

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5496115号  
(P5496115)

(45) 発行日 平成26年5月21日 (2014. 5. 21)

(24) 登録日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 21/33 (2006. 01)	GO 1 N 21/33
GO 1 N 21/17 (2006. 01)	GO 1 N 21/17 6 2 O
GO 1 N 21/64 (2006. 01)	GO 1 N 21/64 Z
GO 1 N 21/47 (2006. 01)	GO 1 N 21/47 A

請求項の数 38 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2010-547673 (P2010-547673)	(73) 特許権者	503351962
(86) (22) 出願日	平成21年2月3日 (2009. 2. 3)		ヴィジョンゲイト, インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2011-512543 (P2011-512543A)		アメリカ合衆国 9 8 3 3 5 ワシントン
(43) 公表日	平成23年4月21日 (2011. 4. 21)		, ギグ ハーバー, フィフティシックスス
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/032969		アヴェニュー コート ノースウエスト
(87) 国際公開番号	W02009/105331		1 5 0 9
(87) 国際公開日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)	(74) 代理人	100094112
審査請求日	平成24年1月19日 (2012. 1. 19)		弁理士 岡部 譲
(31) 優先権主張番号	12/032, 959	(74) 代理人	100085176
(32) 優先日	平成20年2月18日 (2008. 2. 18)		弁理士 加藤 伸晃
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100104352
			弁理士 朝日 伸光
		(74) 代理人	100128657
			弁理士 三山 勝巳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 紫外放射を用いた生細胞の3次元画像化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光断層撮影システム ( 1 1 ) 内の生細胞の3次元画像化システムであって、

顕微鏡対物レンズ ( 1 8 ) に対して位置決めされた管 ( 2 2 )、入口弁 ( 9 6 ) に結合された第1のポートおよび、出口弁 ( 1 2 4 ) に結合された第2のポートを有する導管ループ ( 5 0 2 )、半透過性膜部分 ( 1 0 4 )、回転部分 ( 2 2 )、および画像化窓 ( 1 1 6 ) を含むマイクロ流体カートリッジ ( 4 0 0 ) を含み、

前記回転部分 ( 2 2 ) が、第1の取付け具 ( 9 2 ) と第2の取付け具 ( 9 2 ) の間に取り付けられ、前記第1の取付け具 ( 9 2 ) が、前記回転部分 ( 2 2 ) を前記入口弁 ( 9 6 ) に結合させ、前記第2の取付け具 ( 9 2 ) が、前記回転部分 ( 2 2 ) を前記出口弁 ( 1 2 4 ) に結合させ、前記システムが、

前記回転部分 ( 2 2 ) に取り付けられた回転機構 ( 2 0 ) と、

前記画像化窓 ( 1 1 6 ) を通して物体 ( 1 ) を見るように配置された顕微鏡対物レンズ ( 1 8 ) と、

前記顕微鏡対物レンズ ( 1 8 ) に結合された軸方向の平行移動機構 ( 3 4 ) と、

前記半透過性膜 ( 1 0 4 ) に接続され、前記導管ループ ( 5 0 2 ) 内へ栄養素を運び、前記導管ループ ( 5 0 2 ) から廃棄物を運ぶ第2の導管 ( 5 0 4 ) と、

生体 ( 1 ) を中に保持する前記画像化窓 ( 1 1 6 ) に照射するように位置決めされ、150 nm と 390 nm の間の波長に制限されたスペクトル・バンド幅を有する放射を生成する少なくとも1つの放射源 ( 2 9 ) と、

10

20

前記生体（１）および前記顕微鏡対物レンズ（１８）を透過した放射を感知するように位置決めされた少なくとも１つのセンサと、

前記センサからデータを受け取るように結合された画像処理装置（４０）と、

前記画像処理装置（４０）に結合され、前記データを処理して前記生体（１）の３次元画像を形成する再構成モジュール（４２）とをさらに含む、システム。

【請求項２】

前記栄養素が酸素および緩衝剤を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項３】

前記軸方向の平行移動機構（３４）が圧電変換器を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項４】

前記少なくとも１つの放射源（２９）が、コンピュータ制御型の光源と集光レンズのアセンブリ（５６）を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項５】

コンピュータ（４１）が、前記圧電変換器を制御するようにリンクされ、前記圧電変換器が、前記対物レンズ（１８）の被写界深度を延ばすように前記対物レンズ（１８）を軸方向に動かす、請求項１に記載のシステム。

【請求項６】

前記スペクトル・バンド幅が、２４０ｎｍと３００ｎｍの間にさらに制限された波長を有する、請求項１に記載のシステム。

【請求項７】

前記スペクトル・バンド幅が、２６０ｎｍと２６５ｎｍの間にさらに制限された波長を有する、請求項１に記載のシステム。

【請求項８】

前記スペクトル・バンド幅が、２８０ｎｍと２８５ｎｍの間にさらに制限された波長を有する、請求項１に記載のシステム。

【請求項９】

前記放射が、前記生細胞からの固有蛍光を刺激し、前記刺激された蛍光を測定することをさらに含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項１０】

前記再構成された３次元画像のボクセルの寸法が知られており、前記再構成手段（４２）が、１ボクセル当たりの吸収度を測定することによって前記放射を吸収する分子の濃度を測定する手段をさらに含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項１１】

前記生体（１）が生細胞を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項１２】

前記マイクロ流体カートリッジ（４００）が、温度制御式の水性環境（２）内に含まれる、請求項１に記載のシステム。

【請求項１３】

前記水性環境（２）が生理緩衝食塩水を含む、請求項１２に記載のシステム。

【請求項１４】

前記感知された放射が、ＤＮＡから出る画像化信号を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項１５】

前記感知された放射が、蛋白質から出る画像化信号を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項１６】

前記感知された放射が、親水性表面から出る画像化信号を含む、請求項１に記載のシステム。

【請求項１７】

前記生成された放射が複数の波長を含む、請求項１に記載のシステム。

10

20

30

40

50

## 【請求項 18】

前記再構成モジュール(42)が、レシオ・イメージングを使用して前記データを処理する、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 19】

前記レシオ・イメージングが、260nmから280nmの範囲の波長から形成された画像を含む、請求項18に記載のシステム。

## 【請求項 20】

前記少なくとも1つの放射源(29)が、DNAによる自然放射吸収度を高めるように選択された少なくとも第1および第2の選択された波長を生成する複数の源(30)を含む、請求項1に記載のシステム。

10

## 【請求項 21】

前記スペクトル・バンド幅が、蛋白質による自然放射吸収度を高めるように選択された波長に制限される、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 22】

前記少なくとも1つの放射源(29)が、時系列でパルス化された少なくとも2つの選択された波長を伝送する複数の源(30)を含む、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 23】

前記少なくとも1つの放射源(29)が、少なくとも2つの選択された波長を伝送する複数の源(30)を含む、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 24】

前記センサが紫外画素アレイ検出器である、請求項1に記載のシステム。

20

## 【請求項 25】

放射を少なくとも2つの選択された波長に分割するように位置決めされたビームスプリッタ(15)を含む、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 26】

前記ビームスプリッタ(15)が、偏光ビーム・スプリッタ、ウォラストン・プリズム、複屈折素子、半透鏡、50/50強度ビームスプリッタ、誘電体で光学的に被覆されたミラー、ペリクル膜、およびダイクロイック・ミラー・プリズムからなる群から選択される、請求項25に記載のシステム。

## 【請求項 27】

前記少なくとも1つのセンサが、  
第1の波長を有する光を受け取るように位置決めされた第1の光検出器(10)と、  
第2の波長に反応し、前記第2の波長を有する光を受け取るように位置決めされた第2の光検出器(14)とを含む、請求項1に記載のシステム。

