

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7453653号
(P7453653)

(45)発行日 令和6年3月21日(2024.3.21)

(24)登録日 令和6年3月12日(2024.3.12)

(51)国際特許分類		F I	
G 0 1 N	15/1429(2024.01)	G 0 1 N	15/1429 2 0 0
G 0 1 N	15/14 (2024.01)	G 0 1 N	15/14 C
G 0 1 N	21/49 (2006.01)	G 0 1 N	21/49 Z
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	37/00 1 0 1

請求項の数 84 外国語出願 (全109頁)

(21)出願番号	特願2022-196260(P2022-196260)	(73)特許権者	517075883 ユニバーシティ オブ ワシントン University of Washi ngton アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 9 5 , シアトル, エヌイー キャンパス パ ークウェイ 1 1 0 0 , スイート 2 0 0
(22)出願日	令和4年12月8日(2022.12.8)	(73)特許権者	520054563 ミカレオ インコーポレイテッド 台湾 1 1 4 タイペイ シティ, ネイフ ー ディストリクト, シン アイ ロード , レーン 7 7 , ナンバー 6 9 , 5 エフ .
(62)分割の表示	特願2020-531424(P2020-531424)の分割	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成30年8月15日(2018.8.15)		
(65)公開番号	特開2023-25233(P2023-25233A)		
(43)公開日	令和5年2月21日(2023.2.21)		
審査請求日	令和5年1月10日(2023.1.10)		
(31)優先権主張番号	62/545,925		
(32)優先日	平成29年8月15日(2017.8.15)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 粒子分離システムおよび方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

流体サンプル中の粒子を収集するための方法であって、前記方法は、
前記サンプルの第1のアリコート中の前記粒子の第1の存在を検出することと、
前記第1のアリコート中の前記粒子の存在を検出することに応じて、前記第1のアリコ
ートの流動を第1の容積に指向することにより、第1の単離されたサンプルを形成するこ
とと、

前記第1の単離されたサンプルを分散させることにより、分散させられたサンプルを形
成することであって、前記第1の単離されたサンプルを分散させることは、複数のサンプ
ルのうちの1つが前記複数のサンプルのうちの別の1つとは異なる流路を通して流動する
ように、前記第1の単離されたサンプルを分岐させて前記複数のサンプルにすることを含
み、前記第1の単離されたサンプルを分散させることは、前記粒子を含有する前記第1の
単離されたサンプルの全体的な延長につながり、前記第1の単離されたサンプルの全体的
な延長は、前記第1の単離されたサンプル中の粒子間の平均距離を増加させる、ことと、
前記分散させられたサンプルに分離手順を受けさせることと
を含む、方法。

【請求項2】

前記分離手順は、能動的分離手順または受動的分離手順である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記粒子の第1の存在を検出することは、

第 1 の電磁放射線の源を用いて前記第 1 のアリコート中の前記粒子を調査することと、前記第 1 のアリコート中の前記粒子との前記第 1 の電磁放射線の第 1 の相互作用を検出することと

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する光を備える、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 のアリコート中の前記粒子の第 1 の存在を検出することは、前記流体サンプルの連続流の間に実施される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記粒子は、希少粒子である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記希少粒子は、細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記希少粒子は、希少細胞である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記希少細胞は、癌細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記希少細胞は、免疫細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記希少細胞は、白血球である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、前記第 1 の単離されたサンプルの流動伸張を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記流動伸張は、流路を通した前記第 1 の単離されたサンプルの放物線流によって付与される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記流動伸張は、前記第 1 の単離されたサンプルのヘリングボーン混合によって付与される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、前記第 1 の単離されたサンプルの堰混合を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記流動伸張は、複数の流路を通した前記第 1 の単離されたサンプルの流動によって付与される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、前記第 1 の単離されたサンプルの細胞伸張を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞伸張は、障壁によって付与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記障壁は、細胞の物理的屬性に基づいて前記細胞の速度を改変する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞の前記物理的屬性は、細胞体積、細胞形状、および細胞変形能から成る群から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記障壁は、フィルタ構造物または収縮部を備える、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、流動伸張と、細胞伸張とを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 24】

前記分離手順は、

第 2 の電磁放射線の源を用いて前記粒子を調査することと、

前記粒子との前記第 2 の電磁放射線の第 2 の相互作用を検出することと

を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記第 2 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する光を備える、請求項 24 に記載の方法。

20

【請求項 26】

前記第 2 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記分離手順は、蛍光活性化アリコート選別を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

前記分離手順は、eDARを含む、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 29】

前記分離手順は、フローサイトメトリを含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

前記分離手順は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記分離手順は、磁性粒子分離を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

前記分離手順は、磁気活性化細胞選別 (MACS) を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 33】

前記粒子の第 2 の存在を検出することは、前記流体サンプルの連続流の間に実施される、請求項 24 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

バイアル、ウェルプレート、および濾過容積から成る群から選択される構造物の中で前記粒子を収集することをさらに含む、請求項 1 ~ 33 のいずれかに記載の方法。

【請求項 35】

フィルタ要素を用いて前記粒子を捕捉することをさらに含む、請求項 1 ~ 34 のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

50

前記フィルタ要素から前記粒子を放出することをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記放出することは、バイアル、ウェルプレート、および付加的濾過容積から成る群から選択される容積に前記粒子を放出することを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記フィルタ要素を 1 つ以上のビーズと接触させることをさらに含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記放出することは、前記フィルタ要素を 1 つ以上のビーズと接触させることを含む、請求項 36 に記載の方法。

10

【請求項 40】

前記収集された粒子を濃縮するために、弁を動作させることをさらに含む、請求項 1 ~ 39 のいずれかに記載の方法。

【請求項 41】

1 つ以上の障壁、1 つ以上の堰ストレッチャ、1 つ以上のマイクロスリット、または、1 つ以上のマイクロフィルタを使用して、前記粒子を分散させることをさらに含む、請求項 1 ~ 40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 42】

受動的流体構造物を使用して、前記粒子を精製することをさらに含む、請求項 1 ~ 38 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 43】

流体サンプル中の粒子を収集するための装置であって、前記装置は、
入力チャンネルと、
前記入力チャンネル中の前記粒子を検出するように構成される検出器と、
前記入力チャンネルと流体連通する指向性流チャンネルと、
前記指向性流チャンネル中の流体流を変調させるように構成される弁と、
前記入力チャンネルと流体連通する出力チャンネルと、
前記出力チャンネルと流体連通する分散ステージと、
プロセッサと、実行可能命令が上に記憶された非一過性のメモリとを備えるコンピュータであって、前記実行可能命令は、前記プロセッサによって実行されると、前記装置に、
前記検出器を動作させて、前記サンプルの第 1 のアリコート中の前記粒子の第 1 の存在を検出することと、

30

前記第 1 のアリコート中の前記粒子の存在を検出することに応じて、前記弁を動作させて、前記第 1 のアリコートの流動を第 1 の容積に指向し、第 1 の単離されたサンプルを形成することと、

前記第 1 の単離されたサンプルを前記分散ステージに指向することであって、前記前記第 1 の単離されたサンプルを前記分散ステージに指向することは、複数のサンプルのうちの一つが前記複数のサンプルのうち別の一つとは異なる流路を流れて流動するように、前記第 1 の単離されたサンプルを分岐させて前記複数のサンプルにすることを含み、前記第 1 の単離されたサンプルを前記分散ステージに指向することは、前記粒子を含有する前記第 1 の単離されたサンプルの全体的な延長につながり、前記第 1 の単離されたサンプル中の粒子間の平均距離を増加させ、分散させられたサンプルを形成することと、

40

前記分散させられたサンプルに分離手順を実施することと

を行わせる、コンピュータと

を備える、装置。

【請求項 44】

前記分離手順は、能動的分離手順または受動的分離手順である、請求項 43 に記載の装置。

【請求項 45】

前記粒子の第 1 の存在を検出することは、

50

第 1 の電磁放射線の源を用いて前記第 1 のアリコート中の前記粒子を調査することと、前記第 1 のアリコート中の前記粒子との前記第 1 の電磁放射線の第 1 の相互作用を検出することと

を含む、請求項 4 3 または請求項 4 4 に記載の装置。

【請求項 4 6】

前記第 1 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する光を備える、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 4 7】

前記第 1 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、請求項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 4 8】

前記プロセッサは、前記プロセッサが前記装置内で前記流体サンプルの連続流を引き起こすのと同時に、前記第 1 のアリコート中の前記粒子の前記第 1 の存在の検出を引き起こす、請求項 4 3 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 4 9】

前記粒子は、希少粒子である、請求項 4 3 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 5 0】

前記希少粒子は、細胞である、請求項 4 9 に記載の装置。

【請求項 5 1】

前記希少粒子は、希少細胞である、請求項 5 0 に記載の装置。

【請求項 5 2】

前記希少細胞は、癌細胞である、請求項 5 0 に記載の装置。

【請求項 5 3】

前記希少細胞は、免疫細胞である、請求項 5 0 に記載の装置。

【請求項 5 4】

前記希少細胞は、白血球である、請求項 5 0 に記載の装置。

【請求項 5 5】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、前記第 1 の単離されたサンプルの流動伸張を含む、請求項 4 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の装置。

【請求項 5 6】

前記流動伸張は、流路を通した前記第 1 の単離されたサンプルの放物線流によって付与され、前記装置はさらに、流路を通した前記単離されたサンプルの放物線流を付与するように構成される、請求項 5 5 に記載の装置。

【請求項 5 7】

前記流動伸張は、複数の流路を通した前記第 1 の単離されたサンプルの流動によって付与される、請求項 5 5 に記載の装置。

【請求項 5 8】

前記装置はさらに、前記第 1 の単離されたサンプルに流動伸張を付与するように構成されるヘリングボーンストレッチャを備える、請求項 4 3 ~ 5 6 のいずれかに記載の装置。

【請求項 5 9】

前記装置はさらに、前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるように構成される堰ストレッチャを備える、請求項 4 3 ~ 5 7 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6 0】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、前記第 1 の単離されたサンプルの細胞伸張を含む、請求項 4 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6 1】

10

20

30

40

50

前記装置はさらに、前記第 1 の単離されたサンプルに細胞伸張を付与するように構成される障壁を備える、請求項 6 0 に記載の装置。

【請求項 6 2】

前記障壁は、細胞の物理的属性に基づいて前記細胞の速度を改変するように構成される、請求項 6 1 に記載の装置。

【請求項 6 3】

前記細胞の前記物理的属性は、細胞体積、細胞形状、および細胞変形能から成る群から選択される、請求項 6 2 に記載の装置。

【請求項 6 4】

前記障壁は、フィルタ構造物または収縮部を備える、請求項 6 1 に記載の装置。

10

【請求項 6 5】

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させることは、流動伸張と、細胞伸張とを含む、請求項 4 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6 6】

前記分離手順は、

第 2 の電磁放射線の源を用いて前記粒子を調査することと、

前記粒子との前記第 2 の電磁放射線の第 2 の相互作用を検出することと

を含む、請求項 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

【請求項 6 7】

前記第 2 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する光を備える、請求項 6 6 に記載の装置。

20

【請求項 6 8】

前記第 2 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、請求項 6 7 に記載の装置。

【請求項 6 9】

前記分離手順は、蛍光活性化アリコート選別を含む、請求項 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

30

【請求項 7 0】

前記分離手順は、e D A R を含む、請求項 6 9 に記載の装置。

【請求項 7 1】

前記分離手順は、フローサイトメトリを含む、請求項 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 2】

前記分離手順は、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) を含む、請求項 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 3】

40

前記分離手順は、磁性粒子分離を含む、請求項 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 4】

前記分離手順は、磁気活性化細胞選別 (M A C S) を含む、請求項 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 5】

前記プロセッサは、前記粒子の第 2 の存在を検出することを前記流体サンプルの連続流の間に実施させるように構成される、請求項 6 6 ~ 7 4 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 6】

前記プロセッサはさらに、前記出口チャンネルに接続される容積であって、パイアル、ウェルプレート、および濾過容積から成る群から選択される容積の中で前記粒子を収集させ

50

るよう構成される、請求項 4 3 ~ 7 4 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 7】

前記プロセッサはさらに、フィルタ要素を用いて前記粒子を捕捉させるよう構成される、請求項 4 3 ~ 7 6 のいずれかに記載の装置。

【請求項 7 8】

前記プロセッサはさらに、前記粒子を前記フィルタ要素から放出させるよう構成される、請求項 7 7 に記載の装置。

【請求項 7 9】

前記プロセッサはさらに、前記粒子を前記フィルタ要素から放出させ、バイアル、ウェルプレート、および付加的濾過容積から成る群から選択される容積の中に収集させるよう構成される、請求項 7 8 に記載の装置。

10

【請求項 8 0】

前記プロセッサは、前記フィルタ要素と接触するよう 1 つ以上のビーズを指向するよう構成される、請求項 7 8 に記載の装置。

【請求項 8 1】

前記プロセッサは、前記フィルタ要素を 1 つ以上のビーズと接触させることによって、前記フィルタ要素から前記粒子を放出するよう構成される、請求項 7 8 に記載の装置。

【請求項 8 2】

前記プロセッサはさらに、第 2 の弁を動作させることによって、前記収集された粒子を濃縮するよう構成される、請求項 4 3 ~ 8 1 のいずれかに記載の装置。

20

【請求項 8 3】

前記粒子を濃縮するよう構成される構造物をさらに備え、前記構造物は、1 つ以上の障壁、1 つ以上のフィルタ要素、1 つ以上の堰ストレッチャ、1 つ以上のマイクロスリット、および、1 つ以上のマイクロフィルタから成る群から選択される、請求項 4 3 ~ 8 2 のいずれかに記載の装置。

【請求項 8 4】

前記粒子を精製するよう構成される受動的流体構造物をさらに備える、請求項 4 3 ~ 8 0 のいずれかに記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

相互参照

本願は、その内容全体が参照することによって本明細書に組み込まれる、2017年8月15日に出版された米国仮特許出願第62/545,925号の利益を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

循環腫瘍細胞 (CTC) は、原発腫瘍から血流に流され、癌転移の重要な側面である。CTC は、乳、肺、前立腺、および膵臓癌等の多くの異なる種類の癌で検出されてきた。CTC の数は、転移患者における臨床転帰と直接相関し、臨床診療を管理するために役立つ得る、貴重な予後情報を提供する。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 3】

要旨

本明細書では、流体サンプル (血液等) から粒子 (細胞等) を単離および分析するための方法、装置、システム、およびデバイスが説明される。

【0 0 0 4】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を収集するための方法は、i) サンプルの第 1 のアリコート中の粒子の第 1 の存在を検出する動作と、ii) 第 1 のアリコート中の粒子

50

の存在を検出することに応じて、第1の単離されたサンプルを形成するために、第1のアリコートの流動を第1の容積に指向する動作と、 $i i i$)分散されたサンプルを形成するために、第1の単離されたサンプルを分散させる動作と、 $i v$)分散されたサンプルに分離手順を受けさせる動作とを含む。

【0005】

種々の側面では、分離手順は、能動的分離手順である。ある場合には、分離手順は、受動的分離手順である。

【0006】

いくつかの側面では、粒子の第1の存在を検出するステップは、 i)第1の電磁放射線源を用いて第1のアリコート中の粒子を調査することと、 $i i i$)第1のアリコート中の粒子との第1の電磁放射線の第1の相互作用を検出することとを含む。ある場合には、第1の電磁放射線は、光を備え、ある場合には、光は、 $100\text{ nm} \sim 400\text{ nm}$ 、 $400\text{ nm} \sim 700\text{ nm}$ 、 $700\text{ nm} \sim 1,000\text{ nm}$ 、 $1\text{ }\mu\text{m} \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、および $100\text{ }\mu\text{m} \sim 1,000\text{ }\mu\text{m}$ から成る群から選択される範囲内の波長を有する。

10

【0007】

ある場合には、第1の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される。

【0008】

ある場合には、第1のアリコート中の粒子の第1の存在を検出するステップは、流体サンプルの連続流の間に実施される。

20

【0009】

種々の側面では、粒子は、希少粒子である。ある場合には、希少粒子は、細胞であり、ある場合には、細胞は、希少細胞である。ある場合には、希少細胞は、癌細胞であり、ある場合には、癌細胞は、循環腫瘍細胞である。ある場合には、希少細胞は、免疫細胞である。ある場合には、希少細胞は、白血球である。

【0010】

ある場合には、第1の単離されたサンプルを分散させるステップは、第1の収集されたサンプルの流動伸張を含み、ある場合には、流動伸張は、流路を通した第1の収集されたサンプルの放物線流によって付与される。ある場合には、流動伸張は、第1の単離されたサンプルのヘリングボーン混合によって付与される。ある場合には、流動伸張は、複数の流路を通した第1の単離されたサンプルの流動によって付与される。

30

【0011】

いくつかの側面では、第1の単離されたサンプルを分散させるステップは、第1の単離されたサンプルの堰混合を含む。ある場合には、細胞伸張は、障壁によって付与され、ある場合には、障壁は、細胞の物理的属性に基づいて細胞の速度を改変する。ある場合には、細胞の物理的属性は、細胞体積、細胞形状、および細胞変形能から成る群から選択される。ある場合には、障壁は、フィルタ構造物、チャネルの収縮部、または堰構造物を備える。

【0012】

いくつかの側面では、第1の単離されたサンプルを分散させるステップは、流動伸張と、流動選別とを含む。

40

【0013】

ある場合には、分離手順は、 i)第2の電磁放射線源を用いて粒子を調査することと、 $i i i$)第2の電磁放射線の第2の相互作用を検出することとを含む。ある場合には、第2の電磁放射線は、光を備え、ある場合には、光は、 $100\text{ nm} \sim 400\text{ nm}$ 、 $400\text{ nm} \sim 700\text{ nm}$ 、 $700\text{ nm} \sim 1,000\text{ nm}$ 、 $1\text{ }\mu\text{m} \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、および $100\text{ }\mu\text{m} \sim 1,000\text{ }\mu\text{m}$ から成る群から選択される範囲内の波長を有する。

【0014】

種々の側面では、第2の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レ

50

イリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される。

【0015】

いくつかの側面では、粒子の第2の存在を検出することは、流体サンプルの連続流の間に実施される。

【0016】

ある場合には、本方法はさらに、構造物の中で粒子を収集するステップを含み、種々の場合には、構造物は、バイアル、ウェルプレート、および濾過容積から成る群から選択される。

【0017】

いくつかの側面では、本明細書に説明される方法はさらに、フィルタ要素を用いて粒子を捕捉するステップを含む。ある場合には、本方法はさらに、フィルタ要素から粒子を放出するステップを含み、ある場合には、放出するステップは、粒子をバイアル、ウェルプレート、および付加的濾過容積から成る群から選択される容積に放出することを含む。

【0018】

いくつかの側面では、本方法は、フィルタ要素を1つまたはそれを上回るビーズと接触させることを含み、いくつかの側面では、放出するステップは、フィルタ要素を1つまたはそれを上回るビーズと接触させることを含む。

【0019】

種々の側面では、本明細書に説明される方法は、弁を動作させ、収集された粒子を濃縮するステップ、または受動的流体構造物を使用して、粒子を精製するステップを含む。ある場合には、本方法は、1つまたはそれを上回る障壁、1つまたはそれを上回る堰ストレッチャ、1つまたはそれを上回るマイクロスリット、もしくは1つまたはそれを上回るマイクロフィルタを使用して、粒子を分散させるステップを含む。

【0020】

種々の側面では、流体サンプル中の粒子を収集するための装置は、入力チャンネルと、入力チャンネル中の粒子を検出するように構成される、検出器と、入力チャンネルと流体連通する指向性流チャンネルと、指向性流チャンネル中の流体流を変調させるように構成される、弁と、入力チャンネルと流体連通する出力チャンネルと、出力チャンネルと流体連通する分散ステージと、プロセッサと、プロセッサによって実行されると、装置に、検出器を動作させて、サンプルの第1のアリコート中の粒子の第1の存在を検出させ、第1のアリコート中の粒子の存在を検出することに応じて、弁を動作させて、第1のアリコートの流動を第1の容積に指向させ、第1の単離されたサンプルを形成させ、第1の単離されたサンプルを分散ステージに指向させて、分散されたサンプルを形成させ、分散されたサンプルに分離手順を実施させる、実行可能命令がその上に記憶された、非一過性のメモリとを備える、コンピュータとを備える。

【0021】

ある場合には、本装置によって実施される分離手順は、能動的分離手順または受動的分離手順である。ある場合には、粒子の第1の存在を検出するステップは、第1の電磁放射線源を用いて第1のアリコート中の粒子を調査することと、第1のアリコート中の粒子との第1の電磁放射線の第1の相互作用を検出することとを含む。ある場合には、第1の電磁放射線は、100nm~400nm、400nm~700nm、700nm~1,000nm、1μm~10μm、10μm~100μm、および100μm~1,000μmから成る群から選択される範囲内の波長を有する、光を備える。ある場合には、第1の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される。ある場合には、プロセッサは、プロセッサがシステム内で流体サンプルの連続流を引き起こすのと同時に、第1のアリコート中の粒子の第1の存在の検出を引き起こす。

【0022】

10

20

30

40

50

種々の側面では、本明細書に説明される装置を使用して、第1の単離されたサンプルを分散させることは、第1の収集されたサンプルの流動伸張を含む。いくつかの側面では、流動伸張は、流路を通した第1の収集されたサンプルの放物線流によって付与され、ある場合には、本装置はさらに、流路を通した収集されたサンプルの放物線流を付与するように構成される。いくつかの側面では、流動伸張は、複数の流路を通して第1の単離されたサンプルの流動によって付与される。いくつかの側面では、第1の単離されたサンプルを分散させることは、流動伸張と、細胞伸張とを含む。

【0023】

ある場合には、本明細書に説明される装置は、第1の収集されたサンプルに流動伸張を付与するように構成される、ヘリングボーンストレッチャを備える。ある場合には、本明細書に説明される装置は、第1の単離されたサンプルに細胞伸張を付与するように構成される、障壁を備える。ある場合には、障壁は、細胞の物理的属性に基づいて細胞の速度を改変するように構成され、いくつかの側面では、細胞の物理的属性は、細胞体積、細胞形状、および細胞変形能から成る群から選択される。ある場合には、障壁は、フィルタ構造物またはチャネルの収縮部を備える。

10

【0024】

種々の側面では、本明細書に説明される装置は、第2の電磁放射線源を用いて粒子を調査することと、粒子との第2の電磁放射線の第2の相互作用を検出することを含む、分離手順を実施するように構成される。ある場合には、第2の電磁放射線は、100nm~400nm、400nm~700nm、700nm~1,000nm、1μm~10μm、10μm~100μm、および100μm~1,000μmから成る群から選択される範囲内の波長を有する、光を備える。いくつかの側面では、第2の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザー誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される。いくつかの側面では、分離手順は、蛍光活性化アリコート選別、eDAR、フローサイトメトリ、蛍光活性化細胞選別(FACS)、磁性粒子分離、または磁気活性化細胞選別(MACS)を含む。

20

【0025】

種々の側面では、本明細書に説明される装置のプロセッサは、粒子の第2の存在を検出することを流体サンプルの連続流の間に実施させるように構成される。いくつかの側面では、プロセッサはさらに、出口チャネルに接続される容積であって、バイアル、ウェルプレート、および濾過容積から成る群から選択される容積の中で粒子を収集させるように構成される。いくつかの側面では、プロセッサはさらに、フィルタ要素を用いて粒子を捕捉させるように構成される。ある場合には、プロセッサはさらに、粒子をフィルタ要素から放出させるように構成される。ある場合には、プロセッサはさらに、粒子をフィルタ要素から放出させ、バイアル、ウェルプレート、および付加的濾過容積から成る群から選択される容積の中に収集させるように構成される。

30

【0026】

種々の側面では、プロセッサは、フィルタ要素と接触するように1つまたはそれを上回るビーズを指向するように構成される。いくつかの側面では、プロセッサは、フィルタ要素を1つまたはそれを上回るビーズと接触させることによって、フィルタ要素から粒子を放出するように構成される。ある場合には、プロセッサはさらに、第2の弁を動作させることによって、収集された粒子を濃縮するように構成される。

40

【0027】

種々の側面では、本装置は、粒子を濃縮するように構成され、構造物は、1つまたはそれを上回る障壁、1つまたはそれを上回る要素、1つまたはそれを上回る堰ストレッチャ、1つまたはそれを上回るマイクロスリット、および1つまたはそれを上回るマイクロフィルタから成る群から選択される。

【0028】

ある場合には、本明細書に説明される装置はさらに、粒子を精製するように構成される

50

受動的流体構造物を備える。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

流体サンプル中の粒子を収集するための方法であって、

前記サンプルの第 1 のアリコート中の前記粒子の第 1 の存在を検出するステップと、

前記第 1 のアリコート中の前記粒子の存在を検出することに応じて、第 1 の単離されたサンプルを形成するために、前記第 1 のアリコートの流動を第 1 の容積に指向するステップと、

分散されたサンプルを形成するために、前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるステップと、

前記分散されたサンプルに分離手順を受けさせるステップと、

を含む、方法。

10

(項目 2)

前記分離手順は、能動的分離手順または受動的分離手順である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記粒子の第 1 の存在を検出するステップは、

第 1 の電磁放射線源を用いて前記第 1 のアリコート中の前記粒子を調査することと、

前記第 1 のアリコート中の前記粒子との前記第 1 の電磁放射線の第 1 の相互作用を検出することと、

を含む、項目 1 に記載の方法。

20

(項目 4)

前記第 1 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する、光を備える、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記第 1 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザー誘起蛍光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記第 1 のアリコート中の前記粒子の第 1 の存在を検出するステップは、前記流体サンプルの連続流の間に実施される、項目 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 7)

前記粒子は、希少粒子である、項目 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

前記希少粒子は、細胞である、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記希少粒子は、希少細胞である、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記希少細胞は、癌細胞である、項目 9 に記載の方法。

40

(項目 11)

前記希少細胞は、免疫細胞である、項目 9 に記載の方法。

(項目 12)

前記希少細胞は、白血球である、項目 9 に記載の方法。

(項目 13)

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるステップは、前記第 1 の収集されたサンプルの流動伸張を含む、項目 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

(項目 14)

前記流動伸張は、流路を通した前記第 1 の収集されたサンプルの放物線流によって付与される、項目 13 に記載の方法。

50

(項目 15)

前記流動伸張は、前記第1の収集されたサンプルのヘリングボーン混合によって付与される、項目13に記載の方法。

(項目 16)

前記第1の単離されたサンプルを分散させるステップは、前記第1の単離されたサンプルの堰混合を含む、項目13に記載の方法。

(項目 17)

前記流動伸張は、複数の流路を通して前記第1の単離されたサンプルの流動によって付与される、項目13に記載の方法。

(項目 18)

前記第1の単離されたサンプルを分散させるステップは、前記第1の単離されたサンプルの細胞伸張を含む、項目1~12のいずれかに記載の方法。

10

(項目 19)

前記細胞伸張は、障壁によって付与される、項目18に記載の方法。

(項目 20)

前記障壁は、細胞の物理的属性に基づいて前記細胞の速度を改変する、項目19に記載の方法。

(項目 21)

前記細胞の物理的属性は、細胞体積、細胞形状、および細胞変形能から成る群から選択される、項目20に記載の方法。

20

(項目 22)

前記障壁は、フィルタ構造物または前記チャネルの収縮部を備える、項目19に記載の方法。

(項目 23)

前記第1の単離されたサンプルを分散させるステップは、流動伸張と、細胞伸張とを含む、項目1~12のいずれかに記載の方法。

(項目 24)

前記分離手順は、

第2の電磁放射線源を用いて前記粒子を調査することと、

前記粒子との前記第2の電磁放射線の第2の相互作用を検出することと、

を含む、項目1~23のいずれかに記載の方法。

30

(項目 25)

前記第2の電磁放射線は、100nm~400nm、400nm~700nm、700nm~1,000nm、1 μ m~10 μ m、10 μ m~100 μ m、および100 μ m~1,000 μ mから成る群から選択される範囲内の波長を有する、光を備える、項目24に記載の方法。

(項目 26)

前記第2の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、項目25に記載の方法。

40

(項目 27)

前記分離手順は、蛍光活性化アリコート選別を含む、項目1~23のいずれかに記載の方法。

(項目 28)

前記分離手順は、eDARを含む、項目27に記載の方法。

(項目 29)

前記分離手順は、フローサイトメトリを含む、項目1~23のいずれかに記載の方法。

(項目 30)

前記分離手順は、蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む、項目1~23のいずれかに

50

記載の方法。

(項目 3 1)

前記分離手順は、磁性粒子分離を含む、項目 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 2)

前記分離手順は、磁気活性化細胞選別 (MACS) を含む、項目 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 3)

前記粒子の第 2 の存在を検出することは、前記流体サンプルの連続流の間に実施される、項目 2 4 ~ 3 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 4)

バイアル、ウェルプレート、および濾過容積から成る群から選択される構造物の中で前記粒子を収集するステップをさらに含む、項目 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 5)

フィルタ要素を用いて前記粒子を捕捉するステップをさらに含む、項目 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 6)

前記フィルタ要素から前記粒子を放出するステップをさらに含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記放出するステップは、前記粒子をバイアル、ウェルプレート、および付加的濾過容積から成る群から選択される容積に放出することを含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記フィルタ要素を 1 つまたはそれを上回るビーズと接触させるステップをさらに含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記放出するステップは、前記フィルタ要素を 1 つまたはそれを上回るビーズと接触させることを含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記収集された粒子を濃縮するために、弁を動作させるステップをさらに含む、項目 1 ~ 3 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 1)

1 つまたはそれを上回る障壁、1 つまたはそれを上回る堰ストレッチャ、1 つまたはそれを上回るマイクロスリット、もしくは 1 つまたはそれを上回るマイクロフィルタを使用して、前記粒子を分散させるステップをさらに含む、項目 1 ~ 4 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 2)

受動的流体構造物を使用して、前記粒子を精製するステップをさらに含む、項目 1 ~ 3 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 3)

流体サンプル中の粒子を収集するための装置であって、
 入力チャネルと、
 前記入力チャネル中の前記粒子を検出するように構成される、検出器と、
 前記入力チャネルと流体連通する指向性流チャネルと、
 前記指向性流チャネル中の流体流を変調させるように構成される、弁と、
 前記入力チャネルと流体連通する出力チャネルと、
 前記出力チャネルと流体連通する分散ステージと、
 プロセッサと、前記プロセッサによって実行されると、前記装置に、
 前記検出器を動作させて、前記サンプルの第 1 のアリコート中の前記粒子の第 1 の存在を検出させ、

前記第 1 のアリコート中の前記粒子の存在を検出することに応じて、前記弁を動作さ

10

20

30

40

50

せて、前記第 1 のアリコートの流動を第 1 の容積に指向させ、第 1 の単離されたサンプルを形成させ、

前記第 1 の単離されたサンプルを前記分散ステージに指向させて、分散されたサンプルを形成させ、

前記分散されたサンプルに分離手順を実施させる、

実行可能命令がその上に記憶された、非一過性のメモリとを備える、コンピュータと、を備える、装置。

(項目 4 4)

前記分離手順は、能動的分離手順または受動的分離手順である、項目 4 3 に記載の装置。

(項目 4 5)

前記粒子の第 1 の存在を検出するステップは、

第 1 の電磁放射線源を用いて前記第 1 のアリコート中の前記粒子を調査することと、

前記第 1 のアリコート中の前記粒子との前記第 1 の電磁放射線の第 1 の相互作用を検出することと、

を含む、項目 4 3 または項目 4 4 に記載の装置。

(項目 4 6)

前記第 1 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する、光を備える、項目 4 3 ~ 4 5 のいずれかに記載の装置。

(項目 4 7)

前記第 1 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザ誘起蛍光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、項目 4 3 ~ 4 6 のいずれかに記載の装置。

(項目 4 8)

前記プロセッサは、前記プロセッサが前記装置内で前記流体サンプルの連続流を引き起こすのと同時に、前記第 1 のアリコート中の前記粒子の第 1 の存在の検出を引き起こす、項目 4 3 ~ 4 7 のいずれかに記載の装置。

(項目 4 9)

前記粒子は、希少粒子である、項目 4 3 ~ 4 8 のいずれかに記載の装置。

(項目 5 0)

前記希少粒子は、細胞である、項目 4 9 に記載の装置。

(項目 5 1)

前記希少粒子は、希少細胞である、項目 5 0 に記載の装置。

(項目 5 2)

前記希少細胞は、癌細胞である、項目 5 0 に記載の装置。

(項目 5 3)

前記希少細胞は、免疫細胞である、項目 5 0 に記載の装置。

(項目 5 4)

前記希少細胞は、白血球である、項目 5 0 に記載の装置。

(項目 5 5)

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるステップは、前記第 1 の収集されたサンプルの流動伸張を含む、項目 4 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の装置。

(項目 5 6)

前記流動伸張は、流路を通した前記第 1 の収集されたサンプルの放物線流によって付与され、前記装置はさらに、流路を通した前記収集されたサンプルの放物線流を付与するように構成される、項目 5 5 に記載の装置。

(項目 5 7)

前記流動伸張は、複数の流路を通して前記第 1 の単離されたサンプルの流動によって付

10

20

30

40

50

与される、項目 5 5 に記載の装置。

(項目 5 8)

前記装置はさらに、前記第 1 の収集されたサンプルに流動伸張を付与するように構成される、ヘリングボーンストレッチャを備える、項目 4 3 ~ 5 6 のいずれかに記載の装置。

(項目 5 9)

前記装置はさらに、前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるように構成される、堰ストレッチャを備える、項目 4 3 ~ 5 7 のいずれかに記載の装置。

(項目 6 0)

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるステップは、前記第 1 の単離されたサンプルの細胞伸張を含む、項目 4 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の装置。

10

(項目 6 1)

前記装置はさらに、前記第 1 の単離されたサンプルに細胞伸張を付与するように構成される、障壁を備える、項目 6 0 に記載の装置。

(項目 6 2)

前記障壁は、細胞の物理的属性に基づいて前記細胞の速度を改変するように構成される、項目 6 1 に記載の装置。

(項目 6 3)

前記細胞の物理的属性は、細胞体積、細胞形状、および細胞変形能から成る群から選択される、項目 6 2 に記載の装置。

(項目 6 4)

前記障壁は、フィルタ構造物または前記チャネルの収縮部を備える、項目 6 1 に記載の装置。

20

(項目 6 5)

前記第 1 の単離されたサンプルを分散させるステップは、流動伸張と、細胞伸張とを含む、項目 4 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の装置。

(項目 6 6)

前記分離手順は、

第 2 の電磁放射線源を用いて前記粒子を調査することと、

前記粒子との前記第 2 の電磁放射線の第 2 の相互作用を検出することと、

を含む、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

30

(項目 6 7)

前記第 2 の電磁放射線は、100 nm ~ 400 nm、400 nm ~ 700 nm、700 nm ~ 1,000 nm、1 μm ~ 10 μm、10 μm ~ 100 μm、および 100 μm ~ 1,000 μm から成る群から選択される範囲内の波長を有する、光を備える、項目 6 6 に記載の装置。

(項目 6 8)

前記第 2 の相互作用は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザー誘起蛍光、発光、生物発光、および化学発光から成る群から選択される、項目 6 7 に記載の装置。

40

(項目 6 9)

前記分離手順は、蛍光活性化アリコート選別を含む、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

(項目 7 0)

前記分離手順は、e D A R を含む、項目 6 9 に記載の装置。

(項目 7 1)

前記分離手順は、フローサイトメトリを含む、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

(項目 7 2)

前記分離手順は、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) を含む、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

50

(項目 7 3)

前記分離手順は、磁性粒子分離を含む、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

(項目 7 4)

前記分離手順は、磁気活性化細胞選別 (MACS) を含む、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれかに記載の装置。

(項目 7 5)

前記プロセッサは、前記粒子の第 2 の存在を検出することを前記流体サンプルの連続流の間に実施させるように構成される、項目 6 6 ~ 7 4 のいずれかに記載の装置。

(項目 7 6)

前記プロセッサはさらに、前記出口チャンネルに接続される容積であって、バイアル、ウェルプレート、および濾過容積から成る群から選択される容積の中で前記粒子を収集させるように構成される、項目 4 3 ~ 7 4 のいずれかに記載の装置。

10

(項目 7 7)

前記プロセッサはさらに、フィルタ要素を用いて前記粒子を捕捉させるように構成される、項目 4 3 ~ 7 6 のいずれかに記載の装置。

(項目 7 8)

前記プロセッサはさらに、前記粒子を前記フィルタ要素から放出させるように構成される、項目 7 7 に記載の装置。

(項目 7 9)

前記プロセッサはさらに、前記粒子を前記フィルタ要素から放出させ、バイアル、ウェルプレート、および付加的濾過容積から成る群から選択される容積の中に収集させるように構成される、項目 7 8 に記載の装置。

20

(項目 8 0)

前記プロセッサは、前記フィルタ要素と接触するように 1 つまたはそれを上回るピーズを指向するように構成される、項目 7 8 に記載の装置。

(項目 8 1)

前記プロセッサは、前記フィルタ要素を 1 つまたはそれを上回るピーズと接触させることによって、前記フィルタ要素から前記粒子を放出するように構成される、項目 7 8 に記載の装置。

(項目 8 2)

前記プロセッサはさらに、第 2 の弁を動作させることによって、前記収集された粒子を濃縮するように構成される、項目 4 3 ~ 8 1 のいずれかに記載の装置。

30

(項目 8 3)

前記粒子を濃縮するように構成される構造物であって、1 つまたはそれを上回る障壁、1 つまたはそれを上回る要素、1 つまたはそれを上回る堰ストレッチャ、1 つまたはそれを上回るマイクロスリット、および 1 つまたはそれを上回るマイクロフィルタから成る群から選択される、構造物をさらに備える、項目 4 3 ~ 8 2 のいずれかに記載の装置。

(項目 8 4)

前記粒子を精製するように構成される受動的流体構造物をさらに備える、項目 4 3 ~ 8 0 のいずれかに記載の装置。

40

【0029】

参照による援用

本明細書で記述される全ての出版物、特許、および特許出願は、各個々の出版物、特許、または特許出願が、参照することにより組み込まれるように具体的かつ個別に示された場合と同程度に、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

本開示の新規の特徴は、添付の請求項で詳細に記載される。本開示の特徴および利点のより深い理解は、本開示の原理が利用される、例証的实施形態を記載する以下の発明を実施するための形態および添付図面を参照することによって得られる。

50

【 0 0 3 1 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、本開示の側面による、e D A R の概観である。

【 0 0 3 2 】

【 図 1 B 】 図 1 B は、本開示のいくつかの実施形態による、検出トレースを示す。

【 0 0 3 3 】

【 図 1 C 】 図 1 C は、本開示のいくつかの実施形態による、蛍光および明視野撮像データを示す。

【 0 0 3 4 】

【 図 2 】 図 2 は、本開示の側面による、e D A R マイクロ流体チップの微細製作のためのプロセスフローの実施例を図示する。

【 0 0 3 5 】

【 図 3 】 図 3 A - 3 H は、本開示のいくつかの実施形態による、例示的な流体力学的選別方式を図示する。

【 0 0 3 6 】

【 図 4 】 図 4 A - 4 D は、本開示の側面による、アンサンブル e D A R のマイクロ流体チップおよび流体力学的切替方式を示す。

【 0 0 3 7 】

【 図 5 】 図 5 は、本開示の側面による、高速カメラによって記録された現在の流体方式の切替時間の実施例を描写する。

【 0 0 3 8 】

【 図 6 】 図 6 A - 6 G は、本開示の側面による、e D A R の特性評価および分析性能を示す。

【 0 0 3 9 】

【 図 7 】 図 7 A - 7 E は、本開示の側面による、捕捉された C T C のマルチスリットおよびマルチカラー蛍光画像を示す。

【 0 0 4 0 】

【 図 8 】 図 8 は、本開示の側面による、「二重捕捉」 e D A R の一般構造を描写する。

【 0 0 4 1 】

【 図 9 】 図 9 A - 9 C は、本開示のいくつかの実施形態による、流動切替の明視野画像を示す。

【 0 0 4 2 】

【 図 1 0 A 】 図 1 0 A は、第 1 の e D A R ステージと、分散ステージと、蛍光活性化選別の第 2 のステージとを備える、複数ステージ選別装置を示す。

【 0 0 4 3 】

【 図 1 0 B 】 図 1 0 B は、例示的な第 2 の選別ステージを示す。

【 0 0 4 4 】

【 図 1 0 C 】 図 1 0 C は、例示的な第 1 の選別ステージを示す。

【 0 0 4 5 】

【 図 1 0 D 】 図 1 0 D および E は、第 1 の選別ステージと第 2 の選別ステージとの間の分散ステージ流動ストレッチャの一部を示す。

【 図 1 0 E 】 図 1 0 D および E は、第 1 の選別ステージと第 2 の選別ステージとの間の分散ステージ流動ストレッチャの一部を示す。

【 0 0 4 6 】

【 図 1 1 】 図 1 1 A - 1 1 D は、本開示のいくつかの実施形態による、障害物または種々の設計の複数の流路を含有するチャンネルを伴う第 2 の選別ステージに接続される、例示的な第 1 の選別ステージの上面図を示す。

【 0 0 4 7 】

【 図 1 2 】 図 1 2 A - 1 2 C は、異なる幾何学形状のチャンネルを伴う第 2 の選別ステージに接続される、例示的な第 1 の選別ステージの上面図を示す。

【 0 0 4 8 】

10

20

30

40

50

【図13】図13は、放物線流プロファイルを伴う直線状チャンネルと組み合わせられた例示的ヘリングボーンストレッチャの上面図を示す。

【0049】

【図14】図14は、複数の直線状チャンネルと組み合わせられた例示的な複数のヘリングボーンストレッチャの上面図を示す。

【0050】

【図15】図15は、直線状チャンネルおよび堰ストレッチャと組み合わせられた例示的ヘリングボーンストレッチャの上面図を示す。

【0051】

【図16】図16は、ヘリングボーンストレッチャと組み合わせられた複数の流体経路を伴う例示的流動ストレッチャの上面図を示す。

10

【0052】

【図17】図17は、複数のヘリングボーンストレッチャおよび堰ストレッチャと組み合わせられた複数の流体経路を伴う例示的流動ストレッチャの上面図を示す。

【0053】

【図18A】図18Aは、第1のeDARステージと、分散ステージと、蛍光活性化選別の第2のステージとを備える、複数ステージ選別装置を示す。

【0054】

【図18B】図18Bは、複数ステージ選別装置を動作させる方法を示す。

【0055】

20

【図19】図19は、例示的分散ステージを示す。

【0056】

【図20A】図20Aは、例示的流動ストレッチャの上面図を示す。

【0057】

【図20B】図20Bは、例示的ヘリングボーン流動ストレッチャの上面図を示す。

【0058】

【図21A】図21Aは、例示的堰ストレッチャの上面図を示す。

【0059】

【図21B】図21Bは、例示的な長い堰ストレッチャの上面図を示す。

【0060】

30

【図22】図22A - 22Cは、例示的2次元堰およびフィルタストレッチャの上面図を示す。

【0061】

【図23A】図23Aは、ヘリングボーン構造物を利用するマイクロ流体デバイスを通じた流路の概略図を示す。

【0062】

【図23B】図23Bは、ヘリングボーン構造物を利用するマイクロ流体デバイス内の流動チャンネルの層の側面図を示す。

【0063】

【図24A】図24Aは、選別中の第1の選別合流点からの検出トレースを示す。

40

【0064】

【図24B】図24Bは、選別中の第2の選別合流点からの検出トレースを示す。

【0065】

【図24C】図24Cは、第1の選別合流点および第2の選別合流点からのAPDデータの複合トレースのより短い区分を示す。

【0066】

【図25】図25A - 25Cは、流動ストレッチャ伸張試験の結果を示す。

【0067】

【図26】図26A - 26Bは、フィルタストレッチャ内の細胞の画像を示す。

【0068】

50

【図 27】図 27 A - 27 B は、連続選別流体工学装置内の選別を描写する、画像フレームを示す。

【0069】

【図 28】図 28 は、粒子収集デバイスを動作させるようにプログラムまたは別様に構成される例示的デジタル処理デバイスを示す。

【0070】

【図 29 A】図 29 A は、標的粒子の捕捉および放出のために構成される例示的流路を示す。

【0071】

【図 29 B】図 29 B は、フィルタを横断してピーズおよび流動逆転を使用して、フィルタから細胞を放出する方法を示す。

10

【0072】

【図 30 A】図 30 A は、流路を通して流動を限定するための弁を伴う例示的流路の上面図を示す。

【0073】

【図 30 B】図 30 B は、粒子が収集される流体体積の低減のための弁を備える、例示的流路を示す。

【0074】

【図 30 C】図 30 C は、複数ステージ選別後に濃縮された粒子を収集するための装置を示す。

20

【0075】

【図 31】図 31 は、粒子が分離後に収集される流体体積を低減させるための例示的流路を示す。

【発明を実施するための形態】

【0076】

本開示は、多くの場合、マイクロ流体装置の使用とともに、流体サンプル（例えば、血液）中の粒子（例えば、細胞）を検出、分離、および分析するための方法、システム、およびデバイスを提供する。粒子は、希少粒子（例えば、希少細胞）であり得る。本明細書で提供されるマイクロ流体装置および方法の多くは、アンサンプル決定アリコートランク付け（e D A R）を流体サンプルに実施するために使用されることができ、これは、流体サンプルがアリコートに分割された後に流体サンプルの分析を可能にする。本明細書で提供されるマイクロ流体装置および方法は、分散動作および分離動作が後に続く、e D A R を採用することによって、流体サンプル中の粒子の純度を増進するために使用されることができる。

