



(10) **DE 11 2013 001 375 T5** 2014.11.27

(12)

Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2013/150869**
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2013 001 375.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP2013/056895**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.03.2013**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **10.10.2013**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **27.11.2014**

(51) Int Cl.: **C12M 1/34** (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
G01N 1/02 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
2012-084428 **03.04.2012** **JP**

(71) Anmelder:
Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, JP

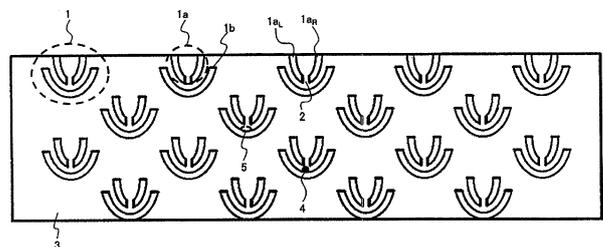
(74) Vertreter:
Patentanwälte Strehl, Schübel-Hopf & Partner,
80538 München, DE

(72) Erfinder:
Matsui, Takuya, c/o Hitachi High-Technologies
Co, Tokyo, JP; Maeshima, Muneo, c/o Hitachi
High-Technologies Cor, Tokyo, JP

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Durchflusszelle, Analysevorrichtung und Analyseverfahren unter Verwendung derselben**

(57) Zusammenfassung: Alle biologischen Substanzen, zum Beispiel Zellen oder Bakterien, werden an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert. Eine Durchflusszelle nach der vorliegenden Erfindung wird zum Analysieren einer biologischen Substanz verwendet und weist einen Strömungskanal und eine Einspritzöffnung und eine Auslassöffnung auf, die mit dem Strömungskanal verbunden sind. Der Strömungskanal ist mit Einfangstrukturelementen zum Einfangen der biologischen Substanz versehen. Die Einfangstrukturelemente weisen eine Struktur auf, die einen Totwasserbereich bildet, in dem die biologische Substanz eingefangen wird.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Durchflusszelle zur Durchführung von Analysen durch Einleiten einer Lösung, die biologische Substanzen wie etwa Zellen oder Bakterien enthält, in eine Vorrichtung und Platzieren aller Substanzen an einzelnen und unabhängigen Positionen, eine Analysevorrichtung mit derselben und ein Analyseverfahren.

Stand der Technik

[0002] Im Allgemeinen wird die Analyse einer biologischen Substanz wie etwa Zellen oder Bakterien mit einer Technik durchgeführt, bei der die biologische Substanz durch Kultivierung vermehrt wird und dann ein Durchschnittswert einer Anzahl von biologischen Substanzen bestimmt wird. Unterdessen ist in den vergangenen Jahren ein Verfahren zum Analysieren einzelner biologischer Substanzen vorgeschlagen worden, und Forschungsarbeiten zu Zellantwort- oder Unterdrückungsmechanismen, Zell-Zell-Wechselwirkungen und Stammzellendifferenzierung werden durchgeführt. Als ein Ergebnis ist festgestellt worden, dass sich ein gemittelt Verhalten einer Anzahl von biologischen Substanzen erheblich von dem Verhalten einzelner biologischer Substanzen unterscheidet. Mit diesem Verfahren kann eine einzelne biologische Substanz analysiert werden, so dass nicht nur eine biologische Substanz, deren Vermehrung durch Kultivierung schwierig ist, oder eine geringe Anzahl von biologischen Substanzen analysiert werden kann, sondern auch eine Frühanalyse durchgeführt werden kann, indem der Vermehrungsschritt für eine kultivierbare biologische Substanz weggelassen wird. Daher ist zu erwarten, dass 99,9% der Bakterien, die gegenwärtig als schwierig zu kultivieren gelten, und eine geringe Anzahl von Patientenzellen wie etwa Stammzellen oder Bakterien frühzeitig analysiert werden können, weshalb die Analyse von einzelnen biologischen Substanzen immer wichtiger wird. Seit einigen Jahren wird auch die Identifizierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTC), bei denen es sich um Krebszellen im Blut handelt, und von Bakterien durchgeführt.

[0003] Zum Analysieren einzelner biologischer Substanzen müssen mehrere biologische Substanzen an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert werden. Der Begriff „unabhängige Positionen“ bezieht sich hierbei auf Positionen, an denen einzelne biologische Substanzen in der Vorrichtung zum Analysieren der Substanzen identifiziert werden können. Die Verfahren zum Platzieren der biologischen Substanzen an den einzelnen und unabhängigen Positionen können weitgehend in strömungsdynamische Verfahren, Verfahren unter Verwendung äußerer Kräfte wie Strom, Licht, Magnetismus oder Ultraschall und Verfahren unter Verwendung einer Oberflächenbehandlung oder chemischen Kopplung eingeteilt werden, wie im Überblick zu Nicht-Patentliteratur 1 diskutiert. Hierbei ist zu beachten, dass beim Platzieren der biologischen Substanzen der Phänotyp der biologischen Substanzen nicht verändert werden darf. Wenn die biologische Substanz zum Beispiel durch Oberflächenbehandlung oder chemische Kopplung platziert wird, besteht die Möglichkeit einer chemischen oder strukturellen Veränderung in der biologischen Substanz, was dazu führt, dass das Verhalten einer anderen biologischen Substanz analysiert wird. Weil das Verfahren unter Verwendung äußerer Kräfte schwierig zu steuern ist, kann es außerdem wünschenswert sein, ein Platzierungsverfahren für die biologische Substanz zu verwenden, das ausschließlich auf der Strömungsdynamik beruht. Im Folgenden werden der Überblick und die Probleme aus einem Bericht über das Platzierungsverfahren für die biologische Substanz auf der Grundlage der Strömungsdynamik beschrieben.

[0004] Beim allgemeinsten Verfahren zum Analysieren einzelner biologischer Substanzen wird eine Lösung, die die biologische Substanz enthält, zwischen einem Objektträger und einem Deckglas eingeschlossen und beobachtet. Nach einem Verfahren wird eine Degeneration oder unspezifische Adsorption der biologischen Substanz durch Verwendung eines Objektträgers verhindert, der mit einem Agarosegel oder einem Blockierungsmittel (etwa BSA oder Casein) beschichtet ist. Bei einem anderen Verfahren wird die Lösung, die die biologische Substanz enthält, in einen Strömungskanal eines Mikrochips eingeleitet und in einem stationären Zustand beobachtet. Bei beiden Verfahren können die biologischen Substanzen an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert werden, indem die Konzentration der Lösung mit den biologischen Substanzen eingestellt wird. So wird zum Beispiel ein Fall behandelt, bei dem 10 µl einer Lösung mit biologischen Substanzen in einem Spalt (0,025 mm) zwischen einem Objektträger und einem Deckglas (20 mm × 20 mm) eingeschlossen ist. Wenn es erwünscht ist, die biologischen Substanzen mit durchschnittlichen Abständen von 1 mm zu platzieren, kann die Lösung mit den biologischen Substanzen mit einer Rate von 4×10^4 ml (40 µl) hergestellt werden. Wenn es erwünscht ist, die biologischen Substanzen mit durchschnittlichen Abständen von 0,1 mm zu platzieren, kann die Lösung mit den biologischen Substanzen mit einer Rate von 4×10^6 ml (4.000 µl) hergestellt werden. Außer in dem Fall, wo die biologischen Substanzen unspezifisch auf dem Objektträger

oder dem Deckglas und dergleichen adsorbiert werden, verändern sich bei dem vorstehenden Verfahren die Positionen der biologischen Substanzen zum Beispiel durch Brownsche Molekularbewegung oder die Motilität der biologischen Substanzen selbst in unregelmäßiger Weise. Sobald die biologische Substanz nicht mehr im Beobachtungsbereich oder Sichtfeld ist, ist es daher schwierig, dieselbe biologische Substanz erneut zu identifizieren. Weil die Abstände der biologischen Substanzen schließlich Durchschnittswerte sind, sind außerdem die biologischen Substanzen nicht immer an den unabhängigen Positionen vorhanden und können sich neben einer anderen biologischen Substanz befinden (in diesem Fall kann die Analysevorrichtung nicht feststellen, dass sich die biologischen Substanzen nebeneinander befinden). Ein weiteres Problem besteht darin, dass es schwierig ist, der Bewegung der biologischen Substanzen zu folgen. Außerdem kann nur eine winzige Menge der Lösung (im vorliegenden Fall 10 µl) mit den biologischen Substanzen für die Analyse verwendet werden.

[0005] In einem anderen Verfahren wird eine Mikrotiterplatte verwendet. Bei diesem Verfahren wird in eine Mikrotiterplatte mit einer Reihe von Mikrowells in Größen von fl (10^{-15} Liter) bis pl 12 (10^{-12} Liter) eine in ihrer Konzentration angepasste Lösung mit den biologischen Substanzen eingefüllt, so dass, probabilistisch, ein Bakterium in eine Mikrozelle gelangt. Indem die Größe der Mikrowells so gestaltet wird, dass sie geringfügig größer sind als die Größe der zu platzierenden biologischen Substanzen, kann verhindert werden, dass mehrere biologische Substanzen in dieselbe Mikrozelle gelangen. Es ist berichtet worden, dass mit diesem Verfahren einzelne Zellen (mehrere Dutzend Mikrometer) in 80 bis 90% der Mikrowells eingebracht worden sind. Wenn die Größe jedoch gering ist, etwa in der Größenordnung von mehreren Mikrometern, wie zum Beispiel im Falle von Bakterien, kann die Anwendung schwieriger werden, wenn die Form nicht kugelförmig, sondern stabförmig ist und die Substanzen selbst beweglich sind. Wenn der Zwischenraum zwischen den Mikrowells und dem Deckglas mit Flüssigkeit gefüllt ist, können bewegliche Bakterien möglicherweise ausströmen. Um die Lösung in den Mikrowells auszutauschen, sind aufgrund der schlechten Substitutionseffizienz außerdem große Mengen an Flüssigkeit und Zeit erforderlich, was die Rückgewinnung der biologischen Substanzen schwierig macht. Darüber hinaus kann nur eine winzige Menge der Lösung mit den biologischen Substanzen für die Analyse verwendet werden.

[0006] Nach einem Verfahren zur Lösung des Problems, dass nur eine winzige Menge der Lösung mit den biologischen Substanzen analysiert werden kann, wird der Strömungskanal eines Mikrochips mit einem Strukturelement zum Einfangen der biologischen Substanzen versehen, und die biologischen Substanzen werden eingefangen, während die Lösung mit den biologischen Substanzen durchströmt. Bei diesem Verfahren kann nur eine winzige Menge der biologischen Substanzen in eine Lösung eingeleitet werden, wodurch die Notwendigkeit zur Einstellung der Konzentration der Lösung mit den biologischen Substanzen entfällt und es möglich ist, eine sehr dünne Lösung zu verwenden. Im Folgenden werden der Überblick und die Probleme im Hinblick auf einen Bericht über ein Platzierungsverfahren für biologische Substanzen auf der Grundlage dieses Verfahrens beschrieben.

[0007] In Nicht-Patentliteratur 2 wird als das Strukturelement zum Einfangen von CD34-Zellen mit einer Größe von ca. 10 µm ein korbähnliches Einfangstrukturelement, das mit Schlitzen von mehreren Mikrometern versehen ist, die größer als die Zelle sind, an drei Stellen verwendet. Eine Lösung, die eine biologische Substanz enthält, wird eingeleitet und durch die Schlitzbereiche geleitet, wodurch die Lösung in das korbähnliche Einfangstrukturelement eingeführt wird. Wenn das korbähnliche Einfangstrukturelement keine Schlitze aufweist, wird es schwierig, Luft (Luftblasen) auszuspülen, die vor dem Einleiten der Lösung vorhanden ist, was nicht praktisch ist.

[0008] Soviel von der Lösung, die die biologische Substanz enthält, kann in das korbähnliche Einfangstrukturelement eingeführt werden, wie die Menge der Lösung, die die biologische Substanz enthält, die aus den Schlitzbereichen austritt. Dabei können die eingeführten biologischen Substanzen die Schlitze nicht passieren, so dass die Substanz durch das korbähnliche Einfangstrukturelement eingefangen wird. Weil das korbähnliche Einfangstrukturelement von einer ähnlichen Größe wie die CD34-Zelle ist, ist die Wahrscheinlichkeit verringert, dass mehrere CD34-Zellen in dasselbe Einfangstrukturelement gelangen, wodurch einzelne CD34-Zellen in den meisten der Einfangstrukturelemente eingefangen werden können. Durch Variieren der Breite oder der Anzahl der Schlitze des Einfangstrukturelements kann das Verhältnis der Lösung, die die biologische Substanz enthält und die in das Einfangstrukturelement eingeführt werden kann, variiert werden, wodurch die Einfangrate für die biologische Substanz geändert wird. In diesem Fall gibt es die folgenden vier Probleme. Das erste besteht darin, dass es, während eine biologische Substanz einer bekannten Größe eingefangen werden kann, indem die Schlitzbreite kleiner als die Größe eingestellt wird, notwendig ist, den Schlitz in dem Maße mit einer geringeren Breite herzustellen, wie die Größe der biologischen Substanz kleiner wird. Während die CD34-Zelle zum Beispiel ca. 10 µm groß ist, beträgt die Nebenachse von Bakterien ca. 0,5 bis 1,0 µm. Weil der Schlitzbreiten-Auslegungswert, zu dem ein maximaler Prozessfehler des Schlitzes hinzuaddiert wird,

kleiner als die Größe der biologischen Substanz sein muss, ist eine hohe Prozessgenauigkeit in der Größenordnung von 0,1 μm erforderlich, was zu einer Erhöhung der Herstellungskosten führt. Außerdem wird, wenn eine schmale Breite des Schlitzes verwendet wird, die Einfangrate für die biologische Substanz verringert. Das zweite Problem ist, dass während die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere biologische Substanzen durch dasselbe Einfangstrukturelement eingefangen werden, indem die Größe des Einfangstrukturelements ähnlich der Größe der biologischen Substanz verringert wird, so dass einzelne biologische Substanzen in den meisten der Einfangstrukturelemente eingefangen werden können, wenn die Größe oder Form der biologischen Substanzen unterschiedlich ist, mehrere biologische Substanzen in einem Einfangstrukturelement eingefangen werden können. Die Längen von Bakterien umfassen zum Beispiel die Nebenachse (ca. 0,2 bis 1,0 μm) und die Hauptachse (ca. 1 bis 10 μm), so dass sie sich über einen großen Bereich erstrecken. Weil nicht alle der biologischen Substanzen mit dem Einfangstrukturelement eingefangen werden können und nur die eingefangenen biologischen Substanzen als Analyseobjekt verwendet werden, besteht das dritte Problem darin, dass wichtige Informationen eventuell übersehen werden oder die Anzahl der biologischen Substanzen nicht quantifiziert werden kann. Weil die biologische Substanz kontinuierlich einer Kraft ausgesetzt ist, die sie in den Schlitzbereich zieht, besteht das vierte Problem darin, dass Stress in der biologischen Substanz verursacht werden kann, was möglicherweise zu einer Veränderung des Phänotyps führt. Während es den Anschein hat, dass in Patentliteratur 1 das Einfangstrukturelement keinen Schlitz aufweist, gibt es einen Spalt von 2 μm in der Z-Richtung, wodurch dieselbe Funktion wie bei den Schlitz in Nicht-Patentliteratur 2 bereitgestellt wird.

[0009] In Nicht-Patentliteratur 3 wird mit einem Einfangstrukturelement mit einem Schlitz von ca. 0,8 μm ein einzelnes Escherichia coli-Bakterium an verschiedenen Einfangstrukturelementpositionen eingefangen. Im Gegensatz zu Nicht-Patentliteratur 2 oder Patentliteratur 1 ist das Einfangstrukturelement in der Größe ausreichend größer als die biologische Substanz ausgeführt, und die Wahrscheinlichkeit des Einfangens der biologischen Substanz ist verringert, so dass als Folge einzelne biologische Substanzen im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden können. Hierbei gibt es jedoch die folgenden Probleme. Das erste ist, dass Escherichia coli-Bakterien von 0,8 μm oder weniger nicht eingefangen werden. In Nicht-Patentliteratur 4 wird auch berichtet, dass Escherichia coli einen Strömungskanal von der Größe der Hälfte ihrer eigenen Nebenachse passieren können, je nach Zustand. In diesem Fall können je nach Zustand selbst Escherichia coli von 1,6 μm passieren. Das zweite Problem ist, dass nicht alle der biologischen Substanzen von dem Einfangstrukturelement eingefangen werden können und keine Analyse der Bedingungen durchgeführt wird. Weil die biologische Substanz kontinuierlich einer Kraft ausgesetzt ist, die sie zu dem Schlitzbereich zieht, besteht das dritte Problem darin, dass in der biologischen Substanz Stress verursacht werden kann, was möglicherweise zu einer Veränderung des Phänotyps führt. Das vierte Problem ist, wie in Nicht-Patentliteratur 3 diskutiert, dass die Bakterien möglicherweise gelöst werden können, wenn die Lösung mit hoher Geschwindigkeit eingeleitet wird.

Zitierliste

Patentliteratur

[0010]

Patentliteratur 1: US 2010/0003666

Nicht-Patentliteratur

[0011]

Nicht-Patentliteratur 1: Analytica Chimica Acta 649 (2009) 141–157

Nicht-Patentliteratur 2: Biomicrofluidics 5, 024106 (2011)

Nicht-Patentliteratur 3: Lab Chip, 2011, 11, 1089

Nicht-Patentliteratur 4: PNAS, 2009, 106, 14861–66

Zusammenfassung der Erfindung

Technisches Problem

[0012] Um den Stand der Technik zusammenzufassen, müssen zum Platzieren aller biologischen Substanzen wie etwa Zellen oder Bakterien an einzelnen und unabhängigen Positionen die folgenden Probleme angegangen werden.

1. Je kleiner die biologische Substanz, umso schmaler muss die Breite eines hergestellten Schlitzes sein. Die Herstellung eines Schlitzes mit einer schmalen Breite führt zu einer Erhöhung der Herstellungskosten. Außerdem wird, wenn ein Schlitz mit einer schmalen Breite verwendet wird, die Einfangrate für die biologische Substanz verringert. Wenn das Einfangstrukturelement keinen Schlitz aufweist, wird es schwierig, Luft (Luftblasen) auszuspülen, die vor dem Einleiten der Lösung vorhanden ist.

2. Weil die biologische Substanz mit einem Schlitz eingefangen wird, wirkt eine äußere Kraft ein, was Stress verursacht.

Wenn die biologische Substanz Stress ausgesetzt ist, besteht die Möglichkeit einer Veränderung des Phänotyps. Außerdem kann in der biologischen Substanz, die in dem Schlitz gehalten wird, eine Scherkraft von einem Strömungsfeld erzeugt werden.

3. Wenn die Lösung mit hoher Geschwindigkeit eingeleitet wird, kann die biologische Substanz möglicherweise gelöst werden.

Einige der Probleme können teilweise mit den unter Bezugnahme auf den Stand der Technik beschriebenen Verfahren gelöst werden, aber es können nicht alle Probleme gelöst werden. Die vorliegende Erfindung stellt eine Analysevorrichtung bereit, die alle diese Anforderungen erfüllen kann.

Lösung für das Problem

[0013] Eine Durchflusszelle nach der vorliegenden Erfindung ist eine Durchflusszelle zum Analysieren einer biologischen Substanz, die einen Strömungskanal und eine Einspritzöffnung und eine Auslassöffnung aufweist, die mit dem Strömungskanal verbunden sind. Der Strömungskanal ist mit Einfangstrukturelementen zum Einfangen der biologischen Substanz versehen. Die Einfangstrukturelemente weisen eine Struktur auf, die einen Totwasserbereich bildet, in dem die biologische Substanz eingefangen wird.

Vorteilhafte Wirkungen der Erfindung

[0014] Eine Lösung, die eine biologische Substanz wie etwa eine Zelle oder ein Bakterium enthält, kann in eine Vorrichtung eingeleitet, an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert und analysiert werden. Probleme, Konfigurationen und andere Wirkungen außer den vorstehend erwähnten werden aus der nachfolgenden Beschreibung der Ausführungsformen ersichtlich.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0015] Fig. 1 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels eines Einfangstrukturelements.

[0016] Fig. 2 zeigt ein Beispiel für die Simulation der Strömung in das Einfangstrukturelement.

[0017] Fig. 3 zeigt ein Beispiel für die Simulation der Strömung in das Einfangstrukturelement.

[0018] Fig. 4 zeigt ein Beispiel für die Simulation der Strömung in das Einfangstrukturelement.

[0019] Fig. 5 zeigt ein Schemadiagramm der Parameter für das Einfangen aller biologischen Substanzen.

[0020] Fig. 6 zeigt die Einfangrate und die Anzahl der Einfangstrukturelemente (Einleitrichtung der Lösung).

[0021] Fig. 7 zeigt die Anzahl der Einfangstrukturelemente (Einleitrichtung der Lösung) und die Kanallänge.

[0022] Fig. 8 zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens zwei oder mehr biologische Substanzen in demselben Einfangstrukturelement eingefangen werden.

[0023] Fig. 9 zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei biologische Substanzen in demselben Einfangstrukturelement eingefangen werden.

[0024] Fig. 10 zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass drei biologische Substanzen in demselben Einfangstrukturelement eingefangen werden.

[0025] Fig. 11 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels des Einfangstrukturelements.

[0026] Fig. 12 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels einer Analysevorrichtung.

[0027] Fig. 13 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Analysevorrichtung.

[0028] Fig. 14 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels einer Durchflusszelle.

[0029] Fig. 15 zeigt ein Ablaufdiagramm für ein Beispiel eines Steuerungsverfahrens zum Reinigen einer Probenahmedüse.

[0030] Fig. 16 zeigt ein Ablaufdiagramm für ein Beispiel eines Steuerungsverfahrens zum Reinigen des Inneren der Durchflusszelle.

[0031] Fig. 17 zeigt ein Ablaufdiagramm für ein Beispiel eines Verfahrens zum Ansaugen eines Reagens aus einem Reagensbehälter.

[0032] Fig. 18 zeigt ein Ablaufdiagramm für ein Beispiel eines Verfahrens zum Einspritzen des Reagens in die Durchflusszelle.

[0033] Fig. 19 zeigt die Beziehung zwischen den Zeitpunkten für das Einstecken oder Herausnehmen der Probenahmedüse in die oder aus der Einspritzöffnung und das Betätigen des Kolbens einer Mikrospritze und Druckveränderungen in der Durchflusszelle.

[0034] Fig. 20 zeigt ein Ablaufdiagramm für ein Beispiel eines Nachweisverfahrens.

[0035] Fig. 21 zeigt ein Ablaufdiagramm für ein Beispiel eines Sammelverfahrens.

[0036] Fig. 22 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Strukturelemente mit unterschiedlichen Einfangraten in jeder Kolonne.

[0037] Fig. 23 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Strukturelemente mit unterschiedlichen Einfangraten in jeder Kolonne.

[0038] Fig. 24 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Strukturelemente mit unterschiedlichen Einfangraten in jeder Kolonne.

[0039] Fig. 25 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels des Einfangstrukturelements mit einem erweiterten Totwasserbereich.

[0040] Fig. 27 zeigt ein Schemadiagramm von Modifikationen des Einfangstrukturelements.

Beschreibung der Ausführungsformen

[0041] Im Folgenden werden Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung anhand der Zeichnungen beschrieben. Die vorliegende Erfindung kann allgemein für eine Analysevorrichtung in einem System so angewendet werden, dass mehrere biologische Substanzen zur Analyse an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert werden. Im Folgenden wird ein Beispiel beschrieben, bei dem die vorliegende Erfindung für eine bakteriologische Analyse angewendet wird.

