

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6717741号  
(P6717741)

(45) 発行日 令和2年7月8日(2020.7.8)

(24) 登録日 令和2年6月15日(2020.6.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 M 1/34	(2006.01)	C 12 M 1/34	B
G 01 N 15/00	(2006.01)	G 01 N 15/00	B
G 01 N 33/483	(2006.01)	G 01 N 33/483	C
G 01 N 33/48	(2006.01)	G 01 N 33/48	M
G 02 B 21/06	(2006.01)	G 02 B 21/06	

請求項の数 24 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-515661 (P2016-515661)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月28日 (2014.5.28)  
 (65) 公表番号 特表2016-529876 (P2016-529876A)  
 (43) 公表日 平成28年9月29日 (2016.9.29)  
 (86) 國際出願番号 PCT/DK2014/050151  
 (87) 國際公開番号 WO2014/191003  
 (87) 國際公開日 平成26年12月4日 (2014.12.4)  
 審査請求日 平成29年5月11日 (2017.5.11)  
 (31) 優先権主張番号 PA201370291  
 (32) 優先日 平成25年5月28日 (2013.5.28)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 デンマーク (DK)

前置審査

(73) 特許権者 501175605  
 シエモメテック・アクティーゼルスカブ  
 C H E M O M E T E C A / S  
 デンマーク、デコーー 3450アレレズ  
 、ギューゼヴァング43番  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 画像形成サイトメータ

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

画像サイトメータであって、

- 試料領域中に光を射出するために構成される第1の光源(111、313、503)と、
- 前記光を前記第1の光源(111、313、503)から前記サイトメータ(140)の光軸に沿って前記試料領域中へと指向するための光学的手段(507)と、
- 前記試料領域中に励起光(307、312)を射出するために構成される第1の励起光源を備える第2の光源(305、112a、112b)と、
- 検出素子の配列(509)上に前記試料領域の少なくとも一部分の画像を形成するための画像形成手段(121、124、501、508)と  
 を備え、

前記試料領域は、前記光学的手段(507)と前記検出素子の配列(509)との間に位置し、

前記光学的手段(507)が、視準光(504、520)が前記試料領域中へと指向されるように、前記第1の光源(111、313、503)からの視準光(504、520)を形成するためのものでありかつ前記視準光(504、520)を前記サイトメータ(140)の光軸に沿って指向するためのものであること、および、

前記第1の光源(111、313、503)が、400nm未満の波長を有する光を射出するために構成されること

10

20

を特徴とし、400 nm未満の波長を有する前記光が存在するときに形成される前記画像は、少なくとも明視野画像である、画像サイトメータ。

【請求項 2】

前記サイトメータは、所定の波長領域または複数の波長領域にわたって前記光の強度を減衰させるため等の光学フィルタ等の減衰手段をさらに備え、かつ／または、

前記サイトメータは、空間変調等の変調手段をさらに備える、

請求項 1 に記載の画像サイトメータ。

【請求項 3】

前記減衰手段および／または前記変調手段は、前記第 1 の光源（111、313、503）と前記試料領域との間の光路中に配置される、請求項 2 に記載の画像サイトメータ。

10

【請求項 4】

前記減衰手段および／または前記変調手段は、前記試料領域と前記検出素子の配列（509）との間の光路中に配置される、請求項 2 ～ 3 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 5】

前記変調手段は、前記試料領域を透過される前記視準光の焦点面の近くに配置される、請求項 2 ～ 4 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 6】

前記減衰手段および／または前記変調手段のうちの 2 つまたはそれを上回るものは、前記減衰手段および／または変調手段の取り外しまたは交換を可能にする交換手段中に載置される、請求項 2 ～ 5 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

20

【請求項 7】

前記交換手段は、回転ユニットを備える、請求項 6 に記載の画像サイトメータ。

【請求項 8】

2 つまたはそれを上回る交換手段は、ゼロ、1 つ、2 つ、またはそれを上回る減衰および／または変調手段が、同時に前記光軸に沿って位置付けられ得るようなものである、請求項 6 ～ 7 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの変調手段は、部分的に不透明である、請求項 2 ～ 8 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

30

【請求項 10】

前記変調手段は、部分的に透明である、請求項 2 ～ 9 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 11】

前記減衰および／または前記変調手段は、部分的に不透明かつ部分的に透明である、請求項 2 ～ 10 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの変調手段の一部分は、部分的に不透明であり、前記変調手段の別の部分は、部分的に透明である、請求項 2 ～ 11 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 13】

前記サイトメータは、変調手段上の障害物を使用して、明視野モードと暗視野モードとの間で切り替えられるように構成されることが可能であり、前記障害物は、前記暗視野モードのために構成される、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

40

【請求項 14】

前記変調手段は、位相差顕微鏡変調手段を備える、請求項 2 ～ 13 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 15】

明視野モードと暗視野モードとの間の切り替えは、変調手段によって実現される、請求項 1 ～ 3 に記載の画像サイトメータ。

【請求項 16】

50

前記試料領域は、生物試料を備える、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 17】

前記試料領域は、試料区画 (101) 中の試料を備える、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の画像サイトメータ。

【請求項 18】

画像サイトメータのための照明システム (110) であつて、

- 光を出射するために構成される第 1 の光源 (111、313、503) と、
- 前記第 1 の光源 (111、313、503) からの前記光を、前記画像サイトメータ (140) の光軸に沿って試料領域中へと指向するための光学的手段 (507) と、
- 励起光 (307、312) を前記試料領域中へと出射するために構成される第 1 の励起光源を含む第 2 の光源 (305、112a、112b) と

を備え、

前記第 1 の光源 (111、313、503) からの前記光が、400 nm 未満の波長を有する光を出射するために構成されることを特徴とし、

400 nm 未満の波長を有する前記光が存在するときに形成される画像は、少なくとも明視野画像であり、

前記光学的手段 (507) は、視準光 (504、520) が前記試料領域中へと指向されるように、前記第 1 の光源 (111、313、503) からの視準光 (504、520) を形成するためのものでありかつ前記視準光 (504、520) を前記画像サイトメータ (140) の光軸に沿って指向するためのものである、照明システム (110)。

【請求項 19】

所定の波長領域または複数の波長領域にわたって前記光の強度を減衰させるため等の光学フィルタ等の減衰手段をさらに備える、請求項 18 に記載の照明システム (110)。

【請求項 20】

生物試料の少なくとも 1 つの量パラメータおよび / または 1 つの品質パラメータの評価のための方法であつて、

露光範囲を画定する平行壁部を有する試料区画 (101) に、ある体積の前記生物試料を適用することであつて、前記壁部は、画像サイトメータからの光が、前記試料区画 (101) の前記壁部を通過することを可能にする、ことと、

第 1 の光源 (111、313、503) からの光で前記試料区画 (101) を照明し、能動検出素子の二次元配列 (509) 上に露光することであつて、光は、前記試料区画 (101) を通過しており、したがって、空間光強度情報の画像を記録する、ことと、

第 2 の光源 (305、112a、112b) からの励起光で前記試料区画 (101) を照明し、前記能動検出素子の二次元配列 (509) 上に露光することであつて、蛍光は、前記試料区画 (101) を通過しており、したがって、空間光強度情報の蛍光画像を記録する、ことと、

個々の生物学的粒子 (521) からの光強度情報が、背景からの光強度情報とは異なると同定されるような方法で、両方の画像を処理することと、

前記処理の結果を、前記生物試料中の生物学的粒子の前記少なくとも 1 つの量パラメータおよび / または品質パラメータに関連付けることと

を含み、

前記試料区画 (101) を照明する前記第 1 の光源からの前記光が、400 nm 未満の波長を有する視準光 (504、520) であり、前記画像サイトメータが、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の画像サイトメータ (140) であることを特徴とする、方法。

【請求項 21】

前記第 1 の光源 (111、313、503) を使用して記録される空間光強度情報の 2 つまたはそれを上回る画像は、光強度情報の前記処理で使用される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

前記生物試料は、基質上で成長した、および／または成長している細胞の懸濁液である、請求項20～21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】

前記基質は、透明基質である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

懸濁液中の粒子（521）が前記試料区画（101）の内側の下方および／または上方境界まで沈降および／または浮遊することを可能にするために、前記能動検出素子の配列（509）に対する前記試料および／または前記試料区画（101）の移動の終了から、光強度情報の前記記録が開始されるまで、十分な時間が経過することができる、請求項20～23のいずれかに記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、典型的には、低光学倍率での画像サイトメトリ解析のための方法およびシステムに関し、解析は、生物学的粒子の検出に基づく。

【背景技術】

【0002】

長い間、生物学的材料の解析のために顕微鏡法が使用されてきた。顕微鏡中の対象物を見るために、対象物が背景の光学的特性とは異なる光学的特性を示すことが必要であり、この差は、対比と呼ばれる。生物学的粒子は、典型的には、大部分が細胞膜内に含まれる水から成り、生物学的粒子をそれらの周囲と本質的に同様にする。細胞の内部は、タンパク質、DNA、およびRNA等のある特定の化学成分によって、周囲の液体とは典型的には異なり、それらのうちの一部は、例えば、細胞核中に詰め込まれたDNA等、それが潜在的に視覚化され得るようなサイズを有する「構造」を形成する。哺乳類細胞、酵母、および細菌等の生物学的粒子は、比較的小さく、典型的には、直径が約20μm未満であり、何らかの先進技術が適用されない限り、顕微鏡法でそれらを見ることを困難にし得る。そのような技術の中には、高倍率、位相差、およびUV顕微鏡法があり、デジタル技術の導入により、いくつかの画像強化技術が導入されてきた。

20

【0003】

高倍率顕微鏡法は、典型的には、×50またはそれを上回る倍率を使用し、生物学的粒子の視覚化および同定を補助する微細構造を分離することを可能にする。位相差顕微鏡法は、高対比を有する画像を生成するために、屈折率の小さい差を利用する。UV顕微鏡法は、タンパク質およびDNAの吸光度特性を使用し、それらは、それぞれ約260および280nmで光を吸収する。光の吸収度は、顕微鏡中の対比として見られる。短波長のさらなる光は、顕微鏡の最大分解能が光の波長によって決まるため、より長い波長の光を使用して可能であるよりも小さい構造を分離することを可能にする。生物学的粒子中のそのような小さい構造は、典型的には、核等の細胞の内部構造である。

30

【0004】

画像サイトメトリによる生物学的粒子の評価において、画像中の生物学的粒子の位置を知ることが最も重要である。これは、生物学的粒子を解析するタスクが試料中の粒子の計数であるとき、当然のことながら明らかであるが、これはまた、試料および／または細胞の他の特性に関するほとんどの評価においても同様である。画像中の任意の対象物の同定に対する必要な条件は、その対象物の画像と周囲の背景の画像との有意な差がある条件を確立することが可能である。

40

【0005】

顕微鏡法の典型的な方法が、屈折率の差、反射性、または減衰等、光の波長を変更しない光学的特性に基づく一方で、蛍光顕微鏡法等の方法は、典型的には、物質の量子力学的特性によってもたらされる、光の波長の移動に基づく。

【0006】

顕微鏡法において、そのような差は、概して「対比」と称される。顕微鏡法において対

50

比を生成するためのいくつかの方法があり、2つの基本的な方法は、暗視野（D F）および明視野（B F）顕微鏡法であり、「視野」信号の強度は、背景の強度を指し、存在し得る任意の対象物を分離する画像の領域である。したがって、背景が明るく、対象物の画像が光の減少を表すB Fとは対照的に、D F中、背景は、暗く、対象物は、より高い強度を有する。

#### 【0007】

生体細胞等の生物学的粒子の顕微鏡解析を考慮するとき、D FおよびB F顕微鏡法の両方が、かなり不十分な対比の画像を表示する。したがって、位相差および蛍光顕微鏡法等の、画像中により大きい対比を概して提供するため、生物学的粒子の解析で広く使用される、さらなる技術がある。両方の方法が、生物学的粒子の同定に対する実施に関して利点ならびに欠点を有する。位相差顕微鏡法が、特殊な光学的構成要素を必要とする一方で、蛍光顕微鏡法は、粒子中に存在しなければならないか、あるいは粒子に結合されなければならない、使用されるフルオロフォアシステムによって定義される選択性によって制限される。

10

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明は、かなりの対比を有する生物学的粒子の画像を記録するための単純で効果的な、かつ信頼できる方法を提供し、本発明による方法およびシステムを画像サイトメトリ中の粒子の同定に特に非常に適したものにする。

20

#### 【0009】

本発明は、画像サイトメータを提供し、

- 試料領域中に光を出射するように構成される、第1の光源と、
- 視準光を形成し、視準光を第1の光源からサイトメータの光軸に沿って指向するための集束手段と、
- 試料領域中に励起光を出射するように構成される第1の励起光源を備える、第2の光源と、
- 検出素子の配列上に試料領域の少なくとも一部分の画像を形成するための画像形成手段と、

を備え、試料領域は、集束手段と検出素子の配列との間に位置し、

30

サイトメータは、明視野モードと、暗視野モードと、蛍光モードとの間で切り替えられるように構成されることが可能であり、および／または

第1の光源は、400 nm未満の波長を有する光を出射するように構成され、および／または

励起光は、蛍光モードを提供するための光軸に対する入射角である。

#### 【0010】

本発明は、画像サイトメータのための照明システムをさらに提供し、

- 光を出射するように構成される、第1の光源と、
- 第1の光源からの光を、画像サイトメータの光軸に沿って、かつ試料領域中へと指向するための集束手段と、
- 励起光を試料領域中へと出射するように構成される第1の励起光源を備える、第2の光源と、

40

を備え、第1の光源からの光は、400 nm未満の波長を有する光を出射するように構成される。

#### 【0011】

さらに、本発明は、生物試料の少なくとも1つの量パラメータおよび／または1つの品質パラメータの評価のための方法を提供し、

- 露光範囲を画定する平行壁部を有する試料区画に、ある体積の生物試料を適用するステップであって、壁部は、請求項1～51に記載の画像サイトメータからの光が、試料区画の壁部を通過することを可能にする、ステップと、

50

- 第 1 の光源からの光で試料区画を照明し、能動検出素子の二次元配列上に露光するステップであって、光は、試料区画を通過しており、したがって空間光強度情報の画像を記録する、ステップと、
  - 第 2 の光源からの励起光で試料区画を照明し、能動検出素子の二次元配列上に露光するステップであって、蛍光は、試料区画を通過しており、したがって、空間光強度情報の蛍光画像を記録する、ステップと、
  - 個々の生物学的粒子からの光強度情報が、背景からの光強度情報とは異なると同定されるような方法で、両方の画像を処理するステップと、
  - 処理の結果を、生物試料中の生物学的粒子の少なくとも 1 つの量パラメータおよび／または品質パラメータに関連付けるステップと、
- 10  
を含む。

本願明細書は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目 1)

画像サイトメータであって、

- 試料領域中に光を出射するように構成される、第 1 の光源と、
- 視準光を形成し、前記視準光を前記第 1 の光源から前記サイトメータの光軸に沿って指向するための集束手段と、
- 前記試料領域中に励起光を出射するように構成される第 1 の励起光源を備える、第 2 の光源と、
- 検出素子の配列上に前記試料領域の少なくとも一部分の画像を形成するための画像形成手段と、

を備え、

前記試料領域は、前記集束手段と前記検出素子の配列との間に位置し、

前記サイトメータは、明視野モードと、暗視野モードと、蛍光モードとの間で切り替えられるように構成されることが可能であり、および／または

前記第 1 の光源は、400 nm 未満の波長を有する光を出射するように構成され、および／または

前記励起光は、前記蛍光モードを提供するための前記光軸に対する入射角である、  
画像サイトメータ。

(項目 2)

前記サイトメータは、所定の波長領域または複数の波長領域にわたって前記光の強度を減衰させるため等の、光学フィルタ等の減衰手段をさらに備え、好ましくは、減衰手段は、前記光軸に沿った所定の平面に配置される、項目 1 に記載の画像サイトメータ。

(項目 3)

前記サイトメータは、空間変調等の変調手段をさらに備え、好ましくは、変調手段は、前記光軸に沿った所定の平面に配置される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目 4)

前記減衰手段および／または前記変調手段は、前記第 1 の光源と前記試料領域との間の光路中に配置される、項目 2～3 に記載の画像サイトメータ。

(項目 5)

前記減衰手段および／または前記変調手段は、前記試料領域と前記検出素子の配列との間の光路中に配置される、項目 2～4 に記載の画像サイトメータ。

(項目 6)

前記変調手段は、前記試料領域を透過される前記視準光の前記焦点面の近くに配置される、前記項目に記載の画像サイトメータ。

(項目 7)

前記減衰手段および／または前記変調手段のうちの 2 つまたはそれを上回るものは、前記減衰手段および／または変調手段の取り外しまたは交換を可能にする交換手段中に載置される、項目 2～6 に記載の画像サイトメータ。

10

20

30

40

50

(項目 8 )

前記交換手段は、回転ユニットを備える、項目 7 に記載の画像サイトメータ。

(項目 9 )

2つまたはそれを上回る交換手段は、ゼロ、1つ、2つ、またはそれを上回る減衰および／または変調手段が、同時に前記光軸に沿って位置付けられ得るようなものである、項目 7～8 に記載の画像サイトメータ。

(項目 10 )

少なくとも1つの変調手段は、部分的に不透明である、項目 2～9 に記載の画像サイトメータ。

(項目 11 )