30

【0077】

分散動作は、本明細書に説明される種々のマイクロ流体装置および方法によって実施されてもよい。例えば、分散動作は、流動伸張動作を使用して実施されてもよい。流動伸張は、本明細書に説明されるように、初期 e D A R 動作後に、マイクロ流体チャネルを通して、粒子を含有するアリコートまたは流体体積の放物線流によって付与されてもよい。流動伸張は、本明細書に説明されるように、初期 e D A R 動作後に、1 つまたはそれを上回るヘリングボーン構造物を備えるマイクロ流体チャネルを通して、粒子を含有するアリコートまたは流体体積の流動によって付与されてもよい。流動伸張は、本明細書に説明されるように、初期 e D A R 動作後に、複数の流路を通して、粒子を含有するアリコートまたは流体体積の流動によって付与されてもよい。ある場合には、分散動作は、細胞伸張動作を使用して実施されてもよい。細胞伸張は、その体積、形状、または変形能に基づいて、粒子の速度を改変する役割を全て果たす、障壁、またはフィルタ構造物、もしくは堰構造物、または収縮部を伴うチャネルを通して、粒子を含有するアリコートまたは流体体積の流動によって付与されてもよい。例えば、細胞伸張動作を実施するために使用されるフィルタ構造物は、1 つまたはそれを上回る細胞型の速度に優先的に影響を及ぼすように（例えば、減衰させるように）定寸される複数の開口を備えてもよい。ある場合には、細胞伸

40

50

張動作を実施するために使用されるフィルタ構造物の1つまたはそれを上回る開口は、1つまたはそれを上回る細胞型の細胞が変形し、フィルタ構造物の開口を通過することを要求するように（例えば、標的細胞の直径または変形能等の標的細胞の寸法または性質に対して）定寸される、高さ、長さ、幅、または断面を有することができる。いくつかの事例では、分散動作は、流動伸張動作および細胞伸張動作の組み合わせを使用して実施されてもよい。

【0078】

分散動作後、分離動作が、実施されてもよい。分離動作は、受動的分離動作または能動的分離動作であってもよい。分離動作は、第2のeDAR動作であってもよい。分離動作は、フローサイトメトリ（例えば、蛍光活性化細胞選別）動作であってもよい。分離動作は、磁気分離動作であってもよい。

10

【0079】

本明細書に説明されるマイクロ流体装置および方法は、eDARのみを使用する標的粒子の単離と比較して、流体サンプル中の非標的粒子からの標的粒子の有意に増進した分離を提供し得る。ある場合には、最終的な収集された粒子の純度は、eDARのみによって達成可能な純度と比較して、5倍、10倍、20倍、30倍、または30倍を上回って増進され得る。

【0080】

本開示で説明される方法、システム、装置、およびデバイスは、被分析物（例えば、希少細胞）の分離、濃縮、および/または単離のために、生物学および病理学における多種多様の用途で使用されることができる。例えば、いくつかの用途は、限定ではないが、疾患の診断および予後のための流体（例えば、体液）からの希少細胞（例えば、癌細胞、癌幹細胞、マラリアに感染した赤血球、幹細胞、胎児細胞、免疫細胞、感染細胞）の捕捉、水質監視のための単細胞寄生生物（例えば、ジアルジア、クリプトスポリジウム）の単離、疾患進行（例えば、HIV、AIDS、癌）を監視するための感染細胞（例えば、リンパ球、白血球）の単離、（例えば、疾患、遺伝学的異常の）スクリーニングのための母体血中の胎児細胞、治療用途で使用するための幹細胞、プリオン関連（例えば、狂牛病）疾患スクリーニングのためのプリオンに感染した細胞、およびその他を含むことができる。

20

【0081】

特定の側面では、希少粒子は、希少細胞である。希少細胞は、有核または非有核であり得る。希少細胞は、限定ではないが、悪性表現型を発現する細胞、母体末梢血中の胎児細胞等の胎児細胞、腫瘍から血液または他の体液に流された腫瘍細胞等の腫瘍細胞、HIVに感染した細胞等のウイルスに感染した細胞、着目遺伝子が移入された細胞、および自己反応障害に罹患した対象の末梢血中に存在するT細胞またはB細胞の異常サブタイプを含む。

30

【0082】

本明細書で使用されるように、「アンサンプル決定」とは、粒子の集合または群内の特性の存在または非存在の検出に基づいて行われる決定を指す。群は、少なくとも3つの粒子、被分析物、および/または細胞を含むことができる。いくつかの側面では、アンサンプル決定は、複数の粒子を含有する流体サンプルのアリコート中の単一の明確に異なる粒子の存在または非存在に基づいて行われるであろう。重要なこととして、単一の粒子の存在または非存在に基づいて行われるアンサンプル決定は、アリコート全体に（すなわち、アリコート中に存在する粒子の全てに）適用されるであろう。

40

【0083】

本明細書で使用されるように、「アリコート」とは、分析される流体サンプルの全体積の一部を指す。アリコートは、少なくとも1つの粒子、被分析物、または細胞を含有することができる。アリコートは、粒子、被分析物、または細胞の群を含有することができる。アリコートは、3次元空間を占有し得、粒子は、その内側で組織化を伴わずに無作為に分布し得る。アリコートは、有限深度を有し得、粒子は、識別できる層を伴わずに深度に沿って分布することができる。本願の文脈で、アリコートは、細分化を伴わずに、その

50

全体で分析される。

【0084】

本明細書で使用されるように、語句「流体を分割する」とは、流体サンプルの全体積から流体の一部またはアリコートを分離すること、または別様に再指向することを指す。

【0085】

ある側面では、アリコートは、より大きい流体サンプルの分数、例えば、流体サンプルの約1/2、または流体サンプルの約1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、もしくはそれ未満を含むことができる。ある側面では、アリコートは、例えば、流体サンプルの約10%、または流体サンプルの約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%、もしくはそれ未満を含むことができる。したがって、本明細書で提供されるeDAR方法によって検査または処理される流体は、例えば、少なくとも約2つのアリコート、または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、1,000,000、もしくはそれを上回るアリコートに分割されることができる。当業者は、流体サンプルが分割されるであろうアリコートの数が、流体中で期待される希少粒子の数および流体サンプルの全体積に依存するであろうと理解するであろう。

10

20

【0086】

ある側面では、アリコートは、より大きい流体サンプルの分数、例えば、流体サンプルの1/2、または流体サンプルの1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、もしくはそれ未満を含むことができる。ある側面では、アリコートは、例えば、流体サンプルの10%、または流体サンプルの9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%、もしくはそれ未満を含むことができる。したがって、本明細書で提供されるeDAR方法によって検査または処理される流体は、例えば、少なくとも約2つのアリコート、または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、1,000,000、もしくはそれを上回るアリコートに分割されることができる。当業者は、流体サンプルが分割されるであろうアリコートの数が、流体中で期待される希少粒子の数および流体サンプルの全体積に依存するであろうと理解するであろう。

30

40

50

【0087】

ある側面では、アリコートは、例えば、約0.1 nL ~ 約10 mL、または約1 nL ~ 約1 mL、または約1 nL ~ 約100 μL、または約1 nL ~ 約10 μL、または約1 nL ~ 約1 μL、または約1 nL ~ 約100 nL、または約0.1 nL ~ 約10 nLの体積を有することができる。

【0088】

ある側面では、アリコートは、例えば、0.1 nL ~ 10 mL、または1 nL ~ 1 mL、または1 nL ~ 100 μL、または1 nL ~ 10 μL、または1 nL ~ 1 μL、または1 nL ~ 100 nL、または0.1 nL ~ 10 nLの体積を有することができる。

【0089】

本明細書で使用されるように、用語「ランク付け」とは、カテゴリ化によってアリコートの定量的性質、定性的性質、または重要性を査定することを指す。一側面では、アリコートをヌル（例えば、希少粒子がアリコート中で検出されない）または非ゼロ（例えば、少なくとも1つの希少粒子がアリコート中で検出される）のいずれかとしてランク付けされることができる。一側面では、ランク付けは、二元であり得る。他の側面では、アリコートは、例えば、アリコート中の希少粒子の濃度、アリコート中の希少粒子の識別、アリコート中の複数の異なる希少粒子の識別、および同等物と関連する、付加的なカテゴリに従って、ランク付けされることができる。このようにして、任意の数のカテゴリが、例えば、約1 ~ 10、約11 ~ 20、約1 ~ 50、約51 ~ 100、約1 ~ 100、約101 ~ 201等の濃度の範囲に基づいて、割り当てられることができる。いくつかの側面では、カテゴリの数は、例えば、1 ~ 10、11 ~ 20、1 ~ 50、51 ~ 100、1 ~ 100、101 ~ 201等の濃度の範囲に基づいて割り当てられることができる。これらのランク付けは、いくつかの所定の定量的もしくは定性的カテゴリのうちの1つに対応する恣意的な数（例えば、0、1、2、3、4、5等）、またはアリコート中の希少粒子の数もしくは概数の実際の値に対応する数を割り当てられることができる。

【0090】

本明細書で使用されるように、用語「マイクロ流体チップ」は、用語「チップ」、「流体チップ」、「マイクロチップ」、または「流体マイクロチップ」と同義的に使用される。

【0091】

本明細書で使用されるように、「コンピュータ」とは、少なくともデジタルプロセッサを指す。デジタルプロセッサは、限定ではないが、フィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）、特定用途向け集積回路（ASIC）、またはリアルタイム（RT）プロセッサであり得る。

【0092】

eDAR装置は、被分析物（例えば、希少細胞）の識別および単離に使用されることができる。eDARは、アリコート中のサンプルを処理することができ、かつ流体力学的切替方式によって制御される能動的選別ステップによって、チャンネルまたはチャンバ中で希少細胞を収集することができる。チャンネルおよびチャンバを伴う、本明細書ではマイクロ流体チップと称される「一体型マイクロ流体チップ」は、希少細胞を選別するために使用されることができる。マイクロ流体チップは、部分的に、機能的面積、すなわち、微細製作フィルタから構成されることができる。eDARは、高い回収率（例えば、90%を上回るまたはそれと等しい）および低い偽陽性率（例えば、ゼロに近い）で被分析物（例えば、1ミリメートルを上回るまたはそれと等しい全血）の混合集団を含有する流体を急速に（例えば、1 mLあたり12.5分未満またはそれと等しい）分析するために使用されることができる。

【0093】

マイクロ流体チップの一般構造およびeDARの例示的構成が、図5に描写されている。左下のチャンネルは、選別されたアリコートを収集するために使用されることができ、かつそれらを後続の精製（例えば、精製チャンバ）面積（例えば、20,000個のマイクロスリット）に移送するために使用されることができる。鎖線付きのボックスで印付けら

10

20

30

40

50

れた領域が、図5B-Dにさらに描写されている。陽性アリコートがランク付けられなかったときの例示的流動条件が、図5Bに示されている。血流は、収集チャネルに切り替えられることができ、選別されたアリコートは、図5Cの第2のウィンドウによって確認されることができる。図5Dは、血流がアリコートを選別した後に切り替えられて戻され得ることを示す。

【0094】

本装置は、いくつかの流速を有することができる。流速とは、流体がeDAR装置および本装置に取り付けられた任意の構成要素を通して流動する速度を指すことができる。いくつかの側面では、例示的な流速は、約5 μ L/分、10 μ L/分、20 μ L/分、25 μ L/分、30 μ L/分、35 μ L/分、40 μ L/分、41 μ L/分、42 μ L/分、43 μ L/分、44 μ L/分、45 μ L/分、46 μ L/分、47 μ L/分、48 μ L/分、49 μ L/分、50 μ L/分、51 μ L/分、52 μ L/分、53 μ L/分、54 μ L/分、55 μ L/分、56 μ L/分、57 μ L/分、58 μ L/分、59 μ L/分、60 μ L/分、61 μ L/分、62 μ L/分、63 μ L/分、64 μ L/分、65 μ L/分、66 μ L/分、67 μ L/分、68 μ L/分、69 μ L/分、70 μ L/分、71 μ L/分、72 μ L/分、73 μ L/分、74 μ L/分、75 μ L/分、76 μ L/分、77 μ L/分、78 μ L/分、79 μ L/分、80 μ L/分、81 μ L/分、82 μ L/分、83 μ L/分、84 μ L/分、85 μ L/分、86 μ L/分、87 μ L/分、88 μ L/分、89 μ L/分、90 μ L/分、91 μ L/分、92 μ L/分、93 μ L/分、94 μ L/分、95 μ L/分、96 μ L/分、97 μ L/分、98 μ L/分、99 μ L/分、100 μ L/分、105 μ L/分、110 μ L/分、115 μ L/分、120 μ L/分、125 μ L/分、130 μ L/分、140 μ L/分、150 μ L/分、160 μ L/分、170 μ L/分、180 μ L/分、190 μ L/分、200 μ L/分、225 μ L/分、250 μ L/分、275 μ L/分、300 μ L/分、350 μ L/分、400 μ L/分、450 μ L/分、500 μ L/分、600 μ L/分、700 μ L/分、800 μ L/分、900 μ L/分、または1,000 μ L/分未満であり得る。

【0095】

いくつかの側面では、流速は、約5 μ L/分~30 μ L/分、15 μ L/分~50 μ L/分、25 μ L/分~75 μ L/分、40 μ L/分~80 μ L/分、50 μ L/分~90 μ L/分、60 μ L/分~100 μ L/分、80 μ L/分~160 μ L/分、90 μ L/分~180 μ L/分、100 μ L/分~200 μ L/分、150 μ L/分~300 μ L/分、200 μ L/分~400 μ L/分、300 μ L/分~500 μ L/分、400 μ L/分~600 μ L/分、500 μ L/分~700 μ L/分、600 μ L/分~800 μ L/分、700 μ L/分~900 μ L/分、または800 μ L/分~1,000 μ L/分の範囲内であり得る。

【0096】

いくつかの側面では、例示的流速は、5 μ L/分、10 μ L/分、20 μ L/分、25 μ L/分、30 μ L/分、35 μ L/分、40 μ L/分、41 μ L/分、42 μ L/分、43 μ L/分、44 μ L/分、45 μ L/分、46 μ L/分、47 μ L/分、48 μ L/分、49 μ L/分、50 μ L/分、51 μ L/分、52 μ L/分、53 μ L/分、54 μ L/分、55 μ L/分、56 μ L/分、57 μ L/分、58 μ L/分、59 μ L/分、60 μ L/分、61 μ L/分、62 μ L/分、63 μ L/分、64 μ L/分、65 μ L/分、66 μ L/分、67 μ L/分、68 μ L/分、69 μ L/分、70 μ L/分、71 μ L/分、72 μ L/分、73 μ L/分、74 μ L/分、75 μ L/分、76 μ L/分、77 μ L/分、78 μ L/分、79 μ L/分、80 μ L/分、81 μ L/分、82 μ L/分、83 μ L/分、84 μ L/分、85 μ L/分、86 μ L/分、87 μ L/分、88 μ L/分、89 μ L/分、90 μ L/分、91 μ L/分、92 μ L/分、93 μ L/分、94 μ L/分、95 μ L/分、96 μ L/分、97 μ L/分、98 μ L/分、99 μ L/分、100 μ L/分、105 μ L/分、110 μ L/分、115 μ L/分、120 μ L/分、125 μ L/分、130 μ L/分、140 μ L/分、150 μ L/分、160 μ L/分、1

70 μL / 分、180 μL / 分、190 μL / 分、200 μL / 分、225 μL / 分、250 μL / 分、275 μL / 分、300 μL / 分、350 μL / 分、400 μL / 分、450 μL / 分、500 μL / 分、600 μL / 分、700 μL / 分、800 μL / 分、900 μL / 分、または1,000 μL / 分未満であり得る。

【0097】

いくつかの側面では、流速は、5 μL / 分 ~ 30 μL / 分、15 μL / 分 ~ 50 μL / 分、25 μL / 分 ~ 75 μL / 分、40 μL / 分 ~ 80 μL / 分、50 μL / 分 ~ 90 μL / 分、60 μL / 分 ~ 100 μL / 分、800 μL / 分 ~ 160 μL / 分、90 μL / 分 ~ 180 μL / 分、100 μL / 分 ~ 200 μL / 分、150 μL / 分 ~ 300 μL / 分、200 μL / 分 ~ 400 μL / 分、300 μL / 分 ~ 500 μL / 分、400 μL / 分 ~ 600 μL / 分、500 μL / 分 ~ 700 μL / 分、600 μL / 分 ~ 800 μL / 分、700 μL / 分 ~ 900 μL / 分、または800 μL / 分 ~ 1,000 μL / 分の範囲内であり得る。

10

【0098】

本装置は、いくつかの選別効率を有することができる。選別効率は、着目被分析物の回収を指すことができる。いくつかの側面では、例示的効率は、約5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%を上回り得る。いくつかの側面では、選別効率は、約5% ~ 30%、15% ~ 50%、25% ~ 75%、40% ~ 80%、50% ~ 90%、または60% ~ 100%の範囲内であり得る。

20

【0099】

いくつかの側面では、例示的選別効率は、5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%を上回り得る。いくつかの側面では、選別効率は、5% ~ 30%、15% ~ 50%、25% ~ 75%、40% ~ 80%、50% ~ 90%、または60% ~ 100%の範囲内であり得る。

30

【0100】

eDAR装置は、いくつかの回収率を有することができる。回収率は、着目被分析物の回収を指すことができる。いくつかの側面では、回収率は、約5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%を上回り得る。いくつかの側面では、回収率は、約5% ~ 30%、15% ~ 50%、25% ~ 75%、40% ~ 80%、50% ~ 90%、または60% ~ 100%の範囲内であり得る。

40

【0101】

いくつかの側面では、回収率は、5%、10%、20%、25%、30%、35%、4

50

0 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %を上回り得る。

【0102】

いくつかの側面では、回収率は、5 % ~ 30 %、15 % ~ 50 %、25 % ~ 75 %、40 % ~ 80 %、50 % ~ 90 %、または60 % ~ 100 %の範囲内であり得る。

10

【0103】

いくつかの側面では、eDAR装置または方法が、第2の細胞型から第1の細胞型を分離するために使用される。いくつかの側面では、単離されたサンプルは、第1の細胞型の総数の5 %、10 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %を上回るものを含む。いくつかの側面では、単離されたサンプルは、第2の細胞型の総数の1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または90 %未満を含む。

20

【0104】

eDAR装置は、励起および検出モードのための放射線源（例えば、レーザ）を装備した顕微鏡と、光源と、タイマと、管類と、廃棄物収集デバイスと、タグ付けされた被分析物（例えば、細胞）を撮像するためのカメラと、マイクロ流体チップの中および外への流体の流動を制御するためのポンプと、能動的選別ステップを制御するためのデジタルプロセッサと、画像を処理するためのデジタルプロセッサ（例えば、コンピュータシステム）とを含むことができる。デジタルプロセッサは、コンピュータであり得る。

30

【0105】

いくつかの側面では、eDARプラットフォームは、1つを上回る被分析物（例えば、希少細胞）の捕捉のための装置を含むことができる。「二重捕捉」eDARは、混合サンプルから複数の希少細胞を分離することができる。混合サンプル（例えば、流体サンプル）は、検出試薬で標識され、主要チャンネルにおいて「二重捕捉」装置の最上部に進入することができる。2つの側方チャンネルが、混合サンプルの流動の流体力学的切替を制御するために使用されることができる。いくつかの側面では、流動は、2つのソレノイドを使用して制御されることができる。希少細胞の2つの亜集団が、分離され、同一マイクロ流体チップの上の2つの異なる濾過面積上に閉じ込められることができる。

40

【0106】

種々の側面では、装置が、流体に由来するサンプルから具体的バイオマーカープロファイルを発現する細胞を分割するために提供され、本装置は、少なくとも1つのチャンネルと、チャンバとを有する、マイクロ流体チップに接続される管類のセットを備え、本装置は、チャンバ中の細胞を単離することが可能であり、単離後、チャンバは、具体的バイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の80 %を上回るものを含み、単離後、チャンバは、異なるバイオマーカープロファイルを発現するサンプル中の細胞の全集団の5 %未満を含む。

【0107】

いくつかの側面では、具体的バイオマーカープロファイルを発現する細胞の単離は、20

50

分未満で起こる。いくつかの側面では、具体的バイオマーカープロファイルは、流体のサンプル中の細胞の5%未満の上に存在する。ある側面では、流体は、血液である。さらなる側面では、流体は、分画全血である。なおもさらなる側面では、流体は、全血の有核細胞分画である。

【0108】

種々の側面では、システムが、流体サンプル中の粒子を検出するために提供され、本システムは、入力チャンネル、第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、および指向性流チャンネルを備える、マイクロ流体チップと、弁であって、弁は、マイクロ流体チップから分離可能であり、弁は、指向性流チャンネル中の第1の流体の流動を調整し、指向性流チャンネル中の第1の流体の流動は、入力チャンネルから第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ第2の流体の流動を指向する、弁と、入力チャンネル中の第2の流体の一部から発せられる信号を検出するように構成される、検出器と、信号に基づいて値の一部に割り当て、弁を動作させるように構成される、プロセッサとを備える。いくつかの側面では、弁は、電子作動型弁である。

10

【0109】

種々の側面では、システムが、流体サンプル中の粒子を検出するために提供され、本システムは、(a)少なくとも1つのサンプル入力チャンネル、少なくとも1つの指向性流チャンネル、および少なくとも2つの出力チャンネルを備える、マイクロ流体チップであって、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、サンプル入力チャンネルに交差する、マイクロ流体チップと、(b)マイクロ流体チップの一部ではないデバイス上に位置する、電子作動型弁であって、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルまたは少なくとも2つの出力チャンネルのうちの少なくとも1つに交差する入力チャンネルを制御することによって、流体の流動を制御する、電子作動型弁と、(c)流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る被分析物を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)アリコート中の被分析物の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることが可能なプロセッサであって、プロセッサは、検出器および電子作動型弁と通信している、プロセッサとを備える。

20

【0110】

いくつかの側面では、電子作動型弁は、ソレノイド弁である。ある側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の流体の流動を制御する。さらなる側面では、電子作動型弁は、常時閉であり、電子作動型弁は、プロセッサから信号を受信した後に開放する。なおもさらなる側面では、電子作動型弁は、常時開であり、電子作動型弁は、プロセッサから信号を受信した後に閉鎖する。

30

【0111】

いくつかの側面では、少なくとも1つの指向性流チャンネルは、少なくとも2つのポートを備え、電子作動型弁は、ポートのうちの1つを通して流体の流動を制御する。ある側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、少なくとも1つの指向性流チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する。ある側面では、電子作動型弁は、1つだけの指向性流チャンネル中の流体の流動を直接制御する。さらなる側面では、電子作動型弁は、出力チャンネル中の流体の流動を直接制御する。なおもさらなる側面では、電子作動型弁は、出力チャンネルに流れ込むチャンネル中の流体の流動を直接制御する。いくつかの側面では、電子作動型弁は、圧電弁である。

40

【0112】

いくつかの側面では、指向性流チャンネルは、合流点で出力チャンネルに交差する。ある側面では、検出器は、出力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。いくつかの側面では、本デバイスは、確認レーザを備える。ある側面では、確認レーザは、入力チャンネルではない、少なくとも1つのチャンネルの上に位置する。さらなる側面では、本システムは、第2の検出器を備える。なおもさらなる側面では、少なくとも1つのチャンネルは、フィルタと流体連通している。

50

【0113】

種々の側面では、デバイスが、流体サンプル中の希少粒子を検出するために提供され、本デバイスは、入力チャンネルと、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルと、流体サンプルの一部の中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、検出器と、粒子の存在または非存在に基づいて、入力チャンネルから第1の出力チャンネル、第2の出力チャンネル、またはそれらの組み合わせへ一部の流動を指向するための機構と、第1の出力チャンネルと流体連通しているフィルタとを備える。いくつかの側面では、フィルタは、開口のアレイを備える。ある側面では、アレイ内の各開口の最小寸法は、粒子の最小寸法より小さい。

【0114】

種々の側面では、デバイスが、流体サンプル中の希少粒子を検出するために提供され、本デバイスは、(a)少なくとも1つのサンプル入力チャンネルと、(b)少なくとも2つの出力チャンネルであって、2つの出力チャンネルのうちの少なくとも1つは、開口のアレイと流体連通している、出力チャンネルと、(c)流体サンプルのアリコート中の1つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)第1の出力チャンネルを通して、1つまたはそれを上回る希少粒子を含有するアリコートの流動を指向することによって、1つまたはそれを上回る希少粒子を選別するための機構とを備える。

【0115】

いくつかの側面では、本デバイスは、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルとを備える。ある側面では、機構は、アリコートが希少粒子を含有しない場合、アリコートの流動を第2の出力チャンネルの中へ指向する。ある側面では、選別のための機構は、電極、磁気要素、音響要素、または電子作動型要素を備える。

【0116】

いくつかの側面では、開口のアレイは、入力チャンネルと出力チャンネルとの間に配置される。ある側面では、開口のアレイは、入力チャンネルおよび出力チャンネルと同一の平面内にある。さらなる側面では、開口のアレイは、第1の出力チャンネル内に配置される。なおさらなる側面では、開口のアレイは、第1の出力チャンネルと流体連通しているチャンバの中に配置される。いくつかの側面では、開口のアレイは、希少粒子が開口を通過することができないが、少なくとも1つの他の粒子が開口を通過することが可能であるように構成される。ある側面では、開口のアレイは、希少粒子が開口を通過することが可能であるが、少なくとも1つの他の粒子が開口を通過することができないように構成される。さらなる側面では、開口のアレイは、1, 0 0 0個を上回る開口を備える。

【0117】

ある側面では、検出器は、カメラ、電子倍增管、電荷結合素子(CCD)画像センサ、光電子倍增管(PMT)、アバランシェフォトダイオード(APD)、単光子アバランシェダイオード(SPAD)、シリコン光電子倍增管(SiPM)、および相補型金属酸化膜半導体(CMOS)画像センサから成る群から選択される。

【0118】

種々の側面では、統合システムが、検定を実施するために提供され、本システムは、粒子を含む流体サンプルであって、粒子は、マーカを含む、流体サンプルと、入力チャンネルと、第1の出力チャンネルと、第2の出力チャンネルと、流体サンプルの一部の中の粒子の存在または非存在を検出するように構成される、第1の検出器であって、一部は、入力チャンネル内に配置される、第1の検出器と、粒子の存在または非存在に基づいて、入力チャンネルから第1の出力チャンネルへ一部の流動を指向するための機構と、第1の出力チャンネルと流体連通し、粒子を閉じ込めるように構成される、微小空洞とを備える。

【0119】

マイクロ流体チップ設計および製作

マイクロ流体チップは、効率的な能動的選別方式および後続の精製(例えば、精製チャンバ)方式を提供するように製作されることができ、マイクロ流体チップは、シリコン

10

20

30

40

50

マスタ上の2つの層から構成されることができ、かつポリジメチルシロキサン (PDMS) への1ステージ複製成形で製作されることができ、マイクロ流体チップは、ガラス基板への結合で仕上げられることができる。

【0120】

いくつかの側面では、シリコンマスタは、2つのフォトリソグラフィプロセスを使用して製作されることができ(図2)。特徴は、標準ソフトウェア(例えば、Autodesk (San Rafael, CA) 製 AutoCAD) を使用して設計されることができ、かつクロムマスク上に書き込まれることができる。これらの場合では、ポジ型レジストリソグラフィおよび深掘り反応性イオンエッチング(DRIE)が、第1の層を形成するため使用されることができ(図2)。第1の層は、マイクロフィルタ特徴であり得る。いくつかの側面では、ポジ型フォトレジスト(例えば、AZ 1512)は、DRIEプロセスを含み得るプロセスによって、達成される。DRIEプロセスは、種々の特徴に好適な深度(例えば、4.5 μm ~ 5 μm)を達成することができる。

10

【0121】

いくつかの側面では、eDARマイクロ流体チップ特徴の第2の層は、ネガ型フォトレジスト(例えば、MicroChem (Newton, MA) 製 SU-8-3050) を使用して製作されることができ、特徴の高さは、制御されることができ(例えば、50 μm)。マスタは、例えば、トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル-1-トリクロロシラン(Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)) を使用して、シラン化されることができ。シラン化マスタおよびシリコンウエハは、未硬化PDMSでコーティングされ、(例えば、70 で2時間)焼成されることができ。いくつかの側面では、所望の微小特徴を伴うPDMS片が、シリコンマスタから剥離され、次いで、eDARマイクロ流体チップの製作を完了するように、プラズマ酸化の標準プロセスを使用してカバーガラス片と結合されることができ。

20

【0122】

マイクロ流体チップは、染色領域、撮像領域、および付加的領域を含む、特殊領域を含むことができる。いくつかの側面では、領域は、少なくとも1つの目的で使用される同一の領域であり得る。他の場合では、領域は、1つの目的で使用される異なる領域であり得る。他の場合では、領域は、少なくとも1つの目的で使用される異なる領域であり得る。各領域は、1つを上回る目的で使用されることができ。いくつかの側面では、eDARマイクロ流体チップは、標準リソグラフィ方法によって製作される統合濾過領域を含む。いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、2つの統合機能面積、すなわち、eDAR選別面積およびスリット構造物ベースの濾過ユニットを有することができる。

30

【0123】

マイクロ流体チップ内のチャンネル

本明細書で提供される本開示は、流体サンプル中の被分析物(例えば、希少粒子)を検出するための装置を説明し、本装置は、(a)少なくとも第1の入力チャンネルと、(b)少なくとも2つの出口チャンネルと、(c)生物学的流体のアリコート中の1つまたはそれを上回る希少粒子を検出することが可能な少なくとも1つの検出器と、(d)アリコートの流動を指向するための機構と、(e)アリコート中の希少粒子の存在、非存在、識別、組成、または数量に基づいて、値をアリコートに割り当てることが可能なランク付けデバイスとを備え、デジタルプロセッサ(例えば、コンピュータ)は、検出器およびアリコートの流動を指向するための機構と通信している。

40

【0124】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、被分析物(例えば、希少細胞)への不慮の損傷を最小限化にするための設計特徴とともに、壁によって封入された、および/または基板上に微細製作された流動チャンネルを備えることができる。希少細胞の不慮の損傷を低減させることは、誤った患者診断または予後を引き起こす偽陰性率を低減させることができる。流動チャンネルはさらに、最小限の応力または損傷を伴って生体細胞を除外するように流体力学的に設計された開口を伴うチャンネルを備えることができる。流動チャ

50

ネルは、米国特許出願公開第2007/0037172号および第2008/0248499号で説明される通りである。前述の特許出願では1次元(「1D」)開口を伴うチャネルと称される、そのようなチャネルは、細胞除外プロセス中に細胞によって被られる流体力学的圧力を低減させ、したがって、細胞溶解の可能性を低減させる。1D開口を伴うチャネルは、流動をさらに再指向し、分割し、抑制し、または分散させ、その結果として、除外の瞬間に細胞によって被られる衝撃の力を低減させるように、米国特許出願公開第2008/0318324号で説明されるような「流出濾過」構成に従って、方略的にアレイに配列されることができる。流動チャネルを封入する壁は、eDAR装置が医療デバイス製造を統制する規制に準拠し得るように、医療デバイスグレードポリマーである生体適合性基板材料から、第PCT/US2009/002426号で説明される手順に従って紫外線硬化プロセスを使用して製作されることができる。

10

【0125】

選別合流点に流体を導入するために使用され得る、選別面積内の主要チャネルは、特定の高さ(例えば、50 μ m)および特定の幅(例えば、150 μ m)を有することができる。大抵の場合、他のチャネル(例えば、4つ)は、特定の高さ(例えば、50 μ m)および特定の幅(例えば、200 μ m)を有することができる。濾過ユニット内のスリット構造ベースのフィルタは、特定の高さ(例えば、5 μ m)および特定の幅(例えば、5 μ m)を有することができる。マイクロ流体チップは、最大50,000個のスリットを含有することができ、かつそれらスリット構造に含むことができる。

【0126】

いくつかの側面では、eDAR装置はさらに、上記ランク付けに基づいて、上記アリコートを導くためのチャネルを備えることができる。チャネルは、抗凝固化合物、被分析物(例えば、希少生体粒子)に優先的に結合する化合物、希少生体粒子の凝集を防止する化合物、またはそれらの組み合わせで処理されることができる。

20

【0127】

いくつかの側面では、本明細書で提供されるeDAR装置は、1つまたはそれを上回る入力流チャネル(例えば、アリコートを検出容積に運ぶチャネル)、および1つまたはそれを上回る出力チャネル(例えば、検出容積からアリコート運び去るチャネル)を含む、複数の流動チャネルを備えることができる。いくつかの側面では、本明細書で提供されるようなeDAR装置は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る入力チャネル、および少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る出力チャネルの組み合わせを備えることができる。いくつかの側面では、本明細書で提供されるようなeDAR装置は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る入力チャネル、および少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれを上回る出力チャネルの組み合わせを備えることができる。いくつかの側面では、装置は、付加的な流体を注入して局所速度を変化させるように、主要チャネルに接続する複数の流動チャネルを備えることができる。

30

40

【0128】

いくつかの側面では、流体は、マイクロ流体チップの一部であるチャネルから、チャネルと流体連通しているがマイクロ流体チップの外部にあるチャンバへ送達される。いくつかの側面では、チャンバは、バイアルである。他の側面では、チャンバは、単一のウェルまたはウェルプレート内のウェルである。さらなる側面では、チャンバは、微小遠心管である。さらなる側面では、チャンバは、微小遠心管であり、微小遠心管は、エッペンドル

50

フ型管である。任意の好適な構造物が、バイアルに使用されることができ、当業者は、本開示と併用するための好適なチャンバを容易に識別し得る。

【0129】

いくつかの側面では、流体は、流体を輸送するための管または他の好適な構造物を介して、チャンネルからチャンネルと流体連通しているチャンバへ送達される。管は、生体適合性ポリマーから構築された材料を含むことができる。他の側面では、チャンバは、例えば、キャピラリ電気泳動を実施するために使用されるような溶融石英毛細管等の毛細管を介して、チャンネルと流体連通することができる。チャンネルをチャンバと流体連通させるために好適な他のタイプの管類が、当業者に容易に明白となるであろう。

【0130】

本明細書で使用されるように、用語「～と流体連通している」（およびその変形例）は、構成要素間の流体経路の存在を指す。流体連通していることは、任意の中間構造物または構成要素の存在を示唆することも除外することもない。2つの構成要素は、いくつかの事例では、それらの間の経路が遮断される、および/または流体がそれらの間で流動していなくても、流体連通することができる。したがって、流体連通がある、ある側面では、断続的な流体流が考慮される。

【0131】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、限定ではないが、ポリマー材料（ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリウレタンメタクリレート（PUMA）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリエチレン、ポリエステル（PET）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリカーボネート、パリレン、ポリ塩化ビニル、フルオロエチルプロピレン、レキサン、ポリスチレン、環状オレフィンコポリマー、環状オレフィンポリマー、ポリウレタン、炭酸ポリエステル、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリアクリレート、ポリカプロラクトン、ポリケトン、ポリフタルアミド、酢酸セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリスルホン、エポキシポリマー、熱可塑性物質、フッ素重合体、およびポリフッ化ビニリデン、ポリアミド、ポリイミド）、無機材料（ガラス、石英、シリコン、GaAs、窒化ケイ素）、溶融石英、セラミック、ガラス（有機）、金属および/または他の材料、ならびにそれらの組み合わせを含む、材料から製作される、壁によって封入される流動チャンネルまたはチャンバを備えることができる。

【0132】

いくつかの側面では、壁材料は、多孔質膜、羊毛の織物または不織繊維（布またはメッシュ等）、金属（例えば、ステンレス鋼またはモネル）、ガラス、紙、または合成物質（例えば、ナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、パリレン、および種々のポリエステル）、焼結ステンレス鋼および他の金属、ならびにアルミナ、シリカ、または炭素等の多孔質無機材料で製作されることができる。

【0133】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、化学または生体分子で前処理された流動チャンネルまたはチャンバを備えることができる。例えば、チャンネルまたはチャンバは、流体サンプル中の被分析物（例えば、希少粒子または細胞）の関連を防止または低減させるための抗凝固化合物、被分析物（例えば、希少粒子または細胞）に優先的に結合する化合物、または流体サンプル中の被分析物（例えば、希少粒子または細胞）の凝集または集合を防止または低減させる化合物で処理されることができる。

【0134】

いくつかの側面では、チャンネルまたはチャンバ表面は、抗凝固化合物、循環腫瘍細胞に優先的に結合する化合物、または細胞の付着を防止する化合物で処理されることができる。

【0135】

いくつかの側面では、チャンネルまたはチャンバ表面は、湿潤を増進するように、または選択細胞、粒子、もしくは分子の吸着を支援するように、化学的に修飾されることができる。表面修飾化学物質は、限定ではないが、トリメチルクロロシラン（TMCS）、ヘキサメチルジシラザン（HMDS）、（トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロ

10

20

30

40

50

オクチル)トリクロロシラン、クロロジメチルオクチルシラン、オクタデシルトリクロロシラン(OTS)、または -メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン等のシラン、アクリル酸、アクリルアミド、ジメチルアクリルアミド(DMA)、2-ヒドロキシエチルアクリレート、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリ(エチレンイミン)(PEI)、ポリエチレングリコール(PEG)、エポキシポリ(ジメチルアクリルアミド)(EPDMA)、またはPEG-モノメトキシシランアクリレート等のポリマー、プルロニック(登録商標)界面活性剤、ポリ(エチレングリコール)系(PEG)界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム(DTAC)、臭化セチルトリエチルアンモニウム(CTAB)、またはPolybrene(PB)等の界面活性剤、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC) 10、またはヒドロキシプロピルメチルルコース(HPMC)等のセルロース誘導体、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、もしくはトリエタノールアミン等のアミン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)を含有するものまたはTeflon等のフッ素含有化合物を含むことができる。

【0136】

濾過

本明細書で提供されるeDAR装置はさらに、フィルタ要素を備えることができる。いくつかの側面では、フィルタ要素は、微小支柱、微小障壁、微小衝突体、微小篩、生体粒子より小さい開口を伴うチャネル、生体粒子が開口に進入することを防止され得るが、流体が開口(「1Dチャネル」)を通して生体粒子の周囲に流動し続けることを可能にされるような開口を伴うチャネル、マイクロビーズ、多孔質膜、壁からの突出部、接着コーティング、羊毛の織物または不織繊維(布またはメッシュ等)、金属(例えば、ステンレス鋼またはモネル)、ガラス、紙、または合成物質(例えば、ナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、パリレン、およびポリエステル)、焼結ステンレス鋼または他の金属、もしくはアルミナ、シリカ等の多孔質無機材料の形態であり得る。ある場合には、フィルタ要素は、2層製作技法を使用して形成されることができる。

【0137】

いくつかの側面では、フィルタ要素内の開口のアレイは、希少粒子または細胞等の着目粒子がフィルタ要素の開口を通過することができない一方で、少なくとも1つの他の粒子がフィルタ要素の開口を通過することが可能であるように構成される。他の側面では、フィルタ要素内の開口のアレイは、希少粒子または細胞等の着目粒子がフィルタ要素の開口を通過することが可能である一方で、少なくとも1つの他の粒子がフィルタ要素の開口を通過することができないように構成される。

【0138】

いくつかの側面では、eDARマイクロ流体チップは、マイクロスリットを伴って製作されることができる(図7A)。マイクロスリットは、いかなる付加的な非特異的粒子(例えば、赤血球、RBC)も留保することなく、希少細胞を捕捉するために使用されることができる。マイクロスリットのサイズは、変動し得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ約0.1 μ m、0.5 μ m、1 μ m、5 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m、35 μ m、40 μ m、50 μ m、75 μ m、もしくは100 μ m未満またはそれと等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ約0.1 μ m~5 μ m、1 μ m~10 μ m、5 μ m~15 μ m、10 μ m~30 μ m、15 μ m~40 μ m、20 μ m~50 μ m、30 μ m~75 μ m、および50 μ m~100 μ mの範囲内であり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ約0.1 μ m、0.5 μ m、1 μ m、5 μ m、10 μ m、15 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m、35 μ m、40 μ m、50 μ m、75 μ m、もしくは100 μ m未満またはそれと等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ約0.1 μ m~5 μ m、1 μ m~10 μ m、5 μ m~15 μ m、10 μ m~30 μ m、15 μ m~40 μ m、20 μ m~50 μ m、30 μ m~75 μ m、および50 μ m~100 μ mの範囲内であり得る。例えば、マイクロスリットは、5 μ mの高さおよび5 μ mの幅を有

することができる (図 7 B) 。

【 0 1 3 9 】

いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ $0.1 \mu\text{m}$ 、 $0.5 \mu\text{m}$ 、 $1 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m}$ 、 $35 \mu\text{m}$ 、 $40 \mu\text{m}$ 、 $50 \mu\text{m}$ 、 $75 \mu\text{m}$ 、もしくは $100 \mu\text{m}$ 未満またはそれと等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの高さは、高さ $0.1 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ 、 $1 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m} \sim 15 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m} \sim 40 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m} \sim 75 \mu\text{m}$ 、および $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲内であり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ $0.1 \mu\text{m}$ 、 $0.5 \mu\text{m}$ 、 $1 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m}$ 、 $35 \mu\text{m}$ 、 $40 \mu\text{m}$ 、 $50 \mu\text{m}$ 、 $75 \mu\text{m}$ 、もしくは $100 \mu\text{m}$ 未満またはそれと等しくあり得る。いくつかの側面では、マイクロスリットの幅は、高さ $0.1 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ 、 $1 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m} \sim 15 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m} \sim 40 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m} \sim 75 \mu\text{m}$ 、および $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲内であり得る。

10

【 0 1 4 0 】

いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、5,000、20,000、30,000、40,000、または50,000個の開口もしくはマイクロスリットを伴って製作されることができる。他の側面では、マイクロ流体チップは、100個を上回る、200個を上回る、300個を上回る、400個を上回る、500個を上回る、600個を上回る、700個を上回る、800個を上回る、900個を上回る、1,000個を上回る、5,000個を上回る、20,000個を上回る、30,000個を上回る、40,000個を上回る、または50,000個を上回る開口もしくはマイクロスリットを伴って製作されることができる。いくつかの側面では、圧力は、より多くのマイクロスリットを伴うマイクロ流体チップにとって、より低くあり得る。例えば、20,000個のスリットを伴うeDARマイクロ流体チップは、流体力学的切替プロセスの平衡を保つために、2つの側方緩衝液チャネルに4psi未満の圧力を要求した。いくつかの側面では、マイクロフィルタを横断するより低い圧力が、単離された希少細胞への応力およびその変形を最小限化にすることができる。

20

【 0 1 4 1 】

マイクロスリットは、濾過源として使用されることができる。いくつかの側面では、マイクロスリットは、選別を可能にし、撮像中に収差を引き起こさない任意の材料 (例えば、PDMS) から製作され、撮像システムと併用するためのカバースリップ片と結合されることができる (図 7 C および 7 D) 。いくつかの側面では、マイクロスリットは、マイクロフィルタの構成要素であり得る。例えば、マイクロフィルタは、1マイクロメートル ~ 100マイクロメートルである、少なくとも1つの寸法 (例えば、幅、高さ、深度、または直径) を伴うスリット (例えば、マイクロスリット) 、細孔 (例えば、微小細孔) 、または開口を有する、フィルタ要素であり得る。