[0042] Fig. 1 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Einfangstrukturelemente nach der vorliegenden Erfindung. Die Einfangstrukturelemente **1** sind Strukturelemente, die ein Paar aus einem Strukturelement **1a** mit Schlitz und einem Strukturelement **1b** ohne Schlitz aufweisen, und mehrere Einfangstrukturelemente **1** sind vorgesehen. Das Strukturelement **1a** mit Schlitz weist eine linke Seite **1a_L** des Strukturelements mit Schlitz und eine rechte Seite **1a_R** des Strukturelements mit Schlitz auf, wobei ein Schlitz **2** zwischen den Seiten angeordnet ist. Eine Lösung (nicht gezeigt), die biologische Substanzen **4** enthält, wird über eine Einspritzöffnung (siehe Fig. 14) oben in Fig. 1 eingespritzt, durch einen Strömungskanal **3** geleitet und tritt an einer Auslassöffnung (siehe Fig. 14) unten in Fig. 1 aus. Die Einfangstrukturelemente **1** weisen eine Höhe auf, die gleich der Höhe des Strömungskanals ist. Bei diesem Prozess fließt die nicht gezeigte Lösung, die die biologischen Substanzen **4** enthält, mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in das Strukturelement **1a** mit Schlitz, passiert den Schlitz **2** und fließt aus Spalten an zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz heraus. Dabei werden die biologischen Substanzen **4** mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in einem Totwasserbereich **5** eingefangen. Der Totwasserbereich **5** ist ein Bereich, in dem keine Strömung vorliegt, oder ein Bereich, in dem die Strömung, sofern vorhanden, eine Verwirbelung ist und nichts mit der

Kanalisation des Durchflussvolumens zu tun hat. Die biologischen Substanzen **4**, die den Schlitz **2** passiert haben, werden aufgrund von Diffusion, Trägheitskraft oder ihrer Beweglichkeit mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in dem Totwasserbereich **5** eingefangen. Der Totwasserbereich **5** ist in einem Bereich wie etwa einem sich stark erweiternden Teil, einem sich stark verengenden Teil oder einem gebogenen Teil gebildet. Der Totwasserbereich **5** kann durch strukturelle Optimierung erweitert werden, etwa indem das Strukturelement **1b** ohne Schlitz mit einer Vertiefung nahe dem Totwasserbereich versehen wird. Die in dem Totwasserbereich **5** eingefangenen biologischen Substanzen **4** sind kaum der Kraft der Flüssigkeit ausgesetzt. Daher wird in den biologischen Substanzen **4** kein Stress verursacht und die Substanz wird auch nicht gelöst. Das Strukturelement **1b** ohne Schlitz ist auf der Abströmseite des Totwasserbereichs **5** vorgesehen. Auch wenn die biologischen Substanzen **4** klein sind, fließen die biologischen Substanzen **4** daher nicht aus dem Totwasserbereich **5** zur Abströmseite. Weil das Strukturelement **1a** mit Schlitz die Funktion hat, den Strömungskanal des Strukturelements **1b** ohne Schlitz mit der Lösung mit den biologischen Substanzen **4** von der Abströmseite zur Anströmseite über den Schlitz **2** zu füllen, können Luftblasen leicht entfernt werden. Während das Strukturelement **1a** mit Schlitz und das Strukturelement **1b** ohne Schlitz jeweils einen Teil eines Ellipsenbogens umfassen, können sie auch einen Teil eines Kreisbogens oder eines Dreiecks umfassen. Unterschiedliche Formen der Strukturelemente produzieren unterschiedliche Strömungen, was wiederum zu Unterschieden in der Einfangrate für die biologischen Substanzen **4** führt.

[0043] Fig. 2A zeigt das Ergebnis einer Strömungssimulation, bei der das Einfangstrukturelement in der Mitte eines Strömungskanals mit einer Breite von 1 mm angeordnet war und die Lösung mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 mm/s von der linken Seite zur rechten Seite geleitet wurde. Die Schlitzbreite betrug 5 µm. Fig. 2B zeigt eine vergrößerte Ansicht des Bereichs des Einfangstrukturelements, wobei die Strömungsrichtung der Lösung durch Pfeile angegeben ist. Wie gezeigt, fließt die Lösung, die den Schlitz passiert hat, in einer verzweigten Weise zu den Spalten an den zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz heraus. Daher wird der Totwasserbereich in dem Verzweigungsbereich gebildet.

[0044] Fig. 3A zeigt das Ergebnis einer Strömungssimulation, bei der die Einfangstrukturelemente in einem von der Mitte des Strömungskanals mit einer Breite von 1 mm versetzten Abschnitt angeordnet waren und die Lösung mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 mm/s von der linken Seite zur rechten Seite geleitet wurde. Die Schlitzbreite betrug 5 µm. Fig. 3B zeigt eine vergrößerte Ansicht des Bereichs des Einfangstrukturelements, wobei die Strömungsrichtung der Lösung durch Pfeile angegeben ist. Wie gezeigt, fließt die Lösung, die den Schlitz passiert hat, zu einer der zwei Stellen mit den Spalten zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz heraus. Es entsteht auch eine Strömung von einer der Spalten zu der anderen Spalte. Weil es im Gegensatz zu Fig. 2 keinen Verzweigungsbereich gibt, wird der Totwasserbereich nicht gebildet.

[0045] Fig. 4A zeigt das Ergebnis einer Strömungssimulation, bei der das Einfangstrukturelement in einem von der Mitte des Strömungskanals mit einer Breite von 1 mm versetzten Abschnitt angeordnet war und die Lösung mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 mm/s von der linken Seite zur rechten Seite geleitet wurde. Die Bedingungen waren dieselben wie in Fig. 3, außer dass die Schlitzbreite 30 µm betrug. Fig. 4B zeigt eine vergrößerte Ansicht des Bereichs des Einfangstrukturelements, wobei die Strömungsrichtung der Lösung durch Pfeile angegeben ist. Wie gezeigt, fließt die Lösung, die den Schlitz passiert hat, in einer verzweigten Weise zu den Spalten an den zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz heraus. Im Gegensatz zu dem Fall in Fig. 3 wird der Totwasserbereich in dem Verzweigungsbereich gebildet. Daher hat das Strukturelement mit dem Schlitz den Vorteil, dass der Totwasserbereich durch Einstellen von Parametern wie etwa der Schlitzbreite gebildet werden kann.

[0046] Die Bedingungen für das Einfangen aller biologischen Substanzen werden beschrieben. Zuerst wird die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) für die biologischen Substanzen in den Einfangstrukturelementen berechnet mit $[\alpha: (\text{Durchflussvolumen der Strömung in das Einfangstrukturelement})/(\text{Gesamtdurchflussvolumen})] \times [\beta: \text{Einfangrate für die biologische Substanz in dem Einfangstrukturelement}]$. Während β im Bereich von 0 bis 1 ist, wenn angenommen wird, dass durch Einstellen von Parametern $\beta = 1$ ist (das heißt, alle biologischen Substanzen, die in das Einfangstrukturelement geflossen sind, werden eingefangen), kann die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) mit α näherungsweise bestimmt werden. Offensichtlich kann α mit einem Sicherheitskoeffizienten multipliziert werden. Daher kann die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) mit $[(\text{Schlitzbreite}) \times (\text{durchschnittliche Strömungsgeschwindigkeit in dem Schlitz})]/[(\text{Strömungskanalbreite})/(\text{durchschnittliche Strömungsgeschwindigkeit in dem Strömungskanal})]$ berechnet werden. In dem Beispiel in Fig. 3 wird die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) mit $[(0,005 \text{ mm})/(0,0004 \text{ mm/s})]/[(1 \text{ mm})/(1 \text{ mm/s})]$ berechnet, was 0,000002 ergibt. Dies gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass von einer Million biologischen

Substanzen zwei in den Einfangstrukturelementen eingefangen werden können. In gleicher Weise ist in dem Beispiel in **Fig. 4** wo nur die Schlitzbreite von 5 μm in **Fig. 3** auf 30 μm geändert ist, die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) $[(0,03 \text{ mm})/(0,0016 \text{ mm/s})]/[(1 \text{ mm})/(1 \text{ mm/s})]$ gleich 0,00005, was ca. 25-mal größer ist. Daher hat das Strukturelement mit dem Schlitz den Vorteil, dass die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) durch Einstellen von Parametern wie dem Abstand der Einfangstrukturelemente, der Schlitzbreite, der Strömungskanalbreite oder der Strömungsgeschwindigkeit eingestellt werden kann. Durch einfaches Ändern der Strömungskanalbreite von 1 mm in **Fig. 4** auf 0,36 mm kann zum Beispiel die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) auf 0,001 erhöht werden. Während jedoch, wie in **Fig. 2** bis **Fig. 4** gezeigt, die Strömungsrichtung der Lösung mit den biologischen Substanzen unmittelbar vor dem Eintritt in das Einfangstrukturelement geändert wird, kann die Richtung wegen der auf die biologischen Substanzen wirkenden Trägheitskraft nicht abrupt geändert werden, wodurch die Lösung ohne weiteres in das Einfangstrukturelement fließt. Daher wird die tatsächliche Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) höher als das berechnete Ergebnis des Durchflussvolumenverhältnisses. Entsprechend wird die tatsächliche Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) höher, denn je schneller die Strömungsgeschwindigkeit, umso größer die Trägheitskraft, die einwirkt.

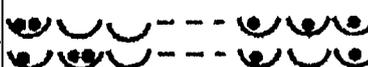
[0047] **Fig. 5** zeigt die Parameter für die Berechnung der Bedingungen für das Einfangen aller Bakterien. Wenn die Einfangrate je Einfangstrukturelement bekannt ist, können die Bedingungen für das Einfangen aller biologischen Substanzen berechnet werden. #Bakterien ist die Anzahl der Bakterien vor dem Einleiten in die Einfangstrukturelemente. #Nicht eingefangene Bakterien ist die Anzahl der Bakterien nach dem Einleiten in die Einfangstrukturelemente. Die Einleitrichtung der Lösung ist durch den Pfeil Strömungsrichtung angegeben. Die Einfangrate ist das Verhältnis der in den Einfangstrukturelementen eingefangenen Bakterien und wird mit $[(\#Bakterien) - (\#Nicht\ eingefangene\ Bakterien)]/(\#Bakterien)$ berechnet. Die Einfangstrukturelemente sind schematisch durch halbkreisförmige Bogen angegeben, wobei die Abstände zwischen den benachbarten Einfangstrukturelementen durch Einfangabstand (x) und Einfangabstand (y) angegeben sind, die x-Richtung parallel zur Einleitrichtung der Lösung ist und die y-Richtung senkrecht bezogen auf die x-Richtung ist. #Einfangobjekt (Kolonnie) ist die Anzahl der in y-Richtung angeordneten Einfangstrukturelemente und #Einfangobjekt (Reihe) ist die Anzahl der in x-Richtung angeordneten Einfangstrukturelemente. Die Kanallänge ist die Länge des Strömungskanals, in dem die Einfangstrukturelemente in der Einleitrichtung der Lösung (x-Richtung) gebildet sind, und die Länge wird mit Einfangabstand (x) \times #Einfangobjekt (Reihe) berechnet. In gleicher Weise ist die Kanalbreite die Länge des Strömungskanals, in dem die Einfangstrukturelemente in y-Richtung gebildet sind, und die Länge wird mit Einfangabstand (y) \times #Einfangobjekt (Kolonnie) berechnet. Die Einfangrate (/Breite) gibt die Einfangrate an, wenn eine Kolonne der in y-Richtung angeordneten Einfangstrukturelemente passiert wird. #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) ist die Anzahl der mit den Einfangstrukturelementen in der ersten Kolonne eingefangenen Bakterien und wird mit $[Einfangrate\ (/Breite)] \times (\#Bakterien)$ berechnet. #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) wird kleiner, wenn die Anzahl der Kolonnen der passierten Einfangstrukturelemente zunimmt. Die Einfangrate (/Breite) ist gleich der Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement), wenn die Strömungskanalbreite dem Einfangabstand (y) in **Fig. 2** bis **Fig. 4** entspricht. Dies liegt daran, dass die Einfangrate der Einfangstrukturelemente je Einfangabstand (y) gleich der Einfangrate ist, wenn mehrere Einfangstrukturelemente parallel angeordnet sind.

[0048] **Fig. 6** zeigt die Beziehung zwischen Einfangrate und #Einfangobjekt (Reihe) für den Fall von Einfangraten (/Breite) von 0,0001 bis 0,1. Wenn die Einfangrate (/Breite) 0,01 beträgt, ist die Anzahl der Kolonnen der Einfangstrukturelemente, die in der Einleitrichtung der Lösung (x-Richtung) angeordnet werden müssen, 300 für eine Einfangrate von 95%, 470 für eine Einfangrate von 99% und 700 für eine Einfangrate von 99,9%. Wenn die Einfangrate (Breite) 0,001 beträgt, ist die Anzahl der Einfangstrukturelemente, die in der Einleitrichtung der Lösung (x-Richtung) angeordnet werden müssen, 3.000 für eine Einfangrate von 95%, 4.700 für eine Einfangrate von 99% und 7.000 für eine Einfangrate von 99,9%.

[0049] **Fig. 7** zeigt die Beziehung zwischen #Einfangobjekt (Reihe) und der Kanallänge (mm) für den Fall eines Einfangabstands (x) von 10 bis 1.000 μm . Wenn der Einfangabstand (x) 100 μm beträgt, ist die erforderliche Kanallänge 70 mm, wenn 700 Kolonnen der Einfangstrukturelemente zum Einfangen von 99,9% mit einer Einfangrate ((Breite) von 0,01 angeordnet sind, oder 700 mm, wenn 7.000 Kolonnen der Einfangstrukturelemente zum Einfangen von 99,9% mit einer Einfangrate (/Breite) von 0,001 angeordnet sind. In Anbetracht dessen, dass die Obergrenze für die Größe eines allgemeinen Mikrochips, der eine einfache Handhabung durch einen Benutzer gestattet, der Größe einer Postkarte (100 mm \times 150 mm) entspricht, ist ein mäanderförmiger Strömungskanal und dergleichen erforderlich, um eine Kanallänge von 700 mm zu realisieren. Um den Maximalwert für #Einfangobjekt (Reihe) abzuschätzen, wird die minimale Größe des Einfangstrukturelements zum Einfangen von Bakterien bestimmt, um den minimalen Einfangabstand (x) zu ermitteln. Der Maximalwert für die Kanallänge einschließlich des mäanderförmigen Strömungskanals und dergleichen kann bestimmt und anschließend zur Berechnung durch den minimalen Einfangabstand (x) dividiert werden.

[0050] Die Bedingungen für das Platzieren aller Bakterien an einzelnen und unabhängigen Positionen werden beschrieben. Wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 1 oder kleiner ist, können alle Bakterien an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert werden. Weil #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich $[\text{Einfangrate} / (\text{Breite})] \times (\text{\#Bakterien})$ ist, kann die Einfangrate (/Breite) gleich $1/\text{\#Bakterien}$ oder kleiner sein. Wenn zum Beispiel #Bakterien 1.000 beträgt, können alle Bakterien an einzelnen und unabhängigen Positionen platziert werden, indem die Einfangrate (/Breite) auf 0,001 oder kleiner eingestellt wird. Wenn #Bakterien nicht bekannt ist, kann #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) größer als 1 werden, wodurch mehrere Bakterien in demselben Einfangstrukturelement eingefangen werden können. In diesem Fall ist es möglich, #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 1 oder kleiner zu machen, indem #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) durch Aufteilen der Lösung, die die #Bakterien enthält, verringert wird oder indem die Einfangrate (/Breite) ausreichend gering gewählt wird. Die nachstehende Tabelle zeigt die für jeden Einfangzustand berechnete Wahrscheinlichkeit, wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 10 und #Einfangobjekt (Kolonne) gleich 100 ist. In der Spalte „Einfangbeispiel“ gibt ein Halbkreis das Einfangstrukturelement an, und ein schwarzer Punkt (•) gibt die eingefangenen Bakterien an.

Tabelle 1

Einfangzustand	Wahrscheinlichkeit	Details	Einfangbeispiel	Wahrscheinlichkeit
Einzel eingefangen	0,63 (= 1 bis 0,37)	-		0,63 (= 1 bis 0,37)
Zu mehreren eingefangen	0,37 (Fig. 8)	Nur zwei Bakterien zu mehreren eingefangen, der Rest einzeln eingefangen		0,20 (Fig. 9) (= $0,37 \times 0,75$)
		Nur drei Bakterien zu mehreren eingefangen, der Rest einzeln eingefangen		0,02 (Fig. 10) (= $0,37 \times 0,055$)
		Sonstige		0,15 (= 0,37 bis 0,22)

[0051] Fig. 8 zeigt die Beziehung zwischen #Einfangobjekt (Kolonne) und der Wahrscheinlichkeit, dass mindestens zwei oder mehr Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) 1 bis 28 beträgt. Wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 10 und #Einfangobjekt (Kolonne) gleich 100 ist, werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,37 (37%) mindestens zwei oder mehr Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen.

[0052] Fig. 9 zeigt die Beziehung zwischen #Einfangobjekt (Kolonne) und der Wahrscheinlichkeit, dass nur zwei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) 1 bis 28 beträgt. Wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 10 und #Einfangobjekt (Kolonne) gleich 100 ist, werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,75 (75%) nur zwei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen. Weil die Wahrscheinlichkeit des mehrfachen Einfangens 0,37 beträgt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass nur zwei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, 0,20 (= $0,37 \times 0,75$). In diesem Fall werden die verbleibenden acht Bakterien einzeln in den Einfangstrukturelementen eingefangen.

[0053] Fig. 10 zeigt die Beziehung zwischen #Einfangobjekt (Kolonne) und der Wahrscheinlichkeit, dass nur drei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) 1 bis 28 beträgt. Wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 10 und #Einfangobjekt (Kolonne) gleich 100 ist, werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,055 (5,5%) nur drei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen. Weil die Wahrscheinlichkeit des mehrfachen Einfangens 0,37 beträgt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass nur drei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, 0,02 (= $0,37 \times 0,055$). In diesem Fall werden die verbleibenden sieben Bakterien einzeln in den Einfangstrukturelementen eingefangen. Wenn #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) gleich 10 und #Einfangobjekt (Kolonne) gleich 100 ist, beträgt daher die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder mehr Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, 0,37, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass nur zwei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, 0,20 beträgt, und die Wahrscheinlichkeit, dass nur drei Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, 0,02 beträgt. Somit beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass vier oder mehr Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden, 0,15 [= $0,37 - (0,20 + 0,02)$].

Je größer #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) oder je kleiner #Einfangobjekt (Kolonne) ist, umso größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Bakterien im selben Einfangstrukturelement eingefangen werden.

[0054] Die Wirkungen der vorliegenden Erfindung sind wie folgt:

1. Die Konzentration der bakterienhaltigen Lösung muss eingestellt werden.

Die Strukturelemente zum Einfangen von Bakterien sind in dem Strömungskanal des Mikrochips angeordnet, und das Einfangen wird durchgeführt, während eine bakterienhaltige Lösung durchströmt. Weil nur eine nötige Menge der bakterienhaltigen Lösung eingeleitet werden kann, besteht keine Notwendigkeit, die Konzentration der bakterienhaltigen Lösung einzustellen, und eine sehr dünne Lösung kann verwendet werden.

2. Je kleiner die Bakterien, umso schmaler muss die Breite des hergestellten Schlitzes sein.

Weil das Bakterien-Einfangprinzip nicht auf einem Schlitz basiert, besteht keine Notwendigkeit, einen Schlitz mit einer schmalen Breite herzustellen.

3. Nicht alle Bakterien können eingefangen werden.

Durch Berechnen der Einfangrate je Einfangstrukturelement kann die Anzahl der Einfangstrukturelemente zum Einfangen aller Bakterien berechnet werden.

4. Weil die Bakterien mit einem Schlitz eingefangen werden, wirkt eine äußere Kraft ein und es wird Stress verursacht.

Anstatt die Bakterien mit einem Schlitz einzufangen, werden die Bakterien in einem Totwasserbereich eingefangen, so dass keine äußere Kraft einwirkt.

5. Mehrere Bakterien werden in einem Einfangstrukturelement eingefangen.

Durch Einstellen von #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) auf 1 oder kleiner kann das Einfangen von mehreren Bakterien in einem Einfangstrukturelement vermieden werden.

6. Wenn die Lösung mit hoher Geschwindigkeit eingeleitet wird, besteht die Möglichkeit der Auflösung der Bakterien.

Weil die Bakterien in dem Totwasserbereich eingefangen werden, wirkt keine äußere Kraft von der Flüssigkeit ein.

[0055] Weil die vorliegende Erfindung ein Strukturelement bereitstellt, das ein Paar aus einem Strukturelement mit einem Schlitz und einem Strukturelement ohne einen Schlitz aufweist, können außerdem die folgenden drei Vorteile erzielt werden.

1. Das Strukturelement mit einem Schlitz macht es möglich, den Strömungskanal des Strukturelements ohne Schlitz von der Abströmseite zur Anströmseite hin über den Schlitz mit der Lösung zu füllen, was das Entfernen von Luftblasen erleichtert.

2. Das Strukturelement mit einem Schlitz ermöglicht das Bilden eines Totwasserbereichs durch Einstellen von Parametern wie der Schlitzbreite.

3. Das Strukturelement mit einem Schlitz macht es möglich, die Einfangrate durch Einstellen von Parametern wie den Abständen zwischen den Einfangstrukturelementen, der Schlitzbreite oder der Strömungsgeschwindigkeit zu ändern. Durch Erhöhen der Einfangrate können alle biologischen Substanzen eingefangen werden. Während der Schlitz 2 an einer Stelle in **Fig. 1** angeordnet ist, können mehrere Schlitzvorgesehen sein, wie in Nicht-Patentliteratur 2 beschrieben.

[0056] Es ist beschrieben worden, dass die Einfangrate (/ein Einfangstrukturelement) für die biologischen Substanzen in dem Einfangstrukturelement mit $[\alpha: (\text{Durchflussvolumen in die Einfangstrukturelemente}) / (\text{Gesamtdurchflussvolumen})] \times [\beta: \text{Einfangrate für die biologische Substanz in den Einfangstrukturelementen}]$ berechnet wird und mit α näherungsweise bestimmt werden kann. Es ist auch beschrieben worden, dass, weil die Anzahl der erforderlichen Einfangstrukturelemente kleiner wird, wenn α zunimmt, α durch Variieren der Schlitzbreite oder der Strömungskanalbreite auf 0,001 erhöht werden kann.

[0057] **Fig. 11** zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Anordnung, um α gleich 1 zu machen. Die gesamte Lösung mit den biologischen Substanzen **4** passiert die Schlitz der Einfangstrukturelemente, so dass dieses Beispiel als eine Variante der Form in **Fig. 1** angesehen werden kann, wo die Abstände zwischen den Einfangstrukturelementen gleich 0 sind. An einer Einspritzöffnung (nicht gezeigt) oben in **Fig. 11** wird die Lösung mit den biologischen Substanzen **4** (nicht gezeigt) eingespritzt, durch den Strömungskanal **3** geleitet und über eine Auslassöffnung (nicht gezeigt) unten in **Fig. 11** abgelassen. In diesem Prozess, während die Lösung mit den biologischen Substanzen **4** (nicht gezeigt) einen Schlitz **2a** passiert und über einen Schlitz **2b** oder **2b'** austritt, werden die biologischen Substanzen **4** mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in dem Totwasserbereich **5** eingefangen. Der Totwasserbereich **5** ist ein Bereich, in dem keine Strömung vorliegt, oder ein Bereich, in dem die Strömung, sofern vorhanden, eine Verwirbelung ist und nichts mit der Kanalisierung des Durchflussvolumens zu tun hat. Die biologischen Substanzen **4**, die den Schlitz **2** passiert haben, werden aufgrund von Diffusion, Trägheitskraft oder ihrer Beweglichkeit mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in dem

Totwasserbereich **5** eingefangen. So werden die biologischen Substanzen **4** nicht mit einem Schlitz (Loch) einer geringeren Größe eingefangen, wie im Falle eines Filters. Es ist auch möglich, die in dem Totwasserbereich eingefangenen biologischen Substanzen **4** zu sammeln. Insbesondere wenn das Einleiten der Lösung gestoppt wird, weichen die in dem Totwasserbereich eingefangenen biologischen Substanzen **4** aufgrund von Diffusion oder Beweglichkeit der Substanzen von dem Totwasserbereich **5** ab. Die Lösung wird dann in die entgegengesetzte Richtung geleitet. Im Einzelnen wird die gesammelte Flüssigkeit über die Einspritzöffnung (nicht gezeigt) unten in **Fig. 11** eingespritzt und veranlasst, den Schlitz **2b** oder **2b'** über den Strömungskanal **3** zu passieren und über den Schlitz **2a** auszuströmen. So wird die gesammelte Flüssigkeit über die Auslassöffnung (nicht gezeigt) oben in **Fig. 11** abgelassen, zusammen mit den biologischen Substanzen **4**. Weil **Fig. 11** eine vertikal symmetrische Form zeigt, wird, wenn die gesammelte Flüssigkeit über die Einspritzöffnung (nicht gezeigt) unten in **Fig. 11** eingespritzt wird, der Totwasserbereich **5**, der zunächst vorhanden war, beseitigt, und stattdessen wird ein Totwasserbereich oben an den Schlitz **2b** und **2b'** in der Abbildung gebildet. Daher besteht im Falle des Einleitens der Lösung in der entgegengesetzten Richtung auch die Möglichkeit, dass die Substanz eingefangen wird, bevor sie die Auslassöffnung (nicht gezeigt) erreicht. In diesem Fall kann ein Verfahren zum Stoppen des Einleitens der Lösung, damit die biologischen Substanzen **4** durch Diffusion oder Beweglichkeit der Substanz von dem Totwasserbereich abweichen können, und anschließendes Einleiten der Lösung wiederholt werden, wodurch die biologischen Substanzen **4** schließlich gesammelt werden können. Alternativ kann die biologische Substanz über die Auslassöffnung gesammelt werden, indem nur das Einleiten der Lösung und das Stoppen des Einleitens wiederholt werden, ohne die Einleitrichtung der Lösung zu ändern. Wenn die biologischen Substanzen **4** gesammelt werden können, kann ihre Nukleinsäure extrahiert werden, so dass eine Analyse wie etwa eine Genanalyse mittels PCR durchgeführt werden kann.