30

## 【請求項 28】

前記第1の光検出器(10)が、ヒトDNAの自然吸収度に整合する波長を有する放射に反応する、請求項27に記載のシステム。

## 【請求項 29】

前記第2の光検出器(14)が、蛋白質の自然吸収度に整合する波長を有する放射に反応する、請求項27に記載のシステム。

40

## 【請求項 30】

前記第1の光検出器(10)が、親水性表面から出る画像化信号を含む波長を有する放射に反応する、請求項27に記載のシステム。

## 【請求項 31】

前記少なくとも1つのセンサと前記透過された放射の間に置かれた少なくとも1つのフィルタ(12A)をさらに含む、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 32】

前記マイクロ流体カートリッジ(400)および第2の導管が、温度制御式の環境(300)内に密閉される、請求項1に記載のシステム。

## 【請求項 33】

50

同じ経路(25)に沿って別々の画像化ステージを含む光断層撮影方法であって、  
経路(25)に沿って第1のステージ(611)へ複数の生体(1)を輸送することと

、  
前記第1のステージ(611)で、前記複数の物体(1)のうちの少なくとも1つの物体(1)に可視光を照射して、回折パターンを作製することと、

前記回折パターンを感知することと、

前記回折パターンを分析して回折分析(602)を行うことと、

第2のステージ(612)で、前記少なくとも1つの物体(1)に可視光を照射(604)することと、

前記少なくとも1つの物体(1)から出る可視光を感知して、第1の複数の疑似投影画像を作製することと、

第3のステージ(613)で、前記少なくとも1つの物体に第1の波長のD U V光を照射することと、

前記少なくとも1つの物体(1)から出る第1の波長の前記D U V光を感知して、第2の複数の疑似投影画像を作製することと、

第4のステージ(614)で、前記少なくとも1つの物体に第2の波長のD U V光を照射することと、

前記少なくとも1つの物体(1)から出る第2の波長の前記D U V光を感知して、第3の複数の疑似投影画像を作製することと、

前記少なくとも1つの物体(1)を、それぞれ前記第1、第2、および第3の複数の疑似投影画像、ならびに前記回折分析(602)に分類することと、

取付け具(92)によって前記第1のステージ乃至第4のステージを含む回転部分(22)に結合された出口弁(124)で、生体(1)を採取することとを含む、方法。

【請求項34】

前記生体(1)を計数することをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記複数の生体(1)が生細胞を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

第1の波長の前記D U V光が、255nm～265nmの範囲内である、請求項33に記載の方法。

【請求項37】

第2の波長の前記D U V光が、275nm～285nmの範囲内である、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

前記回折パターンが、暗視野画像化パターンをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、光断層撮影法による画像化システムに関し、より詳細には、疑似投影式の画像化および3次元画像への再構成のために生体細胞などの小さな物体に紫外放射が照射される3次元顕微鏡法に対する光投影式の断層撮影法に関する。

【背景技術】

【0002】

光断層撮影法を使用する生体細胞の画像化の進歩は、たとえば、2003年2月18日出願の「Apparatus and method for imaging small objects in a flow stream using optical tomography」という名称の米国特許第6,522,775号に開示のように、Nelsonによって発展してきた。同特許の開示全体を、参照により組み込む。この分野のさらなる発展は、2004年4月22日出願の「Method and apparatus of shadowgram formation for optic

10

20

30

40

50

al tomography」という名称の米国特許出願公開第2004-0076319-A1号として公開された、2003年11月18日出願のFauverらの米国特許出願第10/716,744号(Fauver'744)、および2006年9月18日出願の「Focal plane tracking for optical microtomography」という名称のFauverらの米国特許出願第11/532,648号(Fauver'648)に教示されている。これらの出願の開示全体もまた、参照によって組み込む。

#### 【0003】

光断層撮影システム内の処理は、試験片の準備から始まる。通常、患者から採取した試験片は、病院または診療所から受け取って、診断用でない要素を除去するように処理され、固定され、次いで染色される。次いで、染色された試験片は、光ゲルと混合されて微小毛細管内に挿入され、光断層撮影システムを使用して、試験片内の細胞などの物体の画像が作製される。その結果得られる画像は、1組の被写界深度を延ばした異なる観点からの画像を含み、「疑似投影画像」と呼ばれる。これらの疑似投影画像の組は、裏面投影およびフィルタリング技法を使用して当該細胞の3次元再構成をもたらすことによって再構成することができる。3つすべての次元で等角またはほぼ等しい分解能を有することができることは、特に定量的な画像分析の場合、3次元断層撮影法による細胞画像化の利点である。

#### 【0004】

このとき3次元再構成は、当該構造、分子、または分子プローブの定量化および位置の決定を可能にするため、分析に利用可能なままである。生体細胞などの物体は、少なくとも1つの染料またはタグ付き分子プローブで標識を付けることができ、またこのバイオマーカの測定された量および位置は、それだけに限定されるものではないが、肺癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、胃癌、および膵癌などの様々な癌を含む細胞の病状に関する重要な情報をもたらすことができる。

#### 【0005】

本開示は、光投影式の断層撮影法を発展させて生細胞の画像化に用いることを可能にし、また細胞分析、薬品開発、個別化医療、および関連分野を進歩させることが予期される。これまで、生細胞の顕微鏡法は従来、位相コントラスト、DIC、および偏光コントラスト顕微鏡法などの非標識2次元画像化技法によって行われてきた。

#### 【0006】

波長250nmから290nmの遠紫外(DUV)を使用する固有吸収度および蛍光の画像化は技術的に困難であり、照射された細胞に光毒性をもたらす。より最近では、市販の顕微鏡(共焦点、デコンボリューション、および多光子励起の変種)は、3次元画像を生成するための複数の平面スライスを蓄積するのに蛍光に依拠するため、通常3次元生細胞画像化のための蛍光信号を放出する生体染色が使用されてきた。しかし、これらの場合、たくさんの2次元画像から得られる3次元画像の軸方向分解能は、各スライス内の横方向分解能の約4分の1であり、それによって定量的な分析を不正確にする。3つすべての次元で等角またはほぼ等しい分解能を有することができることは、特に定量的な画像分析の場合、3次元断層撮影法による細胞画像化の著しい利点である。

#### 【0007】

生細胞に対してDUV照射を使用する1つの利点は、天然DNAおよび蛋白質が、非正規状態である細胞の細胞膜および時には核膜に浸透しなければならないいかなる光化学標識も使用しないで、それぞれ260nmおよび280nmの光を吸収することである。さらに、標識または染料は、標的蛋白質またはヌクレオチド(DNA)の測定へ向けた中間ステップにすぎないが、この測定に大幅な変動性を加える。そのような外生種を排除すると、蛋白質またはヌクレオチド(DNA)の定量的な測定の精度を潜在的に改善し、ならびにサンプル準備のステップを排除することによって時間、労力、および複雑さを低減させるはずである。しかし残念ながら、強い信号を刺激するには高い線量の放射が必要とされるため、DUV照射の使用は、過去に光毒性を実証してきた。

## 【0008】

しかし最近、培養されたヒトおよびマウスの生細胞のDUV画像化が、DUV発光ダイオード(LED)を使用して260nmおよび280nmで実証された(たとえば、Zeskind, BJら、「P. Nucleic acid and protein mass mapping by live cell deep ultraviolet microscopy」、Nature Methods 4(7):567~569頁(2007)参照)。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0009】

【特許文献1】米国特許第6,522,775号

【特許文献2】米国特許出願第10/716,744号

【特許文献3】米国特許出願公開第2004-0076319-A1号

【特許文献4】米国特許出願第11/532,648号

【特許文献5】米国特許第6,741,730号

【特許文献6】米国特許出願公開第2007-0215528-A1号

## 【非特許文献】

## 【0010】

【非特許文献1】Zeskind, BJら、「P. Nucleic acid and protein mass mapping by live cell deep ultraviolet microscopy」、Nature Methods 4(7):567~569頁(2007)

