

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5959594号
(P5959594)

(45) 発行日 平成28年8月2日(2016.8.2)

(24) 登録日 平成28年7月1日(2016.7.1)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	5/076	(2010.01)	C 1 2 N	5/076	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
G O 1 N	33/48	(2006.01)	G O 1 N	33/48	M

請求項の数 8 外国語出願 (全 244 頁)

(21) 出願番号 特願2014-216689 (P2014-216689)
 (22) 出願日 平成26年10月23日(2014.10.23)
 (62) 分割の表示 特願2012-8334 (P2012-8334)
 の分割
 原出願日 平成16年3月29日(2004.3.29)
 (65) 公開番号 特開2015-37421 (P2015-37421A)
 (43) 公開日 平成27年2月26日(2015.2.26)
 審査請求日 平成26年10月23日(2014.10.23)
 (31) 優先権主張番号 60/458, 607
 (32) 優先日 平成15年3月28日(2003.3.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/458, 731
 (32) 優先日 平成15年3月28日(2003.3.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 308015348
 イングラン・リミテッド・ライアビリティ
 ・カンパニー
 Inguran, LLC
 アメリカ合衆国77868テキサス州ナバ
 ソタ、サウス・ハイウェイ6サウス225
 75番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100156122
 弁理士 佐藤 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 粒子を仕分けるためおよび性別で仕分けられた動物の精子を提供するための装置、および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

染色された精子細胞の混合物を少なくとも1つの集団に仕分ける方法であって、ここに該染色された精子細胞はX染色体を担う精子およびY染色体を担う精子を含み、

流路に染色された精子細胞を含有する流体流れを流し；

流路中に流れるX染色体を担う精子細胞と会合した色素およびY染色体を担う精子細胞と会合した色素を励起して蛍光発光を生じさせ；

励起された染色された精子細胞からの蛍光発光を検出し；

蛍光発光に基づいて、X染色体を担う精子細胞またはY染色体を担う精子細胞を分類し

；

それらの分類に基づいて、流路中の染色された精子細胞を選択し；次いで

選択された精子細胞を光損傷させて、生存能力のあるX染色体を担う精子細胞の豊富化された集団または生存能力のあるY染色体を担う精子細胞の豊富化された集団のいずれかを生成することを含むことを特徴とする該方法。

【請求項2】

流路中の染色された精子細胞を選択して光損傷させる工程が、さらに、仕分け戦略に基づいて精子細胞を光損傷させる工程を含むことを特徴とする請求項1記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【請求項3】

さらに、仕分け戦略を以下のもの：

a. X染色体を担う精子細胞またはY染色体を担う精子細胞のいずれかについての少なくとも1つの集団の純度；および

b. 流体流れにおけるX染色体を担う精子細胞またはY染色体を担う精子細胞の総量に対する少なくとも1つの集団におけるX染色体を担う精子細胞またはY染色体を担う精子細胞の量

の少なくとも1つの関数として変更する工程を含むことを特徴とする請求項2記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【請求項4】

さらに、流体送達速度を以下のもの：

a. X染色体を担う精子細胞またはY染色体を担う精子細胞のいずれかについての少なくとも1つの集団の純度；および

b. 流体流れにおけるX染色体を担う精子細胞またはY染色体を担う精子細胞の総量に対する少なくとも1つの集団における光損傷されていないX染色体を担う精子細胞または光損傷されていないY染色体を担う精子細胞の量

の少なくとも1つの関数として変動させる工程を含むことを特徴とする請求項2記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【請求項5】

さらに、組の精子細胞が

a. 各々がX染色体を有する1以上の精子細胞を含む第1の粒子組；

b. 各々がY染色体を有する1以上の精子細胞を含む第2の粒子組；および

c. 各々が、少なくとも1つがX染色体を有し、少なくとも1つがY染色体を有する2以上の近接して間隔を設けた精子細胞を含む第3の粒子組

を含む、連続した組の精子細胞を含む精子細胞を含有する流れに流体を形成する工程を含むことを特徴とし、ここに連続した組の精子細胞が空間的に近接しすぎて個々の精子細胞を正確に分類または光-除去することができない精子細胞を含む、請求項1記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【請求項6】

さらに、第1および第3の粒子組ではなく、第2の粒子組を光損傷させる、または第1の粒子組ではなく、第2および第3の粒子組を光損傷させることのいずれかの工程を含むことを特徴とする請求項5記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【請求項7】

さらに、少なくとも1つの集団の純度が所望の純度を超える時に流体送達速度を上げ、純度が所望の純度未満である時に流体送達速度を下げる工程を含むことを特徴とする請求項1記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【請求項8】

さらに、少なくとも1つの集団中の光損傷されていないX染色体を担う精子細胞の量が少なくとも1つの集団中の光損傷されていないX染色体を担う精子細胞の許容される量を超える時に、流体送達速度を上げ、少なくとも1つの集団中の光損傷されていないX染色体を担う精子細胞の量が該許容される量より小さい時に、流体送達速度を下げることを特徴とする請求項1記載の染色された精子細胞の混合物を仕分ける方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、動物精液採取のための装置および方法に関し、より具体的には、フローサイトメトリーを含む様々な技術を用いて、動物子孫の性別を事前に選択するための動物生産業による使用のために、DNA特徴に従って仕分けられた精子細胞の生存能力のある集団のような、1以上の所望の特徴を有する精子細胞で豊富化された精子集団を得る装置および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

人工授精(AI)による動物の受精およびインビトロ受精後の胚移植は、確立されたプラクティスである。畜産業において、1以上の所望の特徴を有する子孫に関して生殖結果に影響を及ぼす能力は、明白な利点を有する。一例として、乳牛の生産を確保するために、雌を優先して子孫を選択することが、酪農業において経済的利点となるだろう。米国特許第6,357,307号(Buchanan, et al.)、同第5,985,216号(Rens, et al.)、および同第5,135,759号(Johnson)の開示によって証明されるように、フローサイトメトリーを用いてXおよびY精子細胞を仕分けることによって、この目的を達成しようという試みがなされてきた。しかしながら、これらの試みのいずれも、効果的な受精に対して十分な運動性を有する比較的純粋な性別のある精子細胞の生産量を生産することが可能な商業的に成功する高スループットシステムの導入には至らなかった。

10

【0003】

従って、動物生産業において、商業スケールで使用可能な細胞の量を生産するために、特定のDNA特徴(または他の特徴)に基づいて、精子細胞を効率よく単離するための実行可能な高速システムに対する必要性が現存する。また、単離システムによって処理される間、そのような単離された精子の生存を保ち、使用する時までそのような単離された精子の保存が可能である精子処理システムが必要である。本発明は、これらの必要性を扱う。

【0004】

また、本発明は、より一般的な基盤で、フローサイトメトリーの分野において改良に適用を有する。典型的には、選択された特徴に従って粒子を仕分けるための情報を提供する測定デバイスを介して、一般的に、流体の流れの中に単一ファイルを通させるため、フローサイトメトリーは、個々の粒子の特徴を測定すると広範に定義され得る。所望により、次いで、粒子は、液滴仕分け、液滴干渉仕分け、および流体スイッチを含むいずれかの数の技術を用いて集団に分けてもよい。もう1つのオプションは、例えば、フォトアブレーションによって、不要な粒子を選択的に破壊することである。

20

【0005】

光学系フローサイトメトリーシステムにおいて、光学を使用して、粒子を含有する流れに、光のビーム(例えば、可視光線またはUV光線)を向けてフォーカスし、散乱光および/または粒子からの蛍光発光を含む粒子からの発光を収集する。1つの一般的な光学システムにおいて、例えば、光のビーム(例えば、レーザービーム)は、流れにフォーカスさせ、発光は、一方は散乱光発光を収集するためのレーザーの向きに置かれ、もう一方は蛍光発光を収集するための流れおよびレーザーの両方に直交性に置かれる一対の収集ユニットによって収集される。各収集ユニットは、システムのコストを上げる別個の光検出器を含む。さらに、従来の光学システムにおいて、光検出器は、収集された発光を電気シグナルに翻訳し、これらはアナログシステムを用いて分析されて、粒子の選択された特徴に従って粒子を仕分ける。アナログシステムは、比較的安価であるが、制限された情報しか、シグナルから得ることができない。

30

【0006】

他の者達は、精子細胞を処理して、所望の性染色体を有する精子で豊富化された精子細胞の集団を得るのに用いることができる技術の開発を試みた。しかしながら、現存の技術は、本明細書に記載の発明の技術には不十分である。

40

【0007】

例えば、Johnson et al.(米国特許第5,135,759号)は、フローサイトメーター/細胞仕分け器を用いた、XおよびY染色体を持つ精子豊富化集団へのDNA含有量による無傷のXおよびY染色体を持つ精子集団の分離を記載する。記載のように、精子は、1時間(39)ないし1.5時間(30)の期間の間、30ないし39 の温度にて、DNA選択的色素と組み合わせられる。次いで、フローサイトメーターを用いて、精子が色素を励起するレーザービームを通過する時に発光される蛍光の量を測定する。X染色体を持つ精子は、Y染色体を持つ精子より多くのDNAを含有するため、哺乳類のほとんどの種は、約3ないし5%の差を有し、X染色体を持つ精子は、Y染色体を持つ精子より多くの蛍光を発光する。蛍光測定が精子細胞の回転向きによって変動し得るという事実を明らかにするために、2つの光検出器が使用される

50

。第1は、精子細胞が適切に配向されているかを決定し、第2は、XまたはY染色体を有すると精子を仕分けるのに使用される測定をとる。発振器を使用して、精子を含有する流れを、精子がレーザービームを通過する場所の液滴下流に持ってくる。所定の蛍光強度の単一の精子を含有する液滴は、荷電され、収集容器に、静電的に偏向される。次いで、収集された、性別豊富化された精子集団は、マイクロインジェクション、インビトロ受精、または人工授精に使用される。

【0008】

また、Seidel et al.(WO 02/43574)は、フローサイトメトリーを用いた、XまたはY染色体を有する細胞の性別豊富化集団への精子の分離を記載する。Seidel et al.は、30 および40 の間の温度での細胞の染色を記載する。

10

【0009】

米国特許出願公開2003/0157475 A1(Schenk, August 21, 2003)は、XまたはY染色体含有量に従い仕分けられた精子細胞を冷凍保存する方法を記載する。そこに記されるように、精子細胞を冷凍保存する前に、冷凍保存プロセスの間、精子細胞を保護するために、精子細胞に抗凍結剤を添加することが望ましい。例えば、グリセロールは、冷凍保存前に、ウシ精子細胞に一般的に添加される1つの抗凍結剤である。しかしながら、抗凍結剤からより良い保護を得るために、精子細胞を0 以下の温度に付す前に、抗凍結剤が精子細胞と平衡を保つまで待つのが望ましい。平衡期間の間、抗凍結剤は、細胞膜に浸透して、抗凍結剤によって提供されるいずれかの細胞外保護に加えて、細胞内保護を提供する。従って、米国特許出願公開2003/0157475 A1に記載される冷凍保存方法は、精子細胞が約5 まで冷却された後、グリセロールを含有する増量剤を精子細胞に添加すると明記する。次いで、精子細胞およびグリセロールは、精子細胞がより低い温度に付される前の1および18時間の間のどこかで、5 に平衡される。開示は、最善の結果を得るために、3および6時間の平衡期間を推奨する。

20

【0010】

残念ながら、3ないし6時間の平衡期間に関する時間および費用は、商用精子仕分けプロセスの収益性に悪影響を及ぼすだろう。さらに、商用精子仕分けプロセスの状況下で、精子の健康は、一般的には、精子の収集および冷凍保存の間の時間を減らすことによって改善される(他の要因は同等である)と考えられる。この観点からも、抗凍結剤の最良の利益を得るのに、長い平衡期間を必要としない冷凍保存技術の利用方法を有することが望ましい。さらに、既知の冷凍保存技術は、減少された精子受精率を示唆する精子運動性に対して有害な影響を持つと報告されている。従って、従来の技術と比較して、精子の健康を保つ冷凍保存技術への必要性が存在する。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、一般的には、動物精液採取のための装置および方法に関し、より具体的には、フローサイトメトリーを含む様々な技術を用いて、動物子孫の性別を事前に選択するための動物生産業による使用のために、DNA特徴に従って仕分けられた精子細胞の生存能力のある集団のような、1以上の所望の特徴を有する精子細胞で豊富化された精子集団を得る装置および方法に関する。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、1以上の望ましい特徴に基づき、粒子を分析、分類および仕分けるための改善されたシステム(方法および装置)に指向される;1つの具体例において、フローサイトメトリーを用いて、細胞をDNA含有量によって正確に単離し仕分けるそのようなシステムの提供;特定の具体例において、システムの出力が、粒子の所望の仕分けられた集団の純度、所望の粒子集団が収集される速度、所望の集団に仕分けされていない所望の粒子の喪失、および他の要因を含む1以上の要因の関数として制御されることを可能にする仕分けプロトコルを組み込むそのようなシステムの提供;1つの具体例において、高速で作業

50

して、動物生産業による商用使用のための性別仕分け精子を提供するそのようなシステムの提供;精子細胞の運動性を含む細胞の有意な悪影響なしに、細胞を仕分けするのに使用することができるそのようなシステムの提供;細胞の運動性を含む細胞に対する最小限の悪影響をもって必要とされるまで、仕分けられた精子細胞を保存するのに使用できるシステムの提供、それが性別された精子の生産に関するように、精子細胞の分類および仕分けの速度および正確性を増加する技術を組み込むそのようなシステムの提供;落射光学を用いて、分析され、所望により仕分けられた粒子の様々な特徴を検出するフローサイトメトリーの提供;製造に経済的なそのような落射フローサイトメトリーシステムの提供;1つの具体例において、高い生産率にて、一般的に細胞および特に精子細胞のような粒子を分類および(所望により)仕分けのための統合プラットフォームを共有するマルチプルフローサイトメトリーユニットを組み込むシステムの提供;共通の要素およびシステムを共有して、より効率的な作業のために、チャンネル間の差を減少させるそのようなマルチチャンネルシステムの提供;および1つの具体例において、さらなる仕分けの収益性を評価することができるように、試料の質を決定するために、試料を迅速にテストすることが可能なプロトコルを組み込むそのような仕分けシステムの提供。

10

【0013】

加えて、本発明は、蛍光を表すシグナルをデジタル処理するための改善されたシステム(方法および装置)に指向されている;1つの具体例において、バックグラウンド特徴の関数として、アナログ対デジタル変換パルスを検出するためのそのようなデジタルシステムの提供;1つの具体例において、識別パラメータを開始するためのそのようなデジタルシステムの提供;1つの具体例において、波形パルスに対応するデジタル情報を検出するためのそのようなデジタルシステムの提供;1つの具体例において、特徴抽出を含むデジタル情報分析用のそのようなデジタルシステムの提供;1つの具体例において、パルス进行分类し、決定境界を規定するためのそのようなデジタルシステムの提供;1つの具体例において、液滴ブレイクオフセンサーを用いて、変換器振幅を制御するためのそのようなデジタルシステムの提供;および1つの具体例において、商用分配のために、細胞を分配し収集するためのそのようなデジタルシステムの提供。

20

【0014】

さらに、本発明は、精液試料が、収集された精液に存在するよりも、所望の染色体の特徴を有する精液のより大きいパーセンテージを含有する精子試料の冷凍保存を介して、雄の動物から収集された時から動物精液の商用加工用の改善された総合システム(装置および方法)に指向される;1つの具体例において、生存能力のある性別豊富化された精子の商用量の効率的な加工を可能にするそのようなシステムの提供;1つの具体例において、精液特徴における日々および動物対動物の変動に対処するためのシステムの調整を可能にするそのようなシステムの提供;1つの具体例において、85%純度にて、単一のフローサイトメトリーユニットによる約18,000,000の性別豊富化された精子/時間の生産を可能にするそのようなシステムの提供;および1つの具体例において、約1時間の処理時間において、所望の性別特徴を有する収集された精子の10%未満の喪失で、85%純度にて、所望の性別特徴を有する生存能力のある精液試料を得るための精液のバッチ(例えば、雄の動物から収集された精液の量)の完全な処理を可能にするそのようなシステムの提供。

30

40

【0015】

一般的には、本発明は、本出願の請求の範囲に記載された装置および方法に指向される。

【0016】

本発明の他の目的および特徴は、ある程度明白であり、ある程度は以後指し示されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、本発明の例示的な精子仕分けプロセスのためのワークフロー図である。

【図2】図2は、本発明のフローサイトメトリー液滴仕分けシステムの1つの具体例の模

50

式図である。

【図3】図3は、ノズルシステムによって生じた上向きに動く流体の流れに、励起ビームをフォーカスする落射照明光学アセンブリを示す、液滴仕分けに対する本発明のフローサイトメトリー装置の1つの具体例の一部の側面図である。

【図4】図4は、本発明のノズルおよびノズルホルダーの1つの具体例の端面図である。

【図5】図5は、図4上の切断面5--5を通る図4のノズルおよびノズルホルダーの断面図である。

【図6】図6は、本発明の1つの具体例に従って、楕円形状ビームスポットによって問い合わされる流体の流れ中に同伴された精子細胞の概略図である。

【図7】図7は、光学システムからの光ビームが、一般的に側面に向けて、細胞の広い面にぶつかる精子細胞の所望の配向に対する角包装を示す概略図である。

10

【図8】図8は、本発明のノズルボディーの1つの具体例の断面図である。

【図9】図9は、ノズルボディーを通る一連の切断面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)を示す図8に示されるノズルボディーの側面図である。

【図9A】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9B】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9C】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

20

【図9D】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9E】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9F】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9G】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9H】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

30

【図9J】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図9K】図9A-9Hおよび9J-9Kは、図9の対応する面(A-AからH-HおよびJ-JからK-K)に沿って、図8および9に示されるノズルボディーの断面図である。

【図10】図10は、ノズルにおける配向パッフルを有するノズルシステムの1つの具体例の断面の透視図である。

【図11】図11は、図10で示されるノズルシステムの断面図である。

【図12】図12は、図10および11で示されるノズルシステムの一部の拡大部分断面図である。

【図13】図13は、図12に示される図と似ているが、図12における見る方向に垂直である方向から撮られた拡大部分断面図である。

40

【図14】図14は、パッフルプレートを維持するパッフルホルダーの1つの具体例の側面図である。

【図15】図15は、図14に示されるパッフルホルダーおよびパッフルプレートの上上面図である。

【図16】図16は、パッフルプレートのレッグが、ノズルにおける楕円Dの長軸に対して平行であるラインで交差するように、ノズル中に回転可能に配向されたパッフルホルダーの1つの具体例の上上面図である。

【図17】図17は、パッフルプレートのレッグが、ノズルにおける楕円Dの長軸に対して垂直であるラインで交差するように、ノズル中に回転可能に配向されたパッフルホルダー

50

の1つの具体例の上面図である。

【図18】図18は、ノズルおよびバッフルを通して、一連の切断面(A-AからE-E)を示すバッフルを含むノズルシステムの1つの具体例の側断面図である。

【図18A】図18A-18Eは、図18に示されるノズルシステムにおける様々な地点での断面流量範囲を示す。

【図18B】図18A-18Eは、図18に示されるノズルシステムにおける様々な地点での断面流量範囲を示す。

【図18C】図18A-18Eは、図18に示されるノズルシステムにおける様々な地点での断面流量範囲を示す。

【図18D】図18A-18Eは、図18に示されるノズルシステムにおける様々な地点での断面流量範囲を示す。

10

【図18E】図18A-18Eは、図18に示されるノズルシステムにおける様々な地点での断面流量範囲を示す。

【図19】図19は、ノズルの縦軸に垂直であるバッフルプレートを有するノズルを通して撮られた図12と同様の断面図である。

【図20】図20は、図19上に示される切断面20-20を通して撮られた図19に示されるノズルの断面図である。

【図21】図21は、ズレた位置にて試料導入導管を有するノズルシステムを示す図18の断面図と同様の断面図である。

【図22】図22は、本発明のノズル取付具上に取り付けられたノズルシステムの1つの具体例の斜視図である。

20

【図23】図23は、問い合わせ位置に向かって、本発明のオリフィス部材を通過する時に、回転可能に配向される複数の並べられた精子細胞の概略図である。

【図24】図24は、本発明の1つの具体例に従い、ノズルから下流の液滴破壊位置を示す模式図である。

【図25】図25は、本発明の破壊センサーシステムの1つの具体例の模式図である。

【図26】図26は、本発明の1つのフローサイトメトリーシステムの正面図である。

【図27】図27は、明確性のためにシステムの部分を除去した、図26に示されるシステムの一部の拡大透視図である。

【図28】図28は、本発明の落射照明光学システムの1つの具体例の模式図である。

30

【図29】図29は、本発明の落射照明光学システムの1つの具体例の斜視図である。

【図30】図30は、図29に示された落射照明光学システムの側面図である。

【図31】図31は、図29および30に示された落射照明光学システムの上面図である。

【図32】図32は、図30の面32-32に沿った落射照明光学システムの断面図である。

【図33】図33は、図31の面23-33に沿った落射照明光学システムの一部の断面図である。

【図34】図34は、図29に示される落射照明光学システムのダイクロイックフィルターの後方にある光学フィルタリングシステムの部品のみを示す透視図である。

【図35】図35は、円柱レンズの並進調整を含む本発明のもう1つの落射照明光学システムの透視図である。

40

【図36】図36は、入射の湾曲された角度にて、ノズルの下流の流体の流れにフォーカスされたレーザービームを示す本発明の1つの具体例の問い合わせ位置の概略図である。

【図37】図37は、本発明の仕分け較正システムの1つの具体例の概略図である。

【図38】図38は、図37に示される仕分け較正での使用のための落射照明センサーの1つの具体例の概略図である。

【図39】図39は、本発明によるデジタル細胞アナライザー(DCA)およびプロセッサコントローラーの1つの具体例のブロック図である。

【図40】図40は、2つのチャンネルを示す本発明のマルチチャンネル仕分け器の1つの具体例の概略図である。

【図41】図41は、4つのチャンネルを示す本発明のマルチチャンネル仕分け器の1つの具体

50

例のワークフロー図である。

【図42】図42は、本発明によるアナログ細胞アナライザー(ACA)の1つの具体例のブロック図である。

【図43】図43は、10,000細胞/秒の平均速度にて流れる細胞からの蛍光パルスを検出する光検出器アウトプットからの波形パルスの流れを示すグラフである。

【図44】図44は、10,000細胞/秒の平均速度にて流れる3つの細胞からの3つの蛍光パルスを検出する光検出器アウトプットからの流れを示す図43の分解図である; 100MHz液滴クロックの方形波は、図上に重ねられて、3つのパルスおよび液滴クロックの方形波パルスの間の同期化を示している。

【図45】図45は、狭い幅を有するレーザービームスポットに対する精子細胞の動きを示す。

10

【図49】図49は、105MHz連続サンプリング速度にて、122試料に基づく単一の蛍光パルスを検出する光検出器からの時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報の例示的な図である。

【図50】図50は、本発明の1つの具体例におけるレーザーパルス、レーザーパルスから得られる細胞からの蛍光発光および光検出器アウトプットのデジタル試料の間のタイミング関係を示す概略図である。

【図51】図51は、図50に示されるデジタル試料が、どのようにパルス波形を形成するかを示す概略図である。

【図52】図52は、X精子細胞に対するパルス波形においてより高いピーク強度を示すY精子細胞のパルス波形と同期化されたX精子細胞からのパルス波形の概略図である。

20

【図53】図53は、パルス分析に使用され得る閾値および積分ウィンドウを示すパルス波形の概略図である。

【図54】図54は、スリットスキヤニング技術によって得ることができる高解像度を示すXおよびY精子細胞を含有する試料のヒストグラムである。

【図55】図55は、標準的照明によって得られる比較的劣った解像度を示すXおよびY精子細胞を含有する試料のヒストグラムである。

【図56-59】図56-59は、精子核および生精子細胞に対するピーク対面積の蛍光ヒストグラムおよびバラツキ図を示す。

【図57】図56-59は、精子核および生精子細胞に対するピーク対面積の蛍光ヒストグラムおよびバラツキ図を示す。

30

【図58】図56-59は、精子核および生精子細胞に対するピーク対面積の蛍光ヒストグラムおよびバラツキ図を示す。

【図59】図56-59は、精子核および生精子細胞に対するピーク対面積の蛍光ヒストグラムおよびバラツキ図を示す。

【図60】図60-61は、精子細胞に対する蛍光強度ヒストグラムの4部品モデルを示す-図60は生データを示し、図61は、図60に示されるデータに基づく本発明の反復アルゴリズムの1つの具体例によって生じるモデル曲線を示す。

【図61】図60-61は、精子細胞に対する蛍光強度ヒストグラムの4部品モデルを示す-図60は生データを示し、図61は、図60に示されるデータに基づく本発明の反復アルゴリズムの1つの具体例によって生じるモデル曲線を示す。

40

【図62】図62-63は、精子細胞に対する蛍光強度ヒストグラムの3部品モデルを示す-図62はデータを示し、図63は、図62に示されるデータに基づく本発明の反復アルゴリズムの1つの具体例によって生じるモデル曲線を示す。

【図63】図62-63は、精子細胞に対する蛍光強度ヒストグラムの3部品モデルを示す-図62はデータを示し、図63は、図62に示されるデータに基づく本発明の反復アルゴリズムの1つの具体例によって生じるモデル曲線を示す。

【図64】図64は、CSD特徴の非直線性質を示す;上部パネルは、X-担持およびY-担持精子細胞に対する平均Mプロットを示す;中間パネルは、平均Y-担持蛍光発光パルスのピーク高未満のシグナル振幅値に対するこれらの平均Mプロット(つまり、 M')の一次導関数のグ

50

ラフを示す;および下部パネルは、シグナル振幅の関数として、一次導関数(M'X-M'Y)の間の差を示す。

【図65】図65は、CSD特徴が、蛍光発光パルス上の2つの点を通るラインの計算された傾きである1つの具体例を示す。

【図66】図66-69は、CSD特徴抽出の使用によって達成された改善された識別を示す。

【図67】図66-69は、CSD特徴抽出の使用によって達成された改善された識別を示す。

【図68】図66-69は、CSD特徴抽出の使用によって達成された改善された識別を示す。

【図69】図66-69は、CSD特徴抽出の使用によって達成された改善された識別を示す。

【図70】図70は、CSD対パルス面積のバラツキ図上に設定された二変量仕分け領域を示す。

10

【図71】図71は、高回収/同時受入仕分け戦略(同時発生打切戦略無し)に対応する左パネルおよび高純度/同時拒否仕分け戦略(同時打切戦略)に対応する右パネルにおけるテストのためのフローサイトメトリー再分析の1つの具体例を示す。

【図72】図72は、本発明のデジタルシグナル処理の1つの具体例のワークフロー図である。

【図73】図73は、本発明の1つの具体例に従って使用されてもよいk-平均法クラスタ化戦略の一例である。

【図74】図74は、発明の1つの具体例に従って使用されてもよいように、パルス特徴データへのベイズ最小誤差決定則の適用の概念図およびグラフ表示である。

【図75】図75は、発明の1つの具体例に従って使用されてもよいように、ベイズ最小誤差決定則およびマハラノビス距離閾値処理を使用して得られる結果のグラフ表示である。

20

【図76】図76は、本発明の1つの具体例に従って使用されてもよいように、「忘却」を供するための移動ウィンドウ統計の概念図である。

【図77】図77は、本発明の1つの具体例に従って使用されてもよいグラフ表示ドリフト補償である。

【図78】図78は粒子の例示的分布を含有する流体の流れを示す。

【図79】図79は、同時発生受入仕分け戦略によって、流体送達速度の関数として、純度を示す図である。

【図80】図80は、同時拒否仕分け戦略によって、流体送達速度の関数として、使用可能な集団に上手く仕分けられた所望の粒子のパーセンテージを示す図である。

30

【図81】図81は、該集団への仕分けについて拒否された同時液滴のパーセンテージと比較した、所望の粒子の集団への仕分けについて受諾された同時液滴のパーセンテージの間の反比例関係を示す図である。

【図82】図82は、本発明の仕分け装置の1つの具体例の全体的な操作を示す決定フロー図である。

【図83】図83は、水平速度要素を有する液滴の流れおよび液滴を収集するための収集システムを生成するように向けられたサイトメーターの側面図である。

【図84】図84は、ノズルシステムおよび偏向板に対して示される図83に示される収集システムの拡大透視図である。

【図85】図85は本発明の収集システムの1つの具体例の概略図である。

40

【図86】図86は、図83に示される収集システムのインターセプティングデバイスの正面図である。

【図87】図87は、図83に示される収集システムのインターセプティングデバイスの側面図である。

【図88】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図89】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図90】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図91】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図92】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図93】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

50

【図 9 4】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図 9 5】図88-95は、いくつかの精子遠心分離実験のグラフ結果を示す。

【図 9 6】図96-98は、本発明の濾過方法の 1 つの具体例における工程を示す概略図である。

【図 9 7】図96-98は、本発明の濾過方法の 1 つの具体例における工程を示す概略図である。

【図 9 8】図96-98は、本発明の濾過方法の 1 つの具体例における工程を示す概略図である。

【図 9 9】図99は、精子細胞を濾過するのに使用される濾過システムの 1 つの具体例の概略図である。

10

【図 1 0 0】図100は、フィルター精子細胞を濾過するのに使用されるもう 1 つの濾過システムの概略図である。

【図 1 0 1】図101および102は、精子細胞濾過結果のグラフ結果を示す。

【図 1 0 2】図101および102は、精子細胞濾過結果のグラフ結果を示す。

【図 1 0 3】図103は、本発明の冷凍保存方法の 1 つの具体例に対するワークフロー図である。

【図 1 0 4】図104は、精子細胞冷凍保存実験に対するグラフ結果を示す。

【図 1 0 5】図105は、本発明に従って、精子細胞を処理する方法の 1 つの具体例に対するワークフロー図である。

【図 1 0 6】図106は、仕分け器の内部特徴を示すために分解された部分を持つ本発明のマルチチャンネル粒子仕分け器の 1 つの具体例の斜視図である。

20

【図 1 0 7】図107は、図106のマルチチャンネル粒子仕分け器において、流体送達に使用されてもよいマニフォールドシステムの斜視図である。

【図 1 0 8】図108は、マニフォールドシステムの内部流体接続を示す図107のマニフォールドシステムの斜視図である。

【図 1 0 9】図109は、仕分け器の内部特徴をよりよく示すために、さらなる要素を除去あるいは部分的に除去した、図106に示される粒子仕分け器の斜視図である。

【図 1 1 0】図110は、図106で示される粒子仕分け器の正面図である。

【図 1 1 1】図111は、仕分け器の内部特徴を示すようにハウジングの側壁を除去した、図106に示される粒子仕分け器の側面図である。

30

【図 1 1 2】図112は、(図107が撮られた側とは反対側から撮られた)仕分け器の内部特徴を示すために側壁を除去した図106に示される粒子仕分け器の側面図である。

【図 1 1 3】図113は、仕分け器の後方の角度から撮られ、仕分け器の内部特徴を示すようにバックカバーを除去した図106に示される粒子仕分け器の斜視図である。

【図 1 1 4】図114は、複数のノズルシステムのクロスパーへの取り付けを示す図106に示される粒子仕分け器の一部の斜視図である。

【図 1 1 5】図115は、粒子仕分け器の収集システムおよび他の部分の相対的位置を示す図106に示される粒子仕分け器の一部の斜視図である。

【図 1 1 6】図116は、本発明のマルチチャンネル仕分け器に対する流体送達システムの 1 つの具体例の概略図である。

40

【図 1 1 7】図117および118は、2つの異なるレーザービーム分割システムの概略図である。

【図 1 1 8】図117および118は、2つの異なるレーザービーム分割システムの概略図である。

【図 1 1 9】図119および120は、本発明のもう 1 つのマルチチャンネルシステムの透視図である。

【図 1 2 0】図119および120は、本発明のもう 1 つのマルチチャンネルシステムの透視図である。

【図 1 2 1】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図 1 2 2】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

50

【図123】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図124】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図125】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図126】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図127】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図128】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図129】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図130】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図131】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図132】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図133】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図134】図121-134は、様々な実験のグラフ結果を示す。

【図135】図135は、ノズルが流体の流れを毛管を通して向ける本発明のノズルシステムに対する1つの代替具体例の概略図である。

【図136】図136は、本発明の光損傷仕分けシステムの1つの具体例の概略図である。

【図137】図137は、本発明の技術を使用する装置において使用されてもよい流体スイッチに基づく代替仕分けシステムの概略図である。

【図138】図138は、分析された粒子を運ぶ流体の流れの選択された別々のセグメントを転換する高速液滴緩衝流に基づいた代替仕分けシステムの概略図である。図面を通して、対応する部分は、対応する参照番号によって示される。各部分に対する関連した参照数字の部分リストが続く。部分リストは、部分リストの使用を促進するために、一般的に、明細書中のセクションの見出しに対応したセクションの見出しと一緒に提供される。一般的には、部分リストの各セクションは、詳細な記載の対応するセクションにおいて、初めて紹介される部分に対する参照数字を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

具体例の詳細な記載

下記に記載される具体例は、動物の精液の収集および処理に関し、特に、特定のDNA特徴（例えば、子孫の性別を予め選択するためのX/Y染色体含有量）に従って精子細胞を仕分けるために、家畜からの精液を処理することに関する。下記の結果を達成するために、多くの発明技術が組み合わされる。しかしながら、本明細書中に記載する発明技術は、本発明の範囲から逸脱することなしに、他の適用に提供することができることは理解されるだろう。

【0019】

総括

図1は、本発明の1つの例示的プロセスの工程の概要を提供するワークフロー図である。プロセスは、工程39にて、1以上の雄の動物（例えば、雄牛）からの正味の精液試料の収集で開始する。精液試料は、工程41にて、同定のために標識され、工程41Aにて緩衝剤と接触され、処理施設に移される。緩衝剤に加えて、例えば、エネルギー源、蛋白質源、抗生物質、および/または、酸化/還元反応を調節する組成物を含めた添加物を、工程41Aにて細胞内に、および/または細胞外に添加してもよい。任意の質制御テストを、工程43にて実施して、各試料の質（例えば、精子運動性）が、最終生成物が、最低限の質基準に見合う可能性が高いことを示すのに十分であることを確認してもよい。任意の洗浄工程は、工程47にて行うことができる。工程47Aにて、処理に使用される染色プロトコルは、様々な染色プロトコルを用いて、試料のアリコットを染色し、次いで各アリコットの仕分け性を分析して、その特定の試料に対する所望の染色プロトコルを同定することによって選択される。選択された染色プロトコルによる染色は、工程49にて、化学色素（例えば、DNA選択的蛍光色素）を含有する染色流体48を各試料に添加することによって行われる。染色する流体に加えて、工程48にて、例えば、エネルギー源、蛋白質源、抗生物質、および/または酸化/還元反応を調節する組成物を含む添加物を細胞内に、および/または細

10

20

30

40

50

胞外に添加してもよい。試料は、工程51でインキュベートされて、精子による色素の取り込みを可能にする。次いで、試料は、工程53にて、フローサイトメトリーの試料導入デバイスに装填される。試料流体は、工程54にて、シース流体と一緒に、フローサイトメトリーに導入される。シース流体に加えて、工程54にて、例えば、エネルギー源、蛋白質源、抗生物質、および/または酸化/還元反応を調節する組成物を含む添加物を細胞内に、および/または細胞外に添加してもよい。工程55にて、フローサイトメーターは、下記されるように、特定のDNA特徴に従って、精子細胞を仕分ける。仕分けられた精子細胞が、工程57にて、フローサイトメーターの収集システムによって収集されると、それらは、工程58Aにて、収集流体または低温エクステンダーを含有する収集容器に添加される。収集流体に加えて、工程58Aにて、例えば、エネルギー源、蛋白質源、抗生物質、および/または酸化/還元反応を調節する組成物を含む添加物を細胞内に、および/または細胞外に添加してもよい。この時までには、精子細胞は、プロセスを通して添加された様々な流体によって希釈された溶液中にある。従って、所望のDNA特徴を有する精子細胞の集団は、工程58Bにて、商用人工授精における使用のために、濃縮される。低温エクステンダーは、工程58Cにて、濃縮された仕分けられた精子細胞に添加される。低温エクステンダーに加えて、例えば、エネルギー源、蛋白質源、抗生物質、および/または酸化/還元反応を制御する組成物を含む添加物を、工程58Cにて細胞内および/または細胞外に添加してもよい。次いで、精子細胞は、工程59にて、チューブ容器（畜産業では「ストロー」と呼ばれる）にパックし、工程61にて冷凍保存する。冷凍保存された精子は、工程63にて、液体窒素中に保存のためにパックされる。次いで、冷凍保存された精子は、工程65にて、商用流通システムを通して分配され、工程67にて動物畜産家に売られる。動物畜産家は、工程71にて、精子を使用して、雌の動物（例えば、ウシ）を人工的に受精する準備ができるまで、工程69にて、冷凍保存された精子を保存してもよい。下記で論議されるように、本発明の1つの具体例は、実質的に全工程を通しての温度調節を含む。同様に、規定された時間制限内の様々な工程の完了は、本発明のもう1つの具体例の1つの態様である。この全体的なプロセスは、本発明がどのように使用されるかの一例に過ぎず、後記の工程のいくつかを削除し、および/または他は加えることが可能であることが理解されるであろう。また、仕分けられた精子細胞は、マイクロインジェクションまたは他のインビトロ受精に使用して、その後、受容体の雌の動物に胚移植することもできる。

【0020】

本発明の進歩を取り入れた全プロセスの工程は、下記される。記載される特定のプロセスは、動物の精子(例えば、ウシの精子)を仕分けるという状況である一方、本発明の様々な態様は、精子のいずれのタイプ(ウマ、ブタ、および他)にもより一般的に、細胞のいずれのタイプにもさらにより一般的に、有機および無機、ラテックス粒子、磁気粒子、染色体、細胞下エレメント、プロトプラスト、および澱粉粒子を含む粒子のいずれのタイプにもよりさらに一般的に適用可能であることが理解されるだろう。これらの粒子は、一般的には、0.5ないし200ミクロンのサイズ範囲であるが、本発明の技術は、この範囲に制限されない。

【0021】

試料収集および希釈
試料収集

仕分けられる精子試料は、ウシ、ウマ、ブタ、または他の哺乳動物源、または解凍された、冷凍保存されていた試料から新たに収集された試料であってもよい。さらに、試料は、単一の精液、同一の哺乳動物からの複数のプールされた精液、または2以上の動物からの複数のプールされた精液であってもよい。

【0022】

様々な収集方法が知られており、手袋法、人工腔の使用、および電気射精を含む。精子は、好ましくは、収集されるか、あるいは素早く断熱容器に移して、生理的温度(典型的には、約35 ないし約39)からの速い温度変化を避ける。精液は、典型的には、種および特定の動物に応じて、約0.5ないし150億精子/ミリリットルを含有する。

【 0 0 2 3 】

収集の方法に拘わらず、アリコットを、精子試料から採取し、例えば精子濃度、精子運動性、精子進行的運動性、試料pH、精子膜統合性、および精子形態学といった様々な特徴につき評価することができる。このデータは、標準的かつよく知られた手順(例えば、Farrell et al. Theriogenology(1998) 49(4): 871-9; および米国特許第4,896,966号、同第4,896,967号参照)に従って、例えば、Hamilton-Thorn運動性アナライザー(IVOS)を用いた精子の検査によって得ることができる。

【 0 0 2 4 】

希釈

精子試料を、緩衝剤と(固体または溶液の形態で)組み合わせて、精子懸濁液を形成してもよい。なかでも、緩衝剤は、pHまたは浸透圧の有意な変化に対して、懸濁液を緩衝することによって、精子生存性を高めることができる。一般的には、緩衝剤は、細胞に対して無毒で、細胞を染色するのに使用される色素と適合性がある。例示的な緩衝剤は、リン酸塩、二リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、およびその組合せを含む。現在好ましい緩衝剤は、TCA、TEST、クエン酸ナトリウム、HEPES、TL、TES、クエン酸一水和物、HEP EST(Gradipore, St. Louis, MO)、PBS(Johnson et al., Gamete Research, 17:203-212(1987))、およびダルベッコPBS(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)を含む。

10

【 0 0 2 5 】

1以上の緩衝剤は、下記のように、一緒にまたは添加剤と組み合わされて、緩衝液を形成してもよく、該緩衝液は、精子試料と組み合わされて、精子懸濁液を形成する。また、緩衝液は、下記でより詳細に記載されるように、1以上の添加剤を含有してもよい。例示的な緩衝液は、表Iに記載される。好ましい緩衝液は、約7.0のpHの水中の3%TRIS塩基、2%クエン酸一水和物、および1%果糖(w/v)を含む溶液、表IにおいてTCA #1と指定された溶液、表IにおいてTCA #2と指定された溶液を含む。

20

【 0 0 2 6 】

【表 1】

表 1. 緩衝液

成分	TCA#1	TCA#2	テスト	クエン酸ナトリウム	HEPES	TL
塩化ナトリウム (NaCl)					7.6g	5.84g
塩化カリウム(KCl)					0.3g	0.23g
重炭酸ナトリウム(NaHCO ₃)						2.1g
一塩基性リン酸ナトリウム (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)						0.04g
(+)-2-ヒドロキシプロピオン酸 (乳酸ナトリウム)						3.68ml
塩化マグネシウム (MgCl ₂)					0.1g	0.08g
N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジ ン-N'-(2-エタンスルホン酸) (HEPES)					2.38g	2.38g
トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン(TRIS 塩基)	30.3g	32.02g	10.28g			
クエン酸一水和物	15.75g	18.68g				
クエン酸ナトリウム 二水和物				29g		
2-[(2-ヒドロキシ-1,1-ビス[ヒド ロキシメチル]エチル)アミノエタン スルホン酸 (TES)			43.25g			
果糖	12.5g	2.67g		10g	2.52g	
D-グルコース			2g			
ステプタマイシン			0.25g			
ペニシリン-G			0.15g			
水	1リットル	1リットル	1リットル	1リットル	1リットル	1リットル
標的 pH	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35
標的浸透圧 (ミリオスモル/kg H ₂ O)	~314	~300	~302	~316	~298	~296

【 0 0 2 7 】

別法として、精子は、代謝阻害剤と組み合わせて、阻害された精子懸濁液を形成してもよい。代謝阻害剤は、精子細胞に、哺乳動物の副睾丸または精巣上体管の流体環境を刺激することによって、例えば雄牛のような哺乳動物の副睾丸の精子細胞を模倣させる。そのような阻害剤は、精子の運動性および代謝活性を減少させるかあるいは阻害するだろう。このクラスの例示的な阻害剤は、例えばSalisbury & Graves, J. Reprod. Fertil., 6:35 1-359(1963)記載のもののような炭酸系阻害剤を含む。このタイプの好ましい阻害剤は、NaHCO₃、KHCO₃、およびC₆H₈O₇・H₂Oを含む。このタイプのより好ましい阻害剤は、0.204g NaHCO₃、0.433g KHCO₃、および0.473g C₆H₈O₇・H₂O / 25mLの精製水(水中に0.097モル/LのNaHCO₃、0.173モル/LのKHCO₃、0.090モル/L C₆H₈O₇・H₂O)を含む。

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

緩衝剤に加えて、精子懸濁液は、一連の添加剤を含有して、精子生存性または運動性を高めてもよい。例示的な添加剤は、エネルギー源、蛋白質源、抗生物質、および酸化/還元反応を制御する組成物を細胞内および/または細胞外に含む。1以上のこれらの添加剤は、精子懸濁液の形成前に、緩衝剤または緩衝液に導入されてもよく、あるいは、別法として、精子懸濁液に別々に導入されてもよい。

【0029】

1以上のエネルギー源を添加して、精子細胞が、細胞内リン脂質および他の細胞成分を酸化するのを阻害することができる。例示的なエネルギー源は、果糖、グルコース、ガラクトースおよびマンノースのような単糖、およびスクロース、ラクトース、マルトース、およびトレハロースのような二糖、ならびに他の多糖を含む。例えば、得られた精子懸濁液は、(複数の)エネルギー源の約1%(w/v)ないし約4%(w/v)を含み得る。含まれるならば、エネルギー源は、好ましくは、果糖であり、精子懸濁液は約2.5%(w/v)を含有する。

10

【0030】

希釈ショックを最小化し、細胞に支持を提供し、懸濁を通して細胞を分散するために、蛋白質源が、緩衝剤、緩衝液、または精子懸濁液に含まれてもよい。例示的な蛋白質源は、卵黄、卵黄抽出物、牛乳(熱加熱均質化およびスキムを含む)、牛乳抽出物、大豆蛋白質、大豆蛋白質抽出物、血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清代替補助剤、およびその組合せを含む。アルブミン、より具体的にはウシ血清アルブミン(BSA)が、好ましい蛋白質源である。例えば、もし含まれるならば、BSAは、約5.0%(w/v)未満、好ましくは約2%(w/v)未満、より好ましくは約1%(w/v)未満の量で、最も好ましくは約0.1%(w/v)の量で存在し得る。

20

【0031】

BSAのような蛋白質源のみの使用は、懸濁液中の精子細胞のパーセンテージで、受精能獲得のプロセスを開始することができる。このプロセスが、雌の生殖器官で起こるのが好ましい。従って、希釈の間、ならびに、引き続いての染色および仕分けの間、受精能獲得の開始を阻害するために、代替蛋白質源または蛋白質代替物が、精子懸濁液に含まれてもよい。代替蛋白質源または蛋白質代替物は、精子懸濁液中の細胞のより大きいパーセンテージでの受精能獲得の開始を阻害する能力に加えて、BSAのような典型的な蛋白質源の有利な効果を有する。代替蛋白質源の例は、ヒト血清代替物補助剤(SSS)(Irvine Scientific, Santa Ana, CA)およびコレステロールエンハンサーBSAを含み、一方、蛋白質代替物の例は、例えば、一般的に約30,000ないし約60,000の分子量を有する低いないし中程度の粘性ポリビニルアルコールのようなポリビニルアルコールを含む。一般的には、もし含まれるならば、これらの組成物は、緩衝剤または緩衝液の総アルブミン含有量が、一般的には約5.0%(w/v)を超えないBSAに関して、上記開示と同じ量で存在するだろう。

30

【0032】

抗生物質を、細菌成長を阻害するために、精子懸濁液に添加してもよい。例示的な抗生物質は、例えば、チロシン、ゲンタマイシン、リンコマイシン、スペクチノマイシン、リンコ-スペクチン(登録商標)(塩酸リンコマイシン-スペクチノマイシン)、ペニシリン、ストレプトマイシン、チカルシリン、またはそのいずれかの組合せを含む。抗生物質は、精液が純物であるか、緩衝化されているか、例えば、本明細書中記載の添加剤のいずれかのようなさらなる物質を含有するかに拘わらず、約50 μ gないし約800 μ g/mlの精液の濃度で存在し得る。The Certified Semen Services(CSS)およびNational Association of Animal Breeders(NAAB)は、精子収集および使用に関する抗生物質の使用に関するガイドラインを公布している。

40

【0033】

酸化/還元反応を、細胞内および/または細胞外で制御する組成物も、精子懸濁液に含まれてもよい。そのような組成物は、例えば、精子生存性または進行的運動性を維持することによって、精子細胞に保護効果を提供することができる。そのような組成物の例は、例えば、ピルビン酸塩、ビタミンK、リポ酸、グルタチオン、フラビン、キノン、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、およびSODミミックを含む。精子懸濁液の中に含まれるなら

50

ば、そのような組成物は、精子の健康に悪影響を及ぼさずに、保護効果を達成するのに十分な濃度で存在させることができる。例示的な濃度範囲は、使用される特定の組成物または懸濁液中の精子の濃度のような要因によって、約10 μ Mないし約50mMを含む。例えば、ピルビン酸塩は、約1mMないし約50mM、好ましくは約2.5mMないし約40mM、より好ましくは約5mMないし25mM、さらにより好ましくは約10mMないし15mM、なおさらに好ましくは約15mM、最も好ましくは約10mMの濃度の精子懸濁液中に存在し得る。ビタミンKは、約1 μ Mないし約100 μ M、好ましくは約10 μ Mないし約100 μ M、より好ましくは約100 μ Mの濃度の精子懸濁液中に存在させ得る。リポ酸は、約0.1mMないし約1mM、好ましくは約0.5mMないし約1mM、より好ましくは約1mMの濃度の精子懸濁液中に存在させ得る。

【0034】

仕分けられる細胞の染色

一般的には、精子細胞は、精子細胞、緩衝剤、および色素を含む染色混合物を形成することによって染色することができる。精子細胞は、試料収集および希釈に関して上記したように、新たに得られた精液試料から、あるいは解凍された冷凍保存されていた精液試料から得ることができる。

【0035】

もし精液試料が解凍された、事前に冷凍保存されていた試料であれば、精子は、好ましくは、染色の直前に解凍される。一般的には、冷凍された精子を含有するストローまたは他の冷凍保存容器は、温度が好ましくは精子細胞膜のガラス転移温度(つまり、約17 $^{\circ}$ C)を上回るが、精子の健康に悪影響を及ぼすほどではない温度の水槽に入れることができる。例えば、冷凍された精子は、冷凍保存溶液を、約17 $^{\circ}$ Cないし約40 $^{\circ}$ Cの温度に維持された水槽中に、約30秒ないし約90秒の期間、浸すことによって解凍することができる。

【0036】

一旦入手されると、精子細胞は、純物の精子の形態で、例えば、試料収集および希釈に関して論議した精子懸濁液から得られる懸濁液の形態で、染色混合物に導入することができる。

【0037】

色素は、純物の固体または液体組成物の形態であってもよい。また、色素は、緩衝化されていない液体中に溶解または分散させて、色素溶液を形成することができる。別法として、色素は、色素および緩衝剤または精子細胞と生物学的に適合性のある緩衝液を含む色素懸濁液の形態であってもよい。例示的な緩衝剤および緩衝液の範囲は、試料収集および希釈に関して上記される。例えば、使用可能な緩衝剤の中には、約7.0のpHの水中に3% TRIS塩基、2% クエン酸一水和物、および1%果糖を含むTCA緩衝液、または0.204g NaHCO₃、0.433g KHCO₃、および0.473g C₆H₈O₇ · H₂O / 25mLの精製水(水中に0.097モル/LのNaHCO₃、0.173モル/LのKHCO₃、0.090モル/L C₆H₈O₇ · H₂O)を含む炭酸系阻害剤溶液がある。すなわち、例えば、染色混合物は、純物精液を色素と組み合わせることによって形成することができる。別法として、染色混合物は、純物精液を緩衝剤または緩衝液および色素と組み合わせることによって形成することができる。さらに、染色混合物は、精子懸濁液を色素と組み合わせることによって形成することができる。

【0038】

染色混合物は、米国特許第5,135,759号およびW002/41906に既に記載されるように、1以上のUVまたは可視光線、DNA選択的色素を用いることによって形成することができる。例示的なUV光励起可能な選択的色素は、Hoechst 33342およびHoechst 33258を含み、これらの各々は、Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)から商業的に入手可能である。例示的な可視光励起可能な色素は、Molecular Probes, Inc.(Eugene, OR)から商業的に入手可能なSYBR-14およびW0 02/41906記載のビスベンズイミド-BODIPY(登録商標)コンジュゲート6-{{3-((2Z)-2-{{1-(ジフルオロポリル)-3,5-ジメチル-1H-ピロール-2-イル}メチレン}-2H-ピロール-5-yl)プロパノイル}アミノ}-N-[3-(メチル{3-((4-[6-(4-メチルピペラジン-1-イル)-1H,3'H-2,5'-ピベンズイミダゾール-2'-イル]フェノキシ)アセチル)アミノ}プロピル}アミノ)プロピル]ヘキサンアミド(「BBC」)を含む。これらの色素の各々は、単独でまた

10

20

30

40

50

は組み合わせて使用されてもよく;別法として、他の細胞透過性UVおよび可視光励起可能な色素を、単独でまたは前記の色素と組み合わせて使用してもよく、但し、色素は、他所記載のように仕分けを可能にする濃度で使用される時、許容できない程度まで、精子細胞の生存性に悪影響を及ぼさない。

【0039】

染色混合物中のDNA選択的色素の好ましい濃度は、選択された色素に対する細胞の透過性、染色混合物の温度、染色が起こる時間の量、続いての仕分け工程で望まれる豊富化の程度を含む変数の範囲の関数である。一般的には、色素濃度は、好ましくは、実質的に精子生存性に有害な影響を与えずに、適度に短時間で所望の程度の染色を達成するのに十分である。例えば、染色混合物中のHoechst 33342、Hoechst 33258、SYBR-14、またはBBCの濃度は、一般的には、約0.1 μMおよび約1.0Mの間、好ましくは約0.1 μMないし約700 μM、およびより好ましくは約100 μMないし約200 μMであろう。従って、一組の染色条件下で、Hoechst 33342の濃度は好ましくは約100 μMである。もう一組の染色条件下で、Hoechst 33342の濃度は約150 μMである。さらにもう一組の染色条件下で、濃度は好ましくは約200 μMである。

10

【0040】

緩衝剤に加えて、他の添加剤を染色混合物に含んで、精子の生存性または運動性を高めてもよい;これらの添加剤は、精子源、色素源の一部として、または別々に、染色混合物に供されてもよい。そのような添加剤は、エネルギー源、抗生物質、細胞内および/または細胞外で酸化/還元反応を制御する組成物、および精漿を含み、これらの最初の3つは、試料収集および希釈に関して上記され、最後のものは収集流体に関して下記される。そのような添加剤は、それに従って、染色技術の間に添加されてもよい。

20

【0041】

特に、細胞内および/または細胞外で酸化/還元反応を制御する組成物を含むと、上昇した染色温度にて、上昇した色素濃度にて、増加した色素期間にて、あるいはそのいずれかの組合せにて、精子生存性を維持するのを助けることが観察されている。これらの組成物およびその試用の例は、緩衝剤および希釈剤に関して上記で論議される。そのような組成物は、それに従って、染色技術の間添加されてもよい。

【0042】

染色混合物は、温度の範囲のいずれかで維持されてもよく;典型的には、これは約4 ないし約50 の範囲内であろう。例えば、染色混合物は、「比較的低い」温度、つまり約4 ないし約30 の温度で維持されてもよく;この具体例において、温度は、好ましくは約20 ないし約30 であり、より好ましくは、約25 ないし約30 であり、最も好ましくは、約28 である。別法として、染色混合物は、「中間」温度範囲、つまり約30 ないし約39 の温度内で維持され得る;この具体例において、温度は、好ましくは約34 ないし約39 であり、より好ましくは、約37 である。加えて、染色混合物は、「比較的高い」温度範囲、つまり約40 ないし約50 内で維持され得る;この具体例において、温度は、好ましくは約40 ないし約45 であり、より好ましくは約40 ないし約43 であり、最も好ましくは約41 である。好ましい温度の選択は、一般的に、例えば、使用される(複数の)色素への細胞の透過性、染色混合物中の(複数の)色素の濃度、細胞が染色混合物中で維持されるであろう時間の量、仕分け工程で望まれる豊富化の程度を含む変数の範囲によって決まる。

30

40

【0043】

染色混合物中の精子細胞による色素の摂取は、所望の程度のDNA染色を得るのに十分な時間続けることが可能である。該時間は、典型的には、XおよびY染色体生成精子細胞が、2つの間の異なり測定可能な傾向強度に基づき仕分けられるように、色素が精子細胞のDNAに結合するのに十分な時間である。一般的に、これは約160分以下であり、好ましくは約90分未満であり、さらにより好ましくは約60分以下であり、最も好ましくは約5分ないし約40分であろう。

【0044】

50

従って、1つの具体例において、染色混合物は、約100 μM ないし約200 μM の濃度で、精子細胞および色素を含めて形成され、染色混合物は、約41 の温度にて、ある時間、維持される。もう1つの具体例において、染色混合物は、さらに、約10mMの濃度でピルビン酸塩、約100 μM の濃度でビタミンK、または約1mMの濃度でリポ酸を含む。

【0045】

さらにもう1つの具体例において、染色混合物は、約100 μM ないし約200 μM の濃度で精子細胞および色素を含めて形成され、染色混合物は、約28 の温度にて、ある時間維持される。もう1つの具体例において、染色混合物は、約10mMの濃度でピルビン酸塩、約100 μM の濃度でビタミンK、または約1mMの濃度でリポ酸を含む。

【0046】

さらにもう1つの例において、染色混合物は、精子細胞、0.204g NaHCO_3 、0.433g KHCO_3 、および0.473g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 25mLの精製水(水中に、0.097モル/Lの NaHCO_3 、0.173モル/Lの KHCO_3 、0.090モル/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)を含む代謝阻害剤、および約100 μM ないし約200 μM の濃度の色素を含めて形成され、染色混合物は、約28 の温度にて、ある時間維持される。もう1つの具体例において、染色混合物は、約41 の温度にて、ある時間維持される。

【0047】

シース流体

精子細胞を仕分けるために、染色された細胞を、下記のように、フローサイトメーターのノズルへと、試料流体として導入する。プロセスの一部として、試料流体は、典型的には、シース流体によって囲まれる。シース流体は、試料流体中の精子細胞が、下記のように、単一のファイルラインへと引き出されることを可能にする。シース流体は、フローサイトメーターの収集システムによって、精子細胞と一緒に収集され、従って、精子細胞の仕分け後環境の一部を形成する。従って、シース流体が、シース流体による細胞の接触の際に、細胞に保護効果を供するのが望ましい。

【0048】

シース流体は、一般的には、緩衝剤または緩衝液を含む。シース流体で使用され得る緩衝剤および緩衝液の例ならびにその実例的濃度を、試料収集および希釈に関して開示する。特定の具体例において、シース流体は、約7.0のpHの水中に0.96%ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(w/v)、0.1% BSA(w/v)を含む。

【0049】

所望により、シース流体は、精子生存性または運動性に益するある範囲の添加剤を含有してもよい。例えば、そのような添加剤は、エネルギー源、蛋白質源、細胞内および/または細胞外で酸化/還元反応を制御する組成物、代替蛋白質源、およびポリビニルアルコールを含む。これらの添加剤、およびその例の各々は、試料収集および希釈に関して上記で論議されている。そのような添加剤は、それに従って、シース流体に添加されてもよい。

【0050】

シース流体は、所望により、仕分け工程前に濾過してもよい。非溶解性粒状物のようなシース流体中に存在し得る汚染物質は、仕分けと干渉し得る。従って、シース流体は、フローサイトメーターへの導入前に濾過してもよい。そのようなフィルターおよびそれを使用する方法は、当該分野でよく知られる。一般的に、フィルターは、約0.1ミクロンないし約0.5ミクロン、好ましくは約0.2ミクロンないし約0.3ミクロンであり、より好ましくは約0.2ミクロンの膜である。

【0051】

染色された細胞は、染色後のいずれの時点においてもシース流体に導入することができる。典型的には、試料流体中の染色された細胞の流れは、フローサイトメーターのノズル内のシース流体の流れに注入される。下記でより詳細に論議されるように、最初、流体の層流のため、試料流体およびシース流体の接触は実質的にはない。試料流体およびシース流体は、試料流体中の粒子(例えば、染色された精子細胞)が分析された後まで、実質的

10

20

30

40

50

に別個の流れとして残ることが望ましい。しかしながら、ある時点で、試料流体のシース流体および細胞はもう一方と接触する。例えば、液滴仕分けフローサイトメーター（下記で論議される）において、シース流体および試料流体は、液滴が問い合わせ位置の下流で形成される時に、もう一方と接触し始める。

【 0 0 5 2 】

染色された細胞およびシース流体の導入時、染色された細胞およびシース流体の両方は、約4 ないし約50 の温度であってもよい。シース流体および染色された細胞は、同じ温度または、どちらかが他方よりも高い温度である異なる温度であってもよい。従って、1つの具体例において、染色された細胞およびシース流体の導入時、細胞およびシース流体は同じ温度である；例えば、約5 ないし約8 のような、例えば「比較的低い」温度；例えば、約25 ないし約30 のような「中間の」温度；または約40 ないし約43 のような、「比較的高い」温度。もう1つの具体例において、染色された細胞は、シース流体より高い温度であり、例えば、細胞は約40 ないし約43 であり、シース流体は、約室温または約5 である。さらにもう1つの具体例において、染色された細胞は、シース流体より低い温度である。

【 0 0 5 3 】

フローサイトメトリー

本発明の1つの具体例は、フローサイトメトリーにおいて本発明の技術を使用して、精子細胞を分析し仕分ける。図2および3を参照して、本発明のフローサイトメトリーシステムの1つの具体例は、その全体において、参照数字1によって示される。見掛け通り、フローサイトメトリーシステム1は、選択された特徴に従って、精子細胞のような粒子を分類し仕分けるのに有用である。一般的に、システム1は、仕分けられる粒子を含有するキャリアー流体17の供給3、シース流体19の供給7、9と示される仕分け能力を有するフローサイトメトリー装置、および圧力下で、それぞれの供給3、7から担体17およびシース流体19をフローサイトメトリー装置9に送達するための流体送達システム15を含む。フローサイトメトリー装置9は、担体17およびシース19流体を受け取るように、流体17、19を組合せ、圧縮された流体21の流れを作るように、電磁放射線25(例えば、UVレーザー光)のフォーカスされたビームを通して粒子を運ぶ流れ21を方向付けるように、およびフォーカスされたビームを通過する粒子によって発光された電磁放射線31(例えば、蛍光)を分析するように適合される。また、装置9は、評価される粒子を含有する液滴33に流れ21を壊し、液滴33中に含有された粒子の1以上の特徴に従って、前記測定に基づき、液滴33を仕分けるように機能する。本発明を使用して、いずれのタイプの粒子も分析し、好ましくは仕分けることができる一方で、それは細胞の1以上の所望の特徴(例えば、サイズ、DNA含有量、形状、密度、遺伝子配列等)に従って、細胞を仕分けるのに特に適用を有する。本発明は、下記でより詳細に論議されるように、インピボまたはインピトロ人工授精のための動物生産業による商用使用のために、動物の精子細胞を仕分けるのに特に適している。

【 0 0 5 4 】

シングルチャネル仕分け装置および方法

フローサイトメトリー装置

図3で示されるフローサイトメトリー装置9は、実質的にシングルファイル中の細胞および精子細胞の場合、実質的に記載されるであろう所望の配向の精子細胞の非対称性ヘッドとの圧力下で、ノズルオリフィス103を通して、粒子(例えば、染色された精子細胞)を含有する流体の流れ21を送達するための101と示されたノズルシステムを含む。慣用的なフローサイトメトリー液滴仕分けシステムでのように、ノズルオリフィス103から間隔を設けられた「液滴破壊」位置107にて、個々の細胞を含有する液滴33へと流れ21を破壊する流体の流れ21へ音響エネルギーを導入するために、ノズルオリフィス103に反対に提供される。また、システム1は、記載される具体例において、ノズルオリフィス103および液滴破壊位置107の間にある「問い合わせ」位置115にて、流体の流れ21に電磁放射線25(例えば、350-700nm UVまたは可視レーザー光)のビームをフォーカスするための109と示された光学システムを含む。従って、記載される具体例は、ジェットインエアーシステムである

。他の具体例において、問い合わせ位置107は、ノズルオリフィス103内またはオリフィス103から上流であり得る。いずれにしても、細胞は問い合わせ位置107にて、光のビーム25を通過するように調整され、その結果、細胞中の化学染色（または他の報告媒体）が励起されて、ビーム25（例えば、もし照明光25が、約350ないし370nmの波長を有するならば、蛍光発光31は約460nmの波長を有し得る）のものと異なる波長を有する蛍光発光31が生じる。光検出器117は、これらの発光31を検出し、処理され、精子細胞のX/Y染色体の含有量のような選択された特徴に従って、細胞を分類するのに使用される電子シグナルへとそれらを変換するように操作可能である。さらに、フローサイトメトリー装置9は、液滴33中に含有された細胞の分類に従って、異なる群または集団（例えば、2つの集団123、125）に、液滴33を仕分けるための119と示された仕分けシステムおよび液滴33を収集し、異なる集団123、125の隔離を維持するための2201（図2）と示された収集システムを含む。

10

【0055】

システム1の操作は、記載される様式で、システム1の要素の様々な機能を制御するマイクロプロセッサまたは他のデジタルまたはアナログ制御および/またはプロセッサ、またはその組合せのようなプロセッサ131によって制御される。また、有意義なことに、プロセッサ131は、粒子分析情報にตอบสนองして、選択された制御および粒子の仕分けられた集団のうちの1つの所望の純度、1以上の他の集団中の所望の粒子の量（またはパーセンテージ）と比較した集団のうちの1つの所望の粒子の許容される量（またパーセンテージ）を含めた異なるパラメーター、および後記で論議される他のパラメーターを含む仕分け方法に基づき、システム1のアウトプットを制御する。

20

【0056】

システム1の様々な要素は、下記に詳細に記載される。

【0057】

ノズルシステム

図4および5を参照して、ノズルシステム101は、1つの例示的具体例において、それを通る中心縦内径135を有する略円筒型フローボディー133、および漏斗形状ノズルボディー139を有するフローボディー133上のノズル137を含む。通路141は、フローボディー133の内径135と同軸のノズルボディー139を通して延び、ノズル137の前端にて、前記のノズルオリフィス103で終わる。ノズルボディー139は、フローボディー133の前端にて、螺合突起またはスタッド149を螺合可能に受け取って、ノズル137をフローボディー133に取り外し可能に接続するために、後端にて、内方螺合穴ぐり145を有し、ここに該接続は、O-リングシール155によってシールされる。ノズルは、他の方法でフローボディーに取り外し可能に接続されるか、あるいは別法として、部分が1片として統合し形成することができることが理解されるだろう。

30

【0058】

フローボディー133の内径135に同軸で置かれた導管157の手段によって、粒子はノズル137に送達される。導管157の外径は、輪形隙間が導管157周りに形成されるように、内径135の内径未満である。1つの特定の具体例において、ノズル137の後部の穴ぐり145へと延びる前部を有する管状針である。導管157の後端は、キャリアー流体15（例えば、精子細胞を含有する染色混合物）の導管157への送達のために、流体送達システム15に接続される。導管157の周りの輪形隙間167は、フローボディー133の半径内径173の手段によって、輪形隙間167へのシース流体19の送達のために、流体送達システム15に接続される。図3および5に示されるように、任意の第二の半径内径183は、ノズル137へのさらなるシース流体19の供給のために、もう1つのライン（図示せず）に輪形隙間167を接続するフローボディー133において提供され得る。

40

【0059】

慣用的なフローサイトメトリーシステムにおけるように、シース流体19は、導管157を取り囲む輪形隙間167に導入される。導管157のチップを流れる時のシース流体19の速度は、導管157を出て行くキャリアー流体17の速度よりずっと高く、そこに含有されるキャリアー流体17および細胞（例えば、精子細胞）は、ノズル137のオリフィス103に向かって、シ

50

ース流体19によって加速される。この加速は、光学システム109による別の分析のための単一ファイル配置において、細胞を間隔を開けて置くように機能する。シース流体19はキャリアー流体17を取り囲み、その結果、キャリアー流体17の中心コア189を有する流体の流れ21および中心コア189を取り囲むシース流体19の外側の同軸シース191が生じる(図6参照)。フローサイトメトリーの当業者によって理解されるように、中心コア189の層流および水力学的フォーカシングは、ノズル137中でシース19およびキャリアー流体17の少しの混合で、コア189に粒子を制限する傾向がある。さらに、液滴33が破壊位置107にて形成される時まで、流れ21がノズルシステム101を通るように、中心コア189はシース191内で実質的に無傷のままである。同軸流れのこのタイプは、分析される粒子が流れの比較的狭いコア189内に制限されるため、フローサイトメトリーに特に適している。結果として、流れ21の中心またはコア189上にフォーカスされた光25のビームは、実質的に一時に1つずつ分析することができるように、粒子を照らすだろう。十分に狭い直径内にコア189を制限することによって、コア流体189において、より均一な粒子の照明を得ることができる。良い分析結果のため、粒子を含有するコアの直径は、望ましくは、7ないし20ミクロンの範囲内、より望ましくは7ないし14ミクロンの範囲内であるべきである。コア流189の直径は、シース流体19の送達の数値に対してキャリアー流体17の送達の数値を調整することによって、増加または減少することができる。

【0060】

細胞の向き

分析結果を最適化するため、光学システムからの光ビームを通過する時、非対称な形状を有する粒子が所望の向きにあることが望ましい。当業者に知られるように、対称な粒子からの蛍光発光は、異方性のである傾向がある(つまり、発光の強度は、全方向において均一でない)。本明細書中で使用されるように、用語「所望の向き」は、70%ないし100%、より望ましくは80%ないし100%の範囲、さらにより望ましくは90%ないし100%の範囲、最も望ましくは95%以上の正確性で処理システムが異なる特徴を有する細胞間を識別するのを可能にする向きを意味する。

【0061】

ポイントを説明するために、ウシ精子細胞201は、図6および7で示される。典型的には、細胞は、比較的平坦で広い対向面207および狭いエッジ209、細胞の着色DNAマスを含有するヘッド205の核213、および有効な受精に必要な運動性を供するヘッド205から延びるテイル215を有する。平均的なウシ精子細胞201は、約8 μm のヘッドの長さ219、約4 μm のヘッドの幅221、ヘッドの前から約100 μm のテイルの端までの全長223を有する。平均的なウシ精子細胞201において、核213は、ヘッド容量のほとんどを占有し、精子ヘッド205よりわずかに小さいだけである。従って、核の長さ217は、長さ約8 μm であるヘッドの長さ219とほぼ同等である。ウシにおいて、精子細胞201のX/Y染色体は、ヘッド205の縦中線または赤道211または中心の下およびすぐ隣の核225(図6)の領域に局所化されることが観察されている。より詳細には、この赤道直下付近の領域225は、核213の下半分(テイル215に向かって)上の核の長さ217の約20%以下、よりさらに詳細には核213の下半分上の核の長さ217の約10-15%以下、さらにより詳細には核213の赤道211下約1.0-1.5 μm 以下延びる。

【0062】

精子細胞が、励起ビーム25を通過する時、細胞が実質的にシングルファイルであり、各細胞201が細胞間の向きの変動を減少させるように、実質的に同様に向いて、従って、細胞のより均一な測定を供するのが望ましい。また、細胞がXおよびY細胞の間に正確な識別を可能にする向きを有するのが望ましい。望ましくは、この向きは、精子細胞201の長さが、流れの流量227の方向(ヘッドが先(図6に示される)またはヘッドが後のいずれか)と大体並んでいて、細胞の狭いエッジ209よりはむしろ、図7に模式的に示されているように、光学系109からの光ビーム25が、一般に広い側で細胞の広い面207に当たる角エンベロープ229にヘッド205が入るように、精子細胞201のヘッド205がその縦軸上で回転される。好ましくは、所望の向きを規定するエンベロープ229は、流れ21を通過して横方向に取った断面

10

20

30

40

50

で見えるように、入る光ビーム25と略垂直な面Pに対してR1の角度範囲を通過しての精子細胞201の回転によって生じる。範囲R1は、好ましくは0ないし90度であり、より好ましくは0ないし60度であり、さらにより好ましくは0ないし30度である。本発明のノズルは、90%以上までの正確性をもって、この所望の向きを達成するように操作可能である。

【0063】

精子向きの許容度(つまり、角度範囲R1によって規定されたエンベロープ229のサイズ)は、精子細胞からの蛍光発光31を収集するのに使用されるレンズの開口数に関する。図7に示される具体例において、例えば、光学システム109は、55度の立体角によって規定された蛍光発光31検出容量579を有する。精子ヘッド205の回転向きが、精子がビーム25を通過する時にR1によって規定されたエンベロープ229の外側にある時、精子ヘッド205のエッジ209からの比較的より強い蛍光発光31は光学システム109によって収集され、プロセッサ131が蛍光発光31の強度を精子細胞201のX/Y染色体含有量と関連させることを防ぐ。しかしながら、問い合わせ位置115を通過する時に、精子ヘッド205の回転向きがエンベロープ229内にある限り、光学システム109は精子ヘッド205の狭いエッジ209からの比較的より強い蛍光発光31を収集しない。従って、図7に示される具体例において、精子ヘッド205の狭いエッジ209が角度R1内に制限される限り、精子細胞の向きは、比較的より強いエッジ蛍光発光の収集を生じない。収集容量579の立体角は、より小さい開口数を持つレンズを用いることによって減少させ、それにより角度R1およびあまり配向されていない精子の許容度を増加させることができる。しかしながら、これは、また、光検出器によって検出された発光31の強度を減少させることによって、蛍光発光31の測定に影響を及ぼし得る光学システム109によって収集され得るフォトン数を減少させる。同様に、もし光学システム109が高い開口数を有する蛍光発光31を収集して、光検出器によって検出された蛍光発光のより強い強度を得るならば、精子向きに対する許容度は減少する。従って、本発明のシステムを設計する際、精子向きに対する許容度およびレンズ開口数の間の均衡をとることが必要である。最適な均衡は、システムの配向能力および光学感度によって決まるだろう。1つの望ましい具体例において、例えば、開口数0.65を有するレンズが使用される。

【0064】

ノズル設計

1つの具体例において、図8および9に示されるように、穴ぐり145から下流のノズルボディ139の内部231は、ノズルオリフィス103に向かう下流方向の流体の流れ21の速度を次第に加速するための第1、第2および第3の軸方向にテーパされた領域235、237、239を含む内面233を有する。前述のように、この加速は、単一ファイル形成を規定して、実質的に一度に1つの粒子が分析されるように、流れ21中の粒子(例えば、細胞)の間隔を設けるように機能する。これらの領域のうちの少なくとも2つ、および好ましくは全ての3つの235、237、239は、図9A-9Hおよび図9J-9Kに示されるように、ノズル137の縦軸247に対して直角での断面において略楕円形状を有する。また、ノズルボディ139の内面233は、テーパされておらず、第1の3つの領域235、237、239から下流および1つの具体例において、ノズルボディ139の前面の穴ぐり257に固定された別々のオリフィス部材255において形成されたノズルオリフィス103の直ぐ上流の第4の領域249を有する。1つの具体例において、第1の235および第2の237領域の略楕円断面形状は、実質的に同一の方向に配向されて、第1のねじりゾーン259を規定し、第2のねじりゾーン261を構成する第3の領域239の略楕円断面形状は、第1の235および第2の237領域の略楕円断面形状に対する角度(例えば、約90度)に配向される。配向は、ノズルボディ139の内面233が、流体の流れ21にねじり力を適用し、それによりノズルオリフィス103を通過する時に、前記の所望の向きに精子細胞を向かせる傾向があるようなものである。好ましくは、第1のねじりゾーン259は、3.0-4.5mm、好ましくは約3.6mmの軸の長さ273を有し、ゾーン259を構成する第1の235および第2の237テーパ領域は、大体同等の軸の長さ275、277(例えば、約1.8mm)を有する。第2のねじりゾーン261は、3.5-5.0mm、好ましくは約4.45mmの軸の長さ279を有する。第4の領域249は、好ましくは、形状が略円筒型である。第1の235、第2の237および第3の239領域の境界にある各略断面楕円形状A-D(図8)は、図8および下記

の表1に示される例示的な寸法の長軸直径および短軸直径を有する。

【 0 0 6 5 】

【 表 2 】

表1

楕円	長軸直径(mm)	短軸直径(mm)	比率
A	7.0	6.0	1.2
B	6.1	5.3	1.15
C	2.1	2.1	1
D	0.9	0.2	1.45

10

【 0 0 6 6 】

上記の寸法は例示的であって、他の寸法および形状も適切であり得ることが理解されるであろう。機能的には、外径および内径の間の割合の変化、および領域の楕円形状の異なる向きは、各細胞201に対して作用する横力を作り、その縦軸に対して細胞201を回転させる傾向のあるねじり力271を適用して、その広い面207が第1のねじりゾーン259における短軸と並ぶように、細胞が緩やかに曲げられ(例えば、90度)て第2のねじりゾーン261の短軸と並ぶようにする。また、テーパ表面235、237、239の各々は、ノズル101を通して流れる流れ21(および細胞)を加速させるように働く。1つの具体例において、第1領域235および第3領域239においてより緩慢に増加し、第2の領域237においてより速く増加する。さらに一例としては、第1の領域235のテーパは約11-14度の範囲であってよく;第2の領域237のテーパは約42-48度の範囲であってよく;第3の領域239のテーパは約8-12度の範囲であってよい。ノズルボディ139は、成型プラスチック(ABS)または金属のような適当な材料から形成される。

20

【 0 0 6 7 】

オリフィス部材255(図8)は、好ましくは、サファイアのような、加工できるか、さもなければ正確な寸法で形成され得る強固で摩耗耐性のある材料から形成される。オリフィス部材255自体は、1つの具体例において、直径が約0.92mmから約0.060mmまで減少する略円形断面の円錐上流表面309を有し、約0.54mmの軸の長さ317および約39度のテーパ角度を有する。また、オリフィス部材255は、約0.060mmの直径および約0.36mmの軸の長さ327を有する略円筒型下流表面315を有する。これらの寸法は例示的なだけであって、オリフィス部材255は他のサイズおよび形状を有し得ることが理解されるだろう。例えば、上流表面309の形状は、断面では略楕円形(長円形)であってもよく、ノズル137の下流末端のオリフィス103の直径は40ないし100ミクロン以上までの範囲であってもよい。オリフィス103のサイズは、ノズル101を出て行く細胞が、流れ21のコア189内の実質的に単一ファイル形成にあり、前述のように実質的に所望の向きにあることが望ましい。例えば、精子細胞の場合、下流末端で約60-62ミクロンの直径を有するオリフィス103が適当であることが分かっている。好ましくは、ノズルオリフィス103は、流れ21をさらに加速し、記載されるように、最適な細胞間隔、細胞の向きおよび液滴33形成のために、流れ21を形付け、大きさにするように働く。

30

40

【 0 0 6 8 】

ノズル137を出る時の細胞の速度は、シース流体19がノズルシステム101に導入される時の圧力を含めた様々な要因によって決まるだろう。20psiの圧力にて、細胞は、流れ21のコア189にて実質的に同様に配向された細胞を含有する略円筒型流れ21として、約16.6m/sの速度にて、上記具体例のノズルオリフィス103を出て行くであろう。30psiのシース圧にて、細胞速度は約20.3m/sであろう。異なるシース流体19圧にて、流れ21の速度は変動するだろう。

【 0 0 6 9 】

50

コア流のねじりゾーンへの導入

粒子の改善された向きは、粒子がノズルの中心からズレている位置にありつつ、粒子がノズルによって生じる水力学的配向力に付されるように、その少なくとも一部がノズルの中心からズレた流路に沿って、配向させるべき粒子（例えば、精子細胞）を含むコア流189を向けるように、配向ノズルを通る流体流れ21の流動を変化させることによって配向させることができる。コア流189をオフセット流路に沿って向けることは、従来のノズル（つまり、いずれのねじりゾーンも有さないもの）における粒子の配向を改善し得る。多くのノズルにおいて、ノズルの縦軸から移動しているため、所与の位置はノズルの中心からズレていると決定することができる。また、流体の流れが通って流れるノズルの断面積の幾何学的中心から移動されているため、特定の位置がノズルの中心からズレていると認識することができる。

10

【0070】

多くの技術を使用して、コア流189を、ノズルの中心からズレた流路に沿って向けることができる。例えば、配向バッフルはノズルに置かれて、コア流をノズルの一側面へ偏向することができる。同様に、試料粒子を含有するコア流189を導入するための導管157は、ノズルの従来の中心からオフセット位置へと移転されてもよい。さらに、オフセット試料導入導管157は、配向バッフルと併せて使用され得ることが考えられる。配向バッフルの使用およびオフセット試料導入導管の使用の例示的な具体例は下記で論議される。

【0071】

配向バッフルおよび/またはオフセット試料導入導管157の使用によって達成される粒子（例えば、精子細胞）の改善された配向は多くの要因によるものであり得る。一要因は、コア流189の偏向および/または断面流量範囲のサイズおよび形状の変化が、非対称の粒子を配向する傾向のある流体力の適用を招くことである。(Kachel, et al., *Histochemistry and Cytochemistry*, 25(7): 774-80(1977))。もう1つの要因は、非対称の粒子（特に精子細胞）が、固体表面近くで、流体の流れ中を流れるように配向する傾向があることが分かっていることである。従って、ノズルの内面またはバッフル表面近くにあるようにコア流189を方向付けることによって、粒子の改善された配向を得ることができる。さらに、バッフルおよび/またはオフセット試料導入導管を、さらなる配向する力（例えば、ねじり力）を非対称の粒子に適用する配向ノズルと併せて使用することができる。その場合、配向されるべき粒子が1以上のねじりゾーンによって生じるねじり力に付されつつ、該粒子を含有するコア流が、ノズルの中心からズレている流路に沿って流れるように、流体の流れを方向付けるように操作可能である。

20

30

【0072】

配向バッフル

図10-13は、上記の配向ノズル137に位置する2001と示された1つの例示的な配向バッフルを示す。しかしながら、バッフル2001は、本発明の範囲から逸脱することなしに、配向しないノズルを含む異なるノズルと併用することができる。バッフル2001はオリフィス103から上流および試料注入針157から下流のノズルに位置する。図14および15を参照すると、バッフルは、バッフルホルダー2005によって所定位置に保持されたバッフルプレート2003を含む。示された具体例において、バッフルプレート2003は略L字型であり、実質的に剛直で、耐久性の耐食材料（例えば、ステンレス鋼）で構築される。L字型プレート2003は、望ましくは相互に実質的に垂直（例えば、垂直であることの約5度以内）である上流レッグ2007および下流レッグ2009を有する。図面において示される例示的な具体例において、L字型プレート2003の2つのレッグ2007、2009は、ノズル137（図11）の縦軸2017に垂直なライン2015にて交差する。図14に示されるように、交差2015のラインは、また、バッフルホルダー2005の縦軸2057から短距離2033（例えば、約0.3mm）間隔を設けられる。L字型プレート2003の上流レッグ2007は、図15に示されるように、ノズル137の縦軸2017から離れた交差2015のラインから、途中ずっとバッフルホルダー2005の衛士まで延びる。従って、上流レッグ2007は、バッフルホルダー2005の形状に近似した曲面エッジで形成される。図14で示されるように、上流レッグ2007は、バッフルホルダー2005の縦軸2057に垂直から約15

40

50

-25度の角度AA傾いている。L字型プレート2007の下流レッグ2009は、バッフルホルダー2005の縦軸2057の垂直から約60ないし80度の範囲にある角度BBにて、約2.0ないし2.5mmの距離2025だけ、2つのレッグ2007、2009の交差2015のラインから下流に延びる。

【0073】

バッフルホルダー2005は、図10-13に示されるように、ノズル137の内側に嵌合するような大きさ・形状とされる。バッフルホルダー2005は、好ましくは、成型可能な材料(例えば、ポリプロピレン)製であるが、バッフルホルダー2005は、本発明の範囲から逸脱せずに、他の材料から構築されていてもよい。図14および15において示されるように、例示的な具体例で使用されるバッフルホルダー2005は、一般的に、全体の長さ2027が約4.0-4.5mmの中空円筒殻として形作られる。バッフルホルダー2005は、約5-6mmの外径2029および約2.5-3.5mmの内径2031を持つ。もしバッフルホルダー2005が成型されるならば、抜きしろ(図示せず)を、(例えば、バッフルホルダーが、射出成型機械から容易に取り出せるように)ホルダー2005の表面に設けることができる。例示的なバッフルホルダー2005の上流端2035は、L字型プレート2003の上流レッグ2007と同じ角度AAで傾いた表面2037を有する。L字型プレート2003の上流レッグ2007は終端となり、バッフルホルダー2005の傾いた表面2037によって支持される。L字型プレート2003の下流レッグ2009のサイドエッジ2039(図15)は、バッフルホルダー2005に部分的に埋め込まれて(例えば、スロットで受け取られて)、下流レッグ2009がバッフルホルダー2005の一側面から他方にわたる位置に、バッフルプレート2003を維持する。例示的な具体例において、下流レッグ2009の下流エッジ2041は、バッフルホルダー2005の縦軸2057に略垂直な直線を形成する。下流レッグ2009の下流エッジ2041およびバッフルホルダー2005の柱面2051の間には、ギャップ2049(図14)がある。ギャップ2049は、L字型プレート2003のレッグ2007、2009によって規定された容量2053およびバッフルホルダー2003の内部円筒面2051およびノズル137の内部容量2055の残りの間の流体連絡を供する。

【0074】

L字型プレート2003を上記の位置に保持するように、バッフルホルダー2005は、望ましくは、ノズル137の縦軸2017と整列したバッフルホルダー2005の縦軸2057を有するノズル内に置かれる。望ましくは、例示的なバッフルプレート2003は、プレート2003の2つのレッグ2007、2009の交差2015のラインが、図16に示されるように、楕円Dの長軸を通るライン2059に平行であるように、回転可能に向けられる。しかしながら、例示的なバッフル2001は、また、L字型プレート2003の2つのレッグ2007、2009の交差2015が、図17に示されるように、楕円Dの長軸を通るライン2059に垂直である時に上手く機能する。さらに、本発明の範囲から逸脱することなしに、バッフルはいずれかの回転向きを有し得る。図12に示されるように、例示的な具体例の試料注入針157は、望ましくは、バッフル2001の最上流部2035から約0.25-1.0mm上流の距離2061である。より望ましくは、試料注入針157は、バッフル2001の最上流部2035から約0.55-0.65mm上流である。

【0075】

バッフルホルダー2005は、いずれかの数の方法で、ノズルに対して所望の位置で維持され得る。図14を参照して、バッフルホルダー2005の下流端2067は、ノズル137のさらに下流に嵌合するように、段をつけられる。ホルダー2005の段をつけられた下流端2067は、円形状であり、ノズル137の楕円形の内面233で途切れる。従って、ノズル137の内面233およびバッフルホルダー2005の間の接触は、図13に示されるように、2つの点2069に制限される。一對のO-リング2071は、フローボディ133(図11-13)のノズル137および螺合突起149の間のバッフルホルダー2005辺りに位置し、漏れに対してノズルシステム101を閉じる。O-リング2071は、Viton(登録商標)、またはいずれかの他の同様の材料で出来ていてもよい。2つのO-リング2071は、ノズル137が螺合突起149に止められて、流体密封のシールを供するように、圧縮される。バッフルホルダー2005の長さ2027のため、単一のO-リングをノズル137およびフローボディ133の間の空間内に圧縮することができないので、2つのO-リング2071が例示的な具体例において使用される。いずれの数のO-リングまたは異なるタイプのシールも、本発明の範囲を逸脱することなく用いることができる。但し、O-リン

グの数、またはシールの他のタイプは、ノズルがフローボディー133に螺合した場合に液密シールとなるように選択されるものとする。これは、ノズル13、フローボディー133、バッフルホルダー2005、およびO-リング2071のサイズおよび形状ならびにシールのタイプを含めた多くの要因によって決まるだろう。また、O-リング2071は、所望の位置にバッフルホルダー2005を維持する。O-リング2071はバッフルホルダー2005辺りの空間を占拠し、それによりノズル137内のバッフルホルダー2005の左右の動きを制限する。また、O-リング2071およびバッフルホルダー2005の間の摩擦力は、バッフルホルダー2005の回転動作に抵抗する。

【0076】

ノズル137が、図12に示されるように、フローボディー133上で閉められると、この具体例においてボスの形態であるフローボディー133からの螺合突起149の下流端2077は、バッフル2001の最上流部2035にほぼ等しい。結果として、バッフルホルダー2005は、フローボディー133(バッフルホルダー2005の上流端2035)および(バッフルホルダー2005の下流端67の)ノズル137の内面233の間に、軸方向に捕らえられる。他の保持メカニズムを使用してもよい。図面において示される具体例において、螺合突起149の下流端のボス2079(図12)の内径は、バッフルホルダー2005の内径2031とほぼ同等である。

【0077】

当業者は、ノズルシステム101を通る流れが、流体が流れなければならない小断面積が、流れに低レイノルズ数を生じるため、バッフル2001にもかかわらず層流のままであることを認識するであろう。図11に示されるように、バッフルは、ノズル137の中心縦軸2017から離れて、ノズル137の内面233に向かって、コア流189およびシース流191を偏向する。1つの具体例において、コア流189が、第1の259および第2の261ねじりゾーンの間移行の間を通る時、コア流189もノズル137の内面233の非常に近くを流れる。しかしながら、シース流体の流れ191の一部2081は、コア流189中の粒子は、ノズル137の内面233に実際に影響を与えたり、または接触しないように、コア流189およびノズル137の内面233の間に残る。ノズル137のさらに下流で、流体力は、ノズル137の中心に向かって(例えば、ノズル137の縦軸2017と並んで)、コア流189を押し戻す。

【0078】

図18A-18Eを参照して、バッフル2001は、ノズル137において、断面流量範囲の形状を変化させ、サイズを減少させる。(明確性のため、図18A-18Eは、バッフルから下流のいずれのノズル構造も示さない。図18A-18Eの各々における流量範囲は、明確性のため太字である)。バッフル2001(図18A)から上流で、断面流量範囲2087は、円形または楕円形である。バッフル2001の上流末端にて、流量範囲は、他の形状も適当であり得るが、バッフルプレート2003(図18B)のレッグ2007、2009の交差2015にて、円形状から略半円形状2089へと変化し始める。そこでは、断面流量範囲2089は、バッフルから上流の流量範囲2087より小さい。図18Cは、バッフルホルダー2005の一部から流体の流れとして流量範囲2091を示し、図18Dは、バッフルプレート2003の下流レッグ2009の下流端2041にて、さらに下流の流量範囲2093を示す。バッフルプレート2003の下流レッグ2009の角度方向のため、流量範囲2093は流量範囲2091よりいくらか大きいと観察されるであろう。バッフルプレート2003(図18E)から下流で、バッフルを通る流量範囲2094は、示された具体例において円形である。バッフルホルダー2005の内面2051の形状に対応する。(他の形状も適当であり得る)。バッフルホルダー2005から下流で、ノズル137のねじりゾーン259、261は、望ましくは、上記のようにねじり力を供する。

【0079】

図11に示されるように、1以上の気泡2095は、L字型プレート2003の下流レッグ2009およびバッフルホルダー2005の間の容量2053中に捕獲され得ることが観察されている。さらに、気泡2095の一部は、下流レッグ2009のエッジ2041およびバッフルホルダー2005の間のギャップ2049を通して延びてもよい。従って、(複数の)気泡2095は、恐らくノズル137を通して流体の流れに影響を及ぼしながら、L字型プレート2003の下流レッグ2009の下流の断面流量範囲の一部を占有してもよい。例示的なバッフル2001は、(複数の)気泡2095

10

20

30

40

50

あるなしで、上手く作用することが分かっている。従って、バッフルを使用して、本発明の範囲から逸脱せずに、いずれの気泡の関与もなくして、精子細胞を配向することができる。

【 0 0 8 0 】

2097と示されるもう1つの例示的な配向バッフルは、図19および20に示される。バッフル2097は、上記の配向ノズル137における平らで略半円形バッフルプレート2099を含む。バッフルプレート2099は、試料導入導管157の下流のノズル137に位置し、ノズル137の縦軸2017に略垂直である。バッフルプレート2099は、バッフルプレート2099の曲面エッジ2101およびノズル137の内面233の間に大きなギャップがないように、ノズル137の内面233の曲率に大体マッチする曲面エッジ2101を有する。また、試料導入導管157の外径2109と大体並ぶように、バッフルプレート2099は、ノズル137の縦軸2017を通して短距離延びる真っ直ぐなエッジ2103を有する。バッフルプレート2099は、前記L-字型バッフル2001に関連して記載されたO-リングシール2071と同様なO-リングシール2105と、ノズル137の内部に形成された環状ショルダーまたはシェルフ2107との間のバッフルプレート2099の圧縮に由来する摩擦によって所定の位置に保持される。図19に示されるように、配向バッフル2099は、分析される粒子を含有するコア流189が、その流路の一部に沿って、ノズル137の中心縦軸2017からズレるように、流体の流れを偏向することによって作用する。例えば、コア流189は、第1のねじりゾーン259、ならびに第2のねじりゾーン261の少なくとも一部を流れるように、ノズル137の縦軸2017からズレている流路に沿って向けることができる。結果的に、粒子(例えば、精子細胞)は、ノズル137の中心縦軸2017からズレている位置にあり、ねじりゾーン259、261によって生じたねじり力に付される。

【 0 0 8 1 】

当業者は、本発明の範囲から逸脱することなしに、実質的な変形が上記の例示的なバッフル2001、2097に行われ得ることを認識するであろう。必要なのは、バッフルが、ノズルの内面に向かって、コア流189およびシース流191を偏向するように、またはコア189およびシース流191が、サイズおよび/または形状が変化する断面積を通して流れるように操作されることのみである。さらに、配向バッフル構造は、本発明の範囲から逸脱せずに、ノズルと統合的に形成されるか、あるいはノズルおよびフローボディと統合的に形成され得ると理解される。

【 0 0 8 2 】

オフセット試料導入導管

コア流189は、ノズル137の中心のその従来の位置からズレた位置へと試料導入導管157を配置し直すことによって、ノズル137の中心縦軸2017からズレた流路に沿って方向付けられてもよい。例えば、図21は、ズレた試料導入導管157を有する例示的なズレた試料導入ノズルシステム2151を示す。特記しない限り、ノズルシステム2151は、図4および5に示されるように、ノズルシステム101と実質的に同一である。有意な差は、ノズルの縦軸2017と並ばないように、試料導入導管157がノズル137の中心から動かされていることである。従って、コア流189は、縦軸2017からズレた流路に沿って、配向ノズル137のねじりゾーン259、261へと向けられる。図21に示される例示的なノズルシステム2151は、上記の例示的な配向ノズル137を使用するが、ズレた試料導入導管157を、異なる配向ノズルまたは非配向ノズルと使用して、コア流189において粒子を向けることができると考えられる。

【 0 0 8 3 】

ノズル取り付けおよび調整

フローボディ133およびノズル137は、331と示されたノズル取付具の手段によって選択された向きおよび位置に取り付けられる。1つの具体例(図22)において、取付具331は、各R、XおよびY軸339、341に沿ってフローボディ133およびノズル137の直線状調整を供する第1および第2直線ステージ333、337、およびフローボディ133およびノズル137の縦軸2017に対応するZ軸345の回りの回転調整を供する第3の回転ステージ343を含めた複数のステージを含む。これらのステージ333、337、343は、例えばNewport Corporation of Irvine CAから商業的に入手可能な、慣用的設計の適当なステージであってもよい

。特に、第1の直線運動ステージ333は、フレーム349上に取り付けられた固定された第1のステージ部材(図示せず)、X軸339に沿って固定された第1のステージ部材上で滑らすことができる可動性の第1のステージ部材355、および選択されたX-軸位置に、可動性の第1のステージ355部材を正確に動かすための例えば、マイクロメーターといったアクチュエータ357を含む。第2の直線運動ステージ337は、可動性の第1のステージ部材355上に取り付けられた固定された第2のステージ部材359、Y軸341に沿って固定された第2のステージ部材359上で滑らすことができる可動性の第2のステージ部材361、および選択されたY-軸位置へ可動性の第2のステージ部材361を正確に動かすための例えば、マイクロメーターといったアクチュエータ363を含む。回転(第3の)ステージ343は、可動性の第2のステージ部材316、Z-軸345に対する回転のために、固定された第3のステージ部材365 10
上に回転可能に取り付けられた可動性の第3のステージ部材371、およびZ-軸345に対する選択された角度位置に可動性の第3のステージ部材371を正確に回転するための例えば、マイクロメーターといったアクチュエータ373を含む。これらのステージ333、337 343によって供される三軸調整によって、ノズルオリフィス103を出て行くノズル137および流体の流れ21が、光学システム109に対して正確に置かれることが可能になる。Z-軸345に対するノズル137の回転は、図23に図式的に示されるように、ノズル137を出て行く流れ21が、ノズル137によって配向された細胞(例えば、精子細胞)を、光学システム109からの光ビーム25が細胞の所望の表面(例えば、精子ヘッド205の平坦な面207)上に落ちるであろう位置に持ってくるように、回転させることを可能にするため、特に有用である。他のノズル取 20
付具が適当であり得る。例えば、4-軸ノズル取り付けシステムも使用し、X、YおよびZ軸に沿って直線調整およびZ軸に沿って回転調整を提供することができる。さらに、サーボまたはステッパーモーター制御されたマイクロトランスレーションステージ(例えば、Auburn, MichiganのPolytech PI, Inc.からの成分番号M-110.2DG)のような、自動並列特徴を有する1以上のステージを使用することが望ましいかもしれない。

【0084】

図36において模式的に示された1つの具体例において、例えば、ノズル137は、分析される細胞を含有する流れ21を略上向き方向に向けるように向けられる。流体の流れ21の方向および水平方向の間の角度377は、好ましくは5ないし85度の範囲、より好ましくは15ないし75度の範囲、さらにより好ましくは約30ないし65度、なおさらに好ましくは約45ないし60度、最も好ましくは約50ないし55度である。この配向は、ノズルシステム101中に閉 30
じ込められたいずれの空気もすぐに除去される点で有利である。また、流体の流れ21の速度は、液滴33の収集前に重力下で、徐々に減少する。液滴33のより緩やかな減速は、精子細胞の場合、収集後に仕分けられた精子のより高い運動性を招くことができる分析される細胞に対してよりストレスが少ないと考えられる。もちろん、本発明の他の具体例において、ノズル101は、ジェットインエアーサイトメーターに対して慣用的であるように、オリフィス103を出て行く時、流体の流れ21が実質的に下向きの速度を有するように置かれる。

【0085】

所望により、フローボディー133およびノズル137のようなノズルシステム101の要素は、非反射性、非発光性材料(例えば、UV光線に付された時、光を発光しないくすんだ暗い 40
ペイントまたはエポキシ)で覆われて、シグナルノイズを引き起こすかもしれない、または光学システム109に対して他の有害な影響を有し得るこれらの要素133、137からのいずれかの反射されたおよび/または発光された光を減少する。

【0086】

変換器および液滴形成

流体の流れ21にエネルギーを導入するための変換器105は、1つの具体例において、ノズルシステム101(図3~5)のフローボディー133の回りに固定された焦電エレメント(図示せず)を含むカラー379を含む。変換器は、Beckman Coulter, Inc.から成分番号685836 8として入手可能な慣用的設計である。ノズル137から距離dだけ下流にある液滴破壊位置107においてそれを破壊して液滴33とする周波数にて、エネルギーが流体の流れ21に送達で 50

きるように、変換器は音響エネルギーの適当な源への連結用のターミナル383を有する。フローサイトメトリーの当業者によって理解されるように、液滴形成の特徴は、次の方程式1によって支配される：

