の標的を同時に励起源に曝露するステップであって、それによって、各流体フローチャンネル内の複数の標的が、該チャンネルに固有の変調周波数を備えた異なる変調された光学ビームに曝露されるステップと、

（ｃ）光学検出器により検出される前記複数の標的からの蛍光を、特定の変調周波数における励起に基づいて検出するステップと、

（ｄ）前記流体フローチャンネルの流体内における前記複数の標的の物理的特性及び化学的特性の分析のための前記標的の蛍光データを出力するステップと

を備える、方法。

【００７１】

２７．フローサイトメトリーを実行する方法であって、

（ａ）複数の並行フローチャンネルを有するマイクロ流体チップを提供するステップと、

（ｂ）複数の対象となる流体標的を複数の前記並行フローチャンネル内へと導入するステップと、

（ｃ）前記複数の流体標的が前記並行フローチャンネル中を流れる際に、前記複数の流体標的を同時に励起源に曝露するステップと、

（ｄ）ここで、各並行フローチャンネルは、該チャンネルに固有の変調周波数を備えた異なる変調された光学ビームに曝露され、

（ｅ）流体内の粒子の物理的特性及び化学的特性を分析するために、単一の光学検出器を用いて、前記複数の標的からの蛍光を特定の変調周波数における励起に基づいて検出するステップと

を備える、方法。

【００７２】

２８．各チャンネルが、ビート周波数変調器を用いることによって、該チャンネルに固有の異なる変調周波数の励起に曝露される、任意の前述の実施形態における方法。

【００７３】

２９．各チャンネルが、各チャンネル用の別々の変調源を用いることによって、該チャンネルに固有の異なる変調周波数の励起に曝露される、任意の前述の実施形態における方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 4 】

30．各チャンネル中にて別々の無線周波数で蛍光が励起され、それにより、単一の光検出器を用いて複数の点からの蛍光の検出が可能になる、任意の前述の実施形態における方法。

## 【 0 0 7 5 】

31．2つの干渉する周波数シフトされた光ビーム間のビート周波数において励起が起こる、任意の前述の実施形態における方法。

## 【 0 0 7 6 】

本明細書における説明には多くの詳細が含まれているが、これらは、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるのではなく、現在好ましい実施形態のいくつかの例示を単に提供するものとして解釈されるべきである。したがって、本開示の範囲は、当業者にとって明らかとなり得る他の実施形態を完全に包含することが理解されるであろう。

## 【 0 0 7 7 】

特許請求の範囲において、単数形の要素の参照は、明示的に述べられていない限り「1つ、かつ唯一」を意味することが意図されたものではなく、むしろ「1つ、又はそれ以上」を意味することが意図されている。開示の実施形態における、当業者に既知である要素についての全ての構造的、化学的及び機能的な均等物は、参照により本明細書に明確に組み込まれ、本特許請求の範囲に包含されることが意図される。さらに、本開示におけるいかなる要素、構成要素又は方法ステップも、その要素、構成要素又は方法ステップが明示的に特許請求の範囲に記載されているか否かに関わらず、公衆に開放されることは意図されていない。本明細書におけるいかなる請求項の要素も、該要素が明示的にフレーズ「～ための手段 (means for)」を用いて列挙されていない限り、「ミーンズ・プラス・ファンクション」要素として解釈されるべきではない。本明細書におけるいかなる請求項の要素も、該要素が明示的にフレーズ「～ためのステップ (step for)」を用いて列挙されていない限り、「ステップ・プラス・ファンクション」要素として解釈されるべきではない。

## 【 図 1 A 】

## 【 図 1 B 】

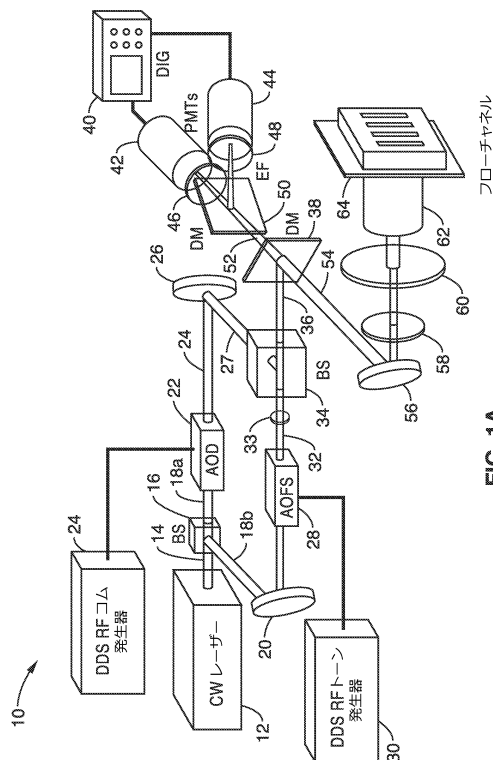


FIG. 1A

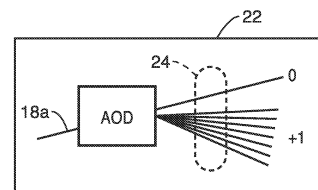


FIG. 1B

## 【 図 1 C 】

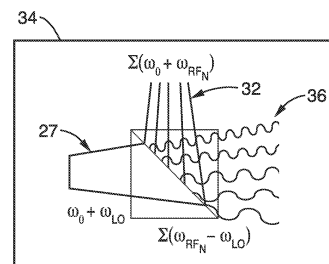


FIG. 1C



【図 1 D】

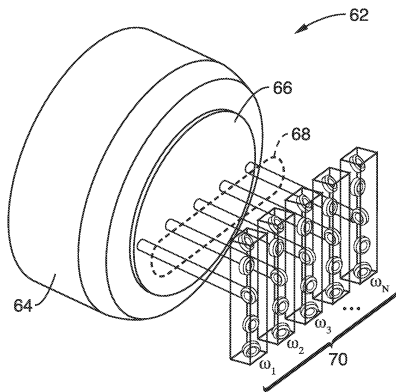


FIG. 1D

【図 2 A】

FIRE ラインスキャン  
フロー中,  $\tau_{\text{exp}} = 1.25 \mu\text{s}$   
 $v = 1 \text{ m/s}$