【非特許文献2】Curry, A., Hwang, W. L., およびWax, A. (2006), 「Epi-illumination through the microscope objective applied to dark-field imaging and microspectroscopy of nanoparticle interaction with cells in culture」、Optics Express 14(14):6535~6542頁

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0011】

本開示は、細胞、より詳細には生細胞のDUV3次元画像化分野の長年の必要に対する解決策を提供する、新しく、新規で、かつ驚くほど効果的な3次元画像化システムについて記載する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0012】

光断層撮影システム内の細胞の3次元画像化方法が提供される。この方法は、顕微鏡対物レンズに対して生体を動かして、変動する画角を提示することを含む。生体には、150nmと390nmの間の波長に制限されたスペクトル・バンド幅を有する光放射が照射される。生体によって透過、散乱、または2次的に放出されて顕微鏡対物レンズによって取り込まれる放射は、カメラで感知されて、複数の異なる視野角からの画像を記録する。感知された放射からの生体の複数の疑似投影画像が形成され、複数の疑似投影図を再構成して細胞の3次元画像を形成する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】紫外放射を使用する光断層撮影システム内の細胞の3次元画像化システムの一例を示す概略図である。

【図2】UVカメラおよび任意選択の適応光学を使用して紫外放射を用いる光断層撮影システム内の細胞の3次元画像化システムの代替例を示す概略図である。

【図3】光断層撮影システムで使用するための温度制御式の筐体の一実施形態を示す概略

10

20

30

40

50

図である。

【図4】細胞を画像化するためにレースウェイ構成で使用されるマイクロ流体カートリッジの一例を示す概略側面図である。

【図5】細胞を画像化するためにレーストラック構成で使用されるマイクロ流体カートリッジの一例を示す概略上面図である。

【図6】同じ経路に沿って別々の画像化ステージを含む光断層撮影プロセスを示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

図面では、同一の参照番号が類似の要素または構成要素を識別する。図面内の要素の寸法および相対位置は、必ずしも原寸に比例して示すわけではない。たとえば、様々な要素の形状および角度は、原寸に比例して示すものではなく、これらの要素のいくつかは、図面の明瞭性を改善するために適宜拡大および位置決めされる。さらに、図示の要素の特定の形状は、特定の要素の実際の形状に関する何らかの情報を伝えるものではなく、図面内の認識を簡単にするためだけに選択された。

【0015】

以下の開示は、当該物体を画像化するいくつかの実施形態およびシステムについて説明する。本発明の例示的な実施形態による方法およびシステムのいくつかの特徴について述べ、図で説明する。本発明の他の例示的な実施形態による方法およびシステムは、図に示すものとは異なる追加の手順または特徴を含みうることが理解されるであろう。例示的な実施形態について、本明細書では生体細胞に関連して説明する。しかし、これらの例は本発明の原理についての説明を目的とすること、そして本発明はそのように限定されないことが理解されるであろう。

【0016】

さらに、本発明のいくつかの例示的な実施形態による方法およびシステムは、これらの図に示す特徴のすべてを含むわけではない可能性がある。図全体にわたって、同じ参照番号が類似または同一の構成要素または手順を指す。

【0017】

文脈上異なる解釈を要する場合を除き、以下に続く明細書および特許請求の範囲全体にわたって、「含む (comprise)」という単語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などのその変形は、「を含むがそれだけに限定されるものではない」と同様に排他的でなく包括的な意味で解釈されるべきである。

【0018】

本明細書全体にわたって、「一例 (one example)」または「例示的な実施形態 (an example embodiment)」、「一実施形態 (one embodiment)」、「一実施形態 (an embodiment)」、またはこれらの用語の様々な組合せへの言及は、その実施形態に関連して記載の特定の特征、構造、または特性が、本開示の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体にわたって様々な位置に「一実施形態で (in one embodiment)」または「一実施形態で (in an embodiment)」という語句が現れるが、必ずしもすべて、同じ実施形態を指すわけではない。さらに、特定の特征、構造、または特性を、1つまたは複数の実施形態で任意の適切な形で組み合わせることができる。

【0019】

定義

全体として本明細書では、顕微鏡プロセスの文脈で使用されるとき、以下の用語は以下の意味を有する。

「毛細管」は、その一般に受け入れられている意味を有し、内径が通常500ミクロン以下である透過性の微小毛細管および等価物を含むものとする。

「被写界深度」は、指定の特徴に対して受け入れがたい画像ぼけが生じないように焦点面をその範囲内で移動できる光軸に沿った長さである。

「物体」は、個々の細胞、物品、もの、または他の実体を意味する。

「疑似投影図」は、光学系の固有の被写界深度より大きなサンプル体積を表す単一の画像を含む。疑似投影図の概念は、Fauver '744に教示されている。

「試験片」は、個々の患者からの単一の試験または手順から得られる完全な生成物を意味する（たとえば、分析用に提出された唾液、生検、または鼻腔スワブ）。試験片は、1つまたは複数の物体から構成されることがある。試験片診断の結果は、症例診断の一部になる。

「サンプル」は、アリコットまたは試験片のすべてまたは一部を含む、分析の準備ができた完成した細胞標本を意味する。

生細胞の画像化に関して、本開示では、(1)光放射の波長を赤外線より高い周波数（近赤外波長以下、1000nm未満）に制限する核内のクロマチン構造には、ミクロン以下の等角の分解能が必要とされること、(2)個々の細胞が画像化、または場合によっては分析され、それにより複数の観点での回折測定を可能にできること、そして(3)画像化後の細胞の採集は細胞の損傷を最小に行うことが望ましいことといういくつかの仮定がなされる。

#### 【0020】

次に図1を参照すると、紫外放射を使用する光断層撮影システム11内の細胞の3次元画像化システムを概略的に示す。毛細管、微小毛細管、または等価物などの管22が、顕微鏡対物レンズ18および結像レンズ素子52を含む顕微鏡16によって見えるように位置決めされる。管22には、回転機構、たとえば回転モータ20が取り付けられる。顕微鏡対物レンズには、軸方向の平行移動機構、たとえばモータ34が結合される。生体1を中に保持する管22の一部に照射するように、放射源29が位置決めされる。放射源29は、150nmと390nmの間の波長に制限されたスペクトル・バンド幅を有する放射を生成する。1つの有用な例では、放射源29は、少なくとも2つの選択された波長を透過する複数の源(source)30、31を含み、これらの波長は、第1の光検出器10および第2の光検出器14によって同時に検出される。任意選択のフィルタ12A、12Bは、固有トリプトファン蛍光など、UVに制限されたスペクトル・バンド幅より長い波長を有する蛍光を遮断し、かつ/または異なる紫外放射信号の離隔距離を増大させるように選択される。放射源は、コンピュータ制御型の光源と集光レンズのアセンブリ56内に組み込むことができると有利である。コンピュータ制御型の光源と集光レンズのアセンブリ56は、集光レンズ光学系24、26、光拡散器28、および放射源29をさらに含むことができる。

