

(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2005-529341

(P2005-529341A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int.CI.⁷

G01N 23/203
G01N 23/225
H01J 37/20
H01J 37/22
H01J 37/252

F 1

G01N 23/203
G01N 23/225
H01J 37/20 A
H01J 37/22 502A
H01J 37/22 502F

テーマコード(参考)

2 G001
5 C001
5 C033

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 140 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-511867 (P2004-511867)
(86) (22) 出願日 平成15年6月1日 (2003.6.1)
(85) 翻訳文提出日 平成17年2月7日 (2005.2.7)
(86) 國際出願番号 PCT/IL2003/000457
(87) 國際公開番号 WO2003/104848
(87) 國際公開日 平成15年12月18日 (2003.12.18)
(31) 優先権主張番号 150054
(32) 優先日 平成14年6月5日 (2002.6.5)
(33) 優先権主張国 イスラエル(IL)
(31) 優先権主張番号 150055
(32) 優先日 平成14年6月5日 (2002.6.5)
(33) 優先権主張国 イスラエル(IL)
(31) 優先権主張番号 60/393,747
(32) 優先日 平成14年7月8日 (2002.7.8)
(33) 優先権主張国 米国(US)

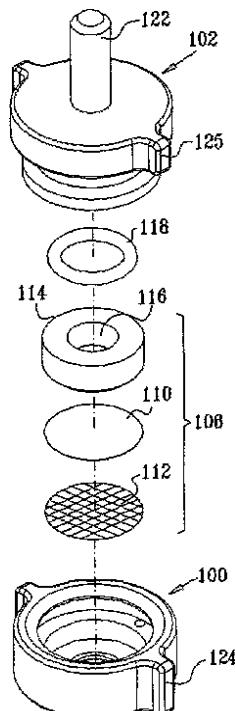
(71) 出願人 504448357
クアントミックス・リミテッド
イスラエル国 70400 ネス・ゾーナ,
ピー・オー・ボックス 4037
(74) 代理人 100089705
弁理士 社本 一夫
(74) 代理人 100076691
弁理士 増井 忠式
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サンプルを含む流体のSEM検査のための方法

(57) 【要約】

【解決手段】 湿った環境でサンプルを視覚化する方法は、サンプルを湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、走査型電子顕微鏡において該標本エンクロージャ内の該サンプルを走査し、これにより、該サンプルを視覚化する、各工程を備える。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

湿った環境でサンプルを視覚化する方法であって、
サンプルを湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、
走査型電子顕微鏡において前記標本エンクロージャ内の前記サンプルを走査し、これにより、該サンプルを視覚化する、各工程を備える、方法。

【請求項 2】

前記サンプルの走査工程前に、前記サンプルの複数の要素の間のコントラストを向上させる工程を更に備える、請求項 1 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 3】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の前記複数の要素のうち少なくとも一部分を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 4】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の分子を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内のリセプターを特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の細胞小器官を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 7】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の結合箇所を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 8】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の構造要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の機能的要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 10】

前記走査工程では、構成原子の原子数の差異に起因したコントラストを有する、前記サンプル内の要素を視覚化する、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 11】

前記コントラスト向上工程では、前記サンプルの要素の構成原子の原子数に差異を導入する、請求項 2 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 12】

前記走査工程では、前記サンプル内の脂質含有物を視覚化する、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 13】

前記走査工程では、前記サンプル内の核酸含有物を視覚化する、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 14】

前記走査工程では、前記サンプル内の蛋白質含有物を視覚化する、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 15】

前記走査工程では、前記サンプル内の炭水化物含有物を視覚化する、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 6】

前記走査工程では、前記サンプル内の金属含有物を視覚化する、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 7】

前記走査工程では、前記サンプル内のヨウ素含有物を視覚化する、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 8】

前記サンプルは、生物学的サンプルである、請求項 1 乃至 1 7 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 9】

前記生物学的サンプルは、液体中の細胞を含む、請求項 1 8 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 0】

前記サンプルは細胞内の脂質を含み、前記走査工程では、該脂質を視覚化する、請求項 1 9 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 1】

前記走査工程では、前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項 1 乃至 2 0 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 2】

前記走査工程では、組織スライス内の組織を視覚化する、請求項 1 乃至 2 0 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 3】

前記走査工程では、組織を視覚化する、請求項 1 乃至 2 0 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 4】

前記走査工程では、電子ビーム透過性膜に接着している前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項 1 乃至 2 3 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 5】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を成長させる工程を更に備える、請求項 1 乃至 2 4 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 6】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を操作する工程を更に備える、請求項 1 乃至 2 5 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 7】

前記走査工程では、前記サンプルへの外来分子の導入の結果を視覚化する、請求項 1 乃至 2 6 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 8】

前記走査工程の結果として前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項 1 乃至 2 7 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 2 9】

前記電磁放射を分析する工程を更に備える、請求項 2 8 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 3 0】

前記電磁放射を分析する工程には、スペクトル分析が含まれる、請求項 2 9 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

前記走査工程の結果として、前記サンプルから後方散乱された電子ビーム並びに前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項1乃至30のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項32】

前記電磁放射は、X線放射を含む、請求項31に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項33】

前記電磁放射は、可視光を含む、請求項31又は32に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項34】

前記電磁放射は、200~1000nmの範囲の波長を有する放射を含む、請求項31乃至33のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項35】

前記電磁放射は、前記サンプルの分子構造に関連した情報を提供する放射を含む、請求項31乃至34のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項36】

前記電磁放射は、前記サンプル内の材料分布に関連した情報を提供する放射を含む、請求項31乃至34のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項37】

前記走査工程は、多数の異なる電子エネルギーレベルで走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の前記サンプルを走査する工程を含む、上記請求項のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項38】

前記多数の電子エネルギーレベルにおける前記サンプルの多数の視覚化画像を使用することにより、前記サンプルの3次元画像を再構成する工程を更に備える、請求項37に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項39】

前記サンプルは、多成分サンプルであり、前記走査工程は、走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の前記多成分サンプルを走査し、これにより、該多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する工程を含む、請求項1乃至38のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項40】

検査されるべき前記サンプルを取得する工程を更に備え、該サンプルは湿った環境にある、請求項1乃至39のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項41】

湿った環境でサンプルを視覚化する方法であって、
湿った環境の標本エンクロージャ内にサンプルを導入し、
多数の異なる電子エネルギーレベルで、走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の前記サンプルを走査する、各工程を備える、方法。

【請求項42】

前記多数の電子エネルギーレベルにおける前記サンプルの多数の視覚化画像を使用することにより、前記サンプルの3次元画像を再構成する工程を更に備える、請求項41に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項43】

前記サンプルの走査工程前に、前記サンプルの複数の要素の間のコントラストを向上させる工程を更に備える、請求項42に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項44】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の前記複数の要素のうち少なくとも一部分を特異的に標識形成する工程を備える、請求項43に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 5】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の分子を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 4 6】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内のリセプターを特異的に標識形成する工程を備える、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 4 7】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の細胞小器官を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 4 8】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の結合箇所を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 4 9】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の構造要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 0】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の機能的要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 1】

前記走査工程では、構成原子の原子数の差異に起因したコントラストを有する、前記サンプル内の要素を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 0 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 2】

前記コントラスト向上工程では、前記サンプルの要素の構成原子の原子数に差異を導入する、請求項 4 3 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 3】

前記走査工程では、前記サンプル内の脂質含有物を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 4】

前記走査工程では、前記サンプル内の核酸含有物を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 5】

前記走査工程では、前記サンプル内の蛋白質含有物を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 6】

前記走査工程では、前記サンプル内の炭水化物含有物を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 7】

前記走査工程では、前記サンプル内の金属含有物を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 8】

前記走査工程では、前記サンプル内のヨウ素含有物を視覚化する、請求項 4 1 乃至 5 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 5 9】

前記サンプルは、生物学的サンプルである、請求項 4 1 乃至 5 8 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 0】

前記生物学的サンプルは、液体中の細胞を含む、請求項 5 9 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 1】

10

20

30

40

50

前記サンプルは細胞内の脂質を含み、前記走査工程では、該脂質を視覚化する、請求項 60 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 2】

前記走査工程では、前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項 41 乃至 61 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 3】

前記走査工程では、組織スライス内の組織を視覚化する、請求項 41 乃至 61 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 4】

前記走査工程では、組織を視覚化する、請求項 41 乃至 51 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 10

【請求項 6 5】

前記走査工程では、電子ビーム透過性膜に接着している前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項 41 乃至 64 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 6】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を成長させる工程を更に備える、請求項 41 乃至 65 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 7】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を操作する工程を更に備える、請求項 41 乃至 66 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 20

【請求項 6 8】

前記走査工程では、前記サンプルへの外来分子の導入の結果を視覚化する、請求項 41 乃至 67 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 6 9】

前記走査工程の結果として前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項 41 乃至 68 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 30

【請求項 7 0】

前記電磁放射を分析する工程を更に備える、請求項 69 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 7 1】

前記電磁放射を分析する工程には、スペクトル分析が含まれる、請求項 70 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 7 2】

前記走査工程の結果として、前記サンプルから後方散乱された電子ビーム並びに前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項 41 乃至 71 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 40

【請求項 7 3】

前記電磁放射は、X線放射を含む、請求項 72 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 7 4】

前記電磁放射は、可視光を含む、請求項 72 又は 73 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 7 5】

前記電磁放射は、200 ~ 1000 nm の範囲の波長を有する放射を含む、請求項 72 乃至 74 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 7 6】

前記電磁放射は、前記サンプルの分子構造に関連した情報を提供する放射を含む、請求項72乃至75のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項77】

前記電磁放射は、前記サンプル内の材料分布に関連した情報を提供する放射を含む、請求項72乃至75のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項78】

湿った環境で多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する方法であって、

湿った環境の標本エンクロージャ内に多成分サンプルを導入し、

走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の前記多成分サンプルを走査し、これにより、該多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する、各工程を備える、方法。 10

【請求項79】

前記サンプルの走査工程前に、前記サンプルの複数の要素の間のコントラストを向上させる工程を更に備える、請求項78に記載の湿った環境で多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する方法。

【請求項80】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の前記複数の要素のうち少なくとも一部分を特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 20

【請求項81】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の分子を特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項82】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内のリセプターを特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 20

【請求項83】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の細胞小器官を特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項84】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の結合箇所を特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 30

【請求項85】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の構造要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項86】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の機能的要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 30

【請求項87】

前記走査工程では、構成原子の原子数の差異に起因したコントラストを有する、前記サンプル内の要素を視覚化する、請求項78乃至86のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 40

【請求項88】

前記コントラスト向上工程では、前記サンプルの要素の構成原子の原子数に差異を導入する、請求項79に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項89】

前記走査工程では、前記サンプル内の脂質含有物を視覚化する、請求項78乃至88のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項90】

前記走査工程では、前記サンプル内の核酸含有物を視覚化する、請求項78乃至88のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項91】

10

20

30

40

50

前記走査工程では、前記サンプル内の蛋白質含有物を視覚化する、請求項 7 8 乃至 8 8 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9 2】

前記走査工程では、前記サンプル内の炭水化物含有物を視覚化する、請求項 7 8 乃至 8 8 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9 3】

前記走査工程では、前記サンプル内の金属含有物を視覚化する、請求項 7 8 乃至 8 8 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9 4】

前記走査工程では、前記サンプル内のヨウ素含有物を視覚化する、請求項 7 8 乃至 8 8 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 10

【請求項 9 5】

前記サンプルは、生物学的サンプルである、請求項 7 8 乃至 8 8 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9 6】

前記生物学的サンプルは、液体中の細胞を含む、請求項 9 5 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9 7】

前記サンプルは細胞内の脂質を含み、前記走査工程では、該脂質を視覚化する、請求項 9 6 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 20

【請求項 9 8】

前記走査工程では、前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項 7 8 乃至 9 7 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 9 9】

前記走査工程では、組織スライス内の組織を視覚化する、請求項 7 8 乃至 9 7 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 0 0】

前記走査工程では、組織を視覚化する、請求項 7 8 乃至 9 7 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 0 1】

前記走査工程では、電子ビーム透過性膜に接着している前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項 7 8 乃至 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 30

【請求項 1 0 2】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を成長させる工程を更に備える、請求項 7 8 乃至 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 0 3】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を操作する工程を更に備える、請求項 7 8 乃至 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 40

【請求項 1 0 4】

前記走査工程では、前記サンプルへの外来分子の導入の結果を視覚化する、請求項 7 8 乃至 1 0 3 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 0 5】

前記走査工程の結果として前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項 7 8 乃至 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 1 0 6】

前記電磁放射を分析する工程を更に備える、請求項 1 0 5 に記載の湿った環境でサンプ 50

ルを視覚化する方法。

【請求項 107】

前記電磁放射を分析する工程には、スペクトル分析が含まれる、請求項 106 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 108】

前記走査工程の結果として、前記サンプルから後方散乱された電子ビーム並びに前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項 78 乃至 107 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 109】

前記電磁放射は、X 線放射を含む、請求項 108 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 10

【請求項 110】

前記電磁放射は、可視光を含む、請求項 108 又は 109 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 111】

前記電磁放射は、200 ~ 1000 nm の範囲の波長を有する放射を含む、請求項 108 乃至 110 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 112】

前記電磁放射は、前記サンプルの分子構造に関連した情報を提供する放射を含む、請求項 108 乃至 111 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 20

【請求項 113】

前記電磁放射は、前記サンプル内の材料分布に関連した情報を提供する放射を含む、請求項 108 乃至 111 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 114】

前記走査工程は、走査型電子顕微鏡における前記標本エンクロージャ内の前記サンプルを多数の異なる電子エネルギーレベルで走査する工程を含む、請求項 78 乃至 113 のいずれか 1 項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 115】

湿った環境でサンプルを視覚化する方法であって、

湿ったサンプルを取得し、

前記湿ったサンプルを、光の回折限界により制限されない解像度で走査型電子顕微鏡内で走査し、

前記湿ったサンプルから放射された光を検出する、各工程を備える、方法。 30

【請求項 116】

前記サンプルの走査工程前に、前記サンプルの複数の要素の間のコントラストを向上させる工程を更に備える、請求項 115 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 117】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の前記複数の要素のうち少なくとも一部分を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 116 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 40

【請求項 118】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の分子を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 116 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 119】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内のリセプターを特異的に標識形成する工程を備える、請求項 116 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 120】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の細胞小器官を特異的に標識形成する工程を備える、請求項 116 に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 121】

50

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の結合箇所を特異的に標識形成する工程を備える、請求項116に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項122】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の構造要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項116に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項123】

前記コントラスト向上工程は、前記サンプル内の機能的要素を特異的に標識形成する工程を備える、請求項116に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項124】

前記走査工程では、構成原子の原子数の差異に起因したコントラストを有する、前記サンプル内の要素を視覚化する、請求項115乃至123のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 10

【請求項125】

前記走査工程では、前記サンプルの要素の構成原子の原子数に差異を導入する、請求項116に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項126】

前記走査工程では、前記サンプル内の脂質含有物を視覚化する、請求項115乃至125のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項127】

前記走査工程では、前記サンプル内の核酸含有物を視覚化する、請求項115乃至125のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 20

【請求項128】

前記走査工程では、前記サンプル内の蛋白質含有物を視覚化する、請求項115乃至125のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項129】

前記走査工程では、前記サンプル内の炭水化物含有物を視覚化する、請求項115乃至125のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項130】

前記走査工程では、前記サンプル内の金属含有物を視覚化する、請求項115乃至125のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 30

【請求項131】

前記走査工程では、前記サンプル内のヨウ素含有物を視覚化する、請求項115乃至125のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項132】

前記サンプルは、生物学的サンプルである、請求項115乃至131のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項133】

前記生物学的サンプルは、液体中の細胞を含む、請求項132に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項134】

前記サンプルは細胞内の脂質を含み、前記走査工程では、該脂質を視覚化する、請求項133に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 40

【請求項135】

前記走査工程では、前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項115乃至134のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項136】

前記走査工程では、組織スライス内の組織を視覚化する、請求項115乃至134のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項137】

前記走査工程では、組織を視覚化する、請求項115乃至134のいずれか1項に記載 50

の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 138】

前記走査工程では、電子ビーム透過性膜に接着している前記サンプル内の細胞を視覚化する、請求項115乃至137のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 139】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を成長させる工程を更に備える、請求項115乃至138のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 140】

前記標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、前記方法は、前記走査工程前に前記電子ビーム透過性膜上の細胞を操作する工程を更に備える、請求項115乃至139のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 141】

前記走査工程では、前記サンプルへの外来分子の導入の結果を視覚化する、請求項115乃至140のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 142】

前記走査工程の結果として前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項115乃至141のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 143】

前記電磁放射を分析する工程を更に備える、請求項142に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 144】

前記電磁放射を分析する工程には、スペクトル分析が含まれる、請求項143に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 145】

前記走査工程の結果として、前記サンプルから後方散乱された電子ビーム並びに前記サンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える、請求項115乃至144のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 146】

前記電磁放射は、X線放射を含む、請求項145に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 147】

前記電磁放射は、可視光を含む、請求項145又は146に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 148】

前記電磁放射は、200~1000nmの範囲の波長を有する放射を含む、請求項145乃至147のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 149】

前記電磁放射は、前記サンプルの分子構造に関連した情報を提供する放射を含む、請求項145乃至148のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 150】

前記電磁放射は、前記サンプル内の材料分布に関連した情報を提供する放射を含む、請求項145乃至148のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 151】

前記走査工程は、走査型電子顕微鏡における前記標本エンクロージャ内の前記サンプルを多数の異なる電子エネルギーレベルで走査する工程を含む、請求項115乃至150のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項 152】

10

20

30

40

50

前記多数の電子エネルギーレベルにおける前記サンプルの多数の視覚化画像を使用することにより、前記サンプルの3次元画像を再構成する工程を更に備える、請求項151に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項153】

前記サンプルは、多成分サンプルであり、前記走査工程は、走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の前記多成分サンプルを走査し、これにより、該多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する工程を含む、請求項115乃至152のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。

【請求項154】

検査されるべき前記サンプルを取得する工程を更に備え、該サンプルは湿った環境にある、請求項115乃至153のいずれか1項に記載の湿った環境でサンプルを視覚化する方法。 10

【請求項155】

生体互換性インプラントを製造するための方法であって、
生体互換性材料から生体互換性インプラントを形成し、
湿った環境で、走査型電子顕微鏡内で前記生体互換性インプラントの少なくとも一部分を検査し、

前記検査工程の結果を分析し、
前記分析工程の結果に従って、検査された前記生体互換性インプラントを分類する、各工程を備える、方法。 20

【請求項156】

前記検査工程は、
前記少なくとも一部分を備えるサンプルを、湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、
前記走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の前記サンプルを走査し、これにより、該サンプルを視覚化する、各工程を備える、請求項155に記載の生体互換性インプラントを製造するための方法。

【請求項157】

微生物学的実体の検出、同定又は特徴化のための方法であって、
少なくとも1つの微生物学的実体を含む、湿ったサンプルを取得し、
走査型電子顕微鏡内で前記湿ったサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査し、
前記走査工程の結果を分析する、各工程を備える、方法。 30

【請求項158】

前記走査工程は、
前記少なくとも1つの微生物学的実体を含む、湿ったサンプルを、湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、
前記走査型電子顕微鏡内で前記標本エンクロージャ内の前記湿ったサンプルを走査し、これにより、該湿ったサンプルを視覚化する、各工程を備える、請求項157に記載の微生物学的実体の検出又は同定のための方法。 40

【請求項159】

前記湿ったサンプルは、尿を含む、請求項157又は158に記載の方法。

【請求項160】

前記湿ったサンプルは、排泄物を含む、請求項157乃至159のいずれか1項に記載の方法。

【請求項161】

前記湿ったサンプルは、血液を含む、請求項157乃至160のいずれか1項に記載の方法。

【請求項162】

前記湿ったサンプルは、唾液を含む、請求項157乃至161のいずれか1項に記載の 50

方法。

【請求項 163】

前記湿ったサンプルは、呼吸器系の洗浄物を含む、請求項157乃至162のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 164】

前記湿ったサンプルは、生体検査組織を含む、請求項157乃至163のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 165】

前記湿ったサンプルは、環境サンプルを含む、請求項157乃至164のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項 166】

前記湿ったサンプルは、脳脊髄流体を含む、請求項157乃至165のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 167】

前記湿ったサンプルは、土壤サンプルを含む、請求項157乃至166のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 168】

前記湿ったサンプルは、食物を含む、請求項157乃至167のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 169】

前記湿ったサンプルは、工業製品を含む、請求項157乃至168のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項 170】

前記湿ったサンプルは、医療装置、工業装置又は家庭内装置を含む、請求項157乃至169のいずれか1項に記載の微生物学的実体を特徴付けるための方法。

【請求項 171】

前記サンプルを特異的に染色する工程を更に備える、請求項157乃至170のいずれか1項に記載の微生物学的実体を特徴付けるための方法。

【請求項 172】

前記微生物学的実体を化学物質で処理する工程を更に備える、請求項157乃至171のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項 173】

前記微生物学的実体に放射を印加する工程を更に備える、請求項157乃至172のいずれか1項に記載の微生物学的実体を特徴付けるための方法。

【請求項 174】

前記分析工程は、前記微生物学的実体の形態を分析する工程を含む、請求項157乃至173のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 175】

生体膜を特徴付けるための方法であって、

生体膜の湿ったサンプルを取得し、 40

走査型電子顕微鏡内で前記生体膜の湿ったサンプルを走査し、

前記走査工程の結果を分析する、各工程を備える、方法。

【請求項 176】

前記走査工程は、

前記生体膜を含む前記湿ったサンプルを湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、

前記走査型電子顕微鏡内の前記湿った標本エンクロージャ内の前記湿ったサンプルを走査し、これにより該湿ったサンプルを視覚化する、各工程を備える、請求項175に記載の生体膜を特徴付けるための方法。

【請求項 177】

サンプルを視覚化する方法であって、 50

サンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内の湿った環境で前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、中間の凝固工程、被覆工程及びスライス切り工程無しに走査し、これによって前記サンプルを視覚化する、各工程を備える、方法。

【請求項 178】

サンプルを視覚化する方法であって、

サンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内の湿った環境で前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前に形態的に衝撃を加えること無しに走査する、各工程を備える、方法。

10

【請求項 179】

サンプルを視覚化する方法であって、

サンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内の湿った環境で前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前の高々固定化及び染色工程に続いて走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 180】

サンプルを視覚化する方法であって、

サンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内の湿った環境で前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前の高々少なくとも1つの水成溶液を用いた処理に続いて走査する、各工程を備える、方法。

20

【請求項 181】

サンプルを視覚化する方法であって、

サンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内の湿った環境で前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前に非水成溶液で処理されること無しに走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 182】

サンプルを視覚化する方法であって、

20ミクロンを超える厚さのサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

30

【請求項 183】

脂肪組織を検査する方法であって、

脂肪組織のサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記脂肪組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 184】

前記サンプルは、前記走査前に染色されていない、請求項183に記載の脂肪組織を検査する方法。

40

【請求項 185】

脂肪組織を検査する方法であって、

脂肪組織のサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記脂肪組織のサンプルを、該サンプルが走査前に染色されること無しに、走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 186】

サンプルを視覚化する方法であって、

走査型電子顕微鏡内で、前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する工程を備え、

50

前記走査型電子顕微鏡のステージに対して前記サンプルが移動すること無く、25平方ミリメートルを超える前記サンプルの面積に亘って、前記走査工程が実行される、方法。

【請求項 187】

細胞外基質を検査する方法であって、
細胞外基質のサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記細胞外基質のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 188】

皮覆組織を検査する方法であって、
皮覆組織のサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記皮覆組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 189】

腎臓組織を検査する方法であって、
腎臓組織のサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記腎臓組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 190】

生体検査組織を検査する方法であって、
生体検査組織のサンプルを取得し、

走査型電子顕微鏡内で、前記生体検査組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 191】

生物学的材料を検査する方法であって、
生物学的材料を免疫標識形成し、

走査型電子顕微鏡内で、前記免疫標識形成された生物学的材料を、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 192】

組織を検査する方法であって、
組織を免疫標識形成し、

走査型電子顕微鏡内で、前記免疫標識形成された組織を、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 193】

サンプルを検査する方法であって、
走査型電子顕微鏡内で、前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査し、
前記サンプルを光学顕微鏡を使用して検査する、各工程を備える、方法。

【請求項 194】

化学物質又は化学物質の組み合わせにさらしたときの毒性効果を分析するための方法であって、

実験動物を、前記化学物質又は化学物質の組み合わせにさらし、
前記実験動物からサンプルを取得し、
走査型電子顕微鏡内で、前記実験動物からの前記サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 195】

環境条件にさらした後に続く毒性効果を分析する方法であって、
前記環境条件にさらされた少なくとも1つの個体を同定し、
前記少なくとも1つの個体の少なくとも1つから少なくとも1つのサンプルを取得し、
走査型電子顕微鏡内で、前記少なくとも1つのサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 196】

化学的実体を特徴付ける方法であつて、

S E M互換性サンプルエンクロージャ内で化学的実体を細胞に印加し、

走査型電子顕微鏡内で、前記細胞を、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える、方法。

【請求項 197】

細胞形状の変化を分析する工程を更に備える、請求項 196 に記載の化学的実体を特徴付ける方法。

【請求項 198】

前記細胞の細胞骨格を分析する工程を更に備える、請求項 196 又は 197 に記載の化学的実体を特徴付ける方法。 10

【請求項 199】

前記細胞の生態分子の分布を分析する工程を更に備える、請求項 196 乃至 198 のいずれか 1 項に記載の化学的実体を特徴付ける方法。

【請求項 200】

前記サンプルの領域からの X 線を検出し、

前記サンプル内で、ヨウ素、金属及びリンのうち少なくとも 1 つの存在を検出するため前記 X 線を分析する、各工程を備える、上記請求項のうちいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 201】

ヨウ素、金属及びリンのうち前記少なくとも 1 つの濃度を決定する工程を更に備える、請求項 200 に記載の方法。 20

【請求項 202】

前記サンプルは、電子透過性で流体不透過性の膜を通過した電子により衝突される、上記請求項のうちいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 203】

前記サンプルを前記電子透過性で流体不透過性の膜に押し付ける工程を更に備える、請求項 202 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

出願人は、「自動化 S E M を使用した、無傷の細胞の分子の定量パターン分析」という標題で、2002 年 7 月 8 日に出願された、米国仮特許出願シリアル番号 60 / 393 , 747 号、「走査型電子顕微鏡 (S E M) の検査システムのための標本エンクロージャ」という標題で、2003 年 2 月 20 日に出願された、米国仮特許出願シリアル番号 60 / 448 , 808 号、「走査型電子顕微鏡と蛍光性又はシンチレーションとを持つマーカーとを使用した、生体サンプルの蛍光画像形成のための装置」という標題で、2002 年 6 月 5 日に出願された、イスラエル特許出願シリアル番号 150054 号、並びに、「湿った環境におけるサンプルの走査型電子顕微鏡による画像形成のための自動化適合性の装置」という標題で、2002 年 6 月 5 日に出願された、イスラエル特許出願シリアル番号 150055 号の優先権を主張する。 40

【0002】

本発明は、概して、サンプルを含む流体の S E M 検査のための方法に係り、より詳しくは、湿った環境においてサンプルを視覚化させる方法に関する。

【背景技術】**【0003】**

以下の列挙された文献が、当該技術分野の現在の状態を表すと考えられ、ここで参照されたことにより各自の開示内容が本願に組み込まれる。

生体細胞及び組織の顕微鏡検査は、臨床診断並びに生命科学の研究の多様な分野において中枢をなすツールである。光学顕微鏡 (L M) は、薄い (数ミクロン) サンプルで実行され、該サンプルには、細胞、無細胞材料、又は、組織の薄い層若しくは薄片が含まれて

10

30

40

50

おり、これらは、例えば、化学薬品等のコントラスト剤又は抗体で染色することができる。透過型電子顕微鏡（TEM）は、通常、特殊に形成準備された超薄型の薄片（0.1ミクロン以下）を必要とし、細胞内情報の豊富さを明らかにする。前述した技術の各々は、制約を持っている。即ち、光学顕微鏡の解像度は、回折により約0.25ミクロンに制限され、TEMの使用は、サンプルの広範囲に亘る処理により妨げられ、サンプルの構造をかなり変えてしまうおそれがある。標準的なTEMのためのサンプルの準備は、特殊な技術を必要とし、達成するまでに少なくとも数日はかかる。非常に薄い切片は、サンプルの非常に制限された、しばしば任意的となる部分を与え、多重連続薄片の画像形成を必要としている。

【0004】

高い解像度の画像は、走査型電子顕微鏡（SEM）によって達成することもできる。走査型電子顕微鏡では、合焦された電子ビームがサンプルを連続的に走査し、続いて連続的に生じる信号が画像を発生するため使用される。非常にしばしば、2次電子が検出され、サンプルの表面トポグラフィーに関する情報を与える。後方散乱電子の検出は、表面より下方の短距離、典型的には数ミクロンまでの距離にあるサンプルの領域の材料分布に関する情報を与える。SEMは、電子が、画像を生じさせるためサンプルを横断する必要がないという意味で、画像形成処理の反射モードである。このため、サンプルは、任意の厚さを持っていてもよく、薄片にする必要はない。しかし、サンプルは、走査電子ビームの妨げられない運動を可能にするため真空環境に置かなければならぬ。従って、サンプルは、広範囲に亘って、脱水され、乾燥されなければならない。更には、乾燥されたとき、生体及び他の有機サンプルは、電気的に絶縁されるようになり、電子ビームによるサンプルの帯電に起因して人為構造をもたらす。それによって、サンプルは、通常、カーボン又は金属の導電層で被覆されている。

【0005】

広範囲に亘る乾燥無しに、生体又は他の湿ったサンプルを観察する一つのアプローチが環境SEM及び類似の技術の開発であつてきた。これらの方は、差動ポンプ及び多重アーチャに基づいており、走査電子ビームの経路のほとんどを通して高真空中を維持しつつ、サンプルの近傍領域で水蒸気圧力に近い局所化された圧力を可能にする。これらの方法では、サンプルは、部分的真空にさらされており、脱水状態を維持するために、低温、及び、複雑化した手動による正圧の維持の両方が要求される。実際に、この技術を使用した生体研究の公開された報告のうち少數が、高い水準で首尾一貫した結果を得る困難さを証明している。

【0006】

高解像度の画像形成は、生物学上幅広い用途を持っている。これらの用途には、細胞、組織、微生物、及び、ウィルス、並びに、例えば生物学的な環境上若しくは工業上の流体、乳濁液及び懸濁液等の無細胞サンプルの画像形成が含まれている。

【0007】

最近のレビューは、臨床診断における電子顕微鏡の使用を論じている（タッカー、J.A. 2000）。少ないが有意な比率のケース（3～8%）において、適切な診断が、電子顕微鏡に基づいてのみなすことができる事が見出されている。このことは、特に、腫瘍学、及び、腎臓疾患等の選択された領域で断言することができる（タッカー 2000）。これらの数は、おそらくは過小評価である。電子顕微鏡の使用は、主要には、ユーティリティの欠如によっては制限されないが、コスト、結果を生成するのに必要となる時間、及び、低いスループットを考慮することによって制限されるからである。かくして、光学顕微鏡と互換性のあるサンプル準備手続きで電子顕微鏡の高い解像度を達成する、生体組織及び細胞のための画像形成システムに対する、かなりの必要性が存在している。

【0008】

【非特許文献1】Tucker, J.A. (2000) The continuing value of electron microscopy in surgical pathology. Ultrastructural Pathology 24:383-9

【非特許文献2】Mathews, R.A. and Donald, A.M. (2002) Conditions for imaging em 50

ulsions in the environmental scanning electron microscope. Scanning 24:75-85.

【非特許文献3】Mittler, M.A., Walters, B.C. and Stopa, E.G. (1996) Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. J. Neurosurg 85:1091-4.

【非特許文献4】Levit-Binnun, N., Lindner A.B., Zik O., Eshhar Z. and Moses, E. (2003) Quantitative detection of protein arrays. Anal. Chem. 75:1436-41.

【非特許文献5】. Becker, R.P. and Sogard, M. (1979) Visualization of subsurface structures in cells and tissues by backscattered electron imaging. Scan. Electron. Microsc. 1979 (II): 835-70.

【非特許文献6】Sedar, A.W., Silver, M.J. and Ingberman-Wolenski, C.M. (1983) Backscattered electron imaging to visualize arterial endothelial detachment in the scanning electron microscope. Scan. Electron. Microsc. 1983 (II): 969-74. 10

【非特許文献7】. Burns, W.A., Zimmerman, H.J., Hammond, J., Howatson, A. Katz, A and White, J. (1975) The clinician's view of diagnostic electron microscopy. Hum. Pathol. 6:467-78.

【非特許文献8】Gyorkey, F., Min, K.W., Krisko, I. And Gyorkey, P. (1975) The usefulness of electron microscopy in the diagnosis of human tumors. Hum. Pathol. 6:421-41.

【非特許文献9】Hayat, M.A. (2000) Principles and Techniques of Electron Microscopy - Biological Applications (Fourth edition; Cambridge University Press) 20

【非特許文献10】Hermann, R., Walther, P. and Muller, M. (1996) Immunogold-labeling in SEM. Histochem. Cell. Biol. 106:31-39.

【非特許文献11】Spargo, B.H. (1975) Practical use of electron microscopy for the diagnosis of glomerular disease. Hum. Pathol. 6:405-20.

【非特許文献12】Gu, X. and Herrera, G.A. (2002) The value of electron microscopy in the diagnosis of IgA nephropathy. Ultrastruct. Pathol. 26:203-10

【非特許文献13】Fisher, C, Ramsay, AD, Griffiths, M and McDougall, J. (1985) An assessment of the value of electron microscopy in tumor diagnosis. J. Clin. Pathol. 38:403-8

【非特許文献14】Brocker, W, Pfefferkorn G. (1975) Applications of the cathodoluminescence method in biology and medicine. Scan. Electron. Microsc. 1979;(II):1 30
25-32

【非特許文献15】Carlen, B. and Englund, E. (2001) Diagnostic value of electron microscopy in a case of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. Ultrastruct. Pathol. 25:285-8

【非特許文献16】Hollinshead M, Sanderson J. & Vaux D.J. (1997). Anti-biotin antibodies offer superior organelle-specific labeling of mitochondria over avidin or streptavidin. J J Histochem. Cytochem. 45:1053-7

【非特許文献17】Kristiansen, E. and Madsen, C. (1995) Induction of protein droplet (alpha-2 microglobulin) nephropathy in male rats after short-term dosage with 1,8-cineole and l-limonene. Toxicol. Letters 80:147-52. 40

【非特許文献18】Goldstein, J.L., Newbury, D.E., Echlin, P., and Joy, D. (1992) . Scanning Electron Microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists. Plenum Press, 1992.

【非特許文献19】Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 110:669-72.

【特許文献1】米国特許番号3,218,459

【特許文献2】米国特許番号3,378,684

【特許文献3】米国特許番号4,037,109

【特許文献4】米国特許番号4,071,766

【特許文献 5】米国特許番号4,115,689
 【特許文献 6】米国特許番号4,448,311
 【特許文献 7】米国特許番号4,587,666
 【特許文献 8】米国特許番号4,596,928
 【特許文献 9】米国特許番号4,618,938
 【特許文献 10】米国特許番号4,705,949
 【特許文献 11】米国特許番号4,720,622
 【特許文献 12】米国特許番号4,720,633
 【特許文献 13】米国特許番号4,880,976
 【特許文献 14】米国特許番号4,929,041
 【特許文献 15】米国特許番号4,992,662
 【特許文献 16】米国特許番号5,103,102
 【特許文献 17】米国特許番号5,250,808
 【特許文献 18】米国特許番号5,323,441
 【特許文献 19】米国特許番号5,326,971
 【特許文献 20】米国特許番号5,362,964
 【特許文献 21】米国特許番号5,406,087
 【特許文献 22】米国特許番号5,412,211
 【特許文献 23】米国特許番号5,811,803
 【特許文献 24】米国特許番号5,898,261
 【特許文献 25】米国特許番号5,945,672
 【特許文献 26】米国特許番号6,025,592
 【特許文献 27】米国特許番号6,072,178
 【特許文献 28】米国特許番号6,114,695
 【特許文献 29】米国特許番号6,130,434
 【特許文献 30】米国特許番号6,365,898
 【特許文献 31】米国特許番号6,452,177
 【特許文献 32】PCT国際公開出願番号 W002/14830 - PCT/IL01/00764.

10

20

30

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

「走査型電子顕微鏡を使用した、非真空環境に置かれたサンプルの検査のための装置及び方法」と題された、本願発明者の一人による、現在係属中のPCT/IL01/01108は、大気圧近傍圧力で、幅広い温度範囲に亘って、湿った環境中の湿ったサンプルの画像形成を可能にする、非真空式走査型電子顕微鏡(SEM)装置を開示している。これは、広範なサンプル準備手続きのための必要性を無くし、かくして、例えば高い解像度及び高いコントラスト又は信号対ノイズ比等といった電子顕微鏡の利点と、例えばサンプル準備手続きの容易さ及び迅速さといった光学顕微鏡の利点とを結合させる。このことは、電子に対しては透過性であるが流体に対しては不透過性であると共に、典型的には大気圧である容器の内部とSEMの画像形成領域における真空との間の圧力差に耐えるのに十分に強い、薄い仕切り膜により覆われたサンプル容器の使用により達成される。この種の膜は、以下では、仕切り膜、又は、電子透過性で流体不浸透性の膜と称される。

【0010】

非真空式SEMの前述した特徴は、次の態様で、流体含有サンプル、特に生物学的サンプルの観察に適用される。

【0011】

1. 真空からのサンプルの分離は、湿ったサンプルの直接的な視覚化を可能にする。これは、水置換及び臨界点乾燥を含む、全ての脱水処置に対する必要性を直ちに無くす。湿った状態は、サンプルの自然な状態にほとんど似ており、脱水の間に歪められ又は破壊されるおそれのある特徴を保存する。この利点は、真の構成が細胞及び細胞外基質の両方を

50

含む、組織の観察において特に重要な。更には、サンプル内及びサンプルの回りの流体の存在は、効率的な電荷及び余剰熱の消失を可能にする。これは、サンプル帯電に起因した人為構造、並びに熱損傷を無くす。

【0012】

2. 生物学的組織の電子顕微鏡検査は、非常にしばしば、2つの画像形成モードでなされる。透過型電子顕微鏡検査(TEM)は、サンプルを透過した電子を利用する。即ち、サンプルの全厚さは、画像に寄与する。透過技術は、サンプルの厚さに関して厳しい制約を課す。典型的には、要求される厚さは50nmであり、これは、超高電圧顕微鏡では3μmまで増大させることができる。走査型電子顕微鏡検査は、反射モードを使用し、最も頻繁にはサンプルの表面形状のみを画像形成する2次電子を検出する。非真空式SEM技術は、走査型電子顕微鏡で後方散乱電子の検出を使用する。電子ビームは、サンプル内を貫通し、後方散乱された電子は、サンプル表面を越えて数ミクロンの深さまでのサンプル特徴を明らかにする。かくして、画像形成の電子散乱/反射モードが陥られるが、画像は、表面には限定されず、サンプルの内部構造が明らかにされる。更には、検出が反射モードでなされるので、相互作用する体積部分を越えて存在する任意材料は、画像形成には効果を及ぼさない。従って、サンプルは、画像形成される領域を遙かに超える厚さを持つことができる。典型的には、数ミリメートル厚の組織断片を見ることができる。表面に最も近接している数マイクロメートル以下の材料層のみが、サンプルのバルク部からの干渉無しに、走査画像に寄与する。画像形成された領域の厚さは、電子ビームの加速電圧を変化させることにより、変調することができる。非真空式SEMは、かくして、サンプルの実際の薄片化の必要無しに、「仮想的薄片」を与える。これは、サンプルを埋め込んだり、凍結させたりする必要性を無くす。そうでなければ、サンプルの薄片化を可能にすることが要求される。最終的には、電子後方散乱効率のサンプル材料組成(原子番号Zによる)の依存性は、TEM画像形成の特徴である重金属染色が無い場合でさえもコントラストを形成する。生体サンプル内部の脂質、リン、塩の濃度の局所的な差異に基づいて細胞小器官を識別することができる。幅広い範囲の染色及び標識工程を、コントラストを向上させるため使用することができる。

【0013】

非真空式SEM技術の追加の能力は、電子ビームで走査する間にサンプルから放射された光を同時に検出する能力である。走査電子ビームは、サンプル内の分子を励起し、これにより当該分子は、特徴的な波長(陰極ルミネッセンス)で光を放射することができる。光強度は、輝く分子の分布の画像を導出するため使用される。該分子は、生物学的サンプルに外的要因無しに特有のものであるか、又は、外的に導入することができる標識のいずれかである。この画像は、電子物質相互作用により制限される解像度で、光の回折によってではない、後方散乱電子(BSE)による画像形成と同時に得られる。同様に、走査されたサンプルから放射されるX線を、従来の検出器及び方法を使用して検出することができ、材料組成及び完全に水和されたサンプルの分布に関する追加の情報を与える。詳しくは、X線分析を、例えばカルシウム、鉄、ナトリウム、カリウム、銅若しくは亜鉛等の金属、又はヨウ素、硫黄若しくは蛍光体等の他の元素を含む領域を探し当て、定量化するため使用することができる。

【0014】

本発明の別の目的は、湿ったサンプル、詳しくは生物学的サンプルの自動電子顕微鏡検査のための手段を提供することである。そのような自動化された電子顕微鏡検査は、半導体産業で幅広く応用されてきた。自動化電子顕微鏡検査の湿ったサンプルへの応用の主要な障壁は、例えば、乾燥、埋め込み、薄片化若しくは薄片化等のサンプル準備手続きを用いる必要性である。これらは、非常に複雑であり、自動化に従うことができない。本発明は、走査型電子顕微鏡において湿ったサンプルの直接画像形成のための手段を提供し、かくして、前述した準備手続きのための必要性を無くす。本発明は、このようにして、湿ったサンプルの自動化された電子顕微鏡検査のための手段を提供する。

【0015】

10

20

30

40

50

以上により、本発明の好ましい実施形態によれば、湿った環境でサンプルを視覚化する方法が提供され、該方法は、サンプルを湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、走査型電子顕微鏡において標本エンクロージャ内のサンプルを走査し、これにより、該サンプルを視覚化する、各工程を備える。

【0016】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、湿った環境でサンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、湿った環境の標本エンクロージャ内にサンプルを導入し、多数の異なる電子エネルギーレベルで、走査型電子顕微鏡の標本エンクロージャ内のサンプルを走査する、各工程を備える。

【0017】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、湿った環境で多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する方法が更に提供され、該方法は、湿った環境の標本エンクロージャ内に多成分サンプルを導入し、走査型電子顕微鏡の標本エンクロージャ内の多成分サンプルを走査し、これにより、該多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する、各工程を備える。

【0018】

本発明のなお別の好ましい実施形態によれば、湿った環境でサンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、湿ったサンプルを取得し、該湿ったサンプルを、光の回折限界により制限されない解像度で走査型電子顕微鏡内で走査し、該湿ったサンプルから放射された光を検出する、各工程を備える。

【0019】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、本方法は、サンプルの走査工程前に、前記サンプルの複数の要素の間のコントラストを向上させる工程を更に備える。好ましくは、該コントラスト向上工程は、サンプル内の複数の要素のうち少なくとも一部分を特異的に標識形成する工程を備える。代替例として、該コントラスト向上工程は、サンプル内の分子を特異的に標識形成する工程を備える。別の好ましい実施形態によれば、コントラスト向上工程は、サンプル内のリセプターを特異的に標識形成する工程を備える。代替例として、コントラスト向上工程は、サンプル内の細胞小器官を特異的に標識形成する工程を備える。更には、コントラスト向上工程は、サンプル内の結合箇所を特異的に標識形成する工程を備える。好ましくは、コントラスト向上工程は、サンプル内の構造要素を特異的に標識形成する工程を備える。代替例として、コントラスト向上工程は、サンプル内の機能的要素を特異的に標識形成する工程を備える。

【0020】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、走査工程では、構成原子の原子数の差異に起因したコントラストを有する、サンプル内の要素を視覚化する。

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、コントラスト向上工程において、サンプルの要素の構成原子の原子数に差異を導入する。

【0021】

好ましくは、上記走査工程では、サンプル内の脂質含有物を視覚化する。代替例として、走査工程では、サンプル内の核酸含有物を視覚化する。更には、走査工程では、サンプル内の蛋白質含有物を視覚化する。本発明の別の好ましい実施形態によれば、走査工程では、サンプル内の炭水化物含有物を視覚化する。代替例として、走査工程では、サンプル内の金属含有物を視覚化する。更には、走査工程では、サンプル内のヨウ素含有物を視覚化する。

【0022】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、サンプルは、生物学的サンプルである。加えて、生物学的サンプルは、液体中の細胞を含む。好ましくは、サンプルは細胞内の脂質を含み、走査工程では、該脂質を視覚化する。

【0023】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、走査工程では、サンプル内の細胞を視覚

10

20

30

40

50

化する。代替例として、走査工程では、組織スライス内の組織を視覚化する。好ましくは、走査工程では、組織を視覚化する。本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、走査工程では、電子ビーム透過性膜に接着しているサンプル内の細胞を視覚化する。

【0024】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、本方法は、走査工程前に電子ビーム透過性膜上の細胞を成長させる工程を更に備える。代替又はこれに加えて、標本エンクロージャは、電子ビーム透過性膜を備え、上記方法は、走査工程前に電子ビーム透過性膜上の細胞を操作する工程を更に備える。これに加えて又は代替として、走査工程では、サンプルへの外来分子の導入の結果を視覚化する。
10

【0025】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、本方法は、走査工程の結果としてサンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える。これに加えて、本方法は、電磁放射を分析する工程を更に備えていてもよい。好ましくは、電磁放射を分析する工程には、スペクトル分析が含まれる。

【0026】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、本方法は、走査工程の結果として、サンプルから後方散乱された電子ビーム並びにサンプルから放射された電磁放射を検出する工程を更に備える。好ましくは、電磁放射は、X線放射を含む。この代替として又はこれに加えて、電磁放射は、可視光を含んでいてもよい。更に加えて又は代替として、電磁放射は、200～1000nmの範囲の波長を有する放射を含む。この代替として又はこれに加えて、電磁放射は、サンプルの分子構造に関連した情報を提供する放射を含む。更に加えて又は代替として、電磁放射は、前記サンプル内の材料分布に関連した情報を提供する放射を含む。
20

【0027】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、走査工程は、多数の異なる電子エネルギーレベルで走査型電子顕微鏡の標本エンクロージャ内のサンプルを走査する工程を含む。これに加えて、本方法は、多数の電子エネルギーレベルにおけるサンプルの多数の視覚化画像を使用することにより、該サンプルの3次元画像を再構成する工程を更に備える。

【0028】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、上記サンプルは、多成分サンプルであり、上記走査工程は、走査型電子顕微鏡の前記標本エンクロージャ内の該多成分サンプルを走査し、これにより、該多成分サンプルの少なくとも1つの成分を視覚化する工程を含む。これに加えて又は代替として、本方法は、検査されるべきサンプルを取得する工程を更に備え、該サンプルは湿った環境にある。
30

【0029】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、生体互換性インプラントを製造するための方法が更に提供され、該方法は、生体互換性材料から生体互換性インプラントを形成し、湿った環境で、走査型電子顕微鏡内で該生体互換性インプラントの少なくとも一部分を検査し、該検査工程の結果を分析し、該分析工程の結果に従って、検査された生体互換性インプラントを分類する、各工程を備える。
40

【0030】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、上記検査工程は、上記少なくとも一部分を備えるサンプルを、湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、走査型電子顕微鏡の標本エンクロージャ内の該サンプルを走査し、これにより、該サンプルを視覚化する、各工程を備える。

【0031】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、微生物学的実体の検出、同定又は特徴化のための方法が提供され、該方法は、少なくとも1つの微生物学的実体を含む、湿ったサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、湿ったサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力に
50

より特徴付けられる環境内に存在する間に走査し、該走査工程の結果を分析する、各工程を備える。

【0032】

好ましくは、上記走査工程は、少なくとも1つの微生物学的実体を含む、湿ったサンプルを、湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、走査型電子顕微鏡内で標本エンクロージャ内の湿ったサンプルを走査し、これにより、該湿ったサンプルを視覚化する、各工程を備える。

【0033】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記湿ったサンプルは、尿を含む。代替例として、湿ったサンプルは、排泄物を含む。これに加えて、湿ったサンプルは、血液を含む。これに加えて又は代替として、湿ったサンプルは、唾液を含む。本発明の別の好ましい実施形態によれば、湿ったサンプルは、呼吸器系の洗浄物を含む。加えて、湿ったサンプルは、生体検査組織を含む。代替として、湿ったサンプルは、環境サンプルを含む。これに加えて又は代替として、湿ったサンプルは、脳脊髄流体を含む。本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、湿ったサンプルは、土壤サンプルを含む。代替として、湿ったサンプルは、食物を含む。これに加えて、湿ったサンプルは、工業製品を含む。代替として又はこれに加えて、湿ったサンプルは、医療装置、工業装置又は家庭内装置を含む。

10

【0034】

本発明の好ましい実施形態によれば、本方法は、サンプルを特異的に染色する工程を更に備える。これに加えて、本方法は、微生物学的実体を化学物質で処理する工程を更に備える。代替として又はこれに加えて、本方法は、微生物学的実体に放射を印加する工程を更に備える。これに加えて又は代替として、分析工程は、微生物学的実体の形態を分析する工程を含む。

20

【0035】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、生体膜を特徴付けるための方法が提供され、該方法は、生体膜の湿ったサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で該生体膜の湿ったサンプルを走査し、該走査工程の結果を分析する、各工程を備える。

【0036】

好ましくは、上記走査工程は、生体膜を含む、湿ったサンプルを湿った環境の標本エンクロージャ内に導入し、走査型電子顕微鏡内の湿った標本エンクロージャ内の湿ったサンプルを走査し、これにより該湿ったサンプルを視覚化する、各工程を備える。

30

【0037】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が提供され、該方法は、サンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内の湿った環境で該サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、中間の凝固工程、被覆工程及びスライス切り工程無しに走査し、これによって該サンプルを視覚化する、各工程を備える。

【0038】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、サンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内の湿った環境で該サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前に形態的に衝撃を加えること無しに走査する、各工程を備える。

40

【0039】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、サンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内の湿った環境で、該サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前の高々固定化及び染色工程に続いて走査する、各工程を備える。

【0040】

本発明のなお別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、サンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内の湿った環境で、該サンプルを、

50

水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前の高々少なくとも1つの水成溶液を用いた処理に続いて走査する、各工程を備える。

【0041】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、サンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内の湿った環境で、該サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に、走査前に非水成溶液で処理されること無しに走査する、各工程を備える。

【0042】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、20ミクロンを超える厚さのサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。10

【0043】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、脂肪組織を検査する方法が提供され、該方法は、脂肪組織のサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該脂肪組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0044】

好ましくは、上記サンプルは、走査前に染色されていない。

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、脂肪組織を検査する方法が更に提供され、該方法は、脂肪組織のサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該脂肪組織のサンプルを、該サンプルが走査前に染色されること無しに、走査する、各工程を備える。20

【0045】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、サンプルを視覚化する方法が更に提供され、該方法は、走査型電子顕微鏡内で、サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する工程を備え、走査型電子顕微鏡のステージに対してサンプルが移動すること無く、25平方ミリメートルを超えるサンプルの面積に亘って、走査工程が実行される。

【0046】

本発明のなお別の好ましい実施形態によれば、細胞外基質を検査する方法が提供され、該方法は、細胞外基質のサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該細胞外基質のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。30

【0047】

本発明のなお別の好ましい実施形態によれば、皮覆組織を検査する方法が提供され、該方法は、皮覆組織のサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、皮覆組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0048】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、腎臓組織を検査する方法が提供され、該方法は、腎臓組織のサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該腎臓組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。40

【0049】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、生体検査組織を検査する方法が提供され、該方法は、生体検査組織のサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該生体検査組織のサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0050】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、生物学的材料を検査する方法が更に提供

50

され、該方法は、生物学的材料を免疫標識形成し、走査型電子顕微鏡内で、該免疫標識形成された生物学的材料を、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0051】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、組織を検査する方法が提供され、本方法は、組織を免疫標識形成し、走査型電子顕微鏡内で、該免疫標識形成された組織を、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0052】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、サンプルを検査する方法が更に提供され、該方法は、走査型電子顕微鏡内で、サンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査し、該サンプルを光学顕微鏡を使用して検査する、各工程を備える。

【0053】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、化学物質又は化学物質の組み合わせにさらしたときの毒性効果を分析するための方法が提供され、該方法は、実験動物を、化学物質又は化学物質の組み合わせにさらし、実験動物からサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、実験動物からのサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0054】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、環境条件にさらした後に続く毒性効果を分析する方法が更に提供され、該方法は、環境条件にさらされた少なくとも1つの個体を同定し、少なくとも1つの個体の少なくとも1つから少なくとも1つのサンプルを取得し、走査型電子顕微鏡内で、該少なくとも1つのサンプルを、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0055】

本発明のなお別の好ましい実施形態によれば、化学的実体を特徴付ける方法が更に提供され、該方法は、SEM互換性サンプルエンクロージャ内で化学的実体を細胞に印加し、走査型電子顕微鏡内で、該細胞を、水の蒸気圧を超える圧力により特徴付けられる環境内に存在する間に走査する、各工程を備える。

【0056】

好ましくは、本方法は、細胞形状の変化を分析する工程を更に備える。これに加えて又は代替として、本方法は、細胞の細胞骨格を分析する工程を更に備える。加えて、本方法は、細胞の生態分子の分布を分析する工程を更に備える。

【0057】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、本方法は、サンプルの領域からのX線を検出し、該サンプル内で、ヨウ素、金属及びリンのうち少なくとも1つの存在を検出するため該X線を分析する、各工程を備える。好ましくは、本方法は、ヨウ素、金属及びリンのうち前記少なくとも1つの濃度を決定する工程を更に備える。

【0058】

本発明の更に別の好ましい実施形態によれば、上記サンプルは、電子透過性で流体不透過性の膜を通過した電子により衝突される。加えて、本方法は、該サンプルを電子透過性で流体不透過性の膜に押し付ける工程を更に備える。

