

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 12 月 17 日(17.12.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/190225 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/483 (2006.01) *G06T 1/00* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/064135
- (22) 国際出願日: 2015 年 5 月 18 日(18.05.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-121066 2014 年 6 月 12 日(12.06.2014) JP
- (71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目 7 番 2 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 一谷 修司(ICHITANI, Shuji); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目 7 番 2 号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人光陽国際特許事務所(KOYO INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒

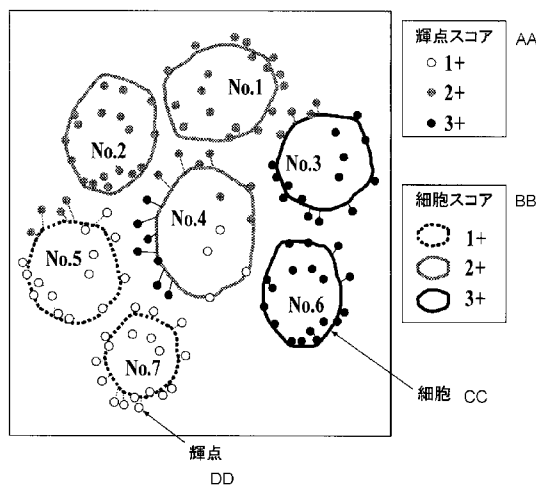
1000006 東京都千代田区有楽町一丁目 1 番 3 号
東京宝塚ビル 17 階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: DIAGNOSIS-ASSISTANCE-INFORMATION GENERATION METHOD, IMAGE PROCESSING DEVICE, DIAGNOSIS-ASSISTANCE-INFORMATION GENERATION SYSTEM, AND IMAGE PROCESSING PROGRAM

(54) 発明の名称: 診断支援情報生成方法、画像処理装置、診断支援情報生成システム及び画像処理プログラム



AA Bright spot score
BB Cell score
CC Cell
DD Bright spot

(57) Abstract: Provided are a diagnosis-assistance-information generation method, image processing device, diagnosis-assistance-information generation system, and image processing program capable of obtaining more accurate diagnosis information. A diagnosis-assistance-information generation method for generating diagnosis assistance information using a sample in which a specific biological material has been stained by a staining reagent using a fluorescent substance is characterized by having: a first input step for inputting a first image representing the expression of the biological material in the sample using fluorescent bright spots; an analysis area information calculation step for extracting prescribed areas of the sample as analysis areas and calculating analysis area information including at least one from among the number of analysis areas, the analysis area surface areas, and the analysis area circumferences; a bright spot area information extraction step for extracting bright spot areas representing the fluorescent bright spots from the first image and extracting bright spot area information including information about the distribution of the bright spot areas; and an image score calculation step for calculating an image score that is the diagnosis assistance information on the basis of the analysis area information and the bright spot area information.

(57) 要約:

[続葉有]



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

より高精度な診断情報を得ることができる診断支援情報生成方法、画像処理装置、診断支援情報生成システム及び画像処理プログラムを提供する。蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用いて診断支援情報を生成する診断支援情報生成方法において、前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力工程と、前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出する解析領域情報算出工程と、前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出工程と、前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出工程と、を有することを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

診断支援情報生成方法、画像処理装置、診断支援情報生成システム及び画像処理プログラム

技術分野

[0001] 本発明は、診断支援情報生成方法、画像処理装置、診断支援情報生成システム及び画像処理プログラムに関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体医薬を中心とした分子標的薬治療の広がりに伴い、分子標的薬をより効果的に設計するため、観察対象細胞上の生体物質の定量が求められている。生体物質の存在を確認する方法として、生体物質認識部位が結合された蛍光物質と、生体物質認識部位に対応した生体物質の結合に基づく、組織分析方法が知られている。

観察対象となる組織標本や細胞には、例えば標本作成時に蛍光物質が凝集するなど、疾病の程度とは無関係な様々なノイズが発生し得ることが知られている。ノイズによって診断結果のばらつきが生じると、誤診に繋がったり、診断結果を一つ一つ再検査するため診断に時間がかかるという問題がある。そこで、組織分析においては、ノイズの影響を受けにくく、安定した高精度な定量結果を得ることが課題となっている。

[0003] 例えば、特許文献1では、バイオマーカー及び細胞内区画を染色してそれぞれの領域を抽出し、細胞内区画に存在するバイオマーカー量を再現性良く定量する方法として、スコア化することが記載されている。

特許文献1に記載の方法によれば、細胞内区画ごとのバイオマーカー量をスコア化することにより、ノイズの影響を受けにくく、再現性の高い定量が可能である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2012-503180号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、癌等の疾病の悪性度は、バイオマーカーの発現量だけでなく、分布の偏り等によって異なることが知られている。特許文献1の発明によれば、細胞内区画ごとのバイオマーカーの発現量を評価することができるが、細胞内区画内におけるバイオマーカーの分布は評価しておらず、定量の精度が十分とは言えなかった。

[0006] 本発明の主な目的は、より高精度な診断情報を得ることができる診断支援情報生成方法、画像処理装置、診断支援情報生成システム及び画像処理プログラムを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するため、請求項1に記載の発明によれば、
蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用いて診断支援情報を生成する診断支援情報生成方法において、
前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力工程と、
前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出する解析領域情報算出工程と、
前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出工程と、
前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出工程と、
を有することを特徴とする診断支援情報生成方法が提供される。

[0008] 請求項2に記載の発明によれば、請求項1に記載の診断支援情報生成方法において、

前記染色試薬は、前記蛍光物質を複数集積した蛍光粒子であり、

前記輝点領域情報は、前記輝点領域のそれぞれに含まれる前記蛍光粒子の数の情報を含むことを特徴とする診断支援情報生成方法が提供される。

[0009] 請求項 3 に記載の発明によれば、請求項 1 又は 2 に記載の診断支援情報生成方法において、

前記標本における細胞の所定の領域を抽出可能な第二の画像を入力する第二入力工程と、

前記第二の画像から、細胞の所定の領域を細胞領域として抽出し、前記細胞領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む細胞情報を算出する細胞情報算出工程と、を有し、

前記画像スコア算出工程は、

前記輝点領域情報及び前記細胞情報に基づいて、前記細胞領域当たりの前記生体物質の発現を解析した細胞スコアを算出し、

前記解析領域情報及び前記細胞スコアに基づいて、前記画像スコアを算出することを特徴とする診断支援情報生成方法が提供される。

[0010] 請求項 4 に記載の発明によれば、請求項 1 又は 2 に記載の診断支援情報生成方法において、

前記画像スコア算出工程は、

前記輝点領域情報に基づいて、前記輝点領域当たりの前記生体物質の発現を解析した輝点スコアを算出し、

前記解析領域情報及び前記輝点スコアに基づいて、前記画像スコアを算出することを特徴とする診断支援情報生成方法が提供される。

[0011] 請求項 5 に記載の発明によれば、請求項 1 又は 2 に記載の診断支援情報生成方法において、

前記標本における細胞の所定の領域を抽出可能な第二の画像を入力する第二入力工程と、

前記第二の画像から、細胞の所定の領域を細胞領域として抽出し、前記細胞領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む細胞情報を算出する細胞情報算出工程と、

を有し、

前記画像スコア算出工程は、

前記輝点領域情報に基づいて、前記輝点領域当たりの前記生体物質の発現を解析した輝点スコアを算出するとともに、

前記細胞情報及び前記輝点スコアに基づいて、前記細胞領域当たりの前記輝点スコアの分布を解析した細胞スコアを算出し、

前記解析領域情報及び前記細胞スコアに基づいて、前記画像スコアを算出することを特徴とする診断支援情報生成方法が提供される。

[0012] 請求項 6 に記載の発明によれば、

蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用いて診断支援情報を生成する画像処理装置において、

前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力手段と、

前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出する解析領域情報算出手段と、

前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出手段と、

前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出手段と、

を有することを特徴とする画像処理装置が提供される。

[0013] 請求項 7 に記載の発明によれば、

請求項 6 に記載の画像処理装置と、

前記画像処理装置で使用される、前記第一の画像を取得する画像取得装置と、

を備えることを特徴とする診断支援情報生成システムが提供される。

[0014] 請求項 8 に記載の発明によれば、

蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用い

て診断支援情報を生成するコンピュータを、

前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力手段、

前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出する解析領域情報算出手段、

前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出手段、

前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出手段、

として機能させるための画像処理プログラムが提供される。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、標本に発現する特定の生体物質の数及び分布をスコア化して評価することができるので、より高精度な診断情報を得ることができ、適切な治療が可能となる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]診断支援情報生成システムのシステム構成を示す図である。

[図2]図1の画像処理装置の機能的構成を示すブロック図である。

[図3]明視野画像の一例を示す図である。

[図4]蛍光画像の一例を示す図である。

[図5]図2の制御部により実行される画像解析処理を示すフローチャートである。

[図6A]蛍光画像を示す図である。

[図6B]輝点領域が抽出された画像を示す図である。

[図7]蛍光粒子数及び輝点領域の面積を用いて輝点スコアを算出する例を示す模式図である。

[図8]図5のステップS10の処理の詳細を示すフローチャートである。

[図9A]明視野画像を示す図である。

[図9B]細胞領域が抽出された画像を示す図である。

[図10]輝点スコアの平均値及び輝点領域の分布を用いて細胞スコアを算出する例を示す模式図である。

[図11]蛍光粒子数及び輝点領域の面積を用いて細胞スコアを算出する例を示す模式図である。

[図12]細胞スコアの平均値及び細胞の分布を用いて細胞スコアを算出する例を示す模式図である。

[図13]輝点スコアの平均値及び輝点領域の分布を用いて画像スコアを算出する例を示す模式図である。

[図14]蛍光粒子数及び輝点領域の面積を用いて画像スコアを算出する例を示す模式図である。

[図15A]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15B]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15C]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15D]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15E]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15F]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15G]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15H]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図15I]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する

る方法の具体例を示す模式図である。

[図15J]図5のステップS12において細胞当たりの輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

[図16]画像内の細胞スコア及び輝点スコアの算出例を示す模式図である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、図を参照して本発明を実施するための形態について説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0018] <診断支援情報生成システム100の構成>

図1に、本発明の蛍光物質の定量方法を用いた診断支援情報生成システム100の全体構成例を示す。診断支援情報生成システム100は、所定の染色試薬で染色された人体の組織標本の顕微鏡画像を取得し、取得された顕微鏡画像を解析することにより、観察対象の組織標本における特定の生体物質の発現を定量的に表す特徴量を出力するシステムである。

[0019] 図1に示すように、診断支援情報生成システム100は、顕微鏡画像取得装置1Aと、画像処理装置2Aと、ケーブル3A等のインターフェースを介してデータ送受信可能に接続されて構成されている。なお、顕微鏡画像取得装置1Aと画像処理装置2Aとの接続方式は特に限定されない。例えば、顕微鏡画像取得装置1Aと画像処理装置2AはLAN (Local Area Network) により接続されることとしてもよいし、無線により接続される構成としてもよい。

[0020] 顕微鏡画像取得装置1Aは、公知のカメラ付き光学顕微鏡であり、スライド固定ステージ上に載置されたスライド上の組織標本の顕微鏡画像を取得し、画像処理装置2Aに送信するものである。

顕微鏡画像取得装置1Aは、照射手段、結像手段、撮像手段、通信I/F等を備えて構成されている。照射手段は、光源、フィルター等により構成され、スライド固定ステージに載置されたスライド上の組織標本に光を照射する。結像手段は、接眼レンズ、対物レンズ等により構成され、照射した光によりスライド上の組織標本から発せられる透過光、反射光、又は蛍光を結像

する。撮像手段は、CCD (Charge Coupled Device) センサー等を備え、結像手段により結像面に結像される像を撮像して顕微鏡画像のデジタル画像データを生成する顕微鏡設置カメラである。通信 I / F は、生成された顕微鏡画像の画像データを画像処理装置 2 A に送信する。本実施の形態において、顕微鏡画像取得装置 1 A は、明視野観察に適した照射手段及び結像手段を組み合わせた明視野ユニット、蛍光観察に適した照射手段及び結像手段を組み合わせた蛍光ユニットが備えられており、ユニットを切り替えることにより明視野／蛍光を切り替えることが可能である。蛍光観察時の光源としては、水銀ランプ、キセノンランプ、LED、レーザー光など、任意のものが使用できる。

[0021] なお、顕微鏡画像取得装置 1 A としては、カメラ付き顕微鏡に限定されず、例えば、顕微鏡のスライド固定ステージ上のスライドをスキャンして組織標本全体の顕微鏡画像を取得するバーチャル顕微鏡スライド作成装置（例えば、特表 2002-514319 号公報参照）等を用いてもよい。バーチャル顕微鏡スライド作成装置によれば、スライド上の組織標本全体像を表示部で一度に閲覧可能な画像データを取得することができる。

