

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-531787

(P2013-531787A)

(43) 公表日 平成25年8月8日 (2013. 8. 8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 15/02 (2006. 01)	GO 1 N 15/02 B	2 G O 4 3
GO 1 N 21/17 (2006. 01)	GO 1 N 21/17 A	2 G O 5 9
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y	
GO 1 N 21/64 (2006. 01)	GO 1 N 21/64 E	
GO 1 N 21/27 (2006. 01)	GO 1 N 21/64 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-512598 (P2013-512598)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月25日 (2011. 5. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月27日 (2012. 12. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/000929
 (87) 国際公開番号 W02011/149525
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011. 12. 1)
 (31) 優先権主張番号 61/348, 072
 (32) 優先日 平成22年5月25日 (2010. 5. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/347, 946
 (32) 優先日 平成22年5月25日 (2010. 5. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503419767
 アリックス インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、60601 イリノイ州
 、シカゴ、ノース ミシガン アベニュー
 316、スイート シーエル 20
 (74) 代理人 110000877
 龍華国際特許業務法人
 (72) 発明者
 オスマン、アッカキール
 アメリカ合衆国、60601 イリノイ州
 、シカゴ、ノース ミシガン アベニュー
 316、スイート シーエル 20 ア
 リックス インコーポレイテッド内

最終頁に続く

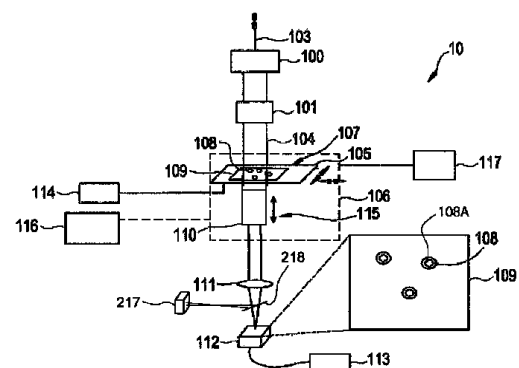
(54) 【発明の名称】 粒子の運動度および／または細胞の分散を求めるためのホログラフィック変動顕微鏡装置および方法

(57) 【要約】

本発明は、検知した運動度に基づいて、検知された運動度に基づいて、迅速且つ効率的に、細胞 / 粒子のサブ固体群を特徴付ける、装置および計測装置、および計測を行う方法およびテスト方法に関する。

【選択図】 図 1 A

FIG. 1A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数の粒子とサンプルホルダの表面との間の相互作用を決定する方法であって、
前記サンプルホルダの上の粒子のサンプル、または、前記サンプルホルダの前記表面の少なくとも一方に、物理的力適用手段を用いて物理的力をかける段階と、
視野を持つ顕微鏡を有する撮像装置の照明源を利用して前記粒子を照明する段階と、
前記物理的力適用手段と同期させて、前記撮像装置を利用して前記視野内の前記粒子の画像シーケンスを取得することで、前記物理的力適用手段に対する前記粒子の反応を計測する段階と、

コンピュータシステムのプロセッサを利用して、前記撮像装置により捕捉された前記粒子の前記画像を統計的に分析する段階と

10

を備え、

前記画像は、前記粒子により回折された第 1 のコンポーネントと、前記粒子によって回折されなかった第 2 のコンポーネントとを含み、前記第 1 のコンポーネントおよび前記第 2 のコンポーネントは、撮像面で干渉して、前記プロセッサが生成する、粒子ごとの強度変動値を表す干渉パターンを生じさせ、

前記物理的力適用手段または拡散のいずれかにより運動することができる前記粒子は、高い強度の変動を呈し、前記サンプルホルダの前記表面に結合されている前記粒子は、低い強度の変動を呈し、前記サンプルホルダの前記表面における前記相互作用の性質を表す、方法。

20

【請求項 2】

サンプルチャンバ内の複数の粒子にホログラフィック光焦合を行う方法であって、
撮像装置のコヒーレントな光源を利用して、透明なサンプルチャンバの粒子のサンプルを照明する段階と、

合焦カメラを利用して前記粒子の画像を取得する段階と、

前記粒子の焦点のずれた回折パターンの画像をディスプレイに表示する段階と、

コンピュータシステムのプロセッサを利用して、前記画像のうち 1 つの撮像されたホログラムについて、前記焦点のずれた画像を異なる距離伝播させて前記プロセッサにより焦点計測値を数値的に決定させる数値的合焦を行い、前記粒子の焦点面を決定する段階と、

前記プロセッサを利用して、各数値的に伝播された画像に前記焦点計測値を関連付け、各数値的に伝播された画像に関連付けられた前記焦点計測値の極値を発見することができるようにする段階と、

30

前記コンピュータシステムに、前記サンプルを必要な焦点位置に位置させるべく、前記サンプルチャンバを一回ステージ運動させる段階と

を備える、

方法。

【請求項 3】

複数の粒子とサンプルホルダの表面との間の相互作用を決定する方法であって、

流体フローデバイスの透明な底面に配置された粒子のサンプルを、視野を有する顕微鏡を持つ撮像装置の照明源を利用して照明する段階と、

40

前記撮像装置を利用して前記視野内の前記粒子の画像スタックを取得することで、熱平衡時の前記粒子の運動を計測する段階と、

前記画像スタックにおいて各画素の位置を決定して各画素の標準偏差と平均画素値とを決定することを含む、コンピュータシステムのプロセッサを利用して前記撮像装置により捕捉された前記粒子の前記画像を統計的に分析する段階と、

前記プロセッサを利用して、前記画像スタックにおいて前記画素それぞれの正規化標準偏差分布を表したものである、前記画素それぞれの変動画像を生成する段階と、

前記プロセッサを利用して前記変動画像を処理して、前記粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階と、

前記サンプルの運動度および前記サンプルホルダの前記表面における前記粒子の相互作

50

用に関する情報を生成する段階と

を備え、

信号強度の変動が比較的大きい場合、前記粒子が運動していることを示し、信号強度の変動が比較的小さい場合、前記粒子が表面相互作用によって静止していることを示す、方法。

【請求項 4】

複数の粒子とサンプルホルダの表面との間の相互作用を決定する方法であって、

流体フローデバイスの透明な底面に配置された粒子のサンプルを、視野を有する顕微鏡を持つ撮像装置の照明源を利用して照明する段階と、

前記撮像装置を利用して前記視野内の前記粒子の画像スタックを取得することで、熱平衡時の前記粒子の運動を計測する段階と、

前記画像スタックにおいて各画素の位置を決定して各画素の標準偏差と平均画素値とを決定することを含む、コンピュータシステムのプロセッサを利用して前記撮像装置により捕捉された前記粒子の前記画像を統計的に分析する段階と、

前記プロセッサを利用して、前記画像スタックについて前記画素それぞれの正規化標準偏差分布を表したものである、前記画素それぞれの変動画像を生成する段階と、

前記プロセッサを利用して前記変動画像を処理して、前記粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階と

を備え、

信号強度の変動が比較的大きい場合、前記粒子が運動していることを示し、信号強度の変動が比較的小さい、または変動がない場合、前記粒子が表面相互作用によって静止していることを示すことで、

前記サンプルの運動度および前記サンプルホルダの前記表面における前記粒子の相互作用に関する情報が生成される、

方法。

【請求項 5】

サンプルホルダの表面の上の様々な種類の粒子を選択的に検知する方法であって、

溶剤に溶かされ、前記サンプルホルダを覆う静止している特異抗体に特異結合されることで前記粒子の動きが制限される 1 の種類の抗原で覆われた粒子のサンプル、または前記サンプルホルダに特異結合されず前記サンプルホルダの前記表面の上の前記溶剤の中を自由に拡散する別の種類の抗原で覆われた粒子のサンプルを、前記サンプルホルダの抗体で覆った表面に導く段階と、

視野を持つ顕微鏡を有する撮像装置の照明源を利用して、前記サンプルホルダに置かれた前記粒子のサンプルを照明する段階と、

前記撮像装置を利用して前記視野内の前記粒子の画像スタックを取得することで、熱平衡における前記粒子の運動を計測する段階と、

前記画像スタックにおいて各画素の位置を決定して各画素の標準偏差と平均画素値とを決定することを含む、コンピュータシステムのプロセッサを利用して前記撮像装置により捕捉された前記粒子の前記画像を統計的に分析する段階と、

前記プロセッサを利用して、前記画像スタックにおいて前記画素それぞれの正規化標準偏差分布を表したものである、前記画素それぞれの変動画像を生成する段階と、

前記プロセッサを利用して前記変動画像を処理して、前記粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階と

を備え、

前記視野内の前記特異結合されている粒子の正規化標準偏差計測値は、マグニチュードが比較的小さく、比較的狭い分布であり、比較的平均値が小さく、自由に拡散している粒子の前記正規化標準偏差計測値は、マグニチュードが比較的大きく、比較的広い分布であり、比較的大幅に (substantially relatively) 平均値が大きく、

前記粒子または前記サンプルホルダの上の前記特異抗体の上の前記 1 の種類の抗原または前記別の種類の抗原が判定される、

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 6】

診断処置として粒子の形状を検知する方法であって、

視野を持つ顕微鏡を有する撮像装置の照明源を利用して、サンプルホルダに置かれた前記粒子のサンプルを照明する段階と、

前記撮像装置を利用して前記視野内の前記粒子の画像シーケンスを取得することで、熱平衡における前記粒子の形状を計測する段階と、

前記画像シーケンスにおいて前記粒子の強度の空間分布を決定することを含む、コンピュータシステムのプロセッサを利用して前記撮像装置により捕捉された前記粒子の前記画像を統計的に分析する段階と、

前記プロセッサを利用して、前記画像シーケンスの画素それぞれの正規化標準偏差分布を表現したものである、前記画素それぞれの変動画像を生成する段階と、

前記プロセッサを利用して前記変動画像を処理して、前記粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階と

を備え、

熱変動または外部から加わった力のいずれかにより容易に形状を変化させる前記粒子は、比較的より剛性な前記粒子よりも高い空間強度変動を呈し、

前記画像シーケンスにおける前記粒子の前記空間強度の前記統計的な分析における正規化標準偏差分布は、粒子の柔軟性、弾性 / 粘弾性、健康か病気か、年齢、溶剤の条件、または結合状態のうち少なくとも 1 つの診断として利用することができる、

方法。

【請求項 7】

サンプルホルダの粒子間の相互作用を決定する方法であって、

(1) 視野を持つ顕微鏡を有する撮像装置の照明源を利用して、サンプルホルダに置かれた粒子のサンプルを照明する段階と、

(2) コンピュータシステムのプロセッサを利用して、前記撮像装置を利用して前記視野内の前記粒子の画像シーケンスを取得することで、熱平衡における前記粒子の形状を計測する段階と、

(3) 前記プロセッサを利用して、前記画像それぞれの前記粒子それぞれを検知する段階と、

(4) 前記画像それぞれの中で互いに隣接している前記粒子の対が、互いに結合することができ、相関性を有する運動をすることができることを、前記プロセッサを利用して証明する段階と、

(5) 前記プロセッサを利用して、隣接している前記粒子の対のうちそれぞれの画像を抽出して、2 つのサブ画像を生成する段階と、

(6) 前記プロセッサを利用して前記 2 つのサブ画像同士を乗算して、サブ画像の積を生成する段階と、

(7) 前記画像の全てにおいて隣接する粒子の全ての対に対して段階 (3) から (6) を繰り返し行い、前記隣接する粒子の対それぞれに対応するサブ画像の積のシーケンスを生成する段階と、

(8) 前記プロセッサを利用して、前記サブ画像の積のシーケンスのピクセルワイズの標準偏差を計算する段階と、

(9) 前記プロセッサを利用して、前記ピクセルワイズの標準偏差の平均値を、サブ画像の積全体における各画素についての平均で除算した値を計算することで、前記隣接する粒子の対の 1 つの平均標準偏差を生成する段階と、

を備え、

互いに結合される隣接している粒子の対同士は、互いに結合されていない隣接している粒子の対同士よりも、サブ画像の積の値の対応する正規化標準偏差を増加させる相関性を有する運動を行い、相関性を有さない運動を行う結合されていない粒子よりも、サブ画像の積の値の前記正規化標準偏差が比較的低く、比較的狭い分布を有し、

10

20

30

40

50

比較的高く、比較的広い分布を有する前記正規化標準偏差をもつ結合されていない粒子の対から、結合されている粒子の対を区別することができる、方法。

【請求項 8】

検知された運動度に基づいて粒子の固体群またはサブ固体群を計測、テスト、および特徴付ける装置であって、

画像形成装置と、

粒子分散を含むサンプルを載置し、コリメートされた光ビームにより照明される、顕微鏡の透明なサンプルホルダと、

前記粒子と前記サンプルホルダとの間の相互作用の存否を推定するべく、前記サンプルホルダの上の前記粒子の運動度を計測する手段と

を備え、

前記画像形成装置は、

光ビームを放射するコヒーレントな光源と、

前記コヒーレントな光源からの前記光ビームをコリメートするコリメータと

を有する、装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞 / 粒子の固体群および / またはこれらと化学的に改質された（または改質されていない）表面との間の相互作用を特徴付けるための測定およびテスト方法を生成し、および / または、これら検知された運動度に基づいて、迅速且つ効率的に、細胞 / 粒子のサブ固体群を検知する装置、計測方法、および方法に関する。

【0002】

本発明は、2010年5月25日提出の米国仮特許出願第61/347,946号明細書、および、2010年5月25日提出の米国仮特許出願第61/348,072号明細書の優先権を主張しており、これら両方の文献の内容全体をここに参照として組み込むこととする。

【背景技術】

【0003】

従来の細胞 / 粒子の追跡方法では、明視野、暗視野、および蛍光等の標準的な顕微鏡技術を用いて、二次元または三次元で、運動する粒子を検知していた。しかし、倍率が低くなると、多数の細胞 / ピーズが視野に入ってきて、従来のフレームごとの粒子検知および追跡方法の速度が必要とされているレベル未満に落ちてしまう。診断に利用するために高いスループットを出すためには試験時間を最小限に抑えることが非常に重要であるので、粒子の運動度をより迅速に計測可能な、新たな顕微鏡方法および装置の開発が望まれている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、検知した運動度に基づいて、検知された運動度に基づいて、迅速且つ効率的に、細胞 / 粒子のサブ固体群を特徴付ける、装置および計測装置、および計測を行う方法およびテスト方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明における一実施形態では、粒子の運動度を計測する装置は、コヒーレントな光源（レーザ、スーパーluminescentダイオード等）と、光源をコリメートするコリメータと（繊維により連結されていてよい）、粒子または細胞のサンプルを保持するための透明なサンプルホルダとを備え、粒子 / 細胞はレーザビームによる照明を受け、透明なカバースリップがサンプルホルダの上に設置され、カバースリップは、カバースリップの表面上の適

10

20

30

40

50

切な抗体 / 抗原に付着して、特異抗体 / 抗原の一定の結び付きを許可する所定のリンカー分子で処理され、装置はさらに、透明なサンプルホルダからレーザビームを受け取るための対物レンズと、対物レンズからレーザビームを受け取るモニタを備え、モニタは、送信中に照射を受ける粒子 / 細胞の拡大されたパターンを撮像する。

【 0 0 0 6 】

一実施形態では、一実施形態では、検知された運動度に基づいて粒子の固体群またはサブ固体群を計測、テスト、および特徴付ける装置であって、画像形成装置と、粒子分散を含むサンプルを載置し、コリメートされた光ビームにより照明される、顕微鏡の透明なサンプルホルダと、粒子とサンプルホルダとの間の相互作用の存否を推定するべく、サンプルホルダの上の粒子の運動度を計測する手段とを備え、画像形成装置は、光ビームを放射するコヒーレントな光源と、コヒーレントな光源からの光ビームをコリメートするコリメータとを有する、装置が提供される。

10

【 0 0 0 7 】

類似した実施形態では、透明な、半透明な、または部分的に鏡で構成される (partially mirrored) サンプルおよびサンプルチャンバを反射モードで計測するが、この計測には、集めた側から、レーザでサンプルを照射して、サンプルからの反射光により画像を形成して、後で、これをモニタに映し出すことが含まれる。

【 0 0 0 8 】

本発明のまた別の実施形態では、透明な、半透明な、または部分的に鏡で構成されるサンプルホルダは、データ取得および分析機能を有する自動流体デバイスまたはマイクロタ
イタープレートデバイスである。

20

【 0 0 0 9 】

細胞 / 粒子の運動度は、細胞 / 粒子と基板との間の相互作用に影響する特定の特性の関数であってよい (例えば、表面抗原の特異結合から、表面結合された抗原、親水性、または静電気等 specific binding of surface antigens to surface bound antigens, hydrophobic, electrostatic etc.)。細胞 / 粒子と表面との相互作用の種類および大きさにより、熱平衡における細胞 / 顕微鏡粒子の熱により生成される運動の程度が影響を受ける。さらには、細胞 / 粒子の、受けた物理的力に対する反応にも影響が出る。表面との相互作用が無視できる程度である細胞 / 粒子はブラウン運動をして、比較的大きな相互作用が生じると、表面で見られる運動の範囲が制限される (例えばブラウン運動が阻害される)。同様に、表面との相互作用が小さい細胞 / 粒子は、受ける物理的力に対して大きな反応をするが、より強い表面反応があると、反応が減衰される。

30

【 0 0 1 0 】

細胞 / 分子の分散物の運動度は、さらに、熱平衡において計測した媒体中の有効粘度、粘弾性特性等の集成的特性の関数である。例えば、より粘度の低い媒体における同様の細胞 / 粒子に対して、より粘度の高い媒体における細胞 / 粒子であっても、それ自身の熱的 (物理的) に駆動される運動の範囲を持っている。

【 0 0 1 1 】

本発明は、分散された細胞 / 粒子を、熱平衡における、または、摂動力があるときに計測した分散特性 (例えば有効分散係数、有効粘度) に基づいて特徴付けるものである。

40

【 0 0 1 2 】

従来の細胞 / 粒子追跡方法の代替例としてここで記載するホログラフィック変動顕微鏡装置および方法 (技術) は、倍率の低い計測に容易に利用可能であり (スループットを上げることができる)、焦点に関する要件が低い。この装置および技術では、コヒーレントに照明して撮像することができる可能性があることから、実質的に焦点のずれたサンプルの回折パターン画像を撮像することができることであることも、さらなる利点である。その後回折パターンを数学的に変換して、数値を伝播することで (numerically propagated)、焦点計測の極値を求める (例えば W. Li et al., J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 24, No. 10, 3054-62, 2007 参照)。数値伝播距離は、焦点からの距離に関連しており、数値的に計算された焦点計測の極値の位置を、焦点からの実際の距離に関連付ける検量線を用いて

50

求める。この特徴によって、迅速且つ自動にサンプルを所望の撮像面へと焦合できることができるようになり、別途自動焦合装置を準備したり、時間のかかる機械的な焦点スキャンを行ったりする必要がなくなる。

【0013】

サンプルチャンバ内の複数の粒子にホログラフィック光焦合を行う方法は、撮像装置のコヒーレントな光源を利用して、透明なサンプルチャンバの粒子のサンプルを照明する段階と、合焦カメラを利用して粒子の画像を取得する段階と、粒子の焦点のずれた回折パターンの画像をディスプレイに表示する段階と、コンピュータシステムのプロセッサを利用して、画像のうち1つの撮像されたホログラムの数値的合焦を行い、粒子の焦点面を決定する段階とを備え、数値的な合焦は、焦点のずれた画像を異なる距離伝播させて、プロセッサにより焦点計測値を数値的に決定させ、方法はさらに、プロセッサを利用して、各数値的に伝播された画像に焦点計測値を関連付け、各数値的に伝播された画像に関連付けられた焦点計測値の極値を発見することができるようにする段階と、コンピュータシステムに、サンプルを必要な焦点位置に位置させるべく、サンプルチャンバを一回ステージ運動させる段階とを備える。

10

【0014】

本発明における一実施形態では、粒子の表面親和性を、その運動度の計測により計測する方法に、物理的力適用手段を利用して、表面上に載置されている複数の粒子に物理的力をかける段階と、物理的力に対する複数の粒子の反応を計測する段階とが備わり、計測段階にはインパルス応答計測または周波数応答計測のいずれか一方が含まれる。

20

【0015】

本発明における一実施形態では、粒子の運動度を計測する方法が、物理的力適用手段を利用して、複数の粒子に物理的力をかける段階と、物理的力に対する粒子の反応を計測する段階とを備え、計測段階には、一連の視野内の粒子のホログラフィック画像を撮像する段階と、複数の粒子に物理的力をかけることと同期させて、一連のホログラフィック画像を統計的に分析して、粒子の運動度の計測値を割り出す段階とが含まれる。

【0016】

一実施形態では、表面に粒子を配置して、物理的力適用手段には、サンプルを動かすことができる並進ステージが備わり、並進ステージを十分加速して動かすことで、粒子がさらに表面に対して動き、この動きは、突然の運動（例えば、段階的、インパルス応答の計測）または連続した運動（例えば周波数応答の計測）のいずれかとする。

30

【0017】

一実施形態では、物理的力適用手段は、光学力手段を利用して光学的に生成した力を含む。または、物理的力適用手段は、外部手段を含んでも良く、この外部手段には、超音波手段、音響手段、ピーズ/細胞との物理プローブ接触、ステージの物理運動、または、流体のフローを提供する自動流体フローデバイスが含まれてよい。

【0018】

一実施形態では、複数の粒子とサンプルホルダの表面との間の相互運動を決定する方法が、サンプルホルダ上の粒子サンプルまたはサンプルホルダの表面の少なくとも1つに対して、物理的力適用手段を利用して物理的力をかける段階と、視野を有する顕微鏡を有する撮像装置の光源を利用して、粒子を照明する段階と、物理的力適用手段に対する粒子の反応を、撮像装置を利用して視野内の粒子の一連のホログラフィック画像を取得することで、計測する段階とを備え、画像の取得は、物理的力適用手段と同期され、方法はさらに、コンピュータシステムのプロセッサを用いて、撮像装置で得た粒子のホログラフィック画像を統計的に分析する段階を備え、画像には、粒子により回折される第1のコンポーネントと、粒子によって回折されない第2のコンポーネントとが含まれ、これら2つのコンポーネントは、撮像面で干渉して、プロセッサによる干渉パターンを生じさせ、これは、粒子間の強度変動を表し、物理的力適用手段または拡散の一方により動くこれら粒子は、高い強度の変動を呈し、サンプルホルダの表面に結合されたものは、低い強度の変動を呈して、サンプルホルダの表面上の相互作用の性質が生じる。

