(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2012-521540
(P2012-521540A)
(43)公表日　平成24年9月13日(2012.9.13)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 21/64	(2006.01)	G01N 21/64	Z	2G043
G01N 21/27	(2006.01)	G01N 21/27	A	2G059

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 23 頁）

(21)出願番号	特願2012-500967 (P2012-500967)
(86)(22)出願日	平成22年3月18日 (2010.3.18)
(85)翻訳文提出日	平成23年9月29日 (2011.9.29)
(86)国際出願番号	PCT/US2010/027843
(87)国際公開番号	WO2010/108020
(87)国際公開日	平成22年9月23日 (2010.9.23)
(31)優先権主張番号	61/162,072
(32)優先日	平成21年3月20日 (2009.3.20)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/232,113
(32)優先日	平成21年8月7日 (2009.8.7)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　595154074
バイオ－ラド　ラボラトリーズ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５４７　ハーキュルズ　アルフレッド　ノーベル　ドライブ　１０００
(74)代理人　100142907
弁理士　本田　淳
(72)発明者　ホン、シン
アメリカ合衆国　９４５４７　カリフォルニア州　ハーキュリーズ　アルフレッド　ノーベル　ドライブ　１０００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】順次ライン走査符号化多色蛍光顕微鏡法および画像フローサイトメトリ

(57)【要約】
高速、高分解能画像サイトメトリを実施するシステムでは、ライン走査センサを利用する。特性解析される細胞は、走査領域を越えて移送される。光学系は、走査領域の一部の画像の焦点を少なくとも一つの線形光センサに合わせ、細胞が走査領域を通って移送される間にセンサに照射される光が繰り返し読み取られる。当該システムは、細胞を直接撮像してもよく、あるいは細胞内で蛍光を励起し、結果として蛍光によって細胞から放射される光を撮像してもよい。当該システムは、走査領域において狭帯域の照明を提供する可能性がある。当該システムは、同時多色蛍光画像サイトメトリを可能にする様々なフィルタおよび結像光学系を含んでいてもよい。複数の線形センサが備えられてもよく、信号対ノイズ比特性が改善された画像を構築するために個々のセンサによって集められた画像が結合されてもよい。

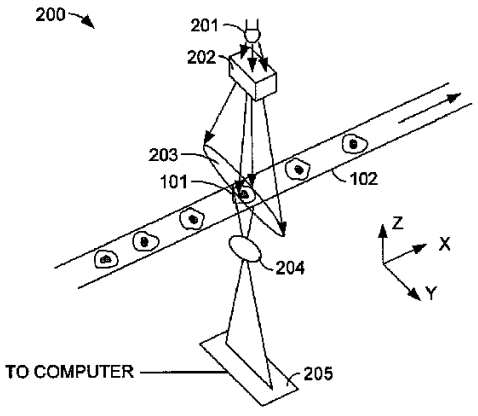


FIG. 2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
サイトメトリを実施するシステムであって、
光源と、
前記光源からの光を走査領域における楕円領域に集光する光成形素子と、
線形光センサと、
前記走査領域の一部分の画像の焦点を前記線形光センサに合わせる光学系と、を備え、
細胞が走査領域を通って移送され、前記光源によって照射される間に、前記システムが前記線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なう、システム。
【請求項２】
前記システムが半共焦点撮像を実施するように、前記線形センサに隣接したスリット開口をさらに備える、請求項１に記載のシステム。
【請求項３】
サイトメトリを実施するシステムであって、
走査領域を照射する光源と、
少なくとも二つの平行な線形光センサと、
前記走査領域の一部分の画像の焦点を前記少なくとも二つの平行な線形光センサに合わせる光学系と、を備え、
細胞が前記走査領域を通って移送され、前記光源によって照射される間に、前記システムが前記線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なう、システム。
【請求項４】
前記システムが半共焦点撮像を実施するように、前記線形センサに隣接したスリット開口をさらに備える、請求項３に記載のシステム。
【請求項５】
前記個々の線形光センサによって集められた画像が、組み合わせられて、単一線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ比特性が改善された画像が形成される、請求項３に記載のシステム。
【請求項６】
前記画像は、前記細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応する前記それぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することによって組み合わせられる、請求項５に記載のシステム。
【請求項７】
前記画像は時間遅延積分によって組み合わせられる、請求項５に記載のシステム。
【請求項８】
前記光源からの光を前記走査領域における楕円領域に集光する光成形素子をさらに備える、請求項３に記載のシステム。
【請求項９】
サイトメトリを実施するシステムであって、
少なくとも第１および第２の波長帯域を含む光によって照射される走査領域と、
前記細胞が照射されるように、前記走査領域を通って細胞を移送する手段と、
第１および第２の組の線形光センサであって、各組は少なくとも一つの線形光センサを備える、前記第１および第２の組の線形光センサと、
第３の波長帯域の放射光が主として前記第１の線形光センサの組に向けられ、第４の波長帯域の放射光が主として前記第２の線形光センサの組に向けられるように、前記細胞から放射された光を前記二つの線形光センサの組に選択的に向ける光学系と、を備え、
前記細胞が前記走査領域を通って移送される間に、前記システムが前記線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なう、システム。
【請求項１０】
各線形光センサの組は少なくとも二つの線形光センサを備える、請求項９に記載のシステム。

【請求項１１】
前記放射光は蛍光を受けて放射される、請求項９に記載のシステム。
【請求項１２】
前記光学系は、
前記細胞から放射される光を受け取って進路変更させる対物レンズと、
前記進路変更された光の第１の部分を前記第１の線形光センサの組に向けて反射し、前記進路変更された光の第２の部分を伝播するミラーと、
をさらに備える、請求項９に記載のシステム。
【請求項１３】
光の前記第１の部分を受け取り、前記対物レンズと協働して前記細胞の画像を前記第１の線形光センサの組に形成する第１のチューブレンズをさらに備える、請求項１２に記載のシステム。
【請求項１４】
光の前記第２の部分を受け取り、前記対物レンズと協働して前記細胞の画像を前記第２の線形光センサの組に形成する第２のチューブレンズをさらに備える、請求項１３に記載のシステム。
【請求項１５】
前記システムが半共焦点撮像を実施するように、前記線形光センサの組の少なくとも一つに隣接したスリット開口をさらに備える、請求項９に記載のシステム。
【請求項１６】
線形光センサの各組は少なくとも二つの線形光センサを備え、線形光センサの各組に対して、前記組内の前記個々の線形光センサによって集められた画像が組み合わせられ、前記組内の単一の線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ特性が改善された画像が形成される、請求項９に記載のシステム。
【請求項１７】
前記画像は、前記細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応する前記それぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することによって組み合わせられる、請求項１６に記載のシステム。
【請求項１８】
前記画像は時間遅延積分によって組み合わせられる、請求項１６に記載のシステム。
【請求項１９】
サイトメトリを実施するシステムであって、
少なくとも第１および第２の波長帯域を含む光によって照射される走査領域と、
前記細胞が照射されるように前記走査領域を通って細胞を移送する手段と、
少なくとも一つの線形光センサを備える組と、
第３の波長帯域の放射光が主として前記線形光センサの組の第１の部分に向けられ、第４の波長帯域の放射光が主として前記線形光センサの組の第２の部分に向けられるように、前記細胞から放射された光を前記線形光センサの組の二つの部分に選択的に向ける光学系と、を備え、
前記細胞が前記走査領域を通って移送される間に、前記システムが前記線形光センサの組に照射される光の読取りを繰り返して行なう、システム。
【請求項２０】
前記組は少なくとも二つの線形光センサを備える、請求項１９に記載のシステム。
【請求項２１】
前記放射光は蛍光を受けて放射される、請求項１９に記載のシステム。
【請求項２２】
前記システムが半共焦点撮像を実施するように、前記線形センサの組に隣接したスリット開口をさらに備える、請求項１９に記載のシステム。
【請求項２３】
前記組は少なくとも二つの線形光センサを備え、前記組内の前記個々の線形光センサに

よって集められた画像が組み合わされ、前記組内の単一の線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ特性が改善された画像が形成される、請求項１９に記載のシステム。

【請求項２４】

前記画像は、前記細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応する前記それぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することによって組み合わせられる、請求項２３に記載のシステム。

【請求項２５】

前記画像は時間遅延積分によって組み合わせられる、請求項２３に記載のシステム。

【請求項２６】

サイトメトリを実施するシステムであって、

光源によって照射される走査領域と、

少なくとも一つの線形光センサを備える組と、

前記走査領域の一部の画像の焦点を前記線形光センサの組に合わせる光学系と、

を備え、

細胞が前記走査領域を通って移送され、前記光源によって照射される間に、前記システムが前記線形光センサの組に照射される光の読取りを繰り返して行なわれ、

第１の実験中に、前記線形光センサの組の長さに対応する寸法内の第１のピクセル数を有する第１の画像が作成され、第２の実験中に、前記線形光センサの組の長さに対応する寸法内の第２のピクセル数を有する第２の画像が作成され、前記第２のピクセル数は第１のピクセル数よりも少ないように構成可能である、システム。

