

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7148530号
(P7148530)

(45)発行日 令和4年10月5日(2022.10.5)

(24)登録日 令和4年9月27日(2022.9.27)

(51)国際特許分類 F I
G 0 1 N 21/47 (2006.01) G 0 1 N 21/47 Z

請求項の数 15 (全43頁)

(21)出願番号	特願2019-547270(P2019-547270)	(73)特許権者	518223823 ユニバーシティ オブ メリーランド, カ レッジ パーク アメリカ合衆国 2 0 7 4 2 メリーラン ド, カレッジ パーク, パルティモア ア ヴェニュー 7 9 5 0
(86)(22)出願日	平成30年3月1日(2018.3.1)	(73)特許権者	507028217 キャノン ユー . エス . ライフ サイエ ンシズ, インコーポレイテッド CANON U . S . LIFE SCI ENCES, INC . アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーラン ド, ロックビル, スイート シー - 1 0 0, メディカル センター ドライヴ 9 8 0 0
(65)公表番号	特表2020-511636(P2020-511636 A)		
(43)公表日	令和2年4月16日(2020.4.16)		
(86)国際出願番号	PCT/US2018/020509		
(87)国際公開番号	WO2018/160874		
(87)国際公開日	平成30年9月7日(2018.9.7)		
審査請求日	令和3年3月1日(2021.3.1)		
(31)優先権主張番号	62/465,230		
(32)優先日	平成29年3月1日(2017.3.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核の機械的シグネチャに基づく細胞分類

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル内の癌性細胞を特定する方法であって、
第1の方向に沿って光ビームによって前記サンプルを照明することと、
前記照明光ビームに反応して前記サンプルから放射されるブリルアン散乱光を収集することと、
前記ブリルアン散乱光を、スペクトル分散を誘発する光学配置に送り、前記ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンを生成する検出ユニットに送ることと、
なお、前記光学配置及び前記検出ユニットは第2の方向に沿って位置決めされる；
前記検出ユニット上で前記ブリルアン散乱光の前記空間スペクトルパターンを検出することと、
なお、前記照明光ビームに沿った前記サンプルの複数の点が同時に測定され、前記サンプルの複数の点の少なくとも1つが細胞核である；
前記検出ユニットにおいて、各空間点における前記スペクトルパターンを校正することと、
前記検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において前記1つ以上のブリルアン指標を計算することと、
前記計算されたブリルアン指標と正常細胞のブリルアン指標とを比較することによって、
前記サンプル内に存在する癌性細胞を特定することと、
を含む、方法。

10

20

【請求項 2】

細胞がラミン A / C 発現の抑制を伴うかどうかを判定する方法であって、
 ブリルアン分光法により可能となったラベルフリーサイトメトリーを使用して細胞の機械的シグネチャを取得することと、
 なお、該取得することは、
 第 1 の方向に沿って光ビームによって前記サンプルを照明することと、
 前記照明光ビームに応答して前記サンプルから放射されるブリルアン散乱光を収集することと、
 前記ブリルアン散乱光を、スペクトル分散を誘発する光学配置に送り、前記ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンを生成する検出ユニットに送ることと、
 なお、前記光学配置及び前記検出ユニットは第 2 の方向に沿って位置決めされる；
 前記検出ユニット上で前記ブリルアン散乱光の前記空間スペクトルパターンを検出することと、
 なお、前記照明光ビームに沿った前記サンプルの複数の点が同時に測定され、前記サンプルの複数の点の少なくとも 1 つが細胞核である；
 前記検出ユニットにおいて、各空間点における前記スペクトルパターンを校正することと、
 前記検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において前記 1 つ以上のブリルアン指標を計算することと、を含む；
 前記細胞の核の機械的シグネチャに基づいて、細胞を、正常なラミン A / C 発現を有する又はラミン A / C 発現の抑制を伴うと分類することと、
 を含む、方法。

10

20

【請求項 3】

前記 1 つ以上のブリルアン指標は、ブリルアン周波数シフト、ブリルアンスペクトル線幅、ブリルアン利得又は損失スペクトル、及びその組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の方向と前記第 2 の方向との間の角度は 0 度より大きい任意の角度である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

スペクトル分散を誘発する前記光学配置は、仮想画像化フェーズドアレイ (VIPA)、ファブリ - ペローエタロン又はエシェル格子を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

30

【請求項 6】

スペクトル分散を誘発する前記光学配置は、前記サンプルから前記検出ユニットへの光路内の前記空間スペクトルパターンのサイズ、形状及び / 又は角度の広がりを変更する光学要素を更に備える、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記サンプルは、生物有機体、組織又は生細胞を含む生体細胞を含む生体サンプルである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記生体細胞は、懸濁されるか、2D 基体に付着しているか、3D 細胞外マトリックス内で培養されるか、又はマイクロ流体チップの 1 つ以上のチャンネルを流れて流れる、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記核の機械的特性は、弾性、粘性及び核の剛性を含む群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

走査された細胞は、前記核の測定された機械的特性に基づいて分類される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

50

走査された細胞は、癌細胞として分類される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ以上のブリルアン指標は、前記核の機械的特性に関する情報を提供し、前記機械的特性は、弾性、粘性及び核の剛性を含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの細胞は、生きている真核細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分類は、細胞集団又は単一細胞のいずれかに基づく、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの細胞は、

(i) マイクロ流体チャネルの内を流れており、

(i i) 懸濁液内で不動であり、又は、

(i i i) 3 Dゲルの小滴内に封入されている、

請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2017年3月1日に出願された米国仮特許出願第62/465,230号の恩典を主張し、この特許出願は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。

【0002】

本発明は、核の機械的シグネチャに基づいて細胞を分類する方法及びシステムに関する。具体的には、本発明による方法及びシステムは、ブリルアン技術により可能となったラベルフリーサイトメトリーを使用して取得される細胞核の機械的シグネチャに基づく。その分類は、細胞集団又は単一細胞のいずれかに基づいて達成され得る。本発明はさらに、細胞核の機械的シグネチャに基づいてサンプル内の癌性細胞を特定する方法及びシステムに関する。さらに、本出願は、細胞核の機械的シグネチャに基づいて癌の進行を測定する方法及びシステムを提供する。

【背景技術】

【0003】

細胞分類は、異なる細胞型又は同じ細胞型の異なる時期を細胞特性に従って区別する必要性に起因する。細胞形態及び表現型の明確な特徴は通常、細胞の分類に使用されるが、それは類似の形態又は表現型を有する細胞の場合にはうまくいかない。したがって、細胞分類のための補足的アプローチとして様々なバイオマーカーが発見されてきた。それらの中でも、細胞力学は、多種多様な用途のための有望なバイオマーカーである。

【0004】

細胞力学は、増殖、遊走、及び遺伝子発現等のその生物学的機能及び活性と密接に関連することが知られている（非特許文献1、非特許文献2）。例えば、細胞が前進する必要がある場合に、細胞体内に収縮力が発生する（非特許文献3）。血管内のせん断流への応答として、ヒト内皮細胞は、せん断応力調節性遺伝子の発現を大きく変えることとなる（非特許文献4）。臨床的には、癌関連死の90%より多くが、非常に悪性で転移性の癌細胞を原因とすることが示されている（非特許文献5）。遺伝的要因及び外環境的要因に加えて、癌細胞の生体力学は、その活性の主要な決定要因である。様々な生物物理的測定から、癌細胞が正常細胞及び良性細胞よりも軟質であること、そしてこの細胞伸展性が転移能の増加と相関することが一貫して見られる（非特許文献6、非特許文献7）。この相関は、3Dマトリックスを通じて効率的に遊走し、及び/又は転移の間に内皮を貫通するために必要とされる癌細胞の最適な機械的特性によるものと考えられる。したがって、細胞の剛性は、癌の進行をグレード分けする固有のバイオマーカーとなり得ることを強く指摘している。近年には、細胞メカノバイオロジーの重要な関心事項として核が浮上している（非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12、非

10

20

30

40

50

特許文献 13、非特許文献 14、非特許文献 15)。力に誘発される核形状の変化は、核内の遺伝物質の大規模な再編をもたらす得る(非特許文献 8)。核の剛性の変化は、ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群等の疾患と関連している(非特許文献 9)。細胞内の最大の最も剛性が高い細胞小器官として、核は細胞遊走のための主たる物理的障壁を授ける(非特許文献 10)。組織を通じて遊走する細胞の場合には、核は、細胞骨格動態と協調して位置、形状及び剛性において複雑な変化を遂げるはずである(非特許文献 11、非特許文献 12、非特許文献 13、非特許文献 14、非特許文献 15)。したがって、核の機械的特性は、それらが細胞機能と密接に関連し、細胞の分類に有用な生物物理学的シグネチャを提供し得るため、非常に関心が持たれている。

【0005】

これまでの 20 年間で、細胞の機械的特性(例えば、弾性及び粘性)を調査するための方法、例えばマイクロピペット吸引(非特許文献 16)、光ピンセット(非特許文献 17)、光ストレッチャー(非特許文献 7、非特許文献 18)、変形能サイトメトリー(deformability cytometry)(非特許文献 19)、原子間力顕微鏡法(AFM)(非特許文献 20)、磁気ツイスティングサイトメトリー(非特許文献 21)、及びマイクロレオロジー(非特許文献 22)を開発するために多くの努力がなされてきた。しかしながら、既存の方法の殆どは、全細胞の機械的特性の平均的な測定をもたらすにすぎず、直接的に核を評価することはできない。目下、核の機械的特性を導き出すには、細胞内に力がどのように伝わるかについての追加の情報及び仮定に加えて染色が必要とされた。初期状態の機械的情報のために、AFM又はマイクロピペット測定(非特許文献 23)を可能にするために核を単離する必要があり、それは、核を自然の環境から単離するため、侵襲的であるだけでなく、測定値を偏らせる場合もある。

【0006】

ブリルアン散乱は、物質の音響フォノンによって誘発される非弾性光散乱現象である。弾性的に散乱した光から小さな(通常、GHzオーダーの)ブリルアン周波数シフトを分離するために、従来のブリルアン分光法では一般に、マルチパス走査型ファブリ・ペロー干渉計のような高分解能分光計が使用される(非特許文献 24)。音響フォノンの動態は物質の粘弾性特性に直接結び付けられるので、散乱光のブリルアン周波数シフトを測定することによって、機械的情報を取得することができる(非特許文献 25)。しかしながら、この方法は、スペクトルを逐点走査することに起因して、かなりの時間を要する。さらに、スループット効率はエタロンのフィネスに制限される。このボトルネックは、大きな角分散を生成することができ(非特許文献 26)、高いスループットを有する CCD カメラによって全てのスペクトル成分を同時に測定できるようにする仮想画像化フェーズドアレイ(VIPA: virtually imaged phased array)を使用することによって克服された。このタイプの分光計を使用して、生物組織内のレーザー走査共焦点ブリルアン顕微鏡法が低い照明電力及び短い積分時間において実行され、その方法では、サンプル内の各点が順次に照明される。ブリルアンに基づく弾性マップを作成するために、ブリルアンスペクトルが分析された(非特許文献 27 及び非特許文献 28)。

【0007】

ブリルアン分光法は、サンプル内の音響的に誘発された光散乱の周波数スペクトルを測定することによって、機械的特性を非侵襲的に測定することが可能なものである。サブミクロン分解能におけるブリルアン顕微鏡法は、細胞の物理化学的特性の測定を可能にした(非特許文献 29)。実際に、細胞の機械的特性は、数多くの細胞機能、例えば、増殖、遊走、遺伝子発現だけでなく、組織レベルの挙動、例えば、組織形態形成、転移及び血管形成も決定的に制御する。結果として、「機械的フェノタイピング(mechanical phenotyping)」、すなわち、その機械的特性に基づいて細胞を分類する能力が、細胞状態及び生理学的/病理学的条件を特徴付ける強力な手法として現れた。例えば、細胞剛性(cell stiffness)の減少が、転移能の向上と相関することがわかっており、それゆえ、腫瘍の検出及び病期分類のための新規のラベルフリーマーカーとして提案されてきた(非特許文献 30 及び非特許文献 6。)

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

関連出願において、ブリルアン光散乱に基づくラベルフリーサイトメトリーのシステム及び方法が提供されており、それにより核の機械的特性をサブミクロン分解能で直接的に調査可能であることを実証するのに成功した（非特許文献31）。この方法は、光ビームを使用して、散乱光のブリルアン周波数シフトを測定することによってサンプルの機械的情報を検知するため、本質的に非接触、非侵襲的、かつラベルフリーである（非特許文献25、非特許文献27、非特許文献29）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 9 】

- 【文献】 Bao and Suresh, *Nature materials* 2, 715- 725(2003)
- Vogel and Sheetz, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 265-275 (2006)
- Stossel, *Science* 260, 1086-1094(1993)
- Mccormick et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8955-8960 (2001)
- Wirtz et al., *Nat. Rev. Cancer.* 11, 512-522 (2011)
- Cross et al., *Nat. Nanotechnology* 2, 780-783 (2007)
- Guck et al, *Biophys J.* 88, 3689- 3698 (2005)
- Dahl et al., *Circ. Res.* 102, 1307-1318 (2008)
- Booth et al., *Soft Matter* 11, 6412-6418(2015)
- Friedl et al., *Curr Opin Cell Biol.* 23, 55-64(2011)
- Denais et al., *Science* 352, 353-358 (2016)
- Davidson et al., *Cell Mol. Bioeng.* 7, 293-306 (2014)
- Khatau et al., *Sci. Rep.* 2:488 (2012)
- Fruleux and Hawkins, *J Phys Condens Matter* 28, 363002 (2016)
- Fu et al., *Lab Chip* 12, 3774-3778 (2012)
- Mitchison and Swann, *J. exp. Biol.* 31, 443-460 (1954)
- Tan et al, *J Biomech Eng.* 132, 044504(2010)
- Guck et al., *Biophys J.* 81, 767-784 (2001)
- Otto et al., *Nat Methods* 12, 199-202 (2015)
- Lulevich et al., *V Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13872-13877(2010)
- Wang et al., *Science* 260, 1124-1127 (1993)
- Weihls et al., *Biophys J.* 91, 4296-4305 (2006)
- Lammerding, *Compr. Physiol.* 1, 783-807 (2011)
- Lindsay S M、Burgess S及びShepherd I W 「Correction of Brillouin linewidths measured by multipass Fabry-Perot spectroscopy」 *Appl. Opt.* 16(5), 1404-1407 (1977)
- Dil J G 「Brillouin scattering in condensed matter」 *Rep. Prog. Phys.* 45, 286-334 (1982)
- Xiao S、Weiner A M及びLin C 「A Dispersion Law for Virtually Imaged Phased-Array Spectral Dispersers Based on Paraxial Wave Theory」 *IEEE J. Quantum Electronics* 40(4), 420-426 (2004)
- Scarcelli G及びYun S H 「Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging」 *Nature Photonics* 2, 39-43 (2007)
- Girard M J A、Dupps W J、Baskaran M、Scarcelli G、Yun S H、Quigley H A、Sigal I A及びStrouthidis N G 「Translating Ocular Biomechanics into Clinical Practice: Current State and Future Prospects」 *Curr. Eye Res.* 40(1), 1-18 (2015)
- Scarcelli G、Polacheck WJ、Nia HT、Patel K、Grodzinsky AJ、Kamm RD、Yun SH 「Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy」 *Nat Methods.* 12, 1132-1134 (2015)
- Swaminathan, V B 「Mechanical Stiffness Grades Metastatic Potential in Patie

nt Tumor Cells and in Cancer Cell Lines」Cancer Research 71, 5075-5080 (2011)
Zhang et al., Lab Chip 17, 663-670 (2017)

【発明の概要】

【0010】

本発明は、ブリルアン光散乱技術に基づくラベルフリー細胞分析によって細胞核の機械的特性を特定する方法及びシステムに関する。本出願はさらに、細胞核の機械的特性に基づいて癌性細胞を特定する方法及びシステムを提供する。

【0011】

本発明の一態様において、サンプル内の複数の点においてブリルアン散乱スペクトルに関連付けられる1つ以上のブリルアン指標を同時に取得する方法であって、少なくとも1つの点は細胞の核内にある、方法が提供される。具体的には、サンプルは、第1の方向に沿って光ビームによって照明される。照明光ビームにตอบสนองしてサンプルから放射されるブリルアン散乱光が収集され、スペクトル分散を誘発する光学配置に送られ、その後、検出ユニットに送られる。光学配置及び検出ユニットは、第1の方向とは異なる第2の方向に沿って位置決めされる。照明光ビームに沿ったサンプルの複数の点が同時に測定されるように、ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンが検出ユニット上で検出される。次に、検出ユニットにおいて各空間点における空間スペクトルパターンが較正される。最終ステップにおいて、検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において1つ以上のブリルアン指標が計算される。一実施の形態において、ブリルアン指標は、核の少なくとも1つの機械的特性に関する情報を提供する。

【0012】

本発明の更に別の態様において、サンプル内の複数の点においてブリルアン散乱スペクトルに関連付けられる1つ以上のブリルアン指標を同時に取得するシステムが提供され、少なくとも1つの点は、細胞の核内にある。具体的には、サンプルは、光源によって与えられる光ビームによって第1の方向に沿って照明される。1つ以上のレンズが、照明光ビームにตอบสนองしてサンプルから放射されるブリルアン散乱光を収集し、ブリルアン散乱光を、スペクトル分散を誘発する光学配置に導光し、その後、検出ユニットに導光する。光学配置、1つ以上のレンズ及び検出ユニットは、第1の方向とは異なる第2の方向に沿って位置決めされる。照明光ビームに沿ったサンプルの複数の点が同時に測定されるように、ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンが検出ユニット上で検出される。検出ユニットと通信するプロセッサが、VIPAにおける角分散を考慮に入れるように、各空間点における空間スペクトルパターンを較正する。さらに、プロセッサは、検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において1つ以上のブリルアン指標を計算する。一実施の形態において、ブリルアン指標は、ブリルアン周波数シフト、ブリルアンスペクトル線幅、ブリルアン利得又は損失スペクトル、及びその組み合わせからなる群から選択される。更に別の実施の形態において、サンプルの物理的特性は、粘弾性率、密度、屈折率、電歪、及びその組み合わせからなる群から選択される。

【0013】

本発明の更に別の態様において、生体細胞を分類する方法及びシステムが提供される。そのシステムは、媒質内に生体細胞を含む生体サンプルを有する容器を含む。次に、生体サンプルが光源によって照明され、生体細胞及び媒質内からブリルアン散乱光が生成される。プロセッサが、各生体細胞内の複数の点においてブリルアン散乱スペクトルを計算する。測定されたブリルアン散乱スペクトルに基づいて、プロセッサによって、生体細胞内の異なる空間点における細胞内物理的特性に関連する1つ以上のブリルアン指標が計算される。さらに、プロセッサは、生体細胞内の異なる空間点における物理的特性に基づいて、生体細胞を分類する。一実施の形態において、細胞内物理的特性に関連する指標はブリルアン周波数シフトである。プロセッサは、生体細胞内の各測定点を含むブリルアン周波数シフトに関するヒストグラムを生成するように更に構成される。ヒストグラムを当てるために、プロセッサによって、ガウス分布の線形重ね合わせが適用される。次に、プロセッサはヒストグラム内の各ピークを特定し、ピークは、細胞内の異なる領域からの機

10

20

30

40

50

械的シグネチャを表す。生体細胞内の異なる空間点における物理的特性は、特定された機械的シグネチャと相関がある。

【0014】

本発明の更に別の態様において、核の機械的特性は、癌性である細胞をサンプル内で特定するために使用され得る。

【0015】

本明細書に組み込まれ、明細書の一部を形成する添付の図面は、本開示の主題に関する種々の実施形態を示す。図面において、同じ参照符号は、同一の、又は機能的に類似の要素を示す。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】逐点走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図2】本発明の一実施形態による、多重化走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図3】本発明の別の実施形態による、多重化走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図4】図4a、図4b、図4c、図4dおよび図4eは、図2の構成を使用することによって取得されるスペクトルパターンの原画像を示す図であり、図4fは、図4a～図4eに関連付けられる測定値に関する空間分解能の特性評価を例示する図であり、正方形が測定データを表し、青線が直線当てはめデータを表す。

