

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6506700号
(P6506700)

(45) 発行日 平成31年4月24日 (2019. 4. 24)

(24) 登録日 平成31年4月5日 (2019. 4. 5)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6841 (2018. 01)

C 1 2 Q 1/6841 Z

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/48 (2006. 01)

G O 1 N 33/48 P

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 M

G O 6 T 1/00 (2006. 01)

G O 6 T 1/00 2 9 5

請求項の数 21 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-554123 (P2015-554123)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月21日 (2014. 1. 21)
 (65) 公表番号 特表2016-507229 (P2016-507229A)
 (43) 公表日 平成28年3月10日 (2016. 3. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/051077
 (87) 国際公開番号 W02014/114612
 (87) 国際公開日 平成26年7月31日 (2014. 7. 31)
 審査請求日 平成29年1月12日 (2017. 1. 12)
 (31) 優先権主張番号 61/756, 025
 (32) 優先日 平成25年1月24日 (2013. 1. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/849, 585
 (32) 優先日 平成25年3月25日 (2013. 3. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 390041542
 ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3
 4 5、スケネクタデイ、リバーロード、1
 番
 (74) 代理人 100137545
 弁理士 荒川 聡志
 (74) 代理人 100105588
 弁理士 小倉 博
 (74) 代理人 100129779
 弁理士 黒川 俊久
 (74) 代理人 100113974
 弁理士 田中 拓人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞レベル F I S H ドットカウントのための方法及びシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的サンプルの細胞レベル F I S H ドットカウントのコンピュータ実装方法であって、コンピュータがプロセッサを含んでいて、当該方法が、

a . プロセッサによって、核の対比染色試薬で染色された生物学的サンプルの第 1 の画像を受け取るステップと、

b . プロセッサによって、核の対比染色試薬からの信号の輝度に基づいて、生物学的サンプルの核をセグメンテーションすることによって、画像を核の対比染色試薬マスクに変換するステップと、

c . プロセッサによって、蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブ (F I S H プローブ) で染色された生物学的サンプルの第 2 の画像を受け取るステップと、

d . プロセッサによって、 F I S H バイナリマスクを抽出するために、マルチレベル拡張 h 最大値又は h 最小値を画像に適用するステップであって、細胞 (i) 毎の最良の h レベルが、ルールベース法を用いて、プロセッサによって選択され、ルールベース法が、レベルを受容又は拒絶するため、以下に定義するコントラストスコアをプロセッサによって計算することを含んでいる、ステップと、

10

【数 1】

$$R_i^j = \frac{|P_i|}{|C_i|}, \quad 0 \leq R_i^j \leq 1$$

式中、 R_i^j はコントラストスコアであり、

$|P_i|$ は集合のカーディナリティを表し、

C_i は*i*番目の細胞の全画素の集合であり、

$P_i = \{p \in C_i : |p| > \mu_{ij} + 2\sigma_{ij}\}$ であり、

μ_i^j 及び σ_i^j はレベル*j*での*i*番目の細胞の背景（非FISH）画素の輝度平均及び標準偏差である。

10

e. 検出された信号に従って、プロセッサによって、核の対比染色試薬マスク及びFISHバイナリマスクを位置合わせして重ね合わせるステップと、

f. 任意に、プロセッサによって、極大値及びサイズ制限を用いて各核の内部のFISHドットの数进行カウントするステップと

を含んでいる、方法。

【請求項 2】

前記ルールベース法は、前記コントラストスコアを受入閾値及び高検出閾値と比較することを含み、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

核の対比染色試薬で染色された生物学的サンプルの第 1 の画像が、生物学的サンプルによる 3 つ以上の焦点深度で取得された一連の画像を表し、生物学的サンプルの核をセグメンテーションするステップが、

プロセッサによって、画像の各々のブレナー勾配値を計算するステップと、

ブレナー勾配値に基づいて、最も良く焦点が合っている画像を選択するステップと、

プロセッサによって、多重スケールで画像をウェーブレット係数に分解するために、ウェーブレットベースのセグメンテーションアルゴリズムを画像に適用するステップと

を含んでいる、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 4】

蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブで染色された生物学的サンプルの第 2 の画像が、生物学的サンプルによる 3 つ以上の焦点深度で取得された一連の画像を表す、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

一連の画像が、プロセッサによって強化されるステップを含み、

プロセッサによって、画像の各々のブレナー勾配値を計算するステップと、

ブレナー勾配値を用いて、最も良く焦点が合っている画像を選択するステップと、

プロセッサによって、画像のノイズを低減するためにメジアンフィルタを用いてノイズ除去するステップと、

40

プロセッサによって、画像のコントラストを強化するために、トッパットフィルタ処理を用いて画像の背景減算を実行するステップと

によって強化される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

個々のFISHドットをカウントするステップは、プロセッサによって、クラスタ化したFISHドットを個別のFISHドットに分離し、得られたオブジェクトを個々のFISHドットとして分類するステップをさらに含んでいる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

プロセッサによってFISHドットをカウントするステップが、

検出されたFISHマスク内の極大値を検出するステップと、

50

接触するドットを分離するためにシード分水嶺アルゴリズムを適用するステップと、任意に、所定の最大面積に基づいて残りの大きなオブジェクトをさらに分割するために、面積ベースの手法を適用するステップとを含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