#### 【0021】

1つの例示的な実施形態では、管22は、標準的な顕微鏡スライド23Aと標準的な顕微鏡カバースリップ23Bなど、2つの光学的に平坦な表面間の観察領域内に配置される。管22と顕微鏡スライド23Aおよびカバースリップ23Bとの間の隙間は、光ゲル32または無機および有機油などの同等の材料で充填される。光ゲル32または同等の材料の屈折率はまた、管22、ならびに顕微鏡スライドおよびカバースリップの屈折率に実質上整合する。管22自体は、類似の光学特性の油で被覆することができると有利である。管22の外径は、たとえば約250ミクロンとすることができる。図面を簡略化して見やすくするために、常に示すわけではないが、本明細書に記載の様々な実施形態では、屈折率整合材料を使用して光学系を整合させることが理解されるであろう。光断層撮影システム内で使用される毛細管に整合される典型的な屈折率nは、たとえば590nmでは約1.48であるが、UVでは分散曲線が急角度で上方へ動く。溶融シリカの毛細管の推定される屈折率は250nmで1.51であり、UVグレードの溶融シリカによるDUVの透過率は約90%である。

#### 【0022】

生体1は、細胞、生細胞、固定細胞、非固定細胞、凍結細胞、解凍細胞、乾燥細胞、ク

10

20

30

40

50



ローン細胞、移動細胞、固定化細胞、カプセル化細胞、細胞核、細胞器官、細胞小器官、亜細胞成分、染色体、および同等の材料からなる群から選択することができると有利である。光断層撮影法による画像化システム 11 は、生体からの固有蛍光を刺激する周波数を有する照射放射を使用することができると有利であり、光検出器および画像処理装置は、刺激された蛍光を測定するモジュールをさらに含む。生体は、水性環境 2 内に含まれる。水性環境 2 は、以下に記載の生理緩衝食塩水または他の溶液を含む。

#### 【0023】

ビームスプリッタ 15 が、生体中を透過した放射を少なくとも 2 つの選択された波長に分割するように位置決めされる。ビームスプリッタは、偏光ビーム・スプリッタ、ウォラストン・プリズム、複屈折素子、半透鏡、50/50 強度ビームスプリッタ、誘電体で光学的に被覆されたミラー、ペリクル膜、ダイクロイック・ビームスプリッタ、ミラー、プリズム、回折光学素子、格子、および等価物からなる群から選択することができると有利である。第 1 の光検出器 10 は、生体 1、顕微鏡対物レンズ 18、ビームスプリッタ 15、および第 1 の組の任意選択のフィルタ 12 A を透過する放射を感知するように位置決めされる。同様に、第 2 の光検出器 14 は、生体 1、顕微鏡対物レンズ 18、ビームスプリッタ 15、および第 2 の組の任意選択のフィルタ 12 B を透過する放射を感知するように位置決めされる。一例では、第 1 の光検出器 10 および第 2 の光検出器 14 はそれぞれ特に、紫外光に反応する画素アレイ検出器を含むことができ、各画素アレイ検出器は、2 つの選択された波長のうちの異なる 1 つを検出するように選択される。

#### 【0024】

コンピュータ 41 は、第 1 の光検出器 10 および第 2 の光検出器 14 からデータを受け取るように結合された画像処理装置 40 を含む。画像処理装置 40 には再構成モジュール 42 が結合され、再構成モジュールは、たとえば Fauser '744 で教示されるような再構成アルゴリズム技法を使用し、データを処理して細胞の 3 次元画像を形成する。画像処理装置 40 は、処理された画像データを 3 次元画像再構成モジュール 42 へ伝送する。3 次元画像再構成モジュール 42 は、操作者が見るために、光ディスプレイ 44 に結合することができると有利である。操作者制御および情報の目的で、ユーザ・インターフェース 46 を提供することができる。ユーザ・インターフェース 46 は、コンピュータ 41 に結合された GUI インターフェースなどとしてすることができる。

#### 【0025】

一例では、軸方向の平行移動機構 34 は、圧電変換器または同等のデバイスを含む。圧電変換器を制御するようにリンクされた制御装置 35 は、コンピュータ、コンピュータ・モジュールなどとしてできると有利であり、圧電変換器は、対物レンズ 18 を軸方向に動かすように制御される。

#### 【0026】

1 つの例示的なシステムでは、光断層撮影法による画像化システム 11 は、フィルタおよび放射源を使用し、240 nm と 300 nm の間に制限された波長を使用して細胞を画像化するように構成される。第 1 の検出器 10 によって検出される放射は、主に 260 nm と 265 nm の間の第 1 の範囲内の波長を有することができる。第 2 の検出器 14 によって検出される放射は、主に 280 nm と 285 nm の間の第 2 の範囲内の波長を有することができる。第 1 の範囲は、DNA および RNA による自然放射吸収度を高めるように動作する。第 2 の範囲は、蛋白質による自然放射吸収度を高めるように動作する。第 1 および第 2 の波長範囲は、1 対の放射源を使用して提供することができ、各源は、波長範囲から選択された 2 つのうちの 1 つを伝送する。検出器の 1 つは、DNA および蛋白質などの親水性表面付近で 270 nm 前後の吸収度を検出するように調整することができる。

#### 【0027】

一実施形態では、放射は、信号を分離する時間を使用して時系列で測定することができる。放射源は、信号対雑音を増大させて信号を分離するために、時系列でパルス化して細胞のパルス励起をもたらすことができる。たとえば、260 nm の放射源を時間  $T_0$  にパルス化し、その後  $T_1$  に 280 nm のパルスが続き、その後、後の時間増分  $T_n$  に 1 つま

10

20

30

40

50

たは複数のレーザ・パルスが続く。上式で  $n$  は、後の時点を示す任意の数である。

【0028】

別法として、固有トリプトファン蛍光を測定して、アミノ酸など、蛋白質の2次測定、ならびにその確認および成分を得ることができる。時系列照射を使用しない場合、第3のビーム・スプリッタが必要とされるはずである。この代替設計では、ビームスプリッタ15は、すべてのDUV光(240~300nm)をDUV光検出器14へ分割するはずであり、一方蛍光光検出器10によって、より低い周波数の蛍光信号が検出されるはずである(300nm超)。DUV光源30、31の動作は時系列であり、したがって時間 $T_0$ に、主にヌクレオチドによる放射吸収度(260~265nm)を捕獲することができ、一方同じ検出器14を使用して時間 $T_1$ に、主にアミノ酸による放射吸収度(280~285nm)を捕獲することができる。この例では、蛍光検出器前のセットが標準的なロングパス蛍光放出フィルタであり、DUV検出器前のセットがDUVバンドパス・フィルタまたはショートパス蛍光遮断フィルタであるため、フィルタ12A、12Bについての議論が保証される。

10

【0029】

さらに別の例では、レーザ光が、対物レンズの光軸に対して斜めの角度で入射し、非散乱光を遮断して、より大きな散乱角度での散乱プロファイルの暗視野測定を可能にする。可視波長でのレーザ散乱を使用する一例は、2004年5月25日出願のRahnの「Method and Apparatus for Three-Dimensional Imaging in the Fourier Domain」という名称の米国特許第6,741,730号に見出すことができる。同特許を、参照により本明細書に組み込む。

20

【0030】

さらに別の例では、光軸と平行なレーザ照射が使用される。対物レンズの後焦点面に、吸収材料の円板が配置される。吸収材の直径は、非散乱光および非常に小さな角度の散乱光を遮断するのに十分なほどしか大きくない。その結果得られる環状開口により、より大きな散乱角度での散乱プロファイルの暗視野測定が可能になる。

【0031】

さらに別の例では、生きた細胞内の蛋白質および/またはDNAの分子特有の標識のため、標準的な明視野透過モード(回折分析を排除)では吸収度もしくは蛍光の生の染料が使用され、または暗視野照射モードでは抗体/プローブおよびナノ粒子が使用される。

30

【0032】

動作の際には、画像再構成モジュール42は、再構成された3次元画像内のボクセルの寸法を決定する。再構成モジュール42は、既知のソフトウェア工学技法によって構築された、1ボクセル当たりの吸収度を測定することによって放射を吸収する分子の濃度を測定するモジュールをさらに含むことができる。