[0058] **Fig. 12** zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels einer Analysevorrichtung (bakteriologische Analysevorrichtung) nach der vorliegenden Erfindung. **Fig. 12(a)** zeigt eine schematische Aufsicht der Vorrichtung, und **Fig. 12(b)** zeigt eine schematische Vorderansicht. Die nachstehende Beschreibung erfolgt unter Bezugnahme auf die X-, Y- und Z-Achsen wie gezeigt.

[0059] Die Analysevorrichtung nach der vorliegenden Ausführungsform ist ausgerüstet mit einem Reagenziengestellunterteil **13**, auf dem ein Reagenziengestell **12** zur Aufnahme mehrerer Reagensbehälter **11** angeordnet ist, einem Durchflusszellentisch **31**, der beweglich ist, während er eine oder mehrere Durchflusszellen **30** trägt, einer Probenahmedüse **20**, die eine Flüssigkeit über ihre Spitze ansaugen oder abgeben kann, einem Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** an eine gewünschte dreidimensionale Position zu bringen, einem Reinigungsbehälter **68** zum Reinigen der Probenahmedüse **20** und einer Nachweiseinheit **40** zum Analysieren einer Reaktion mit der in der Durchflusszelle **30** eingefangenen biologischen Substanz oder der biologischen Substanz selbst durch Einspritzen eines Reagens. Das Ansaugen oder Abgeben des Reagens über die Probenahmedüse **20** oder deren Reinigung und dergleichen werden durch ein Einleitsystem für die Lösung durchgeführt, das nicht gezeigt ist. Das Einleitsystem für die Lösung wird ausführlich anhand von **Fig. 13** beschrieben.

[0060] Die verschiedenen Einheiten der Analysevorrichtung stehen unter der Steuerung einer Steuerungs-/Berechnungseinheit **50**. Die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** steuert und betreibt die Analysevorrichtung kontinuierlich entsprechend einem Programm, das in der Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** über eine Eingabeeinheit **51** eingestellt wird. Ein Speicher in der Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** speichert Informationen zum Beispiel über ein Analyseverfahren, Koordinatenpositionen der mehreren Reagensbehälter **11** in dem Reagenziengestell **12** und des Reinigungsbehälters **68**, die Art der Reagenzien in den jeweiligen Reagensbehältern, die Koordinatenposition der Einspritzöffnung zum Einspritzen der Reagenzien oder der Reinigungsflüssigkeit in die Durchflusszellen **30** und ein Verfahren zur Verarbeitung der Ergebnisse des Nachweises durch die Nachweiseinheit **40**. Die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** steuert unter Bezugnahme auf die in dem Speicher gespeicherten Informationen die verschiedenen Einheiten der Vorrichtung und führt eine Analyse entsprechend dem Analyseprogramm durch.

[0061] Die Probenahmedüse **20** ist zum Beispiel eine Hohldüse mit einem Spitzenabschnitt mit einem Außendurchmesser von 1 mm, einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 150 mm und besteht aus einem Metallwerkstoff wie etwa SUS. Die Probenahmedüse **20** ist mit dem Einleitsystem für die Lösung verbunden, das später beschrieben wird. Die Probenahmedüse **20** kann eine benötigte Menge Reagens aus dem gewünschten Reagensbehälter **11** in dem Reagenziengestell **12** in den Spitzenabschnitt saugen und das Reagens in die Durchflusszelle **30** oder dergleichen abgeben. Das Material und der Aufbau der Probenahmedüse **20** sind für die Erfassung des Flüssigkeitsstands angepasst. Die Erfassung des Flüssigkeitsstands wird zum Beispiel von einer Flüssigkeitsstand-Sensoreinheit **53** in der Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** mit einem bekannten System durchgeführt, wodurch der Flüssigkeitsstand auf der Grundlage einer Kapazitätsänderung

erfasst wird, die verursacht wird, wenn die Spitze der metallischen Probenahmedüse **20** mit einem leitfähigen Bereich wie dem Flüssigkeitsstand in Berührung kommt. Die Flüssigkeitsstand-Sensoreinheit **53** gibt ein Flüssigkeitsstands-signal aus, das für die anschließende Steuerung der Vorrichtung verwendet wird.

[0062] Der Düsenantriebsmechanismus umfasst eine Führungsschiene **21**, eine Linearbewegungseinheit **22**, die sich linear in X-Achsenrichtung entlang der Führungsschiene **21** bewegt, und einen Arm **24**, der um eine Drehwelle **23** der Linearbewegungseinheit **22** drehbar ist. Die Probenahmedüse **20** ist an dem Arm **24** auf der gegenüberliegenden Seite der Drehwelle **23** befestigt. Die Linearbewegungseinheit **22** weist zum Beispiel ein Zahnrad im Eingriff mit einer Zahnstange auf der Führungsschiene **21** auf, so dass die Linearbewegungseinheit **22** durch Drehen des Zahnrads mit einem Schrittmotor in eine gewünschte Position in X-Achsenrichtung gebracht werden kann. Die Drehwelle **23** ist auch mit einem Schrittmotor in einer XY-Ebene drehbar. Die Drehwelle **23** kann auch vertikal entlang der Z-Achsenrichtung bewegt werden, um die Spitze der Probenahmedüse **20** an einer gewünschten Z-Achsenposition zu positionieren. Basierend auf einer Kombination der Linearbewegung in X-Achsenrichtung, der Drehbewegung um die Drehwelle **23** und der Vertikalbewegung in Z-Achsenrichtung mit dem Düsenantriebsmechanismus kann die Probenahmedüse **20** jeden der Reagensbehälter **11** in dem Reagenziengestell **12**, den Reinigungsbehälter **68** oder die Einspritzöffnung der Durchflusszellen erreichen, wie nachstehend beschrieben wird.

[0063] Die Nachweiseinheit **40** weist eine Lichtquelle **41**, die die Durchflusszellen bestrahlt, und eine Bildgebungsvorrichtung **42** wie etwa eine CCD auf, die das Raman-Licht, das bei optischer Bestrahlung aus der Lichtquelle von der biologischen Substanz in der Durchflusszelle **30** erzeugt wird, über optische Komponenten wie etwa ein Beugungsgitter, das das Raman-Licht streut, einen Spiegel, einen Filter, eine Schlitzeblende und ein konfokales Detektionslochblende erfasst. Die Nachweiseinheit **40** kann durch Wählen des optischen Systems auch für die Hellfeld-, Dunkelfeld-, Phasendifferenz-, Differenzialinterferenz-, Fluoreszenz- oder Lichtemissionsbeobachtung konfiguriert werden und ist daher nicht auf die Raman-Beobachtung beschränkt.

[0064] Die Durchflusszelle **30** ist durch den Durchflusszelltisch **31** in Richtung der XY-Achsen beweglich. Wie gezeigt, wird die Durchflusszelle **30**, wenn sie Vorgängen mittels der Probenahmedüse **20** unterzogen wird, etwa dem Einspritzen von Reagens oder dem Reinigen, an einer versetzten Position unter der Nachweiseinheit **40** angeordnet. Beim Nachweis mit der Nachweiseinheit **40** wird die Durchflusszelle **30** durch den Durchflusszelltisch **31** in eine Position unter der Nachweiseinheit **40** gebracht. Eine Anzeigeeinheit **52** zeigt verschiedene Informationen an, etwa die auf der Eingabeeinheit **51** eingegebenen Informationen, Analyseprozessinformationen wie etwa mit der Nachweiseinheit **40** aufgenommene Bilder, Informationen über den aktuellen Zustand der Vorrichtung oder die Parameter, Informationen über die abgeschlossenen Analyseschritte und das Analyseergebnis.

[0065] Es ist auch möglich, die Nachweiseinheit **40** unter der Durchflusszelle **30** anzuordnen, wie in einem allgemeinen biologischen Mikroskop. Bei dieser Anordnung kann die Nachweiseinheit **40** den Nachweis durchführen, während ein Reagens aus der Probenahmedüse **20** über der Durchflusszelle **30** abgegeben wird. In gleicher Weise kann die Durchflusszelle **30** auch in einem Winkel oder senkrecht angeordnet werden, ebenso wie waagrecht, wie in **Fig. 12** gezeigt. Die Durchflusszelle **30** kann zum Beispiel senkrecht angeordnet werden, so dass der Nachweis mit der Nachweiseinheit **40** durchgeführt werden kann, die senkrecht angeordnet ist, während die Lösung eingeleitet wird. Durch Einleiten der Lösung von unten nach oben in der senkrecht angeordneten Durchflusszelle **30** kann das Entfernen von Luftblasen in der Durchflusszelle **30** erleichtert werden. Wenn das spezifische Gewicht eines Bakteriums kleiner ist als das spezifische Gewicht des Reagens, kann die Auftriebskraft zum Einfangen genutzt werden; ist es größer, kann die Schwerkraft zum Einfangen genutzt werden.

[0066] **Fig. 13** zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels des Einleitsystems für die Lösung, das in die Analysevorrichtung nach der vorliegenden Ausführungsform integriert ist. Das Einleitsystem für die Lösung führt das Ansaugen oder Abgeben des Reagens über die Spitze der Probenahmedüse **20** und das Reinigen der Probenahmedüse **20** durch. Das Einleitsystem für die Lösung nach der vorliegenden Ausführungsform weist eine Mikrospritze **60** zum Abwiegen des Reagens aus der Spitze der Probenahmedüse **20** zum Ansaugen oder Abgeben auf sowie einen ersten Strömungskanal **62** und einen zweiten Strömungskanal **63** zum Zuführen einer Reinigungsflüssigkeit zu der Probenahmedüse **20** bzw. dem Reinigungsbehälter **68**. Nach der vorliegenden Ausführungsform wird die Reinigungsflüssigkeit, die sich in dem Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** angesammelt hat, mit einer kontinuierlich laufenden Pumpe **65** angesaugt und über den Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** zum Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** zurückgeführt. Im Einzelnen wird die Reinigungsflüssigkeit mit der Pumpe **65** durch den Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** ständig in Pfeilrichtung umgewälzt. Ein Ende des ersten Strömungskanals **62** ist über ein erstes Elektromagnetventil **71** mit dem Reinigungsflüs-

sigkeitszirkulationskanal **66** verbunden, während das andere Ende über die Mikrospritze **60** mit dem Inneren der Probenahmedüse **20** kommuniziert. In gleicher Weise ist ein Ende des zweiten Strömungskanal **63** über ein zweites Elektromagnetventil **72** mit dem Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** verbunden, während das andere Ende sich in einer Seitenwand des Reinigungsbehälters **68** öffnet. Als Reinigungsflüssigkeit wird zum Beispiel reines Wasser verwendet.

[0067] Wenn der Spitzenabschnitt der Probenahmedüse **20** durch den Düsenantriebsmechanismus in den Reinigungsbehälter **68** bewegt wird und wenn in diesem Zustand nur das erste Elektromagnetventil **71** in den geöffneten Zustand gebracht wird, wird die unter Druck aus der Pumpe **65** zugeführte Reinigungsflüssigkeit über die Probenahmedüse **20** in den Reinigungsbehälter **68** eingespritzt, wodurch das Innere der Probenahmedüse **20** gereinigt werden kann. Während des Reinigens kann der Kolben **61** der Mikrospritze **60** bewegt werden, muss aber nicht bewegt werden. Wenn nur das zweite Elektromagnetventil **72** in den geöffneten Zustand gebracht wird, wird die Reinigungsflüssigkeit von einer Innenwand des Reinigungsbehälters **68** ausgestoßen, wodurch die Außenseite der Probenahmedüse **20** gereinigt werden kann. Außerdem können, wenn das erste Elektromagnetventil **71** und das zweite Elektromagnetventil **72** gleichzeitig in den geöffneten Zustand gebracht werden, sowohl das Innere als auch die Außenseite der Probenahmedüse **20** gleichzeitig in dem Reinigungsbehälter **68** gereinigt werden. Das Öffnen und Schließen des ersten Elektromagnetventils **71** und des zweiten Elektromagnetventils **72** werden durch die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** gesteuert.

[0068] Das Verhältnis der Reinigungsflüssigkeit, die der Probenahmedüse **20** über den ersten Strömungskanal **62** zugeführt wird, zu der Reinigungsflüssigkeit, die dem Reinigungsbehälter **68** über den zweiten Strömungskanal **63** zugeführt wird, wird mit einer Durchflussvolumen-Einstellöffnung **67** eingestellt, die an einer Position nahe dem Reinigungsbehälter **68** für den zweiten Strömungskanal **63** angeordnet ist. Die Reinigungsflüssigkeit, mit der die Probenahmedüse **20** gereinigt worden ist, wird in einem Abwasserbehälter **69** aufgefangen. Die Reinigungsflüssigkeit, die sich in dem Reinigungsbehälter **68** angesammelt hat, kann mit einer Abwasserpumpe (nicht gezeigt) in dem Abwasserbehälter **69** aufgefangen werden. Die Reinigungsflüssigkeit kann auch aus dem Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** eingeleitet werden, indem das zweite Elektromagnetventil **72** geöffnet wird und sie mit einer Abwasserpumpe gefördert wird, wenn der Reinigungsbehälter **68** verschlossen ist. Durch Durchführen eines ähnlichen Vorgangs bei leerem Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** und weiter durch Öffnen des ersten Elektromagnetventils **71** können auch Flüssigkeiten in dem ersten Strömungskanal **62**, dem zweiten Strömungskanal **63** und dem Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** entfernt werden. Wenn die Pumpe **65**, das zweite Elektromagnetventil **72** und die Leitungen nicht richtig angeschlossen sind, kann die Reinigungsflüssigkeit den Reinigungsbehälter **68** nicht verlassen, und daher kann die Probenahmedüse **20** nicht gereinigt werden. In diesem Fall kann durch das Fehlen der Aktivierung der Flüssigkeitsstand-Sensorfunktion der Düse ein Fehler erfasst werden. Durch Ausführen des Reinigungsvorgangs wird die Reinigungsflüssigkeit in dem Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** verbraucht. Der Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** ist mit einem Flüssigkeitsstandsensoren installiert, so dass, wenn die Reinigungsflüssigkeit in dem Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** abnimmt, der Reinigungsflüssigkeitsbehälter **64** mit Reinigungsflüssigkeit aus einem getrennt installierten Reinigungsflüssigkeit-Nachfüllbehälter (nicht gezeigt) aufgefüllt werden kann. Somit können in dem Einleitsystem für die Lösung nach der vorliegenden Ausführungsform große Mengen von Reinigungsflüssigkeit mithilfe von Pumpen in kurzer Zeit dem Inneren oder der Außenseite oder sowohl dem Inneren als auch der Außenseite der Probenahmedüse zugeführt werden, wodurch das nach Gebrauch an der Probenahmedüse anhaftende Reagens in kurzer Zeit hinreichend abgewaschen werden kann. Daher kann eine Verunreinigung des Reagens vermieden werden, und die Analysegenauigkeit kann erhöht werden. Außerdem kann die Reinigungszeit verringert werden, so dass der Analysedurchsatz gesteigert werden kann.

[0069] Das Reagenziengestell **12** ist mit einem Temperaturfühler und einer Temperatureinstelleinheit wie etwa einem Peltier-Element versehen, um eine konstante Temperatur der Reagenzien in den Reagenzbehältern **11** aufrechtzuerhalten. Eine Gruppe von Reagenzien in einem ersten Bereich **12a** des Reagenziengestells wird zum Beispiel bei Raumtemperatur gehalten, während eine Gruppe von Reagenzien in einem zweiten Bereich **12b** bei 4°C gehalten wird. Die Temperaturregelung des Reagenziengestells **12** kann auch mit der Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** erfolgen. Je nach Art des Reagens kann es wünschenswert sein, mehrere Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu mischen und das Gemisch dann der Durchflusszelle zuzuführen. Daher ist das Reagenziengestell **12** mit einem Vormischbehälter **14** zur Verwendung bei der Herstellung eines Reagenziengemischs versehen. Bei Verwendung eines Reagenziengemischs wird jedes mit der Probenahmedüse **20** aus getrennten Reagenzbehältern **11** angesaugte Reagens in den Vormischbehälter **14** abgegeben, und das in dem Vormischbehälter **14** gemischte und hergestellte Reagenziengemisch wird wieder mit der Probenahmedüse **20** angesaugt und der Durchflusszelle **30** zugeführt.

[0070] Fig. 14 zeigt ein Schemadiagramm eines Beispiels der Durchflusszelle. Fig. 14(a) zeigt eine perspektivische Ansicht der Durchflusszelle, und Fig. 14(b) zeigt eine Querschnittsansicht entlang der Linie X-X' in Fig. 14(a). In diesem Beispiel weist die Durchflusszelle Einspritzöffnungen **32**, Auslassöffnungen **33** und Strömungskanäle **34** auf, in denen eine Flüssigkeit fließt. Die Strömungskanäle **34** sind zwischen einem oberen Substrat **36** und einem unteren Substrat **37** gebildet, und die Durchflusszelle **30** ist so ausgelegt, dass die biologischen Substanzen **4** mit den in Fig. 1 gezeigten Einfangstrukturelementen **1** eingefangen werden können. Die Strömungskanäle **34** fungieren als ein Strömungskanal zum Zuführen des Reagens für die bakteriologische Analyse oder der Reinigungsflüssigkeit und auch als Reaktionskammer, in der eine Reaktion stattfindet. Im Hinblick auf ein in der Durchflusszelle **30** eingefangenes Bakterium kann zum Beispiel eine Gramfärbungsreaktion hervorgerufen werden, um mit der Nachweiseinheit **40** ein violett gefärbtes grampositives Bakterium oder ein rosa gefärbtes gramnegatives Bakterium zu beobachten. Um einen Abstand für die Strömungskanäle **34** sicherzustellen, ist ein Abstandshalter **38** zwischen dem oberen Substrat **36** und dem unteren Substrat **37** angeordnet. Der Abstandshalter **38** kann einstückig mit dem oberen Substrat **36** oder dem unteren Substrat **37** ausgeführt sein, so dass die Durchflusszelle **30** mit den Einfangstrukturelementen nach Fig. 1 oder Fig. 11 hergestellt werden kann. Das Reagens wird über die Einspritzöffnungen **32** eingespritzt und über die Auslassöffnungen **33** abgelassen. Der Abstandshalter kann eine Dicke von 50 bis 100 µm, eine Strömungskanalbreite von 1 bis 30 mm und eine Strömungskanallänge von 75 bis 100 mm aufweisen, ist aber nicht auf diese numerischen Werte beschränkt. Das obere Substrat **36** auf der zur Nachweiseinheit **40** weisenden Seite kann aus einem Material bestehen, das Anregungslicht und Fluoreszenz durchlässt, beispielsweise aus Glas, Quarz, Saphir oder PDMS oder einem Harz wie Acrylharz oder Cycloolefin-Polymer. In dem Beispiel in Fig. 14 weist die Durchflusszelle **30** drei Strömungskanäle auf; die Anzahl der Strömungskanäle ist jedoch nicht auf drei beschränkt. Wenn die Anzahl der Strömungskanäle groß ist, können mehrere Reaktionen auf einmal bewirkt werden, wodurch Analysen mit hohem Durchsatz durchgeführt werden können. Bei der Raman-Analyse wird die Durchflusszelle **30** mit einer Temperaturregeleinheit für den Durchflusszellentisch **31** auf eine vorbestimmte Temperatur geregelt.

[0071] Als Nächstes wird ein Verfahren zum Installieren des Reagenziengestells **12** auf dem Reagenziengestellunterteil **13** der Analysevorrichtung und zum Durchführen der Analyse durch Zuführen von Reagens zu der Durchflusszelle beschrieben, wenn die Durchflusszelle **30** auf dem Durchflusszellentisch **31** installiert ist.

(1) Reinigen der Probenahmedüse

[0072] Zuerst wird die Probenahmedüse **20** gereinigt. Ein Steuerungsverfahren für diesen Zweck durch die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** ist in Fig. 15 gezeigt. Die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** steuert zuerst den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** zu dem Reinigungsbehälter **68** zu bewegen (S11). Dann steuert die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** das erste Elektromagnetventil **71**, das mit dem Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** verbunden ist, in dem die Reinigungsflüssigkeit mit der Pumpe **65** zirkuliert wird, und bringt das Ventil in den geöffneten Zustand (S12). Der Kolben **61** der Mikrospritze **60** kann, muss aber während des Reinigens nicht bewegt werden. In diesem Zustand gelangt die unter Druck aus der Pumpe **65** zugeführte Reinigungsflüssigkeit über das erste Elektromagnetventil **71** und den ersten Strömungskanal **62** in die Mikrospritze **60** und wird, so wie sie ist, aus der Düsen Spitze über die Probenahmedüse **20** in den Reinigungsbehälter **68** eingespritzt. In diesem Zustand wird das Innere der Düse gereinigt. Als Reinigungsflüssigkeit kann reines Wasser verwendet werden.

[0073] Als Nächstes steuert die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** das zweite Elektromagnetventil **72**, das mit dem Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** verbunden ist, und bringt das Ventil in den geöffneten Zustand (S13). Danach passiert die unter Druck aus der Pumpe **65** zugeführte Reinigungsflüssigkeit das zweite Elektromagnetventil **72** und den zweiten Strömungskanal **63** und wird über die Innenwand des Reinigungsbehälters in den Reinigungsbehälter **68** abgegeben, wodurch die Außenseite der in dem Reinigungsbehälter **68** positionierten Probenahmedüse **20** gereinigt wird. Auf diese Weise werden das Innere und die Außenseite der Probenahmedüse **20** gereinigt, wie in Fig. 5 gezeigt. Nach Abschluss der Reinigung schließt die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** das erste Elektromagnetventil **71** und das zweite Elektromagnetventil **72** (S14).

[0074] Anstatt zuerst das erste Elektromagnetventil **71** und dann das zweite Elektromagnetventil **72** zu öffnen, können das erste Elektromagnetventil **71** und das zweite Elektromagnetventil **72** auch gleichzeitig geöffnet werden. In diesem Fall wird das Reinigen des Inneren und der Außenseite der Probenahmedüse gleichzeitig durchgeführt. Die Reihenfolge für das Reinigen kann zuerst die Außenseite der Düse sein, gefolgt vom Inneren der Düse.

[0075] In jedem Fall sind, wenn das erste Elektromagnetventil **71** nach dem Reinigen des Inneren der Probenahmedüse geschlossen wird, die Abschnitte von dem ersten Strömungskanal **62**, der mit dem Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** verbunden ist, bis zu der Mikrospritze **60** und der Spitze der Probenahmedüse **20** mit Reinigungsflüssigkeit gefüllt.