コンピュータ実行可能命令を記憶する非一時的コンピュータ可読媒体であって、コンピュータ実行可能命令は、コンピュータによって実行された場合に、コンピュータに対して、

- a. 核の対比染色試薬で染色された生物学的サンプルの第 1 の画像を受け取る処理と、
- b. 核の対比染色試薬からの信号の輝度に基づいて、生物学的サンプルの核をセグメンテーションすることによって、画像を核の対比染色試薬マスクに変換する処理と、
- c. 蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブ (FISH プローブ) で染色された生物学的サンプルの第 2 の画像を受け取る処理と、
- d. FISH バイナリマスクを抽出するために、マルチレベルに拡張された h 最大値又は h 最小値を画像に適用する処理であって、細胞 (i) 毎の最良の h レベルが、ルールベース法を用いて、プロセッサによって選択され、ルールベース法が、レベルを受容又は拒絶するため、以下に定義するコントラストスコアをプロセッサによって計算することを含んでいる、処理と、

【数 2】

$$R_i^j = \frac{|P_i|}{|C_i|}, \quad 0 \leq R_{ij} \leq 1$$

式中、 R_i^j はコントラストスコアであり、

$|P_i|$ は集合のカーディナリティを表し、

C_i は i 番目の細胞の全画素の集合であり、

$P_i = \{p \in C_i : |p| > \mu_i^j + 2\sigma_i^j\}$ であり、

μ_i^j 及び σ_i^j はレベル j での i 番目の細胞の背景 (非 FISH) 画素の輝度平均及び標準偏差である。

- e. 検出された信号に従って、核の対比染色試薬マスク及び FISH バイナリマスクを位置合わせして重ね合わせる処理と、
- f. 任意に、極大値及びサイズ制限を用いて各核の内部の FISH ドットの数のカウントする処理とを実行させる、コンピュータ可読媒体。

【請求項 9】

前記ルールベース法は、前記コントラストスコアを受入閾値及び高検出閾値と比較することを含む、請求項 1 記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項 10】

核の対比染色試薬で染色された生物学的サンプルの第 1 の画像が、生物学的サンプルによる少なくとも 3 つの焦点深度で取得された一連の画像を表し、コンピュータによって実行される場合に、コンピュータに対して、画像の各々のブレナー勾配値を計算する処理と、ブレナー勾配値を用いて、最も良く焦点が合っている画像を選択する処理と、多重スケールで画像をウェーブレット係数に分解するために、ウェーブレットベースのセグメンテーションアルゴリズムを画像に適用する処理とを実行させるコンピュータ実行可能命令をさらに含む、請求項 8 記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項 11】

蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブで染色された生物学的サンプルの第 2

10

20

30

40

50

の画像が、生物学的サンプルによる3つ以上の焦点深度で取得された一連の画像を表す、請求項8記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項12】

当該コンピュータ可読媒体が、コンピュータによって実行される場合に、コンピュータに対して、

画像の各々のブレナー勾配値を計算する処理と、

ブレナー勾配値を用いて、最も良く焦点が合っている画像を選択する処理と、

画像のノイズを低減するためにメジアンフィルタを用いてノイズ除去する処理と、

画像のコントラストを強化するために、トップハットフィルタ処理を用いて画像の背景を減算する処理と

10

を実行させるコンピュータ実行可能命令を含む、

請求項11に記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項13】

コンピュータによって実行される場合に、コンピュータに対して、クラスタ化したFISHドットを個別のオブジェクトに分離し、得られたオブジェクトを個々のFISHドットとして分類する処理を実行させるコンピュータ実行可能命令をさらに含む、請求項8記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項14】

FISHドットをカウントする処理が、

検出されたFISHバイナリマスク内の極大値を検出する処理と、

20

接触するドットを分離するためにシード分水嶺アルゴリズムを適用する処理と、

任意に、所定の最大面積に基づいて残りの大きなオブジェクトをさらに分割するために、面積ベースの手法を適用する処理と

を実行させる命令を含む、請求項13記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項15】

細胞レベルFISHドットカウントのためのシステムであって、当該システムが、プロセッサと、

プロセッサに結合され、画像データを受け取るように構成された入力と、

プロセッサに結合され、コンピュータ実行可能命令を含むメモリと

を含んでおり、コンピュータ実行可能命令が、プロセッサによって実行される場合に、プロセッサに対して、

30

a. 核の対比染色試薬で染色された生物学的サンプルの第1の画像を受け取る処理と、

b. 核の対比染色試薬からの信号の輝度に基づいて、生物学的サンプルの核をセグメンテーションすることによって、画像を核の対比染色試薬マスクに変換する処理と、

c. 蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブ(FISHプローブ)で染色された生物学的サンプルの第2の画像を受け取る処理と、

d. FISHバイナリマスクを抽出するために、マルチレベル拡張h最大値又はh最小値を画像に適用する処理であって、細胞(i)毎の最良のhレベルが、ルールベース法を用いて、プロセッサによって選択され、ルールベース法が、レベルを受容又は拒絶するため、以下に定義するコントラストスコアをプロセッサによって計算することを含んでいる、処理と、

40

【数 3】

$$R_i^j = \frac{|P_i|}{|C_i|}, \quad 0 \leq R_{ij} \leq 1$$

式中、 R_i^j はコントラストスコアであり、

$|P_i|$ は集合のカーディナリティを表し、

C_i は*i*番目の細胞の全画素の集合であり、

$P_i = \{ \forall p \in C_i : I_p > \mu_{ij} + 2\sigma_{ij} \}$ であり、

μ_i^j 及び σ_i^j はレベル*j*での*i*番目の細胞の背景（非FISH）画素の輝度平均及び標準偏差である。

10

e．検出された信号に従って、核の対比染色試薬マスク及びFISHバイナリマスクを位置合わせして重ね合わせる処理と、

f．任意に、極大値及びサイズ制限を用いて各核の内部のFISHドットの数のカウントする処理と

を実行させる、システム。

【請求項 16】

ルールベース法が、コントラストスコアを受入閾値及び高検出閾値と比較する、請求項 10 記載のシステム。

20

【請求項 17】

DAPIで染色された生物学的サンプルの第1の画像は、生物学的サンプルによる3つ以上の焦点深度で取得された一連の画像を表し、コンピュータ実行可能命令は、プロセッサによって実行される場合に、プロセッサに対して、画像の各々のブレナー勾配値を計算する処理と、ブレナー勾配値を用いて、最も良く焦点が合っている画像を選択する処理と、多重スケールで画像をウェーブレット係数に分解するために、ウェーブレットベースのセグメンテーションアルゴリズムを画像に適用する処理とを実行させる、請求項 15 記載のシステム。