【数1】

$$(V = f\lambda \lambda) \quad \text{方程式1}$$

[式中、Vは、流れ21の速度であり；fは、ノズル137を通して流体の流れ21に適用される周波数であり；そして λ は「波長」または液滴33の間の距離である]。液滴33が、流れ21の直径の4.54倍である液滴33の間の距離で、通常のパターンで形成されることは、フローサイトメトリーの既知の原理である。ノズル137に近い流れ21の直径Dは、その下流末端で、ノズルオリフィス103の直径に大体対応するため、流れ21(およびノズル137)が振動して液滴33を形成しなければならない流れでの頻度は、次の方程式2を用いて、容易に計算することができる：

【数2】

$$(f = V/4.54D) \quad \text{方程式2}$$

変換器105を操作して、30,000-100,000液滴33 / 秒の範囲で発生できる。例えば、変換器105は、50,000-55,000液滴 / 秒を発生し得る。頻度が55,000サイクル / 秒(55 kHz)であると仮定し、さらに流れ21における細胞の濃度は、細胞が55,000細胞 / 秒の実質的にマッチする速度でノズル137を出て行くと仮定すると、平均で、1つの細胞 / 液滴33となるであろう。(実際には、いくつかの液滴33は全く細胞を含有せず、いくつかは1つの細胞を含有し、いくつかは1以上の細胞を含有するであろう)。もちろん、周波数(f)、流れ21(オリフィス103)サイズ(D)および流れ21速度(V)の変更を含めた様々な要因のいずれかを変更して、この平均を変動させることができる。理想的には、これらの要因は、特に運動性の保存が重要である精子細胞の場合において、プロセスの経路の間、細胞に与えられるストレスの量を減らすようなものであるべきである。

【0087】

破壊センサー

図2を参照して、破壊センサー389を使用して、流れ21が遊離液滴33を形成し始める位置(例えば、破壊位置107)を決定することができる。破壊位置107は、流れ21粘度、流体の表面張力および変換器105の振動の幅を含めたいくつかの要因によって変動するであろう。破壊位置107をモニタリングすることによって、変換器105の振幅を変動させて、破壊位置107を所与の範囲内に維持し、各液滴33が破壊する時が、マイクロプロセッサ131によってより正確に予測できるようにする。これによって、流れ21の変化を選択的に制御することによって達成される液滴33の電荷をマイクロプロセッサ131が正確に制御することが可能になる。液滴33の電荷は、液滴33形成の直前の流れ21の電荷と同じであるため、マイクロプロセッサ131は、下記のように、流れ21を選択的に荷電することによって、液滴33の仕分けを制御する。

【0088】

一般的に、破壊センサーは、破壊位置にて液滴へと壊れる流体のいずれかの連続した流れと共に使用するためのものである。(図2の具体例において、破壊センサー389は、ノズル137および問い合わせ位置115から下流に位置する)。1つの例示的な破壊センサー389は、図25に図式的に示される。光源393は、流れ21の一側面に位置して、破壊位置107が維持されるであろう所与の範囲内に流れ21を照らす。流れ21の他の側面上に位置した線状フォトアレイ395は適合されて、流れ21に実質的に平行な軸に沿って配向される。結果として、フォトアレイ395は、液滴33を通過する光源393からの光を検出し、検出された光に対応するアウトプットシグナルを供する。

【0089】

アウトプットシグナルを処理して、破壊位置107の位置を決定する。例えば、アウトプットシグナルはデジタル化され、処理のためにプロセッサ131に供される。別法として

、図25に示されるように、光源393は、LEDまたは可視スペクトルの近赤外部分を生じる他の源であってもよい。液滴33間の光通過は、レンズ401によって拡大され、フォトダイオード395の1線状アレイによって8に向けられる。各フォトダイオードは、作用する光強度に比例する電流を発生する。この電流は、8つの電流電圧オペアンプ回路405へ送られる。オペアンプからのアウトプット電圧は、8トラック/ホールド増幅器407にACカップリングされる。増幅器によって使用されるトラック/ホールドシグナル409は、変換器105から採取される。トラック/ホールド増幅器からのアウトプットは、マイクロプロセッサユニット(MPU)391のA/D変換器411に送られる。MPU391によって計算されたデジタル値は、システム制御マイクロプロセッサ131に供されるであろう。参照テーブルおよび/またはアルゴリズムは、システム制御マイクロプロセッサ131によって使用されて、破壊位置107ドリフトおよび変換器105に対する電圧調整の間を変換する。別法として、MPU391からのアウトプットは、変換器105の振動の振幅の変化に対応する振幅を有するDC電圧のようなアナログシグナルであってもよい。dc電圧は、液滴変換器105を駆動する高電圧増幅器インプットに適用されて、振動の振幅を変化させることができる。従って、そのようなプロセッサ391は、フォトアレイ395からアウトプットシグナルを受け取り、破壊位置107の位置に対応する位置シグナルを供するための制御を構成する。そのようなプロセッサ391は、また、液滴33の破壊位置107の位置の指標であるアウトプットシグナルを受け取り、位置107の位置の関数として変換器105の作用を変化させるための制御を構成する。

【0090】

別法として、当業者によく知られるように、ビデオカメラおよびストロボを使用して、液滴破壊位置をモニターし制御することができる。従って、図26-27で示されるように、ビデオカメラシステム412およびストロボ413を、破壊位置107をモニターするために供してもよい。ストロボ413をマスク414A(例えば、小さなスリット形状の開口414Bを備えたカバー)の後ろに置いて、光学システム109に入るストロボ413によって生成される光の量を制限するのが望ましい(図27)。

【0091】

落射照明光学システム

光学システム109は、分析される細胞がスポットを通過するように、ビームスポットとして、流体の流れ21に電磁放射線25(例えば、レーザービーム)のビームをフォーカスするために調整される。他の波長を使用してもよいが、例えば約350-700nmの波長を有するスペクトルの可視または紫外線部分のレーザー光であってもよい。レーザー光の波長は、粒子を分析するのに使用される特定の蛍光色素を励起することが可能であるように選択することができる。もし光学システム109を使用して、例えばHoechst 33342で染色された精子細胞を分析するならば、波長は、約350-370nmの範囲であるように選択され得る。レーザーの電力アウトプットは、50および300mWの間を変動し得る。例えば、精子細胞は、200mWレーザーを用いて分析され得る。図28-34を参照して、システム109は、縦光学軸419を有する417と示された器具を含む落射照明システム415である。本明細書中で使用されるように、用語「落射照明」は、ビームスポットを通過する細胞からの蛍光発光の少なくともいくつか、フォーカスされたビーム25と同じ軸に沿ってだが、反対方向に、光学器具を通過して向けられる光学システムを意味する。システムのこのタイプは、前蛍光および側蛍光を検出し、2つ以上の光検出器を使用する慣用的なシステムと違って、唯一つの光検出器117を含めた、一組の光学のみが必要であるという点で有利である。しかしながら、落射照明システムが好ましいが、本発明の多くの態様が、使用される光学システムのタイプに拘わらず適用できることが理解されるであろう。

【0092】

1つの具体例において、落射照明器具417は、複数の光学要素を支持する長方形のベース429を含む。これらの光学要素は、関連した寸法、焦点距離、およびパーツ数の具体的な例と共に下記される。当業者によって理解されるように、この情報は例示的なものであるだけであって、代替の光学要素を、本発明の範囲から逸脱することなしに使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

図28-34を参照して、光学要素は、レーザーまたはアークランプ435からの光の平行ビーム25を、例えば、ベース429から延びるダイクロイックチャンバー443の側壁441の開口439に取り付けられた調節レンズアセンブリ437を通して反射する反射フィルター431を含む。この特定の具体例において、調節レンズアセンブリ437は、止め輪445、減光フィルター447、円柱レンズ449、レンズホルダー455および薄ナット457を含む。円柱レンズ449は、ビーム225に一次元発散を導入し、好ましくは略楕円形である所望の断面形状459を有するようにビームを形付ける光学要素（下記される）に向かわせる。一例として、円筒型レンズ449は、16mmの焦点距離を有する平凸レンズであってもよい。ビーム拡大器（図示せず）は、所望により、器具417にインストールされて、楕円形ビームスポット459の形状に調整を加えることを可能にする。

10

【 0 0 9 4 】

反射フィルター431は、ビーム25が器具417の光学に向けてフィルター431を反射することが可能なように、開口467を有するホルダー463の角張った面465上のクリップ461によって取り付けられる。ホルダー463は、ベース429およびダイクロイックチャンバー443に固定されたアウトリガ473に対するX-軸471に沿って動かすことが可能な線状ステージ469、適切な位置で、器具417にビーム25を反射するように、ホルダー463および反射フィルター431を正確に置くための適当な手段475（例えば、マイクロメーター）によって動かすことが可能なステージ469に固定される。ダイクロイックフィルター477は、チャンバー443に取り付けられたフレーム485上のクリップ479によって保持され、この特定の具体例において器具の縦の光学軸419に対応する軸489に沿って順方向487に形作られたビーム25を反射するように機能する。ビーム25は、流れ21の流れ227の方向に略垂直に延びる楕円の長軸を有する前記の略楕円形状459（図6）を持つビームスポットとして、流体の流れ21上のビーム25をフォーカスするフォーカスレンズアセンブリ491を通過する。各細胞がビームスポット459を通過する時、細胞中の蛍光染料（または他のレポーター剤）は活性化されて、蛍光31（図23）を発光する。DNA選択的蛍光染料で染色された精子細胞の場合、記載されるように、X細胞はY細胞より多くのDNAを有し、より多くの蛍光染料を含み、細胞を識別し仕分けるための基準を供するY細胞（例えば、3.8%）より強いシグナルを発光する。1つの具体例において、フォーカスレンズアセンブリ491は、ダイクロイックチャンバー443の前壁505の開口503に取り付けられた顕微鏡アダプター501、フォーカスバレル507、一対のレンズ取り付けバレル509、およびレンズ511それ自体、成分番号41209としてOriel Corporationから入手可能な16mmの焦点距離を有する直径12.5mmの平凸レンズを含み、ならびに340-550nmの範囲の波長を有する光に対して反射防止的に覆われる。レンズ511は、石英ガラスであってもよい。また、無限 - 修正蛍光顕微鏡対物レンズのような他のフォーカスレンズも適当であり得る。フォーカスレンズアセンブリ491は、流れ21のコア189に楕円形状のビームスポット459をフォーカスするために、慣用的なテレスコピングフォーカス調整515を有する。

20

30

【 0 0 9 5 】

ビームスポット459を通過する時に細胞によって発光される出て行く蛍光31は、入射レーザー光25とは異なる（ストークスシフトの法則のためより長い）。蛍光発光31のいくつかは、蛍光発光31を収集し平行にするフォーカスレンズ511を通る入射ビーム軸に沿って、逆方向513に伝達される。平行蛍光発光517は、レンズ511から、蛍光発光517を伝達するダイクロイックフィルター477に、逆方向に通過する。一例としては、ダイクロイックフィルター477は、成分番号XF2001、400DCLPとして、Omega Opticalから入手可能なフィルターであってもよい。

40

【 0 0 9 6 】

光学システム415は、器具417の光学軸419に沿って、ダイクロイックフィルター477の後ろに置かれたフィルターシステム519を含む。1つの具体例において、フィルタリングシステム519は、ダイクロイックチャンバー443の後壁527の開口525に取り付けられたホルダー523中の発光フィルター521を含む。発光フィルター521は、ダイクロイックフィルター4

50

77を通して伝達されるいずれかのレーザー光散乱または他の所望の電磁放射線を弱める。一例としてであって、制限としてではなく、発光フィルター521は、成分番号XF3097として、Omega Opticalから入手可能であるように、408nmより大きい波長を有する光の90%以上を伝達するように適合された薄膜のロングパスフィルターであってよい。整列薄膜アセンブリ529は、光学軸419に沿って、発光フィルターから後ろに間隔を設けられる。このアセンブリは、装置417の縦光学軸419に平行なベース429の縦方向に延びるレール533上で動かすことが可能なスライダ531、スライダ531に固定されたフィルターホルダー535、薄膜フィルター要素539、および器具417の光学軸419に対する角度543にて、薄膜フィルター要素539をフィルターホルダー535に固定するためのクリップ541を含む。薄膜フィルター要素539は、ダイクロイックフィルター477と同じ厚みを有し、器具417の光学軸419上に平行蛍光発光517を翻訳し直すように機能する。レール533の反対側上のベース429の平行スロット547を通して延びるファスナー545は、光学軸419に沿った所望の位置のベース429にスライダ531を固定する。整列薄膜アセンブリ529の後方に間隔を設けて、レール533上を摺動可能であって、適当なファスナー557によって選択位置に固定されたフレーム533に設置されたホルダーによって保持された非球面レンズ549がある。非球面レンズ549は、コリメートされた蛍光発光517を、一般に559で示される空間フィルターにフォーカスし、そのフィルターは分析すべき細胞以外の源からの反射または発光を濾過する。非球面レンズ549は、Oriel Corporationから入手可能のように、15mmの焦点距離を有する、例えば、直径が12.5mmの非球面レンズであってよい。レンズ549は、好ましくは、可視の発光波長に対して反射防止被覆されるが、レーザー光散乱の伝達をさらに弱める材料(例えば、フリントガラス)でできている。

【0097】

図34に示されるように、空間フィルター559は、1つの具体例において、装置417のベース429に取り付けられたフレーム563によって取り外し可能に保持された一对の開口プレート561を含む。プレート561の各々は、その中にスリット567、571を有し、1つのスリット567は、好ましくは略垂直で、他方の571は、好ましくは略水平で、配置は、スリット567、571が開口573を形成するように交差するようなものである。1つの具体例において、開口573は、形状が略長方形であり、100ミクロンの垂直寸法575および500ミクロンの水平寸法577を有する。開口573のサイズおよび形状は、収集容量579以外のいずれかの源から反射および光を除去するように機能する限り、変動し得る(または開口プレートを変更することによって調整さえされ得る)。開口プレート561を保持するフレーム563は、好ましくは、2つのパーツ、すなわち、ベース429のレール533上を摺動可能であって、ファスナー587によって選択位置に固定されたプレートホルダー583、および開口プレートをプレートホルダー583上の所定の位置に固定するバックアップメンバーを有する。

【0098】

1つの具体例において、空間フィルター559における開口573のより小さい(垂直)寸法575は、細胞を評価するための「スリットスキヤニング」技術の使用を可能にするような大きさにされる(あるいは調整される)。この技術は、本明細書の「フォーカスされたビームスポット」セクションにより詳細に記載される。

【0099】

450と示される落射照明光学システムのもう1つの具体例は、図35に示される。この具体例は、記される以外は、図28-34に示される具体例と実質的に同じである。1つの有意な差は、ダイクロイックフィルター477が、照明ビーム25を(反射というよりむしろ)伝達し、蛍光発光31を(伝達というよりむしろ)反射する異なるダイクロイックフィルター451によって置き換えられるということである。また、蛍光発光31は、ダイクロイックフィルター451によって、伝達されるというよりむしろ反射されるため、落射照明光学システム450のこの具体例において、整列薄膜539に対する必要性はない。従って、落射照明システム450は、本発明の範囲から逸脱することなしに、所望により光学システムを再構築する一例に過ぎない。

【0100】

10

20

30

40

50

さらに、円柱レンズ449は、調整可能な取付アセンブリ449A上に取り付けられる。取付アセンブリ449Aによって、照射ビーム25に対して垂直な面において円柱レンズ449の2軸転写移動が起こる。解除可能な留め具(例えば、ネジ(図示せず))は、細長い形状の穴449B(そのうちの1つのみが図35上で見える)を通して延びる。留め具の解除によって、ビーム25に垂直な第1の方向におけるレンズ449の移動が可能になる。同様の留め具(図示せず)は、細長い形状の穴449Cを通して延び、第1の方向に垂直な第2の方向におけるレンズ449の移動を可能にする。これによって、ビーム25およびレンズ449の交差がレンズ449の表面にを動くことができ、それにより円柱レンズ449によって供されるフォーカシングに僅かな変化を起こすように、円柱レンズ449およびビーム25の相対的位置を僅かに調整することが可能になる。一旦、レンズ449が所望の位置にあれば、ファスナーをそこにそれを維持するように堅く締めることができる。

10

【0101】

光検出器

空間フィルター559を通過する発光された蛍光は、落射装備417の後方のベース429のレベル533上を摺動可能であってファスナー595によって固定位置に締め付け可能な設置プレート591に装着された光検出器117に落ちる。光検出器117は、以後、より詳細に記載されるように、蛍光発光31を検出し、それらを、細胞の所望の特徴を分析するために処理することができる電子シグナルへと変換する。光検出器117は、Hamamatsuから入手可能な光検出器のような従来のデバイスであってもよい。光検出器117は、好ましくは、分析される特定の染色された細胞に対して落射照明システムによって生成される発光強度に最適な前置増幅器およびPMTゲインを含む。

20

【0102】

一般的には、PMTゲインは、約200および2000の間のボルトが真空管に適用された時に、最適化される。例えば、Hoechst 33342から蛍光発光を検出する場合、PMTゲインは、約400-800の間のボルトが真空管に適用された時に最適化される。1つの特に望ましい光検出器は、185-830nm(530nmピーク)のスペクトル域、0.01mA最大平均陽極電流、典型的に、70mA/Wの陰極放射感度、140 μ A/lmの陰極光感度、300A/lmの陽極光感度、1nA(典型的に0.1nA)の最大陽極暗電流、および1.4ナノ秒立ち上がり時間を有するPMTを含む。PMTは、>37MHzに対して平坦なゲインを示し、50負荷への1Vピークアウトプットを有し、および400+1秒未満の回復時間を有するDCカップルド増幅器である。また、シグナル-対-ノイズ率を80

30

【0103】

ビーム入射の角度

図36は、図式的に、光ビームおよび流体の流れの交差の1つの望ましい配向を示す。いくつかのポイントは注目すべきである。示されるように、光ビーム25は、前記したように、細胞が依然として実質的に所望の向きにありつつスポット459を通過するように、ノズル137の出口オリフィス103から短い距離に過ぎない。好ましくは、1.0未満の位置115にある、あるいはノズル137の内側でさえ、流れ21に焦点を結ぶ。これは、精子細胞を含めた、流体の流れ21において移動性の細胞に対して、特に重要である。

40

【0104】

注目すべきもう1つの点は、この具体例のビーム25が、流れ21の側から見て(図36)、流体流21の縦軸に対して斜め(90はズれる)である入射Aの角度にて流体流21と交差するビーム軸609に沿って流体流21に向けられることである。特定の粒子を仕分ける時、異なるタイプの粒子のより良い識別は、0°以外の入射の角度にて、流れ21を照射することによって得ることができる。例えば、精子核は、望ましくは、5ないし45度の範囲、より好ましくは15ないし30度の範囲、さらにより好ましくは18ないし24度の範囲にある入射の角度Aにて照射される。他の粒子(例えば、生精子細胞)は、光ビーム25が流体の流れ21に対して略垂直である時(つまり、角度Aが約0°である時)、問い合わせるのがより容易である。従って、角度Aは、本発明の範囲から逸脱することなしに、いずれの角度であってもよ

50

い。

【0105】

角度Aの適切な選択によって、特定の粒子の改善されたシグナル対ノイズ識別、したがってそれらの粒子(例えば、XおよびY染色体精子細胞を有する精子核)の異なる特徴に基づくより正確な識別が得られる。この改善は、フォーカスレンズ511に入るレーザー光散乱の減少を含めた多くの要因によるものであろう。フォーカスされたビームスポット459は、好ましくは、流れ21より幅があるため、回折パターンはビーム25および流れ21の交差115で作られる。角度Aが約12度より大きい時、反射された回折パターンは、レンズ511上に落ちない。もう1つの要因は、ノズルボディ139がレンズ511と干渉しないように、湾曲された角度Aによって、ビーム25がノズルオリフィス103に非常に近くでフォーカスされるのを可能になるということであり得る。関連して、ノズル137により近いビームスポット459をフォーカスすることで、改善されたシグナルが得られるように、細胞はノズル137により近く、より均一に並べられる。さらに、湾曲された角度Aでレンズ511(ビーム25)に提示される細胞のより「正面からの」プロファイルは、細胞の何らかの不均衡によって生じる総蛍光強度の変動を減らす。このように、精子細胞の場合、上記の論議のように、ビーム25が各精子細胞201の広い面207のうちの1つに落ち、ノズル101および光学システム109がこの結果を達成するように置かれることが好ましい。

10

【0106】

入射の湾曲された角度Aは、いくつかの粒子を仕分けるのに有益であると考えられるが、ビーム軸および流れの間の交差の角度は、90度または本発明の範囲から逸脱せずに、いずれかの湾曲された角度であってもよいと考えられる。また、入射の最適な角度は、分析される特定の粒子の特性によって、大きく変動し得ることが予測される。

20

【0107】

フォーカスされたビームスポット

図6を参照して、1つの具体例のフォーカスされたビームスポットは、流体流の流動227の方向に略平行に延びる短軸に沿って、流体流の流動227および幅W1の方向に、略直角に延びる長軸に沿った長さL1を持つ略楕円(長円)形状459を有するように示される。1つの具体例において、幅W1は、精子細胞219のヘッドの長さ未満であり、さらにより好ましくは、ウシ精子細胞201の場合、約1 μ m未満の長さを有する細胞の染色体DNAマスを含有する領域225の長さ未満である。直径約60 μ mであるシース流191を有する流れ21およびウシ精子細胞201を含有するコア流189に対して、例示的な長さL1は約80 μ mであり、例示的な幅W1は約1.5 μ mである。ビームスポット459を、精子細胞201のヘッド205の長さ、またはいずれかの他の細胞または分析される粒子より短い、およびさらにより好ましくは、精子細胞201のヘッド205のDNA領域225の直径より短い幅W1にフォーカスすることによって、「スリットスキヤニング」技術に精通している者によって理解されるように、より大きいシグナル解像度が達成される。これは、以降論議されるように、細胞が細いビームを通過する時に、細胞からのフォトン発光31が細胞の長さにより測定されるように、ビーム25が細胞の長さより短い幅(つまり、流れ流の方向にある細胞の寸法)を有するように細くされる技術である。このように、細胞の長さと共に、DNA材料を含む構造における変動に関する情報を得ることができる。また、スリットスキヤニング技術は、「一致」細胞、つまり、重複しているまたは非常に近い細胞を同定するのに役立つ。

30

40

【0108】

前述のように、スリットスキヤニングは、空間フィルター559の開口573が、流れの流動の方向における細胞長の画分に対応する、細胞から発せられた光の一部のみが光検出器117への開口を通過するような垂直寸法575を有するようなサイズとすることによっても行うことができる。さらに、シグナル解像度は、ビームの幅および/または空間フィルターの開口のサイズを調整することによって最適化されて、一緒に作用して、スリットスキヤニングに適した形状にされたビームスポットを供することができる。

【0109】

ビームスポット459の形状の調整する1つの方法は、異なる円柱レンズに変更すること

50

によって、および/または光学システム109のビームエキスパンダーに調整をすることによる。楕円形に形作られたビームスポット459を形成するためのビーム25を形成するさらなるいずれかの方法は、本発明の範囲内であると考えられる。また、他の形状およびサイズのビームスポットが使用されてもよく、本発明の範囲内であると考えられる。

【0110】

仕分けシステム

図2は、仕分けシステム119の例示的具体例を示す。仕分けシステム119は、液滴33(例えば、精子細胞のX/Y染色体含有量)中に含有される粒子の分類によって、液滴33を荷電および/または荷電しないための帯電デバイス627、およびそれらの電荷に従い、液滴33を異なる群123、125に仕分けるための一対の帯電された偏向板629を含む。偏向板629を、鈍い、低発光性コーティング(例えば、エポキシまたはペイント)で覆って、偏向板629によって反射されるまたは発光される光を制限するのが望ましい。偏向板629は、いずれかの適当な電源635によって荷電されてもよい。2つの完全に帯電した偏向板629の間の電位は、2000ないし4000ボルトの範囲であることが一般的に望ましい。しかしながら、偏向板629の間の電位は、約1000および6000ボルトの間のいずれかであってもよい。

10

【0111】

荷電デバイス627は、流れ21が液滴破壊位置107近く(例えば、5液滴長またはより近く)の位置を通る開口633を有する荷電要素631を含む。液滴破壊位置107に関して、荷電要素631の位置の調整を容易にするメカニズムを有する荷電要素631を取り付けることが望ましい。図26および27に示されるように、例えば、荷電要素631および偏向板629は、ノズルシステム101に関して、3-軸翻訳および荷電要素631および偏向板629の偏向調整を可能にする調整可能な取り付けアセンブリ5001に取り付けられてもよい。流れ21に平行な軸5011に沿った翻訳のために、取り付けアセンブリ5001は、ボード5003におけるスロット5009を通る解除可能なファスナー5007によって、バックリング5005に固定されるボード5003を含み、ここにスロット5009は、軸5011に略平行に向けられる。流れ21に垂直な軸5013における翻訳のために、第2の調整ボード5015は、第2の調整ボード5015におけるスロット5019を通過する解除可能なファスナー5017によって、第1のボード5003に固定され、ここにスロット5019は、軸5013に略平行に向けられる。荷電要素631および偏向板629は、第2の調整ボード5015に固定される。従って、ファスナー5007および/または5017を解除することによって、流体の流れ21に平行な面において、ノズルシステム101に対する荷電要素631および偏向板の位置を調整し、次いでファスナー5007および/または5017を強く締めて、取り付けアセンブリ5001を固定することができる。

20

30

【0112】

第1の2つの軸5011、5013に垂直な3つの軸に沿った翻訳のために、下地5005は、調整可能なファスナー5023(例えば、固定支点5021のタップされた穴に留められた螺合ボルト)によって、固定支点5021に固定される。1つの具体例において、各調整可能なファスナー5023は、バックリング5005および固定支点5021の間に置かれたスプリング5025を通過する。いずれのスプリング5025の圧縮の量も、それぞれのファスナー5023を締めるまたは緩めることによって調整可能である。全てのスプリング5025の圧縮を同量で調整することで、第3の軸に沿った翻訳が生じる。取り付けアセンブリ5001は、1以上の他のスプリング5025に関して、1以上のスプリング5025の相対的圧縮を変化させることによって、実質的にいずれの方向にも傾けることができる。

40

【0113】

この例示的な具体例において、荷電要素631および偏向板629の相対的位置は、それらは全て、同じ調整ボード5015に固定されるため、相互に関して固定されたままである。これによって、取り付けアセンブリ5001の調整が、偏向板629に関して、荷電要素631の並列に影響を及ぼすのを防ぐ。

【0114】

荷電要素631は、プロセッサ131の制御下で、適当な電気回路(例えば、90ボルト選択的荷電回路)に接続され、荷電要素631に電荷を適用するための電力供給に関連される。回

50

路を使用して、液滴33が、所望の特徴(例えば、少なくとも1つの生X-染色体精子細胞)を有する粒子を含有するかによって、破壊位置107の液滴33の形成の直前に、流れ21を荷電するかあるいは荷電しない。荷電要素631は、流れ21の静電両極性に関して、電氣的参照を供するために、流れ21の近くまたは流れ21から形成された液滴33の近くに、静電的に置かれる。液滴33は、液滴33が流れ21から離れた時点で、流れ21と同じ電荷を持つ。次いで、荷電されたあるいは荷電されていない液滴33は、偏向板629の間を通り、収集システム2201の収集容器2207へと電荷によって仕分けられる。仕分けが図2における2つの群または液滴123、125の集団を生成する間、粒子は、それぞれの群の液滴33に異なる電荷を置くことによって仕分けられた1からNまでのいずれかの数の集団へと、各々が液滴の異なる集団を収集するように置かれる適切な数の収集容器を供給することによって分離されてもよい。

10

【0115】

自動液滴遅延平衡

上記の仕分けシステム119において、プロセッサ131は、粒子が破壊位置107において最後の付着液滴33である場合に、その粒子を含む液滴に適用されるべき電荷(または電荷の欠如)が適用されるように、問い合わせ位置115から液滴破壊位置107まで粒子が移動するのに要する時間を見積もらなければならない。もしプロセッサ131によって使用される遅延設定が間違っていれば、液滴33は、その内容によって仕分けられないだろう。同様に、もし液滴33への電荷の適用が、液滴33形成と僅かでも位相がズレれば、液滴33はどれも完全に荷電されず、中性電荷を有するはずである液滴33は小さな陽性または陰性電荷を持つため、これは仕分けを低下させ得る。これは、偏向プレート629の間の電界を通して、液滴33の経路を改変するだろう。

20

【0116】

プロセッサ131が、適切な遅延設定を使用していることを確認するまたは液滴遅延設定を調整する(つまり、システムの9液滴遅延設定を較正する)最良の方法は、多くの液滴33を仕分け、結果を検査することである。増加的に遅延設定を変動し、結果をモニタリングすることによって、最適な遅延設定を選択することができる。慣用的には、この仕分け較正は手動で行われる。最近では、自動化較正システムが設計されて、仕分けられた液滴中の液滴の含有量をサンプリングまたは検査し、ヒトの介入なしで、自動的に遅延設定を調整している。例えば、引用によって本明細書中に援用される米国特許第6,372,506号(Norton)および同第5,643,796号(van den Engh)は、両方とも、自動化仕分け較正システムを開示する。これらのシステムのいわゆる利点は、それらがより労働集約的でなく、初期設定の間だけでなく、仕分けプロセスを通して、遅延設定を確認することが可能であることである。欠点は、それらが扱いにくく、不要に、価値ある空間を占めることである。

30

【0117】

(i) 落射照明センサー

図37を参照して、蛍光活性化液滴仕分けサイトメトリーシステム用の本発明の自動化連続較正システム4201は、液滴33の内容を感知するように置かれて、液滴荷電用の遅延設定を確認する1以上の落射照明センサー4203を含む。図38を参照すると、各落射照明センサーは、光源(図示せず)、光ファイバーケーブル4205、ダイクロイックフィルター4207、レンズシステム4209、光検出器4213、および制御システムを含む。1つの例示的な具体例において、プロセッサ131は、制御システムとして作用するが、他のプロセッサまたは制御を代わりに使用することができる。

40

【0118】

光源は、自動化較正システム4201のみに使用される低電力固体レーザーであってもよい。別法として、ビームスプリッタ(図示せず)を使用して、流体流21中の粒子の問い合わせで用いるビーム25におけるエネルギーの一部(例えば約5%)を1以上の落射照明センサー4203に転ずることができる。同様に、光ファイバーケーブル4209は、ビームストップ4215(図26)に置かれて、問い合わせ位置115を通過した後に、ビーム25から光を集める。光源からの光は、仕分けられる粒子において、蛍光分子を励起することが可能な波長を有す

50

る光を含み、それにより、粒子から蛍光発光4211を生じさせなければならない。例えば、もし粒子がHoechst 33342で染色されれば、光源は、約350nm、約407nmの波長またはHoechst 33342分子を励起することが可能ないずれかの他の波長を有する光を供することができる。

【0119】

光ファイバーケーブル4205は、光源から問い合わせ位置115の下流の位置まで延びる。例えば、例示的な具体例において、光ファイバーケーブル4205は、偏向板629の間の電界を通過して動く時、液滴流れのうちの1つの軌道に隣接した位置へと導く。ダイクロイックフィルター4207は、光ファイバーケーブル4205の末端の前に置かれる。ダイクロイックフィルター4207は、光ファイバーケーブル4205によって導かれる光のスペクトル特徴を有する光を伝達するが、蛍光発光4211のスペクトル特徴を有する光を反射する。従って、ダイクロイックフィルター4207は、落射照明光学器具417と関連して上記されたダイクロイックフィルター477と同じ規格を有し得る。各センサー4203の照明/検出容量が液滴33の容量とほぼ同等であるように、レンズシステム4209の焦点距離は、液滴33からのセンサー4203の予測される距離に基づき選択される。

【0120】

図37で示される例示的な具体例を参照して、落射照明センサー4203は、3つの仕分けられた液滴流れ4225、4227、4229の各々の軌道に隣接して置かれて、それぞれの流れにおいて、液滴33の内容を感知する。サイトメーターシステム9は、2つの偏向プレート629を取り付けるための電氣的絶縁サポート4221を含む。サポートは、3つの穴4223、各仕分けられた液滴流れ4225、4227、4229の軌道に隣接したものを有する。落射照明センサー4203は、各穴4223に置かれて、それぞれの穴4223を通過して、液滴流れ4225、4227、4229のうちの1つの中の液滴33を観察する。このコンパクトな配置は、比較的ほとんど空間を必要とせず、較正システム4201の要素を避け、そうすることで、サイトメーター9の他の部分により良いアクセスを供する。

【0121】

もし蛍光粒子を含有する液滴が、センサー4203の照明/検出容量を通過すれば、これは蛍光発光4211のフラッシュを招き、そのうちのいくつかはレンズシステム4209によって収集され、ダイクロイックフィルター4207から光検出器4213へと反射される。光検出器4213からのシグナルは、プロセッサー131に提供される。光検出器4213から受け取られたシグナルに基づき、プロセッサー131は、仕分けられた液滴流れ4225、4227、4229の各々における液滴33の含有量を決定することができる。

【0122】

もしプロセッサー131が蛍光粒子を含有する液滴33が該センサー4203の近くを通過するのを予測している時に、センサー4203が蛍光発光4211のフラッシュを検出するのに失敗すれば、プロセッサー131は、該情報を使用して、遅延設定を調整するか、あるいは液滴破壊位置107の位置を調整することができる。同様に、プロセッサー131は、もしプロセッサー131が粒子を含有する液滴33がセンサー4203の近くを通過するのを予測していない時に、センサー4203が蛍光発光4211を検出すれば、調整を行うことができる。さらに、プロセッサーは、検出された蛍光発光4211の周波数が予測される周波数にマッチするかを確認するために、仕分けられた流れ4225、4227、4229からの蛍光発光4211の相対的な周波数を比較することができる。また、プロセッサー131は、荷電要素631に適用される電荷の振幅を調整して、仕分けられた流れ4225、4229が偏向されて、検出された蛍光発光4211の強度を最大化する量を増加または減少することができる。これにより、液滴が落射照明センサーの収集容量を直接通過するように、偏向された液滴流れ4225、4229の軌道の並列を維持することができるだろう。センサー4203は、流れ4225、4227、4229が偏向板629の間の電界を通過して動く時に、それらを観察するように置かれるため、較正システムは、もしそれが偏向プレートの下流の急降下領域で、流れ4225、4227、4229を観察すれば、より短い応答時間を有する。

【0123】

10

20

30

40

50

(ii) 空液滴テスト流れ

較正の質の1つの高感度の指標は、実質的に空の液滴33のみを含有する較正テスト流れを作り、モニタリングすることによってアレンジすることができる。図37に示される仕分け較正システム4201を参照して、所望の粒子を含有する液滴33は、流れ4225に仕分けられ、いずれかの他の粒子を含有する液滴33および空の液滴33のほとんどは、流れ4229(つまり、廃棄流れ)へと仕分けられる。テスト流れ4227は、空の液滴33の少なくとも画分(例えば、10毎に1)に、中性電荷を適用することによって作られる。慣用的仕分け目的のために、「空」と考えられる多くの液滴33は、実際には、問い合わせ位置115の粒子の到着時間および流体の流れ21の予測される液滴形成境界に基づき、液滴33が粒子を含有する可能性がほとんど無い液滴33である。これらの「空」液滴は、これがテスト流れ4227でいくつかの粒子の検出を招かざるを得ないため、テスト流れ4227に仕分けられるべきではない。

10

【0124】

代わりに、テスト流れ4227に対して、プロセッサ131は、実質的に粒子の無いテスト流れ4227を作るために、粒子を含有する可能性が実質的にゼロであるとプロセッサ131が判断する液滴33のみを選択すべきである。いずれかのランダムに選択された液滴33が細胞を含有する可能性は知られており、大体、液滴発生率によって分けられた平均的な細胞分析速度である。これは、テスト流れ4227における誤仕分けの割合をモニタリングすることによって、液滴33形成の位相をマッチするのに必要な液滴荷電の位相関係の僅かな調整を予測することが可能であることを意味する。例えば、プロセッサ131は、それが見積もって、粒子を含有する約15%以下の確率、粒子を含有する約10%以下の確率、粒子を含有する約5%以下の確率、粒子を含有する約1%以下の確率、粒子を含有する約0.1%以下の確率、粒子を含有する約0.01%以下の確率、粒子を含有する約0.001%以下の確率、粒子を含有する約0.0001%以下の確率を有する液滴を選択することができる。実質的にゼロの可能性の確率的なカットオフは、仕分け速度、不純物に対する許容性、または他の仕分けパラメーターに基づき選択することができ、カットオフは、高速仕分けに対して、あるいは不純物につきより許容性がある場合に、液滴が粒子を含むより高い確率を含む。

20

【0125】

テスト流れ4227中の粒子を含有する液滴33の閾値数以上の検出によって示されるように、実質的に粒子なしのテスト流れ4227(つまり、液滴33の合計数に対する粒子を含有する液滴33の比率が、テスト流れ4227につき液滴33を選択するのに用いられる確率的なカットオフに合致するテスト流れ4227)を作るためのプロセッサ131の失敗は、サブ最適仕分けの決定的な指標であり、プロセッサ131が遅延設定を落とすように促す。閾値レベルは、テスト流れ4227に対して液滴33を選択するのに使用される確率的なカットオフおよびテスト流れ4227に対して選択される液滴33の総数に関連して決定される。理想的には、流体流21中の1以上の粒子は、わずかにサブ最適な液滴遅延設定に対してシステムをより感受性とする各液滴33についての見積もった液滴形成境界に比較的近いが、テスト流れ4227につきいくつかの液滴33を選択することができる。

30

【0126】

もちろん、仕分け較正システムは、本発明の範囲から逸脱することなしに、非中性電荷を適用し、テスト流れに対して選択された液滴を偏向することができる。流れ4225、4227、4229の相対的順序は、また、廃棄流れ4225および所望の粒子4229の流れの間のテスト流れ4227の間に入ることは、(例示的な具体例において示されるように)廃棄流れによる仕分けられた試料のクロスオーバー汚染のリスクを減らすが、本発明の範囲から逸脱せずに並べ直すことができる。さらに、もし粒子が蛍光を発生しないなら、本発明の範囲から逸脱することなしに、異なるセンサーを使用して、テスト流れ中の粒子によって生じるいずれかの散乱光を検出することができる。

40

【0127】

(iii) 仕分け較正システムのインパクト

本発明の1つの具体例において、自動化較正システム4201は、最適な位相の約5%内(つまり、 \pm 約18度内)。もう1つの具体例において、システム4201は、最適な位相の約1%内(

50

つまり、 \pm 約3.6度内)に、位相関係を自動的に決定し、設定するように操作可能である)に、液滴形成および液滴電荷の間の位相関係を自動的に決定し、設定するように操作可能である。もう1つの具体例において、較正システム4201は、高速液滴仕分けシステムを継続してモニターし、最適位相の約10%内(つまり、 \pm 約36度内)に、位相関係を自動的に維持するように操作可能である。さらにもう1つの具体例において、システム4201は、高速液滴仕分けシステムを継続してモニターし、最適位相の約3%内(つまり、 \pm 10.8度内)に位相関係を自動的に維持するように操作可能である。

【0128】

仕分けシステム欠陥修正

時々、液滴33は、その正常な軌道から反れ、荷電要素631または偏向板629にぶつかるだろう。もし1以上の液滴33が荷電要素631にぶつかれば、荷電要素631は、液滴33を適切に荷電しないかもしれない。さらに、荷電要素631を通る正常な液滴33軌道は、妨害されて、さらに多くの液滴33を生じ、荷電要素631上に蓄積し得る。また、もし遊離液滴33が偏向板629にぶつかれば、それらは変形し得、あるいはさもなければ偏向板629の間の電界線を破壊し、それにより、仕分けられた液滴流123、125の軌道を変化させる。

【0129】

従って、デブリス除去システムを有して、荷電要素631および/または偏向板629からデブリスを除去するのが望ましい。図26および27に示される1つの例示的な具体例において、システム9は荷電要素631のためのデブリス除去システム5047および偏向板629のためのデブリス除去システム5049を含む。

【0130】

図27を参照して、荷電要素631は、調整可能な取り付けアセンブリ5001のボード5015に固定されたサポート5051によって置かれる。真空路5053(幽霊線で示される)は、サポート5051を通して、荷電要素631に隣接した開口5057まで延びる。真空路5053は、サポート5051上の接続金具5058に付着した真空ライン5055によって適当な真空源(図示せず)に接続される。適当な制御は、通路5053において、選択的に真空を適用して、荷電要素631からいずれかの望ましくない物質(例えば、遊離液滴33)を吸い取り、荷電要素631の適切な機能を回復するために提供される。

【0131】

関連して、図27に示されるように、取り付けアセンブリ5001に固定された連結管5061は、その中に(幽霊線で示される)、エアライン5059および接続金具5065を介して、圧縮された空気または他のガスの源(図示せず)へと接続された空気の通り道5063のネットワークを有する。通路5063は、各偏向板629の側面5066に沿って置かれた開口5064を有し、開口5065に続く通路5063の部分5067は、連結管5061を通る圧縮された空気が偏向板629からいずれかの遊離液滴33または他のデブリスを排除するように置かれる。偏向板629から流れるいずれかの物質は、カバーパネル(図示せず)に辿り、適当な廃棄物収集デバイス(図示せず)に流れる。

【0132】

1つの具体例において、例えば上記の仕分け較正システムによって示されるように、もしプロセッサまたは他のセンサーが、散在する液滴33が荷電要素631または偏向板629にぶつかったと決定すれば、プロセッサは、自動的に、欠陥修正手順またはモードを開始することができ、これは通路5053に真空を適用して、荷電要素631から物質を吸い取ることおよび/または通路5067に圧縮されたガスを送って、偏向板629から物質を吹き飛ばすことを含むことができる。

【0133】

欠陥モードの仕分けられた試料の保護

また、システム9の1つの具体例は、汚染防止メカニズム4041(図26)を含み、これはプロセッサ131によって活性化されて、仕分けシステムが欠陥修正モードにある時はいつでも、仕分けられた試料の汚染を制限または防止することが可能である。汚染防止メカニズムは、シールド位置(図26に示される)および非シールド位置(図示せず)の間の振りアー

10

20

30

40

50

ム4045を選択的に動かすように操作可能である空気圧式アクチュエータ4043を含む。シールド位置において、振りアーム4045の末端4047は、収集容器4033の開口を覆い、それにより、収集容器4033による液滴33の収集を防止する。非シールド位置において、収集容器4033はカバーされない。通常、振りアーム4045は非シールド位置にあるが、プロセッサ131は、プロセッサ131が汚染のリスクがあると決定する(例えば、ノズルシステム101が詰まる、液滴破壊位置107が不安定になる、または遊離液滴33荷電要素631または偏向板629にぶつかった)時、アクチュエータ4043をシールド位置へと動かす。振りアーム4045の末端4047は、槽状で、振りアーム4045によって収集されたいずれかの流体を廃棄物容器4035へと流す。

【0134】

流体送達システム

上記のシステム1は、選択された特徴によって仕分けられた粒子(例えば、X-精子細胞)の量を効率よく生成することが可能である。生成の速度は、流体送達システム15(図2)がキャリアー流体17およびシース流体19をノズル137に送達する速度を変動させることによって増加または減少できる。1つの具体例において、流体送達システムはシリンジポンプ645を含み、そのようなポンプの一例は、Hamilton Companyから入手可能なMICROLAB(登録商標) Model PSD/3である。ポンプ645は、約20 μ l/分の速度にて、キャリアー流体17をノズル137に送達するように操作可能である。一般的には、ポンプ645は、10-50 μ l/分の範囲の速度にて、試料流体17をノズル137に送達するように操作可能であるべきである。ポンプ645は、フローライン647によって、分析され仕分けられる物質の容量を含有する適した容器649であってもよいキャリアー流体17の供給へと接続される。例えば、精子細胞の場合においてのように、分析される粒子の温度が一要因である場合、容器649の温度は、加熱/冷却槽(図示せず)のような適した温度調節システムによって制御することができる。シリンジポンプ645は、摂取ストロークを通過して移動して、供給容器からのキャリアー流体を吸引することができ、排出ストロークを通過して移動して、供給ライン651を通過してキャリアー流体17をノズルシステム101の注入針157に分配することができる。ポンプ645は、好ましくは、プロセッサ131の制御下で、可変のスピードモーター(図示せず)によって駆動される。一例として、ポンプ645は選択的に可変な速度で作用するステッパーモーターによって駆動されて、所望のスループットを得るのに必要な速度にて、針159にキャリアー流体17を押し出してもよい。流体送達デバイスの他のタイプを、シリンジポンプの代わりに使用してもよい。たった1つの例を提供するために、容器649を、本発明の範囲から逸脱せずに、圧縮されたガスによって圧縮することができる。さらに、ライン647、651を現実的に可能な程度に短く保つのが望ましい。なぜならば、ライン環境は、キャリアー流体17中にあり得る感受性細胞(例えば、精子細胞)の健康に導かないからである。

【0135】

シース流体19の供給7は、例えば、その中に制御弁669を有する供給ライン667によって、ノズルシステム101のフローボディ133における半径内径173に接続された適切な容量のシース流体19を保持する図2中のタンクといった第2の容器661を含む。図1の具体例において、シース流体容器661は、その中にレギュレーター681を有する、タンク661に供給された圧力を制御するためのエアライン679を介してタンク661に連絡する圧縮ガス(例えば、空気、または窒素のような他のガス)の源675を含むガス圧システム671によって圧縮される。エアライン679中の二方弁683は、タンク661およびガス源675の間の連絡を確立する第1の位置と、タンク661を換気する第2の位置との間を動くことができる。ガス圧力調節装置681は、好ましくはプロセッサ131の制御下にある慣用的な調節装置である。また、タンク661圧力を制御することによって、シース流体19がフローボディ133に送達される圧力を調節してもよい。この圧力は、16ないし100psi、より好ましくは10ないし50psi、さらにより好ましくは15ないし40psi、さらにより好ましくは約20ないし30psiの範囲であってもよい。シース流体19がフローボディ133に供給される圧力は、本発明の範囲から逸脱せずに、他の方法で制御することができる。

10

20

30

40

50

【0136】

図26を示す1つの具体例において、流体送達システム15は、シース流体タンク(図示せず)およびサンプルステーション4051を含む。サンプルステーションは、試料管4055を保持するように調整された2部圧力容器4053を含む。圧力容器の底部セクション4057は、試料管4055を負荷し、または負荷解除できる開いた位置(図26に示す)と、圧容器4053の2つのパーツ4057、4059が一緒になって、キャリア流体17を試料管4055からノズルシステム101にポンプ送液するのに用いられる圧縮ガスを含むようにシールを形成する閉じた位置(図示せず)との間の、圧力容器4053の上方セクション4059に対して上下に移動することができる。

【0137】

圧力容器が開いている時、スプリングバイアス振りアーム4071は、キャリア流体17をノズルシステム101まで送達するライン651の直下の位置まで移動する。振りアーム4071は、トラフ形状であり、ライン651を通してバックフラッシュした流体を集め、バックフラッシュした流体をポート4073を通して廃棄容器まで排出するよう適合される。圧力容器4053がその開いた位置からその閉じた位置へと動くにつれ、圧力容器4053の底部セクション4057に付着したカムプレートとそのスプリングバイアスに抗して振りアーム4071まで移動させて、2つのセクション4057-4059の間の領域をきれいにし、圧力容器4053を閉じさせる。

【0138】

制御

図2を参照して、マイクロプロセッサ131(または他のデジタルまたはアナログ制御および/またはプロセッサ、またはその組合せ)は、システム1の操作を制御する。図39に関して下記されるように、マイクロプロセッサは、システム制御プロセッサおよびシグナル処理を扱うための4つのプロセッサとして実行してもよい。別法として、いくつかまたは全ての機能が1以上のプロセッサに統合されてもよい。例えば、システム制御マイクロプロセッサ(図36参照)は、4つのシグナル処理プロセッサのうちの1つを使用することによって実行可能である。加えて、下記のように、シグナル処理は、アナログ回路(例えば、図39に示されるように、アナログ細胞アナライザ)またはアナログおよびデジタル回路の組合せによって実行され得る。

【0139】

マイクロプロセッサ131は、落射照明システム415から受け取られたインプットシグナルにตอบสนองして、流体送達システム15(下記)を制御するためのアウトプットシグナルを提供し、破壊センサー389から受け取られたインプットシグナルにตอบสนองして、変換器105を制御するためのアウトプットシグナルを提供し、落射照明システム415から受け取られたインプットシグナルにตอบสนองして、仕分けシステム119(下記)を制御するためのアウトプットシグナルを提供する。マイクロプロセッサ131は、本明細書中の他のところで記されるように、サイトメトリーシステム9の他の部分に、アウトプットシグナルを提供し得る。

【0140】

さらに、マイクロプロセッサ131は、リアルタイムで情報を処理し、アウトプットシグナルを提供するように適合され得る。広範に言えば、用語「リアルタイム」は、プロセッサ131の操作速度がヒトの時間の認識にマッチする操作、またはプロセッサ131の操作速度が関連する物理的または外部的処理の速度にマッチする操作をいう。1つの文脈において、用語「リアルタイム」は、事象が古くなる前に、システムが事象に反応することを示し得る。

【0141】

一般的には、落射照明システム415からの電気シグナルは、対応するデジタル情報をマイクロプロセッサ131に供給するA/D変換器689によって、デジタル情報に変換される。情報にตอบสนองして、マイクロプロセッサ131は、仕分けシステム119および流体送達システム15を制御し、両方とも上記される。

【0142】

10

20

30

40

50

落射照明システム415の光検出器117からの電気シグナルアウトプットは、それがレーザービーム25によって照射されるにつれ各細胞によって生じた、いずれかの瞬間の蛍光発光31の振幅を示す時変アナログ電圧シグナルである。従って、アナログシグナル(アナログアウトプットとも呼ばれる)は、図52および53において模式的に示されるように、時変波形パルス497の形状である。一般的に、波形パルス497は、1以上のパルスまたはパルスのいくつかの部分を含む波形または波形の一部として定義される。従って、いずれかの瞬間の各波形パルス497の振幅は、細胞がレーザービーム25を通過する時のその瞬間における各細胞の光子発光31の相対速度を表す。X染色体ウシ精子細胞は、Y染色体ウシ精子細胞(例えば、約3.8%)より高いDNA含有量を有する。結果として、上記のように蛍光染色によって標識された生X細胞は、いずれかの他の標識された細胞からのパルスとは異なる波形パルス497を生成するだろう。下記のように、パルス497を分析することによって(シグナル処理、スリットスキヤニング、および臨界勾配差参照)、各細胞は、X細胞として同定されてもよくあるいはX細胞(~X)として同定されなくてもよい。一般的に、本明細書中に使用されるように、X細胞は生X細胞を指し、Y細胞は生Y細胞を指し、~X細胞は、生Y細胞およびさもなければ検出可能な蛍光発光31を生成するが、生X細胞として合理的な確率によって同定することができない細胞の組合せを指す。

10

【0143】

各波形パルス497のタイミングは、流れ21中の各細胞の位置を示す。シース流体19がノズル137を通過して送達される速度は一定であり、ノズル137および液滴破壊位置107の間の距離d(図25中)は知られているため、各細胞の位置は知られ、各液滴33中の細胞が、もしあれば、知られている。従って、マイクロプロセッサ131は、液滴を形成する各々が荷電カラー631を通過する瞬間を計算でき、カラー631の極性を計算でき、かくして液滴33が、仕分けシステム119の荷電要素631による偏向のために荷電されたか否かを制御することができる。マイクロプロセッサ131は液滴形成速度を知っており、液滴内の細胞をXまたは~Xとして同定するため、マイクロプロセッサ131は各液滴33の細胞含有量を知り各集団123、125中の細胞の数を把握または列挙する、下記のように、仕分け方法によって、マイクロプロセッサ131は、どの液滴33が偏向のために荷電され、どの液滴33が偏向されないように荷電されないかを決定する。

20

【0144】

シグナル処理

30

A. デジタル試料導入

前述のように、レーザービーム25および粒子の相互作用は、光学システム109の収集レンズ511によって捕獲され、光検出器117へと送達される「パルスド」光子発光31(例えば、蛍光発光)である。光検出器117は、時変振幅のアナログ電圧アウトプットによって、適切な時期にすぐに、光子エネルギーを変換する。このアウトプットは、粒子の集団間を識別するのに使用可能な多くの特徴を含む一連の波形パルス497(図43および44)である。これらの特徴の中には、総光子発光、レーザービームを通る粒子の空間転移の機能としての光子発光の速度、転移の間の光子発光の最大速度、転移の間の光子発光の平均速度、および転移に必要な時間がある。レーザービーム幾何学459、粒子サイズ、粒子容量および粒子速度を通る発光源の分布の組合せは、波形パルス497の周波数スペクトルを決定する。前述のウシ血清と使用されるシステム1に関して、各細胞201は、持続時間が800nsおよび1200nsの間の波形パルス497を生成すると決定された。また、周波数の機能として、波形パルス497の電力の97%以上が、30MHzを下回る周波数で送達されることが決定された。この周波数スペクトルは、ナイキスト(Nyquist)サンプリング定理に関係するため、後に論議されるだろう。総合すれば、これらの波形パルス497は、連続的で、時変の光検出器117から、アウトプットシグナル701、装置を通過して粒子流れの転移を表すシグナルを形成する。集団間を区別するのに使用される個々のパルスの特徴に加えて、時変シグナルは、装置を通過する個々の粒子の間の相対的間隔(時間および場所)および装置を通過して動く粒子の相対的速度に関して、正確な記録を提供する。この正確な時間、位置および速度記録は、図44に示されるように、液滴発生クロックシグナル703と同

40

50

調させて、どの粒子が液滴発生装置105によって形成された特定の液滴33のメンバーであるか決定することができる。この情報を、「同時発生」または単一の液滴33中の所望のまたは望ましくない粒子の出現率を決定するための基準として使用することができる。液滴33中の各粒子の数および分類を正確に決定する能力によって、正確で、効率的な仕分けが可能になる。

【0145】

図72に示されるように、デジタルシグナル処理705を使用して、光検出器117からの同調してサンプリングされたアウトプットシグナル701によって示されるように、蛍光パルス31の検出を分析してもよい。この処理は、本明細書中に記載されるように、指令および/またはアルゴリズムを用いるパルス分析ソフトウェアで実行されるであろう。光検出器117の時変アナログアウトプットシグナル701は、それを同調してサンプリングするA/D(アナログ/デジタル)変換器689に提供される。同調してサンプリングするとは、サンプリングして、アナログアウトプットに対応するデジタル情報を生成することを意味する。また、同調してサンプリングするとは、連続してサンプリングするまたはストリーミング収集とも呼ばれる。下記されるように、サンプリング速度は、アナログアウトプットの周波数スペクトルによって決まる。

【0146】

変換器689は、マイクロプロセッサ131またはパルス分析ソフトウェアを実行して、デジタル情報707を分析する他のデジタル分析デバイスに提供されるデジタル情報707を含むアウトプットを提供する。一般的には、パルス分析ソフトウェアは、デジタルパルス検出HH3、パルス特徴抽出HH4およびパルス区別HH7を含むだろう。

【0147】

B. サンプリング周波数およびシグナル周波数スペクトル

PMT117からのシグナルアウトプット701は、105MHzの周波数にて、連続して、アウトプット701をサンプリングする高速アナログ・デジタル変換器689(ADC)によって捕らえられる。時変シグナルをサンプリングする時、サンプリング周波数がサンプリングされるシグナルに含有される最大周波数の少なくとも2倍であることが必要であることがよく理解される。これは、ナイキスト(Nyquist)サンプリング定理として知られる。この理由のため、PMT117からのアウトプットシグナル701は、40MHz低域通過フィルター854を通過してまず送られて(図39参照)、シグナル701に含有される最大周波数が、サンプリング速度によって課された52.5MHz制限下であることを確認する。装置1の光学109、流体15および検出システムは、105MHz速度にてサンプリングするための最適な周波数特徴を有するパルス波形497を生成するように調整されていることに注意するのは重要である。サンプリング速度は、本発明の範囲から逸脱することなしに、約25および200MHzの間を変動し得る。

【0148】

C. パルス処理

パルス処理は、メモリーを共有し、高速平行ポートによってもう一方に接続される4つの(4)TigerSharcDSPプロセッサで起こる。図39に示されるように、4つのプロセッサは:1)光検出器117からのアウトプットシグナル701をデジタル化する高速ADC689からデータを受け取るデータ管理プロセッサ863;2)デジタル情報によって表される波形パルス497を検出するパルス検出プロセッサ865;3)特徴抽出および検出されたパルス497から特徴を抽出し、抽出された特徴に基づき、パルス497を識別する識別プロセッサ867;および4)抽出された特徴および識別に基づき、各パルス497に対して仕分け分類を決定し、対応する細胞および液滴33に対して仕分け決断を決定し、液滴形成105と同調する仕分けプロセッサ873である。一般的には、プロセッサ863、865、867、873は、タスクを完了し、コンパニオンプロセッサが処理するのが可能なデータがあると分かるように、「フラッグ」を設定する。

【0149】

各プロセッサ863、865、867、873は、他とは独立して動き、お互いを妨害しないため、全体的なスループットを最大化する。従って、いずれかのプロセッサ863、865、867

10

20

30

40

50

、873は、いずれかの機能を実行することが可能であり、1以上のプロセッサまたは機能が単一のプロセッサへと組み合わされてもよく、あるいは複数のプロセッサに分けられてもよい。上記で使用されるように、プロセッサ863、865、867、873は標識し、この適用は、便宜のためのみに使用され、とにかく制限するように意図されていない。

【0150】

全ての4つのプロセッサ863、865、867、873は、情報を交換するためにDSPボードSDR AM851に連結され、PC735および仕分けパルス発生器861に接続された末端I/Oバス859との同調および通信のために、プロセッサインプット/アウトプット(I/O)857に連結される。プロセッサI/O857は、通信リンクによって接続された2以上のSharcFIN I/Oプロセッサによって使用され得る。仕分けシグナル853は、末端I/Oバス857を介して、PC735に提供され、液滴33の電荷を制御する仕分けパルス発生器861を制御するのに使用される。

10

【0151】

プロセッサI/O857は、例えば、持続された105MHz/1-チャンネルが可能なBitware Corp. 105MHz/2-チャンネル、14ビットといったアナログ/デジタル変換器(ADC)689から、アウトプット707を受け取る。ADC689は、その時変アナログアウトプットシグナル701をデジタル情報707に変換するために、光検出器117アウトプットに接続され、また、ADC689からデジタル情報のブロックを保存するために、I/OボードSDRAM855に接続される。

【0152】

一般的には、光検出器117からのアナログアウトプットシグナル701は、特徴Aまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標である。A/D変換器689は、フローサイトメトリーシステム1の光検出器117からのアナログアウトプットシグナル701を対応するデジタル情報707に変換する。プロセッサ863、865、867、873は、デジタル情報707を分析し、分類し、仕分けシグナルを仕分けシステム119に、検出され分類されたデジタル情報の関数として提供する。

20

【0153】

D. データ取得

前述のように、光検出器117からのシグナルアウトプット701は、105MHzの周波数にて、連続して、アウトプットをサンプリングする高速アナログ・デジタル変換器(ADC)689によって捕らえられる。データ(デジタル情報707)は、着信データを緩衝する働きをする高速メモリーブロック(I/OボードSDRAM)855へとすぐに移される。これらのメモリーブロック855は、データ流707の完全性および並びを維持するように整理される。また、これらのメモリーブロック855は、直接的なメモリアクセス(DMA)によって、デジタルシグナル処理(DSP)プロセッサ863、865、867、873によってアクセス可能である。このように、プロセッサ863、865、867、873は、ADC689を妨害せずに、着信データ707にアクセスできる。これによって、特徴抽出、分析および仕分け分類のための、データ707のこれらのプロセッサ863、865、867、873への効率的な移動を促進される。このプロセスを通して、データ管理プロセッサ863は、パルス試料707を整理し、時間をインデックス(液滴33周波数の128倍であるマスタークロック737に相対的な)して、「リアルタイム」への言及または細胞がレーザービーム25を通過する実際の時間を保存する。ADC689は、2つのインプットの間を行ったり来たりし、波形パルス497を含む時変アナログアウトプットシグナル701を継続してサンプリングし、それらを、データ管理プロセッサ863の制御下で、I/OボードSDRAMにブロック855で提供されるデジタル情報707に変換する。プロセッサ863は、情報707を連続した流れへとまとめる。

30

40

【0154】

E. 検出パラメーターを開始する

バックグラウンドノイズを効果的に識別するために、デジタルパルス検出ソフトウェア747は、シグナルバックグラウンド二次統計を示す情報、つまり、蛍光パルス497がない時に、光検出器117からのアウトプット電圧シグナル701の動きの知識を提供されるべきである。これらの統計学は、システム1のスタートアップの直後の開始時間の間、監視されていない様式で、検出パラメーター741を開始するためのソフトウェアによって学習され得

50

る。一般的には、パルスは、バックグラウンドレベルから2または3の標準偏差として規定することができる。

【 0 1 5 5 】

シース流体流191へのキャリアー流体17の導入がバックグラウンド蛍光発光の変化を生じ得る可能性のため、キャリアー流体17は、検出パラメーターの開始に存在しているべきである。アウトプット電圧シグナル値の時間系列の二次統計の単純な計算は、バックグラウンドの標準偏差を多く見積もりすぎ得る(系列における蛍光パルス497の潜在的な可能性のため)。従って、反復法は、この効果を徐々に排除するのに好ましい。パルス検出ソフトウェア747は、これを、総シグナル701(バックグラウンド+パルス)の統計を計算し、これらの値を使用して、パルス検出論理を適用し、パルス内であると検出された試料なしで、シグナル統計を再計算し、バックグラウンド統計予測が収束する(または反復の固定最大数が生じる)まで、この手順を繰り返すことによって達成する。存在する細胞でバックグラウンドを評価することによって、予測される正確なパルス497振幅のより正確な指標を決定することができる。表IIは、パルス検出ソフトウェアによる使用のための検出パラメーターを決定するための検出初期設定手順を要約する。

10

【 0 1 5 6 】

【表 3】

アルゴリズム: 検出パラメーターを初期設定する	
インプット:	フロートPMTvoltsのベクトル, フロートstatウィンドウSize, 整数maxIterations
アウトプット:	フロートbckgrndMean, フロートbckgrndSTD
手順:	
1.	バックグラウンドベクトルbckgrndを初期設定して、PMTvolts ベクトルおよびnumIterationsのstatウィンドウSize試料, lastSampleMean, およびlastSampleSTD をゼロまで継続する: $bckgrnd = PMTvolts [1 \text{ ないし } statWindow \text{ Size}]$ $lastSampleMean = 0$ $lastSampleSTD = 0$ $numIterations = 0$
2.	試料平均ならびにbckgrndの試料標準偏差およびインクリメント反復カウンターを計算する: $sampleMean = \frac{\sum(bckgrnd)}{statWindowSize}$ $sampleSTD = \frac{\sum(bckgrnd - sampleMean)^2}{statWindowSize}$ $numIterations = numIterations + 1$
3.	収束またはその反復の最大数を越えていないかチェックする: $exitFlag = ((sampleMean - lastSampleMean) < eps \wedge (sampleStd - lastSampleStd < eps)) \vee (numIterations > maxIterations)$ <p>もしexitFlagが真であれば、工程6に進む(さもなければ、工程4を続ける)。</p>
4.	パルス検出アルゴリズムを適用して、パルス試料のベクターおよびバックグラウンド試料の新たな推定値を入力する: $[pulse, bckgrnd] = \text{パルス 検出}(bckgrnd, sampleMean, sampleSTD)$
5.	この反復からの統計上の推定値を記録し、繰り返す $lastSampleMean = sampleMean$ $lastSampleSTD = sampleSTD$ <p>工程2に進む。</p>
6.	試料統計にバックグラウンド統計上の推定値を設定し、抜け出す: $bckgrndMean = sampleMean$ $bckgrndSTD = sampleSTD$

20

30

40

表II. パルス検出アルゴリズムパラメーターの初期設定

【 0 1 5 7 】

一般的に、A/D変換器689は、アナログアウトプットシグナル701を、光検出器117から、特徴Aまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標である対応するデジタル情報707に変換する。デジタルシグナルプロセッサ865は、それに対応するデジタル情報707からの時変ア

50

ウトプットシグナル701のバックグラウンド特徴を決定し、決定されたバックグラウンド特徴の関数として、デジタル情報707から波形パルス497を検出し、検出されたパルス497の関数として仕分けシステム119に仕分けシグナル853を提供する。

【 0 1 5 8 】

F. 初期設定識別パラメーター

検出パラメーターと同様に(および表IIに示されるようにそれらの初期設定に続いて)、識別アルゴリズムでの使用のためのパラメーターを、監視されない様式で初期設定することができる。しかしながら、検出アルゴリズムパラメーターとは違って、反復法は不要である。この場合、識別パラメーター745を初期設定するためのソフトウェアは、蛍光パルス497の現在の数(例えば、100,000)を検出し、各検出されたパルス497のための識別に使用される特徴を計算し、クラスタ化手順(候補クラスタ化手順の概要につき、表II参照)を用いて、これらのパルス497に関心のある集団(例えば、X、~X)に付与する。

10

【 0 1 5 9 】

【表 4】

アルゴリズム名	アルゴリズムアプローチ
k-平均法	各集団内の点の間の平方距離(ユークリッドおよびマハラノビス)の総和の反復(局所)最小化[1]
ファジー k-平均	(ガウス)混合モデルの予測-最大化[2]
凝縮型階層	クラスタの所望数に達するまで、(それ自体のクラスタとしての各データ点で開始して)「最も近い」クラスタの合。「最も近い」クラスタの決定のための種々の尺度は最近接点間の距離、最遠点間の距離、クラスタ平均間の距離、および点の間の平均距離を含む。[1]

20

表2. 識別アルゴリズムパラメーター初期設定で用いられると考えられるクラスタ化アプローチの概要

【 0 1 6 0 】

図73は、分布の統計に基づき、集団1および集団2を規定するために、k-平均法クラスタ化手順の適用の結果の例を含有する。次いで、これらの集団の二次統計を使用して、識別に必要なパラメーターを設定する(一次または二次多項式決定関数の係数)。表IVは、識別初期設定手順の要約である。

30

【 0 1 6 1 】

【表5】

アルゴリズム: 識別パラメータを初期設定する	
インプット:	フロート <i>detectedPulseData</i> の行列, フロート <i>pop事前確率</i> のベクトル
アウトプット:	各クラス集団につき: フロート <i>W</i> の行列, フロート <i>w_j</i> , フロート <i>w₀</i> のベクトル
手順:	
1.	検出されたパルスからの特徴値を計算する(パルス当たりのn値、ここにnは特徴空間の次元): $featureValues = \text{特徴抽出}(detectedPulseData)$
2.	集団メンバーシップを得るための特徴空間におけるクラスター特徴値 $populations = \text{cluster}(featureValues)$
3.	集団の二次統計を計算する: (<i>j</i> = 1ないし <i>m</i> について、ここに <i>m</i> は集団/クラスの数である) (<i>j</i> = 1ないし <i>n</i> について、ここに <i>n</i> は特徴空間の次元である) $popMean[j] = \frac{\text{sum}(featureValues[populations, j])}{\text{集団}_j \text{における試料数}}$ (<i>k</i> = 1ないし <i>n</i> について、ここに <i>n</i> は、特徴空間の次元である) $tmpVal[j, k] = (featureValues[populations, j] - populationMean[j]) \cdot (featureValues[populations, k] - populationMean[k])$ $popCovariance[j, k] = \frac{\text{sum}(tmpVal[j, k])}{\text{集団}_j \text{における試料数}}$
4.	多項式識別関数係数を計算する: (<i>j</i> = 1ないし <i>m</i> について、ここに <i>m</i> は集団/クラスの数である) $W_j = -1/2 \cdot popCovariance_j^{-1}$ $w_j = popCovariance_j^{-1} \cdot popMean_j$ $w_0 = -1/2 \cdot \ln(popCovariance_j) - 1/2 \cdot popMean_j^T \cdot popCovariance_j^{-1} \cdot popMean_j + \ln(popPriorProbabilities_j)$

10

20

表IV.識別アルゴリズムパラメータの初期設定

【0162】

一般的には、A/D変換器689は、光検出器117からのアナログアウトプットシグナル701を、特徴Aまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標である対応するデジタル情報707に変換する。デジタルシグナルプロセッサ-867は、デジタル情報707に対応する初期識別パラメータを発生させ、初期識別パラメータの関数としてデジタル情報を識別し、識別されたデジタル情報の関数として、仕分けシステム119に仕分けシグナル853を提供する。

30

【0163】

G. デジタルパルス検出

第1の処理工程は、パルス検出プロセッサ-865によって行われて特定の波形が細胞の蛍光発光31に対応する波形パルス497か否かを決定するパルス検出である。プロセッサ-865は、パルス検出アルゴリズムを実行し、これは集団に仕分けするための標的化粒子または回避すべき標的化粒子いずれかを表すようである試料組を同定する。何故ならば、それらは集団に対する潜在的汚染物だからである。ウシ血清仕分けの場合、色素を添加して、生育不能な細胞の発光31をクエンチして、それらの関連したパルス強度を、生存能力のある細胞の強度の~1/3にする。生育不能な細胞は、仕分け標的または潜在的汚染とは考えない。それらは、検出されたパルス497とは考えない。生細胞からのパルス497は、バックグラウンドレベルを超える試料の連続する数につき、試料の強度をモニタリングすることによって検出される。一旦、このレベルが、統計学的に決定された閾値と交差すると、プロセッサ-865は、生細胞についての予測されるパルス497の幅のほぼ75%であるより後の時刻にジャンプする。もしレベルがまた閾値を上回っていれば、一連の試料パルス497であると考えられる。検出されたパルス497からの試料は、特徴抽出プロセッサ-867によって使用されるメモリーのブロックまで動かされる。

40

50

【 0 1 6 4 】

統計上の変則検出アプローチは、デジタル化されたパルス497を同定および/または単離するための他のアプローチを使用してもよいと考えられるが、デジタルパルス検出ソフトウェア747によって使用され得る1つの具体例である。基本的に、バックグラウンドから統計学的に変則である蛍光を検出する光検出器117からのアウトプット電圧シグナル701のデジタル試料707は、パルス497の一部であると考えられる。(ノイズ検出を最小化するための)さらなるロバスト性のために、さらなる一時的な基準を含んでもよい。

【 0 1 6 5 】

パルス検出は次のように進行する。光検出器117からの電圧アウトプットシグナル701がパルスでない時、シグナル701の入り試料707のバックグラウンドからのマハラノビス距離が計算され、現在の閾値と比較される。もし所与の試料の距離が閾値を超えれば、パルス497の潜在的な開始と考えられ、パルス検出ソフトウェアは、入り試料を緩衝し始める。また、もし試料の次の所定の数(例えば、25)が閾値を超えれば、パルス497は、開始したと考えられ、緩衝は、パルス終了基準が達成されるまで続く;さもなければ、緩衝はリセットされ、パルスの開始のためのチェックは再開する。パルス497において、もし試料が閾値を下回れば、パルスの潜在的な終了と考えられ、緩衝位置が記録される(しかし、試料緩衝は続く)。また、もし試料の次の所定の数(例えば、25)が閾値を下回れば、パルス497は終了したと考えられ、パルス497は、記録された位置まで緩衝された試料よりなる。表Vはパルス検出アルゴリズムを要約し、図49は、デジタル的に獲得された蛍光パルス497に対するパルス検出の結果の図を提供する。

【 0 1 6 6 】

【表 6】

アルゴリズム: デジタル蛍光パルス検出	
インプット:	フロート <i>digSamples</i> のベクトル, フロート <i>bkgrndMean</i> , フロート <i>bkgrndSigma</i> , フロート <i>pulseStartThresh</i> , フロート <i>pulseEndThresh</i> , 整数 <i>numStartSamples</i> , 整数 <i>numEndSamples</i>
アウトプット:	フロート <i>pulseBuffer</i> のベクトル
手順:	
1.	<i>inPulseFlag</i> = 0, <i>pulseStartCount</i> = 0, <i>pulseEndCount</i> = 0を初期設定する
2.	<i>digSamples</i> における各試料について、バックグラウンドからマハラノビス距離を計算する:
	$mhDist[i] = \frac{(digSample[i] - bkgrndMean)}{bkgrndSigma}$
3.	もし <i>inPulseFlag</i> が設定されていないならば、工程4に進む、さもなければ工程6に進む。
4.	もし <i>mhDist</i> > <i>pulseStartThresh</i> であれば、試料を <i>pulseBuffer</i> に入れ、 <i>pulseStartCount</i> を増分し、工程5に行き;さもなければ <i>pulseStartCount</i> =0を設定し、工程2に行く。
5.	もし <i>pulseStartCount</i> > <i>numStartSamples</i> であれば、 <i>inPulseFlag</i> を設定し工程2に行く。
6.	もし <i>mhDist</i> < <i>pulseEndThresh</i> であれば、試料を <i>pulseBuffer</i> に入れ、 <i>lastPulseSample</i> を現在の緩衝位置に設定し、 <i>pulseEndCount</i> を増分し、工程7に行く;さもなければ <i>pulseEndCount</i> をゼロに設定し、工程2に行く。
7.	もし <i>pulseEndCount</i> が <i>numEndSamples</i> よりも大きければ、 <i>pulseBuffer</i> [<i>!</i> ないし <i>lastPulseSample</i>]を復帰させ、抜ける。

表V. デジタル蛍光パルス検出の要約

【 0 1 6 7 】

一般的には、A/D変換器689は、光検出器117からのアナログアウトプットシグナル701を、特徴Aまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標である対応するデジタル情報707に変換する。デジタルシグナルプロセッサ-865はデジタル情報を分析し、プロセッサ-873は、仕分けシステム119に、検出されたデジタル情報の関数として、仕分けシグナル853を提供

する。

【0168】

H. 特徴抽出および識別

次の処理工程は、特徴抽出およびプロセッサ-867によって実施される特徴抽出である。このプロセッサは、パルス検出プロセッサ-865によって設定されたフラッグに回答する。検出されたパルスからの試料は、特徴抽出プロセッサ-867と共有されるメモリーに置かれる。面積、パルス幅、パルス高、ガウス相関係数のような特徴および/または他の特徴は、各パルス497に対して決定される。いくつかのケースにおいて、パルス497は、「ダブレット」または無効であると決定され、特徴は抽出されない。ウシ血清精子201のケースに対して、特徴は、生XまたはY細胞の一般的な振幅および幅を有するパルス497に対して抽出されるだけである。典型的には、生精子細胞に対するパルス振幅は、約700-900mVの範囲であるが、この範囲は500-1000mVほどの広くてもよい。一旦、特徴が抽出されると、それらは、仕分けに選択された(複数の)集団に対して規定された特徴空間と比較される。もし特徴が、仕分けに対して同定された特徴空間と適合すれば、プロセッサ-867は、プロセッサ-873を仕分けする肯定的仕分けコマンドを示すフラッグを設定する。一般的には、特定の細胞の分類は、識別プロセッサ-867によって行われ、仕分け決定は仕分けプロセッサ-873によって行われる。

10

【0169】

蛍光発光31を表すデジタル情報707(およびすなわちそれらを作った対応する細胞の特徴)は、注目する異なる集団についての特徴空間(軸としてのn個の特徴によって形成されたn-次元直交空間)において識別可能に統計的挙動を呈する特異的特徴に基づいて区別される。従って、識別の目的のためにデジタル情報707を分析する第1の工程は、これらの特徴の計算、プロセッサ-867によって実行されるパルス分析ソフトウェア749によって行われる特徴抽出と呼ばれるプロセスである。表VIは、ソフトウェア749がこの適用のために使用し得るいくつかの候補特徴をリストする。1以上のこれらの特徴は、分類のための特徴スペースを形成するために選択されるだろう。このリストが例示的なものであって、包括的なものでないように、さらなる分離を提供するさらなる特徴が存在することは注意すべきである。例えば、ソフトウェア749は、サブルーチン753を使用してパルス497領域を決定および/またはサブルーチン755を使用してパルス497ピークを決定してもよい。

20

【0170】

【表7】

特徴名	特徴記載
パルス領域	パルス試料の総計(または平均)によって近似
パルスピーク	パルス試料の最大値
パルス「内方」領域	(パルス平均を中心とする)パルスの内方TBD試料の総計(または平均)
パルス幅	パルス中の試料の数
パルス「ガウス性」	MSEまたはガウス形状を持つパルスと同一二次統計との相関係数
パルス「ラギングピーク」	Pulse value at TBD samples past peak (or mean)
臨界勾配差(CSD)	特徴Aを有する粒子によって生じるパルスの一次微分および特徴Bを有する粒子によって生じたパルスの一次微分の間の差が最大において、またはその近くでする時のパルスに沿う点におけるパルスの勾配

30

表VI. 特徴抽出に関連するデジタルパルス分析での使用で現在考慮される候補特徴の概要

40

【0171】

I. スリットスキヤニング

一般的には、照明システム109によって提供される楕円スポット459は、細胞中の相対的なDNA含有量差を測定する。解像度は、評価される特徴を含有する可能性がより高い光検出器117によって検出された蛍光発光31のパルス497の画分を分析することによって、さらに改善することができる。特定の細胞(例えば、ウシ精子細胞)の生物学的現象は、細胞の核の縦方向中央線または赤道または中央に直ぐに隣接する赤道下領域225におけるX/Y染色体の局在化である(図6参照)。事実、X/Y染色体は、必ずしも核213の中心にない。従って、解像度は、光検出器117の時変アナログアウトプット701をデジタル情報707に変換し、

50

蛍光発光31のパルス497の画分に対応する、すなわち、パルス497ピークを中心とする波形パルスの20ないし60%、特に20ないし30%のように赤道周囲領域225から発せられた光に対応するデジタル情報の一部を解析することによって改良することができる。

【0172】

上記のように、スリットスキヤニングを使用して、全体としてのクロマチンからよりもむしろ各細胞のクロマチンの一部からの蛍光測定を得ることができる。もう一方に対するX細胞および~X細胞の解像度が改善されるように、上記の落射照明システム415によって提供される楕円スポット459は、クロマチンの特異的なセクションから、細胞における相対的なDNA含有量差を測定する。上記のように、フォーカスされたスポットサイズ459の寸法が、図6に示されるように、細胞直径よりずっと小さくなるように、スリットスキヤニング測定技術は、励起ビーム25をフォーカスする蛍光測定アプローチである。このように、細胞201は、細胞が楕円形状ビームスポット459を通過する時、レーザービーム25によってスキャンされる。スリットスキヤニング照明から得られた蛍光発光31を検出する光検出器117アウトプット701によって生成された得られた波形パルス497は、細胞201の長さに沿った蛍光の局所化に関する情報を含有する。図45-48に示されるように、細胞201が楕円形状のビームスポット459を横切る時、時変波形パルス497(赤/オレンジのライン)は、相対的ビーム強度(青いライン)および(細胞がビームを横切る時に楕円形スポットによって励起された染色からの蛍光発光に対応し、細胞の軸に沿った蛍光分布が変動するため、変動する)相対的な発光するパルス強度のコンボリューションである。

【0173】

細胞のクロマチンの画分のみを、一時に照射することによって、光検出器117から得られた時変アナログアウトプット701は、細胞201の縦軸に沿ったクロマチン内の蛍光の局所化に特異的な情報を含有する。スリットスキヤニングから検出された蛍光発光31は、細胞直径と同程度のスポット幅を有するビーム25によるスキヤニングから検出された発光31未満であり、その結果、より低いパルス振幅を有するスリットスキヤニングからの波形パルス497がもたらされ、X-染色体担持細胞およびX-染色体担持細胞の間の差の大部分は、波形パルス497の中心20-30%ないし20-60%に現れる。もし図53の長方形領域725のみを、X-Y精子細胞識別で考慮するならば、より大きい相対的な差を、細胞の総DNA含有量と比較して、該領域内のXおよびY染色体の存在による長方形領域725に対応するクロマチンのセクション内のDNA含有量の局所化された変動の間で測定することができる。例えば、ウシX-Y精子細胞は、約3.8%の総DNA含有量の差を有する。XおよびY染色体からの蛍光発光31は、長方形の領域725に含有されるだろう。もしこの長方形の領域725が蛍光発光31に対応する総波形パルス497の20%を占めるならば、領域内の相対的なDNA含有量において、14%の差が存在するだろう。クロマチンの特異的なセクションからの相対的なDNA含有量差を測定することによって、X-Y精子細胞差の解像度が改善される(例えば、3.8%ないし14%)。図54は、スリットスキヤニング照射を用いて、パルス497(つまり、図53の長方形領域725)の中心20%のみからの領域を処理することで達成できる解像度を示す。図54のヒストグラムは、精子を持つX染色体および精子を持つY染色体の非常に高いパーセンテージ(例えば、98%)が、十分な信頼性(例えば、95%)を持って、同定されるのを可能にする。相対的に、標準照射技術を用いた時に入手可能な解像度を示す図55のヒストグラムは、スリットスキヤニングが、標準照射技術を用いて得られる結果より、有意な改善を提供することを示す。

【0174】

図53に示されるように、波形パルス497の中心部分の領域725を得るのに使用可能な2つのアプローチは、このセクションで論議されるように、デジタル化された光検出器117時変アナログアウトプット701のデジタルシグナル処理(DSP)、または下記のようにアナログ閾値トリガーを用いるアナログ統合である。本明細書中で記されるように、DSP処理は、アウトプット701に対応するデジタル情報707を得るために光検出器117からの時変アナログアウトプット701を連続してサンプリングすることおよび異なる細胞201中のXまたはY染色体の存在によるDNA含有量の差に対応する波形パルス497の中心部分725に対応するデジタル情報からの領域サイズのような特徴を抽出するためにDSPアルゴリズムをデジタ

ル情報707に適用することを含む。単純な例として、各波形パルス497の総面積の中心20%は、それに対応するデジタル情報707を分析することによって決定されるだろう。分析を使用して、図53に示されるようなヒストグラムが生成されるだろう。

【0175】

J. パルスレーザーキャニング

1つの具体例において、システム1が細胞を照射するパルスレーザーを含むことが考えられる。この具体例において、(上記の)スリットキャニングを使用しても使用しなくてもよい。例えば、モードロックされた固定レーザーを使用して、約50-150MHzのパルス周波数にて、および約100-500ミリワットの平均電力アウトプットにて、1-100ピコ秒のパルス幅(持続期間)を有する電磁パルスの列を発光することができる。1つの適当なレーザーは、Vanguard350モードロック固定レーザー(Spectra-Physics, Mountain View, CA 94039から入手可能)であり、これは、約85ミリオンパルス/秒の周波数にて、および約350ミリワットの平均電力にて、幅(持続期間)約12ピコ秒のパルスを連続して発光するように操作可能である。350mWの電力は、たった12ピコ秒の非常に短いバーストで送達されるため、そのようなレーザーのピーク電力アウトプットは、平均電力より数百倍(例えば、約800倍)大きい。

10

【0176】

多くの適用に対して、パルス反復速度は、連続波(cw)アウトプットに近づくのに十分速いため、そのようなレーザーのアウトプットは、準連続波(準-cw)として記載され得る。実際に、上記のようなシステムを、cwレーザーで操作するのとほとんど同じ様式で、半cwレーザーで操作することが可能である。固定レーザーは、典型的に、より効率よく操作し、あまり大規模でない冷却システムを要し、ほとんどの他のレーザーほど管理を要しないため、これは、ある種の利益を提供する。

20

【0177】

また、準cwパルス固体レーザーによって、デジタルシグナル処理技術を用いる有意に改善されたシグナル対ノイズ率を得ることができる。タイミング回路が含まれてもよく、問い合わせ位置115(つまり、レーザービーム25が流れ21を照射する領域)にて、レーザーパルスの到達を示すタイミングシグナルを生成するように操作可能である。例えば、タイミング回路は、図40に示されるように、各レーザーパルスの流体の流れ21との相互作用によって生じた散乱光を含みおよび/またはレーザーパルスからの光を含むレーザーパルスに対応する光を検出するためのレーザーパルスセンサー3003であってもよい。別法として、トリガーされ得るレーザーに関して、トリガリングシグナルは、マイクロプロセッサ131および/またはA/D変換器689に提供されて、図50に関して下記されるように、いずれかまたは両方をレーザーパルスに同調してもよい。いずれかの具体例において、レーザーパルスタイミングは、システムに対して、クロックシグナルを提供するだろう。

30

【0178】

図50を参照して、タイミングダイアグラムは、レーザーパルスLPと、細胞が光検出器アウトプット701のビームスポット459およびデジタル試料DSを通過する時にレーザーパルスLPにて反復励起の結果としての細胞からの蛍光発光FEとの間のタイミング関係を説明する。図45-49に示されるように、細胞がレーザービームスポット459を通過する時、蛍光発光31は、蛍光発光31を生じる細胞の部分の照射の量によって変動する。図50は、細胞がフローサイトメーター1の問い合わせゾーン115を通過する時、細胞に影響を与える20の(20)レーザーパルスLP1-LP20を示す。各レーザーパルスLP1-LP20は、それぞれ、蛍光発光FE1-FE20に対応し、レーザーパルスによる実質的に瞬間的な励起の後に、急激に崩壊する。

40

【0179】

それぞれ、デジタル試料DS1-DS20によって示されるように、変換器689が、各蛍光発光FE1-FE20のピークにてまたはその近くで、光検出器117のアウトプットシグナル701をサンプルするように、1つの具体例において、マイクロプロセッサ131は、A/D変換器689(図40参照)を制御する。つまり、タイミング回路は、A/D変換器689のサンプリング速度を蛍光発光FE1-FE20と同調する。問い合わせゾーン115を通る粒子の通過によって生成される

50

得られたデジタルシグナルは、連続波レーザーからのパルス波形497のデジタル化によって生成されたであろうデジタルシグナルの関数的同等物である。図51に示されるように、例えば、デジタル試料DS1-DS20の間蛍光強度のみを考慮し、レーザーパルスLP1-LP20の間の蛍光強度減少を無視することによって、時間の関数としての蛍光強度は、パルス波形497である。これは、蛍光発光FE1-FE20を供する細胞を分析するために、パルスレーザーによって生成されるデジタルシグナル707からのマイクロプロセッサ131による特徴抽出を可能にする。1つの具体例において、2ナノ秒またはそれ未満の比較的速い応答時間を有するより感度の高い光検出器を使用して、より正確に蛍光発光を検出してもよい。

【0180】

従って、パルスレーザーは、フローサイトメトリーシステム1において、より低い電力パルスレーザーを使用して、パルスレーザーの平均電力よりずっと高い平均電力にて作用するcwレーザーによって得られるのと実質的に同じ分析を得ることが可能であるという利点を供する。さらに、蛍光発光が最大化され、それにより光検出器のアウトプットシグナルのシグナル対ノイズ率を減少するように、パルスレーザーからの高いピーク電力はフルオロフォアを飽和する傾向がある。つまり、フルオロフォアを飽和するのに必要なエネルギーよりずっと多くを含有するレーザーパルスを用いることによって、レーザーのアウトプットの変動は、蛍光発光31の変動を生じる。

【0181】

当業者は、レーザーに一連のパルスを放出させる多くの方法があることを認識するであろう。本発明の範囲から逸脱せずに、他のモードロックレーザー、Q-スイッチレーザー、空洞ダンピングレーザーを含む他のパルスレーザーを、上記で論議されたモードロックレーザーの代わりに使用できることが理解される。同様に、デジタルサンプリングの時間を測り、得られた情報を処理する多くの他の方法は、前述の開示から明白であろう。例えば、デジタルサンプリングは、本発明の範囲から逸脱せずに、レーザーパルスおよびデジタル試料の間に異なる遅延があるように（あるいは遅延が全くないように）時間を測ることができる。また、同様に、デジタルサンプリングの間に経過するデジタル試料の数/パルスまたはパルスの数は、本発明の範囲から逸脱せずに、変動し得る。

【0182】

K. 集団特徴の予測

上記のように、フローサイトメトリーを使用して、DNA含有量の相対的な3.8%差に基づき、ウシ精子細胞を有するXおよびウシ精子細胞を有するYを識別することができる。識別は、染色された細胞が問い合わせ位置115を通過する時に蛍光発光31を記録するのに使用される光検出器117によって生成される時変シグナル701の特徴の分析を介して達成される。この相互作用は、図45-48に示される。図45-48は、パルス波形497が、レーザービーム25および染色された精子細胞201の間の相互作用から得られる蛍光発光31によってどのように発生するかを示す。発光パルス497は、励起空間関数498および発光空間関数の重畳積分である。蛍光パルス波形497の特徴を使用して、細胞をX、Yまたは未定として分類する。1つの具体例において、X-Y識別は、2つのパルス特徴：ピークパルス高およびパルス面積に基づく。

【0183】

これらの特徴は、図52および53に現れる例示パルス上に示される。図52および53は、X-担持およびY-担持精子細胞からのパルス497の例である。パルス497は、2 μ mガウスビームウエストW1(図6)を有する楕円形状ビームスポット459を有するレーザービーム25での励起照明を仮定し、およびDNA含有量差が細胞201の20パーセント中心を均一に横切って分布したコンピューターモデルから生じさせた。これらの仮定は、上記でより詳細に論議されたように、局所化されたDNA差を有するウシ精子細胞201のスリットスキヤニング照明を表す。パルス497の統合によって、X細胞に対するパルス497領域およびY細胞に対するパルス497領域の間に、3.8%平均差が生じる。

【0184】

パルス497ピークおよび染色された細胞および核に特徴的な領域のヒストグラムおよび

10

20

30

40

50

分散プロットを生じさせることは可能である。図56-59は、染色された核および生細胞に特徴的なパルス面積をヒストグラムと、パルス497領域および染色された核および生細胞の分散プロットを含む。生細胞識別、および最終的に細胞仕分け率を制限し得る事項のいくつかは、これらのプロットにおいて明白である。注目すべきは、図57の生細胞ヒストグラム、およびそれほどではないにせよ図56の各ヒストグラムは、哺乳類の精子細胞についての蛍光強度ヒストグラムに典型的な左ショルダーを有する。左ショルダーは、僅かに不揃いな細胞(つまり、最適整列からの僅かな偏りにより比較的より弱い蛍光発光を生じ、光学システム109によって収集されるべき精子頭部の狭いエッジ205からの比較的より明るい蛍光発光31を引き起こすにはあまりにも不揃いというのではない細胞)の1以上の集団によって生成されることが決定されている。X細胞のうちの約半分ほどのみが、生細胞領域ヒストグラムにおいて、容易に同定され得る。残りは、Y細胞集団および不揃いな細胞集団と重複する。図56-59の分散プロットにおいて示されるように、ピークパルス高が付加される場合でさえ、X-担持細胞分類が、有意に制限され得る。

10

【0185】

図60-61は、XおよびY集団分布の重複を示す。図60-61において、4成分コンピューターモデルは、未加工データ6000(図60)に適用されて、並べられていない細胞(6001、6003)、並べられた生Y細胞(6005)および並べられた生X細胞(6007)(図61)の2つの集団に対して、集団統計を予測する。XおよびY集団の変動係数(CV)の関数として、XおよびY集団を識別するのが望ましい。例えば、識別を改善するために、XおよびY集団の変動係数(CV)を最小化するのが望ましい。特に、仕分けられたX細胞の集団が望ましい時、X細胞集団のCVが、1.5%未満、より望ましくは約1.3%、さらにより望ましくは1.3%未満であるのが望ましい。伝統的には、精子細胞の蛍光強度の分布のCVは、2つの集団(XおよびY)のみに対する分布関数に関して考えられている。CVに関する質制御は、XおよびY集団のCVの適当な主観的な予測に制限されて、継続した分析または仕分けに意味があるかを決定する。

20

【0186】

本発明の1つの具体例に従い、マイクロプロセッサ131の1つの機能は、図60-61に示される4成分モデルを用いて、X集団のCVの自動予測を供することである。特徴(例えば、パルス面積)分布に存在する集団のCVを予測するために、集団分布の二次統計を予測することが必要である。これは、既知の形態のモデルを適用し、観察されたデータに対するそのモデルのベストフィットを見つけることによって達成され得る。

30

【0187】

正規分布データの期待を仮定すると、(ガウス核(kernel)関数を用いる)パルツェン(Pa rzen)ウィンドウに基づく非パラメーター密度予測よりなるアプローチ、その後のガウス混合パラメーターモデルの適用が選択されている。具体的には、図60-61に示される4成分モデルは、これらの4成分は一変量ガウス分布の合計(または混合物)よりなり、並べられたX細胞、並べられたY細胞、および2成分の並べられていない細胞集団に対応する特徴分布である。次いで、モデルを特徴付けるパラメーターは、集団平均(平均)、集団標準偏差/分数(4)、および事前確率(全分布の期待%)(4)である。次いで、これらの12パラメーターを変動させて、観察されたデータヒストグラムに、モデルのベストフィットを達成することができる。従って、予測されたモデル成分パラメーターと共に、関心のある(特に、X細胞)集団のCVの予測は、予測された集団標準偏差および平均から決定され得る：

40

【数3】

$$CV = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均}} \cdot 100\%$$

【0188】

計算の複雑性を減らすために、モデルに制限を課して、パラメーター空間の次元を減らしている。特に、並べられたXおよび並べられたY集団に対応するモデル成分の標準偏差は、同じとなるように制限されている。また、並べられたXおよび並べられたY成分は、全体の混合物と同一のパーセンテージを構成するように制限されている - すなわち、並べられていない集団は、50%X細胞および50%Y細胞と考えられる。

50

【 0 1 8 9 】

非パラメータ密度予測は、モデルフィティング前に適用されて、未加工のヒストグラムデータの根底にある（成分密度の合計である）総密度関数の改善された予測を得る。適用される特異的な技術は、「パルツェンウィンドウ」(Duda, Hart, and Stork, 2001)として知られ、ここに、根底にある密度の仮定されるガウス性質の合計によって、ガウス核またはウィンドウ関数を利用する。ガウス核の標準偏差は、存在するヒストグラムビンの数の1%であるように選択される；この値は、ヒストグラムの十分であるが過剰ではない平滑化を供すると、経験的に観察されている。そして、ヒストグラムにおける各データポイントは、データポイントを含むヒストグラムビンを中心とする核関数を寄与する。次いで、密度予測は、核関数の合計として得られる。

10

【 0 1 9 0 】

データへのベストフィットを達成するための、モデルパラメータの変動に選択される方法論は、期待値最大化として知られる(Duda R.O., Hart, P.E., and Stork, D.G., 2001, Pattern Classification 2nd Ed., John Wiley & Sons; and Moore, A., "Very Fast EM-based Mixture Model Clustering using Multiresolution kd-trees," in M. Kearns and D. Cohn, Eds., Advances in Neural Information Processing Systems, pages 543-549, 1999, Morgan Kaufman参照)。利用される特定のアルゴリズム実行は次の通りである：

1) モデルパラメータに対する初期条件を設定する。パルツェン密度予測の上位2つの極大値は、初期のYおよびXの平均位置として使用される(XおよびY集団の両方に対する最大値の初期振幅は、右ピークの振幅として予測される)。初期XおよびY集団分散は、右ピーク位置に対する左および右ピークの間を生じる極小の右へのデータの分散として予測される。また、初期XおよびY集団事前確率は、この極小の右側となる全ての点のパーセンテージとして設定される。次いで、初期XおよびY集団ガウス密度予測は、これらのパラメータを用いて計算され、総パルツェン密度予測から差し引かれる。次いで、残りのデータポイントの平均および分散を計算し、次のように、2成分の並んでいない集団モデルを初期設定するのに使用する。2つの集団平均は、5%(並べられていない全平均の上下2.5%)離れていると(任意に)仮定される。同等の事前確率および同等の分数の(初期)仮定を前提とすると、成分分散は：

20

【 数 4 】

$$\sigma_{1,2}^2 = \sigma_{tot}^2 - \frac{1}{4}(\mu_2^2 - \mu_1^2)$$

[ここに、 σ^2 は分散であり、 μ はそれぞれの集団の平均である]によって与えられる。

2) 成分集団統計(平均、標準偏差、および事前確率)のアップデートされた予測は、パルツェン密度予測を用いて計算される。各ヒストグラムビン位置は、該ビンにおけるパルツェン密度予測によって、統計計算において重み付けされる。加えて、各データポイントは、現在の成分集団パラメータに基づいて、該点が所与の集団に属すると考えられている程度によって、全成分集団統計計算に寄与する。メンバーシップのこの程度は、データポイントでの全成分集団確率密度の合計に対する所与の成分集団(ガウス)確率密度値の割合として決定される。従って、我々は(ヒストグラム中の全てのデータ点, 集団 c_p $\{c_x, c_y, c_u\}$ 、および集団パラメータベクトル $\theta_p = [\mu_p, \sigma_p, P_p]$)につき、：

30

40

【 数 5 】

$$P(c_p | x, \theta_p) = P_p \cdot \frac{1}{\sigma_p \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(x - \mu_p)^2}{2\sigma_p^2} \right]$$

$$\text{メンバーシップ}(c_p | x, \theta_p) = \frac{P(c_p | x, \theta_p)}{\sum_{n \neq p} P(c_n | x, \theta_n)} \cdot \text{パルツェン密度予測値}(x)$$

50

によって与えられるアップデートされたパラメータ予測値の計算で用いられる集団成分メンバーシップを有する。

【0191】

次いで、全てのデータ点にわたり各成分集団につき平均メンバーシップによって与えられるアップデートされた事前確率と共に、これらのメンバーシップ値によって重み付けられたパルツェン密度予測値を用いてアップデートされた平均および分散が計算される。

3)パラメータアップデート手順は、全パラメータが、定常状態に達する(つまり、1つのアップデート反復から次のアップデート反復で有意に変化するのを停止する(または最大許容数の反復が起こる)まで続ける。

【0192】

先述のように、並べられたXおよびY集団は、同一の分散および事前確率を有するにはこの手順に制限される。この制限は、各反復にて上記手順を介して計算されたXおよびY分散の平均および事前値を用いることによって達成される。

【0193】

別法として、同様のモデリングアプローチは、3成分モデル(図62-63)に適用することができ、ここに4成分モデル中に2つの並べられていない集団6001、6003を含む細胞は、2つの異なるサブ集団よりむしろ単一のガウス分布6011として処理される。並んでいない細胞は、(図62に示される)未加工データ6010の左ショルダーおよび左ピークのベストフィットによって決定される平均および標準偏差を有する(図63に示される)第3のガウス分布としてモデル化することができる。また、3集団モデルは、並べられたY集団6015および並べられたX集団6017に対する予測された統計を有する。3成分モデルの1つの利点は、(4成分モデルに必要な12次元パラメータ空間と比較して)それが9次元パラメータ空間しか必要としない点である。しかしながら、4成分モデルは、典型的には、未加工データにより近くマッチする予測された密度関数を生じることが分かっている。