前記変調手段は、部分的に透明である、項目 2～10 に記載の画像サイトメータ。

10

(項目 12 )

前記減衰および／または前記変調手段は、部分的に不透明かつ部分的に透明であり、好ましくは、前記部分のうちの1つは、円形状である、項目 2～11 に記載の画像サイトメータ。

(項目 13 )

少なくとも1つの変調手段の一部分は、部分的に不透明であり、前記変調手段の別の部分は、部分的に透明である、項目 2～12 に記載の画像サイトメータ。

(項目 14 )

前記減衰手段は、所定の倍数で光を減衰させる、項目 2～13 に記載の画像サイトメータ。

20

(項目 15 )

前記変調手段は、好ましくは、前記試料領域を通過する視準光を実質的に減衰させる、前記暗視野モードのために構成される障害物を備える、項目 2～14 に記載の画像サイトメータ。

(項目 16 )

前記変調手段は、好ましくは、前記試料領域から出射する非視準光を実質的に減衰させる、前記明視野モードのために構成される開口を備える、項目 2～15 に記載の画像サイトメータ。

(項目 17 )

前記変調手段は、位相差顕微鏡変調手段を含む、項目 2～16 に記載の画像サイトメータ。

30

(項目 18 )

前記変調手段は、位相差顕微鏡変調手段を構成し、前記第1の光源によって出射される前記光の前記実質的な波長は、狭波長帯を有し、好ましくは、前記波長帯の前記幅は、50 nm未満である、項目 2～17 に記載の画像サイトメータ。

(項目 19 )

明視野モードと暗視野モードとの間の切り替えは、変調手段によって、好ましくは、前記試料領域と前記検出素子の配列との間に位置する変調手段を挿入および／または交換することによって実現される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

40

(項目 20 )

前記第1の光源からの前記視準光は、10度未満、より好ましくは、5度未満の偏角で視準光から偏位する、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目 21 )

前記検出素子の配列は、CCD または CMOS センサ素子の配列である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目 22 )

前記第1の光源からの前記波長は、200 nm～700 nm である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目 23 )

50

前記第1の光源からの前記波長は、200nm～400nmである、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目24)

前記第1の光源からの前記波長は、300nm～395nmである、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目25)

前記第1の光源からの前記波長は、320nm～380nmである、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目26)

前記第1の光源からの前記波長は、350nm～380nmである、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目27)

前記励起光は、前記第1の光源からの光の前記波長とは実質的に異なる波長を有する、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目28)

前記励起光の前記入射角は、10～80度、好ましくは、20～60度、より好ましくは、30～50度である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目29)

前記励起光の前記入射角は、90度である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

10

(項目30)

前記入射角は、110～180度、好ましくは、120～160度、より好ましくは、130～150度である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目31)

前記集束手段は、レンズを含む、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目32)

前記集束手段は、鏡を含む、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目33)

第3、または第4、または第6の光源等の追加の光源をさらに備え、好ましくは、前記追加の光源は、励起光源である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

30

(項目34)

前記光源は、前記試料領域にわたって、および/または前記検出素子の配列によって撮像された領域にわたって、実質的に均一な強度を有する光を提供するように構成される光学的手段に光学的に接続される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目35)

前記光学的手段は、マイクロレンズの配列を含む、項目34に記載の画像サイトメータ。

。

(項目36)

前記光学的手段は、円柱マイクロレンズの配列を含み、好ましくは、円柱マイクロレンズの2つの配列を含み、前記円柱レンズの実質的に垂直な配向である、項目34または35に記載の画像サイトメータ。

40

(項目37)

前記光源は、発光ダイオード、および/またはダイオードレーザ、および/またはレーザである、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目38)

前記光源は、1秒未満、好ましくは、0.1秒未満の持続時間、光を出射するように構成される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目39)

前記光源は、0.0001～0.1000秒、好ましくは、0.0001～0.0500秒の持続時間、光を出射するように構成される、前記項目のいずれかに記載の画像サイ

50

トメータ。

(項目40)

前記光源は、2秒を上回る、3秒を上回る、4秒を上回る、5秒を上回る、6秒を上回る、7秒を上回る、8秒を上回る、9秒を上回る、または10秒を上回る等、1秒を上回る持続時間、光を出射するように構成される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目41)

前記励起光源からの光は、前記励起光ビームからの光線を選択的に除去することによって、前記画像形成手段の入口に到達することから実質的に除外される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

10

(項目42)

光線は、前記励起光ビーム中に1つまたは複数の障害物を配置することによって選択的に除去され、好ましくは、前記励起光ビームは、前記障害物が配置される平面内で実質的に視準される、前記項目に記載の画像サイトメータ。

(項目43)

前記光源は、調節可能な固体光源である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目44)

前記調節可能な固体光源は、調節可能な発光ダイオードである、項目43に記載の画像サイトメータ。

20

(項目45)

前記調節可能な固体光源は、調節可能なレーザダイオードである、項目43に記載の画像サイトメータ。

(項目46)

前記画像形成手段は、10μm～150μm等、5μmを上回る被写界深度を提供するように構成される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目47)

前記画像形成手段は、200nm～1000nmの波長領域、より好ましくは、350nm～1000nmの波長領域、より好ましくは、350nm～850nmの波長領域の光を透過するように構成される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

30

(項目48)

前記画像形成手段は、顕微鏡対物レンズを備える、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目49)

前記画像形成手段は、前記試料の線形拡大を提供するように構成される、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目50)

前記線形拡大は、20：1よりも小さい、項目49に記載の画像サイトメータ。

(項目51)

前記線形拡大は、1：1～20：1の範囲、好ましくは、1：1～10：1の範囲、より好ましくは、1：1～4：1の範囲である、項目50に記載の画像サイトメータ。

40

(項目52)

前記試料領域は、試料を含む、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目53)

前記試料は、生物試料である、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目54)

前記試料は、試料区画中にある、前記項目のいずれかに記載の画像サイトメータ。

(項目55)

画像サイトメータのための照明システムであって、

-光を出射するように構成される、第1の光源と、

50

- 前記第1の光源からの前記光を、前記画像サイトメータの光軸に沿って、かつ試料領域中へと指向するための集束手段と、
- 励起光を前記試料領域中へと出射するように構成される第1の励起光源を含む、第2の光源と、  
を備え、

前記第1の光源からの前記光は、400nm未満の波長を有する光を出射するように構成される、照明システム。

(項目56)

前記集束手段は、前記第1の光源からの視準光を形成するためのものである、項目55に記載の照明システム。

10

(項目57)

励起光は、前記光軸に対する入射角である、項目55または56に記載の照明システム。  
。

(項目58)

項目2～51に記載の1つまたはそれを上回る特徴をさらに備える、項目に記載の照明システム。

(項目59)

生物試料の少なくとも1つの量パラメータおよび/または1つの品質パラメータの評価のための方法であって、

露光範囲を画定する平行壁部を有する試料区画に、ある体積の前記生物試料を適用するステップであって、前記壁部は、項目1～51に記載の画像サイトメータからの光が、前記試料区画の壁部を通過することを可能にする、ステップと、

20

前記第1の光源からの光で前記試料区画を照明し、能動検出素子の二次元配列上に露光するステップであって、光は、前記試料区画を通過しており、したがって、空間光強度情報の画像を記録する、ステップと、

前記第2の光源からの励起光で前記試料区画を照明し、能動検出素子の前記二次元配列上に露光するステップであって、蛍光は、前記試料区画を通過しており、したがって、空間光強度情報の蛍光画像を記録する、ステップと、

個々の生物学的粒子からの光強度情報が、背景からの光強度情報とは異なると同定されるような方法で、両方の画像を処理するステップと、

30

前記処理の結果を、前記生物試料中の生物学的粒子の前記少なくとも1つの量パラメータおよび/または品質パラメータに関連付けるステップと、  
を含む、方法。

(項目60)

前記第1の光源を使用して記録される空間光強度情報の2つまたはそれを上回る画像は、光強度情報の前記処理で使用される、前記項目に記載の方法。

(項目61)

前記生物試料は、液体試料である、項目59～60のいずれかに記載の方法。

(項目62)

前記生物試料は、試料区画中に収容され、前記試料区画は、少なくとも1つの透明壁部を有する、項目59～61のいずれかに記載の方法。

40

(項目63)

前記試料区画の前記壁部は、開放容器の底部である、項目62のいずれかに記載の方法。  
。

(項目64)

前記試料区画は、2つの透明壁部を含み、好ましくは、前記壁部は、評価されている前記生物試料の厚さを画定する、項目59～63のいずれかに記載の方法。

(項目65)

前記生物試料は、基質上で成長した、および/または成長している細胞の懸濁液である、項目59～64のいずれかに記載の方法。

50

(項目 6 6)

前記基質は、透明基質であり、好ましくは、そのような基質は、前記試料区画の一体化部であるか、またはそれになることができる、項目 6 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 7)

前記基質は、懸濁液中にある、項目 6 5 ~ 6 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 8)

前記第 1 の光源によって前記試料上に露光されるエネルギーは、露光中  $200 \text{ nJ/m}^2$  未満、好ましくは、 $100 \text{ nJ/mm}^2$  未満である、項目 5 9 ~ 6 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 9)

前記第 1 の光源によって前記試料上に露光される前記エネルギーは、露光中  $50 \text{ nJ/mm}^2$  未満、好ましくは、 $20 \text{ nJ/mm}^2$  未満である、項目 5 9 ~ 6 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 0)

個々の生物学的粒子からの光強度情報は、前記背景からの光強度に対して減衰された光強度である、項目 5 9 ~ 6 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 1)

減衰は、光の散乱によって引き起こされる、項目 5 9 ~ 7 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 2)

散乱は、光の屈折、回折、反射、または干渉によって引き起こされる、前記項目に記載の方法。

(項目 7 3)

減衰は、光の吸収によって引き起こされる、項目 5 9 ~ 7 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 4)

吸収は、前記試料に添加される試薬によって引き起こされる、項目 5 9 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 5)

光の減衰は、個々の生物学的粒子からの強度が、背景からの強度の 5 % ~ 7 0 % になるようなものである、項目 5 9 ~ 7 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 6)

個々の生物学的粒子からの光強度情報は、前記背景からの光強度に対して強化された光強度である、項目 5 9 ~ 7 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 7)

光強化は、光の屈折、回折、反射、および / または干渉によって引き起こされる、項目 7 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 8)

個々の生物学的粒子からの光強度情報は、前記背景からの光強度に対して光の減衰および強化の組み合わせである、項目 5 9 ~ 7 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 9)

前記光源からの光は、それが前記試料を通過するとき、実質的に平行である、項目 5 9 ~ 7 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 0)

前記試料を通過した視準光は、集束手段と検出素子の配列との間に位置する平面に実質的に焦点が合わせられ、変調手段は、実質的に前記焦点面に配置される、項目 5 9 ~ 7 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 1)

空間光強度情報の 2 つまたはそれを上回る画像が記録され、2 つまたはそれを上回る実質的に異なる変調手段が適用される、項目 5 9 ~ 8 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 2)

前記試料区画の前記壁部を通過した前記第 1 の光源からの前記光は、前記壁部の表面に

実質的に垂直である全体的な配向を有する、項目 5 9 ~ 8 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 3 )

前記試料区画の前記壁部の前記表面は、前記検出素子の配列の視野方向に実質的に垂直である、項目 5 9 ~ 8 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 4 )

液体試料の前記体積は、前記露光中に静止したままであり、静止は、生物学的粒子の前記画像の少なくとも一部が、それが 1 回の露光中に同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるのと同様に動かない状況として定義される、項目 5 9 ~ 8 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 5 )

液体試料の前記体積は、前記露光中に静止したままであり、静止は、生物学的粒子の前記画像の少なくとも一部が、それが 2 回の露光時間中に同じ検出素子の実質的に前記境界内に収容されるのと同様に動かない、好ましくは、それが 4 回の露光時間中に同じ検出素子の実質的に前記境界内に収容されるような状況として定義される、項目 5 9 ~ 8 4 のいずれかに記載の方法。

10

(項目 8 6 )

液体試料の前記体積は、前記露光中に静止したままであり、静止は、生物学的粒子の前記画像の少なくとも一部が、それが前記第 1 の光源を用いた第 1 の露光時間から第 2 の光源を用いた第 2 の露光時間中に、同じ検出素子の実質的に前記境界内に収容されるのと同様に動かない状況として定義され、好ましくは、前記第 2 の光源の前記露光の結果は、空間蛍光光強度情報の画像の前記記録である、項目 5 9 ~ 8 5 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 8 7 )

前記試料は、前記露光中に静止したままであり、静止は、前記試料中の生物学的粒子の前記画像が、それが光強度情報の収集中、好ましくは、2 回またはそれを上回る露光中に、同じ検出素子の実質的に前記境界内に収容されるのと同様に動かないように、前記試料が能動検出素子の前記配列に対して動かない状況として定義される、項目 5 9 ~ 8 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 8 )

静止は、前記試料中の生物学的粒子の前記画像が、それが光強度情報の前記収集中、好ましくは、2 回またはそれを上回る露光中に、同じ検出素子の実質的に前記境界内に収容されるのと同様に動かないように、前記試料が能動検出素子の前記配列に対して動かない状況として定義される、項目 5 9 ~ 8 7 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 8 9 )

静止は、前記試料が前記試料区画に対して動かない状況として定義される、項目 5 9 ~ 8 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 0 )

静止は、少なくとも 10 秒、少なくとも 9 秒、少なくとも 8 秒、少なくとも 7 秒、少なくとも 6 秒、少なくとも 5 秒、少なくとも 4 秒、少なくとも 3 秒、少なくとも 2 秒、または少なくとも 1 秒等の期間にわたるものと定義される、項目 5 9 ~ 8 9 のいずれかに記載の方法。

40

(項目 9 1 )

懸濁液中の粒子が前記試料区画の内側の下方および / または上方境界まで沈降および / または浮遊することを可能にするために、能動検出素子の前記配列に対する前記試料および / または前記試料区画の移動の終了から、光強度情報の前記記録が開始されるまで、十分な時間が経過することができる、項目 5 9 ~ 9 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 2 )

前記沈降時間は、10 秒よりも長く、好ましくは、10 ~ 240 秒の範囲、より好ましくは、30 ~ 120 秒の範囲である、項目 5 9 ~ 9 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 3 )

前記試料区画の内部は、20  $\mu\text{m}$  ~ 1,000  $\mu\text{m}$  の平均厚を有する、項目 5 9 ~ 9 2

50

のいずれかに記載の方法。

(項目 94)

前記平均厚は、20 μm～100 μmである、項目59～93のいずれかに記載の方法

。

(項目 95)

前記試料区画の前記厚さは、使用中、前記試料区画に対して個々に決定される、項目59～94のいずれかに記載の方法。

(項目 96)

前記試料区画は、試料の単一解析を目的とする、項目59～95のいずれかに記載の方法。

10

(項目 97)

電磁放射が前記配列上に露光される前記液体試料の前記体積は、0.01 μL～20 μLの範囲である、項目59～96のいずれかに記載の方法。

(項目 98)

前記体積は、0.05 μL～5 μLである、項目59～97のいずれかに記載の方法。

(項目 99)

前記体積は、0.05 μL～1.0 μLである、項目59～98のいずれかに記載の方法。

(項目 100)

電磁放射が前記配列上に露光される前記液体試料の前記体積は、前記試料区画の固定視野範囲および既知の厚さによって定義される、項目59～99のいずれかに記載の方法。

20

(項目 101)

その前記パラメータまたは複数のパラメータが評価される前記粒子は、0.1 μm～100 μmのサイズを有する、項目59～100のいずれかに記載の方法。

(項目 102)

前記サイズは、0.1 μm～20 μmである、項目59～101のいずれかに記載の方法。

(項目 103)

前記サイズは、5 μm～15 μmである、項目59～102のいずれかに記載の方法。

30

(項目 104)

前記サイズは、少なくとも15 μm、少なくとも14 μm、少なくとも13 μm、少なくとも12 μm、少なくとも11 μm、少なくとも10 μm、少なくとも9 μm、少なくとも8 μm、少なくとも7 μm、少なくとも6 μm、少なくとも5 μm、少なくとも4 μm、少なくとも3 μm、少なくとも2 μm、または少なくとも1等、1 μm～15 μmである、項目59～103のいずれかに記載の方法。

(項目 105)

評価される前記パラメータは、液体試料の体積あたりの前記生物学的粒子の数である、項目59～104のいずれかに記載の方法。

(項目 106)

評価される前記パラメータは、前記生物学的粒子の直径、面積、外周、非対称性、円形性等の形態学的特性である、項目59～105のいずれかに記載の方法。

40

(項目 107)

評価される前記パラメータは、生物学的粒子の付着および/または凝集度の決定であり、好ましくは、凝集度は、細胞の凝集塊中の個々の細胞の数の前記実質的な決定を可能にする、項目59～106のいずれかに記載の方法。

(項目 108)

評価される前記パラメータは、生物学的粒子の種である、項目59～107のいずれかに記載の方法。

(項目 109)

評価される前記パラメータは、生物学的粒子の代謝状態である、項目59～108のい

50

すれかに記載の方法。

(項目 110)

評価される前記パラメータは、核小体の数、サイズ、および形状等の細胞内特性である、項目 59～109 のいずれかに記載の方法。

(項目 111)

評価される前記パラメータは、前記空間光強度画像中の生物学的粒子の位置である、項目 59～110 のいずれかに記載の方法。

(項目 112)