【請求項２７】

前記組は少なくとも二つの線形光センサを備える、請求項２６に記載のシステム。

【請求項２８】

前記第２の画像内のピクセルの数は、前記線形光センサの組から前記ピクセルの全部よりも少ないピクセルを選択することによって削減される、請求項２６に記載のシステム。

【請求項２９】

前記第２の画像内のピクセルの数は、前記線形光センサの組から前記ピクセルの一部または全部をビニングすることによって削減される、請求項２６に記載のシステム。

【請求項３０】

特定線形センサに照射される光の各読取りによって前記特定センサに照射される光の量の単一の数値表現が得られる、請求項２６に記載のシステム。

【請求項３１】

楕円照明領域を作り出すシステムであって、

ビームを発生するレーザと、

前記ビームを受け取って前記ビームを第１の軸のみで収束させる円柱レンズと、

前記円柱レンズの後で前記ビームを受け取り、前記第１の軸に対して直角の第２の軸で前記ビームを発散させる、無限遠補正光学系の一部である対物レンズと、

を備える、システム。

【請求項３２】

前記円柱レンズと前記対物レンズの間に波長選択ミラーをさらに備える、請求項３１に記載のシステム。

【請求項３３】

前記対物レンズは前記円柱レンズから前記円柱レンズの焦点距離よりも小さい距離をあけて配置される、請求項３１に記載のシステム。

【請求項３４】

前記対物レンズは前記円柱レンズから前記円柱レンズの焦点距離よりも大きい距離をあけて配置される、請求項３１に記載のシステム。

【請求項３５】

前記ビームは前記対物レンズを離れるにつれて前記第１の軸において発散している、請

求項３１に記載のシステム。
【請求項３６】
前記ビームは前記対物レンズを離れるにつれて前記第１の軸において収束している、請求項３１に記載のシステム。
【請求項３７】
サイトメトリを実施する方法であって、
光源を用いて走査領域における楕円領域を照射することであって、前記楕円領域を照射することは光成形素子を用いて前記光源からの光を前記楕円領域に集光することをさらに含む、前記光源を用いて走査領域における楕円領域を照射することと、
光学系を用いて前記走査領域の一部の画像の焦点を線形光センサに合わせることと、
前記細胞が前記走査領域を通って移送され、前記光源によって照射される間に、前記線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なうことと、
を備える、方法。
【請求項３８】
前記システムが半共焦点撮像を実施するように、前記線形光センサに照射される光を前記線形光センサに隣接するスリット開口に通すことをさらに備える、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
光源を用いて走査領域を照射することと、
光学系を用いて前記走査領域の一部の画像の焦点を少なくとも二つの平行な線形光センサに合わせることと、
細胞が前記走査領域を通って移送され、前記光源によって照射される間に、前記二つの平行な光センサに照射される光の読取りを繰り返して行なうことと、
を備える、サイトメトリを実施する方法。
【請求項４０】
単一の線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ特性が改善された画像を形成するために、前記個々の線形光センサによって集められた画像を組み合わせることをさらに備える、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
画像を組み合わせることは、前記細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応する前記それぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することをさらに備える、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
画像を組み合わせることは、時間遅延積分を用いて画像を組み合わせることをさらに備える、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
前記光源は少なくとも第１および第２の波長帯域内の光を含む照明を生成し、当該方法は、さらに、
前記光学系を用いて、第３の波長帯域内の前記細胞から放射された光を主として前記二つの平行な光センサの一つに向け、前記光学系を用いて、第４の波長帯域内の前記細胞から放射された光を主として前記二つの平行な光センサの他の一つに向けること、
をさらに備える、請求項３９に記載の方法。
【請求項４４】
前記光学系を用いて、前記走査領域の一部の画像の焦点を平行な線形光センサの少なくとも二つの組に合わせることをさらに備え、各組は少なくとも二つの線形光センサを備える、請求項３９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２００９年３月２０日に出願された米国仮特許出願第６１／１６２，０７２

号明細書、および２００９年８月７日に出願された米国仮特許出願第６１／２３２，１１３号明細書に対する優先権を主張し、その開示はすべての目的のために参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００２】

サイトメトリは、生体細胞の計数および特性解析に関する技術的な専門分野である。図１は、フローサイトメトリとして知られる一技術の簡易図を示す。フローサイトメトリの基本形では、細胞１０１が流体内に懸濁され、透明な細管１０２内で一列になって伴流される。伴流は、流体力学収束を含むいくつかの方法のいずれかで実現されうる。光源１０３は、測定位置１０４を通過する各細胞１０１を照射する。光源１０３は、たとえば、レーザであってもよい。光源１０３からの光は、測定されている細胞１０１によって散乱される。一部の光１０５は、細胞１０１に達するように進むので一般に同じ方向に散乱される。光１０５は、「前方散乱」と呼ばれることがあり、前方センサ１０６によって集められことがある。一部の光は他の方向にも散乱されることがある。この光は、「側方散乱」と呼ばれることもあり、側方散乱光１０７の一部は一つ以上の他のセンサ１０８によって集められることがある。センサ１０６および１０８からの出力信号はコンピュータ１０９に送られ、コンピュータ１０９は信号を記憶し解析することができる。散乱光の量と分布を解析することによって、各細胞に関する情報、たとえば、各細胞のサイズと各細胞の内部構造に関する一部の情報とを識別することが可能である。

【０００３】

フローサイトメトリは、散乱光を直接測定することもでき、蛍光を利用することもできる。蛍光サイトメトリでは、細胞は一つ以上の発蛍光団で標識されることがあり、発蛍光団は光源１０３からの光によって励起されて蛍光による光を発生する。放射光の性質によって、細胞に関する新たな情報が明らかになる可能性がある。

【０００４】

図１に示す技術は、細胞構造に関する情報を推論するために散乱光の測定に全面的に依存するものであるが、個々の細胞の画像を生成しない。「画像サイトメトリ」と呼ばれる別の技術では、個々の細胞の画像がカメラまたは顕微鏡によって記録される場合がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

改良された画像サイトメトリシステムは、線形光センサを用いて高速、高分解能サイトメトリを実施する。一部の実施形態では、光源からの光が楕円の走査領域に集光され、走査領域を通って移送されている細胞を照射する。光学系が走査領域の一部の画像の焦点を線形光センサに合わせる。システムは、線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なう。システムは、システムが半共焦点撮像を実施するように、線形光センサに隣接したスリット開口を含んでいてもよい。

【０００６】

一部の実施形態では、光源からの光が走査領域を通って移送されている細胞を照射する。光学系が、走査領域の一部の画像の焦点を少なくとも二つの平行な線形光センサに合わせる。当該システムは、線形光センサに照射される光の読取りを繰り返して行なう。当該システムは、当該システムが半共焦点撮像を実施するように、線形光センサに隣接したスリット開口を含んでいてもよい。一部の実施形態では、単一の線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ比特性が改善された画像を形成するために、個々の線形光センサによって集められた画像が組み合わせられる。当該組合せは、細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応するそれぞれの画像からピクセル値をディジタル的に結合することによって実施されてもよい。当該組合せは、時間遅延積分によって実施されてもよい。一部の実施形態では、光源からの光は走査領域における楕円領域に集光される。

【０００７】

別の実施形態では、サイトメトリを実施するシステムは、少なくとも第１および第２の

波長帯域を含む光によって照射される走査領域と、細胞が照射されるように走査領域を通って細胞を移送する手段とを備える。当該システムは、さらに、第１および第２の組の線形光センサを備え、各組は少なくとも一つの線形光センサと、光学系とを備える。当該光学系は、第３の波長帯域の放射光が主として第１の線形光センサの組に向けられ、かつ第４の波長帯域の放射光が主として第２の線形光センサの組に向けられるように、細胞から放射される光を二つの線形光センサの組に選択的に向ける。細胞が走査領域を通って移送される間に、当該システムが線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なう。各光センサの組は、少なくとも二つの線形光センサを備えていてもよい。放射光は蛍光を受けて放出される可能性がある。当該システムは、細胞から放出される光を受け取って光路変更する対物レンズと、光路変更された光の第１の部分を第１の線形光センサの組に向けて反射して光路変更された光の第２の部分を伝播するミラーとを含んでいてもよい。当該システムは、光の第１の部分を受け取って対物レンズと協働して第１の線形光センサの組に細胞の画像を形成する第１のチューブレンズを備えていてもよい。一部の実施形態では、当該システムは、さらに、光の第２の部分を受け取って対物レンズと協働して第２の線形光センサの組に細胞の画像を形成する第２のチューブレンズを備えていてもよい。当該システムは、システムが半共焦点撮像を実施するように、線形光センサの組の少なくとも一つに隣接したスリット開口を含んでいてもよい。一部の実施形態では、線形光センサの各組は少なくとも二つの線形光センサを備え、線形光センサの各組に対して、その組の個々の線形光センサによって集められた画像が組み合わせられて、その組の単一線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ特性が改善された画像を形成する。当該組合せは、細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応するそれぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することによって実施されてもよい。当該組合せは、時間遅延積分によって実施されてもよい。

