

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-522880

(P2016-522880A)

(43) 公表日 平成28年8月4日(2016.8.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO1N 21/27 (2006.01)	GO1N 21/27	A 2GO43
GO1N 33/483 (2006.01)	GO1N 33/483	C 2GO45
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48	M 2GO59
GO1N 33/49 (2006.01)	GO1N 33/49	A 2HO52
GO1N 33/72 (2006.01)	GO1N 33/72	A 4BO63

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-562467 (P2015-562467)	(71) 出願人	515256947 リチャード・ハリー・ターナー
(86) (22) 出願日	平成26年3月10日 (2014.3.10)		アメリカ合衆国・ワシントン・98040
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月10日 (2015.11.10)		・マーサー・アイランド・エイティス・ブ
(86) 國際出願番号	PCT/IB2014/059581		レイス・サウスイースト・7650
(87) 國際公開番号	W02014/141034	(74) 代理人	100108453
(87) 國際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	61/790,764	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(33) 優先権主張国	米国(US)	(72) 発明者	リチャード・ハリー・ターナー アメリカ合衆国・ワシントン・98040 ・マーサー・アイランド・エイティス・ブ レイス・サウスイースト・7650

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液内の粒子及び可溶化学物質の体外での検出のためのシステムおよび方法

(57) 【要約】

体液内の粒子及び可溶化学物質を検出するためのシステムおよび方法は、顕微鏡測定装置、試料チャンバー、試薬からなるシステム並びに体液内の粒子及び化学物質を検出し、分類し、計数するのに使用される方法からなる。体液は、試薬と結合してデジタル顕微鏡測定検出器の集束面内に来る観察用チャンバーの底部に沈殿する粒子を含む。電磁放射を吸収または放出する取得されたデジタル画像内の領域として識別される粒子は、第1のデジタル画像の所定の領域内の追加的な吸収または放出された電磁放射に基づいてさらに分類可能である。体液内の可溶化学物質は、既知の化学反応または抗体反応を用いて、透過または放出される電磁放射を使用して検出され、濃度が決定され、顕微鏡測定デバイスは体液を用いた体外決定について汎用の検出器である。本要約は技術的開示の対象を簡潔に認識できるようにする要約を必要とする規則に従って提供される。これは特許請求の範囲の意味する範囲を妨げ、または限定するために使用されないことが理解されるべきである。

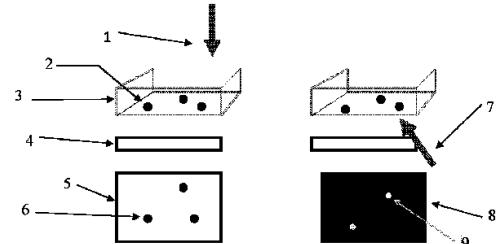


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

視野内において粒子を2次元的物体として分類するための顕微鏡的方法であって、
a) 第1の電磁放射源で視野を照射する段階と、
b) 前記視野の第1のデジタル画像を得るために、画像センサに得られた画像を投影する段階と、
c) 前記第1のデジタル画像を用いて、前記第1のデジタル画像内の第1の物体を識別する段階と、
d) 前記第1の物体の輪郭の輪郭座標を用いて、前記第1のデジタル画像内に含まれる前記第1の物体の領域を画定し、前記第1の物体の領域の境界線を決定する段階と、
e) 前記第1の物体の1つまたは複数の物体特性を決定する段階と、
f) 前記第1の物体の前記第1のデジタル画像に関して、境界から1つまたは複数の画素を差し引くことにより、接触している粒子を分離する段階と、
g) 前記輪郭座標を用いて、第1の物体の前記輪郭に隣接するが前記第1の物体の外側にある領域を画定し、前記第1の電磁放射源の背景照度を計算し、前記第1の物体の電磁照度からこの平均背景照度を差し引く段階と、
h) 前記第1の物体の前記輪郭内の領域の電磁照度を用いて、標準曲線を参照することにより、光を吸収する前記第1の物体内の粒子の特性を決定する段階と、
を含む方法。

【請求項 2】

前記第1の物体を第1のサブセットにさらに分類するのに必要なだけの前記第1の物体の前記第1のデジタル画像の所定の境界内の前記第1の物体についての特有の光学情報を提供するのに必要な数の電磁放射源で、前記第1の物体に順にインタロゲートする段階を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記視野の第2のデジタル画像を得るために第2の電磁放射源で前記視野にインタロゲートする段階であって、前記第2の電磁放射源が、第2の物体の電磁特性に基づき、前記視野内の前記第2の物体を一意的に識別する電磁特性の点で前記第1の電磁放射源とは異なる、第2の電磁放射源で前記視野にインタロゲートする段階と、次いで、第1の電磁放射源によって識別された境界内に含まれる物体を下位分類するために、前記第2の物体を第2のサブセットにさらに分類するのに必要なだけの前記第2のデジタル画像の前記第2の物体についての特有の光学情報を提供するのに必要な数の追加的な電磁放射源で、前記第2の物体を露光する段階と、を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記電磁放射源が、100nmから2000nmの範囲から選択された波長の光を放射し、前記光が、紫外線スペクトル、可視光スペクトル及び赤外線スペクトルの部分を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記電磁放射源が、100nmから1000nmの範囲から選択された波長の光を放射し、前記光が、自然に存在する蛍光色素分子または人工的に導入された蛍光色素分子の蛍光励起を引き起こし、前記励起された蛍光色素分子によって放出された光が、対応する物体を分類するための画像を生成するのに使用される、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記電磁放射源が、100nmから2000nmの範囲から選択された波長の光を放射し、前記光が、前記物体内の化学物質または粒子によって吸収され、吸収性の前記物質または粒子を含む対応する画像が、より低い照度の検出された電磁放射を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

異なる角度で試料と交差する電磁放射源を用いて、異なる照度の前記視野内の物体の電

10

20

30

40

50

磁放射散乱を引き起こす段階を含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出センサの領域に垂直方向 0 から 80° で前記視野内の物体と交差する電磁放射源を用いて、顕微鏡の対物レンズが、異なる角度で散乱される光を捕捉する段階を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

異なる偏光特性を有する電磁放射源を用いる段階を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

自然に存在する蛍光色素分子または人工的に導入された蛍光色素分子の蛍光を誘導する電磁放射源を用いる段階を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 11】

ヘモグロビンのソーレー帯からの透過光源を用いて動物または人間の血液からの赤血球の画像を生成する段階と、前記画像を用いて面積、直径及び体積などの赤血球の粒子特性及び赤血球内のヘモグロビンの濃度を計算する段階と、を含み、網状赤血球内のレチクリンに付着した核酸結合蛍光色素分子を励起し、蛍光発光を有する赤血球を識別することによって、全ての赤血球から網状赤血球が識別される、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

動物または人間の体液からの白血球を蛍光色素分子で処理する段階と、励起光源を用いて白血球を検出する段階と、を含み、放出された光が、検出センサに投影されて、蛍光発光する白血球のデジタル画像を形成する、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 13】

動物または人間の体液から白血球を検出するために、核酸結合蛍光色素分子を用いる段階を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記核酸結合蛍光色素分子が、アクリジニウムエステル、チアゾールオレンジ及びエチジウムプロマイドの群から選択される、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

30

【請求項 15】

2 次元的蛍光画像に対応する物体の直径、蛍光発光する物質の濃度及び体積を計算する段階と、前記物体の直径、蛍光発光する物質の濃度及び体積を、白血球をリンパ球、顆粒球及び単球に分類するのに用いる段階と、を含む、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

白血球内の異なる物質を検出することができるよう、異なる蛍光発光化学種を検出するための 2 つ以上の蛍光励起源または 2 つ以上の蛍光発光検出波長を用いる段階と、白血球をさらにサブセットに分類するために蛍光の照度及び量を用いる段階と、を含む、請求項 1 2 から 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

白血球内の細胞質顆粒が光を強く散乱する一方で、顆粒のない細胞質が光を全く散乱しないまたは非常に低い照度で散乱するように、前記センサに垂直方向 60° から 90° の間の角度で顆粒球を照射する 300 nm から 800 nm の可視光を用いる、請求項 1 2 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記センサに垂直方向 60° から 90° の角度で 300 から 800 nm の光を前記同じ物体に照射することによって下位分類された前記画像から顆粒球を分類する段階を含み、前記顆粒球が、高い照度の散乱光を有する画像である、請求項 1 2 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

50

人間または動物の体液からの白血球が、最初に蛍光を用いて、次に無視できる散乱光を有する画像としてリンパ球及び単球を識別することによって識別される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

1 から 5 0 メガピクセルの C M O S または C C D センサを用いる段階を含む、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記電磁放射源が、同一の視野を順に、前記電磁放射源のための空間の制約及び前記視野を画像化するための時間的制約によってのみ制限された 2 つから 1 0 個の異なる電磁放射源でインターロゲートする能力を提供する電子スイッチでオン及びオフに切り替え可能である、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 2】

対象粒子の液体分散を含み、統計的に有意な数の粒子が計数可能である使い捨てまたは再使用可能な観察用チャンバーを有する段階を含む、請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記観察用チャンバーが、5 0 ミクロンから 1 0 m m の間の厚さを有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

検出用前記 C M O S または C C D センサの間に対物レンズを配置する段階を含み、前記対物レンズが、物体の寸法を決定するのに十分な倍率を提供し、さらに前記視野内の物体を統計的に有意な計数ができるように十分な視野を有する、請求項 1 8 に記載の方法。

20

【請求項 2 5】

前記対物レンズが 2 倍から 1 5 倍の倍率を有する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

体液内の赤血球及び白血球の両方を、赤血球のソーレー帯を用いて赤血球細胞の分離または溶解を行わずに検出して、赤血球と、白血球を検出するための核酸結合蛍光色素分子の蛍光とを識別する段階を含む、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

N - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルフォネートなどの、しかしそれに限定されない球状化試薬を用いて、赤血球を両面陥凹円盤から均一な球体に変換し、前記球状化試薬が、白血球の形態または散乱特性に影響を与えない、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 8】

球状化試薬を使用せず、赤血球本来の両面陥凹円盤形状を維持する試薬を使用する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

白血球の形態または光散乱特性に影響を与えるに、3 0 秒から 1 0 分以内に選択的に赤血球を溶解する段階を含む、請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

球状化試薬とともに、または球状化試薬を用いずに、赤血球溶解試薬として p H 8 . 0 の 0 . 1 M 塩化アンモニウムを用いる、請求項 2 9 に記載の方法。

40

【請求項 3 1】

画像センサと、対物レンズと、顕微鏡観察台を照射するための第 1 の電磁放射源と、を含む顕微鏡測定装置であって、前記画像センサが、前記顕微鏡測定装置内の前記画像センサから収集された画像内の物体を識別し、分類するように構成された分離されたコンピュータに有線で、または無線で接続可能である、顕微鏡測定装置。

【請求項 3 2】

前記顕微鏡測定装置が、体液内の粒子または高分子量もしくは低分子量の化学物質を検出するのに使用され、前記体液が、血液、尿、脊髄液、唾液、腹水、及び肺洗浄液を含む

50

がそれに限定されず、単一の測定装置を用いて体外診断試験の完全な範囲を提供する、請求項31に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項33】

前記顕微鏡測定装置が体外診断試験において血液学検査、尿検査、化学検査、免疫学的測定法及び／または凝固検査を実行するように構成された、請求項31または32に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項34】

第1の光学フィルター、第1のミラー及び第1のビームスプリッターの少なくとも1つを含む光学フィルターアセンブリーを含み、前記第1の光学フィルターが、照射する放射、放出する放射または散乱される放射の光特性を改善するように構成され、前記第1のミラー及び／または前記第1のビームスプリッターが、透過及び散乱した電磁放射並びに放出された電磁放射の方向を決定するように構成された、請求項31から33のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

10

【請求項35】

前記光学アセンブリーが、前記対物レンズからの光を垂直平面から水平面に方向を変化させるように構成され、カメラの高さが2cmから15cmの間である、請求項34に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項36】

前記顕微鏡観察台の下に配置された環状光のような光源を含み、前記光源が前面落射照明のために構成された、請求項31から35のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

20

【請求項37】

前記顕微鏡測定装置が、前記対物レンズを通した前面落射照明を提供するように構成された、請求項31から36のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項38】

前記顕微鏡測定装置が、蛍光顕微鏡測定を実行するように構成された、請求項31から37のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項39】

前記顕微鏡測定装置が、透過顕微鏡測定を実行するように構成された、請求項31から38のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

30

【請求項40】

前記顕微鏡測定装置が、光散乱顕微鏡測定を実行するように構成された、請求項31から36のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項41】

複数の電磁放射源を含み、前記顕微鏡測定装置が、前記顕微鏡観察台の物体を異なる電磁放射源で順に照射することによって、前記物体の同一のセットの透過、光散乱及び／または蛍光顕微鏡測定を順に実行するように構成された、請求項31から40のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項42】

前記顕微鏡測定装置が、前記対物系を通る経路の散乱光の経路に垂直方向0°から60°の間の照射を提供するように構成された、請求項31から41のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

40

【請求項43】

前記顕微鏡測定装置が、前記対物系を通る経路の散乱光の経路に垂直方向60°から80°の照射を提供するように構成された、請求項31から41のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項44】

前記顕微鏡測定装置が、前記観察台と前記対物レンズとの間に配置された1つまたは複数のLEDを含み、前記顕微鏡測定装置が、透過光で前記顕微鏡観察台の試料を照射するように構成された、請求項31から43のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項45】

50

前記顕微鏡測定装置が、蛍光励起源の照射時間を20ミリ秒から10秒の間で制御して、前記画像センサが蛍光放射で対象物体を検出するのに十分な蛍光放射照度を達成するように構成された、請求項31から44のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項46】

前記顕微鏡測定装置が、対物系を通る経路の散乱光の経路に垂直方向0°から80°に配置されたLEDの照射時間を、20ミリ秒から10秒の間で制御して、対象物体を検出するのに十分な光散乱を達成するように構成された、請求項31から45のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項47】

前記顕微鏡観察台が、固定され、または可動であり、前記対物レンズの前面に位置する試料チャンバーを保持する一方で、前記電磁放射源によって照射されるように構成された、請求項31から46のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。 10

【請求項48】

前記顕微鏡観察台が可動であり、前記試料チャンバー内の1つから10の観察領域を、対物系を通して見ることができるように構成され、前記観察台が、手動またはモーター制御のいずれかで可動である、請求項47に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項49】

前記顕微鏡観察台が、前記画像センサの撮像表面と物体が乗る表面との間に、前記試料チャンバーを+/-10ミクロンなどの固定された距離で保持するように構成され、それによって画像を得る前に焦点を合わせる必要性を排除した、請求項31から48のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。 20

【請求項50】

前記顕微鏡観察台が、前記顕微鏡測定装置が前記電磁放射源の照射照度を調整し、試料内の物体を分類する際に使用される照度の範囲を検証することができ、作業者が介在することなく、前記顕微鏡測定装置の倍率及び焦点の質的制御が可能となる、固定参照領域を含む、請求項31から49のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項51】

顕微鏡測定装置に使用するための試料チャンバーであって、前記試料チャンバーが、試料を収容するための5から50ミクロン離隔された2つの平坦な表面を有し、前記試料チャンバーが、5から100μLの液体を収容するように構成され、前記試料チャンバーの形状が、前記試料チャンバーを試料で均一かつ再現性を有して満たすことを可能にし、分析を完了する前に前記試料が移動することまたは試料が蒸発することを防ぐ、試料チャンバー。 30

【請求項52】

前記試料チャンバーが、試料を試薬と混合するために使用されるチャンバーを含む、請求項51に記載の試料チャンバー。

【請求項53】

前記試料チャンバーが、5から50μLの試料及び50から500μLの試薬を正確に測定し、次いで前記試料を前記試料チャンバーの観察領域に導入する前に前記試料を前記試薬と混合させるための手段を含む、請求項51または52に記載の試料チャンバー。 40