30

【請求項 18】

蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブで染色された生物学的サンプルの第2の画像が、生物学的サンプルによる3つ以上の焦点深度で取得された一連の画像を表す、請求項 15 記載のシステム。

【請求項 19】

当該システムが、プロセッサによって実行される場合に、プロセッサに対して、画像の各々のブレナー勾配値を計算する処理と、ブレナー勾配値を用いて、最も良く焦点が合っている画像を選択する処理と、画像のノイズを低減するためにメジアンフィルタを用いてノイズ除去する処理と、画像のコントラストを強化するために、トップハットフィルタ処理を用いて画像の背景を減算する処理とを実行させるコンピュータ実行可能命令を含んでいる、請求項 15 に記載のシステム。

40

【請求項 20】

当該システムが プロセッサによって実行される場合に、プロセッサに対して、クラスタ化したFISHドットを個別のオブジェクトに分離し、得られたオブジェクトを個々のFISHドットとして分類する処理を実行させるコンピュータ実行可能命令をさらに含んでいる、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 21】

FISHドットをカウントする命令が、プロセッサによって実行される場合に、プロセッサに対して、

50

検出された F I S H バイナリマスク内の極大値を検出する処理と、
接触するドットを分離するためにシード分水嶺アルゴリズムを適用する処理と、
任意に、所定の最大面積に基づいて残りの大きなオブジェクトをさらに分割するために、面積ベースの手法を適用する処理と
を実行させるコンピュータ実行可能命令を含んでいる、請求項 20 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞レベル F I S H ドットカウントのためのコンピュータ実装方法及びシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

蛍光インサイツハイブリダイゼーション (F I S H) ドットカウントは、中間期細胞核の染色体異常を列挙する処理である。この処理は、生物医学研究の多くの分野で使用され、特に、癌の診断及び治療の決定において広く使用されている。例えば、乳癌は世界的に女性の最も一般的な癌である。アジュバント標的治療及び / 又は化学療法投薬の適格性を決定する場合に、ヒト上皮細胞成長因子受容体 2 (H E R 2) 遺伝子のコピー数は乳癌患者にとって重要である。1つの F I S H 検査は、細胞が H E R 2 遺伝子の余分なコピーを有するかどうかを調べるために用いることができる。H E R 2 遺伝子のより多くのコピーを有する細胞は、より多くの H E R 2 受容体を有することが知られており、それは乳癌細胞の増殖を刺激する信号を受け取る。この方法を用いると、細胞内の対象部分は蛍光顕微鏡下で有色ドットとなって現れる。H E R 2 プローブは、染色体 17 番動原体 (C E P 17) を調べる際には、オレンジ色に染色されたスポットとして見えるが、遺伝子 H E R 2 がある染色体は、緑色のスポットとして見える。カラードット可視化方法によれば、細胞内のドットをカウントすることによって、H E R 2 遺伝子のコピー数を推定することができる。往々にして、ドットカウントは近似する必要がある、したがって手動で行われる。しかし、主観的であることに加えて、F I S H ドットの手動カウントは時間がかかり、疲労する。

【0003】

何人かの研究者は、F I S H ドットの自動カウントのためのアルゴリズムを提案している。例えば、数学的モーフロジー及び逆多重フラクタル解析に基づく方法が、トップハットフィルタ処理及び 3 D 領域成長に基づく方法と同様に使用されている。別の手法は、実信号をノイズから分離するために、トップハットフィルタ処理及びそれに続くテンプレートマッチングを用いた。これらのアルゴリズムを用いても、自動による F I S H ドット検出は、特に背景アーチファクト (図 1 A)、細胞核と F I S H ドットとの密なクラスター (図 1 B)、及び / 又は低い F I S H ドットコントラスト (図 1 C を参照) が存在する場合には困難である。したがって、当技術分野の技術水準を前進させ、F I S H ドット検出及びカウントの課題に対処する自動検出及びカウントアルゴリズムを開発するための持続的なニーズがある。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、一般的には、生物学的サンプルの細胞レベル F I S H ドットカウントのコンピュータ実装方法に関する。コンピュータはプロセッサを含み、本方法は、プロセッサによって、核の対比染色試薬で染色された生物学的サンプルの第 1 の画像を受け取るステップと、プロセッサによって、核の対比染色試薬からの信号の輝度に基づいて、生物学的サンプルの核をセグメンテーションすることによって、画像を核の対比染色試薬マスクに変換するステップと、プロセッサによって、蛍光インサイツハイブリダイゼーションプローブ (F I S H プローブ) で染色された生物学的サンプルの第 2 の画像を受け取るステップと、プロセッサによって、F I S H バイナリマスクを抽出するために、マルチレベル拡張

10

20

30

40

50

h 最大値又はh 最小値を画像に適用するステップと、検出された信号に従って、プロセッサによって、核の対比染色試薬マスク及びF I S Hバイナリマスクを位置合わせして重ね合わせるステップと、任意に、プロセッサによって、極大値及びサイズ制限を用いて各核の内部のF I S Hドットの数のカウントするステップとを含む方法である。