【０００８】

別の実施形態では、サイトメトリを実施するシステムは、少なくとも第１および第２の波長帯域を含む光によって照射される走査領域と、細胞が照射されるように走査領域を通って細胞を移送する手段とを備える。当該システムは、さらに、少なくとも一つの線形光センサと光学系を備えるセットを含む。光学系は、第３の波長帯域の放射光が主として線形光センサの組の第１の部分に向けられ、第４の波長帯域の放射光が主として線形光センサの組の第２の部分に向けられるように、線形光センサの組の二つの部分に細胞から放出された光を選択的に向ける。細胞が走査領域を通って移送される間に、システムが線形光センサの組に照射される光の読取りを繰り返して行なう。当該組は、少なくとも二つの線形光センサを備えていてもよい。放射光は蛍光を受けて放出されてもよい。当該システムは、システムが半共焦点撮像を実施するように、線形光センサの組に隣接したスリット開口を含んでいてもよい。一部の実施形態では、当該組は少なくとも二つの線形光センサを備え、当該組の個々の線形光センサによって集められた画像は組み合わせられて、当該組の単一線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ特性が改善された画像を形成する。当該組合せは、細胞の実質的に同じそれぞれの位置に対応するそれぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することによって実施されてもよい。当該組合せは、時間遅延積分によって実施されてもよい。

【０００９】

別の実施形態では、サイトメトリを実施するシステムは、光源によって照射される走査領域と、少なくとも一つの線形光センサを備える組と、走査領域の一部の画像の焦点を線形光センサの組に合わせる光学系とを含む。細胞が走査領域を通って移送され、光源によって照射される間に、当該システムが線形光センサの組に照射される光の読取りを繰り返して行なう。この実施形態では、当該システムは、第１の実験中に、線形光センサの組の長さに対応する寸法内の第１のピクセル数を有する第１の画像が作成され、第２の実験中に、線形光センサの組の長さに対応する寸法内の第２のピクセル数を有する第２の画像が作成され、ピクセルの第２の数は第１の数よりも少ないように構成可能である。当該組は少なくとも二つの線形光センサを備えていてもよい。第２の画像のピクセルの数は、線形

光センサの組からピクセルの全部よりも少ないピクセルを選択することによって削減されてもよい。第２の画像のピクセルの数は、線形光センサの組からピクセルの一部または全部をビニングすることによって削減されてもよい。線形センサの特定の一つに照射される光の各読取りによって、特定センサに照射される光の量の単一の数値表現が得られる可能性がある。

【００１０】

別の実施形態では、楕円照射領域を作り出すシステムは、ビームを発生するレーザと、ビームを受け取ってそのビームを第１の軸のみに収束させる円柱レンズと、円柱レンズの後でビームを受け取る対物レンズとを含む。対物レンズは、無限遠補正された光学系の一部であり、ビームを第１の軸に対して直角の第２の軸に収束させる。当該システムは、円柱レンズと対物レンズの間に波長選択ミラーを含んでいてもよい。一部の実施形態では、対物レンズは、円柱レンズから円柱レンズの焦点距離よりも小さい距離をあけて配置される。一部の実施形態では、対物レンズは、円柱レンズから円柱レンズの焦点距離よりも大きい距離をあけて配置される。一部の実施形態では、ビームは対物レンズを離れるにつれて第１の軸において発散している。一部の実施形態では、ビームは対物レンズを離れるにつれて第１の軸において収束している。

【００１１】

別の実施形態では、サイトメトリを実施する方法は、光源を用いて走査領域における楕円領域を照射することを備え、楕円領域を照射することは、さらに、光成形素子を用いて光源からの光を楕円領域に集光することを含む。当該方法は、さらに、光学系を用いて、走査領域の一部の画像の焦点を線形光センサに合わせることと、細胞が走査領域を通って移送され、且つ光源によって照射される間に線形センサに照射される光の読取りを繰り返して行なうこととを備える。一部の実施形態では、当該方法は、さらに、システムが半共焦点撮像を実施するように、線形光センサに照射される光を線形光センサの組に隣接したスリット開口に通すことを含んでいてもよい。

【００１２】

別の実施形態では、サイトメトリを実施する方法が、光源を用いて走査領域を照射することと、光学系を用いて走査領域の一部の画像の焦点を少なくとも二つの平行な線形光センサに合わせることとを備える。この実施形態の方法は、さらに、細胞が走査領域を通って移送され、且つ光源によって照射される間に、二つの平行な光センサに照射される光の読取りを繰り返して行なうことを含む。一部の実施形態では、当該方法は、さらに、単一の線形光センサによって集められた画像と比較して信号対ノイズ特性が改善された画像を形成するために、個々の線形光センサによって集められた画像を組み合わせることを備える。画像を組み合わせることは、さらに、細胞の実質的に同じそれぞれに位置に対応するそれぞれの画像からのピクセル値をディジタル的に結合することを含んでいてもよい。画像を組み合わせることは、さらに、時間遅延積分を用いて画像を組み合わせることを含んでいてもよい。一部の実施形態では、光源は、少なくとも第１および第２の波長帯域の光を含む照明を作り出し、当該方法は、さらに、光学系を用いて第３の波長帯域の細胞から放射される光を主として二つの平行な光センサの一方に向け、光学系を用いて第４の波長帯域の細胞から放射される光を主として二つの平行な線形光センサの他方に向けることを備える。一部の実施形態では、当該方法は、さらに、光学系を用いて、走査領域の一部の画像の焦点を平行な線形光センサの少なくとも二つの組に合わせることを備え、各組は少なくとも二つの線形光センサを備える。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】フローサイトメトリとして知られる技術の簡易図を示す。

【図２】ある実施形態による高速、高分解能ライン走査画像サイトメトリシステムの簡易概念図を示す。

【図３】（ａ）～（ｄ）は、画像形成過程を示す。

【図４】本発明の別の実施形態によるシステムの直交図を示す。

【図５】本発明の別の実施形態によるシステムの直交図を示す。
【図６】本発明の別の実施形態によるシステムの直交図を示す。
【図７】本発明のさらに別の実施形態によるシステムの直交図を示す。
【図８】別の実施形態によるシステムの直交図を示す。
【図９】（ａ）～（ｃ）は、楕円照明領域を作り出すシステムの実施形態を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
図２は、ある実施形態による高速、高分解能ライン走査画像サイトメトリシステム２００の簡易概念図を示す。図２のシステムはフロー・サイトメトリ・システムであるが、本発明の実施形態が他の種類のサイトメトリにも同様に利用されてよいことを当業者は認識するであろう。
【００１５】
細胞１０１は、流体内に懸濁されてチューブ１０２の中を一列になって伴流される。当該システムは、多くの異なる種類の細胞を特性解析するために使用されてもよいが、典型的な応用では、細胞１０１は、たとえば、直径が約１０から２０μｍであってもよく、たとえば、毎秒１０ｍｍの速度でチューブ１０２の中を進んでもよい。光源２０１は、チューブ１０２に光の場２０３を供給する。光源２０１は、レーザ、発光ダイオード、白熱光源、蛍光光源、または別の種類の光源であってもよい。光源２０１は、実質的に単色光、広域スペクトル光、あるいは二つ以上の狭波長帯域を含む光を発生してもよい。オプションの光成形素子２０２は、光源２０１からの光を細胞１０１が移送される楕円領域またはスリット状の場２０３に集中するために様々なレンズ、プリズム、反射器または他の光学部品を含んでいてもよい。以下で説明するように、細線画像のみが走査されるので、対物視野全体が照射される従来の落射照明とは対照的に細線場が照射されるだけで済む。光成形素子２０２によって提供される集中は、通常の対称的な落射照明と比較して、有効な照明レベルを２から６倍も高めることができる。
【００１６】
光源２０１からの一部の光は、伝播されてまたは細胞１０１の一つによって散乱され、その少なくとも一部分は場２０３内にある。光の一部は、一つ以上のレンズ２０４によって線形センサ２０５に経路変更される。線形センサ２０５は、たとえば、電荷結合素子（ＣＣＤ）センサ、相補型金属酸化膜半導体（ＣＭＯＳ）センサ、または一列に配置された複数の感光部位を有する別の種類のセンサであってもよい。レンズ２０４およびセンサ２０５は、たとえば、独国、アーレンスブルク（Ａｈｒｅｎｓｂｕｒｇ）のバスラー　アーゲー（Ｂａｓｌｅｒ　ＡＧ）社が販売するバスラー　スプリント（Ｂａｓｌｅｒ　Ｓｐｒｉｎｔ）ライン走査ＣＭＯＳカメラなどのライン走査カメラの部品であってもよい。個々のセンサ部位は「ピクセル」と呼ばれることがある。また、センサピクセルによって検知された走査ラインの対応する部位もピクセルと呼ばれることがある。センサ２０５は、たとえば、各列が５１２、１０２４、２０４８、またはその他の適切な数のピクセルを含む、一つ以上のピクセル列であってもよい。ピクセルの列に照射される光の強度は、ピクセルアレイを清浄にし（clean）、電荷を所定の露光時間ピクセル部位に蓄積させた後、蓄積電荷量を光強度を表わす数値に変換することによって読み取られてもよい。この過程は、細胞が走査範囲を通過するときに繰り返し実施される。一実施形態例では、システムは、２０μｓｅｃごとに、すなわち、５０ｋＨｚの走査速度で読取り（「ライン走査」）を行なってもよい。毎秒１０ｍｍの細胞移送速度と５０ｋＨｚの走査速度を採用すると、２００ｎｍの画像ピクセルサイズが得られる。他の移送速度と走査速度が可能であり、したがって他の画像ピクセルサイズが得られる可能性がある。得られたアレイの測定値は、細胞の近似的な画像に再構築されうる。
【００１７】
図３（ａ）～（ｃ）は画像形成過程を示す。図３（ａ）では、走査ライン３０１が、ピクセルａ、ｂ、ｃ、ｄ、およびｅを含む。細胞１０１は、図３（ｂ）に示すように、走査ライン３０１を越えて移送され、図３（ｂ）は連続サンプル時刻$Ｔ_{1}$～$Ｔ_{7}$に細胞１０１に