【図5】マイクロ流体チャンネルを流れる2つの異なる液体に関連付けられるブリルアン周波数を例示する図である。

【図6】本発明による多重化ブリルアン分光法と、従来の逐点ブリルアン分光法との間の信号対雑音比(SNR)の比較を示す図である。

【図7】本発明の一実施形態による、多重化走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図8】図7の構成を使用することによって取得された空間領域内の単一のピクセルにおける推定ブリルアン周波数シフトの精度の特性評価を例示する図であり、図8aは、カメラによって取り込まれた元の分散パターンを例示する図、図8bは、単一の点におけるスペクトルパターンを例示する図、図8cは、SNR対照明エネルギーの対数プロットを例示する図、図8dは、時間トレースデータの推定ブリルアン周波数の分布を例示する図である。

【図9】図7に従って取得された測定値に関する空間分解能の特性評価を例示する図であり、正方形は測定データを表し、赤線は直線当てはめデータを表す。

【図10】図10aは、キュベット内のポリメチルメタクリレート(PMMA)レンズの写真を例示する図であり、その写真はキュベットを屈折率整合液で満たす前に撮影されており、図10bは、カメラによって取得されたブリルアンスペクトルパターンのスナップショットを例示する図であり、図10cは、屈折率整合液のブリルアンスペクトルを例示する図であり、点及び実曲線はそれぞれ、測定データ及び当てはめデータを表し、図10dは、PMMAレンズのブリルアンスペクトルを例示する図である。

【図11】PMMAレンズの2D及び3Dブリルアン画像を例示する図であり、図11aは、図7による構成によって走査されたPMMAレンズの断面を例示する図であり、図11bは、図10aに点線によって示される場所におけるPMMAレンズの断面ブリルアン画像を例示する図であり、図11cは、PMMAレンズの3D走査の図解を例示する図であり、図11dは、PMMAレンズの3Dブリルアン結像を例示する図であり、各スライスは、z軸に沿った場所におけるPMMAレンズの断面画像を表す。

【図12】本発明の一実施形態による、逐点走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図13】図12によるブリルアン分光法構成に関連付けられる制御インターフェースのスナップショットを示す図である。

10

20

30

40

50

【図14】図14 a、図14 bおよび図14 cは、異なる時点におけるブリルアン信号及び明視野像の両方のスナップショットを例示する図であり、図14 d、図14 eおよび図14 fは、図14 aの未処理のブリルアン信号から計算されたブリルアン周波数の時間トレースである。

【図15】図15 aおよび図15 bは、ブリルアン周波数に及ぼすシーフローの影響を示す図である。

【図16】本発明による、流動する細胞をレーザービームの合焦スポットに位置合わせする原理を示す図である。

【図17】図17 a、図17 bおよび図17 cは、図12によるブリルアン分光法構成を使用することによって実施される細胞スペクトル分析を示す図である。

10

【図18】図18 aは、図12によるブリルアン分光法構成を使用することによって取得された測定値から生じる細胞スペクトル分析を示す図であり、図18 bは、2Dブリルアン細胞画像から生じるスペクトル分析を示す図である。

【図19】図19 aは、同じ細胞の明視野画像を示す図であり、図19 bは、同じ細胞の蛍光画像を示す図であり、図19 dは、同じ細胞のブリルアン画像を示す図であり、図19 cは、図19 aの明視野画像及び図19 bの蛍光画像を融合した画像を示す図であり、図19 eは、図19 cの画像に基づいて一緒にプロットされた細胞核及び細胞質両方のヒストグラムを示す図である。

【図20】図20 a、図20 b、図20 c、図20 dおよび図20 eは、細胞核に及ぼすサイトカラシンD (Cytochalasin D) の影響を示す細胞スペクトル分析を示す図である。

20

【図21】本発明の別の実施形態による、逐点走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図22】図21のブリルアン分光法構成によって取得された細胞画像を示す図であり、画像内の各点は細胞内の或る特定の領域において取り込まれた1つの測定値を表し、異なる濃淡はデータ点の相対密度を符号化する。

【図23】図21のブリルアン分光法構成によって取得された、細胞核に及ぼすサイトカラシンDの影響を示す図である。

【図24】図7のブリルアン分光法構成を使用することによって2D画像を取得する概念図である。

【図25】ルビジウムガスを含むガスチャンバーの測定された吸収スペクトルを例示する図である。

30

【図26】本発明の別の実施形態(例4において使用される)による、逐点走査モードのためのブリルアン分光法構成を示す図である。

【図27】図27 a、図27 bおよび図27 cは、異なる時点においてマイクロ流体チャネルを流れる細胞のスナップショットであり、スケールバーは30 μm であり、図27 dは、対応するブリルアン信号の時間トレースを例示する図であり、点は測定データを表し、実線は見やすくするために引いた線である。

【図28】図28 aは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)及び細胞の両方のシグネチャを含む元のデータを例示する図であり、図28 bは、PBS自体のシグネチャを例示する図であり、図28 cは、細胞のシグネチャを例示する図である。

40

【図29】図29 aは、細胞集団(29個の細胞)の2D画像を例示する図であり、図29 bは、2D画像からのデータ点の分布を示す図であり、図29 cは、細胞内の複数の点においてブリルアン周波数を取得することに基づく流動実験からのデータ点の分布を示す図である。

【図30】細胞の蛍光画像によって検証される細胞のブリルアンシグネチャを例示する図であり、ヒストグラムはそれぞれ細胞核及び細胞質からのブリルアンシグネチャを表し、挿入写真は、(i)明視野画像、(ii)蛍光画像、(iii)(i)及び(ii)の融合画像、(iv)ブリルアン画像である。

【図31】図31 a、図31 bおよび図31 cは、クロマチン脱凝縮による細胞核の軟化の実験的観測を例示する図である。

50

【図 3 2】本発明の一実施形態によるシステムを示すブロック図である。

【図 3 3】図 3 3 A および図 3 3 B は、本発明の第 1 の実施形態の例示的な結果を示す図である。アクチンフィラメントの阻害が、核を軟化させることが示されている。その代わりに、微小管フィラメントの阻害は、核を硬化させることとなる。

【図 3 4】本発明の第 2 の実施形態の例示的な結果を示す図である。核機構を癌の進行のグレード分けに使用し得ることが示されている。

【図 3 5】本発明の第 3 の実施形態の例示的な結果を示す図である。ラミン A / C ノックダウンサンプルにおいては、細胞質特性は不変であるが、核の剛性は大幅により低い。

【図 3 6】図 3 6 A および図 3 6 B は、同一のパラメーターを使用して撮影された蛍光画像の例示的な結果を示す図である。ノックダウンサンプルにおいて、ラミン A / C 発現は、はるかにより低いことが示されている。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は幾つかの実施形態を有し、当該技術分野において既知の細部に関しては種々の特許、特許出願及び他の参考文献に頼る。それゆえ、本明細書において或る特許、特許出願又は他の参考文献が引用されるか、又は繰り返されると、その特許、特許出願又は他の参考文献は、あらゆる目的のために、そして説明される提案のために、引用することによりその全体が本明細書の一部をなすことは理解されたい。

【0018】

本発明は、ブリルアン分光法に基づくラベルフリー細胞分析の方法及びシステムに関する。細胞サンプルから放射されるブリルアン散乱光によって、サンプルを特徴付ける物理的情報を取得できるようになる。本発明の一態様では、これを果たすために、サンプルが第 1 の方向に沿って光ビームによって照明され、サンプルによって放射されたブリルアン散乱光が第 2 の方向に沿って収集され、検出される。第 1 の方向に沿ったサンプルの複数の位置を同時に測定することができ、それにより、測定スループットを実効的に改善することができる。さらに、ブリルアンスペクトルから取得された細胞内情報に基づいて、サンプル内の生体細胞を分類することができる。

20

【0019】

等方性物質のブリルアン周波数シフト f_b は以下のように表すことができる。

【数 1】

$$f_b = \frac{2n}{\lambda} \cdot V \cdot \cos(\theta/2) \quad (1)$$

30

ただし、 n は物質の屈折率であり、 λ はレーザーの波長であり、

【数 2】

$$V = \sqrt{E/\rho}$$

40

は音響速度であり、 E は弾性率であり、 ρ は密度であり、 θ は散乱角（ここでは、 $\theta = 90$ 度）である。

【0020】

サンプル内の複数の点におけるブリルアン散乱スペクトルに関連付けられる 1 つ以上の指標を測定することによって、測定サンプルの機械的及び/又は物理的特性を直接読み出すことができる。一実施形態において、指標としてブリルアン周波数シフトが使用される。サンプルの機械的及び/又は物理的特性は、粘弾性率、密度、屈折率及び電歪を含むことができる。測定サンプルの機械的及び/又は物理的特性を特定するために、ブリルアンスペクトル線幅、ブリルアン利得又は損失スペクトル及びその組み合わせ等の他の指標を

50

使用することができる。

【 0 0 2 1 】

図 1 は、マイクロ流体チャンネル 1 1 1 とともにエビ検出を用いる逐点走査モードのためのブリルアン分光法構成を例示する。具体的には、到来するレーザービーム 1 1 0 が、最初に、ビームスプリッター 1 1 3 によって導光され、その後、対物レンズ 1 1 2 によってマイクロ流体チャンネル 1 1 1 上に合焦する。励起されたブリルアン散乱光が、同じ対物レンズ 1 1 2 によって収集され、ビームスプリッター 1 1 3 及びミラー 1 1 4 によってコリメーター 1 1 5 に導光される。コリメーター 1 1 5 に後続するコリメートされたビームは、最初に、円柱レンズ 1 1 6 によって合焦し、その後、V I P A 1 1 7 に送り込まれる。到来する散乱光の異なるスペクトル成分が V I P A 1 1 7 によって空間分離され、球面レンズ 1 1 8 によって合焦し、スペクトルパターンが生成される。スペクトルパターンは、その後、球面レンズ 1 1 9 によって検出ユニット 1 2 0 上に結像される。一例として、検出ユニット 1 2 0 はカメラとすることができる。幾つかの実施形態において、球面レンズ 1 1 9 は不要な場合があり、その場合、カメラ 1 2 0 は、球面レンズ 1 1 8 の前方焦点面に直接配置することができる。マイクロ流体チャンネル 1 1 1 の中にサンプルが流されるとき、そのブリルアンシグネチャを識別し、その固有の物理的特性に相関させることができる。したがって、各時点において、対物レンズ 1 1 2 の焦点面において 1 つの点しか測定することができないので、結像のために逐点走査が必要とされる。

10

【 0 0 2 2 】

図 2 は、マイクロ流体チップとともに多重化ブリルアン分光法を用いる本発明の一実施形態に関連する。具体的には、到来する照明光ビーム 2 1 0 が対物レンズ 2 1 1 によって再整形され、サンプルを有するマイクロ流体チップ 2 1 2 内にペンシルビームが生成される。検出ユニット 2 2 7 に通じる検出経路 (x 方向に沿っている) は、照明経路 (y 方向に沿っている) に直交する。一例として、検出ユニット 2 2 7 はカメラとすることができる。チップ 2 1 2 内に生成される散乱光は、最初に、第 2 の対物レンズ 2 2 0 によって収集され、チューブレンズ 2 2 1 の焦点面において中間像が生成される。一実施形態において、中間像面内に空間フィルター又はアパーチャ 2 2 8 が位置決めされ、サンプルから到来する焦点外の光が除去される。中間像がその後方焦点面上にあるように球面レンズ 2 2 2 が配置され、それゆえ、光が球面レンズ 2 2 2 によってコリメートされる。コリメートされた光は、その後、円柱レンズ 2 2 3 によって、z 方向において V I P A 2 2 4 上に合焦する。到来する散乱光の異なるスペクトル成分が V I P A 2 2 4 によって空間分離され、球面レンズ 2 2 5 によって合焦し、スペクトルパターンが生成される。スペクトルパターンは、その後、球面レンズ 2 2 6 によってカメラ 2 2 7 上に結像される。検出経路において、ビームラインの 3 つのグループが、サンプルの異なる位置を示す。対物レンズ 2 2 0 の視野内で、サンプルの複数の位置を同時に測定できることが、図 2 から明らかである。幾つかの実施形態において、カメラ 2 2 7 が球面レンズ 2 2 5 の前方焦点面に直接配置されるように、球面レンズ 2 2 6 を除くことができる。

20

30

【 0 0 2 3 】

照明ビームに沿った全ての測定位置から収集された散乱光が同じ球面レンズ 2 2 2 によってコリメートされるので、異なる位置からのコリメートされたビームは、V I P A 2 2 4 に関する x y 平面において異なる角度を有する。この結果として、軸上の点に対して、軸外の点に関するスペクトルに更なる空間的なシフトが生じることになり、それゆえ、空間次元 (すなわち、y 方向) に沿ったスペクトルは、カメラ 2 2 7 において一直線ではなく、湾曲する。したがって、照明ラインを横切る異なる点からの散乱光の入射角は異なる。これは、サンプル内の異なる点からの散乱が V I P A エタロン内でわずかに異なる経路長及び分散を有することを意味する。角分散を、それゆえ、スペクトル線の曲がりを取り除くために、レンズ 2 2 1 の中間結像面において生じる結像倍率が最小化された。V I P A 2 2 4 においてスペクトル分散が生じた後に、カメラ 2 2 7 上のスペクトル線の湾曲に影響を及ぼすことなく、結像倍率を復元することができる。

40

【 0 0 2 4 】

50

さらに、角分散を補償するために、スペクトル較正が必要とされる場合がある。カメラ 227 上で検出されたスペクトル内に照明ビームラインが存在するとき、VIPA エタロンの種々の異なる回折次数におけるシフトされない照明ビームラインの場所を用いて、空間ラインの各ピクセル（サンプルの 1 つの点に対応する）においてスペクトル較正を実行することができる。照明ビームラインが利用できないとき、各空間点における較正のために必要とされる 2 つの未知のパラメーター、すなわち、自由スペクトル領域（FSR）及びスペクトル分散係数がある。それゆえ、未知のパラメーターを求めるのに、2 つ以上の既知のサンプルの結果を組み合わせれば十分である。

【0025】

代替的には、図 3 において例示されるような多重化ブリルアン分光法に基づく本発明の別の実施形態を使用することによって、空間較正を回避することができる。

【0026】

図 3 は、本発明の別の実施形態による、レンズアレイを使用する多重化ブリルアン分光法構成を示す。照明経路は図 2 に示される照明経路と同じである。対物レンズ 311 を用いて再整形された光 310 のビームによって、マイクロ流体チップ 312 が照明される。検出経路（x 方向に沿っている）は、照明経路（y 方向に沿っている）の法線方向にある。チップ 312 内に生成される散乱光は、最初に、第 2 の対物レンズ 320 によって収集される。チューブレンズ 321 の焦点面において中間像が生成される。一実施形態において、中間像面内に空間フィルター又はアパーチャ 330 が位置決めされ、サンプルから到来する焦点外の光が除去される。図 2 の球面レンズ 222 が、コリメーションのためのレンズアレイ 322 に置き換えられる。像全体が数多くの部分に分割され、それぞれがレンズレットによって独立してコリメートされるように、レンズアレイ 322 の各レンズレットが、中間像の小さな部分からの光のみを受光する。各小部分がレンズレットに対して軸上にあると近似され、全てのレンズレットが十分に位置合わせされるので、コリメートされたビーム全体が平行であり、対応するスペクトルは一直線になるであろう。コリメートされた光は、その後、VIPA 224 の中に送り込まれる。第 2 のレンズアレイ 327 のレンズレットの口径を適合させるために、一对の円柱レンズ 325 及び 326 を用いて、VIPA 224 の出力光を圧縮する。レンズアレイ 327 の前方焦点面においてスペクトルパターンが生成され、球面レンズ 328 によって検出ユニット 329 上に結像される。一例として、検出ユニット 329 はカメラとすることができる。幾つかの実施形態において、レンズアレイ 327 の前方焦点面にカメラ 329 を直接配置できるように、球面レンズ 328 を除くことができる。

【0027】

例 1

本発明の検証の一例として、図 2 の構成を用いて多重化ブリルアン分光法の空間分解能を実証するために実験が実施された。この実験において、光源として、単一モード 532 nm 連続波レーザーが使用され、サンプルとして、メタノールを含むプラスチックキュベットが使用された。照明経路（y 軸に沿っている）内の対物レンズ 211 は、0.0175 の開口数（NA）を有し、検出経路（x 軸に沿っている）内の対物レンズ 220 は 0.1 の NA を有する。VIPA 224 は、17 GHz の自由スペクトル領域（FSR）と、20 mm の入射窓とを有する。カメラ 227 は、電子増倍電荷結合素子（EMCCD: electron multiplying coupled charge device）である。サンプル（プラスチックキュベット）と対物レンズ 220 との間にナイフエッジが配置された。ナイフエッジは、並進ステージを用いて、y 方向に沿って動かすことができる。ナイフエッジを y 方向に向かって動かすとき、キュベットからの散乱信号が部分的に遮断される。ナイフエッジの変位と、カメラの記録された信号とを比較することによって、分光法の空間分解能を取得することができる。図 4 a ~ 図 4 e は、ナイフエッジが異なる位置にあったときにカメラによって取り込まれた原画像を示す。これらの画像において、スペクトル領域内の複数のスペクトル次数が示された。各次数は 3 つの縞のグループを含み、両側に 2 つのブリルアン周波数（ストークス及び反ストークスシフト）と、その間にレーザー周波数とを有する。図 4 f

は、ナイフエッジの動きと測定された変位との間の線形関係を示す。カメラの1ピクセルはサンプルの $2.45\ \mu\text{m}$ のサイズに対応することが示された。また、図2に示されるような現在の構成は、 $800\ \mu\text{m}$ 程度の大きいサンプルを測定することができ、結果として、300点より多くの点を同時に測定できることを示す。

【0028】

図2に示されるような本発明の実施形態を使用するマイクロ流体チャネル内の流動液体の測定が図5において例示された。溶融石英ガラスから形成されるマイクロ流体チャネルは、 $100\ \mu\text{m}$ の幅と、 $250\ \mu\text{m}$ の深さとを有する。チャネル層は、 $500\ \mu\text{m}$ の幅を有する2つのガラス窓によって挟持される。チャネルは、光ビームが通過できるようにするためのその両側が研磨された1インチ×2インチのチップの中央に位置した。測定中に、液体がz方向に沿ってチャネル内で流動できるように、チップは直立するように配置された。レーザービーム210が、チップの側方からチャネルを照明する。水($5.2\ \text{GHz}$ の Brillouin 周波数シフトを有する)及びメタノール($3.9\ \text{GHz}$ の Brillouin 周波数シフトを有する)が、ハンドヘルドシリンジによって管を通して交互にチャネルの中に注入された。カメラの積分時間は、測定シーケンスの時間でもある0.2秒であった。図5は、多重化 Brillouin 分光法によって、マイクロ流体チャネル内の流動液体を明確に識別できることを示す。この実験は、フローサイトメトリーの適用例における本発明の能力を実証する。

10

【0029】

図2において例示される実施形態による、本発明の利点の別の証拠として、本発明(図2)と従来のエピ検出構成(図1)との間の信号対雑音比(SNR)が比較された。各構成のSNRは、光の異なる入力電力密度及びカメラの異なる露光時間において測定された。図6は、本発明がショット雑音限界であり(理論的な当てはめ)、同じ入力エネルギー密度において従来のエピ検出よりはるかに高いSNRを有することを示す。言い換えると、本発明によれば、同じSNRレベルにおいて、従来のエピ検出より速く測定できるようになる。

20

【0030】

上記の方法以外に、測定スループットを更に改善する他の方法がある。一実施形態において、マイクロ流体チャネルの真下に励起源としてトランスデューサーを配置し、サンプルによって生成される音響信号を高めることができる。さらに、刺激された Brillouin 散乱は、一般に、自然発生の Brillouin 散乱よりはるかに強い。単波長光源を使用する代わりに、可変の波長を有する2つのレーザーを用いて、マイクロ流体チャネル内に刺激された Brillouin 散乱を生成し、信号を更に高めることができる。さらに、1つの超短パルスレーザーを用いて、インパルス性の刺激された Brillouin 散乱を生成することもできる。