【請求項54】

前記試料チャンバーが、それぞれ2つの平坦な表面を有する第1の壁及び第2の壁を有し、前記第1の壁及び前記第2の壁の厚さが100ミクロンから4mmの間であり、前記壁の厚さ及び組成が、そうでなければ背景散乱に寄与し得る、前記表面から前記チャンバー内へのスペクトル反射及び光散乱を最小化するように選択された、請求項51から53のいずれか一項に記載の試料チャンバー。

【請求項55】

前記試料チャンバーが、1mm×1mmから最大5mm×5mmの観察領域を有し、100ミクロンから20mmの高さを有する、請求項51から54のいずれか一項に記載の試料チャンバー。 50

【請求項 5 6】

前記試料チャンバーが、試料が60秒から最大24時間で沈殿することができるよう構成され、沈殿した粒子が、前記試料チャンバーの底部に堆積し、前記顕微鏡測定装置によって観察され、識別され、分類されることができる、請求項51から55のいずれか一項に記載の試料チャンバー。

【請求項 5 7】

前記試料チャンバーが、静定時間の間に蒸発が起こらないように、前記試料チャンバーを充填した後に前記試料チャンバーを閉じる閉鎖部を含む、請求項51から56のいずれか一項に記載の試料チャンバー。

【請求項 5 8】

画像センサ、対物レンズ、照射する放射、放出する放射もしくは散乱した放射の光特性を改善し、及び／または透過、散乱された電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意選択的な光学フィルターアセンブリー、オンとオフとに切り替えることができる少なくとも1つの電磁放射源を含む顕微鏡測定装置を用いて免疫学的測定法を行う方法であって、前記顕微鏡測定装置が、画像化ソフトウェアを含み、前記顕微鏡測定装置の前記画像センサから集められた画像内の物体を識別し、分類するように構成された分離されたコンピュータと有線通信または無線通信するように構成され、前記方法が、

a) 水溶液内で1分間に0.1mmから1分間に2mmの早さで堆積する分散された固相粒子に付着された特異的な抗体を用いる段階であって、前記粒子上の前記抗体が、全血中の検体に特異的に結合する、抗体を用いる段階と、

b) 標識された検体を競合的に用いて、または標識されたキャッピング抗体を非競合的に用いて、抗体結合された固体相に付着された検体を検出する段階であって、分散された前記粒子が、観察用チャンバーの底部に沈殿し、前記観察用チャンバーの高さが、前記測定法のための望ましい感度を達成するための洗浄段階が不要となるように前記粒子の十分な濃度を提供するように選択され、前記沈殿した粒子の画像が、第1の電磁放射によって識別され、前記第1の画像の物体の境界または輪郭が決定される、検体を検出する段階と、

c) 第2の電磁放射に露光した後に、前記第1の電磁放射によって画定される前記境界内にある電磁放射の照度を決定する段階と、

d) 第2の電磁放射に露光した後に、前記第1の電磁放射によって画定される前記境界の外側にある電磁放射の照度を決定し、前記第1の電磁放射によって画定された前記境界の外側にある電磁放射の照度を、前記第1の電磁放射によって画定された前記境界内にある電磁放射の照度から差し引き、効果的に背景電磁放射を差し引き、それによって前記第2の電磁放射の照度が、測定される前記検体の濃度を得るために標準曲線と比較される段階と、を含む、方法。

【請求項 5 9】

分散性固体相物体に付着された所望の化学物質のための結合パートナーを用いた所望の化学物質の測定を実施する方法であって、顕微鏡測定装置が画像センサと、対物レンズと、照射する放射、放出する放射もしくは散乱された放射の光特性を改善し、並びに／または透過電磁放射、散乱電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意選択的な光学フィルターアセンブリーと、オンとオフとで切り替えることができる少なくとも1つの電磁放射源と、を含み、前記顕微鏡測定装置が、画像化ソフトウェアを含み、前記顕微鏡測定装置の前記画像センサから集められた画像内の物体を識別し、分類し、前記顕微鏡を視野内の2次元的物体を分類する方法によって動作させるためにソフトウェアを制御するように構成された分離されたコンピュータと有線通信または無線通信するように構成され、

a) 前記視野内の前記物体を、第1の電磁放射源で照射する段階と、

b) 得られた画像を画像センサ上に投影する段階と、

c) 得られた前記視野内の前記物体のデジタル画像を用いて、ImageJソフトウェアを用いて前記デジタル画像内の物体として粒子を識別する段階と、

10

20

30

40

50

d) 物体それぞれの輪郭の座標を用いて、前記物体のデジタル画像内に含まれる領域を、各物体の領域を取り囲んで画定する段階と、

e) 各物体の前記デジタル画像の領域、直径及び平均照度を決定する段階と、

f) 接触する粒子が識別でき、計数でき、適切に分類できるように、前記物体のデジタル画像に関して前記境界から 1 つの画素を差し引くことによって接触する粒子を分離する段階と、

g) 前記輪郭座標を用いて、前記物体の輪郭に隣接するが前記物体の外側にある領域を画定し、前記電磁放射源の背景照度を計算し、この平均背景照度を各物体のデジタル画像の輪郭内に含まれる前記物体の電磁照度から差し引く段階と、

h) 前記物体の輪郭内の領域の電磁照度を用いて、標準曲線を参照することによって光を吸収する物体内の化学物質の濃度を決定する段階と、

i) 第 1 のセットの物体をサブセットにさらに分類するのに必要なだけの前記物体の前記第 1 のデジタル画像の所定の境界内の前記物体についての特有の光学情報を提供するのに必要な数の電磁放射源で、同一の第 1 の物体に順にインタロゲートする段階と、

j) n 個の追加的な第 1 の電磁放射源で同一の視野にインタロゲートする段階であって、各電磁放射源が、前記物体の電磁特性に基づき、前記視野内の物体を一意に識別する電磁特性の点で異なる、同一の視野にインタロゲートする段階と、次いで第 1 の照射源によって識別された境界内に含まれる物体を下位分類するための数だけの追加電磁放射源で前記物体を露光する段階と、

k) 分散された固体相に付着された結合パートナーを用いて、体液内の所望の化学物質を捕捉し、前記所望の化学物質を、第 2 の標識された化学物質の捕捉パートナーを競合的に用いて、または前記所望の化学物質の標識された派生物を非競合的に用いて検出する段階と、

l) 分散された前記粒子が観察用チャンバーの底部に沈殿し、前記観察用チャンバーの高さが、前記測定法のための望ましい感度を達成するための洗浄段階が不要となるように前記粒子の十分な濃度を提供するように選択される段階と、

m) 前記沈殿した粒子の画像が、第 1 の電磁放射によって識別され、前記第 1 の画像の物体の境界または輪郭が決定される段階と、

n) 第 2 の電磁放射への露光後に、前記第 1 の電磁放射によって画定される前記境界内にある電磁放射の照度を決定する段階と、

o) 第 2 の電磁放射の露光後に、前記第 1 の電磁放射によって画定される前記境界の外側にある電磁放射の照度が決定され、前記第 1 の電磁放射によって画定された前記境界内にある電磁放射の照度から差し引かれて決定される段階と、

p) 前記第 2 の電磁放射の照度を標準曲線と比較して、測定される核酸の濃度を得る段階と、によって行われる、方法。

【請求項 6 0】

前記方法が、対象とする比色分析化学反応の着色された生成物の波長に特異的な透過 L E D 光を用いる段階を含み、前記方法が、前記 L E D をオンまたはオフにして、所望の波長の照射を得る、請求項 5 9 に記載の化学的試験を行う方法。

【請求項 6 1】

前記顕微鏡測定装置が、対象とする化学反応に対して特異的な放出電磁放射を用いるように構成された、請求項 3 1 から 5 0 のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【請求項 6 2】

前記顕微鏡測定装置が、可動観察台に乗せられた乾燥化学試験紙を用いて化学分析を行うように構成され、一貫性のある測定値を提供する乾燥反応パッドの領域を計算することによって、検出領域が決定される、請求項 3 1 から 5 0 のいずれか一項に記載の顕微鏡測定装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

本発明は一般に、体液内の粒子及び化学物質の体外での検出に関する。具体的には、本発明は、(1)体液内の粒子を識別し、分類し、計数し、及び/または(2)体液試料内の可溶化学物質の濃度を決定する、システムおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

体外における医学的診断試験は、疾病診断の一助として、体液内の異常を検出するため幅広く使用されている。この試験の多くは、定期的な高額な保守を必要とし、試験を行い解釈し、装置が正確に動作していることを確認する高度な技術を有する作業者を必要とする、複雑な、高度に自動化され、高価な装置を用いて、多数の体液試料を処理する、病院の実験室または標準実験室で行われる。

10

【0003】

実験システムは大きく、高額であるので、これらは家庭内で個人で、またはほとんどの医師の診察室で、または外来診療所もしくは救急医療室で使用することはできない。試料を遠隔の実験設備に送付し、患者の挙動または臨床医の介入及び適時な治療を変更できる、より素早い回答を提供する必要を減ずるために、これらの設定の試験の必要性がある。

【0004】

治療試験のそのような点の必要性に合わせるために、いくつかのシステムが既に開発されている。最も注目すべきであるのは、インスリンの使用を制御し、糖尿病患者の食生活習慣を変化させる一助としての血液グルコースレベルを監視するためのグルコース試験測定の広範な使用である。装置を必要としない乾燥化学試験紙が、尿の異常の検出(検尿)、排泄物試料を用いた腸内出血の検出、及び尿試験紙を用いた妊娠の検出のために使用されている。診断の製造業者は、血液及び尿内の細胞を検出するため、集中実験装置よりも複雑でないいくつかのシステムを開発しているが、これらのシステムは依然として動作に費用が掛かり、複雑であり、そのため血液学の医療装置の真の点の必要性を満たしていない。装置を使用する免疫学的測定法のための医療システムの点では、今まで大きな成功を収めていない。

20

【0005】

注目すべきであるのは、典型的には病院の実験室で行われる幅広い試験を行うことができる単一の装置または技術が存在しないことであり、その理由は、実験用分析機器が、これらの種類の測定が必要とする感度及び精度の必要性の要求を達成するために大きく異なる技術を使用しているためである。使用者が1つの装置を購入するだけで済むようになるため、幅広い試験を行うことができる1つの装置があれば、非常に望ましいこととなる。これは、単に初期投資を低減するだけでなく、多くの異なる装置を操作し、保守する複雑さを低減することになるであろう。

30

【0006】

最近まで、デジタル撮影を使用した医療用顕微鏡の点における設計は、実現困難であった。微小試料のデジタル撮影は、当面は研究実験施設で行われてきた。最近まで、これらのシステムに使用されるセンサは高額であった。また、最近まで、センサは画素数が限られ、顕微鏡のデジタル画像の解像度の品質が低く、小さな視野しか見ることができなかつた。この制限のために、体液の粒子を正確に識別し、分類し、同時に正確な計数統計をもたらす十分大きな体積の観察を行うことが困難であった。また、最近まで、顕微鏡に使用されるセンサのための照射光源も高価であり、保守が難しく、単純な設計で使用することが困難であった。

40

【0007】

過去数十年間に、CMOS及びCCD技術の劇的な進歩がみられ、これらは価格を劇的に低減させ、画像センサの解像度を劇的に改善してきた。透過、散乱、蛍光及びリン光に関して微小試料を照射することを可能にする、電磁照射光源の革命(最も注目すべきはLED技術)があった。これらの技術的優位性により、現在、安価で高品質であり、耐久性があるデジタル微小測定を達成する新しい方法でこれらの構成要素を採用するシステムの設計が可能になっている。照射に対する反応性及び集中実験システムで使用される検出器

50

と同等の感度を有するC M O Sセンサの使用で、病院の実験システムと同様の特性での化学的試験及び免疫学的試験を行うためにC M O Sセンサを使用したデジタル顕微鏡を使用することが可能になっている。

【0008】

既存の病院の実験装置もまた、そのコスト及び複雑さにもかかわらず、欠点を有している。例えば、血液検査及び検尿のために使用される実験用フローサイトメーターにおいて、検出器を通過して流れる粒子は粒子が干渉しないように大きな幅で離隔されており、得られる信号はいずれも背景干渉なく単一の粒子から来るものであるという仮定がなされる。これは、例えば、シスメックス分析機器で分析した尿試料中にアモルファス状結晶が存在する場合に赤血球と白血球とを識別し、分類する際にエラーを引き起こす。流動分析を用いる全ての実験用サイトメーター（フローサイトメーター）は、非常に感度が良く高価な光増倍検出器を使用したとしても、高速で光源を通過する単一の細胞からの信号を検出するために必要な照射照度を達成するために、高価なレーザー光源を使用しなければならない。この手法は照射、照射検出構成要素、及び高額であり、高度に訓練された人による操作及び保守を必要とする複雑な流動制御を必要とする。本発明は、識別、分類及び計数の実際上のこれらの制限の全てを、より低コストで、複雑さを低減しつつ解決する。

10

【0009】

免疫学的測定法は通常、多くの免疫学的測定法によって必要とされる高い感度及び特異性を達成するために多数の反応段階を連係させる複雑な装置を必要とする。典型的には、免疫学的測定法は分離段階を必要とする。この段階は具体的には、低コストな分析機器では実現困難な、複雑な機械的な流体処理動作を必要とする。本発明は、洗浄の必要性を排除し、そのため本発明において説明される検出手法を用いた免疫学的測定法は、コスト及び複雑性が低減される。これは、医療装置の点で望ましい特性である。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示は、視野内の2次元的物体を分類する顕微鏡測定方法、測定装置及び測定装置のための試料チャンバーに関する。さらに、免疫学的測定を行う方法及び所望の化学物質の測定を行う方法が開示される。

30

【0011】

本開示は、体液を用いた血液学検査、化学検査、尿検査及び免疫学的測定に類似した試験を行うための体外診断試験システム及び方法に関する。本発明は、それぞれ分離された顕微鏡測定装置と通信するためのU S BポートまたはB l u e t o o t h接続などの有線または無線接続を有する任意のコンピュータを使用しうる。本発明は、測定装置に内蔵されたコンピュータを使用しうる。

【0012】

コンピュータは、デスクトップコンピュータ程度に複雑なものであっても、i P a d m i n iまたはS a m s u n g G a l a x yなどのタブレット程度に単純なものであってもよい。コンピュータは、使用者が試料を識別し、行う試験を選択し、試験手順を初期化することができるアプリケーションソフトウェアを含む。コンピュータは、高レベルの信号をB l u e t o o t hを使用して無線で、またはU S B接続を通した有線で顕微鏡測定装置に伝送する。代替的に、コンピュータは、測定装置に内蔵されうる。

40

【0013】

視野内において粒子を2次元的物体として分類するための顕微鏡的方法が開示される。この方法は、第1の電磁放射源で視野を照射する段階と、視野の第1のデジタル画像を得るために、画像センサに得られた画像（第1の画像）を投影する段階と、を含みうる。本方法は、第1のデジタル画像を用いて、第1のデジタル画像内の第1の物体を識別する段階と、第1の物体の輪郭の輪郭座標を用いて、第1のデジタル画像内に含まれる第1の物体の領域を画定し、第1の物体の領域の境界線を決定する段階と、続いて第1の物体の1つまたは複数の物体特性を決定する段階と、を含みうる。任意選択的に、本方法は、第1

50

の物体の第1のデジタル画像について、境界から1つの画素を差し引くことにより、接触している粒子を分離する段階を含みうる。本方法は、輪郭座標または輪郭座標の少なくともいくつかを用いて、第1の物体の輪郭に隣接するが第1の物体の外側にある領域を画定し、第1の電磁放射源の背景照度を計算し、例えば第1の物体の電磁照度からこの平均背景照度を差し引くことによって背景照度を補償する段階を含みうる。本方法は、第1の物体(第1の画像)の輪郭内の領域の電磁照度を用いて、標準曲線またはその他の参照曲線を参照することにより、光を吸収する第1の物体内の粒子の特性を決定する段階を含みうる。

【0014】

また、画像センサ、対物レンズ、顕微鏡観察台を照射するための第1の電磁放射源を含む1つまたは複数の電磁放射源、及び/または顕微鏡観察台を照射するための第2の電磁放射源を含む、顕微鏡測定装置が開示される。画像センサは、顕微鏡測定装置内の画像センサから収集された画像内の物体を識別し、分類するように構成された分離されたコンピュータに有線で、または無線で接続される。