【0005】

別の態様では、本発明は、コンピュータに、上記の方法を実行させることができる非一時的コンピュータ可読媒体を提供する。

【0006】

さらに別の態様では、本発明は、細胞レベルF I S Hドットカウントのためのシステムを提供し、システムは、プロセッサと、プロセッサに結合され、画像データを受け取るように構成された入力と、プロセッサに結合され、コンピュータ実行可能命令を含むメモリとを含み、コンピュータ実行可能命令は、プロセッサによって実行される場合に、プロセッサに対して、上記の方法を実行させる。

【0007】

本発明の上記その他の特徴、態様及び利点は、添付の図面を参照しつつ以下の詳細な説明を読めば、よりよく理解されよう。添付の図面では、図面の全体にわたって、類似する符号は類似する部分を表す。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】背景アーチファクトを示す乳癌画像の例を示す顕微鏡写真であり、Aは雑音及びアーチファクトを含むH E R 2 F I S H画像、Bは高密度な核及びF I S Hドットのグレースケール合成画像、Cは低いコントラストのH E R 2 F I S H画像である。白い矢印は、H E R 2 F I S Hドットを示す。

【図2】細胞レベルF I S Hカウントアルゴリズムのフローチャートである。

【図3】トップハットフィルタ処理を用いた背景減算の結果を示す顕微鏡写真である。

【図4】サンプルのF I S Hドット検出結果を示す一連のグレースケール顕微鏡写真である。

【図5】アルゴリズム1、すなわち細胞毎に最良のレベルを設定するためのルールベースのアルゴリズムを示す図である。

【図6】最終F I S Hカウントステップを示す図であり、(A)は細胞の輪郭が重畳されたH e r 2 F I S H画像からの細胞、(B)はトップハットフィルタ処理の結果、(C)はF I S H(前景)検出、(D)は検出された極大点、(E)は9ドットから8ドットが検出された初期ドット分離、(F)は9ドットのサイズベースの制約結果を用いた最終的なカウントを示す。

【図7】カウント方法及び選択されたF I S Hドット検出結果の対応する顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

生物学的サンプルの2次元蛍光画像のF I S Hドットの細胞レベルカウントのための方法を開示する。本明細書で用いられる用語「生物学的サンプル」は、生物学的被検体から得られたサンプルを指し、インビボ又はインビトロで得られた生物学的組織又は流体に由来するサンプルを含む。このようなサンプルは、これらに限定されないが、体液(例えば、血液、血漿、血清、又は尿)、器官、組織、画分、ヒト及び細胞小器官を含む哺乳動物から分離された細胞であってもよい。また生物学的サンプルは、組織(例えば器官又は組織の断面部分)を含む生物学的サンプルの一部を含んでもよい。また生物学的サンプルは、生物学的サンプルからの抽出物を含んでもよい。生物学的サンプルは、タンパク質、炭水化物、又は核酸を含んでもよい。

【0010】

生物学的サンプルは、原核生物由来、古細菌由来、又は真核生物由来(例えば、昆虫、原生動物、鳥類、魚類、爬虫類)であってもよい。いくつかの実施形態では、生物学的サ

10

20

30

40

50

ンプルが哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウシ、イヌ、ロバ、モルモット、又はウサギ）である。特定の実施形態では、生物学的サンプルは、霊長類由来（例えば、チンパンジー又はヒト）である。

【 0 0 1 1 】

特定の実施形態では、図 2 に示すように、カウントの方法は、核の対比染色試薬により生物学的サンプルを染色し、画像を取得するステップを含む。核の対比染色試薬の非限定的な例としては、D A P I（4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール）等の青色蛍光対比染色試薬、並びにプロピジウムヨウ素等の緑色、黄色、オレンジ、又は赤色の蛍光対比染色試薬が挙げられる。本方法は、さらに、核の対比染色試薬マスクを生成するために画像をセグメンテーションされた画像に変換するステップを含み、例えば D A P I を使用する場合には、D A P I マスクが生成される。特定の実施形態では、対比染色試薬マスクは、細胞核を画定するための 2 次元ウェーブレットベースのセグメンテーションアルゴリズムを用いて取得されてもよい。この後に、F I S H ドット検出及びカウントが続き、これによって、様々な画像コントラストを考慮するマルチレベル最小変換手法を用いることができる。このステップに先立って、画像ノイズをきれいにし（ノイズ除去又は画像のノイズ除去と呼ぶことができる）、背景を減算し、F I S H ドットのコントラストを向上させるために、メジアン及びトップハットフィルタを用いる画像前処理を行ってもよい。マルチレベル変換後に、F I S H ドットカウントが進行することができ、クラスタ化した F I S H ドットが検出に基づく極大値を用いて分離される。特定の実施形態では、制約条件に基づく F I S H ドットサイズのフィルタリングは、密にクラスタ化したドットの大きな連結成分を明らかにするために使用されてもよい。

【 0 0 1 2 】

単一細胞レベルでの正確なドット定量化結果を達成するために、重要なステップは、細胞核の正確なセグメンテーションを得ることである。このように、ほぼ少なくとも 3 つの核の対比染色試薬で染色された（例えば D A P I で染色された）画像の 3 次元スタックは、生物学的サンプルによる様々な焦点深度で取得することができる。各スタックは、いくつかの焦点が合ったスライスのみを含むことができる。したがって、特定の実施形態では、最も良く焦点が合ったスライスは、各画像 / スライスのブレナー勾配値を計算することによって選択される。それから、ウェーブレットベースのセグメンテーションアルゴリズムを、選択された焦点が合ったスライスに適用することができる。