30

【 0 1 4 2 】

いくつかの側面では、濾過目的でのマイクロスリットの使用は、撮像精度および閉じ込められた細胞のカウントを向上させることができる。いくつかの側面では、マイクロスリットは、閉じ込められた希少細胞上の2回目の標識の速度および効率を増加させることができる。例えば、抗EpCAM-PEで標識された2つの癌細胞は、マイクロスリット上に閉じ込められることができる (図 7 E) 。細胞は、固定され、透過化され、抗サイトケラチン-Alexa488、抗CD45-Alexa700、抗Her2-Alexa647、およびHoechstで標識されることができる。

40

【 0 1 4 3 】

流体力学的選別

eDARプラットフォームの特徴および性能に寄与する、2つの主要な要因は、(1) 効率的かつ能動的選別方式、および(2) 後続の効率的な精製 (例えば、精製チャンバ)

50

方式である。マイクロ流体チップおよび流体力学的切替機構の分析性能は、特定の回収効率（例えば、95%）、特定の偽陽性率（例えば、0）、および特定のスループット（例えば、1時間あたり4.8mLの全血）のために最適化されることができる。

【0144】

いくつかの側面では、流動を指向するための機構は、希少粒子の識別、組成、または数量に応じて、希少粒子を含有するアリコートの流動を複数の出口チャネルのうちの1つの中へ指向する。アリコートの流動を指向するための機構は、アリコートが希少粒子を含有する場合は第1の出口チャネル、またはアリコートが希少粒子を含有しない場合は第2の出口チャネルのいずれかの中へ入り得る。

【0145】

いくつかの側面では、アリコートの流動を指向するための機構は、電極、磁気要素、音響要素、電子作動型要素、電場、圧電弁、または磁場を備えることができる。他の場合では、アリコートの流動を指向するための機構は、1つまたはそれを上回る電子作動型弁もしくはピストンを備えることができ、弁またはピストンは、第1の合流点で第1の入力チャネルおよび2つの出口チャネルに交差する、少なくとも第1の指向性流チャネルの中の液体流を制御する。

【0146】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、粒子、アリコート、または流体サンプルの軌道または流動を追跡および/または操作するための1つまたはそれを上回る電極を備えることができる。いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、粒子またはアリコートの集合または群の軌道または流動を追跡および/または操作するための1つまたはそれを上回る電極を備えることができる。この場合、電極は、そのような誘電泳動またはエレクトロウエティング現象に基づいて、アリコートの分離を増進することができる。

【0147】

他の場合では、本明細書で提供される装置はさらに、磁性粒子に結合された、または磁性粒子によって結合された希少粒子（例えば、細胞）の分離のための磁気要素を備えることができる。他の場合では、本明細書で提供される装置はさらに、少なくとも1つの磁性粒子に結合された、または少なくとも1つの磁性粒子によって結合された希少粒子（例えば、細胞）の集合または群の分離のための磁気要素を備えることができる。いくつかの側面では、磁気要素は、細胞、または粒子もしくは細胞に付着したマイクロ磁気またはナノ磁性粒子の磁化率に基づいて、アリコート、粒子、または細胞の分離を増進することができる。いくつかの側面では、磁気要素は、細胞、または少なくとも1つの粒子もしくは細胞に付着したマイクロ磁性またはナノ磁性粒子の磁化率に基づいて、粒子または細胞の集合または群の分離を増進することができる。

【0148】

eDAR装置は、リアルタイムで流体力学的切替の効率を監視するように、収集側に位置する第2線共焦点検出窓を有することができる。いくつかの側面では、eDAR装置は、共焦点撮像と対合されることができる。

【0149】

いくつかの側面では、流体力学的切替は、ソレノイドおよび2つの側方緩衝液ライン内の圧力降下によって制御されることができる。ソレノイドは、希少細胞収集チャネルの中に位置することができる。いくつかの側面では、このソレノイドは、左側の閉鎖位置にあり、「陰性」アリコートは、右側の廃棄物チャネルに流入する（図1A）。ソレノイドが開放されるとき、緩衝液を含有する2つの側方チャネル間の圧力降下は、廃棄物チャネルから収集側に血流を切り替える。この切替は、希少粒子（例えば、細胞）を収集するように、10ミリ秒未満（例えば、2~3ミリ秒）で起こることができる。

【0150】

いくつかの側面では、種々の流体力学的選別方式が、使用されることができる。本開示は、8つの異なる流体力学的選別方式を提供する（図3）。流体サンプル（例えば、血液

10

20

30

40

50

)は、黒色の流動として示される、主要チャンネルから注入されることができる。緩衝液(マイクロ流体チップ内の薄い灰色)は、2つの側方チャンネルに流入することができ、希少細胞は、左下のチャンネルに収集されることができ、廃棄物は、右下のチャンネルに指向されることができ、長方形のブロックは、ソレノイドを表す(「ソレノイド」参照)。ソレノイドは、それぞれ、濃い灰色または薄い灰色のブロックによって示されるように、常時開(N.O.)または常時閉(N.C.)に設定されることができ(図3)。

【0151】

マイクロ流体チップのチャンネルは、合流点で交差してもよい。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点で1つを上回る異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つより多くのチャンネルが、合流点で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルが、合流点で1つの異なるチャンネルと交差する。

10

【0152】

マイクロ流体チップのチャンネルは、合流点で交差しなくてもよい。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で、1つを上回る異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つのチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1つを上回るチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で異なるチャンネルと交差する。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の異なるチャンネルが、合流点ではないマイクロ流体チップ上の場所で1つの異なるチャンネルと交差する。

20

30

【0153】

ソレノイドおよび流動の調整

eDAR装置は、流体の流動および流体力学的選別方式を制御するためのソレノイドを含む。いくつかの側面では、ソレノイドは、ピストンであり得る。例えば、ソレノイドピストンは、電子作動型ソレノイド弁の副次構成要素である。いくつかの側面では、電子作動型ソレノイド弁は、圧電弁であり得る。いくつかの側面では、ソレノイドピストンは、成形によって装置に組み込まれることができる。いくつかの側面では、ソレノイドは、弁であり得る。例えば、組み込みソレノイドピストンは、管類を介して流体連通しているソレノイド弁によって置換されてもよい。

40

【0154】

いくつかの側面では、eDAR装置は、1つのソレノイドを含有することができる。他の場合では、eDAR装置は、1つを上回るソレノイドを含有することができる。例えば、eDAR装置は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドを含有することができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、開放し得る。例えば、開放ソレノイドは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過することを可能にするために使用されることができ、いくつかの

50

側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドが、開放し得る。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、常時開(N.O.)であり得る。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドが、常時開であり得る。

10

【0155】

いくつかの側面では、ソレノイドは、閉鎖されることができる。例えば、閉鎖ソレノイドは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過しないように防止するために使用されることができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、閉鎖されることができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドが、閉鎖されることができる。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、常時閉(N.C.)であり得る。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドが、常時閉であり得る。

20

【0156】

いくつかの側面では、ソレノイドは、開放から閉鎖に切り替えられることができる。例えば、開放ソレノイドを閉鎖することは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過しないように防止するために使用されることができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、開放から閉鎖に切り替えられることができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドが、開放から閉鎖に切り替えられることができる。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。

30

【0157】

いくつかの側面では、ソレノイドは、閉鎖から開放に切り替えられることができる。例えば、閉鎖ソレノイドを開放することは、流動がマイクロ流体デバイスの1つの部分からマイクロ流体デバイスの異なる部分へ通過することを可能にするために使用されることができる。いくつかの側面では、少なくとも1つのソレノイドが、閉鎖から開放に切り替えられることができる。いくつかの側面では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50個を上回るソレノイドが、閉鎖から開放に切り替えられることができる。いくつかの側面では、1つの部分が、サンプル進入点であり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、廃棄物チャンネルであり得る。いくつかの側面では、1つの部分が、選別チャンバであり得る。

40

【0158】

いくつかの側面では、eDARに使用され得る、流体マイクロ流体チップの構造物および流体力学的選別の対応する方式が、図3に示されている。ソレノイドの位置は、単一の

50

チャンネル上に出口または入口があるときに印付けられることができる。例えば、図 3 F では、第 2 のソレノイドの位置は、廃棄物収集チャンネルの中央出口の上にあることを意味する、「中央廃棄物」であり得る。図 3 G に示されるものを除く全方式では、「陽性」事象が検出され得るときに、ソレノイドに印加される DC 電圧は、選別をトリガするよう変更されることができ、ある期間後に通常状態に戻されることができ、いくつかの側面では、4 つの個々のステップが、選別を制御するために使用されることができ（例えば、図 3 G に示される方式）。両方のソレノイドが、閉鎖されることができ、流体は、廃棄物チャンネルへ流動することができる。スイッチオーバーステップを実施するように収集側のソレノイドを開放し得る選別が、トリガされることができ、他のソレノイドは、細胞が収集された後にスイッチバックステップを実施するように開放されることができ、両方のソレノイドは、流体流が通常状態に戻るよう完全に切り替えられて戻った後に、同時に閉鎖されることができ、本明細書で説明される 8 つの異なる流体力学的選別方式の流体構成および性能の概要が、表 1（以下）に描写されている。いくつかの側面では、2 つのソレノイドが、使用されることができ（例えば、図 3 C、3 E、および 3 G に示される方式）。

10

【表 1】

方式	位置	通常状態	左圧力 (psi)	右圧力 (psi)	スイッチオーバー時間(ミリ秒)	スイッチバック時間(ミリ秒)
a	収集	閉	低	高	~2-3	~15-25
b	廃棄物	開	高	低	~15-20	~2-3
c	収集	閉	低	高	~4-5	~10
	廃棄物	開				
d	右緩衝液	閉	低	高	~3	~40
e	廃棄物	開	高	低	~25	~2
f	収集	閉	低	高	~25	~5-6
	中央廃棄物	開				
g	収集	閉	低	高	~2-3	~2-3
	中央廃棄物	閉				
h	中央右緩衝液	閉	低	高	~2-3	~2-3

20

30

表 1. 8 つの選別方式の流体構成および性能の概要

【 0 1 5 9 】

いくつかの側面では、オフチップソレノイドが、使用されることができ、オフチップソレノイドは、方法の大半で閉鎖されることができ、オフチップソレノイドを開放するために、電圧（例えば、5 V DC 電圧）が、印加されることができ、オフチップソレノイドは、急速に（例えば、3 ミリ秒未満またはそれと等しい）開放することができる。オフチップソレノイドが使用される場合、マイクロ流体チップの製作は、修正されることができ、ソレノイドは、マイクロチャンネルと接続されることができ、いくつかの側面では、オンチップソレノイドが、使用されることができ、オンチップソレノイドは、方法の大半で閉鎖されることができ、オンチップソレノイドを開放するために、電圧（例えば、5 V DC 電圧）が、印加されることができ、オンチップソレノイドは、急速に（例えば、3 ミリ秒未満またはそれと等しい）開放することができる。オンチップソレノイドが使用される場合、マイクロ流体チップの製作は、修正されることができ、ソレノイドは、マイクロチャンネルと接続されることができ、

40

【 0 1 6 0 】

50

例えば、この方式では、オフチップソレノイドが使用される。標識流体サンプルは、シリンジポンプを使用して、マイクロ流体チップの上部チャンネルに注入されることができる（図4A）。緩衝液が通して流動する、2つの側方チャンネルが、能動的選別ステップを制御するために使用されることができる。2つのポートが、右側チャンネル上に位置し、両方が、加圧緩衝液源に接続される。オフチップソレノイドは、流体力学的切替を制御するように、選別合流点の近傍のポートに接続されることができる。オフチップソレノイドを使用する切替プロセスは、安定し得、 10^5 のオン・オフサイクルを通して安定性を維持することができる。

【0161】

いくつかの側面では、インラインソレノイドが、流体サンプルがソレノイドに接触しないように防止するように緩衝液ライン上に配置されることができる。これは、サンプルの腐敗および二次汚染の可能性を排除することができる。eDAR装置および方法の使用中に、希少細胞収集チャンネルの中に一定流量の緩衝液が存在し得る。オンチップソレノイドは、後続の精製（例えば、精製チャンバ）ステップの効率を向上させることができ、かつ細胞の凝集体の形成を防止することができる。

10

【0162】

いくつかの側面では、eDAR装置内の流体の流動は、検出容積の上流または下流のいずれかにある、以下のうちの1つ、すなわち、ソレノイド、弁、気泡、電場、磁場、光場、空気圧源、固体粒子、膜、不混和液滴、重力差、またはチャンネルの表面張力を変化させるためのコーティングを用いて調整されることができる。eDAR装置内の流体の流動は、検出容積の上流または下流のいずれかにある、以下のうちの1つ、すなわち、第2のソレノイド、第2の弁、第2の気泡、第2の電場、第2の磁場、第2の光場、第2の空気圧源、第2の固体粒子、第2の膜、第2の不混和液滴、第2の重力差、またはチャンネルの表面張力を変化させるための第2のコーティングを用いて調整されることができる。流動は、細胞が検出容積を通して横断するにつれて、停止、減速、または加速されることができる。

20

【0163】

いくつかの側面では、流動チャンネルを通した流体サンプルの連続流が、検出中に維持されることができる。いくつかの側面では、個々のアリコートは、物理的に分離されなくてもよく、むしろ光学検出ステップおよび/または選別ステップによって定義されることができる。

30

【0164】

例えば、流動は、廃棄物を収集するために使用され得るチャンネルの中へ指向されることができる（図4B）。選別合流点の後に、2つのチャンネルが存在し得る。左のチャンネルは、陽性アリコートを収集し、それらをさらなる精製（例えば、精製チャンバ）のための濾過および収集面積に送達することができる。右のチャンネルは、廃棄物（例えば、陰性アリコート）を収集する。この場合、アリコートが「陰性」としてランク付けされ、閉鎖されたままであるときに、いかなる電圧もソレノイドに印加されない（図4B）。流動パターンの変化が、第1および第3緩衝液源の間の初期圧力降下後に起こり得る（図4A）。陽性事象が、第1の検出窓によって検出されることができる。この場合、DC電圧（例えば、5V）が、緩衝液リザーバ（例えば、2番）から緩衝液流を開放するようにソレノイドに印加されることができる。右側の緩衝液チャンネルの減少した流動抵抗が、より速い流速を生成することができる。流体流は、陽性アリコートを収集するように右側から左側に押動されることができる（図4C）。アリコートは、収集され、第2の検出窓によって確認されることができる。いくつかの側面では、ソレノイドは、流体流を廃棄物収集チャンネルに戻して切り替えるように閉鎖されることができる（図4D）。スイッチオーバーおよびバックに要求される時間は、20ミリ秒未満であり得、例示的な場合では、時間は、2~3ミリ秒またはその間である（表1および図5、フレームレート=毎秒1,918フレーム）。いくつかの側面では、使用される条件は、 10^5 を上回るオン・オフサイクルに繰り返されることができる。

40

50

【0165】

いくつかの側面では、流動は、例えば、限定ではないが、機械的原理（例えば、外部シリンジポンプ、空気圧膜ポンプ、振動膜ポンプ、真空デバイス、遠心力、および毛管作用）、電気または磁気的原理（例えば、電気浸透流、動電ポンプ、圧電/超音波ポンプ、強磁性流体プラグ、電気流体力学的ポンプ、および電磁流体力学的ポンプ）、熱力学的原理（例えば、気泡生成/位相変化誘導型体積膨張）、表面湿潤原理（例えば、エレクトロウエッティング、化学、熱、および放射性誘導型表面張力勾配）に基づいて動作するものを含む、流体力学的流体圧力を誘導する方法およびデバイスによって送達されることができる。

【0166】

さらに他の場合では、流体は、重力送給によって提供される流体駆動力、（毛管作用のような）表面張力、静電力（動電流）、遠心力流（コンパクトディスク上に配置され、回転させられる基板）、磁力（振動するイオンが流動を引き起こす）、電磁流体力学的力、および真空または圧力差によって送達される、または導かれることができる。

【0167】

いくつかの側面では、流体力学的流体圧力または流体駆動力を誘導するための方法およびデバイスに関して列挙されるもの等の流体流制御デバイスが、本主題の入力ポートまたは出力ポートに結合されることができる。いくつかの側面では、複数のポートが、入口および出口のいずれか一方または両方において提供され、1つまたはそれを上回るポートが、流体流制御デバイスに結合される。

【0168】

経過時間

被分析物（例えば、希少細胞または循環腫瘍細胞（CTC））は、第1の検出窓から第2の検出窓へ流動することができる。第1の窓での決定APDピークの記録と確認信号の検出との間で経過し得る時間は、被分析物を選別するための経過時間であり得る。いくつかの側面では、経過時間は、変動し得る。いくつかの側面では、線形流速が、経過時間に影響を及ぼし得る。いくつかの側面では、マイクロチャネルの層流が、経過時間に影響を及ぼし得る。いくつかの側面では、体積流速は、40 $\mu\text{L}/\text{分}$ に設定されることができる（図6B）。いくつかの側面では、体積流速は、約1 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、2 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、4 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、6 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、7 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、8 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、9 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、11 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、12 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、13 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、14 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、16 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、17 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、18 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、19 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、21 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、22 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、23 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、24 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、25 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、35 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、45 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、50 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、55 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、60 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、65 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、70 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、75 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、80 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、85 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、90 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、95 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、100 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または200 $\mu\text{L}/\text{分}$ であり得る。

【0169】

いくつかの側面では、流速は、約1 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 5 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 10 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 15 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 20 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 30 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 40 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 50 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 60 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、50 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 70 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、60 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 80 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、70 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 90 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、80 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 100 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、90 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 100 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または90 $\mu\text{L}/\text{分}$ ~ 200 $\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲内であり得る。他の場合では、体積流速は、80 $\mu\text{L}/\text{分}$ に設定されることができる（図6B）。

【0170】

いくつかの側面では、体積流速は、1 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、2 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、3 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、4 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、5 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、6 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、7 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、8 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、9 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、11 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、12 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、13 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、14 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、15 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、16 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、17 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、18 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、19 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、20 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、21 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、22 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、23 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、24 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、25 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、30 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、35 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、40 $\mu\text{L}/\text{分}$

10

20

30

40

50

L / 分、45 μ L / 分、50 μ L / 分、55 μ L / 分、60 μ L / 分、65 μ L / 分、70 μ L / 分、75 μ L / 分、80 μ L / 分、85 μ L / 分、90 μ L / 分、95 μ L / 分、100 μ L / 分、または200 μ L / 分であり得る。

【0171】

いくつかの側面では、流速は、1 μ L / 分～5 μ L / 分、3 μ L / 分～10 μ L / 分、5 μ L / 分～15 μ L / 分、10 μ L / 分～20 μ L / 分、15 μ L / 分～30 μ L / 分、20 μ L / 分～40 μ L / 分、30 μ L / 分～50 μ L / 分、40 μ L / 分～60 μ L / 分、50 μ L / 分～70 μ L / 分、60 μ L / 分～80 μ L / 分、70 μ L / 分～90 μ L / 分、80 μ L / 分～100 μ L / 分、90 μ L / 分～100 μ L / 分、または90 μ L / 分～200 μ L / 分の範囲内であり得る。より速い流速が、より少ない経過時間を達成するために使用されることができ(図6C)。

10

【0172】

検出

本開示は、検出システムを装備し得るマイクロ流体チップを使用する、eDAR用の装置を提供する。いくつかの側面では、検出システムは、線共焦点検出方式を含むことができる。線共焦点検出方式では、2つのレーザ源(例えば、488および633 nm)は、一連のダイクロイックミラー、円柱レンズ、およびビームスプリッタを使用して、(例えば、2つの)検出窓を形成する。第1の検出窓は、同時に重複する2つのレーザビームを有することができ、かつ標識希少細胞(例えば、CTC)から蛍光信号を検出するために使用されることができ、第2の検出窓は、選別されたアリコート中で、希少細胞の識別または希少細胞の欠如を確認するために使用されることができ、第2の検出窓はさらに、選別効率を監視するために使用されることができ。

20

【0173】

いくつかの側面では、2つの希少粒子が、同時に検出されることができ、各希少粒子は、一意の検出試薬と接触されることができ、各検出試薬は、2つの検出デバイスのうちの1つによって検出されることができ、さらに、検出試薬は、蛍光部分を含み、異なる蛍光部分の励起波長に対応する異なる波長で放射線を生成する、2つの調査デバイス(例えば、2つのレーザ)が、使用されることができ、個別の蛍光放射線は、2つの異なる検出デバイスによって検出されることができ、いくつかの側面では、検出試薬は、異なる波長における蛍光によって区別可能であり得る。

30

【0174】

いくつかの側面では、2つまたはそれを上回る希少粒子が、連続して検出されることができ、例えば、本方法は、eDAR装置の第1の場所で第1の希少粒子を検出するステップと、eDAR装置の第2の場所で第2の希少細胞を検出するステップとを含むことができる。この場合、第1および第2の粒子が存在するアリコートは、第1の検出ステップの後、第2の検出ステップの後、または両方の検出ステップの後に、新しい場所へ導かれることができる。

【0175】

ある側面では、検出事象は、規則的な頻度で起こり得る。頻度は、検出容積のサイズおよび流体サンプルの流速に関し得る。特定の装置の検出容積は、0.1 μ L～100 μ Lであり、かつその限界を含む範囲内(例えば、10 μ L)であり得、流体サンプルは、1 μ L / 秒～1,000 μ L / 秒であり、かつその限界を含む範囲内の速度(例えば、100 μ L / 秒)で、装置を通して流動することができ、異なるアリコートが、0.001秒～1秒であり、かつその限界を含む範囲内(例えば、0.1秒)で1回、または1 Hz～100 Hzであり、かつその限界を含む範囲内の速度(例えば、10 Hz)で、検出されることができ。

40

【0176】

いくつかの側面では、装置の幾何学形状および処理される流体の体積は、レートに影響を及ぼし得る。例えば、アリコートは、0.1 kHz～100 MHzであり、かつその限界を含む範囲内のレートで、検出容積を通して横断することができ、いくつかの側面で

50

は、アリコートは、10 Hz ~ 10 MHz または約 10 MHz であり、かつその限界を含む範囲内のレートで、検出容積を通して横断する。いくつかの側面では、アリコートは、0.1 kHz ~ 100 MHz または約 100 MHz であり、かつその限界を含む範囲内、もしくは 1 kHz または約 1 kHz ~ 10 MHz または約 10 MHz であり、かつその限界を含む範囲内の頻度で、もしくは約 1 kHz ~ 5 MHz または約 5 MHz であり、かつその限界を含む範囲内の頻度で、もしくは 1 kHz または約 1 kHz ~ 1 MHz もしくは約 1 MHz であり、かつその限界を含む範囲内の頻度で、検出容積を通して横断してもよい。いくつかの側面では、アリコートが検出容積を通して横断する頻度は、少なくとも約 0.1 kHz、または少なくとも約 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、400、500、600、700、800、もしくは 900 kHz、または少なくとも約 1 MHz、または少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、もしくは 100 MHz であり得る。いくつかの側面では、アリコートが検出容積を通して横断する頻度は、少なくとも 0.1 kHz、または少なくとも 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、400、500、600、700、800、もしくは 900 kHz、または少なくとも 1 MHz、または少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、もしくは 100 MHz であり得る。

10

20

【0177】

いくつかの側面では、流体サンプルのアリコート中の被分析物（例えば、細胞）の集合からの特性の検出は、同時または経時的に累積的であり得る。例えば、特性の検出は、被分析物の集合を含有する、大きいアリコートから同時であり得る。同時モード中に、粒子は、可変速度の流動によって搬送されることができる。他の場合では、粒子は、検出容積を通して横断するにつれて定常流によって搬送されることができる。

【0178】

種々の側面では、eDAR装置および方法は、信号が複数の被分析物（例えば、複数の細胞）から同時に検出されることを可能にする。いくつかの側面では、アリコートが、アリコート内に存在する複数の被分析物から同時に検出される信号に基づいて、ランク付けされる。

30

【0179】

他の場合では、細胞の集合からの特性の検出のための本明細書で提供される方法は、複数の細胞が流動を用いて検出容積を通して横断するが、およそ単一の細胞である小さい検出容積から、経時的に（「累積的に」）発生し得る。eDARの累積モードは、単一の生体粒子から発生する連続信号またはフレームの時間経過オーバーレイとは明確に異なり、単一の生体粒子の時間経過オーバーレイは、生体粒子の集合を構成しない。同時および累積の両方で、細胞の集合からの特性が検出された後のみ、決定が下される。

40

【0180】

いくつかの側面では、検出器は、カメラ、電子倍增管、電荷結合素子（CCD）画像センサ、光電子倍增管（PMT）、アバランシェフォトダイオード（APD）、単光子アバランシェダイオード（SPAD）、シリコン光電子倍增管（SiPM）、および相補型金属酸化膜半導体（CMOS）画像センサから成る群から選択される。いくつかの側面では、本明細書で提供されるeDAR装置は、選択細胞の運動を追跡するため、またはアリコート中に存在する選択粒子もしくは細胞をカウントするための光、電気、音響、または磁気検出器を備えることができる。

【0181】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置または方法は、限定ではないが、明視

50

野、落射、共焦点、透過、DIC（微分干渉コントラスト）、暗視野、ホフマン、または位相差を含む、種々の構成において、蛍光（単または多色）顕微鏡検査法を組み込むことができる。

【0182】

いくつかの側面では、本明細書で提供される装置は、複数の検出デバイス、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれを上回る検出デバイスを備えることができる。複数の検出デバイスが、本開示の方法を実施するために有用であり得、例えば、1つを上回る希少粒子または細胞が、流体サンプル中に存在する、1つを上回る細胞マーカが、異なる細胞型を区別するために使用されている、または複数の検出試薬が同時に検出されている。いくつかの側面では、検出デバイスは、確認レーザを含むことができる。例えば、確認レーザは、選別されたアリコートを検査するために使用されることができる。いくつかの側面では、確認レーザによって検出される、選別されたアリコートは、陽性アリコートであり得、選別後に留保されることができる。いくつかの側面では、確認レーザによって検出される、選別されたアリコートは、陰性アリコートであり得、選別後に廃棄されることができる。例えば、確認レーザは、eDAR選別方式の精度を制御するために第2の検出方法として使用されることができる。

10

【0183】

放射線源およびデバイス

本開示は、検出デバイスまたは撮像デバイスと、ランク付けデバイス（例えば、コンピュータ）とを含むことができる、eDAR用の装置を提供する。いくつかの側面では、レーザ（または1つを上回るレーザ）が、調査デバイスとしての機能を果たすことができる。フォトダイオード、光電子増倍管、またはカメラを伴う倒立顕微鏡が、検出デバイスとして使用されることができる。マスクが、チャンネルと検出デバイスとの間の経路に配置されることができる。

20

【0184】

いくつかの側面では、調査デバイス（例えば、488nm固体ダイオード励起レーザおよび633nmHeNeレーザ）は、倒立顕微鏡の中へ指向されることができる。2つのレーザビームが、顕微鏡対物レンズに進入することに先立って、10対1の縦横比を伴うコリメートされた楕円ビームを形成するように、円柱光学部または回折光学部を使用して、成形されることができる。半波長板および偏光ビームスプリッタの組み合わせを使用して、各ビームの強度が、調節されることができる一方で、鏡が、光を独立して操向し、空間的に共同在化した励起領域を作成する。生体粒子からの蛍光は、帯域通過フィルタを通過する前に、2つのダイクロイックミラーによって3つの波長帯に分割され、3つの単光子アバランシェダイオード（SPAD）上に再集束されることができる。1つのSPADは、560nm~610nmの波長範囲内の蛍光を収集することができ、第2のSPADは、645nm~700nmの範囲内の蛍光を収集することができ、第3のSPADは、500nm~540nmの範囲内で収集することができる。SPAD出力は、カウンタ/タイマボードを伴うデジタルプロセッサ（例えば、コンピュータ）に指向され、いくつかのアルゴリズムで分析される。

30

【0185】

いくつかの側面では、デジタルプロセッサは、アリコートをランク付けするためアルゴリズムを通して、検出デバイスから信号を受容する。デジタルプロセッサは、ランク付けの値（例えば、流体サンプル中の希少粒子の存在、非存在、数量、識別、または組成）に基づいて、アリコートを適切なチャンネルの中へ指向することができる。eDARは、1、2、3、4、5、または6つの検出デバイスと、1、2、3、4、5、または6つの調査デバイス、もしくは多数の検出デバイスおよび調査デバイスを備えることができる。

40

【0186】

二重捕捉eDAR

本開示はさらに、eDARの「二重捕捉」バージョン用の装置を提供する。二重捕捉装置は、混合流体の同一のサンプルから、希少細胞の2つの異なる亜集団を分離することが

50

できる。これは、単一のマイクロ流体チップ上で同時に実施されることができる。2つの亜集団はさらに、マイクロ流体チップ上の2つの異なる領域上で別々に閉じ込められることができる。

【0187】

マイクロ流体 e D A R デバイスの二重捕捉バージョンの一般構造が、図 8 に描写されている。サンプルは、一意の蛍光タグに共役される少なくとも2つの一意の抗体で標識されることができる。例えば、サンプル（例えば、血液）は、サンプル内の被分析物上のマーカ（例えば、上皮、抗 E p C A M - P E ）に結合する一意のフルオロフォアと共役される第1のタグ、およびサンプル内の被分析物上のマーカ（例えば、間葉、抗 E G F R、または抗ビメンチン）に結合する一意のフルオロフォアと共役される第2のタグで標識されることができ、各フルオロフォアは、異なる発光波長を有することができる（例えば、F I T C ）。標識血液サンプルは、マイクロ流体チップに注入されることができる。E p C A M を発現する希少細胞は、（以前に説明された）線共焦点方式を使用して検出されることができ、ピークは、黄色チャンネル内で検出されることができる。選別事象が、収集チャンネル（例えば、収集チャンネル # 1 ）の中へその特定のアリコートを集めるようにトリガされることができる。いくつかの側面では、アリコートは、間葉マーカに対して陽性としてランク付けされることができ、次いで、希少細胞は、異なる収集チャンネル（例えば、収集チャンネル # 2 ）の中へ選別されることができる。希少細胞の2つの亜集団は、別個に二重捕捉 e D A R マイクロ流体チップ上に閉じ込められ、濃縮されることができる。

【0188】

二重捕捉 e D A R 装置は、流体切替方式（図 8 ）を使用することができる。標識サンプルは、最上部の主要チャンネルに導入されることができる。緩衝液は、2つのソレノイドを使用して、血流の流体力学的切替を制御するように、2つの側方チャンネルに流入することができる。いくつかの側面では、二重捕捉 e D A R の濾過面積は、（以前に説明された）マイクロスリットを使用して構築されることができる。C T C の2つの亜集団は、分離され、同一のマイクロ流体チップ上の2つの異なる濾過面積上に閉じ込められることができる。

【0189】

二重捕捉 e D A R 装置は、ソレノイドを含むことができる。いくつかの側面では、ソレノイドの両方が、アリコートが陰性としてランク付けされるときに閉鎖されることができる（図 9 ）。サンプルは、圧力が両方のチャンネル内で平衡を保たれた場合に、廃棄物として収集するように底部中央チャンネルへ流動することができる。他の場合では、アリコートが2つのマーカのうちの1つだけ（例えば、上皮）に対して陽性としてランク付けされるとき、次いで、ソレノイド # 2 は、サンプルが左側の収集チャンネルに流入するために開放されることができる（図 9 B ）。アリコートが収集された後、ソレノイド # 2 は、再度閉鎖されることができ、サンプル流は、中央チャンネルに戻される。いくつかの側面では、アリコートは、1つだけのマーカ（例えば、上皮）に対して陽性としてランク付けされることができ、ソレノイド # 1 は、右チャンネルへのサンプルの流動を可能にするように、開放されることができる（図 9 C ）。いくつかの側面では、二重捕捉 e D A R 装置における2つのタイプの選別事象の応答時間は、迅速である（例えば、3ミリ秒未満またはそれと等しい）。

【0190】

分散

図 1 9 は、例示的分散ステージを示す。分散ステージは、本明細書に説明されるような流動ストレッチャを備えてもよい。分散ステージは、細胞を分散させるための放物線流プロファイルの使用を含んでもよい。分散ステージは、複数の流路に細胞を流動させ、細胞を分散させるステップを含んでもよい。分散ステージは、本明細書に説明されるようなヘリングボーンストレッチャを備えてもよい。分散ステージは、本明細書に説明されるような堰ストレッチャを備えてもよい。

【0191】

10

20

30

40

50

本明細書に説明されるような分散ステージが、サンプル（例えば、分散されていないサンプル、第1の単離されたサンプル、第2の単離されたサンプル等）またはその一部から分散されたサンプルを形成するために、使用されることができる。分散されたサンプルは、サンプルの2つまたはそれを上回る成分が隔離または分散される、サンプルであり得る。例えば、分散ステージは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回るタイプまたは集団の細胞を含む、サンプルの2つのタイプまたは集団の細胞を物理的に隔離または分散させるために、使用されることができる。

【0192】

分散された体積は、分散されたサンプルを含むことができる。例えば、サンプル（またはその一部）を含む流体体積は、（例えば、第1の選別ステージから）分散ステージに通過されることができ、サンプル（またはサンプルの一部）は、分散ステージを通過するにつれて分散されることができる。（例えば、分散ステージを通過した後）分散されたサンプルを含む流体体積は、分散された体積であり得る。

10

【0193】

ある場合には、分散されたサンプル中で隔離または分散されるサンプルの2つまたはそれを上回る成分は、同一の流体体積の成分であり得る、またはそれらは、異なる流体体積（例えば、サンプルの分散中に単一の流体体積から形成される複数の流体体積）の成分であり得る。サンプルを含む流体体積は、（例えば、分散ステージで）分散されるときに、2つまたはそれを上回る分散された流体体積を形成することができる。ある場合には、2つまたはそれを上回る分散された体積は、2つまたはそれを上回る分散された体積の間の流体の不連続性によって、相互から分離または隔離される。例えば、流体体積が分散ステージを通過するにつれて単一の流体体積から形成される2つの分散された体積は、ガスまたは非混合性流体等の第2の流体によって（例えば、チャンネルの中で）相互から分離されることができる。

20

【0194】

流動伸張

図20Aは、例示的流動ストレッチャの上面図を示す。流動ストレッチャは、1つまたはそれを上回る直線状流動区分を備えてもよい。例えば、流動ストレッチャは、図20Aの上部に示されるように、粒子を含有するアリコートまたは流体の部分が右に流動する、第1の直線状流動区分を備えてもよい。流動ストレッチャは、図20Aの中央および下部に示されるように、粒子を含有するアリコートまたは流体体積の部分が下向きの角度で左に進行する、第2の直線状流動区分を備えてもよい。流動ストレッチャは、任意の方向に進行する任意の数の直線状流動区分を備えてもよい。直線状流動区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の幅を有してもよい。直線状流動区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である幅を有してもよい。

30

【0195】

直線状流動区分は、流動分布をアリコートまたは流体体積に付与することによって、粒子を含有するアリコートまたは流体体積を伸張させてもよい。すなわち、アリコートまたは流体体積の異なる部分が、直線状流動区分を通して異なる率で流動してもよく、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積の全体的な延長につながる。直線状流動区分は、流速が直線状流動区分の幅を横断して変動するように、側方流動分布をアリコートまたは流体体積に付与してもよい。直線状流動区分は、放物線流分布をアリコートまたは流体体積に付与してもよい。直線状流動区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の高さを有してもよい。直線状流動区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である高さを有してもよい。直線状流動区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の幅を有してもよい。直線状流動区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である

40

50

幅を有してもよい。

【0196】

ヘリングボーン流動伸張

図20Bは、直線状流動区分と組み合わせられた例示的ヘリングボーン流動ストレッチャの上面図を示す。ヘリングボーン流動ストレッチャは、1つまたはそれを上回る直線状流動区分を備えてもよい。例えば、ヘリングボーン流動ストレッチャは、図20Bの上部に示されるように、粒子を含有するアリコートまたは流体体積が右に流動する、第1の直線状流動区分を備えてもよい。直線状流動区分は、図20Aに関して説明される直線状流動区分に類似し得る。ヘリングボーン流動ストレッチャは、1つまたはそれを上回るヘリングボーン流動区分を備えてもよい。例えば、ヘリングボーン流動ストレッチャは、図20Bの中央および下部に示されるように、粒子を含有するアリコートまたは流体体積が下向きの角度で左に進行する、ヘリングボーン流動区分を備えてもよい。ヘリングボーン流動ストレッチャは、任意の方向に進行する任意の数の直線状流動区分と、任意の方向に進行する任意の数のヘリングボーン流動区分とを備えてもよい。ヘリングボーン流動区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の幅を有してもよい。ヘリングボーン流動区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である幅を有してもよい。

10

【0197】

ヘリングボーン流動区分は、1つまたはそれを上回るヘリングボーン構造物(図20Bに示されるようなV字様構造)を備えてもよい。ヘリングボーン流動区分は、1、2、5、10、20、50、100個、または100個を上回るヘリングボーン構造物を備えてもよい。ヘリングボーン流動区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である、ヘリングボーン構造物の数を備えてもよい。各ヘリングボーン流動区分は、同一数のヘリングボーン構造物を有してもよい。各ヘリングボーン流動区分は、異なる数のヘリングボーン構造物を有してもよい。ヘリングボーン構造物は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の幅を有してもよい。ヘリングボーン構造物は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である幅を有してもよい。各ヘリングボーン構造物は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の距離によって、他のヘリングボーン構造物から分離されてもよい。各ヘリングボーン構造物は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である距離によって、他のヘリングボーン構造物から分離されてもよい。

20

30

【0198】

ヘリングボーン流動区分は、カオスの混合をアリコートまたは流体体積に付与することによって、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積を伸張させてもよい。ヘリングボーン流動区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の高さを有してもよい。ヘリングボーン流動区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である高さを有してもよい。

40

【0199】

堰伸張

図21Aは、例示的堰ストレッチャの上面図を示す。堰ストレッチャは、1つまたはそれを上回る直線状流動区分を備えてもよい。例えば、堰ストレッチャは、図21Aの上部に示されるように、粒子を含有するアリコートまたは流体体積が右に流動する、第1の直線状流動区分を備えてもよい。直線状流動区分は、図21Aに関して説明される直線状流動区分に類似し得る。堰ストレッチャは、1つまたはそれを上回る堰区分を備えてもよい。例えば、堰ストレッチャは、図21Aの中央および下部に示されるように、粒子を含有するアリコートまたは流体体積が下向きの角度にある、堰区分を備えてもよい。堰ストレ

50

ツチャは、任意の方向に進行する任意の数の直線状流動区分と、任意の方向に進行する任意の数の堰区分とを備えてもよい。堰区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の幅を有してもよい。堰区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である幅を有してもよい。

【0200】

堰区分は、1つまたはそれを上回る堰構造物（図21Aに示されるような構造支持のための複数の支柱を含有する流動区分）を備えてもよい。堰区分は、1、2、5、10、20、50、100個、または100個を上回る堰構造物を備えてもよい。堰区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である、堰構造物の数を備えてもよい。各堰区分は、同一数の堰構造物を有してもよい。各堰区分は、異なる数のヘリングボーン構造物を有してもよい。堰構造物は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の幅を有してもよい。ヘリングボーン構造物は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である幅を有してもよい。堰構造物は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の長さを有してもよい。堰構造物は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である幅を有してもよい。各堰構造物は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の距離によって、他の堰構造物から分離されてもよい。各堰構造物は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である距離によって、他の堰構造物から分離されてもよい。

【0201】

堰区分は、細胞サイズ、形状、または変形能に基づいて、細胞移動に対する異なる程度の抵抗を付与することによって、粒子を伸張させてもよい。堰区分は、10ミクロン未満、20ミクロン未満、50ミクロン未満、100ミクロン未満、200ミクロン未満、500ミクロン未満、または1,000ミクロン未満の高さを有してもよい。堰区分は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である高さを有してもよい。

【0202】

図21Bは、例示的な長い堰ストレッチャの上面図を示す。堰ストレッチャは、単一の長い堰区分を備えてもよい。長い堰区分は、図21Aを参照して説明される堰区分のうちのいずれかに類似し得る。

【0203】

図22は、例示的な障壁またはフィルタベースの細胞ストレッチャの上面図を示す。障害物または複数の流路による流動伸張

【0204】

図11は、障害物または種々の設計の複数の流路を含有するチャンネルを備える分散ステージを伴う第2の選別ステージに接続される、例示的な第1の選別ステージの上面図を示す。

【0205】

図11Aは、広い流動チャンネル内に複数の障害物を備える、分散ステージを示す。図11Aに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、広い流動チャンネル内に複数の障害物を備える分散ステージに通過させてもよい。分散ステージは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る広い流動チャンネルを備えてもよい。例えば、分散ステージは、図11Aに示されるように、1つの広い流動チャンネルを備えてもよい。障害物は、図11Aに示されるように、円形を有してもよい。障害物は、卵形、正方形、長方形、五角形、六角形、または任意の他の形状を有してもよい。障害物は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経

10

20

30

40

50

路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。障害物は、流動チャンネルの高さに沿って延在する支柱であってもよい。支柱は、支持をチャンネルに提供し得、チャンネルが、チャンネルを構築するために使用される材料の重量の下で圧潰しないように防止することに役立ち得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような第2の選別を実施してもよい。

【0206】

図11Bは、複数の分岐場所を備える、分散ステージを示す。図11Bに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、チャンネル内に複数の分岐場所を備える分散ステージに通過させてもよい。分散ステージは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る分岐場所を備えてもよい。例えば、分散ステージは、図11Bに示されるように、4つの分岐場所を備えてもよい。各分岐場所では、アリコートまたは流体体積の異なる下位体積が、異なる流路をとってもよい。例えば、第1の下位体積は、(図11Bの上から下まで)左、右、左、右から成る流路をとってもよい。第2の下位体積は、右、左、右、左から成る流路をとってもよい。第1の下位体積は、第2の下位体積よりも長い経路をとってもよい。第1の下位体積は、したがって、第1の選別ステージから第2の選別ステージまで進行するために第2の下位体積よりも長い時間を要し得る。アリコートまたは流体体積の任意の下位体積が、任意の可能性として考えられる経路をとってもよい。複数の分岐場所は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。分岐は、流動チャンネルの高さに沿って延在する支柱(図11Bでは半円形として示される)であってもよい。支柱は、支持をチャンネルに提供し得、チャンネルが、チャンネルを構築するために使用される材料の重量の下で圧潰しないように防止することに役立ち得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような第2の選別を実施してもよい。

【0207】

図11Cは、続いて、広くなり、かつ狭くなる、複数の流動区分を備える、分散ステージを示す。図11Cに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、続いて、広くなり、かつ狭くなる、複数の流動区分を備える分散ステージに通過させてもよい。分散ステージは、続いて、広くなり、かつ狭くなる、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る区分を備えてもよい。例えば、分散ステージは、図11Cに示されるように、続いて、広くなり、かつ狭くなる、3つの流動区分を備えてもよい。広くなり、かつ狭くなる流動区分は、図11Cに示されるように、菱形様形状を有してもよい。流動区分は、円形、卵形、正方形、長方形、五角形、六角形、または任意の他の形状を有してもよい。流動区分は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。続いて、広くなり、かつ狭くなる区分は、流動チャンネル(図11Cでは円として示される)の高さに沿って延在する支柱を備えてもよい。支柱は、支持をチャンネルに提供し得、チャンネルが、チャンネルを構築するために使用される材料の重量の下で圧潰しないように防止することに役立ち得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に

10

20

30

40

50

説明されるような第2の選別を実施してもよい。

【0208】

図11Dは、複数の多重分岐チャンネルを備える、分散ステージを示す。図11Dに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、チャンネル内に複数の多重分岐場所を備える分散ステージに通過させてもよい。各多重分岐場所は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または2つを上回る分岐を備えてもよい。例えば、各多重分岐場所は、図11Dに示されるように、4つの分岐を備えてもよい。分散ステージは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る多重分岐場所を備えてもよい。例えば、分散ステージは、図11Dに示されるように、2つの多重分岐場所を備えてもよい。各多重分岐場所では、アリコートまたは流体体積の異なる下位体積が、異なる流路をとってもよい。例えば、第1の下位体積は、(図11Dの上から下まで)最右、最右から成る流路をとってもよい。第2の下位体積は、最左、最左から成る流路をとってもよい。第1の下位体積は、第2の下位体積よりも長い経路をとってもよい。第1の下位体積は、したがって、第1の選別ステージから第2の選別ステージまで進行するために第2の下位体積よりも長い時間を要し得る。アリコートまたは流体体積の任意の下位体積が、任意の可能性として考えられる経路をとってもよい。複数の多重分岐場所は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。分岐は、流動チャンネルの高さに沿って延在する支柱(図11Dでは略腎臓形として示される)を備えてもよい。支柱は、支持をチャンネルに提供し得、チャンネルが、チャンネルを構築するために使用される材料の重量の下で圧潰しないように防止することに役立ち得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような第2の選別を実施してもよい。