空間光強度情報の画像が記録され、前記空間光強度情報は、前記試料区画の壁部を通して記述された前記第2の光源からの励起光によって引き起こされる蛍光に関する情報である、項目 59～111 のいずれかに記載の方法。

10

(項目 113)

第2の空間光強度情報の第2の画像が記録され、前記第2の空間光強度情報は、第3の光源からの励起光によって引き起こされる蛍光に関する情報である、項目 59～112 のいずれかに記載の方法。

(項目 114)

第3の空間光強度情報の第3の画像が記録され、前記第3の空間光強度情報は、前記試料区画の前記壁部を通して記述された前記第2または第3の光源からの励起光によって引き起こされる、好ましくは、第4または後続の光源からの励起光によって引き起こされる、蛍光に関する情報である、項目 59～113 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 115)

第4の空間光強度情報の第4の画像が記録され、前記第4の空間光強度情報は、蛍光に関する情報である、項目 59～114 のいずれかに記載の方法。

(項目 116)

前記第1の空間光強度画像中の生物学的粒子の位置は、生物学的粒子と関連した光強度情報の別の記録された画像中の光強度情報の存在を決定するために使用され、好ましくは、もう一方の光強度情報は、蛍光である、項目 59～115 のいずれかに記載の方法。

(項目 117)

生物学的粒子の位置は、空間光強度情報の第1および第2の画像中の情報を組み合わせることによって決定され、前記画像は、前記第1の光源からの照明を使用し、前記画像のための実質的に異なる変調手段を適用して記録され、好ましくは、前記画像は、暗視野および明視野画像である、前記項目に記載の方法。

30

(項目 118)

生物学的粒子の位置は、空間光強度情報の3つまたはそれを上回る画像中の情報を組み合わせることによって決定され、前記画像は、前記第1の光源からの照明を使用し、前記画像のための実質的に異なる変調手段を適用して記録される、前記項目に記載の方法。

(項目 119)

生物学的粒子と関連した光強度情報の存在の決定は、生物学的粒子の種および/または条件の前記評価のために使用される、項目 59～116 のいずれかに記載の方法。

40

(項目 120)

生物学的粒子と関連した第2または追加の光強度情報の強度の決定は、生物学的粒子の種および/または条件の前記評価のために使用される、項目 59～119 のいずれかに記載の方法。

(項目 121)

生物学的粒子と関連した第2または追加の光強度情報の強度の決定は、バイオマーカーを含む生物学的粒子の種および/または条件の前記評価のために使用される、項目 59～120 のいずれかに記載の方法。

(項目 122)

生物学的粒子の条件は、代謝条件である、項目 59～121 のいずれかに記載の方法。

(項目 123)

50

前記励起光は、前記検出素子の配列の反対側で前記試料区画に入る、項目59～122のいずれかに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、本発明による画像サイトメータの一実施形態を図示する。

【図2A】図2Aは、観察された対比を図示するグラフを示す。

【図2B】図2B-Gは、光の異なる波長を使用して記録された、明視野画像を図示する。

【図2C】図2B-Gは、光の異なる波長を使用して記録された、明視野画像を図示する。

10

【図2D】図2B-Gは、光の異なる波長を使用して記録された、明視野画像を図示する。

【図2E】図2B-Gは、光の異なる波長を使用して記録された、明視野画像を図示する。

【図2F】図2B-Gは、光の異なる波長を使用して記録された、明視野画像を図示する。

【図2G】図2B-Gは、光の異なる波長を使用して記録された、明視野画像を図示する。

【図3A】図3は、傾斜した光源の配列および光の遮蔽効果を図示する。

20

【図3B】図3は、傾斜した光源の配列および光の遮蔽効果を図示する。

【図3C】図3は、傾斜した光源の配列および光の遮蔽効果を図示する。

【図3D】図3は、傾斜した光源の配列および光の遮蔽効果を図示する。

【図3E】図3は、傾斜した光源の配列および光の遮蔽効果を図示する。

【図3F】図3は、傾斜した光源の配列および光の遮蔽効果を図示する。

【図4】図4は、蛍光ポリマービーズの強度を図示するグラフを示す。

【図5A-1】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5A-2】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5B】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5C】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

30

【図5D】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5E】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5F】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5G】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5H】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5I】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5J】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【図5K】図5は、明視野画像中の受動的光変調の構成を図示する。

【発明を実施するための形態】

【0013】

一実施形態による画像サイトメータの1つの第1の効果は、画像サイトメータが、明視野モードと、暗視野モードと、蛍光モードとの間で切り替えられるように構成されることが可能であることである。本発明の好ましい実施形態では、第1の光源は、単一の光源のみが明視野モードおよび暗視野モードに必要とされるように、明視野光源および暗視野光源を提供してもよい。したがって、2つのモード間の切替は、光源または光学的手段の変更よりもむしろ交換手段によって得られ得る。好ましくは、第1の光源は、400nm未満の波長を有する光を射出するように構成される。この観点から、第1の光源は、紫外線(UV)明視野光源と見なされてもよい。UV明視野光源を使用する効果は、そのような照明が、400nmよりも高い波長を有する光を射出する光源からの光で記録された画像と比較して、粒子中のさらなる詳細および/または画像中のより高い対比を提供することであることが分かっている。

40

50

## 【0014】

本発明によると、第2の光源は、蛍光モードを提供してもよく、本発明の効果は、蛍光モードが、第2の光源または第2の光源からの蛍光灯を指向し得る部分を移動させることなく提供され得ることである。すなわち、蛍光モードは、蛍光灯源の移動または蛍光灯を指向し得る部分の移動がなくてもよいため、迅速に提供され得る。好ましくは、励起光は、蛍光モードを提供するための光軸に対する入射角であり、画像サイトメータの光軸は、試料領域と検出素子の配列との間の軸によって画定される。そのような設定の1つの効果は、検出素子上に露光された励起光の強度が有意に低減され得ることであることが分かっている。

(減衰手段および変調手段)

10

## 【0015】

本発明の好ましい実施形態では、画像サイトメータは、1つまたはそれを上回る所定の波長帯中の光強度を減衰させるため等の、光学フィルタ等の減衰手段をさらに備え、好ましくは、減衰手段は、光軸に沿った所定の平面に配置される。さらに、画像サイトメータは、空間変調手段等の変調手段をさらに備えてもよく、好ましくは、変調手段は、光軸に沿った所定の平面に配置される。本発明のいくつかの実施形態では、減衰手段および/または変調手段は、第1の光源と試料領域との間の光路中に配置される。好ましくは、減衰手段および/または変調手段は、試料領域と検出素子の配列との間の光路中に配置される。より好ましくは、変調手段は、光軸に沿って検出素子に向かって試料領域を透過される視準光の焦点面内に、またはその近くに配置される。

20

## 【0016】

試料領域を透過される視準光の焦点面内に、またはその近くに配置される変調手段を有する多くの効果が多くあることが分かっている。まず第1に、高い空間周波数等の対比が、この位置における変調手段なしの配列と比較して改善され得る。第2に、視準光の焦点面が画像形成装置の開口絞りであってもよいため、変調手段は、拡張された被写界深度をもたらし得る。第3に、変調手段は、試料領域中の試料中の粒子によって屈折または分散された光のみが検出素子に到達することを可能にし、光源から直接出射される光を排除し得る。変調手段が試料領域を透過される視準光の焦点面内に、またはその近くに配置される配列によって、単純に、好適な変調を配置または除去することによって、高対比の明視野もしくは暗視野画像、または2つの組み合わせを記録する順応性を有する、画像サイトメータを実現することが可能であり得る。

30

## 【0017】

本発明のいくつかの実施形態では、減衰手段および/または変調手段のうちの2つまたはそれを上回るものは、減衰手段および/または変調手段の取り外しまたは交換を可能にする交換手段中に載置される。交換手段は、例えば、フィルタホイール等の回転ユニットを含んでもよい。2つまたはそれを上回る交換手段は、ゼロ、1つ、2つ、またはそれを上回る減衰および/または変調手段が同時に光軸に沿って位置付けられ得るようなものであってもよい。2つまたはそれを上回る交換手段を有する効果は、これらが変調手段、減衰手段、または両方の手段の組み合わされた効果を可能にすることであってもよい。別の効果は、2つまたはそれを上回る交換手段が、例えば、そのような交換手段が単一の交換手段より小さくてもよく、より迅速に回転することが可能であるため、同じ数の減衰手段および/または変調手段を有する単一の交換手段よりも迅速に、減衰手段および/または変調手段を交換し得ることであってもよい。

40

## 【0018】

本発明のいくつかの実施形態では、少なくとも1つの変調手段は、部分的に不透明または部分的に透明であってもよい。減衰および/または変調手段は同様に、ある部分で部分的に不透明であり、かつ異なる部分で部分的に透明であってもよく、好ましくは、その部分のうちの1つまたはそれを上回るものは、円形状である。したがって、少なくとも1つの変調手段の一部分は、部分的に不透明であってもよく、変調手段の別の部分は、部分的に透明であってもよい。好ましくは、減衰手段は、 $10^{-3}$ 未満、 $10^{-4}$ 未満、 $10^{-5}$ 未満。

50

<sup>5</sup> 未満、または 10<sup>-6</sup> 未満等、所定の倍数で光を減衰させてもよい。

【0019】

本発明の好ましい実施形態では、変調手段は、好ましくは、試料領域を通過する視準光を実質的に減衰させる、暗視野モードのために構成される障害物を備える。本発明の別の好ましい実施形態では、変調手段は、好ましくは、試料領域から出射する非視準光を実質的に減衰させる、明視野モードのために構成される開口を備える。明視野モードと暗視野モードとの間の切り替えが可能になることは、障害物および開口の切り替えによって達成され得る。したがって、明視野モードと暗視野モードとの間の切り替えは、変調手段によって、好ましくは、試料領域と検出素子の配列との間に位置する変調手段を挿入および/または交換することによって実現され得る。

10

【0020】

本発明の別の好ましい実施形態では、変調手段は、位相差顕微鏡変調手段を含む。したがって、変調手段は、位相差顕微鏡変調手段を構成してもよく、第1の光源によって出射される光の実質的な波長は、狭波長帯を有し、好ましくは、波長帯の幅は、50nm未満である。

(第1および第2の光源)

【0021】

光学的設定において、完全な視準を得ることが必ずしも可能ではなく、第1の光源からの視準光が、10度未満、より好ましくは、5度未満の偏角で視準光から偏位してもよいことが認められ得る。

20

【0022】

本発明の実施形態では、第1の光源からの波長は、200nm~700nmである。好ましくは、第1の光源からの波長は、300nm~395nmであってもよい。さらにより好ましくは、第1の光源からの波長は、320nm~380nmであってもよい。最も好ましくは、第1の光源からの波長は、350nm~380nmであってもよい。

【0023】

第2の光源からの励起光は、第1の光源からの光の波長とは実質的に異なる波長を有してもよい。好ましくは、励起光の入射角は、10~80度、好ましくは、20~60度、より好ましくは、30~50度であってもよい。代替として、励起光の入射角は、90度であってもよい。本発明の別の代替実施形態では、入射角は、110~180度、好ましくは、120~160度、より好ましくは、130~150度である。

30

(集束手段)

【0024】

本発明の好ましい実施形態では、集束手段は、レンズを含むが、本発明の別の同様に好ましい実施形態では、集束手段は、曲面鏡を含む。

(追加の光源)

【0025】

本発明のいくつかの実施形態では、画像サイトメータは、第3もしくは第4の、または第5もしくは第6の光源等、追加の光源をさらに備え、好ましくは、追加の光源は、励起光源である。光源は、調節可能な固体光源および/または調節可能な発光ダイオード等、発光ダイオード、および/またはダイオードレーザ、および/またはレーザであってもよい。調節可能な固体光源は、調節可能なレーザダイオードであってもよい。

40

(光学的手段および検出素子)

【0026】

本発明の好ましい実施形態では、光源は、試料領域にわたって、および/または検出素子の配列によって撮像される領域にわたって、実質的に均一な強度を有する光を提供するように構成される光学的手段に光学的に接続される。光学的手段は、マイクロレンズの配列を含んでもよい。代替として、光学的手段は、円柱マイクロレンズの配列を含んでもよく、好ましくは、円柱マイクロレンズの2つの配列を含んでもよく、円柱レンズは、実質的に垂直な配向である。検出素子の配列は、CCDまたはCMOSセンサ素子の配列であ

50

つてもよい。

(露光)

【0027】

本発明によると、光源は、1秒未満、好ましくは、0.1秒未満の持続時間、光を出射するように構成される。好ましくは、光源は、0.0001～0.1000秒、好ましくは、0.0001～0.0500秒の持続時間、光を出射するように構成される。しかしながら、高感度が蛍光撮像において必要とされるとき等、ある状況において、光源は、2秒を上回る、3秒を上回る、4秒を上回る、5秒を上回る、6秒を上回る、7秒を上回る、8秒を上回る、9秒を上回る、10秒を上回る等、1秒を上回る持続時間、光を出射するように構成されてもよい。

10

(光の遮断)

【0028】

本発明の一実施形態では、励起光源からの光は、励起光ビームからの光線を選択的に除去することによって、画像形成手段の入口に到達することから実質的に除外されてもよい。光線は、励起光ビーム中に1つまたは複数の障害物を配置することによって選択的に除去されてもよく、好ましくは、励起光ビームは、障害物が配置された平面内で実質的に視準される。

(画像形成手段)

【0029】

本発明の好ましい実施形態では、画像形成手段は、10 μm～150 μm等、5 μmを上回る被写界深度を提供するように構成される。このようにして、試料領域は、例えば、試料が異なる深度に位置付けられる粒子を有するとき、試料領域中の試料の鮮明な画像を取得するために、画像形成手段および/または検出素子の配列が除去される必要がなくてもよいように、被写界深度中で焦点があつてもよい。しかしながら、本発明のいくつかの実施形態では、画像形成手段、および/または検出素子の配列、および/または試料区画は、画像形成手段および/または検出素子の配列が試料に対する最適な位置に配置され得るように、移動するように構成されてもよい。1つの試料または試料の一部が、例えば、1つの構成で焦点が合つてもよいが、別の試料または試料の異なる部分に変更するとき、もう一方の試料または試料の異なる部分は、焦点が合つていない可能性があり、したがって、試料、および/または画像形成手段、および/または検出素子の配列のいずれかを移動させる必要があり得る。

20

【0030】

本発明の好ましい実施形態では、画像形成手段は、200 nm～1000 nmの波長領域、より好ましくは、350 nm～1000 nmの波長領域、より好ましくは、350 nm～850 nmの波長領域の光を透過するように構成される。

【0031】

本発明のいくつかの好ましい実施形態では、画像形成手段は、顕微鏡対物レンズを備える。画像形成手段は、試料の線形拡大を提供するように構成されてもよい。好ましくは、線形拡大は、20：1よりも小さい。線形拡大はまた、1：1～20：1の範囲、好ましくは、1：1～10：1の範囲、より好ましくは、1：1～4：1の範囲であつてもよい。

30

【0032】

本発明のいくつかの好ましい実施形態では、画像サイトメータは、2つまたはそれを上回る画像形成手段が画像の記録間で交換されることを可能にする手段を有して構成される。撮像手段を交換する目的は、好ましくは、画像の線形倍率を変更すること、および/または視野深度を変更すること等、画像サイトメータの光学的特性を変更することである。多くの場合、撮像手段の選択は、試料の先駆的に既知の特性に基づき行われるが、本発明のいくつかの好ましい実施形態では、撮像手段の選択は、解析される試料の評価の結果に基づき行われる。

(試料)

40

50

**【 0 0 3 3 】**

試料領域は、生物試料等の試料を含んでもよい。試料は、試料区画中にあってもよい。  
( 照明システム )

**【 0 0 3 4 】**

本発明によると、照明システムは、明視野光源および蛍光灯源である、画像サイトメタに対して必要とされる光源を提供するためのものであってもよい。本発明の好ましい実施形態では、照明システムと関連した集束手段は、第1の光源から視準光を形成するためのものである。さらに、励起光は、光軸に対する入射角であってもよい。照明システムは、すでに記載された画像サイトメタからの特徴のいずれかをさらに有してもよい。

( サイトメトリ方法 )

10

**【 0 0 3 5 】**

本発明の一側面では、生物試料の少なくとも1つの量パラメータおよび／または少なくとも1つの品質パラメータの評価のための方法が提供され、  
露光範囲を画定する平行壁部を有する試料区画に、ある体積の生物試料を適用するステップであって、壁部は、第1の光源からの光が試料区画の壁部を通過することを可能にする、ステップと、

試料区画を通過した光を能動検出素子の配列上に露光するステップであって、したがって、空間光強度情報の画像を記録する、ステップと、

個々の生物学的粒子からの光強度情報が、背景からの光強度情報とは異なると同定される  
ような方法で、画像を処理するステップと、

処理の結果を、生物試料中の生物学的粒子の少なくとも1つの量パラメータおよび／または少なくとも1つの品質パラメータに関連付けるステップと、  
を含む。

20

**【 0 0 3 6 】**

本発明は、試料との光学的相互作用を含む、生物試料の品質および／または量パラメタの評価のための方法およびシステムに関する。試料との光学的相互作用は、好ましくは、生物試料または該生物試料中の粒子との相互作用との結果として、光の強度および／または方向の変化をもたらし、好ましい相互作用のいくつかは、反射、屈折、回折、相互作用、散乱、または吸光度のうちの1つまたはそれを上回るものである。

