

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2014-525028  
(P2014-525028A)

(43) 公表日 平成26年9月25日(2014.9.25)

(51) Int.Cl.  
GO1N 21/64 (2006.01)  
GO6T 1/00 (2006.01)

F I  
GO1N 21/64 E  
GO6T 1/00 400B

テーマコード (参考)  
2G043  
5B047

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2014-508819 (P2014-508819)	(71) 出願人	507179346 ベンタナ メディカル システムズ, インコーポレイテッド 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
(86) (22) 出願日	平成24年5月4日 (2012.5.4)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月11日 (2013.11.11)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/058253	(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(87) 国際公開番号	W02012/152693	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(87) 国際公開日	平成24年11月15日 (2012.11.15)		
(31) 優先権主張番号	61/483, 202		
(32) 優先日	平成23年5月6日 (2011.5.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織画像のスペクトル・アンミキシングのための方法およびシステム

(57) 【要約】

生体組織と共役された量子ドットなどの蛍光種のスペクトル多重分離のための方法およびシステム。多重分離の処理は、量子ドットの推定されるスペクトルの曲線適合、および、典型的な量子ドットに対するそのような適合曲線のパラメータを説明する信頼区間に基づく非線形回帰を必然的に含む。

【選択図】 図 3

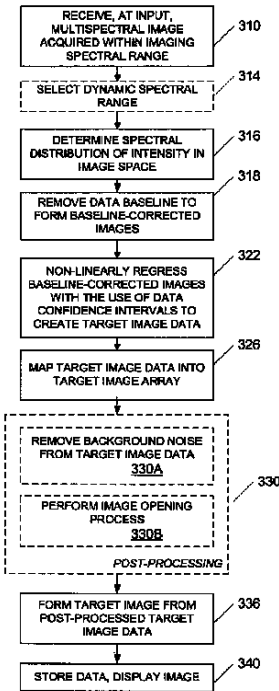


FIG. 3

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生体試料を画像化するための装置であって、

前記生体試料上に位置する第 1 の光源を用いて照光される前記生体試料から取得される画像化データ、および前記生体試料の画像のうちの少なくとも 1 つを受け取るように構成され、前記第 1 の光源が、第 1 の統計分布により説明される第 1 の平均波長および第 1 のスペクトル強度を有する入力と、

前記入力から前記画像化データおよび前記画像のうちの前記少なくとも 1 つを受け取るように、前記画像化データおよび前記画像のうちの前記少なくとも 1 つに関連するスペクトルデータを非線形回帰するように、かつ、第 1 の平均波長での前記生体試料の目標画像を表すデータを発生させるようになされる処理装置とを備える装置。

10

**【請求項 2】**

前記処理装置に動作可能に接続され、前記生体試料の前記目標画像を表示するように構成される表示装置をさらに備える、請求項 1 に記載の装置。

**【請求項 3】**

前記表示装置が、前記目標画像上に重畳される前記第 1 の光源の画像を表示するようにさらに構成される、請求項 2 に記載の装置。

**【請求項 4】**

前記生体試料の前記画像が、対応する複数の離散スペクトル帯域幅で取得された複数のスペクトル的に離散的な画像を表すマルチスペクトル画像を含む、請求項 1 に記載の装置。

20

**【請求項 5】**

前記生体試料が、前記生体試料上に位置する第 2 の光源を用いてさらに照光され、前記第 2 の光源が、第 2 の統計分布により説明される第 2 の平均波長および第 2 のスペクトル強度を有し、前記処理装置が、前記画像化データを、前記第 1 および統計の分布のパラメータに対応する信頼区間の範囲内で、前記第 1 および第 2 の統計分布の組み合わせを表す関数に前記画像化データを適合させることにより非線形回帰するようにさらになされる、請求項 1 に記載の装置。

**【請求項 6】**

30

病理画像を変換するための方法であって、

上に第 1 の蛍光種が配設される組織試料の画像の組を受け取って、前記組織試料を表す光強度のスペクトル分布を取得するステップと、

目標スペクトル帯域での前記組織画像を表す光強度の目標分布を導出するように、少なくとも非線形回帰、および前記蛍光種により規定されるデータ信頼区間に基づいて強度の前記取得されたスペクトル分布を修正するステップと、

光強度の前記目標分布を、前記蛍光種により放出される光に対する前記組織試料の光学応答の視覚的に知覚可能な表現に対応付けするステップとを含む方法。

**【請求項 7】**

40

前記蛍光種を前記組織試料の表面と共役させるステップであって、会合が前記組織試料の材料構造を表すステップをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

画像の前記組を受け取る前記ステップが、複数の離散スペクトル帯域幅で取得された複数の 2 次元 ( 2 D ) 画像を受け取るステップを含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記目標スペクトル帯域およびデータ信頼区間が、前記蛍光種の蛍光スペクトルを規定する、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 10】**

50

前記目標スペクトル帯域が、ガウス分布、逆ガウス分布、指数関数的に修飾されたガウス分布、ガンマ分布、逆ガンマ分布、対数分布、t分布、カイ二乗分布、f分布、指数分布、ラプラス分布、レイリー分布、ロジスティック分布、マクスウェル分布、ベータ分布、コーシー分布、パレート分布、レヴィ分布、極値分布、ワイブル分布、およびガンベル分布からなる群から選定される統計分布を規定する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

対応付けする前記ステップが、光強度の前記目標分布をオフセットして、背景画像雑音を表す強度分布がないオフセット光強度分布を導出するステップを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項12】

オフセットする前記ステップが、  
データ配列の要素に光強度の前記目標分布の値を割り当てるステップと、前記データ配列の非ゼロの要素の平均値を決定するステップと、前記平均値より低い値を包含する前記データ配列の要素をゼロにするステップとを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

対応付けする前記ステップが、次数1の十字行列を使用して前記オフセット光強度分布を変換するステップをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

画像の前記組を受け取る前記ステップが、第2の蛍光種を有する組織試料の超立方体画像を受け取るステップをさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項15】

強度の前記取得されたスペクトル分布を修正する前記ステップが、前記第1および第2の蛍光種の推定される蛍光スペクトルの線形重ね合わせを規定する適合関数への、前記取得されたスペクトル分布の非線形回帰を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記推定される蛍光スペクトルを規定するパラメータのうちの少なくともいくつか、前記データ信頼区間の範囲内に固定される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

生体試料を画像化するための計算機システム上で使用するための計算機プログラム製品であって、前記計算機プログラム製品が、その上に計算機可読プログラムコードを有する計算機使用可能有形媒体を備え、前記計算機可読プログラムコードが、前記計算機システム内にロードされるときに前記計算機システムで実装される装置を確立し、前記装置が、  
前記生体試料の画像を表す画像データ配列を受け取るように構成され、前記画像の各々が、物体領域内の複数の光源から光学システムを通る画像領域への光によって照光される前記生体試料を画像化することにより、それぞれ対応する離散スペクトル帯域で取得されており、光源の各々が、対応する平均波長を有する入力と、

前記受け取られた画像データ配列から、前記画像領域の所定の一部分の全域で強度のスペクトル分布を決定すること、および、

強度の前記決定されたスペクトル分布を非線形回帰して、前記複数の光源から光源のスペクトル分布を表す回帰されたパラメータを導出すること

により、前記受け取られた画像データ配列のうちの少なくとも1つを、選定された対応する平均波長での前記生体試料の慣用画像を表す、少なくとも1つの慣用画像データ配列に変換するようになされる処理装置と、

前記取得された画像および慣用画像のうちの少なくとも1つを表示するように構成されるグラフィカル出力と

を備える計算機プログラム製品。

【請求項18】

前記複数の光源からの少なくとも1つの光源が、多色性であり、スペクトルが統計分布により説明される光を放出する、請求項17に記載の計算機プログラム製品。

【請求項19】

前記入力、複数の光源であって、前記複数の光源のうちの少なくとも1つが前記生体試料に配設される、前記複数の光源からの光によって照光される前記生体試料を画像化することにより取得されている画像を表す画像データの組を受け取るように構成される、請求項17に記載の計算機プログラム製品。

【請求項20】

前記グラフィカル出力が、前記生体試料に配設される少なくとも1つの光源の画像に重畳される前記慣用画像のうちの少なくとも1つを表示するようにさらに構成される、請求項19に記載の計算機プログラム製品。

【請求項21】

前記処理装置が、

前記画像領域の全域で、前記複数の光源から目標光源の目標強度の分布を表すデータ配列を生成すること、および、

前記データ配列の要素を、前記要素に対応する目標強度の値が前記データ配列の非ゼロの値の平均未満であるならばゼロに設定することにより、前記受け取られたデータ配列のうちの少なくとも1つを変換するようにさらに構成される、請求項17に記載の計算機プログラム製品。

【請求項22】

生体試料を画像化するためのシステムであって、

前記生体試料の表面上に少なくとも1つの光源を包含する前記生体試料からの光を受け取るように構成される入力、

少なくとも1つの光学軸に沿って前記入力と光学的に連通する出力、

前記入力と前記出力との間の前記少なくとも1つの光学軸に沿って配設され、複数のスペクトル帯域幅内の前記光を処理して、前記複数のスペクトル帯域幅に対応する複数の画像形成信号を形成するように構成されるスペクトル的に選択的なシステム、

前記複数のスペクトル帯域幅に対応する前記複数の画像形成信号を前記出力から受け取るように、かつ、前記複数の画像形成信号から複数の画像を形成するように構成される検出器

を含む光学システムと、

前記検出器と動作可能に接続される計算機処理装置と、

中に計算機可読命令が組み込まれた有形非一時的記憶媒体であって、前記計算機可読命令が、前記計算機処理装置上にロードされるときに前記処理装置に、

前記生体試料を表す強度のスペクトル分布を前記複数の画像から導出させ、かつ、

非線形回帰アルゴリズムを曲線適合方程式に適用させて、前記生体試料の全域で、前記少なくとも1つの光源により放出される光の強度の分布を決定させる有形非一時的記憶媒体と