30

【0031】

例2

例2は、図7に示されるような本発明の実施形態による、多重化(ライン走査) Brillouin 分光法の特性評価に関連する。図7は、ミラー724と、対物レンズ711、713及び714と、ビームコリメーション用の球面レンズ715と、円柱レンズ716、718及び719と、結像用の球面レンズ722とを含む、ライン走査 Brillouin 分光法構成を例示する。一実施形態において、中間像面内に空間フィルター又はアパーチャ725が位置決めされ、サンプルから到来する焦点外の光が除去される。

40

【0032】

図7による分光計のスペクトル分解能が、この例において特性評価された。1つの非限定的な実施形態において、光源710は、単一モードの $532\ \text{nm}$ cw(連続波)レーザー(Torus, LaserQuantum社)であった。レーザーヘッドからの光は対物レンズ711($\text{NA} = 0.0175$)によって合焦し、サンプル712を照明するためのラインビームが生成された。90度において、ビームラインに沿った散乱光が最初に、一對の対物レンズ713及び714(いずれも $4\times/0.1\ \text{NA}$ であった)によって結像され、その後、球面レンズ715($f = 400\ \text{mm}$)によってコリメートされた。コリメートされ

50

た光は、その後、円柱レンズ716 ($f = 200 \text{ mm}$) によって、VIPA717 ($FSR = 17 \text{ GHz}$ 、フィネス = 35) の入口において合焦した。VIPA717に後続する分散光は、一对の円柱レンズ718 ($f = 1000 \text{ mm}$) 及び719 ($f = 400 \text{ mm}$) によってスリット720の平面上に結像された。この平面は、球面レンズ722 ($f = 60 \text{ mm}$) によってカメラ723 (iXon、Andor社) 上に再び結像された。スリット720の隙間を調整することによって、望ましくない周波数を遮断することができ、ブリルアン周波数成分のみを通過させることができた。

【0033】

サンプルとして、純メタノールを含むプラスチックキュベット712が使用される。カメラ723によって取得された元の分散パターンが図8aに示される。上側及び下側の2つのグレーラインは弾性散乱周波数(レーザーの周波数と同じ)であり、その間にある2つの明るいラインはブリルアン周波数(ストークス及び反ストークス成分)である。横軸及び縦軸はそれぞれ、空間領域及びスペクトル領域に対応する。

10

【0034】

図8bは、図8aにおいて点線によって示される場所におけるブリルアンスペクトルを示す。VIPAの自由スペクトル領域は17GHzであったので、スペクトル分解能がピクセルあたり0.177GHzであったと計算することができた。レーザー周波数の連続するピークと半値全幅との空間比を計算することによって、約35のフィネスも確認された。推定ブリルアン周波数シフトの精度は、空間領域においてピクセルごとの信号対雑音比(SNR)を計算することによって特性評価された。図8cは、SNR対照明エネルギーの対数プロットを示す。図8cのSNRは、異なる照明エネルギーで計算された。測定データは、概ね平方根依存性を示し、ショット雑音限界挙動を示した。図8dは、単一の点において100回測定した場合の推定ブリルアン周波数の典型的な分布を示しており、その分布はガウス形状を有する。この分布の標準偏差を用いて、推定ブリルアン周波数の精度を推定した。この場合、それは8.5MHzであり、0.22%の相対的不確実性に相当する。

20

【0035】

空間分解能を特性評価するために、キュベット712に後続してすぐに、ただし検出対物レンズ713に先行して、ナイフエッジが配置される。一実施形態において、ナイフエッジを搬送する並進ステージが25.4 μm のステップサイズでx方向に動かされ、ナイフエッジの対応する像が分光計のカメラ723によって監視された。その結果が図9に示される。測定データが直線に当てはめられ、それにより、空間分解能はピクセルあたり3.29 μm と計算された。カメラ723は全部で512 \times 512ピクセルを有し、それはサンプル面内の概ね1.68mmに対応する。図8aに示されるように、スペクトル線は空間次元にわたって完全に一直線ではなく、VIPA717における軸外の点の入射角の偏差に起因してわずかな湾曲を有する。この湾曲の結果として、カメラにわたってスペクトル分解能が変動する場合があるが、その変動はピクセルあたり0.2MHz未満まで、すなわち、1mmの空間的視野を超える範囲内で10MHz以下まで最小化された。幾つかの実施形態において、この誤差は、必要な場合に各点においてスペクトル分解能を較正することによって回避することができる。

30

40

【0036】

例3

2次元及び3次元結像

例3は、図7による多重化ブリルアン分光法に基づく2次元及び3次元結像の特性評価に関連する。

【0037】

非球面PMMALレンズのブリルアンシフトが、図10aに示される構成において測定された。図10aは、屈折率整合液でキュベットを満たす前に撮影されたPMMALレンズの写真を示す。下はPMMALレンズを拡大撮影した写真であり、スケールバーは500 μm の長さを有する。PMMALレンズはプラスチックキュベットの中に配置され、サンプルの

50

表面における散乱を低減するために、キュベットは屈折率整合液であらかじめ満たされた。キュベットは、垂直に配置された電動並進ステージによって搬送され、その並進ステージによって、サンプルを y 方向に走査できるようにした。一実施形態において、キュベット（図 7 のサンプル 7 1 2）は、10 mm × 10 mm のサイズを有する。非球面ポリメチルメタクリレート（PMMA）レンズをキュベット 7 1 2 の中央領域に浮かせておくために、PMMA レンズの縁が光学接着剤を用いて注射器の針の先端に取り付けられ、その後、針の端部がキュベットの壁に固定された。一例として、限定はしないが、電動並進ステージ（T - LSM 0 2 5 A、Zaber 社）は、25 mm 移動範囲と RS - 2 3 2 制御とを有した。並進ステージの最大速度は 7 mm / s 程度に速くすることができる。

【0038】

一実施形態において、走査を自動的に実行できるように、Lab View プログラムを用いて、ステージの移動とカメラによる取得とを同期させる。レーザー電力は 70 mW であり、カメラの露光時間は 0.1 秒であった。ステージの速度は、30 秒以内に 300 フレームが取り込まれるように 50 μm / sec と設定され、それは全部で 1.5 mm の変位に対応した。サンプル（PMMA レンズ）が液体の中に浸漬されたとき、屈折率整合液のために、裸眼ではほとんど見ることはできなかった。しかしながら、サンプル及び整合液の剛性が異なったので、それらはブリルアンスペクトルによって容易に識別することができた。図 10 b は、カメラ 7 2 3 によって取得された典型的な信号のスナップショットであり、スリット 7 2 0 によって弾性周波数が遮断されたために、ブリルアン周波数成分のみが示された。PMMA レンズが整合液によって包囲されたことが図 10 b において明確に示される。図 10 c 及び図 10 d はそれぞれ、単一の点における屈折率整合液及び PMMA のブリルアンスペクトルを示す。点及び実線はそれぞれ、測定データ及び当てはめられたデータに対応する。スペクトル分解能の特性評価データを使用するとき、PMMA 及び整合液のブリルアン周波数シフトはそれぞれ、11.32 GHz 及び 9.11 GHz と特定された。

【0039】

図 11 a ~ 図 11 d は、PMMA レンズの 2D ブリルアン画像及び 3D ブリルアン画像を示す。図 11 a は、図 10 a 内の点線に沿って走査された断面を示す。矢印は、照明ビームを示す。図 11 b は、測定されたブリルアン周波数シフトに基づく、整合液内に浸漬された PMMA レンズの 2D 結像を示す。一実施形態において、画像の全体サイズは約 1.1 mm × 1.5 mm であった。PMMA レンズと整合液との界面は、画像から明確に確認することができ、PMMA レンズの内側領域は極めて均一である。異なる物質の界面において、各物質に対応する 2 つのブリルアンシグネチャ間にクロストークがある。2 つの物質が類似のブリルアンシフトを有する場合には、このクロストーク効果が界面において不明瞭な領域を導入することになる。この実験において、PMMA レンズ及び屈折率整合液は異なるブリルアンシフトを有し、それにより、不明瞭な領域を、2 ピクセル、すなわち、6.58 μm 以内にあると定量化できるようになる。図 11 c に示される走査方法を使用することによって、この分光法が迅速な 3D 結像を実施できることが実証された。図 11 d は、別の並進ステージを用いて PMMA レンズが z 軸に沿って動かされるときに取得された断面画像の 5 つのスライスを示す。

【0040】

要するに、図 1 ~ 図 11 d を参照すると、本発明の一実施形態において、照明ビームはレーザービームとすることができ、検出ユニット 1 2 0、2 2 7、3 2 9 及び 7 2 3 は、CCD、CMOS カメラ、又は検出器のアレイとすることができ、更に別の実施形態において、照明光は、その中心値に固定されるか、又はその中心値付近において調整可能である、UV、可視光又は IR 方式における単一波長を有する照明源によって与えられる。各測定サンプル点において計算された 1 つ以上のブリルアン指標に基づいてサンプルの画像を生成するために、サンプルは、結像又は取得中に照明光ビームに対して移動する可動プラットフォーム上に配置することができる。更に別の実施形態において、照明光ビームは、結像中に静止したサンプルに対して移動している場合がある。一例として、限定はし

10

20

30

40

50

ないが、サンプルは、生物有機体、組織又は生体細胞を含む、生体サンプルとすることができる。一実施形態において、生体細胞は生細胞である。生体細胞は、ブリルアン指標を測定している間に、懸濁される場合があるか、2D基体に付着している場合があるか、又は3D細胞外マトリックス内で培養される場合がある。

【0041】

一実施形態において、カメラ120、227、329及び723上で検出されたスペクトルは、ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンである。検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において1つ以上のブリルアン指標を計算することができる。一例として、限定はしないが、ブリルアン指標はブリルアン周波数シフト、ブリルアンスペクトル線幅、ブリルアン利得又は損失スペクトル、及びその組み合わせとすることができる。サンプル点において測定されたブリルアン指標はそれぞれ、この時点におけるサンプルの物理的特性を示す。一例として、限定はしないが、サンプルの物理的特性は、粘弾性率、密度、屈折率、電歪及びその組み合わせとすることができる。一実施形態において、ブリルアン散乱光に関連付けられる指標は、ブリルアン周波数シフトである。

10

【0042】

各測定サンプル点における1つ以上のブリルアン指標に基づいて、サンプルの画像を生成することができる。図2、図3及び図7は90度の角度をなすように配置される照明経路及び検出経路を示すが、いずれの構成も、互いに対して0度より大きい任意の角度に配置される照明経路及び検出経路を用いて実現することができる。

20

【0043】

図2、図3及び図7を参照すると、スペクトル分散を誘発する光学配置は、球面レンズ、円柱レンズ、VIPAを備えることができる。具体的には、その光学配置は、図2の要素222、223、224、225及び226、図3の要素322、323、324、325、326、327及び328、並びに図7の要素715、716、717、719、720及び722を備える。一実施形態において、スペクトル分散を誘発する光学配置は、仮想画像化フェーズドアレイ(VIPA)、ファブリ-ペローエタロン又はエシェル格子を備える。更に別の実施形態において、光学配置は、サンプルから検出ユニットまでの光路内の空間スペクトルパターンのサイズ、形状及び/又は角度の広がりを変更する光学要素を更に備える。具体的には、照明光ビームは、サンプルを含む容器内にペンシルビームを生成するために、第1のレンズ211、311及び711によって再整形される。空間光変調器又は変形可能ミラー(図7、ミラー724)を用いて、第1のレンズ(図7、レンズ711)に入射する照明光ビームを再整形することができる。更に別の実施形態において、サンプル容器内で生成されるブリルアン散乱光は、第2のレンズ220、320、713を備え、第3のレンズ221、321、715の焦点面において中間像を生成する第1の結像系によって収集される。中間像の倍率は、VIPA224、324及び717における測定サンプル点の角分散を最小化するように最適化される。サンプルから到来する焦点外の光を除去するために、中間像面において空間フィルター又はアパーチャ228、330及び725を使用することができる。

30

【0044】

図2の要素222、225、226、図3の要素322、326、327及び328、図7の要素715、718及び722の組み合わせである第2の結像系が中間像を検出ユニット227、329、723上に投影し、VIPAを含む光学配置は、第2の結像系の無限遠空間(infinity space)内にある。本発明の更なる態様において、ブリルアン散乱光は、球面レンズ(図2、レンズ222;図7、レンズ715)によってコリメートされ、円柱レンズ(図2、レンズ223;図7、レンズ716)によってz方向においてVIPA上に合焦し、異なる位置からのコリメートされたビームは、VIPAに関するxy平面において異なる角度を有する。ブリルアン空間スペクトルパターンの焦点を検出ユニット227、329、723上に厳密に合わせるために、VIPAの出力光は幾つかの円柱レンズ及び球面レンズ225、226、718、719、722によって変更される。さ

40

50

らに、本発明の別の態様において、ブリルアン散乱光は第1のレンズアレイ322によってコリメートされ、第1のレンズアレイの各レンズレットが中間像の一部からの光のみを受光し、像全体は複数の部分に分割され、各部分はレンズレットによって独立してコリメートされる。VIPAの出力光は、第2のレンズアレイ327のレンズレットの口径を適合させるために、一对の円柱レンズ325及び326によって補償される。ブリルアン空間スペクトルパターンは、第2のレンズアレイ327の前方焦点面において生成され、検出ユニット329上に結像される。

【0045】

更に別の実施形態において、空間スペクトルパターン内のレーザーラインを吸収する狭帯域フィルターであり、狭帯域フィルターは吸収ガスセル及びファブリ-ペローエタロンデバイスからなる群から選択される。照明源の波長及び狭帯域フィルターによって吸収される波長は互いにロック(lock)される。

【0046】

一実施形態において、ブリルアン空間スペクトルパターンは、光学配置の異なる回折次数によって生成される異なるレーザーライン又は弾性散乱ライン間の距離を検出ユニット227、329、723上で測定することによって較正される。更に別の実施形態において、レーザーラインが狭帯域フィルターによって吸収され、較正のために利用できないとき、既知のブリルアン特性の基準物質を用いて、光学配置のスペクトル分散特性を計算する。

【0047】

図7において例示されるような構成の利点及び制約を理解するために、角度のある幾何学的配置のスペクトル効率が、図1において例示されるような共焦点エピ検出構成を使用する従来の構成と比較された。照明ビームが垂直偏光され、それゆえ、散乱面に対して垂直である場合には、微分断面積は散乱角から独立しており(非特許文献28)、それゆえ、直交する照明経路-検出経路を備える構成は、エピ検出と同じ微分断面積を有する。しかしながら、角度のある幾何学的配置は結果として、単一の点あたりの幾何学的効率が減少することになる(すなわち、測定の実質的な並列化に起因する利点を排除する)。収集された散乱電力は $P = I_{i11} \cdot V \cdot R$ と書くことができる。ただし、 I_{i11} は照明光の強度であり、 V は散乱の相互作用体積であり、 Ω は収集立体角であり、 R は散乱係数であり、それは m^{-1} の単位を有し、ここでは定数と見なすことができる。直交構成において、相互作用体積は、半径 $r = 0.61 / NA_{col}$ 及び長さ $l = 0.61 / NA_{i11}$ を有する円柱形によって近似することができる。ただし、 NA_{col} 及び NA_{i11} はそれぞれ、照明対物レンズ及び収集対物レンズのNAである。収集立体角は、収集開口数 NA_{col} によって決まる。それゆえ、収集散乱電力は、 $P_{90} = I_{i11} \cdot R \cdot 2 \cdot 0.61^3 \cdot \Omega^3 / NA_{i11}$ である。エピ構成の場合、代わりに、相互作用体積は約 $0.61^2 \cdot \Omega^3 / NA_{epi}^4$ である。ただし、 NA_{epi} は対物レンズのNAであり、収集立体角は $\Omega = NA_{epi}^2$ である。したがって、収集散乱電力は、 $P_{epi} = I_{i11} \cdot R \cdot 2 \cdot 0.61^2 \cdot \Omega^3 / NA_{epi}^2$ である。同じ照明強度の場合、2つの構成間の収集電力の比は、結局、 $P_{90} / P_{epi} = 0.61 \cdot NA_{epi}^2 / NA_{i11}$ になる。直交構成では、視野にわたって均一な長い照明ビームラインを生成するために、一般に低い NA_{i11} が好ましい。例えば、 1.737 mm の使用可能なレイリー範囲に対応する $NA_{i11} = 0.0175$ が使用された。本発明による特定の試験構成を $NA_{epi} = 0.1$ を有するエピ構成(x方向において同じ分解能を与える)と比較すると、その比は 34.8% である。この計算は、対物レンズの異なる組み合わせが使用された他の研究(Scarcelli, G., Kim, P.及びYun, S.H. 「In vivo measurement of age-related stiffening in the crystalline lens by Brillouin optical microscopy」Biophysical Journal 101, 1539-1545 (2011))による予測と一致する。重要なことに、この計算は、図2の実験結果、そして他のエピ検出結果(Guilluy, C.ら「Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus」Nature Cell Biology 16, 376 (2014))と一致する。直交及びエピ検出における散乱効率は、照明体積

10

20

30

40

50

と検出体積との間の重なりによって決定され、それゆえ、並列化の利点を最大化するために、角度のある幾何学的配置を、単一点測定あたりエピ検出と同じ効率になるように設計することができる。ライン並列検出を含むとき、多重ブリルアン分光法は、エピ検出における1時間超の長さ比べて、数十秒内に数ミクロンの分解能でmmサイズのサンプルの走査を成し遂げることができる。ビームラインに沿って測定可能なサイズは、照明NAと、カメラのピクセル数との両方によって決定される。空間分解能は、検出NA(x方向、ビームラインに沿っている)及び照明NA(y方向及びz方向)によって決定される。

【0048】

背景除去に関して、角度のある構成は、エピ検出より本質的に低い背景雑音を有する。一般の共焦点構成では、照明光の後方反射が分光計の中に容易に結合され、背景雑音の一因になる。ライン走査構成では、照明経路及び検出経路が直交して配置されるので、後方反射を完全に回避することができる。さらに、ラインビームによって照明される領域のみが励起されるので、ライン走査構成は、光学的分割(optical sectioning)に関して、共焦点構成と類似の機能を有する。一方、1ステージVIPAのみが使用されるので、分光計の消光比は制限される。これは、界面、又はイントラリピッド媒質若しくは組織等の光学的に不透明なサンプルを測定するのを難しくする。機器の全体的な消光比を改善するために、ライン走査構成を、アポディゼーション、狭帯域バンドパスフィルタリング、及びガスチャンパー狭帯域吸収フィルタリング等の、背景雑音を抑圧することができる既存の方法と組み合わせることができる。

【0049】

本発明の別の態様は、細胞内物理的(機械的)特性に基づいて、生細胞を分類するシステム及び方法に関する。一例として、限定はしないが、分類されることになる細胞は、ヒト細胞、動物細胞又は植物細胞とすることができる。細胞内物理的情報は、細胞内部の音響特性に関連するブリルアン光散乱のスペクトル分析から取得される。分類は、細胞集団又は個々の細胞のいずれかに基づくことができる。一実施形態において、細胞は、懸濁された状態で、及び/又は2D基体に付着している状態で、及び/又は3D合成/天然細胞外マトリックス内で培養された状態で分析することができる。更に別の実施形態において、細胞は、静止状態において、又は細胞流動を介して分析することができる。

