

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成26年9月18日(2014.9.18)

【公表番号】特表2014-505465(P2014-505465A)

【公表日】平成26年3月6日(2014.3.6)

【年通号数】公開・登録公報2014-012

【出願番号】特願2013-540047(P2013-540047)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 21/27 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/48 M

G 0 1 N 21/27 A

【手続補正書】

【提出日】平成26年7月29日(2014.7.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

生細胞と死細胞とを識別するように細胞集団中の細胞をカウントするための方法であって、

(a) 生細胞よりも死細胞を優先的に透過する生体染色で、集団のアリコート进行处理する工程；

(b) そのように処理した該アリコートを第一の波長帯の光で照明し、かつ該アリコートの第一の画像を生成する工程であって、該第一の波長帯の光は、該生体染色によって実質的に吸収されず、生細胞と死細胞の双方を視覚化することを可能にする、工程；

(c) 該第一の画像中の生細胞と死細胞の双方をカウントする工程；

(d) そのように処理した該アリコートを第二の波長帯の光で照明し、かつ該アリコートの第二の画像を生成する工程であって、該第二の波長帯の光は、該生体染色によって少なくとも部分的に吸収される、工程；

(e) 該第二の画像中の該生体染色が実質的に透過していない生細胞をカウントする工程；ならびに

(f) 該第一の画像中でカウントされた生細胞および死細胞の数から該第二の画像中でカウントされた生細胞数を引き算して、該第一の画像中の死細胞数を得る工程、を含み、該第一および第二の画像中の細胞をカウントする工程が細胞の内部と細胞の外形線とのコントラストを検出することを含む、方法。

【請求項2】

工程(b)が、第一の波長帯に制限された光を用いる第一の照明によってアリコートを照明し、かつ該第一の照明からの該アリコートの該第一の画像を生成することを含み、ならびに工程(d)が、第二の波長帯に制限された光を用いる第二の照明によって該アリコートを別途照明し、かつ該第二の照明からの該アリコートの該第二の画像を生成することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

工程 (b) および (d) が、第一の波長帯および第二の波長帯の双方を含む波長帯の光によってアリコート照明することを含み、工程 (b) が該第一の波長帯のみの光を用いて該第一の画像を生成することを含み、ならびに工程 (d) が該第二の波長帯のみの光を用いて該第二の画像を生成することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

第一の波長帯および第二の波長帯の双方を含む波長帯の光が、白色光である、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

第一の波長帯の光のみを通す吸収フィルターを介して第一の画像を生成すること、および第二の波長帯の光のみを通す吸収フィルターを介して第二の画像を生成することを含む、請求項3記載の方法。

【請求項 6】

第二の波長帯の範囲内の波長に対して選択的に反応性であるピクセルから分離している第一の波長帯の範囲内の波長に対して選択的に反応性であるピクセルを有するCMOS画像センサーによって、第一および第二の画像を生成することを含む、請求項3記載の方法。

【請求項 7】

生体染色がトリパンプルー、ブリリアントクレシルブルー、メチレンブルー、トリパンレッド、バイタルレッド、ニュートラルレッド、ヤーヌスグリーン、インドシアニンググリーン、メチレングリーン、サフラニン、アニリンイエロー、カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル、ヨウ化プロピジウム、臭化エチジウム、フルオレセインジアセテート、カルボキシフルオレセインジアセテート、フルオレセインイソチオシアネートジアセテート、およびアザフロキシ (azafloxin) からなる群より選択されるメンバーである、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

生体染色がトリパンプルー、ブリリアントクレシルブルー、メチレンブルー、トリパンレッド、バイタルレッド、ニュートラルレッド、ヤーヌスグリーン、インドシアニンググリーン、およびメチレングリーンからなる群より選択されるメンバーである、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

生体染色がトリパンプルー、ブリリアントクレシルブルー、ヤーヌスグリーン、およびヨウ化プロピジウムからなる群より選択されるメンバーである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

生体染色がトリパンプルーおよびヨウ化プロピジウムからなる群より選択されるメンバーである、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

生体染色がトリパンプルーである、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

生体染色がトリパンプルーであり、第一の照明の光が青色光、赤外線、および紫外線からなる群より選択されるメンバーであり、かつ第二の照明の光が赤色光、橙黄色光、および白色光からなる群より選択されるメンバーである、請求項2記載の方法。

【請求項 13】

生体染色がトリパンプルーであり、第一の照明の光が青色光であり、かつ第二の照明の光が橙黄色光である、請求項2記載の方法。

【請求項 14】

第一の画像が、アリコートを透過した光から生成される、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

第一の画像が、アリコートによって散乱した光から生成される、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