を備えるシステム。

【請求項23】

前記少なくとも1つの光源が蛍光の発生源を含む、請求項22に記載のシステム。

【請求項24】

前記少なくとも1つの光源が量子ドットを含む、請求項22に記載のシステム。

【請求項25】

前記少なくとも1つの光源が複数の光源を含み、前記曲線適合方程式が、前記複数の光源により放出される光のスペクトル分布を規定する、請求項22に記載のシステム。

【請求項26】

量子ドット(QD)を使用して組織試料の生体構造を識別するための方法であって、

前記組織試料から画像形成光を受け取り、前記画像形成光がQD種により放出される光を含み、前記QD種が、前記組織試料の成分と、前記QD種と前記成分との間の所定の親和性によって共役されるステップと、

複数のスペクトル帯域内の前記画像形成光を分析して、前記画像形成光の強度のスペクトル分布を決定するステップと、

10

20

30

40

50

パラメータ適合関数および前記パラメータ適合関数のパラメータを規定する信頼区間を用いて前記ＱＤ種のスペクトル分布を推定するステップと、

前記ＱＤ種に対応するスペクトル帯域幅内の前記組織試料の前記成分の空間的位置を表す画像データを導出するステップとを含む方法。

【請求項２７】

前記導出された画像データ、および前記所定の親和性に基づいて、前記組織試料の前記成分を特定するステップをさらに含む、請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】

導出する前記ステップが、前記ＱＤ種の前記推定されるスペクトル分布を非線形回帰して、前記信頼区間を満足する前記パラメータ適合関数の回帰されたパラメータを決定するステップを含む、請求項２６に記載の方法。

10

【請求項２９】

導出する前記ステップが、前記組織試料の画像を発生させるステップを含む、請求項２６に記載の方法。

【請求項３０】

前記パラメータ適合関数が統計分布関数を含む、請求項２６に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

20

本発明は、マルチスペクトル画像のスペクトル分解に関し、より詳細には、量子ドットを用いてマーキングされた生体試料を特徴付ける画像化データの非線形回帰に関し、この非線形回帰は、量子ドット、およびこれらの量子ドットを用いてマーキングされた組織の成分の個々のスペクトルシグネチャを識別することを考慮したものである。

【背景技術】

【０００２】

量子ドット（ＱＤ）は、半導体のナノ結晶構造であり、その電子特性は、個々の半導体結晶の大きさおよび形状と密接に関係がある。量子ドットのエネルギースペクトルは、幾何学的な大きさ、形状、および閉じ込めポテンシャルの強度を制御することによって量子閉じ込め効果を規定することにより操作され得る。したがって、ＱＤの直接的に結果として得られる光学的特徴はその呈色であり、同じ材料の、ただし異なる大きさのＱＤは、異なる色の光を放出し得る。ＱＤの呈色は、ＱＤのエネルギー準位と直接関係がある。一般にはＱＤが大きいほど、その蛍光スペクトルはより赤色（より低いエネルギー）になる。逆により小さなＱＤは、より青色（より高いエネルギー）の光を放出する。研究者は、トランジスタ、太陽電池、ＬＥＤ、およびダイオードレーザにおいてＱＤを研究し、医用画像化用の作用物質として、特にバイオセンシング用途用の蛍光標識として量子ドットを使用することを試みてきた。

30

【０００３】

現代の生物学的分析では、様々な種類の有機色素が使用される。しかしながら年を追うごとに、これらの色素のより高い操作上の柔軟性が必要とされてきており、従来の色素は期待に添うことが不可能であることが多い。

40

【０００４】

この目的に対してＱＤが、その役割を急速に務めつつある可能性があり、いくつかの論点に関して従来の有機色素より優れていることが見出されており、最も直接的に明白であるそれらの論点のうちの２つが、（蛍光色素に匹敵する量子収率とともに高い吸光係数に起因する）より狭い蛍光帯域幅および輝度、ならびに安定性である。生体組織のターゲティングに対してＱＤを使用する試みが行われてきた。そのようなターゲティングを実施するためにＱＤは、組織の選定された一部分に選択的に結合するように組織特異的結合部位を伴って機能化されることが多い。例えばＱＤは、蛍光分光法を使用する生体組織成分の検出用の無機蛍光体として使用され得る。ここではＱＤは、組織分子の成分として使用さ

50

れ得るものであり、その成分によってこの分子が、対応する型の組織成分を具体的に識別するような形で蛍光を発するようになる。程なく組織試料のQ D固有の蛍光を検出することにより、組織の生体構造および/または組織成分の場所に関して結論が得られ得る。

#### 【0005】

しかしながらいくつかの蛍光種を用いてマーキングされた組織の蛍光の検出は、いくつかの未解決の問題を引き起こす。問題の1つは光学的位置合わせの問題点であり、この問題点は、光学検出器の表面での、組織の成分に選択的に結合された複数の蛍光体により放出される波面の空間的な重なりから生じる。この空間的な重なりは、空間的に入り組んだマルチスペクトル画像をもたらし、物体空間での組織の境界内部の所与の成分の物理的場所を満足のゆくように識別するために、組織の結果として得られる画像のスペクトル分解を必要とする。

10

#### 【0006】

蛍光体の個々のスペクトル寄与を分離するために、従来の多重化された蛍光顕微鏡法では、一方では広帯域の蛍光体色素および慎重に選択された光学フィルタを、ならびに他方では線形アンミキシング・スペクトル・アルゴリズムを用いてきた。フィルタに基づく方法は、スペクトルの相互干渉および不十分な標本化に起因する接近して重なるスペクトルシグネチャを定量的に区別するそれらの方法の能力が乏しいことが知られている。信号分離のために線形アンミキシング・アルゴリズムを使用することは、フィルタに基づく取得により引き起こされる標本化の不足に対処可能であるが、基準スペクトルの慎重な選択を必要とする。実際には線形アンミキシング・アルゴリズムが最適に動作するために、高い精度で選択された基準スペクトルまたは(自己蛍光などの)低いアーチファクトの条件のいずれかが必要とされる。しかしながら動作パラメータの大きな変動および許容差が存在する現実の用途では、線形アンミキシング・アルゴリズムの変換の精度および安定性は急速に低下する。

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

したがって、異なるQ Dが対応する組織成分に選択的に結合される組織のマルチスペクトル画像の信頼性の高いスペクトル分解、および、Q D固有の組織成分を画定する組織画像を向上した精度によって生出することが可能な、装置および方法を提供することが所望されている。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明の実施形態は、生体試料を画像化するための装置を考慮したものである。装置の1つの実施形態は、生体試料から取得される画像化データもしくはそのような試料の画像のいずれか、または両方を受け取るようになされ、試料が、光源が試料に位置する状態で照光される入力を含む。特定の実施形態では生体試料の受け取られる画像は、対応する複数の離散スペクトル帯域で取得された複数のスペクトル的に離散的な画像を表すマルチスペクトル画像を含む。光源からの光は平均波長により特徴付けられ、そのスペクトル強度は統計分布により説明される。装置は、入力から画像化データもしくは画像のいずれか、または両方を受け取るように、受け取られた画像化データまたは画像に関連するスペクトルデータを非線形回帰するように、かつ、光源の平均波長での生体試料の目標画像を表すデータを発生させるようになされる処理装置をさらに含む。特定の実装形態では装置は、処理装置に動作可能に接続され、生体試料の目標画像を表示するように構成される表示装置をさらに含む。表示装置は、目標画像上に重畳される光源の画像を表示するように追加的に構成され得る。特定の実施形態では試料での光源の場所は、光源と生体試料の個別の成分との間の親和性により規定される。関係する実施形態では、試料は複数の光源を用いて照光され、その場合処理装置は、画像化データを、必然的に含まれる光源の各々のスペクトル分布に対する統計的近似の組み合わせを表す関数にこれらのデータを適合させることにより非線形回帰するように、かつ、そのような統計分布に対応する信頼区間に関して

40

50

回帰の結果を評価するようになされる。

【0009】

本発明の実施形態は、病理画像を変換するための方法をさらに考慮したものであり、その方法は少なくとも、(i)上に蛍光種が配設される前記組織試料の画像の組を受け取って、組織試料を表す光強度のスペクトル分布を取得するステップ、ならびに、(ii)特定の場合では目標スペクトルデータおよびデータ信頼区間により規定される、目標スペクトル帯域での組織画像を表す光強度の目標分布を導出するように、少なくとも非線形回帰、およびこの蛍光種により規定されるデータ信頼区間に基づいて強度の取得されたスペクトル分布を修正するステップを含む。1つの実施形態では目標スペクトル帯域は、ガウス分布、逆ガウス分布、指数関数的に修飾されたガウス分布、ガンマ分布、逆ガンマ分布、対数分布、t分布、カイ二乗分布、f分布、指数分布、ラプラス分布、レイリー分布、ロジスティック分布、マクスウェル分布、ベータ分布、コーシー分布、パレート分布、レヴィ分布、極値分布、ワイブル分布、およびガンベル分布などの統計分布のうちの少なくとも1つにより規定される。

10

【0010】

代替的または追加的に方法は、光強度の目標分布を、前記蛍光種により放出される光に対する組織試料の光学応答の視覚的に知覚可能な表現に対応付けするステップを含む。特定の実施形態では組織試料の光学応答は、蛍光種により放出される光の反射を表し、画像の受け取られる組は、複数の離散スペクトル帯域で取得された2次元画像を含む。1つの実施形態では対応付けするステップの処理は、目標分布をオフセットして、背景雑音の強度がないオフセット光強度分布を導出するステップを必然的に含む。1つの実施形態ではオフセットするステップは、データ配列の要素に光強度の目標分布の値を割り当てるステップ、データ配列の非ゼロの要素の平均値を決定するステップ、および、前記平均値より低い値を包含するデータ配列の要素をゼロにするステップを必然的に含む。オフセットするステップの処理は、次数1の十字行列(cross-matrix)の使用を必然的に含む処理を追加的に含み得る。

