

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6801846号
(P6801846)

(45) 発行日 令和2年12月16日 (2020. 12. 16)

(24) 登録日 令和2年11月30日 (2020. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

GO3H 1/22 (2006.01)
GO1N 15/00 (2006.01)
GO1N 21/41 (2006.01)
GO1N 21/49 (2006.01)
GO2B 21/00 (2006.01)

GO3H 1/22
GO1N 15/00 A
GO1N 15/00 B
GO1N 21/41 Z
GO1N 21/49 Z

請求項の数 27 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-556256 (P2015-556256)
(86) (22) 出願日 平成26年2月5日 (2014. 2. 5)
(65) 公表番号 特表2016-511435 (P2016-511435A)
(43) 公表日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/014955
(87) 国際公開番号 W02014/124057
(87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)
審査請求日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2)
審判番号 不服2019-3192 (P2019-3192/J1)
審判請求日 平成31年3月6日 (2019. 3. 6)
(31) 優先権主張番号 61/761, 079
(32) 優先日 平成25年2月5日 (2013. 2. 5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 508144082
マサチューセッツ インスティテュート
オブ テクノロジー
アメリカ合衆国、02139-4307
マサチューセッツ州、ケンブリッジ、77
マサチューセッツ アベニュー
(74) 代理人 110000877
龍華国際特許業務法人
(72) 発明者 ソン、ヨンジン
アメリカ合衆国、02139-4307
マサチューセッツ州、ケンブリッジ、77
マサチューセッツ アベニュー マサチ
ューセッツ インスティテュート オブ
テクノロジー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3Dホログラフィックイメージングフローサイトメトリ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軸外ホログラフィのためのイメージングシステムであって、
試料ビーム経路と、参照ビーム経路と、に分割される光を放出する照明源と、
検出において、検出された参照光は、検出された散乱光に対して角度オフセットして試
料の角スペクトルが生成されるように、前記試料ビーム経路に沿って収集された前記散乱
光と、前記参照ビーム経路に沿って収集された前記参照光と、の両方を検出する検出シス
テムと、

前記検出システムに接続されるデータプロセッサと、を備え、

前記試料ビーム経路は、

前記試料を直線集束ビームで照明すべく、前記試料ビーム経路に沿って、前記光の焦点
を合わせる照明光学系と、

懸濁培地に懸濁された細胞を含む試料を、前記直線集束ビームを横断して連続して流す
基板で画定されたフローチャネルであり、前記フローチャネルは、前記試料ビーム経路内
の前記細胞の回転を抑制する大きさを有する、フローチャネルと、

前記試料ビーム経路に沿って、試料から散乱された光を収集する収集光学系と、
を含み、

前記データプロセッサは、検出された前記参照光と検出された前記散乱光とを使用して
、前記フローチャネル内の前記試料の様々な位置 に対する干渉イメージを取得し、前記
干渉イメージを処理して前記角スペクトルの位相データおよび振幅データを3次元表示に

10

20

マッピングし、前記マッピングされたデータを2次元フーリエ変換することができ、処理された前記角スペクトルを空間周波数領域内の前記試料の散乱ポテンシャルにさらにマッピングすることができる、イメージングシステム。

【請求項2】

前記照明源は、コリメートされた照明源または多波長の照明源である、請求項1に記載のイメージングシステム。

【請求項3】

前記照明源から放出される前記光を、前記試料ビーム経路と前記参照ビーム経路とに分割するためのスプリッタをさらに備え、

前記参照ビーム経路は、検出された前記参照光を検出された前記散乱光に対して角度オフセットする傾斜ミラーを含むオフセットオブティックスを含む、請求項1または2に記載のイメージングシステム。

10

【請求項4】

前記試料および前記直線集束ビームを互いに相対的に並進させるスキャンシステムまたは前記試料を前記直線集束ビームを横断して並進させるスキャンシステムをさらに備え、

前記細胞は、生分解性である、請求項1から3のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

【請求項5】

前記フローチャネルは、前記試料の推定された幅サイズの150～200%の間の断面直径を含み、前記断面直径は、前記フローチャネルの断面高さである、請求項4に記載のイメージングシステム。

20

【請求項6】

(i)前記フローチャネル内の前記試料の回転を低減させる、および(ii)前記フローチャネル内の前記試料の安定性を増大させることのうち少なくとも1つのために、前記フローチャネルの(i)断面高さ、および(ii)断面幅のうち少なくとも1つが、選択され、

任意で、前記フローチャネルの前記断面高さは、前記フローチャネルの前記断面幅とほぼ同じであり、前記フローチャネルの前記断面高さおよび前記断面幅を選択すべく、前記フローチャネルの前記断面高さおよび前記断面幅に基づく回転推定値が使用される、請求項5に記載のイメージングシステム。

30

【請求項7】

前記フローチャネルの(i)断面高さおよび(ii)断面幅のうち少なくとも1つが、経験データに基づいて選択され、

前記経験データは、複数のテストされたフローチャネルの各々の中を流れる参照物質のイメージングに基づいて、複数のテストされた前記フローチャネルに対する複数の回転推定値を含む、請求項5または6に記載のイメージングシステム。

【請求項8】

前記フローチャネルの中心線と前記収集オブティックス近傍の表面との間の前記基板の厚みは、200μm未満である、または、前記フローチャネルの中心線と前記収集オブティックス近傍の表面との間の前記基板の厚みは、100μm未満である、請求項4から7のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

40

【請求項9】

当該システムはマルチモードシステムであり、前記マルチモードシステムは、前記試料の推定されたまたは実際の試料の回転を検出する、回転検出システムを含む、または、前記マルチモードシステムは、前記試料のための複数の体積の測定を検出する共焦点顕微鏡システムを含む、請求項1から8のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

【請求項10】

前記マルチモードシステムは、それぞれが異なる波長範囲のための複数のイメージングシステムを含み、前記マルチモードシステムは、それぞれがフローチャネル沿いの異なるポイントにおける、複数の開口を含む、または任意で、前記マルチモードシステムは、共

50

有された開口を含む、請求項 9 に記載のイメージングシステム。

【請求項 1 1】

検出された前記参照光と、検出された前記散乱光との間の前記角度オフセットは、検出された前記参照光のビーム軸と、検出された前記散乱光のビーム軸との間の角度オフセットである、または、検出された前記参照光と、検出された前記散乱光との間の前記角度オフセットは、2.5 ~ 4 ピクセルの間の、複数の未処理の干渉イメージにおけるフリンジ周期によって特徴付けられる、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

【請求項 1 2】

前記照明オブティクスは、円筒形レンズおよび集光レンズを含み、

10

前記円筒形レンズは、照明経路沿いの光の焦点を、前記集光レンズの後焦点面の線に合わせ、

前記集光レンズは、前記線の焦点を試料平面上に再度合わせる、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

【請求項 1 3】

前記集光レンズは、高開口数のレンズであり、開口数は 0.5 より大きい、または、前記開口数は 1.0 より大きい、または、前記開口数は 1.3 より大きい、請求項 12 に記載のイメージングシステム。

【請求項 1 4】

前記収集オブティクスは、高開口数対物レンズを含み、前記高開口数対物レンズは、0.5 より大きい開口数、または、1.0 より大きい前記開口数、または、1.3 より大きい前記開口数を含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

20

【請求項 1 5】

前記収集オブティクスは、さらに、前記高開口数対物レンズの下流側に、収集された前記散乱光の焦点を合わせるための管形レンズを含み、前記収集オブティクスは、さらに、前記管形レンズの下流側に、円筒形レンズを含む、請求項 14 に記載のイメージングシステム。

【請求項 1 6】

前記検出システムは、試料ごとに少なくとも 30 イメージのスキャン解像度を使用し、任意で、前記検出システムは、試料ごとに少なくとも 100 イメージのスキャン解像度を使用する、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

30

【請求項 1 7】

少なくとも 2 度の検出された角解像度とともに、少なくとも - 30 度から 30 度の検出された角度範囲、または、少なくとも - 45 度から 45 度の検出された角度範囲、または、少なくとも - 60 度から 60 度の検出された角度範囲で特徴付けられる、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

【請求項 1 8】

前記データプロセッサは、 k_x (空間座標 x に対応する空間周波数) 方向および 方向に沿って、フーリエ変換を計算し、それにより、サイノグラムを提供し、さらに前記サイノグラムの x 空間座標と y 空間座標に対するフーリエ変換を計算し、それを、フーリエ回折定理を使用して 3D 空間周波数領域にマッピングする、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載のイメージングシステム。

40

【請求項 1 9】

軸外ホログラフィシステムを使用するフローサイトメトリの方法であって、

試料を、基板のチャネルを通して移動させる段階であり、前記チャネルは前記試料の回転を抑制する大きさを有する、段階と、

前記チャネル内で、移動する前記試料を収束光で照明する段階と、

検出器を用いて、前記試料からの散乱光及び前記試料からの前記散乱光から角度オフセットされた参照光を検出する段階であり、前記試料からの前記散乱光及び前記参照光は光源からの照明光に応答する、段階と、

50

検出された前記参照光と検出された前記散乱光とを使用して、前記チャネル内の前記試料の様々な位置 に対する干渉イメージを形成する段階と、

前記干渉イメージを処理して角スペクトルの位相データおよび振幅データを 3 次元表示にマッピングし、前記マッピングされたデータを 2 次元フーリエ変換し、処理された前記角スペクトルを空間周波数空間内の前記試料の散乱ポテンシャルにマッピングする段階と

、
を備える、方法。

【請求項 20】

イメージデータをデータプロセッサで処理する段階と、前記試料の複数の位相イメージを生成する段階と、をさらに備える、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記試料の 3 次元 (3 D) イメージを生成する段階をさらに備え、

前記試料は、生物流体または細胞を含む生物物質を含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記試料の屈折率を決定する段階と、前記試料のイメージを電子ディスプレイ上に表示する段階と、をさらに備える、請求項 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

制御システムを前記試料上で光をスキャンする複数のスキャンパラメータでプログラミングする段階をさらに備える、請求項 19 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 24】

集束円筒形光学要素で、光の焦点を前記チャネル上に合わせる段階と、前記チャネル内の流体の流速を調整する段階をさらに備える、請求項 19 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記干渉イメージからの位相データを生成する段階、および、前記干渉イメージからの振幅データを生成する段階をさらに備える、請求項 19 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

計算された散乱ポテンシャルを提供すべく、反復計算を実行する段階をさらに備える、請求項 19 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記試料の屈折率を決定する段階、または、前記試料の屈折率分布を決定する段階をさらに備える、請求項 19 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、3Dホログラフィックイメージングフローサイトメトリに関する。

