

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6908624号
(P6908624)

(45) 発行日 令和3年7月28日 (2021.7.28)

(24) 登録日 令和3年7月5日 (2021.7.5)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 1/30 (2006.01)	GO 1 N 1/30
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P

請求項の数 16 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2018-554524 (P2018-554524)	(73) 特許権者	507179346
(86) (22) 出願日	平成29年4月25日 (2017.4.25)		ベンタナ メディカル システムズ, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2019-519757 (P2019-519757A)		アメリカ合衆国アリゾナ州85755, トゥーソン, イースト・イノベーション・パーク・ドライブ 1910
(43) 公表日	令和1年7月11日 (2019.7.11)	(74) 代理人	100140109
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/059769		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開番号	W02017/186705	(74) 代理人	100118902
(87) 国際公開日	平成29年11月2日 (2017.11.2)		弁理士 山本 修
審査請求日	令和2年4月13日 (2020.4.13)	(74) 代理人	100106208
(31) 優先権主張番号	62/328,245		弁理士 宮前 徹
(32) 優先日	平成28年4月27日 (2016.4.27)	(74) 代理人	100120112
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リアルタイム体積制御するためのシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析中の生体試料を保持する基板(102)上に分配されることになる流体(105)の補給(replenishment)量の概算(estimating)方法であって、

a. 撮影画像を生成するために撮像システムを用いて、前記生体試料を保持する前記基板(102)上に分配される前記流体の画像を撮影するステップであって、前記流体(105)が前記基板(102)とカバーガラス(130)との間の空間に閉じ込められているステップと、

b. 前記基板(102)上に分配され、前記基板(102)と前記カバーガラス(130)との間の前記空間に閉じ込められた前記流体(105)の流体境界(boundaries)(107)を識別するために前記撮影画像を分析するステップと、

c. 前記基板(102)上に分配された前記流体(105)の流体体積を前記流体境界から決定される流体幅を用いて計算するステップと、

d. 前記計算流体体積および所定の流体体積に基づいて前記流体の前記補給量を計算するステップとを、
含む方法。

【請求項 2】

前記撮像システムが、前記カバーガラス上に配置されたカメラ(125)と、少なくとも2つの光源(110,120)とを含み、第1の光源(110)は、前記第1の光源(110)から発せられる第1の光(111)が、前記カメラの視野(FOV)内にあるように位置決めされ、第2の光源(120)は、前記第2の光源(120)から発せられる第2の光(121)が、前記カメラ(125)の前

記視野外にあるように位置決めされ、暗視野撮像用に構成された撮像配置を提供し、

前記カメラと、前記カバーガラスの間の距離(128)が、38.1cm(15インチ)から、50.8cm(20インチ)の間である、
請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記撮影画像内にエラーまたは異常があるか否かを判断するためにフレームチェックを実行するステップであって、前記フレームチェックが前記撮影画像内にエラーまたは異常を検出する場合、前記撮影画像が前記フレームチェックを通過するまで、またはフレームチェックのエラー反復最大回数に到達するまで、画像を繰り返し撮影するステップをさらに含み、

10

前記フレームチェックのエラー反復最大回数が、5回の反復である、
請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記基板上に分配された前記流体の流体位置を決定するステップと、前記流体位置を所定の位置と比較するステップとを、さらに含み、前記カバーガラスが、前記基板を横断して前記流体を動かす可動カバーガラスであり、流体位置が前記所定の位置の外側にある場合、前記流体が可動カバーガラスによって前記所定の位置へ移動されるまで、画像の撮影を繰り返し、前記流体位置が前記所定の位置内に入った場合、前記流体体積を計算する、
請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

20

暗視野撮像が、前記撮影画像を分析するとき、前記流体境界(107)を識別するために使用される、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記撮影画像を分析するステップが、前記流体境界を識別するために、前景検出を前記撮影画像に適用するステップを含む、
請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記流体が透明な流体であり、流体動作に基づいた前景(foreground)検出が、前記流体境界を識別するために使用される、
請求項1から6のいずれかに記載の方法。

30

【請求項8】

前記流体が着色された流体であり、色しきい値検出が、前記流体境界を識別するために使用される、
請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記撮影画像を分析するステップが、ノイズを前記撮影画像のバックグラウンドから除去するステップをさらに含む、
請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記流体体積を計算するステップが、前記計算流体体積を提供するために前記流体幅を検量線(calibration curve)と比較するステップを含み、前記検量線は、対応する流体幅に対する既知の流体体積をプロットすることによって準備され、
前記検量線が、一次の検量線である、
請求項1から9のいずれかに記載の方法。

40

【請求項11】

前記流体体積を計算するステップが、さらに

a. 前記撮影画像内の気泡を識別するために円形(circle)検出を実行することによって、前記基板と前記カバーガラスとの間の前記空間に閉じ込められた前記分配された流体内の気泡を検出するステップと、

b. 気泡の数および各気泡の気泡体積を計算すること、および補正計算体積を提供す

50

るために、前記流体幅を使用して決定された前記計算体積から総気泡体積を減じることによって気泡体積を補償するステップと、

c. 前記補給量を計算するために、前記補正された計算体積を使用するステップとを含む、

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記フレームチェックを実行するステップが、前記撮影画像内の暗画素に対する明画素の比を計算するステップを含み、前記撮影画像内で暗画素に対する明画素の前記比が 50 % よりも大きいとき、前記画像が、前記フレームチェックを失敗し、前記撮影画像内で暗画素に対する明画素の前記比が 50 % よりも小さいとき、前記画像は、前記フレームチェックを通過し、

10

及び／又は、

前記フレームチェックを実行するステップが、体積差を得るために、前記計算流体体積を前記所定の流体体積または少なくとも 1 つの事前に計算された体積と比較するステップを含み、前記体積差と前記所定の流体体積または前記事前に計算された体積との比の絶対値が、前記流体の所定の蒸発速度を使用して計算された差よりも大きいとき、前記画像が、前記フレームチェックを失敗し、

及び／又は、

前記フレームチェックを実行するステップが、フレームチェックエラー反復最大回数に到達した場合にユーザに通知するステップをさらに含む、

20

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

前記流体位置を決定するステップが、前記可動カバーガラスの位置を決定するステップを含み、前記可動カバーガラスの前記位置が、前記流体位置と関連性を示し、前記可動カバーガラスの前記位置が、所定領域の外側にある場合、前記流体位置は、前記所定位置の外側にあり、

前記可動カバーガラスが、流体を転がすカバーガラス(fluid rolling cover)を含み、前記所定の領域は、前記流体を転がすカバーガラスの位置に対する前記流体位置の動作の遅れを補償するために、前記流体を転がすカバーガラスの中心線からオフセットしており、

30

更に、前記流体位置を決定するステップが、前記流体を転がすカバーガラスが、前記基板を横断して前記流体を動かそうとするとき、前記流体を転がすカバーガラスの前記中心線に対する前記流体の動作の方向を決定するステップをさらに含む、

請求項 4 に記載の方法。

【請求項 14】

前記補給量だけ前記流体体積を補給するステップをさらに含む、

請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1 から 14 のいずれかに記載の方法を実行させる命令を記憶してあるコンピュータ可読媒体。

40

【請求項 16】

分析中の生体試料を含む基板(102)上に分配される流体(105)の補給量を概算するシステムであって、前記流体が、前記基板(102)とカバーガラス(130)との間の空間に閉じ込められており、前記システムが、

a. 画像取得記憶システムであって、

i. 前記基板および前記カバーガラス上に配置されたカメラ(125)と、

ii. 少なくとも 2 つの光源(110,120)であって、第 1 の光源(110)が、前記第 1 の光源(110)から発せられる第 1 の光(111)が、前記カメラ(125)の視野(FOV)内にあるように位置決めされ、第 2 の光源(120)が、前記第 2 の光源(120)から発せられる第 2 の光(121)が、前記カメラ(125)の前記視野外にあるように位置決めされ、それにより暗視野撮

50

像用に構成された撮像配置を作成する、光源とを含む、
画像取得記憶システムと、

b. 前記画像取得記憶システムに動作可能に結合されたプロセッサ(200)と、

c. 前記プロセッサ(200)に動作可能に結合されたメモリ(210)であって、デジタルコード化された命令が、前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサに、

i. 撮影画像を生成するために前記カメラ(125)を用いて、前記生体試料を保持する前記基板(102)上に分配される前記流体(105)の画像を撮影することと、

i i. 前記基板(102)上に分配され、前記基板(102)と前記カバーガラス(130)との間の前記空間に閉じ込められた前記流体(105)の流体境界(107)を識別するために前記撮影画像を分析することと、

i i i. 前記基板(102)上に分配された前記流体(105)の流体体積を前記流体境界から決定される流体幅を用いて計算することと、

i v. 前記計算流体体積および所定の流体体積に基づいて前記流体の前記補給量を計算することとを、

含む動作を実行させるように前記システムが構成されるような、前記デジタルコード化された命令を記憶するように構成される、メモリとを、
備える、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

[0001]本開示は、内容が本明細書に参照により組み込まれる、2016年4月27日に提出された米国仮特許出願第62/328,254号の利益を主張するものである。

【0002】

[0002]本発明は、試薬量検知用のシステムおよび方法に関し、詳細には、組織染色処理中のスライドガラス上の試薬量検知用のシステムおよび方法に関する。

【背景技術】

【0003】

[0003]生物学的検定法は、生体標本に関連付けられた1つまたは複数の特性、たとえば、その分子含有量または細胞構造などを、測定または観察するために実行され得る解析手順である。たとえば、組織切片および細胞試料などの細胞標本は、それらが基板上に支持されている間、1つまたは複数の流体を標本に塗布することによって、顕微鏡分析のために準備され得る。顕微鏡スライドガラスが支持する細胞標本は、多くの場合、着色するために1つまたは複数の染料または他の試薬で処理され、他の透明なまたは不可視の細胞および細胞の成分と対比される。免疫組織化学的(IHC)および原位ハイブリッド形成法(ISH)染色法は、標本内部のタンパク質および核酸それぞれの存在、位置、および分布を明瞭化するために、細胞標本の処理に使用され得る。

【0004】

[0004]分析およびプラットフォーム構築および商業的分析試験は、再現性および精度が、現在は病理学者の評価によって安定化されるため、時間および資源の点から費用がかかり得る。スライドガラスに基づく分析の成功は、一定のISH分析に12時間以上かかり得る分析の完了後によりやうく、病理学者によって、さらに時間を要する多標的プロトコルを用いて評価される。組織染色処理での任意の混乱または不整合は、その後によりやうく発見され、多くの場合、正確な原因には広範な追加分析が必要となる。全体的に、そのような処理は、浪費される高価な組織試料、および増加する開発時間とその付随するコストに関して、問題を生み出す。

【0005】

[0005]試薬流体の蒸発は、試薬濃度の変化を生じさせ得るメカニズムの1つである。たとえば、試薬からの溶媒の蒸発は、特に試薬流体の体積の縁部において、試薬成分の濃度の増加をもたらす得る。同様に、分析中の生体試料による試薬成分の取り込みも、1つま

10

20

30

40

50

たは複数の試薬成分の局在的な枯渇の原因となり得る。この取り込みは、たとえば組織試料全体で不均一であり得るので、濃度勾配が発生し得て、1つまたは複数のそのような勾配に沿った染色度合いの差を生じさせ得る。さらに、濃度が増加するにつれて、通常、取り込みおよび他の相互作用ならびに反応が加速するので、蒸発は、こう配および不均一な染色の原因となり得る。全体的に、時間的および空間的な試薬濃度の変化は、組織試料全体の不均一な染色という結果をもたらし得る。蒸発の場合、組織が部分的にまたは全体的に乾燥し、組織試料が使用不能になることもあり得る。原因に関係なく、濃度変化または組織損傷を判定するために、病理学者の分析を待たねばならないことは、多大な浪費時間と、高価および／または希少な試料のさらなる消費とに、つながることになる。

【0006】

10

[0006]商業的分析を商業的計器で実行した後、分析の成功は、病理学者によって評価されることになる。トラブルシューティング指針および彼ら自身の知識を用いることで、病理学者は、試験所へ分析を実行するフィードバックを提供し、新しい試料を要求することができる。再び、このことは、相当な遅延につながるが、この場合、遅延は、患者が、彼らの生活の質に非常に密接に影響を与え得る結果を受け取るのに要する時間に影響する。