重畳された走査ライン３０１を示す。図３（ｂ）は、サンプル時刻ごとに正確に１ピクセルを横切る細胞を示すが、これは必要条件ではなく、実際には、細胞移動速度、サンプルレート、およびピクセルサイズのある組合せに対して横切るだけとなる。実際に、連続的な走査ラインは撮像されている細胞に重なる場合があり、あるいは、連続的な走査ラインによって読み取られる細胞の範囲間に隔たりが存在する場合がある。ピクセルａ、ｂ、ｃ、ｄ、およびｅによって読み取られる光レベルは、細胞１０１の構造によって影響を受ける。たとえば、どの細胞も走査ライン３０１を横切らないとき、比較的高い光レベルが記録される。細胞１０１の比較的透明な部分がピクセルを横切るとき、そのピクセルによって記録される光レベルはやや低下する。細胞１０１の核がピクセル内にあるとき、そのピクセルに記録される光レベルは著しく低下する可能性がある。図３（ｃ）は、時間の関数としてピクセルａ、ｂ、およびｃに記録される光レベル（０から１の範囲の任意の目盛りの）のトレースを示す。図３（ｄ）は、複数の連続的なライン走査中に走査されたデータを一緒に重ねることによって形成されて、表示された階調レベルによる各数値的な光の読取りを表わす再構築された画像を示す。図３（ｄ）は数回サンプリングされる数個のピクセルだけを用いて構築され、したがって、細胞１０１の比較的粗雑な模写を示すが、実際に、本発明の実施形態によるシステムでは各細胞の通過中により多くのラインあるいはより少ないラインを走査してもよく、各ラインは図示よりも多くのあるいは少ないピクセルを含んでいてもよい。一実施形態では、システムは各細胞の通過中におよそ５０本のラインを走査してもよく、各ラインはおよそ５０個のピクセルを含んでいてもよい。走査されたラインと各細胞のために影響を受けるピクセルの正確な数は、細胞のサイズと、ライン走査周波数と、細胞が走査ラインを流れ去る速度と、使用される具体的なセンサおよび光学部品とに依存する。

【００１８】

システムの理論的な分解能は、主に対物レンズの品質に依存する。また、システムの実際の走査分解能は、走査速度と、走査ラインを通過する細胞の移送速度と、使用される具体的なセンサおよび光学系とに依存する。Ｙ方向のピクセル分解能は、使用される具体的なレンズおよびセンサを含む結像系によって決定される。Ｘ方向のピクセル分解能は、ｖ・ｄｔに等しく、ここで、ｖはサンプル搬送速度であり、ｄｔはカメラの露光時間である。好ましくは、ｖは、既知のパラメータであり、具体的な流動実験の前に予め決定されるか、あるいは細胞がシステムを通過する過程において測定される。理想的には、走査されている細胞は、その走査ラインを通過中に無回転かつ無振動のはずである。

【００１９】

図２のシステムの動作については直接光画像化との関連で前述しており、光源２０１からの散乱光はセンサ２０５によって測定される。蛍光画像化を実現するためにも同じ原理で動作するシステムが採用されうるし、事実、システムは蛍光画像化に特に役立つ可能性がある。その場合、光源２０１からの光は、測定されている細胞１０１内で蛍光を励起することになり、得られる放射光が集められてセンサ２０５によって測定されることになる。放射光は、一般に、光源２０１からの励起光よりも長い波長となる。蛍光画像化では、様々なフィルタまたは構成部品の幾何学的配置を用いて光源２０１の受光からセンサ２０５を遮蔽することが好ましいかもしれず、したがって、光源光が優勢になったり蛍光によって放射される光の測定を妨げたりすることはない。典型的に、蛍光によって放射される光は光源光ほど強力でなく、直接画像化の場合よりも蛍光画像化の場合の方が、より長い露光時間、より強力な照明、またはより高感度のセンサが求められるかもしれない。また、図３（ｃ）に示す一時的な信号変化の形は、蛍光画像化では直接画像化と異なる場合がある。直接画像化では、細胞内の付加構造によって、センサ２０５の対応するピクセルによって受け取られる光が少なくなる傾向がある。蛍光画像化では、付加構造が付加的な発蛍光団を持つ場合があり、小さい構造の細胞部分に対応するピクセルと比較して対応するセンサピクセルに達する光が多くなる可能性がある。

【００２０】

図４は、本発明の別の実施形態によるシステム４００の直交図を示す。図４の実施形態

は、単一色の蛍光画像サイトメトリに特に適している可能性がある。図４の実施形態では、光源４０１が光を放射する。光源４０１は、レーザ、発光ダイオード、白熱光源、蛍光光源、または別の種類の光源であってもよい。光源４０１は、実質的に単色光、広域スペクトル光、あるいは二つ以上の狭波長帯域含む光を発生してもよい。一実施形態例では、光源４０１は、公称波長が４８８ｎｍの光を放射するレーザである。特に、光源４０１が広域スペクトル光である場合や具体的なサイトメトリ実験にとって望ましくない波長を生成する場合は、システムによって利用される光の波長帯域をさらに狭めるために励起フィルタ４０２が使用されてもよい。オプションの光成形素子または集光レンズ４０３は、細胞１０１が移送されている走査領域４０４に放射光を集中してもよい。好ましくは、細胞１０１は、光源４０１からの光によって励起されるときに蛍光を発する一つ以上の発蛍光団で標識されている。米国、カリフォルニア州カールズバッド（Ｃａｒｌｓｂａｄ）のライフ　テクノロジーズ　コーポレイション（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）社が販売するアレクサ　フルオル（ＡＬＥＸＡ　ＦＬＵＯＲ）（商標）シリーズの発蛍光団など、様々な発蛍光団が知られている。光成形素子または集光レンズ４０３によって提供される集光は、細胞１０１の実効照明を改善してより強力な蛍光信号をもたらす。信号が強力になると、システムで使用されるセンサの露光時間の制限が緩和される。楕円またはスリット状の照明場は、半導体レーザや発光ダイオードなど、自然な非対称照明パターンを有する光源によく適している。

【００２１】

細胞１０１から散乱される光は、対物レンズ４０５によって集められて進路変更され、ダイクロイックミラー４０６から反射し、チューブレンズ４０８を通過し、ライン走査カメラに達して、そこで処理ユニット４１０による解析のために走査領域４０４の折れ線画像が集められる。カメラ４０９に供給される光波長の帯域を狭めるために、放射フィルタ４０７がシステム内に設置されてもよい。また、ダイクロイックミラー４０６がフィルタ処理を行なってもよい。このフィルタ処理は、細胞１０１によって散乱される可能性のある光源４０１からの直接光の影響を抑制する可能性がある。対物レンズ４０５およびチューブレンズ４０８は、好ましくは、これらの間に「無限遠空間」が作り出されるように、無限遠補正光学系を形成する。（当技術分野で知られる）このようなシステムでは、システムの性能は、対物レンズとチューブレンズの距離に比較的鈍感であり、ダイクロイックミラー４０６および放射フィルタ４０７など、他の構成要素を挿入する余地を与える。

【００２２】

図５は、本発明の別の実施形態によるシステム５００の直交図を示す。図５のシステムは、同時二色蛍光画像サイトメトリ用に構成される。図５のシステムでは、二帯域の波長を備える励起光が画像化されている細胞１０１に提供される。これは、実線および鎖線で示される種々の波長の光を生成する二つの光源５０１によって図５に描かれている。光は、さらに、一つ以上のフィルタ５０２によって調整されてもよい。他の構成も考えられる。たとえば、単一の広域スペクトル光源が利用されてもよく、特定帯域の波長がフィルタ５０２によって優先的に選択されてもよい。あるいは、単一の光源が二つの異なる蛍光波長を励起するために使用されうる。好ましい実施形態では、光源５０１は、一つは５３２ｎｍの公称波長で第１の狭帯域の光を生成し、他の一つは６３３ｎｍの公称波長で第２の狭帯域の光を生成する、二つのレーザを備える。光は、光形成素子または集光レンズ５０３によって走査領域５０４に集光されてもよい。素子５０３は、様々なレンズ、プリズム、反射器または他の光学部品を単独でまたは組み合わせて備えていてもよく、好ましくは、光源５０１によって生成された光を走査領域５０４の楕円領域に集光する。