【0059】

本発明は、添付図面と関連付けられた次の詳細な説明からより完全に理解され、認められるであろう。

【実施例】

【0060】

本発明は、非真空中で湿った環境におけるサンプルの電子顕微鏡による検査のための方法に関する。より詳しくは、本発明は、重要な詳細構造を破壊して観察されるべきサンプル

10

20

30

40

50

に擬似物を導入するおそれのある水置換及び臨界点乾燥を始めとする脱水処置を施す必要無しに、走査型電子顕微鏡でサンプルを視覚化するための方法に関する。本発明の方法を用いない場合、電子顕微鏡で試験されるべきサンプルは、真空又は真空に近い状態でしか移動することができない電子ビームによる妨げられないアクセスを可能にするため、真空又は真空に近い状態で保持されなければならない。

【0061】

本発明の方法は、走査されるべきサンプルがその中に配置されるところの、後述される新規なSEMサンプル容器を有利に用いている。サンプルの水和及び大気圧状態は、SEMステージに配置し、SEM走査チャンバーを退去させた後でさえも、維持される。

【0062】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解されたSEM互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である、図1A乃至図5Bを参照する。図1A及び図1Bに示されるように、SEM互換性サンプル容器は、閉鎖の容易さ及び速さを向上させるため配列された、参考番号100及び102により指し示された、第1及び第2の互いにねじ込まれるエンクロージャ要素を備えている。エンクロージャ要素100及び102は、好ましくは、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆される。

【0063】

第1のエンクロージャ要素100は、好ましくは、液体サンプルエンクロージャを形成し、略中央アパー・チャ106を持つベース表面104を有する。図2A及び図2Bに詳細に示される、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜サブアッセンブリ108は、図3A、3B及び図5A、5Bに示されるように、アパー・チャ106に対向してこれを覆って、エンクロージャ要素100の内部に着座している。エンクロージャ要素100内に適切に配置されたサブアッセンブリ108を備えるサンプル皿部は、図3A乃至図5Bに示されるように、参考番号109により指し示されている。

【0064】

更に図2A及び図2Bを参照すると、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110が、接着剤により、機械式支持格子112に接着される。該膜110は、アメリカ合衆国、UT、オレムのモックステック社から市販されている、カタログ番号LWN00033等のポリイミド膜を含むのが好ましい。格子112は、図面で縮尺通りには示されておらず、該格子としては、アメリカ合衆国、ニューヨークのコートランドのバックビーメアズから市販されている、カタログ番号BM0090-01が好ましい。接着剤は、アメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されており、カタログ番号NOA61であるのが好ましい。液体サンプルエンクロージャ形成リング114は、好ましくは、例えばアメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号NOA61の接着剤により、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110に接着されている。リング114は、スペイン、バルセロナ市のイルペンから市販されている、例えばカタログ番号692106001000等のPMMA(ポリメチルメタクリレート)から形成されるのが好ましく、約20マイクロリットルの体積で約2mmの高さを備えた液体サンプルエンクロージャを画定するのが好ましい。好ましくは、リング114は、傾斜壁を有する液体サンプルエンクロージャ116を画定するように構成される。

【0065】

代替例として、膜110は、ポリアミド、ポリアミド-イミド、ポリエチレン、ポリブロピレン、「パーソディオン」、「コロディオン」、「カプトン」、「フォームバー」、「ビニレック」、「バットバー」、「ピオロフォルム」、「パリーネ」、二酸化シリコン、一酸化シリコン、又は、カーボン、或いは、前掲したものの任意の組み合わせ、又は、他の任意の適切な材料から形成されてもよい。

【0066】

リング118は、リング114と、第2のエンクロージャ要素102の内部表面との

10

20

30

40

50

間に配置されているのが好ましい。Oリング118は、エンクロージャ要素100及び102が緊密なねじ込み係合であるとき、要素100及び102のねじ込み係合が密封係合であるべき必要性を無くすように作用する。

【0067】

第2のエンクロージャ要素102には、走査型電子顕微鏡の標本ステージの適切な凹部(図示せず)に着座するように配列された、略中央スタブ122が形成されるのが好ましい。図1A乃至図10に示される容器は、従来の走査型電子顕微鏡の従来のスタブ用凹部に適合するサイズで働き、それが何であれ、変形する必要はないことが、本発明の特別な特徴である。スタブの様々な形態及びサイズを、様々な走査型電子顕微鏡に適合するよう10に提供することができることが認められよう。

【0068】

エンクロージャ要素100及び102は、容器を、適切な多重容器ホルダー内に容易に着座させることを可能にし、更にユーザーがエンクロージャ要素100及び102をねじ込み開閉することを援助するため、径方向に延在する夫々の位置決め保持突起部124及び125が設けられるのが好ましい。好ましくは、各々のエンクロージャ要素100及び102上の突起部124及び125の相対的な方位角方向の配置は、図4A及び図4Bに示されるように、これら突起部間の相対的な方位角方向の整列が、要素間のねじ込み閉鎖の所望の度合いを指し示すようになっているのが好ましい。

【0069】

本発明の別の実施例では、サンプル皿部がエンクロージャ100及び102を備えていてもよいことが認められよう。20

ここで、図1A乃至図5BのSEM互換性サンプル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である、図6A、6B及び6Cを参照する。図6Aは、エンクロージャ要素100及び102をねじ込み閉鎖する前の図1Bに示される配位で配列されている、液体サンプル130を蓄えた図1A乃至図5Bの容器を示している。なお、液体サンプルは、表面張力に起因して、液体サンプルエンクロージャ116からは流れ出ない。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110が、図6Aにおいて、略平坦であるように示されている。

【0070】

図6Bは、周囲からの液体サンプルエンクロージャ116の密封を生成するエンクロージャ要素100及び102の間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図6Aの容器を示している。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110と、その支持格子112とが、この態様におけるその密封の結果生じた液体サンプルエンクロージャ116の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。30

【0071】

図6Cは、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空でSEMの脱ガス環境に配置されたときの図6Bの容器を示している。この環境では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110と支持格子112とが、図6Bの周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっていることが見て取れる。更には、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110は、図6Bの周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子112の隙間を通って隙間内に入り込もうとしていることが理解できる。40

【0072】

ここで、図1A乃至図6CのSEM互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図である、図7A、7B、7C、7D及び7Eを参照する。典型的な細胞培養状況を示す、図7Aを参照すると、サブアッセンブリ108を内部に配置させたエンクロージャ要素100は、図1Aに示された配置態様にあり、液体媒体142内の細胞140は液体サンプルエンクロージャ116内に配置され、これらの細胞140が、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110に接触して横たわっている。

【0073】

図 7 B は、典型的には吸引によって液体サンプルエンクロージャ 116 から液体を除去した状態を示し、図 7 C は、液体サンプルエンクロージャ 116 に液体を追加した状態を示している。液体の除去及び追加を多数回に亘って液体サンプルエンクロージャ 116 内のサンプルに関して実行してもよい。好ましくは、液体除去及び追加のため用いられる装置は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 の意図しない破裂を防止するように、設計され、備え付けられるのがよい。

【 0074 】

図 7 D は、図 7 C に示される細胞 140 を液体媒体 142 内に含む容器の閉鎖状態を示している。図 7 E は、SEM 146 のステージ 144 上に挿入される閉鎖容器を図 1 B の配位で示している。容器の配位が図 7 E に示されたものとは反対である SEM が存在することが認められよう。

【 0075 】

図 7 A 乃至図 7 D は、液体サンプルエンクロージャ 116 に関する液体の追加又は除去に拘わらず、サンプルを含む液体の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 と接触したままとなる状況を例示している。この状況は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 に、サンプルの一部が吸収され、そうでなければ、接着される状況を含んでいてもよい。サンプルを含む液体の例は、細胞、培養菌、血液、バクテリア及び無細胞材料を含んでいてもよい。

【 0076 】

図 1 A 乃至図 6 C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 と接触したサンプル含有液体、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である、図 8 A、8 B 及び 8 C を参照する。図 8 A 乃至図 8 C は、サンプルを含む液体 160 の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 と接触しているが、それに接着されていない状況を例示している。サンプルを含む液体の例には、例えば、ミルク、化粧用クリーム、ペイント、インク、及び、液体形態の薬剤等、様々な乳濁液及び懸濁液がある。図 8 A 乃至図 8 B で、サブアッセンブリ 108 を内部に配置させたエンクロージャ要素 10 は、図 1 A に示される配位にあることが見て取れよう。

【 0077 】

図 8 B は、サンプル 160 を含む容器の閉鎖状態を示している。図 8 C は、SEM 146 のステージ 144 上に挿入された、図 1 B の配位にある、閉鎖容器を示している。容器の配位が図 8 C に示されたものとは反対である SEM が存在することが認められよう。

【 0078 】

ここで、図 1 A 乃至図 6 C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、サンプルの SEM 検査の簡略図及び断面図である、図 9 を参照する。図 9 に示されるように、参照番号 170 により指示された容器は、SEM により発生された電子ビーム 172 が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 を通過し、容器 170 内のサンプル 174 を含む液体に照射されように、SEM 146 のステージ 144 上に配置されている。サンプル 174 からの後方散乱電子は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 110 を通過し、SEM の一部を形成する検出器 176 により検出される。例えば 2 次電子検出器等の 1 つ以上の追加の検出器を設けてもよい。電子ビーム励起に起因してサンプル 174 により放射される X 線放射を検出するための X 線検出器（図示せず）を設けてもよい。

【 0079 】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る容器 170 内のサンプル 174 との電子ビーム相互作用の詳細を概略的に示す図 10 を追加的に参照する。なお、本発明は、図 10 に示されるように、それらの平均的な原子番号により互いから区別される特徴群の高いコントラストの画像形成を可能にしている。図 10 では、比較的高い平均原子番号を有する、細胞核 180 は、周囲の核質 182 よりも電子をより大きく後方散乱させることが示されている。

【 0080 】

なお、本発明の好ましい実施例によれば、約 2 ミクロンまでの深さのサンプル内部の画

10

20

30

40

50

像形成は、図10に示されるように、50KeVより低いエネルギーレベルを有する電子に対して達成可能であり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜110より下方に位置する細胞核180が画像形成される。

【0081】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された走査型電子顕微鏡(SEM)の互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である、図11A乃至図15Bを参照する。図11A及び図11Bに示されるように、SEM互換性サンプル容器は、閉鎖の容易さ及び速さを向上させるように配列された、参考番号200及び202により指示された、第1及び第2の相互にねじ込まれるエンクロージャ要素を備えている。エンクロージャ要素200及び202は、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆されるのが好ましい。

【0082】

第1のエンクロージャ要素200は、好ましくは、液体サンプルエンクロージャを形成し、略中央アパーチャ206を持つベース表面204を有する。図12A及び図12Bに詳細に示される、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜サブアッセンブリ208は、図13A、13B及び図15A、15Bに示されるように、アパーチャ206に対向してこれを覆って、エンクロージャ要素200の内部に着座している。エンクロージャ要素200内に適切に配置されたサブアッセンブリ208を備えるサンプル皿部は、図13A乃至図15Bに示されるように、参考番号209により指示されている。

【0083】

更に図12A及び図12Bを参照すると、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜210が、接着剤により、機械式支持格子212に接着される。該膜210は、アメリカ合衆国、UT、オレムのモックステック社から市販されている、カタログ番号LWN00033等のポリイミド膜を含むのが好ましい。格子212は、図面で縮尺通りには示されておらず、該格子としては、アメリカ合衆国、ニューヨークのコートランドのバックビームアズから市販されている、カタログ番号BM0090-01が好ましい。接着剤は、アメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されており、カタログ番号NOA61であるのが好ましい。液体サンプルエンクロージャ形成リング214は、好ましくは、例えばアメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号NOA61の接着剤により、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜210に接着されている。リング214は、スペイン、バルセロナ市のイルペンから市販されている、例えばカタログ番号692106001000等のPMMA(ポリメチルメタクリレート)から形成されるのが好ましく、約20マイクロリットルの体積で約2mmの高さを備えた液体サンプルエンクロージャを画定するのが好ましい。好ましくは、リング214は、傾斜壁を有する液体サンプルエンクロージャ216を画定するように構成される。

【0084】

ダイヤフラム218が、リング214と、第2のエンクロージャ要素202の内側表面219との間に配置されるのが好ましい。好ましくは、ダイヤフラム218は、Oリング部220から一体成形され、該Oリング部220には、伸張可能シート部221が密封されている。ダイヤフラム218は、約50のショア硬度を有するシリコンゴムから成形されるのが好ましく、シート部221は、0.2~0.3mmの厚さを有するのが好ましい。ダイヤフラム218は、エンクロージャ要素200及び202が、緊密なねじ込み係合にあるとき、要素200及び202のねじ込み係合が密封係合であるべき必要性を無くすように、並びに、その動的圧力及び静的圧力を提供するように作動する。

【0085】

第2のエンクロージャ要素202には、走査型電子顕微鏡の標本ステージの適切な凹部(図示せず)に着座するように配列された、貫通ボア223を有する略中央スタブ222が形成されるのが好ましい。ボア223は、ダイヤフラム218の一方の側と(SEM)互換性サンプル容器が配置されている環境との間に流体連通チャンネルを形成することに

10

20

30

40

50

より、ダイヤフラム 218 が圧力リリーフを提供することを可能にする。図 11A 乃至図 20 に示される容器は、従来の走査型電子顕微鏡の従来のスタブ用凹部に適合するサイズで働き、それが何であれ、変形する必要はないことが、本発明の特別な特徴である。スタブの様々な形態及びサイズを、様々な走査型電子顕微鏡に適合するように提供することができることが認められよう。

【0086】

エンクロージャ要素 200 及び 202 は、容器を、適切な多重容器ホルダー内に容易に着座させることを可能にし、更にユーザーがエンクロージャ要素 200 及び 202 をねじ込み開閉することを援助するため、径方向に延在する夫々の位置決め保持突起部 224 及び 225 が設けられるのが好ましい。好ましくは、各々のエンクロージャ要素 200 及び 202 上の突起部 224 及び 225 の相対的な方位角方向の配置は、図 14A 及び図 14B に示されるように、これら突起部間の相対的な方位角方向の整列が、要素間のねじ込み閉鎖の所望の度合いを指示するようになっているのが好ましい。

【0087】

ここで、図 11A 乃至図 15B の SEM 互換性サンプル容器の作動態様を作動の 3 段階で各々示した 3 つの断面図である、図 16A、16B 及び 16C を参照する。図 16A は、エンクロージャ要素 200 及び 202 をねじ込み閉鎖する前に、図 11B に示された配位で配列されている、液体サンプル 230 を蓄えた図 11A 乃至図 15B の容器を示している。なお、液体サンプルは、表面張力に起因して、液体サンプルエンクロージャ 216 からは流れ出ない。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 が、図 16A において、略平坦であるように示されている。

【0088】

図 16B は、周囲からの液体サンプルエンクロージャ 216 の密封を生成するエンクロージャ要素 200 及び 202 の間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図 16A の容器を示している。ダイヤフラム 218 が、この態様におけるその密封の結果生じた液体サンプルエンクロージャ 216 の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。本実施例では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 及びその支持格子 212 も、この態様におけるその密封の結果生じた液体サンプルエンクロージャ 116 の圧力形成に起因して、外方にしなっているが、ダイヤフラム 218 の作用に起因して、かなりより小さい程度にしか、しなっていない。これは、図 16B と図 6B とを比較することにより、理解することができる。

【0089】

図 16C は、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中で SEM の脱ガス環境に配置されたときの図 16B の容器を示している。この環境では、ダイヤフラム 218 が、図 16B の周囲環境のときよりもより大きい度合いで外方にしなり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 と支持格子 212 とが、図 16B の周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっているが、ダイヤフラム 218 の作用に起因して、図 6C の実施例のときよりも、かなり小さい度合いでしかしなっていないことが見て取れる。これは、図 16C と図 6C とを比較することにより、理解することができる。

【0090】

なお、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 は、図 16B の周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子 212 の隙間を通って隙間内に入り込もうとしているが、ダイヤフラム 218 の作用に起因して、図 6C の実施例のときよりもかなり小さい度合いでしかしなっていないことが理解できる。これは、図 16C と図 6C とを比較することにより、理解することができる。

【0091】

ここで、図 11A 乃至図 16C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である、図 17A、17B、17C、17D 及び 17E を参照する。図 7A と同一で、典型的な細胞の培養状況を示す、図 17A を参照すると、サブアッセンブリ 208 を内部に配置させたエンクロー

10

20

30

40

50

ジャ要素 200 が、図 11A に示される配位にあり、液体媒体 242 中の細胞 240 が、液体サンプルエンクロージャ 216 内に配置され、細胞 240 が、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 に接触して横たわっていることが示されている。

【0092】

図 7B と同一の図 17B は、典型的には吸引により、液体サンプルエンクロージャ 216 からの液体の除去を示し、図 7C と同一の図 17C は、液体サンプルエンクロージャ 216 への液体の追加を示している。液体の除去及び追加を多数回に亘って液体サンプルエンクロージャ 216 内のサンプルに関して実行してもよい。好ましくは、液体除去及び追加のため用いられる装置は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 の意図しない破裂を防止するように、設計され、備え付けられるのがよい。

10

【0093】

図 17D は、図 17C に示される細胞 240 を液体媒体 242 内に含む容器の閉鎖状態を示している。図 17E は、SEM 246 のステージ 244 上に挿入される閉鎖容器を図 11B の配位で示している。容器の配位が図 17E に示されたものとは反対である SEM が存在することが認められよう。

【0094】

図 17A 乃至図 17D は、液体サンプルエンクロージャ 216 に関する液体の追加又は除去に拘わらず、サンプルを含む液体の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 と接触したままとなる状況を例示している。この状況は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 に、サンプルの一部が吸収され、そうでなければ、接着される状況を含んでいてもよい。サンプルを含む液体の例は、細胞、培養菌、血液、バクテリア及び無細胞材料を含んでいてもよい。

20

【0095】

図 11A 乃至図 16C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 と接触したサンプル含有液体、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である、図 18A、18B 及び 18C を参照する。図 18A 乃至図 18C は、サンプルを含む液体 260 の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 と接触しているが、それに接着されていない状況を例示している。サンプルを含む液体の例には、例えば、ミルク、化粧用クリーム、ペイント、インク、及び、液体形態の薬剤等、様々な乳濁液及び懸濁液がある。図 18A 乃至図 18B で、サブアッセンブリ 208 を内部に配置させた、エンクロージャ要素 200 は、図 11A に示される配位にあることが見て取れよう。図 18A は図 8A と同一である。

30

【0096】

図 18B は、サンプル 260 を含む容器の閉鎖状態を示している。図 18C は、SEM 246 のステージ 244 上に挿入された、図 11B の配位にある、閉鎖容器を示している。容器の配位が図 18C に示されたものとは反対である SEM が存在することが認められよう。

30

【0097】

ここで、図 11A 乃至図 16C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、サンプルの SEM 検査の簡略図及び断面図である、図 19 を参照する。図 19 に示されるように、参照番号 270 により指し示された容器は、SEM により発生された電子ビーム 272 が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 を通過し、容器 270 内のサンプル 274 を含む液体に照射されよう、SEM 246 のステージ 244 上に配置されている。サンプル 274 からの後方散乱電子は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 210 を通過し、SEM の一部を形成する検出器 276 により検出される。例えば 2 次電子検出器等の 1 つ以上の追加の検出器を設けてもよい。電子ビーム励起に起因してサンプル 274 により放射される X 線放射を検出するための X 線検出器（図示せず）を設けてもよい。

40

【0098】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る容器 270 内のサンプル 274 との電子ビーム相互作用の詳細を概略的に示す図 20 を追加的に参照する。なお、本発明は、図 20 に示

50

されるように、それらの平均的な原子番号により互いから区別される特徴群の高いコントラストの画像形成を可能にしている。図20では、比較的高い平均原子番号を有する、細胞核280が、周囲の核質282よりも電子をより大きく後方散乱させることができている。

【0099】

なお、本発明の好ましい実施例によれば、約2ミクロンまでの深さのサンプル内部の画像形成は、図20に示されるように、50KeVより低いエネルギーレベルを有する電子に対して達成可能であり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜210より下方に位置する細胞核280が画像形成される。

【0100】

ここで、図1A乃至図20に示された型式のSEM互換性サンプル容器で使用する顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの簡略的な分解図である、図21A及び図21Bを参照する。更に、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーを、覆われていない状態、及び、覆われて組み立てられた状態で各々示した、簡略図である、図22A及び図22Bを参照する。

【0101】

図21A及び図21Bに示されるように、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーは、ベース部300と、頂部要素302と、カバー304と、を備えるのが好ましい。好ましくは、カバー304が顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの内部に無菌状態を維持するため設けられる。

【0102】

ベース部300は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、容器支持収容部306の列を形成する。各々の容器支持収容部306は、光透明底部壁を有する凹部308により形成されるのが好ましい。該光透明底部壁を通して光学顕微鏡の検査を実行することができる。図1A乃至図8Cで参照番号100により指し示されたエンクロージャ要素で、各凹部308に隣接して、図1A乃至図4Bで参照番号124により指し示された突起部を収容するように配置された、一対の互いに整列した対の直立相互間隔突起部310が形成され、これにより方位角方向の整列を固定するのが好ましい。

【0103】

ベース部300は、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの内部で所望レベルの湿度を維持するため使用される液体を保持するようになった、複数の液体リザーバー312を形成するのが好ましい。ベース部300は、床部320が形成されるのが好ましい。ベース部300の所望の配列で、図3A乃至図5Bの参照番号109により指し示されたサンプル皿部を保持するように、頂部要素302は、取り外し可能にベース部300とスナップ式に係合するため配列されている。頂部要素302には、容器支持収容部306で着座されたサンプル皿部109の上を横たわるように配列されたアパーチャ324の列を有する、平坦表面322が形成されている。アパーチャ324のサイズは、サンプル皿部109が通過することを防止するように、エンクロージャ要素100のサイズよりも小さくなるように選択されるのが好ましい。平坦表面322は、液体リザーバー312と連通するアパーチャ326を備えるのが好ましい。

【0104】

頂部要素302は、位置決め案内部328と、ダミーアパーチャ330とを更に提供する。ダミーアパーチャは、図23A及び図23Bを参照して後述されるように、これと連結された吸引装置により使用するため設けられている。組み合わせダミーアパーチャ332も設けられている。各アパーチャ332の一部分だけが液体リザーバー312を覆い、各アパーチャ332の残りが、吸引装置のためのダミーアパーチャとして機能する。

【0105】

カバー304が、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの内部の無菌状態を維持するため提供される。カバー304は、図22Bに示されるように光に対して透明であるのが好ましい。図21A乃至図22Bの顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーは、光学顕微鏡、

10

20

30

40

50

遠心分離機及び自動位置決め装置等の従来の細胞生物学的設備と互換性があるように寸法が定められるのが好ましい。好ましい寸法は、85mm × 127mmである。

【0106】

ここで、吸引装置及びピペットを伴った、図21A乃至図22Bの顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの簡略図である、図23A、23B及び23Cを参照する。図23Aを参照すると、参考番号350により指示された吸引装置が吸引源に導管354を介して連結されたマニホールド352を備えることが示されている。マニホールド352は、均一に間隔を隔てられたニードル356の直線状列と連通するのが好ましい。一对のスペーサー358が、マニホールド352を取り付けられるか、又は、マニホールドと一体成形されている。スペーサー358は、ニードル356の直線状列と一列に並んで配置される。これらのスペーサー358は、頂部要素302の両側にある隣接する位置決め案内部328の中間のところでベース部30の床部320と係合するのが好ましい。スペーサー358は、ニードル356が図1A乃至図10で参考番号110により指示された電子ビーム透過性で流体不透過性の膜と係合しないことを確実にする。

10

【0107】

図23Aに示されるように、容器支持収容部306は、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダー上で互い違いの列に配列されている。かくして、図23Bに示されるように、列毎に、ニードル356のうち3つがアパー・チャ324と係合し、ニードル356のうち2つがダミーアパー・チャ330と係合し、ニードル356のうち一つが、ダミーアパー・チャとして機能するアパー・チャ332の一部と係合する。

20

【0108】

図23Cは、従来のピペット360を用いて個々のサンプル皿部109に液体を追加した状態を示している。図1A乃至図10で参考番号110により指示された電子ビーム透過性で流体不透過性の膜とピペットとの意図しない係合を防止するため、カラー要素362が、ピペット360と連係して使用するため設けられてもよい。

20

【0109】

ここで、図1A乃至図10で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図24A、24B及び24Cを参照する。図24Aに示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部400と、密封カバー404とを備えるのが好ましい。ベース部400は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、容器支持収容部406の列を形成する。各々の容器支持収容部406は、アパー・チャ408により形成されるのが好ましい。該アパー・チャを通してSEM顕微鏡の検査を実行することができる。図1A乃至図8Cで参考番号100により指示されたエンクロージャ要素で、各アパー・チャ408に隣接して、サンプル皿部425の突起部424を収容するように配列された、一对の互いに整列した対の直立相互間隔突起部410が形成されるのが好ましい。サンプル皿部425は、図3A乃至図5Bに示されたサンプル皿部109と略同一であってもよいが、ねじ込み式機構又は他の取り付け機構を必要としない。

30

【0110】

ベース部400は、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの内部で所望レベルの湿度を維持するため使用される液体を保持するようになった、複数の液体リザーバー412を形成してもよい。

40

【0111】

密封カバー404は、サンプル皿部425の各々と個々に密封係合するように配列されている。好ましくは、密封カバー404は、その下側に、図24Cに示されたOリング426が提供される。Oリング426は、密封カバー404が、適所に、好ましくはベース部400との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部425の各々の頂部リム表面と密封係合するように、そこに密封され配列されている。

【0112】

図24Bは、1つのサンプル皿部425がベース部400の皿支持収容部406に配置

50

された状態の図 24A の装置を示している。図 24C は、ベース部 400 とスナップ式に係合する密封カバー 404 を示している。密封カバー 404 は、これにより、O リング 426 と、周囲を取り囲む密封カバー 404 の一部分とを用いてサンプル皿部 425 の各々の個々の密封を提供する。

【0113】

ここで、図 11A 乃至図 20 で示された型式の SEM 互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 25A、図 25B 及び図 25C を参照する。図 25A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 450 と、密封カバー 454 とを備えるのが好ましい。ベース部 450 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、皿支持収容部 456 の列を形成する。各々の皿支持収容部 456 は、アパー・チャ 458 により形成されるのが好ましい。該アパー・チャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。各アパー・チャ 458 に隣接して、サンプル皿部 475 の突起部 474 を収容するように配列された、一対の互いに整列した対の直立相互間隔突起部 460 が形成されるのが好ましい。サンプル皿部 475 は、図 13A 乃至図 15B に示されたサンプル皿部 109 と略同一であってもよいが、ねじ込み式機構又は他の取り付け機構を必要としない。

【0114】

ベース部 450 は、顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの内部で所望レベルの湿度を維持するため使用される液体を保持するようになった、複数の液体リザーバー 462 を形成してもよい。

【0115】

密封カバー 454 は、図 25C に示される、ダイヤフラム 476 とサンプル皿部 475 の各々とを個々に密封係合するため配置される。該ダイヤフラムは、密封カバー 454 に形成されたアパー・チャ 478 を覆って密封式に取り付けられている。好ましくは、図 11A 乃至図 20 を参照して上述されたダイヤフラム 218 と同一であってもよい、ダイヤフラム 476 の列が、密封カバー 454 の下側に設けられている。個々のダイヤフラム 476 は、密封カバー 454 が、適所に、好ましくはベース部 450 との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部 475 の各々の頂部リム表面と密封係合するように配列されている。

【0116】

図 25B は、1 つのサンプル皿部 475 がベース部 450 の皿支持収容部 456 に配置された状態の図 25A の装置を示している。図 25C は、ベース部 450 とスナップ式に係合する密封カバー 454 を示している。密封カバー 454 は、これにより、ダイヤフラム 476 を用いてサンプル皿部 475 の各々の個々の密封を提供する。

【0117】

本発明の好ましい実施例に係る、複数の SEM 互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 26A 及び図 26B を参照する。図 26A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 500 と、密封カバー 504 とを備えるのが好ましい。ベース部 500 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器 506 の列を形成する。各々のサンプル容器 506 は、アパー・チャ 508 を備えるのが好ましい。該アパー・チャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。図 26B に示される電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 510 が各アパー・チャ 508 を覆って密封する。膜 510 は、図 1A 乃至図 10 を参照して上述された膜 110 と同一であるのが好ましい。密封カバー 504 は、サンプル容器 506 の各々と個々に密封係合するように配列されている。

【0118】

図 26B は、図 26A の装置が密封係合した状態を示している。この密封係合により、サンプル容器 506 の各々の個々の密封が提供される。

本発明の好ましい実施例に係る、複数の SEM 互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 27A 及び図 27B を参照する。図 27A

10

20

30

40

50

に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 550 と、密封カバー 554 とを備えるのが好ましい。ベース部 550 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器 556 の列を形成する。各々のサンプル容器 556 は、アーチャ 558 を備えるのが好ましい。該アーチャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。図 27B に示される電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 560 が各アーチャ 558 を覆って密封する。膜 560 は、図 11A 乃至図 20 を参照して上述された膜 210 と同一であるのが好ましい。密封カバー 554 は、例えば、約 50 のショア硬度を有する、0.2 ~ 0.3 mm の厚さのシリコンゴム等から成形された弾性シート材料から形成されたダイヤフラムであるのが好ましく、サンプル容器 556 の各々と個々に密封係合するように配列されている。

10

【0119】

図 27B は、図 27A の装置が密封係合した状態を示している。この密封係合により、サンプル容器 556 の各々の個々の密封が提供される。

ここで、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である、図 28 を参照する。図 28 に示されるように、複数の顕微鏡検査前の多重サンプルホルダー 600 は、各々が図 1A 乃至図 20 に示された型式の多数の SEM 互換性サンプル容器 602 を含み、細菌培養器 604 内に配置された状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号 606 で示されるように、容器 602 がホルダー 600 内に取り付けられた状態で、容器 602 内のサンプルの光学顕微鏡検査が実行される。好ましくは、倒立光学顕微鏡 608 がこの目的のため用いられる。

20

【0120】

好ましくは、図示のような例えばロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、顕微鏡検査前多重サンプルホルダー 600 及び容器 602 を搬送するため使用される。1つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0121】

その後、個々の容器 602 は、ホルダー 600 から取り外され、取り外し可能な電子顕微鏡標本ステージ 610 に配置され、次に、走査型電子顕微鏡 612 内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び / 又は、典型的にはコンピュータ 614 で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

30

【0122】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である、図 29 を参照する。図 29 に示されるように、複数の顕微鏡検査前の多重サンプルホルダー 650 は、各々が図 24A 乃至図 25C に示された型式のうちいずれかの多数の SEM 互換性サンプル容器 652 を含み、細菌培養器 654 内に配置された状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号 656 で示されるように、サンプル皿部がホルダー 650 内に取り付けられた状態で、皿部 652 内のサンプルの光学顕微鏡検査が実行される。好ましくは、倒立光学顕微鏡 658 がこの目的のため用いられる。

40

【0123】

好ましくは、図示のような例えばロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、サンプル皿部 652 を含む顕微鏡検査前多重サンプルホルダー 650 を搬送するため使用される。1つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0124】

その後、ホルダー 650 は、電子顕微鏡標本ステージ 660 に配置され、次に、走査型電子顕微鏡 662 内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び / 又は、典型的にはコンピュータ 664 で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

50

【0125】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である、図30を参照する。図30に示されるように、複数の顕微鏡検査前の多重サンプルホルダー670は、各々が図26A乃至図27Bのいずれか1つに示された多数のSEM互換性サンプル容器672を形成し、細菌培養器674内に配置された状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号676で示されるように、サンプル容器672内のサンプルの光学顕微鏡検査がホルダーの位置で実行される。好ましくは、倒立光学顕微鏡678がこの目的のため用いられる。

【0126】

好ましくは、図示のような例えばロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、顕微鏡検査前多重サンプルホルダー670を搬送するため使用される。1つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0127】

その後、ホルダー670は、電子顕微鏡標本ステージ680に配置され、次に、走査型電子顕微鏡682内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ684で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0128】

本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された操作型電子顕微鏡(SEM)互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である、図31A乃至図35Bを参照する。図31A及び図31Bに示されるように、SEM互換性サンプル容器は、閉鎖の容易さ及び速さを向上させるため配列された、参考番号1100及び1102により指示された、第1及び第2の互いにねじ込まれるエンクロージャ要素を備えている。エンクロージャ要素1100及び1102は、好ましくは、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆される。

【0129】

第1のエンクロージャ要素1100は、好ましくは、液体サンプルエンクロージャを形成し、略中央アパーチャ1106を持つベース表面1104を有する。図32A及び図32Bに詳細に示される、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜サブアッセンブリ1108は、図33A、33B及び図35A、35Bに示されるように、アパーチャ1106に対向してこれを覆って、エンクロージャ要素1100の内部に着座している。エンクロージャ要素1100内に適切に配置されたサブアッセンブリ1108を備えるサンプル皿部は、図33A乃至図35Bに示されるように、参考番号1109により指示されている。

【0130】

更に図32A及び図32Bを参照すると、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1110が、接着剤により、機械式支持格子1112に接着される。該膜1110は、アメリカ合衆国、UT、オレムのモックスティック社から市販されている、カタログ番号LWN00033等のポリイミド膜を含むのが好ましい。格子1112は、図面で縮尺通りには示されておらず、該格子としては、アメリカ合衆国、ニューヨークのコートランドのパックビルニアーズから市販されている、カタログ番号BM0090-01が好ましい。接着剤は、アメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されており、カタログ番号NOA61であるのが好ましい。サンプルエンクロージャ形成リング1114は、好ましくは、例えばアメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号NOA61の接着剤により、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1110に接着されている。リング1114は、スペイン、バルセロナ市のイルペンから市販されている、例えばカタログ番号692106001000等のPMMA(ポリメチルメタクリレート)から形成されるのが好ましく、約20マイクロリットルの体積で約2mmの高さを備えた液体サンプルエンクロージャを画定するのが好ましい。好ましくは、リング1114は、傾斜壁を有する液体サンプルエンクロージャ1116を画

定するように構成される。

【0131】

第1のOリング1118は、第2のエンクロージャ要素1102の内側表面と、接続要素1122との間に配置されているのが好ましい。接続要素1122は、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆されているのが好ましい。第2のOリング1123は、接続要素1122と、サブアッセンブリ1108のリング1114との間に配置されているのが好ましい。Oリング1118及び1123は、エンクロージャ要素1100及び1102と接続要素1122とが緊密なねじ込み係合であるとき、要素1100及び1102のねじ込み係合が密封係合であるべき必要性を無くすように作用する。

【0132】

接続要素1122は、凹部1124を有するのが好ましい。接続要素1122には、図35A及び図35Bに示される、突起部1126が形成され、該突起部は凹部1124内に突出している。

【0133】

ポジショナー1128は、2つの直立した可撓性突起部1130から構成されるのが好ましく、各々は、突起部1130の端部1134に形成されたリッジ1132を備える。ポジショナー1128は、プラスチックから成形されるのが好ましい。図35A及び35Bに示されるように、突起部1130は、接続要素1122の凹部1124内に挿入されたとき互いに押圧し、一旦、リッジ1132が接続要素1122の突起部1126に着座されたならば、直立位置へとスナップ式に戻る。

【0134】

ポジショナー1128は、リム1137から延在する、夫々の径方向に延在する位置決め保持突起部1136が設けられているのが好ましい。位置決め保持突起部1136は、ポジショナー1128の回転を防止するためリング1114のサンプルエンクロージャ1116の傾斜壁に形成されたアパーチャ1140内に着座されている。

【0135】

コイルスプリング1142は、リム1137と、突起部1130のリッジ1132との間にポジショナー1128に配置されている。スプリング1142は、硬化ステンレス鋼から形成されるのが好ましい。

【0136】

ポジショナー1128及びスプリング1142は、エンクロージャ要素1100及び1102と接続要素1122とが密接にねじ込み係合した状態にあるとき、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1110に接触して非液体サンプルを上方に移動させるように作用する。

【0137】

第2のエンクロージャ要素1102には、走査型電子顕微鏡の標本ステージの適切な凹部(図示せず)に着座するように配列された、略中央スタブ1150が形成されるのが好ましい。図31A乃至図40に示される容器は、従来の走査型電子顕微鏡の従来のスタブ用凹部に適合するサイズで働き、それが何であれ、変形する必要はないことが、本発明の特別な特徴である。スタブの様々な形態及びサイズを、様々な走査型電子顕微鏡に適合するように提供することができる事が認められよう。

【0138】

エンクロージャ要素1100及び1102は、容器を、適切な多重容器ホルダー内に容易に着座させることを可能にし、更にユーザーがエンクロージャ要素1100及び1102をねじ込み開閉することを援助するため、径方向に延在する夫々の位置決め保持突起部1154及び1155が設けられるのが好ましい。好ましくは、各々のエンクロージャ要素1100及び1102上の突起部1154及び1155の相対的な方位角方向の配置は、図34A及び図34Bに示されるように、これら突起部間の相対的な方位角方向の整列が、要素間のねじ込み閉鎖の所望の度合いを指示するようになっているのが好ましい。

【0139】

10

20

30

40

50

ここで、図31A乃至図35BのSEM互換性サンプル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である、図36A、36B及び36Cを参照する。図36Aは、エンクロージャ要素1100及び1102と接続要素1122をねじ込み閉鎖する前の図31Bに示される配位で配列されている、組織サンプル1160を蓄えた図31A乃至図35Bの容器を示している。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1110が、図36Aにおいて、略平坦であるように示されている。

【0140】

図36Bは、周囲からの組織サンプルエンクロージャ1116の密封を生成するエンクロージャ要素1100及び1102と接続要素1122との間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図36Aの容器を示している。なお、組織サンプル1160はポジショナー1128により発揮された力に起因して、電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110と緊密に接触している。電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110と、その支持格子1112とが、この態様におけるその密封の結果生じた組織サンプルエンクロージャ1116の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。

10

【0141】

図36Cは、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中でSEMの脱ガス環境に配置されたときの図36Bの容器を示している。この環境では、電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110と支持格子1112とが、図36Bの周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっていることが見て取れる。更には、電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110は、図36Bの周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子1112の隙間を通って隙間内に入り込もうとしていることが理解できる。

20

【0142】

ここで、図31A乃至図36CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む組織とSEMへの挿入とを示す、簡略図及び断面図である、図37を参照する。

図37は、SEM1166のステージ1164に挿入される、図31Bの配位にある閉鎖容器を示している。容器の配位が図37に示されたものとは反対であるSEMが存在することが認められよう。

20

【0143】

ここで、図31A乃至図35BのSEM互換性サンプル容器の様々な作動配位を4つの作動段階で示した、4つの断面図である、図38A、38B、38C及び38Dを参照する。図38Aは、図31A乃至図35Bの容器と同一である容器1170を示し、それ以外では、該容器は、以下で特定されるように、細胞成長プラットフォーム1174上で成長する細胞1172を有するサンプルを含み、エンクロージャ要素1100及び1102と接続要素1122とのねじ込み閉鎖前に、図31Bに示された配位に配列されている。電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110が、略平坦であるように図38Aに示されている。細胞成長プラットフォーム1174は、図31A乃至図37の実施例のポジショナー1128に対応する、適切に構成されたポジショナー1176に取り外し可能に取り付けられている。典型的には、細胞は、プラットフォーム1174がポジショナー1176上に取り付けられていない間にも、細胞成長プラットフォーム1174上で成長する。プロットフォーム1174の取り付けは、典型的には、SEM検査が行われる直前に行われる。

30

【0144】

図38Bは、周囲からの、参考番号1178により指し示された細胞サンプルエンクロージャの密封を生成するエンクロージャ要素1100及び1102と接続要素1122との間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図38Aの容器を示している。なお、細胞1172を含むサンプルはポジショナー1176により発揮された力に起因して、電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110と緊密に接触している。電子ビーム透过性で流体不透过性の膜1110と、その支持格子1112とが、この態様におけるその密封の結果生じた細胞サンプルエンクロージャ1178の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。

40

50

【0145】

図38Cは、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中でSEMの脱ガス環境に配置されたときの図38Bの容器を示している。この環境では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜11110と支持格子11112とが、図38Bの周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっていることが見て取れる。更には、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜11110は、図38Bの周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子11112の隙間を通して隙間内に入り込もうとしていることが理解できる。

【0146】

図38Dは、SEM1166のステージ1164に挿入される、図31Bの配位にある閉鎖容器1170を示している。容器の配位が図38Dに示されたものとは反対であるSEMが存在することが認められよう。

【0147】

ここで、図31A乃至図37のSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルのSEM検査の簡略図及び断面図である、図39を参照する。図39に示されるように、参考番号1180により指示された容器は、SEMにより発生された電子ビーム1182が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜11110を通過し、容器1180内のサンプル1184を含む組織に照射されよう。SEM1166のステージ1164上に配置されている。サンプル1184からの後方散乱電子は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜11110を通過し、SEMの一部を形成する検出器1186により検出される。例えば2次電子検出器1188等の1つ以上の追加の検出器を設けてもよい。電子ビーム励起に起因してサンプル1184により放射されるX線放射を検出するためのX線検出器(図示せず)を設けてもよい。

【0148】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る容器1180内のサンプル1184との電子ビーム相互作用の詳細を概略的に示す図40を追加的に参照する。なお、本発明は、図40に示されるように、それらの平均的な原子番号により互いから区別される特徴群の高いコントラストの画像形成を可能にしている。図40では、比較的高い平均原子番号を有する、細胞核1190は、周囲の核質1192よりも電子をより大きく後方散乱させることができている。

【0149】

なお、本発明の好ましい実施例によれば、約2ミクロンまでの深さのサンプル内部の画像形成は、図40に示されるように、50KeVより低いエネルギーレベルを有する電子に対して達成可能であり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜11110より下方に位置する細胞核1190が画像形成される。

【0150】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された走査型電子顕微鏡(SEM)の互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である、図41A乃至図45Bを参照する。図41A及び図41Bに示されるように、SEM互換性サンプル容器は、閉鎖の容易さ及び速さを向上させるように配列された、参考番号1200及び1202により指示された、第1及び第2の相互にねじ込まれるエンクロージャ要素を備えている。エンクロージャ要素1200及び1202は、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆されるのが好ましい。

【0151】

第1のエンクロージャ要素1200は、好ましくは、サンプルエンクロージャを形成し、略中央アーチャ1206を持つベース表面1204を有する。図42A及び図42Bに詳細に示される、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜サブアッセンブリ1208は、図43A、43B及び図45A、45Bに示されるように、アーチャ1206に対向してこれを覆って、エンクロージャ要素1200の内部に着座している。エンクロージャ要素1200内に適切に配置されたサブアッセンブリ1208を備えるサンプル皿部は、図43A乃至図45Bに示されるように、参考番号1209により指示されている。

10

20

30

40

50

【0152】

更に図42A及び図42Bを参照すると、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210が、接着剤により、機械式支持格子1212に接着される。該膜210は、アメリカ合衆国、U.S.、オレムのモックステック社から市販されている、カタログ番号LWN00033等のポリイミド膜を含むのが好ましい。格子1212は、図面で縮尺通りには示されておらず、該格子としては、アメリカ合衆国、ニューヨークのコートランドのバックビーメアズから市販されている、カタログ番号BM0090-01が好ましい。接着剤は、アメリカ合衆国、N.J.のグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されており、カタログ番号NOA61であるのが好ましい。サンプルエンクロージャ形成リング1214は、好ましくは、例えばアメリカ合衆国、N.J.のグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号NOA61の接着剤により、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210に接着されている。リング1214は、スペイン、バルセロナ市のイルペンから市販されている、例えばカタログ番号692106001000等のPMMA(ポリメチルメタクリレート)から形成されるのが好ましく、約20マイクロリットルの体積で約2mmの高さを備えた液体サンプルエンクロージャを画定するのが好ましい。好ましくは、リング1214は、傾斜壁を有する液体サンプルエンクロージャ1216を画定するように構成される。

10

【0153】

好ましくは、ダイヤフラム1218が、Oリング部220から一体成形され、該Oリング部220には、伸張可能シート部221が密封されているのがよい。ダイヤフラム1218は、第2のエンクロージャ要素1202の内側表面1219と、接続要素1222との間に配置されるのが好ましい。接続要素1222は、好ましくは、プラスチックから成形され、導電金属コーティングで被覆されている。ダイヤフラム1218は、約50のショア硬度を有するシリコンゴムから成形されるのが好ましく、シート部1221は、0.2~0.3mmの厚さを有するのが好ましい。

20

【0154】

Oリング1223は、接続要素1222と、サブアッセンブリ1208のリング1214との間に配置されているのが好ましい。ダイヤフラム1218及びOリング1223は、エンクロージャ要素1200及び1202と接続要素1222とが緊密なねじ込み係合にあるとき、要素1200及び1202と接続要素1222とのねじ込み係合が密封係合であるべき必要性を無くすように、並びに、その動的圧力及び静的圧力リリーフを提供するように作動する。

30

【0155】

接続要素1222は、中央凹部1224を有するのが好ましい。接続要素1222には、凹部1224内に突出する、図45A及び45Bに示される突起部1226が形成されている。

【0156】

ポジショナー1228が、2つの直立した可撓性突起部1230から構成されるのが好ましく、各々は、突起部1230の端部1234に形成されたリッジ1232を備える。ポジショナー1228は、プラスチックから成形されるのが好ましい。図45A及び45Bに示されるように、突起部1230は、接続要素1222の凹部1224内に挿入されたとき互いに押圧し、一旦、リッジ1232が接続要素1222の突起部1226に着座されたならば、直立位置へとスナップ式に戻る。

40

【0157】

ポジショナー1228は、リム1237から延在する、夫々の径方向に延在する位置決め保持突起部1236が設けられているのが好ましい。位置決め保持突起部1236は、ポジショナー1228の回転を防止するためリング1214のサンプルエンクロージャ1216の傾斜壁に形成されたアパーチャ1240内に着座されている。

【0158】

コイルスプリング1242は、リム1237と、突起部1230のリッジ1232との

50

間でポジショナー 1228 上に配置されている。スプリング 1242 は、硬化ステンレス鋼から形成されるのが好ましい。

【0159】

ポジショナー 1228 及びスプリング 1242 は、エンクロージャ要素 1200 及び 1202 と、接続要素 1222 とが密接にねじ込み係合した状態にあるとき、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1210 に接触して非液体サンプルを上方に移動させるように作用する。

【0160】

第 2 のエンクロージャ要素 1202 には、走査型電子顕微鏡の標本ステージの適切な凹部（図示せず）に着座するように配列された、貫通ボア 1252 を有する略中央スタブ 1250 が形成されるのが好ましい。ボア 1252 は、ダイヤフラム 1218 の一方の側と（SEM）互換性サンプル容器が配置されている環境との間に流体連通チャンネルを形成することにより、ダイヤフラム 1218 が圧力リリーフを提供することを可能にする。図 41A 乃至図 50 に示される容器は、従来の走査型電子顕微鏡の従来のスタブ用凹部に適合するサイズで働き、それが何であれ、変形する必要はないことが、本発明の特別な特徴である。スタブの様々な形態及びサイズを、様々な走査型電子顕微鏡に適合するように提供することができることが認められよう。

【0161】

エンクロージャ要素 1200 及び 1202 は、容器を、適切な多重容器ホルダー内に容易に着座させることを可能にし、更にユーザーがエンクロージャ要素 1200 及び 1202 をねじ込み開閉することを援助するため、径方向に延在する夫々の位置決め保持突起部 1254 及び 1255 が設けられるのが好ましい。好ましくは、各々のエンクロージャ要素 1200 及び 1202 上の突起部 1254 及び 1255 の相対的な方位角方向の配置は、図 44A 及び図 44B に示されるように、これら突起部間の相対的な方位角方向の整列が、要素間のねじ込み閉鎖の所望の度合いを指し示すようになっているのが好ましい。

【0162】

図 41A 乃至図 45B の SEM 互換性サンプル容器の作動態様を作動の 3 段階で各々示した 3 つの断面図である、図 46A、46B 及び 46C を参照する。図 46A は、エンクロージャ要素 1200 及び 1202 と接続要素 1222 とをねじ込み閉鎖する前に、図 41B に示された配位で配列されている、組織サンプル 1260 を蓄えた図 41A 乃至図 45B の容器を示している。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1210 が、図 46A において、略平坦であるように示されている。

【0163】

図 46B は、周囲からの組織サンプルエンクロージャ 1216 の密封を生成するエンクロージャ要素 1200 及び 1202 の間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図 46A の容器を示している。なお、組織サンプル 1260 は、ポジショナー 1228 により発揮された力に起因して、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1210 と緊密に接触した状態にある。ダイヤフラム 1218 は、この態様におけるその密封の結果生じた組織サンプルエンクロージャ 1216 の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。本実施例では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1210 及びその支持格子 1212 も、この態様におけるその密封の結果生じた組織サンプルエンクロージャ 1216 の圧力形成に起因して、外方にしなっているが、ダイヤフラム 1218 の作用に起因して、かなりより小さい程度にしか、しなっていない。これは、図 46B と図 36B とを比較することにより、理解することができる。

【0164】

図 46C は、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中で SEM の脱ガス環境に配置されたときの図 46B の容器を示している。この環境では、ダイヤフラム 1218 が、図 46B の周囲環境のときよりもより大きい度合いで外方にしなり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1210 と支持格子 1212 とが、図 46B の周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっているが、ダイヤフラム 1218 の作用

10

20

30

40

50

に起因して、図36Cの実施例のときよりも、かなり小さい度合いでしかしなっていないことが見て取れる。これは、図46Cと図36Cとを比較することにより、理解することができる。

【0165】

なお、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210は、図46Bの周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子1212の隙間を通って隙間内に入り込もうとしているが、ダイヤフラム1218の作用に起因して、図36Cの実施例のときよりもかなり小さい度合いでしかしなっていないことが理解できる。これは、図46Cと図36Cとを比較することにより、理解することができる。

【0166】

ここで、図41A乃至図46CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む組織とSEMへの挿入とを示す、簡略図及び断面図である、図47を参照する。

図47は、SEM1266のステージ1264に挿入される、図41Bの配位にある閉鎖容器を示している。容器の配位が図47に示されたものとは反対であるSEMが存在することが認められよう。

【0167】

ここで、図41A乃至図45BのSEM互換性サンプル容器の様々な作動配位を4つの作動段階で示した、4つの断面図である、図48A、48B、48C及び48Dを参照する。図48Aは、図41A乃至図45Bの容器と同一である容器1270を示し、それ以外では、該容器は、以下で特定されるように、細胞成長プラットフォーム1274上で成長する細胞1272を有するサンプルを含み、エンクロージャ要素1200及び1202と接続要素1222とのねじ込み閉鎖前に、図41Bに示された配位に配列されている。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210が、略平坦であるように図48Aに示されている。細胞成長プラットフォーム1274は、図41A乃至図47の実施例のポジショナー1228に対応する、適切に構成されたポジショナー1276に取り外し可能に取り付けられている。典型的には、細胞は、プラットフォーム1274がポジショナー1276上に取り付けられていない間にも、細胞成長プラットフォーム1274上で成長する。プロットフォーム1274の取り付けは、典型的には、SEM検査が行われる直前に行われる。

【0168】

図48Bは、周囲からの、参考番号1278により指示された細胞サンプルエンクロージャの密封を生成するエンクロージャ要素1200及び1202と接続要素1222との間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図48Aの容器を示している。なお、細胞1272を含むサンプルはポジショナー1276により発揮された力に起因して、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210と緊密に接触している。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210と、その支持格子1212とが、この態様におけるその密封の結果生じた細胞サンプルエンクロージャ1278の圧力形成に起因して、外方にしなっているが、ダイヤフラム1218の作用に起因して、図38Bの実施例のときよりもかなり小さい度合いでしかしなっていないことが見て取れる。これは、図48Bと図38Bとを比較することにより、理解することができる。

【0169】

図48Cは、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中でSEMの脱ガス環境に配置されたときの図48Bの容器を示している。この環境では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210と支持格子1212とが、図48Bの周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっていることが見て取れる。更には、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210は、図48Bの周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子1212の隙間を通って隙間内に入り込もうとしているが、ダイヤフラム1218の作用に起因して、図38Cの実施例のときよりもかなり小さい度合いでしかしなっていないことが見て取れる。これは、図48Cと図38Cとを比較することにより、理解することができる。

10

20

30

40

50

【0170】

図48Dは、SEM1266のステージ1264に挿入される、図41Bの配位にある閉鎖容器1270を示している。容器の配位が図48Dに示されたものとは反対であるSEMが存在することが認められよう。

【0171】

ここで、図41A乃至図47のSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルのSEM検査の簡略図及び断面図である、図49を参照する。図49に示されるように、参考番号1280により指し示された容器は、SEMにより発生された電子ビーム1282が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210を通過し、容器1280内のサンプル1284を含む組織に照射されよう。SEM1266のステージ1264上に配置されている。サンプル1284からの後方散乱電子は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210を通過し、SEMの一部を形成する検出器1286により検出される。例えば2次電子検出器1288等の1つ以上の追加の検出器を設けてもよい。電子ビーム励起に起因してサンプル1284により放射されるX線放射を検出すためのX線検出器(図示せず)を設けてもよい。

【0172】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る容器1280内のサンプル1284との電子ビーム相互作用の詳細を概略的に示す図50を追加的に参照する。なお、本発明は、図50に示されるように、それらの平均的な原子番号により互いから区別される特徴群の高いコントラストの画像形成を可能にしている。図50では、比較的高い平均原子番号を有する、細胞核1290は、周囲の核質1292よりも電子をより大きく後方散乱させることができている。

【0173】

なお、本発明の好ましい実施例によれば、約2ミクロンまでの深さのサンプル内部の画像形成は、図50に示されるように、50KeVより低いエネルギーレベルを有する電子に対して達成可能であり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1210より下方に位置する細胞核1290が画像形成される。

【0174】

ここで、図31A乃至図40で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図51A、51B及び51Cを参照する。図51Aに示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部1400と、密封カバー1404とを備えるのが好ましい。ベース部1400は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、容器支持収容部1406の列を形成する。各々の容器支持収容部1406は、アパーチャ1408により形成されるのが好ましい。該アパーチャを通してSEM顕微鏡の検査を実行することができる。各アパーチャ1408に隣接して、サンプル皿部1425の突起部1424を収容するように配列された、一対の互いに整列した対の直立相互間隔突起部1410が形成されるのが好ましい。サンプル皿部1425は、図33A乃至図35Bに示されたサンプル皿部1109と略同一であってもよいが、ねじ込み式機構又は他の取り付け機構を必要としない。