【0050】

一実施形態において、細胞は*in vitro*で培養及び調製することができ、マイクロ流体デバイスを用いてプローブビームに送達することができる。細胞の異なる領域における細胞内情報を、標準又はカスタムマイクロ流体デバイスを利用する幾つかの構成において取得することができる。細胞は、フローサイトメトリー又は他の細胞分析技法に関連付けられる概ね全ての構成において分析することができる。一例として、限定はしないが、細胞は、マイクロ流体チャネルの中を流れている間に、及び/又は細胞が懸濁液内に静止したままであるときにマップされた状態で、及び/又は既知の方法に従って3Dゲル又は他の細胞外マトリックスの小滴内に封入された状態で、及び/又は細胞凝集体を形成している間に測定することができる。代替的には、マイクロ流体デバイスを用いて、又は用いることなく、細胞は、基体上に付着している間に、又は3Dゲル内にある間に、又は凝集体を形成している間に、明視野若しくは共焦点結像手法で細胞内情報のブリルアン取得を誘導することによって、他の構成(皿、又はフラスコ、又はプレートアレイ内等)において分析することができる。取得された物理的フェノタイピングに基づいて、細胞周期の異なる段階における異なるタイプの細胞又は同じタイプの細胞を区別することができる。一実施形態において、薬物への細胞応答を分析することができる。分析は、細胞の集団、又は個々の細胞のいずれかにおいて実行することができる。

【0051】

図12は、ブリルアン信号を励起/収集するエピ検出経路、監視結像手法、マイクロ流体デバイス(又は他の細胞播種(cell plating)デバイス)、ブリルアン分光計、及びこれら全てのサブ構成要素をリンクする、ソフトウェアを備えるコンピューターの新規の組み合わせから生じる本発明の例示的な実施形態を示す。第1の到来する照明ビーム121

10

20

30

40

50

0 が、ビームスプリッター 1 2 1 1 及び対物レンズ 1 2 1 2 を使用することによって、マイクロ流体デバイス 1 2 3 0 内部の 1 つにスポット上に合焦する。照明レーザービーム 1 2 1 0 はレーザービームとすることができる。一実施形態において、第 1 の到来するレーザービーム 1 2 1 0 は $1 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$ のスポットの中に合焦する。後方ブリルアン散乱光が同じ対物レンズ 1 2 1 2 によって収集され、ビームスプリッター 1 2 1 1、反射ミラー 1 2 1 3 及びカップリングレンズ 1 2 1 4 を介して、ブリルアン分光計 1 2 1 5 に導光される。ブリルアン分光計 1 2 1 5 は、ブリルアン周波数シフトを正確に測定することができるデバイスである。ブリルアン分光計 1 2 1 5 の一例が非特許文献 2 9 において開示されている。マイクロ流体デバイス 1 2 3 0 の上方に、第 2 の光源 1 2 2 0 (一般にレーザービーム 1 2 1 0 とは異なる波長を有する)、ビームスプリッター 1 2 2 1、チューブレンズ 1 2 2 2、対物レンズ 1 2 2 4 及び 2 D 画像記録デバイス 1 2 2 5 からなる明視野顕微鏡が存在する。この顕微鏡構成の目的は、マイクロ流体デバイス 1 2 3 0 内部の細胞の流動状況を監視することである。一実施形態において、その顕微鏡構成はスペクトルフィルター 1 2 2 3 を更に含み、スペクトルフィルターは、レーザービーム 1 2 1 0 からの光を遮断するが、光源 1 2 2 0 からの光が通過できるようにする。対物レンズ 1 2 1 2 からの合焦スポットが対物レンズ 1 2 2 4 の像面上にあるのを確実にするように、対物レンズ 1 2 1 2 及び 1 2 2 4 が調整される。

【 0 0 5 2 】

一実施形態において、ソフトウェアインターフェースを用いて、2 D 画像記録デバイス 1 2 2 5 によって取得された明視野像と、ブリルアン分光計 1 2 1 5 のブリルアン信号とを同期させることができる。これにより、ブリルアン信号を測定サンプルの正確な場所に割り当てることができる。

【 0 0 5 3 】

図 1 3 は、図 1 2 のブリルアン分光法構成とともに使用されるインターフェースのスナップショットを示す。インターフェースの主な機能は、その中に細胞を有するマイクロ流体デバイスの未処理のブリルアン信号 1 3 1 0 (空間スペクトルパターン) 及び明視野像 1 3 2 0 を同時に記録することである。2 つの白色の点 1 3 1 0 はブリルアン信号 (空間スペクトルパターン) であり、点間の距離はブリルアンピークを表す。レーザーラインからブリルアンピークまでの距離は、所望の周波数シフトである。この表現において、ここで適切な較正が行われた場合、2 つのブリルアンピーク間の距離を計算することによって、ブリルアンシフトを測定することができる。この場合に、2 つのピーク間の距離が短いほど、大きな周波数シフト、それゆえ、高い剛性に対応する。

【 0 0 5 4 】

図 1 4 a ~ 図 1 4 f において、ブリルアン信号検出を実際にいかに実施できるかについての非限定的な例が示される。具体的には、図 1 4 a ~ 図 1 4 c はそれぞれ、0 . 8 5 s e c、1 . 3 5 s e c 及び 1 . 6 5 s e c において同時に取得された未処理のブリルアン信号 (空間スペクトルパターン) 及び明視野像の両方のスナップショットである。そのスナップショットは、上から下にチャネル内部を流れる細胞を示す。丸 1 4 0 2 は、細胞が横切っている照明 (プローブ) ビームスポットの場所を示す。図 1 4 d ~ 図 1 4 f は、図 1 4 a ~ 図 1 4 c の未処理のブリルアン信号から計算されたブリルアン周波数シフトの時間トレースを示す。図 1 4 a ~ 図 1 4 c の同期した画像から、ブリルアン信号の元の場所を、曖昧にすることなく特定することができる。ブリルアン周波数シフトを特定の細胞内の場所に割り当てること以外に、画像処理技法を組み込むことと、細胞容器を並進させること、又はブリルアンプローブビームの位置を制御することのいずれかによって、この能力を用いてブリルアンプローブビームを特定の場所に導光することもできる。

【 0 0 5 5 】

1 つの非限定的な実施形態において、細胞を合焦したプローブビームスポットに位置合わせするために、図 1 2 に示されるようなマイクロ流体デバイス 1 2 3 0 を 2 D 並進ステージ上に配置することができる。一例として、限定はしないが、マイクロ流体デバイス 1 2 3 0 は、長方形の断面を有するか、又はフローサイトメータの大部分と同様に円形の断

10

20

30

40

50

面を有する一直線のチャンネルとすることができる。チャンネルのサイズ（一例として、 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ）が、細胞のサイズ（一例として、直径が $10\ \mu\text{m} \sim 20\ \mu\text{m}$ ）よりはるかに大きい場合には、細胞は、マイクロ流体デバイス1230を通過してランダムな場所に流れる場合があるので、測定精度、そして潜在的には測定スループットが減少する。一実施形態において、全ての細胞を照明ビーム1210によって探査できるように、細胞をチャンネル内部の同じトレースに沿って位置合わせするために、シースフローと呼ばれる流体力学的合焦技法を実施することができる。これは、各細胞の中心がプローブビーム1210の合焦スポットに絶えず位置合されるのを確実にする実効的な方法である。

【0056】

図15a及び図15bは、シースフロー技法を使用することによって取得された実験データ（図15b）と、シースフロー技法を使用することなく取得された実験データ（図15a）との比較を示す。流量及び分光計1215の取得時間を調整することによって、細胞が光ビーム1210を横切って進むときに、1つの細胞の幾つかの場所を探査することができる。図15a及び図15bのプロットに関して、単一の細胞の平均剛性を記述するために、細胞内で取得された全てのブリルアン周波数シフトの平均が計算された。それゆえ、図15a及び図15bにおいて、ヒストグラムの各データ点は1つの細胞を表す。これらの結果は、非シースフローによって引き起こされる人工的な広がりを取り除かれるので、測定データの広がり（分布の線幅）が、シースフロー技法を使用することによって約40%狭くされる。1つの非限定的な実施形態において、NIH 3T3細胞系統が実験において使用された。

【0057】

更に別の実施形態において、画像誘導位置合わせ（image-guided alignment）と呼ばれる第2の手法を用いて、流動する細胞をレーザービーム1210の合焦スポットに位置合わせすることができる。その概念の概要が図16に示される。この手法も図12に示される構成内で実施することができるが、以下の変更が加えられる。図12において、レーザービーム1210の合焦スポットは、顕微鏡1212の視野の中心に位置する。しかしながら、図16において、合焦スポット1620は、マイクロ流体チャンネル1610の底部に動かされ、x方向に沿った中間点に、すなわち、 x_0 に設定された。細胞1630がy方向に（上から下に）流れていると仮定して、細胞が視野内に現れると、その場所（ x_1 ）及び合焦スポット1620に対する水平シフト（ $x_0 - x_1$ ）を特定することができる。その後、マイクロ流体チャンネル1610を搬送する並進ステージを自動的に、又は手動で動かして、細胞1630を合焦スポット1620に完全に位置合わせすることができる。代替的には、更に別の実施形態において、ブリルアンプローブビームは、レーザー走査補助部品（例えば、検流計スキャナー、ポリゴン）又は他の既知のビーム位置決め技法を用いて調整することができる。この手法の成功は、2つの条件に基づく。第一は、流動実験の全てが層流であることであり、それは、細胞がチャンネルに入ると、横方向にドリフトするのではなく、そのトレースを維持するのを確実にする。第二は、細胞及びプローブの場所を調整するフィードフォワードアルゴリズムが、チャンネルの位置調整を行うだけの十分な時間があるように流速より速いことである。図12のブリルアン分光法構成を使用することによって取得された典型的な実験結果が、図17aに示される。細胞が培養され、実験直前に緩衝液の中に懸濁された。一実施形態において、緩衝液として、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）が使用された。流量を調整することによって、細胞が光ビームを横切って進むときに、各細胞内の5～10の位置が探査される。この場合に、測定データ点の全てを用いて、図17a内のヒストグラムグラフをプロットした。図17aのヒストグラムは3つの部分からなり、それらの部分の輪郭が3つの実曲線1702、1704及び1706によって描かれる。第1のピーク1704はPBSのシグネチャであり、それは図17bに示されるように、容易に認識し、位置を特定し、除去することができる。光ビーム1210は、2つの隣接する細胞間の時間間隔内でのみ緩衝液を探査することになるので、測定データ内のPBSのシグネチャの出現が予想される。1つの非限定的な実施形態において、上記のように、細胞流動実験のために、NIH 3T3細胞系統が使用される

場合がある。

【0058】

細胞内情報を抽出するために、曲線当てはめ法を用いて、図17aから細胞のシグネチャを抽出することができる。3つのガウス分布1702、1704及び1706の線形重ね合わせを用いて、元のヒストグラムを当てはめた。PBS溶液のシグネチャ1704は、図17bのデータをあらかじめ当てはめることによって十分に特定することができるので、この情報は、当てはめの既知のパラメータとして使用することができる。図17aの元のヒストグラムに最も適合するように破曲線を当てはめた後に、図17cに示されるように、PBS溶液1704のシグネチャを差し引くことによって、細胞の情報が取得された。図17cのヒストグラムは2つのピークからなり、それらのピークは、2つのガウス分布1708及び1710の重ね合わせである。実際には、ガウス分布1708及び1710は、細胞内の異なる領域（すなわち、細胞質及び細胞核）からの機械的シグネチャを表す。

10

【0059】

図17a内のフローデータが、細胞集団の機構を正しく表すことを検証するために、細胞集団のフローデータと、細胞の組の2D画像とが直接比較された。最初に、細胞が図12のマイクロ流体デバイス1230の中に送達され、その後、2～3分間、チャンネル内部で細胞が懸濁されるのを確実にするために停止された。比較として、同じ細胞内の複数の場所において、同一の方法で調製された同じ細胞システムを用いてブリルアン周波数を取得することに基づく流動実験が、図12のブリルアン分光法構成を使用することによって行われた。図18aは、チャンネルを流れている細胞がレーザーを横切るラインに沿った一群の点に対して測定されたブリルアン周波数シフトの分布を示すヒストグラムである。一実施形態において、577個の細胞（3546個の細胞内の点）が測定された。図18aのヒストグラムは、2つのガウス分布1802及び1804の重ね合わせによって当てはめられる。図18bは、2つのガウス分布1806及び1808の重ね合わせによって当てはめられた流動細胞の2Dブリルアン画像から生じるヒストグラムである。一実施形態において、全部で4378個の細胞内の点を含む、29個の細胞が測定された。図18a及び図18bのヒストグラムは、2ピークプロファイル及び各ピークの周波数シフトを含む、同じ特徴を共有することがわかる。上記で規定されたような細胞及び測定値の数は、限定するものではなく、任意の数の細胞及び測定値を用いて、図18a及び図18bのヒストグラムを取得することに留意されたい。

20

30

【0060】

さらに、図17cの2つのピークが、細胞質/細胞骨格及び細胞核の機械的シグネチャに対応することが検証された。細胞の細胞核のみを染色するために蛍光染料が使用され、その後、同じ細胞の明視野/蛍光画像（図19a及び図19b）並びに2Dブリルアン画像（図19d）の両方が取得された。図19a及び図19bの画像を融合することによって取得された図19cの画像を図19dのブリルアン2D画像と比較することによって、細胞質から細胞核を分離することができる。細胞核及び細胞質の両方のヒストグラムが図19eに合わせてプロットされており、ピーク1904は細胞核に由来し（図19bの蛍光領域に対応する）、ピーク1902は細胞質に由来する（図19bの非蛍光領域に対応する）。図19eと図17cとの間の比較に基づいて、細胞がプローブビームを横切るときに、図12のブリルアン分光法構成を用いて細胞内の複数の点においてブリルアン周波数を取得する流動実験によって、細胞集団内で細胞核及び細胞質の機械的シグネチャを区別できると結論付けられる。蛍光/ブリルアンを組み合わせた構成を用いて、蛍光で標識される特定の細胞内成分のブリルアン取得を正確に割り当てることができるか、又は画像誘導することができる。

40

【0061】

本発明の別の態様において、細胞内物理的（機械的）フェノタイピングに基づいて細胞を分類する能力が例示される。例えば、細胞に及ぼすサイトカラシンD（CytD）の影響が分析された。細胞の全体剛性（変形能）は、細胞骨格及び細胞核の両方によって決

50

まることが広く受け入れられている (Fletcher DA, Mullins RD 「Cell mechanics and the cytoskeleton」 Nature 463, 485-492 (2010))。細胞骨格は3つの主な重合体、すなわち、アクチン、微小管及び中間径フィラメントからなる。F - アクチンはアクチンの重合した状態であり、細胞形状及び機械的特性を制御する際に主要な役割を有する。それゆえ、F - アクチンの重合及び解重合が、細胞形状及び剛性の変化を推進する有向力を生成する。C y t o D は、F - アクチンの重合を抑制する薬物である。F - アクチンは C y t o D で処置された付着細胞において著しく低減されることになり、結果として、細胞全体がその剛性を低下させることが報告された (Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC, Elson EL. 「Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells.」 J Cell Sci. 114, 1025-1036 (2001))。細胞内レベルにおいて、細胞核及び細胞骨格はいずれも、その両方内にアクチンが存在するときに、剛性を低下させることになる。さらに、細胞核及び細胞骨格は機械的に接続されるので、細胞核は細胞骨格からのプレストレスを受ける (Wang N, Tytell JD, Ingber DE. 「Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus」 Nat Rev Mol Cell Biol. 10, 75- 82 (2009))。したがって、F - アクチンの崩壊は、最終的に細胞核を軟化させるようなプレストレスも低減するはずである (Chalut KJ, Hoepfler M, Lautenschlaeger F, Boyde L, Chan CJ, Ekpenyong A, Martinez-Arias A, Guck J. 「Chromatin decondensation and nuclear softening accompany Nanog downregulation in embryonic stem cells」 Biophys J. 103, 2060-2070 (2012))。

10

20

【0062】

一実施形態において、C y t o D は細胞上に塗布され、その後、トリプシンを用いて剥離される。その後、処置された細胞は P B S に再懸濁され、図 1 2 の構成において測定される。投与量依存性を観測するために、C y t o D の3つの投与量が使用された。一例として、限定はしないが、C y t o D 投与量は、0 . 5 u g / m l、2 u g / m l 及び 5 u g / m l であった。処置された細胞 (279、232 及び 577) は投与量ごとに探査され、対照のために、処置されない細胞 (268) が探査された。細胞全体にわたる平均値を用いて、細胞の機械的フェノタイピングを表した。図 2 0 a の結果は、細胞の剛性への C y t o D の投与量依存効果を示す。したがって、細胞全体にわたる平均 Brillouin 周波数シフト値を用いて、高スループットの機械的フェノタイピングを取得することができる。1つの非限定的な実施形態において、N I H 3 T 3 細胞系統を用いて、実験を実行した。

30

【0063】

平均された細胞値の他に、図 1 7 a ~ 図 1 7 c を参照しながら説明された方法は、細胞内情報を取得することができる。C y t o D の異なる投与量に対応する図 2 0 b ~ 図 2 0 e に示されるように、ピーク 2 0 0 4、2 0 0 8、2 0 1 2 及び 2 0 1 6 の Brillouin 周波数シフトは小さくなり、それゆえ、図 2 0 b から図 2 0 e に左に移動した。これは、高い投与量の C y t o D による処置ほど細胞核が軟化していることを示している。一方、細胞質を表すピーク 2 0 0 2、2 0 0 6、2 0 1 0、2 0 1 4 は、この実験において概ね変化しないことに留意されたい。これは、フラスコ基体から細胞を剥離するために使用されるトリプシン処理ステップが全ての F - アクチンストレス線維を崩壊させるので、結果として、懸濁された細胞に関する細胞骨格に測定可能な影響をほとんど及ぼさないためである。付着細胞において、細胞骨格剛性が著しく低減されることが検証された。

40

【0064】

図 2 1 は、本発明の別の実施形態による、Brillouin 分光法構成を示す。この実施形態において、細胞が Brillouin ビームによって探査されると同時に、一緒に記録される細胞の共焦点蛍光画像を取得するために、第 2 の光学手法が追加される。第 2 の光学手法は、ダイクロイックミラー 2 1 2 7 と、チューブレンズ 2 1 2 2 と、ピンホールマスク 2 1 2 6 と、光検出器 2 1 2 5 とを備えることができる。ダイクロイックミラー 2 1 2 7 は、レーザービーム 2 1 1 0 及び Brillouin 信号を通過させるが、蛍光を反射する。図 1 2 の明

50

視野顕微鏡と比べて、共焦点構成は、焦点外れの面からの蛍光を除去することによって、より良好な横断及び横方向光学分解能を有する。実際には、蛍光標識された細胞を用いて、細胞のサブ領域（例えば、細胞核）を識別することができ、レーザービーム 2 1 1 0 の合焦スポットを用いて、蛍光放射を直接励起することができる。その後、共焦点構成を用いて、カメラ 2 1 2 5 によって蛍光放射光を検出する。蛍光放射光の強度に基づいて、ブリルアン信号を目標点に割り当てることができるように、細胞内部の合焦スポット（それゆえ、ブリルアン信号）の場所を正確に特定することができる。この手法を用いて、測定中にブリルアンビームを細胞の特定の領域に導光することもできる。更に別の実施形態において、反転構成に加えて、共焦点顕微鏡の直立構成を使用することもできる。この場合、共焦点構成は、マイクロ流体デバイス 2 1 3 0 の上に存在することになる。また、蛍光情報を
10

【 0 0 6 5 】

図 2 2 の画像は図 2 1 の実施形態によるブリルアン分光法構成を使用することによって取得されたが、共焦点顕微鏡法ではなく、明視野蛍光が使用された。蛍光染料を用いて、マイクロ流体デバイス 2 1 3 0 の中に後に送達される細胞の細胞核を染色した。細胞が懸濁液内に静止したままになると、マイクロ流体デバイスを動かすことによって、単一細胞の 2 D マッピングが実行された。ブリルアンビームスポット及び蛍光が空間内で互いに重ね合わせられるので、ブリルアン信号を測定点ごとに蛍光強度に結び付けることができる。その結果を表現する 1 つの取り得る方法が図 2 2 に示される。各点が細胞内の或る特定の領域において取り込まれた 1 つの測定値を表し、異なる色は、データ点の相対密度を符号化する。散乱スポットから、横軸上にプロットされた蛍光強度に従って、各ブリルアン信号の場所を明確に見定めることができる。例えば、破線の丸はそれぞれ、細胞核（蛍光領域）及び細胞質（非蛍光領域）からの測定点を示す。
20

