

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-529033

(P2012-529033A)

(43) 公表日 平成24年11月15日(2012.11.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49	F 2 GO 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	K
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K
GO 1 N 15/10 (2006.01)	GO 1 N 15/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2012-513723 (P2012-513723)  
 (86) (22) 出願日 平成22年6月2日 (2010.6.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年1月26日 (2012.1.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2010/052460  
 (87) 国際公開番号 W02010/140127  
 (87) 国際公開日 平成22年12月9日 (2010.12.9)  
 (31) 優先権主張番号 09162096.3  
 (32) 優先日 平成21年6月5日 (2009.6.5)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 590000248  
 コーニンクレッカ フィリップス エレクトロニクス エヌ ヴィ  
 オランダ国 5621 ペーアー アインドーフエン フルーネヴァウツウェッハ 1  
 (74) 代理人 100114753  
 弁理士 宮崎 昭彦  
 (72) 発明者 モーガン ハイウェル  
 オランダ国 5656 アーイー アインドーフエン ハイ テック キャンパスビルディング 44

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定のマーカーを表す粒子を判別し、計数するための多重周波数インピーダンス方法及び装置

(57) 【要約】

特定の抗原性マーカーを表す粒子を識別し計数するための分析方法が、提案される。1つの例(排他的でない)は、血液内のCD4+Tリンパ球分析である。当該方法は、懸濁液内に粒子を有するサンプルを得るステップと、インピーダンスラベルで特定のマーカーを表す粒子をラベル付けするステップと、特定のマーカーを表すラベル付けられた粒子を少なくとも判別するためにデュアル周波数システムを使用して、ラベル付けられたサンプルを測定するステップとを有する。当該方法は、粒子の正確なカウント、例えば血流内のCD4+Tリンパ球の数のカウントを可能にする。対応する装置も提供される。

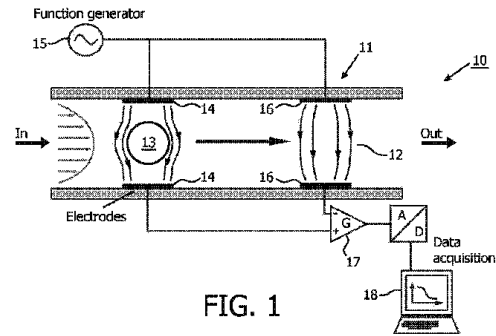


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

特定のマーカ-を表す粒子を識別し、計数するための分析方法であって、粒子を有するサンプルを得るステップと、インピーダンスラベルで前記特定のマーカ-を表す粒子にラベル付けするステップと、前記特定のマーカ-を表すラベル付けられた粒子を少なくとも判別するために複数の周波数システムを用いて、ラベル付けられたサンプルを測定するステップとを有する、分析方法。

**【請求項 2】**

前記特定のマーカ-を表す粒子をラベル付けするステップがマイクロ流体システム内で実施される、請求項 1 に記載の分析方法。

10

**【請求項 3】**

前記特定のマーカ-を表すラベル付けられた粒子を少なくとも判別するために、ラベル付けられたサンプルを測定するステップは、ラベル付けられたサンプルを単一の粒子を有する滴へ分割するステップと、少なくとも第 2 の周波数より低い第 1 の周波数と第 2 の周波数とで、単一の粒子のインピーダンスを決定するステップと、第 1 の周波数でのインピーダンスを、第 2 の周波数でのインピーダンスと第 1 の周波数でのインピーダンスとの比である不透明度に相関させるステップと、この相関から前記特定のマーカ-を表すラベル付けられたサンプルを少なくとも判別するステップとを有する、請求項 1 に記載の分析方法。

**【請求項 4】**

サンプルをラベル付けするステップが、前記特定のマーカ-に対する抗体で被覆されているビーズでのサンプルの培養を含む、請求項 1 に記載の分析方法。

20

**【請求項 5】**

ラベル付けられたサンプルを測定する前に、溶解ステップを実施するステップを更に有する、請求項 1 に記載の分析方法。

**【請求項 6】**

前記サンプルが血液サンプルであり、前記溶解ステップを実施するステップが、血液サンプルを有機酸のサポニンに曝すステップを有する赤血球溶解ステップを実施するステップである、請求項 5 に記載の分析方法。

**【請求項 7】**

ラベル付けられたサンプルを測定するステップがサンプルフローにおいて実施される、請求項 1 に記載の分析方法。

30

**【請求項 8】**

C D 4 + T リンパ球を識別し、計数するための請求項 1 に記載の方法の使用。

**【請求項 9】**

特定のマーカ-を表す粒子を識別し、計数するための装置であって、前記特定のマーカ-を表すラベル付けられた粒子を有するサンプルフローを有するためのマイクロチャンネルと、少なくとも一つの対の電極と、少なくとも第 2 の周波数より低い第 1 の周波数の第 1 の A C 信号及び第 2 の周波数の第 2 の A C 信号を前記少なくとも一つの対の電極に付与するための電子回路と、前記対の電極間に存在する粒子のインピーダンスを決定するための計算ユニットとを有し、前記計算ユニットは、少なくとも第 1 の周波数及び第 2 の周波数で粒子のインピーダンスを決定し、第 1 の周波数でのインピーダンスを、第 2 の周波数でのインピーダンスと第 1 の周波数でのインピーダンスとの比である不透明度に相関させ、この相関から前記特定のマーカ-を表すラベル付けられた粒子を少なくとも判別する、装置。

40

**【請求項 10】**

更に、基準電極として機能するための第 2 の対の電極を有する、請求項 9 に記載の装置。

**【請求項 11】**

更に、これら電極対のうちの一つの電極対間に存在する粒子の差動測定をするための増

50

幅回路を有する、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

前記マイクロチャネルは、懸濁液内の粒子の流れを受けて、懸濁液内の粒子の流れにおいて特定のマーカを表す粒子を識別し計数するため少なくとも一対の電極間で、懸濁液内の粒子の流れを導く、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 13】

サンプルのインピーダンスラベル付けがマイクロ流体装置で実施される、請求項 1 に記載の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、医療装置、医学診断法及び粒子カウントの分野に関し、より詳しくは細菌、ウイルス、非生物学的粒子及び細胞を含む種々異なる粒子を判別し、識別し、計数するための方法及び装置に関する。1つの例は、例えばヒト血液中のCD4 + Tリンパ球を判別し、識別し、計数するための例えば特定のマーカを表す血球である。他の例は、種々異なる表面マーカを表す細菌又はウイルスである。他の例は、抗体又はDNA若しくはペプチドの一部である表面マーカを持つ固体粒子である。

【背景技術】

【0002】

マイクロ流体システムは、細胞機能、細胞及び組織工学、疾患診断、血液サンプル調製及び創薬を研究するための固有の展望を示している。ごく最近、白血球又は白血球サブセットの純粋な母集団を全体の血液から分離するマイクロ流体工学の使用が、POC診断（ポイントオブケア診断）に対する多くの利点を引きつけている。

20

【0003】

例えば、免疫不全症（主にHIV）の診断は、血液分析を使用して実施される。血液中のTヘルパーリンパ球の濃度の測定は、HIV感染の経過を監視するために重要である。従って、CD4 + 及びCD8 + Tリンパ球の存在を検出して計数することは重要である。WHOガイドラインによると、血液の200 /  $\mu$ l未満の細胞のCD4 + T細胞数は、エイズの陽性診断を確定し、多くの設定において、抗レトロウイルス治療を適用するために必要な指標として用いられる。CD4 + カウント値が例えば350細胞 /  $\mu$ lの閾値から200 /  $\mu$ l未満に下がる前に、抗レトロウイルス治療の開始が推奨され、500細胞 /  $\mu$ lのCD4 + カウント閾値が、患者の臨床監視の頻度を増やすために広く使われている。

30

【0004】

蛍光ベースの流量血球計算（FACS）によるCD4 + Tリンパ球のレベルの定量化は、現在ゴールドスタンダードである。蛍光ベースの流量血球計算器は、複雑で高価な部品の器材であって、このように、サハラ以南のアフリカのようなリソースに乏しい環境に浸透していなかった。例えば発展途上国用にポイントオブケアCD4 + T細胞計数システムを使用するための単純さへのニーズがある。

【0005】

40

インピーダンス分光学（IS）は、細胞の誘電体特性を測定するために広く使われ、膜静電容量、膜抵抗、細胞質伝導率及び誘電率の値を供給してきた。これは、分析の「ラベル無」方法とみなされ得る。一般に、細胞は懸濁液内で測定され、データは母集団の平均を表す。単一の細胞の電気的特性の第1の高速測定は、1950年代にCoulterにより実施された。シングル低周波（又は直流）電気信号で実施される「電氣的ボリューム測定」を用いて、個々の血球が計数され判別できることが示された。1970年代において、ホフマン及びブリットは、フローチャネルに置かれた電極を持つミニチュアフローセルを使用して、単一の細胞の低周波及び高周波同時インピーダンス分析のためのマクロシステムを開発した。

【0006】

50

X. Cheng等による"Cell detection and counting through cell lysate impedance spectroscopy in microfluidic devices", Lab Chip, 2007, 7, 746-755 という文献は、マイクロ流体チャネル内の表面を固定された細胞から放出されるイオンによる周囲媒体の伝導率の変化の測定に基づいて、細胞を計数するための電気的方法を説明している。固定された細胞は、低い伝導率の低張性媒体を使用して溶解され、結果としてのインピーダンス変化が、細胞の数を検出し定量化するために、表面パターン化電極を使用して測定される。説明されている細胞溶解の方法は、20細胞/μlを検出するのに十分感度が高く、リソースが限られた環境のHIV患者のCD4細胞数の測定を含む多くのアプリケーション用のマイクロ流体装置内で細胞を検出し、列挙するための単純で効率的な方法を提供する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

インピーダンス分光法は、細胞、通常は混合タイプの大きな母集団で一般に実施される。従って、他の細胞の懸濁液内のCD4+細胞の分析は、この方法を使用して可能ではない。CD4+細胞は、基板に固定でき、顕微鏡により計数されるが、これはあまり信頼性が高くない。

【0008】

単離細胞アプローチの背景にある原理が臨床アプリケーションの広い薬効範囲に容易に適用できる一方、これらの単離細胞を検出することは、強調されるべき技術的なチャレンジのままである。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

特定のマーカを表す細菌、ウイルス、非生物学的粒子又は細胞、例えば血球のような粒子を識別し、計数するための良好な方法及び装置を提供することが、本発明の実施例の目的である。本発明の実施例による良好な方法及び装置は、特定のマーカを表す識別された粒子の数が正確に決定できるという点で、正確である。更にまた、本発明の実施例による良好な方法及び装置が、限定されるものではないが、リソースに乏しい環境においても使用できる。アプリケーションの他の領域は、異なるマーカを表す異なる細胞の包括的な分析及び識別のためのPOC(ポイントオブケア)装置を含む。

30

【0010】

上記の目的は、本発明による方法及び装置により達成される。

【0011】

本発明は、特定のマーカ、例えば特定の抗原性マーカを表す粒子、具体例では血球を判別し、識別し、計数するための総合的な方法及び装置を提供する。これは、オプションで疾患の診断のために、複数の周波数(2つ以上の周波数)インピーダンス血球計算と組み合わせたインピーダンスラベリングを用いて得られる。

【0012】

第1の態様において、本発明は、特定のマーカ又は他の抗体を表す例えば細菌、ウイルス、非生物学的粒子又は例えば血球のような細胞を識別し、計数するための分析方法を提供する。単なる例として、当該方法は、血液中のCD4+Tリンパ球を識別し、計数するために適用される。当該方法は、粒子を有するサンプルを得るステップと、インピーダンスラベルで前記特定のマーカを表す粒子をラベル付けするステップと、前記特定のマーカを表すラベル付けられた粒子を少なくとも識別するために複数の周波数システムを用いて、ラベル付けられたサンプルを測定するステップとを有する。

40

【0013】

速くて、安価且つ単純な分析を可能にし、例えば十分な血球分析(十分な血球算定)が数分内で実施できることが、本発明の実施例による方法の利点である。本発明の実施例による方法は、臨床現場において日常的に使用できる。分析は粒子の大きな母集団でよりもむしろ個々の粒子(又は、個々の粒子/ラベル複合体)で実施されるので、限定量のサン

50

ブル、例えば限定量の血液だけが必要とされる。イベント計数の予め定められた数を達成するために、サンプル、例えば血液の所与の量が使用されなければならない。本発明の実施例による方法は、1滴のサンプル内の粒子の数、例えば1滴の血液中の細胞の数を変えない。しかしながら、血液は大きな中央研究所で使用され、4mlチューブが研究所へ送られるサンプルであるので、従来のシステムは、4ml管の静脈穿刺血液を使用する。本発明の実施例によると、当該方法は、マイクロ流体装置で適用され、マイクロ流体フォーマットは次にPOC使用を可能にし、よって、何の格納を必要とすることなくサンプルへの即時のアクセスを可能にする統合されたサンプル調製を可能にする。指穿刺の血液がカウントを統計的に有意にするのに十分な細胞を含むという事実は、4mlチューブよりもむしろ指穿刺の血液だけの使用を可能にする。

10

**【0014】**

本発明の実施例による分析方法において、特定のマーカを表す粒子をラベル付けすることは、マイクロ流体システム内で実施される。具体例では、当該方法は、マイクロ流体システム内の例えば血球に適用される。細胞はマイクロ流体システムに加えらる必要があるだけであり、溶解及びラベリングが順次なされ得る。