【0194】

多種多様な統計技術を用いて、並べられたXおよび並べられたY集団の特徴を予測することができることを、当業者は認識するだろう。従って、4成分モデル、3成分モデル、または他のモデルは、いずれかのパラメータまたは非パラメータコンピューターアルゴリズムによって実行されて、本発明の範囲から逸脱せずに、並べられたX細胞および/または並べられたY細胞集団の特徴を予測してもよい。

【0195】

L. 染色条件のCVベースの選択

いくつかの要因は、細胞の豊富化されたサブ集団に、集団内の染色された細胞を仕分ける効率に影響する。これらの要因のなかには、染色された集団内の細胞の様々なサブ集団の間の微分蛍光の量がある。微分蛍光は色素摂取によって影響され、これは、例えば、染色の濃度、染色時間の長さ、染色が起こる温度、および染色と含まれ得るまたは染色混合物に添加され得るいずれかの添加剤の数および濃度といった染色要因によって変動する。従って、これらの要因のいずれかまたは全てに調整がなされて、染色された細胞の集団の仕分け効率(純度および/または所望の細胞の最小の喪失の特定の程度で、細胞が細胞の少なくとも1つの豊富化されたサブ集団に仕分けられ得る速度)を増加してもよい。さらに、各試料につき、1以上のこれらの要因を調整することによって、マルチ試料仕分けシステムの効率を増加し、それにより、いずれかの試料対試料変動に対抗することができる。例えば、ウシ精子仕分けの関連で、仕分け効率は、1つの精液試料から次の精液試料へとこれまでの染色要因を調整して、雄ウシ間の変動または同一の試料内での試料間の変動に対抗することによって改良することができる。

【0196】

仕分けられる細胞の集団の所与の蛍光発光特徴に対する変動係数(「CV」)の決定は、染色条件への調整が、所望の仕分け効率を達成するためになされるかを決定する1つの様式である。例えば、(総蛍光強度およびピーク蛍光強度を含む)総蛍光強度またはピーク蛍光強度を示すいずれかの特徴のような、問い合わせ位置を通る細胞の動きによって生じるパ

10

20

30

40

50

ルス波形から抽出されるいずれかの特徴のCVの関数として、染色条件を調整してもよい。より詳細に先に論議したように、CVは、例えば、所与の集団の特定のサブ集団の蛍光発光特徴のような、集団の測定可能な特性または特徴の分布の均一性または一定性の指標である。CVは、試料平均によって、試料の測定された特徴の標準偏差を割ることによって決定されてもよい。また、CVは、上記で詳細に論議された反復のCV予測アルゴリズムの実施のように、フローサイトメトリーシステム9によって、自動的に決定することができる。CVが低ければ低いほど、測定された特徴の分布の均一性または一定性は大きい。

【0197】

精子細胞の染色および分離に適用されるように、精子細胞を有するXおよびY染色体の試料の特定の蛍光発光特徴のCVは、染色条件によって影響され得る。染色の濃度、染色時間の長さ、染色混合物の温度、および/または添加剤の数および濃度は、所与の蛍光発光特徴のCVに影響を与える。染色の濃度、染色時間の長さ、および染色混合物の温度を増加するおよび/または添加剤の数および濃度を減少することによって、徐々にCVが低下するだろう。そのような条件は、個々にまたは組合せで改変され得る。加えて、もしこれらの要因のうちのいずれか1つが、例えば、染色時間を短くすることによって、蛍光発光特徴のCVを増加する傾向があるようならば、いずれか1以上の他の条件は、例えば、色素濃度を増加させることによるなどして、それが最初の効果に反対に作用するように調整することができ、総じての結果は、所望の仕分け効果を達成するのに十分なレベルまでの蛍光発光特徴のCVの減少である。従って、この様式で、これらの要因のいずれか1またはいずれかの組合せを操作することによって、XおよびY染色体を有する集団の蛍光発光特徴のCVは、所望のパーセント純度のX染色体担持細胞を含む性豊富化された精液のサブ集団への精子試料の仕分けが可能な値へと減少され得る。

【0198】

残念ながら、精子を有するXのCVを低下する傾向のある変化は、増加されたコストまたは減少された精子運動性または受精率のような負の結果をもたらし得る。例えば、他の条件が同じなら、より低い染色濃度およびより短い染色時間を用いて、精子に対する染色プロセスのいずれかの有害な影響を最小化するのが望ましい。この点を考慮して、許容される仕分け効率が達成されるCVを予め決定してもよい。その後、仕分けられる細胞試料の画分は染色され、フローサイトメトリー分析に付される。画分の蛍光発光特徴は決定され、画分は、特徴に基づき、サブ集団に分類される。蛍光特徴のCVは、サブ集団(豊富化されたサブ集団)のうちの1つの細胞に関して、決定される。豊富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特徴のCVが、仕分けが起こる所定のCVと同等またはそれ未満であれば、細胞試料の残部は、画分は染色された条件に従って染色される。その後、試料は、例えば、本明細書に開示された方法に従って、仕分けられる。豊富化されたサブ集団の細胞の特定の蛍光発光特徴のCVが、仕分けが起こる所定のCVより大きければ、同一の試料のもう一方の画分が、同様の様式であるが、さらにより低いCVを達成すると考えられる染色条件下で、分析される。そのような状況において、CVは、例えば、染色時間の長さを増加する、色素の濃度を増加する、画分が染色される温度を増加する、またはそのいずれかの組合せによって低下させてもよい。この一連の工程(つまり、仕分けられる試料からの画分の除去、染色条件の調整、およびCVの決定)を、豊富化されたサブ集団の細胞の特定の蛍光発光特徴のCVが所定のCVと同等またはそれ未満であると決定されるまで繰り返す。その後、試料の残部は、適宜に染色され、例えば、本明細書に開示された方法に従い、仕分けられてもよい。本発明の特定の具体例において、細胞試料は、精液試料を含み、豊富化されたサブ集団の細胞は精子細胞を有するX染色体を含む。

【0199】

従って、本発明の1つの具体例は、仕分け用の細胞の集団を染色するための一組の条件を評価するためのプロセスであり、該集団は、細胞の第1のタイプおよび第2のタイプを含む。プロセスは、(a)細胞の集団の画分を、一組の染色条件下で、蛍光色素によって染色し;(b)染色された細胞が速度Rにて、フローサイトメーターの問い合わせ位置を通過する時に、染色された細胞を電磁放射線に暴露し;(c)暴露された細胞の蛍光発光特徴を決定

10

20

30

40

50

し;(d)決定された蛍光特徴を用いて、細胞を2以上のサブ集団に分類し、ここにサブ集団のうちの一つは第1の細胞タイプの豊富化されたサブ集団であり;(e)豊富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特徴に対して変動係数を決定し;次いで(f)細胞が染色されるいずれかの染色条件または染色された細胞がフローサイトメーターの問い合わせ位置を通過する速度Rを修飾するか否かを決定することを特徴とする。もう一つの具体例において、細胞の集団のもう一つの画分は、異なる組の染色条件下で染色され、工程(b)から(e)は、該画分と共に繰り返される。このプロセスは、2、3、4またはいずれかの数のさらなる画分に対して行われてもよい。もう一つの具体例において、細胞の複数の画分が同時に試料から採られる。各画分は、同時に染色されてもよく、あるいは各々は、フローサイトメーターを通過する先の画分に続いて染色されてもよい。前者の場合、各画分は、染色条件のその独特の組で染色されてもよく、工程(f)は、それぞれのCVを用いることを特徴として、さらなる細胞を染色するのに使用される1組の染色条件を決定してもよい。後者の例において、続いて染色された画分の染色条件は、予め分析された画分に関する工程(f)によって変更されてもよい。1つの具体例において、プロセスは、CVが特定のCVとほぼ同等またはそれ未満(例えば、1.3%)であると決定されるまで繰り返される。

【0200】

別法として、一旦許容される仕分け効率が達成されるCVを予め決定すると、全細胞試料は染色されてもよい。細胞試料の画分は除去され、フローサイトメーター分析に付される。画分の蛍光発光特徴は決定され、細胞を2以上のサブ集団に分類するのに使用される。蛍光特徴のCVは、豊富化されたサブ集団の細胞に関して決定される。もし豊富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特徴のCVが、仕分けが起こる所定のCVと同等またはそれ未満であれば、細胞試料の残りはその後仕分けられる。もし豊富化されたサブ集団の細胞の特定の蛍光発光特徴のCVが、仕分けが起こる所定のCVより大きければ、同一の試料からの第2の画分は、同様の様式で分析され、同一の蛍光特徴のCVが決定される。第2の画分のCVは、例えば、染色時間の長さを増加する、色素の濃度を増加する、あるいはそのいずれかの組合せによって低下されてもよい。この一連の工程(つまり、仕分けられる試料からの画分の除去およびCVの決定)は、豊富化されたサブ集団の細胞の特定の蛍光発光特徴のCVが、所定のCVと同等またはそれ未満であると決定されるまで繰り返される。その後、試料の残りは、例えば、本明細書に開示された方法に従い、仕分けられてもよい。本発明の特定の具体例において、細胞試料は、精液試料を含み、豊富化されたサブ集団の細胞はX染色体を有する細胞を含む。

【0201】

従って、本発明のもう一つの具体例は、仕分け用の細胞の集団を染色するための1組の条件を評価するためのプロセスであり、ここに、集団は、細胞の第1のタイプおよび第2のタイプを含む。プロセスは、(a)1組の染色条件下で、蛍光色素で、細胞の集団の画分を染色し;(b)染色された細胞が、速度、Rにて、フローサイトメーターの問い合わせ位置を通過する時に、染色された細胞を電磁放射線に暴露し;(c)暴露された細胞の蛍光発光特徴を決定し;(d)決定された蛍光発光特徴を用いて、細胞を2以上のサブ集団に分類し、ここにサブ集団のうちの一つは、第1の細胞タイプの豊富化されたサブ集団であり;(e)豊富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特徴に対する変動係数を決定し;(f)細胞の画分が染色されるいずれかの染色条件または、染色された細胞がフローサイトメーターの問い合わせ位置を通過する速度Rを修飾するかを決定し;次いで(g)修飾された染色条件を、細胞の集団の残りに適用することを特徴とする。もう一つの具体例において、工程(a)から(f)は、一度、二度、三度、四度またはより多くの回数繰り返されてもよい。もう一つの具体例において、細胞の複数の画分は、同時に、試料から採られる。各試料は、同時に染色されてもよく、あるいは各々は、フローサイトメーターを通過する先の画分に続いて染色されてもよい。後者の例において、画分の続いての染色は、先に分析されたものに関する工程(f)の決定に従い変更され得る。さらにもう一つの具体例において、プロセスは、さらに、工程(g)の前に、蛍光発光特徴についての最低変動係数を生じる修飾された

10

20

30

40

50

染色条件を選択することを特徴とする。さらにもう1つの具体例において、プロセスは、画分の少なくとも1つの蛍光発光特徴に対する変動係数が、約1.3%またはそれ未満になるまで、反復工程(a)から(e)を含む。本発明のもう1つの具体例において、プロセスは、さらに、工程(g)の前に、約1.3%またはそれ未満の変動係数を生じる修飾された染色条件を選択することを特徴とする。

【0202】

上記のように、全試料を仕分ける前にそのような分析を実施することに加えて、同様の分析が、仕分け効率が維持されることを確認するために、試料の染色および仕分けが起きている間、実施されてもよい。従って、もう1つの具体例において、一部が仕分けられるプロセスにある予め染色されている試料の画分の豊富化されたサブ集団の細胞の光発光特徴のCVは上記のとおり決定される。これらの試料が染色される染色条件への調整は、仕分け前調整に関して、上記で論議された方法に従って行われる。

10

【0203】

許容される仕分け効率が達成されるであろう所定のCVの選択は、例えば、集団の豊富化されたサブ集団への仕分けに関して望まれる仕分けられる細胞のタイプ、仕分けの速度、および純度の程度を含めたいくつかの要因に基づく。一般的には、CVは、例えば、染色期間の長さを最小化しつつ豊富化されたサブ集団の85%純度を達成することなどによって、それを達成するのに必要な時間の量を最小化しつつ、豊富化されたサブ集団の所望のパーセント純度まで仕分けるのを可能とするように選択される。これらの要因を考慮して、豊富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特徴のCVは、一般的には、約2.0%および約1.0%の間であり、好ましくは約1.5%および約1.0%の間、より好ましくは約1.4%、さらにより好ましくは約1.3%である。

20

【0204】

M. 限界勾配差特徴抽出

細胞仕分け器の一部として使用される図40に示されるデジタルシグナル処理(DSP)を備えたマイクロプロセッサ131'は、時間分解蛍光発光パルスの特徴、特にアナログ技術を用いて容易にまたは安価に入手できない特徴を抽出することを可能にする。特に、非線状特性を呈し、分離すなわち粒子AおよびBの解像度を有意に改善する(例えば、生きていた並べられたX精子細胞の識別を改善する)パルス特徴は、臨界勾配差(CSD)と呼ばれる特徴である。CSDは、粒子A(例えば、X-担持細胞)によって生成されたパルスの第1の微分および粒子B(例えば、Y-担持細胞)によって生成されたパルスの第1の微分の差が最大に近づくシグナル振幅での、蛍光発光パルスの傾きの定量化である。

30

【0205】

蛍光発光パルスを記載する関数は、時間の関数 $y=x(t)$ として、シグナル振幅換算で表現され得る。CSD特徴を検出する状況内では、関数は、シグナル振幅の関数として、パルス持続時間の観点で、蛍光発光パルスを記載するものと定義され得る。この関数は、M関数と呼ぶことができる。M関数は、下記のように、蛍光発光パルス関数を置き換えられてもよい。

【0206】

蛍光発光パルス関数: $y=x(t)$

40

M関数: $t=M(y)$

t =パルス持続

y =シグナル振幅

【0207】

典型的なXおよびYウシ精子細胞に対するM関数の比較は、CSD特徴の識別力を示す。図64の上部パネルは、X-担持およびY-担持精子細胞に対する平均的なMプロットを示す。図64の中部パネルは、平均的なY-担持 蛍光発光パルスのピーク高より小さいシグナル振幅値に対するこれらの平均的なMプロット(つまり、 M')の第1の微分のグラフを示す。シグナル振幅がY-担持パルスの平均的なピーク高に近づくにつれ、第1の微分($M'Y$ および $M'X$)の間の差が有意に増加することが、このプロットにおいて分かる。シグナル振幅の関数とし

50

ての第1の微分(M'X-M'Y)の間の差が、図64の下部パネルにプロットされる。CSD特徴は、第1の微分における最大の差が生じる領域の近くの個々のパルスに対するM(M')の傾き(または、蛍光発光パルス関数上の対応する点での傾き)を定量化する。XおよびY担持精子細胞を識別する目的のために、CSDは、図62-63に示されるように、パルスの前部エッジがCSD閾値と交差する点にて、各パルスを決定する。いくつかの具体例において、CSDは、ビームが断続的かパルスかに拘わらず、ビーム幅のような照明ビームの特徴によって決まってもよい。CSDを決定するアルゴリズムは、図65に関して、下記で論議される。

【0208】

図64は、いくつかのケースにおいて、CSD特徴は、X-Y精子細胞集団を仕分けるケースにおいてのような、非線状性質を有することを示す。微分(M'X-M'Y)の間の差は、CSD閾値がYパルスのピークに近づくにつれ増加する。この差の非線状特徴は、並べられていないおよび並べられたY細胞の平均値を、CSD特徴空間の並べられたX細胞の平均値より45%低く置く。並べられたX細胞のCSD特徴空間の標準偏差は、概ね影響がない(つまり、ピークまたは領域特徴空間で見られるものと同様)。正確に識別することができる並べられたX細胞の数を増加するのは、CSD特徴のこの非線状、高利得性質である。

【0209】

所与のパルスに対するCSD値を決定する1つの計算的に効率的な方法は、図65に示される。CSD閾値は、蛍光発光パルスのピーク高の関数として決定されてもよい。特に、蛍光発光パルスの平均的なピーク高に基づき決定されてもよい。CSD閾値は、生きて、並べられた細胞からのパルスピークの約25%が閾値またはそれ以下である点で維持される。従って、CSD閾値は、連続的ピーク高分布に基づく(つまり、平均的なピーク高に対する)仕分けの間に動的に調整される。例えば、閾値は、ピーク高分布の重み付けしたランニング平均に基づくことができる(より最近の測定はより古い測定よりも大きな重量が与えられている)。CSD値は、パルス上の2つの点を通る線の傾きである。これらの点は、CSDパルス閾値およびパルスピークである。従って、この具体例において、CSD値は、パルスの前部エッジおよびCSD閾値の交差でのパルス波形497の傾きの単なる近似である。しかしながら、所与のパルスに対するCSD値を計算する他の方法は、すぐに明白であり、そのうちのいくつかは、所望により、より正確なCSDを供することができる。

【0210】

もう1つの具体例において、CSD閾値は、粒子のサブ集団に対するCSD特徴抽出のCVの関数として、動的に調整される。例えば、比較的低いレベル(例えば、パルス検出閾値)からのCSD閾値を増加させることによって、精子細胞を仕分ける場合、CSD閾値は、Y細胞のCSDのCVの実質的な増加を生むが、まだ、X細胞に対するCSDのCVの増加が、Y細胞のCV増加と比較して有意に低いほど低くはない。この効果は、全体的なCSD分布における1つのサブ集団からのファンニングアウトとして、CSD分布において観察することができる。CSD特徴からの良い識別は、CSD閾値をこのレベルに維持することによって達成できる。

【0211】

CSD特徴の識別力は、フローサイトメトリーへのスリットスキヤニングアプローチの使用によって高められることに注意するべきである。ビームスポット459の形状は、パルス波形497の形状に影響を及ぼし得る。例えば、比較的小さい幅W1を有するビームスポット459を使用することによって、試料粒子中の局所化蛍光差(例えば、精子核213の中心領域225におけるXまたはY染色体の局所化から得られる局所化蛍光強度差)は、パルス波形の一階微分に対してより大きい影響を有する。従って、本発明の1つの具体例は、CSD特徴抽出と併せて、スリットスキヤニング技術を用いることを含む。反対に、大きすぎる(例えば、粒子の直径と同等またはより大きい)ビームウエストを有するレーザーを用いることで、粒子を識別するためのCSD特徴の効果的な使用が妨げられるかもしれない。フォーカスされた照明ビームのビームウエストの幅の許容される範囲は、粒子のサイズおよび形状、分析される粒子内の色素の分布、および識別される粒子に対する典型的な波形パルスの間の差の量を含む多くの要因によって決まるだろう。精子細胞の場合、3μm未満のビームウエストを有するレーザーを有するウシ精子細胞201の励起によって生じる波形パルス497か

10

20

30

40

50

らのCSD特徴抽出は、下記されるのと同様に首尾よく行われた。もちろん、スリットスキヤニングセクションで論議されるスリットスキヤニングのいずれかの形態を有するCSD特徴抽出は、発明の本態様の範囲内であると考えられる。

【0212】

より多くの並べられたX細胞の収集を可能にするため、特にX-Y精子細胞集団を仕分ける場合、CSD特徴の使用は、実質的に、システムの収率を増加する。ピーク対領域または上昇時間対領域特徴空間で規定された集団の重複のため、並べられたX細胞の約70%以下は、約85%またはそれ未満で、確実に識別され得る。CSD特徴が使用される時、95%以上の並べられたX細胞は識別され得、純度の所望のレベル以下の収集されたX細胞の集団の純度を減少させずに収集することができる生X細胞のパーセンテージを有意に増加する。

10

【0213】

これは、図66-69に示される生細胞データで、グラフ的に見られる。CSD特徴の非線形性質によって、X細胞を、仕分けのために単離することができる。図68に示される分散図で適用されるCSDに対する肉眼での選択は、70%純粋なX領域集団を生じる。二変量仕分け識別が領域およびCSD特徴空間に適用されると(図68)、並べられたX細胞の>95%は、仕分けのために識別され得る。図66-69のデータは、4チャンネルサイトメトリーシステム(下記のマルチチャンネルシステム論議参照)のうちの1つのチャンネル上の約22,000生細胞/秒の総細胞スループットにて収集された。同時発生検出が可能だとしても(高純度)、6,000X細胞/秒以上が少なくとも85%純度の純度レベルにて、収集された。

【0214】

20

図66-69は、X-担持およびY-担持精子細胞を識別するのに使用される時のCSD特徴の1つの利点を示す。図66および67は、図68および69に示される分散図で定義された特徴空間に対する蛍光発光パルスの領域特徴のヒストグラムである。図68において、CSD特徴は、並べられていないおよび並べられたY細胞のほとんどを分散図のディスプレイから動かしている。これによって、分散図のフレーム中の70%純粋なX集団が残り、これが図66のパルス面積ヒストグラムに示されるものである。非-CSD識別は、図69に示されたパルス面積/上昇時間分散図に示される。並べられたX細胞は、対応する領域ヒストグラム(図67)の約30%を構成する。95%以上の並べられたX細胞は、識別のためにCSD特徴を用いて、>85%純度にて収集され得る。比較すると、70%未満の並べられたX細胞は、右側の慣用的特徴空間を用いて識別され得る。

30

【0215】

いくつかの生細胞仕分けは、CSD対パルス面積、二変量識別技術を用いて完成している。図70は、この二次元特徴空間に設定された仕分け領域を使用して、並べられていない細胞およびY細胞を排除する方法の例である。図70は、CSD対パルス面積分散の分散図に設定された二変量仕分け領域を示す。どのように、仕分け領域が、CSDの高値に対する領域特徴上でより低く落ち(CSDは左から右に増加し、領域は下から上に増加する)、CSDがより低い値に落ちにつれ、領域特徴上でより高く動くかに留意されたい。上記のCSD対パルス面積分散図上の二変量仕分け領域組を使用して、26,000細胞/秒のインプット生細胞速度で、仕分け決定速度>6000X細胞/秒にて、X細胞を仕分けた。フローサイトメトリー分析に基づく純度は、87%であった。

40

【0216】

CSD特徴は、高収率、非-同時発生打切(つまり、同時発生受入または高回収)仕分け方法を可能にする。いくつかの具体例において、パルス特徴はほぼベースライン分離を供し、従って、生XおよびY精子細胞の100%正確な分類を供し得る。この状態は、Xおよび非-X(未知またはYのいずれか)として分類される細胞の両方を含有する液滴を停止せずに、適度に高い速度にて、細胞を仕分けることを可能にするだろう。この仕分け方法は、高回収または同時発生受入方法と呼ばれる。実験を実施して、CSD特徴を用いてこれをテストした。同時発生受入仕分けは、4チャンネルフローサイトメーターの1つのチャンネル上で、12,000生X細胞/秒のインプット速度で実施した。X細胞の77%は適切に並べられ、4,600X細胞/秒を仕分けに潜在的に入手可能にした。これらの状況下で、4,300細胞/秒をX細胞の集団

50

に仕分けた。続いての純度分析は、死滅細胞についての修正なくして> 87%、および死滅細胞についての修正を施して89%のこの仕分けからの純度を示した。高純度、同時発生拒否検出仕分けは、同一条件下で、この仕分け直後に行われた。3200-3500細胞/秒の収集速度が観察された。純度分析は、死滅細胞についての修正なくして92%の純度、および死滅細胞修正を施して94%の純度を示した。

【0217】

上記実験の結果は、12,000生細胞/秒インプットにて、並べられたX細胞の>92%が、純度>85%にて収集され得ることを示す。これは、CSD特徴が、全ての並べられたX細胞の95%正確な分類を供することを示す。これらの状況下で、セルソーターからの収率は、主に正しい細胞の並びによって制限される。

10

【0218】

図71は、左パネルが高回収/同時発生受入仕分け戦略(同時発生打切戦略無し)に対応し、右パネルは高純度/同時発生拒否仕分け戦略(同時発生打切戦略)に対応するテストのためのフローサイトメトリー再分析の1つの具体例を示す。左パネル(87%純粋)は、同時発生打切なしで、4,400X細胞/秒のアウトプットに対するものであった。右パネルは、汚染細胞を含有する液滴が捨てられる以外は同一条件下で完了された仕分けからのものであった。この仕分けに対する純度は約92%であった。これらの仕分けは、高回収、同時発生打切無し仕分けは、CSD特徴が識別に対して使用されるとき可能であることを示す。

【0219】

CSD特徴の使用は、精子細胞の仕分けまたは精子細胞のいずれかの特定の種に制限されない。当業者が前述の開示から理解するように、CSD特徴は、差の原因に拘わらず、異なる一次微分特徴を有するシグナルパルスを発生するいずれかの群の粒子の間の識別を改善するように適合され得る。

20

【0220】

N. 識別

一旦、パルスの特徴がパルス分析ソフトウェア749によって抽出されると、パルスの識別(例えば、分類)は、ベイズ最小リスク(Bayes Minimum Risk)決定則のようなロジック適用を用いるプロセッサ867によって実行されるパルス識別ソフトウェア757によって達成される。この規則は、異なる間違った分類(例えば、識別)決定を下すことと関連した異なるコスト(に対する調整)割り当てを可能にするベイズ最小誤差(Bayes Minimum Error)決定則の修飾である。

30

【0221】

ベイズ最小誤差(Bayes Minimum Error)は、特徴空間における集団の間の同等の事後確率の表面として、決定境界763または決定表面を計算する。(推定)ガウス確率分布の場合につき、この表面は、特定の条件では線状であってもよいが(あるいは超平面により非常に近似される得る)、一般的には二次である。分類(例えば、識別)決定は、まず(一般的に、クラス条件的確率密度およびベイズ則を用いる既知/仮定推測集団確率からの)特徴空間における所与のポイントに対する事後確率を計算し、次いで最高の事後確率を有する集団のものとして、クラス標識を選択することによってなされる。

40

【0222】

ベイズ最小リスクは、異なる分類誤差(例えば、「Y」細胞を「X」細胞として分類する方がその逆の場合よりも高価かもしれない)を作るのに異なるコストを割り当てるのが望まれる場合、決定境界763の調整を可能にするための要因を含む。この適用において、これによって、仕分けられた試料の純度および回収の間の交換が可能になる。この決定規則において、各可能なクラス標識を特徴空間におけるポイントに割り当てる「リスク」は、各他の集団における真のメンバーシップを仮定すると現在の集団として分類されるに関するコストに、各集団におけるメンバーシップの事後確率を乗じたものの総和として計算される。表6は、ベイズ最小誤差分類の手順を要約する。多変量ガウス密度については、事後確率を得るためのベイズ則の評価は、W、w、およびwoが表3に与えられた識別アルゴリズムパラメーター初期設定において計算されると仮定すれば、表VIIに見られる二次関数

50

の評価に帰結することができる。図74は、この手順による分類のグラフ的例を示す。左の図は、2つの集団1および2および集団を分離する決定境界763の略図である。右側のヒストグラムは、XおよびY領域を規定する楕円の2つの同心組を示し、決定境界763は楕円の交差によって規定された線である。

【 0 2 2 3 】

【表 8】

アルゴリズム:	ベイズ最小誤差蛍光パルス分類(識別)
インプット:	各クラス集団 i に対するフロート $pulseFeatures_i$ のベクトル: フロート W_i の行列 フロート W_i , フロート W_{i0} のベクトル
アウトプット:	整数 $classLabel$
手順:	<ol style="list-style-type: none"> 各クラス/集団 i につき、識別関数 g_i の値を計算し: $g_i = pulseFeatures_i \cdot W_i \cdot pulseFeatures + w_{i0} \cdot pulseFeatures + w_{i0}$ 各クラス/集団 i につき、リスク関数 $risk_i$ の値を計算し: $risk_i = 0$ を初期設定し、次いで、各クラス/集団 j につき、 $risk_j = risk_j + cost_{ij} * g_j$ 探索 j s.t. $risk_j = \min(risk_j) \forall i$. 復帰 $classLabel = j$, 抜け出る。

10

表 VII. ベイズ最小誤差決定則によるデジタル蛍光パルス分類(識別)の概要

さらなる頑健性のために、デジタル蛍光パルスの分類において、さらなる工程をとる。ベイズ最小誤差を介して割り当てられる集団からの特徴空間のパルスのマハラノビス距離が計算され、もし閾値より大きければ、パルスは「分類されず」またはそれがいずれかの既知の集団の一員ではないようであるという何らかの他の適当な表示として標識される。図75は、デジタル的に得られた蛍光パルスデータから計算される特徴を再び用いて、このさらなる工程の効果を示す。

20

【 0 2 2 4 】

一般的に、A/D変換器689は、光検出器117からのアナログアウトプットシグナル701を、特徴Aまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標である対応するデジタル情報707へと変換する。デジタルシグナルプロセッサ-865は、デジタル情報から特徴を抽出し、プロセッサ-873は、抽出された特徴の関数として、仕分けシステムに、仕分けシグナル853を提供する。

【 0 2 2 5 】

0. 仕分け分類および液滴同期化

第4の、仕分けプロセッサ-873は、液滴分類を管理し、仕分け方法を使用し、仕分けのために選択された液滴と同期化される仕分けトリガーパルス853を送達する。このプロセッサ-873は、識別プロセッサ-867からの細胞分類情報を受け取り、該情報を液滴生成クロック703に関連させる(つまり、液滴の形成でもって集団に仕分けするのに分類された粒子の位置を並べる)。それは、液滴内で同時発生があるかを決定し、予め決定された仕分け方法に基づき、その同時発生を管理する。それは、粒子がリアルタイムで観察された時および粒子が最後に結合された液滴に到着する時の間の正しい遅延を設定する全細胞分類および液滴仕分け決定のFIFOを維持する。仕分けのための選択された各液滴に対する適切な極性および振幅の適切なタイミングのアウトプットパルス853を生成するであろう。

30

【 0 2 2 6 】

一般的に、A/D変換器689は、アナログアウトプットシグナル701を、光検出器117から特徴Aまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標である対応するデジタル情報707へと変換する。デジタルシグナルプロセッサ-867は、特徴Aの指標としてまたは特徴B(例えば、Xまたは~X)の指標として、デジタル情報707を識別し、仕分けシグナル853を、仕分けシステム119に、識別されたデジタル情報の関数として供する。

40

【 0 2 2 7 】

一般的に、デジタルシグナルプロセッサ-863、865、867、873は、デジタル情報によって表される波形パルスを検出する指令、検出されたパルス中の特徴を抽出するための指令およびそれらの抽出された特徴の関数として、検出されたパルスを識別するための指令を含む。加えて、プロセッサは、特徴Aを表す抽出された特徴および特徴Bを表す抽出された特徴の間を識別する決定境界763を規定するための指令を含む。さらに、プロセッサ-8

50

63、865、867、873は、所望により、次:(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して、少なくとも1つの集団の純度、および(2)流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する少なくとも1つの集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として、特徴Aを表す抽出された特徴Aに関しておよび特徴Bを表す抽出された特徴に関して、決定境界763の相対的位置を調整してもよい。例えば、プロセッサは、特定の試料のアウトプットに基づきまたは所望のアウトプットに基づき(例えば、ベイズ最小リスク 決定規則に関して上記のように、異なるコストにつき、決定境界を調整する)、集団1をより少なく、集団2をより多く、あるいはその反対を含むように、決定境界763を動かしてもよい。

【0228】

10

P.ドリフト補償

もし、経時的に、蛍光発光に対応する波形パルスが、(例えば、染色変動、温度変化、試料年齢および/または他の要因のため)変動すれば、または経時的にドリフトを呈すれば、システムは、所望により、ドリフトのいずれかの効果を補償するように変動する動的閾値を規定するドリフト分析ソフトウェア761(図72)を使用することもできる。特に、ソフトウェア747によって使用されるパルス検出閾値は、シグナルバックグラウンド特徴におけるいずれかの緩い変動に対して調整され得、ソフトウェア757の識別アルゴリズムは、特徴空間における集団のいずれかのドリフトの要因となる決定境界763(図74)を調整することができる。

【0229】

20

パルス検出ソフトウェア747によって使用される(複数の)アルゴリズムの場合、ドリフト補償ソフトウェア761は、現在の試料で終了する。与えられた長さの試料(例えば、10-100試料)の移動ウィンドウ内で計算された試料統計予測に基づいてバックグラウンドの平均および標準偏差予測をアップデート更新することによってドリフト補償を達成することができる。データ獲得頻度に対する遅い(推定)ドリフト速度を仮定すると、バックグラウンド統計は、試料ごとにアップデートされる必要はない;むしろ、バックグラウンド統計アップデートは、定期的にもよい(例えば、6秒おき;参照文字795および図82参照)。加えて、ウィンドウは、統計計算において、「忘却」速度が、より新しい試料に対してより古い試料の重み付けを外すことができるように、単位未満の重み付けを含むことができる。「忘却」速度なくして、あるいはそれを用いての、移動ウィンドウ内での統計(平均)計算の概念を示す。

【0230】

30

検出アルゴリズムドリフト補償と同様、パルス識別ソフトウェア757によって使用される(複数の)識別アルゴリズムは、特徴空間の集団の二次統計の定期的なアップデートによってドリフト補償を達成する。しかしながら、この場合、所与の集団に割り当てられるパルスからのそれらの特徴値のみを使用して、該集団の統計学をアップデートする。再び、非-単位重み付けを使用して、「忘却」速度を含んでもよい。図77は、特徴空間における集団にこの技術を適用する効果の概念図を示す。図77は、特徴空間における集団統計学に対するドリフト補償の例を示す。黄色は集団1(X)を示し、緑色は集団2(Y)を示し、菱形は(ドリフトの誇張表示を伴う)クラス平均予測を示し、ブロックは一定シグマ楕円の変形に反映された集団共分散予測の変化を矢印で示す。

【0231】

40

一般的に、デジタルシグナルプロセッサ863は、デジタル情報を分析するのに検出閾値を使用し、この閾値は、現在の試料で終わる試料のムービングウィンドウ内で計算されたサンプルされた時変アウトプットシグナルのバックグラウンド平均予測値および標準偏差の関数である。

【0232】

Q.全デジタルの利点

アナログ技術を超える技術

全デジタルシステムを仕分けに使用する主な利点の1つは、パルスの検出および分析と

50

関連した「不感時間」がないことである。アナログシステムでは、パルスの発生および検出後リセットするための電子工学に必要な有限な「スイッチング時間」が常にある。この時間は、通常、約少なくとも1マイクロ秒である。デジタルシステムは、連続した流れを捕らえるため、実質的に不感時間がない。

【0233】

デジタルシステムのもう1つの利点は、仕分けのために分類されたパルスの回りで早めに前方および後方を見る能力である。一般的に、デジタルシグナル処理は、分析に約5液滴時間を要する。好ましくは、液滴照明115および液滴形成107の間の時間遅延は、約7液滴時間である。これは、特定の粒子の特徴によって示されるように使用可能な集団をそれが汚染するであろう確率に基づいて、かつもう1つの分類された粒子に対する特定の粒子の近接性も基づいて、システムが特定の粒子を分類するのを可能とする。一例として、仕分けプロセッサ873は、生X細胞である50%確率を有すると見える粒子を拒否することができ、他方、仕分けプロセッサ873は、当該粒子が、生X細胞である95%確率を有すると見える第2の粒子と一致する場合、生X細胞である50%確率を有すると見える粒子を受け入れることができる。

10

【0234】

R. アナログ細胞分析

また、光検出器からの時変アウトプットシグナルは、デジタル細胞アナライザより安価であり得るフィールドプログラマブルゲートアレイのようなアナログ回路819によって処理されてもよいと考えられる。図42は、本発明に従い、システムの一部として使用されるアナログ細胞アナライザの1つの具体例の構成図である。図53は、アナログ分析をグラフで示す。閾値は、パルス高に基づき、トリガーを生成するように設定される。閾値は、アナログ積分器が電荷を蓄積するのをゲート制御する積分ウィンドウを開ける。ウィンドウは、固定された時間またはパルス振幅がトリガー閾値を下回るまでのいずれか開いたままである。このように、積分ウィンドウ内のパルスの部分の領域のみが、相対的蛍光測定に使用される。

20

【0235】

図42を参照して、光検出器117のアウトプット701は、液滴クロック703と同期して、アウトプットシグナル701を積分する積分器825に供される。積分シグナルは、パルスを規定する閾値レベルに対して積分シグナルのレベルを比較するための幅/面積コンパレータ827に供される（例えば、パルスはある閾値の40%をもって積分シグナルと定義することができる）。動的閾値計算器829は、積分シグナル/レベルをモニターし、それが、幅/面積コンパレータが用いる閾値レベルを、平均積分シグナル/レベルの変動の関数として変動させる点で、前記ドリフト補償と同様に機能する。

30

【0236】

パルス識別されたシグナルは、ウィンドウコンパレータ837に供されて、パルス面積が許容される範囲内であることを確認する。また、Tパルス識別されたシグナルは、パルス幅およびトリガーロジック回路839に供されて、パルス幅が許容される範囲内であることを確認する。もし領域および幅が許容されれば、ロジックはトリガーシグナルを、仕分け決定841を示すI/Oコントローラ843に供する。従って、ウィンドウコンパレータ837およびパルス幅およびトリガーロジック839は、細胞がX細胞または~X細胞として分類されるべきかに関する決定を下す。

40

【0237】

I/Oコントローラ843は、Xまたは~Xシグナルの形態で、仕分けコントローラボード847に、仕分け決定841を供する。また、I/Oコントローラ843は、PC735に接続するためのUniversal Serial Bus(USB)インターフェイス849を含み、他のチャンネルのスレーブコントローラ845に接続するためのI/Oポートを有し得る。また、アナログ細胞アナライザは、幅/面積、コンパレータ、ウィンドウコンパレータおよびパルス幅およびトリガーロジックをプログラムするためのJoint Test Access Group(JTAG)ポート833を含む。

【0238】

50

また、アナログ細胞アナライザーがデジタル細胞アナライザー705と同時に使用され得ると考えられる。例えば、アナログアナライザーを使用して、デジタルアナライザーによって使用される電圧閾値を調整してもよい。一方で、デジタルアナライザーを使用して、パルスの様々な特徴を同定してもよく、特にそれがゲートアレイで導入されるなら、この特徴情報を使用して、アナログ細胞アナライザーを配置する。

【0239】

制御方法

一般的に、マイクロプロセッサ131は、スループットおよび/または所望の粒子の喪失の点でシステム1の効率を最適化して、仕分けられた産物のいずれのコスト要件も満足させることを意図する制御および仕分け戦略を実行するようにプログラムされる。これは、例えば、少なくとも1つの収集された集団の高純度への必要性および仕分けられる試料から所望の粒子の少なくとも最小パーセンテージを回収する必要性の均衡をとることを含む。特に、コストおよび採算性が重要な考慮すべき事柄である商用適用の状況では、そのような均衡を達成することが重要である。

10

【0240】

このため、マイクロプロセッサ131は、連続した指令である制御方法および/または流体送達速度および/または仕分けパラメーターのような可変システムを制御するアルゴリズムを導入する。また、マイクロプロセッサは、各粒子または粒子の群がどのように仕分けられるかを決定するための決定プロセスを定義する仕分け方法を導入する。各特定の制御方法は、1以上の仕分け方法を使用してもよい。様々な仕分け方法を、選択された制御方法、粒子検出システムおよび/または流体の流れにおける粒子分布に関する情報のような要因によって使用してもよい。

20

【0241】

粒子分布に関して、図78は、粒子の例示的な分布を含有する流体の流れを示す。この特定の具体例において、流れは、上記のノズルと同様のノズルによって形成され、例えば、XおよびY精子細胞といった異なる特徴AおよびBを有する粒子の混合物を含有する。示されるように、細胞は、一般的に、粒子の順次の組として見るることができる一連の1つずつに従う。これらの組は、各々が(例えば、生X精子細胞を示す)特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が(例えば、Y精子細胞またはより一般的には、Y細胞、または死XまたはY細胞のような、生X細胞(~X)ではない精子細胞を示す)特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および、各々が、その少なくとも1つが特徴Aを有し、およびその少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けられた粒子(例えば、1以上のX精子細胞および1以上の~X精子細胞)を含む第3の粒子組を含む。また、第3の粒子組は、以後、「同時」粒子組と呼ばれる。

30

【0242】

特定の粒子がそれ自体で組またはもう1つの組の一部を構成すると考えられるかは、主にその空間的位置および/または隣接する粒子に対する分離によって決まるだろう。例えば、液滴仕分けシステムにおいて、様々な粒子組は、液滴中の粒子によって定義されるだろう。下記の「光損傷仕分け」セクションで論議されるように、レーザーを使用して、選択された粒子組を除去(消すさもなければ損傷する)して、所望の含有量を有する収集された集団を提供する光損傷仕分けシステムにおいて、様々な粒子組は、粒子の空間的近接、つまり、粒子間の空間的分離が、1以上の所望の粒子も除去せずに、レーザーにより、粒子の正確な分類および/または1以上の望ましくない粒子の除去を可能にするのに十分であるかによって規定される。同様に、「粒子スイッチング仕分け」システムにおいて下記で論議されるように、選択された粒子を含有する流れの部分が、所望の含有量を有する収集された集団を提供するように進路変更される流体スイッチング仕分けシステムにおいて、様々な粒子組は、粒子の空間的近接、つまり、粒子間の空間的分離が粒子の正確な分類および/または選択された粒子の方向転換を可能にするのに十分であるかによって規定される。

40

【0243】

50

前述から、所望の結果またはシステムのスループットによって、異なる粒子組に適用される仕分け決定は変動し得ることが観察されるだろう。例えば、液滴仕分けシステムにおいて、使用される仕分け方法は、「同時」液滴、つまり、第3の粒子組を含有する液滴の処理によって決まるだろう。フローサイトメトリー液滴仕分けシステムにおけるウシ精子細胞の取り扱いおよび例えば、少なくとも1つの収集された集団におけるX精子細胞の数を促進するための本明細書記載の方法において、X精子細胞を含有する各同時液滴が、たとえ液滴が~X精子細胞も含んでいても、まるでそれがX精子細胞のみを含有するかのよう

10

に許容され仕分けられる方法(同時受入戦略)を使用することが望ましいかもしれない。他方で、前述の集団において収集されたX精子細胞の純度を高めるために、たとえ同じ液滴がX精子細胞も含有しても、~X精子細胞を含有する各同時液滴を拒否することが望ましい

かもしれない(同時拒否戦略)。一般的に、下記で示されるように、粒子スループットを最大化するのに使用してもよい多くの制御方法があり、各特定の制御方法で使用され得る多くの仕分け方法がある。方法は、液滴仕分け、光損傷仕分け、および流体スイッチング仕分けのようなフローサイトメトリーを用いる様々な仕分け技術に適用することができる。さらに、上記方法を使用して、粒子のいずれかの所望の特徴または複数特徴に従って、粒子のいずれかのタイプを仕分けすることができる。

【0244】

1つの具体例によると、マイクロプロセッサは、流体送達システムが、システムの他の変数の関数として、粒子を含有する流体を送達する速度を制御する。例えば、所望のアウトプット結果の関数として、マイクロプロセッサは、流体送達速度を制御することが

20

できる。マイクロプロセッサは、各粒子のアイデンティティを決定し、そのようなものが少なくとも1つの収集された集団に向けられているかを決定するため、マイクロプロセッサは、制御方法を変動することによっておよび/または仕分け方法を変動することによって、アウトプット結果を決定し制御することができる。所望のアウトプット結果は、一般的に、次:(1)特徴A粒子または特徴B粒子に関して、少なくとも1つの収集された集団の純度(「高回収」)、および(2)流れにおける特徴A粒子の総量に対する前述の集団における特徴A粒子の量、または流れにおける特徴B粒子の総量に対する前述の集団における特徴B粒子の量(「高純度」)のうちの少なくとも1つとして定義されてもよい。もう1つの例として、システムは、実質的に一定の流体送達速度を使用してもよく、マイクロプロセ

30

ッサは、所望のアウトプット結果の関数として、仕分けパラメータを制御することができる。この後者の例において、所望のアウトプット結果は、一般的に、(1)少なくとも1つの収集された集団の粒子の純度および(2)流れにおいて入手可能であるが前述の集団に含まれない所望の粒子の量(「一定の流動」)の組合せとして定義される。

【0245】

一般的に、2つの集団を仕分けるとき、同定された細胞は、1つの集団または他方の一部である50/50確率を有することができるかと仮定してもよい。しかしながら、同定されていない細胞もまた、実際には、1つの集団または他の一部である50/50確率以外のいくつかの他の確率を有し得ることが考えられる。この他の確率は、経験的分析によってまたは仕分けられる試料に関する他の特徴から決定することができる。

【0246】

いくつかの異なる制御方法は、下記でより詳細に論議される。

【0247】

A. 高回収制御方法

制御方法の1つのタイプは、「高回収」制御方法と呼ばれることがある。この方法の目的は、該集団の純度が許容される純度またはそれを超える限り、所望の粒子の集団に仕分けられた所望の粒子の数を最大化することである。

【0248】

この方法に従い、上記の第1の粒子組は、これらの組の各々が所望の特徴Aを有する1以上の粒子を含有するため、所望の粒子の集団に仕分けられる。また、第3の粒子組は、これらの組の各々もまた特徴Bを有する1以上の粒子によって伴われているにもかかわら

50

ず、所望の特徴Aを有する1以上の粒子を含有するため、所望の粒子の集団(同時受入)に仕分けられる。他方で、第2の粒子組は、それらが所望の特徴を有する粒子を含有しないため、拒否される(つまり、所望の粒子の集団に仕分けられない)。この方法を用いてスループットを最適化するために、マイクロプロセッサは、収集された集団の純度が許容されるレベルまたはそれを超える限り、流体送達速度を増加させる。逆に言えば、所望の粒子の集団の汚染の推定レベルは、許容されるレベルまたはそれを下回る限り、流体送達速度は増加される。一例として、図78の流体の流れにおけるXおよびY精子細胞を仕分けるための高回収制御方法の使用を考える。所望の結果は、集団が許容される純度またはそれを超えたままである限り、例えば、 $X/(X+Y)$ が85%以上またはいくつかの他の許容されるレベルである限り、X細胞の集団に全てのX細胞を仕分けることであってもよい。この結果を得るために、第1の粒子組は、それらが1以上のX細胞を含有するため、X細胞の集団に仕分けられる。また、第3の粒子組は、それらはY(または~X)細胞も含有し得るが、それらは1以上のX細胞も含有するため、X細胞の集団に仕分けられる。第2の粒子組は、それらが1以上のX細胞を含有しないため、いくつかの他の集団に仕分けられる。この例において、流体送達システムが細胞を含有する流体をノズルに送達する速度は、X細胞の集団の純度が85%を超える限り、増加され続けるだろう。反対に、もしX細胞の集団の純度が85%を下回れば、流体送達速度は減少される。

【0249】

液滴仕分けシステムに関連して、いずれかの所与の液滴発生速度につき、細胞送達速度が増加するにつれ、複数の細胞液滴の数が増加することは、ポアソン方程式から知られている。言い換えれば、細胞を含有する流体の送達速度を増加することは、複数の細胞液滴の数を増加するだろう。従って、もし同時受入仕分け方法を使用して、第3の粒子組を含有する同時液滴が所望の粒子の集団に仕分けられれば、流体送達速度を増加すると、収集された集団の純度において減少を生じるだろうが、これは流体送達速度が高ければ高いほど、より多くの同時液滴が生じ、収集されるからである。図79は、所望の粒子の100%が捕獲されるように、2つの(2)粒子流体に対するこの結果を示す。示されるように、非常の遅い流体送達速度(X軸に沿ったFDR)、得られた集団の純度(y軸)は非常に高いが、これは、第3の粒子組を含有する同時液滴はほとんど生じず収集されないからである。流体送達速度が増加するにつれ(FDRはX軸に沿って右へと増加する)、発生する同時液滴のパーセンテージは、増加し、その結果、より多くの同時液滴が収集され、使用可能な集団の純度を減少する(y軸に沿って)。示される特定の例において、流体送達速度は、約80%純度にて、30K粒子/秒である。

【0250】

XおよびY精子細胞が液滴仕分けプロセスを用いて仕分けられる単純な例によって示されるように、高回収方法の使用の結果は劇的であり得る。例えば、液滴が60K/秒の速度で生じ、精子細胞が30K/秒の速度で問い合わせ位置に送達されると仮定する。ポアソン方程式によれば、もしXおよびY細胞を含有する同時液滴を含むX細胞を含有する全液滴がX細胞の集団に仕分けられれば、約15,000X細胞が毎秒収集されるだろう。収集された集団は、約2,600Y細胞を含み、X細胞に関する集団の純度は約85.2%まで減少する。しかしながら、収集されたX細胞(15,000)の数は、下記で論議される高純度方法またはモードにあるように、同時液滴が収集されない方法に対する実質的な増加を表す。40K/秒の液滴周波数および40K/秒の細胞送達(上記の高回収モード例より10K細胞/秒多い)速度で作用する高純度モードにおいて、約11,800X細胞のみが毎秒あるいは、高回収方法よりも約3,800X細胞少なく収集される。さらに、高純度方法が使用される間、約9,200X細胞が失われるか、あるいは無駄になるが、それは同時液滴がX細胞の集団に仕分けられないからである。従って、100%未満の純度が許容されるならば、高回収モードを使用して、収集されるX細胞の数を増やすか、あるいは逆に言えば、失われるX細胞の数を減らすことが望ましいかもしれない。

【0251】

要約すれば、同時受入仕分け方法を用いる高回収制御方法において、粒子送達速度は、所望の粒子の収集された集団(「使用可能な」集団として呼ばれることもある)の純度に反

10

20

30

40

50

比例する。

【0252】

B. 高純度制御方法

制御方法の第2のタイプは、「高純度」制御方法と呼ばれてもよい。流れにおいて入手可能な所望の粒子の総数に対する収集された集団中の所望の粒子の量が許容される量またはそれ以上である限り(つまり、流れにおける収集されていない所望の粒子の量が、許容される量未満のままである限り)、この方法の目的は、高レベルにて所望の特徴を有する粒子に関して、収集された集団の純度を維持することである。この方法に従い、上記の第1の粒子組は、所望の粒子の集団に仕分けられるが、これはこれらの組の各々が所望の特徴Aを有する1以上の粒子を含有し、これらの組が汚染する粒子を全く含有しないからである。他方で、第2および第3の粒子組は、1以上の「使用不能な」集団(同時拒否)に仕分けられるのだが、これはそれらが汚染する粒子(つまり、特徴B粒子)を含有するからである。この「高純度」方法を用いてスループットを最適化するために、流れにおいて入手可能な所望の粒子の総数に対する使用可能な集団に仕分けられる所望の粒子の量が許容される量またはそれを上回る限り、マイクロプロセッサは流体送達速度を増加する。

10

【0253】

一例として、図78の流体の流れにおけるXおよびY精子細胞を仕分けするための高純度制御方法の使用を考える。所望の結果は、流れから収集されるX細胞の量が許容される量、例えば、少なくとも60%またはそれを超える限り、X細胞の集団へ、X細胞の全てを仕分けることであってもよい。この結果を得るために、1以上のX細胞のみを含有するため、第1の粒子組は、使用可能な集団に仕分けられる。他方で、1以上の汚染する(~X)細胞を含有するため、第2および第3の粒子組は、1以上の使用不可能な集団に仕分けられる。この例において、仕分けられているX細胞の総入手可能な量のパーセンテージとしての使用可能な集団において収集されるX細胞の量が60%またはそれ以上のものである限り、流体送達システムが細胞を含有する流体をノズルに送達する速度は増加し続けるだろう。反対に、もし使用可能な集団において収集されないX細胞の量が、仕分けられている入手可能なX細胞の総数の約40%を超えるなら、流体送達速度は減少する。

20

【0254】

液滴仕分けシステムの文脈で上記されるように、流体送達速度を増加すると、複数の細胞液滴の数、従って第3の粒子組を含有する同時液滴の数を増加することは知られている。同時液滴は、同時拒否仕分け方法を用いる時、収集されたX細胞の集団に仕分けられないため、これは、流体送達速度を増加すると、使用不可能な集団に失った生X細胞の量の増加を招くことを意味する。

30

【0255】

図80は、使用可能な集団が100%純度の所望の粒子を有するように、2つの(2)粒子に対するこの結果を示す。示されるように、非常に低い流体送達速度(X軸に沿ったFDR)、使用可能な集団の所望の粒子のパーセンテージは非常に高く、これは同時液滴がほとんど発生せず拒否されていないからである。流体送達速度が増加するにつれ(FDRはX軸に沿って右に増加する)、第3の粒子組を含有する同時液滴のパーセンテージは増加し、より多くのそのような組は拒否される。このため、流れにおいて入手可能な所望の粒子の総量に対する使用可能な集団に仕分けられる所望の粒子の量(つまり、使用可能な集団において収集される流れからの所望の粒子のパーセンテージ)は減少する。示される特定の例において、流体送達速度は約40K粒子/秒であり、所望の粒子の約75%は使用可能な集団に仕分けられる。

40

【0256】

要約すると、同時拒否仕分け方法を実行する高純度制御方法において、粒子送達速度は、収集された集団における所望の粒子のパーセンテージ(つまり、使用可能な集団における所望の粒子の高純度)に反比例する。

【0257】

C. 一定流速制御方法

50

制御方法の第3のタイプは、一定流速制御方法と呼ばれる。この方法において、少なくとも1つの収集された集団の純度が許容されるレベルであるかまたはそれを上回る限り、および該集団における所望の粒子の総量が、処理されている所望の粒子に対する許容される量であるかまたはそれを超える限り、マイクロプロセッサは、流体送達速度を一定に(あるいは一定の範囲内に)維持し、収集された(または拒否された)同時液滴のパーセンテージを変動する。反対に言えば、使用可能な集団の汚染の可能なレベルが純度の許容されるレベルであるかそれを下回る限りおよび前述の(使用可能な)集団以外の集団に失われた所望の粒子の可能な量が許容される量であるかそれ未満である限り、流体送達速度は一定であり、許容される(または拒否される)同時液滴のパーセンテージは変動する。

【0258】

一例として、図78に示される流体の流れを仕分けるための一定流速制御戦略の使用を考える。所望の結果は、少なくとも85%の純度を有する使用可能な集団にX精子細胞を仕分け、流れ中のX細胞の少なくとも60%を収集し、そうすることで、X細胞の40%以下が使用不可能な集団に仕分けられることであってもよい。この例において、X細胞に関する使用可能な集団の純度が、85%と同等またはそれより大きい限り、および使用不可能な集団に仕分けられたX細胞のパーセンテージが40%未満で、使用可能な集団に仕分けられた所望の粒子のパーセンテージが60%と同等またはそれ以上(可変同時受入仕分け方法)になる限り、流体送達システムが粒子を送達する速度は、一定に維持され、収集されたまたは拒否された第3の粒子組(同時組)のパーセントは変動するだろう。許容される第3の粒子組のパーセンテージが増加するにつれ、使用可能な集団の純度は減少するが、使用不可能な集団に仕分けられる所望の粒子(例えば、X細胞)の量は減少する。反対に、許容される第3の粒子組のパーセンテージが減少するにつれ、使用可能な集団の純度は増加するが、使用不可能な集団に仕分けられる所望の粒子(例えば、X細胞)の量は増加する。

【0259】

上記のように、複数の細胞の液滴の数(すなわち、第3の粒子組を含有する同時液滴の数)が、流体(細胞)送達速度に対して一定であることは、ポアソン方程式から知られている。液滴の数はこの制御方法において一定であるため、使用可能な集団に仕分けられる同時液滴のパーセンテージは、使用可能な集団の純度および使用不可能な集団に仕分けられることによって無駄になるX細胞の量の両方に影響を及ぼすだろう。これは、収集された使用不可能な集団に許容され仕分けられた同時液滴中の不要なY(または~X)細胞のパーセントが、拒否され、すなわち収集された使用可能な集団に仕分けられていない同時液滴中のX細胞のパーセントに反比例するためである。

【0260】

図81は、フローサイトメトリー液滴仕分けシステムにおける一定流体送達速度制御方法および2つの(2)粒子流体に対し可変同時拒否仕分け方法を実行する本明細書中に記載されるような方法を示す。示されるように、線OLは、許容される同時液滴(y軸)のパーセンテージと比較した拒否された同時液滴(x軸)のパーセンテージの間の反比例関係を示す。非常に低いパーセンテージの許容される同時液滴が存在する時、非常に高いパーセンテージの拒否された同時液滴が存在する。反対に、非常に高いパーセンテージの受け入れられた同時液滴が存在する時、非常に低いパーセンテージの拒否された同時液滴が存在する。線OLは、この反比例関係を示し、所与の一定の粒子流速での可変同時受入仕分け方法の操作ラインを表す。操作ラインOLに沿った図81における点Pにて、使用可能な集団の純度は、粒子流速、例えば、85%純度によって所与のパーセンテージである。許容される同時液滴のパーセンテージが、操作ラインOLに沿って(左および上向きに)増加するにつれ、使用可能な集団に仕分けられる望ましくない粒子の数は増加し、純度は85%を切り、これは許容不可能であるかもしれない。許容される同時液滴のパーセンテージが操作ラインOLに沿って(右および下向きに)減少するにつれ、純度は85%を超え、許容される。

【0261】

操作ラインOLに沿った点LLにて、使用不可能な集団に仕分けられることによって無駄になる所望の粒子のパーセンテージが粒子送達速度に基づいた所与のパーセンテージ、例え

10

20

30

40

50

ば、40%であるように、同時液滴の75%は拒否される(つまり、使用不可能な集団に仕分けられる)。液滴のパーセンテージが操作ラインOLに沿って(右および下向きに)増加するにつれ、使用可能な集団に仕分けられる所望の粒子のパーセンテージは、(例えば、<60%まで)減少し、これは許容されないかもしれない。拒否された同時液滴のパーセンテージが操作ラインOLに沿う(左および上向きに)につれ、使用可能な集団に仕分けられる所望の粒子のパーセンテージは、(例えば、>60%まで)増加し、許容される。従って、可変同時受入仕分け方法を実行する一定流速制御方法に対する本発明のこの態様によって、マイクロプロセッサは、受け入れられたおよび拒否された同時液滴のパーセンテージが、矢印ORによって示されるように、点P1およびLLの間の操作範囲を変動するように、システムを操作してもよい。操作範囲ORは、使用不可能な集団に対する不純度および所望の粒子の喪失に対する耐性のレベルによって、操作ラインの大部分を網羅し得ることに留意されたし。

10

【0262】

要約すると、可変同時受入仕分け方法を用いる一定流速制御方法において、許容される第3の粒子組のパーセンテージは、使用可能な集団の純度に反比例し、使用不可能な集団に仕分けられることによって無駄になった所望の粒子の量に反比例する。

【0263】

D. 制御方法の要約

次の表は、上記の制御方法の概要である。

【0264】

【表9】

20

制御戦略	高回収	高純度	一定の流速
制御されたパラメーター	流体送達速度	流体送達速度	仕分けパラメーター
制御するパラメーター:	集団の純度	集団における所望の粒子の量	集団の純度および集団中の所望の粒子の量
仕分け戦略	同時許諾	同時拒否	可変同時許諾
X/Y 仕分け戦略	X液滴およびX+~X液滴を収集し; ~X液滴を拒否する	X液滴を収集し; X+~X液滴および~X液滴を拒否する	X液滴を収集し; 収集されたX+~X液滴のパーセンテージを変動させ; X液滴を拒否する
定義	X粒子に関する集団の純度が許容されるレベルあるいはそれ以上である限り、流体送達速度は増加される	流れ中のX粒子の総量に対する使用可能な集団中の所望の粒子の量が許容される量またはそれ以上である限り、流体送達速度は増加される	X粒子に関する集団の純度が許容されるレベルまたはそれ以上である限り、集団中の同時液滴のパーセンテージは増加される; 操作を続けるために、流れ中のX粒子の総量に対する使用可能な集団中の所望の粒子の量が、許容される量またはそれ以上でなければならない
逆の定義	使用可能な集団の汚染の確率が、許容されるレベルの純度あるいはそれ以下である限り、流体送達速度は増加される	使用不可能な集団中の所望の粒子の量の喪失の確率が、許容される量またはそれ以下である限り、流体送達速度は増加される	使用可能な集団の汚染の確率が、許容される純度のレベルまたはそれ以下である限り、ならびに使用不可能な集団中の所望の粒子の量の喪失の確率が、許容される量またはそれ以下である限り、流体送達速度は増加される
所望の結果	>最小許容可能純度; 例えば、>85%純度	>最小許容可能量; 例えば、捕獲された所望の粒子の>60% (失われた所望の粒子の<40%)	>最小許容可能純度および>最小許容可能量; 例えば、>85%純度および捕獲された所望の粒子の>60% (失われた所望の粒子の<40%)

30

40

関連して、上記制御方法の1つを用いて入手された仕分けられた試料を第2の試料と組み合わせ、所望の特徴を有する最終(例えば、商用)試料を得ることができる。例えば、100%純粋な集団を生成する高純度に従い仕分けられる試料は、80%純度に仕分けられる同一の容量の集団と組み合わせられて、90%の純度を有する最終試料を生成することができる。あるいは高純度に仕分けられる動物精子の場合、仕分けられた精子のアリコート量は、仕分けられていない精子のアリコート量と組み合わせられて、上記仕分け方法のいずれかを用いて精子の全体の量を仕分けるよりも低コストにて所望の純度の最終試料を生成することができる。

50

【0265】

制御方法の上記記載は、各同時液滴を含む各液滴の正確な同定および仕分けを仮定する。実際には、100%正確性は、いくつもの理由のため不可能である。従って、汚染を最小限に止めるために、所望の集団に属すると確実に分類することができない粒子を拒否することが望ましいかもしれない。他方で、もし特定の粒子が、特定の選択された確率(例えば、精子細胞の場合、50%より大きい)内で所望の集団中に属すると同定され分類され得るなら、それらが使用不可能な集団に失われないように、所望の集団に属するとして、粒子を分類することが望ましいかもしれない。従って、先に論議したように、精子細胞のような粒子は、そのような粒子が使用可能な集団に属する確率に基づき、所望の細胞の集団への仕分けに許容され、または拒否されてもよい。

10

【0266】

上記表および本出願において使用される用語「使用可能」および「使用不可能な」は、便宜のためのみに使用され、決して制限するように意図されていない。従って「使用可能な」集団は、それがどのように使用されるかまたは使用されるかに拘わらず、いずれかの「第1の」集団を含み、「使用不可能な」集団は、どのようにそれが使用されるかまたはそれが使用されるかに拘わらず、使用可能な集団とは異なるいずれかの「第2の」集団を含む。同様に、「所望の」集団は、選択された粒子特徴に従って仕分けられるいずれかの集団を意味する。

【0267】

マイクロプロセッサおよびそのシグナル処理ソフトウェアは、光検出器からの電子シグナルを処理するためのシステムを構成して、粒子の特徴に従って粒子(例えば、一般的には粒子、特に精子粒子)を分類して、図78に関して上記のように、粒子の分布に関する情報を得る。さらに、マイクロプロセッサは、粒子の分布に関する得られた情報の関数として、流体送達システムがノズルシステムに粒子を送達する速度を変動させるためのシグナル処理ソフトウェアに応答性の制御システムを構成する。さらに、マイクロプロセッサは、粒子の分布に関する得られた情報の関数として、仕分け方法を変動するためのシグナル処理ソフトウェアに応答性の制御システムを構成する。

20

【0268】

一般的には、マイクロプロセッサは、その仕分け方法を変動するための仕分けシステムを制御するためのまたは流体送達システムを制御するためのフローサイトメトリー装置から受け取られた情報に応答性の制御システムを構成する。言い換えると、マイクロプロセッサは、第1のモードにおいて操作して、仕分け方法を変動することが可能であり、流体送達システムを制御するために第2のモードにおいて操作することが可能であり、仕分け方法を変動するためおよび流体送達システムを制御するために第3のモードにおいて操作することが可能であり、他のモードで操作することが可能であってもよい。第1または第3のモードにおいて操作する時、マイクロプロセッサは、流体が以下の:(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する少なくとも1つの集団の純度、および(2)流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動することが可能である。

30

40

【0269】

収集システム

偏向板の間を通った後に液滴を収集するのに、収集システムが必要である。慣用的サイトメーターのための収集システムは、それらが偏向プレートの間を通過した後、様々な液滴流れ中の液滴を捕獲するように配置された収集容器以上のものでなくてよい。同様の慣用的な収集システムを、本発明のいくつかの具体例において使用することができる。

【0270】

しかしながら、ノズルが上向きの角度で流体の流れを方向付けるように配置され、それにより液滴に左右方向の速度要素を与える本発明の具体例においては、慣用的な収集システムを使用することは困難かもしれない。1つの問題は、液滴が、それらが収集容器に落

50

ちるのに適当である下向きの動きを開始する前に、弓なりの曲線に沿って、いくらかの水平距離を移動するであろうということである。例えば、もしノズルが45°ないし60°の範囲にて、上向きに置かれ、液滴が15m/sおよび20m/sの間の速度にて出て行くなれば、液滴は、それらが曲線の頂点に達し、下向きの動きを始める前に、ノズルから数メートル離れた水平距離であろう。従って、相当量のラボ空間は、液滴流れによって占められるだろう。また、さらに、数メートルの範囲にて、液滴が適切な収集容器に落ちることを確実にするのは困難であろう。液滴流れの曲線は、サイトメーターに対する1以上の操作条件が変化する時(例えば、ノズルオリフィスでの流体速度における変化を生じる流体送達速度への調整)はいつでも変化し得る。液滴流れの曲線の変化は、液滴が移動する距離によって拡大されるだろう。従って、ノズルの比較的近くの地点で液滴位置の望ましい変化を生じない曲線の変化は、ノズルから離れた位置の液滴の位置において有意な変化を生じ得るだろう。上記で論議されるように、本発明のいくつかの具体例は、曲線を定期的に改変する液滴流れを生じ得る液滴形成および/または試料流体送達システムへのフィードバックを使用する。また、シース流体がノズルに送達される圧力を変動させたい者がいるかもしれない。気流、温度変化、および湿度変化も、液滴流れの曲線を改変し得るだろう。液滴流れの軌道を変化し得るいずれの要因も、液滴が望ましい収集容器に落ちるように、収集容器を再配置することを必要とするだろう。対照的に、下向きノズルを有する慣用的なサイトメーターにおける液滴流れの曲線は、変動にあまり感受性でない。例えば、液滴流れが実質的に下向きの初期速度を有するという事実は、オリフィスでの流体速度の変動が、曲線においていずれかの有意な変動を生じないことを意味する。さらに、収集容器は、液滴流れにおける軌道変動により耐性のある収集システムを作るノズルに比較的近い。

【0271】

図83-85は、本発明のシステムにおいて仕分けられた液滴を収集するのに使用され得る一般的に2201と示される収集システムの1つの具体例を示す。サイトメーターノズルシステム101が上向き角度または水平要素を有するいずれかの他の角度にて、流体の流れ21を方向付けるように配置される時、収集システムは、液滴33の収集に特に適している。液滴が偏向板629の間を通過する時、それらは異なる弓なりの曲線を有する複数の液滴流れ123、125(例えば、2つ)に仕分けられる。図84および85に示されるように、各液滴流れの軌道は、デバイス2203をインターセプト(intercept)する2つの液滴のうちの1つへと導く。もし液滴が2以上の液滴流れに仕分けられるなら、別々のインターセプティング(intercepting)デバイスが、各さらなる液滴流れに供される必要があるだろう。従って、本発明の収集システムのインターセプティングデバイスの数は、液滴が仕分けられる流れの数によって決まるだろう。

【0272】

例示的収集システムの各インターセプティングデバイス2203は、各インターセプティングデバイスの下に置かれた収集容器2207に、軌道に沿って動く液滴をそらすために、液滴流れのうちの1つの軌道にわたるように置かれたインパクト表面2205を有する。インパクト表面は、好ましくは、柔軟な材料で作られる。特定の理論に縛られずに言えば、柔軟な材料は、インターセプティングデバイスの表面にぶつかる液滴の衝撃を吸収し、それにより、液滴中の粒子(例えば、精子細胞)への損傷を減らすと考えられる。例えば、インターセプティングデバイスは、ポリプロピレン、ポリエチレン、あるいは他の同様なポリマーで構成されてもよい。図86および87を参照すると、インターセプティングデバイス2203は、ピベット2215の球部2213の一方側における液滴進入路2211(例えば、三角形ウィンドウ)を切断することによって構築されている。かくして、液滴の対抗側の球部の内側壁2217の一部は、各液滴流の軌道にわたる曲面インパクト表面を形成する。便宜には、ピベットの管は液体をインパクト表面から収集容器に向けるためのガイド2225として働く。

【0273】

図84を参照すると、インターセプティングデバイスは、それらを所定の位置に維持する収集システムフレーム2227に固定される。液滴流れの曲線の変動を説明するために、インターセプティングデバイスの位置の調整を可能にするのが望ましい。例えば、各インター

セプティングデバイスの垂直な高さは、ホルダー2229を通過して、円形内径内を上下に、導管を滑らすことによって調整してもよい。インターセプティングデバイスが所望の高さにある時、位置決めねじ2231を締めてそれをその高さで維持することができる。ホルダーは、収集システムフレームに取り付けられた取り付けプレート2233に、例えば位置決めねじ2235(例えば、2つの位置決めねじ)によって取り付けられてもよい。位置決めねじ2235は、取り付けプレートの水平スロット2241を通過して、インターセプティングデバイスの側部調整を可能にする。調整後、位置決めねじは、所望の位置に円形ホルダーを維持するように固定されてもよい。当業者は、本発明の範囲から逸脱せずに、多種多様の他の固定デバイスを使用して、インターセプティングデバイスの位置を調整できることを認識するだろう。収集容器2207は、収集容器を保持するためのトレイ2243のスロット2241のインターセプティングデバイスの下に維持される。従って、各収集容器は、それがそれぞれのインターセプティングデバイス下の位置に留まるように、必要に応じて、それぞれのスロット内を動かされてもよい。また、水槽(図示せず)が、所望により、収集容器辺りに供されて、収集容器の内容物の温度を制御してもよい。

【0274】

図85を参照すると、本発明の1つの具体例において、1以上の液滴流がインターセプティングデバイスを通るのを可能とするために、インターセプティングデバイス2247の1つの裏面がカットされている。第2のインターセプティングデバイス2249は、このウィンドウを通過する液滴をインターセプトするために、出口ウィンドウの後に位置している。第2のインターセプティングデバイスに対する例示的な進入ウィンドウは、第1のインターセプティングデバイスに対する例示的な出口ウィンドウと大体同じサイズであってもよい。明白になるであろう理由のため、出口ウィンドウは、第1のインターセプティングデバイスに対する進入ウィンドウより有意に小さいのが望ましい。例えば、第1のインターセプティングデバイスに対する例示的な進入ウィンドウは、高さ約5/8インチおよび幅約3/8インチである。対照的に、例示的な出口ウィンドウは、高さ1/8インチおよび幅5/16インチであってもよい。

【0275】

サイトメーターの操作の間、収集システムは、仕分けられた流れ中の液滴をインターセプトするように操作する。次いで、インターセプトされた液滴は、インターセプティングデバイス2203の導管2225を通過して収集容器2207へと流れ落ちる。サイトメーターが弓なりの曲線に沿って液滴流れを方向付ける上向きサイトメーターノズルを有する場合、例えば、インターセプティングデバイスは、液滴が、液滴が慣用的収集システム(つまり、デバイスなしの収集システム)によって収集されるであろう地点と比較して、ノズルにより近い軌道上の地点にてインターセプトされるのを可能にする。

【0276】

その弓なりの軌道に沿って、比較的速く(例えば、それらがまだ上向きに動いている間)液滴流れをインターセプトすることで、液滴が最初に収集システムに遭遇する時に、液滴の位置の変動の量が減少する。従って、収集システムは、慣用的な収集システムが耐え得る液滴流れの軌道のより大きな変動に耐えることができる。同様に、液滴は、それらの収集システムへのより短い経路のため、気流によって吹き付けられる可能性が低い。

【0277】

インターセプティングデバイス2203をノズル101のより近くに動かして、軌道変動に対する耐性を増加させることと、インターセプティングデバイスをノズルオリフィスから遠くに動かして、それらが実質的に曲線の頂点の液滴流れをインターセプトするように、インターセプティングデバイスを位置させることによるように、液滴がインターセプティングデバイスに衝撃を与える時、衝撃の力を減らすまたは最小化することとの間に均衡が取られなければならない。従って、インターセプティングデバイスの最良の位置は、仕分けられる粒子(例えば、精子細胞)の耐久性、液滴速度、および液滴流軌道の変動の予測される大きさによって決まるだろう。ノズルオリフィスにて約16ないし20m/sの速度を有するウシ精子細胞を含有する液滴の場合、例えば、インターセプティングデバイスは、ノズル

10

20

30

40

50

オリフィスから4-6インチの範囲に位置させることができる。第1のインターセプティングデバイスが出口ウィンドウを有し、第2のインターセプティングデバイスが第1のインターセプティングデバイスの後ろに置かれる具体例において、例えば第1のインターセプティングデバイスは、ノズルから約4および5インチの範囲であってもよい。より望ましくは、第1のインターセプティングデバイスはノズルから約4.5インチである。第2のインターセプティングデバイスは、ノズルから約5ないし6インチの範囲であってもよい。より望ましくは、第2のインターセプティングデバイスは、ノズルから約5.5インチである。

【0278】

1つのインターセプティングデバイス2203が、もう1つのインターセプティングデバイスの出口ウィンドウを通過する液滴をインターセプトするように位置させる配置は、仕分けられた集団のうちの1つの純度について考えていない(例えば、乳牛を育種するのに用いるために仕分けられた精子の場合におけるY染色体-担持精子)時、特に有利である。当業者は、未知の含有量を有する多数の漂遊液滴2265(例えば、漂遊液滴のミス)が、図85に示されるように、仕分けられた流れ中の液滴に加えて、サイトメーターによって生成され得ることを知るだろう。第1のインターセプティングデバイスは、第1のインターセプティングデバイスのインパクト表面2205に当たり、純度が最も臨界的である流れが出口ウィンドウ2245を通過して第2のインターセプティングデバイスのインパクト表面に当たるように位置させるべきである。このように、図85に示すように、漂遊液滴の大部分は、純度について余り関心がない集団を含有する収集容器2207に収集され、純度が臨界的である集団を汚染しないであろう。また、漂遊液滴をインターセプトし、収集することによって、あたかも漂遊液滴が収集システムから逃げるように、しばしば洗浄する必要性が回避される。第1のインターセプティングデバイスとは対照的に、第2のインターセプティングデバイスは、より小さな出口ウィンドウを通過する液滴を方向転換するに過ぎない。これは、第2のインターセプティングデバイスによって収集された集団の純度の維持を容易とする。

【0279】

当業者は、例示的な収集システムが、本発明の範囲から逸脱せずに、多くの方法で容易に修飾することができることを認識するだろう。例えば、本発明の範囲から逸脱せずに、その直下に、一体的に形成された(あるいはさもなければ取り付けられた)収集容器を有する液滴インターセプティングデバイスを構築することが可能であろう。同様に、図83-87中に示される具体例のインターセプティングデバイスは、修飾されたピペットであるが、インターセプティングデバイス2203は、本発明の範囲から逸脱せずに、様々な形状のいずれかであり得ることが理解される。例えば、各インターセプティングデバイスは、平面または曲がったシート、スプーン、ボール、または他の同様の形状を含んでもよい。唯一の必要条件は、インターセプティングデバイスが液滴流れのそれぞれの軌道に沿って動く液滴をインターセプトし、インターセプトされた液滴を収集容器に流すように操作可能であることである。しかしながら、ピペットのような容易に入手でき、かつ比較的安価な製品からインターセプティングデバイスを構築する1つの利点は、試料の流れの間にインターセプティングデバイスを洗浄するよりはむしろ各試料の流れの後に使用したインターセプティングデバイスを置き換え、捨てるのがより経済的であるということである。

【0280】

収集流体

仕分けられた精子は、収集流体2301(図56および57)を含有する容器中に収集される。一般的には、収集流体の目的は、精子細胞の衝撃を収集容器で吸収し、細胞に流体支持体を供することを含む。これらの考慮と一致して、収集流体は、緩衝剤または緩衝液および蛋白質源を含み得る。

【0281】

もし含まれるなら、収集流体中に使用され得る緩衝剤または緩衝液の例は、試料収集および希釈に関して上記に開示される。典型的には、これらの緩衝剤または緩衝液は、約0.001Mないし約1.0Mの濃度であり、約4.5ないし約8.5、好ましくは約7.0のpHを有するだろ

10

20

30

40

50

う。1つの具体例において、収集流体は、約7.0のpHにて、0.96% ダルベッコのPBS(w/v)を含む緩衝剤を含有する。もう1つの具体例において、収集流体は、精製水の0.204g NaHCO₃、0.433g KHCO₃、および0.473g C₆H₈O₇・H₂O/25mLを含む代謝阻害剤を含有する(水中、0.097モル/LのNaHCO₃、0.173モル/LのKHCO₃、0.090モル/LのC₆H₈O₇・H₂O)。

【0282】

もし含まれるなら、蛋白質源は、精子細胞の生存能力と干渉せず、使用される特定の緩衝剤または緩衝液と適合性のあるいずれの蛋白質源であってもよい。一般的な蛋白質源の例は、(加熱均質化およびスキム)乳、乳抽出物、卵黄、卵黄抽出物、大豆蛋白質および大豆蛋白質抽出物を含む。そのような蛋白質は、約1%(v/v)ないし約30%(v/v)、好ましくは約10%(v/v)ないし約20%(v/v)、およびより好ましくは約10%(v/v)の濃度で使用されてもよい。乳は、緩衝剤または緩衝液と併せて使用されてもよいが、一般的には、乳は、それ自体、緩衝剤または緩衝液と同じ目的を果たし得る溶液であるため、その不在下で使用される。そのような例において、収集流体は、約80%(v/v)ないし約90%(v/v)の乳を含有し得る。

10

【0283】

蛋白質源に加えて、またはそれに代わって、収集流体は、精漿も含んでもよい。精漿は、精子生存性および運動性を改善することおよび精子膜を安定させること(それにより、精子の収集および貯蔵の間、受精能獲得を防ぐ)の2つの利益を果たす。Maxwell et al., *Reprod. Fert. Dev.* (1998) 10: 433-440. 精漿は、精液試料が得られたのと同じ哺乳類から、同じ種の異なる哺乳類から、異なる種の哺乳類からであってもよい。もし収集流体に含まれるなら、典型的には、精漿のパーセンテージは、約0.5%(v/v)ないし約10%(v/v)の範囲だろう。もし、例えば卵黄または乳のような蛋白質源と併用されるなら、精漿および蛋白質源の総パーセンテージは、約1%(v/v)ないし約30%(v/v)の範囲だろう。そのような例において、精漿のパーセンテージは、蛋白質源のパーセンテージに反比例するだろう。従って、1つの具体例において、収集流体は、精漿を含む。もう1つの具体例において、収集流体は、約0.5%(v/v)ないし約10%(v/v)の量で、好ましくは、約4%(v/v)ないし約6%(v/v)の量で、より好ましくは約5%(v/v)の量で、精漿を含有する。もう1つの具体例において、収集流体は、蛋白質源および精漿を含有する。さらにもう1つの具体例において、収集流体は、精漿および卵黄を含み、両方のパーセンテージは、合計で、約1%(v/v)および約30%(v/v)の間である。

20

30

【0284】

所望により、収集流体は、精子生存性または運動性に利益的である、ある範囲の添加剤も含有し得る。そのような添加剤の例は、エネルギー源、抗生物質、および細胞内および/または細胞外で酸化/還元反応を調節する組成物を含み、これらの各々は、試料収集および希釈に関して上記で論議される。そのような添加剤は、それに従って、収集流体に添加され得る。

【0285】

従って、特定の具体例において、収集流体は、約7.0のpHにて、水中に、0.96% ダルベッコのPBS(w/v)、1%(w/v)フルクトース、10%(v/v)卵黄を含む。さらにもう1つの具体例において、収集流体は、さらに、10mMピルビン酸、100 μMビタミンK、または1mMのリポ酸を含む。

40

【0286】

別法として、および収集流体の使用に代わって、仕分けられた細胞は、続いての低温保存工程で使用されるおよびさらに下記される低温エキステンダーを含有するまたはそれで覆われた容器に収集されてもよい。従って、1つの特定の具体例において、仕分けられた細胞は、低温エキステンダーに収集される。もう1つの具体例において、収集された細胞は、水、Triladyl (登録商標) (Minitube, Verona, WI, グリセロール、トリス、クエン酸、果糖、5mg/100ml チロシン、25mg/100ml ゲンタマイシン、30mg/100ml スペクチノマイシン、および15mg/100ml リンコマイシンを含む)、卵黄およびピルビン酸を含む低温エキステンダーに仕分けられる。さらにもう1つの具体例において、収集流体は、75mLの水中

50

に、25gTriladyl(登録商標)、25g卵黄、および10mMピルビン酸を含む低温エキステンダーである。

【0287】

本明細書中に開示される収集流体中の蛋白質のパーセント濃度は、フロー仕分けされた細胞の添加前のものであることが理解されるべきである。フロー仕分けされた細胞の添加は、収集流体の最終濃度を、フロー仕分けされた細胞の添加前であったものの約1/20まで希釈するだろう。従って、例えば、収集流体は、最初は、約10%(v/v)卵黄を含有し得る。フロー仕分けされた細胞が収集流体を含有する収集容器に収集された後、卵黄の最終濃度は、約0.5%(v/v)まで減少されるだろう。

【0288】

インターセプティングデバイスおよび/または収集容器の前処理

本発明に従って仕分けられ得る粒子(例えば、精子細胞)への潜在的損傷を最小化するために、インターセプティングデバイス2203および/または収集容器2207(図56-60)は、使用前に処理されてもよい。そのような前処理は、例えば、粒子およびインターセプティングデバイスとの間のインパクトを最小化するように働く組成物を含有する浴にインターセプティングデバイスおよび収集容器を接触または浸漬させることを含むことができる。インターセプティングデバイスおよび収集容器の浴からの取り出しに際し、ある量の組成物はインターセプティングデバイスおよび収集容器に残り、液滴中の粒子用のクッション剤として働く。従って、組成物は、所望のクッション効果を供するのに適した特徴を有するべきである。加えて、組成物は、また、粒子または仕分けられる細胞、シース流体、および収集流体と適合性があるべきである。これらの考慮と一致して、インターセプティングデバイスおよび収集容器を処理するのに使用される組成物は、緩衝剤または緩衝液、シース流体、収集流体、低温エキステンダー、緩衝液、シース流体、収集流体、または低温エキステンダーに含有されるいずれかの成分、またはそのいずれかの組合せを含み得る。本発明の方法に従って、精子細胞の染色および分離に使用される緩衝剤、緩衝液、シース流体、および収集流体は上記される。従って、1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器はシース流体と接触される(例えば、浸漬されたりあるいは磨かれる)。もう1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は収集流体と接触される。さらにもう1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、下記の低温エキステンダーと接触される。

【0289】

組成物とインターセプティングデバイスおよび収集容器との接触または浸漬は、好ましくは、組成物がインターセプティングデバイスおよび収集容器の表面に付着するのを可能にするのに十分な時間起こる。そのような時間は、一般的には、約90分未満、好ましくは約60分未満、より好ましくは、約30ないし約60分、最も好ましくは約60分である。さらにもう1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、単に、使用前に組成物と接触される。

【0290】

インターセプティングデバイスおよび収集容器の上記組成物との接触の代わりに、あるいはそれと併せて、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、また、シース流体、収集流体、例えば、BSA、SSS、卵黄、卵黄抽出物、(熱加熱均質化およびスキムを含む)乳、乳抽出物、大豆蛋白質、および大豆蛋白質抽出物のようなおよび/または低温エキステンダー中に含有される特定の成分と接触させてもよい。従って、1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、シース流体と接触され、引き続いて、0.1%(v/v)ウシ血清アルブミンと接触される。もう1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、シース流体と接触させ、引き続いて、10%(v/v)卵黄と接触させる。もう1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、収集流体に浸漬され、引き続いて0.1%(v/v)ウシ血清アルブミンと接触させる。もう1つの具体例において、インターセプティングデバイスおよび収集容器は、収集流体に浸漬され、引き続いて10%(v/v)卵黄と接触させる。

【0291】

インターセプティングデバイスおよび収集容器は、上記の各具体例において同じ前処理を受け取るが、本発明の範囲から逸脱せずに、インターセプティングデバイスおよび収集容器に対して異なる前処理プロトコルを使用することは可能である。同様に、いくつかのインターセプティングデバイスまたは収集容器は、1つの前処理を受け、インターセプティングデバイスまたは収集容器の他は、本発明の範囲から逸脱せずに、異なる前処理を受けることができる。再び本発明の範囲から逸脱せずに、前処理の特定の利益は、また、インターセプティングデバイスのみまたは収集容器のみを前処理することによって得ることができる。

【0292】

濃度

上記のように、フローサイトメーターによって収集された仕分けられた精子は、様々な緩衝剤およびエキステンダー、染色流体、シース流体、および収集流体の添加によって希釈されている。典型的には、上記のようにフローサイトメトリーによって仕分けられた後の精子細胞の濃度は、約 0.7 ないし 1.4×10^6 精子細胞/mlの範囲である。従って、仕分けられた精子細胞を濃縮して、精子への希釈衝撃を最小化し、冷凍保存および人工授精のために、精子の適切な濃度を獲得することが重要である。畜産業における標準的な実践は、例えば、約 20×10^6 または約 40×10^6 精子細胞/mlのいずれかの濃度にて、精子と人工授精を実施することである。精子細胞を濃縮する1つの方法は、サイトメーターによって収集された流体の遠心分離を通してである。精子を濃縮するもう1つの方法は、サイトメーターによって収集された流体を、濾過システムに通すことである。これらの方法は、下記でより詳細に論議される。

【0293】

A. 遠心分離

いずれかの慣用的な遠心分離機を使用して、精子を濃縮することができる。しかしながら、商用操作において、一度に大きなバッチの精子細胞を遠心分離する能力を有する遠心分離機を使用することが好ましい。遠心分離の間、大部分の精子細胞は、精子細胞に対して作用する遠心分離力のため、遠心分離管の下部にあるペレット中に集まる。遠心分離力の規模は、便宜により、遠心分離力が重力を超える倍数として述べられる。遠心分離力は、臨界パラメーターであり、いずれかの所与のスピード(角速度)での遠心分離力の規模は、曲率の半径の長さによって変動するため、遠心分離の速度は、典型的には、遠心分離力の規模を述べることによって特定される。例えば、 $600g$ 力は、遠心分離の角速度が、得られた遠心分離力が重力の 600 倍になるように選択されることを意味する。ペレットに遠心分離されるのを逃れる流体およびY精子細胞の大部分は、上澄み中にあるだろう。一般的には、上澄みは除去され、ペレット中の精子細胞は、下記のようにさらなる処理のために再懸濁される。同時に精子細胞への損傷を最小化しつつ、ペレット内で濃縮される精子のパーセンテージを最大化することが重要である。

【0294】

本発明の1つの方法に従って、約 10×10^6 の仕分けられた精子細胞を含有する遠心分離管を、遠心分離機に入れる。濃縮を促進するために、遠心分離管を、サイトメーターの収集システムにおいて収集容器として使用してもよい。これによって、遠心分離前に、仕分けられた精子細胞を遠心分離管に移す必要を避ける。管は、濃縮された精子細胞のペレットを管の下部で形成させるのに十分な速度および継続時間、遠心分離される。遠心分離の速度および継続時間は、望ましくは：精子細胞が脆く、過剰な速度にて遠心分離によって損傷され得る；遠心分離管のサイズが、精子細胞が管の下まで動くのに必要な時間に影響を及ぼす；および遠心分離が長く続けば続くほど、所与の速度での遠心分離によって、精子細胞が損傷される可能性がより高くなるという要因を含むいくつかの要因の考慮において選択される。従って、本発明の1つの具体例において、遠心分離管は、約 6 - 10 分の間、 550 - $800g$ にて遠心分離される。本発明のもう1つの具体例に従い、遠心分離管は、約 6 - 10 分の期間、 650 - $750g$ にて遠心分離される。さらにもう1つの具体例において、遠心分離

10

20

30

40

50

管は、約6-10分の期間、700gにて遠心分離される。さらにもう1つの具体例において、遠心分離管は、約7分の期間、700gにて遠心分離される。

【0295】

次の実験において示されるように、遠心分離機の速度および遠心分離の継続時間は、回収される精子細胞のパーセンテージおよび回収された精子細胞の運動性に影響を及ぼし得る。実験は、実際に精子細胞を仕分けることなしに実行した。代わりに、緩衝剤、エキステンダー、シース流体および染色流体を含む様々な流体を、精液試料に添加して、仕分け工程を刺激した。次いで、試料を、精子細胞を濃縮しようと、遠心分離した。

【実施例】

【0296】

遠心分離実施例I

遠心分離実施例Iにおいて、上記のように、ウシ血清を収集し、評価した。精液試料を、ある量の7.3のpHを有するトリス-クエン酸("TCA")で希釈して、 150×10^6 精子細胞/mlの濃度を得た。精子を、20分間、41にて、Hoechst 33342(100 μ M)で染色した。2つの15ml管を、シミュレーションのために、緩衝剤で調製した。管1を、部分的に、10%卵黄を含む750 μ lのリン酸緩衝生理食塩水("PBS")および0.1%ウシ血清アルブミン("BSA")を含む14.25ml PBSで充填した。管2を部分的に10%卵黄を含む750 μ l TCAおよび0.1% BSAを含む14.25ml PBSで充填した。2つの管の各々は、染色された精子を含有する100 μ lの溶液を受け取り、次いで、これらを室温にて20分間インキュベートした。次いで、2つの管を、各々、7mlの2アリコートへと分けた。各管からの1アリコートを、固定されたバケツ遠心分離機で、7分間、2250 rpm(約540g)にて遠心分離した。2つの管の各々からの他のアリコートを、7分間、2500 rpm(約660 g)にて遠心分離した。遠心分離の直後、10mlピペットを使用して、各アリコートから上澄みを除去して保存した。ペレットを200 μ lのTCA中で、10%卵黄(pH 7.0)で再懸濁した。遠心分離前後の精子運動性を位相コントラスト顕微鏡下で観察した。50 μ lの固定剤(3.4%クエン酸ナトリウム中0.1%グルタルアルデヒド)を、各ペレットおよび上澄みに添加して、血球計による濃縮決定のために精子を固定した。精子の総数を、血球計によって決定されたように、対応する精子濃度によって掛けられた使用された/回収された容量に基づき計算した。回収率を、ペレット中の精子の総数および上澄み中の精子の総数の合計によって割ったペレット中の精子の総数として計算した。

【0297】

図88および89に示されるように、結果は、遠心分離速度を変動することによって生じた精子細胞運動性の差はほとんどないことを示す。また、結果は、PBSと比較して、TCSを使用した方が僅かに運動性が良かったことを示す。

【0298】

遠心分離実施例II

遠心分離実施例IIにおいて、上記のように、3つの雄牛からの精液試料を収集し、評価した。試料の1つは、初期条件質制御基準に満たなかったため、不適當であった。他の2つの精液試料を、ある量の7.3のpHを有するTCAで希釈して、 150×10^6 精子/mlの精子濃度を得た。精子を、20分間、41にて、10 μ M Hoechst 33342溶液で染色した。10%卵黄を含む1500 μ l PBSおよび0.1% BSAを含む28.3ml PBSを含有するシミュレートされた緩衝剤を2つの管の各々に添加した。200 μ lの染色された精子(30×10^6 精子細胞)を各管に添加し、室温にて、20分間インキュベートした。精液混合物の3つの9mlアリコートを、遠心分離のために、2つの管の各々から得た。2つの試料の各々からの1アリコートを次の速度:550g; 650g; および750gの各々にて、15ml遠心分離管において、7分間、遠心分離した。遠心分離の間の温度は22であった。遠心分離直後、上澄みを10mlピペットで除去し、ペレット中に約200-300 μ lの上澄みを残した。ペレットを、7.0のpHを有する10%(v/v)卵黄を有する200 μ lのTCAで再懸濁した。仕分け前後の精子運動性を、位相コントラスト顕微鏡下で観察した。2つの雄牛のうちの1つからの遠心分離後試料において、ひどい精子凝集が見られた。50 μ lの固定剤(3.4%クエン酸ナトリウム中の0.1%グルタル

10

20

30

40

50

アルデヒド)を、各上澄みおよびペレットに添加して、濃度決定のために精子を固定する。回収率を、遠心実験I記載の様式に従って決定した。

【0299】

結果を図90に示す。結果は、550gと比べて、650gにて、精子細胞の改善された回収率を示す。しかしながら、650gおよび750gの間の回収率にはほとんど差がなかった。遠心分離機の速度を変動することによって生じる精子細胞運動性において有意な差はなかった。

【0300】

遠心分離機実施例III

遠心分離機実施例IIIについて、遠心分離機実施例IIの手順を、異なる日に、同じ3頭の雄牛で実質的に繰り返した。結果を図91に示す。結果は、750gと比べて、650gでの回収率にほとんど差がないことを確認する。

【0301】

遠心分離機実施例IV

精液を、2つの異なる日に、2頭の異なる雄牛から収集した。精液を、上記の様式で、移し、評価した。生の精液の精子濃度に基づき、精子をトリス-クエン酸(TCA, pH 7.3)+10mM ピルビン酸で 150×10^6 精子/mlの濃度まで希釈した。精子を、41にて、20分間、10 μ M Hoechst 33342で染色した。染色後、染色された精子を含有する267 μ lの溶液を、次のシミュレート緩衝液: 10%(v/v) 卵黄を含む 2ml PBS; および0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)を含む37.733ml PBSの添加によって、 1×10^6 精子/mlの濃度まで希釈した。染色された精子およびシミュレート緩衝剤を室温にて、少なくとも20分インキュベートした。4つの9ml アリコート染色された精子および各雄牛から得られたシミュレート緩衝混合物から得た。第1の雄牛からの4つのアリコートを、次:

- (1) 第1のアリコートにつき、700gで7分;
 - (2) 第2のアリコートにつき、700gで10分;
 - (3) 第3のアリコートにつき、650gで10分;および
 - (4) 第4のアリコートにつき、650gで7分
- の順序で遠心分離速度および持続時間の変動する組合せにて、遠心分離した。

【0302】

第2の雄牛からの4つのアリコートを、次:

- (1) 第1のアリコートにつき、700gで10分;
 - (2) 第2のアリコートにつき、700gで7分;
 - (3) 第3のアリコートにつき、650gで10分;および
 - (4) 第4のアリコートにつき、650gで7分
- の順序で遠心分離速度および持続時間の変動する組合せにて遠心分離した。

【0303】

全遠心分離を、22にて、スイングヘッド遠心分離機(Allegra 6R, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA)中の15ml 遠心分離管で行った。農場での精液収集およびラボでの遠心分離の間の時間間隔は、4-5時間であった。遠心分離直後、上澄みを10ml ピペットで除去し、各ペレットで、~250 μ l 上澄み残した。ペレットを、250 μ lのダルベッコのPBS (pH 7.0)中で再懸濁した。精子運動性および進行性運動性を、染色後であるが、遠心分離前および再び遠心分離後に、Hamilton-Thorn運動性アナライザー(試料当たり2つのスライド;スライド当たり2つのチャンパー)を用いて観察した。精子濃度は、予めフリーザーに入れられたプレ-遠心染色精子およびシミュレート緩衝液混合物の100 μ l アリコート、および90 μ l 固定剤(3.4%クエン酸ナトリウム中0.1%グルタルアルデヒド)と混合した再懸濁ペレットの10 μ l アリコートの血球計測定によって決定した。回収率を、遠心分離機実施例Iでのように決定した。結果を図92および93に示す。

【0304】

データは、> 85%の精子が650gまたは700gでの7または10分(図92)間の遠心分離に回収できることを示す。しかしながら、回収率は、700gにて僅かに良かった(95%)。全処理における(遠心分離前と比較した)遠心分離後の運動性の減少は、遠心分離力のストレスに耐え

10

20

30

40

50

られなかった死/異常/脆い精子の存在のためであろう。精子運動性は、全処理において、10-14%(図93)減少した。650gでの7分間の精子運動性(14%)のより大きい減少は、650gでの遠心分離が700gの後に実施されたため、シミュレート緩衝剤への精子のより長い暴露のためかもしれない。遠心分離は、精子の進行性運動性にいずれの悪影響も示さず、むしろ2-3%の改善があった。

【0305】

遠心分離機実施例V

精液を、2つの異なる日に、一頭の雄牛から収集した。精液を評価し、Hoechst 33342で希釈し染色し、さらに、遠心分離機実施例IV記載のように、シミュレート緩衝剤中で希釈した。染色された精子およびシミュレート緩衝剤混合物の4つの9ml アリコート、2つの精液試料の各々に対して入手した。第1の試料からのアリコートを、次:

- (1) 第1のアリコートに対して、750gで10分;
- (2) 第2のアリコートに対して、750gで7分;
- (3) 第3のアリコートに対して、700gで10分; および
- (4) 第4のアリコートに対して、700gで7分

の順序で、次の遠心分離速度および持続時間の組合せのうちの1つにて、遠心分離した。

【0306】

第2の試料から得られたアリコートについて、遠心分離速度および持続時間の組合せは同じであったが、順序を次のように修飾した:

- (1) 第1のアリコートに対して、750gで7分;
- (2) 第2のアリコートに対して、750gで10分;
- (3) 第3のアリコートに対して、700gで7分; および
- (4) 第4のアリコートに対して、700gで10分。

【0307】

遠心分離を、22にて、スイングヘッド遠心分離機(Allegra 6R, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA)中の15ml 遠心分離管において実施した。農場での精液収集およびラボラトリーでの遠心分離の間隔は、第1の試料に対して、約6.5時間、第2の試料に対して約4時間であった。遠心分離処理、つまり上澄みの除去後、ペレットの再懸濁、精子濃度の決定、およびHamilton-Thorn運動性アナライザーを介する運動性予測を、実施例IV記載と同じ手順に従い実施した。結果を図94および95に示す。

【0308】

高度に希釈された懸濁液中の精子集団の> 85%が、700gまたは750gで、7分または10分で回収することができることを、結果は示す(図94)。g力の750gまでの増加は、回収率を有意に改善しなかった。遠心分離機実施例IVにおける場合がそうであったように、(遠心分離前と比較した)遠心分離後の運動性の減少は、全処理において観察された。現在の実験において、精子運動性は13-20%減少し(図95)、これは、遠心分離機実施例IVにおいてより少し高かった。変動は、精液試料および1つの複製における精液収集から遠心分離までの時間間隔(6時間)の変動のためであり得る。実施例IVにおいて説明されるように、低速遠心分離(700xg, 7または10分間)での精子運動性の減少(約20%)は、それらが750g 遠心分離後遠心分離された時の、シミュレート緩衝剤への精子のより長い暴露のためかもしれない。進行性運動性の低下は、無視できる程度であった(1-5%)。