20

【0011】

代替的または追加的に方法のある実施形態は、前記蛍光種を前記組織試料の表面と共役させ、会合が前記組織試料の材料構造を表すステップを必然的に含む。代替的または追加的には画像の組を受け取るステップは、上に他の蛍光種を有する組織試料の超立方体画像を受け取るステップを含む。1つの実施形態では強度の取得されたスペクトル分布を修正するステップは、組織試料と共役された蛍光種の推定される蛍光スペクトルの線形重ね合わせを規定する適合関数への、取得されたスペクトル分布の非線形回帰を含む。特定の実施形態では非線形回帰は、推定される蛍光スペクトルを規定するパラメータのうちの少なくともいくつか、データ信頼区間の範囲内に固定されることを確実にすることにより実行される。

30

【0012】

加えて本発明の実施形態は、生体試料を画像化するための計算機システム上で使用するための計算機プログラム製品を提供する。そのような計算機プログラム製品は、計算機可読プログラムコードを有する計算機使用可能有形媒体を包含し、計算機可読プログラムコードは、計算機システム内にロードされるときに計算機システムで実装される装置を確立し、その装置は、(i)生体試料の画像を表す画像データ配列を受け取るように構成され、前記画像の各々が、物体領域内の複数の光源から光学システムを通る画像領域への光によって照光される生体試料を画像化することにより、それぞれ対応する離散スペクトル帯域で取得されている入力、および、(ii)受け取られた画像データ配列のうちの少なくとも1つを、選定された対応する平均波長での生体試料の慣用画像(accustomed image)を表す、少なくとも1つの慣用画像データ配列に変換するようになされる処理装置を含む。

40

【0013】

試料を照光する光源の各々は、対応する平均波長を有する。少なくとも1つの光源は、

50

多色性であり得るとともに、統計分布により説明されるスペクトルを有し得る。1つの実施形態では入力は、試料に配設される光源によって照光される試料を画像化することにより取得されている画像を表す画像データの組を受け取るように構成される。

【0014】

1つの実施形態では処理装置は、受け取られたデータ画像配列から、画像領域の所定の一部分の全域で強度のスペクトル分布を決定することにより、および、強度の決定されたスペクトル分布を非線形回帰して、複数の光源から光源のスペクトル分布を表す回帰されたパラメータを導出することにより、少なくとも1つの画像データ配列の変換を容易にする。特定の実施形態では計算機システムで実装される装置は、取得された画像および慣用画像のうちの少なくとも1つを表示するように構成されるグラフィカル出力を追加的に含む。処理装置は、画像領域の全域で、複数の光源から目標光源の目標強度の分布を表すデータ配列を生成すること、および、このデータ配列の要素を、要素に対応する目標強度の値がデータ配列の非ゼロの値の平均未満であるならばゼロに設定することにより、受け取られた画像データ配列のうちの少なくとも1つを変換するように追加的になされ得る。

【0015】

本発明の実施形態は、生体試料を画像化するためのシステムを追加的に提供し、そのシステムは、光学システムと、光学システムと動作可能に通信する計算機処理装置と、有形計算機可読記憶媒体とを含む。光学システムは、(i)生体試料と合体させられた少なくとも1つの光源を包含する生体試料からの光を受け取るように構成される入力、(ii)少なくとも1つの光学軸に沿って入力と光学的に連通する出力、(iii)前記入力と前記出力との間の少なくとも1つの光学軸に沿って配設され、複数のスペクトル帯域幅内の光を処理して、前記複数のスペクトル帯域幅に対応する複数の画像形成信号を形成するように構成されるスペクトル的に選択的なシステム、および、(iv)複数のスペクトル帯域幅に対応する複数の画像形成信号を出力から受け取るように、かつ、これらの信号に基づいて複数の画像を形成するように構成される検出器を含む。

【0016】

1つの実施形態では、試料での光源は例えば量子ドットなどの蛍光の発生源を含む。1つの実施形態では計算機処理装置は、光学システムの検出器と動作可能に接続される。1つの実施形態では有形非一時的記憶媒体は、組み込まれた計算機可読命令であり、計算機可読命令は、計算機処理装置上にロードされるときに処理装置に、生体試料を表す強度のスペクトル分布を複数の画像から導出させ、かつ、非線形回帰アルゴリズムを曲線適合方程式に適用させて、生体試料の全域で、試料と合体させられた光源の光の強度の分布を決定させる。生体試料に関連する2つ以上の光源が存在するとき、曲線適合方程式は、そのような複数の光源により放出される光のスペクトル分布の重ね合わせにより規定される。

【0017】

本発明の実施形態は、量子ドット(QD)を使用して組織試料の生体構造を識別するための方法をさらに提供する。そのような方法は、組織試料から画像形成光を受け取り、その画像形成光がQD種により放出される光を含み、QD種が、組織試料の成分と、QD種と組織成分との間の所定の親和性によって共役されるステップ、および、複数のスペクトル帯域内の受け取られた画像形成光を分析して、この画像形成光の強度のスペクトル分布を決定するステップを包含する。方法は、パラメータ適合関数および前記パラメータ適合関数のパラメータを規定する信頼区間を用いてQD種のスペクトル分布を推定するステップ、ならびに、前記QD種に対応するスペクトル帯域幅内の組織試料の成分の空間的位置を表す画像データを導出するステップを追加的に含む。特定のパラメータ関数は、統計分布関数を含む。

【0018】

1つの実施形態では方法は、導出された画像データ、およびQD種と組織試料の成分との間の所定の親和性に基づいて、組織試料の成分を特定するステップを追加的に含む。1つの実施形態では画像データの導出の処理は、QD種の推定されるスペクトル分布を非線形回帰して、信頼区間を満足するパラメータ適合関数の回帰されたパラメータを決定する



ステップを含む。関係する実施形態では導出の処理は、組織試料の画像を発生させるステップを含む。

【 0 0 1 9 】

本発明は、図面と連関する以下の発明を実施するための形態を参照することにより、より完全に理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】図 1 A は、本発明を用いて使用され得るマルチスペクトル画像化 ( M S I ) システムの例を概略的に例示する図である。図 1 B は、本発明を用いて使用され得るマルチスペクトル画像化 ( M S I ) システムの例を概略的に例示する図である。

10

【図 2】図 2 A は、重ねられたガウス適合曲線とともに量子ドット種の典型的なスペクトルを示す図である。図 2 B は、重ねられたガウス適合曲線とともに量子ドット種の典型的なスペクトルを示す図である。

【図 3】本発明の方法の実施形態を例示する流れ図である。

【図 4】図 4 A は、単一の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果および対応する画像を示す図である。図 4 B は、単一の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果および対応する画像を示す図である。

【図 5】図 5 A は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 1 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。図 5 B は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 1 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。

20

【図 6】図 6 A は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 2 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。図 6 B は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 2 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。

【図 7】図 7 A は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 3 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。図 7 B は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 3 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。

30

【図 8】図 8 A は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 4 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。図 8 B は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 4 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。

【図 9】図 9 A は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 5 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。図 9 B は、5 つの量子ドット種を用いてマーキングされた生体組織のマルチスペクトル画像からの第 5 の量子ドット種のスペクトル・アンミキシングの実験結果を示す図である。

40

【図 10】図 10 A は、より高い信号対雑音比となって現れる、回帰の従来の方法に対する、試料での蛍光種のスペクトルシグネチャをアンミックスする際に本発明のある実施形態を使用する利点を例示する図である。図 10 B は、より高い信号対雑音比となって現れる、回帰の従来の方法に対する、試料での蛍光種のスペクトルシグネチャをアンミックスする際に本発明のある実施形態を使用する利点を例示する図である。

【図 11】より高い信号対雑音比となって現れる、回帰の従来の方法に対する、試料での蛍光種のスペクトルシグネチャをアンミックスする際に本発明のある実施形態を使用する利点を例示する図である。

50

【図 1 2】図 1 2 A は、本発明のある実施形態による、画像オープニング処理手順の結果としての残留背景雑音の除去を示す図である。図 1 2 B は、本発明のある実施形態による、画像オープニング処理手順の結果としての残留背景雑音の除去を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下で明細書では、付随する図面を参照して本発明の実施形態の説明を提供する。図面では可能であればどこでも、同じ参照番号および標識が、同じまたは類似する構成要素または要素を表す。しかしながら同様の構成要素または要素が、異なる番号および標識を用いて表される場合もあることが理解されよう。

【0022】

本明細書の全体を通して「1つの実施形態」、「ある実施形態」、または同様の文言に対する言及は、言及される実施形態に関して説明される個別の特徴、構造、または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを示唆する。したがって、本明細書の全体を通して使用される語句「1つの実施形態で」、「ある実施形態で」、および同様の用語は、必ずではないが、すべてが同じ実施形態を表す場合がある。さらに、本明細書で説明される本発明の様々な実施形態の特徴、要素、構成要素、構造、詳細、または特性が、1つまたは複数の実施形態において任意の適した様式で組み合わせられ得ることが理解されよう。特定の特徴、要素、構成要素、構造、詳細、もしくは特性のうちの1つもしくは複数の用いずに、または、他の方法、構成要素、材料等々を使用して、本発明が場合によっては実践され得ることを当業者であれば認めるであろう。したがって本発明のある実施形態の個別の詳細が、そのような実施形態を説明するどの図面にも示されるとは限らない場合があるが、図面にこの詳細が存在することは、説明の文脈において他の方法を必要としない限り示唆され得る。他の事例では、よく知られている構造、詳細、材料、または動作が、本発明のある実施形態の態様を不明瞭にすることを避けるために、所与の図面に示されない、または詳細に説明されない場合がある。