**【 0 0 3 7 】**

30

本発明の好ましい実施形態では、評価される生物試料は、試料区画中に収容される。試料区画の好ましい特性は、試料の境界を画定することである。本発明の別の好ましい実施形態は、試料区画の壁部が、開放容器の底部である場合である。いくつかの実施形態では、試料区画の境界が、試料の底部または頂部のいずれかを画定する透明壁部によって形成される一方で、他の同様に好ましい実施形態では、試料区画は、評価される試料の厚さを画定する、2つの透明壁部によって形成され、試料は、壁部間に配置される。

**【 0 0 3 8 】**

本発明の1つの好ましい実施形態では、評価される生物試料は、生物学的粒子の懸濁液である。生物学的粒子のそのような懸濁液は、より大きい試料体積の一部分であってもよく、評価の目的は、より大きい試料体積の特性を決定または推測することであり得る。別の同様に好ましい実施形態では、生物試料は、基質上で成長した、および／または成長している細胞の試料である。代替として、試料は、液体試料であってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、基質は、懸濁液中にある一方で、他の同様に好ましい実施形態では、そのような基質は、試料区画の一体化部であるか、またはそれになることができる。概して、試料区画中に配置される基質は、実質的に透明であり、多くの好ましい実施形態では、透明基質プレートは、試料区画の壁部であることが好ましい。

40

**【 0 0 3 9 】**

本発明の好ましい実施形態では、生物試料の少なくとも1つの量パラメータおよび／または少なくとも1つの品質パラメータの評価は、個々の細胞の解析である。そのような個々の細胞は、多くの場合、懸濁液中または基質上のいずれかで単離されるが、そのような

50

個々の細胞はまた、細胞の凝集塊中にあってもよく、そのような細胞は、互いに付着する。本発明の他の好ましい実施形態では、生物試料の少なくとも1つの量パラメータおよび/または少なくとも1つの品質パラメータの評価は、組織試料等、細胞の大部分の解析である。

#### 【0040】

本発明のいくつかの最も好ましい実施形態では、第1の光源は、発光ダイオード(LED)、および/またはダイオードレーザ、および/またはレーザである。LEDおよびレーザダイオードの特性のうちのいくつかは、小さい物理的サイズおよび電力効率等、本発明によるシステムの設計および動作において実質的な利点を提供する。本発明の多くの好ましい実施形態では、第1の光源からの光の波長は、400 nm未満である。多くの場合、第1の光源からの光の波長は、300 nm～395 nm等、200 nm～400 nmであることが好ましい。驚くべきことに、短波長の光の使用は、本発明による生物学的粒子の評価の実質的な改善を提供し、200 nm～250 nm、200 nm～300 nm、250 nm～350 nm、および320 nm～380 nm等の波長帯の光が全て好ましいことが分かっている。

10

#### 【0041】

多くの場合、評価される生物学的粒子は、光が粒子の特性を変化させ得る程度まで光に感受性があり、光の効果を低減するための1つの好ましい方法は、試料が光に露光される時間の長さを制限することであり、光源が試料上に光を出射する時間を制限することであり、好ましくは、光源からの光の照明の持続時間は、1秒未満であり、より好ましくは、0.1秒未満である。他の同様に好ましい実施形態では、照明期間は、0.0001～0.0500秒等、0.0001～0.1000秒である。エネルギーで表現される場合、試料は、露光中、100 nJ/mm<sup>2</sup>またはそれを下回る、好ましくは、50 nJ/mm<sup>2</sup>またはそれを下回る、20 nJ/mm<sup>2</sup>またはそれを下回るもの等、200 nJ/mm<sup>2</sup>またはそれを下回るもので照明されることが好ましい。

20

#### 【0042】

本発明によると、生物学的粒子の評価のための1つの好ましい方法は、試料の体積からの空間光強度情報の画像の記録に基づき、個々の生物学的粒子からの信号は、背景からの光強度に対して減衰された光強度信号である。減衰は、反射、屈折、回折、干渉、吸収、散乱のうちの1つまたはいくつかによってもたらされ得る。これらの実施形態では、生物学的粒子に関連する光は、背景からの信号よりも強度が低く、個々の細胞からの信号および背景からの信号が互いに異なる方法で画像を処理することが可能であるということに基づき、好ましくは、粒子からの信号は、背景からの信号よりも実質的に小さく、背景からの好ましい信号は、粒子に空間的にごく近接している。

30

#### 【0043】

いくつかの好ましい実施形態では、光の減衰は、光の散乱によって引き起こされ、そのような散乱は、光の屈折および/または反射等の過程に由来する。さらに、これらおよび他の好ましい実施形態では、減衰は、光の吸収によって引き起こされ、そのような吸収は、評価下の生物学的粒子の化学成分によって、および/または試料に意図的に添加される他の化学成分から引き起こされる。したがって、吸収は、試料に添加される試薬によって引き起こされてもよい。本発明による実施形態では、背景からの信号の強度に対して、生物学的粒子に関連した光の5%～70%の減衰が実現される。他の同様に好ましい実施形態では、背景からの光に対する生物学的粒子に関連した光の減衰は、50%～90%である。

40

#### 【0044】

本発明の他の同様に好ましい実施形態では、個々の生物学的粒子からの信号は、背景からの光強度に対する光強度信号の強化、例えば、観察された増加である。これは、典型的には、光信号の集束または他の変化と組み合わせて、散乱、干渉、反射、および屈折等の過程によって引き起こされ得、強化は、光の空間再分布の結果である。これらの実施形態では、生物学的粒子に関連する光は、背景からの信号よりも強度が高く、個々の細胞から

50

の信号および背景からの信号が互いに異なる方法で画像を処理することが可能であるということに基づき、好ましくは、粒子からの信号は、背景からの信号よりも実質的に高く、背景からの好ましい信号は、粒子に空間的にごく近接している。

【0045】

本発明のさらに他の非常に好ましい実施形態では、生物学的粒子からの光強度の記録された画像は、生物学的粒子に関連する信号を含み、そのような画像は、背景からの光強度に対する光強度の減衰および強化の組み合わせである光強度情報の変化を含む。

【0046】

概して、光強度情報の記録中の対比を増加させる効果を有する、本発明の多くの場合好ましい方法は、試料を通って透過または散乱される光を変調することである。好ましくは、そのような変調は、光源から能動検出素子の配列までの光路中の所定の平面における光特性の空間的差異に対応する。そのような変調は、典型的には、不透明、または実質的に不透明、または透明である手段等、変調手段の使用によってもたらされ、好ましくは、透明度、例えば、減衰は、所定の特性である。好ましくは、そのような変調手段は、不透明および透明手段の組み合わせとして実装され、したがって、変調手段は、所定の位置または領域では、不透明である一方で、他の所定の位置または領域では、透明である。変調手段の2つの好ましい実装は、第1に、その中に穴を有する不透明ディスク、および第2に、平行な光ビームの直径よりも実質的に小さい直径を有する不透明ディスクである。これらの2つの変調手段が組み合わせて使用されるとき、第1の手段の中心穴の直径は、第2の手段のディスクの直径と同様または同一である。好ましくは、不透明および/または透明領域の所定の位置は、変調手段の位置の近くの光学的平面における光源の画像に対応する。好ましくは、そのような変調手段は、試料を透過される光に対して異なる効果を有し、光は、生物学的粒子を透過される。変調手段の典型的な好ましい位置は、撮像システムの収集対物レンズに入る平行光の焦点面に近い。

10

20

【0047】

典型的には、変調手段の好ましい特性は、位相の変化、強度の変化、例えば、光の減衰、遮蔽、例えば、光の遮断等、変調手段を通過する光を変化させるものである。変調手段は、好ましくは、これらの特性のうちの1つまたはいくつかを含む。

【0048】

多くの好ましい実施形態では、変調手段は、光源と試料との間の位置の光軸に沿って配置される一方で、試料と能動検出素子の配列との間の光軸に沿った位置に変調手段を配置することが、同様に好ましい。さらに多くの好ましい実施形態は、光軸に沿って、試料の両側に変調手段を含む。試料と能動検出素子の配列との間の光軸に沿った位置においてのみ、変調手段を含んだ実施形態において、光源からの光は、それが試料を横断する際に実質的に平行であり、好ましくは、そのような平行光の光強度もまた、能動検出素子の配列によって撮像される試料の部分にわたって実質的に均一である。

30

【0049】

レンズ等の光学的構成要素が、試料区画からの光を能動検出素子の配列上に集束するために使用されるとき、試料区画を透過される平行光は、多くの場合、光軸に沿った平面で集束される。これらの条件下で、多くの場合、そのような焦点面にまたはその近くに変調手段を配置することが好ましい。好ましい実施形態では、生物学的粒子と相互作用し、それを、例えば、偏向、屈折、および/または散乱させる光は、撮像システムの収集対物レンズに入る。さらに、多くの場合、不透明および透明特性等の変調手段の特性は、この焦点面における光源の画像の形状に実質的に従うように配列されることが好ましい。多くの場合、変調手段の好ましい特性および形態は、試料区画を透過される光と、生物試料を透過される光との正味の効果の差である。

40

【0050】

変調手段を含む実施形態では、概して、光の所定の波長帯から成る光を生成する光源を使用することが好ましく、好ましくは、波長帯は、実質的に狭く、幅がわずか50nm、好ましくは、20nm未満等、30nm未満でさえある。さらに、典型的には、所定の波

50

長の光を使用することが好ましく、好ましくは、光の波長は、主に、250 nm ~ 400 nm、より好ましくは、300 nm ~ 390 nm等、400 nm未満である。

#### 【0051】

本発明の好ましい実施形態は、位相差画像を生成する方法であるが、試料区画を透過される光の波長が400 nm未満である条件下で配列される、変調手段を含む。

#### 【0052】

本発明のいくつかの好ましい実施形態は、光路に配置され得るか、または光路から取り外され得る変調手段を含み、多くの場合、好ましくは、2つまたはそれを上回る異なる変調手段が含まれる。したがって、2つまたはそれを上回る実質的な異なる変調手段が適用される場合、空間光強度の2つまたはそれを上回る画像が記録され得る。変調手段を含むか、または排除することによって光路を変化させることが可能である実施形態において、試料区画を透過される光からの光強度情報の2つまたはそれを上回る画像を記録することが好ましい。したがって、第1の光源を使用して記録された空間光強度情報の2つまたはそれを上回る画像が、光強度情報の処理で使用されてもよい。

10

#### 【0053】

好ましい実施形態では、試料区画の壁部を通される光源からの光は、壁部の表面に実質的に垂直である全体的な配向を有する。本発明の別の好ましい実施形態では、光源からの光は、それが試料を通過する際に実質的に平行である。本発明のさらに別の好ましい実施形態では、試料を通過した視準光は、集束手段と検出素子の配列との間に位置する平面に実質的に集束され、変調手段は、実質的に焦点面内に配置される。光源からの光が、好ましくは、レンズおよび/または鏡等の1つまたはそれを上回る光学的構成要素の使用によって誘導されるため、この配向は、光源の光軸として見なされ得、その文脈において、光源の光軸は、壁部の表面に実質的に垂直である。さらに、いくつかの実施形態では、多くの場合、試料区画の壁部が、能動検出素子の配列の視野方向に実質的に垂直であることが好ましい。同様に、光が、概して、レンズおよび/または鏡等の光学的構成要素の使用によって、能動検出素子の配列上に集束されるため、これは、検出素子の配列の光軸が壁部に垂直であることに対応する。したがって、本発明のいくつかの好ましい実施形態は、光源の光軸および検出素子の配列が実質的に単軸上にあるように、全てが単軸上に実質的に位置する光源、試料区画、および能動検出素子の配列を備え、この軸は、試料区画の壁部がこの共通の軸に実質的に垂直になるように、試料区画を通過する。

20

#### 【0054】

本発明の多くの非常に好ましい実施形態は、試料の照明のための2つまたはそれを上回る光源を含む。2つまたはそれを上回る光源は、典型的には、光軸の配列または波長等の特性が異なる。2つまたはそれを上回る光源を含む本発明の1つの好ましい実施形態は、第2の光源からの光が試料区画の壁部を通される場合であり、第2の光源は、主な光の方向が、ある角度で、好ましくは、垂直面に対して10 ~ 80度の角度で、試料区画の露光範囲を画定する壁部を通って入るような方法で、配列される。そのような配列は、典型的には、2つまたはそれを上回る光源が実質的に永続的な位置に載置されるとき、特に2つを上回る光源が載置されるとき、利点を提供する。さらに、そのような角度配列は、背景光信号の強度を低減し得ることが分かっている。さらに、本発明のいくつかの好ましい実施形態は、試料区画の壁部を通って光を照明および/または通過させる、4つ等、3つまたはそれを上回る光源を含む。他の同様に好ましい実施形態は、5つの光源等、4つを上回る光源を含む。光源の数の増加が、生物学的粒子の評価を実施する可能性を提供するため、処理が複数の光強度情報に基づく場合、6つ、7つ、8つ、または10等、8つを上回りさえする個々の光源を含む実施形態が好ましい。

30

#### 【0055】

ここで、および本考査の別の場所において、用語「主な光の方向」は、用語「光軸」と交換され得、典型的には、視準、集束、または分散のためであるかどうか、レンズおよび/または鏡の機能にかかわらず、1つまたはそれを上回るもの等の光学的手段および/または鏡と組み合わせて、光源または能動検出素子の配列等の別の能動構成要素によって形

40

50

成される。そのようなシステムの光軸は、概して、対称軸を有する。

#### 【0056】

本発明の好ましい実施形態では、2つまたはそれを上回る個々の光源は、好ましくは、そのような2つまたはそれを上回る光源が実質的に同期して動作され、したがって、出射される全光エネルギーを増加させる、および／または試料区画の照明範囲を拡大する、および／または試料区画の少なくとも一部のより均一な光強度照明を確実にするような状況において、例えば、波長に対して実質的に同一の光を出射する。これらの実施形態だけではなく、本発明の他の同様に好ましい実施形態においても、2つまたはそれを上回る個々の光源は、好ましくは、1つのそのような光源のみが1度にオンにされるか、または1つのそのような光源の光のみが1度に試料区画を照明しているように、そのような2つまたはそれを上回る光源が独立して動作されるような状況において、例えば、波長に対して実質的に異なる光を出射する。異なる光を出射するそのような2つまたはそれを上回る光源の1つの好ましい特性は、そのような光源のうちの少なくとも1つが、蛍光を生じさせることであり、好ましくは、そのような蛍光強度情報は、生物試料の少なくとも1つの量パラメータおよび／または少なくとも1つの品質パラメータを評価する目的で、減衰された光強度情報と組み合わせて使用される。

10

#### 【0057】

いくつかの好ましい実施形態では、全ての光源が、試料区画の同じ側に位置する。そのような実施形態では、多くの場合、そのような光源は、能動検出素子の配列から試料区画の反対側に位置することが好ましい。

20

#### 【0058】

多くの場合、2つまたはそれを上回る光源は、光源の光軸が試料区画の壁部に実質的に垂直にならないよう、蛍光を生じさせる光源が、試料区画の壁部に対してある角度で配置されるような方法で、配列されることが好ましい。そのような配列の1つの好ましい利点は、多くの場合、信号対背景(S/B)と呼ばれる、背景からの光の強度に対する生物学的粒子から出射される蛍光灯の強度の比の増加である。背景が、典型的には、対象の任意の生物学的粒子の外の光強度情報の画像中の領域である、背景からの光は、多くの源および／または現象に由来し得、それらのうちの一部は、検出素子の配列の光軸に対する光源の配向等、光源の特性に直接関連する。試料区画の壁部に対してある角度で光源を配列する他の同様に好ましい利点は、試料区画に対して固定位置で多くの光源を位置付け、したがって、機械的手段を使用することなく、2つまたはそれを上回る光源からの光での試料区画の照明を可能にすることが可能であることがある。そのような特性の好ましい利点は、タスクが、連続した2つまたはそれを上回る異なる波長で試料区画中の試料を照明することであるとき、システムのより単純な構造および／またはシステムをより迅速に動作させる能力である。さらに、励起光源のそのような配列は、そうでなければ能動検出素子の配列上に反射されて戻る可能性がある、光源の平面上に出射する光からの内部反射を低減することが分かっている。

30

#### 【0059】

本発明の1つの好ましい実施形態は、例えば、屈折および／または反射による光の減衰の記録のための光源の使用である。多くの場合、そのような光源からの光は、光の実質的な部分が平行または実質的に平行になるように、実質的に視準された方法で試料区画を透過されることが好ましい。驚くべきことに、そのような実質的に平行な光が、減衰の対比、すなわち、背景の領域中の透過された光の強度に対する、生物学的粒子による光の減衰の比を強化することができることが分かっている。本発明のこれらおよび他の好ましい実施形態では、試料を透過される光の一部分は、正確に平行ではないが、好ましくは、30°未満、15°未満等、平行に対して45°未満の角度である。光軸に対してわずか5°の光の発散等、10°またはそれを下回るもの等のさらに小さい発散が、多くの場合、好ましい。

40

#### 【0060】

いくつかの好ましい実施形態では、視準された条件下で記録された高対比が、実質的に

50

維持され得る一方で、適度な発散が、多くの場合、試料区画を透過され、能動検出素子の配列上に露光される光の強度を均一にすることに積極的に寄与することが分かっている。多くの場合、これらの実施形態の多くは、試料区画の実質的に外側のレンズまたは鏡等の光学的構成要素によってもたらされる、光源の集束点を有する。

