

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03802820.4

[51] Int. Cl.

G06K 9/00 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)
G06F 15/00 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1294520C

[51] Int. Cl. (续)

G03C 3/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.1.21 [21] 申请号 03802820.4

[30] 优先权

[32] 2002.1.22 [33] US [31] 10/055,066

[86] 国际申请 PCT/US2003/001761 2003.1.21

[87] 国际公布 WO2003/061454 英 2003.7.31

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.28

[73] 专利权人 维森盖特有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 A·C·尼尔森

[56] 参考文献

US 6165734A 2000.12.26 G01N 33/567

US 5987158A 1999.11.16 G06K 9/00

CN 2258617Y 1997.7.30 G01N 33/48

审查员 韩燕_2

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

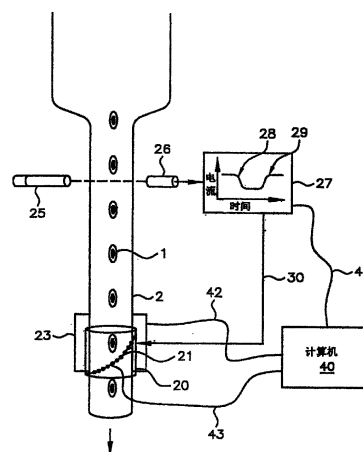
权利要求书 5 页 说明书 21 页 附图 9 页

[54] 发明名称

自动检测具有与疾病相关的核密度特征和细胞质密度特征的细胞的光学投影成像方法

[57] 摘要

用多维、高度定量的核密度特征和细胞质密度特征(NDF 和 CDF)快速检测靶细胞的系统和方法,其包括流式光学 X 线断层摄影(FOT)设备,该流式光学 X 线断层摄影(FOT)设备能够产生包括细胞的精确密度信息的各种光学投影图像(或 x 射线照相),和用于对投影图像进行分析和重建成多维数据集的计算机和软件,以及自动特征收集和目标分类器。所述系统和方法对于早期诊断癌症是特别有用的,例如利用来自痰液或颊部刮片的支气管样本检测肺癌,以及用宫颈刮片诊断宫颈癌或卵巢癌,所述系统可以用于检测包括血液的样本中的不寻常细胞。



1. 检测细胞样本中靶细胞（1）的方法，包括以下步骤：
- （a）获取细胞样本，并将细胞（1）悬浮于溶液（17）中；
 - （b）如果需要，将细胞样本中的细胞（1）固定于溶液中；
 - 5 （c）标记细胞（1）以生成样本内每个细胞的光密度；
 - （d）用至少一个点光源（21）照明样本；
 - （e）用数字阵列检测器（23）获取至少一个通过样本的投影图像；
 - （f）对所述至少一个投影图像补偿背景照明上的差异；
 - （g）对所述至少一个投影图像进行分析以检测至少一个靶目标；
 - 10 （h）对于所述至少一个靶目标计算具有一维（一维）特征值和二维（二维）特征值的特征值组（94）；
 - （i）将上述特征值（94）组提供给至少一个分类器（90）；以及
 - （j）使用上述特征值（94）组以及所述至少一个分类器（90）鉴别来自所述细胞样本的所述至少一个靶目标。

15

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述用于对所述样本中所述至少一个靶目标进行分类的特征值（94）组选自由以下构成的组中：一维和二维核密度特征（NDF）、细胞质密度特征（CDF）、面积、平均半径、光密度（OD）方差、光密度斜度、光密度范围、光
- 20 密度平均值、光密度最大值、光点密度、低 DNA 区域、高 DNA 区域、低 DNA 量、高 DNA 量、高平均距离、中等/高平均距离、相关性、均匀性、熵、分形维数、DNA 指数、质地、点状、连接部分以及在空间密度频率空间中的谐波。

- 25 3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，使用所述至少一个分类器（90）的步骤包括使用具有至少一个判别函数的分类器。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述至少一个判别函数采用一组判别特征，该组判别特征选自由以下构成的组中：一维和
- 30 二维核密度特征（NDF）、细胞质密度特征（CDF）、面积、平均半

径、光密度(OD)方差、光密度斜度、光密度范围、光密度平均值、光密度最大值、光点密度、低DNA区域、高DNA区域、低DNA量、高DNA量、高平均距离、中等/高平均距离、相关性、均匀性、熵、分形维数、DNA指数、质地、点状、连接部分以及在空间密度频率空间中的谐波。

5 5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞样本包括人类肺样本。

10 6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞样本包括人类宫颈样本。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞样本包括人类血液样本。

15 8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞样本包括不寻常细胞。

9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,标记样本的步骤包括用选自着色由化学计量DNA染料,化学计量RNA染料,成比例的DNA染料,和成比例的RNA染料构成的组的染料进行着色。

10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,标记所述样本的步骤包括用选自着色由福尔根染料, Romanowski 染料, May-Grunwald-Giemsa 染料, 甲基绿和硫堇构成的组的染料进行着色。

11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,标记样本的步骤包括用抗体标记物进行着色。

30 12. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,标记样本的步骤包括用核酸序列标记物进行着色。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括选择所述至少一个靶目标进行癌症诊断的步骤。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包
5 括选择所述至少一个靶目标以包括扩散前的癌细胞的步骤。

15. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括选择所述至少一个靶目标以包括扩散的癌细胞的步骤。

10 16. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括使用至少一个靶目标筛选癌症患者的步骤。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括使用至少一个靶目标确定患者是否会发展为扩散性癌症的步骤。

15 18. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述扩散前的癌细胞来自上皮细胞癌。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述上皮细胞癌选自
20 自由肺癌、喉癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌和胃肠道癌症构成的组。

20. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 扩散性癌细胞来自上皮细胞癌。

25 21. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述上皮细胞癌选自自由肺癌、喉癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃肠道癌症、淋巴瘤和骨癌构成的组。

22. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述扩散前的癌细胞
30 来自神经内分泌癌症。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其特征在于, 神经内分泌癌症选

自由以下构成的组：肺癌、喉癌、宫颈癌、乳腺癌、胃肠道癌症、淋巴瘤和骨癌。

24. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，扩散性癌细胞来自
5 神经内分泌癌症。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，神经内分泌癌症选自由以下构成的组中：肺癌、喉癌、宫颈癌、乳腺癌、胃肠道癌症、淋巴瘤和骨癌症。

10

26. 如权利要求 1 所述的方法，进一步地包括采用计算图像重建方法以产生多维图像，结合至少两个投影图像的步骤。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述计算图像重建
15 方法包括选自由以下构成的组：扇形光束投射几何学和锥形光束投射几何学。

28. 如权利要求 26 所述的方法，进一步地包括对多维图像进行处理的以下步骤：

20

- (a) 对多维图像补偿背景照明上的差异；
- (b) 分析所述多维图像以检测至少一个靶目标；
- (c) 计算结合至每个靶目标的表面；
- (d) 对每个靶目标计算一组多维特征值 (94)；以及
- (e) 将上述多维特征值 (94) 组提供给至少一个分类器 (90)，

25 以鉴别和表征细胞样本中的靶细胞。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，用于对样本中的靶细胞进行分类的多维特征值 (94) 选自由以下构成的组：一维核密度特征 (NDF)、二维核密度特征、3 维核密度特征和 3 维+核密度特征、一维细胞质密度特征 (CDF)、二维细胞质密度特征、3 维细胞质密度特征和 3 维+细胞质密度特征、面积、平均半径、体积，平均体积，光密度 (OD) 方差、光密度斜度、光密度范围、光密度平均值、光密
30

度最大值、光点密度、低 DNA 容量、高 DNA 容量、低 DNA 量、高 DNA 量、高平均距离、中等/高平均距离、相关性、均匀性、熵、分形维数、DNA 指数、质地、点状、连接部分以及在空间密度频率空间中的谐波。

5

30. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，多维特征值（94）包括一维，二维，3 维，3 维+特征，该些特征被分类程序利用用于表征与类型、成熟、疾病状态、相对丰度和定量标记物的存在有关的靶细胞。

10

31. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，分类器检测并表征包括不寻常细胞的靶细胞。

32. 如权利要求 28 所述的方法，进一步地包括基于对细胞的所述
15 表征诊断细胞样本。

33. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述至少一个投影图像包括一 x 射线照相。

20

自动检测具有与疾病相关的核密度特征和细胞质密度特征的细胞的光学投影成像方法

5 相关申请

本申请是尚未审批的由 Alan C.Nelson 于 2001 年 8 月 10 日提出的美国申请 09/927151 的系列申请，而该申请又与 Alan C.Nelson 于 2001 年 3 月 28 日提出的尚未审批的临时申请（序列号为 60/279244）相关，上述两个申请的名称均为“用光学 X 线断层摄影法显示流体中微小物
10 体的装置和方法”。

技术领域

总体来说，本发明涉及投影成像系统以及细胞分类法，尤其涉及采用投影成像的高通量流式自动系统，例如流式光学 X 线断层摄影
15 (FOT)，其基于对与疾病有关的核密度特征和细胞质密度特征(nuclear densitometric features (NDF) 和(cytoplasmic densitometricCDF)的高定量测量，检测异常细胞和肿瘤细胞以及检测不寻常细胞。