【0023】

含まれる概略的な流れ図の図は、全体的に論理流れ図の図として記載される。したがって論理流れの図示される順序および標識されるステップは、提示される方法の1つの実施形態を指し示すものである。機能、論理、または効果において、例示される方法の1つもしくは複数のステップまたはそれらの一部分と同等であり得る他のステップおよび方法が考え出される場合がある。加えて、用いられる形式および記号は、方法の論理ステップを解説するために与えられ、方法の範囲を限定しないと理解される。様々な矢印の型および線の型が流れ図の図で用いられる場合があるが、それら是对応する方法の範囲を限定しないと理解される。実際いくつかの矢印または他の結合子は、方法の論理流れのみを指し示すために使用され得る。例えば矢印は、図示される方法の列挙されるステップ間の不特定の継続時間の待機または監視の期間を指し示す場合がある。加えて個別の方法が行われる順序は、示される対応するステップの順序を厳重に固守する場合もあればそうでない場合もある。

【0024】

本発明によれば、生体組織のマルチスペクトル画像を処理するための方法および装置が開示され、この処理は、画像化の処理によって多重化されている複数のスペクトルシグネチャから、画像空間においてQDなどの蛍光体のスペクトルシグネチャを非線形分離することによる組織の一部分の空間的識別を考えに入れたものである。

【0025】

QDは、QDをある特定の抗体またはプローブと共役させることにより、組織の標識付け病理検査において使用される。これらの抗体またはプローブは、関心のある特定の受容体、特にウイルスまたはがんに関連がある受容体に結合する。標識付けの処理は、異なる波長で蛍光を発する複数のQDが使用されるという意味で、スペクトル的に多重化されることが多い。診断目的で結果として得られる組織を使用するために、次いで個々のQDを観視し、組織内部でのそれらの位置（複数可）を確認することが必要である。した

がって、組織のマルチスペクトル画像から使用されるQDの光学応答をアンミックスする（または多重分離する、またはスペクトル的に分離する）ための方法が達成される必要がある。

#### 【0026】

本発明の実施形態によれば、そのようなスペクトル多重分離を実施するために、最初に組織の画像が、標識付けのために使用されるQDのスペクトル特性により規定されるスペクトル範囲に集合的に広がるスペクトル帯域で取得される。そのような画像が得られた後、推定されるQD強度分布関数の非線形回帰が、例えば画素単位を基礎としてさらに遂行され得る。非線形回帰は、使用されるQDを特徴付ける、推定されるスペクトル分布（スペクトルシグネチャ）の組み合わせを表す適合曲線を基礎として実行され得る。非線形回帰は、非負の値のみを包含する、使用されるQDの蛍光スペクトル分布のどれかに対して曲線適合を実現するためにさらに最適化され得る。本発明は、広い蛍光シグネチャ（例えば、多くの折にスペクトル的に重なり、検出される際に信号取得の相互干渉の原因となる最高50～60nmの帯域幅）を有する従来の蛍光色素と比較して類のない、QDにより提示される画像化条件を活用する。特に本発明は、低次元での、したがって分析的に扱いやすい空間でのQDの関心の（10～20nmの程度の）比較的狭いスペクトルシグネチャをパラメータ的に説明する能力を供与する。そのようなパラメータ的な説明および厳密な最小化条件によって、例えば生体組織を扱う際に共通であるスペクトル信号の変動などの変化する動作条件に対する、本発明の方法の高い水準の計算的な適応性および安定性が可能になる。適応性および安定性が増大された結果として、本発明のある実施形態を用いる全体的な測定システムの出力での信号対雑音比が、関係する技術のシステムと比較して高められる。例えば図10Aおよび10Bは、本発明のある実施形態による非線形方法を用いる、試料に存在する単一のQD種のスペクトルシグネチャのアンミッキングの結果を包含する画像（図10A）、および従来の線形回帰アルゴリズムを用いて得られた画像を表す。これらの画像間の比較によって、線形の型の回帰が使用されるときに誤って識別されるQD種に対応する視覚的に知覚可能なより高い水準の画像雑音が明確に例示される（例えば区域1002A、1002B内のアンミックスされた個々のQDの密度を、それぞれ対応する区域1004A、1004B内の密度と比較されたい）。追加的な例示として図11は、2つのQD種、QD565およびQD655（Life Technologies Corp.）を識別する線形アンミッキング処理手順の結果を表すスペクトル曲線1120を示す。しかしながらこの場合での正しい結果は、本発明の非線形アンミッキング・アルゴリズムが正しく識別した、スペクトル曲線1110により示されるような単一のQD種、QD585（Life Technologies Corp.）の識別である。

#### 【0027】

本発明は、マルチスペクトル画像化（MSI）システムまたは蛍光顕微鏡法システムなどの画像化システムとともに用いられ得る。一般にMSIは、画素水準での画像のスペクトル分布へのアクセスをもたらすことにより、病理標本の分析に対して、計算機化された顕微鏡に基づく画像化システムを用意する。種々のマルチスペクトル画像化システムが存在するが、これらのシステムのすべてに共通である動作態様は、マルチスペクトル画像を形成する性能である。マルチスペクトル画像は、特定の波長での、または電磁スペクトルの全域での特定のスペクトル帯域幅での画像データを捕捉する画像である。これらの波長は、例えば赤外部（IR）などの可視光範囲の範囲を超えた波長での電磁放射を含む所定のスペクトル成分を選択可能な、光学フィルタにより、または他の機器の使用により選出され得る。

#### 【0028】

標本の画像の取得を容易にする2つの一般的な型のMSIシステムが、図1Aおよび1Bに概略的に例示される。図1Aは光学画像化システム104を含む装置100を示し、光学画像化システム104の一部分108は、所定の数Nの離散光学帯域を規定するように調節可能であるスペクトル的に選択的なシステムを包含する。光学システム104は、

光学検出器 116 上に広帯域光源 112 を用いて透過状態で照光される組織試料 110 を画像化されるようになされる。示されるように、1つの実施形態では例えば顕微鏡などの拡大システムを含み得る光学画像化システム 104 は、光学システム 104 の単一の光学出力 122 と全体的に空間的にそろえられた単一の光学軸 120 を有する。システム 104 は、スペクトル的に選択的なシステム 108 が、異なる離散スペクトル帯域で画像が取得されることを確実にするように、(例えば計算機処理装置 126 を用いて)調整または調節されている際に、組織 110 の一連の画像を形成する。装置 100 は、一連の取得された画像からの組織の少なくとも 1つの視覚的に知覚可能な画像が中に現れる表示装置 122 を追加的に包含し得る。スペクトル的に選択的なシステム 108 は、光源 112 から試料 110 を通って検出器 116 に向かって透過させられる光のスペクトルから個別の通過帯域を、使用者の入力またはあらかじめプログラムされた処理装置 126 の指令のいずれかに応答して選択するようになされる、回折格子などの光学分散要素、薄膜干渉フィルタなどの光学フィルタの集合体、または任意の他のシステムを含み得る。

#### 【0029】

いくつかのスペクトル帯域での多数のスペクトル的に離散的な光学画像を同時に入手するようになされる装置の代替の実装形態 150 が、図 1B に示される。ここではスペクトル的に選択的なシステム 154 が、N 個の離散スペクトル帯域に対応するいくつかの光学出力を規定する。システム 154 は、光学システム 158 からの透過させられた光出力 156 を取り入れ、識別されるスペクトル帯域で検出器システム 166 上に、この識別されるスペクトル帯域に対応する光学経路に沿って試料 110 を画像化するような形で、N 個の空間的に異なる光学経路 162 - 1 から 162 - N に沿って、この光出力の少なくとも一部分を、空間的に方向を変える。別の代替の実装形態(示されない)で、実施形態 100 および 150 の特徴を組み合わせる場合があることが認識される。

#### 【0030】

本発明の実施形態によれば生体組織は、QD などの蛍光種を用いて標識される。使用される QD に対する 2つの典型的なスペクトルが図 2A および 2B に示され、各々のスペクトルは、図 2A、2B の場合では次式のように一般には表現されるガウス分布である、対応する曲線適合とともに重ね書きされている。

#### 【0031】

##### 【数 1】

$$\frac{a^2}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\lambda-\mu}{\sigma}\right)^2\right] \quad (1),$$

#### 【0032】

ここで  $\lambda$  は波長であり、 $\mu$  は平均値であり、 $\sigma$  は標準偏差であり、 $a^2$  は非負の前指数である。図 2A、2B の強度分布を説明するパラメータの値が表 1 に示され、565 nm の付近の光を放出する QD 種は QD 565 と標識され、655 nm の付近の光を放出する QD 種は QD 655 と標識される。

#### 【0033】

##### 【表 1】

表 1

	QD565 (図2A)	QD655 (図2B)
$a$	3.62	8.89
$\mu$	574.74	639.52
$\sigma$	17.35	20.80

#### 【0034】

より従来型のガウス振幅因子  $a$  の代わりに非負の  $a^2$  を用いることにより、本発明の実施形態で使用されるガウス分布は、(QD 光の強度分布の正值と相互に関連がある) 正值を

有する。これに対して、別の統計分布（例えば逆ガウス、指数関数的に修飾されたガウス、ガンマ分布、逆ガンマ分布、対数分布、t分布、カイ二乗分布、f分布、指数、ラプラス分布、レイリー分布、ロジスティック分布、マクスウェル分布、ベータ分布、コーシー分布、パレート分布、レヴィ分布、極値分布、ワイブル分布、およびガンベル分布）により密接に近似されるスペクトルプロファイルなどの、QDにより放出される光の他のスペクトルプロファイルが本発明の範囲内にあることが認識される。