10

20

【0209】

図12は、異なる幾何学形状のチャンネルを伴う第2の選別ステージに接続される、例示的な第1の選別ステージの上面図を示す。

【0210】

図12Aは、蛇行チャンネルを形成する、複数の曲線状流動区分を備える、分散ステージを示す。図12Aに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、全体的な蛇行形状を形成する複数の曲線状流動区分を備える分散ステージに通過させてもよい。分散ステージは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る曲線状区分を備えてもよい。例えば、分散ステージは、図12Aに示されるように、5つ曲線状区分を備えてもよい。曲線状区分は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような第2の選別を実施してもよい。

30

40

【0211】

図12Bは、複数の直線状流動区分によって接続される、続いて、広くなり、かつ狭くなる、複数の流動区分を備える、分散ステージを示す。図12Bに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、複数の直線状流動区分によって接続される、続いて、広くなり、かつ狭くなる、複数の流動区分を備える分散ステージに通過させてもよい。分散ステージは、続いて、広くなり、かつ狭くなる、1、2、3、4、5、6、

50

7、8、9、10個、または10個を上回る流動区分を備えてもよい。例えば、分散ステージは、図12Bに示されるように、続いて、広くなり、かつ狭くなる、4つの流動区分を備えてもよい。広くなり、かつ狭くなる流動区分は、図12Bに示されるように、円形を有してもよい。広くなり、かつ狭くなる流動区分は、卵形、正方形、長方形、五角形、六角形、または任意の他の形状を有してもよい。広くなり、かつ狭くなる流動区分は、広くなり、かつ狭くなる流動区分の長さによって変動する幅を有してもよい（例えば、流動区分は、図12Bに示されるように、第1の長手方向場所における幅「 w_1 」から第2の長手方向位置における幅「 w_2 」まで広くなり得る）。広くなり、かつ狭くなる流動区分は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような第2の選別を実施してもよい。

10

【0212】

図12Cは、続いて、広くなり、かつ狭くなる、複数の流動区分を備える、分散ステージを示す。図12Cに示されるように、第1の選別ステージは、本明細書に説明されるような第1の選別を実施してもよい。第1の選別ステージは、アリコートまたは流体体積を、続いて、広くなり、かつ狭くなる、複数の流動区分を備える分散ステージに通過させてもよい。分散ステージは、続いて、広くなり、かつ狭くなる、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る流動区分を備えてもよい。例えば、分散ステージは、図12Cに示されるように、続いて、広くなり、かつ狭くなる、3つの流動区分を備えてもよい。広くなり、かつ狭くなる流動区分は、図12Cに示されるように、略菱形形状を有してもよい。流動区分は、流動区分の長さによって変動する幅（図12Cに示されるような「 w 」）を有してもよい（例えば、流動区分は、第1の長手方向場所における幅「 w_1 」から第2の長手方向位置における幅「 w_2 」まで広くなり得る）。菱形流動区分の場合、菱形の2つの辺は、任意の角度（図12Cに示されるような）で衝合してもよい。角度は、0度を上回り得る。角度は、180度未満であり得る。流動区分は、アリコートまたは流体体積の1つまたはそれを上回る下位体積のための流体経路長を増加または減少させ得る。アリコートまたは流体体積の異なる下位体積によって受けられる異なる経路長は、種々の下位体積中の粒子の間の平均距離を増加させ得る。例えば、収集される粒子とアリコートまたは流体体積の他の粒子との間の距離は、増加され得る。分散ステージは、分散された体積を第2の選別ステージに通過させてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような第2の選別を実施してもよい。

20

30

【0213】

複数の分散方略

分散ステージは、本明細書に説明される分散方略のうちの2つまたはそれを上回るものを組み合わせてもよい。例えば、分散ステージは、分散方略のうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回るものを組み合わせてもよい。分散ステージは、任意の可能性として考えられる組み合わせで、かつ任意の可能性として考えられる順序で分散方略を組み合わせてもよい。

40

【0214】

図13は、放物線流プロファイルを伴う直線状チャネルと組み合わせられた例示的ヘリングボーンストレッチャの上面図を示す。ヘリングボーンストレッチャは、図20Bに関して本明細書に説明されるヘリングボーンストレッチャ等の本明細書に説明される任意のヘリングボーンストレッチャに類似し得る。直線状チャネルは、図20Aに関して本明細書に説明される直線状チャネル等の本明細書に説明される任意の直線状チャネルに類似し得る。ヘリングボーンストレッチャおよび直線状チャネルは、任意の可能性として考えられる順序で生じ得る。

【0215】

50

図14は、複数の直線状チャンネルと組み合わせられた例示的な複数のヘリングボーンストレッチャの上面図を示す。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回るヘリングボーンストレッチャを備えてもよい。各ヘリングボーンストレッチャは、図20Bに関して本明細書に説明されるヘリングボーンストレッチャ等の本明細書に説明される任意のヘリングボーンストレッチャに類似し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る直線状チャンネルを備えてもよい。各直線状チャンネルは、図20Aに関して本明細書に説明される直線状チャンネル等の本明細書に説明される任意の直線状チャンネルに類似し得る。ヘリングボーンストレッチャおよび直線状チャンネルは、任意の可能性として考えられる順序で生じ得る。

【0216】

図15は、直線状チャンネルおよび堰ストレッチャと組み合わせられた例示的ヘリングボーンストレッチャの上面図を示す。堰ストレッチャはさらに、構造物支柱を備えてもよい。構造物支柱は、本明細書に説明されるように、チャンネル圧潰を防止し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回るヘリングボーンストレッチャを備えてもよい。各ヘリングボーンストレッチャは、図20Bに関して本明細書に説明されるヘリングボーンストレッチャ等の本明細書に説明される任意のヘリングボーンストレッチャに類似し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る直線状チャンネルを備えてもよい。各直線状チャンネルは、図20Aに関して本明細書に説明される直線状チャンネル等の本明細書に説明される任意の直線状チャンネルに類似し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る堰ストレッチャを備えてもよい。各堰ストレッチャは、図21Aに関して本明細書に説明される堰ストレッチャ等の本明細書に説明される任意の堰ストレッチャに類似し得る。ヘリングボーンストレッチャ、直線状チャンネル、および堰ストレッチャは、任意の可能性として考えられる順序で生じ得る。

【0217】

図16は、ヘリングボーンストレッチャと組み合わせられた複数の流体経路を伴う例示的流動ストレッチャの上面図を示す。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る複数の流体経路区分を備えてもよい。各複数の流体経路区分は、図11Dに関して本明細書に説明される複数の流体経路区分等の本明細書に説明される任意の複数の流体経路区分に類似し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回るヘリングボーンストレッチャを備えてもよい。各ヘリングボーンストレッチャは、図20Bに関して本明細書に説明されるヘリングボーンストレッチャ等の本明細書に説明される任意のヘリングボーンストレッチャに類似し得る。複数の流体経路区分およびヘリングボーンストレッチャは、任意の可能性として考えられる順序で生じ得る。

【0218】

図17は、複数のヘリングボーンストレッチャおよび堰ストレッチャと組み合わせられた複数の流体経路を伴う例示的流動ストレッチャの上面図を示す。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る複数の流体経路区分を備えてもよい。各複数の流体経路区分は、図11Dに関して本明細書に説明される複数の流体経路区分等の本明細書に説明される任意の複数の流体経路区分に類似し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回るヘリングボーンストレッチャを備えてもよい。各ヘリングボーンストレッチャは、図20Bに関して本明細書に説明されるヘリングボーンストレッチャ等の本明細書に説明される任意のヘリングボーンストレッチャに類似し得る。本デバイスは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または10個を上回る堰ストレッチャを備えてもよい。各堰ストレッチャは、図21Aに関して本明細書に説明される堰ストレッチャ等の本明細書に説明される任意の堰ストレッチャに類似し得る。複数の流体経路区分、ヘリングボーンストレッチャ、および堰ストレッチャは、任意の可能性として考えられる順序で生じ得る。

【0219】

10

20

30

40

50

流動伸張マイクロデバイス

図 2 3 A は、ヘリングボーン構造物を利用するマイクロ流体デバイスを通した流路の概略図を示す。粒子を含有するアリコートまたは流体体積は、第 1 の e D A R ステージから流動チャンネルに沿ってヘリングボーン区分に進入してもよい。アリコートまたは流体体積は、1 つまたはそれを上回るヘリングボーン流動区分に遭遇し得る。例えば、アリコートまたは流体体積は、図 2 3 A の右上に示されるように、複数の直線状ヘリングボーン構造物を備える、第 1 のヘリングボーン流動区分に遭遇し得る。アリコートまたは流体体積は、次いで、図 2 3 A の右下に示されるように、流動チャンネルの中心からオフセットされた複数の V 字形ヘリングボーン構造物を備える、第 2 のヘリングボーン区分に遭遇し得る。アリコートまたは流体体積は、次いで、第 2 のヘリングボーン区分から反対方向に流動チャンネルの中心からオフセットされた複数の V 字形ヘリングボーン構造物を備える、第 3 のヘリングボーン区分に遭遇し得る。ヘリングボーン区分および構造物は、本明細書に説明されるような任意のヘリングボーン区分および構造物であってもよい。

10

【 0 2 2 0 】

図 2 3 B は、ヘリングボーン構造物を利用するマイクロ流体デバイス内の流動チャンネルの層の側面図を示す。マイクロ流体デバイスは、特徴層と、閉鎖層とを備えてもよい。特徴層および閉鎖層は、流動チャンネルによって分離されてもよい。流動チャンネルは、10 ミクロン未満、20 ミクロン未満、50 ミクロン未満、100 ミクロン未満、200 ミクロン未満、500 ミクロン未満、または 1,000 ミクロン未満の高さを有してもよい。流動チャンネルは、前述の値のうちのいずれか 2 つによって定義される範囲内である高さを有してもよい。特徴層は、ポリジメチルシロキサン (P D M S) を含んでもよい。P D M S 特徴層は、ソフトリソグラフィ技法を使用して生産されてもよい。特徴層は、S U 8 等の硬化フォトレジストを含んでもよい。特徴層は、フォトリソグラフィ技法を使用して生産されてもよい。特徴層は、シリコンを含んでもよい。特徴層は、ウェットエッチング、アルカリエッチング、ドライエッチング、反応性イオンエッチング、または深掘り反応性イオンエッチング等の半導体エッチング技法を使用して生産されてもよい。特徴層は、ガラスを含んでもよい。特徴層は、フッ化水素酸エッチング等のガラスエッチング技法を使用して生産されてもよい。特徴層は、シクロオレフィンコポリマー (C O C)、シクロオレフィンポリマー (C O P)、またはポリメチルメタクリレート (P M M A) 等のプラスチックを含んでもよい。特徴層は、インプリントリソグラフィを使用して生産されてもよい。特徴層は、射出成形を使用して生産されてもよい。特徴層は、3 D 印刷技法を使用して生産されてもよい。特徴層は、本明細書に説明される任意のマイクロ流体生産方法を使用して生産されてもよい。

20

30

【 0 2 2 1 】

特徴層は、1 つまたはそれを上回るヘリングボーン構造物を備えてもよい。ヘリングボーン構造物は、複数のウェルおよび隆起を備えてもよい。ヘリングボーン構造物は、本明細書に説明されるヘリングボーン構造物のうちのいずれかであってもよい。

【 0 2 2 2 】

閉鎖層は、1 つまたはそれを上回る接合技法を使用して、特徴層に密閉されてもよい。閉鎖層は、ガラスを含んでもよい。ガラス閉鎖層は、プラズマ接合技法を使用して、P D M S 特徴層に密閉されてもよい。ガラス閉鎖層は、融合接合技法を使用して、ガラス特徴層に密閉されてもよい。ガラス閉鎖層は、融合接合技法または陽極接合技法を使用して、シリコン特徴層に密閉されてもよい。閉鎖層は、C O C、C O P、または P M M A 等のプラスチックを含んでもよい。プラスチック閉鎖層は、融合接合技法を使用して、プラスチック特徴層に密閉されてもよい。プラスチック閉鎖層は、溶剤接合技法を使用して、プラスチック特徴層に密閉されてもよい。

40

【 0 2 2 3 】

図 1 0 A は、例示的複数ステージ蛍光活性化選別装置の上面図を示す。複数ステージ装置は、本明細書に説明されるようなマイクロ流体装置であってもよい。複数ステージ装置は、本明細書に説明される e D A R 選別原理を利用する、第 1 の選別ステージを備えても

50

よい。複数ステージ装置はさらに、本明細書に説明されるように、e D A Rステージ後に分散ステージを備えてもよい。分散ステージは、本明細書に説明されるような流動ストレッチャを備えてもよい。複数ステージ装置はさらに、本明細書に説明されるように、分散ステージ後に第2の選別ステージを備えてもよい。第2の選別ステージは、本明細書に説明されるような蛍光活性化選別ステージであってもよい。

【0224】

図10Cは、例示的な第1の選別ステージを示す。第1の選別ステージは、本明細書に説明されるようなe D A Rステージであってもよい。例えば、第1の選別ステージは、図18Aに関して本明細書に説明される第1のe D A Rステージに類似し得る。

【0225】

図10Bは、例示的な第2の選別ステージを示す。第2の選別ステージは、本明細書に説明される任意の蛍光活性化選別ステージであってもよい。例えば、第2の選別ステージは、図18Aに関して本明細書に説明される第2の選別ステージに類似し得る。

【0226】

図10DおよびEは、第1の選別ステージと第2の選別ステージとの間の流動ストレッチャを備える分散ステージの一部を示す。図10Eに示されるように、複数の粒子(図10Eでは1、2、3、4、5、6、および7として標識されるが、複数は、8個の粒子、9個の粒子、10個の粒子、10個を上回る粒子、20個を上回る粒子、50個を上回る粒子、100個を上回る粒子、200個を上回る粒子、500個を上回る粒子、1,000個を上回る粒子、または前述の値のうちいずれか2つによって定義される範囲内である粒子の数を備えてもよい)は、分散ステージを通して流動してもよい。流動ストレッチャは、粒子(図10Eの流動ストレッチャの上部における1から7と標識された粒子等)が、流動ストレッチャを通して流動することに所与の時間量を費やした後に、最終的に異なる位置にあるように、流体流に作用してもよい。したがって、粒子は、異なる時点で第2の選別ステージに到着してもよい。図10Eに示される実施例では、粒子2が、第2の選別ステージに到着してもよく、その後、粒子3、次いで、粒子6、次いで、粒子1、次いで、粒子4、次いで、粒子7、次いで、粒子5が続く。流動ストレッチャは、粒子が、任意の可能性として考えられる順序で、かつ任意の可能性として考えられる時間量で、第2の選別ステージに到着するように、流体に作用してもよい。異なる到着時間が、いずれか2つの粒子の間の距離の量を増加させ得る。したがって、粒子は、増加した距離に起因して、独立して選別されてもよい。

【0227】

細胞伸張

分散ステージにおける伸張はまた、細胞伸張を含んでもよい。細胞伸張は、流動チャンネル内の障壁によって付与されてもよい。障壁は、粒子の物理的属性に基づいて、アリコートまたは流体体積の中に含有される粒子(細胞等)の速度を改変し得る。例えば、障壁は、その体積、形状、または変形能に基づいて、粒子の速度を改変し得る。粒子が細胞であるとき、障壁は、細胞体積、細胞形状、または細胞変形能に基づいて、細胞の速度を改変し得る。障壁は、チャンネル内にフィルタ構造物、堰構造物、断面寸法の収縮/縮小部を備えてもよい。ある場合には、分散ステージは、流動伸張および細胞伸張を利用してもよい。

【0228】

第2の分離

分散後、収集される粒子はさらに、分離手順(例えば、分離技法)を使用して、アリコートまたは流体体積の中に含有される他の粒子から分離されてもよい。好ましい実施形態では、収集される粒子は、第2のe D A Rプロセスを受けてもよい。第2のe D A Rプロセスはさらに、本明細書に説明されるように、収集される粒子または細胞を分離してもよい。

【0229】

分離手順(例えば、第2の分離)は、能動的分離手順または受動的分離手順であり得る。第2の分離手順(例えば、e D A R等の第1の分離後に実施される分離手順)は、単離

10

20

30

40

50

されたサンプルまたは分散されたサンプル（例えば、第1の分離、または第1の分離および分散手順を受けたサンプル）に実施されることができる。

【0230】

収集される粒子はさらに、受動的分離手順を使用して、（例えば、eDAR等の第1の分離および/または分散ステージに粒子または細胞を通過させることによって実施されるもの等の分散手順等の後に）他の粒子から分離されてもよい。ある場合には、受動的分離は、分散手順を含むことができる。分散手順を含む、受動的分離は、分散ステージに（例えば、単離されたサンプルまたは分散されたサンプルの）粒子または細胞を通過させるステップを含むことができる。ある場合には、受動的分離は、本明細書に説明される流速で流体において放物線流を生成することが可能な寸法を有する、複数の流路および/またはチャンネルを備える、ヘリングボーンストレッチャ、堰、チャンネル（またはチャンネルの一部）の使用を含む。

10

【0231】

収集される粒子はさらに、能動的分離手順を使用して、（例えば、第1の分離後に）他の粒子から分離されてもよい。例えば、分離手順（例えば、第2の分離手順）は、蛍光活性化選別を含むことができる。ある場合には、蛍光活性化選別は、流体体積中の単一細胞または流体体積中の細胞群を選別するステップを含むことができる。蛍光活性化選別は、アリコート形態ではない場合がある、流体体積中の小さい細胞群を選別するステップ（例えば、蛍光活性化選別は、eDARの場合にあり得るように、流体体積中で無作為に分散されていない小さい細胞群を選別するステップを含んでもよい）、または単一細胞を選別するステップを含んでもよい。第2の蛍光活性化選別であり得る第2の分離は、収集される粒子を、eDAR選別を含み得る第1の分離手順によって生成されるアリコートよりも小さい体積に濃縮してもよい。このようにして、第2ステージ蛍光活性化選別はさらに、第1のeDARステージによって生成されるアリコートと比較して、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積の純度を増加させ得る。随意に、代替として、または加えてのいずれかで、収集される粒子はさらに、他の分離技法を使用して、他の粒子から分離されてもよい。収集される粒子はさらに、フローサイトメトリ動作または技法を採用することによって、第1の分離（例えば、装置のeDAR選別ステージにおいて実施される第1のeDAR選別）後に分離されてもよい。フローサイトメトリ動作は、単一粒子または単一細胞基準で、単離されたサンプルまたは分散されたサンプルの複数の粒子または細胞を選別するステップを含み得る、蛍光活性化細胞選別（FACS）動作であってもよい。フローサイトメトリ動作は、フローセルを通して、標的粒子および非標的粒子の両方を含有する、分散されたアリコートまたは流体体積を流動させることによって、非標的粒子から収集される標的粒子を分離してもよい。フローセルは、粒子がフローセルを通して一列に流動するように、アリコートまたは流体体積を整合させてもよい。フローセルは、2つの粒子の間の距離が粒子の直径よりも有意に大きいように構成されてもよい。

20

30

【0232】

フローセルの中にある間、アリコートまたは流体体積は、1つまたはそれを上回る光源で照明されてもよい。例えば、アリコートまたは流体体積は、1つまたはそれを上回るレーザで照明されてもよい。光源によって発せられる光は、標的粒子および非標的粒子と相互作用してもよい。例えば、光源によって発せられる光は、標的粒子または非標的粒子の蛍光を誘発してもよい。粒子は、自己蛍光であってもよい。この場合、蛍光は、光と粒子の内因性成分との間の相互作用から生じてもよい。粒子は、蛍光分子でタグ付けされてもよい。この場合、蛍光は、光と粒子に付着された外因性フルオロフォアとの間の相互作用から生じてもよい。外因性フルオロフォアは、粒子の物理的または化学的性質に基づいて、粒子に付着されてもよい。例えば、外因性フルオロフォアは、細胞の対応する表面抗原に対する抗体に共有結合している外因性フルオロフォアを標的化することによって、細胞に付着されてもよい。異なるフルオロフォアが、異なるタイプの粒子に結合してもよい。このようにして、異なるタイプの粒子が、異なる蛍光信号によって区別されてもよい。蛍光相互作用は、光検出器（フォトダイオード等）によって検出され、プロセッサによって

40

50

処理されてもよい。

【0233】

フローセルは、アリコートまたは流体体積から液体の小さい液滴を生成するように構成されてもよい。例えば、フローセルは、小さい液滴を生成する振動機構を備えてもよい。振動機構は、液滴あたりゼロまたは1つの粒子を含有する、液滴を生成するように構成されてもよい。振動機構は、非常に低い確率で1つを上回る粒子を含有する液滴を生成するように構成されてもよい。

【0234】

液滴は、液滴に電荷を加えるデバイスを通してもよい。例えば、液滴は、充電リングを通してもよい。液滴に加えられる電荷は、光検出器によって検出され、プロセッサによって処理される蛍光信号に依存し得る。例えば、標的粒子が、具体的な色の光によって照明されたときに蛍光信号を生じさせてもよい一方で、非標的粒子は、その色の光によって照明されたときに蛍光信号を生じさせなくてもよい。したがって、非標的粒子を含有する液滴に加えられる電荷と異なる電荷が、標的粒子を含有する液滴に加えられてもよい。荷電液滴は、電場を通してもよく、そこで、それらの電荷に基づいて偏向されてもよい。例えば、標的粒子を含有する液滴が、その電荷に基づいて1つの方向に偏向されてもよい一方で、非標的粒子を含有する液滴は、その異なる電荷に基づいて異なる方向に偏向されてもよい。液滴は、例えば、1つまたはそれを上回るバイアルもしくはウェルプレートの中で収集されてもよい。

【0235】

分離手順（例えば、分離動作）は、磁気分離動作を含んでもよい。分離動作は、磁気活性化細胞選別（MACS）を含んでもよい。磁気分離動作は、磁性粒子を利用し、非標的粒子から標的粒子を分離してもよい。磁性粒子は、超常磁性粒子を含んでもよい。磁性粒子は、超常磁性微粒子を含んでもよい。磁性粒子は、超常磁性ナノ粒子を含んでもよい。磁性粒子は、標的粒子または非標的粒子をタグ付けするように構成されてもよい。磁性粒子は、粒子の物理的または化学的性質に基づいて、粒子に付着されてもよい。例えば、磁性粒子は、細胞の対応する表面抗原に対する抗体に共有結合している磁性粒子を標的化することによって、細胞に付着されてもよい。磁性粒子は、標的粒子に結合するように構成されてもよい。代替として、磁性粒子は、非標的粒子に結合するように構成されてもよい。粒子は、カラムを通させられてもよい。カラムは、磁場内に位置してもよい。磁性粒子でタグ付けされた粒子は、磁場との相互作用に起因してカラムに付着してもよい。タグ付けされていない粒子は、カラムを通してもよい。標的粒子がタグ付けされた場合、それらは、カラムの端部にバイアルまたはウェルプレート等の収集コンテナを設置し、非標的粒子がカラムを通することを可能にされた後に磁場をオフにすることによって、収集されてもよい。標的粒子がタグ付けされていない場合、それらは、磁気分離動作中にカラムの端部に収集コンテナを設置することによって、収集されてもよい。

第1ステージeDAR選別後の複数ステージ蛍光活性化選別

【0236】

本開示はさらに、蛍光活性化選別および第1のeDARステージの各セットの間に分散分離ステージを利用する、eDARの第1のステージ後の複数ステージ蛍光活性化選別のための装置を提供する。本装置は、単一ステージeDAR装置と比較して、サンプルのさらなる精製を提供することができる。本装置は、単一のマイクロ流体チップに実施されることができる。

【0237】

本装置は、図18Aに示されるように、第1のeDARステージ、分散ステージ、および蛍光活性化選別の第2のステージを備えてもよい。分散ステージは、第1のeDARステージと蛍光活性化選別の第2のステージとの間に実装されてもよい。図18Aでは3ステージ装置として示されているが、複数ステージ装置はさらに、第2の分散ステージと、蛍光活性化選別の第3のステージとを備えてもよい。第2の分散ステージは、蛍光活性化選別の第2のステージと第3のステージとの間に実装されてもよい。複数ステージ装置は

さらに、第3の分散ステージと、蛍光活性化選別の第4のステージとを備えてもよい。第3の分散ステージは、蛍光活性化選別の第3のステージと第4のステージとの間に実装されてもよい。複数ステージ装置はさらに、第4の分散ステージと、蛍光活性化選別の第5のステージとを備えてもよい。第3の分散ステージは、蛍光活性化選別の第4のステージと第5のステージとの間に実装されてもよい。一般に、複数ステージ装置は、蛍光活性化選別のn個のステージと、第1のステージe D A R後のn個の分散ステージとを備えてもよく、nは、正の整数である。n番目の分散ステージが、蛍光活性化選別のn番目のステージとn番目のステージとの間、および第1のステージe D A Rの後に実装されてもよい。

【0238】

第1のe D A Rステージでは、流体サンプルは、流動チャンネルに進入する。流体サンプルは、血液サンプルであってもよい。流体サンプルは、本明細書に説明されるような任意の流体サンプルであってもよい。流体サンプルは、収集される1つまたはそれを上回る粒子を含んでもよい。粒子は、希少粒子であってもよい。粒子は、細胞であってもよい。細胞は、希少細胞であってもよい。希少細胞は、癌細胞であってもよい。癌細胞は、循環腫瘍細胞(C T C)であってもよい。希少細胞は、白血球であってもよい。粒子は、本明細書に説明されるような収集される任意の粒子であってもよい。流体サンプルが、流動チャンネルの第1の区分を通して流入すると、流体サンプルは、検出装置を通過する。検出装置は、一連の時点で検出装置を通過する流体サンプルの一連のアリコートからの一連の信号を連続的に検出してもよい。各信号は、所与のアリコート中の収集される粒子の存在(または非存在)を示し得る。検出装置は、本明細書に説明されるような任意の検出装置であってもよい。

【0239】

検出装置は、電磁放射線源で流体サンプルの各細胞群を調査することによって、収集される粒子の存在を検出してもよい。収集される粒子が検出装置によって調査されている細胞群の中に存在するとき、検出装置は、その細胞群の中の粒子との電磁放射線の相互作用を検出してもよい。特に、検出装置は、光の形態で電磁放射線を発してもよい。光は、紫外線、可視光、または赤外光であってもよい。光は、100nm~400nm、400nm~700nm、700nm~1,000nm、1μm~10μm、10μm~100μm、または100μm~1,000μmの範囲内の波長を有してもよい。光は、1つまたはそれを上回る発光ダイオード(LED)もしくはレーザーによって発せられてもよい。光は、1つまたはそれを上回るガスレーザー、エキシマレーザー、色素レーザー、固体レーザー、ファイバレーザー、ドープファイバレーザー、希土類ドープファイバレーザー、半導体レーザー、ダイオードレーザー、ダイオード励起レーザー、垂直キャビティ面発光レーザー(V C S E L)、または任意の他のレーザーによって発せられてもよい。

【0240】

光は、光反射、光透過、弾性光散乱、非弾性光散乱、レイリー散乱、ラマン散乱、表面増進型ラマン散乱、ミー散乱、ブリルアン散乱、蛍光、自己蛍光、レーザー誘起蛍光、生物発光、または化学発光等の任意の光学相互作用を通して、粒子と相互作用してもよい。粒子と光との間の光学相互作用は、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、光電子倍增管、アバランシェフォトダイオード、カメラ、電荷結合素子(C C D)カメラ、相補型金属酸化膜半導体(C M O S)カメラ、分光計、分散分光計、格子分光計、フーリエ変換分光計、または顕微鏡等の光検出器を用いて、光学信号を検出することによって、推測されてもよい。検出装置は、本明細書に説明されるような任意の光検出技法を利用してもよい。

【0241】

流動チャンネルは、2つのチャンネルに分岐してもよい。一方のチャンネル(図18Aで右に示される)は、廃棄物チャンネルを構成してもよい。検出器が収集される粒子の存在を検出することができない時間周期にわたって、流体サンプルは、廃棄物チャンネルまで流動してもよい。他方のチャンネル(図18Aで左に示される)は、本明細書に説明されるような分散ステージまで流動してもよい。アリコート中の粒子を検出することに応じて、検出装置

は、信号をコントローラ（図示せず）に送信し、収集される粒子を含有するアリコートが分散ステージまで流動するように、流動方向を切り替えるための流動切替機構（図示せず）をアクティブ化してもよい。流動切替機構は、ソレノイド（図示せず）を備えてもよい。流動切替機構は、いったん収集される粒子が流動チャンネルと分散ステージに至るチャンネルとの間の合流点を越えて移動すると、廃棄物チャンネルに戻るように流動方向を切り替えてもよい。合流点を越えた収集される粒子の移動は、例えば、合流点と分散ステージとの間に第2の検出装置（図示せず）を設置することによって、検出されてもよい。このようにして、収集される粒子を含有する流体のわずかなアリコートのみが、分散ステージに向かって流動してもよい。

【0242】

分散ステージでは、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積は、伸張を受けてもよい。伸張は、収集される粒子と収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積中の他の粒子との間の平均距離を増加させ得る。伸張は、本明細書に説明される伸張方法のうちいずれかによってアクティブ化されてもよい。例えば、伸張は、本明細書に説明されるように、直線状チャンネルを通したアリコートまたは流体体積の流動、流動ストレッチャを通したアリコートまたは流体体積の流動、ヘリングボーンストレッチャを通したアリコートまたは流体体積の流動、直線状チャンネルと組み合わせられたヘリングボーンストレッチャを通したアリコートまたは流体体積の流動、複数の流路を通したアリコートまたは流体体積の流動、複数の流路と組み合わせられたヘリングボーンストレッチャを通したアリコートまたは流体体積の流動、複数の流路と組み合わせられた直線状チャンネルを通したアリコートまたは流体体積の流動、もしくは堰ストレッチャを通したアリコートまたは流体体積の流動によって、達成されてもよい。伸張は、本明細書に説明されるように、マイクロチャンネル、ヘリングボーン混合を通した、または複数の経路を通した、アリコートまたは流体体積の放物線流によって、付与されてもよい。

【0243】

分散ステージにおける流動伸張後、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積は、第2ステージ蛍光活性化選別まで流動してもよい。第2ステージ蛍光活性化選別は、第1のeDARステージと同様に構成されてもよい。第2ステージ蛍光活性化選別は、第1のeDARステージと同じであり得る。第2のeDARステージは、第1のeDARステージと異なり得、例えば、第2のステージは、流体体積中の複数の粒子または細胞を選別してもよく、複数の粒子または細胞は、（例えば、アリコートの場合にあり得るように）流体体積の全体を通して無作為に分配される、または第2のステージは、流体体積中の細胞群を選別してもよく、複数の粒子または細胞は、（例えば、単離されたサンプルまたは分散されたサンプルの場合にあり得るように）流体体積の全体を通して無作為に分配されない。第2ステージ蛍光活性化選別は、第1のeDARステージに関して本明細書に説明されるような任意の分離方法を利用してよい。第2ステージ蛍光活性化選別は、収集される粒子を、第1のeDAR選別によって生成されるアリコートよりも小さい体積に濃縮してもよい。このようにして、第2ステージ蛍光活性化選別はさらに、第1のeDARステージによって生成されるアリコートと比較して、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積の純度を増加させ得る。

【0244】

図18Aは、蛍光活性化選別の第2のステージおよび1つの分散ステージが後に続く、第1のeDARステージを備える、装置を説明するが、開発される原理は、第1のeDARステージ後に蛍光活性化選別の2つのステージおよび2つの分散ステージ、第1のeDARステージ後に蛍光活性化選別の3つのステージおよび3つの分散ステージ、第1のeDARステージ後に蛍光活性化選別の4つのステージおよび4つの分散ステージ、または第1のeDARステージ後に、 n が正の整数である、蛍光活性化選別の n 個のステージおよび n 個の分散ステージを利用する、装置を生産するように適用されてもよい。

【0245】

図18Bは、いくつかの実施形態による、第1のeDARステージ後に蛍光活性化選別

10

20

30

40

50

および分散の複数のステージを伴う装置を動作させる方法を示す。第1のステップでは、サンプルが、第1の緩衝液流（図18Bでは「L」と表される）および第2の緩衝液流（図18Bでは「R」と表される）との合流点に流入する。第1および第2の緩衝液流は、任意の緩衝液を含んでもよい。例えば、第1および第2の緩衝液流は、水性緩衝液を含んでもよい。第1および第2の緩衝液流は、有機緩衝液を含んでもよい。第1および第2の緩衝液流は、両性イオン緩衝液を含んでもよい。第1および第2の緩衝液流は、細胞成長培地を含んでもよい。第1および第2の緩衝液流は、最小細胞成長培地を含んでもよい。第1および第2の緩衝液流は、同一の緩衝液を含んでもよい。第1および第2の緩衝液流は、異なる緩衝液を含んでもよい。

【0246】

収集される粒子（例えば、赤血球および/または白血球の集団の間の循環腫瘍細胞または白血球等の非標的細胞の集団の間の標的細胞）の検出に先立って、第1および第2の緩衝液流の流速は、サンプルが廃棄物チャンネルに向かって流動するように選択されてもよい。例えば、第1の緩衝液流の流速は、第2の緩衝液流の流速よりも高くなるように選定されてもよい。

【0247】

第2のステップでは、収集される粒子が、検出装置によって検出されてもよい。検出装置は、本明細書に説明されるような任意の検出装置であってもよい。検出装置は、本明細書に説明されるような光検出装置であってもよい。

【0248】

第3のステップでは、収集される粒子の検出に応じて、流体切替弁が、開放してもよい。流体切替弁の開放は、第1または第2の緩衝液流の流速を改変することによって達成され得る。第1の緩衝液流の流速は、流体サンプルが廃棄物チャンネルから離れて分散ステージに向かって流動するように、減少され得る。第2の緩衝液流の流速は、流体サンプルが廃棄物チャンネルから離れて分散チャンネルに向かって流動するように、増加され得る。

【0249】

第4のステップでは、流体切替弁が、（例えば、流体切替弁の開放の前に有していたものと同じの流速を有するように第1または第2の緩衝液流の流速を改変することによって等）閉鎖されてもよい。これは、流体サンプルを、もう一度、廃棄物チャンネルに向かって流動させてもよい。このようにして、（収集される粒子を含有する）流体サンプルの小さいアリコートまたは流体体積が、形成され、分散ステージに向かって流動してもよい。流体切替弁は、それが開放された直後に閉鎖されてもよい。流体切替弁は、下流に位置する第2の検出装置による収集される粒子の検出に反応して、閉鎖されてもよい。流体切替弁は、検出装置から廃棄物チャンネルまでの計算された流動時間後等の所定の時間量後に、閉鎖されてもよい。流体切替弁は、1ミリ秒未満、2ミリ秒未満、5ミリ秒未満、10ミリ秒未満、20ミリ秒未満、50ミリ秒未満、100ミリ秒未満、200ミリ秒未満、500ミリ秒未満、または1,000ミリ秒未満の周期後に、閉鎖されてもよい。流体切替弁は、前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内である周期後に、閉鎖されてもよい。

【0250】

第5のステップでは、収集される粒子を含有するアリコートまたは流体体積が、本明細書に説明されるように、分散ステージによって伸張されてもよい。アリコートまたは流体体積の伸張は、アリコートまたは流体体積中の収集される粒子と非標的粒子との間の平均間隔の増加をもたらす。アリコートまたは流体体積は、本明細書に説明される伸張装置または方法のうちのいずれかによって伸張されてもよい。

【0251】

第6、第7、および第8、ならびに第9のステップでは、伸張されたアリコートまたは流体体積はさらに、蛍光活性化選別の第2のステージによって選別されてもよい。第6のステップは、第1のステップに類似し得る。第7のステップは、第2のステップに類似し得る。第8のステップは、第3のステップに類似し得る。第9のステップは、第4のステ

10

20

30

40

50

ップに類似し得る。蛍光活性化選別の第2のステージ後に、収集される粒子は、第1のeDARステージ後に生成されるアリコートよりも小さいアリコートまたは流体体積中で収集されてもよい。アリコートまたは流体体積は、蛍光活性化選別の第2のステージから下流で収集されてもよい。例えば、アリコートまたは流体体積は、収集のために、96ウェルプレート等のウェルプレートまで流動されてもよい。アリコートまたは流体体積は、収集のためにバイアルまで流動されてもよい。アリコートまたは流体体積は、収集のために濾過容積まで流動されてもよい。

【0252】

図18Bに関して説明される方法は、第2の分散ステージおよび蛍光活性化選別の第3のステージを含むように拡張され得る。第2の分散ステージは、本明細書に説明される第5のステップに類似するステップを創出し得る。蛍光活性化選別の第3のステージは、本明細書に説明される第6、第7、第8、および第9に類似するステップを創出し得る。図18Bに関して説明される方法は、第3の分散ステージおよび蛍光活性化選別の第4のステージを含むように拡張され得る。第3の分散ステージは、本明細書に説明される第5のステップに類似するステップを創出し得る。蛍光活性化選別の第4のステージは、本明細書に説明される第6、第7、第8、および第9に類似するステップを創出し得る。図18Bに関して説明される方法は、第4の分散ステージおよび蛍光活性化選別の第5のステージを含むように拡張され得る。第4の分散ステージは、本明細書に説明される第5のステップに類似するステップを創出し得る。蛍光活性化選別の第5のステージは、本明細書に説明される第6、第7、第8、および第9のステップを創出し得る。一般に、図18Bに関して説明される方法は、 n が正の整数である、 n 番目の分散ステージおよび蛍光活性化選別の $(n+1)$ 番目のステージを含むように拡張され得る。 n 番目の分散ステージは、本明細書に説明される第5のステップに類似するステップを創出し得る。蛍光活性化選別の $(n+1)$ 番目のステージは、本明細書に説明される第6、第7、第8、および第9に類似するステップを創出し得る。

【0253】

図18Bに関して説明される方法に基づく多くの変形例、改変、および適合が、可能であり得る。例えば、図18Bに関して説明される方法のステップの順序は、変更されてもよく、ステップのうちのいくつかは、除去されてもよく、ステップのうちのいくつかは、複製されてもよく、付加的ステップが、適宜、追加されてもよい。ステップのうちのいくつかは、連続して実施されることができる。ステップのうちのいくつかは、並行して実施されることができる。ステップのうちのいくつかは、1回実施されることができる。ステップのうちのいくつかは、1回を上回って実施されることができる。ステップのうちのいくつかは、サブステップを含むことができる。ステップのうちのいくつかは、自動であり得、ステップのうちのいくつかは、手動であり得る。本明細書に説明されるようなプロセスは、図18Bに関して説明される方法の1つまたはそれを上回るステップの少なくとも一部を実施する1つまたはそれを上回る命令を備えることができる。

【0254】

粒子捕捉および収集

細胞（例えば、標的細胞）等の1つまたはそれを上回る粒子が2ステージ選別（随意に、1つまたはそれを上回る分散動作を受けること）中に分離および/または濃縮された後に、粒子は、（例えば、図7Aおよび図29A - 図31に示されるような）フィルタ要素を使用して、捕捉または収集されることができる。例えば、複数の粒子（例えば、標的細胞）は、複数ステージ選別後にフィルタ要素を使用して、1つまたはそれを上回る粒子もしくは1つまたはそれを上回るタイプの粒子から精製されることができる。ある場合には、複数の粒子は、複数の粒子が存在する流体体積の最終体積を低減させるように濃縮される。

【0255】

ここで図29Aおよび29Bを参照すると、1つまたはそれを上回る粒子（例えば、標的細胞）を含む流体体積が、（例えば、第2の選別ステージを通過した後に）濾過面積の

10

20

30

40

50

中に導入されることができる。濾過面積は、流体体積中に存在する1つまたはそれを上回る非標的粒子から、1つまたはそれを上回る標的粒子をさらに分離または精製するために使用されることができる。

【0256】

濾過面積は、第2の選別ステージの出力チャンネルまたは流路と流体連通する入力流路を備えることができる。濾過面積はさらに、1つまたはそれを上回る開口（例えば、スリット、マイクロスリット、細孔、微小細孔、または間隙）を有する、フィルタ要素を備えることができる。ある場合には、1つまたはそれを上回る開口（もしくはスリット、細孔、または間隙）は、標的粒子がフィルタの反対側（例えば、フィルタの下流側）に位置する濾過領域への開口を通過しないように防止するように定寸される、少なくとも1つの寸法を有することができる。例えば、1つまたはそれを上回る開口（もしくはスリット、細孔、または間隙）は、標的細胞が開口を通過しないように防止するように定寸される、幅、高さ、直径、または断面積を有することができる。ある場合には、開口の寸法は、標的粒子が開口を通過しないように防止するように、標的細胞の直径または半径よりも小さい。ある場合には、開口の寸法は、（変形されたか、または変形されていないかのいずれかである間に）1つまたはそれを上回る非標的粒子が開口を通過することを可能にする一方で、（変形されたか、または変形されていないかのいずれかである間に）標的粒子が無傷で開口を通過することを許可しないように定寸される。標的粒子（例えば、標的細胞）は、標的粒子がフィルタと接触して設置され（例えば、それと関連付けられ）、（例えば、開口のサイズおよび/または形状の結果として）フィルタの開口を通過することを防止されるように、（例えば、第2の選別ステージからの入力またはフィルタ要素の上流側の濾過面積に接続される1つまたはそれを上回る付加的な上流流路等の上流流路から）流体圧力を、標的粒子を含む流体体積に印加することによって、（例えば、図29Aおよび29Bに示されるような）濾過面積のフィルタ要素によって捕捉されることができる。

【0257】

濾過領域は、濾過面積の上流の選別ステージからの入力流路とフィルタの反対側で1つまたはそれを上回る流路に接続されることができる。ある場合には、入力流路とフィルタの反対側で濾過面積に接続される流路は、出力チャンネル（例えば、一次流体出口）を備えることができる。非標的細胞は、フィルタを通過した後に、収集バイアルまたは廃棄物レセプタクルまでそのような出力チャンネルを通過することができる。例えば、図29Aは、（例えば、フィルタ要素を横断する流体圧力差の結果としての白血球（WBC）の変形によって）細胞の直径よりも小さい幅を有する開口を通過するWBCを示す。図29はまた、開口を通過する、開口の幅よりも小さい直径を有する赤血球（RBC）も示す。循環腫瘍細胞（CTC、例えば、標的細胞）は、CTCの直径および/またはCTCの変形能に対する開口の幅に起因して、開口を通過することができない。

【0258】

ある場合には、入力流路とフィルタの反対側で濾過面積に接続される流路は、流体入力チャンネルであり得る。例えば、付加的な流体が、（例えば、図29Aおよび29Bに示されるように）濾過面積のフィルタ要素の下流の流路を通して濾過面積に注入されてもよい。

【0259】

ある場合には、（例えば、フィルタ要素の下流の流路を介して流体を濾過面積に注入することによる）フィルタ要素への下流流体圧力の印加は、1つまたはそれを上回る粒子（例えば、標的粒子）をフィルタ要素から放出させる（例えば、フィルタ要素と関連なくさせる）ことができる。

【0260】

複数のピースが、フィルタ要素の下流側の濾過面積に接続される流路を通して注入される付加的な流体を介して、濾過面積の中に導入されてもよい。図29Bに示されるように、ピース（剛性ピースであり得る）は、フィルタ要素の1つまたはそれを上回る開口と関連し、1つまたはそれを上回る開口を通じた流動を遮断することができる。ある場合には、濾過面積のフィルタ要素の1つまたはそれを上回る開口との1つまたはそれを上回るピー