[0076] Mit dem Reinigungsverfahren nach der vorliegenden Ausführungsform kann eine große Menge Reinigungsflüssigkeit in kurzer Zeit dem Inneren oder der Außenseite oder sowohl dem Inneren als auch der Außenseite der Probenahmedüse zugeführt werden, wodurch die Reinigungszeit verringert und der Analyse-durchsatz gesteigert werden können.

(2) Reinigen der Durchflusszelle

[0077] Als Nächstes wird das Innere der Durchflusszelle **30** gereinigt. Ein Steuerungsverfahren für diesen Zweck durch die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** ist in dem Ablaufdiagramm in **Fig. 16** gezeigt.

[0078] Die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** steuert den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** an eine Position über der Einspritzöffnung **32** der Durchflusszelle **30** zu bringen (S21). Danach wird die Probenahmedüse abgesenkt, und die Düsenspitze wird in die Einspritzöffnung eingesteckt (S22). Dann öffnet die Steuerungs-/Berechnungseinheit das erste Elektromagnetventil **71** (S23). Dabei kann der Kolben **61** der Mikrospritze **60** fixiert sein oder bewegt werden. Als Folge passiert die unter Druck von der Pumpe **65** zugeführte Reinigungsflüssigkeit das erste Elektromagnetventil **71** und den ersten Strömungskanal **62** und gelangt in die Mikrospritze **60**; außerdem passiert sie die Einspritzöffnung **32** von der Spitze der Probenahmedüse **20** und fließt in den Strömungskanal **34** der Durchflusszelle **30**, wodurch die Durchflusszelle gereinigt wird. Die Reinigungsflüssigkeit, mit der der Strömungskanal der Durchflusszelle gereinigt worden ist, wird in dem Abwasserbehälter **69** aufgefangen. Nachdem das Reinigen der Durchflusszelle durch Öffnen des ersten Elektromagnetventils **71** für eine bestimmte Zeit abgeschlossen ist, schließt die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** das erste Elektromagnetventil **71** (S24). Danach hebt die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** die Probenahmedüse **20** von den Einspritzöffnungen **32** weg, indem sie den Düsenantriebsmechanismus steuert (S25). Anstatt den Düsenantriebsmechanismus anzuweisen, die Probenahmedüse sofort nach dem Schließen des ersten Elektromagnetventils **71** anzuheben, gibt die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** dabei die Anweisung, die Probenahmedüse nach Warten für eine vorbestimmte Zeit anzuheben, damit sich der Druck der Reinigungsflüssigkeit in der Durchflusszelle stabilisieren kann. Dies wird später unter Bezugnahme auf das Einspritzen des Reagens in die Durchflusszelle beschrieben.

(3) Ansaugen des Reagens aus dem Reagensbehälter

[0079] Unter Bezugnahme auf das Ablaufdiagramm in **Fig. 17** wird ein Verfahren zum Ansaugen von Reagens aus dem Reagensbehälter **11** an einer vorbestimmten Position in dem Reagenziengestell **12** mit der Probenahmedüse **20** beschrieben, wobei angenommen wird, dass das Reagens eine bakterienhaltige Lösung ist.

[0080] Die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** bestimmt nach einem programmierten Verfahren die Art und die Ansaugmenge des anzusaugenden Reagens. Sodann bestimmt die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** unter Bezugnahme auf die in dem Speicher gespeicherten Informationen über die Korrespondenzbeziehung zwischen der Reagensbehälterposition und der Art des Reagens die Position, an die die Probenahmedüse gebracht werden soll. Danach steuert die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** an eine Position über dem Reagensbehälter mit dem Zielreagens zu bringen (S31). Sodann wird die Probenahmedüse abgesenkt, und die Düsenspitze wird in den Reagensbehälter eingesteckt (S32). Dabei wird der Reagens-Flüssigkeitsstand in dem Reagensbehälter mit der Flüssigkeitsstand-Sensorfunktion der Flüssigkeitsstand-Sensoreinheit **53** erfasst. Nachdem der Reagens-Flüssigkeitsstand erfasst worden ist, wird die Probenahmedüse um eine bestimmte Distanz weiter abgesenkt, und in einem Zustand, in dem die Düsenspitze eine vorbestimmte Tiefe in die Reagenslösung eingesteckt ist, wird die Probenahmedüse angehalten (S33). Sodann betätigt die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den Kolben **61** der Mikrospritze **60** zur Ansaugseite um einen vorbestimmten Betrag, um die festgelegte Menge des Reagens vor der in die Probenahmedüse **20** eingefüllten Reinigungsflüssigkeit anzusaugen und aufzunehmen (S34).

[0081] Danach steuert die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse nach oben zu bewegen und so die Düsenspitze aus dem Reagensbehälter zu entfernen und die Probenahmedüse weiter zu dem Reinigungsbehälter **68** zu transportieren (S35). Anschließend öffnet die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** das zweite Elektromagnetventil **72**. Als Folge wird die Reinigungsflüssigkeit aus der Innenwandfläche des Reinigungsbehälters **68** abgegeben und wäscht das an der Außenseite der

Probenahmedüse **20** anhaftende Reagens ab (S36). Das in die Probenahmedüse gesaugte Reagens verbleibt unverändert in der Düse, ohne dass eine Reinigung erfolgt. Nachdem das Reinigen der Außenseite der Probenahmedüse abgeschlossen ist, schließt die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** das zweite Elektromagnetventil **72** und steuert den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** nach oben zu bewegen.

[0082] Weil die in das Reagens eingetauchte Spitze der Probenahmedüse **20** auf eine nötige Mindesttiefe durch die Flüssigkeitsstand-Sensorfunktion beschränkt ist, kann die Menge an Reagens, die auf der Außenseite der Probenahmedüse **20** anhaftet und die in dem Reinigungsbehälter **68** abgewaschen wird, jederzeit auf ein Minimum begrenzt werden. Ein weiterer Vorteil der Durchführung der Erfassung des Reagens-Flüssigkeitsstands ist der, dass die verbleibende Menge an Reagens aus den Informationen über die Form des Reagensbehälters und die Flüssigkeitsstandhöhe bekannt sein kann. Somit kann die Anzahl der verbleibenden Basen, die analysiert werden können, berechnet werden, oder der Benutzer kann über den Zeitpunkt zum Wechseln des Reagens informiert werden.

(4) Einspritzen des Reagens in die Durchflusszelle

[0083] Unter Bezugnahme auf das Ablaufdiagramm in **Fig. 18** wird ein Verfahren zum Einspritzen des angesaugten und in der Spitze der Probenahmedüse **20** gehaltenen Reagens in die Durchflusszelle **30** beschrieben.

[0084] Zuerst steuert die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** an eine Position über der Einspritzöffnung **32** der Durchflusszelle **30** zu bringen. Danach wird die Probenahmedüse **20** abgesenkt, und die Düsen Spitze wird in die Einspritzöffnung **32** eingesteckt (S41). Dann betätigt die Steuerungs-Berechnungseinheit **50** den Kolben **61** der Mikrospritze **60** in der Abgaberrichtung, um das vor der in die Probenahmedüse **20** eingefüllten Reinigungsflüssigkeit angesaugte Reagens über die Einspritzöffnung **32** in die Durchflusszelle **30** abzugeben (S42). In der Durchflusszelle **30** ist eine Reihe von in **Fig. 1** gezeigten Einfangstrukturelementen **1** angeordnet, und die in dem Reagens enthaltenen Bakterien werden in den Einfangstrukturelementen eingefangen, wenn die Lösung eingeleitet wird. Nach dem Betätigen des Kolbens **61** wartet die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50**, bis sich der Druck in der Durchflusszelle **30** stabilisiert hat (S43), und steuert dann den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse anzuheben (S44).

[0085] **Fig. 19** zeigt schematisch die Beziehung zwischen den Zeitpunkten für das Einstecken oder Herausnehmen der Probenahmedüse in die oder aus der Einspritzöffnung und das Betätigen des Kolbens einer Mikrospritze und den Druckveränderungen in der Durchflusszelle. Die horizontale Achse zeigt die Zeit. **Fig. 19** zeigt, dass die Probenahmedüse **20** zum Zeitpunkt t_0 in die Einspritzöffnung **32** der Durchflusszelle eingesteckt wird und später zum Zeitpunkt t_4 aus der Einspritzöffnung **32** angehoben wird. Der Kolben **61** der Mikrospritze **60** wird zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 betätigt, um das Reagens abzugeben.

[0086] Das Reagens wird durch Betätigen des Kolbens **61** der Mikrospritze **60** unter Druck in den niedrigleitenden Strömungskanal der Durchflusszelle eingespritzt. Daher ist unmittelbar nach dem Ende der Betätigung des Kolbens **61** (Zeitpunkt t_2) der Druck in der Durchflusszelle **30** hoch. Wenn die Probenahmedüse **20** sofort von der Einspritzöffnung **32** weggezogen wird, kann deshalb das Reagens zurückfließen und aus der Einspritzöffnung **32** austreten. Nach der vorliegenden Ausführungsform wird die Probenahmedüse **20** nach Abwarten einer Zeit vom Endzeitpunkt t_2 des Einspritzens des Reagens bis zum Stabilisieren des Drucks in der Durchflusszelle **30** von der Einspritzöffnung **32** getrennt und angehoben. Im Einzelnen wird der Zeitpunkt t_4 , an dem die Probenahmedüse **20** aus der Einspritzöffnung **32** angehoben wird, so eingestellt, dass $t_4 > t_3$. Die Wartezeit ($t_3 - t_2$), bis sich der Druck in der Durchflusszelle stabilisiert hat, wird zum Beispiel durch die Viskosität des eingespritzten Reagens, die Einspritzgeschwindigkeit und den Strömungskanalwiderstand der Durchflusszelle bestimmt; in der Regel kann die Wartezeit in der Größenordnung von 0,5 Sekunden bis eine Sekunde betragen.

[0087] Nachdem das Reagens in die Durchflusszelle eingespritzt ist, steuert die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** zu dem Reinigungsbehälter **68** zu bringen. Danach werden das Innere und die Außenseite der Probenahmedüse in Vorbereitung für den nächsten Vorgang entsprechend dem unter (1) Reinigen der Probenahmedüse beschriebenen Verfahren gereinigt.

[0088] In dem Verfahren zum Ansaugen und Einspritzen des Reagens nach der vorliegenden Ausführungsform ist die Menge des aus der Probenahmesonde in die Durchflusszelle einzuspritzenden Reagens ausreichend, wenn die Menge dem Volumen der Durchflusszelle entspricht, zu dem das Volumen entsprechend einem Totraum an der Einspritzöffnung **32** der Durchflusszelle addiert wird. Es wird geschätzt, dass das Volumen

des Totraums nicht mehr als 5 µl beträgt. Daher ist die Menge des Reagens, die in die Durchflusszelle **30** eingespritzt werden muss, das heißt die Menge des Reagens, die aus dem Reagensbehälter **11** in die Probenahmedüse **20** gesaugt werden muss, mindestens das Volumen der Durchflusszelle und würde ausreichen, wenn ein Volumen in der Größenordnung von höchstens 5 bis 10 µl zu dem Volumen der Durchflusszelle addiert wird. Daher sind nach der vorliegenden Ausführungsform die Menge des Reagens, die zum Einspritzen in die Durchflusszelle aus dem Reagensbehälter gesaugt wird, und die Menge des Reagens, das an der Außenseite der Probenahmedüse **20** anhaftet und dann abgewaschen wird, gering. Mit anderen Worten, die Menge des verwendeten Reagens ist gering, was zu weniger Reagenzienabfall führt. Daher macht die vorliegende Ausführungsform es möglich, teure Reagenzien effektiv zu nutzen.

[0089] Weiter sind nach der vorliegenden Ausführungsform das Ansaugen des Reagens und das Einleiten der Lösung in die Durchflusszelle durch die Probenahmedüse realisiert, wodurch die Einleitzeit der Lösung verglichen mit einem System mit Schläuchen und einem Umschaltventil verringert werden kann. Außerdem ist die Reagensverschleppung sehr gering, so dass der Durchflusszelle ein reineres Reagens zugeführt werden kann.

(5) Nachweis

[0090] Ein Nachweisverfahren wird anhand des Ablaufdiagramms in **Fig. 20** beschrieben.

[0091] Nachdem das Reagens in die Durchflusszelle eingespritzt ist und die Bakterien eingefangen sind, wird die Temperatur der Durchflusszelle **30** auf eine optimale Temperatur geregelt (S51). Nach Bedarf kann die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den unter (2) Reinigen der Durchflusszelle beschriebenen Prozess oder den unter (3) Ansaugen von Reagens aus dem Reagensbehälter und (4) Einspritzen des Reagens in die Durchflusszelle beschriebenen Prozess im Hinblick auf die Reinigungsflüssigkeit (Reagens) durchführen, die in dem Reagenziengestell **12** angeordnet ist, um das Innere der Zelle zu reinigen (S52). Danach steuert die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** die Bewegung des Durchflusszellentischs **31**, um die Durchflusszelle **30** an eine Position unter der Nachweiseinheit **40** zu bringen (S53).

[0092] Wenn eine transparente biologische Substanz wie etwa eine Zelle oder ein Bakterium untersucht wird, wird im Allgemeinen ein Phasenkontrastmikroskop verwendet. Wenn ein Bakterium unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet wird, entsteht rund um das Bakterium ein relativ starkes Licht, das als Lichthof oder „Halo“ bezeichnet wird. Obwohl die Größe von Bakterien mit mehreren Mikrometern gering ist, nimmt die Größe der Halo mit zunehmendem Abstand vom Brennpunkt des Mikroskops zu und kann mehrere Dutzend Mikrometer erreichen. Daher kann durch Finden der Halo bei dem Versuch, die Einfangstrukturelemente zu identifizieren, in denen Bakterien eingefangen sind, bekannt sein, dass ein Bakterium in der Mitte der Halo vorliegt und dass die Verschiebung aus dem Brennpunkt des Mikroskops, wie durch die Größe der Halo bekannt, korrigiert werden kann. Dann veranlasst die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** die Nachweiseinheit **40**, Licht zu emittieren, um das von den Bakterien in der Durchflusszelle **30** emittierte Raman-Licht zu erfassen (S54). Eine Analyse des Raman-Lichts liefert Einblicke in die Vibrations- oder Drehbewegung von Atomen oder Molekülen, wobei diese Einblicke für die Gram-Bestimmung von Bakterienspezies, Identifizierung von Bakterienspezies oder Bestimmung von Bakterienstämmen angewendet werden können. Es ist zum Beispiel auch möglich, eine Gram-Bestimmung oder eine Bestimmung der antibiotischen Empfindlichkeit für ein Bakterium durch Einleiten einer Lösung eines Gram-Bestimmungsreagens oder eines antibiotischen Empfindlichkeits-Testreagens zu den in der Durchflusszelle eingefangenen Bakterien durchzuführen.

(6) Sammeln

[0093] Ein Verfahren zum Sammeln der analysierten Bakterien wird anhand des Ablaufdiagramms in **Fig. 21** beschrieben.

[0094] Das Sammeln der Bakterien wird am Ende des Nachweises (**5**) in der Durchflusszelle durchgeführt. Die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** steuert den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** in die Einspritzöffnung **32** der Durchflusszelle **30** einzustecken, in der die Reaktion beendet ist (S91). Danach wird der Kolben **61** der Mikrospritze **60** zur Ansaugseite hin betätigt, und die Bakterien in der Durchflusszelle **30** werden angesaugt (S92). Alternativ kann, während eine Lösung mit einer Pumpe (nicht gezeigt) auf der Auslassseite der Durchflusszelle durch die Probenahmedüse **20** geleitet wird, der Kolben **61** der Mikrospritze **60** mit derselben Einleitgeschwindigkeit der Lösung angesaugt werden. Die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** steuert dann den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** zu einem Reagenziensammelbehälter, der in dem Reagenziengestell **12** vorbereitet ist, zu transportieren (S93), und die angesaugten Bak-

terien werden in den Behälter abgegeben, um sie zu sammeln (S94). Natürlich wird für jede Probe ein Bakteriensammelbehälter vorbereitet. Alternativ können die biologischen Substanzen an der Auslassöffnung gesammelt werden, indem nur das Einleiten der Lösung und das Beenden des Einleitens der Lösung wiederholt werden, ohne die Einleitrichtung der Lösung zu ändern. Nachdem das Sammeln der Bakterien abgeschlossen ist, steuert die Steuerungs-/Berechnungseinheit **50** den Düsenantriebsmechanismus, um die Probenahmedüse **20** zu dem Reinigungsbehälter **68** zu transportieren, wo das Innere und die Außenseite der Probenahmedüse **20** in Vorbereitung auf den nächsten Vorgang gereinigt werden. Das in dem Reagenziensammelbehälter gesammelte Reagens kann in gleicher Weise wie das Reagens in den normalen Reagensbehältern verwendet werden. Die gesammelten Bakterien können zum Beispiel der Extraktion von Nukleinsäure für die Analyse wie etwa der Identifizierung von Bakterien durch Nukleinsäureverstärkung mittels PCR und dergleichen unterzogen werden.

[0095] Das Einleitsystem für die Lösung nach der Ausführungsform umfasst den Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66**, der mit der Pumpe **65** versehen ist. Die Reinigungsflüssigkeit wird aus dem Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal **66** über die Elektromagnetventile **71** und **72** dem ersten Strömungskanal **62** bzw. dem zweiten Strömungskanal **63** zugeführt. Der Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal ist jedoch nicht unbedingt erforderlich.

[0096] Vorstehend sind die Ausführungsformen beschrieben worden, bei denen die vorliegende Erfindung für die bakteriologische Analyse angewendet wird. Die vorliegende Erfindung kann jedoch nicht nur für die bakteriologische Analyse angewendet werden, sondern auch für Verfahren im Allgemeinen, bei denen eine Lösung, die die biologischen Substanzen wie etwa Zellen oder Bakterien enthält, in eine Vorrichtung eingeleitet wird, in der die Substanzen an einzelnen und unabhängigen Positionen für die Analyse platziert werden. Der Begriff „biologische Substanz“ bezieht sich auf eine Substanz wie ein kleines Molekül, ein Protein, einen Antigen-Antikörper, ein Hormon, ein Bakterium oder eine Zelle, oder eine gebundene Substanz aus dieser Substanz und einer künstlichen Substanz wie etwa Feinpartikeln. Solange es eine Vorrichtung gibt, in der die biologischen Substanzen eingefangen werden, kann diese Vorrichtung in der Hand getragen und zur Analyse in einem Raman-Mikroskop oder dergleichen installiert werden oder einer automatischen Analyse mit dem durch die vorstehende Erfindung offengelegten Einleitsystem für die Lösung unterzogen werden.

[0097] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die vorstehend genannten Ausführungsformen beschränkt und kann verschiedene Modifikationen umfassen. Die vorstehenden Ausführungsformen sind beschrieben worden, um das Verständnis der vorliegenden Erfindung zu erleichtern, und sind nicht auf jene beschränkt, die alle beschriebenen Konfigurationen aufweisen. Ein Teil der Konfiguration einer bestimmten Ausführungsform kann durch die Konfiguration einer anderen Ausführungsform ersetzt werden, oder die Konfiguration der anderen Ausführungsform kann zu der Konfiguration der bestimmten Ausführungsform hinzugefügt werden. Im Hinblick auf einen Teil der Konfiguration der jeweiligen Ausführungsform sind auch das Hinzufügen, Weglassen oder Ersetzen einer anderen Konfiguration möglich.

[0098] Die vorstehend beschriebenen Konfigurationen, Funktionen, Verarbeitungseinheiten, Bearbeitungseinrichtungen und dergleichen können ganz oder teilweise durch Hardware realisiert werden, etwa durch Konstruktion einer integrierten Schaltung. Die vorstehend beschriebenen Konfigurationen, Funktionen und dergleichen können auch durch Software realisiert werden, zum Beispiel durch ein Programm, das von einem Prozessor interpretiert und ausgeführt wird, um die Funktionen zu realisieren. Die Informationen zur Realisierung der Funktionen, beispielsweise Programme, Tabellen oder Dateien, können in einem Aufzeichnungsgerät wie einem Speicher, einer Festplatte oder einer SSD oder auf einem Aufzeichnungsmedium wie einer IC-Karte, einer SD-Karte oder einer DVD abgelegt werden.

[0099] Im Folgenden werden verschiedene Modifikationsbeispiele beschrieben. Zuerst wird ein Verfahren zum Erreichen derselben Einfangrate unter Verwendung einer geringeren Anzahl von Kolonnen mit Einfangstrukturelementen als in **Fig. 6** beschrieben. Für **Fig. 6**, wenn die Einfangrate (/Breite) 0,001 beträgt, ist beschrieben worden, dass die Anzahl der Einfangstrukturelemente, die in der Einleitrichtung der Lösung (x-Richtung) angeordnet werden müssen, 3.000 für eine Einfangrate von 95%, 4.700 für eine Einfangrate von 99% bzw. 7.000 für eine Einfangrate von 99,9% beträgt. Weil die Einfangrate in jeder Kolonne gleich ist, wird die Einfangrate mit $1 - [1 - \{Einfangrate/(Breite)\}]^{\#Falle(x)/(Kanallänge)}$ berechnet. In diesem Fall, wenn $\#Bakterien$, das heißt die Anzahl der Bakterien vor dem Einleiten der Lösung in die Einfangstrukturelemente, 1.000 und die Einfangrate (/Breite) 0,001 betragen, ist die Anzahl der Bakterien, die in den Einfangstrukturelementen der ersten Kolonne eingefangen werden, oder $\#Eingefangene\ Bakterien\ (erste\ Kolonne)$ $1 (= 1.000 \times \{1 - (1 - 0,001)^1\})$; die Anzahl der in den Einfangstrukturelementen der zweiten Kolonne eingefangenen Bakterien oder $\#Eingefangene\ Bakterien\ (zweite\ Kolonne)$ ist $0,999 [= 1.000 \times \{1 - (1 - 0,001)^2\}]$, die Anzahl der in den Einfangstrukturelementen der