#### 【0035】

図3の流れ図に概略的に提示される本発明のある実施形態によれば、QDなどの光源を有する所与の生体組織が、例えば400nmから900nmなどの（以降は画像化スペクトル範囲と呼ばれる）画像化波長の範囲にわたって画像化されて、画像化波長に対応する個々のスペクトル帯域で入手される組織の複数の個々の画像を含む超立方体画像などのマルチスペクトル画像の組を発生させる。画像化は、上記で説明されたようなMSIシステムを用いることが可能である。ステップ310では、画像（複数可）が本発明の装置の入力で受け取られる。一般に、組織がMSIシステムを使用して画像化されている画像化波長は、個別のQDのスペクトルの（中心波長または平均波長などの）特性波長と必ずしも一致しないということが認識される。1つの実施形態では超立方体画像は、実質的に重ならないスペクトル帯域で入手されるスペクトル的に離散的な画像を含み得る。ステップ314では、結果として得られるマルチスペクトル超立方体画像から所与のQDのスペクトルシグネチャを分離するために、動的スペクトル範囲が随意に選択され得る。動的範囲は、画像化スペクトル範囲より狭い場合があり、好ましくは、所与の使用されるQD種の推定される蛍光スペクトルを含むスペクトル全範囲に対応する。例えば565nmの推定される平均波長を伴うQD（QD565と呼ばれるLife Technologies Corp.の製品）に対しては、約529nmと598nmとの間の動的スペクトル範囲が選定され得る。

#### 【0036】

図3を参照して説明されるような以下の処理手続きのステップは、（完全な画像化スペクトル範囲内で入手される）完全な超立方体画像に関して、（選定された動的スペクトル範囲に対応する）超立方体画像の部分集合に関して、または画像の別の組もしくは部分集合に関して実行され得る。これらのステップは、画素単位を基礎としてスペクトルデータを処理することにより、または代替的には、隣接する画素の群にわたる画像強度の平均もしくは中央値のスペクトル分布を得ることにより1回で画素の集団に関して演算することにより遂行され得る。単一の画像の大きさは、光学検出設備機器の利用可能な性能に依じて使用者の裁量で選定され得るものであり、1つの実施形態では縦横が800および600の画素であり得る。

#### 【0037】

ステップ316では、強度のスペクトル分布が、個々の画像の選定された組を分析することにより取得された画像から導出される。ステップ318では、強度の導出されたスペクトル分布が、例えば各々の画像データ点から、選定された波長範囲にわたって取得された強度の最小値を減算することにより基線補正される。基線補正の処理手順は、基線補正された画像データの発生をもって終結する。代替的には画像は、画像の点(x, y)での画像データにより規定されるような強度の値から、その画像点に対応する（1次以上の多項式により表現される）適合関数の値を減算することにより基線補正され得る。基線補正のためのさらに別の代替方法には、主成分分析（PCA）の使用、または、非常に大きな、例えば数十nmの標準偏差を有するガウス適合関数の使用がある。

#### 【0038】

ステップ322では、基線補正された画像の各々が、例えば使用されるQD種のスペクトルのパラメータ規定を使用する非線形回帰によりさらに分析される。例えばレーベンバーグ・マルカート・アルゴリズム（Levenberg-Marquardt algorithm）（LMA）が、関数のパラメータの空間にわたって一般には非線形の関数を最小化する問題に数値解を与えることが知られている。本発明の着想によれば、LMAな

どの非線形回帰アルゴリズムは、画像化される組織試料に配設されるQDのスペクトルを規定する、推定されるパラメータ関数（例えば単一のQD種に対する（1）のガウス関数、または、組織上のいくつかのQD種に対するガウス分布もしくは他の統計分布の組み合わせ）と連関して使用され得る。例えば、画像化されている組織に関連する単一のQD種が存在するときの場合では、非線形LMAが、上記で述べられたような統計分布のうちの1つを規定するQDスペクトルに適合する関数と連関して使用され得る。比較して、画像化されている組織に関連する複数のQD種が存在するとき、LMAが、複数のQD種にそれぞれ対応する推定される蛍光スペクトルの重ね合わせを規定する適合関数と連関して使用され得る。図3の実施形態の以下の検討は、簡単のために組織に関連する単一のQD種を参照して提示される。

10

#### 【0039】

個別の基線補正された画像から導出される画像データの非線形回帰の目的は、個別のQD種に関連するスペクトル帯域での組織試料から発出する光強度の空間分布を表す目標データを生出することである。そのような非線形回帰の精度を向上させるために、目標データが所与のQD種を確信的に識別することを確実にするために、所与のQD種のスペクトルプロファイルを規定するために選定されるパラメータ関数にいくつかのパラメータ制約が課せられる場合がある。そのようなパラメータ制約は部分的には、使用されるQDの特質に、および非線形回帰を実行するために用いられる計算機処理装置の能力に左右される場合がある。典型的な可視光QD種は、ガウス関数により近似または適合される場合に、20nmほどの程度の半値半幅（HWHM）および約11...20nmの値により特徴付けられる光放出スペクトルを有することに留意されたい。これらの典型的な値は、QDの光強度分布を説明していると推定される個別のスペクトル分布が現実に即したものであるかどうかを判断し、そのことによってデータ処理手続きの間のパラメータ信頼区間を規定する際に指針として使用され得る。例えば本発明による非線形回帰アルゴリズムに課せられる典型的な制約は、目標分布を特徴付ける回帰されるパラメータがパラメータ信頼区間の範囲内にあるかどうかの評価を含み得る。例としてガウススペクトル分布を規定するQD種を使用する場合では、典型的なパラメータ制約（パラメータ区間またはパラメータ信頼区間とも互換的に呼ばれる）は、i) 回帰される平均波長の値 $\mu_{reg}$ は+/-5nmの範囲内などの、その期待値の周囲の狭い範囲内にあること、ii) 回帰される標準偏差の値 $\sigma_{reg}$ は20nm未満であること、iii)  $R^2$ 値により特徴付けられる非線形回帰分析の品質は0.95より大きいこと、および、iv) 非線形回帰の収束を実現するために必要とされる反復の数は15より小さいこと、を含み得る。これらのパラメータ区間は変動し得るものであり、市販で入手可能な蛍光種の典型的なパラメータに基づいて選定されることが理解される。

20

30

#### 【0040】

上記で述べられた非線形回帰に対する代替方法として、特定の異形の線形回帰手法が使用される場合がある。この場合、例としてQD光の推定されるスペクトル分布を説明するガウス適合関数を使用すると、そのようなガウス関数は、線形回帰処理が乗算項のみに対処することを可能にするために固定された平均および標準偏差の両方のパラメータを有すべきである。例えば線形回帰は、適合関数の非線形振幅に関して、その適合関数のすべての他のパラメータが固定されている状態で遂行され得る。関係する技術のアルゴリズムとは対照的に、非線形回帰は、QD種の異なる単位体により放出される光のスペクトル分布を規定するパラメータ間の必然的な統計的広がりを補償可能であることにもまた留意されたい。例えば、約565nmでの、指定された標準偏差値を伴う光を発生させると想定される所与の種QD565に関しては、どの個々のQDも、565nmとは幾分異なる平均波長での、または、スペクトル偏差の指定された値と正確には一致しない標準偏差を伴う光を発生させる場合がある。非線形回帰アルゴリズムは、QD種の個々の単位体のQD間のそのような統計的差に対して責任をもつ必要がない回帰を考えに入れたものである。特に回帰アルゴリズムの非線形の性質によって、個々のQDにより放出される光の強度を説明する非線形分布の（非負の振幅、平均波長、および標準偏差などの）パラメータでの

40

50

偏差を、部分的には非線形回帰がこれらのパラメータのいずれかに関して実施されるので、補償することが可能になる。対照的に線形回帰手法は、非負の振幅に関してのみ進められ、Q Dのスペクトル特性での実際的な広がりを受け入れず、そのことによって回帰の精度は低減する。

#### 【 0 0 4 1 】

少なくともステップ 3 1 0 の入力マルチスペクトル画像、およびステップ 3 2 2 で Q D を説明するデータにより規定されるパラメータ信頼区間に基づく強度の取得されたスペクトル分布の修正により生じられる目標画像データによって、画像空間内の使用される Q D 種をスペクトル的に分解または単離すること、および、組織試料の全域で、使用される Q D 種により放出される光の分布を規定することが可能になる。

10

#### 【 0 0 4 2 】

ステップ 3 2 6 では、これらの目標データが、以下のように目標画像配列にさらに対応付けされる。目標画像配列は、使用される Q D の目標スペクトル帯域に対応し、画像取得の間に所与のスペクトル帯域で入手される個々の画像と同一の広がりをもつ、すなわち同じ寸法を有する。回帰処理が進行する際に、目標画像配列の要素は、対応する画像画素に関連する目標データ点が選定された信頼区間を満足するならば  $a^2$  に設定され、対応する目標データ点が信頼区間の外側であるならばゼロ値が割り当てられる。ステップ 3 2 6 のデータ対応付け処理手順に続いて、随意の後処理手続き 3 3 0 が遂行され得る。例えばステップ 3 3 0 A では、背景雑音を表す目標画像強度データを除去するために、目標画像配列の非ゼロの要素の平均より低いデータ値を包含する目標画像配列の要素がゼロに設定され得る。加えてステップ 3 3 0 B では、(画像の高い空間周波数成分を単離し、そのことによって個々の Q D を識別するために) 残留背景雑音があれば除去するために、および信号対雑音比 (S N R) を上昇させるために画像オープニング処理が遂行され得る。行列により表されるような様々な型の数学的「開口」(例えば平円形開口または細隙開口)がこの目的で使用され得るが、1つの実施形態では、次数 1 の十字行列