10

20

30

40

50

ズの関連性は、フィルタ要素を横断した圧力差を変化させ、1つまたはそれを上回る標的粒子をフィルタ要素から放出させる（例えば、フィルタ要素と関連しなくさせる）ことができる。ある場合には、フィルタ要素の1つまたはそれを上回る開口との1つまたはそれを上回るビーズの関連性は、フィルタ要素の上流側から1つまたはそれを上回る標的粒子を放出することを補助し得る、フィルタ要素の1つまたはそれを上回る開口を通した逆流流体流（例えば、フィルタの下流側からフィルタの上流側までの流体流）の増加を引き起こし得る。ある場合には、フィルタ要素の1つまたはそれを上回る開口との1つまたはそれを上回るビーズの関連性は、フィルタ要素の上流側からの1つまたはそれを上回る標的粒子の放出を補助し得る、フィルタ要素を横断する圧力差の減少を引き起こし得る。

【0261】

1つの粒子または複数の粒子がフィルタ要素の上流側のフィルタ要素から放出された後、1つの粒子または複数の粒子は、（例えば、図29Aおよび図31に示されるように）収集バイアルまたは収集領域と流体連通する流路（例えば、出口流路）を通して流されることができる。

【0262】

ある場合には、粒子は、選別ステージを通過した後、濾過面積内の捕捉ならびに放出後、および/または収集に先立って、流体体積中で濃縮されることができる。粒子は、粒子を含む流体体積のわずかな体積が流路を通過することを可能にするように、（例えば、コンピュータ制御による）弁の動作によって流体体積中で濃縮されることができる。例えば、弁は、短い時間周期のみにわたって開放し、標的粒子が弁の場所において流路を通過することを可能にすることによって、流体体積中の粒子を濃縮することに有用であり得る。ある場合には、弁は、2～3ミリ秒、2～20ミリ秒、または20ミリ秒～50ミリ秒のみにわたって開放し得、弁が開放される度に、1～3ナノリットル、3～5ナノリットル、5～10ナノリットル、10～20ナノリットル、または20～30ナノリットルが流路を通過することを可能にし得る。弁は、非常に短い再現可能な時間周期（例えば、2～3ミリ秒、2～20ミリ秒、または20ミリ秒～50ミリ秒）で開閉し得るため、粒子を濃縮することに有用であり得る、ソレノイド弁であり得る。

【0263】

弁の開放および/または閉鎖は、コンピュータによって制御されることができる。例えば、流体体積中の粒子を濃縮するために使用される弁は、コンピュータに接続される検出器が標的粒子を検出するときに開放されることができる。標的粒子が検出される時のみ弁を開放することによって、最小量の流体が、流路を通過することを可能にされる各標的粒子とともに、流路を通して進入許可されることができる。

【0264】

図30A-30Cに示されるように、弁は、インライン弁、2方向ピンチ弁、または外部弁であり得る。インライン弁または2方向ピンチ弁は、マイクロ流体チップの中に統合されることができる。外部弁は、（例えば、締結具によって）マイクロ流体チップに接続されることができる。ある場合には、外部弁は、マイクロ流体チップから除去可能であり得る。外部弁は、閉鎖されたときに流路（例えば、1本の管類）を挟締することによって動作することができる。

【0265】

図30Cに示されるように、弁（例えば、収集弁）を備える流路は、第2の選別ステージ、マイクロ流体チップ（例えば、マイクロ流体選別チップ）、および/または1本の収集管類の出口と流体連通し得る。ある場合には、収集弁は、流路から接続解除されることができ、流路（例えば、収集弁に前もって接続された管類）は、選別された粒子が第2の選別ステージと収集弁との間の流路の中（例えば、マイクロ流体チップの1つまたはそれを上回る流路の中、もしくは第2の選別ステージと収集弁との間の管類の中）に存在するときに、収集バイアルと流体連通して設置されることができる。流路内の選別された粒子は、流路が収集バイアルに接続された後に収集バイアルの中に流されることができる。

【0266】

10

20

30

40

50

ここで図 3 1 を参照すると、濾過面積は、1 つまたはそれを上回る標的粒子を含む流体体積の体積の受動的縮小のために有用な構造物を備えることができる。濾過面積は、第 2 の選別ステージからの出口と流体連通し、かつ収集バイアル等の粒子収集領域または構造物と流体連通する、入力流路またはチャネルを備えることができる。第 2 の選別ステージの出口を粒子収集領域と接続する流路は、1 つまたはそれを上回る標的粒子が無傷で開口を通過することを許可されない一方で、流体、随意に、1 つまたはそれを上回る非標的粒子が、開口を通過することができるように定寸される寸法（例えば、幅、高さ、直径、または断面）を伴う複数の開口 3 1 2 0（またはスリット、マイクロスリット、細孔、微小細孔、もしくは間隙）を有する、1 つまたはそれを上回るフィルタ要素 3 1 1 0 を備えることができる。濾過面積は、第 2 の選別ステージを粒子収集領域または構造物に接続する流路とフィルタ要素 3 1 1 0 の反対側に位置する、1 つまたはそれを上回る濾過領域 3 1 3 0 を備えてもよい。濾過領域は、1 つまたはそれを上回る流体出口（例えば、出口または廃棄物と流体連通する流路）と流体連通し得る。

10

【 0 2 6 7 】

流路の上流端への流体圧力の印加（例えば、濾過面積の入力流路またはチャネルもしくはその上流における流体圧力の印加）を通して、第 2 の選別ステージから濾過面積の中に導入される流体体積中の 1 つまたはそれを上回る粒子は、フィルタ要素 3 1 1 0 と接触して設置される（例えば、それと関連付けられる）ことができる。本流体圧力は、1 つまたはそれを上回る粒子を含む流体体積の一部を、フィルタ要素 3 1 1 0 の開口を通して濾過領域 3 1 3 0 の中に通過させることができる。ある場合には、フィルタ要素 3 1 1 0 を横断した流体体積の一部の本移動は、1 つまたはそれを上回る粒子を含む流体体積のサイズを減少させ得る。ある場合には、フィルタ要素 3 1 1 0 を横断した流体体積の一部の移動は、1 つまたはそれを上回る粒子（例えば、1 つまたはそれを上回る非標的粒子）を、フィルタ要素 3 1 1 0 の 1 つまたはそれを上回る開口 3 1 2 0 を通して濾過領域 3 1 3 0 まで通過させることができる。ある場合には、濾過領域 3 1 3 0 と、第 2 の選別ステージを収集領域と接続する流路との間の毛細管力および / または体積差は、流体体積ならびに / もしくは 1 つまたはそれを上回る粒子（例えば、非標的粒子）の一部を、フィルタ要素 3 1 1 0 を横断して濾過領域 3 1 3 0 まで（例えば、フィルタ要素 3 1 1 0 の 1 つまたはそれを上回る開口 3 1 2 0 を通して）移動させるために十分であり得る。

20

【 0 2 6 8 】

マーカ / バイオマーカ

本方法は、被分析物（例えば、閉じ込められた粒子）によって発現される、その上に位置する、またはその近傍に位置し得る、複数のバイオマーカを提供する。本開示によって検出され得る複数のバイオマーカは、閉じ込められた粒子に実施され得る、数回の免疫染色および光退色を受ける。各回の免疫染色は、0 個のタグ、1 個のタグ、2 個のタグ、3 個のタグ、4 個のタグ、5 個のタグ、6 個のタグ、7 個のタグ、8 個のタグ、9 個のタグ、または 1 0 個のタグを含むことができる。各回の免疫染色のためのタグの範囲は、1 ~ 1 0 個のタグ（例えば、4 つ）を含むことができる。

30

【 0 2 6 9 】

いくつかの側面では、バイオマーカ等のマーカの存在は、タグによって発せられる信号によって示され、タグは、マーカに対する親和性を有する。本明細書で使用されるように、語句「~に対する親和性を有する」は、広義には、タグによるマーカに対する直接分子結合親和性、ならびに 1 つまたはそれを上回る他の構造を伴う分子複合体を介して相互作用するタグおよびマーカ的能力等の間接親和性の両方を包含する。例えば、いくつかの側面では、タグは、マーカに対する直接親和性を伴う一次抗体であってもよい一方で、他の側面では、タグは、マーカに対する間接親和性を伴う二次抗体であってもよい。

40

【 0 2 7 0 】

いくつかの側面では、細胞は、所与の細胞が一意および / または識別可能なマーカもしくはバイオマーカプロファイルを呈するように、具体的マーカまたはバイオマーカプロファイルに従って単離される。ある側面では、マーカまたはバイオマーカプロファイルは、

50

細胞または細胞型を定義および識別するために使用され得る、1つまたはそれを上回る、2つまたはそれを上回る、3つまたはそれを上回る、4つまたはそれを上回る、5つまたはそれを上回る、6つまたはそれを上回る、7つまたはそれを上回る、8つまたはそれを上回る、9つまたはそれを上回る、もしくは10個またはそれを上回るマーカもしくはバイオマーカの具体的組み合わせである。いくつかの側面では、マーカまたはバイオマーカプロファイルは、特定の一式の性質を有する細胞の特定の集団の一部として、細胞を識別するために使用されることができる。

【0271】

いくつかの側面では、バイオマーカは、細胞外である。他の場合では、バイオマーカは、細胞内、細胞質、細胞質内、細胞表面、核外、核内、リソソーム、ミトコンドリア、小胞体、および同等物であり得る。他の場合では、バイオマーカは、粒子に付着されることができるが、粒子に移行しない。

10

【0272】

いくつかの側面では、バイオマーカは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、変性タンパク質であり得る。これらの場合では、構造物は、天然または変性であり得る。

【0273】

いくつかの側面では、バイオマーカは、核酸、オリゴ核酸、リボ核酸、転移リボ核酸、メッセンジャーリボ核酸、マイクロリボ核酸、またはデオキシリボ核酸であり得る。これらの場合では、酸は、一本または二本鎖であり得る。

20

【0274】

他の場合では、希少粒子は、細胞、タンパク質、タンパク質複合体、核酸、核タンパク質複合体、炭水化物、代謝産物、異化代謝産物、および同等物であり得る。いくつかの側面では、希少粒子は、細胞である。いくつかの側面では、細胞は、癌細胞、循環腫瘍細胞(CTC)、癌幹細胞、癌表面抗原を表示する癌細胞、例えば、CD44、CD2、CD3、CD10、CD14、CD16、CD24、CD31、CD45、CD64、CD140b、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される1つであり得る。

【0275】

いくつかの側面では、細胞は、胎児細胞である。いくつかの側面では、胎児細胞は、母体流体中にあり得る。母体流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物を含むことができる。

30

【0276】

いくつかの側面では、被分析物は、他の細胞もしくは細胞外基質に接続されていない、または組織内に埋め込まれていない解離細胞である。

【0277】

いくつかの側面では、癌幹細胞は、限定ではないが、CD44、CD2、CD3、CD10、CD14、CD16、CD24、CD31、CD45、CD64、CD140b、またはCD166を含み得る、バイオマーカに選択的に結合する、他の試薬を灌流させることによって、通常の癌細胞と区別されることができる。

40

【0278】

例えば、タグは、EGFRおよびCD166の発現を検出して腫瘍細胞の間葉特性を実証するように設計されることができる。ビメンチンおよびカドヘリン等の他の関連マーカが、この群で使用されることができる。

【0279】

他の場合では、粒子の生存能力を示すバイオマーカが、使用されることができる。これらの場合では、アポトーシス、壊死、有糸分裂、有糸分裂のステージ、減数分裂、および同等物を示す、バイオマーカが、使用されることができる。

【0280】

50

いくつかの側面では、各一式のマーカは、陽性対照バイオマーカとして核染色 (Hoechst)、陰性対照バイオマーカとしてFITCと共役したCD45、およびPEまたはAlexa647と共役した2つのタンパク質バイオマーカを含むことができる。いくつかの側面では、Hoechst染色は、光退色されなくてもよい。この場合、Hoechstは、陽性対照である。この場合、Hoechstは、標準光源で光退色されなくてもよい。この場合、紫外線暴露が、染色を退色させるために使用されてもよい。

【0281】

サンプル

本明細書で提供される本開示では、サンプルは、流体サンプルを含むことができる。流体サンプルは、種々の発生源を起源とすることができる。いくつかの側面では、発生源は、ヒト、哺乳類、動物、微生物、細菌、真菌、酵母、ウイルス、齧歯類、昆虫、両生類、および魚類であってもよい。

10

【0282】

本開示で提供される流体サンプルは、着目希少粒子を含有する場合とそうではない場合がある、液体であり得る。いくつかの側面では、サンプルは、例えば、湖、川、海、池、小川、泉、沼地、貯水池、または同等物からの環境流体サンプルであってもよい。さらに他の場合において、サンプルは、例えば、脱塩工場、水処理工場、貯水池、泉、小川、氷河水流、給水塔、または飲料水源と見なされ得る他の水源からの水サンプルであってもよい。

【0283】

いくつかの側面では、本開示は、希少粒子である被分析物を含む、被分析物を提供する。希少粒子は、低レベルで流体サンプル中に存在する細胞または巨大分子であり得る。ある側面では、希少粒子は、細胞、タンパク質、タンパク質複合体、核酸、核タンパク質複合体、炭水化物、代謝産物、異化代謝産物、および同等物であり得る。ある側面では、粒子は、流体中の全粒子集団の約10%未満の濃度で、または流体中の全粒子集団の約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%未満で、もしくはそれより少なく、流体サンプル中に存在する場合に、希少と見なされることができる。さらに他の場合では、希少粒子は、流体中の全粒子集団の約 10^3 分の1未満で、または流体中の全粒子集団の約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 分の1未満で、もしくはそれより少なく、流体サンプル中に存在し得る。ある側面では、粒子は、流体中の全粒子集団の10%未満の濃度で、または流体中の全粒子集団の9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%未満で、もしくはそれより少なく、流体サンプル中に存在する場合に、希少と見なされることができる。さらに他の場合では、希少粒子は、流体中の全粒子集団の 10^3 分の1未満で、または流体中の全粒子集団の 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 分の1未満で、もしくはそれより少なく、流体サンプル中に存在し得る。

20

【0284】

いくつかの側面では、流体サンプルは、ある割合の水および/または他の要素を含有することができる。例えば、流体サンプルは、いくつかある物質の中でも血漿を含有する、血液であり得る。概して、血漿は、大部分が水であり、タンパク質、イオン、ビタミン、酵素、ホルモン、および体内の他の化学物質を含有することができる。

40

【0285】

いくつかの側面では、流体サンプルは、体液であり得る。体液は、多くの場合、液体中の生物学的粒子の複合懸濁液である。例えば、体液は、血液であり得る。いくつかの側面では、血液は、血漿および/または細胞(例えば、赤血球、白血球、循環希少細胞)、ならびに血小板を含むことができる。いくつかの側面では、血液の液量の55%は、細胞であり得る。いくつかの側面では、血液サンプルは、血液の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%が細胞であるように、濃縮されることができる。いくつかの側面

50

では、血液サンプルは、1つまたはそれを上回る細胞型が奪われた血液を含有する。いくつかの側面では、血液サンプルは、1つまたはそれを上回る細胞型が豊富にされた血液を含有する。いくつかの側面では、血液サンプルは、血液の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%が細胞であるように、希釈されることができる。いくつかの側面では、血液サンプルは、細胞の異質、均質、または近均質混合を含有する。

【0286】

体液は、限定ではないが、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物を含むことができる。いくつかの側面では、体液は、細胞および生体粒子の混合物を含有する種々の臓器（例えば、肺）と接触することができる。

10

【0287】

いくつかの側面では、体液は、希少粒子を含有することができる。いくつかの側面では、希少粒子は、希少細胞である。希少細胞は、有核または非有核であり得る。希少細胞は、限定ではないが、悪性表現型を発現する細胞、母体末梢血中の胎児細胞等の胎児細胞、腫瘍から血液または他の体液に流された腫瘍細胞等の腫瘍細胞、HIVに感染した細胞等のウイルスに感染した細胞、着目遺伝子が移入された細胞、および自己反応障害に罹患した対象の末梢血中に存在するT細胞またはB細胞の異常サブタイプを含む。

20

【0288】

いくつかの側面では、体液は、血液であり得、希少細胞を含有することができる。希少細胞は、赤血球、白血球細胞、白血球、リンパ球、B細胞、T細胞、肥満細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、樹状細胞、幹細胞、赤血球系細胞、癌細胞、腫瘍細胞、または内胚葉、中胚葉、外胚葉、もしくは神経堤組織を起源とする任意の細胞から単離された細胞であり得る。希少細胞は、一次発生源または二次発生源（例えば、細胞株）に由来し得る。

【0289】

特定の体液（例えば、血液）中に存在する細胞および生体粒子の種類および量は、生物の健康についての情報を明らかにすることができる。例えば、癌に罹患している対象は、体液中に癌細胞を有し得る。感染に罹患している対象からのサンプルは、感染を示す増加した数の免疫細胞（例えば、リンパ球、好中球、B細胞、T細胞、樹状細胞等）を含有し得る、または微生物細胞もしくは核酸等の病原性物質を含有し得る。妊婦からのサンプルは、胎児の遺伝子型または核型を示す胎児細胞を含有し得る。

30

【0290】

いくつかの細胞または生体粒子は、通常数量と比較して希少数量で体液中に存在し得る。そのような希少細胞は、循環腫瘍細胞、癌幹細胞等を含むことができる。これらの細胞は、身体の領域中で発生する事象（例えば、癌）の結果として、体液中に出現することができる。細胞は、体液を含有する臓器または体液の近傍の臓器を起源とすることができる。例えば、希少乳癌細胞は、乳腺の近傍に位置する血液またはリンパ液中に存在し得る。いくつかの側面では、細胞は、より遠隔の臓器を起源とする。例えば、精巣腫瘍を起源とする細胞は、腕から採取された血液サンプル中に存在し得る。

40

【0291】

分析

本開示はさらに、分析が実施され得る方法を提供する。いくつかの側面では、分析は、アリコートまたは流体体積を調査するための発生源を含むことができる。アリコートが化学発光または生物発光を本質的に呈し得る被分析物（例えば、希少粒子）を含有する、他の場合では、本装置は、アリコートを調査するための発生源を要求しなくてもよい。

【0292】

いくつかの側面では、ランク付けデバイスは、コンピュータ、プロセッサ、コントロー

50

ラ、集積回路を伴うチップ、回路基板、電子要素、ソフトウェア、アルゴリズム、またはそれらの組み合わせから選択されることができる。いくつかの側面では、プロセッサは、デジタルプロセッサ（例えば、FPGA、ASIC、またはRT）であり得る。いくつかの側面では、コンピュータは、検出デバイスから信号を受け取り、アルゴリズムを通してアリコートにランク付けする。ランク付けデバイスは、ランク付けの値（例えば、流体サンプル中の希少粒子の存在、非存在、数量、識別、または組成）に基づいて、アリコートを適切なチャンネルの中へ指向することができる。

【0293】

いくつかの側面では、第1の検出器に由来する情報は、分析されることができる。第1の検出器からの情報は、分析されることができ、結果は、被分析物が陽性であることを示すことができる。いくつかの側面では、検出器からの情報は、分析することができ、結果は、被分析物が陰性であることを示すことができる。いくつかの側面では、ランク付けデバイスは、被分析物を選別するように、陽性または陰性被分析物を読み取る信号を流体力学的切替要素（例えば、ソレノイド弁）に送信する。いくつかの側面では、陽性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンバへ移動されることができる。いくつかの側面では、陽性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンネルへ移動されることができる。いくつかの側面では、陽性被分析物は、マイクロ流体チップの廃棄物チャンバへ移動されることができる。いくつかの側面では、陰性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンネルへ移動されることができる。いくつかの側面では、陰性被分析物は、マイクロ流体チップの一意のチャンバへ移動されることができる。いくつかの側面では、陰性被分析物は、マイクロ流体チップの廃棄物チャンバへ移動されることができる。いくつかの側面では、陽性被分析物は、陰性被分析物から分割される。

【0294】

いくつかの側面では、分析は、第2の検出器から中継される情報を使用して実施されることができる。第2の検出器は、第1の検出器を使用して取得される情報を確認するために使用されることができる。いくつかの側面では、第2の検出器は、マイクロ流体チップ上に位置することができる。いくつかの側面では、第2の検出器は、マイクロ流体チップ上に位置しなくてもよい。いくつかの側面では、第2の検出器は、第1の検出器によって検出される信号に基づいて選別され得る細胞から信号を取得する。いくつかの側面では、第2の検出器は、選別された細胞から検出信号を受信し、信号についての情報をコンピュータに送信することができる。コンピュータは、適切な細胞が選別されたかどうかを判定するために使用されることができる。

【0295】

用途

本開示は、種々の用途で使用される方法を提供する。いくつかの側面では、本方法は、流体サンプル、例えば、血液サンプル等の生物学的流体中の希少粒子の存在と関連付けられる条件の診断または予後を対象に提供することができる。

【0296】

本明細書で説明される方法および装置は、(a) タグを、該タグおよび被分析物を含む複合体に変換するために好適な条件下で、対象からの生物学的流体をタグと接触させるステップと、(b) 生物学的流体のアリコート中で、ステップ(a)で形成された複合体の存在または非存在を検出するステップと、(c) ステップ(a)で形成された複合体の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(d) 単離されたアリコートの分析に基づいて、診断または予後を対象に提供するステップとを含むことができる。いくつかの側面では、ステップ(b)は、放射線源でアリコートを調査し、被分析物に結合されたタグによって発せられる信号を検出するステップを含むことができる。

【0297】

種々の側面では、方法が、流体内の被分析物上に存在する複数のマーカを識別するために提供され、本方法は、(a) 放射線源を使用して、第1のタグから信号を検出するステップであって、第1のタグは、被分析物上の第1のマーカに結合する第1の構造物に付着

される、ステップと、(b)第1のタグの存在に基づいて被分析物を分割するステップと、(c)第1のタグの信号の強度を低減させるステップと、(d)被分析物を、第2のマーカに結合する第2の構造物と接触させるステップであって、第2の構造物は、第2のタグに付着される、ステップと、(e)第2のタグを検出するステップとを含む。

【0298】

いくつかの側面では、ステップ(b)の分割は、第1のタグおよび第3のタグの存在に基づく。さらなる側面では、ステップ(b)の分割は、マイクロ流体デバイスを用いて実施される。なおもさらなる側面では、ステップ(b)の分割およびステップ(b)またはステップ(e)のうちの少なくとも1つにおける検出は、同一のマイクロ流体デバイス内で起こる。

10

【0299】

種々の側面では、方法が、被分析物上に存在する複数のマーカを検出するために提供され、本方法は、被分析物を第1のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第1のマーカを含み、第1のタグは、第1のマーカに対する親和性を有する、ステップと、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップであって、第1の信号の存在は、第1のマーカの存在を示す、ステップと、第1の信号の存在に基づいて、被分析物を含む流体を分割するステップと、第1の信号の強度を低減させるステップと、被分析物を第2のタグと接触させるステップであって、被分析物は、第2のマーカを含み、第2のタグは、第2のマーカに対する親和性を有する、ステップと、第2のタグによって発せられる第2の信号を検出するステップであって、第2の信号の存在は、第2のマーカの存在を示す、ステップとを含む。

20

【0300】

いくつかの側面では、第1のタグの信号は、50%を上回って低減される。ある側面では、信号の強度を低減させるステップは、放射線を被分析物に印加することによって達成される。さらなる側面では、白色光が、信号の強度を低減させるために使用される。なおもさらなる側面では、レーザーが、信号の強度を低減させるために使用される。他の側面では、発光ダイオードが、信号の強度を低減させるために使用される。いくつかの側面では、信号の強度を低減させるステップは、化学物質を第1のタグに適用することによって達成される。ある側面では、化学物質は、還元剤である。さらなる側面では、還元剤は、ジチオスレイトールである。

30

【0301】

いくつかの側面では、流体を分割するステップは、第1の信号および第3の信号の存在に基づく。さらなる側面では、第1の信号を検出するステップ、第2の信号を検出するステップ、流体を分割するステップ、またはそれらの組み合わせは、マイクロ流体デバイスを使用して実施される。

【0302】

いくつかの側面では、被分析物は、細胞である。ある側面では、細胞は、癌細胞である。さらなる側面では、癌細胞は、希少細胞である。いくつかの側面では、被分析物は、循環腫瘍細胞である。ある側面では、細胞は、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である。さらなる側面では、細胞は、流体中の全細胞集団の1%未満を含む、希少細胞である。ある側面では、被分析物は、解離細胞である。

40

【0303】

いくつかの側面では、流体は、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髓懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される。ある側面では、流体は、全血である。他の側面では、流体は、分画全血である。

【0304】

いくつかの側面では、第1のタグは、フルオロフォアである。さらなる側面では、第1のタグは、抗体である。他の側面では、第1のタグは、核酸から構成されるプローブであ

50

る。ある側面では、本方法はさらに、第1のタグおよび第2のタグから信号を撮像するステップを含む。いくつかの側面では、被分析物は、流体中に存在し、流体は、より大きい体積の流体のアリコートである。さらなる側面では、第1のタグによって発せられる第1の信号を検出するステップは、複数の被分析物上で同時に実施される。

【0305】

ある側面では、分割は、半自動的または自動的に実施される。ある側面では、分割は、アンサンプル決定アリコートランク付けによって実施される。いくつかの側面では、フローサイトメータが、被分析物を分割するために使用されない。

【0306】

さらなる側面では、被分析物は、複数のマーカを含む。いくつかの側面では、複数のマーカーはそれぞれ、バイオマーカーである。ある側面では、被分析物は、発現プロファイルを含み、発現プロファイルは、複数のマーカーによって定義される。

10

【0307】

さらなる側面では、本方法はさらに、被分析物を緩衝液と接触させるステップを含む。なおもさらなるいくつかの側面では、緩衝液は、固定剤を含有する。ある側面では、緩衝液は、透過化剤を含有する。他の側面では、緩衝液は、洗浄緩衝液である。

【0308】

種々の側面では、方法が、第1の細胞型および第2の細胞型を含むサンプルから細胞を単離するために提供され、本方法は、(a)一式の管類を介してサンプルをマイクロ流体チップの中に導入するステップであって、マイクロ流体チップは、(i)一式の管類に流体的に接続される少なくとも1つのチャンネルと、(ii)少なくとも1つのチャンネル内の細胞の信号を検出するように構成される検出器と、(iii)少なくとも1つのチャンネルに流体的に接続される少なくとも1つのチャンバとを備える、ステップと、(b)検出器を越えてサンプルの一部を流動させるステップと、(c)検出器を使用し、サンプルの一部内の第1の細胞型の存在または非存在を検出するステップと、(d)第1の細胞型がサンプルの一部内で検出される場合、サンプルのアリコートをチャンバの中へ指向するステップであって、アリコートは、第1の細胞型を含む、ステップと、(e)ステップ(b)、(c)、および(d)を繰り返し、それによって、チャンバが、サンプル内の第1の細胞型の総数の80%を上回るものと、サンプル内の第2の細胞型の総数の5%未満とを含むように、チャンバ中の複数のアリコートを単離するステップとを含む。

20

30

【0309】

種々の側面では、方法が、サンプルから細胞を単離するために提供され、本方法は、(a)サンプルをマイクロ流体チップの中に導入するステップであって、サンプルは、第1の細胞型と、第2の細胞型とを含み、マイクロ流体チップは、チャンネルと、チャンネル内で発せられる信号を検出するように構成される検出器と、チャンネルと流体連通しているチャンバとを備える、ステップと、(b)チャンネルを通してサンプルの一部を流動させるステップであって、一部は、複数の第1の細胞型、複数の第2の細胞型、またはそれらの組み合わせを含む、ステップと、(c)検出器を使用して、一部内の第1の細胞型の存在または非存在を検出するステップと、(d)第1の細胞型が一部内に存在する場合、一部分をチャンバの中へ指向するステップと、(e)チャンバが、サンプル内に存在する第1の細胞型の総数の80%を上回るものと、サンプル内に存在する第2の細胞型の総数の5%未満とを含むように、十分な回数で(b)、(c)、および(d)を繰り返すステップとを含む。

40

【0310】

いくつかの側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、癌細胞である。ある側面では、癌細胞は、希少細胞である。さらなる側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、循環腫瘍細胞である。なおもさらなる側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、細菌細胞、免疫細胞、胎児細胞、治療後に残留する疾患を示す細胞、または幹細胞である。いくつかの側面では、第1の細胞型および第2の細胞型のうちの少なくとも1つは、サンプル中の全細

50

胞集団の1%未満を含む、希少細胞である。

【0311】

いくつかの側面では、サンプルは、全血、分画血液、血清、血漿、汗、涙、耳内流動物、痰、リンパ液、骨髄懸濁液、リンパ液、尿、唾液、精液、腔内流動物、糞便、経頸管洗浄液、脳脊髄液、脳液、腹水、母乳、硝子体液、房水、皮脂、内リンパ液、腹膜液、胸膜液、耳垢、心膜外液、ならびに呼吸器、腸管、および尿生殖路の分泌物から成る群から選択される。ある側面では、サンプルは、全血である。他の側面では、サンプルは、分画全血である。

【0312】

いくつかの側面では、チャンバは、マイクロ流体チップの外部にある。ある側面では、チャンバは、バイアル、微小遠心管、またはウェルプレート内のウェルである。さらなる側面では、チャンバは、管類を介してチャンバと流体連通している。なおもさらなる側面では、チャンバは、毛細管を介してチャンネルと流体連通している。

10

【0313】

種々の側面では、方法が、マイクロ流体チップ内の流体サンプルのアリコートまたは流体体積を単離するために提供され、アリコートまたは流体体積は、希少粒子を含み、本方法は、(a)アリコート中の希少粒子の存在または非存在を検出するステップと、(b)希少粒子の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)電子作動型弁を開放することによって、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向するステップであって、電子作動型弁は、マイクロ流体チップの外部にあるデバイス上に位置する、ステップとを含む。いくつかの側面では、マイクロ流体チップは、サンプル入力チャンネルと、少なくとも2つの出力チャンネルと、少なくとも1つの指向性流チャンネルとを備え、電子作動型弁は、指向性流チャンネル内の流体の流動を制御する。

20

【0314】

種々の側面では、タグ、サンプル(例えば、細胞または分子であり得る、被分析物等の粒子を含む、例えば、サンプル)、またはサンプルの一部を、チャンネル、マイクロ流体チップ、または選別デバイスの中に導入するステップ、タグ、サンプル、またはサンプルの一部をチャンネルまたは流路を通して流動させるステップ、サンプルまたはその一部にその流動方向を逆転させるステップ、(例えば、放射線源を動作させることによって)タグ、サンプル、またはサンプルの一部を調査するステップ、チャンネルまたは流路内のサンプルまたはその一部の流動を変調させるステップ、流路またはチャンネル内の流動プロファイルを変調させるステップは、コンピュータのプロセッサによって制御または実施されることができる。種々の側面では、1つまたはそれを上回る検出器を動作させるステップ、希少粒子の存在または非存在を検出するステップ、希少粒子の存在または非存在に基づいて、値をアリコート(例えば、細胞または分子等の被分析物を含み得る、サンプルの一部)に割り当てるステップ、アリコートまたはサンプルを分割させるステップ、アリコートに分離手順を受けさせるステップ(例えば、電子作動型弁を開放することによって、割り当てられた値に基づいてアリコートの流動を指向するステップ等)、分離手順を実施するステップ、弁を動作させるステップ、被分析物(例えば、細胞または分子)等の粒子を動作させるステップ、被分析物等の粒子を放出するステップ、サンプルまたはその一部を濾過するステップ、もしくはサンプルまたはその一部を収集するステップは、コンピュータのプロセッサによって制御されることができる。

30

40

【0315】

疾患の診断

いくつかの側面では、本方法を使用して単離される被分析物(例えば、細胞)はさらに、標的治療を開発するように(例えば、遺伝子型または表現型に従って)亜集団分析を受けることができる。例えば、単離された細胞(例えば、腫瘍細胞)は、薬剤標的の発現の存在または程度を判定するように、具体的バイオマーカ(例えば、薬剤標的)に結合するタグ(例えば、蛍光抗体)とともに培養されることができる。いったん薬剤標的の発現が確認されると、特定の薬剤標的の発現を標的化するように特異的に開発される薬剤が、治

50

療のために選定されることができる。一実施例では、単離された腫瘍細胞は、CTCを流す乳房腫瘍がHer2陽性であるかどうかを判定するように、Her2受容体に特異的に結合する蛍光抗体とともに培養されることができる。単離された腫瘍細胞が、高いHer2発現を呈する場合、Herceptin(トラスツズマブ)が、HER2タンパク質過剰発現の機能を標的化して遮断するように設計されているため、本薬剤が治療として使用されることができる。BCR-ABLまたはPDGFR(薬剤Gleevecによって標的化される)、ERBB2(Herceptinによって標的化される)、EFGR(Iressa、Tarcevaによって標的化される)、RARアルファ(ATRAによって標的化される)、エストロゲン受容体(タモキシフェンによって標的化される)、アロマターゼ(レトロゾールによって標的化される)、アンドロゲン受容体(フルタミド、ピカルタミドによって標的化される)、CD20(リツキシマブによって標的化される)、VEGF受容体(Avastinによって標的化される)を含む、他の既知の薬剤標的もまた、適切な化学療法計画を処方する前に単離された腫瘍細胞から同様に選抜されることができる。

【0316】

いくつかの側面では、被分析物は、希少粒子(例えば、癌細胞または循環腫瘍細胞(CTC))であり得る。他の場合では、希少粒子は、寄生細胞または生物、例えば、ジアルジアまたはクリプトスポリジウムの種、原虫の種に感染した赤血球、HIVに感染したリンパ球または白血球、母体血中の胎児細胞、幹細胞、プリオンに感染した細胞、CD4+T細胞、および同等物であり得る。

【0317】

いくつかの側面では、本方法は、対象からの血液サンプル中の循環腫瘍細胞を検出するステップを含むことができる。本方法は、eDARを含むことができる。ある側面では、対象は、癌と診断された患者であり得る。いくつかの側面では、癌は、ステージI、ステージII、ステージIII、またはステージIVであり得る。いくつかの側面では、循環腫瘍細胞(CTC)が、癌と以前に診断された患者からの血液サンプル中で検出されることができる。これらの場合では、患者はさらに、転移癌と診断され得る。

【0318】

いくつかの側面では、本方法は、固形腫瘍と以前に診断された対象で転移癌を診断するために使用されることができ、本方法は、(a)対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップと、(b)CTCの存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップとを含む。

【0319】

いくつかの側面では、血液サンプル中のCTCの非存在は、転移癌を有していない対象と相関し得る。血液サンプル中の少なくとも1つのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関し得る。いくつかの側面では、血液中の少なくともいくつかのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関し得る。本方法はさらに、(d)CTCが血液サンプル中で検出されない場合には転移癌を有していないものとして対象を診断するステップ、または少なくとも1つのCTCが血液サンプル中で検出される場合には転移癌を有するものとして対象を診断するステップを含むことができる。

【0320】

本開示はまた、癌と診断された対象を監視するための方法も提供する。本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法を使用して、対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップを含むことができる。いくつかの側面では、患者は、規則的な間隔で、例えば、1年に少なくとも1回、1年に少なくとも2回、1年に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、もしくは1年に少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、転移癌への癌の進行に関して監視されることができる。いくつかの側面では、対象は、1ヶ月に1回、もしくは1ヶ月に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそ

10

20

30

40

50

れを上回って、監視されることができる。いくつかの側面では、対象は、1ヶ月に約1回、もしくは1ヶ月に少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、監視されることができる。血液サンプル中のCTCの非存在は、転移癌を有していない対象と相関し得る。血液サンプル中の少なくとも1つのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関し得る。血液中の少なくともいくつかのCTCの存在は、転移癌を有する対象と相関し得る。

【0321】

CTCが血液サンプル中で検出される場合において、本方法はさらに、1つまたは複数のCTC細胞の1つまたはそれを上回る特性を識別するように、CTCを含有するものとして識別される1つまたはそれを上回るアリコートにさらなる分析を受けさせるステップを含むことができる。例えば、CTCを含有するアリコートまたはアリコートのプールは、1つまたはそれを上回る癌特異的表面抗原に対して特異的な1つまたはそれを上回る検出試薬と接触されることができる。解析され得る、癌特異的表面抗原の非限定的実施例は、限定ではないが、BCR-ABLまたはPDGFR（薬剤Gleevecによって標的化される）、ERBB2（Herceptinによって標的化される）、EGFR（Iressa、Tarcevaによって標的化される）、RARアルファ（ATRAによって標的化される）、エストロゲン受容体（タモキシフェンによって標的化される）、アロマターゼ（レトロゾールによって標的化される）、アンドロゲン受容体（フルタミド、ピカルタミドによって標的化される）、CD20（リツキシマブによって標的化される）、VEGF受容体（Avastinによって標的化される）、および同等物を含む。本明細書で提供される方法およびデバイスは、癌以外の疾患を診断するために使用されることができる。いくつかの側面では、マラリアが診断されることができ、本方法は、原虫に感染した赤血球を検出するステップを含む。別の場合では、HIV感染を診断するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、HIVウイルスに感染したリンパ球または白血球を検出するステップを含む。さらに別の場合では、プリオンと関連付けられる疾患を診断するための方法が提供され、本方法は、ヒトまたは他の動物からの生物学的流体中でプリオンを検出するステップを含む。

【0322】

いくつかの側面では、被分析物は、希少細胞であり、希少細胞は、細菌細胞である。いくつかの側面では、細菌細胞は、全血サンプル中に存在する。他の側面では、デバイス、方法、システム、または装置が、全血中の希少細菌細胞の存在を検出するために使用される。いくつかの側面では、デバイス、方法、システム、または装置が、細菌感染または敗血症を特性評価または管理することに関連する診断、予後、または他の治療パラメータを提供するために、全血サンプル中の希少細菌細胞の存在を検出するように使用される。

【0323】

疾患の予後

本開示は、流体中の被分析物の存在と関連付けられる疾患または症状の予後のための方法を提供する。いくつかの側面では、被分析物は、生物学的粒子であり得る。いくつかの側面では、流体は、生物学的流体であり得る。いくつかの側面では、本方法は、(a)対象からのサンプルのアリコート中の被分析物の存在または非存在を検出するステップと、(b)被分析物の存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップと、(d)被分析物がサンプル中で検出されない場合に良好な予後、または被分析物がサンプル中で検出される場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含む。

【0324】

いくつかの側面では、アリコートは、アリコート中の被分析物の数量または識別に基づいて、値を割り当てられることができる。いくつかの側面では、良好または不良な予後が、サンプル中の被分析物の数量に基づいて提供されることができる。例えば、良好な予後は、サンプル中の被分析物の数量が所定の参照値より少ない場合に提供されることができ、不良な予後は、サンプル中の被分析物の数量が参照値に等しいまたはそれを上回る場合

10

20

30

40

50

に提供されることができる。いくつかの側面では、所定の参照値が、特定の治療に応答する可能性、またはある期間、例えば、少なくとも6ヶ月、もしくは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年、またはそれを上回る期間にわたる全または無病生存率の可能性と関連付けられることができる。

【0325】

いくつかの側面では、本明細書で提供される方法が、希少粒子と関連付けられる任意の疾患の予後を提供するために使用されることができる。いくつかの側面では、マリアの予後を提供するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、個人からの血液サンプル中の原虫に感染した赤血球の数を判定するステップを含むことができる。いくつかの側面では、血液サンプル中で検出される感染赤血球の総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、もしくはサンプル中で検出される感染赤血球の総数が参照値に等しいまたはそれを上回る場合に不良な予後のいずれかが、提供されることができる。いくつかの側面では、HIV感染の予後を提供するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、個人からの血液サンプル中のHIVウイルスに感染したリンパ球または白血球の数を判定するステップと、血液サンプル中で検出される感染細胞の総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、もしくはサンプル中で検出される感染細胞の総数が所定の参照値に等しいまたはそれを上回る場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含むことができる。いくつかの側面では、プリオンと関連付けられる疾患の予後を提供するための方法が提供され、本方法は、本明細書で提供されるeDAR方法および/または装置を使用して、対象からの生物学的流体サンプル中のプリオンの数を判定するステップと、サンプル中で検出されるプリオンの総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、もしくはサンプル中で検出されるプリオンの総数が所定の参照値に等しいまたはそれを上回る場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含むことができる。

【0326】

いくつかの側面では、本開示は、固形腫瘍と診断された対象の予後を提供するための方法を提供する。いくつかの側面では、本方法は、(a)対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップと、(b)CTCの存在または非存在に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップと、(d)CTCが検出されない場合に良好な予後、またはCTCが検出される場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含む。

【0327】

いくつかの側面では、方法が、転移癌と診断された対象の予後を提供するために提供される。いくつかの側面では、本方法は、(a)対象からの血液サンプルのアリコート中のCTCの存在または非存在を検出するステップと、(b)アリコート中で検出されるCTCの数に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)割り当てられた値に基づいてアリコートの流動または収集を指向するステップと、(d)血液サンプル中で検出されるCTCの総数が所定の参照値より少ない場合に良好な予後、もしくはサンプル中で検出されるCTCの総数が参照値に等しいまたはそれを上回る場合に不良な予後のいずれかを提供するステップとを含む。

【0328】

いくつかの側面では、所定の参照値が、特定の治療に応答する可能性、またはある期間、例えば、少なくとも6ヶ月、もしくは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年、またはそれを上回る期間にわたる全または無病生存率の可能性と関連付けられることができる。

【0329】

治療への疾患の応答

本開示は、疾患の進行または治療への応答を監視するための方法を提供する。いくつかの側面では、本方法は、流体サンプル中の被分析物を検出するステップを含むことができ

10

20

30

40

50

る。いくつかの側面では、本方法は、(a)第1の時間に対象から採取された第1の生物学的サンプルの複数のアリコート中の被分析物の存在または非存在を検出するステップと、(b)希少粒子の存在、非存在、数量、または識別に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(c)第1のサンプルからの全てのアリコートの合計値を判定するステップと、(d)第2の時間に対象から採取された第2の生物学的サンプルの複数のアリコート中の被分析物の存在または非存在を検出するステップと、(e)被分析物の存在、非存在、数量、または識別に基づいて、値をアリコートに割り当てるステップと、(f)第2のサンプルからの全てのアリコートの合計値を判定するステップと、(g)第1のサンプルに割り当てられた合計値を第2のサンプルに割り当てられた合計値と比較するステップとを含み、第1のサンプルと比較して、第2のサンプルに割り当てられた増加値は、疾患の進行および/または治療への不良な応答と関連し、ならびに/もしくは第1のサンプルと比較して、第2のサンプルに割り当てられた減少値は、疾患の退行および/または治療への良好な応答と関連する。いくつかの側面では、アリコートはさらに、収集、さらなる濃縮、またはさらなる分析のために割り当てられた値に基づいて、特定のチャンネルまたはチャンバ(チャンネル付き)の中へ指向されることができる。

10

【0330】

いくつかの側面では、疾患の診断または治療計画の開始後に定期的に、疾患の進行または治療への応答を監視する方法が、採用されることができる。例えば、サンプルが、1年に少なくとも1回、1年に少なくとも2回、1年に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、もしくは1年に少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、対象から収集されることができる。いくつかの側面では、対象は、1ヶ月に1回、もしくは1ヶ月に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、監視されることができる。いくつかの側面では、対象は、1ヶ月に約1回、もしくは1ヶ月に少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれを上回って、監視されることができる。

20

【0331】

疾患の進行または治療への不良な応答が見出される、いくつかの側面では、本方法はさらに、治療を割り当てるステップ、投薬計画を増加させるステップ、治療計画を変更するステップ、および同等物を含むことができる。いくつかの側面では、希少粒子と関連付けられる疾患または症状は、癌、マラリア、HIV/AIDS、プリオン関連疾患、または同等物であり得る。

30

【0332】

デジタル処理デバイス

いくつかの実施形態では、本明細書に説明されるプラットフォーム、システム、媒体、および方法は、デジタル処理デバイスまたは同デバイスの使用を含む。さらなる実施形態では、デジタル処理デバイスは、デバイスの機能を実施する、1つまたはそれを上回るハードウェア中央処理ユニット(CPU)、汎用グラフィック処理ユニット(GPGPU)、もしくはフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)を含む。なおもさらなる実施形態では、デジタル処理デバイスはさらに、実行可能命令を実施するように構成されるオペレーティングシステムを備える。いくつかの実施形態では、デジタル処理デバイスは、随意に、コンピュータネットワークに接続される。さらなる実施形態では、デジタル処理デバイスは、随意に、ワールドワイドウェブにアクセスするようにインターネットに接続される。なおもさらなる実施形態では、デジタル処理デバイスは、随意に、クラウドコンピューティングインフラストラクチャに接続される。他の実施形態では、デジタル処理デバイスは、随意に、イントラネットに接続される。他の実施形態では、デジタル処理デバイスは、随意に、データ記憶デバイスに接続される。