第一および第二の画像がデジタル画像である、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

電荷結合素子、相補型金属酸化膜半導体、フォトダイオードアレイ、電荷注入素子、LCOS (liquid-crystal-on-silicon) イメージャー、および高温ポリシリコンイメージャーからなる群より選択されるメンバー上に第一および第二の画像を生成することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

電荷結合素子および相補型金属酸化膜半導体からなる群より選択されるメンバー上に第一および第二の画像を生成することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 19】

相補型金属酸化膜半導体上に第一および第二の画像を生成することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 20】

以下の工程を含む、生細胞と死細胞とを識別するように細胞集団中の細胞をカウントするための方法：

(a) 生細胞よりも死細胞を優先的に透過する生体染色で、集団のアリコート进行处理する工程；

(b) そのように処理した該アリコートを第一の波長帯の光で照明し、かつ該アリコートの第一の画像を生成する工程；

(c) そのように処理した該アリコートを第二の波長帯の光で照明し、かつ該アリコートの第二の画像を生成する工程であって、該第一の波長帯および該第二の波長帯は、該第一の波長帯よりも該第二の波長帯からの光を実質的に多く該生体染色が吸収するように選択される、工程；ならびに

(d) 該アリコートの個々の細胞について、該第一の画像と該第二の画像との間のコントラストの差を検出し、かつ

閾値を上回るコントラストの差を示す細胞が死細胞と定義されかつ閾値を下回るコントラストの差を示す細胞が生細胞と定義されるように選択された閾値に対して、前記差を比較し、かつ

死細胞と定義された該細胞を、生細胞と定義された該細胞とは別にカウントする工程。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

このたび、細胞集団中の生細胞と死細胞とを識別する細胞カウントは、生体染色で集団进行处理する工程、集団または集団のアリコートを照明する工程、および集団を透過する照明からの光のたった2つの画像を得る工程によって得ることができるということを見出した。この画像は、生体染色によって異なる程度で吸収される異なる波長帯の光の画像である。1つの画像は、ユーザーまたはセンサーが全細胞、生細胞および死細胞をカウントすること、または全細胞、生細胞および死細胞を表すカウントを達成することを可能にし、もう一方の画像は、ユーザーまたはセンサーが生細胞を死細胞から識別すること、または死細胞を別にして生細胞を表すカウントを達成することを可能にする。2つの照明から、識別可能な細胞の画像、好ましくは連続的な細胞の画像が得られ、2枚の画像は共同で、生細胞および死細胞の双方に関する全情報を提供する。特に、集団によって実質的に吸収されない光の画像であり得る細胞集団による吸収の程度のより低い光の画像は、ユーザーまたはセンサーが全細胞、生細胞および死細胞をカウントすること、または全細胞、生細胞および死細胞を表すカウントを達成することを可能にし、吸収の程度のより高い光の画像は、ユーザーまたはセンサーが生細胞を死細胞から識別すること、または死細胞を別にして生細胞を表すカウントを達成することを可能にする。前者の画像、即ち、全細胞数が導かれる画像は、細胞の外形線を際立たせることによって個々の細胞を示し、そうでな

れば入射光の吸収に起因するであろう不確かな形状によるものではない。したがって、2つのカウントから、それぞれ、全細胞および生細胞の正確なカウントが得られ、引き算によって死細胞の正確なカウントも得られる。

[本発明1001]

以下の工程を含む、生細胞と死細胞とを識別するように細胞集団中の細胞をカウントするための方法：

(a) 生細胞の膜よりも死細胞の膜を優先的に透過する生体染色で、集団のアリコート进行处理する工程；

(b) そのように処理した該アリコートを照明し、かつ該アリコートを透過する光の第一および第二の画像を生成する工程であって、該第一の画像は、該生体染色によって実質的に吸収されない第一の波長帯の光の画像であり、かつ該第二の画像は、該生体染色によって少なくとも一部分が吸収される第二の波長帯の光の画像である、工程；ならびに

(c) 該第一および該第二の画像中の細胞をカウントする工程であって、それによって、該第一の画像中でカウントされた細胞数が、該集団の全細胞を表し、該第二の画像中でカウントされた細胞数が、該集団の生細胞を表し、かつ該第一の画像中でカウントされた細胞数引く該第二の画像中でカウントされた細胞数が、該集団の死細胞を表す、工程。

[本発明1002]

工程 (b) が、
第一の波長帯に制限された光を用いる第一の照明によってアリコートを照明し、かつ該アリコートを透過する該第一の照明からの光の該第一の画像を生成すること、および第二の波長帯に制限された光を用いる第二の照明の光によって該アリコートを別途照明し、かつ該アリコートを透過する該第二の照明からの光の該第二の画像を生成すること
を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