[0022] 画像処理装置 2 A は、顕微鏡画像取得装置 1 A から送信された顕微鏡画像を解析することにより、観察対象の組織標本における特定の生体物質の発現分布を算出する。

図 2 に、画像処理装置 2 A の機能構成例を示す。図 2 に示すように、画像処理装置 2 A は、制御部 21、操作部 22、表示部 23、通信 I / F 24、記憶部 25 等を備えて構成され、各部はバス 26 を介して接続されている。

[0023] 制御部 21 は、CPU (Central Processing Unit)、RAM (Random Access Memory) 等を備えて構成され、記憶部 25 に記憶されている各種プログラムとの協働により各種処理を実行し、画像処理装置 2 A の動作を統括的に制御する。例えば、制御部 21 は、記憶部 25 に記憶されているプログラムとの協働により画像解析処理（図 5 参照）を実行し、輝点領域情報抽出手段、

解析領域情報及び画像スコア及び細胞情報の算出手段としての機能を実現する。

[0024] 操作部 22 は、文字入力キー、数字入力キー、及び各種機能キー等を備えたキーボードと、マウス等のポインティングデバイスを備えて構成され、キーボードで押下操作されたキーの押下信号とマウスによる操作信号とを、入力信号として制御部 21 に出力する。

[0025] 表示部 23 は、例えば、CRT (Cathode Ray Tube) や LCD (Liquid Crystal Display) 等のモニタを備えて構成されており、制御部 21 から入力される表示信号の指示に従って、各種画面を表示する。本実施の形態において、表示部 23 は、画像解析結果を出力するための出力手段として機能する。

[0026] 通信 I / F 24 は、顕微鏡画像取得装置 1A をはじめとする外部機器との間でデータ送受信を行なうためのインターフェースである。通信 I / F 24 は、明視野画像と蛍光画像の入力手段（第一入力手段及び第二入力手段）として機能する。

[0027] 記憶部 25 は、例えば HDD (Hard Disk Drive) や半導体の不揮発性メモリ等で構成されている。記憶部 25 には、前述のように各種プログラムや各種データ等が記憶されている。

その他、画像処理装置 2A は、LAN アダプターやルーター等を備え、LAN 等の通信ネットワークを介して外部機器と接続される構成としてもよい。

[0028] 本実施の形態における画像処理装置 2A は、顕微鏡画像取得装置 1A から送信された明視野画像及び蛍光画像を用いて解析を行うことが好ましい。

明視野画像は、H（ヘマトキシリン）染色試薬、HE（ヘマトキシリン－エオジン）染色試薬等を用いて染色された組織標本を、顕微鏡画像取得装置 1A において明視野で拡大結像及び撮影することにより得られる顕微鏡画像であって、当該組織標本における細胞の形態を表す細胞形態画像である。ヘマトキシリンは青紫色の色素であり、細胞核、骨組織、軟骨組織の一部、漿液成分など（好塩基性の組織等）を染色する。エオジンは赤～ピンク色の色素であり、細胞質、軟部組織の結合組織、赤血球、線維素、内分泌顆粒など（好

酸性の組織等）を染色する。図3に、HE染色を行った組織標本を撮影した明視野画像の一例を示す。

蛍光画像は、特定の生体物質と特異的に結合及び／又は反応する蛍光物質又は蛍光物質を内包したナノ粒子（蛍光物質内包ナノ粒子と呼ぶ）を含む染色試薬を用いて染色された組織標本に対し、顕微鏡画像取得装置1Aにおいて所定波長の励起光を照射して蛍光物質内包ナノ粒子を発光（蛍光）させ、この蛍光を拡大結像及び撮影することにより得られる顕微鏡画像である。

即ち、蛍光画像に現れる蛍光は、組織標本における、特定の生体物質の発現を示すものである。図4に、蛍光画像の一例を示す。

[0029] <蛍光画像の取得>

ここで、蛍光画像の取得方法について、この蛍光画像の取得に際して用いられる染色試薬、染色試薬による組織標本の染色方法等も含めて詳細に説明する。

[0030] [蛍光物質]

蛍光画像の取得のための染色試薬に用いられる蛍光物質としては、蛍光有機色素及び量子ドット（半導体粒子）を挙げることができる。200～700nmの範囲内の波長の紫外～近赤外光により励起されたときに、400～1100nmの範囲内の波長の可視～近赤外光の発光を示すことが好ましい。

[0031] 蛍光有機色素としては、フルオレセイン系色素分子、ローダミン系色素分子、Alexa Fluor（インビトロジェン社製）系色素分子、BODIPY（インビトロジェン社製）系色素分子、カスケード系色素分子、クマリン系色素分子、エオジン系色素分子、NBD系色素分子、ピレン系色素分子、シアニン系色素分子、芳香族炭化水素系分子等を挙げることができる。

[0032] 具体的には、5-カルボキシーフルオレセイン、6-カルボキシーフルオレセイン、5,6-ジカルボキシーフルオレセイン、6-カルボキシー2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン、6-カルボキシー2',4,7,7'-テトラクロロフルオレセイン、6-カルボキシー

4' , 5' -ジクロロ-2' , 7' -ジメトキシフルオレセイン、ナフトフルオレセイン、5-カルボキシーローダミン、6-カルボキシーローダミン、5, 6-ジカルボキシーローダミン、ローダミン 6 G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、スルホローダミンB、スルホローダミン 101、及びAlexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665（以上インビトロジェン社製）、メトキシクマリン、エオジン、NBD、ピレン、Cy5、Cy5.5、Cy7、HiLyte Fluor 594（登録商標、アナスペック社製）、DyLight 594（登録商標、サーモサイエンティフィック社製）系色素分子、ATT0 594（登録商標、ATT0-TEC社製）、MFP 594（登録商標、Morbitec社製）、5,10,15,20-テトラフェニルポルフィンテトラスルホン酸、亜鉛5,10,15,20-テトラフェニルポルフィンテトラスルホン酸、フタロシアニンテトラスルホン酸、亜鉛フタロシアニンテトラスルホン酸、N, N-Bis-(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-(4-tert-butylphenoxy)-perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylene-3,4:9,10-tetracarboxylic diimide、Benzenesulfonic acid, 4,4',4'',4'''-[(1,3,8,10-tetrahydro-1,3,8,10-tetraoxoperylo [3,4-cd:9,10-c'd'] dipyrro-5,6,12,13-tetrayl) tetralis (oxy)] tetrakis-等を挙げることができる。蛍光有機色素は、単独でも複数種を混合したものを用いてもよい。

[0033] 量子ドットとしては、II-VI族化合物、III-V族化合物、又はIV族元素を成分として含有する量子ドット（それぞれ、「II-VI族量子ドット」、「III-V族量子ドット」、「IV族量子ドット」ともいう。）のいずれかを用いるこ

とができる。単独でも複数種を混合したものを用いてもよい。

[0034] 具体的には、CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Geが挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] 上記量子ドットをコアとし、その上にシェルを設けた量子ドットを用いることもできる。以下、本明細書中シェルを有する量子ドットの表記法として、コアがCdSe、シェルがZnSの場合、CdSe/ZnSと表記する。例えば、CdSe/ZnS、CdS/ZnS、InP/ZnS、InGaP/ZnS、Si/SiO₂、Si/ZnS、Ge/GeO₂、Ge/ZnS等を用いることができるが、これらに限定されない。

量子ドットは必要に応じて、有機ポリマー等により表面処理が施されているものを用いてもよい。例えば、表面カルボキシ基を有するCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）、表面アミノ基を有するCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）等が挙げられる。

[0036] [蛍光物質内包ナノ粒子]

本実施の形態において蛍光物質内包ナノ粒子とは、蛍光物質がナノ粒子内部に分散されたものをいい、蛍光物質とナノ粒子自体とが化学的に結合していても、結合していなくてもよい。

ナノ粒子を構成する素材は特に限定されるものではなく、ポリスチレン、ポリ乳酸、シリカ、メラミン等を挙げることができる。

[0037] 本実施の形態で用いられる蛍光物質内包ナノ粒子は、公知の方法により作製することが可能である。例えば、蛍光有機色素を内包したシリカナノ粒子は、ラングミュア 8巻 2921ページ（1992）に記載されているFITC内包シリカ粒子の合成を参考に合成することができる。FITCの代わりに所望の蛍光有機色素を用いることで種々の蛍光有機色素内包シリカナノ粒子を合成することができる。

[0038] 量子ドットを内包したシリカナノ粒子は、ニュー・ジャーナル・オブ・ケミストリー 33巻 561ページ（2009）に記載されているCdTe

内包シリカナノ粒子の合成を参考に合成することができる。

[0039] 蛍光有機色素を内包したポリスチレンナノ粒子は、米国特許4 3 2 6 0 0 8 (1 9 8 2) に記載されている重合性官能基をもつ有機色素を用いた共重合法や、米国特許5 3 2 6 6 9 2 (1 9 9 2) に記載されているポリスチレンナノ粒子への蛍光有機色素の含浸法を用いて作製することができる。

[0040] 量子ドットを内包したポリマーナノ粒子は、ネイチャー・バイオテクノロジー1 9 巻6 3 1 ページ(2 0 0 1) に記載されているポリスチレンナノ粒子への量子ドットの含浸法を用いて作製することができる。

[0041] [生体物質認識部位と蛍光物質内包ナノ粒子との結合]

本実施の形態では、蛍光物質として蛍光物質内包ナノ粒子を用い、染色試薬として蛍光物質内包ナノ粒子と生体物質認識部位を予め直接結合したものをを用いる場合を例にとって説明する。本実施の形態に係る生体物質認識部位とは、目的とする生体物質と特異的に結合及び／又は反応する部位である。目的とする生体物質は、それと特異的に結合する物質が存在するものであれば特に限定されるものではないが、代表的にはタンパク質(ペプチド)および核酸(オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド)、抗体等が挙げられる。したがって、そのような目的とする生体物質に結合する物質としては、前記タンパク質を抗原として認識する抗体やそれに特異的に結合する他のタンパク質等、および前記核酸にハイブリタイズする塩基配列を有する核酸等が挙げられる。具体的には、細胞表面に存在するタンパク質であるHER2に特異的に結合する抗HER2抗体、細胞核に存在するエストロゲン受容体(ER)に特異的に結合する抗ER抗体、細胞骨格を形成するアクチンに特異的に結合する抗アクチン抗体等があげられる。中でも抗HER2抗体及び抗ER抗体を蛍光物質内包ナノ粒子に結合させたものは、乳癌の投薬選定に用いることができ、好ましい。

[0042] 生体物質認識部位と蛍光物質内包ナノ粒子の結合の態様としては特に限定されず、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着及び化学吸着等が挙げられる。結合の安定性から共有結合等の結合力の強い結合が好ま

しい。

[0043] また、生体物質認識部位と蛍光物質内包ナノ粒子の間を連結する有機分子があってもよい。例えば、生体物質との非特異的吸着を抑制するため、ポリエチレングリコール鎖を用いることができ、Thermo Scientific社製SM (PEG) 12を用いることができる。

[0044] 蛍光物質内包シリカナノ粒子へ生体物質認識部位を結合させる場合、蛍光物質が蛍光有機色素の場合でも、量子ドットの場合でも同様の手順を適用することができる。例えば、無機物と有機物を結合させるために広く用いられている化合物であるシランカップリング剤を用いることができる。このシランカップリング剤は、分子の一端に加水分解でシラノール基を与えるアルコキシシリル基を有し、他端に、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基、アルデヒド基等の官能基を有する化合物であり、上記シラノール基の酸素原子を介して無機物と結合する。具体的には、メルカプトプロピルトリエトキシシラン、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリエチレングリコール鎖をもつシランカップリング剤（例えば、Gelest社製PEG-silane no. SIM6492.7）等が挙げられる。シランカップリング剤を用いる場合、二種以上を併用してもよい。

[0045] 蛍光有機色素内包シリカナノ粒子とシランカップリング剤との反応手順は、公知の手法を用いることができる。例えば、得られた蛍光有機色素内包シリカナノ粒子を純水中に分散させ、アミノプロピルトリエトキシシランを添加し、室温で12時間反応させる。反応終了後、遠心分離又はろ過により表面がアミノプロピル基で修飾された蛍光有機色素内包シリカナノ粒子を得ることができる。続いてアミノ基と抗体中のカルボキシル基とを反応させることで、アミド結合を介し抗体を蛍光有機色素内包シリカナノ粒子と結合させることができる。必要に応じて、EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl] carbodiimide Hydrochloride : Pierce (登録商標) 社製) のような縮合剤を用いることもできる。