【0033】

1つの有用な実施形態では、光断層撮影法による画像化システム11は、DUV吸収度の画像化によく適している。20nmのバンド幅で260nmおよび280nmのLEDを使用すると、励起フィルタを必要とすることなく、簡単でかつ堅固な計測が可能になる。集光光学系56は、たとえば、DUV集光レンズ(たとえば、ドイツZeissからのUV-Kondモデル)を含むことができ、対物レンズ18は、Zeissから入手可能な100倍、1.25NAのUltrafluar、またはニューヨーク州ロチェスターのOptics Technologies, Inc. から入手可能なカスタム265nmの対物レンズなどのレンズを含むことができる。周囲光および蛍光を遮断するために、フィルタ12A、12Bは、光がUV感応性CCDカメラに到達する前に、どちらもバーモント州ブラットルボロのChroma Technology Corp. またはOmega Opticalから入手可能な250nmから290nmのバンドパスを有するバンドパス・フィルタを含むことができる。有用なCCDカメラには、日本のSony CorporationからのCCDカメラ、ニュージャージー州トレントンのPrin

40

50

ce ton InstrumentsからのPhotonMaxモデル・カメラ、またはニュージャージー州プリンストンのSarnoff Imagingからのデバイスが含まれる。

#### 【0034】

生細胞の画像化では、試験片ステージおよびグリセロール、油、または水浸漬対物レンズを温度制御する必要があることが多い。2次元DUVの画像化から3次元Cell-CT DUVの画像化へ移行するには、直径50ミクロンの微小毛細管内で分離された細胞を画像化するために短い透過距離（経路長さ）が必要とされるため、材料はUV透過性でなければならない。たとえば、細胞培地は、細胞プラズマ膜との整合を助けるためにより高い屈折率を有することができる生理緩衝液とするべきである。水溶液への添加物には、それだけに限定されるものではないが、ポリエチレン・グリコール（PEG）、グリセロール、変性または誘導PEG、およびアガロース・ゲルを含むことができる。微小毛細管に使用されるガラスに細胞培地をうまく整合させることができないとき、内径を増大させると、内側の管壁の屈折の程度を低減させるのに役立つことがある。外側の管壁とは、生体適合性に対処する必要はないので、屈折率をうまく整合できるはずである。しかし、回転接合部が選択されているときは、250nm～290nmの信号の波長範囲内で蛍光を発しない材料を考慮すべきである。

#### 【0035】

次に図2を参照すると、UVカメラおよび任意選択の適応光学を使用して紫外放射を用いる光断層撮影システム内の細胞の3次元画像化システムの代替例を概略的に示す。生細胞画像化の要件は、水溶液および生理緩衝液のタイプに、したがって細胞の周囲で使用できる屈折率の範囲に制限を課す。細胞周辺および管内のこの包埋媒体は、標準的な乾燥または油浸顕微鏡対物レンズに対して、その結果得られる画像に収差をもたらすのに十分なほどの屈折率不整合を有することが予期される。この屈折率不整合の補償は、対物レンズから生理緩衝剤を含む細胞までの指定の画像化深さまたは距離に対して設計することができる。しかし、下位の球面収差でさえ軸方向の深さの変動とともに変動し、したがって、軸方向の深さにわたる顕微鏡の画像化には、光波面歪みの動的補償が有利である。動的歪み制御または補償のこの技法は、適応光学と呼ばれる。そのような動的収差補償に使用される光学構成要素は、空間光変調器または変形可能な膜ミラーであることが多い。精巧な光学構成要素のDUV光の透過特性が最適でないため、適応反射鏡がDUV顕微鏡内で好ましい構成要素である。

#### 【0036】

細胞の3次元画像化システム200は、図1に関して上述のものと同じまたは類似のいくつかの構成要素を含む。上述のように、当該物体1を見るために、管22が、顕微鏡対物レンズ18に対して位置決めされる。上述のように、顕微鏡16は、対物レンズ18および結像レンズ素子52を含む。顕微鏡対物レンズ18は、光軸202に沿って位置合わせされる。図1のシステムとは対照的に、当該物体の画像を取得するために、単一の紫外（UV）カメラ48だけが使用される。UVカメラ48もまた、光軸202に沿って位置合わせされる。UVカメラ48と結像レンズ素子52の間には、蛍光遮断フィルタ50が置かれる。上記のように、蛍光遮断フィルタ50は、より長い波長の蛍光を遮断し、かつ/または異なる紫外放射信号の離隔距離を増大させるように選択される。

#### 【0037】

水性環境2および当該物体1は、顕微鏡対物レンズ18と管22および光ゲル32または等価物との間に、適応ミラー54を関連する適応光学（AO）制御装置201とともに使用して深さに依存する画像収差を低減させることを必要とするのに十分なほど大きな屈折率不整合をもたらすことがある。この適応光学構成要素は、放射源29、光学要素27、および集光レンズ24の間に位置する任意選択の素子とすることができる。一定の波面補償（2次元）プロファイルで無通電であるか、それとも通電しているかにかかわらず、適応ミラー54は光学系内で静的に90度回転し、これにより単一の深さレベルを補償することができる。

## 【 0 0 3 8 】

上述のように、UVカメラ48からの画像は、画像処理装置40へ伝送される。画像処理装置は、処理された画像データを3次元画像再構成モジュール42へ伝送する。3次元画像再構成モジュール42は、望ましい場合、操作者が見るために、光ディスプレイ44に結合することができると有利である。操作者制御および情報の目的で、ユーザ・インターフェース46が提供される。ユーザ・インターフェース46は、GUIインターフェースなどとして行うことができる。

## 【 0 0 3 9 】

次に図3を参照すると、光断層撮影システム内で使用するための温度制御式の筐体の一実施形態を概略的に示す。温度制御式の筐体300は、生体細胞1または他の生物材料などの当該物体を含み、この物体は、顕微鏡対物レンズ18に対して位置決めされた管、毛細管、または微小毛細管22内に含まれる。微小毛細管22は、微小毛細管22内の細胞1の制御された回転運動21を可能にするように、回転モータ20によって回転可能である。細胞1およびゲル32は、たとえばシリンジ80によってかけられる陽圧によって、毛細管22内で水平軸に沿って進めることができる。別のモータ34は、顕微鏡対物レンズ18および結像レンズ52の垂直軸方向の動きを制御する。微小毛細管22は、光ゲルまたは屈折率整合媒体32内に入れられ、サンプル集光アセンブリ56の一部となり、その上に位置する。

## 【 0 0 4 0 】

電力増幅器60は、温度制御装置64に対してエネルギーを提供する。温度制御装置64は、少なくとも1つのセンサ74に応答し、摂氏5から39度などの指定の範囲内で所望の温度を維持するように、コンピュータおよび電子入力78を用いてさらに調整することができる。しかし、生理レベルに達する機能を維持するためには、ヒトなどの温血動物の細胞は厳重な温度制御を必要とし、すなわち摂氏0.5度の範囲内で摂氏36度にする必要がある。温度ならびにマイクロ流体条件の調整により、細胞（すなわち、特に不安定な正常もしくは異常細胞、前癌性、癌性、ウイルス感染、または他の病原性細胞の集団）を生きたまま保つことが容易になる。一例では、3つのセンサ74が、顕微鏡ヘッド16付近、ならびに微小毛細管22上および下に位置決めされる。いくつかの実施形態では、温度制御を助けるために、空気循環のための任意選択の内部ファン68が存在する。ペルチェ熱電加熱器/冷却器70をシステム全体にわたって位置決めすることができ、また微小毛細管22の上と下の両方に位置決めして、優れた温度制御のために熱エネルギーを提供することができる。特有の実施形態では、ペルチェ加熱器/冷却器70をさらに配置できると有利である。熱電加熱器/冷却器およびファンの代替手段は、顕微鏡を密閉するチャンバの周囲に温度制御式の水循環器または等価物を選択することである。いくつかの実施形態では、摂氏約35度から摂氏約36度の温度が使用され、他の実施形態では、温度をより高くまたはより低くすると、特有の生物学的プロセスの研究、または生きた細胞内での特有の試薬の使用を容易にすることができる。