40

【0333】

本明細書の説明によると、好適なデジタル処理デバイスは、非限定的実施例として、サーバコンピュータ、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、ノートブックコンピュータ、サブノートブックコンピュータ、ネットブックコンピュータ、ネットパ

50

ッドコンピュータ、セットトップコンピュータ、メディアストリーミングデバイス、ハンドヘルドコンピュータ、インターネットアプライアンス、モバイルスマートフォン、タブレットコンピュータ、携帯情報端末、ビデオゲーム機、および車両を含む。当業者は、多くのスマートフォンが、本明細書に説明されるシステムで使用するために好適であることを認識するであろう。当業者はまた、随意のコンピュータネットワーク接続性を伴う選択的テレビ、ビデオプレーヤ、およびデジタル音楽プレーヤが本明細書に説明されるシステムで使用するために好適であることも認識するであろう。好適なタブレットコンピュータは、当業者に公知である、ブックレット、スレート、および転換可能構成を含む。

【0334】

いくつかの実施形態では、デジタル処理デバイスは、実行可能命令を実施するように構成されるオペレーティングシステムを含む。オペレーティングシステムは、例えば、デバイスのハードウェアを管理し、アプリケーションの実行のためのサービスを提供する、プログラムおよびデータを含む、ソフトウェアを含む。当業者は、好適なサーバオペレーティングシステムが、非限定的実施例として、FreeBSD、OpenBSD、NetBSD（登録商標）、Linux（登録商標）、Apple（登録商標）Mac OS X Server（登録商標）、Oracle（登録商標）Solaris（登録商標）、Windows Server（登録商標）、およびNovell（登録商標）NetWare（登録商標）を含むことを認識するであろう。当業者は、好適なパーソナルコンピュータオペレーティングシステムが、非限定的実施例として、Microsoft（登録商標）Windows（登録商標）、Apple（登録商標）Mac OS X（登録商標）、UNIX（登録商標）、およびGNU/Linux（登録商標）等のUNIX（登録商標）様オペレーティングシステムを含むことを認識するであろう。いくつかの実施形態では、オペレーティングシステムは、クラウドコンピューティングによって提供される。当業者はまた、好適なモバイルスマートフォンオペレーティングシステムが、非限定的実施例として、Nokia（登録商標）Symbian（登録商標）OS、Apple（登録商標）iOS（登録商標）、Research In Motion（登録商標）BlackBerry OS（登録商標）、Google（登録商標）Android（登録商標）、Microsoft（登録商標）Windows Phone（登録商標）OS、Microsoft（登録商標）Windows Mobile（登録商標）OS、Linux（登録商標）、およびPalm（登録商標）WebOS（登録商標）を含むことも認識するであろう。当業者はまた、好適なメディアストリーミングデバイスオペレーティングシステムが、非限定的実施例として、Apple TV（登録商標）、Roku（登録商標）、Boxee（登録商標）、Google TV（登録商標）、Google Chromecast（登録商標）、Amazon Fire（登録商標）、およびSamsung（登録商標）HomeSync（登録商標）を含むことも認識するであろう。当業者はまた、好適なビデオゲーム機オペレーティングシステムが、非限定的実施例として、Sony（登録商標）PS3（登録商標）、Sony（登録商標）PS4（登録商標）、Microsoft（登録商標）Xbox 360（登録商標）、Microsoft Xbox One、Nintendo（登録商標）Wii（登録商標）、Nintendo（登録商標）Wii U（登録商標）、およびOuya（登録商標）を含むことも認識するであろう。

【0335】

いくつかの実施形態では、本デバイスは、記憶および/またはメモリデバイスを含む。記憶および/またはメモリデバイスは、一時的または恒久的にデータまたはプログラムを記憶するために使用される、1つまたはそれを上回る物理的装置である。いくつかの実施形態では、本デバイスは、揮発性メモリであり、記憶された情報を維持するために電力を要求する。いくつかの実施形態では、本デバイスは、不揮発性メモリであり、デジタル処理デバイスが電力供給されていないときに記憶された情報を留保する。さらなる実施形態では、不揮発性メモリは、フラッシュメモリを備える。いくつかの実施形態では、不揮発性メモリは、ダイナミックランダムアクセスメモリ（DRAM）を備える。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、不揮発性メモリは、強誘電体ランダムアクセスメモリ（FRAM（登録商標））を備える。いくつかの実施形態では、不揮発性メモリは、相変化ランダムアクセスメモリ（PRAM）を備える。他の実施形態では、本デバイスは、非限定的実施例として、CD-ROM、DVD、フラッシュメモリデバイス、磁気ディスクドライブ、磁気テープディスク、光ディスクドライブ、およびクラウドコンピューティングベースの記憶装置を含む、記憶デバイスである。さらなる実施形態では、記憶および/またはメモリデバイスは、本明細書に開示されるもの等のデバイスの組み合わせである。

【0336】

いくつかの実施形態では、デジタル処理デバイスは、視覚情報をユーザに送信するためのディスプレイを含む。いくつかの実施形態では、ディスプレイは、陰極線管（CRT）である。いくつかの実施形態では、ディスプレイは、液晶ディスプレイ（LCD）である。さらなる実施形態では、ディスプレイは、薄膜トランジスタ液晶ディスプレイ（TFT-LCD）である。いくつかの実施形態では、ディスプレイは、有機発光ダイオード（OLED）ディスプレイである。種々のさらなる実施形態では、OLEDディスプレイは、パッシブマトリクスOLED（PMOLED）またはアクティブマトリクスOLED（AMOLED）ディスプレイである。いくつかの実施形態では、ディスプレイは、プラズマディスプレイである。他の実施形態では、ディスプレイは、ビデオプロジェクタである。なおもさらなる実施形態では、ディスプレイは、本明細書に開示されるもの等のデバイスの組み合わせである。

【0337】

いくつかの実施形態では、デジタル処理デバイスは、ユーザから情報を受信するための入力デバイスを含む。いくつかの実施形態では、入力デバイスは、キーボードである。いくつかの実施形態では、入力デバイスは、非限定的実施例として、マウス、トラックボール、トラックパッド、ジョイスティック、ゲームコントローラ、またはスタイラスを含む、ポインティングデバイスである。いくつかの実施形態では、入力デバイスは、タッチスクリーンまたはマルチタッチスクリーンである。他の実施形態では、入力デバイスは、声または他の音声入力を捕捉するためのマイクロホンである。他の実施形態では、入力デバイスは、運動または視覚入力を捕捉するためのビデオカメラまたは他のセンサである。さらなる実施形態では、入力デバイスは、Kinect、Leap Motion、または同等物である。なおもさらなる実施形態では、入力デバイスは、本明細書に開示されるもの等のデバイスの組み合わせである。

【0338】

図28を参照すると、特定の実施形態では、例示的デジタル処理デバイス2801は、粒子収集デバイスを動作させるようにプログラムまたは別様に構成される。デバイス2801は、例えば、処理ステップを実施すること等の本開示の粒子収集デバイスの種々の側面を調整することができる。本実施形態では、デジタル処理デバイス2801は、単一コアもしくはマルチコアプロセッサ、または並列処理のための複数のプロセッサであり得る、中央処理ユニット（CPU、また、本明細書では「プロセッサ」および「コンピュータプロセッサ」）2805を含む。デジタル処理デバイス2801はまた、メモリもしくはメモリ場所2810（例えば、ランダムアクセスメモリ、読取専用メモリ、フラッシュメモリ）、電子記憶ユニット2815（例えば、ハードディスク）、1つまたはそれを上回る他のシステムと通信するための通信インターフェース2820（例えば、ネットワークアダプタ）、ならびにキャッシュ、他のメモリ、データ記憶装置、および/または電子ディスプレイアダプタ等の周辺デバイス2825も含む。メモリ2810、記憶ユニット2815、インターフェース2820、および周辺デバイス2825は、マザーボード等の通信バス（実線）を通してCPU2805と通信する。記憶ユニット2815は、データを記憶するためのデータ記憶ユニット（またはデータリポジトリ）であり得る。デジタル処理デバイス2801は、通信インターフェース2820の助けを借りてコンピュータネットワーク（「ネットワーク」）2830に動作可能に結合されることができる。ネットワーク2830は、インターネット、インターネットおよび/またはエクストラネット、

またはインターネットと通信するイントラネットならびにノもしくはエクストラネットであり得る。ネットワーク2830は、ある場合には、電気通信およびノまたはデータネットワークである。ネットワーク2830は、クラウドコンピューティング等の分散型コンピューティングを可能にし得る、1つまたはそれを上回るコンピュータサーバを含むことができる。ネットワーク2830は、ある場合には、デバイス2801の助けを借りて、デバイス2801に結合されるデバイスがクライアントまたはサーバとして挙動することを可能にし得る、ピアツーピアネットワークを実装することができる。

【0339】

図28を参照し続けると、CPU2805は、プログラムまたはソフトウェアで具現化され得る、一連の機械可読命令を実行することができる。命令は、メモリ2810等のメモリ場所の中に記憶されてもよい。命令は、続いて、本開示の方法を実装するようにCPU2805をプログラムまたは別様に構成し得る、CPU2805に指向されることができる。CPU2805によって実施される動作の実施例は、フェッチ、デコード、実行、およびライトバックを含むことができる。CPU2805は、集積回路等の回路の一部であり得る。デバイス2801の1つまたはそれを上回る他の構成要素が、回路の中に含まれることができる。ある場合には、回路は、特定用途向け集積回路(ASIC)またはフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)である。

10

【0340】

図28を参照し続けると、記憶ユニット2815は、ドライバ、ライブラリ、および保存されたプログラム等のファイルを記憶することができる。記憶ユニット2815は、ユーザデータ、例えば、ユーザ選好およびユーザプログラムを記憶することができる。デジタル処理デバイス2801は、ある場合には、イントラネットまたはインターネットを通して通信する遠隔サーバ上に位置する等の外部にある、1つまたはそれを上回る付加的データ記憶ユニットを含むことができる。

20

【0341】

図28を参照し続けると、デジタル処理デバイス2801は、ネットワーク2830を通して1つまたはそれを上回る遠隔コンピュータシステムと通信することができる。例えば、デバイス2801は、ユーザの遠隔コンピュータシステムと通信することができる。遠隔コンピュータシステムの実施例は、パーソナルコンピュータ(例えば、ポータブルPC)、スレートもしくはタブレットPC(例えば、Apple(登録商標) iPad(登録商標)、Samsung(登録商標) Galaxy Tab)、電話、スマートフォン(例えば、Apple(登録商標) iPhone(登録商標)、Android対応デバイス、BlackBerry(登録商標))、または携帯情報端末を含む。

30

【0342】

本明細書に説明されるような方法は、例えば、メモリ2810または電子記憶ユニット2815の上等のデジタル処理デバイス2801の電子記憶場所の上に記憶された機械(例えば、コンピュータプロセッサ)実行可能コードを介して、実装されることができる。機械実行可能または機械可読コードは、ソフトウェアの形態で提供されることができる。使用中に、コードは、プロセッサ2805によって実行されることができる。ある場合には、コードは、記憶ユニット2815から読み出され、プロセッサ2805による容易なアクセスのためにメモリ2810上に記憶されることができる。ある状況では、電子記憶ユニット1315は、除外されることができ、機械実行可能命令は、メモリ2810上に記憶される。

40

【0343】

非一過性のコンピュータ可読記憶媒体

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプラットフォーム、システム、媒体、および方法は、随意にネットワーク化されたデジタル処理デバイスのオペレーティングシステムによって実行可能な命令を含む、プログラムでエンコードされる、1つまたはそれを上回る非一過性のコンピュータ可読記憶媒体を含む。さらなる実施形態では、コンピュータ可読記憶媒体は、デジタル処理デバイスの有形コンポーネントである。なおもさらな

50

る実施形態では、コンピュータ可読記憶媒体は、随意に、デジタル処理デバイスから除去可能である。いくつかの実施形態では、コンピュータ可読記憶媒体は、非限定的実施例として、CD-ROM、DVD、フラッシュメモリデバイス、ソリッドステートメモリ、磁気ディスクドライブ、磁気テープドライブ、光ディスクドライブ、クラウドコンピューティングシステムおよびサービス、ならびに同等物を含む。ある場合には、プログラムおよび命令は、恒久的、実質的に恒久的、半恒久的、または非一過性に、媒体上にエンコードされる。

【0344】

コンピュータプログラム

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプラットフォーム、システム、媒体、および方法は、少なくとも1つのコンピュータプログラムまたは同コンピュータプログラムの使用を含む。コンピュータプログラムは、規定タスクを実施するように書かれる、デジタル処理デバイスのCPUの中で実行可能な命令のシーケンスを含む。コンピュータ可読命令は、特定のタスクを実施する、または特定の抽象データ型を実装する、機能、オブジェクト、アプリケーションプログラミングインターフェース(API)、データ構造、および同等物等のプログラムモジュールとして実装されてもよい。本明細書で提供される本開示を踏まえて、当業者は、コンピュータプログラムが種々の言語の種々のバージョンで書かれ得ることを認識するであろう。

10

【0345】

コンピュータ可読命令の機能性は、種々の環境内で所望に応じて組み合わせられる、または分散されてもよい。いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、命令の1つのシーケンスを備える。いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、命令の複数のシーケンスを備える。いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムが、1つの場所から提供される。他の実施形態では、コンピュータプログラムは、複数の場所から提供される。種々の実施形態では、コンピュータプログラムは、1つまたはそれを上回るソフトウェアモジュールを含む。種々の実施形態では、コンピュータプログラムは、部分的または全体的に、1つまたはそれを上回るウェブアプリケーション、1つまたはそれを上回るモバイルアプリケーション、1つまたはそれを上回る独立型アプリケーション、1つまたはそれを上回るウェブブラウザプラグイン、拡張機能、アドイン、もしくはアドオン、またはそれらの組み合わせを含む。

20

【0346】

ウェブアプリケーション

いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、ウェブアプリケーションを含む。本明細書で提供される本開示を踏まえて、当業者は、ウェブアプリケーションが、種々の実施形態では、1つまたはそれを上回るソフトウェアフレームワークおよび1つまたはそれを上回るデータベースシステムを利用することを認識するであろう。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、Microsoft(登録商標)、NETまたはRuby on Rails(ROOR)等のソフトウェアフレームワーク上に作成される。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、非限定的実施例として、関係、非関係、オブジェクト指向、連想、およびXMLデータベースシステムを含む、1つまたはそれを上回るデータベースシステムを利用する。さらなる実施形態では、好適な関係データベースシステムは、非限定的実施例として、Microsoft(登録商標)SQLサーバ、mySQLTM、およびOracle(登録商標)を含む。当業者はまた、ウェブアプリケーションが、種々の実施形態では、1つまたはそれを上回る言語の1つまたはそれを上回るバージョンで書かれることも認識するであろう。ウェブアプリケーションは、1つまたはそれを上回るマークアップ言語、プレゼンテーション定義言語、クライアント側スクリプト言語、サーバ側スクリプト言語、データベースクエリ言語、もしくはそれらの組み合わせで書かれてもよい。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、ある程度、ハイパーテキストマークアップ言語(HTML)、拡張可能ハイパーテキストマークアップ言語(XHTML)、または拡張可能マークアップ言語(XML)等のマークア

30

40

50

ップ言語で書かれる。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、ある程度、カスケーディングスタイルシート（CSS）等のプレゼンテーション定義言語で書かれる。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、ある程度、非同期JavaScriptおよびXML（AJAX）、Flash（登録商標）Actionscript、JavaScript、またはSilverlight（登録商標）等のクライアント側スクリプト言語で書かれる。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、ある程度、Active Server Pages（ASP）、ColdFusion（登録商標）、Perl、Java（登録商標）、JavaServer Pages（JSP）、Hypertext Preprocessor（PHP）、PythonTM、Ruby、Tcl、Smalltalk、WebDNA（登録商標）、またはGroovy等のサーバ側スクリプト言語で書かれる。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、ある程度、構造化クエリ言語（SQL）等のデータベースクエリ言語で書かれる。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、IBM（登録商標）Lotus Domino（登録商標）等の企業サーバ製品を統合する。いくつかの実施形態では、ウェブアプリケーションは、メディアプレーヤ要素を含む。種々のさらなる実施形態では、メディアプレーヤ要素は、非限定的実施例として、Adobe（登録商標）Flash（登録商標）、HTML 5、Apple（登録商標）QuickTime（登録商標）、Microsoft（登録商標）Silverlight（登録商標）、Java（登録商標）、およびUnity（登録商標）を含む、多くの好適なマルチメディア技術のうちの1つまたはそれを上回るものを利用する。

10

20

【0347】

モバイルアプリケーション

いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、モバイルデジタル処理デバイスに提供されるモバイルアプリケーションを含む。いくつかの実施形態では、モバイルアプリケーションは、モバイルデジタル処理デバイスが製造されるときに、それに提供される。他の実施形態では、モバイルアプリケーションは、本明細書に説明されるコンピュータネットワークを介して、モバイルデジタル処理デバイスに提供される。

【0348】

本明細書で提供される本開示に照らして、モバイルアプリケーションは、当技術分野に公知であるハードウェア、言語、および開発環境を使用して、当業者に公知である技法によって作成される。当業者は、モバイルアプリケーションがいくつかの言語で書かれることを認識するであろう。好適なプログラミング言語は、非限定的実施例として、C、C++、C#、Objective-C、Java（登録商標）、JavaScript、Pascal、Object Pascal、PythonTM、Ruby、VB.NET、WML、およびCSSの有無別のXHTML/HTML、またはそれらの組み合わせを含む。

30

【0349】

好適なモバイルアプリケーション開発環境は、いくつかのソースから利用可能である。市販の開発環境は、非限定的実施例として、Airplay SDK、alchemo、Appcelerator（登録商標）、Celsius、Bedrock、FlashLite、.NET Compact Framework、Rhomobile、およびWorkLight Mobile Platformを含む。非限定的実施例として、Lazarus、MobiFlex、MoSync、およびPhonegapを含む、他の開発環境が、費用を伴わずに利用可能である。また、モバイルデバイス製造業者は、非限定的実施例として、iPhone（登録商標）およびiPad（登録商標）（iOS）SDK、AndroidTM SDK、BlackBerry（登録商標）SDK、BREW SDK、Palm（登録商標）OS SDK、Symbian SDK、webOS SDK、ならびにWindows（登録商標）Mobile SDKを含む、ソフトウェア開発者キットを配布する。

40

【0350】

50

当業者は、非限定的実施例として、Apple（登録商標）App Store、Google（登録商標）Play、Chrome WebStore、BlackBerry（登録商標）App World、Palmデバイス用のApp Store、webOS用のApp Catalog、モバイル用のWindows（登録商標）Marketplace、Nokia（登録商標）デバイス用のOviStore、Samsung（登録商標）Apps、およびNintendo（登録商標）DSiShopを含む、いくつかの商業フォーラムが、モバイルアプリケーションの配布のために利用可能であることを認識するであろう。

【0351】

独立型アプリケーション

いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、既存のプロセスへのアドオンではなく、例えば、プラグインではなく、独立コンピュータプロセスとして起動されるプログラムである、独立型アプリケーションを含む。当業者は、独立型アプリケーションが、多くの場合、コンパイルされることを認識するであろう。コンパイラは、プログラミング言語で書かれたソースコードを、アセンブリ言語または機械コード等のバイナリオブジェクトコードに変換する、コンピュータプログラムである。好適なコンパイルされたプログラミング言語は、非限定的実施例として、C、C++、Objective-C、COBOL、Delphi、Eiffel、Java（登録商標）、Lisp、PythonTM、Visual Basic、およびVB.NET、またはそれらの組み合わせを含む。コンパイルは、多くの場合、少なくとも部分的に、実行可能プログラムを作成するように実施される。いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、1つまたはそれを上回る実行可能なコンパイルされたアプリケーションを含む。

【0352】

ウェブブラウザプラグイン

いくつかの実施形態では、コンピュータプログラムは、ウェブブラウザプラグイン（例えば、拡張機能）を含む。コンピューティングでは、プラグインは、具体的機能性をより大型のソフトウェアアプリケーションに追加する、1つまたはそれを上回るソフトウェアコンポーネントである。ソフトウェアアプリケーションのメーカーは、第三者開発者が、アプリケーションを拡張する能力を作成すること、新しい特徴を容易に追加することを支援すること、およびアプリケーションのサイズを縮小することを可能にするためのプラグインをサポートする。サポートされるとき、プラグインは、ソフトウェアアプリケーションの機能性をカスタマイズすることを可能にする。例えば、プラグインは、ビデオを再生する、双方向性を生成する、ウイルスに関してスキャンする、および特定のファイルタイプを表示するために、ウェブブラウザで一般的に使用されている。当業者は、Adobe（登録商標）Flash（登録商標）Player、Microsoft（登録商標）Silverlight（登録商標）、およびApple（登録商標）QuickTime（登録商標）を含む、いくつかのウェブブラウザプラグインに精通しているであろう。いくつかの実施形態では、ツールバーは、1つまたはそれを上回るウェブブラウザ拡張機能、アドイン、もしくはアドオンを備える。いくつかの実施形態では、ツールバーは、1つまたはそれを上回るエクスプローラバー、ツールバンド、もしくはデスクバンドを備える。

【0353】

本明細書で提供される本開示に照らして、当業者は、非限定的実施例として、C++、Delphi、Java（登録商標）、PHP、PythonTM、およびVB.NET、またはそれらの組み合わせを含む、種々のプログラミング言語においてプラグインの開発を可能にする、いくつかのプラグインフレームワークが利用可能であることを認識するであろう。

【0354】

ウェブブラウザ（インターネットブラウザとも呼ばれる）は、ワールドワイドウェブ上で情報リソースを読み出し、提示し、トラバースするために、ネットワーク接続デジタル処理デバイスと併用するために設計される、ソフトウェアアプリケーションである。好適

10

20

30

40

50

なウェブブラウザは、非限定的実施例として、Microsoft（登録商標）Internet Explorer（登録商標）、Mozilla（登録商標）Firefox（登録商標）、Google（登録商標）Chrome、Apple（登録商標）Safari（登録商標）、Opera Software（登録商標）Opera（登録商標）、およびKDE Konquerorを含む。いくつかの実施形態では、ウェブブラウザは、モバイルウェブブラウザである。モバイルウェブブラウザ（マイクロブラウザ、ミニブラウザ、および無線ブラウザとも呼ばれる）は、非限定的実施例として、ハンドヘルドコンピュータ、タブレットコンピュータ、ネットブックコンピュータ、サブノートブックコンピュータ、スマートフォン、音楽プレーヤ、携帯情報端末（PDA）、およびハンドヘルドビデオゲームシステムを含む、モバイルデジタル処理デバイス上で使用するために設計される。好適なモバイルウェブブラウザは、非限定的実施例として、Google（登録商標）Android（登録商標）ブラウザ、RIM BlackBerry（登録商標）ブラウザ、Apple（登録商標）Safari（登録商標）、Palm（登録商標）Blazer、Palm（登録商標）WebOS（登録商標）ブラウザ、モバイル用のMozilla（登録商標）Firefox（登録商標）、Microsoft（登録商標）Internet Explorer（登録商標）Mobile、Amazon（登録商標）Kindle（登録商標）Basic Web、Nokia（登録商標）ブラウザ、Opera Software（登録商標）Opera（登録商標）Mobile、およびSony（登録商標）PSP™ブラウザを含む。

10

【0355】

20

ソフトウェアモジュール

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプラットフォーム、システム、媒体、および方法は、ソフトウェア、サーバ、および/またはデータベースモジュール、もしくは同部分の使用を含む。本明細書で提供される本開示に照らして、ソフトウェアモジュールは、当技術分野に公知である機械、ソフトウェア、および言語を使用して、当業者に公知である技法によって作成される。本明細書に開示されるソフトウェアモジュールは、多数の方法で実装される。種々の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、ファイル、コードの区分、プログラミングオブジェクト、プログラミング構造、またはそれらの組み合わせを備える。さらなる種々の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、複数のファイル、コードの複数の区分、複数のプログラミングオブジェクト、複数のプログラミング構造、またはそれらの組み合わせを備える。種々の実施形態では、1つまたはそれを上回るソフトウェアモジュールは、非限定的実施例として、ウェブアプリケーション、モバイルアプリケーション、および独立型アプリケーションを備える。いくつかの実施形態では、ソフトウェアモジュールは、1つのコンピュータプログラムまたはアプリケーションの中にある。他の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、1つを上回るコンピュータプログラムまたはアプリケーションの中にある。いくつかの実施形態では、ソフトウェアモジュールは、1つの機械上でホストされる。他の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、1つを上回る機械上でホストされる。さらなる実施形態では、ソフトウェアモジュールは、クラウドコンピューティングプラットフォーム上でホストされる。いくつかの実施形態では、ソフトウェアモジュールは、1つの場所において1つまたはそれを上回る機械上でホストされる。他の実施形態では、ソフトウェアモジュールは、1つを上回る場所において1つまたはそれを上回る機械上でホストされる。

30

40

【0356】

データベース

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプラットフォーム、システム、媒体、および方法は、1つまたはそれを上回るデータベース、もしくは同データベースの使用を含む。本明細書で提供される本開示に照らして、当業者は、多くのデータベースが情報の記憶および読み出しのために好適であることを認識するであろう。種々の実施形態では、好適なデータベースは、非限定的実施例として、関係データベース、非関係データベース、オブジェクト指向データベース、オブジェクトデータベース、エンティティ関係モデル

50

データベース、連想データベース、およびXMLデータベースを含む。さらなる非限定的実施例は、SQL、PostgreSQL、MySQL、Oracle、DB2、およびSybaseを含む。いくつかの実施形態では、データベースは、インターネットベースである。さらなる実施形態では、データベースは、ウェブベースである。なおもさらなる実施形態では、データベースは、クラウドコンピューティングベースである。他の実施形態では、データベースは、1つまたはそれを上回るローカルコンピュータ記憶デバイスに基づく。

【0357】

範囲は、本明細書では「約」1つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして表されることができる。そのような範囲が表されるとき、別の実施形態は、一方の特定の値から、および/または他方の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表されるとき、先行詞「約」の使用によって、特定の値が別の実施形態を形成することを理解されたい。さらに、範囲のそれぞれの終点が、他方の終点に関連して、および他方の終点から独立して、両方で重要であることを理解されたい。本明細書で使用されるような用語「約」は、特定の使用法の文脈内で規定数値から $\pm 15\%$ である範囲を指す。例えば、約10は、8.5~11.5の範囲を含むであろう。

10

【0358】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書で示され、説明されているが、そのような実施形態は一例のみとして提供されることが当業者に明白となるであろう。ここで、本発明から逸脱することなく、多数の変形例、変更、および置換が当業者に想起されるであろう。本明細書で説明される本発明の実施形態の種々の代替案が、本発明を実践する際に採用され得ることを理解されたい。以下の請求項は、本発明の範囲を定義し、これらの請求項およびそれらの均等物の範囲内の方法および構造物がそれによって対象とされることが意図される。

20

【0359】

本明細書で示される詳細は、一例として、および本発明の好ましい実施形態の例証的議論の目的のためにすぎず、本発明の種々の実施形態の原理および概念的側面の最も有用で容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示される。この点に関して、本発明、図面とともに解釈される説明、および/または本発明のいくつかの形態が実践で具現化され得る方法を当業者に明白にする実施例の基本的理解のために、本発明の構造的詳細を必要以上に詳細に示す試行は行われない。以下の定義および解説は、以下の実施例で明瞭かつ明確に修正されない限り、または意味の適用が任意の構造物を無意味あるいは本質的に無意味にするときに、任意の将来の構造物を統括するように意図および意向されている。用語の構造がそれを無意味または本質的に無意味にする場合において、定義は、Webster's Dictionary第3版、またはOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)等の当業者に公知である辞書から取られるべきである。

30

【0360】

本明細書で使用されるように、かつ別様に指示されない限り、用語「a」および「an」は、「1つ」、「少なくとも1つ」、もしくは「1つまたはそれを上回る」を意味すると解釈される。文脈によって別様に要求されない限り、本明細書で使用される単数形の実語は、複数を含むものとし、複数形の実語は、単数形を含むものとする。

40

【0361】

文脈が明確に別様に要求しない限り、説明および請求項の全体を通して、用語「comprise (~を備える)」、「comprising」、および同等物は、排他的または包括的な意味とは対照的に包含的な意味で、すなわち、「including, but not limited to (限定ではないが、~を含む)」という意味で、解釈されるものである。

50

【0362】

別様に規定されない限り、現在説明されている方法およびプロセスは、任意の順序で実施されることができる。例えば、ステップ(a)、(b)、および(c)を説明する方法は、最初にステップ(a)、それに続いてステップ(b)、次いで、ステップ(c)で実施されることができる。または、本方法は、例えば、最初にステップ(b)、それに続いてステップ(c)、次いで、ステップ(a)等の異なる順序で実施されることができる。さらに、これらのステップは、詳細に別様に規定されない限り、同時または別個に実施されることができる。

【0363】

単数または複数を使用する用語はまた、それぞれ、複数および単数も含む。加えて、用語「本明細書で」、「上記で」、および「以下で」、ならびに類似する趣旨の用語は、本願で使用されるときに、本願の任意の特定の部分ではなく、本願を全体として指すものとする。

10

【0364】

(実施例)

以下の実施例は、本発明のいくつかの側面をさらに説明するように含まれ、本発明の範囲を限定するために使用されるべきではない。

【0365】

(実施例1)

循環腫瘍細胞の大容量閉じ込めのためのマイクロ流体構成要素に基づくアンサンブル決定アリコートランク付け

20

本実施例は、本開示の側面による、細胞を含む粒子を単離するための新規のeDARプラットフォームを説明し、その正当性を立証する。

【0366】

eDARプラットフォームの特徴および性能を判定した2つの要因は、効率的かつ能動的選別方式、および後続の効率的な精製(例えば、精製チャンバ)方式である。本eDARプラットフォームは、これら2つの構成要素を最適化する。一実施例では、eDARプラットフォームは、標準リソグラフィ方法によって製作される統合濾過面積を含むことができる。マイクロ流体チップは、シリコンマスタ上の2つの層から構成されることができ、かつポリジメチルシロキサン(PDMS)への1ステージ複製成形で製作されることができる。マイクロ流体チップは、ガラス基板への結合で仕上げられることができる。システム全体は、能動的選別方式を含むことができる。マイクロ流体チップおよび流体力学的切替機構の分析性能は、特定の回収効率(例えば、95%)、特定の偽陽性率(例えば、0)、および特定のスループット(例えば、1時間あたり4.8mLの全血)のために最適化されることができる。

30

【0367】

マイクロ流体チップ

本実施例で使用されるマイクロ流体チップは、同一の設計で統合される2つの機能的面積、すなわち、eDAR選別面積およびスリット構造に基づく濾過ユニットを有していた。選別合流点に血液を導入した、選別ユニット内の主要チャンネルは、50μmの高さおよび150μmの幅を有し、全ての他の4つのチャンネルは、高さ50μmおよび幅200μmであった。スリットフィルタは、高さ5μmおよび幅5μmであった。試験されたスリットの最大数は、20,000であった。

40

【0368】

シリコンマスタは、2つのフォトリソグラフィプロセスを使用して製作された(図5、20、および21)。特徴は、AutoCAD(Autodesk(San Rafael, CA))を使用して設計され、クロムマスク(TRICR Corporation(SF, CA))上に書き込まれた。ポジ型レジストリソグラフィおよび深掘り反応性イオンエッチング(DRIE)が、マイクロフィルタ特徴である第1の層を形成するために選定された。ワシントン大学(The University of Washing t

50

on)の微細製造施設(Micromanufacturing Facility; MMF)によって提供されたAZ 1512が、ポジ型フォトレジストとして使用された。DRIEプロセスは、4.5 μm~5 μmの範囲内の深度を達成するように最適化された。eDAR特徴の第2の層は、ネガ型フォトレジストとしてSU-8-3050(MicroChem(Newton, MA))を使用して製作され、特徴の高さは、50 μmであるように制御された。トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル-1-トリクロロシラン(Sigma-Aldrich(St. Louis, MO))を使用して、マスタがシラン化された後、未硬化PDMSがシリコンウエハ上に傾注され、70 °Cで2時間焼成された。所望の微小特徴を伴うPDMS片が、シリコンマスタから剥離され、次いで、プラズマ酸化の標準プロセスを使用してカバーガラス片と結合された。

10

【0369】

生物学および臨床サンプル

3つの乳癌細胞株、すなわち、SKBr-3、MCF-7、およびMDA-MB-231細胞(American Type Culture Collection(ATCC)(Manassas, VA))が、eDARシステムを特性評価して最適化するために使用された。SKBr-3細胞は、マッコイ5培地で培養され、MCF-7は、イーグル最小必須培地(EMEM)で培養され、MDA-MB-231は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ATCC(Manassas, VA))で培養された。全ての細胞培地はまた、2 mM L-グルタミン、10%ウシ胎仔血清(FBS)(ATCC(Manassas, VA))、および50 μg/mLペニシリン/ストレプトマイシン(ATCC(Manassas, VA))も含有していた。培養は、加湿環境内で5%CO₂を伴って37 °Cで行われた。MDA-MB-231-GFP細胞株は、タフツ大学(Tufts University)のGail Sonenshein教授によって提供され、10%FBSおよび1 μg/mLピューロマイシン(Life Technologies(Carlsbad, CA))を伴うDMEM培地で培養された。健康なドナーからの対照血液が、Plasma International Lab(Everett, WA)から購入され、皮膚細胞からの任意の起こり得る汚染を防止するように、採血の第1の管が廃棄された。全血サンプルが、Fred Hutchinson

20

Cancer Research Centerの施設内倫理委員会によって承認されたプロトコルに基づいて、転移臓器癌がある患者から採取された。患者サンプルが、抗凝固剤としてEDTAを含有するVacutainer管(BD(Franklin Lakes, NJ))を使用して、Seattle Cancer Care Alliance(SCCA)で収集され、4 °Cで貯蔵され、4時間以内に分析された。

30

【0370】

サンプル調製およびeDAR分析

別様に規定されない限り、Isoton(Beckman Coulter Inc.(Chino, CA))が、全ての実験用の緩衝液として使用された。典型的なeDAR実験については、1 mLの全血サンプルが、暗室にて室温で30分間、フィコエリトリン(PE)(ロット番号515776、Abnova(Walnut, CA))と共役した抗EpCAMで標識された。全ての標識パラメータが最適化されている。標識サンプルは、14 mLまで希釈され、次いで、遊離抗体を除去するように遠心分離された。最終体積は、初期体積と同一であるように調節された。調製されたサンプルは、次に、シリンジポンプを使用してマイクロ流体チップに注入された。ファイバ結合アバランシェフォトダイオード(APD)(Excelitas Technologies(Waltham, MA))からのトレースが、PCIデータ取得カード(PCI 6602、National Instruments(Austin, TX))によって収集された。eDARの選別プロセスは、施設で書かれたLabVIEW(National Instruments(Austin, TX))スクリプトおよび施設内で構築されたフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)デバイスを使用して、自動的に制御された。選別されたアリコートを集めた流体力学的切替は、Lee Company(Westbr

40

50

ook, CT) から購入されたソレノイド (INKA 1226212H) によって制御された。

【0371】

全ての陽性アリコートが濾過面積上に収集された後、濾過面積を1分未満で迅速に洗浄するために isoton が使用された。任意の細胞質マーカが二次標識に使用された場合、細胞を固定するように、4%のパラホルムアルデヒド (PFA) が濾過面積の中に装填された。Surfynol (登録商標) 465 (Air product (Allentown, PA)) が、固定された細胞を透過化するために使用された。抗 EpcAM - PE および抗 サイトケラチン - APC (ロット番号 MAB5131、Abnova (Walnut, CA))、ならびに抗 CD45 - フルオレセインイソチオシアネート (FITC) (ロット番号 B116314、BioLegend (San Diego, CA)) が、典型的には、二次標識のための抗体として使用された。Hoechst (Life Technologies (Carlsbad, CA)) もまた、標識標的が実際に有核細胞であったことを検証するために核染色として使用された。

10

【0372】

eDAR の方法は、以下の通りであり、血液サンプルがマイクロ流体チップに注入され、アリコートに分割された。次いで、標識方式によって判定された「陽性」または「陰性」としてアリコートをランク付けするように、線共焦点検出方式が適用された。例えば、多くの用途では、血液が抗 EpcAM - PE で標識されたため、その抗体に共役した特定の色素からの蛍光信号を有していたアリコートのみが、陽性事象としてランク付けされた。陽性アリコートが迅速に収集されることを可能にした、血流の方向の切替を生成するように、自動フィードバック方式が適用された。CTC の非常に低い濃度に起因して、アリコートの 99.999% を上回るものが、所望の蛍光信号の非存在のため廃棄された。陽性蛍光信号を生じた、これらのアリコートは、さらに精製され、次いで、カウントされるように、マイクロ流体チップ上の別の面積に移送された。一連の下流分析が、閉じ込められた細胞に実施されることができる。

20

【0373】

再設計された流体力学的選別方式

以前に、eDAR は、電気浸透流またはゾル・ゲル変換等の他の報告された切替機構と比較して、高速 (約 2 ミリ秒の応答時間) かつ堅調であった、能動的選別ステップを制御する機械弁を有していた。有望であるが、この機械弁方式のいくつかの設計要因は、eDAR の潜在的用途を潜在的に制約した。マイクロ流体チップ上で機械弁を形成するために、3つの個々の構造層、すなわち、ソレノイド、その PDMS スレッド、および 150 μm PDMS フィルム上のマイクロチャネルが要求された。これは、マイクロ流体チップの製作を複雑で時間がかかるものにするであろう。別の欠点は、CTC の損失または損傷のリスクを潜在的に増加させた、捕捉された血液アリコートと機械弁との間の直接接触であった。本実施例では、ソレノイドは、常時閉であるが、5 VDC 電圧が印加されるときに 2 ~ 3 ミリ秒で開放され得る、オフチップモデルと置換された。このインラインソレノイドがマイクロ流体チップの一部ではなかったため、マイクロ流体デバイスの製作は、有意に簡略化された。ソレノイドは、流体力学的選別方式を試験するように、任意のマイクロチャネルと容易に接続されることができる。8つの異なる方式が、流体切替を駆動するように設計および試験された (図 3)。このタイプのソレノイドの構造、および PDMS の弾性的性質により、流体性能が変動し (表 1)、各方式が最良性能のために特性評価された。

30

40

【0374】

特性評価および最適化後に、プラットフォームの構造および流体力学的選別の対応する方式が、eDAR のために選定された (図 4)。標識血液サンプルが、シリンジポンプを使用して、マイクロ流体チップの上部チャネルに注入された (図 4A)。緩衝液が通して流動した、2つの側方チャネルが、能動的選別ステップを制御するために使用された。右側チャネル上に配置された2つのポートがあり、それらの両方が加圧緩衝液源に接続され

50

た。常時閉ソレノイドは、流体力学的切替を制御するように、選別合流点の近傍のポートに接続された。選別合流点の後に、2つのチャンネルがあった。左側の1つは、陽性アリコートを集し、それらをさらなる精製（例えば、精製チャンバ）のために濾過および収集面積に送達するために使用され、右側の1つは、全ての陰性アリコートが通して流動した、廃棄物収集チャンネルであった。

【0375】

これらのアリコートが「陰性」としてランク付けられたとき（図4B）、ソレノイドに印加された電圧がなかったため、それが閉鎖された。初期圧力降下が1番および3番の緩衝液源の間で設定されたため、血液は廃棄物を収集したチャンネルのみに流入することができ、これは、図4Bの明視野像にも示されている。陽性事象が第1の検出窓によって検出されたとき、5VDC電圧が、2番の緩衝液リザーバから緩衝液流を開放するように、即時にソレノイドに印加された。これは、右側の緩衝液チャンネルの流動抵抗を減少させ、そこでより速い流速を生成した。血流は、陽性アリコートを収集するように右側から左側に押動された（図4C）。このアリコートが収集され、第2の検出窓によって確認された後、ソレノイドは、血流を廃棄物収集チャンネルに戻して切り替えるように閉鎖された（図4D）。スイッチオーバーおよびバックに要求される時間は、それぞれについて2~3ミリ秒であると判定された（図5）。本プロセスは、 10^5 を上回るオン・オフサイクルが試験された後でさえもeDARのために十分に安定していた。インラインソレノイドが緩衝液ライン上に配置されたため、血液はソレノイドと接触することができず、これは、血液凝固および二次汚染の可能性を排除した。また、本方式では、eDARプロセス中にCTC収集チャンネルの中に一定流量の緩衝液があった。これは、後続の精製（例えば、精製チャンバ）ステップの効率を向上させ、細胞の凝集体の形成を防止した。

【0376】

本実施例のいくつかの側面では、陽性アリコートが、濾過面積上に収集されることができ、Isotonが、濾過面積を1分未満で洗浄するために使用されることができ、細胞質マーカは、二次標識に使用されることができ、細胞を固定するように、濾過面積の中への4%パラホルムアルデヒドの装填を伴うことができる。Surfynol（登録商標）465（Air product（Allentown, PA））が、固定された細胞を透過化するために使用されることができ、抗EpCAM-PEおよび抗サイトケラチン-APC（Abnova（Walnut, CA））、ならびに抗CD45-フルオレセインイソチオシアネート（FITC）（BioLegend（San Diego, CA））が、二次標識に使用されることができ、Hoechst（Life Technologies（Carlsbad, CA））が、有核細胞を検証するために核染色として使用されることができ、

【0377】

精製（例えば、精製チャンバ）機構の設計

本実施例のさらに別の側面は、PDMSから作製され得、付加的な層を要求しない場合がある、オンチップ濾過ベースのマイクロスリット構造の新しい方式を含むことができる（図7A）。図7Aは、いかなる赤血球（RBC）も留保することなくCTCを捕捉するために使用された、これらのマイクロスリットの実施例の基本構造を示す。スリットのサイズは、いかなる小さいCTCの損失も回避するために、高さ $5\mu\text{m}$ および幅 $5\mu\text{m}$ （図7B）であるように最適化された。多くの白血球が、濾過に基づくCTC方法の大部分で使用されるものより小さい、このサイズのフィルタを使用して、捕捉されなかった。マイクロフィルタが、PDMSで作製され、カバースリップ片と結合されたため、完全に透明ではなく、散乱および収差を生成し得る、ポリカーボネートフィルタと比較して、画質が有意に向上された（図7Cおよび7D）。また、細胞がスリットのアレイに沿ってのみ捕捉され得るため、それらは、容易に参照および追跡され得、多くの他の方法では、細胞は、表面上に無作為に分配される。スリットに沿ったこの閉じ込めは、撮像手技をより高速にし、カウントの結果をより正確にした。スリットはまた、閉じ込められたCTCに二次標識を実施することをより高速かつ効率的にした。図7Eは、抗EpCAM-PEで標識

された2つの癌細胞がマイクロスリット上に閉じ込められたことを示す。細胞が、抗サイトケラチン - A l e x a 4 8 8、抗H e r 2 - A l e x a 6 4 7、およびH o e c h s t を使用して、固定、透過化、および標識された。蛍光画像は、これら2つの細胞上のこれらのマーカの発現を明確に示し、明視野像もまた、それらの形態を確認した。2つの細胞はまた、陰性対照マーカとして抗C D 4 5 - A l e x a 7 0 0で標識され、カラーチャンネルからのいかなる信号も、このタグに対応しなかった。

【0378】

e D A Rの特性評価および分析性能

能動的選別ステップの効率が、リアルタイムで監視された。図6は、膵臓癌患者サンプルからのA P Dデータのごく一部分を示す。「決定A P Dトレース」は、アリコートをランク付けし、選別を制御した第1の検出窓に由来した。978および1,298ミリ秒における2つのピークは、アリコート選別をトリガした、抗E p C A M - P Eで標識された2つのC T Cを表した。「確認A P Dトレース」の2つのピークは、2つの癌細胞が収集チャンネル上に位置する第2の検出窓を通して流動したことを示し、2つの陽性アリコートが実際に選別されたことを確認する。第2の検出器からの背景変化(図6A)がまた、血液のごく一部分のみがe D A Rによって収集され、C T Cの高い濃縮比(典型的な臨床サンプルについて最大100万倍)に寄与したことも確認したことを指摘する価値がある。