40

50

【 0 0 1 9 】

一実施形態では、ホログラフィック顕微鏡装置を用いて一連の粒子サンプルの画像が得られ、各画像は、粒子のサンプルを表す干渉パターンを呈し、干渉パターンには、回折コンポーネントと非回折コンポーネントとが含まれ、画像の焦点のずれ量を調節して、干渉パターンの信号対雑音比を向上させる。信号対雑音比は、干渉パターンがより高いコントラストを有する際に向上する。次いで一連の画像を処理して、統計画像を生成して、粒子の動的情報を生成する。統計画像は、物理的力に因る、一連の粒子の画像の画素の強度の変動を反映しており、次いで、粒子の近隣からなるマスク画像でマスクされてよい。粒子の近隣のマスク画像は、標準的な画像処理技術（例えば背景補正、エッジ検知、画像フィルタリング等）を画像に施すことで生成することができる。一連の画像の一定の期間における粒子位置の変化は、平均的な粒子間の距離よりも実質的に小さいので、取得される一連の画像のうち、1つのフレームがあれば、粒子の近隣を決定するのに足る。これは、一連の画像のうち、一枚の画像のみを利用して生成される粒子の近隣で、粒子を一意に特定できることを示唆している。統計画像を、粒子の近隣マスクで乗算すると、各粒子に関する統計学上の量のリストを生成することができる。これら量を各粒子で平均化することで、累積値である粒子の運動度または粒子の運動の統計学上の計測値が生じ、視野内のこれら量のヒストグラム分布を生成することができる。この分布は、部分的な視野における粒子を利用することでも、複数の視野における粒子を利用することでも生成することができる。

10

【 0 0 2 0 】

20

一実施形態では、統計画像は、画素強度のピクセルワイズの標準的な偏差を計算して、これを画素強度のピクセルワイズの平均で除算することで、一連の画像の画素強度の正規化された画素強度の標準偏差をもつ統計画像を生成して、生成される。統計画像は、粒子の近隣画像でマスクされることで、各粒子で平均化された正規化標準偏差値を得ることができる。このように生成された正規化標準偏差の平均は、ヒストグラムにプロットして値の分布を生成することもできる。正規化標準偏差値が高い粒子は、正規化標準偏差値が低い粒子と比べて、運動度が高い、または動きが大きい、ということになる。また、粒子のうち最低限の動きをする割合（つまり正規化標準偏差値が小さい粒子の割合のこと）を、動きがより自由な粒子（つまり正規化標準偏差値が大きい粒子の割合のこと）から区別するために、正規化標準偏差の閾値を選択してもよい。中ぐらいの正規化標準偏差値を有する他の割合を選択するためには、正規化標準偏差に他の閾値を設けることもできる。

30

【 0 0 2 1 】

一実施形態では、結合粒子の割合の計測を行う試験（assay）を、結合粒子の閾値未満の正規化標準偏差の値を持つ粒子の割合を計測することで行うことができる。結合粒子が統計的に有意な割合であれば、背景の信号レベルを特徴付ける必要がある。背景信号は、実験の条件下では名目上結合されるべきではない同様の粒子の分散を計測することで特徴付けることができる。このような条件下で、結合されるべきであるが結合されていない粒子の割合（つまり、閾値未満の正規化標準偏差値を有する粒子の割合のことである）に、背景信号がある。この割合、および、ある実験でテストされる粒子数を知ることにより、二項式の確率分布を利用して、背景にあるソースから一定の実験的な結合割合を求める統計的確率を求めることができる。結合粒子の割合の最小閾値は、この結果の所望の統計的有意性に基づいて、粒子分散と処置表面との間にポジティブな反応が生じたかを判断するように決定されてよい。

40

【 0 0 2 2 】

一実施形態では、制御下で行う粒子の運動キャリブレーション実験、または、粒子の物理的運動（運動距離の二乗平均平方根）とその正規化標準偏差値との間の関係を生成する、制御下で行う粒子の運動を用いることで、検量線を生成することができる。

【 0 0 2 3 】

一実施形態では、平均画素値、画素標準偏差、画素分散、上位画素変動、画素時間相関関数、画素空間相関関数、画素時空相関関数、背景画素値、背景画素標準偏差、背景画素

50

分散、上位背景画素変動、背景画素時間相関関数、背景空間相関関数、背景画素時空相関関数等の画素統計計測値の幾つかの組み合わせを用いて、統計画像を生成する。画素統計計測値は、一連の画像にピクセルワイズに生成され、粒子の近隣で平均化されたものであってよい。画素統計計測値は、粒子の近辺で計算されてから、その一連の画像内の他の画像内の、対応する近隣で計算されてもよい。粒子の近隣マスクは、一連の画像内の1つのフレームを利用して生成することもできる。一連の画像の複数のフレームを利用して、粒子の近隣マスクを生成することもできる。画素統計計測値は、一連の画像のサブセットで計算することもできる。画素統計計測値は、一連の画像の連続するサブセットについて計算することで、粒子ごとの時変統計計測値が生成される。粒子ごとの時変統計計測値は、時变的な実験条件（たとえば物理的運動、振動、溶剤の条件、フローの条件、その他の環境が持つ効果）に関連する場合がある。粒子に基づく統計計測値の空間および時間の相関付けを実行することができる。粒子に基づく統計学的計測値の統計計測値の時とともに変化する時空相関性を求めることもできる（画素に基づく統計学的計測値に対して）。統計粒子計測値の閾値は、所望の表面親和性および商業的、診断的に重要な相互関連特性を持つ部分が選択されるように、選択することができる。選択する割合の閾値は、ポジティブな結果が示される前に、所望の統計的有意性に基づいて計測される必要がある最小割合レベルを示すように選択することができる。

10

【0024】

一実施形態では、粒子の位置を経時的に追跡して、粒子の位置の統計的計測値を生成することもでき（変位の二乗平均（mean squared displacement）、正味の変位（net displacement）、等）、複数の粒子についてこれらの量の分布を図にすることもできる。粒子の位置の計測値および粒子の位置に基づく粒子の統計的量の閾値を利用して、対象となる粒子と表面との親和性をもつ割合を決定することもできる。粒子の運動の統計計測値は、二乗平均の位置、平均粒子位置、正味の粒子位置、上位粒子位置統計値、またはこれらの量のいずれか、または全ての組み合わせに基づいて決定されてよい。粒子の運動の同様な計測値も、制御上の目的から計測することができる（例えば背景相関性）。

20

【0025】

一実施形態では、複数の粒子とサンプルホルダの表面との間の相互作用を決定する方法が、流体フローデバイスの透明な底面に配置された粒子のサンプルを、視野を有する顕微鏡を持つ撮像装置の照明源を利用して照明する段階と、撮像装置を利用して視野内の粒子の画像スタックを取得することで、熱平衡時の粒子の運動を計測する段階と、コンピュータシステムのプロセッサを利用して、撮像装置により捕捉された粒子の画像を統計的に分析する段階とを備え、統計的に分析する段階は、画像スタックにおいて各画素の位置を決定して、各画素の標準偏差と平均画素値とを決定することを含み、方法はさらに、プロセッサを利用して、画像スタックにおいて画素それぞれの正規化標準偏差分布を表したものである、画素それぞれの変動画像を生成する段階と、プロセッサを利用して変動画像を処理して、粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階とを備え、信号強度の変動が比較的大きい場合、粒子が運動していることを示し、信号強度の変動が比較的小さい場合、粒子が表面相互作用によって静止していることを示し、方法はさらに、サンプルの運動度およびサンプルホルダの表面における粒子の相互作用に関する情報を生成する段階を備える。

30

40

【0026】

一実施形態では、粒子の運動の変動を、熱平衡状態で分析して、統計的分析には、粒子のサンプルにおける一連の画像を、ホログラフィック顕微鏡装置を利用して取得して、一連の画像を分析して、各画素の標準偏差および平均を求め、ホログラフィック変動画像を生成して、各画素値を、経時的な画素の標準偏差を画素の平均で除算した値に等しくさせ、ホログラフィック変動画像を処理して、各粒子の平均正規化標準偏差（NSD）の分布を生成することが含まれている。

【0027】

一実施形態では、結合されている、または部分的に結合されている粒子の運動は、高温

50

より低温環境においてより制限されたものとなる。一例では、 $4.8 \mu\text{m}$ のシリカビーズを平面ガラス製のカバースリップ上に拡散させ、3つの異なる温度で正規化標準偏差分布をとったところ、温度の上昇とともに分布の平均も上がり、ビーズの二乗平均位置の上昇が、温度の関数であることが示された。

【0028】

自由な分布においては、二乗平均位置は、温度と一次関数の関係にある。

【数1】

$$\langle \Delta x^2 \rangle = 4 D t, D = k_B T / (6\pi\eta r)$$

Dは、分散係数（または有効分散係数）であり、tは、粒子の位置の計測の時間間隔であり、 k_B は、ボルツマン係数であり、Tは、ケルビン温度であり、 η は粘度（または有効粘度）であり、球形拡散器（spherical diffuser）の半径である。ビーズの動きの計測値とシミュレーション値とを比較すると、ビーズの運動度の計測値として、正規化標準偏差が優れていることが分かる。上述した自由な拡散の公式は、拡散が制限されているビーズ／細胞にも利用することで、有効拡散係数の推定値が求められる。

10

【0029】

一実施形態では、統計的分析に、粒子（例えば赤血球細胞）の一連の画像を、ホログラフィック顕微鏡装置を利用して取得して、一連の画像を分析して、各画素の標準偏差と平均を求め、ホログラフィック変動画像を生成して、各画素値を、経時的な画素の標準偏差を画素の平均で除算した値に等しくさせ、正規化標準偏差値によるホログラフィック変動画像を処理して、各粒子の平均正規化標準偏差（NSD）の分布を生成することが含まれている。

20

【0030】

一実施形態では、複数の粒子とサンプルホルダの表面との間の相互作用を決定する方法が、流体フローデバイスの透明な底面に配置された粒子のサンプルを、視野を有する顕微鏡を持つ撮像装置の照明源を利用して照明する段階と、撮像装置を利用して視野内の粒子の画像スタックを取得することで、熱平衡時の粒子の運動を計測する段階と、コンピュータシステムのプロセッサを利用して、撮像装置により捕捉された粒子の画像を統計的に分析する段階とを備え、統計的に分析する段階は、画像スタックにおいて各画素の位置を決定して、各画素の標準偏差と平均画素値とを決定することを含み、方法はさらに、プロセッサを利用して、画像スタックについて画素それぞれの正規化標準偏差分布を表したものである、画素それぞれの変動画像を生成する段階と、プロセッサを利用して変動画像を処理して、粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階とを備え、信号強度の変動が比較的大きい場合、粒子が運動していることを示し、信号強度の変動が比較的小さい、または変動がない場合、粒子が表面相互作用によって静止していることを示すことで、サンプルの運動度およびサンプルホルダの表面における粒子の相互作用に関する情報が生成される。

30

【0031】

一実施形態では、サンプルホルダの粒子間の相互作用を判断する方法が、（1）視野を持つ顕微鏡を有する撮像装置の照明源を利用して、サンプルホルダに置かれた粒子のサンプルを照明する段階と、（2）コンピュータシステムのプロセッサを利用して、撮像装置を利用して視野内の粒子の画像シーケンスを取得することで、熱平衡における粒子の形状を計測する段階と、（3）プロセッサを利用して、画像それぞれの粒子それぞれを検知する段階と、（4）画像それぞれの中で互いに隣接している粒子の対が、互いに結合することができ、相関性を有する運動をすることができることを、プロセッサを利用して証明する段階と、（5）プロセッサを利用して、隣接している粒子の対のうちそれぞれの画像を抽出して、2つのサブ画像を生成する段階と、（6）プロセッサを利用して2つのサブ画像同士を乗算して、サブ画像の積を生成する段階と、（7）画像の全てにおいて隣接する粒子の全ての対に対して段階（3）から（6）を繰り返し行い、隣接する粒子の対それぞれに対応するサブ画像の積のシーケンスを生成する段階と、（8）プロセッサを利用して

40

50

、サブ画像の積のシーケンスのピクセルサイズの標準偏差を計算する段階と、(9)プロセッサを利用して、ピクセルサイズの標準偏差の平均値を、サブ画像の積全体における各画素についての平均で除算した値を計算することで、隣接する粒子の対の1つの平均標準偏差を生成する段階と、を備え、互いに結合される隣接している粒子の対同士は、互いに結合されていない隣接している粒子の対同士よりも、サブ画像の積の値の対応する正規化標準偏差を増加させる相関性を有する運動を行い、相関性を有さない運動を行う結合されていない粒子よりも、サブ画像の積の値の正規化標準偏差が比較的低く、比較的低い分布を有し、比較的高く、比較的高い分布を有する正規化標準偏差をもつ結合されていない粒子の対から、結合されている粒子の対を区別することができる。

【0032】

本発明の一実施形態では、統計的分析には、粒子のサンプルにおける一連の画像を、ホログラフィック顕微鏡装置を利用して、ホログラフィック画像として取得して、各ホログラフィック画像から各粒子を検知して、各ホログラフィック画像から隣接する粒子対を探し、各粒子対のうち各粒子の画像を抽出して各粒子対を分析して、2つのサブ画像を作成して、2つのサブ画像同士を乗算（または加算）して、積（または和）からなるサブ画像を形成して、隣接する粒子対全てに対して分析段階を繰り返して、一連の画像内の全てのホログラフィック画像に対して分析段階を繰り返して、各一意の隣接する粒子対に対応する一連のサブ画像の積（または和）を生成し、各対についてのサブ画像の一連の積（和）の、ピクセルサイズの標準偏差およびピクセルサイズの平均のアレイを計算して、ピクセルサイズの標準偏差の平均を、サブ画像の積（和）における各画素についての平均で除算して、各粒子における平均正規化標準偏差を求める。

【0033】

本発明の一実施形態では、粒子/細胞を抗体で処理した表面に置き、所定の抗原を塗布した粒子/細胞と抗体とが選択的に結合するようにする。さらに、粒子/細胞の動きは、表面における抗体との粒子/細胞の結合に基づいて制限される。抗体に反応していない粒子/細胞は、結合せず、表面上を自由に（比較的自由に）拡散する。

【0034】

本発明の一実施形態では、粒子は、赤血球細胞であり、この赤血球細胞が、赤血球細胞の表面上の抗原に特異な、表面上の抗体に結合される。

【0035】

本発明の一実施形態では、粒子は、表面抗原（表面受容体）を発現しうる細胞であり、特異抗体および/または表面に結合した受容体リガンドに結合された細胞の運動度は低減する。従って運動度（例えば正規化標準偏差）を計測することで、細胞表面における抗原の存否、および/または抗原が存在する程度を判断することができる。

【0036】

本発明の一実施形態では、粒子は、表面結合サイトにおいて、自由に拡散する抗原と競合する、表面抗原の細胞/ビーズである。このような拡散する種が存在すると、その濃度に応じて、結合された細胞/ビーズの運動度に影響が出てくる。この種類の計測は、表面結合サイトにおいて、ビーズ/細胞結合種と競合する、自由に拡散する種の存否、および/またはその濃度を判断するために利用することができる。

【0037】

一実施形態では、サンプルホルダの表面上の様々な種類の粒子を選択的に検知する方法が、サンプルホルダの抗体を塗布した表面に、溶剤内に溶かした、2種類の抗原を塗布した粒子のサンプルを置き、第1の種類の抗原を塗布された粒子は、サンプルホルダに塗布された静止している特異抗体（specific antibodies）に特異結合して、これら粒子の運動が制限され、別の種類の抗原を塗布された粒子は、サンプルホルダには特異結合されず、この粒子は、サンプルホルダの表面において溶剤内を自由に拡散する。方法はさらに、サンプルホルダに置かれた粒子のサンプルを、視野を有する顕微鏡を有する撮像装置の照明源を用いて照明して、撮像装置を利用して視野内での粒子のホログラフィック画像スタックを取得することで、熱平衡時における粒子の運動を計測して、コンピュータシステム

10

20

30

40

50

のプロセッサを利用して、撮像装置が取得する粒子のホログラフィック画像を統計学的に分析して、この統計的分析には、ホログラフィック画像スタックから各画素の位置を判断して、各画素の標準偏差とその平均画素値とを求めて、プロセッサを利用して各画素のホログラフィック変動画像を生成して、このホログラフィック変動画像は、画像スタックの各画素についての正規化標準偏差分布を表現したものである。方法はさらに、プロセッサでホログラフィック変動画像を処理して、各粒子についての平均正規化標準偏差の分布を生成して、この、視野内の特異結合された粒子は、比較的低い正規化平均を有する正規化標準偏差計測値において、比較的小さいマグニチュードと、比較的小さい分布とを呈し、自由に拡散する粒子は、実質的に比較的高い平均で、比較的大きく、比較的広い正規化標準偏差分布を呈するので、粒子およびサンプルホルダいずれの上の抗原かを見分けることが可能である。

10

【0038】

本発明の一実施形態では、粒子は、溶剤内に存在する拡散部分に結合されうる表面抗原を有する細胞／ビーズである。さらにこの部分は、同時に適切な処理を施した表面（固相）に結合させることもできる。このように、この部分が溶剤内に存在するか否か、またはその量は、適切な処理を施した表面（固相）上の適切な塗布を行われた粒子の運動度を計測することで、計測することができる。このような拡散する種が存在すると、その濃度に応じて、結合細胞／ビーズの運動度に影響が出てくる。この種類の計測は、粒子の捕捉剤として機能する、自由に拡散する対象部分の存否、および／またはその濃度を判断するために利用することができる。

20

【0039】

一実施形態では、表面上の抗体に結合されていない赤血球細胞は、正規化標準分布の幅広い分布を表し、さらに正規化標準分布のより高い平均を有しており、一方で、表面上の抗体に結合されている赤血球細胞は、狭い分布およびより低い平均を有する正規化標準分布を示す。

【0040】

一実施形態では、中間の正規化標準偏差において赤血球細胞の割合が増えることからわかるように、中間結合レベルを検知することができる。

【0041】

一実施形態では、異種の有効拡散特性の計測により検知可能な、異種の結合特性を有する粒子同士は、分布の幅および形状を分析して、実験的に計測された分布を異種の拡散モデルに適合させて、粒子と表面との相互作用および親和性の分布を反映しうる拡散特性の固体群分布の推定値を生成することで検知可能である。

30

【0042】

一実施形態では、互いに結合された粒子対が位相を合わせて運動するとき、相関性のある変動が生じる。さらに、隣接する粒子の対同士が結合すると、相関性のある変動が生じ、サブ画像の積（和）の、対応する正規化標準偏差の値が、結合されておらず、相関がない変動をするがために比較的低い正規化標準偏差値を有する粒子と比べて、高くなる。

【0043】

一実施形態では、診断処置として粒子の形状を検知する方法は、視野を持つ顕微鏡を有する撮像装置の照明源を利用して、サンプルホルダに置かれた粒子のサンプルを照明する段階と、撮像装置を利用して視野内の粒子の画像シーケンスを取得することで、熱平衡における粒子の形状を計測する段階と、コンピュータシステムのプロセッサを利用して、撮像装置により捕捉された粒子の画像を統計的に分析する段階とを備え、統計的に分析する段階は、画像シーケンスにおいて粒子の強度の空間分布を決定することを含み、方法はさらに、プロセッサを利用して、画像シーケンスの画素それぞれの正規化標準偏差分布を表現したものである、画素それぞれの変動画像を生成する段階と、プロセッサを利用して変動画像を処理して、粒子それぞれの正規化標準偏差の平均の分布を生成する段階とを備え、熱変動または外部から加わった力のいずれかにより容易に形状を変化させる粒子は、比較的より剛性な粒子よりも高い空間強度変動を呈し、画像シーケンスにおける粒子の空間

40

50

強度の統計的分析における正規化標準偏差分布は、粒子の柔軟性、弾性／粘弾性、健康か病気か、年齢、溶剤の条件、または結合状態のうち少なくとも１つの診断として利用することができる。

【 0 0 4 4 】

上記の特徴の一部のまとめは、以下の詳細な説明の理解を促すことを目的としており、先行技術に対する本願の貢献を分かりやすくする目的を有する。もちろん、以下には、本発明の別の特徴も詳述されており、ここに添付する特徴の主題の次に説明される。

【 0 0 4 5 】

この点において、本発明の少なくとも１つの実施形態を説明する前に、本発明が、以下の説明で説明されたり、図面に示されたりする詳細な構成またはコンポーネントの配置に対する用途に限定されない点を留意されたい。本発明の方法および装置は、他の実施形態での実施形態も可能であり、様々な方法での実施および実行が可能である。さらに、ここで利用する言い回しおよび用語は、以下に示す要約とともに、記載を目的としたものであり、限定は意図していない点にも留意されたい。

【 0 0 4 6 】

従い、当業者であれば、本開示が基づく構想が、本発明の幾つかの目的を実行するための他の構造、方法、およびシステムの設計の元として容易に利用可能である点に気づくであろう。従って、これら特徴には、本発明の方法および装置の精神および範囲から逸脱しない限り均等物である構造が含まれるものとみなされるべきである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 7 】

【 図 1 A 】細胞／粒子の表面相互作用および／または集合的分散／粘弾性特性を推定するために、細胞／粒子の運動度を計測するよう設計された、位置合わせされたホログラフィック顕微鏡装置を示す概略図である。

【 図 1 B 】少なくとも１つの細胞／粒子が提供された透明な表面を有するサンプルホルダの断面図である。

【 図 1 C 】ガラススライド、スペーサ、処置済みカバースリップを有し、粒子が分散されたサンプルチャンバを形成する透明なサンプルホルダの断面図である。粒子は、照明源、顕微鏡対象、撮像光学系および図 1 A の取得ハードウェアを利用して撮像されてよい。

【 図 1 D 】少なくとも１つの細胞／粒子が提供されている（１）最下面または（２）最上面に、反射性／部分的な反射性を有する表面を有するサンプルホルダの断面図であり、反射モードでも計測が可能である。サンプルチャンバには、処置済みカバースリップの表面に落ち着く粒子の分散が含まれている。

【 図 2 】図 1 B のホログラムが拡散によりシフトする様子を示し、これにより画素の強度を大幅に変動させることができる。

【 図 3 A 】サンプル流体が内部を通るサンプルチャンバの断面図である。

【 図 3 B 】各々が異種の粒子混合を有しているカバースリップの様々な処置済み表面領域（A、B、C、およびD）の上下方向の図を示しており、ここでは各種の粒子が区別可能に表示されている（例えば蛍光による表示またはホログラフィック画像特性によって）。