[関連出願への参照]

本出願は、2013年2月5日に提出された米国仮特許出願第61/761、079号に関連し、それに基づく優先権を主張する。当該出願の全開示は、本明細書に参照により全体として組み込まれる。

40

【0002】

[政府のサポート]

本発明は、アメリカ国立衛生研究所により授けられた、付与第EB015871号の下、政府のサポートとともになされた。政府は、本発明において複数の特定の権利を有する。

[背景技術]

【0003】

フローサイトメトリは、液体のストリームを流れる多数の細胞を調べるテクノロジーであ

50

り、通常、光学スペクトルスコピーと組み合わせられる。フローサイトメトリは、ゲノムレベルにまでおける細胞の特性評価を可能にする。フローサイトメトリにおけるコントラストメカニズムは、遺伝子操作によって外部的に管理または生成された蛍光である。しかしながら、最も自然な状況において、複数の生物標本を観察するには、標本の複数の固有特性を利用する、汚染のない複数の方法が好ましい。さらに、蛍光標識は、とりわけ複数の一次細胞に対し、必ずしも実行可能な選択肢ではない。複数の標識薬剤の光退色および不均一なバインディングは通常、複数の標的分子を正確に定量化するのを難しくする。

【0004】

屈折率は、光干渉断層撮影および光散乱分光法を含む、様々な画像診断法における、固有コントラストソースとして機能する。同時に、屈折率は、複数の有機分子の密度に関連付けられ得、その体積積分は、細胞内または複数の細胞器内の非水の合計内容量を提供し得る。複数の細胞の屈折率における変動および変化は、複数の発癌形質転換に結び付けられてきた。複数の均質バルク材の屈折率は、既知の屈折率を有する他の物質に対し、標本の臨界角を測定する、臨界角屈折計を使用して取得され得る。複数の薄膜層物質については、入射光のエリプソメトリ測定脱分極が精密であるとして既知である。しかしながら、複数の生物学的細胞のような非均質な標本の屈折率は、より細心の扱いを要求する。

【0005】

断層撮影位相差顕微鏡(TPM)は、複数の生体細胞内の屈折率の3Dマッピングを可能にする新規な技術である。TPMの最近の複数の開発は、細胞内レベルにおける複数の生体細胞の生理学的状態に係る汚染のない監視を約束する。通常、屈折率の断層イメージングは、標本上の様々な照明角度における複数のイメージの記録を要求する。従って、既存の複数の方法は、データ取得中に固定されている標本に対する照明角度を変更するための複数の移動要素を有していたか、あるいは標本を回転させていた。結果的に、断層イメージングのスループットは通常低く、それによりTPMが日常の生物学的研究に使用されるのを妨げてきた。

【0006】

屈折率は、物質内の光波の速度に関連付けられることができる。従って、標本による波面歪は、標本によって誘発される光波の全位相(時間)遅延を表す。波面歪は、シャックハルトマンの波面センサ、干渉法、またはインラインホログラフィ(または伝播ベースの複数の方法とも呼ばれる)で測定され得る。これらの技術の中で、干渉法は光レジームにおいて特に適切であり、そこでは、相当大きなコヒーレンス長を持つ複数の光源が容易に利用可能である。位相遅延は、標本の光学経路の長さ、光の伝播方向に沿った屈折率の積分に比例する。従って、本明細書に記載の通り、波面測定と連携して、断層撮影再構成アルゴリズムを使用することで、深さ分解屈折率マップが取得されてよい。断層撮影屈折率測定は通常、X線コンピュータ断層撮影のように、試料への入射角が変化される、コリメートされたレーザービームを使用して実行される。あるいは、屈折率マップは、空間的インコヒーレントビームを使用すること、および試料の対物フォーカスをスキャンすることで取得されてよい。しかしながら、いずれのアプローチにおいても、照明方向または対物フォーカスが変化される間、試料は固定されている必要があり、それにより、イメージングのスループットを制限する。

【0007】

結果的に、複数のイメージングシステムの速度および精度を改善するには、断層撮影位相差顕微鏡における、さらなる複数の改善が必要とされる。

【発明の概要】

【0008】

ホイヘンス原理は、平面波は、複数の平行な直線集束ビームから合成され得、その相対位相が波の伝播方向を決定すると規定する。従って、本明細書において、試料の直線集束ビームをスキャンし、散乱光の複数の角スペクトルを測定する、複数のシステムおよび方法が提供される。有利には、深さ分解屈折率マップは、直線集束ビームの様々な位置に対し取得される複数の角スペクトルから取得されてよい。このイメージング技術は、波合成

10

20

30

40

50

または合成開口断層撮影とも呼ばれる。

【0009】

複数の例示的な実施形態において、複数の複素量である複数の角スペクトルは、位相シフト干渉法（PSI）で測定されてよい。フィルタされた逆投影アルゴリズムが断層撮影再構成に適用されてよい。しかしながら、PSIでは、試料は位相シフトステップ中に固定されている必要があり、従って、複数のイメージは、断続的に取得され、それにより、イメージングスループットを制限する。また、フィルタされた逆投影アルゴリズムは複数の厚い細胞には理想的ではない。従って、本明細書で教示される通り、複数の角スペクトルの測定に対し、軸外デジタルホログラフィを採用すること、およびスカラー回折理論に基づくアルゴリズムを、断層撮影再構成に対し適用することによって、イメージングスループットおよび適用可能性（特に、複数のより厚い細胞に対し）が増大されてよい。複数の例示的な実施形態において、本明細書で教示される複数のシステムおよび方法はまた、マイクロ流体チャネル内を連続的に流れる複数の細胞の3D屈折率イメージングに有利に使用され得る、高開口数セットアップのために特別に設計されたマイクロ流体チャネルを利用する（本明細書において、経験的に示される通り）。

10

【0010】

本発明は、マイクロ流体チャネル内を連続的に流れる複数の細胞のような物質の、3Dホログラフィックイメージングのための複数のシステムおよび方法に関する。好ましい実施形態において、レーザビームのような光は、線を通る複数の細胞から散乱される複数の角スペクトルを測定するのに使用される、マイクロ流体チャネル内の線に焦点が合わされる。複数の複素散乱場の測定については、標本の各位置に対する場のワンショット記録を可能にすべく、軸外デジタルホログラフィが使用される。細胞タンプリングを減少させ、高NA集光レンズおよび対物レンズの使用を可能にするよう構成されたマイクロ流体チャネルが、システムの実視野にわたり、物質を運搬するのに使用される。データ再構成については、複数の細胞内の複数の焦点がぼけた細胞器官から生じる、複数の回折アーティファクトを減少させ、入射ビームの限定的な角度範囲による複数のアーティファクトを減少すべく、反復的な制約手順を適用するために、光回折断層撮影が使用される。従って、本発明は、3Dホログラフィックイメージングフローサイトメトリのための複数のシステムおよび方法を提供する。

20

【0011】

好ましい実施形態は、チャネル内を移動する試料の複数の位相イメージを検出すべく、2次元検出器アレイを使用する。次にデータプロセッサが、複数の位相イメージを提供し、試料内の屈折率分布を計算すべく、イメージデータを処理する。好ましい実施形態において、イメージデータの位相および振幅コンポーネントは、3Dサイノグラムにマッピングされ、データのフーリエ変換が実行され、次にデータは周波数領域内の散乱ポテンシャルにマッピングされる。再構成処理が適用され、3D屈折率分布が取得される、3D散乱ポテンシャルを提供すべく、逆フーリエ変換が実行される。

30

【0012】

本発明の好ましい実施形態において、屈折率分散を測定し、分子構成を定量化すべく、複数の異なる波長でチャネルを照明する、複数の光源が使用され得る。複数の異なる波長で作動する2つの異なる光源からの光は、例えば、共通の試料供給経路に沿って結合され得、試料を通過後、2つの異なる検出で、スプリットされ得る。

40

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】3Dホログラフィックイメージングフローサイトメトリシステムの概略図である。

【図1B】フローサイトメトリを使用してイメージされたオブジェクトの3D表現を形成する、N個の2次元イメージを示す。

【図1C】試料から散乱される複数の角スペクトルを記録するのに使用される、複数の例示的な光学システム（CLおよびCL1～CL3：円筒形レンズ、M1およびM2：ミラ

50

ー、B 1 および B 2 : ビームスプリッタ、L : 集光レンズ、O L : 対物レンズ、T L : 管形レンズ、および S P : 試料平面、F P : 後焦点面および I P : 像平面) および複数の測定に使用されるマイクロ流体チャネルの概略図である。

【図 1 D】試料から散乱される複数の角スペクトルを記録するのに使用される複数の例示的な光学システム (C L および C L 1 ~ C L 3 : 円筒形レンズ、M 1 および M 2 : ミラー、B 1 および B 2 : ビームスプリッタ、L : 集光レンズ、O L : 対物レンズ、T L : 管形レンズ、および S P : 試料平面、F P : 後焦点面および I P : 像平面) および複数の測定に使用されるマイクロ流体チャネルの概略図である。

【図 1 E】チャンネル内を流れる $10 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズの合成イメージを示す。

【図 2】未処理の干渉イメージを示す。それぞれ、対数尺度で示される線イメージのフーリエ変換の大きさ (底が 10) および抽出された振幅と位相イメージである。

【図 3 A】一連の未処理の干渉イメージおよび試料の異なる複数の位置に対し記録された対応する複数の位相イメージを示す。

【図 3 B】サイノグラムであり、 k_x の様々な値に対し、プロットされた複数の複素散乱場である。

【図 3 C】マッピング後の R K O ヒト大腸癌細胞の空間周波数スペクトルを示す。(i) は k_x - k_y 断面を、(i i) は k_x - k_z 断面を、(i i i) は (i i) の点線を含む k_y - k_z 平面の断面である。(i) のスケールバー ($1 \mu\text{m}^{-1}$) は、(i i) および (i i i) にも適用される。

【図 4 A】例示的な R K O 細胞の再構成された屈折率マップである。(i) は断面中心 (スケールバー、 $5 \mu\text{m}$)、(i i) は $15 \mu\text{m}$ 間隔で抽出された複数の高さにおける複数の断面、および (i i i) は 3 D レンダリング後の同一細胞の底部の半分である。