[0046] 必要により、有機分子で修飾された蛍光有機色素内包シリカナノ粒子と直

接結合しうる部位と、分子標的物質と結合しうる部位とを有するリンカー化合物を用いることができる。具体例として、アミノ基と選択的に反応する部位とメルカプト基と選択的に反応する部位の両方をもつ sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate: Pierce 社製) を用いると、アミノプロピルトリエトキシシランで修飾した蛍光有機色素内包シリカナノ粒子のアミノ基と、抗体中のメルカプト基を結合させることで、抗体結合した蛍光有機色素内包シリカナノ粒子ができる。

[0047] 蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子へ生体物質認識部位を結合させる場合、蛍光物質が蛍光有機色素の場合でも、量子ドットの場合でも同様の手順を適用することができる。すなわち、アミノ基等の官能基をもつポリスチレンナノ粒子へ蛍光有機色素、量子ドットを含浸することにより、官能基もつ蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子を得ることができ、以降EDC又はsulfo-SMCCを用いることで、抗体結合した蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子ができる。

蛍光物質内包メラミンナノ粒子へ生体物質認識部位を結合させる場合、蛍光物質内包シリカナノ粒子と同様の手順を適用することができる。また、より反応性を向上させるため、メラミンナノ粒子と多官能性アミン化合物をあらかじめ反応させて表面アミノ基数を増やしても良い。

[0048] 特定抗原を認識する抗体としては、M. アクチン、M.S. アクチン、S.M. アクチン、ACTH、Alk-1、 α 1-アンチキモトリプシン、 α 1-アンチトリプシン、AFP、bcl-2、bcl-6、 β -カテニン、BCA 225、CA19-9、CA125、カルシトニン、カルレチニン、CD1a、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD15、CD20、CD21、CD23、CD30、CD31、CD34、CD43、CD45、CD45R、CD56、CD57、CD61、CD68、CD79a、"CD99、MIC2"、CD138、クロモグラニン、c-KIT、c-MET、コラーゲン タイプIV、Cox-2、サイクリンD1、ケラチン、サイトケラチン（高分子量）、パンケラチン、パンケラチン、サイトケラチン5/6、サイトケラチン7、サイトケラチン8、サイトケラチン8/18、サイトケラチン14、サイトケラチン19、サイトケラチン20、CMV、E-カドヘリン、EGFR、ER、EMA

、EBV、第VIII因子関連抗原、ファッシン、FSH、ガレクチン-3、ガストリン、GFAP、グルカゴン、グリコフォリン A、グランザイムB、hCG、hGH、ヘリコバクターピロリ、HBc 抗原、HBs 抗原、ヘパトサイト特異抗原、HER2、HSV-I、HSV-II、HHV-8、IgA、IgG、IgM、IGF-1R、インヒビン、インスリン、カップル鎖、Ki67、ラムダ鎖、LH、リゾチーム、マクロファージ、メラニンA、MLH-1、MSH-2、ミエロパーオキシダーゼ、ミオゲニン、ミオグロビン、ミオシン、ニューロフィラメント、NSE、p27 (Kip1)、p53、p53、P63、PAX 5、PLAP、ニューモシスティス カリニ、ポドプラニン (D2-40)、PGR、プロラクチン、PSA、前立腺酸性フォスファターゼ、Renal Cell Carcinoma、S100、ソマトスタチン、スペクトリン、シナプトフィジン、TAG-72、TdT、サイログロブリン、TSH、TTF-1、TRAcP、トリプターゼ、ビリubin、ビメンチン、WT1、Zap-70が挙げられる。

[0049] なお、蛍光物質又は蛍光物質内包ナノ粒子と生体物質認識部位とは、上述のように予め結合したものを染色試薬として用いても良いが、免疫染色における公知の間接法のように、染色工程において間接的に結合されても良い。具体的には、例えば、組織標本に対して、特定タンパクを抗原とする一次抗体を反応させた後、一次抗体を抗原とする二次抗体に蛍光物質又は蛍光物質内包ナノ粒子を結合させた染色試薬をさらに反応させて染色を施しても良い。また、例えば、組織標本に対して、特定タンパクを抗原とする一次抗体、及び当該一次抗体を抗原とするビオチン化二次抗体を反応させた後、ストレプトアビジンにより修飾された蛍光物質又は蛍光物質内包ナノ粒子を染色試薬としてさらに反応させて、ストレプトアビジンとビオチンが特異的に結合して複合体を形成することを利用して染色を施しても良い。

[0050] [染色方法]

以下、組織標本の染色方法について述べるが、本願発明は組織標本に限定されるものではなく、基板上に固定した細胞等の標本にも適用可能である。

また、以下に説明する染色方法が適用できる組織標本の作製法は特に限定されず、公知の方法により作製されたものを用いることができる。

[0051] 1) 脱パラフィン工程

キシレンを入れた容器に組織標本を浸漬させ、パラフィンを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でキシレンを交換してもよい。

次いで、エタノールを入れた容器に組織標本を浸漬させ、キシレンを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

次いで、水を入れた容器に組織標本を浸漬させ、エタノールを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

[0052] 2) 賦活化処理

公知の方法にならい、目的とする生体物質の賦活化処理を行う。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0)、1mM EDTA溶液 (pH 8.0)、5% 尿素、0.1M トリス塩酸緩衝液等を用いることができる。加熱機器は、オートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバス等を用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は50-130℃、時間は5-30分で行うことができる。

次いで、PBS (Phosphate Buffered Saline: リン酸緩衝生理食塩水) を入れた容器に、賦活化処理後の組織標本を浸漬させ、洗浄を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

[0053] 3) 生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包ナノ粒子を用いた染色

生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包ナノ粒子のPBS分散液を組

組織標本に載せ、目的とする生体物質と反応させる。蛍光物質内包ナノ粒子と結合させる生体物質認識部位を変えることにより、さまざまな生体物質に対応した染色が可能となる。数種類の生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包ナノ粒子を用いる場合には、それぞれの蛍光物質内包ナノ粒子 P B S 分散液を予め混合しておいてもよいし、別々に順次組織標本に載せてもよい。

温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は、30分以上24時間以下であることが好ましい。

蛍光物質内包ナノ粒子による染色を行う前に、B S A 含有 P B S 等、公知のブロッキング剤を滴下することが好ましい。

次いで、P B S を入れた容器に、染色後の組織標本を浸漬させ、未反応蛍光物質内包ナノ粒子の除去を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中で P B S を交換してもよい。カバーガラスを組織標本に載せ、封入する。必要に応じて市販の封入剤を使用してもよい。

なお、H E 染色試薬を用いて染色を行う場合、カバーガラスによる封入前に H E 染色を行う。

[0054] 〔蛍光画像の取得〕

染色した組織標本に対し顕微鏡画像取得装置 1 A を用いて、蛍光画像（第一の画像）及び明視野画像（第二の画像）を取得する。顕微鏡画像取得装置 1 A において、染色試薬に用いた蛍光物質の吸収極大波長及び蛍光波長に対応した励起光源及び蛍光検出用光学フィルターを選択する。

[0055] <診断支援情報生成システム 100 の動作（画像処理方法を含む。）>

以下、診断支援情報生成システム 100 において、上記説明した蛍光画像及び明視野画像を取得して解析を行う動作について具体的な実施形態を挙げて説明する。ここでは、特定のタンパク質（ここでは、乳癌組織における H E R 2 タンパクとする。以下、特定タンパクと呼ぶ。）を認識する生体物質認識部位が結合した蛍光物質内包ナノ粒子を含む染色試薬を用いて染色され

た組織標本を観察対象とする場合を例にとって説明するが、これに限定されるものではない。

[0056] まず、操作者は、H E 染色試薬と、特定タンパクを認識する生体物質認識部位が結合した蛍光物質内包ナノ粒子を蛍光標識材料とした染色試薬との、2種の染色試薬を用いて組織標本を染色する。

その後、顕微鏡画像取得装置1 Aにおいて、(a 1) ~ (a 5)の手順により明視野画像及び蛍光画像が取得される。なお、本実施形態において、顕微鏡画像取得装置1 Aは、標本を上方から観察する正立型の顕微鏡とする。

(a 1) 操作者は、H E 染色試薬と蛍光物質内包ナノ粒子を含む染色試薬とにより染色された組織標本をスライドに載置し、そのスライドを顕微鏡画像取得装置1 Aのスライド固定ステージに設置する。

(a 2) 明視野ユニットに設定し、撮影倍率、ピントの調整を行い、組織上の観察対象の領域を視野に納める。

(a 3) 撮像手段で撮影を行って明視野画像の画像データを生成し、画像処理装置2 Aに画像データを送信する。

(a 4) ユニットを蛍光ユニットに変更する。

(a 5) 視野及び撮影倍率を変えずに撮像手段で撮影を行って蛍光画像の画像データを生成し、画像処理装置2 Aに画像データを送信する。

[0057] 画像処理装置2 Aにおいては、明視野画像及び蛍光画像に基づき画像解析処理が実行される。

図5に、画像処理装置2 Aにおける画像解析処理のフローチャートを示す。図5に示す画像解析処理は、制御部2 1と記憶部2 5に記憶されているプログラムとの協働により実行される。

ユーザーが操作部2 2を操作して画像解析処理を開始すると、制御部2 1により記憶部2 5に記憶された設定プログラムが実行される。

[0058] まず、通信1 / F 2 4により顕微鏡画像取得装置1 Aから明視野画像が入力されると(ステップS 1: 第二入力工程)、ステップS 2において解析領域の抽出が行われ、解析領域情報が算出される(解析領域情報算出工程)。

解析領域とは、本発明の診断支援情報生成方法によって診断を行うための、組織標本内の所定の領域であり、抽出方法は任意である。例えば、ステップS 1で入力された明視野画像に基づいて解析領域を抽出する場合には、ユーザーが操作部2 2（例えば、マウス操作等）により明視野画像中の任意の領域を選択して抽出しても良いし、組織内の特定の領域を明視野画像の輝度や色から自動的に抽出するプログラムを実行しても良い。また、解析領域は、後述するステップS 3で入力される蛍光画像に基づいて抽出されても良い。その場合にも、ユーザーが蛍光画像中の任意の領域を操作部2 2（例えば、マウス操作等）の操作を介して選択して抽出しても良いし、また、蛍光画像の輝度や色に基づいて組織内の特定の領域を自動的に抽出するプログラムを実行しても良い。

制御部2 1は、具体的には、例えば、組織内で細胞が密集している領域を解析領域として抽出する。1回の画像解析処理において抽出される解析領域の数は、任意である。

解析領域情報は、解析領域から一意に定まる値であれば任意であり、例えば、解析領域の数、面積、周長、等が挙げられる。算出される解析領域情報は、一種類でも複数種類でも良く、公知の任意の方法によって算出される。

[0059] 一方、ステップS 3～ステップS 6において、蛍光画像から蛍光物質内包ナノ粒子（本実施形態では以下単に「蛍光粒子」という。）の蛍光に由来する輝点領域の情報が抽出される。

まず、通信1/F 2 4により顕微鏡画像取得装置1 Aから図6 Aに示されるような蛍光画像が入力されると（ステップS 3：第一入力工程）、蛍光輝点の波長に応じた色成分の抽出が行われる（ステップS 4）。たとえば、蛍光粒子の発する蛍光波長が5 5 0 n mである場合には、その波長成分を有する蛍光輝点のみが蛍光画像として抽出される。

[0060] 次いで、抽出された蛍光画像に閾値処理が施されて二値化画像が生成され、輝点領域が抽出される（ステップS 5）。なお、閾値処理の前に細胞自家蛍光や他の不要信号成分等のノイズ除去処理が施されてもよく、ガウシアン

フィルタ等のローパスフィルタや二次微分等のハイパスフィルタが好ましく用いられる。図6Bに、輝点領域が抽出された画像の一例を示す。

[0061] 次いで、各輝点領域から輝点領域情報が抽出される（ステップS6：輝点領域情報抽出工程）。輝点領域情報は、輝点領域から一意に定まる値であれば任意であり、例えば、輝点領域の面積、周囲長、分布のばらつき、輝点領域内の蛍光粒子数、等が挙げられる。抽出される輝点領域情報は、一種類でも複数種類でも良い。

[0062] ステップS2及びステップS6の処理の終了後、画像解析処理における輝点スコア算出工程の有無が判断される（ステップS7）。輝点スコア算出工程を実行する場合（ステップS7：Yes）には、ステップS8の処理に移行し、ステップS6で算出した輝点領域情報から、輝点スコアが算出される。輝点スコアは、輝点領域ごとの特定タンパクの発現を解析した結果であり、例えば、1+～10+の10段階で評価される。算出された輝点スコアは、記憶部25に記憶される。なお、輝点スコアの評価は10段階に限られるものではなく、標本の種類や特定タンパクの種類に応じて任意の段階数で評価することができる。