【0309】

B. 二次遠心分離

上澄み中に失われかねない精子を回収するために、ペレットから分離された後、上澄みを遠心分離することが可能である。特定の理論によって制限されずに言えば、出願人らは、ペレット/上澄み間期が、精子のペレットへの動きを妨げると考える。ペレットを上澄みから分離することによる間期の除去によって、上澄みをさらに遠心分離して、上澄みに留まって第2のペレットを形成し得た精子細胞を生じるだろう。第2のペレットを、再懸濁して、第1のペレットからの再懸濁された精子に添加することができる。

【0310】

C. 濾過

上澄み中の精子細胞の喪失を避けるために使用できる別の濃縮方法は、濾過である。図96に示されるように、1つの例示的な具体例に従い、フィルター2415を収集容器2403に組み込む。フィルターの穴のサイズは、望ましくは、約0.2-1ミクロンの間である。また、フィルターは、デプスフィルター(例えば、精子テイルが捕らえられかねない曲がりくねった経路を有するフィルター)でないことが望ましい。むしろ、フィルターは出来る限り薄いのが望ましい。例えば、フィルターの厚みは、50 μm ないし500 μm の範囲であるのが望ましく;より望ましくは、フィルターの厚みは75 μm ないし250 μm の範囲であり;最も望ましくは、フィルターの厚みは100 μm ないし150 μm の範囲である。低レベル真空2417が、液滴33が収集される時に、フィルターを介して流体を除去するように適用される。精子細胞に損傷を与えることを避けるために、低レベル真空(水銀20インチ未満、例えば、水銀15インチ)を使用するのが重要である。1つの具体例において、真空は、流体除去速度が、約1.0ml/15秒であるのに十分に低い。本発明のもう1つの具体例に従って、真空は断続的に適用されて、精子細胞に回収する機会を与える。さらにもう1つの具体例において、フィルター2415は、精子細胞と適合性があるが、それらに対して結合親和性を有しない材料で構築される。仕分けの完了時、約80-90%の流体がフィルターを通して除去されているだろう。しかしながら、精子細胞が濃縮されたスラリー2405中に存在するのに十分な流体(約10-20%)が残り、それにより、精子細胞がフィルターケーキを形成するのを防ぐ。濃縮された懸濁液は、例えば図97に示されるように、もう1つの容器に移されてもよい。カニューレチップフィルター2411を有するシリンジメカニズム2409を使用して、この容器2419から、いくらかの残りの液体を除去することができる。しかしながら、精子細胞がフィルター2411上にケーキ形成するのを防ぐのに十分な流体が、容器中に残される。同じ考えが、収集容器中のフィルター2415として、カニューレチップフィルター2411に適用される。従って、カニューレフィルター2411の穴のサイズは、望ましくは、約0.2ないし1.0ミクロンの範囲であり、カニューレフィルターは、精子テイルがフィルター中の曲がりくねった経路に捕まるのを避けるために、比較的薄い。例えば、Spectrum Laboratories, Inc. of Rancho Dominguez, CAから商業的に入手可能なDynaGard(登録商標)中央ポリプロピレンファイバーシリンジチップフィルターをカニューレチップフィルターに対して使用することができる。図98に示されるように、再懸濁流体2413はカニューレ-チップフィルターから流されて、フィルター表面にくっついているかもしれない細胞を、スラリーへと洗い戻す。再懸濁流体は、ある量の濾過された流体および/または適当なエキстенダーを含み得る。フィルターから精子細胞を除去するのに十分なある量の再懸濁流体が、フィルターを通して洗い流された後、さらなる再懸濁流体を、所望により、添加してもよい。再懸濁流体の総量は、濃度を所望の濃度(例えば、約 20×10^6 精子細胞/ml)に持ってくるように選択される。従って、この具体例の濾過工程は、収集容器におけるフィルターの使用、カニューレフィルターを用いる濾過、所望の濃度を得るための再懸濁を含む三段階プロセスである。

【0311】

別の二段階濾過プロセスにおいて、上記の三段階プロセスの第1および第2段階を、全流体の除去がカニューレフィルターを通して行われるように組み合わせられる。このプロセスにおいて、仕分けられた精子細胞は、フィルターを有しない収集容器に向けられる。流体は、カニューレ-チップフィルター2411を介して適用される上記のような低真空および/または間欠的真空によって除去される。精子細胞が濃縮されたスラリー中にある時、例えばエキстенダーのような再懸濁流体は、カニューレフィルターを通して洗い戻されて、精子細胞の所望の濃度を得る。

【0312】

濾過実施例I

濾過実施例Iは、本発明の三段階濾過プロセスによる濃縮後の精子細胞の回収率および運動性を示す。精液試料を三頭の雄牛から収集し、上記の試料調製セクションで供されるように評価した。3つの精液試料のうちの1つは、最低初期条件質基準に満たなかったた

10

20

30

40

50

め、不適當であった。2つの残りの試料を、 150×10^6 精子細胞/mlの濃度を得るのに必要なある量のTCA(pH 7.3)で希釈した。5000を、2つの15ml 試験管の各々に添加した。67 μ l精液試料(約 10×10^6 精子細胞)を各試験管に添加し、室温にて20分間インキュベートした。図99を参照すると、真空ポンプ2427を使用して、負圧を適用して、フィルター2425を介して、希釈された精液2423の4ml アリコートを引き出した。濾液2429をシリンジ 2421中に収集した。濾過後、フィルター上の精子細胞を、15ml管中の1ml TCA緩衝剤で洗い戻した。精子運動性を視覚的に評価した。濾過前後の試料を、固定剤(3.4 クエン酸ナトリウム中0.1% グルタルアルデヒド)と混合して、精子細胞を固定した。精子濃度を血球計を用いて決定した。精子細胞の総数を、精子細胞の濃度によって掛けられた容量に基づき、計算した。回収率を、濾過前のアリコート中の精子細胞の総数によって分けられた洗い戻された部分中の精子細胞の総数として計算した。工程を、異なるフィルターで繰り返した。実験は、次:(1)1.0 μ m PTFE(FTPEではない)膜ディスク(シリンジ)フィルター(Pall Corporation, Life Science Group, Ann Arbor, MIから入手可能, Cat # PN4226T or VWR, Batavia, IL, Cat. # 28143-928);および(2) 0.8 SFCA(無仮面活性剤酢酸セルロース)膜ディスク(シリンジ)フィルター(Corning, Inc., Corning, NY, Cat. # 431221; VWR Batavia, IL, Cat. # 28200-028)のフィルターの両方をテストした。結果を図101に示す。PTFEフィルターと比較して、より多くの精子を、酢酸セルロースフィルターで回収した、つまり酢酸セルロースの低い蛋白質結合親和性のため67対33%。回収された精子の視覚的な運動性は、63%(PTFE)ないし68%の範囲であった(酢酸セルロース)。

10

【0313】

20

濾過実施例II

濾過実施例IIは、本発明の二段階濾過プロセスによる濃縮後の精子細胞の回収率および運動性を示す。精液試料を、三頭の雄牛から収集し、上記の試料調製セクションで供されるように、評価した。3つの試料を 150×10^6 精子細胞/mlの濃度を得るのに必要なある量のTCA(pH 7.3)で希釈した。10% 卵黄を含む 1.5mlのPBSおよび0.1% BSAを含む28.3mlのPBSを、50 試験管の各々に添加した。200 μ lの精液試料(約 30×10^6 精子細胞)を各試験管に添加し、室温にて20分間、インキュベートした。図100を参照し、シリンジ2431を使用して、負圧を適用して、フィルター2435を通して各試験管から希釈された精液2433の6ml アリコートを吸い取った。フィルターを、フィルターホルダー2437(Millipore Corporation, Billerica, MA Cat # SX0002500からのSwinnex フィルターホルダー)に入れた。濾過後、濾過ホルダー2437を、フィルターホルダーを無傷のまま維持しながら、シリンジおよび管から外した。フィルター上の精子を、フィルターアセンブリをひっくり返し、15ml 試験管中の先端にチューブの薄片を有する3ml シリンジを用いて1mlのTCA緩衝液を逆フラッシュすることによって収集した。精子運動性を視覚的に評価した。濾過前後の試料を、固定剤(3.4 クエン酸ナトリウム中0.1% グルタルアルデヒド)と混合して、精子細胞を固定した。精子濃度を血球計を用いて決定した。精子細胞および回収率の総数を、濾過実施例Iで特定されるように計算した。プロセスを、2度繰り返して、異なるフィルターをテストした。実験は、次:(1) a 0.2 μ m テフロン膜フィルター(X-Partek, P.J Covert Associates Inc. St. Louisから入手可能 Cat. # 944106; および(2) 0.8 酢酸セルロース膜フィルター(Millipore Corporation, Billerica, MA Cat. # AAWP 02500)のフィルターの両方をテストした。結果を図102に示す。両方のフィルターにおいて、精子の回収率は低かった(~25%)。実施例Iのように、テフロンフィルターにおいて低かった。しかしながら、酢酸セルロースフィルター中の洗い戻された精子の低回収率および視覚的運動性は、異なる販売業者によって使用される材料および/またはフィルターホルダー/アセンブリと結合する精子の能力のためかもしれない。

30

40

【0314】

D. 密な媒体の濃度

収集された精子を濃縮するもう1つの別法は、高密度媒体中の精子細胞の浮遊に依存する。この方法に従って、高密度媒体を、収集された精子細胞に添加して、懸濁液の比重を約1.3以上に上げた。例えば、Percoll(登録商標)およびIsolate(登録商標)といった

50

商品名下で入手可能なコロイド状シリカ懸濁液を使用して、懸濁液の比重を増加してもよい。精子細胞は、懸濁液の頂部まで浮遊し、そこでそれらは、懸濁液の増加した比重のため、すくい取るか、さもなければ収集される。再懸濁流体を、表面から収集された細胞に添加して、最終濃度を約 20×10^6 精子細胞/mlまで持ってくる。いくつかの懸濁流体を、高密度媒体の添加前に上記の濾過方法のうちの1つによって除去して、所望の特異的な重力を得るのに必要な高密度媒体の量を減らしてもよい。

【0315】

低温拡大

A. 凍結保護

一旦、精子が仕分けられ、収集容器に収集されると、それらを雌の哺乳類を受精させるのに使用することができる。これは、精子のさらなる処理をほとんど要さず、ほとんど直ぐに生じることができる。同様に、また、精子を、後日の使用のため、冷却したり、冷凍してもよい。そのような例において、精子は、さらなる処理から利益を得て、冷却および冷凍の結果としての生存性または解凍後運動性に対する衝撃を最小化することができる。

【0316】

一般的には、低温エキステンダーは、緩衝剤または緩衝液、蛋白質源、および抗凍結剤を含む。低温エキステンダーにおいて使用可能な緩衝剤および緩衝液の例は、試料収集および伸長に関して上記で開示する。典型的には、これらの緩衝剤は、約0.001Mないし約1.0Mの濃度であり、約4.5ないし約8.5、好ましくは約7.0のpHを有する。

【0317】

もし含まれるなら、蛋白質源を添加して、細胞に支持体を提供し、収集容器で細胞の接触を和らげてよい。蛋白質源は、精子細胞の生存性と干渉せず、使用される特定の緩衝剤または緩衝液と適合性のあるいずれの蛋白質源であってもよい。一般的な蛋白質源の例は、乳(加熱均質化およびスキムを含む)、乳抽出物、卵黄、卵黄抽出物、大豆蛋白質および大豆蛋白質抽出物を含む。そのような蛋白質は、約10%(v/v)ないし約30%(v/v)、好ましくは約10%(v/v)ないし約20%(v/v)、より好ましくは約20%(v/v)の濃度で見出すことができる。乳は緩衝剤または緩衝液と併用してもよいが、一般的には、乳は、それ自体、緩衝剤または緩衝液の同じ目的を果たし得るため、乳はその不在下で使用される。そのような例において、低温エキステンダーは、約80%(v/v)ないし約90%(v/v)の乳を含有するだろう。

【0318】

抗凍結剤は、好ましくは、低温エキステンダーに含まれて、冷衝撃を緩めるかまたは防ぐ、あるいは精子の受精率を維持する。多くの抗凍結剤が当該分野で知られている。所与のエキステンダーとの使用に適した抗凍結剤の選択は、変動し得、冷凍される精子が得られた種によって決まる。適した抗凍結剤の例は、例えば、グリセロール、硫酸ジメチル、エチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、Triladyl(登録商標)およびその組合せを含む。もし含まれるなら、一般的には、これらの抗凍結剤は、約1%(v/v)ないし約15%(v/v)の量、好ましくは約5%(v/v)ないし約10%(v/v)の量、より好ましくは約7%(v/v)の量、最も好ましくは約6%(v/v)の量で、低温エキステンダー中に存在する。

【0319】

1つの特定の具体例において、低温エキステンダーは、水、Triladyl(登録商標)、卵黄、およびピルビン酸を含む。さらにもう1つの具体例において、低温エキステンダーは、75mLの水中に、25g Triladyl(登録商標)、25g 卵黄、および10mM ピルビン酸を含む。

【0320】

所望により、低温エキステンダーは、精子生存性または運動性に有益であり、冷凍保存の有害な副作用を防ぐまたは緩める、ある範囲の添加剤を含んでもよい。そのような添加剤は、例えば、エネルギー源、抗生物質、または細胞内および/または細胞外で、酸化/還元反応を調節する組成物を含んでもよく、これらの各々は、試料収集および希釈に関して上記で論議される。そのような添加剤を、それに従って、低温エキステンダーに添加し

10

20

30

40

50

てもよい。

【0321】

B. 仕分けられた精子細胞の冷凍保存

ほとんどの場合において、上記のように仕分けられた精子細胞を、直ちに人工受精に使用することは可能ではないだろう。特に、商用精子仕分け操作の場合において、仕分けられた精子細胞は、それらが人工受精に使用される前に、仕分けられおよび/または移送されなければならない。これは、大抵、精子細胞の冷凍保存を要する。仕分けられた精子は、細長いシリンダー(畜産業では、「ストロー」として知られる)にロードして、冷凍保存して、移送および貯蔵の間、精子を保存してもよい。冷凍保存された精子細胞を、液体窒素中に、長期間保存することができる。冷凍保存された精子を使用するために、ストローを熱した水槽中に浸漬して、精子を解凍すればよい。次いで、ストローを、雌の動物を受精させるのに使用される人工受精ガンにロードする。いくつかの予防措置をとって、冷凍保存の間、精子細胞を保護しなければならない。さもなければ、精子細胞は、(5-10%の解凍後運動性率の低さによって示されるように)人工受精での使用に適さないほどに損傷されるだろう。

10

【0322】

慣用的な冷凍保存方法は、順次に、蛋白質源(例えば、卵黄)を添加し、約4-5 の温度まで精子を冷却し、抗凍結剤(例えば、グリセロール)を添加し、精子および抗凍結剤を、精子細胞に抗凍結剤と平衡を保たせるのに十分な時間、約4-5 の範囲で、一定の温度に維持し、次いで、貯蔵のために、-196 の液体窒素中に精子細胞を浸漬することによってのように精子を過冷却することを含む。当業者は、蛋白質源の目的が、精子細胞が最も冷衝撃に感受性のある温度である約14 ないし約8 に冷却する時に、損傷から精子を保護することであることを認識するだろう。対照的に、抗凍結剤は、0 以下の温度にて、損傷から精子細胞を保護する。冷凍保存に関与する温度が、フリージング以下であっても(用語「フリージング」は、冷凍保存を記載するのに使用されることがある)、当業者は、冷凍保存された精子が実際に冷凍でないことが分かるだろう。正確には、冷凍保存された精子は過冷却状態にある。精子細胞および抗凍結剤が一定の温度で維持される慣用的な時間は、何れの場合においても60分以上何時間までも継続することができる。慣用的な方法を用いて冷凍保存を完了する全体の時間は、一般的には、4 時間を超える。さらに、最大50%の精子細胞が、慣用的な冷凍保存プロセスにおいて死滅すると考えられる。本発明のいくつかの具体例に従って、慣用的な方法を用いて、精子は冷凍保存されるが、本発明の他の具体例は、改良された冷凍保存法を使用して、冷凍保存に必要な時間を減らしおよび/または冷凍保存された精子の健康を改善する。

20

30

【0323】

図103は、本発明に従って、精子を冷凍保存する改良された方法の1つの例示的な具体例の段階を概説するワークフロー図を示す。工程2501にて、仕分けられた精子細胞を含有する溶液の濃度は、標的消費者(例えば、畜産関連)によって使用される基準によって、約100万-4000万精子/mlの範囲であるように調整される。例えば、精子濃度は、約2000万ないし2400万精子/mlの範囲であるように調整されてもよい。精子濃度の調整は、再懸濁流体、緩衝剤および/またはエキステンダーの上記のような濃縮された精子への添加を含んでもよい。工程2503にて、抗凍結剤(例えば、グリセロール)は、精子が冷却される前に添加される。精子細胞は、抗凍結剤と接触すると直ぐに、抗凍結剤と平衡を維持し始める。工程2505にて、蛋白質源(例えば、卵黄)は、上記のように、精子細胞を含有する溶液にも添加される。

40

【0324】

精子細胞溶液、蛋白質源、および抗凍結剤は、工程2507にて、慣用的なローディング機械を用いて、慣用的な0.5または0.25ml 人工受精ストローにロードされる。当業者は、精液をストローにロードするのに使用することができる多くの慣用的な装置および技術を知っているだろう。例えば、ここに引用して援用するCassou, et al.に対する1993年10月5日に発光された米国特許第5,249,610号は、使い捨てのインジェクターノズルを用いて、

50

ストローのウシ血清による充填に関する指示を提供する。さらに、ストローを充填するための器具は、Verona WIにあるMinitube of Americaから商業的に入手可能である。これらのいずれかまたは同様の慣用的なローディング方法および装置を使用して、仕分けられた精子細胞をストローにロードすることができる。

【0325】

ロード後、精子細胞を、工程2509にて、維持温度まで冷却する。一般的には、維持温度は、次:高すぎる温度(例えば、10)で精子細胞を維持すると、冷衝撃から不要な損傷を生じ得る;精子細胞の抗凍結剤(例えば、グリセロール)との平衡は、4-5 の範囲の温度で、最も活動的であると考えられる;およびholding 精子細胞を低すぎる温度(例えば、 $< 0^{\circ}$)で維持することは、精子細胞に損傷を与えると考えられることを考えて選択すべきである。従って、1つの具体例に従って、維持温度は0-8 の範囲である。より望ましくは、維持温度は2-6 の範囲である。さらにより望ましくは、維持温度は4-5 の範囲である。もう1つの具体例において、この工程2509に使用される冷却速度は、精子細胞への損傷を最小化するように選択される。例えば、冷却速度を(例えば、実質的に一定に)制御して、均一な冷却を提供し、精子が温度衝撃から損傷を受けるのを防いでよい。また、冷却速度は、膜損傷を生じる前に、代謝を減らすのに十分に迅速に、温度衝撃から損傷を受けない程度にゆっくりと、精子を冷却すべきである。精子細胞を含有するストローを、プログラム可能なフリーザー(例えば、Verona, WIにあるMinitube of Americaから商業的に入手可能なIceCube 1810CDフリーザー)に入れて、冷却することによって、冷却速度を制御することができる。1つの具体例に従って、プログラム可能なフリーザーは、精子を室温(典型的には約22および24 の範囲)から、0.1および0.3 /分の一定の冷却速度にて冷却する。より望ましくは、冷却速度は、約0.15および0.25 /分の範囲である。さらにより望ましくは、冷却速度は約0.2 /分である。もう1つの具体例において、精子が、約90分で、初期温度から維持温度へと冷却されるように、冷却速度を選択する。さらにもう1つの具体例において、冷却速度は、精子を、約90分で一定の冷却速度にて、初期温度から維持温度へ冷却するように選択される。上記で呼ばれる冷却速度は、実際には、プログラム可能なフリーザーのチャンバーの冷却の速度を指すが、ストローの薄い壁および長く薄い形(例えば、約5.25インチの長さ、3mm未満の直径、および約0.15mmの壁の厚み)およびストローの伝導性質のため、精子細胞および冷却チャンバーの間の温度差は有意ではない。

【0326】

精子細胞が維持温度まで冷却された後、工程2511にて、それらは、抗凍結剤との平衡の実質的な完了が可能な時間、その温度またはそれに近い温度で維持される。例えば、上記のプログラム可能なフリーザーをプログラムして、時間の間、一定の温度にて、精子細胞を維持することができる。本発明のもう1つの具体例に従い、冷却プロセスの間、精子が既に抗凍結剤と平衡を維持しているため、慣用的な方法と比較して短縮された期間、精子細胞は維持温度にて維持される。例えば、時間は約10および60分の範囲であってよい。より望ましくは、時間は、約20および40分の範囲である。さらにより望ましくは時間は約30分である。もう1つの具体例において、時間は60分未満である。さらにもう1つの具体例において、時間は40分未満である。比較的短い維持時間は、商用精子仕分けプロセスにおいて、多くの利益を供する。まず、仕分け精子を加工するのに要する時間が減り、これにより、コストを節約できる。また、精子細胞は、0-8 の範囲の温度にて、代謝プロセスを実行し、そうして、精子がこの温度で維持するのに必要な時間を減らすことで、精子細胞の健康を改善し、これは、人工受精成功率について懸念している動物畜産業者にとっての精子細胞の価値を増加させるだろう。

【0327】

精子細胞が上記の時間、維持温度にて維持された後、精子細胞は、工程2513にて、精子冷凍保存のための臨界温度ゾーンに近い温度まで冷却される。当業者は、臨界温度ゾーンが氷血漿形成および浸透圧の変化が精子細胞を損傷するゾーンであることを知るだろう。この温度は、精子細胞が冷凍保存される溶液によって変動し得るが、臨界温度ゾーンは、

10

20

30

40

50

一般的には-18および-35 の範囲である。この臨界温度ゾーンは、約-18および-30 の範囲であると報告される時もある。従って、本発明のさらにもう1つの具体例に従って、維持温度から、-18 に近い温度(例えば、-15)までの温度まで精子細胞を冷却するのに使用される冷却速度は、精子の健康を保護するように選択される。考慮すべき関連した要因は、精子細胞が、この期間、まだ抗凍結剤と平衡を維持しているという事実、精子がまだなんらかの代謝機能を行っているという事実、および精子がまだ迅速な温度変化にいくらか感受性であるという事実を含む。再び、冷却速度は、上記のプログラム可能なフリーザーにプログラムすることができる速度のような、制御された速度であるのが望ましい。より望ましくは、精子を維持温度から約-18 に近い温度まで冷却するのに使用される冷却速度は、一定の冷却速度である。従って、本発明のもう1つの具体例に従って、約1.0-5.0 /分の範囲の冷却速度にて、維持温度から約-15 まで冷却される。より望ましくは、冷却速度は、約2.0ないし4.0 /分の範囲である。さらにより望ましくは、冷却速度は約3.0 /分である。

【0328】

工程2515は、臨界温度ゾーンを介して、精子細胞を迅速に冷却して、精子細胞がその中にある時間を制限することを含む。従って、本発明の1つの具体例に従って、臨界温度ゾーン(例えば、-18 ないし約-30)を介する冷却速度は、維持温度まで精子細胞を冷却するのに使用される冷却速度および臨界温度ゾーンに近い温度まで精子細胞を冷却するのに使用される冷却速度よりずっと早いように選択される。従って、より急な冷却速度は、望ましくは、約8-40 /分である。より望ましくは、より急な冷却速度は、約8-12 /分である。最も望ましくは、より急な冷却速度は、約10 /分である。より急な冷却速度が使用される温度範囲は、臨界温度ゾーンを越えて延びてもよい。従って、本発明のさらにもう1つの具体例において、精子細胞は約-15 ないし約-40 の上記のより急な冷却速度のうちの一つで冷却される。さらにもう1つの具体例において、精子細胞は、約-15 ないし約-80 の上記のより急な冷却速度のうちの一つで冷却される。精子を、より急な速度で、臨界温度ゾーンを介して冷却する工程は、上記のプログラム可能なフリーザーで達成することができる。

【0329】

精子細胞が臨界温度ゾーン(例えば、-80 まで)以下に冷却された後、仕分けられた精子を含有するストローは、工程2517にて、液体窒素(-196)中に浸漬されて、仕分けられた精子細胞の最大有用な寿命を供する。冷凍保存された精子を保存するための液体窒素の使用は、仕分けられていない精子の状況で、畜産業において広く知られている。従って、当業者は、本明細書中で詳細に論議する必要のない液体窒素中での精子の移送および保存を含む技術を知っているだろう。慣用的な容器は、液体窒素中の人工受精ストローのバルク量の長期間保存に提供するのに入手可能であり、より小さく、より持ち運びに便利な容器が、消費者への移送および/または冷凍保存された精子で受精される一頭以上の雌の動物を有する農場への移送のための液体窒素中の人工受精ストローの保存を提供するのに入手可能であることを記せば十分である。

【0330】

本明細書中に記載される冷凍保存方法の1つの利点は、冷凍保存が慣用的な方法に従って必要であるより短時間で完了できることである。恐らく関連して、本発明による冷凍保存のための運動性の低下は、下記で論議される例によって示されるように、ほんの約5-11%である。従って、本発明に従って冷凍保存された精子細胞が、約50秒間、37 の水中で解凍された後、50%以上(例えば、約60%)の運動性を有することを示すテストによって示されるように、本発明による冷凍保存は、精子細胞の健康を保存する。上記のように、精子運動性は、自動機械(例えば、Hamilton Thorn ResearchからのIVOS精子アナライザー)または視覚検査によって分析することができる。

【0331】

上記の冷凍保存方法は、商業スケールの精子仕分けプロセスにおいて使用されると考えられていることは注意すべきである。従って、本発明の1つの具体例に従って、本明細

10

20

30

40

50

書中記載の本発明の方法の工程は、仕分けられた精子細胞のバッチに対して同時に実施されて、それらの健康を保存する様式で、精子細胞の全バッチを直ぐに冷凍保存する。例えば、下記のマルチチャンネルフローサイトメトリー装置を使用することによって、約20分で装置の収集システムにおいて、約 840×10^6 の仕分けられたX染色体-担持精子細胞を得ることが可能である。これは、数ダースのストローを充填するのに十分な精子細胞である。さらに、バッチは、2以上の異なる仕分けサイトメーターによって組み合わされた精子細胞を含み得る。上記のように濃縮された後、精子細胞は、いずれかの数のストローにロードされ、バッチとして冷凍保存される。例えば、本発明の具体例によって、(蛋白質源 および抗凍結剤の両方を含む) エキステンダーを、精子細胞のバッチに添加するには、約5分かかり、自動ローディング機械を用いて人工受精ストローに精子細胞をロードするには約15分かかる。バッチ中の全ストローは、プログラム可能なフリーザー内で、同時に冷却される。さらに、いくつかのプログラム可能なフリーザーの能力によって、何千もの人工受精ストローの同時冷凍保存が可能である。例えば、上記で圍繞されるIceCube 1810 CDフリーザーは、2,500の0.5mlストローまたは3,800の0.25mlストロー以上を同時に冷凍保存する能力を有する。従って、複数のバッチが得られるまで、冷却工程を開始するのを待つことができる。別法として、複数のバッチを、平衡して複数のマルチチャンネルフローサイトメトリー機械(下記参照)を動かし、同時にプログラム可能なフリーザーと一緒にそれから得られた複数のバッチを冷却することによって、実質的に同時に入手することができる。本発明の1つの具体例において、精子細胞を室温から過冷却状態まで冷却し、それらを液体窒素(-196)中に浸漬するには、220分かからない。もう1つの具体例において、過冷却期間は190分未満である。さらにもう1つの具体例において、過冷却期間は150分未満である。

【0332】

当業者は、実質的な修飾が、本発明の範囲から逸脱せずに、前述の例示的な方法になされてもよいことを認識するだろう。例えば、精子細胞は、人工受精ストロー以外の容器内で冷凍保存されてもよい。同様に、温度を変化するまたは維持することを含む方法の工程を、例えば、水浴、液体窒素ペーパー、および慣用的なプログラム可能なまたはプログラムできないフリーザーを含むいずれかの適当な手段によって実施してもよい。さらに、多種多様な物質または物質の組合せを、本発明の範囲から逸脱せずに、蛋白質源および/または抗凍結剤として使用することができる。これらの物質は、緩衝剤、エキステンダー、抗凍結剤、シース流体、および収集流体に関する論議と関連して上記にリストした物質および物質の濃縮物を含む。さらに、方法のいくつかの工程の順番は、本発明の範囲から逸脱せずに、変動し得る。図95は、抗凍結剤は、仕分けられた精子の濃度が調整された後に添加されることを示すが、本発明の範囲から逸脱せずに、濃度が調整される前に抗凍結剤を添加することができることも考えられる。例えば、抗凍結剤は、収集流体中またはフローサイトメーターと関連して使用されるシース流体中に提供されてもよい。また、本発明のいくつかの利益は、精子細胞を部分的に冷却し、次いで抗凍結剤を添加することによって入手することができる。同様に、蛋白質源を添加される順序は、精子細胞が約14ないし8 の温度範囲を通過する時に、蛋白質源がそれらを冷衝撃から保護するのに効果的である限り、変動してもよい。

【0333】

冷凍保存実施例I

ウシ血清を、上記のように、収集し、移送し、評価した。各々が5mlのTCA緩衝液(pH 7.3)を含有する2つの試験管を、少なくとも5分間、2つの水槽のうちの1つに入れた。1つの水槽は、35 の温度で、他の水槽は41 であった。24 で、精子を各管に添加して、各管での最終濃度が 150×10^6 精子/mlになるようにした。2つの管を、各々、2つのアリコートに分け、これらを、それぞれの水槽に保管した。精子が、5分間、TCA緩衝剤と平衡を保った後、80 μ M Hoechst 33342を、35 アリコートのうちの1つおよび41 アリコートのうちに1つに添加した。Hoechst 33342の添加後、全4つのアリコートを、それぞれの水槽中で、20分間インキュベートした。インキュベーション後、試験管を水槽か

10

20

30

40

50

ら除去し、室温(約25℃)にて、5分間放置した。次いで、各試験管の内容物を、20% 卵黄および6% グリセロール(v/v)(pH 7.0)を含有するTCA エキステンダーで、 20×10^6 精子/mlの最終濃度まで希釈した。次いで、各試験管の内容物を使用して、0.5ml 人工受精ストローを充填した。4つのストローの各々を、プログラム可能なフリーザー(Minitube of America, WIからのIceCube 1810CDフリーザー)の各々に入れた。以下の冷却系列をプログラム可能なフリーザーにプログラムした:(1) -0.2℃/分にて22℃ないし4℃;(2) 4℃に30分間保持;(3) -3.0℃/分にて4℃ないし-15℃; および(4) -10.0℃/分にて-15℃ないし-80℃。-80℃に達した後、ストローを、45分間、液体窒素(-196℃)中に浸漬した。次いで、ストローを50秒間37℃水槽に浸漬して、解凍した。精子運動性を、冷凍保存前後の両方で位相コントラスト顕微鏡下でチェックした。結果を図104に示す。解凍後の運動性は、一般的に、約60%であった。これは、冷凍保存前と比較して、ほんの約5-11%の運動性の低下を表す。変動の分析は、解凍後の精子運動性に対する41℃でのHoechst 33342またはインキュベーションのいずれかの有意な効果を全く示さなかった。

10

【0334】

システムの操作

さて、フローサイトメトリーシステム9の全体的な操作813を、図82を参照し、精子細胞(例えば、ウシ精子細胞)の具体的関係で記載するが、記載は例示的なものであるだけであって、粒子の他のタイプを処理するのに、システムを使用することができることは理解されるだろう。

【0335】

6つの第2反復ループに至る第1シリーズの工程は、システムの較正を含む。769の開始後、システムチェック771を実行して、なかでも、プロセッサ131またはプロセッサが操作可能であることを確認する。もしエラーが、3度の失敗したシステムチェック775後に検出されれば、ユーザーの干渉773が要求される。もしシステムチェックが陽性なら、マイクロプロセッサは、システムを、ビーズまたはウシ核のような適当な流体でノズルシステムを洗い流す777ように方向付け、システムを通して検出パラメーター(図72の739参照)を初期設定し、システムが許容される質制御内で操作していることを確認する。これは、システムが十分に試料を識別することができることを確認するために、システムの感受性および精度をテストするための制御材料の評価を含む。もし質制御が、3度の試み775後確認されなければ、ユーザーの介入773が要求される。

20

30

【0336】

もし質制御が質制御の許容されるレベルを示せば、試料781は吸引され、仕分けられる試料の一部またはアリコートは、質のためにチェックされる783。試料質は、試料の質因子(Q-因子)の計算によって決定することができる。例えば、細胞のタイプは、試料の最初のアリコート中で検出され得る。この検出の間、初期設定された検出パラメーター(741)は、再度チェックされ、初期識別パラメーター(745)が生じる。もしアリコート中で検出された細胞のタイプが、試料が現在の基準に見合うまたはそれを超える(例えば、試料が識別されて、特定の純度または運動性を得ることができる、特に、処理のために入手可能な十分な生X細胞が存在すること)と示せば、システムは操作を続ける。もし質制御が三度失敗すれば775、ユーザーの介入が要求される。

40

【0337】

継続した操作は、6つの第2反復ループを用いる試料の残部の仕分け785を含む。ループの始めに、マイクロプロセッサは、試料の仕分けが完了していない789ことを確認する。もし試料の仕分けが完了していれば789、マイクロプロセッサは、入手可能であれば、次の試料781を吸引し続け、あるいは、もしさらなる試料が入手できなければ、仕分け操作を止める793。もし試料が完了していなければ789、マイクロプロセッサは、まず、試料のX/Y識別をチェックして795、それが最適範囲内であることを確認する。つまり、上記のドリフト分析(図72中の761)が実行される。もしいずれかの変化がなされるなら、そのような変化は導入され、識別795が再びチェックされる。もし識別が、この時点でまだ許容不可能であれば、仕分けが止まり793、ユーザーの介入が要求される。

50

【0338】

さもなければ、システムは、流体送達システムが最適範囲内である速度にて、流体および細胞を送達しているかを決定する801ように進む。この決定は、使用される制御方法のタイプによって決まる。高回収制御方法について、最適範囲は、純度を評価するまたは収集された集団の $X/X+ \sim X$ を見ることによって決定されるだろう。もし決定された純度が必要な純度レベルより高ければ、細胞のフィードインプット速度は、シリンジポンプ803に提供される速度制御シグナルを増加することによって増加される。これは、 $\sim X$ 細胞を含むより多くの同時細胞が X 細胞と共に収集されるため、同時細胞を増加し、純度を減少させる傾向があるだろう。もし決定された純度が必要な純度より低ければ、細胞のフィードインプット速度は、同時細胞の周波数を減少する803のために、シリンジポンプに提供される速度制御シグナルを減少することによって減少される。従って、細胞インプット速度は、所望の純度、レベル例えば、収集された同定された $\sim X$ 精子細胞の関数と比較して、収集された集団の決定された純度の関数である。

10

【0339】

高純度制御方法について、最適範囲は、失われた X 細胞、例えば捨てられた X /捨てられた X +収集された X を計算することによって決定されるだろう。もし失われた X 細胞の量またはパーセンテージが許容されるレベル未満であれば、細胞のインプット速度は、シリンジポンプ803に提供される速度制御シグナルを増加させることによって増加される。これは、 X 細胞を含むより多くの細胞が、 Y 細胞内で廃棄されるため、同時細胞を増加し、捨てられた X 細胞の数を増加する傾向があるだろう。もし失われた X 細胞の量またはパーセンテージが、許容されるレベルを超えれば、細胞のインプット速度は、同時細胞を減少するために、シリンジポンプ803に提供される速度制御シグナルを減少することによって減少される。従って、細胞インプット速度は、収集された集団中の X 細胞の数、例えば、収集されていない X 精子細胞の数の関数と比較して、捨てられた集団の決定された失われた X 細胞の関数である。

20

【0340】

もしこの修飾された速度が許容されれば805、システムは、もう1つのシステムチェック807に進む。もしシステムチェックが許容されれば807、仕分けが6つの第2ループで続く。もしそうでなければ、システムはリセットされる809。もしリセット後、システムが許容されない、またはもし改正されたフィード速度が許容されなければ811、仕分けが止まり793、ユーザーの介入が要求される773。

30

【0341】

仕分けられた液滴流れは、収集システム2201によって収集される。 X 細胞の集団に仕分けられる液滴は、第1のインターセプティングデバイス2247の出口ウィンドウ 2245を通過して、第2のインターセプティングデバイス2249によってインターセプトされる。そこから、 X 細胞を含有する液滴は、収集容器2207へ流れる。他の液滴は、第1のインターセプティングデバイス 2247によってインターセプトされ、2805を採って廃棄に向けられる。もちろん、第1のインターセプティングデバイスによってインターセプトedされる液滴は、上記のように、保存されてもよい。適当な量の X -担持精子細胞が、収集容器に収集されると、仕分けは中断されて、収集容器2207中の精子細胞の濃縮を可能にすることができる。新たな収集容器を、第1のインターセプティングデバイス2247下に置いてもよく、または収集された流体を、異なる容器および置き換えられた収集容器に流し入れてもよく、次いで、仕分けは止めてもよい。収集された流体中の精子細胞を濃縮し、ストローにロードし、上記のように冷凍する。

40

【0342】

操作の間の温度制御

プロセスを通しての温度制御を使用して、プロセスの結果を改善することができる。上記で既に論議したように、精子の温度は、プロセス中の様々な工程(例えば、染色および冷凍保存)の間制御することができる。本発明のいくつかの具体例において、方法の様々な工程を通して精子細胞の温度を制御して、改善された結果を達成する。

50

【0343】

例えば、図105は、本発明による温度制御の方法の1つの具体例のワークフロー図である。収集時の精液試料の温度は、収集された動物の体温によって決定されるだろう。例えば、工程2601にて、ウシ血清試料は約37にて収集される。断熱容器を、精液試料の工程2603での収集箇所からラボへの移送に使用する。断熱容器は、精子の冷却を遅らせる。

【0344】

工程2605での試料評価の間、温度を、収集温度以下であるが、精子細胞が膜損傷をこうむる未満のガラス転移温度に対応する温度を超えて維持する。例えば、温度を、約18-37

の範囲で維持してもよい。もう1つの具体例において、温度を、試料評価の間、約24-37の範囲で維持してもよい。特定の具体例において、精子細胞を、試料評価の間、約22-25の範囲の温度を有する環境に置く。ラボ到着時の精子の温度によって、それらを約22-25の範囲の温度を有する環境下に置く効果は、精子の冷却を遅らせ続ける、精子の温度を維持する、あるいは精子の温度を僅かに上昇させるかもしれない。1つの具体例において、温度は、染色セクションで論議したように、工程2607での染色のために上昇(例えば、40またはそれ以上まで)してもよい。もう1つの具体例において、染色工程の間の精子細胞の温度は、上記でも論議されるように、約20-40の範囲であってもよい。

10

【0345】

工程2609にて、染色された精液混合物は、混合物がフローサイトメーターに導入される時間まで、水槽中で維持される。水槽の温度は、染色工程で使用される温度と同様であってもよい。1つの具体例において、水槽の温度は、約40-47の範囲である。もう1つの具体例において、水槽の温度は約20-37である。さらにもう1つの具体例において、水槽の温度は、約20-25の範囲である。1分および2時間の間のいずれかの時間の間、水槽中に維持した後、染色された精子細胞を、工程2611にて上記で論議したように、フローサイトメーターによって仕分ける。濃縮を精子細胞の温度を有意に変化しない温度を有する環境中で行ってもよい。例えば、1つの具体例において、濃縮を、約20および25の範囲の温度を有する環境で行ってもよい。エキステンダー、蛋白質源、および抗凍結剤を、工程2615にて、濃縮された精子に添加する。次いで、工程2617にて、精子細胞を人工受精ストローにロードする。1つの具体例において、ロード工程は、精子細胞の温度を有意に変化しない温度を有する環境下で行う。最後に、工程2619にて、精子の温度を、上記で論議したように、冷凍保存の間、制御する。

20

30

【0346】

もう1つの具体例において、精子細胞を、本発明の範囲から逸脱せずに、さらにより低い温度にて染色してもよい。例えば、比較的低温(例えば、約0ないし約8)にて、フローサイトメーターにおいて精子細胞を仕分けるのが望ましいかもしれない。これは、全体的な温度制御の修飾を要するかもしれない。まず、フローサイトメーターへの導入前に精子細胞を冷却する時、ガラス転移温度以下の温度での冷却衝撃から精子細胞を保護する卵黄および他の一般的な蛋白質源は、一般的には、フローサイトメーターの流体工学を汚すおおよび/または詰まらせる傾向のあるそのような蛋白質含有物質として使用することができない。従って、例えば、精液流体のような純粋な精液中で見受けられる天然の冷却衝撃保護剤を利用するために、染色工程を実施する前に精子細胞を冷却するのが望ましい。冷却前に精子細胞を染色しようといういずれの試みも、純粋な精液を希釈し、冷却衝撃に対して天然の保護を減らす精子を保護するための緩衝剤の添加を要するだろう。

40

【0347】

従って、約0ないし約8の範囲の温度で精子細胞を仕分けるための本発明の1つの具体例は、約8未満の温度を有する環境下に精子細胞を置いて、精子細胞を、染色前に約0

ないし約8の範囲の温度まで冷却することを含む。どの方法を使用して、精子細胞を冷却してもよいが、冷却プロセスの間、精子細胞の早い温度変動に対して保護する方法を使用するのが望ましい。例えば、1つの具体例において、精子細胞を維持する容器を、室温の水槽中に入れ、これを、代わりに、約8未満の温度を有する環境下に置く。もう1つの具体例において、精子細胞の温度をモニターし、氷を水槽に添加して、さらに精子細胞

50

胞を冷却する。染色工程は、染色混合物を約0 ないし約8 の範囲の温度に付すということを除いては、上記のように行ってよい。より低い温度のため、細胞を染色するのに必要なインキュベーション期間は、大幅に長い。一旦、精子細胞が8 またはそれ以下まで冷却されると、それらを温めるのは避けるのが望ましい。従って、本発明のもう1つの具体例は、約0 ないし約8 の範囲の温度を有する環境下でフローサイトメーターを操作することである。同様に、本発明のもう1つの具体例は、約0 ないし約8 の範囲の温度を有する環境に取り囲まれた収集容器中の仕分けられた精子細胞を収集することである。本発明のさらにもう1つの具体例は、いずれかのエキステンダー、抗凍結剤、緩衝剤、蛋白質源、抗生物質、抗酸化剤、または他の添加剤を、約0 ないし約8 の範囲の温度にて添加することである。抗凍結剤の添加に関して、約0 ないし約8 の範囲の温度にて、精子細胞の仕分けがない時に添加されるとりも僅かに多く抗凍結剤を加えるのが望ましいであろう。従って、1つの特定の具体例において、7% グリセロール(v/v)を含有する抗凍結剤を、精子細胞が約0 ないし約8 の範囲の温度にて仕分けられた後、精子細胞に添加する。

10

【0348】

約0 ないし約8 の範囲の温度からの精子細胞の過冷却は、一般的には、上記の冷凍保存セクションに記載された通りに進む。しかしながら、精子細胞は、抗凍結剤の添加後から過冷却の前の時間、約0 ないし約8 の範囲の温度で維持して、精子細胞が抗凍結剤と平衡を維持する時間を可能にする必要があるだろう。従って、1つの具体例に従って、精子細胞を、30分ないし約3時間の範囲の時間、抗凍結剤と平衡を維持させる。もう1つの具体例において、精子細胞を、1ないし2時間の範囲の時間、抗凍結剤と平衡を維持させる。もう1つの特定の具体例において、精子細胞を、約90分の時間、抗凍結剤と平衡を維持させる。

20

【0349】

慣用的な温度制御装置および方法(例えば、水槽、インキュベーター、クーラー、およびフリーザー)を使用して、試料を加熱または冷却して、本発明の前述の具体例において特定された温度を得るまたは維持してもよい。試料と異なる温度を有する環境下に試料を置くことは、そのうち試料の温度を変化させるであろうことは理解される。試料内で温度変動があり得るかもしれない。前述のように、試料の温度を、緩やかに変化させて、精子の健康を維持するのを助けるのが望ましい。また、緩やかな温度変化は、試料内の温度変動を減らす役割を担う。当業者によってよく知られるように、試料の温度変化の速度は、試料の容量、試料容器のサイズおよび形状、および試料および環境の間の温度差の規模を含めた多くの要因によって影響されるであろう。しかしながら、当業者は、適切な方法および装置を選択して、全ての関連した要因を考慮した後、所望の温度制御を達成することが直ぐに可能になるだろう。

30

【0350】

当業者は、本発明の範囲から逸脱せずに、例示的な温度制御における実質的な変動に対する余地があることを認識するだろう。一般的には、一旦精子細胞が冷却されると、それらを加温することを避けるのが望ましい。さらに、試料収集、染色、仕分け、液滴収集、濃縮、および冷凍保存と関連して上記で論議した温度変動は、本発明の範囲から逸脱せずに、全体的な温度制御に組み込むことができる。また、さらに、精子細胞がいずれかの温度のままである時間は、精子の健康に衝撃を与え得る。従って、温度がプロセスを通して制御される具体例に従って処理することは、下記で論議のように、時刻表内で完了するのが望ましい。

40

【0351】**操作のための時刻表**

一般的には、精子への損傷を減らすのに最低限の時間で、精子仕分けプロセスを完了するのが望ましい。上記で論議のように、本発明は、上昇した温度で染色して、精子細胞を染色するのに必要な時間を減らすことを含んでもよい。例えば、記載された改善された染色方法の特定の具体例は、約10分まで、染色に必要な時間を減らす。同様に、上記の新規なサイトメーターを使用して、慣用的なサイトメーターによって必要であるより少ない時

50

間で、精子細胞を仕分けてもよい。例えば、上記の技術を用いるフローサイトメーターは、所望のDNA特徴を有する2,000および10,000の間の精子細胞/秒を収集することができる。さらに、冷凍保存プロセスを使用して、慣用的な冷凍保存方法と比較して、処理された精子細胞の冷凍保存を完了するのに必要な時間を減らしてもよい。従って、本発明の1つの具体例は、全体的な方法に従って、精子を処理して、1以上の時間節約の革新を利用して、全プロセスを完了するのに必要な時間を減らすことを含む。例えば、本発明の1つの具体例に従って、精子細胞のバッチ(例えば、射精された精液)を、雄の哺乳類(例えば、雄牛)から収集し、質制御のために評価し、染色し、特異的なDNA特徴に従って仕分け、1以上の容器(例えば、ストロー)にロードし、収集時から約12間の時間内に冷凍保存する。もう1つの具体例において、時間は約8時間未満である。もう1つの具体例において、時間は約6時間未満である。さらにもう1つの具体例において、時間は約3時間未満である。さらにもう1つの具体例において、時間は約2時間未満である。もう1つの具体例において、時間は約1時間未満である。

10

【0352】

マルチチャネル仕分け装置および方法

より少ない時間でより多くの精子を仕分けるために、1以上のサイトメトリーユニットを平行して使用して、該同一の精子試料を仕分けることが可能である。これを行う1つの方法は、染色された精子細胞を複数のアリコートに分割し、各アリコートを異なるサイトメーターに流すことである。しかしながら、下記で論議したように、特定の利益を、単一の統合マルチチャネルサイトメトリーユニット内の複数のサイトメトリーユニットを含む装置を設計することによって入手することができる。

20

【0353】

統合プラットフォームを共有するマルチチャネルシステム

図106-116は、一般に1001で示されるマルチチャネルサイトメトリーシステムを含む本発明の1つの具体例を示し、ここに1003で示される多数のシングルチャネルフローサイトメトリーユニットを統合されたシステムとして一緒にまとめて仕分けられた生成物を得る。4つのそのようなユニットを、この特定の具体例において示すが、この数は変動し得る。ユニットは、次の要素(1)粒子1005の共通供給;(2)電磁放射線1007の共通源;(3)共通ハウジング1009;(4)ユニット1011の操作を制御するための共通インプット;(5)もう一方のユニットに対する1つのユニットの操作の評価を可能にする共通アウトプット1019;(6)共通流体送達システム;(7)共通温度制御システム1023;(7)共通の電力源1025;(8)共通の廃棄物回収システム 1027;(9)共通の偏向板システム1029; および(9)共通の清掃システム 1031の1以上を含む統合プラットフォームを共有することによってのように、様々な方法で統合することができる。1つの具体例において、システムは、これらの要素の全てを含むが、この発明のマルチチャネルシステムは、要素のいずれの組合せも含み得ることが理解されるだろう。システムがより効率的かつ利益的に動くのを可能にし、変数の数を減らすことによってチャネル間のより一定の結果を達成し、必要かもしれないいずれの故障修理を促進し、経済的であるため、共通要素の使用は利益的である。また、マルチチャネルアプローチは、スケールアップまたはスケールダウンに対してより影響を受けやすい仕分けシステムを作る。

30

40

【0354】

サイトメトリーユニット1003の各々は、先の具体例のフローサイトメトリー装置9の特定の部品と同様の部品を有し、便宜のため、対応する部分を、プライム(')の付加された同じ参照数字によって示す。一般的には、各ユニットは、ノズルシステム101'、ノズルシステム 331'を取り付けるための取付具、変換器105'、および、ノズルオリフィス103'を出て行く流体の流れ21'に対して光のビームをフォーカスするための落射照明光学器具417'を含み、これらは全て前述である。各ユニットは、さらに、第1の具体例にあるように操作可能な光検出器117'を含んで、流れ21'中の粒子から蛍光発光31'を検出し、特異的なDNA特徴によって粒子を分類するように処理された電子シグナル701'に、発光31'を変換することを含む。また、各ユニット1003は、液滴35'中に含有された粒子の分類に従って、

50

異なる群または集団123'、125'に、液滴33'を仕分けるために取り付けられる。ユニットによって仕分けられた液滴の集団は、収集システム2201によって収集される。

【0355】

A. 共通ハウジングおよびモジュール性

フローサイトメトリーユニットは、共通ハウジング1009において、モジュール配置で取り付けられる。図106および109-113で示される具体例において、ハウジングは、ベース1069およびベースから延びる2つの側壁1071を有する。側壁は、ハウジング1077の前部にて、下部カバーパネル1075を支えるためのショルダー1073の底部対およびショルダー1081の上部対を有する。ハウジング1077の前部の下部カバーパネル1075を、底部ショルダー1073の間に取り付けられる。上部ショルダー1081は、ハウジング1085の後方にて、上部カバーパネル1083を支える。ハウジング1077、1085の前部および後方は、実質的に、開いており、内側の装置へのアクセスを提供する。ハウジング1009が、本発明の範囲から逸脱せずに、他の配置を有し得ることは理解されるだろう。さらに、様々なユニットを別々のハウジング内にインストールすることができることは理解されるだろう。

10

【0356】

フローサイトメトリーユニット1003は、ハウジング1009内の適切なフレームワーク1087上のモジュールとして、並んで取り付けられる。具体的には、ノズル101'を位置決定するためのノズル取付具331'は、ハウジングの側壁1071に取り付けられた十字バー1089(図106)に開放可能に取り付けられ、落射照明器具417'のベース429'は、ハウジング1085(図109)の後方に向けてハウジングの側壁1071の間に延びる角度をつけた設置プレート1093に開放可能に締結され、該配置は特定のユニットがモジュールとしてインストールでき、または除去できるようなものである。このモジュール性は維持および/または取換のためのインストール、除去を容易とし、いずれかの数のフローサイトメトリーユニット1003が、必要に応じてまたは所望であれば、容易に付加されて、システムのスループットキャパシティーを増加させるのを可能とする。

20

【0357】

B. 共通流体供給および送達システム

この具体例の流体送達システム1021を備えて、サイトメトリーユニット1003の各々に適切な流体を供する。図108に図式的に示したように、システムは、一般的には、圧力下で、キャリアー流体1107の共通供給からのキャリアー流体17'を運ぶためのポンプ1105、圧力下で、シース流体19'の共有供給1117からの流体を運ぶためのガス圧システム1115mそれぞれの供給からの流体を受け取り、圧力下で、必要に応じて、様々なサイトメトリーユニット1003に流体を送達するための様々なシステム1121を含む。図116の特定の具体例において、キャリアー流体の供給は、そのような流体の適当な容量(例えば、5ml)を含有する容器1123を含む。容器は、ホルダー1125によって維持され、これは容器1123を受け取る大きさにされた空洞1135を有するブロック1133であってもよい。また、ブロックは、後記するように、使用の間、システムを調整するための適当な緩衝材料を含有する容器1139を維持するための第2の空洞1137を有する。

30

【0358】

容器からのキャリアー流体を送達するためのポンプ1105は、望ましくは(必要ではない)、前述のように、シリンジポンプ1141である。ポンプのプランジャは、撮取ストロークを通過して移動して、容器1139から選択された容量のキャリアー流体17'を吸引し、排出ストロークを通過して、キャリアー流体を、供給ライン1147を通過してマニフォールド1177へ、およびそこから、システムの種々のノズル101'まで分注する。また、シリンジポンプは、緩衝剤を含有する容器1139から流体を吸引し、記載される様式で、システムを介して、緩衝剤を押し出すように操作可能である。三方弁1149は、担体および緩衝流体の流れを、ポンプ1141へのおよびそれからの流れを制御する。ポンプは、プロセッサー131'の制御下で、可変のスピードモーターによって動かされる。一例として、ポンプは、選択的に可変のスピードにて操作して、ユニット1003から所望のスループットを得るのに必要な速度にて、多種多様なシステム1121に、キャリアー流体を押し出すステッパーモーターによって動か

40

50

してもよい。流体送達デバイスの複数のシリンジポンプまたは他のタイプは、単一のシリンジポンプの代わりに使用することができる。

【0359】

1つの具体例において、シース流体の供給1117は、容器1155、例えば、供給ライン1157の手段によってマニフォールド1177に接続されたタンクを含む。ガス圧システム1115は、タンクを加圧するように操作可能であり、タンクに供給される圧力を制御するためのその中にレギュレーターを有するガスライン1163、および第1の位置において、タンクおよびガス源の間の連絡を確立し、第2の位置において、タンクに送気するよう操作される二方弁1167を介してタンクに連絡する圧縮ガス1161(例えば、空気または窒素)の源を含む。ガス圧調節装置1165は、空気源から供給された圧力を制御するように調整可能な慣用的な調節装置である。ガス圧システム1115は、また、以後記載する様式で、流体回路を洗い流すのに使用可能な洗浄液の供給1173(例えば、タンク内の脱イオン水)を加圧するガスライン1169を含む。ガスラインを通る流れは、弁1167と同じ様式で操作可能な二方弁1167によって制御される。

10

【0360】

1つの具体例において、マニフォールド1177は、図116に図式的に示されるような流体回路1185を規定するように、形成された通路1181を有する材料のラミネート加工されたブロック1179(図112)を含む。(通路は、ブロックを形成するためのラミネート加工のアセンブリの前に、ラミネートの面に溝を機械加工することによって形成することができる。)流体回路は、シリンジポンプ1141およびシース流体の供給1117に接続されたインレット1189、1191、およびそのような流体をフローサイトメトリーユニット1003に供するための各々がキャリアー流体アウトレットおよびシース流体アウトレットを含むアウトレット1193の組を含む。様々な流路1181を通る流れは、弁V1-V6によって制御され、これらは、1つの具体例において、マニフォールドブロック1179に付着したソレノイド弁である。ブロックは、望ましくは、実質的に透明な材料(例えば、アクリル樹脂)製で、システム1121のモニタリングおよび故障修理を促進する。示される具体例において、マニフォールド1177は、ノズルシステム101'の下のハウジングの底部に隣接するハウジング1009の側壁1071の間を延びるフレーム部品1203に付着する。マニフォールド1177のインレットおよびアウトレット1193は、Scivexの子会社であるUpchurch Scientificから入手可能なフランジのないナットおよびフェールフィットのようなブロックに縫合されたフィッティング1205を含んでもよい。一般的に流体回路1185の設計および構築、特にマニフォールド1177は、本発明の範囲から逸脱せずに変動し得ることが理解されるであろう。

20

30

【0361】

図116を参照すると、キャリアー流体17'に対するマニフォールド流体回路1185は、キャリアー流体の制限された供給(例えば、1.0ml)を維持するための試料容器1207を含む。もし、例えば、キャリアー流体が精子細胞を含有するならば、短時間の間でさえ、小さな空間でのそのような細胞の保存は運動性に対して有害であるため、そのような容器をノズル101'の近くに提供することは、精子細胞の生存性および運動性に対して利益的であろう。試料容器1207からノズル101'へのキャリアー流体の流れは、一連の二方弁V1A-V1D、各ノズルに対して1つによって制御される。各弁V1A-V1Dは、シリンジポンプ1141によって生じた圧力下の針へのキャリアー流体17'の送達のための試料容器の針1217およびそれぞれのノズルの針157'の間の流体連絡を確立する第1の位置、および全フローサイトメトリーユニット1003に一般的な、1221と示された針1217および廃棄システム間の流体連絡を確立する第2の位置を有する。示された具体例において、廃棄システム1221は、廃棄物質を保持するための廃棄タンク1223、廃棄タンク中に真空を発生させるための真空ポンプのようなメカニズム1225、および弁V1A-V1Dおよび廃棄タンクを接続する廃棄ライン1227を含む。弁V3は、必要に応じて、廃棄ラインを開いたり閉じたりするための廃棄タンクから上流の廃棄ラインにおいて提供される。適当な疎水性フィルター1233は、廃棄タンク1223および真空ポンプ1225を接続するラインにおいて提供される。

40

【0362】

50

シース流体19'に対するマニフォールド流体回路1185は、複数の弁V2A-V2Dを含む。各弁は、シース供給ライン1241を介するシース流体19'のそれぞれのフローボディ-133'への送達のためのタンク内のシース流体の供給1117と流体連絡を確立する第1の位置、および廃棄ライン1247を介するフローボディおよび廃棄タンク間の流体連絡を確立する第2の位置を有する。シース流体がフローボディ133'に送達される圧力は、(調節装置1165によって制御されるように)シースタンク圧によって変動し、これは、1ないし100 psi、より望ましくは10ないし50 psi、さらにより望ましくは15ないし40 psi、さらにより望ましくは約20ないし30 psiを変動し得る。

【0363】

ユニットのユニットに対する共通供給の使用は様々な利点を有するが、少なくともいくつかのフローサイトメトリユニットが、別々の源からの試料材料で供給することができることが考えられる。

10

【0364】

C. 共通電力源およびインプットおよびアウトプット制御

また、フローサイトメトリユニット1003は、共通電力供給1025、共通電力送達システム、マイクロプロセッサ-131'によってチャンネルの操作を制御するための共通インプット(GUI)715'、およびもう1つのチャンネルに対する1つのチャンネルの操作の評価を可能にするマイクロプロセッサに提供される共通アウトプットを共有する。例えば、共通アウトプットは、各チャンネルによって測定された蛍光強度の指標、各チャンネルが粒子を分離する速度の指標、(XおよびY細胞からの蛍光パルスの強度差によって示され得る)染色変動の指標および粒子間を識別するために各チャンネルによって使用される決定境界763の指標のために、各落射照明システムからマイクロプロセッサに、デジタル化されたシグナルを供することを含む。もう1つの例として、共通アウトプットは、破壊センサー389'からマイクロプロセッサに、各チャンネルの液滴破壊位置107'を示すために、アウトプットシグナルを供することを含む。

20

【0365】

D. 共通温度制御

所望により、1257と示される温度制御システムは、保持ブロック1133中の容器1123の内容物の温度およびマニフォールド1177の温度を制御するために提供される。そのような温度制御は、システムの変動を減らし、従って、チャンネル間のより一定の測定を供し、特定のタイプの細胞(例えば、精子細胞)に関しては、細胞の生存性を維持するのを助ける。

30

【0366】

1つの具体例において、温度制御システム1257は、保持ブロック1133中に流体路1263およびマニフォールドブロック1179中に流体路1269を含む流体流回路1259、選択された温度にて回路を通る温流体(例えば、水)を循環させるための制御ユニット1265を含む。温度は、望ましくは、流体、特にキャリアー流体を最適な温度で維持して、細胞生存性、もし精子細胞が含まれるなら精子運動性を最大化するようなものである。遮断弁V6は、回路を通る流れを制御するために、回路に位置させる。温度制御ユニットを使用して、上記で議論したように、仕分け前に所望の温度にて精子細胞を維持してもよい。

40

【0367】

流体送達システム1021の全ての弁は、オペレーターの制御または適当なプログラム下で、ソレノイドのような慣用的な手段によって操作する。マニフォールドブロック1179の外側にシステムの部材を接続する様々な流体流ラインは、望ましくは、いずれの閉塞も観察するために、実質的に透明なプラスチック管でできている。例えば、管は、FEPポリマーの0.0625 in. OD管であってもよい。温度制御システム1257のフローラインは、望ましくは、いくらか大きく(例えば、0.125 in. OD)、より大きいフロー能力を提供する。

【0368】

E. 共通光ビームおよびビーム分散システム

前述のように、マルチチャンネルシステムは、電磁放射線またはビーム光1007の共通源を共有する。(制限ではなく)例としては、源は、主に351.1 nmおよび363.8 nmの波長を有

50

するUVマルチラインレーザーからのレーザービームであってもよい。別法として、各サイトメトリユニットに送達される有効な電力を増加し、それにより単一レーザーで操作できるサイトメトリユニットの数を増加させるために、パルスレーザー(例えば、モードロックされたレーザー)を用いる、特に(パルスレーザーセクションで論議されるように)パルスレーザーとデジタルサンプリングを同期化することが望ましいかもしれない。

【0369】

レーザービームを生じるのに必要な電力は、各フローサイトメトリユニットの必要およびユニットの数によって変動するだろう。例えば、もしNユニットが存在し、各ユニットが、Wワットの有効な電力を有する光ビームを必要とするならば、 $(W \times N) + L$ [式中、Lはシステムの光学部材間のシステム電力喪失に等しい]の電力を有するレーザービームを生じるのが必要になるだろう。単一のレーザーを使用して、全てのフローサイトメトリユニットを供給することは、複数のレーザーを用いるシステムと比較すると、経済的である。また、経済的であり、異なるビーム特徴(例えば、ビーム強度、光偏光性、ビーム発散)または複数のレーザーの使用から生じる電気的ノイズによる変動がないため、1つのチャンネルから次ぎへのより一定した測定を提供する。

【0370】

本発明の1つの具体例によると、ビーム分割およびガイダンスシステムを使用して、単一のレーザービームを、3以上の別々のビームに分ける。図117に示されるように、例えば、50/50 ビームスプリッター1270(つまり、単一のビームを、大体同等の強度を有する2つの別々のビームに分けるように操作可能なビームスプリッター)を使用して、単一のビーム25'を2つのビーム1270A、1270Bに分けることができる。第2の50/50 ビームスプリッター1271を使用して、2つのビームのうちの1つ1270Bをさらなるビーム1271A、1271Bに分けることによって、単一のビーム25'から全部で3つのビーム1270A、1271A、1271Bを発生することができる。各ビームは、フローサイトメーターの光学システム、例えば図117に示されるように落射照明光学システム415'に向けることができる。また、さらなる50/50ビームスプリッターを使用して、単一のレーザービームをいずれの数のさらなる別々のビームにも分けることができる。図118に模式的に示されるように、例えば、3つの50/50 ビームスプリッター1270、1271、1272を使用して、単一の25' ビームを4つの別々のビーム1271A、1271B、1272A、1272Bに分けることができるように、第3のビームスプリッター1272を、3-方ビーム分割システム(図117)に加えることができる。これから、単一のビームをいずれの数の別々のビームにも分けることができることを直ぐに理解することができる。他のビーム分割配置を使用して、入射源ビームを様々なユニットに対して複数の光ビームに分けてもよい。

【0371】

ビーム分割システムの1つの望ましい具体例を図106および109に示す。ビームガイダンスシステム1273は、共通ビーム1007を様々なフローサイトメトリユニット1003の光学器具417'にガイドするために提供される。図106および111に示される具体例において、ガイダンスシステム1273は、ハウジング1009の1つの側壁1071上に取り付けられた下部鏡アセンブリ1279、下部鏡アセンブリ上の側壁1071上に取り付けられた上部鏡アセンブリ1281、および各光学器具417'と関連した一連の反射フィルター1283を含む。下部鏡アセンブリは、適当な源から、上部鏡アセンブリに上向きにビーム1007を反射するように操作可能であり、上部鏡アセンブリは、側壁1071中の開口を通るビームを、様々な器具417'の反射フィルター431'に反射するように操作可能である。

【0372】

1つの具体例において、下部鏡アセンブリは、ハウジング1009の側壁1071に固定されたベース1285、マイクロメーター、ステージ上の傾斜を変えることができるプラットホーム1293(例えば、Newportから入手可能な運動光学取付具Model P100-P)、およびプラットホーム上の鏡1295のような適当なメカニズム1291によってベース上を垂直に動くことができるステージ1289を含み、鏡の位置は、ステージおよび鏡プラットホームを動かすことによって、適当な位置に調整可能である。上部鏡アセンブリは、下部アセンブリと同様で、ベ

10

20

30

40

50

ス1297、垂直に動くことができるステージ1299、ステージ1301上の傾斜を変えることができるプラットフォーム、およびプラットフォーム上の鏡1303を含む。一对の標的プレート1309を、上部および下部鏡アセンブリの間のハウジング1009の側壁に加える。標的プレート1309は、そこに垂直に並んだ穴1311を有して、上部および下部の鏡の調整を促進して、入射ビーム 1007が、そのフィルターの全てが入射ビームと並んでいる器具417'の反射フィルター431'に向かって正確に反射されるようにする。

【0373】

最初の3つの反射フィルター1315、1317、1319の各々は、ビームスプリッターとして機能し、つまり、ビームの特定のパーセンテージを反射し、ビームの残りのパーセンテージを通すように機能する。例えば、4つの落射照明器具の場合、最初の3つの器具の反射フィルター431'の各々は、レーザー光1007のパーセンテージを反射し、一連の最初の3つのユニットの各々が、元のビーム 1007の電磁放射線の25%を受け取るようにする。例えば、第1、第2および第3のユニットの反射フィルターは、それぞれ、同時光の25%、33%および50%を反射してもよい。一連の最後の反射フィルター1321は、望ましくは、残りの光(元ビームの約25%)の全てを、一連の最後の器具に反射する。結果として、4つの器具の各々は、放射線(光)の同一の強度を受け取って、それぞれの流れにおいて細胞を問い合わせるはずである。

【0374】

上記システム1273で使用されるビーム分割デバイスによって、レーザービームが特定の偏光を有することが望ましいかもしれない。誘電フィルターの透過率-対-反射率の比率は、光の偏光によって変動し得る。さらに、直線偏光した光を扱う場合、(入射の特定の角度での使用のために製造される)誘電フィルターは、入射の角度の変動に対して敏感すぎ得る。光の偏光は、光がフィルターと相互作用する時、誘電フィルターの光学軸に関して様々な異なる配向にあるため、円偏光または楕円偏光に偏光した光は、この問題をある程度軽減する。従って、楕円偏光または円偏光した光は、ランダムに偏光した光をシミュレートし、これは、誘電フィルターに対する入射の角度の変動に対してより耐性を提供する。従って、もし上記のレーザーが垂直偏光を有する光のビームを生じれば、例えば、分割する前に、光を円偏光した光に変換するのが有利かもしれない。当業者によって理解されるように、これは、レーザー偏光の面に対して45度回転されたその光学軸を有する偏光物質の1/4波遅延プレート(フィルター)を介して、ビームを通すことによって達成することができる。従って、波プレートによって透過されたビームは、ほぼ円偏光を有し、より簡単に分割することができ、それぞれのフローサイトメーターユニットの光学システムに、複数のビームを提供することができる。

【0375】

さらに、波遅延プレートを回転して、レーザー偏光および波プレートを作るのに使用される物質の光学軸の間の角度を改変することによって、離心率を、ビームのほぼ円形の偏光に導入することができる(つまり、偏光をより楕円偏光にすることができる)。ビームの楕円偏光の離心率を変えることで、光のより大きいパーセンテージに対する偏光ベクトルを誘電フィルターの光学軸に関して特定の角度を有するようにすることによって、誘電フィルターの透過率-対-反射率の比率を変えることができる。従って、もし複数のサイトメトリ ユニット間の光のバランスが所望の範囲外であれば、波プレートを回転させて、楕円形に偏光した光の離心率を増加または減少させ、それにより、より良いバランスが達成されるまで種々のフィルターの透過率-対-反射率の比率を改変することができる。同様に、もし波プレートが楕円形に偏光した光を透過しているなら、フィルターを回転することによって、該フィルターのうちの1つの透過率-対-反射率の比率に影響を及ぼすことができる。

【0376】

単一ビームを複数の単一ビームに分けるのに使用される方法に拘わらず。各サイトメトリユニットに送達された電力のバランスは、光のパーセンテージを選択的に遮断して、全てのサイトメトリユニットを同じレベルの電力まで下げることによって達成すること

10

20

30

40

50

ができる。例えば、各落射照明システム415'の減光フィルター 447'を選択して、光を多少遮断して、ビーム分割およびガイダンスシステムによって、各個々のサイトメトリユニットに送達される照明電力の均衡をとることができる。もしマルチチャンネルユニットの1つのチャンネルが、有意に、ビーム分割およびガイダンスシステムから有意により多くの照明を受け取るなら、より少ない光を伝達する減光フィルター 467'を該チャンネルの落射照明システム415'で使用して、該チャンネルに対する照明電力をもっと他のチャンネルと一致するようにすることができる。必須ではないが、照明電力のチャンネル間の変動は、約10%未満であることが望ましい。チャンネル間の変動が約5%未満であることがさらに望ましい。

【0377】

また、上記のように、パルスレーザースキャニングは、マルチチャンネルフローサイトメトリーに望ましいかもしれないことが理解されるであろう。例えば、UVマルチラインレーザを、約85MHzで操作するモードロックされたパルスレーザと置き換えて、より多くのフローサイトメトリーチャンネルを単一のレーザによって電力を供給することができる。例えば、約85MHzの周波数にて、約12ピコ秒の幅(持続)を有するモードロックされたレーザ発光パルスの各パルスにおいて提供されるピーク電力は、レーザの平均電力アウトプットの約800倍である。従って、モードロックされたレーザ(例えば、Spectra-PhysicsからのVanguard 350)は、ほんの約350ミリワットで操作するが、2、3ダースのサイトメトリユニット(例えば、32サイトメトリユニット)を操作するのに十分な照明エネルギーを供することができる。

【0378】

また、ユニットに光を供給するための光ファイバーの使用も考えられる。この具体例において、ファイバーを使用して、それぞれのユニットにレーザからの光を向け、従って、上記のガイダンスシステムの必要性を排除する。

【0379】

F. 共通偏光板

図106および108-116で示された具体例において、各フローサイトメトリユニット1003の仕分けシステム119'は、ユニットが望ましくはハウジングの前部にて、ハウジング1009の幅を横切って延びる2つの共通偏光板1331を共有する以外は、最初の具体例において記載された仕分けシステム119と実質的に同一である。偏光板の共通組を使用することには、1つのチャンネルから次への一定の変化、共通電力供給の使用、より安定した磁場およびより均一の液滴偏光を供するより大きなプレート面積、および仕分けられた試料の収集のための偏光の一定の角度を含めた利点が存在する。偏光板1331は、ハウジング1009に固定されたフレーム 1333上に取り付けられる。別法として、別々のプレートは、各ユニットに提供され得る。

【0380】

G. 共通収集システム

図107および116に示される具体例において、共通収集システム 2801は、単一のユニットに対する収集システム 2201と関連した、上記の各サイトメトリユニットに対する2つのインターセプティングデバイスを含む。しかしながら、共通フレーム 2803は、全8つのインターセプティングデバイスを保持するために供される。また、各サイトメトリユニットに対する2つのインターセプティングデバイスのうちの1つは、流体を、収集容器よりむしろ共通廃棄トラフ2805に向ける。廃棄トラフは、ほとんど価値のない粒子(例えば、乳牛を育種するためのY-染色体担持精子細胞)を含有する仕分けられた液滴を廃棄するのをより容易にする。もし全ての仕分けられた液滴を維持するのが望ましいならば、廃棄トラフを除去して、収集容器を各インターセプティングデバイスの下に置いてよい。図107および116に示される具体例における4つの収集容器は、収集トレイ2807の表面の開口にある。共通水漕(図示せず)は、収集トレイの表面下に供されて、収集容器の内容物の温度を制御してもよい。

【0381】

10

20

30

40

50

H. マルチチャネル制御

種々のフローサイトメトリーユニットは、望ましくは上記のような共通インプットおよび共通アウトプットを有するマイクロプロセッサ131'、(または他の適当な処理システム)によって制御される。

【0382】

望ましくは、各フローサイトメトリーユニット1003の操作パラメーターは、そのようなパラメーターがユニット間で変動し得るように、他のユニットとは独立して設定することができる。これらのパラメーターは、例えば、液滴形成の頻度、特定のユニットによって利用される制御および仕分け戦略、ユニット、および他のパラメーターに供給される流体中の粒子を分類および仕分けのために各ユニットによって使用される基準を含んでもよい。例えば、特定の状況において、1以上のユニットに、第1の流速にてキャリアー流体17'を供給し、他のユニットに第2の(異なる)流速にて供給するのが望ましいかもしれない。同様に、1以上のユニットに対して1つの制御仕分け方法(例えば、「高効率」戦略)を使用し、その間、他のユニットに対しては異なる戦略(例えば、「低喪失」戦略)を使用するのが望ましいかもしれない。ユニット間のこれらのパラメーターの制御された変動によって、履歴的データおよびリアルタイムベースで収集されたデータに基づき、ユニットのスループットを管理し、システムの結果を最適化することができる。また、独立した操作の能力は、選択されたユニットが、全てのユニットが必要または入手可能であるより少ない事象において操作されることを可能にする。

【0383】

I. マルチチャネルシステムの操作

この具体例のマルチチャネルシステムの操作は、複数のフローサイトメトリーユニットが、より高いスループットのために、並列してフローサイトメトリー操作を実行するように適合されるという点以外は(つまり、同じ時間または重複する時間の間)、先に記載されたものと同様である。

【0384】

ランの開始前に、必要に応じて、流体送達システム1021は、弁V5をその洗浄位置に動かすことによって、タンク1173からの洗浄溶液で洗い流される。次いで、システムは、シリンジポンプ1141を用いて緩衝流体によって調節される。この手順の間、弁V1A-V1DおよびV2A-V2Dを動かして、真空下の廃棄容器1223との連絡を確立する。結果として、洗浄溶液および/または緩衝流体は、システムを通過して廃棄へと流れる。このプロセスは、システム1021を洗浄し、シリンジポンプ1141を準備し、システムから気泡を除去する。

【0385】

適当に位置された三方弁1149によって、シリンジポンプ1141は、摂取ストロークを通して操作されて、粒子、例えば、精子細胞を含有するある量のキャリアー流体17'を吸引し、引き続いて、弁1149を動かして、マニフォールド1177との連絡を確立し、シリンジポンプは、放出ストロークを通過して、ある量のキャリアー流体を試料容器1207へと押し出して、それを充填する。キャリアー流体17'の温度は、温度制御システム1257によって制御して、所望の温度にて、キャリアー流体中の細胞を維持する。試料容器1207との連絡を確立するために置かれた弁V1A-V1Dによって、シリンジポンプ1141のさらなる操作は、前述のように、ラインを通して、ノズル101'を通る流れに対するそれぞれのノズルアセンブリの針へとキャリアー流体を押し出す。同時に、シース流体タンク1155との連絡を確立するように置かれた弁V2A-V2Dによって、前述のように、それぞれのフロー対への供給ラインを通過して、およびノズルを通過して、シース流体19'は押し出される。このプロセスは、システム1001を通過して適当な量の流体を押し出すのに十分な適当な時間、続く。特定のランの持続期間は、供給容器中のキャリアー流体の量、キャリアー流体がシステムを通過して押し出される速度、およびシステムのチャネルの数によって変動するだろう。例えば、ランは、制限された時間(例えば、キャリアー流体の約1ml.が各ノズルに送達される間の15分)だけ続いてよく、または必要に応じて補給される流体の供給によって、無制限に続いてよい。

【 0 3 8 6 】

針157'が詰まる場合、適切な弁 V1を動かして、廃棄容器1223との連絡を確立する。次いで、フローボディ-133'に進入するシース流体19'は、真空1225の力下で、針157'を通過して廃棄へと流れ戻り、従って、針を洗い流し、洗浄する。もし流れを特定のノズルへと閉じる必要があるれば、弁 V1およびV2は、単にそれらの廃棄位置へと交換される。

【 0 3 8 7 】

シングルチャネルおよびマルチチャネルに関して本明細書中に記載のシステムは、XおよびY細胞の分離のような、粒子分離に関して記載されてきたが、そのような粒子が、特徴Aおよび特徴Bとして適宜に留意され得る異なる特徴を有するいずれかの粒子を含み得ることが考えられる。さらに、いくつかの具体例において、フローサイトメトリー装置(シングルチャネルまたはマルチチャネル)が粒子を仕分けるためではなく、それらを分類するためだけに操作するように、仕分け機能は、全て、排除されてもよいことが理解されるであろう。

10

【 0 3 8 8 】

マルチチャネルシステムを、フローサイトメトリーユニットを平行して操作する文脈で上記したが、ユニットは連続して操作することが可能であることも理解されるであろう。例えば、1つの流れ中の粒子は、1つのユニットによって、複数の集団へと仕分けことができ、次いで1以上のそのような仕分けられた集団が、連続した1以上の他のユニットを通過して、さらなる仕分け操作を実施して、同じまたは異なる仕分け戦略を用いて異なる粒子を仕分けすることができることが考えられる。

20

【 0 3 8 9 】

J. 縦型マルチチャネル具体例

図119および120は、もう1つの例示的マルチチャネルフローサイトメトリーシステムを示す。一般的に4001と示されるこのシステムは、一緒にまとめられた4つのサイトメトリーユニット4009を含む。ノズルシステム101'、落射照明光学システム450'、偏光板629'、試料ステーション4051、汚染防止メカニズム4031および各ユニット4009の他の部材は、共有の垂直の取り付けボード4011上に取り付けられる。図120を参照すると、単一レーザー4013および上記のビーム分割およびガイダンスシステム1273と実質的に同様のビーム分割およびガイダンスシステム4015は、各落射照明システム450'の照明を供する。レーザー4013は、ビーム分割およびガイダンスシステム4115を含有する共通ハウジング4021の穴4019(図119)を通過する。ビーム分割およびガイダンスシステム4115および落射照明システム450'は、ボード4011の一側面上にある。各落射照明システム450'のフォーカスレンズアセンブリ491'は、ボード4011を通過して、ユニット4009の部材の残りが取り付けられる他の側面(図26および27に示されるシングルチャネルシステムの配置の様子と同様)へと延びる。

30

【 0 3 9 0 】

ユニット4009は、全て、ノズルシステム101'が流体の流れ21'を下向きに向けるように向けられる。また、各ユニット4009は、粒子の所望の集団を含有する液滴33を収集するための収集容器4033および他の液滴33を収集するための廃棄容器4035を含む収集システム4031を有する。水槽(図示せず)または他の温度制御を使用して、収集容器 4033の温度を制御してもよい。

40

【 0 3 9 1 】

また、複数のフローサイトメトリーユニット4009は、共通電力供給(図示せず)、ユニットの操作を制御するための共通インプット(図示せず)、およびもう一方に対するユニット4009の操作の比較的评价を可能にする共通アウトプット(図示せず)を共有することができる。

【 0 3 9 2 】

2つの例示的マルチチャネル具体例1001、4001の比較によって示されるように、統合プラットフォームの性質およびマルチチャネルシステムにおける複数のフローサイトメトリーユニットの間またはその中の特徴の共有は、本発明の範囲から逸脱せずに、広範囲に変動

50

し得る。

【0393】

全体的なプロセスに対するマルチチャネル処理のインパクト

上記の全体的なプロセスは、マルチチャネル精子仕分けと実施して、精子細胞を仕分けるのに必要な時間を減らすことができる。ほとんど例外なく、方法は変わらない。1つの小さな変更は、仕分けられた精子細胞が複数の収集容器中に収集されるであろうことである。複数の収集容器の内容物は、所望により、濃縮のために組み合わせられてもよい。別法として、各収集容器の内容物は、別々に濃縮されてもよい。収集から冷凍保存工程の完了までの精子細胞(例えば、精液)のバッチを仕分けるのに必要な時間は、複数のサイトメトリーユニットを用いてバッチを処理することによって、有意に減少することができることが理解されるであろう。例えば、もし4つのサイトメトリーユニットが平行して操作して、精子細胞のバッチを処理するならば、仕分けを完了するのに必要な時間は、単一のサイトメトリーユニットを用いてバッチを仕分けるのに必要な時間の約1/4まで減少する。従って、平行して操作する4つのサイトメトリーユニットで精子を仕分ける工程を、単一のサイトメトリーユニットで精子を仕分ける工程と置き換えることによって、収集から冷凍工程までの方法の完了の例示的な時刻表は減少させることができる。時間は、平行に操作するサイトメーターの数を増加して、4つ以上のそのようなユニットを有する平行システムを操作することに関する実際の制限に付される試料中の精子細胞を仕分けることによって、よりさらに減少させることができる。従って、本発明の1つの具体例によると、上記の全体的なプロセスにおける仕分け工程は、マルチチャネルフローサイトメトリー装置における特異的なDNA特徴に従って、精子細胞を仕分けることによって実施される。さらにもう1つの具体例において、精子処理方法は、各チャネルが所望のDNA特徴を有する約2,000-10,000精子細胞/秒の範囲で収集するマルチチャネルフローサイトメトリー装置における特異的なDNA特徴に従って、精子細胞を仕分ける工程を含む。

【0394】

マルチチャネル仕分け実施例I

人工膺および37℃で温度制御された容器中の近くの染色設備に移送された試料を用いて、雄牛精液を、性的に成熟した雄牛から収集した。受け取った際、精液を、標準的かつよく知られた手順に従い、Hamilton-Thorn 運動性アナライザー(IVOS)によって、濃度、視覚的運動性、運動性、進行的運動性について分析した(Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9(Mar 1998))。

【0395】

6つの管の1mlの 150×10^6 精子/mL精子懸濁液を、10mMピルビン酸を含有する41 TCA #2緩衝液中に精液のアリコート懸濁することによって調製して、全体的なpHを7.35まで持ってきた。次いで、水中の10 mM Hoechst 33342溶液の可変量を、精子試料に添加して、200、300、400、500、600、および700 μ M Hoechst 33342の最終色素濃度を得た。6つの試料の各々を、約30分間、41℃にてインキュベートした。試料を、フローサイトメトリーによって分析し、X細胞集団の%CVを、200、300、および400 μ M Hoechst 33342試料に対して、反復コンピューターアルゴリズムによって予測した。300および200 μ M Hoechst 33342に対する%CVを、両方とも、1.3 %CV近くの許容される範囲内であることを確実にした。従って、250 μ M Hoechst 33342の濃度を使用して、さらなる処理について、精子細胞のバッチを染色することを決定した。

【0396】

各々、 150×10^6 精子/mL精子懸濁液の2mLを含有する2つの管を、10mMピルビン酸を含有する41 TCA #2緩衝液中の精液のアリコート懸濁することによって(再び、全体的なpHを7.35に持ってくる)調製した。次いで、水中の10 mM Hoechst 33342溶液を、2つの精子懸濁液の各々に添加して、250 μ M Hoechst 33342の最終色素濃度を得た。精子懸濁液を、30分間、41℃水槽中で維持した。30分後、精子懸濁液を41℃水槽から除去し、4 μ Lの25mg/mL FD&C #40を懸濁液のうちの1つに添加した。他を、外界温度で保存して、評価アッセイに、比較試料を供した。

10

20

30

40

50

【0397】

染色されクエンチされた精子懸濁液を、4チャンネル液滴仕分けフローサイトメーターのうちの1チャンネルの試料ポートにロードした。ダルベッコのPBSをシース流体として使用した。サイトメーターに、上記のように60ミクロンオリフィスを有する配向ノズルを設けた。半円形バッフルプレートを、上記のように、ノズルの縦軸に垂直にインストールした。変換器を54 KHzで操作し、液滴破壊位置を手動で制御した。上記の落射照明光学システムを使用して、連続波レーザーのビームの約25%を向けて、垂直の角度にて、流体の流れと交差した。フォーカスおよび収集レンズは、0.65開口数を有した。ビームを、精子細胞をスリットスキニングするために、3 μ m未満の幅を有するスポットにフォーカスした。デジタルシグナル処理を使用して、各検出されたパルス波形に対して、限界勾配差およびパルス面積を抽出した。二次元CSDおよびパルス面積特徴空間におけるX細胞、Y細胞、および不確定の細胞の分類のための分類パラメーターを、染色体内容物に従って精子細胞を分類するために、手動で、処理システムに入れた。

10

【0398】

精子を、XおよびY染色体内容物に従って、X細胞の収集に対して同時受入戦略を用いて仕分け、各分類されていない精子がX細胞またはY細胞である50/50確率を付与した。試料流体速度を手動で調整して、85%以上にて、(GUIによって示されるように)収集されたX細胞集団の純度を維持し、X細胞収集の速度を、最小限の速度以上で維持した。約1500万のX精子を、少なくとも1時間、シース流体中に浸漬した管中に収集し、次いで、pH 7.0にてTCA #2緩衝液中で0.5mLの10%卵黄で覆った後、管を取り出し、同様に調製されたさらなる管と置き換えた。

20

【0399】

フローサイトメーターから収集管を取り出した直後、染色されているが仕分けられていない精子懸濁液からの比較試料を調製した。仕分けられた試料および比較試料を、15ml管において、750gにて、7分間遠心した。上澄みを、移送ピペットを用いて除去して、約4000万精子/mLの濃度を得た。TCA #2緩衝液pH 7.0を、精子懸濁液に添加して、約2000万精子/mLの最終濃度を得た。このプロセスを、フローサイトメーターが4つの収集管(A2-A5)を生成するまで続けた。仕分けられた試料および「仕分けられていない」比較試料をIVOSによって評価した。仕分けられた試料およびその仕分けられていない比較試料を、微分干渉顕微鏡によって、%無傷の先体についてテストした。全ての仕分けられた試料を血球計によって計数して、仕分けられた試料/時間のアウトプット速度を決定した。% X染色体担持精子を、フローサイトメーター再分析によって確認した。仕分けられた試料および「仕分けられていない」比較試料に対するIVOS評価の結果を、図121(運動性)および122(進行性運動性)に提供する。各収集管へ仕分けられた精子の総数を、図123に示す。各収集期間に対する一時間当たり仕分けられた精子の割合を図124に示す。各仕分けられた試料に対するX染色体担持精子のパーセンテージを図125にリストする。先体完全性の評価の結果は、仕分けられた試料に対して72%無傷の先体であり、仕分けられていない比較試料に対して78%であった。

30

【0400】

結果は、持続した期間、マルチチャンネルフローサイトメトリシステムのチャンネル当たり、85%以上の純度にて、1秒当たり5,000以上の仕分けられたX細胞を得る技術的能力を示す。また、結果は、理想的条件下で、持続された期間、85%以上の純度にて、1秒当たり7,000以上のX細胞/秒を得る技術的能力も示す。さらに、結果は、そのような高速フローサイトメトリ仕分けによって得られた仕分けられた精子細胞の試料が、運動性のほんの僅かな低下に悩むだけであり、仕分けられた精子が良い受精能を有するであろうことを示す。

40

【0401】

マルチチャンネル仕分け実施例II

雄牛精液を、人工膺を用いて性的に成熟した雄牛から収集した。精液を2つのアリコートに分けた。250 μ Lの精液の第1のアリコートを、5mLの37 TriladyI(登録商標)中で

50

懸濁した。精液の残りを含む第2のアリコート、2部37 炭酸緩衝液(pH 6.1-6.2)中で懸濁した。両方のアリコートを、温度制御された容器内で、37 にて、処理施設へ移送した。処理施設にて、第1のアリコートを、200mLビーカー内の~120mLの37 の水中で漂遊させ、冷室に置いて、5 までゆっくり冷却した。第2のアリコートを、標準のおよびよく知られた手順に従って、Hamilton-Thorn運動性アナライザー(IVOS)によって、濃度、運動性および進行性運動性について分析した(Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9(Mar 1998))。

【0402】

150 X 10⁶ 精子/mL 精子懸濁液の3つの1mL管を、第2のアリコートから、空の管へ、15000万精子を含有するサブ-アリコートを移すことによって調製し、5分間500gにて遠心し、上澄みを除去し、10mM ピルビン酸 pH 7.35を含有する1mLの28 TCA #2緩衝液中に、精子ペレットを再懸濁した。水中の10mM Hoechst 33342溶液を、種々の量で、3つの管の各々に添加して、100、150、および200 μM Hoechst 33342の最終色素濃度を得た。3つの管の各々を、約60分間28 に維持した。3つの管の各々からの精子を、フローサイトメトリーによって分析し、X集団の総蛍光強度のCVを、対話式コンピュータアルゴリズムを用いて、100、150、および200 μM Hoechst 33342染色条件について決定した。150および200 μM Hoechst 33342に対するCVは、両方とも、1.3%近くの許容される範囲内であった。従って、仕分けのために150 μM Hoechst 33342 濃度を含む染色条件を用いることを決定した。

【0403】

5mLの150 X 10⁶ 精子/mL 精子懸濁液を含有する1つの管を、第2のアリコートからの75000万精子を含有するサブ-アリコートを移すことによって調製し、5分間500gにて遠心し、上澄みを除去し、10mM ピルビン酸(pH 7.35)を含有する28 TCA #2緩衝液中に精子ペレットを再懸濁した。水中の10mM Hoechst 33342溶液を、150 μM Hoechst 33342の最終色素濃度を得る量で、管に添加した。管を、60分間、28 水槽中で維持した。60分後、管を28 水槽から取り出し、10 μLの25mg/mL FD&C #40を添加した。

【0404】

仕分けられ、クエンチされた精子懸濁液を、マルチチャンネル液滴仕分けフローサイトメーターシステムの1つのチャンネルの試料ポートにロードした。精子懸濁液を、28 にて維持した。マルチチャンネル実施例I記載と実質的に同一の器具設定を用いて、XおよびY染色体担持精子を、少なくとも1時間、シース緩衝液と浸漬し、次いで、10 mM ピルビン酸 pH 6.6を含有する0.5mLのTriladyl (登録商標) 冷凍保存培地を添加することによって調製された収集管に、約1800万精子の豊富化されたX細胞集団を入れるのに必要な時間、同時発生打切仕分け戦略を用いるフローサイトメーターシステムによって分離した。精子細胞を、約25,000および30,000細胞/秒の間の速度にて、フローサイトメーターシステムに導入した。X細胞の豊富化された集団を、4,500 / 秒ないし6,000 / 秒を変動する速度にて収集した。約1800万精子を収集管に仕分けた後、管を除去し、同様に調製されたもう1つの管で置き換えた。フローサイトメーターから収集管を除去した直後、仕分けられた精子懸濁液を、700gにて、7分間遠心した。上澄みを、移送ピペットを用いて除去して、約10000万精子/mLの濃度を得た。10 mM ピルビン酸(pH 6.6)を含有するTriladyl (登録商標) 冷凍保存培地を、精子懸濁液に添加して、約5000万精子/mLの最終濃度を得た。このプロセスを、フローサイトメーターが3つの収集管(D1-D3)を生成するまで続けた。約5200万精子を、259分で仕分け、約1200万の豊富化されたX精子 / 仕分けの時間の全体的な収集速度を得た。再懸濁され仕分けられた試料管を、200mLビーカー内の~120mLの28 水中で漂遊させ、5 冷室に入れて、ゆっくり冷却した。

【0405】

仕分けられた試料が5 に達した後、仕分けられた精子の3つの管を1つの管に合わせた。プールされた試料を、IVOSによって分析して、% 運動性、% 進行性運動性、および濃度を決定した。10 mM ピルビン酸 pH 6.6を含有するさらなるTriladyl (登録商標) 冷凍保存培地を試料に添加して、約5000万精子/mLの最終濃度を得た。仕分けられたプールさ

れた試料中の% X-染色体担持精子は、フローサイトメーター再分析によって決定したところ、87%であった。同じ精液の仕分けられていない試料と比較したIVOS評価の概要を図126に示す。

【0406】

プールされ仕分けられた試料および第1のアリコートを、5℃冷室中の標準的0.25ccストローにロードした。ロードされたストローを、プログラム可能なフリーザーに移し、以下のプログラムによって冷凍した: 5℃にて5分間、4℃/分にて、5℃から-12℃まで冷却、40℃/分にて、-12℃から-100℃まで冷却、20℃/分にて、-100℃から-140℃まで冷却、-140℃にて維持。ストローが-140℃に達した後、それらをフリーザーからすぐに取り出し、液体窒素に突っ込んだ。

10

【0407】

解凍されたストローを、30および120分間、37℃でのインキュベーション後、%運動性および%進行性運動性について、IVOSによって分析した。2つの仕分けられたおよび仕分けられていないストローの1組からの結果を図127および図128に要約する。

【0408】

マルチチャンネル仕分け実施例III

雄牛精液を、人工膺を用いて、性的に成熟した雄牛から収集し、精液を2つのアリコートに分けた。250μLの精液の第1のアリコートを、5mLの37℃ TriladyI (登録商標)中に懸濁した。精液の残りを含む第2のアリコートを、2部37℃炭酸緩衝液(2部水中に0.097モル/LのNaHCO₃, 0.173モル/LのKHCO₃, 0.090モル/L C₆H₈O₇・H₂O)(pH 6.1-6.2)中に懸濁した。両方のアリコートを、温度制御された容器内で、37℃にて、処理施設に移した。処理施設にて、第1のアリコートを、200mLビーカー内の~120mLの37℃水中で漂遊させ、冷室に入れて、5℃までゆっくり冷却した。第2のアリコートを、標準的かつよく知られて手順に従って、Hamilton-Thorn運動性アナライザー(IVOS)によって、濃度、運動性および進行性運動性について分析した(Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9(Mar 1998))。

20

【0409】

150 X 10⁶精子/mL精子懸濁液の2つの管を、第2のアリコートから、90000万精子を含有する画分を、2つの空の管の各々に移し、5分間、500 X gにて各管を遠心し、各管から上澄みを除去し、10mMピルピン酸(pH 7.35)を含有する6mLの28℃TCA #2緩衝液中で各精子ペレットを再懸濁することによって調製した。水中の10mM Hoechst 33342溶液を、2つの管の各々に添加して、1つの管で、200μM Hoechst 33342、他の管で、400μM Hoechst 33342の最終色素濃度を得た。2つの管の各々を、約120分間、28℃にて維持した。各管からの精子を、フローサイトメーターによって分析し、X集団の総蛍光強度のCVを、対話式コンピューターアルゴリズムを用いて、200μMおよび400μM Hoechst 33342染色条件について決定した。200μMおよび400μM Hoechst 33342に対するCVは、両方とも、約1.3%の許容される範囲内であった。200μM Hoechst 33342の濃度で染色された精子懸濁液を、仕分けに選択した。10μLの25mg/mL FD&C #40を、仕分けの直前に、染色された精子懸濁液のこの管に添加した。

30

【0410】

染色された精子懸濁液を、マルチチャンネル液滴仕分けフローサイトメーターシステムの1チャンネルの試料ポートにロードした。精子懸濁液を、28℃で維持した。マルチチャンネル実施例I記載と実質的に同じ器具設定を用いて、XおよびY染色体担持精子を、少なくとも1時間、シース流体で浸漬し、次いで、0.5mLのTriladyI (登録商標)冷凍保存培地(pH 6.6)を添加することによって調製した収集管に、約1800万の精子の豊富化されたX染色体担持細胞集団を入れるのに必要な時間、同時発生打切仕分け戦略を用いるフローサイトメーターシステムによって分離した。精子細胞を、約25,000および30,000細胞/秒の間の速度にて、フローサイトメーターシステムに導入した。X染色体担持細胞の豊富化された集団を、4,500/秒から6,000/秒を変動する速度にて収集した。約1800万の精子が収集管に仕分けられると、管を除去し、同様に調製されたもう1つの管と置き換えた。フローサイト

40

50

メーターから収集管を取り出した直後、仕分けられた精子懸濁液を、700 X gにて、7分間、遠心した。上澄みを、移送ピペットを用いて除去して、約10000万精子/mLの濃度を得た。TriladyI (登録商標) 冷凍保存培地(pH 6.6)を、精子懸濁液に添加して、約5000万精子/mLの最終濃度を得た。このプロセスは、フローサイトメーターが2つの収集管(C1-C3)を生成するまで続いた。約3500万の精子を、193分で仕分け、仕分けの1時間当たり、1100万の豊富化されたX染色体担持細胞の全体的な収集速度を得た。再懸濁された仕分けられた試料管を、200mLビーカー内の~120mLの28℃水中で漂遊させ、5℃の冷室に入れて、ゆっくり冷却した。

【0411】

仕分けられた試料が5℃に達した後、仕分けられた精子の3つの管を1つの管に組合せた。プールされた試料を、IVOSによって分析して、%運動性、%進行性運動性および濃度を決定した。さらなるTriladyI (登録商標) 冷凍保存培地(pH 6.6)を試料に添加して、約5000万精子/mLの最終濃度を得た。仕分けられプールされた試料中の% X-染色体担持精子は、フローサイトメーター再分析によって決定されたところでは、88%であった。同じ精液の仕分けられていない試料と比較したIVOS評価の概要を、図129に示す。

10

【0412】

プールされ仕分けられた試料および仕分けられていない試料(つまり、上記からの第1のアリコート)を、5℃の冷室内の標準的な0.25ccストローにロードした。ロードされたストローを、プログラム可能なフリーザーに移送し、以下のプログラムによって冷凍した: 5℃にて5分間、4℃/分にて、5℃から-12℃に冷却、40℃/分にて、-12℃から-100℃まで冷却、20℃/分にて、100℃から-140℃まで冷却、-140℃にて維持。ストローが-140℃に達した後、それらを、フリーザーからすぐに取り出し、液体窒素に突っ込んだ。

20

【0413】

解凍されたストローを、30および120分間、37℃でのインキュベーション後、%運動性および%進行性運動性につき、IVOSによって分析した。仕分けられたおよび仕分けられていないストローの1組からの結果を、図130および図131に要約した。

【0414】

マルチチャンネル仕分け実施例IV

雄牛精液を、人工膺を用いて、性的に成熟した雄牛から収集し、精液を2つのアリコートに分けた。250μLの精液の第1のアリコートを、5mLの37℃ TriladyI (登録商標) 中に懸濁した。精液の残りを含む第2のアリコートを、2部37℃炭酸緩衝液(水中に、2部0.097モル/L of NaHCO₃、0.173モル/L of KHCO₃、0.090モル/L C₆H₈O₇・H₂O)(pH 6.1-6.2)中に懸濁し、CO₂下で維持した。両方のアリコートを、温度制御された容器内で、37℃にて、処理施設に移送した。処理施設にて、第1のアリコートを、200mLビーカー内の~120mLの37℃水中に漂遊させ、冷室に入れて5℃までゆっくり冷却した。第2のアリコートを標準的かつよく知られた手順に従い、Hamilton-Thorn運動性アナライザー(IVOS)によって、濃度、運動性および進行性運動性について分析した(Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9(Mar 1998))。