【００２３】

好ましくは、光源５０１からの励起光が細胞１０１に達するとき少なくとも二つの異なる色特性の光が蛍光によって生成されるように、細胞１０１は一つ以上の発蛍光団で標識される。たとえば、一つの発蛍光団は５３２ｎｍの励起光に強い反応を示して約５５０ｎｍの放射ピークを有する放射光を生成してもよく、第２の発蛍光団は６３３ｎｍの励起に強い反応を示して約６５０ｎｍの放射ピークを有する放射光を生成してもよい。これらの

異なる放射は、二色の励起光を表わす方法と同様の方法で鎖線および実線を用いて図５で近似的に表わされるが、放射後に特定の線種で表わされる光は、一般に、同じ線種で表わされる励起光と同じスペクトル特性を有しないことは理解されたい。

【００２４】

走査領域５０４からの光は、この後、対物レンズ５０５によって集められ、ダイクロイックミラー５０６に向けられる。ミラー５０６は、基本的に波長帯域からの光がミラー５０６から反射され残る光が通過されるように、何らかのフィルタ処理を施されてもよい。ミラー５０６から反射される光は、別の放射フィルタを通過してさらに光のスペクトル特性を制限し、この後、チューブレンズ５０８を通過してカメラ５０９に達してもよい。それゆえ、カメラ５０９は、細胞１０１における第１の発蛍光団マーカーによって放射された光を優先的に受け取り、光源５１０のいずれからの光によっても、第２の発蛍光団マーカーによって放射される光からもほとんど悪影響を受けることがない。すなわち、カメラ５０９に達する光は、第１の発蛍光団の蛍光放射から選択される第３の波長帯域に含まれることが好ましい。

【００２５】

ダイクロイックミラー５０６を通過した光は、この後、別のダイクロイックミラー５１０から反射され、別のダイクロイック放射フィルタ５１１を通過し、第２のチューブレンズ５１２を通過し、カメラ５１３に達してもよい。それゆえ、カメラ５０９は細胞１０１内の第２の発蛍光団マーカーによって放射される光を優先的に受け取り、光源５１０のいずれからの光によっても、第１の発蛍光団マーカーによって放射される光からもほとんど悪影響を受けることがない。すなわち、カメラ５１３に達する光は、第２の発蛍光団の蛍光放射から選択される第４の波長帯域に含まれることが好ましい。

【００２６】

カメラ５０９および５１３は、この後、種々の放射スペクトルで細胞１０１の同時画像を走査しうる。カメラ５０９および５１３の出力は、記憶、解析、表示または他の目的のために処理ユニット５１４に渡される。処理ユニット５１４は、たとえば、画像データを処理しうるコンピュータシステムなどのプロセッサ・ベース・システムであってもよい。処理ユニット５１４は、外部スタンドアロン装置であってもよく、試験装置に組み込まれてもよい。

【００２７】

システムには多くの変形形態が考えられる。たとえば、ダイクロイックミラー５１０は省かれてもよく、フィルタ５１１、チューブレンズ５１２、およびカメラ５１３はダイクロイックミラー５０６を通過した光を直接受け取るように定置されてもよい。システム内のフィルタの一部は、採用される具体的な光源および蛍光体に応じて任意であってもよい。三つ、四つ、あるいはさらに多くの異なるスペクトル帯域で同時画像化が実施されうるように、さらなる組の光源、フィルタ、ミラー、レンズ、またはカメラが追加されてもよい。

【００２８】

これまでに説明したダイクロイックミラーおよびフィルタは完全な波長識別や完全な効率を有しないことを当業者は認識するであろう。特定フィルタを通過することが意図される波長帯域内の一部の光は、吸収または反射されてもよい。特定フィルタによって阻止されることが意図される波長帯域内の一部の光は、通過または反射されてもよい。しかしながら、フィルタおよびミラーは、システムが種々の放射光の色を効果的に識別しうる指定波長を優先的に通過または阻止するだけの十分な実施能力がある。他の変形形態では、プリズム、回折格子または他の光学部品を含む色分解にダイクロイックミラー以外の構成部品が採用されてもよい。

【００２９】

図６は、本発明の別の実施形態によるシステム６００の直交図を示す。システム６００は、それぞれカメラ５０９および５１３の前方にスリット開口６０１および６０２が新たに設置されている点を除いてシステム５００に似ている。スリット開口６０１および６０

２は、システムの焦点面以外の位置から集められた一部の光がそれぞれのカメラに到達するのを阻止または排除しようとする効果を有する。この効果は、細胞１０１上方の焦点外の位置から出てくる微細な点の光線束６０３によって図６に示される。その結果、レンズ５０８から出てくる光線束６０４は、システムの焦点面からの光よりもレンズ５０８のより近くに焦点を結ぶ。光線束６０４の光がスリット開口６０１に達するまでに、光線束６０４は既に発散し始めており、したがって、光線束６０４の中心の小さな部分だけがスリット６０１を通過してカメラ５０９に達しうる。それゆえ、システムは、細胞１０１におけるシステムの焦点面からの光を優先的に受け取り、他の深度位置から受け取った少なくとも一部の光を排除する。

【００３０】

小さい円形開口がこのように使用されて単一センサによって受け取られる光を制限する場合、この技術は共焦点撮像と呼ばれる。図６のシステムでは、開口６０１および６０２はスリットであり、したがって、一軸のみの光を排除する。本開示を目的として、これは「半共焦点」撮像と呼ばれる。この技術では、半共焦点撮像を利用しないシステムによって記録される画像と比較してシステムによって記録される画像のコントラストが向上する。

【００３１】

本発明を具体化するサイトメトリシステムの別の優位性は、これが点検出器型システムに修正されても設定可能にされてもよいことであり、その場合、線形検出器の真ん中の数個のピクセルのみが動作しているか、あるいは列の一部または全部のピクセルがビニングされて一つのピクセルまたは数個のピクセルになる。その結果、線形光センサの長さに対応する寸法の分解能が低下した画像が得られる（図６のＹ方向）。たとえば、センサピクセルのすべてがビニングされる場合、光センサの各露光はセンサに照射される光の量の単一の数値表現となることさえある。任意として、照射場は、そのモードで動作しているときにシステムの速度を高めるためにはるかに小さい円または楕円に形成されうる。この種のシステムの優位性は、細胞の超高速単一断面画像が作成されうることである。電子通信帯域幅が制限されているものの十分な照明が得られるとき、この種のシステムは特に有用であるかもしれない。こうして設定できるシステムは、ライン走査画像サイトメトリおよび非画像フローサイトメトリの両方に適用可能であるかもしれない。

【００３２】

図７は、本発明のさらに別の実施形態によるシステム７００の直交図を示す。図７のシステムでは、同時二色蛍光画像サイトメトリが一つの線形光センサまたはライン走査カメラのみを用いて起動される。システム７００の照射システムは、たとえば、図５に示したシステム５００に関して前述した照射システムのいずれであってもよい。すなわち、一つ以上の光源が、たとえば、細胞１０１内の二つの異なる発蛍光団からの二つの異なる蛍光スペクトルを励起する。細胞１０１からの蛍光によって放射される光の一部は、捕捉され、ダイクロイックミラー７０１に向けて対物レンズ５０５によって進路変更される。図７の実線および鎖線は、二つの異なる蛍光スペクトルを含む光がダイクロイックミラー７０１に達することを示す。ミラー７０２は、一つの波長帯域が優先的にミラー７０１から反射し、他の波長が優先的にミラー７０１を通過してミラー７０２に向かって進むように光を選択的にフィルタ処理する。さらなるミラーおよびフィルタが、要望通りに、光を指し向けて調整する光学系に設置されてもよい。たとえば、ミラー７０３はミラー７０２からの光をチューブレンズ７０５の方向に進路変更させ、ミラー７０３はさらに新たなフィルタ処理を提供してもよい。同様に、ミラー７０４はミラー７０１からの光をチューブレンズ７０５の方向に進路変更させ、ミラー７０４はさらにフィルタ処理を提供してもよい。放射フィルタ７０７および７０８などの一つ以上の新たなフィルタが光路に設置されてもよい。チューブレンズ７０５は光の焦点を再び線形光センサ７０６に合わせ、線形光センサ７０６は、ライン走査カメラの一部であってもよく、処理ユニット５１４によって読み取られうる。