【図 4 B】体積 (0.980 ± 0.110) の正規化された推定および $10 \mu\text{m}$ の複数のポリスチレンビーズの屈折率値 (0.986 ± 0.032) を示す。 $N = 8$; R P M I 8 2 2 6 体積 ($1654 \pm 69 \text{ fl}$) および複数の R K O 細胞 ($1845 \pm 70 \text{ fl}$)、R P M I 8 2 2 6 乾燥質量 ($345 \pm 13 \text{ pg}$) および複数の R K O 細胞 ($300 \pm 11 \text{ pg}$) および R P M I 8 2 2 6 乾燥密度 ($170 \pm 5 \text{ g/l}$) および複数の R K O 細胞 ($145 \pm 5 \text{ g/l}$)。両方の細胞に対し、 $N = 60$ 。

【図 4 C】体積および密度の正規化された推定を示す。

【図 5】本発明の複数の好ましい実施形態による、屈折率分布を決定するためのプロセス順序である。

【図 6 A】試料データを測定および分析する複数の好ましい方法を示す、プロセスフロー図である。

【図 6 B】試料データを測定および分析する複数の好ましい方法を示す、プロセスフロー図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

複数の生物標本の屈折率 (R I) は、余分な造影剤によって引き起こされる、光退色または悪影響の心配が一切なく、調査され得る固有コントラストのソースである。また、R I は、細胞レベルおよび細胞内レベルにおける、複数の細胞のメタボリズムに関する豊富な情報を含む。本出願は、マイクロ流体チャネル内を連続的に流れる複数の生物試料に係る複数の 3 次元 (3 D) R I マップを提供する、可動部分のないアプローチを開示する。特に、複数の高速で流れる試料から散乱される光の複数の角スペクトルを記録すべく、ライン照明と軸外デジタルホログラフィが使用される。また、測定されたスペクトルから複数の試料に係る複数の正確な R I マップを取得すべく、光回折断層撮影アルゴリズムが適用される。本明細書に記載の複数の経験的研究に示される通り、本開示に係る複数のシステムおよび方法は、複数の生きた R K O ヒト大腸癌細胞および複数の R P M I 8 2 2 6 多発性骨髄腫細胞のラベルフリー 3 D イメージング、並びに測定された複数の 3 D の R I マップからこれらの細胞の体積、乾燥質量、および密度を取得するにおいて、有効であることが実証された。これらの結果は、開示された複数のシステムおよび方法は、単独で、ま

10

20

30

40

50

たは複数の既存のフローサイトメトリ技術と組み合わせて、多数の細胞に関する、汚染のない定量的な特性評価を有利に可能にすることを示す。

【 0 0 1 5 】

本発明は、ホログラフィック位相サイトメトリを実行するための複数のシステムおよび方法に関する。複数のオブジェクトの複数の位相イメージを測定すべく、断層撮影位相イメージングが開発されており、これは、測定のためにホルダに固定される複数の小さな用意された試料の屈折率の測定を可能にする。断層撮影位相差顕微鏡の複数のシステムおよび方法に関する追加の詳細は、2008年7月10日に出願された米国出願第12/218、029号に見出され得、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。屈折率の定量的測定におけるさらなる複数の改善、および複数の回折のない高解像度3Dイメージを提供することは、Optics Express, Vol. 17, No. 1 (2009)におけるSung他の「Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging」に記載されており、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。複数の外因性の造影剤を追加することなく、複数の試料成分に係る複数の分子濃度を決定すべく、屈折率マップが使用され得る。従って、本明細書に記載された複数の方法を使用して、さらなる複数の定量的特性が決定され得る。

10

【 0 0 1 6 】

ホイヘンスの原理は、平面波は同相にあり、かつ、平らな波面上に整列された複数の点光源を重ね合わせることによって、合成され得ることを規定する。漸進的に点光源および検出器を移動することによって、拡張された試料をイメージすべく、合成開口レーダは例えば、この原理を利用する。検出システムが標本内の複数の散乱ポイントの3D構造を再構築するのに必要な情報を収集できるよう、本発明の複数の好ましい実施形態は、標本を直線集束ビームにわたり並進させるためのシステムを提供する。光レジームに、これが、位相シフト干渉法を使用する、合成開口断層撮影(SAT)とともに実装され得る。しかしながら、以前は、位相シフトステップ中に、標本は固定されている必要があった。従って、標本は並進ステージに搭載され、複数の離散ステップにおいて直線収束ビームを横切って移動された。

20

【 0 0 1 7 】

円筒形の収束波(図1A)は、収束線上で同相にある、複数の平面波成分に分解され得る。特に、円筒形レンズで集束された、電場の複素振幅は、次のように、非近軸条件下で記述され得る。

30

【数1】

$$u_{in}(x, y, z) = \int P(\lambda f p) \exp[i2\pi(p x + w(p) z)] dp, \quad (1)$$

式(1)

式中、被積分関数は、複素振幅 $P(\lambda f p)$ および波ベクトル $(p, 0, w(p))$ を備えた平面波を表す。ここで、関数 $w(p)$ は、 $w(p) = ((1/\lambda)^2 - p^2)^{1/2}$ と定義され、変数 λ および f は、それぞれ照明光の波長および円筒形レンズの焦点距離である。瞳関数 $P(x)$ は、円筒形レンズの光学収差、または該当する場合はアポディゼーションを表す。定量的位相イメージングでは、瞳関数は直接測定され得、複数のイメージから差し引かれ得る。従って、我々は以降の式において、瞳関数を省略する。

40

【 0 0 1 8 】

標本からの散乱場は、入射場のための遠距離場および一般伝送モードで測定されることに留意されたい(図1A)。スカラー回折理論から、散乱場の複素振幅は、次のように記述され得る。

【数2】

$$u_{scat}(\vec{r}) = \int V(\vec{r}') u_{in}(\vec{r}') G(\vec{r} - \vec{r}') d^3 r', \quad (2)$$

50

(式2)

ここで、

【数3】

$$G(r) = \exp(ikr)/4\pi r$$

は、スカラー波動方程式（ヘルムホルツ方程式）のためのグリーン関数である。は、再び媒体内の入射光の波長であり、 $K=2/\lambda$ は、は波数である。

【0019】

関数 $V(x, y, z) = k^2(1 - (n(x, y, z)/n_0)^2)$ は、標本の散乱ポテンシャルであり、式中、 $n(x, y, z)$ および n_0 は、それぞれ標本および周囲媒体の屈折率を表す。平面波照明については、式(2)が、従来の光回折断層撮影の複素散乱位相を提供する点に留意されたい。本開示によると、標本を複数の平面波を含む直線集束ビームで照明し、散乱光の複数の角スペクトルを測定する、複数のシステムおよび方法が提供される。断層撮影再構成では、試料が直線集束ビームを通過する間、一連の角スペクトル $E_{\text{samp}}(k_x, y; \eta)$ が試料の様々な位置について記録されてよく、変数 k_x は空間座標 x に対応する空間周波数座標である。光学収差による任意の背景位相を除去すべく、実験を開始する前に、複数の角スペクトル $E_{\text{bg}}(k_x, y)$ も記録してよい。一次Rytov近似を用い、測定された複数の角スペクトル $E_{\text{samp}}(k_x, y; \eta)$ および $E_{\text{bg}}(k_x, y)$ は、標本の散乱ポテンシャル $V(x, y, z)$ に次のように関連付けられ得る。

10

20

【数4】

$$\tilde{u}_{\text{scat}}(k_x, y; \eta) = \frac{1}{i4\pi w(k_x)} \int \tilde{V}(k_x - p, y, w(k_x) - w(p)) \exp[i2\pi(k_x - p)\eta] dp, \quad (3)$$

式(3)

ここで、

【数5】

$$\bar{u}_{\text{scat}}(k_x, y; \eta) = \log[E_{\text{samp}}(k_x, y; \eta)/E_{\text{bg}}(k_x, y)], \text{ および } w(u) = (k^2 - u^2)^{1/2} ..$$

ここでも、変数 k_x は、空間座標 x に対応する空間周波数であり、角スペクトル

【数6】

30

$$\tilde{u}_{\text{scat}}(k_x, y; \eta)$$

は、異なる複数の値 η に対し測定される（図1Aを参照）。式(3)を y と η についてフーリエ変換すると、次の式が導かれる。

【数7】

$$\tilde{V}(k_x, k_y, k_z) = i4\pi w(k_x) \tilde{\bar{u}}_{\text{scat}}(k_x, k_y; k_\eta), \quad (4)$$

式(4)

ここで、

【数8】

40

$$k_z = w(k_x) - w(k_x - k_\eta), \quad \tilde{\bar{u}}_{\text{scat}}(k_x, k_y; k_\eta)$$

は、

【数9】

$$\bar{u}_{\text{scat}}(k_x, y; \eta)$$

の y と η に対する二次元フーリエ変換である。式(4)は、測定された複数の角スペクトルを空間周波数領域内の標本の散乱ポテンシャルに関連付ける。従って、

【数 10】

$$\hat{u}_{\text{scat}}(k_x, k_y; k_q) = \frac{1}{i\pi w(w)} \hat{V}(\xi, k_y, w(k_x) - w(k_x - k_q)). \quad (5)$$

式 (5)

式 (5) は、測定された、標本からの散乱された複数の角スペクトルを、空間周波数領域内の標本の散乱ポテンシャルにマッピングする方法を提供する。

【0020】

図 1 C および 1 D は、例えば、図 1 B に示されるような試料からの複数の角スペクトルを記録するのに使用される例示的なシステム 40 を示す。このマッハツェンダタイプの干渉計は、ワンショット測定における複素場の振幅と位相の両方の記録を可能にする。当該システムは、例えば、He-Ne レーザ ($\lambda = 633 \text{ nm}$) の光源 42 を含んでよい。光源 42 からのビーム光を拡張すべく、初期ビーム整形光学 (例えば、集光レンズのペア) が使用され、その後で、ビーム光は、第 1 のビームスプリッタ B1 を使用して、参照ビーム (コリメートされた) および試料ビームにスプリットされる。高開口数の集光レンズ (例えば、開口数 = 1.4) および円筒形レンズ CL (例えば、 $f = 100 \text{ mm}$) を使用し、直線集束ビームが試料ビームから生成される。直線集束ビームは、マイクロ流体チャネル 20 に対し、視野 (FOV) 平面に焦点が合わされる。従って、システムは、複数の細胞からの複数の角スペクトルを記録しつつ、直線集束ビームを横切って、マイクロ流体チャネル 20 に複数の細胞の連続的な流れ 16 を提供する。CMOS カメラ 44 の特定のフレームレートに対し、約 400 ~ 500 イメージ/細胞を取得するように、流速は調整され得る (例えば、約 15 μm の細胞直径を前提とすると、5000 フレーム/秒のイメージ取得レートおよび約 150 μm /秒の流速に対応)。取得された複数のイメージについて、5000 フレーム/秒のイメージ取得レートが使用され、それは検出器 44 での光子束に基づいて判断された。試料に対する高スキャン解像度 (例えば、高フレームレート) およびイメージングシステムの高開口数 (NA) の両方が、高い空間分解能を実現するのに重要である。しかしながら、スキャン解像度を増大させると、イメージングスループットを低減させ得ることに留意されたい。高 NA 油浸レンズの作動距離は通常、200 μm 未満であり、これには上部 PDMS (ポリジメチルシロキサン) 層の厚みを使用することを含み、複数のマイクロ流体チャネルの全高はそれに応じて小さくなる (例えば、チャネル内部での細胞タンプリングおよび回転を最小化すべく、チャネル高さは複数の細胞の平均直径より僅かに大きくてよい)。ソフトリソグラフィ処理の正確な制御を使用し、これらの基準を満たすマイクロ流体デバイスが作成され、位相イメージングに使用された。取得された複数のイメージについて、使用されたチャネル断面の寸法は、30 × 400 μm^2 (高さ × 幅) であった。いくつかの実施形態において、フローチャネルの中心線と、収集光学近傍の表面との間の基板の厚みは、200 μm 未満、または好ましくは 100 μm 未満である。