【0061】

本発明の他の同様に好ましい実施形態では、光の減衰の記録に対して、光の減衰の記録のための試料区画を通過する光源からの光は、試料区画上に実質的に集束される。好ましくは、試料区画を透過される光の実質的な部分は、能動検出素子の配列によって記録され得る。

【0062】

本発明の非常に好ましい1つの特徴は、試料区画を通って、および／または試料区画上に透過される光が、能動検出素子の配列の視野にわたって実質的に強度が均一であることである。好ましくは、例えば、平均強度に対する強度の変動の比として表現される、均一な照明からの偏差は、25%未満、より好ましくは、10%未満、さらにより好ましくは、5%未満である。そのような特性は、概して、能動検出素子の配列上で記録される試料の光学的特性の変動を低下させる効果を有し、多くの場合、照明された光の強度によって実質的に決まる、特性の発現のより低い変動の結果である。これは、例えば、光の減衰および蛍光の出射の両方に対して明らかである。

【0063】

一配列中に配列される多くのレンズから成る光学的手段は、試料区画上に、および／または試料区画を通して、光源の光出射素子の複数の画像を実質的に集束するために配列され得る。マイクロレンズのそのような配列は、試料区画の一部分を効果的に照明する、好ましくは、光が能動検出素子の配列上に露光される部分のみを実質的に照射する目的で、本発明のいくつかの実施形態では、好ましい。

【0064】

マイクロレンズの1つの多くの場合に好ましい配列は、円柱マイクロレンズの配列を含む。そのようなマイクロレンズ配列は、好ましくは、円柱マイクロレンズの第2の、またはそれを上回る配列と組み合わせて使用され、典型的には、互いに垂直に配向される。そのような配列は、主に、それが、試料区画の一部にわたって均一な照明を作成することによって、および／または試料区画の一部上に光源から出射される高い割合の光を透過したことによって、照明の効率性を改善する場合、本発明のいくつかの好ましい実施形態に含まれる。いくつかの好ましい実施形態では、円柱マイクロレンズのそのような2つまたはそれを上回る配列の特性が、実質的に同一である一方で、他の多くの場合好ましい実施形態において、特性は、能動検出素子の配列の形状に形状が適合される照明を生成するために等、実質的に異なる。そのような形状を生成するために変更されるマイクロレンズの配列の特性は、例えば、レンズのピッチおよび／または焦点距離である。

【0065】

多くの場合、1つまたはそれを上回るレンズまたは鏡等、検出素子の配列上に露光される光を集束するための光学的手段を含むことが好ましく、そのような光学的手段は、対物面内の焦点深度として表される、露光された光の信号を集束する能力を有する。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、そのような集束手段は、5 μmよりも大きい、好ましくは、10 μm～150 μmの範囲の焦点深度を有する。

【0066】

減衰された透過光および出射された蛍光灯の記録の両方のために单一の光学的手段を使用するために、概して、検出素子の配列上への露光される光の集束のために使用される、1つまたはそれを上回るレンズが、200 nm～1,000 nmの波長領域の光に実質的に透明であることが好ましく、好ましくは、300 nm～1,000 nmの波長領域において透明であり、より好ましくは、350 nm～850 nmの波長領域において透明である。好ましくは、集束のために使用される1つまたはそれを上回るレンズは、その範囲内で光学的に収差補正される。好ましくは、1つまたはそれを上回るレンズの透明性は、光

10

20

30

40

50

の減衰が、領域内で 3 O D 未満、より好ましくは、1 O D 未満であるようなものである。

#### 【 0 0 6 7 】

蛍光灯等の出射された光が、典型的には、強度が弱い一方で、減衰を決定するために使用される光等の透過された光は、多くの場合、かなりの強度を有する。したがって、多くの実施形態では、多くの場合、任意に抑制フィルタを用いて光を減衰させることが好ましく、好ましくは、試料区画上に出射される光が、減衰される。好ましくは、使用される抑制フィルタは、1 O D を上回って、透過された光の強度を低減する、好ましくは、3 O D ほど、透過された光の強度を低減する、特性を有する。

#### 【 0 0 6 8 】

本発明の実施形態における能動検出素子の配列は、典型的には、C C D またはC M O S 10 センサのいずれかである。

本発明のいくつかの好ましい実施形態では、光減衰画像に加えて、2つまたはそれを上回る蛍光 (f l o r e s c e n c e) 光強度画像が記録される場合、蛍光灯は、フィルタおよび / または干渉フィルタ等、波長制限手段を使用して除去され、これらのフィルタが、画像の記録間に交換され得ることが好ましい。これらのフィルタは、線形平行移動または回転等によって、移動される固定具上に載置され得る。

#### 【 0 0 6 9 】

本発明の好ましい実装では、能動検出素子の配列上に露光される光の光学倍率は、対象物のサイズに対する試料区画中の対象物の任意の次元の投影のサイズの比として定義される、20 : 1 未満である。他の同様に好ましい実施形態は、1 : 1 ~ 20 : 1、好ましくは、1 : 1 ~ 1 : 10 の光学倍率を有する。いくつかの実施形態では、試料区画の大面積が撮像される場合、光学倍率は、1 : 1 ~ 4 : 1 の範囲内等、4 : 1 未満であることが好ましい。

#### 【 0 0 7 0 】

本発明のいくつかの実施形態が、固定光学倍率を有する手段を含む一方で、いくつかの同様に好ましい実施形態は、例えば、より低い倍率での細胞の検出およびより高い倍率での細胞の後続の詳細な解析を促進するために使用され得る、2つまたはそれを上回る光学倍率での画像の記録を可能にする手段を含む。いくつかの好ましい実施形態は、可変光学倍率のための手段、例えば、ズームを含む。

#### 【 0 0 7 1 】

本発明の好ましい実施形態の多くが、生物学的特性の特性を評価する目的で、多くの光強度画像を露光することを含むため、試料または試料中の粒子のいかなる移動も、制御下で保持されることが好ましく、より好ましくは、そのような移動は、最小限に保持されるべきである。したがって、液体試料の体積が露光中に静止していることが好ましく、静止は、生物学的粒子の画像の少なくとも一部が、それが露光中に同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるのと同様に動かない状況として定義される。さらに、光強度情報の2つまたはそれを上回る画像の生成のために、検出素子の配列上への光の1つを上回る露光装置 (e x p o s e r) があるとき、静止の状況が維持されることが好ましく、静止は、生物学的粒子の画像の少なくとも一部が、それが2回の露光時間中に同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるのと同様に動かない、好ましくは、それが3、4、5、または6回でさえある露光等、2回を上回る露光時間中に同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるような状況として定義される。最も好ましくは、静止の状況は、生物学的粒子の特性の評価のために処理される光強度情報の全画像の露光中に維持される。

#### 【 0 0 7 2 】

本発明の好ましい方法において、液体試料の体積は、露光中に静止しており、より好ましくは、静止は、露光前、中、後、およびそれらの間である。静止状態は、何も移動しない状況であるが、そのような状況は、粒子を含む試料の一部を、例えば、沈降または振動を通して移動させる、動作中の重力または運動力等の力がある場合があり、そのような力は、非意図的に、すなわち、能動的起動および / または制御なしで、試料に作用するため、生物学的粒子が液体中に懸濁したとき等、液体システム中で得ることが困難であり得る

10

20

30

40

50

。したがって、多くの場合、静止を、移動を引き起こし得る意図的な力が、試料、試料区画、または検出手段に印加されない状況と定義することが好ましい。別の好ましい定義は、静止が、生物学的粒子の画像の少なくとも一部が、第1または第2の光源を用いた露光時間を通して等、光源を用いた露光時間中に同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるのと同様に動かない状況として定義される場合であり、好ましくは、移動の原因は、意図的ではない。

#### 【0073】

静止の他の同様に好ましい定義は、試料中の生物学的粒子の画像が、それが光強度情報の収集中、好ましくは、2回またはそれを上回る露光中に、同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるのと同様に動かないように、静止が、試料が能動検出素子の配列に対して動かない状況として定義される場合であり、好ましくは、移動の原因は、意図的ではない。さらに、静止の他の同様に好ましい定義は、試料中の生物学的粒子の画像が、それが光強度情報の収集中、好ましくは、2回またはそれを上回る露光中に、同じ検出素子の実質的に境界内に収容されるのと同様に動かないように、試料が能動検出素子の配列に対して動かない状況として定義される場合であり、好ましくは、移動の原因は、意図的ではない。

#### 【0074】

静止状況を得るための1つの多くの場合の好ましい方法は、懸濁液中の生物学的粒子が、試料区画の内側の下方および/または上方境界まで沈降および/または浮遊することを可能にするために、懸濁した生物学的粒子を有する試料が、試料および/または試料区画の移動後、測定を開始するまで十分な時間にわたって動かないでいることを可能にし、したがって、試料区画に対する生物学的粒子の静止状況を得ることである。好ましくは、生物学的粒子の沈降および/または浮遊は、240秒未満、好ましくは、45秒等の100秒未満等、比較的短時間に実現される。より好ましくは、沈降時間は、10秒よりも長い、好ましくは、10~240秒の範囲内、より好ましくは、30~120秒の範囲内である。静止は、試料が試料区画に対して動かない状況として定義されてもよい。本発明の好ましい実施形態では、静止は、少なくとも10秒、少なくとも9秒、少なくとも8秒、少なくとも7秒、少なくとも6秒、少なくとも5秒、少なくとも4秒、少なくとも3秒、少なくとも2秒、または少なくとも1秒等の期間にわたるものと定義される。好ましくは、この期間は、露光前、中、および/または後であってもよい。

#### 【0075】

解析される試料の体積は、通常、体積のサイズが、典型的には、解析される個々の粒子の数に直接関連するため、生物学的粒子の評価の統計的品質に関連する。例えば、生物学的粒子の評価が、個々の粒子の計数に関係するとき、集計された粒子の総数は、結果の精度を決定する。解析される試料の体積に影響を及ぼす1つのパラメータは、その壁部によって画定される試料区画の厚さであり、したがって、試料区画の内部が $20\text{ }\mu\text{m} \sim 1,000\text{ }\mu\text{m}$ の平均厚を有する、本発明のいくつかの実施形態を好む。これらおよび他の好ましい実装において、 $20\text{ }\mu\text{m} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ の平均厚を有する。理想的には、試料区画の厚さは、不均一であるが、驚くべきことに、解析される試料区画の部分の平均厚が既知である限り、不均一な厚さからの実質的な偏差が、評価の結果を損なわないことが分かっている。さらに、生物学的粒子の評価が、試料の单一の解析のみを目的とする試料区画等、実質的に使い捨ての試料区画中で実施される実施形態では、各試料区画の平均厚が既知であるか、または好ましくは、本システムの手段によって決定されることが好ましい。

#### 【0076】

本発明の好ましい実装では、電磁放射が検出素子の配列上に露光される液体試料の体積は、 $0.05\text{ }\mu\text{L} \sim 5\text{ }\mu\text{L}$ 等、 $0.01\text{ }\mu\text{L} \sim 20\text{ }\mu\text{L}$ の範囲内である。検出素子の配列上に露光される評価される試料の全体積が、試料厚および検出素子の配列上に露光される試料区画の部分の面積を含む、いくつかの要因によって決まるため、この体積を決定するために本発明のいくつかの特徴を組み合わせることが可能であるが、好ましい実施形態の多くは、 $0.05\text{ }\mu\text{L} \sim 1.0\text{ }\mu\text{L}$ である、单一の露光中に解析される体積をもたらす。

10

20

30

40

50

評価の全体積は、好ましくは、試料区画中の試料の部分を異なる部分と交換することによって、あるいは試料区画を移動させ、したがって、試料区画の配列上に試料区画の異なる部分を露光することによってのいずれかで、試料の付加的部分を露出することによって、さらに増加され得る。試料または試料の一部分の配置または交換は、ポンプ、プランジャー等のポンプ手段を用いて、ならびに／または毛管力および／もしくは重力等の力を用いて、試料区画中に試料または試料の一部分を送り込むことによって達成され得る。試料または試料の一部分の配置または交換後、試料または試料の一部分は、本発明に従って、試料または試料の一部分を解析および／または評価するために、試料区画内で固定され、好ましくは、試料または試料の一部分への力の印加等であり、かつ試料区画が動き回され得る、任意の意図的な作用がないため、固定されている。

10

#### 【0077】

典型的には、検出素子の配列上に露光される試料の体積の決定に有意に寄与する1つの概して好ましい実施形態は、光強度情報を露光する光学的配列の表示領域であり、表示領域が実質的に固定された実施形態を含み、または同様に好ましい実施形態では、表示領域が光学的構成要素の調節に基づき決定され得る。単一の露光中に解析される体積の決定のための1つの好ましい方法は、露光システムの能動表示領域に関する情報と、試料区画の厚さに関する情報を組み合わせることである。本発明の一実施形態によると、試料区画の厚さは、使用中の試料区画に対して個々に決定される。さらに、試料区画は、試料の単一の解析を目的としてもよく、多くの好ましい実施形態では、試料区画は、単一の試料の解析のみに使用され得る。

20

#### 【0078】

生物学的粒子は、種類および特性が様々であるが、概して、本発明の実施形態のいくつかにおいて、そのパラメータまたは複数のパラメータが評価される粒径が、0.1 μm～100 μmのサイズであることが好ましい。そのような粒径は、典型的には、粒子の平均直径であり、いくつかの同様に好ましい実施形態では、生物学的粒子のこの平均サイズは、0.1 μm～20 μmである。本発明の他の好ましい実施形態では、サイズは、5 μm～15 μmである。本発明のいくつかの実施形態では、サイズは、少なくとも15 μm、少なくとも14 μm、少なくとも13 μm、少なくとも12 μm、少なくとも11 μm、少なくとも10 μm、少なくとも9 μm、少なくとも8 μm、少なくとも7 μm、少なくとも6 μm、少なくとも5 μm、少なくとも4 μm、少なくとも3 μm、少なくとも2 μm、または少なくとも1等、1 μm～15 μmである。

30

#### 【0079】

生物学的粒子ならびにそのような粒子の特性の多様性が大きいため、本発明の実施形態は、生物試料および／または生物試料の粒子の多数の量および／または品質パラメータを評価するために使用され得る。そのような好ましいパラメータのうちのいくつかには、液体試料の体積あたりの生物学的粒子の数、生物学的粒子の直径、面積、外周、非対称性、円形性、生物学的粒子の付着および／または凝集度の決定があり、好ましくは、凝集度は、細胞の凝集塊中の個々の細胞の数の実質的な決定を可能にする。他の同様に好ましいパラメータは、生物学的粒子の種、生物学的粒子の代謝状態、核小体の数、サイズ、形状等の細胞内特性である。

40

#### 【0080】

さらに、評価が、1つの画像が光の減衰を表す、空間光強度情報の2つまたはそれを上回る画像の記録を含む場合に、試料中の生物学的粒子の多くの場合好ましい1つの特性は、空間光強度画像中の生物学的粒子の実質的な位置である。粒子のこの位置は、好ましくは、蛍光等、他の光強度情報を粒子に関連付けるために使用される。これは、例えば、多くの場合、個々の粒子の大部分の中で、一部の粒子がそのような他の光強度情報を反映する一方で、他の粒子が、この光強度情報を実質的に反映しないことが予測され得るときに、好ましい。そのような光強度情報が実質的に存在しないことは、そのような粒子が、時として、背景と区別され得る情報を示さないため、光強度情報だけに基づき、そのような粒子の存在を決定することを困難にし得る。これらの場合、多くの場合、粒子の位置が、

50

空間画像強度の他の画像に基づき得られ得ることが好ましい。

【0081】

本発明の好ましい実施形態は、生物試料および／または生物学的粒子の特性の評価のための方法を含み、空間光減衰情報の画像が記録される。これらの実施形態の多くは、好ましくは、画像情報の処理中に含まれる、空間光強度情報の追加の画像を記録するステップをさらに含み、追加の空間光強度情報は、蛍光に関する情報である。いくつかの実施形態では、この追加の蛍光画像情報は、試料区画の壁部を通される光源からの励起光によって生成され、減衰画像情報を生成するために使用され、出射フィルタが採用され、したがって、蛍光を生成する。他の同様に好ましい実施形態では、そのような追加の蛍光情報画像は、追加の光源からの励起光によって生成される。より多くの情報が、概して、空間光強度情報の1つまたは2つを上回る画像を記録することによって記録されるため、概して、減衰情報の画像に加えて、2つの追加の蛍光情報画像が画像の処理中に含まれることが好ましく、典型的には、3つ、4つ、または5つの追加の蛍光情報画像を使用することがより好ましい。本発明の一実施形態によると、空間光強度情報の画像が記録され、空間光強度情報は、試料区画の壁部を通される第2の光源からの励起光によって引き起こされる蛍光に関する情報である。他の好ましい実施形態では、第2の空間蛍光灯強度情報は、第3の光源からの励起光によって引き起こされる。本発明の別の実施形態では、第3の空間光強度情報の第3の画像が記録され、第3の空間光強度情報は、試料区画の壁部を通される第2または第3の光源からの励起光によって引き起こされる、好ましくは、第4または後続の光源からの励起光によって引き起こされる、蛍光に関する情報である。本発明の第3の実施形態では、第4の空間光強度情報の第4の画像が記録され、第4の空間光強度情報は、蛍光に関する情報である。10