10

【0015】

さらに、顕微鏡測定装置に使用するための試料チャンバーが開示され、試料チャンバーが、試料を収容するための5から50ミクロン離隔された2つの平坦な表面を有し、試料チャンバーが、5から100 μL の液体を収容するように構成され、試料チャンバーの形状が、試料チャンバーを試料で均一かつ再現性を有して満たすことを可能にし、分析を完了する前に試料が移動することまたは試料が蒸発することを防ぐ。

20

【0016】

免疫学的測定法を行う方法が開示され、本方法は、画像センサ、対物レンズ、照射する放射、放出する放射もしくは散乱した放射の光特性を改善し、及び/または透過、散乱された電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意選択的な光学フィルターアセンブリー、オンとオフとに切り替えることができる少なくとも1つの電磁放射源を含む顕微鏡測定装置を用い、顕微鏡測定装置が、画像化ソフトウェアを含み、顕微鏡測定装置の画像センサから集められた画像内の物体を識別し、分類するように構成された分離されたコンピュータと有線通信または無線通信するように構成される。本方法は、以下の1つまたは複数の段階を含みうる。

30

a) 水溶液内で1分間に0.1mmから1分間に2mmの早さで堆積する分散された固相粒子に付着された特異的な抗体を用いる段階であって、粒子上の抗体が、全血中の検体に特異的に結合する、抗体を用いる段階。

b) 標識された検体を競合的に用いて、または標識されたキャッピング抗体を非競合的に用いて、抗体結合された固体相に付着された検体を検出する段階であって、分散された粒子が、観察用チャンバーの底部に沈殿し、観察用チャンバーの高さが、測定法のための望ましい感度を達成するための洗浄段階が不要となるように粒子の十分な濃度を提供するように選択され、沈殿した粒子の画像が、第1の電磁放射によって識別され、第1の画像の物体の境界または輪郭が決定される、検体を検出する段階。

c) 第2の電磁放射に露光した後に、第1の電磁放射によって画定される境界内にある電磁放射の照度を決定する段階。

40

d) 第2の電磁放射に露光した後に、第1の電磁放射によって画定される境界の外側にある電磁放射の照度を決定し、第1の電磁放射によって画定された境界の外側にある電磁放射の照度を、第1の電磁放射によって画定された境界内にある電磁放射の照度から差し引き、効果的に背景電磁放射を差し引き、それによって第2の電磁放射の照度が、測定される検体の濃度を得るために標準曲線と比較される段階。

【0017】

さらに、分散性固体相物体に付着された所望の化学物質のための結合パートナーを用いた所望の化学物質の測定を実施する方法が開示され、本方法は、画像センサと、対物レンズと、照射する放射、放出する放射もしくは散乱された放射の光特性を改善し、並びに/または透過電磁放射、散乱電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意

50

選択的な光学フィルターアセンブリーと、オンとオフとで切り替えることができる少なくとも1つの電磁放射源と、を含む顕微鏡測定装置を使用し、顕微鏡測定装置が、画像化ソフトウェアを含み、顕微鏡測定装置の画像センサから集められた画像内の物体を識別し、分類し、顕微鏡を視野内の2次元的物体を分類する方法によって動作させるためにソフトウェアを制御するように構成された分離されたコンピュータと有線通信または無線通信するように構成される。本方法は、以下の1つまたは複数の段階を含む。

- a) 視野内の物体を、第1の電磁放射源で照射する段階。
- b) 得られた画像を画像センサ上に投影する段階。
- c) 得られた視野内の物体のデジタル画像を用いて、ImageJソフトウェアを用いてデジタル画像内の物体として粒子を識別する段階。

10 d) 物体それぞれの輪郭の座標を用いて、物体のデジタル画像内に含まれる領域を、各物体の領域を取り囲んで画定する段階。

- e) 各物体のデジタル画像の領域、直径及び平均照度を決定する段階。
- f) 接触する粒子が識別でき、計数でき、適切に分類できるように、物体のデジタル画像に関して境界から1つまたは複数の画素を差し引くことによって接触する粒子を分離する段階。

g) 輪郭座標を用いて、物体の輪郭に隣接するが物体の外側にある領域を画定し、電磁放射源の背景照度を計算し、この平均背景照度を各物体のデジタル画像の輪郭内に含まれる物体の電磁照度から差し引く段階。

- h) 物体の輪郭内の領域の電磁照度を用いて、標準曲線を参照することによって光を吸収する物体内の化学物質の濃度を決定する段階。

i) 第1のセットの物体をサブセットにさらに分類するのに必要なだけ、物体のデジタル画像の所定の境界内の物体についての特有の光学情報を提供するのに必要な数の電磁放射源で、第1の物体に順にインタロゲートする段階。

- j) n個の追加的な第1の電磁放射源で同一の視野にインタロゲートする段階であって、各電磁放射源が、物体の電磁特性に基づき、視野内の物体を一意に識別する電磁特性の点で異なる、同一の視野にインタロゲートする段階と、次いで第1の照射源によって識別された境界内に含まれる物体を下位分類するための数だけの追加電磁放射源で物体を露光する段階。

k) 分散された固体相に付着された結合パートナーを用いて、体液内の所望の化学物質を捕捉し、所望の化学物質を、第2の標識された化学物質の捕捉パートナーを競合的に用いて、または所望の化学物質の標識された派生物を非競合的に用いて検出する段階。

- l) 分散された粒子が観察用チャンバーの底部に沈殿し、観察用チャンバーの高さが、測定法のための望ましい感度を達成するための洗浄段階が不要となるように粒子の十分な濃度を提供するように選択される段階。

m) 沈殿した粒子の画像が、第1の電磁放射によって識別され、第1の画像の物体の境界または輪郭が決定される段階。

- n) 第2の電磁放射への露光後に、第1の電磁放射によって画定される境界内にある電磁放射の照度を決定する段階。

o) 第2の電磁放射の露光後に、第1の電磁放射によって画定される境界の外側にある電磁放射の照度が決定され、第1の電磁放射によって画定された境界内にある電磁放射の照度から差し引かれて決定される段階。

- p) 第2の電磁放射の照度を標準曲線と比較して、測定される核酸の濃度を得る段階。

【0018】

顕微鏡測定装置は、幅及び高さの点で iPad と類似しているが、厚さは数インチである。しかし、より大きな型が、特定の用途では便利でありうる。装置の設計は概念的に単純であり、製造及び動作が低コストである。

【0019】

顕微鏡測定装置は、顕微鏡検出を用いて、体液中の白血球または赤血球などの粒子を検出する。これを達成するために、本装置は、様々な波長、方向及び特性の照射で試料を順

10

20

30

40

50

に照射するアレイを有する。試料は、電磁照射を吸収し、散乱し、再放出しうる。これは対物レンズで拡大され、C M O S またはC C D センサ上に投影される。センサからのデジタル画像がコンピュータに伝送され、画像処理ソフトウェアが画像内の物体を識別し、分類し、計数する。

【0020】

この発明の独特の特徴は、視野を静止状態に保ちつつ、物体の異なる照射手段を用いて視野の複数の画像を得るという概念である。異なる照射手段を用いて視野の複数の画像を得ることにより、最終的に、物体を正確に識別し、分類することが可能になる。

【0021】

この発明の別の特徴は、1つの電磁放射源を使用した第1のデジタル画像が、この画像内のそれぞれの物体の1つの照射特性に基づいて物体の座標及び境界を識別するのに使用され、次いで異なる電磁照射を用いて1つまたは複数の追加的な画像を取得するということである。各画像を第1の画像に登録する手段を有することにより、各デジタル画像の特性が、第1の物体の特性であると確認することが可能になる。単一の画像に基づいた通常の顕微鏡測定では、背景信号が物体に属するものとして誤って認識される可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】試料チャンバーの底部へ沈殿した試料内の物体を、第1の電磁放射及び続いて第2の電磁放射で照射することによって生成されたデジタル画像の例を示す。

【図2】画像処理アプリケーションおよびユーザーインターフェースソフトウェアを含むコンピュータと共に使用される顕微鏡測定装置の構成を示す。

【図3】顕微鏡測定装置の構成要素の概略図を示す。

【図4】試料チャンバーの側面図及び上面図の概略を示す。

【図5】コンピュータ上のソフトウェアアプリケーション及び顕微鏡測定装置上のファームウェアアプリケーションの例示的な段階並びにソフトウェアアプリケーションおよびファームウェアアプリケーションが共同して処理を行う例示的な段階を示す。

【図6】血液試料を処理するために作業者が行いうる段階を示す。

【図7】本発明を用いる免疫学的測定アプリケーションを示す。

【図8】網状赤血球アプリケーションのための画像処理段階を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の以下の説明において、本発明の一部を成す図面の説明を参照し、図面には、例として、本発明の原理及びどのように実施されうるかを示す例示的な実施形態が示される。その他の実施形態も、本発明を実施するために利用されてもよく、構造的変更及び機能的変更も、本発明の範囲から逸脱しない範囲でなされうることは理解されるべきである。さらに、図に関して説明された特徴は、必ずしも図に開示された特徴の特定の組み合わせに限定されるものではない。

【0024】

本発明は、第1の物体を第1のサブセットにさらに分類するのに必要なだけの、第1の物体の第1のデジタル画像の所定の境界内の第1の物体についての特有の光学情報を得るために、必要な数の、例えば、少なくとも2つ、3つまたはそれ以上の電磁放射源で順にインタロゲートする段階を含みうる。

【0025】

本方法は、視野の第2のデジタル画像を得るために視野を第2の電磁放射源でインタロゲートする段階を含んでもよく、第2の電磁放射源は、第2の物体の電磁特性に基づいて視野内の第2の物体を特異的に識別する何らかの電磁特性の点で第1の電磁放射とは異なる。次いで、本方法は、第1の電磁放射源によって識別された境界内に含まれる物体を下位分類するために、第2の物体を第2のサブセットにさらに分類するのに必要なだけ、第2のデジタル画像の第2の物体についての特有の光学情報を得るために必要な数の追加的な電磁放射源で第2の物体を露光する段階を含みうる。

10

20

30

40

50

【0026】

電磁放射源は、100nmから2000nmの範囲から選択された波長の光を放射するように構成され、または放射しうる。光は、紫外線スペクトル、可視光スペクトル、及び／または赤外線スペクトルの部分を含んでもよい。

【0027】

電磁放射源は、100nmから000nmの範囲から選択された波長の光を放射するように構成され、または放射しうる。光は、自然に存在する蛍光色素分子及び／または人工的に導入された蛍光色素分子の蛍光励起を発生させうる。励起された蛍光色素分子によって放出された光は、対応する物体を分類するための画像を生成するために使用されてもよい。

10

【0028】

電磁放射源は、100nmから2000nmの範囲から選択された波長の光を放射するように構成され、または放射しうる。光は、吸収性物質または粒子を含む対応する画像が、低い照度で検出された電磁放射を有するように、物体内の化学物質または粒子によって吸収されてもよい。

【0029】

本方法は、試料を異なる角度で横切る電磁放射源を用いて、視野内の物体の異なる照度の電磁放射散乱を発生させる段階を含んでもよい。

【0030】

顕微鏡の対物レンズが、第1の電磁放射源について第1の角度及び／または第2の電磁放射源について第2の角度などの異なる角度で散乱された光を捉えるように、本方法は、検出センサ領域に垂直方向0から80°で、視野内の物体と交差する、例えば第1の電磁放射源及び／または第2の電磁放射源などの1つまたは複数の電磁放射源を用いる段階を含んでもよい。第1及び第2の角度は、異なるものであってもよい。

20

【0031】

本方法は、同一または第1の偏光特性を有する第1の電磁放射源及び第2の偏光特性を有する第2の電磁放射源などの異なる偏光特性を有する電磁放射源を使用する段階を含んでもよい。

【0032】

本方法は、自然に存在する蛍光色素分子及び／または人工的に導入された蛍光色素分子の蛍光を誘導する電磁放射源を使用する段階を含んでもよい。

30

【0033】

本方法は、血液などの動物または人間の体液からの赤血球の画像を生成するために、ヘモグロビンのソーレー帯からの透過光源を使用する段階を含んでもよい。本方法は、これらの画像を使用して、赤血球の面積、直径及び体積、並びに／または赤血球内のヘモグロビンの濃度などの粒子の特性を計算する段階を含んでもよい。網状赤血球は、網状赤血球のレチクリンに付着した核酸結合蛍光色素分子などの蛍光色素分子を励起することによって全ての赤血球の中から識別されうる。本方法は、蛍光発光を有するこれらの赤血球を識別する段階を含んでもよい。

【0034】

本方法は、血液などの動物または人間の体液からの白血球を蛍光色素分子で処理する段階を含んでもよい。本方法は、例えば励起光源を用いることによって、白血球を検出する段階を含んでもよい。放出された光は、検出センサ上に投影されて、蛍光発光する白血球のデジタル画像を形成してもよい。本方法は、動物及び／または人間の血液から白血球を検出するために、核酸結合蛍光色素分子を使用してもよい。核酸結合蛍光色素分子は、アクリジニウムエステル、チアゾールオレンジ及びエチジウムプロマイドの群から選択される。

40

【0035】

本方法は、例えば、2次元的蛍光画像に対応する物体の直径、蛍光発光物質の濃度及び体積の1つまたは複数の、物体の特性を計算する段階を含んでもよい。本方法は、白血球

50

をリンパ球、顆粒球及び単球に分類するために、例えば物体の直径、蛍光発光物質の濃度、及び／または体積などの1つまたは複数の特性を用いる段階を含んでもよい。

【0036】

本方法は、白血球内の異なる物質を検出できるように、異なる蛍光化学種を検出するための2つもしくはそれ以上の蛍光励起起源または2つもしくはそれ以上の蛍光発光検出波長を使用する段階を含んでもよい。本方法は、白血球のサブセットをさらに分類するために、蛍光の照度及び量を使用する段階を含んでもよい。

【0037】

本方法は、例えば、顆粒のない細胞質が光を全く散乱しないか、非常に低い照度でしか光を散乱しない一方で、白血球内の細胞質顆粒は強く光を散乱するように、センサの垂直方向60から90°の間の角度で顆粒球を照射する、300nmから800nmの可視光を使用する段階を含んでもよい。

10

【0038】

本方法において、血液などの人間または動物の体液からの白血球は、最初に蛍光（第1の画像）を用いて識別され、次いで、散乱光が無視できる画像（第2の画像）としてリンパ球及び単球を識別してもよい。

【0039】

本方法は、CMOSまたはCCDセンサなどの1から50メガピクセルの画像センサを用いる段階を含んでもよい。

20

【0040】

電磁放射源は、電子的なスイッチでオン及びオフに切り替えられて、同一の視野を、視野を画像化するための電磁放射源に関する空間の制約及び時間的な制約によってのみ制限される、2つから10の異なる電磁放射源で順にインターロゲートする能力を提供してもよい。

【0041】

本方法は、対称粒子の液体分散を含み、統計的に有意な数の粒子を計数することができる、使い捨て可能な、または再使用可能な観察用または試料チャンバーを有する段階を含んでもよい。観察用または試料チャンバーは、50ミクロンから10mmの間の厚さを有してもよい。

30

【0042】

本方法は、検出用CMOSまたはCCDセンサの間に対物レンズを配置する段階を含んでもよく、対物レンズは物体の寸法を決定するのに十分な倍率を提供するが、さらに視野内の物体を統計的に有意に計数することを可能にする十分な視野を有する。対物レンズは、2倍から15倍の間の倍率を有してもよい。

【0043】

本方法は、赤血球の分離及び／または溶解を行うことなく、赤血球を識別するための赤血球のソーレー帯及び白血球を検出するための核酸結合蛍光色素分子の蛍光を用いて、体液内の赤血球と白血球の両方を検出する段階を含んでもよい。

【0044】

本方法は、赤血球を両面陥凹円盤形状から均一な球体に変換するN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネートなどの、しかしそれに限定されない球状化試薬を使用してもよい。球状化試薬は、白血球の形態または散乱特性には影響を与えないものであってよい。