【0007】

[0007]処理中の蒸発を軽減するための現在の解決策は、局所的な湿度および温度に依存する概算蒸発速度に基づいた流体の補給に頼っている。湿度および温度は、分析処理時間中に変動し得るので、そのような試薬の概算補給速度は、正確でない可能性がある。さらに、補給速度は、スライドガラス毎に決定されないし、リアルタイムでも決定されない。したがって、流体体積を検知し、かつリアルタイムで正確な液体補給を提供する、方法およびシステムが必要である。

20

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0008】**

本願発明の一実施例は、例えば、リアルタイム体積制御するためのシステムおよび方法に関する。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

[0008]本明細書で開示されるのは、流体体積を検知し、かつリアルタイムで液体補給を提供する、方法、コンピュータプログラム製品、およびシステムであり、その結果、分析結果を損ねかねない処理条件が、未然に回避される。さらに、開示される方法、プログラム製品、およびシステムは、病理学者が処理過失発生を判定する、試料試験の完了を待たなくてもよいように、支援し得る。

30

【0010】

[0009]一態様によれば、分析中の生体試料を保持する基板上に分配されることになる、流体補給量の概算方法が開示される。本方法は、撮影画像を生成するために撮像システムを用いて、（顕微鏡のスライドガラス上に載せられた組織または細胞学試料などの）生体試料を保持する基板上に分配される流体の画像を撮影することを含む。特に、流体は、向かい合わされる表面が、分析ステップが実行される（毛管現象空間のような）小体積空間を形成するように基板から一定の間隔を置かれた薄膜染色システムのように、基板とカバーガラスとの間に閉じ込められ得る。撮影画像は、基板上に分配され、基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められた流体の流体境界を識別するために（たとえば画像分析方法によって）分析される。識別される流体境界は、次に基板上に分配された流体体積を計算するために使用され得る、流体幅を提供する。たとえば、決定された幅は、既知の体積に対応する流体幅を測定し、一次（線形）関数などの関数との関係にフィッティングすることによって作成された検量線と比較されてもよい。別法として、基板とカバーガラスとの間の空間の幾何学的寸法が、観察された幅と共に、体積の計算に用いられてもよい。流体体積の計算方法に関係なく、この計算流体体積は、追加流体が追加されるべきか否か判定し、たとえば蒸発、または逃散ならびに漏洩などの他の任意の過程による、流体損失を

40

50

補給するために、どれだけの量が追加されるべきか決定するために使用され得る。流体の補給量は、所定の体積と計算流体体積とを比較することによって、計算されてもよく、計算流体体積と所定の体積との差分が、補給量を提供する。具体的な実施形態では、方法は、補給量だけ流体体積を補給するステップをさらに含む。この方法では、任意の流体損失は、置換され得て、それにより分析中、十分な試薬などの流体と、生体試料との接触の保証を支援する。生体試料と接触する適切な流体量の維持は、結果として、計画通りの分析進行の補償を支援し、全ての分析プロセスが完了してはじめて（乾燥組織などの）問題が発見されるとすると、他に発生するかもしれない分析結果を提供することで、遅延を回避し得る。

【0011】

[0010]別の態様では、分析中の生体試料を含む基板上に、詳細には流体が基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められたところに、分配される流体補給量を概算するシステムが開示される。全体システムは、基板およびカバーガラス上に配置されたカメラと、少なくとも2つの光源とをそれ自体が含む、画像取得記憶システムを含む。第1の光源は、第1の光源から発せられる第1の光が、カメラの視野（FOV）内にあるように位置決めされ、第2の光源は、第2の光源から発せられる第2の光が、カメラの視野外にあるように位置決めされる。撮像配置は、それにより暗視野撮像を支援するように構成される。画像分析システムは、画像取得記憶システムに動作可能に結合されたプロセッサと、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに一定の動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するように構成されたプロセッサに動作可能に結合されたメモリとをさらに含む。動作は、撮影画像を生成するためにカメラを使用して、生体試料を保持する基板上に分配される流体の画像を撮影することと、基板上に分配され、基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められた流体の流体境界を識別するために撮影画像を解析することと、流体境界から決定された流体幅を使用して、基板上に分配された流体の流体体積を計算することと、計算流体体積および所定の流体体積に基づいて流体の補給量を計算することを含む。ある実施形態では、流体体積を所定の体積に復帰させるために、たとえば自動的に、プロセッサの制御下で、メモリが補給ディスペンサを制御する命令をさらに記憶して、補給量は、システムの補給ディスペンサを使用して追加される。

【0012】

[0011]具体的な実施形態では、流体境界の縁部を照明する暗視野撮像の使用、および／または動作中の流体境界を検出する前景動作検出の使用、および／または着色された流体の検出を支援する色しきい値の使用、の全てが合同して、流体幅の検出を確実に支援し、最小限の誤差で（たとえば約1.5%未満の誤差で）リアルタイムに多種多様な流体の計算流体体積を提供する。そのうえ、開示された方法およびシステムは堅牢であり、システム内の分析は、ディスペンサの動作などの他のシステムの動作、組織の色の变化、および機器の振動によって影響されない。

【0013】

[0012]他の態様では、開示されたシステムに開示された方法を実行させる命令と、開示された方法を実行する命令を記憶する（非一時的な）コンピュータ可読媒体と、を含むコンピュータプログラム製品が提供される。

【0014】

[0013]追加の実施形態および態様が、添付図面に関連して提供される以下の詳細な説明の考察から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】[0014]開示された実施形態による例示的なカメラおよび照明の配置の側面図である。

【図2】[0015]開示された実施形態によるリアルタイム補給システム（RTRS）のブロック図である。

【図3】[0016]図3Aは、動作ベースの色しきい値処理の前景検出を使用した流体縁部検

10

20

30

40

50

出の例を示す図である。図 3 B は、動作ベースの色しきい値処理の前景検出を使用した流体縁部検出の例を示す図である。図 3 C は、動作ベースの色しきい値処理の前景検出を使用した流体縁部検出の例を示す図である。図 3 D は、動作ベースの色しきい値処理の前景検出を使用した流体縁部検出の例を示す図である。図 3 E は、動作ベースの色しきい値処理の前景検出を使用した流体縁部検出の例を示す図である。図 3 F は、動作ベースの色しきい値処理の前景検出を使用した流体縁部検出の例を示す図である。

【図 4】[0017] 図 4 A は、体積計算に使用されるべきでない画像フレームタイプの例を示す図である。図 4 B は、体積計算に使用されるべきでない画像フレームタイプの例を示す図である。

【図 5】[0018] 開示された実施形態による前景検出の例示的な処理を示す図である。

10

【図 6】[0019] 図 6 A は、変化する A R C および流体位置を示す図である。図 6 B は、変化する A R C および流体位置を示す図である。図 6 C は、変化する A R C および流体位置を示す図である。図 6 D は、変化する A R C および流体位置を示す図である。

【図 7】[0020] 図 7 A は、A R C 位置対流体位置を示す図である。図 7 B は、A R C 位置対流体位置を示す図である。図 7 C は、A R C 位置対流体位置を示す図である。図 7 D は、A R C 位置対流体位置を示す図である。

【図 8】[0021] R T R S 境界部の動作 1 2 0 秒後の例示的なスクリーンショットである。

【図 9】[0022] R T R S 境界部の流体の気泡補償を用いた例示的なスクリーンショットである。

【図 1 0】[0023] 例示の実施例による、計算体積と既知の体積との間の密な対応を示す図である。

20

【図 1 1】[0024] 図 1 1 A は、明視野および暗視野画像内での変化する組織の色および振動を用いた縁部検出の非限定的な例を示す図である。図 1 1 B は、明視野および暗視野画像内での変化する組織の色および振動を用いた縁部検出の非限定的な例を示す図である。図 1 1 C は、明視野および暗視野画像内での変化する組織の色および振動を用いた縁部検出の非限定的な例を示す図である。図 1 1 D は、明視野および暗視野画像内での変化する組織の色および振動を用いた縁部検出の非限定的な例を示す図である。

【図 1 2】[0025] 多様な試薬の測定体積の非限定的な例を示す図である。

【図 1 3】[0026] 図 1 3 A は、暗視野および明視野の撮像配置を示す図である。[0027] 図 1 3 B は、対象物の縁部を強調した暗視野撮像の非限定的な例を示す図である。

30

【図 1 4】[0028] 図 1 4 A は、明視野撮像と暗視野撮像との比較を示す図である。図 1 4 B は、明視野撮像と暗視野撮像との比較を示す図である。図 1 4 C は、明視野撮像と暗視野撮像との比較を示す図である。図 1 4 D は、明視野撮像と暗視野撮像との比較を示す図である。図 1 4 E は、明視野撮像と暗視野撮像との比較を示す図である。図 1 4 F は、明視野撮像と暗視野撮像との比較を示す図である。

【図 1 5】[0029] 図 1 5 A は、縁部検出に使用された組織試料の画像フレームの例を示す図である。図 1 5 B は、縁部検出に使用された組織試料の画像フレームの例を示す図である。

【図 1 6】[0030] 図 1 5 A の縁部検出を示す図である。

【図 1 7】[0031] 図 1 5 B の縁部検出を示す図である。

40

【図 1 8】[0032] 図 1 8 A は、ライン状にパターン化されたヒータ上で、ヘマトキシリンで染色された組織を示す図である。図 1 8 B は、ライン状にパターン化されたヒータ上で、ヘマトキシリンで染色された組織を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 6】

[0033] 本明細書で説明する特徴または特徴の組合せは、任意のそのような組合せに含まれる特徴が相互に矛盾しないという条件のもと、文脈、本明細書、およびある当業者の知識から明らかになるように、本開示の範囲内に含まれる。付加的な利点および態様は、以下の詳細な明細書および請求項を考慮することで明らかになるであろう。

【0 0 1 7】

50

[0034]一態様では、分析中の生体試料を保持する基板上に分配されることになる流体の補給量の概算方法が開示される。方法は、撮影画像を生成するために撮像システムを使用して、生体試料を保持する基板上に分配される流体の画像を撮影するステップであって、流体が基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められているステップと、基板上に分配され、基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められた流体の流体境界を識別するために撮影画像を解析するステップと、流体境界から決定された流体幅を使用して、基板上に分配された流体の流体体積を計算するステップと、計算流体体積および所定の流体体積に基づいて流体の補給量を計算するステップとを含む。

【0018】

[0035]本明細書で使用されるように、「流体幅」は、カバーガラスと下層の基板との間の空間内にある液体の1つまたは複数の観察される幅を示し、より一般には、撮影画像内で観察されるような液体によって占有される面積の計算を可能にする1つまたは複数の測定値を示す。その最も単純な形状では、流体は、カバーガラス下に正方形または長方形の形状を占有すると見ることができ、液体の測定された単一の幅は、カバーガラスと基板との間の空間の既知の形状に基づいた体積計算を支援するのに十分である。別法として、単一の幅は、既知の体積を空間に置き、観察される対応する幅を測定することによって作成される検量線と共に利用され得る。「流体幅」対体積の関係への数学的なフィッティング（一次またはそれ以上の関数、対数、指数関数、および他の周知のカーブフィッティング関数など）は、その上で計算体積が測定済みの流体幅から決定され得る検量線を提供し得る。流体は、流体の基板との相互作用に応じて、または流体がたとえば蒸発によって流体がなくなるようにカバーガラスと基板との間の空間から引き離されるので、通常、卵形または他の幾何学的形状のように見え得る可能性もある。したがって、画像は、1つまたは複数の方向のいくつかの幅から流体本体の複数の部分の体積を計算し、計算体積を提供するためにそれらを組み合わせるための原理を提供し得る。全くさらに洗練された実施形態では、カバーガラスと下層の基板との間の空間内の流体によって占有される面積は、液体本体または本体の集合が画像分析方法によって分離され得る一連の幾何学的形状の面積を合計することによって決定され得る。全体的に、カバーガラスと基板との間の空間の形状の図形は、空間内の流体の体積を概算するために、1つまたは複数の「流体幅」の組合せで決定され、使用され得る。