【0082】

本発明の実施形態では、生物試料および／または生物学的粒子のパラメータが複数の画像を含む場合は、処理中に含まれ、通常、必要とされる画像情報を得るために、2つまたはそれを上回る光源を使用することが好ましい。通常、2つ、3つ、4つ、または5つの個々の光源である、光源の数および性質は、光の波長および強度、減衰および散乱、ならびに蛍光の場合、背景抑制等の特性を反映する。20

【0083】

そのような多重画像処理のいくつかの非常に好ましい実施形態では、生物学的粒子の位置に関する空間情報が、空間光強度情報の画像の処理の一体化された特徴であることが好ましい。30

【0084】

多重画像情報の処理を含む実施形態では、評価され得る生物学的粒子のパラメータは、好ましくは、生物学的粒子の種、生物学的粒子の条件の評価のうちの1つまたはいくつかであってもよく、好ましくは、生物学的粒子の条件は、細胞周期、生存能力、活力、アポトーシス、運動性等の代謝条件である。本発明の好ましい実施形態では、第1の空間光強度画像中の生物学的粒子の位置は、生物学的粒子に関連する光強度情報の別の記録された画像中の光強度情報の存在を決定するために使用され、好ましくは、もう一方の光強度情報は、蛍光である。本発明の別の好ましい実施形態では、生物学的粒子の位置は、空間光強度情報の第1および第2の画像中の情報を組み合わせることによって決定され、画像は、第1の光源からの照明を使用して、画像のための実質的に異なる変調手段を適用して記録され、好ましくは、画像は、暗視野および明視野画像である。本発明のさらに別の好ましい実施形態では、生物学的粒子の位置は、空間光強度情報の3つまたはそれを上回る画像中の情報を組み合わせることによって決定され、画像は、第1の光源からの照明を使用して、画像のための実質的に異なる変調手段を適用して記録される。生物学的粒子に関連する第2または追加の光強度情報の強度の決定は、生物学的粒子の種および／または条件の評価のために使用されてもよい。代替として、生物学的粒子に関連する第2または追加の光強度情報の強度の決定は、バイオマーカーを含む生物学的粒子の種および／または条件の評価のために使用されてもよい。40

## 【0085】

本発明の多くの好ましい実施形態では、使用される光源は、調節可能な固体光源である。調節可能な光源の存在は、本発明によるシステムの設計を有意に単純化することができ、また、調節可能な固体光源が蛍光灯の励起のために使用されるとき等、より大きい順応性を可能にする。好ましくは、そのような調節可能な固体光源は、発光ダイオード（LED）あるいはレーザダイオードのいずれかである。

## 【実施例】

## 【0086】

（実施例1）

（画像サイトメータ）

10

図1は、本発明のいくつかの好ましい実施形態を含む、画像サイトメータの可能な構成を図示する。図面は、4つの主な構成要素の群、試料ホルダ（100）、照明手段（110）、撮像手段（120）、および検出手段（130）を概説する。最後に、画像サイトメータの主な光軸（140）を図示し、それに沿って、光学的構成要素の大部分が配列される。

## 【0087】

試料ホルダは、試料が撮像手段と集束整合していることを確実にするために、撮像手段に対して光軸に沿って移動され得る。試料区画（101）は、光路中の試料台（102）上に配置される。試料区画は、典型的には、試料台に取り付けられるが、画像サイトメータから除去され、手動あるいは自動過程を通して再び交換され得るように、そこから解放され得る。試料台は、光軸に垂直な2つの方向で移動することができる。これは、試料区画内の試料の異なる部分が評価されることを可能にする。

20

## 【0088】

照明手段は、試料区画の所望の照明を維持するために、光軸に沿って移動することができる。照明手段は、通常、2つまたはそれを上回る光源を含む（3つが示される）。図面は、光軸状に位置する光源（111）を示し、検出器に向かった方向における試料の照明は、多くの場合、目的が、明視野または暗視野画像等、受動的光減衰および/または散乱特性の画像を生成することであるときのみ、好ましい。加えて、図面は、2つの蛍光灯源（112）を示し、それらは、光軸に対して傾斜して試料区画を照明し、粒子からの信号が背景からの信号とは異なると同定される条件を改善することが分かっている。さらに、単一の配列中に2つの発光ダイオードを配置することによる、単一の波長を出射する光源（112a）ならびに2つの波長を出射する光源（112b）を図示する。

30

## 【0089】

撮像手段は、公称倍率等の実質的に異なる特性を有する2つまたはそれを上回る収集対物レンズ（121aおよび121b）を交換することが可能である配列中に、収集対物レンズ（121）を備える。2つまたはそれを上回る収集対物レンズは、線形あるいは円形移動のいずれかによって交換される。光変調手段は、好ましくは、2つまたはそれを上回り、フィルタ、開口、障害物、または位相差素子等、それぞれ $Y_i$ （122）および $X_i$ （123）と表示される、多くの光学的に能動的な構成要素を含む。光変調手段は、光学的構成要素のそれぞれが収集対物レンズから出射される光のビーム中に配置され得るように、光軸に垂直に移動され得、移動は、線形あるいは円形であってもよい。各光変調手段は、好ましくは、全ての光変調手段が、この空の位置が光ビーム中に位置するように配列される場合、変調が行われないように、光学的構成要素のない位置を有する。撮像手段は、検出器上に収集対物レンズからの光を集束する、集束手段（124）を含む。

40

## 【0090】

検出手段は、光強度情報の集束された画像を記録するために、光軸に沿って移動され得る。情報は、能動検出素子（131）の配列、感光性カメラを使用して収集される。

## 【0091】

画像サイトメータの動作およびデータの収集は、コンピュータ手段（図示せず）によって制御される。コンピュータ手段は、好ましくは、生物学的粒子の自動同定および評価の

50

ために使用され得る、画像処理手段を備える。

【0092】

(実施例2)

(低波長顕微鏡法の特性)

本発明による明視野顕微鏡法における対比を、Jurrkat細胞(ヒト白血病細胞株、サブクローニングA3、ATCC CRL-2570)の試料を測定することによって調査した。異なる波長の4つの光源を使用して測定を実施した。光源のうちの3つは、単色狭波長帯発光ダイオード(LED)であり、第4の光源は、広波長帯白色LEDであった。全ての光源が、出射された光が試料を通過するときに視準された、光学的配列中にあった。

【0093】

修正なしで狭波長帯LEDからの出力を使用したが、白色LEDからの出力は、修正して使用し、狭帯域フィルタを使用して修正した。白色LEDからの広波長帯光は、可視顕微鏡法の典型的な条件を表す。測定で使用される狭波長帯光の主波長は、以下の表2-1に列挙される。

【表1】

表2-1 光源のリスト

光源	主波長
LED 365 nm	365 nm
LED 400 nm	400 nm
LED 453 nm	453 nm
白色+フィルタ	555 nm
白色+フィルタ	720 nm

【0094】

懸濁液中にJurrkat細胞を含む試料を、約100μm厚の試料区画中に搭載した。試料区画を本光学システム中に配置し、明視野情報を、2×線形倍率を使用して能動検出素子の配列上に集束した。画像のそれぞれの集束および光強度を、同等の結果を生成するために調節した。

【0095】

光の相対減衰の基準である、背景の強度に対する細胞の積分強度の比として、個々の細胞の全強度対比を決定することによって、画像中の情報を解析した。対比決定の結果は、図2Aのグラフに示され、光源の波長帯の関数としての観察された対比を示す。グラフ中、実線は、白色LEDの広波長帯光を使用するときに観察された全強度対比を表す、400nm~750nmの波長範囲内で引かれる。

【0096】

図2B-2Gは、記録された画像の実施例を示す。図2Bは、365nmの光を使用して、2Cは、400nmの光を使用して、2Dは、白色光を使用して、および図2Eは、710nmの光を使用して記録された画像である。画像は、画像中の対比が、細胞の存在および空間位置の正確な同定の目的で、生物学的粒子の画像表示に対して深い影響を及ぼしたこと示す。

【0097】

図2Fおよび2Gは、より高い分解能で収集された画像のセクションを示す。図2F中、365nmの光を使用した画像であり、図2G中、710nmの光を使用した画像である。画像は、400nmを下回る波長の光を使用することが、長波長光を使用して収集された画像よりも詳細を示す画像をもたらすことを示すが、画像は、同様の条件下で収集される。365nmの光の画像は、長波長画像よりも、形状、サイズ、および相対位置に関するかなりの詳細を示す。

【0098】

(実施例3)

(背景に対する信号の強化)

生物試料の蛍光解析を実施するとき、画像中の十分な対比を得るために、励起および出

10

20

30

40

50

射光を管理することが重要である。対比を改善するために、基本的に2つのアプローチがあり、第1に、蛍光の励起に使用されるものよりも長い波長の光を低減するために、励起フィルタを使用することであり、第2に、能動検出素子の配列に達することから、蛍光灯よりも短い波長の光を低減するために、出射フィルタを使用することである。

#### 【0099】

信号対比が重要な側面である高感度蛍光解析を実施するために、収集された強度情報に影響を及ぼす本光学システムの全側面を考慮することが必要である。これは、励起強度、本システムの任意の構成要素の自家蛍光、および光学フィルタの減衰等の側面を含む。生物試料の蛍光空間強度情報の収集において対比を改善するタスクにおいて、第1に、蛍光信号の強度を最適化し、第2に、背景信号を最小限に抑えることが重要である。蛍光信号の強度は、主に、励起光の強度によって決定される。背景信号の強度は、能動検出素子の配列上への励起光の露光および光学的構成要素の自家蛍光の強度等、いくつかの側面によつて決まる。

#### 【0100】

理想的には、能動検出素子の配列上への励起光の露光は、無限の減衰または遮断を有する出射フィルタを使用することによって排除され得る。そのような理想的なフィルタは、実現することが困難であり、フィルタは、概して、 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 等所与の波長の割合に光を減衰させ(6~7桁の減衰)、したがって、高品質フィルタに加えて、励起光の露光に影響を及ぼす他の側面を考慮することが必要である。能動検出素子の配列の視野に対する励起光源の配向は、検出素子上への励起光の露光に大きな影響を及ぼし得、検出素子の視野軸に直接沿った全体的な配向は、通常、露光された励起光の最高強度をもたらす。視野軸を外れた励起光の全体的な配向は、検出素子上への露光された励起光の強度を低減するであろう。

#### 【0101】

本発明の好ましい実施形態では、励起光は、試料区画と能動検出素子の配列との間の軸に対してある角度で、試料区画中の試料に向かって指向される。そのような実施形態は、図3Aに示され、励起光の全体的な軸は、試料区画と能動検出素子の配列との間の軸に対して約40度である。図3A中、試料区画の底部を画定する透明壁部(303)および試料区画の頂部を画定する別の透明壁部(304)によって画定される、試料区画からの光を収集する、収集対物レンズ(301)を示す。対物レンズは、出射フィルタ(302)を通して試料区画からの光を透過し、それを能動検出素子の配列(図示せず)上に撮像する。

#### 【0102】

励起光は、発光ダイオード(305)によって生成され、それからの光は、励起光モジュール(306)中の第1のレンズによって収集され、励起光モジュール(306)は、1つまたはそれを上回るレンズ(2つが示される)と、励起フィルタおよび光分散素子等、1つまたはそれを上回る光変調素子(2つが示される)から成る。励起光モジュールからの光は、励起光からの光ビーム(307)の境界によって示されるように、試料区画上に集束される。図面中に示されるような条件下で、励起光の一部は、散乱(図示せず)によって、あるいは励起光ビームの一部が、受光角未満である角度で、収集対物レンズ(307a)の開口部に入る場合、生じ得る直接照明によってのいずれかで、収集対物レンズの視野に入ることができることが可能である。この光の大きな割合が、検出素子(309)に到達するために出射フィルタによって除去されるが、蛍光灯は、到達することができる(310)。出射フィルタは、大きな減衰を有するが、例えば、 $10^{-7}$ の倍数に限定され、小さいが光のこの割合が、検出素子に到達することができることを意味する。さらに、収集対物レンズの素子は、出射フィルタを通過し、検出素子上に背景画像を生成するであろう、蛍光(自家蛍光)を生成することができる。

#### 【0103】

図3Bは、励起光ビーム(307a)の割合に対応する、収集対物レンズの入口における光強度の図を示す。励起モジュールの構成要素の配列から、励起光モジュールの開口を

10

20

30

40

50

制限することによって、この光を低減することが可能であるが、これは、試料区画上に露光される励起光の総量を大幅に低減し、したがって、同様に、蛍光強度を低減する。本発明の好ましい実施形態は、図3Cに示され、障害物(311)が、励起光モジュール中に配置され、したがって、収集対物レンズの視野に入る光線を大幅に除去する励起光(312)の光ビームを変化させる。

#### 【0104】

図3Dは、ごく一部が障害物によって除去される、修正された励起光の光ビームの強度プロファイルを示す。図3Eは、収集対物レンズに入る、得られた光強度を示し、図3Bと比較して、光の延長が大幅に除去されていることを示すが、さらに、本実施例では、2つの画像のスケーリングが、図3Eが約 $\times 200$ の倍数で増幅されているようなものであり、励起光の強度が効果的に低減されていることを図示することに留意することが重要である。

10

#### 【0105】

以下の表3-1は、励起照明の強度および収集対物レンズに入る励起光の強度に対する障害物のサイズの効果を示す。表は、試料区画上に露光される励起光の相対量ならびに収集対物レンズに入る励起光の光ビームの相対量を示す。障害物は、励起光モジュール内の光の円柱ビーム中に線形スクリーンを配置することによって形成され、報告された値は、光ビームの直径に対する障害物の挿入である。

#### 【表2】

表3-1 励起光および収集対物レンズ中の光

20

障害物	励起光	対物レンズ中の光
0%	100%	11%
6%	98%	8%
13%	93%	3%
19%	85%	0.8%
22%	81%	0.18%
25%	77%	0.005%

#### 【0106】

弱蛍光性の粒子、例えば、比較的少ない蛍光色素を含有する粒子の解析における効果が、典型的な条件を使用して、以下で実証される。本発明の一実施形態において、0.20の開口数(NA)を有する収集対物レンズの使用が仮定される。さらに、粒子の蛍光変換効率が $2 \times 10^{-6}$ であること、同様に、試料区画の蛍光変換効率が $2 \times 10^{-7}$ であると仮定され、この蛍光は、透明壁部および/または他の材料中の不純物に由来する。出射フィルタは、収集対物レンズに入る励起光の大部分を減衰させるが、収集対物レンズに入ると、光は、光学的構成要素ならびに収集対物レンズ中の他の材料中の不純物によって引き起こされる、実質的な背景蛍光をもたらすことができ、この蛍光の実質的な部分は、出射フィルタを通過するであろう。したがって、収集対物レンズに入る励起光によって引き起こされる、検出素子上へと出射フィルタを透過される正味の光強度があり、出射フィルタを通過する散乱され、露光され、かつ蛍光の光の正味の強度が、 $5 \times 10^{-7}$ になると仮定されることができる。

30

#### 【0107】

これらの条件は、背景の全強度が粒子から観察された蛍光強度のものの約3倍であるため、生物学的粒子からの蛍光強度を評価することが非常に困難であるシステムを説明する。励起光モジュール中の励起光ビームに障害物を挿入することによって、収集対物レンズに入る光の量を低減し、したがって、背景信号を有意に抑制することが可能である。表3-1中、同時に、試料区画に入る励起光の総量もまた、はるかに小さい程度まで低減されることを示している。この効果は、以下の3-2に図示され、正規化された蛍光および背景信号を示す。

40

## 【表3】

表3-2 正規化された蛍光および背景信号

障害物	蛍光	試料背景	対物レンズ中の光	背景	信号／背景
0%	1.00	0.10	2.67	2.77	0.36 (1)
6%	0.98	0.10	1.98	2.08	0.47 (1.3)
13%	0.93	0.09	0.74	0.83	1.1 (3.1)
19%	0.85	0.09	0.16	0.24	3.5 (10)
22%	0.81	0.08	0.04	0.12	6.8 (19)
25%	0.77	0.08	0.00	0.08	9.6 (27)

## 【0108】

表3-2は、全背景信号が、蛍光強度よりも有意に迅速に低減することを示し、信号／背景(S/B)値で図示される(括弧内は、蛍光信号対背景信号の比の相対変化である)。表3-2の結果は、これらの条件下で、S/B比が、光ビームの直径の約25%を覆うよりも、励起光ビーム中に障害物を配置することによって30倍近く増加することを示唆する。これらの条件下で、蛍光灯の強度は、23%のみ減少した。

## 【0109】

(実施例4)

(粒子標準の検出)

典型的には、フローサイトメトリ器具を較正するために使用される、キャリブレーションビーズを同定および定量化するために、本発明によるシステムを使用した。ビーズは、蛍光の異なる強度を生成する8つの群を含む、直径3μmのビーズのセットである、Rainbow Calibration Particles (P/N RCP-30-5A) (Spherotech USA) であった。

## 【0110】

約475nmの狭帯域の励起光で試料を照明するために、かつ約536nmの波長帯における蛍光出射を検出するために、本発明の画像サイトメータを設定した。試料区画からの光を、NA 0.20の4×収集対物レンズを使用して収集し、能動検出素子の配列上に集束した。ビーズを、供給業者によって提供される説明書に従って取り扱い、約100μm厚の試料区画中に配置した。