【 図 4 】スクリーンショット A は $2\ \mu\text{m}$ のシリカビーズのホログラフィック画像を示しており、スクリーンショット B は、ホログラフィック画像スタック（60 個の画像）から生成された変動画像を示している。

【 図 5 A 】画像スタックの上の、各画素に対するピクセルワイズの平均によって、ピクセルワイズの標準偏差を除算することで得られるホログラフィック変動画像 $S(i, j)$ を生成するために行う、ホログラフィック画像の分析を示す。

【 図 5 B 】一連のホログラム内の１つの画像から生成される粒子の近隣のマスク画像でマスクされた変動画像（つまり、正規化標準偏差（NSD）画像）を用いた、粒子ごとの変動計測値の計算方法を示す。各粒子の近隣における正規化標準偏差値は、平均化した後に、ヒストグラムとしてプロットした。

10

20

30

40

50

【図 6】スクリーンショット A は摂氏 5 度の脱イオン化された水内の $2\text{ }\mu\text{m}$ のシリカビーズのホログラフィック変動画像を示しており（60 のフレームスタックから構築された）、スクリーンショット B は、摂氏 47 度の脱イオン化された水内の $2\text{ }\mu\text{m}$ のシリカビーズのホログラフィック変動画像を示している（60 のフレームスタックから構築された）。光領域は、粒子の動きによって高い強度の変動を表しており、低温ではより制限されている。

【図 7】摂氏 6.8 度（下のヒストグラム）、摂氏 28 度（中間ヒストグラム）、摂氏 46.3 度（上のヒストグラム）で計測した水中の直径が $4.8\text{ }\mu\text{m}$ のシリカビーズの正規化標準偏差を示す 3 つのヒストグラムである。これらヒストグラムの主要なピークは、自由に拡散するビーズに対応しており、NSD の下位の値（5 - 10 %）は、表面に留まった、または部分的に留まった、ずっと小さいビーズの割合を表している。

【図 8】様々な温度で計測した、自由に拡散する $4.8\text{ }\mu\text{m}$ のビーズの NSD 値の平均および標準偏差のグラフである（白い四角）。

【図 9】スライド（1）は、抗体で覆われた表面に配置される各種の粒子を示している（つまり、直接的な免疫試験（direct immunoassay））。A 抗原で覆われた粒子は、具体的には、カバースリップの表面を覆う静止している特異抗体（A 抗体）に結合されて、粒子の動きが規制される。スライド（2）では、各種の粒子により異なる行動が表されており、特異結合されていない B 抗原を塗布された粒子は、表面上を溶剤内で自由に拡散しており、A 型の粒子の動きは、表面の抗体との特異結合によってかなり拘束されていることが分かる。

【図 10 A】抗 A 塗布表面の上で計測された 2 つの異なるサンプルまたは RBC（赤血球細胞）の正規化標準偏差ヒストグラムのグラフである。表面に A 抗原を持つ赤血球細胞（A 型）は、抗 A 塗布表面と特異結合して、A 抗原のない赤血球細胞は（A ネガティブ）は結合しないので、自由に拡散する。

【図 10 B】図 10 A の A ポジティブヒストグラムに比して、抗原 A（A 型、黒いほうのヒストグラム）についてポジティブに特異結合されている細胞が、同様に狭い分布であり、同様に低い平均を有する様子を示すグラフである。

【図 11】スライド（1）は、溶剤に相補抗体（complementary antibody）が存在する抗原を塗布された表面に各種の粒子を置いた様子を示す（間接免疫測定法）。溶剤内の A 抗体は、A 抗原を塗布された表面に結合することができ、同時に A 抗原を塗布された粒子にも結合することができる。スライド（2）は、各種の粒子で異なる行動を表しており、特異結合されていない B 抗原を塗布された粒子が、溶剤内で表面上を自由に拡散している様子を示しており、A 種類の粒子の動きが、表面に特異結合されている抗体との特異結合によってかなり拘束されている様子を示している。

【図 12 A】それぞれの時点でとられた赤血球細胞のサンプルの NSD ヒストグラムシリーズを示す。カバースリップ表面に B 型抗原がある表面に、合成プラズマで抗 A 抗原（ 100 nM ）が高濃度で存在しているなかの、A 型の赤血球細胞を示す。NSD の平均が高いことから分かるように、細胞は拡散することもできる。

【図 12 B】それぞれの時点でとられた赤血球細胞のサンプルの NSD ヒストグラムシリーズを示す。図 12 A と類似した条件下でのヒストグラムのタイムシリーズを示すが、図 12 A との違いは、表面に A 型抗原がある点である（B 型抗原の表面を計測するのではなく）。図 12 A および図 12 B のヒストグラムを比較することで、細胞が結合されているか否かを判断するための NSD の閾値を選択することができる。

【図 13 A】図 12 A および図 12 B の計測条件に類似しているが、抗体の濃度がずっと低い点が異なっている。 1 nM 抗 A（ 1 nM anti-A ）を合成プラズマとして利用した。B 型の表面の上の A 型の細胞は、サンプルを表面に置いてから 19 分経過したところで最初に計測した結果、殆どが未結合であった。

【図 13 B】図 12 A および図 12 B の計測条件に類似しているが、抗体の濃度がずっと低い点が異なっている。 1 nM 抗 A を合成プラズマとして利用した。 1 nM 抗 A を含む合成プラズマの A 型の細胞を、A 型の抗原を有する表面に置いてから計測した。

10

20

30

40

50

【図 1 4】図 1 3 A および図 1 3 B で観察されるものと同じサンプルの細胞接着動力学 (cell adhesion kinetics) を示す。

【図 1 5】スライド A は、直径が $4.8 \mu\text{m}$ のシリカビーズの画像を示しており、この拡散ビーズの 40 個のフレームシーケンスを (毎秒 5 フレームずつ取得した)、粒子追跡アルゴリズムを利用して分析して、図 1 5 のスライド B に示すような x および y という計測された質量中心位置にシフトしたシーケンスが生じた。

【図 1 6】スライド A は、図 1 5 のスライド B に示す粒子追跡分析で利用された、同様に計測された 40 個のフレームシーケンスから計算された NSD の画像を示しており、ビーズ領域における NSD の平均が 23.6% であった。ビーズ領域における平均 NSD を図 1 6 のスライド B にプロットしており、これは、実験的に計測された NSD とよく調和していることが分かる。

【図 1 7】二乗平均平方根変位位置に、計測されたビーズ NSD 分布の平均を関連付ける検量線を示す。

【図 1 8】図 1 7 に示す検量線とともに、2 つの他のビーズ画像から生成された 2 つの他の検量線を示す。

【図 1 9】図 1 8 のビーズとともに、量で示したコントラスト補正係数を示す。この係数は、各ビーズの近隣の画素強度の標準偏差を計算して (各ビーズを取り囲む矩形内を参照)、これを同じ領域の画素強度の平均で除算する (つまり、正規化された空間標準偏差) ことで得られる。

【図 2 0】プロット A は、抗 B が A 抗原を有する表面上に分散された合成プラズマの B 型の赤血球細胞の NSD ヒストグラムである。図 2 0 のグラフ B は、図 2 0 で計測した各赤血球細胞の NSD 値を、その正規化空間標準偏差に関連付ける分散プロットを示す。

【図 2 1】プロット A は、抗 B が B 抗原を有する表面上に分散された合成プラズマの B 型の赤血球細胞の NSD ヒストグラムである。抗 B 抗体は、赤血球細胞の B 抗原および表面の B 抗原に付着して、細胞を動かなくさせる。その結果生じる強度変動が、A 抗原パッチ (図 2 0 のプロット A) の細胞に比べて顕著に低減する (図 2 1 のプロット A に示す低い NSD 計測値が示すように)。図 2 1 のプロット B は、図 2 1 で計測した各赤血球細胞の NSD 値を、正規化された空間標準偏差に関連付けた散布図である。

【図 2 2】プロット A および B は、結合されていない (図 2 0 のプロット A)、および、結合されている (図 2 1 のプロット A)、補正された、および、補正されていない赤血球細胞のヒストグラムを示し、この補正は、線の適合 (図 2 0 のプロット B および図 2 1 のプロット B) により行うことで、NSD の正規化空間標準偏差に対する依存をなくした。

【図 2 3】図 2 2 のプロット A および図 2 2 のプロット B に示すヒストグラムの累積確率分布のプロットである (特定の NSD 値以下の NSD を持つ細胞の部分のプロットである)。

【図 2 4】水に $4.8 \mu\text{m}$ の直径のビーズを入れた NSD ヒストグラム (上のヒストグラム) と、ガウス分布を利用して、 $0.131 \mu\text{m}$ の二乗平均平方根の変位を生成するシミュレーションによる NSD ヒストグラム (下のヒストグラム) とを示す。

【図 2 5】 0.4% の生理的食塩水に $4.8 \mu\text{m}$ の直径のビーズを入れた NSD ヒストグラム (上のヒストグラム) と、ガウス分布を利用して、 $0.0064 \mu\text{m}$ の二乗平均平方根の変位を生成するシミュレーションによる NSD ヒストグラム (下のヒストグラム) とを示す。

【図 2 6】プロット A、B、および C は、 5 nM の抗 A が B 抗原を有する表面に分散された合成プラズマ内の A 型赤血球細胞の NSD ヒストグラムを示す。

【図 2 7】プロット A および B は、1 つの画像からそれぞれ計測した未結合赤血球細胞および結合赤血球細胞の正規化された空間標準偏差値のプロットである。

【図 2 8】プロット A および B は、シーケンス内の 40 個のフレーム全てにおける、図 2 0 のプロット A および図 2 4 のプロット A (図 2 8 のプロット A) の未結合の固体群内の 100 個の細胞、および図 2 0 のプロット B および図 2 4 のプロット B (図 2 8 のプロット B) の結合されている固体群固体 100 個の細胞について平均空間正規化標準偏差をグ

10

20

30

40

50

ラフにしたものである。両プロットで、誤りバーには、40個のフレームシーケンスにおける各細胞の空間正規化された偏差の標準偏差がプロットされている。

【図29】結合された細胞および結合されていない細胞両方について、シーケンス内の40個のフレームで各細胞について計測した空間正規化標準偏差の標準偏差をグラフにした。

【図30】ホログラフィック合焦を利用した検量線を示す。粒子を含む校正サンプルは、焦点位置からの公知の距離に置かれ、画像が各距離で取得される。次に各画像は、数値的に伝播されて、その焦点計測極値の位置を、焦点からのサンプル距離の関数としてプロットした。

【図31】当初の位置から+1mmと-1mm分、焦点から離れた範囲で最初開始されたサンプルの最終的な位置を示す。合焦している位置は、視覚的に決定されて、 $\pm 1 \mu\text{m}$ の誤りを有すると推定された。ホログラフィック合焦の精度は、焦点位置推定の誤りに比較することができる。

【図32A】サブ画像を利用して、結合されている粒子/細胞対を、結合されていない粒子/細胞対から区別する対の粒子/細胞の相関図である。

【図32B】サブ画像を利用して、結合されている粒子/細胞対を、結合されていない粒子/細胞対から区別する対の粒子/細胞の相関図である。

【図33A】外部力を利用せずに計測した（つまり熱平衡計測）、2つの異なるビーズ分散のサンプル（4.8 μm シリカ）のビーズ強度変動（NSD、正規化標準偏差値）であり、1つのサンプルを表面に結合させ（濃い断面ハッチングを施されたヒストグラム）、他のサンプルが表面に結合されていない（まばらな斜交いの線のパターンのヒストグラム）。ビーズは、0.9%の生理的食塩溶液で希釈することで、ガラスカバースリップの表面に結合され、ビーズは、脱イオン化水で希釈されることでカバースリップ上を自由に拡散する。未結合のビーズは、これら実験条件下で結合されたものと明確に区別できる（つまり、分布が最小限しか重なっていない）。

【図33B】段階を追って運動させた後に計測された同じサンプルを示す。分析されたヒストグラムのスタックにおける各画像は、サンプルを一つの軸上で25 μm 行きつ戻りつさせる、圧電による段階的運動の後にとられたものである。システム内の物理的通気（perturbation）は、NSD計測法で力を与えずに計測された値と比べて、結合しているビーズの固体群の運動度に影響を持たない。しかし、未結合のビーズは、図33Aの力を加えない例と比べて、段階的運動によりビーズの運動度が上がった結果、より高いNSDを示している。従って物理力の利用によって、図33Bの結合されているビーズのヒストグラムと、結合されていないビーズのヒストグラムの間が大きくかけ離れていることから分かるように、結合されている固体群および結合されていない固体群の間の課題を解決することができる。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は、検知された運動度に基づいて、迅速且つ効率的な方法で、細胞/粒子の固体群を特徴付けたり、細胞/粒子のサブ固体群を検知したりする計測およびテストに利用する機器および計測装置および方法に係る。

【0049】

<装置>

一実施形態を示す図1Aは、細胞/粒子の表面相互作用（つまり、特異表面の存否、粒子の相互作用）および/または粒子の分散の集合的分散/粘弾性特性（例えば有効粘度）を推定するために、粒子（細胞）の運動度を計測する手段として設計された、位置合わせされたホログラフィック顕微鏡装置10を示す概略図である。

【0050】

図1Aおよび図1Cに示す実施形態では、本発明を実行する際に利用される装置10は、コリメータ101がコリメートしたコヒーレントな光源（例えばレーザ、スーパーluminescentダイオード等）100を有し、この光源100は、光ファイバ103に連結す

10

20

30

40

50

ることができ、レーザビーム 104 によって、顕微鏡 106 の透明なサンプルホルダ 105 (つまり顕微鏡のスライド) を照明する。

【0051】

一実施形態では、コヒーレントな光源 100 を、短いコヒーレンス長 ($< 400 \mu\text{m}$) を有し、600 nm で動作するレーザとする。レーザを利用しない光源 (例えば、スーパーミネッセントダイオード) を含む他の波長およびタイプの光源、および従来の光源 (LED、白熱灯、アークランプ等) を利用することもできる。ホログラフィック光トラップ装置も当技術分野で公知である (Grier に対する米国特許第 7,161,140 号明細書に開示されており、この全体をここに参照として組み込む)。

【0052】

一実施形態では、サンプルホルダ 105 に置かれているサンプル 107 は、処置されていてもいなくてもよい透明な表面 109 (つまりカバースリップ 109A) の上に分散された粒子 108 (つまり細胞) を含んでいる。細胞 / 粒子 108 のサンプル 107 は、自動流体デバイス 116 (後述する) によってまたは手で、サンプルホルダ 105 へと導かれて良く、デバイス 116 の構造および動作については関連技術分野で公知の通りである。

【0053】

粒子 108 は、表面 109 に落ち着かされて、粒子と表面との間の相互作用がテストされる。一実施形態では、粒子 108 は、重力によって表面 109 に落ち着く。別の実施形態では、粒子 108 は表面 109 に、遠心分離機 (例えば 117) を利用してサンプルチャンバ 118 (図 3A 参照) に加えられる遠心分離力によって落ち着かされる。さらに別の実施形態では、粒子 108 が表面 109 に、粒子 108 に加えられる他の力によって落ち着かされても良い (後で詳述する)。

【0054】

粒子 108 は、様々な物理的および化学的属性を有してよく、大きさ、形状、および材料に基づいて異なるタイプであってよく、画像形成装置上にそれぞれ区別可能な画像を生成する。例えば、粒子 108 は、いくらか対称性を有する定型のビーズであってよい (例えば球形、長球、偏球)、または非定型のビーズであってよい。粒子 108 は、一種類の材料からなってもよいし、複数の種類の材料からなってもよい。粒子 108 は、固体であってよく、多孔質であってよく、または中空のコア形状であってよい。粒子 108 は、他の 1 または複数の材料で完全または部分的に覆われていてもよい。粒子 108 は、金属であってよく部分的に金属であってよい。粒子 108 は、非金属であってよく部分的に非金属であってよい。粒子 108 は、テクスチャを与えるために表面処理されてもよい。粒子 108 は、リンカー分子を表面に有するシリカビーズであってよく、表面に生分子または合成分子が付着したシリカビーズであってよい。粒子 108 は、表面のリンカー分子に、生分子または合成分子が付着したシリカビーズであってよく、表面に共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合された蛍光またはルミネッセンスで表示される分子の組み合わせが被膜された、またはこれらが埋め込まれたビーズであってよく、こうすることで、蛍光発光スペクトルであるかルミネッセンス発光スペクトルであるかに基づいて粒子のタイプを見分けることもできる。粒子 108 は、また、共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合された様々な蛍光またはルミネッセンスで表示される分子の組み合わせが被膜された、またはこれらが埋め込まれたビーズであってよく、こうすることでも、蛍光発光スペクトルであるかルミネッセンス発光スペクトルであるかに基づいて粒子のタイプを見分けることもできる。粒子 108 は、共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合されたナノ粒子、磁気ナノ粒子、または蛍光ナノ粒子を有するビーズであってよい。

【0055】

別の例では、粒子 108 は生体細胞であってよく。粒子 108 は、遺伝子組み換えされた生体細胞または遺伝子組み換えされた生体細胞の子孫細胞であってよく。粒子 108 は、生分子および / または合成分子で処理された細胞であってよく。粒子 108 は、

10

20

30

40

50

リンカー分子で処理された細胞であってもよい。粒子 108 は、リンカー分子に付着する生分子および / または合成分子で処理される細胞であってもよい。粒子 108 は、共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合された蛍光またはルミネッセンスで表示される分子を有する細胞であってもよい。粒子 108 は、共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合された異なる蛍光またはルミネッセンスラベルの分子を有する細胞であってもよい。粒子 108 は、共有結合的または非共有結合的に付着したナノ粒子を有する細胞であってもよい。粒子 108 は、共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合された磁気ナノ粒子を有する細胞であってもよい。粒子 108 は、共有結合的または非共有結合的に付着した、または統合された蛍光ナノ粒子を有する細胞であってもよい。粒子 108 は、蛍光たんぱく質を自然に発現してもよいし、遺伝子組み換えされることで、蛍光たんぱく質を表すものであってもよい。

10

【0056】

一実施形態では、粒子 108 のサンプル 107 は、さらに、計測前、計測中または計測後に、サンプルホルダ 105 に試薬または非反応性の溶剤を投入することで変質させられてもよい。例えば、図 1 B に示すように、細胞 / 粒子 108 の表面相互作用を計測するために、サンプルホルダ 105 の、細胞 / 粒子 108 が落ち着くべき透明な表面 109 (例えばカバースリップ 109 A) に、特別な処理を施すこともできる。

【0057】

例えば、表面 109 (カバースリップ 109 A を含む) は、様々な方法での提供が可能である。一実施形態では、表面 109 は、平坦で透明であってもよい。表面 109 は、平坦で部分的に透明であってもよい。表面 109 は、平坦で、完全にまたは部分的に反射性であってもよい。表面 109 は、テクスチャ加工された平坦面であってもよい。表面 109 は、生分子または合成分子で処理することもできる。表面 109 は、リンカー分子で処理することもできる。表面 109 は、リンカー分子に結合された生分子または合成分子で処理することもできる。表面 109 は、様々な分子で別々に処理することもできる。表面 109 は、様々なリンカー分子で別々に処理することもできる。表面 109 は、分子の混合物により処理することもできる。表面 109 は、マイクロ流体デバイスの一部であってもよい。表面 109 は、マイクロタイタプレートの一部であってもよい。表面 109 は、透明または部分的に透明なサンプルチャンバ 118 の一部であってもよい (図 1 D、図 3 A 参照)。表面 109 は、反射性の、または部分的に反射性のサンプルチャンバ 118 (図 1 D の反射性の、または部分的に反射性の表面 120) の一部であってもよい。表面 109 は、微視的に十分な平滑性を持つことで、粒子 108 の撮像を可能とするものであってもよい。

20

30

【0058】

一例では、図 3 B は、各々が異種の粒子 108 の混合物を有しているサンプルホルダ 105 の上のカバースリップ 109 A の様々な処置済み表面領域 (A、B、C、および D) の上下方向の図を示しており、ここでは各種類の粒子 108 が区別可能に表示されている (例えば蛍光による表示またはホログラフィック画像特性によって)。各表面 109、109 A は、異種の粒子の固体群 108 の運動度の計測値に対して、異なる相互作用を生じさせている (つまり、各領域で異なる種類の粒子 108 が拡散可能である)。図 3 B は、本発明において、別々の処置された表面 109、109 A の領域があってもなくても区別可能な粒子 108 の異質性を利用することで、同時に調査可能な相互作用の種類の数を示している (多重計測)。

40

【0059】

一実施形態では、異質の粒子の固体群 108 は、同時に計測され、各種類の粒子が、異なる量で、または同様の量の範囲で計測可能である (例えば多重計測) (図 3 B)。全てまたは幾つかの種類粒子 108 は、ラベル (例えば蛍光、ナノ粒子)、粒子画像 (異なる吸収、分散、蛍光、ルミネッセンス特性、蛍光またはルミネッセンス発光プロフィール、蛍光またはルミネッセンスにより減った寿命)、および / または、粒子の位置 (粒子の種類、堆積が制御されていることを想定している : controlled deposition of particle

50

types) に基づいて区別可能であってよい。全てまたは幾つかの種類の粒子 108 は、各粒子 108 のデータのマルチモーダルな収集で区別することができるものもある。全てまたは幾つかの種類の粒子 108 は、コヒーレントな光源が生成するホログラムに基づいて区別可能であってよい。全てまたは幾つかの種類の粒子 108 は、コヒーレントな光源 100 が生成する、焦点が合った、および / または、焦点がずれたホログラムに基づいて区別可能であってよい。全てまたは幾つかの種類の粒子 108 は、1 を超える数の焦点面で収集されたホログラムに基づいて区別可能であってよい。同質な粒子の固体群 108 は、同時に計測されてよい。

【0060】

一実施形態では、サンプル 107 は、生分子 A を含み (または含まず)、他の種類の生分子 (例えば生分子 C、D、E 等) を含む (または含まない) 溶剤内で、生分子 B で覆った表面 (固相) を持ち、生分子 A で覆った粒子 108 を含む。この方法のサンプル計測によって、制御された力または熱的力に対する粒子の運動度を分析することで、研究、産業および / または医療目的で、粒子 108 と表面 109 との間の生分子の相互作用に関する情報が得られる。