【００３３】

センサ７０６の一部が蛍光スペクトルの一つで放射された光から選択された一つの波長帯域の光を受け取り、センサ７０６の別の一部が他の蛍光スペクトルで放射された光から選択された他の波長帯域の光を受け取るように、ミラーの配置はセンサ７０６に達する光の二つの帯域間に幾何学的ずれをもたらす。たとえば、センサ７０６が一列に配置された５１２個のピクセルを備える場合、およそ第１の２５６個のピクセルが一つの波長帯域の光を受け取ってもよく、およそ残りの２５６個のピクセルが他の波長帯域の光を受け取ってもよい。前述のように、処理ユニット５１４はセンサ７０６から反復ライン走査を受け、各波長帯域に対して一つの画像、すなわち細胞１０１の二つの画像を再構築することができる。このようなシステムは、一つの線形光センサまたはライン走査カメラのみを必要とし、二つの線形光センサまたはライン走査カメラを有するシステムと比較して低コストで構築される可能性がある。また、二波長帯域の光を線形光センサの別々の部分に向けるために、他の種類の光学系が採用されてもよい。たとえば、このような光学系は、光回折格子を備えていてもよい。システムが半共焦点撮像を実施するように、システム７００などのシステムにスリット開口が含まれていてもよい。

【００３４】

図８は、さらに別の実施形態によるシステム８００の直交図を示す。システム８００は、図４に示すシステム４００の変形形態として示されるが、システム８００のさらなる特徴が多色画像、蛍光画像または他の技術を実施するシステムを含む、他のシステムにおいて採用されてもよいことを当業者は認識するであろう。

【００３５】

システム８００では、狭い間隔で並んだ三つの平行なセンサ列８０２、８０３、８０４を有する例示的なカメラ８０１を採用している。センサ列は、図８に横向きに示される。システムの光学系の動作に基づいて、列の各々は細胞１０１の異なる「縞」を撮像する。それゆえ、カメラ８０１は、細胞１０１が走査領域４０４のそばを通過するときに細胞１０１の特定部分を撮像する三度の異なる機会がある。すなわち、細胞１０１の特定部分が最初は列８０２で撮像される。細胞１０１の同じ部分がその後に列８０３で撮像され、さらにその後に列８０４で撮像される。図８では、不必要な詳細によってシステムの動作が分かりにくくならないように、細胞１０１とセンサ列８０２、８０３、８０４を結ぶ中心光線束のみが示される。

【００３６】

一技術では、細胞１０１について、一つがセンサ列８０２、８０３、８０４の各々によって作られる三つの異なる画像が集められてもよい。異なる画像は、互いに対して時間的にシフトされ、すなわち、Ｘ方向に空間的にシフトされるものと考えられてもよい。これらの複数の画像は、信号対ノイズ特性が改善された合成画像を作成するために採用されてもよい。たとえば、三つの画像がディジタル的に元の配列にシフトされ、細胞１０１の実質的に同じ位置に対応する三つの画像からのピクセル値が加えられると、得られる合成画像は個々の画像のいずれか一つと比較しておよそ√３倍だけ改善された信号対ノイズ比を有することになる。カメラ８０１は三本の走査ラインを有するものとして示されているが、これは２本、４本、あるいは任意の有効な数ｎを有していてもよい。ｎ本のラインを有するカメラからのこのディジタル加算または平均法によって生成される合成画像は、単一画像と比較しておよそ√ｎ倍だけ信号対ノイズ比が改善されることになる。走査画像ラインが得られると画像の組合せは「その場で」で行なわれる可能性があり、したがって、単一の線形センサで作られる特定細胞の完全な画像は作成されない。

【００３７】

複数列のピクセルを有するカメラ８０１は、追加的または代替的に時間遅延積分（time delay integration:ＴＤＩ）を実施するように構成される可能性がある。ＴＤＩでは、細胞１０１への露光から生じる様々なピクセルの電荷がディジタル値への変換前にピクセル列内に蓄積される。細胞１０１に対するセンサの露光は、細胞１０１の特定位置が一回の露光中にセンサ列８０２に露光され、次の露光中にセンサ列８０３に露光され、そして次の露光中にセンサ列８０４に露光されるように、実質的に同期される。最初の露光中に

列８０２に蓄積された電荷は、列８０３にシフトされて第２の露光が加わり、得られる電荷は列８０４にシフトされて第３の露光が加わる。蓄積電荷は、この後、ディジタル値に変換される。ＴＤＩは、単一画像と比較して信号対ノイズ比におよそ√ｎの改善をもたらす。

【００３８】

同時平行画像ラインを走査する一つの優位性は、ディジタル画像結合とＴＤＩのいずれとともに使用するかにかかわらず、当該技術が利用可能な照明をよりうまく活用することである。素子４０３などの光成形素子は、一般に、光の焦点を走査ラインの単一ピクセル幅のストリップに結ばない。照明場は或る相当の幅を有し、照明の一部が単一のライン・カメラ・システムで破壊される場合がある。

【００３９】

このようなシステムの別の優位性は、信号対ノイズ特性を改善するために単にピクセルをビニングすることはシステム内でもできるので、分解能が損なわれないことである。

図５に示すシステム５００などのシステムは各カメラ５０９、５１３が一組の二つ以上の線形光センサを含むようにさらに適合されうることを当業者は認識するであろう。画像化は、カメラ８０１に対して前述のように各カメラ５０９、５１３によって実施されることになり、したがって、多色画像化はディジタル画像結合またはＴＤＩによって実現される可能性がある。

【００４０】

同様に、図７に示すシステム７００などのシステムは、センサ７０６が一組の少なくとも二つの線形光センサに置き換えられるように適合されうる。システムは、この後、波長が選択された光を一組の線形光センサの二つの部分に別々に向けることになる。

【００４１】

図２、４、５、６、および７のシステムは、単一線形光センサを有する「組」を含むと考えられてもよい。

さらに、少なくとも二つの平行な線形光センサからの画像の組合せは、ディジタル組合せによるかそれとも時間遅延積分によるかにかかわらず、ビニングや他の分解能低減法と組み合わせられうる。ビニングは、画像精度が落ちるものの信号対ノイズ特性がさらに改善された画像を生成する可能性がある。

【００４２】

図９（ａ）～（ｃ）は、ライン走査サイトメトリを実施するのに好都合な楕円照射領域を提供するさらなる技術を示す。

ライン走査サイトメトリ技術は、すべての実施形態において楕円照射領域の採用を必要としないかもしれない。光力が十分に高い場合には、従来の円形落射照明が利用されるかもしれない。散乱される非蛍光性の光を使用する画像化では、照明光源の十分な光力を実現することは困難でないかもしれない。しかしながら、蛍光によって放射される光を実際に検出するために励起光を楕円領域に集中すると、エネルギー効率がはるかに高くなる可能性があり、たとえば、所要励起レーザ出力が数十Ｗあるいは数百Ｗで測定されるレベルから数十ｍＷあるいは数百ｍＷで測定されるレベルに減少する。

【００４３】

図９（ａ）は、楕円照明領域を提供する技術の実施形態を含むシステム９００の一つの図を示す。システム９００では、図４に示したシステム４００のそれらに類似した一部の構成部品および装置を採用するが、図９（ａ）に示した照明技術は他の検知装置とともに使用されてもよいことを当業者は認識するであろう。システム９００では、照明は検知が実施される方向と同じ方向からレーザ９０１によって提供され、したがって、サンプル上方の空間は遮るものがない状態にある。したがって、この装置は、サンプルステージと集光レンズとの距離と同程度の厚さのサンプルに限定される可能性のある前述の装置よりもはるかに大きいサンプルを受け入れる可能性がある。図９（ａ）のシステムの別の優位性は、対物レンズ４０５が照明場の形成に関与することである。対物レンズ４０５は、典型的にきわめて高品質のレンズである可能性があり、したがって、このレンズが生成する照

明場はきわめて厳密に規定される可能性がある。

【００４４】

図９（ａ）のシステム例では、レーザ９０１が細胞１０１に向けてビーム９０２を生成する。ビーム９０２は、円柱レンズ９０３を通過する。本開示を目的として、円柱レンズは、唯一の寸法の曲率を有する任意のレンズである。円柱レンズは、円柱によって規定される曲面を有していてもよいがその必要はない。図９（ａ）の図では、円柱レンズ９０３はその円柱軸がＸ方向に平行になるように定置され、レンズ９０３はビーム９０２に影響を持たないように見える。ビーム９０２はダイクロイックミラー４０６を通って対物レンズ４０５に進み、対物レンズ４０５はビームの焦点を細胞１０１に結ぶ。細胞１０１から生じた光は対物レンズ４０５を通過し、ミラー４０６から優先的に反射し、場合によっては一つ以上のフィルタ４０７に入り、レンズ４０８を通過してカメラ４０９に達する。

【００４５】

図９（ｂ）は、Ｘ軸に沿って見た図９（ａ）の照明部分の実施形態を示す。すなわち、図９（ｂ）は、図９（ａ）の図から９０°回転された図を示す。この図では、チューブ１０２は円として投影され、円柱レンズ９０３は湾曲した輪郭を有するものとして示される。図９（ｂ）の実施形態例では、円柱レンズ９０３の材料および寸法は、レンズ９０３が円柱レンズと対物レンズの距離よりも大きい、比較的長い焦点距離を有するように選択される。円柱レンズ９０３を通過したビーム９０２は、この図から分かるように、比較的緩やかに収束するように見える。対物レンズ４０５は、この後、照明場が拡大されるように、ビームを収束させてＹ方向に再び広げる。図９（ａ）に示すように、対物レンズ４０５は、ビームをＸ方向に同時に収束させる。得られる照明場は、細胞１０１に入ると輪郭がはっきりした楕円形を有する可能性がある。