**【0015】**

本発明の実施例による分析方法では、特定のマーカを表す少なくともラベル付けられた粒子を判別するためにラベル付けられたサンプルを測定するステップは、ラベル付けられたサンプルを単一の粒子を有する滴に分割するステップと、少なくとも第1の周波数及び第1の周波数より高い第2の周波数、オプションで2つより多い周波数で単一の粒子のインピーダンスを決定するステップと、第1の低い周波数でのインピーダンスを不透明度に相関させるステップであって、前記不透明度は、第2の高い周波数インピーダンスと第1の低い周波数インピーダンスとの比で定められる当該ステップと、この相関から特定のマーカを表す少なくともラベル付けられた粒子を判別するステップとを有する。

20

**【0016】**

本発明の実施例による分析方法では、サンプルをラベル付けすることは、特定のマーカに対する抗体でコーティングされたビーズでのサンプルの培養を含む。

**【0017】**

本発明の実施例による方法は、更に、ラベル付けられたサンプルを測定する前に、溶解ステップを実施するステップを有する。斯様な溶解ステップは、特定のマーカを表す細胞のより簡単な判別ができる。溶解ステップがマイクロ流体装置内で実施されることは、特に有利である。サンプルが血液である場合、溶解ステップは赤血球溶解ステップを有する。斯様な赤血球溶解ステップは、血液サンプルを有機酸のサポニンに曝すステップを有する。

30

**【0018】**

本発明の実施例では、ラベル付けられたサンプルを測定するステップは、サンプルフロー内で、例えばマイクロ流体装置内で実施される。

**【0019】**

第2の観点では、本発明は、サンプル内の粒子を識別し計数するための本発明の実施例による方法の使用を提供する。第2の観点の具体例では、本発明は、CD4+Tリンパ球のカウント及び検出のための本発明の実施例による方法の使用を提供する。斯様なカウントは、HIVを診断する際の助けになるので有利である。本発明の実施例では、個々のCD4+細胞の数は、単一の細胞のインピーダンス信号から推定される。

40

**【0020】**

第3の観点では、本発明は、特定のマーカを表す粒子を識別し、計数するための装置であって、少なくとも一对の電極で、前記特定のマーカを表すラベル付けられた粒子を有するサンプルフロー、例えば懸濁液内の粒子を有するためのマイクロチャンネルと、少なくとも第2の周波数より低い第1の周波数の第1のAC信号及び第2の周波数の第2のAC信号を前記少なくとも一对の電極に少なくとも付与するための例えばファンクションジェネレータのような電子回路と、前記一对の電極間に存在する粒子のインピーダンスを決

50

定するための計算ユニットとを有し、前記計算ユニットは、少なくとも第1の周波数及び第2の周波数で粒子のインピーダンスを決定し、第1の周波数でのインピーダンスを、第2の周波数でのインピーダンスと第1の周波数でのインピーダンスとの比である不透明度に相関させ、この相関から前記特定のマーカを表すラベル付けられた粒子を少なくとも判別する、装置を提供する。

【0021】

本発明の実施例による斯様な装置は、特定のマーカを表す粒子、例えば血球が固定基板に固定され、従って、マイクロチャンネルがサンプルのフローを有しない従来技術とは異なる。

【0022】

本発明の実施例による装置は、更に、基準電極として機能するように調整されている第2の対の電極を有する。

【0023】

本発明の実施例による装置は、更に、これら電極対の1つの電極対間に存在する粒子の差動の測定をなすように調整されている増幅回路を有する。このように、差動のカウント、例えばサンプルが血液サンプルである場合、白色の血球差数カウントを実施できるマイクロ流体単細胞インピーダンス血球計算器が提供される。

【0024】

本発明の実施例による装置では、マイクロチャンネルは、懸濁液内の粒子の流れを受けて、懸濁液内の粒子の流れにおいて特定のマーカを表す粒子を識別し計数するため少なくとも一対の電極間で、懸濁液内の粒子の流れを導くのに適している。

【0025】

本発明の実施例による装置では、低周波測定能力は、粒子をラベル付けするために使用される官能化されたビーズのインピーダンス特性の修正を通じてサンプル内に存在する例えばDNA、ウイルス、タンパク質等の生物学的粒子の検出を可能にするために拡張できる。

【0026】

本発明の実施例によると、マイクロ流体装置は、官能化されたナノスケールのビーズと生物学的粒子、例えばDNA、ウイルス、タンパク質等との結合の検出を可能にするために縮小できる。

【0027】

CD4 + Tリンパ球計数のために使用されてもよいことが、本発明の実施例の利点である。使用するのに単純で、速くて、正確で、安価であることは、本発明の実施例の利点である。

【0028】

本発明の特定の及び好適な態様は、独立請求項及び従属請求項にセットされている。従属請求項の特徴は、適当にまた請求項で単に明示されていない特徴と共に、独立請求項の特徴と組み合わせられてもよいし、他の従属請求項の特徴と組み合わせられてもよい。

【0029】

本発明の上記及び他の態様が、以下に説明される実施例を参照して明らかに説明されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、デュアル周波数インピーダンス測定を実行する本発明の実施例によるマイクロインピーダンス血球計算器システムの模式図である。

【図2】図2(a)は、差動の検出システムを示す本発明の実施例によるインピーダンス検出システムの簡略概略図である。左側の電極対は電極間に細胞のない等価回路モデル(ECM)を例示し、右側の電極対は電極間に細胞を持つ。図2(b)は、ポリマービーズのため、及び類似のサイズの細胞のための典型的な周波数依存のインピーダンス大きさ信号の比較を例示する。

10

20

30

40

50

【図3】図3は、インピーダンスの大きさに対して、(a) 5.62  $\mu\text{m}$ 直径のラテックスビーズ、及び(b) Tリンパ球、単球、好中球のMACS精製された母集団のための周波数を示している実験データを与える。各ポイントは、約1500のイベントを有し、測定データの平均及び標準偏差を示す。点線は、細胞(又は、ビーズ)及び差動増幅電子回路を持つ検出領域に対する等価回路モデルを組み込んでいるPSPICE回路シミュレーションを示す。

【図4】図4(a)は、Tリンパ球、単球、好中球及び5.62  $\mu\text{m}$ 直径ラテックスビーズの母集団の混合物のための低周波(503 kHz)インピーダンス大きさに対してプロットされる不透明度( $|Z|@1707\text{ kHz} / |Z|503\text{ kHz}@$ )を示している散乱プロットである。図4(b)は、低周波インピーダンス大きさのヒストグラムを示す。図4(c)は、不透明度のヒストグラムを示す。図4(d)は、細胞(ビーズなし)の前方及び側部散乱特性を示している同じサンプルのFACS分析を例示する。

【図5】図5(a)乃至図5(c)は、蛍光ラベル付けられた(抗CD14 FITC及び抗CD16 Alexa700)サポニン/ギ酸処理された全体血液の蛍光及び前方方向光散乱特性のFACS散乱プロットである。全てのイベントは、FSC信号でトリガーされ、細胞母集団がこれらの蛍光信号に従って識別された。図5(d)乃至図5(f)は、マイクロインピーダンス血球計算器を使用して測定されるような、蛍光及び低周波(503 kHz)インピーダンス大きさ特性を示している(同じサンプルからの)散乱プロットである。データは、両システムが3つの細胞母集団、好中球、単球及びリンパ球を明らかに分離できることを示す。

【図6】図6(a)は、不透明度( $|Z|@1707\text{ kHz} / |Z|@503\text{ kHz}$ )に対して、サポニン/ギ酸処理された全体の血液及び7.18  $\mu\text{m}$ 直径ラテックスビーズの母集団に対する低周波(503 kHz)インピーダンス大きさを示している散乱プロットである。図6(b)は、低周波インピーダンス大きさのヒストグラムを示す。別々の母集団のためのデータは、ガウス分布(グレイ曲線)にフィットする。図6(c)は、不透明度のヒストグラムを示す。別々の母集団のためのデータは、ガウス分布(グレイ曲線)にフィットする。図6(d)は、細胞(ビーズなし)の前方及び側部散乱特性を示している同じサンプルのFACS分析である。

【図7】図7は、サポニン/ギ酸溶解溶液での処置の後、白血球に対する典型的差動散乱プロットを示す。図の楕円は、二次元のガウス確率プロフィールを例示し、相対的なリンパ球、単球及び顆粒白血球母集団は、これらの確率分布から得られた。この差動の散乱プロットのデータは、図8に関して分析された。

【図8】図8は、基準全血液アナライザから得られる測定の関数として、相対的なWBC分布の相関を例示する。基準装置及び本発明の実施例によるインピーダンス血球計算器から得られた結果間の共分散ファクタは、凡例で例示される。新規な溶解物及び完全にきれいにされたチップを毎回調製して、1つのサンプルに対して、同じ実験が5回繰り返された。

【図9】図9は、抗体被覆されたビーズでのラベリングにより、CD4+母集団がどのように識別されるかを示す。リンパ球及び単球は、インピーダンスプロットで明らかに判別される。

【図10】図10は、実験からのデータ例を示す。図10は、ラベリング前のリンパ球及び好中球のプロット線を示す。

【図11】図11は、実験からのデータ例を示す。図11は、CD4抗体官能化されたビーズでのラベリングの後の血球のプロット線を示す。

【図12】図12は、溶解した全体の血液及びCD4ビーズで培養される溶解した全体の血液に対するFACS散乱プロットである。楕円は、取付けられたラテックスビーズを持つCD4+Tリンパ球母集団の位置を示す。

【図13】図13は、(CD4及びCD14に対する)蛍光抗体でラベルをつけられると共にCD4ビーズで培養された溶解される全体の血液のサンプルからのFACSデータを示す。

10

20

30

40

50

【図14】図14は、不透明度（|Z|@10007kHz / |Z|@503kHz）に対して、様々な母集団を示している低周波大きさ（503kHz）のIS散乱プロットである。

【図15】図15は、本発明の実施例によるインピーダンスマイクロ血球計算器のための較正データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

図面は、単に模式的であって、非限定的である。図において、幾つかの要素のサイズは誇張され、説明の便宜上、寸法通りには描かれていない。

【0032】

請求項の何れの参照符号も、範囲を制限するものとして解釈されない。

【0033】

異なる図面において、同じ参照符号は、同じ又は類似した要素を指す。

【0034】

一つの態様では、本発明は、例えばヒト血液中のCD4+Tリンパ球を識別し計数するために、特定のマーカーを表す細胞、例えば血球を識別し計数するために、インピーダンスラベリングと組み合わせて低コストで単純なインピーダンスフローの血球計算分析方法の使用を提供する。

【0035】

これ以降の詳細な説明は、血液中のCD4+Tリンパ球を識別し計数する具体例のために与えられているが、本発明は、これに限定されず取付けられたウイルスを持つナノビーズ、（限定的なリストの）細菌、ウイルス、非生物学的粒子、細胞、解離した組織を含む、粒子の識別、判別及び計数を一般に含む。

【0036】

一般に血液、特にヒトの血液は、以下の3つのカテゴリの何れかに分類される血球を有する：ボディ組織に酸素を送るための赤色の血球、すなわち赤血球と、感染症及び異物に対してボディを防御するために抗体を作る白色の血球、すなわち白血球と、血液凝固のための血小板とを有する。血球の3つのカテゴリは、血漿内に懸濁される。血漿は、90%水であり、血液量の約55%を構成し、様々なタンパク質（例えばアルブミン、フィブリノゲン、グロブリン及び他の凝固タンパク質）を含む。

【0037】

白血球の5つの異なる多様なタイプが、存在する：好中球（白血球の40-75%）、好酸球（白血球の0-7%）、好塩基球（白血球の0-1%）（これら三つは、顆粒白血球という名前でもとめられている）、リンパ球（白血球の20-45%）及び単球（白血球の3-11%）。血液内の白血球の数は、しばしば疾患の指標である。1リットルの血液内に、通常 $4 \times 10^9$ と $1.1 \times 10^{10}$ との間の白血球がある。

【0038】

リンパ球は、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、T細胞及びB細胞を有する。T細胞及びB細胞の機能は、抗原提示として知られるプロセス中の特定の「異物」抗原（細菌の抗原）を認識することである。T細胞及びB細胞が侵入物を識別すると、これらの細胞は、特定の病原体又は病原体に感染した細胞を最大限除去するように調整される特定の反応を生成する。B細胞は、細菌及びウイルスのような異物を中和するとき、大量の抗体を作ることにより病原体に反応する。病原体に反応して、ヘルパーT細胞と呼ばれる幾つかのT細胞は免疫反応を導くサイトカインを作る一方、細胞障害性T細胞と呼ばれる他のT細胞は病原体に感染した細胞の死を誘導する中毒性顆粒を作る。

【0039】

指定のクラスタと呼ばれ、しばしばCDと略記される分化のクラスタは、白血球に存在する細胞表面の微粒子の識別及び調査のために使用されるプロトコルである。ほぼ250の異なるCDタンパク質がある。CDシステムは、細胞マーカーとして一般に用いられ、細胞表面上に微粒子が存在することに基づいて細胞を規定できる。これらのマーカーは、

10

20

30

40

50

しばしば、特定の免疫機能を細胞と関連付けるために用いられる。

【0040】

CD微粒子は、フローサイトメトリを含む様々な方法を使用して、細胞分類に利用される。細胞母集団は、通常、特定の細胞分画がCD微粒子を表すか又は欠いているかどうかを示すために、「+」（正）又は「-」（負）シンボルを用いて定められる。2つの一般に使用されるCD微粒子は、一般に、ヘルパー及び細胞障害性T細胞のためのマーカーとして、それぞれ使われるCD4及びCD8である。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、入り込むためにヘルパーT細胞の表面上のケモカイン受容体及びCD4を結合させる。血液内のCD4及びCD8T細胞の数は、しばしば、HIV感染の経過を監視するために用いられる。