背景技术

20 诊断患者所患癌症的最常用方法是得到怀疑组织的样本，然后在显微镜下检查有无明显的恶性细胞。当怀疑组织的解剖位置已知时，所述方法相对较为简单，但是当不存在有可以轻易确定的肿瘤或癌前损伤时，所述方法就不那么简单。例如，为了从痰液中检测有无肺癌需要在样本中找到一个或多个相对较为不寻常的肿瘤细胞。因此，如
25 果样本不能灵敏且精确地反映肺部情况，就不能正确诊断出患有肺癌的患者。

Palcic 等人在美国专利申请 US6026174 中公开了一个基于显微镜的系统和方法，该系统用于检测诊断细胞和具有与恶性肿瘤相关改变的细胞。所述 Palcic 等人的系统包括一个自动分类器，具有常规显微
30 镜、照相机和图像数字转换器，控制并与上述组件连接的计算机系统，

进行初次细胞分类的初级分类器，以及进行接下来的细胞分类的次级分类器。该方法利用自动分类器自动检测诊断细胞以及具有与恶性肿瘤相关改变的细胞。然而，常规显微镜的使用限制了所述诊断结果的质量，其不能对着色密度进行精确测量。所述 Palcic 等人的方法没有提及分子探针的使用。

随着分子探针的出现，例如抗体探针和核酸杂交探针，通过标记这些分子探针然后测量它们在生物细胞和组织中的位置和浓度，从而解决新的与疾病相关的问题。随着人们对这些探针进行更加精确地定位和定量的需求，同时还出现了对改进技术的需求，用于在显微镜下对探针密度进行二维（二维）和三维（3 维）的测量。常规的光学显微技术利用玻片上的细胞，由于焦平面深度、采样角度以及细胞制备中所产生的通常导致细胞在成像平面上重叠的问题，其仅仅进行近似二维和三维的测量。光学显微技术的另一个缺陷是通过物镜观察而存在的固有局限性，其中只有位于窄的焦平面中的区域提供了分析用的精确数据。

流式细胞仪方法通过使细胞在流体中一个接一个的流动，从而克服了上述细胞重叠的问题。不幸地是，流式细胞仪系统不能产生与传统光学显微技术相同质量的细胞图像，而且无论如何其不是三维的。相关背景技术参见 Shapiro, HM, Practical Flow Cytometry, 第 3 版, Wiley-Liss, 1995.

在计算机辅助断层摄影技术领域，Johnson 等人提出的美国专利 No.5402460 于 1995 年 3 月 28 日公开，其题目为“三维微断层分析系统”。其中公开了一种微断层系统，通过 x 线发生器和 x 线检测器产生样本的高分辨率三维图像，其中 x 线检测器用于测量 x 线束经过所述样本发生的减弱。Johnson 等人的微断层系统对样本的每次观察产生两个投影，每个投影采用不同能量的 x 线束。在对样本的一个观察产生两个投影之后，将样本在样本支架上旋转然后进行另一组投影。对样本每次观察产生的投影一起进行分析，提供关于材料的相位差的定量指标，所述材料包括上述样本。结合不同观察的投影提供样本的三维图像。本文结合并引用美国专利 No.5402460。尽管美国专利 No.5402460 中教导的 x-线技术在某些应用中有用，但是其不能提供

用于流式细胞仪的光学技术方案，通过所述光学技术方案可以测量生物细胞内分子密度的三维分布。

为了克服上述系统中的上述和其它缺陷，本发明的目的是将流式细胞仪中一个接一个的显示细胞与多个点光源投影的计算机光学断层摄影技术结合起来，从多个投影中重建细胞内的密度信息。重建的三维密度信息能够精确测量核密度特征（NDF）和细胞质密度特征（CDF）。

本文中所提及的 NDF 和 CDF 是投影成像系统所特有的，不需要使用透镜和焦平面及其固有的不希望有的模糊制品，其产生原因是位于窄的焦平面之外的非聚焦结构。由于投影成像系统不需要透镜和焦平面，而产生 x 射线照相，其中所述结构均同时清楚显示，因而密度特征的测量比传统显微系统更加定量及精确。所以，术语“NDF”和“CDF”指由 x 射线照相得到的密度特征量度以及采用 x 射线照相的断层摄影重建。NDF 和 CDF 是指公知的在与癌症组织相关的细胞中发生的细微变化。上述变化指示偏离常态，并反映与疾病过程相关的分子变化。

然而，目前 NDF 和 CDF 仍没有被广泛接受用于筛选确定病人是否患有或将要患有癌症，这是因为测量方法没有提供足够的精确度和 / 或通量。一般地，通过仔细选择取自肿瘤或癌前损伤附近位置的细胞样本，并采用具有相对高放大倍率的显微镜观察细胞，从而检测 NDF 和 CDF。但是，细胞内发生的 NDF 和 CDF 变化被认为是非常细微的，以至于通过常规显微设备工作的病理学家不能可靠地检测出上述变化，特别是病理学家通常不能进行定量测量。例如，NDF 变化可以由核内 DNA 的分布和密度指示，伴随着核形状的微小变化。由于人类观察者们不能较为容易地对上述微小细胞变化进行定量，因此很难确定哪个细胞显示了 NDF 改变。

发明内容

在一个实施例中，本发明提供了一种检测细胞样本中靶细胞的方法，包括以下步骤，获得细胞样本并将细胞悬浮于溶液中；如果需要，将细胞样本中的细胞固定于溶液中；对细胞进行着色和 / 或标记，以

产生与样本的每个分子内的核分子或其它结构有关的光学密度；用“点”光源照明样本，通过数字阵列检测器得到透过样本的一个或多个投影成像（例如，x 射线照相）；补偿投影成像在背景照明上的变化；分析投影成像并检测靶目标；对每个靶目标计算一组一维（一维）和两维(二维)特征值；将上述特征值组提供给至少一个分类器（90），分类器确定和表征细胞样本中的靶细胞。

另一方面，本发明提供了自动检测细胞样本中 NDF 和 CDF 的系统。优选的系统包括流式光学 X 线断层摄影（FOT）装置，其由计算机系统控制并与计算机系统相连接。FOT 捕获的投影成像存储在图像处理板中，并经计算机系统控制以检测是否存在一维和两维的 NDF 和 CDF。通过计算机可以重建多个投影图像以产生三维（3 维）或更高维（3 维+）的图像以及与之相关的 NDF 和 CDF。

为了测量 NDF 和 CDF，需获取细胞样本，并在悬浮液中着色，然后由 FOT 成像。所述着色是化学计量的，和 / 或与 DNA 和 / 或 DNA 相关蛋白，或包括细胞质的细胞内的其它靶分子成比例。然后计算机系统直接对投影图像进行分析和 / 或计算出也被分析的三维（3D）重建。所述图像对于不均衡照明和图像获取系统的其它缺陷进行校正。对所述图像进行校正后，计算靶目标的边缘、表面积、体积和密度，也就是界限，界线确定哪些像素或体素属于靶目标或靶结构而哪些属于背景。

计算机系统为每个目标或结构计算一组一维，二维，3 维和 3 维+特征值。对于某些特征的计算，用一个或多个像素（或体素）扩大或缩小边缘（或表面），从而对沿着最高梯度值的界限进行校正。这样做的目的是使每个特征在不同类型目标之间都具有更高的分辨能力，从而是目标特异性的。然后通过分类器分析这些特征值，分类器用这些特征值确定目标是人造物品还是细胞核或靶结构。如果目标似乎是细胞核或靶结构，然后用所述分类器对特征值进行进一步的分析，以确定所述目标是否显示指示疾病的 NDF 和 CDF。基于样本中所发现的目标的数量，所述目标似乎具有显著的与疾病相关的 NDF 和 CDF 改变，进行统计学评价以确定所述细胞样本来自的病人是健康的还是患有恶性肿瘤。

在其它实施例中，本发明提供了一种检测细胞样本中上皮细胞的方法，以及在所述上皮细胞中检测具有与疾病有关的 NDF 和 CDF 的细胞。在另一实施例中，提供了一种预测病人是否会患有癌症的方法。

5 附图说明

附图 1 示意性地显示了在本发明一个实施例中流式细胞仪系统的例子。

附图 2 示意性地显示了在本发明一个实施例中单个细胞流动过程的例子。

10 附图 3A 和附图 3B 示意性地显示了在本发明一个实施例中一个细胞和重建横截面的例子。

附图 4 示意性地显示了在本发明一个实施例中重建圆柱体的例子。

附图 5 示意性地显示了在本发明一个实施例中流式光学 X 线断层摄影 (FOT) 系统的例子。

15 附图 6 示意性地显示了在本发明一个实施例中位于重建圆柱体内的投射射线的例子。

附图 7 示意性地显示了在本发明一个实施例中重建圆柱体的顶视图。

20 附图 8 示意性地显示了在本发明一个实施例中在细胞重建中采用的光源 / 单列射线结构的几何形状。

附图 9 示意性地显示了在本发明一个实施例中对来自投影图像和 X 线断层摄影重建的 NDF 和 CDF 进行分析所采用的分类方法。

具体实施方式

25 此处结合特定的生物细胞实施例对本发明进行描述，但是，应该这样理解，这些例子用于阐述本发明的原理，并不对本发明进行限制。在一个实施例中，在一微观体积内构建点密度和发射密度的三维分布考虑到位于所述微观体积内的任何位置测量密度和荧光，并确定靶结构、靶分子或靶分子探针的位置。采用标记的分子探针，可以测量结
30 合在所述微观目标特定结构上的探针数量。为了阐述，可以用至少一种标记分子探针标记例如生物细胞等的目标，所述探针的测量量和位