【0021】

複数の例示的な実施形態において、フローチャネルは、例えば、試料の推定された幅サイズの 150 から 200 % の間の高さといった、断面直径を含んでよい。いくつかの実施形態において、(i) フローチャネル内の試料の回転を低減する、および (ii) フローチャネル内の試料の安定性を増大させることのうち少なくとも 1 つのために、フローチャネルの (i) 断面高さ、および (ii) 断面幅のうち少なくとも 1 つが、選択されてよい。いくつかの実施形態において、フローチャネルの断面寸法の高さおよび断面寸法の幅は、ほぼ等しくてよい。そのような複数の実施形態においては、回転は本明細書に記載された通り推定されてよい。いくつかの実施形態において、フローチャネルの (i) 断面高さ、および (ii) 断面幅のうちの少なくとも 1 つは、例えば、複数のテストされたフローチャネルの各々を流れる参照物質のイメージングから導かれた、複数のテストされたフローチャネルに対する複数の回転推定値等の経験データに基づいて選択されてよい。例えば、そのような回転を補償すべく、試料の推定されたまたは実際の回転に基づいて、回旋が適用されてよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

イメージデータを処理する、データプロセッサ 4 5 が検出器 4 4 に接続されている。メモリ 4 7 は、電子ディスプレイデバイス 4 9 上でユーザーに対し、表示するためのデータを格納できる。プロセッサ 4 5 は、システムの複数の作動パラメータを制御するためにも使用され得ることに留意されたい。

【 0 0 2 3 】

図 1 D は、本発明の好ましい実施形態により、使用されるフローチャネルデバイス 5 0 の概略図をさらに示す。適切な 3 D 再構成のため、複数の細胞の高さおよびマイクロ流体チャネル 2 0 内のそれらの速度は、それらが直線集束ビームを流れる間、およそ一定であることが要求される。チャネル 2 0 は、基板 5 0 6 上に、レンズ (O L) に隣接して配置される実視野 5 4 とともに形成される。マニホールド 5 8 が、流入ポート 6 0 および流出ポート 6 2 を通る流体を制御すべく、使用され得る。マイクロ流体チャネルを用いて、水チャネル内の複数のポリスチレンビーズの流れが、照明のためのレーザのような、光源 4 2 を備えた高視野顕微鏡を使用して記録された。図 1 E は、0 . 0 1 秒間隔で抽出された、複数の未処理のイメージの合成イメージである。ビーズの変位から、流速は、1 mm / 秒で均一であると推定され、複数のビーズの流れ方向の直線運動は、横断方向における移動は無視できることを示す。特記すべきことは、インラインホログラフィシステムでは、複数のビーズの高さの変化は、複数の回折リングの変化から認識され得、それはここでは無視できることが示される。

【 0 0 2 4 】

図 2 は、(i) 記録された干渉イメージおよび (i i) そのフーリエ変換の振幅の例を示す。点線の円内の領域は、標本からの散乱された角スペクトルの情報を含む。この情報は、軸外デジタルホログラフィによって、非散乱光とは別に記録される (中心がピーク) 。点線領域を選択し、点線領域を中心に移動させ、その逆フーリエ変換をすることで、複数の複素角スペクトル

【 数 1 1 】

$$\tilde{u}_{scat}(k_x, y, \eta)$$

が取得され得る。図 2 の (i i i) および (i v) は、図 2 の (i) のイメージから取得された複数の角スペクトルの振幅と位相をそれぞれ示す。

【 0 0 2 5 】

図 3 A ~ 図 3 C は、空間周波数領域における複数の複素場の例示的マッピングを示す。複数の未処理の干渉イメージ、従って、試料の様々な位置 に対する複数の角スペクトルが取得され得る (図 3 A) 。次に、 k_x および 方向に沿うデータキューブのフーリエ変換が行われ、それにより図 3 B に示すようなサイノグラムを提供する。 x および y は、空間座標であり、 k は照明角度に対応することに留意されたい。次に、サイノグラムの x と y に対しフーリエ変換を行い、それを 3 D 空間周波数領域に、式 (5) のフーリエ回折法則を使用しマッピングする。あるいは、元のデータキューブの x と y に対するフーリエ変換を単純に行い、それを、式 (4) を使用して、3 D 空間周波数領域にマッピングすることができる。

【 0 0 2 6 】

図 3 C は、マッピング後の R K O ヒト大腸癌細胞の空間周波数マップ

【 数 1 2 】



の複数の断面イメージを示す。好ましい実施形態において、複数の試料が直線集束ビームを横切って流れ、これは照明角度を回転ビームの配置において直線的に変更することに等しい。従って、りんごの芯に似た空の領域が、図 3 C (i) のイメージの中心近くに示され得る。 $k_x - k_z$ 断面 (図 3 C (i i)) は、同様の欠損領域を示し、これは集光レンズおよび対物レンズの限定された角度範囲による。これらの空の領域は、複数のいわゆ

る欠損角アーティファクトを生成し、それらは反復的な再構成処理において、試料のアプリオリ情報を取り込むことによって、抑制され得る。この実施形態において、複数の細胞の複数の平均屈折率値を正確に提供する、質量密度の非負性を利用するアルゴリズムが使用された。欠損角データのより完全な補正のために、例えば、屈折率プロファイルの区分的平滑化のような、追加の複数の制約を、再構成処理において適用できる。また、空間分解能および光学的断面機能は、1軸スキャンを採用する平面波断層撮影に対するものと同じである。

【0027】

図4Aから4Bは、空間周波数領域における複数の複素場の例示的マッピングを示す。特に、図4Aは、200回反復後の、RKOヒト大腸癌細胞の屈折率マップを示す。図4Aの(i)に、断面中心が細胞の核および核小体を明瞭に示している。図4Aの(ii)は、様々な高さに対して抽出された複数の水平断面図を示す(複数のスライス間の間隔は15 μm)。結果は、細胞内の様々な構造を、高度な光学的断面機能を用いて示していることに留意されたい。図4Aの(iii)は、同一細胞の3Dレンダリングイメージによる底部の半分を示す。複数の収集された光学的断面は、メモリに格納され得、複数の別個のスライスまたは領域が表示のために選択され得る。

10

【0028】

複数の細胞の質量と体積を測定することは、どのように、複数の細胞が成長し、それらの成長は制御できるのかという、生物学の根本的問題につながる。生物標本の屈折率は、標本内の複数の有機分子の集まりに比例する。この関係を採用すると、細胞内の乾燥密度と呼ばれる、非水物質の密度を次から取得できる。

20

【数13】

$$\rho_{dry} = \frac{1}{\alpha} (n(x, y, z) - n_0), \quad (6)$$

式(6)

【0029】

量 α は、平均比屈折率インクリメントであり、 $\alpha = 0.18 \text{ (g/mL)}^{-1}$ である。屈折率マップから、試料の体積は閾値化することで直接的に(例えば、複数のボクセル数を数えることによって)、あるいは球状であることを前提とすると、投影面積から計算可能である。細胞内の合計乾燥質量は、3D密度マップ、式(6)を細胞体積で積分することで取得され得、平均乾燥密度が合計乾燥質量を細胞体積で割り算することで取得される。この方法を検証するために、屈折率1.54の屈折率整合油を流れる、10 μmの複数のポリスチレンビーズがイメージされた。当該ポリスチレンビーズ(N=8)の測定された直径は、標準偏差0.35 μmの9.89 μmであり、屈折率は標準偏差0.005の1.583であった。これらの値は、製造業者によって提供される複数の値(10 μm、1.585)と非常によく一致する。製造業者の複数の値で正規化される場合、複数のビーズの体積および屈折率は、それぞれ0.980 ± 0.110および0.986 ± 0.032であり、これらは図4Cに示される。これらの値は、体積および密度の測定に対し、提案される方法の精度に対する複数の推定値として使用されてよい。

30

【0030】

図4B(i~iii)は、イメージされた複数のRKOヒト大腸癌細胞(N=60)およびイメージされた複数のRPMI8226ヒト多発性骨髄腫細胞(N=60)の体積、乾燥質量、および乾燥密度をそれぞれ示す。測定が非同調細胞集団に対し適用されたので、質量と体積の分布は広範である。興味深いことに、複数のRPMI8226細胞(1654 ± 69 f l)の平均体積は、複数のRKO細胞(1845 ± 70 f l)のそれより11.6 ± 6.3%小さい一方で、複数のRPMI8226細胞(345 ± 13 p g)の平均乾燥質量は、複数のRKO細胞(300 ± 11 p g)のそれより、15.0 ± 5.8%大きい。2つのタイプの細胞の体積は、統計的に異ならないが(p > 0.05、両側t検定、N=60)、複数のRPMI8226細胞(170 ± 5 g/l)は、それらのより大きい質量に起因し、複数のRKO細胞(145 ± 5 g/l)より、17.2 ± 5.4%大

40

50

きな平均（乾燥）密度を有することに留意されたい。乾燥質量および密度の両方は、2つのタイプの細胞で大きく異なる（ $p < 0.01$ 、両側 t 検定、 $N = 60$ ）。