【0379】

標識C T Cが第1の検出窓から第2の検出窓へ流動する必要があったため、決定A P Dピークとその確認信号との間の時間差が観察された。この時間差は、マイクロチャンネル中の層流の性質に起因して、C T Cが異なる線流速を有し得るため変動し得る、選別されたC T Cの経過時間として定義された。図6Bは、40および80 μ L/分の流速での経過時間の分布ヒストグラムを示す。概して、血液のより高い体積流速は、選別されたC T Cの短縮した経過時間をもたらした(図6C)。流速が90 μ L/分であったとき、平均経過時間は、選別方式の切替時間(2~3ミリ秒)に非常に近い、4ミリ秒まで低減させられ、これがe D A Rのための設計の本特定の実施形態のためのスループットの限界であることを含意する。他の実施形態では、本e D A R設計は、2ミリ秒未満の経過時間をもたらし得る。

【0380】

選別されたC T Cの経過時間が流体力学的切替時間より短かった場合、細胞は、本プラットフォーム上で確実に選別されなかった場合がある。選別効率は、したがって、選別をトリガした事象の総数と対比した、収集された事象の数として定義された。図6Dは、30 μ L/分~100 μ L/分の流速での選別効率の値を示す。流速が30 μ L/分であったとき、その流速での平均経過時間が約10ミリ秒であったため(図6D)、選別効率は、ほぼ100%であった。この経過時間は、能動的選別ステップがC T Cを収集するために十分に長かった。選別効率は、80 μ L/分の流速で90%まで減少し、次いで、流速が90 μ L/分であったときに49%まで低下した。図6Dはまた、選別効率と比較して類似動向を有していた、異なる流速でのe D A Rの回収効率も示す。しかしながら、回収効率は、マイクロ流体チップ上で多色蛍光撮像を使用してカウントされる、回収された細胞の数と対比した、混入細胞の数として定義された。この性能は、抗体標識効率、線共焦点検出効率、および選別効率を含む、多くの要因の組み合わせである。これは、同一の流速での回収および選別効率の間の差を説明する。結果として、この現世代のe D A Rについて、スループットの上限は、88%回収率で80 μ L/分であった(1mLの血液に12.5分)。このスループットは、全血の分析のための殆どのC T C技術より高いが、より広い血液入口チャンネルを設計すること、または第1の検出ビームをさらに上方に移動させることによって、さらに向上されることができる。

【0381】

3~975個のM C F - 7細胞が、50 μ L/分の流速での回収効率を分析するように、1mLの健康な血液に混入された。低性能で細胞数の精度を確保するために、毛管カウント方法が、濃度が100個の細胞/mLより低かったときに培養細胞を正確に混入する

10

20

30

40

50

ように使用された。平均回収率は、第1世代のeDAR(93%)より少し高い、0.998の R^2 値で95%であった(図6E)。CTCの濃度が、通常、非常に低いため、カウント結果は、ポアソン分布の影響を受けた。この場合、容認可能なスループットおよび回収率でより大量の全血サンプルを分析する能力が非常に重要であった。同数のMCF-7細胞が、1、5、および10mLの健康な血液に混入され、次いで、これらの3つのサンプルが、50 μ L/分の流速で分析された。それらの回収率に有意な変化はなく(図6F)、本方法が高い効率およびスループットで大量の全血を流すことが可能であることを示す。

【0382】

EpCAMが腫瘍細胞を選択するためにCTC検査の大部分で使用されたが、ますます多くの研究は、低いEpCAM発現を伴うCTCがより多くの間葉特性を有し、より活動的であることを報告している。最新のeDARプラットフォームは、EpCAM以外のバイオマーカを使用して腫瘍細胞を捕捉するように希少細胞を選択する任意の標識方式を使用するために、十分に便宜的である。3つの方式が、異なる培養乳癌細胞株を選択するように設計された(図6G)。EpCAMが、MCF-7細胞を選択するために使用され、Her-2が、SKBr-3細胞を選択するために使用され、EGFRが、MDA-MB-231細胞を選択するために使用された。これら3つ全ての方式は、88%より高い回収率で標的細胞を単離して閉じ込めた。eDARの別の一意の重要な特徴は、マーカが位置する場所の独立性である。例えば、表面捕捉方法または免疫磁性方法等の他の技術では、細胞表面上の抗原のみを捕捉することができる。本方法は、GFP等の細胞内マーカを伴う細胞を選択することができた(図6D)。ヒト全血に混入されたMDA-MB-231-GFP細胞の回収率は、91%であった(図6G)。蛍光タンパク質が、転移の進行および機構を研究するために動物モデルで広く使用されるため、eDARは、これらのモデルでCTCを選択するための理想的なツールである。

【0383】

(実施例2)

二重捕捉eDAR

本実施例は、本開示の側面による、eDARの「二重捕捉」バージョンを説明する。二重捕捉eDARは、同一のマイクロ流体デバイス上の同一のヒト血液サンプルからCTCの2つの異なる亜集団を同時に分離することができる。これら2つの亜集団は、それぞれ、高い回収率および純度で、マイクロ流体チップ上の2つの異なる領域上に別々に閉じ込められることができる。

【0384】

図8は、マイクロ流体デバイスの一般構造を示す。血液サンプルが、異なる蛍光タグと共役した2種類の抗体で事前標識された。例えば、血液サンプルは、PEと共役した抗EpCAM等の上皮マーカ、ならびにFITC等のPEと比較して異なる発光波長を有する別のフルオロフォアと共役した抗EGFRまたは抗ビメンチン等の間葉マーカで標識された。標識血液サンプルは、マイクロ流体チップに注入され、EpCAM発現を伴うCTCは、黄色チャンネルにピークを伴って、線共焦点方式を使用して検出されることができ、次いで、能動的選別事象が、収集チャンネル#1の中にその特定のアリコートを集めるようにトリガされた。同様に、アリコートは、間葉マーカに対して陽性としてランク付けされた場合、収集チャンネル#2に選別された。次いで、2つの亜集団は、別個にマイクロ流体チップ上に閉じ込められて濃縮された。濾過面積は、第2世代のeDARで使用される同一設計のマイクロスリット上に構築された。

【0385】

流体切替方式は、以下のように要約される。アリコートが適用される任意のマーカに対して陰性としてランク付けされたとき、次いで、図8のソレノイドの両方が閉鎖された。2つの側方チャンネルへの圧力が平衡を保たれた場合、血液は、廃棄物を収集するために使用された底部中央チャンネルへ流動した。アリコートが上皮マーカのみに対して陽性としてランク付けされたとき、ソレノイド#2が即時に開放したため、血流が左側の収集チャネ

ルへ押動された(図9B)。アリコートが収集された後、ソレノイド#2が再度閉鎖したため、血流が中央に戻った。アリコートが上皮マーカのみに対して陽性としてランク付けされたとき、ソレノイド#1が即時に開放したため、血流が右側へ押動された(図9C)。2つのタイプのeDAR選別事象の応答時間は、約2~3ミリ秒であった。

【0386】

図8は、「二重捕捉」eDARの一般構造を示す。標識血液が、最上部の主要チャネルに導入された。緩衝液が、2つのソレノイドを使用して、血流の流体力学的切替を制御するように、2つの側方チャネルの中で流動していた。CTCの2つの亜集団が、分離され、同一のマイクロ流体チップ上の同一の異なる濾過面積上に閉じ込められた。

【0387】

図9は、血流の3つの状態の明視野像を描写する。A)血液は、アリコートがいずれか一方のマーカに対して陰性としてランク付けされたため、廃棄物収集チャネルに流入した。B)血液は、収集チャネル#1に切り替えられ、CTCの第1の亜集団は、そこに移送された。C)血液は、収集チャネル#2に切り替えられ、CTCの第2の亜集団は、そこに移送された。

【0388】

(実施例3)

複数ステージ選別および分散

MCF-7細胞株が、American Type Culture Collection (ATCC (Manassas, VA))から入手された。細胞が、EMEM培地(ATCC)の中で37度および5%CO₂において培養された。培地が、5%v/vウシ胎仔血清(FBS)および1%v/vペニシリンストレプトマイシン(両方ともSigma (St. Louis, MO)から)を補充された。

【0389】

健康な全血サンプルが、Plasma Lab International (Everett, WA)から入手された。

【0390】

抗体が、フィコエリトリン(PE)-抗EpCAM(Abcam, Cambridge, MA)以外にBioLegend, Inc. (San Diego, CA)から購入された。eDAR用のシース流として使用されるIsoton II緩衝液が、Becton Coulter (Brea, CA)から購入された。ウシ血清アルブミン(BSA)およびTWEEN(登録商標)20が、Sigma (St. Louis, MO)から購入された。2つの溶液、すなわち、1つは標識に使用される0.1%BSA w/w、第2のものは材料を前処理するために使用される1%BSA/0.05%TWEEN(登録商標)20 w/wが、Isoton中で調製された。グリセロールが、EMD (Billerica, MA)から購入され、25%w/w溶液が、選別実験のために血液の流体特性をシミュレートするようにIsoton中で調製された。本溶液は、選別の画像が必要とされる実験のために、緑色食用色素(COV Extract Company (Rockford OH))と30/70比で混合された。

【0391】

シリコンマスタが、スピンコーティング用のSU-82050(MicroChem (Westborough, MA))を使用する標準フォトリソグラフィ技法を使用して、作製された。チップが、前駆体対ポリマーベースの1:10比でPDMSから作製され、完全に硬化され、1分間のO₂プラズマへの暴露の直後にガラス基板に密閉された。即時に使用されない場合、チップが、被覆され、1ヶ月よりも長くはないが使用まで貯蔵された。

【0392】

アリコートを伸張するそれらの能力に関して、異なるチップ設計を試験するために、10μlのPE-ヤギ抗マウス抗体が、遠心フィルタ管(EMD Millipore (Billerica, MA))中の40μlの濾過されたisotonに添加され、凝集

10

20

30

40

50

体を除去するように、14,000 RPMにおいて5分間、回転された。これは、isoton中の1mlの25%グリコール溶液に添加された。約10 μ mの1500黄色蛍光ビーズ(Duke Scientific (Palo Alto, CA))が、添加された。サンプルが、第1ステージeDAR選別チップ後に複数ステージ蛍光活性化選別に流し込まれ、選別が、確立された。APDトレースが、選別事象をトリガするためにビーズを使用して収集され、選別された色素ピークが、分析された。

【0393】

MCF7細胞が、3時間にわたって30 μ lのPE-抗EpCAMで標識された。洗浄後、細胞が、カウントされ、約100個の細胞が、0.5mlの血液に混入された。血液が、チップ上で選別された。選別を確立した後、1%BSA0.05%TWEEN(登録商標)20で前処理された新たな管が、収集出口に差し込まれ、前処理された15ml遠心管の中に延設された。選別後、収集された細胞が、450RCFにおいて10分間、回転され、上清が、除去された。15 μ lのPE-抗CD45(凝集体を除去するように回転された)が、3時間にわたって添加された。サンプルが、isoton+0.1%BSAで洗浄され、使用を容易にするために入口および出口のみに穿孔された新しいチップ上に流し込まれた。トレースが、収集され、全PE標識細胞が、MATLAB(登録商標)分析を使用してカウントされた。対照として、上記のプロセスが、PE-抗CD45の添加を伴わずに繰り返され、PEピークが、カウントされ、第1の選別実験からのPEピークの数と合致することが確認された。

【0394】

MCF7細胞が、3時間にわたって30 μ lのPE-抗EpCAM(凝集体を除去するように回転された)で標識された。洗浄後、細胞が、カウントされ、既知の数量(約100個の細胞)が、0.5mlの血液に混入された。血液が、チップ上で選別された。選別を確立した後、1%BSA0.05%TWEEN(登録商標)20で前処理された新たな管が、収集出口に差し込まれ、前処理された96ウェルプレートの中に延設された。細胞が、96ウェルプレートのウェルの中に収集され、約250 μ lの体積に到達したときに管を新しいウェルの中に手動で移動させた。選別の完了に応じて、ウェルプレートが、450rcfにおいて10分間、回転された。細胞が、20倍の0.75NA対物レンズ(Nikon(Tokyo, Japan))を用いたNikon TE 2000U顕微鏡上で、撮像され、カウントされた。

【0395】

eDARが、細胞を一行に分析する代わりに全血のアリコートを選別するため、サンプルの実行時間は、他の蛍光選別方法と比較して、大いに短縮される。しかしながら、血液細胞が着目標識細胞を伴って選別されるであろうという事実が、本方法に付随する。eDARの前の反復に関して、オンチップフィルタが、幅5 μ mのスリットを伴って、細胞を収集するために使用された。これは、最も小さいCTCさえも留保しながら、全ての赤血球および白血球の殆どが通過することを可能にした。しかしながら、フィルタ上で留保された細胞は、除去することに時間がかかり、細胞が選別の直後に収集されることになっていた場合に、向上された純度の必要が生じた。これを達成するために、第1の選別合流点の後に第2の選別合流点を含むように新しいチップを設計した(図18A参照)。選別されたプラグは、2つの合流点を分離するチャンネル(分散領域)を通過するにつれて伸張され、いったん細胞が第2の合流点に到達すると、第2の検出および選別が存在する。2つの検出スポット、すなわち、図18Aに示されるように、各選別合流点の前に1つだけが存在する。

【0396】

図24Aおよび図24Bは、選別中の2つの合流点からの検出トレースを示す。細胞が、プロット上で見られるように、両方の合流点の中で検出される。図24Cは、それぞれ、緑色および青色で示される、第1の選別合流点および第2の選別合流点からのAPDデータの複合トレースのより短い区分を示す。選別の合間に遅延時間があり、その間に、アリコートまたは流体体積が伸張および希釈される。これは、血液細胞の濃度が低減され、

細胞の間の平均距離が増加され、2回目に選別されるこれらの細胞の数ははるかに少なく、したがって、例えば、収集される全有核細胞で除算されたサンプルあたりの選別されるCTCの数によって測定されるような純度を向上させることを意味する。

【0397】

本向上を定量化するために、MCF7細胞が、PE-抗EpCAMで標識され、洗浄され、カウントされ、0.5mlの健康な血液に混入された。血液が、30μl/分の率において連続選別チップ上に流動され、選別が、流圧を調節することによって確立された。いったん安定した選別圧力が設定されると、収集出口管類が、除去され、前処理された管類(Isoton中の1%BSAおよび0.05% tween(登録商標)20)が、挿入された。本管類からの出口が、前処理された15ml遠心管の中に設置され、選別されたMCF7細胞、各アリコート中で選別される血液細胞、およびisoton緩衝液シース流を含有する、選別された体積全体が、収集された。0.5mlの血液を用いた選別実験に関して、本体積は、約1mlであった。選別後、収集された体積は、450rcfにおいて10分間、遠心分離され、上清が、約300μlまで慎重に除去された。15μlのPE-抗CD45が、添加され、細胞が、3時間にわたって標識され、洗浄され、上清が、1mlまで除去された。これは、入口および出口のみに穿孔された清潔なチップを通して流し込まれ、APDトレースが、収集および分析された。対照として、上記のプロセスが、PE-抗CD45の添加を伴わずに行われ、PEピークの数、第1の選別実験からのPEピークの数と相関し、したがって、細胞が標識プロセス中に失われないことを確認した。

【0398】

トレース内のピークの数、初期選別からのPE標識MCF7細胞および選別後に標識されるPE標識白血球の両方である、選別された全有核細胞を生じさせる。純度を計算するために、選別されたMCF7細胞の数が、全有核細胞によって除算された。選別されたMCF7細胞の数は、第1の選別実験における選別事象の数から取得された。1ステージ選別に関して、約1%の純度を計算した。2つの合流点が3cmのチャンネルによって分離される、2ステージ選別に関して、約15%純度を達成する。

【0399】

2つの合流点を分離する3cmの直線状チャンネルに関して上記で提示されるデータは、純度の約15倍増加を示す。これは、アリコートまたは流体体積が2つの選別合流点の間を進行するにつれて、その伸張および希釈によって駆動される。混合がマイクロチャンネル中の層流において低いため、より長いチャンネルが、実質的な混合を達成するために必要とされる。したがって、純度を向上させるための最も容易な方法は、2つの合流点の間のチャンネルを延長することであろう。チップが、2つの合流点を分離する5.5cmのチャンネルを伴って設計および製造され、純度が、前述で説明されたように測定された。本設計は、約21%の純度を有することが見出された。さらなる延長は、はるかに高い純度を生じさせるはずである。

【0400】

合流点の間のチャンネルを延長することは、伸張および純度を向上させるが、純度を著しく向上させ、単一細胞単離に接近するために必要とされるチャンネルの長さは、非現実的であり得る。したがって、より侵襲的な混合または分離方略が、必要とされる。アリコートまたは流体体積を伸張し、純度を向上させるために採用した、3つの方法が存在する。1つは、アリコートの一部が第1の小さいチャンネルを進み、アリコートが多くより小さいアリコートまたは流体体積に完全に分離されるまで、一部が主要チャンネルを進み続けるであろうように、一連のより小さいチャンネルによって接続される長いチャンネルを備えた(図20)、「流動ストレッチャ」を設計した。

【0401】

これを試験するために、PE色素が、蛍光ビーズを含有するグリセロール溶液中でチップ上に流動され、選別が、確立された。選別されたアリコートまたは流体体積は、黄色蛍光ビーズおよび色素のプラグを含有し、純度の向上は、第2の選別合流点の直前に、AP

10

20

30

40

50

Dトレースによって可視化されるように、色素アリコートまたは流体体積の伸張から推定されることができた。これは、絶対純度を生じないであろうが、デバイス設計の間で比較するための有用な方法であった。アリコートまたは流体体積が第2の合流点に長くあるほど、それがより伸張され、より少ない血液細胞を新しいアリコートまたは流体体積に選別させた。選別された色素アリコートまたは流体体積を使用する結果は、有望に見えた(図25A-C参照)が、必要とされる側方チャンネルの小さいサイズは、目詰まりの可能性および潜在的細胞損失をもたらした。図25は、直線状チャンネル流動ストレッチャ(図25A-B)、およびヘリングボーン特徴(図25C)がチャンネルを横断して側方にアリコートまたは流体体積を拡散するために使用された、流動ストレッチャの両方である、流動ストレッチャ伸張試験の結果を示す。

10

【0402】

第2の方略は、チャンネルが高さ5~30 μm まで高さを簡潔に縮小され、合流点を分離するチャンネルに沿って設置された区分である、堰を伴った。より大型である、および/またはあまり変形可能ではない、CTCまたはいくつかの希少細胞が、堰において実質的に減速され、他の血液細胞が進み続けるであろうことが仮定された。堰フィルタが、30~35 μm のスリットを伴って、チャンネルを横断して側方に採用された、別の堰様の構造物が、試験された。

【0403】

図26Aは、第1の堰ストレッチャにおける細胞の画像を示す。図26Aの左の画像は、チャンネルの一区分の明視野像である。スリットは、チャンネルの長さに跨架し、幅35 μm である。図26Aの右の画像は、PE標識細胞の蛍光画像である。図26Bは、第2の堰ストレッチャにおける細胞の画像を示す。図26Bの左の画像は、この場合、幅30 μm のスリットを伴う、チャンネルの一区分の明視野像である。図26Bの右の画像は、PE標識細胞の蛍光画像である。

20

【0404】

最終的に、分離チャンネルの開始部にヘリングボーン特徴を使用するカオスの混合設計を採用し、チャンネルの残りの部分を進行する前にアリコートまたは流体体積を側方に拡散した。本設計は、チャンネルの最初の0.7cmに沿って使用されるヘリングボーンを伴って、5.5cmの直線状チャンネル設計に追加された。ヘリングボーンは、いくつかの理由により、混合方略として魅力的である。第1に、それらは、製作することが単純であり、SU-8微細製作の1つだけの付加的な層を要求し、いかなる弁または複雑な特徴も要求しない。第2に、それらは、多種多様な用途に同調可能であることが実証されている。最終的に、それらは、細胞が閉じ込められ得る構造を追加しない。

30

【0405】

ヘリングボーンの3つの区分、すなわち、主に内壁を進行するアリコートまたは流体体積中の細胞を確認したため、内壁から外壁まで角度を付けられた3つの初期ヘリングボーン、中央がより外壁に向かって交互配置された12個のヘリングボーンの区分、次いで、反対方向に交互配置された12個のヘリングボーンを備える、ヘリングボーン設計を採用した(図23A参照)。ヘリングボーンの高さは、30 μm であった。直線状ヘリングボーンの第1の区分は、幅80 μm であり、95 μm 離間された。ヘリングボーンの第2の区分は、幅70 μm であり、180 μm 離間された。混合区分は、4.8cmの直線状チャンネルを直後に伴って、長さ0.7cmであった。本設計は、細胞が、外壁に沿ってプラグの中で進行するのではなく、チャンネルを横断して側方に分離されるように、十分な混合を可能にする。直線状チャンネルの長い区分は、次いで、放物線流プロファイルにより、チャンネルの中央の近傍の細胞が外縁上の細胞よりも速く進行するであろうため、細胞が長手方向にさらに分離することを可能にするであろう。本設計は、前述で説明されたように試験されたときに30%純度を生じさせた。これは、第1の合流点の中の選別されたCTCまたは希少細胞毎に、第2の合流点の中で再び選別されるときに約2.5個の白血球が存在することを意味する。第2の選別がないと、各CTCを伴って選別される約100個の白血球が存在する。平均90個のMCF7細胞が選別されると、第2の選別後に収集され

40

50

た約 225 個の白血球が存在した。全選別体積が約 1 ml であるため、これは、 2.2×10^4 または $4.3 \log$ (全血中の 5×10^6 個の白血球 / ml 対選別された体積中の 225 個の白血球 / ml) の白血球枯渇率に対応する。さらに長いチャネルを伴うより多くのヘリングボーンが、これをさらに向上させ得ることが可能である。試験された設計によって取得された純度結果は、表 2 に要約される。

【表 2】

表 2.

設計	純度 (CTC / 全有核細胞)
1 ステージ eDAR	~1%
3 cm チャネル	~15%
5.5 cm チャネル	~21%
5.5 cm チャネルおよびヘリングボーン	~30%

10

【0406】

本方法が臨床的に有用であるために、細胞は、それらが容易にカウントされ得る方法で収集される必要があり、CTC または希少細胞単離技法の正当性を立証する従来の方法である、混入回収が、実施される必要があった。eDAR プラットフォームは、異なる細胞株ならびに臨床サンプルからの回収を用いて以前に正当性を立証されている。本方法は、細胞損失が起こり得る 2 つの新しい要素、すなわち、第 2 の選別合流点および 96 ウェルプレート収集を導入した。したがって、回収は、これらの要素が細胞損失を生成しないことを検証するように実施された。

20

【0407】

回収は、簡単にするために事前標識された MCF7 細胞を用いて行われた。我々の血液中細胞標識ステップの以前の試験が行われているため、本報告に関して、システムにとって新しい特徴のみを単離することを決定した。これらのうちの第 1 のものは、チップ上に 2 つの選別合流点を含む、新しい流体方式である。流動が、以前のチップと同様に平衡を保たれ、ここでは、流圧が、3 つの位置、すなわち、(1) 第 1 の廃棄物チャネルに流動を伴ってオフであるソレノイド 1 および 2 (図 27A および図 27B の両方では第 1 のフレーム)、(2) 第 1 の収集チャネルに流動を伴って、開放したソレノイド 1 および閉鎖されたソレノイド 2 (図 27A に示される)、ならびに (3) 第 2 の収集で細胞を収集するように閉鎖されたソレノイド 1 および開放したソレノイド 2 (図 27B) に関して、調節された。連続チップ上の選別は、潜在的な詰まりを導入するオンチップフィルタの非存在に起因して、より安定していた。

30

【0408】

図 27A は、連続選別流体工学装置の第 1 の合流点内の選別を描写する、3 つの画像フレームを示す。スケールバーは、 $200 \mu\text{m}$ である。溶液は、30% グリセロール溶液 (Isoton 中の 25% w/w グリセロール) および 70% 緑色食用色素である。3 つのフレームは、左から右へ、ソレノイドが開放していないこと、ソレノイドが開放し、流動が左に移動し始めること、および流動が完全に収集チャネルを流れていることを示す。図 27B は、連続選別流体工学装置の第 2 の合流点内の選別を描写する、3 つの画像フレームを示す。スケールバーは、 $200 \mu\text{m}$ である。溶液は、30% グリセロール溶液 (Isoton 中の 25% w/w グリセロール) および 70% 緑色食用色素である。3 つのフレームは、左から右へ、ソレノイドが開放していないこと、ソレノイドが開放し、流動が左に移動し始めること、および流動が完全に収集チャネルを流れていることを示す。

40

【0409】

第 2 の合流点において選別された後に PE - 抗 EpCAM 標識 MCF7 細胞を収集するために、前処理された管類が、選別が確立された後に収集出口の中に挿入され、管類の出口が、前処理された 96 ウェルプレートの上方に搭載された。管類および収集用の 96 ウェルプレートは、細胞付着を防止するように Isoton 中の 1% BSA + 0.05% T

50

ween (登録商標) 20 の溶液で前処理された。出力体積は、約 250 μ l に到達するまでウェルの中で収集され、次いで、管類は、次のウェルに手動で移動された。0.5 ml の血液の選別のための全出力は、約 4 つのウェルまたは約 1 ml であった。ウェルの中の細胞をカウントするために、プレートは、全ての細胞をウェルの底部まで単離するように、450 rcf において 10 分間、プレート遠心分離機上で回転された。細胞が、次いで、20 倍の 0.75 NA 対物レンズを用いた蛍光顕微鏡上でカウントされることができた。本ステージで、さらなる標識が要求された場合、上清が、所望の標識体積まで除去され、抗体または固定/透過化溶液が、添加されることができた。本ステップが細胞損失を導入しないであろうことを検証するために、付加的回数で細胞を回転させ、上清を除去し、200 μ l の isoton 緩衝液 + 0.1% BSA を添加し、プレートを再び回転させ、ウェルを再カウントした。いかなる細胞損失も観察されなかった。3 つ全ての設計 (ヘリングボーンを伴う 3 cm チャネル、5.5 cm チャネルおよび 5.5 cm チャネル) に関する回収は、平均して約 91% であり、最小限の細胞損失が新しい設計に伴って導入されることを示した。

【0410】

(実施例 4)

粒子捕捉および放出を伴う複数ステージ選別および分散

本実施例は、本開示の側面による、複数ステージ選別装置の「捕捉および放出」バージョンと、本開示の側面による、粒子捕捉および放出を実施する方法とを説明する。選別中または後のフィルタまたは障壁からの粒子または細胞の捕捉および放出は、より多数の検定が見出される粒子に実施されることを可能にする。例えば、CTC は、高純度で捕捉され、複数の蛍光でタグ付けされた抗体で標識され、蛍光で撮像され、次いで、バイアルの中に放出され、ポリメラーゼ連鎖反応および/または遺伝子シーケンシング等の技法を使用して、分析されることができ。

【0411】

粒子捕捉

細胞等の粒子が精製され、2 つの選別ステージおよび少なくとも 1 つの分散ステージを使用する、2 ステージ選別および 1 つまたはそれを上回る分散動作によって濃縮された後、粒子は、図 7 A および図 29 A に示されるようなフィルタ要素を使用して収集される。

【0412】

所定数の SKBR-3 乳癌細胞株細胞が、4 mL の全血 (例えば、SKBR-3 細胞の添加に先立って、複数の細胞を含有するが、SKBR-3 細胞または他の CTC を含有しない) に添加され、フィコエリトリンと共役した抗 EpCAM 抗体で標識された。SKBR-3 細胞 (例えば、サンプル) を混入された全血は、本明細書に説明されるような分散動作を含む 2 ステージ選別を使用して、分離され、粒子捕捉のために、図 29 A のように濾過面積の中に導入された。

【0413】

細胞は、第 2 の選別ステージからの流路を介して、濾過面積の中に導入された。図 29 A に示される構成に加えて、それを通して細胞が濾過面積に導入される、第 2 の選別ステージおよび濾過面積を接続する流路は、濾過面積のフィルタと平行に、垂直に、またはそれに対してある角度で配向され得ることが考慮される。濾過面積の中への細胞の導入後に、細胞が、正の流体流条件下でフィルタと関連付する (例えば、接触する) ことを可能にされることによって捕捉された。

【0414】

図 29 A は、第 2 の選別ステージを濾過面積に接続する流路に加えて、フィルタの上流の濾過面積に接続される 2 つの別個の流路 (例えば、第 2 および第 3 の流路) を示す。濾過面積は、フィルタの上流の濾過面積に接続される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、または 10 個を上回る流路を有し得ることが考慮される。第 2 の選別ステージを濾過面積に接続する流路を通した濾過面積の中への細胞の導入中に、第 2 および第 3 の流路は、閉鎖された。細胞を濾過面積に導入するために使用されるものに加えて、少な

10

20

30

40

50

くとも1つの流路が、細胞捕捉中に開放し得ることが考慮される。

【0415】

細胞が選別され、フィルタの中で捕捉された後、抗サイトカイン - APC (例えば、付加的流体) を含む緩衝液が、注入ポートを備え、第2の選別ステージを濾過面積に接続する流路から分離した第2の流路を介して、濾過面積に流入された。ある場合には、抗体を含む付加的流体が、細胞を濾過面積の中に導入するために使用されたものと同一の流路を介して、濾過面積の中に導入された。

【0416】

蛍光撮像が、フィルタの中に捕捉された標的細胞の数をカウントするために実施された。簡潔には、フィルタの中に捕捉された細胞が、20倍の0.75 NA対物レンズ (Nikon (Tokyo, Japan)) を用いた Nikon TE 2000U顕微鏡 (例えば、Nikon TE 2000U顕微鏡、MiSelect R器具 (MiCareo Taiwan Co., Ltd., (Taipei, Taiwan))、または同等物)、検出器、および電磁放射線源を使用して、撮像され、カウントされた。回収率 (例えば、回収効率) が、捕捉または収集後に検出された標的細胞の数 (例えば、図29A、29B、および31に示されるような濾過面積内で撮像された標的細胞) を血液に添加された標的細胞の既知の数と比較することによって、判定された。平均回収率は、選別ステージの回収率からの有意な変動を示し、細胞捕捉フィルタが、選別ステージから退出する標的細胞を留保することに100%成功した、または選別ステージから退出する標的細胞を留保することに本質的に100%成功したことを示した。

【0417】

ある場合には、第1の選別ステージの中への注入に先立って血液サンプル中に存在するが、捕捉または収集された細胞集団中で検出されない標的細胞は、第1の選別ステージに注入されることに先立って、死容積の中に、または細胞接着によって閉じ込められる。これらの方法における細胞の損失は、計算された回収率に影響を及ぼすが、しかしながら、いかなる定量化可能な細胞損失も、第1の選別ステージの中への注入後に観察されない。第1の選別ステージの中への細胞の注入に先立った死容積および/または細胞接着の量に応じて、回収率は、69%~100%、75%~100%、81%~100%、94%~100%、または100%であると観察された。細胞損失が第1の選別ステージの中への注入に先立って起こらなかった場合、第1の選別ステージと、分散ステージと、第2の選別ステージとを有する、システム内の回収率は、99.5%~100%である。

【0418】

粒子放出

粒子または細胞 (例えば、標的粒子または標的細胞) が、捕捉され、フィルタ要素の中で撮像され、分析された後、異なる技法が、(例えば、収集、および/または別個のチップ、ウェルプレート、スライド、もしくはバイアル上の撮像、またはシーケンシングもしくはPCR分析等のさらなる処理のために) 細胞を放出するために使用されることができる。細胞放出効率を増加させるために、複数の流体設計およびサンプル処理オプションが、存在する。

【0419】

フィルタ要素からの細胞の効率的な放出は、細胞が、細胞をフィルタと関連付けさせる (例えば、それらをフィルタと接触させる) 流体圧力よりも高い流体圧力を受け、それらをフィルタから離れるように押進させるときに、達成される。これを遂行する1つの方法は、フィルタから離れるように細胞を押動するために、フィルタを横断して流体流の方向を逆転させることである。流体流動方向は、フィルタの上流の流体圧力に対してフィルタの下流の流体圧力を増加させることによって逆転された。フィルタの下流の圧力増加は、図29Aに示されるように、流体出口または付加的流体用の入口等のフィルタの下流の濾過面積に接続される1つまたはそれを上回る流路に圧力を印加することによって遂行される。ある場合には、流体流動方向は、フィルタの上流の場所において陰圧 (例えば、真空) を印加することによって、フィルタの下流の流体圧力に対してフィルタの上流の流体圧

10

20

30

40

50

力を減少させることによって逆転される。フィルタからの細胞の効率的な放出は、流体圧力がフィルタの下流で増加され、流体圧力がフィルタの上流で減少されるときに遂行されることが考慮される。流体流動方向が逆転される前に、フィルタの上流および上流選別ステージの下流に位置する、流体の逆流を防止または制御するように構成される構造物またはデバイス（例えば、図30Aに示されるような弁）は、流体が選別ステージまで戻るように進行することができないように閉鎖される一方で、フィルタの上流の弁は、細胞が収集のために流路を通してパイアルまで進行することを可能にするように開放される。

【0420】

フィルタの1つまたはそれを上回る具体的部分を横断して圧力差を増加させること（例えば、局所圧力増加）は、フィルタから細胞を放出することを補助する。局所圧力増加は、フィルタの一部を遮断すること（例えば、1つまたはそれを上回る開口を備えるフィルタの一部を遮断すること）によって流体流を許容する、フィルタの断面積を縮小することによって、遂行された。フィルタの開口が、濾過面積に接続される流路を介して、ポリスチレンビーズをフィルタの下流の濾過面積に添加することによって、遮断された。

10

【0421】

最初に、開口と物理的に関連付けられる標的細胞（例えば、開口の上流側を完全または部分的に遮断する標的細胞）を有していないフィルタ要素の開口は、流体流を許容する、関連付けられる細胞を伴う開口よりも大きい断面区分を有し、1つまたはそれを上回る開口と関連付けられる細胞が、開口を通して流体経路を部分的または完全に遮断するため、開口の上流側と関連付けられる1つまたはそれを上回る標的細胞を有するフィルタの開口よりも高い流体流速を受けるであろう。流体流逆転中に、フィルタの1つまたはそれを上回る開口を遮断することが可能な材料（例えば、ビーズ等の粒子）をフィルタの下流側に導入することによって、フィルタから離れるようにフィルタの開口の上流側と関連付けられる1つまたはそれを上回る標的細胞を押し戻す圧力は、より特異的に、材料がフィルタの下流側に導入されなかった場合よりも大きい程度に増加され、標的細胞がフィルタから放出されるであろう可能性を向上させる。ポリスチレンビーズが、フィルタの開口を遮断し、フィルタを横断して局所圧力を増加させるために使用されたが、フィルタの下流の他の形状を有する粒子の導入等のフィルタの開口を遮断する任意の手段が使用され得ることが考慮される。

20

【0422】

図29Bは、フィルタの上流側からの細胞（例えば、標的細胞）の向上された放出のために、フィルタの開口内の局所圧力を増加させるためのフィルタの下流部分への複数のビーズの導入を図示する。デバイスを通した流体流が逆転された後、ポリスチレンビーズを含む溶液（例えば、付加的流体）が、フィルタに導入される。フィルタの上流側で1つまたはそれを上回る細胞によって部分的または完全に遮断されるフィルタの開口を通した流動は、最初は、フィルタの上流側で1つまたはそれを上回る細胞によって部分的または完全に遮断されないフィルタの開口を通した流動よりも低い。ポリスチレンビーズは、より低い抵抗およびより高い流速に起因して、細胞と関連付けられない、またはフィルタの上流側の細胞によって遮断されるより小さい断面積を有する、フィルタの下流側の開口と優先的に関連する。逆流体流中にフィルタの下流側のビーズによって部分的または完全に遮断されない開口（例えば、フィルタの上流側の1つまたはそれを上回る細胞と関連付けられる開口）内の流体流および圧力増加は、細胞に対する圧力を増加させ、フィルタからの細胞の放出を補助する。

30

40

【0423】

フィルタを通した逆流体流が最小限にされるものであるとき（例えば、流体流が逆転される場合に、小さい細胞がフィルタを通して下流側から上流側まで戻るように移動し得る場合において）、流体圧力は、フィルタから細胞を放出するように、フィルタの下流の陽圧の印加、フィルタの上流の陰圧の印加、またはそれらの組み合わせによって、フィルタを横断して均等化される。

【0424】

50

細胞が濾過面積のフィルタから放出された後、細胞は、濾過面積の上流部分（例えば、フィルタの上流の濾過面積の一部）から、濾過面積を収集バイアルに接続する流路の中へ流される。

【0425】

（実施例5）

高い粒子濃度を伴う複数ステージ選別および分散

本実施例は、本開示の側面による、複数ステージ選別装置の「高濃度」バージョンを説明する。複数ステージ選別装置の高濃度バージョンを備える、方法およびシステム、ならびにその使用は、細胞を収集し、遠心分離し、および/または（例えば、流体体積の低減を通して）後続の調製ステップおよび検定を受けるために適切な流体体積に濾過するステップにおいて一般的な細胞損失を回避することに役立ち得る。

10

【0426】

流体収集体積低減

図30Aは、流体体積中の希少粒子の濃度を伴うものを含む、流路が閉鎖され得る、任意の方法に、または任意のシステムで使用され得る、複数ステージ選別装置（例えば、複数ステージeDARシステム）の流路内の弁の実施例を示す。複数ステージ選別装置の高濃度バージョンでは、弁が、複数ステージ選別装置の第2の選別ステージの下流に位置する。ある場合には、弁は、（例えば、図30Aに示されるように）複数ステージ選別装置を備える、マイクロ流体チップの中に統合され、ある場合には、弁は、（例えば、図30Cに示されるように）マイクロ流体チップの外部にある。弁は、標的細胞が弁の上流にある第2の選別ステージから流体体積中の弁まで進行するときを除いて、閉鎖されたままであるように構成される。弁は、ソレノイド弁であり、短期間に開放し、再び迅速に閉鎖し、流路を通して、標的細胞を含有する流体体積を進入許可するように構成される。弁の開放は、細胞（例えば、標的細胞）を検出するように構成される上流検出器と通信するコンピュータからの信号を用いて、制御される。

20

【0427】

多くの場合、ソレノイド弁は、2～3ミリ秒またはそれ未満で開閉するように構成される。弁に到達するときの標的粒子を含有する流体の圧力および速度に応じて、本弁の応答時間は、数ナノリットルまたはそれ未満の流体が、（例えば、標的細胞の収集のために）弁が位置する流路を通過することを可能にするために、十分に速い。流路内の流体の流速が5 μ L/分である場合において、弁は、弁が開放される事象毎に、0.17nL～0.25nLが弁を通過するために十分に迅速に開閉することができる。流路内の流体の流速が1,000 μ L/分である場合において、弁は、弁が開放される事象毎に、34nL～50nLが弁を通過するために十分に迅速に開閉することができる。結果として、弁は、弁が標的細胞を通過させるように開放される事象毎に、0.17nL～50nLが、弁が位置する流路を通過することを可能にすることができる。複数ステージ選別装置の高濃度バージョンは、第2の選別ステージの下流の流路内の点に位置するソレノイド弁を使用し、2mLの血液という最初の体積から30 μ Lの最終流体体積に16個のSKBr-3細胞を選別することができる。弁が位置する流路を通過した後、濃縮された体積が、流路と流体連通する収集バイアルの中に収集される。システムの多くの用途および構成に関して、流体体積低減は、流体体積が第2の選別ステージから受容されるにつれて、それに実施される。

30

40

【0428】

図30Bは、標的細胞を含む流体体積が第2の選別ステージから受容されるにつれて、流体体積中の選別された標的細胞を濃縮することに有用である、高濃度システムの構成の概略図を示す。本実施例では、図30Bに示される流路構成は、マイクロ流体チップの下流の複数ステージ選別装置に接続される。選別ステージから至る第1の流路は、変形可能な管類を備え、粒子収集バイアルに接続される、第2の流路と、変形可能な管類を備え、廃棄物バイアルに接続される、第3の流路とに分岐する。2方向ソレノイドピンチ弁は、2方向ピンチ弁が第2の流路を閉鎖し（例えば、挟締して閉じ）、そのデフォルト状態で

50

第3の流路を開放したままにするが、第3の流路を閉鎖し、アクティブ化されたときに第2の流路を開放したままにするように、第2および第3の流路に対して位置付けられる。

【0429】

第2の選別ステージの中に位置する検出器と通信するコンピュータは、2方向ピンチ弁のアクティブ化を制御する。コンピュータは、代替として、または加えて、2方向ピンチ弁を制御するために、複数ステージ選別装置の第1の選別ステージ内の検出器、または複数ステージ選別装置の濾過面積内の検出器に接続され得ることが考慮される。標的粒子（すなわち、本実施例では、標的細胞）が検出器によって検出されるとき、コンピュータは、2方向ピンチ弁をアクティブ化し、ピンチ弁の状態は、切り替わり、流体が第2の流路を通して収集バイアルまで流動することを可能にし、第3の流路を通じた流体流を閉鎖する。

10

【0430】

標的細胞の収集は、マイクロ流体チップを収集バイアルに接続する可撓性管類を備える、第2の流路内のインライン2方向ソレノイド弁の包含によって、向上され得る。そのデフォルト状態では、インライン2方向弁は、可撓性管類を圧縮することによって、第2の流路の下流場所において第2の流路の一部を挟締する（または閉鎖する）ように、かつ第2の流路の上流場所において第2の流路の一部を通して流動を可能にするように構成される。アクティブ化されたとき、インライン2方向弁は、第2の流路の上流場所において第2の流路の一部を挟締する（または閉鎖する）ように、かつ下流場所において第2の流路の一部を通して流動を可能にするように構成される。標的細胞が、複数ステージ選別装置の第2の選別ステージ内および/または複数ステージ選別装置のマイクロ流体チップ内の検出器によって検出され、標的細胞が、流路の上流場所と下流場所との間の第2の流路の一部に進入するとき、インライン2方向ソレノイド弁は、標的細胞を含む約1~30 nLの小さい体積が収集バイアルの中に通過することを可能にするようにアクティブ化される。インライン2方向弁を通過することを可能にされる流体の体積は、第2の流路の上流場所と下流場所との間の距離および第2の流路の直径に依存する。

20

【0431】

別の実施例では、弁は、第2の選別ステージとマイクロ流体チップの下流の複数ステージ選別装置の出口との間の流路の中に位置し、標的粒子を第2の選別ステージとマイクロ流体チップとの間の流路の中で収集させる。選別が完了した後、流路は、例えば、収集バイアルを出口のポートに接続することによって、または出口をバイアルまで物理的に移動させることによって、収集バイアルと界面接触される。弁は、次いで、開放され、標的粒子は、流路の出口から外に流される。

30

【0432】

既知の数のSKBr-3細胞が、2、4、または8 mLの血液に添加され、2ステージ選別装置を使用して、本明細書に説明されるように処理および分離された。収集バイアルの中で収集された細胞は、カウントされ、数は、実験毎に添加された細胞の数と比較された。細胞回収効率は、流体体積中の粒子の濃度に本構成を使用して、77%の中央値を伴って50%~100%に及んだ。細胞が流体体積低減後に収集された、最終流体体積は、20 uL~150 uLであった。

40

【0433】

これらの実施例における、粒子移動および複数ステージ選別装置から収集される体積のより優れた制御は、複数ステージ選別装置の検出器から独立して、弁のアクティブ化をトリガすること（例えば、弁状態および閉鎖ならびに開放される流路を切り替えること）によって、遂行される。2方向ピンチ弁（または複数ステージ選別装置内の任意の他の弁）の独立したアクティブ化は、タイマ、圧力センサ、またはユーザ入力デバイスからの信号を使用することを含む、種々の方法で制御されることができる。

【0434】

図30Cは、選別された標的細胞または複数の選別された標的細胞を濃縮および/または収集するために有用な弁が、複数ステージ選別装置を備えるマイクロ流体チップの外部

50

にある、システムの構成を示す。ソレノイド弁が、本目的のために使用されることができる。1つまたはそれを上回る標的細胞を濃縮するための外部弁は、流路と流体通信し、短期間に開放し、再び迅速に閉鎖し、流路を通して、標的細胞を含有する流体体積を進入許可するように構成される。外部弁の開放は、細胞（例えば、標的細胞）を検出するように構成される上流検出器と通信するコンピュータからの信号を用いて、制御される。外部弁は、各細胞が第2の選別ステージ内で検出されると、短期間に（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20ミリ秒、2ミリ秒未満、2ミリ秒～20ミリ秒、または20ミリ秒～50ミリ秒）開放するように構成される。弁が、2ミリ秒～20ミリ秒の時間にわたって開放しているとき、1～30ナノリットル（nL）の流体が弁を通過し、流体経路を下って流体中の細胞を移動させる。