【0019】

[0036]具体的な実施形態では、開示される方法は、撮影画像内にエラーまたは異常があるか否かを判断するためにフレームチェックを実行するステップをさらに含み、フレームチェックが撮影画像内にエラーまたは異常を検出する場合、撮影画像がフレームチェックを通過するまで、またはフレームチェックのエラー反復最大回数に到達するまで、画像を繰り返し撮影する。さらに具体的な実施形態では、カバーガラスが、基板を横断して流体を動かす可動カバーガラスであり、方法は、基板上に分配された流体の流体位置を決定するステップと、流体位置を所定の位置と比較するステップとをさらに含む。流体位置が所定の位置の外側にあるとき、画像は、流体が可動カバーガラスによって所定の位置へ移動されるまで、繰り返し撮影され得て、流体位置が所定の位置内に入った後、流体体積は計算され得る。別のさらに具体的な実施形態では、フレームチェックを実行するステップは、撮影画像内の暗画素に対する明画素の比を計算するステップを含み、撮影画像内で暗画素に対する明画素の比が約50%よりも大きいとき、画像は、フレームチェックを失敗し、撮影画像内で暗画素に対する明画素の比が約50%よりも小さいとき、画像は、フレームチェックを通過する。また別のさらに具体的な実施形態では、フレームチェックを実行するステップは、体積差を得るために、計算流体体積を所定の流体体積または少なくとも1つの事前に計算された体積と比較するステップを含み、体積差と所定の流体体積または事前に計算された体積との比の絶対値が、流体の所定の蒸発速度を使用して計算された差よりも大きいとき、画像は、フレームチェックを失敗する。なおいっそうさらに具体的な実施形態では、フレームチェックを実行する開示される方法は、フレームチェックエラー反復最大回数に、たとえば約5回の反復に到達した場合に、ユーザに通知するステップを

さらに含む。

【0020】

[0037]別の具体的な実施形態では、撮像システムは、カバーガラス上に配置されたカメラと、少なくとも2つの光源とを含み、第1の光源は、第1の光源から発せられる第1の光が、カメラの視野（FOV）内にあるように位置決めされ、第2の光源は、第2の光源から発せられる第2の光が、カメラの視野外にあるように位置決めされ、暗視野撮像用に構成された撮像配置を提供する。さらに具体的な実施形態では、暗視野撮像は、撮影画像を分析するとき、流体境界を識別するために、方法において使用される。別のさらに具体的な実施形態では、撮影画像を分析するステップは、流体境界を識別するために、動作に基づいた前景検出などの前景検出を撮影画像に適用するステップを含む。たとえば、流体が透明な流体であるとき、流体動作に基づいた前景検出は、流体境界を識別するために使用され得る。さらに別のより具体的な実施形態では、流体が着色された流体であり、色しきい値検出が、流体境界を識別するために、方法において使用される。ノイズが、撮影画像のバックグラウンドから除去され得る。別の具体的な実施形態では、カメラとカバーガラスとの間の距離は、約38.1cmから約50.8cmの間（約15から約20インチの間）である。

10

【0021】

[0038]開示される方法の別の具体的な実施形態では、流体体積を計算するステップは、計算流体体積を提供するために流体幅を検量線と比較するステップを含み得て、検量線は、対応する流体幅に対する既知の流体体積をプロットすることによって準備される。さらに具体的な実施形態では、検量線は、一次の検量線である。他の具体的な実施形態では、開示される方法は、撮影画像内の気泡を識別するために円形検出を実行することによって、基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められた分配された流体内の気泡を検出するステップをさらに含み得る。気泡体積は、気泡の数および各気泡の気泡体積を計算することによって補償され得て、総気泡体積は、流体幅を使用して決定された計算体積から減じられ、補正計算体積を提供する。以下にさらに詳細に示すように、補給量を計算するためにそのような「気泡補償」体積を使用することは、決定された補給量に改善された精度をもたらす。

20

【0022】

[0039]別の具体的な実施形態では、開示される方法は、補給量だけ流体体積を補給するステップをさらに含む。補給は、ロボットのピペッタなどの流体ディスペンサ、貯蔵部から流体を給送する流体ライン、または機械的ディスペンサを使用して自動的に実現され、あるいは手動的に実現され得る。組織を染色する試薬などの流体の補給は、同一の流体の追加によってなされ得て、または補給は、試薬が中に溶存または懸濁され蒸発などによって失われる、溶媒の追加であり得る。

30

【0023】

[0040]他の具体的な実施形態では、開示される方法は、可動カバーガラスの位置と流体位置との間に通常は相関があるので、流体位置を決定するために、可動カバーガラスの位置を利用するステップ（画像撮影をトリガするために使用され得る）をさらに含み得る。可動カバーガラスの位置が所定領域の外側にある場合、流体位置は、所定位置の外側にある。さらに具体的な実施形態では、可動カバーガラスは、流体を転がすカバーガラス（fluid rolling cover）を含み得て、所定の領域は、流体を転がすカバーガラスの位置に対する流体位置の動作の遅れを補償するために、流体を転がすカバーガラスの中心線からオフセットしている。さらにより具体的な実施形態では、開示される方法は、流体を転がすカバーガラスが、基板を横断して流体を動かそうとするとき、流体を転がすカバーガラスの中心線に対する流体の動作の方向を決定するステップをさらに含む。

40

【0024】

[0041]別の態様では、分析中の生体試料を含む基板上に分配される流体補給量を概算するシステムが開示され、ここで流体は基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められて

50

いる。開示されるシステムは、基板およびカバーガラス上に配置されたカメラと、少なくとも2つの光源とをそれぞれ自体が含む、画像取得記憶システムを含む。第1の光源は、第1の光源から発せられる第1の光が、カメラの視野（F O V）内にあるように位置決めされ、第2の光源は、第2の光源から発せられる第2の光が、カメラの視野外にあるように位置決めされ、それにより暗視野撮像用に構成された撮像配置を作成する。システムは、画像取得記憶システムに動作可能に結合されたプロセッサと、プロセッサに動作可能に結合されたメモリとをさらに含む。メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに一定の動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するように構成される。これらの動作は、撮影画像を生成するためにカメラを使用して、生体試料を保持する基板上に分配される流体の画像を撮影することと、基板上に分配され、基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められた流体の流体境界を識別するために撮影画像を解析することと、流体境界から決定された流体幅を使用して、基板上に分配された流体の流体体積を計算することと、計算流体体積および所定の流体体積に基づいて流体の補給量を計算することを含む。具体的な実施形態では、カメラとカバーガラスとの間の距離は、約38.1 cmから約50.8 cmの間（約15から約20インチの間）である。ある実施形態では、システムは、プロセッサの制御下の補給ディスペンサをさらに含み、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、補給ディスペンサに流体補給量をカバーガラスと基板との間の空間に送達させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。

10

【0025】

20

[0042]開示されるシステムの具体的な実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに撮影画像内にエラーまたは異常があるか否かを判断するためにフレームチェックを実行することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成され、フレームチェックが撮影画像内にエラーまたは異常を検出する場合、プロセッサは、撮影画像がフレームチェックを通過するまで、またはフレームチェックのエラー反復最大回数に到達するまで、画像を繰り返し撮影する。さらに具体的な実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに撮影画像内の暗画素に対する明画素の比を計算することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成され、撮影画像内で暗画素に対する明画素の比が約50%よりも大きいとき、画像は、フレームチェックを失敗し、撮影画像内で暗画素に対する明画素の比が約50%よりも小さいとき、画像は、フレームチェックを通過する。別のさらに具体的な実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに体積差を得るために、計算流体体積を所定の流体体積または少なくとも1つの事前に計算された体積と比較することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成され、体積差と所定の流体体積または事前に計算された体積との比の絶対値が、流体の所定の蒸発速度を使用して計算された差よりも大きいとき、画像は、フレームチェックを失敗する。さらに別のより具体的な実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに、フレームチェックエラー反復最大回数に到達した場合に、ユーザに通知することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。他のさらに具体的な実施形態では、フレームチェックエラー反復最大回数は、約5回の反復である。

30

40

【0026】

[0043]開示されるシステムの別の実施形態では、カバーガラスが、基板を横断して流体を動かす可動カバーガラスであり、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに、基板上に分配される流体の流体位置を決定することと、流体位置を所定の位置と比較することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。流体位置が所定の位置の外側にあるとき、流体は、可動カバーガラスによって所定の位置へ移動され、流体位置が所定の位置内に入った場合、流体体積を計算する。

【0027】

50

[0044]開示されるシステムの具体的な実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、流体境界を識別するために暗視野撮像を適用する、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。他の具体的な実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、流体境界を識別するために前景検出を撮影画像に適用する、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。より具体的な実施形態では、体積が計算される流体は、透明な流体であり、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、流体境界を決定するために動作に基づいた前景検出を適用する、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。他のより具体的な実施形態では、体積が計算される流体は、着色された流体であり、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、流体境界を決定するために色しきい値検出を適用する、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。他の実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、撮影画像のバックグラウンドからノイズを除去する、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。

10

【0028】

[0045]開示されるシステムのさらに他の実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに、計算流体体積を提供するために流体幅を検量線と比較することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成され、検量線は、対応する流体幅に対する既知の流体体積をプロットすることによって準備される。具体的な実施形態では、検量線は、一次の検量線である。

【0029】

20

[0046]システムのさらなる実施形態では、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに、撮影画像内の気泡を識別するために円形検出を実行することによって、基板とカバーガラスとの間の空間に閉じ込められた分配された流体内の気泡を検出することと、気泡の数および各気泡の気泡体積を計算し、流体幅を使用して決定された計算体積から全気泡体積を減じることによって気泡体積を補償して、補正計算体積を提供することと、補給量を計算するために補正計算体積を使用することを含む動作を実行させる、デジタルコード化された命令を記憶するようにさらに構成される。さらなる実施形態では、自動化された補給ディスペンサも、プロセッサの制御下であり、メモリは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに補給ディスペンサが流体補給量をカバーガラスと基板との間の空間に分配するようにさせる、デジタルコード化された命令を記憶するよう

30

【0030】

[0047]以下に、曲線状のカバーガラスを利用する、生体試料が載せられた基板に、基板を横断して「転がされる (rolled)」流体を適用する具体的なシステムに関して論じられるが、開示される方法およびシステムは、(顕微鏡のスライドガラスまたは質量分析試料基板などの) 基板と、生体試料に適用されることになる流体が中に配置され得る(毛管現象空間などの) 空間を形成するために基板から間隔を空けられる(カバースリップなどの) カバーガラスとを含む任意のシステムで使用され得ることが理解されるであろう。カバーガラスは、固定式または連結式であっても、あるいはそうでなければ、流体に動きを与えるためにカバーガラスを動かす機構による可動式であってもよい。固定式のカバーガラスを含むシステムの例は、US 20140329270、US 20150253225、US 20130196339、US 20030138353、US 8932543、およびUS 20150031071で開示された例を含む。カバーガラスと基板との間の空間の高さを変化させるために角度式に動かされるカバーガラスを含むシステムの例は、US 7476543、US 8454908、およびWO 2006116039を含む。

40

【0031】

[0048]ここで図1を参照すると、いくつかの実施形態では、撮像システム(100)は、カメラ(125)ならびに前部光源(110)および後部光源(120)を含み得る。他の実施形態では、撮像システムは、1つ以上のカメラ、1つ以上の前部光源、および1つ以上の後部光源を含み得る。ある実施形態では、撮像システムの構成要素のいくつかま

50

たは全ては、試料処理システム上に搭載され得る。撮像システムは、照明し、試料処理システムでの1つまたは複数の基板の画像を撮影するために使用され得る。試料処理システムは、試料を横断して流体を移動させるための流体動作機構と、流体を試料に追加するための流体ディスペンサ、および流体を試料から除去するための流体除去装置を有する、流体交換システムとを含み得る。ある実施形態では、流体動作機構は、流体ローラ、すなわち流体を転がすカバーガラス(130)または「ARC」を含み得る。本方法およびシステムで使用され得る流体を転がすカバーガラスの実施形態は、通常指定される「Specimen Processing Systems and Methods for Holding Slides (標本処理システムおよびスライドガラスを保持する方法)」という名称の2015年11月12日公開の米国特許出願公開第2015/0323776号で説明されており、その明細書は参照により本明細書に組み込まれる。たとえば、流体を転がすカバーガラスは、表面、タイル、帯状体、またはスライドガラス上で標本を処理するために試薬流体を操作することが可能となる任意の構造であり得る。流体を転がすカバーガラスは、スライドガラスに沿って転がるまたはそうでなければ移動する非平面の流体操作表面を有し得る。流体を転がすカバーガラスは、全体がまたは部分的に、重合体、プラスチック、エラストマ、複合材、セラミクス、ガラス、または任意の、十分に半透明な、試薬流体および標本と化学的に共存できる材料からなり得る。