10

【0061】

本発明の一実施形態では、粒子 108 は、溶剤内に存在する拡散部分に結合されうる表面抗原を有する細胞 / ビーズ 108 である。この部分は、同時に適切な処理を施した表面 (固相) に結合することもできる。このように、この部分が溶剤内に存在するか否か、またはその量は、適切な処理を施した表面 109 (固相) 上の適切な塗布を行われた粒子 108 の運動度を計測することで、計測することができる。このような拡散する種が存在すると、その濃度に応じて、結合細胞 / ビーズ 108 の運動度に影響が出てくる。この種類の計測は、粒子の捕捉剤として機能する、自由に拡散する対象部分の存否、および / またはその濃度を判断するために利用することができる。

20

【0062】

一実施形態では、細胞 / 粒子の表面 108 a に特異抗原を調べる場合 (図 1 B および図 1 C)、透明な表面 109 に対する適切な表面処理には、表面 109 を、適切なリンカー分子で化学的に改質することで、適切な抗体の表面 109 への付着を促すことが含まれてよく、こうすることで、対象となる抗原が呈された細胞 / 粒子 108 を、透明な表面 109 上の表面の抗体と特異結合させることができる。対象となる抗原が表面 108 a にない細胞 / 粒子 108 の場合は、透明な表面 109 の表面には特異結合されない。細胞 / 粒子 108 の拡散特性 (有効拡散係数、有効粘度または粘弾性特性) を計測する場合には、一例として (後述する)、不活性な表面 109 を利用することができる。

30

【0063】

細胞 / 粒子 108 の撮像は、顕微鏡装置の顕微鏡対物レンズ 110 (図 1 A 参照)、および、CCD または CMOS カメラ 112 上での撮像に利用される細胞 / 粒子 108 の拡大パターンの撮像を可能とするチューブ状レンズ 111 によっても可能であり、これは、画像処理用のコンピュータ 113 に接続される。サンプル 107 を、公知の並進ステージ 114 (例えばモータ駆動式の顕微鏡並進ステージ) で並進させることで、サンプル 107 の様々な領域を撮像することができる。サンプルホルダ 105 はさらに、計測領域の全てまたは部分を、内部に含んでいる温度制御装置で温度制御することで、例えば、生分子の相互作用を起こすのに最適な温度環境を作成するために定温放置することもできる。さらに、顕微鏡 106 が撮像する焦点面は、焦点コントローラ 115 (これもモータ駆動式であってよい) を利用して調節することもできる。

40

【0064】

一実施形態では、粒子 108 が、粒子タイプを、蛍光またはルミネッセント発光スペクトルで区別可能な蛍光またはルミネッセント分子またはナノ粒子で覆われている、またはこれらが埋め込まれている場合、装置 10 は、蛍光、ルミネッセント励起源 100、適切なフィルタ (不図示)、二色性部材 (不図示)、および、色検知機能 (例えばカラーカメラ 113 および / または発光フィルタ選択) を備える必要があると思われる。それぞれが

50

固有のコーティングを施された様々な種類の粒子 108 の導入によって、計測を多重化することができるようになる（つまり、複数の種類の相互作用を同時に計測することができるようになる）。

【0065】

数多くの従来の蛍光分析による多重計測とは異なり、ポジティブな結合の相互作用を示すのが、特異粒子 108 の存在ではなく、ポジティブな結合を示す粒子の運動度計測値となることから、洗浄段階を別途設ける必要がなくなる。

【0066】

本発明の別の実施形態では、透明な、反透明な、部分的に鏡とされた、反射性の被膜 120 を有する（図 1D 参照）サンプル 107 およびサンプルチャンバ 118 は、反射モードでの計測が可能であり、これには、レーザ照明（またはその他の照明源）を利用して、サンプル 107 を収集側から照明して、サンプル 107 から反射される光で画像形成を行い、次いで、コンピュータ 113 のモニタに映し出すことが含まれる。

10

【0067】

本発明のまた別の実施形態では、透明なサンプルホルダ 105 が、ここで説明するデータ取得および分析機能を有する（図 3A）自動の流体デバイス 116 またはマイクロタイタープレートデバイスである。粒子 108 は、マイクロ流体デバイス 116 のサンプルチャンバ 118 に流入させられる、または、異なるウェルに複数のサンプル 107（粒子 108 および溶剤）を投入することのできるロボットマイクロタイター装置によりマイクロタイタープレートに置かれる。各ウェルは、その位置により示される固有の表面化学を有してよく、これにより、複数のテスト（例えば、独立した結合試験（binding assays））等、最終的には単一のサンプル 107（または複数のサンプル 107）を、複数の表面 109 でテストさせるようなもの）の実行が可能となる。

20

【0068】

粒子 108 が落ち着く先の透明な表面 109 は、処理されたプラスチックまたはガラスからなっていてよい。マイクロタイタープレートは、透光性のキャップ、サンプル配信ゾーン、サンプル観察ゾーン等を含む、特注であってもなくてもよい構成である。ここで概略を説明した器具類は、サンプルコンテナから各ウェルに自動で（並行処理で）流体を供給し、サンプルの混合および定温放置機能、並びに、並行処理マイクロタイタープレート計測機能を有する、ロボットマイクロタイタープレート処理機械に統合することで、プログラミング可能としたり、自動化したりすることもできる。従って、試験は、1 または複数のサンプル 107 に複数のテストを並行して行うことができるよう設計されている。加えて、適切な並行処理光トレーンおよび検知設定を利用することで、複数のマイクロタイタープレートを並行して計測することもできる。ロボット装置は、マイクロタイタープレートを検知領域に供給して、自動的計測を可能とし、マイクロタイタープレートのスタックをユーザの介入なく計測することができる。

30

【0069】

所与のサンプルチャンバ 105、マイクロ流体サンプルチャンバ 105、またはマイクロタイタープレートウェルにおける計測は、溶剤、粒子または混合物を加えた後で、または、溶剤、粒子または混合物を交換した後で、および / または、様々な温度での定温放置の後で、繰り返し行うことができる。

40

【0070】

滴定計測は、所与のサンプルチャンバ 105、マイクロ流体サンプルチャンバ 105、または、マイクロタイタープレートウェルにて、さらなる検体をチャンバ / ウェル溶剤（1 または複数）に導入することで、行うことができる。

【0071】

さらに、所与のサンプルチャンバ 105、マイクロ流体サンプルチャンバ 105、またはマイクロタイタープレートウェルで、さらなる検体をチャンバ / ウェルの溶剤に導入した（しなくてもよい）後の粒子の運動計測（NSD）から時間が経った後に、動力学実験を行うこともできる。

50

【 0 0 7 2 】

開示する試験方法は、コンピュータシステムで利用可能なコンピュータプログラムプロダクトとしての実装が可能である。この実装には、コンピュータ可読媒体（ディスク、CD-ROM, ROM, または固定ディスク）等の有形の媒体に固定されるか、ネットワークに媒体経由で接続される通信アダプタ等のモデムまたは他のインタフェースデバイス経由でコンピュータシステムに送信可能な形とされる一連のコンピュータ命令を含んでよい。媒体は、有形の媒体（例えば光またはアナログ通信線）または無線技術（例えばマイクロウェーブ、赤外線その他の送信技術）で実装される媒体であってよい。一連のコンピュータ命令は、システムに関して前述した機能の全てまたは一部を具現化するものであってよい。当業者であれば、このようなコンピュータ命令を複数のプログラミング言語で記述して、数多くのコンピュータアーキテクチャまたはオペレーティングシステムとともに利用することができる点を理解するだろう。

10

【 0 0 7 3 】

このようなコンピュータプログラムプロダクトは、印刷物または電子化書類（市販ソフトウェア）を伴った取り外し可能な媒体として配信されてもよいし、コンピュータシステムに予め搭載されてもよいし（例えばシステムROMまたは固定ディスクで）、ネットワーク経由で（例えばインターネットまたはワールドワイドウェブ）サーバまたは電子掲示板から配信されてもよい。もちろん本発明の一部の実施形態は、ソフトウェア（例えばコンピュータプログラムプロダクト）およびハードウェア両方の組み合わせで実装することもできる。本発明のまた別の実施形態としては、全体がハードウェアからなるもの、または全体がソフトウェア（例えばコンピュータプログラムプロダクト）からなるものも含まれる。

20

【 0 0 7 4 】

< 結合技術 >

一実施形態では、受容体を発現する細胞 1 0 8 等の複数の粒子 1 0 8 が、受容体リガンド（固相）等の検体で処理された表面 1 0 9（固相）に配置され、リガンドが選択的に、リガンドに対して相補的な受容体で覆われた粒子の一部を検知するようにしてもよい。

【 0 0 7 5 】

粒子 1 0 8 は、サンプル溶剤の中で、固相上の結合サイトをめぐって対象となる受容体と競争して、これによりサンプル溶液内での受容体の濃度が決定される。対象となる受容体を含む溶剤は、覆われた粒子 1 0 8 を導入する前に、固相の表面 1 0 9 上で予め定温放置されていてもよい。

30

【 0 0 7 6 】

一実施形態では、複数の粒子 1 0 8 が、銘々の表面上でたんぱく質を発現する細胞 1 0 8 であり、たんぱく質結合受容体等の部分または抗体で処理された表面 1 0 9（固相）に配置され、この表面のたんぱく質が、固相の受容体または抗体に選択的に結合可能としてよい。言い換えると、粒子 1 0 8 は、相補的な抗原で覆われ、固相の上で静止しているたんぱく質結合受容体 / 抗体の上の結合サイトを廻り、同じ溶剤内の抗原と競合する。上述したように、対象となる抗原を有するサンプル溶液は、覆われた粒子 1 0 8 の導入前に、固相を含むサンプルチャンバ 1 0 5、マイクロ流体サンプルチャンバ 1 0 5、またはマイクロタイターウェルで予め定温放置されてよく、この後で、固相上の占有されていない抗体に結合して、その運動度に基づいて、未結合の粒子 1 0 8 から区別可能であってよい。校正を行うことで、方法は、サンプル溶剤で目標の抗原の濃度を達成することができる。

40

【 0 0 7 7 】

粒子 1 0 8 上を抗原 / 抗体 / 検体 / 表面のたんぱく質が覆っている密度（または、細胞における表面のたんぱく質の発現レベル）は、既知の固相に観察される動きの制限の度合いおよび既に分かっている溶剤の条件に基づいて推定されてよい。

【 0 0 7 8 】

固相は、対称の検体の特定のエピトープに特定の不動捕捉抗体からなり、粒子 1 0 8 は、同じ検体の異なる領域上のエピトープに特異な二次的な抗体（「表示抗体：label anti

50

body」と同様なもの)で覆われ、固相の捕捉抗体と粒子に結合される「表示抗体」とが、同時に検体に結合されるようにする(サンドイッチ法: sandwich assay)。相互作用によって表面10⁹に結合される粒子10⁸は、未知のサンプル10⁷の検体の濃度の計測値として利用することができる。加えて、部分的な粒子の結合(つまり、結合粒子の割合)の動力学を、検体の濃度および検体の生化学特性(例えば、比率定数、均衡定数等)を計測する方法として利用することができる。このような計測では「表示抗体」洗浄段階が不要であるが、それは、結合されている「表示抗体」(つまり、抗体で覆われた粒子)が、その拡散行動(つまり、結合されている粒子が、実質的に低減した運動度を示す)または物理的力に対する応答(つまり、結合した粒子が、物理的力に対して著しく低減した応答を示すこと)によって未結合の粒子10⁸から区別可能であるからである。従来の量子免疫学(immunometric)的な試験とは異なり、「表示抗体」は、必ずしも、ポジティブな結合相互作用を示さなくても構わない。この存在は、必要ではあるが十分ではない。ポジティブな結合相互作用は、最終的には粒子の運動計測によって見分けられる。

10

【0079】

一実施形態では、複数の粒子10⁸は赤血球細胞10⁸であり、表面10⁹上の抗体に結合される。

【0080】

一実施形態では、対象となる抗体を血液サンプルから採取して、固有処理された表面のアレイに対して試験を行うことで、抗体プロフィールが決定される。特に、対象となる抗体の血液サンプルからの採取は、ウィルス感染を検知する目的で行われる。任意のウィルスの表面に発生するたんぱく質は、表面(固相)で静止して、ウィルスに対する特異抗体を捕捉することができる。加えて、ウィルスの抗体の別の領域に対して相補的な抗体で覆われた粒子がテスト中に存在していると(対象となるウィルスの抗体のなかで存在していると)、粒子が静止することで、血液サンプル中の抗体の存在を知ることができる。この計測は、適宜制御を行いつつ、感染を診断する目的、または、対象となる抗体の濃度を定量化する目的で実行される。

20

【0081】

粒子の運動度が低下して、粒子の結合度合いが増えることで測られる粒子の結合のマグニチュードと結合強度の動力学を、検体の濃度および生化学特性(比率定数、均衡定数等)を計測する方法として利用することができる。

30

【0082】

<ホログラフィック合焦>

複数の視野、サンプルチャンバ118(図3A)、マイクロ流体チャンバ118、および/またはマイクロタイターウェルプレートチャンバの計測には、焦点を合わせなおす処理が複数回必要となる場合がある。この計測のスループットを上げるには、合焦時間を最小限に抑える必要がある。

【0083】

従来の合焦技術は、複数回の焦点変更、および、これら異なる焦点位置で取得された画像を比較することが必要となる。各画像に焦点計測値をあてはめていくと、焦点の変更が真の焦点位置に近づいているか否かの判断が可能となる。サンプル10⁷を複数回物理的に動かして焦点を合わせていると、時間がかかる。

40

【0084】

しかし、従来の技術に比べて、コヒーレントな光源100を利用して粒子10⁸を撮像することにより、撮像されたホログラムを数値的に処理して、迅速に粒子10⁸の焦点面を決定できるようになる。透明なサンプルチャンバ118の粒子10⁸のサンプル10⁷を、コヒーレントな光源100で照明すると、粒子10⁸の回折パターンの撮像が、焦点がかなりずれている場合であっても可能となる。数値的に解決することで、迅速な合焦が可能となり、しかも、長距離焦点がずれている場合であっても、焦点を合合わせることができるようになる。この数値的な合焦法は、焦点のずれた画像を、異なる距離に伝播させ、焦点を数値的に決定することを含む。焦点計測値を、各数値的に伝播された画像に関連

50

付けることで、焦点計測値の極値が見つかり、これにより、一回のステージの運動で、必要な焦点位置にサンプルを配置することができるようになる。これは、様々な焦点距離サンプルを比較的ゆっくり物理的走査して、なんらかの焦点計測値に従って焦点距離を決定していく従来の合焦方法とは対照的である。

【0085】

従って、取得された焦点のずれた回折パターンは、一定の距離範囲を伝播して、焦点計測値が最大化される距離が判断される。この距離が数値的に決定されると、一回のステージの運動で、必要な焦点位置にサンプル107を運動させることができる。

【0086】

専用の合焦カメラ217（図1A参照）を利用して、数値的な伝播計算を実行する対象となる画像を取得することができる。一実施形態では、このカメラは、ビームスプリッタ218により運動度の計測に利用されるカメラのものとは異なる撮像面に配置されてよい。従って、焦点計算は、計測カメラ112と比較して焦点がずれた面に配置される、この別個の合焦カメラ217から収集された画像で実行される。

【0087】

さらに、合焦および運動度の計測の両方のために単一のカメラ112を利用することもできる。合焦するための画像は、サンプル107のピンぼけを制御してから収集してもよい。

【0088】

図30は、真の焦点位置の1mm上から1mm下までずらした校正サンプル107から画像を数値的に伝播させて生成した検量線である。画像は、対物空間で焦点から1mm離して配置した専用合焦カメラから収集されたものである。低倍率且つ低い数値的アパーチャの対物レンズ（objective）110を利用した。検量線の生成には、異なる対物レンズ（objectives）110およびCCDの位置を利用することもできる。検量線のx軸は、校正サンプル107を実際に焦点位置に対して動かした距離を示しており、y軸の値は、焦点計測値の数値的伝播ピークの位置を示す。焦点位置からかなり遠くずれているサンプル107について、所望の焦点精度を達成するためには、数値的合焦処理を、2回以上繰り返す必要がある場合もあることが想定される。

【0089】

図31は、当初の位置から+1mmと-1mm分、焦点から離れた範囲で最初開始されたサンプルの最終的な位置を示す。合焦している位置は、視覚的に決定されて、 $\pm 1\mu\text{m}$ の誤りであった。焦点面に対する最終的な位置の値は、視覚的に求まる焦点位置計測値から一定の推定誤差の範囲内で正確である。

【0090】

< 発明を実行するための方法および装置 >

上述した装置を利用して本発明を実行するため方法は幾つか存在しており、以下でこれに関して説明する。

【0091】

< 物理的力を利用する方法 >

本発明の一実施形態では、物理的力適用手段10（図1Aおよび図1B参照）により細胞/粒子108および/またはその表面108aにかかる物理的力、および、細胞/粒子108の反応力を、コンピュータ113を利用して計測することができる（つまり、インパルス応答計測、周波数応答計測）。物理的力適用手段10は、並進ステージ114の急な、または継続した周期的運動、または、光学力適用手段100、101等を利用して光学的に生成された力、サンプル107に超音波をかける超音波発振器117を利用する超音波手段117、音響手段（音響波を利用する）、または物理プローブ接触により、または、自動化流体フロー（マイクロ流体）デバイス116からの流体フロー（これら全てが問う業者には公知である）等の他の外部手段の力を含むことができる。

【0092】

上述した物理的力適用方法によると、本発明の計測方法は、視野内の細胞/粒子108

10

20

30

40

50

のホログラフィック画像のシーケンスを取得することを含む（例えば顕微鏡 106 を利用した観察により）（図 1 A、図 1 B、および図 2 参照）。

【0093】

外部力の適用と協働して行われる計測の場合には（物理的力適用方法）、物理的力をかけるのと同期してホログラフィック顕微鏡画像のシーケンスの統計的分析を行うことで、表面 108 a における相互作用特性または細胞 / 粒子 108 の分散の拡散 / 粘弾性特性の性質が得られる。

【0094】

特に、コンピュータ 113 が行う撮像デバイス 112 が取得する細胞 / 粒子 108 の画像の分析では、画像が、細胞 / 粒子 108 が回折するコンポーネントとともに、回折されないコンポーネントを含む、とされた。これら 2 つのコンポーネントが撮像面で干渉しあって、サンプル 107 を表す干渉パターンが生じる。空間的にコヒーレントな、コヒーレントな照明を利用すると、焦点がかなりずれていても、サンプル 107 の撮像が可能となる。ピンぼのけ量を調節することで、干渉パターンを調節して、計測の信号対雑音比を向上させることができる。

【0095】

後述する計測例では、焦点距離は、低強度の底が中央（図 2 参照）にあり、これをリング状の明るい強度が囲うような干渉パターンとなるように調節された。さらなる同心円状の、より変調深さの浅い明暗のリングも、中央から遠くに存在している。低い中央強度の周りを高い周辺強度がリング状に覆っている干渉パターンを形成すると、高い信号対雑音比が得られる。

【0096】

本実施形態では、運動しないビーズまたは細胞（つまり粒子）108 のホログラム画素数の変動は、環境的な振動、陽子の統計データ、およびマグニチュードが比較的小さい検知器の雑音により強い影響を受ける。運動しない粒子または細胞 108（物理的力または拡散により）の干渉パターンは、粒子または細胞 108 が運動するとシフトする。あるフレームの細胞または粒子 108 が前のフレームに対して運動すると、第 1 のフレームの中央の底にある低いカウントの画素が、後続するフレームの隣接する明るいリングからの画素強度に晒されることがある。この画素の強度が、低いカウント値から高いカウント値へと大きく変動する状態が繰り返されると、平均画素変動値が高くなる（図 2 のグラフを参照）。この変動を正規化する（つまり、画素値の標準偏差を、平均でピクセルサイズに除算する）ことで、平均はこの領域で最低の値であるので、粒子 / 細胞 108 ホログラムの中央の強度の変動を最も高く重み付けすることができるようになる。

【0097】

まとめると、本実施形態は、粒子ごとの強度変動値を生成し、これにより、物理的力適用または拡散により運動可能な粒子 108 が、高い強度の変動を示し、表面 109 に結合しているものは、低い強度の変動を示すことになる。この強度の変動計測値は、粒子結合に基づくテストにおいて粒子の結合を判断するために利用可能であり、計測が可能である。

【0098】

他の多くの種類の結合試験とは異なり、結合が運動度の計測に基づいて決定され、未結合の粒子 108 がこの点において結合されているものから明らかに区別可能なので、未結合の粒子 108 を除去するために表面 109 を洗浄する必要がない。

【0099】

特に、図 2 は、ホログラムが分散によりシフトする様子を示し、これにより画素の強度を大幅に変動させる可能性を示す。ホログラムの中央の低い強度の部分の画素については、ホログラムに周辺の明るい縁部が見られる場合、ホログラムの位置のシフトにより大きな変動が生じる。図における画素 k は、ホログラムが位置 x_1 にある場合にホログラムの中央最小値を検知する。位置 x_2 へとホログラムがシフトすると、画素 k は、周辺のリングのピーク強度となる。ホログラムが元の位置 x_1 に戻ると、画素 k が低いカウントのレ

10

20

30

40

50

ートに再度戻る。全体に対する効果は、最小カウントの値の中央領域が、ホログラムの動きによって大きな画素強度変動を経ることになり、これにより、明るい周辺の縁部が、周期的に高い画素強度に周期的に貢献することになる。

【0100】

上述したように、コヒーレントなレーザ光源100は、短いコヒーレンス長($< 400 \mu\text{m}$)を有し、 660 nm で動作する。短いコヒーレンス長とすることで、干渉の縁部の形成が妨げられるが、これは、光の反射が、送信ビームとコヒーレントに重畳することにより起因していると思われる。既に記載したように、レーザを利用しない光源(例えば、スーパーミネッセントダイオード)を含む他の波長および他のタイプの光源、および従来の光源(LED、白熱灯、アークランプ等)を利用することもできる。粒子108を、十分にコントラストを持たせて撮像することができるのであれば、任意の光源100の利用が可能である。

10

【0101】

本実施形態では、CCD112を利用して、サンプル107の拡大画像を取得する。CCD112の露光時間(あるいは、パルスレーザをストロブ光源として利用する場合には、パルスレーザ100のパルス期間)は、拡散時間定数より実質的に短くすべきである。こうすることで、露光時間中に細胞/粒子108が実質的に拡散しないようにして、画像がぶれないようにする。

【0102】

インパルス応答計測のためには、適切なインパルス生成装置117を顕微鏡106に取り付けて、その応答を計測するために画像取得と同期させる力を細胞/粒子108にかけることができる。