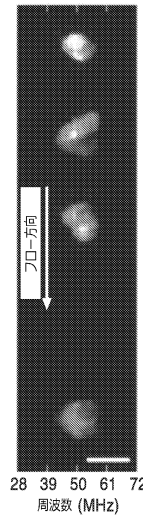


FIG. 2A

【図 2 B】

広視野 (EMCCD)  
フロー中,  $\tau_{\text{exp}} = 10 \mu\text{s}$   
 $v = 1 \text{ m/s}$

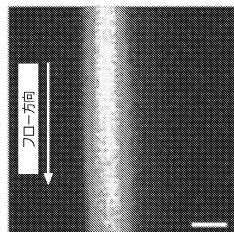


FIG. 2B

【図 2 D】

広視野 (CMOS)  
静止,  $\tau_{\text{exp}} = 200 \text{ ms}$   
 $v = 0 \text{ m/s}$

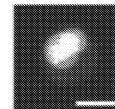


FIG. 2D

【図 2 E】

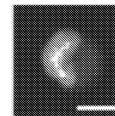


FIG. 2E

【図 2 C】

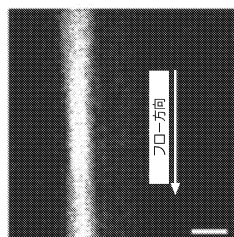


FIG. 2C

【図 2 F】

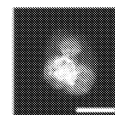


FIG. 2F

【図 2 G】

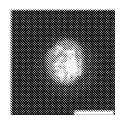


FIG. 2G

【図 3】

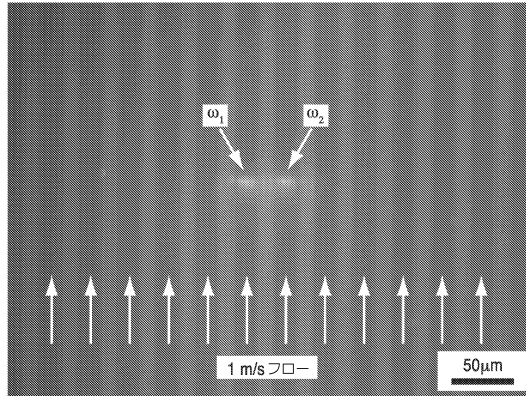


FIG. 3

【図 4 A】

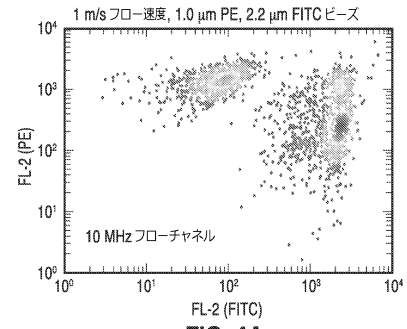


FIG. 4A

【図 4 B】

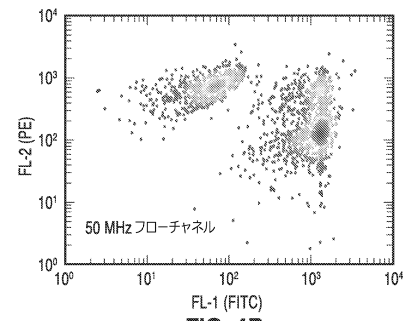


FIG. 4B

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 2 B 21/06  
G 0 1 J 9/04

(74)代理人 100114432

弁理士 中谷 寛昭

(72)発明者 ジャラリ, パーラム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0 0 9 5 - 1 5 9 4 ロサンゼルス, ボックス 9 5 1 5  
9 4, エンジニアリング フォー ビルディング 6 8 - 1 0 9, ユニバーシティ オブ カリフ  
ォルニア, ロサンゼルス, エレクトリカル エンジニアリング デパートメント

(72)発明者 ディボールド, エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0 0 9 5 - 1 5 9 4 ロサンゼルス, ボックス 9 5 1 5  
9 4, エンジニアリング フォー ビルディング 6 3 - 1 2 8, ユニバーシティ オブ カリフ  
ォルニア, ロサンゼルス, エレクトリカル エンジニアリング デパートメント

(72)発明者 バックリー, ブランドン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0 0 9 5 - 1 5 9 4 ロサンゼルス, ボックス 9 5 1 5  
9 4, エンジニアリング フォー ビルディング 6 3 - 1 2 8, ユニバーシティ オブ カリフ  
ォルニア, ロサンゼルス, エレクトリカル エンジニアリング デパートメント

審査官 素川 慎司

(56)参考文献 特開2007-285999(JP, A)

特開平10-148778(JP, A)

米国特許第05485530(US, A)

特開2009-109197(JP, A)

特開2002-296178(JP, A)

Eric D. Diebold et al., Digitally synthesized beat frequency multiplexing for sub-mill  
isecond fluorescence microscopy, Nature Photonics, 英国, 2013年 9月22日, Natur  
e Photonics 7, 806-810(2013)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 1 4

G 0 1 N 2 1 / 0 0 - 2 1 / 9 5 8

G 0 1 N 3 3 / 4 8