置可以产生关于细胞疾病状态的重要信息，包括但不限于，各种肿瘤，例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌以及卵巢癌。

制备用于流式细胞仪的生物细胞，并用标记的用于特定疾病诊断的分子探针进行着色或标记，使其流过一装置，收集投影图像，并从基本垂直于细胞流动矢径的光学投射射线路径重建二维和 3 维密度信息。控制细胞沿某一轴的流动速度，重建的垂直二维平面可以被正确地沿着上述细胞轴进行定位（或迭加），以产生完整细胞的 3 维图像，或可以直接从二维光透射投影或发射投影计算出细胞的 3 维图像。

由于下列特征，流式细胞仪非常适合于图像重建：

- 细胞以单行通过毛细管，因此细胞重叠和遮蔽降至最低，
- 可以直接测量通过毛细管的细胞流动速度，其是恒定的，
- 细胞趋向于毛细管的中心轴，因此在结构上是放射状对称的，
- 取决于细胞固定和悬浮试剂，细胞可以保持可塑性，相应于毛细管的速度梯度，细胞可以呈现沿 z 轴的伸长形状。

本发明利用了上述特点提供用于点光源投影成像和断层成像重建的系统。

参照图 1，图 1 示意性地给出了本发明一个实施例的流式细胞仪系统的例子。所述系统以坐标系 11 进行定向，所述坐标系 11 具有 x、y、z 方向的三个坐标。在操作时，用公知的注射装置 4 将细胞 1 注射入注射管 3。所述毛细管在注射端 5 较宽，包括一压力盖 6。从管 8 引入外鞘流 7，以在毛细管 2 内产生层流。传统流式细胞仪的特征在于，制备并悬浮于溶液中的细胞 1 可以被冲压通过毛细管 2，从而细胞沿着流动轴伸长，并朝着毛细管 2 的中心轴近似向下移动，用虚线 9 表示。较为有利的是，细胞可以轴向对称地流动，并沿着圆柱形毛细管的中心轴以单列、恒定速度 10 移动。

现在参照图 2，图 2 示意性地给出了本发明一个实施例的单个细胞的流动过程。一个细胞 1 以用速度矢量 10 表示的恒定速度（V）移动通过毛细管 2。所述细胞 1 包括细胞质壁 12 和细胞核壁 13。在流动通过毛细管 2 的过程中，细胞 1 通过多个重建平面，为了进行阐述，分别用第一、第二和第三重建平面 14a，14b 和 14c 表示。穿过细胞质壁的第一平面片段 15a 位于重建平面 14a 内。类似地，穿过细胞质壁和

细胞核壁的第二平面片段 15b 位于重建平面 14b 内, 第三平面片段 15b 位于重建平面 14c 内。本发明的一个主要特征在于许多具有可选择波长的点光源同心分布在毛细管周围。所述点光源与相对的光传感器阵列共同工作, 所述光传感器阵列对光谱的可选择部分敏感, 从而可以得到透射穿过细胞的光的投影。可以直接用断层图像重建算法对得到的投影图像进行分析或处理, 以提供细胞内密度和 / 或发射强度分布的空间图形或图像。应该这样理解, 在实际工作中, 依赖于呈现给系统的目标的所需图像分辨率, 重建平面的数量可以从几个到几百个或更多。可以在软件中结合或迭加一组重建的平行平面片段图像, 以产生细胞内密度和发射强度的三维 (3 维) 图像。此外, 用平面 (二维) 光传感器阵列代替线 (一维) 传感器阵列, 用锥形照明射线模式代替扇形照明射线模式, 可以同时得到多个连续通过流动细胞的平面片段。作为结果, 采用锥形光束重建算法, 可以直接从二维 (二维) 投影计算出细胞体积内的密度和发射强度分布的三维 (3 维) 图像。作为选择, 可以直接分析具有无限景深的二维点光源投影图像。

对于生物细胞, 重建平面之间的距离 (d) 可以是几微米或更小。位于细胞 1 内的一个点可以与不同时间间隔的每个重建平面重合, 其中时间间隔 (t) 可以表述为:

$$t=d \div V \quad (\text{方程 } 1)$$

结合参照附图 3A 和 3B, 其示意性地给出了本发明一个实施例的重建横截面 16。流动细胞的轴向对称以及向心性有利于由通过细胞的光投影重建细胞内的点密度。此外, 投影的采样空间可以做成包括三个分离腔室的模型:

1. 细胞 17 外部的流体 (也就是外鞘流体或细胞悬浮介质),
2. 细胞质 18, 以及
3. 细胞核 19

定量知晓在这三个腔室中的光密度或分子探针的分布就足够解决细胞生物学和疾病诊断中的许多重要问题。此外, 如果特定分子探针优选结合至细胞质或细胞壁 12 和细胞核壁 13 的边界表面, 计算这两个边界表面是非常有用的。此外, 将这些壁作为上述三个不同腔室的过渡表面是足够的。

通过将细胞的重建片段结合起来，或以螺旋状体积测量的方式进行重建，可以产生 3 维形态和体积信息，但是绝对（与相对相反）体积依赖于细胞位置的准确信息。细胞位置是流动速度的函数。但是，
5 在一些情况下，密度或分子探针的相对浓度足够用于解决下述诊断问题：有多少探针位于相对于细胞核的细胞质内，而又有多少未结合探针位于背景液体中？或者，探针主要位于细胞膜上还是位于核膜表面？

尽管通过毛细管的细胞可以在结构上变成放射对称状，至少一个结合分子探针在核和细胞质腔室内的分布并不是如上所述的轴向对称。因此，需要的是成像系统以及（特别是发射）重建算法提供足够的空间分辨率对结合的荧光分子探针的体积进行定位，其比上述要求的提供三个腔室分析的分辨率更加精细。进一步地，需要的是所述系统提供关于在两个细胞内腔室中非对称分布的探针浓度的定量信息。
10 通过亚微粒空间分辨率有助于了解探针与特定亚细胞腔室、位于细胞质或细胞核中的结构或细胞器之间的关系。

一个更加特殊的例子是关于早期检测高危患者的癌症。在上述情况下，当细胞发生改变，某些基因将表达过高或过低。测量相对于细胞核的细胞质中基因产物（通常为蛋白质）的相对过度或过低表达，同时使背景悬浮液体中的非结合探针正常化，这在诊断上是非常重要的。
20 如果基因产物是蛋白质，可以使用标记抗体探针定位和/或定量基因产物蛋白质以评价细胞的疾病状态。因此，对这三个腔室的分析足够用于确定疾病状态。

现在参照附图 4，附图 4 中示意性地给出了重建圆柱体的例子，所述重建圆柱体包绕流动管 2，所述流动管包括流动细胞 1，如本发明的一个实施例所述。重建圆柱体 20，例如包括由点光源 21 构成的螺旋线 24，所述点光源以预定螺旋倾斜度分布，其倾斜角为 θ 。每个点光源发出一光子束 22，其中光子束 22 通常为锥形或扇形。在附图 4 中光源为螺旋状设置，但是部分地依据电子设备的速度、细胞速度以及使
25 传感器（检测器）处的投影信号不产生重叠的几何图形，点光源的排列可以是各种各样的几何图案。传感元件 23 用于接受来自点光源的光。

当完整细胞 1 经过光源时，固定的点光源 21 与相对的安装在外

周的检测器 23 可以对细胞 1 进行多投射角度的采样。通过对点光源和减弱的透射光和/或散射光和/或发射光的发射或读出进行时间控制，或对两者都进行时间控制，每个检测出的信号将与沿着流动细胞 z 方向的轴的一个特定已知位置一致。这样，以已知速度并沿着垂直于光源的一个已知轴流动的细胞 1 可以用经过细胞的投影进行光学切割并重建形成 x-y 平面的二维片段，所述光源可以同步发射光或被检测出。通过将序列片段迭加或在数学上结合起来，可以形成细胞的 3 维图形。同时还可以将细胞运动与流动轴周围的光源位置结合起来，以产生可以重建的数据，例如以螺旋形式构建细胞的 3 维图形。可以通过迭加连续的平面图像进行重建，所述平面图像是通过扇形光束重建算法由线性（一维）投影重建的，或是通过锥形光束重建算法由平面（二维）投影重建的。所述细胞的 3 维图像可以产生关于亚细胞结构以及有关标记分子探针的位置和数量的定量量度，所述分子探针提供诊断信息。

如上所述，重建截面或体积的二维或 3 维密度结构要求有一个以上的经过细胞截面的投影。在传统的一个片段与一个片段的医学计算机断层 x 射线照相法中，通过使患者保持不动，而 x 射线源和相对的检测器沿着外周移动产生经过患者的多个投射角度，从而进行多个投影。通过类比，本发明的流式光断层成像系统以预定速度使细胞通过多个光源，所述光源以不同角度设置在毛细管的外周，从而当细胞经过点光源时产生多个投影。这些点光源发出光子，所述光子经过细胞被与光源相对的传感器阵列检测。所述点光源可以沿着螺旋线 24 和其它适当的几何图案排列在毛细管的外周，这样当细胞经过点光源阵列，可以从多个角度对细胞的每个点进行采样。对于好的采样几何图案，这些点光源可以覆盖外周的至少 180 度。在某些情况下，较少的角度覆盖范围（也就是低于采样的角度）是可行的，但是额外的放射覆盖范围将提高计算机重建的精确度和信噪比。根据几何学，对于锥形或扇形光束图像重建，较为有利的是采用传统的分析、迭代或统计学算法。（参见例如，Gilbert, P, "Iterative Methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections", Journal of Theoretical Biology 36:105-17, 1972; Oppenheim, BE, "More accurate algorithms for iterative 3 dimensional reconstruction," IEEE Transactions on Nuclear