## 【 0 0 4 1 】

光断層撮影システムについて上記で詳細に説明したが、本開示の理解を助けるため、システムの動作についての説明を次に提示する。生きた細胞などの生体1が、シリンジ・デバイス80を介して微小毛細管22内に注入され、加圧された毛細流84が、生体1を顕微鏡16の対物レンズ18下の観察窓へ動かす。少なくとも1つの放射源29（たとえば、DUVおよび可視光）が、生体1を含む微小毛細管22の一部分に照射するように位置決めされる。いくつかの実施形態では、約260nmから約280nmの放射波長が使用される。放射は、サンプル集光アセンブリ56の一部として、光拡散器28と集光レンズ24、26のアセンブリを通過する。組み込まれたセンサ74、温度制御装置64、およびファン68は、温度を維持して、細胞の生存性を維持および増大させる。このシステムは、定義および制御された条件下での生きた細胞の研究に多数の変形を可能にする。

## 【 0 0 4 2 】

上記その他に記載の光断層撮影システムは、温度制御およびマイクロ流体を使用して、

10

20

30

40

50

それだけに限定されるものではないが、ヒトからの細胞、ならびに任意の他の種からの細胞を含む任意の生きた生物材料を検査するのに適した条件を維持する。細胞、または他の生物材料は、1つまたは複数の管（たとえば、微小毛細管）の中を流れて画像化を容易にする。いくつかの実施形態では、微小毛細管22は、2つ以上のチャネルからなるまっすぐな管を含む。特定の実施形態では、光断層撮影システムを使用して、細胞または亜細胞材料を採集できることが理解される。

#### 【0043】

いくつかの実施形態では、システムは、生きた細胞もしくは場合によっては生きていない細胞、またはその断片内に含まれる高分子複合体、核蛋白質、DNA、RNA、または蛋白質から出る画像化信号を含む放射を感知する。成分DNA、RNA、および蛋白質複合体を含む細胞は、それだけに限定されるものではないが、生物活性分子、ナノ粒子、変性ナノ粒子、マイクロスフェア、蛋白質原細胞、抗体、バイオマーカ、サイトカイン、他のヌクレオチド、他の蛋白質を含む化学物質、生物薬剤を用いて処理し、または別法として、顕微操作もしくは他の治療（たとえば、トランスフェクション試薬、ウイルス、リボソーム、および同様の薬剤）によって機械的に操作して、分子の取込みを変更もしくは容易にし、または画像化プロセス中の他の細胞プロセスに影響を及ぼすことができる。生物薬剤または化学薬剤は、発色団およびフルオロフォアで標識を付け、または変性させることができる。実施形態はまた、3次元画像または回折パターン内で光学コントラスト機構として働く吸収、蛍光、および散乱特性を有する金、コロイド金、鉄および酸化鉄、ならびに同様の分子で標識を付けることによって変性されたナノ粒子を使用する。発色団およびフルオロフォアに加えてナノ粒子およびマイクロスフェアを使用すると、3次元コントラストを高めることが可能になる。たとえば、細胞は、細胞周期、細胞分化、感染性に影響を及ぼし、病原性を低減もしくは増大させる薬剤で処理することができ、または細胞は、亜細胞区画化を変更するようにさらに操作することができる。これらの処理のすべてまたは一部の間、細胞表面バイオマーカ、あるいはクロマチンまたは他の細胞の核蛋白質もしくは高分子複合体の発現および露呈を検査することができる。

#### 【0044】

特定の実施形態では、生きた細胞または他の生物材料に、複数の波長の放射が照射される。そのような場合、入力画像のコンピュータ処理から形成される細胞または他の生物材料の複数の疑似投影画像は、レシオ・イメージング技法を使用して処理することができる。いくつかの実施形態では、レシオ・イメージングは、約260nmから約280nmの放射波長から形成された画像を含む。

#### 【0045】

別法として、場合によっては、それだけに限定されるものではないが、蛍光およびレーザ回折を含む生細胞染色技法を使用して画像を得ることができると有利である。

#### 【0046】

次に図4を参照すると、マイクロ流体カートリッジ400の一例の側面図を概略的に示す。回転モータ20は、ベルト188を回すように結合されたシャフト121を含み、ベルト188の第2の端部は、微小毛細管22を回転させるように結合される。マイクロ流体カートリッジ400は、レースウェイ内で細胞を動かすように陽圧および陰圧120で動作し、第2のチャネル504が、栄養素および酸素を供給し、代謝廃棄物を除去し、そして薬品が生理緩衝剤内の細胞と相互に作用できるようにする（図5に最もよく示す）。軸受けまたは摩擦嵌合92により、細胞などの物体が管を通過する間、微小毛細管22を回転させることが可能である。集光照射アセンブリ56を含む顕微鏡16は、顕微鏡16の光軸に沿って物体が見えるように、カートリッジ近傍に位置決めされる。

#### 【0047】

次に図5を参照すると、細胞を画像化するためにレーストラック構成で使用されるマイクロ流体カートリッジの一例の上面図を概略的に示す。マイクロ流体カートリッジ400は、流体レーストラック構成500内に結合される。レーストラック構成は、光学窓を含む対物レンズの光軸に沿って画像化領域116を含む。また、入口弁96、出口弁124

10

20

30

40

50

、および第1のチャネル502が含まれる。第1のチャネル502は、第2のチャネル504と流動的に連通している。これらのチャネルは、たとえば半透過性膜104を用いてつなぎ合わせることができる。レーストラック全体は、図3に関して本明細書に記載のように、ペルチェ加熱器/冷却器素子または等価物を使用する温度制御式の環境内に維持される。いくつかの実施形態では、レーストラックおよびチャネルは導管を含む。

#### 【0048】

細胞の生存性を維持するのに必要とされる新鮮な栄養素、酸素、緩衝剤（pH、オスモル濃度など）、任意選択の薬品などは、流れ矢印108によって示すように第2のチャネル504を通して導入することができる。しかし、マイクロ流体条件が正しい場合、細胞は横方向には動かず、第1のチャネル502を通して軸方向だけに動き、一方拡散により、 $O_2$ などの新鮮な栄養素、緩衝材料、および代謝廃棄物が濃度勾配に沿って動き、したがって混合することが可能である。一例では、半透過性膜104は、つなぎ合わせたチャネルに置き換えることができ、荒れていない平行流により、元の流線形のマイクロ流体流内に細胞を維持しながら、小さな分子および溶液の拡散を可能にする。流速が遅い場合、生理学的範囲内のせん断応力が可能であり、一方チャネル幾何形状、流体の粘性、温度、および細胞タイプもまた役割を果たす。

#### 【0049】

動作の際には、入口弁96を通してマイクロ流体カートリッジ400内に細胞が注入される。トラフ100は、細胞が管を通して進む間、微小毛細管22を回転させるのに使用される回転モータおよびベルトのための筐体として働く。陽圧および陰圧120をかけて、レーストラック全体にわたって、加圧された流れ84を制御する。画像化後、出口弁124を使用して、流体を廃棄チャネル内に流すことによって、または生細胞を採集するために、選択された細胞1を誘導する。