【0175】

密封カバー1404は、サンプル皿部1425の各々と個々に密封係合するように配列されている。好ましくは、密封カバー1404は、その下側に、図51Cに示されたOリング1426が提供される。Oリング1426は、密封カバー1404が、適所に、好ましくはベース部1400との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部1425の各々の頂部リム表面と密封係合するように、そこに密封され配列されている。

【0176】

好ましくは、密封カバー1404は、その下側で、図51Cに示された、突起部1428の列が設けられ、サンプル皿部1425に着座された電子ビーム透過性で流体不透過性の膜1110(図31A乃至図40に示された)と接触し、その上方に非液体サンプルを

10

20

30

40

50

移動させるように配列されている。個々のポジショナー 1428 は、図 51C に示されるように、コイル 1430 内に吊り下げられている。

【0177】

図 51B は、1つのサンプル皿部 1425 がベース部 1400 の皿支持収容部 1406 に配置された状態の図 51A の装置を示している。図 51C は、ベース部 1400 とスナップ式に係合する密封カバー 1404 を示している。密封カバー 1404 は、これにより、O リング 1426 と、周囲を取り囲む密封カバー 1404 の一部分とを用いてサンプル皿部 1425 の各々の個々の密封を提供する。

【0178】

ここで、図 41A 乃至図 50 で示された型式の SEM 互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 52A、52B 及び 52C を参照する。図 52A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 1450 と、密封カバー 1454 とを備えるのが好ましい。ベース部 1450 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、皿部支持収容部 1456 の列を形成する。各々の皿部支持収容部 1456 は、アパーチャ 1458 により形成されるのが好ましい。該アパーチャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。各アパーチャ 1458 に隣接して、サンプル皿部 1475 の突起部 1474 を収容するように配列された、一対の互いに整列した対の直立相互間隔突起部 1460 が形成されるのが好ましい。サンプル皿部 1475 は、図 43A 乃至図 45B に示されたサンプル皿部 1209 と略同一であってもよいが、ねじ込み式機構又は他の取り付け機構を必要としない。

【0179】

好ましくは、密封カバー 1454 は、その下側に、図 52C に示された O リング 1476 が提供される。O リング 1476 は、密封カバー 1454 が、適所に、好ましくはベース部 1450 との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部 1475 の各々の頂部リム表面と密封係合するように、そこに密封され配列されている。

【0180】

密封カバー 1454 は、図 52C に示されるダイヤフラム 1477 を備えた、サンプル皿部 1475 の各々の個々の密封係合のため配列されている。該ダイヤフラムは、密封カバー 1454 に形成されたアパーチャ 1478 を覆って密封式に取り付けられている。好ましくは、図 41A 乃至図 50 を参照して上述されたダイヤフラム 1218 と同一であってもよい、ダイヤフラム 1477 の列が、密封カバー 1454 の下側に設けられている。個々のダイヤフラム 1477 は、密封カバー 1454 が、適所に、好ましくはベース部 1450 との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部 1475 の各々の頂部リム表面と密封係合するように配列されている。

【0181】

好ましくは、密封カバー 1454 には、ポジショナー 1480 の列が設けられている。個々のポジショナー 1480 は、サンプル皿部 1475 に着座された電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1210 (図 41A 乃至図 50 に示された) と接触し、その上方に非液体サンプルを移動させるように配列されている。個々のポジショナー 1428 は、図 51C に示されるように、コイル 1432 内に吊り下げられている。

【0182】

図 52B は、1つのサンプル皿部 1475 がベース部 1450 の皿支持収容部 1456 に配置された状態の図 52A の装置を示している。図 52C は、ベース部 1450 とスナップ式に係合する密封カバー 1454 を示している。密封カバー 1454 は、これにより、ダイヤフラム 1476 を用いて、サンプル皿部 1475 の各々の個々の密封を提供する。

【0183】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る、複数の SEM 互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 53A 及び 53B を参照する。図 53A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 1500 と、

10

20

30

40

50

密封カバー 1504 とを備えるのが好ましい。ベース部 1500 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器 1506 の列を形成する。各々のサンプル容器 1506 は、アパー チャ 1508 を備えるのが好ましい。該アパー チャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。図 53B に示された、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1510 が、各アパー チャ 1508 を覆って密封されている。膜 1510 は、図 31A 乃至図 40 を参照して上述された膜 1110 と同一であるのが好ましい。密封カバー 1504 は、サンプル容器 1506 の各々と個々に密封係合するように配列されている。

【0184】

好ましくは、密封カバー 1504 には、図 53B に示されるポジショナー 1520 の列が設けられている。個々のポジショナー 1520 は、図 53B に示されるように、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1510 と接触し、その上方に非液体サンプルを移動させよう、コイル 1522 内に吊り下げられている。

【0185】

図 53B は、1 つのサンプル皿部 1475 がベース部 1450 の皿支持収容部 1456 に配置された状態の図 52A の装置を示している。図 52C は、ベース部 1450 とスナップ式に係合する密封カバー 1454 を示している。密封カバー 1454 は、これにより、ダイヤフラム 1476 を用いて、サンプル皿部 1475 の各々の個々の密封を提供する。

【0186】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る、複数の SEM 互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 53A 及び 53B を参照する。図 53A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 1500 と、密封カバー 1504 とを備えるのが好ましい。ベース部 1500 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器 1506 の列を形成する。各々のサンプル容器 1506 は、アパー チャ 1508 を備えるのが好ましい。該アパー チャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。図 53B に示された、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1510 が、各アパー チャ 1508 を覆って密封されている。膜 1510 は、図 31A 乃至図 40 を参照して上述された膜 1110 と同一であるのが好ましい。密封カバー 1504 は、サンプル容器 1506 の各々と個々に密封係合するように配列されている。

【0187】

図 53B は、図 53A の装置が密封係合した状態を示している。この密封係合により、サンプル容器 1506 の各々の個々の密封が提供される。

ここで、本発明の好ましい実施例に係る、複数の SEM 互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 54A 及び図 54B を参照する。図 54A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 1550 と、密封カバー 1554 とを備えるのが好ましい。ベース部 1550 は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器 1556 の列を形成する。各々のサンプル容器 1556 は、アパー チャ 1558 を備えるのが好ましい。該アパー チャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。

【0188】

図 54B に示される電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1560 が各アパー チャ 1558 を覆って密封する。膜 1560 は、図 41A 乃至図 50 を参照して上述された膜 1210 と同一であるのが好ましい。密封カバー 1554 は、例えば、約 50 のショア硬度を有する、0.2 ~ 0.3 mm の厚さのシリコンゴム等から成形された弾性シート材料から形成されたダイヤフラム 1562 であるのが好ましい。ダイヤフラム 1562 は、密封カバー 1554 に形成されたアパー チャ 1564 を覆って密封式に取り付けられ、サンプル容器 1556 の各々と個々に密封係合するように配列されている。

【0189】

10

20

30

40

50

好ましくは、密封カバー 1554 には、図 54B に示されたポジショナー 1570 の列が設けられている。個々のポジショナー 1570 は、図 54B に示されるように、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 1560 と接触し、その上方に非液体サンプルを移動せるように、コイル 1572 内に吊り下げられている。

【0190】

図 54B は、図 54A の装置が密封係合した状態を示している。この密封係合により、サンプル容器 1556 の各々の個々の密封が提供される。

ここで、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である、図 55 を参照する。図 55 に示されるように、好ましくは、図示のような例えはロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、多数の SEM 互換性サンプル容器 1602 を搬送するため使用される。1 つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。10

【0191】

その後、個々の容器 1602 は、電子顕微鏡標本ステージ 1610 に配置され、次に、走査型電子顕微鏡 1612 内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び / 又は、典型的にはコンピュータ 1614 で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0192】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である、図 56 を参照する。図 56 に示されるように、複数の顕微鏡検査用の多重サンプルホルダー 1650 は、各々が図 51A 乃至図 52C に示された型式のいずれかの多数の SEM 互換性サンプル皿部 1652 を形成し、テーブル 1654 に載った状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号 1656 で示されるように、サンプル皿部 1652 内のサンプルの光学顕微鏡検査がサンプル皿部がホルダー 1650 に取り付けられている間に実行される。好ましくは、解剖顕微鏡 1658 がこの目的のため用いられる。20

【0193】

好ましくは、図示のような例えはロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、顕微鏡検査用多重サンプルホルダー 1650 を搬送するため使用される。1 つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。30

【0194】

その後、ホルダー 1650 は、電子顕微鏡標本ステージ 1660 に配置され、次に、走査型電子顕微鏡 1662 内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び / 又は、典型的にはコンピュータ 1664 で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0195】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である、図 57 を参照する。図 57 に示されるように、複数の顕微鏡検査用の多重サンプルホルダー 1670 は、図 53A 乃至図 54B のいずれかに示されるように、各々が多数の SEM 互換性サンプル皿部 1672 を形成し、テーブル 1674 に載った状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号 1676 で示されるように、サンプル容器 1672 内のサンプルの光学顕微鏡検査がホルダーの位置で実行される。好ましくは、解剖顕微鏡 1678 がこの目的のため用いられる。40

【0196】

好ましくは、図示のような例えはロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、顕微鏡検査用多重サンプルホルダー 1670 を搬送するため使用される。1 つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0197】

その後、ホルダー 1670 は、電子顕微鏡標本ステージ 1680 に配置され、次に、走50

査型電子顕微鏡 1682 内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ 1684 で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0198】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された操作型電子顕微鏡（SEM）互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である、図 58A 乃至図 62B を参照する。図 58A 及び図 58B に示されるように、SEM 互換性サンプル容器は、閉鎖の容易さ及び速さを向上させるため配列された、参考番号 2100 及び 2102 により指し示された、第 1 及び第 2 の互いにねじ込まれるエンクロージャ要素を備えている。エンクロージャ要素 2100 及び 2102 は、好ましくは、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆される。

【0199】

第 1 のエンクロージャ要素 2100 は、好ましくは、液体サンプルエンクロージャを形成し、略中央アーチャ 2106 を持つベース表面 2104 を有する。図 59A 及び図 59B に詳細に示される、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜サブアッセンブリ 2108 は、図 60A、60B 及び図 62A、62B に示されるように、アーチャ 2106 に対してこれを覆って、エンクロージャ要素 2100 の内部に着座している。エンクロージャ要素 2100 内に適切に配置されたサブアッセンブリ 2108 を備えるサンプル皿部は、図 60A 乃至図 62B に示されるように、参考番号 2109 により指し示されている。

【0200】

更に図 59A 及び図 59B を参照すると、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 が、接着剤により、機械式支持格子 2112 に接着される。該膜 2110 は、アメリカ合衆国、UT、オレムのモックスティック社から市販されている、カタログ番号 LWN00033 等のポリイミド膜であるのが好ましい。格子 2112 は、図面で縮尺通りには示されておらず、該格子としては、アメリカ合衆国、ニューヨークのコートランドのバックビルメアズから市販されている、カタログ番号 BM0090-01 が好ましい。接着剤は、アメリカ合衆国、NJ のグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されており、カタログ番号 NOA61 であるのが好ましい。液体サンプルエンクロージャ形成リング 2114 は、好ましくは、例えばアメリカ合衆国、NJ のグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号 NOA61 の接着剤により、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 に接着されている。リング 2114 は、スペイン、バルセロナ市のイルペンから市販されている、例えばカタログ番号 692106001000 等の PMMA（ポリメチルメタクリレート）から形成されるのが好ましく、約 20 マイクロリットルの体積で約 2 mm の高さを備えた液体サンプルエンクロージャを画定するのが好ましい。好ましくは、リング 2114 は、傾斜壁を有する液体サンプルエンクロージャ 2116 を画定するように構成される。

【0201】

O リング 2118 は、リング 2114 と、第 2 のエンクロージャ要素 2102 の内部表面 2120 との間に配置されているのが好ましい。O リング 2118 は、エンクロージャ要素 2100 及び 2102 が緊密なねじ込み係合であるとき、要素 2100 及び 2102 のねじ込み係合が密封係合であるべき必要性を無くすように作用する。

【0202】

第 2 のエンクロージャ要素 2102 には、走査型電子顕微鏡の標本ステージの適切な凹部（図示せず）に着座するように配列された、貫通ボア 2123 を有する略中央スタブ 2122 が形成されるのが好ましい。

【0203】

エンクロージャ要素 2100 及び 2102 は、容器を、適切な多重容器ホルダー内に容易に着座させることを可能にし、更にユーザーがエンクロージャ要素 2100 及び 2102 をねじ込み開閉することを援助することを可能にする。好ましくは、各々のエンクロージャ要素 2100 及び 2102 上の突起部 2124 及び 2125 の相対的な方位角方向の

10

20

30

40

50

配置は、図 6 1 A 及び図 6 1 B に示されるように、これら突起部間の相対的な方位角方向の整列が、要素間のねじ込み閉鎖の所望の度合いを指示するようになっているのが好ましい。

【 0 2 0 4 】

S E M 検査の間に電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 に面していないサンプル側から、液体サンプルエンクロージャ 2 1 1 6 内のサンプルからの光を受け取るように、光案内部 2 1 2 6 が設けられている。

【 0 2 0 5 】

光案内部 2 1 2 6 は、切頭錐体先端部 2 1 2 8 を備えたシリンダーから形成され、スタブ 2 1 2 2 のボア 2 1 2 3 内に挿入される。光案内部 2 1 2 6 は、好ましくは、アメリカ合衆国、C T、ポムフレットの 1 2 ファイバー-R d のファイバーオプティックステクノロジー社から市販されている、数値アパーチャ 0 . 6 6 の、プラスチック若しくはガラス製のクラッドを用いた光案内部であり、接着剤等の任意の従来手段により、エンクロージャ 2 1 0 2 に密封されている。

【 0 2 0 6 】

錐体先端部 2 1 2 8 の壁は所定角度をなして構成され、該所定角度は、サンプルから放射された入射光子が光案内部 2 1 2 6 内で反射されることを確実にするように、臨界反射角より小さくされている。

【 0 2 0 7 】

ここで、図 5 3 A 乃至図 6 2 B の S E M 互換性サンプル容器の作動態様を作動の 3 段階で各々示した 3 つの断面図である、図 6 3 A、6 3 B 及び 6 3 C を参照する。図 6 3 A は、エンクロージャ要素 2 1 0 0 及び 2 1 0 2 をねじ込み閉鎖する前の図 5 8 B に示される配位で配列されている、液体サンプル 2 1 3 0 を蓄えた図 5 8 A 乃至図 6 2 B の容器を示している。なお、液体サンプルは、表面張力に起因して、液体サンプルエンクロージャ 2 1 1 6 からは流れ出ない。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 が、図 6 3 A において、略平坦であるように示されている。

【 0 2 0 8 】

図 6 3 B は、周囲からの液体サンプルエンクロージャ 2 1 1 6 の密封を生成するエンクロージャ要素 2 1 0 0 及び 2 1 0 2 の間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図 6 3 A の容器を示している。光案内先端部 2 1 2 8 は、液体サンプル 2 1 3 0 内に浸漬された状態で示されている。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 と、その支持格子 2 1 1 2 とが、この態様におけるその密封の結果生じた液体サンプルエンクロージャ 2 1 1 6 の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。

【 0 2 0 9 】

図 6 3 C は、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中で S E M の脱ガス環境に配置されたときの図 6 B の容器を示している。この環境では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 と支持格子 2 1 1 2 とが、図 6 3 B の周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっていることが見て取れる。更には、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 は、図 6 3 B の周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子 2 1 1 2 の隙間を通って隙間内に入り込もうとしていることが理解できる。

【 0 2 1 0 】

ここで、図 5 8 A 乃至図 6 3 C の S E M 互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及び S E M への挿入の各状態の簡略断面図である、図 6 4 A、6 4 B、6 4 C、6 4 D 及び 6 4 E を参照する。典型的な細胞培養状況を示す、図 6 4 A を参照すると、サブアッセンブリ 2 1 0 8 を内部に配置させたエンクロージャ要素 2 1 0 0 は、図 5 8 A に示された配置態様にあり、液体媒体 2 1 4 2 内の細胞 2 1 4 0 は液体サンプルエンクロージャ 2 1 1 6 内に配置され、これらの細胞 2 1 4 0 が、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 に接触して横たわっている。

【 0 2 1 1 】

図 6 4 B は、典型的には吸引によって液体サンプルエンクロージャ 2 1 1 6 から液体を

10

20

30

40

50

除去した状態を示し、図 64C は、液体サンプルエンクロージャ 2116 に液体を追加した状態を示している。液体の除去及び追加を多数回に亘って液体サンプルエンクロージャ 2116 内のサンプルに関して実行してもよい。好ましくは、液体除去及び追加のため用いられる装置は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 の意図しない破裂を防止するように、設計され、備え付けられるのがよい。

【0212】

図 64D は、図 64C に示される細胞 2140 を液体媒体 2142 内に含む容器の閉鎖状態を示している。光案内先端部 2128 が、液体サンプル 2140 の液体媒体 2142 内に浸漬されている状態で示されている。図 64E は、SEM 2146 のステージ 2144 上に挿入される閉鎖容器を図 58B の配位で示している。容器の配位が図 64E に示されたものとは反対である SEM が存在することが認められよう。10

【0213】

図 64A 乃至図 64D は、液体サンプルエンクロージャ 2116 に関する液体の追加又は除去に拘わらず、サンプルを含む液体の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 と接触したままとなる状況を例示している。この状況は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 に、サンプルの一部が吸収され、そうでなければ、接着される状況を含んでいてもよい。サンプルを含む液体の例は、細胞、培養菌、血液、バクテリア及び無細胞材料を含んでいてもよい。

【0214】

ここで、図 58A 乃至図 63C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 と接触したサンプル含有液体、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である、図 65A、65B 及び 65C を参照する。図 65A 乃至図 65C は、サンプルを含む液体 2160 の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 と接触しているが、それに接着されていない状況を例示している。サンプルを含む液体の例には、例えば、ミルク、化粧用クリーム、ペイント、インク、及び、液体形態の薬剤等、様々な乳濁液及び懸濁液がある。図 65 及び図 65B で、サブアッセンブリ 2108 を内部に配置させた、エンクロージャ要素 2100 は、図 58A に示される配位にあることが見て取れよう。20

【0215】

図 65B は、サンプル 2160 を含む容器の閉鎖状態を示している。図 65C は、SEM 2146 のステージ 2144 上に挿入された、図 58B の配位にある、閉鎖容器を示している。容器の配位が図 65C に示されたものとは反対である SEM が存在することが認められよう。30

【0216】

ここで、図 58A 乃至図 63C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、サンプルの光検出を用いた SEM 検査の簡略図及び断面図である、図 66 を参照する。図 66 に示されるように、参考番号 2170 により指し示された容器は、SEM 2146 のステージ 2144 で凹部 2171 に配置された状態で示されている。ステージ 2144 は、SEM 検査の間、サンプル 2174 を含む液体内の関心のある領域を検査するため、電子ビーム 2172 の下方に容器 2170 を配置することを可能にするように、回転動作する。40

【0217】

SEM により発生された電子ビーム 2172 は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 を通過し、容器 2170 内のサンプル 2174 を含む液体に照射される。サンプル 2174 からの後方散乱電子は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2110 を通過し、SEM の一部を形成する検出器 2176 により検出される。例えば 2 次電子検出器 2178 等の 1 つ以上の追加の検出器を設けてもよい。電子ビーム励起に起因してサンプル 2174 により放射される X 線放射を検出するための X 線検出器（図示せず）を設けてよい。

【0218】

電子ビーム励起に起因して液体サンプル 2174 から放射される光子 2180 は、図 550

8 A 乃至図 6 3 C の光案内部 2 1 2 6 と同じである、参照番号 2 1 8 4 により指し示された第 1 の光案内部を通って、第 2 の光案内部 2 1 8 6 へと伝達される。第 2 の光案内部 2 1 8 6 は、光子 2 1 8 0 を、例えば光増幅管（PMT）2 1 8 8 等の光検出器へと伝達するように作動する。光検出器 2 1 8 8 から得られた光強度の時間依存測定は、走査電子ビームの位置に関する情報と組み合わされ、当該技術分野で知られた方法によりサンプル 2 1 7 4 の画像を生成するように、好ましくは、コンピュータ 2 1 8 9 上のデジタル画像として、結合される。

【 0 2 1 9 】

好ましくは、第 2 の光案内部 2 1 8 6 は、屈折に起因した光案内部 2 1 8 4 及び 2 1 8 6 の間の通路内の光子の損失を最小にし、2 つの光案内部の相対的整列をずらすように、
10 第 1 の光案内部 2 1 8 4 の断面領域の直径よりも大きい直径を備えた断面領域を有する。

【 0 2 2 0 】

図示の実施例では、第 2 の光案内部 2 1 8 6 は、好ましくは L 字形状湾曲部内に形成されるのが好ましく、第 2 の光案内部 2 1 8 6 の長さを通して光子 2 1 8 0 の内部反射を確実にする角度で L 字形状の光案内部 2 1 8 6 に沿って配置された、多数の光ファイバーを備えるのが好ましい。

【 0 2 2 1 】

本発明では、光子 2 1 8 0 は、第 1 の光案内部 2 1 8 4 から、第 2 の光案内部 2 1 8 6 を介して、SEM 2 1 4 6 の床部の下方に配置された光検出器まで垂直下方に伝達され得ることが認められよう。代替例として、光子 2 1 8 0 は、第 1 の光案内部 2 1 8 4 から光検出器まで伝達されてもよく、第 2 の光案内部 2 1 8 6 を省略してもよい。
20

【 0 2 2 2 】

本発明の別の実施例では、光子 2 1 8 0 は、フィルター、回折格子又はプリズム（図示せず）等の従来手段により、光検出器 2 1 8 8 による検出前に、スペクトル分析されてもよい。これは、1 つ以上の特定の範囲内にある波長の光子の検出を可能にし、サンプル 2 1 7 4 の組成及び構造又はサンプル 2 1 7 4 内部の特徴に関する追加の情報をもたらす。

【 0 2 2 3 】

加えて、例えば、光案内部 2 1 8 4 及び 2 1 8 6 の屈折率に類似した屈折率のオイル若しくはゲル（図示せず）等の液体は、光子 2 1 8 0 が光案内部 2 1 8 4 及び 2 1 8 6 の外部に散乱することを防止するため、光案内部 2 1 8 4 及び 2 1 8 6 の間に配置されてもよい。
30

【 0 2 2 4 】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る容器 2 1 7 0 内のサンプル 2 1 7 4 との電子ビーム相互作用の詳細を概略的に示す図 6 7 を追加的に参照する。なお、本発明は、図 6 7 に示されるように、それらの平均的な原子番号により、又は、電子の励起に起因したそれらの平均的な発光収量により、互いから区別される特徴群の高いコントラストの画像形成を可能にしている。図 6 7 では、比較的高い平均原子番号を有する、細胞核 2 1 9 0 は、周囲の核質 2 1 9 2 よりも電子をより大きく後方散乱させることができている。

【 0 2 2 5 】

光子 2 1 8 0 は、細胞核 2 1 9 0 から放射され、光案内部 2 1 8 4 を介して、光検出器 2 1 8 8 （図 6 6 に示される）へと伝達される。なお、後方散乱電子の検出器により得られたコントラスト、及び、光子検出により得られたコントラストは、異なる物理的プロセスに起因し、サンプル内部の特徴の化学的特性に起因しており、従って、一般には重なり合わない。
40

【 0 2 2 6 】

なお、本発明の好ましい実施例によれば、約 2 ミクロンまでの深さのサンプル内部の画像形成は、図 6 7 に示されるように、50 KeV より低いエネルギーレベルを有する電子に対して達成可能であり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜 2 1 1 0 より下方に位置する細胞核 2 1 9 0 が画像形成される。

【 0 2 2 7 】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された走査型電子顕微鏡（SEM）互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である、図68A乃至図72Bを参照する。図68A及び図68Bに示されるように、SEM互換性サンプル容器は、閉鎖の容易さ及び速さを向上させるため配列された、参考番号2200及び2202により指示された、第1及び第2の互いにねじ込まれるエンクロージャ要素を備えている。エンクロージャ要素2200及び2202は、好ましくは、プラスチックから成形され、導電性金属コーティングで被覆される。

【0228】

第1のエンクロージャ要素2200は、好ましくは、液体サンプルエンクロージャを形成し、略中央アーチャ2206を持つベース表面2204を有する。図69A及び図69Bに詳細に示される、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜サブアッセンブリ2208は、図70A、70B及び図72A、72Bに示されるように、アーチャ2206に対向してこれを覆って、エンクロージャ要素2200の内部に着座している。エンクロージャ要素2200内に適切に配置されたサブアッセンブリ2208を備えるサンプル皿部は、図70A乃至図72Bに示されるように、参考番号2209により指示されている。

【0229】

更に図69A及び図69Bを参照すると、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210が、接着剤により、機械式支持格子2212に接着されている状態が示されている。該膜2210は、アメリカ合衆国、UT、オレムのモックスティック社から市販されている、カタログ番号LWN00033等のポリイミド膜を含むのが好ましい。格子2212は、図面で縮尺通りには示されておらず、該格子は、アメリカ合衆国、ニューヨークのコートランドのバックビーメアズから市販されている、カタログ番号BMO090-01であるのが好ましい。接着剤は、アメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号NOA61であるのが好ましい。液体サンプルエンクロージャ形成リング2214は、好ましくは、例えばアメリカ合衆国、NJのグランベリーのノーランドプロダクツ社から市販されているカタログ番号NOA61の接着剤により、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210に接着されている。リング2214は、スペイン、バルセロナ市のイルペンから市販されている、例えばカタログ番号692106001000等のPMMA（ポリメチルメタクリレート）から形成されるのが好ましく、約20マイクロリットルの体積で約2mmの高さを備えた液体サンプルエンクロージャを画定するのが好ましい。好ましくは、リング2214は、傾斜壁を有する液体サンプルエンクロージャ2216を画定するように構成される。

【0230】

好ましくは、ダイヤフラム2218が提供され、動的及び静的な圧力リーフを提供するように作動する。好ましくは、ダイヤフラム2218は、Oリング部2220から一体成形され、該Oリング部2220には、伸張可能シート部2221が密封されている。ダイヤフラム2218は、約50のショア硬度を有するシリコンゴムから成形されるのが好ましく、シート部2221は、0.2~0.3mmの厚さを有するのが好ましい。

【0231】

ダイヤフラム2218は、第2のエンクロージャ要素2202の壁の外側表面に形成された第1のアーチャ2222内に挿入される。図72A及び図72Bに示される第2のアーチャ2223は、第2のエンクロージャ要素2202の壁の内側表面に形成される。第1のアーチャ2222及び第2のアーチャ2223は、ダイヤフラム2218が、ダイヤフラム2218の一方の側部とSEM互換性サンプル容器が配置されている環境との間に流体連通チャンネルを形成することにより圧力リーフを提供することを可能にする。アーチャ2222内にダイヤフラム2218を保持するためプラグ2224が設けられるのが好ましい。プラグ2224は、好ましくは、略中央アーチャ226を有するリング2225から形成され、例えば緊密な適合等の任意の従来手段により、アーチャ2222により形成された第2のエンクロージャ要素2202の内側表面に取り付けられている。

10

20

30

40

50

【0232】

○リング2228は、リング2214と、第2のエンクロージャ要素2202の内部表面2230との間に配置されているのが好ましい。○リング2228は、エンクロージャ要素2200及び2202が緊密なねじ込み係合であるとき、要素2200及び2202のねじ込み係合が密封係合であるべき必要性を無くすように作用する。

【0233】

第2のエンクロージャ要素2202には、走査型電子顕微鏡の標本ステージの適切な凹部(図示せず)に着座するように配列された、貫通ボア2233を有する略中央スタブ232が形成されるのが好ましい。

【0234】

エンクロージャ要素2200及び2202は、容器を、適切な多重容器ホルダー内に容易に着座させることを可能にし、更にユーザーがエンクロージャ要素2200及び2202をねじ込み開閉することを援助するため、径方向に延在する夫々の位置決め保持突起部2234及び2235が設けられるのが好ましい。好ましくは、各々のエンクロージャ要素2200及び2202上の突起部2234及び2235の相対的な方位角方向の配置は、図71A及び図71Bに示されるように、これら突起部間の相対的な方位角方向の整列が、要素間のねじ込み閉鎖の所望の度合いを指し示すようになっているのが好ましい。

【0235】

SEM検査の間に電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210に面していないサンプル側から、液体サンプルエンクロージャ2216内のサンプルからの光を受け取るように、光案内部2236が設けられている。

【0236】

光案内部2236は、切頭錐体先端部2238を備えたシリンダーから形成され、スタブ2232のボア2233内に挿入される。光案内部2236は、好ましくは、アメリカ合衆国、CT、ポムフレットの12ファイバーRdのファイバーオプティックステクノロジー社から市販されている、数値アパーチャ0.66の、プラスチック若しくはガラス製のクラッドを用いた光案内部であり、接着剤等の任意の従来手段により、エンクロージャ2202に密封されている。

【0237】

錐体先端部2238の壁は所定角度をなして構成され、該所定角度は、サンプルから放射された入射光子が光案内部2236内で反射されることを確実にするように、臨界反射角より小さくされている。

【0238】

ここで、図68A乃至図72BのSEM互換性サンプル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である、図73A、73B及び73Cを参照する。図73Aは、エンクロージャ要素2200及び2202をねじ込み閉鎖する前に、図68Bに示された配位で配列されている、液体サンプル2239を蓄えた図68A乃至図72Bの容器を示している。なお、液体サンプルは、表面張力に起因して、液体サンプルエンクロージャ2216からは流れ出ない。電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210が、図73Aにおいて、略平坦であるように示されている。

【0239】

図73Bは、周囲からの液体サンプルエンクロージャ2216の密封を生成するエンクロージャ要素2200及び2202の間の完全なねじ込み係合に続く中間状態にある、図73Aの容器を示している。ダイヤフラム2218が、この態様におけるその密封の結果生じた液体サンプルエンクロージャ2216の圧力形成に起因して、外方にしなっていることが見て取れる。本実施例では、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210及びその支持格子2212も、この態様におけるその密封の結果生じた液体サンプルエンクロージャ2216の圧力形成に起因して、外方にしなっているが、ダイヤフラム2218の作用に起因して、図63Bの実施例のときよりも、かなりより小さい程度にしか、しなっていない。これは、図73Bと図63Bとを比較することにより、理解することができる。

【0240】

図73Cは、典型的には、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空中でSEMの脱ガス環境に配置されたときの図73Bの容器を示している。この環境では、ダイヤフラム2218が、図73Bの周囲環境のときよりもより大きい度合いで外方にしなり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210と支持格子2212とが、図73Bの周囲環境に配置されたときよりも、より大きい度合いで外方にしなっているが、ダイヤフラム2218の作用に起因して、図63Cの実施例のときよりも、かなり小さい度合いでしかしなっていないことが見て取れる。これは、図73Cと図63Cとを比較することにより、理解することができる。

【0241】

なお、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210は、図73Bの周囲環境で生じたものよりも大きい度合いで格子2212の隙間を通して隙間内に入り込もうとしているが、ダイヤフラム2218の作用に起因して、図63Cの実施例のときよりもかなり小さい度合いでしかしなっていないことが理解できる。これは、図73Cと図63Cとを比較することにより、理解することができる。

【0242】

ここで、図68A乃至図73CのSEM互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図である、図74A、74B、74C、74D及び74Eを参照する。図64Aと同一で、典型的な細胞の培養状況を示す、図74Aを参照すると、サブアッセンブリ2208を内部に配置させたエンクロージャ要素2200が、図68Aに示される配位にあり、液体媒体2242中の細胞2240が、液体サンプルエンクロージャ2216内に配置され、細胞2240が、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210に接触して横たわっていることが示されている。

【0243】

図64Bと同一の図74Bは、典型的には吸引により、液体サンプルエンクロージャ2216からの液体の除去を示し、図64Cと同一の図74Cは、液体サンプルエンクロージャ2216への液体の追加を示している。液体の除去及び追加を多数回に亘って液体サンプルエンクロージャ2216内のサンプルに関して実行してもよい。好ましくは、液体除去及び追加のため用いられる装置は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210の意図しない破裂を防止するように、設計され、備え付けられるのがよい。

【0244】

図74Dは、図74Cに示される細胞2240を液体媒体2242内に含む容器の閉鎖状態を示している。光案内先端部2238が液体サンプルの液体媒体2242内に浸漬されている状態で示されている。図74Eは、SEM2246のステージ2244上に挿入される閉鎖容器を図68Bの配位で示している。容器の配位が図74Eに示されたものとは反対であるSEMが存在することが認められよう。

【0245】

図74A乃至図74Dは、液体サンプルエンクロージャ2216に関する液体の追加又は除去に拘わらず、サンプルを含む液体の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210と接触したままとなる状況を例示している。この状況は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210に、サンプルの一部が吸収され、そうでなければ、接着される状況を含んでいてもよい。サンプルを含む液体の例は、細胞、培養菌、血液、バクテリア及び無細胞材料を含んでいてもよい。

【0246】

図68A乃至図73CのSEM互換性サンプル容器を使用した、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2110と接触したサンプル含有液体、密封及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図である、図75A、75B及び75Cを参照する。図75A乃至図75Cは、サンプルを含む液体2260の少なくとも一部分が電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210と接触しているが、それに接着されていない状況を例示している。サンプルを含む液体の例には、例えば、ミルク、化粧用クリーム、ペイント、インク、及び、液体形

態の薬剤等、様々な乳濁液及び懸濁液がある。図75及び図75Bで、サブアッセンブリ2208を内部に配置させた、エンクロージャ要素2200は、図68Aに示される配位にあることが見て取れよう。図75Aは図65Aと同一である。

【0247】

図75Bは、サンプル2260を含む容器の閉鎖状態を示している。図75Cは、SEM2246のステージ2244上に挿入された、図68Bの配位にある、閉鎖容器を示している。容器の配位が図75Cに示されたものとは反対であるSEMが存在することが認められよう。

【0248】

ここで、図68A乃至図73CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルの光検出を用いたSEM検査の簡略図及び断面図である、図76を参照する。図76に示されるように、参考番号2270により指し示された容器は、SEM2246のステージ2244上で凹部2271に配置された状態で示されている。ステージ2244は、SEM検査の間、サンプル2274を含む液体内の関心のある領域を検査するため、電子ビーム2272の下方に容器2270を配置することを可能にするように、回転動作する。

【0249】

SEMにより発生された電子ビーム2272は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210を通過し、容器2270内のサンプル2274を含む液体に照射される。サンプル2274からの後方散乱電子は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210を通過し、SEMの一部を形成する検出器2276により検出される。例えば2次電子検出器2278等の1つ以上の追加の検出器を設けてもよい。電子ビーム励起に起因してサンプル2274により放射されるX線放射を検出すためのX線検出器(図示せず)を設けてもよい。

【0250】

電子ビーム励起に起因して液体サンプル2274から放射される光子2280は、図68A乃至図73Cの光案内部2226と同じである、参考番号2284により指し示された第1の光案内部を通って、第2の光案内部2286へと伝達される。第2の光案内部2286は、光子2280を、例えば光増幅管(PMT)2188等の光検出器へと伝達するように作動する。この光増倍管には、日本国、静岡県、浜松市砂山町325-6の浜松フォトニクスで市販されているカタログ番号H6180-01等がある。光検出器2288から得られた光強度の時間依存測定は、走査電子ビームの位置に関する情報と組み合わされ、当該技術分野で知られた方法によりサンプル2274の画像を生成するように、好ましくは、コンピュータ2289上のデジタル画像として、結合される。

【0251】

好ましくは、第2の光案内部2286は、屈折に起因した光案内部2284及び2286の間の通路内の光子の損失を最小にし、2つの光案内部の相対的整列をずらすように、第1の光案内部2284の断面領域の直径よりも大きい直径を備えた断面領域を有する。

【0252】

図示の実施例では、第2の光案内部2286は、好ましくはL字形状湾曲部内に形成されるのが好ましく、第2の光案内部2286の長さを通して光子2280の内部反射を確実にする角度でL字形状の光案内部2286に沿って配置された、多数の光ファイバーを備えるのが好ましい。

【0253】

本発明では、光子2280は、第1の光案内部2284から、第2の光案内部2286を介して、SEM2246の床部の下方に配置された光検出器まで垂直下方に伝達され得ることが認められよう。代替例として、光子2280は、第1の光案内部2284から光検出器まで伝達されてもよく、第2の光案内部2286を省略してもよい。

【0254】

本発明の別の実施例では、光子2280は、フィルター、回折格子又はプリズム(図示せず)等の従来手段により、光検出器2288による検出前に、スペクトル分析されても

10

20

30

40

50

よい。これは、1つ以上の特定の範囲内にある波長の光子の検出を可能にし、サンプル2274の組成及び構造又はサンプル2274内部の特徴に関する追加の情報をもたらす。

【0255】

加えて、例えば、光案内部2284及び2286の屈折率に類似した屈折率のオイル若しくはゲル(図示せず)等の液体は、光子2280が光案内部2284及び2286の外部に散乱することを防止するため、光案内部2284及び2286の間に配置されてもよい。

【0256】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る容器2270内のサンプル2274との電子ビーム相互作用の詳細を概略的に示す図77を追加的に参照する。なお、本発明は、図77に示されるように、それらの平均的な原子番号により、又は、電子の励起に起因したそれらの平均的な発光収量により、互いから区別される特徴群の高いコントラストの画像形成を可能にしている。図77では、比較的高い平均原子番号を有する、細胞核2290は、周囲の核質2292よりも電子をより大きく後方散乱させている。

【0257】

光子2280は、図示のように、細胞核2290から放射され、光案内部2284を介して、光検出器2288(図76に示される)へと伝達される。なお、後方散乱電子の検出器により得られたコントラスト、及び、光子検出により得られたコントラストは、異なる物理的プロセスに起因し、サンプル内部の特徴の化学的特性に起因しており、従って、一般には重なり合わない。

【0258】

なお、本発明の好ましい実施例によれば、約2ミクロンまでの深さのサンプル内部の画像形成は、図77に示されるように、50KeVより低いエネルギーレベルを有する電子に対して達成可能であり、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2210より下方に位置する細胞核2290が画像形成される。

【0259】

図21A乃至図22Bで上記示された顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーが、図58A乃至図77に示された型式のSEM互換性サンプル容器で使用するため設けられてもよいことが認められよう。加えて、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーは、図23A、23B及び23Cで上記のように示された吸引装置及びピペットと連系されてもよい。

【0260】

ここで、図58A乃至図67で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図78A、78B及び78Cを参照する。図78Aに示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部2400と、密封カバー2404とを備えるのが好ましい。ベース部2400は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、皿部支持収容部2406の列を形成する。各々の皿部支持収容部2406は、アパーチャ2408により形成されるのが好ましい。該アーチャを通してSEM顕微鏡の検査を実行することができる。各アーチャ2408に隣接して、サンプル皿部2425の突起部2424を収容するように配列された、一対の互いに整列した対の直立相互間隔突起部2410が形成されるのが好ましい。サンプル皿部2425は、図60A乃至図62Bに示されたサンプル皿部2109と略同一であってもよいが、ねじ込み式機構又は他の取り付け機構を必要としない。

【0261】

ベース部2400は、顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの内部で所望レベルの湿度を維持するため使用される液体を保持するようになった、複数の液体リザーバー2412を形成するのが好ましい。

【0262】

密封カバー2404は、サンプル皿部2425の各々と個々に密封係合するように配列されている。好ましくは、密封カバー2404は、その下側に、図78Cに示されたOリング2426の列が提供される。Oリング2426は、密封カバー2404が、適所に、

10

20

30

40

50

好ましくはベース部 2400との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部 2425の各々の頂部リム表面と密封係合するように、そこに密封され配列されている。

【0263】

密封カバー 2404は、光検出の間に、サンプル皿部 2425内のサンプルから光を受け取るように配列された光案内部 2430の列が設けられているのが好ましい。光案内部 2430は、密封カバー 2404上に形成されたアーチャ 2432内に挿入される。

【0264】

図 78B は、1つのサンプル皿部 2425がベース部 2400の皿支持収容部 2406に配置された状態の図 78A の装置を示している。図 78C は、ベース部 2400とスナップ式に係合する密封カバー 2404を示している。密封カバー 2404は、これにより、Oリング 2426と、周囲を取り囲む密封カバー 2404の一部分とを用いてサンプル皿部 2425の各々の個々の密封を提供する。

【0265】

ここで、図 68A 乃至図 77 で示された型式の SEM 互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図 79A、図 79B 及び図 79C を参照する。図 79A に示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部 2450と、密封カバー 2454とを備えるのが好ましい。ベース部 2450は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、皿支持収容部 2456の列を形成する。各々の皿支持収容部 2456は、アーチャ 2458により形成されるのが好ましい。該アーチャを通して SEM 顕微鏡の検査を実行することができる。各アーチャ 2458に隣接して、サンプル皿部 2475の突起部 2474を収容するように配列された、一対の互いに整列した対の直立相互間隔突起部 2460が形成されるのが好ましい。サンプル皿部 2475は、図 70A 乃至図 72B に示されたサンプル皿部 2209と略同一であってもよいが、ねじ込み式機構又は他の取り付け機構を必要としない。

【0266】

ベース部 2450は、顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの内部で所望レベルの湿度を維持するため使用される液体を保持するようになった、複数の液体リザーバー 2462を形成してもよい。

【0267】

密封カバー 2454は、サンプル皿部 2475の各々と個々に密封係合するように配列されている。好ましくは、密封カバー 2454は、その下側に、図 78C に示されたOリング 2476の列が提供される。Oリング 2476は、密封カバー 2454が、適所に、好ましくはベース部 2450との取り外し可能なスナップ式の係合で配置されたとき、サンプル皿部 2475の各々の頂部リム表面と密封係合するように、そこに密封され配列されている。

【0268】

密封カバー 2454には、図 68A 乃至図 77 を参照して上述されたダイヤフラム 2218と同一であり得る、図 79C に示された、ダイヤフラム 2477の列が設けられている。個々のダイヤフラム 2477は、密封カバー 2454内に形成されたアーチャ 2479に亘って取り付けられたリング 2478に着座されている。

【0269】

好ましくは、密封カバー 2454は、光検出の間に、サンプル皿部 2475のサンプルから光を受け取るように配列された光案内部 2480の列が設けられているのが好ましい。光案内部 2480は、密封カバー 2454上に形成されたアーチャ 2482内に挿入される。個々の光案内部 2480は、SEM 検査の間に、サンプル皿部 2475内のサンプルから光を収集するため設けられている。

【0270】

図 79B は、1つのサンプル皿部 2475がベース部 2450の皿支持収容部 2456に配置された状態の図 79A の装置を示している。図 79C は、ベース部 2450とスナ

10

20

30

40

50

ップ式に係合する密封カバー 2454 を示している。密封カバー 2454 は、これにより、Oリング 2476 を用いてサンプル皿部 2425 の各々の個々の密封を提供する。

【0271】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図80A及び図80Bを参照する。図80Aに示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部2500と、密封カバー2504とを備えるのが好ましい。ベース部2500は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器2506の列を形成する。各々のサンプル容器2506は、アーチャ2508を備えるのが好ましい。該アーチャを通してSEM顕微鏡の検査を実行することができる。図80Bに示される電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2510が各アーチャ2508を覆って密封する。膜2510は、図58A乃至図67を参照して上述された膜2110と同一であるのが好ましい。密封カバー2504は、サンプル容器2506の各々と個々に密封係合するように配列されている。

【0272】

密封カバー2504は、光検出の間に、サンプル皿部2425内のサンプルから光を受け取るように配列された光案内部2514の列が設けられているのが好ましい。個々の光案内部2514は、密封カバー2504上に形成されたアーチャ2516内に挿入される。

【0273】

図80Bは、図80Aの装置が密封係合した状態を示している。この密封係合により、サンプル容器2506の各々の個々の密封が提供される。

ここで、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である、図81A及び図81Bを参照する。図81Aに示されるように、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーは、ベース部2550と、密封カバー2554とを備えるのが好ましい。ベース部2550は、好ましくは、プラスチック材料から射出成形され、サンプル容器2556の列を形成する。各々のサンプル容器2556は、アーチャ2558を備えるのが好ましい。該アーチャを通してSEM顕微鏡の検査を実行することができる。

【0274】

図81Bに示された電子ビーム透過性で流体不透過性の膜2560が各アーチャ2558を覆って密封する。膜2560は、図68A乃至図77を参照して上述された膜2210と同一であるのが好ましい。

【0275】

好ましくは、密封カバー2554には、図68A乃至図77を参照して上述されたダイヤフラム2218と同一であってもよい、図81Bに示されたダイヤフラム2561の列が設けられている。個々のダイヤフラム2561は、密封カバー2554に形成されたアーチャ2563を覆って取り付けられたリング2562内に着座されている。

【0276】

密封カバー2554は、光検出の間に、サンプル容器2556内のサンプルから光を受け取るように配列された光案内部2564の列が設けられているのが好ましい。個々の光案内部2564は、密封カバー2554上に形成されたアーチャ2566内に挿入される。

【0277】

図81Bは、図81Aの装置が密封係合した状態を示している。この密封係合により、サンプル容器2556の各々の個々の密封が提供される。

ここで、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である、図82を参照する。図82に示されるように、複数の顕微鏡検査前の多重サンプルホルダー2600は、各々が図58A乃至図77に示された型式の多数のSEM互換性サンプル容器2602を含み、細菌培養器2604内に配置された状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参照番号260

10

20

30

40

50

6で示されるように、容器2602がホルダー2600内に取り付けられた状態で、容器2602内のサンプルの光学顕微鏡検査が実行される。好ましくは、倒立光学顕微鏡2608がこの目的のため用いられる。

【0278】

好ましくは、図示のような例えはロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、顕微鏡検査前多重サンプルホルダー2600及び容器2602を搬送するため使用される。1つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0279】

その後、個々の容器2602は、ホルダー2600から取り外され、取り外し可能な電子顕微鏡標本ステージ2610に配置され、次に、走査型電子顕微鏡2612内に導入される。

【0280】

SEM検査から結果的に得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ2614で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0281】

容器2602内のサンプルの光検査が、容器2602がSEM2612内に配置された状態で実行される。好ましくは、光案内部2620が、容器2602内に挿入された光案内部（図示せず）からの光を受け取り、該光を例えはPMT2622等の光検出器へと送り出すため用いられる。

【0282】

光検査から結果的に得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ2624で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0283】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である、図83を参照する。図83に示されるように、複数の顕微鏡検査用の多重サンプルホルダー2650は、各々が図78A乃至図79Cに示された型式のうちいずれかのSEM互換性サンプル皿部2652を含み、細菌培養器2654内に配置された状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号2656で示されるように、サンプル皿部がホルダー2650内に取り付けられた状態で、サンプル皿部2652内のサンプルの光学顕微鏡検査が実行される。好ましくは、倒立光学顕微鏡2658がこの目的のため用いられる。

【0284】

好ましくは、図示のような例えはロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、サンプル皿部2652を備えた顕微鏡検査用多重サンプルホルダー2650を搬送するため使用される。1つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0285】

その後、ホルダー2650は、電子顕微鏡標本ステージ2660上に配置され、次に、走査型電子顕微鏡2662内に導入される。

その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ2664で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0286】

好ましくは、サンプル皿部2652内のサンプルの光検査が、サンプル皿部2652がSEM2662内に配置された状態で実行される。好ましくは、光案内部2666が、サンプル皿部2652内に挿入された光案内部（図示せず）からの光を受け取り、該光を例えはPMT2668等の光検出器へと送り出すため用いられる。

【0287】

10

20

30

40

50

光検査から結果的に得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ2669で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0288】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である、図84を参照する。図84に示されるように、複数の顕微鏡検査用の多重サンプルホルダー2670は、各々が図80A乃至図81Bのいずれかに示された多数のSEM互換性サンプル容器2672を形成し、細菌培養器2674内に配置された状態で示されている。好ましくは、関心のあるサンプルを同定するため、参考番号2676で示されるように、サンプル容器2672内のサンプルの光学顕微鏡検査がホルダーの位置で実行される。好ましくは、倒立光学顕微鏡2678がこの目的のため用いられる。

【0289】

好ましくは、図示のような例えはロボットアーム等の自動位置決めシステムが、システムを通して、顕微鏡検査用多重サンプルホルダー2670を搬送するため使用される。1つ以上のステージで手動介入操作が適宜用いられてもよいことが認められよう。

【0290】

その後、ホルダー2670は、電子顕微鏡標本ステージ2680上に配置され、次に、走査型電子顕微鏡2682内に導入される。その結果得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ2684で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0291】

好ましくは、容器2672内のサンプルの光検査が、容器2672がSEM2682内に配置された状態で実行される。好ましくは、光案内部2686が、容器2672内に挿入された光案内部（図示せず）からの光を受け取り、該光を例えはPMT2688等の光検出器へと送り出すため用いられる。

【0292】

光検査から結果的に得られた画像は、オペレータにより視覚的に検査され、及び／又は、典型的にはコンピュータ2689で具現化される従来の画像分析機能により分析される。

【0293】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、サンプルSEM検査の簡略部分図の部分断面図である、図85を参照する。図85に示されるように、サンプル3002を蓄えたサンプル容器3000は、電子銃アッセンブリ3010のルーフ3006内に形成された略中央アパーチャ3004に着座され、SEM検査の間、サンプル3002上に合焦した電子銃3012の突き当たりを可能にするように、配置され、サイズが定められている。

【0294】

容器3000は、ルーフ3006の内側表面3016に配置されたOリング3014を覆って着座している。容器3000は、サンプル容器3000の周辺リング3022の下側に接着された、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜3020を備える。サンプル3002は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜3020に亘って存在する。

【0295】

SEM検査アッセンブリの一部分である、電子銃アッセンブリ3010には、電子ビーム3012を略上方向に極部品3024を通して放射するように作動する電子銃（図示せず）が設けられている。

【0296】

電子銃により発生された電子ビーム3012は、経路3026に沿って移動するように示されている。電子ビーム3012は、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜3020を介して通過し、サンプル容器3000内のサンプル3002に突き当たる。電子がサンプ

10

20

30

40

50

ル3002から後方散乱され、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜3020を通過して戻り、電子銃アッセンブリ3010内で、後方散乱電子の検出器3030により検出されるのが好ましい。

【0297】

電子ビーム3020は、サンプル3002にその下側で突き当たり、これにより、電子ビーム透過性で流体不透過性の膜3020に接触して存在するサンプル領域を検査するというのが本発明の特別の特徴である。

【0298】

電子銃アッセンブリ3010は、電子銃アッセンブリ内部体積部3032を形成する。内部体積部3032は、SEM検査の間に、典型的には $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの10真空に、内部体積部3032内で、脱ガス環境を維持するように、電子銃アッセンブリ3010及び容器3000の壁により密封されている。

【0299】

電子銃アッセンブリ3010は、安全バルブシステムの内部体積部3040を形成する、空気ロック部3040と、頂部壁3042と、を備える安全バルブシステムを有する。容器3000の除去前に、空気ロック部3040は、容器除去の間に、典型的には $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ミリバールの真空に、内部体積部3044内で脱ガス環境を維持するようになり、固定化される。空気ロック部3040がロックされた後、ガス、典型的には窒素は、電子銃アッセンブリ3010の内部体積部3032へと入口管3046を介して導入される。容器3000は、除去され、好ましくは、置換される。代替例として、別の容器3000は、サンプル皿部アッセンブリ3010内に配置されてもよい。容器3000又は別の容器が電子銃アッセンブリ3010内に導入された後、ガスは、ポンプ(図示せず)により、典型的には出口管3048を介して流出され、空気ロック部3040が解除される。

【0300】

空気ロック部3040は、サンプル容器3000又はアーチャ3004を通過し又は電子ビーム透過性で流体不透過性の膜3020の傷を通過する漏れに起因して周囲から電子銃アッセンブリ3010に入り込むことができる流体から、内部体積部3044を急激に断絶させるように作動する。

【0301】

本発明の別の好ましい実施例によれば、電子銃アッセンブリ3010は、サンプル容器3000のための調整可能なシートを備えている。調整可能なシートは、サンプル3002内部の様々な領域の高倍率画像形成を可能にする。

【0302】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、組織サンプル切り取りアッセンブリの簡略部分図の部分断面図である、図86A乃至図87Bを参照する。図86Aに示されるように、複数の積み重ね式取り外し可能な矩形形状の厚板3050がステージ3052上に取り付けられている。略中央アーチャ3056が、個々のスラブ3050の各々に形成され、凹部3058の一部を形成する。好ましくは、従来の切り取り器具3060、例えば剃刀ブレード3062が、設けられ、凹部3058に着座された組織サンプル3064を切り取るように作動する。組織サンプル3064が、スラブ3050のスタックの頂部を超えて延在するように図86Aに示されている。

【0303】

図86Bは、頂部スラブ3066を始めとして、組織サンプルの厚さX1を提供する、複数のスラブ3050を示している。切り取り器具3060は、組織サンプル3064を2つの部分、即ち、頂部3068及び底部3070へと切り取り、生じた底部3070は、厚さX1を有する。

【0304】

図87Aは、厚さX2の組織サンプル厚さを提供する、複数のスラブ3070を備える、図86Aの組織サンプル切り取りアッセンブリを示し、ここで、X2<図86A及び図86BのX1である。図87Aに示されるように、切り取り器具3060は、組織サンプ

ル3064を2つの部分、即ち、頂部3074及び底部3076へと切り取り、生じた底部3076は、厚さX2を有する。

【0305】

本発明は、走査型電子顕微鏡内のサンプルを、大気圧近傍で、任意の所望の温度、好ましくは、0～50の範囲の温度で、湿った状態に維持しつつ、該湿ったサンプルを画像形成する方法を提供する。これは、SEMの脱ガス環境からサンプルを密封する。SEM互換性サンプル容器にサンプルを配置することにより達成される。当該サンプルは、該サンプル又はその一部分が、電子透過性の仕切り膜と、好ましくは、5ミクロンよりも小さい距離で近接した状態に、配置されるよう、SEM互換性サンプル容器内に配置されている。SEM内のサンプルの検査は、SEM内にサンプルを含むSEM互換接着サンプル容器を配置し、電子透過性仕切り膜を通してサンプルに走査電子ビームを差し向けることにより実行される。