10

【0041】

HIV感染は、CD4受容体を所有するT細胞の数の漸進的低減を導く。従って、医学専門家は、いつHIV感染患者の治療を開始するべきかを定めるために、CD4陽性細胞数を参照する。CD4試験は、細胞の表面上のCD4受容体を表すT細胞の数を測定する。通常血液値は、 $1 \times 10^9 / L$ を超える。結果は、通常、血液のマイクロリットル当たりの細胞の数で表される。CD4陽性細胞数が最低点、1マイクロリットルにつき約200350個の細胞数に到達するとき、患者は、しばしば治療を受ける。

【0042】

フローサイトメトリは、微細な粒子、例えば液体ストリーム内に懸濁される細胞の化学及び/又は物理的特性を学習するための技術、例えば計数し、分類し、調べるための技術である。

20

【0043】

本発明の実施例は、インピーダンス分光学を実施するためのフローサイトメトリを利用する。

【0044】

図1は、本発明の実施例による単一の細胞分析システム10のブロック図を示す。マイクロチャンネル12を含むマイクロ流体装置11が提供され、懸濁している液体内に懸濁される細胞13がマイクロチャンネル12を流れる。これは、細胞が計数されるため固定基板に固定される従来の分析システムと異なる。最初の1対のマイクロ電極14は、チャンネル12内に組み立てられ、これらは小さな信号のAC電圧が生成されるファンクションジェネレータ15に接続されている。この印加電圧とマイクロ電極14間のマイクロチャンネル12を流れる測定された電流との比は、マイクロ電極14の間を通過する単一細胞13の電気的インピーダンスを決定するために用いられる。

30

【0045】

図1及び図2に示されるように、マイクロ電極14、16の2つの対は、2つの密接に配置された検出ボリュームを定めるために用いられ、両方とも同じファンクションジェネレータ15に接続され、従って、同じAC電圧を受信するので、差動の測定が個別セル13でなされる。最初の対の電極14は細胞13から電気的信号を測定する一方、第2の対の電極16は、基準として働き、懸濁している液体を持つが、細胞13が存在しないマイクロチャンネル12からの信号を測定する。電気的信号は、カスタムメイドの電子回路を使用して測定される。このダブル測定方法は、温度の変動又は懸濁している液体の構成から生じる測定ノイズ及びドリフトを著しく減らす。

40

【0046】

使用において、懸濁液内の細胞13は、所定のレート、例えば秒当たりほぼ100個の細胞13のレートでシリンジポンプ（図示されていない）を使用して、マイクロ流体装置11のマイクロ流体チャンネル12を通過するポンピングされる。細胞13がチャンネル12を通過するので、細胞13は検出ボリューム内の電界をかき乱し、よってその後、正の信号（細胞13が最初の対の電極14を通過するとき）及び負の信号（細胞13が第2の対の電極16を通過するとき）を発生させ、これらの信号は、インピーダンスを供給するように処理される。測定された信号の2つのピーク（正及び負の）間の時間は、電極14、1

50

6間の細胞13の移動時間に対応する。本発明の実施例によると、高速インピーダンス分析は、2つの同時の周波数で実施され、システム10からのデータは、分析装置18上で動いている分析ソフトウェアを使用して分析される。分析装置18は、一对の電極の間にある血球のインピーダンスを決定するための計算ユニットを有し、当該計算ユニットは、第1の周波数及び第2の周波数で血球のインピーダンスを決定し、第1の周波数でのインピーダンスを、高周波インピーダンスと低周波インピーダンスとの比である不透明度に相関させ、この相関から特定のマーカーを表すラベル付けられた血球を判別する。

【0047】

懸濁液内の細胞13の誘電体特性は、異質なシステムの等価複素誘電率と個々の粒子及び懸濁媒体の特性との関係の特徴づけるマクスウェルの混合物論を使用して説明される。

【0048】

媒体内の球状粒子（例えば細胞13）の懸濁液に対して、混合物の等価複素誘電率  $\tilde{\epsilon}_{mix}$  は、

$$\tilde{\epsilon}_{mix} = \tilde{\epsilon}_m \frac{1 + 2\Phi f_{CM}}{1 - \Phi f_{CM}}$$

により与えられる。

ここで、

$$f_{CM} = \left( \frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_p + 2\tilde{\epsilon}_m} \right)$$

であり、

$$\tilde{\epsilon}_m$$

及び

$$\tilde{\epsilon}_p$$

は、それぞれ懸濁媒体及び細胞13の複素誘電率である。  $\Phi$  は体積分率、すなわち細胞13の体積と検出体積との比である。このモデルは、細胞13が固体均一な対象物であるという仮定に基づく。この仮定は、薄膜により囲まれた均一な対象物として粒子を扱うシェルモデルを使用して、生体細胞の場合にまで拡張できる。ここで、

$$\tilde{\epsilon}_p$$

は、以下により与えられる：

10

20

30

40

$$\tilde{\epsilon}_p = \tilde{\epsilon}_{mem} \frac{\left(\frac{R}{R-d}\right)^3 + 2\left(\frac{\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_{mem}}{\tilde{\epsilon}_i + 2\tilde{\epsilon}_{mem}}\right)}{\left(\frac{R}{R-d}\right)^3 - \left(\frac{\tilde{\epsilon}_i - \tilde{\epsilon}_{mem}}{\tilde{\epsilon}_i + 2\tilde{\epsilon}_{mem}}\right)}$$

ここで、

10

$$\tilde{\epsilon}_{mem}$$

及び

$$\tilde{\epsilon}_i$$

は、それぞれ細胞膜及び細胞内部（細胞質）の複素誘電率である。Rは細胞の半径であり、d（ $d < R$ ）は膜の厚みである。

【0049】

混合物論は、低い体積分率  $< 0.2$ 、例えば  $< 0.1$ での細胞の混合物の性質を記述し、最初の1対の測定電極である2つの測定電極14の間に位置される単一の細胞13の誘電体特性をモデル化するために用いられる。システムの幾何学的なパラメータ（電極サイズ、チャンネル寸法等）が知られている場合、システムの誘電率及び伝導率の値は、等価な電気的部品により置き換えられる。

20

【0050】

懸濁液内の細胞13のための簡略化された等価回路モデル（ECM）が、図2（a）に示される。細胞がない媒体のインピーダンスは、図2（a）の左側に示されるように抵抗（ $R_m$ ）とキャパシタ（ $C_m$ ）との並列結合により表わされる。電極14間の細胞13で、図2（a）の右側に示されるように、回路は変更されている。細胞13は、薄い絶縁膜を持ち、キャパシタ（ $C_{mem}$ ）としてふるまう。 $R_{cyt}$ は、細胞質の等価抵抗である。 $C_{dl}$ は、液電極インターフェースでの電気的ダブル層の静電容量を表す。

30

【0051】

ECM内の部品の値は、細胞13の誘電体特性（膜静電容量及び細胞質抵抗）、懸濁媒体伝導率及び誘電率、並びに体積分率により決定される。システムの反応を支配する式は、以下に詳述される。

【0052】

2つの平面電極14の間に保持された細胞13と、低い体積分率（例えば $< 10\%$ ）とに対して、個々の電気的部品は以下の通りに表される：

$$R_m = \frac{1}{\sigma_m (1 - 3\Phi/2) l \kappa}$$

$$C_m = \epsilon_\infty l \kappa$$

40

$$C_{mem} = \frac{9\Phi R C_{mem,0}}{4} \kappa l$$

50

$$R_i = \frac{4 \left( \frac{1}{2\sigma_m} + \frac{1}{\sigma_i} \right)}{9\Phi\kappa l}$$

$$\kappa = \frac{K(k)}{K'(k)} \quad k = \tanh \left( \frac{\pi w}{2h} \right)$$

10

【 0 0 5 3 】

この式において、 $\kappa$  は不均一性の電界を考慮するシュヴァルツ-クリストッフェルマッピング方法を使用して解析されるインピーダンス検出領域に対する幾何的細胞定数であり、 $h$  はマイクロ流体チャネル12の高さであり、 $w$  は幅であり、 $l$  は電極14の長さである。 $K(k)$  は、第1種の完全楕円積分であり、 $K'(k)$  は相補的積分であり、 $k$  は楕円関数のモジュラスである。

20

【 0 0 5 4 】

これらの式において、体積分率  $\phi$  は、以下により与えられる：

$$\phi = 4/3 * R^3 * 1/wlh$$

また、

$$C_{mem,0} = \epsilon_{mem} / d \quad \epsilon_{\infty} = \epsilon_m \frac{2\epsilon_m + \epsilon_i - 2\Phi(\epsilon_m - \epsilon_i)}{2\epsilon_m + \epsilon_i + \Phi(\epsilon_m - \epsilon_i)}$$

ここで、 $C_{mem}$  は比膜容量（単位領域当たりの静電容量）であり、 $d$  は膜の厚さであり、

30

 $\epsilon_{\infty}$ 

は無限周波数での誘電率であり、

 $\tilde{\epsilon}_p$ 

及び

 $\tilde{\epsilon}_m$ 

40

はそれぞれ細胞13及び懸濁媒体の複素誘電率である。

【 0 0 5 5 】

システムの複素インピーダンス

 $\tilde{Z}_{mix}$ 

は、

$$\tilde{Z}_{mix} = \frac{1}{j\omega\tilde{\epsilon}_{mix}l\kappa}$$

となる。

【0056】

懸濁媒体内の電界も、電極と電解質とのインターフェースで電氣的ダブル層のため、周波数で変化する。この作業において、ダブル層は、理想的なキャパシタ ( $C_{dl}$ ) として単純にモデル化される。

【0057】

回路 (ダブル層を含む) の総インピーダンスは、以下の通りである：

$$\tilde{Z}_{mix\_DL} = \frac{2}{j\omega C_{DL}} + \frac{R_m(1+j\omega R_i C_{mem})}{j\omega R_m C_{mem} + (1+j\omega R_i C_{mem})(1+j\omega R_m C_m)}$$

【0058】

細胞13の誘電パラメータに対する典型的値は、以下の通りである： $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$ 、 $d = 5 \text{ nm}$ 、 $\sigma_m = 80 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ 、 $\sigma_{mem} = 1.6 \text{ S m}^{-1}$ 、 $\sigma_{mem} = 11.0 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ 、 $\sigma_{mem} = 10^{-8} \text{ S m}^{-1}$ 、 $\sigma_i = 60 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ 、 $\sigma_i = 0.6 \text{ S m}^{-1}$ 。シミュレーションでは、細胞パラメータに対する実際値は、表1からの値が採用された。マイクロ流体装置11のための典型的幾何学的な寸法は、 $w = h = 1 = 20 \text{ } \mu\text{m}$ である。実際値は、個々のマイクロ流体装置の測定から得られる。

【0059】

以上の説明から、低周波でのインピーダンスが細胞膜 ( $C_{mem}$ ) により支配されることが分かる。印加される電界の周波数が増大するにつれて、このキャパシタは短絡され始め、細胞は、細胞質の伝導率に比例した値を持つ抵抗 ( $R_{cyt}$ ) としてふるまう。細胞質の容量性リアクタンスは、高周波での反応にほとんど効果を持たず、無視される。

【0060】

上記式は、懸濁液内の単一の細胞13の電氣的インピーダンスを計算するために用いられた。十分な電気回路分析は、PSPICEを使用して実施された。モデルは、マイクロ流体装置11、電氣的ダブル層、懸濁媒体内の細胞13及び増幅回路17の部品の電氣的特性を含む。図2(b)は、任意の細胞13及び(同様のサイズの)ラテックスビーズのインピーダンスの大きさが周波数でどのように変化するかを示す。低周波では、システムは、電氣的ダブル層により支配される。1 MHz ~ 10 MHzの周波数範囲では、細胞13のインピーダンスは、細胞膜の(マクスウェルワグナー)界面緩和(誘電分光学では、これは、分散と称される)のため、急速に減少する。斯様な緩和はビーズに対しても測定され、インピーダンスは実質的に一定のままである。細胞13に対して、より高い周波数では、回路の特性は、電氣的回路内の寄生容量及び細胞質抵抗により支配される。図2(b)は、膜静電容量が1 ~ 3 MHzの領域での反応に対して最大の影響を持つことを示す。

【0061】

異なる白血球副母集団を特徴づけ、判別のための最適周波数を決定するために、精製されたTリンパ球、単球及び好中球の周波数に依存するインピーダンスが測定された。

【0062】

好酸球、好塩基球、好中球は、これらが1つのグループとして検出されるので、顆粒白血球としてグループ化される。好酸球及び好塩基球は小さなパーセンテージを形成し、特別な技術が分離した識別及び算出のために必要とされる。いずれの場合においても、5.62  $\mu\text{m}$ 直径ラテックスビーズのサンプルの特性が、基準として測定された。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 3 】