20

【0103】

図33Aは、外部力を利用せずに計測した(つまり熱平衡計測)、2つの異なるビーズ分散のサンプル($4.8 \mu\text{m}$ シリカ)のビーズ強度変動(NSD、正規化標準偏差値)であり、1つのサンプルを表面に結合させ(濃い断面ハッチングを施されたヒストグラム)、他のサンプルが表面に結合されていない(まばらな斜交いの線のパターンのヒストグラム)。ビーズは、 0.9% の生理的食塩溶液で希釈することで、ガラスカバースリップの表面に結合され、ビーズは、脱イオン化水で希釈したカバースリップ上を自由に拡散する。未結合のビーズは、これら実験条件下で結合されたものと明確に区別できる(つまり、分布が最小限しか重なっていない)。

30

【0104】

図33Bは、段階を追って運動させた後に計測された同じサンプルを示す。分析されたヒストグラムのスタックにおける各画像は、サンプルを一つの軸上で $25 \mu\text{m}$ 行きつ戻りつさせる、圧電による段階的運動の後にとられたものである。システム内の物理的通気(perturbation)は、NSD計測法で力を与えずに計測された値と比べて、結合しているビーズの固体群の運動度に影響を持たない。しかし、未結合のビーズは、図33Aの力を加えない例と比べて、段階的運動によりビーズの運動度が上がった結果、より高いNSDを示している。従って物理力の利用によって、図33Bの結合されているビーズのヒストグラムと、結合されていないビーズのヒストグラムの間が大きくかけ離れていることから分かるように、結合されている固体群および結合されていない固体群の間の課題を解決することができる。結合されているビーズの固体群および結合されていないビーズの固体群の間の解像度は、力を加えない場合も良好であった(図33Aの熱平衡計測)が、物理的力を加えることにより、ビーズまたは細胞の運動度計測の際に大きな解像性能が得られるようなサンプルおよび状況もあると思われる。

40

【0105】

ロボットサンプルコンテナの走査、サンプルのポンピングまたはマイクロピペットによる供給およびその温度制御、サンプル107の異なる領域の合焦およびサンプリング、力を同期させてかけること、画像取得およびデータ分析までの試験の全ての側面は、自動化してコンピュータにより制御することで(コンピュータ113を利用して)、人間の介入

50

なしに計測して結果を得ることができる。

【0106】

< 熱平衡計測方法 >

別の実施形態では、ホログラフィック画像のシーケンスの統計学的特徴の分析を受動プローブ法により行うことで、サンプル107の熱平衡における細胞/粒子108の範囲の計測値を得ることができる。本実施形態では、サンプル107を、熱平衡における細胞/粒子108の動きの顕微鏡における変動を図1Aの修正装置を利用して分析することで計測する、という受動プローブ法を利用した。別個の実体であり外部からの、物理プローブ技術との関連で熱平衡で実行される受動プローブ法は、ビーズ/細胞108を取り囲む流体分子の熱エネルギーを利用することで、自由なビーズ/細胞108をブラウン運動させることができる。ブラウン運動の範囲は、ここでは、サンプルに関する結論を導き出すための技術を用いて計測することができる。

10

【0107】

受動プローブ法では、上述した物理力をかける方法同様に、本実施形態の計測方法に、視野範囲内の細胞/粒子108のホログラフィック画像のシーケンスを取得することが含まれる（例えば顕微鏡106により観察される、図2参照）。

【0108】

具体的に、熱平衡法では、マイクロ流体（またはマイクロタイタープレート）に基づく装置116を利用することができ、この装置により、粒子/細胞108のフローがサンプルチャンバ118に入り、サンプルチャンバ118の底部の透光性の撮像面119に留まっている十分に希釈された粒子/細胞108の分散が、レーザ光源100により照明される。マイクロ流体（またはマイクロタイタープレート）装置116は、複数の解決法を可能とし、分散物を混合して、定温放置させ、適切なチャンバ118内で計測する。マイクロ流体（マイクロパイプタイタープレート）装置116は、さらに、当業者に公知な通り、必要なポンピング（ピペット操作）機能、温度制御機能を含み、さらに遠心分離力適用機能を含む場合もある。

20

【0109】

図4は、スクリーンショットAは2 μ mのシリカビーズのホログラフィック画像を示している。このホログラフィック画像のシーケンスは、撮像デバイス112により取得され、コンピュータ113により統計学的に分析される。

30

【0110】

図5Aは、スタックにおける各画素位置を分析して、その標準偏差と平均画素値とを判断する方法を示す。次いで、ホログラフィック変動画像をコンピュータ113により生成して、経時的な画素の標準偏差が与える各画素値を、その画素の平均で除算する。

【0111】

一実施形態では、一実施形態では、平均画素値、画素標準偏差、画素分散、上位画素変動、画素時間相関関数、画素空間相関関数、画素時空相関関数、背景画素値、背景画素標準偏差、背景画素分散、上位背景画素変動、背景画素時間相関関数、背景空間相関関数、背景画素時空相関関数等の画素統計計測値の幾つかの組み合わせを用いて、統計画像を生成する。画素統計計測値は、一連の画像にピクセルサイズに生成され、粒子の近隣部で平均化されたものであってよい。画素統計計測値は、粒子の近隣部で計算されてから、その一連の画像内の他の画像内の、対応する近隣部で計算されてもよい。粒子の近隣マスクは、一連の画像内の1つのフレームを利用して生成することもできる。一連の画像の複数のフレームを利用して、粒子の近隣マスクを生成することもできる。画素統計計測値は、一連の画像のサブセットで計算することもできる。画素統計計測値は、一連の画像の連続するサブセットについて計算することで、粒子ごとの時変統計計測値が生成される。粒子ごとの時変統計計測値は、時变的な実験の条件（たとえば物理的運動、振動、溶剤の条件、フローの条件、その他の環境が持つ効果）に関連付けることができる。粒子に基づく統計計測値の空間および時間の相関付けを実行することができる。粒子に基づく統計計測値の時変する空間および時間の相関付けを実行することもできる。粒子の統計的値の閾値は、

40

50

所望の表面親和性および商業的、診断的に重要な相互関連特性を持つ部分が選択されるよう、選択することができる。選択する部分の閾値は、ポジティブな結果が示される前に、所望の統計的有意性に基づいて計測される必要がある、部分最小レベルを示すように選択することができる。

【0112】

一実施形態では、粒子の位置を経時的に追跡して、粒子の位置の統計的計測値を生成することもでき（二乗平均の位置、正味の位置、等）、複数の粒子についてこれらの量の分布を図にすることもできる。粒子の位置の計測値および粒子の位置に基づく粒子の統計的量の閾値を利用して、対象粒子 - 表面親和性を有する部分を決定することもできる。粒子の運動の統計計測値は、粒子位置の二乗平均、粒子位置の平均、正味の粒子位置、粒子位置の上位統計値、またはこれら量のいずれか、または全ての組み合わせに基づいて決定されてよい。同様の粒子の運動に関する計測値も、制御上の目的から計測することができる（例えば背景相関性など）。

10

【0113】

図5Aに関して上述したホログラフィック画像のシーケンスまたはスタック（60枚の画像）から生成したホログラフィック変動画像を、図4のスクリーンショットBに示す。画像の明るい領域は、信号強度の変動の大きなサンプル面の領域に対応しており（粒子/細胞108が運動している領域に対応している）、暗い背景部分は、粒子/細胞108が存在する領域の変動がより低いことを示している。

20

【0114】

図5Aは、画像スタックの上の、各画素に対するピクセルワイズの平均によって、ピクセルワイズの標準偏差を除算することで得られるホログラフィック変動画像 $S(i, j)$ を生成するために、ホログラフィック画像の分析を示す。

【0115】

より詳しくは、変動画像 $S(i, j)$ が、画像のスタックの正規化標準偏差分布（つまり、画素ごとに標準偏差を平均で除算したもの）である。次いでこの画像を処理して、各細胞/粒子108について平均の正規化標準偏差分布を生成する。この分布、または、細胞/粒子108の正規化標準偏差（NSD）のヒストグラムにより、サンプル107の運動度に関する所望の情報、ひいては、粒子と表面との相互作用を示す。

30

【0116】

図1Aの装置を利用するとして示されている別の実施形態では、 $2\mu\text{m}$ のシリカビーズ108が水に分散されて、カバースリップ表面109に拡散されており、ホログラフィック変動画像（つまり、画像のシーケンスにおいて正規化標準偏差の画像）が図6のスクリーンショットAおよびBに示されている。データは、温度制御された顕微鏡ステージ114で取られたものである。

【0117】

特に図6のスクリーンショットAは、摂氏5度のサンプルのホログラフィック変動画像（正規化標準偏差画像）（60のフレームスタックから構築された）を示しており、図6のスクリーンショットBは、摂氏47度に平衡化されたサンプル107の脱イオン化水に分散されている $2\mu\text{m}$ のシリカビーズのホログラフィック変動画像を示している（60のフレームスタックから構築された）。各ホログラフィック変動画像は、約11秒間に取得された60枚の画像から生成された。

40

【0118】

低温で高い強度の領域（図6のA）は、高温で高い強度の領域（図6のB）と比べて、動きを拘束されていることが分かる。これは、高い強度の変動を生じさせる粒子の動きが、低温ではより拘束されることを示している。これは、粒子の平均二乗変位が、温度が低減するに連れて低減するという拡散理論からも予測可能な事象である。

【0119】

図7は、摂氏6.8度（下のヒストグラム）、摂氏28度（中間ヒストグラム）、摂氏46.3度（上のヒストグラム）で計測した水中の直径が $4.8\mu\text{m}$ のシリカビーズを水

50

中に分散させてガラスのカバースリップ上に置いたものの（毎秒5フレームで40フレーム取得した）正規化標準偏差を示す3つのヒストグラムである。最低温度（摂氏6.8度）で計測された分布は、正規化標準偏差（NSD）の最低値を有する。これらヒストグラムの主要なピークは、自由な拡散ピーズに対応しており、NSDの下位の値（5 - 10%）における最小ピークは、表面に留まった、または部分的に留まった、ずっと小さいピーズの部分を表している。

【0120】

主要なピークは、温度が上昇すると、NSDのより高い値へとシフトする。より高い温度におけるピーズは、より高い振幅の熱が誘導する運動を受け、より大きな画素の強度の変動を引き起こし、これが、より高いピーズのNSD値として検知される。

10

【0121】

特に、自由な拡散においては、平均二乗変位値が、温度の一次関数となる。

【数1】

$$\langle \Delta x^2 \rangle = 4 D t, D = k_B T / (6\pi\eta r)$$

Dは、分散係数（または有効分散係数）であり、tは、粒子の位置の計測の時間間隔であり、 k_B は、ボルツマン係数であり、Tは、ケルビン温度であり、 η は粘度（または有効粘度）であり、球形拡散器（spherical diffuser）の半径である。温度が上昇すると、水の粘度が低下して、温度の上昇に伴って平均二乗変位の値が上昇する、というさらなる温度への依存が生じる。図8は、様々な温度で計測した、ガラスカバースリップにおいて自由に拡散する4.8 μm のピーズの正規化標準偏差分布の平均および標準偏差のグラフである（白い四角）。x軸の上部が、計測を行った温度を反映しており、x軸の下部は、ピーズの直径、温度（温度制御されたサンプルステージ上に配置される場合）、水の温度に依存する粘度、表面 - 粘度補正（ファクセンの法則）および時間間隔が所与の場合の、理論的に予想される平均二乗変位の平方根を表している。計測されたNSD値は、温度に対してプロットされ（軸の上部）、且つ、拡散公式（上述を参照）および表面 - 粘度の補正係数（ファクセンの法則）に基づいて計算された、対応する平方根の変位（軸の下部）に対してもプロットされている。

20

【0122】

図8の第2のプロット（黒い四角で示されている）は、シミュレーションによるピーズの運動の平均および標準偏差を示しており、平均がゼロであり、様々な異なる幅を有する（様々な平均二乗変位の平方根（square-rooted mean squared displacements）に対応して）ガウス分布が支配するステップサイズにより、ピーズのサブ画像をずらすことにより生成される。40個のこのようなずらされたサブ画像を生成して、単一のピーズの画像スタックをシミュレートした。このようなシミュレーションを一定のステップサイズの範囲（平均二乗変位の平方根）に250回行った。実験データ（40フレームの長さであった）に適用されたピーズの正規化された強度変動（正規化標準偏差：NSD）を計算するための同一のアルゴリズムを、次にシミュレーションされたデータに適用して、各ステップサイズでシミュレーションされたNSD値の分布を生成して、その平均および標準偏差をプロットした。

30

40

【0123】

計測値およびシミュレーション値の間の比較は、良好であり、正規化標準偏差が、ピーズの平均二乗変位の変化を温度の関数として定量計測する際の優秀な計測値の選択として間違っていないことを示し、粒子追跡アルゴリズムの代わりに利用可能であることが証明された。上述したように、計測されたピーズについての、僅かに大きな誤りのバー、および、正規化標準偏差値の平均が低いことは、大半が未結合の固体群のなか、少数しか結合ピーズがないことにより説明されうる（図7のヒストグラムにおける5 - 10% NSD間の小さなピークを参照）。

【0124】

正規化標準偏差を、粒子の運動度を定量化するための計測値として利用することにまつ

50

わる利点は幾つかある。第 1 に、粒子 108 の集まりのダイナミクスを反映させるために、スタックにおけるピクセルサイズの統計データの空間マップを表す画像が 1 つしか必要ではない点である。画素の変動に関するこの統計画像は、さらに、これを計算する際の計算上の負荷が比較的小さいことから、リアルタイムに生成することができる。さらに、この統計画像を計算する際に、細胞 / 粒子の形状の想定が不要である点も挙げられる。

【0125】

第 2 に、粒子の位置を、シーケンスのうちの 1 枚のフレームのみの利用により構築することができる点も利点である。各粒子 108 に変動観測量 (fluctuation observables) を割り当てるべく、各粒子 108 の位置を判断するために、シーケンスの 1 枚のさらなる画像が必要となる。次に、粒子の近隣部を統計学的画素変動画像でマスクして、視野内の全ての粒子について粒子ごとの平均変動を生成する (図 5 B 参照)。粒子は、平均粒子内距離に比べて、短距離しか拡散 / 運動しないので、統計学上の画素変動画像から正規化標準偏差分布を生成するべく、粒子の近隣部を構築するには、1 枚のフレームで十分である。この方法により、シーケンス内の各画像に通常適用可能なオブジェクト認識のための計算上の要件をかなり軽減することができるようになる。

10

【0126】

第 3 に、正規化標準偏差計測方法によって、低い倍率への倍率変更が容易になり、視野ごとに計測される粒子の数を多くすることができる。これは、粒子結合確率が低いことが想定される場合には、一度に計測される粒子の数を増やすことができるので、計測値についての結合検知統計を向上させることができ、有用である。

20

【0127】

コヒーレントな光源 100 を利用して粒子 108 のサンプル 107 を照明することで、サンプル 107 の計測にさらなる利点が生じる。従来の照明法において低いコントラストでオブジェクトを拡散すると、計測における背景画像の雑音の効果が大きくなることによりロバストな検知および位置追跡が難しくなるが、コヒーレントな光源 100 を画像に利用すると、焦点の変位量が調節されて、より高いコントラストの画像を生成することができるようになる。加えて、コヒーレントな光源 100 を利用すると、焦点面の位置を、数値的に決定することができるようになり (例えばホログラフィック合焦)、従来利用されてきた時間のかかる機械的な焦点操作法を行う必要がなくなる。これは、コヒーレントな光源 100 で照明することで、焦点のずれたサンプル 107 が、一定の距離の範囲に数値的に伝播することができる回折パターンを生成することができるようになり、必要な焦点位置を発見することができるからである。

30

【0128】

< 表面結合検知計測 >

本発明の別の実施形態では、上述した器具およびデータ分析技術を、表面 109 に結合される粒子 108 の検知に利用する (図 9 参照)。この実施形態では、図 1 A の装置も利用することができる。

【0129】

例えば、図 9 は、一種類の抗原 (A -) または別の種類の抗原 (B -) で覆われたビーズ 108 の処理された表面 109 上におけるサンプル 107 のコンポーネントを示し、試験の目標は、抗体で覆われた表面との相互作用に基づき、各種類のビーズを選択的に検知することである。

40

【0130】

図 9 は、スライド (1) は、抗体で覆われた表面 109 に配置される各種類の粒子 108 を示している。A 抗原で覆われた粒子 108 は、具体的には、カバースリップの表面 109 を覆う静止している特異抗体 (specific antibodies) (A 抗体) に結合されて、粒子の動きが規制される。スライド (2) では、各種類の粒子 108 によって異なる行動が表されており、特異結合されていない B 抗原を塗布された粒子は、表面 109 上を溶剤内で自由に拡散しており、A 型の粒子の動きは、表面の抗体との特異結合によってかなり拘束されていることが分かる。

50

【 0 1 3 1 】

同様の種類の結果は、細胞 1 0 8 でも生じうる。以下は、赤血球細胞に行われた、図 1 A、図 1 B、および図 3 A に示す装置 1 0 を利用して、カバースリップ表面 1 0 9 上を覆っている特異抗体との相互作用に基づいて、その表面抗原を特定するための実験を説明している。

【 0 1 3 2 】

例えば、赤血球細胞は、A B O 血液型で特徴付けることができる。ある人が血液型 A と判定されると、その人の赤血球細胞 (R B C) がその表面に A 型の抗原を有している、という意味であり、B 型の人、表面に B 型の抗原を有しており、O 型の人、何の抗原も有しておらず、A B 型の人、表面に両方の抗原を有している、ということである。

10

【 0 1 3 3 】

A および B 型の抗原に加えて、赤血球細胞は、R h D 抗原の存否によっても試験することができ、この判定法では、抗原が存在すると「+」または「ポジティブ」と示され、高くない場合には「-」または「ネガティブ」として示される。試験は、図 1 A の装置を利用して表面 1 0 9 上の 3 つの領域での親の赤血球細胞の相互作用を撮像して行われた。表面 1 0 9 は、表面 1 0 9 に特異抗体を結合させるよう化学的処置したカバースリップ 1 0 9 を含む。表面 1 0 9 には 3 つの領域が含まれており、1 つの領域には、表面 1 0 9 に抗 A 抗体を結合させ、1 つの領域には、抗 B を結合させ、1 つの領域には抗 R h D を結合させた。

【 0 1 3 4 】

20

患者の血液を希釈してから、底面 1 1 9 が静止抗体パッチで処理されたカバースリップ 1 1 9 であるサンプルチャンバ 1 1 8 に投入した。赤血球細胞は、底面 1 1 9 に落ちてパッチの特異抗体と相互作用した。パッチの抗体に対応する特異抗原を表面 1 1 9 に持つ細胞 1 0 8 が、表面 1 1 9 に特異結合した。静止抗体に対応する特異抗原がない細胞は、表面 1 1 9 上を自由に拡散した。このタイプのテスト (つまり、赤血球細胞膜の表面の抗原の型判断) は、血液型の順方向の型判断 (forward typing of the blood sample) に類似している (血液のプラズマ内の表面の抗原に特異な抗体の存在を計測する相補的な型判断技術である逆方向の型判断 (reverse typing) に対する概念である)。

【 0 1 3 5 】

上述したホログラフィック変動方法は、a) 赤血球細胞が特異パッチに特に引っかかっており、そのパッチに存在する抗体へのポジティブな反応を示す、または、b) 自由に拡散してで、ネガティブな反応を示している、特異反応がないとみなす目的で利用される。この判断は、細胞のホログラフィック画素変動の正規化標準偏差の計測ヒストグラムに基づいて、行われる。視野内で特異結合されている細胞 1 0 8 は、正規化標準偏差計測値の、比較的低い平均、且つ、狭い分布として反映される。自由な細胞は、N S D (正規化標準偏差) の平均が実質的に高く、より幅の広い分布を示す。

30

【 0 1 3 6 】

図 1 0 A は、抗 A 塗布表面の上で計測された 2 つの異なるサンプルの正規化標準偏差ヒストグラムのグラフである。ドナーからの、静止している抗 A 抗体を有する表面上の A 抗原に対してポジティブな赤血球細胞は、黒色 (A 型) で示されており、別のドナーからの、同様に抗 A で覆われた表面の A 抗原に対してネガティブな R B C は、ハッチングされたパターン (B 型のドナー、つまり A 抗原が細胞に存在していない) で示されている。A 型の細胞 (黒色) は、特に表面に留まっており、細胞の正規化標準偏差が低い値を有していることから分かるように、その動きの範囲がかなり制限されている。他方で、B 型の細胞 (ハッチングされているパターン) は、細胞の画素値の変動が大きく、正規化標準偏差値が高いことから分かるように、表面に結合されていない。

40

【 0 1 3 7 】

B 型の血液細胞は、正規化標準偏差値のマグニチュードが大きく、幅広い分布を有していることから分かるように、抗 A 表面に特異結合されていない。A 型の血液は、正規化標準分布値の分布が狭くマグニチュードも小さいことから分かるように、特異結合されて

50

いる。

【0138】

結合されている細胞と未結合の細胞との間を明確に区別するために、中間レベルの結合も検知してもよい。図10Bは、図10Aの計測の後一時間計測した抗A被膜表面上の2つの異なるサンプル107の正規化標準偏差ヒストグラムをプロットしたものである。

【0139】

図10BのA型の分布(Aポジティブ)は、図10Aの分布に類似しているが、図10BのB型の分布(Aネガティブ)は、第2のピークを特徴としており、これは、中間の正規化標準偏差値を有する、より多い細胞部分により示されており、おそらく時間に依存した非特異細胞表面の相互作用によって、表面に対する結合の部分的なまたは中間的な状態を示していると思われる。

10

【0140】

図10Bでは、B型のドナー細胞(ハッチングされたパターン)が、特異結合されておらず(抗Aに対してネガティブ)、幅広いヒストグラムを有しており、これは、拡散行動を表している。しかし、7%までのNSD(正規化標準偏差)ピークを有するサブ固体群も、1時間経過後には見られる。これら細胞は、時間とともに優位性の増していく表面との非特異性の相互作用によって、部分的に結合された部分を表している可能性がある。このサブ固体群は、他の未結合の細胞に比べるとあまり動かない特徴を示しているものの、それでも、特異結合している固体群(つまり抗原Aに対してポジティブな固体群)から区別可能であるので、この技術を利用すると、非特異結合から特異結合を区別することができる。