dritten Kolonne eingefangenen Bakterien oder #Eingefangene Bakterien (dritte Kolonne) ist $0,998001 [= 1.000 \times \{1 - (1 - 0,001)^3\}]$, und die Anzahl nimmt weiter ab. Wenn die Berechnung fortgeführt wird, ergeben sich für die Anzahl der eingefangenen Bakterien oder #Eingefangene Bakterien zum Beispiel folgende Werte: 0,90569 für die 100. Kolonne, 0,779 für die 250. Kolonne, 0,60698 für die 500. Kolonne, 0,36806 für die 1.000. Kolonne, 0,135335 für die 2.000. Kolonne, 0,049762 für die 3.000. Kolonne, 2.000. Kolonne, 0,049762 für die 3.000. Kolonne, 0,018297 für die 4.000. Kolonne, 0,00672 für die 5.000. Kolonne, 0,002473 für die 6.000. Kolonne und 0,0009 für die 7.000. Kolonne, und die Anzahl nimmt weiter ab. Daher nimmt die Anzahl der eingefangenen Bakterien für je 1.000 Kolonnen von 632 für die erste bis 1.000. Kolonne, 233 für die 1.000. bis 2.000. Kolonne, 85 für die 2.000. bis 3.000. Kolonne, 11 für die 3.000. bis 4.000. Kolonne, 4 für die 5.000. bis 6.000. Kolonne bis auf 2 für die 6.000. bis 7.000. Kolonne ab. Wenn dieselbe Einfangrate (99,9%) mit einer Anzahl von Kolonnen mit Einfangstrukturelementen unter 7.000 erreicht werden kann, würde der Nachweisbereich schmaler und die Nachweiszeit könnte verkürzt werden. Zu diesem Zweck kann dieselbe Anzahl von Bakterien in jeder Kolonne eingefangen werden, was durch Variieren der Einfangrate in jeder Kolonne erreicht werden kann. Vorzugsweise beträgt die Anzahl der in jeder Kolonne eingefangenen Bakterien, wie anhand von **Fig. 7** beschrieben, nicht mehr als 1, so dass im selben Einfangstrukturelement nicht mehrere Bakterien eingefangen werden. Daher wird im Folgenden ein Fall beschrieben, bei dem in jeder Kolonne ein Bakterium eingefangen wird. Wenn die Anzahl der Bakterien vor dem Einleiten der Lösung in die Einfangstrukturelemente oder #Bakterien 1.000 und die Einfangrate (Breite) 0,001 betragen, ist die Anzahl der in den Einfangstrukturelementen der ersten Kolonne eingefangenen Bakterien oder #Eingefangene Bakterien (erste Kolonne) $1 (= 1.000 \times \{1 - (1 - 0,001)^1\})$, die Anzahl der in den Einfangstrukturelementen der zweiten Kolonne eingefangenen Bakterien oder #Eingefangene Bakterien (zweite Kolonne) ist $0,999 [= 1.000 \times \{1 - (1 - 0,001)^2\}]$ und die Anzahl nimmt weiter ab. Um die Anzahl der in den Einfangstrukturelementen der zweiten Kolonne eingefangenen Bakterien oder #Eingefangene Bakterien (zweite Kolonne) auf 1 zu bringen, wie in der ersten Kolonne, kann die Einfangrate (Breite) der zweiten Kolonne von 0,001 auf $0,001001001 [= 1/(1.000 - (2 - 1))]$ erhöht werden. In gleicher Weise kann die dritte Kolonne $0,001002004 [= 1/(1.000 - (3 - 1))]$ betragen, die 100. Kolonne kann $0,001109878 [= 1/(1.000 - (100 - 1))]$ betragen, die 250. Kolonne kann $0,001331558 [= 1/(1.000 - (250 - 1))]$ betragen, die 500. Kolonne kann $0,001996008 [= 1/(1.000 - (500 - 1))]$ betragen, die 750. Kolonne kann $0,0038984064 [= 1/(1.000 - (750 - 1))]$ betragen, die 900. Kolonne kann $0,00990099 [= 1/(1.000 - (900 - 1))]$ betragen, die 990. Kolonne kann $0,0909090 [= 1/(1.000 - (990 - 1))]$ betragen, die 999. Kolonne kann $0,5 [= 1/(1.000 - (999 - 1))]$ betragen und die 1.000. Kolonne kann $1 [= 1/(1.000 - (1.000 - 1))]$ betragen. Wenn die Einfangrate von 99,9% akzeptabel ist, sind die Einfangstrukturelemente der 1.000. Kolonne mit einer Einfangrate (/Breite) von 1 nicht erforderlich. Weil die Anzahl der Bakterien vor dem Einleiten der Lösung zu den Einfangstrukturelementen oder #Bakterien gleich 1.000 ist und von jeder Kolonne ein Bakterium eingefangen wird, können alle Bakterien eingefangen werden, wenn es 1.000 Kolonnen gibt. Dies ist 1/7 der Anzahl von Kolonnen in dem Fall, wo die Einfangrate (/Breite) in allen Kolonnen 0,001 beträgt (99,9% Einfangrate mit 7.000 Kolonnen). Somit kann die in **Fig. 7** gezeigte Kanallänge auf 1/7 verringert werden, und auch die Nachweiszeit kann verringert werden. So ist das Prinzip, nach dem dieselbe Einfangrate mit einer geringeren Anzahl von Kolonnen mit Einfangstrukturelementen als in **FIG.** erreicht werden kann. Die Einfangrate (/Breite) kann variiert werden, wie anhand von **Fig. 2** bis **Fig. 4** beschrieben, was durch Einstellen von Parametern wie der Schlitzbreite, der Strömungskanalbreite oder der Strömungsgeschwindigkeit auf der Grundlage einer Strömungssimulation und dergleichen erreicht werden kann. Ein Beispiel ist in **Fig. 22** gezeigt. In **Fig. 22** wird die Einfangrate (/Breite) erhöht, indem die Größe der Einfangstrukturelemente **1** zur Abströmseite des Strömungskanals **3** hin vergrößert wird, wodurch die Menge der Lösung verringert wird, die zwischen den Einfangstrukturelementen durchläuft. Wenn die Einfangrate (/Breite) schließlich gleich 1 ist, kann das Durchflussvolumen, das zwischen den Einfangstrukturelementen durchläuft, null betragen, wie in den in **Fig. 11** gezeigten Strukturelementen. Weil die Anordnung möglich ist, ohne die Anzahl der Einfangstrukturelemente in jeder Kolonne zu ändern, können die Abstände zwischen den Mittelpunkten der Strukturelemente gleich ausgeführt werden. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn die Einfangrate (/Breite) 1 beträgt, wobei alle Bakterien eingefangen werden können. In **Fig. 22** wird die Größe der Einfangstrukturelemente vergrößert, indem alle Abmessungen der Einfangstrukturelemente **1** vergrößert werden. Es kann jedoch auch nur eine bestimmte Abmessung der Einfangstrukturelemente **1** wie etwa ihre Dicke vergrößert werden. In **Fig. 23** wird die Einfangrate (/Breite) vergrößert, indem die Breite von Schlitz **2** zur Abströmseite des Strömungskanals **3** hin vergrößert wird. Weil die Anordnung möglich ist, ohne die Anzahl der Einfangstrukturelemente in jeder Kolonne zu ändern, können die Abstände zwischen den Mittelpunkten der Strukturelemente und deren äußere Form gleich ausgeführt werden. Auch wenn es keine Beschränkungen für die Breite von Schlitz **2** gibt, beträgt die Breite vorzugsweise 1 bis 50 µm. Wenn es erwünscht ist, die Einfangrate (/Breite) schließlich auf 1 einzustellen, gibt es eine Grenze, wenn nur die Breite von Schlitz **2** vergrößert wird. In diesem Fall kann der Zweck durch kombinierte Verwendung der Strukturelemente mit einem Durchflussvolumen von null zwischen den Einfangstrukturelementen erreicht werden, wie bei den in **Fig. 11** gezeigten Strukturelementen. In **Fig. 24** wird die Einfangrate (Breite) in der Größe durch Erhöhen der Anzahl der Einfangstrukturelemente **1** zur Abströmseite des Strömungskanals **3** hin erhöht. Wenn die Ein-

fangrate (/Breite) schließlich gleich 1 ist, kann das Durchflussvolumen, das zwischen den Einfangstrukturelementen durchläuft, null betragen, wie bei den in **Fig. 11** gezeigten Strukturelementen. Während in diesem Fall die äußeren Formen der Einfangstrukturelemente **1** gleich ausgeführt werden können, werden die Anzahl der Einfangstrukturelemente in jeder Kolonne und die Abstände der Mittelpunkte der Strukturelemente geändert. Natürlich ist es möglich, einen Teil der Konfigurationen in **Fig. 22** bis **Fig. 24** mit einer anderen Konfiguration zu ersetzen, eine andere Konfiguration zu einer Konfiguration hinzuzufügen oder eine andere Konfiguration im Hinblick auf eine Konfiguration hinzuzufügen, wegzulassen oder zu ersetzen.

[0100] **Fig. 25** zeigt einen Fall, bei dem die Größe der biologischen Substanzen **4** kleiner ist als die Breite von Schlitz **2**, aber größer als die Spalten an den beiden Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz. Wenn diese Bedingung erfüllt ist, können die biologischen Substanzen **4** den Schlitz **2** passieren, aber nicht die Spalten an den zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz. Auf diese Weise werden die biologischen Substanzen **4** zuverlässig in den Einfangstrukturelementen **1** eingefangen. Sobald die biologischen Substanzen **4** in den Einfangstrukturelementen **1** eingefangen sind, sind die Spalten an den zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz teilweise blockiert, wodurch die Einfangrate (/Breite) verglichen mit dem Zustand vor dem Einfangen der biologischen Substanzen **4** verringert ist. Als Folge verringert sich die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere biologische Substanzen **4** in denselben Einfangstrukturelementen **1** eingefangen werden, so dass einzelne biologische Substanzen **4** in einer Reihe von Einfangstrukturelementen **1** eingefangen werden können. Das vorliegende Verfahren wird als effektiv angesehen, wenn die Nebenachse der biologischen Substanzen **4** vorzugsweise 5 µm oder mehr beträgt, und kann daher für Zellen allgemein angewendet werden. Insbesondere kann das Verfahren für Krebszellen im Blut wie etwa zirkulierende Tumorzellen (CTC) mit einer geringen Deformation verglichen mit Blutzellen oder Stammzellen (iPS- und ES-Zellen) angewendet werden. Wenn sie eingefangen werden, ist außerdem die Einfangrate deutlich verringert. Andererseits ist in **Fig. 1** die Größe der biologischen Substanzen **4** kleiner als die Breite von Schlitz **2** und die Spalten an den zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz, so dass nicht alle biologischen Substanzen **4** eingefangen werden, aber sie werden mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in dem Totwasserbereich **5** eingefangen.

[0101] In **Fig. 26** ist das Strukturelement **1b** ohne Schlitz mit einer Vertiefung zur Vergrößerung des Totwasserbereichs **5** versehen. Auf diese Weise kann die Einfangrate für die biologische Substanz, die den Schlitz passiert hat, erhöht werden.

[0102] **Fig. 27** zeigt Modifikationen der Einfangstrukturelemente. In **Fig. 27(a)** sind das Strukturelement **1a** mit Schlitz und das Strukturelement **1b** ohne Schlitz abgerundet, um ihre Scheitelpunkte teilweise zu glätten. Das Abrunden führt zum Beispiel zu dem Effekt, dass ein Auftrennen des Flüssigkeitsstroms vermieden wird. Weil mittels Strömungssimulation und dergleichen eine den Durchfluss stabilisierende Form realisiert werden kann, ist es auch möglich, den Schlitzbereich in **Fig. 27(a)** zu optimieren. **Fig. 27(b)** zeigt ein Einfangstrukturelement, das so beschaffen ist, dass das Strukturelement **1a** mit Schlitz einen Teil eines Dreiecks umfasst. Daher kann die Form des Strukturelements **1a** mit Schlitz und des Strukturelements **1b** ohne Schlitz einen Kreisbogen, einen Ellipsenbogen oder einen Teil eines Dreiecks umfassen. Andere Formen wie etwa eine Hyperbel können bei Bedarf ebenfalls vorgesehen werden. In **Fig. 27(c)** ist das Strukturelement **1a** mit Schlitz mit zwei Halbkreisformen versehen, um die biologischen Substanzen **4** aufzufangen. Durch Hinzufügen der Halbkreisformen kann die Lösung beim Einleiten der Lösung von dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz zu dem Strukturelement **1a** mit Schlitz aus dem Totwasserbereich **5** zu dem Strukturelement **1a** mit Schlitz geleitet werden, wodurch die biologischen Substanzen **4** aufgefangen werden können. Andererseits kann bei Fehlen der Halbkreisformen die Lösung nicht aus dem Totwasserbereich **5** zu dem Strukturelement **1a** mit Schlitz geleitet werden, was es schwierig macht, die biologischen Substanzen **4** aufzufangen. **Fig. 27(d)** zeigt einen Fall, bei dem das Strukturelement **1a** mit Schlitz zwei Schlitze aufweist. Auch in diesem Fall können die biologischen Substanzen **4** in dem Fall können die biologischen Substanzen **4** in dem Totwasserbereich **5** eingefangen werden. Während die Schlitze **2** liniensymmetrisch im Verhältnis zu dem Strukturelement **1a** mit Schlitz angeordnet sind, können die Schlitze **2** an Positionen angeordnet sein, die nicht liniensymmetrisch sind, wie in **Fig. 27(e)** gezeigt. Dies ist effektiv, wenn zum Beispiel das Durchflussvolumen zwischen den Spalten an den zwei Stellen zwischen dem Strukturelement **1a** mit Schlitz und dem Strukturelement **1b** ohne Schlitz unterschiedlich ist.

Bezugszeichenliste

1	Einfangstrukturelement
1a	Strukturelement mit Schlitz
1a_L	Linke Seite des Strukturelements mit Schlitz
1a_R	Rechte Seite des Strukturelements mit Schlitz
1b	Strukturelement ohne Schlitz
2, 2a, 2b	Schlitz
3, 34	Strömungskanal
4	Biologische Substanz
5	Totwasserbereich
11	Reagensbehälter
12	Reagenziengestell
13	Reagenziengestellunterteil
14	Vormischbehälter
20	Probenahmedüse
21	Führungsschiene
22	Linearbewegungseinheit
23	Drehwelle
24	Arm
30	Durchflusszelle
31	Durchflusszellentisch
32	Einspritzöffnung
33	Auslassöffnung
36	Oberes Substrat
37	Unteres Substrat
38	Abstandshalter
40	Nachweiseinheit
41	Lichtquelle
42	Bildgebungsvorrichtung
50	Steuerungs-Berechnungseinheit
51	Eingabeeinheit
52	Anzeigeeinheit
53	Flüssigkeitsstand-Sensoreinheit
60	Mikrospritze
61	Kolben
62	Erster Strömungskanal
63	Zweiter Strömungskanal
64	Reinigungsflüssigkeitsbehälter
65	Pumpe
66	Reinigungsflüssigkeitszirkulationskanal
67	Durchflussvolumen-Einstellöffnung
68	Reinigungsbehälter
69	Abwasserbehälter
71	Erstes Elektromagnetventil
72	Zweites Elektromagnetventil

Patentansprüche

1. Durchflusszelle zum Analysieren einer biologischen Substanz, aufweisend: einen Strömungskanal und eine Einspritzöffnung und eine Auslassöffnung, die mit dem Strömungskanal verbunden sind, wobei der Strömungskanal mit einem Einfangstrukturelement versehen ist, das die biologische Substanz einfängt, und das Einfangstrukturelement eine Struktur aufweist, die einen Totwasserbereich bildet, in dem die biologische Substanz eingefangen wird.

2. Durchflusszelle nach Anspruch 1, wobei das Einfangstrukturelement ein Schlitzelement mit einem Schlitz, den die biologische Substanz passiert, und ein Aufnahmeelement aufweist, das auf der Abströmseite des Schlitzelements angeordnet ist und zu dem Schlitzelement weist, um die biologische Substanz aufzunehmen.

3. Durchflusszelle nach Anspruch 2, wobei das Aufnahmeelement eine U-förmig gebogene Form aufweist.
4. Durchflusszelle nach Anspruch 3, wobei das Aufnahmeelement eine Vertiefung an einer dem Schlitz gegenüberliegenden Position aufweist.
5. Durchflusszelle nach Anspruch 1, wobei:
das Einfangstrukturelement in einer Matrix mit einer Flüssigkeitsströmungsrichtung und einer Richtung senkrecht zur Flüssigkeitsströmungsrichtung angeordnet ist, das Einfangstrukturelement in regelmäßigen Abständen in Reihenrichtung angeordnet ist und
ein Einfangstrukturelement in einer ungeraden Reihe im Wesentlichen in der Mitte der benachbarten Einfangstrukturelemente in den geraden Reihen angeordnet ist.
6. Durchflusszelle nach Anspruch 1, wobei das Einfangstrukturelement eine Höhe aufweist, die gleich der Höhe des Strömungskanals ist.
7. Durchflusszelle nach Anspruch 1, wobei:
das Einfangstrukturelement ein Paar von Strukturelementen mit parallel gebogener Wellenform umfasst, die gebogene Wellenform eine Periodizität aufweist, die Wellenform jeder Periode symmetrisch ist und
ein Strukturelement von dem Paar von Strukturelementen einen Schlitz an einem oberen Ende und das andere einen Schlitz am unteren Ende aufweist, wobei die Schlitze jeweils einen vorbestimmten Abstand haben.
8. Durchflusszelle nach Anspruch 2, wobei das Einfangstrukturelement zur Abströmseite hin eine zunehmend höhere Einfangrate aufweist.
9. Durchflusszelle nach Anspruch 8, wobei das Einfangstrukturelement zur Abströmseite hin eine zunehmend größere Größe aufweist.
10. Durchflusszelle nach Anspruch 8, wobei das Schlitzelement zur Abströmseite hin einen zunehmend größeren Schlitzabstand aufweist.
11. Durchflusszelle nach Anspruch 8, wobei das Einfangstrukturelement zur Abströmseite hin eine zunehmend größere Anzahl von Reihen aufweist.
12. Analyseverfahren zum Analysieren einer biologischen Substanz unter Verwendung einer Durchflusszelle mit einem Strömungskanal und einer Einspritzöffnung und einer Auslassöffnung, die mit dem Strömungskanal verbunden sind, wobei das Verfahren einen Schritt zum Bilden eines Totwasserbereichs durch ein Einfangstrukturelement, das in dem Strömungskanal angeordnet ist, um die biologische Substanz einzufangen, und zum Einfangen der biologischen Substanz in dem Totwasserbereich umfasst.
13. Analyseverfahren nach Anspruch 12, wobei die biologische Substanz ein Bakterium, eine Zelle oder ein gebundener Körper aus dem Bakterium und/oder der Zelle und einem Feinpartikel ist.
14. Analyseverfahren nach Anspruch 12, wobei:
das Einfangstrukturelement ein Schlitzelement mit einem Schlitz, den die biologische Substanz passiert, und ein Aufnahmeelement aufweist, das auf der Abströmseite des Schlitzelements angeordnet ist und zu dem Schlitzelement weist, um die biologische Substanz aufzunehmen, und
der Schlitz einen großen Abstand im Hinblick auf die biologische Substanz aufweist, wobei der Abstand größer ist als der Abstand eines Spalts zwischen dem Schlitzelement und dem Aufnahmeelement.
15. Analyseverfahren nach Anspruch 12, wobei das Verfahren einen Schritt zum Nachweis der eingefangenen biologischen Substanz umfasst.
16. Analyseverfahren nach Anspruch 15, wobei für den Nachweisschritt ein Raman-, Hellfeld-, Dunkelfeld-, Phasendifferenz-, Differenzialinterferenz-, Fluoreszenz-, Lichtemissions- oder Elektronenmikroskop verwendet wird.
17. Analyseverfahren nach Anspruch 15, wobei das Verfahren nach dem Nachweisschritt einen Schritt zum Sammeln der biologischen Substanz durch Variieren der Einleitgeschwindigkeit der Lösung oder der Einleitgeschwindigkeit der Lösung und der Einleitrichtung der Lösung umfasst.

18. Analysevorrichtung zum Analysieren einer biologischen Substanz, aufweisend:
eine Durchflusszelle mit einem Strömungskanal und einer Einspritzöffnung und einer Auslassöffnung, die mit dem Strömungskanal verbunden sind,
einen Einspritzmechanismus, der eine Probe über die Einspritzöffnung einspritzt, und
einen Nachweismechanismus, der die in der Durchflusszelle eingefangene biologische Substanz erfasst,
wobei der Strömungskanal mit einem Einfangstrukturelement versehen ist, das die biologische Substanz einfängt, wobei das Einfangstrukturelement eine Struktur aufweist, die einen Totwasserbereich bildet, in dem die biologische Substanz eingefangen wird.