40

【0045】

本方法は、赤血球の本来の両面陥凹円盤形状を維持する試薬を使用してもよい。

【0046】

本方法は、白血球の形態または光散乱特性に影響を与えずに、30秒から10分以内に赤血球を選択的に溶解する段階を含んでもよい。

【0047】

本方法は、球状化試薬を用いて、または用いずに、赤血球溶解試薬として、pH8.0

50

の 0 . 1 M 塩化アンモニウムなどの、塩化アンモニウムを使用してもよい。

【 0 0 4 8 】

顕微鏡測定装置は、体液内の粒子または高分子量もしくは低分子量化学物質を検出するために使用されてもよい。体液は、血液、尿、脊髄液、唾液、腹水、肺洗浄液を含んでもよいがそれに限定されず、単一の測定装置を使用して体外診断試験の完全な範囲を提供する。

【 0 0 4 9 】

顕微鏡測定装置は、体外診断試験における、血液検査、尿検査、化学検査、免疫測定法及び／または凝固検査の 1 つまたは複数を実行するように構成されてもよい。

【 0 0 5 0 】

顕微鏡測定装置は、少なくとも 1 つの第 1 の光学フィルター、第 1 のミラー及び第 1 のビームスプリッターを含む光学フィルターアセンブリーを含んでもよく、第 1 の光学フィルターは、照射する放射、放出する放射または散乱される放射の光特性を改善するように構成され、第 1 のミラー及び／または第 1 のビームスプリッターは、透過された電磁放射、散乱された電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するように構成される。

【 0 0 5 1 】

光学アセンブリーは、カメラの高さが 2 cm から 15 cm の間になるように、対物レンズからの光を、垂直平面から水平面に方向を変更するように構成されてもよい。

【 0 0 5 2 】

顕微鏡測定装置は、顕微鏡観察台の下に配置された環状光のような光源を含んでもよい。光源は、前面落射照明のために構成されてもよい。

【 0 0 5 3 】

顕微鏡測定装置は、対物レンズを通して前面落射照明を提供するように構成されてもよい。

【 0 0 5 4 】

顕微鏡測定装置は、蛍光顕微鏡測定を実行するように構成されてもよい。顕微鏡測定装置は、透過顕微鏡測定を実行するように構成されてもよい。顕微鏡測定装置は、光散乱顕微鏡測定を実行するように構成されてもよい。

【 0 0 5 5 】

顕微鏡測定装置は、複数の電磁放射源を含んでもよい。顕微鏡測定装置は、顕微鏡観察台の物体を異なる電磁放射源で順に照射することによって、同一のセットの物体の透過、光散乱及び／または蛍光顕微鏡測定を順に実行するように構成されてもよい。

【 0 0 5 6 】

顕微鏡測定装置は、例えば第 1 の電磁放射源での対物レンズを通る経路の散乱光の経路の垂直方向 0 ° から 60 ° の間の照射を提供するように構成されてもよい。

【 0 0 5 7 】

顕微鏡測定装置は、例えば第 1 の電磁放射源及び／または第 2 の電磁放射源での対物レンズを通る経路の散乱光の経路の垂直方向 60 ° から 80 ° の照射を提供するように構成されてもよい。

【 0 0 5 8 】

顕微鏡測定装置は、観察台と対物レンズとの間に配置された 1 つまたは複数の LED (発光ダイオード) を含んでもよい。顕微鏡測定装置は、顕微鏡観察台の試料を透過光で照射するように構成されてもよい。顕微鏡測定装置は、例えば、画像センサが対象物体を蛍光放射で検出するためには十分な蛍光放射照度を達成するために、20 ミリ秒から 10 秒の間で蛍光励起源の照射時間を制御するように構成されてもよい。

【 0 0 5 9 】

顕微鏡測定装置は、例えば対象物体を検出するのに十分な光散乱を達成するために、20 ミリ秒から 10 秒の間で、対物レンズを通る経路の散乱光の経路に対して垂直方向 0 から 80 ° に配置された LED の照射時間を制御するように構成されてもよい。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

顕微鏡測定装置は、対象の化学反応に特有の放出される電磁放射を使用するように構成されてもよい。

【0061】

顕微鏡測定装置は、可動観察台に乗せられた乾燥化学試験紙を用いて化学分析を行うように構成されてもよく、一貫性のある測定値を提供する乾燥反応パッドの領域を計算することによって検出領域が決定される。

【0062】

顕微鏡観察台は、固定されまたは可動であってもよく、電磁放射源によって照射される間、試料チャンバーを対物レンズの前方に位置するように保持するため構成されてもよい。顕微鏡観察台は可動であってもよく、試料チャンバー内の1つから10の観察領域を対物レンズを通して観察することを可能にするように構成されてもよい。観察台は、手動で及び／またはモーター制御下で可動であってもよい。顕微鏡観察台は、例えば画像を得る前に焦点を合わせる必要がないように、画像センサの撮像表面と物体が乗る表面との間に、試料チャンバーを+/-10ミクロンなどの固定された距離で保持するように構成されてもよい。

10

【0063】

顕微鏡観察台は、顕微鏡測定装置が電磁放射源の照明照度を調整し、及び／または試料内の物体を分類するのに使用される照度の範囲を検証することを可能にする、固定参照領域を含んでもよい。固定参照領域は、作業者が介在せずに顕微鏡測定装置の倍率及び焦点の質的制御が可能となるものであってよい。

20

【0064】

試料チャンバーは、試料を試薬と混合するために使用されるチャンバーを含んでもよい。試料チャンバーは、試料を試料チャンバーの観察領域に導入する前に、例えば5から50μLの試料及び例えば50から500μLの試薬を正確に測定し、次いで、試料を試薬と混合させるための手段を含んでもよい。

【0065】

試料チャンバーは、それぞれ2つの平坦な表面を有する第1の壁及び第2の壁を有してもよい。第1の壁及び／または第2の壁は、厚さが100ミクロンから4mmの間であってよい。それぞれの壁の厚さ及び／または組成は、そうでなければ背景散乱に寄与し得る、表面からチャンバー内へのスペクトル反射及び／または光散乱を最小化し、または低減するように選択される。試料チャンバーは、1mm×1mmから最大5mm×5mmの観察領域を有してもよい。試料チャンバーは、100ミクロンから20mmの高さを有してもよい。試料チャンバーは、試料が60秒から最大24時間で沈殿することができるよう構成されてもよく、例えば、沈殿する粒子は、試料チャンバーの底部に堆積し、顕微鏡測定装置によって観察され、識別され、分類されることができる。

30

【0066】

試料チャンバーは、例えば静定時間の間に蒸発が低減されるように、または蒸発が全く発生しないように、試料チャンバーを充填した後に試料チャンバーを閉じるための閉鎖部を含んでもよい。

40

【0067】

本発明は、図1、2、3、4、5及び6に示され、以下の説明で記載された要素の1つまたは複数を含むシステムに具現化されうる。

【0068】

図1は、粒子または物体2を含む試料チャンバー3を照射する、照射源1を示している。顕微鏡測定装置12(図2)は、照射源1をオンに切り替える。照射源1は、試料チャンバー3を照射し、照射源1からの照射は、試料チャンバー3内の粒子または物体2によって吸収される。その結果、照射は試料チャンバーを通過して試料チャンバー下部に位置する2次元CMOSまたはCCDセンサ4に落射する。CMOSまたはCCDセンサは、白黒であっても、またはカラーであってもよい。センサは、照射源1に対して感度がなければならない。図示の目的のために、図1の照射源1は、試料チャンバー及びセンサの平

50

坦面に対して垂直であり、そのため透過される放射を図示している。照射源 1 は、透過照射に限定される必要はない。

【 0 0 6 9 】

顕微鏡測定装置（図 2 に示される 12）からのファームウェアの制御下で、顕微鏡装置（図 2 に示される 12）は、透過照射のデジタル画像 5 を取得する。この例示において、試料チャンバー 3 内の粒子または物体 2 は照射源 1 からの照射を吸収し、デジタル画像 5 は、本質的に白い背景に暗い物体 6（照射の吸収の程度に応じた陰影）を有する。デジタル画像 5 は、顕微鏡装置のファームウェアメモリに保存され、その後、さらなる画像処理、結果の計算及び装置使用者への報告のためにコンピュータ 10（図 2）に伝送される。

【 0 0 7 0 】

第 1 の画像 5 が取得され、保存された後、顕微鏡測定装置 12（図 2）は、試料チャンバー 3 を同じ位置に保ちつつ、照射源 1 をオフに切り替え、照射源 7 をオンに切り替える。照射源 7 は、照射源 1 とは何らかの点（波長、試料に対する位置、コリメーションの程度または偏光の程度などの照射源の品質）で異なる。

【 0 0 7 1 】

示された図において、照射源 7 は、放射の散乱を引き起こす照射源である。照射源 7 により、試料チャンバー 3 内の物体または粒子 2 がセンサ 4 に対して放射を散乱する場合、散乱された放射はセンサ 4 の上に投影され、デジタル画像 8 内で本質的に黒い背景上で白い領域 9（散乱された放射の照度に応じた白色陰影の照度）として観察される。図 1 は、試料チャンバー内の中の物体の 1 つが光を吸収してデジタル画像 6 上に暗い点を発生させるが放射を散乱させず、そのためセンサに放射を散乱させず、デジタル画像 8 内に白い領域を発生させない場合を示している。この粒子は他の 2 つの粒子とはこの 1 つの特性の点で異なり、この違いに基づいて、異なる種類に正確に分類可能である。

【 0 0 7 2 】

図 1 は本発明の単なる 1 つのありうる実施形態であることは理解されるべきである。第 1 の照射源 1 または第 2 の照射源 7 は、完全に、均一に試料チャンバーを照射することができることのみによって制約される、試料チャンバーを取り囲む任意の角度または位置からであってもよい。具体的には、照射源は、試料チャンバー及びチャンバー内の物体を、10°（試料チャンバーの表面に対してほとんど平行）から試料チャンバーの表面の垂直方向 80° までの角度で照明してもよい。本発明の 1 つの実施形態において、660 nm の LED が、センサに対して平行な観察用チャンバーの表面に対して垂直方向 20 から 60° の間で観察用チャンバー内の物体を照射するために配置され、全血中の顆粒球が、単球またはリンパ球よりも強く光を散乱させ、異なる粒子の種類であるとして顆粒球を明確に分類可能にする。

【 0 0 7 3 】

照射源 1 及び 2 は、100 nm から 2000 nm の範囲の波長であってよい。照射源 1 及び 2 は、様々な角度にコリメートされもしくはコリメートされなくてもよく、または放射の品質は、光を偏光することなど何らかの方法で改善されてもよい。放射源は、センサ 4 上に投影される放射を放出する粒子または粒子の特定の部分の中に保持される蛍光色素分子またはリン光発光分子を励起してもよい。本発明は、粒子の種類の識別及び分類を可能にする特異的な特性を有する対応するデジタル画像を得るために順にオン及びオフに切り替えられうる照射源の数には制限されない。

【 0 0 7 4 】

本発明の特徴は、試料チャンバー及び試料チャンバー内の物体を異なる照射源で順に照射すること及び対応するデジタル画像を処理することである。順次に可能な照射源の数および対応する画像は、図 1 の具体的な例によっては制限されない。1 から 10 の順次照射が、空間及びコストの制限のみに制約されて使用されてもよい。

【 0 0 7 5 】

本発明の別の特徴は、試料チャンバー及び試料チャンバー内の物体を、安定した動作条件に達する短い持続時間を必要とする照射源を単にオンまたはオフに切り替えることによ

10

20

30

40

50

って、異なる照射特性（例えば波長、変更、コリメーション、照射角度などだがそれに限
定されない）を有する異なる照射源で照射する能力である。照射源は、この装置で実際的
である1ミリ秒から1000ミリ秒で、安定な動作条件に到達できるべきである。発光ダイ
オードは、安定な動作条件に到達するのにかなりの時間を必要とし得るキセノンまたは
タンゲステンランプなどの照射源と対照的に、この利点を提供する照射源の具体的な例で
ある。

【0076】

本発明の別の重要な特徴は、観察用チャンバー内の物体または粒子を検出するために第
1の照射源1を使用し、物体の座標、領域及び境界または輪郭を決定するために第1のデ
ジタル画像5を使用することである。第1の照射源1は、フリーウェアとしてNational
Institutes of Health社から利用可能なImageJソフトウェアなどの市販の画像処理ツールを
使用できるように、物体2の十分なコントラストを提供しなければならない。デジタル画像処理の技術分野における当業者に知られたその
ようなソフトウェアおよび同等な市販製品は、5のようなデジタル画像を、画像内の粒子
または物体の検出、計数、面積、直径、形状及び照射照度を可能にする二値画像に変換す
るアルゴリズムを含む。大きさ、照度または形状の閾値は、典型的には顕微鏡測定装置の
メモリ内に保存された所定の基準に合致するデジタル画像内の粒子及び物体を識別し、計
数するために使用される。

【0077】

照射源7からの物体の照射は、第2のデジタル画像内の各物体の物体座標を画定するた
めに使用される、デジタル画像8のようなデジタル画像を生成することとなる。デジタル
画像5内の物体の座標は、第2のデジタル画像8内の物体の座標と比較される。どの距離
だけ座標が離れている場合に物体が同一であると依然として考えることができるかについ
ての、顕微鏡測定装置ファームウェア内に埋め込まれた規則を使用して、画像処理ソフト
ウェアは第2のデジタル画像8内の物体を第1のデジタル画像5内の画像と照合する。合
致するものがあれば、デジタル画像8内の物体に関する照射特性は、合致する座標を有する
デジタル画像5内の対応する物体によるものである。この手法は、干渉（例えば、非特
異的な散乱もしくは蛍光、または、デジタル画像5内の物体に関して課せられた閾値限界の外側
の効果を有する一方で、照射源7に明確な効果を有する粒子に起因する散乱もしくは蛍光）に起因し得る照射特性を、要因であるとする危険性を低減する。

【0078】

2つの異なる画像内の粒子の座標を照合した後、より正確な照射照度の推定を提供する
ために、デジタル画像5及び8内の物体の境界の外側の照射照度が平均され、物体の境界
内の照射照度から背景として差し引かれてもよい。代替的に、信頼性を有するために、物
体の境界の周囲に2から10画素の境界層を選択し、物体の照射照度に対する背景修正を行
うのに使用してもよい。

【0079】

本発明の他の重要な特徴は、試料チャンバーの照射の持続時間を制御する、図2の顕微
鏡測定装置12の能力である。透過照射の場合、センサ4、試料チャンバー3及び試料チ
ャンバー内の物体2の露光時間は、照射源の照度及びセンサの感度に応じて1から200
ミリ秒の間で変化させてもよい。物体からの光を散乱させ、または物体の蛍光もしくはリ
ン光を発生させる照射源に関して、センサ4、試料チャンバー3及び試料チャンバー内の
物体2の露光時間は、照射源の照度及びセンサの感度に応じて100ミリ秒から10秒の
間で変化してもよい。

【0080】

図2は、システムの主要な構成要素を示している。アプリケーションソフトウェアは、
顕微鏡装置12と通信するためにユニバーサルシリアルバス(USB)ポートまたはBluetooth接続能
力のいずれかを有する任意の装置であることができる、コンピューティング装置10上に存在する。

【0081】

10

20

30

40

50

コンピューティング装置は、デスクトップパソコンコンピュータ、モバイルコンピュータ、タブレット（i Pad mini または Samsung Galaxy など）であってもよい。コンピュータ10と顕微鏡測定装置12との間のBluetooth通信は、無線通信のシンボル11と共に図内に示されている。顕微鏡測定装置の構成要素は図3により詳細に示されている。体液試料は、1つまたは複数の試薬14とともに集められ、混合されて、照射及び画像取得のために顕微鏡測定装置12内に挿入される試料チャンバー13内に移送される。

【0082】

図3は、構成要素が顕微鏡測定装置内にどのように配置されるかを示す本発明の例示的な実施形態の概略図である。この図に示された構成要素のその他の構成またはこれらに追加されるその他の構成要素は、本発明の範囲を逸脱しない範囲で表される。