20

【0141】

「中間」レベルの結合を有する細胞は、特異結合細胞から区別可能であることが明らかであり、この技術を、サブ固体群の細胞が基板と別々の相互作用をすることにまつわる課題を解決するものとして推奨することができる。

【0142】

同様のデータは、抗Bで覆われたパッチおよび表面に付着して静止している抗RhDとドナー細胞とを相互作用させて、収集することができる。このようにして各ドナーの赤血球細胞について、A、B、および/またはRhD抗原の存否を調べて、順方向の血液型判断テスト結果を出した。

30

【0143】

図11のスライド1は、2つの種類の粒子を表しており、A型の粒子はA型の抗原を塗布されており、B型の粒子はB型の抗原を塗布されている。この構成では、表面に抗原Aが塗布されている。表面には、同時にA抗原を塗布した粒子にもA抗原を塗布した表面にも結合可能なA抗体(IgM)が存在するA型粒子が結合可能であり、これにより粒子が静止する。このテストは、患者の血液プラズマ(抗体を含む)を混合して、既に分かっている表面の抗原とともに、分かっている抗原の種類の表面で定温放置することを含む。このテストの目標は、プラズマ内に存在する抗体の種類を、各種の表面での各種の制御粒子の行動を計測することで判断することである。

【0144】

40

溶剤に存在する抗体の種類は、適切な抗原を塗布された表面の粒子の運動度を計測することで判断することができる。既に分かっている抗体とは異なり、粒子の種類は、適切な抗原を塗布された表面でのその運動度を計測することで判断することができる。溶剤内のA抗体は、A抗原を塗布された表面に結合することができ、同時にA抗原を塗布された粒子にも結合することができる。図11のスライド2は、各種の粒子で異なる行動を表しており、特異結合されていないB抗原を塗布された粒子が、溶剤内で表面上を自由に拡散している様子を示しており、A種類の粒子の動きが、表面に特異結合されている抗体との特異結合によってかなり拘束されている様子を示している。従って、図11のスライド2は、粒子の運動度を計測することで、未結合のB型の粒子を、結合されているA型の粒子から見分けることができることを示している。

50

【 0 1 4 5 】

図 1 2 A は、それぞれの時点でとられた赤血球細胞のサンプルの NSD ヒストグラムシリーズを示す。サンプルは、ガラスのカバースリップ表面に B 型抗原がある表面において、抗 A の IgM 抗原 (1 0 0 n M) が高濃度で拡散している合成プラズマ内の A 型赤血球細胞から構成されている。この計測法の構成は、既知の種類の表面に既知の種類の血液細胞が結合する度合いを検知するので、主体のプラズマに対して、自然に生じた抗体の存否を調べる、逆方向の血液型判断法に類似している。このケースにおいて結合が存在していることは、複数の細胞を表面に同時に結合してこれらを静止することができる抗体の存在を示唆する。本質的に、順方向の型判断法は、赤血球細胞の表面の特異抗原の存在を検知することに関しており、逆方向の型判断法は、血液プラズマにおける特異抗体の存在を検知することに関している。試験は、ビーズ / 細胞ホログラムシーケンスにおける変動の度合いに反映されうる、血液群の抗体の存否の検知に基づいて、逆血液型判断を行うよう設計されていてよい。

10

【 0 1 4 6 】

図 1 2 A の一番下のヒストグラムは、1 0 0 n M の抗 A を有する合成プラズマに A 型の細胞が分散されたものを、B 抗原を有する表面上に導入してから 1 3 分間後に計測したものである。各ヒストグラムは、毎秒 5 フレームのレートで取得された 4 0 枚のフレームシーケンスの分析 (細胞 NSD 計算) により生成されたものである。細胞は拡散することができるが、これは NSD の平均が高いことから分かる。細胞は、後の時間になっても同様の拡散行動を示しているが、これは、2 1、2 9、3 7 および 4 5 分の時間区切りにおけるヒストグラムが同様であることから分かるだろう。

20

【 0 1 4 7 】

図 1 2 B は、図 1 2 A と類似した条件下でのヒストグラムのタイムシリーズを示すが、図 1 2 A との違いは、表面に A 型抗原がある点である (B 型抗原の表面を計測するのではなく)。抗 A (1 0 0 n M) という高い濃度を選択して、A 細胞を確実に A 型の表面に結合させた (視覚的にも確かめられる通りである)。第 1 の計測ヒストグラム (一番下のヒストグラム) は、細胞が表面に置かれてから 1 4 分間とられたものであり、合成プラズマの抗体濃度が高いということを条件として予期されるように、細胞が静止していることを示している (低い平均 NSD および狭い幅)。細胞は、後の時間になっても同様の拡散行動を示しているが、これは、2 2、3 0、3 8 および 4 6 分の時間区切りにおけるヒストグラムが同様であることから分かるだろう。図 1 2 A および図 1 2 B のヒストグラムを比較することで、細胞が結合されているか否かを判断するための NSD の閾値を選択することができる。これら条件下における 7 % の NSD の閾値は、図 1 2 A の未結合の固体群において大半の細胞がこの閾値を上回り、図 1 2 B の結合している固体群の大半の細胞がこの閾値を下回っていることから、適切であることがわかる。

30

【 0 1 4 8 】

図 1 3 A および図 1 3 B は、図 1 2 A および図 1 2 B の計測条件に類似しているが、抗体の濃度がずっと低い点が異なっている。1 n M という低量の抗 A を合成プラズマとして利用した。図 1 3 A において、B 型の表面の上に 1 n M の抗 A が分散している合成プラズマにおける A 型細胞は、サンプルを表面に置いてから 1 9 分経過したところで最初に計測した結果、殆どが未結合であった。2 5、3 1、3 7、4 3、4 9、および 5 5 分後においての後の計測も、同様の行動を示している。図 1 3 B では、1 n M の抗 A を含む合成プラズマ内の A 型細胞を、A 型の抗原を有する表面に置いてから計測した。1 8 分経過後、低い NSD 値で僅かに高い細胞の部分が、図 1 3 A で計測された制御細胞セット (未結合の細胞) から発見されている。時間が経つと、低い NSD の部分が大きくなることは、ヒストグラムの左側へシフトが進んでいることから分かる。抗 A の低い 1 n M の濃度は、細胞と表面との間の結合が行われる速度を低下させるが、これは、1 0 0 n M の抗 A を利用したとき (図 1 2 B) の細胞と表面との間の結合相互作用がずっと速いことと比べても明らかであり、実際には全ての細胞が 1 4 分間の間に結合されたことが分かっている。

40

【 0 1 4 9 】

50

別の実施形態では、結合試験を特定のサンプルに連続実行することができ、粒子付着動力学曲線 (particle adhesion kinetics curves) を生成することができる。この試験によって、ある時間における結合の程度に関する情報が生成されるだけでなく、結合の変化率に関する情報も生成され、結合動力学をモデル化することができる。図 14 は、図 13 A および図 13 B で観察されるものと同じサンプルの細胞接着動力学を示す。各時点 (サンプルは $t = 0$ で準備された) で、NSD 値が閾値 7 % NSD を下回る細胞の割合を各表面で計算して、各表面に結合されている細胞の割合を推定した。B 表面の上の A 細胞について、無視できる結合が検知された ($\sim 0.5\%$ の範囲で) が、この数字は経時的に僅かに上昇した (つまり、時間に依存した細胞と表面との非特異な相互作用関係が存在しており、これにより、経時的に結合割合が増加する)。他方で、A 表面の上の A 細胞は、第 1 の計測時点ではこれより実質的に高い結合を示し、結合割合はその後、約 35 分の間に実質的に増えた ($\sim 1\%$ から、 $\sim 5\%$ へと増えた)。

10

【0150】

細胞ごとの運動度を計測すると、結合した細胞の割合を計測することができる。1つの信号を生成するために細胞のかなりの割合を反応させる必要のある多くのバルク計測法とは対照的に、本技術は、1つの細胞の感度が高く、細胞の一部のみが結合しているときにもポジティブの反応を計測することが可能である。

【0151】

< 拡散モデル化 (校正) およびシミュレーション結果 >

粒子の正規化標準偏差計測値と、その基礎となる粒子の位置の計測との間には関連性がある。粒子の動きをシミュレーションして、実験で計測された NSD 分布をモデル化した。

20

【0152】

図 15 のスライド A は、直径が $4.8 \mu\text{m}$ のシリカビーズの画像を示している。この拡散ビーズの 40 個のフレームシーケンスを (毎秒 5 フレームずつ取得した)、粒子追跡アルゴリズムを利用して分析して、図 15 のスライド B に示すような x および y という計測された質量中心位置にシフトしたシーケンスが生じた。 x 方向および y 方向の標準偏差は、 $0.17 \mu\text{m}$ と計測された (同等のサイズのビーズの水溶液における拡散論理により、ファクセンの法則における表面 - 粘度の補正係数を含めて計算された、理論的に予測される値である $0.16 \mu\text{m}$ と比較されたい)。

30

【0153】

図 15 で粒子を追跡して分析した同一のフレームシーケンスを、正規化標準偏差法を用い、画素変動を分析することで、再度分析することができる。

【0154】

図 16 のスライド A は、図 15 のスライド B に示す粒子追跡分析で利用された、同様に計測された 40 個のフレームシーケンスから計算された NSD の画像を示しており、これにより、ビーズ領域における NSD の平均が 23.6% であった。

【0155】

図 15 のプロット B からの粒子追跡結果を利用して幅を実験的に計測したガウス分布により位置変位を制御しつつ、シーケンス内の 1 つのフレームのビーズの画像を利用するシミュレーションを、40 個の位置を変位させたビーズの画像のシーケンスを生成することで実行した。250 個のこれらシミュレーションのビーズシーケンスの集合体を生成して、250 個の NSD 画像を計算した (つまり各シーケンスにつき 1 つの NSD 画像を計算した)。この集合体の各構成物についてのビーズ領域で平均化した NSD 値を図 16 のプロット B に示し、ここでは平均が 23.7% NSD であり、標準偏差は 2.1% NSD であり、実験的に計測した NSD と良好に調和していることが示されている (図 16 のスライド A)。

40

【0156】

一連のシミュレーションを行って、NSD 結果を、様々なステップサイズの粒子の動きに関連付けることができる (幅の変化するガウス分布)。図 17 に、二乗平均平方根変位

50

置に、計測されたビーズNSD分布の平均を関連付ける検量線を示す（塗りつぶされた四角の曲線）。曲線は、フレームごとのビーズのシフトを、変位の平均二乗の範囲を有するビーズの動きに対応している、一定の範囲の幅を有するガウス分布でシミュレーションすることで生成される。曲線の各点は、250個のシミュレーションされたビーズのシーケンスの集合体であり、平均（黒塗りの四角）および標準偏差（白い四角）をプロットしたNSD分布である。図から分かるように、この曲線は、0.1 μm 未満の平方根平均二乗変位については線形となっている（図17では「std dev」として示されている）。これより大きい変位量については（0.3 μm から0.4 μm ）、NSDの値が横ばいになり、その大きさが低減し始める。これは、40個のフレームの間、その近隣の縁部を越えるビーズに起因しており、近隣部に位置する変動も低下する。

10

【0157】

図18は、図17にプロットした検量線（黒塗りの四角）、および、4.8 μm の直径のシリカビーズの2つの他の画像から生成された2つの他の検量線（丸および三角で示す）を示している。各画像は、同一の範囲の分布を利用して配置されているが、曲線同士はかなり異なり、ビーズの画像の強度分布の差が、差を生じさせている原因であることが分かる。塗られていない印は、各ビーズの40個のフレームシーケンスに対する実験的に計測された平均NSD値を示す。実験的結果は、シミュレーション結果を追従するものとなっている。

【0158】

図19は、図18のビーズとともに、量で指標した（quantity termed）コントラスト補正係数を示す。この係数は、各ビーズの近隣の画素強度の標準偏差を計算して（各ビーズを取り囲む矩形内を参照）、これを同じ領域の画素強度の平均で除算する（つまり、正規化された空間標準偏差）ことで得られる。コントラストの高い画像ほど、コントラスト補正係数が高い傾向がある。高いコントラスト補正係数の拡散ビーズは、低いコントラスト補正係数の同様の拡散ビーズよりも大きな画素変動を生成して、計測されるNSD値が比較的高くなる。この画像アーチファクトを補正するために、各ビーズの曲線を、ビーズ1のコントラスト補正係数に対してスケールした。再スケールにより、図18の3つの曲線が、ビーズ1の曲線へと、近似的に崩壊（collapse）した。塗られていないシンボルは、同様に再スケールされた、実験的に計測した平均NSD値を再スケールしたものを示す。これらも、より締まった分布になっている。NSDパラメータは、ビーズ/細胞の動力学を反映するものであり、コントラストの反映は意図していないので、コントラストに依存する貢献を画素変動の大きさ（コントラスト補正係数）へと低減することで、正規化標準偏差（NSD）を、動的に観察可能な形へと向上することができる。

20

30

【0159】

コントラスト補正はまた、処理済みの表面の上に分散する細胞の固体群に適用することもできる。図20のプロットAは、抗BがA抗原を有する表面上に分散された合成ブラズマのB型の赤血球細胞のNSDヒストグラムである。B細胞に付着する抗B抗体は、表面上のA光源には結合されないため、自由に拡散する。図20のグラフBは、図20で計測した各赤血球細胞のNSD値を、その正規化空間標準偏差に関連付ける分散プロットを示す。適合が示すポジティブな相関性は、動力学に関わらず、低い正規化空間標準偏差により、低いNSD値が生じうることを示している。細胞/ビーズの動力学は基本的には正規化された空間標準偏差から独立したものであるため、動的観測量（NSD）は、一次曲線（linear fit）を利用してコントラスト補正されたデータを生成することで、正規化された空間標準偏差に対する依存性に対する補正を行うことができる。

40

【0160】

図21のプロットAは、抗BがB抗原を有する表面上に分散された合成ブラズマのB型の赤血球細胞のNSDヒストグラムである。抗B抗体は、赤血球細胞のB抗原および表面のB抗原に付着して、細胞を動かなくさせる。その結果生じる強度変動が、A抗原パッチ（図20のプロットA）の細胞に比べて顕著に低減する（図21のプロットAに示す低いNSD計測値が示すように）。図21のプロットBは、図21で計測した各赤血球細胞の

50

NSD 値を、正規化された空間標準偏差に関連付けた散布図である。図 20 のプロット B からは、ポジティブな相関性がみてとれる。一次曲線を利用することで、正規化された空間標準偏差値に対する NSD の値の偽の依存性を補正することができる。

【0161】

図 22 のプロット A および B は、結合されていない（図 20 のプロット A）、および、結合されている（図 21 のプロット A）、補正された、および、補正されていないヒストグラムを示し、この補正は、線の補正（図 20 のプロット B および図 21 のプロット B）により行うことで、NSD の正規化空間標準偏差に対する依存をなくした。この補正は、ヒストグラムの全体の形状を実質的に変更はしていない。これのもつ最も重要な効果は、未結合の NSD 分布の末尾の減衰に対するものである。閾値を NSD 値に適用することで、細胞 / ビーズが「結合」しているか（「結合」部分 = NSD ヒストグラムにおける細胞部分 < 閾値、「未結合」部分 = NSD ヒストグラムの細胞部分 > 閾値）を判断することができる。補正された NSD 分布の末尾の減衰は、末尾領域の閾値を利用するときに、「結合」されている細胞の部分が小さいことを示し、所謂未結合の固体群の「非特異な結合（non-specifically bound）」の割合を減らすことができる。補正のこの特徴は、テストの「非特異な背景部分」を低減させることに等しい。アーチファクトを最小限にする別の選択肢である、NSD に対するコントラストの貢献を利用する方法では、許容可能な空間標準偏差に対する最小および / または最大閾値を設定して、閾値内の粒子のみを分析することができる。

10

【0162】

図 23 は、図 22 のプロット A および図 22 のプロット B に示すヒストグラムの累積確率分布のプロットである（特定の NSD 値以下の NSD を持つ細胞の部分のプロットである）。補正された「未結合の」ヒストグラムは、未結合の割合 1.7% に比して、閾値 9（0.93%）以下の NSD 値を有する、かなり小さい割合の細胞を有する。これは、赤血球細胞と対照させる背景値を低下させる効果を持つ。

20

【0163】

＜異種の拡散動力学検知および特徴付け＞

均一の表面上を拡散する均一な大きさのビーズは、単一の拡散係数で表現可能な拡散を示す必要がある。図 24 は、水に 4.8 μm の直径のビーズを入れた NSD ヒストグラム（上のヒストグラム）と、ガウス分布を利用して、0.131 μm の二乗平均平方根の変位を生成するシミュレーションによる NSD ヒストグラム（下のヒストグラム）とを示す。シミュレーションしたヒストグラムは、計測されたヒストグラムの自由なビーズによく対応している（NSD > 7%）。計測されたビーズの（非特異結合により）留まる小さな割合は、比較には含めなかった（NSD < 7%）。

30

【0164】

0.4% の生理的食塩水の塩分濃度を上げることで、ビーズが表面に留まる場合がある。図 25 は、0.4% の生理的食塩水に 4.8 μm の直径のビーズを入れた NSD ヒストグラム（上のヒストグラム）と、ガウス分布を利用して、0.0064 μm の二乗平均平方根の変位を生成するシミュレーションによる NSD ヒストグラム（下のヒストグラム）とを示す。シミュレーションによる NSD ヒストグラムは、その動きがかなりの制約を受けていることを示すこれらビーズの計測ヒストグラムとよく対応している。つまり、結合されているように見えるビーズが実際は、より小さな振幅で拡散に似た運動をしている、ということである。従って、結合されているビーズは、その結合程度により特徴づけることができ、小さな二乗平均平方根の変位を有するビーズ（および結果として小さな NSD 値を有するビーズ）の結合の程度が高い。

40

【0165】

図 26 のプロット A、B、および C は、5 nM の抗 A が B 抗原を有する表面に分散された合成プラズマ内の A 型赤血球細胞の NSD ヒストグラムを示す（図 26 のプロット A（上のヒストグラム）は、2653 個の細胞が計測されている）。抗 A 抗体は、細胞を表面に架橋する結合（bond）を生成することができず、細胞を拡散させる。0.069 μm の

50

二乗平均平方根の変位をガウスのステップサイズ分布の幅に利用する場合、平均的なNSD値のモデル化に、単一の特徴的な二乗平均平方根の変位を有するRBC拡散のシミュレーションを利用できることがわかった。シミュレーションは、2650回行われて、NSD値の分布が得られた(図26のプロットB, 中間のヒストグラム)。計測ヒストグラムは、シミュレーションヒストグラムよりずっと幅が広く、これは、単一の平均平方根の変位が、表面上のRBCの動力学を特徴付けていないことを示している。図26のプロットCは、二乗平均平方根の変位値のガウス分布($0.069 \pm 0.02 \mu m$)を利用して、計測した細胞拡散を細胞の拡散率の異種の分布としてモデル化することで得られたシミュレーションによるNSD分布(2650回試された)を示す。二乗平均平方根の変位の同一の分布を生成する、自由に拡散する球の分布として拡散率をモデル化することで、半径が3倍を超える率で変化するガウス分布が生成され(平均の半径の1つの標準偏差の範囲内)、拡散動力学における顕著な異質性が示唆される。細胞の大きさ分布はずっと狭いので、この結果は、表面における細胞の相互作用のポテンシャルの異質性を生じさせる、表面および/または細胞の異質性に起因した、表面と細胞との異質な相互作用であることを示している。このように、本発明によって、異質および同質な拡散動力学の検知ができるようになり、表面条件がわかっている場合、細胞の特性の分布の診断として利用することができるようになる。特に、このような計測および分析により、表面が分かっている場合に、研究または診断目的で、細胞(粒子)の特性(例えば、表面結合密度、親和性など)の異質性に関する情報を得ることができるようになる。例えば、細胞の固体群は、一定の発現レベルを有する、一定の範囲の表面たんぱく質を現すことができる。一定の密度の表面たんぱく質を発現する細胞の割合は、診断対象である。より高い表面たんぱく質の濃度を表す細胞は、より低い表面たんぱく質濃度を有する細胞よりも相補的な表面により強固に結合することは、運動度の観測量にも反映されるところである(正規化標準偏差値)。さらには、細胞の対象となる割合を検知した後で、さらなる診断値の情報を生成するための他の条件下において、他の表面から隔離され、および/または、これとともにテストされてよい。これら細胞は、さらなる操作(例えば遺伝子操作)および培養目的で隔離されてもよい。選択した細胞の培養は、治療に有効な細胞成分(例えば、たんぱく質)を発現させ、純化する目的で行うことができる。

10

20

30

40

50

【0166】

これを補うように、存在している粒子が既知であるときには、計測および分析によって、表面特性の異質性に関する情報を得ることもできる(例えば、品質制御、調査目的で)。例えば、テスト表面における抗原の表面密度が分かっている場合、校正粒子を利用することで、固体群からの同質な運動度の反応は、同質な表面を示し、異質な運動度の応答は、表面にある程度の異質性があることを示す(例えば、表面リンクされた部分の不均一な表面密度)。

【0167】

<細胞空間統計学データおよび細胞形状変化の動力学>

結合状態に関する情報は、赤血球細胞の空間正規化標準偏差にも見られる。図27のプロットAおよびBは、図20のプロットAおよび図21のプロットAでそれぞれ計測された、未結合赤血球細胞および結合赤血球細胞の正規化された空間標準偏差値のプロットである。赤血球細胞の結合された固体群は、僅かに低い平均を有しているが、未結合の固体群の正規化されている空間標準偏差値と実質的に重なっている。表面に結合されている細胞は、未結合の細胞と比べて僅かに平坦になっており、これは、赤血球細胞の両凹面特性を特徴付けている。この僅かな平坦性によって、細胞のコントラストが少し失われる。固体群の平均的な差異はあるものの、未結合赤血球細胞と結合赤血球細胞との間で、空間正規化標準偏差値の分布はかなり重なっている。具体的に各細胞の正規化された空間標準偏差値は、計測期間におけるフレーム間で実質的に変化していない(図28のプロットAおよび図28のプロットB)ので、上述した我々の構成方法の正当性を裏付けるものである。

【0168】

図 28 のプロット A および B は、シーケンス内の 40 個のフレーム全てにおける、図 20 のプロット A および図 24 のプロット A (図 28 のプロット A) の未結合の固体群内の 100 個の細胞、および図 20 のプロット B および図 24 のプロット B (図 28 のプロット B) の結合されている固体群固体 100 個の細胞について平均空間正規化標準偏差をグラフにしたものである。両プロットで、誤りバーには、40 個のフレームシーケンスにおける各細胞の空間正規化された偏差の標準偏差がプロットされている。フレーム間での、ある細胞の変化は、細胞間の変化よりも僅かである。