10

【0435】

図30Cに示されるように、弁（例えば、外部収集弁）は、管類を伴うマイクロ流体選別チップの出口に接続される。細胞が、第2の選別ステージ内で選別された後、選別された細胞は、第2の選別ステージと弁との間の流体体積中に存在する（例えば、細胞は、第2の選別ステージと弁との間のチップおよび/または管類（例えば、収集管類）の流路の中にある）。管類は、弁から接続解除され、（例えば、手動で、またはコンピュータによって制御される機械的変位を介して）収集バイアルと流体連通して設置される。第2の選別ステージと弁との間の流体体積中に存在する細胞は、選別ステージの一方または両方の上流に流体圧力を印加することによって、流路および/または管類から外へ、かつ収集バイアルの中に流される。

20

【0436】

付加的流体経路を用いた流体収集体積低減

標的粒子が収集される流体の体積を低減させるための受動的な方法およびデバイスが、本明細書に説明される方法および装置のある実施形態で使用される。図31に示されるように、流体体積中の標的細胞（例えば、標的粒子）の濃度は、交差流濾過（すなわち、接線濾過）を助長するように、流体体積が第2の選別ステージから出た後に通過する流路の幾何学形状を構成することによって、標的細胞を含む流体体積が複数ステージ選別装置の第2の選別ステージから外へ通過した後に増加される。本実施例では、流路の一部は、流体出口（例えば、一次流体出口）と流体連通する濾過領域3130から、標的細胞を含有する流体体積を分離する、フィルタを備える。そのような場合では、流路は、より小さい寸法、またはさらなる程度の変形能を有する、流体および/または細胞が、フィルタのスリット（または細孔、ステップ、間隙、ならびに/もしくは開口）3120を通過することを可能にしながら、標的細胞がフィルタを横断しないように防止するように定寸される、少なくとも1つの寸法を伴うスリット（または細孔、ステップ、間隙、ならびに/もしくは開口）3120を有する、フィルタ3110によって、複数の領域および流体出口から分離されることができる。

30

【0437】

図31に示されるように、濾過領域3130は、フィルタを備える流路の容積よりも大きい容積を有してもよい。流体体積がこれらの特徴を有する流路の一部に進入すると、流体体積の一部は、フィルタを通して濾過領域3130の中に通過する。標的細胞は、（例えば、フィルタのスリットが、細胞がフィルタのスリットのうちのいずれかを通過しないように防止するように定寸される、1つまたはそれを上回る寸法を有するため）フィルタのスリットを通過することを防止され、フィルタを備える流路の一部を通過するにつれて、濾過領域3130とフィルタの反対側に留まる。図31に示されるように、流路は、それぞれが1つまたはそれを上回る流体出口と流体連通し得る、1つを上回る濾過領域3130と流体連通し得る。

40

【0438】

標的細胞が位置する流路の一部と濾過領域3130との間の容積差は、流体体積の一部を、フィルタを横断して濾過領域3130のより大きい容積まで拡散させるために十分で

50

あるが、流体体積中の細胞を濃縮する付加的な受動的手段が、本明細書に説明される方法および装置の実践では有用である。

【0439】

例えば、一実施例では、流路は、直線状ではなく、直線状ではない流路の一部において流路の外壁に配置されるフィルタを備える。標的細胞を含む流体体積が、直線状ではない流路の一部に向かって進行すると、流体体積の運動量が、フィルタに対して力を及ぼし、流体体積の一部が、フィルタの開口を通して、細胞とフィルタの反対側に位置する流路の一部（例えば、濾過領域）まで通過する。フィルタの開口は、細胞がフィルタを通過することを許可しないように定寸され、流体体積の細胞は、フィルタを通過しないように遮断される。本実施例では、流体体積は、流体体積の慣性が、流体体積の一部をフィルタに通過させることを可能にする一方で、細胞が同じことをすることを可能にしないことによって、低減される。

10

【0440】

本構造および幾何学形状を伴う流路の区分を通過する結果として、フィルタに接触する細胞は、細胞に力を印加し、細胞表現型または生存能力に影響を及ぼし得ることが考慮される。これは、殆どの場合、直線状ではない流路の一部が、その最初の方向から90度またはそれを上回る角度または屈曲を流路の中に備える場合に当てはまる。側方変位または慣性力の結果としての細胞表現型または生存能力への影響が特に懸念されるとき、流路内の角度または屈曲は、その最初の方向から90度未満の角度または屈曲を備えるように作製される。いずれの場合も、選別後の流体体積低減のための流路内の屈曲の角度は、流体体積（および流体体積の中に含有される細胞）の速度ならびに細胞のサイズ、変形能、および形態の考慮に基づく。

20

【0441】

受動的流体体積低減のこれらの実施例で使用されるフィルタは、類似形状およびサイズの開口を備えるが、しかしながら、種々の形状またはサイズの開口を備える連続フィルタ、もしくは異なる形状またはサイズの開口を備える複数のフィルタが、異なるサイズまたは識別の細胞を分離することに有用であることも考慮される。一実施例では、螺旋形屈曲を備える流路の一部の中のフィルタの開口は、フィルタの上流部分における断面積がフィルタの下流部分におけるフィルタの開口よりも小さい。細胞の不均質混合物を含む流体体積が流路を通過されるとき、より小さい細胞が、フィルタの上流部分を通過する一方で、より大きい細胞は、フィルタの下流を通過し、フィルタの最初の側面上のフィルタの開口のうちのいずれかを通過することができない、最も大きい細胞のみを残すであろう。この場合、流路は、流路の長さに沿った異なる点においてフィルタを通過した、異なるサイズの細胞が、複数の出口チャネルのうちの異なるチャネルによって別個に収集され得るように、流路の長さに沿った異なる点において複数の出口チャネルに接続される。

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

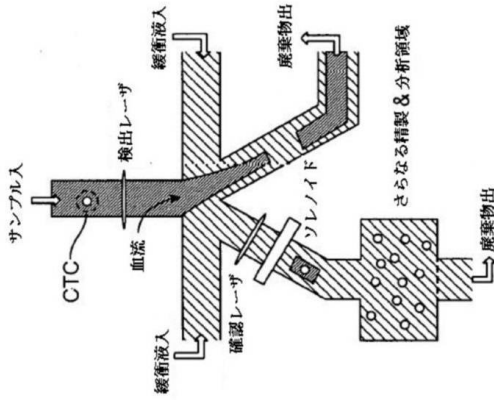


FIG. 1A

【図 1 B】

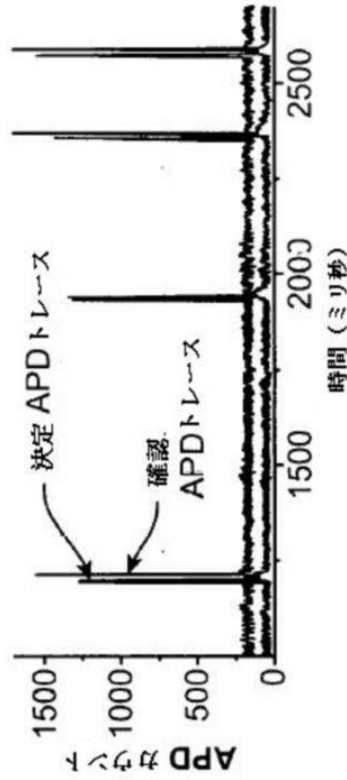


FIG. 1B

【図 1 C】

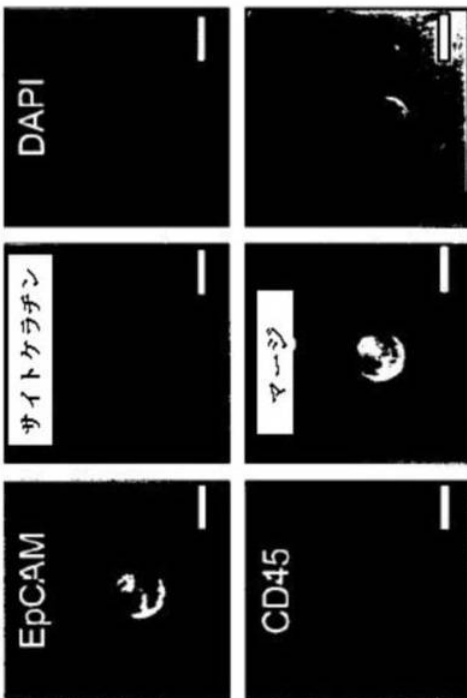


FIG. 1C

【図 2】

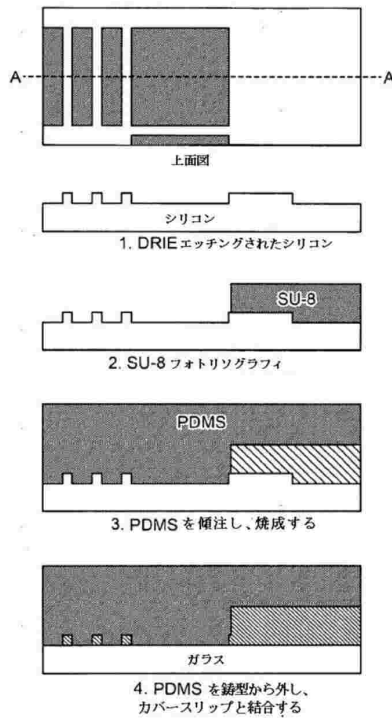


FIG. 2

10

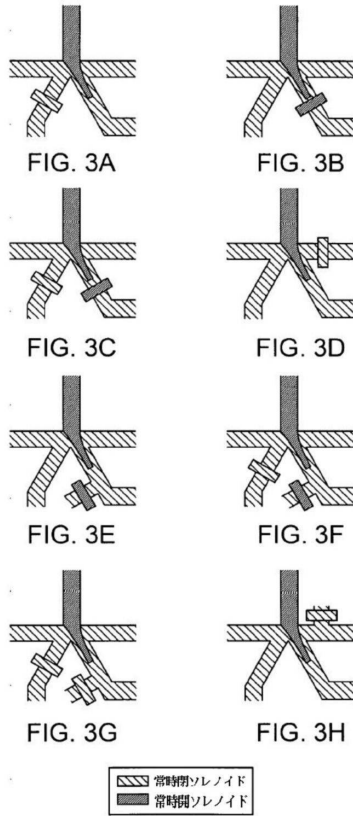
20

30

40

50

【 図 3 】



【 図 5 】

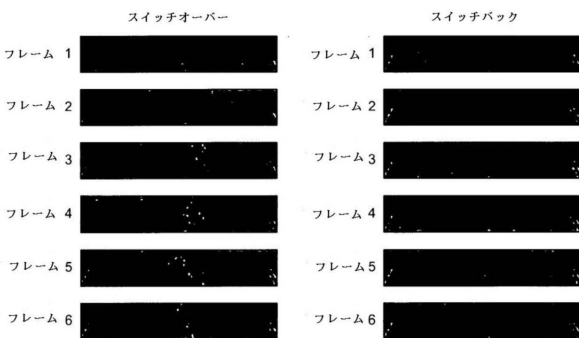
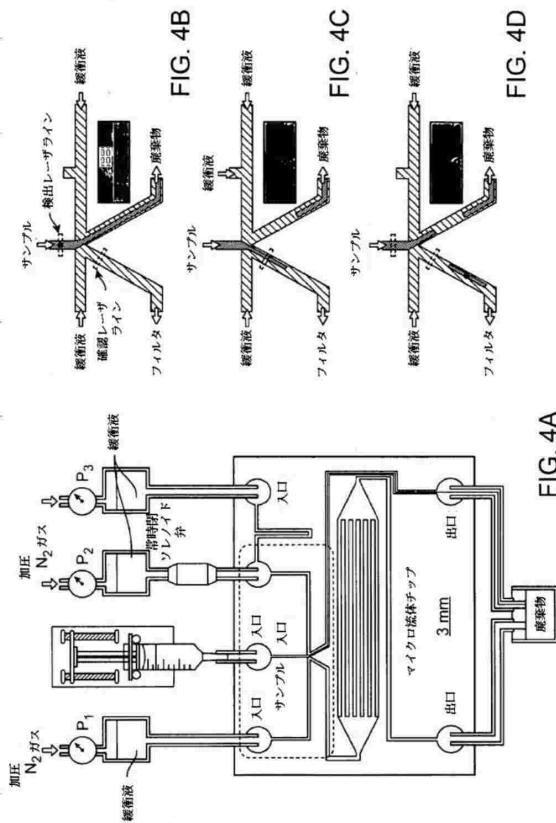
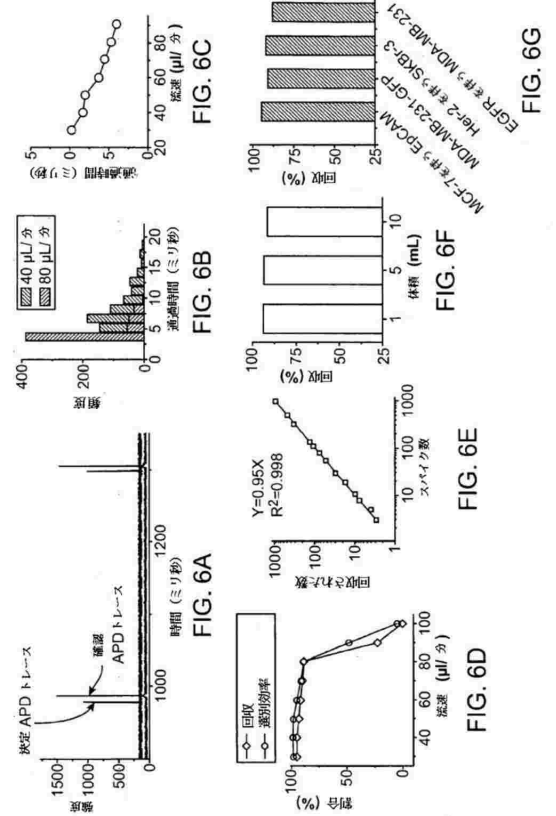


FIG. 5

【 図 4 】



【 図 6 】



10

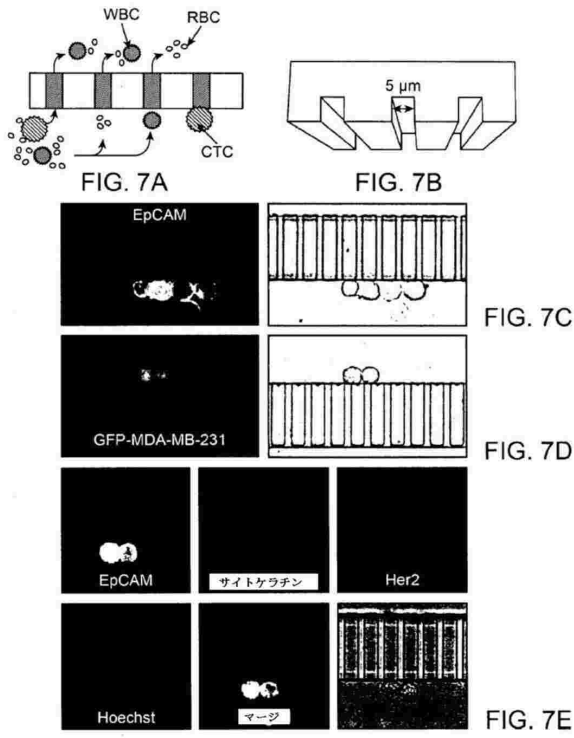
20

30

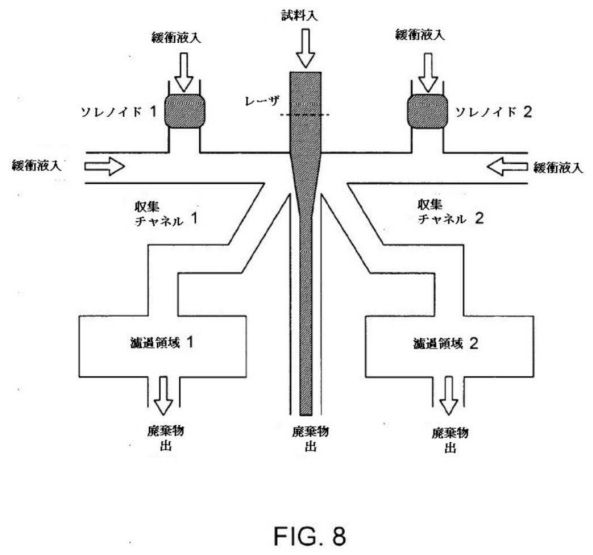
40

50

【 図 7 】



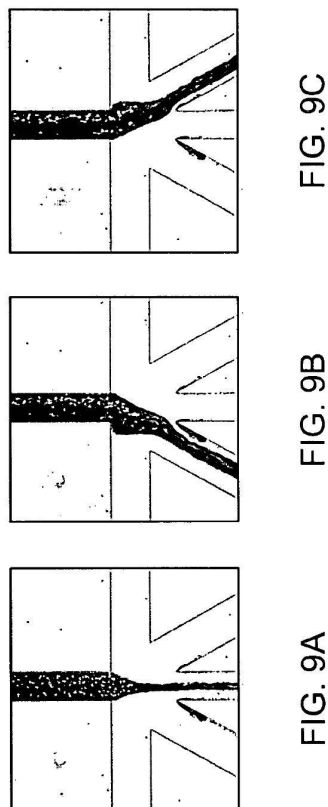
【 図 8 】



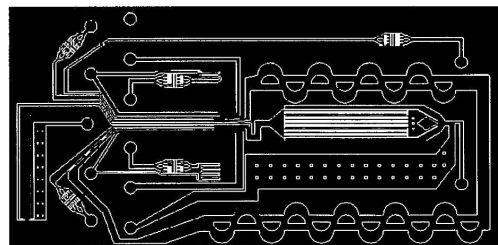
10

20

【 図 9 】



【 図 10 A 】



30

40

50

【図 10 B】

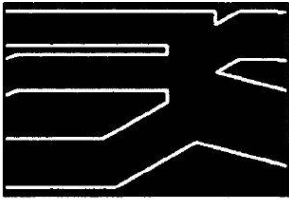


FIG. 10B

【図 10 C】

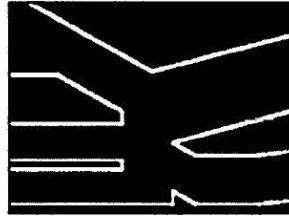


FIG. 10C

【図 10 D】



FIG. 10D

【図 10 E】

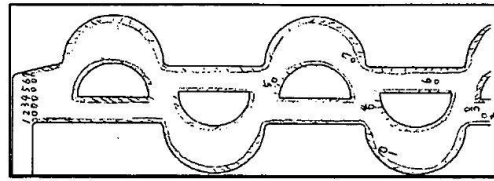


FIG. 10E

【図 11】

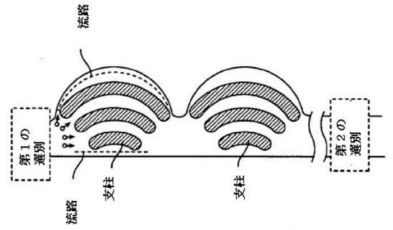


FIG. 11A

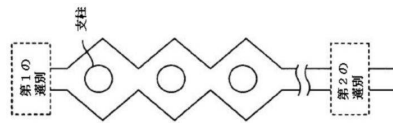


FIG. 11B

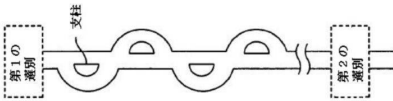


FIG. 11C

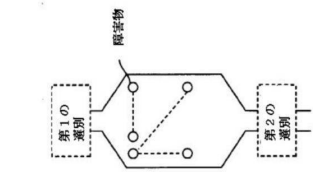


FIG. 11A

【図 12】



FIG. 12A

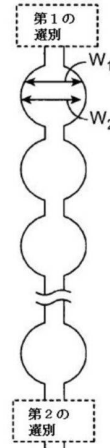


FIG. 12B

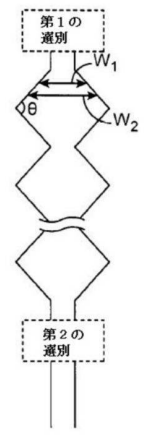


FIG. 12C

10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

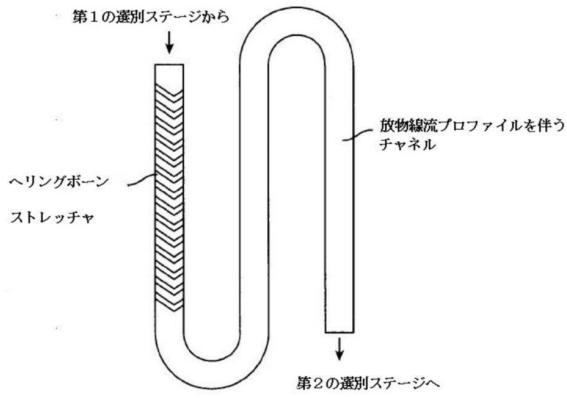


FIG. 13

【 図 1 4 】

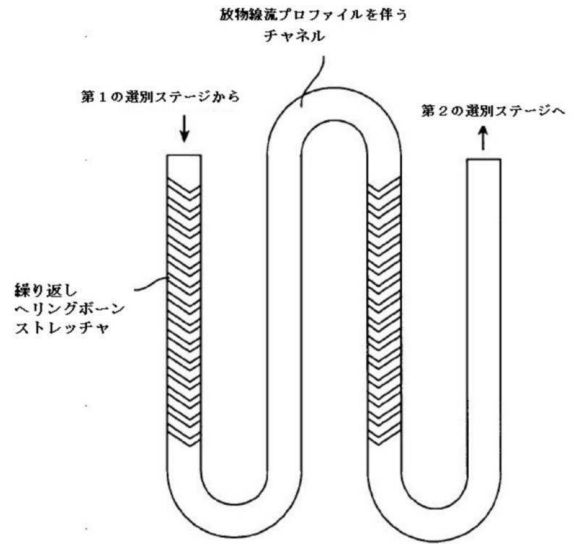


FIG. 14

【 図 1 5 】

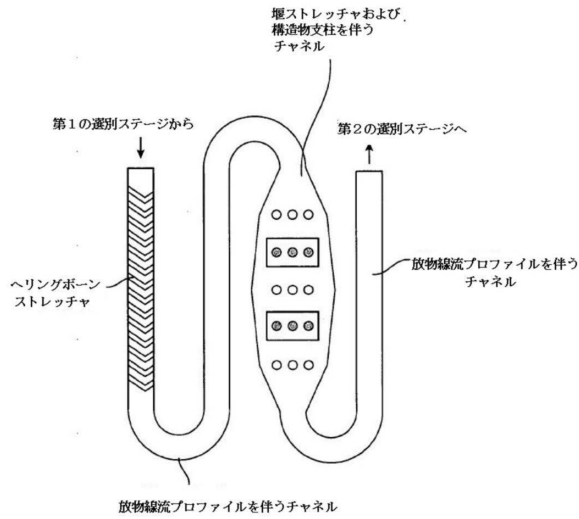


FIG. 15

【 図 1 6 】

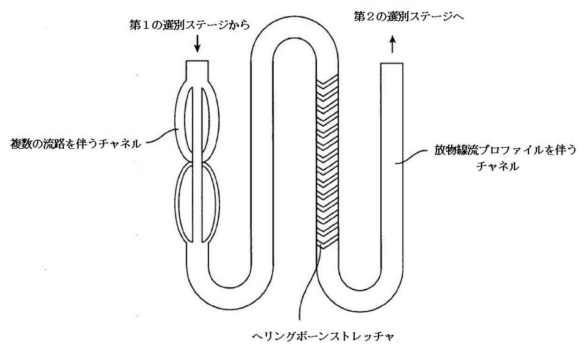


FIG. 16

10

20

30

40

50

【 図 17 】

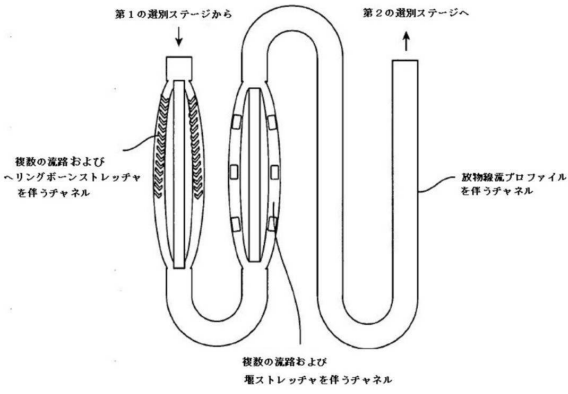


FIG. 17

【 図 18 A 】

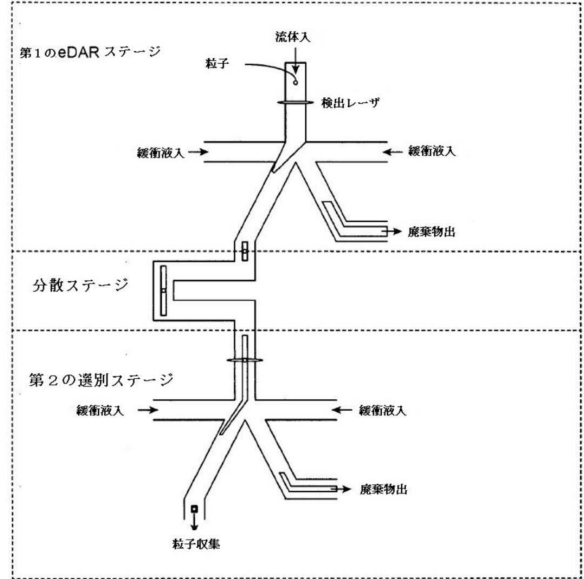


FIG. 18A

【 図 18 B 】

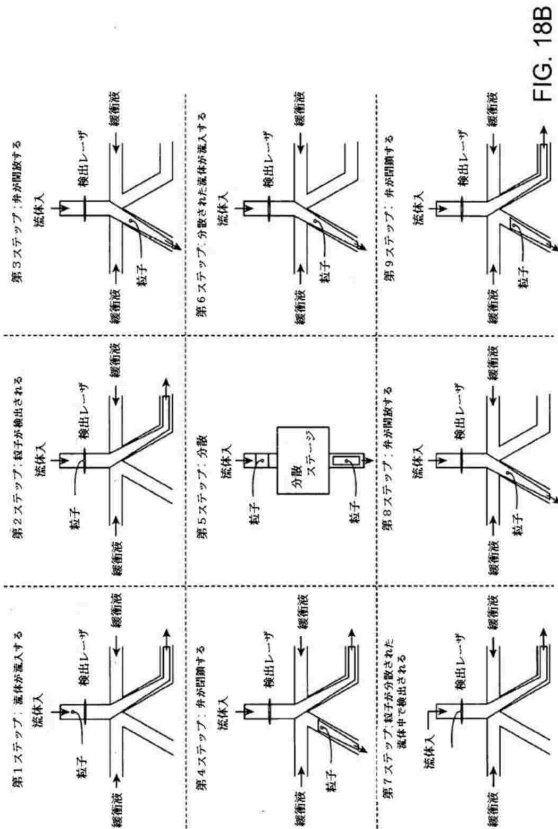


FIG. 18B

【 図 19 】

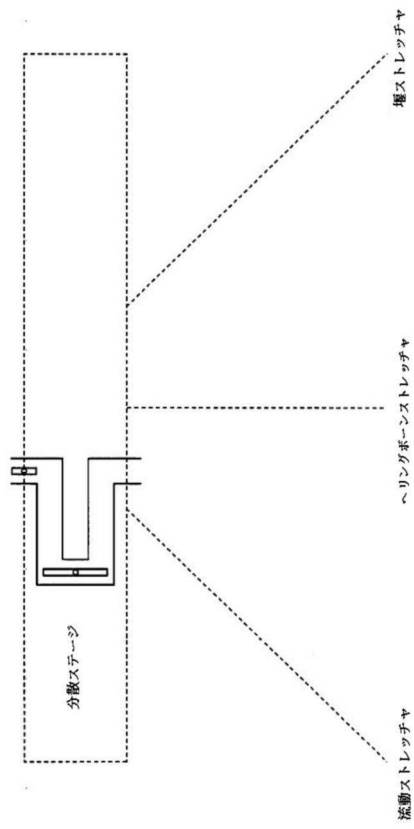


FIG. 19

10

20

30

40

50

【図 20 A】

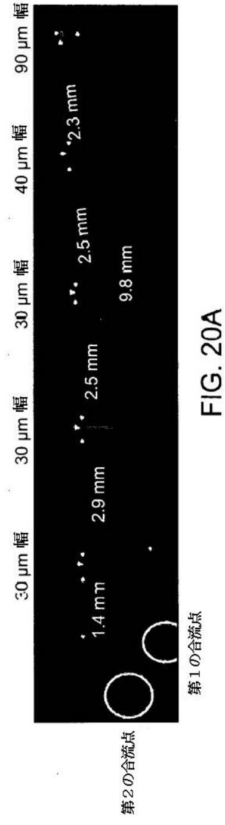


FIG. 20A

【図 20 B】



FIG. 20B

10

20

【図 21 A】

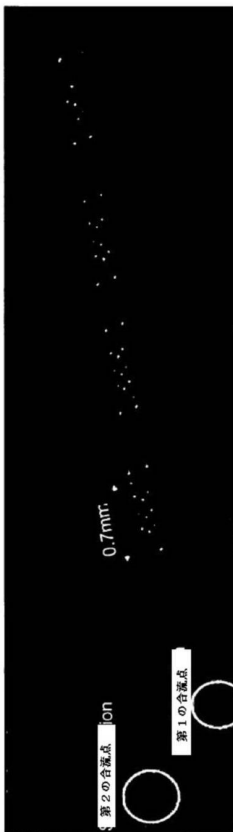


FIG. 21A

【図 21 B】

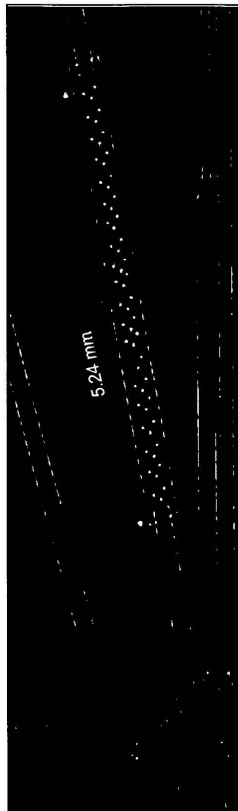


FIG. 21B

30

40

50

【図 2 2】



FIG. 22A

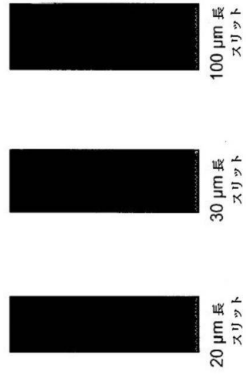


FIG. 22B

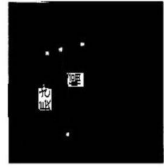


FIG. 22C

【図 2 3 A】

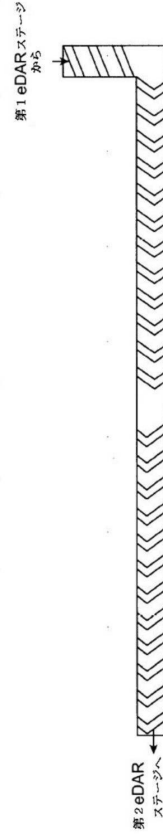


FIG. 23A

【図 2 3 B】

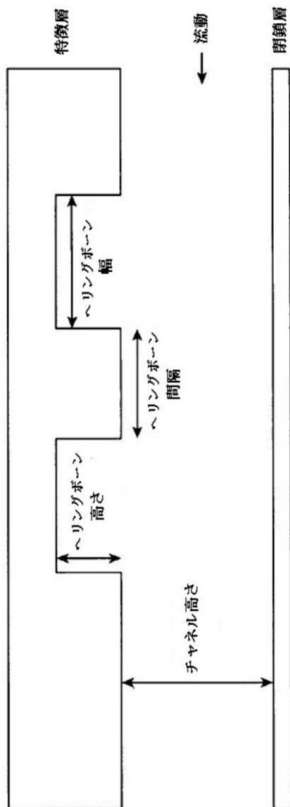


FIG. 23B

【図 2 4 A】

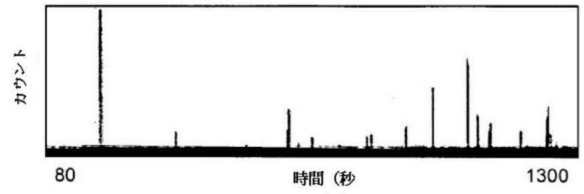


FIG. 24A

10

20

30

40

50

【 2 4 B 】

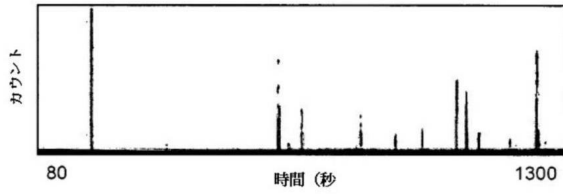


FIG. 24B

【 2 4 C 】

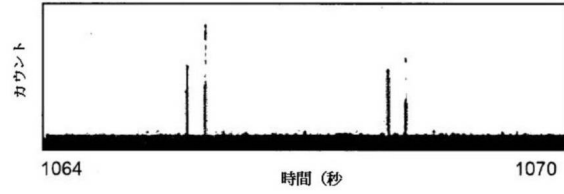


FIG. 24C

【 2 5 】

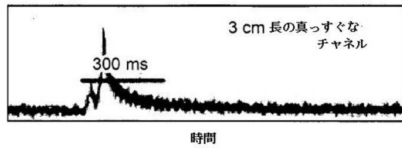


FIG. 25A

【 2 6 】

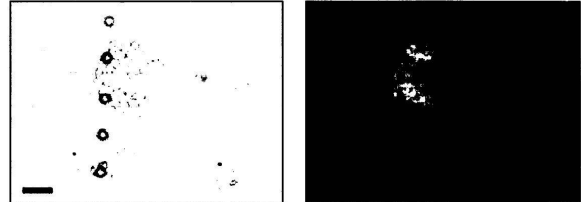


FIG. 26A

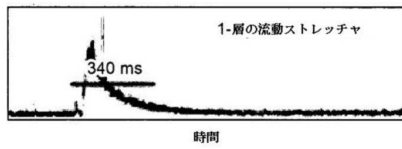


FIG. 25B

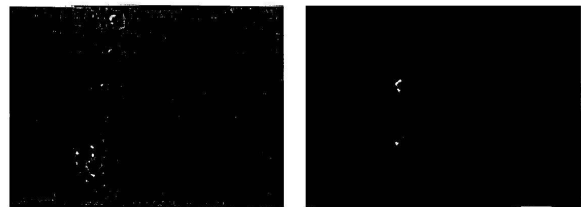


FIG. 26B

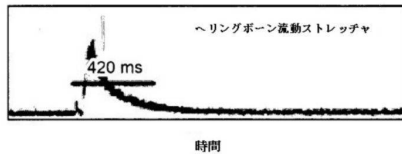


FIG. 25C

10

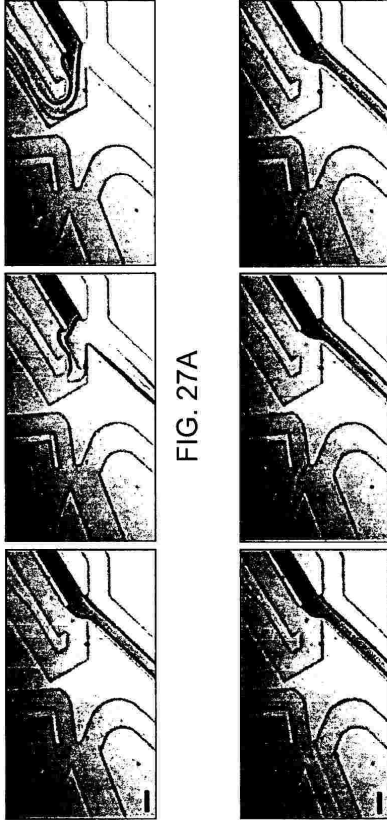
20

30

40

50

【図 27】



【図 28】

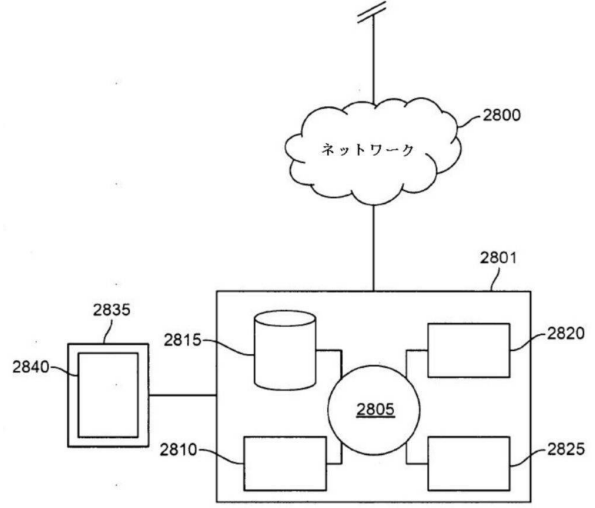


FIG. 28

【図 29 A】

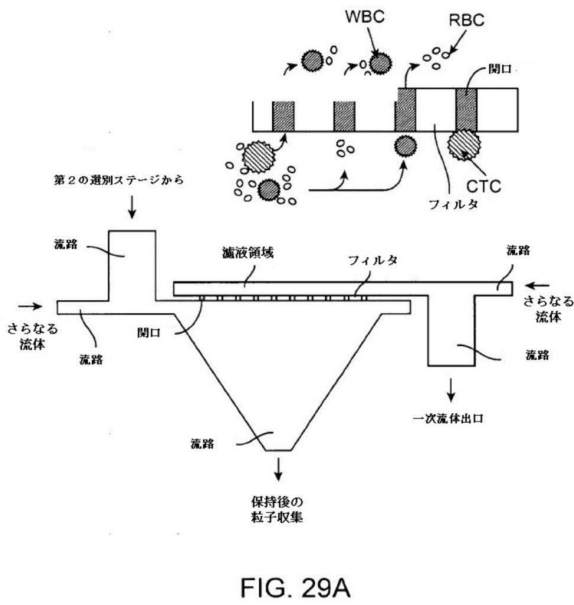


FIG. 29A

【図 29 B】

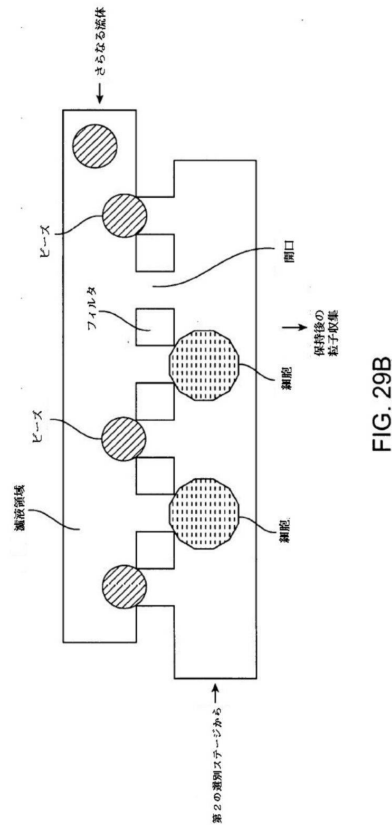


FIG. 29B

10

20

30

40

50

【図30A】

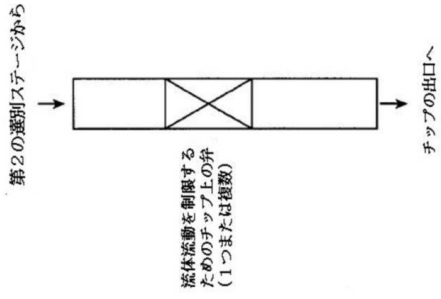


FIG. 30A

【図30B】

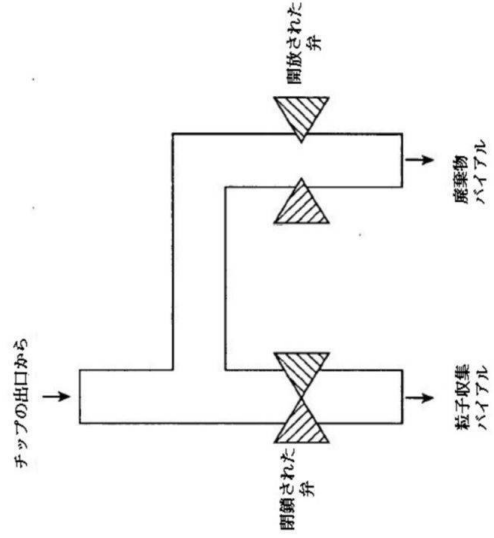


FIG. 30B

【図30C】

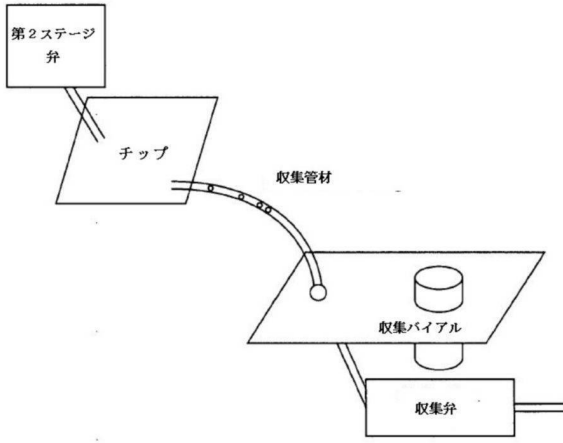


FIG. 30C

【図31】

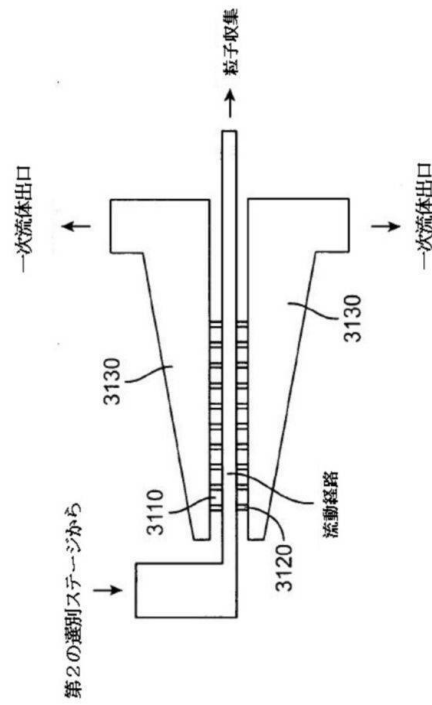


FIG. 31

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ダニエル ティー . チウ
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 , シアトル , ルーズベルト ウェイ エヌイー 4 5 4 5
, スイート 4 0 0
- (72)発明者 メンシャ ジャオ
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 , シアトル , ルーズベルト ウェイ エヌイー 4 5 4 5
, スイート 4 0 0
- (72)発明者 エレナー エス . ジョンソン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5 , シアトル , ルーズベルト ウェイ エヌイー 4 5 4 5
, スイート 4 0 0
- (72)発明者 ベリー ジー . シロ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , バーリンゲム , ハイウェイ ロード 1 5 0 4
- (72)発明者 ユー フィ ミン
台湾 2 4 1 ニュー タイペイ シティ , サンチョン ディストリクト , ジーヨン ストリート ,
ナンバー 5 1 , 7エフ .
- (72)発明者 ファン ウェイ - フェン
台湾 3 3 3 タオユアン シティ , グイシャン ディストリクト , シンファー 1 3 ティーエイチ
ストリート , ナンバー 2 1 , 1エフ .
- (72)発明者 チェン ジュイ - リン
台湾 1 1 4 タイペイ シティ , ネイファー ディストリクト , ガンファ ストリート , ナンバー
1 0 1 , 4エフ . - 1
- 審査官 外川 敬之
- (56)参考文献 特開 2 0 1 7 - 0 9 6 9 8 2 (J P , A)
特開 2 0 1 0 - 2 1 6 9 8 5 (J P , A)
特開平 0 1 - 1 8 2 7 3 6 (J P , A)
特表 2 0 1 6 - 5 2 7 4 9 4 (J P , A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 1 5 / 1 4 2 9
G 0 1 N 1 5 / 1 4
G 0 1 N 3 7 / 0 0
G 0 1 N 2 1 / 4 9