[0063] 図7は、1つの輝点領域当たりの蛍光粒子数及び面積に基づいて輝点スコアを算出する例を模式的に示した図である。図中の楕円の大きさは輝点領域の面積を示し、各楕円の上に示されるピークは蛍光粒子数を示す。1+、2+、3+は算出された輝点スコアを示し、数値が大きいほど癌の悪性度が高い。

一般的に、蛍光粒子数が多いほど、癌の悪性度が高く、高い輝点スコアが算出されるが、蛍光粒子数が同じである場合には、蛍光粒子が広範囲に分布している方が悪性度が高いため、輝点領域の面積が大きいほど高い輝点スコアが算出される。同様に、一般的に、輝点領域の面積が大きいほど、癌の悪性度が高く、高い輝点スコアが算出されるが、輝点領域の面積が同じである場合には、蛍光粒子数が多い方が悪性度が高いため、高い輝点スコアが算出される。

[0064] 例えば、図7において、左下に示されるように面積が小さく蛍光粒子数が少ない輝点領域の輝点スコアは1+と算出され、右下に示されるように面積が小さいが蛍光粒子数が多い輝点領域、又は、左上に示されるように面積は大きいが蛍光粒子数が少ない輝点領域の輝点スコアは、2+と算出される。そして、右上に示されるように面積が大きく蛍光粒子数も多い輝点領域の輝点スコアは、3+と算出される。

[0065] なお、輝点スコアの算出に用いられる輝点領域情報の組み合わせと、組み合わせに対応する輝点スコアの値は、生体物質や標本の種類に応じて適宜変更する。

[0066] ステップS7において、輝点スコア算出工程を実行しない場合（ステップS7：No）には、ステップS9の処理に移行し、記憶部25に輝点領域情報が記憶される。

[0067] 次いで、細胞スコア算出工程の有無が判断される（ステップS9）。細胞スコア算出工程を実行する場合（ステップS9：Yes）には、ステップS10の処理に移行し、まず、細胞の特定の領域（細胞領域）が抽出される。細胞核、細胞質など、任意の部位を細胞領域として抽出することができるが、定量する生体物質が特異的に発現する領域を抽出することが好ましく、本実施形態においては、特定タンパクが特に細胞膜に発現するHER2タンパクであることから、細胞全体を細胞領域として抽出すると好適である。

[0068] 図8に、ステップS10において細胞領域が抽出される処理の詳細フローの例を示す。まず、明視野画像のモノクロ画像への変換が行われる（ステップS101）。図9Aに、モノクロ変換された明視野画像の一例を示す。

次いで、モノクロ画像に対し予め定められた閾値を用いて閾値処理が施され、各画素の値が二値化される（ステップS102）。

[0069] 次いで、ノイズ処理が行われる（ステップS103）。ノイズ処理は、具体的には、二値画像にクロージング処理が施されることにより行うことができる。クロージング処理は、膨張処理を行ってから同じ回数分だけ収縮処理を行う処理である。膨張処理は、注目画素から $n \times n$ 画素（ n は2以上の整

数)の範囲内にある画素に1つでも白が含まれている場合に注目画素を白に置き換える処理である。収縮処理は、注目画素から $n \times n$ 画素の範囲内にある画素に1つでも黒が含まれている場合に注目画素を黒に置き換える処理である。クロージング処理により、ノイズ等の小さい領域を除去することができる。図9Bに、ノイズ処理後の画像の一例を示す。図9Bに示されるように、ノイズ処理後には、細胞領域が抽出された画像が生成される。

[0070] 次いで、ノイズ処理後の画像にラベリング処理が施され、抽出された細胞領域のそれぞれにラベルが付与される(ステップS104)。ラベリング処理とは、連結している画素に同じラベル(番号)を付与していくことで画像内のオブジェクトを識別する処理である。ラベリング処理により、ノイズ処理後の画像から各細胞を識別してラベルを付与することができる。

[0071] 次いで、ステップS11においては、輝点スコアが既に算出されているか否かが判断される。輝点スコアが算出されている場合(ステップS11:Yes)には、ステップS12の処理に移行し、ステップS8で算出された輝点スコアの情報及びステップS10で抽出された細胞領域から算出される情報(細胞情報)に基づいて、細胞スコアが算出される。細胞スコアは、細胞領域ごとの特定タンパクの発現を解析した結果であり、例えば、1+~10+の10段階で評価される。算出された細胞スコアは、記憶部25に記憶される。なお、細胞スコアの評価は10段階に限られるものではなく、標本の種類や特定タンパクの種類に応じて任意の段階数で評価することができる。

[0072] 細胞領域から細胞情報を算出する工程においては、例えば、細胞領域の数、面積、周長等が算出される。

また、輝点スコアの情報とは、細胞領域における輝点スコアの値から一意に定まる値であれば任意であり、例えば、1つの細胞領域に存在する輝点スコアの平均値、所定の輝点スコアを持つ輝点領域の数、分布、比率、密度、等があげられる。輝点スコアの情報は、一つでも複数でも良く、抽出方法は任意である。

[0073] 図10は、1つの細胞領域に存在する輝点スコアの平均値及び輝点領域の

分布に基づいて細胞スコアを算出する例を模式的に示した図である。図中の、白い丸で示された輝点の輝点スコアは1＋、灰色の丸で示された輝点の輝点スコアは2＋、黒い丸で示された輝点の輝点スコアは3＋である。1＋、2＋、3＋は算出された細胞スコアを示し、数値が大きいほど癌の悪性度が高い。

一般的に、輝点スコアの平均値が大きいほど、癌の悪性度が高く、高い細胞スコアが算出されるが、輝点スコアの平均値が同じである場合には、輝点領域が細胞全体に広がって分布している方が悪性度が高く、高い細胞スコアが算出される。同様に、一般的に、輝点領域の分布が広がっているほど、癌の悪性度が高く、高い細胞スコアが算出されるが、輝点領域の分布が同じである場合には、輝点スコアの平均値が多い方が悪性度が高く、高い細胞スコアが算出される。

[0074] 例えば、図10において、左下に示されるように輝点の分布範囲が狭く輝点スコアの平均値が2＋である細胞の細胞スコアは1＋と算出され、右下に示されるように輝点の分布範囲が狭いが輝点スコアの平均値が3＋である細胞、又は、左上に示されるように輝点の分布が広範囲だが輝点スコアの平均値が1＋である細胞の細胞スコアは、2＋と算出される。そして、右上に示されるように輝点の分布が広範囲であり輝点スコアの平均値が2＋である細胞の細胞スコアは3＋と算出される。

[0075] なお、細胞スコアの算出に用いられる輝点スコア及び細胞領域の情報の組み合わせと、組み合わせに対応する細胞スコアの値は、生体物質や標本の種類に応じて適宜変更する。

また、図10において、細胞領域の面積又は周長当たりの輝点スコアの平均値及び輝点領域の分布の広がりから細胞スコアを算出しても良い。

[0076] ステップS11において、輝点スコアが算出されていないと判断された場合（ステップS11：No）には、ステップS13の処理に移行し、ステップS6で抽出された輝点領域情報及びステップS10で抽出された細胞領域の情報から、細胞スコアが算出される。

細胞領域の情報とは、例えば、細胞領域の数、面積、周長等である。

[0077] 図 1 1 は、1 つの細胞領域に存在する蛍光粒子数及び輝点領域の面積に基づいて細胞スコアを算出する例を模式的に示した図である。図中の楕円の大きさは輝点領域の面積を示し、各楕円の上に示されるピークは蛍光粒子数を示す。1 +、2 +、3 + は算出された細胞スコアを示し、数値が大きいほど癌の悪性度が高い。

一般的に、蛍光粒子数が多いほど、癌の悪性度が高く、高い細胞スコアが算出されるが、蛍光粒子数が同じである場合には、蛍光粒子が広範囲に分布している方が悪性度が高いため、輝点領域の面積が大きいほど高い細胞スコアが算出される。同様に、一般的に、輝点領域の面積が大きいほど、癌の悪性度が高く、高い細胞スコアが算出されるが、輝点領域の面積が同じである場合には、蛍光粒子数が多い方が悪性度が高いため、高い細胞スコアが算出される。

[0078] 例えば、図 1 1 において、左下に示されるように面積が小さく蛍光粒子数が少ない輝点領域の輝点スコアは 1 + と算出され、右下に示されるように面積が小さいが蛍光粒子数が多い輝点領域、又は、左上に示されるように面積は大きいが蛍光粒子数が少ない輝点領域の輝点スコアは、2 + と算出される。そして、右上に示されるように面積が大きく蛍光粒子数も多い輝点領域の輝点スコアは 3 + と算出される。

[0079] なお、細胞スコアの算出に用いられる輝点領域情報の組み合わせと、組み合わせに対応する細胞スコアの値は、生体物質や標本の種類に応じて適宜変更する。

また、図 1 1 において、細胞領域の面積又は周長当たりの蛍光粒子数及び輝点領域の面積から細胞スコアを算出しても良い。

[0080] ステップ S 1 2 又はステップ S 1 3 において細胞スコアが算出されると、ステップ S 1 5 の処理に移行し、ステップ S 1 2 又はステップ S 1 3 で算出された細胞スコアの情報及びステップ S 2 で抽出された解析領域の情報から、画像スコアが算出される（画像スコア算出工程）。画像スコアは、解析領

域における特定タンパクの発現を解析した結果であり、例えば、1+～10+の10段階で評価される。算出された画像スコアは、記憶部25に記憶される。なお、画像スコアの評価は10段階に限られるものではなく、標本の種類や特定タンパクの種類に応じて任意の段階数で評価することができる。

[0081] 解析領域の情報とは、例えば、解析領域の数、面積、周長等である。

細胞スコアの情報とは、解析領域における細胞スコアの値から一意に定まる値であれば任意であり、例えば、1つの解析領域に存在する細胞スコアの平均値や、所定の細胞スコアを持つ細胞の数、分布、比率、密度、等があげられる。細胞スコアの情報とは、一つでも複数でも良く、抽出方法は任意である。

[0082] 図12は、1つの解析領域に存在する細胞スコアの平均値及び細胞の分布に基づいて画像スコアを算出する例を模式的に示した図である。図中の、白い丸で示された細胞の細胞スコアは1+、灰色の丸で示された細胞の細胞スコアは2+、黒い丸で示された細胞の細胞スコアは3+である。1+、2+、3+は算出された画像スコアを示し、数値が大きいほど癌の悪性度が高い。

一般的に、細胞スコアの平均値が大きいほど、癌の悪性度が高く、高い画像スコアが算出されるが、細胞スコアの平均値が同じである場合には、細胞が画像全体に広がって分布している方が悪性度が高く、高い画像スコアが算出される。同様に、一般的に、細胞の分布が広がっているほど、癌の悪性度が高く、高い画像スコアが算出されるが、細胞の分布が同じである場合には、細胞スコアの平均値が大きい方が悪性度が高く、高い画像スコアが算出される。

[0083] 例えば、図12において、左下に示されるように解析領域内の細胞の分布範囲が狭く細胞スコアの平均値が2+である画像の画像スコアは1+と算出され、右下に示されるように細胞の分布範囲が狭いが細胞スコアの平均値が3+である画像、又は、左上に示されるように細胞の分布が広範囲だが細胞スコアの平均値が1+である画像の画像スコアは、2+と算出される。そし

て、右上に示されるように細胞の分布が広範囲であり細胞スコアの平均値が2+である画像の画像スコアは3+と算出される。

[0084] なお、画像スコアの算出に用いられる細胞スコア及び解析領域の情報の組み合わせと、組み合わせに対応する画像スコアの値は、生体物質や標本の種類に応じて適宜変更する。

また、図12において、解析領域の面積又は周長当たりの細胞スコアの平均値と細胞の分布の広がりから画像スコアを算出しても良い。

[0085] ステップS9において、細胞スコア算出工程を実行しない場合（ステップS9：No）には、ステップS16の処理に移行し、輝点スコアが既に算出されているか否かが判断される。輝点スコアが算出されている場合（ステップS16：Yes）には、ステップS17の処理に移行し、ステップS8で算出された輝点スコアの情報及びステップS2で抽出された解析領域の情報から、画像スコアが算出される。算出された画像スコアは、記憶部25に記憶される。

[0086] 解析領域の情報とは、例えば、解析領域の数、面積、周長等である。

輝点スコアの情報とは、細胞領域における輝点スコアの値から一意に定まる値であれば任意であり、例えば、1つの細胞領域に存在する輝点スコアの平均値や、所定の輝点スコアを持つ輝点領域の数、分布、比率、密度、等があげられる。輝点スコアの情報とは、一つでも複数でも良く、抽出方法は任意である。