工程 (b) が、
第一の波長帯および第二の波長帯の双方を含む波長帯の光によってアリコートを照明し、かつ第一の波長帯のみの光の該第一の画像を生成すること、および該第二の波長帯のみの光の該第二の画像を生成すること
を含む、本発明1001の方法。

[本発明1004]

第一の波長帯および第二の波長帯の双方を含む波長帯の光が、白色光である、本発明1003の方法。

[本発明1005]

第一の波長帯の光のみを通す吸収フィルターを介して第一の画像を生成すること、および第二の波長帯の光のみを通す吸収フィルターを介して第二の画像を生成することを含む、本発明1003の方法。

[本発明1006]

第一の波長帯の範囲内の波長に対して選択的に反応性であるピクセルが第二の波長帯の範囲内の波長に対して選択的に反応性であるピクセルから分離しているCMOS画像センサーによって、第一および第二の画像を生成することを含む、本発明1003の方法。

[本発明1007]

生体染色がトリパンブルー、ブリリアントクレシルブルー、メチレンブルー、トリパンレッド、バイタルレッド、ニュートラルレッド、ヤーヌスグリーン、インドシアニンググリーン、メチレングリーン、サフラニン、アニリンイエロー、カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル、ヨウ化プロピジウム、臭化エチジウム、フルオレセインジアセテート、カルボキシフルオレセインジアセテート、フルオレセインイソチオシアネートジアセテート、およびアザフロキシン (azafloxin) からなる群より選択されるメンバーである、本発明1001の方法。

[本発明1008]

生体染色がトリパンブルー、ブリリアントクレシルブルー、メチレンブルー、トリパン

レッド、バイタルレッド、ニュートラルレッド、ヤーヌスグリーン、インドシアニンググリーン、およびメチレングリーンからなる群より選択されるメンバーである、本発明1001の方法。

[本発明1009]

生体染色がトリパンブルー、ブリリアントクレシルブルー、ヤーヌスグリーン、およびヨウ化プロピジウムからなる群より選択されるメンバーである、本発明1001の方法。

[本発明1010]

生体染色がトリパンブルーおよびヨウ化プロピジウムからなる群より選択されるメンバーである、本発明1001の方法。

[本発明1011]

生体染色がトリパンブルーである、本発明1001の方法。

[本発明1012]

生体染色がトリパンブルーであり、第一の照明の光が青色光、赤外線、および紫外線からなる群より選択されるメンバーであり、かつ第二の照明の光が赤色光、橙黄色光、および白色光からなる群より選択されるメンバーである、本発明1002の方法。

[本発明1013]

生体染色がトリパンブルーであり、第一の照明の光が青色光であり、かつ第二の照明の光が橙黄色光である、本発明1002の方法。

[本発明1014]

第一の画像が、アリコート透過した光の画像である、本発明1001の方法。

[本発明1015]

第一の画像が、アリコートによって散乱した光の画像である、本発明1001の方法。

[本発明1016]

第一および第二の画像がデジタル画像である、本発明1001の方法。

[本発明1017]

電荷結合素子、相補型金属酸化膜半導体、フォトダイオードアレイ、電荷注入素子、LCOS (liquid-crystal-on-silicon) イメージャー、および高温ポリシリコンイメージャーからなる群より選択されるメンバー上に第一および第二の画像を生成することを含む、本発明1001の方法。

[本発明1018]

電荷結合素子および相補型金属酸化膜半導体からなる群より選択されるメンバー上に第一および第二の画像を生成することを含む、本発明1001の方法。

[本発明1019]

相補型金属酸化膜半導体上に第一および第二の画像を生成することを含む、本発明1001の方法。

[本発明1020]

以下の工程を含む、生細胞と死細胞とを識別するように細胞集団中の細胞をカウントするための方法：

(a) 生細胞の膜よりも死細胞の膜を優先的に透過する生体染色で、集団のアリコートを処理する工程；

(b) そのように処理した該アリコートを照明し、かつ該アリコートを透過する光の第一および第二の画像を生成する工程であって、該第一の画像は、第一の波長帯の光の画像であり、かつ該第二の画像は、該第一の波長帯よりも該第二の波長帯からの光を実質的に多く該生体染色が吸収するように選択された該第二の波長帯の光の画像である、工程；ならびに

(c) 該アリコートの各細胞について、該第一の画像と該第二の画像との間のコントラストのあらゆる差を検出し、かつ

閾値を上回るコントラストの差を示す細胞が死細胞と定義されかつ閾値を下回るコントラストの差を示す細胞が生細胞と定義されるように選択された閾値に対して、前記差を比較し、かつ

死細胞と定義された該細胞を、生細胞と定義された該細胞とは別にカウントする工程。