【 0 0 1 3 】

ウェーブレットベースの手法は、いくつかの理由で有利であり得る。すなわち、ウェーブレットは、効果的なスケール空間分析を可能にする空間ドメイン及び周波数ドメインの両方に画像を分解し、複数のスケールにまたがってウェーブレットの計算が高速で、コンピュータ処理上効率的であり、パラメータの数を制限することができる。画像のノイズを除去し、細胞をセグメンテーションするために、画像のシフト不変型ウェーブレットフレーム変換に基づくアルゴリズムを、非突出ウェーブレット係数のフィルタ処理と同様に使用することができる。各レベルの間引き動作が省略される以外は、ウェーブレットフレームは、標準的なウェーブレット変換と同じである。分解は、次の式 1 及び 2 のように表される。

【 0 0 1 4 】

【 数 1 】

$$I_i(x, y) = \sum_{m, n} h(m, n) I_{i-1}(x - 2^{i-1}m, y - 2^{i-1}n) \quad (1)$$

$$W_i(x, y) = I_i(x, y) - I_{i+1}(x, y) \quad (2)$$

式中、 I_i 及び W_i はそれぞれ各スケール i での近似及び詳細画像を表し、 $h(m, n)$ はスケーリング関数を表し、 m 及び n は x 及び y のインデックスである。式 1 の再帰的定義は $I_0(x, y)$ を元の離散的画像に設定することによって初期化される。

10

20

30

40

分解を用いることで、ウェーブレット係数空間において、直接的に画像のノイズ除去をすることができる。画像ノイズが加法的なものであるとすると、対応するウェーブレット変換は、基礎となる信号 W^i により生成された係数及び画像ノイズ W^N に対応する係数になる。

【 0 0 1 5 】

【 数 2 】

信号項を近似するため、以下の式3に示すように所与のスケール i 及び位置 (x,y) でのウェーブレット係数 $W_i^I(x,y)$ の重要度の推定値としてジェフリーズ事前分布を用いた振幅スケール不変ベイズ推定器 (ABE) で画像スタックを閾値処理することができる。

$$W_i^I(x,y) \approx \delta^{ABE}(W_i(x,y)) = \frac{(W_i(x,y)^2 - 3\sigma_i^2)}{W_i(x,y)} \quad (3)$$

10

式中、 σ_i^2 は背景パッチにおいて算出した所与のスケール i での推定ノイズ分散である。ノイズをさらに低減又は画像ノイズを除去し、複数の解像度にわたって延在するオブジェクトを強化させるために、相関スタック $C_s(x,y)$ を計算することができるが、これは選択したスケールに対応するノイズ除去されたウェーブレット係数の部分集合を乗算したものである (式4)。

$$C_s(x,y) = \prod_{i=j_i}^{j_u} W_i^I(x,y)_+ \quad (4)$$

20

このウェーブレットベースのセグメンテーションアプローチは、比較的低い対ノイズコントラストが存在する場合、及びゆっくり変化する背景として現れる平坦な場の影響が存在する場合であっても、セグメント画像に使用することができる。

【 0 0 1 6 】

生物学的サンプルの核の対比染色に加えて、生物学的サンプルの核のセグメンテーション、FISH染色も同時に又は逐次的に行うことができる。FISH染色は、色素の吸収/発光波長の違いに基づいて、核の対比染色と区別することができる。

【 0 0 1 7 】

FISH検出及びカウントステップは、1) 画像前処理及び背景減算、2) 前景抽出、並びに3) カウントの3つのステップを含む。

30

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態では、画像前処理及び背景減算は、核の対比染色画像の変換と同様である。このように、ほぼ少なくとも3つのFISH画像、好ましくは少なくとも5つの、より好ましくは少なくとも10のFISH画像の3次元スタックが、生物学的サンプルにより様々な焦点深度で取得される。わずかな数の画像が焦点が合っている。最も良く焦点が合っているスライスが最大のブレナー値を有しており、それを見つけるために、3次元画像スタックのブレナー勾配値が計算される。そのスライスに加えて、前後のスライスが抽出され、最大2次元投影が適用される。それから、画像ノイズを低減する、又はノイズ除去を行うために、メジアンフィルタ処理を最大投影像に適用する。最後の前処理ステップは、トップハットフィルタ処理を用いる背景減算/クリーニングである。FISHドットは小さな輝点として現れるので、トップハットフィルタを用いることができる。それは、グレースケール又は2値画像に形態学的フィルタ処理を行う。それは最初に画像の形態学的オープニングを計算して、近似的な背景画像を生成するが、ここで背景とは非FISHドット信号を意味する。それから、それは原画像から背景画像を減算する。数学的には、これは次の式5のように表される。

40

【 0 0 1 9 】

【数 3】

$$T(I) = I - (I \circ s) \quad (5)$$

式中、 I は入力画像であり、 s はフィルタカーネルであり、 $\circ$ は形態学的オープニング処理を表す。これは、図3に示すようなFISHドットのクリーナマップになる。トップハットフィルタのカーネルサイズは、予想されるFISHドットサイズよりもわずかに大きく設定される。本研究では、半径5画素のディスク構造化要素を用いた。

特定の実施形態では、画像前処理及び背景減算に続いて、FISHバイナリマスクを画像から抽出する。前のステップで述べたように、FISHドットは小さな輝点であると予想される。したがって、 h 最大値及び h 最小値などの形態学的方法是、双対演算であり、FISH検出を助けることができる。しかし、このセクションで後述するように、コントラストが変化するドット及び/又は画像の密なクラスタを扱う場合には、これらの方法をそのまま適用することは失敗するおそれがある。