[0087] 図13は、1つの解析領域に存在する輝点スコアの平均値及び輝点領域の分布の広がりに基づいて画像スコアを算出する例を模式的に示した図である。図中の、白い丸で示された輝点の輝点スコアは1+、灰色の丸で示された輝点の輝点スコアは2+、黒い丸で示された輝点の輝点スコアは3+である。1+、2+、3+は算出された画像スコアを示し、数値が大きいほど癌の悪性度が高い。

一般的に、輝点スコアの平均値が大きいほど、癌の悪性度が高く、高い画像スコアが算出されるが、輝点スコアの平均値が同じである場合には、輝点

領域が画像全体に広がって分布している方が悪性度が高く、高い画像スコアが算出される。同様に、一般的に、輝点領域の分布の広がりが多いほど、癌の悪性度が高く、高い画像スコアが算出されるが、輝点領域の分布の広がりと同じである場合には、輝点スコアの平均値が多い方が悪性度が高く、高い画像スコアが算出される。

[0088] 例えば、図 1 3 において、左下に示されるように解析領域内の輝点の分布範囲が狭く輝点スコアの平均値が 2 + である画像の画像スコアは 1 + と算出され、右下に示されるように輝点の分布範囲が狭いが輝点スコアの平均値が 3 + である画像、又は、左上に示されるように輝点の分布が広範囲だが輝点スコアの平均値が 1 + である画像の画像スコアは、2 + と算出される。そして、右上に示されるように輝点の分布が広範囲であり輝点スコアの平均値が 2 + である画像の画像スコアは 3 + と算出される。

[0089] なお、画像スコアの算出に用いられる輝点スコア及び解析領域の情報の組み合わせと、組み合わせに対応する画像スコアの値は、生体物質や標本の種類に応じて適宜変更する。

また、図 1 3 において、解析領域の面積又は周長当たりの輝点スコアの平均値及び輝点領域の分布の広がりから画像スコアを算出しても良い。

[0090] ステップ S 1 6 において、輝点スコアが算出されていないと判断された場合（ステップ S 1 6 : N o）には、ステップ S 1 8 の処理に移行し、ステップ S 6 で抽出された輝点領域情報及びステップ S 2 で抽出された解析領域の情報から、画像スコアが算出される。

解析領域の情報とは、例えば、解析領域の数、面積、周長等である。

[0091] 図 1 4 は、1 つの細胞領域に存在する蛍光粒子数及び輝点領域の面積に基づいて画像スコアを算出する例を模式的に示した図である。図中の楕円の大きさは輝点領域の面積を示し、各楕円の上に示されるピークは蛍光粒子数を示す。1 +、2 +、3 + は算出された画像スコアを示し、数値が多いほど癌の悪性度が高い。

一般的に、蛍光粒子数が多いほど、癌の悪性度が高く、高い画像スコアが

算出されるが、蛍光粒子数が同じである場合には、蛍光粒子が広範囲に分布している方が悪性度が高いため、輝点領域の面積が大きいほど高い画像スコアが算出される。同様に、一般的に、輝点領域の面積が大きいほど、癌の悪性度が高く、高い画像スコアが算出されるが、輝点領域の面積が同じである場合には、蛍光粒子数が多い方が悪性度が高いため、高い画像スコアが算出される。

[0092] 例えば、図14において、左下に示されるように解析領域内の輝点領域の面積が小さく蛍光粒子数が少ない画像の画像スコアは1+と算出され、右下に示されるように輝点領域の面積が小さいが蛍光粒子数が多い画像、又は、左上に示されるように輝点領域の面積は大きい蛍光粒子数が少ない画像の画像スコアは、2+と算出される。そして、右上に示されるように輝点領域の面積が大きく蛍光粒子数も多い画像の画像スコアは3+と算出される。

[0093] なお、画像スコアの算出に用いられる輝点領域情報及び解析領域の情報の組み合わせと、組み合わせに対応する画像スコアの値は、生体物質や標本の種類に応じて適宜変更する。

また、図11において、解析領域の面積又は周長当たりの蛍光粒子数及び輝点領域の面積から画像スコアを算出しても良い。

[0094] 図15A～図15Jは、ステップS13において輝点領域情報から細胞スコアを算出する際に、輝点領域の分布を評価する方法の具体例を示す模式図である。

図15A及び図15Bは、輝点領域の包括面積を用いる方法を示す図である。包括面積とは、例えば、図15A及び図15Bの一点鎖線で示されるような、1つの細胞に含まれる輝点領域を全て包括する最小の長方形の面積として定義される。輝点領域の包括面積を、図示しない細胞の包括面積で割って正規化した値が、1に近い場合は輝点領域が図15Aのように細胞内で広範囲に分布し、0に近い場合は図15Bのように密集して存在している。

[0095] 図15C及び図15Dは、輝点領域を結んだ線の内側の領域の面積（輝点

内側面積)を用いる方法を示す図である。輝点内側面積の算出方法は任意であるが、例えば、図15C及び図15Dの斜線部分で示されるように、隣り合う2つの輝点領域を直線で結び、直線に囲まれた面積を輝点内側面積とする。輝点内側面積を細胞の面積で割って正規化した値が、1に近い場合は輝点領域が図15Cのように細胞内で広範囲に分布し、0に近い場合は図15Dのように密集して存在している。

[0096] 図15E及び図15Fは、輝点領域の面積の総和を用いる方法を示す図である。1つの細胞に含まれる輝点領域(斜線部分)の面積の総和を、細胞の面積で割って正規化した値が、1に近い場合は輝点領域が図15Eのように細胞内で広範囲に分布し、0に近い場合は図15Fのように密集して存在している。

[0097] 図15G及び図15Hは、全ての輝点領域を線で結んだ距離の総和を用いる方法を示す図である。輝点領域を線で結ぶ方法は任意であるが、例えば、全ての輝点領域を1度ずつ通る連続した1本の線を、線の長さの総和が最も短くなるように引く。この長さを、例えば細胞の周長で割って正規化した値が、大きい場合は輝点領域が図15Gのように細胞内で広範囲に分布し、小さい場合は図15Hのように密集して存在している。

[0098] 図15I及び図15Jは、輝点領域の座標のばらつきを用いる方法を示す図である。例えば、輝点領域のx座標位置及びy座標位置の標準偏差をそれぞれstd_x、std_yとした場合に、「 $\sqrt{\text{std\_x}^2 + \text{std\_y}^2}$ 」で算出される値を輝点領域の座標のばらつきとして、これを細胞の面積で割って正規化した値が大きい場合は輝点領域が図15Iのように細胞内で広範囲に分布し、小さい場合は図15Jのように密集して存在している。

[0099] なお、図15A～図15Jに記載の輝点領域の分布を評価する方法において、細胞の形状及び大きさが全て似通っている場合には、正規化は必ずしも必要ではないが、精度を高めるためには正規化をすることが好ましい。

また、図15A～図15Jに記載の方法は、ステップS12において輝点領域の分布を評価する場合だけでなく、ステップS8、ステップS13、ス

テップS 1 8において輝点領域の分布を評価する場合、ステップS 1 5において細胞の分布を評価する場合、ステップS 1 7において輝点領域の分布を評価する場合にも適用可能である。

[0100] 実際の組織標本においては、1つの画像内に様々な値の細胞スコアが混在し、各細胞において、様々な値の輝点スコアが存在している。このような場合の各種スコアの算出結果の例を、図16の模式図を用いて具体的に説明する。

[0101] 図16において、輝点スコアから細胞スコアを算出する場合、N o. 1及びN o. 2の細胞に含まれる輝点領域の輝点スコアは全て2+であり、輝点領域が細胞全域に広がっているので、細胞スコアは2+と算出される。また、N o. 6の細胞に含まれる輝点領域の輝点スコアは全て3+であり、輝点領域が細胞全域に広がっているので、細胞スコアは3+と算出される。また、N o. 7の細胞に含まれる輝点領域の輝点スコアは全て1+であり、輝点領域が細胞全域に広がっているので、細胞スコアは1+と算出される。

ここで、例えばN o. 1の細胞において、ノイズにより1つの輝点領域の輝点スコアが10+と計測された場合であっても、N o. 1の細胞全体における分布によれば2+が支配的であるため、細胞スコアは2+と算出され、診断結果はノイズの影響を受けない。

[0102] N o. 3の細胞においては、輝点スコアが2+と3+の輝点領域が混在しているが、例えば、3+の輝点領域は2+の輝点領域に比べて数が多く、また、広範囲に分布している等の観点から、細胞スコアは3+と算出される。

N o. 5の細胞においては、輝点スコアが1+と2+の輝点領域が混在しているが、例えば、1+の輝点領域は2+の輝点領域に比べて数が多く、また、広範囲に分布している等の観点から、細胞スコアは1+と算出される。

N o. 4の細胞においては、輝点スコアが1+、2+、3+の輝点領域が混在しているが、例えば、輝点スコアの平均値から、細胞スコアは2+と算出される。

[0103] また、図16において、画像全体を解析領域として、細胞スコアから画像

スコアを算出する場合、例えば、細胞スコアの平均値及び各細胞スコア値の分布等から、画像スコアは2+と算出される。

[0104] また、図16において、画像全体を解析領域として、輝点スコアから画像スコアを算出する場合、例えば、輝点スコアの平均値及び各輝点スコア値の分布等から、画像スコアは2+と算出される。

[0105] 上述した本発明の実施形態によれば、輝点領域情報及び解析領域情報に基づいて、生体物質の発現量をスコア化した画像スコアを診断情報として用いて評価するため、ノイズの影響を受けにくく、安定した高精度な定量を行うことができる。また、輝点領域情報に基づいて算出された輝点スコア又は細胞スコア、及び解析領域情報に基づいて画像スコアを算出することとすれば、さらにノイズの影響を受けにくく、安定した高精度な定量を行うことができる。

なお、上記実施形態における記述内容は、本発明の好適な一例であり、これに限定されるものではない。

[0106] 上記実施形態では、明視野画像に対して図5のステップS2及びステップS10の処理を行って解析領域及び細胞領域を抽出したが、例えば細胞質又は細胞核を蛍光物質で染色し、ステップS3で入力される蛍光画像と同じ画像、又はステップS3で入力される蛍光画像とは別の蛍光画像に対して、図5のステップS2及びステップS10の処理を行って解析領域及び細胞領域を抽出しても良い。

[0107] また、上記実施形態では、1種の特定タンパクのみを対象としたが、複数の特定タンパクに対し、発光波長が互いに異なる2種以上の蛍光粒子を用いてもよい。かかる場合、ステップS4においてフィルターワーク等を用いてそれぞれの色成分を抽出し、その抽出した色成分（波長成分）ごとにステップS5～S6の処理を実行すればよい。診断対象となる病変（がん）種に応じて、蛍光画像を取得する際の生体物質認識部位を異なるものとするれば、病変種に応じた特定タンパクの発現量を定量的に示す特徴量を医師に提供することが可能となる。

なお、複数の蛍光物質を用いて染色を行う場合には、蛍光物質の励起光及び蛍光波長が互いに干渉しないような組み合わせを選択する。

[0108] また、上記の説明では、本発明に係るプログラムのコンピュータ読み取り可能な媒体としてHDDや半導体の不揮発性メモリ等を使用した例を開示したが、この例に限定されない。その他のコンピュータ読み取り可能な媒体として、CD-ROM等の可搬型記録媒体を適用することが可能である。また、本発明に係るプログラムのデータを、通信回線を介して提供する媒体として、キャリアウエーブ（搬送波）も適用される。

その他、診断支援情報生成システム100を構成する各装置の細部構成及び細部動作に関しても、発明の趣旨を逸脱することのない範囲で適宜変更可能である。

産業上の利用可能性

[0109] 本発明は、標本に発現する特定の生体物質の数及び分布をスコア化して評価することを特徴とし、より高精度な診断情報の取得に特に好適に利用することができる。

符号の説明

- [0110]
- 1 A 顕微鏡画像取得装置
 - 2 A 画像処理装置
 - 3 A ケーブル
 - 2 1 制御部
 - 2 2 操作部
 - 2 3 表示部
 - 2 4 通信 I / F
 - 2 5 記憶部
 - 2 6 バス
 - 1 0 0 診断支援情報生成システム