Es folgen 25 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

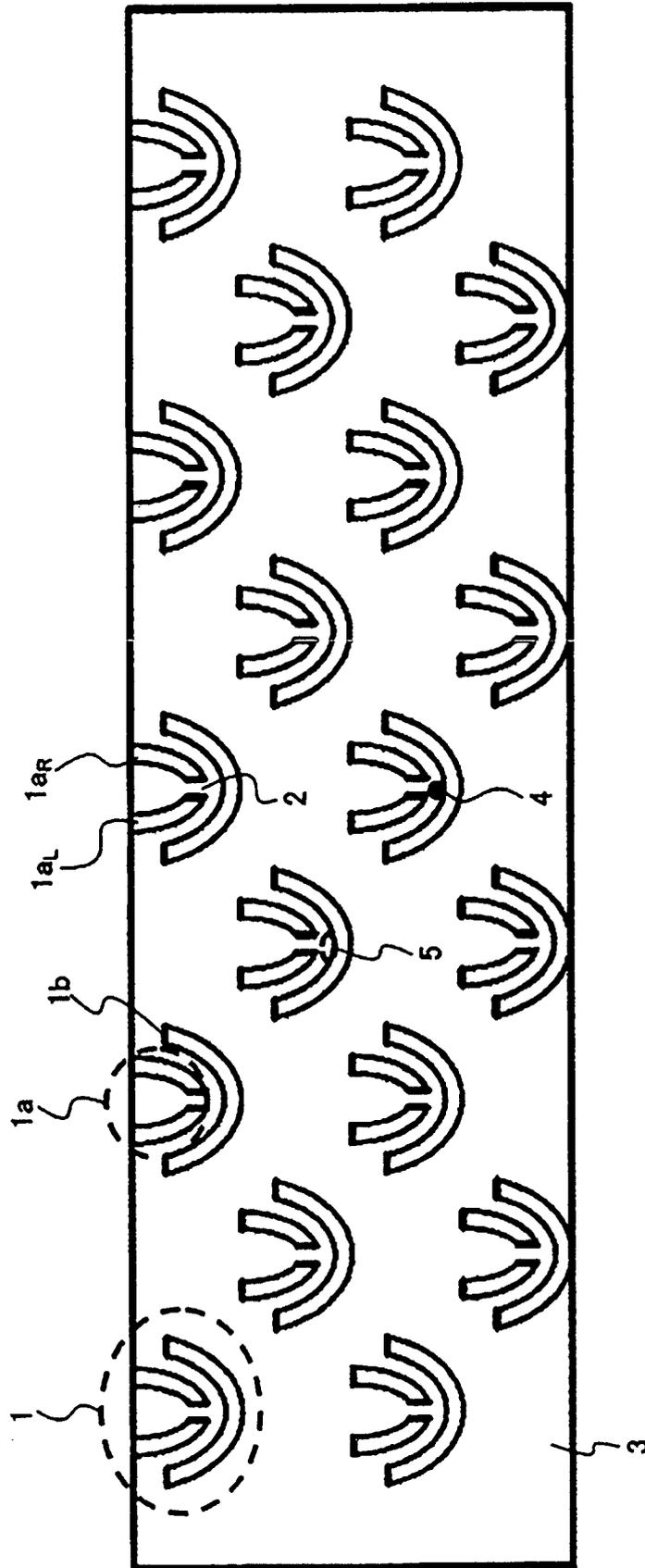


FIG. 2

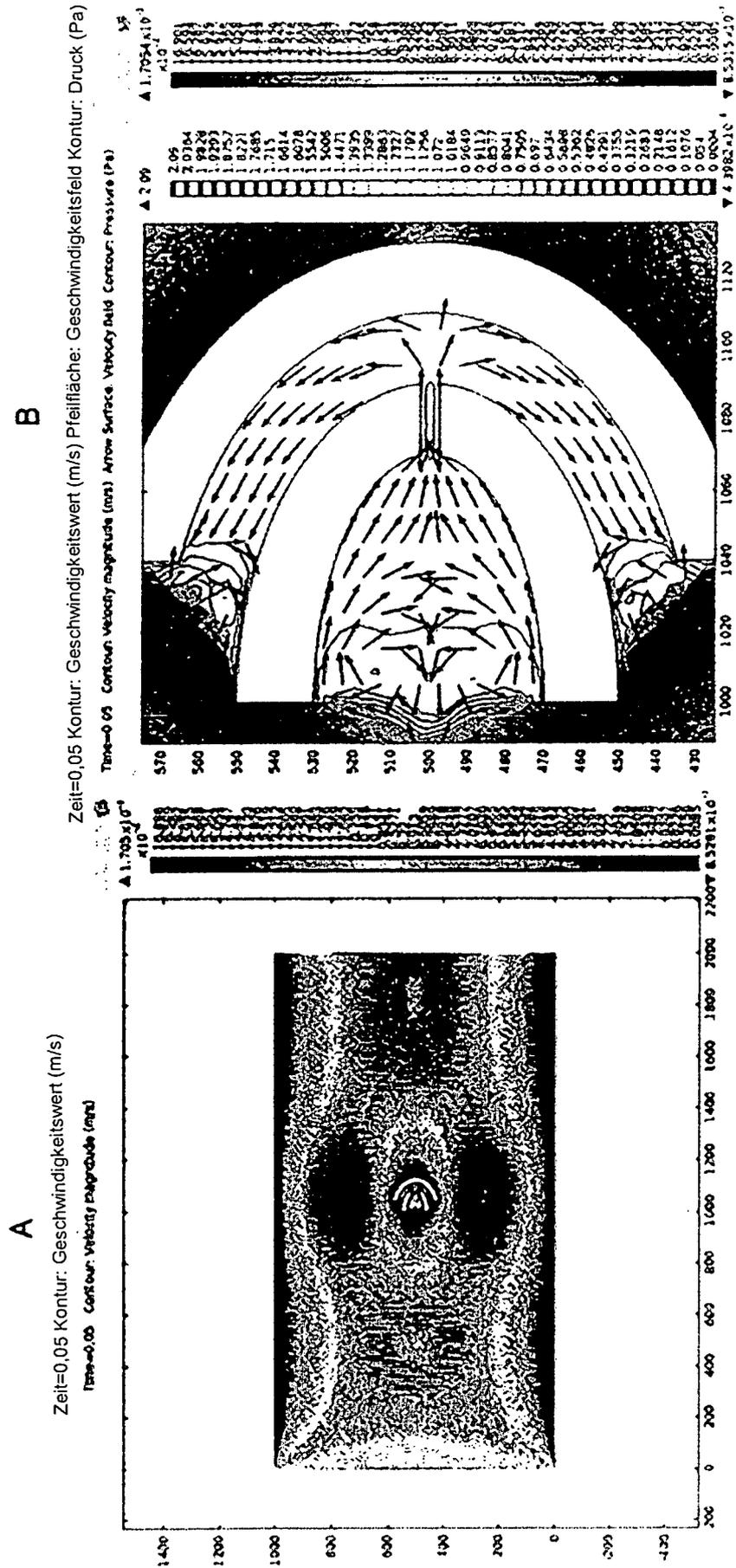


FIG. 3

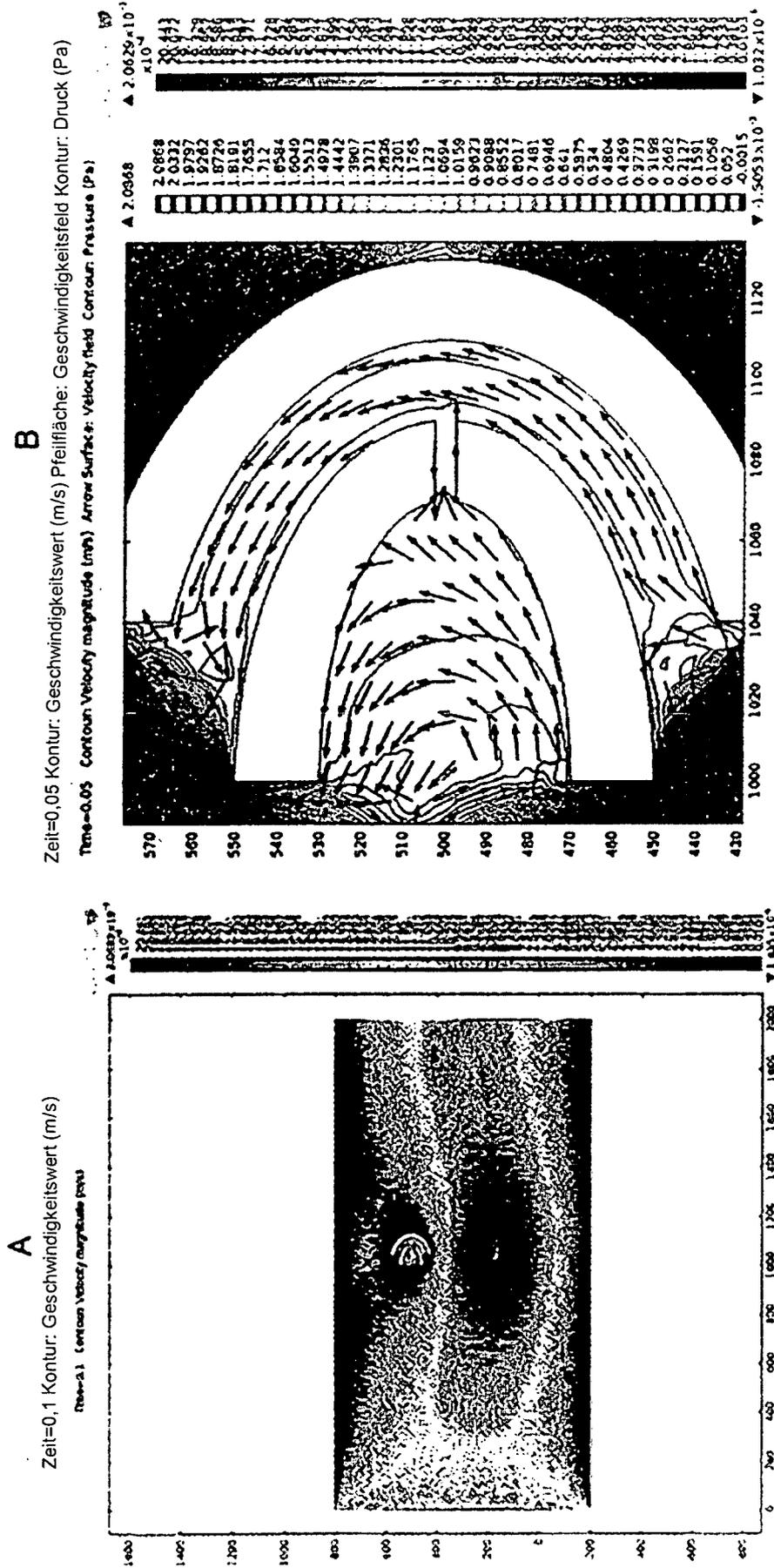


FIG. 4

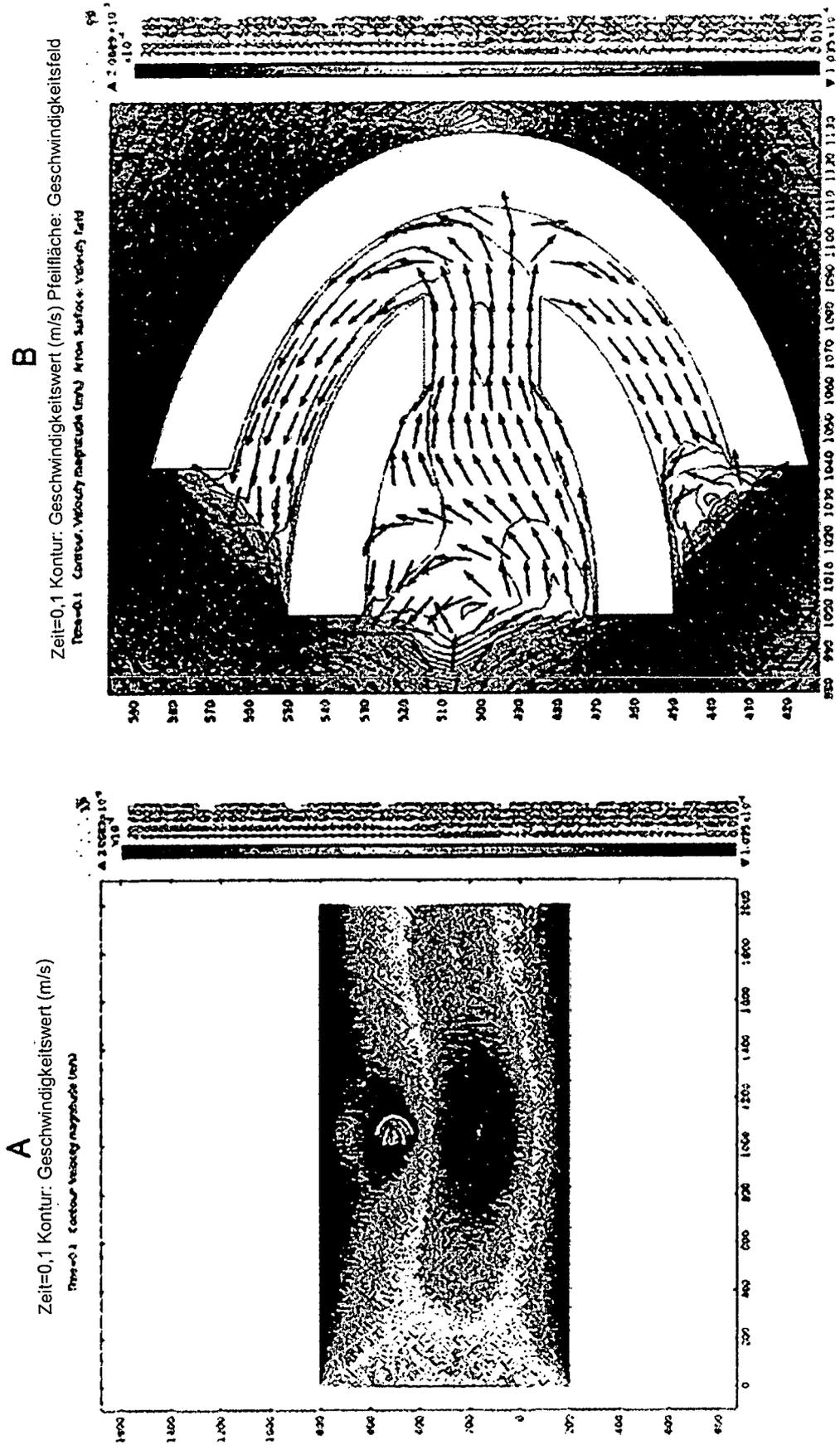


FIG. 5

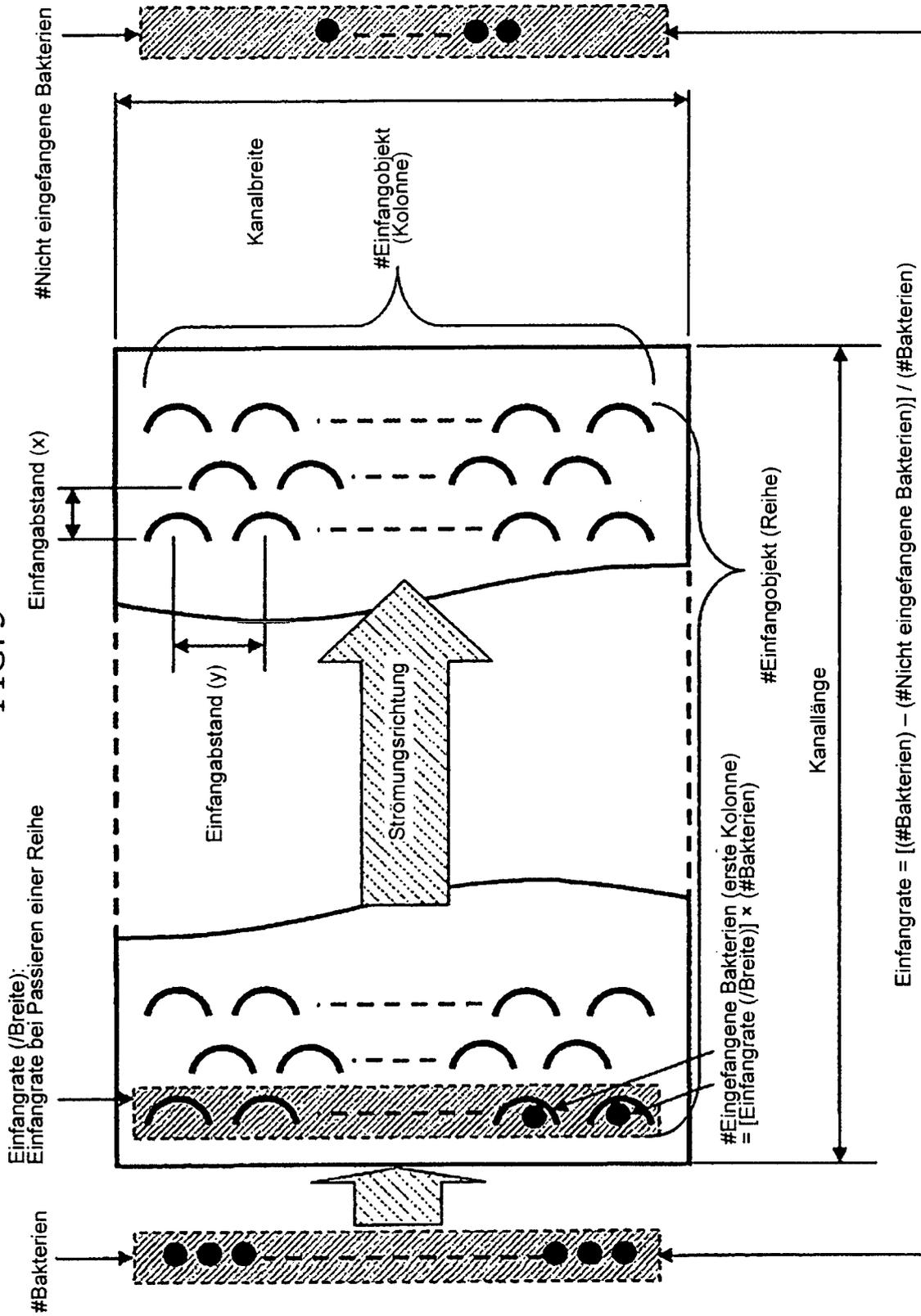


FIG. 6

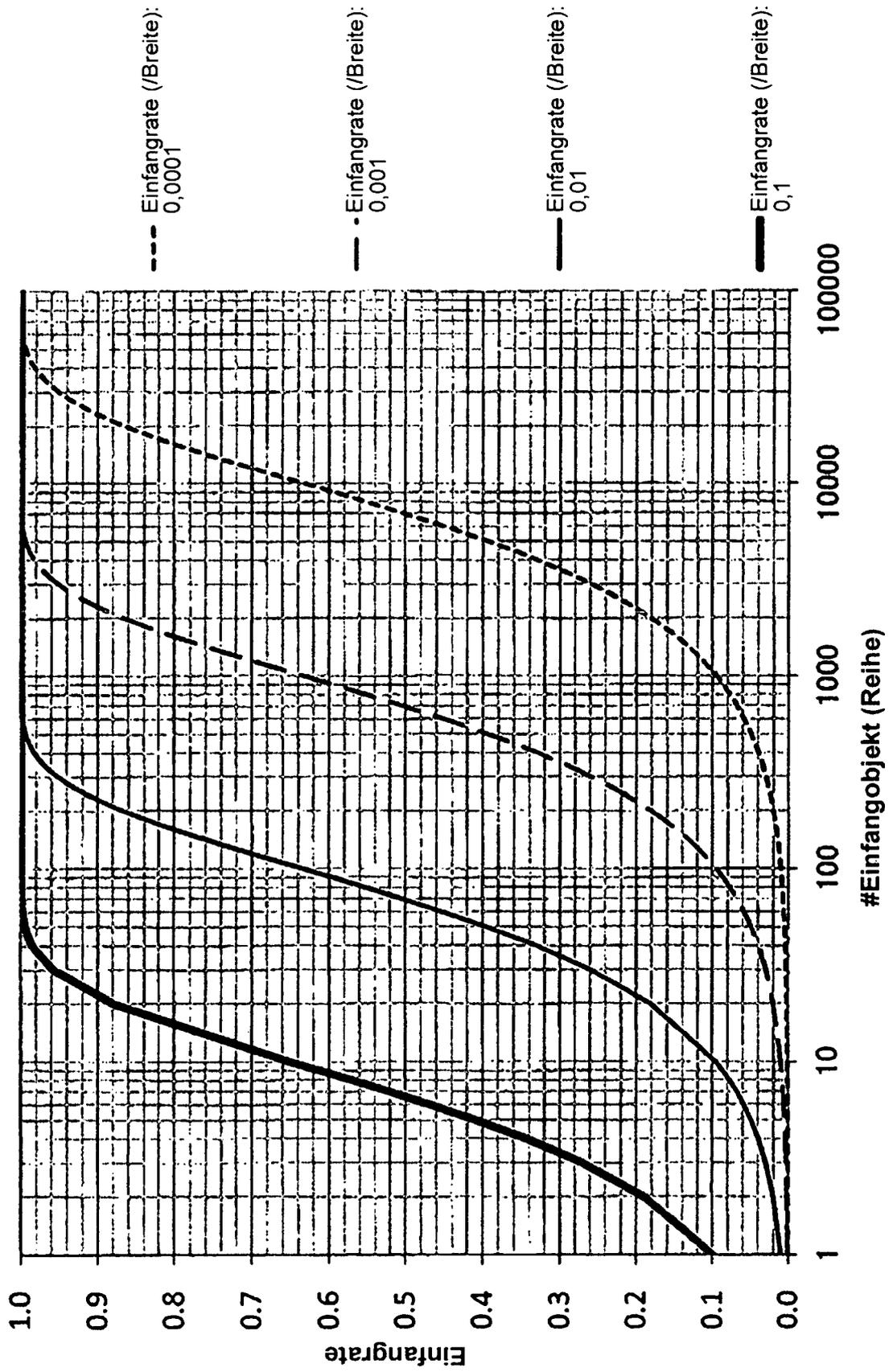


FIG. 7