【0306】

本発明の好ましい実施例によれば、SEM検査法は、例えば、培養細胞、組織切片又は断片、臓器切片、生体検査材料、液体懸濁液内の細胞、細針吸引物、呼吸器系又は消化器系の洗浄物等、幅広い生物学的材料に対して提供される。更に加えて、生体流体、例えば、尿、脳脊髄液、ミルク、唾液、血漿、粘液、侵入型流体、精液も本発明の方法を使用して検査してもよい。また、本発明に含まれるものは、例えば、排泄物、嘔吐物、土壤サンプル、植物脂肪、植物組織及び、例えば、バクテリア、菌類、藻類、マイコプラズマ、及びウィルス等の生物スラリーのSEM検査である。上記掲げられた材料は、本発明の方法を使用して検査されてもよい生物学的材料だけを表していることが認められよう。検査されるべき材料は、均一なサンプル、又は、オプションで幾つかの異なる種類の生物学的材料の異種混合物のいずれかであってもよい。オプションで、非生物学的材料も含まれてもよい。

【0307】

本発明の別の好ましい実施例によれば、細胞は、細胞培養条件の下で、画像形成前に、SEM互換性サンプル容器若しくはそのサブアッセンブリ内で維持される。この細胞培養条件には、例えば、バクテリアに対しては37のLB媒体等の成長媒体内に浸漬させた条件、又は、動物細胞に対しては、5%CO₂を含む加湿大気中で10%の牛胎児血清が添加された37のダルベッコ改变エッセンシャル培地(DMEM)内に浸漬させた条件がある。本実施例では、SEM互換性サンプル容器又はサブアッセンブリは、細胞の成長及び/又は操作のため、例えばペトリ皿、細胞培養皿、細胞培養フラスコ、及び/又は、多重井戸プレート等の従来容器に類似した実験容器として機能する。更には、細胞を含むサンプル及び他のサンプルは、実験若しくは分析の対象に応じて、サンプル容器若しくはサブアッセンブリ内に置かれている間に、ミトゲン、薬剤、ホルモン、サイトカイン、抗生物質、有毒材料、ウィルス、バクテリア、生体染色若しくは他の染色溶液の添加、異種細胞の混合(共同培養)、DNAの細胞へのトランスフェクション、超音波、X線又は線等の放射、例えば血清が無い媒体等の他の媒体での成長媒体の置換等を始めとした様々な処置を受け得るが、これらの例に限定されるものではない。

【0308】

本発明の更に別の好ましい実施例によれば、例えば、化粧用クリーム、粘土、使用済み機械若しくはモーターのオイル、処理済み食品製造物、及び、薬剤処方物等の、非生物サンプル及び生物学的材料から直接生み出すことができないサンプルのSEM視覚化のための方法が提供される。

【0309】

本発明の別の好ましい実施例によれば、固定化されていないサンプルの画像形成のための方法が、提供される。これらのサンプルとして、SEM互換性サンプル容器内で培養された動物若しくは人間の細胞、サンプル容器内に導入された、動物、人間、原生動物、菌類、植物若しくはバクテリアの細胞、サンプル容器内に導入された、動物、人間若しくは植物組織の切片又は他の液体サンプルが掲げられるが、これらの例に限定されるものでは

10

20

30

40

50

ない。顕微鏡においては、観察までに経過した時間の間及び準備工程の間にサンプルの構造的完全さ又はサンプル内部の特徴を保存するため、サンプル取得工程及び画像形成工程の間で透過化、脱水化、埋め込み、薄片化、染色等の固定化プロセスが用いられる。本発明の方法は、前述した準備工程のいずれも実行すること無くサンプルの画像形成を可能にする。

【0310】

本発明の別の好ましい実施例によれば、サンプルは、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド等、又は、それらの混合物等のアルデヒドの添加、メタノールの添加、又は、4酸化オスミウムの添加等の従来の固定化方法を使用して画像形成前に準備することができる。

10

【0311】

本発明の更に別の好ましい実施例によれば、電子顕微鏡の重金属染色による特徴化無しにサンプルを視覚化するための方法が提供される。電子後方散乱の効率は、例えばサンプルを構成する様々な原子若しくはその化合物の原子番号又はZ値に応じて変化する、走査されたサンプルの材料組成の関数である。例えば、異なる原子のZ値の差異から生じる、電子後方散乱におけるこれらの定量的差異は、重金属の染色が無い場合でさえもコントラストを提供する。本発明の方法は、サンプルの分子組成を、あるとしても僅かにだけしかかき乱さないので、サンプルの組成は、平均的なZ値において互いに異なる化合物の局所的濃度の差異に基づいて区別することができる。例えば、生体サンプルにおける細胞小器官を、それらの各々の組成、及び、脂質、磷酸、蛋白質及び塩類の濃度における差異に基づいて区別することができる。同様に、ミルク若しくは汚物のもののような複雑な混合物の組成も、それらの材料組成、例えば、それらのZ値等の差異に基づいて、区別することができる。

20

【0312】

加えて、サンプルは、従来の非特異的及び/又は特異的な染色剤で染色されてもよい。例えば、典型的には高いZ値を有する、ウラニルアセテート、4酸化オスミウム、鉄含有フェリシアン化カリウム、クエン酸鉛、及び、磷酸等の非特異的染色剤が、サンプルの特徴群に付着し、又は、他の仕方で同伴し、これによりサンプルの特徴群のコントラストを強化する。従来の特異的染色剤は、サンプルが従来の方法により染色剤に浸透可能にされる場合、サンプルの表面又はその内部に、特異的ターゲットとなる分子又は構造に選択的に結合し、又は他の仕方で接着する。特異的な染色剤は、ターゲットとなる分子又は構造に高い選択的な親和力を有する分子を含み、これにより、ターゲットの分子又は構造に結合し、又は他の仕方で同伴する。そのようなターゲットとなる分子の例は、抗体、リセプターリガンド、ホルモン、酵素、酵素基体、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、及び、核酸である。原子を提供する、少なくとも1つの高いZ値のEMコントラスト成分が、高い選択的な親和性分子に、従来の方法により連結されてもよい。ターゲットとなる分子又は構造に結合されるか又は他の仕方で同伴されたとき、ターゲットとなる分子又は構造は、高い選択的な親和性分子に連結された少なくとも1つの高いZ値の原子の存在によって、走査型電子顕微鏡内で画像形成されるときに同定される。本方法は、当該技術分野では、しばしば、直接標識形成と称される。

30

【0313】

加えて、原子を提供する少なくとも1つの高いZ値のEMコントラスト成分は、高い選択的な親和性分子に連結される必要はないが、間接的な標識形成法により取り付けられてもよい。その代わりに、原子を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分は、第2の高い選択的な親和性分子に従来の方法により連結されてもよい。この第2の高い選択的な親和性分子は、その親和力が第1の高い選択的な親和性分子に向けられている。第1の高い選択的な親和性分子は、ターゲットとなる分子又は構造に結合されるか又は他の仕方で同伴されることを可能にされ、次に、原子を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分を備えた第2の高い選択的な親和性分子は、第1の高い選択的な親和性分子に連結され、これにより、ターゲットとなる分子又は構造を同定する。

40

50

【 0 3 1 4 】

以上のような第1及び第2の高い選択的な親和性の分子の従来例には、2つの異なる有機体からの2つの異なる抗体があり、1つの有機体からの第1の抗体は、ターゲットとなる分子又は構造へと結合されることを可能にされ、第2の有機体からの、原子を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分に連結された、第2の抗体が、ターゲットとなる分子又は構造に結合された第1の抗体に結合することを可能にされる。本方法は、間接標識形成として知られている。本発明の趣旨における間接的な標識形成の主要な利点は、薬剤を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分に結合された第2の高い選択的な親和性試薬が、市販されており、そのような連結分子を改めて形成する必要性を無くすということである。

10

【 0 3 1 5 】

別の従来例は、ビオチンの少なくとも1つの分子が、被ターゲット分子又は構造への高い選択的親和力で、従来の方法により抗体又は他の分子に連結され、原子を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分は、蛋白質アビジン又は蛋白質ストレプトアビジンのいずれかに連結される。ビオチンに連結される抗体は、ターゲットとなる分子又は構造に結合され、次に、原子を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分に連結された、蛋白質アビジン又は蛋白質ストレプトアビジンのいずれかに結合され、これにより、ビオチンに連結された分子により結合されたターゲット分子又は構造を同定することを可能にされている。

20

【 0 3 1 6 】

追加の従来例は、第1の抗体が、そのターゲット分子又は構造に結合し、次に、原子を提供する少なくとも1つのEMコントラスト成分に連結された蛋白質A又は蛋白質Gのいずれかが、第1の抗体に特異的に結合し、これによりターゲット分子又は構造を同定することを可能にされている。

【 0 3 1 7 】

本発明の更に別の実施例によれば、細胞培養、細胞懸濁及び液体サンプルとは対照的に、厚い「固体」サンプルを画像形成するための方法が提供される。本実施例を参照すると、「固体」という用語は、硬質のコラーゲン基質、骨及び硬質植物組織、並びに、例えば胸腺組織若しくは臍臓組織等の柔らかい組織や、血の塊り、寒天ゲル等のゲル状材料を始めとして、ある範囲の軟度のものを指し示している。これらのサンプルには、既に説明した組織又は生体組織検査用の組織の部分、天然及び人工のゲル及び基質、アガローセ等の半固体媒体、多細胞アッセンブリ、又は、厚い固体基質の表面上に堆積された薄いサンプル等が含まれている。

30

【 0 3 1 8 】

本実施例では、本方法は、仕切り膜との密接な接触を提供するための追加の工程を備えている。仕切り膜との適切な接触を維持するため、サンプルは、かなり滑らかな表面が形成されている。この表面は、例えば、組織サンプルの一部分である保護層ライニング等のサンプルの天然エッジであってもよく、又は、剃刀又は切り取り器具で組織部分を切断することにより、好ましくは、図86A乃至87Bに表された装置及び方法により若しくはバイオラトーム(R)等の機械器具を用いて別の好ましい実施例において、形成されてもよい。加えて、本実施例では、組織は、典型的には、例えば、位置決め装置、好ましくは図31A乃至図50に示された装置により、仕切り膜に接触して押される必要がある。

40

【 0 3 1 9 】

サンプルの準備及び画像形成は、後述されることを除き、その他の点で細胞のための準備及び画像形成と類似している。組織は、一切の処理、即ち、次の固定化、又は、次の染色／標識形成無しに画像形成されてもよい。固定化処置は、それが使用される場合には、固定剤を用いた血管局所灌流により実行されるか、又は、小さな組織断片を固定剤中に浸漬することにより、実行される。染色及び標識形成は、細胞に対して後述されるものに類似した処理を使用してなされる。一つの重要な差異は、サンプル容器の仕切り膜に接着された細胞を含むサンプルが、容器内の流体を交換することにより処理されることができ

50

るのに対して、組織断片を含むサンプルは、サンプル容器への導入前に処理されるのが好ましいという点である。これらの処置は、実験結果の観点で、組織断片で使用するため僅かに修正される必要があり得ることは、当業者により認められよう。

【0320】

本発明の更に別の好ましい実施例によれば、サンプル及び／又は該サンプル上の特異的な構造を視覚化するための方法も提供される。後方散乱電子の検出に加えて、SEMは、電子ビーム走査の結果として生成される光を検出するため、図58A乃至図84に示されるように光子検出器が設けられていてもよい。2つの有意な利点は、従来の配位とは異なる、図58A乃至図84に開示された光子検出器の配位に伴っている。第1に、サンプルは、SEMの走査チャンバー内で真空から完全に孤立され、大気圧近傍圧力で湿った状態に維持することができる。第2には、光検出器に導く光案内手段は、サンプルの略同じ側面側に配置されている従来の陰極ルミネッセンス検出器とは異なり、後方散乱電子の検出器に対してサンプルの略反対側に配置されている。本発明では、2つの検出モードに対して使用される検出器は、同じ空間を競合せず、光及び後方散乱電子の両方の非常に効率的な好ましくは同時的な収集を可能にする。走査電子ビームは、サンプル内の分子を、直接的又は間接的に励起させ、特徴的な波長で可視光を放射させることができる。これは、陰極ルミネッセンス又はシンチレーションとして幅広く知られているプロセスである。放射光の強度及び／又はスペクトル特性は、サンプル中で自発発光している分子から導き出されたサンプル画像を構成するために使用される。サンプルを構成する様々な構成要素又は分子のZ値における固有の差異を、後方散乱電子に基づく顕微鏡写真図を構成するため利用することができるので、サンプルを構成する様々な構成要素又は分子により放射された陰極ルミネッセンスの強度及び波長における固有の差異を、従来の方法により、サンプルの顕微鏡写真図を構成するために使用することができる。

【0321】

代替例として、当該技術分野で知られている、外因性の陰極ルミネッセンス標識を、陰極ルミネッセンス染色としてサンプルと接触させることができ。そのような陰極ルミネッセンス標識の例は、アメリカ合衆国、オレゴン州、ユジン、分子プローブ、カタログ番号F-8814等の「FLUOSOHERES」であり、アメリカ合衆国、N.J.、ピスカタウェイ、アメルシャム生命科学のカタログ番号PRNQ0006等のシンチレーション近接分析（SPA）ビーズであるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、本発明の方法は、特異的な陰極ルミネッセンス染色を提供する。特異的な陰極ルミネッセンス染色は、上述された直接的又は間接的な標識形成技術に類似しており、原子を提供する少なくとも1つの高いZチャンネルのEMコントラスト成分の代わりに、少なくとも1つの陰極ルミネッセンスの片割れが、当該技術分野で知られている方法により、直接又は間接的なターゲット分子に連結されている。SEM画像は、陰極ルミネッセンスのみに基づいて導出されてもよく、又は、後方散乱電子に基づいて構成されたSEM画像と関連して導出されてもよい。本発明の別の実施例では、陰極ルミネッセンス検出システムは、走査されたサンプルから放射された光のスペクトル分解のための従来手段が備え付けられている。スペクトル分解のためのそのような手段の例には、フィルター、回折格子及びプリズムがあるが、これらに限定されるものではない。かくして、本実施例は、選択された波長の光の測定、又は、選択された範囲内にある波長の測定を提供し、例えば、サンプル中の異なる材料により放射された光を区別することを可能にし、特定材料又は材料のクラスを検出し、又は、信号の信号対ノイズ特性を改善する。

【0322】

本発明の更に別の好ましい実施例によれば、従来の方法に従って、サンプルからの更なる情報を、電子ビームとの相互作用の結果としてサンプルから放射されたX線の検出及びスペクトル分析によって得ることができる。そのような分析は、サンプル又は該サンプル内の領域の元素組成及び分布に関する、特異的及び定量的な情報を提供する。

【0323】

更には、任意の与えられたサンプルに対して、異なる染色及び標識形成法を、画像形成

10

20

30

40

50

及び分析の必要性に応じて組み合わせてもよい。限定されない例として、後方散乱電子及び陰極ルミネッセンスを、同じサンプルの走査中に検出することができ、サンプルの同じ領域の2つの画像を生じさせることができる。別の例では、後方散乱電子の検出を、従来の方法を使用して、走査領域全体又はより小さい領域からのX線検出と組み合わせることができる。

【0324】

本発明の別の好ましい実施例によれば、サンプルの表面下数ミクロンのところのSEM画像形成のための方法が提供される。従来のSEMでは、サンプルの表面トポロジーが、反射モードを使用して画像化され、走査電子ビームによりサンプルの表面から除去されて検出された2次電子からの画像を構成する。本発明は、主要検出モードとして、後方散乱電子の検出を使用し、そのような後方散乱電子は、サンプルの表面下、数ミクロンまで存在し得るサンプルの構成要素と走査電子ビームとの相互作用から生じる。画像は、検出された後方散乱電子から導出されるので、サンプルの実際の厚さは、本発明のサンプル容器の深さによってのみ、任意的に限定される。関心のある特徴群のコントラスト、即ちサンプルの表面上の特徴群及びサンプルの下方にある特徴群の両方のコントラストは、非特異的染色又は特異的染色のいずれか1つ又は適切な組み合わせを用いることにより強化することができる。

【0325】

本発明のなお別の好ましい実施例によれば、サンプルの仮想連続的な薄片化のための方法が提供される。当該サンプルは、最初に低加速エネルギーの電子ビームで走査され、仕切り膜に最も近いサンプルの領域の画像を形成する。電子ビームの加速エネルギーを増加させることにより、該ビームが、僅かに増大した深さにまでサンプル内に貫通することが可能となり、その結果生じた後方散乱電子から当該深さにおけるサンプルの内部の画像を導出することができる。引き続く画像は、加速エネルギーを逐次的に増大させることにより類似の態様で得られ、これにより、電子ビームが、数ミクロンの深さにまでサンプル内により深く貫通していくとき、各深さレベルにおける画像を導出していく。加速エネルギー値は、約8keV及び約30keVの間の範囲に亘るのがこのましい。このようにして得られた一連の画像は、サンプル内の異なる深さに存在する特徴群を同定するように機能するか、又は、適切なアルゴリズムを使用して、そのような特徴群の3次元的分布を再構成するための生データとして機能することができる。

【0326】

本発明の更に別の好ましい実施例によれば、外科手術の時間フレーム内で急速な組織病理分析に適した方法が提供される。その分析及び結果が手術の持続及び進路を決定するため使用される、外科的病理分析は、現在のところ疾患組織の凍った薄片の光学顕微鏡検査に基づいて構築される。この技術は約30分以内に達成することができるが、使用される天然凍結技術は、組織の構造にかなりの損傷を引き起こし、詳細な細部の損失をもたらす。本発明の方法は、固定化、染色、乾燥の工程無しに、大気圧の下で、要求された時間フレーム内で、疾患組織のより高い分解能のSEM検査を可能にし、これにより、サンプルの詳細な細部を保存する。更には、追加のより詳細な分析が要求される場合には、非特異的及び特異的な染色、並びに、より穏やかな固定化技術を用いることができる。

【0327】

別の好ましい実施例によれば、画像形成能力を提供する本発明の方法は、顕微鏡画像形成を使用する、研究、診断、医療、工業的又は調整的検査における任意のプロセスを置換し又は改善するため使用することができる。

【0328】

上述したように、従来の電子顕微鏡は、光学顕微鏡の分解能が不十分である、例えば腎臓病理学又は腫瘍学等、特殊ケースの小さい比率部分(3~8%)を検査するため使用される。本発明の方法は、特に、一般的病理学及び外科的な病理学のためSEMのより広範囲な使用を可能にする。更には、本発明の方法を、光学顕微鏡を現在使用する組織学又は細胞学的検査の代わりに、又は、それに加えて、使用することができる。本発明の方法に

10

20

30

40

50

より提供される利点は、速度、自然な状態により近い状態でのサンプルの保存、薄い薄片化の必要性を無くすこと、又は、新規な画像形成モードの他の特徴に関連する。これらの利点は、現在の方法が不十分である医療分野で特に重要となり得る。このような医療分野には、例えば、脳腫瘍及び一般的な神経病理学の正確なステージング、例えば甲状腺若しくは胸部組織の細針吸引等による疾患細胞標本の細胞学的検査、及び、血管サンプル等がある。

【0329】

本発明の方法は、以下に記載される選択された用途で使用するため特に適している。これらの例は、開示の目的のみのため使用され、これに限定することを意図したものではない。

10

【0330】

(肥満及び糖尿病：太った細胞、白色及び茶色の脂肪組織の脂質小滴)

従来のTEMのためのサンプルの準備には、通常、例えばアルコール又は無色溶媒等の有機溶媒で置換することによる水の完全な除去工程を含んでいる。これらの溶媒は、脂質を分解し、サンプルから脂質を損失させる。脂質分子を架橋する4酸化オスミウムを用いた固定化は、例えば、脂質2分子膜等の薄い構造に脂質を保存するように作用する。しかし、例えば脂質小滴又は含脂肪細胞(太った細胞)の脂質成分等のより大きい脂質構造を用いた場合、オスミウムは、表面上の脂質と迅速に反応し、4酸化オスミウムに対して浸透性がより少ない「外皮」を形成し、かくして、脂質構造の内部が固定化されていない状態のままとなり、後に破壊されるか又は分解され得る。

20

【0331】

本発明の方法は、組織抽出及び脂質固定化のための必要性を回避することにより、生物学的サンプルにおける脂質リッチな成分を観察する独自の能力を提供する。この能力は、肥満及び糖尿病の医療分野で有用性を有する。肥満及びタイプIIの糖尿病のための処理は、本発明の方法を使用して直接評価することができる、次のパラメータのうち1つ以上における変化をもたらす。これらのパラメータとは、即ち、脂肪細胞(含脂肪細胞)における脂質の分布、含脂肪細胞の数及びサイズの測定、茶色脂肪組織(BAT)及び白色脂肪組織(WAT)を始めとした解剖的及び新陳代謝的に異なる含脂肪細胞の間の区別、様々な解剖位置からの脂肪組織、若者対老人からの脂肪組織である。加えて、診断手段を用いて、人間、実験動物から生じた含脂肪細胞又は前含脂肪細胞において、又は、連続的な細胞ラインにおいて脂質分布を測定することができる。

30

【0332】

(腎臓、肝臓における脂肪質変化)

多数の組織タイプ、最も顕著には、肝臓、腎臓及び筋肉の病理学的状態は、細胞の内外における脂質小滴の急速な蓄積、所謂、脂肪質変化に関連する。脂肪質変化の臨床的な観察は、様々な腎臓病理学及び動脈疾患の、アルコール及び他の肝臓損傷因子に起因した組織損傷の早期のサインである。より稀ではあるが、有意には、脂肪過多変化は、梗塞、血液欠如、又は、退行性疾患に起因した心臓壁損傷も示唆している。脂肪質変化を監視することは、肝臓移植の間においても、手術の進路の判断や、様々な患者のための肝臓の適正を方向付ける上で有用となる。

40

【0333】

(腎臓病理学)

腎臓病理学は、電子顕微鏡が、臨床診断のため現在使用されている主要な分野の一つである。電子顕微鏡(EM)は、最小変化疾患、薄い基盤膜の腎臓疾患、遺伝性腎炎(アルポート症候群)、及び、纖維質糸球体腎炎を始めとした、多数の腎炎疾患の診断にとって必要である。EMは、免疫複合体沈着の正確な位置決め、ループス腎炎及びHIV関連の腎臓病における管状網状含有物の同定も可能にする。本発明の方法は、腎臓サンプルの高解像度の画像形成のより迅速且つより容易な性能を可能にする。

【0334】

(毒生物学)

50

毒物学研究は、動物又は人間において実行される。後者の場合には、倫理的に制御された研究又は不注意な接触の結果を調査研究するかのいずれかで実行される。毒物学的效果は、顕微鏡分析を使用してしばしば評価することができる。多数の毒物は、主要には、選択されたターゲット組織、肝臓、腎臓、肺及び消化器系に非常に高い頻度で影響を及ぼす。本発明の方法は、これらの及び他の組織から導出されたサンプルの感度の良い迅速な分析のための手段を提供する。そのような分析は、例えば、環境上の毒物、職業上の毒物及び栄養学的な毒物、並びに、薬剤の毒性副作用に対してテストするときの用途を持っている。本発明の別の好ましい実施例では、そのような分析は、X線検出を使用して実行される。該X線検出は、様々な要素の分布及び濃度に関する情報を与え、これは、肺又は肺胞のマクロファージにおける微粒子汚染の検出において有用性を持っている。

10

【0335】

(CNS:ミエリン、MS、神経トラウマ及び再生、並びに、腫瘍)

神経プロセスのミエリン鞘は、本発明の方法において明瞭に目に見える、非常に脂質の豊富な構造である。神経髓鞘形成範囲の変化、及び、神経線維及びこれに連係するミエリン鞘の構造における変化は、幅広い臨床的な神経組織変性状況に伴っている。このような状況には、例えば、多発性硬化症等の自己免疫不全、ギラン・バレー症候群、神経性セロイドリポフチジン症等の先天性蓄積症(OMIM 256730、子供における神経組織変性病の最も一般的なグループの可能性有り)、例えば、ジフテリア、HIV、又は、プリオント病の感染病の複合、及び、トラウマ等がある。これらの場合には、本発明の方法は、例えば、生体検査又は脳脊髄流体等の小さいサンプルの迅速な高分解能画像形成に基づく診断に、患者又は動物のいずれかにおける疾患組織の顕微鏡病理分析に、寄与することができる。更には、高分解能で神経組織の組織を観察する能力は、神経系の疑わしい腫瘍の分析で用いることができる。

20

【0336】

(細胞外基質)

そのほとんどが蛋白質、糖蛋白質、オリゴ糖類及び多糖類鎖から構成される細胞外基質(ECM)は、組織及び臓器の構造的基礎である。ECMは、形態形成、器官形成、細胞成長の調整、軸索成長等の、移動及び極展開を含む多様なプロセスにおいて、決定的な役割を演じる。幾つかの遺伝的及び退行性疾患は、例えば、ビタミンCの欠乏に起因した壞血病等の細胞外基質の構造における変化を伴っている。ビタミンCの欠乏は、コラーゲンの不完全な変形及び接続組織の一般的な分解、接続組織の変化をもたらす加齢によるコラーゲンの変形、例えば骨形成不全症(コラーゲンI突然変異)、エーラス・ダンロス症候群及び様々な関節炎状態等、コラーゲン遺伝子における突然変異に起因した遺伝病へと導く。加えて、癌細胞は、周囲の細胞外基質と特殊な相互作用を持ち得る。例えば、癌細胞は、周囲の基質の構造を変化させる酵素を生成し、密かに隠しておく。そのような酵素の生成及び隠しは、癌細胞の特有の性質に伴い得る。このような特有な性質には、予後及び処置に関して重要で密接な係わり合いを持ち得る、癌転移活動が含まれる。

30

【0337】

本発明の方法は、細胞外基質の構造及び組成のための独自の画像形成能力を可能にする。そのような画像形成は、患者及び実験動物における、診断又は薬剤作用の分析を提供することができる。癌の状況では、腫瘍から又は生体外での癌細胞の培養から直接引き出したサンプルの細胞外基質の分析を、本発明の方法に従って実行することができる。そのような分析は、処置のプロトコルを示し、処置の進行を評価するための、腫瘍の特徴に関するデータを提供することができる。

40

【0338】

(皮覆組織)

本発明の方法は、皮覆組織を見る、直接的で効果的な手段を提供する。皮覆組織は、それが、仕切り膜と接触するか又は近接するように、サンプル容器内に直接配置されている。容器は、SEM内に密封され、配置され、本発明の実施例に係る走査型電子顕微鏡により、画像形成される。皮覆組織は、下層の組織に接着している間に画像形成されてもよく

50

、又は、画像形成前にそのような組織から除去されてもよい。更に、皮覆組織は、画像形成のための除去前に身体内にその自然な位置でそのような接着無しに存在し得る。これらの用途には、消化器系統、呼吸器系統、内分泌腺及び外分泌腺等の疾患、血管系疾患、皮膚病、眼病等の、皮覆組織の構造に影響を与える多数の病気の診断が含まれている。

【0339】

(血液学及び免疫学)

本発明の方法は、組織検査における毛細管内部、又は、特に炎症箇所若しくは例えば血液又は細針吸引物等の流体サンプル等の血管外部における、例えば、胸腺、リンパ節又は骨髄の組織を生体検査する状況において、赤血球生成系統の細胞の分析の手段を提供する。組織における赤血球形成細胞の豊富さ又は配列に関する情報を、例えばリウマチ性関節炎、狼ソウ、他の自己免疫性病、関節病等の炎症、及び、外傷治療を始めとした様々な病理状況における処理プロトコルに関して、診断したり、決定を方向付けるため使用することができます。独自の重要性の別の用途は、例えば心臓等の移植組織の拒絶反応の早期且つ正確な検出である。そのような移植組織の受容者は、一般に、移植の拒絶反応を防止するため長期間に亘って免疫抑制処理の下に置かれる。しかし、移植は、しばしば拒絶反応の早期の兆候を監視されなければならず、該兆候があったときは、即時に調整処置を施さなければならない。そのような監視は、現在のところ、例えば、週単位の間隔で実行される組織生体検査の顕微鏡検査により達成されている。本発明の方法は、そのような生体検査から移植状態を評価するための、より感度の高く正確な手段を提供することができる。

【0340】

(癌)

外科的に除去された腫瘍の一部分及び腫瘍から導出されて生体外条件で維持された細胞の、腫瘍顕微鏡画像形成、生体検査、針吸引、又は、疑わしい腫瘍からの細胞懸濁液は、腫瘍の診断、分類、及び、腫瘍の格付けにおいて、並びに、患者処置の予後及び進路を決定する上で、重要な役割を果たす。本発明で提供される方法は、例えば、高解像度、容易且つ迅速なサンプルの準備、サンプル準備に起因した人為構造の減少、独自のコントラスト機構等、顕微鏡画像形成のための新しい能力を提供する。この能力は、腫瘍の診断、分類、及び、腫瘍の格付けにおいて、並びに、患者処置の予後及び進路を決定する上で、改善をもたらし、又は、独自の手段として使用することができる。

【0341】

(微生物学的実体)

本発明の別の好ましい実施例によれば、本方法は、バクテリア、原生菌、菌類、原生動物、ジアルディア、寄生組織、ニューモシスチスカリニ菌、バクテリア及び菌類のコロニー、菌糸体、バクテリア及び菌類の生体膜、及び、ウィルスを始めとした、微生物学的実体の画像形成を提供するが、これらの例に限定されない。微生物学的実体は、例えば、血液、汗、涙、大便、唾液、小便、膿、脳脊髄流体、組織標本、肺若しくは気管支若しくは消化器系統の洗浄物、環境サンプル、土壤サンプル、及び、植物サンプル等の幾つかの種類のサンプル内で画像形成することができる。そのような検査は、患者、動物若しくは植物における微生物学的汚染、又は、医療、工業若しくは家庭内の装置の微生物学的汚染を検出するため使用することができる。

【0342】

更には、微生物学的実体のSEM検査は、例えば、バクテリアを菌類若しくはウィルスから区別するか、又は、微生物学的実体の幅広い若しくは独自の分類を決定するものとして、実体を同定するため、サンプル内のそのような実体の存在を検出するように使用することができる。加えて、SEM検査は、微生物学的実体の特性を特徴付けるため使用してもよい。例えば、1つ以上の抗生物質に対するバクテリアの感度又は抵抗性は、好ましくは、幾つかの平行して行われる実験の各々において、異なる濃度の抗体を使用し、抗生物質でそのようなバクテリアの少数を培養し、個々の細胞に与える効果を検出するのに十分な時間、典型的には、ペニシリリンに対しては1時間未満の時間が経過した後、本発明の方法に係るSEMによりバクテリアを検査することによって、迅速に検査することができる

10

20

30

40

50

。抗生物質は、鋭敏なバクテリアの形態的変化又は分解を引き起こし得るが、その一方で、同じ抗生物質が、抵抗性のあるバクテリアにはそのような変化を誘起せず、これによって、バクテリアにおける抗生物質への感度又は抵抗を迅速に評価するための基準を確立することができる。

【0343】

(細胞被覆装置、インプラント、ステント)

本発明の別の態様は、装置から導出されたサンプルの画像形成、又は、生体医療インプラントとして若しくは生命工学用の細胞キャリアとして使用される装置若しくはフォーミュレーション、又は、手術若しくは格納の間の生体材料と接触し得る他の医療若しくは工業装置若しくはフォーミュレーションから導き出されたサンプルの画像形成を提供する。これらのサンプルのための共通の特徴は、人間、動物、原生動物又は微生物の細胞を始めとした細胞が、装置又はフォーミュレーションの表面に接着されるか又はその表面上で成長されるということである。本装置又はフォーミュレーションは、一般に電子又は光が透過できないほどの厚さ又は材料組成を持つことができ、かくして、透過型電子顕微鏡又は透過光型顕微鏡における直接画像形成を除外している。本発明の方法を使用して、そのようなサンプルは、関心のある表面が、電子透過性の仕切り膜に近くなるように、サンプル容器内に配置することができる。前述されたように、本発明の画像形成の反射モードは、表面上に存在する任意の細胞を始めとしてサンプルの表面層を画像形成することを可能にする。そのようなサンプルの例には、例えば、ステント、カバー付きステント、バルブ、バイパス、又は、代用動脈等の心臓関連のインプラントが含まれている。これらの装置は、典型的には、金属、合成若しくは天然のポリマー若しくは組織、又は、それらの組み合わせである。そのような装置の使用に関する主要な関心事項は、移植前の、細胞、特に菌類及び微生物の存在、通常の内皮による覆い、及び、塊形成へと導く望ましくない反応の防止を含んでいる。インプラントは、移植前、実験中若しくは品質制御状態で、細胞若しくはバクテリアが生体外条件で培養された後、又は、人間に移植された後、インプラントがもはや要求されないと考えられる後若しくはそれが失敗したと考えられる後に、検査することができる。

【0344】

心臓関連のインプラント等のインプラント、又は、人工補てつ物、縫合糸、硬質若しくは軟質組織のインプラントを、製造プロセスの一部として本発明の方法により更に検査することができる。インプラントの材料及び構造特性に関する情報、又は、インプラントの他の任意の機能的態様、例えば、生体外条件又は生体内条件における様々な処理に対する応答等に関する情報を導き出すことができる。試験は、インプラント又はインプラントの製造で使用される材料及び部品の開発中になすことができる。他の実施例では、試験は、製造バッチの一部又は製造された全てのサンプル上で実行することができる。

【0345】

望ましくない材料の表面への堆積を被るおそれがある医療装置には、様々なカテーテル、腎臓透析装置、点滴チューブ、内視鏡装置、及び、医学的又は栄養学的に使用されるべき材料と接触するおそれがある、任意の容器又はチューブが含まれているが、これらについても本発明の方法により検査することもできる。装置上に堆積し得る材料の例には、バクテリア、バクテリア生体膜、菌類、原生動物、マイコプラズマ、有機若しくは無機質の沈殿物若しくは接着相、例えば血小板、マイクロファージ、白血球等の血液細胞が含まれている。

【0346】

更には、組織エンジニアリングで使用される材料及びフォーミュレーションには、典型的には、合成若しくは生物学的に導出された基質、オプションで、そのような基質の内部又は表面上に沈着した細胞が含まれており、これらについても本発明の方法により検査することができる。バイオテクノロジー及びバイオエンジニアリングの用途で使用される、マイクロキャリア、ファイバーベッド、中空ファイバー、積み重ね式プレートモジュール、を含む、細胞取り付け又は成長のための、容器、チューブ、フィルター、下層も、本発

10

20

30

40

50

明の方法により検査することができる。細胞成長マイクロキャリアの例には、アメルシャムバイオサイエンスから市販されている「CYTOLINE(R)」及び「CYTODEX(R)」及びアメリカ合衆国、UT, ローガンのヒクロンから市販されている「CULTISPHERE(R)」が含まれるが、これらの限定されるものではない。中空ファイバーの例には、アメリカ合衆国、MD、フレドリックのファイバーセルシステムから市販されている「ファイバーセル(R)」が含まれるが、これに限定されるものではない。容器、チューブ及び下層は、培養された細胞、細胞成長媒体、及び/又は、クリーニング溶液と接触するに至る。培養細胞、及び、そのような細胞の層及び集団の、配列、密度、完全さ、及び、構造は、そのような細胞のバイオテクノロジー的用途において重要な結果をもたらし、本発明の方法を使用して監視され、分析されることがある。異常な細胞又は細胞アッセンブリ、病原菌、病原菌生体膜、菌類、原生動物、マイコプラズマ、有機若しくは無機質の沈殿物若しくは接着相を始めとした、容器、チューブ及び下層上への望ましくないものの堆積又は成長も、本発明の方法を使用して監視し、分析することができる。
10

【0347】

(生体分子の定量的パターン分析)

本発明の別の態様では、サンプル内の特定分子の量及び空間的分布を決定するための方法が提供される。そのような分析の必要性は、多数の状況で生じ、そのうちの幾つかが以下に詳細に説明される。

【0348】

生物学的サンプルの生体分子の定量化は、現在のところ以下の手段を含む様々な手段により、なされている。
20

【0349】

1. 多数の細胞における生体分子の総量が測定されるところの生物化学的及び免疫学的分析評価には、例えば、放射性リガンド結合検定、放射性免疫測定法、蛍光ベースの結合検定、酵素活性検定、免疫プロッティング等がある。そのような方法は、サンプル中の生体分子の総量の正確な測定を与える一方で、空間的分布、サンプル中の異なる細胞の濃度差に関する情報は一切与えない。更には、感度について2つの問題が生じる。第1には、検出感度に関する限界は、多数の細胞の使用、又は、測定のための大量の組織を必要とする。第2には、細胞内部の細胞一部組織又は組織サンプル等、細胞の限定された領域に非常に集中した生体分子は、生体分子を含んでいないサンプルの領域からの過剰な材料で希釈され、かくして、検出感度を制限する。
30

【0350】

2. 細胞学又は病理学的サンプルの抗体、付与原子又は酵素をベースとした、染色及び光学顕微鏡による検出が挙げられる。典型的には、サンプルは、関心のある生体分子に特異的に結合する抗体を含む溶液で培養される。抗体は、光学顕微鏡により見ることができる片割れ標識に、直接又は間接的に連結される。そのような片割れ標識は、フルオロフォア、色生成粒子群、光若しくは散乱光に不透明である粒子であり、又は、フルオロフォア、色生成粒子群、不透明若しくは非常に散乱される材料の局所化された濃度を発生する酵素である。光学顕微鏡で画像形成する工程及び画像分析する工程に連結された、そのような方法は、ターゲットとなる生体分子の量及び分布の両方に関する情報を与える。そのような技術の限界には、分解能(光回折により約250nmまでに制限される)、特に拡散分布の生体分子を分析するときの信号対ノイズ比、感度、蛍光性色素の漂白、制限されたダイナミックレンジ、及び、非線形応答が含まれる。
40

【0351】

3. 細胞学若しくは病理学的なサンプルの抗体若しくはリガンドベースの染色と、電子顕微鏡(EM)による検出が挙げられる。一般原理において光学顕微鏡ベースの方法に類似して、ここでいう検出は、電子密集又は電子散乱物質に基づいている。このような物質には、例えば、コロイド状金粒子、フェリチン、例えば磷酸鉛等の沈殿物、重金属又は4酸化オスミウムで染色されたポリマー化されたジアミノベンジンが含まれている。生体分子のEMベースの検出、定量化、及び、パターン分析は、非常に高い解像度に到達する
50

ことができる（透過型EMでは1nmより良好、走査型EMでは、5~10nmより良好である）。生体分子の蛍光ベースの定量化に対して比較されたEMベースの分析によれば、感度、信号対ノイズ比及びダイナミックレンジの点で、金コロイドを用いたEMベース検出法にかなりの利点があると報告されている（リビット・ビナン・N、リンドナー・A B、ジック・O、エッシャー・Z、モーゼ・Eによる、2003年度、化学分析、75（6）：1436-41に記載された「蛋白質アレイの定量的検出」、並びに、特許出願WO02/14830-PCT/IL01/00764）。

【0352】

例えば細胞又は組織等の生態サンプル中の生体分子のEMベースの定量化及びパターン分析のための現在の方法は、電子顕微鏡に典型的であるサンプル準備手続きを要求している。透過型EMに関しては、埋め込み又は迅速凍結と、これに続く超薄薄片化とが要求される。その結果としての一つの制限は、細胞又は組織の、小さく、しばしば任意の部分のみが、薄片に存在するということである。例えば、細胞膜と連係する蛋白質を検出し、定量化しようとするとき、薄片は、細胞膜全体のうち非常に小さい部分のみを含んでいる。完全又は透過性の細胞を標識形成し画像形成することは、画像形成のためサンプルが薄片化される必要が無い走査型EMを検出するため使用されるとき可能とされる。サンプルが例えは臨界点乾燥等の方法により乾燥される必要がある標準SEMは、乾燥プロセスに起因した人為構造といった問題、並びに、サンプルが被覆され、2次電子検出により画像形成されるときには、標識粒子を明瞭に同定する上で問題を被る。

【0353】

本発明の方法は、現存する技術の多数の制限を独自に克服する、生体分子の検出及び定量化のモードを提供する。EMベースの検出は、高い感度、ダイナミックレンジ、及び、信号対ノイズ比を提供し、高い分解能の画像形成、及び、コロイド状金粒子等の離散標識の片割れの選択的使用は、生体分子の空間的分布を高分解能でマップすることを可能にする。完全な細胞又は透過性であるが他の態様で完全な細胞を観察する能力は、検査される、細胞、細胞表面又は組織を通した生体分子の分布の全体的な視野を与え、脱水、乾燥及び埋め込み無しで細胞及び組織を観察する能力は、これらのプロセスと連係する可能性がある人為構造を無くす結果をもたらす。

【0354】

生体分子の量及び空間的分布が重要なパラメータである用途の例には以下のものが含まれるが、これらに限定するものではない。

【0355】

細胞表面上のリセプターの分布

例えばホルモン等の分子、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、細胞外基質、細胞間相互作用、細胞接着分子、及び、細胞対病原体相互作用を信号で知らせるための細胞表面のリセプターは、不均一分布で細胞表面上にしばしば分布され、そのようなリセプターの量及び分布の両方は、信号への反応に影響を及ぼし、信号への応答で変調され得る。かくして、細胞及び組織における細胞表面上のリセプターの量及び分布は、特性、外部刺激に対する応答性、細胞及び組織の重要な予測因子である。更には、信号の適用時のリセプターの量及び分布における変化は、信号への応答に関する独自の情報を与える。広範囲に研究されたケースは、例えば、細胞性表皮成長因子（EGF）リセプター等の成長因子リセプターの二量体化及び多量体化を含んでいる。EGFの結合前にはモノマー形態にあり得る、EGFリセプターは、EGFの結合時には、二量体及びより大きな多量体へと急激に集成する。この集成は、形質導入プロセスの少なくとも一部分において必要且つ十分なステップである。初期の集成の後、リセプターは、量及び表面分布を変化させる追加のプロセス、即ち、更なる集成、及び、細胞外部からアクセスすることができない細胞内部室への内在化を経験し得る。これらのプロセスは、信号形質導入、活動状態の持続、引き続く信号に対する感度を変調させることにおいても重要な役割を果たしている。

【0356】

生体分子と、同一又は別の生体分子との連合

10

20

30

40

50

例えば蛋白質等の生体分子は、しばしば、小単位が同一（ホモ二量体、ホモオリゴマー）又は異種（ヘテロ二量体、ヘテロオリゴマー）であり得る二量体又はより大きなオリゴマーとして機能する。例えば、HER1としても示される、EGFリセプターは、他のHER1分子、又は、HER2、HER3及びHER4と称される類似のリセプター分子の群のうち任意のもの二量体を形成することができる。実際、HER1～4蛋白質は、様々なホモ二量体及びヘテロ二量体を伴い得る。そのような二量体の各々の形成は、幾つかのEGF状リガンドの任意のものの結合により、異なる仕方で影響を及ぼされ、異なる生物学的結果を伴い得る。最終的に、リセプターのHERファミリーは、幾つかの種類の癌で異なる仕方で表される。多数論じられた例は、胸部癌におけるHER-2の高い流布である。実際、癌におけるHER2の高い流布は、貧弱な予後に連係しており、「Herceptin(R)」等の薬剤が、このリセプターを特異的にターゲットとする。リセプター及び他の蛋白質の二量体及びより大きなオリゴマーへの連合が、バルク技術を使用して、又は、フルオレン分子と、異なる蛋白質に付着されたオロフォアとの間の距離に依存するエネルギー転移により、調査研究されてきた。このバルク技術では、（例えば、）一般的な架橋分子が、接近している分子を共有結合するため使用される。本発明の方法は、本発明の方法に係るSEM検査により互いから区別することができる標識で、生体分子の各々を標識形成することにより、類似の又は異なる生体分子の連合の範囲を測定することを独自に可能にする。そのような識別可能な標識の例には、異なるサイズ（例えば、10nm及び20nm、15nm、25nm及び35nm等）のコロイド状金粒子や、後方散乱電子及び光の同時的検出により同じサンプル内で視覚化される、陰極ルミネッセンス標識と電子密集標識との組み合わせがある。10
20

【0357】

(乳濁液及び懸濁液)

例えば、オイル及び水等の混合不可能相の微細な混合物を備える乳濁駆と、液体中の固体粒子の微細な混合物である懸濁液とは、現在の電子顕微鏡技術を使用して分析するのが非常に困難である。固定化又は凍結のためのほとんど全ての方法は、サンプルの顕微鏡的構造に損傷を与えるか又はかなり変えてしまう可能性がある。環境SEMを使用したそのようなサンプルの観察は、固定化されていないサンプルの組成を維持するための困難さに起因して、信頼できない。30

【0358】

本発明の方法は、そのようなサンプルを画像形成する独自の手段を提供する。例えば、日々の製品、バター、マーガリン及び代替品、化粧用クリーム等を含む他の食製品、日焼け止めクリーム、機械及びモーターオイルや潤滑油、粘土、及び、薬剤フォーミュレーション、例えば乳、血液、血漿及びリンパ液、排泄物及び環境サンプル等の生物学的流体等のサンプルを画像形成する独自の手段を提供する。30

【0359】

(自動化SEM)

本発明の別の目的は、生体サンプルに特異的な、湿ったサンプルの自動化電子顕微鏡のための手段を提供することである。そのような自動化顕微鏡は、半導体工業で幅広く適用されてきた。湿ったサンプルに自動化電子顕微鏡を適用する上での主要な障壁は、非常に複雑で、自動化に追従しない、例えば乾燥、埋め込み、薄片化又はコーティング等のサンプルの準備手続きを用いる必要性である。本発明は、走査型電子顕微鏡において湿ったサンプルの直接的な画像形成のための手段を提供し、かくして、前述した準備手続きを不要にする。実際、生体又は他の湿ったサンプルのサンプル容器への導入及び画像形成のための準備は、高々、液体の皿部への一連の追加及び除去しか含んでいない。適切に設計されたピペット及び流体吸引器により実行されるそのような操作は、例えば薬剤スクリーニング及びゲノム配列決定等の用途で大量スケールでなされるように、容易に自動化される。本発明の方法により提供される自動化サンプルの準備は、SEMへの自動導入、自動位置決め、位置マーカーの登録、観察のため関心のある領域の選択及び画像分析等の技術分野で知られている他の自動化工程に連結することができ、本質的に、要求される自動化の任40
50

意のレベルを提供することができる。そのような自動化システムの有用性の例には、高い分解能で測定され、前述した章で開示された、例えば細胞における薬剤誘起構造的変化、又は、細胞表面リセプターの豊富さ若しくは分布における薬剤誘起変化等のパラメータを使用する、薬剤スクリーニング、並びに、例えば薬剤や他の化学工業における品質保証用途が含まれているが、これらに限定するものではない。

【0360】

本発明の一般的なプロトコル

本発明の方法で使用されるプロトコルの一般的なアウトラインは、以下に開示される。これらのプロトコルが、一般的な範疇にあり、検査される特定のサンプルの状況及び所望の分析に適するように構成され又は変形することができることは、電子顕微鏡の分野の当業者により認められよう。

【0361】

ここで、本発明の方法を構成する、主要なプロトコルの工程を概略的に表す、図88を参照する。必ずしも全ての実施例が、以下に列挙された工程の全てを含むわけではないことが理解されよう。個々で開示された方法は、サンプルを準備し、視覚化する際に所望の度合いの柔軟性を提供することが理解されよう。

【0362】

プロトコルを構成する個々の工程を、より詳細に説明する。全てのプロトコルでは、全ての操作は、他の仕方で特定化されない場合、室温で実行される。「洗浄」手段は、サンプル容器から液体を除去し、適切な洗浄液体を追加し、約5分間に亘って培養する。

【0363】

1. 電子透過性仕切り膜のコーティング

画像形成されるべきサンプルは、電子透過性仕切り膜に近接して、好ましくは接触するように保持されなければならない。幾つかのサンプルは、特殊な処理無しに仕切り膜に直接接着することができる。他のサンプルは、サンプルが容器内に配置され、仕切り膜に適用される前に、接着剤で被覆されるならば、より良好に接着する。一般的な接着剤の例は、ポリ-L-リジンであるが、これに限定されるものではない。ポリ-L-リジンは、非接着性動物細胞（例えば、血液細胞）、バクテリア、原生動物、及び、細胞状粒子（例えば、懸濁液中の微粒子物質）を含む様々なサンプルで使用することができる。当該技術分野で知られている接着剤の他の例は、フィブロネクチン、コラーゲン、ゲラチン、ラミニン、又は、マトリケル（R）（インビトロゲン）等の細胞外基質成分であるが、これらに限定されるものではない。細胞外基質成分は、典型的には、培養された又は主要な動物細胞が、培養条件の下で一定期間（数時間又は数日）の間、仕切り膜に維持されるべきであるとき、接着剤として使用される。サンプルの特定の成長要求、及び、もしもあるならば仕切り膜上で実行される生体実験の性質に基づいて、特定の接着剤が選択される。

【0364】

次の例は、電子透過性仕切り膜を被覆するため使用することができる、本発明の方法の例であるが、これに限定されるものではない。

【0365】

(a) フィブロネクチンコーティング

材料

フィブロネクチン 0.1% w/v (例えば、シグマ化学社のカタログ番号 F-1141)

PBS (リン酸緩衝生理食塩水、例えば、インビトロゲンのカタログ番号 14040)

処置
PBSでフィブロネクチンを 1:10 で希釈 (フィブロネクチンの最終濃度 0.01 %)

希釈溶液の 15 μl を仕切り膜に適用し、室温で 30 分間培養する。

溶液を除去し、PBSで 5 回洗浄する。

適切な成長媒体 (例えば、アルファ-ミネラル エッセンシャル媒体、10% 牛胎児血

10

20

30

40

50

清を備えた - M E M) で 2 回洗浄する。

【 0 3 6 6 】

(b) ポリ - L - リジンコーティング

材料

水中のポリ - L - リジン 0 . 1 % w / v (例えば、シグマ化学社のカタログ番号 P 8 9 2 0)

P B S

処置

ポリ - L - リジン 0 . 1 % 溶液の 1 5 μ l を仕切り膜に適用し、室温で 1 時間培養する 10

。 溶液を除去し、蒸留水で 5 回洗浄する。

P B S 又は適切な媒体で 2 回洗浄する。

【 0 3 6 7 】

2 . 容器内にサンプルを配置し、仕切り膜に適応する

液体サンプル又は細胞懸濁液が、容器内に配置され、該液体又は細胞懸濁液を容器の膜へと直接ピペットで注入することにより、仕切り膜に適用される。細胞及び粒子は、通常、重力により又はランダム運動により膜に到達し、接着する。接着は、受動的なプロセスであり、例えば、静電相互作用により、仲立ちされる。動物細胞の場合には、接着は、しばしば、新陳代謝エネルギーに依存し得るリセプターにより仲立ちされる特有のプロセスであり、次いで、細胞が仕切り膜に広がっていく。細胞濃度が低いか又は細胞が膜に容易に吸着されない場合には、細胞は、サンプル容器内で静かに遠心分離されてもよく(例え 20 ば、5 分間、5 0 0 \times g)、これにより、細胞を仕切り膜に集中させる。

【 0 3 6 8 】

更には、細胞は、標準のポリスチレン組織培養皿部上の成長と同一又は非常に類似した条件の下、オプションの被覆された仕切り膜上で成長することができる。細胞は、広がり、増殖し、隣接する細胞と相互作用し、外因性又は内因性信号に応答する。典型的には、細胞は、例えば、3 7 で 5 % の C O₂ を含む加湿大気中で、1 0 % の牛胎児血清で増補された、ダルベッコ改变エッセンシャル培地 (D M E M) 又はハムの F - 1 2 等の成長媒体で維持される。加えて、細胞に D N A を導入するか、又は、ウィルス又は遺伝子組み換えウイルスベクターで細胞を感染させることが可能となる。 30

【 0 3 6 9 】

図 8 8 に示されるように、サンプルを、追加の処理無しに画像形成することができ(以下のステップ 7 を参照せよ)、又は、後述されるように、オプションで、サンプルのコントラストを向上させるか又は特定の構成要素を標識形成するように、更に処理されてもよい。

【 0 3 7 0 】

3 . 固定化

前段階で固定化無しに非特異的及び特異的の両方でサンプルをオプションで染色することは可能であるが、サンプルは、通常、オプションの染色工程前に固定化される。固定化は、細胞構造を可能な限り生きている状態に近い状態に保存し、サンプルが形態的に変化すること及び引き続く処理の間に損傷を被ることから該サンプルを保護する。更には、固定化は、引き続く観察のためサンプルを特定の状態に永久的に安定化することができ(凍結)、遷移状態が視覚化されるべき場合には特に有用となる。 40

【 0 3 7 1 】

細胞学、免疫染色、電子顕微鏡の分野において知られている幅広い範囲の固定化技術を使用することができる。一つの固定剤は必ずしも全ての細胞構造を保存せず、かくして、固定剤の正確な選択は、サンプルに依存し、視覚化されるべき特定の特徴に依存する。サンプルが、固定化に引き続く免疫染色等の特有の染色を経験するべき場合、抗原及び抗体の性質も、固定化処置の選択に影響を及ぼす。

【 0 3 7 2 】

固定化工程は、典型的には、培養媒体を洗い出し、サンプルを適切な時間間隔で固定化溶液で培養し、固定剤を除去する、各工程を含んでいる。

次のものが、本発明の方法で使用することができる、固定化プロトコルの例であるが、これらに限定されるものではない。オプションで、当該技術分野で知られている他の固定化処置は、サンプル、染色、標識形成及び視覚化目的の詳細事項により規定されるように使用されてもよい。