(生理的食塩水、PBS (リン酸緩衝食塩水) 内に懸濁される) 細胞 13 及び / 又はラテックスビーズの精製された母集団は、細胞分析システム 10 のマイクロ流体装置 11 を通って流れ、インピーダンスの大きさが幾つかの離散的周波数で記録された。図 3 (a) は、周波数の関数として、5.62  $\mu\text{m}$  直径ラテックス球体に対するインピーダンスの大きさを示す。データは、2つの周波数を電極 14、16 に同時に付与することにより得られた。第 1 の周波数 (基準周波数) は、503 kHz に保たれた。低周波は基本的に直流 (DC) として作用する。503 kHz は好ましい値であり、100 kHz ~ 800 kHz は良好な値であって、直流から 1 MHz までも直流として作用する一方、第 2 の周波数は、500 kHz と 50 MHz との間で離散的ステップで変えられた。図 3 (a) の各データポイントは、第 2 の周波数のためにその特定の周波数値で測定されたほぼ 1500 の個々の事象に対するインピーダンス信号の平均値及び標準偏差値である。図 3 (a) に示される完全なデータセットは、5.62  $\mu\text{m}$  ビーズの平均周波数依存的なインピーダンスである。各セットの測定 (1500 個のビーズ) には、ほぼ 2 分かかかる。図には 14 のデータセットがあり、完全なスペクトルは記録するのに 30 分かかかる。ビーズに対する移動時間は、ほぼ 1 ms (60 mm / 秒の粒子速度) であった。各ビーズが電極 14、16 を通過したとき、両極性の電圧信号が記録された。この信号は、平均ピーク値を供給するために処理された。他の信号処理は、データに適用されなかった。

10

## 【 0 0 6 4 】

図 2 (b) は、60 pF のダブル層静電容量  $C_{dl}$  を持ち、(製造業者から得られる) 様々な増幅器の伝達関数を含む等価回路を使用した、PSPICE モデルからのデータを示す。適合 (点線) は、2.5  $\Omega$  のビーズ誘電率、PBS (リン酸緩衝食塩水) 懸濁媒体との 0.36 mS / m (表面伝導率 = 1.2 nS) の伝導率で計算された。データは、等価回路モデルにより良く説明される。

20

## 【 0 0 6 5 】

3つの白血球副母集団の周波数依存的な特性は、図 3 (b) に図示されるように、同じやり方で測定された。表 1 にまとめられるように、Yang J., Huang Y., Wang X-B., Becker FF. 及び Gascoyne, PRC (2000), "Differential analysis of human leukocytes by dielectrophoretic field-flow-fractionation", Biophys J. 78:2680-2689 から採用された誘電パラメータのための値を持つ等価回路を使用して、実施される PSPICE シミュレーションも示される。

30

表 1

	直径 ( $\mu\text{m}$ )	膜静電容量 (mF/m <sup>2</sup> )	細胞質 伝導率 (mS/m)	細胞質 誘電率
リンパ球	6.58 $\pm$ 0.7	10.5 $\pm$ 3.1	0.65 $\pm$ 0.15	154.4 $\pm$ 39.9
単球	9.26 $\pm$ 0.72	15.3 $\pm$ 4.3	0.56 $\pm$ 0.1	126.8 $\pm$ 35.2
顆粒球	9.42 $\pm$ 0.46	11 $\pm$ 3.2	0.6 $\pm$ 0.13	150.9 $\pm$ 39.3

40

表 1

## 【 0 0 6 6 】

図 3 (b) のデータは、特に低周波 (例えば 503 kHz の基準周波数) で、インピーダンスの大きさが細胞サイズで変化することを示す。また、膜静電容量の違いによる変動が、明白である。Tリンパ球は、単球又は好中球より非常に小さく、サイズだけを基にして識別できる。表 1 は、単球及び顆粒白血球 (好中球、好酸球及び好塩基球を含む) が同様のサイズであって、低周波インピーダンスの大きさに基づいて判別するのが困難である

50

ことを示す。しかしながら、これらの膜静電容量は異なり、判別が中央の周波数帯域（図 2（b）参照）で可能であるべきことを意味する。P S P I C E 適合（点線）は、これを確認し、ここで、単球と好中球との間のインピーダンスの最大差は 1 ~ 3 M H z の窓内にある。実験的に決定されたインピーダンスの平均値も、単球と好中球との間の判別が、この周波数窓で可能であるべきことを示す。しかしながら、これらの細胞に対するサイズ及び膜静電容量両方の大きな分布があるので、判別は単純ではない。

【 0 0 6 7 】

図 3 から、サイズに基づく判別のための最適周波数が約 5 0 0 k H z であることは明白である。範囲において、膜静電容量の 1 1 0 M H z の違いが、支配的である。判別のための可能性を決定するために、細胞のインピーダンス分析は、精製された細胞を等しい比率で（0 . 5 % の B S A （ウシ血清アルブミン）及び 2 m M の E D T A （エチレンジアミン四酢酸）を含む P B S のような緩衝液内で）混合することにより実施された。測定は、2 つのプロブ周波数、低い周波数及び高い周波数、例えば 5 0 3 k H z 及び 1 . 7 0 7 M H z を同時に使用してなされた。

10

【 0 0 6 8 】

独立した確認のために、単球及び好中球は、蛍光ラベル、例えば単球のための F I T C 接合反 C D 1 4 抗体及び好中球のための A l e x a 7 0 0 接合反 C D 1 6 抗体でラベル付けられた。蛍光発光は、各セルを識別し、細胞表現型と測定インピーダンス信号との相関を可能にした。

20

【 0 0 6 9 】

図 4 は、3 つの異なる細胞タイプ（T リンパ球、単球及び好中球）と 5 . 6 2 μ m 直径ビーズとの混合からのデータを示す。このプロット線では、インピーダンスは、不透明度（ $|Z|@1707\text{kHz} / |Z|@503\text{kHz}$ ）対低周波インピーダンス（ $|Z|@503\text{kHz}$ ）の散乱プロット線として示される。不透明度は、高周波インピーダンスと低周波インピーダンスとの比で、細胞サイズから独立しているパラメータを供給し、このように細胞膜の変化を反映する。単球及び好中球母集団は、蛍光に従って色分けされる。グラフでは、異なる細胞母集団は、「最良適合楕円」により囲まれる。散乱プロット線（図 4（a））は、T リンパ球がサイズ（低周波インピーダンス）を基にして単球及び好中球を有するグループと判別できることを示す。また、細胞サイズに大まかに比例している前方方向散乱（F S C）に対して粒状の尺度である側方散乱（S S C）としてプロット（図 4（d））される商業的な流動血球計算器（F A C S A r i a、Becton Dickinson）で測定されるのと同じサンプルからのデータと共に、低周波インピーダンス大きさ（図 4（b））及び不透明度ヒストグラム（図 4（c））が示される。良好な相関は、低周波インピーダンスデータ（サイズ）と F S C との間に見つかる（表 2）。

30

		Tリンパ球 (%)	単球 (%)	好中球 (%)
MACS 精製され 再混合	FACSAria	37.8	32.3	29.9
	マイクロ 血球計算器	33.6	36.7	29.6
サポニン 処理された 全血液	FACSAria	24.0 (B & Tリンパ球)	6.4	71.2
	マイクロ 血球計算器	24.0	4.8	69.6
全血液内の典型的比率		20-45 (全リンパ球)	3-11	40-75

表2

10

## 【0070】

インピーダンス散乱プロット(図4(a))及びヒストグラム(図4(b)及び図4(c))の分析は、精製され再混合された細胞母集団内の好中球と単球との間の重要な重複部分を示し、明白な判別が細胞の他の修飾なしでは可能でないことを示唆する。

20

## 【0071】

全体の血液では、上記に示される精製された母集団に反して、白色の血球の化学修飾は、電気的信号を強調し、白血球副母集団の判別を補助するために使用できる。例えば、全体の血液を溶解剤に曝すことは、対象の細胞構成要素の引き続く単離、識別及び/又は分析を可能にするのに必要な程度に、複雑な血液サンプルの一つ以上の細胞構成要素を、選択ベースで効果的に変える。斯様な溶解剤の例は、例えば全体の血液が短い期間の時間(10秒未満)露出され、細胞ボリューム及び細胞膜特性を変えて、白血球の特性を修飾する有機酸(ギ酸)のサポニンである。他の溶解剤が、赤色細胞の滅失のために使われてもよい。他の溶解剤は、例えば米国特許US 5 155 044及びUS 4 485 175に説明されている。全体の血液中の白血球の分析のための従来技術は、しばしば(常にではないが)、赤血球を溶解するためのある形式の前処理を必要とする。サポニンへの全体の血液の露出は、以前に報告されたような赤血球の溶解と、それらの識別を改善する白血球母集団の修飾との両方を可能にすることが、本発明の実施例としてわかった。

30

## 【0072】

好中球(例えば反CD16 Alexa700で)及び単球(例えば反CD14 FITCで)を蛍光性でラベル付けした後に、全体の血液(50µl)は、6秒間ギ酸のサポニンの溶液(0.12%のv/vギ酸、0.05%のw/vサポニン)に曝され、その後、クエンチング(0.6%のw/v炭酸ナトリウム、3%のw/v塩化ナトリウム)され、本発明の実施例によるインピーダンス血球計算器及び既知の流動血球計算器(FACS)で分析された。図5(a-c)に示されるように、サポニン/ギ酸治療両方によって、赤血球を取り出し、単球、好中球及びリンパ球を識別可能にする。図5(d-e)は、本発明の実施例によるインピーダンス血球計算器からの同様のデータを示し、各事象が低周波信号(503kHz)の振幅でトリガーされ、蛍光信号に従って偽の色をつけられている。このデータセットのためのイベントの数は、表2にまとめられ、FACSデータと相関する。

40

## 【0073】

図6は、図6(d)の従来技術のFACSからのSSC及びFSCデータを持つ、サポニン投与された全体の血液に対する本発明の実施例による散乱データ(説明の容易さのため「最良適合楕円」によりタイプ毎に囲まれた母集団)を示す。図6(a)のインピーダ

50

ンスプロットは、3つの異なる細胞タイプ（リンパ球、単球、好中球）がデュアル周波数測定に基づいてだけ明白に識別できることを示す。FACS及びインピーダンス血球計算器両方に対する細胞カウントは、類似していて、全体の血液において見られる比率を表わす（表2）。これらのデータは、3つの異なる患者サンプルを使用して3回複製された。

#### 【0074】

細胞上のサポニン処置の正確な効果はわからないが、図4(a)と図6(a)との比較は、サポニン処置が細胞サイズ(503kHzのインピーダンス)の分布の低減を導くことを示す。細胞サイズの変化の推定は、低周波インピーダンスから得られる。システムは、血球の明白なサイズ分析を可能にするために最初に調整された。システムは、ラテックス粒子の3つの異なるサイズ(5.8µm、7.18µm及び9.52µm)を使用して調整された。ラテックスビーズの3つのサイズ(5.82µm、7.18µm及び9.52µm 図15に黒い四角としてプロットされる)が、混合され、サポニン/ギ酸処理された全体の血液に懸濁された。サンプルは、全体の血液実験(図5及び図6に示されるデータ)と同じ状況下で、本発明の実施例によるインピーダンスマイクロ血球計算器システム上を流れた。データは図15に示され、ここで、ビーズ母集団の平均値及び標準偏差値が、ビーズサイズ対低周波(503kHz)信号の大きさとしてプロットされる。2次の多項式が、校正曲線としてビーズデータに適合される。このとき、図5及び図6の全体の血液データから得られる平均信号振幅が、リンパ球、単球及び好中球に対する細胞サイズを推定するために校正曲線で用いられる。これらの校正データは、白血球の大きさをみるために使用され、結果が表1にまとめられる。細胞の平均サイズのごくわずかな変化しかないが、単球及び好中球母集団分布の変動が低減されていることがわかる。

10

20

#### 【0075】

図4(a)と図6(a)との比較は、また、単球及び好中性母集団が、サポニン処置の結果として互いに対して移動することを示し、よって、これらの2つの母集団の明確な判別及び識別を可能にする。サポニン処置の後、単球母集団の不透明度は、ほぼ5%他の細胞に対して低減する。単球の膜静電容量の等価な変化が、(PSPICEを使用して)計算され、ほぼ15mF/m<sup>2</sup>から19mF/m<sup>2</sup>までの増加に対応した。補助実験において、単球(磁氣的に精製された、Miltenyi Biotec MACS)の膜静電容量が電気回転分析を使用して測定され、16±2mF/m<sup>2</sup>(12の未処置の細胞)から19±3mF/m<sup>2</sup>(サポニン/ギ酸処置された細胞)への増大を見た。この違いは、全体の血液のサポニン処置の後、単球に対する本発明の実施例によるインピーダンス血球計算器を使用して測定される変化を反映する。細胞の平均半径は、いずれの場合にせよ、サポニン/ギ酸露出の後には著しく変化しなかった。主な変化は、細胞膜構造体の変化による不透明度である。

30

40

#### 【0076】

差動の血液計数のための本発明の実施例によるマイクロ流体装置を更に評価するために、サンプルが、ボランティアからとられて、商業的な血液分析器具及び本発明の実施例によるマイクロインピーダンスアナライザで測定された。10日にわたって、7つの別々の静脈血液サンプルが、異なるボランティア被験者(n=7)から得られた。2つのバイアル(瓶)分の血液がとられ、1本は実験の用に供し、第2のバイアルは堀場 ABXPentraDX120マシンでの独立十分な血球算定分析のため病院(Mount Alvernia, Guildford UK)に送られた。図7は、サンプルの1つに対する散乱プロットを示す。3つの分布は、識別され、最大尤推定法アプローチを使用して、二次元のガウス確率プロフィールに適合させた。図の楕円は、これらの分布を例示する。相対的なリンパ球、単球及び顆粒白血球母集団が、これらの確率分布から得られた。