30

【0415】

150 X 10⁶精子/mL精子懸濁液の5mL管を、75000万精子を含有する画分を、第2のアリコート(pH 6.1-6.2)から、空の管に移し、最終濃度の5mLまで、28℃炭酸緩衝液(pH 7.35)を添加することによって調製した。この精子懸濁液に、水中の10 mM Hoechst 33342を添加して、最終色素濃度150μM Hoechst 33342を得た。懸濁液を、CO₂下で、41℃にて、約40分間維持し、次いで、仕分けのために28℃にて維持した。10μLの25mg/mL FD&C #40を、仕分けの直前に、染色された精子懸濁液の管に添加した。

40

【0416】

染色された精子懸濁液を、マルチチャンネル液滴仕分けフローサイトメーターシステムのうちの1チャンネルの試料ポートにロードした。精子懸濁液を、28℃にて維持した。XおよびY染色体担持精子を、少なくとも1時間、シース緩衝液で浸漬し、次いで0.5mLのTriladyI (登録商標) 冷凍保存培地(pH 6.6)を添加することによって調製された収集管に、約18

50

00万精子の豊富化されたX染色体担持細胞集団を入れるのに必要な時間、同時発生打切仕分け戦略を用いるフローサイトメトリーによって分離した。精子細胞を、約25,000および30,000細胞/秒の間の速度にて、フローサイトメトリーシステムに導入した。X染色体担持細胞の豊富化された集団を、4,500/秒ないし6,000/秒を変動する速度にて収集した。約1800万精子が収集管に仕分けられた時、管を取り出し、同様に調製されたもう1つの管で置き換えた。フローサイトメーターから収集管を取り出した直後、仕分けられた精子懸濁液を、700 X gにて、7分間遠心した。上澄みを、移送ピペットを用いて除去して、約1000万精子/mLの濃度を得た。TriladyI (登録商標) 冷凍保存培地およびピルビン酸(pH 6.6)を精子懸濁液に添加して、約5000万精子/mLの最終濃度を得た。このプロセスを、フローサイトメーターが2つの収集管(C2-C3)を生成するまで続けた。再懸濁された仕分けられた試料管を、200mL ビーカー内の~120mLの28 水中で漂遊させ、5 冷室に入れてゆっくり冷却した。

10

【0417】

仕分けられた試料が5 に達した後、仕分けられた精子の2つの管を1つの管に合わせた。プールされた試料を、IVOSによって分析して、% 運動性、%進行性運動性および濃度を決定した。さらなるTriladyI (登録商標) 冷凍保存培地およびピルビン酸(pH 6.6)を使用し添加して、約5000万精子/mLの最終濃度を得た。同じ精液の仕分けられていない試料と比較したIVOS評価の概要を、図132に示す。

【0418】

プールされた仕分けられた試料および仕分けられていない試料(つまり、上記からの第1のアリコート)を、5 冷室中の標準的0.25cc ストローにロードした。ロードされたストローをプログラム可能なフリーザーに移し、以下のプログラムによって冷凍した: 5 にて5分間、4 /分にて5 から-12 まで冷却する、40 /分にて-12 から-100 まで冷却する、20 /分にて100 から-140 まで冷却する、-140 にて維持する。ストローが-140 に達した後、それらをすぐにフリーザーから取り出し、液体窒素に突っ込んだ。

20

【0419】

解凍されたストローを、解凍直後および30分間37 にてインキュベーションした直後、% 運動性および% 進行性運動性について、IVOSによって分析した。1組の仕分けられたおよび仕分けられていないストローからの結果を、図133および図134に要約する。

【0420】

毛管ノズルシステム

図135は、一般的に1335と示される、ノズルオリフィス103を出て行く流体が、管に向かっておよび管を通して向けられるように、(例えば、石英性または溶融シリカ製の)毛管137がノズル137に接続されていること以外では上記のものと同様である別のノズルシステムを示す。フローサイトメーターの光学システム109は、管の側面に、既知の屈折率を有する油またはゲルのような光透過媒体で充填されたチャンバー 1341によってのような適当な様式で、光学的に連合される。オープンスペースを通る流体の流れのジェットと比較して、毛管の使用は、変換器 105によって供給される音響エネルギーによって、流れ21のレンズを減少し、フォーカスレンズ1343が発光シグナルの解像度を増加するために、流体の流れのすぐ隣に置くことを可能にするという利点を有する。

40

【0421】

粒子が問い合わせられ、分類された後、それらは、図137に示される流体スイッチデバイスまたは光損傷システムまたは液滴仕分けシステムのような他の適当なデバイスによってのような、当業者に知られるいずれかの慣用的な技術を用いて仕分けられてもよい。

【0422】

液滴仕分け以外の仕分け技術

光損傷仕分け

本発明のフローサイトメトリー改良は、上記の液滴細胞仕分けにだけでなく、光損傷(レーザー切断)による仕分けのような他の仕分け技術にも適用できる。光損傷仕分けは、その全文において本明細書中に援用される米国特許第4,395,397号で論議される。図136は

50

、模式的に、一般的に参照数字によって示される、シングルチャネルフローサイトメトリー光損傷システムの1つの具体例を示す。

【0423】

図136に示されるように、光損傷仕分けシステム1351は、図2の液滴仕分けシステムと同様であり、対応する部分は、ダブルプライム(")を加えられた対応する参照数字によって示される。一般的には、システムは、液滴仕分け部材が除去される(例えば、変換器105、電荷デバイス627、偏光板629、および関連した電力源635)こと以外は、図2のシステムと同じ部材を含む。代わりに、これらの部材は、レーザー1353あるいは流体のマイクロプロセッサ131'から受け取られる流れ21'中の望ましくない粒子を除去するための指示に
10 応答する同様のデバイスによって置き換えられる。結果として、収集容器1355中に収集された流れは、粒子の所望の集団を含有する。例えば、もし分析される粒子が精子細胞であり、意図される結果が、特徴A(例えば、所望の染色体含有量)を有する精子細胞を収集することであれば、マイクロプロセッサは、特徴Aを有しない細胞を同定する落射照明システム415'からシグナルを受け取り、選択的にレーザーを作動させて、そのような細胞を除去するかあるいはさもなければそれらを無力にする。

【0424】

異なる制御仕分け戦略を、液滴ソーターの文脈において上記で論議した「高回収」および「高純度」仕分け戦略を含む光損傷システムにおいて使用することができる。光損傷システムにおいて、流体の流れ中に含有された粒子を、流れに沿って、様々な間隔で置き、一般的に、単一ファイルで次々に続く。粒子は異なる特徴を有し、いくつかは特徴Aを有し、
20 例えば他は特徴Bを有する。粒子の配列はランダムであり、連続処理として見ると、粒子は、一方が他方に続く、異なる粒子シリーズに分けることができ、特徴Aを有する1以上の粒子のみからなる第1の粒子シリーズ、特徴Bを有する1以上の粒子のみからなる第2の粒子シリーズ、およびその少なくとも1つが特徴Aを有し、その少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子よりなる第3の粒子シリーズを含む。後者(第3)の群は、一般的には、少なくとも仕分け方法目的のために、先述の「同時」液滴において近接にして間隔を設けられた粒子に対応する。従って、第3の群における2以上の粒子は、粒子間の空間的分離が粒子の正確な区別/分類を可能とするには不十分であるという意味で、あるいはそのような分離は、同一シリーズ中の他の粒子を損なうことなくシリーズ中の1つの粒子が融和されるには不十分である故に、第3のシリーズ中の2以上
30 の粒子は近接して間隔を設けられている。いずれにしても、第3のシリーズの粒子の各々(あるいは少なくとも1いくつか)における近接して間隔を設けられた粒子は、使用される仕分け方法によって除去されてもあるいは除去されなくてもよい。第1のシリーズの複数の粒子または第2のシリーズの複数の粒子は、「近接して間隔を設けられ」てもよいが、いずれのそのようなシリーズの粒子も、同じ特徴(AまたはB)を有するため、それらは、少なくとも仕分け方法目的のため、単一粒子シリーズとして処理されることが留意されるべきである。

【0425】

光損傷システムは、上記のように、シングルチャネルシステムであってもあるいはマルチチャネルシステムであってもよい。
40

【0426】

流体スイッチ仕分け

本発明の原理を、例えば、その全文において本明細書中に援用される米国特許第6,432,246(Adair)号、同第4,756,427号(Gohde, et al.), および同第3,791,517号(Friedman)に開示されるように、流体スイッチ技術を用いるフローサイトメトリーシステムにも適用可能であることが考えられる。図137は、一般的に1357と示されるそのようなシステムを示す部分図である。ノズルシステム101'が毛管1369(例えば、図135参照)を含み、仕分けシステムが問い合わせ位置115'から下流の毛管1369にカップリングされた流体スイッチデバイス1359を含む以外は、図2に示されるシステムと実質的に同一である。流体スイッチデバイスの構築および操作は、上記で援用された特許において開示されるように、い
50

ずれの慣用的な流体スイッチ技術も援用し得る。一般的には、プロセッサから受け取られた指示に回答して、望ましくない粒子から所望の粒子を仕分けるように、容器中の収集用の別々の流路1361、1365等に沿って、所望の/望ましくない粒子を含有する流体の流れの部分、間欠的に転換することによって機能する。スイッチは、流路のうちの1つにおける変換器 1367を選択的に動かすことによって一般的に達成される。

【0427】

液滴仕分けおよび光損傷仕分けに関する上記の様々な仕分け戦略は、流体スイッチシステムにおいても使用可能である。流体スイッチシステムにおいて、流体の流れ中に含有される粒子は、流れに沿った様々な間隔を設けられ、一般的には、単一ファイルで次々に続く。粒子は異なる特徴を有し、いくつかは特徴Aを有し、例えば他は特徴Bを有し、粒子の配列はランダムである。従って、光損傷システムに関して上記論議のように、粒子の列は、一方が他方に続く、異なる粒子シリーズに分けることができ、特徴Aを有する1以上の粒子のみからなる第1の粒子シリーズ、特徴Bを有する1以上の粒子のみからなる第2の粒子シリーズ、およびその少なくとも1つが特徴Aを有し、その少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子よりなる第3の粒子シリーズを含む。後者(第3)の群は、一般的には、少なくとも仕分け方法目的のために前述の「同時」液滴において、近接して間隔を設けられた粒子に対応する。従って、第3の群における2以上の粒子は、粒子間の空間的分離が、粒子の正確な区別/分類を可能とするには不十分であるという意味で、あるいはそのような分離が、シリーズ中の1つの粒子が、同一シリーズ中のもう1つの粒子とは別に流体スイッチデバイスによって方向転換されるのを可能とするのには不十分である故に、近接して間隔を設けることができる。いずれにしても、第3のシリーズの粒子の各々(あるいは少なくともいくつか)において近接して間隔を設けられた粒子は、使用される仕分け方法によって、1つの収集位置またはもう1つに分けられる。光損傷仕分けと関連して上記で説明したように、第1のシリーズの複数の粒子または第2のシリーズの複数の粒子は、「近接して間隔を設けられ」てもよいが、いずれのそのようなシリーズの粒子は同じ特徴(AまたはB)を有するため、それらは仕分け方法の目的のために、単一粒子シリーズとして処理される。

【0428】

流体スイッチシステムは、上記で論議のように、シングルチャネルシステムであってもあるいはマルチチャネルシステムであってもよい。

【0429】

液滴干渉仕分け

また、本発明の技術を、液滴干渉流体スイッチ技術と併せて使用することができると思われる。例えば、図138において模式的に示される高速液滴干渉仕分けシステム1371を使用して、同軸キャリアーおよびシース流体流れの選択されたセグメントを転換することによって、粒子を仕分けてもよい。

【0430】

いくつかの他の仕分け技術と比較して、液滴干渉仕分け技術は、液滴へと形成される同軸キャリアーおよびシース流を要さない。従って、キャリアーおよびシース流体の送達のために、液滴発生システムと使用されるノズルシステム101''''をカップリングさせる必要はない。ほんの一例として、キャリアーおよびシース流体を60 psiにてノズルシステムを通過させて、50ミクロン直径流れを作るのは、液滴干渉仕分けシステムへ粒子を送達するための層流同軸流体の流れの形成のための1つの適当な準備である。同軸流体の流れ中の粒子は、他の仕分けシステムについて上記したように、それらが問い合わせ位置 115''''を通過する時に、光学システム 109''''およびプロセッサ-131''''によって分析され分類される。仕分けは、問い合わせ位置から下流で、同軸流体の流れが高速液滴干渉流1373と交差する位置で起こる。

【0431】

液滴干渉流1373は、液滴仕分けに使用される液滴発生システムと同様の液滴発生システム 1375によって発生される。高速流体の流れ1379は、圧電変換器 1381または高速ノズル

から下流で、液滴 1383に分かれる高速流体の流れを引き起こす音響エネルギーの他の源にカップリングされる高速ノズルシステム 1377を通過する。例えば、1500 psiの粒子-無しの流体は、高速ノズルを通過して、70 ミクロン直径高速流体ジェットを形成してもよい。高速ノズルは、400 KHzにて振動して、高速液滴を形成してもよい。高速液滴 1383は、高速液滴の経路が、液滴仕分けシステムにおいて液滴の経路を制御するのになされたように、液滴に電荷を選択的に適用することによって制御され得るように、1以上の電気偏光プレートによって生じる電界を通過する。高速液滴干渉流は、いくつかの高速液滴が、問い合わせ位置から下流の地点1399にて、同軸流体の流れと交差するように向けられる。例えば、荷電されていない液滴 1389は、荷電された液滴 1391が同軸流体の流れから偏向される間、流体の流れと衝突するように向けられてもよい。高速液滴が同軸流体の流れと衝突するとき、流体の流れのセグメント 1397およびその中に含有されるいずれかの粒子は、さもなければそれらがとったであろう経路から転換される。電荷の高速液滴への適用または適用無しは、同軸流体流との交差 1399におけるその液滴の到着が、同軸流体流の特定のセグメントの到着と一致するようにタイミングを調節することができる。従って、同軸流セグメント内に含有される粒子の分類によって、高速液滴を選択的に荷電することによって、1以上の選択された粒子を含有する全ての同軸流体の流れセグメントを転換し、他の同軸流セグメントを転換しないあるいはその逆によって、粒子を仕分けすることができる。僅かな真空を有する収集毛管を使用して、転換された1397および転換されていない同軸流セグメントの両方を収集してもよい。液滴干渉仕分けシステムを、高速液滴が転換された同軸流セグメントと融合するように、あるいは高速液滴が同軸流セグメントとの衝突後、転換された流れセグメントから分離したあつまであるように設定してもよい。

【0432】

高速液滴干渉流1373中には粒子または細胞が存在しないため、仕分けられる粒子または細胞を損傷せずに、非常に高い圧力および非常に高い液滴周波数を使用することが可能である。これによって、各々が液滴仕分けシステム中の液滴より少ない容量（例えば、4倍少ない容量）を有する流れセグメントの分類が可能である。これは、仕分けられた粒子の希釈因子も減少しつつ、システムの最大スループットを非常に増加させる。さらに、細胞無しまたは有りの細かく濾過された粒子を使用して、液滴干渉流を形成するため、液滴形成ノズルは、液滴仕分けシステムにおいて使用されたノズルシステムより蛋白質蓄積で詰まるまたはそれに悩む可能性が低いため、より均質の液滴形成が可能である。もう1つの利点は、問い合わせ位置での粒子分析および仕分け地点1399の間の距離を減らすことができ（例えば、4倍で）、仕分け地点での特定の粒子の到着の時間のより正確な予測が可能になることである。さらに、液滴干渉システムは、同軸流体の流に対するノズルサイズまたは圧力の調整においてより柔軟性を可能にする。所望により、液滴干渉仕分けシステムを毛管ノズルシステムと組み合わせることができる。マルチチャネル液滴干渉仕分けシステムは、高圧流体ポンプを使用して、共通流体供給からの流体を持つノズルを生じる複数の液滴干渉流を供給してもよい。

【0433】

本発明の要素またはその（複数の）具体例を紹介する時、冠詞「a」、「an」、「the」、および「said」は、1以上の要素が存在することを意味するように意図される。用語「含む（comprising）」、「含む（including）」、および「有する（having）」は、包括的であるように意図され、リストされた要素以外のさらなる要素が存在し得ることを意味する。用語「または」は、「および/または」を含むように意図され、「1またはもう1つまたは両方」を意味するように意図される。したがって、「ABCまたはDEF」の表示は、(1) ABC、または(2) DEF、または(3) ABCおよびDEFの両方を意味する。用語「および/または」は、上記定義のように「または」と同じ意味を有するように意図される。従って、用語「および/または」は、「または」を含むように意図され、「1またはもう1つまたは両方」を意味するように意図される。例えば、「ABCおよび/またはDEF」の表示は、(1) ABC、または(2) DEF、または(3) ABCおよびDEFの両方を意味する。

【0434】

上記に鑑みて、本発明のいくつかの目的が達成され、他の有利な結果が得られることが分かるであろう。

【0435】

本発明の範囲から逸脱せずに、上記構築、製品、および方法において、様々な変更をなすことが出来るように、上記記載および添付の図面に示されるに含有される全ての事は、制限する意味ではなく、説明として解釈されるべきである。

【0436】

発明の特徴に関するコメント

当業者は、上記の発明が、少なくとも次を含む多くの発明の態様を含むことを認識するであろう。

【0437】

A. マルチチャネル仕分け装置

A1. 粒子の1以上の特徴に従い、粒子を仕分けるためのマルチチャネルシステムであって:

各々が、電磁放射線のビームを用いて該粒子を含有する流体の流れを問い合わせることによって、粒子の混合物中の粒子の所望の集団を仕分けるように操作可能な複数のフローサイトメトリーユニットを含み;

該ユニットが次の要素:(1)粒子の共通供給;(2)電磁放射線の共通源;(3)共通ハウジング;(4)ユニットの操作を制御するための共通インプット;(5)ユニットからの情報を受け取り処理するための共通プロセッサ;および(6)該粒子を含有する流体を、該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通流体送達システムのうちの少なくとも1つを含む統合プラットフォームを共有することを特徴とする該システム。

【0438】

A2. 該粒子が細胞であるA1記載のシステム。

【0439】

A3. 該粒子が精子細胞であるA1記載のシステム。

【0440】

該システムが、少なくとも要素(2)を含み、1以上の該複数のフローサイトメトリーユニットが、ジェットインエアー液滴仕分けフローサイトメトリーユニットを含むA1記載のシステム。

【0441】

A5. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(2)および(3)を含むA1記載のシステム。

【0442】

A6. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(4)および(5)を含むA1記載のシステム。

【0443】

A7. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(2)を含み、ここに該共通源が単一のレーザービームを含むA1記載のシステム。

【0444】

A8. さらに、単一のレーザービームを複数のビームに分け、複数のビームを、それぞれのフローサイトメトリーユニットの光学システムに向けるためのビーム分割システムを含むA7記載のシステム。

【0445】

A9. 該単一レーザービームが複数のパルスを含み、ここに各パルスがレーザーの平均電力アウトプットより大きいピーク電力を有するA8記載のシステム。

【0446】

A10. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(3)を含み、ここに該フローサイトメトリーユニットがハウジングに取り外し可能に取り付けられた取り替え可能なモジュールを含むA1記載のシステム。

【0447】

A11. 各フローサイトメトリーユニットが、それぞれの流体の流れを問い合わせるための落

10

20

30

40

50

射照明光学システムを含むA1記載のシステム。

【0448】

A12. さらに、各ユニットから粒子の該所望の集団を収集するための収集システムを含むA1記載のシステム。

【0449】

A13. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(5)を含み、ここに該共通アウトプットが各ユニットによって測定された蛍光強度の指標を含むA1記載のシステム。

【0450】

A14. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(5)を含み、ここに該共通アウトプットが、各ユニットが粒子を分離する速度の指標を含むA1記載のシステム。

10

【0451】

A15. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(5)を含み、ここに該共通アウトプットが粒子染色変動の指標を含むA1記載のシステム。

【0452】

A16. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(5)を含み、ここに該共通アウトプットが粒子間を識別する各ユニットによって使用される決定境界の指標を含むA1記載のシステム。

【0453】

A17. 該フローサイトメトリーユニットの各々が液滴仕分けシステムを含むA1記載のシステム。

20

【0454】

A18. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(5)を含み、ここに該共通アウトプットが各ユニットの液滴破壊位置の指標を含むA1記載のシステム。

【0455】

A19. 該フローサイトメトリーユニットのうちの少なくとも1つが光損傷システムを含むA1記載のシステム。

【0456】

A20. 少なくとも1つの該フローサイトメトリーユニットが、流体スイッチ仕分けシステムを含むA1記載のシステム。

【0457】

A21. 該フローサイトメトリーユニットが平行に作業するように適合されるA1記載のシステム。

30

【0458】

A22. 統合プラットフォームが、各パルスがレーザーの平均力を超えるピーク力を有する複数の電磁放射線パルスを発光するように操作可能な少なくとも1つの共有レーザーを含むA1記載のシステムであって：

試料粒子を含有する流体の流れを、粒子問い合わせ位置を通して向けるためのフローチャンネル；

パルス中の電磁放射線の一部を問い合わせ位置に向けるように操作可能なビームガイダンスシステム；

40

問い合わせ位置での電磁放射線の到着を示すタイミングシグナルを生成するように操作可能なタイミング回路；

問い合わせ位置から電磁放射線を検出するように適合され、検出された電磁放射線の強度を示す時変アナログシグナルを出力するように操作可能な検出器；

時変アナログシグナルをインプットとして受け取り、アナログシグナルをサンプリングして、デジタル化されたアウトプットを生成するように適合されたアナログ・デジタル変換器；および

アナログ・デジタル変換器からのデジタル化されたアウトプットを、タイミングシグナルの関数として分析するように操作可能な電子プロセッサを含む1以上の該フローサイトメトリーユニット。

50

【 0 4 5 9 】

A23. 複数のフローサイトメトリーユニットが、3以上のフローサイトメトリーユニットを含むA1記載のシステム。

【 0 4 6 0 】

A24. 複数のフローサイトメトリーユニットが、少なくとも12のフローサイトメトリーユニットを含むA1記載のシステム。

【 0 4 6 1 】

A25. 統合プラットフォームが、少なくとも要素(5)を含み、共通プロセッサが:(1)リアルタイムで該情報を受け取り処理し;次いで(2)該情報を受け取り処理して、もう1つのユニットに対する1つのユニットの操作の評価を可能にすることのうち少なくとも1つを実施するクレームA1記載のシステム。

10

【 0 4 6 2 】

A26. 各フローサイトメトリーユニットが、粒子の少なくとも1つの特徴を示す時変アウトプットシグナルを発生するように操作可能なセンサーを含み、該統合プラットフォームは、少なくとも要素(5)を含み、共通プロセッサによって受け取られた該情報は、それぞれのセンサーからのアウトプットシグナルを含み、プロセッサはアウトプットシグナルを実質的に連続した流れとして受け取り、リアルタイムでアウトプットシグナルを実質的に連続して処理するように操作可能であるA1記載のシステム。

【 0 4 6 3 】

A27. 該統合プラットフォームが、仕分けプロセスの間、リアルタイムで、フローサイトメトリーユニットに制御シグナルを送って、それらの操作を、共通プロセッサによって受け取られた該情報の関数として調整するように操作可能であり、フローサイトメトリーユニットが制御シグナルに応答するA1記載のシステム。

20

【 0 4 6 4 】

B. マルチチャネル仕分け方法

B1. 粒子の1以上の特徴に従って、粒子を仕分けるマルチチャネル方法であって:

複数のフローサイトメトリーユニットを供し;

該フローサイトメトリーユニットを操作して、複数のフローサイトメトリー操作を実施し、ここに該操作は、各々が粒子の混合物を含有する別々の流体の流れを形成し、粒子の該混合物中の粒子の所望の集団を、電磁放射線のビームを用いて流れを問い合わせることによって仕分け;次いで

30

該操作を実施する間、以下の要素のうちの少なくとも1つの共有する:(1)該流れに対する粒子の共通供給;(2)該ビームに対する電磁放射線の共通源;(3)共通操作制御インプット;(4)ユニットから情報を受け取り処理するための共通プロセッサ;(5)該流れに流体を送達するための共通システム;および(6)該フローサイトメトリーユニットのための共通ハウジング

ことを特徴とする該方法。

【 0 4 6 5 】

B2. 該粒子が細胞であるB1記載の方法。

【 0 4 6 6 】

B3. 該粒子が精子細胞であるB1記載の方法。

40

【 0 4 6 7 】

B4. 少なくとも1つの該マルチプルフローサイトメトリーユニットが、ジェットインエアー液滴仕分けフローサイトメトリーユニットを含むB1記載の方法。

【 0 4 6 8 】

B5. さらに、単一レーザービームの形態で、電磁放射線の該共通源を少なくとも共有することを特徴とするB1記載の方法であって、さらに、単一のレーザービームを複数のビームに分割し、複数のビームをそれぞれのフローサイトメトリーユニットの光学システムに向けることを特徴とする該方法。

【 0 4 6 9 】

50

B6. 単一のビームのビーム光のパーセンテージを、該フローサイトメトリユニットのうちの1つの光学システムに向かって反射させ、該フローサイトメトリユニットのもう一方の光学システムに伝達するための単一ビームのビーム光のあるパーセンテージを通すことを特徴とするB5記載の方法。

【0470】

B7. さらに、固体レーザーを用いて、該単一のレーザービームを形成することを特徴とするB6記載の方法。

【0471】

B8. さらに、単一のレーザービームが、複数のパルスを含むように固体レーザーをモードロックすることを特徴とし、ここに各パルスが、レーザーの平均電力アウトプットより大きいピーク電力を有するB7記載の方法。

10

【0472】

さらに、少なくとも要素(6)を共有することを特徴とするB1記載の方法であって、さらに、共通ハウジングに、該フローサイトメトリユニットを取り外し可能に取り付けることを特徴とする該方法。

【0473】

B10. さらに、共有されたレーザーの形態で、電磁放射線の該共通源を少なくとも共有することを特徴とするB1記載の方法であって、さらに：

レーザーからの複数の電磁放射線(EMR)パルスを発光し、ここに各パルスのピーク電力は、レーザーの平均電力を超え；

20

各パルスをビーム分割およびガイダンスシステムに向けて、その中に含有される各流体の流れおよび粒子を、レーザーから各問い合わせ位置へのビーム経路に沿って、パルスのエネルギーの一部を向けることによって間欠的に照明し；

少なくとも1つの問い合わせ位置からのEMRを検出し；

該問い合わせ位置から検出されたEMRの強度を示す時変アナログシグナルを発生し；

該問い合わせ位置にて、パルスの到着を示すタイミングシグナルを発生し；

時変アナログシグナルをデジタルシグナルに変換し；次いで

デジタルシグナルを分析して、それぞれの問い合わせ位置を通して流れる流体の流れ中の粒子の特徴を決定する工程を含む該方法。

【0474】

30

B11. さらに、該操作の第1の操作における第1の仕分け方法および該操作の第2の操作における第1の仕分け方法と異なる第2の仕分け方法を用いることを特徴とするB1記載の方法。

【0475】

B12. さらに、各フローサイトメトリユニットによって仕分けられた所望の粒子の集団を収集し、異なるユニットから収集された集団と、1つのユニットから収集された集団を組み合わせて、所望の粒子の混合集団を生成することを特徴とするB1記載の方法。

【0476】

B13. さらに、流体が、次：(1)第1の仕分けられた集団の純度；および(2)第2の集団中の所望の粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として、1以上のフローサイトメトリユニットに送達される速度を変動させることを特徴とするB1記載の方法。

40

【0477】

B14. さらに、該フローサイトメトリ操作を並列接続で実施することを特徴とするB1記載の方法。

【0478】

B15. 共有工程が少なくとも要素(4)を共有することを含むB1記載の方法であって、さらに、共通プロセッサを使用して、以下：(1)リアルタイムで、該情報を受け取り処理し；次いで(2)該情報を受け取り処理して、もう一方のユニットに対する1つのユニットの操作の評価を可能にするのうちの少なくとも1つを行うことを特徴とする該方法。

【0479】

50

B16. 共有工程が少なくとも要素(4)を共有することを含むB1記載の方法であって、さらに、各それぞれのサイトメトリユニットに対するセンサーを用いて、粒子の少なくとも1つの特徴を示す時変アウトプットシグナルを発生し、共通プロセッサを用いて、それぞれのアウトプットシグナルを、実質的に連続した流れとして受け取り、リアルタイムでアウトプットシグナルを処理することを特徴とする該方法。

【0480】

B17. 共有工程が少なくとも要素(4)を共有することを含むB1記載の方法であって、さらに、制御シグナルを、仕分けプロセスの間、リアルタイムで、1以上のフローサイトメトリユニットに送って、ユニットの操作を、共通プロセッサによって受け取られた情報の関数として調整することを特徴とする該方法。

10

【0481】

C. 留保

【0482】

D. マルチチャンネルアナライザ

D1. 粒子の1以上の特徴に従って、粒子を分類するためのマルチチャンネルシステムであって:

各々が、粒子の混合物中の粒子を、電磁放射線のビームを用いる該粒子を含有する流体の流れを問い合わせることによって分類するように操作可能な複数のフローサイトメトリユニット、

以下の要素のうちの少なくとも1つを含む統合プラットフォームを共有する該ユニット:(
1)粒子の共通供給;(2)共通ハウジング;(3)ユニットの操作を制御するための共通インプット;(4)ユニットから情報を受け取り処理するための共通プロセッサ;および(5)該粒子を含有する流体を該フローサイトメトリユニットに送達するための共通流体送達システムを含む該システム。

20

【0483】

D2. 該統合プラットフォームが、さらに、電磁放射線の共通源を含むD1記載のシステム。

【0484】

D3. 該粒子が細胞であるD1記載のシステム。

【0485】

D4. 該粒子が精子細胞であるD1記載のシステム。

30

【0486】

D5. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(3)および(4)を含むD1記載のシステム。

【0487】

D6. 該統合プラットフォームが、さらに、電磁放射線の共通源を含むD5記載のシステム。

【0488】

D7. 該統合プラットフォームが、さらに、電磁放射線の共通源を含み、ここに、該共通源が単一のレーザービームを含むD1記載のシステム。

【0489】

D8. さらに、単一のレーザービームを複数のビームに分け、複数のビームをそれぞれのフローサイトメトリユニットの光学システムに向けるためのビーム分割システムを含むD7記載のシステム。

40

【0490】

D9. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(2)を含み、ここに該フローサイトメトリユニットが、ハウジングにおいて、取り外し可能に取り付けられた互換性のあるモジュールを含むD1記載のシステム。

【0491】

D10. 各フローサイトメトリユニットがそれぞれの流体の流れを問い合わせるための落射照明光学システムを含むD1記載のシステム。

【0492】

D11. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(4)を含み、ここに該プロセッサが各ユ

50

ニットによって測定される蛍光強度の指標を出力するのに操作可能であるD1記載のシステム。

【0493】

D12. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(4)を含み、ここに該プロセッサが、各ユニットが粒子を分離する速度の指標を出力するように操作可能であるD1記載のシステム。

【0494】

D13. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(4)を含み、ここに該プロセッサが粒子染色変動の指標を出力するように操作可能であるD1記載のシステム。

【0495】

D14. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(4)を含み、ここに該プロセッサが粒子間を識別するための各ユニットによって使用される決定境界の指標を出力するように操作可能であるD1記載のシステム。

【0496】

D15. 該フローサイトメトリーユニットが平行に操作するように適合されるD1記載のシステム。

【0497】

D16. 該複数のフローサイトメトリーユニットが粒子を仕分けるのに操作可能であるD1記載のシステム。

【0498】

D17. 統合プラットフォームが、さらに、電磁放射線の共通源を含み、ここに該複数のフローサイトメトリーユニットがジェットインエア液滴仕分けフローサイトメトリーユニットを含むD16記載のシステム。

【0499】

D18. 該統合プラットフォームが、少なくとも要素(4)を含み、ここに共通プロセッサが次:(1)リアルタイムで該情報を受け取り処理し;次いで(2)該情報を受け取り処理して、もう一方のユニットに対する一方のユニットの操作の評価を可能にするのうちの少なくとも1つを実行するのに操作可能であるD1記載のシステム。

【0500】

D19. 各フローサイトメトリーユニットが、粒子の少なくとも1つの特徴を示す時変アウトプットシグナルを発生するように操作可能であり、該統合プラットフォームが少なくとも要素(4)を含み、共通プロセッサによって受け取られた該情報がそれぞれのセンサーからのアウトプットシグナルを含み、プロセッサが、アウトプットシグナルを、実質的に連続した流れとして受け取って、リアルタイムで、アウトプットシグナルを処理するように操作可能であるD1記載のシステム。

【0501】

D20. 該統合プラットフォームが、仕分けプロセスの間、リアルタイムで、フローサイトメトリーユニットに制御シグナルを送って、それらの操作を、共通プロセッサによって受け取られた該情報の関数として調整するように操作可能である共通プロセッサを含み、ここにフローサイトメトリーユニットは、制御シグナルに応答するD1記載のシステム。

【0502】

E. マルチチャンネル分析方法

E1. 粒子の1以上の特徴に従って、粒子を分類するマルチチャンネル方法であって:

複数のフローサイトメトリーユニットを供し;

該フローサイトメトリーユニットを操作して、複数のフローサイトメトリー操作を実行し、ここに該操作は、各々が粒子の混合物を含有する別々の流体の流れを形成し、粒子の該混合物中の粒子を、電磁放射線のビームを用いて、流れを問い合わせることによって分類し;次いで

以下の要素:(1)該流れに対する粒子の共通供給;(2)共有操作制御インプット;(3)ユニットからの情報を受け取り処理するための共通プロセッサ;(4)該流れに流体を送達する

10

20

30

40

50

ための共通システム;および(5)該フローサイトメトリーユニットに対する共通ハウジングのうちの少なくとも1つを共有して、該操作を実行することを特徴とする該方法。

【0503】

E2. さらに、該ビームに対する電磁放射線の共通源を共有することを特徴とするE1記載の方法。

【0504】

E3. 該複数のフローサイトメトリーユニットが、ジェットインエア-液滴仕分けフローサイトメトリーユニットを含むE2記載の方法。

【0505】

E4. さらに、該複数のフローサイトメーターを操作して、分類に基づき、粒子の該混合物を仕分けることを特徴とするE1記載の方法。

10

【0506】

E5. 該粒子が細胞であるE1記載の方法。

【0507】

E6. 該粒子が精子細胞であるE1記載の方法。

【0508】

E7. さらに、単一レーザービームの形態で、該ビームに対する電磁放射線の共通源を共有し、単一レーザービームを複数のビームに分け、次いで、複数のビームをそれぞれのフローサイトメトリーユニットの光学システムに向けることを特徴とするE1記載の方法。

【0509】

20

E8. 共有工程が、少なくとも要素(5)を含むE7記載の方法であって、さらに、ビームを分ける前に、該単一レーザービームを、該共通ハウジングにガイドすることを特徴とする該方法。

【0510】

E9. さらに、単一のビームのビーム光のあるパーセンテージを、該フローサイトメトリーユニットのうちの1つの光学システムに向かって反射させ、該フローサイトメトリーユニットのもう一方の光学システムに伝達するための単一ビームのビーム光のあるパーセンテージを通すことを特徴とするE7記載の方法。

【0511】

共有工程が少なくとも要素(5)を含むE1記載の方法であって、さらに、共通ハウジングの該フローサイトメトリーユニットを取り外し可能に取り付けることを特徴とする該方法。

30

【0512】

E11. 各フローサイトメトリーユニットを操作して、落射照明光学システムを用いて、それぞれの流体の流れを問い合わせることを特徴とするE1記載の方法。

【0513】

E12. さらに、平行に該フローサイトメトリーユニットを操作することを特徴とするE1記載の方法。

【0514】

E13. 該複数のフローサイトメトリーユニットが12以上のフローサイトメトリーユニットを含むE1記載の方法。

40

【0515】

E14. 共有工程が少なくとも要素(4)を共有することを含むE1記載の方法であって、さらに、共通プロセッサを使用して、以下の:(1)リアルタイムで、該情報を受け取り処理し;次いで(2)該情報を受け取り処理して、もう一方のユニットに対する1つのユニットの操作の評価を可能にするのうちの少なくとも1つを行うことを特徴とする該方法。

【0516】

E15. 共有工程が少なくとも要素(4)を共有することを含むE1記載の方法であって、さらに、各それぞれのサイトメトリーユニットに対するセンサーを用いて、粒子の少なくとも1つの特徴を示す時変アウトプットシグナルを発生し、共通プロセッサを用いて、そ

50

それぞれのアウトプットシグナルを、実質的に連続した流れとして受け取り、リアルタイムでアウトプットシグナルを処理することを特徴とする該方法。

【0517】

E16. 共有工程が少なくとも要素(4)を共有することを含むE1記載の方法であって、さらに、制御シグナルを、仕分けプロセスの間、リアルタイムで、1以上のフローサイトメトリーユニットに送って、ユニットの操作を、共通プロセッサによって受け取られた情報の関数として調整することを特徴とする該方法。

【0518】

F.[保留]

【0519】

G. マルチチャネルサイトメトリーに対する単一レーザーを分割する方法

G1. 各々が、粒子の混合物からの粒子の所望の集団を、光のビームを用いて該粒子を含有する流体の流れを問い合わせることによって仕分けるように操作可能である3以上のフローサイトメトリーユニットを含むシステムを用いて粒子を仕分ける方法であって:

単一レーザービームを発生させ;

単一のビームを、3以上の光ビームに分割し、フローサイトメトリーユニットの光学システムに光ビームを向け;次いで

フローサイトメトリーユニットを操作して、粒子を仕分けることを特徴とする該方法。

【0520】

G2. 各サイトメトリーユニットが大体同じ強度の光ビームを有する流体の流れを問い合わせることを特徴とするG1記載の方法。

【0521】

G3. 各ユニットがWワットの電力を有する光ビームを必要とするG1記載の方法であって、ここに、さらに、 $(W \times N) + L$ [式中、Nはフローサイトメトリーユニットの数と同等であり、Lはシステムにおける電力喪失に等しい]の電力を有する該単一レーザービームを生じることが特徴とする該方法。

【0522】

G4. サイトメトリーユニットによって使用されるビーム光の量をバランスさせて、1以上のフィルターを用いることによって、それぞれの流体の流れを問い合わせ、少なくとも1つの該3以上の光ビームの強度を弱めることを特徴とするG1記載の方法。

【0523】

G5. さらに、各ユニットが、10%の耐性内のビーム光の同一量を受け取るように、それぞれのユニットに進入するビーム光の強度を調整することを特徴とするG4記載の方法。

【0524】

G6. 該フローサイトメトリーユニットのうちの少なくとも1つが、液滴仕分けプロセスを用いて、該粒子を仕分けるG1記載の方法。

【0525】

G7. 該フローサイトメトリーユニットのうちの少なくとも1つが光損傷プロセスを使用して、該粒子を仕分けるG1記載の方法。

【0526】

G8. 少なくとも1つの該フローサイトメトリーユニットが流体スイッチ仕分けプロセスを用いて、該粒子を仕分けるG1記載の方法。

【0527】

G9. 該フローサイトメトリーユニットが共通ハウジング内に取り付けられるG1記載の方法であって、さらに、ビームを分ける前に、該単一レーザービームを該共通ハウジングにガイドすることを特徴とする該方法。

【0528】

G10. さらに、単一のレーザービームのビーム光のあるパーセンテージを、該フローサイトメトリーユニットのうちの1つの光学システムに向かって反射させ、該フローサイトメトリーユニットのもう一方の光学システムに伝達するための単一レーザービームのビーム

10

20

30

40

50

光のあるパーセンテージを通すことを特徴とするG9記載の方法。

【0529】

G11. 単一ビームを分割する工程が、単一ビームを、4つの別々のビームに分割することを含むG1記載の方法。

【0530】

G12. 分割工程が、50/50ビームスプリッターを用いて、単一ビームを2つのビームに分割し、第2の50/50ビームスプリッターを用いて、2つのビームのうちの1つを2つのさらなるビームに分割し、第3の50/50ビームスプリッターを用いて、2つのビームのうちの他方を、2つのよりさらなるビームに分割することを含むG11記載の方法。

【0531】

H. 仕分け戦略を用いる仕分けのための装置

H1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムであって、該粒子を含有する流体を送達するための流体送達システム、それを流れへと形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類する該流体を受け取るためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供する仕分けシステムを含む該システムにおいて、仕分けシステムを制御して、その仕分け戦略を変更するか、あるいは流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動するためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報に応答する制御を含むことを特徴とする改良。

【0532】

H2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するH1記載のシステム。

【0533】

H3. 粒子が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるH1記載のシステム。

【0534】

H4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であるH3記載のシステム。

【0535】

H5. さらに、該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満にて維持することを含むH4記載のシステム。

【0536】

H6. 該制御が、該純度が所望の純度より大きい時に、流体送達を増加させ、該純度が該所望の純度より小さい時に、流体送達を減少させるH1記載のシステム。

【0537】

H7. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団の純度を決定し、該システムは、さらに、所望の純度を示すための該制御へのオペレーターインプットを含み、ここに該制御は、純度が所望の純度に対応するように、流体送達の変動するH1記載のシステム。

【0538】

H8. 該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量より大きい時に、制御は流体送達を増加させ、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、該許容される量未満である時に、制御が流体送達を減少させるH7記載のシステム。

【0539】

H9. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量を決定し、該システムは、さらに、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量を示すための制御へのオペレーターインプットを含み、ここに制御は、流体送達速度を変動して、該少なくとも1つの集団中の該許容され

10

20

30

40

50

る量を得ることを含むH8記載のシステム。

【0540】

H10. 該流れが、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成されたH1記載のシステム。

【0541】

H11. 該仕分けシステムが、該第1の粒子組が該少なくとも1つの集団における収集のために選択され、該第2および第3の粒子組が該少なくとも1つの集団のために選択される仕分け方法を使用するように操作可能であるH10記載のシステム。

10

【0542】

H12. 該仕分けシステムが、該第1および第3の粒子組が、該少なくとも1つの集団における収集のために選択され、該第2の粒子組が該少なくとも1つの集団における収集のために選択されない仕分け方法を使用するように操作可能であるH10記載のシステム。

【0543】

H13. 該仕分けシステムが液滴仕分けシステムを含むH1記載のシステム。

【0544】

H14. 該仕分けシステムが光損傷仕分けシステムを含むH1記載のシステム。

【0545】

H15. 該仕分けシステムが流体スイッチ仕分けシステムを含むH1記載のシステム。

20

【0546】

I. 仕分け方法を用いて粒子を仕分けするための方法

I1. フローサイトメトリーシステムを用いて特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けする方法であって:

該粒子を含有する流体を送達し;

流体を流れへと形成し、フローサイトメトリーを使用して、該特徴に従って流れにおける粒子を分類し;

該分類およびそれによる仕分け戦略に従って、流れにおける粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供し; 次いで

30

仕分け戦略を変更し、または流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度; および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動することを特徴とする該方法。

【0547】

I2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するI1記載の方法。

【0548】

I3. 該粒子が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるI1記載の方法。

【0549】

I4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であるI3記載の方法。

40

【0550】

I5. 該純度を85%以上95%未満にて維持することを特徴とするI3記載の方法。

【0551】

I6. さらに、該少なくとも1つの該純度が所望の純度より大きい時に、流体送達のを増加させ、該純度が所望の純度より小さい時に、流体送達のを減少させることを特徴とするI1記載の方法。

【0552】

I7. さらに、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量より大きい時に流体送達のを増加させ、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が該許容される量より少ない時に、流体送達のを減少させる

50

ことを特徴とするI1記載の方法。

【0553】

I8. 該流れを、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成することを特徴とするI1記載の方法。

【0554】

I9. さらに、第1の粒子組のみが該少なくとも1つの集団における収集に選択される仕分け方法によって、該粒子を仕分けすることを特徴とするI8記載の方法。

10

【0555】

I10. さらに、第1および第3の粒子組が、該少なくとも1つの集団における収集のために選択される仕分け方法に従って、該粒子を仕分けすることを特徴とするI8記載の方法。

【0556】

I11. 該仕分けが液滴仕分けプロセスを使用することを特徴とするI1記載の方法。

【0557】

I12. 該仕分けが、光損傷仕分けプロセスを使用することを特徴とするI1記載の方法。

【0558】

I13. 該仕分けが流体スイッチ仕分けプロセスを用いることを含むI1記載の方法。

【0559】

20

J. 仕分け戦略を含む液滴仕分け

J1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのシステムであって:

該粒子を含有する流体の流れを送達するための流体送達システム;

該流れを受け取り、該粒子を含有する液滴を形成し、仕分け戦略に従って、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含有する第1の液滴、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第2の液滴および各々が特徴Aを有する1以上の粒子および特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第3の液滴を含む該液滴を異なる集団に仕分けするためのフローサイトメトリー装置;および

フローサイトメトリー装置を制御して、仕分け戦略を変更する、または流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して該少なくとも1つの液滴集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動するためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報に応答する制御を含むことを特徴とする該システム。

30

【0560】

J2. 該制御が流体送達システムを制御して、流体が実質的に一定に送達される速度を維持し、かつ制御が仕分け戦略を変更するJ1記載のシステム。

【0561】

J3. 該制御が仕分け戦略を変更して、液滴集団のうちの1つにおいて、第3の液滴のパーセンテージを変動させるJ2記載のシステム。

40

【0562】

J4. 該制御が、流体送達システムを制御して、流体が、該少なくとも1つの液滴集団の純度の関数として送達される速度を変動させるJ1記載のシステム。

【0563】

J5. 該純度が少なくとも85%かつ95%以下であるJ4記載のシステム。

【0564】

J6. 該制御が、流体送達システムを制御して、流体が、該流れにおける特徴A粒子の総量に対する該少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子の量の関数として送達される速度を変動させるJ1記載のシステム。

50

【0565】

J7. 該少なくとも1つの液滴集団中の特徴A粒子量が、該流れ中の特徴A粒子の総量の少なくとも約60%を表すように、流体が送達される速度が変動するJ6記載のシステム。

【0566】

J8. 該粒子が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるJ1記載のシステム。

【0567】

J9. 該混合物における特徴A粒子対特徴B粒子の割合が既知の割合であり、該制御が、粒子のうちのいくつかを、特徴Aまたは特徴Bを有すると分類し、流体送達速度を、分類された粒子の速度の関数として、既知の速度に変動するように操作することが可能なJ1記載のシステム。

10

【0568】

J10. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、仕分けされた粒子の純度を決定するJ1記載のシステムであって、さらに、所望の純度を示すための該制御へのオペレーターインプットを含み、ここに該制御は、該少なくとも1つの液滴集団の純度が、略、所望の純度に対応するように、割合を変更する該システム。

【0569】

K. 仕分け戦略を含む液滴仕分け方法

K1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分ける方法であって:

該粒子を含有する流体の流れを送達し;

20

該粒子を含有する液滴を形成し;

仕分け戦略に従って、該液滴を異なる集団に分類し、ここに、該液滴は、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含有する第1の液滴、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第2の液滴および各々が特徴Aを有する1以上の粒子および特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第3の液滴を含み;次いで、

仕分け戦略を変更する、または、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの液滴集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動することを特徴とする該システム。

30

【0570】

K2. さらに、流体が送達される速度を、実質的に一定に維持し、仕分け方法を変動させることを特徴とするK1記載の方法。

【0571】

K3. さらに、液滴集団のうちの1つにおいて、第3の液滴のパーセンテージを変動させるために、仕分け方法を変動させることを特徴とするK2記載の方法。

【0572】

K4. さらに、流体が送達される速度を、液滴集団のうちの少なくとも1つの純度の関数として変動させることを特徴とするK1記載の方法。

【0573】

K5. さらに、該純度を85%ないし95%の範囲に維持することを特徴とするK4記載の方法。

40

【0574】

K6. さらに、流体が、該流れにおける特徴A粒子の総量に対する該少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子の量の関数として送達される速度を変動させることを特徴とするK1記載の方法。

【0575】

K7. 該少なくとも1つの液滴集団中の特徴A粒子の量が、該流れ中の特徴A粒子の総量の少なくとも約60%を表すように、流体が送達される速度を変動させるK6記載の方法。

【0576】

K8. 該粒子が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるK1記載の方法。

50

【0577】

K9. さらに、該少なくとも1つの液滴集団の純度が所望の純度以上である時、速度を上げ、該少なくとも1つの液滴集団の純度が所望の純度未満である時、速度を下げることを特徴とするK1記載の方法。

【0578】

L. フィードバックループを有する可変流速液滴仕分け器

L1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含めた粒子の混合物を仕分けするためのシステムであって：

該粒子を含有する流体の流れの送達するための可変速流体送達システム；

該流れを受け取り、該粒子を含有する液滴を形成し、仕分け戦略に従って、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含有する第1の液滴、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第2の液滴および各々が特徴Aを有する1以上の粒子および特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第3の液滴を含む該液滴を異なる集団に仕分けするためのフローサイトメトリー装置；および

フローサイトメトリー装置を制御して、仕分け戦略を変更する、または流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して該少なくとも1つの液滴集団の純度；および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動するためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報にตอบสนองする制御を含むことを特徴とする該システム。

【0579】

L2. 該制御が、流体送達システムを制御して、流体が、該少なくとも1つの液滴集団の純度の関数として送達される速度を変動させるL1記載のシステム。

【0580】

L3. 純度が少なくとも85%かつ95%以下であるL2記載のシステム。

【0581】

L4. 該制御が、流体送達システムを制御して、流体が、該流れ中の特徴A粒子の総量に対する少なくとも1つの液滴集団中の特徴A粒子の量またはパーセンテージの関数として送達される速度を変動するL1記載のシステム。

【0582】

L5. 該少なくとも1つの液滴集団中の特徴A粒子の量が、該流れ中の特徴A粒子の総量の少なくとも約60%を表すように、流体が送達される速度を変動するL4記載のシステム。

【0583】

L6. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するL1記載のシステム。

【0584】

L7. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるL1記載のシステム。

【0585】

L8. 該少なくとも1つの液滴集団中の液滴の少なくともいくつかは、同じ液滴中に少なくとも1つの生X細胞および少なくとも1つのY細胞を含有し、該少なくとも1つの液滴集団の該純度が、 $X/(X+Y)$ によって測定されるL7記載のシステム。

【0586】

L9. 該制御が、流体送達の変動速度を変動させて、該純度を85%以上95%未満で維持するL8記載のシステム。

【0587】

L10. 特徴Bが生X細胞ではない細胞の指標であるL7記載のシステム。

【0588】

L11. 該少なくとも1つの液滴集団中の生X細胞のパーセンテージが、該第1、第2および第3の複数の液滴中の生X細胞の総数の少なくとも60%であるように、該制御が、流体送達の変動速度を変動するように操作可能であるL7記載のシステム。

【0589】

10

20

30

40

50

L12. 該少なくとも1つの液滴集団の純度が95%未満で維持されるL11記載のシステム。

【0590】

L13. 該混合物における特徴A粒子対特徴B粒子の割合が既知の割合であり、該制御が、粒子のうちのいくつかを、特徴Aまたは特徴Bを有すると分類し、流体送達システムを、分類された粒子の速度の関数として、既知の速度に変動するように操作可能であるクレームL1記載のシステム。

【0591】

L14. 特徴Aを有する粒子が生X精子細胞であり、特徴Bを有する粒子が、生X精子細胞ではない精子細胞であり、該制御が、分類された精子細胞の割合の関数として、流体送達速度を、50%まで変動するように操作可能であるL1記載のシステム。

10

【0592】

L15. 該少なくとも1つの液滴集団の純度が所望の純度より大きい時に、速度を増加させ、該少なくとも1つの液滴集団の純度が該所望の純度より小さい時に、速度を減少させることを特徴とするL1記載のシステム。

【0593】

L16. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、仕分けられた粒子の純度を決定するL1記載のシステムであって、さらに、所望の純度を示すための該制御へのオペレーターインプットを含み、ここに該制御は、該少なくとも1つの液滴集団の純度が、略、所望の純度に対応するように、割合を変更する該システム。

【0594】

20

M. 可変流速およびフィードバックを用いる液滴仕分け方法

M1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分ける方法であって：

該粒子を含有する流体の流れを送達し；

該粒子を含有する液滴を形成し；

仕分け戦略に従って、該液滴を異なる集団に分類し、ここに、該液滴は、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含有する第1の液滴、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第2の液滴および各々が特徴Aを有する1以上の粒子および特徴Bを有する1以上の粒子を含有する第3の液滴を含み；次いで、

仕分け戦略を変更する、または、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの液滴集団の純度；および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動することを特徴とする該方法。

30

【0595】

M2. さらに、流体が送達される速度を、少なくとも1つの液滴集団の純度の関数として変動させることを特徴とするM1記載の方法。

【0596】

M3. 該純度が少なくとも85%かつ95%以下であるM2記載の方法。

【0597】

40

M4. さらに、流体が、該流れにおける特徴A粒子の総量に対する該少なくとも1つの液滴集団における特徴A粒子の量の関数として送達される速度を変動させることを特徴とするM1記載の方法。

【0598】

M5. さらに、該少なくとも1つの液滴集団中の特徴A粒子の量が、該流れ中の特徴A粒子の総量の少なくとも約60%を表すように、流体送達速度を変動することを特徴とするM4記載の方法。

【0599】

M6. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するM1記載の方法。

【0600】

50

M7. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるM1記載の方法。

【0601】

M8. 該することを特徴つの液滴集団中の少なくともいくつかの該液滴が、同じ液滴中に少なくとも1つの生X細胞および少なくとも1つのY細胞を含有し、該少なくとも1つの液滴集団の該純度が $X/(X+Y)$ によって測定されるM7記載の方法。

【0602】

M9. さらに、流体送達の変動させて、該純度を85%以上95%未満で維持することを特徴とするM8記載の方法。

【0603】

M10. 特徴Bが生X細胞でない細胞の指標であるM7記載の方法。

10

【0604】

M11. さらに、該少なくとも1つの液滴集団中の生X細胞のパーセンテージが、該第1、第2および第3の複数の液滴中の生X細胞の総数の少なくとも60%であるように、流体送達の変動することを特徴とするM7記載の方法。

【0605】

M12. さらに、該少なくとも1つの液滴集団の純度を95%未満で維持することを特徴とするM11記載の方法。

【0606】

M13. 該混合物における特徴A粒子対特徴B粒子の割合が既知の割合である方法であって、さらに、流体送達速度を、分類された粒子の速度の関数として、既知の速度に変動することを特徴とするM1記載の方法。

20

【0607】

M14. 特徴Aを有する粒子が生X精子細胞であり、特徴Bを有する粒子が生X精子細胞であるM1記載の方法であって、さらに、流体送達速度を、分類された精子細胞の割合の関数として、50%まで変動することを特徴とする該方法。

【0608】

M15. さらに、該少なくとも1つの液滴集団の純度が所望の純度より大きい時に、速度を増加させ、該少なくとも1つの液滴集団の純度が該所望の純度より小さい時に、速度を減少させることを特徴とするM1記載の方法。

【0609】

30

N. 高純度仕分け戦略のための精子仕分けシステム

XおよびY精子細胞を仕分けするためのシステムであって:

XおよびY精子細胞を含有する流体の流れを送達するための可変速流体送達システム;

(1) 該流れを受け取り、粒子を含む液滴を形成し、該液滴は、各々が1以上のX精子細胞を含有する第1の液滴、各々が1以上のY精子細胞を含有する第2の液滴、および各々が1以上のX精子細胞および1以上のY精子細胞を含有する第3の複数の液滴を含み、(2) 該第1の液滴を、該第2および第3の液滴から仕分け、(3) 該第1の液滴を収集して、X精子細胞の少なくとも1つの集団を供し、および(4) 少なくとも1つの集団におけるX精子細胞の量を同定するためのフローサイトメトリー装置; および

流体がフローサイトメーター装置に送達される速度を、該第1、第2および第3の液滴におけるX細胞の総数に対する該少なくとも1つの集団における同定されたX精子細胞の量の関数として変動させるためのフローサイトメーター装置から受け取った指示に应答する制御;

40

を含むことを特徴とする該システム。

【0610】

N2. 該フローサイトメトリー装置が、該少なくとも1つの集団において収集されたX細胞の数を同定するのに操作可能であり、該制御は、流体が、該第1、第2および第3の液滴中のX細胞の総数に対する許容可能な量にて、またはそれ以上にて、該少なくとも1つの集団において収集されるX細胞の量を維持するために、フローサイトメトリー装置に送達される速度を変化させるN1記載のシステム。

50

【 0 6 1 1 】

N3. 該許容される量がX細胞の該総数の少なくとも60%であるN2記載のシステム。

【 0 6 1 2 】

N4. 該X細胞が生X細胞であるN3記載のシステム。

【 0 6 1 3 】

N5. 該制御が、該少なくとも1つの集団中のX細胞の量が該許容される量を上回る時、流体送達を増加させ、該少なくとも1つの集団中のX細胞の量が該許容される量を下回る時、流体送達を減少するように操作可能であるN2記載のシステム。

【 0 6 1 4 】

O. 高-純度仕分け戦略を含む精子仕分け方法

10

O1. XおよびY精子細胞を仕分ける方法であって：

XおよびY精子細胞を含有する流体の流れを、第1の場所に送達し、該流れを、第2の場所にて液滴へと分け、該液滴は、各々が1以上のX精子細胞を含有する第1の液滴、各々が1以上のY精子細胞を含有する第2の液滴、および各々が1以上のX精子細胞および1以上のY精子細胞を含有する第3の複数の液滴を含み；

該第1の液滴を該第2および第3の液滴から仕分け；

該第1の液滴を収集して、X精子細胞の少なくとも1つの集団を供し；

該少なくとも1つの集団において収集されたX精子細胞の量を同定し；次いで

流体が、該第1の場所に送達される速度を、該第1、第2および第3の液滴中のX細胞の総数に対する該少なくとも1つの集団において収集された同定されたX精子細胞の量の関数として変動させることを特徴とする該方法。

20

【 0 6 1 5 】

O2. さらに、流体が、該第1、第2および第3の液滴中のX細胞の総数に対する許容可能な量にて、またはそれ以上にて、該少なくとも1つの集団において収集されるX細胞の量を維持するために、該第1の場所に送達される速度を変動させることを特徴とするO1記載の方法。

【 0 6 1 6 】

O3. 該許容される量が、X細胞の該総数の少なくとも60%であるO2記載の方法。

【 0 6 1 7 】

O4. 該X細胞が生X細胞であるO3記載の方法。

30

【 0 6 1 8 】

O5. さらに、該少なくとも1つの集団に収集されるX細胞の量またはパーセンテージが、該許容される量を上回る時、流体送達を増加させ、該少なくとも1つの集団中に収集されるX細胞の量またはパーセンテージが、該許容される量を下回る時、流体送達を減少させることを特徴とするO1記載の方法。

【 0 6 1 9 】

P. 高回収仕分け戦略のための精子仕分け器

P1. XおよびY精子細胞を仕分けるためのシステムであって：

XおよびY精子細胞を含有する流体の流れを送達するための可変速度流体送達システム；
(1)該流れを受け取り、粒子を含む液滴を形成し、該液滴は、各々が1以上のX精子細胞を含有する第1の液滴、各々が1以上のY精子細胞を含有する第2の液滴、および各々が1以上のX精子細胞および1以上のY精子細胞を含有する第3の複数の液滴を含み、(2)該第1および第3の液滴を、該第2の液滴から仕分け、(3)該第1および第3の液滴を収集して、X精子細胞の少なくとも1つの集団を供し、次いで(4)少なくとも1つの集団において、Y精子細胞の量を同定するためのフローサイトメーター装置；および

40

流体が、該少なくとも1つの集団において同定されたY精子細胞の量の関数として、フローサイトメーター装置に送達される速度を変動させるフローサイトメーター装置から受け取った指示にตอบสนองする制御；

を含むことを特徴とする該システム。

【 0 6 2 0 】

50

P2. 該制御が、所望の純度にて、またはそれ以上に、該少なくとも1つの集団の純度を維持するために、流体が、フローサイトメーターシステムに送達される速度を変動させるP1記載の方法。

【0621】

P3. 該制御が、該少なくとも1つの集団の純度が該所望の純度より大きい時、流体送達速度を増加し、純度が該所望の純度未満である時、流体送達速度を減少するように操作可能であるP2記載のシステム。

【0622】

P4. 該所望の純度が95%以下であるP2記載のシステム。

【0623】

P5. 該X精子細胞が生細胞であるP2記載のシステム。

【0624】

Q. 高回収仕分け戦略を含む精子仕分け方法

Q1. XおよびY精子細胞を仕分ける方法であって：

XおよびY精子細胞を含有する流体の流れを、第1の場所に送達し、該流れを、第2の場所にて液滴へと分け、該液滴は、各々が1以上のX精子細胞を含有する第1の液滴、各々が1以上のY精子細胞を含有する第2の液滴、および各々が1以上のX精子細胞および1以上のY精子細胞を含有する第3の複数の液滴を含み、；

該第1および第3の液滴を、該第2の液滴から仕分け；

該第1および第3の液滴を収集して、X精子細胞の少なくとも1つの集団を供し；

該少なくとも1つの集団において収集されたY精子細胞の量を同定し；次いで

該少なくとも1つの集団において収集された同定されたY精子細胞の量の関数として、流体を該第1の場所に送達する速度を変動させることを特徴とする該方法。

【0625】

Q2. さらに、流体が送達される速度を変動させて、X細胞に対する該少なくとも1つの集団の純度を、所望の純度にてまたはそれ以上で維持することを特徴とするQ1記載の方法。

【0626】

Q3. さらに、該少なくとも1つの集団の純度が該所望の純度より大きい時、流体送達速度を増加させ、純度が該所望の純度未満である時、流体送達速度を減少させることを特徴とするQ2記載のシステム。

【0627】

Q4. 該所望の純度が95%以下であるQ2記載の方法。

【0628】

Q5. 該X精子細胞が生細胞であるQ2記載の方法。

【0629】

Q6. フローサイトメトリーを用いて、XおよびY精子細胞を仕分ける方法であって

XおよびY精子細胞を含有する流体の流れを、第1の場所に送達し、該流れを、第2の場所にて液滴へと分け、該液滴は、各々が1以上のX精子細胞を含有する第1の液滴、各々が1以上のY精子細胞を含有する第2の液滴、および各々が1以上のX精子細胞および1以上のY精子細胞を含有する第3の複数の液滴を含み；

該第1の液滴および該第3の液滴を第2の液滴から仕分け；

該第1の液滴および第3の液滴を収集して、X精子細胞の少なくとも1つの集団を供する；

ことを特徴とする該方法。

【0630】

Q7. 該X精子細胞が生細胞であり、死X細胞ではないQ6記載の方法。

【0631】

Q8. フローサイトメトリーを用いてXおよびY精子細胞を仕分ける方法であって：

XおよびY精子細胞を含有する流体の流れを送達し、該流れを液滴へと壊し；

液滴に壊れる前に、流体の流れを問い合わせて、どの精子細胞がどの液滴中に存在する

10

20

30

40

50

かを同定し;

X精子細胞を含有する液滴を、X精子細胞を含有しない液滴から仕分け;次いで少なくとも1つのX精子細胞および少なくとも1つのY精子細胞を含有する液滴を含むX精子細胞を含有する該液滴を収集することを特徴とする該方法。

【0632】

Q9. 該X精子細胞が生X細胞であり、死X細胞ではないQ8記載の方法。

【0633】

R. 仕分け戦略を有する光損傷仕分け

R1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムであって、該粒子を含有する流体を送達するための流体送達システム、それを流れへと形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類する該流体を受け取るためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供する仕分けシステムを含む該システムにおいて、仕分けシステムを制御して、その仕分け戦略を変更するか、あるいは流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団において除去されない特徴A粒子または除去されない特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動するためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報にตอบสนองする制御を含むことを特徴とする改良。

10

20

【0634】

R2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するR1記載のシステム。

【0635】

R3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるR1記載のシステム。

【0636】

R4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であるR3記載のシステム。

【0637】

R5. 該制御が、該少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達の速度を増加させ、純度が所望の純度より小さい時に、流体送達の速度を減少させるR1記載のシステム。

30

【0638】

R6. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、少なくとも1つの集団の純度を決定するU1記載のシステムであって、さらに、所望の純度を示すための制御にオペレーターインプットを含み、ここに該制御が流体送達の速度を変動させて、所望の純度を得る該システム。

【0639】

R7. 該流れが、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成されるR1記載のシステム。

40

【0640】

R8. 該レーザーが第2の粒子組のみを除去するR7記載のシステム。

【0641】

R9. 該制御が該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満で維持するR8記載のシステム。

【0642】

R10. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、該レーザーが、流れ中の第2の粒子組および第3の粒子組を除去するように操作可能であるR7記載のシステム。

【0643】

50

R11. 該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量より大きいとき、流体送達を増加させ、制御が、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、該許容される量より小さい時、流体送達を減少させるR10記載のシステム。

【0644】

R12. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量を決定するR10記載のシステムであって、さらに、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量を示すための制御に、オペレーターインプットを含み、ここに制御が、流体送達速度を変動させて、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量を得る該システム。

10

【0645】

S. 仕分け戦略を含む光損傷仕分け方法

S1. フローサイトメトリーシステムを用いて、特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分ける方法であって：

該粒子を含有する流体を送達し；

流体を流れへと形成し、フローサイトメトリーを用いて、該特徴に従って、流れ中の粒子を分類し；

流れ中の粒子を、該分類に従って、および仕分け方法に従って、選択された粒子を除去することによって仕分け、それにより、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供し；次いで

20

仕分け方法を変動させる、あるいは流体が送達される速度を、以下：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子または除去されていない特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として変動させることを特徴とする該方法。

【0646】

S2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するS1記載の方法。

【0647】

S3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるS1記載の方法。

30

【0648】

S4. さらに、該少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達を増加させ、該純度が所望の純度より小さい時に、流体送達を減少させることを特徴とするS1記載の方法。

【0649】

S5. さらに、該流体を、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成することを特徴とするS1記載の方法。

40

【0650】

S6. さらに、第1および第3の粒子組ではなく、第2の粒子組を除去することを特徴とするS5記載の方法。

【0651】

S7. さらに、該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満にて維持することを特徴とするS6記載の方法。

【0652】

S8. さらに、第1の粒子組ではなく、第2および第3の粒子組を除去することを特徴とするS5記載の方法。

【0653】

50

S9. さらに、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量より大きい時、流体送達を増加させ、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が該許容される量未満である時、流体送達を減少させることを特徴とするS8記載の方法。

【0654】

T. 可変流速およびフィードバックを有する光損傷仕分け器

T1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムであって、該粒子を含有する流体を送達するための流体送達システム、それを流れへと形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類する該流体を受け取るためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供する仕分けシステムを含む該システムにおいて、仕分けシステムを制御して、その仕分け戦略を変更するか、あるいは流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団において除去されない特徴A粒子または除去されない特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動させるためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報に応答する制御を含むことを特徴とする改良。

10

【0655】

T2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するT1記載のシステム。

20

【0656】

T3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるT2記載のシステム

【0657】

T4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、該レーザーが第2の粒子組のみを除去するT3記載のシステム。

【0658】

T5. さらに、該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満にて維持することを特徴とするT4記載のシステム。

【0659】

T6. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、該レーザーが第2および第3の粒子組を除去するT2記載のシステム。

30

【0660】

T7. 制御が、少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時、流体送達を増加させ、純度が所望の純度より小さい時、流体送達を減少させるT1記載のシステム。

【0661】

T8. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、少なくとも1つの集団の純度を決定するT1記載のシステムであって、さらに、所望の純度を示すための制御にオペレーターインプットを含み、ここに該制御が流体送達の変動させて、所望の純度を得る該システム。

40

【0662】

T9. 該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量より大きい時に、該制御が流体送達を増加させ、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量より小さい時に、該制御が流体送達を減少させるT8記載のシステム。

【0663】

T10. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、少なくとも1つの集団の純度を決定するT8記載のシステムであって、さらに、所望の純度を示すための制御にオペレーターインプットを含み、ここに該制御が流体送達の変動させて、所望の純度を得る該システム。

50

【0664】

T11. 該流れが、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成されるT1記載のシステム。

【0665】

T12. T特徴Aが生X精子細胞(X)の指標であり、特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、レーザーが第1の粒子組でなく、第2の粒子組および第3の粒子組を除去し、制御が、流体がフローサイトメーター装置に送達される速度を、少なくとも1つの集団中の生X精子細胞の数の関数として変動させるT11記載のシステム。

10

【0666】

T13. 特徴Aが生X精子細胞(X)の指標であり、特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、レーザーが、第1および第3の粒子組ではなく第2の粒子組を除去し、制御が、流体がフローサイトメーターシステムに送達される速度を、該少なくとも1つの集団中の~X精子細胞の数の関数として変動させるT11記載のシステム。

【0667】

U. 可変流速仕分け戦略を含む光損傷仕分け方法

U1. フローサイトメトリーシステムを用いて特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分ける方法であって:

20

該粒子を含有する流体を送達し;

流体を流れへと形成し、フローサイトメトリーを使用して、該特徴に従って流れにおける粒子を分類し;

該分類およびそれによる仕分け戦略に従って、流れにおける粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供し;次いで

仕分け戦略を変更し、または流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における除去されていない特徴A粒子または除去されていない特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動させることを特徴とする該方法。

30

【0668】

U2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するU1記載の方法。

【0669】

U3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるU2記載の方法。

【0670】

U4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であるおよび該レーザーが、第2の粒子組を除去するU3記載の方法。

【0671】

U5. さらに、該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満にて維持することを特徴とするU4記載の方法。

40

【0672】

U6. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、該レーザーが第2および第3の粒子組を除去するU2記載の方法。

【0673】

U7. 該制御が、少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達のを増加させ、該純度が該所望の純度より小さい時に、流体送達のを減少させるU1記載のシステム。

【0674】

U8. 該制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、少なくとも1つの集団の純度を決定するU1記載のシステムであって、さらに、所望の純度を示す

50

ための制御にオペレーターインプットを含み、ここに該制御が流体送達の変動させて、所望の純度を得る該システム。

【0675】

U9. 該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量より大きい時に、該制御が流体送達を増加させ、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量より小さい時に、該制御が流体送達を減少させるU8記載のシステム。

【0676】

U10. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の総数を決定するU8記載のシステムであって、さらに、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の許容される量を示すための制御に、オペレーターインプットを含み、ここに、制御は、少なくとも1つの集団中の特徴A粒子の量が、該許容される量またはパーセンテージを得るように、速度を変動させる該システム。

10

【0677】

U11. 該流れが、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成されるU1記載のシステム。

【0678】

20

U12. T特徴Aが生X精子細胞(X)の指標であり、特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、レーザーが第1の粒子組でなく、第2の粒子組および第3の粒子組を除去し、制御が、流体がフローサイトメーター装置に送達される速度を、少なくとも1つの集団中の生X精子細胞の数の関数として変動させるU11記載のシステム。

【0679】

U13. 特徴Aが生X精子細胞(X)の指標であり、特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、レーザーが第1の粒子組でなく、第2の粒子組および第3の粒子組を除去し、制御が、流体がフローサイトメーター装置に送達される速度を、少なくとも1つの集団中の生X精子細胞の数の関数として変動させるU11記載のシステム。

【0680】

30

V. 仕分け戦略を含む流体スイッチ粒子仕分け器

V1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムであって、該粒子を含有する流体を送達するための流体送達システム、それを流れへと形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類する該流体を受け取るためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供する仕分けシステムを含む該システムにおいて、仕分けシステムを制御して、その仕分け戦略を変更するか、あるいは流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動させるためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報に回答する制御を含むことを特徴とする改良。

40

【0681】

V2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するV1記載のシステム。

【0682】

V3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるV1記載のシステム。

【0683】

V4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であるV3記載のシステム。

【0684】

50

V5. 該制御が、該少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達のを速度を増加させ、純度が所望の純度より小さい時に、流体送達のを速度を減少させるV1記載のシステム。

【0685】

V6. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団の純度を決定し、該システムは、さらに、所望の純度を示すための該制御へのオペレーターインプットを含み、ここに該制御は、純度が所望の純度に対応するように、流体送達のを速度を変動させるV1記載のシステム。

【0686】

V7. 該流れが、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成されるV1記載のシステム。

10

【0687】

V8. 該レーザーが第2の粒子組のみを除去するV7記載のシステム。

【0688】

V9. 該制御が該少なくとも1つの集団の純度を、85%以上95%未満にて維持するV8記載のシステム。

【0689】

20

V10. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、該レーザーが、流れ中の第2の粒子組および第3の粒子組を除去するように操作可能であるV7記載のシステム。

【0690】

V11. 制御が、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量より大きい時、流体送達のを速度を増加させ、制御が、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、該許容される量より小さい時、流体送達のを速度を減少させるV10記載のシステム。

【0691】

V12. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量を決定するV10記載のシステムであって、さらに、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量を示すための制御に、オペレーターインプットを含み、ここに制御が、流体送達速度を変動させて、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量を得る該システム。

30

【0692】

W. 仕分け戦略を含む流体スイッチ仕分けの方法

W1. フローサイトメトリーシステムを用いて特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分ける方法であって:

該粒子を含有する流体を送達し;

流体を流れへと形成し、フローサイトメトリーを使用して、該特徴に従って流れにおける粒子を分類し;

40

該分類およびそれによる仕分け戦略に従って、流れにおける粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供し;次いで

仕分け戦略を変更し、または流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動させることを特徴とする該方法。

【0693】

W2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するW1記載の方法。

【0694】

50

W3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるW1記載の方法。

【0695】

W4. さらに、該少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達を増加させ、該純度が所望の純度より小さい時に、流体送達を減少させることを特徴とするW1記載の方法。

【0696】

W5. さらに、該流体を、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成することを特徴とするW1記載の方法。

10

【0697】

W6. さらに、第1および第3の粒子組ではなく、第2の粒子組を除去することを特徴とするW5記載の方法。

【0698】

W7. さらに、該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満にて維持することを特徴とするW6記載の方法。

【0699】

W8. さらに、第1の粒子組ではなく、第2および第3の粒子組を除去することを特徴とするW5記載の方法。

20

【0700】

W9. 該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量より大きいとき、流体送達を増加させ、制御が、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、該許容される量より小さい時、流体送達を減少させるW8記載のシステム。

【0701】

X. 可変流速仕分け戦略を含む流体スイッチ仕分け器

X1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムであって、該粒子を含有する流体を送達するための流体送達システム、それを流れへと形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類する該流体を受け取るためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供する仕分けシステムを含む該システムにおいて、仕分けシステムを制御して、その仕分け戦略を変更するか、あるいは流体送達システムを制御して、流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動させるためのフローサイトメトリー装置から受け取った情報に回答する制御を含むことを特徴とする改良。

30

【0702】

40

X2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するX1記載のシステム。

【0703】

X3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるX1記載のシステム。

【0704】

X4. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であるX3記載のシステム。

【0705】

X5. 該制御が、該少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達を増加させ、純度が所望の純度より小さい時に、流体送達を減少させるX1記載のシステム。

【0706】

50

X6. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団の純度を決定し、該システムは、さらに、所望の純度を示すための該制御へのオペレーター入力を含み、ここに該制御は流体送達の変動させて、所望の純度を得るX1記載のシステム。

【0707】

X7. 該流れが、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成されるX1記載のシステム。

10

【0708】

X8. 該レーザーが第2の粒子組のみを除去するX7記載のシステム。

【0709】

X9. 該制御が該少なくとも1つの集団の純度を、85%以上95%未満にて維持するX8記載のシステム。

【0710】

X10. 特徴Bが生X細胞(~X)以外の指標であり、該レーザーが、流れ中の第2の粒子組および第3の粒子組を除去するように操作可能であるX7記載のシステム。

【0711】

X11. 該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量より大きいとき、流体送達を増加させ、制御が、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、該許容される量より小さい時、流体送達を減少させるX10記載のシステム。

20

【0712】

X12. 制御が、フローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づき、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量を決定するX10記載のシステムであって、さらに、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量を示すための制御に、オペレーター入力を含み、ここに制御が、流体送達速度を変動させて、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量を得る該システム。

30

【0713】

Y. 可変流速およびフィードバックを含む流体スイッチ仕分け方法

Y1. フローサイトメトリーシステムを用いて特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分ける方法であって:

該粒子を含有する流体を送達し;

流体を流れへと形成し、フローサイトメトリーを使用して、該特徴に従って流れにおける粒子を分類し;

該分類に従って、流れ中の選択された粒子を転換することによって、流れ中の粒子を仕分け、それにより、所望の粒子を含有する少なくとも1つの集団を供し;次いで

仕分け戦略を変更し、または流体が、以下の(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1つの集団の純度;および(2)該流れにおける特徴A粒子または特徴B粒子の総量に対する該少なくとも1つの集団における特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1つの関数として送達される速度を変動させることを特徴とする該方法。

40

【0714】

Y2. 粒子が細胞であり、特徴AおよびBが細胞の物理的特徴に関するY1記載の方法。

【0715】

Y3. 該細胞が精子細胞であり、特徴Aが生X精子細胞の指標であるY1記載の方法。

【0716】

Y4. さらに、該少なくとも1つの集団の純度が所望の純度より大きい時に、流体送達を増加させ、該純度が所望の純度より小さい時に、流体送達を減少させることを

50

特徴とするY1記載の方法。

【0717】

Y5. さらに、該流体を、各々が特徴Aを有する1以上の粒子を含む第1の粒子組、各々が特徴Bを有する1以上の粒子を含む第2の粒子組、および各々が、少なくとも1つが特徴Aを有し、少なくとも1つが特徴Bを有する2以上の近接して間隔を設けた粒子を含む第3の粒子組を含めた、連続した組の粒子を含む一連の一般的に次々に続く粒子を含有するように形成することを特徴とするY1記載の方法

【0718】

Y6. さらに、第1および第3の粒子組ではなく、第2の粒子組を除去することを特徴とするY5記載の方法。

10

【0719】

Y7. さらに、該少なくとも1つの集団の純度を85%以上95%未満にて維持することを特徴とするY6記載の方法。

【0720】

Y8. さらに、第1の粒子組ではなく、第2および第3の粒子組を除去することを特徴とするY5記載の方法。

【0721】

Y9. さらに、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が、少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の許容される量より大きい時、流体送達を増加させ、該少なくとも1つの集団中の除去されていない特徴A粒子の量が該許容される量未満である時、流体送達を減少させることを特徴とするY8記載の方法。

20

【0722】

Z.[保留]

【0723】

AA. PMTアウトプットシグナル用のA/D変換器ならびにDSP分析および分類
AA1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは、該粒子含む流体を送達するための流体送達システム、該流体を受容し、それを流れに形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置、および、該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして所望の粒子を含む少なくとも1の集団を提供する仕分けシステムを含み、改良点が：

30

該フローサイトメトリー装置からの時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、および、該時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供するA/D変換器、ここに該時変アナログアウトプットおよび対応するデジタル情報は特徴Aまたは特徴Bを示し；

デジタル情報を分析および分類し、および、分析および分類したデジタル情報の関数として該仕分けシステムに仕分けシグナルを提供するデジタルシグナルプロセッサを含む該フローサイトメトリーシステム。

【0724】

AA1A. 時変アナログアウトプットが一連の波形パルスを含み、その各々が粒子の特徴の表示であって、ここにデジタルシグナルプロセッサが波形パルスに対応するデジタル情報の部分を検出し、および、該検出した部分を分類し、および、デジタルシグナルプロセッサが該検出および分類した部分の関数として該仕分けシグナルを提供するAA1記載のシステム。

40

【0725】

AA1B. さらに、以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるための、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイ

50

トメトリー装置から受容した情報に応答する制御を含む A A 1 記載のシステム。

【 0 7 2 6 】

A A 2 . 粒子が細胞であって、特徴 A および B が細胞の物理学的特徴に関する A A 1 B 記載のシステム。

【 0 7 2 7 】

A A 3 . 粒子が精子細胞であって、特徴 A が生 X 精子細胞を示す A A 1 B 記載のシステム。

【 0 7 2 8 】

A A 4 . 特徴 B が生 X 細胞 (~ X) 以外のものを示す A A 3 記載のシステム。

【 0 7 2 9 】

A A 5 . さらに、該少なくとも 1 の集団の純度を 8 5 % を超えるが 9 5 % 未満に維持することを含む A A 4 記載のシステム。

【 0 7 3 0 】

A A 6 . 制御が該純度が所望の純度よりも大きい場合には流体送達の上昇し、および、該純度が該所望の純度よりも小さい場合には流体送達を下げる A A 1 記載のシステム。

【 0 7 3 1 】

A A 7 . 制御がフローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づいて該少なくとも 1 の集団の純度を決定し、該システムがさらに所望の純度を示すためにオペレータが制御に入力することを含み、および、制御が純度が所望の純度に対応するように流体送達 20 の速度を変化させる A A 1 記載のシステム。

【 0 7 3 2 】

A A 8 . 制御が該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の量が少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の許容し得る量よりも多い場合には流体送達の上昇し、および、制御が該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の量が該許容し得る量よりも小さい場合には流体送達 30 の速度を下げる A A 7 記載のシステム。

【 0 7 3 3 】

A A 9 . 制御がフローサイトメトリー装置からのアウトプットシグナルに基づいて該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の量を決定し、該システムがさらに該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の許容し得る量の特徴 A 粒子を示すために制御に入力するオペレータ 30 を含み、および、制御が該少なくとも 1 の集団中の該許容し得る量を得るために流体送達速度を変化させる A A 8 記載のシステム。

【 0 7 3 4 】

A A 1 0 . 該流れが、各々特徴 A を有する 1 またはそれを超える粒子を含む第 1 の粒子セット、各々特徴 B を有する 1 またはそれを超える粒子を含む第 2 の粒子セット、および、各々 2 またはそれを超える近接して離れた粒子を含む第 3 の粒子セット (そのうちの少なくとも 1 は特徴 A を有し、そのうちの少なくとも 1 は特徴 B を有する) を含む第 3 の粒子セットを含む、連続する一連の粒子を含む直列中で一般に逐次に続く粒子を含むために形成される A A 1 記載のシステム。

【 0 7 3 5 】

A A 1 1 . 該仕分けシステムが、該第 1 の粒子セットが該少なくとも 1 の集団中の収集のために選択され、および、該第 2 および第 3 の粒子セットが該少なくとも 1 の集団中の収集のために選択されない仕分け戦略を使用するのに作動可能である A A 1 0 記載のシステム 40 。

【 0 7 3 6 】

A A 1 2 . 該仕分けシステムが、該第 1 および第 3 の粒子セットが該少なくとも 1 の集団中の収集のために選択され、および、該第 2 の粒子セットが該少なくとも 1 の集団中の収集のために選択されない仕分け戦略を使用するのに作動可能である A A 1 0 記載のシステム 50 。

【 0 7 3 7 】

10

20

30

40

50

AA13. 該仕分けシステムが、液滴仕分けシステムを含むAA1記載のシステム。

【0738】

AA14. 該仕分けシステムが、光損傷仕分けシステムを含むAA1記載のシステム。

【0739】

AA15. 該仕分けシステムが、流体スイッチング仕分けシステムを含むAA1記載のシステム。

【0740】

AA16. 該デジタルプロセッサが、デジタル情報に対応するパルスを検出する命令、検出したパルス中の特徴を抽出する命令、および、その抽出した特徴の関数として検出したパルスを識別する命令を含むAA1記載のシステム。

10

【0741】

AA17. 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴と特徴Bを表わす抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定する命令を含むAA16記載のシステム。

【0742】

AA18. 以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量のうちの少なくとも1の関数として、該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴に関して、および、特徴Bを表わす抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整するAA17記載のシステム。

20

【0743】

AA19. 該デジタルシグナルプロセッサが、連続流れにデジタル情報をアセンブリングするためのデータ管理プロセッサを含むAA1記載のシステム。

【0744】

AA20. 該デジタルシグナルプロセッサが、デジタル情報によって表わされる波形パルスを検出するためのパルス検出プロセッサを含み、および、該デジタルシグナルプロセッサが、検出した波形パルスの関数としてデジタル情報を分類するAA1記載のシステム。

【0745】

30

AA21. さらに、変換器の連続サンプリング速度の2分の1以下の周波数でアナログアウトプットを濾過するためのフィルタを含み、該変換器が濾過したアナログアウトプットに対応するデジタル情報に変換し、および、該デジタルシグナルプロセッサが識別境界の関数としてデジタル情報を分類するAA20記載のシステム。

【0746】

AA22. 連続サンプリング速度が、約105MHzまたはそれよりも高いAA21記載のシステム。

【0747】

AA23. 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴と特徴Bを表わす抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定するための特徴抽出および識別プロセッサを含み、および、特徴抽出および識別プロセッサは該デジタル情報によって表される特徴を抽出し、決定境界の関数として特徴を分類するAA1記載のシステム。

40

【0748】

AA24. 該デジタルシグナルプロセッサが、該仕分けシステムに仕分けシグナルを提供するための分類に応答する仕分けプロセッサを含むAA1記載のシステム。

【0749】

AA25. 該プロセッサが、特徴Aを有するまたは特徴Bを有する分類した粒子の数を計数しない(innumerate)AA1記載のシステム。

【0750】

AA26. 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを有する粒子の集団の変動の係

50

数を実質的にプリセット量以下に低下する関数として、または、特徴 B を有する粒子の集団の変動の係数を実質的にプリセット量以下に最小化する関数として、デジタル情報を分類する A A 1 記載のシステム。

【 0 7 5 1 】

A A 2 7 . プリセット量が約 1 . 5 % 以下である A A 2 6 記載のシステム。

【 0 7 5 2 】

A A 2 7 a . プリセット量が約 1 . 3 % 以下である A A 2 6 記載のシステム。

【 0 7 5 3 】

A A 2 8 . 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴 A を有する粒子の集団および特徴 B を有する粒子の集団が特徴 A を有する粒子の第 1 のモデル集団、特徴 B を有する粒子の第 2 のモデル集団および非整列粒子の第 3 のモデル集団を含む 3 の集団のコンピューターモデルに対応するように、デジタル情報を分類する A A 1 記載のシステム。

10

【 0 7 5 4 】

A A 2 9 . 第 3 のモデル集団が非整列粒子の 2 の集団を含み、該モデルが 2 の集団について集団統計を見積もる A A 2 8 記載のシステム。

【 0 7 5 5 】

A A 3 0 . 該デジタルシグナルプロセッサがデジタル情報によって表される波形パルスを検出するためのパルス検出プロセッサを含み、該デジタルシグナルプロセッサが特徴 A を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてまたは特徴 B を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてデジタル情報を分類する A A 1 記載のシステム。

20

【 0 7 5 6 】

A A 3 0 a . さらに、変換器の連続サンプリング速度の二分の一以下の周波数でアナログアウトプットを濾過するためのフィルタを含み、変換器が濾過したアナログアウトプットを対応するデジタル情報に変換し、および、該デジタルシグナルプロセッサが特徴 A を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてまたは特徴 B を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてデジタル情報を分類する A A 3 0 記載のシステム。

【 0 7 5 7 】

A A 3 0 b . 該デジタルシグナルプロセッサが特徴 A を表す抽出した特徴と特徴 B を表す抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定するための特徴抽出および識別プロセッサを含み、および、特徴抽出および識別プロセッサが該デジタル情報によって表される特徴を抽出し、および、特徴 A を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてまたは特徴 B を有する粒子の集団の変動の係数の関数として特徴を分類する A A 1 記載のシステム。

30

【 0 7 5 8 】

A A 3 1 . 特徴 A を有する粒子および特徴 B を有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためにフローサイトメトリーシステムを用いる方法であって：

該粒子を含む流体を送達し；

流体を流れに形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って流れ中の粒子を検出し；

流れ中の粒子を仕分け戦略に従って仕分けし、それによって、所望の粒子を含む少なくとも 1 の集団を提供し；

40

該フローサイトメトリーからのアナログアウトプットを対応するデジタル情報に変換し、ここにアナログアウトプットが特徴 A または特徴 B を示し；および

デジタル情報を分析および分類し、および、分析および分類したデジタル情報の関数として粒子を仕分けすることを含む該方法。

【 0 7 5 9 】

A A 3 1 . さらに、以下のもの：(1) 特徴 A 粒子または特徴 B 粒子のいずれかに関する該少なくとも 1 の集団の純度；および、(2) 該流れ中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の全量に対する該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の量、のうちの少なくとも 1 の関数として、仕分け戦略を変化しまたは流体が送達される速度を変化させる

50

ことを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 6 0 】

A A 3 2 . 粒子が細胞であって、特徴 A および B が細胞の物理学的特徴に関する A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 6 1 】

A A 3 3 . 該粒子が精子細胞であって、特徴 A が生 X 精子細胞を示す A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 6 2 】

A A 3 4 . 特徴 B が生 X 細胞 (~ X) 以外を示す A A 3 3 記載の方法。

【 0 7 6 3 】

A A 3 5 . さらに、該純度を 8 5 % を超えるが 9 5 % 未満に維持する A A 3 3 記載の方法。

【 0 7 6 4 】

A A 3 6 . さらに、該純度が所望の純度よりも大きい場合に流体送達の上昇し、および、該純度が所望の純度よりも小さい場合に流体送達を下げることを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 6 5 】

A A 3 7 . さらに、該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の量が少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の許容し得る量よりも大きい場合に流体送達の上昇し、該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子の量が該許容し得る量よりも少ない場合に流体送達を下げることを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 6 6 】

A A 3 8 . さらに、各々特徴 A を有する 1 またはそれを超える粒子を含む第 1 の粒子セット、各々特徴 B を有する 1 またはそれを超える粒子を含む第 2 の粒子セット、および各々 2 またはそれを超える近接して離れた粒子を含み、その少なくとも 1 が特徴 A を有し、その少なくとも 1 が特徴 B を有する第 3 の粒子セットを含む、粒子の連続するセットを含む直列において一般的に逐次に該粒子を含むように流れを形成することを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 6 7 】

A A 3 9 . さらに、該少なくとも 1 の集団中の収集のために第 1 の粒子セットのみを選択する仕分け戦略に従って該粒子を仕分けすることを含む A A 3 8 記載の方法。

【 0 7 6 8 】

A A 4 0 . さらに、該少なくとも 1 の集団中の収集のために第 1 および第 3 の粒子セットを選択する仕分け戦略に従って該粒子を仕分けすることを含む A A 3 8 記載の方法。

【 0 7 6 9 】

A A 4 1 . 該仕分けが、液滴仕分けプロセスを用いることを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 7 0 】

A A 4 2 . 該仕分けが、光損傷仕分けプロセスを用いることを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 7 1 】

A A 4 3 . 該仕分けが、流体スイッチング仕分けプロセスを用いることを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 7 2 】

A A 4 4 . さらに、デジタル情報により表される波形パルスを検出し、デジタル情報から波形パルスの特徴を抽出し、ついで、それらの抽出した特徴の関数として検出した波形パルスを識別することを含む A A 3 1 記載の方法。

【 0 7 7 3 】

A A 4 5 . さらに、特徴 A を表す抽出した特徴と特徴 B を表す抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定することを含む A A 4 4 記載の方法。

【 0 7 7 4 】

10

20

30

40

50

AA46. さらに、以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して該少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、特徴Aを表す抽出した特徴に関しておよび特徴Bを表す抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整することを含むAA45記載の方法。

【0775】

AA47. 該変換がアナログアウトプットを同期してサンプリングすることを含むAA31記載の方法。

【0776】

AA48. デジタル情報を分類することが、特徴Aを有する粒子の集団の変動の係数を実質的にプリセット量以下に最小限化する関数として、または、特徴Bを有する粒子の集団の変動の係数を実質的にプリセット量以下に最小限化する関数として、デジタル情報を分類することを含むAA31記載の方法。

10

【0777】

AA49. プリセット量が約1.5%以下であるAA48記載の方法。

【0778】

AA50. デジタル情報を分類することが、特徴Aを有する粒子の集団および特徴Bを有する粒子の集団が特徴Aを有する粒子の第1モデル集団、特徴Bを有する粒子の第2モデル集団、および、非整列粒子の第3のモデル集団を含む3の集団のコンピューターモデルに対応するようにデジタル情報を分類することを含み、該モデルが第1、第2および第3のモデル集団に対して集団統計を概算するAA31記載の方法。

20

【0779】

AA51. デジタル情報を分類することが、特徴Aを有する粒子の集団の変動の係数の関数としてまたは特徴Bを有する粒子の集団の変動の係数の関数として、デジタル情報を分類することを含むAA31記載の方法。

【0780】

BB. 初期検出パラメーターの決定

BB1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは、該粒子を含む流体を送達するための流体送達システム、該流体を受容し、それを流れに形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置、および、該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして所望の粒子を含む少なくとも1の集団を提供する仕分けシステムを含み、改良点が：

30

該フローサイトメトリー装置からの時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、該時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供し、ここに該時変アナログアウトプットおよび対応するデジタル情報が特徴Aまたは特徴Bを示すA/D変換器；

該デジタル情報から該時変アナログアウトプットのバックグラウンド特徴を決定するデジタルシグナルプロセッサー；

該決定したバックグラウンド特徴の関数として該デジタル情報によって表される波形パルスを検出すること；および

40

検出した波形パルスの関数として該仕分けシステムに仕分けシグナルを提供すること、を含む該フローサイトメトリーシステム。

【0781】

BB2. 該デジタルシグナルプロセッサーが、バックグラウンド特徴を規定するためのパルス検出閾値を決定する反復手順を用いるBB1記載のシステムであって、該反復手順が：

デジタル情報からのバックグラウンド統計概算値を計算し；

特徴Aまたは特徴Bを示すパルスを同定するために、計算した概算値を用いてパルス検出論理を該デジタル情報にあてはめ；

50

同定したパルスに対応するデジタル情報を用いることなく概算値を再計算し；ついでバックグラウンド統計概算値収束または反復の固定最大数が生じるまで前記手順を反復する

ことを含む該システム。

【 0 7 8 2 】

B B 3 . 該デジタルシグナルプロセッサがデジタル情報によって表される波形パルスを検出する命令、検出したパルス中の特徴を抽出する命令、およびその抽出した特徴の関数として検出したパルスを識別する命令を含む B B 1 記載のシステム。

【 0 7 8 3 】

B B 4 . 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴 A を表わす抽出した特徴と特徴 B を表わす抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定する命令を含む B B 3 記載のシステム。

【 0 7 8 4 】

B B 5 . 以下のもの：(1) 特徴 A 粒子または特徴 B 粒子のいずれかに関する該少なくとも 1 の集団の純度；および(2) 該流れ中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の全量に対する該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の量、のうちの少なくとも 1 の関数として、該デジタルシグナルプロセッサが、特徴 A を表わす抽出した特徴に関して、および、特徴 B を表わす抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整する B B 4 記載のシステム。

【 0 7 8 5 】

B B 6 . さらに、以下のもの：(1) 特徴 A 粒子または特徴 B 粒子のいずれかに関して少なくとも 1 の集団の純度；および、(2) 該流れ中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の全量に対する該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の量、のうちの少なくとも 1 の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるか、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイトメトリー装置から受容した情報に応答する制御を含む B B 1 記載のシステム。

【 0 7 8 6 】

B B 7 . 該デジタルシグナルプロセッサがデジタル情報によって表わされる波形パルスを検出するためのパルス検出プロセッサを含み、および、該デジタルシグナルプロセッサが検出した波形パルスの関数としてデジタル情報を分類する B 1 記載のシステム。

【 0 7 8 7 】

B B 8 . さらに、変換器のサンプリング速度の 1 / 2 以下の周波数でアナログアウトプットを濾過するフィルタを含み、および、変換器が濾過したアナログアウトプットに対応するデジタル情報に変換する B B 7 記載のシステム。

【 0 7 8 8 】

C C . 初期識別パラメーターの生成

C C 1 . 特徴 A を有する粒子および特徴 B を有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは、該粒子を含む流体を送達するための流体送達システム、該流体を受容し、それを流れに形成し、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置、および、該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして所望の粒子を含む少なくとも 1 の集団を提供する仕分けシステムを含み、改良点が：

該フローサイトメトリー装置からの時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、該時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供し、ここに該時変アナログアウトプットおよび対応するデジタル情報が特徴 A または特徴 B を示す A / D 変換器；および

デジタル情報から初期識別パラメーターを生成し、初期識別パラメーターの関数としてデジタル情報を識別し、および、識別したデジタル情報の関数として該仕分けシステムに仕分けシグナルを提供するデジタルシグナルプロセッサを含む該フローサイトメトリーシステム。

10

20

30

40

50

【 0 7 8 9 】

CC2 . デジタルシグナルプロセッサが、以下のアルゴリズム：k - M e a a n s、F u z z y k - M e a n s および凝縮型階層、のうちの少なくとも1を用いて初期識別パラメータを生成するCC1記載のシステム。

【 0 7 9 0 】

CC3 . 該デジタルシグナルプロセッサが、デジタル情報によって表される波形パルスを検出する命令、検出した波形パルス中の特徴を抽出する命令、および、その抽出した特徴の関数として検出した波形パルスを識別する命令を含むCC1記載のシステム。

【 0 7 9 1 】

CC4 . 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴と特徴Bを表わす抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定する命令を含むCC3記載のシステム。

10

【 0 7 9 2 】

CC5 . 以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴に関して、および、特徴Bを表わす抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整するCC4記載のシステム。

【 0 7 9 3 】

20

CC6 . さらに、以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して該少なくとも1の集団の純度、および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるか、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイトメトリー装置から受容した情報に应答する制御を含むCC1記載のシステム。

【 0 7 9 4 】

DD . 分類するための波形パルスの同調サンプリング

DD1 . 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは：

30

該粒子を含む流体を送達するための流体送達システム、および、該流体を受容し、それを流れに形成し、および、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置；

該フローサイトメトリー装置からの一連の波形パルスを含む該時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、および、該波形パルスに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供するA/D変換器、ここに該波形パルスおよび対応するデジタル情報は特徴Aまたは特徴Bを示し；および

デジタル情報を分析し、それに対応する分析したデジタル情報の関数として粒子を分類するデジタルシグナルプロセッサ

を含む該フローサイトメトリーシステム。

40

【 0 7 9 5 】

DD2 . 該デジタルプロセッサが波形パルスを規定するために検出閾値を用い、および、該検出閾値がバックグラウンド平均概算値および最新のパルスで終了する試料の動くウィンドウ内で計算したデジタル情報の標準偏差の関数であるDD1記載のシステム。

【 0 7 9 6 】

DD3 . 該デジタル制御が統計変則検出分析を用い、および、デジタル情報のバックグラウンド特徴からのデジタル情報統計変則をデジタルパルスの部分と考えるDD1記載のシステム。