特に断りのない限り、ここで記載された全ての方法は室温で実行される。

【0373】

(a) マイルドホルムアルデヒドの固定化（オプションで、ターゲットとなる箇所への損傷を最小にするため、特異的な染色前に使用される）：

10

材料

パラホルムアルデヒド、EMグレード（例えば、16%溶液、電子顕微鏡科学、カタログ番号15710）

PBS

処置

PBS中のパラホルムアルデヒド4%溶液の準備

サンプルをPBSで数回洗浄

室温で15分間パラホルムアルデヒド4%で固定化

PBSで5回洗浄

【0374】

(b) グルタルアルデヒド／ホルムアルデヒド固定化（オプションで、例えばウラニルアセテート等、活動的な染色処置の以前に使用されている）

20

材料

PBS

洗浄溶液：0.1Mカコジル酸ナトリウム、pH7.4, 1%ショ糖、5mMCaCl₂

固定剤溶液：洗浄溶液中に2%グルタルアルデヒド、3%ホルムアルデヒド

処置

PBS中でサンプルを5回洗浄

室温で1時間の間、固定化溶液中で培養

30

洗浄溶液で5回洗浄

水で5回洗浄

【0375】

(c) 低温メタノール固定化（オプションで特異的標識形成前に使用される。ホルムアルデヒドを用いた処理がそのような標識形成に干渉し得る場合）

材料

-20まで冷却したメタノール

PBS

処置

室温でサンプルをPBSを用いて5回洗浄

40

仕切り膜の氷との直接接触を回避するため注意を払いつつ、氷の上にサンプル容器を配置

PBSを除去し、予め冷却した(-20)メタノールを追加

5分間、-20に転移

室温で、PBSを用いて5回洗浄

染色又は標識形成反応への進行

【0376】

4. 非特異的な染色

サンプルの全体的な電子顕微鏡コントラストは、当該技術分野で知られている、非特異的染色及び染色処置を使用することにより強めることができる。これらの処置で共通して

50

いるものは、それらが、サンプル又はサンプル中の構造に、高い原子番号（Z値）の原子の吸着又は集中を生じさせるということである。

【0377】

次のものは、当該技術分野で知られている染色処置の例であるが、これらに限定されるものではない。オプションで、当該技術分野で知られている他の染色処置を、サンプル、標識形成及び視覚化目的により規定されるように使用することができる。

【0378】

(a) ウラニルアセテート(UA)染色

材料

タンニン酸、水中1% (w/v) 溶液（シグマ化学社のカタログ番号から準備されている） 10

酸性ウラニルアセテート(UA)濃度：HCLでpH3.5まで調整された、水中で5% (w/v) UA

UA染色溶液：水中で5% UA濃度から希釈により新たに準備された0.1% UA
処置

グルタルアルデヒド／ホルムアルデヒド処置に記載されているようにサンプルを固定化
蒸留水で5回洗浄

タンニン酸溶液を追加、5分間培養

水中で5回洗浄

UA染色溶液を追加、20分間培養

水中で5回洗浄 画像形成のため水中に残す

4 酸化オスミウム(OsO₄)の染色

材料

OsO₄染色溶液：市販の4%在庫溶液から希釈された、水中の1% (w/v) 4酸化オスミウム

処置

グルタルアルデヒド／ホルムアルデヒド処置に記載されているようにサンプルを固定化
蒸留水で5回洗浄

OsO₄の染色溶液追加、30分間培養

水中で5回洗浄 画像形成のため水中に残す

【0379】

5. 特異的標識形成

サンプル内での特定の分子及び／又は構造の位置及び量を、被ターゲット分子及び／又は構造と結合するか又は他の仕方で連係する特異的なターゲット分子の使用により測定することができる。特異的なターゲット分子に直接又は関節的に連結される少なくとも1つの高いZ値の原子は、被ターゲット分子及び／又は構造のためのコントラスト向上を提供する。代替例として、特異的ターゲット分子は、本発明の方法により視覚化されたとき、被ターゲット分子及び／又は構造の近傍に測定可能なコントラストを発生する局所化された物質の蓄積を形成することができる。

【0380】

被ターゲット分子及び／又は構造と結合するか又は他の仕方で連係する特異的なターゲット分子として使用することができる市販の分子の例には、抗体、蛋白質A、及び、ストレプトアビジン；抗体、蛋白質A、及び、コロイド状金粒子が連結されたストレプトアビジン；抗体、蛋白質A、及び、セイヨウワサビセロキシダーゼが連結されたストレプトアビジンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0381】

標識形成の片割れが、高いZ値の原子に限定される必要はないことは、当業者により認められよう。SEM機器に、光検出器及び／又はX線検出器が備え付けられている場合、特異的ターゲット分子は、高いZ値原子の代わりに電子ビームに応答して光又はX線を放射する連結片割れであってもよい。

10

20

30

40

50

【0382】

一般に、特異的標識形成処置は、少なくとも1つの高いZ値の原子が、ターゲット分子に直接的又は間接的のいずれかに連結されているかに応じて、4つ又は5つの主要工程からなっている。即ち、オプションのサンプル準備、オプションの固定化、非特異的結合のオプションのブロッキング、ターゲット分子による被ターゲット分子又は構造の結合、並びに、余剰の非結合ターゲット分子のオプションの除去である。ターゲット分子が少なくとも1つの高いZ値の原子に既に連結されている場合、標識形成プロセスは完了し、サンプルは視覚化の準備ができることになる。ターゲット分子が標識形成されていない場合、高いZ値の原子が第2のターゲット分子により第1のターゲット分子に結合されている視覚化工程の前に、1つ以上の追加の工程が、必要とされる。

10

【0383】

表面分子又は構造は、生きている細胞か又は固定化された細胞上に標識形成することができる。細胞内抗原を、固定化された透過性細胞に標識形成することができる。固定化処置は、エピトープをマスクし又は変化させることができ、かくして、各ターゲット分子に対する最適な固定化処置が、実験的に決定されるべきであることが当業者により認められよう。非特異的な背景のための最適なブロッキング、ターゲット分子の濃度、及び、培養時間は、被ターゲット分子及び/又は構造及び問題とするターゲット分子に依存するパラメータであることも、当業者により認められよう。幾つかのケースでは、特異的培養及び洗浄緩衝は、被特異的結合を回避するため要求されている。かくして、全ての標識形成のために作用する標準的な処置は存在しない。特定のターゲット分子及びターゲットを用いる以前の経験に基づいて、又は、蛍光性顕微鏡において蛍光標識及び視覚化を使用した予備実験を実行することにより、オプションの条件を確立することができる。

20

【0384】

次のものは、当該技術分野で知られている特異的な標識形成処理の例であるが、これらに限定されるものではない。オプションで、当該技術分野で知られている他の特異的な標識形成処置を、サンプル、染色及び視覚化目的により規定されるように使用することができる。

30

【0385】

(a) 細胞表面リセプターの特異的標識形成

材料

PBS

プロッキング剤：牛血清アルブミン、(BSA)又は通常の血清

所望のリセプターにターゲットにされた主要又は第1の抗体

1次即ち第1の抗体に結合され得るか又は他の仕方で連係され得る金粒子接合
蒸留されたH₂O

銀強化キット(例えば、AURIN R-GENT SE-EM(R) カタログ番号500.033)

処置

マイルドホルムアルデヒド処置を用いて細胞を固定化

30分間、PBS内で、例えば3% BSA(牛血清アルブミン)、又は、2次抗体を介して間接的標識形成が使用されるべき場合には2次抗体の種からの通常の1~5%の血清等の溶液を含んだ蛋白質で細胞を培養

40

上記と同じプロッキング溶液で1次抗体で細胞を培養(典型的には30~60分間)

幾つかの抗体に対しては、標識形成は、37℃で培養することにより、又は、4℃でより長い培養(数時間から一晩中)を行うことにより、改善することができる。

【0386】

上記のような制御反応であるが、1次抗体無しの制御反応を実行

細胞をPBSで数回洗浄

例えば、1~3% BSA又は1~5%の通常血清等の溶液を含む蛋白質において金で標識形成された共役物(例えば、1次抗体に対してターゲットとなる金接合2次抗体、又は金接合蛋白質A又はG; 1次抗体がビオチン化される場合には、金接合ストレプトアビジ

50

ン、又は、アビジンを使用することができる)で培養

未結合抗体を除去するためP B Sで広範囲に洗浄

コロイド状金粒子が、非常に小さくてS E Mで有効に見ることができない場合(典型的には、熱電子銃を用いたS E Mでは30nm未満、フィールド放射電子銃を用いたS E Mでは10nm未満)には、高いZ粒子のサイズを増大させるため銀強化法を使用することができる。銀強化法は、例えば、AURION R-GENT SE-EM(R) カタログ番号500.033等の市販されているキットを使用してなすことができる。

蒸留水で数回洗浄

【0387】

(b) 細胞内部の分子又は構造の特異的標識形成

内部分子又は構造の特異的標識形成のための処置は、細胞は、固定化の後、透過性を持たねばならないことを除いて、表面分子に対するものと事実上同じである。

(追加材料)

P B S中で0.2%トリトンX-100

P B S中で1%トリトンX-100

(処置)

パラホルムアルデヒド又はグルタルアルデヒド固定細胞に対しては、5~15分間、0.2%トリトンX-100/P B Sで培養することにより細胞を透過的にする(メタノール固定化が使用される場合には、追加の透過性処理は要求されない)

P B Sで5回洗浄

上記のように、特異的標識形成処置を実行

引き続く視覚化処置が余剰の背景信号に関する問題を暴露する場合、例えば、トリトンX-100/N P 4 0 (1% v / v)等のマイルドな洗浄剤を、1次抗体で培養した後、使用される洗浄緩衝剤に添加

大きい(例えば、20~40nm)コロイド状金粒子よりも、容易に固定透過性細胞を貫通する、小さい金粒子(例えば、0.8nmコロイド金粒子)又は他のコントラスト発生材料(例えば、ペルオキシダーゼ/ジアミノベンジン/4酸化オスミウム)を使用するのが好ましい。

【0388】

(c) 酵素架橋ターゲット分子を使用した特異的標識形成

本発明の別 の方法では、特異的標識形成は、ターゲット分子に直接連結された高いZ値のコントラスト発生剤を持つこと無しに達成される。むしろ、ターゲット分子は、コントラスト発生分子の局所的蓄積をその近傍で引き起こす。これに限定されない例として、このことは、高いZ番号の原子を含む材料の沈積を引き起こす、酵素的若しくは他の化学的反応により達成することができる。当該技術分野で知られている例は、抗体に共有結合されているセイヨウワサビペルオキシダーゼ(H R P)の酵素活性を使用する標識形成処置である。酵素は、ジアミノベンジン(D A B)のポリマー化及び不溶解化に触媒作用を及ぼす。ポリマー化されたD A Bは、例えば、4酸化オスミウム又はサンプルの周囲材料よりも遙かに高い親和性を持つ金属成分等の高いZ反応剤と結合し、蓄積し、高いコントラストを生じさせる。

【0389】

次のものがH R Pを使用した特異的標識形成処置の例であるが、これらに限定されるものではない。

【0390】

材料

上述されたような固定化及び免疫染色のための全ての試薬; 第2の抗体はH R Pに共役接合される(例えば、カタログ番号アメルシャム)

ジアミノベンジン染色キット(例えば、ベクター研究所のカタログ番号S K - 4 1 0 0)

水中の0.05%4酸化オスミウム(4%濃度から希釈される)

10

20

30

40

50

処置

マイルドホルムアルデヒドを用いたサンプルの固定化、上述されたような第1の抗体で染色

2次抗体、抗マウスペルオキシダーゼで培養(1:100希釈、1h)

PBSで5回洗浄

蒸留水で3回洗浄

キットプロトコルに従ってDAB染色(ベクター研究所のカタログ番号SK-4100)を実行

水で3回洗浄

1分間、0.05%の4酸化オスミウムで培養

10

蒸留水で5回戻場、画像形成前に水中に保持

【0391】

6. 固定化無しの特異的標識形成(細胞外分子又は構造に限定された)

処置が実行される間に、被ターゲット表面の蛋白質又は構造が、再分布もせず、細胞内に吸収もされないと仮定した上で、上記プロセスを使用して固定化無しで表面蛋白質又は構造を特異的に標識形成することがしばしば可能となる。0~4で培養を実行することにより、ターゲットの再分布又は内部吸収プロセスを抑制することができる。培養回数は、これに従って増大させる必要があり得る。

【0392】

7. 画像形成

20

サンプル準備が完了し、サンプルがサンプル容器内に配置された後、例えば、容器の底部及び一部分を嵌合させることにより、サンプル容器は、密封され、SEMのサンプルステージ上に配置される。画像形成は、サンプル容器外部の真空度が、サンプルの画像形成にも安定さにも実質的な影響を及ぼさないので、高い真空又は「低い真空」モードのいずれでもなされる。しかしながら、万全を期すため、仕切り膜が破れる稀なケースで顕微鏡が汚染される可能性を防止するため、SEM画像エネルギー形成を低真空条件で実行することができる。

【0393】

画像形成は、一般に、10から30KeVで設定された電子ビームを用いてなされる。熟練したSEMのオペレータにより決定されたとき、サンプルに対して最適な画像形成パラメータ(ビームエネルギー、電流、スポットサイズ、走査率、コントラスト及び明るさの設定等々)が使用される。

30

【0394】

代替例として、サンプル容器内の導入前に、サンプルが固定化され、染色され、及び/又は、特異的に標識形成される。このオプションは、図88の一番左側の矢印で示唆されている。これによって、このように処理されたサンプルは、「サンプル」として認識される。そのようなサンプル容器内への導入前のサンプルの処置は、特に、サンプル容器内の導入の後実行するのが困難であるサンプルに対して適用可能であるが、細胞サンプル又は他の液体サンプルに対しても適用可能である。

40

【0395】

次のプロトコルは、サンプル容器及び仕切り膜への導入前の非接着性細胞サンプルの準備及び免疫染色を例示している。

本発明は、厚い固体サンプルを画像形成するための方法を提供する。本発明の方法に係る、そのようなサンプルのSEM検査は、本発明のサンプル容器の仕切り膜と密接に接触した状態で画像形成されるようにサンプルの表面を配置する工程と、サンプル容器を密封する工程と、サンプル容器を走査型電子顕微鏡内に配置する工程と、サンプルを電子ビームを用いて走査する工程と、を最小でも含んでいる。

45

【0396】

好みしくは、サンプルの画像形成表面を、実質的な領域に亘って仕切り膜と接触するようを作ることができるようにするべきである。実際、このことは、サンプルがサンプル容

50

器に配置される前か又はサンプルを仕切り膜に対して当接するように圧力を印加した後のはずれかで、画像形成表面が略平坦であるか、又は、適度の湾曲若しくは不規則性を持つべきであることを意味している。

【0397】

固体サンプルは、そのような表面、例えば、組織若しくは器官の自然なエッジ、又は、組織を裏打ちする表面保護層を持っていてもよい。他のケースでは、例えば、個体組織の内部領域が視覚化されるべきとき、画像表面は、サンプルを切断することにより発生される。この切断工程は、外科用メス又は剃刀ブレードを用いて手で達成することができ、切断表面の平坦さ及び位置のより良好な制御を提供する支持スペーサーにより支持される剃刀ブレードを使用する。そのような支持スペーサーは、図86A乃至87Bに例示されている。代替例として、例えば、バイオラトーム(R)又は組織スライサー(EMS科学)等の機械加工装置を、幅広く多様なサンプルから平坦で損傷を受けていない表面を形成するため、使用することができる。なお、本発明の方法のための固体サンプルの準備は、薄片が要求されないという点で、ほとんどの他の画像形成モードとは異なっている。薄片化(LMに対しては数ミクロンまでのスライス、TEMに対しては0.1ミクロン未満までのスライス)は、サンプルが硬化されるべきことを要求するが、これは、パラフィン及びエポキシ樹脂等の固体媒体に埋め込むか、又は、低温で急速凍結及び薄片化することにより、達成される。本発明のほとんどの態様では、そのような硬化手段は要求されず、脱水又は凍結のための必要性を無くし、サンプル準備時間を短縮化する。

【0398】

サンプルが、サンプル容器の内部体積のサイズより大きい場合、サンプルの追加のトリミング(画像形成表面とは異なる側で)を実行することができる。これに限定されない例として、サンプル容器は、3mmの直径及び3mmの高さを備えたシリンドーとして形成された内部体積を持つことができ、固体サンプルは、サンプル容器内に導入されるように、これらの寸法よりい小さくなるように、区分化され又は切り取られなければならない。様々なサイズ及び形状のサンプル容器を、画像形成のより大きな連続的サンプルが所望されたならば、使用することができる。

【0399】

前述したプロトコルにおける細胞サンプルに対して記載されているように、本発明の方法は、(オプションの)切断及びトリミング工程とは異なる処理を用いること無く、固体の厚いサンプルのSEM検査を提供する。そのような未処理サンプルにおける材料分布に起因したコントラストは、有意な情報を明らかにすることができます。オプションで、構造的特徴を保存し、前段の固定化に依存した染色処置を可能にするため、サンプルを固定化することができる。オプションで、サンプルは、コントラストを向上させ、構造要素の同定及び定量化を可能にするため当該技術分野で知られている方法を使用して染色することができる。後述される3つのプロトコルは、組織の画像形成で使用されるプロトコルを例示している。

【0400】

未処理の心臓組織の画像形成

材料

PBS

処置

実験動物の心臓を取得(例えば、窒息により捧げられたマウスから)

処理が容易されるまで氷上でPBS内に保存(好ましくは、1時間未満)

組織断片を2mm以下の任意の寸法に外科用メスで切断

所望の表面が仕切り膜に面した状態で、図31A乃至図50に記載されているサンプル容器内に配置

図36A乃至図36Cで一例として示されるように、図30Aのサンプルポジショナー1128により圧力を印加する間に容器を密封

例えば、図37及び図39乃至図40に示されるように、SEM内で検査

10

20

30

40

50

【0401】

ホルムアルデヒドへの浸漬を用いた固定化

材料

P B S

濃縮ホルムアルデヒド溶液（16%又は37%）；好ましくは、パラホルムアルデヒドから準備され、新鮮な状態又は密封して凍結保存された状態のいずれかの部分標本が使用される。代替例として、一般には純度がより少ないが、同様な濃度のホルマリン溶液を使用してもよい。

ホルムアルデヒド作業溶液：P B S中の4%ホルムアルデヒド（新たに希釈される）

処置

動物又は人間のソースから組織を取得

余剰の血液を除去するためP B Sで短時間洗浄

組織を（一つの次元寸法で）2mm以下の厚さの部品に切断

ホルムアルデヒド作業溶液の大きな体積（少なくとも20倍、v/w）に配置

少なくとも1時間に亘って固定化

新鮮なホルムアルデヒド作業溶液中に格納

上述されたような画像形成のためのプロセス又は染色工程への移行

【0402】

血管局所灌流による固定化

材料洗浄溶液

1mlのヘパリン溶液（1000ユニット/ml）

1mlの亜硝酸ナトリウム

1000mlの脱イオン水

8.5gの塩化ナトリウム

pHを7.2~7.4に調整

局所灌流溶液（マクドウェルの及びトランプの4F:1G固定剤）

次のものを連続的に添加して掻き混ぜる

71ml蒸留水

25mlの16%PFA(EMグレード)

30

4mlの25%グルタルdehyd(EMグレード)

1.16gのNaH₂PO₄H₂O

~0.27gのNaOH(pHチェック及び1NのNaOHで7.2~7.4に調整)

P B S

処置

ラットを麻酔にかける

心臓を露出するため切開

針を左心室に挿入

流体排除を可能にするため右心房に孔貫通

37まで予め暖められた少なくとも250mlの洗浄溶液で動物を肝臓が青白くなるまで灌流

40

37まで予め暖められた局所灌流溶液250mlで灌流

動物を切開、関心のある器官又は組織（例えば、腎臓）を取り出す

必要ならば器官を更に切開、局所灌流溶液中に4で断片を保存

【0403】

固定化組織のウラニルアセテートによる染色

染色溶液は拡散によりサンプル内を浸透し、それにより、理に適った時間内での最良の染色は、表面に近いところで達成される。従って、画像形成されるべき表面を、染色溶液に直接、露出することが好ましい。この表面が、サンプルの元々のエッジではない場合、組織を切除し、所望の内部表面を露出させることが好ましい。

50

材料

固定剤溶液（例えば、ホルムアルデヒド作業溶液又はトランプの固定剤）

P B S

水

1 % のタンニン酸溶液

0 . 1 % のウラニルアセテート溶液（5 % w / v ストックから新たに希釀される。p H 3 . 5 ）

処置

浸漬又は血管局所灌流により組織を固定化

所望のサイズの断片に組織を切断し、画像形成されるべき表面を露出

10

全ての固定剤及び磷酸イオンを除去するため水で広範囲に洗浄

5 分間、1 % タンニン酸で培養

水で 3 回洗浄、各洗浄毎に 5 分間

ウラニルアセテート溶液に 10 分間浸漬

水で 5 回洗浄

【 0 4 0 4 】

組織の免疫染色

材料

固定剤：P B S 内の 4 % パラホルムアルデヒド

P B S

20

プロッキング溶液：1 % B S A を含み、p H 8 . 2 の P B S

1 ° 抗体

洗浄溶液

2 ° 抗体 / 金

銀強化キット

処置

混合、固定、プロック、プロッチ、洗浄、監視

【 0 4 0 5 】

本発明の例

本発明の例は、図示のものとして与えられ、開示された特有の例に本発明を限定するものではない。当業者は、本願で開示された方法が本明細書で説明されていない追加のサンプルの詳細な特徴へと変形され又は適合させることができることを、理解するであろう。

30

【 0 4 0 6 】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、培養されたチャニーズハムスターの卵巣（C H O）の S E M 顕微鏡写真図を示す、図 8 9 を参照する。図 1 1 A 乃至図 2 0 に示された容器等のサンプル容器は、フィブロネクチンの溶液で処理され、次に、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）で洗浄され、C H O 細胞は、通常の成長媒体（10 % 牛胎児血清が補充された D M E M）内で培養基培養される。一晩かけた培養の間に、細胞は、電子透過性で流体不透過性の膜 2 1 0 に接着し、該膜上に広がっていく。サンプル容器は、密封され、S E M 内に配置される。S E M の内部はガスを抜かれ、真空に維持されているが、サンプル容器内の流体は、完全に保持され、細胞は、媒体内に残つてその組成を維持する。このようにして得られた S E M 顕微鏡写真図は、細胞の構成成分に起因した材料コントラストが、細胞 3 2 0 0 の輪郭を視覚化し、並びに、細胞核 3 2 0 2 及び脂質小滴 3 2 0 4 を含む細胞内の内部構造を識別するのに十分であることを実証している。図 8 9 は、更に、例えば脂質リッチ構造、例えば脂質小滴 3 2 0 4 が、染色剤又は固定剤等の異質の物質の添加無しで、周囲の水様液に対して、鮮やかに見えることを実証している。

40

【 0 4 0 7 】

本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ヒーラー細胞の S E M 顕微鏡写真図である、図 9 0 A 及び図 9 0 B を参照する。好ましくは、図 1 1 A 乃至図 2 0

50

に記載されているようなサンプル容器は、フィブロネクチンの溶液で処理され、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）で洗浄され、ヒーラー細胞は、通常の成長媒体（10%牛胎児血清が補充されたD M E M）内で培養基培養される。一晩かけた培養の間に、細胞は、仕切り膜210に接着し、該膜上に広がっていく。媒体は、好ましくは、図17Bに示されるように、吸引により除去され、膜210に接着したままとなっている細胞は、上記詳細に説明したように、ウラニルアセテート染色工程を施される。

【0408】

図90A及び図90Bは、細胞核3210と、核小体3212と、アクチントレスファイバー3214と、皮質のアクチン3216と、を含む、高いレベルの詳細構造を示している。図90A及び図90Bは、例えばウラニル化合物等の一般的なコントラスト強化剤によって、コントラスト及び解像度を向上させることができ、特定の生物学的構造を同定することができる、ことを実証している。10

【0409】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、反上皮細胞増殖因子で固定化され染色され、次に20μmのコロイド状金粒子に連結された第2の抗体が続くA431細胞の、2つの異なる倍率におけるS E M顕微鏡写真図である、図91A及び図91Bを参照する。図91Bは、図91Aの暗い長方形3220によりマークされた領域の拡大図を表している。20nm金粒子は、図91Bでは輝点として目に見ることができる。図91Aで用いられているより低い倍率では、金粒子は、分解されていないが、金コロイドの分布は、電子後方散乱電子の強度の変化として示されている。20

【0410】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、抗C D 2 5の抗体で標識形成され、湿った状態で画像形成された、人間のインターロイキン-2のリセプターC D 2 5の暗号化遺伝子が一時的にトランスフェクトされたヒーラー細胞のS E M顕微鏡写真図である、図92を参照する。C D 2 5蛋白質を表していない、ヒーラー細胞は、F U G E N - 6試薬（イス、バースル市にあるロッシュ診断社のカタログ番号1 814, 443）を使用してポリエステル培養皿内で人間のC D 2 5遺伝子を暗号化するプラスミドがトランスフェクトされる。2日後、細胞は、トリプシンを使用して皿から取り出され、好ましくは、フィブロネクチン被覆仕切り膜220を備えた図11A乃至図20で説明されたようなサンプル容器内で培養基培養される。更なる培養のための24時間後、細胞は、ホルムアルデヒドで固定化され、抗C D 2 5抗体で染色され、次に30nmコロイド状金粒子に連結された2次抗体が続いた。最終的には、サンプルは、銀強化処理された。30

【0411】

当該技術で知られているように、トランスフェクション処置は、細胞群のうち一部で、トランスフェクトされたD N Aの取り込み及び表現を生じさせ、その一方で、他の細胞は、トランスフェクトされた遺伝子を取り込まず表現もしない状態を生じさせる。このことは、図92に明瞭に示されている。図92では、例えば、細胞核3232が輝いた楕円体として明瞭に見える1つの細胞3230が、明るい斑点で示されるように、金に連結された抗体で非常に染色されているが、隣接する細胞は、抗体により染色されず、その細胞核3236が、サイトプラズマからのその生得的な材料コントラストに起因して見えている。この画像は、本発明の方法で達成することができる、優れた信号対ノイズ特性を例示している。40

【0412】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って、抗ビオチン抗体で浸透化され標識形成され、湿った状態で画像形成された、ヒーラー細胞のS E M顕微鏡写真図である、図93A、93B及び93Cを参照する。図90Aで表されたようなフィブロネクチンで被覆された仕切り膜上で成長した細胞は、P B Sで4回洗浄され、15分間、P B S内の4%（w / v）ホルムアルデヒドの溶液を添加することにより固定化される。次に、当該溶液は、除去され、細胞は、P B Sで4回洗浄され、P B S内の0.1%トリトンX-100の溶液で5分回培養することにより浸透化される。次に、細胞は、ブロッキング溶液内で350

0分間処理される。該ブロッキング溶液は、1%牛血清アルブミン(B S A)及び5%(v/v)通常ヤギ血清を含むP B Sである。次に、細胞は、ブロッキング溶液で抗ビオチン抗体で1時間の間培養され、続いてP B Sで4回洗浄される。これらの細胞は、ブロッキング溶液において、例えばアメリカ合衆国、P A、F t .ワシントン、電子顕微鏡科学社のカタログ番号25371等の0.8nm金コロイドに連結された2次抗体を用いて1時間に亘って培養され、P B Sで4回洗浄され、5分間、P B S内の2%グルタルアルデヒドを用いて固定化された。次に、細胞は、蒸留水で6回洗浄され、市販のキット(アーリオン R - G E N T S E - E M)を使用して銀強化処理を施される。この実験で使用される抗ビオチン抗体は、共有結合したビオチンの片割れを含む蛋白質(酵素)を検出する。そのような酵素は、ミトコンドリアの内部基質内に優先的に配置され、従って、この細胞部分の良好なマーカーとなる(参照:ホリンシードM等、1997年)。図93A及び93Bは、上述されたように標識形成されたヒーラー細胞の2つの異なる倍率を示している。図93Cは、抗ビオチン抗体が省略されているということを除いて、同一の態様で実施される制御実験を示している。図93A乃至図93Cは、明るいひも状構造として示されている、ミトコンドリア(3240)の特異的な標識形成を明らかに実証している。図93A及び図93Cの両方に示された、細胞核3242及び脂質小滴3244等の構造は、抗体を用いた特異的標識形成に起因するものではない。むしろ、それらは、図89の議論で実証された自然のコントラストに起因するものであり、銀強化試薬を用いた一般的な染色からの寄与に由来している。なお、図93A乃至図93Cに関して詳細に説明された方法と、図91A乃至図92で使用される方法との間に有意な差異が存在する。図93A乃至図93Cでは、細胞内部の分子の抗体による十分な標識形成を可能にするため、特殊な工程が採用されている。即ち、第1の工程では、細胞は、洗剤(トリトンX-100)で浸透化され、抗体の侵入を可能にする。第2の工程では、境界の抗体を視覚化するため使用されるコロイド金粒子は、非常に小さく(0.8nm)、典型的な抗体分子よりは大きくはなく、該金コロイドの細胞内の箇所への容易な侵入と、該細胞内との平衡状態とを可能にする。最後の工程では、銀強化処理が、SEM内の金コロイドの視覚化を可能にするため使用される。銀強化処理(実際に、金コロイドを大きくする)の程度は、所望の解像度を維持するように制御される。

【0413】

図91A乃至図93Cは、特異的な抗体又は他のリガンドを利用することによって、特異的なターゲット分子の位置及び量を、光学顕微鏡よりも遙かに勝った解像度及び精度で測定する本発明の能力を示している。更に、本発明の方法は、EM画像を取得するのに要求されるサンプル準備に通常伴っている、冗長で有害な可能性のある工程を回避する。

【0414】

上記能力は、細胞表面分子、細胞内分子、後述する図106に示されるように、細胞外構造にまで拡張することができる。

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って、ポリリシン被覆膜に接着され、湿った状態で画像形成された、バクテリア(大腸菌及び枯草菌)のSEM顕微鏡写真図である、図94A及び94Bを参照する。成長媒体(L B , D I F C O)におけるバクテリア細胞は、記載したように、仕切り膜210が以前にはポリレジンで被覆されていたところの好ましくは図11A乃至図20に記載されているようなサンプル容器に適用される。30分後、媒体は除去され、細胞は、P B Sで4%ホルムアルデヒドで固定化された。図94Aの細胞は、更なる処理無しにSEMで画像形成された。その一方で、図94Bの細胞は、水で洗浄され、上述されたようにウラニルアセテートで染色され、SEMで画像形成された。図94Aの大腸菌細胞3250は、染色されておらず、詳細な構造は、図89と同様に、自然の材料のコントラストに起因して目に見えている。図94Bの枯草菌細胞3255は、ウラニルアセテートで染色され、そのコントラストは、ほとんどウラニルからくるものである。図94A乃至図94Bは、微生物学的実体を画像形成する方法の能力と、通常では本発明のサンプル容器の電子透過性仕切り膜に接触しない細胞を付着する一般的な能力と、を実証している。

10

20

30

40

50

【0415】

本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは図11A乃至図20で説明されたように、固定化され、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態において、走査電子ビームの異なるエネルギーレベル12KeV、15KeV及び25KeVで各々画像形成された、CHO細胞のSEM顕微鏡写真図である、図95A、95B及び95Cを参照する。図95Aは、仕切り膜に垂直な方向に細胞の全厚さよりもかなり薄い仕切り膜210に最近接した細胞3260の層を独占的に示している。図95B及び図95Cは、仕切り膜から漸次より大きな距離のところの細胞の層からの画像への寄与を表している。このように図95A乃至図95Cは、画像形成の異なる深さを表す、「仮想的区分」を見るため本発明の方法により提供された能力を例示している。この能力は、引き続く3次元画像再構築のための基礎ともなり得る。

【0416】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図41A乃至図50の説明に従って、サンプル容器内への処理無しに挿入され、湿った状態で画像形成された、ハツカネズミ心臓の断片の、2つの異なる倍率におけるSEM顕微鏡写真図である、図96A及び図96Bを参照する。なお、細胞3270の全体的な構成は、図96A乃至図96Bでより低い倍率で示され、細胞内部詳細構造（細胞核3272と、明るい細胞部分3274、おそらくはミトコンドリア）は、図96Cでより高い倍率で示されている。例えば、図96A乃至図96Cに示された膜支持格子は、本発明の方法により提供された、サンプル中の自然な材料分布から画像形成コントラストを発生する能力を再び実証しているが、より重要なことは、外科手術中に採取された生体検査組織又はサンプル等である組織を取得した後、非常に短い時間（5～10分）以内でその画像を発生する能力である。

【0417】

ここで、本発明の別の好ましい実施例、好ましくは図41A乃至図50の記載に従って、更なる染色無しで（図97A乃至図97C）、又は、ウラニルアセテート染色に続いて（図97D）、グルタルアルデヒドで固定化され、湿った状態で画像形成された、豚類の脂肪組織の断片のSEM顕微鏡写真図である、図97A、97B、97C及び97Dを参照する。含脂肪細胞（太った細胞）は、大きい（50～100μm）暗い楕円体3280として示されている。暗い領域は、暗い脂質リッチ領域を取り囲む明るい領域として目に見える（細胞のサイトプラズマ及び細胞核、並びに、細胞外材料）水成材料3282により取り囲まれた、含脂肪細胞（大きな脂質小滴）内部の脂質リッチ領域である。脂質は、最も一般的なサンプル準備処置の間に失われ、それにより、本発明の方法は、脂質のための独自の画像形成能力を提供する。組織内の脂質及び他の領域の間の自然のコントラスト差は、ウラニルアセテート染色により細胞核3284及びサイトプラズマ3286がマークされる図97Dに示されるように、染色を使用して達成することができる。

【0418】

ここで、本発明の好ましい実施例、好ましくは図41A乃至図50の記載に従って、ホルマリンで固定化され、染色無しにSEM内に挿入され、湿った状態で画像形成された、ウサギの眼の網膜色素の皮覆組織（RPE）の、2つの異なる倍率におけるSEM顕微鏡写真図である、図98A及び図98Bを参照する。この非染色サンプルでは、示された最も顕著な特徴は、明るいシガー形状の対象として現われる、メラノソーム3290である。皮覆組織の輪郭は、この皮覆組織内の細胞の表面上で細繊毛内に座して、メラノソームの略多角形クラスターとして、図98に概略示されている。図98A及び図98Bは、本発明の方法を使用して得られる、サンプル内の材料分布からの自然のコントラストを再び実証している。サンプル内の材料は、この場合には、RPEの細繊毛におけるメラノソーム（細胞内のメラニンの豊富なボディ）である。

【0419】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図41A乃至図50の説明に従って、グルタルアルデヒドで固定化され、染色無しにSEM内に挿入され、湿った状態で画像形成された、ラットの脊髄の、2つの異なる倍率におけるSEM顕微鏡写真図であ

10

20

30

40

50

る、図 99A 及び図 99B を参照する。脊髄の全断面を包含する低倍率図を示す、図 99A は、より明るい領域 3300 と、より暗い領域 3310 とを区別しており、より明るい領域は、ニューロン及びグリア細胞の細胞体の豊富なところであり、より暗い領域は、ミエリン鞘の神経線維が豊富であり、より高い脂質の含有量に起因してより明るい領域から区別されている。これは、図 99A の長方形 3320 で示された領域をより高い倍率で示した、図 99B でより詳細に現われている。ここで、軸索が、暗い脂質リッチなミエリン鞘 3340 により取り囲まれた明るい領域 3330 として示されている。図 99A 及び図 99B は、成分の間の材料差からきたコントラストに基づいて未染色サンプルで異なる成分を決定する本発明の方法により提供される能力を再び例示している。更には、脂質リッチ相及び水成相の並置を一般に含む神経組織の独自の画像は、ミエリン鞘脱落、トラウマ、及び、再生、炎症、及び、癌を含む、神経障害の研究、診断及び処理の重要な能力を与えることができる。

10

【0420】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 41A 乃至図 50 の説明に従って、ホルムアルデヒドで固定化され、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態で画像形成された、ハツカネズミの脾臓の断片の、走査電子ビームの異なるエネルギーレベルにおける SEM 顕微鏡写真図である、図 100A 及び図 100B を参照する。30 kV の電子ビームエネルギーで取られた顕微鏡写真図である、図 100A は、外分泌腺脾臓の幾つかの腺房 3340 の組織を示している。細胞のエッジは、一般に目に見える。15 kV の電子ビームエネルギーで取られた図 100B は、より低いエネルギー電子のより限定された貫通に起因した、仕切り膜（図 41 の 1210）に近接して配置された細胞外基質 3350 の繊維のみを示している。図 100A 乃至図 100B は、湿った状態で画像形成されたサンプルの 3 次元情報を得るために本発明の方法により提供される能力を実証している。更には、図 100B は、細胞外基質の構造を湿った状態で画像形成する能力を実証している。

20

【0421】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 41A 乃至図 50 の記載に従って、ホルムアルデヒドでコテかされ、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態で画像形成された、ハツカネズミの脾臓、ラットの尾、マウスの十二指腸の断片の、各々の SEM 顕微鏡写真図である、図 101A、101B 及び図 101C を参照する。図 101A、101B 及び 101C、並びに、図 100B における画像は、脾臓（3360）、尾（3370）及び十二指腸（3380）の細胞外基質の繊維を示している。かくして、本発明の方法は、異なる組織及び病理状態において劇的に構造が異なる、ECM の独自の見方を提供する。この構造は、一般的の顕微鏡検査のための他の方法がなされるように、サンプルが脱水又は凍結するとき破壊される可能性がある。

30

【0422】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 41A ~ 50 の記載に従って、血管局所灌流により固定化され、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態で画像形成された、ハツカネズミの腎臓の断片の SEM 顕微鏡写真図である、図 102A、102B、図 102C 及び 102D を参照する。図 102A は、外皮から取られた、糸球体の一部を示し、図 102B は、同じものより高い倍率の画像である。明瞭に見えるものは、細胞の細胞核 3390 と基底膜 3392 である。図 102C は、髓質の領域の顕微鏡写真図であり、図 102D は、同じものより高い倍率の画像である。該図には、腎臓の尿細管 3394 が、皮覆組織細胞 3396 及び基底膜 3398 と共に、示されている。図 102A 乃至 102D は、乾燥、凍結、埋め込み、又は、薄片化無しに、組織断片の高い倍率及び解像度で画像を得るという本発明の方法により提供される一般的な能力を実証しており、例えば、糸球体及び管状基底膜等、医療及び診断上で重要なものの特徴の詳細図を与えている。

40

【0423】

本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 41A 乃至図 50 の記載に従って、

50

ホルムアルデヒドで固定化され、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態で画像形成された、ラットの心臓筋肉の、2つの異なる倍率におけるSEM顕微鏡写真図である、図103A及び図103Bを参照する。組織の細胞組織は、図103Aに明瞭に示されている。図103Bで使用されるより高い倍率は、心臓筋肉細胞の筋状の構造等の細胞内部特徴を明らかにする。図103A乃至図103Bは、高い解像度で様々な構造を画像形成するという本発明の方法により提供される能力を更に実証している。心臓及び他の筋状筋肉を画像形成する特定の能力は、心臓筋疾患、筋肉変性疾患を含む、心臓及び骨格筋肉の異常に關する、研究、診断及び処理に有用となり得る。

【0424】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図41A乃至図50の記載に従って、ホルムアルデヒドで固定化され、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態で画像形成された、人間の甲状腺の、2つの異なる倍率におけるSEM顕微鏡写真図である、図104A及び図104Bを参照する。図104Aは、濾胞細胞3402の皮覆組織により取り囲まれた、甲状腺濾胞3400の管腔と、濾胞を取り囲む接続組織3404の領域とを示している。図104Bは、濾胞細胞3402を含む濾胞3400の領域のより高い倍率を示している。濾胞細胞の間の接続部3406は、ほとんど多角形の配列で明るい染色された薄いラインとして明瞭に示されている。図104A及び104Bは、本発明の方法により提供される能力を実証している。

【0425】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って、好ましくは、図41A乃至図50の記載に従って、ホルムアルデヒドで固定化され、ウラニルアセテートで染色され、湿った状態で画像形成された、ラットの胸腺のSEM顕微鏡写真図である、図105を参照する。異なる細胞種類が、それらが相互に配列されるように、示されている（リンパ球3410及びマクロファージ3412）。例えば、リンパ球及びマクロファージ等の赤血球形成細胞の画像形成及び同定は、炎症、自己免疫病、動脈病、傷治療及び癌を含む様々な病気の研究、診断及び処理において有用性を持ち得るが、これらの例に限定されるものではない。

【0426】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って、好ましくは、図41A乃至図50の記載に従って、湿った状態で画像形成された、免疫標識形成されたラットの腎臓のSEM顕微鏡写真図である、図106A及び図106Bを参照する。雄のラットは、Dリモネンで処理され、特に、腎臓の皮質細管におけるアルファ-2マイクログロブリンの蓄積をもたらす（クリスチアンセン及びマッドセン、1995）。ラットは犠牲にされ、その腎臓が血管局所灌流により固定化され、断片へと切断され、該断片は、抗アルファ-2マイクログロブリン抗体で処理され、次に2次抗体が0.8nmの金コロイドに連結され、最後に、銀強化処理により処理される。図106Aは、このように標識形成され画像形成された腎臓の断片の画像を示している。図106Bは、抗アルファ-2マイクログロブリン抗体が省略されたという点を除いて、同一工程で処理された、腎臓の同じ一般領域からの別の断片を示している。免疫標識が、銀強化金コロイドを表す明るいスポット3420として図106Aに示されている。ここで、そのような免疫標識が図106Bには存在せず、標識形成の特異性を実証している。図106A及び図106Bは、湿った、スライス切りされていない組織サンプルにおける特異的な生体分子を高い解像度で視覚化している。そのような能力は、病気の研究、診断及び処理において重要であり得る。

【0427】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って、好ましくは、図18A乃至図20に示されるように、SEM内に直接挿入され、2つの異なる倍率で画像形成された、市販の牛乳（1.5%）のSEM顕微鏡写真図である、図107A及び図107Bを参照する。ミルクは、乳濁液であり、水成媒体中に脂質小滴を含んでいる。図107A乃至図107Bは、ミルクの水成媒体である明るい背景3432上の暗い領域として様々なサイズの脂質小滴3430を示している。図107Bは、より高い倍率で、画像のおおよその解像

10

20

30

40

50

度を画定する 120 nm 程度の大きさの脂質小滴 (3434) を示している。

【0428】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 18A 乃至図 20 に示されるように、SEM 内に直接挿入され、2 つの異なる倍率で画像形成された、新鮮な人間の乳の SEM 顕微鏡写真図である、図 108A 及び図 108B を参照する。脂質小滴 3436 は、図 107A 及び図 107B の液滴小滴 3432 とは異なる全体形状及び細部分布を備えた暗いスポットとして図 107A 及び図 107B に示されている。図 107A 乃至図 108B は、走査型電子顕微鏡において、乳濁液をそれが何であれ、処理無しに画像形成するという本発明の方法により提供される能力を実証している。そのような能力は、生物学的流体、食品、化粧品、及び、調剤薬を含む様々なサンプルの研究、分析及び品質保証における使用において発揮される。10

【0429】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に従って、SEM 互換性サンプルエンクロージャ内に形成されたピロアンチモン酸塩の結晶の、湿った状態で画像形成された SEM 顕微鏡写真図である、図 109 を参照する。ヒーラー細胞は、図 90A 及び図 90B を参照して記載されたように、サンプル容器内で成長する。これらの細胞は、2% (w/v) ピロアンチモン酸カリウム及び 4% グルタルアルデヒドの溶液中で固定化される。培養の間、ピロアンチモン酸の結晶は、細胞のところで大部分は核を形成し、多重リッジ 3438 として見えている。図 109 は、結晶化プロセスを画像形成するという本発明の方法により提供された能力を実証している。そのような能力は、調剤薬及び他の工業調合剤を含む様々なサンプルの研究、分析及び品質保証における使用において発揮される。20

【0430】

ここで、本発明の更に別の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 58A 乃至図 77 に従って、走査型電子顕微鏡における後方散乱電子検出及び光検出により各々得られた、CHO 細胞の顕微鏡写真図である、図 110A 及び図 110B を参照する。これらの細胞は、仕切り膜 2110 上で成長し、例えば固定化又は染色等の処理無しに直接画像形成される。図 110A は、図 89 に示されるものに略類似した画像を示している。即ち図 110A によれば、細胞の概略的輪郭 3440 と、細胞核を示す明るい領域 3442 と、脂質小滴を示す暗いスポット 3444 と、が示されている。この画像におけるコントラストは、電子後方散乱の反射効率における材料差に起因している。図 110B は、SEM 走査の間にサンプルから放射された光子から導き出された、同時的に得られた画像である。この画像では、細胞の輪郭 3450 は、細胞核を示す明るい領域 3452 と、脂質小滴を示す暗い領域 3454 と、が表されている。図 110B におけるコントラストは、図 110A におけるコントラストとは全体として異なる機構から、即ち陰極ルミネッセンスの効率から導き出されている。この場合には、陰極ルミネッセンス画像は、標本内部の材料分布に関する独自の情報を生じさせることができる。30

【0431】

本発明の好ましい実施例に従って、好ましくは、図 58A 乃至図 77 に従って、走査型電子顕微鏡における後方散乱電子検出及び光検出により各々得られた、200 nm 直径の蛍光性ビーズ（アメリカ合衆国、インディアナ州、BLI から、サーフグリーン蛍光色素を備えたポリスチレンビーズ）の顕微鏡写真図である、図 111A 及び図 111B を参照する。図 111A で後方散乱電子画像でからうじて識別可能であるビード 3460 は、図 111B では、明るい陰極ルミネッセンス球体 3462 として示されている。図 111A 及び図 111B は、光学顕微鏡で利用可能であるものを超える解像度で、光放射を画像形成するという本発明の方法により提供された能力を実証する。40

【0432】

ここで、本発明の好ましい実施例に従って X 線検出を使用したサンプルの SEM 検査の顕微鏡写真図である、図 112A 及び図 112B を参照する。図 112A は、図 11A 乃至図 20 に示されたようなサンプル容器内の水中のヒーラー細胞の水成サンプルの、X 線分光計を使用した SEM 検査結果を示している。当該分析結果は、主要成分としての酸素

10

20

30

40

50

3474を、より少ない量の炭素3472と共に同定している。これらは、水中の細胞の分析から予想された結果である。図112Bは、真空グリースの類似の分析を示している。即ち、炭素3476、酸素3477、及び、フッ素3478が、主要な元素である。

【0433】

ここで、本発明の好ましい実施例に係る、患者を検査するための方法を示す概略図である、図113を参照する。少なくとも1つのサンプルが、患者から得られており、該患者は、サンプルを取得する前の処理をオプションで受けていてもよい。少なくとも1つのサンプルは、当該技術分野で知られている方法、例えば、血液サンプルの抜き出し、経口抜き取り、脳脊髄流体の抜き出し、尿、唾液若しくは排泄物の取得、洗浄、組織生体検査、外科切開、又は、検死解剖等によって、得ることができる。

10

【0434】

少なくとも1つのサンプルは、本発明の方法に従って、SEMで検査される。オプションで、サンプルは、画像形成前のサンプル準備工程無しで検査されてもよく、又は、オプションの固定化、染色又はそれらの組み合わせ工程の後、検査されてもよい。本発明の別の実施例では、患者からの別個のサンプル又は該患者のサンプルの別個の部分を、追加の情報を得るために、各々異なるプロトコルを使用して、SEM検査のため準備し、又は、検査することができる。

20

【0435】

ここで、本発明の別の好ましい実施例に係る、実験動物への処置効果をテストするための方法を示す概略図である、図114を参照する。そのようなテストは、例えば、薬剤、環境、栄養又は職業上の条件の毒性又は疑わしい毒性をテストする際に、薬剤発見又は開発における工程として使用することができる。少なくとも1つのサンプルが、少なくとも1つの動物から得られ、該動物は、サンプルを取得する前の処理をオプションで受けていてもよい。少なくとも1つのサンプルは、当該技術分野で知られている方法、例えば、血液サンプルの抜き出し、経口抜き取り、脳脊髄流体の抜き出し、尿、唾液若しくは排泄物の取得、洗浄、組織生体検査、又は、生きている若しくは死んでいる動物の解剖等によって、得ることができる。

20

【0436】

少なくとも1つのサンプルは、本発明の方法に従って、SEMで検査される。オプションで、サンプルは、画像形成前のサンプル準備工程無しで検査されてもよく、又は、オプションの固定化、染色又はそれらの組み合わせ工程の後、検査されてもよい。本発明の別の実施例では、動物からの別個のサンプル又は該動物のサンプルの別個の部分を、追加の情報を得るために、各々異なるプロトコルを使用して、SEM検査のため準備し、又は、検査することができる。

30

【0437】

ここで、本発明の方法に係る、SEM検査を含む製造プロセスの概略図である、図115を参照する。かくして、原料、製造プロセスの中間製造物及び製造品を含む、製造プロセスの任意のステージから導き出された実体のサンプルを検査することができる。これらの実体のサンプルは、本発明の方法に係るSEMで取得し、検査される。オプションで、画像形成前のサンプル準備工程無しで、又は、オプションの固定化、染色又はそれらの組み合わせの後に、サンプルを検査することができる。本発明の別の実施例では、実体からの別個のサンプル、又は、実体のサンプルの別個の部分を、追加の情報を得るために、各々異なるプロトコルを使用して、SEM検査のため準備し、又は、検査することができる。次に、SEM検査の結果は、品質基準に基づいて評価され、原料、製造プロセスの中間製造物及び製造品の個々のもの又はそれらのバッチを受諾するか又は却下する決定がなされる。

40

【0438】

ここで、医薬物、又は、販売中止若しくは既知の有毒物質を生物検定するための方法の概略図である、図116を参照する。細胞が、図1A乃至図84のうち任意のものに記載されているような1つ以上のサンプルエンクロージャへと導入され、医薬品、又は、疑わ

50

しいか若しくは既知の毒物が細胞に適用される。これらの細胞は、本発明の方法に従って、S E M内で検査される。オプションで、画像形成前のサンプル準備工程無しで、又は、オプションの固定化、染色又はそれらの組み合わせの後に、サンプルを検査することができる。本発明の別の実施例では、別個のサンプル容器内の細胞を、追加の情報を得るよう、各々異なるプロトコルを使用して、S E M検査のため準備し、又は、検査することができる。S E M検査の結果は、分析され、その分析結果は、医薬品、又は、疑わしいか若しくは既知の毒物の効果を評価するため適用される。

【0439】

本発明は、特定に示され、上述されたものに限定されることは当業者により認められよう。本発明の範囲は、前記した明細書を読むとき当業者に想到され、従来技術には存在しないような、上述された様々な特徴の組み合わせ及びサブコンビネーションの両方、並びに、それらの変形及び変更を網羅している。

【図面の簡単な説明】

【0440】

【図1】図1A及び図1Bは、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解されたS E M互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図2】図2A及び図2Bは、図1A及び図1Bの容器のサブアッセンブリの、各々反対側に向いた簡略的な部分断面図である。

【図3】図3A及び図3Bは、図1A乃至図2BのS E M互換性サンプル容器を部分的に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図4】図4A及び図4Bは、図1A乃至図3BのS E M互換性サンプル容器を完全に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略図である。

【図5】図5A及び図5Bは、図3A及び図3Bで、各々、ラインVA - VA及びラインVB - VBに沿って取られた、各々反対側に向いた簡略的な部分断面図である。

【図6】図6A、6B及び6Cは、図1A乃至図5BのS E M互換性サンプル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である。

【図7】図7A、7B、7C、7D及び7Eは、図1A乃至図6CのS E M互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及びS E Mへの挿入の各状態の簡略断面図である。

【図8】図8A、8B及び8Cは、図1A乃至図6CのS E M互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む液体、密封及びS E Mへの挿入の各状態の簡略断面図である。

【図9】図9は、図1A乃至図6CのS E M互換性サンプル容器を使用した、サンプルのS E M検査の簡略図及び断面図である。

【図10】図10は、図9の状況においてサンプルのS E M検査状態を拡大した簡略図である。

【図11】図11A及び図11Bは、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解されたS E M互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図12】図12A及び図12Bは、図11A及び図11Bの容器のサブアッセンブリの、各々反対側に向いた簡略的な部分断面図である。

【図13】図13A及び図13Bは、図11A乃至図12BのS E M互換性サンプル容器を部分的に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図14】図14A及び図14Bは、図11A乃至図13BのS E M互換性サンプル容器を完全に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略図である。

【図15】図15A及び図15Bは、図13A及び図13Bで、各々、ラインXVA - XVA及びラインXVB - XVBに沿って取られた、各々反対側に向いた簡略的な部分断面図である。

【図16】図16A、16B及び16Cは、図11A乃至図15BのS E M互換性サンプル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である。

【図17】図17A、17B、17C、17D及び17Eは、図11A乃至図16CのS

10

20

30

40

50

EM互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図である。

【図18】図18A、18B及び18Cは、図11A乃至図16CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む液体、密封及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図である。

【図19】図19は、図11A乃至図16CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルのSEM検査の簡略図及び断面図である。

【図20】図20は、図19の状況においてサンプルのSEM検査状態を拡大した簡略図である。

【図21】図21A及び図21Bは、図1A乃至図20に示された型式のSEM互換性サンプル容器で使用する顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの簡略的な分解図である。 10

【図22】図22A及び図22Bは、顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーを、覆われていない状態、及び、覆われて組み立てられた状態で各々示した、簡略図である。

【図23】図23A、23B及び23Cは、吸引装置及びピペットを伴った、図21A乃至図22Bの顕微鏡検査前の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図24A】図24Aは、図1A乃至図10で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図24B】図24Bは、図1A乃至図10で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図24C】図24Cは、図1A乃至図10で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。 20

【図25A】図25Aは、図11A乃至図20で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図25B】図25Bは、図11A乃至図20で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図25C】図25Cは、図11A乃至図20で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図26】図26A及び図26Bは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図27】図27A及び図27Bは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。 30

【図28】図28は、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図29】図29は、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図30】図30は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図31】図31A及び図31Bは、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解されたSEM互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。 40

【図32】図32A及び図32Bは、図31A及び図31Bの容器のサブアッセンブリの、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図33】図33A及び図33Bは、図31A乃至図32BのSEM互換性サンプル容器を部分的に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図34】図34A及び図34Bは、図31A乃至図33BのSEM互換性サンプル容器を完全に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略図である。

【図35】図35A及び図35Bは、図33A及び図33Bで、各々、ラインX X X V A - X X X V A及びラインX X X V B - X X X V Bに沿って取られた、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図36】図36A、36B及び36Cは、図31A乃至図35BのSEM互換性サンプ 50

ル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である。

【図37】図37は、図31A乃至図36CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む組織とSEMへの挿入とを示す、簡略図及び断面図である。

【図38】図38A、38B、38C及び38Dは、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEM互換性サンプル容器を使用した、作動の様々な段階及びSEMへの挿入を各々示す該SEM互換性サンプル容器の作動態様の簡略断面図である。

【図39】図39は、図31A乃至図37のSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルのSEM検査の簡略図及び断面図である。

【図40】図40は、図39の状況においてサンプルのSEM検査状態を拡大した簡略図である。

【図41】図41A及び図41Bは、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解されたSEM互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図42】図42A及び図42Bは、図41A及び図41Bの容器のサブアッセンブリの、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図43】図43A及び図43Bは、図41A乃至図42BのSEM互換性サンプル容器を部分的に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図44】図44A及び図44Bは、図41A乃至図43BのSEM互換性サンプル容器を完全に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略図である。