【 0 0 6 6 】

図 2 1 の実施形態を使用して細胞を分類する一例として、細胞に及ぼす C y t o D の影響が分析された。処置する場合、及び処置しない場合の細胞のブリルアン及び蛍光両方の 2 D 結像が行われ、図 2 2 の方法を用いて、データを分析した。その結果が図 2 3 a 及び図 2 3 b に示されており、(a) 及び (b) はそれぞれ、対照群及び C y t o D 処置群の結果である。細胞が C y t o D で処置された後に、細胞核ははるかに軟化することが観測された。
30

【 0 0 6 7 】

図 1 2 及び図 2 1 の実施形態において、ブリルアン信号が逐点走査モードにおいて取得され、そのモードは全体的なスループットの制限である。その場合に、個々の細胞を分析するのに十分な、細胞あたりの細胞内点を取得するのは難しい場合がある。したがって、図 1 2 及び図 2 1 の実施形態は、細胞集団分析に関して有用であるが、単一細胞の機械的フェノタイピングに関して強力というほどでない場合があり、それゆえ、細胞選別の適用例には適していない。この問題への 1 つの解決策は、単一の細胞を分析するのに十分な細胞内点を有するように流速を下げることである。別の解決策は、2 つ以上の分光計を利用して、一度に 2 つ以上の場所を測定することである。代替的には、図 7 によるブリルアン分光法構成が、細胞の複数の点を同時に測定することができる。図 7 の光学配置は、図 1 2 及び図 2 1 の配置に比べて決定的に重要な変更を有する。この場合の主な変更は、C C D カメラによって記録された湾曲したブリルアンスペクトルパターンを一直線にするために、一对の対物レンズ 7 1 3 及び 7 1 4 が高分解能において利用されることである。これは、取得されたブリルアン信号が照明ラインビームに沿った対応する場所に正確に割り当てられるのを確実にするので決定的に重要である。具体的には、レーザー源 7 1 0 からのビームは最初にミラー 7 2 4 によって導光され、その後、x 方向において照明ラインビームになるように対物レンズ 7 1 1 によって合焦する。ラインビームは、マイクロ流体デバイス 7 1 2 の縁部から、そのチャンネルの中に差し込む。細胞は、y 方向に沿って流動することによって、ラインビームを通り抜けることができる。ラインビームによって励起され
40

10

20

30

40

50

たブリルアン散乱信号は、ブリルアン分光計の並列構成によって検出され、その構成は、
 一對の対物レンズ 713 及び 714 と、コリメートレンズ 715 と、円柱レンズ 716 と
 、分散デバイス（すなわち、VIPA）717 と、円柱レンズ 718 及び 719 と、マスク
 720 と、球面レンズ 722 と、高感度 CCD カメラ 723 とからなる。

【0068】

図 12 及び図 21 の分光計とは異なり、図 7 の多重化ブリルアン分光計は、照明ライン
 ビームに沿って数多くの点からのブリルアン信号を同時に取得することができる。例えば
 、適切な対物レンズを選択し、分光計内の光学系を調整することによって、x 方向におい
 て $1\ \mu\text{m}$ 未満の分解能を達成することができる。細胞の通常のサイズは約 $10\ \mu\text{m} \sim 15$
 μm であるので、細胞が流動しているときに、1 ショットの場合に約 10 個の点を、単一
 の細胞の場合に最大で 100 個を超える点を取り込むことができる。このデータセットは
 、単一の細胞の細胞内機構を取得するのに十分な情報を確実に与えることになる。それゆ
 え、図 7 の実施形態は、その細胞内機械的フェノタイプングに基づいて、単一の細胞を分
 類する、より実効的な方法を提供する。幾つかの実施形態において、照明経路及び検出経
 路が直角に配置されることに加えて、図 7 の構成は、45 度及び 60 度の配置角度を含む
 、0 度より大きい任意の角度において機能することもできる。

10

【0069】

図 24 は、図 7 の実施形態の概念図を示す。照明レーザーライン 2410 は左縁部（x
 方向）からマイクロ流体チャンネル 2430 を照明し、細胞 2420 は、チャンネルの内部を
 y 方向に沿って流れる。細胞 2420 がレーザーライン 2410 に当たると、細胞 242
 0 の照明された領域からのブリルアン信号が同時に取得されることになる。細胞が通り抜
 けると、そのラインビームによって細胞体全体を走査することができる。最終的に、図
 24 に示されるように、細胞 2420 の 2D 画像 2440 を再構成することができる。

20

【0070】

図 7 の実施形態は、細胞又はチャンネルから反射されるか、又は散乱するレーザーからの
 スプリアス光を除去するために、フィルタリング要素を追加することによって更に改善す
 ることができる。このために、ファブリ-ペローフィルターを使用することができる。フ
 ァブリ-ペローフィルターは、実際には、選択された周波数を有する光が通過できるよう
 にし、他の光を遮断できるようにするエタロンである。フィルターを適切に設計すること
 によって、フィルターの透過ピークを、ブリルアン信号と重なり合うように調整すること
 ができる。スプリアス光は、ブリルアン信号とは異なる周波数を有し、抑圧されること
 になる。しかしながら、図 7 の方法は、位置合わせの問題及び潜在的なアーティファクトを
 導入する場合があります、正確に校正することによって解決されるべきである。

30

【0071】

代替的には、吸収ガスチャンバーを使用することができる（Piironen P、Eloranta E
 W. 「Demonstration of a high-spectral-resolution lidar based on an iodine abs
 orption filter」Opt. Lett. 19, 234-236 (1994)）。ガスチャンバーは、ビームの方向
 変更（redirection）によるスペクトル分散を導入せず、それゆえ、並列分光計に極めて
 適している。ガスチャンバーは一般にガラスから製造され、明確に規定された吸収スペク
 トルを有する特定の原子元素からの蒸気を含む。光は入口を介してガスチャンバーを通り
 抜け、いかなる光学歪みも導入することなく、窓から出る。吸収ガスは、特定の光学波長
 において非常に狭い（ $1\ \text{GHz}$ 未満の）分子吸収スペクトルを有する。吸収ガスを適切に
 選択することによって、その吸収ラインが光源 710 の波長と完全に重なり合うガスチャ
 ンバーを設計することができる。例えば、ガスチャンバーは、レンズ 712 と 713 との
 間に配置することができ、ブリルアン信号が通り抜ける間に、スプリアス光（レーザー光
 源 710 と同じ波長を有する）が吸収されることになる。吸収スペクトルの線幅は非常に
 狭いので、レーザーの周波数の任意の小さなドリフトがあると、ガスチャンバーの実効性
 がなくなる。ガスチャンバーを図 7 の実施形態とともに十分に機能させるために、レーザ
 ー源の波長をガスチャンバーの吸収ラインにロックする必要がある。一例として、図 25
 は、ルビジウムガスを含む、ガスチャンバーの測定吸収スペクトルを示す。このガスチャ

40

50

ンバーは780.24 nmの波長において機能し、その結果は、チャンバーが94.5まで加熱されたときに、ピーク吸収は約34 dBであり、挿入損失が2 dBであることを示す。得られたスペクトル減衰によって、強い背景雑音を有する生体サンプルを測定できるようになる。

【0072】

例4

本発明の例示的な構成が図26に示される。垂直偏光レーザービーム2628が最初に偏光ビームスプリッター(PBS)2634によって反射され、対物レンズ2632によって底部側からマイクロ流体チャネル2624の中央に合焦する。一実施形態において、ブリルアン散乱を励起するための光源として、11 mW単一モード直線偏光532 nm c wレーザー(Torus, Laser Quantum社)が使用された。4分の1波長板(QWP)2626に起因して、合焦したビームは円偏光される。後方散乱光が同じ対物レンズ2632によって収集され、QWP2626に再び通される。円偏光した光は最終的に、PBS2634によって完全に透過する水平偏光した光に変換される。散乱光は、その後、ミラー2630によって導光され、ファイバーカップリングレンズ(FC)2636によってブリルアン分光計2638に結合される。ブリルアン分光計2638は、交差軸構成において、標準的な2ステージ仮想画像化フェーズドアレイ(VIPA)によって構成される。マイクロ流体チャネル2624の上側に、チャネル2624内部の細胞の流動状況を監視するために、明視野顕微鏡が構築された。破線矢印は、チャネル2624内部の細胞の流動方向を示す。照明のために赤色LED2616が使用され、ブリルアンビームを遮断するためにロングパスフィルターが使用された。一例として、限定はしないが、LED2616の波長は660 nmとすることができ、ロングパスフィルターはFEL0600、Thorlabs社とすることができ、合焦したブリルアンビームの場所は、ロングパスフィルター(LP)2612を取り外すことによってあらかじめ決定された。ブリルアン信号に及ぼすLED光2616の影響を排除するために、ブリルアン分光計2638の前方に狭帯域フィルターが配置された。一実施形態において、分光計のデータを測定サンプルの対応する場所に割り当てることができるように、CCDカメラ2610及びブリルアン分光計2638をLabVIEWプログラムによって同期させた。一実施形態において、実験中に、分光計のサンプリング時間が50 msと設定された。図27a~図27dは、細胞内の複数の点においてブリルアン周波数を取得することに基づく、細胞流動実験の測定手順を示す。実験が行われているとき、ブリルアン分光計2638は絶えず信号を記録する。細胞がビームの場所を通り抜けるとき(矢印によって示される白色の点)、そのブリルアンシフトが測定される。

【0073】

マイクロ流体デバイス

図26の構成において使用されるチップは、入口においてシースフロー構成を備える単一の一直線のチャネル2624を有する。一実施形態において、チャネルの断面は150 μm (幅) \times 50 μm (深さ)のサイズを有し、長さは約50 mmである。チップは顕微鏡の2Dステージ上に組み付けられ、細胞懸濁液をチャネルの中に送り込むためのシリンジポンプに接続される。シースフロー技法を用いて、細胞をチャネルの中央に位置合わせすることができる。一実施形態において、流速は約20 $\mu\text{m}/\text{s}$ ~ 40 $\mu\text{m}/\text{s}$ である。全体的なスループットは一時間あたり細胞約160個から300個まで変化し、平均では一時間あたり細胞230個である。

【0074】

サンプル調製

細胞が培養され、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} 不含のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の溶液内に再懸濁される。一実施形態において、最終的な細胞濃度は、100万細胞/ml ~ 1000万細胞/mlである。クロマチン脱凝縮実験の場合、古い培地が吸引され、完全な成長培地内の100 ng/mlトリコスタチンA(TSA)溶液と置き換えられる。その後、細胞は2時間、インキュベートされる。インキュベーション後に、細胞が、0.25%

トリプシンEDTAを用いて採取され、 $250 \times g$ において5分間、遠心分離され、約250万細胞/mLにおいて、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} 不含のPBSに再懸濁された。細胞核を蛍光染色する場合、Vybrant DyeCycle Ruby染料(ThermoFisher社)が使用され、推奨プロトコルに従った。要するに、50万細胞/mLの濃度を有する細胞懸濁液に1 μ L染料が添加され、十分に混合される。最終的な染料濃度は5 μ Mである。その後、その混合物は37 $^{\circ}$ Cで15分~30分間、インキュベートされ、光から保護される。その際、細胞は、洗浄することなく、蛍光実験の準備ができています。一実施形態において、実験のために、NIH 3T3細胞系統が使用される。

【0075】

細胞の2次元画像

本発明の一実施形態において、細胞懸濁液が、シリンジポンプを用いて、マイクロ流体チャネルの中に徐々に送り込まれる。チャネル内に細胞が満たされると、ポンプが停止される。数分後に、細胞はチャネルの底部に沈殿するが、依然として、丸みを帯びた形状を保持する。その後、レーザービームスポットの高さが細胞の中心に調整され、顕微鏡のステージを走査することによって、水平面において2D走査が実行される。走査のステップサイズは、両方の次元において0.5 μ mと設定される。一実施形態において、実験のために、NIH 3T3細胞系統が使用される。

【0076】

元のフローデータからの細胞のシグネチャの抽出

緩衝液内に懸濁された細胞は一般に丸い形状を有する。一実施形態において、細胞の直径は10 μ mから20 μ mに及ぶ。合焦したブリルアンビームは約0.5 μ mのスポットサイズを有するので、細胞がビームスポットを横切って流れるときに複数の位置を測定することができる。一実施形態において、流動実験中に、ブリルアン分光計は、20Hzの速度において絶えずデータを取得する。図27a~図27dは、測定手順を例示する。具体的には、図27a~図27cは、異なる時点(t_1 、 t_2 及び t_3)において細胞がマイクロ流体チャネルを通して流れる場合を示す。スケールバーは30 μ mである。矢印によって示される白色の点は、レーザービームスポットの場所である。図27dにおいて、ブリルアン信号の時間トレースが提示される。点は測定データであり、実線は見やすくするために引いた線である。

【0077】

データの後処理において、明視野画像の助けを借りて、時間窓を用いて元のデータストリームから細胞事象を選出することができる。図28a~図28cは、577個の細胞について測定されたブリルアン周波数シフトの分布を表す。各データ点は、ブリルアン周波数シフトを測定するブリルアン分光計の1つの測定事象に対応する。細胞の機械的情報を保持するために、時間窓は一般に、各細胞事象の継続時間より広い。それゆえ、細胞及びPBS緩衝液両方の機械的シグネチャが記録され、図28aに示される。ヒストグラムの第1のピーク2802はPBS緩衝液のシグネチャであり、それは、そのブリルアン周波数シフトに基づいて容易に識別することができる。その際、このシグネチャは、PBS緩衝液のみを流すことによって特徴付けられ、その結果が図28bに示される。そのフローデータは正規分布に十分に当てはめることができ、それは、ブリルアンシフトが7.51GHzであり、0.047GHzの幅を有することを示す。図28aからPBS緩衝液のシグネチャ2804を除去することにより、直接、細胞の機械的シグネチャを抽出ことができ、その結果が図28cに示される。細胞のシグネチャは2つのピークを明らかにする。測定データを当てはめるために、2つの正規分布2806及び2808の線形重ね合わせが使用された。それらの結果が図28cにおいて実曲線2806及び2808によって示され、それぞれ7.57GHz及び7.80GHzの中心周波数を有する。細胞核は細胞の最も剛性が高い細胞小器官であることが当該技術分野において既知である(非特許文献10);非特許文献28)。それゆえ、実曲線はそれぞれ、細胞質及び細胞核のシグネチャである。これは、細胞核を染色し、蛍光画像をそのブリルアンデータと比較することによって確認することができる。さらに、3T3細胞の場合の細胞核の体積比は、3

10

20

30

40

50

0%より大きいことが報告されており、それは、細胞質と細胞核との直径比が約3:7であることを意味する。それゆえ、細胞内の複数の点においてブリルアン周波数を取得することに基づく流動実験中に、細胞核のシグネチャは、細胞質より、ブリルアン分光計によって測定される機会が2倍より大きく、それも図28cの2つのピーク2806及び2808の振幅によって確認される。

【0078】

フローデータが細胞集団機構を表す

懸濁された細胞は丸みを帯びた形状を有し、それは簡単にするために球として近似することができる。シースフローの助けを借りて、細胞がマイクロ流体チャネルを流れるときに、細胞の中心を幅方向においてレーザービームスポットの場所に位置合わせすることができる。チャンネルの深さが細胞サイズより大きいので、細胞の中心は、深さ方向において細胞ごとに異なることになる。このような場合には、細胞がレーザービームスポットを横切って進むときに、各単一細胞の直径を含む断面内の1つのラインがサンプリングされることになる。細胞流動中のブリルアン周波数シフトの測定値が、細胞集団の機構を表すのを確実にするために、それらの測定値が、細胞の中心を通る断面の画像と比較される。具体的には、細胞の2D画像が、図29aに示されるように取得された。図29bは、2つの曲線2902及び2904の重ね合わせによって当てはめられる細胞集団の全体的な機構を表す、図29aの画像データの全ての分布を示す。細胞がレーザーを横切るラインに沿った一群の点に対応するブリルアンフローデータの分布が図29cにプロットされ、曲線2908及び2906の重ね合わせによって当てはめられる。図29bの2Dブリルアン画像データを図27cのブリルアンフローデータと比較することによって、両方の分布が2ピークシグネチャを有することが観測される。より重要なことに、両方の分布に関するこれら2つのピークのブリルアンシフトは同じであり、すなわち、7.57GHz及び7.80GHzである。したがって、フローデータが、細胞集団の機械的特性を正確に明らかにすると結論付けられる。

【0079】

ブリルアンシグネチャが細胞核を細胞質から区別する

懸濁された細胞を球であると見なすと、固定されたビームスポットによって1つの直径が検知されるように、細胞がシースフローを介して位置合わせされる。しかしながら、実際の実験において、垂直方向における細胞の場所はわずかに上下変動するので、ビームスポットは実際には、その直径を通る断面をマッピングしている。図28cの2ピークシグネチャを更に検証するために、蛍光染料を用いて、細胞の細胞核のみを染色した。図30に示されるように、明視野(I)、蛍光(II)及びブリルアン2D(IV)の画像が取得された。明視野画像及び蛍光画像を含む融合画像(III)をブリルアン画像と比較することによって、ヒストグラム3002及び3004によってそれぞれ示されるように、細胞核のブリルアンシグネチャを細胞骨格のブリルアンシグネチャから容易に分離することができる。集団内の細胞間の小さな差を考えると、細胞内の複数の点においてブリルアン周波数を取得することに基づいて流動実験から取得されたデータの分布は、細胞結像からの分布に類似しているはずであり、それが、図30と図28cとの間の高い類似度によって確認される。したがって、図28cの流動データの2つのピークがそれぞれ細胞核及び細胞骨格のシグネチャに対応することが検証される。

【0080】

クロマチン脱凝縮が細胞核を軟化させる

クロマチンはDNA及びタンパク質の複合物であり、細胞核内に染色体を形成する。その機能は、細胞の細胞核に収まるように、かつDNA構造及び配列を保護するように、DNAを小さな体積の中に効率的に詰め込むことである。研究の積み重ねが、クロマチンの凝縮レベルが細胞核の剛性に密接に関連することを示唆する。例えば、クロマチン脱凝縮の結果として、細胞核の剛性が低下する。逆に、クロマチン凝縮の増加が、細胞核の硬化につながる。一実施形態において、機械的サイトメトリーを用いて、TSA、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤によって引き起こされるクロマチン脱凝縮の影響を特徴付けた。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

図 3 1 a ~ 図 3 1 c は、クロマチン脱凝縮による細胞核の軟化の実験的な観測結果を与える。1つの非限定的な実施形態において、356個及び353個の細胞が、TSA処置群及び対照（非TSA処置）群からそれぞれ収集される。図 3 1 a 及び図 3 1 b に示されるように、細胞がTSAで処置された後に、細胞核の Brillouin シフトが 7.80 GHz (曲線 3 1 0 8) から 7.71 GHz (曲線 3 1 0 4) に動かされ、それは細胞核の明確な軟化を示す。一方、細胞質の Brillouin シフトは概ね同じままであり (7.56 GHz (曲線 3 1 0 2 及び 3 1 0 6))、それは細胞質が TSA によって影響を及ぼされなかったことを意味する。図 3 1 c に示されるように、TSA 処置細胞及び対照細胞の細胞質に関する平均 Brillouin シフトにそれぞれ関連付けられる棒グラフ 3 1 1 0 及び 3 1 1 2 は、同じ高さを有し、Brillouin 周波数に変化がないことを示す。対照的に、TSA 処置細胞及び対照細胞の細胞核に関する平均 Brillouin シフトにそれぞれ関連付けられる棒グラフ 3 1 1 4 及び 3 1 1 6 は、異なる高さを有し、Brillouin 周波数に変化があることを示す。