請求の範囲

- [請求項1] 蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用いて診断支援情報を生成する診断支援情報生成方法において、
前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力工程と、
前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出する解析領域情報算出工程と、
前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出工程と、
前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出工程と、
を有することを特徴とする診断支援情報生成方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の診断支援情報生成方法において、
前記染色試薬は、前記蛍光物質を複数集積した蛍光粒子であり、
前記輝点領域情報は、前記輝点領域のそれぞれに含まれる前記蛍光粒子の数の情報を含むことを特徴とする診断支援情報生成方法。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の診断支援情報生成方法において、
前記標本における細胞の所定の領域を抽出可能な第二の画像を入力する第二入力工程と、
前記第二の画像から、細胞の所定の領域を細胞領域として抽出し、前記細胞領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む細胞情報を算出する細胞情報算出工程と、
を有し、
前記画像スコア算出工程は、
前記輝点領域情報及び前記細胞情報に基づいて、前記細胞領域当たりの前記生体物質の発現を解析した細胞スコアを算出し、

前記解析領域情報及び前記細胞スコアに基づいて、前記画像スコアを算出することを特徴とする診断支援情報生成方法。

[請求項4]

請求項1又は2に記載の診断支援情報生成方法において、

前記画像スコア算出工程は、

前記輝点領域情報に基づいて、前記輝点領域当たりの前記生体物質の発現を解析した輝点スコアを算出し、

前記解析領域情報及び前記輝点スコアに基づいて、前記画像スコアを算出することを特徴とする診断支援情報生成方法。

[請求項5]

請求項1又は2に記載の診断支援情報生成方法において、

前記標本における細胞の所定の領域を抽出可能な第二の画像を入力する第二入力工程と、

前記第二の画像から、細胞の所定の領域を細胞領域として抽出し、前記細胞領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む細胞情報を算出する細胞情報算出工程と、

を有し、

前記画像スコア算出工程は、

前記輝点領域情報に基づいて、前記輝点領域当たりの前記生体物質の発現を解析した輝点スコアを算出するとともに、

前記細胞情報及び前記輝点スコアに基づいて、前記細胞領域当たりの前記輝点スコアの分布を解析した細胞スコアを算出し、

前記解析領域情報及び前記細胞スコアに基づいて、前記画像スコアを算出することを特徴とする診断支援情報生成方法。

[請求項6]

蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用いて診断支援情報を生成する画像処理装置において、

前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力手段と、

前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出す

る解析領域情報算出手段と、

前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出手段と、

前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出手段と、

を有することを特徴とする画像処理装置。

[請求項7]

請求項6に記載の画像処理装置と、

前記画像処理装置で使用される、前記第一の画像を取得する画像取得装置と、

を備えることを特徴とする診断支援情報生成システム。

[請求項8]

蛍光物質を用いた染色試薬により特定の生体物質が染色された標本を用いて診断支援情報を生成するコンピュータを、

前記標本における前記生体物質の発現を蛍光輝点で表す第一の画像を入力する第一入力手段、

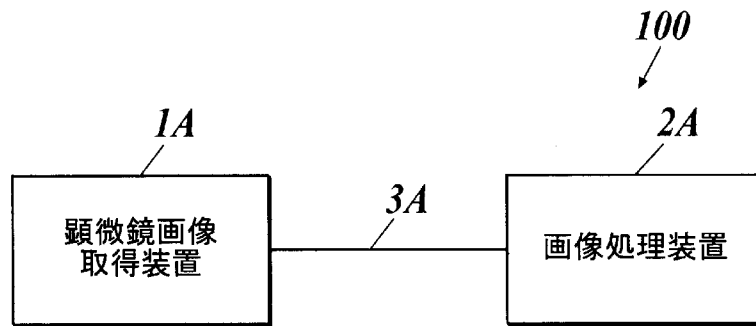
前記標本の所定の領域を解析領域として抽出し、前記解析領域の数、面積、及び周長のうち少なくとも一つを含む解析領域情報を算出する解析領域情報算出手段、

前記第一の画像から前記蛍光輝点を示す輝点領域を抽出し、当該輝点領域の分布の情報を含む輝点領域情報を抽出する輝点領域情報抽出手段、

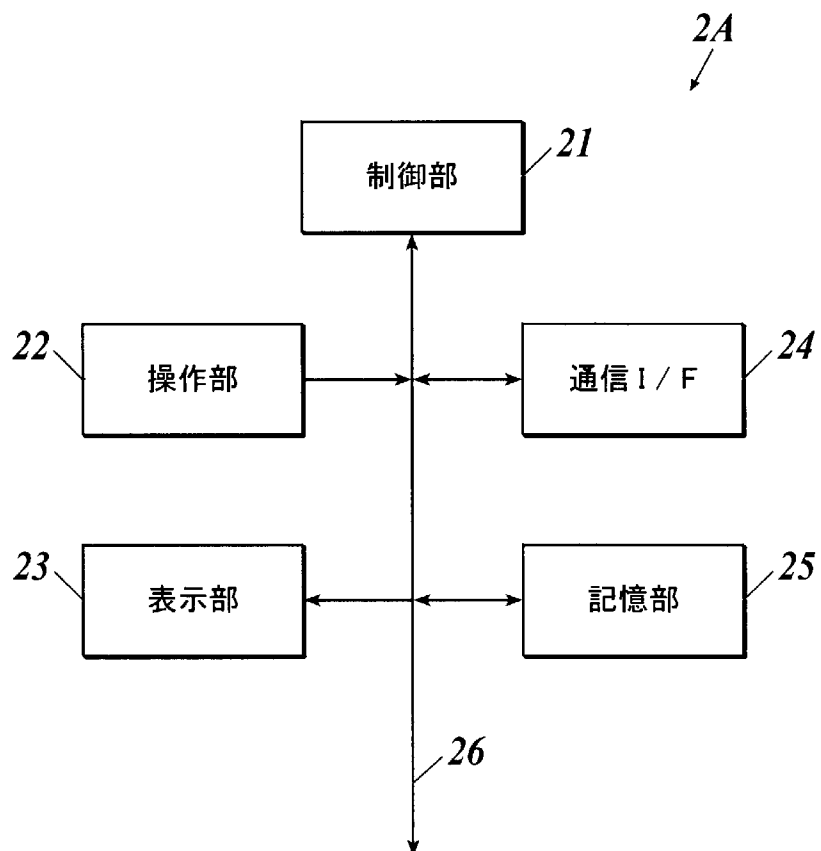
前記解析領域情報及び前記輝点領域情報に基づいて、前記診断支援情報である画像スコアを算出する画像スコア算出手段、

として機能させるための画像処理プログラム。

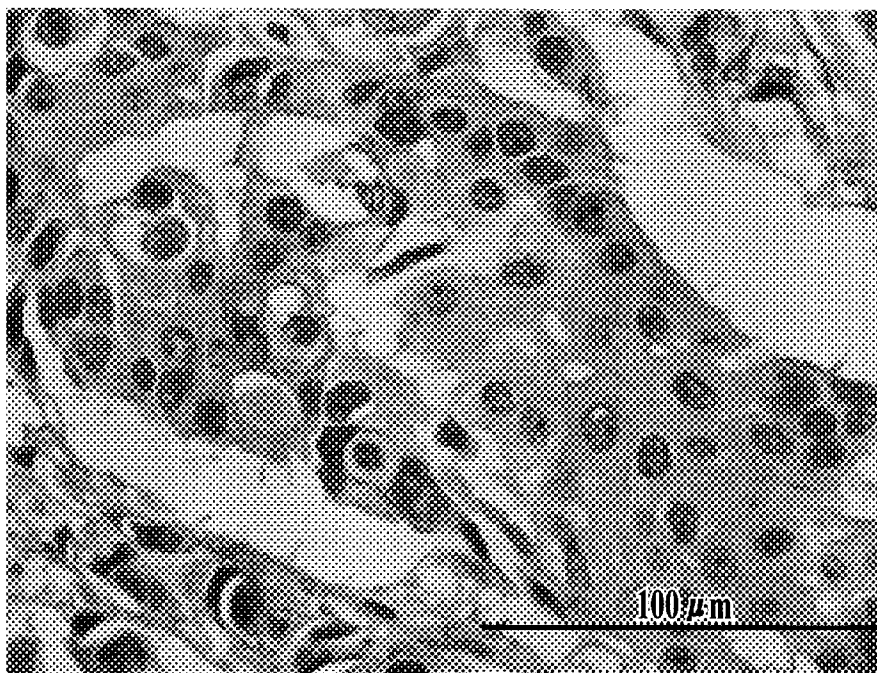
[図1]



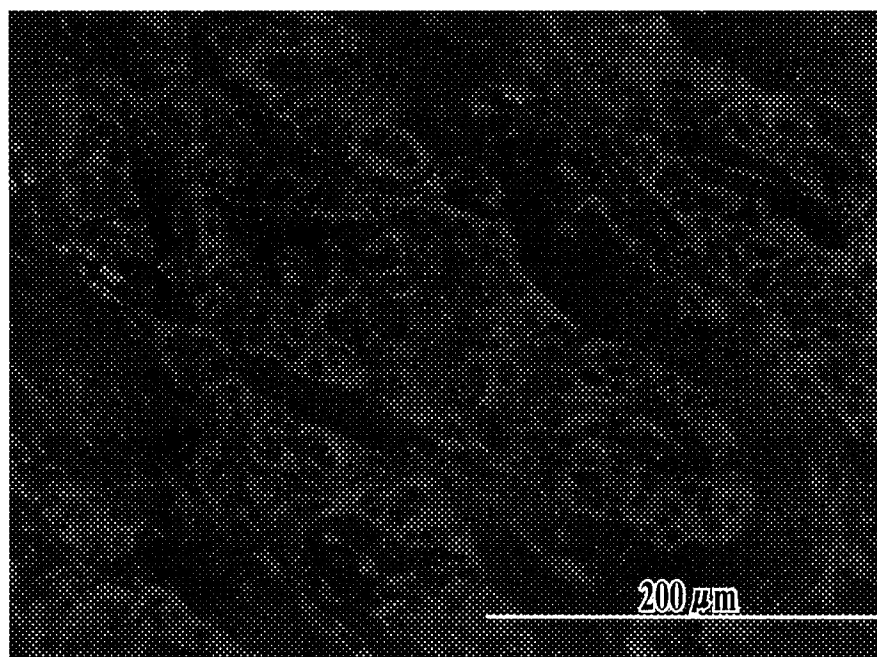
[図2]



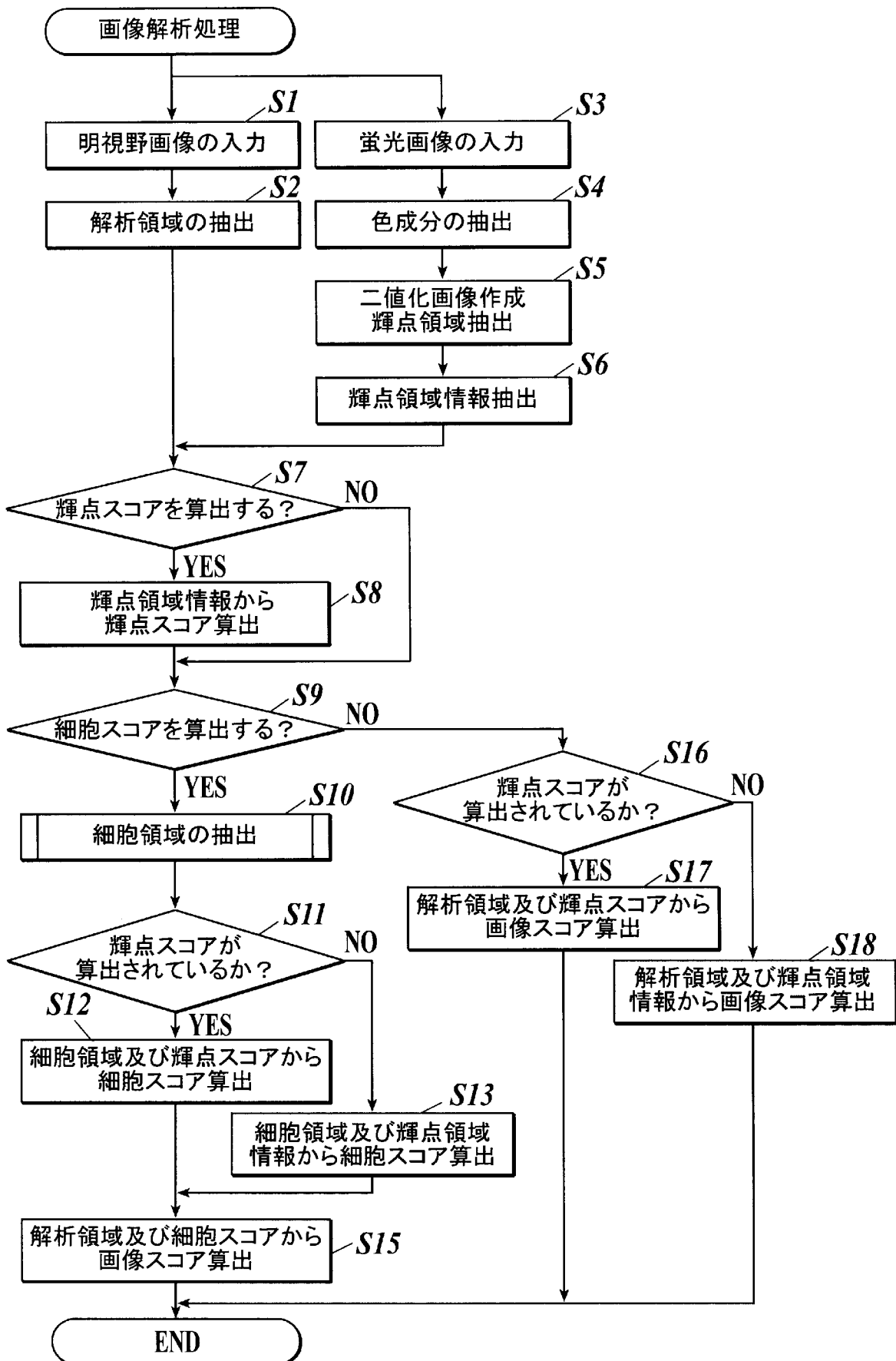
[図3]