【0032】

[0049]他の実施形態では、流体動作機構は、分析中の1つまたは複数の試料を有する1つまたは複数の染色カセットを含み得る。試料処理システム内のカセットによって保持される組織試料の各々は、分析によって分析されることになる1つまたは複数の標本を保持するスライドガラス(102)を含み得る。試薬および/または染料などの1つまたは複数の流体(105)は、流体ディスペンサシステムによって標本に適用され得る。ある実施形態では、試薬および/または染料56は、それだけに限定されないが、抗体希釈液、プロテアーゼ3、反応緩衝液、システム流体、HRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)抑制体、抗体、HQLINKA、HRP多量体、 H_2O_2 、DAB(3,3'-ジアミノベンジン)、銅試薬、ヘマトキシリン(HTX)、プローブ試薬、および青味試薬を含み得る。カバーガラスは、次に標本ならびに試薬および/または染料の上に配置され得る。いくつかの実施形態では、カバーは、透明または半透明の固体プラスチックまたはアクリルであり得て、異なる色の色合い、たとえば、黄色の色合いを、他の実施形態では有し得る。さらなる実施形態では、カバーは、透明な流体であり得る。開示されるシステムおよび方法で使用され得る試料処理システムの例は、米国特許出願公開第2015/0323776号、および通常指定される「Apparatus and Method for Biological Sample Processing (生物学的サンプル処理用装置と方法)」という名称の2014年11月11日登録の米国特許第8,883,509号でさらに説明されており、その明細書は参照により本明細書に組み込まれる。

【0033】

[0050]撮像システムの適切なカメラおよび照明は、画像分析、体積計算、および流体体積検知のための基板およびカバーガラスの高品質画像の確保を支援する。画像内で流体縁部および標本を撮影するために、十分な分解能(または画素ごとの距離)および良好なコントラストを有することが望ましい。例示的な実施形態では、 1600×1200 画素(2メガピクセルすなわち2MP)カメラが使用され得る。別の実施形態では、カメラは、およそ 988×740 mmの視野(FOV)および約 $61.25 \mu m$ /ピクセルの分解能を有する35mm固定焦点距離レンズを含み得る。しかしながら、他の実施形態では、カメラは、2メガピクセルよりも多いことも少ないこともあり、固定焦点距離は、35mmより長いことも短いこともあり、視野は、 988×740 mmより大きいことも小さいこともあり、かつ/あるいは分解能は、約 $61.25 \mu m$ /ピクセルより高いことも低いこともあり得る。さらに別の実施形態では、カメラは、 0.16 mmまたはより低い画素スケール(または分解能)を有し得る。さらなる実施形態では、カメラは、より小さいFOVだがより高い分解能を有する50mm固定焦点距離レンズを使用し得る。例示的な実施

形態では、35mm固定焦点距離レンズが、少なくとも3つのスライドガラスを同時に撮像するとき使用され得る。より多くの撮像されるスライドガラスがある場合、画像品質が妥協されないように、画素アレイのサイズは、増大され、レンズの焦点距離は、短縮され得る。

【0034】

[0051]いくつかの実施形態では、フレームレートは、視野を横断する移動する流体の速度に依存し得る。たとえば、視野が100mm／幅で、流体の最大速度が40mm／sとすれば、約60フレーム毎秒（fps）は、1200ピクセル全体で約8ピクセルのボケをもたらす、これは画像分析に用いられ得る。

【0035】

[0052]いくつかの実施形態では、カメラは、基板がカメラのFOV内にあるように、基板上の所定の距離（128）で配置され得る。ある実施形態では、カメラは、移動物体すなわち試薬および／または染料のひずみを防止するためにグローバルシャッターを有するエリアスキャンカメラであり得る。グローバルシャッターは、画像内の行ごとに沿って画素を掃引するとき、液滴領域をひずませることになるローリングシャッターよりも好適である。しかしながら、他のタイプのカメラが、他の実施形態で使用され得る。

【0036】

[0053]基板上でカメラを位置決めする所定の距離は、カメラの分解能およびカメラのFOV内で撮影されることになる基板の数に依存し得る。ある実施形態では、所定の距離は、約38.1cm～約50.8cm（約15～20インチ）であり得る。たとえば、所定の距離は、3つの基板を撮影するために49.53cm（19.5インチ）であり得る。しかしながら、他の所定の距離が、他の実施形態で使用され得る。別の実施形態では、3つ以上の基板が撮影されることになる場合、カメラは、同様の画像品質を維持するために、増大されたサイズの画素アレイと、短縮された焦点距離のレンズとを使用し得る。他の実施形態では、カメラは、さらに詳細に基板の画像を撮影するために、より高い分解能、すなわちより低い画素毎の距離、およびより小さい視野を有するレンズを有し得る。

【0037】

[0054]いくつかの実施形態では、試薬の流体境界（107）は、組織試料が色を有するときでも、背景から容易に識別され得るように、照明される。流体境界（107）を照らすために、組織のスライドガラス（102）の、後部近傍に配置された1つの光源（120）、および前部近傍に配置された他の光源（110）の2つの光源が使用され得る。いくつかの実施形態では、前部光源は、LED発光体であってもよく、後部光源は、別のLED発光体であってもよい。いくつかの実施形態では、光源は、基板を照明するために使用される白色光を各々生成してもよい。いくつかの実施形態では、前部光源（110）および／または後部光源（120）は、照明固定具と共に使用する照明装置に組み立てられ得る。一例として、光源は、白熱電球、発光ダイオード（LED）、または蛍光灯によって実装されてもよい。しかし、他の光源のタイプおよび光のタイプも、他の実施形態では可能である。図1の実施形態に示すように、前部光源（110）は、カメラの視野内に配置され、光（111）を基板の1つの側面の方に向け得て、一方、後部光源（121）は、カメラの視野外に配置され、第2の光（121）を基板の他方の側面の方に向け得る。他の実施形態では、前部光源および後部光源のうち1つまたは両方が、カメラの視野の内側または外側のどちらかであり得る。

【0038】

[0055]代替の実施形態では、撮像の図式は、分析プロセスの監視に使用され得る。より高い分解能を有するカメラおよびより小さい視野を有するレンズが、より良好に詳細に組織領域を撮像するために使用され得る。有利なことに、前部光源および後部光源は、基板に均一な照明を提供するために基板の周りに配置され得て、それにより、結果は照明によって偏らされたり、ゆがめられたりしない。

【0039】

[0056]ある実施形態では、後部光源（120）は、流体内の流体境界（107）または

10

20

30

40

50

縁部を明るくする暗視野撮像を提供するためにカメラの視野外に配置され得て、その結果、流体の縁部または境界（１０７）は、暗い通常の背景に対して強いコントラストを有する。さらに、暗視野撮像を用いることによって、影または光源を遮断するピペットからの妨害などのいくつかの他の問題が、さらに解決され得る。代替の実施形態では、明視野撮像が、カメラ（１２５）の視野内に前部光源（１１０）を配置することによる撮像システムによって使用され得る。

【００４０】

[0057]図２に示すように別の実施形態では、開示されるシステムは、基板とカバーガラスとの間の空間内の流体体積（１０９）を追跡するためにリアルタイム補給システム（ＲＴＲＳ）を提供し、もしあるなら流体交換システム（２８０）によって、試料に追加されるまたはそこから除去される流体（２７９）の量を決定するように構成される。ＲＴＲＳは、撮像システム（１００）、画像分析装置（２４０）、体積概算装置（２６０）、ディスペンサ体積計算装置（２７０）、流体交換システム（２８０）、およびたとえば染色カセット（５０）および流体を転がすカバーガラス、またはＡＲＣローラ（１３０）などの流体動作機構からの位置信号（１３７）を使用し得る。

【００４１】

[0058]図２でさらに示すように、リアルタイム補給システム（ＲＴＲＳ）は、メモリ（２１０）、プロセッサ（２００）、カメラおよび照明を備える撮像システム（１００）、染色カセット（５０）、ならびに補給ディスペンサ（２８０）を備える。撮像システム（１００）は、基板の画像情報（１２７）をプロセッサ（２００）内に給送し得る。染色カセット（５０）が、測定値を採取する時刻のプロセッサへの信号（１３７）を送信するとき、プロセッサ（２００）は、フィードバック制御ループを形成して、フレームチェックを実行し、ディスペンサ体積計算装置（２７０）から染色カセット（５０）への補給量（２７９）を提案し得る。一例として、ＭＡＴＬＡＢプログラムは、提案された値を、フィードバック概念を示すようにリアルタイムでユーザインタフェースに出力し得る。別の実施形態では、ディスペンサ体積計算装置（２７０）からの補給量（２７９）は、ユーザインタフェースへ提供され得て、ユーザはその後、試薬および／または染料を試料に提供するために流体交換システム（２８０）を制御することができる。別法として、フィードバック制御ループは、補給量（２７９）を送達するために、補給ディスペンサ（２８０）を染色カセット（５０）に自動的に向け得る。

【００４２】

[0059]プロセッサ（２００）は、カメラ（１２５）から取得または撮影された画像を受信するためにカメラに動作可能に接続され得る。プロセッサは、染色カセット（５０）内の流体（１３７）の位置を示すデジタル信号を受信するために、流体動作機構に付随するデジタルＩ／Ｏ装置に動作可能にさらに接続され得る。ある実施形態では、カメラからの画像は、首尾一貫した結果のために、同一の流体位置で撮影され、そして分析され得る。別の実施形態では、画像分析は、カラーまたはグレースケール画像のいずれでも実行され得る。

【００４３】

[0060]いくつかの実施形態では、メモリ（２１０）は、プロセッサ（２００）に、試料と共に用いられる試薬および／または染料などの流体量を決定するために体積（３６０）を概算することと、画像（３４０）を分析することと、どれだけの試薬および／または染料を、概算体積からの情報に基づいて流体交換システムを用いて試料へ適用するかを決定するために補給体積（３８０）を計算することとを含む、図５に示した動作を実行させる命令を含み得る。命令は、ソフトウェア、ハードウェア、ファームウェア、または任意のその組合せで実施され得る。たとえば、命令は、ソフトウェアで実施され、メモリ内に記憶される。ソフトウェアで実施されるとき、命令は、命令を取り出し、実行する命令実行装置によってまたはそれに関連して使用するための非一時的コンピュータ可読媒体上に、記憶され移送され得る。

【００４４】

[0061]一例として、プロセッサは、中央処理装置（CPU）またはデジタルシグナルプロセッサ（DSP）を含み得る。バスなどのローカルインタフェースが、プロセッサと通信し得る。そのうえ、キーパッド、キーボード、またはマウスなどの入力インタフェースが、ユーザからのデータを入力するために使用され得て、プリンタ、モニタ、液晶表示装置（LCD）、または他の表示装置などの出力インタフェースが、ユーザヘデータを出力するために使用され得る。また、通信インタフェースが、前部光源、後部光源、カメラ、流体動作機構、および流体交換システムを有する1つまたは複数のネットワークを通じて、データを交換するために使用され得る。

【0045】

[0062]RTRSによって用いられる境界検出方法は、境界検出（341）用の流体（対象）の特徴と異なる特徴を使用し得る。具体的な実施形態では、動作に基づいた前景検出が、透明な流体の境界を検知するために使用され得て、色しきい値検出が、着色された流体の境界を検知するために使用され得る。これらの方法の頑強性により、それらは、組織色変化、任意の組織形態の存在などの多様な条件で機能することが可能になる。

【0046】

[0063]いくつかの実施形態では、対象の最も明確な特徴が、検出に使用される。たとえば、動作は、それが視野内でスライドガラスに対して移動する唯一の部品であるため、透明な流体の最も明確な特徴である。アルゴリズムは、スライドガラス上の透明な流体の境界を検知するように適合され得る。たとえば、混合ガウス分布モデルの前景検出が、用いられ得る。混合ガウス分布モデルの前景検出算アルゴリズムでは、液滴の左右に配置された2つの流体液滴の境界が、流体体積を計算するために抽出され得る。モデル用パラメータは、実験により選択され、試験は、図3Aおよび3Bによって明白にされたように、信頼できる結果を作成した。図3Aは、透明な流体の撮影画像を示し、図3Bbは、前景検出後のその図3Aの撮影画像を示す。動作に基づいた前景検出方法は、縁どられた透明な流体の識別には好適であるが、この方法を用いたHTXなどの着色された試薬の検出は、図3Eeおよび3Fに示すように、問題があることを証明している。図3Eは、着色された試薬の撮影画像を示し、図3Fは、前景検出後のその図3Eの撮影画像を示す。視野内での移動領域が非常に広いので、プログラムがフレームの背景を識別することは、困難になる。