## 【0111】

空間光強度情報の一連の画像を、能動検出素子の配列によって収集し、第1に、空間明視野光強度情報の露光を、粒子の位置に関する情報を取得する目的で収集し、第2に、空間蛍光灯強度の露光を、300msの積分時間を使用して収集した。明視野および蛍光画像の合計で35個の対を、試料区画を除去することによって試料の異なる部分から収集し、合計で70個の光強度画像をもたらした。

## 【0112】

各明視野画像を使用して、粒子の位置を決定し、この情報を使用して、その位置における蛍光画像を取得し、各粒子からの蛍光灯の全強度を積分する。合計で12,750個の粒子を解析し、その結果が、図4に示され、観察された蛍光強度のヒストグラムを示す。図は、キャリブレーションビーズの供給会社によって与えられる仕様書に従った、8つの異なる強度の群の明確な区別を示す。これは、本発明による画像サイトメータの感度が、当時の典型的なフローサイトメータと同様であることを実証する。

## 【0113】

(実施例5)

(明視野／暗視野構成)

付着性WeHi-S細胞(ネズミ線維肉腫細胞株)の試料を、図5Aに概略的に図示される本発明の画像サイトメータ中に配置し、約365nmの狭波長帯の光を出射する光源(503)で照明した。検出素子に向かって光を露光する、能動検出素子の配列(509)から2つの透明壁部(502および503)によって画定される試料区画まで延在する光軸上に、光源を搭載した。

## 【0114】

10

20

30

40

50

露光された光を、それが、収集対物レンズ（501）の光軸に実質的に平行である光のビーム（504）を形成するように、光学的手段（507）に通した。使用された収集対物レンズの特性は、光源から出射される平行光が、光の実質的な部分が、検出素子上に光を集めする収集素子（508）によって離れて指向されるように、対物レンズと能動検出素子の配列との間の光軸に沿って位置する、平面（506）上に実質的に集束されるようなものである。この配列を使用して、光から出射され、収集対物レンズを通される光の一部分は、その光が試料中の粒子によって偏向される場合に、試料のその位置からの光が、光強度を減衰し、したがって、粒子の空間明視野画像を形成する場合を除いて、均一な背景強度を形成する検出素子に入る。

## 【0115】

10

粒子によって偏向される光は、粒子の要素によって影響を受ける。そのように偏向される光は、方向を変化させ、いくつかの方向に出射され、異なる方向における光の強度は、粒子の特性によって決定される。偏向された光の一部は、収集対物レンズに入り、粒子から生じる異なる方向の光の束（505）を形成する。収集対物レンズに入る偏向された光は、それが収集素子に到達するとき、光の実質的に平行なビームを形成し、収集素子上に集束される。この偏向された光は、試料の明視野画像と混合される、光強度情報の空間画像を形成し、その実施例は、図5Dに示される。

## 【0116】

図5Bは、収集対物レンズと検出素子との間に位置する、光源から出射される実質的に平行な光の焦点面内に配置される、障害物（510）を示す。この障害物は、ディスクの穴によって形成される開口であり、穴の寸法は、それが、光源からの光が粒子によって分散される光を排除する検出素子に到達することのみを実質的に可能にするようなものである。得られた画像は、その実施例が図5Eに示されるが、明視野光情報の空間画像であり、対比は、すでに考察された該開口障害物なしの配列と比較して、実質的に改善される。この配列の追加の特性は、そのような明視野画像が、この明視野画像の集束が、試料区画を通過する光の視準の程度および障害物の開口の寸法によって大部分が決まるため、収集対物レンズの集束に対する感度がかなり小さく、したがって、実質的に大きな焦点深度を有する画像を促進することである。

20

## 【0117】

図5Cは、収集対物レンズと検出素子との間に位置する、光源から出射される実質的に平行な光の焦点面内に配置される、障害物（511）を示す。この障害物は、それが、粒子によって分散される光が光源から直接出射される光を排除する検出素子に到達することのみを実質的に可能にするような寸法を有し、かつそのように位置する。得られた画像は、その実施例が図5Fに示されるが、試料中の粒子の暗視野光情報の空間画像である。

30

## 【0118】

図5Gは、屈折率に関する特性が生物学的粒子のものと同様である、球状物体と相互作用する光線を図示する。視準光（520）が粒子（521）を照明するとき、光線が、屈折率の差によって屈折することを示し、屈折の程度は、粒子の光学的特性によって決定される。粒子（522）の周囲を通過する光は、まだ視準された状態で収集対物レンズ（図示せず）に入る。光の一部は、それらが入口の外側の収集対物レンズの入口の平面を照明し、したがって、検出素子の配列（図示せず）に到達しないように、大きな角度で分散される（523）。他の光線は、それらが収集対物レンズに入り、したがって、検出素子上で撮像されるように、小さい角度で屈折される（524）。

40

## 【0119】

粒子の周囲を通過する視準された光線を考慮すると、これらは、粒子の画像の外側でかなりの光強度を有し、粒子の内側でほとんどまたは全く光強度を有さず、検出素子上の画像を形成し、したがって、粒子の影を形成する。粒子と相互作用する光線は、異なる程度まで屈折され、そのうちのいくつかが、それらが垂直に粒子の境界を交差するため、ゼロの屈折角度を有する一方で、異なる分散角度を有するものもある。分散された光線を考慮すると、これらは、粒子が発光性であった場合に観察される画像とある程度同様であるが

50

、粒子の位置と一致しない、異なる暗視野集束点（525）を有する、粒子の画像を形成し、集束点は、粒子のサイズおよび光学的特性によって決定される。

【0120】

図5H-図5Jは、異なる照明条件を使用して記録された懸濁液中のCHO細胞の画像を示す。図5Hが、細胞の明視野画像である一方で、図5Iは、屈折された光が平行光の焦点面に開口を配置することによって遮断されている（図5Bを参照）、明視野画像であり、図5Jは、視準光が遮断されている（図5Cを参照）、暗視野画像であり、全ての画像は、個々に集束される。最後に、図5Kは、特定の染色を示す粒子の蛍光画像である。図5H、5I、および5Jの画像は、細胞の数を集計し、個々の細胞の蛍光強度を評価するために使用される情報である、個々の細胞の位置および輪郭を決定するために組み合わせて使用され、細胞特性を分類するために使用される。

10

【0121】

収集対物レンズの焦点面内の障害物が交換可能である配列によって、単純に好適な障害物を配置または除去することによって、高対比の明視野もしくは暗視野、または2つの組み合わせを記録する順応性を有する、画像サイトメータシステムを実現することが可能である。

Fig. 1

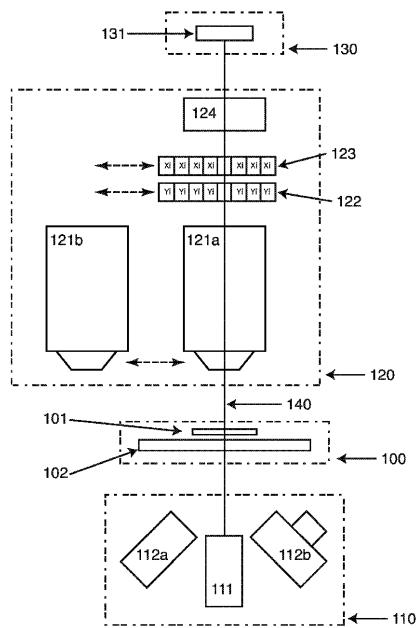
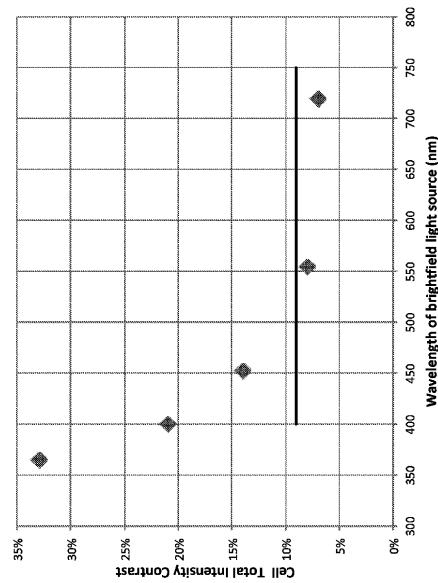


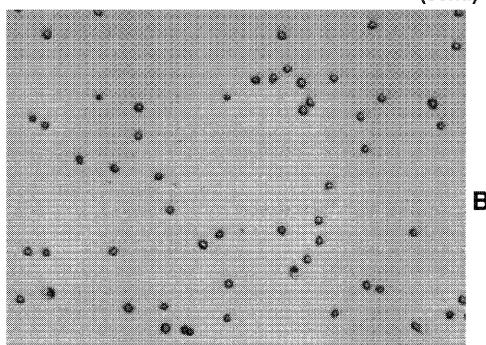
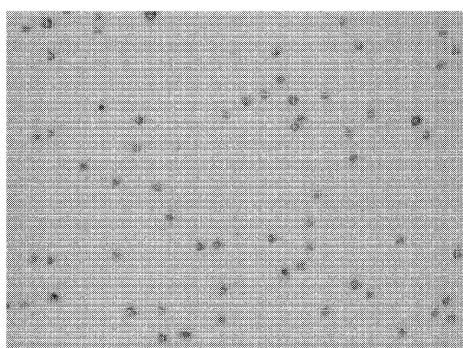
Fig. 2



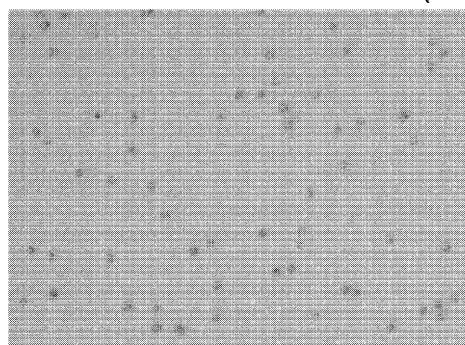
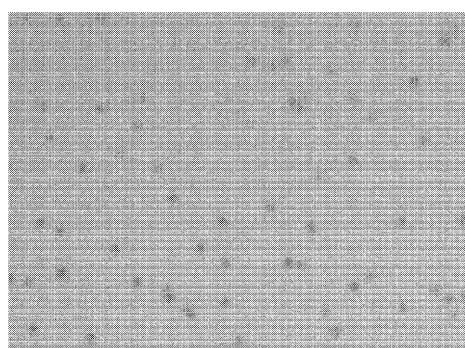
A

**Fig. 2**

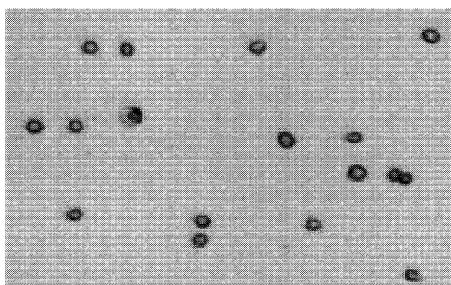
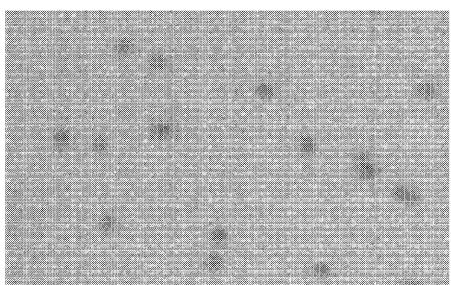
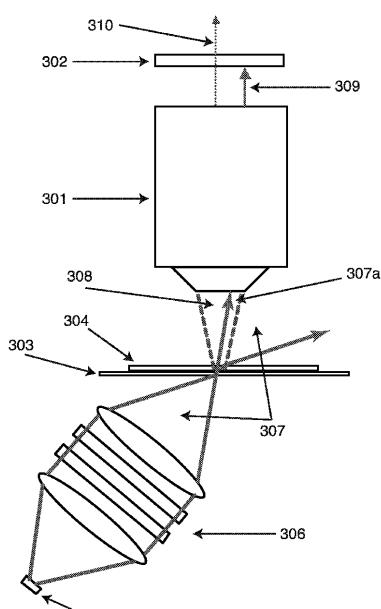
(cont.)

**B****C****Fig. 2**

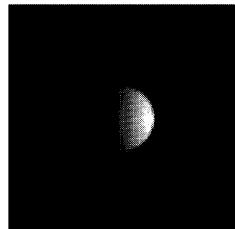
(cont.)

**D****E****Fig. 2**

(cont.)

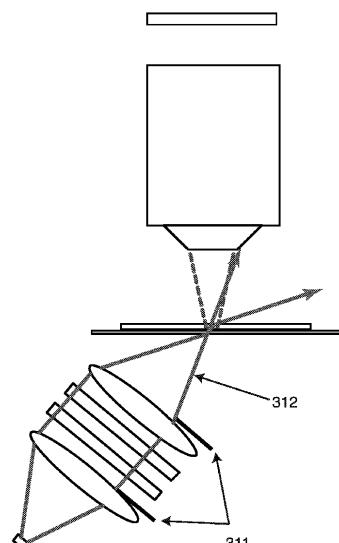
**F****G****Fig. 3****A**

**Fig. 3**  
(cont.)



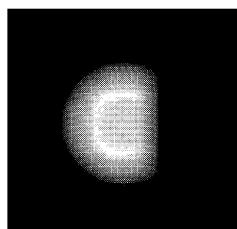
**B**

**Fig. 3**  
(cont.)

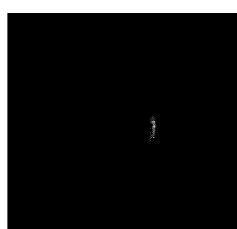


**C**

**Fig. 3**  
(cont.)

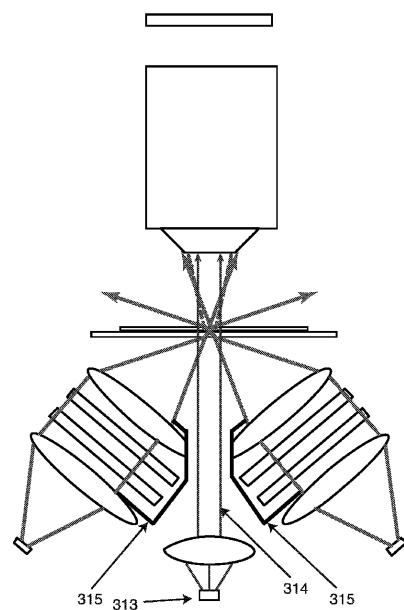


**D**

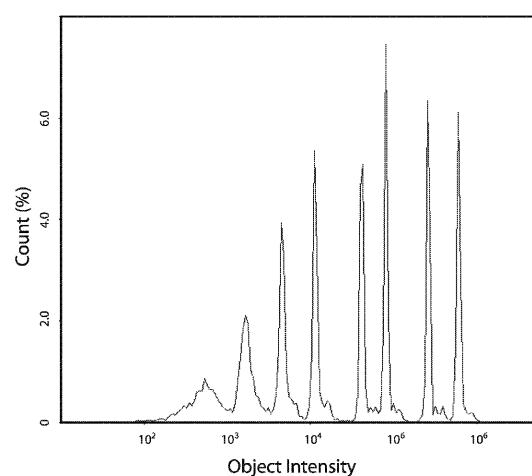
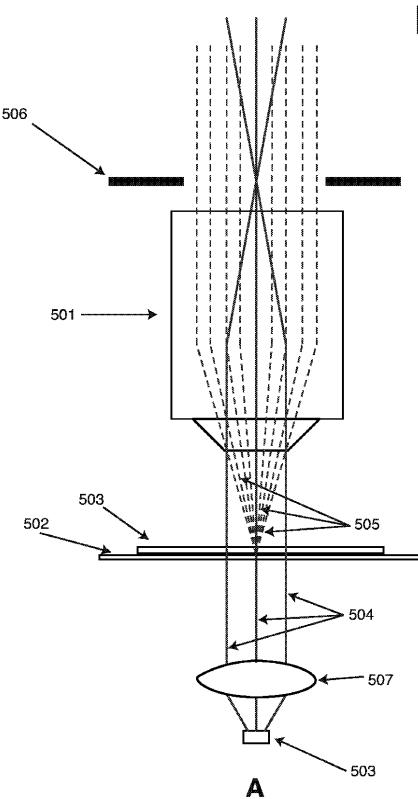
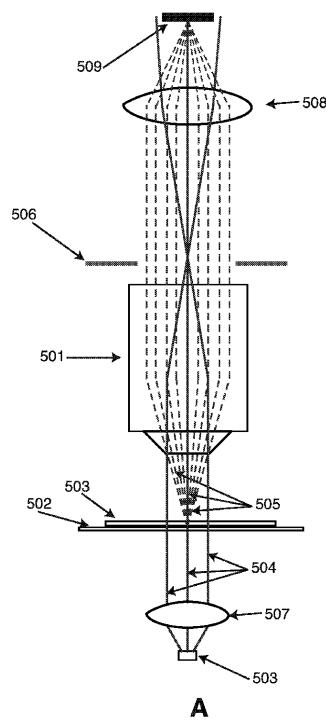


**E**

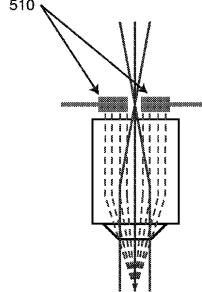
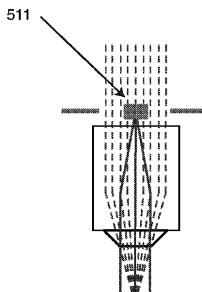
**Fig. 3**  
(cont.)