【0031】

3Dホログラフィックイメージングフローサイトメトリ（3D HIFC）は、マイクロ流体チャネルを連続的に流れる複数の細胞の3D屈折率マップを提供する。特に、複数の試料は、直線集束ビームを横切って流れ、システムは、軸外デジタルホログラフィを使用して、複数の試料から散乱された複数の角スペクトルを記録した。複数の回折および欠損角アーティファクトを適切に処理する再構成アルゴリズムを採用することによって、システムは複数の細胞の3D屈折率マップを高い空間分解能および精度をもって生成する。当該方法は、可動システム要素を何ら要求せず、従って、当該方法は、既存のフローサイトメトリ構成の下流側に容易に組み込まれることができ、さらにスクリーニングの精度を向上させる。より重要なことには、屈折率マップは、細胞または細胞内レベルにおける質量分布に関連付けられ得る豊富な情報を含み、従って、複数の細胞器官のメタボリズムを測定するために使用される。当該システムは、屈折率コントラストを使用することで、汚染のない、精確な、単一の細胞特性評価を提供する。

【0032】

RKOヒト大腸癌細胞は、10%のFBS（インビトロゲン、10438026）および1%の100Xペニシリンストレプトマイシン溶液（インビトロゲン、15140-122）で補足されたダルベッコ変法イーグル培地（インビトロゲン、21063-029）で培養された。複数のRPMI 8226ヒト多発性骨髄腫細胞は、10%のFBS、および1%の100Xペニシリンストレプトマイシン溶液で補足されたRPMI 1640培地（インビトロゲン、11835-030）で培養された。70~80%の密集度で、複数の細胞は0.25%のトリプシンEDTA（インビトロゲン、25200-114）で収集され、新鮮な培地に1:100で希釈され、シリンジでマイクロ流体チャネル内に注入された。複数の10 μ mのポリスチレンビーズおよび屈折率液体がPolysciences, Inc（17136-5）およびCargille（1809X）からそれぞれ購入された。

【0033】

マッハツェンダ干渉法に基づく軸外ホログラフィのための、システム40に係る例示的な模式図を示す図1Cおよび1Dに戻ると、例えば、HeNeレーザ（ $\lambda = 633\text{nm}$ ）のような光源からのレーザビームが、試料ビームおよび参照ビームにスプリットされ（例えば、第1のビームスプリッタB1を使用して）、（例えば、第2のビームスプリッタB2を利用して）検出面の前（検出器44において）で後から結合されている。前述の通り、試料ビームは最初に、円筒形レンズCL（例えば、 $f = 100\text{mm}$ ）を用いて、高NA集光レンズL（例えば、 $NA = 1.4$ ）の後焦点面のラインに焦点が合わされている。高NA集光レンズLを使用して、ラインビームは試料平面SP上の細いラインビームにしっかり再度焦点を合わされている。試料平面は元の試料ビームに対し直交してよく、より広い角度範囲を有してよい。複数の試料粒子（例えば、細胞）は、マイクロ流体チャネル内のこのラインビームを横切って流れ、複数の細胞からの散乱光の複数の角スペクトルは、高NA対物レンズOLを使用して収集される。集光は、筒型レンズ（TL）を使用して、集束させられ、筒型レンズの後で、ビームは円筒形レンズCL2（例えば、 $f = 400\text{mm}$ ）を使用して拡張される。非焦点軸に沿って4f構成にイメージを供給すべく、2つの他の円筒形レンズCL1およびCL3（例えば、 $f = 200\text{mm}$ ）がビーム経路に使用されてよい。参照ビームに対し直交するようにビーム軸を変更すべく、ミラーM1が筒型レンズ（TL）および円筒形レンズCL1~CL3の間に使用されてよく、それにより、第2のビームスプリッタB2を使用して、それらの再結合を可能にする。検出面に入射する角スペクトルの拡大イメージは、参照ビームとともに干渉イメージを作成する。軸外ホログラフィ用に、参照ビームの角度は、例えば、傾斜ミラーM2を使用して、収集された試料ビームに対し僅かに傾斜46されている。円筒形レンズCL2の後焦点面に配置された相補型金属酸化膜半導体（CMOS）カメラ（1024PCI、Photron）は

、複数の干渉イメージを例えば、5000フレーム/秒でキャプチャすべく、内部クロックまたは別個のコントローラによって作動され得る。データプロセッサ45は、本明細書に記載の通りデータを処理し、システム動作を制御すべく、コンピュータ可読媒体に格納された複数の命令を実行するソフトウェアを用いてプログラムされ得る。複数の例示的な実施形態において、集光レンズLおよび/または対物レンズOLは、0.5より大きい、好ましくは1.0より大きい、より好ましくは1.3より大きい、高開口数によって特徴付けられてよい。

【0034】

特に、軸外ホログラフィを使用すると、流れる試料の各位置に対しワンショットで、角スペクトルの振幅と位相の両方を記録することが可能になる。従って、複数の例示的な実施形態において、試料ビームに対する参照ビームの僅かな傾斜は、複数の未処理の干渉イメージにおける3ピクセルフリンジ周期を生じさせるべく構成される。例示的な実施形態において、検出された参照光および検出された散乱光の間の角度オフセットは、2.5~4ピクセル間の未処理の干渉イメージにおけるフリンジ周期によって特徴付けられる。

【0035】

複数の例示的な実施形態において、検出システムは、試料ごとに少なくとも30イメージ、好ましくは試料ごとに少なくとも100イメージ、より好ましくは試料ごとに少なくとも200イメージのスキャン解像度を使用してよい。いくつかの実施形態において、検出された角度範囲は、少なくとも-30度から30度、好ましくは少なくとも-45度から45度、より好ましくは少なくとも-60度から60度であってよい。従って、検出された角度分解能は、少なくとも2度、またはより好ましくは少なくとも1度であってよい。

【0036】

3次元の屈折率測定は、最小摂動で細胞全体および複数の内部の細胞器官の質量を測定することによって、細胞メタボリズムを定量化することを可能にする。平面波の断層撮影を使用することで、付着力のある状態で成長する複数の細胞は、複数の浮遊細胞のように、サイズ別の成長速度を有する一方で、分裂非対称は前者の方がより高いことが実証された。低ノイズ回折位相差顕微鏡と連携し、哺乳類の軟骨細胞は、体積増加に関する3つの異なる段階を受けることが本明細書において、さらに実証され、また示される。最近の結果は、多波長における屈折率測定から、複数の細胞の分子固有の指標が取得され得ることを示す。

【0037】

本明細書に示されるように、マイクロ流体チャネル内を連続的に流れる複数の細胞の屈折率イメージングのための複数のシステムおよび方法が提供される。特に、記載された複数のシステムおよび方法は、流れる試料の各位置に対し、ワンショットで複素角スペクトルを測定可能な軸外デジタルホログラフィを使用する。断層撮影再構成のために、スカラー回折理論に基づくアルゴリズムが採用され、異なる複数の高さを流れる焦点がぼけた複数の細胞器官または細胞に起因する複数のアーティファクトが修正されてよい。これらの複数の技術を使用すると、フロー構成における異なる複数のタイプの細胞に関する屈折率の複数の3Dマッピングを取得でき、それによって、複数の細胞の体積、乾燥質量および乾燥密度のような複数の特性を定量化できる。これは、フロー構成で細胞密度を取得するための複数の先行技術に対し、複数の顕著な利点を与える。先行技術は、2つの異なる密度の液体に対し、懸濁されたマイクロチャネル共振器を使用する、浮遊質量測定に依存する。その場合、各測定に対し、当該液体を切り替えることは、健全な、自然な状態における複数の細胞の高スループットまたは長期のイメージングに対し理想的ではないことがある。

【0038】

本明細書から導かれ、採用される断層撮影再構成アルゴリズムは、チャネル内の細胞の鉛直位置は固定されており、かつ、データ収集の間、または各セルの直線集束ビームを横切って完全に通過する間に対し、細胞の回転は無視できることを前提とする。コリメート

10

20

30

40

50

されたレーザ照明の下、高速カメラを用いて、複数の細胞を観察すると、細胞タンブリングは、本明細書に記載の設計条件およびフロー条件に対し最小であることが確認され得る。しかしながら、マイクロ流体チャネル内を流れる複数の細胞を安定化させるメカニズムを用いず、細胞の回転の可能性は、完全に除外され得ない。複数のマイクロ流体システムにおいて、細胞の回転は、フロー速度に比例し、細胞のサイズに反比例する、細胞に働くせん断力によって引き起こされる。細胞がチャネルの高さの真ん中に位置する際、細胞の複数の側面における流体速度の差が減少するので、チャネルの高さの半分より大きい細胞は、このせん断力によってあまり影響を受けない。複数の空気欠陥とともに複数のPDMSビーズをイメージングすることにより、データ取得中(0.1秒)における、複数の細胞(平均直径: ~ 15 μm)の最大回転は、約 5×10^{-3} のレイノルズ数において、約4度であると推定できる。この回転の最小効果は、図4Aの、複数の再構成された例示イメージ内の細胞と核の複数のはっきりした境界によってさらに確認される。回転していれば、おそらくばやけを生じさせたことであろう。

【0039】

好ましい実施形態において、屈折率分散を測定すべく、チャネル内を流れる物質を照明するため、複数の異なる波長の光が使用され得る。断層イメージングに対する複数の波長の使用に関するさらなる詳細は、Sung他のPLOS ONE、Vol、7、11(2012)の「Stain-Free Quantification of Chromosomes in Live Cells Using Regularized Tomographic Phase Microscopy」に見出され得、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。従って、試料の複数のイメージが、異なる複数の照明波長において取得され得る。

【0040】

各角スペクトルの振幅と位相は、上記の軸外ホログラフィセットアップによって記録される。図2の(i~iv)は、未処理の干渉イメージの処理方法を示す。検出器上の放射照度は、次のように表され得る。

【数14】

$$I(x, y) = I_S(x, y) + I_R + 2\sqrt{I_S(x, y)I_R} \cos(2\pi(px + qy) - \Delta\phi(x, y)), \quad (7)$$

式(7)

ここで、 $I_S(x, y)$ および I_R は、それぞれ試料ビームおよび参照ビームの放射照度であり、 (x, y) は、当該2つのビームの間の位相差である。ベクトル (p, q) は、参照ビームの角度に対する、検出面上の試料ビームの入射角を示す。ベクトルの大きさおよび角度は、未処理の干渉における、複数のフリンジ(図2の(i)の挿絵を参照)の間隔および向きをそれぞれ示す。図2の(ii)は、図2の(i)のフーリエ変換の大きさ、または対数尺度(底10)の式(7)を示す。点線の円内の領域は、次によって記述され得る。