20

#### 【 0 0 4 3 】

##### 【 数 2 】

$$\begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

30

#### 【 0 0 4 4 】

が使用され得る。したがってステップ 3 3 6 では、洗練された目標画像配列が、対応する目標画像を形成するためにさらに使用され、その目標画像は、波長の回帰された平均値での光を放出するスペクトル的にアンミックスされた蛍光種(ここでは Q D)を表し、このアンミックスされた Q D 種により放出される光に対する組織試料の光学応答の視覚的に知覚可能な表現を提供し得る。最後にステップ 3 4 0 では、例えば電子監視装置などのグラフィカル出力装置で目標画像が表示され得る。追加的または代替的に、ステップ 3 1 0 の入力超立方体画像を構成する個々の画像のいずれかが、別々に、または組み合わせで、おおよび目標画像との比較のために表示される場合もある。代替的には目標画像配列のデータは、デジタルまたはアナログなどの他の形態での将来の処理手続きまたは使用のために、記憶かつ/または提示される場合がある(示されない)。

40

#### 【 実施例 1 】

#### 【 0 0 4 5 】

5 6 5 nm で蛍光を発する単一の Q D 種 (Q D 5 6 5) が結合された状態での前立腺組織の超立方体画像が、Applied Spectral Imaging (A S I、M i g d a l H a ' E m e k、I s r a e l) による画像化システムを使用して 4 0 0 nm から 9 0 1 nm に広がる波長の画像化範囲にわたって取得された。超立方体画像は、9 7 個の 6 5 6 × 8 3 2 画素のスペクトル的に離散的な画像を含んだ。Q D 5 6 5 により放出される光に対する組織の光学応答のアンミキシングを容易にするために、5 2 9 nm から 5 9 8 nm の動的スペクトル範囲が選定されたが、このことは、個々の Q D 5 6 5 の間

50

でのスペクトルパラメータの起こり得る差または偏差を考慮したものである。選定された動的スペクトル範囲内の30個の個々の画像に対応する画像データから、画像強度のスペクトルが545, 762画素の各々に対して決定された。これらのスペクトルデータは、図3のステップ318によって、データ点の各々からスペクトル強度の最小値を減算することによりさらに補正された。LMA非線形回帰が、(1)の関数としてのガウス適合関数を用いて、ならびに、 $a = 1$ 、 $\mu = 550$ および $\sigma = 1$ の初期条件を用いて適用された。所与の画素に対する非線形回帰の結果が上記で説明された信頼区間を満足したならば、そのような画素に対応する目標画像配列の要素が、 $a_{reg}^2$ の値を用いて創始された。そうでなかったならば、目標配列の要素は図3のステップ326によってゼロ値が割り当てられた。目標画像配列は、図3のアルゴリズムのステップ330A、330Bによって背景雑音を除去するために、および画像オープニング処理を遂行するためにさらに修正された。

10

#### 【0046】

前立腺組織に関連するQD565のスペクトル・アンミキシングの結果が、図4Aおよび4Bに示される。ここで図4Aは、QD565を用いた前立腺組織の超立方体画像の565nmでのスライスを表す個々の画像であり、一方で図4Bは、スペクトル的にアンミックスされた565nmの量子ドット410の目標画像との、図4Aの個々の画像の重ね合わせである。本発明の方法の実装形態は、QDを確信的に識別する方法の能力を立証する。

20

#### 【実施例2】

#### 【0047】

異なる実験では、 $n = 5$ 個の型(5つの種)のQDが接合された状態での胸部組織が、 $608 \times 656$ の光学検出器画素を用いて、402nmから800nmの画像化スペクトル範囲での90個の離散波長で画像化され、そのことによってマルチスペクトル超立方体画像を取得した。蛍光QD種は、490nm、525nm、565nm、625nm、および655nmの典型的な波長により特徴付けられたものであり、そのことに応じて $QD_1 = QD_{490}$ 、 $QD_2 = QD_{525}$ 、 $QD_3 = QD_{565}$ 、 $QD_4 = QD_{625}$ 、および $QD_5 = QD_{655}$ (Life Technologies Corp.)と標識された。398, 848画素の各々に対して、検出された光強度のスペクトルが、図3のステップ316、318によって導出され、さらに基線補正された。LMA非線形回帰が、図3のステップ322によって、次式の適合関数を用いて、基線補正されたスペクトル強度に対してさらに適用された。

30

#### 【0048】

#### 【数3】

$$f(\lambda) = \sum_{i=1}^n \frac{a_i^2}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{\lambda - \mu_i}{\sigma_i} \right)^2 \right] \quad (2)$$

#### 【0049】

この式は特定の場合では、個々のQD種のスペクトルプロファイルに対する近似として使用される $n = 5$ 個のガウス統計分布の重ね合わせを表す。初期条件が、 $i = 1$ から $i = 5$ に対して $a_i = 1$ 、および( $\mu_1 = 490$ 、 $\mu_2 = 525$ 、 $\mu_3 = 565$ 、 $\mu_4 = 625$ 、 $\mu_5 = 655$ )であるように選定された。非線形回帰が、これらの型のQD種に対するスペクトル分布に対して典型的である標準偏差値に基づいて実行された。全体的には選定された適合関数の個別のパラメータが固定され、回帰が残りのパラメータに対して実施される。回帰されたパラメータのすべてが既定のパラメータ区間の範囲内にあると、かつ/または、しきい値条件が満足されると、回帰は終結させられ、決定された回帰されたパラメータが、個々のQD種のスペクトル分布を説明するために、選定された適合関数とともに使用される。1つの実施形態では、 $n = 5$ 個のQD種を用いる状況に適用されるような非線形回帰処理は以下のように進行する。

40

50



## 【 0 0 5 0 】

最初に回帰が、適切な動的スペクトル範囲を用いて、2つの選定された種のスペクトルに適用される。ここでは回帰は、402 nmから581 nmに広がるように選定された動的スペクトル範囲、および以下の初期条件、すなわち、固定された  $\mu_1 = 10$ 、 $\sigma_1 = 10$  を用いて、 $QD_1 = QD490$  および  $QD_2 = QD525$  の種に最初に適用された。信頼区間は、 $QD490$  に対する平均波長の回帰される値に対して  $470 < \mu_{reg,1} < 500$  の区間を含んだ。 $QD490$  に対する回帰された平均波長がこの信頼区間の範囲内であったならば、かつ、 $QD490$  に対するスペクトル強度振幅値が、(特定の実施形態では、関心の範囲にわたる画像形成信号の最大強度の10倍の値として規定される) 雑音しきい値の値を上回らなかったならば、(2)のスペクトル強度分布への $QD490$ 種の寄与が、回帰されたパラメータを用いるガウス適合

10

## 【 0 0 5 1 】

## 【数4】

$$f_{reg,1}(\lambda) = \frac{a_{reg,1}^2}{\sigma_{reg,1}\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\lambda - \mu_{reg,1}}{\sigma_1}\right)^2\right]$$

## 【 0 0 5 2 】

であるように設定された。そうでなかったならば、スペクトル強度分布(2)への $QD490$ 種の寄与を表す(2)の成分がゼロに設定され、 $f_{reg,1}(\lambda) = 0$ となった。

次に、非線形回帰が次式の組み合わせに適用された。

20

## 【 0 0 5 3 】

## 【数5】

$$f_{reg,1}(\lambda) + \sum_{i=2}^5 \frac{a_i^2}{\sigma_i\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\lambda - \mu_i}{\sigma_i}\right)^2\right] \quad (3),$$

## 【 0 0 5 4 】

この式で用いる初期パラメータは、( $QD_2 = QD525$  に対する)  $\mu_2 = 10$ 、( $QD_3 = QD565$  に対する) 固定された  $\mu_3 = 14$ 、( $QD_4 = QD625$  に対する)  $\mu_4 = 20$ 、および( $QD_5 = QD655$  に対する) 固定された  $\mu_5 = 10$  である。このステップでは、回帰される式は $QD655$ に関して探索されている。結果として得られる回帰されたパラメータが、非線形回帰処理手順に対して選定されるように、信頼区間  $\mu_{reg,2} < 2$ 、または  $\mu_{reg,4} < 2$ 、または  $[\mu_{reg,5} - \mu_{reg,4}] < 5$  を満足するならば、代替的な回帰が、以下のパラメータ、すなわち、 $\mu_2 = 10$ 、固定された  $\mu_3 = 14$ 、固定された  $\mu_4 = 15$ 、および固定された  $\mu_5 = 10$  を用いて行われる。これに対して、結果として得られる回帰されたパラメータが、以下の「誤り」区間 ( $\mu_{reg,3} - \mu_{reg,2}$ 、 $\mu_{reg,3} > 585$ 、 $\mu_{reg,5} - \mu_{reg,4}$ 、 $\mu_{reg,5} > 700$ 、 $\mu_{reg,3} < 2$ 、 $\mu_{reg,4} < 4$ 、 $\mu_{reg,4} > 30$ ) のいずれかの範囲内にあり、それらの区間のいずれかを満足するならば、または、選定された信頼区間(例えば95%区間)が  $a_{reg,4}$ 、 $\mu_{reg,4}$ 、 $\sigma_{reg,4}$ 、 $a_{reg,5}$  のいずれかに対してゼロ値を含んだならば、スペクトル強度分布(3)への $QD655$ 種の寄与を表す(3)の成分  $f_{reg,5}(\lambda)$  がゼロに定まった状態となつて、 $f_{reg,5}(\lambda) = 0$  となり、 $QD655$ の寄与は、これ以上は勘定に入れられない。

30

40

## 【 0 0 5 5 】

後者の場合では回帰の次のステップは、以下の適合式を使用して402 nmから800 nmの完全な画像化スペクトル範囲内での  $QD_2 = QD525$ 、 $QD_3 = QD565$ 、および  $QD_4 = QD625$  の回帰を含んだ。

## 【 0 0 5 6 】

【数 6】

$$f_{reg,1}(\lambda) + \sum_{i=2}^4 \frac{a_i^2}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{\lambda - \mu_i}{\sigma_i} \right)^2 \right] \quad (4)$$