【0047】

[0064]染料または着色された試薬の縁部または境界を識別するために、色しきい値検出算アルゴリズムは、流体の明確な色特徴により、着色された試薬用に好適である。組織が、染色処理中に試薬と同様の色に染められるが、試薬の強度は、さらにより強く、それゆえ色しきい値検出方法は、試薬を染料された組織から識別し得る。検出を実行するために、画像は、色相、彩度、および明度（HSV）カラーマップに転送される。適切な色相範囲が試薬の領域を抽出するために選択される。ヘマトキシリンの一例を図3Ccおよび3Dに示す。図3Cは、着色された試薬の撮影画像を示し、図3Dは、前景検出後のその図3Cの撮影画像を示す。色しきい値前景検出アルゴリズムでは、試薬の領域が抽出され得て、流体体積は、抽出された領域から計算され得る。

【0048】

[0065]カバーガラスおよび基板が互いに対して角度式に動かされる他の実施形態（US7476543、US8454908、およびWO2006116039で開示されたシステムなどの）では、流体本体の一方の境界は、固定位置にあり得て、ただ1つの流体本体の境界が、開示された方法およびシステムで使用する流体幅を決定するために監視される必要があり得る。

【0049】

[0066]通常、補給は、体積計算が透明な流体境界を用いた良好な画像を使用して決定されるとき、最も正確である。染色プロセスでは、体積概算の精度に影響を及ぼし、それにより補給量の計算に影響を及ぼし得る問題に遭遇し得る。たとえば、図4Aは、視野を通過し動くピペットアームを有するフレームの前景検出結果の画像である。このフレームは

、過大な計算体積をもたらし得て、補給の提案に使用されるべきでない。本問題を克服するために、フレーム内の明画素の比が、フレームチェックの一部として計算され、明画素が、通常予測されるまたは「暗い」画素に対してフレームの約50%以上存在するとき、補給が提案されないことを保証する。すなわち、受け入れ可能なフレームは、通常予測されるまたは「暗い」画素に対して約50%未満の過大な明画素を有する。通常予測されるまたは「暗い」画素が、画像が撮影される際にフレームを通過して動くピペットアームなどの物体からの妨害がないとき、分析中の試料の画素強度に対応し得る画素である。

【0050】

[0067]別の実施形態では、正確な体積計算は、流体境界の一方の部分が視野内にない場合、見出され得ない。図4Bは、流体境界の一部が視野内にない場合の、前景検出の結果画像の一例である。たとえば、流体境界は、大きな体積(200 μ L以上)がより高速度(100mm/sより大きい)で転がるとき、範囲外に、すなわち視野内にない可能性がある。さらなる実施形態では、前景分析が正しい流体境界をもたらすことができないとき、正確な体積計算は、見出し得ない。これらの場合、RTRSは、先行の体積を現在の体積と比較し得る。2つの体積間に大きな差がある場合、システムは、現在の体積を決定するために後続の測定を用い得る。すなわち、2つの計算体積間に大きな差があるとき、フレームチェック(370)は、体積測定を却下し、新しい画像を取得するプロセスに戻り得る。

【0051】

[0068]図5を参照すると、RTRSプロセスは、画像およびSPSデジタル信号出力を取得するために、カメラおよびデジタル入力/出力(I/O)装置に接続する。画像および信号を用いて、RTRSプログラムは、適切な補給体積を提案するために、画像分析、エラーチェック、および体積計算を実行する。プロセスの開始時点で、カメラおよびI/O装置段取りが開始される(310、320)。露出、明るさ、およびゲインなどのカメラのパラメータが、このステップで設定される。カメラおよびI/O装置が設定された後、プロセスは、カメラからの画像取得(330)のループへと進み、そして取得された画像の分析(340)へと進む。前景検出アルゴリズムは、流体境界を識別するために、画像分析装置によって撮影画像へ適用され得る(341)。ある実施形態では、画像分析装置は、機械学習によって画像背景を識別するために画像または動画と共に継続的に提供され得る。画像分析装置は、処理される画像から任意のノイズを除去し得る(342)。体積計算は、I/O装置が、適切なARC位置、すなわち適切なカバーガラス位置を示す信号を受信するとき、流体測定値を作成するためになされ得る(350)。適切なI/O信号が受信されなかったとき、プロセスは、別の画像を取得することになる。

【0052】

[0069]ある実施形態では、試薬および/または染料の体積は、システム(または「ARC」)図形および測定された流体幅(108)すなわち検出された流体境界間の距離に基づいて、計算され得る(360)。ある実施形態では、計算体積は、体積計算に使用される前提および/または計算精度に影響を及ぼし得る他の可能性のある要素を打ち消すために、較正される必要があり得る。フレームチェック(370)は、次に、フレームおよび対応する体積計算が受け入れ可能であるか否かの判定を実行する。フレームチェックにより、過大な体積変化およびピペットのFOV遮断などの他の異常なフレーム状況を有するフレームを除去することによるエラーチェックを可能にする。フレームチェックが不良フレームを識別する場合、すなわちフレームに関連したエラーまたは異常がある場合、プロセスは、画像取得へと戻る。体積計算が受け入れ可能でない場合、すなわち体積計算に関連したエラーまたは異常がある場合、プロセスは、別の画像取得へと戻る。他の方法では、補給量は、ディスペンサ体積計算装置によって計算され(380)、次のループが、別の画像を取得し始める。

【0053】

[0070]いくつかの実施形態では、ARC位置は、測定点を識別するためにフレームごとに取得され得る。ARC位置は、ステップモータ位置によって決定される。図6に示すよ

うに、ステップモータ位置は、流体がスライドガラスの縁部付近にあるとき、中心から＋4500および－4500付近にある。理想的には、測定値は、ARC位置0が最適の測定点を意味する、スライドガラスの中心で取得されるべきである。しかしながら、いくつかの実施形態では、流体は、動作中ARCの背後に引っ張られており、それゆえ、ARC位置が＋4500からの場合、－300付近のARC位置が測定点として採られるべきである。RTRSは、ARC位置を周期的にチェックし得るので、SPSは、ARC位置が－300と＋4500との間にある場合は、信号1に、他の位置にある場合は、信号0に調整される。したがって、信号が記録され、先行の信号が1であり、現在の信号が0になる場合、ARC位置が＋4500から動いており、体積計算およびフレームチェックを実行するためにRTRSに信号を出す測定点である－300を横切っている。

10

【0054】

[0071]図6に示すように、カバーガラス位置は、I/O信号によって提供されるように、画像を毎回取得され得て、またはフレームが、基板とカバーガラスとの間の空間内の試薬および／または染料の位置を識別するために取得される。カバーガラス位置は、カバーガラスを動かしそれにより試薬および／または染料を試料上で動かす、流体動作機構内のステップモータ位置によって決定され得る。ある実施形態では、ステップモータ位置および対応するカバーガラス位置は、中心位置から、スライドガラス（図6Bを参照のこと）の右端の試薬および／または染料に対応する一方の端部位置を示す＋4500付近、ならびにスライドガラス（図6Aを参照のこと）の左端の試薬および／または染料に対応するもう一方の端部位置を示す－4500付近にあり得る。測定を行うための適切なカバーガラス位置は、試薬および／または染料が、スライドガラスの中心に配置されているときであり得る。図6Cは、試薬および／または染料が、図6Cで右から左へ動くときの中心位置に対応するカバーガラス位置0にある、試薬および／または染料を示し、このとき、カバーガラス位置は、スライドガラスの中心にある試薬および／または染料に対応しない。試薬および／または染料が、カバーガラスと、基板との間の空間内を動くので、適切なカバーガラス位置は、移動する方向ならびに試薬および／または染料の粘性によって決まる、基板の中心（カバーガラス位置0に対応する）に対する所定の場所にあり得る。別の実施形態では、図6dに示すように、試薬および／または染料は、測定点にあり、すなわち、試薬および／または染料は、試薬および／または染料が基板との間の空間内を右から左へ動くとき、スライドガラスの中心、カバーガラス位置－300にある。図6A～6Dで示した実施形態は、カバーガラス位置に対する試薬および／または染料の位置を示すために使用される概略図であり、構成要素の相対的サイズに関するいかなる詳細も提供することは意図されない。

20

30

【0055】

[0072]ある実施形態では、RTRSは、カバーガラス位置を周期的にチェックし得る。I/O信号を生成する流体動作機構の検出機構は、カバーガラスが、カバーガラス位置＋4500から移動するとき、カバーガラス位置－300を通過するか否かを判定し得る。検出機構は、カバーガラス位置が－300と＋4500との間にある場合、I/O信号を「1」に調整し、他の位置では、I/O信号を「0」に調整し得る。RTRSは、I/O信号を記録または記憶し得て、先行のI/O信号が1に等しく、目下のI/O信号が0に変わった場合、このことは、試薬および／または染料が、＋4500のカバーガラス位置から移動し、測定に適切な位置にある試薬および／または染料に対応する－300のカバーガラス位置をまさに横切っていることを示し得る。別の実施形態では、検出機構は、カバーガラス位置に対応する信号を送信し得て、RTRSは、検出機構からの信号を評価して、信号からの対応するカバーガラス位置が、カバーガラス位置の所定の場所の所定の範囲内にあるか否かを判断し得る。たとえば、RTRSは、試薬および／または染料が基板との間の空間内を右から左へ動くとき、カバーガラス位置がおよそ－200と－400との間にある場合、正のI/O信号を示し得る。

40

【0056】

[0073]上述のように、試薬および／または染料は、カバーガラス位置の中心の背後に引

50

っ張られている可能性があるので、測定は、基板位置の中心点からわずかに離れて行われるべきである。たとえば、流体動作機構の中心点（138）にある画像を取得するとき、試薬および／または染料が右に動いている場合、試薬および／または染料の大部分は、中心点の左側にあり、試薬および／または染料が左に動いている場合、試薬および／または染料の大部分は、中心点の右側にあり得る。図7に示すように、ARCの中心点（138）が黒線で印をつけられているとき、異なる流体位置が観察され得て、一方、画像はARC動作の中心点で取得される。図7Aおよび7Bでは、流体が右に動くとき背後に引っ張られているので、流体本体は、中心点（138）の左側にあることを見出すことができる。同様に、図7Cおよび7Dに示すように、流体が左へ戻るとき、同一の現象が見出し得る。

10

【0057】

[0074]いくつかの実施形態では、RTRSが一定のカバーガラス位置で画像を取得し得るので、RTRSは、どのように試薬および／または染料が、異なる転がり速度および試薬体積で移動するのか、どのように異なる粘性を有する異なる試薬が、転がる動作中に振る舞うのかを理解するために、試薬および／または染料の動作と、流体動作機構との間の関係の特徴づけるために使用され得る。

【0058】

[0075]ある実施形態では、RTRSは、画像取得、カバーガラス位置取得、および画像分析を約0.06秒内で実行することができ、およそ毎秒16フレームのフレームレートを有し得る。処理時間は、画像分析を実行するために用いられるプログラミング言語、および画像分析を実行するために用いられるコンピュータの性能に基づき得る。処理時間の改善は、より効果的なプログラミング言語またはより良好に実行するコンピュータを使用することによって、獲得され得る。

20

【0059】

[0076]図8の例示的な実施形態に示すように、RTRSのインターフェースは、4つのパネルを備える。上段左側のパネルは、カメラによって取得された目下の画像を示す。上段右側のパネルは、ヘマトキシリンの場合の、混合ガウス分布モデルまたは色しきい値方法を用いて検出された前景を示す。下段左側のパネルは、前景に基づいて計算された目下の体積を示す。測定体積の低下が、観察され得る。たとえば、120秒の転がしの後、8 μ Lの試薬が蒸発した。下段右側のパネルは、ユーザ入力 of 目標体積、オフセット体積、および測定体積に基づいて示唆される補給を示す。

30

【0060】

[0077]流体領域での気泡形成は、測定される流体幅を増大させ、RTRSに目下の体積を過大評価させることになる。現象は、カバーガラスと用いられるとき、抗体希釈液などの試薬内で発生し得る。したがって、気泡を除去または補償する方法が必要である。ある実施形態では、流体内部の気泡の円形状が、気泡の存在を検出するために用いられ、次に気泡の補償が実行され得る。円形検出方式は、取得される画像の検出される前景内の任意の気泡を識別するために用いられ得る。例示的な円形検出方式は、画像内の気泡を識別するためにハフ変換に基づき得る。画像内の気泡数を計算し、気泡の体積補償を決定することによって、試薬および／または染料の体積は、試薬および／または染料内の気泡の存在下でより正確に測定されることが可能になる。