【数15】

$$\tilde{I}(u, v) = \iint \sqrt{I_S(x, y)I_R} e^{i(2\pi(px + qy) - \Delta\phi(x, y))} e^{-i2\pi(ux + vy)} dx dy = \tilde{\Phi}(u - p, v - q), \quad (8)$$

式(8)

ここで、

【数16】

$$\tilde{\Phi}(u, v)$$

は、

【数17】

$$\Phi(x, y) = \sqrt{I_S(x, y)I_R} e^{-i\Delta\phi(x, y)}$$

のフーリエ変換である。点線の円内の領域を選択し、それを周波数座標の元に移動させ

、その逆フーリエ変換を取ることによって、関数 (x,y) を取得できる。図 2 の (iii) および図 2 の (iv) 内の複数のイメージは、図 2 の (i) から取得された、それぞれ振幅イメージと位相イメージである。

【0041】

複数のマイクロ流体デバイスは、微細加工されたマスタモールドで、ポリジメチルシロキサン（ミシガン州ミッドランドのダウコーニングの P D M S ）を成型することによって生成された。モールドは、後述される複数の標準的なフォトリソグラフィックテクノロジーを使用して製造された。シリコンウェハが 200 にセットされたオーブンで 30 分間焼成され、酸素プラズマ（カリフォルニア州コンコルドの March ）で洗浄され、その後、およそ 30 μm の最終厚みを実現すべく、1850 rpm で SU-8 25 フォトレジスト（マサチューセッツ州ニュートンの Microchem の SU8 ）で回転塗布され、製造業者によって推奨される、標準的な手順に従い処理された。P D M S の薄膜層（厚み < 200 μm ）が作成され、真空チャンバで約 1 時間ガス抜きされ、その後、600 rpm で、ウェハ上に 15 秒間回転塗布された。65 で約 8 時間焼成後、より厚い、硬化されたカット済みの複数の P D M S ピース（長さ ~ 1 cm、幅 ~ 0.5 cm、高さ ~ 0.3 cm ）とともに、マスタを覆う P D M S 薄膜層は、酸素プラズマに 20 秒間さらされ、入口領域および出口領域（図 1 E ）に接着された。モールドは、75 で 10 分間焼成され、切断され、マスタモールドからゆっくり剥離され、その後、デバイスの入口穴と出口穴を画定すべく、0.75 mm パンチャで穿孔された。最後に、穿孔されたメンブレンベースのチャンネルデバイスとともに、48 x 65 mm の No. 1 金被覆カバーガラス（ペンシルバニア州ピッツバーグの Fisher Scientific ）が酸素プラズマに 20 秒間さらされ、複数のマイクロ流体チャンネルを画定すべく、注意深く 75 において 10 分間接着された。可撓性のあるプラスチック管の 2 つが、~ 3 cm の長さに切断され（マサチューセッツ州ウーバンの Greene Rubber Co. , 社のタイゴン、ID 0.010 インチ x OD 0.030 インチ）、その後、デバイスの入口穴と出口穴に挿入された。次に、複数の試料装填の目的のため、シリンジが接続されるのを可能にすべく、30 g の鈍化針（ニュージャージー州デイトンの Brico Medical Supplies ）が当該 2 つの管の一方に挿入された。もう一方の流体試料ソースは、システムと共に使用するため、流入ポートに接続され得る。イメージされた試料を、流出ポートから収集すべく、試料収集コンテナが使用され得る。

【0042】

図 5 に示されるのは、本発明の複数の好ましい実施形態によるプロセス順序 100 である。そこでは、データプロセッサ 45 が、イメージング検出器からイメージデータを受信し、フローチャンネル内のシステムの実視野を移動する試料に係る複数の 2 次元および 3 次元イメージを生成すべく、イメージデータを処理し、試料の屈折率の 3 次元分布を決定する。データプロセッサが以下の一連の命令を実行するように、ソフトウェアプログラムがメモリ内に格納され得る。オブジェクトの複数の 3 次元イメージを生成すべく、一連の干渉イメージが検出される 102。各未処理のイメージからの位相データおよび振幅データが抽出され 104、さらなる処理のためにメモリ内に格納され得る。複数の抽出された場は、3D サイノグラム 106 にマッピングされ得、そこにおける は様々な座標である。サイノグラムの x-y 平面に対するフーリエ変換が計算され 108、その結果が周波数領域の散乱ポテンシャルにマッピングされる 110。本明細書に記載の通り、反復的な再構成処理が適用され 112、逆フーリエ変換が使用され 114、計算された屈折率分布 116 を生成する。

【0043】

本発明の複数の好ましい実施形態は、試料に関する補足情報を生成すべく、多様なイメージング機能を使用できる。これは、測定される物質をさらに特性化すべく、追加の複数の分析処理も提供できる。図 6 A は、前述の通り、複数の干渉イメージが、異なる複数の角度 202 から取得される、プロセスフロー順序 200 を示す。フーリエマッピング 204 後、測定される物質の形態をより正確に反射すべく、平滑化制約 206 がデータに適用

され得る。例えば、細胞物質は通常、中心に、より均一な屈折率分布を有し、細胞の境界において急な推移を受ける。対象の複数の細胞が、チャネル内を流れる周囲媒体よりも、より高い屈折率を有することを示し得る、正制約も使用されてよい。複数の試料エラーに起因して発生し得る周波数空間の空の領域に入力すべく 210、追加のデータも使用され得る。収束 212 が測定され得、必要に応じて所望の収束値を実現すべく、複数の制約ステップが反復 214 され得るよう、この正規化処理は反復プロセス順序の一部として使用され得る。

【0044】

図 6 B のプロセス順序 250 に見られるように、複数の好ましい実施形態は、異なる複数の特性を決定すべく 254、チャネル内の複数の開口または領域を介する測定 252 を提供し得る。本明細書に全般的に記載される干渉イメージングに加え、測定中、フロー内の複数の細胞が回転しているかどうか、回転速度を判断し、かつ、回転速度を修正すべく角度試料数を増大させる等、複数のイメージングパラメータを調整するために使用され得る、複数の補正信号を生成すべく、第 2 の領域における複数の測定のために、第 2 の検出器が使用され得る。あるいは、結果的に得られるイメージデータが、より低い角度サンプリング処理のために、修正され得るよう、試料の全体積をイメージすべく、試料からの光を反射する第 2 のレーザ光源を使用する共焦点イメージングが使用され得る。この方法を使用して、試料の蛍光は測定され得る。別のオプションは、第 2 の波長における複数のイメージ、および物質の異なる複数の構造的または組成的特性を検出すべく比較される複数のイメージを生成する。このデータは、本明細書に記載された複数の反復技術を使用して、分析され得る 256。データは、さらなる処理または表示のために格納され得る 258。

【0045】

本発明は、複数の特定の好ましい実施形態に関連して本明細書において記載されており、当業者は本出願を読んだ後、本明細書に記載された複数のデバイスおよび方法に対し、複数の変更、複数の均等物による複数の置換、他の変形をもたらすことができる。本明細書に記載された各実施形態は、他の複数の実施形態とともに開示された、そのような変更を含むこともできる。

本明細書によれば、以下の各項目に記載の構成もまた開示される。

[項目 1]

軸外ホログラフィのためのイメージングシステムであって、
試料ビーム経路と、参照ビーム経路と、に分割される光を放出する照明源と、
検出において、検出された参照光は、検出された散乱光に対して角度オフセットするように、前記試料ビーム経路に沿って収集された前記散乱光と、前記参照ビーム経路に沿って前記参照光と、の両方を検出する検出システムと、を備え、
前記試料ビーム経路は、
試料を直線集束ビームで照明すべく、前記試料ビーム経路に沿って、前記光の焦点を合わせる試料照明オブティクスと、
前記試料ビーム経路に沿って、試料から散乱された光を収集する収集オブティクスと、を含んでいる、イメージングシステム。

[項目 2]

前記照明源は、コリメートされた照明源である、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 3]

前記照明源は、多波長の照明源である、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4]

前記照明源から放出される前記光を、前記試料ビーム経路と、前記参照ビーム経路とに分割するためのスプリッタをさらに備える、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 5]

前記参照ビーム経路は、検出された前記参照光を、検出された前記散乱光に対して角度オフセットする、オフセットオブティクスを含む、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 6]

前記オフセットオブティクスは、傾斜ミラーを含む、請求項 5 に記載のシステム。

[項目 7]

前記試料および前記直線集束ビームを互いに相対的に並進させる、スキャンシステムをさらに備える、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 8]

前記スキャンシステムは、前記試料を、前記直線集束ビームを横断して並進させる、請求項 7 に記載のシステム。

[項目 9]

前記スキャンシステムは、懸濁培地に懸濁された試料を、直線集束ビームを横断して流す、基板で定義されたフローチャネルを含む、請求項 8 に記載のシステム。

[項目 10]

前記試料は細胞である、請求項 9 に記載のシステム。

[項目 11]

前記フローチャネルは、前記試料の推定された幅サイズの 150 ~ 200 % の間の断面直径を含む、請求項 9 に記載のシステム。

[項目 12]

前記断面直径は、前記フローチャネルの断面高さである、請求項 11 に記載のシステム。

[項目 13]

(i) 前記フローチャネル内の前記試料の回転を低減させる、および (i i) 前記フローチャネル内の前記試料の安定性を増大させることのうち少なくとも 1 つのために、前記フローチャネルの (i) 断面高さ、および (i i) 断面幅のうち少なくとも 1 つが、選択される、請求項 9 に記載のシステム。

[項目 14]

前記フローチャネルの前記断面高さは、前記フローチャネルの前記断面幅とほぼ同じであり、前記フローチャネルの前記断面高さおよび前記断面幅を選択すべく、前記フローチャネルの前記断面高さおよび前記断面幅に基づく回転推定値が使用される、請求項 13 に記載のシステム。

[項目 15]

前記フローチャネルの (i) 前記断面高さおよび (i i) 前記断面幅のうち少なくとも 1 つが、経験データに基づいて選択される、請求項 13 に記載のシステム。

[項目 16]

前記経験データは、複数のテストされたフローチャネルの各々の中を流れる参照物質のイメージングに基づいて、複数のテストされたフローチャネルに対する複数の回転推定値を含む、請求項 15 に記載のシステム。

[項目 17]

前記フローチャネルの中心線と、前記収集オブティクス近傍の表面との間の前記基板の厚みは、200 μ m 未満である、請求項 9 に記載のシステム。

[項目 18]