【0169】

細胞形状変更の動力学に関する情報は、一連の画像における細胞の空間強度の統計学データを分析することで、抽出および利用することもできる。「より柔らかい (floppier)」細胞 (つまりその形状が、熱変動または外部からかけられた力によって変化しやすい細胞) は、比較的硬い細胞よりも高い空間強度変動を呈するはずである。このセクションで説明される強度の変動は、各細胞の参照フレームで計算され、細胞の質量中心の動き (つまり、前述した正規化標準偏差の計測値を利用して計測される細胞の運動度のこと) が、細胞の空間動力学の計算と干渉しない。

【0170】

図 29 は、結合された細胞および結合されていない細胞両方について、シーケンス内の 40 個のフレームで各細胞について計測した空間正規化標準偏差の標準偏差をグラフにした。フレームごとの正規化された空間標準偏差の変化の大きさは小さいが、結合された赤血球細胞および未結合の赤血球細胞の間の、正規化された空間標準偏差の変化はかなり異なっていることが分かった。結合されている細胞は未結合の細胞と比較して、幅広い分布を有し、ずっと低い振幅で変化する細胞を有しており、これは、結合されている細胞の多くの割合が、未結合の細胞よりも低い振幅の空間強度変動を有することを示している。図 19 の結合されている細胞の 19 パーセント (19%) が、0.005 未満の正規化空間標準偏差 (毎秒 5 フレームで得た 40 個のフレームで計測した) を有し、未結合の固体群では、細胞の 0.3% のみが 0.005 未満の値であった。前述した分析とは異なり、40 フレームシーケンスの各フレームでは、細胞の近隣が、空間標準偏差の変動に対する質量中心の動きの貢献を補正するように決定される (シーケンスから 1 つのフレームのみの細胞の近隣を決定する場合とは対照的に)。この細胞のフレームシーケンスにおける空間統計学データの分布は、膜の柔軟性、細胞質柔軟性 / 粘弾性、細胞が健康か病気か、細胞年齢、溶剤の条件、結合状態等の診断に利用することができ、これら全てが、経時的およびその量の分布において細胞の空間統計学データの動力学に反映される細胞の形状の変化の動力学に影響を与えうるものである。フレームの露光時間は、変動する細胞の画像を固定させる目的から十分短くすべきであり、フレームの露光時間が長くなりすぎると、細胞の動きが露光中に平均化されてしまって、技術の感度が低下する。

【0171】

< 相関関係のある運動の検知 >

ビーズの運動の相関性検知を必要としない場合においては上述した分析技術で十分である。しかし、試験は、ビーズと表面の結合ではなく、ビーズとビーズとの結合を検知することに基づいて行うことがある。ポジティブな結合には (2 以上のビーズの結合)、相関性を有するビーズの動きおよび相関性を有さないビーズの動きの間の差異が検知可能である必要がある。互いに結合されたビーズは、その運動が時間に相関付けられているが、未結合のビーズは、互いの隣にあっても、相関性を有するビーズの動きはしない。

【0172】

従って、本発明の別の実施形態は、単に互いの隣にあるものから、互いに結合されている近隣にあるビーズ / 細胞同士を区別する方法の 1 つである。

【0173】

この方法では、各隣接する細胞 / 粒子の対について、相関性のある変動を、各対の細胞 / 粒子のサブ画像の近隣をフレームごとに乗算することで (または加算することで) 計算する。こうすることで、その平均正規化標準偏差を計算することで定量化することができ

る「相関性を有する近隣部」が生じる。

【0174】

互いに結合された一対のビーズが位相を合わせて運動している場合、相関性を有する近隣部の変動の振幅が高くなる。

【0175】

独立したビーズ／細胞の運動が、各ビーズ／細胞の近隣における平均的な変動レベルを比較することで定量化することができるのと同様に、隣接するビーズ／細胞の各対の相関性を有する運動度は、各相関性を有する近隣部の平均的な変動レベルを比較することで定量化することができる。

【0176】

相関性を有する運動の検知技術は、段階200で、各ビーズ／細胞18を、各ホログラフィック画像120で検知することを含む。画像の近隣のビーズ／細胞18は、結合相手の候補であるので、相関性を有する運動をする。段階201で近隣の相手を有するビーズ／細胞18を構築すると、段階202でビーズ／細胞対のリストを作成する。

【0177】

隣接するビーズ／細胞18の各対は、対121の各ビーズ／細胞18の画像を抽出して分析することで、段階203で2つのサブ画像が作成される。次に段階204で、2つのサブ画像同士を乗算して、サブ画像の積を生成する。段階205で、この処理を全ての隣接する細胞／ビーズ18の対に対して繰り返してから、段階206では、シーケンスの全てのフレーム122について繰り返すことで、隣接するビーズ／細胞18の各対121に対応する、サブ画像の積のシーケンスが生成される(図32A)。段階207で、これら各ビーズ／細胞18の各対121それぞれに対応させて、サブ画像の積シーケンスのピクセルワイズの標準偏差を生成して、最終的に、ピクセルワイズの標準偏差の平均を、サブ画像の積全体における各画素の平均で除算したものを計算することで、段階208で平均標準偏差を生成する(図32Bの相関図を参照)。

【0178】

正規化標準偏差(NSDP: サブ画像の積を正規化した標準偏差)の平均は、画像のシーケンス120、122の、隣り合う細胞／ビーズ18対1つに起因している単一の数である。互いに結合されている細胞／ビーズ18の隣り合う対121同士は、結合されていない対同士よりも、対応するNSDP値を増加させる傾向を有するような相関性を有する運動を行うので、独立して拡散され、相関付けられていない運動によってより低いNSDP値が生成される。このことを基にして、結合されている細胞／ビーズ18の対121を、結合されていない細胞／ビーズ18の対121から区別することができる。

【0179】

従って、ホログラフィック変動画像を処理して、各粒子について平均的な正規化標準偏差を生成することを含む統計的分析を利用して、粒子の結合を判断することができる。この正規化標準偏差の平均は、研究、産業、および／または診療目的の粒子の特性、溶剤の特性、表面の特性、またはこれら特性の幾つかの組み合わせであってよい任意の表面における粒子の運動度の計測値であり、1つのフレームシーケンスにおける各粒子の空間統計学データの分析を含むことができ、これは、研究、産業、および／または診療目的の形状変化の動力学、粒子の特性、溶剤の特性、表面の特性、またはこれら特性の幾つかの組み合わせであってよい計測値であってよい。

【0180】

表面上の抗体に結合されていない粒子は、正規化標準偏差分布のマグニチュードが大きく、幅広くなり、表面上の抗体に結合されている粒子は、正規化標準偏差分布のマグニチュードが小さく、幅が狭くなる。

【0181】

一実施形態では、粒子が赤血球細胞であるが、赤血球細胞以外の細胞であってもよい。正規化標準偏差の中間値を有する粒子の割合が示すように、中間レベルの粒子結合が検知可能である。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 2 】

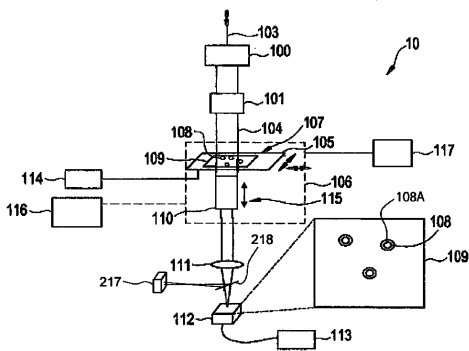
正規化標準偏差の分布は、拡散の異質性を分析されて、研究、産業、および／または診療目的の形状変化、粒子の特性、溶剤の特性、表面の特性、またはこれら特性の幾つかの組み合わせを特徴付ける。

【 0 1 8 3 】

本発明に関して上述した実施形態は、本発明の原理の明確な理解のために述べられた実装例に過ぎない。本発明の上述した実施形態には、本発明の精神および原理を逸脱しない範囲での変形例および変更例が可能である。これら変形例および変更例は全て、本発明の範囲内に含まれ、以下の特徴によって保護されることが意図されている。

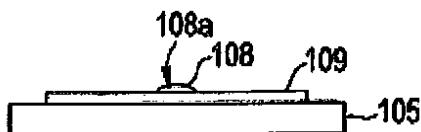
【 図 1 A 】

FIG. 1A

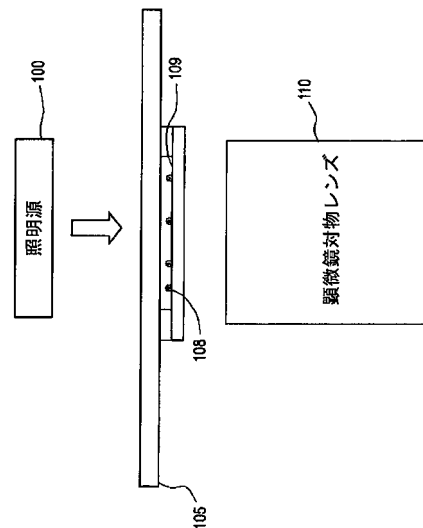


【 図 1 B 】

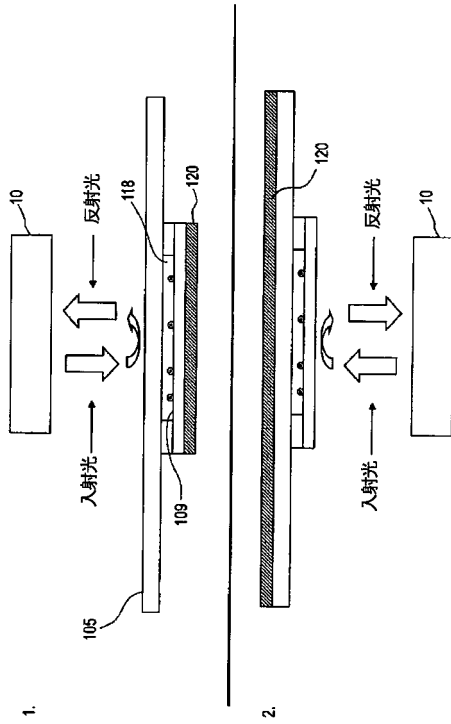
FIG. 1B



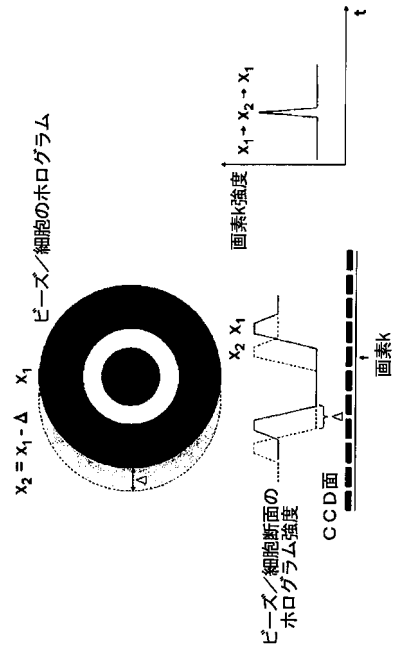
【 図 1 C 】



【図 1 D】

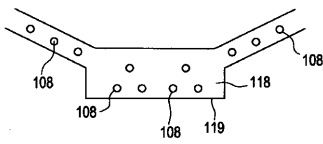


【図 2】



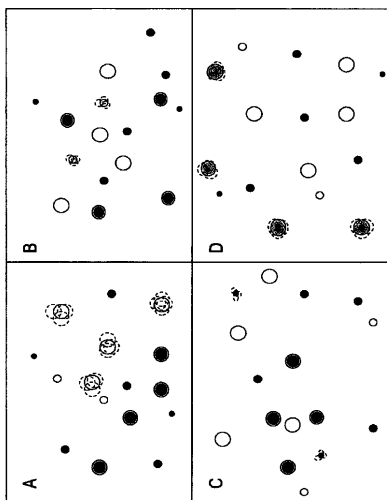
【図 3 A】

FIG. 3A



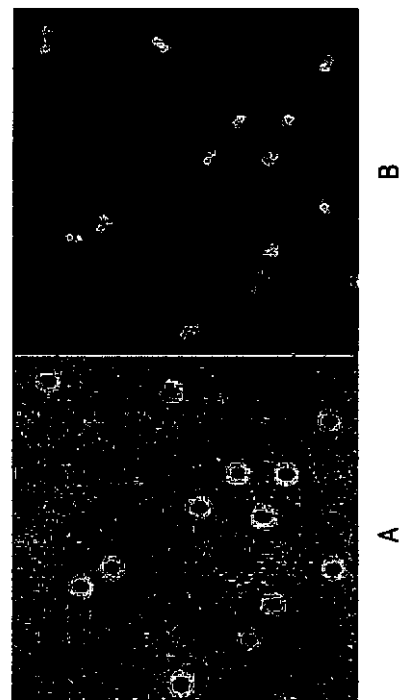
【図 3 B】

FIG. 3B

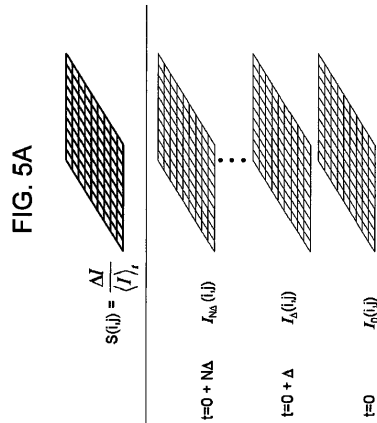


【図 4】

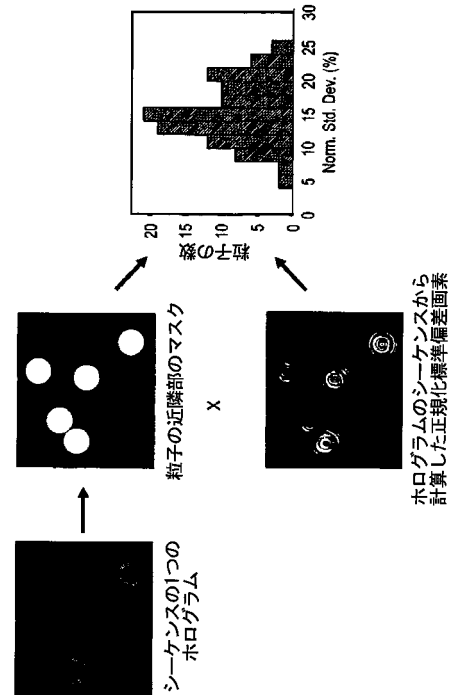
FIG. 4



【図 5 A】



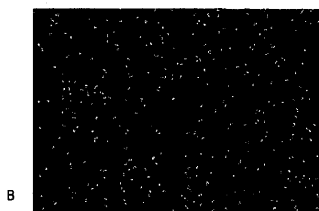
【図 5 B】



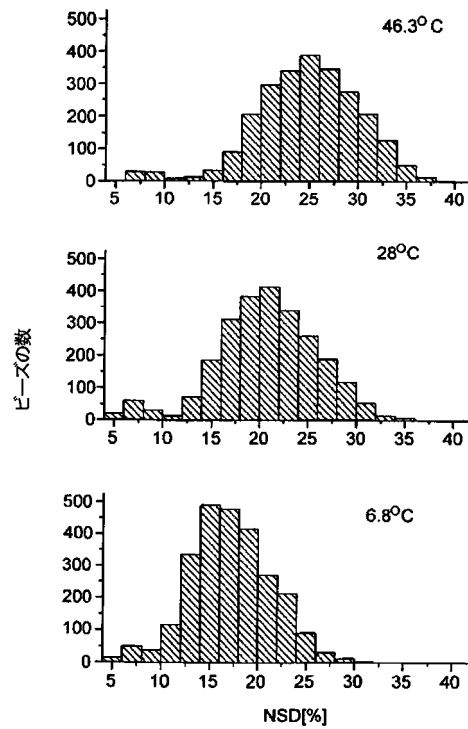
【図 6 A】



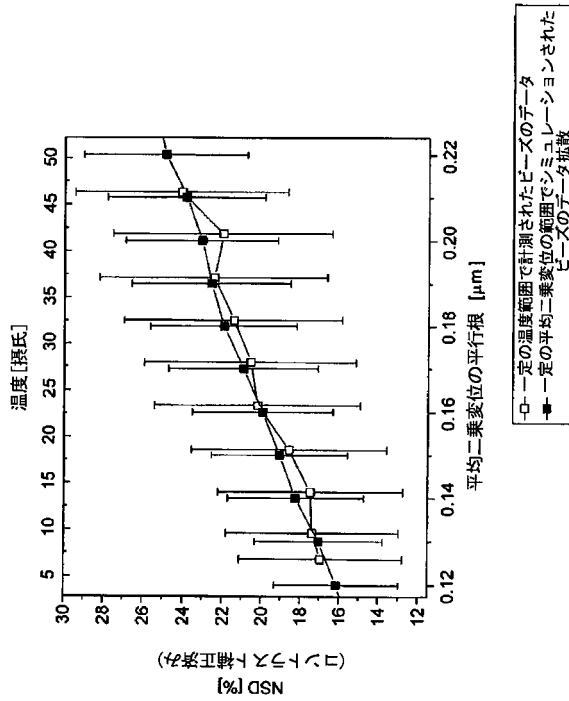
【図 6 B】



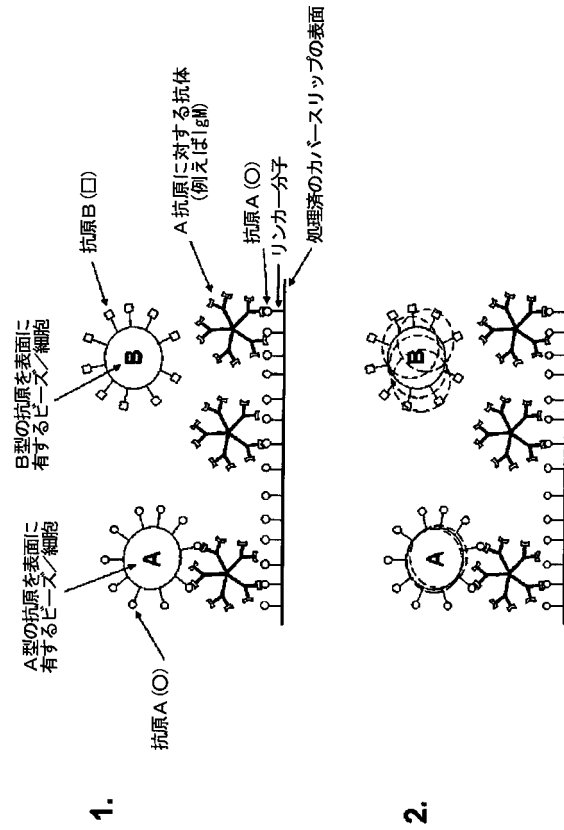
【図 7】



【図 8】



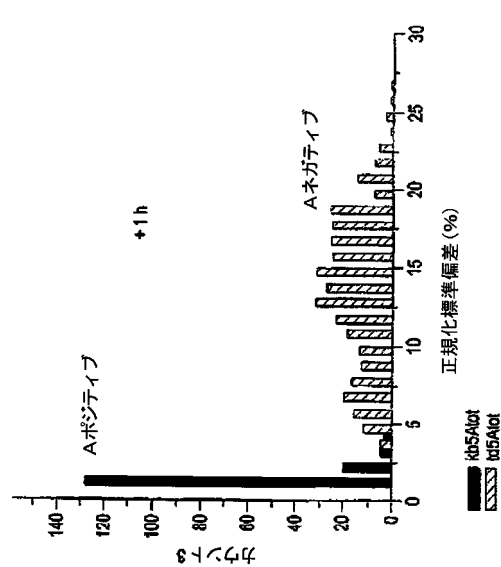
【図 9】



【図 10 A】

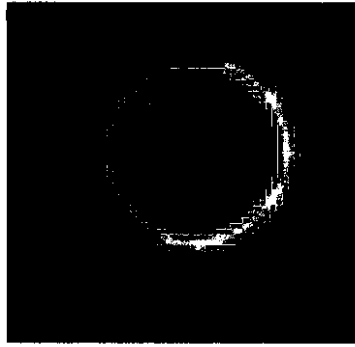


【図 10 B】



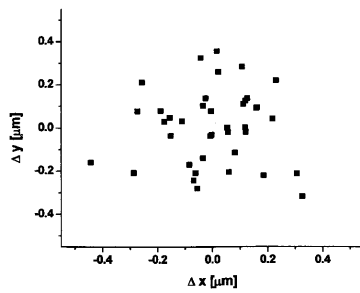
【図15A】

A.



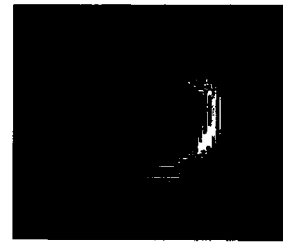
【図15B】

B.



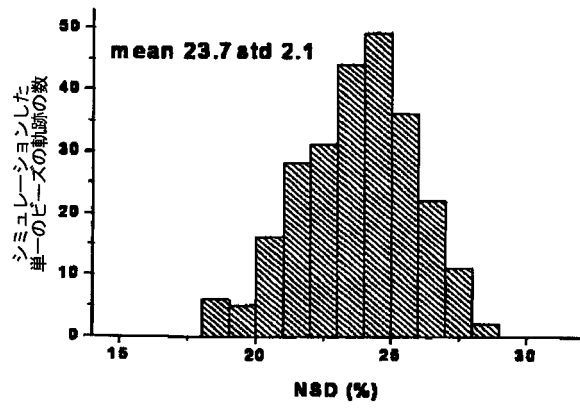
【図16】

A.