【 0 7 9 7 】

DD4 . 該デジタルシグナルプロセッサが、デジタル情報に対応するパルスを検出す

50

る命令、検出したパルス中の特徴を抽出する命令、およびそれらの抽出した特徴の関数として検出したパルスを識別する命令を含む D D 1 記載のシステム。

【 0 7 9 8 】

D D 5 . 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴 A を表す抽出した特徴と特徴 B を表す抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定する命令を含む D D 4 記載のシステム。

【 0 7 9 9 】

D D 6 . 以下のもの：(1) 特徴 A 粒子または特徴 B 粒子のいずれかに関して少なくとも 1 の集団の純度；および(2) 該流れ中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の全量に対する少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の量、のうちの少なくとも 1 の関数として、該デジタルシグナルプロセッサが、特徴 A を表す抽出した特徴に関しておよび特徴 B を表す抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整する D D 5 記載のシステム。

10

【 0 8 0 0 】

D D 7 . さらに、変換器のサンプリング速度の 2 分の 1 以下の周波数でアナログアウトプットを濾過するためのフィルタを含み、該変換器が濾過したアナログアウトプットを対応するデジタル情報に変換する D D 1 記載のシステム。

【 0 8 0 1 】

D D 8 . さらに、以下のもの：(1) 特徴 A 粒子または特徴 B 粒子のいずれかに関して少なくとも 1 の集団の純度；および、(2) 該流れ中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の全量に対する少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の量、のうちの少なくとも 1 の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるか、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイトメトリー装置から受容した情報に回答する制御を含む D D 1 記載のシステム。

20

【 0 8 0 2 】

D D 9 . プロセッサが、特徴 A を有するかまたは特徴 B を有する分類した粒子の数を計数しない D D 1 記載のシステム。

【 0 8 0 3 】

D D 1 0 . さらに、粒子を照らして対応する波形パルスを生成するための同期サンプリングと同期したパルス化照明装置を含む D D 1 記載のシステム。

【 0 8 0 4 】

D D 1 1 . 該デジタルプロセッサが、デジタル情報によって表される波形パルスを検出するためのパルス検出プロセッサを含み、ここに該デジタルシグナルプロセッサが特徴 A を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてまたは特徴 B を有する粒子の集団の変動の係数の関数としてデジタル情報を分類する D D 1 0 記載のシステム。

30

【 0 8 0 5 】

E E . 特徴抽出

E E 1 . 特徴 A を有する粒子および特徴 B を有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは、該粒子を含む流体を送達するための流体送達システム、該流体を受容し、それを流れに形成し、および、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして所望の粒子を含む少なくとも 1 の集団を提供する仕分けシステムを含み、改良点が；

40

該フローサイトメトリー装置からの時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、および、該時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供し、ここに該時変アナログアウトプットおよび対応するデジタル情報が特徴 A および特徴 B を示す A / D 変換器；

デジタル情報から特徴を抽出し、抽出した特徴の関数として該仕分けシステムに仕分けシグナルを提供するデジタルシグナルプロセッサを含む該フローサイトメトリーシステム。

【 0 8 0 6 】

50

EE2. 抽出した特徴が、1またはそれを超える以下の特徴：パルス面積、パルスピーク、パルス内側面積、パルス幅、パルスガウシアンティーン、パルス遅延ピークまたはパルス傾斜に対応するEE1記載の装置。

【0807】

EE3. 抽出した特徴が、パルスの誘導体の近似化またはパルスの平均ピーク高に対するパルスの点におけるパルスの傾斜を含むEE2記載の装置。

【0808】

EE4. 該パルスに沿った点が、特徴Aを有する粒子によって生成されたパルスの第1の誘導体と特徴Bを有する粒子によって生成されたパルスの第1の誘導体との間に差異が存在する点に対応するEE3記載の装置。

10

【0809】

EE5. 時変アナログアウトプットが、粒子からの蛍光放射パルスに対応し、および、該パルスに沿った点が特徴Aを有する粒子によって生成されたパルスの第1の誘導体および特徴Bを有する粒子によって生成されたパルスの第1の誘導体との間の差異が最大またはほぼ最大になる点に対応するEE3記載の装置。

【0810】

EE6. 時変アナログアウトプットが粒子からの蛍光放射パルスに対応し、および、該パルスに沿った点が蛍光放射パルスのピーク高の関数であるEE3記載の装置。

【0811】

EE7. 該デジタルシグナルプロセッサが、デジタル情報によって表わされる波形パルスを検出する命令、検出した波形パルス中の特徴を抽出する命令、およびその抽出した特徴の関数として検出した波形パルスを識別する命令を含むEE1記載の装置。

20

【0812】

EE8. 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴と特徴Bを表わす抽出した特徴との間を識別する決定境界を規定する命令を含むEE7の装置。

【0813】

EE9. 以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して該少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表す抽出した特徴に関しておよび特徴Bを表す抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整するEE8記載の装置。

30

【0814】

EE10. さらに、以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する該少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるか、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイトメトリー装置から受容した情報に応答する制御を含むEE1記載の装置。

【0815】

EE11. 該デジタルプロセッサが、デジタル情報によって表される波形パルスを検出し、および、検出した波形パルスを分類するためのパルス検出プロセッサを含むEE1記載の装置。

40

【0816】

EE12. さらに、変換器のサンプリング速度の二分の一以下の周波数でアナログアウトプットを濾過するためのフィルタを含み、変換器が濾過したアナログアウトプットに対応するデジタル情報に変換するEE11記載の装置。

【0817】

FF. 波形パルスの識別

FF1. 特徴Aを有する粒子および特徴Bを有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けす

50

るためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは、
該粒子を含む流体を送達するための流体送達システム、該流体を受容し、それを流れに形成し、および、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置、および該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして所望の粒子を含む少なくとも1の集団を提供する仕分けシステムを含み、改良点が：

該フローサイトメトリー装置からの波形パルスを含む時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、および、該波形パルスに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供し、ここに該波形パルスおよび対応するデジタル情報が特徴Aおよび特徴Bを示すA/D変換器；

特徴Aを示すものまたは特徴Bを示すものとしてデジタル情報を識別し、および、識別したデジタル情報の関数として該仕分けシステムに仕分けシグナルを提供するデジタルシグナルプロセッサ
を含む該フローサイトメトリーシステム。

【0818】

FF2. 該デジタルシグナルプロセッサが、デジタル情報によって表わされる波形パルスを検出する命令、検出した波形パルス中の特徴を抽出する命令、およびそれらの抽出した特徴の関数として検出した波形パルスを識別する命令を含むFF1記載の装置。

【0819】

FF3. 該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴と特徴Bを表わす抽出された特徴との間を識別する決定境界を規定する命令を含むFF2の装置。

【0820】

FF4. 以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関する少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、該デジタルシグナルプロセッサが、特徴Aを表わす抽出した特徴に関して、および、特徴Bを表わす抽出した特徴に関して決定境界の相対的位置を調整するFF3記載の装置。

【0821】

FF5. 該デジタルシグナルプロセッサがデジタル情報に対応する波形パルスを検出するパルス検出プロセッサを含み、および、該デジタルシグナルプロセッサが検出した波形パルスの関数としてデジタル情報を分類するFF1記載の装置。

【0822】

FF6. さらに、変換器のサンプリング速度の2分の1以下の周波数でアナログアウトプットを濾過するためのフィルタを含み、該変換器が濾過したアナログアウトプットを対応するデジタル情報に変換するFF5記載の装置。

【0823】

FF7. さらに、以下のもの：(1)特徴A粒子または特徴B粒子のいずれかに関して該少なくとも1の集団の純度；および(2)該流れ中の特徴A粒子または特徴B粒子の全量に対する該少なくとも1の集団中の特徴A粒子または特徴B粒子の量、のうちの少なくとも1の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるか、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイトメトリー装置から受容した情報に回答する制御を含むFF1記載の装置。

【0824】

FF8. さらに、粒子を照らして対応する波形パルスを生成するための同期サンプリングと同期したパルス化照明装置を含むFF1記載の装置。

【0825】

FF9. 該デジタルシグナルプロセッサが、デジタル情報によって表される波形パルスを検出するためのパルス検出プロセッサを含み、該デジタルシグナルプロセッサが特徴Aを有する粒子の集団の変動の係数の関数としてまたは特徴Bを有する粒子の集団の変動の係数の関数としてデジタル情報を分類するFF8記載の装置。

10

20

30

40

50

【 0 8 2 6 】

G G . L E Dアレイブレイクオフセンサー

G G 1 . ブレイクオフ (break-off) 位置で液滴に破碎される流体の連続流れと用いる装置であって：

流れを照らすための流れの 1 の側に位置する光源；

流れに対して実質的に平行な軸に沿って方向付けられるように適合された流れの他の側に位置する線形フォトアレイ、ここに該フォトアレイは流れを通過する光源からの光を検出するように適合され、および、該フォトアレイは検出した光に対応するアウトプットシグナルを提供するように適合され；

アウトプットシグナルを受容し、ブレイクオフ位置の位置に対応する位置シグナルを提供する制御を含む該装置。

10

【 0 8 2 7 】

G G 2 . さらに、ブレイクオフ位置の位置を示す表示を提供するためのディスプレイを含む G G 1 記載の装置。

【 0 8 2 8 】

G G 3 . さらに、ブレイクオフ位置の位置を変化させるため流れに力を加えるトランスデューサーを含み、該トランスデューサーはインプットシグナルの関数として力の大きさを変化し、ディテクターからの位置シグナルをインプットシグナルとしてトランスデューサーに提供する G G 1 記載の装置。

20

【 0 8 2 9 】

G G 4 . さらに、ブレイクオフ位置の位置の関数として、流れに加える力の大きさの変化を特定するためのルックアップ表を含む G G 3 記載の装置。

【 0 8 3 0 】

H H . フローサイトメトリーブレイクオフセンサー

H H 1 . 特徴 A を有する粒子および特徴 B を有する粒子を含む粒子の混合物を仕分けするためのフローサイトメトリーシステムにおいて、該システムは、

該粒子を含む流体を送達するための流体送達システム、該流体を受容し、それを流れに形成し、および、フローサイトメトリーを用いて該特徴に従って粒子を分類するためのフローサイトメトリー装置、および、該分類に従っておよび仕分け戦略に従って粒子を仕分けして所望の粒子を含む少なくとも 1 の集団を提供する仕分けシステムを含み、改良点が：

30

流れを照らすための流れの 1 の側の第 2 の位置に位置する光源；

流れに対して実質的に平行な軸に沿って方向付けられるように適合された流れの他の側の第 2 の位置に位置する線形フォトアレイ、ここに該フォトアレイは流れを通過する光源からの光を検出するように適合され、および、該フォトアレイは検出した光に対応するアウトプットシグナルを提供するように適合され；

第 2 の位置の位置を示すアウトプットシグナルを受容するための制御、ここに該制御はアウトプットシグナルの関数として該トランスデューサーの作業を変化することを含む該フローサイトメトリーシステム。

40

【 0 8 3 1 】

H H 2 . さらに、以下のもの：(1) 特徴 A 粒子または特徴 B 粒子のいずれかに関する少なくとも 1 の集団の純度；および(2) 該流れ中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の全量に対する該少なくとも 1 の集団中の特徴 A 粒子または特徴 B 粒子の量、のうちの少なくとも 1 の関数として、仕分けシステムを制御してその仕分け戦略を変化させるか、または、流体送達システムを制御して流体が送達される速度を変化させるためのフローサイトメトリー装置から受容した情報に回答する制御を含む H H 1 記載の装置。

【 0 8 3 2 】

H H 3 . さらに、ブレイクオフ位置の位置を示す表示を提供するためのディスプレイを含む H H 1 記載の装置。

【 0 8 3 3 】

50

HH4 . さらに、ブレークオフ位置の位置を変化させるために流れに力を加えるトランスデューサーを含み、該トランスデューサーはインプットシグナルの関数として力の大きさを変化し、ディテクターからの位置シグナルがインプットシグナルとしてトランスデューサーに提供されるHH1記載の装置。

【0834】

HH5 . さらに、ブレークオフ位置の位置の関数として、流れに加える力の大きさの変化を特定するためのルックアップ表を含むHH4記載の装置。

【0835】

II . 落射照明型光学装置を有する液滴ソーター

II1 . 粒子の1またはそれを超える特徴に従って流体流れに含まれる粒子を仕分けする装置であって、該システムは：

10

該粒子を含む流体流れを第1の位置に送達するための、および、第2の位置で流れの液滴への破碎(break into)を引き起こすためのフローサイトメトリー装置、該フローサイトメトリー装置は該特徴に従って粒子を分類するために、および、液滴に含まれる粒子の分類に従って該液滴を仕分けするためにフローサイトメトリーを用いるのに作動可能であり；

該フローサイトメトリー装置はフォーカシングレンズを含む落射照明型光学装置システムを含み、該光学装置システムは該細胞がビームを通過するように、該フォーカシングレンズを通るレーザービームを該第1の位置において流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向けるのに作動可能であり、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じる該装置。

20

【0836】

II2 . 該粒子が細胞であるII1記載の装置。

【0837】

II3 . 該粒子が精子細胞であるII1記載の装置。

【0838】

II4 . 該ビームが該光学システムによって該第1の位置において流体流れ上のスポットとしてフォーカスされ、該スポットが流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れに対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅が当該スポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さい一般的に楕円形を有するII3記載のシステム。

30

【0839】

II5 . 該光学装置システムが、該放射を検出するための該フォーカシングレンズの背後に単一フォトディテクターを含むII3記載の装置。

【0840】

II6 . 該フローサイトメトリー装置が、さらに、該ビームを通過する前に粒子を所望の方向に向ける傾向の力がそれに働くように形成された内部表面を有するノズルを含むII1記載の装置。

【0841】

II7 . 該ノズルが、ノズルの縦方向の軸の周りに回転可能であり、該所望の粒子方向をビーム軸に対して調整するII4記載の装置。

40

【0842】

II8 . 該フローサイトメトリー装置が、流体流れを上方、非垂直方向に向くよう方向付けられたノズルを含むII1記載の装置。

【0843】

II9 . 該ノズルが、非反射、非放射コーティングで被覆された外部表面を有するII1記載の装置。

【0844】

II10 . 該光学装置システムが、該放射を検出するための該フォーカシングレンズの背後に単一フォトディテクターを含むII1記載の装置。

50

【 0 8 4 5 】

II 1 1 . 該フローサイトメトリー装置が、ノズルオリフィスを有するノズル、および、中を通して該流体流れが該第 1 の位置に送達されるオリフィスから伸長するキャピラリー管を含む II 1 記載の装置。

【 0 8 4 6 】

II 1 2 . 該第 1 の位置が該キャピラリー管の内側に存在する II 9 記載の装置。

【 0 8 4 7 】

II 1 3 . 該フローサイトメトリー装置が、複数の流体流れを同時に分析するのに作動可能な複数のフローサイトメトリーユニットを含み、各フローサイトメトリーユニットが該落射照明型光学装置システムを含む II 1 記載のシステム。

10

【 0 8 4 8 】

J J . 落射照明型光学装置を用いて粒子を仕分けする方法

J J 1 . 粒子の 1 またはそれを超える特徴に従って流体流れ中に含まれる粒子を仕分けする方法であって：

該粒子を含む流体流れを第 1 の位置に送達し、第 2 の位置で流れの液滴への破碎を引き起こし；ついで

フローサイトメトリー法を用いて、該特徴に従って粒子を分類し、および、液滴中に含まれる粒子の分類に従って該液滴を仕分けすることを含み、

該フローサイトメトリー法が、該細胞がビームを通過するように、フォーカシングレンズを通るレーザービームを該第 1 の位置において流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向けることを含み、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じることを含む該方法。

20

【 0 8 4 9 】

J J 2 . 該粒子が細胞である J J 1 記載の方法。

【 0 8 5 0 】

J J 3 . 該粒子が精子細胞である J J 1 記載の方法。

【 0 8 5 1 】

J J 4 . 流体流れを送達する工程が、20 ないし 40 p s i の圧力および 30,000 ないし 50,000 精子細胞 / 秒の速度で、50 ないし 70 ミクロンの直径を有するノズルオリフィスを通して該流れを向けることを含む J J 3 記載の方法。

30

【 0 8 5 2 】

J J 5 . さらに、流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅がビームスポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さい一般的に楕円形のスポットとして該流体流れ上に該ビームをフォーカシングすることを含む J J 3 記載の方法。

【 0 8 5 3 】

J J 6 . 該精子細胞の頭部が流れの流れの方向で長さを有する DNA 領域を含み、および、該ビームスポット幅が該 DNA 領域の長さよりも小さい J J 5 記載の方法。

【 0 8 5 4 】

J J 7 . さらに、各々が精子細胞を含む複数の離れた流体流れを生成することを含み、かかる流れの各々について工程 (a) (b) を行う J J 3 記載の方法。

40

【 0 8 5 5 】

J J 8 . さらに、一般的なレーザービームを用いて該流体流れを照らすことを含む J J 7 記載の方法。

【 0 8 5 6 】

J J 9 . さらに、該ビームを通過する前に粒子を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせることを含む J J 1 記載の方法。

【 0 8 5 7 】

J J 1 0 . さらに、該力を働かせるために形成したノズルを通して流体流れを流動させ

50

、および、ノズルの縦方向の軸の周りにノズルを回転させてビーム軸に対する該所望の粒子の方向を調整することを含む「」4記載の方法。

【0858】

「」11. 該フローサイトメトリー法が、さらに、1のみのフォトディテクターを用いて電磁放射の放射を検出することを含む「」1記載の方法。

【0859】

「」. 落射照明型光学装置を有する光損傷ソーター

「」1. 粒子の1またはそれを超える特徴に従って流体流れに含まれる粒子を仕分けする装置であって：

該粒子を含む流体流れを第1の位置に送達し、該特徴に従って粒子を分類し、および、該分類に従って該粒子を所望の粒子を含む少なくとも1の集団に仕分けするためのフローサイトメトリー装置；および

該流れ中の粒子を溶解するためのレーザーを含み、該フローサイトメトリー装置が、フォーカシングレンズを含む落射照明型光学装置システムを含み、該光学装置システムが、該細胞がビームを通過するように、該フォーカシングレンズを通るレーザービームを該第1の位置において流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向けるのに作動可能であり、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じる該装置。

【0860】

「」2. 該粒子が細胞である「」1記載の装置。

【0861】

「」3. 該細胞が精子細胞である「」2記載の装置。

【0862】

「」4. 該フローサイトメトリー装置が、さらに、該ビームを通過する前に粒子を所望の方向に向ける傾向の力がそれに働くように形成された内部表面を有するノズルを含む「」1記載の装置。

【0863】

「」5. 該ノズルがノズルの縦方向の軸の周りに回転可能であり、該所望の粒子方向をビーム軸に対して調整する「」4記載の装置。

【0864】

「」6. 「」1（請求項A A 2ほかのコピー）

【0865】

「」. 落射照明型光学装置および光損傷を用いて粒子を仕分けする方法

「」1. 粒子の1またはそれを超える特徴に従って流体流れ中に含まれる粒子を仕分けする方法であって：

フローサイトメトリー法を用い、該特徴に従って流体流れ中の粒子を分類し、該粒子の分類に従って該粒子を仕分けし；ついで

該流体流れ中の粒子を溶解することを含み、

該フローサイトメトリー法が、該細胞がビームを通過するように、フォーカシングレンズを通るレーザービームを流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向けることを含み、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じる該方法。

【0866】

「」. 落射照明型光学装置を有する精子ソーター

「」1. 染色体DNAの特徴に従って精子細胞を仕分けするためのシステムであって：

該細胞を含む流体流れを第1の位置に送達するための、および、第2の位置で流れの液滴への破碎を引き起こすためのフローサイトメトリー装置、ここに該フローサイトメトリー装置は該DNA特徴に従って細胞を分類するのに、および、液滴中に含まれる細胞の分類に従って該液滴を仕分けするのに作動可能であり、

該フローサイトメトリー装置は、フォーカシングレンズを含む落射照明型光学装置シス

10

20

30

40

50

テムを含み、該光学装置システムは、該細胞がビームを通過するように、該フォーカシングレンズを通るレーザービームを該第 1 の位置において流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向けるのに作動可能であり、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じる該システム。

【 0 8 6 7 】

MM 2 . 該光学装置システムが、さらに、該放射の少なくとも幾つかを検出し、それを該 DNA 特徴を示す電気シグナルに変換するのに作動可能な該フォーカシングレンズの背後の該ビーム軸上のフォトディテクターを含む MM 1 記載のシステム。

【 0 8 6 8 】

MM 3 . 該液滴を、各々が少なくとも 1 の生 X 精子細胞を含む第 1 の液滴および各々が少なくとも 1 の Y 細胞を含む第 2 の液滴に仕分けする MM 1 記載のシステム。

10

【 0 8 6 9 】

MM 4 . 第 1 の液滴の少なくとも幾つかが生 X 細胞および生 Y 細胞を含む MM 3 記載のシステム。

【 0 8 7 0 】

MM 5 . 該フローサイトメトリー装置が、該ビームを通過する前に細胞を所望の方向に向ける傾向の力がそれに働くように形成された内部表面を有するノズルを含む MM 1 記載のシステム。

【 0 8 7 1 】

MM 6 . 該ノズルがノズルの縦方向の軸の周りに回転可能であり、該所望の細胞方向をビーム軸に対して調整する MM 5 記載のシステム。

20

【 0 8 7 2 】

MM 7 . 該ビーム軸が、該第 1 の位置において、流れの縦方向の軸に対して斜めである入射の角度で流体流れを交差する MM 1 記載のシステム。

【 0 8 7 3 】

MM 8 . 該ビームが該第 1 の位置における流体流れ上のスポットとして該光学装置システムによってフォーカスされ、該スポットが流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅が当該ビームスポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さい一般的に楕円形を有する MM 1 記載のシステム。

30

【 0 8 7 4 】

MM 9 . 該精子細胞の頭部が、流れの流れの方向で長さを有する DNA 領域を含み、該ビームスポット幅が該 DNA 領域の長さよりも短い MM 8 記載のシステム。

【 0 8 7 5 】

MM 10 . 該フローサイトメトリー装置が、同時に複数の流体流れを分析するのに作動可能である複数のフローサイトメトリーユニットを含み、各フローサイトメトリーユニットが該落射照明型光学装置システムを含む MM 1 記載のシステム。

【 0 8 7 6 】

MM 11 . 該フローサイトメトリー装置が、流体流れを上方、非垂直方向に向くよう方向付けられたノズルを含む MM 1 記載のシステム。

40

【 0 8 7 7 】

MM 12 . 該光学装置システムが、該放射を検出するための 1 のみのフォトディテクターを含む MM 1 記載のシステム。

【 0 8 7 8 】

MM 13 . さらに、少なくとも 1 の該第 1 の液滴を収集するためのコレクターを含む MM 1 記載のシステム。

【 0 8 7 9 】

MM 14 . 該フローサイトメトリー装置が、ノズルオリフィスを有するノズル、および、該流体流れが通って該第 1 の位置に送達されるオリフィスから伸長するキャピラリー管を含む MM 1 記載のシステム。

50

【 0 8 8 0 】

MM 1 5 . 該第 1 の位置が該キャピラリー管の内側に存在する MM 1 4 記載のシステム。

【 0 8 8 1 】

MM 1 6 . 該光学装置システムが、管を通して流れる流れにビームを伝達するために、該キャピラリー管に光学的に結合されている MM 1 5 記載のシステム。

【 0 8 8 2 】

NN . 落射照明型光学装置を用いて精子を仕分けする方法

NN 1 . 動物精子細胞の染色体 DNA 特性に従って動物精子細胞を仕分けする方法であって：

(a) 該細胞を含む流体流れを第 1 の位置に送達し、および、第 2 の位置において流れを液滴に破碎し；

(b) 該細胞がビームを通過するように、フォーカシングレンズを通るレーザービームを該第 1 の位置において流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向け、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じ；

(c) 該放射の少なくとも幾つかを検出し、および、それを該 DNA 特徴を示す電気シグナルに変換し；

(d) 該電気シグナルを処理し、該 DNA 特性に従って細胞を分類し；ついで

(e) 液滴中に含まれる細胞の分類に従って該液滴を仕分けする

工程を含む該方法。

【 0 8 8 3 】

NN 2 . 該液滴を、各々が少なくとも 1 の生 X 精子細胞を含む第 1 の液滴および各々が少なくとも 1 の Y 細胞を含む第 2 の液滴に仕分けする NN 1 記載の方法。

【 0 8 8 4 】

NN 3 . 該第 1 液滴の少なくとも幾つかが、生 X 細胞および生 Y 細胞を含む NN 2 記載の方法。

【 0 8 8 5 】

NN 4 . 工程 (a) が、20 ないし 40 p s i の圧力および 30,000 ないし 50,000 精子細胞 / 秒の速度で、50 ないし 70 ミクロンの直径を有するノズルオリフィスを通して該流れを向けることを含む NN 1 記載の方法。

【 0 8 8 6 】

NN 5 . さらに、該ビームを通過する前に、細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせることを含む NN 1 記載の方法。

【 0 8 8 7 】

NN 6 . 該精子細胞が広い面および狭い角を有する頭部を有し、および、該所望の方向がビームが該広い面に当たるところのものである NN 5 記載の方法。

【 0 8 8 8 】

NN 7 . 該流体送達工程がノズルを通して該流れを向けることを含み、および、該方法がさらにノズルをノズルの縦方向の軸の周りに回転させて、該所望の細胞方向をビーム軸に対して調整することを含む NN 6 記載の方法。

【 0 8 8 9 】

NN 8 . さらに、該ビームを、流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れに対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅が当該スポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さい一般的に楕円形のスポットとして該流体流れ上にフォーカスすることを含む NN 1 記載の方法。

【 0 8 9 0 】

NN 9 . 該精子細胞の頭部が流れの流れの方向で長さを有する DNA 領域を含み、および、該ビームスポットの幅が該 DNA 領域の長さよりも小さい NN 8 記載の方法。

【 0 8 9 1 】

NN 1 0 . 工程 (d) が少なくとも該第 1 の液滴をそらせることを含む NN 5 記載の方

10

20

30

40

50

法。

【 0 8 9 2 】

NN 1 1 . さらに、長さおよび幅寸法を有する開口を有する空間フィルター (spatial filter) を含む濾過システムを通して該放射のうちの少なくとも幾つかを向けることを含み、該寸法のうちの少なくとも 1 が開口のサイズを変化するのに調整可能である NN 1 記載の方法。

【 0 8 9 3 】

NN 1 2 . さらに、該流体流れを上方、非垂直の軌跡に沿って向けることを含む NN 1 記載の方法。

【 0 8 9 4 】

NN 1 3 . さらに、各々が精子細胞を含む複数の離れた流体流れを生成することを含み、各々のかかる流れに対して工程 (a)、(b)、(c) および (d) を行う NN 1 記載の方法。

【 0 8 9 5 】

NN 1 3 A . さらに、一般のレーザービームを用いて該流体流れを照らすことを含む NN 1 3 記載の方法。

【 0 8 9 6 】

NN 1 4 . 該流体流れが、流体の一般の供給からの流体を含む NN 1 3 記載の方法。

【 0 8 9 7 】

NN 1 5 . 該流体流れをキャピラリー管を通して該第 1 の位置に送達する NN 1 記載の方法。

【 0 8 9 8 】

OO . 落射照明型光学装置を有する精子アナライザー

OO 1 . 染色体 DNA 特徴によって動物精子細胞を分類するための装置であって：

精子細胞を含む流体流れを第 1 の位置に送達するための、および、流れが該第 1 の位置に達する前に精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせるためのノズルシステム；

該細胞がビームを通過するように、0°以外の入射の角度で該第 1 の位置において該流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に電磁的放射のビームを向け、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射的の放射を後方方向に生じるための落射照明型光学装置システム；

該放射のうちの少なくとも幾つかを検出し、および、それを該 DNA 特徴を示す電気シグナルに変換するのに作動可能なフォトディテクター；および

該電気シグナルを処理し、および、該 DNA 特徴に従って細胞を分類するためのプロセッサー

を含む該装置。

【 0 8 9 9 】

OO 2 . 該ノズルシステムが液滴細胞仕分けシステムの一部である OO 1 記載の装置。

【 0 9 0 0 】

OO 3 . 該ノズルシステムが光損傷細胞仕分けシステムの一部である OO 1 記載の装置。

【 0 9 0 1 】

OO 4 . 該ノズルシステムが流体スイッチング細胞仕分けシステムの一部である OO 1 記載の装置。

【 0 9 0 2 】

OO 5 . 該光学装置システムが、さらに、該放射のうちの少なくとも幾つかを検出し、および、それを該 DNA 特徴を示す電気シグナルに変換するのに作動可能な該フォーカシングレンズの背後の該ビーム軸上のフォトディテクターを含む OO 1 記載の装置。

【 0 9 0 3 】

10

20

30

40

50

〇〇 6 . 該フローサイトメトリー装置が、該ビームを通過する前に細胞を所望の方向に向ける傾向の力がそれに働くように形成された内部表面を有するノズルを含む〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 0 4 】

〇〇 7 . 該ノズルがノズルの縦方向の軸の周りに回転可能であり、該所望の細胞の方向をビーム軸に対して調整する〇〇 6 記載の装置。

【 0 9 0 5 】

〇〇 8 . 該ビーム軸が、該第 1 の位置において、流れの縦方向の軸に対して斜めである入射の角度で流体流れを交差する〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 0 6 】

〇〇 9 . 該ビームが該光学システムによって該第 1 の位置において流体流れ上のスポットとしてフォーカスされ、該スポットが流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅が当該ビームスポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さい一般的に楕円形を有する〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 0 7 】

〇〇 1 0 . 該精子細胞の頭部が流れの流れの方向で長さを有する DNA 領域を含み、該ビームスポットの幅が該 DNA 領域の長さよりも小さい〇〇 9 記載の装置。

【 0 9 0 8 】

〇〇 1 1 . 該フローサイトメトリー装置が、複数の流体流れを平行して同時に分析するのに作動可能な複数のフローサイトメトリーユニットを含み、各フローサイトメトリーユニットが該落射照明型光学装置システムを含む〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 0 9 】

〇〇 1 2 . 該ノズルシステムが、流体流れを上方、非垂直方向に向けるように方向付けられたノズルを含む〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 1 0 】

〇〇 1 3 . 該光学装置システムが、該放射を検出するための 1 のみのフォトディテクターを含む〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 1 1 】

〇〇 1 4 . 該フローサイトメトリー装置が、ノズルオリフィスを有するノズル、および、中を通して該流体流れが該第 1 の位置に送達されるオリフィスから伸長するキャピラリー管を含む〇〇 1 記載の装置。

【 0 9 1 2 】

〇〇 1 5 . 該第 1 の位置が該キャピラリー管の内側に存在する〇〇 1 4 記載の装置。

【 0 9 1 3 】

〇〇 1 6 . 該光学装置システムが、管を通して流れる流れにビームを伝達するために、該キャピラリー管に光学的に結合されている〇〇 1 5 記載の装置。

【 0 9 1 4 】

PP . 落射照明型光学装置を用いて精子を分析する方法

PP 1 . 染色体 DNA 特徴によって動物精子細胞を分類する方法であって：

(a) 精子細胞を含む流体流れを第 1 の位置に送達し、および、流れが該第 1 の位置に達する前に精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせ；

(b) 該細胞がビームを通過するように、 0° 以外の入射の角度で該第 1 の位置において該流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に電磁的放射のビームを向け、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じ；

(c) 該放射の少なくとも幾つかを検出し、および、それを該 DNA 特徴を示す電気シグナルに変換し；ついで

(d) 該電気シグナルを処理し、該 DNA 特徴に従って細胞を分類する工程を含む該方法。

【 0 9 1 5 】

10

20

30

40

50

PP2 . さらに、該DNA特徴に従って該細胞を仕分けすることを含むPP1記載の特徴。

【0916】

PP3 . さらに、光損傷仕分けプロセスを用いて該細胞を仕分けすることを含むPP1記載の方法。

【0917】

PP4 . さらに、流体スイッチング仕分けプロセスを用いて該細胞を仕分けすることを含むPP1記載の方法。

【0918】

PP5 . さらに、液滴仕分けプロセスを用いて該細胞を仕分けすることを含むPP1記載の方法。

【0919】

PP6 . 工程(a)が、20ないし40psiの圧力および30,000ないし50,000精子細胞/秒の速度で、50ないし70ミクロンの直径を有するノズルオリフィスを通して該流れを向けることを含むPP1記載の方法。

【0920】

PP7 . さらに、該ビームを通過する前に精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせることを含むPP1記載の方法。

【0921】

PP8 . 該精子細胞が広い面および狭い角を有する頭部を有し、および、該所望の方向がビームが該広い面に当たるところのものであるPP7記載の方法。

【0922】

PP9 . 該流体送達工程がノズルを通して該流れを向けることを含み、および、該方法がさらにノズルをノズルの縦方向の軸の周りに回転させて、該所望の細胞の方向をビーム軸に対して調整することを含むPP8記載の方法。

【0923】

PP10 . さらに、流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅がビームスポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さい一般的に楕円形のスポットとして該流体流れ上に該ビームをフォーカスすることを含むPP1記載の方法。

【0924】

PP11 . 該精子細胞の頭部が、流れの流れの方向に長さを有するDNA領域を含み、該ビームスポットの幅が該DNA領域の長さよりも小さいPP10記載の方法。

【0925】

PP12 . さらに、長さおよび幅寸法を有する開口を有する空間フィルタを含む濾過システムを通して該放射のうちの少なくとも幾つかを向けることを含み、該寸法のうちの少なくとも1が開口のサイズを変化するのに調整可能であるPP1記載の方法。

【0926】

PP13 . さらに、該流体流れを上方、非垂直の軌跡に沿って向けることを含むPP1記載の方法。

【0927】

PP14 . さらに、各々が精子細胞を含む複数の離れた流体流れを生成することを含み、各々のかかる流れに対して工程(a)、(b)、(c)および(d)を行うPP1記載の方法。

【0928】

PP15 . さらに、一般のレーザービームを用いて該流体流れを照らすことを含むPP14記載の方法。

【0929】

PP16 . 該流体流れが、流体の一般の供給からの流体を含むPP14記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 9 3 0 】

P P 1 7 . 該流体流れをキャピラリー管を通して該第 1 の位置に送達する P P 1 記載の方法。

【 0 9 3 1 】

Q Q . 斜め入射の角度の落射照明型光学装置を有する粒子アナライザー

Q Q 1 . 流体流れに含まれる粒子を分析するための装置であって：

流体流れの長軸に対して斜めである入射の角度で該流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に電磁的放射のビームを向けるための落射照明型光学装置システム；

スポットとして流体流れ上に該電磁的放射のビームをフォーカスするための該ビーム軸路上のフォーカシングレンズを含む該落射照明型システム、ここに該粒子は、該スポットを通過し、後方方向で該ビーム軸に沿って向けた該粒子からの電磁的放射の放射を生じ；
および

該放射のうちの少なくとも幾つかを検出し、および、それを該粒子に関する情報を得るために処理すべき電気シグナルに変換するためのフォーカシングレンズの背後のフォトディテクター

を含む該装置。

【 0 9 3 2 】

Q Q 2 . 該入射の角度が 5 ないし 4 5 ° の範囲内である Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 3 3 】

Q Q 3 . 該入射の角度が 1 5 ないし 3 0 ° の範囲内である Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 3 4 】

Q Q 4 . 該粒子が細胞であって、該情報が細胞の D N A 特徴に関する Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 3 5 】

Q Q 5 . 該粒子が精子細胞であって、該情報が細胞の X / Y 染色体 D N A に関する Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 3 6 】

Q Q 6 . さらに、該流体流れを方向付けるための、および、流れが該ビームを通過する前に精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせるためのノズルシステムを含む Q Q 5 記載の装置。

【 0 9 3 7 】

Q Q 7 . 該ノズルシステムがノズルを含み、該ビームがノズルから 1 . 0 m m 未満の位置で該流体流れに当たる Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 3 8 】

Q Q 8 . さらに、該情報に従って該粒子を仕分けするための液滴細胞仕分けシステムを含む Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 3 9 】

Q Q 9 . さらに、該情報に従って該粒子を仕分けするための光損傷細胞仕分けシステムを含む Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 4 0 】

Q Q 1 0 . さらに、該情報に従って該粒子を仕分けするための流体スイッチング細胞仕分けシステムを含む Q Q 1 記載の装置。

【 0 9 4 1 】

R R . 斜め落射照明型光学装置を用いて粒子を分析する方法

R R 1 . 流体流れ中に含まれる粒子を分析する方法であって：

流体流れの長軸に対して斜めである入射の角度で該流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に電磁的放射のビームを向け；

スポットとして流体流れ上に該電磁的放射のビームをフォーカスし、ここに該粒子は、該スポットを通過し、後方方向で該ビーム軸に沿って向けられた該粒子からの電磁的放射の放射を生じ；

10

20

30

40

50

該放射のうちの少なくとも幾つかを検出し、および、それを該粒子の特徴を示す電気シグナルに変換し；ついで

該電気シグナルを処理して該特徴に関する情報を得ることを含む該方法。

【 0 9 4 2 】

R R 2 . R R 1 (Q Q 2 - ほかに類似した請求項を加える)

【 0 9 4 3 】

S S . 落射照明型光学装置および楕円スポットフォーカスを有する細胞アナライザー

S S 1 . 流体流れ中の細胞の D N A 特徴を分析するための装置で、ここに各細胞は流れの流れの方向に長さを有する D N A 領域を含み；

ビームが該流体流れを交差するようにビーム軸に沿って前方方向で電磁的放射のビームを向けるための落射照明型光学装置システム；

該光学装置システムは、流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有する一般的に楕円スポットとして流体流れ上にビームをフォーカスするための該ビーム軸上のフォーカシングレンズ、ここにビームスポットの幅は該 D N A 領域の長さよりも小さく、該細胞は該スポットを通過して、該 D N A 特徴を示す該 D N A 領域からの放射を含む該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じるように適合されており；

染色体領域からの該放射の少なくとも幾つかを検出し、およびそれを該染色体特徴を示す電気シグナルに変換するためのフォトディテクター；および

該電気シグナルを処理し、該染色体特徴を同定し、および、該染色体特徴に従って精子細胞を分類するためのプロセッサを含む該装置。

【 0 9 4 4 】

S S 1 0 . 該染色体特徴が精子細胞の性別を示す S S 9 記載の装置。

【 0 9 4 5 】

S S 1 1 . 該精子細胞がウシ精子細胞である S S 1 0 記載の装置。

【 0 9 4 6 】

S S 1 2 . 該染色体領域が、核の縦方向の中央のいずれかの端の核の長さの約 2 0 % 以下で伸長する核の領域内に位置する S S 1 0 記載の装置。

【 0 9 4 7 】

S S 1 3 . 該染色体領域が、核の縦方向の中央のいずれかの端の核の長さの約 1 0 ないし 1 5 % 以下で伸長する核の領域内に位置する S S 1 0 記載の装置。

【 0 9 4 8 】

S S 1 4 . さらに、該フォトディテクターから時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、ついで、該時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供する A / D 変換器を含み、ここに該時変アナログアウトプットおよび対応するデジタル情報が該染色体特徴を示し；ここに該プロセッサがデジタル情報を分析および分類するデジタルシグナルプロセッサを含む S S 9 記載の装置。

【 0 9 4 9 】

S S 1 5 . 該スポットの幅が約 3 . 0 μ m 未満である S S 9 記載の装置。

【 0 9 5 0 】

S S 1 6 . 該スポットの長さが約 8 0 μ m である S S 1 5 記載の装置。

【 0 9 5 1 】

S S 1 7 . さらに、流れが該ビームを通過する前に精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせるためのノズルシステムを含む S S 9 記載の装置。

【 0 9 5 2 】

S S 1 8 . さらに、該染色体 D N A 特徴に従って該精子細胞を仕分けするための液滴細胞仕分けシステムを含む S S 9 記載の装置。

10

20

30

40

50

【 0 9 5 3 】

SS19. さらに、該染色体DNA特徴に従って該精子細胞を仕分けするための光損傷精子細胞仕分けシステムを含むSS9記載の装置。

【 0 9 5 4 】

SS20. さらに、該染色体DNA特徴に従って該精子細胞を仕分けするための流体スイッチング精子細胞を含むSS9記載の装置。

【 0 9 5 5 】

TT. 落射照明型光学装置および楕円スポットフォーカスを用いて細胞を分析する方法

TT1. 流体流れ中の細胞のDNA特徴を分析する方法であって、各細胞は流れの流れの方向で長さを有するDNA領域を含み；

ビームが該流体流れを交差するようにビーム軸に沿って前方方向で電磁的放射のビームを向け；

流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有する一般的に楕円スポットとして、流体流れ上に電磁的放射のビームをフォーカスし、ここにビームスポットの幅は該DNA領域の長さよりも小さく、該細胞は該スポットを通過して、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じるように適合されており；

該放射を検出し、および、それを該DNA特徴を示す電気シグナルに変換し；ついで

精子頭部のDNA領域からの放射からの電気シグナルと精子細胞の他の領域からの放射からの電気シグナルとの間を識別することを含んで、該電気シグナルを処理し；ついで該DNA特徴に従って細胞を分類することを含む該方法。

【 0 9 5 6 】

TT2. 該細胞が精子細胞であるTT1記載の方法。

【 0 9 5 7 】

TT3. さらに、流れが該ビームを通過する前に流れ中の細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせることを含むTT1記載の方法。

【 0 9 5 8 】

TT4. さらに、該DNA特徴に従って該細胞を液滴仕分けすることを含むTT1記載の方法。

【 0 9 5 9 】

TT5. さらに、該DNA特徴に従って該粒子を光損傷仕分けすることを含むTT1記載の方法。

【 0 9 6 0 】

TT6. さらに、該DNA特徴に従って該粒子を流体スイッチング仕分けすることを含むTT1記載の方法。

【 0 9 6 1 】

TT7. 流動の方向を有する流体流れ中の動物精子細胞の染色体DNA特徴を分析する方法で、各精子細胞は少なくとも1の染色体を含む局在化染色体領域を含む核を有する頭部を有し、該核は流れの流れの方向の長さを有し；

流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有する一般的に楕円スポットとして流体流れ上に電磁的放射のビームをフォーカスし、ここにビームスポットの幅は該核の長さよりも小さく、該精子細胞は該スポットを通過して、領域の染色体特徴を示す該染色体領域からの放射を含む、精子細胞からの電磁的放射の放射を生じるように適合されており；

染色体領域からの該放射の少なくとも幾つかを検出し、および、それを該染色体特徴を示す電気シグナルに変換し；

該染色体特徴を同定することを含めて、該電気シグナルを処理し；ついで

10

20

30

40

50

該染色体特徴に従って精子細胞を分類することを含む該方法。

【0962】

TT8 . 該染色体特徴が精子細胞の性別を示すTT7記載の方法。

【0963】

TT9 . 該精子細胞がウシ精子細胞であるTT8記載の方法。

【0964】

TT10 . 該染色体領域が、核の縦方向の中央のいずれかの端の核の長さの約20%以下で伸長する核の領域内に位置するTT8記載の方法。

【0965】

TT11 . 該染色体領域が、核の縦方向の中央のいずれかの端の核の長さの約10ないし15%以下で伸長する核の領域内に位置するTT10記載の方法。

【0966】

TT12 . 該電気シグナルが時変アナログアウトプットを含み、および、さらに、時変アナログアウトプットを同期してサンプリングし、ついで、該時変アナログアウトプットに対応するデジタル情報を含むアウトプットを提供することを含み、ここに該時変アナログアウトプットおよび対応するデジタル情報が該染色体特徴を示し；ここに該処理がデジタル情報を分析することを含み；および、該分類が分析したデジタル情報を分類することを含むTT7記載の方法。

【0967】

TT13 . 該スポットの幅が約3.0 μm未満であるTT7記載の方法。

【0968】

TT14 . 該スポットの長さが約180 μmよりも大きいTT13記載の方法。

【0969】

TT15 . さらに、流れが該ビームを通過する前に精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせることを含むTT7記載の方法。

【0970】

TT16 . さらに、該染色体DNA特徴に従って該精子細胞を液滴仕分けすることを含むTT7記載の方法。

【0971】

TT17 . さらに、該染色体DNA特徴に従って該精子細胞を光損傷仕分けすることを含むTT7記載の方法。

【0972】

TT18 . さらに、該染色体DNA特徴に従って精子細胞を流体スイッチング仕分けすることを含むTT7記載の方法。

【0973】

UU . 1のみのフォトディテクターを有する精子ソーター

UU1 . 細胞の染色体DNA特徴に従って精子細胞を分類および仕分けするための装置であって：

該細胞を含む流体流れを第1の位置に送達し、および、第2の位置で流れの液滴への破碎を生じるためのノズルシステム、ここに該ノズルシステムは該第1の位置に達する前に細胞を所望の方向に向ける傾向の力がそれに働くように形成された内部表面を有するノズルを含み；

流れ中の細胞が該ビームを通過して細胞からの電磁的放射の放射を生じるように、電磁的放射のビームを該第1の位置において流体流れを交差するよう向ける光学装置システム；

該放射のうちの少なくとも幾つかを検出し、およびそれを電気シグナルに変換する1のみのフォトディテクター；および

該DNA特徴に従って細胞を分類し、および、液滴中に含まれる細胞の分類に従って該液滴を仕分けするシステム

10

20

30

40

50

を含む該装置。

【0974】

UU2 . 該光学装置システムが落射照明型システムであるUU1記載の装置。

【0975】

VV . 方向付けノズル

VV1 . 染色体含量によって流体流れ中の動物精子細胞を仕分けするフローサイトメトリー装置に使用するノズルであって：

それを通して該流体流れが流動するように適合される内部表面およびオリフィスを有するノズル本体；

該ノズルオリフィスに向かう下流方向で該流体流れのスピードを進行的に加速する第1、第2および第3の軸方向テーパ処理領域 (axially tapered region) を含むノズルの該内部表面を含み、該領域の少なくとも2は精子細胞を所望の方向に向ける傾向の力を該流体流れに加えるための異なる方向に方向付けられた一般的に楕円断面を有する該ノズル。

10

【0976】

VV2 . 該少なくとも2の領域のうちの1の該一般的に楕円断面形が、該少なくとも2の領域のうちの他のものの一般的に楕円断面形に対して約90°で方向付けられているVV1記載のノズル。

【0977】

VV3 . 第1および第2の領域の該一般的に楕円断面形が実質的に同一の方向に方向付けられて第1のねじりゾーンを画定し、第2のねじりゾーンを構成している第3の領域の一般的に楕円断面形が第1および第2の領域の一般的に楕円断面形に対して約90°で方向付けられている粒子を所望の方向に向ける傾向の力をそれに働かせるVV2記載のノズル。

20

【0978】

VV4 . 第1のねじりゾーンが3.0ないし4.5mmの軸長さを有し、第2のねじりゾーンが3.5ないし5.0mmの軸長さを有するVV3記載のノズル。

【0979】

VV5 . 第3の領域が42ないし48°の角度で先細るVV1記載のノズル。

【0980】

VV6 . すべての該領域が一般的に楕円断面形を有するVV1記載のノズル。

30

【0981】

VV7 . 該ノズル本体が、その上に非反射コーティングを有する外部表面を有するVV1記載のノズル。

【0982】

VV8 . さらに、上方軌跡に沿って該流体流れを向けるために上方に尖った位置に該ノズルを載置するためのマウントを含むVV1記載のノズル。

【0983】

VV9 . 該ノズル本体が、該マウント上で本体の縦方向の軸上で回転可能であるVV8記載のノズル。

【0984】

WW . 精子細胞を方向付ける方法

40

WW1 . フローサイトメトリー装置中で動物精子細胞を方向付ける方法であって：

精子細胞を含む流体を流体流れに導入し；

50ないし70ミクロンの範囲の直径を有するノズルオリフィスに向けて下流方向で該流体流れのスピードを加速するための1またはそれを超えるテーパ処理領域を有するノズルを通して、20ないし40psiの範囲の圧力下で該精子細胞を含む流体流れを向けることを含み、ここに該1またはそれを超えるテーパ処理領域が、30,000ないし50,000精子細胞/秒の範囲の速度で通過する際に、細胞を所望の方向に向ける傾向のねじり力を該流体流れに加えるための一般的に楕円断面形を有する該方法。

【0985】

50

WW 2 . 該ノズルが、ノズルオリフィスに向けて該流体流れを進行的に加速するための3またはそれを超えるテーパ処理領域を有するWW 1 記載の方法。

【0986】

WW 3 . 該ノズルが、該3またはそれを超えるテーパ処理領域中のノズルの内部表面によって画定される2のねじりゾーンを有するWW 2 記載の方法。

【0987】

WW 4 . 該ノズルが該オリフィスを通る流動軸を有し、および、該内部ノズル表面の少なくとも幾つかが該軸の回りに互いに対して回転する一般的に楕円形を有するWW 3 記載の方法。

【0988】

WW 5 . さらに、該流れを上方の非垂直軌跡に沿って向けることを含むWW 1 記載の方法。

【0989】

WW 6 . さらに、該流れを向けつつ、ノズル本体の中心縦軸上でノズル本体を回転することを含むWW 1 記載の方法。

【0990】

XX . 上方尖頭 (upward pointing) ノズルを有する粒子ソーター

XX 1 . フローサイトメトリーを用いる粒子を仕分けするための装置であって：

上方、非垂直軌跡に沿ったノズルオリフィスを通して該粒子を含む流体流れを送達するためのノズルシステム；

電磁放射のビームを向けて該第1の位置において該流体流れを交差し、粒子からの電磁的放射の放射を生じる光学装置システム；

該放射の少なくとも幾つかを検出し、および、それを該粒子特徴を示す電気シグナルに変換するのに作動可能なフォトディテクター；

該電気シグナルを処理し、および、該特徴に従って粒子を分類するためのプロセッサー；および

粒子の分類に従って該粒子を仕分けするための仕分けシステムを含む該装置。

【0991】

XX 2 . 該仕分けシステムが液滴仕分けシステムを含むXX 1 記載の装置。

【0992】

XX 3 . 該仕分けシステムが光損傷仕分けシステムを含むXX 1 記載の装置。

【0993】

XX 4 . 該仕分けシステムが流体スイッチング仕分けシステムを含むXX 1 記載の装置。

【0994】

XX 5 . 該ノズルシステムがその上に非反射コーティングを含むXX 1 記載の装置。

【0995】

XX 6 . ノズルオリフィスにおける該上方軌跡が、水平から離れる5ないし85°の範囲の角度においてであるXX 1 記載の装置。

【0996】

XX 7 . ノズルオリフィスにおける該上方軌跡が、水平から離れる15ないし75°の範囲の角度においてであるXX 1 記載の装置。

【0997】

XX 8 . ノズルオリフィスにおける該上方軌跡が、水平から離れる30ないし65°の範囲の角度においてであるXX 1 記載の装置。

【0998】

XX 9 . ノズルオリフィスにおける該上方軌跡が、水平から離れる45ないし60°の範囲の角度においてであるXX 1 記載の装置。

【0999】

10

20

30

40

50

ＹＹ．上方尖頭ノズルを用いて粒子を仕分けする方法

ＹＹ１．フローサイトメトリーを用いて粒子を仕分けする方法であって：

該粒子を含む流体流れを上方、非垂直軌跡に沿ってノズルオリフィスを通して第１の位置に送達し；

電磁的放射のビームを向けて該流体流れを交差して、粒子からの電磁的放射の放射を生じ；

該放射の少なくとも幾つかを検出し、および、それを該粒子特徴を示す電気シグナルに変換し；

該特徴に従って該電気シグナルを処理し、および、粒子を分類し；ついで

粒子の分類に従って該粒子を仕分けする

10

ことを含む該方法。

【１０００】

ＹＹ２．該仕分け工程が、液滴仕分けプロセスを用いることによって仕分けすることを含むＹＹ１記載の方法。

【１００１】

ＹＹ３．該仕分け工程が、光損傷仕分けプロセスを用いることによって仕分けすることを含むＹＹ１記載の方法。

【１００２】

ＹＹ４．該仕分け工程が、流体スイッチング仕分けプロセスを用いることによって仕分けすることを含むＹＹ１記載の方法。

20

【１００３】

ＺＺ．プロセスパラメーター

ＺＺ１．フローサイトメトリーを用いて細胞の混合物から所望の細胞集団を分離する方法であって、該集団は光検出可能な特徴を有し：

該細胞を含む流体の流れを、約２０ないし４０ｐｓｉの圧力および約３０，０００ないし５０，０００細胞／秒の細胞速度で、約５０ないし７０μｍの直径を有するノズルオリフィスを通して向け；

約２０ないし１００ＫＨｚの周波数で流体流れの液滴への破碎を引き起こし；ついで

フローサイトメトリーを用いて液滴を仕分けして該細胞の混合物から該所望の細胞集団を分離する

30

ことを含む該方法。

【１００４】

ＡＡＡ．ビジネス方法

ＡＡＡ１．その中に細胞を有する精子を取り扱うことを含むビジネスを行う方法であって：

精子の供給を得；

プログラム可能な機器を用いて複数の統合フローサイトメトリー作業を行い、ここに該作業が：（ａ）該精子の供給を受容し；（ｂ）該細胞を含む複数の流れを形成し；および（ｃ）該細胞を特徴Ａを有する細胞の第１の集団および特徴Ｂを有する細胞の第２の集団に仕分けし；ついで

40

第１または第２の集団を商業的使用のために分配する

ことを含む該方法。

【１００５】

ＡＡＡ２．該細胞が精子細胞であって、特徴Ａが生Ｘ精子細胞を示すＡＡＡ１記載の方法。

【１００６】

ＡＡＡ３．該精子がウシ精子であって、第１の集団を人工精液注入雌ウシにおける使用のために販売するＡＡＡ２記載の方法。

【１００７】

ＡＡＡ４．該プログラム可能な機器が、該作業を平行して行うのに作動可能であるＡＡ

50

A 3 記載の方法。

【1008】

B B B . ビジネス方法

B B B 1 . その中で細胞を有する精子の試料を取り扱うことを含むビジネスを行う方法であって：

精子の供給を得；

プログラム可能な機器を用いて複数の統合フローサイトメトリー作業を行い、ここに該作業は：(a) 該精子の供給を受容し；ついで(b) 該供給の最初の部分からの該細胞を、特徴Aを有する細胞を含む第1の集団および特徴Bを有する細胞を含む第2の集団を含む異なる集団へ仕分けし；ついで

最初の部分から最初に仕分けした細胞がプリセット標準に合致するかまたはそれを超える場合にのみ、該供給の残りの部分からの該細胞を、特徴Aを有する細胞を含む第1の群および特徴Bを有する細胞を含む第2の群を含む異なる群に仕分けする

ことを含む該方法。

【1009】

B B B 2 . さらに、第1または第2の集団を商業的使用のために分配することを含む B B 1 記載の方法。

【1010】

B B B 3 . プリセット標準が、特徴Aまたは特徴Bを有する細胞の最小回収率または集団のうちの少なくとも1の最低純度である B B B 1 記載の方法。

【1011】

B B B 4 . さらに、該複数の統合フローサイトメトリー作業を平行して行うことを含む B B B 1 記載の方法。

【1012】

C C C . ビジネス方法

C C C 1 . その中で細胞を有する精子の試料を取り扱うことを含むビジネスを行う方法であって：

精子の供給を得；

機器を用いて複数の統合フローサイトメトリー作業を行い、ここに該作業は：(a) 該精子の供給を受容し；ついで(b) 該供給の第1の部分からの該細胞を、特徴Aを有する細胞を含む第1の集団および特徴Bを有する細胞を含む第2の集団を含む異なる集団へ仕分けし、ついで、該供給の第2の部分からの該細胞を、特徴Aを有する細胞を含む第1の集団および特徴Bを有する細胞を含む第2の集団を含む異なる集団へ仕分けし；ついで

第1の部分の集団の1を第2の部分の集団の1と混合して、混合した集団を得ることを含む該方法。

【1013】

C C C 2 . 第1の部分の第1の集団が許容し得ない純度を有し、第2の部分の第1の集団が許容し得る純度を有し、および、混合した集団が許容し得る純度を有する C C C 1 記載の方法。

【1014】

D D D . 液滴干渉仕分けW / 落射照明

D D D 1 . 染色体DNA特徴に従って精子細胞を仕分けするための液滴干渉システムであって：

該細胞を第1の位置に送達し、および、第2の位置で液滴干渉流体流れからの液滴によって当てられるべき第1の流れの選択した流れセグメントを引き起こし、それによって選択したセグメントおよびそれに含まれる細胞を流体流れから分離するためのフローサイトメトリー装置、ここに該フローサイトメトリー装置は該DNA特徴に従って細胞を分類し、および、流れセグメントに含まれる細胞の分類に従って流れセグメントを仕分けするのに作動可能であり、

フォーカシングレンズを含む落射照明型光学装置システムを含む該フローサイトメトリ

10

20

30

40

50

一、ここに該光学装置システムは、該細胞がビームを通過するように、該フォーカシングレンズを通ったレーザービームを該第1の位置において流体流れを交差するビーム軸に沿って前方方向に向けるのに作動可能であり、該ビーム軸に沿って向けられた細胞からの電磁的放射の放射を後方方向に生じるを含む該システム。

【1015】

DDD2. 該光学装置システムが、さらに、該放射のうちの少なくとも幾つかを検出し、および、それを該DNA特徴を示す電気シグナルに変換するのに作動可能な該フォーカシングレンズの背後の該ビーム軸上のフォトディテクターを含むDDD1記載のシステム。

10

【1016】

DDD3. 細胞が精子細胞であって、DNA特徴が精子細胞の性染色体内容物を含むDDD1記載のシステム。

【1017】

DDD4. 該ビームが該第1の位置における流体流れ上のスポットとして該光学装置システムによってフォーカスされ、該スポットが流体流れの流れの方向に対して一般的に右角度で伸長する長軸に沿った長さおよび流体流れの流れの方向に対して一般的に平行に伸長する短軸に沿った幅を有し、該幅が当該ビームスポットを通過する精子細胞の頭部の長さよりも小さいDDD3記載のシステム。

【1018】

DDD5. 該精子細胞の頭部が流れの流れの方向で長さを有するDNA領域を含み、および、該ビームスポットの幅が該DNA領域の長さよりも小さいDDD4記載のシステム。

20

【1019】

DDD6. 該フローサイトメトリー装置が、該ビームを通過する前に粒子を所望の方向に向ける傾向の力がそれに働くように形成された内部表面を有するノズルを含むDDD1記載のシステム。

【1020】

DDD7. 該ノズルがノズルの縦方向の軸の回りに回転可能であり、該所望の細胞方向をビーム軸に対して調整するDDD6記載のシステム。

30

【1021】

DDD8. 該フローサイトメトリー装置が、複数の流体流れを同時に分析するのに作動可能な複数のフローサイトメトリーユニットを含み、各フローサイトメトリーユニットが該落射照明型光学装置システムを含むDDD1記載のシステム。

【1022】

DDD9. 該光学装置システムが、該放射を検出するための1のみのフォトディテクターを含むDDD1記載のシステム。

【1023】

DDD10. 該フローサイトメトリー装置が、ノズルオリフィスを有するノズル、および、通って該流体流れが該第1の位置に送達されるオリフィスから伸長するキャピラリー管を含むDDD1記載のシステム。

40

【1024】

DDD11. 該第1の位置が、該キャピラリー管の内側に存在するDDD10記載のシステム。

【1025】

DDD12. 該光学装置システムが、管を通して流れる流れにビームを伝達するために、該キャピラリー管に光学的に結合されているDDD11記載のシステム。

【1026】

A'. 低温保存

a. (凍結保護物質添加後の冷却)

50

A 1' . ある量の精子細胞に凍結保護物質を添加し ;
 該量の精子細胞および該凍結保護物質を約 0 ~ 8 の範囲の保持温度に冷却し ;
 該精子細胞および該凍結保護物質を実質的に該保持温度にて 60 分間未満の期間維持し ;
 次いで

該量の精子細胞を - 40 の温度に過冷却する
 工程を含む精子細胞を凍結保存する方法。

【 1027 】

A 2' . 該保持温度が、約 2 ~ 6 の範囲にあるクレーム A 1' 記載の方法。

【 1028 】

A 3' . 該保持温度が、約 4 ~ 5 の範囲にあるクレーム A 1' 記載の方法。 10

【 1029 】

A 4' . 凍結保護物質を添加する工程が、グリセロールの添加を含むクレーム A 1' 記載の方法。

【 1030 】

A 5' . 凍結保護物質を添加する工程が、約 6 % のグリセロール (v / v) の添加を含むクレーム A 1' 記載の方法。

【 1031 】

A 6' . 該保持期間が、約 40 分未満であるクレーム A 1' 記載の方法。

【 1032 】

A 7' . 該保持期間が、約 30 分であるクレーム A 1' 記載の方法。 20

【 1033 】

A 8' . 冷却工程が、実質的に一定の冷却速度で該量の精子を冷却することを含むクレーム A 1' 記載の方法。

【 1034 】

A 9' . 該量の精子細胞が、それ未満で精子細胞が低温衝撃からの損傷に付されるガラス転移温度を超える温度から保持温度まで約 90 分間に冷却されるように冷却速度が選択されるクレーム A 8' 記載の方法。

【 1035 】

A 10' . 実質的に一定の冷却速度が、毎分約 0 . 1 ~ 0 . 3 の範囲にあるクレーム A 8' 記載の方法。 30

【 1036 】

A 11' . 実質的に一定の冷却速度が、毎分約 0 . 15 ~ 0 . 25 の範囲にあるクレーム A 8' 記載の方法。

【 1037 】

A 12' . 該保持期間が、約 40 分未満の長さであるクレーム A 11' 記載の方法。

【 1038 】

A 13' . 冷却工程が、プログラムされた速度で精子細胞を冷却するようなプログラム可能な冷凍装置を用いて行なわれるクレーム A 1' 記載の方法。

【 1039 】

A 14' . 該保持期間が 40 分未満の長さであるクレーム A 13' 記載の方法。 40

【 1040 】

A 15' . プログラムされた冷却速度が、毎分約 0 . 2 の一定の冷却速度よりなるクレーム A 14' 記載の方法。

【 1041 】

A 16' . 該量の精子を過冷却する工程が、第 1 の速度にて精子細胞を氷晶形成および浸透圧の変化が精子細胞を損傷する臨界温度ゾーンに接近した温度に冷却し、次いで、該第 1 の冷却速度より速い第 2 の冷却速度にて精子を約 - 30 未満である温度に冷却することを含むクレーム A 1' 記載の方法。

【 1042 】

A 17' . 該第 1 の冷却速度が、毎分約 1 ~ 5 の範囲にあるクレーム A 16' 記載の 50

方法。

【1043】

A18' . 該第1の冷却速度が、毎分約2~4 の範囲にあるクレームA16'記載の方法。

【1044】

A19' . 該第1の冷却速度が毎分約3 であるクレームA16'記載の方法。

【1045】

A20' . 該第2の冷却速度が、毎分約8~12 の範囲にあるクレームA16'記載の方法。

【1046】

A21' . 該第2の冷却速度が、毎分約10 であるクレームA16'記載の方法。

【1047】

A22' . 精子細胞が、該第1の冷却速度で約-15 の温度に冷却されるクレームA16'記載の方法。

【1048】

A23' . 精子細胞が、該第2の冷却速度で約-15 から約-80 の温度に冷却されるクレームA22'記載の方法。

【1049】

A24' . 精子細胞が、該第1の冷却速度で約-18 の温度に冷却されるクレームA16'記載の方法。

【1050】

A25' . 精子細胞が、該第2の冷却速度で約-18 から約-80 の温度に冷却されるクレームA24'記載の方法。

【1051】

A26' . 精子細胞が、プログラム可能な冷凍装置中で該第1および第2の速度にて冷却されるクレームA16'記載の方法。

【1052】

A27' . ある量の精子細胞に凍結保護物質を添加する工程が、シース流体に凍結保護物質を添加し、次いで、精子細胞を分析するフローサイトメーター中の該シース流体を用いることを含むクレームA1'記載の方法。

【1053】

A28' . 該フローサイトメーターを用いて、該精子細胞を所望の特性を有する精子細胞の集団に仕分けし、該量の精子細胞を得る工程をさらに含むクレームA27'記載の方法。

【1054】

A29' . 該量の精子を冷却し、該精子細胞を保持温度に維持し、次いで該量の精子細胞を過冷却する工程のすべてを220分間未満で完了するクレームA1'記載の方法。

【1055】

A30' . 該量の精子を冷却し、該精子細胞を保持温度に維持し、次いで該量の精子細胞を過冷却する工程のすべてを約190分間未満で完了するクレームA1'記載の方法。

【1056】

A31' . 該量の精子を冷却し、該精子細胞を保持温度に維持し、次いで該量の精子細胞を過冷却する工程のすべてを約150分間未満で完了するクレームA1'記載の方法。

【1057】

A32' . 凍結保護物質が該量の精子細胞に添加された後に人工授精ストローに該量の精子細胞を負荷する工程をさらに含むクレームA1'記載の方法。

A33' . フローサイトメーターから 500×10^6 個を超える精子細胞を含む精子細胞の仕分けされた集団を得て、それにより第1の量の精子細胞を含む複数の量の精子細胞を得、人工授精ストローに該複数の量の各精子細胞を負荷し、次いで、バッチ処理にて該複数の量の各精子細胞に冷却、維持および過冷却の工程を行い、凍結保存された精子細胞

10

20

30

40

50

を含む人工授精ストローのバッチを得る工程をさらに含む、該量の精子細胞が該第 1 の量の精子細胞を構成するクレーム A 1 ' 記載の方法。

【 1 0 5 8 】

A 3 4 ' . 精子細胞の該仕分けされた集団が、 800×10^6 個を超える精子細胞を含むクレーム A 3 3 ' 記載の方法。

【 1 0 5 9 】

A 3 5 ' . 該方法の工程が、約 2 4 0 分未満に完了するクレーム A 3 3 ' 記載の方法。

【 1 0 6 0 】

A 3 6 ' . 該方法の工程が、約 2 1 0 分未満に完了するクレーム A 3 3 ' 記載の方法。

【 1 0 6 1 】

A 3 7 ' . 該方法の工程が、約 1 7 0 分未満に完了するクレーム A 3 3 ' 記載の方法。

【 1 0 6 2 】

A 3 8 ' . 冷却工程前に該量の精子細胞を DNA 選択的蛍光色素で染色する工程をさらに含むクレーム A 1 ' 記載の方法。

【 1 0 6 3 】

A 3 9 ' . 該 DNA 選択的色素が、Hoechst 3 3 3 4 2 を含むクレーム A 3 8 ' 記載の方法。

【 1 0 6 4 】

A 4 0 ' . 該量の精子を染色する該工程が、4 0 を超える温度で Hoechst 3 3 3 4 2 を含む溶液中で該量の精子細胞をある期間インキュベートする工程を含むクレーム A 3 9 ' 記載の方法。

【 1 0 6 5 】

b . 冷温度仕分け

A 4 1 ' . ある量の精子細胞を約 0 ~ 8 の範囲の保持温度に冷却し ; 凍結保護物質を該量の精子細胞に添加し ; 次いで該精子細胞および該凍結保護物質を実質的に該保持温度に 6 0 分未満の期間維持する工程を含む精子細胞を凍結保存する方法。

【 1 0 6 6 】

A 4 2 ' . 該期間が、約 3 0 分 ~ 6 0 分未満の範囲にあるクレーム A 4 1 ' 記載の方法。

【 1 0 6 7 】

A 4 3 ' . 凍結保護物質を添加する工程が、グリセロールの添加を含むクレーム A 4 1 ' 記載の方法。

【 1 0 6 8 】

A 4 4 ' . 凍結保護物質を添加する工程が、約 7 % のグリセロール (v / v) の添加を含むクレーム A 4 1 ' 記載の方法。

【 1 0 6 9 】

B ' . バッフルを備えたノズル

B 1 ' . 流体流れ中の粒子を分析するためのフローサイトメトリー装置に用いるノズルであって、該流体流れが、該粒子を含む中核流れを囲むシース流を含み、ノズルが、該流体流れに対して流れ経路を規定する内面、およびノズルからの流体流れの出口用のオリフィスを有するノズル ; ならびに

流体流れが該流れ経路に沿って移動するように、流体流れを偏向させるための該オリフィスから上流の該流れ経路に配置したノズル内のバッフルを含み、ノズルのバッフルおよび内面が、粒子がオリフィスを出るように、所望の配向に粒子を指向するように構成される該ノズル。

【 1 0 7 0 】

B 2 ' . 該バッフルが、該中核流れをノズルの中央の縦軸から離れて、ノズルの該内面に向けて偏向させるように設定されるクレーム B 1 ' 記載のノズル。

【 1 0 7 1 】

10

20

30

40

50

B 3' . 該ノズルが、該バッフルの上流の第 1 の断面フロー領域およびバッフルでの該第 1 の断面フロー領域とは異なる第 2 の断面フロー領域を有するクレーム B 1' 記載のノズル。

【 1 0 7 2 】

B 4' . 第 2 の断面フロー領域が、第 1 の断面フロー領域より小さいクレーム B 3' 記載のノズル。

【 1 0 7 3 】

B 5' . 第 1 および第 2 の断面フロー領域が、異なる形状を有するクレーム B 3' 記載のノズル。

【 1 0 7 4 】

B 6' . 該第 2 の断面フロー領域が、ほぼ半円筒状であるクレーム B 5' 記載のノズル。

【 1 0 7 5 】

B 7' . ノズルの該内面が、ノズルオリフィスに向けて下流方向に流体流れの速度を徐々に加速するための該バッフルから下流の少なくとも 2 つの軸方向のテーパ領域を規定するように成形されたクレーム B 1' 記載のノズル。

【 1 0 7 6 】

B 8' . 該バッフルが、少なくとも 1 つの該少なくとも 2 つの軸方向のテーパ領域を規定するノズルの該内面の一部分の方向に該中核流れを偏向させるように設定されたクレーム B 7' 記載のノズル。

【 1 0 7 7 】

B 9' . 該少なくとも 2 つの軸方向のテーパ領域が、粒子を該所望の配向にする傾向にある該流体流れにねじれ力を適用するための異なった方向に配向されたほぼ楕円の断面形状を有するクレーム B 8' 記載のノズル。

【 1 0 7 8 】

B 10' . 該少なくとも 2 つの領域の一方のほぼ楕円の断面形状が、該少なくとも 2 つの領域の他方のほぼ楕円の断面形状に対し約 90 度で配向されるクレーム B 9' 記載のノズル。

【 1 0 7 9 】

B 11' . 非反射コーティングをその上に持つ外面を有するクレーム B 1' 記載のノズル。

【 1 0 8 0 】

B 12' . 上方軌道に沿って該流体流れを導くための上方に示す位置にて該ノズルを取り付けるためのマウントをさらに含むクレーム B 1' 記載のノズル。

【 1 0 8 1 】

B 13' . ノズルが、ノズルの縦軸について該マウント上で回転可能であるクレーム B 13' 記載のノズル。

【 1 0 8 2 】

B 14' . 該バッフルが、該流体流れを偏向させるためのバッフル部材および該ノズル中の固定位置で該バッフル部材を保持するためのホルダーを含むクレーム B 1' 記載のノズル。

【 1 0 8 3 】

B 15' . 該バッフル部材が、バッフルプレートを含むクレーム B 14' 記載のノズル。

【 1 0 8 4 】

B 16' . 該バッフルプレートが、該流体流れに対してほぼ横軸に伸びる第 1 の脚、および該流体流れの方向にほぼ伸びる第 2 の脚を有するクレーム B 15' 記載のノズル。

【 1 0 8 5 】

B 17' . 該ホルダーが、該バッフルプレートを保持し、該ノズル内に位置したほぼ円筒胴を含むクレーム B 15' 記載のノズル。

10

20

30

40

50

【1086】

B18' . ノズルの該内面が、該バッフルから下流のほぼ楕円の断面の領域を有し、かつバッフル部材の該第1および第2の脚が、該ほぼ楕円の断面の主軸と実質的に平行であるラインに沿って交差するクレームB16'記載のノズル。

【1087】

B19' . ノズルの該内面が、該バッフルから下流のほぼ楕円の断面の領域を有し、かつバッフル部材の該第1および第2の脚が、該ほぼ楕円の断面の主軸と実質的に垂直であるラインに沿って交差するクレームB16'記載のノズル。

【1088】

B20' . バッフルプレートが、ノズルの縦軸にほぼ垂直であるクレームB15'記載のノズル。 10

【1089】

B21' . バッフルプレートが、半円形を有するクレームB20'記載のノズル。

【1090】

B22' . バッフルが、半楕円形を有するクレームB20'記載のノズル。

【1091】

B23' . ノズルの内面が、ショルダーを規定するように成形され、ホルダーが、所望の位置でバッフルプレートを保持するようにそのショルダーに対してバッフルプレートを押すことができるo-リングシールを含むクレームB20'記載のノズル。

【1092】

B24' . バッフルホルダーが、バッフルプレートがノズルの縦軸と交差する位置でバッフルプレートを保持するクレームB20'記載の方法。 20

【1093】

B25' . 該粒子が、精子細胞を含むクレームB1'記載のノズル。

【1094】

C' . バッフルを備えたノズル(方法)

C1' . 該粒子を含む試料流体の中核流れおよび中核流れを囲むシース流体のシース流を、ノズルの上流部分から、ノズルの下流端のオリフィスにほぼ先細になる内面を有するノズルを通して流れさせ;次いで

ノズルを通して流れるように中核流れを偏向させて、中核流れ中の粒子を所望の配向とみなされる傾向を有する流体力学的な力に付すことを特徴とする
フローサイトメトリー装置における粒子を配向させる方法。 30

【1095】

C2' . ノズルが縦軸を有し、中核流れを偏向させる工程が、縦軸から離れて該内面に偏向させることを特徴とするクレームC1'記載の方法。

【1096】

C3' . ノズルが縦軸を有し、中核流れの経路を偏向させる工程が、中核流れを縦軸とほぼ一致する経路から偏向された経路に偏向させ、少なくとも1つの部分の偏向された経路がノズルの縦軸からズレているクレームC1'記載の方法。

【1097】

C4' . さらに縦軸からズレている位置にて中核流れをシース流に導入することを特徴とする、ノズルが縦軸を有するクレームC1'記載の方法。 40

【1098】

C5' . 偏向工程が、バッフルを用いて中核流れを偏向させることを含むクレームC1'記載の方法。

【1099】

C6' . 偏向工程が、バッフルを用いて中核流れを偏向させ、バッフルホルダーを用いてノズル内の位置にバッフルプレートを保持することを含むクレームC1'記載の方法。

【1100】

C7' . バッフルプレートが、ノズルの縦軸と交差するクレームC6'記載の方法。 50

【 1 1 0 1 】

C 8' . ノズルが、粒子を流体力学的に偏向する力に付するための少なくとも1つのねじれゾーンを規定するように成形された内面を有するクレームC 1' 記載の方法。

【 1 1 0 2 】

C 9' . 少なくとも1つのねじれゾーンが、ほぼ楕円の断面を有するノズルのテーパ領域を含むクレームC 8' 記載の方法。

【 1 1 0 3 】

C 10' . 該内面が、複数のねじれゾーンを規定するように成形されたクレームC 8' 記載の方法。

【 1 1 0 4 】

C 11' . 該複数の各ねじれゾーンが、ほぼ楕円の断面を有するノズルのテーパ領域を含むクレームC 10' 記載の方法。

【 1 1 0 5 】

C 12' . 複数のねじれゾーンの第一についてのほぼ楕円の断面が、複数のねじれゾーンの第2についてほぼ楕円の断面の異なる方向に配向されたクレームC 11' 記載の方法。

【 1 1 0 6 】

C 13' . さらに、流体流れを第1の断面フロー領域、次いで、第1の断面フロー領域から下流の第2の断面フロー領域を通して流れさせる工程を含み、第1および第2の断面フロー領域は異なった形状を有する、中核流れを偏向させる工程がバツフルを用いて中核流れを偏向させるクレームC 1' 記載の方法。

【 1 1 0 7 】

C 14' . 第2の断面フロー領域が第1の断面フロー領域より小さいクレームC 15' 記載の方法。

【 1 1 0 8 】

D' . 非対称注射針を備えたノズル(装置)

D 1' . 流体流れ中の粒子を分析するためのフローサイトメーターにおいて用いるノズルシステムであって、該流体流れが、該粒子を含む中核流れを囲むシース流を含み、

縦軸を有するノズル、該流体流れについて流れ経路を規定する内面、およびノズルからの流体流れの流れ経路の出口用の下流端のオリフィス、

該内面が、流体流れがねじれゾーンを通してオリフィスの方向へ流れるように、所望の配向に該粒子を配向させるためのほぼ楕円の断面を有する軸方向のテーパ領域を含む少なくとも1つのねじれゾーンを規定するように成形され；ならびに

粒子源からノズルへの導管、該導管は、該中核流れをノズルの縦軸に関してズレている位置にてノズルに導入するように配置されることを含む該ノズルシステム。

【 1 1 0 9 】

D 2' . 該位置が、少なくとも1つの該ねじれゾーンから上流であるクレームD 1' 記載のノズルシステム。

【 1 1 1 0 】

D 3' . 少なくとも1つの該ねじれゾーンが、第1のねじれを構成し、該ノズルが第2のねじれゾーンをさらに含むクレームD 1' 記載のノズルシステム。

【 1 1 1 1 】

D 4' . 該位置が、第1のねじれゾーンおよび少なくとも一部分の第2のねじれゾーンから上流であるクレームD 3' 記載のノズルシステム。

【 1 1 1 2 】

D 5' . 第2のねじれゾーンは、ほぼ楕円の断面を有するノズルの軸方向のテーパ領域を含むクレームD 3' 記載のノズルシステム。

【 1 1 1 3 】

D 6' . 第1のねじれゾーンのほぼ楕円の断面の主軸が、第2のねじれゾーンのほぼ楕円の断面の主軸とは異なった方向に配向されるクレームD 5' 記載のノズルシステム。

10

20

30

40

50

【 1 1 1 4 】

D 7' . 第 1 のねじれゾーンのほぼ楕円の断面が、第 2 のねじれゾーンのほぼ楕円の断面に関して約 90 度の角度で配向されるクレーム D 6' 記載のノズルシステム。

【 1 1 1 5 】

D 8' . 該位置が、第 1 のねじれゾーンおよび少なくとも一部分の第 2 のねじれゾーンから上流であるクレーム D 7' 記載のノズルシステム。

【 1 1 1 6 】

E' . 非対称試料導入 (方法)

E 1' . シース流体を、縦軸およびほぼ楕円の断面を有するノズルの軸方向のテーパ領域を含む少なくとも 1 つのねじれゾーンを有するノズルを通して流れさせ；次いで

少なくとも 1 つのねじれゾーンを通してシース流体流れおよび中核流体流れについて該縦軸からズレている位置にて該縦軸からシース流体の流れに粒子を含む中核流体流れを導入することを含むフローサイトメーターにおける粒子を配向させる方法。

【 1 1 1 7 】

E 2' . 少なくとも 1 つのねじれゾーンを通った流体流れを引き起こす工程が、中核流体の流れ経路に沿って流れさせ、該流れ経路の一部が、ノズルの縦軸からオフセットされ、次いで該粒子が該オフセット部分の流れ経路に沿って移動する間、該粒子を該ねじれゾーンにより生成された流体力学的な配向力に付することを特徴とするクレーム E 1 記載の方法。

【 1 1 1 8 】

E 3' . 少なくとも 1 つのねじれゾーンが第 1 のねじれゾーンを構成し、さらに、シース流体流れおよび中核流体流れが、粒子を所望の配向に配向されるための第 2 のねじれゾーンを通して流れさせる工程を含む該クレーム E 1 記載の方法。

【 1 1 1 9 】

E 4' . 該第 2 のねじれゾーンが、ほぼ楕円の断面領域を有するノズルにおけるテーパ領域を含むクレーム E 3 記載の方法。

【 1 1 2 0 】

E 5' . 第 1 のねじれゾーンのほぼ楕円の断面領域の主軸が、第 2 のねじれゾーンのほぼ楕円の断面領域の主軸とは異なった方向に配向されたクレーム E 4 記載の方法。

【 1 1 2 1 】

E 6' . 第 1 のねじれゾーンのほぼ楕円の断面領域の主軸が、第 2 のねじれゾーンのほぼ楕円の断面領域の主軸に垂直であるクレーム E 4 記載の方法。

【 1 1 2 2 】

F' . 第 2 の遠心による仕分けされた精子の濃縮

F 1' . 雄性動物から精子細胞を採取し；

1 以上の特定の DNA 特徴に基づき精子細胞の複数の集団の 1 つに精子細胞を仕分けし；

精子細胞の該複数の集団の 1 つから所望の DNA 特徴を有するある量の精子細胞を得、該量の精子細胞は、ある体積の集められた流体に含まれ；

該体積の集められた流体を第 1 の遠心プロセスに付して、精子細胞の第 1 のペレット、および第 1 のペレットを覆う上澄みを形成し；

上澄みから第 1 のペレットを分離し；

上澄みをさらなる遠心に付して、第 1 の遠心後に上澄みに残っていた精子細胞の第 2 のペレットを形成し；次いで

ある体積の再懸濁流体を第 1 および第 2 のペレットに添加して、所望の DNA 特性を有する精子細胞の懸濁液を得、該体積の懸濁流体の量が、懸濁液中の精子細胞の所望の濃度を生じるように選択される工程を含む動物精子細胞の処理方法。

【 1 1 2 3 】

F 2' . 第 1 の遠心プロセスが、550 ~ 800 g の範囲における g - 力を生成するのに十分な速度で遠心することを含むクレーム F 1' 記載の方法。

10

20

30

40

50

【 1 1 2 4 】

F 3' . 第 1 の遠心プロセスが、7 ~ 1 0 分の範囲における期間該速度にて該体積の集めた流体を遠心することを含むクレーム F 2' 記載の方法。

【 1 1 2 5 】

F 4' . 該 1 以上の特定の D N A 特徴が、精子細胞が X または Y 性染色体を含有するかを含むクレーム F 1' 記載の方法。

【 1 1 2 6 】

F 5' . 所望の D N A 特徴を有する多量の精子細胞を得て、商品流通システムを通して動物の飼育者に該多量の精子細胞を流通させるクレーム F 1' 記載の方法。

【 1 1 2 7 】

G' . 低圧力での濾過

G 1 : 雄性動物から精子細胞を採取し ;

精子細胞を仕分けして、所望の特徴を有するある量の精子細胞を得、該量の仕分けされた精子細胞が、その中に第 1 の濃度の精子細胞を有する第 1 の体積の流体中に含まれ ; 次いで

該精子細胞の濃度が、該第 1 の濃度より高い第 2 の濃度に増加される濃縮工程に該精子細胞が付される工程を含み、

ここに、該濃縮工程が、約 2 0 インチ水銀未満の第 1 のフィルターを横切る異なる圧力にて第 1 のフィルターを通して第 1 の体積の流体の少なくとも一部分を流すことを含み、該フィルターがそれを通る該精子細胞の通過を抑制するのに十分小さいフィルター孔を有し、該精子細胞を含む第 2 の体積の未濾過流体を保持することを含む動物精子細胞の処理方法。

【 1 1 2 8 】

G 2' . 該流れの間フィルターを横切る異なる圧力が、実質的に一定であるクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 2 9 】

G 3' . ある期間にフィルターを横切る異なる圧力を断続的に低下させ、次いで、実質的に圧力差を回復する工程をさらに含むクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 3 0 】

G 4' . 圧力差を低下させる工程が、異なる圧力を約 0 に低下させる工程を含むクレーム G 3' 記載の方法。

【 1 1 3 1 】

G 5' . フィルター孔が、約 0 . 2 ~ 1 . 0 ミクロンの範囲のサイズを有するクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 3 2 】

G 6' . 該第 1 の体積の流体の約 8 0 % ~ 9 0 % が該第 1 のフィルターを流れて流れるクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 3 3 】

G 7' . 該第 2 の体積の未濾過流体が、該第 1 のフィルター上の精子細胞の固化 (c a k i n g) を防止するのに十分であるクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 3 4 】

G 8' . 該精子細胞の通過をそれを通して抑制するのに十分に小さなフィルター孔を有する第 2 のフィルターを通して第 2 の体積の未濾過流体の少なくとも一部分を流し、該精子細胞を含む第 3 の体積の未濾過流体を保持し、次いで、再懸濁流体で該第 2 のフィルターを洗い流して、該第 3 の体積に加えるための第 2 のフィルターから精子細胞を取り出して、該第 2 の濃度を達成することをさらに含むクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 3 5 】

G 9' . 第 2 の体積の未濾過流体流れの約 8 0 % が、該第 2 のフィルターを通して流れるクレーム G 8' 記載の方法。

【 1 1 3 6 】

10

20

30

40

50

G 1 0' . 該第 3 の体積の未濾過流体が、該第 2 のフィルター上の精子細胞の固化を防止するのに十分であるクレーム G 8' 記載の方法。

【 1 1 3 7 】

G 1 1' . 該第 2 のフィルターが、約 5 0 ~ 5 0 0 ミクロンの範囲の厚みを有する薄いフィルターであるクレーム G 8' 記載の方法。

【 1 1 3 8 】

G 1 2' . 該第 2 のフィルターが、約 7 5 ~ 2 5 0 ミクロンの範囲の厚みを有する薄いフィルターであるクレーム G 8' 記載の方法。

【 1 1 3 9 】

G 1 3' . 該第 2 のフィルターが、約 1 0 0 ~ 1 5 0 ミクロンの範囲の厚みを有する薄いフィルターであるクレーム G 8' 記載の方法。

10

【 1 1 4 0 】

G 1 4' . 該第 1 のフィルターが、約 5 0 ~ 5 0 0 ミクロンの範囲の厚みを有する薄いフィルターであるクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 4 1 】

G 1 5' . 該第 1 のフィルターが、約 7 5 ~ 2 5 0 ミクロンの範囲の厚みを有する薄いフィルターであるクレーム G 1' 記載の方法。

【 1 1 4 2 】

G 1 6' . 該第 1 のフィルターが、約 1 0 0 ~ 1 5 0 ミクロンの範囲の厚みを有する薄いフィルターであるクレーム G 1' 記載の方法。

20

【 1 1 4 3 】

H' . 全体的な温度調節 (高温染色)

H 1' . 雄性動物から精子細胞を含む精液試料を採取し ;

精子処理施設に精液試料を輸送し ;

精液に初期の品質管理チェックを行い ;

該精子細胞を D N A 選択的蛍光色素に曝露することにより精子細胞中の D N A に選択的に結合する D N A 選択的蛍光色素で該精液試料中の精子細胞を染色して、染色用混合物を形成し、次いで染色用混合物を、少なくとも約 4 0 の温度に付し ;

フローサイトメーターを用いて、特定の D N A 特徴に基づき精子細胞を仕分けし ;

ある体積の流体中に懸濁した所望の D N A 特性を有するある量の精子細胞を得 ;

濃縮工程を行なうことにより該懸濁液中の精子細胞の濃度を調節して、所望の濃度を達成し ; 次いで

30

該量の精子細胞を過冷却する

工程を含む精子細胞の処理方法。

【 1 1 4 4 】

H 2' . 精子細胞が採取された時点から染色工程の開始まで精子細胞の温度を約 2 0 ~ 3 7 の範囲の温度に維持し、次いでその時間の間に温度変動から精子細胞を隔離することをさらに含むクレーム H 1' 記載の方法。

【 1 1 4 5 】

H 3' . 精子細胞を隔離する工程が、処理施設への輸送の間に精液試料を断熱容器中に保つことを含むクレーム H 2' 記載の方法。

40

【 1 1 4 6 】

H 4' . 該フローサイトメーターへ導入される前に、約 1 8 ~ 2 5 の範囲の温度を有する環境下に染色された精子細胞を置き、仕分け工程を始める前の染色工程の間に精子細胞をそれらが得た温度から冷却する工程をさらに含むクレーム H 1' 記載の方法。

【 1 1 4 7 】

H 5' . 過冷却する工程が、精子細胞を 2 0 を超える温度から約 0 ~ 8 の範囲の温度に冷却して、精子細胞の温度が 2 0 未満に冷却される前に、該精子細胞に蛋白質源および凍結保護物質を添加することを含むクレーム H 1' 記載の方法。

【 1 1 4 8 】

50

H 6' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、
 (a) 約 0 ~ 8 の範囲の保持温度に精子細胞を冷却し ; (b) 約 6 0 分未満の期間精子
 を該保持温度に維持して、精子細胞が凍結保護物質と実質的に平衡するのを可能にし ; (c) 第 1 の冷却速度にて精子を氷晶形成および浸透圧における変化が精子細胞を損傷する
 臨界温度ゾーンに接近する温度に冷却し ; 次いで (d) 該第 1 の冷却速度より速い第 2 の
 冷却速度で該臨界温度ゾーンを通して精子細胞を冷却するクレーム H 5' 記載の方法。

【 1 1 4 9 】

H 7' . 該第 1 の冷却速度にて精子細胞を該保持温度から約 - 1 5 に冷却することを
 さらに含むクレーム H 6' 記載の方法。

【 1 1 5 0 】

H 8' . 該第 2 の冷却速度にて精子細胞を約 - 1 8 から少なくとも約 - 3 0 に冷却
 することをさらに含むクレーム H 7' 記載の方法。

【 1 1 5 1 】

H 9' . 該第 1 の冷却速度にて精子細胞を該保持温度から約 - 1 8 に冷却することを
 さらに含むクレーム H 6' 記載の方法。

【 1 1 5 2 】

H 1 0' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、毎分約 0 . 1 ~ 0 . 3 の範囲の冷却
 速度にて精子細胞を該保持温度に冷却することをさらに含むクレーム H 6' 記載の方法。

【 1 1 5 3 】

H 1 1' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、毎分約 1 ~ 5 の該第 1 の速度にて精
 子細胞を該保持温度から約 - 1 5 の温度に冷却することをさらに含むクレーム H 1 0'
 記載の方法。

【 1 1 5 4 】

H 1 2' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、毎分約 8 ~ 1 2 の該第 2 の速度にて
 精子細胞を約 - 1 8 から少なくとも約 - 3 0 の温度に冷却することをさらに含むクレ
 ーム H 6' 記載の方法。

【 1 1 5 5 】

H 1 3' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、毎分約 1 ~ 5 の該第 1 の速度にて精
 子細胞を該保持温度から少なくとも約 - 1 5 の温度に冷却することをさらに含むクレ
 ーム H 1 2' 記載の方法。

【 1 1 5 6 】

H 1 4' . 精子細胞が、約 3 0 分の期間該保持温度に維持されるクレーム H 6' 記載の
 方法。

【 1 1 5 7 】

H 1 5' . 染色用混合物が酸化防止物質をさらに含むクレーム H 1' ~ H 1 4 のいずれ
 か 1 記載の方法。

【 1 1 5 8 】

H 1 6' . 酸化防止物質が、ピルビン酸塩、ビタミン K、リポ酸およびそれらの組合せ
 よりなる群から選択されるクレーム H 1 5' 記載の方法。

【 1 1 5 9 】

H 1 7' . 染色された精子細胞を少なくとも約 3 7 の温度を有する環境下にそれらが
 フローサイトメーターに導入されるまで置くことを含むクレーム H 1' および H 5' ~ H
 1 6' のいずれか 1 記載の方法。

【 1 1 6 0 】

H 1 8' . 染色された精子細胞を少なくとも約 4 0 の温度を有する環境下にそれらが
 フローサイトメーターに導入されるまで置くことを含むクレーム H 1' および H 5' ~ H
 1 6' のいずれか 1 記載の方法。

【 1 1 6 1 】

H 1 9' . ある量の精子細胞を得る工程が、毎秒少なくとも 5 , 0 0 0 個の精子細胞の
 速度で該所望の DNA 特徴を有する生精子細胞の集団を得ること含むクレーム H 1' 記載

10

20

30

40

50

の方法。

【 1 1 6 2 】

H 2 0 ' . 該集団の純度が、少なくとも 8 5 % であるクレーム H 1 9 ' 記載の方法。

【 1 1 6 3 】

J ' . 全体的な温度調節（高温染色なし）

J 1 ' . 雄性動物から精子細胞を含む精液試料を採取し；

精子処理施設に精液試料を輸送し；

精液試料に初期の品質管理チェックを行い；

D N A 選択的蛍光色素で該精液試料中の精子細胞を染色し；

精子細胞をフローサイトメーターで仕分けして、所望の D N A 特徴を有する精子細胞の 10
1 以上の集団を得；

流体中に懸濁された所望の D N A 特徴を有するある量の精子細胞を得；

該量の精子細胞の濃度を調整して、流体懸濁液中の所望の D N A 特徴を有する所望の濃度の精子細胞を得；

該量の精子細胞が、それ未満で精子細胞が低温衝撃からの損害に付されるガラス転移温度より高い温度を有する間に該所望の特徴を有するある量の精子細胞に凍結保護物質を添加し、；

該量の該精子細胞および凍結保護物質を該ガラス転移温度から約 0 ~ 8 の範囲の保持温度に冷却し；

該量の該精子細胞および凍結保護物質を約 0 ~ 8 の温度範囲に 6 0 分未満の期間維持し；次いで 20

該量の精子を - 4 0 未満の温度に過冷却する

工程を含む精子細胞の処理方法。

【 1 1 6 4 】

J 2 ' . 該量の精子細胞が約 2 0 を超える温度を有する間に、該凍結保護物質が添加されるクレーム J 1 ' 記載の方法。

【 1 1 6 5 】

J 3 ' . 染色された精子細胞が、それらがフローサイトメーター中で仕分けされるまで、約 2 0 ~ 2 5 の範囲の温度を有する環境下に置かれるクレーム J 1 ' 記載の方法。

【 1 1 6 6 】

J 4 ' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、第 1 の冷却速度にて該量の精子を該保持温度から、氷晶形成および浸透圧における変化が精子細胞を損傷する臨界温度ゾーンに接近する温度に冷却し、次いで、第 1 の冷却速度より速い第 2 の冷却速度にて該臨界温度ゾーンを通して該量の精子細胞を冷却することをさらに含むクレーム J 1 ' 記載の方法。 30

【 1 1 6 7 】

J 5 ' . 該量の精子細胞を維持する工程が、約 4 0 分未満の期間該保持温度に該量の精子細胞を保つことを含むクレーム J 1 ' 記載の方法。

【 1 1 6 8 】

J 6 ' . 該量の精子細胞を維持する工程が、約 3 0 分の期間該保持温度に該量の精子細胞を保つことを含むクレーム J 1 ' 記載の方法。 40

【 1 1 6 9 】

J 7 ' . 染色工程が、さらに精子細胞に酸化防止物質を添加することを含むクレーム J 1 ' ~ J 6 ' のいずれか 1 記載の方法。

【 1 1 7 0 】

J 8 ' . 酸化防止物質が、ビルビン酸塩、ビタミン K、リポ酸およびそれらの組合せよりなる群から選択されるクレーム J 7 ' 記載の方法。

【 1 1 7 1 】

J 9 ' . 所望の D N A 特徴を有するある量の精子細胞を得る工程が、毎秒少なくとも 5 , 0 0 0 個の精子細胞の速度で該生精子細胞の集団を得ることを含むクレーム J 1 ' 記載の方法。 50

【 1 1 7 2 】

J 1 0 ' . 精子細胞の該集団の純度が、少なくとも 8 5 % であるクレーム J 9 ' 記載の方法。

【 1 1 7 3 】

K ' . 全体的な温度調節（冷染色）

K 1 ' . 雄性動物から精子細胞を含む精液試料を採取し；

精子処理施設に精液試料を輸送し；

精液試料に初期の品質管理チェックを行い；

精子細胞のいずれかの実質的な希釈前に約 0 ~ 8 ° の範囲の温度に精子細胞を冷却し；

精子細胞および D N A 選択的色素を含有する溶液を含む混合物を形成し、次いで、混合物を 0 ~ 8 ° の範囲の温度に付して、精子細胞を染色し；

精子細胞をフローサイトメーターで仕分けして、所望の D N A 特徴を有する精子細胞の 1 以上の集団を得；

流体中に懸濁された所望の D N A 特徴を有するある量の精子細胞を得；

該量の精子細胞の濃度を調整して、流体懸濁液中の所望の D N A 特徴を有する所望の濃度の精子細胞を得；

凍結保護物質を該量の精子細胞に添加し；

該量の精子細胞および該凍結保護物質を約 0 ~ 8 ° の範囲の保持温度に約 3 0 分間 ~ 3 時間の範囲の期間保持し；次いで

4 0 ° 未満の温度に該量の精子細胞を過冷却する

工程を含む精子細胞の処理方法。

【 1 1 7 4 】

K 2 ' . 実質的に処理中のいずれの時点でも細胞を温めるのを回避する工程をさらに含むクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 7 5 】

K 3 ' . 精子細胞を 0 ~ 8 ° の範囲の温度に冷却する工程が、実質的に予め冷却された精子細胞と同一温度である水浴に精子細胞を保持する容器に位置させ、約 8 ° 未満の温度を有する環境に水浴を位置させる含むクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 7 6 】

K 4 ' . 冷却工程が、さらにそれらが冷却される精子細胞の温度をモニターし、精子細胞が約 1 0 ° 未満の温度に冷却した後、水浴に氷を添加することを含むクレーム K 3 ' 記載の方法。

【 1 1 7 7 】

K 5 ' . 該保持期間が、約 1 ~ 2 時間の範囲内にあるクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 7 8 】

K 6 ' . 該保持期間が、約 9 0 分の範囲内にあるクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 7 9 】

K 7 ' . 該保持期間が、約 3 0 分 ~ 6 0 分未満の範囲内にあるクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 8 0 】

K 8 ' . プログラム可能な冷凍装置を用いて、第 1 の冷却速度にて該量の精子を該保持温度から氷晶形成および浸透圧における変化が精子細胞を損傷する臨界温度ゾーンに接近する温度に冷却し、次いで、第 1 の冷却速度より速い第 2 の冷却速度にて該臨界温度ゾーンを通して該量の精子細胞を冷却することを含むクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 8 1 】

K 9 ' . 凍結保護物質の添加工程が、グリセロールの添加を含むクレーム K 1 ' 記載の方法。

【 1 1 8 2 】

K 1 0 ' . 凍結保護物質の添加工程が、7 % のグリセロール (v / v) の添加を含むクレーム K 1 ' 記載の方法。

10

20

30

40

50

【 1 1 8 3 】

K 1 1 ' . 所望のDNA特徴を有するある量の精子細胞を得る工程が、毎秒少なくとも5,000個の精子細胞の速度で該精子細胞の集団を得ること含むクレームK 1 ' 記載の方法。

【 1 1 8 4 】

K 1 2 ' . 精子細胞の該集団の純度が、少なくとも85%であるクレームK 1 1 ' 記載の方法。

【 1 1 8 5 】

L ' . 回収システム(装置)

L 1 ' . 水平コンポーネントを含む軌道に沿って移動する液滴の流れを生成する液滴仕分けフローサイトメーターにより仕分けされた液滴の流れを集める回収システムであって、液滴が該軌道に沿って移動するような該流れ中の液滴を妨害するための妨害装置および該妨害された液滴を集めるように配置された回収容器を含む該回収システム。

10

【 1 1 8 6 】

L 2 ' . 妨害装置が、該液滴が衝撃を与えるのに適応した該軌道を横切って配置された衝撃表面を含むクレームL 1 ' 記載の回収システム。

【 1 1 8 7 】

L 3 ' . 衝撃表面が、該液滴が上方速度コンポーネントを有する位置にて該軌道を横切って配置されるクレームL 2 ' 記載の回収システム。

【 1 1 8 8 】

L 4 ' . 少なくともいくつかの液滴が粒子を含み、衝撃表面が衝撃表面での損傷に際しての該粒子に対する損傷を低下させる物質で覆われるクレームL 2 ' 記載の回収システム。

20

【 1 1 8 9 】

L 5 ' . 該物質が、卵黄、ウシ血清アルブミンおよびリン酸塩緩衝食塩水よりなる群から選択される1以上の物質を含むクレームL 4 ' 記載の回収システム。

【 1 1 9 0 】

L 6 ' . 該粒子が、精子細胞であるクレームL 4 ' 記載の回収システム。

【 1 1 9 1 】

L 7 ' . 該妨害装置が、回収容器に該妨害された液滴を導くために配置されたクレームL 2 ' 記載の回収システム。

30

【 1 1 9 2 】

L 8 ' . 妨害装置が、該液滴を該回収容器に至るまで導くための該衝撃表面下のガイドを含むクレームL 7 ' 記載の回収システム。

【 1 1 9 3 】

L 9 ' . 妨害装置が、該衝撃表面を規定し、該衝撃表面に対する衝撃用の中空の包囲に該軌道に沿って移動する液滴が入るためのエントリーウィンドウを有する該包囲を含むクレームL 7 ' 記載の回収システム。

【 1 1 9 4 】

L 1 0 ' . 液滴の該流れが液滴の第1の流れを構成し、該妨害装置が第1の妨害装置を構成し、該回収容器が第1の回収容器を構成し、該サイトメーターが、該第1の軌道とは異なる該第2の軌道に沿って移動する液滴の第2の流れを生成し、さらに、該第2の軌道に沿って移動する液滴を妨害する第2の妨害装置ならびに第2の妨害装置によって妨害された液滴を集めるための第2の回収容器を含むクレームL 1 ' 記載の回収システム。

40

【 1 1 9 5 】

L 1 1 ' . 該第1の妨害装置がそれを通して通過するように該第2の流れが適応されるウィンドウを有し、該第2の妨害装置が、該ウィンドウを通して通過する第2の流れにおける液滴を妨害するための該第1の妨害装置の後部に位置するクレームL 1 0 ' 記載の回収システム。

【 1 1 9 6 】

50

L 1 2' . 該第 2 の妨害装置が、第 2 の流れ中の該妨害された液滴を第 2 の回収容器に導くために配置されたクレーム L 1 0' 記載の回収システム。

【 1 1 9 7 】

L 1 3' . 該液滴が粒子を含み、さらに衝撃に際して該粒子への損傷を低下させる妨害装置の衝撃表面を覆う物質を含むクレーム L 1' 記載の回収システム。

【 1 1 9 8 】

L 1 4' . 該粒子が、生精子細胞を含むクレーム L 1 3' 記載の回収システム。

【 1 1 9 9 】

L 1 5' . 該物質が、卵黄、ウシ血清アルブミンおよびリン酸塩緩衝食塩水よりなる群から選択される物質を含むクレーム L 1 3' 記載の回収システム。

10

【 1 2 0 0 】

L 1 6' . 妨害装置に液滴流れを指向させるように位置したフローサイトメーターと組み合わせたクレーム L 1' 記載の回収システム。

【 1 2 0 1 】

M' . 回収システム (方法)

M 1' . 水平コンポーネントを含む軌道に沿って移動する液滴の流れを生成する液滴仕分けフローサイトメーターによって仕分けされた液滴を集める方法であって、

液滴が該軌道に沿って移動するように該液滴を妨害し; 次いで

第 1 の回収容器に該妨害された液滴を集める工程を含む該方法。

【 1 2 0 2 】

20

M 2' . 該集める工程が、該妨害された液滴を該第 1 の回収容器に導くことを含むクレーム M 1' 記載の方法。

【 1 2 0 3 】

M 3' . 該妨害工程が、該液滴が上方速度コンポーネントを有する位置での該軌道を横切った衝撃表面を配置することを含むクレーム M 2' 記載の方法。

【 1 2 0 4 】

M 4' . 該衝撃表面の位置を調節して、異なった液滴軌道を供することをさらに含むクレーム M 3' 記載の方法。

【 1 2 0 5 】

M 5' . 該フローサイトメーターが、第 1 および第 2 の各軌道に沿って移動する第 1 および第 2 の流れを生成し、各軌道が、水平コンポーネントを有し、さらに、液滴が該第 2 の軌道に沿って移動する該第 2 の流れにおける該液滴を妨害し、次いで、第 2 の回収容器に第 2 の流れの該妨害された液滴を集めることを含むクレーム M 1' 記載の方法。

30

【 1 2 0 6 】

M 6' . 該第 1 および第 2 の軌道が、実質的に 1 平面に存在するクレーム M 5' 記載の方法。

【 1 2 0 7 】

M 7' . 該第 1 の流れにおける液滴が、該液滴が上方速度コンポーネントを有する位置で該第 1 の軌道を横切って第 1 の衝撃表面を位置させることにより妨害され、該第 2 の流れの液滴が、該液滴が上方速度コンポーネントを有する位置で該第 2 の軌道を横切って第 2 の衝撃表面を位置させることにより妨害されるクレーム M 5' 記載の方法。

40

【 1 2 0 8 】

M 8' . 該第 2 の衝撃表面が、該第 1 の衝撃表面とは異なる高さ (elevation) に位置するクレーム M 7' 記載の方法。

【 1 2 0 9 】

M 9' . 該液滴が粒子を含み、該液滴を妨害する工程が、該液滴を妨害する妨害装置を用いることを含み、該妨害装置と該粒子に対する損傷を低下させる組成物とを接触させることをさらに含むクレーム M 1' 記載の方法。

【 1 2 1 0 】

M 1 0' . 該粒子が生精子細胞を含むクレーム M 9' 記載の方法。

50

【 1 2 1 1 】

M 1 1 ' . 該組成物が、卵黄、ウシ血清アルブミンおよびリン酸塩緩衝食塩水よりなる群から選択される物質を含むクレーム M 1 0 ' 記載の方法。

【 1 2 1 2 】

M 1 2 ' . 該妨害装置と組成物とを接触させる工程が、組成物が妨害装置により吸着および/または付着されるのに十分である期間該組成物中の該妨害装置に浸すことを含むクレーム M 1 0 ' 記載の方法。

【 1 2 1 3 】

M 1 3 ' . 該期間が、約 3 0 ~ 9 0 分の範囲にあるクレーム M 1 2 ' 記載の方法。

【 1 2 1 4 】

M 1 4 ' . 該期間が、約 3 0 ~ 6 0 分の範囲にあるクレーム M 1 3 ' 記載の方法。

【 1 2 1 5 】

M 1 5 ' . 該期間が、約 6 0 分であるクレーム M 1 4 ' 記載の方法。

【 1 2 1 6 】

M 1 6 ' . 該液滴を集める工程が、回収容器に該液滴を集め、さらに、回収容器と組成物とを接触させ、該粒子に対する損傷を低下させる工程を含むクレーム M 1 0 ' ~ M 1 5 ' のいずれか 1 記載の方法。

【 1 2 1 7 】

M 1 7 ' . 回収容器と組成物とを接触させ、該粒子に対する損傷を低下させる工程が、回収容器と妨害装置を接触させるのに用いた同一組成物とを接触させることをさらに含むクレーム M 1 6 ' 記載の方法。

【 1 2 1 8 】

M 1 8 ' . 回収容器と組成物とを接触させ、該粒子に対する損傷を低下させる工程が、組成物が妨害装置により吸着および/または付着されるのに十分である期間該組成物中の該妨害装置に浸すことを含むクレーム M 1 6 ' 記載の方法。

【 1 2 1 9 】

M 1 9 ' . 該期間が、約 3 0 ~ 9 0 分の範囲にあるクレーム M 1 8 ' 記載の方法。

【 1 2 2 0 】

M 2 0 ' . 該期間が、約 6 0 分であるクレーム M 1 8 ' 記載の方法。

【 1 2 2 1 】

N ' . 相乗的組合せ

a . マルチチャネル F C M (仕分け戦略有り)

N a 1 ' . 各々が 1 以上の D N A 特徴に基づいて精子細胞を仕分けするように作動可能である複数のフローサイトメトリーユニットに精子細胞を含む試料流体を送達し、次いで少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該ユニットを操作することを含むフローサイトメトリープロセスを用いて 1 以上の特定の D N A 特徴に基づき精子細胞を異なる集団の精子細胞に仕分けし；次いで

試料流体が、少なくとも 1 つの以下のもの：(1) 所望の D N A 特徴を有する精子細胞の第 1 の仕分けされた集団の純度；および(2) 第 2 の仕分けされた集団中の該所望の D N A 特徴を有する精子細胞の量の関数として 1 以上のフローサイトメトリーユニットに送達される速度を変更する

工程を含む動物の精子細胞を処理する方法。

【 1 2 2 2 】

N a 2 ' . 並列にて該フローサイトメトリーユニットを操作することをさらに含むクレーム N a 1 ' 記載の方法。

10

20

30

40

50

【 1 2 2 3 】

N a 3' . 該 1 以上の特定の D N A 特徴が、精子細胞が X または Y 性染色体を含有するかどうかを含むクレーム N a 1' 記載の方法。

【 1 2 2 4 】

b . デジタル処理でのマルチチャネル F C M

N b 1' . : 各々が 1 以上の D N A 特徴に基づいて精子細胞を仕分けするように作動可能である複数のフローサイトメトリーユニットに精子細胞を含む試料流体を送達し、次いで少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該ユニットを操作することを含むフローサイトメトリープロセスを用いて 1 以上の特定の D N A 特徴に基づき精子細胞を異なる集団の精子細胞に仕分けし；次いで

1 以上のアナログデジタル変換器を用いて各フローサイトメトリーユニットから時変アナログ出力を同調してサンプリングし、次いで該時変アナログ出力に対応するデジタル情報を含む出力を供し、ここに、該時変アナログ出力および対応するデジタル情報が、該特定の D N A 特徴を示す工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 2 5 】

N b 2' . 該 1 以上の特定の D N A 特徴が、精子細胞が X または Y 性染色体を含有するかを含むクレーム N b 1' 記載の方法。

【 1 2 2 6 】

c . マルチチャネル F C M (w / 高温染色)

N c 1' .