#### 【0077】

図8は、相対的なWBC分布と堀場 ABXPentraからのデータとの相関を示す。単球は、5% 20%の間の割合を持つ最小多量の細胞種である。顆粒白血球(主に好中球)は、40% 80%の間の割合を持つ。相対的な割合の範囲は、臨床範囲の全てでなく、重要な一部をカバーする。例えば、顆粒白血球の通常臨床範囲は、20% 90

50

%の間にある。インピーダンス血球計算器から得られた結果と基準装置から得られた結果との間の共分散(CV)ファクタが、凡例に例示される。実験変動の尺度を提供するために、毎回新規な溶解物を調製し、洗浄されたチップを使用して、サンプルのうちから一つのサンプルでの実験が5回繰り返された。この結果は、図8の中抜きにより示される。図から、本発明の実施例によるインピーダンス血球計算器と市販のフル血液アナライザとの間の相関は、約95%である。

【0078】

例えばヒト血液のCD4+Tリンパ球を識別し計数するための特定のマーカ-を表す血球を、識別し計数するための本発明の実施例による分析方法は、血液のサンプルを得るステップと、特定のマーカ-を表す血液のサンプル内のこれらの血球をラベル付けするステップと、例えば、インピーダンスラベル例えば誘電ラベル付けで、例えば血液のサンプル内のCD4+Tリンパ球をラベル付けする当該ステップと、例えばラベル付けられたCD4+Tリンパ球を識別するために特定のマーカ-を表す少なくともラベル付けられた血球を識別するために、複数、例えばデュアルの周波数システムを使用して血液のラベル付けられたサンプルを測定するステップとを有する。

10

【0079】

本発明の実施例による、特定のマーカ-を表す少なくともラベル付けられた血球、例えばラベル付けられたCD4+Tリンパ球を識別するためにラベル付けられたサンプルを測定するステップは、ラベル付けられたサンプルを単一の細胞を有する滴に分割するステップと、第2の周波数より低い第1の周波数で単一の細胞のインピーダンスを決定するステップと、第1の低い周波数でのインピーダンスを、第2の高い周波数インピーダンスと第1の低い周波数インピーダンスとの比率である不透明度に相関させるステップと、この相関から特定のマーカ-を表す少なくともラベル付けられた細胞を識別するステップとであって、例えば少なくともCD4+Tリンパ球を識別するステップとを有する。

20

【0080】

特定のマーカ-を表す細胞をラベル付けするステップ、例えばCD4+Tリンパ球をラベル付けするステップは、これらを、抗体で被覆されたビーズ、例えばCD4+抗体で被覆されたビーズ、例えばBeckman CoulterのCoulter CD4 Cytosphere Reagentから入手可能な市販のキットマニュアルCD4 Countビーズでラベル付けするステップを有する。粒子、例えば細胞をラベル付けするステップは、粒子のサイズの変化による判別を補助する。システムへのビーズの包含は、ノイズの小さな増大を導く。ノイズの振幅は、血小板が存在するときに見られたのと同様である。3つの部分の差動測定に関して、このノイズ信号は、容易にゲート制御される。

30

【0081】

本発明の実施例による方法及び装置は、針で刺して最小のサンプル調製からの血液の小さいサンプルだけを必要とし、オプションで自動化できる。これは、例えば抗体で被覆したビーズ、例えばBeckman Coulterのような製造業者から得られるCD4+抗体で被覆したビーズで、例えば2分間の全血液の培養を含む。挙げられる特定の例では、CD4+抗体は、Tリンパ球のサブセット、更に単球のサブセット両方にラベル付けする。赤血球溶解ステップ、例えば自動化された赤血球溶解ステップは、洗浄剤を使用して、例えば蒸留水の2%の酢酸又はサポニン/ギ酸を使用して、実施される。サポニン/ギ酸溶解剤は、RBC残骸の存在を引き起こさないもので、重要なノイズに結果としてならないという効果がある。

40

【0082】

このように処置されたサンプルは、他のいかなる予備ステップなしで、細胞分析システム10のマイクロ流体装置11に直接導入される。

【0083】

上述のように、CD4+抗体は、Tリンパ球のサブセット、更に単球両方をラベル付けする。しかしながら、HIVの診断は、CD4+Tリンパ球サブセットだけの正確なカウントを必要とする。これは、CD4+ラベル付けられたTリンパ球及びCD4+ラベル付

50

けられた単球が他の全ての細胞から非常によく離隔され、不透明度対低周波インピーダンス散乱プロットで互いに非常によく離隔されるので、現在の本発明の実施例に従って達成するのが容易である。この方法の原理は、図9に示される。図9は、抗体被覆されたビーズでのラベリングのためCD4+母集団がどのように識別されるかを示す。リンパ球及び単球は、インピーダンスプロット線で明らかに識別される。

【0084】

デュアル周波数インピーダンス分光法を適用することにより、特定の抗原性マーカーを表す血球が誘電ラベルでラベル付けされる血液サンプルで、CD4+Tリンパ球及びCD4+単球が同時に識別でき、計数できることは、本発明の実施例の利点である。

【0085】

本発明の実施例によると、サンプルの測定は、単球、リンパ球及び好中球を計数するためにデュアル周波数システムを使用して実施される。正確な診断は、CD4+細胞が誘電的にラベル付けられるので、異なった母集団として容易に識別できるCD4+細胞を計数することにより実施される。本発明の実施例では、CD4+カウントの絶対値は、総リンパ球数に対して参照される。代替りの少し正確でない実施例では、CD4+カウントの絶対値は、リンパ球及び好中球のほとんど合計である総白血球数に対して参照される。

【0086】

本発明の実施例による装置は、単一の細胞の誘電体特性を測定するマイクロ流体インピーダンス血球計算器である。

【0087】

本発明の実施例によるデュアル周波数測定は、膜静電容量及びサイズによる細胞の判別を可能にする。サポニン/ギ酸を使用する全血液の化学的前処理は、細胞残骸(赤血球ゴーストを含む)での汚染がない、きれいな白血球サンプルを供給するサンプルから赤血球母集団を除去するために用いられる。前処理は、また、単球及び好中球の電気的特性を変えて、判別を良好にする。リンパ球、単球及び好中性母集団は、デュアル周波数インピーダンスデータを使用して、全て明白に識別される。ボランティア血液は、マイクロ血球計算器及び病院の血液アナライザで測定され、優れた相関を示した。

【0088】

本発明の実施例によるマイクロ流体インピーダンス血球計算の頑健な性質及び簡明さは、蛍光ラベルのない技術を使用している手頃なポイントオブケア(POC)診断システムを含む、細胞分析の可能な用途範囲を提供する。システムの簡明さで提供される節約及び試薬経費(例えば蛍光プローブが要求されない等)の低減は、発展途上の世界のような低いリソースの設定での使用を適用可能にする。更にまた、細胞の誘電体特性が、薬微粒子の投与並びに細菌及びウイルス生成物に由来する様々なマイトジェンから生じる刺激に影響されるので、この技術は、細胞サイクル分析及び毒性/生死判別試験でのアプリケーションを見出す。

【0089】

システムは、類似のインピーダンス特性(例えばHIV診断法のためのCD4+カウント数)を持つ細胞を判別可能にするために、誘電タグの開発を通じて更に精練される。等価の複数の蛍光をすることは、可能である。すなわち、複数のCDメーカーでの多重分析であって、各々が異なる誘電署名(これらが異なる物質の異なるサイズであるので)を持つビーズの母集団を用いて検出されることは可能である。

【0090】

図10及び図11は、実験からのデータ例を示す。上述のように概説されるように、健康なドナーからヒト血液が、処置され、本発明の実施例によるインピーダンス血球計算を使用して測定された。図10は、血液サンプルのラベリングの前のリンパ球及び顆粒白血球のデュアル周波数インピーダンス測定の結果を示す。図11は、本発明の実施例によるCD4+抗体被覆されたビーズでのラベル付けした後の血液のデュアル周波数インピーダンス測定の結果を示す。ラベル付けられた単球及びTリンパ球両方は、判別され、簡単なカウントを可能にし、よって診断可能にする。

10

20

30

40

50

## 【0091】

当該方法は、診断及び治療の管理のために使用できる。抗体の絶対値又は比率（例えばCD4+/CD8+）が、決定される。CD4+母集団とCD8+母集団との比は、両方の母集団に対する異なるタグを使用して決定され、例えば一方が絶縁で他方が伝導、又は異なるサイズを持つタグを用いて決定され、細胞の異なる部分母集団の識別を可能にする。

エイズ持つ患者に対して、CD4+T細胞数は、以下の付加的情報を供給する。

200/μlより少ない：ニューモシスティス肺炎（PCP）。

100/μlより少ない：トキソ血漿症及びクリプトコックス髄膜炎。

75/μlより少ない：トリ型結核菌複合体（MAC）。

10

## 【0092】

実験の結果1：

50μlの新しいヒト血液が、CD4及びCD14に対する蛍光抗体でラベル付けられた。これは、細胞副母集団の表面抗原を表すこれらの識別を可能にする。CD14は単球上に存在し、CD4はT細胞（誘因T細胞）の部分母集団の表面上で、また単球上の低レベルに存在する。

## 【0093】

細胞は、また、CD4被覆されたビーズでラベル付けられた。蛍光抗体ラベリング及びビーズ接合両方が、赤血球溶解（サポニン/ギ酸内に6秒、その後クエンチング）の前に実施された。その後、同じサンプルが、本発明の実施例によるIS（インピーダンス分光学）及び従来から知られているFACS（蛍光活性化細胞選別装置）両方により分析された。

20

## 【0094】

図12は、溶解された全血液のサンプルからのFACSデータを示す。図12(a)は、CD4ビーズでラベル付けられなかった血液の散乱プロットであり、図12(b)は、CD4ビーズで培養された同じ血液のサンプルを示す。（SSCは、全ての母集団の簡単な視覚化を可能にするために、対数スケールでプロットされる）。

## 【0095】

これらの図に示されるように、CD4ビーズ（~2.2μm直径）と錯体を形成するとき、CD4+T細胞は異なった母集団（図12(b)で概説される）を形成し、SSC信号は顆粒白血球からの信号を超えて増大される。

30

## 【0096】

図13は、蛍光抗体でラベル付けされ、CD4ビーズで培養された、溶解される全血液のサンプルからのFACSデータを示す。CD4+細胞及びCD14+細胞は、これらの蛍光発光信号（それぞれ図13(b)の領域P1及びP2）から、明らかに識別できる。これらの蛍光母集団上のゲート制御及びFSC対SSCのプロットは、取り付けられたCD4ビーズを持つ細胞の識別を可能にする（図13(a)参照）。

## 【0097】

ビーズと錯体を形成する細胞の数は、母集団の散乱特性及び蛍光に基づいてFACSデータから数えられる。取り付けられたビーズを持つCD4+T細胞母集団は、ビーズのないリンパ球集団（CD4/T細胞、B細胞、NK等）と判別できる。単球上のCD4表現の低レベルは、小さなパーセンテージの単球だけがCD4ビーズ（Beckman CoulterマニュアルCD4カウントキットデータシートを参照）と結合することを意味する。単球は、2つの母集団を形成する；(i)「単球（ビーズなし）」として示される非常に低いレベルのCD4+を表わすビーズを持たない細胞、(ii)高いSSCを導くが明らかにT細胞と同じレベルではないビーズとの錯体を形成する細胞。これは多分、より少しのビーズがT細胞と比較して（抗原表現のレベルを表わす）単球に取付けられるからであろう（図13(a)を参照）。

40

## 【0098】

図14は、本発明の実施例による不透明度（10MHz/0.5MHz）対大きさ（0

50

・5 MHz)としてプロットされるISデータを示す。種々異なる母集団が、散乱プロット上に見える。CD4ビーズとの錯体を形成する細胞は、不透明度及びサイズ両方が増加し、種々異なった母集団(丸く囲んである)を形成する。

【0099】

FACSは、細胞がビーズと錯体を形成するときのFSCの小さな変化を示す(図13(a))。

【0100】

表3は、FACS及びISを比較して、種々異なる副母集団に対するこのデータを示す。FACS及びIS両方の総カウントが異なるにもかかわらず、細胞の比率を比較することは可能である。トータルに対する細胞カウント数が、括弧に示される。これは、血液の1つのサンプルに対する代表的なデータセットである。同様のデータが、3つの他の機会(異なる血液サンプル)でFACSで得られた。

10

表3

細胞タイプ	FACS (% of total)	IS (% of total)
CD4ビーズを持つT細胞	18.0 (11243/62312)	15.6 (1215/7789)
リンパ球(ビーズなし)	12.7 (7914/62312))	12.9 (1005/7789)
CD4ビーズを持つ単球	0.6 (328/62312)	0.8 (66/7789)
単球(ビーズなし)	4.3 (2695/62312)	5.4 (2695/7789)
顆粒球	64.4 (40132/62312)	65.4 (5095/7789)

20

表3

【0101】

CD4+T細胞数は、HIVを診断するための重要なパラメータである。FACSとISとの比較は、パーセンテージ数が類似していることを示す。2つ間の小さな誤差は、パラメータのゲーティング、より小さなサンプルサイズ、又は沈殿によるISシステム内のビーズ錯体細胞の損失を含む、多くの理由に起因する。この実験は、両方の技術が、この方法論を使用して、比較可能な結果をもたらすことを示す。

30

【0102】

上記実験の目的は、本発明の実施例によるインピーダンス分光学を使用して測定されるCD4+Tリンパ球及びCD4+単球の数が商業的なFACSにより測定されるCD4+細胞の数に類似していることを示すことにある。