【0057】

この式で用いる初期パラメータは、 $\mu_2 = 10$ 、固定された  $\mu_3 = 14$ 、および  $\mu_4 = 20$  である。ここでも、回帰されたパラメータがパラメータ区間  $\mu_{reg,3}$   $\mu_{reg,2}$  もしくは  $\mu_{reg,4}$   $\mu_{reg,3}$  の範囲内にあるならば、または、 $a_{reg,2}$  もしくは  $a_{reg,3}$  もしくは  $\mu_{reg,3}$  もしくは  $\mu_{reg,3}$  もしくは  $a_{reg,4}$  もしくは  $\mu_{reg,4}$  もしくは  $\mu_{reg,4}$  に対する信頼区間がゼロを含んだならば、スペクトル強度分布 (4) への QD 565 種の寄与を表す (4) の成分  $f_{reg,3}$  ( ) がゼロに設定され、 $f_{reg,3}$  ( ) = 0 となった。この場合、全体的な適合関数に対する QD 565 の寄与は、これ以上は勘定に入れられなかったことになり、残りの非線形回帰ステップが、残りの 2 つの QD 種、QD<sub>2</sub> = QD 525 および QD<sub>4</sub> = QD 625 を用いて、

【0058】

【数 7】

$$f_{reg,1}(\lambda) + \frac{a_2^2}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{\lambda - \mu_2}{\sigma_2} \right)^2 \right] + \frac{a_4^2}{\sigma_4 \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{\lambda - \mu_4}{\sigma_4} \right)^2 \right] \quad (5),$$

【0059】

および 402 nm から 800 nm の完全な画像化スペクトルの全域で取得された画像化データによって実行された。初期パラメータは、固定された  $\mu_2 = 14$ 、および固定された  $\mu_4 = 15$  であった。

【0060】

非線形回帰のこの最後のステップの結果が  $R^2 > 0.95$  であることを確実にしたならば、図 3 のステップ 326 によって、QD<sub>1</sub> = QD 490、QD<sub>2</sub> = QD 525、QD<sub>3</sub> = QD 565、QD<sub>4</sub> = QD 625、および QD<sub>5</sub> = QD 655 にそれぞれ対応する目標画像データ配列に、 $i = 1, 2, 3, 4$ 、および 5 の各々に対する回帰された値

【0061】

【数 8】

$$a_{reg,i}^2$$

【0062】

が割り当てられた。次の随意のステップ (図 3 には示されない) として、これらの目標画像配列に対応する目標画像は、例えば Kapur ら、Computer Vision, Graphics, and Image Processing (第 29 巻、273 ~ 285 頁、1985 年) により検討されたような最大エントロピー法に基づく自動しきい値処理を使用して、2 進形にさらに変換される場合がある。そのような 2 進変換によって、特定の QD 種に対応する平均波長での組織の画像の形成および視覚化、ならびに、目標画像の背景上のこの QD 種の視覚化および / または識別が容易になる。

【0063】

QD<sub>1</sub> = QD 490、QD<sub>2</sub> = QD 525、QD<sub>3</sub> = QD 565、QD<sub>4</sub> = QD 625、および QD<sub>5</sub> = QD 655 を用いてマーキングされた胸部組織に適用されたような本発明の方法の例示的な結果が、図 5 A、5 B、6 A、6 B、7 A、7 B、8 A、8 B、9 A、および 9 B に提示される。図 5 B、6 B、7 B、8 B、および 9 B は、QD 種の各々に対して、関心の波長での (すなわち  $\lambda_1 = 490$  nm、 $\lambda_2 = 525$  nm、 $\lambda_3 = 565$  nm、 $\lambda_4 = 625$  nm、および  $\lambda_5 = 656$  nm での) 超立方体画像のスペクトルスラ

10

20

30

40

50

イスに対応する個々の画像を例示する。比較として図 5 A、6 A、7 A、8 A、および 9 A は、対応する目標のアンミックスされた画像を表示し、それらの画像の各々は、Q D のそれぞれに対応する種の蛍光放出に対する画像組織の光学応答を表す。図 5 B、7 B、および 9 B は、2.5 倍に増大された強度によって提示され、一方で図 6 B および 8 B は、5 倍に増大された強度を図示し、このことは両方の場合で、組織に入射する光の相対的強度を反映したものである。

【0064】

図 1 2 A、1 2 B は、(図 3 のステップ 3 3 0 B の処理手順などの) 画像オープニング処理手順の使用が好ましい場合がある状況の簡単な例示を与える。図 1 2 A の画像は、目標画像データからの背景雑音の除去の後の、図 3 のステップ 3 3 0 A の結果として得られた単一の Q D の画像に対応する。識別された Q D (画素群 1 2 0 2) に加えて、残留雑音 (画素 1 2 0 2、1 2 0 4) の存在が観察され得る。円形開口を表す単位行列

【0065】

【数 9】

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

【0066】

を用いて実行される「画像オープニング」処理手順の後、残留背景雑音が図 1 2 B に示されるように除去される。

本発明は上記で説明された例示的な実施形態によって説明されているが、例示された実施形態に対する修正、およびそれらの実施形態の変形が、本明細書で開示された発明概念から逸脱することなく行われ得ることは、当業者には理解されるであろう。例えば本発明の方法のいくつかの態様は流れ図を参照して説明されたが、流れ図の各々のブロックのすべてもしくは一部分の、またはブロックの組み合わせの機能、動作、判断等が、組み合わせられ得る、別々の動作に分離され得る、または他の順序で遂行され得ることを当業者は容易に認識するはずである。さらに実施形態は様々な例示のデータ構造に関して説明されているが、システムは種々のデータ構造を使用して実施され得ることを当業者であれば認めるであろう。本発明の実施形態に対して選定された特定の値が詳述されているが、本発明の範囲内で、パラメータのすべての値は異なる用途に合うように幅広い範囲にわたって変動し得ることを理解されたい。加えて、本明細書で利用されたものとは異なる波長特性を有するナノ結晶量子ドットの使用。さらには開示された態様、またはこれらの態様の一部分は、上記でリストアップされなかった形で組み合わせられる場合がある。したがって本発明は、開示された実施形態(複数可)に限定されるとみなされるべきではない。

10

20

30

【図 1】

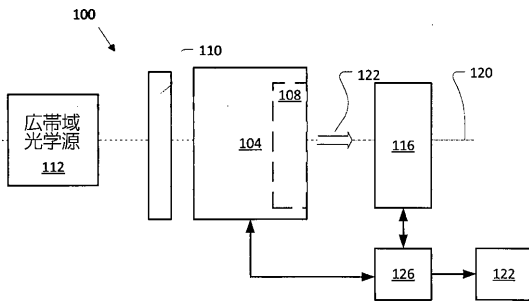


FIG. 1A

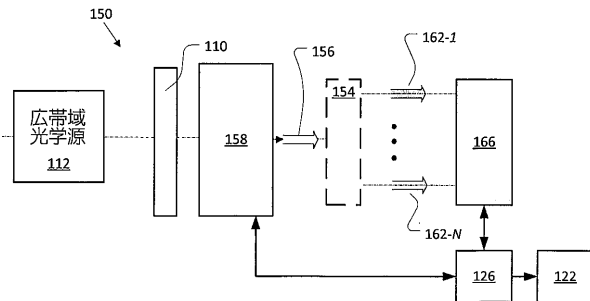


FIG. 1B

【図 2】

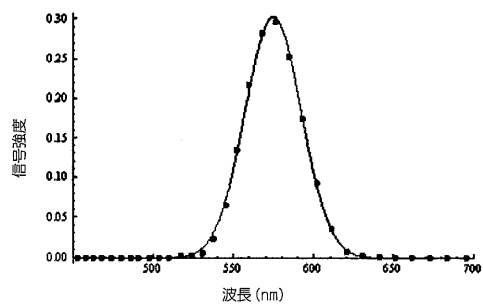


FIG. 2A

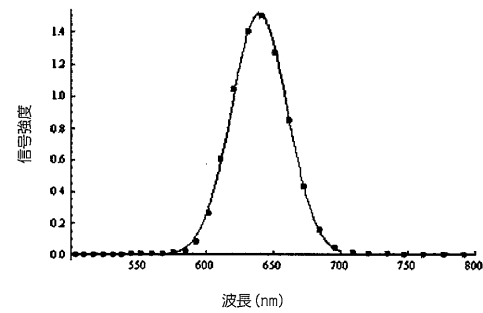
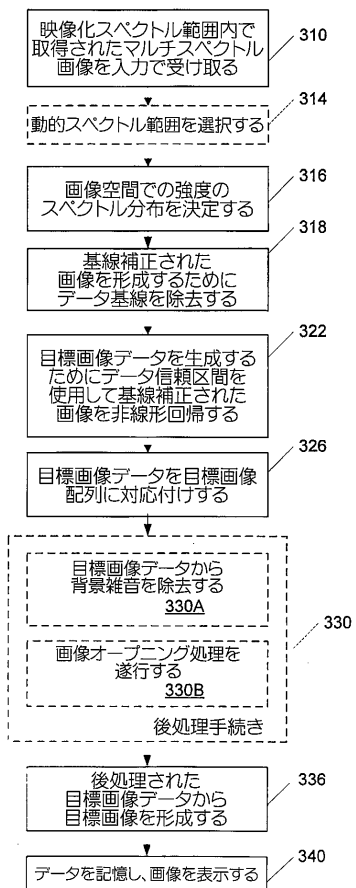