【図45】図45A及び図45Bは、図43A及び図43Bで、各々、ラインXLVA-XLVA及びラインXLVB-XLVBに沿って取られた、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図46】図46A、46B及び46Cは、図41A乃至図45BのSEM互換性サンプル容器の作動態様を作動の3段階で各々示した3つの断面図である。

【図47】図47は、図41A乃至図46CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む組織及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図及び簡略図である。

【図48】図48A、48B、48C及び48Dは、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEM互換性サンプル容器を使用した、作動の様々な段階及びSEMへの挿入を各々示す該SEM互換性サンプル容器の作動態様の簡略断面図である。

【図49】図19は、図11A乃至図16CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルのSEM検査の簡略図及び断面図である。

【図50】図50は、図49の状況においてサンプルのSEM検査状態を拡大した簡略図である。

【図51A】図51Aは、図31A乃至図40に示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図51B】図51Bは、図31A乃至図40に示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図51C】図51Cは、図31A乃至図40に示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図52A】図52Aは、図41A乃至図50に示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図52B】図52Bは、図41A乃至図50に示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図52C】図52Cは、図41A乃至図50に示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する顕微鏡検査用の多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図53A】図53Aは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図53B】図53Bは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図54A】図54Aは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル

10

20

30

40

50

容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図 54B】図 54B は、本発明の好ましい実施例に係る、複数の SEM 互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図 55】図 55 は、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図 56】図 56 は、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図 57】図 57 は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動する SEM ベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図 58】図 58A 及び図 58B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された SEM 互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。 10

【図 59】図 59A 及び図 59B は、図 58A 及び図 58B の容器のサブアッセンブリの、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図 60】図 60A 及び図 60B は、図 58A 乃至図 59B の SEM 互換性サンプル容器を部分的に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図 61】図 61A 及び図 61B は、図 58A 乃至図 59B の SEM 互換性サンプル容器を完全に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略図である。

【図 62】図 62A 及び図 62B は、図 60A 及び図 60B で、各々、ライン L X I I A - L X I I A 及びライン L X I I B - L X I I B に沿って取られた、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。 20

【図 63】図 63A、63B 及び 63C は、図 58A 乃至図 62B の SEM 互換性サンプル容器の作動態様を作動の 3 段階で各々示した 3 つの断面図である。

【図 64】図 64A、64B、64C、64D 及び 64E は、図 58A 乃至図 63C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である。

【図 65】図 65A、65B 及び 65C は、図 58A 乃至図 63C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む液体、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である。

【図 66】図 66 は、図 58A 乃至図 63C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、サンプルの SEM 検査の簡略図及び断面図である。 30

【図 67】図 67 は、図 66 の状況においてサンプルの SEM 検査状態を拡大した簡略図である。

【図 68】図 68A 及び図 68B は、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、分解された SEM 互換性サンプル容器の、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図 69】図 69A 及び図 69B は、図 68A 及び図 68B の容器のサブアッセンブリの、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図 70】図 70A 及び図 70B は、図 68A 乃至図 69B の SEM 互換性サンプル容器を部分的に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略的な分解図である。

【図 71】図 71A 及び図 71B は、図 68A 乃至図 69B の SEM 互換性サンプル容器を完全に組み立てた状態で示した、各々反対側に向いた簡略図である。 40

【図 72】図 72A 及び図 72B は、図 70A 及び図 70B で、各々、ライン L X X I I A - L X X I I A 及びライン L X X I I B - L X X I I B に沿って取られた、各々反対側に向いた簡略的な部分図の部分断面図である。

【図 73】図 73A、73B 及び 73C は、図 68A 乃至図 72B の SEM 互換性サンプル容器の作動態様を作動の 3 段階で各々示した 3 つの断面図である。

【図 74】図 74A、74B、74C、74D 及び 74E は、図 68A 乃至図 73C の SEM 互換性サンプル容器を使用した、細胞成長、液体除去、液体追加、密封及び SEM への挿入の各状態の簡略断面図である。 50

【図75】図75A、75B及び75Cは、図68A乃至図73CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルを含む液体、密封及びSEMへの挿入の各状態の簡略断面図である。

【図76】図76は、図68A乃至図73CのSEM互換性サンプル容器を使用した、サンプルのSEM検査の簡略図及び断面図である。

【図77】図77は、図76の状況においてサンプルのSEM検査状態を拡大した簡略図である。

【図78A】図78Aは、図58A乃至図67で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図78B】図78Bは、図58A乃至図67で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。 10

【図78C】図78Cは、図58A乃至図67で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図79A】図79Aは、図68A乃至図77で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図79B】図79Bは、図68A乃至図77で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図79C】図78Cは、図68A乃至図77で示された型式のSEM互換性サンプル皿部で使用する、顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図80A】図80Aは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。 20

【図80B】図80Bは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図81A】図81Aは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図81B】図81Bは、本発明の好ましい実施例に係る、複数のSEM互換性サンプル容器を形成する顕微鏡検査用多重サンプルホルダーの簡略図である。

【図82】図82は、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図83】図83は、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である。 30

【図84】図84は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って構成され、作動するSEMベースのサンプル検査システムの簡略図である。

【図85】図85は、本発明の別の好ましい実施例に従って構成され、作動する、サンプルSEM検査の簡略部分図の部分断面図である。

【図86A】図86Aは、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、組織サンプル切り取りアッセンブリの簡略部分図の部分断面図である。

【図86B】図86Bは、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、組織サンプル切り取りアッセンブリの簡略部分図の部分断面図である。

【図87A】図87Aは、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、組織サンプル切り取りアッセンブリの簡略部分図の部分断面図である。 40

【図87B】図87Bは、本発明の好ましい実施例に従って構成され、作動する、組織サンプル切り取りアッセンブリの簡略部分図の部分断面図である。

【図88】図88は、本発明の好ましい実施例に係る、非真空下で湿った生体環境サンプルを電子顕微鏡検査するための方法を含む、主要工程の概略図である。

【図89】図89は、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、培養されたチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)のSEM顕微鏡写真図である。

【図90】図90A及び図90Bは、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ヒーラー細胞のSEM顕微鏡写真図である。

【図91】図91A及び図91Bは、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形 50

成された A 4 3 1 細胞の、2つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 2】図 9 2 は、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ヒーラー細胞の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 3】図 9 3 A、9 3 B 及び 9 3 C は、本発明の別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ヒーラー細胞の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 4】図 9 4 A 及び 9 4 B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、大腸菌バクテリア及び枯草菌バクテリアの S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 5】図 9 5 A、9 5 B 及び 9 5 C は、本発明のなお別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された C H O 細胞の、走査電子ビームの異なるエネルギーレベルで取られた S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 6】図 9 6 A 及び 図 9 6 B は、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ハツカネズミの心臓の断片の、2つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 7】図 9 7 A、9 7 B、9 7 C 及び 9 7 D は、本発明の別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、豚類の脂肪組織の断片の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 8】図 9 8 A 及び 図 9 8 B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ウサギの眼の網膜色素の皮覆組織 (R P E) の、2つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 9 9】図 9 9 A 及び 図 9 9 B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ラットの脊髄の、2つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 0】図 1 0 0 A 及び 図 1 0 0 B は、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ハツカネズミの臍臓の断片の、走査電子ビームの異なるエネルギーレベルにおける S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 1】図 1 0 1 A、1 0 1 B 及び 図 1 0 1 C は、本発明の別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ハツカネズミの臍臓、ラットの尾、マウスの十二指腸の断片の、各々の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 2】図 1 0 2 A、1 0 2 B、図 1 0 2 C 及び 1 0 2 D は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ハツカネズミの腎臓の断片の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 3】図 1 0 3 A 及び 図 1 0 3 B は、本発明のなお別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ラットの心臓筋肉の、2つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 4】図 1 0 4 A 及び 図 1 0 4 B は、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、人間の甲状腺の、2つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 5】図 1 0 5 は、本発明の別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ラットの胸腺の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 6】図 1 0 6 A 及び 図 1 0 6 B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、免疫標識形成されたラットの腎臓の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 7】図 1 0 7 A 及び 図 1 0 7 B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、市販の 1 . 5 % 脂肪牛乳の 2 つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 8】図 1 0 8 A 及び 図 1 0 8 B は、本発明の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、新鮮な人間の乳の 2 つの異なる倍率における S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 0 9】図 1 0 9 は、本発明の別の好ましい実施例に従って準備され、画像形成された、ピロアンチモン酸塩の結晶の S E M 顕微鏡写真図である。

【図 1 1 0】図 1 1 0 A 及び 図 1 1 0 B は、本発明の更に別の好ましい実施例に従って、

10

20

30

40

50

走査型電子顕微鏡において、後方散乱電子検出及び光検出により各々得られた、C H O 細胞の顕微鏡写真図である。

【図 111】図 111A 及び図 111B は、本発明のなお別の好ましい実施例に従って、走査型電子顕微鏡において、後方散乱電子検出及び光検出により各々得られた、蛍光性ビーズの顕微鏡写真図である。

【図 112】図 112A 及び図 112B は、本発明の好ましい実施例に従って X 線検出を使用したサンプルの SEM 検査の顕微鏡写真図である。

【図 113】図 113 は、本発明の好ましい実施例に係る、患者を検査するための方法を示す概略図である。

【図 114】図 114 は、本発明の別の好ましい実施例に係る、実験動物への処置効果をテストするための方法を示す概略図である。 10

【図 115】図 115 は、本発明の更に別の好ましい実施例に係る、SEM 検査を含む製造プロセスの概略図である。

【図 116】図 116 は、本発明のなお別の好ましい実施例に係る、医薬物、又は、販売中止若しくは既知の有毒物質を生物検定するための方法の概略図である。

FIG. 1A

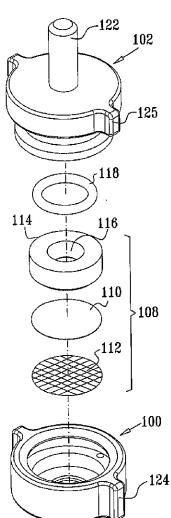


FIG. 1B

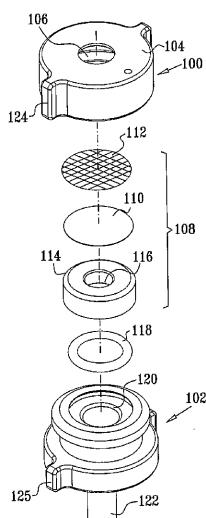


FIG. 2A

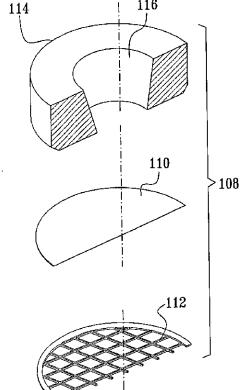


FIG. 2B

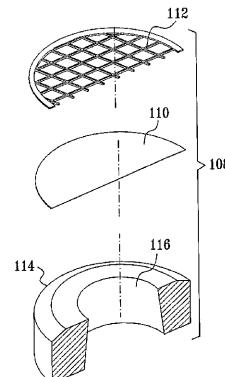


FIG. 3A

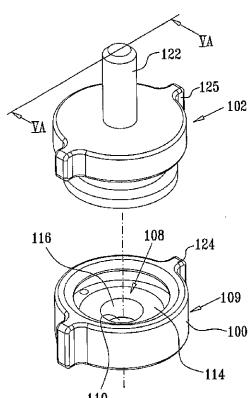


FIG. 3B

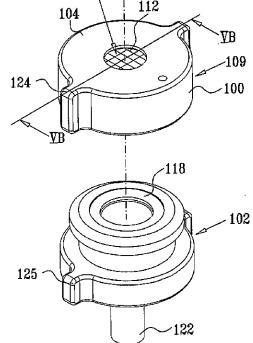


FIG. 4A

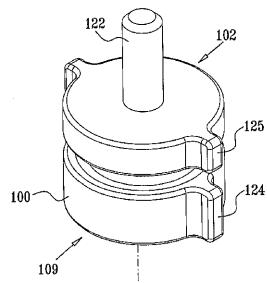


FIG. 4B

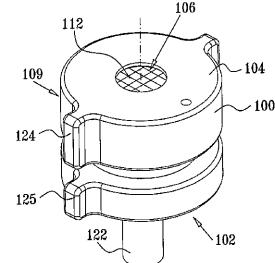


FIG. 5A

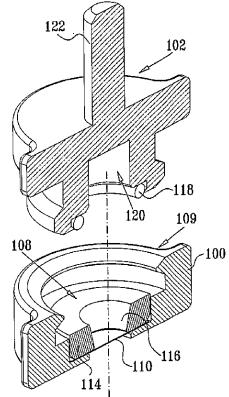


FIG. 5B

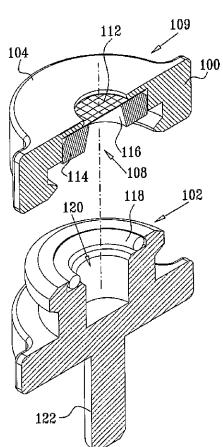
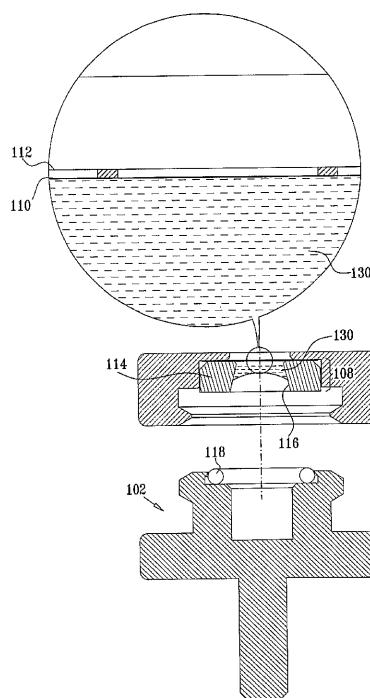
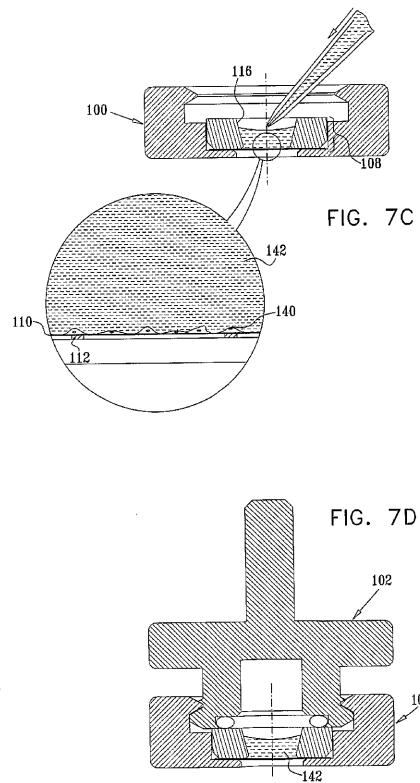
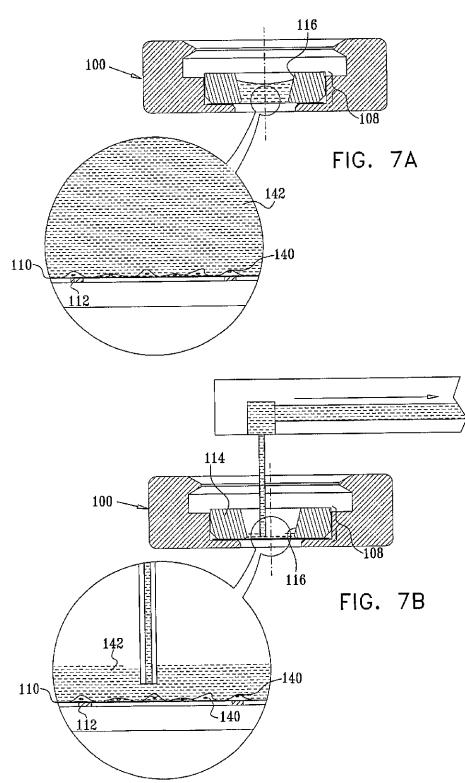
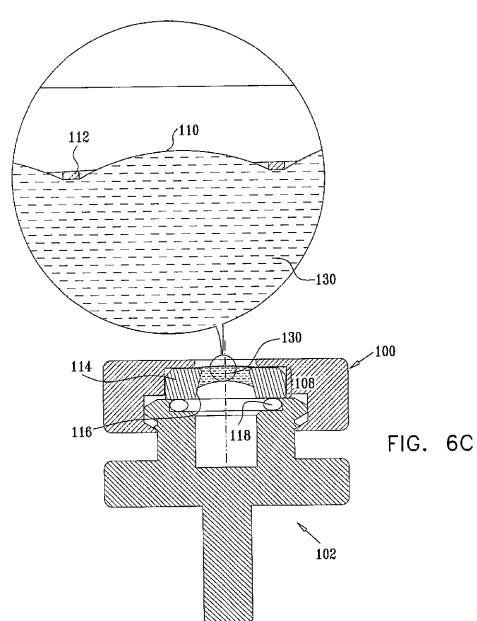
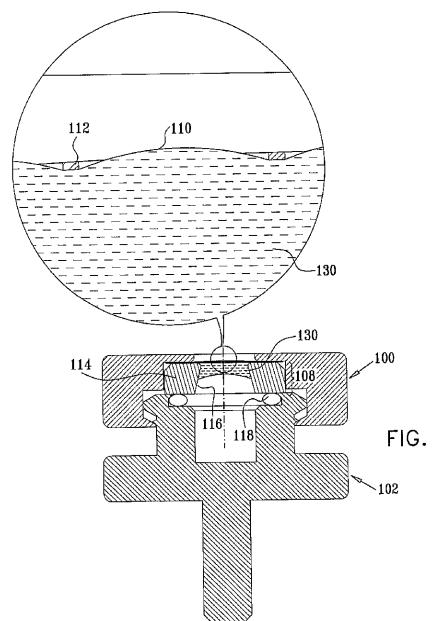
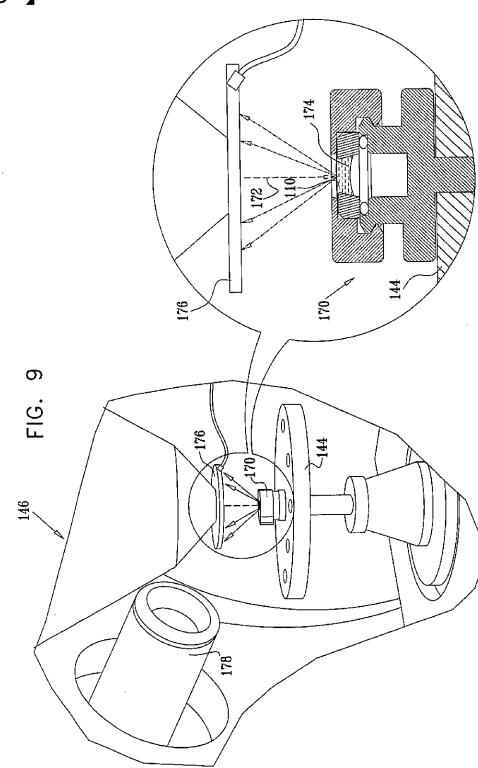
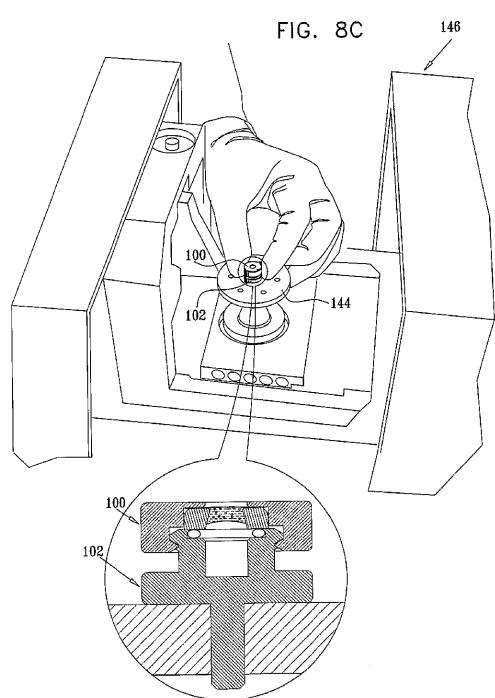
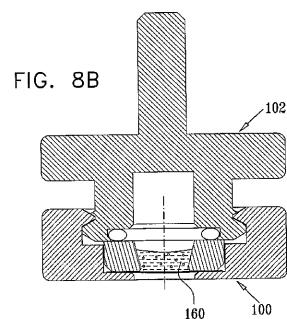
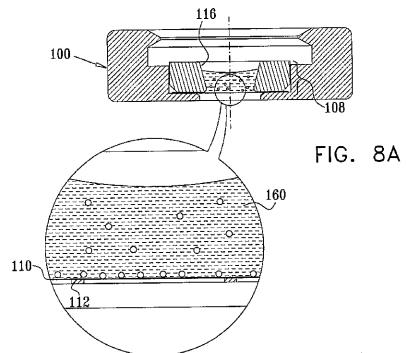
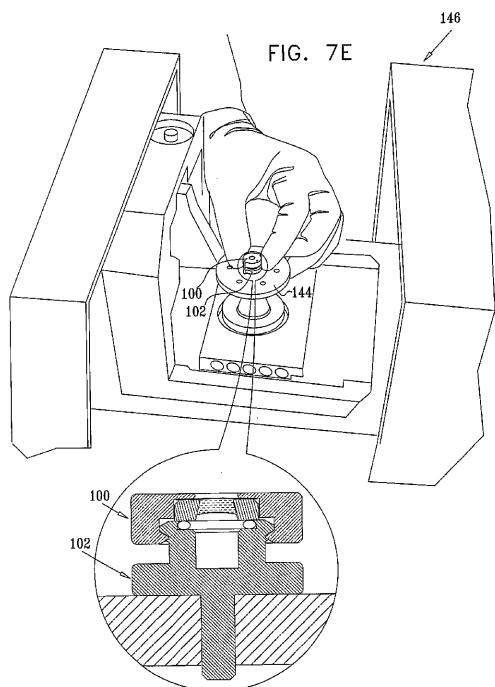


FIG. 6A







【図10】

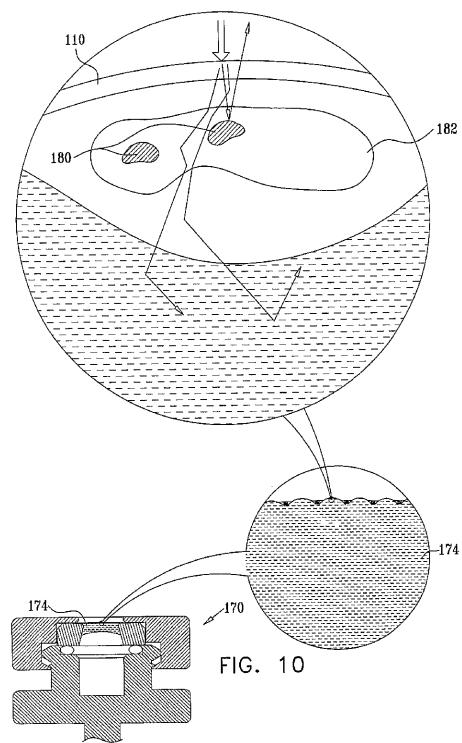


FIG. 11A

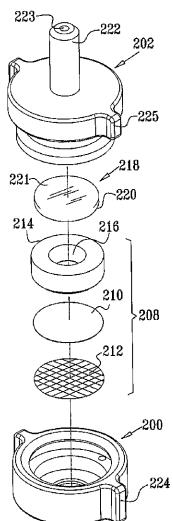


FIG. 11B

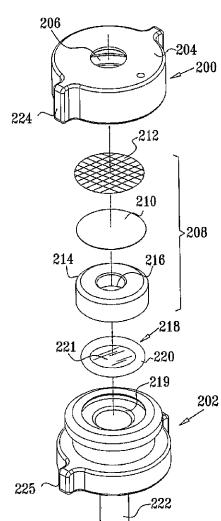


FIG. 12A

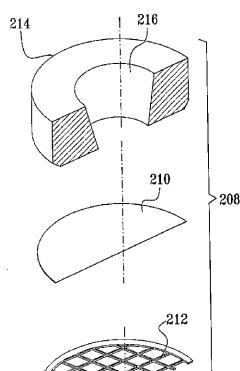


FIG. 12B

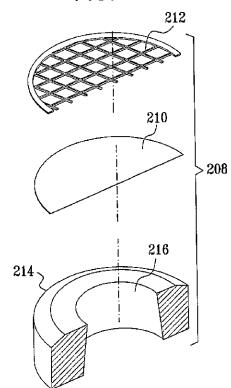


FIG. 13A

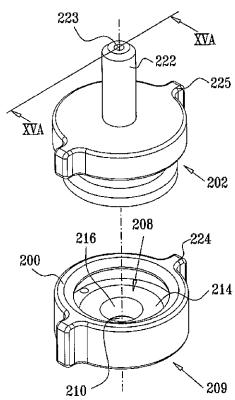
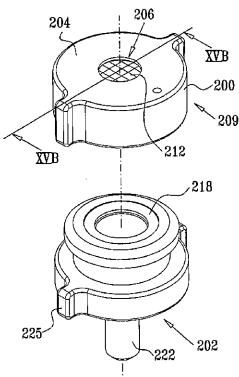
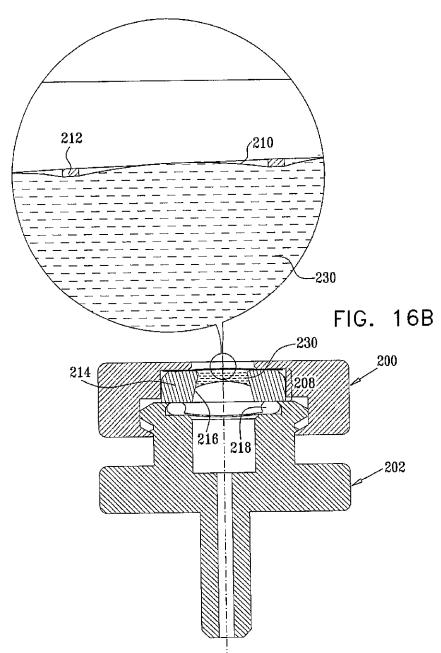
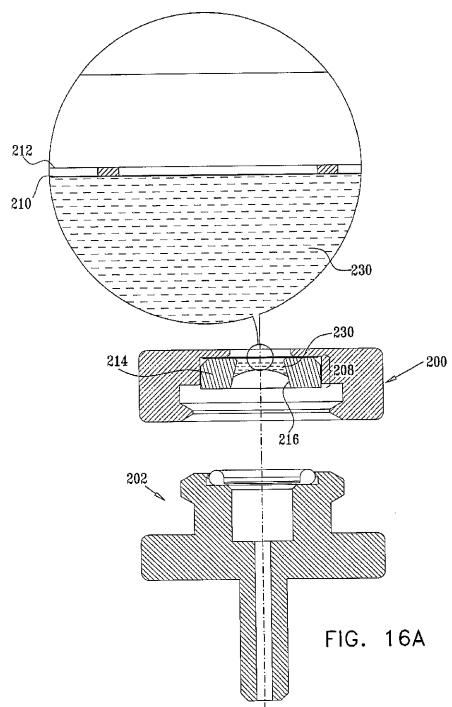
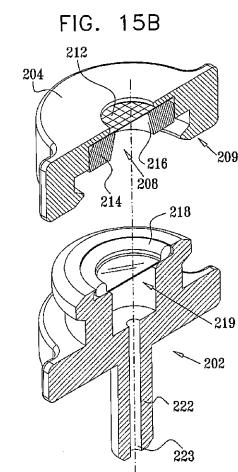
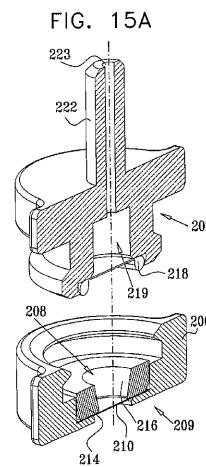
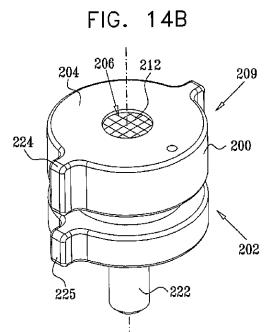
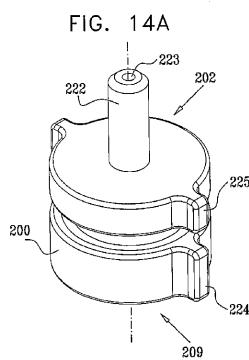
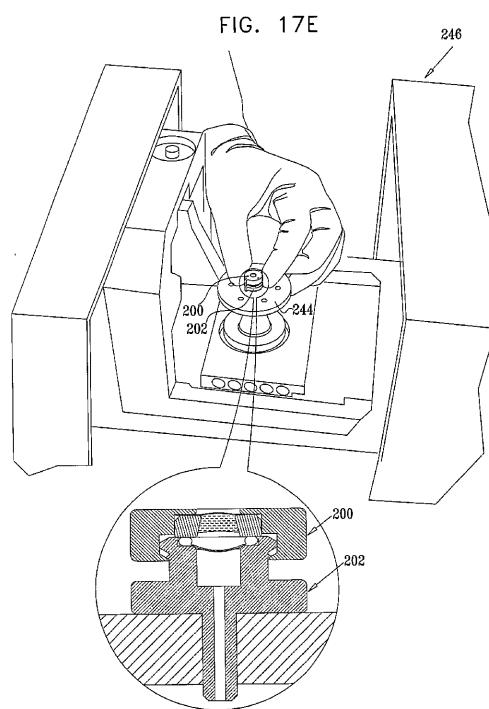
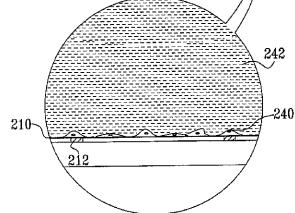
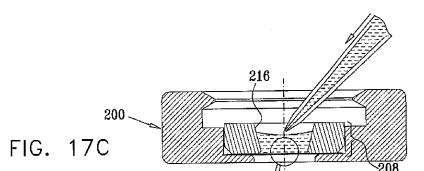
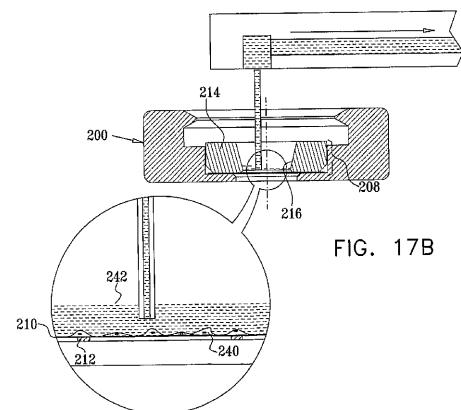
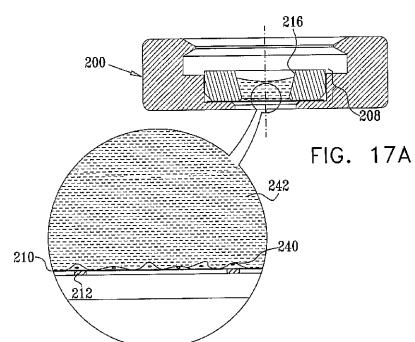
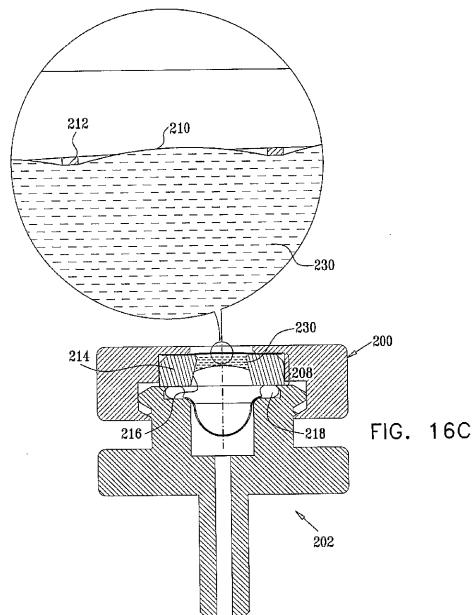
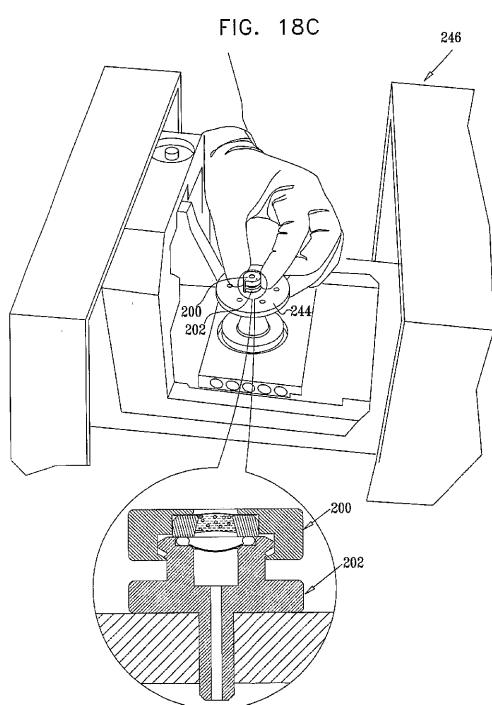
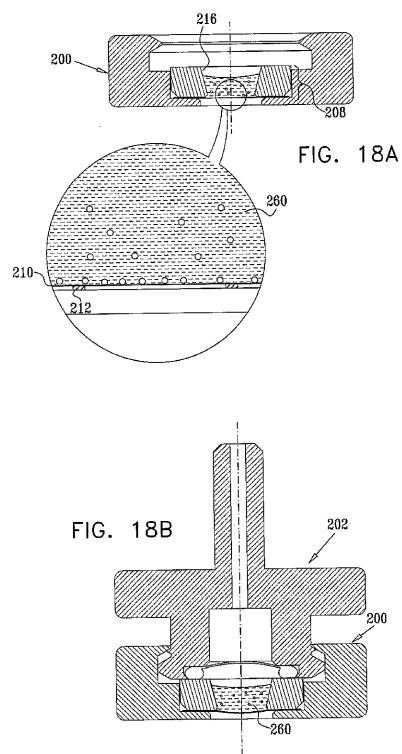


FIG. 13B

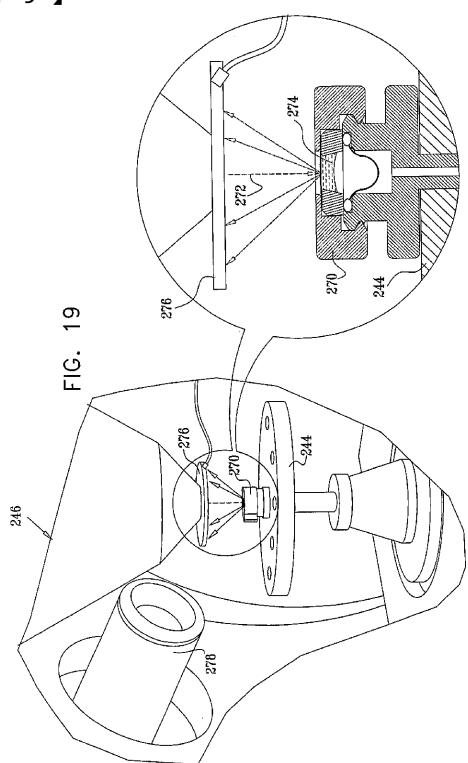




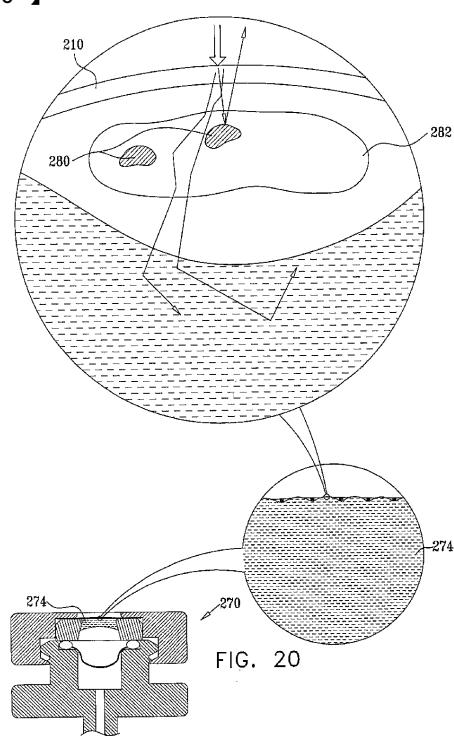


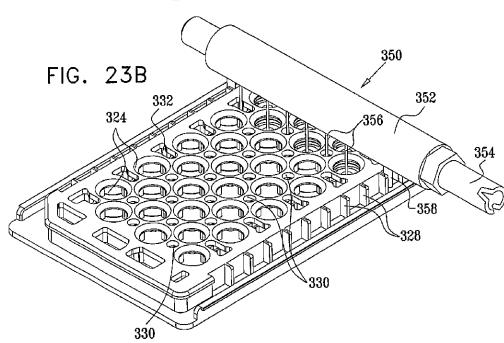
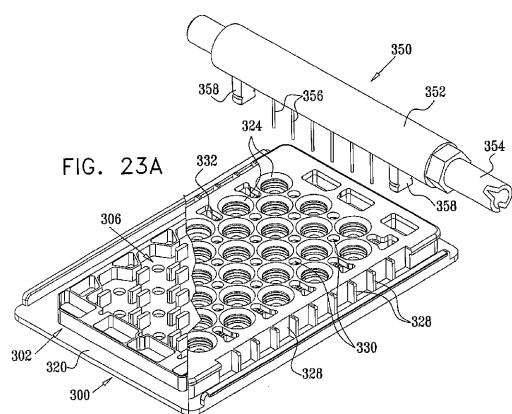
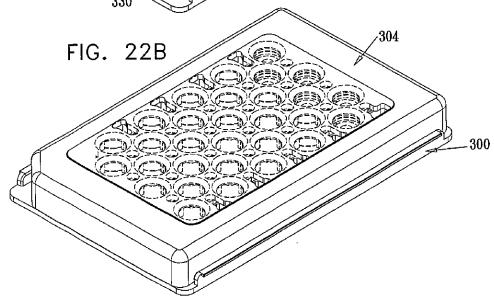
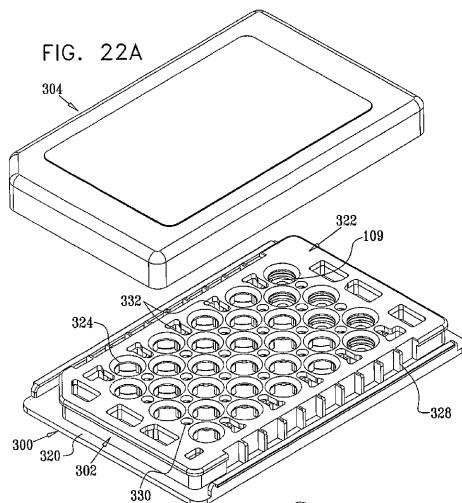
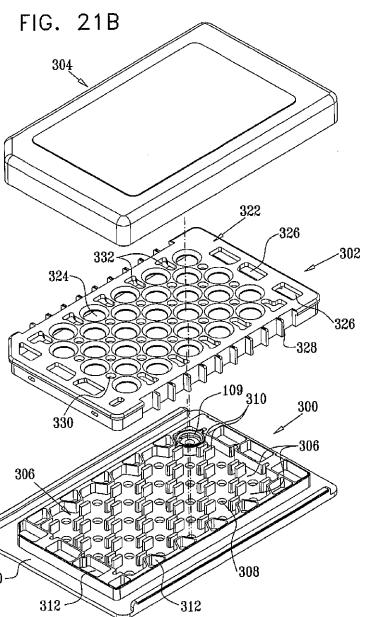
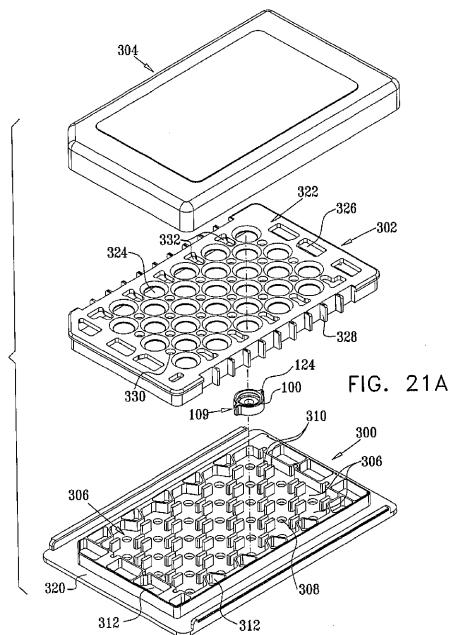


【図 19】



【図 20】





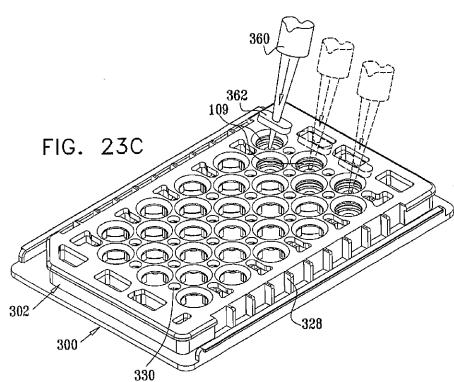


FIG. 24A

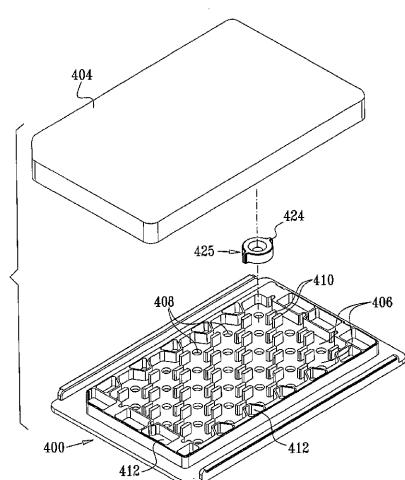
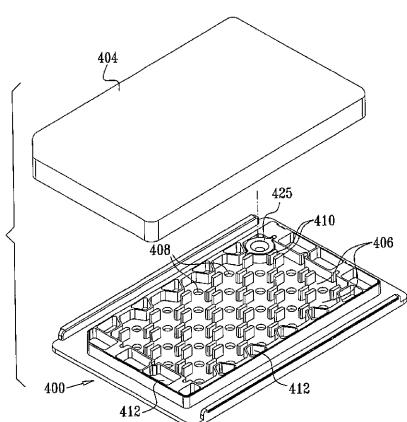


FIG. 24B



【図 24C】

FIG. 24C

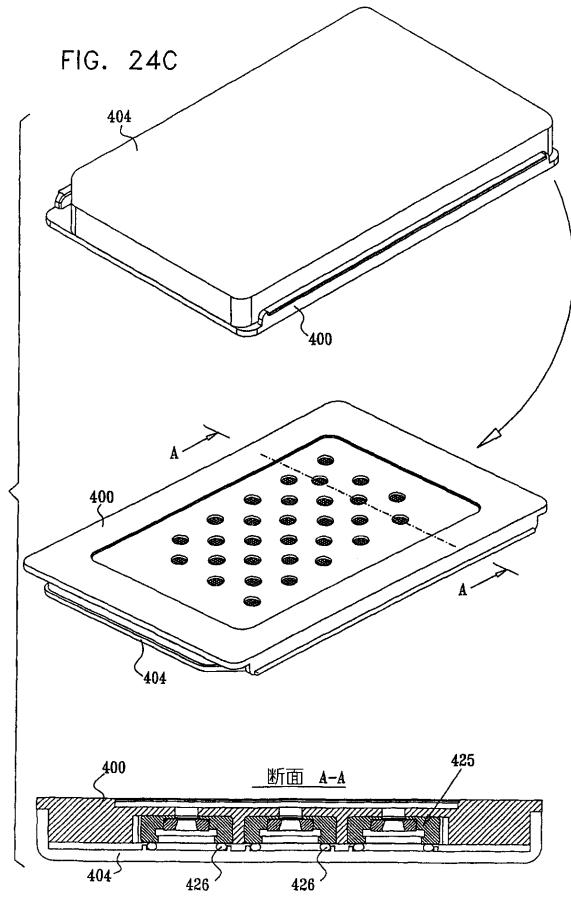


FIG. 25A

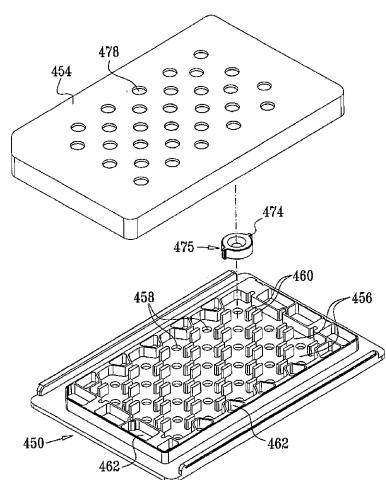
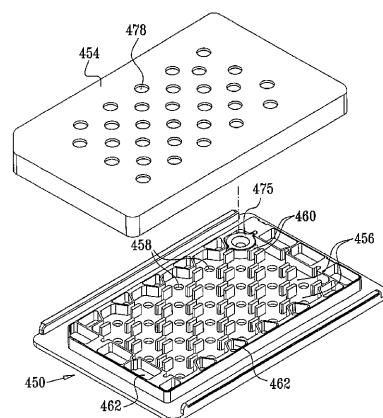


FIG. 25B



【図 25C】

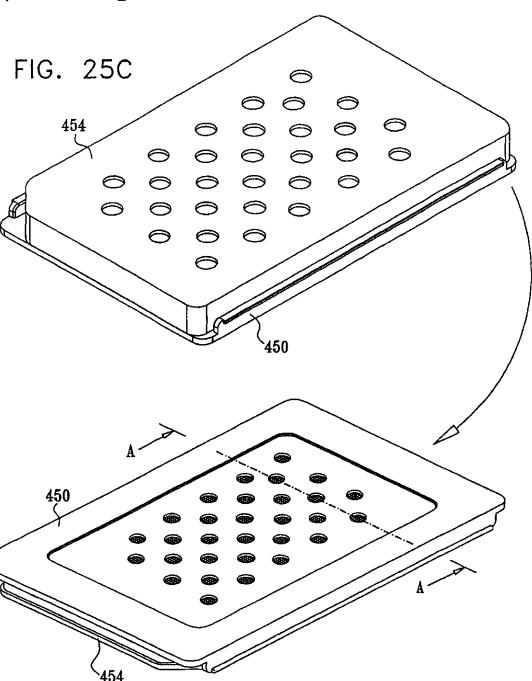
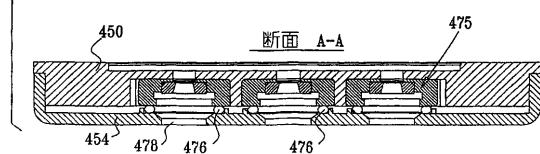
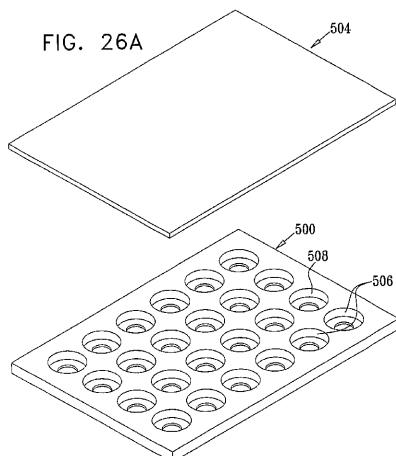
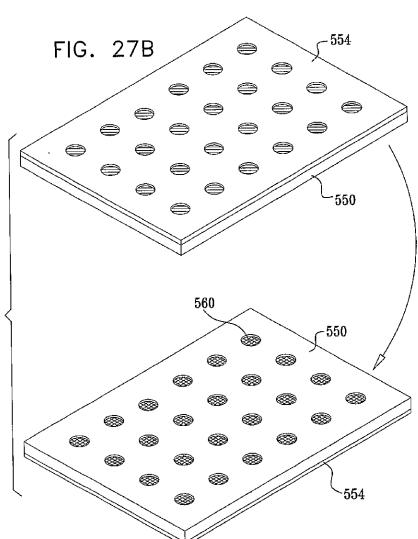
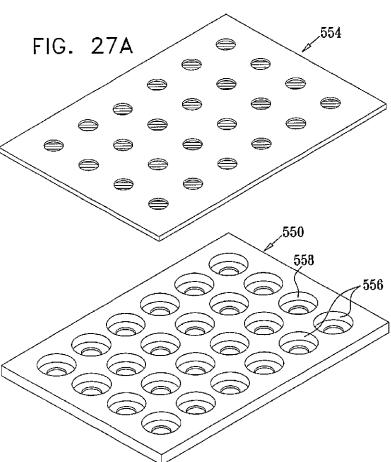
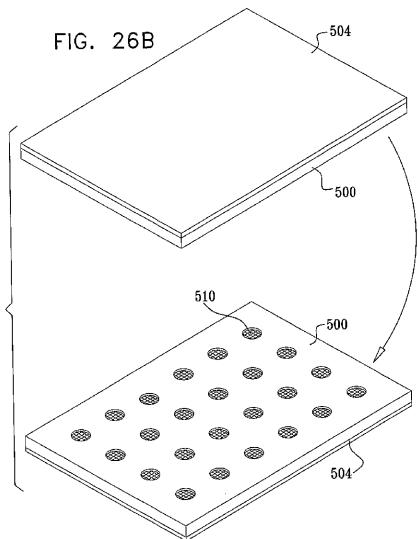
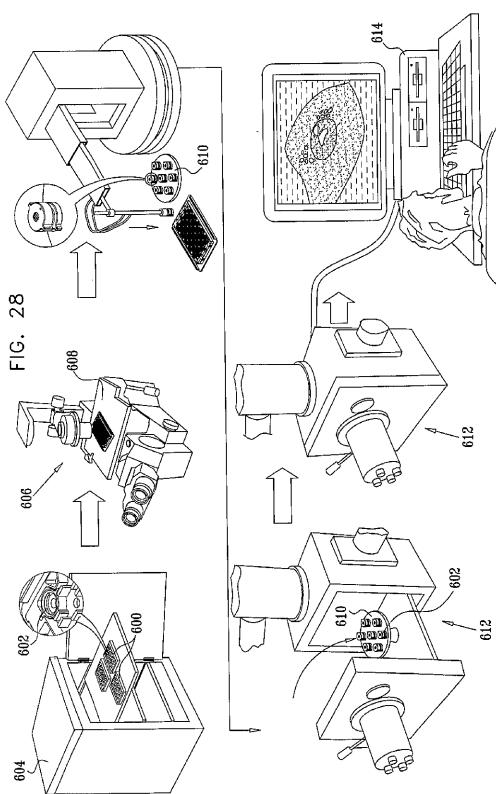