Science NS-21:72-7, 1974; Singer, JR, Grunbaum, FA, Kohn, P 和 Zubelli, JP, “Image reconstruction of the interior of bodies that diffuse radiation” Science 248 (4958):990-3,1990; Mueller, K 和 Yage, R, “Rapid 3-D cone-beam reconstruction with the simultaneous algebraic reconstruction technique (SART) using 2-D texture mapping hardware”, IEEE transactions on Medical imaging 19 (12) 1227-37, 2001.) 相关的方法包括但不局限于 ART(代数重建技术, 如 Bellman, SH, Bender, R, Gordon, R 和 Rowe, JE 的 “ART is science being A defense of algebraic reconstruction techniques for three-dimensional electron microscopy”, Journal of Theoretical Biology 32:205-16,1971), SIRT (联立迭代重建技术, 例如 Gilbert, id #1493 中所述), MLEM (最大似然期望值最大化, 例如, Manglos, SH, Jaszczak, RJ 和 Floyd, CE 的 “Maximum likelihood reconstruction for cone beam SPECT: development and initial tests”, Physics in Medicine and Biology 34(12):1947-57, 1989,#1382), 以及 OSEM (有序子集期望值最大化, 例如 Manglos, SH, Gagne, GM, Krol A, Thomas, FD 和 Narayanaswamy, R “Transmission maximum-likelihood reconstruction with ordered subsets for cone beam CT”, Physics in Medicine and Biology 40(7):1225-41, 1995, #4389)。

20 方法

流式细胞仪

参见附图 5, 其示意性给出了本发明一个实施例的流式光学断层成像系统 (FOT)。所述流式光学断层成像系统包括一流式细胞仪, 以及位于毛细管 2 周围的重建圆柱体 20。光子源 25 和光子传感器 26 与作为触发装置的脉冲高度分析仪 27 一起工作。脉冲高度分析仪按照公知的原理工作, 为细胞的开始提供第一触发点 28, 为细胞的结束提供第二触发点 29, 所述脉冲高度分析仪输出与每个细胞的开始和结束相对应的触发信号 30, 其中所述触发信号被重建圆柱体 20 接收。

计算机 40 通过信号线 41-43 将数据、控制信号和定时信号传输给点光源 21、传感元件 23 和脉冲高度分析仪 27。所述计算机可以包括一个公知的计算机或多个计算机以及适于图像获取和图像重建处理的阵列处理器。

商业上的流式细胞仪具有三个基本流动结构：也就是，圆柱形流动管，矩形流动管和空气系统中的流动（参见，Shapiro, HM, Practical Flow Cytometry, 3rd, ed., Wiley-liss, 1995）。优选的结构为圆柱形流动管，这是因为保持最理想的圆柱形几何形状对于重建算法是非常重要的，将由于流动硬件而导致的径向依赖性降至最低（见附图 1）。而且，圆柱形流动管可以相对于毛细管的横截面具有均匀的薄壁。

此外，触发装置可以位于重建模块的上游，提供一定时信号，当细胞进入然后从重建圆柱体中出去时，启动然后终止数据采集。有利的是，所述触发装置可以包括一激光二极管，CCD，PMT，光电探测器组合，固态光电探测器和上述元件的组合。所述触发装置有一阈值设置用于探测流动细胞的存在，因此产生一触发信号。当下游的重建圆柱体开始采集关于特定靶细胞的数据，所述触发信号与已知的细胞速度用于计算。进一步地，对应于细胞进入和流出重建圆柱体的第一和第二触发点之间的时间间隔可以被分为相等或不等的增量，在每个增量期间，可以通过选通光源 21 和对传感器阵列 23 进行读数获得另外的投影数据。

需要对流动速度进行控制和精确地测量。在高级商业系统中采用 1 米/秒至 10 米/秒之间的速度具有上述能力。根据下文所要描述的数据采集速度和信噪比可以确定最佳细胞速度。

重建模块

现在参照附图 6，其示意性地给出了本发明一个实施例的重建圆柱体 20 内的扇形投射射线的例子。重建圆柱体的目的是提供将多个沿着小的外周固定的点光源 21a-21c 发出的光投射至圆柱形毛细管。点光源发出的光子具有已知的投射几何形状，例如扇形或锥形，并通过毛细管被传感元件 23a，23b 或 23c 阵列检测出，所述传感元件阵列可以根据情况位于相应的点光源对面的更大的外周上。出于阐述的目的，图中给出了适于扇形光束透射的弯曲线（一维）传感器阵列，但是也可以采用适于锥形光束照明的直线（一维）传感器阵列或平面（二维）传感器阵列。这样，可以产生一组投射射线，其中投射射线可以被描绘成连接点光源和单个传感元件的直线。沿着例如射线 31 的特定投射

射线离开点光源的光子数量与特定传感元件接收的光子数量之差与丢失或减弱的光子数量有关，其原因是细胞与沿着投射光线路径的流动管内其它内容物的相互作用。

然而，由于光散射、光子能量漂移、不完善的几何图形以及校准不正可以使情况变得复杂，当同时激发多个点光源时，不同光源的光子可以到达同一个特定传感元件。通过细心地构造重建圆柱体，例如通过仔细选择本文所述的点光源的图案以及它们相对的检测器，以及对多个点光源的激活和传感器的读出进行适当地时间控制或多路传输，可以将由于上述问题导致的光子污染降至最低但是不能消除。

对系统校准可以估计出光子污染，例如没有细胞存在。也就是说，可以轮流启动每个光源并测量其对每个传感器的影响，从而提供偏移数据使系统正常化。另外的校准步骤使用，例如光学特性已知的成像乳胶聚合物珠或其它微球或椭圆形小球，并采用所需要的密度范围进行细胞成像。通过如下文所述在检测器中使用带通滤波器，由荧光探针发出的光子可以与来源于点光源的光子区分开来。

光源

每个光源可以具有相同的一般特性，优选地：

- 可以近似为小的圆形点光源，
- 可以以已知的光谱容量发光，
- 从光源发出的光子可以具有已知的几何图形，例如锥形或扇形。

每个光源产生针对每个投射角的数据。当细胞流过模块时，沿着螺旋线排列的多个光源产生来源于经过每个连续平面（或重建部分）的多个投射角的数据，所述螺旋线的轴线是流动管的中心轴。根据传感器的几何图形，数个点光源可以共同线性排列在同一个外周上，这样投影不会在传感器上重叠。将光源等距离地沿着 180 度的螺旋线排列，可以获得良好的采样几何图形，然而在某些情况下，也可以是较小的角度覆盖范围，为了提供信噪比可以采用 360 度覆盖范围。理想的光源数目是每个平面重建（x-y 平面）或体积重建内所需分辨率的函数。出于阐述的目的，点光源采用了螺旋分布，但是应这样理解，点

光源阵列可以采用各种各样的几何图形。进一步地，通过采用各种各样的二极管或其它激光器或白色或其它宽带光源的带通滤波器，例如汞或氙弧光灯，光源的波长是可以选择的。

现在参照附图 7，其示意性地给出了根据本发明一个实施例的附图 6 中重建圆柱体的顶视图。图中给出了第一点光源 21a 和传感器阵列 23a，以及具有细胞核 19 的细胞，所述细胞垂直于光源轨迹投射的平面流动，其在两维上构成了重建圆圈 32，其中所有的投影，即使以时间交错模式获取的投影，均被描绘成重叠的，其中包含了整个细胞。第二个点光源 21b 和第二个传感器阵列 23b 排列在螺旋线周围大约 30°，第三个点光源 21c 和第三个传感器阵列 23c 排列在螺旋线周围大约 90°。

数据收集与位于“厚”的平面轴向横截面内的细胞速度同步控制。理想的平面厚度是在 z 方向上所需分辨率的函数。典型地，轴向（z 方向）上的分辨率小于平面横轴向方向的分辨率。同时，重建的最佳圆圈可以由投影扇形的重叠交叉部分限定，所述投影扇形的顶点为点光源，底部为传感阵列的宽度。理想的是，重建圆柱体的几何图形应使流动细胞的横截面全部包含在重建圆圈中。

在构建点光源时可以采用数个选择方案，例如：

- 在激光或其它高强度光子源的前面有一小孔，
- 具有小的横截面的光纤，
- 在光子源前有一具有短焦距的透镜，
- 发出的一个点位于磷表面上（CRT 的一种形式）的电子束，以及
- 以上所述的不同组合。

所述几何图形为点光源离靶目标（细胞）越近，放大倍率越高，这是因为离光源越近的目标对着越宽的几何角度。相反，如果在系统设计之前知道所需要的分辨率，可以针对该特定分辨率将几何图形优化。有关背景技术，可以参见 Blass,M(主编)，Handbook of Optics: fiber optics and nonlinear optics，第 2 版，第 4 卷，Mcgraw-Hill，2001。