【００４６】

図９（ｃ）は、Ｘ軸に沿って見た、図９（ａ）の照明部分の別の実施形態を示す。この実施形態では、円柱レンズ９０３の材料および寸法は、レンズ９０３が円柱レンズと対物レンズの距離よりも短い、比較的短い焦点距離を有するように選択される。円柱レンズ９０３を通過したビーム９０２は、収束しているように見え、この後、再び発散して対物レンズ４０５に達する。対物レンズ４０５は、ビーム９０２が再び収束するようにビーム９０２を進路変更させるが、進路変更はあまりにも緩やかなので、ビーム９０２が細胞１０１に達するときにビーム９０２はカメラ４０９によって走査されているラインの少なくとも一部分に亘るほどなお十分に広い。さらに、対物レンズ４０５はビームをＸ方向に同時に収束させる。得られる照明場は、細胞１０１に入ると輪郭がはっきりした楕円形を有する可能性がある。

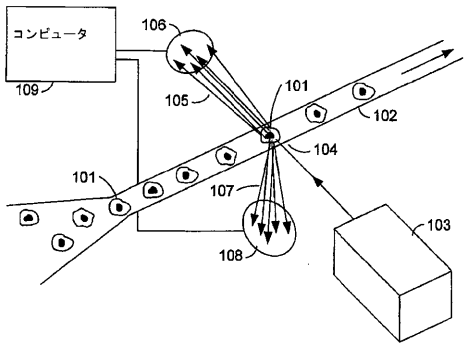
【００４７】

本発明の実施形態では直線状チューブ内に閉じ込められた細胞を走査するものとして説明しているが、本発明の実施形態は、電気泳動法、圧力駆動流、光ピンセット、電動移動ステージなどを含む、広範な細胞分配法のいずれかを用いるシステムにおいて利用されてもよいことを当業者は認識するであろう。細胞は、油乳剤、エレクトロウェッティング作動液滴におけるペイロードとして、あるいは磁気ビーズ標識を利用した磁気移送によって搬送されてもよい。特許請求の範囲は、利用される細胞分配法によって制限されるものではない。

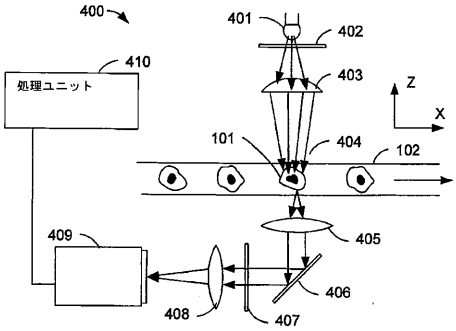
【００４８】

本発明をここでは明瞭さと理解を目的として詳しく説明してきた。しかしながら、添付された特許請求の範囲内で一定の変更および修正が実施されてもよいことを当業者は理解するであろう。

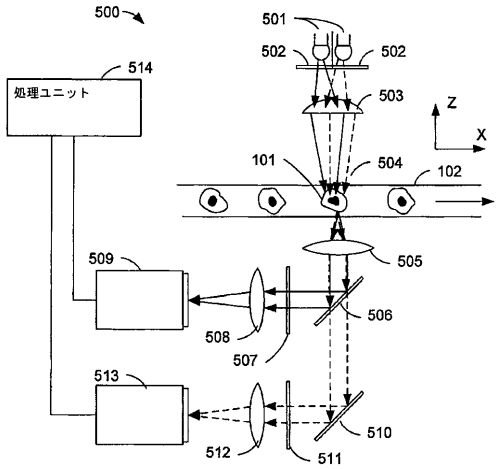
【図１】


コンピュータ
106
109
105
101
102
104
101
107
103
108

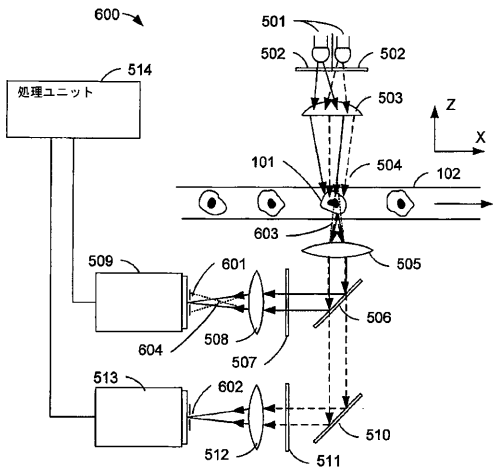
【図４】


400
401
402
410
処理ユニット
403
Z
X
101
404
102
405
409
406
408
407

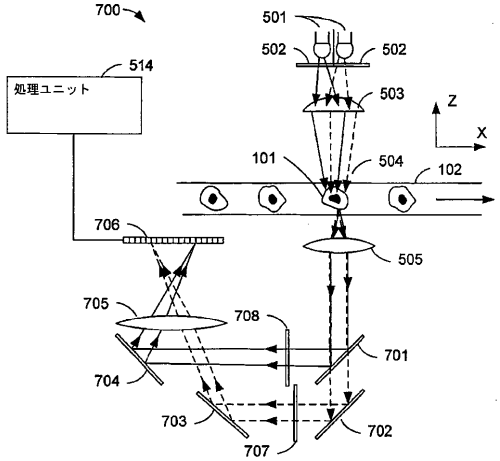
【図５】


500
501
502
502
514
処理ユニット
503
Z
X
101
504
102
509
505
506
508
507
513
510
512
511

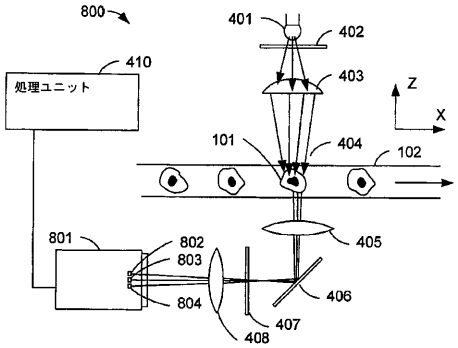
【図６】


600
501
502
502
514
処理ユニット
503
Z
X
101
504
102
603
509
601
505
506
604
508
507
513
602
510
512
511

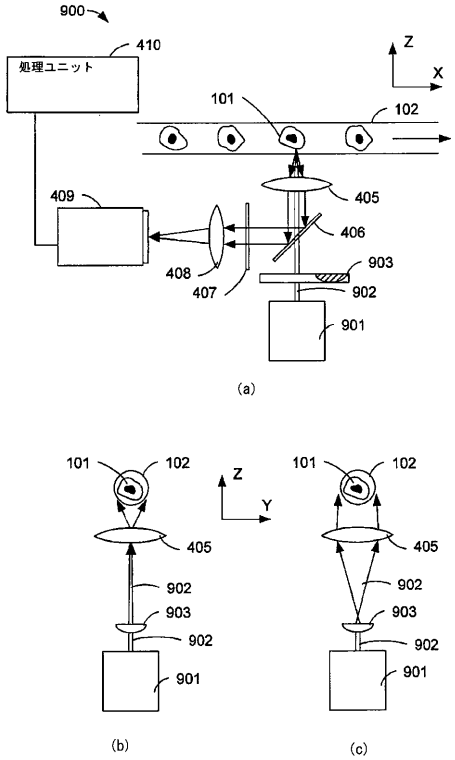
【図７】


700
501
502
502
514
処理ユニット
503
Z
X
101
504
102
706
505
705
708
701
704
703
702
707