FIG. 26A

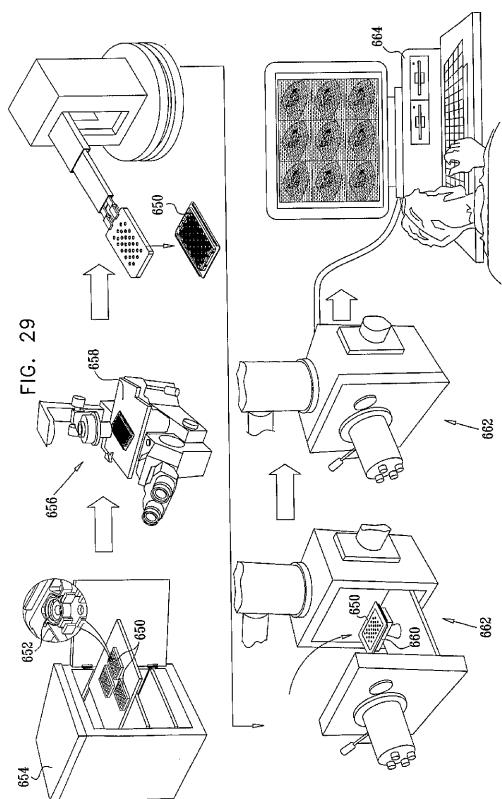




【図 28】



【図29】



【図30】

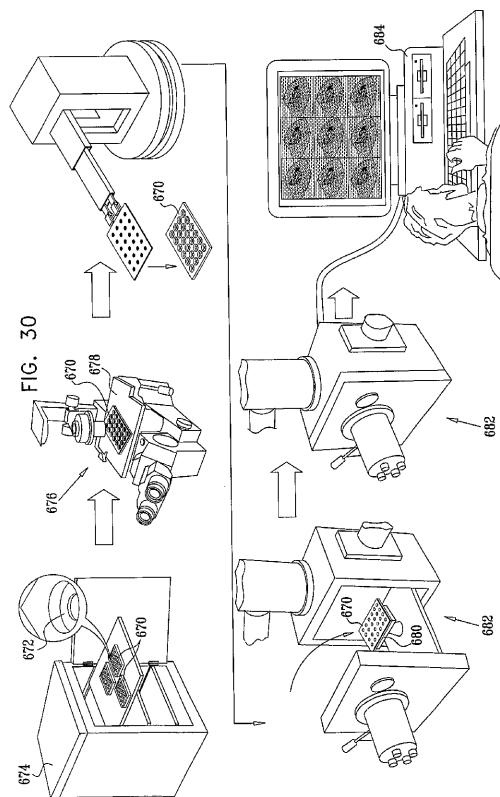


FIG. 31A

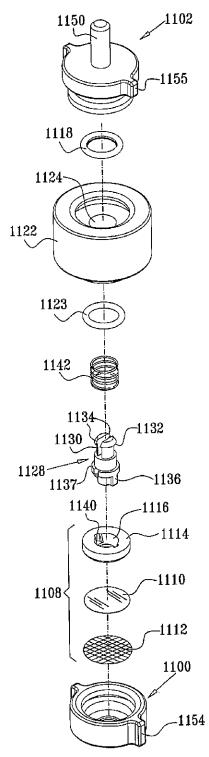


FIG. 31B

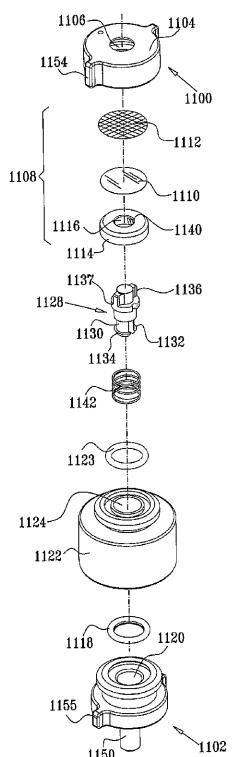


FIG. 32A

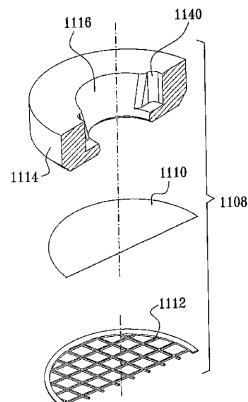


FIG. 32B

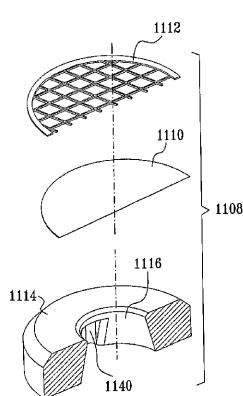


FIG. 33A

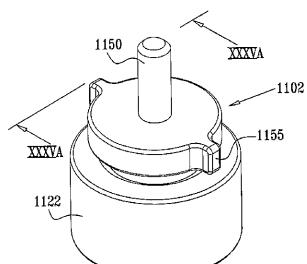


FIG. 33B

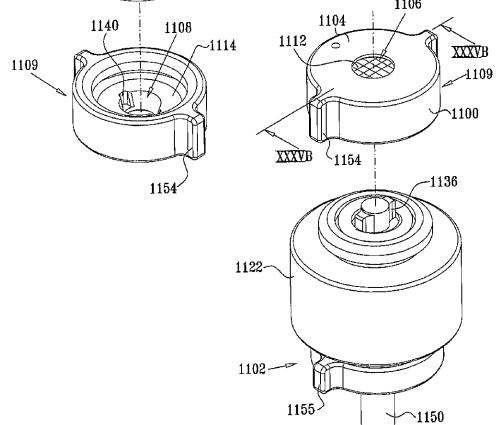


FIG. 34A

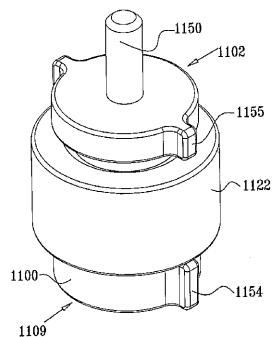


FIG. 34B

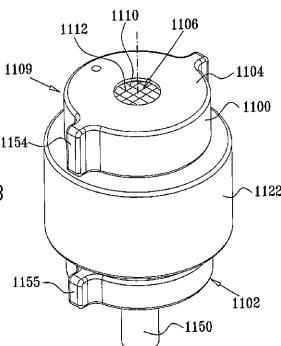


FIG. 35A

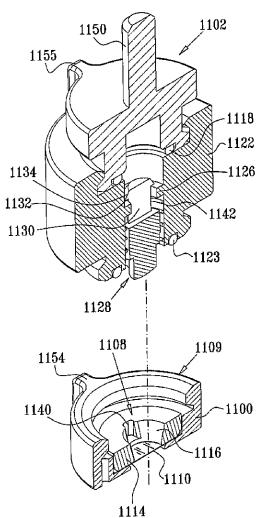


FIG. 35B

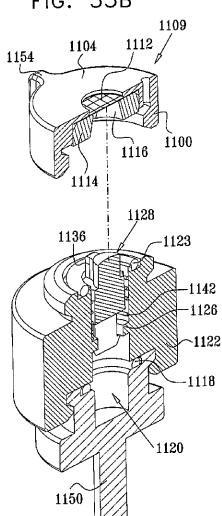
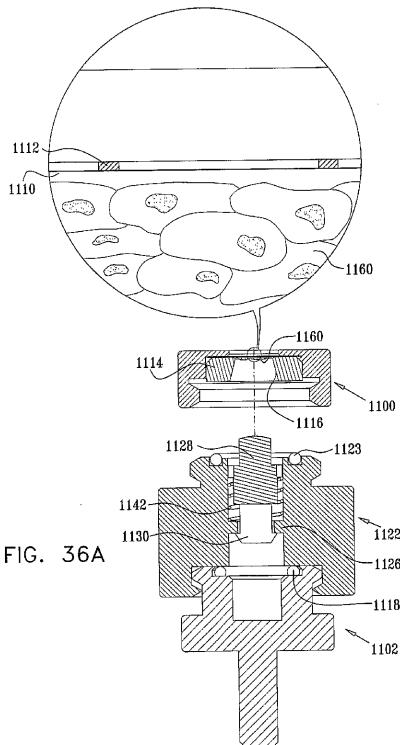
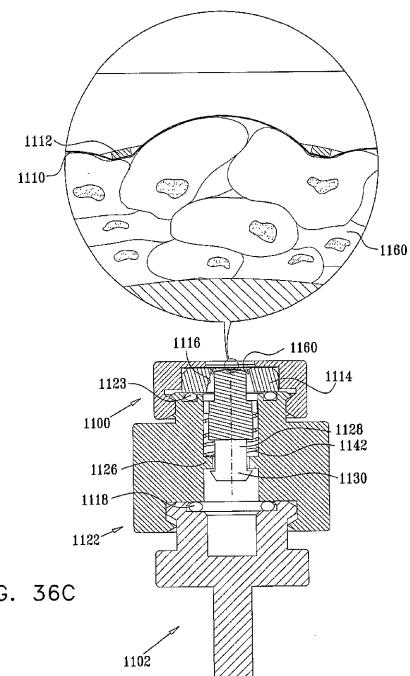
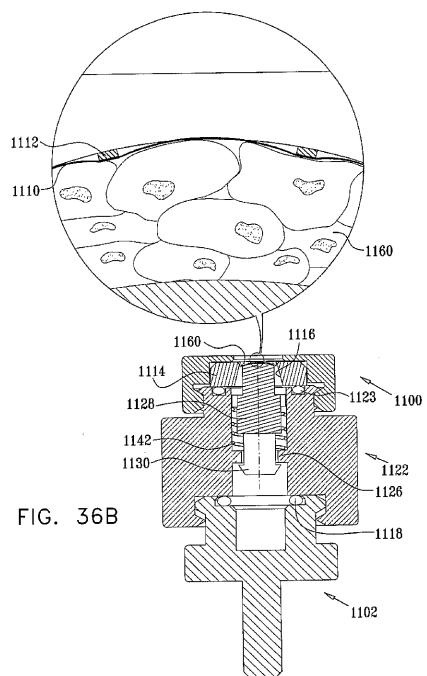
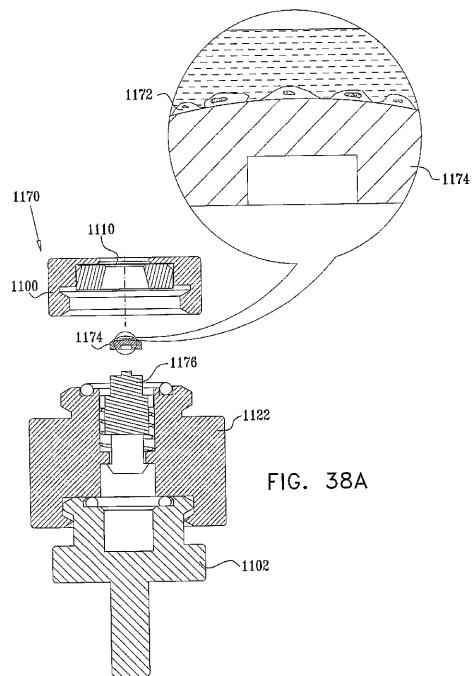
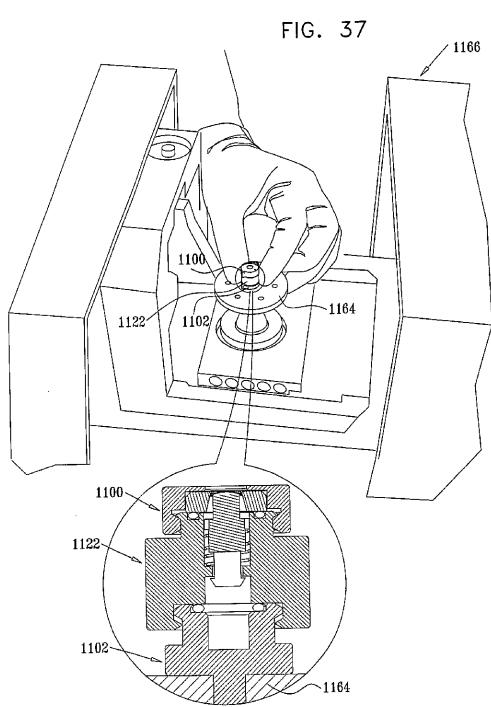


FIG. 36A





【図37】



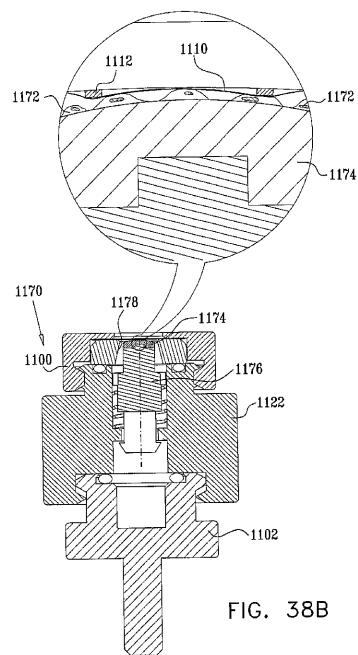


FIG. 38B

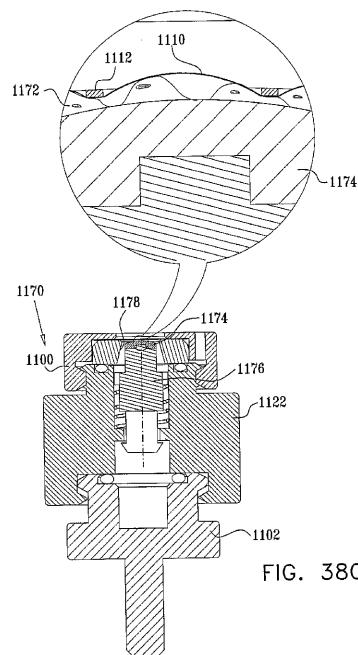


FIG. 38C

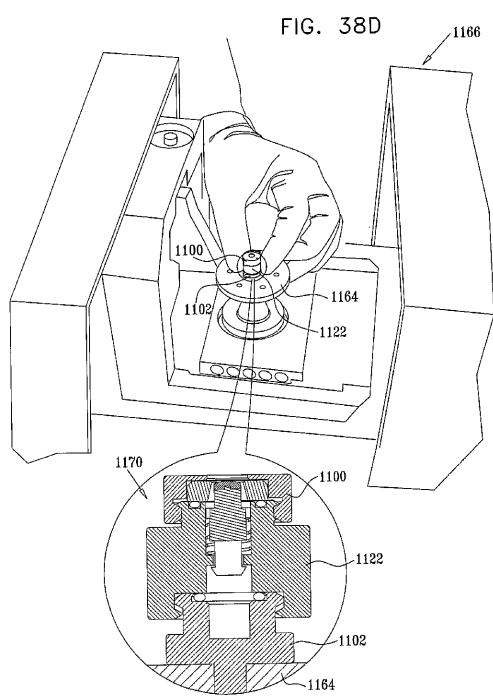


FIG. 38D

【図 39】

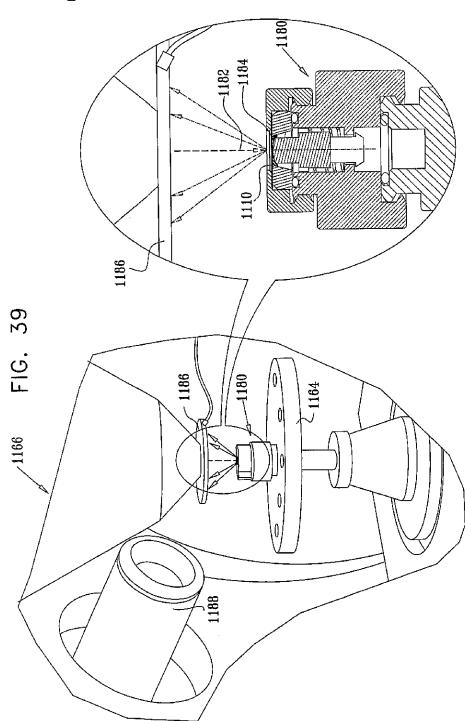


FIG. 39

【図40】

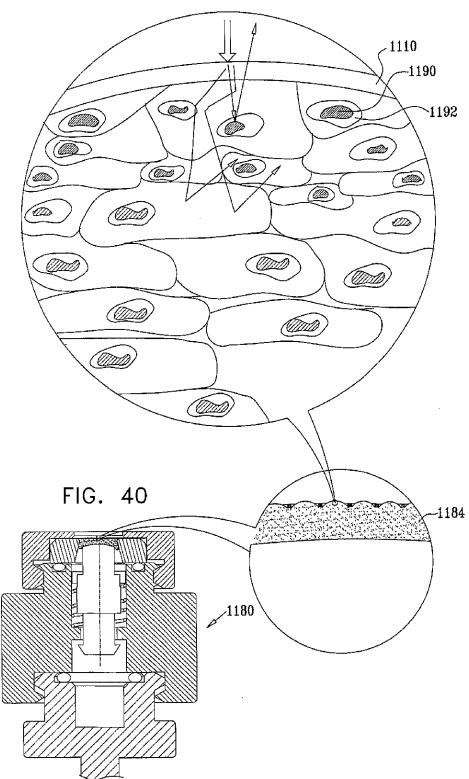


FIG. 41A

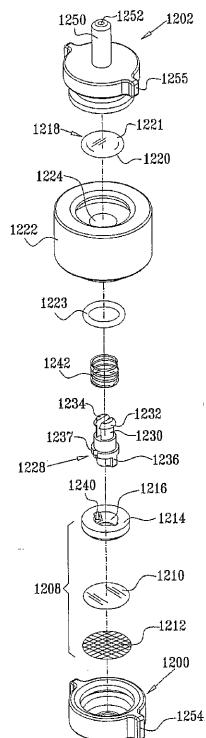


FIG. 41B

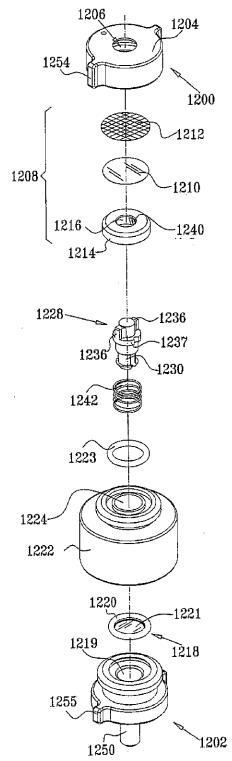


FIG. 42A

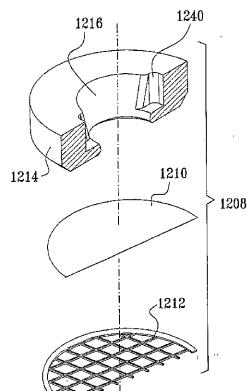


FIG. 42B

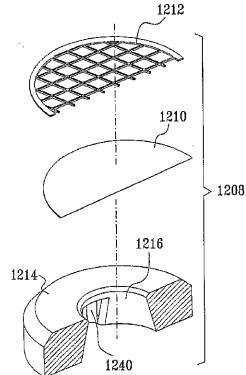


FIG. 43A

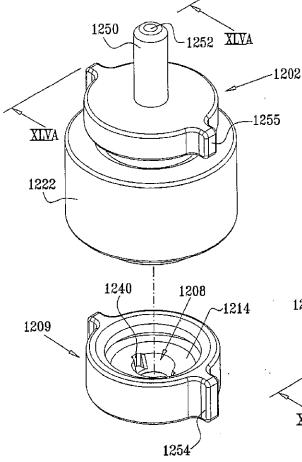
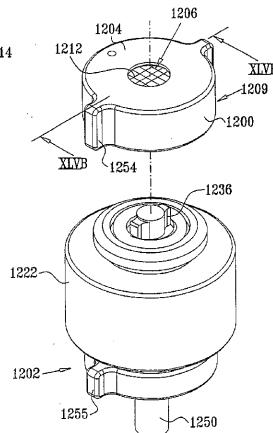


FIG. 43B



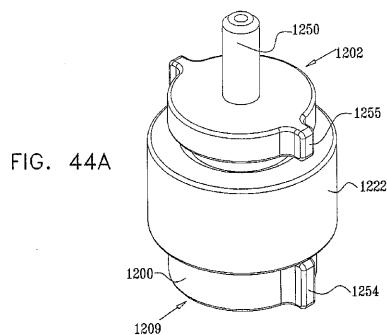


FIG. 44A

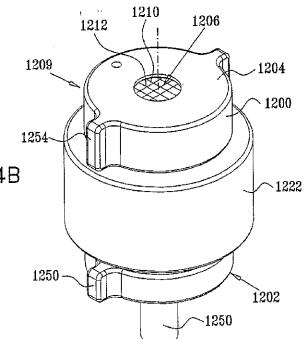


FIG. 44B

FIG. 45A

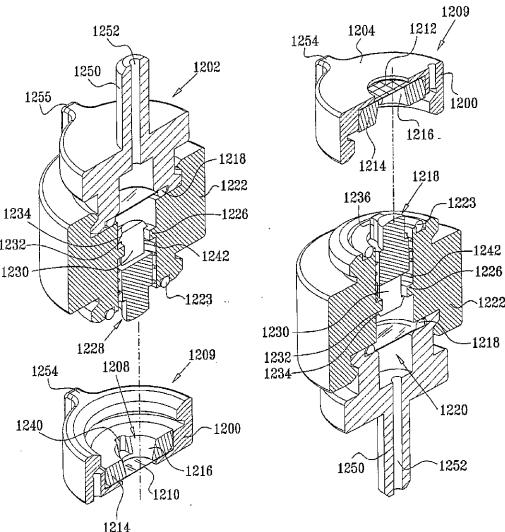


FIG. 45B

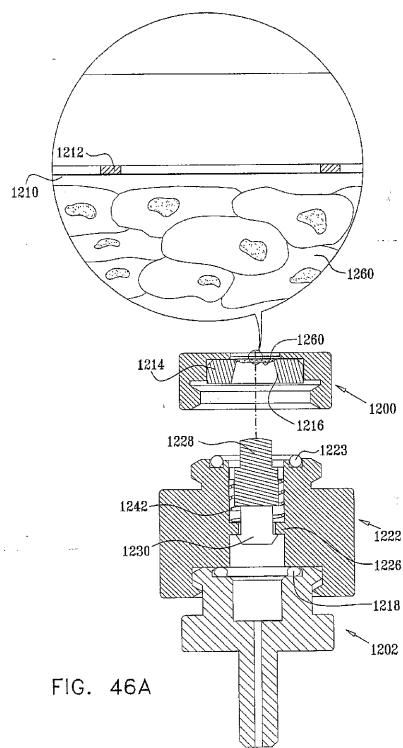
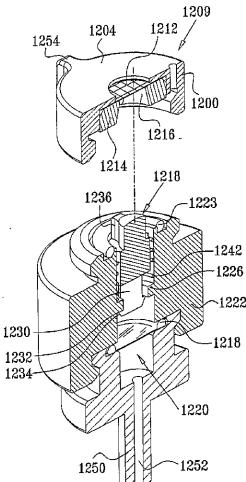


FIG. 46A

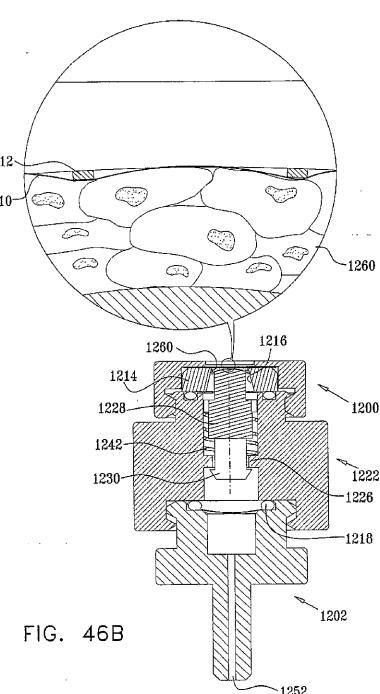
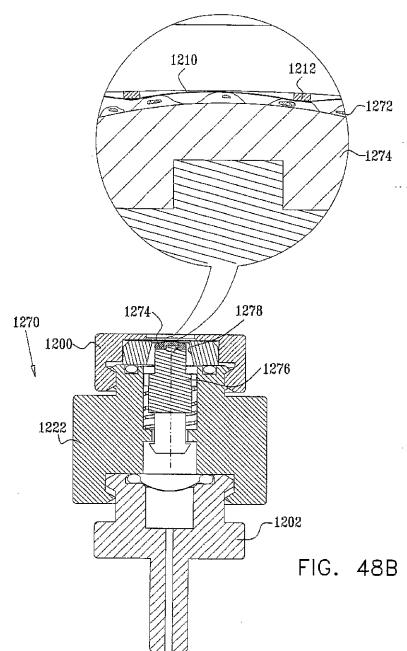
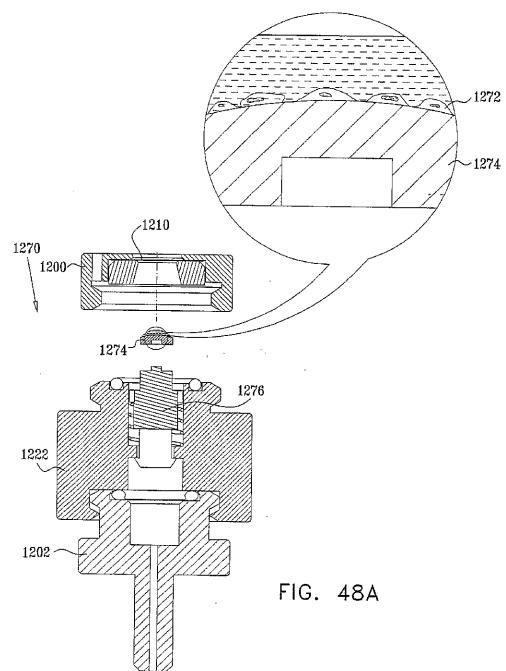
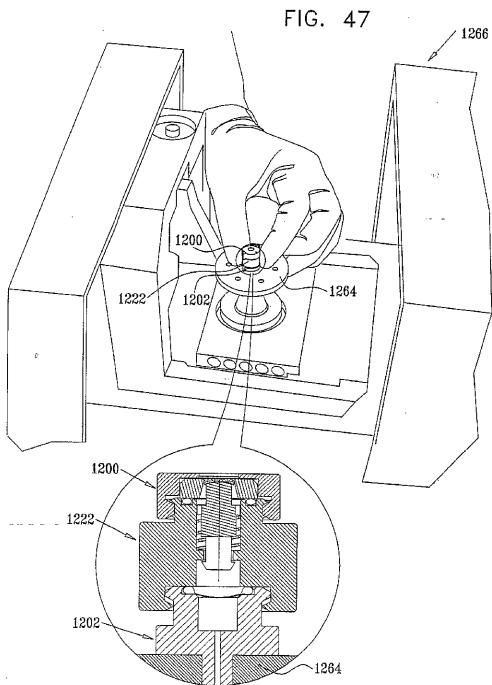
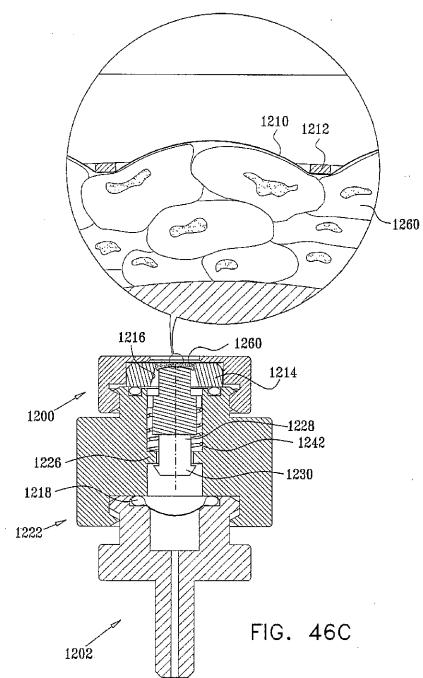
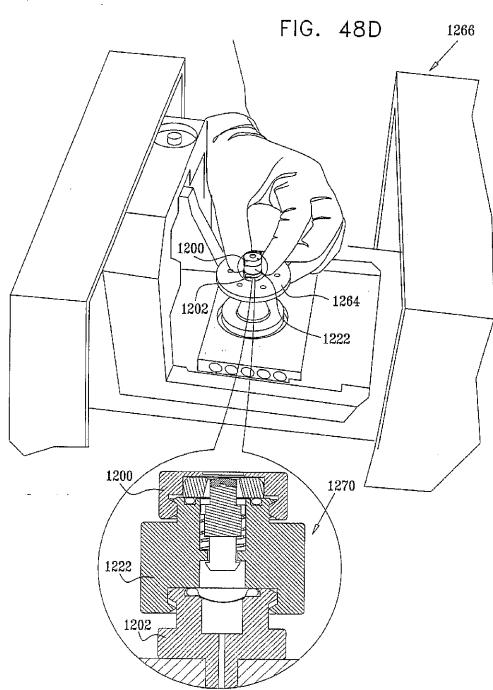
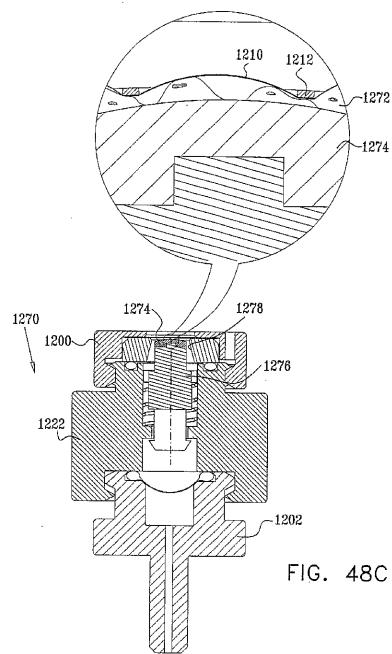


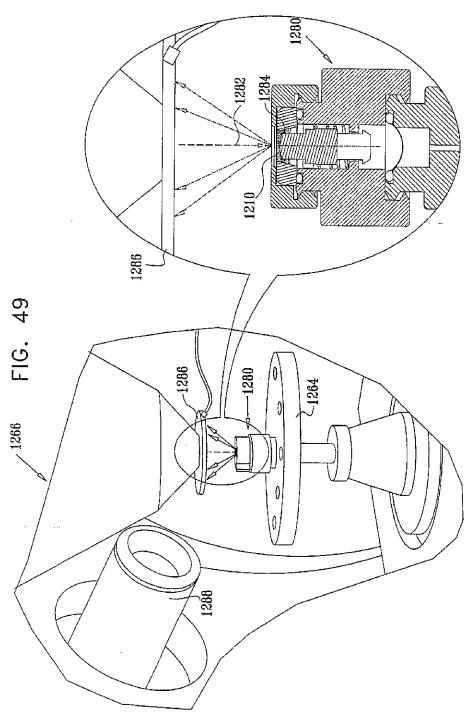
FIG. 46B

【図47】





【図 49】



【図 50】

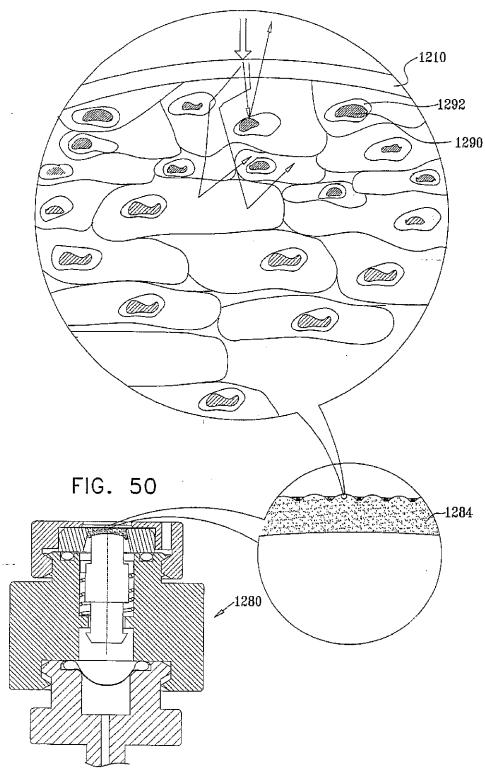


FIG. 51A

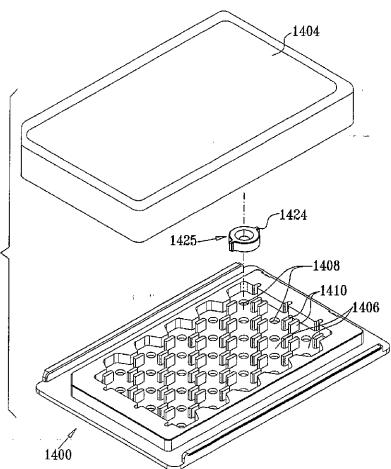
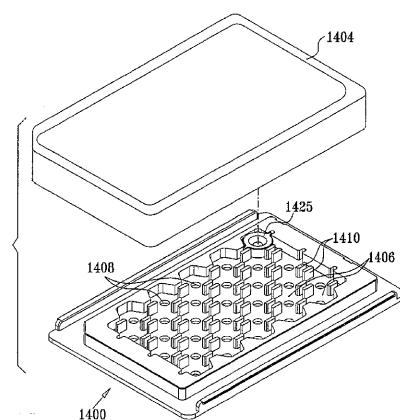


FIG. 51B



【図 51C】

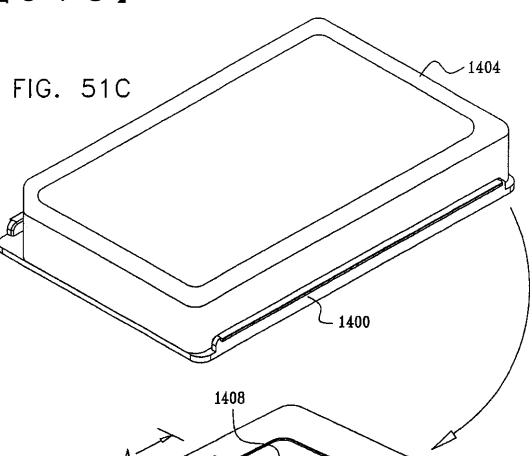
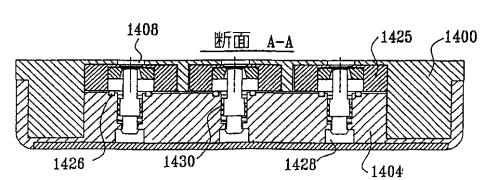
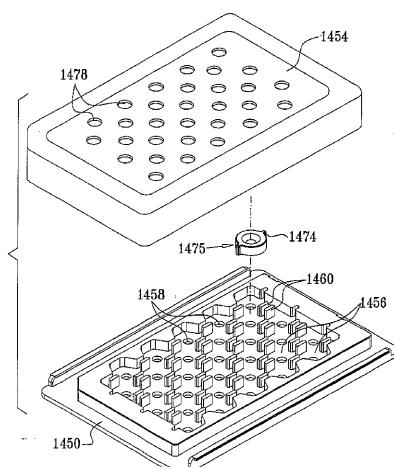


FIG. 52A



【図 5 2 C】

FIG. 52B

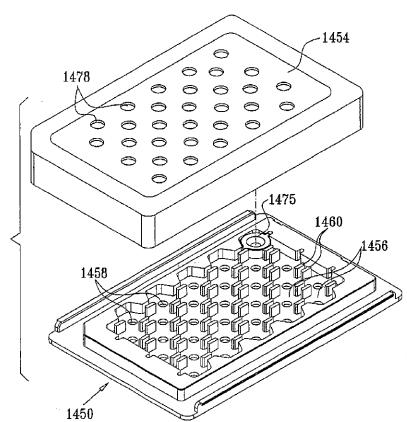


FIG. 52C

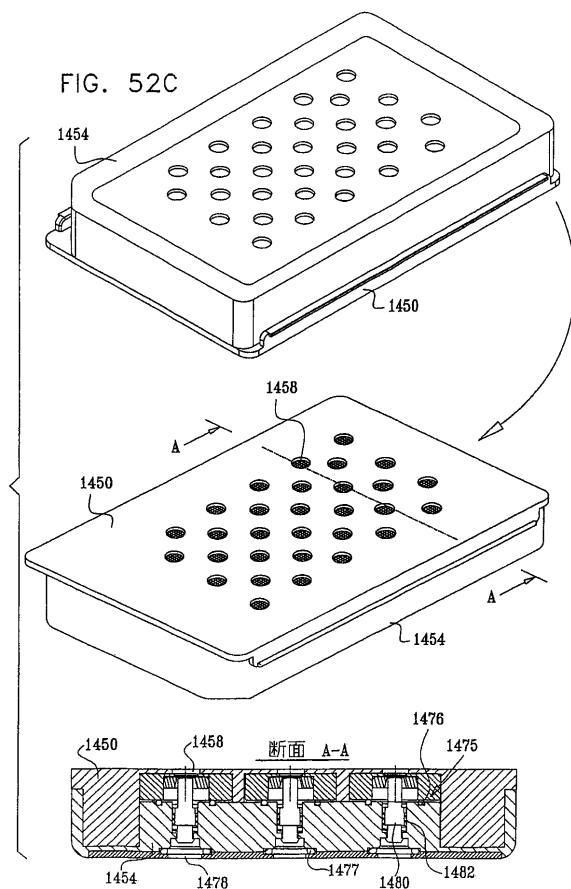
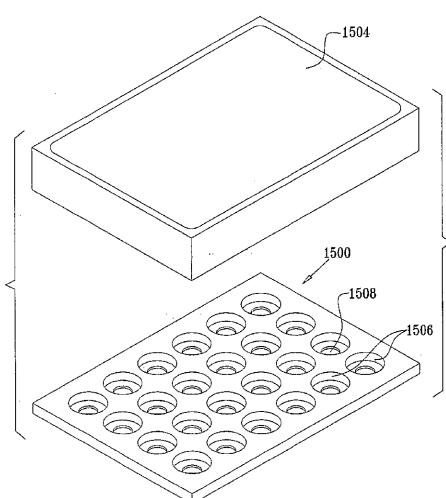


FIG. 53A



【図 5 3 B】

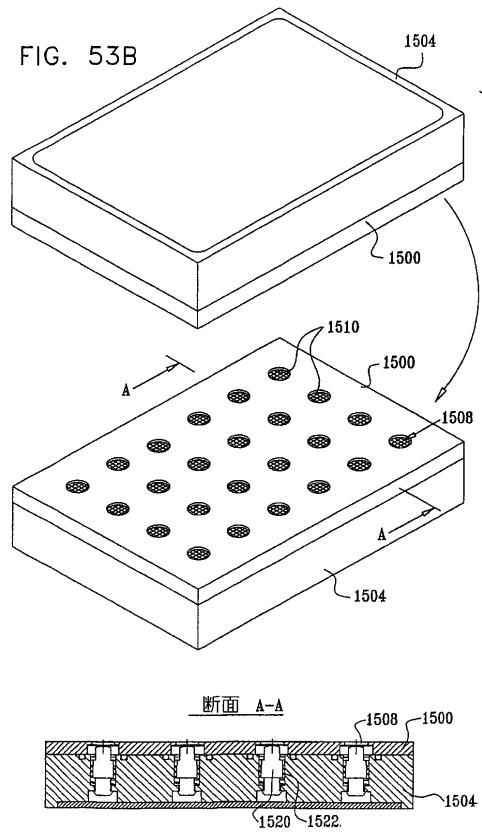
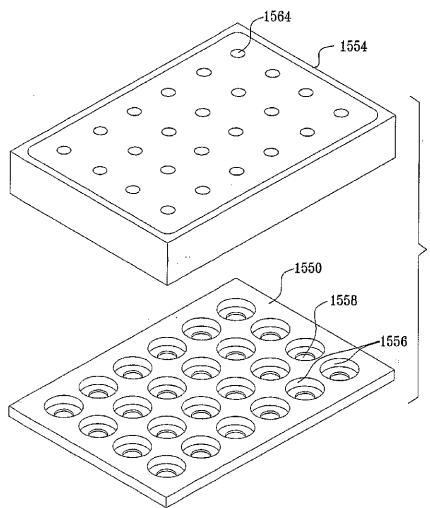
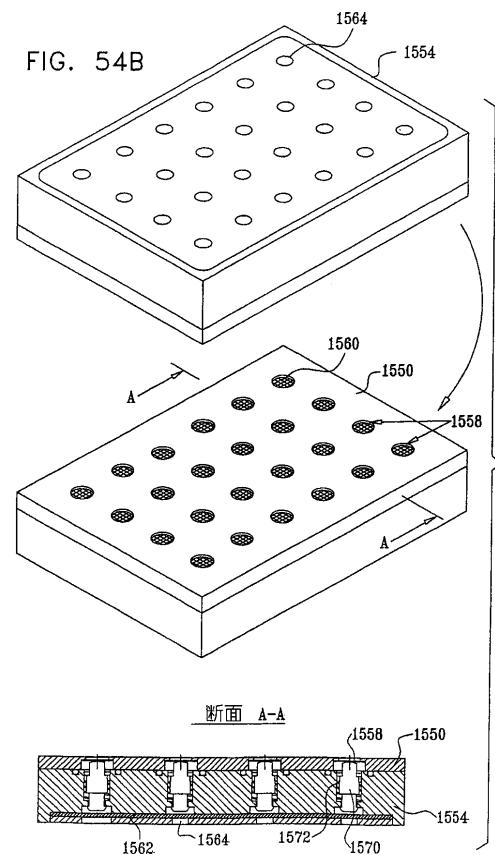


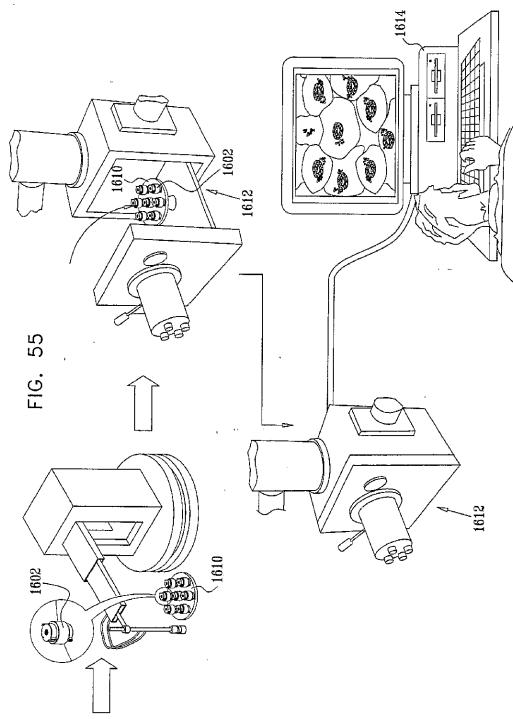
FIG. 54A



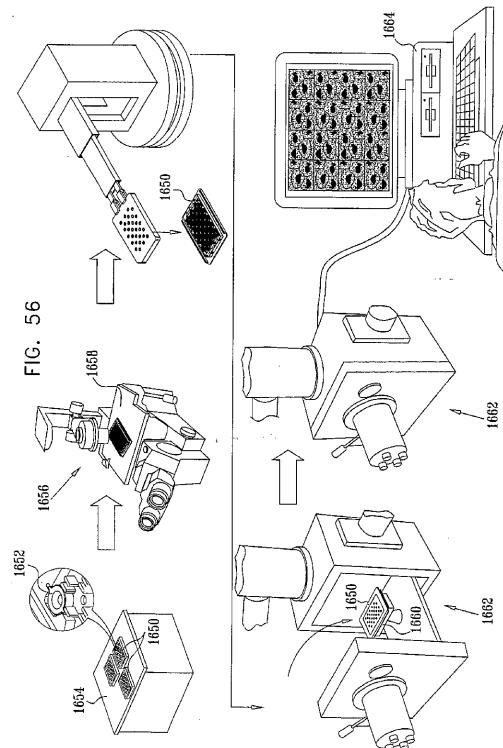
【図 54B】



【図 55】



【図 56】



【図57】

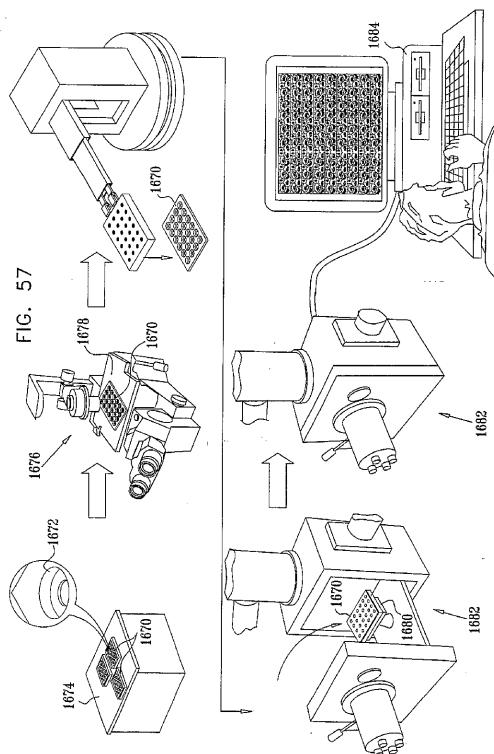


FIG. 57

FIG. 58A

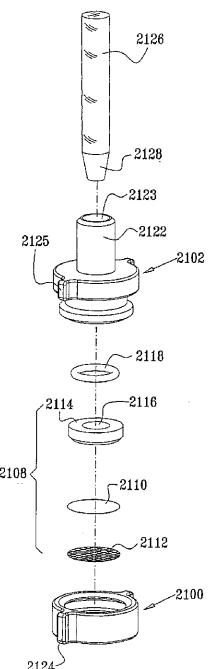


FIG. 58B

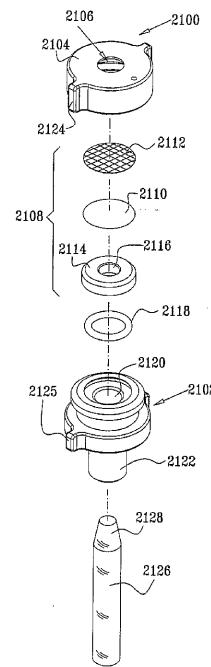


FIG. 59A

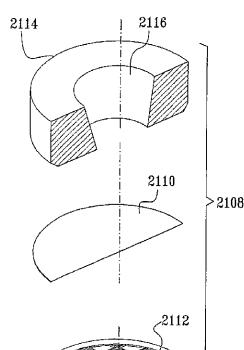


FIG. 59B

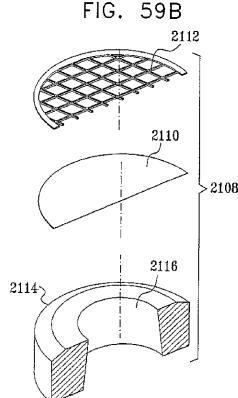


FIG. 60A

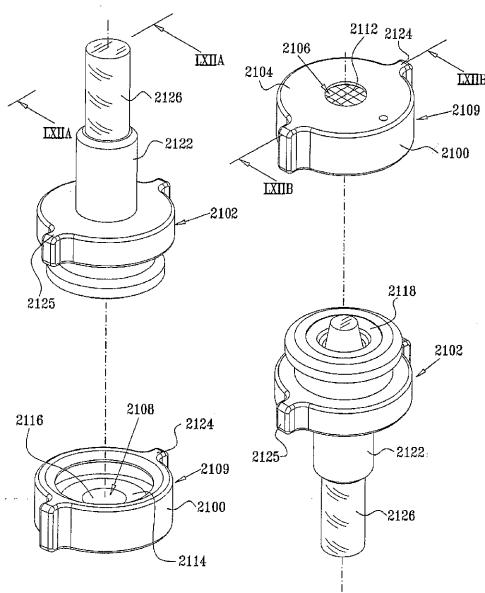
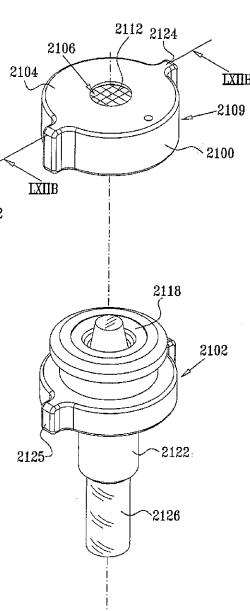


FIG. 60B



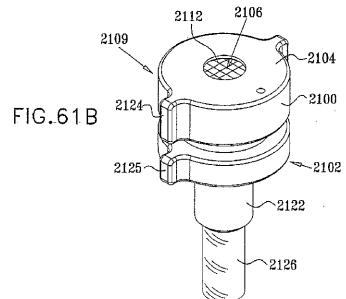
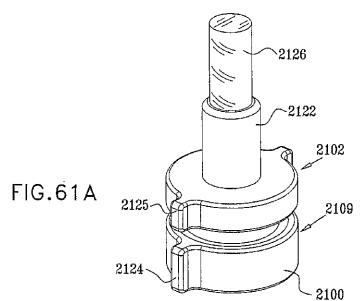


FIG. 62A

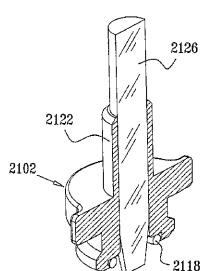
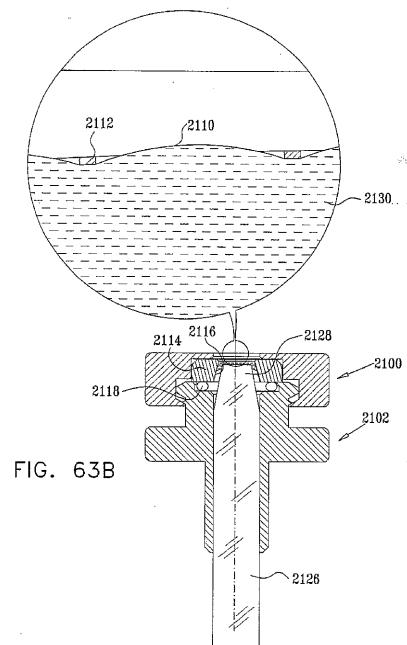
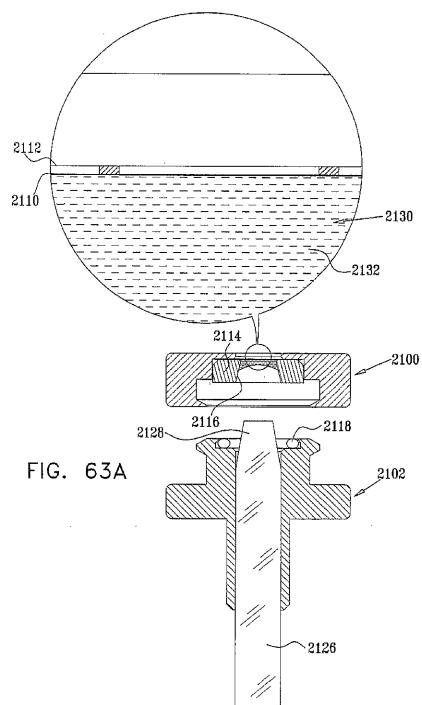
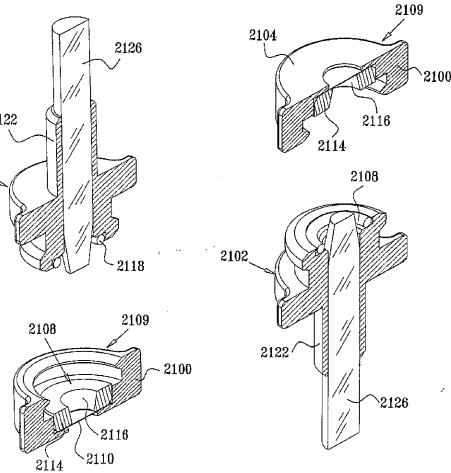


FIG. 62B



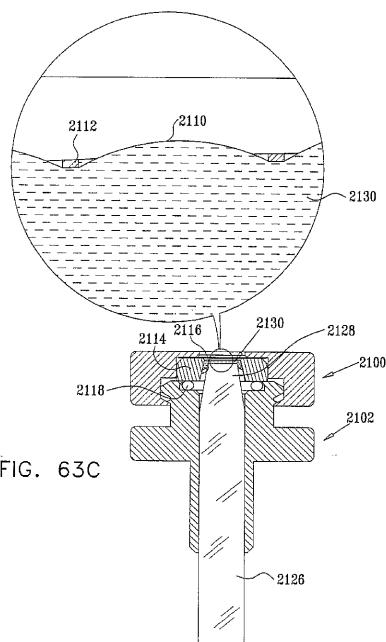


FIG. 63C

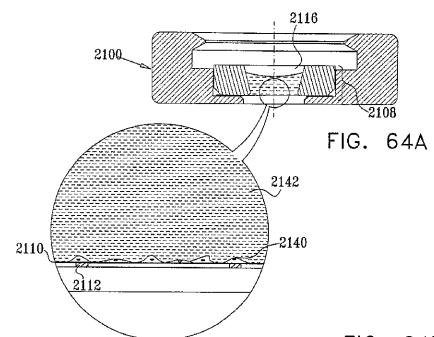


FIG. 64A

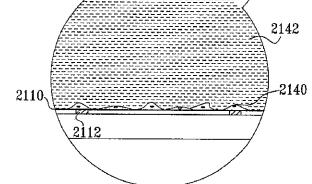


FIG. 64B

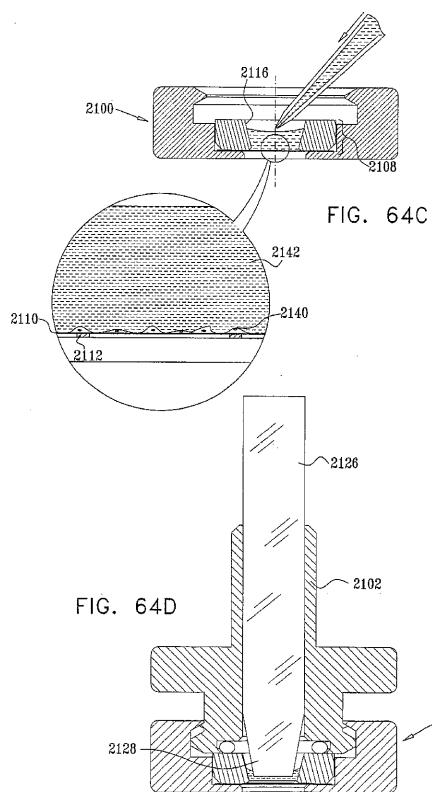
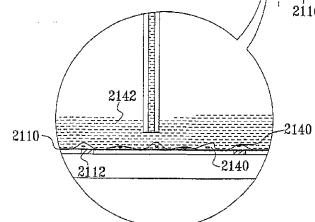
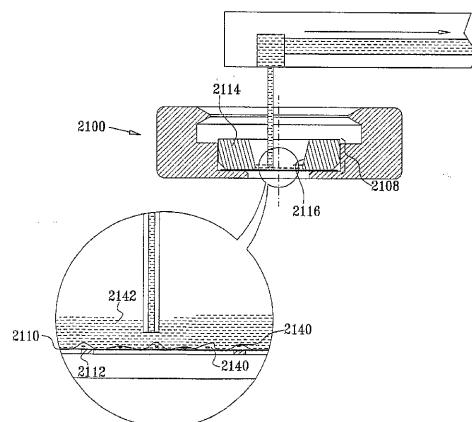


FIG. 64D

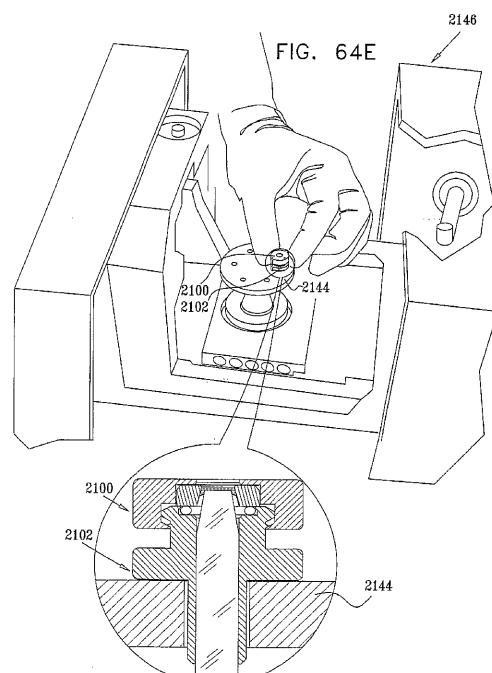
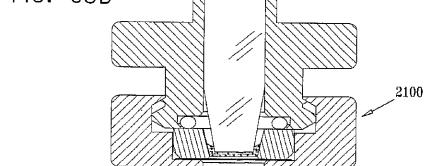
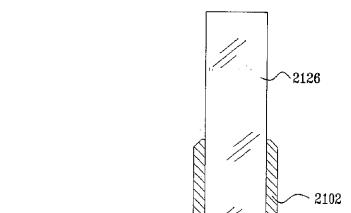
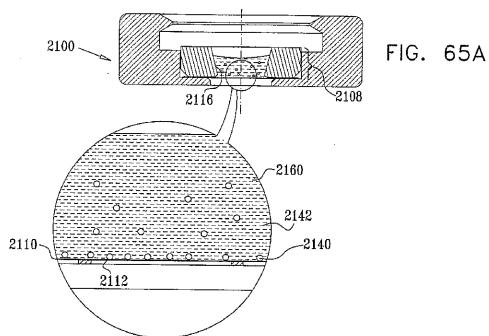
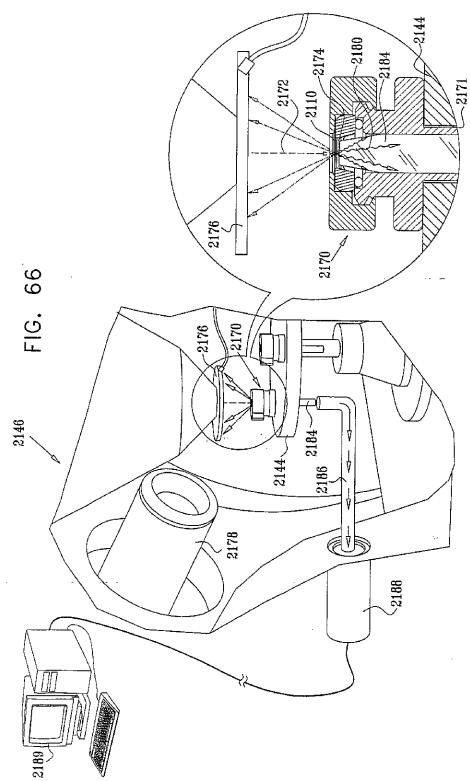