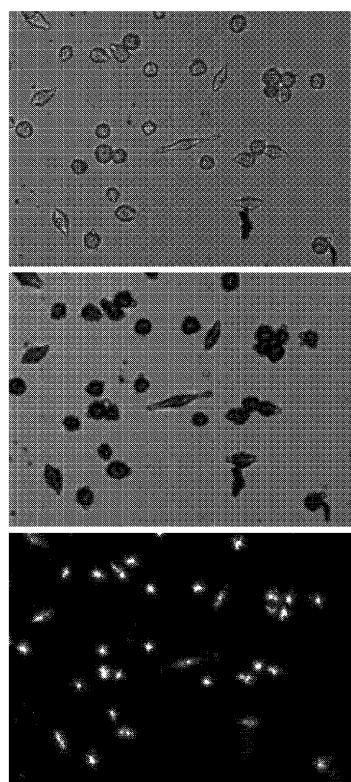


**F**

**Fig. 4****Fig. 5****Fig. 5****Fig. 5**

(cont.)

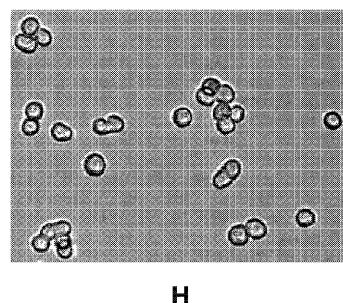
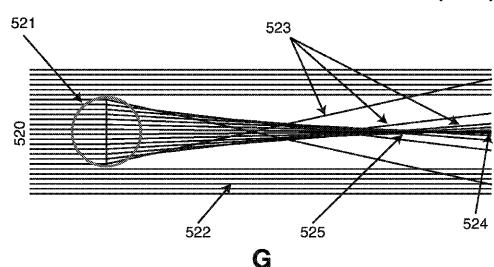
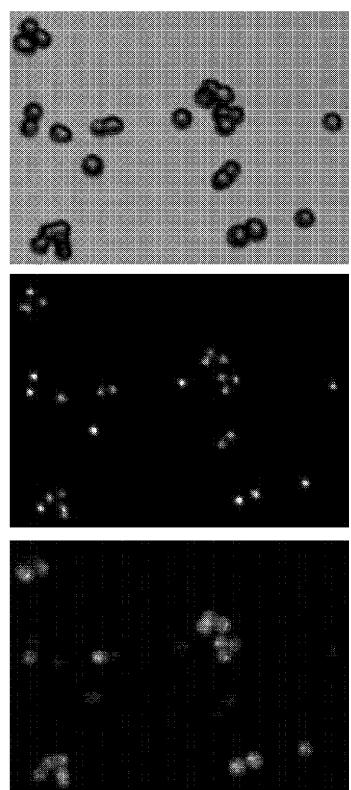
**B****C**

**Fig. 5**

(cont.)

**D****E****F****Fig. 5**

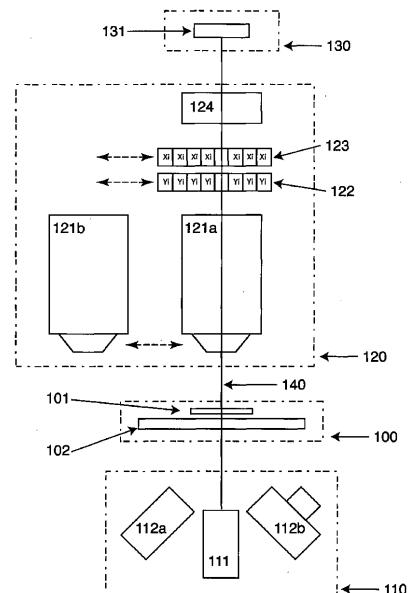
(cont.)

**H****Fig. 5**

(cont.)

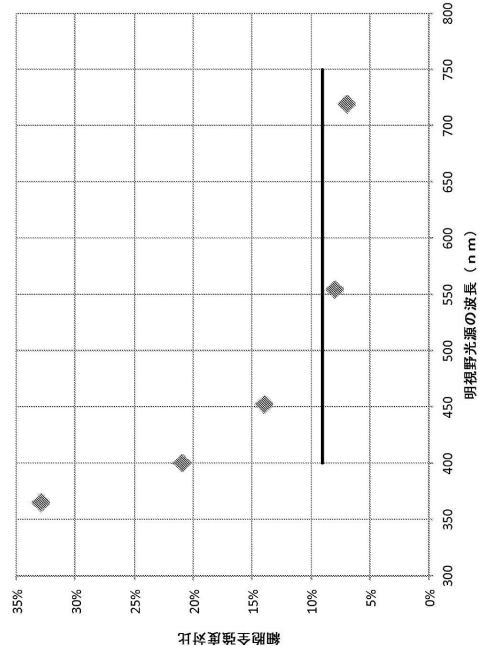
**I****J****K**

【図 1】

**Fig. 1**

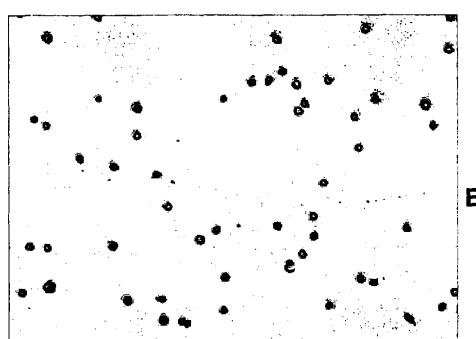
【図 2 A】

Fig. 2



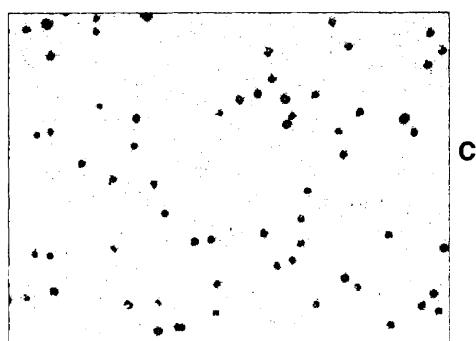
A

【図 2 B】



B

【図 2 C】



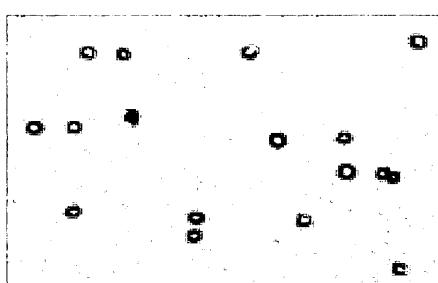
C

【図 2 D】



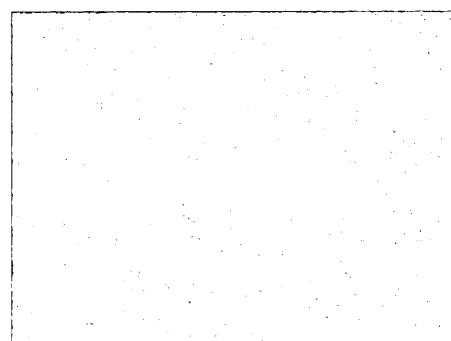
D

【図 2 F】



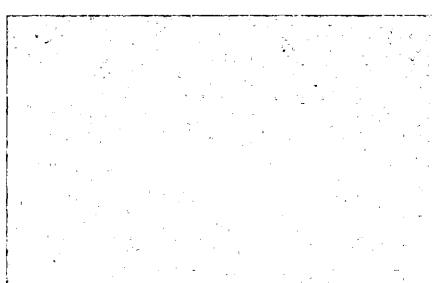
F

【図 2 E】



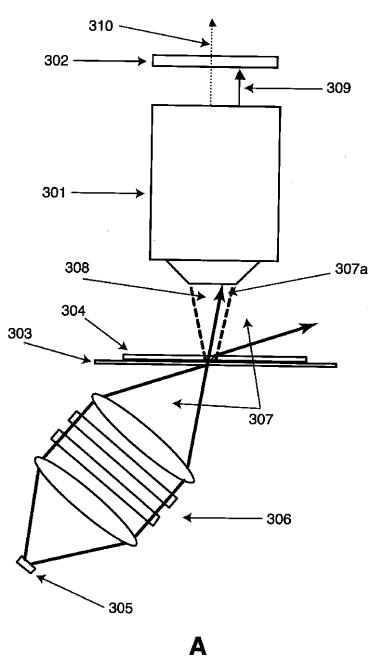
E

【図 2 G】



G

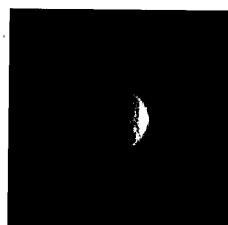
【図3-1】

**Fig. 3****A**

【図3-2】

**Fig. 3**

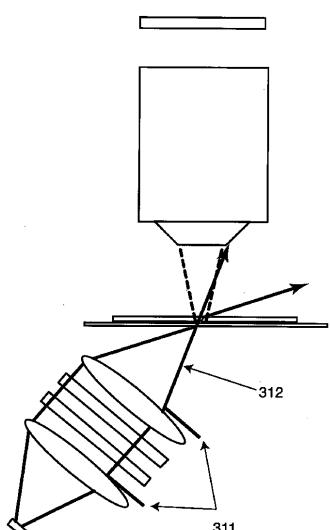
(cont.)

**B**

【図3-3】

**Fig. 3**

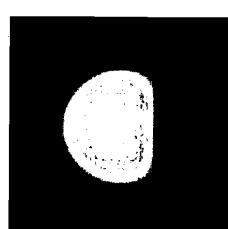
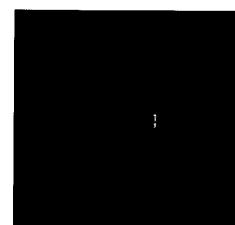
(cont.)

**C**

【図3-4】

**Fig. 3**

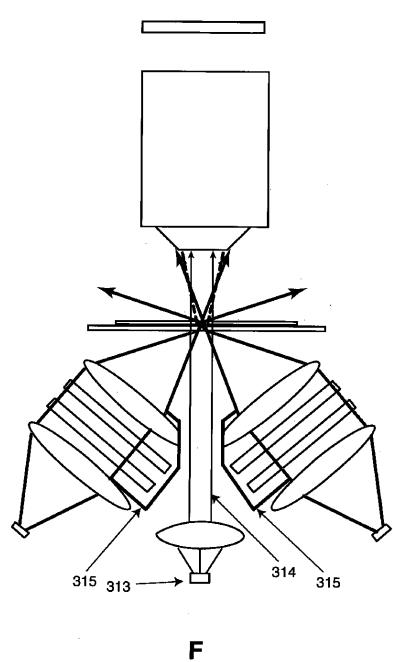
(cont.)

**D****E**

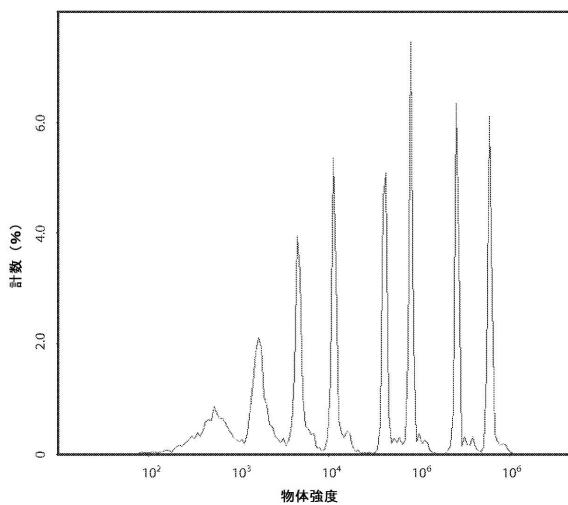
【図3-5】

**Fig. 3**

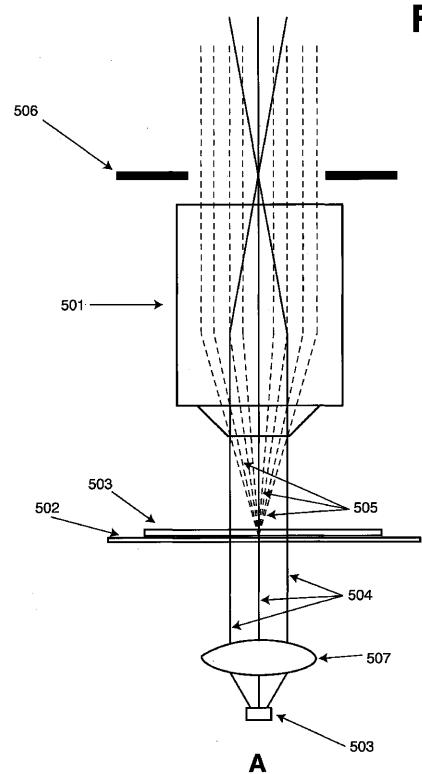
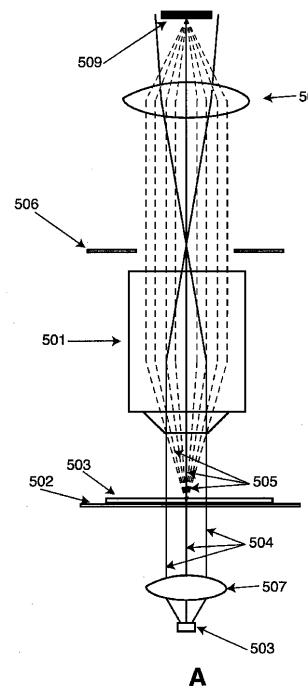
(cont.)

**F**

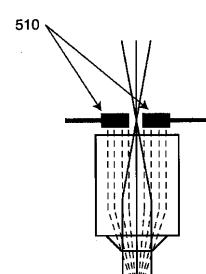
【図4】

**Fig. 4**

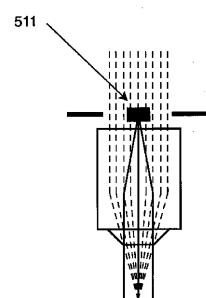
【図5-1】

**Fig. 5****Fig. 5**

【図 5 - 3】



B

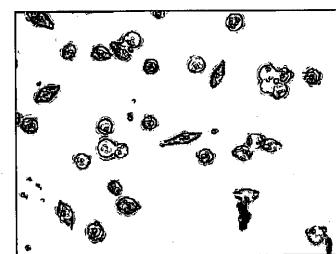


C

**Fig. 5**

(cont.)

【図 5 - 4】

**Fig. 5**

(cont.)

D

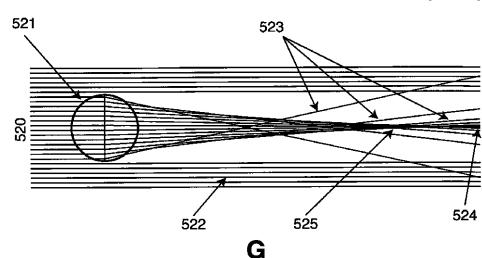


E



F

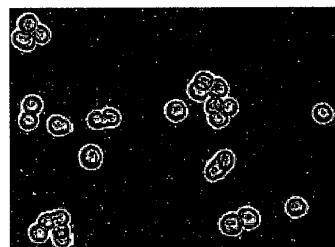
【図 5 - 5】



G

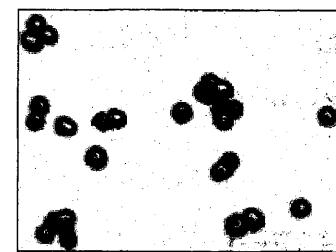
**Fig. 5**

(cont.)



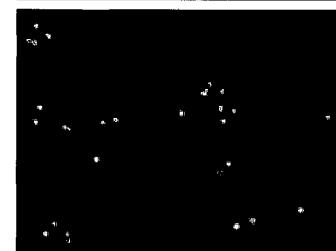
H

【図 5 - 6】

**Fig. 5**

(cont.)

I



J



K

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
G 0 2 B 21/36 (2006.01)	G 0 2 B 21/36	
G 0 1 N 21/27 (2006.01)	G 0 1 N 21/27	A
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	Z

(72)発明者 グレンスピエアウ， マルティン  
デンマーク国 デーコー- 2700 ブレンショ， ネスピホルムヴァイ 2， 4. テヴィ  
(72)発明者 ホルム， ヨハン  
デンマーク国 デーコー- 2860 セーボー， グレンモーズ アレ 117  
(72)発明者 シェルルッフ， セーレン  
デンマーク国 デーコー- 3400 ヒレズ， スコブヴァイ 25  
(72)発明者 ラヴン ハンセン， フランス アイナー  
デンマーク国 デーコー- 1905 フレデリクスペアウ スイ， スヴァンホルムスヴァイ 1  
， 3. テホウ

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 国際公開第2011/088014 (WO, A1)  
米国特許出願公開第2005/0259245 (US, A1)  
米国特許出願公開第2009/0208072 (US, A1)  
米国特許第04786165 (US, A)  
特開2008-002932 (JP, A)  
特開2007-212201 (JP, A)  
米国特許出願公開第2013/0099120 (US, A1)  
米国特許出願公開第2010/0189338 (US, A1)  
特開2006-084233 (JP, A)  
特開2009-237486 (JP, A)  
国際公開第2012/096153 (WO, A1)  
特表2013-513109 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 M 1/34  
G 01 N 21/17  
G 02 B 21/36  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / WPIDS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)