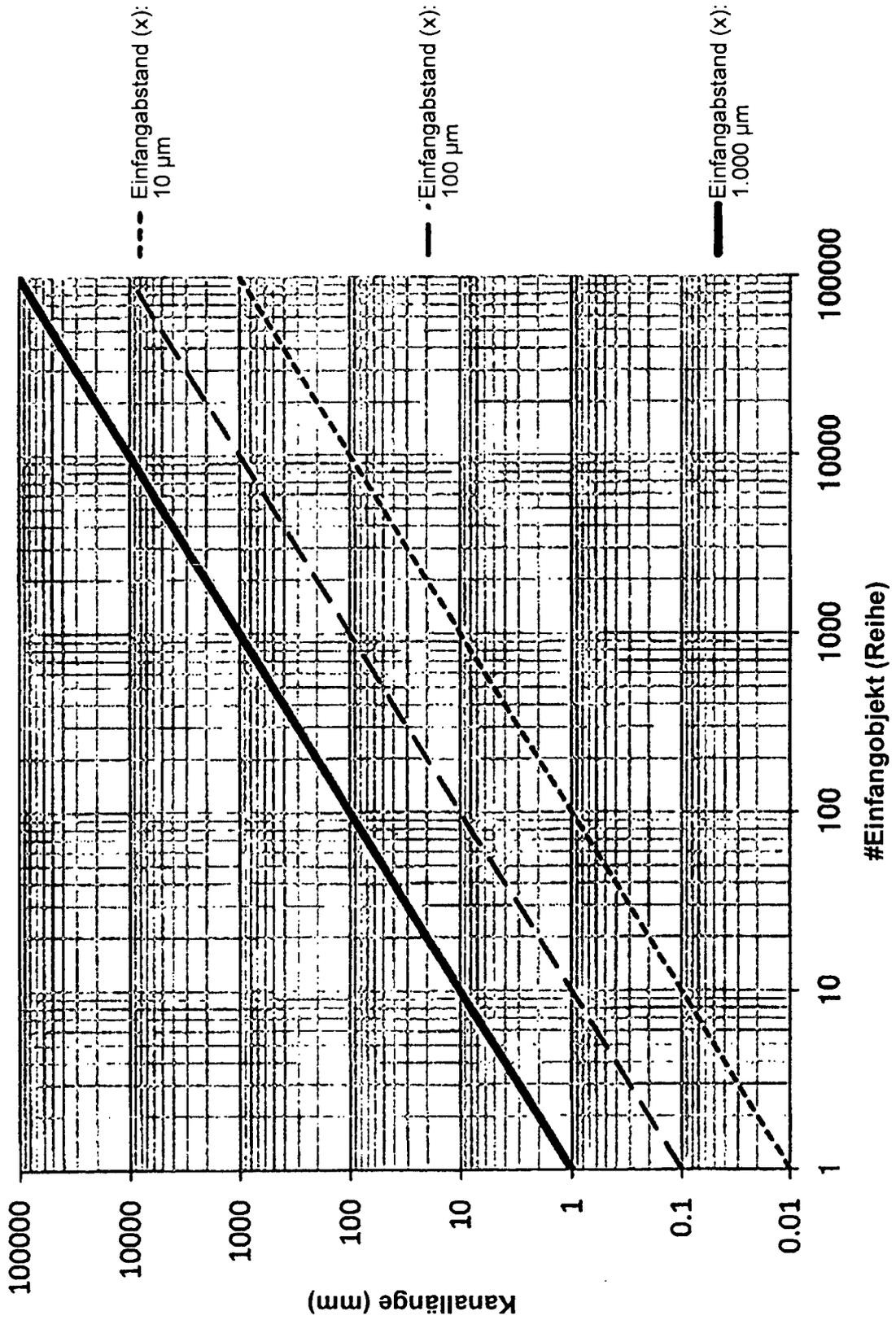


FIG. 8

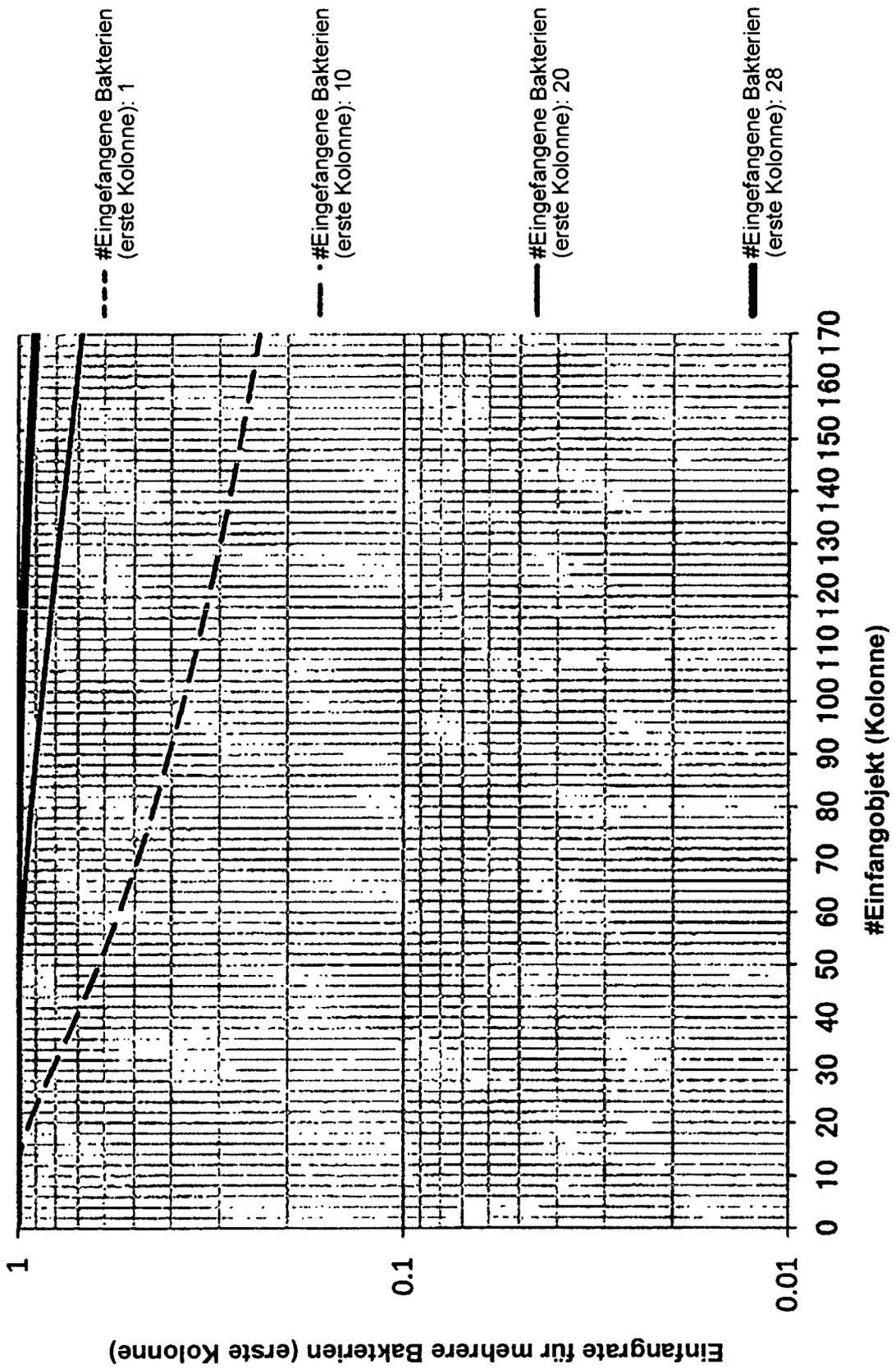


FIG. 9

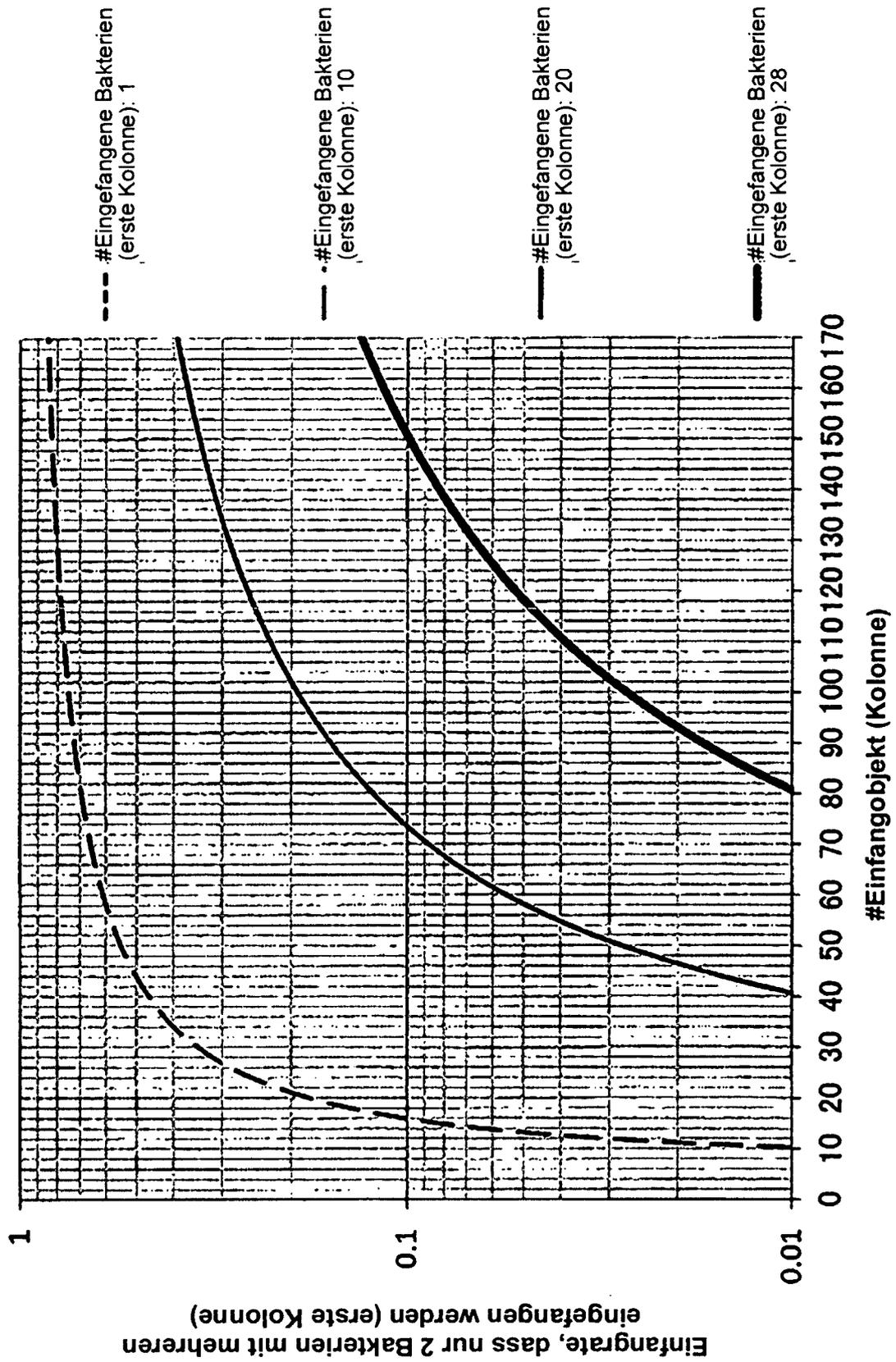


FIG. 10

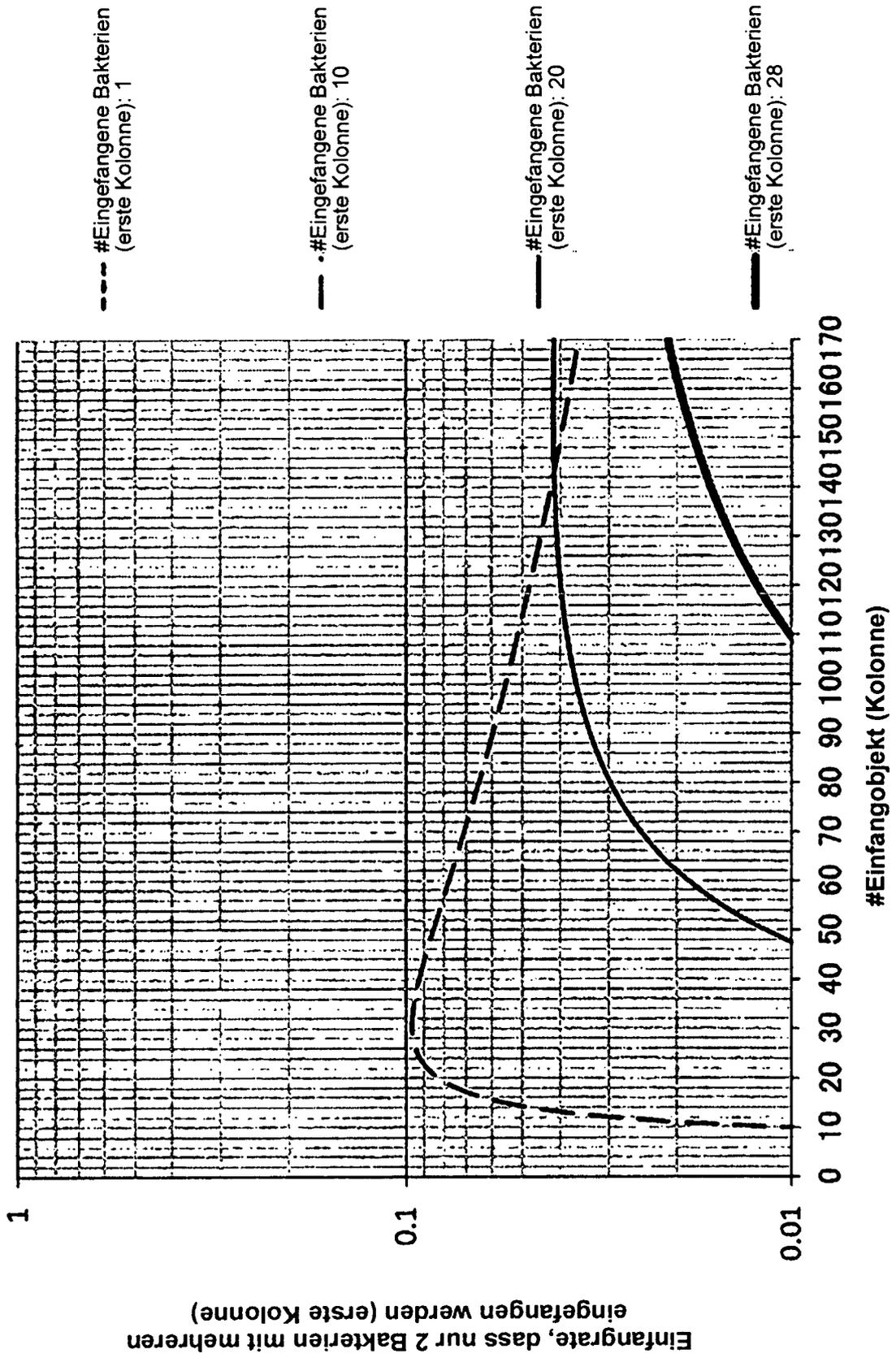


FIG. 11

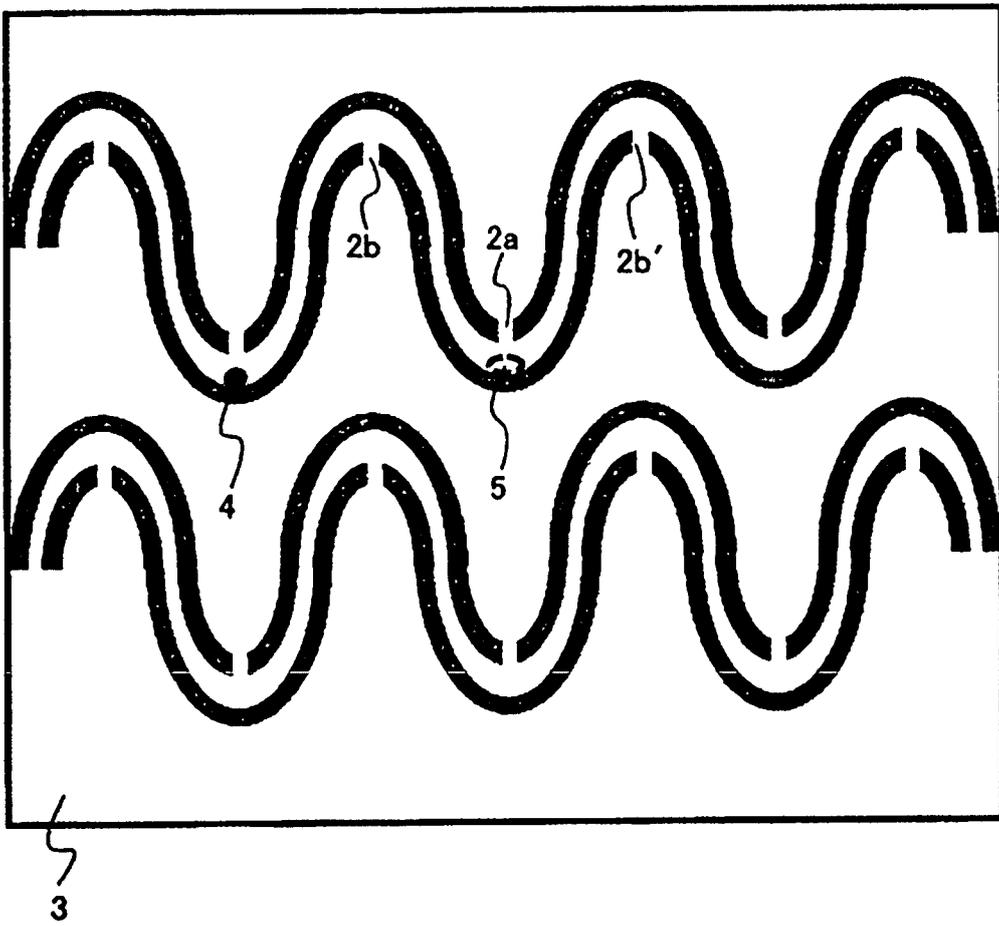


FIG. 12

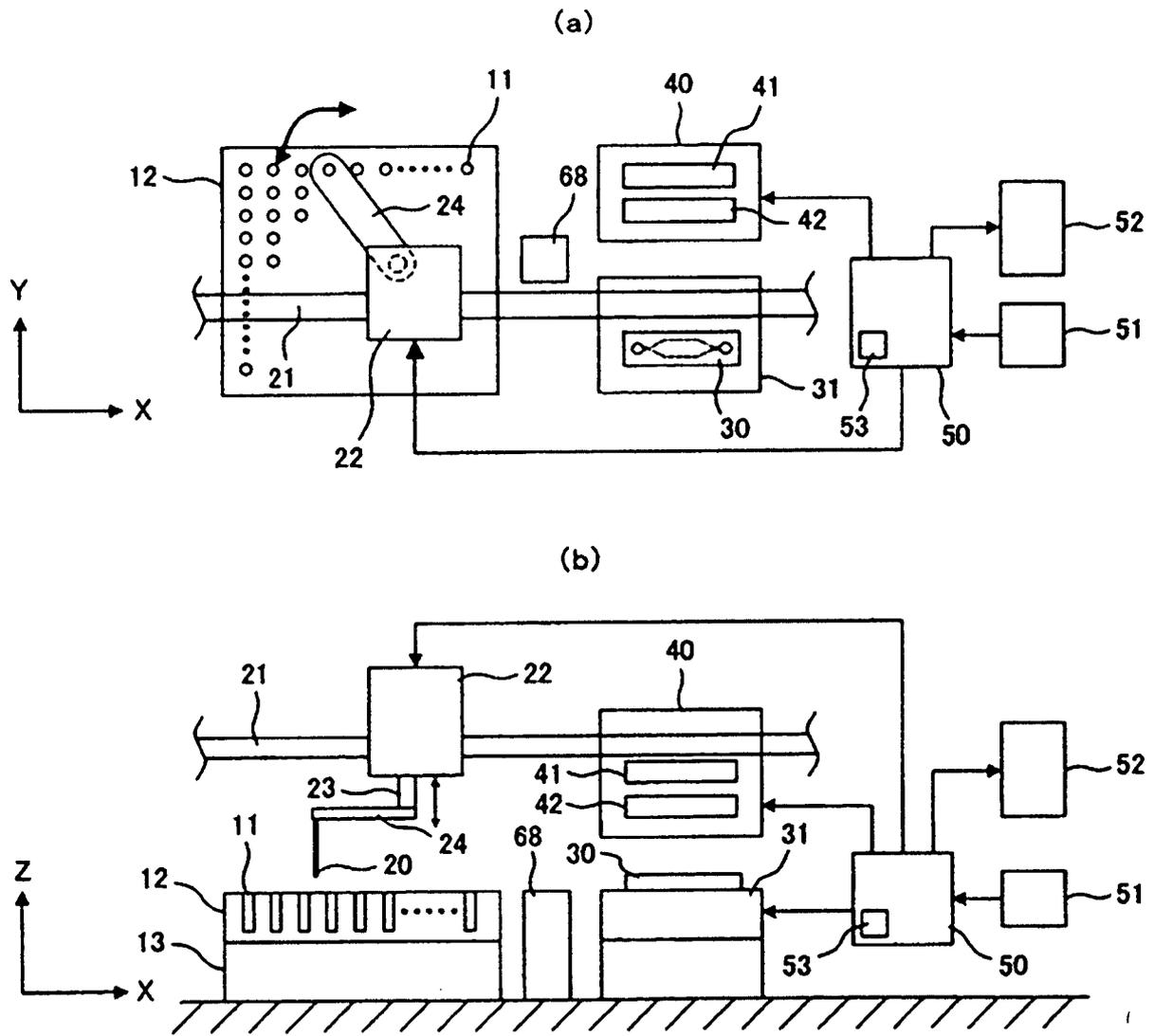


FIG. 13

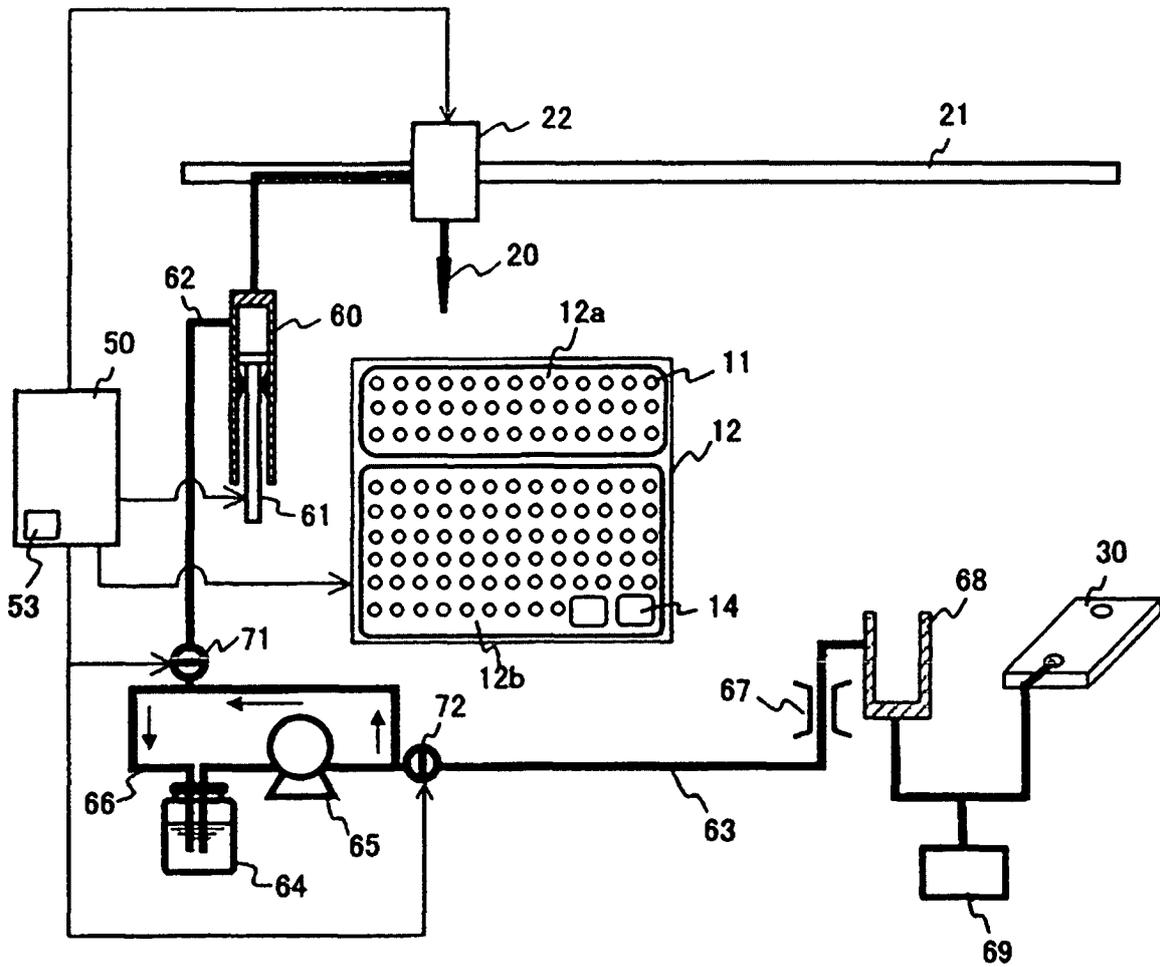
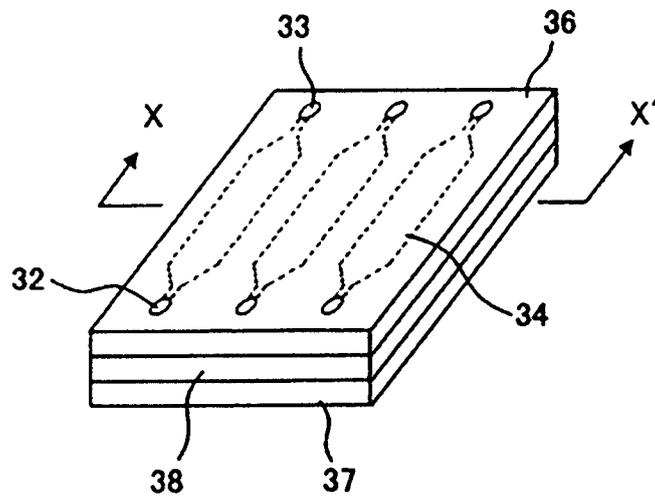


FIG. 14

(a)



(b)