现在参见附图 8，其示意性地给出了根据本发明一个实施例在细胞重建中采用的直线阵列 23。例如，对于包含在 30 微米直径的重建圆圈

内的细胞横截面 12 和核 19，以及所需的 0.5 微米分辨率，Nyquist 采样（也就是 2 倍的过采样）规定了每个点光源 21 至少需要 120 个传感元件 33。位于顶点的点光源 21 和位于底部的线阵列长度 34 构成了一个三角形 35，从而例如直径为 30 微米的细胞位于三角形 35 之内，其尽可能5 地接近于点光源 21。在该例子中，如果阵列中的每个元件（例如，CCD）为 20 微米宽，阵列长度为 2400 微米，则细胞的中心距离点光源约 100 微米（毛细管直径的一半），当点光源和线性阵列之间的距离是 8 毫米，提供 80 倍的放大。

在第二个例子中，重建圆圈的直径为 30 微米，互补金属氧化物半10 导体（CMOS）的像素大小为 4 微米。在该情况下，所述阵列可以含有 120 个元件，宽度为 480 微米，可以距离点光源 1.6mm 放置，当点光源和细胞间的距离为 100 微米，提供 160 倍的放大。

传感元件

15 每个点光源应具有一对应的传感元件阵列，例如以直线或曲线几何排列的 CCD，其与点光源相对，用于接收透射穿过重建圆圈的光子射线。典型地，线阵列的传感元件以点光源和中心流动轴之间的线为中心，并可以垂直于流动轴排列。可以采用二维阵列，其中只对二维阵列内每条线上的元件子集进行读数用作重建输入。在二维阵列中，20 将适当数量的元件沿着点光源的螺旋形排列适当地与每个不同点光源对齐，从而将每个元件的连续子集交错开来。

对于一个片段接一个片段的扇形光束重建，使用 30 微米重建圆圈和每个扇形有 120 个传感元件，获得 0.5 微米的分辨率，一个具有 2000x2000 20 微米元件的二维阵列足够用于进行检测 136，点光源以 125 径向角度增量设置，其中连续视野之间的平均偏移量为 300 微米，其等于 15 个传感元件（在阵列的中心，偏移量可以是 140 微米或 7 个元件，但是在阵列的边缘，视野之间的 1 径向角度范围可以导致更大的偏移量）。如果传感器阵列中平均 15 排为一组为每片提供投影数据，那么在细胞图像中 z 轴分辨率为 3.75 微米，然而如果每个投影平均为 30 2 排，则目标空间的轴向分辨率为 0.5 微米，等于横轴向的分辨率。

在本发明的一个优选实施例中，二维阵列沿着圆柱形外周弯曲排

列，所述圆柱形外周与重建圆柱体同心，这样所有射线路径在长度上均相等。对于 30 微米的重建圆圈，一个弯曲的二维阵列，其中只含有所需的相对于点光源的螺旋轨迹的元件，所述二维阵列可以是宽为 120 个元件、高（长度）为 136 个元件的倍数的螺旋条带，如上文所述。

5 尽管出于阐述的目的描述了平面或“厚”的扇形照明，但是应这样理解，真正的未经准直的锥形光束照明可以与二维平面检测器结合使用，采用锥形光束算法进行 3 维重建。可以直接对所述二维投影图像进行分析，以获得例如关于疾病状态或细胞变化状态的信息。对于直接的体积锥形光束重建，对多个点光源发出的照明进行多路复用，
10 考虑到点光源和检测器的几何排列，使得来自于不同点光源的照明锥形不与传感器阵列重叠。

然而，如果细胞以 1 米/秒（或 1,000,000 米/秒）的速度流动，二维阵列上的每个元件为 20 微米宽，每 20 微秒的线性读出可以轻易地捕获 0.25 微米细胞片段内的数据。当平均一排有 15 个传感器为 3.75
15 微米的片段提供数据，那么每 300 微秒进行一次读数。采用更大的二维阵列可以使重建图像的质量得到显著的改善。

对于特别适用于大量透射或发射波段的多谱段成像的本发明的实施例，包括系列设置的两个或多个重建模块是非常有利的。可以通过插入毛细管片段分离上述多个重建圆柱体，每个模块提供充足的投影
20 数据，用于产生关于流经该模块的目标的完整重建图像。每一个重建模块中的点光源和/或传感器阵列可以最优化从而适合于一特定波段。例如，第一重建模块可以采用强白光照明和不经过滤检测以提供完整的投影数据集以重建关于目标光密度、吸收或散射系数的图形，而第二重建模块可以采用以 495nm 为中心的窄波带照明，例如氩离子激光
25 器（488nm），以激发用荧光探针标记的蛋白质，与经过滤的对 520nm 发射光敏感的传感器阵列一起进行免疫荧光研究，提供充足的第二完整投影数据，通过下文描述的发射光重建算法，描绘出标记蛋白质的浓度分布。第三个重建模块可以使用以 535 和/或 342nm 为中心的窄带照明，激发以化学计量结合至 DNA 的碘化丙啶（Propidium iodide），
30 以及过滤传感器阵列，从而最佳地检测出红（617nm）的发射光以研究倍数性。应这样理解，上述例子仅用作说明，所述方法通常适用于任

一用于照明和检测的波长组合。

图像重建

最常用的、易于实施的重建算法，也就是公知的经过滤的反向投影法，衍生自采用锥形光束和扇形光束的计算机断层 x 射线照相 (CT) 中的类似范例 (参见以下参考文献，例如，Kak, AC 和 Slaney, M, Principles of computerized tomographic imaging, IEEE Press, 纽约, 1988, 和 Herman, G, Image reconstruction from projections: the fundamentals of computerized tomography, Academic Press, 纽约, 1988)。这些方法的基础是经修正的 Radon 转换定律，其反映了光源/检测器结构的特定几何图形和照明光束的射线路径。然而，对于临床用 x 射线 CT，为了一个片段接一个片段的获取，使人体固定不动，而 x 射线源和检测器阵列沿着患者周围的弧形移动从位于给定片段内的多个投射角度采集数据。然后将患者沿着 z 轴重新定位，采集另一片段的数据等等。此外，在更加先进的临床螺旋 CT 中，患者在 z 方向上连续平移，而光源/检测器设备连续旋转提供螺旋形的投射数据，然后将该数据进行内推得到垂直于患者 z 轴的投影。在流式光学 X 线断层摄影中，研究对象 (细胞) 相对于静止光源和检测器阵列以恒定速度流动，其中多个光源/检测器系统与沿着细胞速度矢量的特定选通时间点同步获得数据，从而产生位于一个给定片段或体积内的多个投射角数据。对于一个片段接一个片段的扫描，重建算法计算垂直于移动轴的平面的二维图像，多个片段的序列迭加将产生研究对象的 3 维图像，其中对比度是 CT 或流式光学 X 线断层摄影中研究对象的 x 射线减弱系数或光密度变化的函数。对于体积、锥形光束扫描，重建算法直接从平面透射或发射光投影计算细胞内或其它研究对象内的体积的 3 维图像，其中对比度是成像目标内的光密度和/或标记探针密度分布的函数。

理想的是，对于透射数据产生细胞密度重建，或对于发射数据重建标记探针分布，或者两者都包括，采用图像重建算法而不是过滤的反向投射。在某些情况下，常用的一类算法也就是公知的迭代重建算法更加有效，特别是对于发射断层成像或在例如本发明中，在已知目标轴向对称和具有三个腔室性质的情况下，在重建算法中可以结合先验信息以提高重建的质量 (参见，例如 Gilbert, P, “Iterative methods

for the three-dimensional reconstruction of an object from projections”, *Journal of theoretical Biology* 36:105-17, 1972 以及上文提及的其它参考文献)。

类似地, 一种方法可以是有利地采用基于有限元素模型 (FEM) 的统计重建算法。FEM 算法衍生自线性传输理论, 其中在元素的所有边缘求解光子传播/移动方程从而产生成像目标的吸收、散射、反射率和各向异性因数特性的某些组合的两维或三维图形。上述方法的例子参见 Paulsen, KD 和 Jiang, H 的 “Spatially varying optical property reconstruction using a finite element diffusion equation approximation”, *Medical Physics* 22(691-701) 1995, 以及 Hampel, U 和 Freyer, R 的 “Fast image reconstruction for optical absorption tomography in media with radially symmetric boundaries”, *Medical Physics* 25(1):92-101, 1998, 以及 Jiang, H、Paulsen, KD 和 Osterberg, UL, “Frequency-domain near-infrared photo diffusion imaging: initial evaluation in multitarget tissuelike phantoms”, *Medical Physics* 25(2):183-93, 1998。

颜色分离

如果使用多颜色的点光源 (例如, 白光), 则可以采用不同颜色着色 (例如生色团) 以区分大量的分子探针和细胞内的结构特征。本文, 在光源或检测阵列 (或两者) 处采用系列带通滤波器分离波长数据, 并对单个着色分子进行重建和空间定位。对多个探针成像的更稳固的办法是采用强白光光源, 并同时收集传感器阵列的多个过滤带宽, 从而通过图像重建算法计算每个生色团的空间成像片段。这些可以显示为彩色图像。

25

荧光、磷光、化学发光和纳米颗粒发光

作为流式光学断层成像系统的一个特殊例子, 某些特定分子探针可以用“报道分子”进行标记, 所述报道分子在受到初级光子源激发时, 可以发出不同波长 (更长) 的光。来自报道分子的第二次发射可以用标准光滤波器过滤以将初级光源的光子从次级发射的光子中分离出来。然而, 次级发射光子的图像重建算法更加复杂, 这是因为从光源发出的第二次发射的光子不一定是沿着直线射线路径。如果假设次