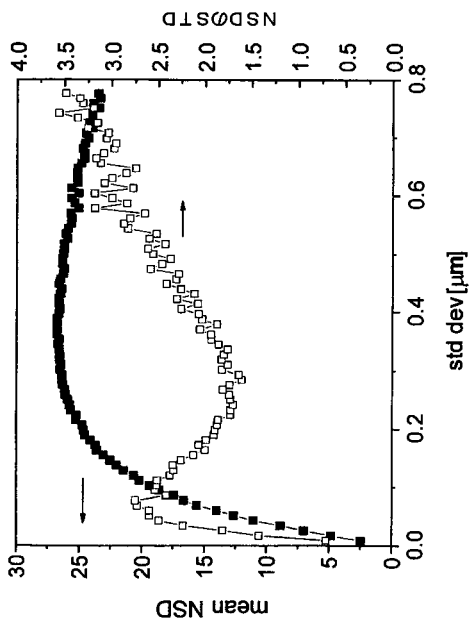


NSD=23.6

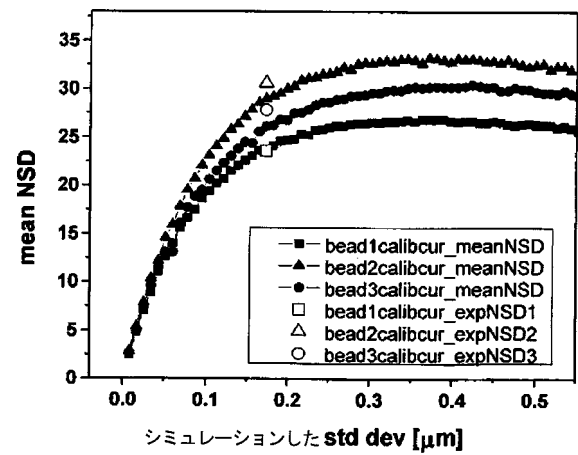
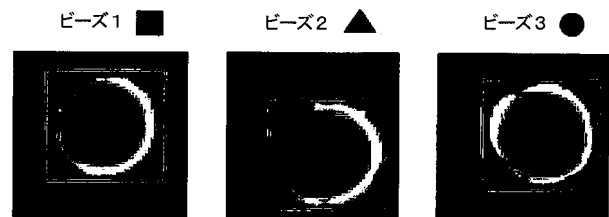
B.



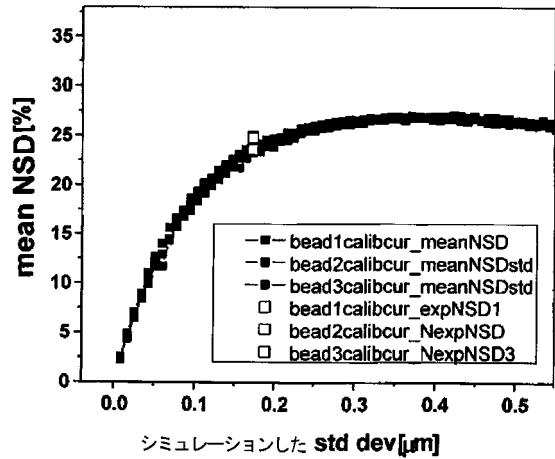
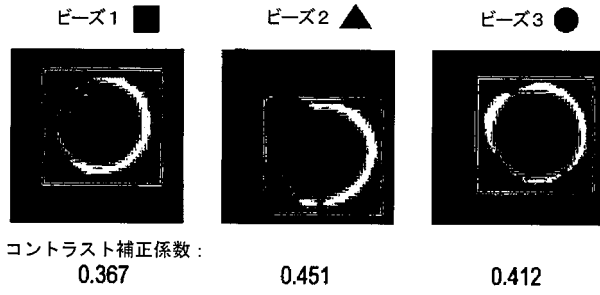
【図17】



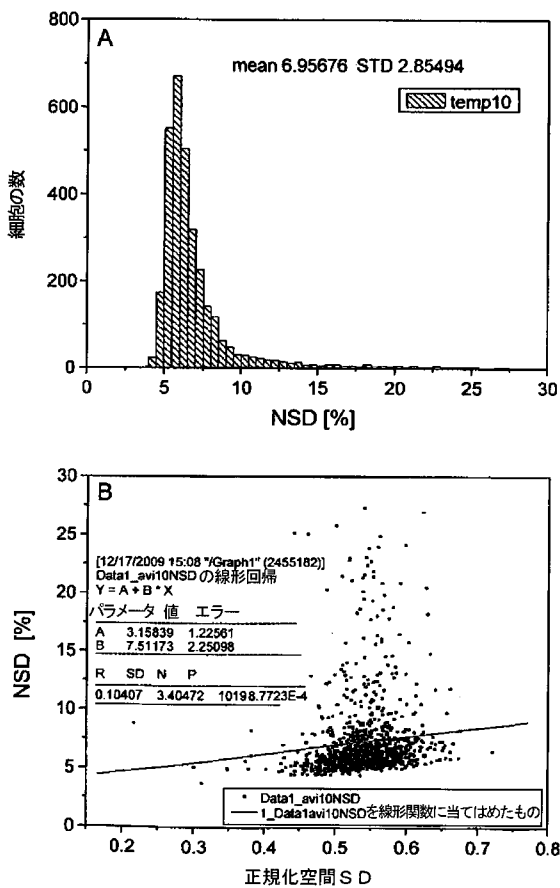
【図18】



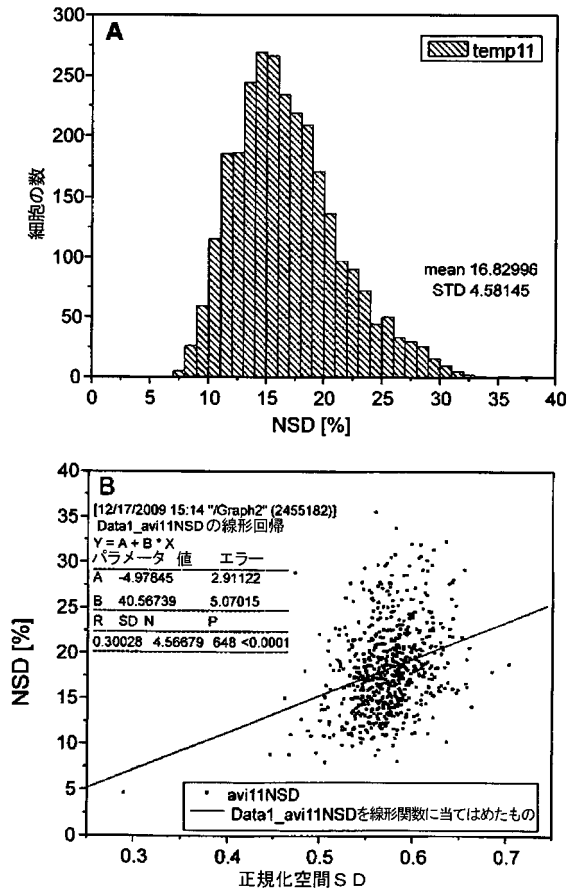
【図 19】



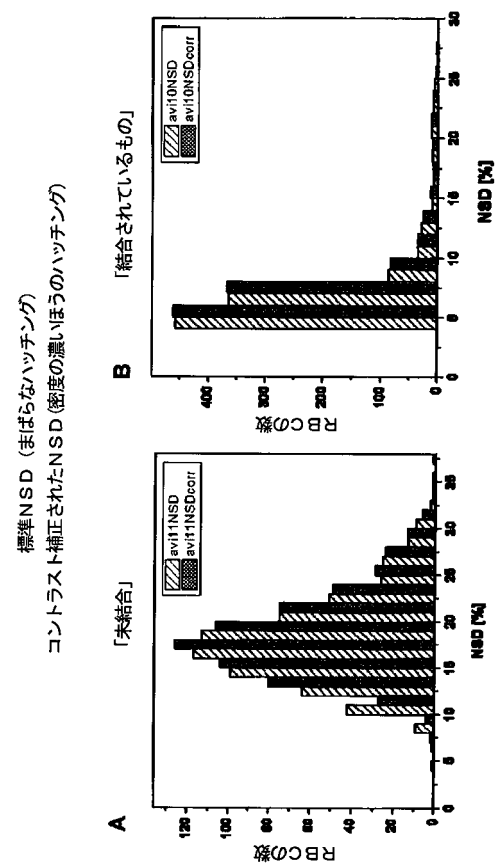
【図 21】



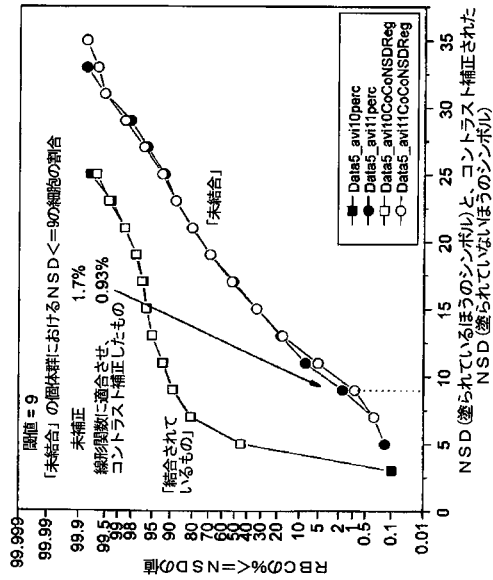
【図 20】



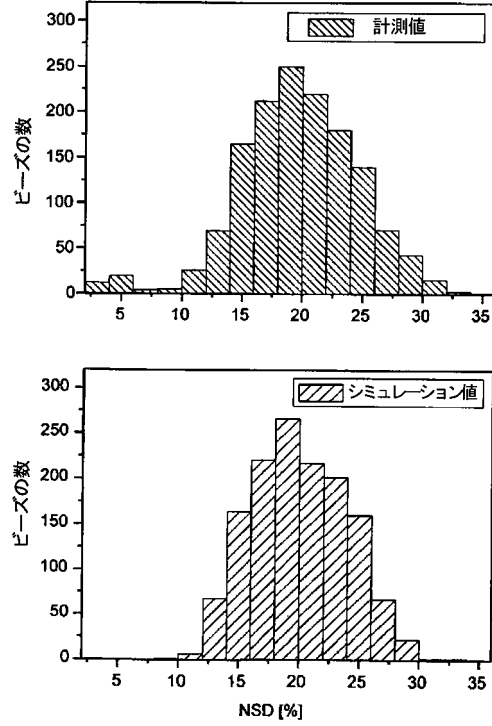
【図 22】



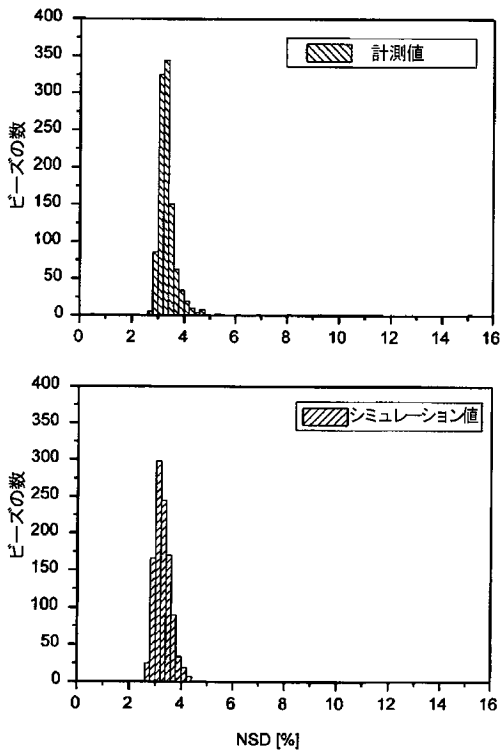
【図 2 3】



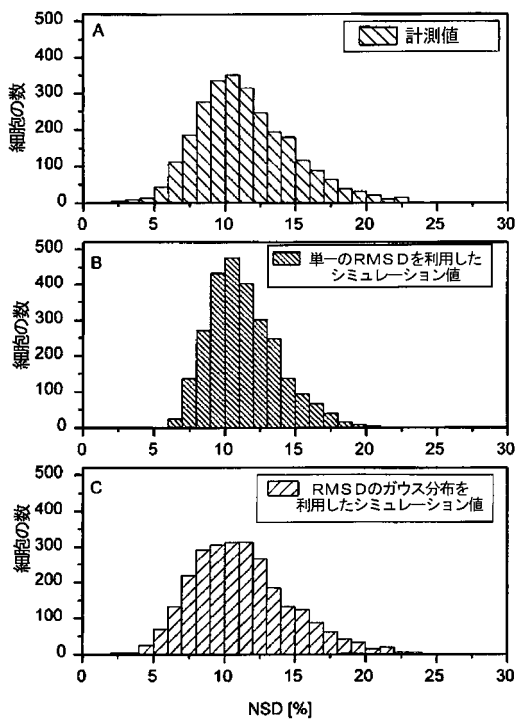
【図 2 4】



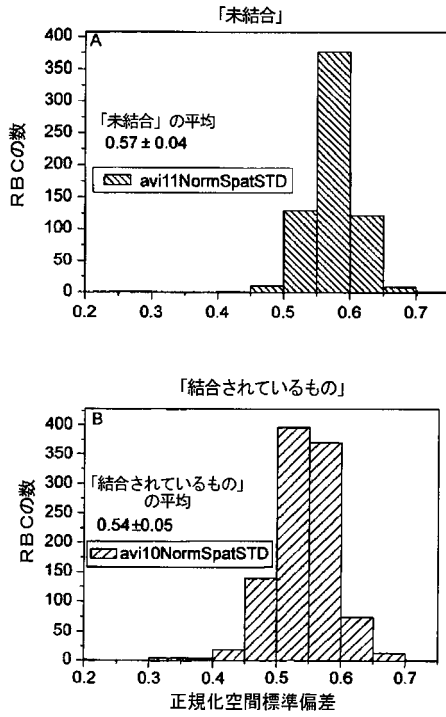
【図 2 5】



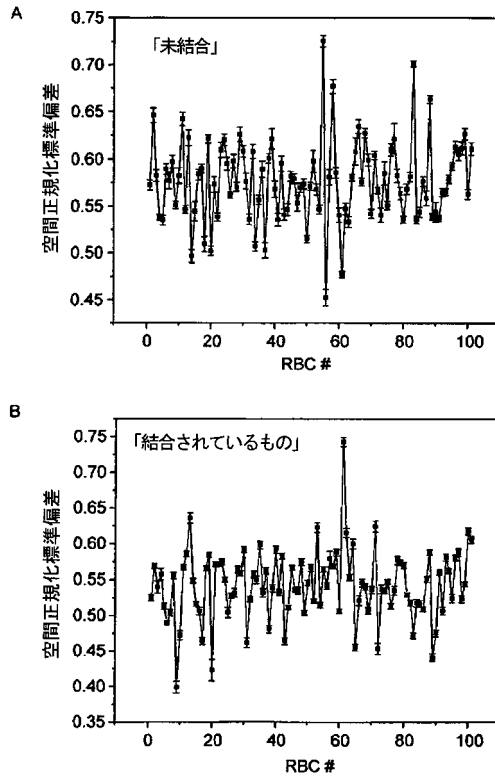
【図 2 6】



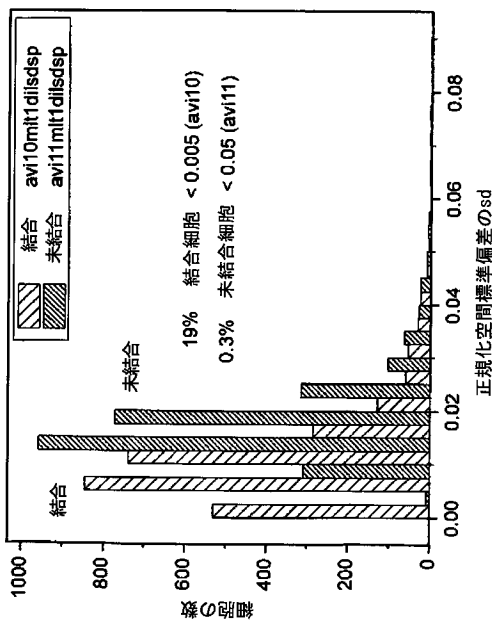
【図 27】



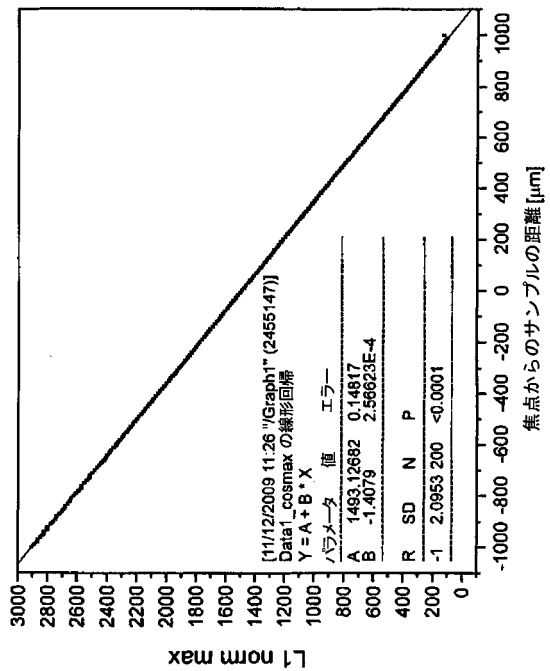
【図 28】



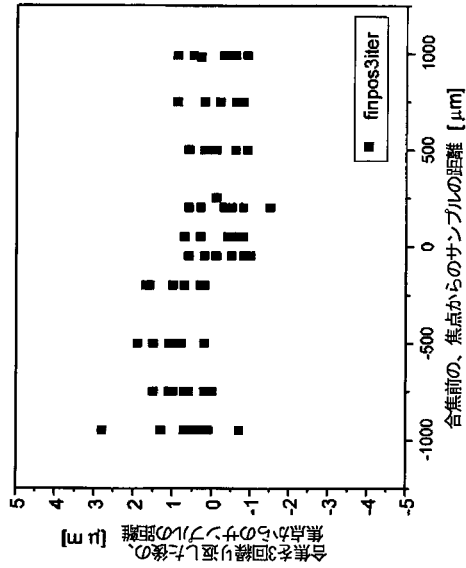
【図 29】



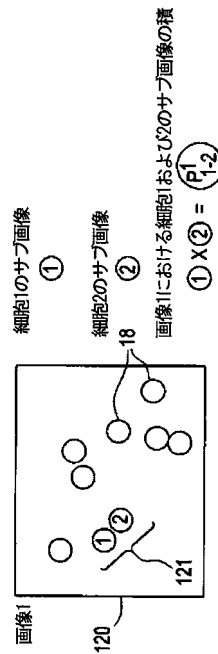
【図 30】



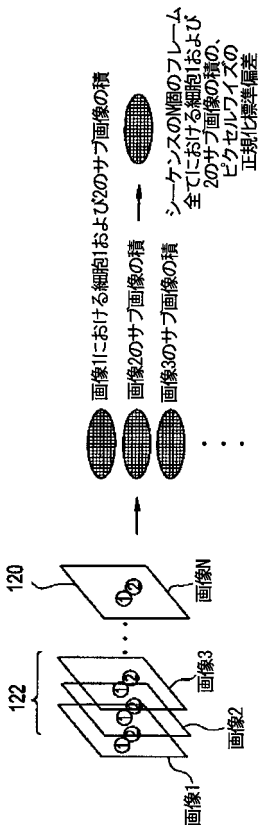
【図 3 1】



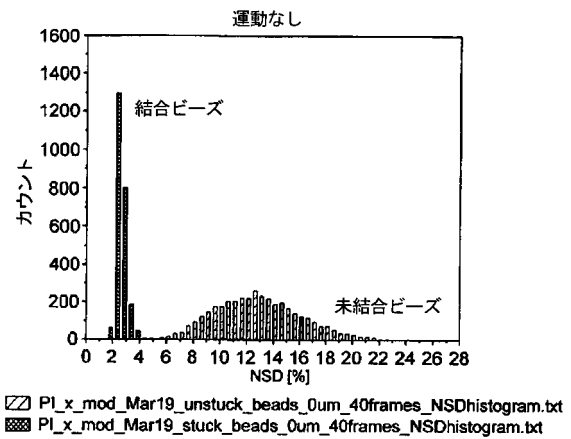
【図 3 2 A】



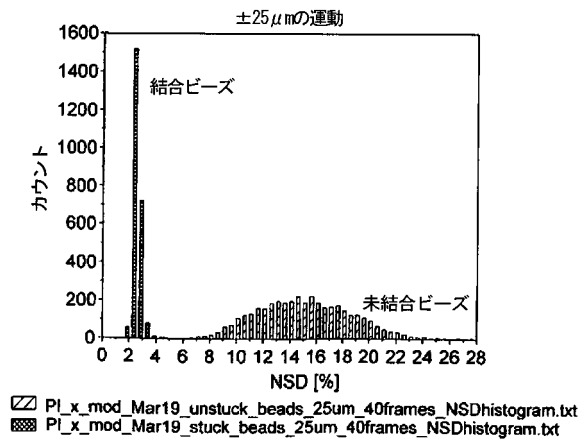
【図 3 2 B】



【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/000929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/00 (2011.01)

USPC - 435/287.1

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - C12Q 1/00, 1/04, 1/06, 1/08; G01B 9/021; G01N 21/64 (2011.01)

USPC - 73/656; 250/458.1, 459.1, 461.1, 461.2; 356/317-18, 417, 457-58, 496, 502-03, 512, 515, 521; 422/63, 68.1, 73, 82.05, 82.08; 435/7.1, 7.2, 173.1, 173.9, 174, 287.1, 287.2, 287.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

MicroPatent, Google Patents, Google Scholar

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,740,497 B2 (ALLBRITTON et al) 25 May 2004 (25.05.2004) entire document	8
A	US 7,460,240 B2 (AKCAKIR) 02 December 2008 (02.12.2008) entire document	1-8
A	US 2009/0068671 A1 (CHAKRABARTY) 12 March 2009 (12.03.2009) entire document	1-8
A	US 6,310,887 B1 (STUMBO et al) 30 October 2001 (30.10.2001) entire document	1-8
A	WO 2008/034102 A2 (KNUTSON et al) 20 March 2008 (20.03.2008) entire document	1-8
A	WO 2007/073345 A1 (GUSTAVSSON et al) 28 June 2007 (28.06.2007) entire document	1-8
A	US 6,610,256 B2 (SCHWARTZ) 26 August 2003 (26.08.2003) entire document	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 August 2011

Date of mailing of the international search report

26 AUG 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 21/27

A

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

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA06 DA02 DA05 DA06 EA01 EA13 FA01 FA02
 GA07 GB07 GB08 GB19 HA01 HA05 HA09 JA02 KA02 KA05
 KA09 LA03 NA02 NA05 NA06 NA11 NA13
 2G059 AA05 BB09 BB14 DD03 DD12 DD13 DD15 DD16 EE07 EE13
 FF01 FF03 FF04 GG01 GG02 HH02 HH06 JJ02 JJ07 JJ11
 JJ17 KK04 LL01 MM02 MM03 MM05 MM09 MM10 MM12 MM14
 PP04