【0103】

実験の結果2:

細胞調製

血液サンプルは、インフォームドコンセントされた健常なドナーから得られた。血液(5ml)は、バキュテナ(商標)チューブ(EDTAK3E15%、0.12ml、ベクトンディキンソン)に収集された。収集の後、血液チューブは、ローラーに配置され、室温で継続して混合された。全ての後続の処理及び実験作業が、12時間以内に実施された。

40

【0104】

精製された白血球副母集団

血液は、密度勾配分離及び磁氣的に起動される細胞選別装置(MACS、Miltenyi Biotech、Bisley、UK)を使用して処理された。抗凝固処理全血液(5ml)は、5mlのPolymorphoprep(商標)(Nycomed、Zurich、Switzerland)上に慎重に階層化され、室温で、450xgで30分間遠心分離された。遠心分離の後、単核細胞分画(主に単球及びリンパ球)及び多形核分画(顆粒白血球)は、勾

50

配上の別々のバンドとして現れ、別々のチューブに収集された。両方の細胞分画は、交互に、未使用のPBS (0.5% BSA及び2 mM EDTAを含む) 内で再懸濁して、残りのPolymorphoprep及び汚染する血漿及び血小板を除去するため遠心分離(室温で400xgで10分)によりペレット化することにより、3回洗浄された。

#### 【0105】

Tリンパ球(CD3+細胞)、単球(CD14+細胞)及び好中球(CD16+細胞)の精製された母集団は、磁気活性された細胞選別(MACS)を使用して調製された。単核細胞サンプルは、2つの部分、抗CD3MACSビーズで培養される1つのサンプルと、抗CD14MACSビーズで培養される別のサンプルとに分割された。多形核細胞は、抗CD16MACSビーズで培養された。全ての培養及び洗浄ステップは、製造業者のガイドラインに従って実施された。個々の磁氣的にタグを付けられた細胞サンプルは、AutoMACS(商標)分離システム(Miltenyi Biotec)を使用して分別され、陽性細胞分画が収集された。

10

#### 【0106】

母集団の純度を評価するために、サンプルは、蛍光性の接合型抗体：抗CD3FITC、抗CD14APC(両方ともMiltenyi Biotec、Bisley、UK)及び抗CD16Alexa700(BioLegend, San Diego, California)でラベル付けられた。細胞は30分間培養され、その後上記のように洗浄された。全ての場合において、制御として整合されたアイソタイプ制御が含まれた。細胞サンプルは、FACSAria(Becton Dickinson)で分析された。

20

#### 【0107】

本発明の実施例によるマイクロ血球計算器での分析の前に、細胞は、PBS(2 mM EDTA及び0.5%のBSAを含む)中に懸濁され、ml当たり $\sim 1 \times 10^6$ 個の細胞の最終密度であった。3つの細胞タイプの混合物として精製された細胞母集団は、別々に分析された。懸濁媒体は、 $1.6 \text{ Sm}^{-1}$ の伝導率、 $\text{pH} = 7.4$ 及びオスモル濃度 = 290 mOsmで等張性だった。

#### 【0108】

全体の血液分析(サポニン/ギ酸を使用する赤血球溶解)：

全体の血液は、上述のように抗凝固剤に収集された。50  $\mu\text{l}$ の新しい全体の血液が、CD14(FITC)及びCD16(Alexa700)に対して向けられる蛍光性の接合型単クローン抗体で4時間の暗室で15分培養された。赤血球溶解が、600  $\mu\text{l}$ の溶解溶液(0.12% v/vギ酸、0.05% w/vサポニン)を、ラベル付けられた全体の血液へ付加することにより実施された。サンプルは、血液及び溶解試薬の調合を強化するために、継続的な攪拌で室温で6秒間培養された。この溶解反応が、265  $\mu\text{l}$ の急冷溶液(0.6% w/v炭酸ナトリウム、3% w/v塩化ナトリウム)の付加により止められた。その後、サンプルは、FACSAria及びマイクロ流体インピーダンス血球計算器を使用して、他の処理なしに分析された。

30

#### 【0109】

一致

サンプルは、急冷剤への希釈(1:1.4)の前に、6秒間、(上記のような)溶解溶液に1:13で希釈された。(全体の血液に関して)最終的な希釈率は、1:18であった。ほぼ25  $\mu\text{L}$ の溶液が、本発明の実施例によるインピーダンス血球計算器チップを通じてポンプ圧送され、データが500 kHz及び1.7 MHzで同時に測定された。

40

#### 【0110】

マイクロチップ

チップが、フォトリソグラフィ及び十分なウエハ-熱結合を使用して製造された。チップに対する電氣的及び流体工学的相互接続は、PEEKポリマーから機械加工された接続ブロックを使用してなされた。流体工学的及び電氣的接続は、ブロック内にチップを固定することによりなされた。パネ負荷の電氣的コネクタが、チップ電極との接触を形成するために使用され、ミニチュアリングがブロックとチップとの間の流体工学的接続を封止

50

するために用いられた。コネクタブロックが、フロント端インピーダンス検出回路を持つ PCBに取り付けられた。全体のアセンブリが、特注の顕微鏡上の光ベンチ上の x y z ステージに取り付けられて、チップの配置及びマイクロ流体チャンネル内の光検出領域及びレーザスポットの正確な位置決めを可能にした。

#### 【0111】

チップは、30分間、装置を通じて2mMのEDTA及び2%BSAを含むPBSを流すことにより満たされた。これは、細胞粘着力を減らすために、タンパク質でチャンネル及び管壁をコーティングした。細胞懸濁液のサンプルは、チップの吸気口で貯蔵部へピペットで移されて、シリンジポンプを使用して一定速度で装置を通じて吸引された。1分につき5 $\mu$ lのボリュームフローレートが、全ての実験作業のために使われた。実験の間、全ての器材は、10%次亜塩素酸ナトリウム及び4M水酸化ナトリウムで洗浄された。

10

#### 【0112】

##### インピーダンス検出

固定周波数（一方が503kHz、他方が0.5-30MHz@2.5Vppで変動する）の2つの正弦波電圧が、対の検出電極（図1も参照）両方に付与された。差動電流が、カスタムメイドの電子回路及び2台のロックイン増幅器（SR844, Stanford Research Instruments, USA）（周波数ごとに1台）を使用して測定された。ロックイン増幅器からの出力は、各特定の周波数で電氣的インピーダンスの実成分（同調している）及び複素成分（位相を90°異にする）から成る。光電子増倍管信号と共に出力は、16ビットADカード（NI6034E, National Instruments）での120kHzでサンプリングされ、データが捕捉され、LabVIEWTM（National Instruments, USA）で書かれたソフトウェアで分析された。低周波同相インピーダンス信号は、データの捕捉をトリガーするために用いられた。データは、処理されて、MATLAB（Mathworks Inc., Natick, USA）での後続の分析のため散乱プロットとしてプロットされた。

20

#### 【0113】

##### オプティカルシステム

比較理由のため、光測定が電氣的測定を実施するのと同時に実施された。488nm（50mW半導体）及び633nm（20mW HeNe）レーザーからの光が、ダイクロイックミラー（Chroma Technologies, Rockingham, VT, USA）を使用して結合された。ビームは、一对のレンズを使用して拡大され、無限遠補正対物レンズ（x20、NA=0.7、ニコン）の後方へ通過した。対象物の焦点面で形成されるスポットは、チャンネルの中心間に位置付けられた。蛍光が、同じ対物レンズを介して収集された。ダイクロイックミラー及びバンドパスフィルタ（Chroma Technologies, Rockingham, VT, USA）は、光電子増倍管（H7710-13、Hamamatsu）の前に配置されたピンホール（100 $\mu$ m、Thorlabs）及びレンズで空間的にフィルタリングする前に、スペクトル的に光をフィルタリングした。電源（C7169、Hamamatsu）はPMT上の利得を調整するために用いられ、信号が調節されて、Hamamatsu増幅器（C7319、Hamamatsu）で増幅された。3つの放射波長515nm、675nm及び>715nmは、同時に測定された。

30

#### 【0114】

##### フロー血球計算

細胞の従来フロー血球計算分析が、2つのレーザー、488nm半導体（20mW、Coherent（登録商標）SapphireTM）及び633nmHeNe（20mW、JDSUniphaseTM）を具備したFACS Aria（Becton Dickinson）で実施された。FACSFlow sheath fluid（Becton Dickinson）が用いられ、サンプルフローは70 $\mu$ mノズルを通過して70psiの圧力であった。器具は、PC動作するFACS Diva（商標）ソフトウェア（Becton Dickinson）により制御された。

40

#### 【0115】

本発明が図面及び前述の説明で例示され詳述されている一方、斯様な図例及び説明は、図示的又は例示的であると考慮されるべきであり、限定的ではない。本発明は、開示され

50

た実施例に限定されない。

【0116】

例えば、CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19、CD21、CD45又は他の細胞表面受容体、活性化マーカーのような細胞母集団が検出できる実施例で、本発明を扱うことは可能である。細胞は、ヒト及び/又は哺乳類であり得る。本発明の実施例は、非哺乳類細胞、例えば細菌及び酵母細胞にも適用できる。

【0117】

他の例は、敗血症検出に対する好中球上のCD64、血液の循環腫瘍細胞の検出のためのEpCam(上皮細胞接着分子)、又は幹細胞のためのCD34である。

【0118】

開示された実施例に対する他の変形は、図面、明細書及び添付の請求の範囲の検討から、請求項に係る本発明を実施する際の当業者により理解され、遂行できる。請求項において、用語「を有する」は、他の要素又はステップを除外しないし、不定冠詞「a」又は「an」は複数を除外しない。単一のプロセッサ又は他のユニットが、請求項で説明される複数のアイテムの機能を成し遂げてよい。特定の手段が相互に異なる従属請求項において再引用されているという単なる事実は、これらの手段の組合せが効果的に使用できないことを示さない。コンピュータプログラムは、他のハードウェアと共に、又はその一部と共に、光記憶媒体又は半導体媒体のような適切な媒体に格納/配布されてもよいが、インターネット又は他の有線若しくは無線通信システムを介してのような他の形式で配布されてもよい。請求項内の何れの参照符号も、範囲を制限するものとして解釈されてはならない。

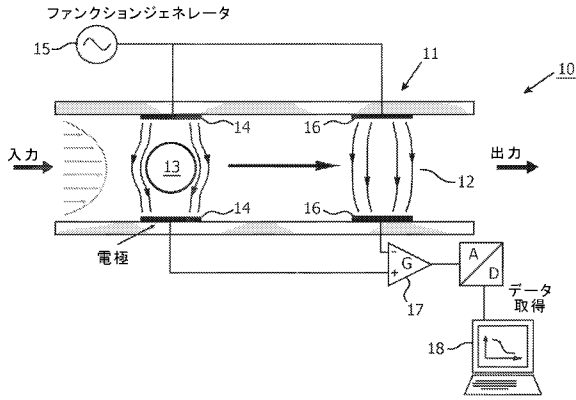
10

20

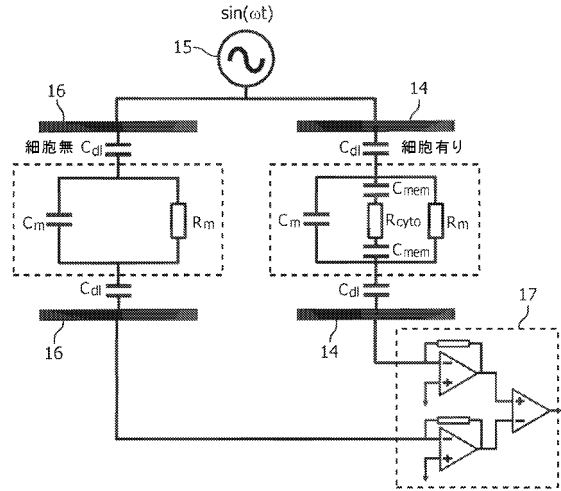
【0119】

前述の説明は、本発明の特定の実施例を詳述する。しかしながら、どのように詳述して前述の説明が文章に表されるかにかかわらず、本発明は、様々なやり方で実践されてもよく、従って、開示される実施例に限定されないことは、理解されるだろう。本発明の態様又は特定の特徴を説明するときの特定の用語の使用は、その用語が関連する本発明の態様又は特徴の任意の特定の特性を含むように制限されるために本願明細書において当該用語が再定義されていることを意味するように採られるべきでない点に留意されたい。