10

【 0 0 8 2 】

したがって、本発明による機械的サイトメトリーは、オンチップ Brillouin 技法を用いて、細胞の細胞核シグネチャを識別することができる。それは、細胞集団の細胞核の機械的特性を測定するラベルフリーの非接触、非侵襲的方法を提供する。一実施形態において、総合スループットは一時間あたり約 230 細胞であり、それは、原子間力顕微鏡法 (AFM) 及びマイクロピペット吸引等の既存の技法よりはるかに効率的である。さらに、本発明による機械的サイトメトリーを用いて、細胞核の剛性に及ぼすクロマチン脱凝縮の影響を評価することができる。TSA 処置後に明確に軟化することがわかっている。細胞核剛性の変化は、遊走、分化及び悪性転換等の細胞の数多くの重要な活動に関与するので、本発明による機械的サイトメトリーは、細胞集団の細胞核機構の効率的で、ラベルフリーの特性評価が必要とされる場合に適用される可能性がある。

20

【 0 0 8 3 】

要するに、図 1 2 ~ 図 3 1 c を参照すると、本発明による生体細胞を分類する方法は、各生体細胞内の複数の点において Brillouin 散乱スペクトルを測定することに基づく。測定された Brillouin 散乱スペクトルに基づいて、生体細胞内の異なる空間点において細胞内物理的特性に関連する 1 つ以上の指標が特定される。生体細胞は、生体細胞内の異なる空間点における細胞内物理的特性に基づいて分類される。

30

【 0 0 8 4 】

一実施形態において、生体細胞内の各測定点を含む、Brillouin 周波数シフトに関するヒストグラムが生成される。そのヒストグラムを当てはめるために、ガウス分布の線形重ね合わせが適用される。次に、ヒストグラム内の各ピークが特定され、各ピークは、細胞内の異なる領域からの機械的シグネチャを表す。生体細胞内の異なる空間点における物理的特性は、特定された機械的シグネチャと相関がある。

【 0 0 8 5 】

生体サンプルは、生物有機体、組織又は生体細胞を含むことができる。一実施形態において、生体細胞は生細胞である。更に別の実施形態において、指標として Brillouin 周波数シフトが選択される。さらに、一実施形態において、生体細胞内の異なる空間点において細胞内物理的特性を特定するステップは、画像を形成することと、特定された物理的シグネチャの空間による違いに基づいて、パラメーターを分割することとを含む。サンプルの物理的特性は、粘弾性率、密度、屈折率、電歪及びその組み合わせからなる群から選択される。

40

【 0 0 8 6 】

一実施形態において、生体サンプルを有する容器は、マイクロ流体デバイスのマイクロ流体チャネルである。生体細胞は、スペクトルが測定される間に、マイクロ流体チャネルを流れて流れる。

【 0 0 8 7 】

50

一実施形態において、ブリルアン散乱の元の場所を識別するために、そして照明光ビームをマイクロ流体チャンネル内の特定の場所に導光するために、ブリルアン光スペクトルパターンと同時に明視野2D画像が取得される。更に別の実施形態において、多次元ヒストグラムを作成して生体細胞を分類するために、蛍光散乱、ラマン散乱、前方散乱及び側方散乱とともに1つ以上のブリルアン指標が使用される。一実施形態において、細胞核を細胞質から分離するために、2D明視野細胞画像及び2D蛍光細胞画像を含む融合画像が、ブリルアン周波数シフトに基づく細胞画像と比較される。

【0088】

ブリルアン周波数シフトは、点走査モードにおいて、又は多重化走査モードにおいて測定することができる。細胞内から取得された抽出された物理的特性は、単一の生体細胞又は生体細胞の集団の分析結果を指す場合がある。

10

【0089】

一実施形態において、ブリルアンスペクトルを表すヒストグラムは、細胞質及び細胞核にそれぞれ対応する2つのピークを有する。更に別の実施形態において、ブリルアンスペクトルによって規定された細胞の細胞内機械的特性に基づいて、改変された生体細胞が無傷の生体細胞から区別され、細胞は、細胞骨格又は細胞核等の細胞内成分を標的にする薬物によって改変される。細胞内物理的特性を用いて、細胞を選別する。

【0090】

図32は、本発明の一実施形態によるシステムを示すブロック図である。ブリルアン分光計3202が、ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターン3404と、ブリルアン光スペクトルとをユーザーインターフェース3208に与える。プロセッサ3206が、ブリルアン分光計3202、ユーザーインターフェース3208、及びメモリ3210と通信する。プロセッサ3206は、メモリ3210内の命令を実行するように構成される。一実施形態において、メモリ3210は、検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点における1つ以上のブリルアン指標を計算するための命令を含む。更に別の実施形態において、メモリ3210は、測定されたブリルアン散乱スペクトルに基づいて、生体細胞内の異なる空間点において細胞内物理的特性に関連する1つ以上の指標を抽出する命令と、生体細胞内の異なる空間点における物理的特性に基づいて、生体細胞を分類するための命令とを含む。さらに、メモリ3210は、ブリルアン周波数シフトに関するヒストグラムをプロットし、ヒストグラムをユーザーインターフェース3208に通信するための命令、ヒストグラムを当てはめるためにガウス分布の線形重ね合わせを適用するための命令、ヒストグラム内の各ピークを特定するための命令であって、ピークは細胞内の異なる領域からの機械的シグネチャを表す、命令、及び媒質に関連付けられるデータをヒストグラムから除去するための命令を含むことができる。

20

30

【0091】

核の機械的特性

アクチンフィラメント、微小管及び中間径フィラメントから構成される細胞骨格は、核と機械的にしっかりと相互接続されている (Ingber DE, Wang N, Stamenovic D, "Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems", *Rep Prog Phys*. 77, 046603 (2014))。アクチンフィラメントは、核に引張プレストレスを加えることで、核を硬くする。微小管フィラメントは、このプレストレスの釣り合いを保つために圧縮ストラットとして働く。したがって、核の剛性は、これらの2つの細胞骨格フィラメントの釣り合いによって取り持たれることとなる (Wakatsuki et al., *J Cell Sci*. 114, 1025-1036 (2001)、Chalut et al., *Biophys J*. 103, 2060-2070 (2012))。

40

【0092】

アクチン及び微小管の阻害を伴う細胞の特定

2つの薬物のサイトカラシンD (cytoD) 及びノコダゾール (Noco) を3T3細胞に適用することで、アクチンフィラメント及び微小管フィラメントをそれぞれ阻害した。アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) から購入したNIH 3T3線維芽細胞を、全ての実験のために使用した。細胞を以下の標準的なプロトコルに従って培養した。

50

微小管フィラメントの阻害のために、細胞をまず $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の *NoCo* により 30 分間処置し、次いでトリプシン処理により回収し、測定前に Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を有しないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の溶液内に 1 mL 当たり約 10 万個の細胞の濃度で再懸濁させた。濃度が低いと、流動により細胞は殆ど取り込まれなかった。その代わりに、懸濁液中の単一細胞は、それがマイクロ流体デバイス中に送達された後に結像された。図 33A に示されるように、棒グラフ 3311 及び 3312 は、それぞれ対照細胞及び処置細胞の核の平均ブリルアンシフトを表す。処置細胞のブリルアンシフト 3312 の方が 0.29 GHz 高いことから、その核の明確な硬化が示される。機器の感度が約 0.01 GHz であることを考慮して、微小管フィラメントが阻害された細胞は、核の機械的硬化に基づいて正常細胞から容易に特定された。

10

【0093】

アクチンフィラメントの阻害のために、細胞をまず $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の *cytoD* により 10 分間処置し、次いでトリプシン処理により回収し、測定前に Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を有しないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の溶液内に 1 mL 当たり約 100 万個の細胞の濃度で再懸濁させた。ブリルアンに基づくラベルフリーフローサイトメトリーを使用して、それぞれ 368 個の細胞が対照群から取得され、232 個の細胞が処置群から取得された。図 33B は測定された結果を示し、棒グラフ 3321 及び 3322 は、それぞれ対照群及び処置群の核の平均ブリルアンシフトを表す。処置群 3322 は、対照群 3321 と比較して 0.12 GHz の明確な減少を特徴とし、こうしてアクチンフィラメントの破壊による核の軟化が示される。

20

【0094】

悪性細胞の特定

図 34 は、第 2 の例示的な実施形態を示す。ブリルアンに基づくラベルフリーフローサイトメトリーを使用して、5 種の癌関連細胞系統を試験した。その内の 4 種 (バーバリアンカルマノス研究所から取得した M1、M2、M3、及び M4) は、MCF10A 細胞系統に由来する同種同系の腫瘍形成性が増している細胞系統であり、それはヒト乳癌の進行をモデル化するための標準的なアプローチである (Santner et al., *Breast Cancer Res Treat.* 65, 101-110 (2001))。5 つ目は、高転移性の乳癌細胞系統 MDA-MB-231 (ATCC から得られた) である。MCF10A (M1) は、ヒト上皮の非腫瘍形成性の細胞系統である。MCF10AT1k.cl2 (M2) は、マウスに注射された場合に持続性の限局性良性病変を引き起こす前悪性細胞である。MCF10CA1h (M3) 細胞及び MCF10CA1a.cl1 (M4) 細胞は、それらがマウスの尾静脈内に注射された場合に遠隔の肺に転移する能力を有する。実験により、M4 細胞が M3 細胞系統よりも素早く転移することも指摘される。それというのも、M4 細胞はより素早く成長する腫瘍を形成し得るからである (Santner et al. (2001))。

30

【0095】

全ての細胞系統は、標準的なプロトコルに従って培養した。それらを、同じ培地 (MCF10A 細胞系統 (M1 ~ M4) のための標準的な完全培地) 内で増殖させた。細胞を、低濃度のトリプシンで培養物から回収し、それらを実験前に Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を有しない PBS 内に 1 mL 当たり約 200 万個の細胞の濃度で再懸濁した。細胞系統 M1 ~ M4 及び MDA-MB-231 から、223 個、343 個、233 個、538 個及び 430 個の細胞が収集され、核の剛性の平均は、それぞれ棒グラフ 3421、3422、3423、3424 及び 3425 として示されている。棒グラフ 3421、3422 は、限局性腫瘍 M2 細胞系統が、ブリルアン周波数シフトの差 (0.16 GHz) に基づいて非腫瘍形成性の細胞系統 M1 と明らかに区別され得ることを示している。さらに、棒グラフ 3423、3424 及び 3425 は、転移性細胞系統 M3、M4 及び MDA-MB-231 も、非転移性の M1 及び限局性の M2 の両方と統計学的有意差 (p 値 < 0.01) をもって区別され得ることを示している。M3 と M4 との間に統計学的有意差は見出されなかった。それというのも、それらのブリルアンシフト測定値は互いに類似していたからである。しかしながら、M3 (M4) と MDA-MB-231 との間には統計学的有意差 (p 値 < 0

40

50

． 0 1) が見出された。核の機械的シグネチャの測定に基づいて、正常細胞及び良性病変細胞は悪性癌細胞と区別されたため、癌の進行をグレード分けすることができる。

【 0 0 9 6 】

細胞内でのラミン発現の特定

図 3 5 は、本発明の第 3 の例示的な実施形態を示す。核の主要な構成成分の 1 つは、ラミンとして知られるタンパク質群である。核ラミナの主要成分として、ラミン A / C は、多数の機能、例えば核の構造的支持を与え、クロマチン構成、遺伝子調節並びに DNA 複製及び修復を促進する (Ho and Lammerding, J Cell Sci. 125, 2087-2093 (2012))。ラミンはまた、広範なヒト疾患につながることも分かっている。例えば、10 種を超える癌型からのエビデンスにより、ラミンは癌の進行の役割を担うか、又はそれに応答して変化することが示唆されている (Irianto et al., Cell Mol Bioeng. 9, 258-267 (2016))。また、A 型ラミンにおける突然変異は、ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 (HGPS) (Mounkes and Stewart, Current Opinion In Cell Biology. 16, 322-327(2004) (Butin-Israeli, Trends Genet. 28(9):464-71 (2012)) 等の老化症の原因であることも分かっている。さらに、実験によって、ラミン A / C の過剰発現が核の剛性を高める一方で、ノックダウンが剛性をより低くすることが示された (Pajeroski et al., Proc Natl Acad Sci USA 104, 15619-15624 (2007)、Lammerding et al., J Biol. Chem. 281, 25768-25780 (2006)、Davidson (2014)、Schaepe et al., Biophys. J 96, 4319-4325 (2009)、Swift et al., Science 341, 1240104 (2013))。

10

20

【 0 0 9 7 】

ラミン発現の調整により生ずる核における機械的变化を測定するために必要とされる感度がこの方法を使用して可能であるため、それを細胞分類のために使用することができることを確認するために試験を行った。それを行うために、NIH / 3 T 3 細胞を培養し、市販の脂質を基礎とするトランスフェクション試薬 (Dharmafect) を使用して、ラミン A / C 発現を選択的にノックダウンさせた。Dharmafect の溶液及び siRNA を事前に複合体化し、次いでトランスフェクション複合体を含む培地内で細胞をインキュベートした。1 つはラミン A / C をターゲティングするために知られており、1 つは既知の細胞標的を有しないスクランブル配列である 2 種の市販の siRNA を使用した。ラミン A / C をターゲティングする siRNA に関しては、低効率のノックダウン及び高効率のノックダウンのそれぞれを達成するために 2 種の異なる用量 (25 nM 及び 50 nM) を使用した。トランスフェクションを経なかった対照も含まれていた。72 時間のインキュベート後に、細胞をトリプシン処理により回収し、直ちにラベルフリーのプリルアンに基づくフローサイトメトリー構成を使用して分析した。図 3 5 の 3 5 1 2、3 5 2 2、3 5 3 2、3 5 4 2 の棒グラフにそれぞれ示されるように、対照、スクランブル対照、低効率ノックダウン及び高効率ノックダウンのために、122 個、195 個、208 個、114 個の細胞を収集した。核の機械的特性は、スクランブル対照群 3 5 2 2 において、非トランスフェクション対照群 3 5 1 2 と比較してほぼ不変 (0.01 GHz 未満) であったが、図 3 5 の棒グラフ 3 5 3 2 及び 3 5 4 2 に示されるようにラミン A / C をターゲティングする siRNA でトランスフェクションされたサンプルにおいては、剛性に

30

40

【 0 0 9 8 】

並行してラミン A / C 発現を可視化するために、標準的なプロトコルに従って免疫細胞化学を実施した。上記の 72 時間のトランスフェクション後に、接着細胞を中性緩衝ホルマリンで固定化し、Triton - X 100 で透過処理を行い、ウシ血清アルブミンの溶液でブロッキングし、一次抗ラミン抗体と一緒に一晚インキュベートし、最後に蛍光体結合二次抗体と一緒に簡単にインキュベートした。各ステップ間にサンプルを PBS で 3 回すすいだ。一定の結像条件 (光強度、露光時間) で各サンプルの蛍光画像を撮影した。図

50

36に示されるように、図36Bにおけるノックダウン群の蛍光強度は、図36Aにおけるスクランブル群の蛍光強度よりも大幅に弱いことから、ラミンA/C発現は、ラミンA/CをターゲティングするsiRNAで処置されたサンプルにおいてスクランブルsiRNAサンプルと比較してノックダウンされていることが指摘される。ラミンA/Cノックダウンを大まかに定量化するために、核タンパク質抽出物を、トランスフェクション後に全てのサンプルから採取した。

【0099】

一実施形態において、サンプル内の少なくとも1つの細胞の核の機械的特性を測定する方法であって、ブリルアン分光法により可能となったラベルフリーサイトメトリーを使用して少なくとも1つの細胞の機械的シグネチャを取得することと、上記細胞の少なくとも1つの核の機械的シグネチャに基づいて細胞を分類することを含む、方法が提供される。幾つかの実施形態において、ラベルフリーサイトメトリーは、ブリルアン走査を使用する本明細書において与えられる一連のステップのいずれかを含む。或る特定の実施形態において、上記ラベルフリーサイトメトリーは、第1の方向に沿って光ビームによって上記サンプルを照明するステップと、上記照明光ビームに反応して上記サンプルから放射されるブリルアン散乱光を収集するステップと、上記ブリルアン散乱光を、スペクトル分散を誘発する光学配置に送り、上記ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンを生成する検出ユニットに送るステップと、なお、上記光学配置及び上記検出ユニットは第2の方向に沿って位置決めされる；上記検出ユニット上で上記ブリルアン散乱光の上記空間スペクトルパターンを検出するステップと、なお、上記照明光ビームに沿った上記サンプルの複数の点が同時に測定され、上記サンプルの複数の点の少なくとも1つが細胞核である；上記検出ユニットにおいて、各空間点における上記スペクトルパターンを校正するステップと、上記検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において上記1つ以上のブリルアン指標を計算するステップとを含む。幾つかの実施形態において、第1の方向と第2の方向との間の角度は0度より大きい任意の角度である。別の実施形態において、スペクトル分散を誘発する光学配置は、仮想画像化フェーズドアレイ(VIPA)、ファブリ-ペローエタロン又はエシェル格子を含む。他の実施形態において、スペクトル分散を誘発する光学配置は、サンプルから検出ユニットへの光路内の空間スペクトルパターンのサイズ、形状及び/又は角度の広がりを変更する光学要素を更に備える。

【0100】

更なる実施形態において、上記サンプルは、生物有機体、組織又は生細胞を含む生体細胞を含む生体サンプルである。別の実施形態において、上記生体細胞は、懸濁されるか、2D基体に付着しているか、3D細胞外マトリックス内で培養されるか、又はマイクロ流体チップの1つ以上のチャンネルを流れる。幾つかの実施形態において、上記少なくとも1つの細胞は、生きている真核細胞である。別の実施形態において、上記分類は、細胞集団又は単一細胞のいずれかに基づく。

【0101】

幾つかの実施形態において、ブリルアン指標は、ブリルアン周波数シフト、ブリルアンスペクトル線幅、ブリルアン利得又は損失スペクトル、及びその組み合わせからなる群から選択される。更なる実施形態において、ブリルアン指標は、細胞核の機械的特性に関する情報を提供する。他の実施形態において、核の機械的特性は、弾性、粘性及び核の剛性である。幾つかの実施形態において、走査された細胞は、核の測定された機械的特性に基づいて分類される。別の実施形態において、走査された細胞は癌細胞として分類される。

【0102】

別の実施形態において、サンプル内の少なくとも1つの細胞の核の機械的特性を測定する方法において使用するためのシステムが提供される。一実施形態において、該システムは、ブリルアン分光法により可能となったラベルフリーサイトメトリーを提供する。更なる実施形態において、該システムは、少なくとも1つの点がサンプル内の少なくとも1つの細胞の核内にある複数の点においてブリルアン散乱スペクトルに関連付けられる1つ以上のブリルアン指標を取得する。更なる実施形態において、該システムは、第1の方向に

沿って光ビームによって上記サンプルを照明する照明源と、上記照明光ビームに応答して、上記サンプルから放射されるブリルアン散乱光を収集する1つ以上のレンズと、上記1つ以上のレンズから上記ブリルアン散乱光を受光する光学配置であって、該光学配置はスペクトル分散を誘発する、光学配置と、上記ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンを検出する検出ユニットであって、上記1つ以上のレンズ、上記光学配置及び上記検出ユニットは、第2の方向に沿って位置決めされ、上記照明光ビームに沿った上記サンプルの複数の点が同時に測定される、検出ユニットと、プロセッサであって、上記検出ユニットにおいて、(1)各空間点における上記スペクトルパターンを校正するための命令と、(2)上記検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において上記1つ以上のブリルアン指標を計算するための命令とを実行する、プロセッサとを備える。

10

【0103】

別の実施形態において、上記システムは、ブリルアン周波数シフト、ブリルアンスペクトル線幅、ブリルアン利得又は損失スペクトル、及びその組み合わせを含む1つ以上のブリルアン指標を取得する。更なる実施形態において、上記1つ以上のブリルアン指標は、少なくとも1つの細胞核の機械的特性を決定し、上記機械的特性は、弾性、粘性及び核の剛性を含む群から選択される。別の実施形態において、走査された細胞は、上記核の測定された機械的特性に基づいて分類される。更なる実施形態において、走査された細胞は、癌細胞として分類される。