[図4]



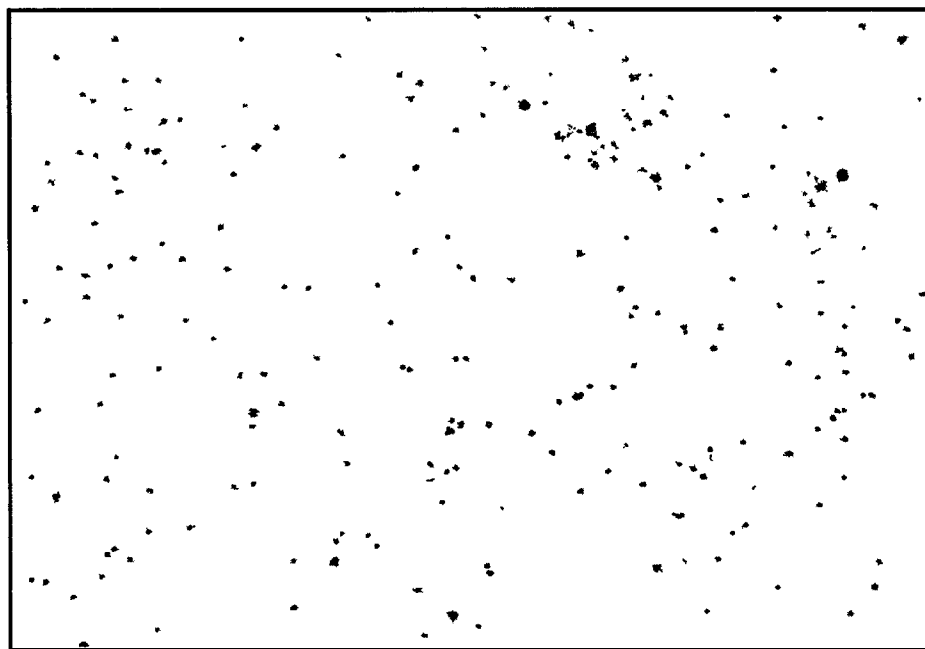
[図5]



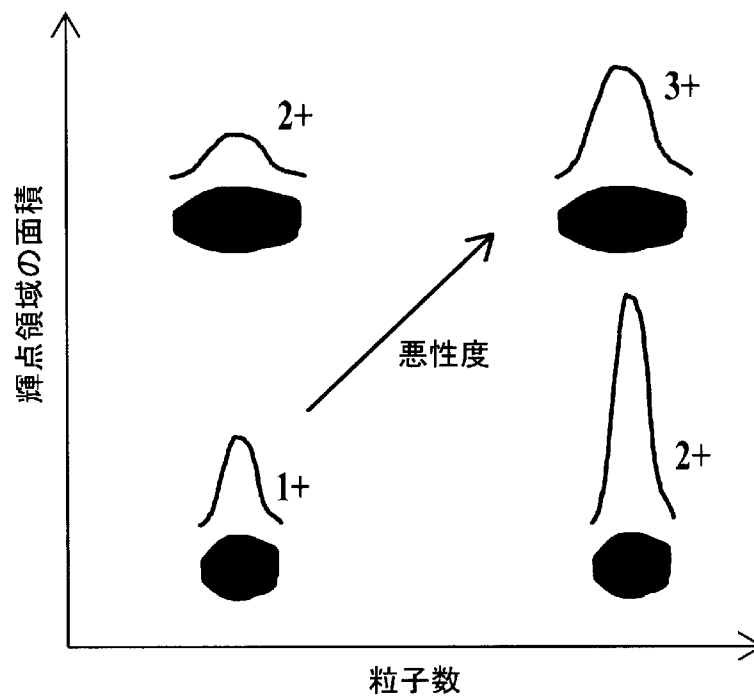
[図6A]



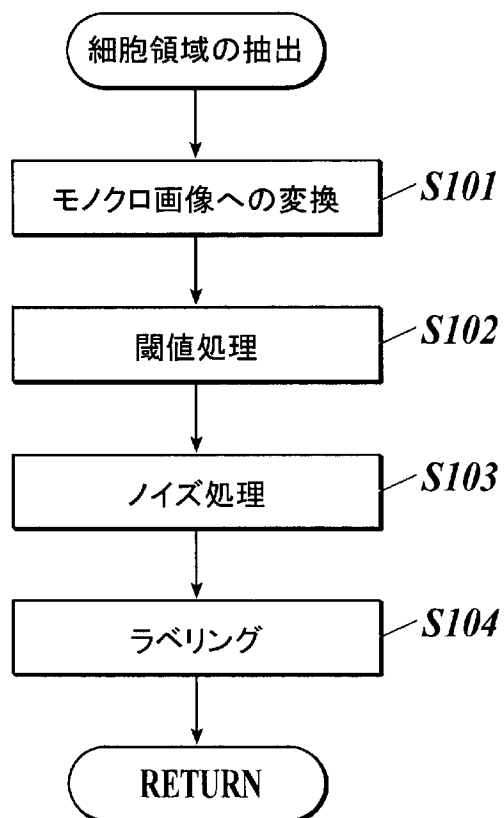
[図6B]



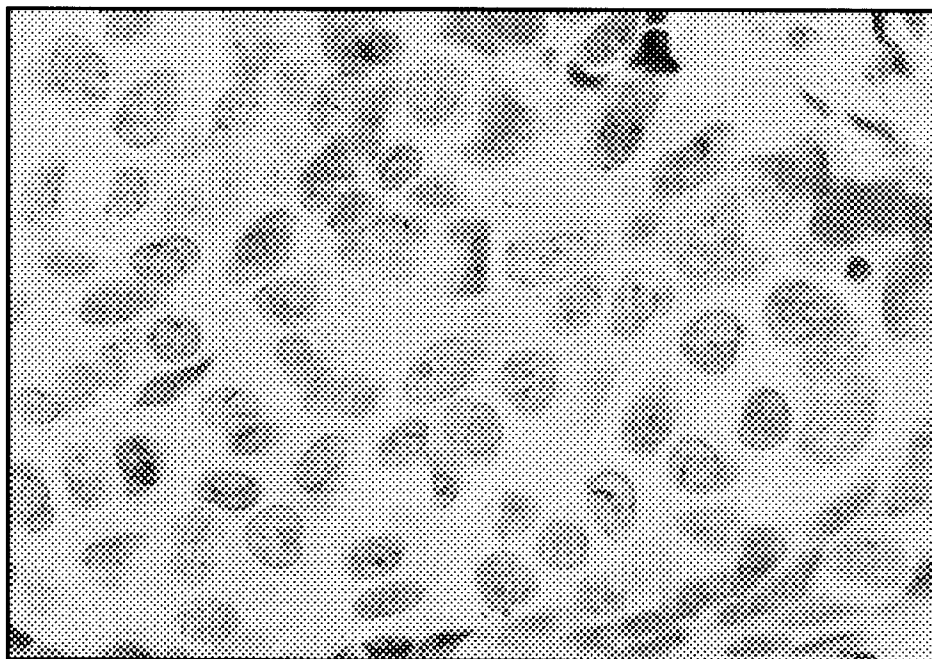
[図7]



[図8]



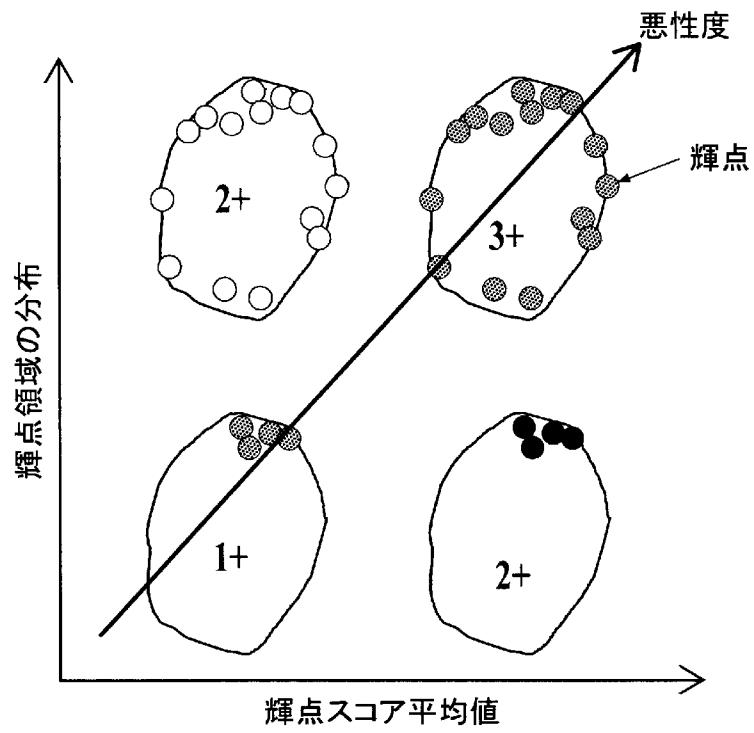
[図9A]



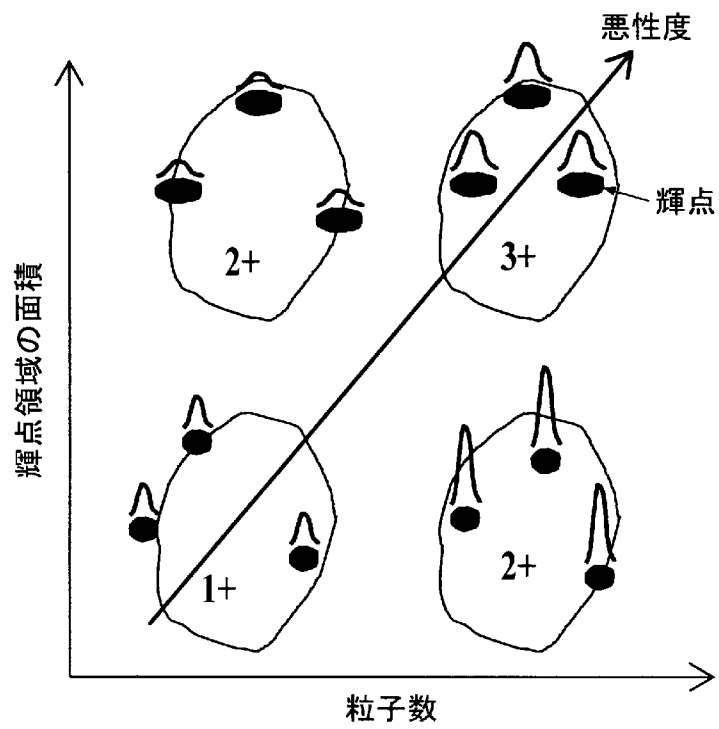
[図9B]