40

【0061】

[0078]図9に示すように、検出される気泡は、円を描く。図9は、さらに示す。気泡がない場合（目下の体積）と、気泡補償がある場合（補償ありの目下の体積）との測定蒸発速度の比較を示す。結果は、1分の転がし操作後にわずか4 μ Lほどの差が見られた。補償なしで、目下の体積は、約151 μ Lから約156 μ Lへの増加として計算され得て、一方気泡補償ありでは、目下の体積は、141 μ Lから134 μ Lへと減少することになると計算される。気泡補償は、図8の目下の体積の同様の傾向に追随し、それは、予測されたように、蒸発により体積損失を示す。

【0062】

50

[0079]いくつかの実施形態は、A R C図形およびが測定される流体幅に基づいて体積を概算するために一次近似を提供する体積計算方法を使用する。この手法は、より良好な体積評価のための検量線を必要とする。検量線を導出するために、70から250 μL の異なる体積が手動で分配され、転がしプロセスで各体積少なくとも5回ずつテストされた。散布図に既知の分配された体積(209)と、計算体積(109)とをプロットすることによる。検量線が、 $R^2 = 0.9871$ を有する検量線図10に示すように見出され得る。さらなる実施形態では、改善された検量線が、検量線のより高い次元を用いて導出され得る。

【0063】

[0080]

10

【実施例1】

【0064】

[0081]以下は、振動、ピペットによる視野遮断などのシステム妨害を伴う全負荷状態で試験されるR T R Sの非限定的な実施例である。扁桃腺の試料でのC D-20染色処理が実行され、記録された。結果は、検出システムが流体の領域/縁部を識別できるか否かによって評価された。

【0065】

[0082]染色分析での6つの処理が、R T R Sを試験するために代表的な事例として列挙された。これらの6つの事例は全て、補給を要するA R Cシステムを用いて実行された目下の分析プロセスを表す。事例毎に、目標体積が、ピペットによって10回手動で分配され、最初の5データ点が、測定体積とみなされ、事例毎に総数で50のデータポイントとなる。蒸発が5データポイント後に効力を生じ始めるので、最初の5ポイントのみが選択された。事例毎に50データポイントを収集した後、母集団に基づく平均値および標準偏差が、性能を評価するために計算された。未処理のデータが、測定値の分布を示すために四角点を用いてさらに表示されている。

20

【0066】

[0083]扁桃腺の試料に関する全装填されたC D-20染色プロセスが記録され、前景検出を試験するために使用された。図11に示すように、前景検出がカメラの振動および組織色の変化に耐性を示めすことが見出された。たとえば、図11Bは、組織が色を変化させていく、すなわち図11Aの組織からさらに染色されていくことを示す。明視野撮像内の流体縁部は、流体縁部が組織の背景に溶け込み得るので、組織がより暗い色になるとき観察することが困難であった。この問題は、縁部を明るくするために暗視野撮像を用いることによって解決され、その結果、縁部は、暗い通常的背景に対して強いコントラストを有した。撮像方法を変更することによって、他のA R Cシステムの陰による干渉および光源を遮断するピペットなどのいくつかの他の問題がさらに解決される。ピペット動作は、視野を遮断するためにさらに観察され、このことは、分析中不回避の処理である。したがって、それが発生することを防止するのではなく、過剰な明画素が、フレームに入り込む大きな物体を多くの場合表すので、視野内に存在するか否かを確認するために、追加の機能がフレームチェックプログラムに追加された。

30

【0067】

40

[0084]下の表1に示すように、測定体積は、目標体積に標準偏差 $\pm 1.5\%$ で一致する。このパーセンテージをマイクロリットルに逆変換すると、性能は、 $\pm 10 \mu\text{L}$ への変換を果たす。測定体積の分布は、図12で見ることができる。200 μL 付近の目標体積での分析は、より広いデータの広がりをもたらす。異なる試薬は、異なる粘性を有するので、種々のA R C位置範囲が、異なる試薬に使用されるべきであることが分かる。表内の位置範囲は、流体領域を対象領域の中央で撮影する最良の範囲を示す。最終的に、検量線が、計算体積と実際の体積との間の傾きを描写するために導出された。多様な校正定数が、各目標体積の周りの誤差を最小化するために使用された。

【0068】

[0085]

50

【0069】

【表1】

表1. 代表事例の条件および測定結果

	フローブ試薬(ハイブリッド形成法)	フローブ試薬(変性)	プロテアーゼ3	抗体希釈液	HEM (IHC)	HEM (ISH)
目標体積 (μL)	200	200	150	140	120	120
測定体積 (μL)	201.96 ± 2.09	202.10 ± 2.17	148.58 ± 1.63	139.76 ± 1.52	119.09 ± 1.05	118.37 ± 1.11
転がし速度 (mm/s)	40	50	50	50	40	40
組織状態	透明	透明	透明	透明	茶色 (染色済み)	茶色 (染色済み)
A R C位置1	0	0	-300	-300	-75	-100
A R C位置2	5000	5000	5000	5000	5000	5000
較正係数	13.128	13.128	25.128	28.128	31.128	31.128
試薬1	フローブ試薬	フローブ試薬	プロテアーゼ3	希釈液	HEM	HEM
体積 (μL)	200	200	25	100	40	60
試薬2	N/A	N/A	Apollo Wash	RB	RB	RB
体積 (μL)	N/A	N/A	125	40	80	60

【0070】

[0086] 前述したように、暗視野撮像により、物体の縁部が検出のために明るくされることが可能になる。図13Aは、照明角度とカメラ位置との間の関係を示し、図13Bは、暗視野撮像内で明るくされた縁部を有する物体を示す。暗視野撮像と明視野撮像とによって取得された透明な流体の写真が、図14で見られる。明視野撮像が、分析用の高品質画像を提供するが（図14Aおよび14B）、流体境界の暗さは、標本が染色されたとき、分析中に課題をもたらす（図14Eおよび14F）。したがって、いくつかの開示された実施形態では、暗視野撮像が、R T R Sに利用される（図14Cおよび14D）。

【0071】

[0087]

【実施例2】

【0072】

[0088] いくつかの一般に用いられる縁部検出器アルゴリズムが利用可能である。これらのアルゴリズムは、Canny、Log、Prewitt、Roberts、Sobel、およびZero Crossを含む。各エッジ検出器は、フレーム内の縁部を識別するためにそれ独自の数学モデルを使用する。図15で示したフレームは、その検出アルゴリズムを使用した縁部検出の例として使用される。

【0073】

[0089] ハフ線検出を使用する縁部検出は、R T R Sが異なる組織背景および撮像条件に直面するため、理想的方法とは見られなかった。組織形態は、一旦染色された後、流体縁部検出を悪化させ得る。さらに、異なる縁部検出方法は、異なる感度を有し得る。たとえば、弱い検出方法は、境界の片側を失敗し得て、強い検出方法は、背景内の過剰に多くの不規則な縁部を検知し、流体境界を識別困難にさせ得る。

【0074】

[0090] 多様なアルゴリズムを使用する図15Aの縁部検出を図16に示す。SobelおよびPrewitt検出器は、ヘマトキシリンの縁部をプロットすることができる。しかしながら、染料済み組織の境界も同様に観察可能である。このことは、縁部識別の歩留まりに影響を及ぼす。強い検出器は、Canny、Log、およびZero Crossの事例で示したように、過剰なノイズをプロットし得る。弱い検出器は、流体の縁部を失

10

20

30

40

50

敗し得る。多様なアルゴリズムを使用する図15Bの縁部検出を図17に示す。SobelおよびPrewitt検出器は、流体縁部を識別することがさらにできる。Robert検出器によって、流体境界の一部が明確でない結果になる。Canny、Log、およびZero Cross検出器によって、組織から過大なノイズ（またはパターン）がもたらされ、それが縁部識別を困難にする。

【0075】

[0091]染色システムは、RTRSと共存できるようにするために、列パターンを形成しないヒータを有することが好ましい。列パターンを有するヒータは、図18に示すように、性能を妥協し画像処理に影響を及ぼし得る。この問題は、着色された試薬が染料済み組織上に適用されるとき、背景内の列パターンによって生成される強いコントラストによって、より顕著になり得る。

10

【0076】

[0092]コンピュータは通常、プロセッサ、オペレーティングシステム、システムメモリ、メモリ記憶装置、入出力制御装置、入出力機構、および表示機器などの周知の構成要素を含む。コンピュータの多くの可能な構成および構成要素が、存在し、キャッシュメモリ、データバックアップ装置、および多くの他の装置をさらに含み得ることを、当業者はさらに理解されたい。入力デバイスの例は、キーボード、カーソル制御装置（たとえば、マウス）、マイクロホン、スキャナ、などを含む。出力装置の例は、表示機器（たとえば、モニタまたはプロジェクタ）、スピーカ、プリンタ、ネットワークカード、などを含む。表示機器は、視覚的な情報を提供する表示機器を含み得て、この情報は通常、論理的かつ／または物理的に画素の配列として構成され得る。入力および出力インタフェースを提供する、種々の既知または将来のソフトウェアプログラムの任意のものを備え得る、インタフェース制御装置もまた含まれ得る。たとえば、インタフェースは、1つまたは複数の図形表現をユーザに提供する、一般に「グラフィカル・ユーザ・インタフェース」と呼ばれる（多くの場合GUIと呼ばれる）ものを含み得る。インタフェースは通常、当業者に知られる選択または入力の手段を使用して、ユーザ入力を受け取ることが可能になる。インタフェースは、タッチ画面であってもよい。同様のまたは代替の実施形態では、コンピュータ上のアプリケーションは、「コマンド・ライン・インタフェース」と呼ばれる（多くの場合CLIと呼ばれる）ものを含み得るインタフェースを利用し得る。CLIは通常、アプリケーションとユーザとの間の文字に基づく相互作用を提供する。通常、コマンド・ライン・インタフェースは、表示機器を介して文字ラインとして、出力を提供し、入力を受信する。たとえば、いくつかの実施態様は、当業者に知られるUnix Shell、またはマイクロソフト社の.NET Frameworkなどのオブジェクト指向型プログラミング・アーキテクチャを利用するマイクロソフト社のWindows PowerShellなどの「シェル」と呼ばれるものを含み得る。

20

30

【0077】

[0093]インタフェースが1つまたは複数のGUI、CLI、またはその組合せを含み得ることを当業者には理解されたい。プロセッサは、インテル社製のCeleron、Core、またはPentiumプロセッサ、サン・マイクロシステムズ社製のSPARCプロセッサ、AMD社製のAthlon、Sempron、Phenom、またはOpteronプロセッサなどの市販されているプロセッサ、あるいは入手可能なまたはこれから入手可能になる他のプロセッサのうちの1つであり得る。プロセッサのいくつかの実施形態は、マルチコアプロセッサというものを含み、かつ／またはシングルまたはマルチコア構成での並列処理技術を利用することが可能にされ得る。たとえば、マルチコア・アーキテクチャは通常、2つ以上のプロセッサ「実行コア」を備える。本実施例では、各実行コアは、マルチスレッドの並列実行を可能にする独立したプロセッサとして実行し得る。さらに、プロセッサは、一般に32または64ビットアーキテクチャと呼ばれるものに構成され得るか、現在知られるもしくは将来開発され得る他のアーキテクチャ構成であり得ることを、当業者は理解されたい。

40

【0078】

50

[0094] プロセッサは通常、オペレーティングシステムを実行するが、それは、たとえばマイクロソフト社のWindows型のオペレーティングシステム、アップルコンピュータ社のMac OS Xオペレーティングシステム、多くの販売店またはオープンソースというもののから入手可能なUnixまたはLinux（登録商標）タイプのオペレーティングシステム、別のまたは将来のオペレーティングシステム、あるいはいくつかのその組合せであり得る、オペレーティングシステムは、よく知られている方法でファームウェアおよびハードウェアとインタフェースし、種々のプログラミング言語で記述され得る多様なコンピュータプログラムの機能を調整し実行するプロセッサを支援する。オペレーティングシステムは、通常プロセッサと共同で、コンピュータの他の構成要素の機能を調整し実行する。オペレーティングシステムは、全て周知の技術による、スケジューリング、入出力制御、ファイルおよびデータ管理、メモリ管理、ならびに通信の制御および関連処理をさらに提供する。