30

级点光源发出的次级光子为均一球形，则到达任一传感元件的次级光子强度是与传感元件之间距离的简单函数。进一步的精细化通过提供相对于点光源位于重建片段中的次级光子的空间分布，可以解释次级光源发出的次级光子的非球形分布。上述任一方法提供了计算位于重建片段或体积内的次级光源的位置的方法。成像目标与检测器阵列之间的校准将改善图像重建。

如果通过光过滤同时计算初级光子强度和次级光子强度，则原始光子强度的高分辨率密度重建可以叠加或融合在次级光源重建上，这样在单个重建图像中就具有图像形态和定位的探针浓度。根据强度、信噪比、以及在光源和/或传感器处过滤或产生窄波带光子的能力，利用多个次级光源是有利的，每个次级光源对应于不同的标记分子探针。

2001年3月13日公开的 Basiji 等人的美国专利 No.6201628(题目是“高通量光扫描仪”)中披露了一扫描装置，用于对底物荧光、光密度或磷光进行自动、快速和灵敏的扫描。所述扫描仪采用具有恒定路径长度的光学系统，可以使进行高速扫描的移动光束与减少噪声的相位灵敏检测结合起来。所述扫描仪包括光源，用于接收来自光源的光并将其扫过控制镜的扫描镜，用于接收来自扫描镜的光并将其反射给底物的控制镜，这样所述光沿着扫描弧经过底物，以及用于接收来自底物的发射或散射光的光电检测器，其中光源至光电检测器的光路路径长度在整个经过底物的扫描中基本恒定。所述光学系统可以进一步地包括波导或反射镜用于收集来自底物的发射或散射光并将其引至光电检测器。对于相位敏感检测，光源是强度调制的，检测器连接至相位敏感检测电子设备。同时还提供了使用底物转换器的扫描仪。对于二维成像，所述底物被转换成一维，而扫描镜扫描在第二维中扫描光束。对于高通量的扫描仪，将多个底物放置于来自盘式供给机的传输带上。美国专利 No.6201628 在本文结合并作为参考。然而，这些申请中没有考虑到产生光学投射图像，因此不能用这些图像进行断层成像重建。

如上所述，本申请是一自动检测细胞核中 NDF 和细胞质中 CDF 的系统，其对患者的细胞进行光学投影和断层成像重建。根据与疾病相关的 NDF 和 CDF 的存在与否，可以作出关于患者是否患有恶性肿

瘤的结论。

现在参照附图 9, 其示意性地给出了本发明一个实施例的对细胞重建数据进行分类的方法。该系统可以包括数个分类器, 它们可以共同工作确定特定细胞样本是否含有靶细胞和诊断细胞, 所述细胞具有与疾病相关的 NDF 和 CDF。一个分类器是计算机程序, 基于特定特征值 94 对目标进行分析。本发明的自动分类器系统可以包括, 例如, 初级分类器 90, 其执行基本的筛选功能并选择靶目标。次级分类器 92 对细胞目标进行分类, 分为形态上不正常或形态上正常但是具有与疾病相关的 NDF 和 CDF, 或正常而且不显示与疾病相关的 NDF 和 CDF。可以提供报道 93 对任一和全部分类器的分类结果进行详细解释。应理解为根据应用可以采用多个和不同的分类器。

如上所述, 本发明的自动系统可以包括一初级和次级分类器, 但是也可以使用单个分类器用于顺序进行本发明的分类。基于统计学方法产生分类函数的软件包通常在商业上可以购得。

本发明的自动分类器优选包括基于直接计算出的 NDF 和 CDF、采用模糊二元判断或 Bayesian 统计判断来执行其分类功能的分类器。所述分类器可以包括大量的特征值, 例如包括形态特征, 光度特征, 离散质地特征, Markovian 质地特征, 非 Markovian 质地特征, 不规则碎片质地特征以及运转周期质地特征。

初级分类器典型地可将靶目标分为三个类型: 1) 包括诊断细胞和可能含有与疾病相关的 NDF 和 CDF 的细胞的上皮细胞; 2) 炎症细胞; 以及 3) 人造物品。初级分类器可以通过二元决策树和选择特征值进行一个细胞接一个细胞的分类。

如上所述, 本发明的系统将细胞核与人造物品、上皮细胞与其他细胞类型、具有与疾病相关的 NDF 和 CDF 的细胞与其它正常上皮细胞区分开来的能力依赖于分类器根据计算的特征值进行区分的能力。例如, 为了判别正常上皮细胞和异常上皮细胞(也就是, 诊断细胞), 本发明可以采用数个不同的判别函数, 每个函数用于确认特定类型的目标, 以及 NDF 和 CDF 发生的改变。

次级分类器对经初级分类器选择的细胞样本中的上皮细胞进行分类, 也采用二元决策树和特征值执行其分类功能。所述次级分类器可

以认为是一个样本接一个样本的分类器，用于分析经初级分类器分类的上皮细胞，并将这些细胞分为正常而且与疾病相关的 NDF 或 CDF 阴性，或正常而且与疾病相关的 NDF 或 CDF 阳性。与初级分类器一样，次级分类器基于一组优选的 NDF 和 CDF 值对细胞进行区分。

5 每个分类器所使用的特征组来自分析细胞核和/或细胞质的定量密度特征的判别函数，而且优选包括最小数量的特征。理想地，选择最小数量的最佳核特征将产生有效且稳定的分类器。也就是说，分类器优选可以精确地对细胞或细胞类型进行分类，同时可靠地对各种细胞和样本制剂进行分类。

10 所述分类器可以包括至少一个判别函数，其中判别函数采用来自 x 射线照相的特征对样本中靶细胞进行分类，包括但不限于，一维和二维核密度特征（NDF）以及细胞质密度特征（CDF），和选自以下的特征，包括面积、平均半径、光密度（OD）方差、光密度斜度、光密度范围、光密度平均值、光密度最大值、光点密度、低 DNA 区域、
15 高 DNA 区域、低 DNA 量、高 DNA 量、高平均距离、中等/高平均距离、相关性、均匀性、熵、分形维数、DNA 指数、质地、点状、连接部分以及在空间密度频率空间中的各种谐波。

细胞样本可以是人类的肺组织、宫颈组织、血样或可以含有不寻常细胞。在一个例子中，用于确定 NDF 和 CDF 而对样本进行着色包
20 括用化学计量或成比例的 DNA 和 RNA 染料进行着色。DNA 染料可以选自以下构成的组中，福尔根（Feulgen）染料，Romanowski 染料，May-Grunwald-Giemsa 染料，甲基绿和硫堇。在另一例子中，样本可以用抗体标记物进行着色以确定 NDF 和 CDF。在另一个例子中，可以非常有利地采用核酸序列标记物对样本进行着色。

25 本发明的系统对于分析生物细胞的不同类型是有用的。在一个例子中，靶细胞被选择用于诊断癌症，和/或，所述靶细胞可以有利地是扩散前的癌细胞。靶细胞可以包括扩散的癌细胞，其中利用所述靶细胞筛选癌症患者。也可以利用靶细胞确定患者是否会患有扩散性癌症。所述扩散癌细胞可以源自上皮细胞癌。选择性地，或另外，所述扩散
30 前的癌细胞可以源自上皮细胞癌。有利地是，上皮细胞癌可以选自由以下构成的组中，肺癌和喉癌、宫颈癌和卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、

皮肤癌和胃肠道癌症。

在用于分析多维图像的实施例中，例如，3 维图像和更高维（3 维+）图像，对样本中靶细胞进行分类的特征可以包括但不限于，一维、二维、3 维、3 维+核密度特征（NDF）和细胞质特征（CDF），以及
5 选自由以下构成的特征，包括面积、平均半径、体积、平均体积、光密度（OD）方差、光密度斜度、光密度范围、光密度平均值、光密度最大值、光点密度、低 DNA 容量、高 DNA 容量、低 DNA 量、高 DNA 量、高平均距离、中等/高平均距离、相关性、均匀性、熵、分形维数、DNA 指数、质地、点状、连接部分以及在空间密度频率空间中的各种
10 谐波。高 DNA 容量，例如可以是高于对正常细胞群进行测量得到的基线。

本文对本发明进行了详细地描述以符合专利法，并提供了本领域技术人员所需的信息以应用本发明的新颖原理，并构建和使用所需要的示范性和专门组件。然而，应理解为，本发明可以通过不同的设备、
15 装置和重建算法实施，可以对本发明作出关于设备细节和操作步骤的各种改变，只要不偏离本发明的真正精神和范围。