10

【0083】

試料チャンバー16上に配置された照射源15（図4にも詳細に示されている）は、照射がこの図において試料チャンバー16の平面に対して垂直方向かつセンサ26の平面に対して平行に向けられている場合には、ビームの透過顕微鏡測定のための照射を提供する。照射源15はまた、試料チャンバー16に垂直な平面の0から90°の角度で試料チャンバー16を照射する能力を有するライトのアレイであってもよい。この軸外照射は、試料チャンバー16内の粒子による照射源15からの照射の前方散乱を発生させうる。

【0084】

試料チャンバー16は、顕微鏡観察台17によって適切な位置に保持される。顕微鏡観察台17の平面及び試料チャンバー16は、水平である。顕微鏡観察台17は固定されてもよい。顕微鏡観察台17は、試料チャンバー16の様々な部分を照射し、顕微鏡撮像をするための位置決めを、手動でまたはモーターによる制御下で移動してもよい。

20

【0085】

観察台の下には、照射源18のステージ下部アレイがある。この照射アレイの1つの構成は、異なる波長で光を放出するLEDライトのリングである。このアレイは、試料チャンバー16の底面及び試料チャンバー16の底面に沈殿する粒子を照射する。本発明のいくつかの実施形態において、このアレイ18は、試料チャンバー16内の粒子に対してほぼ直角であるLED照射を提供するが、試料チャンバー16の底面から10から約80°までの照射を提供してもよい。1つの実施形態において、このアレイは、（1）対物レンズ19によって集められセンサ26上に投影される光の散乱を引き起こす、試料チャンバー16内の粒子の660nmのLED照射を提供し、（2）次の段階で、450nmから500nmのLED光で試料チャンバー内の物体を照射し、650nmのより長い波長の蛍光を発生させる粒子内の蛍光色素分子を励起させ、この放出された光は、顕微鏡の対物レンズ19によって集められ、センサ26上に投影される。

30

【0086】

顕微鏡の対物レンズ19は、試料チャンバー16、顕微鏡観察台17及び照射源のステージ下部アレイ18の下に配置される。顕微鏡の対物レンズ19は、顕微鏡観察台17、試料チャンバー16及び照射源のステージ下部アレイ18の平面に対して垂直に配置される。対物レンズは、5倍から20倍の対物系であることができる。対物レンズは、粒子からの照射特性を正確に決定する分解能及び能力を犠牲にすることなく、試料チャンバー16の単一の視野内で粒子の最大数を観察できるように選択される。試料チャンバー内の粒子がCMOSまたはCCDセンサ26上に5倍に拡大されるように配置された10倍の対物レンズは、これらの多数の実施形態に関して、良い選択である。本発明の1つの実施形態に関して、ニコンの10倍の対物レンズ（MRL00102 CF1 Plan Ac hro 10X NA 0.25 WD 10.5mm）が使用された。10倍の対物レンズ19は、5.1倍の倍率で、粒子をセンサ上に投影し、試料チャンバーが適切な位置にしっかりと保持されている場合には装置の焦点調節が不要となるように、約10から50ミクロンの被写界深度が可能である。

40

【0087】

50

対物レンズ 19 を顕微鏡観察台 17 及び試料チャンバー 16 の下に配置することは、倒立顕微鏡として当業者に知られている。照射源が、背景干渉をこの構成において最小にすることが多いいため、この構成は本発明に好適である。倒立型の構成において、照射は試料照射前に粒子のない試料または試料チャンバー 16 の複数の面を通過する必要がない。同様に、物体から散乱されまたは放出された散乱は、対物レンズ 19 によって集められる前に、粒子のない溶液または試料チャンバー 19 の多数の面を通過しない。

【 0 0 8 8 】

本発明の 1 つの実施形態において、直角ミラー 20 が、対物レンズ 19 からの光を垂直面から水平面に、光学フィルター 27 を通してセンサ 26 まで導く。このミラーの目的は、顕微鏡測定装置全体の高さを、2 から 3 インチ未満にして、容易に平坦なテーブル上に置くことができるようになる。本発明はまた、直角ミラー 20 を用いず、対物レンズ 19 の直下で光学フィルター 27 及びセンサ 26 を用いて作ることも可能である。

10

【 0 0 8 9 】

図示されたものの代替的な構成要素の配置は、垂直面内の対物レンズからの光を水平面内のセンサ 26 上に方向を変えるビームスプリッターを有する直角ミラー 20 と置き換えることである。この構成において、ビームスプリッターの下に照射源を配置し、この照射源からの照射を対物レンズ 19 を通して試料チャンバー 16 内の粒子に導くことも可能になる。この構成は、光を粒子上に集束し、粒子上の液体にはそれほど集束させず、粒子上の照射を最大化し、その周りの液体内の潜在的に干渉を引き起こす材料への照射を最小化するという利点を有する。この構成は、対物レンズを通して向けられた照射源を使用して蛍光励起を引き起こす場合に有用である。この構成において、必要であれば、照射源とビームスプリッターとの間にさらにフィルターを追加し、または照射を調整することが可能である。

20

【 0 0 9 0 】

図 3 は、直角ミラー 20 (またはビームスプリッター) とセンサ 26 との間に配置された照射フィルター 27 を示している。照射フィルター 27 の目的は、特定の波長の照射がセンサ 26 に到達するのを妨げることである。

30

【 0 0 9 1 】

センサ 26 は、画素の 2 次元アレイである。初期の実施形態では 0.5 メガピクセル程度の小さなものから、20 メガピクセルまたはそれよりも大きな最大の市販センサまであってもよい。コストの制限内で可能な最大のセンサが最適である。より大きなセンサは、より良好な解像度を提供し、またはより小さなセンサと同じ解像度で試料のより大きな領域を観察することができる。センサはカラーセンサであっても、白黒型センサであってもよい。照射源の波長の選択は色情報を提供し、はるかに制御された方法でこれを行うことができるため、ほとんどの用途に関して、白黒型センサが好適な実施形態である。さらに、全ての画素が与えられた波長で撮像のために利用可能であるので、白黒型センサを使用することにより、より良好な解像度が得られる。

30

【 0 0 9 2 】

図 3 の顕微鏡測定装置は、Bluetooth カード 25 または Bluetooth ドングルを使用して無線でコンピュータ 10 (図 2) と通信することができる。顕微鏡測定装置はまた、ユニバーサルシリアルバス (USB) 24 を用いて、コンピュータ 10 と通信し、及び / またはコンピュータ 10 から電力を受け取ってもよい。顕微鏡測定装置はまた、電池 23 によって電力供給を受けてもよい。コンピュータは、測定装置内に任意選択的に埋め込まれてもよい。

40

【 0 0 9 3 】

顕微鏡測定装置は、センサ 25 から取得された画像並びに照射源、通信、電力、センサ及びその他任意の電力を要する装置を制御するために必要な情報及びファームウェアアプリケーションを保存するためのメモリ 23 を有する少なくとも 1 つの印刷回路基板を有する。印刷回路基板はまた、照射源、通信、電力、センサ及びその他任意の電力を要する装置を制御する顕微鏡測定装置特有のファームウェアアプリケーションを動作させるマイク

50

ロプロセッサ 22 も含む。

【0094】

図 4 は、試料チャンバーの 1 つの実施形態である。図 4 の上側の概略図は試料チャンバーの側面図である。下側の概略図は、試料チャンバーの上面図である。試料チャンバーは、使い捨てまたは再利用可能であってもよい。

【0095】

試料チャンバーは、液体試料を収容する中空試料ウェル 29 を形成するためにスペーサー 32 によって離隔された上側光学表面 30 及び下側光学表面 33 を有する。試料は、排出ポート 31 を通して空気を逃がしつつ、導入ポート 28 を通して試料チャンバー内に導入される。

10

【0096】

上側光学表面 30 及び下側光学表面 33 は、光学グレードのアクリル、ガラスまたは同等の光学品質を有する任意の材料からなるものであってよい。どちらの部品も平坦であってよく、試料を含むチャンバー 26 に向く表面は試料チャンバーの体積を決定し、そのため粒子または可溶化学物質の濃度の計算に影響を与えることとなるため、表面は理想的には一方の端面または側面から他方まで + / - 5 ミクロンを超える変化があるべきでない。また、試料を含む中空ウェル 26 の底部にある全ての粒子が対物レンズの焦点面にあるように、これらの許容範囲に合致することが重要である。

【0097】

スペーサー 32 は、用途に応じて、上側光学表面 30 と下側光学表面 33 とを 50 ミクロンから最大 10 mm だけ離隔する。スペーサーは個別の材料（例えば、2 つの棒状の接着テープ）または上側光学表面 30 もしくは下側光学表面 33 のいずれかのモールドされた特徴体であってもよい。スペーサー 32 、上側光学表面 30 及び下側光学表面 33 は、液体が試料ウェル 29 から漏洩しないように、一体に接合される。いずれの場合においても、好適には試料ウェルの高さが + / - 5 ミクロンであることを確保する一定の厚さまたは所定の用途について適切な、信頼性のある体積決定を補償する一定の厚さであるべきである。

20

【0098】

図 5 は、コンピュータ 10 上のソフトウェアアプリケーション（図 5 の左側の「ユーザーインターフェースコンピュータアプリケーション」）及び顕微鏡測定装置 12 上のファームウェアアプリケーション（図 5 の右側の「顕微鏡測定装置ファームウェア」）の 1 つの可能な実施形態である。矢印は、試料の処理においてコンピュータ 10 と顕微鏡測定装置 12 との間に発生しうる通信を示している。

30

【0099】

ユーザーインターフェースコンピューターアプリケーションは、
 ・作業者がオプションを選択して試料の処理を開始し、
 ・処理開始信号がコンピュータから顕微鏡に送信され、
 ・この信号が処理されるべき試料の種類についての情報を含む、
 段階 52 を含む。

【0100】

40

顕微鏡装置ファームウェアは、

- ・電源をオンに切り替え、
 - ・暗電流が調整され、
 - ・LED 照度が調整され、
 - ・コンピュータに処理準備ができたことの信号を送信し、
 - ・照射の種類及び持続時間を決定するために使用される試料特有の情報が顕微鏡内に保存される、
- 段階 54 に進行する。

【0101】

50

ユーザーインターフェースコンピューターアプリケーションは、

- 使用者に試料チャンバーを挿入するように促し、
 - 使用者は試料チャンバーが挿入され、タイマーを開始させるために顕微鏡に信号を送る、
- 段階 5 6 に進行する。

【 0 1 0 2 】

顕微鏡装置ファームウェアは、

- タイマーを開始し、所定の経過時間後に処理を開始し、
 - 必要に応じて任意選択的にモーターまたはポンプを作動させる、
- 段階 5 8 に進行する。

【 0 1 0 3 】

- 顕微鏡装置ファームウェアは、
- 試料チャンバーを、試料に適した電磁照射のそれぞれで順に照射し、
 - 画像を生成するために使用される照射の種類で識別された各照射後に、デジタル画像を取得し、
 - 画像を、画像処理のためにコンピュータに伝送する、
- 段階 6 0 に進行する。

【 0 1 0 4 】

ユーザーインターフェースコンピュータアプリケーションは、

- アプリケーションが、視野内の及び / または視野全体の中の粒子の識別、数、寸法及び照射照度を決定するために画像処理を行い、
 - アプリケーションが、濃度を決定するために計算を行い、
 - 結果がメモリーに保存され、確認のために使用者に表示され、
 - 結果が任意選択的にインターネットを介して遠隔地へ送信される、
- 段階 6 2 に進行する。

【 0 1 0 5 】

図 6 は、作業者が、顕微鏡測定装置 1 2 内に体液試料を導入するために本発明の 1 つの実施形態において取りうる段階を示している。この例は、網状赤血球を決定するために使用される全血試料を示している。全血を得るために、作業者はまずランセットで指を刺し、精密ピッティング装置を用いて 5 から 50 μ L の全血を測定して 500 μ L から 5000 μ L の試薬とともにコンテナ内に入れ、コンテナを 3 回もしくはそれ以上裏返して、または混合物を穏やかに 3 回もしくはそれ以上吸引と吐出を行って、全血を試薬と混合する。作業者は、混合物を試料チャンバーに移し、試料チャンバーを顕微鏡測定装置に挿入する。

【 0 1 0 6 】

図 7 は、本発明に基づく免疫学的測定への応用を示している。この例において、高分子 3 7 を含む体液は、粒子 3 8 に付着する白色の三日月形で表された抗体を含む試薬と混合される。大きな粒子に付着した抗体は、水溶液中で沈殿することができるが、水溶液中で分散可能である。大きな粒子に付着した抗体は、高分子 3 7 の第 1 の箇所に結合する。試薬はまた、星形の付いた影付き半三日月形で表された第 2 の抗体 3 9 も含む。星形は、標識を表している。この例では、標識は抗体に共有結合され、標識に蛍光を引き起こさせる波長の光で照射したときに蛍光を発する分子である。

【 0 1 0 7 】

試薬が体液内で混合され、図 7 に示された試料チャンバー内に置かれると、高分子 3 7 は、粒子 3 8 に付着した抗体と結合し、蛍光標識を有する第 2 の抗体 3 9 は、粒子 3 8 に付着した抗体に結合された高分子 3 7 と結合して、粒子 - 抗体 - 高分子 - 標識抗体の複合体を形成する。これらの複合体は、試料チャンバーの底部に沈殿し、粒子複合体を画像センサ 4 4 上に拡大する対物レンズ 4 3 の焦点面に来る。試料チャンバーは、適切な周波数の光を透過する光学的に透明な材料からなる。

【 0 1 0 8 】

試料チャンバーの底部における粒子は、粒子に付着した蛍光ラベルを励起させる波長の

10

20

30

40

50

光で照射される。試料の底面の間の L E D のリング 4 2 は試料チャンバーの底面及び粒子が結合した標識を照射する。理想的には、これらの L E D は、結合していない（すなわち、反応していない）標識抗体 3 9 が、試料が励起されたときに蛍光を発する可能性があるように、非常に低い角度で粒子を照射すべきである。

【 0 1 0 9 】

この種類の免疫学的測定の方式においては、粒子に結合する標識の量が、試料内の高分子 3 7 の量が増えるにつれて増加する。標準曲線が、観察される標識の照度と分子の濃度との間の関係を表すために構築可能である。

【 0 1 1 0 】

典型的には、この種類の免疫学的測定は、測定を正確にするために、粒子 3 8 に付着した抗体に結合した高分子 3 7 に結合されていない標識 3 9 を、標識に結合した粒子 4 0 からから分離することを必要とする。

【 0 1 1 1 】

図 7 の免疫学的測定の方式において、分離は、粒子に結合した標識がチャンバーの底部に沈殿する際に発生する。本発明に開示されるように顕微鏡検出器の焦点面の粒子を撮像することにより、試料チャンバーの限定された領域の標識だけが検出されることとなる。試料チャンバーの高さを増加させることにより、分離の程度を増大させ、背景蛍光を低下させることができる。

【 0 1 1 2 】

さらに、標識されていない粒子は試料チャンバーの底部に沈殿することとなるが、チャンバーを完全には覆わない。粒子の間には空間ができることとなり、光は溶液内を貫通し、粒子に結合されていない標識を励起しうる。蛍光は、測定の感度を劣化させることとなる非特異的な背景蛍光を発生させることとなる。

【 0 1 1 3 】

粒子に結合されていない標識からのこの非特異的な背景蛍光は、第 1 の光源（例えば、散乱を発生させる光源）を使用し、この第 1 の照射を使用して粒子の境界を識別し、次いで第 2 の蛍光色素分子を励起させる光源により各粒子境界内から放出される蛍光の照度を決定して焦点面内の粒子を最初に識別することによって、部分的には排除可能である。さらに、粒子境界の外側の蛍光信号は、測定の精度を向上させるために、粒子に結合した蛍光から差し引くことができる非特異的蛍光を決定するために使用可能である。

【 0 1 1 4 】

小さな分子に特異的な粒子結合抗体が、標識された小さな分子に競合することを除いて、類似する手法が、競合免疫学測定法について使用可能である。試料チャンバーの底部に沈殿する粒子結合標識の量は、試料内の小さな分子の濃度に関連する。