前記フローチャネルの中心線と、前記収集オブティクス近傍の表面との間の前記基板の厚みは、100 μ m 未満である、請求項 9 に記載のシステム。

[項目 19]

当該システムはマルチモードシステムである、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 20]

前記マルチモードシステムは、前記試料の推定されたまたは実際の試料の回転を検出する、回転検出システムを含む、請求項 19 に記載のシステム。

[項目 21]

前記マルチモードシステムは、共焦点顕微鏡システムを含む、請求項 19 に記載のシステム。

10

20

30

40

50

[項目 2 2]

前記共焦点顕微鏡システムは、前記試料のための複数の体積の測定を検出する、請求項 2 1 に記載のシステム。

[項目 2 3]

前記マルチモードシステムは、それぞれが異なる波長範囲のための複数のイメージングシステムを含む、請求項 1 9 に記載のシステム。

[項目 2 4]

前記マルチモードシステムは、それぞれがフローチャネル沿いの異なるポイントにおける、複数の開口を含む、請求項 1 9 に記載のシステム。

[項目 2 5]

前記マルチモードシステムは、共有された開口を含む、請求項 1 9 に記載のシステム。

[項目 2 6]

検出された前記参照光と、検出された前記散乱光との間の前記角度オフセットは、検出された前記参照光のビーム軸と、検出された前記散乱光のビーム軸との間の角度オフセットである、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 2 7]

検出された前記参照光と、検出された前記散乱光との間の前記角度オフセットは、2 . 5 ~ 4 ピクセルの間の、複数の未処理の干渉イメージにおけるフリンジ周期によって特徴付けられる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 2 8]

前記試料照明オブティクスは、円筒形レンズおよび集光レンズを含み、
前記円筒形レンズは、照明経路沿いの光の焦点を、前記集光レンズの後焦点面の線に合わせ、

前記集光レンズは、前記線の焦点を試料平面上に再度合わせる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 2 9]

前記集光レンズは、高開口数のレンズである、請求項 2 8 に記載のシステム。

[項目 3 0]

前記集光レンズは、0 . 5 より多い開口数を含む、請求項 2 9 に記載のシステム。

[項目 3 1]

前記集光レンズは、1 . 0 より多い開口数を含む、請求項 2 9 に記載のシステム。

[項目 3 2]

前記集光レンズは、1 . 3 より多い開口数を含む、請求項 2 9 に記載のシステム。

[項目 3 3]

前記収集オブティクスは、高開口数対物レンズを含む、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 3 4]

前記対物レンズは、0 . 5 より多い開口数を含む、請求項 3 3 に記載のシステム。

[項目 3 5]

前記対物レンズは、1 . 0 より多い開口数を含む、請求項 3 3 に記載のシステム。

[項目 3 6]

前記対物レンズは、1 . 3 より多い開口数を含む、請求項 3 3 に記載のシステム。

[項目 3 7]

前記収集オブティクスはさらに、前記対物レンズの下流側に、収集された前記散乱光の焦点を合わせるための管形レンズを含む、請求項 3 3 に記載のシステム。

[項目 3 8]

前記収集オブティクスはさらに、前記管形レンズの下流側に、円筒形レンズを含む、請求項 3 7 に記載のシステム。

[項目 3 9]

前記収集オブティクスはさらに、前記管形レンズの下流側に、非焦点軸に沿い 4 f 構成を実装するための、一連の円筒形レンズを含む、請求項 3 7 に記載のシステム。

10

20

30

40

50

[項目 4 0]

検出された前記散乱光は、前記試料から散乱された複数の角スペクトルを含む、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 1]

前記検出システムは、試料ごとに少なくとも 3 0 イメージのスキャン解像度を使用する、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 2]

前記検出システムは、試料ごとに少なくとも 1 0 0 イメージのスキャン解像度を使用する、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 3]

前記検出システムは、試料ごとに少なくとも 2 0 0 イメージのスキャン解像度を使用する、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 4]

少なくとも - 3 0 度から 3 0 度の検出された角度範囲で特徴付けられる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 5]

少なくとも - 4 5 度から 4 5 度の検出された角度範囲で特徴付けられる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 6]

少なくとも - 6 0 度から 6 0 度の検出された角度範囲で特徴付けられる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 7]

少なくとも 2 度の検出された角解像度で特徴付けられる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 8]

少なくとも 1 度の検出された角解像度で特徴付けられる、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 4 9]

前記試料の様々な位置 に対する複数の角スペクトルを含む、複数の未処理の干渉イメージを取得すべく、検出された前記参照光と、検出された前記散乱光とが使用される、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 5 0]

前記検出システムは、 k_x (空間座標 x に対応する空間周波数) 方向および 方向に沿って、フーリエ変換を計算してそれにより、サイノグラムを提供し、さらに前記サイノグラムの x 空間座標と y 空間座標に対するフーリエ変換を計算し、それを、フーリエ回折定理を使用して、3 D 空間周波数領域にマッピングする、請求項 4 9 に記載のシステム。

[項目 5 1]

前記検出システムは、データプロセッサに接続される、請求項 1 に記載のシステム。

[項目 5 2]

フローサイトメトリの方法であって、

試料を、チャンネルを通して移動させる段階と、

前記チャンネル内で、移動する前記試料を収束光で照明する段階と、

照明光に応答して、前記試料からの光を検出する段階と、

前記試料のイメージを形成する段階と、を備える、方法。

[項目 5 3]

前記試料の複数の位相イメージを生成する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 5 4]

前記チャンネルを横断して延びる線上の前記チャンネルを照明する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 5 5]

イメージデータをデータプロセッサで処理する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

[項目 5 6]

前記試料の 3 次元 (3 D) イメージを生成する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 5 7]

前記試料は、生物物質を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 5 8]

前記試料は、生物流体を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 5 9]

前記試料は、細胞を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

10

[項目 6 0]

前記試料は、癌性細胞を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 6 1]

前記試料の屈折率を決定する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 6 2]

前記試料のイメージを電子ディスプレイ上に表示する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 6 3]

制御システムを前記試料上で光をスキャンする複数のスキャンパラメータでプログラミングする段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

20

[項目 6 4]

収束円筒形光学要素で、光の焦点を前記チャンネル上に合わせる、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 6 5]

前記チャンネル内の流体の流速を調整する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 6 6]

前記試料の干渉イメージを生成する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 6 7]

前記イメージからの位相データを生成する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 6 8]

前記イメージからの振幅データを生成する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 6 9]

位相データおよび振幅データを 3 次元表示にマッピングする段階をさらに備える、請求項 5 2 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 0]

3 次元表示は、サイノグラムである、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 7 1]

マッピングされたデータの 2 次元フーリエ変換を形成する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

[項目 7 2]

フーリエ変換された角スペクトルを、空間周波数領域内の前記試料の散乱ポテンシャルにマッピングする段階をさらに備える、請求項 7 1 に記載の方法。

[項目 7 3]

計算された散乱ポテンシャルを提供すべく、反復計算を実行する段階をさらに備える、請求項 7 2 に記載の方法。

[項目 7 4]

3 次元散乱ポテンシャルを決定すべく、逆フーリエ変換を実行する段階をさらに備える

50

、請求項 7 1 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 5]

前記試料の屈折率を決定する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 6]

前記試料の屈折率分布を決定する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 7]

照明光を前記チャネルの視野に供給する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 7 8]

検出器において、参照光ビーム経路を、試料光ビーム経路に対し傾斜させる段階をさらに備える、請求項 5 2 から 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 9]

前記参照光ビーム経路および前記試料光ビーム経路は、ゼロより大きい角度で傾斜されている、請求項 7 8 に記載の方法。

[項目 8 0]

検出器で干渉パターンを検出する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 1]

20

供給オブティクスで、光源からの光を前記試料に連結する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 2]

収集オブティクスで、前記試料からの光を検出器に連結する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 3]

照明ビームを作動された光学素子に移動する段階をさらに備える、請求項 5 2 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 4]

前記作動された光学素子は、可動ミラーを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

30

[項目 8 5]

前記作動された光学素子は、スキャナを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

[項目 8 6]

イメージデータを平滑化制約で処理する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 8 7]

イメージデータを正制約で処理する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 8 8]

周波数空間の領域に入力するデータを生成する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

40

[項目 8 9]

前記試料を第 1 の波長および第 2 の波長で照明する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 9 0]

データを正規化する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 9 1]

前記チャネル内の前記試料の領域の回転を測定する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

[項目 9 2]

前記チャネル内の前記試料の共焦点イメージを取得する段階をさらに備える、請求項 5

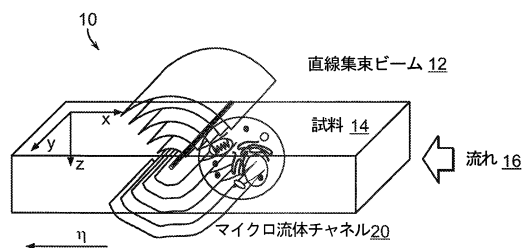
50

2に記載の方法。

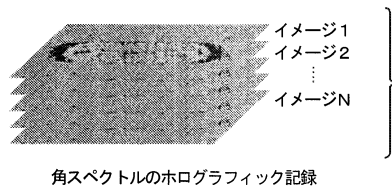
[項目 9 3]