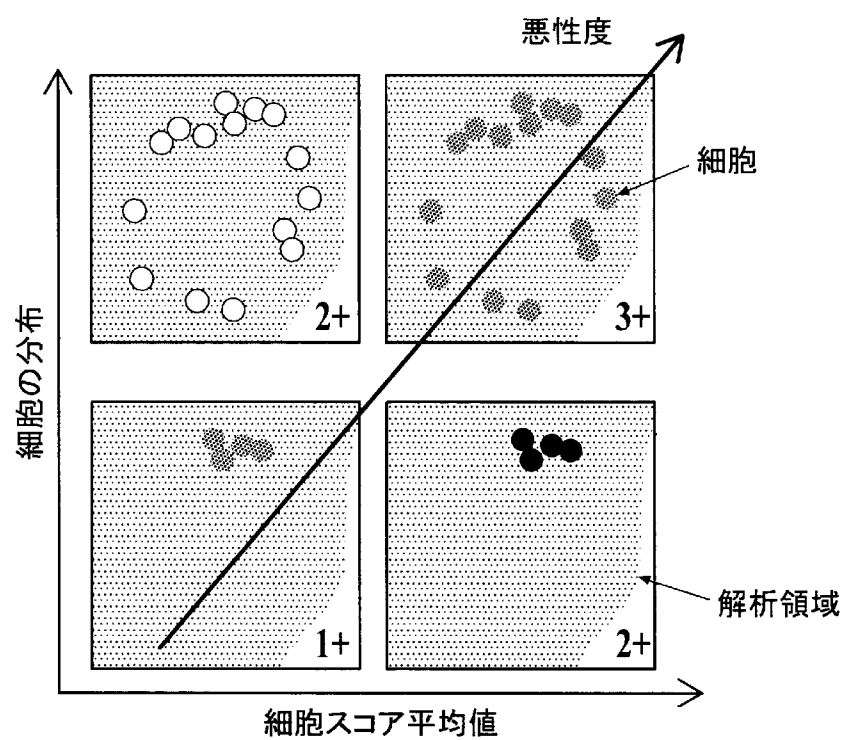
[図10]



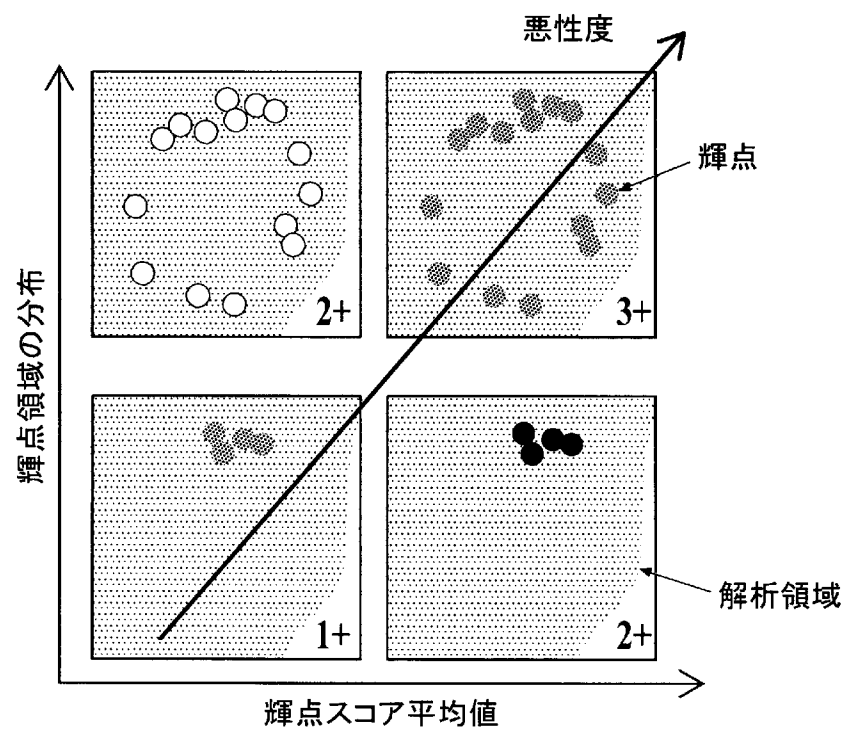
[図11]



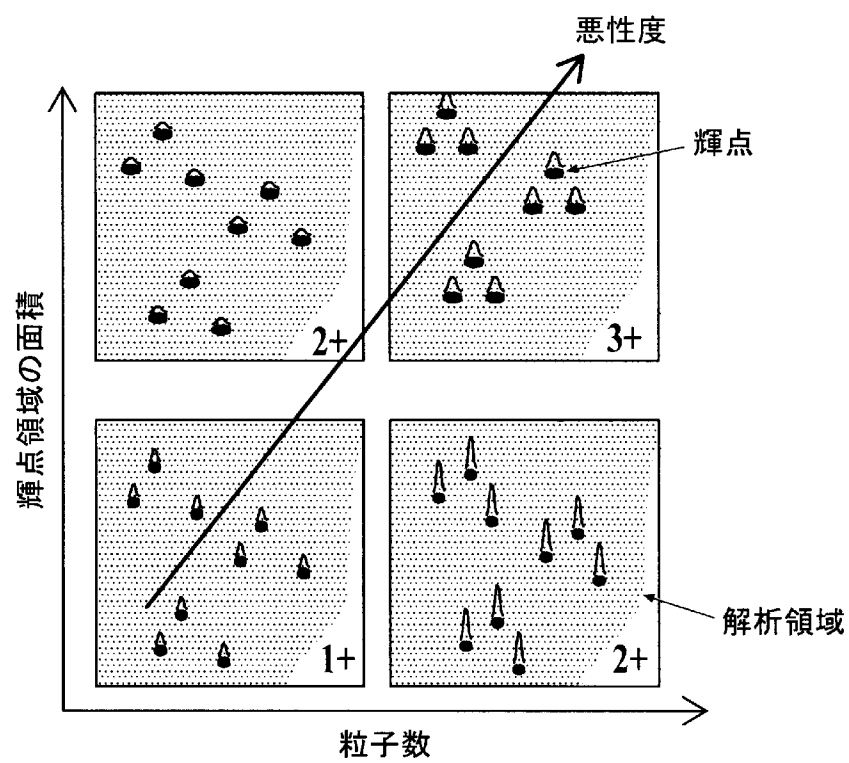
[図12]



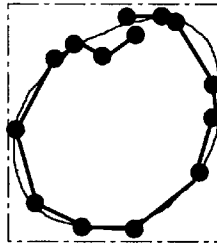
[図13]



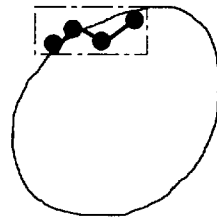
[図14]



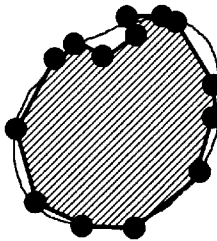
[図15A]



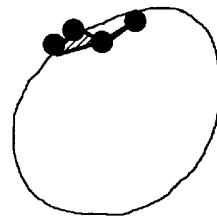
[図15B]



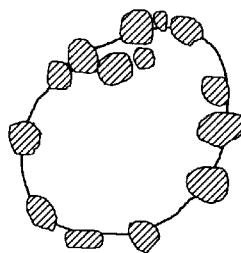
[図15C]



[図15D]



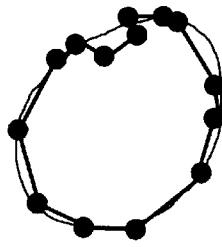
[図15E]



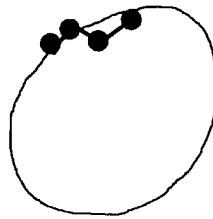
[図15F]



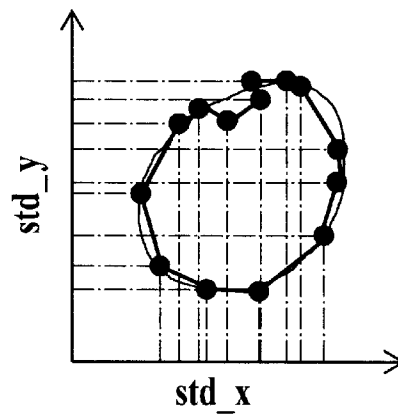
[図15G]



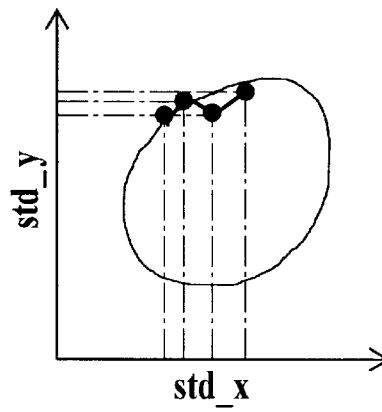
[図15H]



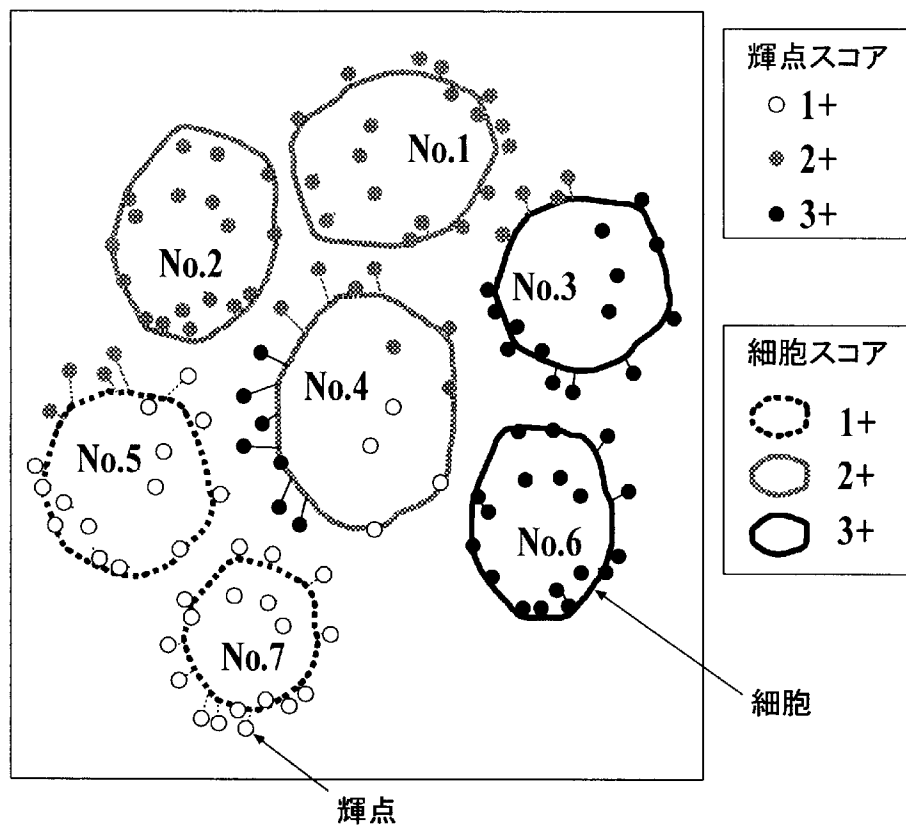
[図15I]



[図15J]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/064135

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/483(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G06T1/00(2006.01)i

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)

G01N33/483, G01N33/48, G06T1/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/011587 A1 (Nagoya Industrial Science Research Institute), 02 February 2006 (02.02.2006), claims; paragraph [0009] & US 2009/0004647 A1 & EP 1783231 A1	1-8
Y	Makoto KAWAGUCHI et al., "Gan Yokusei Inshi ATBF1(ZFHX3) no Saibonai Kyokuzai o Biomarker to suru Gan Akuseido Shindanho no Kaihatsu", Journal of Japanese Biochemical Society, 2010, Shoroku CD, 1W14-P-4	1-8
Y	Ichiro KAGARA et al., "Zenritsusen Gan ni Okeru ADAM-10 no Saibonai Kyokuzai to Byorigaku-teki Akuseido tono Kanren", Proceedings of the Japanese Cancer Association, 28 August 2006 (28.08.2006), vol.65th, page 297	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* 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

17 July 2015 (17.07.15)

Date of mailing of the international search report

28 July 2015 (28.07.15)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/064135

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-57631 A (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 28 March 2013 (28.03.2013), claims (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/483(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G06T1/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/483, G01N33/48, G06T1/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 5 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	WO 2006/011587 A1 (財団法人名古屋産業科学研究所) 2006.02.02, 特許請求の範囲、段落[0009] & US 2009/0004647 A1 & EP 1783231 A1	1-8	
Y	川口誠 ほか, 癌抑制因子 ATBF1 (ZFHX3) の細胞内局在をバイオマーカーとする癌悪性度診断法の開発, 生化学, 2010, 抄録 CD, 1W14-P-4	1-8	
Y	加々良一郎ほか, 前立腺癌における ADAM - 10 の細胞内局在と病理学的悪性度との関連, 日本癌学会学術総会記事, 2006.08.28, Vol.65th, P.297	1-8	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 1 7 . 0 7 . 2 0 1 5		国際調査報告の発送日 2 8 . 0 7 . 2 0 1 5	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 海野 佳子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2	2 J 3 9 0 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-57631 A (コニカミノルタエムジー株式会社) 2013.03.28, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8