【 0 1 1 5 】

前述の説明及び図 7 は、本発明の範囲を免疫学的測定法に限定するものではない。図 7 における粒子 3 8 に付着した白色の三日月形状は、生物学的または化学的起源の可溶化学物質に結合する任意の生物学的または化学的起源の分子であることができる。例えば、これは甲状腺ホルモンに結合するホルモン受容体であることができる。また、可溶核酸に結合する核酸であることができる。また、可溶ビオチンに結合するアビジンなどの分子であることができる。また、可溶化学物質または生物学的物質に結合する合成キメラ物質であることができる。

【 0 1 1 6 】

同じように、図 7 で符号 3 9 で示された三日月形状の結合パートナーは、標識された抗体であることができるが、標識されたホルモン受容体、核酸または、標識され、溶液中の可溶物質に結合することができる任意の生物学的または化学物質であることができる。

【 0 1 1 7 】

免疫学的測定は、本発明で検出可能な可溶化学物質（生物学的起源の化学物質を含む）の検出の一例である。これらの免疫学的測定は、粒子に結合した特定の照射信号を検出するという概念に基づいているため、以下の例示的な実施形態も、どのように免疫学的測定

10

20

30

40

50

法が働くかを示している。

【0118】

[例1]

本発明の1つの実施形態は、全血中の網状赤血球を決定するために使用された。

【0119】

5 μ Lの指を刺した全血は、5000 μ Lの試薬と混合された。試薬は63 μ g / mL (0.19 mM)のラウラミドプロピルベタイン、20 mMの重炭酸ナトリウム、5 mMのEDTA四ナトリウム水和物及び96 mMの塩化ナトリウムを含む。最終的なpHは8.1に、最終的なオスモル濃度は必要であればNaClまたは水で、272 mOsmであるように調整される。この試薬は、0.2ミクロンフィルターでろ過され、室温で最大2か月、目立った劣化や細胞球状化能力が低下することなく保存された。

10

【0120】

顕微鏡測定装置は、倒立顕微鏡の代わりに正立顕微鏡であった以外は、図3に示された構成要素を含む。対物レンズ19は、Nikon Instruments製の10倍の対物レンズである(CFI LU Plan Fluor BD 10X)。透過顕微鏡測定に関して、照射源15は、照射経路に配置された410 nmのフィルターを有するNikonハロゲンランプであった。試料は80ミリ秒照射され、ビットは235に設定された。

20

【0121】

蛍光に関して、試料はNikon水銀ランプ(Nikon Instruments, X-Cite 120XL Fluor System)で2000ミリ秒照射された。これは、Philips Rebel Lumiled(700mAで701mのBlue (470nm) Luxeon Rebel LED)で置き換えることもできた。これらの光源は、図3の直角ミラー20の下に配置された。この照射方法は、図3のステージ下部照射源18の場所で行われた。

20

【0122】

図3の直角ミラー20は、FITCフィルターキューブ(Semrock Corporation FITC-3540B)で置き換えられた。このフィルターキューブは、青い光の狭い帯域のみが対物レンズ19を通って試料チャンバー16に通過させることができるフィルターに蛍光照射源からの光を通過させるビームスプリッターを含む。Semrockフィルターキューブも、図3の照射フィルター27と同じ目的を果たすフィルターを含む。

30

【0123】

図3のセンサ26は、5MPのCMOSカメラ及び画像取得ソフトウェア(カナダ国オタワのPixelink Corporation)であった。10倍の対物レンズとカメラとの間に、0.5倍のリレーレンズ(Edmund Optics, NT58-376 0.5倍ビデオ顕微鏡結合器)が設けられて、カメラのセンサーにおいて全倍率は5.1倍であった。リレーレンズは、対物レンズとセンサとの間の距離を最適化することによるこのシステムの最終形態においては除去可能であった。

40

【0124】

希釈された試料は図4に示されたものと設計の点で類似する市販の顕微鏡測定試料チャンバー(ドイツ国、ibidiのibidi.comの製品番号81121)内に導入された。チャンバーは高さ100ミクロン、幅5mm、長さ50mmである(体積は25 μ L)。

【0125】

この構成は、容易に市販の構成要素とともに素早く組み立てることができるため、本発明の原理を示すのに使用された。透過光で試料を照射するためには、図3の照射フィルター27と等価なフィルターを除去する必要があった。この手動の介入は、図3に示されるような最終的な試作機では必要とならなかった。

【0126】

50

波長 410 nm の透過画像及び蛍光画像が、各試料について取得された。画像は National Institute of Health (ImageJ) の ImageJ オープンソースソフトウェアを使用して処理された。(1) 透過画像または蛍光画像内に観察された粒子の数を、使用者が定義する大きさと照度の閾値に基づいて計数し、(2) 各粒子について透過の粒子の MCH 及び MCV を計算し、(3) 網状赤血球を使用者が定義した照度及び大きさの蛍光の粒子として識別する、特殊なプラグイン (ImageJ 用赤血球プラグイン) が書かれた。透過の粒子及び蛍光の粒子の座標がそれぞれ決定され、蛍光を発する粒子に対応する透過画像内の赤血球細胞を識別するために使用された。

【0127】

図 8 は、網状赤血球及び赤血球を識別し、分類するために画像ソフトウェア、ここでは ImageJ プラグインによって使用される例示的な段階をまとめている。この用途において、粒子の閾値は、粒子の最小直径を 20 画素に、最大直径を 80 画素に設定した。「合致した」蛍光画像及び透過画像内の物体に関して、これらは 70 画素よりも離れたものであってはならない。蛍光画像内の物体についての照度閾値は、最小照度閾値を 40 とし、最大閾値を 255 とした。

【0128】

第 1 の (透過) 画像が 102 で処理され、続いて第 2 の (蛍光) 画像が 104 で処理される。続いて、第 1 及び第 2 の画像の粒子が 106 で照合され、網状赤血球についての結果が、108 でまとめられる。

【0129】

第 1 の画像を処理する段階 102 は、
 1. 画像に渡る背景照度を均一にすること、
 2. 背景を差し引き、背景を 255 に設定すること、
 3. 標準の ImageJ の機能を用いて画像を 2 値化すること、
 4. ImageJ 領域分割を適用して接触している可能性のある粒子を分離すること、
 5. 領域分割及び粒子の修正の後に、粒子の計数を決定すること、
 6. 領域分割が粒子の計数を 5 % 未満しか増加させなかつた場合には、修正された粒子の計数を記録し、5 % を超える場合には試料を希釈して再び処理を行うこと、
 7. ImageJ を用いて粒子の計数、粒子の座標、直径及び平均照度を、最終結果の構築の間に決定された照度及び大きさの制限に基づいて決定すること、及び
 8. 透過画像内の全ての粒子について結果を保存すること、
 の 1 つまたは複数の段階を含む。

【0130】

第 2 の (蛍光) 画像を処理する段階 104 は、
 1. 画像に渡る背景照度を均一化すること、
 2. 背景を差し引くこと、
 3. 白のレベルを 255 に設定すること、
 4. 標準の ImageJ 機能を使用して画像を 2 値化すること、
 5. ImageJ 領域分割を適用して接触している可能性のある粒子を分割すること、
 6. 領域分割及び粒子の計数の修正の後に粒子の計数を決定すること、
 7. 領域分割後に粒子の計数の増加が 5 % 未満である場合には係数は正確であると判断し、5 % よりも大きいと、試料は希釈されて再度処理されなければならないと判断する段階と、
 8. ImageJ を使用して粒子の計数、座標、直径及び平均照度を、照度及び大きさの制限に基づいて決定すること、及び
 9. 蛍光画像内の全ての粒子についての結果を保存すること、
 の 1 つまたは複数の段階を含む。

【0131】

第 1 及び第 2 の画像内の粒子を照合する段階 106 は、
 1. 透過画像及び蛍光画像内の粒子の座標を比較すること、

10

20

30

40

50

2. 透過画像及び蛍光画像内の粒子の座標が、受容可能として構築において決定された数よりも小さい場合に、透過画像内の粒子が網状赤血球として分類されること、及び

3. 透過画像及び蛍光画像内の照合された粒子の間の距離を記録すること、の1つまたは複数を含む。

【0132】

網状赤血球の結果（すなわち、所定の大きさ及び照度より大きな対応する蛍光画像を有する透過の粒子について）をまとめる段階108は、以下の、

1. 透過照度、
2. 粒子ごとの平均画素数、
3. 平均粒子直径、
4. 計算された赤血球の体積、及び／または
5. 計算されたヘモグロビンの濃度、

の1つまたは複数を含む。

【0133】

表1は、本発明の精度データまたは特性を示している。

【0134】

【表1】

パラメータ	RBC	MCH	MCV
単位	μL あたり100万	pg	fL
全日数	11	11	11
1日当たりの実施	1	1	1
実施ごとの複製	2	2	2
実施におけるCV	7.4%	2.6%	2.3%
日ごとのCV	2.1%	2.0%	1.4%
全CV	7.7%	3.3%	2.7%

【0135】

表2は、本発明をSymex Hematology Analyzerと比較した方法を示す。

【0136】

10

20

30

【表2】

表2

パラメータ	RBC	MCH	MCV	網状赤血球 %	MCHr
単位	μL あたり 100万	pg	fL	%	pg
試料の数	30	30	30	30	30
相関係数	0.88	0.81	0.91	0.76	0.62
傾き	1.01	0.76	1.03	0.91	1.04
切片	-0.03	8.0	-1.9	-0.1	-0.5
推計の標準誤差	0.3	1.3	2.4	0.3	1.9
許容できる 全誤差	0.6	4	5	0.8	4
顕微鏡 平均+/-SD	4.6 +/- 0.6	31 +/- 2	88 +/- 6	1.0 +/- 0.4	34 +/- 2
S y s m e x 平均+/-SD	4.6 +/- 0.6	30 +/- 2.5	88 +/- 6	1.3 +/- 0.4	33 +/- 2
顕微鏡範囲	3.7 to 6.1	24 to 35	71 to 99	0.5 to 1.9	29 to 38
S y s m e x 範囲	3.7 to 6.0	20 to 35	68 to 97	0.6 to 2.2	28 to 37
通過/失敗	通過	通過	通過	通過	失敗
試料> 許容誤差	1	0	1	0	2

【0137】

ここで、

RBC濃度：赤血球 / μL

MCH：pgで表した平均赤血球ヘモグロビン量

MCV：fLで表した（赤血球の）平均赤血球体積

MCHr：pgで表した網状赤血球の平均赤血球ヘモグロビン量。MCHrは主に、光散乱によるある程度の寄与を有する光学密度の測定であり、細胞体積からの主要でない寄与を有しうる。

CHr：網状赤血球ヘモグロビン量。Baye rはAdvia 120網状赤血球ヘモグロビン量についてこの略語を使用している。これは、概略的にMCHrと等価であるべきである。CHrは光散乱測定である。

RET HE：網状赤血球のヘモグロビンである。Sysmexは、網状赤血球ヘモグロビン量のSysmex XE-2100決定についてこの略語を使用する。RET HEは、概略的にMCHr及びCHrと等価であるべきである。RET HEは、前方光散乱の測定である。細胞の体積及びヘモグロビン量がこの値に影響を与える。細胞体積の影響は、このパラメータでより顕著である。

【0138】

[例2]

本発明の第2の実施形態は、全血内の顆粒球を決定するために使用された。

【0139】

本実施形態において、図6にまとめられた多くの手動の試料及び試薬操作の段階は、試料チャンバーを含む特別なカートリッジを使用することによって自動化された。全血は、EDTAバキュテナー内に集められ、このカートリッジ内に挿入された。カートリッジ内の液体回路は、全血をバキュテナーから、全血を正確に100 μL に区画する回路に自動的に移動された。装置は、全血を含む区画を10mLの試薬で混合チャンバー内に洗い流した。

【0140】

10

20

30

40

50

試薬は、535 mg mの塩化アンモニウム、84 mg mの重炭酸ナトリウム、38 mg mのEDTA、10 mg mのアジ化ナトリウム、1 mg mのアクリジンオレンジ及び100 mLの蒸留水を含んでいた。アクリジンオレンジは、細胞核内または細胞質内のいずれかの核酸に結合されたときにのみ蛍光を発する核酸結合色素である。これはまた、細胞質内のいくつかの複合炭水化物にも結合可能である。この試薬は、赤血球を溶解して、より容易に白血球を検出することを可能にする。これは、白血球を正確に検出、分類及び計数するために必要な白血球の形態の多くを保存する。

【0141】

全血試薬の混合は、カートリッジの近くのモーターに取り付けられた磁石によって回転する直径1/8インチのステンレス鋼ボールベアリングを用いて混合された。試薬の混合後、全血混合物は、自動的にカートリッジ内の試料チャンバーに移送されて、光学的画像が収集された。液体はチャネルを通して空気圧を用いて押し出された。本発明は、任意選択的に、試料チャンバーへのこれらの段階を含んでもよい。

【0142】

顕微鏡測定装置は、図3に説明された構成要素を含む。この初期試作機は、倒立顕微鏡であった。対物レンズ19は、Nikon Instruments製10倍対物レンズである(CFI LU Plan Fluor BD 10X)。透過顕微鏡測定に関して、照射源15は約640から680 nmのピーク放出波長を有する赤色LEDであった。

【0143】

蛍光に関して、試料は赤色LEDと青色LEDとが交互に配置されたリングで照射された。この構成は、図3のステージ下部照射源18と同一であった。青色LEDは450 nmから500 nmの間のピーク波長放出を有し、赤色LEDは640から680 nmの間のピーク放出を有した。リング内には6個の青色LEDと、6個の赤色LEDとが存在した。これらは、図5の試料チャンバー16を、試料チャンバー16の水平面の下10から45°の間の角度から照射するように配置された。このようにLEDを配置する目的は、対物レンズの軸から可能な限り90°に近いように照射源を配置することであった。この位置において、直角に近い角度で散乱された光は、対物レンズによって捉えることが可能である。顆粒球は、直角に強く光を散乱する一方で、単球及びリンパ球は光を散乱せず、そのため直角に散乱された光は、顆粒球を分類するのに使用可能である。

【0144】

装置は、図3に示すように直角ミラー20を有した。

【0145】

図3のセンサ26は、0.5 MPのCCDカメラであった。カメラは、センサにおいて5倍から10倍の倍率の物体を達成できるような対物レンズからの距離に配置された。

【0146】

画像取得ソフトウェアはプロプライエタリであるが、図8に説明されたように透過画像と蛍光画像とを照合するプラグインとともにImageJソフトウェアのそれと類似する画像処理段階を実施するものであった。しかし、この場合には、第1のデジタル画像は蛍光画像であり、第2のデジタル画像は、直角に散乱された光からの画像である。

【0147】

この方法は、本方法を用いた15試料の顆粒球の計数と、病院の研究所で使用されるCounteterカウンターの結果との方法の比較において、0.86の相関係数を有した。回帰直線の傾きは0.98であり、回帰直線の接片は0.0であった。

【0148】

また、以下の実施形態のいずれかに従う方法及び装置が開示される。

【0149】

実施形態1は、視野内の2次元的物体を分類するための顕微鏡測定方法であって、

a) 視野内の物体を第1の電磁放射源で照射する段階と、

b) 得られた画像をCMOSまたはCCDセンサに投影する段階と、

10

20

30

40

50

c) 得られた視野内の物体のデジタル画像を使用して、例えば、ImageJソフトウェアなどの画像ソフトウェアを使用することにより粒子をデジタル画像内の物体として識別する段階と、

d) 各物体の輪郭の座標を使用して、物体のデジタル画像内に含まれる各物体の領域を取り囲む、領域を画定する段階と、

e) 各物体のデジタル画像の面積、直径及び平均照度を決定する段階と、

f) 接触する粒子が識別され、計数され、適切に分類されることが可能となるように、任意選択的に、物体のデジタル画像に関して境界から1画素を差し引くことにより、接触する粒子を分離する段階と、

g) 輪郭の座標を使用して、物体の輪郭に隣接するが物体の外側である領域を画定し、電磁放射源の背景照度を計算し、この平均背景照度を、各物体のデジタル画像の輪郭内に含まれる物体の電磁照度から差し引く段階と、

h) 物体の輪郭内の領域の電磁照度を使用して、光を吸収する物体内の化学物質の濃度を、標準曲線を参照して決定する段階と、

i) 同一の第1の物体を順に、必要なだけの数の電磁放射源でインタロゲートして、第1のセットの物体をサブセットにさらに分類するのに必要なだけの物体のデジタル画像の所定の境界内の物体についての特有の光学情報を得る段階と、

j) n個の追加的な第1の電磁放射源で同一の視野をインタロゲートする段階であって、各電磁放射源が物体の電磁特性に基づき視野内の物体を一意に区別する何らかの電磁特性の点で異なる、インタロゲートする段階と、次いで物体を多くの追加的な電磁放射源で露光して、第1の放射源によって識別された境界内に含まれる物体を下位分類する段階と、