10

【0079】

[0095] システムメモリは、所望の情報を記憶するために使用し得る、コンピュータによってアクセスされ得る、種々の周知のまたは将来のメモリ記憶装置の任意のものを含み得る。コンピュータ可読記憶媒体は、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュール、または他のデータなどの情報のストレージ用の任意の方法または技術で実装された、揮発性および不揮発性媒体、取り外し可能および取り外し不可能なメディアを含み得る。実施例は、任意の一般に入手可能な、ランダム・アクセス・メモリ（RAM）、読み出し専用メモリ（ROM）、電子的に消去可能なプログラマブル読み出し専用メモリ（EEPROM）、デジタル多用途ディスク（DVD）、内蔵ハードディスクまたはテープなどの磁気媒体、読み出しおよび書き込みコンパクトディスクなどの光学的媒体、あるいは他のメモリ記憶装置を含む。メモリ記憶装置は、コンパクトディスクドライブ、テープドライブ、取り外し可能なハードディスクドライブ、USBまたはフラッシュドライブ、あるいはフロッピーディスクドライブを含む、種々の周知のまたは将来の装置の任意のものを含み得る。そのようなタイプのメモリ記憶装置は通常、個々に、コンパクトディスク、磁気テープ、取り外し可能なハードディスク、USBまたはフラッシュドライブ、あるいはフロッピーディスクなどのプログラム記憶媒体から読み出し、かつ／またはそれに書き込む。これらのプログラム記憶媒体、または現在使用されている他のものもしくは後に開発されるもののうちの任意のものは、コンピュータプログラム製品と考えられ得る。上記の内容から分かるように、これらのプログラム記憶媒体は通常、コンピュータソフトウェアのプログラムおよび／またはデータを記憶する。コンピュータ制御ロジックとも呼ばれるコンピュータソフトウェアプログラムは通常、システムメモリ内に、および／またはメモリ記憶装置に結合されて使用されるプログラムストレージデバイス内に記憶される。いくつかの実施形態では、コンピュータプログラム製品は、その中に記憶された制御ロジック（プログラムコードを含むコンピュータソフトウェアプログラム）を有するコンピュータ使用可能媒体を備えると説明される。制御ロジックは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサに本明細書で説明した機能を実行させることになる。他の実施形態では、いくつかの機能は、たとえばハードウェア状態機械を使用するハードウェア内に主に実装される。本明細書で説明した機能を実行するハードウェア状態機械の実施態様は、当業者には明らかであろう。入出力制御装置は、人間または機械の、ローカルまたはリモートの、ユーザからの情報を受け入れて処理する任意の種々の周知の装置を含み得る。そのような装置は、たとえばモデムカード、無線カード、ネットワークインタフェースカード、音声カード、または任意の種々の周知の入力装置の他のタイプの制御装置を含む。出力制御装置は、人間または機械の、ローカルまたはリモートの、ユーザへの情報を提供する任意の種々の周知の表示装置の制御装置を含み得る。ここで説明する実施形態では、コンピュータの機能要素は、システムバスを介して互いに通信する。コンピュータのいくつかの実施形態は、ネットワークまたは他のタイプの遠隔通信を用いていくつかの機能要素と通信し得る。当業者には明白であるように、測定器制御および／またはデータ処理アプリケーションは、ソフトウェアで実装されている場合、システムメモリおよび／またはメモリ記憶

20

30

40

50

装置内にロードされ、そこから実行され得る。測定器制御および／またはデータ処理のアプリケーションの全部または部分は、メモリ記憶装置の読み出し専用メモリまたは同様のデバイス内に存在し、そのようなデバイスは、先に測定器制御および／またはデータ処理のアプリケーションが、入出力制御装置を介してロードされていることを必要としない。測定器制御および／またはデータ処理のアプリケーション、またはその一部は、実行に有利なようにシステムメモリまたはキャッシュメモリあるいは両方へ、周知の方法でプロセッサによってロードされ得ることが、当業者には理解されよう。さらに、コンピュータは、システムメモリに記憶された、1つまたは複数のライブラリファイル、試験データファイル、およびインターネットクライアントを含み得る。たとえば、試験データは、検出された信号値、または合成試験またはプロセスによる1つまたは複数の配列決定に関連付けられた他の値などの、1つまたは複数の試験または分析に関するデータを含み得る。さらに、インターネットクライアントは、ネットワークを用いて、別のコンピュータ上のリモートサービスにアクセス可能にされたアプリケーションを含み得て、たとえば一般に「ウェブブラウザ」と呼ばれるものを備え得る。ここでの例では、いくつかの一般に利用されるウェブブラウザは、マイクロソフト社から入手可能なマイクロソフト・インターネット・エクスプローラ、モジラ社のモジラ・ファイアフォックス、アップルコンピュータ社のサファリ、グーグル社のグーグルクロム、または現在当技術分野で知られているもしくは将来開発されることになる他のタイプのウェブブラウザを含む。さらに、同様のまたは他の実施形態では、インターネットクライアントは、生物学のアプリケーション用のデータ処理アプリケーションなどの、ネットワークを介した遠隔情報へのアクセスが可能な特殊用途のソフトウェアアプリケーションを含み得る、またはその構成要素であり得る。

10

20

【0080】

[0096]ネットワークは、当業者によく知られる多くの多様なタイプのネットワークの1つまたは複数を含み得る。たとえば、ネットワークは、一般にTCP/IPプロトコル・スイートと呼ばれるものを通信に利用し得る、ローカルまたは広域ネットワークを含み得る。ネットワークは、インターネットと一般に呼ばれる、相互接続コンピュータネットワークの世界的システムを備えるネットワークを含み得る、または多様なイントラネットアーキテクチャをさらに含み得る。ネットワーク環境にいるユーザには、ハードウェアおよび／またはソフトウェアシステムへのおよびからの情報トラフィックを制御するために「ファイアウォール」と一般に呼ばれるもの（パケットフィルタまたは境界保護装置と呼ばれる場合もある）を利用することを好み得るユーザもいることが、当業者には理解されよう。たとえば、ファイアウォールは、ハードウェアもしくはソフトウェア構成要素またはいくつかのその組合せを備え得て、たとえばネットワーク管理者などのように、ユーザによって導入されるセキュリティポリシーを強化するように通常設計される。

30

【0081】

[0097]本明細書で使用されるとき、用語「約」は、参照数のプラスマイナス10%を示す。

[0098]多様な変形例が当業者には、本明細書で説明したそれらの実施形態に加えて、前述の記述から明らかになるであろう。そのような変形例は、添付の請求項の範囲に含まれることがさらに意図されている。本出願で引用された各参照は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0082】

[0099]請求項で引用される参照番号は、例示であり、特許局による審査を容易にするためだけのものであり、何ら限定しない。いくつかの実施形態では、本特許出願書類内で提示された図は、角度、寸法の比、などを含めて、縮尺を合わせて描かれている。いくつかの実施形態では、図は単なる代表物であり、請求項は、図の寸法によって限定されない。いくつかの実施形態では、語句「備える」または「含む」を用いた本明細書での説明は、「から成る」としてさらに説明され得て、そのように、語句「から成る」を用いた1つまたは複数の実施形態を請求するための記述された説明要件は、満足される。

【0083】

50

参考文献

[00100] P. Kaewtrakulpong、R. Bowden 著「An Improved Adaptive Background Mixture Model for Realtime Tracking with Shadow Detection」、In Proc. 2nd European Workshop on Advanced Video Based Surveillance Systems、AVBS01、VIDEO BASE SURVEILLANCE SYSTEMS: Computer Vision and Distributed Processing (2001年9月)。

【 0 0 8 4 】

[00101] Stauffer, C. および Grimson, W. E. L. , 、 Adaptive Background Mixture Models for Real-Time Tracking, Computer Visions and Pattern Recognition、IEEE Computer Society Conference on、第2巻 (1999年8月5日)、2246~2252ページ、第2巻。