#### 【0050】

検査されている試験片は、穿刺吸引（FNA）からの生検とすることができる。その結果得られる生細胞のサンプルは、別々の入口弁（図示せず）を有するいくつかの異なるレーストラック内に分割することができる。検査されている各サブサンプルは、異なる薬品（薬品A、薬品B、薬品の組合せA+B、および対照（薬品なし）など）に露出させることができ、また反応は、患者に対する個別化薬品反応の目的で、リアルタイムのフィードバックとして監視することができる。

#### 【0051】

一例では、レーストラック構成は、研究/創薬計器として有用である。動作の際には、3次元で画像化しながら、生細胞をレーストラック内で循環させることができる。サンプル内の各生細胞を化学および環境プロトコルに露出させることができ、また細胞の反応のわずかな変化は、所望の細胞タイプを示すことができる。刺激に対するアポトーシス、有糸分裂、壊死、分泌、および他のプログラムされた細胞反応の変動を、リアルタイムで高い感度で測定することができる。生細胞が所望の特性を示すとき、これらの細胞を採集することができる。1つのそのような採集方法は、2007年9月20日公開のHayengaの「Cantilevered coaxial flow injector apparatus and method for sorting particles」という名称の同時係属の米国特許出願公開第2007-0215528A1号に開示されている。同願の開示全体を、参照により本明細書に組み込む。

#### 【0052】

いくつかの代替実施形態では、金またはナノスフェアの抗体/DNAの標識付けのように標識を付けたナノ粒子を生細胞とともに使用して、特有の蛋白質、クロマチン、およびDNAに標識を付けることができる。たとえば、金ナノ粒子またはコロイド金は、吸収と散乱の両方のコントラストを有し、生きた細胞との生体適合性がある。蛍光標識されたナノスフェアおよびマイクロスフェアは、3次元画像または回折パターン内の光学コントラスト機構として吸収、蛍光、および散乱を有することができる。発色団およびフルオロフォアに加えてナノ粒子を使用すると、散乱という第3のコントラスト強調が可能になる。

「黒色」背景または視野で高いコントラストとして散乱信号を画像化する手段は、画像化対物レンズのものを上回る入射角で入射する光を照射し、したがって信号散乱だけが収集されるようにすることである。この画像は、最終画像から照射光子が除去される蛍光画像化に類似している。暗視野顕微鏡法を使用する2次元の生細胞画像化は、Duke Universityで行われている。たとえば、Curry, A., Hwang, W. L., およびWax, A. (2006), 「Epi-illumination through the microscope objective applied to dark-field imaging and microspectroscopy of nanoparticle interaction with cells in culture」、Optics Express 14(14): 6535~6542 頁を参照されたい。

10

#### 【0053】

回折パターン測定は、DNA、クロマチン、蛋白質、およびこれらの特有の標識付け強調の3次元の空間パターンを測定する上記の画像化技法と相補型の非画像化技法である。疾患特有の回折シグネチャは、細胞からの特有の散乱角度で測定される特有の空間周波数で見ることができる。レーザ・ビームからのゼロ次光は、生細胞からの弱散乱光より数桁大きいので、このゼロ次光が光学検出器またはカメラに到達するのを大幅に低減させるために、細胞の斜め照射の技法が提案される。この技法は、上記で論じたナノ粒子を使用する暗視野顕微鏡法に類似している。

#### 【0054】

20

上記のそれぞれの技法の例はまた、以下に示すいくつかの一般的な概念を使用して、組合せとして実施することができる。しかし、話を簡単にするために、そして生細胞の3次元画像化の開発段階中の複雑な不確定要素をなくすために、研究室の実装は、個々の技法の例として行われる可能性が最も高い。複数の画像化および測定技法を組み合わせるいくつかの例を、以下に提示する。

#### 【0055】

次に図6を参照すると、同じ経路に沿って別々の画像化ステージを含む光断層撮影プロセスを示す。別々の画像化ステージは、単一の微小毛細管などの同じ経路に沿って処理することができる。たとえば、第1のステージ611で、可視光の回折分析および細胞計数602を行い、その後第2のステージ612で、可視光の画像化604を行うことができる。生きた染料を使用して画像化する場合、第3のステージ613で、吸収280nmの画像化606を行い、その後第4のステージ614で、吸収260nmの画像化608を行うことができる。この例示的な実施形態では、細胞は、単一の回転毛細管を通して連続して下方へ動くので、各ステージの制限された視野内に位置合わせされるべきである。吸収280nmの画像化は、約275nmから285nmの範囲内の第1の波長のDUV光を物体1に照射することを含む。吸収260nmの画像化は、約255nmから265nmの範囲内の第2の波長のDUV光を物体1に照射することを含む。

30

#### 【0056】

別の例では、単一の画像化ステージが、260nmおよび280nmの波長の吸収など、1つまたは複数の画像コントラスト機構を組み合わせ、DUV吸収および固有蛍光を測定し、または1つもしくは複数の生きた染料に対する3つ以上の可視波長の吸収を測定する。光学画像化技法を組み合わせる構成要素は、ビーム分割および組合せのための複数の光学構成要素（ダイクロイックまたは偏光ビームスプリッタ）、ならびに場合によっては複数のカメラを使用することができる。別法として、複数の励起光源が時系列でパルス化される場合、またはフィルタ・ホイールもしくは実際の源が時系列で物理的に動かされ、もしくは閉じられる場合、単一のカメラおよび検出経路を使用することができる。単一のステージで画像化および測定を行うことにより、視野との高精度の位置合せのために、細胞の流れの軸方向の輸送を停止させることが可能になる。

40

#### 【0057】

さらに別の例では、ナノ粒子散乱体による生きた細胞染料の暗視野画像化と、回折パタ

50

ーン分析にレーザを用いる細胞の斜め照射とを組み合わせることができると有利である。この技法は、より高速で行うことができ、最初の結果が特定の細胞の詳細な3次元画像を保証する場合、より遅い後の3次元画像化ステージの前の最初のステージとすることができる。

【0058】

動作の際には、システムは、同じ経路に沿って別々の画像化ステージを含む光断層撮影プロセスを提供する。複数の生体が、経路25に沿って第1のステージ611へ輸送される。第1のステージで、複数の物体のうちの少なくとも1つの物体に可視光を照射して回折パターンを作製し、この回折パターンが、光センサによって感知される。コンピュータ・プログラムまたは等価物を使用して、回折パターンを分析し、回折分析を行う。第2のステージ612で、少なくとも1つの物体1に可視光を照射し、少なくとも1つの物体から出る可視光を感知して、第1の複数の疑似投影画像を作製する。第3のステージ613で、少なくとも1つの物体1に第1の波長のDUV光を照射し、少なくとも1つの物体から出る第1の波長のDUV光を感知して、第2の複数の疑似投影画像を作製する。第4のステージで、少なくとも1つの物体に第2の波長のDUV光を照射し、このDUV光を感知して、第3の複数の疑似投影画像を作製する。第1、第2、および第3の複数の疑似投影画像から導出される特徴、ならびに回折分析に基づいて、分類器610を使用して、複数の物体を分類し、または他の方法で分離することができる。分類器610は、統計分類器、適応分離器、ニューラル・ネットワーク、または等価物など、コンピュータ内に存在するソフトウェア内で通常実施される多くのタイプの従来の分離器のいずれかとすることができる。