FIG. 2B

【図 3】



【図 4 A】

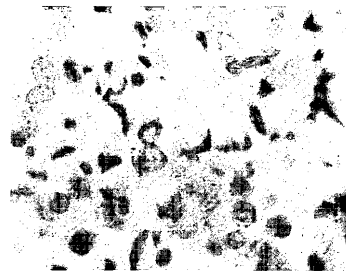


FIG. 4A

【図 4 B】

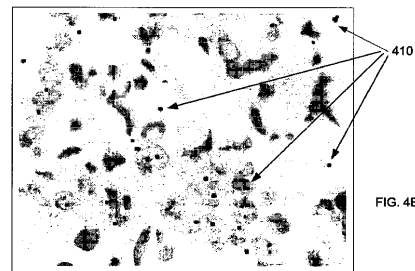


FIG. 4B

【図 5 A】

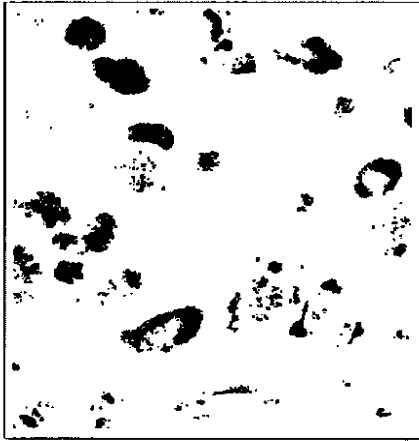


FIG. 5A

【図 5 B】

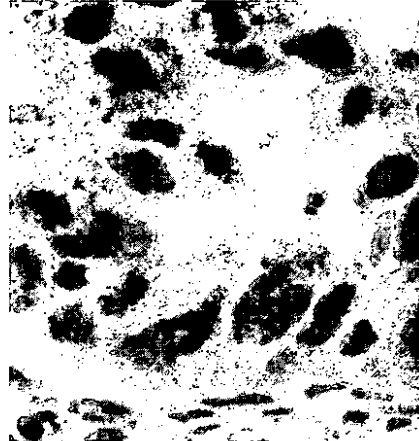


FIG. 5B

【図 6 A】

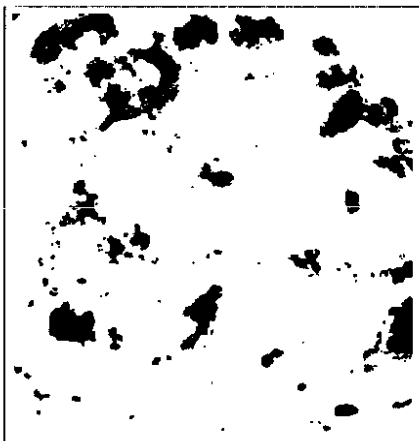


FIG. 6A

【図 6 B】

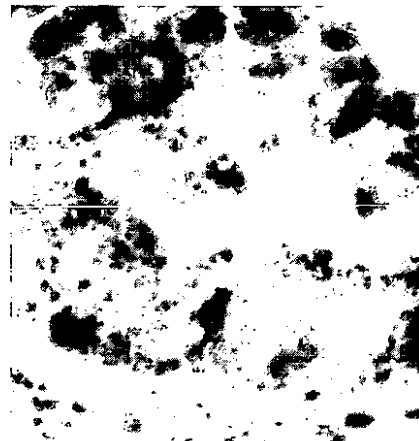


FIG. 6B

【図 7 A】

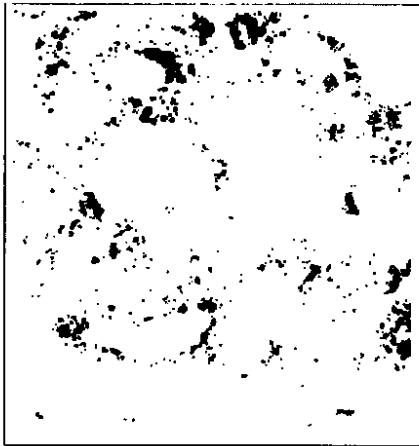


FIG. 7A

【図 7 B】



FIG. 7B

【図 8 A】



FIG. 8A

【図 8 B】



FIG. 8B

【図 9 A】



FIG. 9A

【図 9 B】



FIG. 9B

【図 10 A】

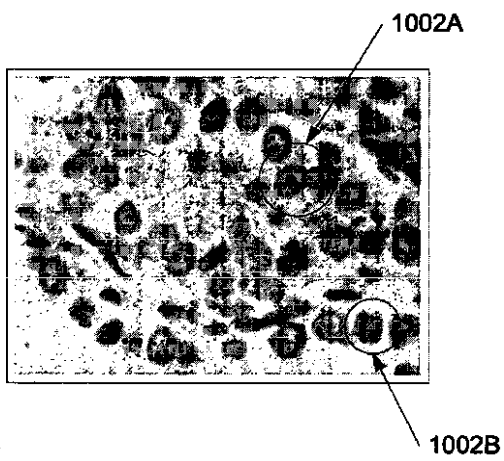


FIG. 10A

【図 10 B】

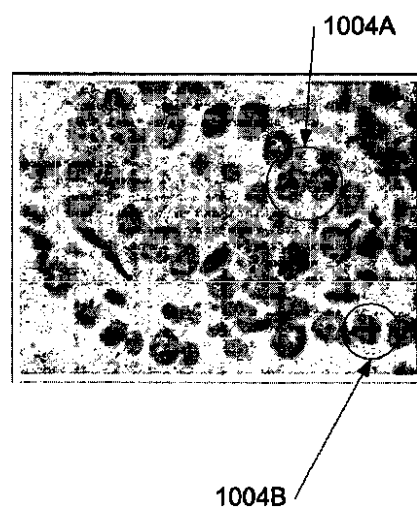
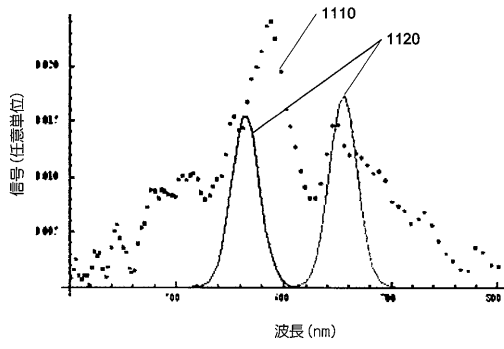


FIG. 10B

【図 1 1】



【図 1 2】

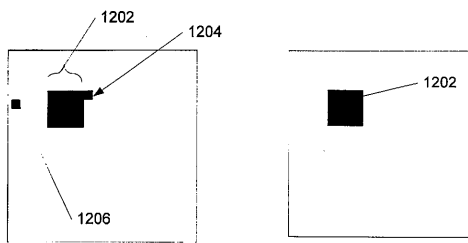


FIG. 12A

FIG. 12B



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/058253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G06K9/00  
ADD.

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)  
G06K

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

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

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/212866 A1 (LETT G SCOTT [US] ET AL) 4 September 2008 (2008-09-04) paragraph [0055] - paragraph [0126]; figures 1-17	1-30
A	----- Eismann and Stein: "Stochastic Mixture Modeling" In: Chein-I Chang: "Hyperspectral Data Exploitation: Theory and Applications.", 1 December 2008 (2008-12-01), PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, XP002683270, ISBN: 978-0-471-74697-3, pages 107-148, sect.5.2, 5.2.2, 5.2.5, 5.4, 5.4.1, 5.5.3.1, 5.6.3 ----- -/--	1-30

☒ 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

12 September 2012

Date of mailing of the international search report

05/10/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Darolti, Cristina

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/058253

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BURTON K ET AL: "Spectral optical imaging in biology and medicine", 22 April 2009 (2009-04-22), BIOMEDICAL OPTICAL IMAGING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, PAGE(S) 29 - 72, XP008123661, ISBN: 978-0-19-515044-5 p.29-38, 40-42, 49 -----	1-30
A	Aguet et al: "An introduction to fluorescence microscopy" In: Jens Rittscher, Raghu Machiraju und Stephen T. C. Wong: "Microscopic Image Analysis for Life Science Applications", 1 January 2008 (2008-01-01), Artech House, XP002683271, ISBN: 1596932368 pages 85-114, -----	1-30
A	STEIN D: "Application of the normal compositional model to the analysis of hyperspectral imagery", ADVANCES IN TECHNIQUES FOR ANALYSIS OF REMOTELY SENSED DATA, 2003 IEEE WORKSHOP ON 27-28 OCT. 2003, PISCATAWAY, NJ, USA, IEEE, 27 October 2003 (2003-10-27), pages 44-51, XP010701471, DOI: 10.1109/WARSD.2003.1295171 ISBN: 978-0-7803-8350-0 sect.2 -----	1-30
A	PINAUD F ET AL: "Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 27, no. 9, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 1679-1687, XP025097611, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.11.018 [retrieved on 2006-03-01] figure 3 -----	1-30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/058253

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008212866 A1	04-09-2008	AU 2007352394 A1	06-11-2008
		EP 2095094 A2	02-09-2009
		EP 2378275 A1	19-10-2011
		EP 2378276 A1	19-10-2011
		EP 2381242 A1	26-10-2011
		JP 2010512508 A	22-04-2010
		US 2008212866 A1	04-09-2008
		US 2011235879 A1	29-09-2011
		US 2011235880 A1	29-09-2011
		US 2011235881 A1	29-09-2011
		US 2011238325 A1	29-09-2011
		US 2012224044 A1	06-09-2012
		WO 2008133666 A2	06-11-2008
-----			

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100146710

弁理士 鐘ヶ江 幸男

(72)発明者 バンフォード, パスカル

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 6 8 , ダブリン, ホールトン・コート 4 9 7 8

(72)発明者 カーニク, ロナルド

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 4 0 4 , フォスター・シティ, ハドック・ストリート 9 6 1

(72)発明者 オッター, マイケル

アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 7 3 7 , トゥーソン, ノース・マウンテン・ローレル・ブレイス 1 1 8 0 9

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 EA01 FA01 FA02 FA06 GA25 LA03 NA01

NA05 NA06

5B047 AA17 AB04 BC04 BC07 BC11 CA23 CB21