による顕微鏡測定方法である。

【0150】

実施形態2は、電磁放射源が、紫外線スペクトル、可視光スペクトル及び赤外線スペクトルの部分を含む100nmから2000nmの波長の光である、実施形態1の方法である。

【0151】

実施形態3は、電磁放射源が、自然に存在する蛍光色素分子または人工的に導入された蛍光色素分子の蛍光励起を引き起こす100nmから1000nmの光であって、励起された蛍光色素分子から放出された光が、対応する物体を分類するための画像を生成するのに使用される、実施形態1または2の方法である。

【0152】

実施形態4は、電磁放射源が、物体内の化学物質によって吸収される100nmから2000nmの光であり、吸収性の物質を含む対応する画像が、より低い照度の検出された電磁放射を有する、実施形態1から3のいずれかの方法である。

【0153】

実施形態5は、異なる角度で試料と交差する電磁放射源を用いて、前記視野内の異なる照度の電磁放射散乱を引き起こす、実施形態1から4のいずれかの方法である。

【0154】

実施形態6は、検出センサの領域に垂直方向0°から80°で視野内の物体と交差する電磁放射源を用いて、顕微鏡の対物レンズが、異なる角度で散乱される光を捕捉する、実施形態1から5のいずれかの方法である。

【0155】

実施形態7は、異なる偏光特性を有する電磁放射源を用いる、実施形態1から6のいずれかの方法である。

【0156】

実施形態8は、自然に存在する蛍光色素分子または人工的に導入された蛍光色素分子の蛍光を誘導する電磁放射源を用いる、実施形態1から7のいずれかの方法である。

【0157】

10

20

30

40

50

実施形態 9 は、ヘモグロビンのソーレー帯からの透過光源を用いて動物または人間の血液からの赤血球の画像を生成する段階と、これらの画像を用いて赤血球の面積、直径及び体積並びに赤血球内のヘモグロビンの濃度を計算し、網状赤血球内のレチクリンに付着した核酸結合蛍光色素分子を励起し、蛍光発光を有する赤血球を識別することによって、全ての赤血球から網状赤血球が識別される、実施形態 1 から 8 のいずれかの方法である。

【0158】

実施形態 10 は、蛍光色素分子で処理された動物または人間の血液からの白血球が、励起光源を用いて検出され、放出された光が、検出センサに投影されて、蛍光発光する白血球のデジタル画像を形成する、実施形態 1 から 9 のいずれかの方法である。

【0159】

実施形態 11 は、動物または人間の血液からの白血球の検出が、核酸結合蛍光色素分子を用いる、実施形態 10 の方法である。

【0160】

実施形態 12 は、核酸結合蛍光色素分子が、アクリジニウムエステル、チアゾールオレンジまたはエチジウムプロマイドなどの、しかしこれらに限定されない、実施形態 11 の方法である。

【0161】

実施形態 13 は、2 次元的蛍光画像に対応する物体の直径、蛍光発光する物質の濃度及び体積が計算され、白血球をリンパ球、顆粒球及び単球に分類するのに用いられる、実施形態 10 から 12 のいずれかの方法である。

【0162】

実施形態 14 は、白血球内の異なる物質が検出可能となるように、2 以上の蛍光励起源または 2 つ以上の蛍光発光検出波長が、異なる蛍光発光する化学種を検出するために使用され、蛍光発光の照度及び量が白血球をさらにサブセットに分類するために用いられる、実施形態 10 から 13 のいずれかの方法である。

【0163】

実施形態 15 は、白血球内の細胞質顆粒が光を強く散乱する一方で、顆粒のない細胞質が光を全く散乱しないまたは非常に低い照度で散乱するように、センサに垂直方向 60° から 90° の間の角度で顆粒球を照射する 300 nm から 800 nm の可視光を用いる、実施形態 1 から 14 のいずれかの方法である。

【0164】

実施形態 16 は、センサに垂直方向 60° から 90° の角度で 300 から 800 nm の光を同じ物体に照射することによって、これらの画像から顆粒球が下位分類され、顆粒球が、高い照度の散乱光を有するこれらの画像である。

【0165】

実施形態 17 は、人間または動物の血液からの白血球が、最初に蛍光を用いて、次いでリンパ球及び単球を無視できる散乱光を有する画像として識別することによって識別される、実施形態 1 から 16 のいずれかの方法である。

【0166】

実施形態 18 は、1 から 50 メガピクセルの CMOS または CCD センサを用いる、実施形態 1 から 17 のいずれかの方法である。

【0167】

実施形態 19 は、電磁放射源が、同一の視野を順に、電磁放射源のための空間の制約及び視野を画像化するための時間的制約によってのみ制限された 2 つから 10 個の異なる電磁放射源でインタロゲートする能力を提供する電子スイッチでオン及びオフに切替え可能である、実施形態 1 から 18 のいずれかの方法である。

【0168】

実施形態 20 は、対象粒子の液体分散を含み、統計的に有意な数の粒子が計数可能である使い捨てまたは再使用可能な観察用チャンバーを有する、実施形態 1 から 19 のいずれかの方法である。

10

20

30

40

50

【0169】

実施形態21は、観察用チャンバーが50ミクロンから10mmの間の厚さである、実施形態20の方法である。

【0170】

実施形態22は、対物レンズが検出用CMOSまたはCCDセンサの間に配置され、対物レンズが、物体の寸法を決定するのに十分な倍率を提供し、さらに視野内の物体を統計的に有意な計数ができるように十分な視野を有する、実施形態18の方法である。

【0171】

実施形態23は、対物レンズが2倍から15倍の倍率である、実施形態22の方法である。

10

【0172】

実施形態24は、体液内の赤血球及び白血球の両方を、赤血球のソーレー帯を用いて赤血球細胞の分離または溶解を行わずに検出して、赤血球と、白血球を検出するための核酸結合蛍光色素分子の蛍光とを識別する、実施形態1から23のいずれかの方法である。

【0173】

実施形態25は、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネートなどの、しかしそれに限定されない球状化試薬を用いて、赤血球を両面陥凹円盤形状から均一な球体に変換し、球状化試薬が白血球の形態または散乱特性に影響を与えない、実施形態1から23のいずれかの方法である。

20

【0174】

実施形態26は、球状化試薬を使用せず、赤血球本来の両面陥凹円盤形状を維持する試薬を使用する、実施形態25の方法である。

【0175】

実施形態27は、白血球の形態または光散乱特性に影響を与えずに、30秒から10分以内に選択的に赤血球を溶解する、実施形態1から23のいずれかの方法である。

【0176】

実施形態28は、球状化試薬とともに、または球状化試薬を用いずに、赤血球溶解試薬としてpH8.0の0.1M塩化アンモニウムを用いる、実施形態26または27の方法である。

30

【0177】

実施形態29は、CMOSセンサと、対物レンズと、照射する放射、放出する放射または散乱される放射の光特性を改善するための任意選択的な光学フィルタと、透過された電磁放射、散乱された電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意選択的なミラーまたはビームスプリッターと、オン及びオフに切替え可能な電磁放射手段と、を含み、顕微鏡測定装置内のCMOSセンサから収集された画像内の物体を識別し、分類する画像ソフトウェアを含む分離されたコンピュータと有線または無線通信として、顕微鏡を作動させるための制御ソフトウェアと、を含む顕微鏡測定装置である。

【0178】

実施形態30は、独立した電源を有し、または外部電源供給部に接続可能である、実施形態29の測定装置である。

40

【0179】

実施形態31は、体液内の粒子または高分子量もしくは低分子量の化学物質を検出するのに使用され、体液が、血液、尿、脊髄液、唾液、腹水及び肺洗浄液を含むがそれに限定されず、単一の検出測定装置を用いて体外診断試験の完全な範囲を提供する、実施形態29または30の測定装置である。

【0180】

実施形態32は、体外診断試験において血液学検査、尿検査、化学検査、免疫学的測定法及び/または凝固検査を実行する、実施形態29から31のいずれかの測定装置である。

【0181】

50

実施形態 33 は、カメラの高さが 2 cm から 15 cm の間であるように、対物レンズからの光を垂直平面から水平面に方向を変化させるためのミラー及び / またはビームスプリッターを用いる、実施形態 29 から 32 のいずれかの測定装置である。

【0182】

実施形態 34 は、顕微鏡観察台の下部に配置された環状光または類似の照明手段による前面落射照明を提供する、実施形態 29 から 33 のいずれかの測定装置である。

【0183】

実施形態 35 は、対物レンズを通した前面落射照明を提供する、実施形態 29 から 34 のいずれかの測定装置である。

【0184】

実施形態 36 は、蛍光顕微鏡測定を実行する能力を有する、実施形態 29 から 35 のいずれかの測定装置である。

【0185】

実施形態 37 は、透過顕微鏡測定を実行することができる、実施形態 29 から 36 のいずれかの測定装置である。

【0186】

実施形態 38 は、光散乱顕微鏡測定を実行することができる、実施形態 29 から 37 のいずれかの測定装置である。

【0187】

実施形態 39 は、視野内の物体を異なる照明源で順に照射することによって、物体の同一のセットの透過、光散乱及び / または蛍光顕微鏡測定を順に実行することができる、実施形態 29 から 38 のいずれかの測定装置である。

【0188】

実施形態 40 は、対物系を通る経路の散乱光の経路に垂直方向 0 から 60° の間の照射を提供することができる、実施形態 39 の測定装置である。

【0189】

実施形態 41 は、対物系を通る経路の散乱光の経路に垂直方向 60° から 80° の間の照射を提供する、実施形態 39 または 40 の測定装置である。

【0190】

実施形態 42 は、LED と顕微鏡対物系との間に配置された試料に対して 1 つまたは複数の LED を用いて、試料を透過光で照明する、実施形態 37 の測定装置である。

【0191】

実施形態 43 は、蛍光励起源の照射時間を 20 ミリ秒から 10 秒の間で制御して、CMOS センサが蛍光放射で対象物体を検出するのに十分な蛍光放射照度を達成する、実施形態 37 の測定装置である。

【0192】

実施形態 44 は、対物系を通る経路の散乱光の経路に垂直方向 0 から 80° に配置された LED の照射時間を、20 ミリ秒から 10 秒の間で制御して、対象物体を検出するのに十分な光散乱を達成する、実施形態 37 の測定装置である。

【0193】

実施形態 45 は、対物レンズの前面に位置する試料チャンバーを保持する一方で、光源によって照射される観察台であって、観察台が固定され、または可動であることができる、実施形態 29 から 44 の測定装置である。

【0194】

実施形態 46 は、観察台が、試料チャンバー内の 1 から 10 の観察領域を、対物系を通して見ることができ、観察台が手動またはモーター制御のいずれかで移動する、実施形態 45 の測定装置である。

【0195】

実施形態 47 は、観察台が、CMOS センサの面と物体が乗る表面との間に、固定した距離 (+ / - 10 ミクロン) で試料チャンバーを保持し、そのため、画像を得る前に焦点

を合わせる必要を排除した、実施形態45または46の測定装置である。

【0196】

実施形態48は、可動観察台が、顕微鏡が光源の照射照度を調整し、試料内の物体を分類する際に使用される照度の範囲を検証することができ、作業者が介在することなく、顕微鏡の倍率及び焦点の質的制御が可能となる、固定参照領域を含む、実施形態45から47のいずれかの測定装置である。

【0197】

実施形態49は、可動観察台が、測定装置が、複数の画像を取得するのに作業者の介在を必要としないように、画像を取得するための照明手段及びCMOSセンサを動作させる、試料チャンバー内の1つの視野から他の視野への移動を検出するため使用するセンサを遮断する、実施形態45から48のいずれかの測定装置である。

10

【0198】

実施形態50は、可動観察台が、試料チャンバーが顕微鏡内に導入され、測定装置内へ試料チャンバーを導入した後に、10秒から10分の間の固定された間隔で、試料チャンバー内の視野から画像を取得し始める時間を決定するこの能力を用いて、試料チャンバー内の1つの視野から他の視野への移動を検出するセンサを含む、実施形態45から49のいずれかの測定装置である。

【0199】

実施形態51は、5から50ミクロン離隔された2つの平坦な表面の間に保持された試料を含み、5から100 μ Lの液体を含み、チャンバーの形状が、チャンバーを試料で均一かつ再現性を有して満たすことを可能にし、分析を完了する前に試料が移動することまたは試料が蒸発することを防ぐ、請求項29の顕微鏡測定装置のための試料チャンバーである。

20

【0200】

実施形態52は、試料を試薬と混合するために使用されるチャンバーを含む、実施形態51の試料チャンバーである。

【0201】

実施形態53は、5から50 μ Lの試料及び50から500 μ Lの試薬を正確に測定し、次いで試料を試料チャンバーの観察領域に導入する前に試料を試薬と混合させる、実施形態51または52の試料チャンバーである。

30

【0202】

実施形態54は、100ミクロンから4mmの間の厚さである2つの平坦な表面を有し、表面の厚さ及び組成が、そうでなければ背景散乱に寄与しうる、表面からチャンバー内へのスペクトル反射及び光散乱を最小化するように選択された、実施形態51から53のいずれかの試料チャンバーである。

【0203】

実施形態55は、1mm×1mmから最大5mm×5mmの観察領域を有し、100ミクロンから20mmの高さを有する、実施形態51から54のいずれかの試料チャンバーである。

40

【0204】

実施形態56は、試料が60秒から最大24時間で沈殿でき、沈殿した粒子がチャンバーの底部に堆積し、実施形態29から50のいずれかの顕微鏡測定装置によって観察され、識別され、分類されることができる、実施形態51から55のいずれかの試料チャンバーである。

【0205】

実施形態57は、静定時間の間に蒸発が起こらないように、試料チャンバーを充填した後に試料チャンバーを閉じる手段を有する、実施形態51から56のいずれかの試料チャンバーである。

【0206】

実施形態58は、CMOSセンサと、対物レンズと、照射する放射、放出する放射また

50

は散乱された放射の光特性を改善するための任意選択的な光学フィルターと、透過され、散乱された電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意選択的なミラーまたはビームスプリッターと、オン及びオフに切り替えることができる電磁放射手段と、からなり、顕微鏡測定装置内のCMOSセンサから収集された画像内の物体を識別し、分類するための画像ソフトウェアおよび顕微鏡を作動させるための制御ソフトウェアを含む別個のコンピュータと有線または無線通信するための手段を有し、

a) 水溶液内で1分間に0.1mmから1分間に2mmの間の早さで沈殿する、分散された固相粒子に付着された特異的な抗体であって、粒子上の抗体が全血内の検体と特異的に結合する抗体を使用する段階と、

b) 標識された検体を競合的に用いて、または標識されたキャッピング抗体を非競合的に用いて、固相結合された抗体に付着された検体を検出する段階であって、分散された粒子が観察用チャンバーの底部に沈殿し、観察用チャンバーの高さが、測定法のための望ましい感度を達成するための洗浄段階が不要となるように粒子の十分な濃度を提供するように選択され、沈殿した粒子の画像が、第1の電磁放射によって識別され、第1の画像の物体の境界または輪郭が決定される、検体を検出する段階と、

c) 第2の電磁放射に露光した後に、第1の電磁放射によって画定される境界内にある電磁放射の照度を決定する段階と、

d) 第2の電磁放射に露光した後に、第1の電磁放射によって画定される境界の外側にある電磁放射の照度を決定し、第1の電磁放射によって画定された境界内の電磁放射の照度から差し引き、効果的に背景電磁放射を差し引き、それによって第2の電磁放射の照度が、測定される検体の濃度を得るために標準曲線と比較される段階と、を含む、顕微鏡測定装置を用いた免疫学的測定法を行う方法である。