【0059】

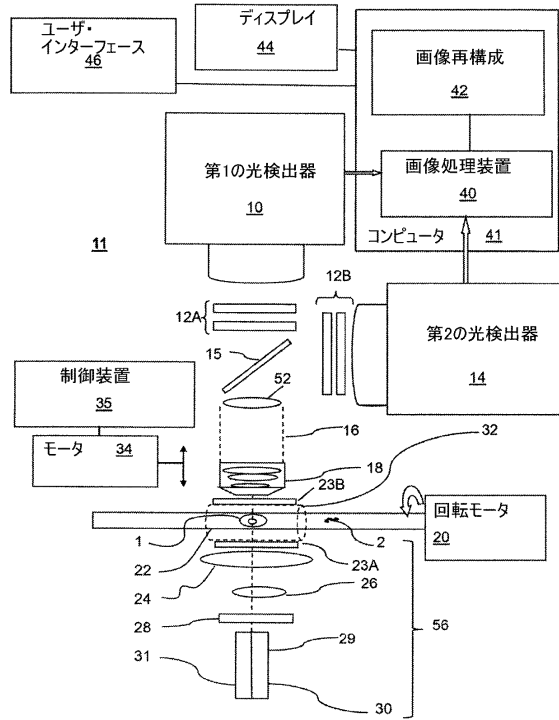
本発明について、特許法を順守するため、そして本発明の新規な原理を適用するのに必要な情報を当業者に提供するために、ならびにそのような例示的かつ特殊な構成要素を必要に応じて構築および使用するために、かなり詳細に本明細書に説明した。しかし、特に異なる機器およびデバイスによって本発明を実施できること、そして本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、機器の細部と動作手順の両方に関する様々な修正を実現できることを理解されたい。

10

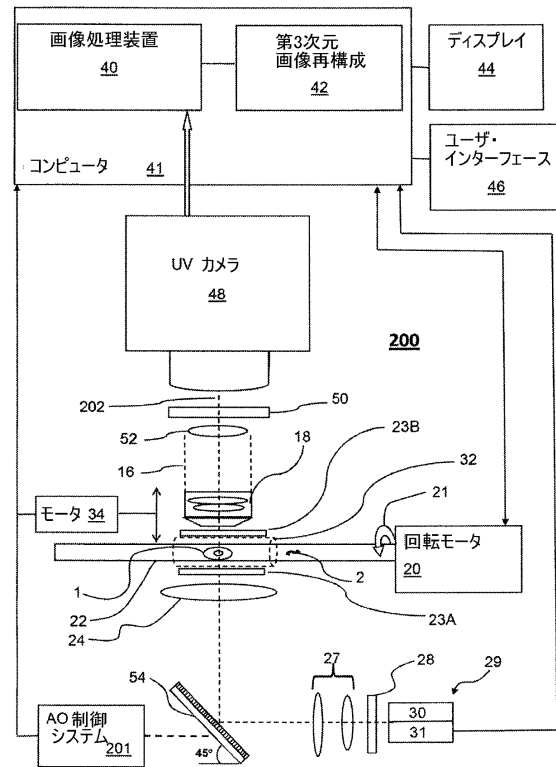
20



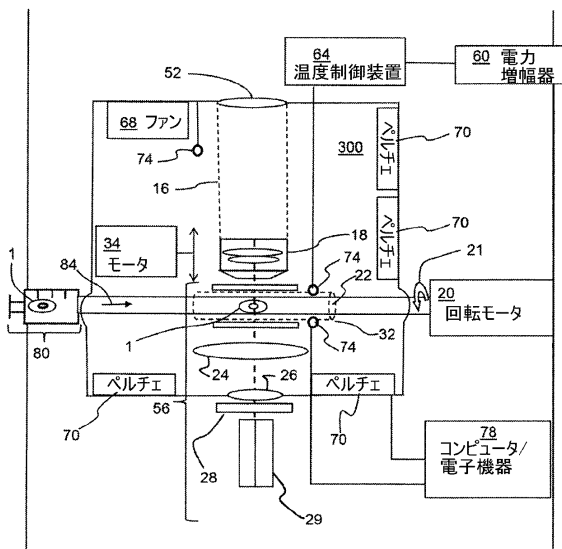
【図 1】



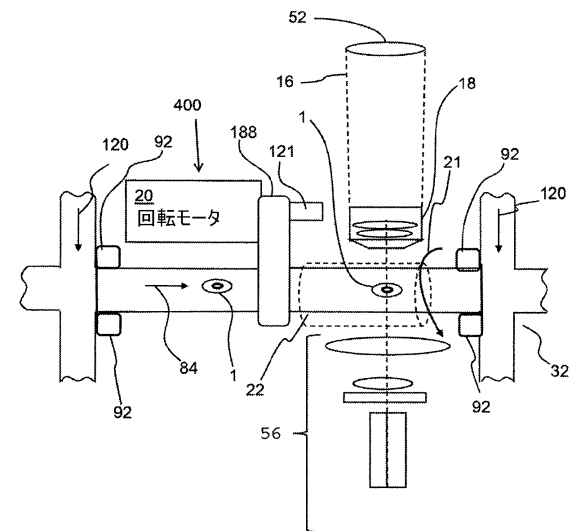
【図 2】



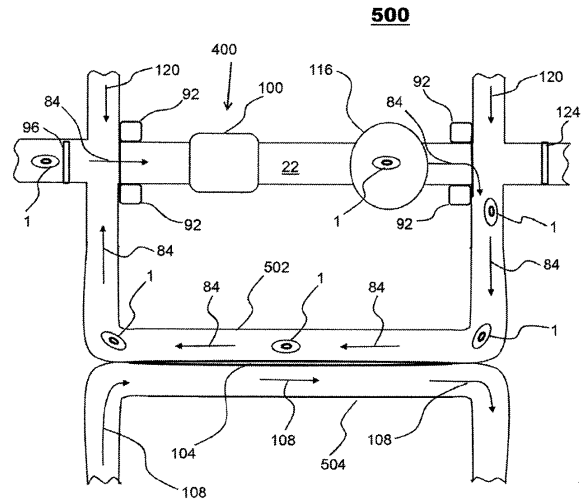
【図 3】



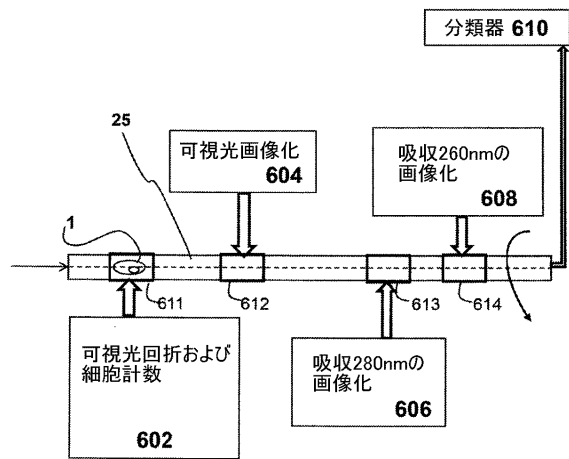
【図 4】



【図5】



【図6】



## フロントページの続き

(74)代理人 100160967

弁理士 濱 口 岳久

(72)発明者 セイベル, エリック ジェー.

アメリカ合衆国 98117 ワシントン, シアトル, サーティフォース アヴェニュー エヌ.  
ダブリュ. 6702

(72)発明者 ネルソン, アラン シー.

アメリカ合衆国 98335 ワシントン, ギグ ハーバー, フィフティシックス アヴェニュー  
コート エヌ.ダブリュ. 1509

(72)発明者 ファウバー, マーク イー.

アメリカ合衆国 98103 ワシントン, シアトル, エバンストン アヴェニュー エヌ. 97  
09

(72)発明者 ラーン, ジェー. リチャード

アメリカ合衆国 98074 ワシントン, サマミッシュ, エヌ.イー. フォーティサード プレ  
イス 21130

審査官 横尾 雅一

(56)参考文献 特表2006-509197(JP, A)

特表2005-502907(JP, A)

特表2005-523717(JP, A)

特開2007-113979(JP, A)

特表2005-524833(JP, A)

特表2003-529747(JP, A)

特表2005-537476(JP, A)

国際公開第2005/038438(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/74

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)