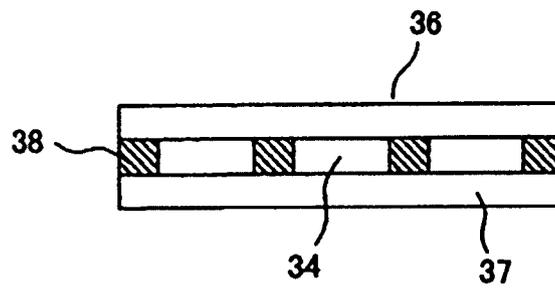


FIG. 15

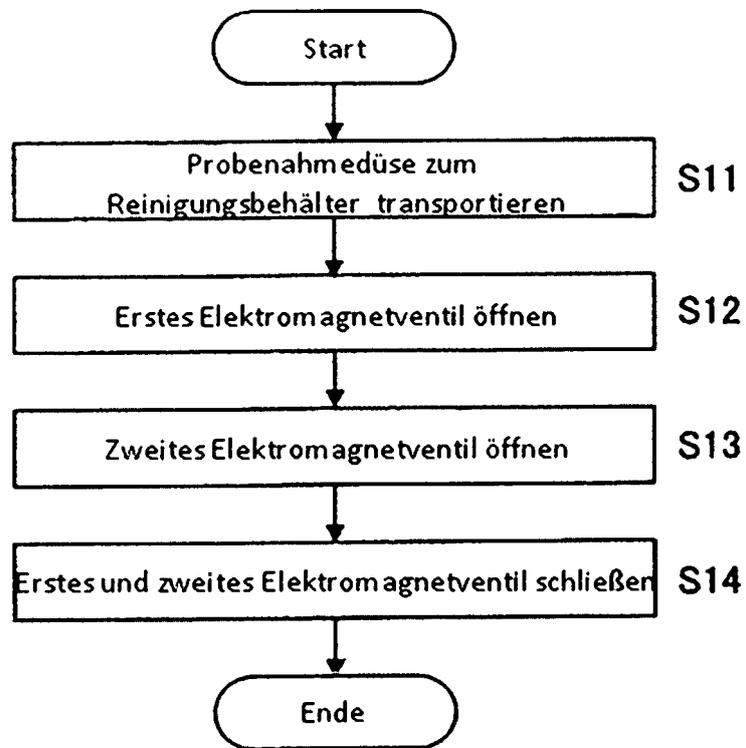


FIG. 16

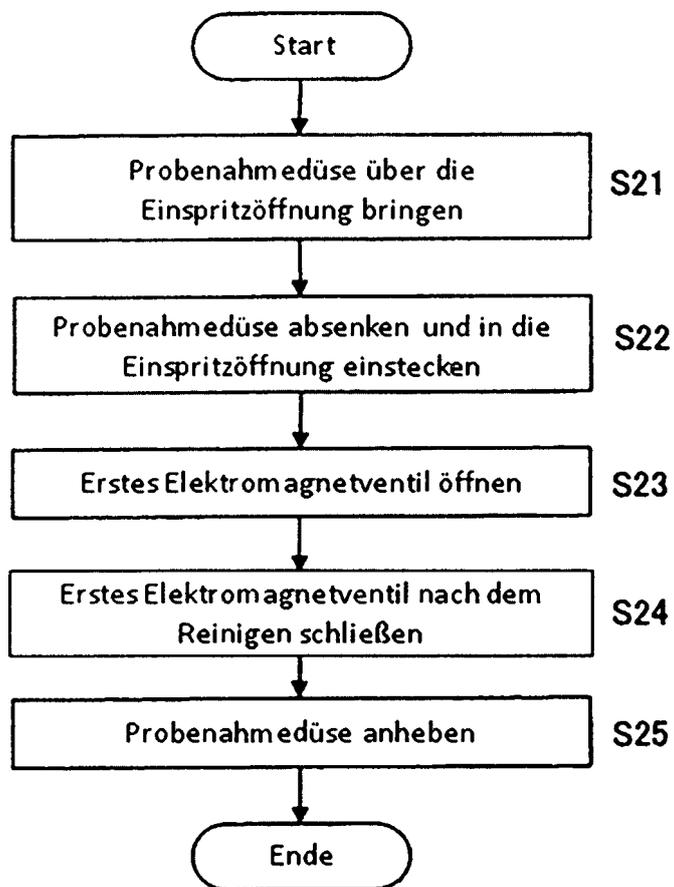


FIG. 17

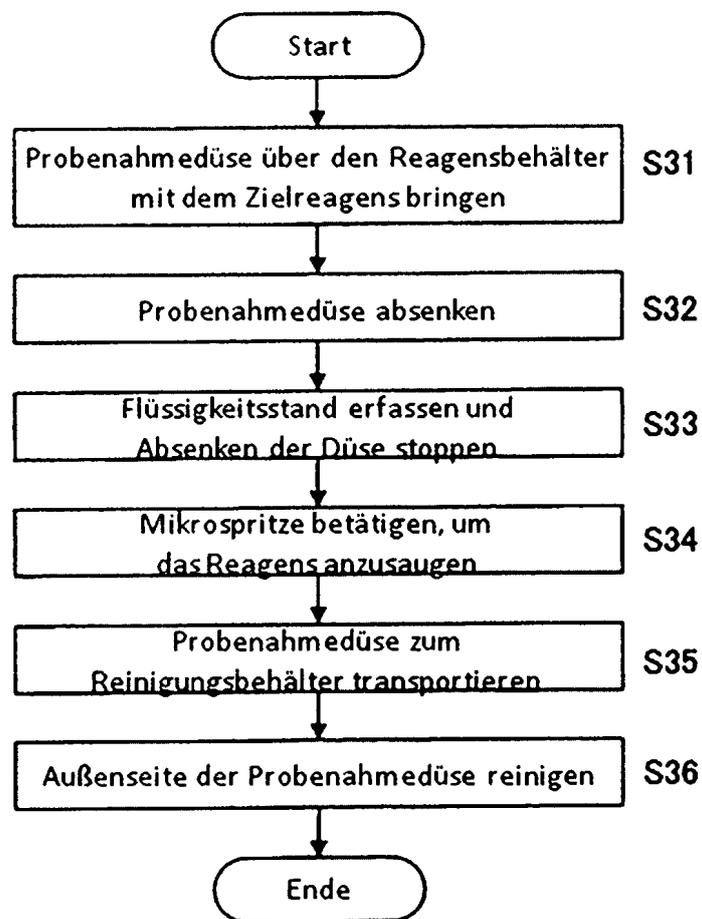


FIG. 18

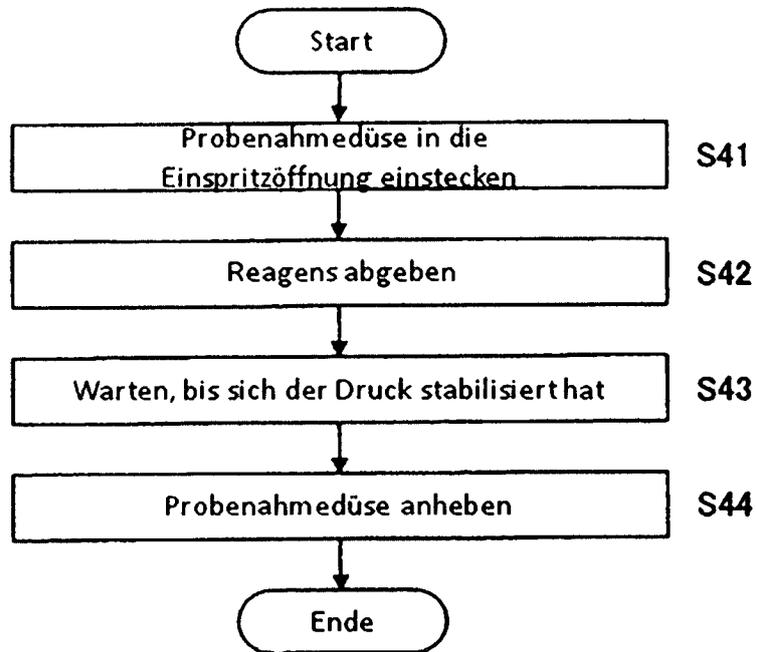


FIG. 19

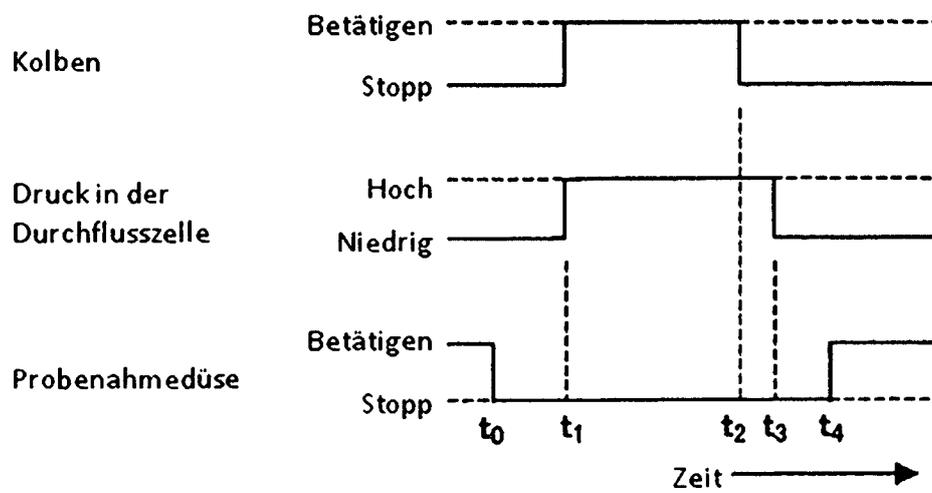


FIG. 20

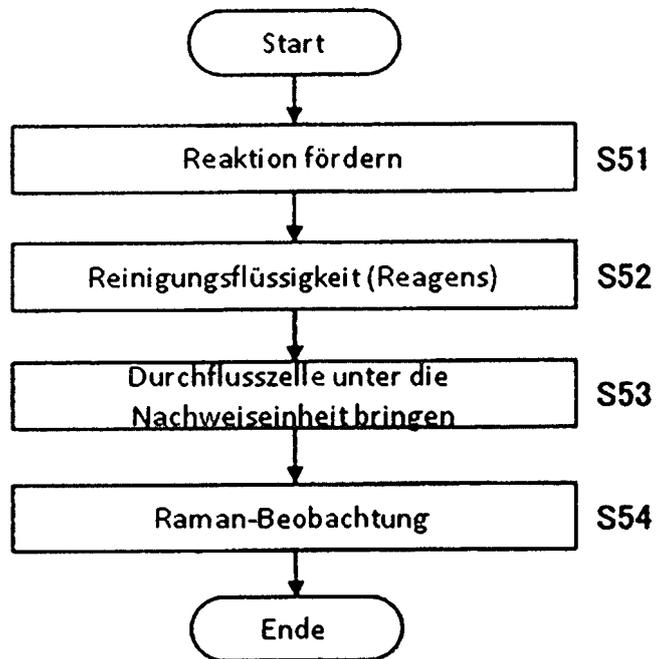


FIG. 21

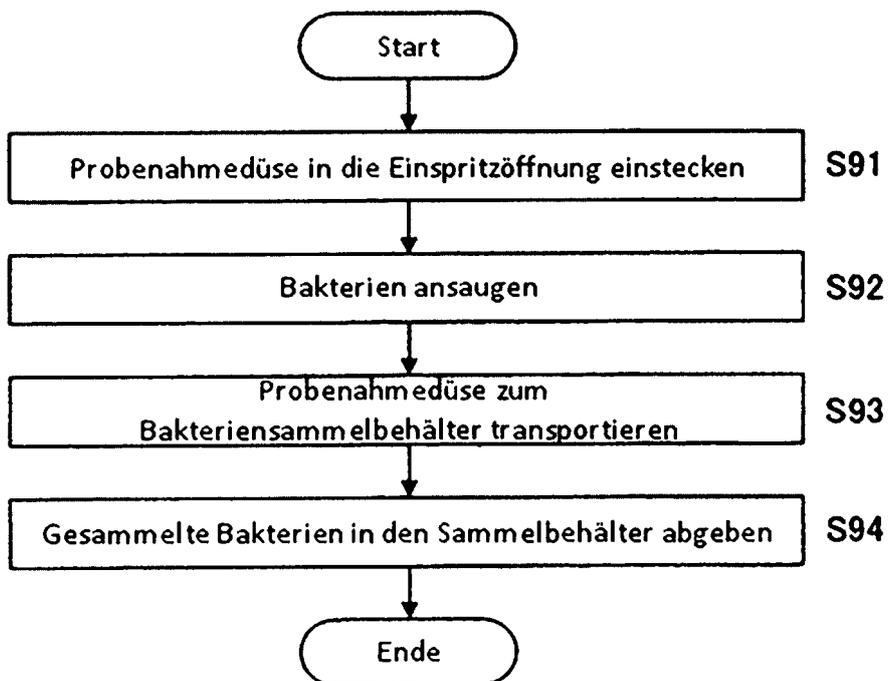


FIG. 22

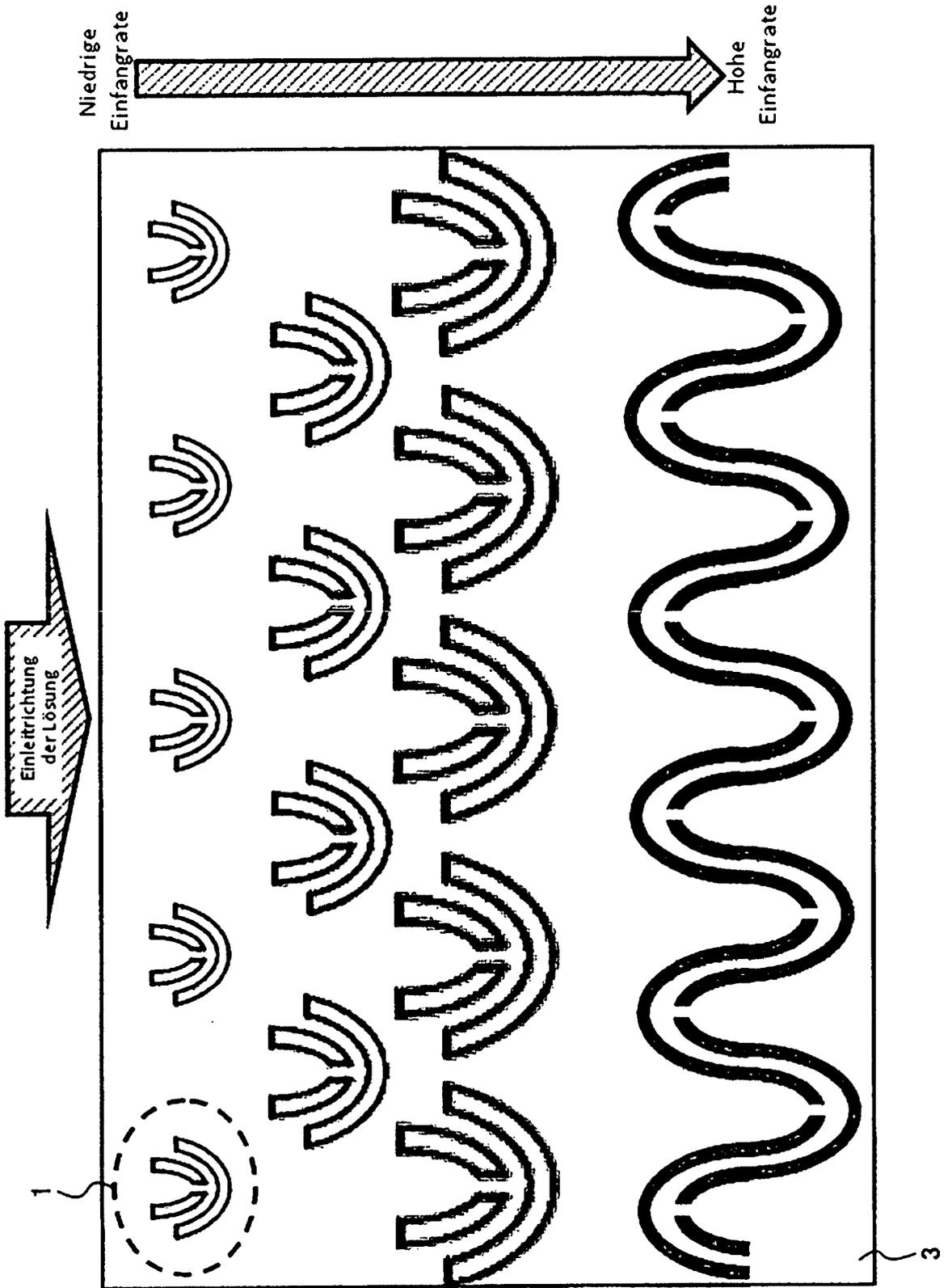


FIG. 23

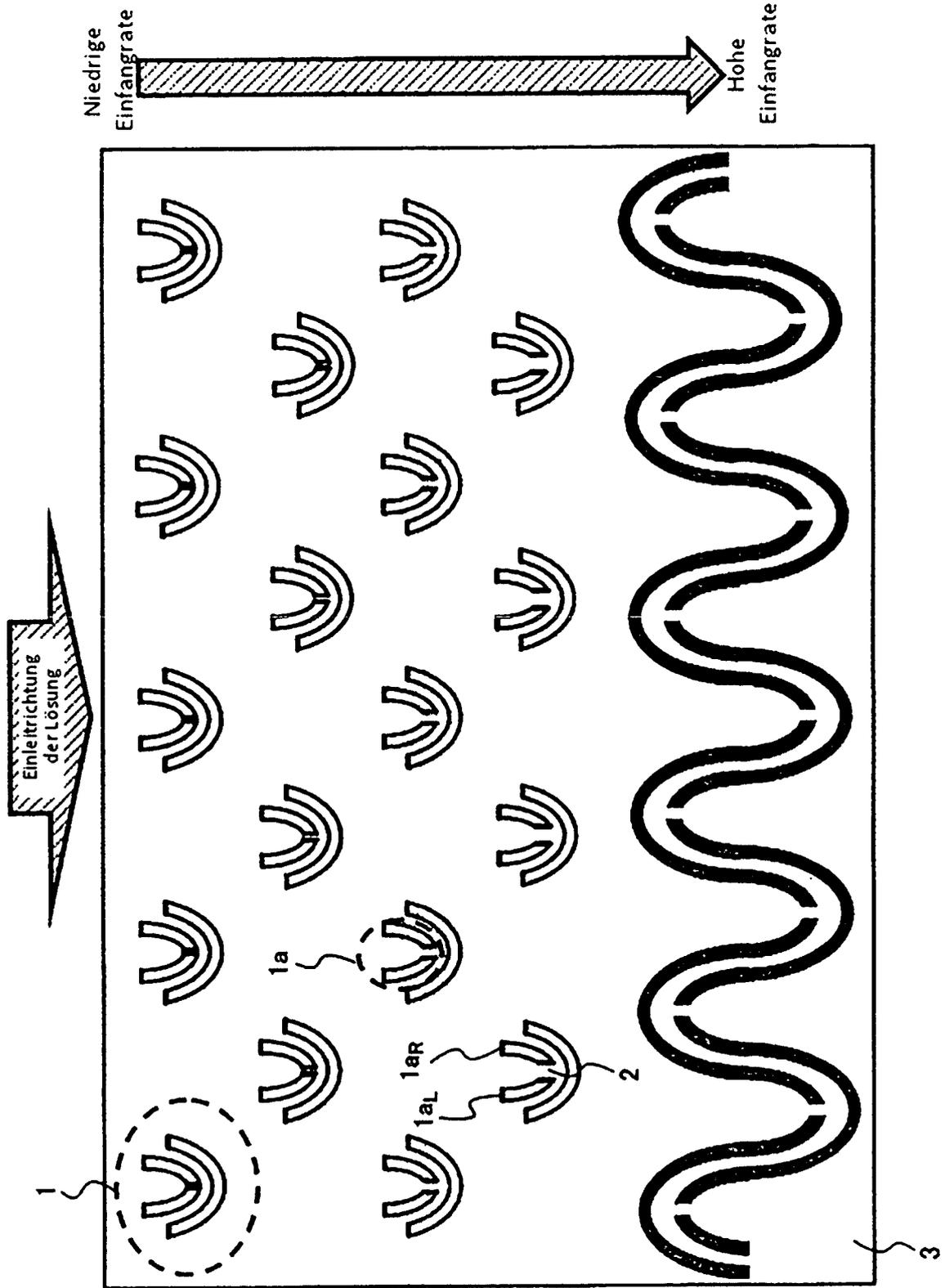


FIG. 24

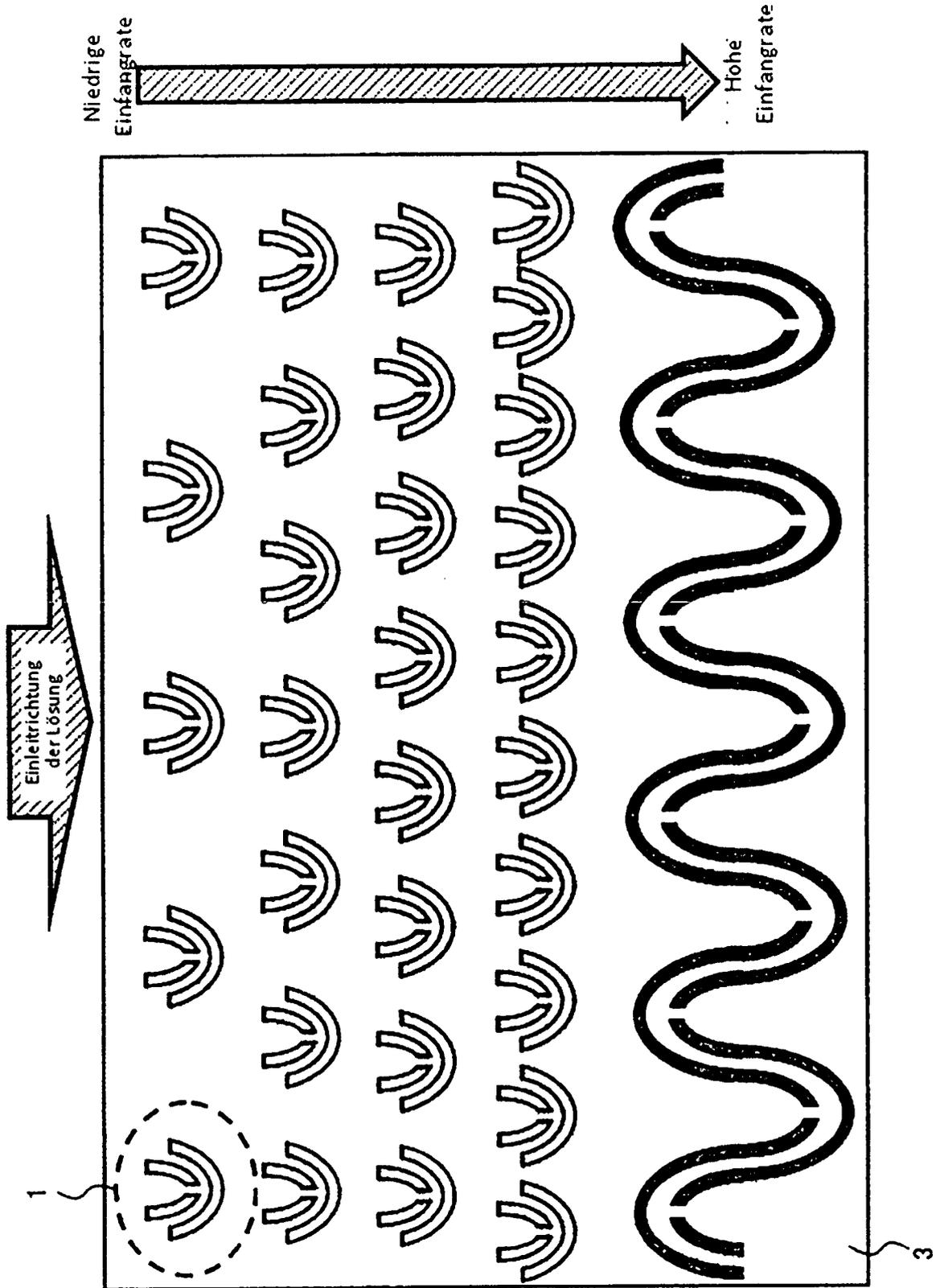


FIG. 25

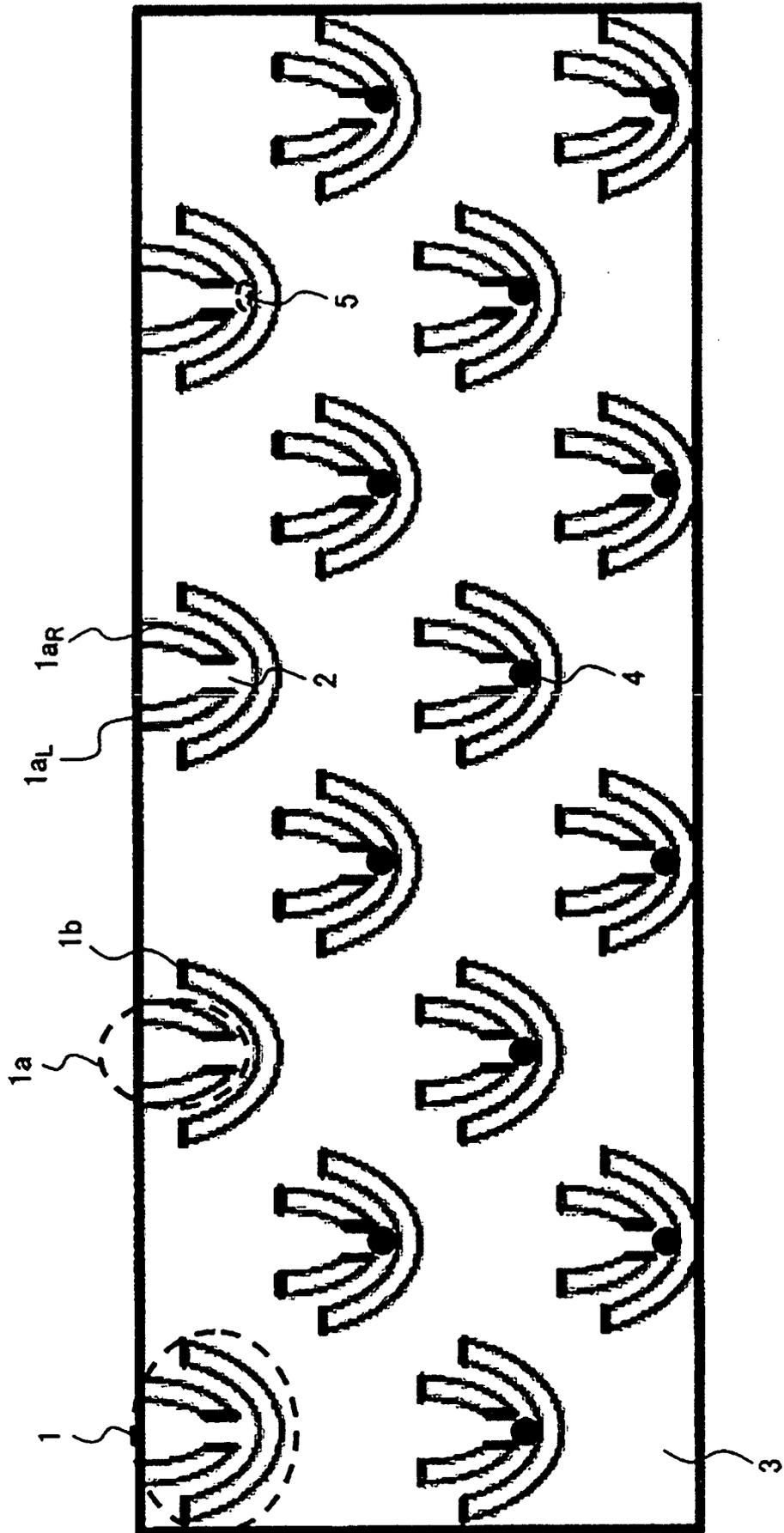


FIG. 26

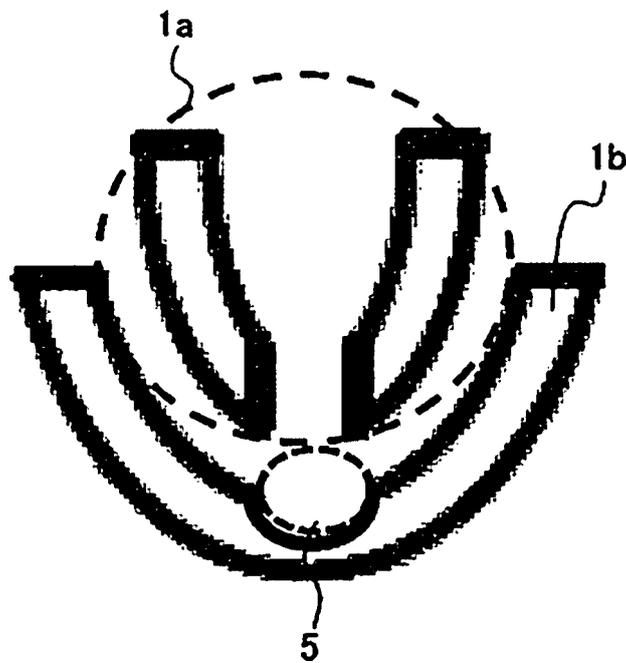


FIG. 27