10

【図 1】

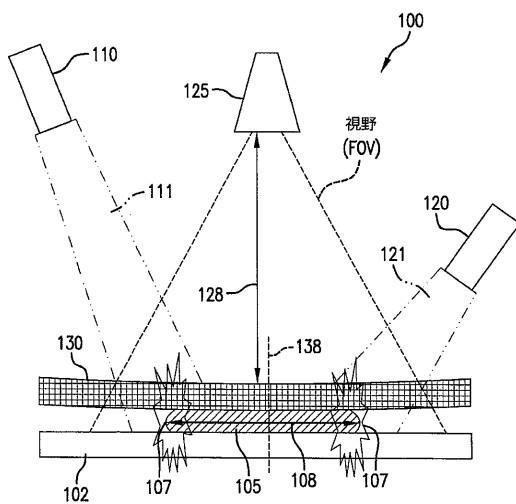


FIG.1

【図 2】

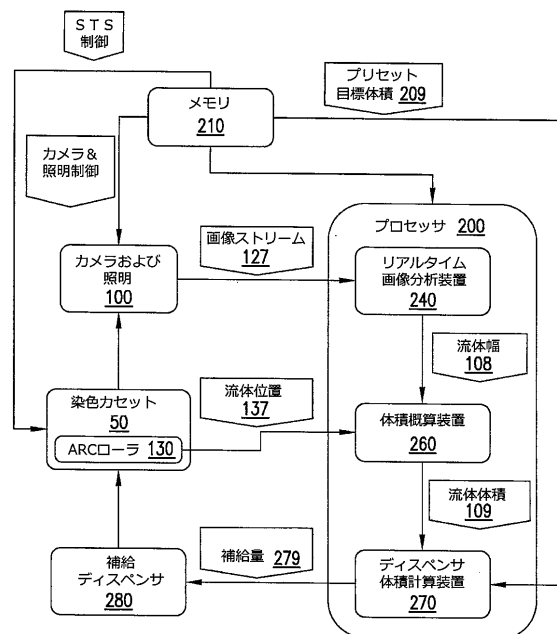


FIG.2

【図 3 A】

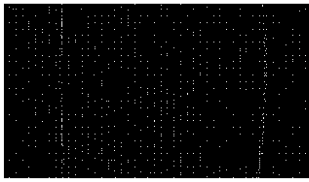


FIG.3A

【図 3 C】

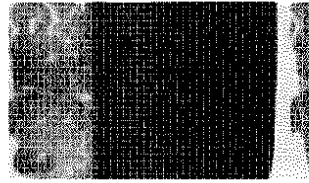


FIG.3C

【図 3 B】

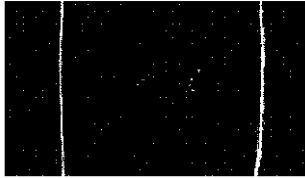


FIG.3B

【図 3 D】

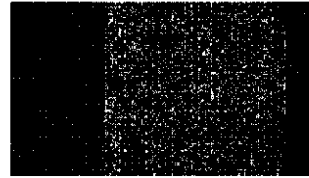


FIG.3D

【図 3 E】

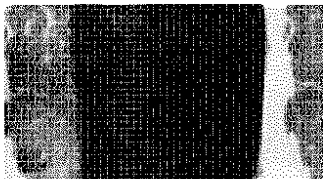


FIG.3E

【図 4 A】



FIG.4A

【図 3 F】

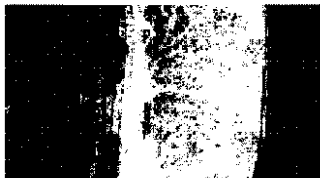


FIG.3F

【図 4 B】

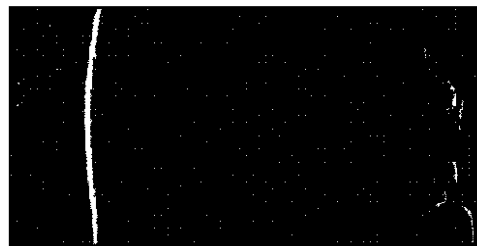


FIG.4B

【図 5】

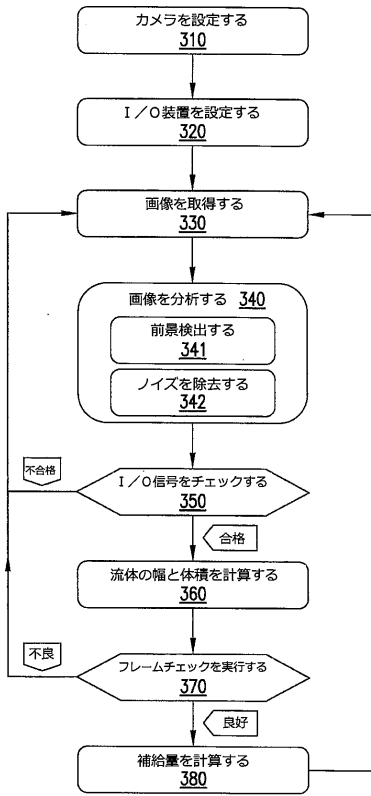


FIG.5

【図 6】



FIG.6A

FIG.6B

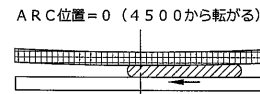


FIG.6C

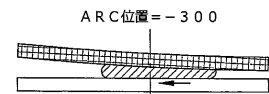


FIG.6D

【図 7】

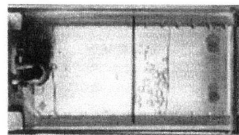


FIG.7A

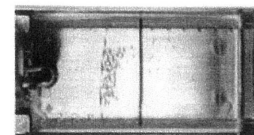


FIG.7C

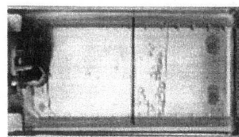


FIG.7B

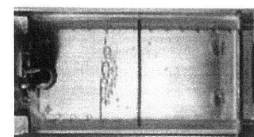


FIG.7D

【図 8】

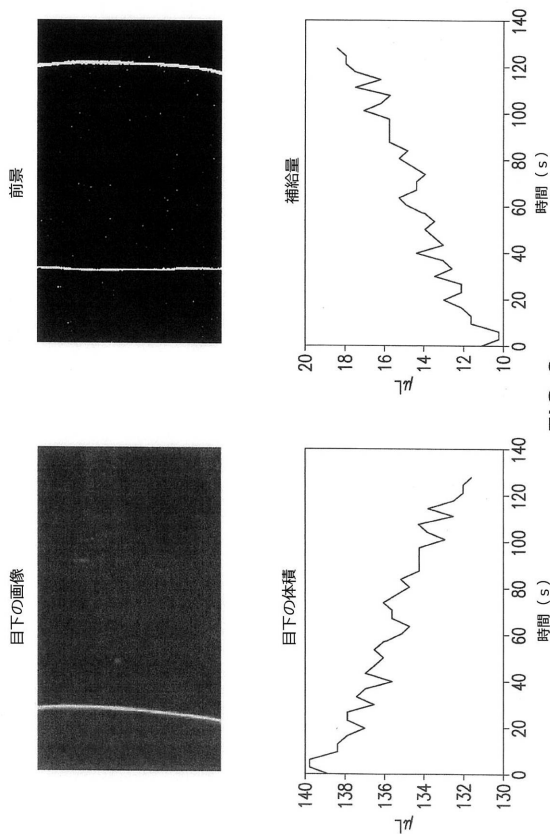


FIG.8

【図 9】

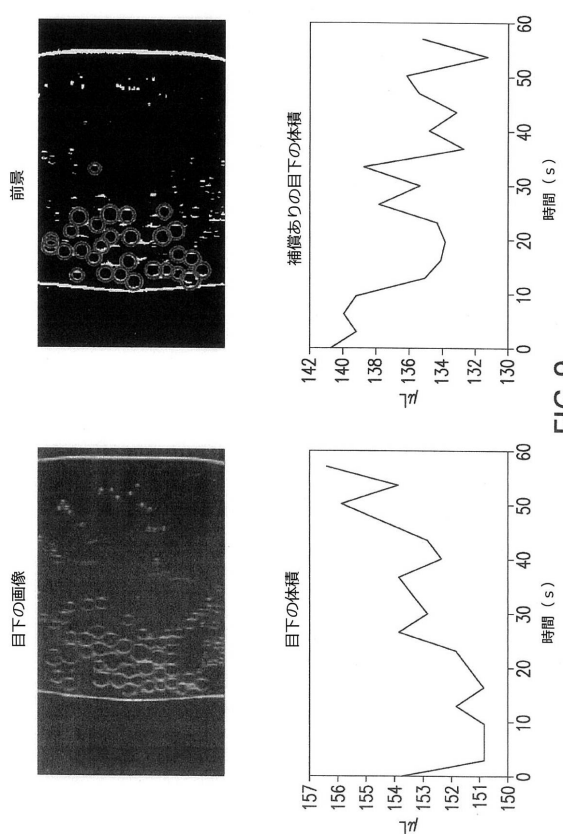
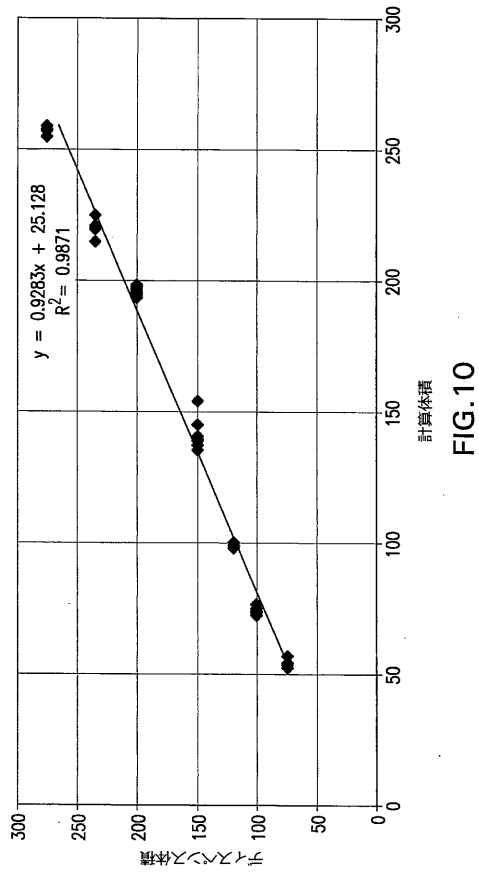


FIG.9

【図 10】



【図 11 A】

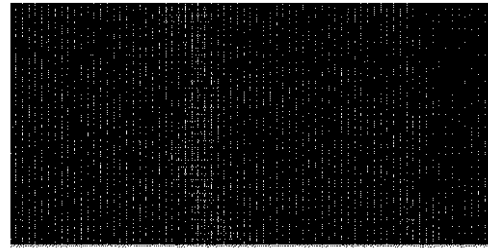


FIG.11A

【図 11 B】

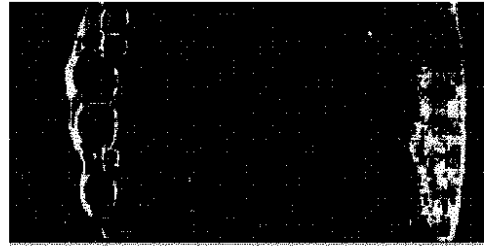


FIG.11B

【図 11 C】

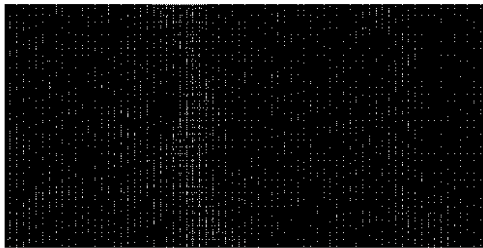


FIG.11C

【図 11 D】

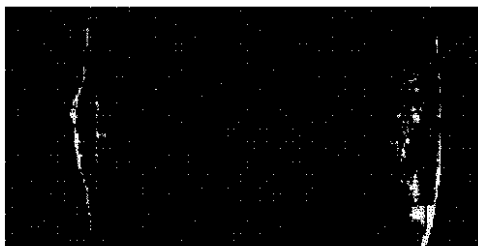


FIG.11D

【図 12】



【図 13】

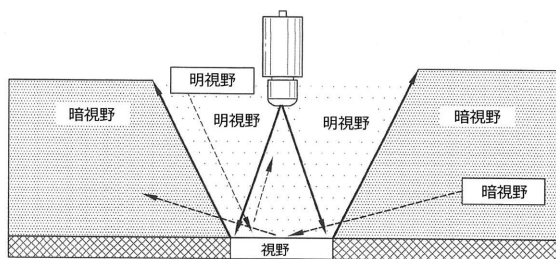


FIG.13A



FIG.13B

【図 14 B】

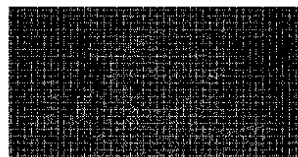


FIG.14B

【図 14 C】



FIG.14C

【図 14 A】

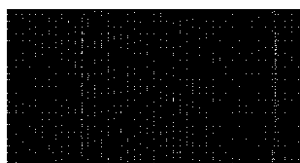


FIG.14A

【図 14 D】



FIG.14D

【図 14 F】



FIG.14F

【図 14 E】



FIG.14E

【図 15 A】

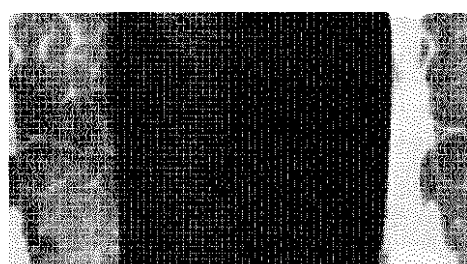


FIG.15A

【図 15 B】

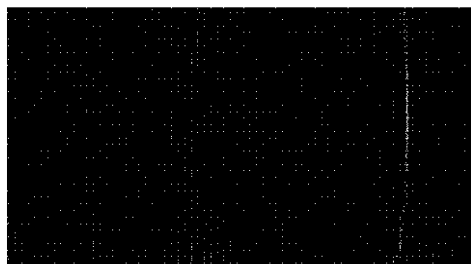


FIG.15B

【図 16】

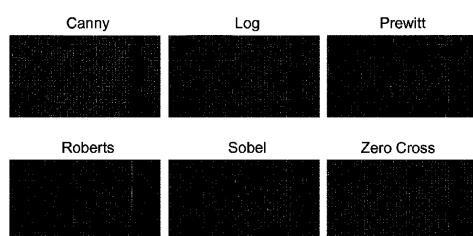


FIG.16

【図 17】

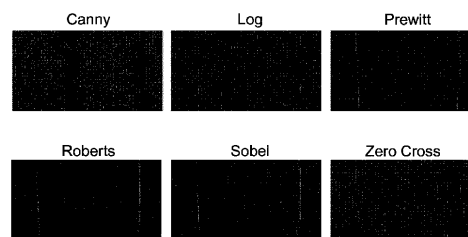


FIG.17

【図 18 A】

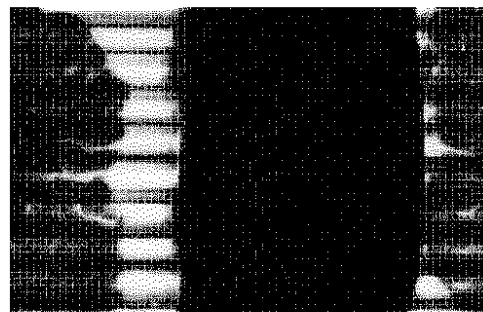


FIG.18A

【図 18 B】

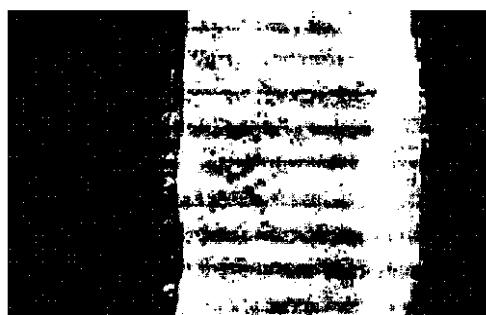


FIG.18B

フロントページの続き

(74)代理人 100119781

弁理士 中村 彰吾

(72)発明者 チェン, ユーヘン

アメリカ合衆国ミシガン州48168, ノースヴィル, パインハースト・サークル 46519

(72)発明者 ウィフォール, ジェシカ・エイ

アメリカ合衆国アリゾナ州85737, オロ・バレー, イースト・ラム・ロック・ロード 2356

(72)発明者 ジョーンズ, リサ・エイ

アメリカ合衆国アリゾナ州85704, ツーソン, ウェスト・リンダ・ヴィスタ・ブルヴァード 225

審査官 岡村 典子

(56)参考文献 特表2015-526713 (JP, A)

特表2010-520487 (JP, A)

国際公開第2016/047676 (WO, A1)

特開2015-105998 (JP, A)

特開2012-123039 (JP, A)

米国特許出願公開第2009/0325822 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 1/00-1/44

G01N 33/48-33/98

G01N 21/00-21/01, 21/17-21/61

G02B 19/00-21/00, 21/06-21/36