【0104】

更なる実施形態において、サンプル内の癌性細胞を特定する方法が提供される。一実施形態において、該方法は、本明細書に与えられるラベルフリーサイトメトリーを使用して細胞核の特性を測定することを含む。幾つかの実施形態において、該方法は、第1の方向に沿って光ビームによって上記サンプルを照明することと、上記照明光ビームに応答して上記サンプルから放射されるブリルアン散乱光を収集することと、上記ブリルアン散乱光を、スペクトル分散を誘発する光学配置に送り、上記ブリルアン散乱光の空間スペクトルパターンを生成する検出ユニットに送ることと、なお、上記光学配置及び上記検出ユニットは第2の方向に沿って位置決めされる；上記検出ユニット上で上記ブリルアン散乱光の上記空間スペクトルパターンを検出することと、なお、上記照明光ビームに沿った上記サンプルの複数の点が同時に測定され、上記サンプルの複数の点の少なくとも1つが細胞核である；上記検出ユニットにおいて、各空間点における上記スペクトルパターンを校正することと、上記検出された空間スペクトルパターンに基づいて、各測定サンプル点において上記1つ以上のブリルアン指標を計算することと、上記計算されたブリルアン指標と正常細胞のブリルアン指標とを比較することによって、上記サンプル内に存在する癌性細胞を特定することを含む。

20

30

【0105】

幾つかの実施形態において、1つ以上のブリルアン指標は、核の機械的特性に関する情報を提供する。別の実施形態において、該機械的特性は、弾性、粘性及び核の剛性を含む群から選択される。幾つかの実施形態において、癌性細胞は、その核の剛性を非癌性細胞の核の剛性と比較することにより特定される。

【0106】

更なる実施形態において、サンプルは、生物有機体、組織又は生細胞を含む生体細胞を含む生体サンプルである。別の実施形態において、生体細胞は、懸濁されるか、2D基体に付着しているか、又は3D細胞外マトリックス内で培養されるか、又はマイクロ流体チップの1つ以上のチャンネルを流れる。幾つかの実施形態において、少なくとも1つの細胞は、生きている真核細胞である。別の実施形態において、上記分類は、細胞集団又は単一細胞のいずれかに基づく。

40

【0107】

別の実施形態においては、細胞がラミンA/C発現の抑制を伴うかどうかを判定する方法が提供される。更なる実施形態において、該方法は、ブリルアン分光法により可能となったラベルフリーサイトメトリーを使用して少なくとも1つの細胞の核の機械的シグネチ

50

ヤを取得することを含む。更なる実施形態において、細胞は、細胞の核の機械的シグネチャに基づいて、正常なラミンA / C発現を有する又はラミンA / C発現の抑制を伴うと分類される。別の実施形態において、ラベルフリーサイトメトリーは、本明細書に記載されるように実施される。

【0108】

本発明を説明する文脈において（特に添付の特許請求の範囲の文脈において）「1つの（a、an）」及び「その（the）」という用語並びに類似の指示物を使用することは、本明細書において他に指示されない限り、又は文脈によって明確に否定されない限り、単数形及び複数形の両方を含むと解釈されるべきである。「備える」、「有する」「含む」及び「含有する」という用語は、他に言及されない限り、オープンエンドの用語（すなわち、「含むが、それに限定されない」を意味する）と解釈されるべきである。本明細書において値の範囲を列挙することは、本明細書において他に指示されない限り、その範囲内に入る別々の各値を個々に参照する簡潔な方法としての役割を果たすことを意図するにすぎず、本明細書において個々に列挙されたかのように、別々の各値が本明細書に組み込まれる。例えば、範囲10～15が開示される場合には、11、12、13及び14も開示される。本明細書において説明される全ての方法は、本明細書において他に指示されない限り、又は文脈によって明確に否定されない限り、任意の適切な順序において実行することができる。本明細書において与えられるありとあらゆる例、又は例示する用語（例えば、「～等の（such as）」）の使用は、本発明の理解をより容易にすることを意図するにすぎず、別に特許請求されない限り、本発明の範囲に制限を課すものではない。本明細書における文言は、任意の特許請求されない要素を、本発明を実施する上で不可欠であると示すものと解釈されるべきでない。

【0109】

本発明の方法及び構成は、様々な実施形態の形で組み込むことができ、その幾つかのみが本明細書において開示されることは理解されよう。上記の説明を読むと、それらの実施形態の変形が当業者に明らかになる場合がある。本発明者らは、当業者が必要に応じてそのような変形を利用することを期待しており、本発明者らは、本発明が本明細書において具体的に説明されたのとは別のやり方で実施されることを意図している。

【0110】

したがって、本発明は、適用法令によって許されるような添付の特許請求の範囲において列挙される主題の全ての変更及び均等物を含む。さらに、本明細書において他に指示されない限り、又はそうでなくても文脈によって明確に否定されない限り、本発明の全ての取り得る変形における上記の要素の任意の組み合わせが本発明によって包含される。