精子細胞および D N A 選択的蛍光色素を含む染色用混合物を形成し、染色用混合物を少なくとも約 4 0 の温度に付し；次いで、

各々が 1 以上の D N A 特徴に基づいて精子細胞を仕分けするように作動可能である複数のフローサイトメトリーユニットに精子細胞を含む試料流体を送達し、次いで少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該ユニットを操作することを含むフローサイトメトリープロセスを用いて 1 以上の特定の D N A 特徴に基づき精子細胞を異なる集団の精子細胞に仕分けする工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 2 7 】

N c 2' . 色素が、U V 励起または可視光線励起の色素であるクレーム N c 1' 記載の方法。

【 1 2 2 8 】

N c 3' . 色素が、ビスベンズイミド、S Y B R - 1 4 ならびにそのコンジュゲート、アナログおよび誘導体よりなる群から選択されるクレーム N c 2' 記載の方法。

【 1 2 2 9 】

N c 4' . 染色用混合物が、X および Y を担う精子細胞が蛍光に基づいて異なって仕分けできるように色素が D N A に結合するのを可能にするのに十分な期間該温度に付されることを含むクレーム N c 1' ~ N c 3 のいずれか 1 記載の方法。

【 1 2 3 0 】

N c 5' . 期間が、約 1 ~ 1 6 0 分の範囲にあるクレーム N c 4' 記載の方法。

【 1 2 3 1 】

10

20

30

40

50

N c 6' . 染色用混合物がさらに酸化防止物質を含むクレーム N c 1' ~ N c 5' のいずれか 1 記載の方法。

【 1 2 3 2 】

N c 7' . 1 以上の該特徴が、精子細胞が X または Y 性染色体を含むかどうかを含むクレーム N c 1' 記載の方法。

【 1 2 3 3 】

d . マルチチャネル (急速低温保存)

N d 1' . 各々が 1 以上の DNA 特徴に基づいて精子細胞を仕分けするように作動可能である複数のフローサイトメトリーユニットに精子細胞を含む試料流体を送達し、次いで少なくとも 1 つの以下のエレメント : (1) 精子細胞の共通の供給 ; (2) 電磁放射線の共通の源 ; (3) 共通のハウジング ; (4) ユニットの操作を制御するための共通の入力 ; (5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ ; および (6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該ユニットを操作することを含むフローサイトメトリープロセスを用いて 1 以上の特定の DNA 特徴に基づき精子細胞を異なる集団の精子細胞に仕分けし ;

精子細胞の仕分けされた集団の 1 以上から所望の DNA 特徴を有するある量の精子細胞を得 ;

凍結保護物質を該量の精子細胞に添加し ;

該量の精子細胞および凍結保護物質を約 0 ~ 8 の保持温度に冷却し ;

該精子細胞および該凍結保護物質を実質的に該保持温度に 6 0 分未満の期間維持し ; 次いで

該量の精子細胞を - 4 0 の温度に過冷却する工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 3 4 】

N d 2' . 凍結保護物質を添加する工程が、グリセロールを添加することを含むクレーム N d 1' 記載の方法。

【 1 2 3 5 】

N d 3' . 該 1 以上の特定の DNA 特徴が、精子細胞が X または Y 性染色体を含むかどうかを含むクレーム N d 1' 記載の方法。

【 1 2 3 6 】

N d 4' . 該量の精子細胞を該保持温度に冷却する工程が、該量の精子細胞が、それ未満で精子細胞が低温衝撃からの損傷に付されるガラス転移温度を超える温度から該保持温度まで約 9 0 分間に冷却されるように冷却速度が選択されるクレーム N d 1' 記載の方法。

【 1 2 3 7 】

N d 5' . 冷却速度が、毎分約 0 . 1 ~ 0 . 3 の範囲にある実質的に一定の冷却速度であるクレーム N d 4' 記載の方法。

【 1 2 3 8 】

N d 6' . 該量の精子を過冷却する工程が、氷晶形成および浸透圧の変化が精子細胞を損傷する臨界温度ゾーンに接近した温度まで第 1 の速度にて冷却し、次いで、該第 1 の冷却速度より速い第 2 の冷却速度にて精子を約 - 3 0 未満である温度まで冷却することを含むクレーム N d 1' 記載の方法。

【 1 2 3 9 】

N d 7' . 精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 4 0 の温度に付す工程をさらに含む N d 1' 記載の方法。

【 1 2 4 0 】

e . 仕分け戦略 (高温染色)

N e 1' . 精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、

10

20

30

40

50

次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

精子細胞を含有する該染色用混合物の流体流れを第 1 の位置に送達し、該流れを第 2 の位置にて液滴に壊し、該液滴が、各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 1 の液滴、各々が所望しない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 2 の液滴、ならびに各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞および所望でない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 3 の液滴を含み；

該第 2 および第 3 の液滴から第 1 の液滴を仕分けし；

該第 1 の液滴を集めて、所望の性染色体を有する精子細胞の少なくとも 1 つの集団を供し；

所望の性染色体を有するある量の精子細胞を該少なくとも 1 つの集団中で同定し；次いで

該第 1、第 2 および第 3 の液滴中の該所望の性染色体を有する精子細胞の総数に対し少なくとも 1 つの該集団の中で所望の性染色体を有すると同定されたある量の精子細胞の関数として該第 1 の位置に流体が送達される速度を変更する

工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 4 1 】

Ne 2' . 精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

精子細胞を含有する該染色用混合物の流体流れを第 1 の位置に送達し、該流れを第 2 の位置にて液滴に壊し、該液滴が、各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 1 の液滴、各々が所望しない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 2 の液滴、ならびに各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞および所望でない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 3 の液滴を含み；

該第 2 の液滴から第 1 の液滴および第 3 の液滴を仕分けし；

該第 1 および第 3 の液滴を集めて、所望の性染色体を有する精子細胞の少なくとも 1 つの集団を供し；

所望の性染色体を有するある量の精子細胞を該少なくとも 1 つの集団中で同定し；次いで

少なくとも 1 つの該集団の中で所望ではない性染色体を有すると同定された量の精子細胞の関数として該第 1 の位置に流体が送達される速度を変更する

工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 4 2 】

f . 高温染色 (w / 急速低温保存)

Nf 1' . 精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

特定の DNA 特徴に基づき該染色用混合物中の該精子細胞を仕分けし；

所望の DNA 特徴を有するある量の精子細胞を得；

該量の精子細胞に凍結保護物質を添加し；

該量の精子細胞および凍結保護物質を約 0 ~ 8 の保持温度に冷却し；

該精子細胞および該凍結保護物質を実質的に保持温度に 60 分未満の期間維持し；次いで

該量の精子細胞を - 40 の温度に過冷却する

工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 4 3 】

Nf 2' . 結保護物質を添加する工程が、グリセロールの添加を含むクレーム Nf 1 記載の方法。

【 1 2 4 4 】

Nf 3' . 該特定の DNA 特徴が、精子細胞が X または Y 性染色体を含有するかを含むクレーム Nf 1 記載の方法。

【 1 2 4 5 】

10

20

30

40

50

N f 4' . 該量の精子細胞を冷却する工程が、該量の精子細胞が約 90 分間で約 0 ~ 8 に冷却されるように選択された冷却速度を用いることを含むクレーム N f 1 記載の方法

【 1 2 4 6 】

N f 5' . 冷却速度が、毎分約 0 . 1 ~ 0 . 3 の範囲にある実質的に一定の冷却速度であるクレーム N d 4 記載の方法。

【 1 2 4 7 】

N f 6' . 該量の精子を過冷却する工程が、氷晶形成および浸透圧の変化が精子細胞を損傷する臨界温度ゾーンに接近した温度まで第 1 の速度にて精子細胞を冷却し、次いで、該第 1 の冷却速度より速い第 2 の冷却速度にて精子を約 - 30 未満である温度まで冷却

10

【 1 2 4 8 】

g . 複数組合せ

N g 1' . (高温染色 / マルチチャネル仕分け / 急速低温保存)

精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

各々が 1 以上の DNA 特徴に基づいて精子細胞を仕分けするように作動可能である複数のフローサイトメトリーユニットに精子細胞を含む試料流体を送達し、次いで少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該ユニットを操作することを含むフローサイトメトリープロセスを用いて 1 以上の特定の DNA 特徴に基づき該染色用混合物中の精子細胞を異なる集団の精子細胞に仕分けし；

20

所望の DNA 特徴を有するある量の精子細胞を得；

該量の精子細胞に凍結保護物質を添加し；

該量の精子細胞および凍結保護物質を約 0 ~ 8 の保持温度に冷却し；

該精子細胞および該凍結保護物質を実質的に保持温度に 60 分未満の期間維持し；次いで

30

該量の精子細胞を - 40 の温度に過冷却する工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 4 9 】

N g 2' . (高温染色 / マルチチャネル仕分け / 高純度仕分け戦略)

精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

精子細胞を含有する該染色用混合物の流体流れを複数の各フローサイトメトリーユニットに送達し、フローサイトメトリーを用いて各流体流れを液滴に壊し、該液滴が、各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 1 の液滴、各々が所望しない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 2 の液滴、ならびに各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞および所望でなはなない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 3 の液滴を含み；

40

少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該複数のフローサイトメトリーユニットを操作することを含む液滴仕分けフローサイトメトリープロセスを用いて該第 2 および第 3 の

50

液滴から該第 1 の液滴を仕分けし；

該第 1 の液滴を集めて、所望の性染色体を有する精子細胞の少なくとも 1 つの集団を供し；

所望の性染色体を有するある量の精子細胞を該少なくとも 1 つの集団中に同定し；次いで

該第 1、第 2 および第 3 の液滴中の該所望の性染色体を有する精子細胞の総数に対し少なくとも 1 つの該集団の中で所望の性染色体を有すると同定された量の精子細胞の関数として 1 以上のフローサイトメトリーユニットに流体が送達される速度を変更する工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 5 0 】

N g 3' . (高温染色 / マルチチャネル仕分け / 高回収仕分け戦略)

精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

精子細胞を含有する該染色用混合物の流体流れを複数の各フローサイトメトリーユニットにフローサイトメトリーユニットを用いて各流体流れを液滴に壊し、該液滴が、各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 1 の液滴、各々が所望しない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 2 の液滴、ならびに各々が所望の性染色体を有する 1 以上の精子細胞および所望ではない性染色体を有する 1 以上の精子細胞を含む第 3 の液滴を含み；

少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、複数のフローサイトメトリーユニットを操作することを含む液滴仕分けフローサイトメトリープロセスを用いて該第 2 の液滴から該第 1 および第 3 の液滴を仕分けし該ユニットを操作し；

該第 1 および第 3 の液滴を集めて、所望の性染色体を有する精子細胞の少なくとも 1 つの集団を供し；

所望ではない性染色体を有するある量の精子細胞を該少なくとも 1 つの集団中に同定し；次いで

少なくとも 1 つの該集団の中で所望ではない性染色体を有すると同定された量の精子細胞の関数として 1 以上のフローサイトメトリーユニットに流体が送達される速度を変更する

工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【 1 2 5 1 】

N g 4' . (高温染色 / マルチチャネル仕分け / 仕分け戦略 / 急速低温保存)

精子細胞および DNA 選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、染色用混合物を少なくとも約 40 の温度に付し；

精子細胞を含有する該染色用混合物の流体流れを複数の各フローサイトメトリーユニットに送達し、フローサイトメトリーユニットを用いて、各流体流れを液滴に壊し、液滴に含まれた精子細胞の 1 以上の特定の DNA 特徴により該液滴を仕分けして、少なくとも 1 つの以下のエレメント：(1) 精子細胞の共通の供給；(2) 電磁放射線の共通の源；(3) 共通のハウジング；(4) ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5) もう一つのユニットに対し 1 つのユニットの操作の評価を可能にするユニットから情報を受け取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6) 該精子細胞を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含む統合プラットフォームを共有しつつ、該複数のフローサイトメトリーユニットを操作することを含む液滴仕分けフローサイトメトリー処理を用いて所望の DNA 特徴を有する精子細胞の 1 以上の集団を得；

10

20

30

40

50

少なくとも1つの以下のもの：(1) 所望のDNA特徴を有する精子細胞の該1以上の集団の純度；および(2) 該液滴中に所望のDNA特徴を有する精子細胞の総数に対し精子細胞の該1以上の集団における所望のDNA特徴を有するある量の精子細胞の関数として1以上のフローサイトメトリーユニットに流体を送達させる速度を変更し；

凍結保護物質を添加して、精子細胞の該1以上の集団から得たある量の精子細胞を保護し；

該量の精子細胞および該凍結保護物質を約0～8℃の保持温度に冷却し；

該精子細胞および該凍結保護物質を実質的に該保持温度に60分未満の期間維持し；次いで

該量の精子細胞を-40℃の温度に過冷却する

10

工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【1252】

O' . 全体的なスケジュール

O1' . 雄性動物から精子細胞を採取し；

DNA選択的蛍光色素で精子細胞を染色し；

精子細胞に電磁放射線を照射して、DNA選択的蛍光色素に蛍光を発光させ；

精子細胞により発光された蛍光を検出し；

精子細胞により発光された蛍光を分析して、精子細胞の1以上の特定のDNA特徴を決定し；

該1以上の特定のDNA特徴に基づき精子細胞の複数の集団に精子細胞を仕分けし；

20

精子細胞の該複数の集団の1つから所望のDNA特徴を有するある量の精子細胞を得；次いで

該量の精子細胞を過冷却し、

ここに、過冷却の工程は、精子細胞が集められた後の約12時間未満に完了する

工程を含む動物の精子細胞の処理方法。

【1253】

O2' . 過冷却の工程が、精子細胞が集められた後の約8時間未満に完了するクレーム

O1' 記載の方法。

【1254】

O3' . 過冷却の工程が、精子細胞が集められた後の約6時間未満に完了するクレーム

30

O1' 記載の方法。

【1255】

O4' . 過冷却の工程が、精子細胞が集められた後の約3時間未満に完了するクレーム

O1' 記載の方法。

【1256】

O5' . 過冷却の工程が、精子細胞が集められた後の約2時間未満に完了するクレーム

O1' 記載の方法。

【1257】

O6' . 過冷却の工程が、精子細胞が集められた後の約1時間未満に完了するクレーム

O1' 記載の方法。

40

【1258】

O7' . 精子細胞が、生精子細胞を含むクレームO1' 記載の方法。

【1259】

O8' . 該1以上のDNA特徴精子細胞がXまたはY性染色体を含むかどうかを含むクレームO7' 記載の方法。

【1260】

O9' . 過冷却する工程の後に該量の精子細胞を解凍し、次いで人工授精によって該量の精子細胞からの精子細胞で卵子を受精させる工程をさらに含むクレームO1' 記載の方法。

【1261】

50

010' . 所望の特性を有する複数の量の精子細胞を生成し、該複数の量の精子細胞を商品流通システムを介して動物の飼育者に流通させることをさらに含むクレーム01'記載の方法。

【1262】

P' . 仕分け速度

P1' . (a) 生精子細胞の供給にDNA選択的蛍光色素を添加し；

(b) 該精子細胞を含む試料流体およびシース流体を、精子細胞を所望の配向に回転させる傾向にある配向ノズルを通して流させ、該試料流体およびシース流体が、中核流れの周囲の試料流体および精子細胞により形成された中核流れおよびシース流体流れを含む流体流れとしてノズルを出て行き；

(c) ノズルに音響エネルギーを適用して、流体流れをノズルから下流の液滴破壊位置にて液滴の流れに壊し；

(d) 電磁放射線のビームを導いて、液滴破壊位置から上流の問い合わせ位置に流体流れを交差させ、精子細胞中の蛍光色素を励起し、それによって精子細胞から蛍光発光させ；

(e) 検出された蛍光発光の強度を示す時変アナログシグナルを出力する光検出器で蛍光発光を検出し；

(f) 該時変アナログシグナルを電子的に処理して、複数の精子細胞の染色体含量を決定し；

(g) 選択的に静電的荷電を流体流れに適用して、液滴中に含有された精子細胞の染色体含量により電荷を液滴に選択的に適用するかまたは適用せず；

(h) 電場を用いて、それらの電荷により液滴を偏向させ、それにより異なる電荷を有する液滴中に含有された精子細胞から同一の電荷を有する液滴中に含有された精子細胞を分離し；次いで

(i) 毎秒少なくとも5,000個の精子細胞の速度にて少なくとも1つの集団の生精子細胞を集める

を含む染色体含量により生精子細胞を仕分けする方法。

【1263】

P2' . 集める工程において集めた少なくとも1つの集団が、少なくとも85%の純度を有するP1'。

【1264】

P3' . 該集める工程が、毎秒少なくとも6,000個の精子細胞の速度で生精子細胞の少なくとも1つの集団を集めることを含むP1'。

【1265】

P4' . 該集める工程が、毎秒少なくとも7,000個の精子細胞の速度で生精子細胞の少なくとも1つの集団を集めることを含むP1'。

【1266】

P5' . 各々が、統合プラットフォームを共有する間に工程(b)~(i)を行うように並列に2以上のサイトメトリーユニットを操作し、該統合プラットフォームが、1以上の以下のもの：(1)粒子の共通の供給；(2)電磁放射線の共通の源；(3)共通のハウジング；(4)ユニットの操作を制御するための共通の入力；(5)もう一つのユニットに対して1つのユニットの操作の判定を可能にするためにユニットからの情報を受取りおよび処理するための共通のプロセッサ；および(6)該粒子を含む流体を該フローサイトメトリーユニットに送達するための共通の流体送達システムを含むP1'。

【1267】

P6' . 統合プラットフォームを共有している間に、該2以上のフローサイトメトリーユニットを操作する工程が、モードロックの固体状態レーザーを操作して複数の電磁パルスを含む単一ビームを生成し、各パルスのピーク力が、レーザーの平均パワー出力より大きく、単一ビームを2以上のビームに分割し、次いで該2以上の各ビームをフローサイトメトリーユニットの1つに向かわせることをさらに含むP5'。

【1268】

10

20

30

40

50

R' . C S D & スリットスキャンニング

a . 精子細胞

R 1' . 流れの方向を有する流体流れの中で動物精子細胞の染色体 D N A 特徴を分析する方法であって、各精子細胞が、少なくとも 1 つの染色体を含む局所的な染色体領域を含む核を有し、該核が、流れフローの方向の長さを有し、

流れフローの方向にほぼ直角に伸びる主軸に沿った長さおよび流れフローの方向にほぼ平行に伸びる短軸に沿った幅を有するほぼ楕円のスポットとして流体流れについて電磁放射線のビームを集中し、ビームスポットの幅が該核の長さ未満であり、該精子細胞を該スポットを通過するように適用する結果、精子細胞から染色体領域の染色体 D N A 特徴を示す該領域からの放射を含む電磁放射線を放射し；

染色体領域からの少なくともいくらかの該放射を該染色体 D N A 特徴を示す時変アナログ電気的シグナルに検出および変換し；

時変アナログシグナルをデジタル的にサンプリングし、次いで該時変アナログシグナルに対応するデジタル情報を含む出力の供し；

デジタル情報を分析して、時変アナログシグナルの誘導特徴を示す情報を抽出し；次いで

少なくとも部分的に該抽出された情報に基づいて特定の染色体 D N A 特徴を有するように少なくともいくらかの精子細胞を分類する該方法。

【 1 2 6 9 】

R 2' . 該染色体 D N A 特徴が、精子細胞の性別を示すクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 0 】

R 3' . 該精子細胞が、ウシの精子細胞であるクレーム R 2' 記載の方法。

【 1 2 7 1 】

R 4' . 該染色体領域が、核の縦の中心の一側で約 2 0 % 以下の核長を延長する核の領域内に局在化されるクレーム R 3' 記載の方法。

【 1 2 7 2 】

R 5' . 該染色体領域が、核の縦の中心の一側で約 1 0 % ~ 1 5 % 以下の核長を延長する核の領域内に局在化されるクレーム R 3' の装置。

【 1 2 7 3 】

R 6' . デジタル的なサンプリング工程が、時変アナログ出力を同調してサンプリングすることを含むクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 4 】

R 7' . 該スポット幅が、約 3 . 0 未満 μm であるクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 5 】

R 8' . 該スポット長が、約 1 0 0 μm より大きいクレーム R 7' 記載の方法。

R 9' . 流れが該ビームを通過する前にそれらを所望の配向にする傾向にある流れにおける精子細胞に対して力を働かせることをさらに含むクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 6 】

R 1 0' . 該染色体 D N A 特徴により液滴該精子細胞を仕分けする液滴をさらに含むクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 7 】

R 1 1' . 該染色体 D N A 特徴により該精子細胞を仕分けする光損傷をさらに含むクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 8 】

R 1 2' . 該染色体 D N A 特徴により精子細胞を仕分けする流体スイッチングをさらに含むクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 7 9 】

R 1 3' . 該誘導特徴が、閾値に対しシグナル点にて時変アナログシグナルの傾斜を含むクレーム R 1' 記載の方法。

【 1 2 8 0 】

10

20

30

40

50

b. 一般的な粒子

R 1 4' . 流れの方向を有する流体流れにおける粒子を分析する方法であって、

流れフローの方向にほぼ直角に伸びる主軸に沿った長さおよび流れフローの方向にほぼ平行に伸びる短軸に沿った幅を有するほぼ楕円のスポットとして流体流れについて電磁放射線のビームを集中し、ビームスポットの幅が、該核の長さ未満であり、該粒子が該スポットを通して通過するように適用される結果、粒子から電磁放射線を放射し；

少なくともいくつかの該放射を粒子の特徴を示す時変アナログ電氣的シグナルに検出および変換し；

時変アナログシグナルをデジタル的にサンプリングし、次いで該時変アナログシグナルに対応するデジタル情報を含む出力を供し；

デジタル情報を分析して、時変アナログシグナルの誘導特徴を示す情報を抽出し；次いで

少なくとも部分的に該抽出された情報に基づいて特定の特徴を有するように少なくともいくつかの粒子を分類する該方法。

【 1 2 8 1 】

R 1 5' . デジタル的なサンプリング工程が、時変アナログ出力を同調してサンプリングすることを含むクレーム R 1 4' 記載の方法。

【 1 2 8 2 】

R 1 6' . 該分類により液滴該粒子を仕分けする液滴をさらに含むクレーム R 1 4' 記載の方法。

【 1 2 8 3 】

R 1 7' . 該染色体 DNA 特徴により該精子細胞を仕分けする光損傷をさらに含むクレーム R 1 4' 記載の方法。

【 1 2 8 4 】

R 1 8' . 該染色体 DNA 特徴により精子細胞を仕分けする流体スイッチングをさらに含むクレーム R 1 4' 記載の方法。

【 1 2 8 5 】

R 1 9' . 該誘導特徴が、閾値に対しシグナルの点にて時変アナログシグナルの傾斜を含むクレーム R 1 4' 記載の方法。

【 1 2 8 6 】

S' . パルスレーザー FCM 装置

S 1' . 粒子問い合わせ位置を導くためのフローチャンネル；

複数の電磁放射 (EMR) パルスを発するのに作動可能なレーザー、ここに、核パルスは、レーザーの平均パワーを超えるピークパワーを有し、該パルスは、ビーム経路に沿ってレーザーから粒子問い合わせ位置に向けられ；

問い合わせ位置にてパルスの到達を示すタイミングシグナルを生成するのに作動可能なタイミング回路；

問い合わせ位置からの EMR を検出するように適応させ、検出された EMR の強度を示す時変アナログシグナルを出力する検出器；

入力として時変アナログシグナルを受け入れて、アナログシグナルをサンプリングしてデジタル化された出力を生成するように適応されたアナログデジタル変換器；および

タイミングシグナルの関数としてアナログデジタル変換器からのデジタル化された出力を分析するのに作動可能な電子プロセッサーを含むフローサイトメトリー装置。

【 1 2 8 7 】

S 2' . レーザーが、約 1 0 0 ~ 5 0 0 ミリワットのパワーで約 5 0 ~ 1 5 0 M H z のパルス周波数にて約 1 ~ 1 0 0 ピコ秒の幅を有する EMR パルスを発するのに作動可能である S 1' の装置。

【 1 2 8 8 】

10

20

30

40

50

S 3' . レーザーが、約 70 ~ 100 MHz の周波数で約 5 ~ 20 ピコ秒の幅を有する E M R パルスを発するのに作動可能である S 2' の装置。

【 1 2 8 9 】

S 4' . タイミング回路が、各パルスと流体流れとの相互作用により生成された散乱光を含むか、または E M R パルスの光を含む E M R パルスに対応する光を感知するのに適応されたセンサーを含む S 1' の装置。

【 1 2 9 0 】

S 5' . タイミング回路が、レーザーを触発してパルスを発するのに作動可能な時計を含む S 1' の装置。

【 1 2 9 1 】

S 6' . 検出器が、パルスの励起エネルギーによって刺激された蛍光発光を検出するのに適応された S 1' の装置。

【 1 2 9 2 】

S 7' . レーザーが、モードロックの固体状態レーザーを含む S 1' の装置。

【 1 2 9 3 】

S 8' . レーザーが、Q スイッチのレーザーを含む S 1' の装置。

【 1 2 9 4 】

S 9' . レーザーが、空洞ダンピングレーザーを含む S 1' の装置。

【 1 2 9 5 】

S 10' . 検出器が、光電子増倍管である S 1' の装置。

【 1 2 9 6 】

S 11' . 光電子増倍管が、約 2 ナノセカンド未満の応答時間を有する S 9' の装置。

【 1 2 9 7 】

S 12' . 電子プロセッサが、パルス波形としてデジタル化された出力を処理するのに作動可能である S 1' の装置。

【 1 2 9 8 】

S 13' . 電子プロセッサが、以下の特徴、デジタル化された出力：臨界傾斜差；パルス立ち上がり時間；パルスピーク；およびパルス領域からの少なくとも 1 つを抽出するのに作動可能である S 12' の装置。

【 1 2 9 9 】

T' . パルスレーザー方法

T 1' . 粒子が問い合わせ位置を流れて流れるように流体流れ中に含まれた粒子を分析する方法であって、

レーザーからの複数の電磁放射 (E M R) パルスを放射し、ここに、核パルスのピークパワーは、レーザーの平均パワーを超え；

流体流れおよびその中に含まれた粒子を、ビーム経路に沿ってレーザーから問い合わせ位置に該パルスを向けることにより断続的に照らし；

問い合わせ位置からの E M R を検出し；

検出された E M R の強度を示す時変アナログシグナルを生成し；

問い合わせ位置でのパルスの到着を示すタイミングシグナルを生成し；

時変アナログシグナルをデジタルシグナルに変換し；次いで

デジタルシグナルを分析して流体流れ中の粒子の特徴を決定する

工程を含む該方法。

【 1 3 0 0 】

T 2' . 時変アナログシグナルをデジタルシグナルに変換する工程が、パルスによる流体流れの照明と一致するように同調される時間にてアナログシグナルをサンプリングすることを含む T 1' 記載の方法。

【 1 3 0 1 】

T 3' . 流体流れを照らす工程が、該粒子と会合する蛍光体を励起させ、かつ、時変アナログシグナルをデジタルシグナルに変換する工程が、問い合わせの照明の後でかつ該蛍

10

20

30

40

50

光体の蛍光性の寿命内所定時間にてアナログシグナルをサンプリングすることを含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 2 】

T 4 ' . 各パルスが、該蛍光体を飽和するのに十分なパワーを含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 3 】

T 5 ' . 問い合わせ位置からの光の検出工程が、光電子増倍管を用いて、該粒子と会合した蛍光体からの蛍光発光を検出することを含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 4 】

T 6 ' . 電磁放射線のパルスを発する工程が、毎秒約 5 0 0 0 ~ 1 5 0 0 0 万パルスの間で発する工程を含み、ここに、各パルスは約 1 ~ 1 0 0 ピコ秒間の幅を有する T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 5 】

T 7 ' . タイミングシグナルを生成する工程が、パルスと流体流れとの相互作用に起因する散乱光を感知することを含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 6 】

T 8 ' . タイミングシグナルを生成する工程が、クロックシグナルを生成することを含み、かつレーザーからの複数の E M R パルスを発する工程が、刻時シグナルを用いてレーザーを触発しパルスを発することを含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 7 】

T 9 ' . デジタルシグナルを分析する工程が、パルス波形としてデジタルシグナルを分析することを含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 0 8 】

T 1 0 ' . デジタルシグナルを分析する工程が、さらに以下の特徴：シグナル；臨界傾斜差；パルス立ち上がり時間；パルスピーク；およびパルス領域から少なくとも 1 つを抽出することを含む T 9 ' 記載の方法。

【 1 3 0 9 】

T 1 1 ' . 該粒子が精子細胞を含む T 1 ' 記載の方法。

【 1 3 1 0 】

U ' [留保]

【 1 3 1 1 】

V ' C V 最適化

V 1 ' . 仕分け用の細胞の集団を染色するための一組の条件を評価する方法であって、集団は、第 1 のタイプおよび第 2 のタイプの細胞を含み、

(a) 1 組の染色条件下、細胞の集団の画分を蛍光色素で染色し；

(b) 染色された細胞が速度 R にてフローサイトメーターの問い合わせ位置を通過するように染色された細胞を電磁放射線に曝露し；

(c) 曝露した細胞の蛍光発光特性を決定し；

(d) 決定された蛍光を用いて、曝露された細胞を 1 以上のサブ集団の細胞に分類し、ここに、サブ集団の 1 つは、第 1 の細胞タイプの富化されたサブ集団であり；

(e) 富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特性についての変動係数を決定して、染色条件についての仕分け効率の指標を供し；次いで

(f) 仕分け効率を改善するために細胞が染色されるべき染色条件、または染色された細胞がフローサイトメーターの問い合わせ位置を通過すべき速度 R を修飾するかを決定することを含む該方法。

【 1 3 1 2 】

V 2 ' . 該画分が、第 1 の画分を含み、該組の染色条件が、第 1 の組の染色条件を含み、さらに、第 1 の組とは異なる第 2 の染色条件下で該集団の細胞の第 2 の画分を染色し、次いで該集団の細胞の第 2 の画分を用いて工程 (b) ~ (e) を行うことを含むクレーム V 1 ' の方法。

【 1 3 1 3 】

10

20

30

40

50

V 3' . 変動係数が第 1 画分について決定された後、第 2 の画分が染色されるクレーム V 2' の方法。

【 1 3 1 4 】

V 4' . 第 2 の組の染色条件が、少なくとも 1 つの以下のもの：(1) 蛍光色素の濃度；(2) 細胞を染色するのに用いた染色期間の長さ；および(3) 細胞を染色するのに用いた染色期間中の細胞の温度により第 1 の組の染色条件とは異なるクレーム V 2' の方法。

【 1 3 1 5 】

V 5' . さらに、第 1 および第 2 の組とは異なる第 3 の組の染色条件下で細胞の該集団の第 3 の画分を染色し、細胞の集団の第 3 の画分を用いて工程 (b) ~ (e) を行うことを含むクレーム V 2' の方法。

10

【 1 3 1 6 】

V 6' . さらに、第 1、第 2 および第 3 の組とは異なる第 4 の組の染色条件下で細胞の該集団の第 4 の画分を染色し、細胞の集団の第 4 の画分を用いて工程 (b) ~ (e) を行うことを含むクレーム V 5' の方法。

【 1 3 1 7 】

V 7' . さらに、第 1、第 2、第 3 および第 4 の組とは異なる第 5 の組の染色条件下で細胞の該集団の第 5 の画分を染色し、細胞の集団の第 5 の画分を用いて工程 (b) ~ (e) を行うことを含むクレーム V 6' の方法。

【 1 3 1 8 】

20

V 8' . さらに、第 2 の組の染色条件を得るために該決定に基づいて第 1 の組の染色条件を選択的に変更することを含むクレーム V 2' の方法。

【 1 3 1 9 】

V 9' . 第 2 の画分について工程 (f) を行なうことにより決定された修飾された染色条件が、残りの細胞の集団の染色に適用されるクレーム V 2' の方法。

【 1 3 2 0 】

V 1 0' . 細胞の複数の画分が、工程 (a) において染色され、各画分が、ユニークな組の染色条件下で染色され、ここに、工程 (b) ~ (e) は各画分について行われ、工程 (f) は、各変動係数を用いて、該集団中のさらなる細胞を染色するために用いられるべき染色条件の組を決定することを含むクレーム V 1' の方法。

30

【 1 3 2 1 】

V 1 1' . 細胞が、精子細胞であるクレーム V 1' の方法。。

【 1 3 2 2 】

V 1 2' . 第 1 の細胞タイプが、X 染色体を担う精子細胞を含むクレーム V 1 1' の方法。

【 1 3 2 3 】

V 1 3' . 工程 (a) が Hoechst 3 3 3 4 2 で細胞を染色することを含むクレーム V 1' の方法。

【 1 3 2 4 】

V 1 4' . 該蛍光発光特性が、問い合わせ位置を通る細胞の移動に対応する蛍光パルス波形の特徴を含み、該特徴が、以下のもの：(1) 蛍光強度の合計および(2) ピーク蛍光強度の少なくとも 1 つを示すクレーム V 1' の方法。

40

【 1 3 2 5 】

V 1 5' . 工程 (f) の前に工程 (e) からの変動係数が事前決定した変動係数以下であるかを決定し、次いで工程 (e) において決定された変動係数が事前決定された変動係数以下となるまで各時点にて異なる組の染色条件を用いて工程 (a) ~ (e) を繰り返して異なる画分の細胞を染色し、ここに、工程 (f) は、各染色条件についての工程 (e) からの変動係数が事前決定された変動係数以下であるならば、さらなる細胞を染色するための染色条件を用いることを決定することを含むクレーム V 1' の方法。

【 1 3 2 6 】

50

V 1 6 . 仕分け用の細胞の集団を染色するための一組の条件を評価する方法であって、
 集団は、第 1 のタイプおよび第 2 のタイプの細胞を含み、
 (a) 1 組の染色条件下、細胞の集団の画分を蛍光色素で染色し；
 (b) 染色された細胞が速度 R にてフローサイトメーターの問い合わせ位置を通過するよ
 うに染色された細胞を電磁放射線に曝露し；
 (c) 曝露した細胞の蛍光発光特性を決定し；
 (d) 決定された蛍光を用いて、曝露された細胞を 1 以上のサブ集団の細胞に分類し、こ
 こに、サブ集団の 1 つは、第 1 の細胞タイプの富化されたサブ集団であり；
 (e) 富化されたサブ集団の細胞の蛍光発光特性についての変動係数を決定して、染色条
 件の仕分け効率の指標を供し；
 (f) 仕分け効率を改善するために細胞の画分が染色されるべきいずれかの染色条件、ま
 たは染色された細胞がフローサイトメーターの問い合わせ位置を通過すべきである速度 R
 を修飾するかを決定し；
 (g) 残りの細胞の集団に修飾された染色条件を適用する
 ことを含む該方法。

10

【 1 3 2 7 】

V 1 7 ' . さらに、フローサイトメーター中の残りの細胞の集団を仕分けして、第 1 の
 細胞タイプの富化された試料集団を得るクレーム V 1 6 ' の方法。

【 1 3 2 8 】

V 1 8 ' . 該画分が、第 1 の画分を含み、該組の染色条件が、第 1 の組の染色条件を含
 み、さらに、第 1 の組とは異なる第 2 の染色条件下で該集団の細胞の第 2 の画分を染色し
 、次いで該集団の細胞の第 2 の画分を用いて工程 (b) ~ (e) を行うことを含むクレ
 ム V 1 6 ' の方法。

20

【 1 3 2 9 】

V 1 9 ' . 変動係数が第 1 画分について決定された後、第 2 の画分が染色されるクレ
 ム V 1 8 ' の方法。

【 1 3 3 0 】

V 2 0 ' . 第 2 の組の染色条件が、少なくとも 1 つの以下のもの：(1) 蛍光色素の濃
 度；(2) 細胞を染色するのに用いた染色期間の長さ；および(3) 細胞を染色するの
 に用いた染色期間中の細胞の温度により第 1 の組の染色条件とは異なるクレーム V 1 8 ' の
 方法。

30

【 1 3 3 1 】

V 2 1 ' . さらに、第 1 および第 2 の組とは異なる第 3 の組の染色条件下で細胞の該集
 団の第 3 の画分を染色し、細胞の集団の第 3 の画分を用いて工程 (b) ~ (f) を行うこ
 とを含むクレーム V 1 8 ' の方法。

【 1 3 3 2 】

V 2 2 ' . さらに、第 1、第 2 および第 3 の組とは異なる第 4 の組の染色条件下で細胞
 の該集団の第 4 の画分を染色し、細胞の集団の第 4 の画分を用いて工程 (b) ~ (f) を
 行うことを含むクレーム V 2 1 ' の方法。

40

【 1 3 3 3 】

V 2 3 ' . さらに、第 1、第 2、第 3 および第 4 の組とは異なる第 5 の組の染色条件下
 で細胞の該集団の第 5 の画分を染色し、細胞の集団の第 5 の画分を用いて工程 (b) ~ (f)
 を行うことを含むクレーム V 2 2 ' の方法。

【 1 3 3 4 】

V 2 4 ' . さらに、工程 (g) に先立って、蛍光発光特性についての変動係数レベルが
 事前決定された変動係数以下を生じる工程 (g) において用いたある組の染色条件を選択
 することを含むクレーム V 1 8 ' の方法。

【 1 3 3 5 】

V 2 5 ' . 事前決定した変動係数が、約 1 . 3 % 以下であるクレーム V 2 4 ' の方法。

【 1 3 3 6 】

50

V 2 6 ' . 工程 (f) の前に工程 (e) からの変動係数が事前決定した変動係数以下であるかを決定し、次いで工程 (e) において決定された変動係数が事前決定された変動係数以下となるまで各時点にて異なる組の染色条件を用いて工程 (a) ~ (e) を繰り返して異なる画分の細胞を染色し、ここに、工程 (f) は、各染色条件についての工程 (e) からの変動係数が事前決定された変動係数以下であるならば、さらなる細胞を染色するための染色条件を用いることを決定することを含むクレーム V 1 6 ' の方法。

【 1 3 3 7 】

V 2 7 ' . 細胞が、精子細胞であるクレーム V 1 6 ' の方法。

【 1 3 3 8 】

V 2 8 ' . 第 1 の細胞タイプが、X 染色体を担う精子細胞を含むクレーム V 2 7 ' の方法。 10

【 1 3 3 9 】

V 2 9 ' . 工程 (a) が、Hoechst 3 3 3 4 2 で細胞を染色することを含むクレーム V 1 6 ' の方法。

【 1 3 4 0 】

V 3 0 ' . 該蛍光発光特性が、問い合わせ位置を通る細胞の移動に対応する蛍光パルス波形の特徴を含み、該特徴が、以下のもの：(1) 蛍光強度の合計および (2) ピーク蛍光強度の少なくとも 1 つを示すクレーム V 1 6 ' の方法。

【 1 3 4 1 】

W ' . 落射照明センサーを用いる自動較正 20

W 1 ' . 液滴破壊位置にて連続的な流体流れを中断するように複数の液滴にある 1 組の 1 以上の電荷を選択的に適用または適用せず、かつ液滴を 2 以上の個別の液滴流れに静電学的に仕分する液滴仕分けフローサイトメーターを自動的に較正する装置であって、各液滴についての電荷の選択が、連続的な流体流れに含まれた粒子がフローサイトメーターの問い合わせ位置で検出された時期と、液滴破壊位置でのその粒子の到着との間の経過時間の見積りを表す液滴遅延設定に基づいた液滴の予期された含量に依存し、

(a) 1 つの該個別の液滴流れ中の液滴を照らし、液滴に含まれた粒子により発光されたいずれかの蛍光発光を検出し、次いで検出された蛍光発光に代表的な出力シグナルを生成するための問い合わせ位置の下流の落射照明センサー；ならびに

(b) 出力シグナルを分析し、(1) 液滴遅延設定；および (2) 該組の電荷における電荷の許容度 (amplitude) のうち少なくとも 1 つを自動的に調整するように作動可能な制御を含む該装置。 30

【 1 3 4 2 】

W 2 ' . 制御が、検出された蛍光発光と、予期された含量を有する液滴により生成された蛍光発光との間の差の関数として液滴遅延設定を調節する W 1 ' の装置。

【 1 3 4 3 】

W 3 ' . 制御が、該蛍光性の粒子を含む液滴につき検出された蛍光発光の平均ピーク強度における変化の関数として該組の電荷における帯電の程度を調整する W 1 ' の装置。

【 1 3 4 4 】

W 4 ' . 該落射照明センサーが、光源、ダイクロイックフィルター、レンズシステムおよび光検出器を含む W 1 ' の装置。 40

【 1 3 4 5 】

W 5 ' . 落射照明センサーが、さらに光源からセンサーが液滴を照らす位置に光を導くのに作動可能な光ファイバーケーブルを含む W 4 ' の装置。

【 1 3 4 6 】

W 6 ' . 電場が 1 対の電氣的に帯電したバッフルプレートによって生成され、落射照明センサーが液滴が該バッフルプレート間を通過するように、該液滴を照らすように位置させた W 5 ' の装置。

【 1 3 4 7 】

W 7 ' . 落射照明センサーが、液滴が 1 以上のバッフルプレートにより生成された電場 50

を通過して移動するようにバッフルプレートの少なくとも1つを保持する電氣的に絶縁された支持体においてホールを通過して該液滴を照らすように位置されるW6'の装置。

【1348】

W8' . 光源が、問い合わせ位置にて粒子を照らすのに作動可能であるW4'の装置。

【1349】

W9' . 残りの該2以上の別々の各液滴流れのためのクレームW1'のパラグラフ(a)に記載された落射照明センサーをさらに含み、該制御が、各液滴流れについての落射照明センサーからの出力シグナルを分析し、少なくとも1つの：(1)1以上の流れについての検出された蛍光発光と液滴流れにおける予期された含量を有する液滴により生成された蛍光発光との間の差の関数としての液滴遅延設定；および(2)該1以上の液滴流れの少なくとも1つで蛍光粒子を含有する液滴につき検出された蛍光発光の平均ピーク強度における変動の関数として該組の電荷における電荷の許容度を自動的に調節するように作動可能であることを含むW1'の装置。

10

【1350】

W10' . 電場が、1対の電氣的に絶縁されたバッフルプレートにより生成され、落射照明センサーが該液滴が該バッフルプレート間を通過するように該液滴を照らすように位置されたW9'の装置。

【1351】

W11' . 落射照明センサーが、液滴が1以上のバッフルプレートにより生成された電場を通過して移動するように少なくとも1つのバッフルプレートを保持する電氣的に絶縁された支持体におけるホールを通過して該液滴を照らすように位置させたW10'の装置。

20

【1352】

W12' . 制御が、液滴形成に最適な相の上下約36度内でチャージさせた液滴の相を自動的に維持するように作動可能であるW1'の装置。

【1353】

W13' . 制御が、液滴形成に最適な相の上下約10.8度内でチャージさせた液滴の相を自動的に維持するように作動可能であるW12'の装置。

【1354】

X' . 自動較正方法

X1' . 液滴破壊位置にて連続的な流体流れを中断するように複数の液滴にある1組の1以上の電荷を選択的に適用または適用せず、かつ液滴を2以上の個別の液滴流れに静電学的に仕分する液滴仕分けフローサイトメトリーにおける適当な仕分け較正を連続的に確認する方法であって、各液滴についての電荷の選択が、連続的な流体流れに含まれた粒子がフローサイトメーターの問い合わせ位置で検出された時期と、液滴破壊位置でのその粒子の到着との間の経過時間の見積りを表す液滴遅延設定に基づいた液滴の予期された含量に依存し、

30

(a) ビーム軸に沿って前方方向にレンズシステムを通過して照明ビームを方向付けることにより該個別の液滴流れのうちの1つにおける液滴を照らして、液滴中に含有されたいずれかの粒子により蛍光光の発光を引き起こし；

(b) 該レンズシステムを用いて、いくらかの蛍光光を集め、それをビーム軸に沿って後方方向に方向付けし；

40

(c) 少なくともいくらかの集めた蛍光光を検出し、検出された光に代表的な出力シグナルを生成し；次いで

(d) 出力シグナルを分析し、その分析に基づいて、(1)液滴遅延設定；および(2)該組の電荷における電荷の許容度の少なくとも1つを自動的に調整する

ことを含む該方法。

【1355】

X2' . 調整工程が、検出された蛍光発光と、予期された含量を有する液滴により生成された蛍光発光との間の差の関数として液滴遅延設定を調整することを含むX1'記載の方法。

50

【 1 3 5 6 】

X 3' . 調整工程が、該蛍光性の粒子を含む液滴につき検出された蛍光発光の平均ピーク強度における変動の関数として該組の電荷における帯電の程度を調整する X 1' 記載の方法。

【 1 3 5 7 】

X 4' . 照明工程が、光ファイバーケーブルを用いて、光を光源から該仕分け液滴流れに隣接する位置に導くことを含む X 1' 記載の方法。

【 1 3 5 8 】

X 5' . 電場が 1 対の電氣的に帯電したバッフルプレートによって生成され、照明工程がそれらが該バッフルプレート間を通過するように、該液滴を照らすことを含む X 1' 記載の方法。

10

【 1 3 5 9 】

X 6' . 少なくとも 1 つのバッフルプレートが、電氣的に絶縁された支持体によって保持され、照明工程が液滴が電場を通過して移動するように、支持体中のホールを通過して液滴を照らすことを含む X 5' 記載の方法。

【 1 3 6 0 】

X 7' . さらに、光源を用いて問い合わせ位置にて粒子を照らすことを含む X 1' 記載の方法。

【 1 3 6 1 】

X 8' . 残りの該 2 以上の各液滴流れについて工程 (a) ~ (c) を行うことをさらに含み、該工程 (d) が、各出力シグナルの各々を分析し、次いで少なくとも 1 つの ; (1) 検出された蛍光発光と予期された含量を有する液滴により生成された蛍光発光との間の差の関数としての液滴遅延設定 ; および (2) 少なくとも 1 つの該液滴流れにおいて蛍光粒子を含有する液滴につき検出された蛍光発光の平均ピーク強度における変動の関数として該組の電荷における電荷の許容度を調整することをさらに含む X 1' 記載の方法。

20

【 1 3 6 2 】

X 9' . 電場が、 1 対の電氣的に絶縁されたバッフルプレートにより生成され、照明工程が、該液滴が該バッフルプレート間を通過するように該液滴を照らすことを含む X 8' 記載の方法。

【 1 3 6 3 】

X 10' . 少なくとも 1 つのバッフルプレートが、電氣的に絶縁された支持体によって保持され、照明工程が液滴が電場を通過して移動するように、支持体中のホールを通過して液滴を照らすことを含む X 9' 記載の方法。

30

【 1 3 6 4 】

Y' . テストストリーム較正方法

Y 1' . 液滴破壊位置の連続的な流体流れを中断するように複数の液滴にある 1 組の 1 以上の電荷を選択的に適用または適用せず、かつ液滴を 2 以上の個別の液滴流れに静電学的に仕分する液滴仕分けフローサイトメトリーにおける適当な仕分け較正を連続的に確認する方法であって、各液滴についての電荷の選択が、連続的な流体流れに含まれた粒子がフローサイトメーターの問い合わせ位置で検出された時期と、液滴破壊位置でのその粒子の到着との間の経過時間の見積りを表す液滴遅延設定に基づいた液滴の予期された含量に依存し、

40

粒子を含む実質的にゼロの可能性を持つ見積もられた液滴を選択し ;

選択された液滴の外にテスト流れを形成するために、選択された液滴に該組の電荷の 1 つの電荷を適用し ;

テスト流れ中の液滴を照らし ; 次いで

選択された液滴中のいずれかの粒子により発光または散乱されたいずれかの光を検出することを含む該方法。

【 1 3 6 5 】

Y 2' . 検出工程において検出した光が閾値レベルを超える場合に、液滴遅延設定を調

50

整することをさらに含む Y 1' 記載の方法。

【1366】

Y 3' . 調整する工程が、自動的に行なわれる Y 2' 記載の方法。

【1367】

Y 4' . 帯電する工程において適用した電荷が、中間の電荷 (neutral charge) である Y 1' 記載の方法。

【1368】

Y 5' . 照明および検出工程が、落射照明センサーを用いて行なわれる Y 1' 記載の方法。

【1369】

Z' . 仕分け回収システム

Z 1' . 液滴が液滴破壊位置にて連続的な流体流れから形成されるように、ある組の電荷から液滴の流れにおける各液滴に 1 つの電荷を選択的に適用するための電荷エレメント ;

液滴がバッフルプレート間を通過して、それらの電荷により液滴を仕分けするように配置した電荷エレメントから下流の 1 対の電氣的に絶縁されたバッフルプレート ; および

以下のエレメント : (1) 荷電エレメントから残骸を取り出すための選択的に作動できる空気システム ; および (2) バッフルプレートから残骸を取り出すための選択的に作動できる空気システムの少なくとも 1 つを含む残骸取り出しシステムを含む

液滴仕分けフローサイトメーター用の仕分けシステム回収システム。

【1370】

Z 2' . 該残骸取り出しシステムが、エレメント (1) およびエレメント (2) を含む Z 1' 記載のシステム。

【1371】

Z 3' . 残骸取り出しシステムが、遊離液滴からの残骸が液滴仕分けに干渉するプロセッサーによる測定に際してプロセッサーにより自動的に作動されるように適応された Z 1' 記載のシステム。

【1372】

Z 4' . 残骸取り出しシステムがエレメント (1) を含み、エレメント (1) の該選択的に作動できる空気システムが荷電エレメントから残骸を吸引 (vacuum) するための該荷電エレメントに隣接するオリフィスを有する真空通路を含む Z 1' 記載のシステム。

【1373】

Z 5' . 残骸取り出しシステムがエレメント (2) を含み、エレメント (2) の該選択的に作動できる空気システムが、圧縮ガスがバッフルプレートから残骸を吹き飛ばすために送達されるオリフィスを有する真空通路を含む Z 1' 記載のシステム。

【1374】

Z 6' . 液滴仕分けフローサイトメーターシステムを操作する方法であって、電荷エレメントを用いて、液滴が液滴破壊位置にて連続的な流体流れから形成されるように、1 つの電荷をある組の電荷から液滴の流れ中の各液滴に選択的に適用し ;

荷電エレメントから下流の 1 対の電氣的に絶縁されたバッフルプレート間に液滴を通過させて、それらの電荷により液滴を仕分けし ;

プロセッサーを用いて、残骸が液滴仕分けと干渉するかを決定し ; 次いで

プロセッサーが、液滴仕分けと干渉すると決定した場合に、プロセッサーの制御下で残骸取り出しシステムを用いて該残骸を取り出し、ここに、該残骸取り出しシステムは少なくとも 1 つの以下のエレメント : (1) 荷電エレメントから残骸を取り出すための選択的に作動できる空気システム ; および (2) バッフルプレートから残骸を取り出すための選択的に作動できる空気システムを含む該方法。

【1375】

権利の留保

出願人は、前記されたいずれかの発明の態様に指向される特許請求の範囲ならびに本明

10

20

30

40

50

細書に記載されたかまたは図面に示されたいずれかの他の主題を要求するために、いずれの指定国においても、補正した特許請求の範囲ならびに継続出願および/または分割出願の提出に関する全ての権利を留保する。

【符号の説明】

【 1 3 7 6 】

各部分につき関連した参照数字の部分リスト

	総括	
39	精液収集	
41	精液を標識する	
41A	緩衝剤を添加する	10
43	質制御	
47	洗浄	
48	流体を染色する	
49	染色する	
51	インキュベーション	
53	フローサイトメーターの試料導入デバイスに負荷する	
54	フローサイトメトリーを介してシース流体を添加する	
55	仕分ける	
57	仕分けられた精子を収集する	
58A	収集流体を添加する	20
58B	精子細胞を濃縮する	
58C	低温エキстенダーを添加する	
59	仕分けられた精子をストローに負荷する	
61	冷凍保存	
63	液体窒素中にパックする	
65	分配	
67	販売	
69	貯蔵	
71	人工授精	
		30
	フローサイトメトリー	
1	システム(全体的な)	
3	キャリアー流体の供給	
7	シース流体の供給	
9	仕分け能力を持つフローサイトメトリー装置	
15	流体送達システム	
17	キャリアー流体	
19	シース流体	
21	流体の流れ	
23	粒子の流れ	40
25	電磁放射線のビーム	
31	粒子からの電磁放射線の発光	
33	液滴	
35	液滴中に含有された粒子	
	フローサイトメトリー装置(シングルチャンネル)	
101	ノズルシステム	
103	ノズルオリフィス	
105	変換器	
107	液滴破壊	50

109	光学システム	
115	問い合わせ位置	
117	光検出器	
119	仕分けシステム	
123	液滴の第1の異なる群または集団	
125	液滴の第2の異なる群または集団	
2201	収集システム	
131	プロセッサ	
	ノズルシステム	10
133	円筒型フローボディー	
135	中心長軸内径	
137	ノズル	
139	漏斗型ノズルボディー	
141	ノズルボディーを通る流路	
145	内側螺合穴ぐり	
149	螺合突起またはスタッド	
155	O-リングシール	
157	導管(管状針)	
167	環状空間(ギャップ)	20
173	フローボディー(シース流体)の半径内径	
183	第2の半径内径(さらなるシース流体)	
189	キャリアー流体の中心コア	
191	流体の外側同軸シース	
	細胞配向	
201	ウシ精子細胞	
205	パドル形状のヘッド	
207	平坦で広い対向面	
209	エッジ	30
211	精子赤道	
213	核	
215	尾	
217	核の長さ	
219	ヘッド長さ	
221	ヘッド幅	
223	全体的な長さ	
225	核内の局所化領域	
227	流れ流量の向き	
229	光ビームが広い面にぶつかる角エンベロープ	40
R1	角範囲	
P	面	
	ノズルデザイン	
231	ノズルボディーの内部	
233	ノズルボディーの内面	
235	第1の軸方向にテーパを施した領域	
237	第2の軸方向にテーパを施した領域	
239	第3の軸方向にテーパを施した領域	
247	ノズルの縦軸	50

249	ノズルの第4の内部	
251	第4の領域の軸の長さ	
255	オリフィス部材	
257	ノズルの前端の穴ぐり	
259	第1のねじれゾーン	
261	第2のねじれゾーン	
263	第1のねじれゾーンの表面	
267	第2のねじれゾーンの表面	
271	ねじり力	
273	第1のねじれゾーンの軸の長さ	10
275	第1のテーパ領域の軸の長さ	
277	第2のテーパ領域の軸の長さ	
279	第2のねじれゾーンの軸の長さ	
309	オリフィス部材の円錐上流面	
315	オリフィス部材の円筒下流面	
317	円錐上流面の軸方向の長さ	
327	下流表面の軸の長さ	
配向バッフル		
2001	配向バッフル	20
2003	バッフルプレート	
2005	バッフルホルダー	
2007	上流レッグ	
2009	下流レッグ	
2015	交差の線	
2017	ノズルボディの中心軸	
2019	上流レッグの曲面エッジ	
2025	距離下部レッグは下流に延びる	
2027	バッフルホルダーの全体的な長さ	
2029	バッフルホルダーの外径	30
2031	バッフルホルダーの内径	
2033	交差の線およびノズルの中心の間の距離	
2035	バッフルの上流端	
2037	バッフルホルダーの傾斜面	
2039	下流レッグのサイドエッジ	
2041	下流レッグの下流エッジ	
2049	バッフルプレートおよびバッフルホルダーの間のギャップ	
2051	バッフルホルダーの内部表面	
2053	バッフルプレート背後の容量	
2055	ノズルの内部容量	40
2057	円柱バッフルホルダーの縦軸	
2059	楕円Dの長軸を通るライン	
2061	注入針およびバッフルの間の距離	
2067	バッフルホルダーの下流端	
2069	バッフルホルダーおよびノズルの間の接触点	
2071	O-リング	
2077	ノズルホルダー(ボス)の下流端	
2079	ボスの内径	
2081	コア流およびノズル表面の間のシース流体の部分	
2087	上流(A)での切断面	50

2089	バッフル(B)での切断面	
2091	バッフル(C)での切断面	
2093	バッフル(D)での切断面	
2094	バッフル(E)の下流での切断面	
2097	垂直なバッフルシステム	
2095	気泡	
2099	垂直なバッフルプレート	
2101	垂直なバッフルプレートの曲面エッジ	
2103	垂直なバッフルプレートの真っ直ぐなエッジ	
2105	O-リング	10
2107	ノズルにおける環状ショルダー(シェルフ)	
2109	試料注入針(導管)の外径	
2151	ズレた試料導入導管を有するノズルシステム	
ノズル取り付けおよび調整		
331	ノズル取付具	
333	第1の直線ステージ	
337	第2の直線ステージ	
339	X軸	
341	Y軸	20
343	第3の回転ステージ	
345	Z軸	
347	固定された第1のステージ部材(図示せず)	
349	第1の固定されたステージ部材のためのフレーム	
355	可動性の第1のステージ部材	
357	第1のステージのためのアクチュエータ(マイクロメーター)	
359	固定された第2のステージ部材	
361	可動性の第2のステージ部材	
363	第2の部材のためのアクチュエータ(マイクロメーター)	
365	固定された第3のステージ部材	30
371	可動性の第3のステージ部材	
373	第3のステージに対するアクチュエータ(マイクロメーター)	
375	細胞を含有する流れの略上向き方向	
377	上向き方向の角度	
変換器および液滴形成		
379	カラー	
381	圧電素子(図示せず)	
383	端子	
D	流れの直径	40
破壊センサー		
389	破壊センサー	
391	マイクロプロセッサ	
393	光源	
395	線状フォトアレイ(フォトダイオード)	
401	液滴破壊センサー用のレンズ	
405	電圧オペアンプ回路への電流	
407	トラック/ホールド増幅器	
409	正弦波発生器(トラック/ホールドシグナル)	50

411	A/D変換器	
412	カメラシステム	
413	ストロボ	
414A	マスク	
414B	マスクにおけるスリット形状開口	
落射照明工学システム		
415	落射照明システム	
417	落射照明器具	
419	縦光学軸	10
425	ビームスポット	
427	フォーカスされた照明ビームの軸	
429	長方形のベース	
431	反射フィルター	
435	レーザーまたはアーク放電ランプ	
437	レンズアセンブリを調整	
439	開口	
441	ダイクロイックチャンバーの側壁	
443	ダイクロイックチャンバー	
445	保持リング	20
447	中性密度フィルター	
449	円柱レンズ	
455	レンズホルダー	
457	ジャムナット	
459	ビームスポットの楕円断面図	
461	フィルターを反すためのクリップ	
463	フィルターホルダー	
465	フィルターホルダーの角面	
467	フィルターホルダーの開口	
469	フィルターホルダーに対する直線ステージ	30
471	X軸	
473	アウトリガ	
475	直線ステージに対するアクチュエータ	
477	ダイクロイックフィルター	
479	ダイクロイックフィルター用のクリップ	
485	ダイクロイックフィルター用のフレーム	
487	順方向	
489	光学器具の長軸光学軸	
491	フォーカスアセンブリ	
497	細胞によって発光された蛍光パルス波形またはシグナル	40
498	励起空間関数	
501	顕微鏡アダプター	
503	ダイクロイックチャンバーの前面壁における開口	
505	ダイクロイックチャンバーの前面壁	
507	フォーカスバレル	
509	レンズ取り付けバレル	
511	フォーカスレンズ	
513	後方方向	
515	伸縮式フォーカス調整	
517	平行発光された光	50

519	フィルタリングシステム	
521	発光フィルター	
523	発光フィルターホルダー	
525	ダイクロイックチャンバーの裏壁における開口	
527	ダイクロイックチャンバーの裏壁	
529	整列薄膜アセンブリ	
531	整列薄膜のスライダー	
533	フィルターアセンブリ構成要素のためのレール	
535	整列薄膜のためのフィルターホルダー	
539	薄膜フィルターエレメント	10
541	フィルターエレメントをフィルターホルダーに取り付けるためのクリップ	
543	光学軸に対する整列薄膜についての角度	
545	スライダーをベースに固定するためのファスナー	
547	ベース中の平行スロット	
549	非球面レンズ	
551	非球面レンズのためのホルダー	
553	非球面レンズ用のフレーム	
557	非球面レンズ用のファスナー	
559	空間フィルター	
561	開口プレート	20
563	空間フィルタープレート用のフレーム	
567	垂直スリット	
571	水平スリット	
573	開口	
575	垂直寸法	
577	水平寸法	
579	収集容量	
583	プレートホルダー	
587	プレートホルダー用のファスナー	
589	開口プレートのためのバックング部材	30
449A	調整可能な取り付けアセンブリ	
449B	スロット	
449C	スロット	
450	蛍光発光を反射する落射照明	
451	ダイクロイックフィルター	
光検出器		
591	光検出器用の取り付けプレート	
595	光検出器用のファスナー	40
ビーム入射の角度		
605	問い合わせ位置およびノズルオリフィスの間の距離	
609	ビーム軸	
A	入射の角度	
フォーカスされたビームスポット		
L1	長軸に沿った長さ	
W1	短軸に沿った幅	
仕分けシステム		
		50

627	荷電デバイス	
629	荷電された偏向板	
631	荷電要素	
633	荷電要素における開口	
635	偏向板用の電力供給	
5001	調整可能な取り付けアセンブリ	
5003	取り付けアセンブリ調整ボード	
5005	取り付けアセンブリバックキング	
5007	ファスナー	
5009	スロット	10
5011	並進軸	
5013	並進軸	
5015	取り付けアセンブリ調整ボード	
5017	ファスナー	
5019	スロット	
5021	固定支点	
5023	ファスナー	
5025	スプリング	
	自動仕分け較正	20
4201	較正システム	
4203	落射照明センサー	
4205	光ファイバーケーブル	
4207	ダイクロイックフィルター	
4209	レンズシステム	
4211	液滴中の粒子からの蛍光発光	
4213	光検出器	
4215	ビームストップ	
		30
	仕分けシステム欠陥修正	
5047	荷電要素に対するデブリス除去システム	
5049	偏向板に対するデブリス除去システム	
5051	荷電要素に対するサポート	
5053	真空通路	
5055	真空ライン	
5057	荷電要素に隣接した開口	
5058	フィッティング	
5059	加圧ガスライン	
5061	マニフォールド	40
5063	空気通路	
5064	開口	
5065	フィッティング	
5066	偏向板の側面	
	仕分けられた試料の保護	
4033	収集容器	
4041	汚染防止メカニズム	
4043	空気圧式アクチュエータ	
4045	スイングアーム	50

4047 スイングアームの末端

流体送達システム

645	シリンジポンプ	
647	ポンプからキャリアー供給までのフローライン	
649	キャリアー流体の供給を含有するための容器	
651	ポンプから注入針へのライン	
657	シリンジポンプから針への供給ライン	
659	可変速モーター	
661	シース流体の供給のための第2の容器	10
667	ノズルにおける半径内径にシース流体を接続するための供給ライン	
669	供給ラインにおける制御弁	
671	シース流体に対するガス圧システム	
675	加圧ガスの源	
679	加圧ガスのエアライン	
681	シース流体タンクに供給される圧力を制御するための調節装置	
683	エアラインにおける二方弁	

制御

689	A/D変換器	20
693	ビームスポットを通過して動く点によって経験される相対的なビーム強度	
695	ビームスポット横切る精子からの相対的発光パルス強度	
d	ノズルおよび液滴破壊位置の間の距離	

シグナル処理

701	光検出器からのアウトプットシグナル	
703	液滴発生クロックシグナル	
705	デジタルシグナル処理(デジタル細胞アナライザー)	
707	A/Dからのデジタルシグナル	
735	PC/コンピューターターミナル	30
737	マスタークロック(128 x クロックシグナル)	
739	データ獲得(HH1')	
741	検出パラメーター(HH1)を初期設定する	
745	識別パラメーター(HH2)を初期設定する	
747	デジタルパルス検出(HH3)	
749	デジタルパルス分析-特徴抽出(HH4)	
753	パルス面積(HH5)	
755	パルスピーク(HH6)	
757	パルス識別(HH7)	
759	仕分け(HH8)	40
761	ドリフト分析(HH9)	
763	ベイズ則についての決定境界	
769	初期設定	
771	システムチェック	
773	ユーザー相互干渉	
775	リトライ(3回まで)	
777	フラッシュ	
779	ビーズ品質制御	
781	試料を吸収	
783	試料質制御	50

785	サンプリングを開始	
787	仕分けオン	
789	サンプリング完了	
791	サンプリング継続	
793	仕分けオフ	
795	X/Y識別最適	
797	X/Y識別を設定	
799	識別OK	
801	速度最適	
803	シリンジ速度を設定	10
805	速度OK	
807	システムチェック	
809	システムリセット	
811	システムOK	
813	例示的総操作流	
825	積分器	
827	幅/面積コンパレータ	
829	動的 閾値計算器	
831	パルス識別	
833	JTAGポートI/O	20
837	ウィンドウコンパレータ (面積)	
839	パルス幅およびトリガーロジック	
841	仕分け決定	
843	I/Oコントローラー	
845	スレーブコントローラー	
847	仕分けコントローラーボード	
849	USB	
851	DSPボードSDRAM	
853	仕分けシグナル	
854	低域フィルター	30
855	I/OボードSDRAM	
857	プロセッサ I/O	
859	周辺I/Oバス	
861	仕分けパルス発生器	
863	データ管理プロセッサ	
865	パルス検出プロセッサ	
867	特徴抽出プロセッサ	
873	仕分けプロセッサ	
875	DSPボードRAM	
OL	使用不可能な集団中の同時液滴と比較した使用可能な集団中の同時液滴の間の反比例関係	40
P1	85% 純度に対応するラインOL上の点	
LL	所望の粒子の60%収集に対応するラインOL上の点	
OR	操作範囲(P1およびLLの間のOLのセグメント)	
6000	生データ	
6001	並べられていない細胞の第1の集団	
6003	並べられていない細胞の第2の集団	
6005	並べられたY集団	
6007	並べられたX集団	
6010	未加工データ	50

6011	並べられていない細胞の集団	
6015	並べられたY集団	
6017	並べられたX集団	
	マルチチャネルシステム	
1001	マルチチャネルシステム	
1003	フローサイトメトリーユニット	
1005	共通粒子供給	
1007	電磁放射線の共通源	
1009	共通ハウジング	10
1011	制御のための共通インプット	
1019	共通アウトプット	
1021	共通流動体送達システム	
1023	共通温度制御システム	
1025	共通電力源	
1027	共通廃棄回収システム	
1029	共通偏向板システム	
1031	共通清浄システム	
	共通ハウジング	20
1069	ベース	
1071	2つの側壁	
1073	ショルダーの下部対	
1075	より低いカバーパネル	
1077	ハウジングの前	
1081	ショルダーの上部対	
1083	上部カバーパネル	
1085	ハウジングの後方	
1087	複数のサイトメトリーユニットを取り付けるためのフレームワーク	
1089	(ノズルマウントを取り付けるための)ハウジングの側壁に付けられた横棒	30
1093	側壁の間に延びる斜軸式設置プレート	
	共通流体供給	
1105	キャリアー流体のためのポンプ	
1107	キャリアー流体の共通供給	
1115	シース流体に対するガス圧システム	
1117	シース流体の共通供給	
1121	マニフォールドシステム	
1123	キャリアー流体の共通供給を含有する容器	
1125	容器用のホルダー	40
1133	ホールディングブロック	
1135	容器を受け取るためのキャビティー	
1137	緩衝材料用の第2のキャビティー	
1139	緩衝材料用の容器	
1141	シリンジポンプ	
1147	シリンジポンプからマニフォールドへの供給ライン	
1149	キャリアーおよび緩衝流体を制御する三方弁	
1155	シース流体の共通供給のための容器	
1157	シース流体容器からマニフォールドへの供給ライン	
1161	加圧ガスの源	50

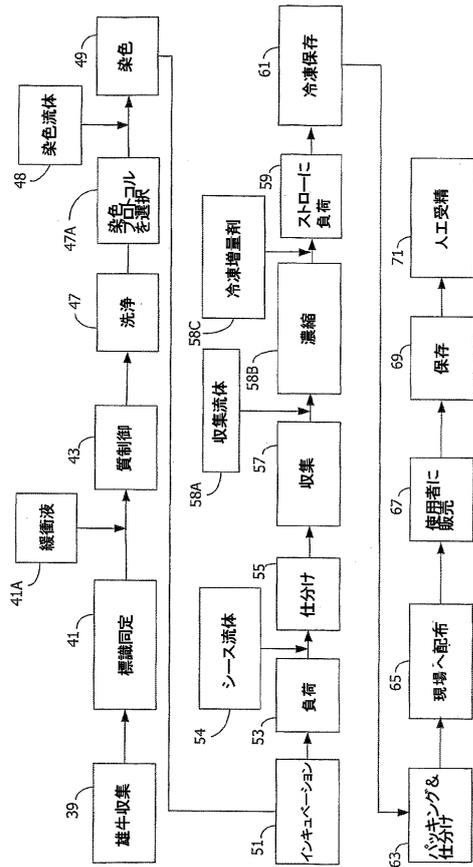
1163	ガスライン	
1165	ガスライン中のレギュレーター	
1167	ガス源およびシース流体タンクのためのガスラインのための二方弁	
1169	清浄液の供給を加圧するためのガスライン	
1173	清浄液のタンク	
1175	清浄液に対するガスラインのための二方弁	
1177	マニフォールド	
1179	ラミネート加工されたブロック	
1181	経路	
1185	流体流量回路	10
1189	シリンジポンプに接続されたインレット	
1191	シース流体の供給に接続されたインレット	
1193	キャリアー流体およびシース流体のためのアウトレット	
V1-V6	マニフォールド通路を通過する流れを制御するための弁	
1203	(マニフォールドブロックを付着するための) フレーム部材	
1205	ブロックに螺合されたフィッティング	
1207	試料容器	
V1A-V1D	(試料流体のノズルへの流れを制御するための)二方弁	
1217	試料容器の針	
1221	廃棄システム	20
1223	廃棄タンク(容器)	
1225	(真空を発生するための)真空ポンプのようなメカニズム	
1227	(弁V1A-V1Dを廃棄タンクに接続する)廃棄ライン	
1233	(廃棄タンクおよび真空ポンプを連結するラインにおける)疎水性フィルター	
1235	シース流体のための流体回路	
V2A-V2D	(シース流体のノズルへの流れを接続するための)二方弁	
1241	シース供給ライン	
1247	シース流体流回路を廃棄タンクに連結する廃棄ライン	
	共通電力供給および制御	30
1249	共通電力供給	
1251	共通電力送達システム	
1253	共通インプット(GUI)	
1255	(マイクロプロセッサへの)共通アウトプット	
	共通温度制御	
1257	温度制御システム	
1259	流体流回路(温度制御用)	
1263	(ホールディングブロックにおける温度制御のための)流体通路	
1265	制御ユニット	40
1269	(マニフォールドにおける温度制御のための)流体通路	
V6	シャットオフ弁	
	共通光ビームおよびビーム分割システム	
1270	ビームスプリッター	
1270A	ビームスプリッターからの第1のビーム	
1270B	ビームスプリッターからの第2のビーム	
1271	第2のビームスプリッター	
1271A	第2のビームスプリッターからの第1のビーム	
1271B	第2のビームスプリッターからの第2のビーム	50

1272	第3のビームスプリッター	
1272A	第3のビームスプリッターからの第1のビーム	
1272B	第3のビームスプリッターからの第2のビーム	
1273	ビームガイダンスシステム	
1279	下部フィルターアセンブリ	
1281	上部ミラーアセンブリ	
1285	(下部フィルターアセンブリ用の)ベース	
1289	(下部フィルターアセンブリ用の)ステージ	
1291	ステージを移動させるためのメカニズム(マイクロメーター)	
1293	ステージ上の傾斜可能プラットフォーム	10
1295	(プラットフォーム上の)ミラー	
1297	(上部ミラーアセンブリ用の)ベース	
1299	(上部ミラーアセンブリ用の)ステージ	
1301	(上部ミラーアセンブリ用の)傾斜可能プラットフォーム	
1303	(上部ミラーアセンブリ用の)ミラー	
1305	上部ステージを移動させるためのメカニズム	
1309	(ハウジングの側壁に付けた)標的プレート	
1311	(標的プレートにおける)垂直に整列させた穴	
1315	第1の反射フィルター	
1317	第2の反射フィルター	20
1319	第3の反射フィルター	
1321	第4の反射フィルター	
共通偏向板		
1331	2つの共通偏向板	
1333	(ハウジング上に共通偏向板を取り付けるための)フレーム	
モジュラーマルチチャンネルシステム		
4001	マルチチャンネルシステム	
4009	モジュラーサイトメトリー ユニット	30
4011	モジュラーユニットのためのハウジング	
4013	共通ハウジング	
4015	レーザー	
4017	ビーム分割およびガイダンスシステム	
4021	モジュラーハウジングに進入するためのレーザーに対する穴	
4023	出口穴を覆うためのプレート	
4025	システムのための収集システム	
毛管ノズルシステム		
1335	毛管ノズルシステム	40
1337	毛管	
1341	光透過媒体で充填されたチャンバー	
代替仕分けシステム		
1351	光損傷仕分けシステム	
1353	第2のレーザー	
1355	収集容器	
1357	流体スイッチシステム	
1359	流体スイッチデバイス	
1361	第1収集容器への毛管分岐	50

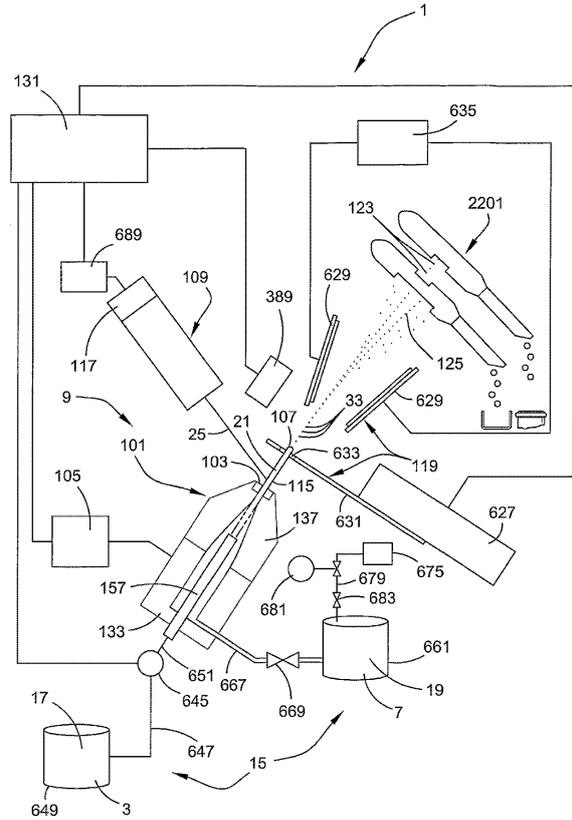
1365	第2収集容器への毛管分岐	
1367	(流体流の方向を選択的に制御するための圧力波を発生させる)変換器	
1369	ノズルの末端上の毛管	
1371	液滴緩衝流仕分けシステム	
1373	高速液滴緩衝流れ	
1375	高速液滴流れに対する液滴発生システム	
1377	高速ノズルシステム	
1379	高速の流体の流れ	
1381	液滴緩衝流発生のための変換器	10
1383	高速液滴	
1387	高速液滴偏向のための電気偏向プレート	
1389	荷電されていない液滴	
1391	荷電された液滴	
1397	流体の流れの転換されたセグメント	
1399	高速液滴流れの同軸流体の流れとの交差	
1403	収集毛管	
	収集システム	20
2201	収集システム	
2203	インターセプティングデバイス	
2205	インパクト表面	
2207	収集容器	
2211	液滴進入路	
2213	ピペットのバルブ	
2215	ピペット	
2217	ピペットの内壁	
2225	導管	
2227	収集システムフレーム	
2229	円状ホルダー	30
2231	インターセプティングデバイスの高さ用の位置決めねじ	
2233	プレートを取り付ける	
2235	側面調整用の位置決めねじ	
2241	側面スロット	
2243	収集容器を保持するためのトレイ	
2245	出口ウィンドウ	
2247	第1のインターセプティングデバイス	
2249	第2のインターセプティングデバイス	
2265	漂遊液滴	40
	収集流体	
2301	収集流体	
	濾過	
2401	フィルター	
2403	濾過用の収集容器	
2405	精子細胞を含有する濃縮されたスラリー	
2409	シリンジメカニズム	
2411	カニューレフィルター	
2413	再懸濁流体	50

2419	第2の容器	
2421	濾過実験のためのシリンジ	
2423	濾過実験のための試料	
2425	濾過実験のためのフィルター	
2427	濾過実験のための真空ポンプ	
2431	濾過実験IIのためのシリンジ	
2433	濾過実験IIのための試料	
2435	濾過実験IIのためのフィルター	
2437	濾過実験IIのためのフィルターホルダー	
		10
	冷凍保存	
2501	濃度を調整する	
2503	抗凍結剤を添加する	
2505	蛋白質源を添加する	
2507	ストローに負荷する	
2509	保持温度まで冷却する	
2511	保持温度にて維持する	
2513	臨界ゾーンに近い温度まで冷却する	
2515	氷結晶形成の範囲を通して冷却する	
2517	液体窒素中に浸漬する	20
	共通収集システム	
2801	共通収集システム	
2803	インターセプティングデバイス用の共通フレーム	
2805	廃棄物トラフ	
2807	収集容器のためのトレイ	
	パルスレーザーシステム	
3001	パルスレーザー	
3003	レーザーパルスセンサー	30
3005	レーザーパルス	
3007	蛍光パルス寿命壊変	
3009	デジタル試料	