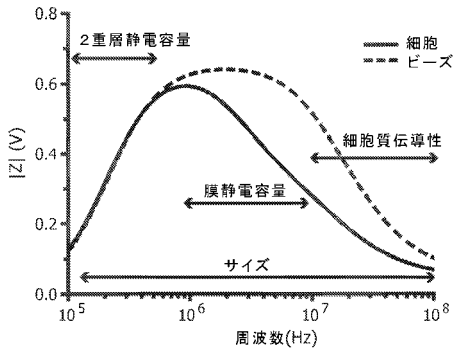
【図1】



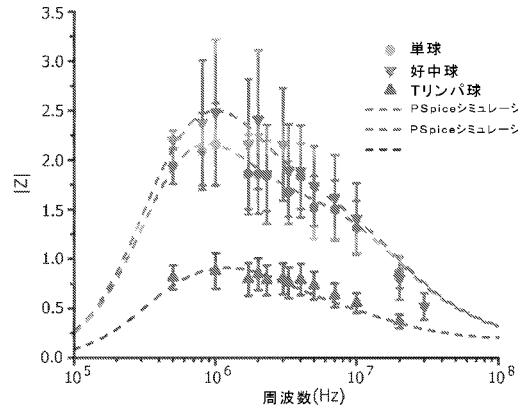
【図2a】



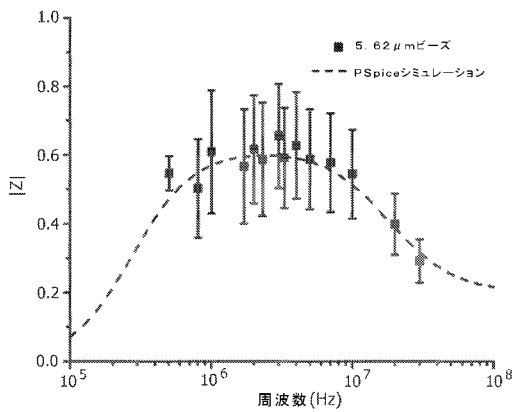
【図2b】



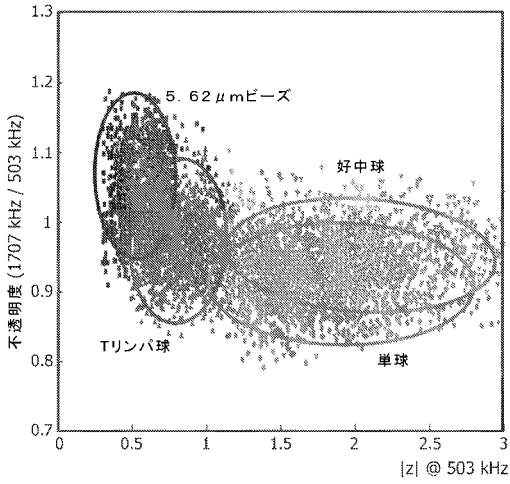
【図3b】



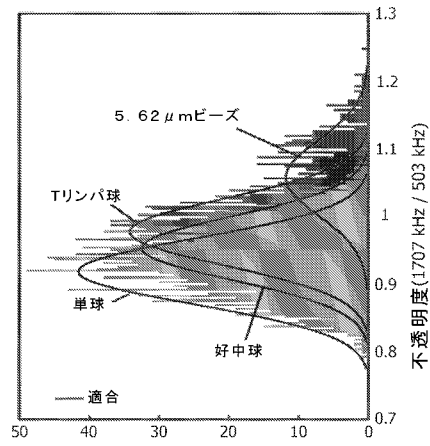
【図3a】



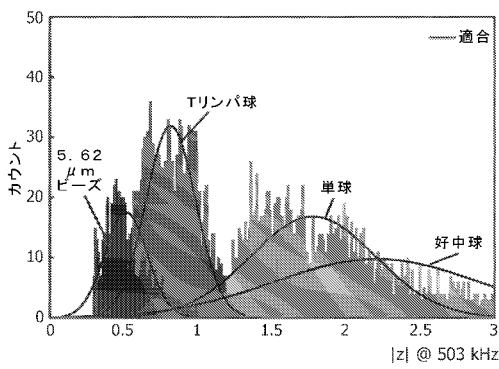
【 図 4 a 】



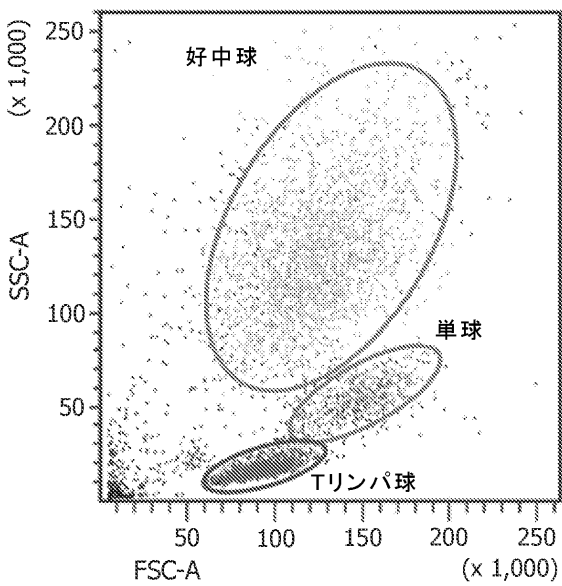
【 図 4 c 】



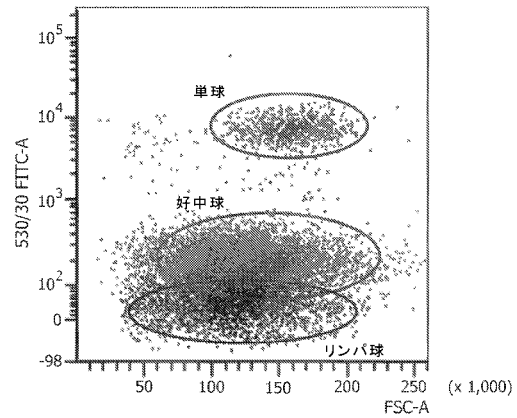
【 図 4 b 】



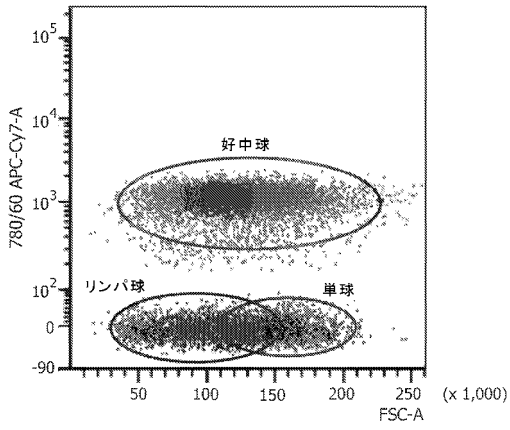
【 図 4 d 】



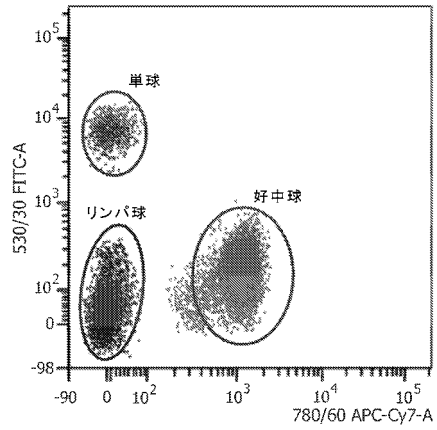
【 図 5 a 】



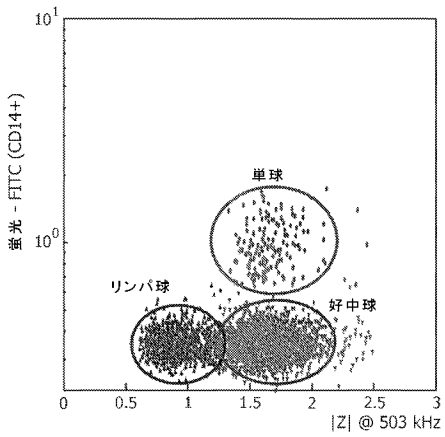
【 図 5 b 】



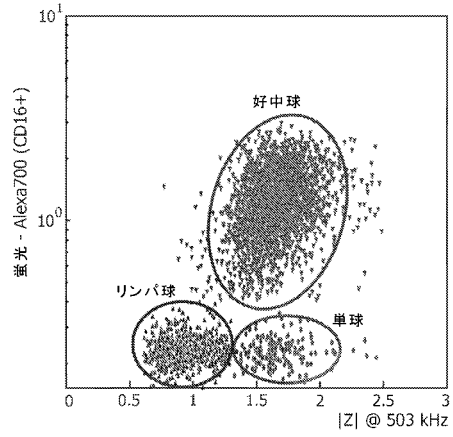
【 図 5 c 】



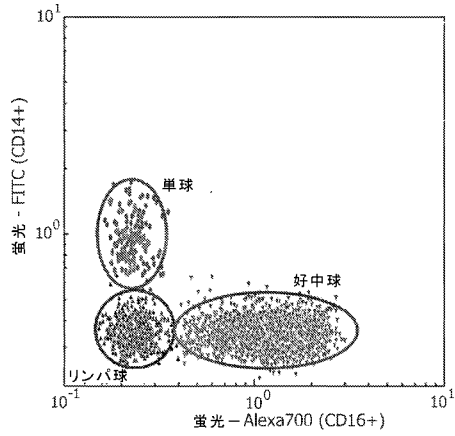
【 図 5 d 】



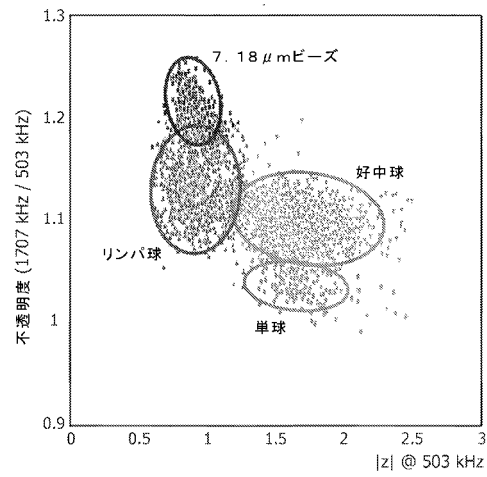
【 図 5 e 】



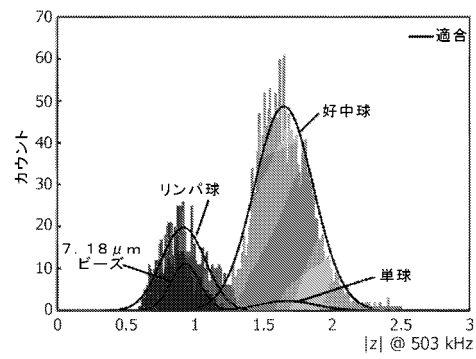
【 図 5 f 】



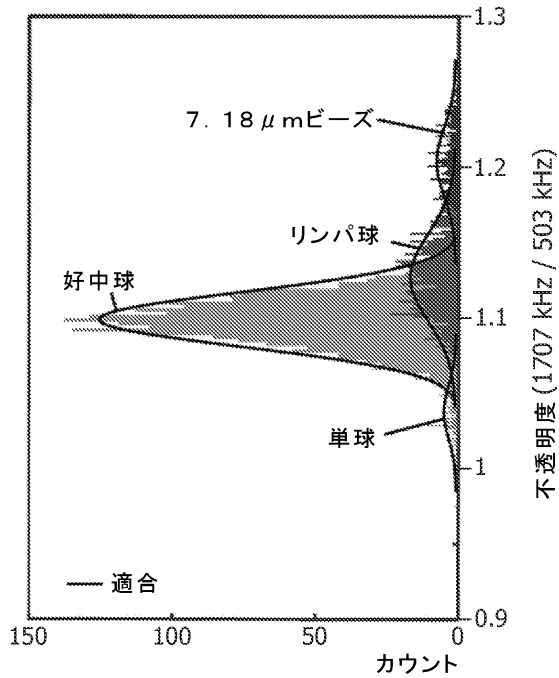
【 図 6 a 】



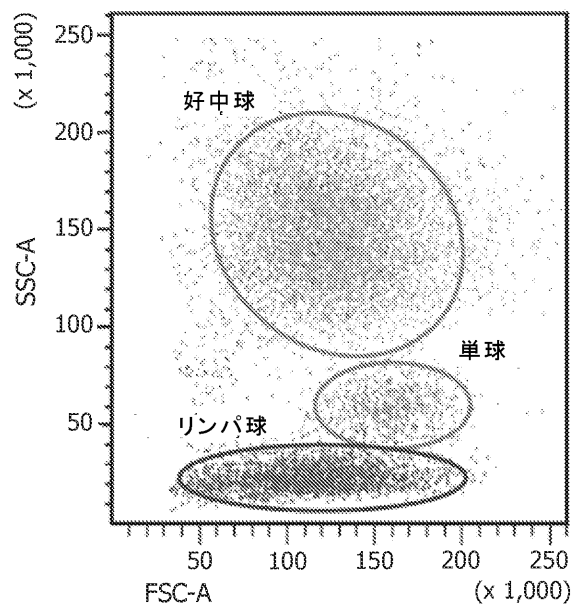
【 図 6 b 】



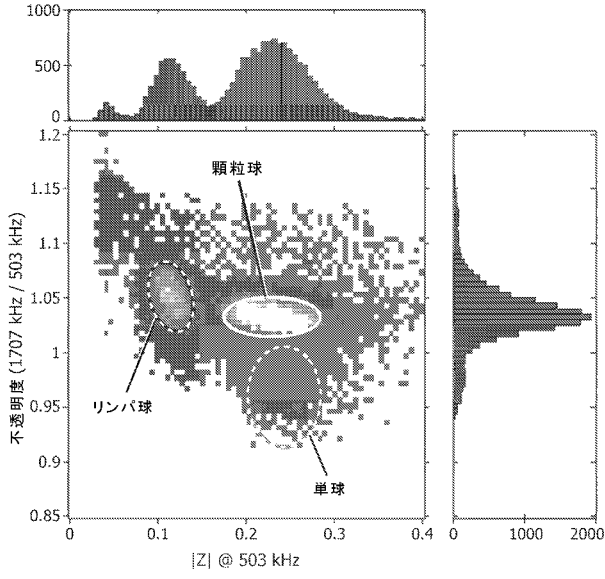
【 図 6 c 】



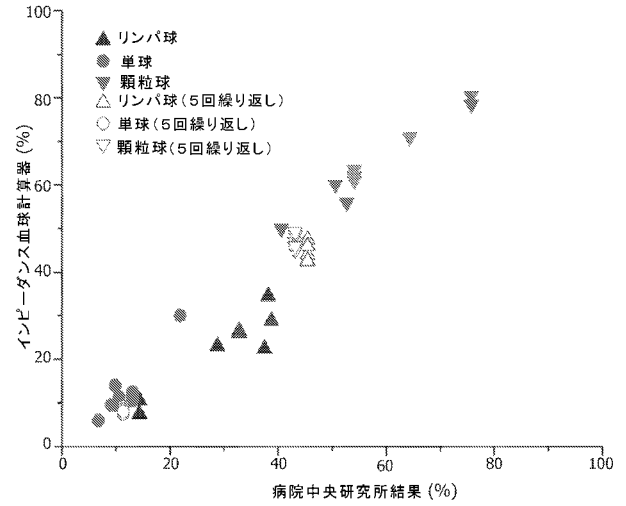
【 図 6 d 】



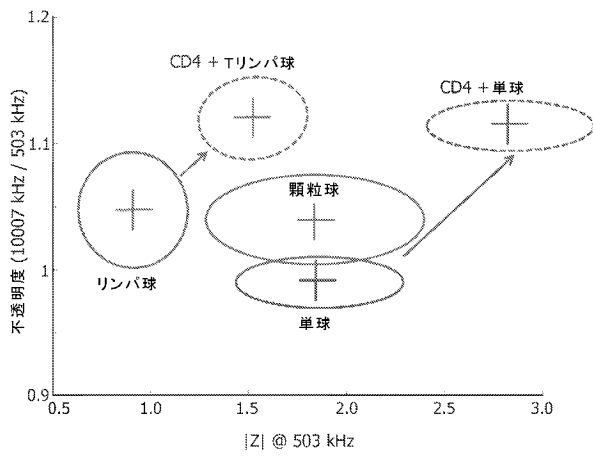
【 図 7 】



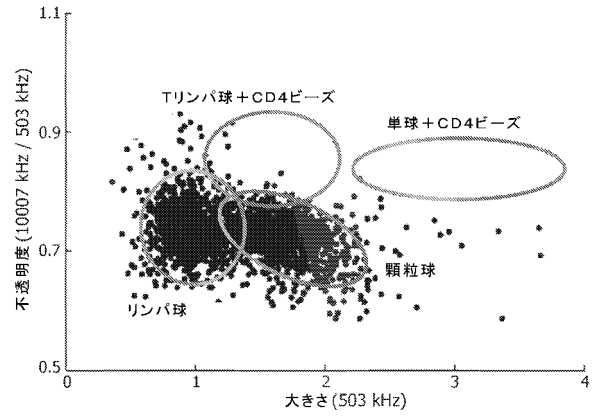
【 図 8 】



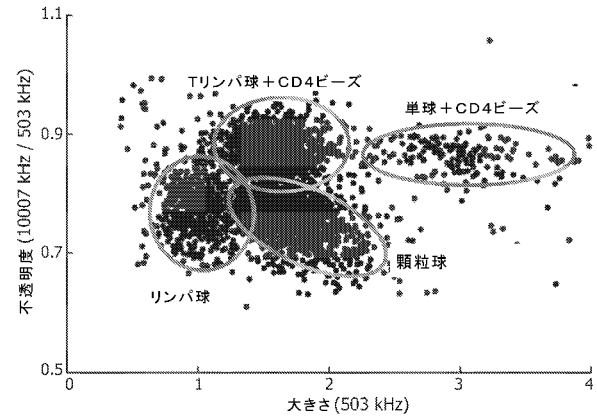
【 図 9 】



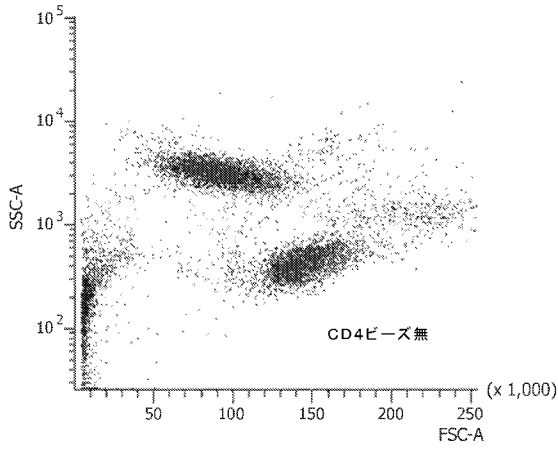
【 図 10 】



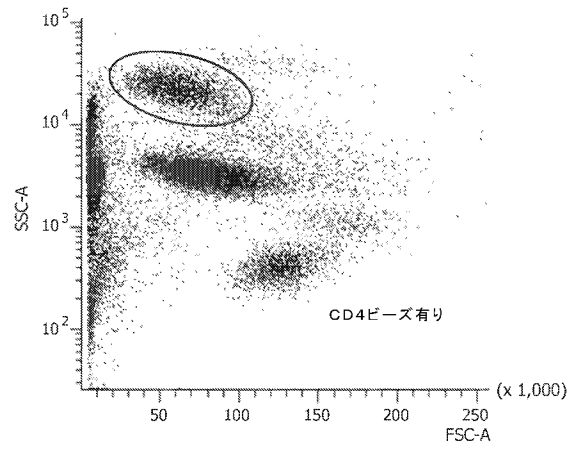
【 図 11 】



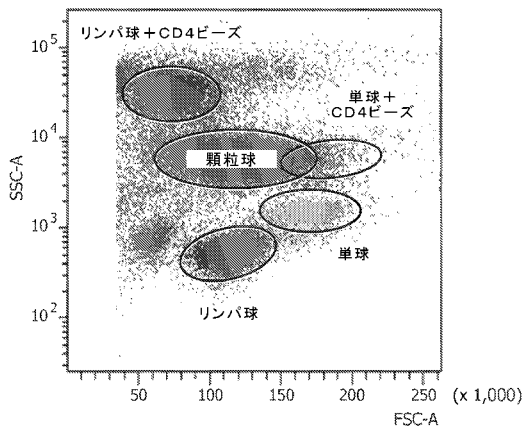
【 図 1 2 a 】



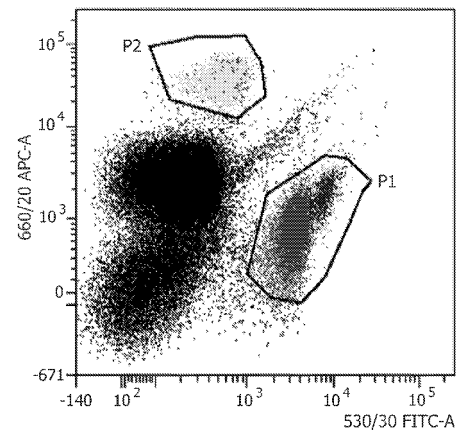
【 図 1 2 b 】



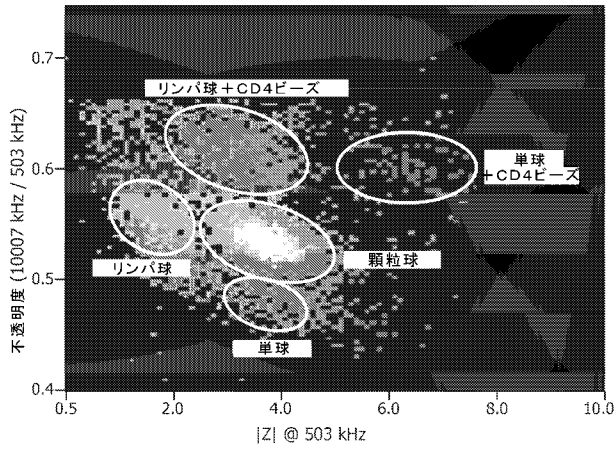
【 図 1 3 a 】



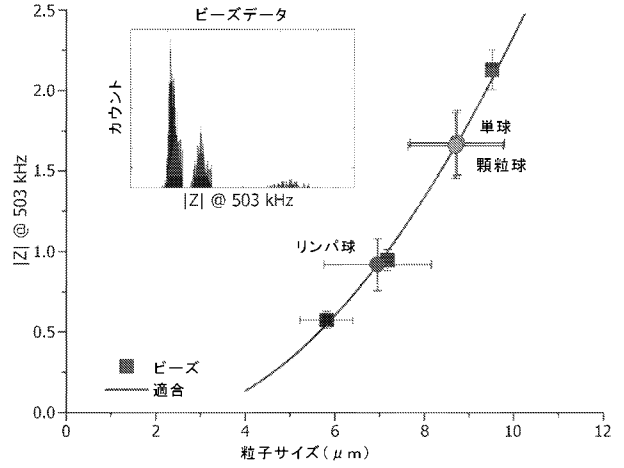
【 図 1 3 b 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2010/052460

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N15/10 G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHENG XUANHONG ET AL: "Cell detection and counting through cell lysate impedance spectroscopy in microfluidic devices" LAB ON A CHIP, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE, GB, vol. 7, no. 6, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 746-755, XP008091009 ISSN: 1473-0197 [retrieved on 2007-05-11] the whole document	8
X	EP 0 472 522 A (COULTER ELECTRONICS [US] COULTER CORP [US]) 4 March 1992 (1992-03-04) page 3, lines 32-41; figures 3,7,19	1,3-9
Y	page 12, line 1 - page 13, line 11 -/--	2,8, 10-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 July 2010		05/08/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Klein, Marc-Oliver

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2010/052460

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLMES D ET AL: "Label-Free Differential Leukocyte Counts Using a Microfabricated, Single-Cell Impedance Spectrometer" SENSORS, 2007 IEEE, IEEE, PI, 28 October 2007 (2007-10-28), pages 1452-1455, XP031221347 ISBN: 978-1-4244-1261-7 the whole document	2,10-13