【0020】

これらの限界を克服するために、マルチレベル拡張 h 最小値変換（又は h 最大値）を用いるFISHドット検出方法を、自動レベル選択により用いることができる。単一レベル拡張 h 最小値変換は、 h 最小値変換の局所的な最小値を抽出する。それは、深さが輝度値 h よりも小さい画像中の全ての最小値を抑制するために、レベル h で h 最小値変換を適用することにより開始する。それから、得られる画像の局所的な最小値を抽出する。 h の値が慎重に設定されている場合には、 h 最小値変換は、非FISHドット画素について均一な背景を生成する。その場合には、局所的な最小値を抽出することは、画像内の非FISH画素の全てを抽出する。逆をすることで、FISHドットマスク（レベル h ）が得られる。数学的には、これは、式6のように表される。

【0021】

【数 4】

$$F_h = 1 - E^h(I') \quad (6)$$

式中、 F_h はレベル h でのFISHドットマスクであり、 E^h はレベル h での拡張 h 最小値変換であつて2値画像であり、 I' はトップハットフィルタ処理したFISH画像である。

上記の単一レベル手法の主な限界は、画像内の様々な（不均一な）コントラストを扱うことである。その場合には、大きな h 値（高いレベル）を用いることにより、非常に明るいスポットのみを検出するおそれがある。非常に小さな h 値（低いレベル）を用いる場合には、低コントラスト領域のより暗い（又は薄暗い）ドットのみを検出するおそれがある。しかし、それは高コントラストの画像領域において誤った検出をする可能性が高くなり得る。一例を図4に示しており、2つの関心領域（ROI 1及びROI 2）が同じ画像から抽出され、3つの h 値を用いて処理された。明らかなように、より高い h 値（低感度）は第1のROIに対してより良好な検出結果を生成したが、しかし、より低い h 値（高感度）は第2の（低コントラスト）ROIに対してより良好な検出結果を生成した。このことが、マルチレベル手法を開発する動機になった。

【0022】

マルチレベル手法では、画像は、3つの h 値（ h_0 ：低感度、 h_1 ：中感度、及び h_2 ：高感度）を用いて処理される。それから、細胞毎に最良の感度レベルが他の細胞とは独立して選択される。細胞 i のレベル j の受容又は拒絶は、コントラストスコア（式6a）を計算することによって行われる。

【0023】

【数 5】

$$R_i^j = \frac{|p_i|}{|c_i|} \quad (6a)$$

ここで、 $0 \leq R_i^j \leq 1$ であり、 $|\cdot|$ は集合のカーディナリティ（すなわち要素数）を表し、 C_i は i 番目の細胞の全画素 i の集合であり、 P_i は所定の閾値よりも大きい輝度値を有する i 番目の細胞の画素の集合である。

所与の細胞についてのコントラストスコアは、閾値より大きいその細胞内の画素の比を示す。閾値は、細胞の背景（非 F I S H）画素の輝度統計を用いて計算される。数学的には、 P_i は、次のように定義される（式 7）。

【0 0 2 4】

【数 6】

$$P_i = \{ \forall p \in C_i: I(p) > \mu_i^j + 2\sigma_i^j \} \quad (7)$$

式中、 $I(p)$ は画素 $I(p)$ の輝度値であり、 μ_i^j 及び σ_i^j はレベル j での i 番目の細胞の背景（非F I S H）画素の輝度平均及び標準偏差である。

2つの閾値、すなわち受入閾値 T_1 （0.6に設定）及び高検知閾値 T_2 （0.9に設定）を定義する。それから、図5に示すようなアルゴリズム1で説明したように、細胞毎に最良のレベルを自動的に選択するためにルールベース法が使用される。

【0 0 2 5】

3つの h レベルは、上記の手法を適用する前に定義する必要がある。したがって、これらのレベルを自動的に推定する簡易な方法を開発した。この方法は3段階で進行する。

【0 0 2 6】

【数 7】

- I. 核内の極大値(M_x)及び極小値(M_n)の集合を抽出し、それらの輝度値に基づいてソーティングする。

$$\begin{aligned} M_x &\xrightarrow{\text{descend_sort}} \overleftarrow{M_x} \\ M_n &\xrightarrow{\text{ascend_sort}} \overrightarrow{M_n} \end{aligned}$$

- II. 背景レベルを計算する (式 8):

$$B_g = \frac{\sum \overleftarrow{M_n}^{10\%}}{|\overleftarrow{M_n}^{10\%}|} \quad (8)$$

- III. 3つの h レベルを計算する (式 9):

$$h_i = \frac{\sum \overleftarrow{M_x}^{(i-1) \times 5\%}}{|\overleftarrow{M_x}^{(i-1) \times 5\%}|} - B_g, \quad i = \{0, 1, 2\} \quad (9)$$

式中、 $\overleftarrow{M_n}^{y\%}$ 及び $\overrightarrow{M_x}^{y\%}$ は、それぞれ $\overleftarrow{M_n}$ 及び $\overrightarrow{M_x}$ の最低及び最高 $y\%$ であり、 $|\cdot|$ は集合のカーディナリティである。