【0207】

実施形態59は、分散性固体相物体に付着された所望の化学物質のための結合パートナーを用いた所望の化学物質の測定を実施する方法であって、顕微鏡測定装置がCMOSセンサと、対物レンズと、照射する放射、放出する放射もしくは散乱する放射の光特性を改善するための任意選択的な光学フィルターと、透過され、散乱された電磁放射及び放出された電磁放射の方向を決定するための任意選択的なミラーまたはビームスプリッターと、オンとオフとで切り替えることができる電磁放射手段と、を含み、顕微鏡装置内のCMOSセンサから収集された画像内の物体を識別し、分類する画像化ソフトウェア及び顕微鏡を動作させるための制御ソフトウェアを含む別個のコンピュータと有線または無線通信するための手段を有する方法であって、視野内の2次元的物体を分類する方法が、

a) 視野内の物体を第1の電磁放射源で照射する段階と、
 b) 得られた画像をCMOSまたはCCDセンサ上に投影する段階と、
 c) 得られた視野内の物体のデジタル画像を用いて、ImageJソフトウェアを用いてデジタル画像内の物体として粒子を識別する段階と、
 d) 各物体の領域を取り囲む物体それぞれの輪郭の座標を用いて、物体のデジタル画像内に含まれる領域を画定する段階と、

e) 各物体のデジタル画像の領域、直径及び平均照度を決定する段階と、
 f) 接触する物体が識別でき、計数でき、適切に分類できるように、物体のデジタル画像に関して境界から1つの画素を差し引くことによって接触する粒子を分離する段階と、
 g) 輪郭座標を用いて、物体の輪郭に隣接するが物体の外側にある領域を画定し、電磁放射源の背景照度を計算し、この平均背景照度を各物体のデジタル画像の輪郭内に含まれる物体の電磁照度から差し引く段階と、

h) 物体の輪郭内の領域の電磁照度を用いて、標準曲線を参照することによって光を吸収する物体内の化学物質の濃度を決定する段階と、

i) 第1のセットの物体をサブセットにさらに分類するのに必要な、物体の第1のデジタル画像の所定の境界内の物体についての特有の光学情報を提供するのに必要な数の電磁放射源で、同一の第1の物体に順にインタロゲートする段階と、

j) n個の追加的な第1の電磁放射源で同一の視野にインタロゲートする段階であって

10

20

30

40

50

、各電磁放射源が、物体の電磁特性に基づき、視野内の物体を一意に識別する電磁特性の点で異なる、同一の視野にインタロゲートする段階と、次いで第1の照射源によって識別された境界内に含まれる物体を下位分類するための数だけの追加電磁放射源で物体を露光する段階と、

k) 分散された固体相に付着された結合パートナーを用いて、体液内の所望の化学物質を捕捉し、所望の化学物質を、第2の標識された化学物質の捕捉パートナーを競合的に用いて、または所望の化学物質の標識された派生物を非競合的に用いて検出する段階と、

1) 分散された粒子が観察用チャンバーの底部に沈殿し、観察用チャンバーの高さが、測定法のための望ましい感度を達成するための洗浄段階が不要となるように粒子の十分な濃度を提供するように選択される段階と、

m) 沈殿した粒子の画像が、第1の電磁放射によって識別され、第1の画像の物体の境界または輪郭が決定される段階と、

n) 第2の電磁放射への露光後に、第1の電磁放射によって画定される境界内にある電磁照射の照度を決定する段階と、

o) 第2の電磁放射の露光後に、第1の電磁放射によって画定される境界の外側にある電磁放射の照度が決定され、第1の電磁放射によって画定された境界内にある電磁放射の照度から差し引かれて決定される段階と、

p) 第2の電磁放射の照度を標準曲線と比較して、測定される核酸の濃度を得る段階と、によって行われる、方法である。

【0208】

実施形態60は、対象とする比色分析化学反応の着色された生成物の波長に特異的な透過LED光を用い、LEDがオンまたはオフにされて所望の波長の照射を得る、実施形態59の方法である。

【0209】

実施形態61は、測定装置が、対象とする化学反応に対して特異的な放出電磁放射を用いる、実施形態29から50のいずれかの測定装置である。

【0210】

実施形態62は、可動観察台に乗せられた乾燥化学試験紙を用いて化学分析を行い、一貫性のある測定値を提供する乾燥反応パッドの領域を計算することによって、検出領域が決定される、実施系値29から50のいずれかの測定装置である。

【符号の説明】

【0211】

- 1 照射源
- 2 物体
- 3 試料チャンバー
- 4 C M O S または C C D センサ
- 5 デジタル画像
- 6 デジタル画像
- 7 照射源
- 8 デジタル画像 8
- 1 0 コンピュータ
- 1 1 無線通信のシンボル
- 1 2 顕微鏡測定装置
- 1 5 照射源
- 1 6 試料チャンバー
- 1 7 顕微鏡観察台
- 1 8 照射源
- 1 9 対物レンズ
- 2 0 直角ミラー
- 2 2 マイクロプロセッサ

10

20

30

40

50

- 2 3 メモリ
 2 5 センサ
 2 6 センサ
 2 7 光学フィルター
 2 8 導入ポート
 2 9 中空試料ウェル
 3 0 上側光学表面
 3 1 排出ポート
 3 2 スペーサー
 3 3 下側光学表面
 3 7 高分子
 3 8 粒子
 3 9 抗体
 4 2 L E D のリング
 4 3 対物レンズ
 4 4 画像センサ

10

【図 1】

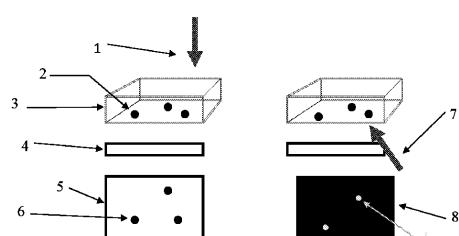


Figure 1

【図 2】

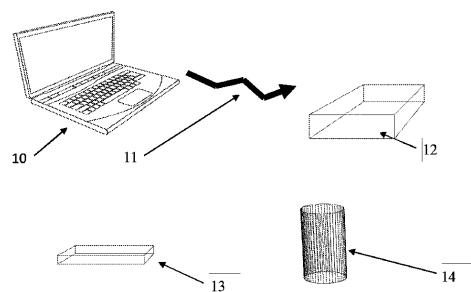


Figure 2

【図 3】

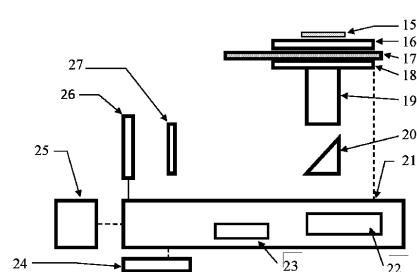


Figure 3

【図 4】

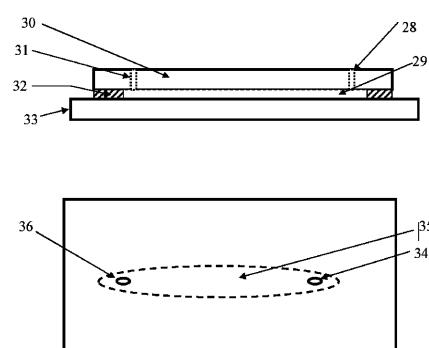


Figure 4

【図5】

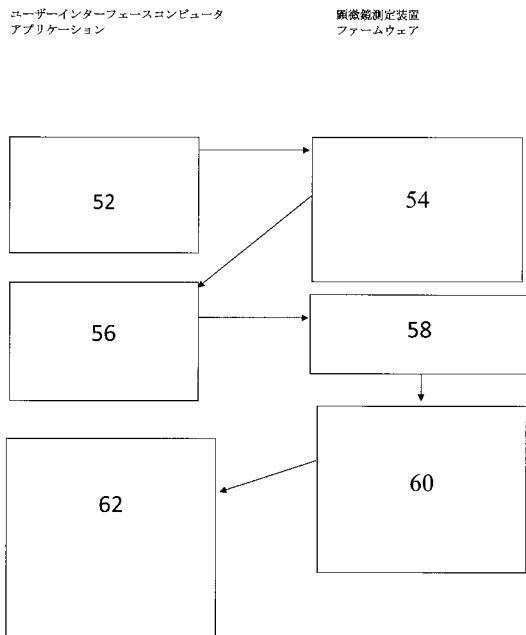


Figure 5

【図6】

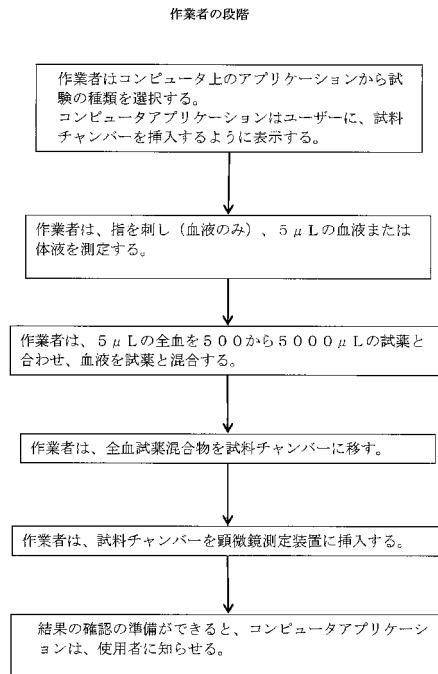


Figure 6

【図7】

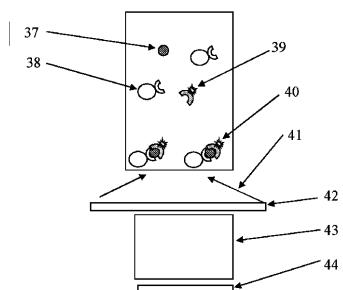


Figure 7

【図8】

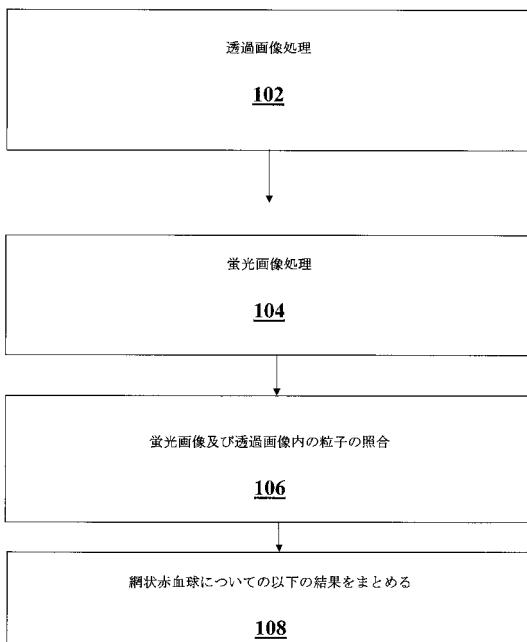


Figure 8

【国際調査報告】

61600190008



INTERNATIONAL SEARCH REPORT PCT/IB2014/059581 27.03.2015

International Application No.

PCT/IB2014/059581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - G01N15/14 (2014.01)

USPC - 435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - G01N15/14; G01N21/64; C12Q1/68 (2014.01)

USPC - 435/4, 6, 287.2; 436/63, 172

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - G01N2015/14; G01N15/1459 (2014.02)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase, Google Patents, Google Scholar,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,134,662 A (BACUS et al.) 28 July 1992 (28.07.1992) entire document	31-33
Y	WO 2008/124456 A2 (TYCZKOWSKI et al.) 23 November 2006 (23.11.2006) entire document	58-61
Y	US 2009/0176271 A1 (DURAK et al.) 09 July 2009 (09.07.2009) entire document	1-3, 19, 58-61
Y	US 2011/0177548 A1 (GRAHAM et al.) 21 July 2011 (21.07.2011) entire document	1-3, 19, 58-61
Y	US 2002/0090120 A1 (WETZEL et al.) 11 July 2002 (11.07.2002) entire document	1-3, 19
Y	US 5,287,272 A (RUTENBERG et al.) 15 February 1994 (15.02.1994) entire document	1-3, 19, 58-61

Further documents are listed in the continuation of Box C.

• Special categories of cited documents:	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 July 2014	27 MAR 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 17. 3. 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT PCT/IB2014/059581 27.03.2015

International Application No.

PCT/IB2014/059581

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Extra Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3, 19, 31-33, 58-60

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT PCT/IB2014/059581 27-03-2015

International application No.

PCT/IB2014/059581

Continuation of Box No. III:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-3, 19, 31-33, 58-60, drawn to a microscopic method of classifying particles as two-dimensional objects by projecting images onto an image sensor, a method of performing immunoassays using a microscopic measuring apparatus comprising an image sensor to identify and classify objects in images collected from the image sensor, and a method of performing assays of a desired chemical entity using a microscopic measuring apparatus comprising an image sensor.

Group II, claims 51-53, drawn to a sample chamber for use with a microscopic measuring apparatus.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group I invention: using the edge coordinates to define an area adjacent to the edge of a first object but outside of the first object to calculate a background intensity of the first electromagnetic radiation source and subtracting this average background intensity from the electromagnetic intensity of the first object, and using the electromagnetic intensity of the areas within the edges of the first objects to determine particle properties within the first objects that absorb light by reference to a standard curve as claimed therein is not present in the invention of Group II. The special technical feature of the Group II invention: the shape of the sample chamber permitting uniform and reproducible filling of the sample chamber with sample and preventing movement of the sample or evaporation of sample prior to completing analysis as claimed therein is not present in the invention of Group I.

Groups I & II lack unity of invention because even though the inventions of these groups require the technical feature of a microscopic measuring apparatus, this technical feature is not a special technical feature as it does not make a contribution over the prior art. Specifically, US 2009/0176271 A1 (DURACK et al) 9 July 2009 (09.07.2009) discloses a system for efficient staining and storing of populations of cells (Title, para 0002) and teaches a microscopic measuring apparatus (multi-channel apparatus for classifying particles according to one or more particle characteristics ... the apparatus comprises a plurality of flow cytometry units, each of which is operable to classify particles in a mixture of particles by interrogating a stream of fluid containing the particles with a beam of electromagnetic radiation, abstract; measuring characteristics of individual particles as they pass generally single file in a fluid stream through a measuring device which, typically, provides information for classifying the particles according to selected characteristics para 0006; an improved methods and apparatus for analyzing, classifying and sorting particles based on one or more desired characteristics, para 0012; the focusing lens assembly 491 includes, in one embodiment, a microscope adapter 501, para 0833).

Since none of the special technical features of the Group I or II inventions are found in more than one of the inventions, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)	
<i>G 0 1 N</i>	<i>15/00</i>	(2006.01)	G 0 1 N	15/00 B 5 B 0 5 7
<i>G 0 1 N</i>	<i>21/64</i>	(2006.01)	G 0 1 N	21/64 F
<i>G 0 6 T</i>	<i>1/00</i>	(2006.01)	G 0 1 N	21/64 Z
<i>G 0 2 B</i>	<i>21/00</i>	(2006.01)	G 0 6 T	1/00 2 9 5
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>	(2006.01)	G 0 2 B	21/00
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
			C 1 2 Q	1/68 A

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. BLUETOOTH
2. i Pad

F ターム(参考) 2G043 AA01 AA03 BA16 CA04 DA05 DA06 EA01 EA13 EA14 FA01
FA02 HA01 HA02 HA09 JA03 KA01 KA02 KA03 LA03 MA01
2G045 AA25 CA25 DA51 FA16 FA25 FA26 FA27 GA02 GA03
2G059 AA01 AA05 BB13 CC18 DD12 DD13 EE01 EE02 EE07 FF01
FF03 GG02 GG03 HH01 HH02 HH03 JJ03 JJ11 JJ13 JJ22
KK04 MM16 NN01
2H052 AA09 AC09 AC12 AC13 AC17 AE02 AF02 AF14
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QR66 QS36 QX02
5B057 AA10 BA02 CA08 CA12 CA16 CB08 CB12 CB16 DA08 DA12
DA13 DB02 DB09 DC03 DC04 DC16