FIG. 64E



【図 6 6】



【図 6 7】

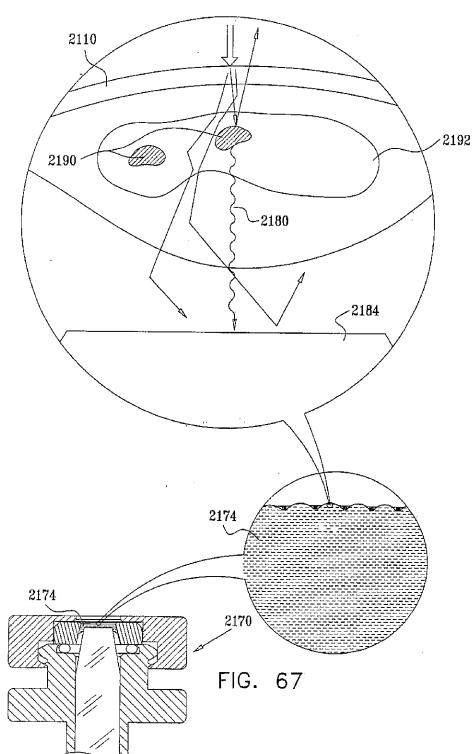


FIG. 68A

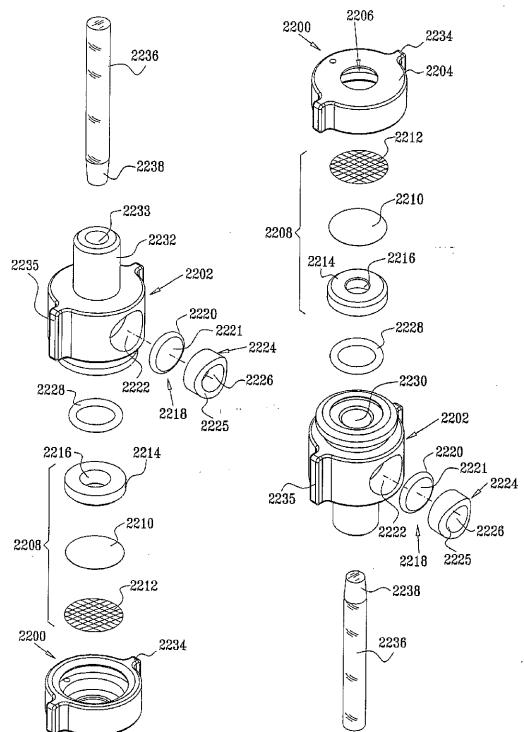


FIG. 68B

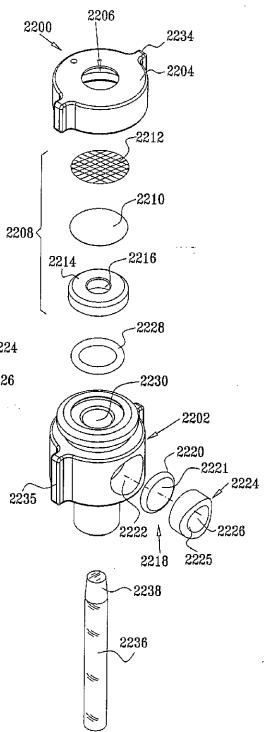


FIG. 69A

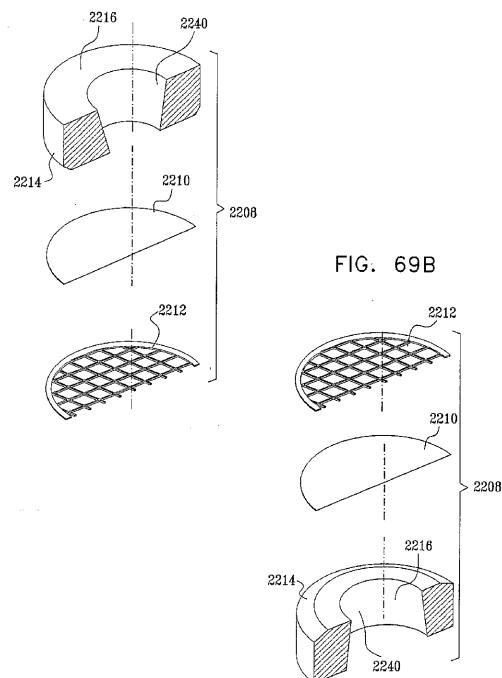


FIG. 70A

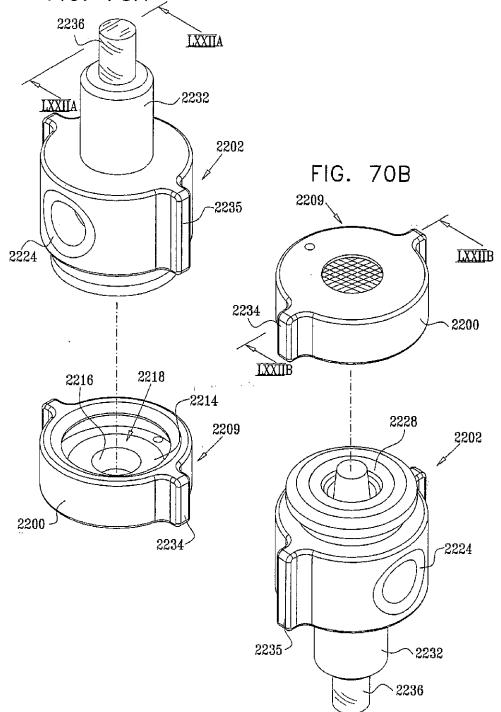


FIG. 70B

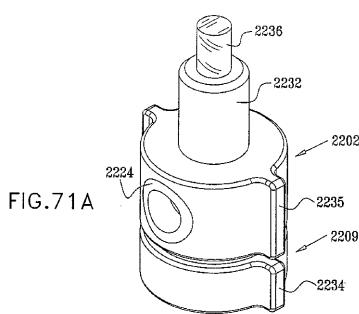


FIG. 71A

FIG. 72A

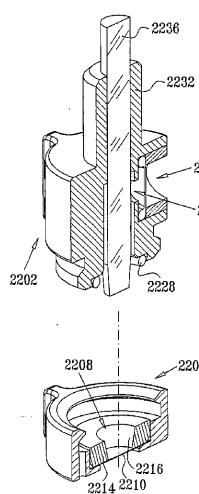


FIG. 72B

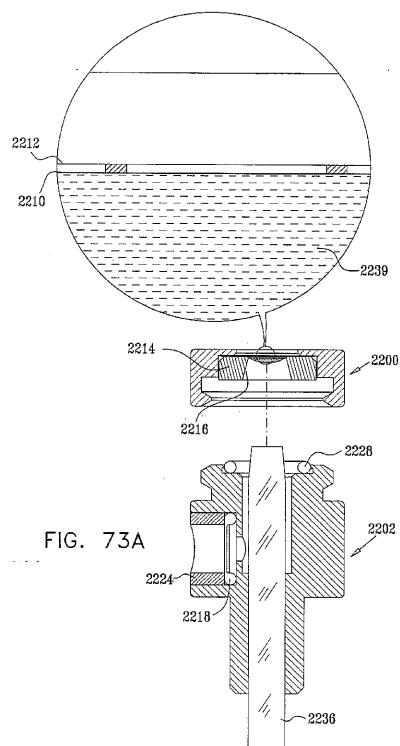
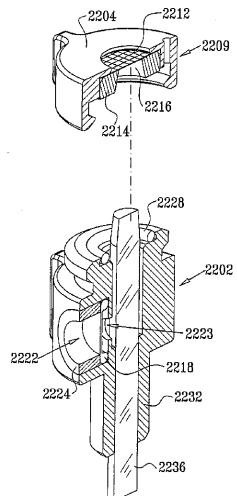


FIG. 73A

FIG. 73B

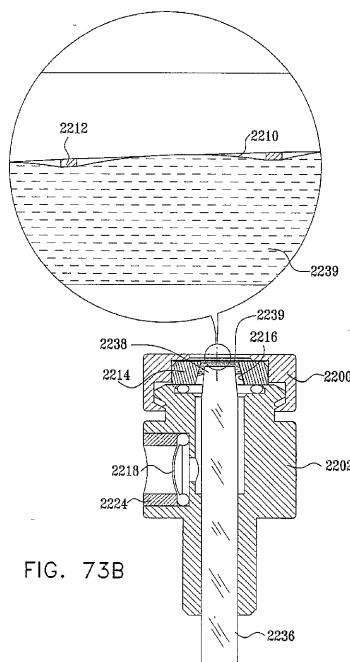
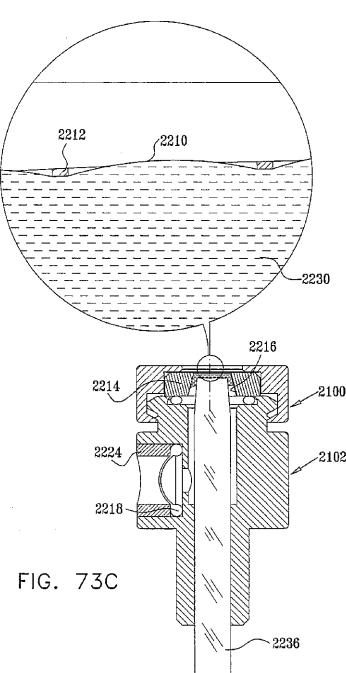
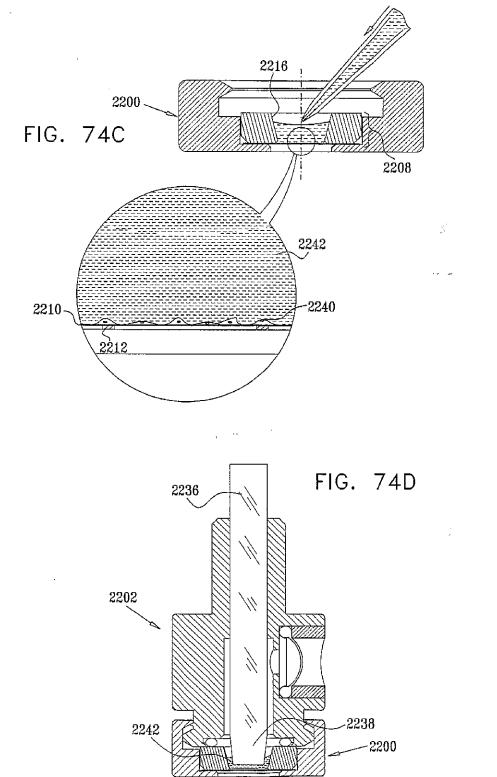
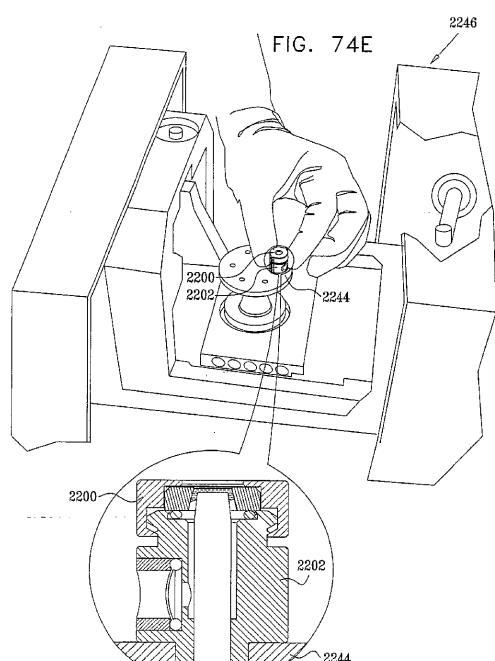
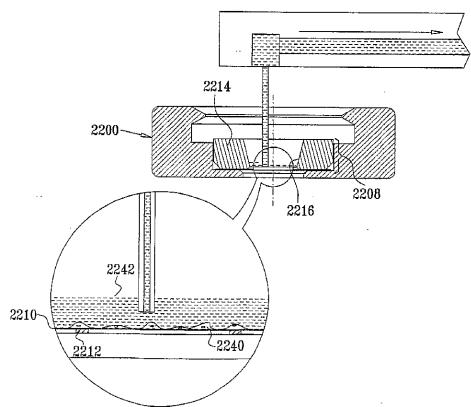
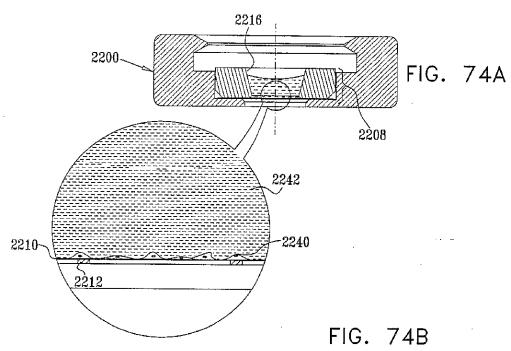
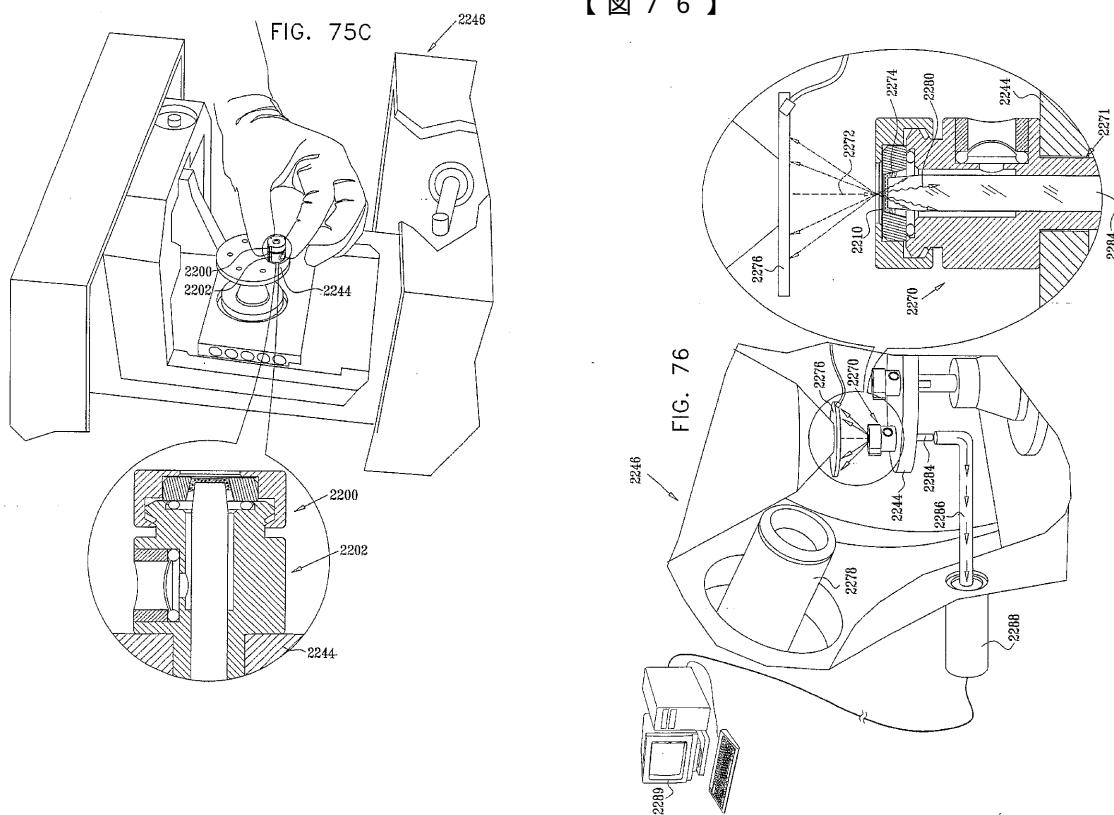


FIG. 73C





【図 7 6】



【図 7 7】

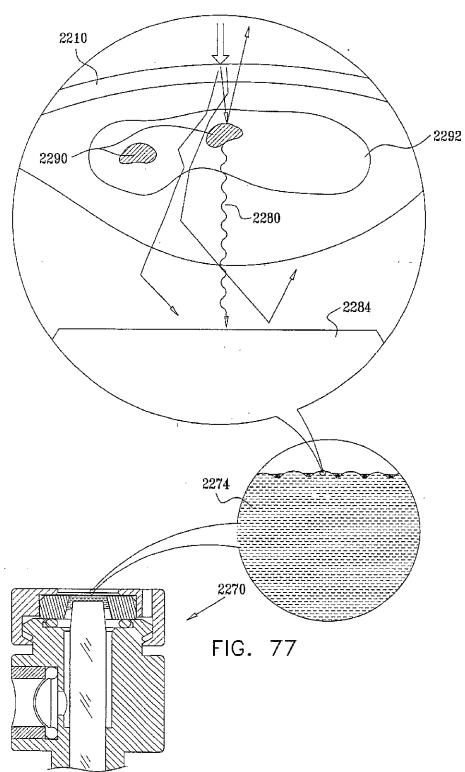
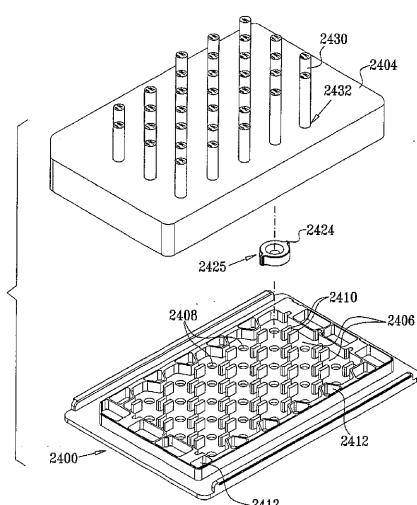
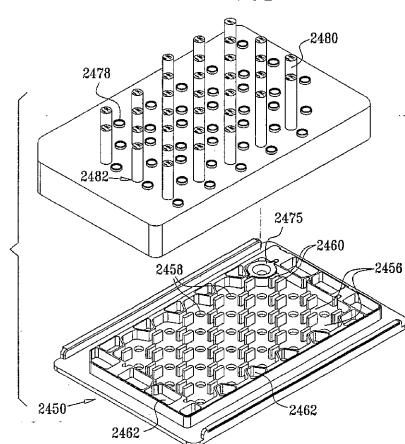
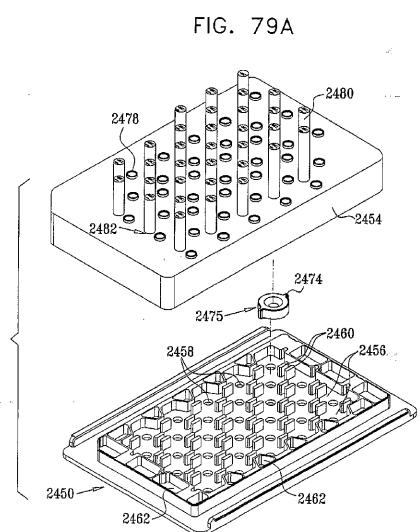
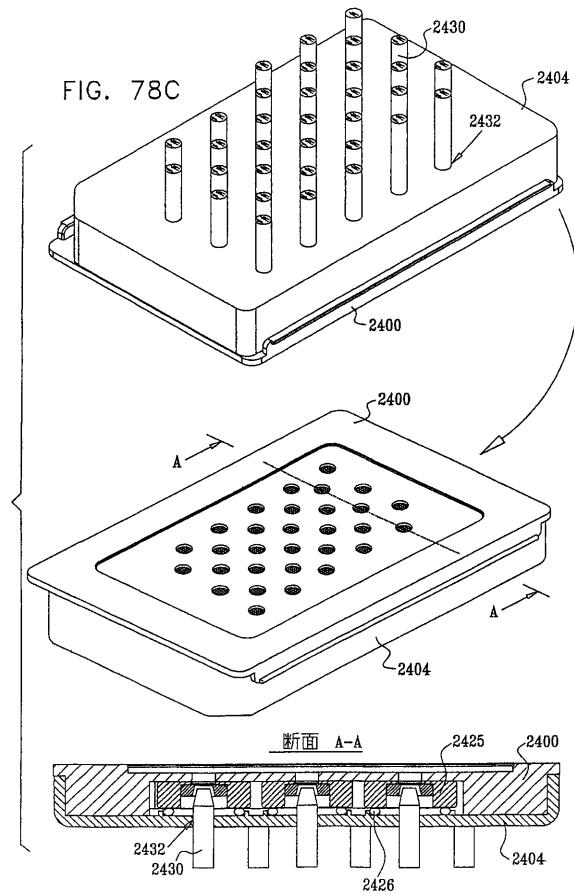
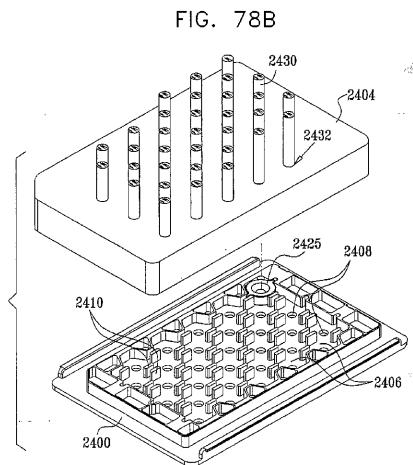


FIG. 78A



【図 7 8 C】



【図 79C】

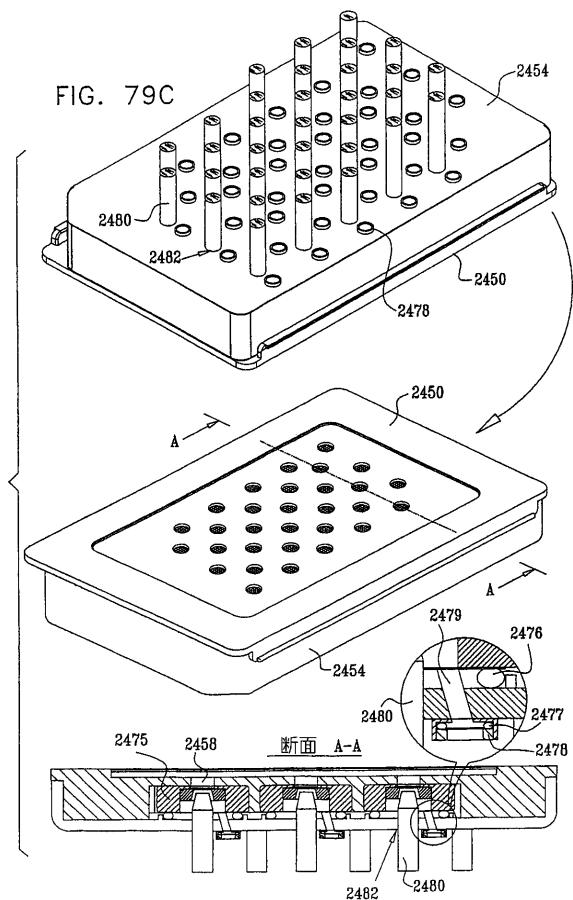
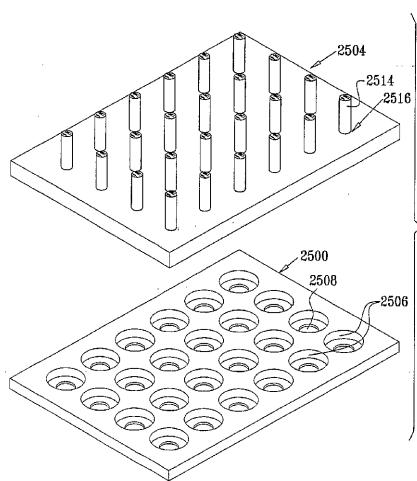


FIG. 80A



【図 80B】

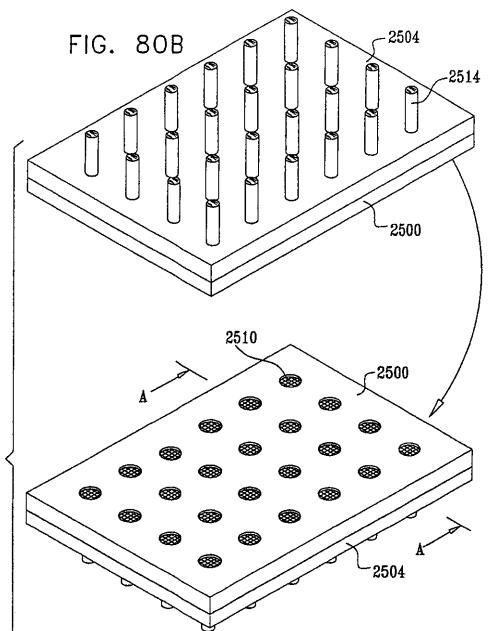
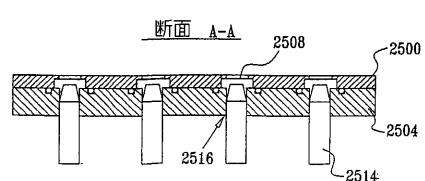
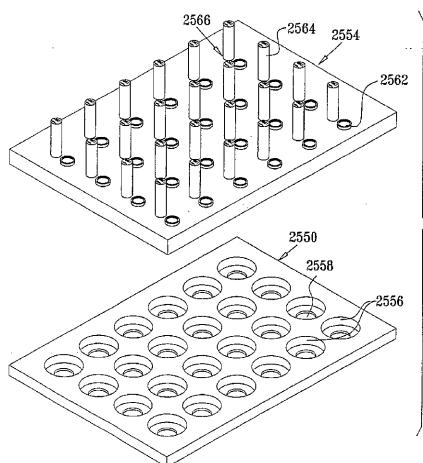
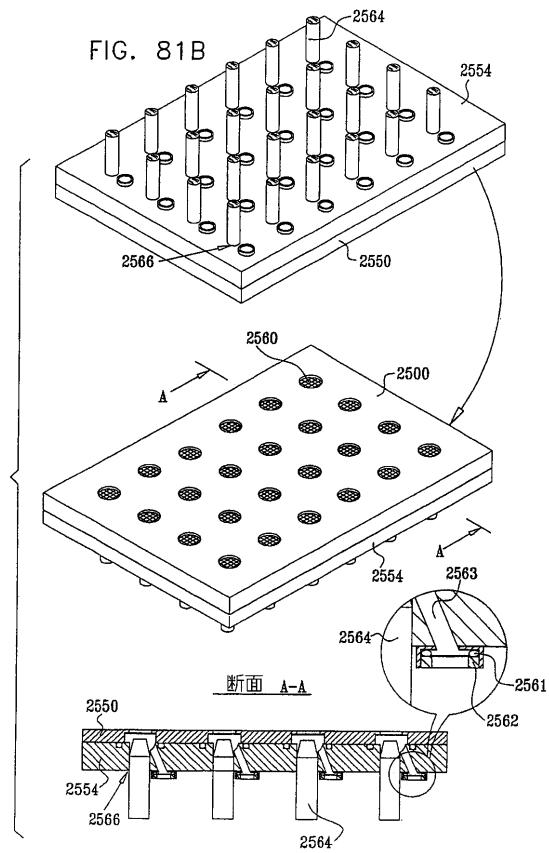


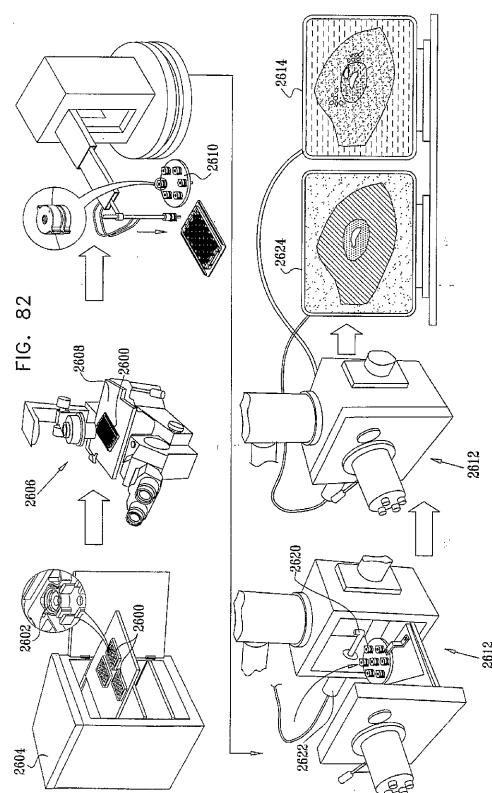
FIG. 81A



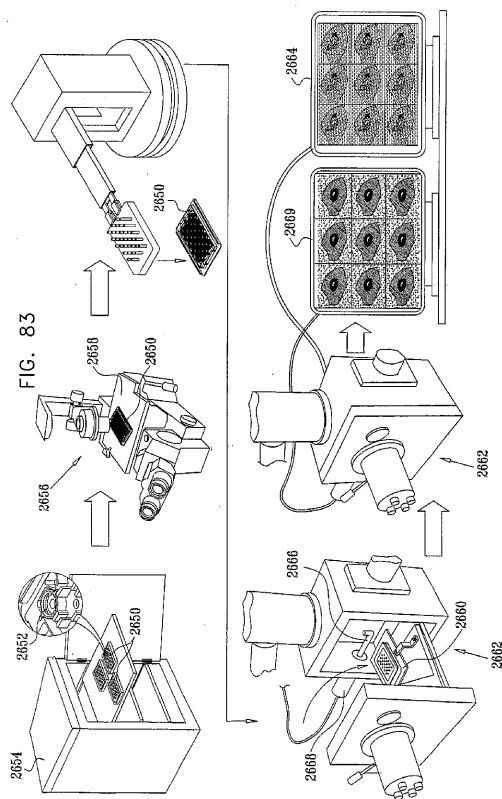
【図 8 1 B】



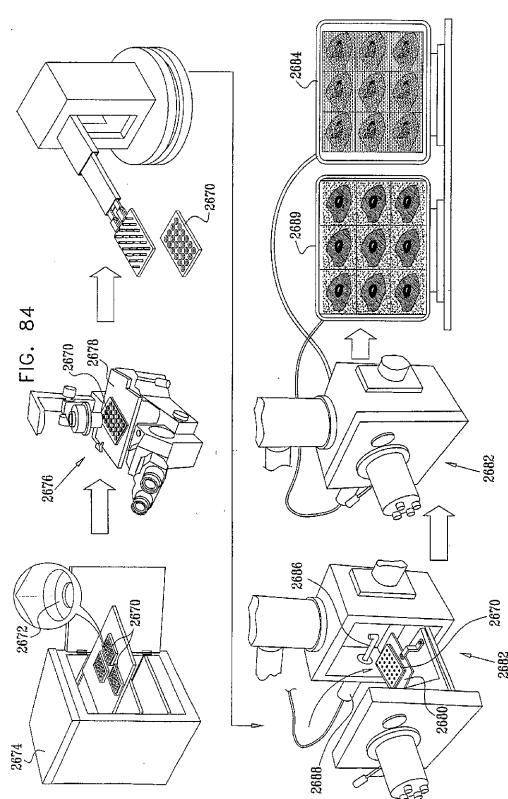
【図 8 2】



【図 8 3】

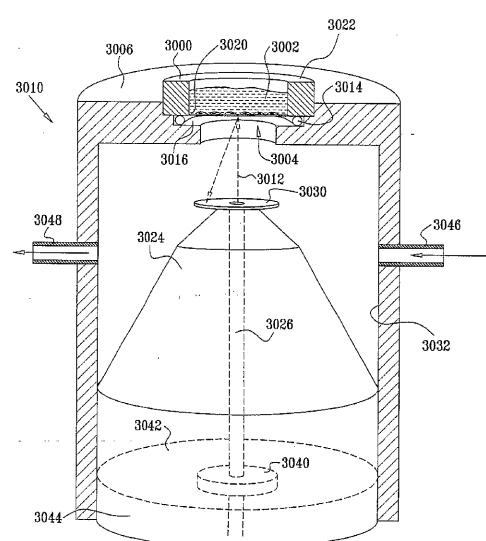


【図 8 4】



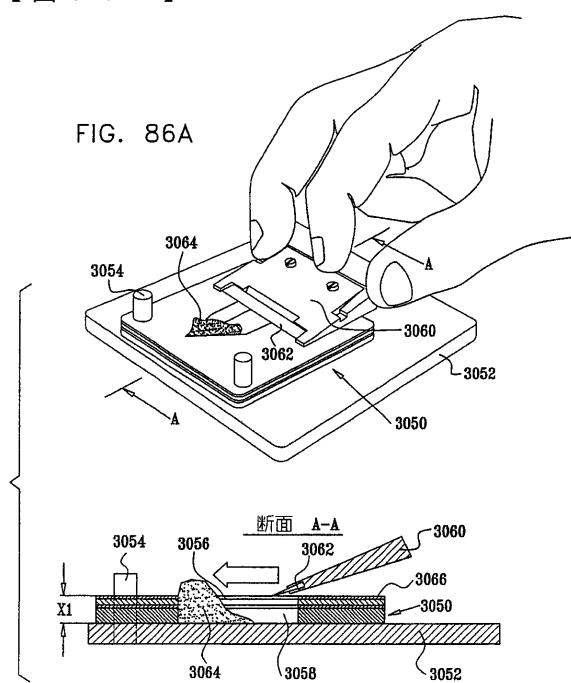
【図 85】

FIG. 85



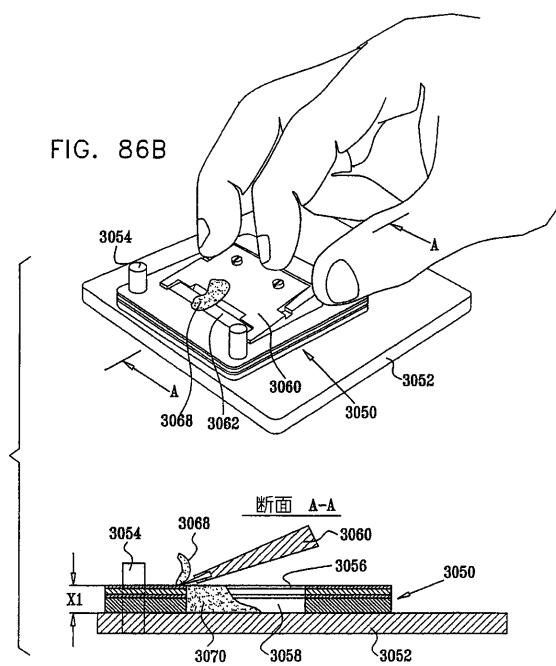
【図 86A】

FIG. 86A



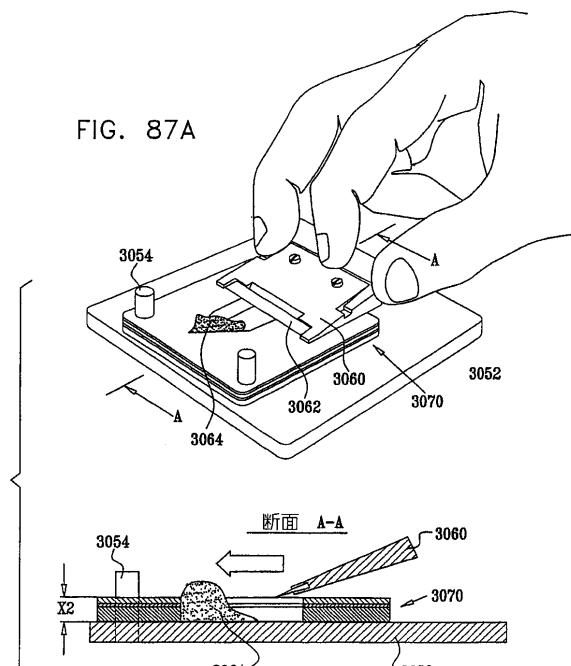
【図 86B】

FIG. 86B

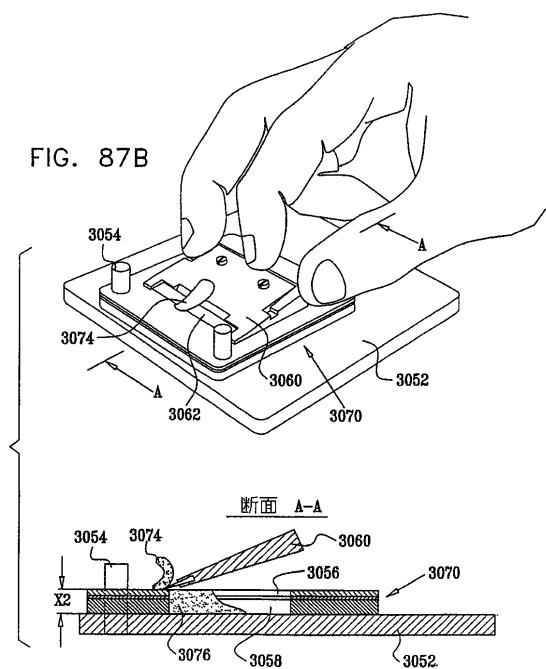


【図 87A】

FIG. 87A



【図 8 7 B】



【図 8 8】

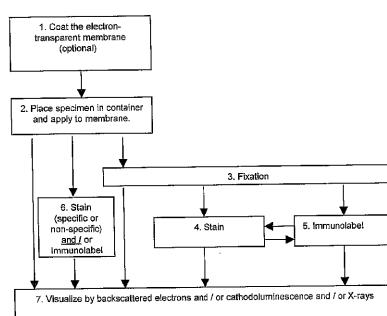


Fig. 88

【図 8 9】

Fig. 89

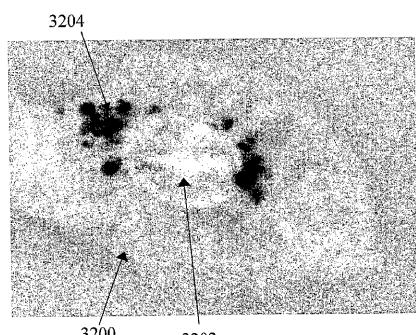


Fig. 90 A



Fig. 90 B

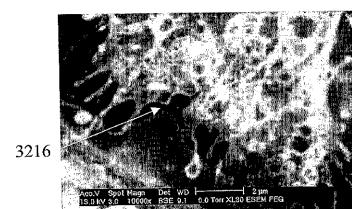


Fig. 91 A

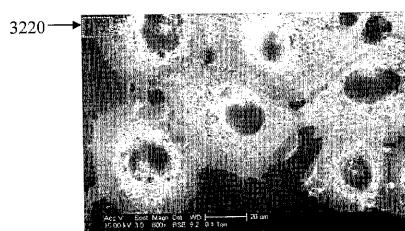
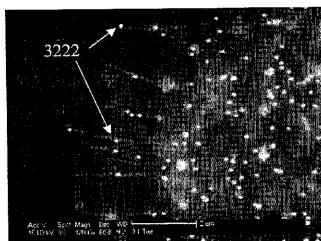


Fig. 91 B



【 図 9 2 】

Fig. 92

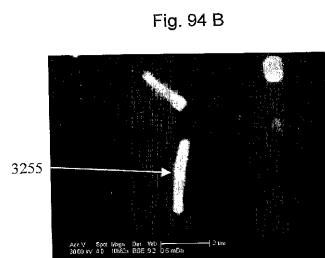
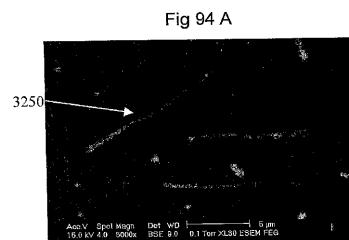
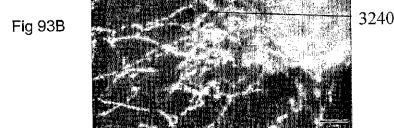
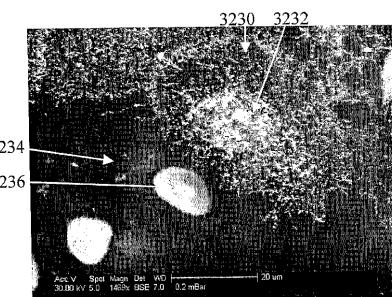


Fig 95A

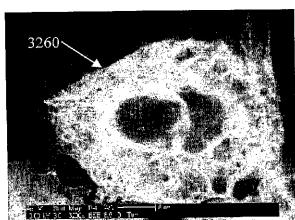


Fig 95B

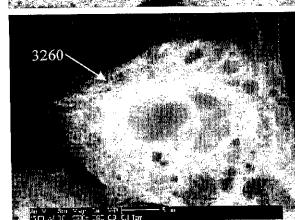


Fig 95C

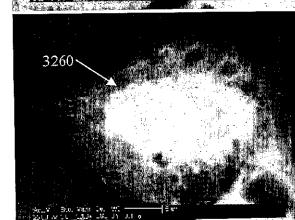


Fig. 96A

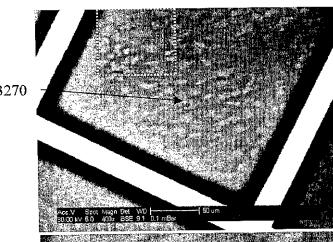


Fig. 96B

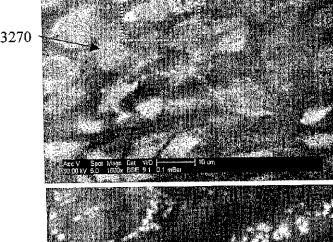


Fig. 96C

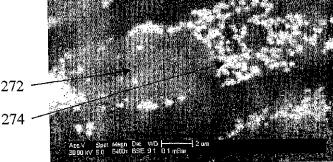
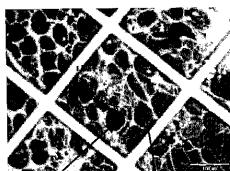
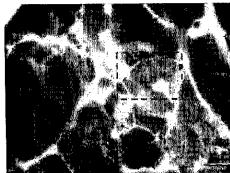


Fig. 97A



3280

Fig. 97B



3282

Fig. 97C



3284

Fig. 97D

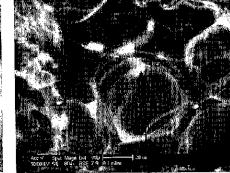
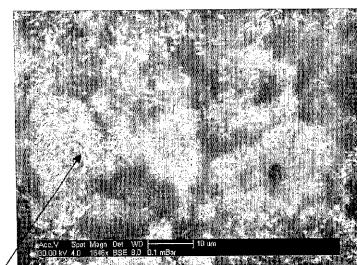


Fig. 98A



3290

Fig 98B

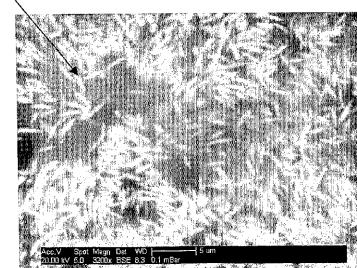


Fig. 99A

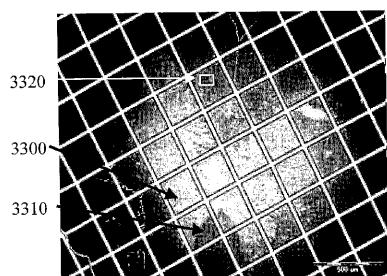


Fig. 100A

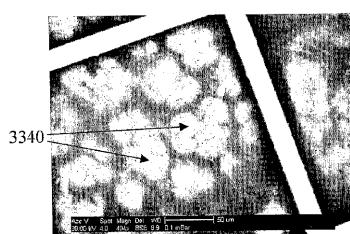


Fig. 99B

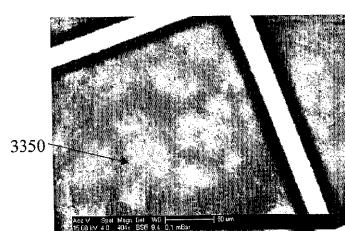
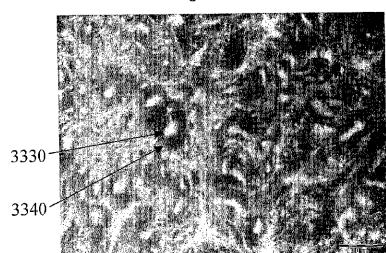


Fig. 101 A

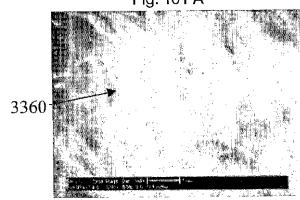


Fig. 102A



Fig. 102B

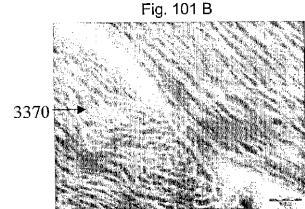


Fig. 102C



Fig. 101 C

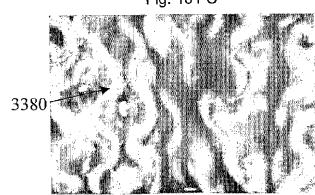


Fig. 103 A



Fig. 103 B



Fig. 104 A

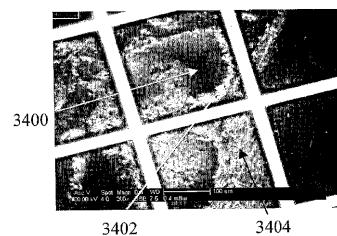
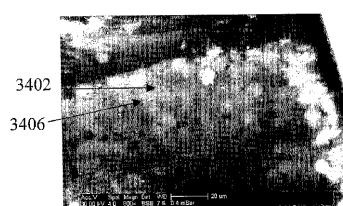


Fig. 104 B



【図 105】

Fig. 105



Fig. 106 A



Fig. 106 B



Fig. 107A

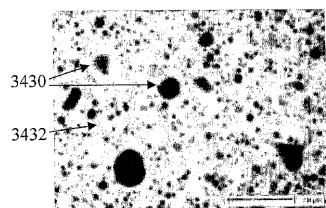


Fig. 107B

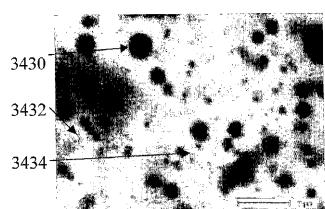


Fig. 108 A

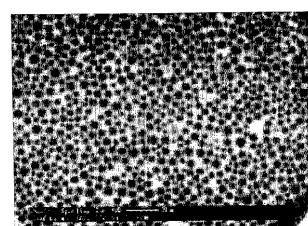
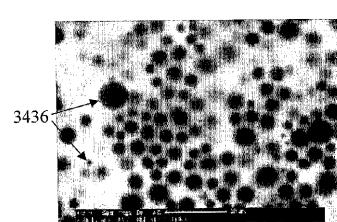


Fig. 108 B



【図 109】

Fig. 109

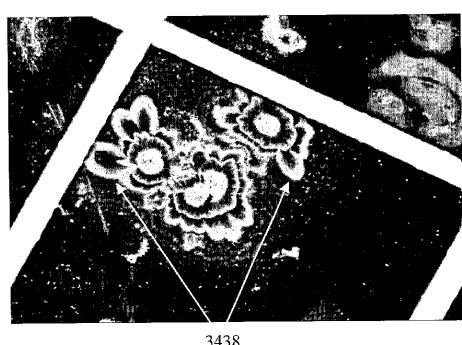


Fig. 110 A

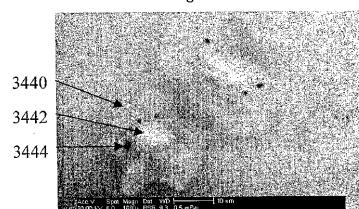


Fig. 110 B

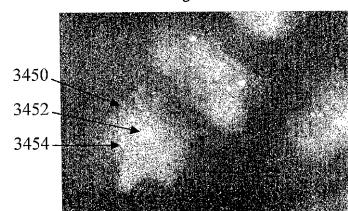


Fig. 111 A

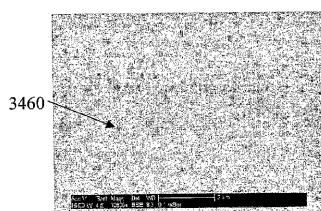


Fig. 111 B

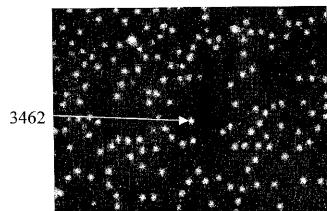


Fig. 112A

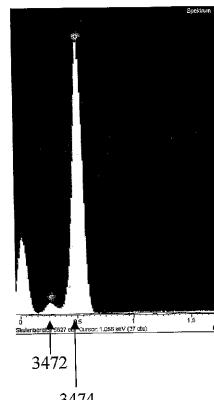
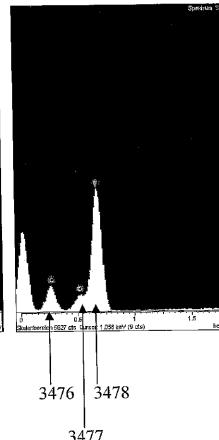
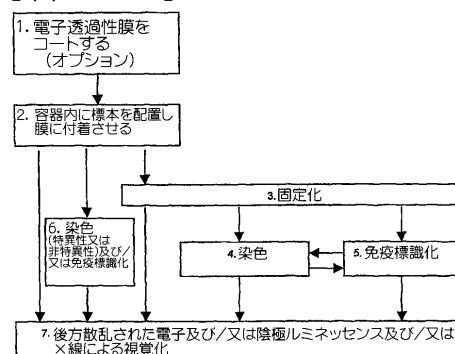


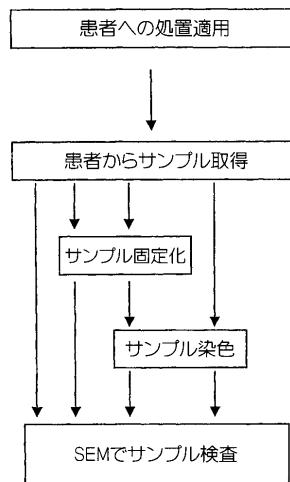
Fig. 112B



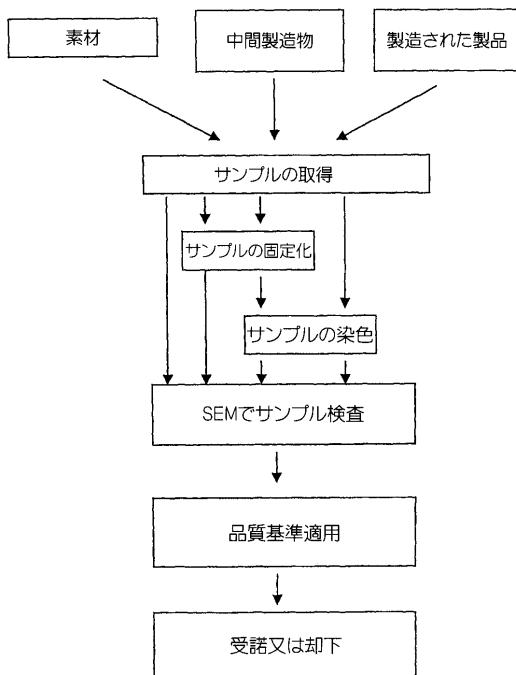
【図 113】



【図 114】

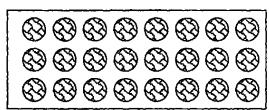


【図 115】



【図 116】

標本容器内に細胞配置

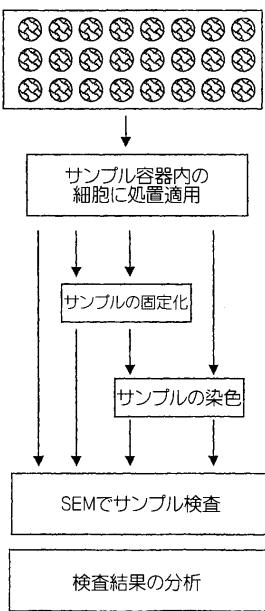
サンプル容器内の
細胞に処置適用

サンプルの固定化

サンプルの染色

SEMでサンプル検査

検査結果の分析



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL03/00457
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 23/00, H01J37/256 US CL : 250/310, 250/397		
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) U.S. : 250/310, 250/397, 250/251		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,720,633 A (NELSON) 19 January 1988 (19.01.1988), column 2, line 19 - column 5, line 19, and Fig. 1.	1-203
A	US 4,880,976 A (MANCUSO et al.) 14 November 1989 (14.11.1989), column 1, line 46 - column 4, line 14, and Fig 1.	1-203
A	US 5,412,211 A (KNOWLES) 02 May 1995 (02.05.1995), column 3, line 37 - column 12, line 2.	1-203
A	US 5,789,748 A (LIU et al.) 04 August 1998 (04.08.1998), column 2, line 29 - column 8, line 64.	1-203
A, P	US 6,459,482 B1 (SINGH et al.) 01 October 2002 (01.10.2002), column 2, line 49 - column 7, line 65.	1-203
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 16 September 2003 (16.09.2003)	Date of mailing of the international search report 23 DEC 2003	
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. (703)305-3230	Authorized officer John Lee <i>John Lee</i> Telephone No. (703) 308-0956	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
H 01 J 37/28	H 01 J 37/252	A
	H 01 J 37/28	B

(31)優先権主張番号 60/448,808

(32)優先日 平成15年2月20日(2003.2.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(72)発明者 ベハー,ベレッド

イスラエル国 90815, モシャブ・ベイト・ザイット 202, ピー・オー・ボックス 152
90

(72)発明者 ネチュスタン,アモツツ

イスラエル国 76858 アセレット,ハーロン・ストリート 32

(72)発明者 クリーガー,ヨーゼフ

イスラエル国 75445 リッション・レズイオン,ミブザ・ナチション・ストリート 14

(72)発明者 ギレアーディ,オファー

イギリス国オックスフォード オーエックス2・7エスディー,サウスデール・ロード 4

F ターム(参考) 2G001 AA03 BA15 CA03 CA07 HA07 JA13 KA12 LA01 MA02

5C001 AA01 BB03 CC04

5C033 PP02 PP05 PP06 UU03 UU04 UU05 UU06