X	US 2009/051372 A1 (SETHU PALANIAPPAN [US] ET AL) 26 February 2009 (2009-02-26) paragraphs [0010], [0030] - [0033]; figures 1,2	1,8
A	HOFFMAN R A ET AL: "FLOW CYTOMETRIC ELECTRONIC DIRECT CURRENT VOLUME AND RADIOFREQUENCY IMPEDANCE MEASUREMENTS OF SINGLE CELLS AND PARTICLES" CYTOMETRY, ALAN LISS, NEW YORK, US, vol. 1, no. 6, 1 January 1981 (1981-01-01), pages 377-384, XP008028058 ISSN: 0196-4763 the whole document	1-13
A	US 4 751 179 A (LEDIS STEPHEN L [US] ET AL) 14 June 1988 (1988-06-14) the whole document	1-13
T	HOLMES DAVID ET AL: "Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry" LAB ON A CHIP, vol. 9, no. 20, 2009, pages 2881-2889, XP002555068 ISSN: 1473-0197(print) 1473-0189(ele) the whole document	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2010/052460

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
EP 0472522	A	04-03-1992	AT 153758 T 15-06-1997			
			AU 655154 B2 08-12-1994			
			AU 4821890 A 01-08-1990			
			BR 8907826 A 22-10-1991			
			CA 1339840 C 28-04-1998			
			CN 1043566 A 04-07-1990			
			DE 68928085 D1 03-07-1997			
			DE 68928085 T2 15-01-1998			
			JP 2795746 B2 10-09-1998			
			JP 4503405 T 18-06-1992			
			WO 9007259 A2 12-07-1990			
			US 2009051372	A1	26-02-2009	NONE
			US 4751179	A	14-06-1988	AU 4401985 A 31-12-1985
CA 1248856 A1 17-01-1989						
DE 3587036 D1 11-03-1993						
DE 3587036 T2 02-09-1993						
EP 0185048 A1 25-06-1986						
ES 8609727 A1 16-12-1986						
JP 61502277 T 09-10-1986						
WO 8505684 A1 19-12-1985						

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ホルメス デイビッド

オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフェン ハイ テック キャンパス ビルディング  
4 4

Fターム(参考) 2G045 AA03 CA18 CA25 FA34 JA01

专利名称(译)	用于区分和计数代表特定标记的粒子的多频阻抗方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012529033A</a>	公开(公告)日	2012-11-15
申请号	JP2012513723	申请日	2010-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司的Vie		
[标]发明人	モーガンハイウェル ホルメスデイビッド		
发明人	モーガン ハイウェル ホルメス デイビッド		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/50 G01N33/53 G01N15/10		
CPC分类号	G01N33/56972 B01L3/502761 G01N15/1056 G01N33/585 G01N2015/0069 G01N2015/008 G01N2015/129 G01N2333/70514		
FI分类号	G01N33/49.F G01N33/50.K G01N33/53.K G01N15/10		
F-TERM分类号	2G045/AA03 2G045/CA18 2G045/CA25 2G045/FA34 2G045/JA01		
代理人(译)	宫崎明彦		
优先权	2009162096 2009-06-05 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提出了用于鉴定和计数代表特定抗原标记的颗粒的分析方法。一个例子(非排他性)是血液中的CD4 + T淋巴细胞分析。该方法包括以下步骤: 获得在悬浮液中具有颗粒的样品, 用阻抗标记标记代表特定标记的颗粒, 至少标记代表特定标记的标记颗粒并使用双频系统测量标记样品。该方法允许精确计数颗粒, 例如计算血流中CD4 + T淋巴细胞的数量。还提供了相应的设备。