特定の実施形態では、プロセッサは、1以上のステップを自動化することが可能であり、データ解析を可能にするように構成することができる。またプロセッサは、コントロー

10

20

30

40

50

ラによって実行された場合に、多重化デバイスに対して、説明した解析方法を実行させる命令を含む機械可読媒体を含んでもよい。

【実施例】

【0027】

実験

一例では、各々がいくつかの乳癌（スライドあたり12～24点の範囲）の組織サンプルを含む19のスライドについて、合計で300スポット/画像より多くが処理された。提案するFISHドットカウントアルゴリズムの性能を定量的に評価するために、自動カウント結果を、19個のスライドから得られた167スポット/画像から選択された880個の細胞の手動カウントと比較した。手動カウントは、画像を調査した専門家によって、拡大/縮小することができ、3次元スタックをナビゲートすることができ、さらに選択的にチャンネルをオン/オフさせる能力を有し、複数のチャンネルを同時に観察することができる画像可視化ツールを用いて行われた。細胞レベルのドットカウント精度を評価するために、2つのメトリックが定義された。第1のメトリック（タイプA誤差）は、細胞の分類一致である。2つクラス、すなわち正常及び癌性が定義された。正常な細胞（非癌性）は、3以下のHER2及びCEP17ドットを有するものとして定義された。それ以外は、細胞は癌性として分類される。第2のメトリック（タイプB誤差）は、ドットカウントマッチであり、絶対カウント数の20%より大きい差は誤差としてみなされる。例えば、手動で10ドットが見いだされた場合には、8～12ドットの範囲の自動カウントはタイプB誤差とみなされない。

【0028】

このようなFISHカウントの結果を図6に示してあり、画像は最終的なFISHカウントステップを示す。図6では、画像（A）は、細胞の輪郭が重畳されたHER2FISH画像からの細胞の拡大顕微鏡写真である。顕微鏡写真（B）は、トップハットフィルタ処理の結果である。顕微鏡写真（C）はFISH（前景）検出を示し、（D）は検出された極大点を示す。顕微鏡写真（E）は、9ドットから8ドットが検出された初期ドット分離の結果である。顕微鏡写真（F）は、9ドットのサイズベースの制約結果を用いた最終的なカウントを示す。

【0029】

アルゴリズムによって、88%の細胞毎の分類一致（タイプA）、及びドットカウントマッチ（タイプB）について正確に同じレート（88%）が得られた。分類一致誤差及びカウントマッチ誤差を結合する（和集合をとる）と、全体の精度は81%である（165の誤差）。表1は、正常組織及び腫瘍組織の両方について、誤差タイプの百分率によりカウント結果をまとめたものである。より高い値は、より大きい誤差を示す。タイプA誤差又はタイプB誤差を用いて別々に測定した場合は、両方とも約12%の全体的な誤差率となる。両方が実施される場合には、誤差率は19%まで増大し、それらが異なる誤差を測定することを示している。

【0030】

図7は、検出されたドットが重畳された、セグメンテーションされた核のギャラリーを示す。細胞毎に、合成画像、HER2及びCEP17チャンネル、並びに自動及び手動によるドットカウント数を比較する表を示す。本アルゴリズムの精度をさらに検討するために、カウント誤差を検査し、核のセグメンテーション誤差により生じる165個の誤差のうち35個を見いだした。それらの細胞を除いて、本アルゴリズムは、84.6%の全体的な精度が得られた。本アルゴリズムは、計算上高価なステップを含んでおらず、効率的かつ高速である。平均して、2.67 Core i7プロセッサ及び4GBのメモリを備えたデスクトップを用いて、12スライスの2048×2048画像/スタックを処理するのに30秒かかる。

【0031】

【表 1】

表 1：(3つの異なるパッチからの) 19の事例から得た880個の注釈付き細胞を用いたカウント誤差率の概要。

タイプ	パッチ 1	パッチ 2	パッチ 3	全体
A	12% (46/376)	12% (44/364)	11% (15/140)	12% (105/880)
腫瘍	14% (30/216)	19%(39/210)	16% (6/37)	16% (75/463)
正常	10% (16/160)	3% (5/154)	9% (9/130)	7% (30/417)
B	13% (47/376)	13% (47/364)	6% (8/140)	12% (102/880)
腫瘍	20% (43/216)	20% (43/210)	8% (3/37)	19% (89/463)
正常	3% (4/160)	3% (4/154)	5% (5/130)	3% (13/417)
A 又は B	22% (82/376)	17% (63/364)	14% (20/140)	19% (165/880)
腫瘍	29% (62/215)	28% (58/210)	22% (8/37)	28% (128/463)
正常	13% (20/160)	3% (5/154)	12% (12/103)	9% (37/417)

10

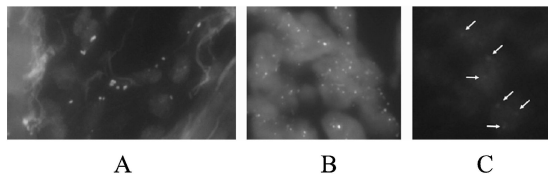
記載した方法が、所与の組織サンプルにおけるその存在が癌の指標及び / 又は患者の転帰の予測となり得る、細胞タイプの位置及び識別を可能にすることができることを理解されたい。重要であることが判明した細胞タイプは、細胞スタックモンタージュによるバイオマーカー署名及びそのメンバーの無作為選択を可視化することにより調査することができる。結果は、疾患進行の機構に関する仮説を生成するために使用することができる。

【 0 0 3 2 】

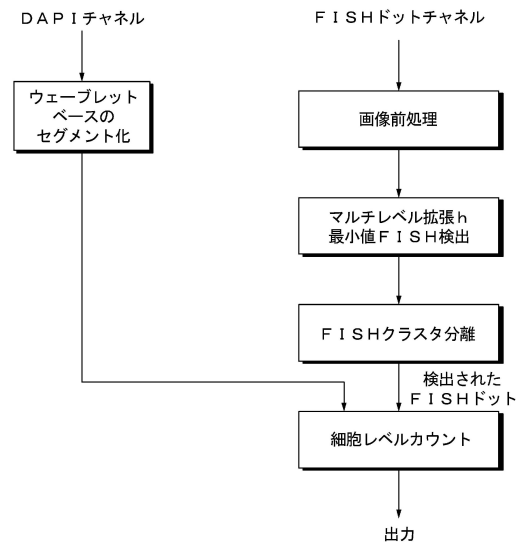
特定の実施形態では、記載した解析方法は、薬物治療の有効性を判定し、薬物の分子経路を解析し、又は環境暴露もしくは他の可能な癌の原因物質の可能な原因及び効果を解析する等の予測結果についての研究に用いることができる。このように、本方法は、研究、予測、又は治療の用途を有することができる。