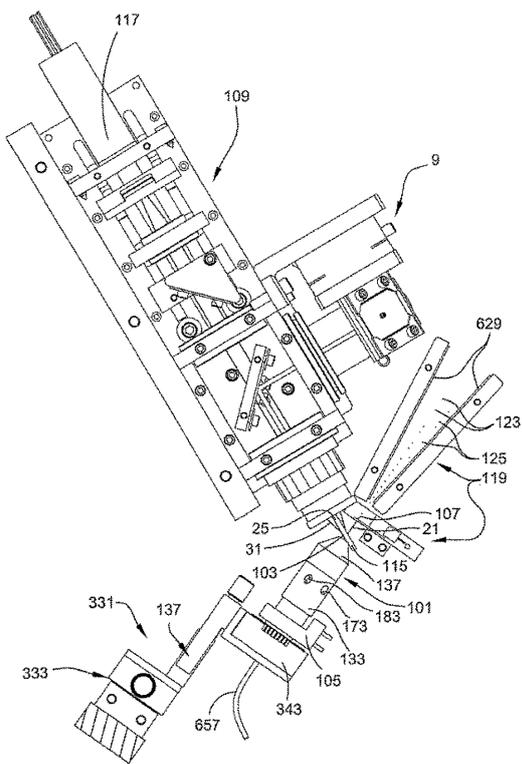
【図1】



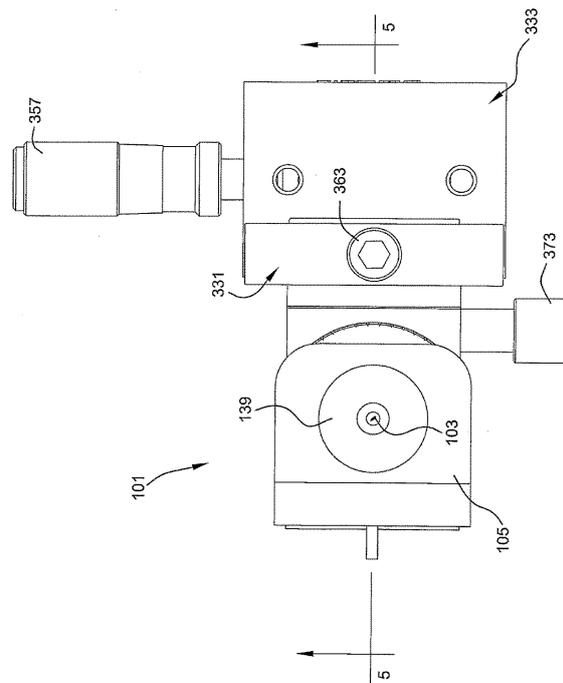
【図2】



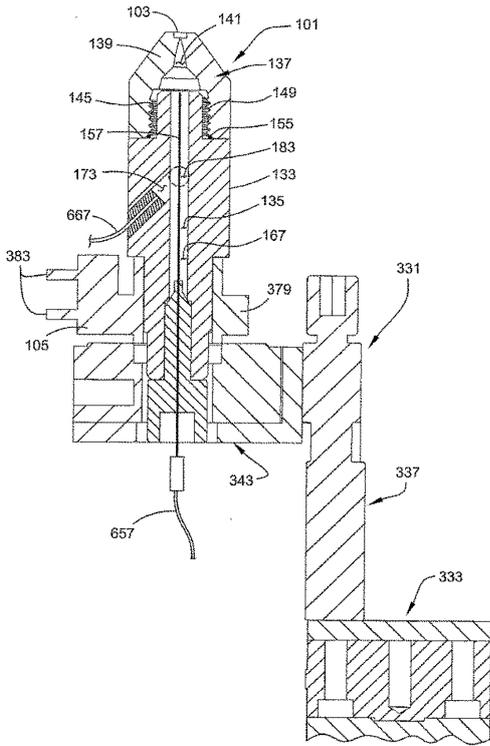
【図3】



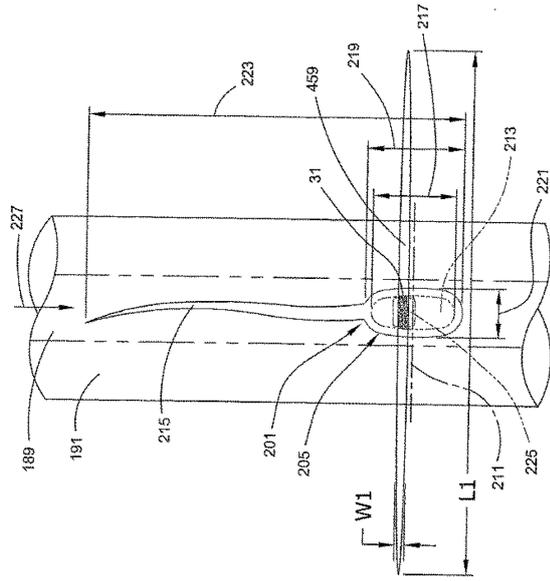
【図4】



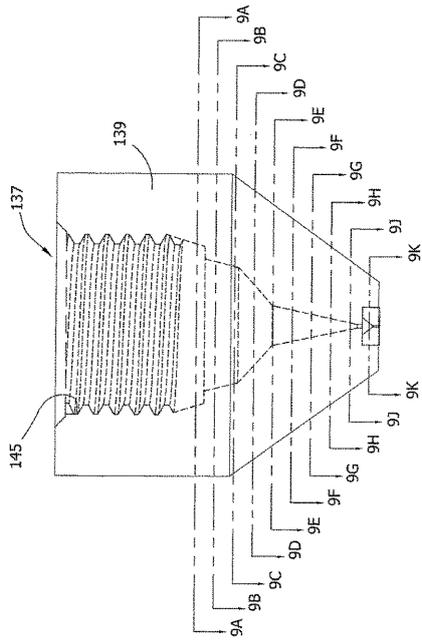
【 図 5 】



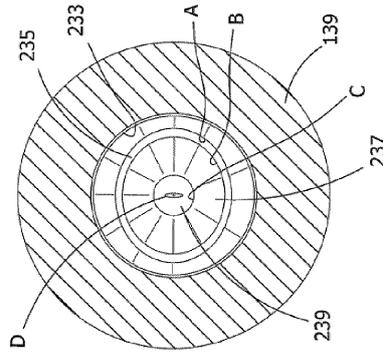
【 図 6 】



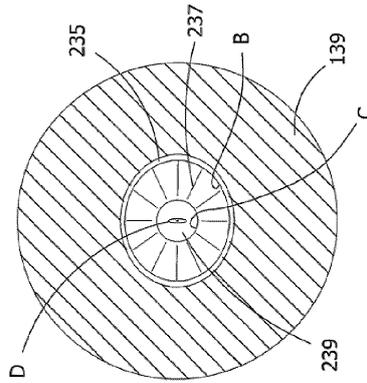
【 図 9 】



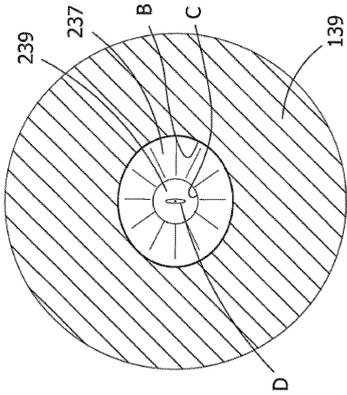
【 図 9 A 】



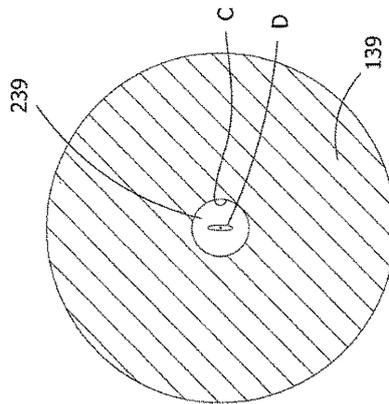
【 図 9 B 】



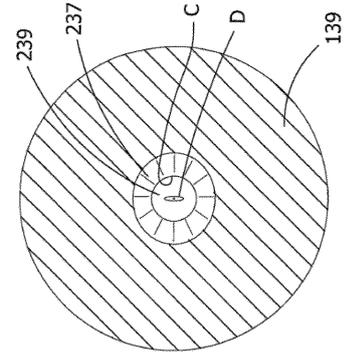
【 図 9 C 】



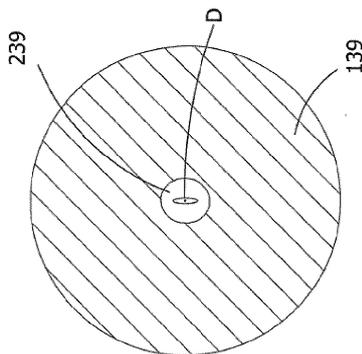
【 図 9 E 】



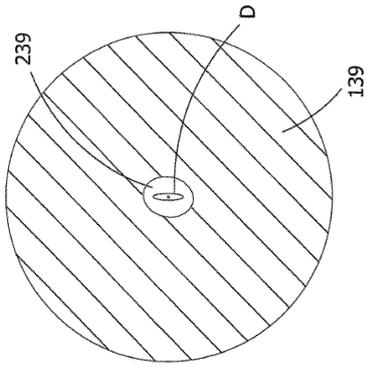
【 図 9 D 】



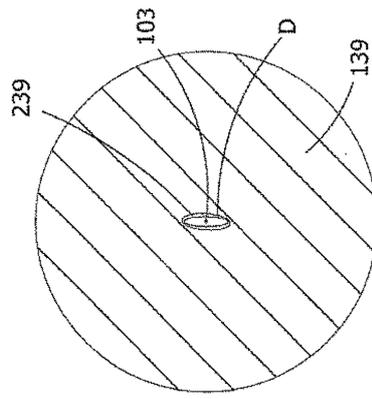
【 図 9 F 】



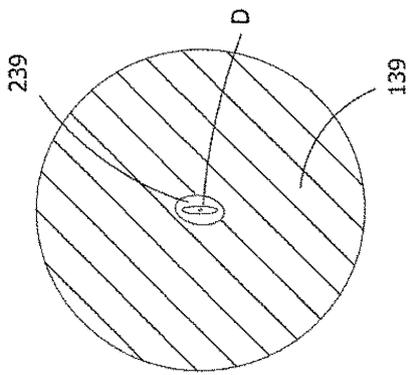
【 9 G 】



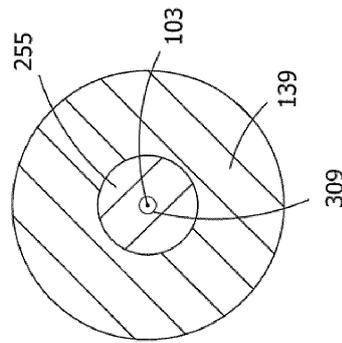
【 9 J 】



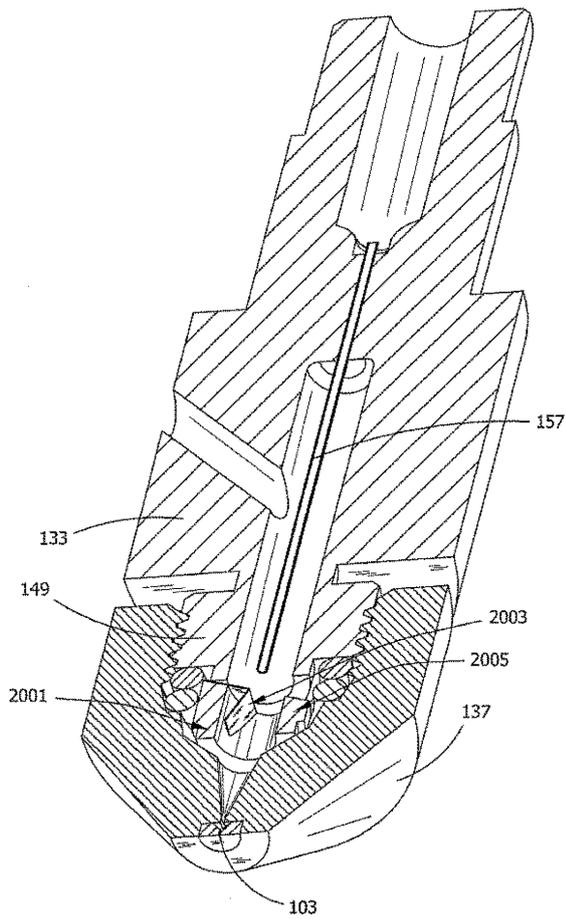
【 9 H 】



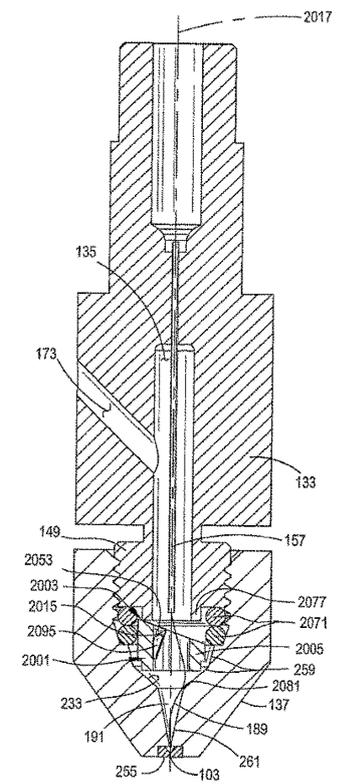
【 9 K 】



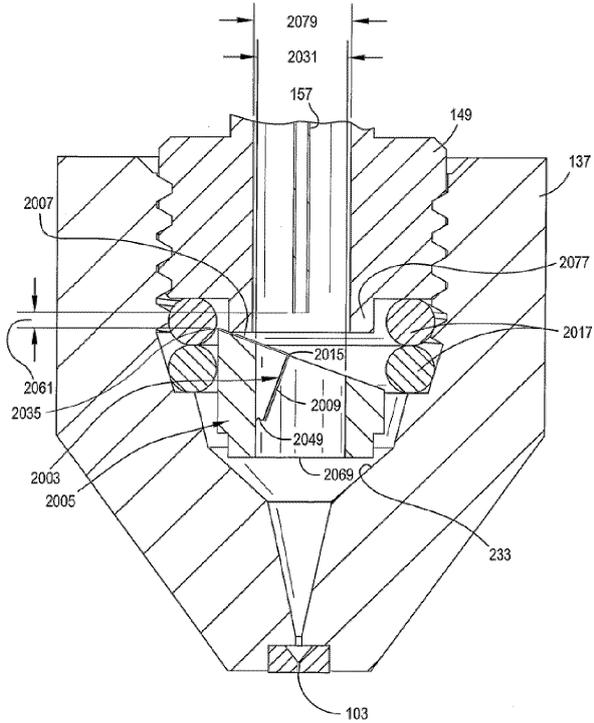
【 1 0 】



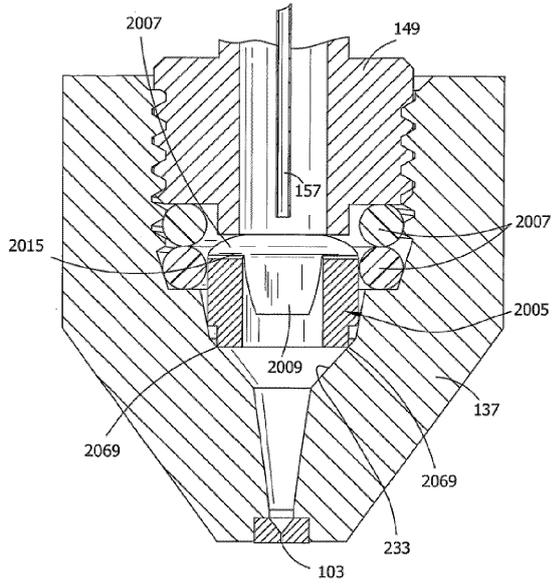
【 1 1 】



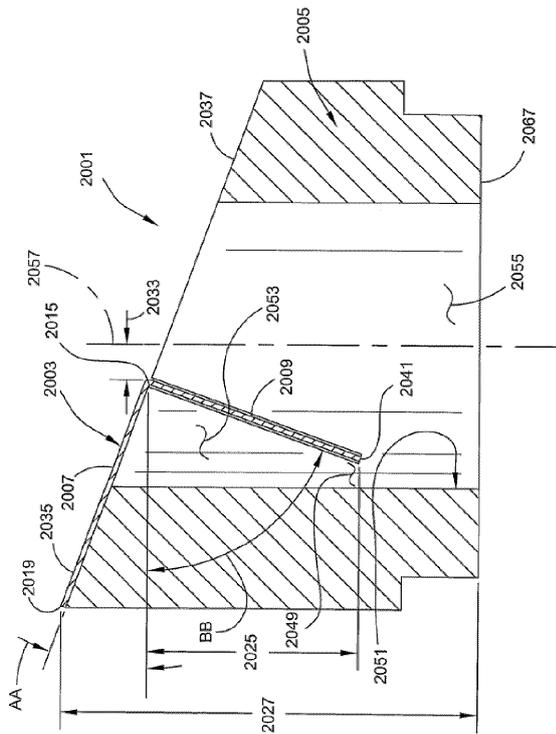
【 図 1 2 】



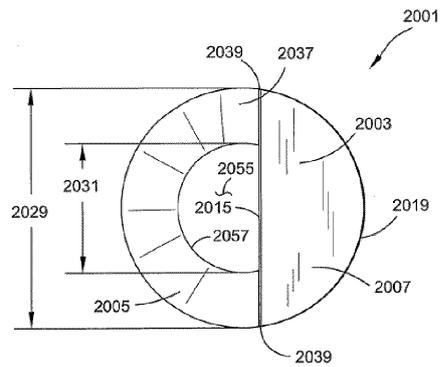
【 図 1 3 】



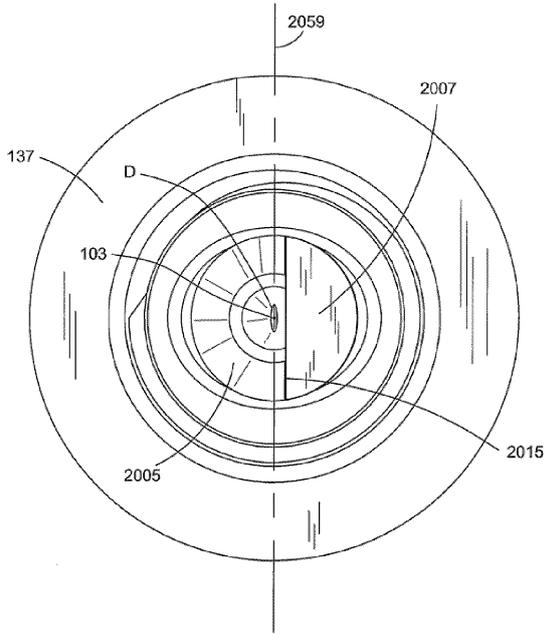
【 図 1 4 】



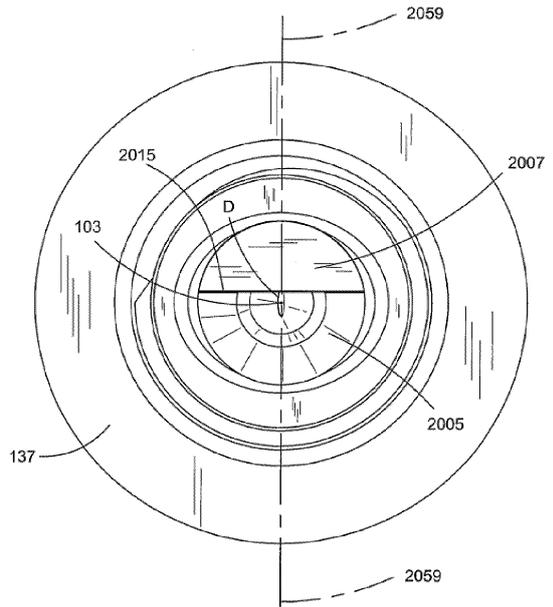
【 図 1 5 】



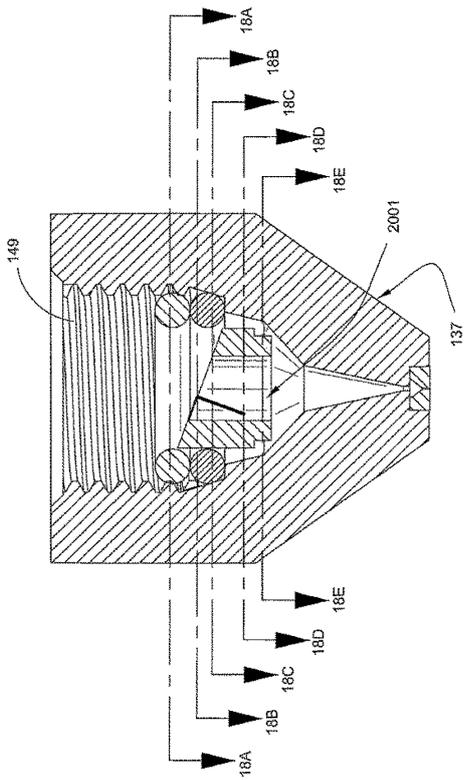
【図16】



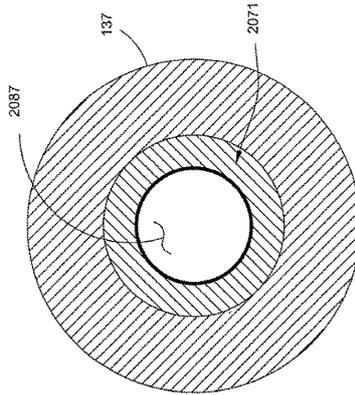
【図17】



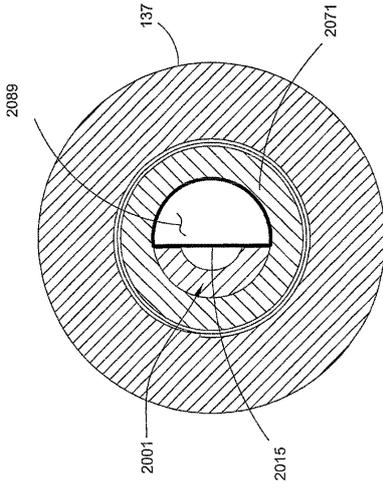
【図18】



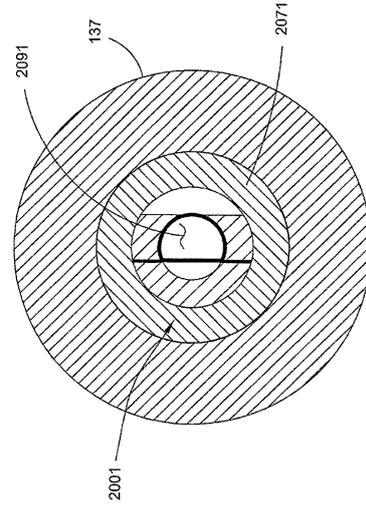
【図18A】



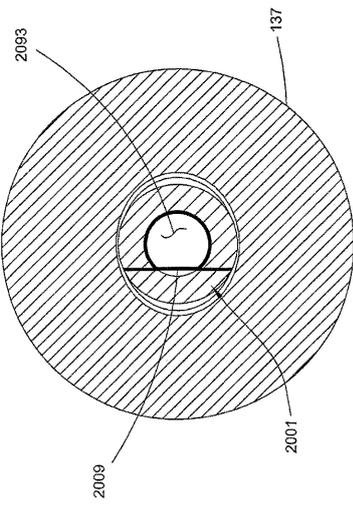
【 18 B】



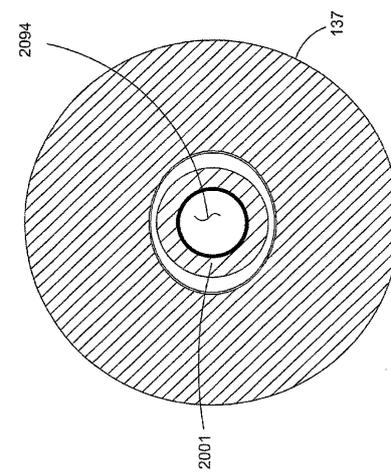
【 18 C】



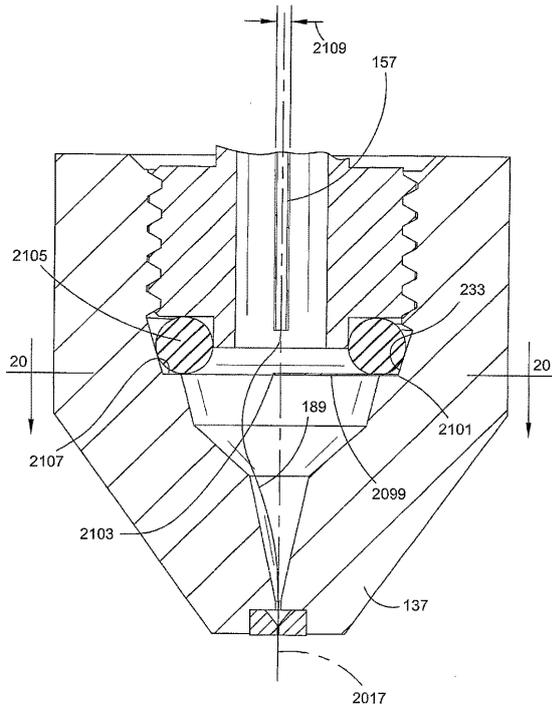
【 18 D】



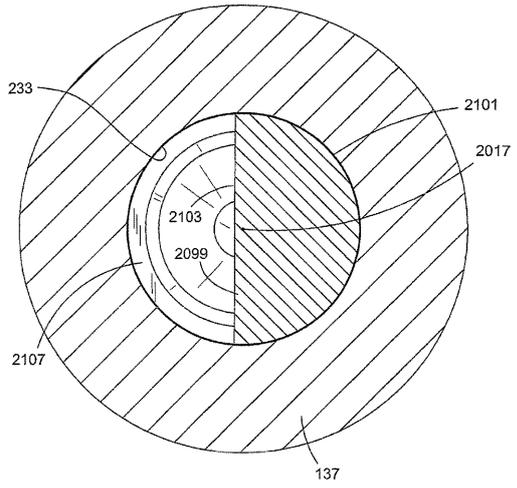
【 18 E】



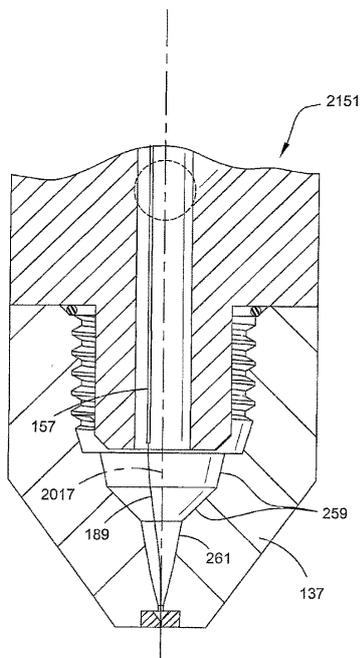
【図 19】



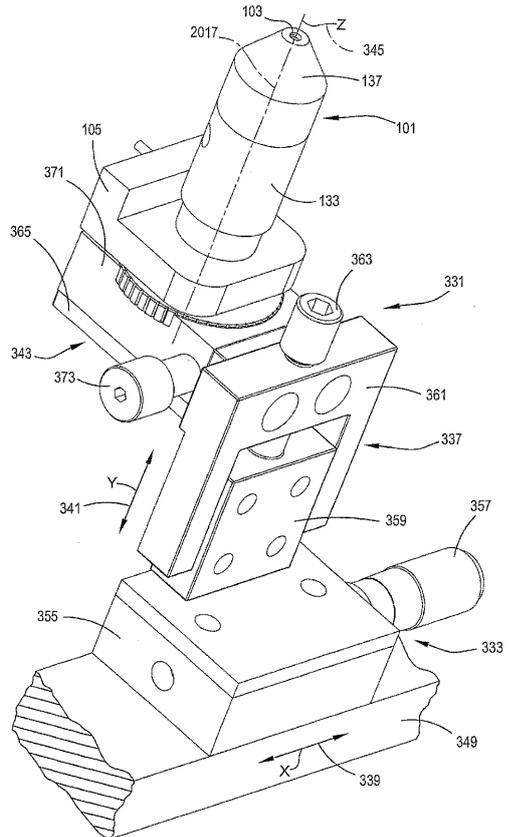
【図 20】



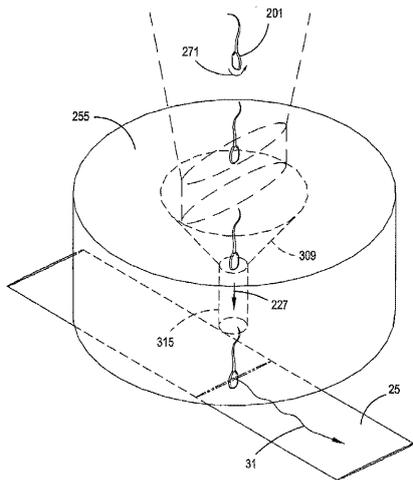
【図 21】



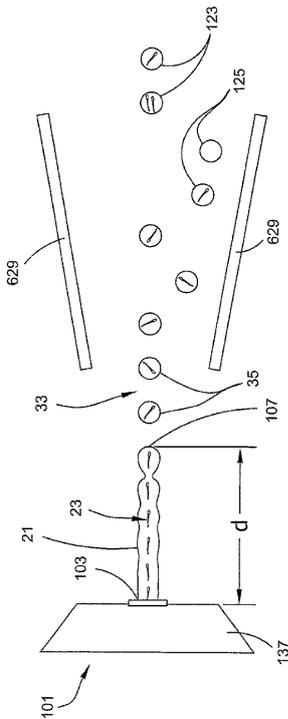
【図 22】



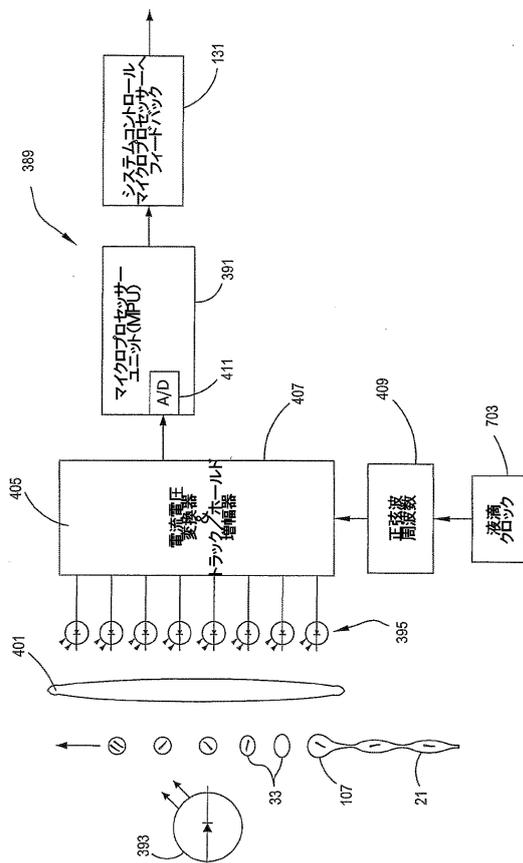
【図 23】



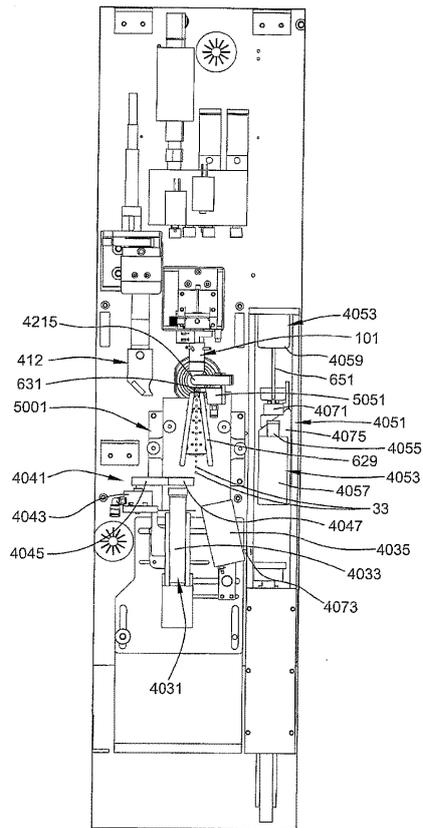
【図 24】



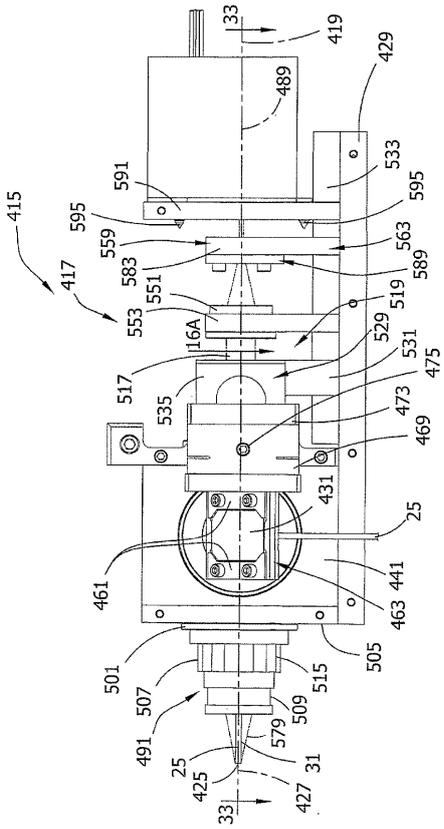
【図 25】



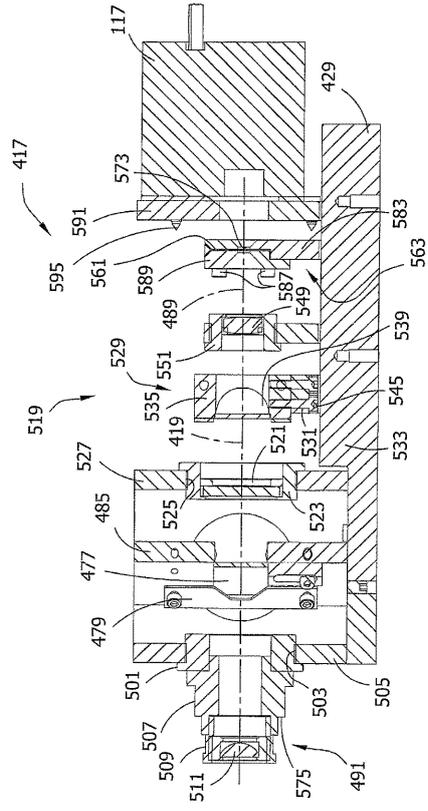
【図 26】



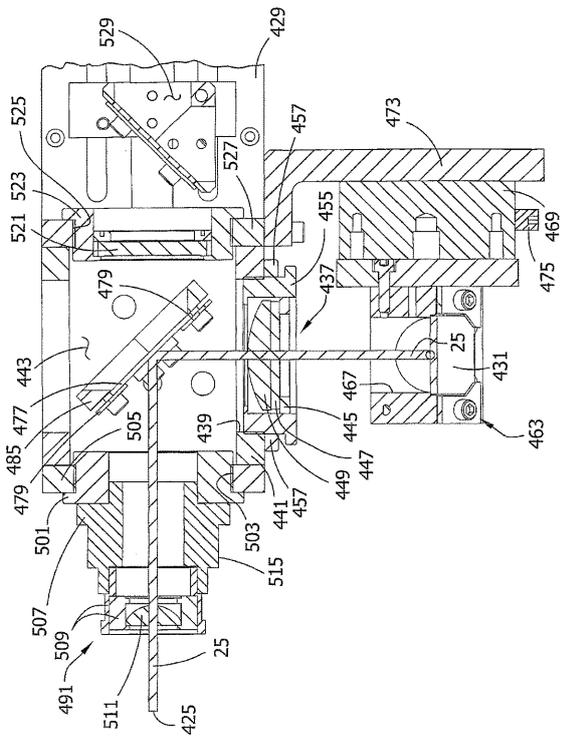
【 図 3 1 】



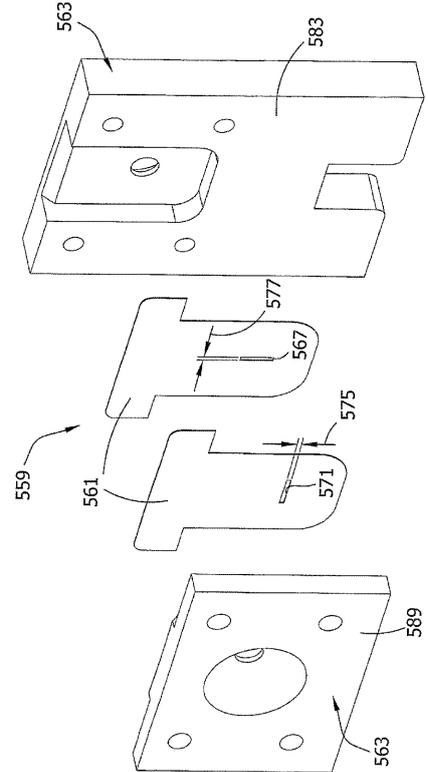
【 図 3 2 】



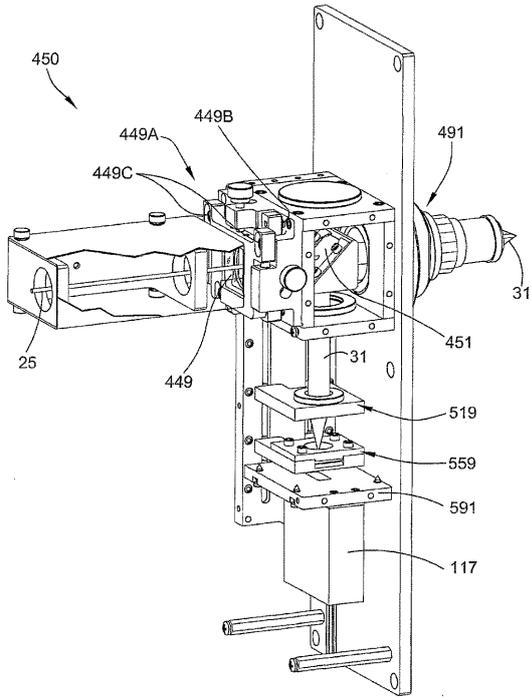
【 図 3 3 】



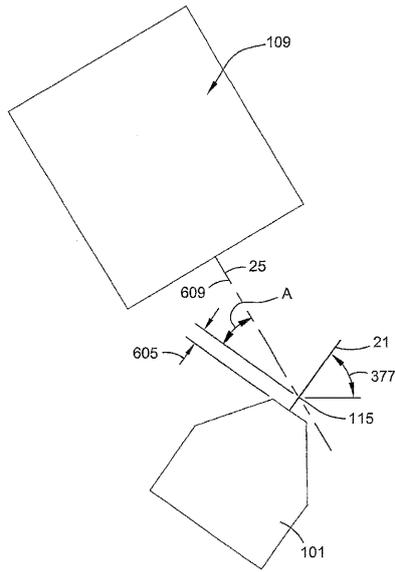
【 図 3 4 】



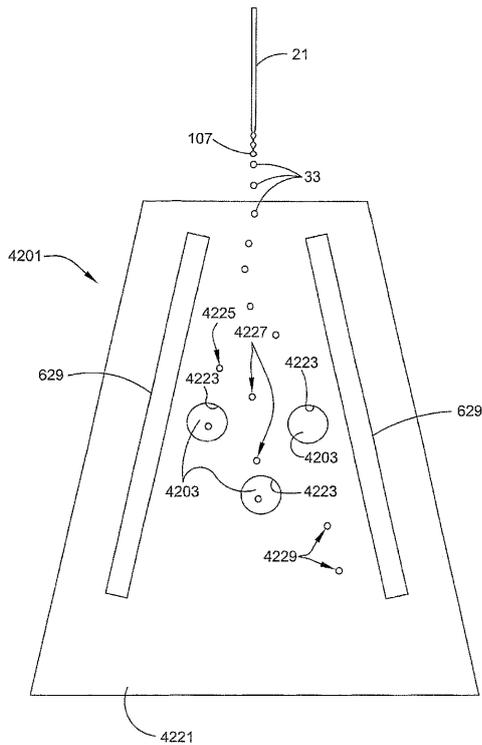
【 図 3 5 】



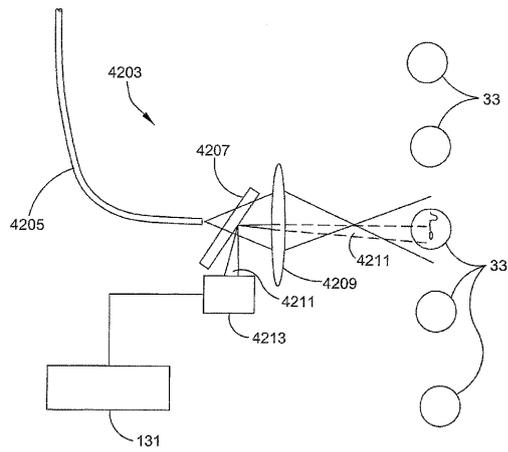
【 図 3 6 】



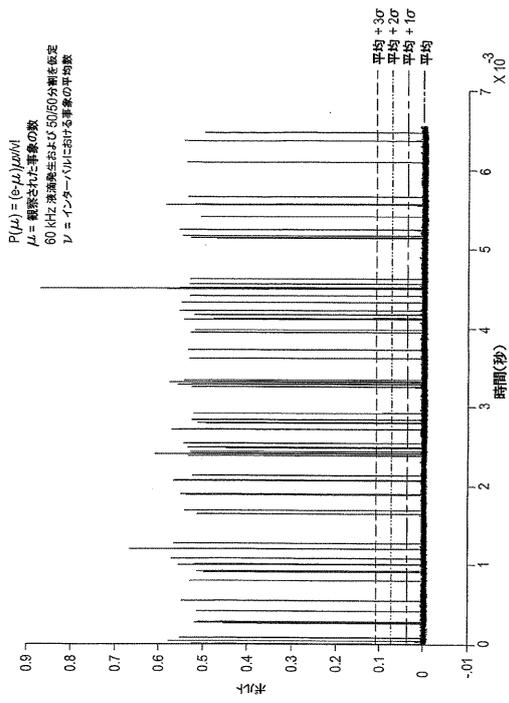
【 図 3 7 】



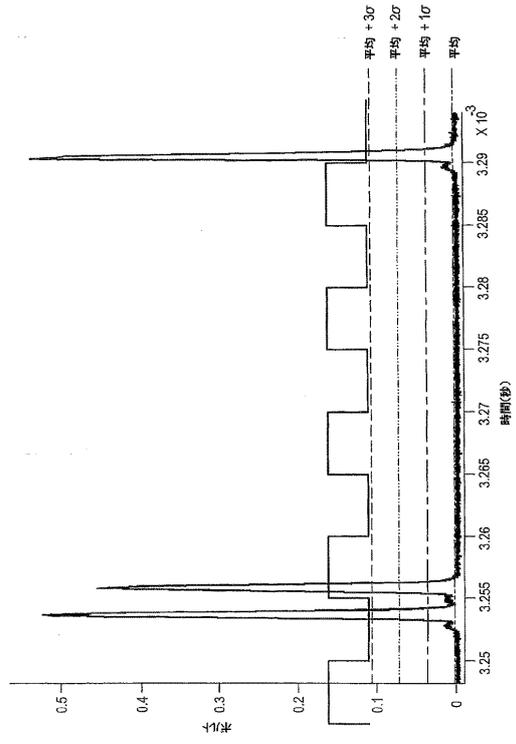
【 図 3 8 】



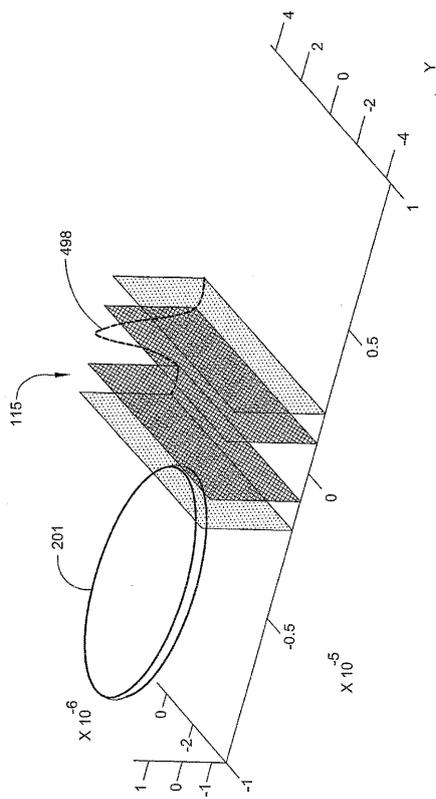
【 図 4 3 】



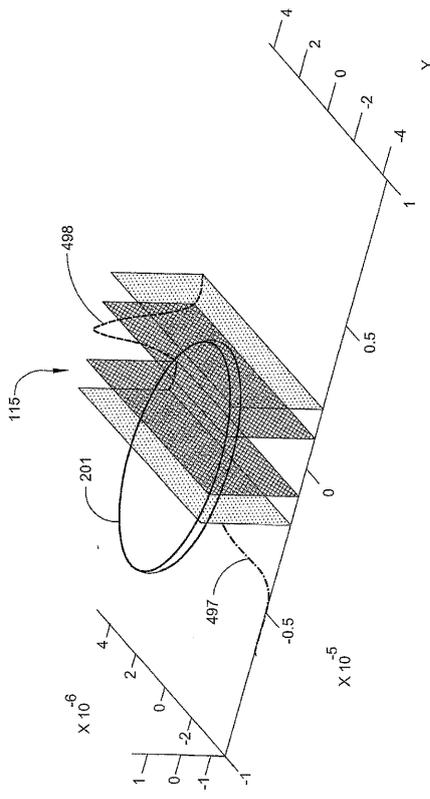
【 図 4 4 】



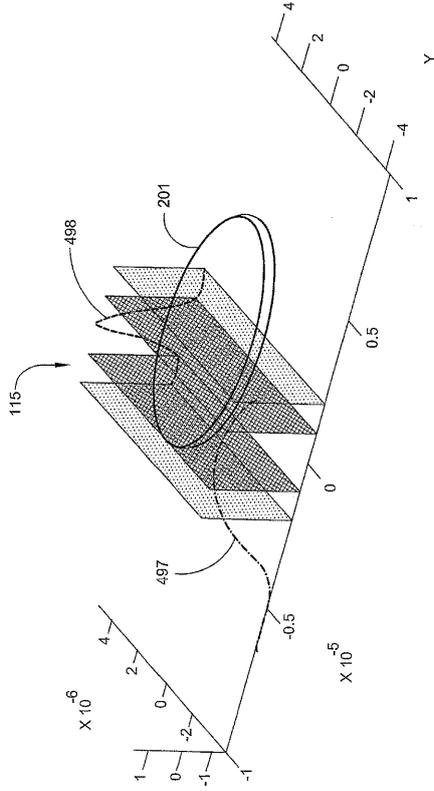
【 図 4 5 】



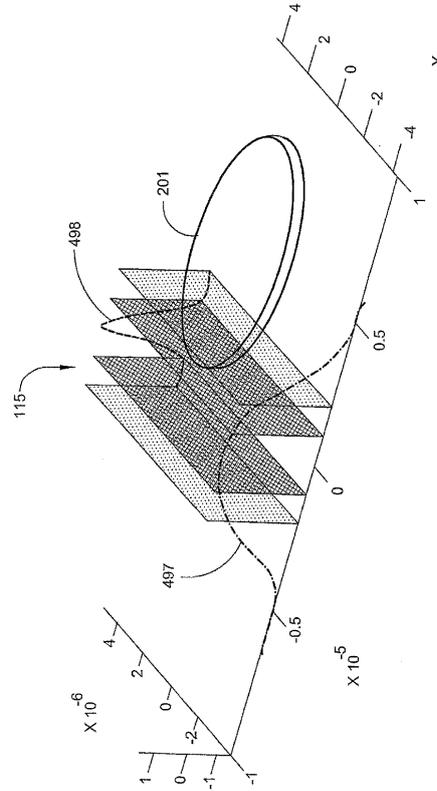
【 図 4 6 】



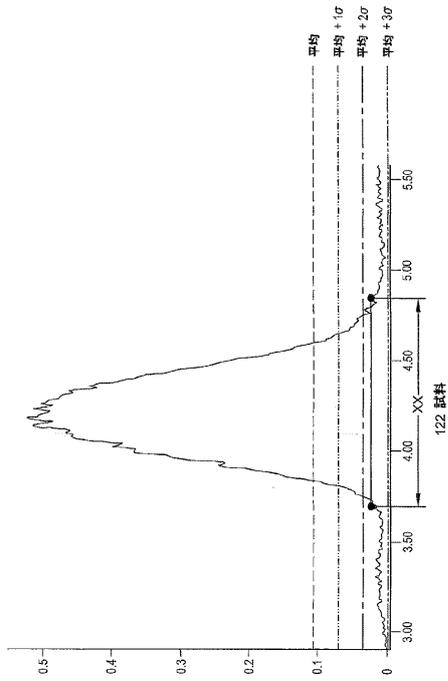
【図47】



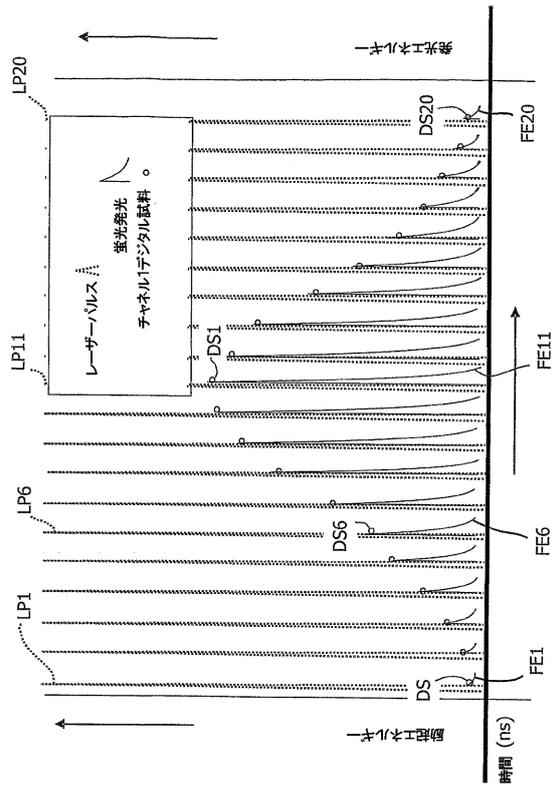
【図48】



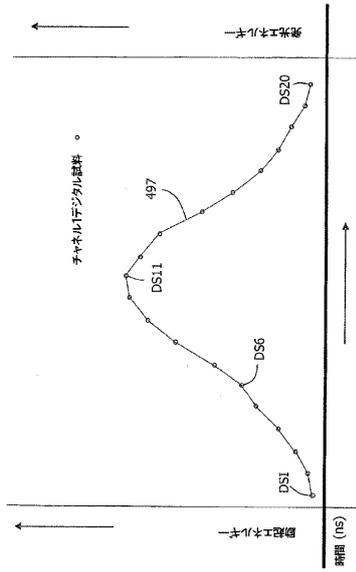
【図49】



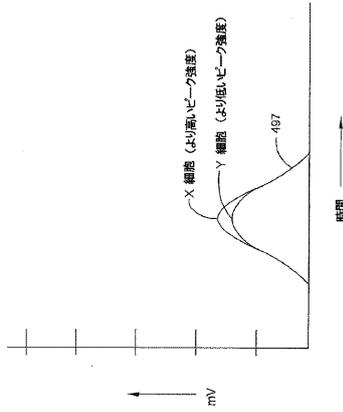
【図50】



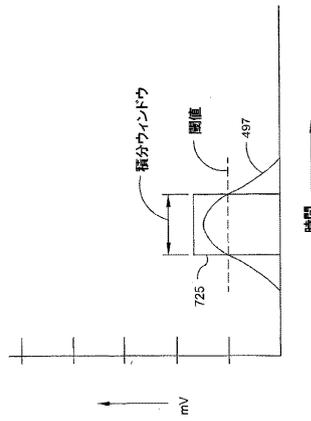
【図 5 1】



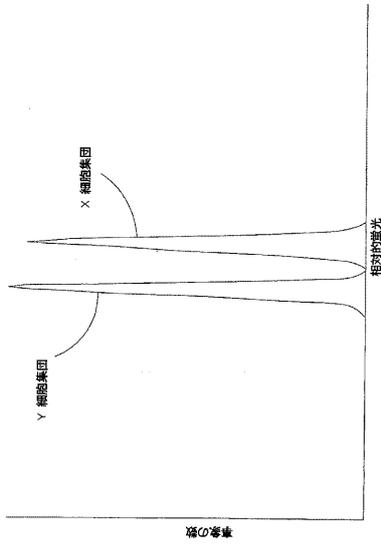
【図 5 2】



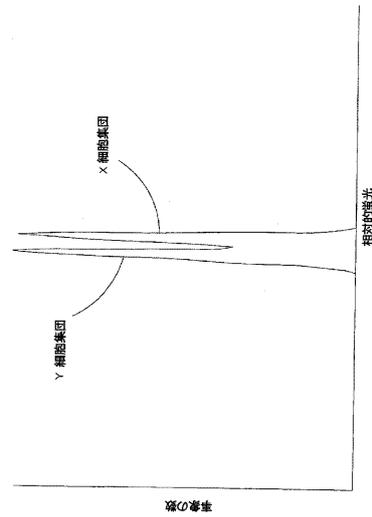
【図 5 3】



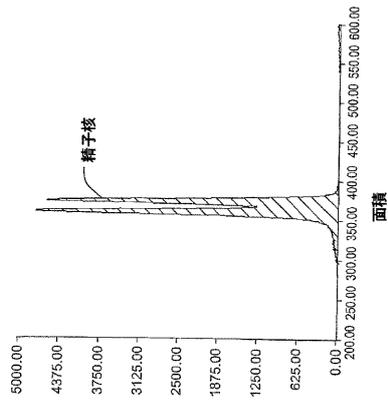
【図 5 4】



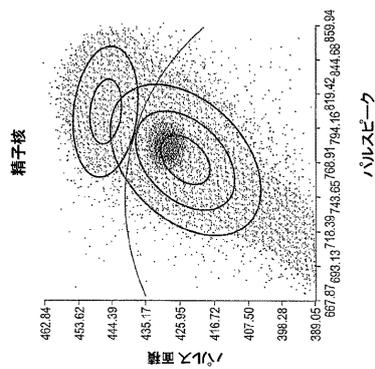
【図 5 5】



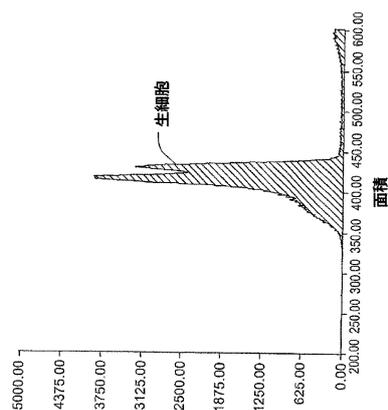
【図 56】



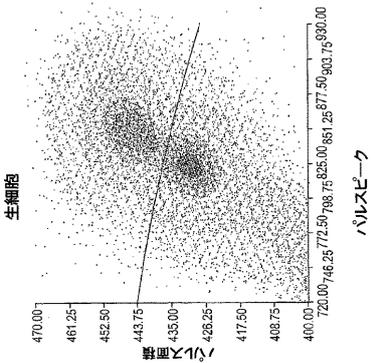
【図 58】



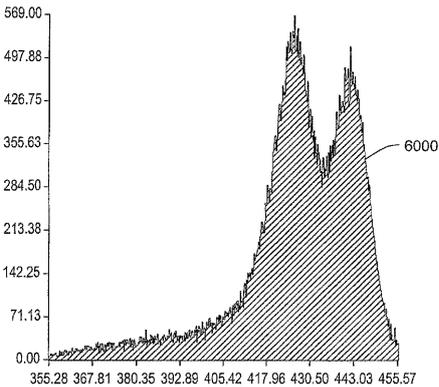
【図 57】



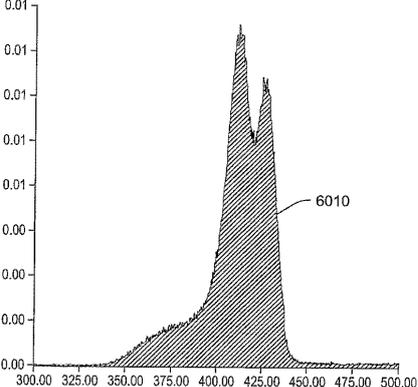
【図 59】



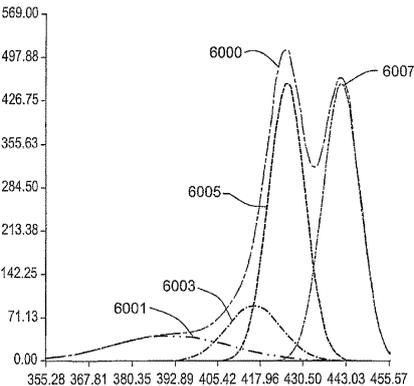
【図 60】



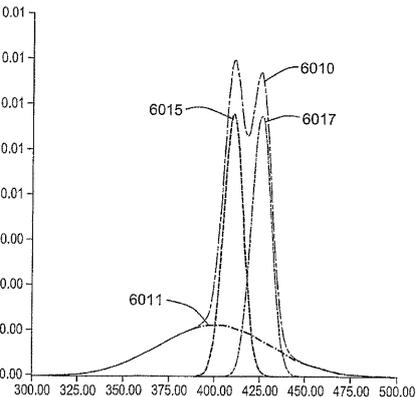
【図 62】



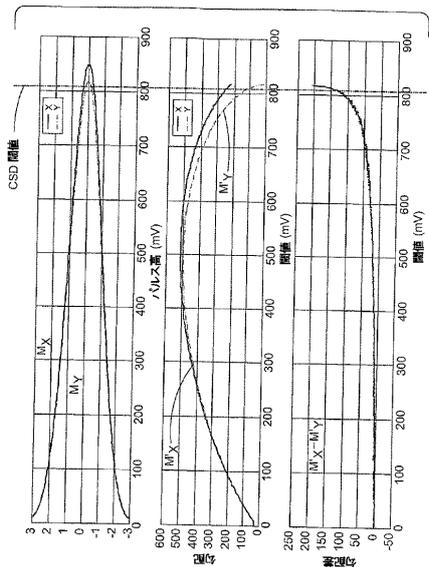
【図 61】



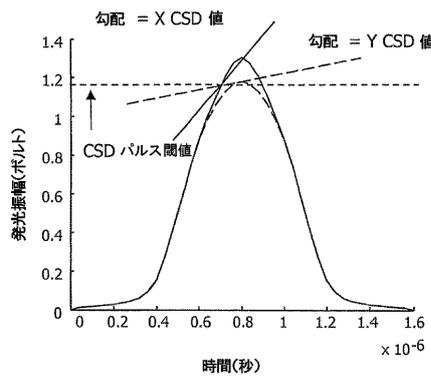
【図 63】



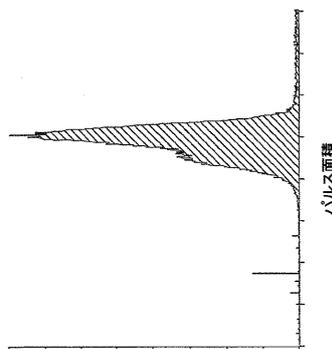
【図 64】



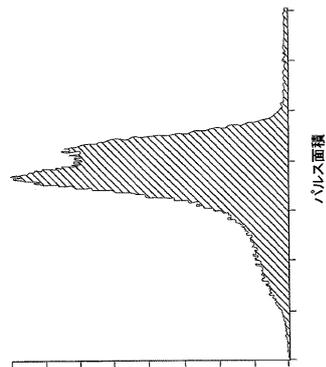
【図 65】



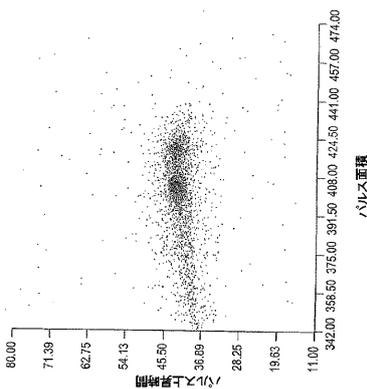
【図 66】



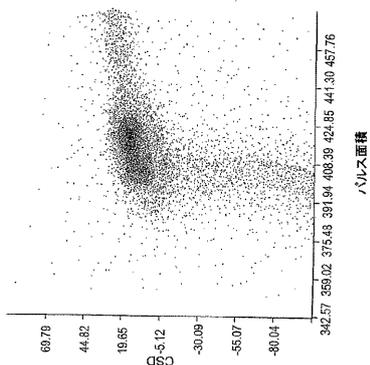
【図 67】



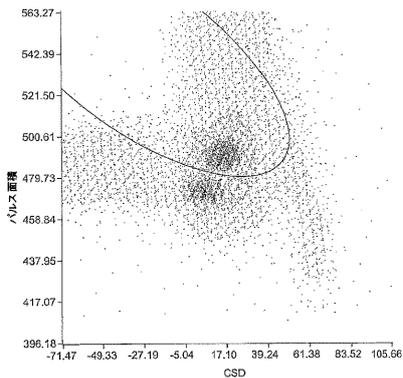
【図 69】



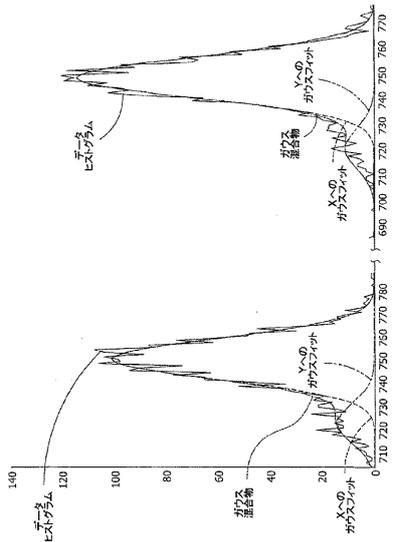
【図 68】



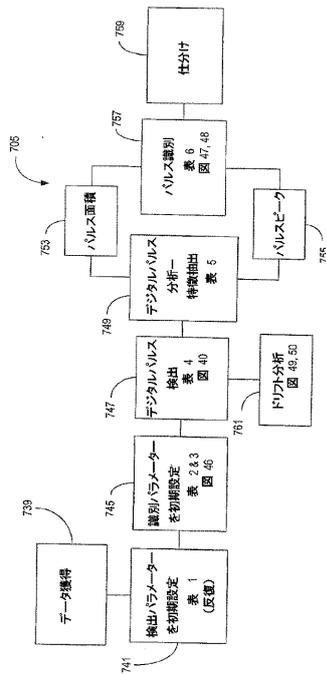
【図 70】



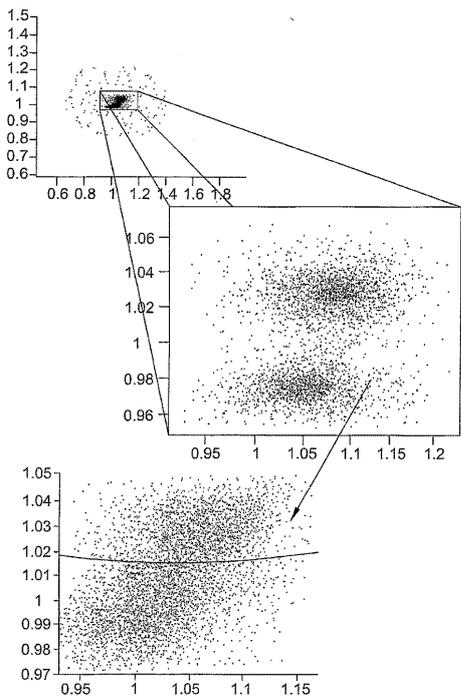
【図 7 1】



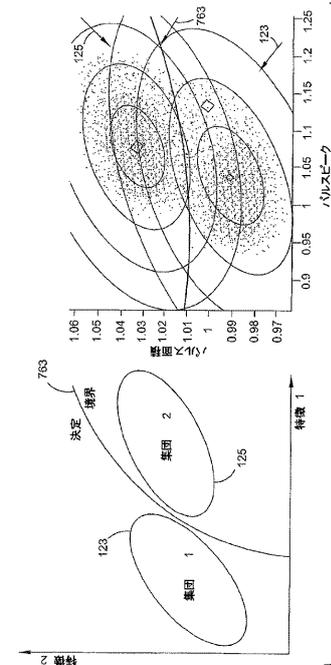
【図 7 2】



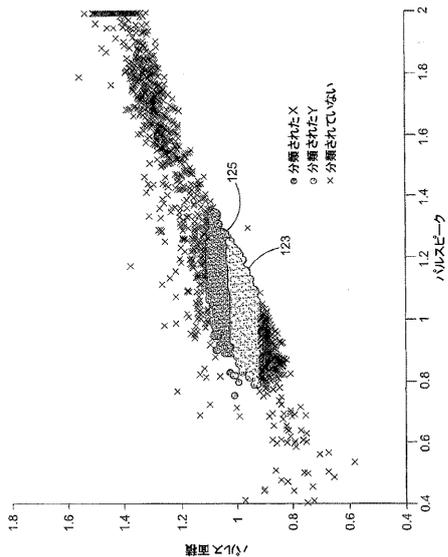
【図 7 3】



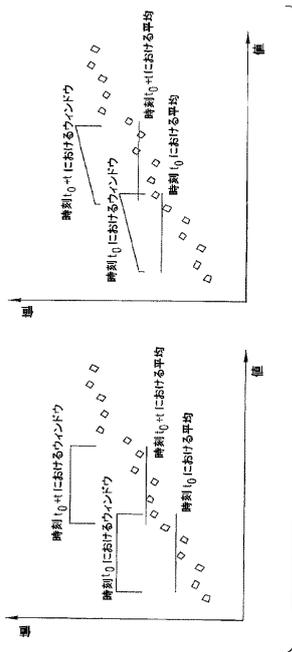
【図 7 4】



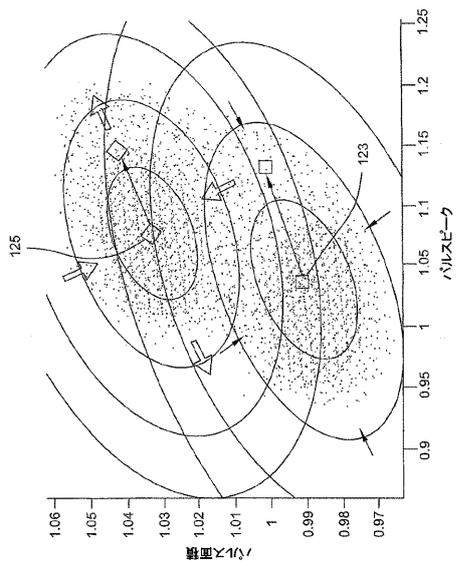
【図75】



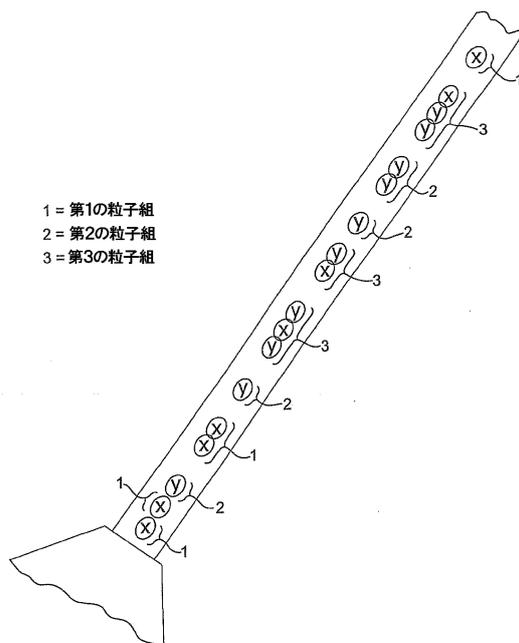
【図76】



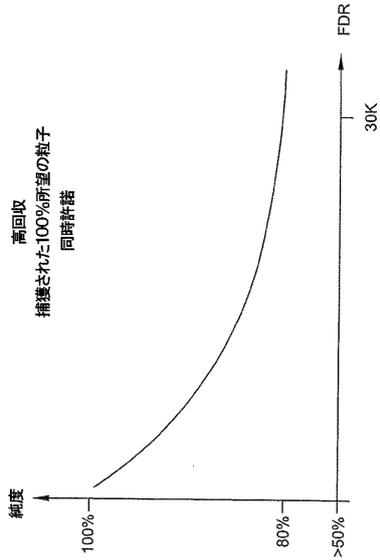
【図77】



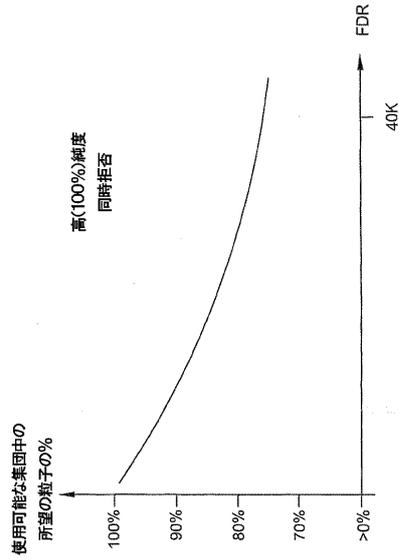
【図78】



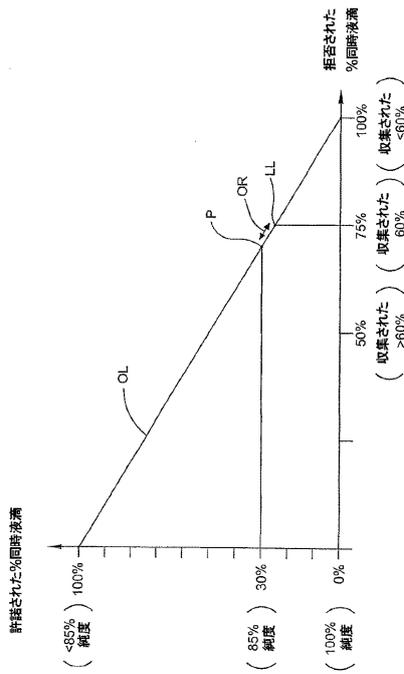
【 図 79 】



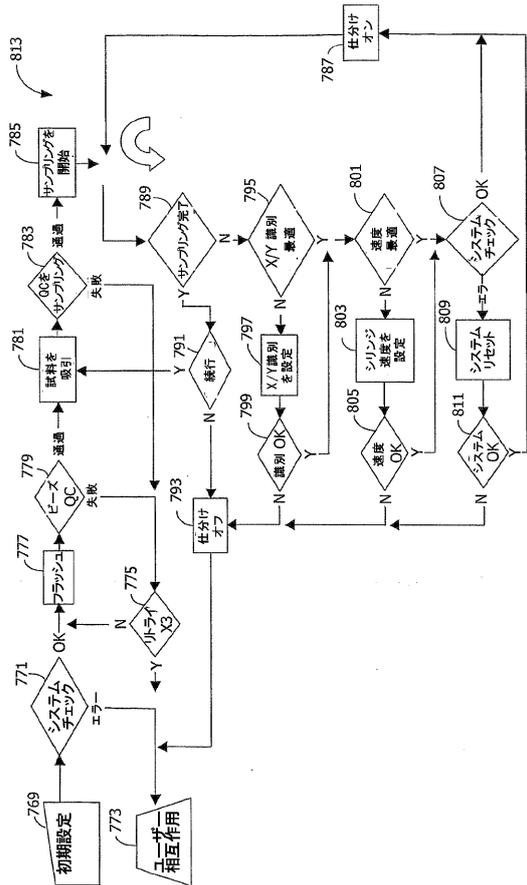
【 図 80 】



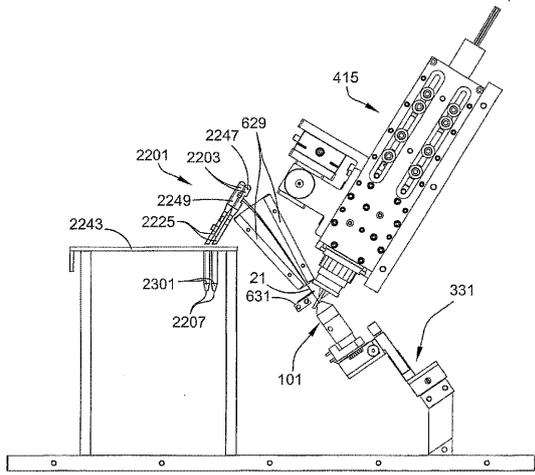
【 図 81 】



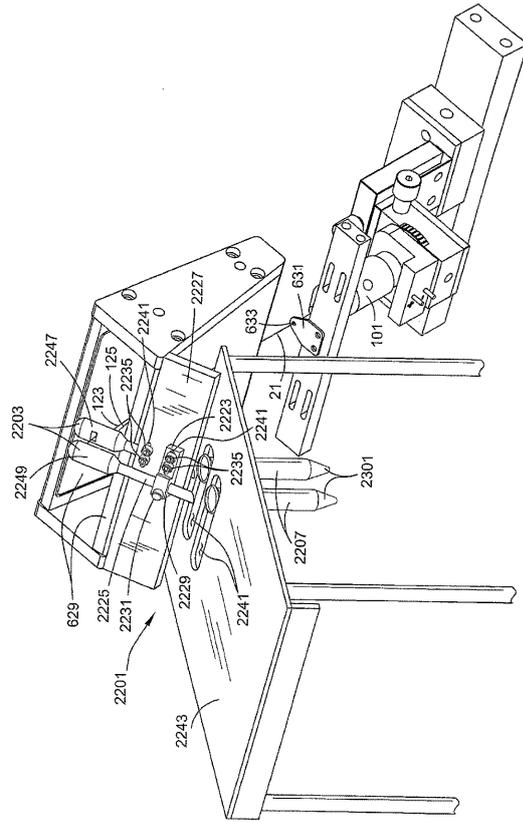
【 図 82 】



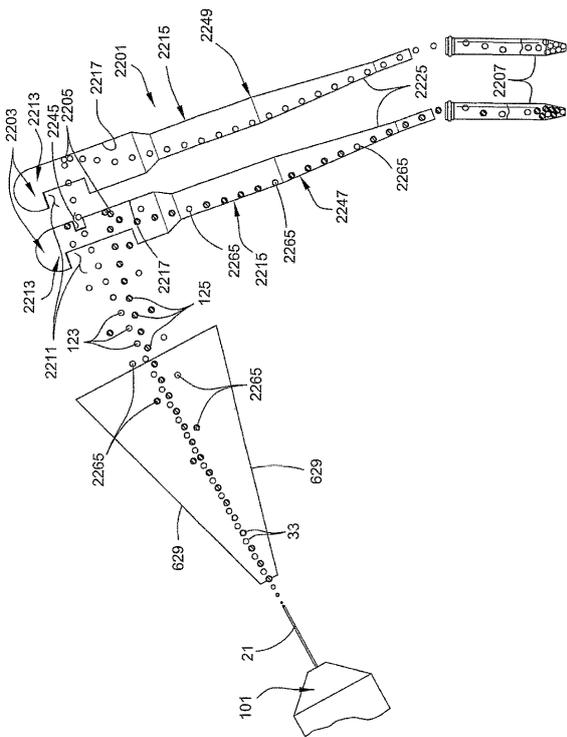
【 8 3 】



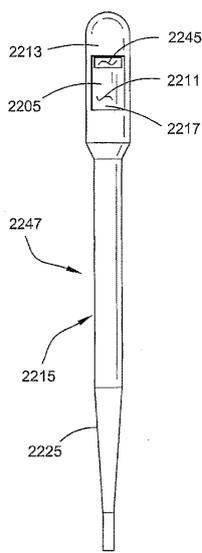
【 8 4 】



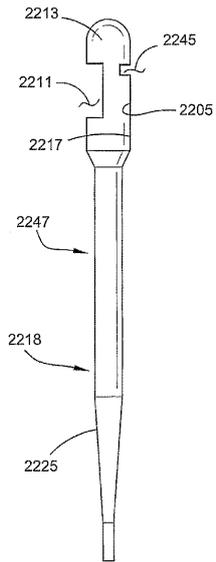
【 8 5 】



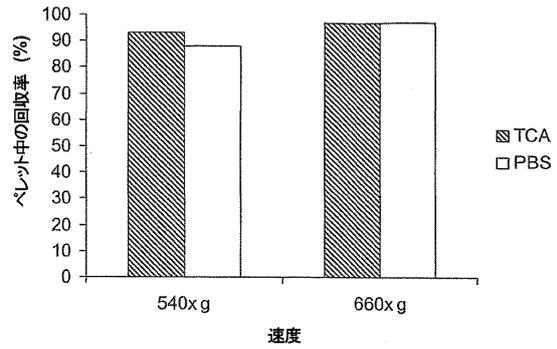
【 8 6 】



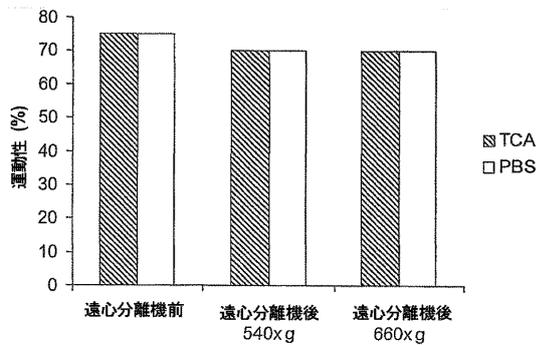
【図 87】



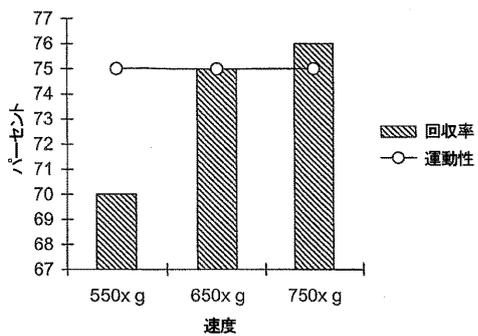
【図 88】



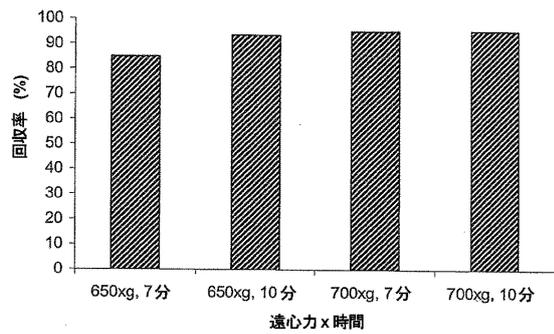
【図 89】



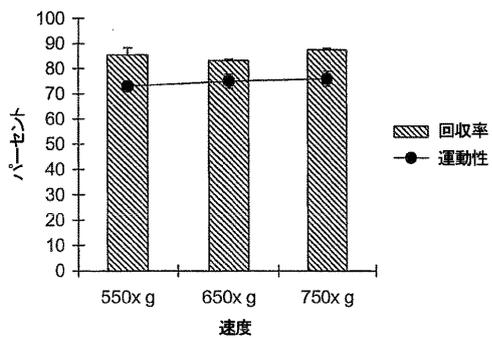
【図 90】



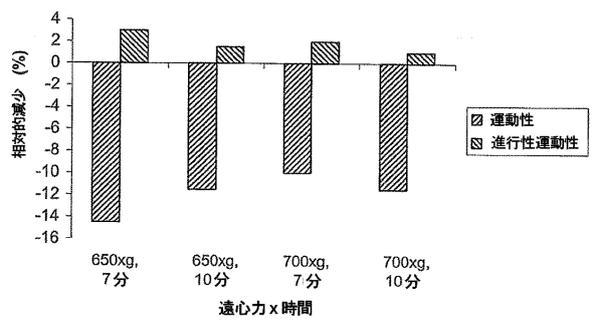
【図 92】



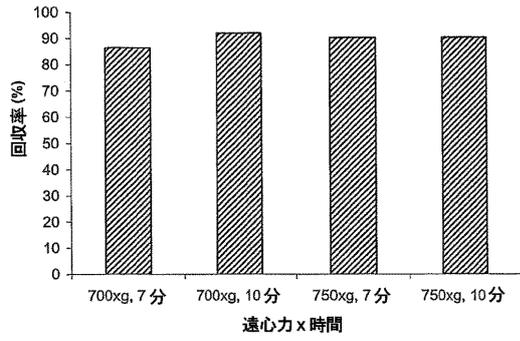
【図 91】



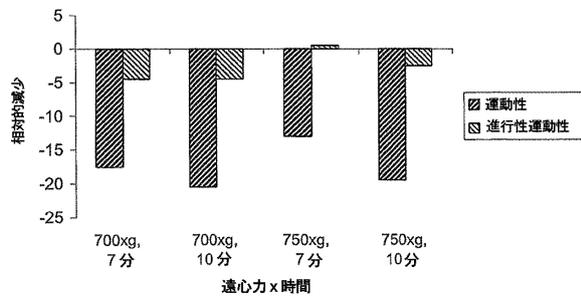
【図 93】



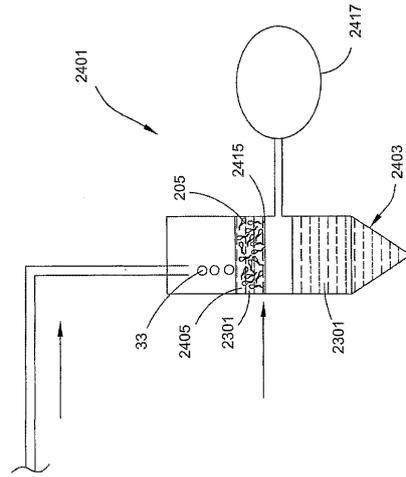
【 図 9 4 】



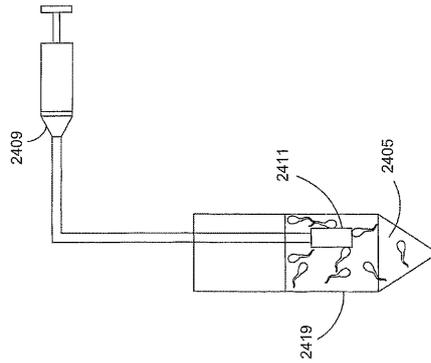
【 図 9 5 】



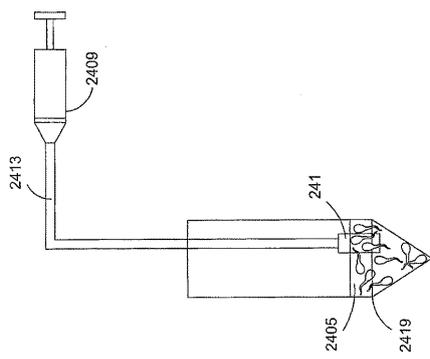
【 図 9 6 】



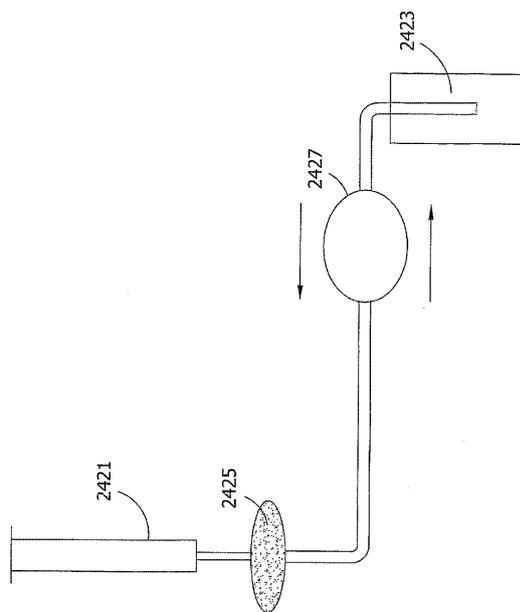
【 図 9 7 】



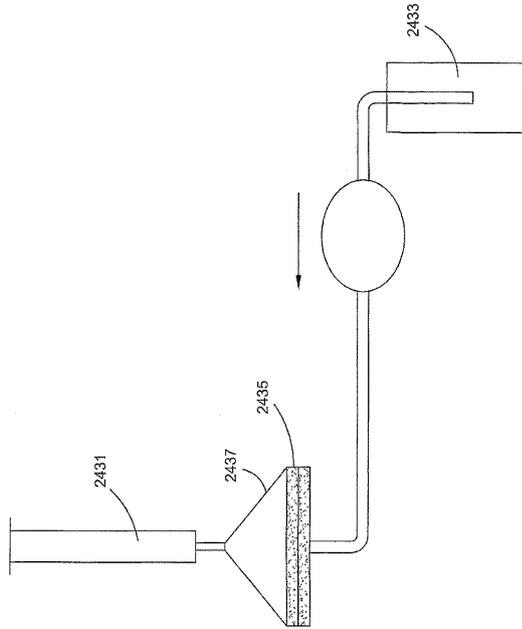
【 図 9 8 】



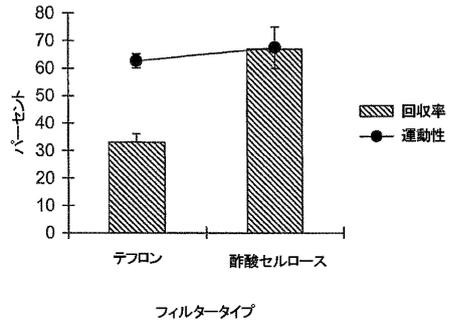
【 図 9 9 】



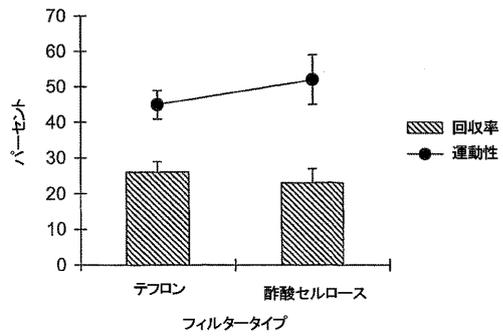
【図100】



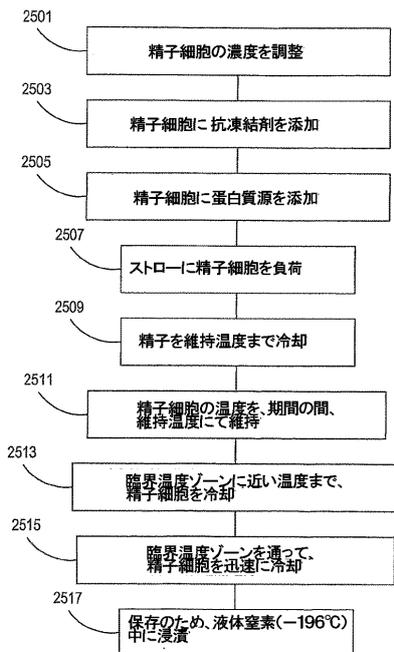
【図101】



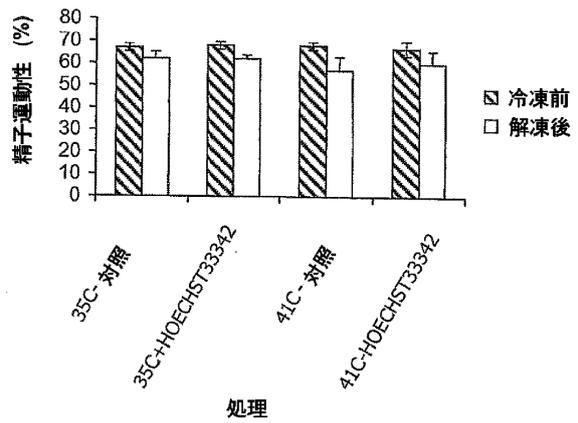
【図102】



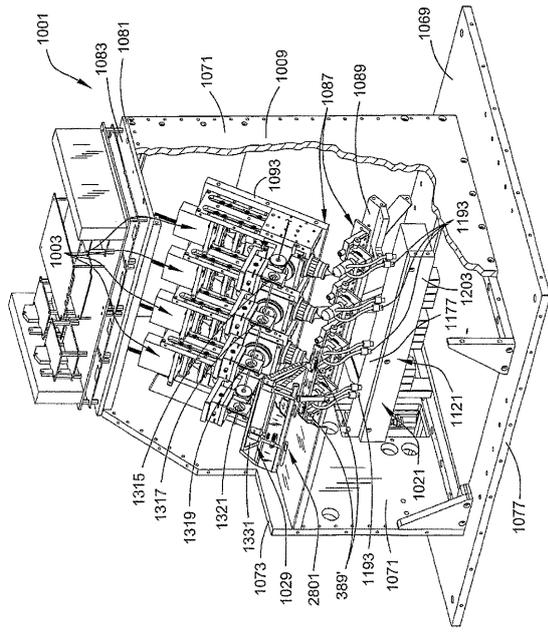
【図103】



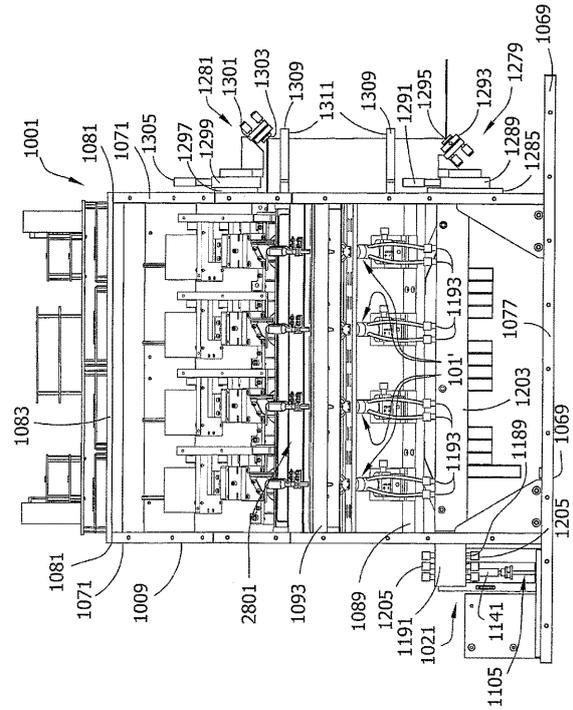
【図104】



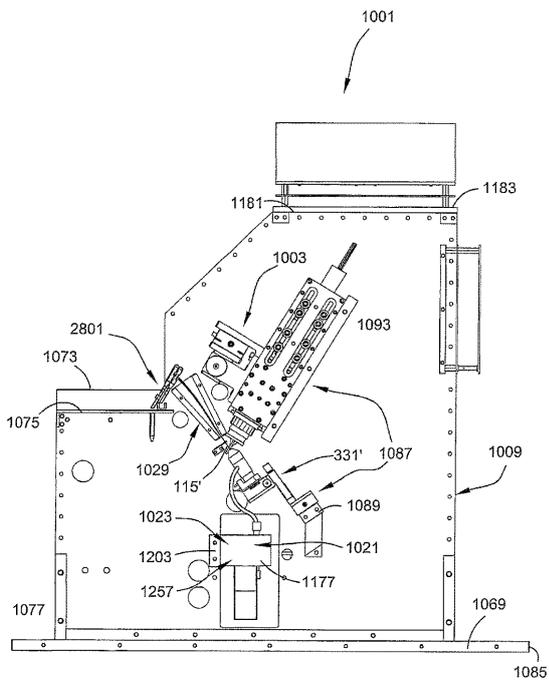
【図109】



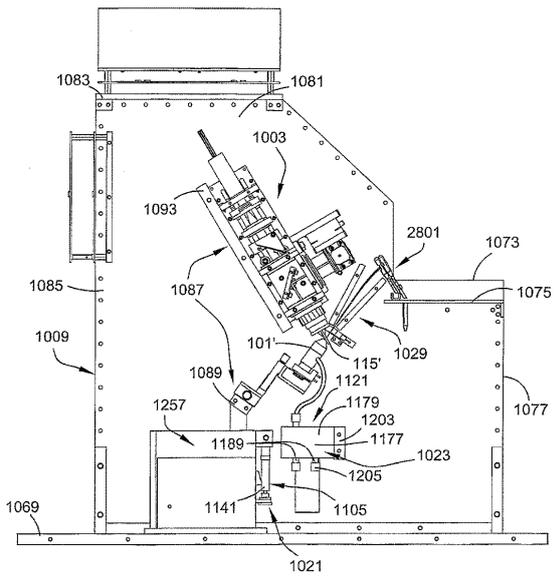
【図110】



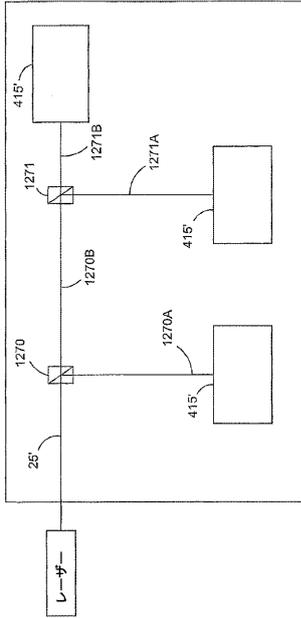
【図111】



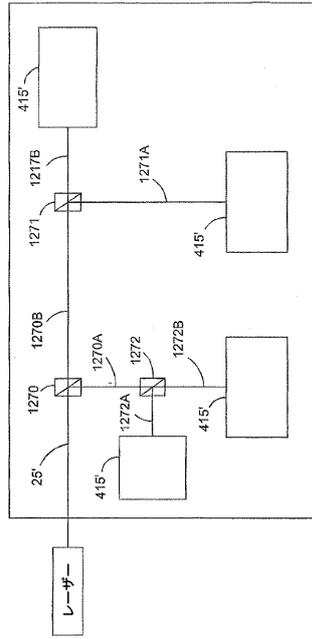
【図112】



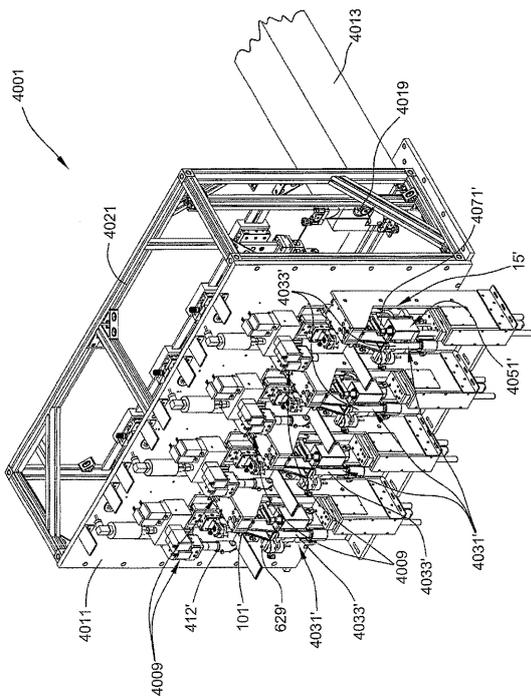
【図117】



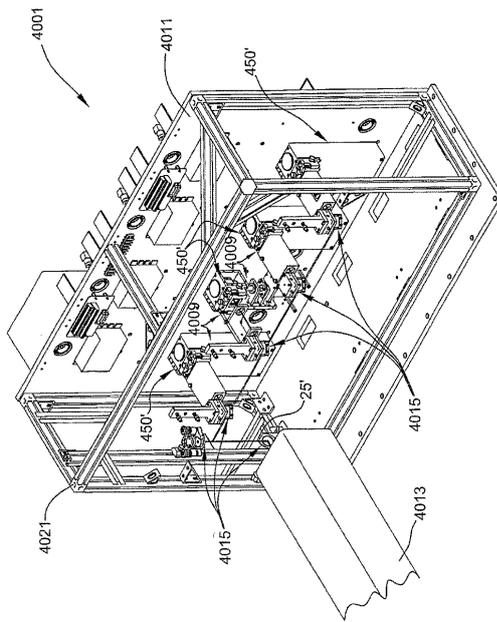
【図118】



【図119】

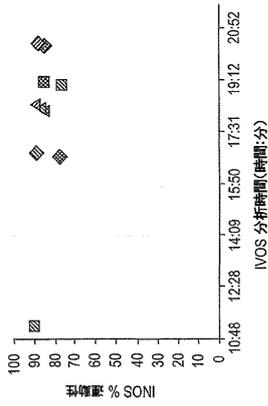


【図120】



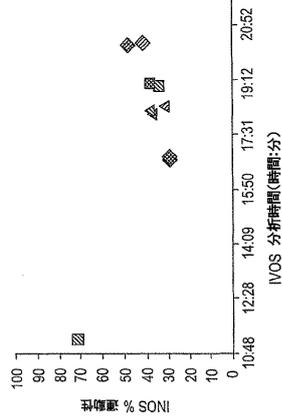
【 1 2 1】

- 新鮮な精液
- A2 仕分けられた
- A2 比較
- A3 仕分けられた
- A3 比較
- A3 比較繰り返し
- A4 仕分けられた
- A4 比較
- A5 仕分けられた
- A5 比較



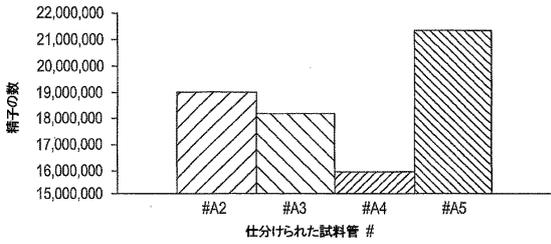
【 1 2 2】

- 新鮮な精液
- A2 仕分けられた
- A2 比較
- A3 仕分けられた
- A3 比較
- A3 比較繰り返し
- A4 仕分けられた
- A4 比較
- A5 仕分けられた
- A5 比較



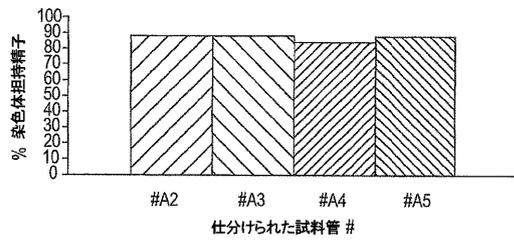
【 1 2 3】

- A2
- A3
- A4
- A5



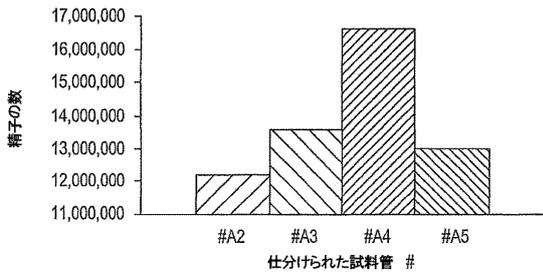
【 1 2 5】

- A2
- A3
- A4
- A5

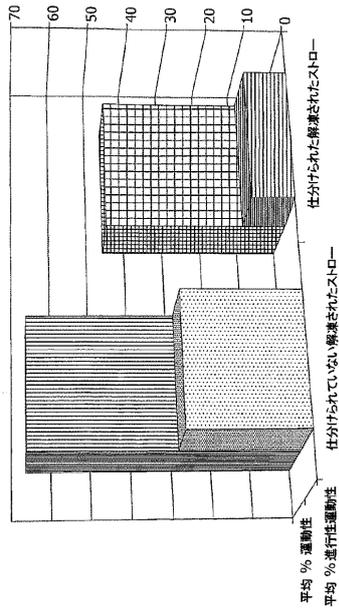


【 1 2 4】

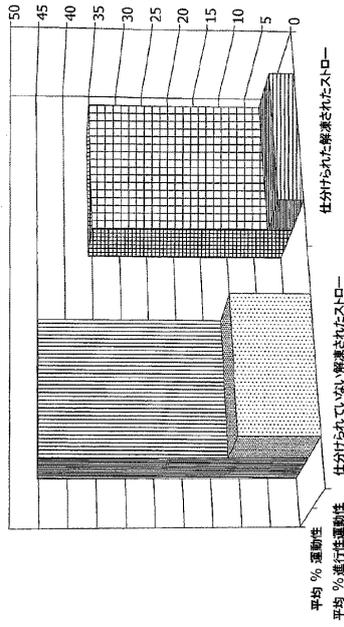
- A2
- A3
- A4
- A5



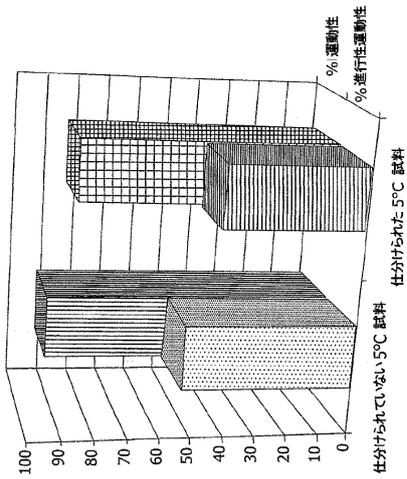
【図130】



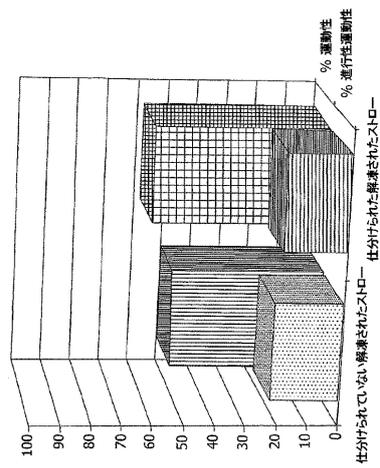
【図131】



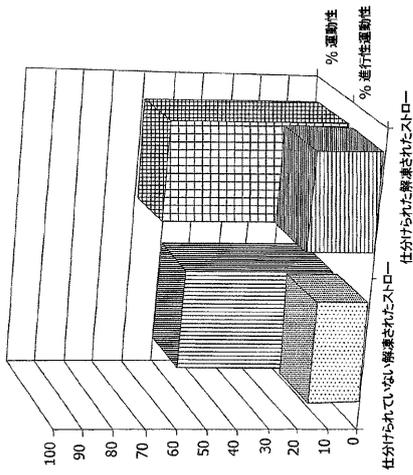
【図132】



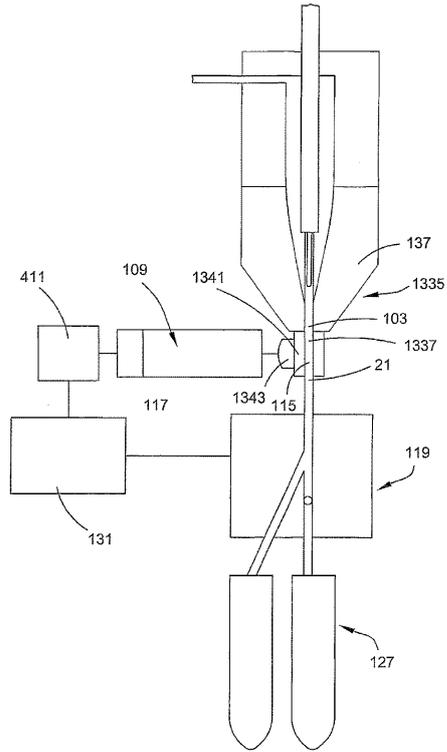
【図133】



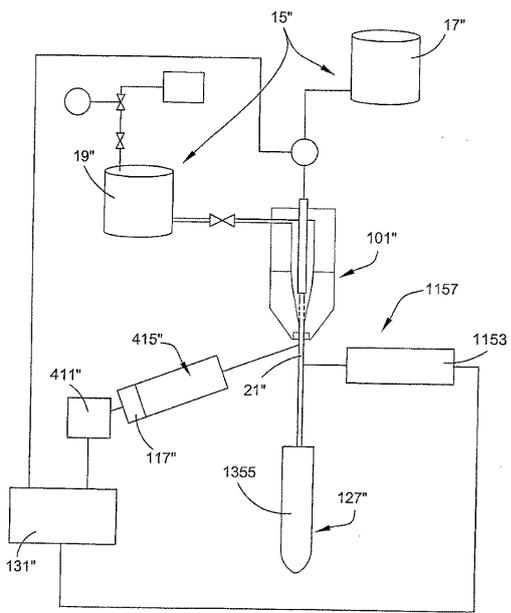
【図134】



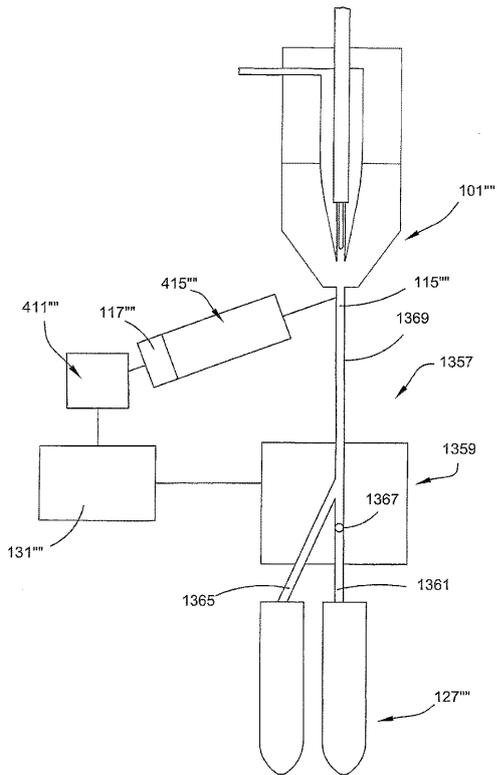
【図135】



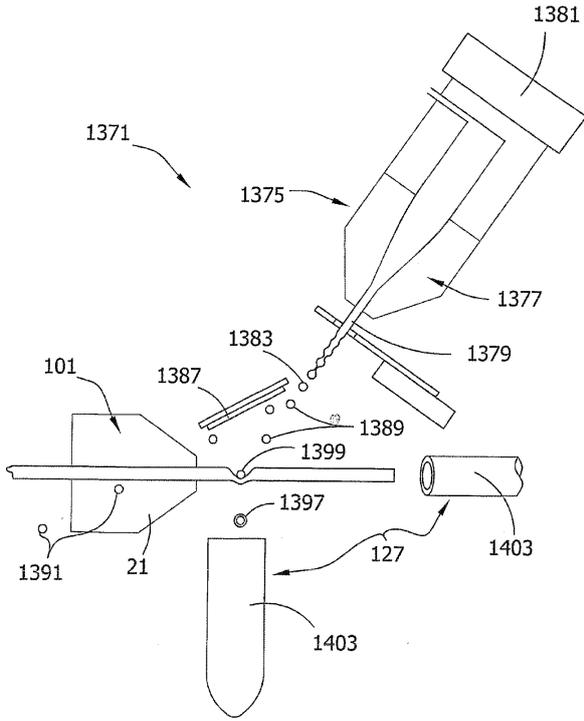
【図136】



【図137】



【 図 1 3 8 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ゲイリー・ドゥラック
アメリカ合衆国61853イリノイ州マホメット、アパルーサ・レイン2505番
- (72)発明者 ジェレミー・ティ・ハッチャー
アメリカ合衆国61801イリノイ州アーバナ、イースト・シャーツ・ストリート509番
- (72)発明者 ロン・エイ・ウエストフォール
アメリカ合衆国61853イリノイ州マホメット、ティンバー・ドライブ1007番
- (72)発明者 デイビッド・アール・ヘルブリング
アメリカ合衆国61853イリノイ州マホメット、サウス・フォーン・ドライブ904番
- (72)発明者 ジェフリー・ディ・ウォレス
アメリカ合衆国61866イリノイ州ラントウール、オータム・フィールズ・レイン666番
- (72)発明者 ゲイリー・ピー・バンダー
アメリカ合衆国61853イリノイ州マホメット、シャロン・ドライブ105番
- (72)発明者 ブラッドリー・ディディオン
アメリカ合衆国63090ミズーリ州ワシントン、ヒッコリー・ホロー220番
- (72)発明者 ニラジュ・ブイ・ナヤック
アメリカ合衆国90277カリフォルニア州レドンド・ビーチ、アパートメント・ナンバー24、
アベニュー・ジー504番
- (72)発明者 ムハンマド・アンザー
アメリカ合衆国63017ミズーリ州チェスターフィールド、ティエンダ・ドライブ14506番
- (72)発明者 シンディ・エル・ラドウィッグ
アメリカ合衆国63146ミズーリ州セント・ルイス、ドートル・レイン1412番
- (72)発明者 ジェフリー・エイ・グレアム
アメリカ合衆国63017ミズーリ州チェスターフィールド、ピカデリー・ヒル・ドライブ49番
- (72)発明者 キャスリーン・エス・クロリー
アメリカ合衆国63119ミズーリ州ウェブスター・グローブズ、カーメル・ロード315番

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第01/085913(WO, A1)
特表平04-501364(JP, A)
特表2002-500006(JP, A)
国際公開第01/040765(WO, A1)
特表2002-511843(JP, A)
米国特許第04395397(US, A)
国際公開第01/029538(WO, A1)
国際公開第2002/052244(WO, A1)
特表平04-507040(JP, A)
特表2002-521043(JP, A)
日本レーザー医学会誌, 1999年, 第20巻第1号, pp. 1-8
THERIOGENOLOGY, 1999年, Vol. 52, No. 8, pp. 1323-1341
CYTOMETRY, 1983年, Vol. 4, No. 1, pp. 11-19

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/076
C12Q 1/00-1/68
C12M 1/00-1/42
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
DWPI(Thomson Innovation)