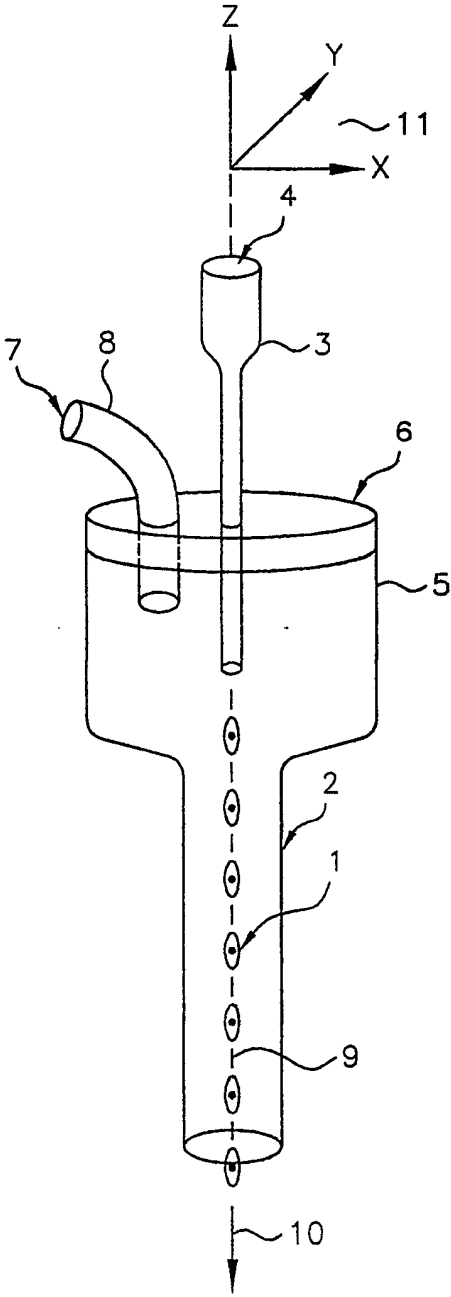


图 1

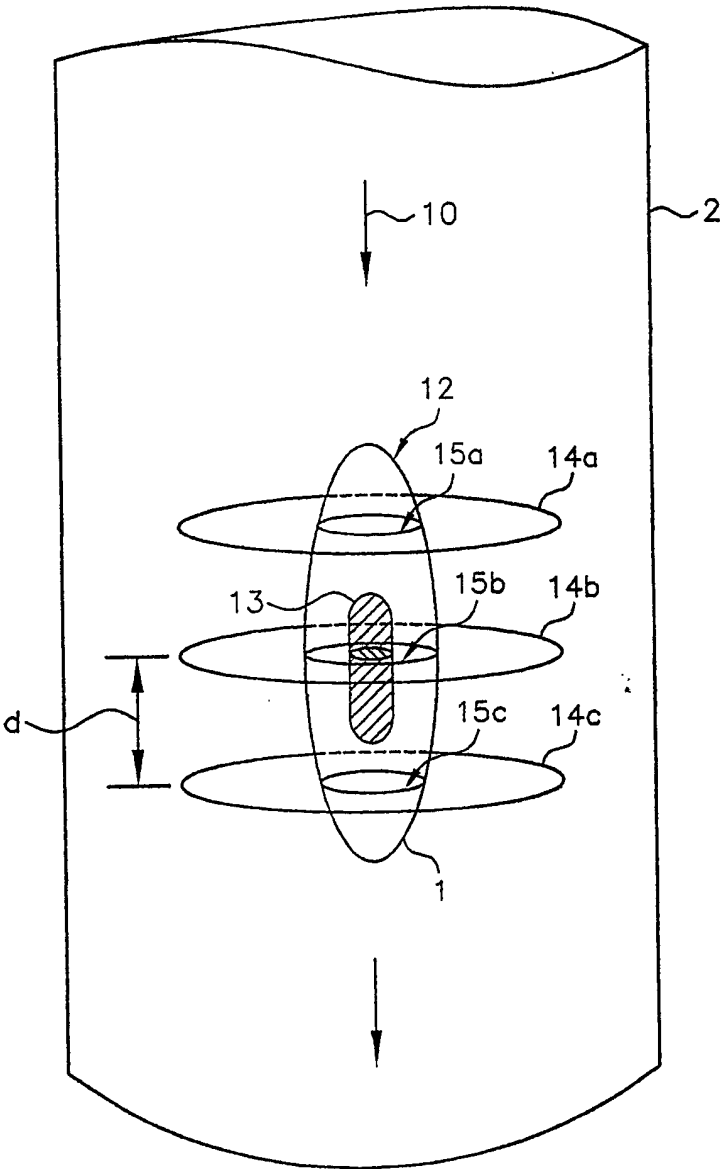


图 2

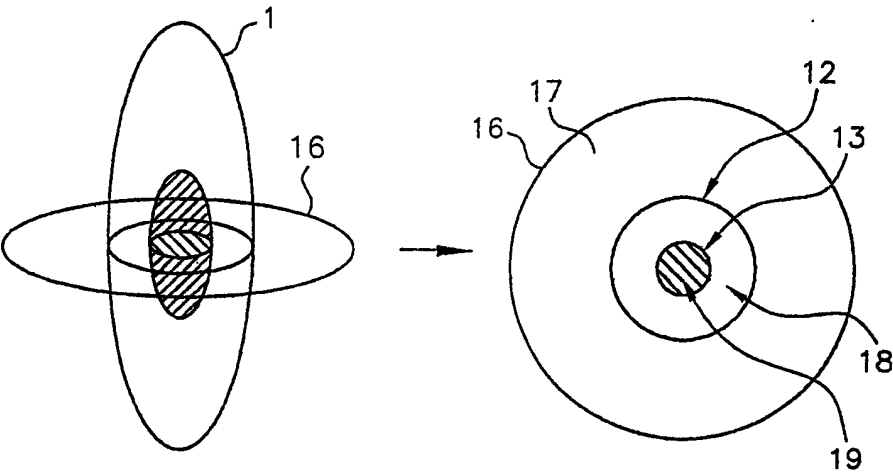


图 3A

图 3B

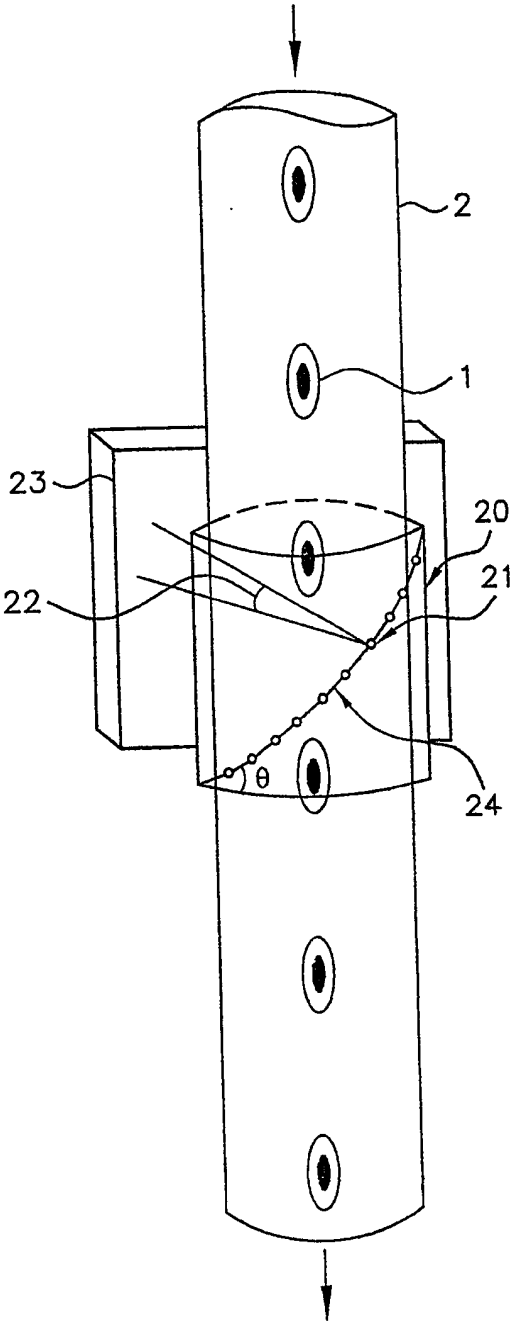


图 4