10

20

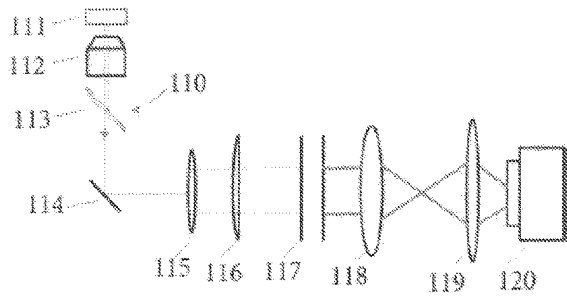
30

40

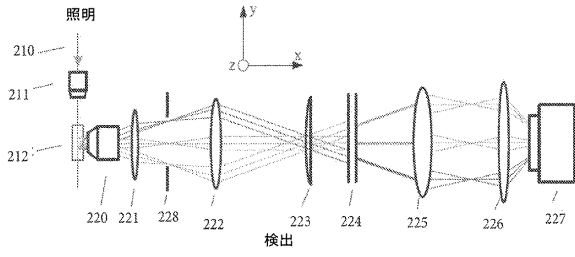
50

【図面】

【図 1】

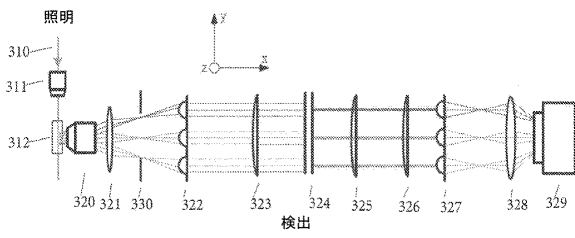


【図 2】

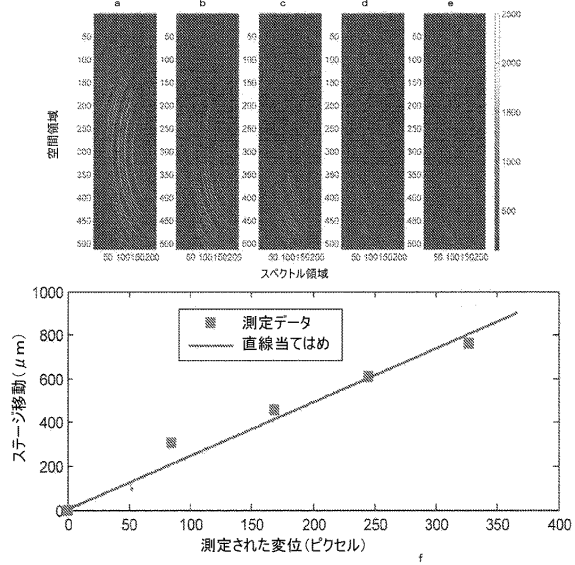


10

【図 3】



【図 4】



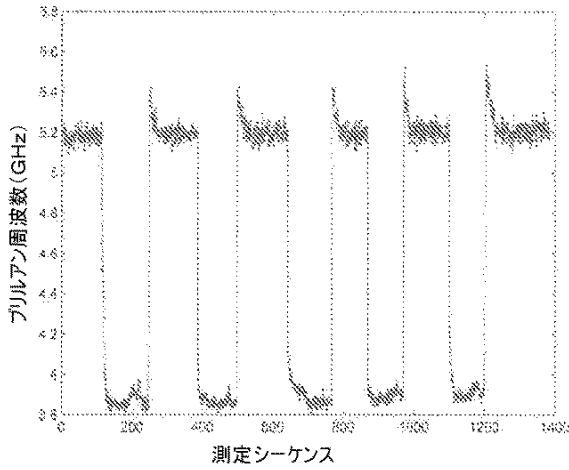
20

30

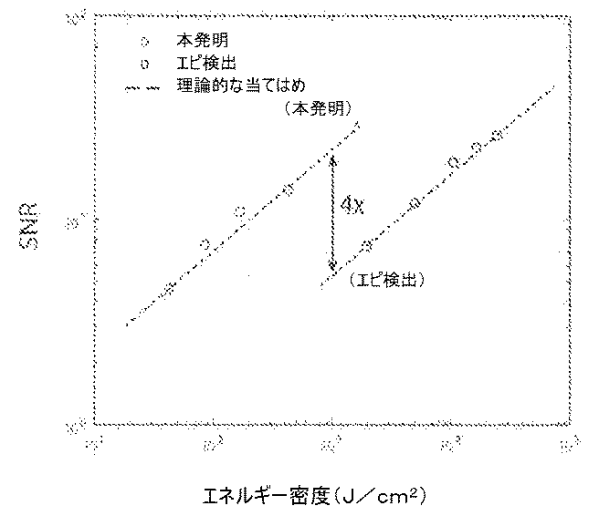
40

50

【図 5】

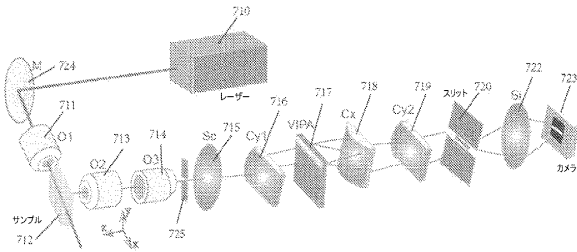


【図 6】

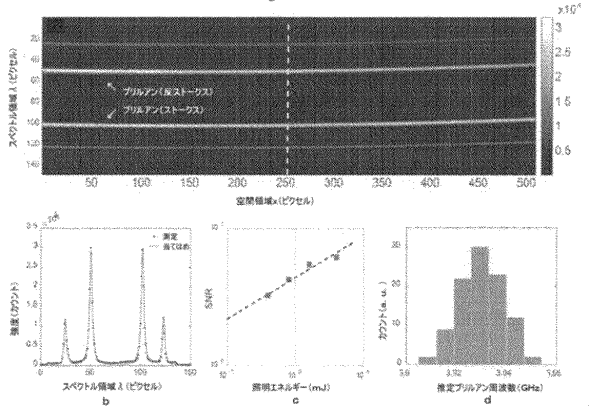


10

【図 7】



【図 8】



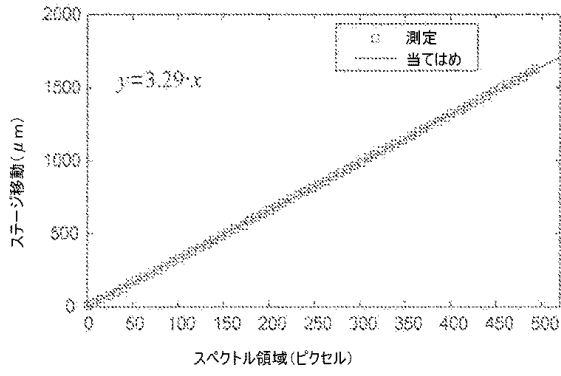
20

30

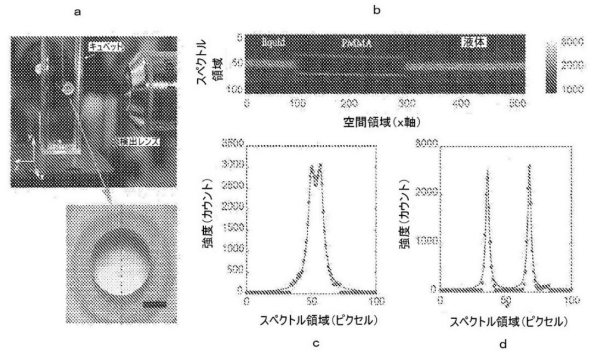
40

50

【図 9】

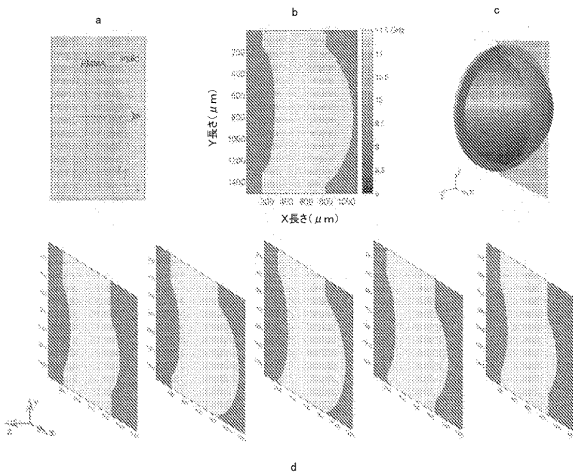


【図 10】

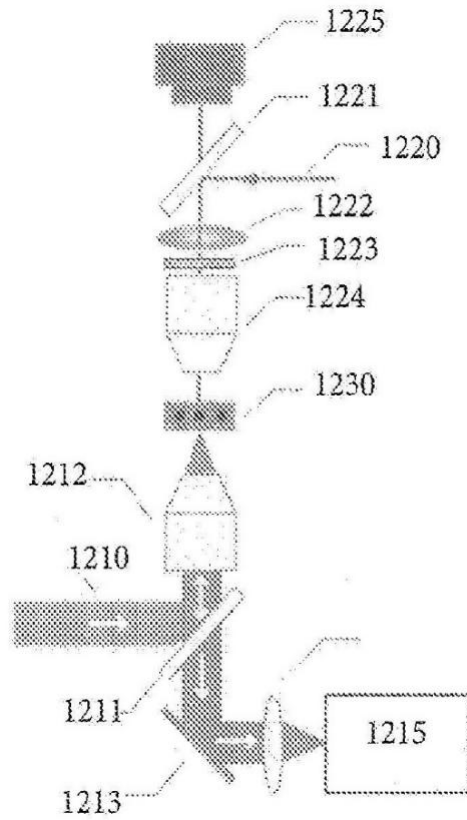


10

【図 11】



【図 12】



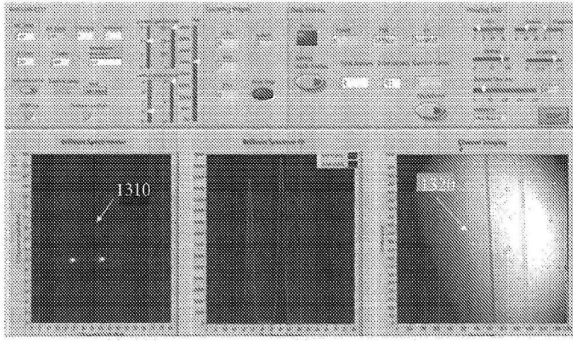
20

30

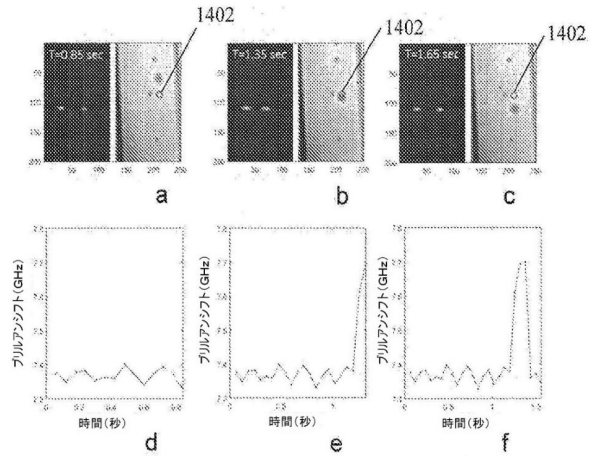
40

50

【図 13】

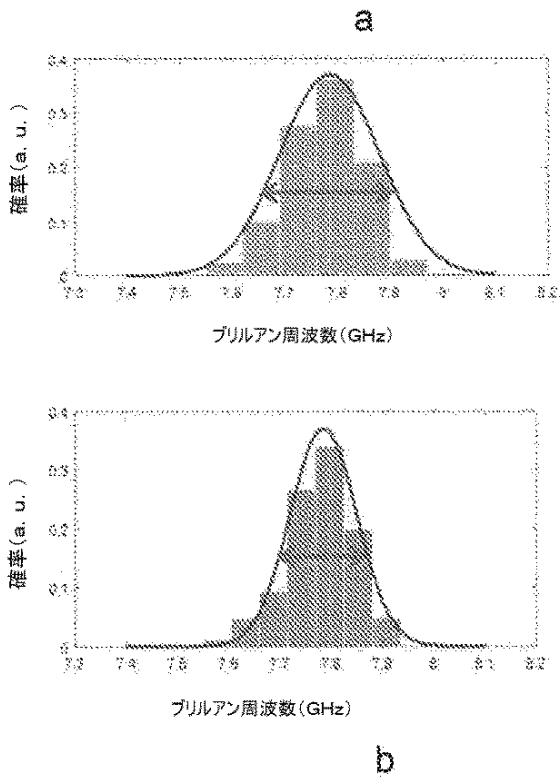


【図 14】

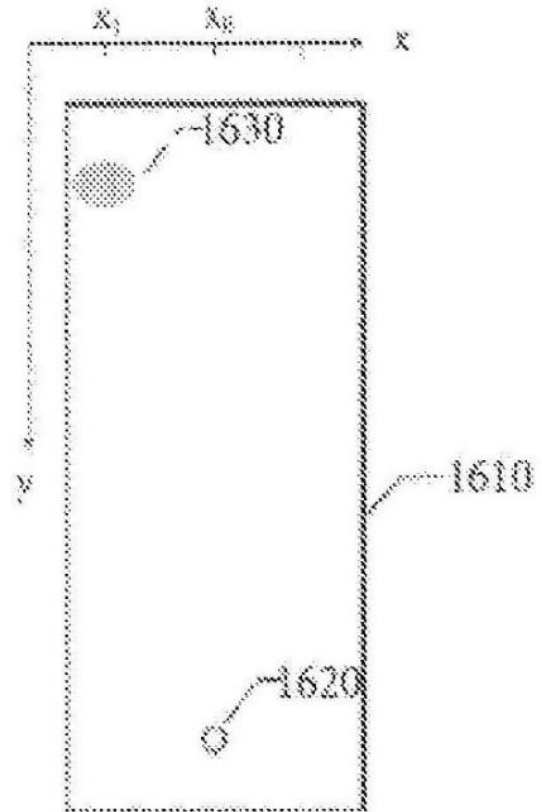


10

【図 15】



【図 16】



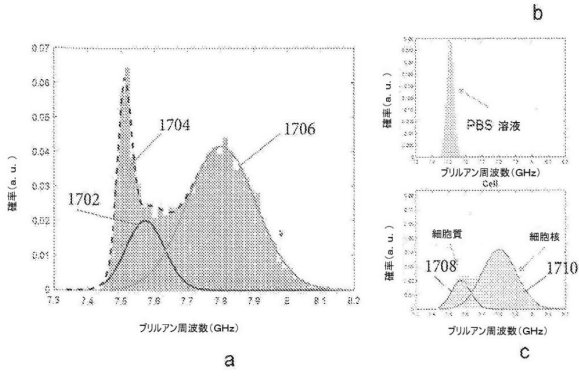
20

30

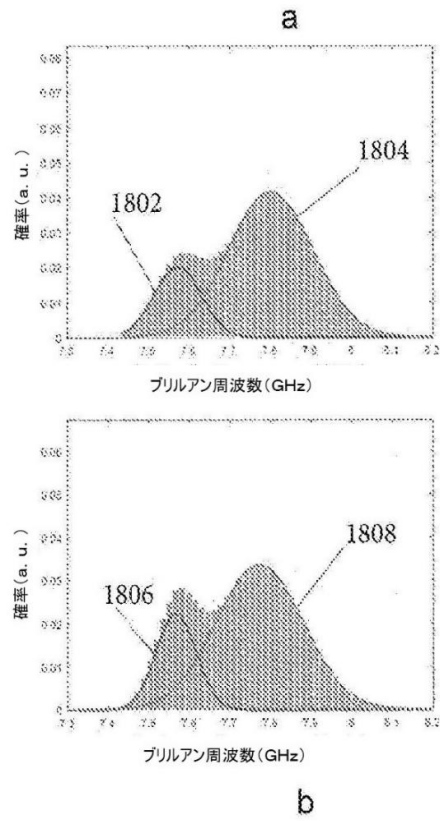
40

50

【 図 17 】



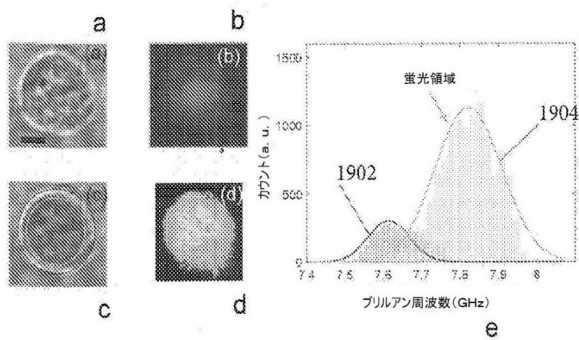
【 図 18 】



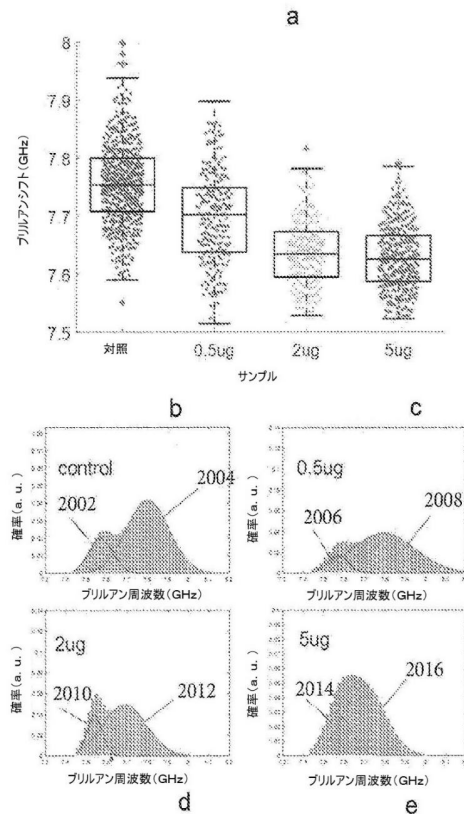
10

20

【 図 19 】



【 図 20 】

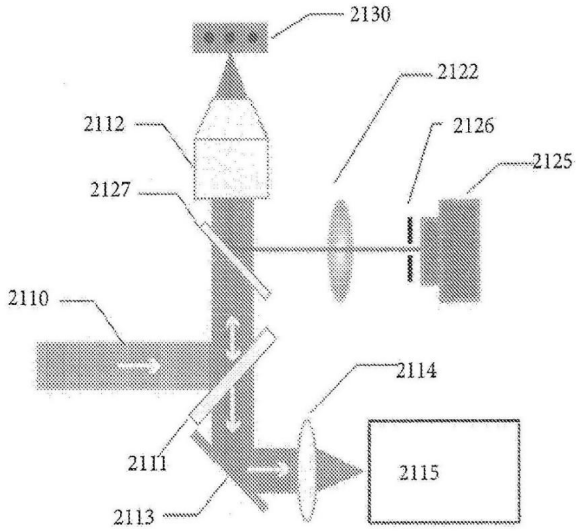


30

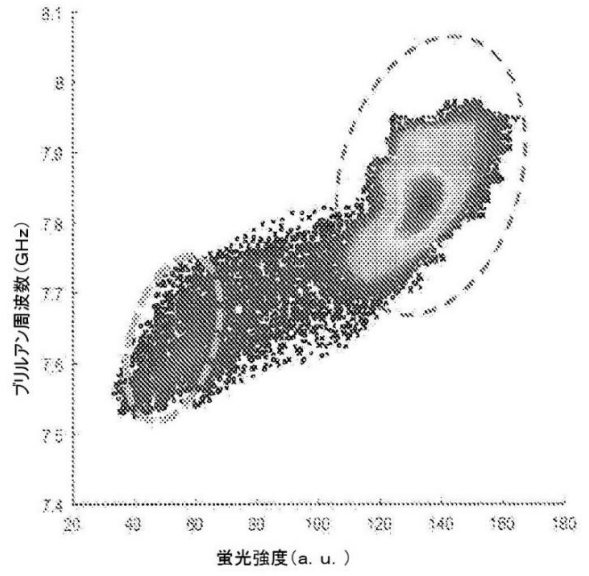
40

50

【図 2 1】

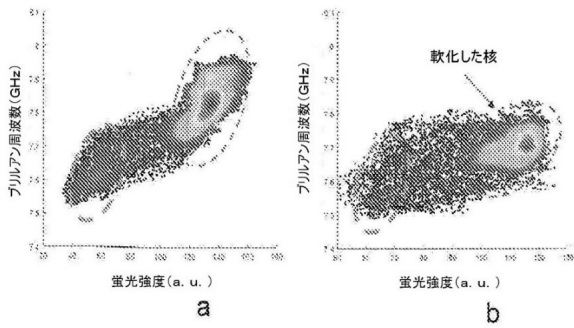


【図 2 2】

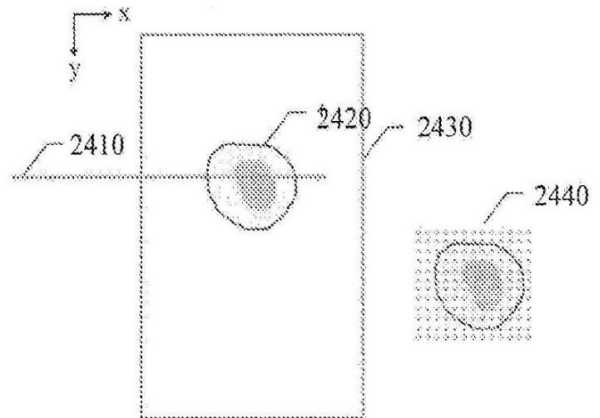


10

【図 2 3】



【図 2 4】



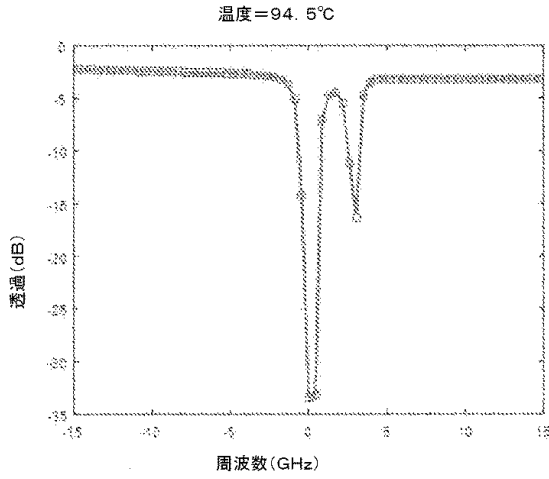
20

30

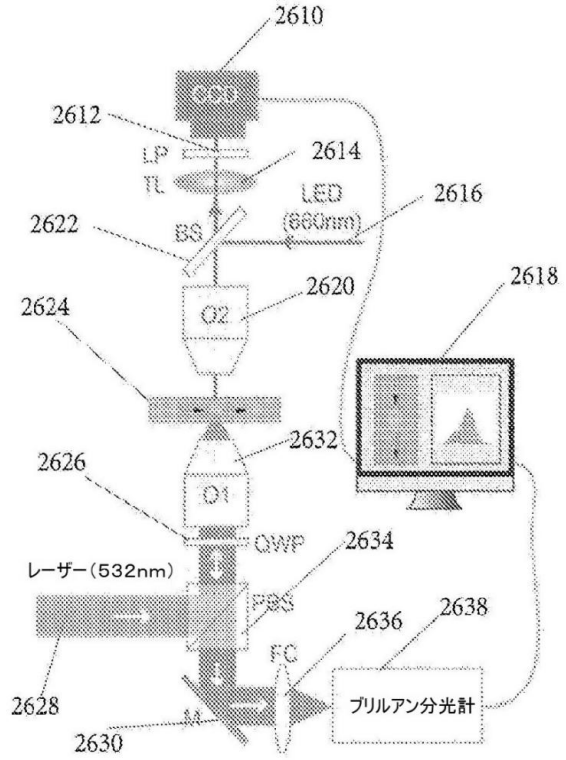
40

50

【図 25】



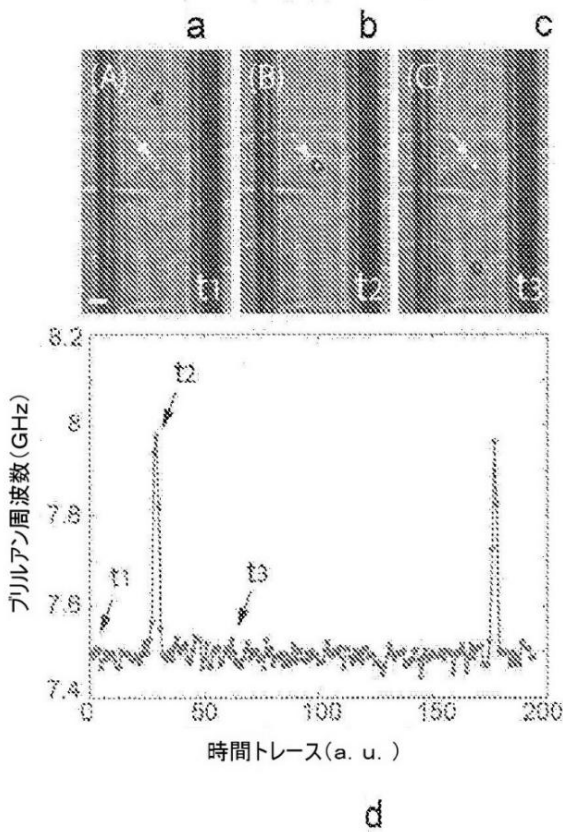
【図 26】



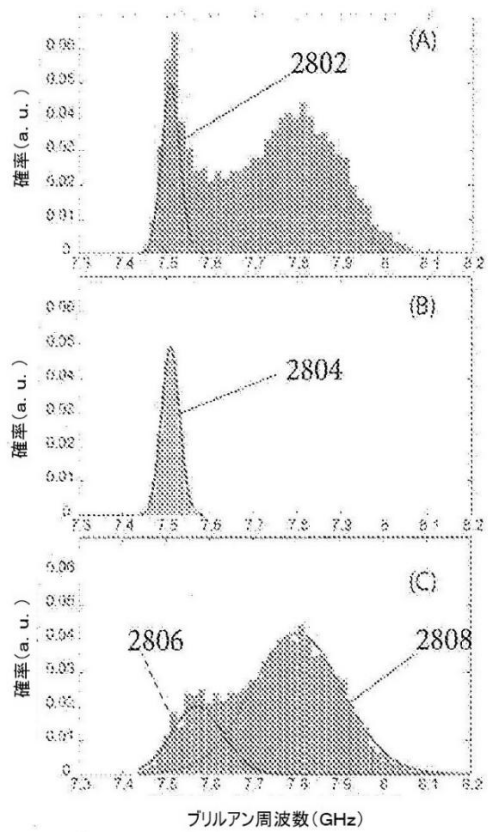
10

20

【図 27】



【図 28】



a

b

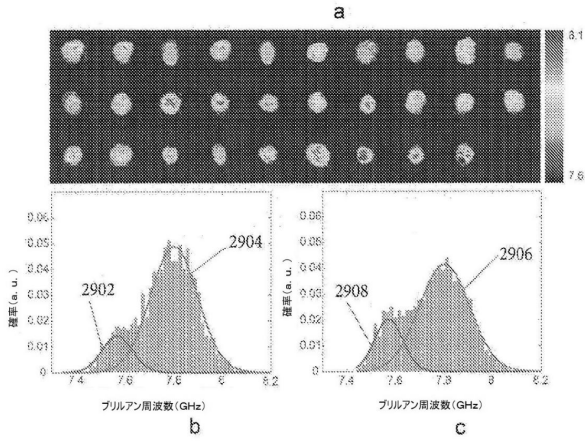
c

30

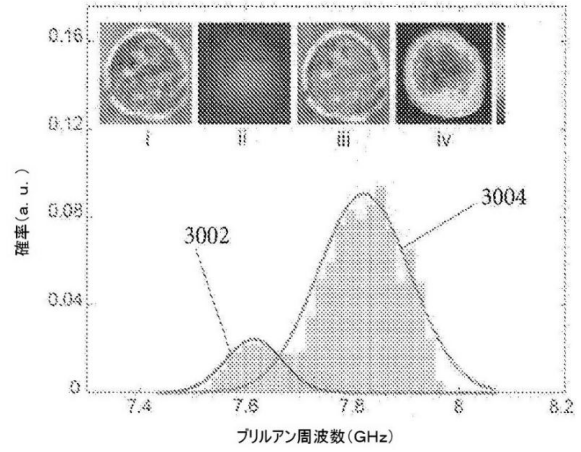
40

50

【図 29】

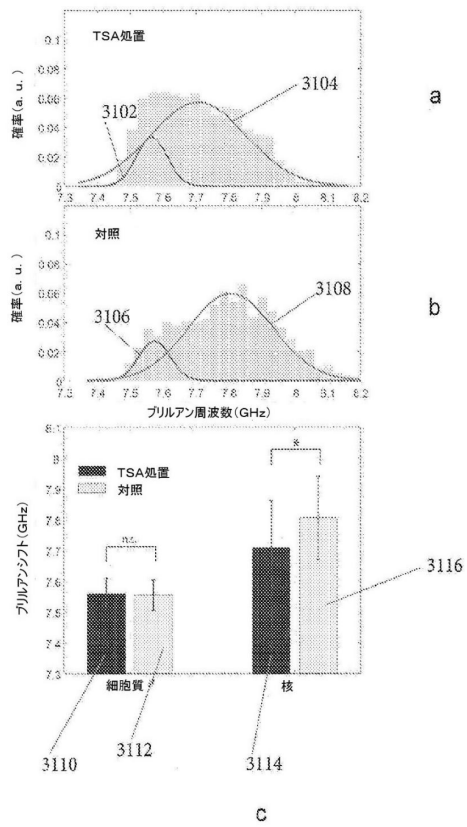


【図 30】

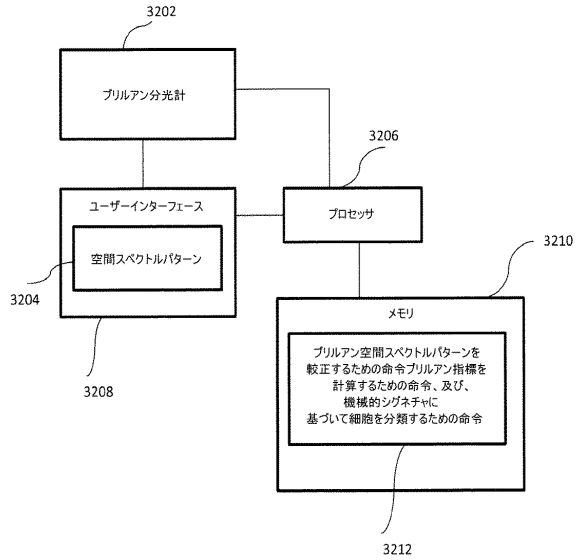


10

【図 31】



【図 32】



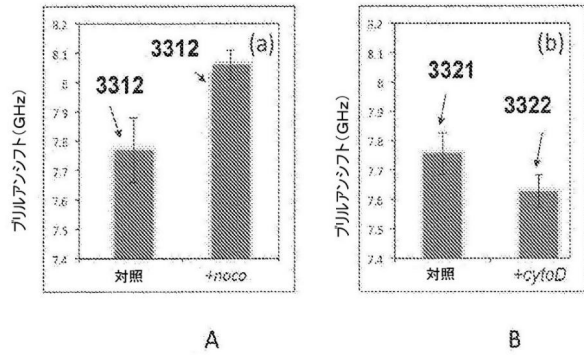
20

30

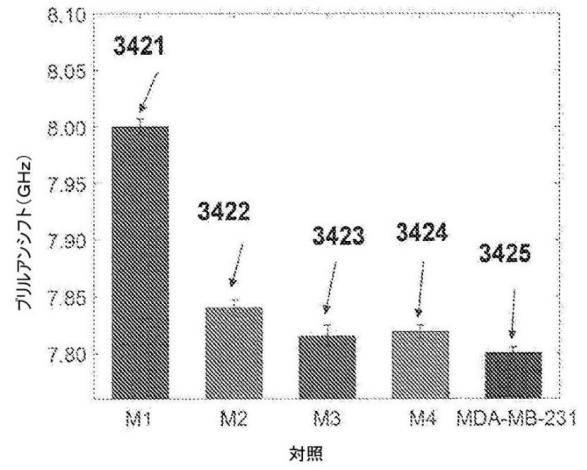
40

50

【 図 3 3 】

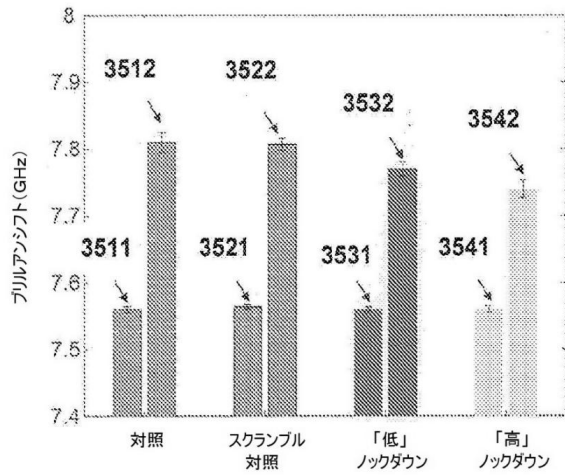


【 図 3 4 】

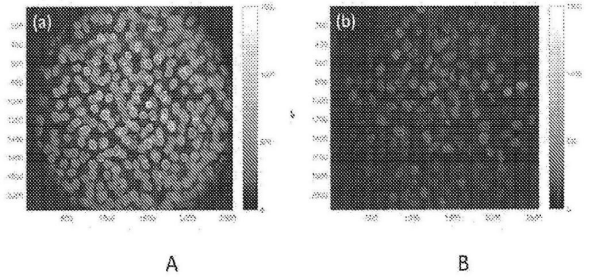


10

【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100094112
弁理士 岡部 譲
- (74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
- (74)代理人 100096943
臼井 伸一
- (72)発明者 スカーセリ, ジュリアーノ
アメリカ合衆国 2 0 7 4 2 メリーランド, カレッジ パーク, ジョン エッチ . キム エンジニア
リング ビルディング 2 2 1 8
- (72)発明者 ザン, ジタオ
アメリカ合衆国 2 0 7 4 2 メリーランド, カレッジ パーク, ジョン エッチ . キム エンジニア
リング ビルディング 2 2 1 8
- (72)発明者 キム, ハンユブ
アメリカ合衆国 2 3 6 0 6 メリーランド, ニューポート ニュース, キャノン ブルーヴァード
1 2 0 0 0
- 審査官 吉田 将志
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 4 8 0 2 (W O , A 1)
特開 2 0 0 8 - 0 3 9 6 3 5 (J P , A)
特開昭 6 1 - 2 6 0 1 4 4 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 2 9 1 8 9 (U S , A 1)
ZHANG et al. , Brillouin flow cytometry for label-free mechanical phenotyping of the nucleus , Lab Chip , 2017年02月14日 , Vol.17/Iss.4 , PP.663-670
ZHANG et al. , Line-scanning Brillouin microscopy for rapid non-invasive mechanical imaging , SCIENTIFIC REPORTS , 2016年10月14日 , Vol.6/No.35398 , PP.1-7
ANTONACCI et al. , Biomechanics of subcellular structures by non-invasive Brillouin microscopy , SCIENTIFIC REPORTS , 2016年11月15日 , Vol.6/No.37217 , PP.1-6
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 2 1 / 0 0 - G 0 1 N 2 1 / 9 5 8