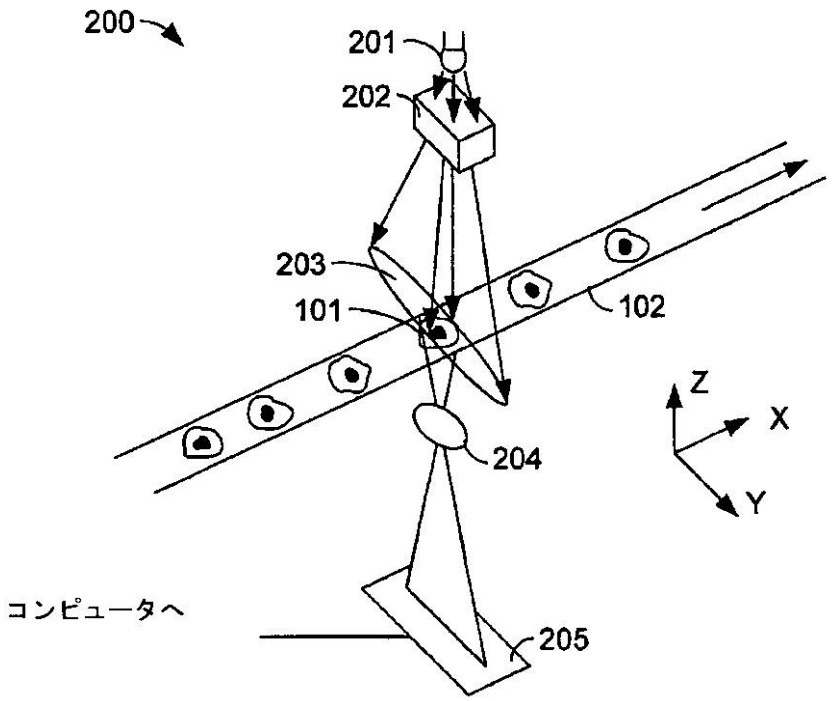
【図８】


800
401
402
410
処理ユニット
403
Z
X
101
404
102
801
802
803
405
804
406
407
408

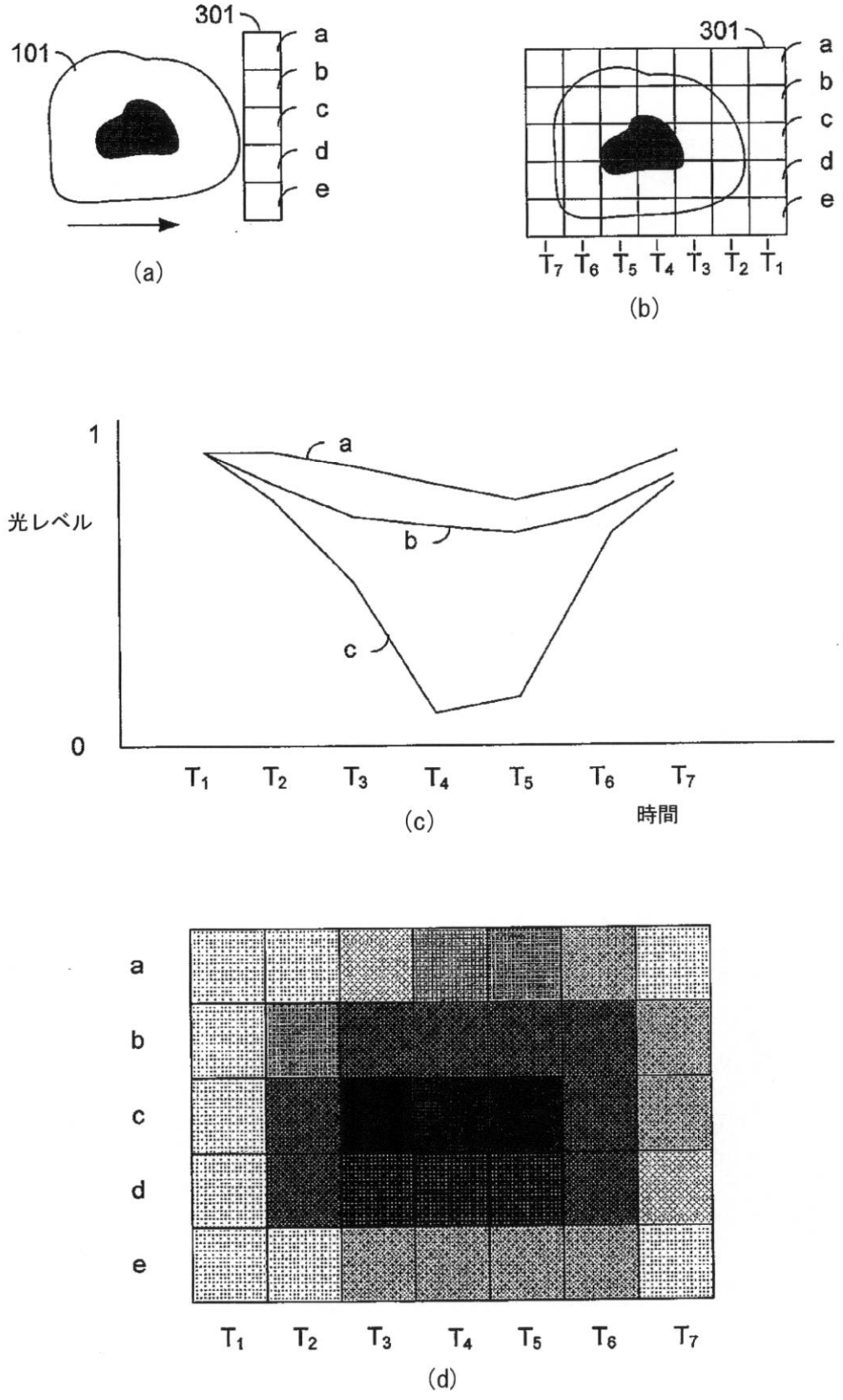
【図９】


900
410
処理ユニット
Z
X
101
102
409
405
406
408
407
903
902
901
(a)
101
102
Z
Y
405
902
903
902
901
(b)
101
102
405
902
903
902
901
(c)

【図２】


200
201
202
203
101
102
Z
X
Y
204
コンピュータへ
205

【図３】


301
101
a
b
c
d
e
(a)
301
a
b
c
d
e
T7 T6 T5 T4 T3 T2 T1
(b)
1
光レベル
0
a
b
c
T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7
時間
(c)
a
b
c
d
e
T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7
(d)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/027843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - G01N 21/00 (2010.01)
USPC - 356/343
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - G01N 21/00, G02B 26/08 (2010.01)
USPC - 356/343, 359/399, and 359/831

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/0174842 A1 (CROMWELL et al) 24 July 2008 (24.07.2008) entire document	1-2 and 31-38
Y	US 5,437,946 A (MCCOY) 01 August 1995 (01.08.1995) entire document	1-2 and 31-38
Y	US 6,243,189 B1 (RIBES et al) 05 June 2001 (05.06.2001) entire document	2, 31-36 and 38
A	EP 1 474 033 B1 (NELSON) 17 September 2008 (17.09.2008) paragraphs [0017], [0031], [0036], [0039], [0046]	1-2 and 31-38

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 July 2010	21 JUL 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/027843

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2, 31-36, 37-38

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/027843

Continuation of Box III.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-2, 31-36, 37-38, drawn to a system and method comprising a light shaping element that concentrates light onto an oblong illumination field.
Group II, claims 3-8, 39-44, drawn to a system and method for performing cytometry, comprising at least two parallel light sensors.
Group III, claims 9-18, 19-25 drawn to a system for performing cytometry comprising a scanning region that is illuminated by light including at least first and second wavelength bands; and an optical system that selectively directs light to the light sensors such that emitted light in a third wavelength band is primarily directed to a first linear light sensor set and emitted light in a fourth wavelength band is rpimarily directed to a second linear light sensor set.
Group IV, claims 26-30, drawn to a system for performing cytometry comprising a system which is configurable, such that during a first experiment, a first image is created having a first number of pixels in a dimension corresponding to the length of a linear light sensor set, and during a second experiment, a second image is created having a second number of pixels in the dimension corresponding to the length of the linear light sensor set, the second number of pixels being fewer than the first.

The inventions listed as Groups I, II, III or IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group I invention: a light shaping element that concentrates light onto an oblong illumination field as claimed therein is not present in the invention of Groups II, III or IV. The special technical feature of the Group II invention: parallel light sensors as claimed therein is not present in the invention of Groups I, III or IV. The special technical feature of the Group III invention: a scanning region that is illuminated by light including at least first and second wavelength bands; and an optical system that selectively directs light to the light sensors such that emitted light in a third wavelength band is primarily directed to a first linear light sensor set and emitted light in a fourth wavelength band is rpimarily directed to a second linear light sensor set as claimed therein is not present in the invention of Groups I, II or IV. The special technical feature of the Group IV invention: a system which is configurable, such that during a first experiment, a first image is created having a first number of pixels in a dimension corresponding to the length of a linear light sensor set, and during a second experiment, a second image is created having a second number of pixels in the dimension corresponding to the length of the linear light sensor set, the second number of pixels being fewer than the first as claimed therein is not present in the invention of Groups I, II or III.

Groups II, II, III and IV lack unity of invention because even though the inventions of these groups require the technical feature of a flow cytometry system including a scanning device, a light source, an optical system that focuses light onto a linear light sensor, wherein the system repeatedly takes readins of light falling on the linear light sensor while a cell is transported through the scanning region and illuminated by the light source, this technical feature is not a special technical feature as it does not make a contribution over the prior art in view of EP 1 474 033 B1 (NELSON) 17 September 2008 (17.09.2008) paragraphs [0017], [0031], [0036], [0039], [0046].

Since none of the special technical features of the Group I, II, III or IV inventions are found in more than one of the inventions, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

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

(72)発明者 パット、ポール
アメリカ合衆国 ９４５４７ カリフォルニア州 ハーキュリーズ アルフレッド ノーベル ドライブ １０００

Ｆターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA04 EA01 EA14 FA01 HA01 HA02 JA03 KA02
KA05 KA09 LA03 MA04 NA01 NA04 NA05
2G059 AA05 BB14 CC16 DD03 DD12 EE02 EE07 EE11 FF01 FF12
GG01 GG02 GG03 HH02 HH06 JJ02 JJ11 JJ13 KK03 KK04
LL01 MM01 MM09