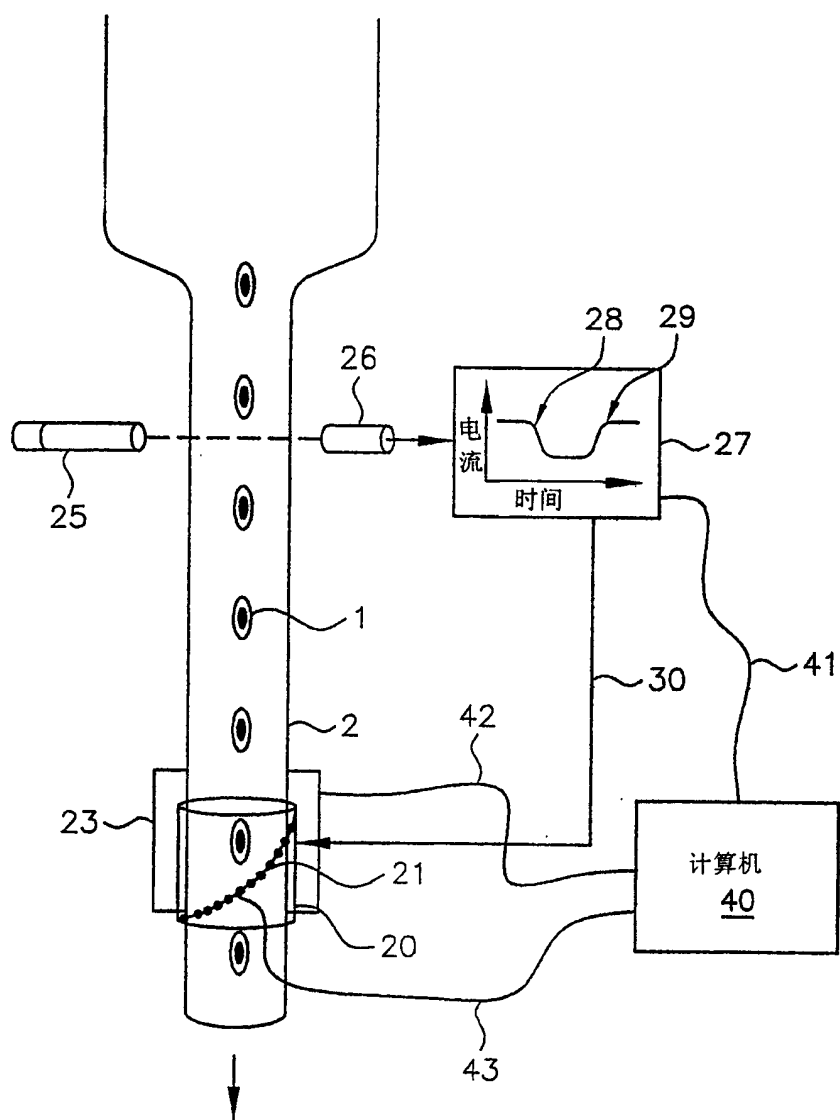


图 5

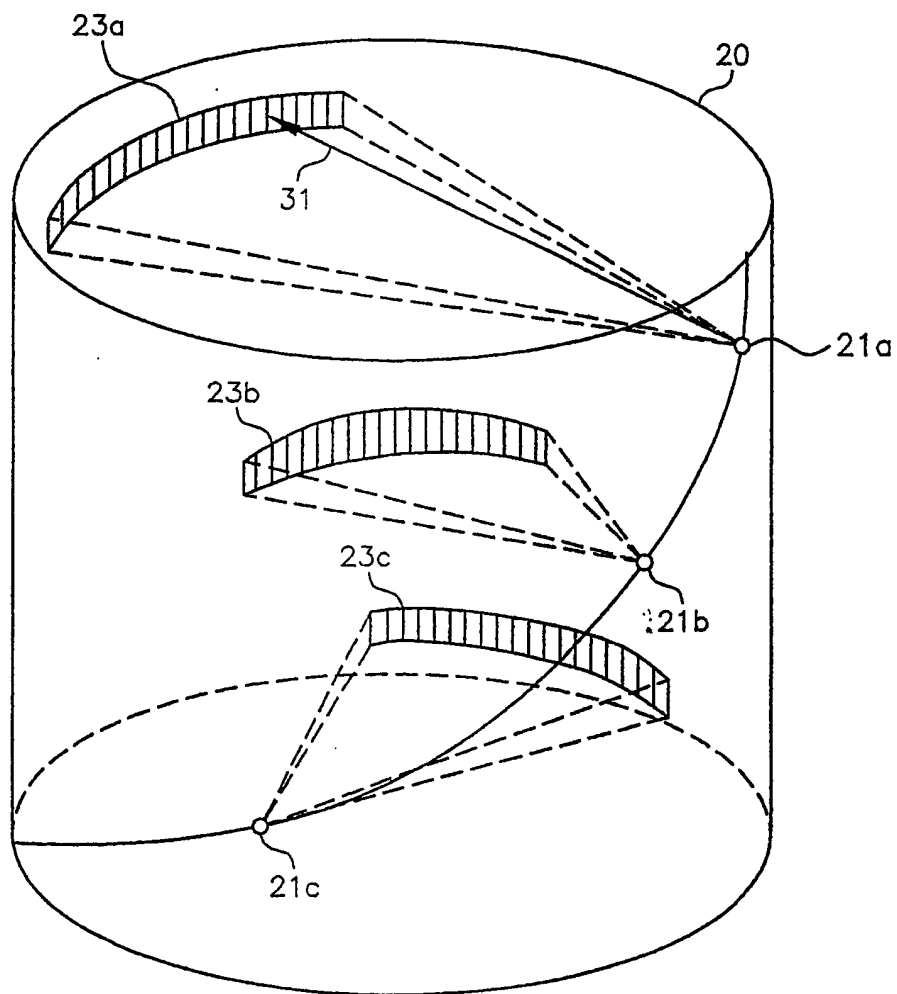


图 6

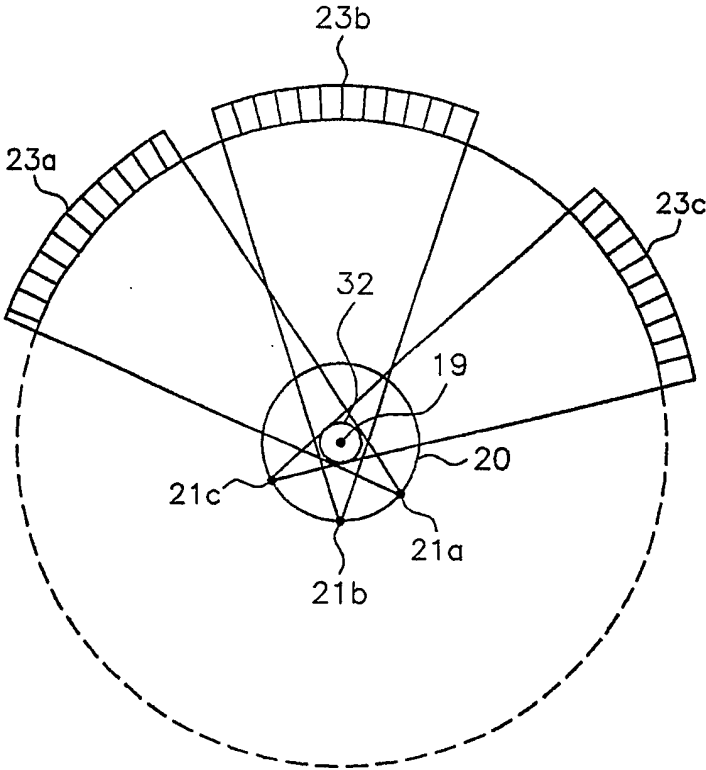


图 7

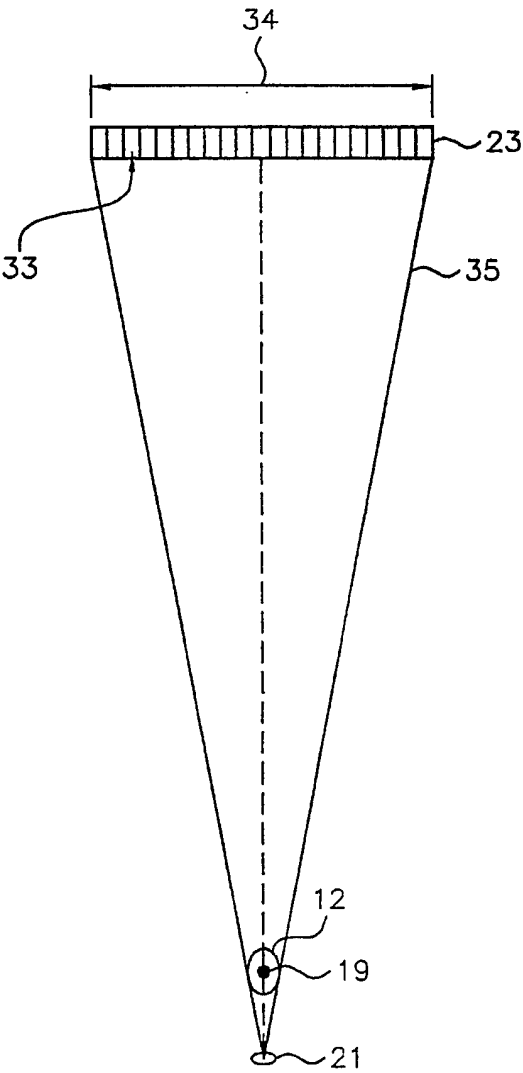


图 8

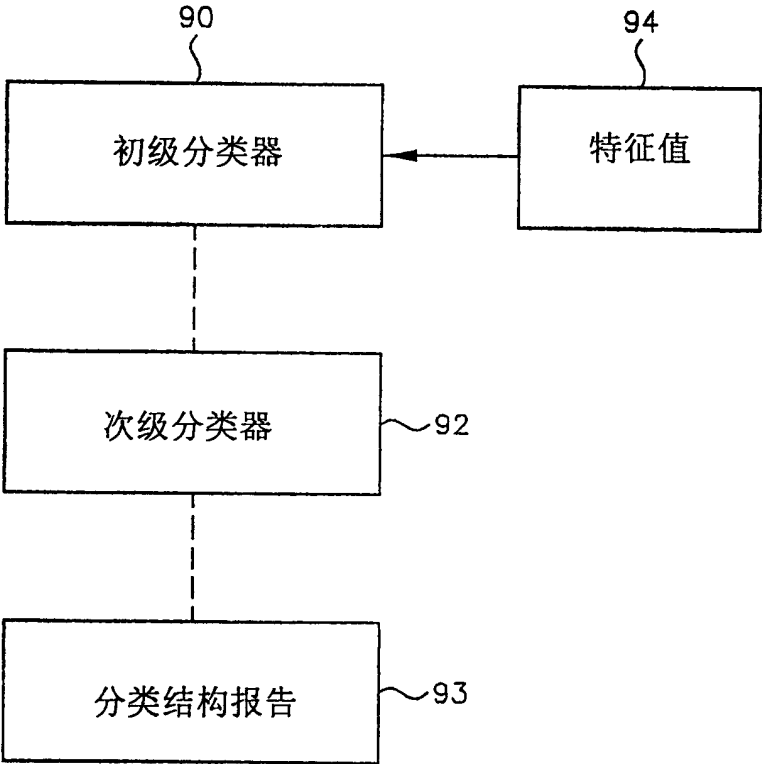


图9