20

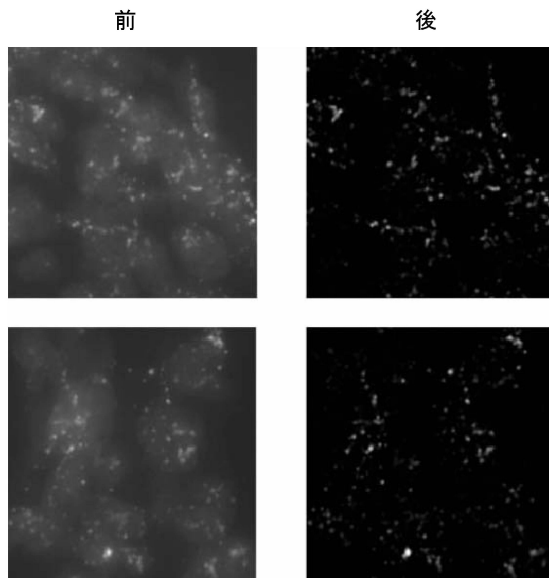
【図 1】

*Fig. 1*

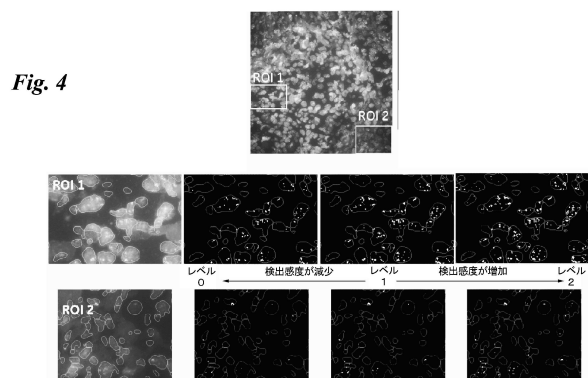
【図 2】

*Fig. 2*

【図 3】

*Fig. 3*

【図 4】



【図 5】

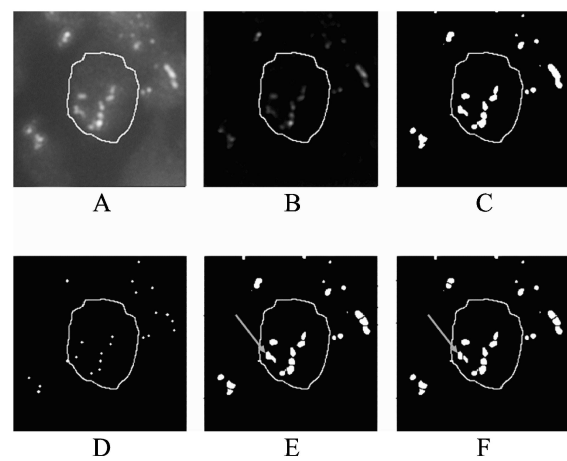
```

各細胞 i
|
|   if  $R_i^1 \geq T_1$  then
|   |   if  $R_i^1 \geq T_2$  and  $R_i^2 \geq T_1$  then
|   |   |   レベル  $\rightarrow h_2$ ;
|   |   |   else
|   |   |   |   レベル  $\rightarrow h_1$ ;
|   |   |   end
|   |   else
|   |   |   レベル  $\rightarrow h_0$ 
|   |   end
|   end
end

```

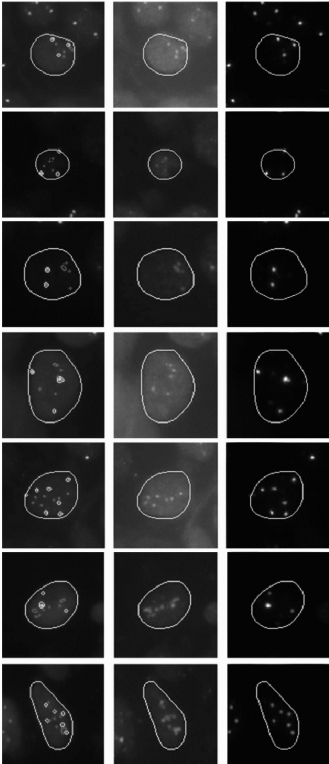
Fig. 5

【図 6】

*Fig. 6*

【図 7】

	合成	Her2	Cep17
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	5	3	
自動	5	3	
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	4	3	
自動	4	3	
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	5	2	
自動	5	2	
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	6	3	
自動	6	3	
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	7	7	
自動	7	7	
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	12	3	
自動	11	3	
カウント方法	Her2	Cep17	
手動	12	6	
自動	11	6	


Fig. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 6 T 7/00 (2017.01) G 0 6 T 7/00 6 3 0

- (72)発明者 パドフィールド, ダーク・ライアン
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケー1-3エー59
 、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 セツポ, アニッティ・エルハス
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケー1-3エー59
 、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 アル・コファヒ, ユーセフ・アーメド
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケー1-3エー59
 、ワン・リサーチ・サークル、ゼネラル・エレクトリック・カンパニー・グローバル・リサーチ

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0286654 (US, A1)
 IEEE Trans. Image. Process., 2005年, vol.14, no.9, pp.1288-1299

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12Q 1/00 - 1/70
 G01N 33/40 - 33/98
 Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
 WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 PubMed