前記試料内の蛍光を検出する段階をさらに備える、請求項 5 2 に記載の方法。

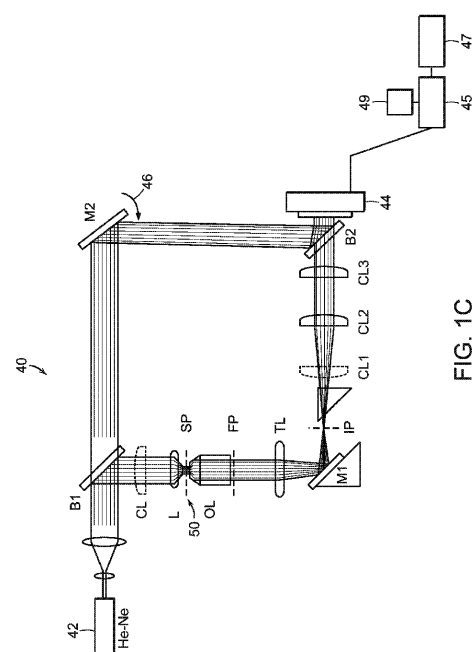
【 図 1 A 】



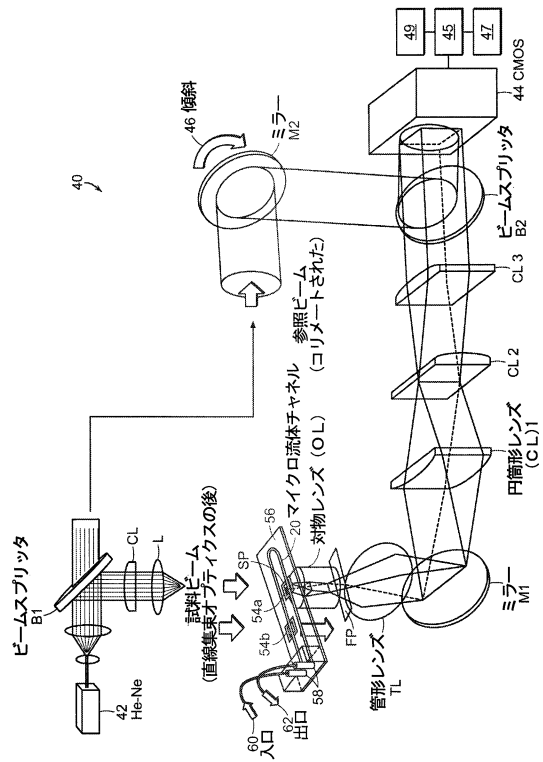
【 図 1 B 】



【 図 1 C 】



【図 1 D】



【図 1 E】

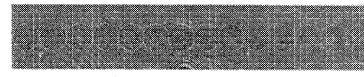


FIG. 1E

【図 2】

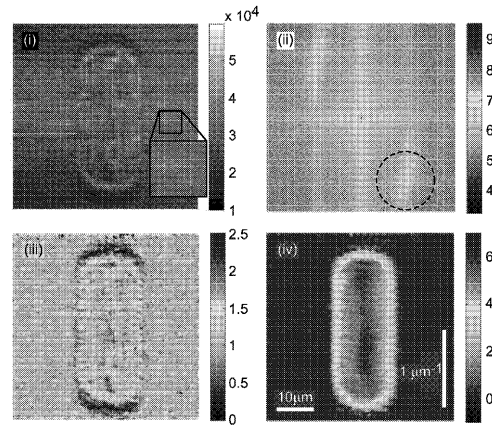
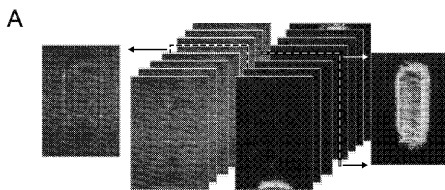
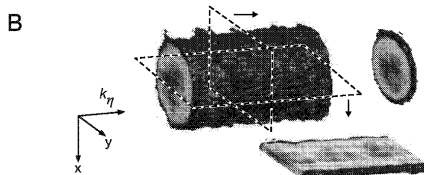


FIG. 2

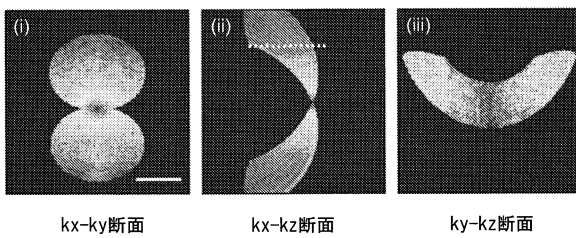
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



【図 4 A】

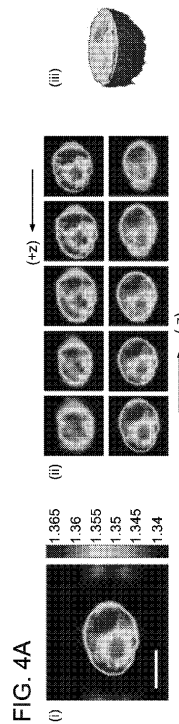
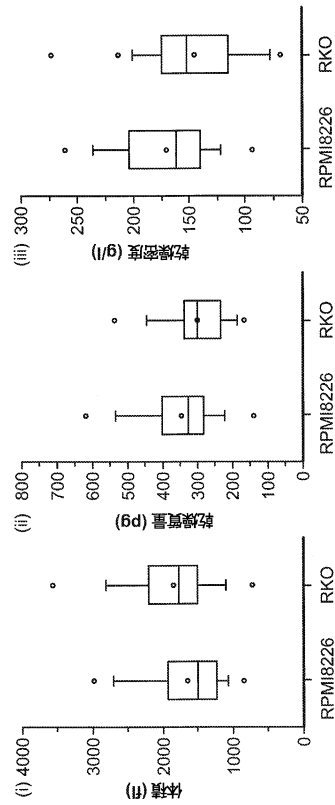
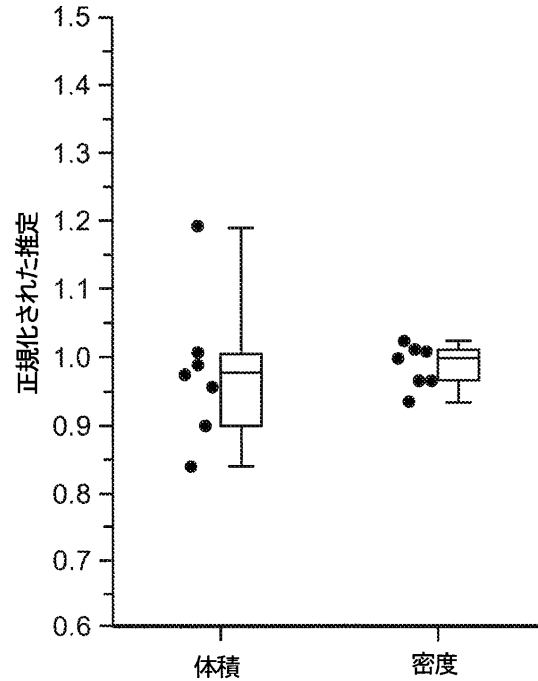


FIG. 4A

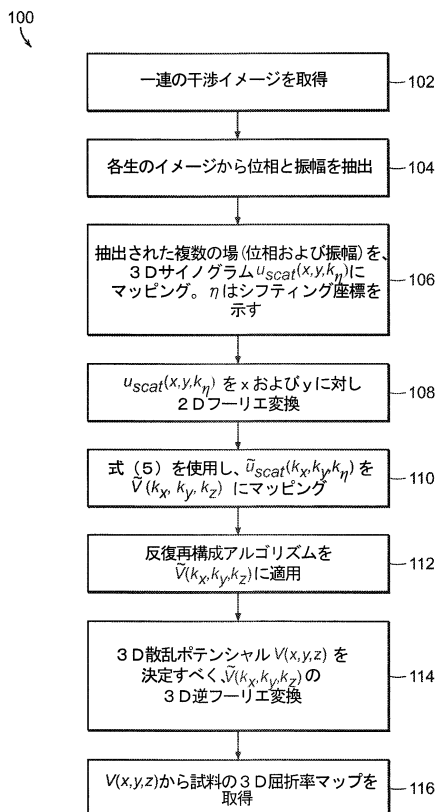
【図 4 B】



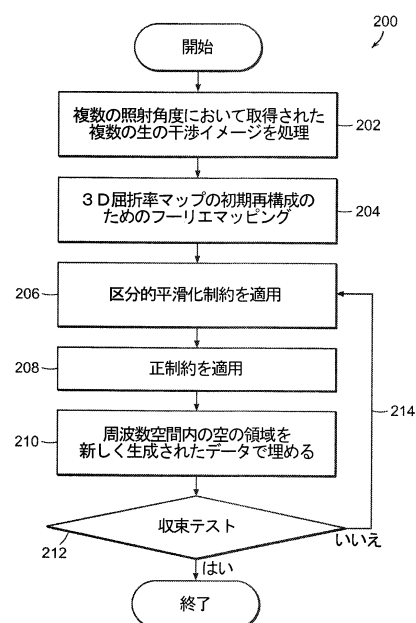
【図 4 C】



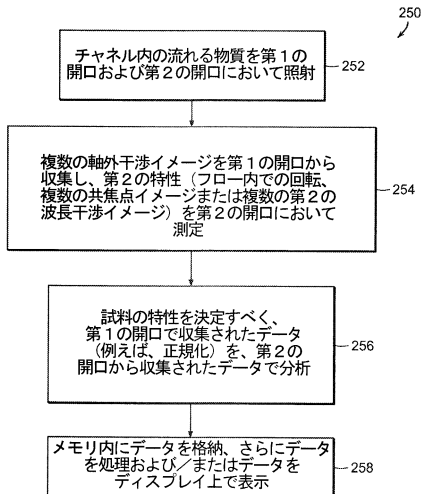
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 3 H 1/16 (2006.01) G 0 2 B 21/00
 G 0 3 H 1/16

- (72)発明者 ルー、ニヨム
 アメリカ合衆国、0 2 1 3 9 - 4 3 0 7 マサチューセッツ州、ケンブリッジ、7 7 マサチューセッツ アベニュー マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー内
- (72)発明者 ヤクーブ、ザヒド
 アメリカ合衆国、0 2 1 3 9 - 4 3 0 7 マサチューセッツ州、ケンブリッジ、7 7 マサチューセッツ アベニュー マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー内
- (72)発明者 ダサリ、ラマチャンドラ
 アメリカ合衆国、0 2 1 3 9 - 4 3 0 7 マサチューセッツ州、ケンブリッジ、7 7 マサチューセッツ アベニュー マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー内
- (72)発明者 ソ、ピーター、ティー．シー．
 アメリカ合衆国、0 2 1 3 9 - 4 3 0 7 マサチューセッツ州、ケンブリッジ、7 7 マサチューセッツ アベニュー マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー内

合議体

審判長 里村 利光

審判官 樋口 信宏

審判官 関根 洋之

- (56)参考文献 特表2 0 1 2 - 5 2 1 5 4 0 (J P , A)
 特開2 0 1 3 - 2 3 1 7 1 6 (J P , A)
 特表2 0 1 4 - 5 0 3 7 9 4 (J P , A)
 米国特許出願公開第2 0 0 9 / 0 1 2 5 2 4 2 (U S , A 1)
 米国特許出願公開第2 0 0 2 / 0 1 3 2 3 1 5 (U S , A 1)
 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 0 9 5 5 7 6 (U S , A 1)
 米国特許第4 2 9 3 2 2 1 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G03H 1/22

G01N 15/00

G01N 21/41

G01N 21/49

G02B 21/00

G03H 1/16