

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7667164号
(P7667164)

(45)発行日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(24)登録日 令和7年4月14日(2025.4.14)

(51)国際特許分類		F I	
G O 1 N	15/1429(2024.01)	G O 1 N	15/1429 2 0 0
G O 1 N	21/64 (2006.01)	G O 1 N	15/1429 3 0 0
		G O 1 N	21/64 Z
請求項の数 15 (全45頁)			
(21)出願番号	特願2022-546568(P2022-546568)	(73)特許権者	595117091
(86)(22)出願日	令和3年1月20日(2021.1.20)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カン
(65)公表番号	特表2023-511760(P2023-511760		パニー
	A)		B E C T O N , D I C K I N S O N A
(43)公表日	令和5年3月22日(2023.3.22)		N D C O M P A N Y
(86)国際出願番号	PCT/US2021/014167		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 0
(87)国際公開番号	WO2021/154561		7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レ
(87)国際公開日	令和3年8月5日(2021.8.5)		イクス ベクトン・ドライブ 1
審査請求日	令和6年1月19日(2024.1.19)	(74)代理人	100114557
(31)優先権主張番号	62/968,516		弁理士 河野 英仁
(32)優先日	令和2年1月31日(2020.1.31)	(74)代理人	100078868
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 河野 登夫
	米国(US)	(72)発明者	ハルバート, リチャード リー
(31)優先権主張番号	63/053,108		アメリカ合衆国 9 7 5 2 0 オレゴン,
(32)優先日	令和2年7月17日(2020.7.17)		アシュランド, エヌ マウンテン アベニ
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛍光フローサイトメータデータを分類するための方法およびシステム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光フローサイトメータデータを分類する方法であって、
教師付きアルゴリズムを用いて前記蛍光フローサイトメータデータを処理することを含んでおり、
前記教師付きアルゴリズムは、
前記蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、
前記蛍光フローサイトメータデータの集団についてスピルオーバー拡散の尺度を決定することと、
決定されたスピルオーバー拡散に基づいて前記蛍光フローサイトメータデータの集団を調整して、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することと、
蛍光フローサイトメータデータの前記別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立して、蛍光フローサイトメータデータの前記別個のスピルオーバー拡散調整集団を分類することと
を行うように構成されている、方法。

【請求項2】

前記蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素に対する前記蛍光フローサイトメータデータの陽性または陰性に基づいて集団にクラスタリングされる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記蛍光フローサイトメータデータは、閾値に対する前記蛍光フローサイトメータデータの関係に基づいて、特定の蛍光色素について陽性または陰性であると判定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器によって収集された蛍光フローサイトメータデータが特定の蛍光色素から放出される光の収集によって増加する程度を定量化することを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器－蛍光色素対のスピルオーバー拡散係数を計算することを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【数 1】

$$SS = \frac{\Delta\sigma_f}{\sqrt{\Delta d}} = \frac{\sqrt{(\sigma_{pos})^2 - (\sigma_{neg})^2}}{\sqrt{d_{pos} - d_{neg}}}$$

式中、

SS は、前記スピルオーバー拡散係数であり、

20

$\Delta\sigma_f$ は、蛍光色素から収集された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の発光の拡散を示す増分標準偏差であり、

Δd は、蛍光検出器によって受信された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の蛍光強度の差である、

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記スピルオーバー拡散係数を計算することは、フローサイトメータデータの陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が 0 であると仮定することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

30

前記スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【数 2】

$$SS = \frac{\sqrt{\sigma^2 - \sigma_0^2}}{\sqrt{d}}$$

式中、

SS は、前記スピルオーバー拡散係数であり、

σ^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陽性集団の標準偏差であり、

σ_0^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値であり、

40

d は、蛍光検出器によって収集された光の強度である、

請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

σ_0^2 は、線形回帰によって計算される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記蛍光フローサイトメータデータは、複数の異なる蛍光色素から放出された光から収集される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

各蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わせられる、請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

スピルオーバー拡散行列に基づいて、複数の異なる蛍光色素の各々についてスピルオーバー拡散の大きさを計算することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

蛍光フローサイトメータデータを調整することは、前記複数の異なる蛍光色素の各々についての前記スピルオーバー拡散の大きさを、その蛍光色素に対応する蛍光フローサイトメータデータの集団から減算することを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

システムであって、

蛍光フローサイトメータデータを取得するように構成された粒子分析器構成要素と、

プロセッサであって、前記プロセッサに動作可能に結合されたメモリを備え、前記メモリは、前記メモリに記憶された命令を含み、前記命令は、前記プロセッサによって実行されると、前記プロセッサに、

前記蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、

前記蛍光フローサイトメータデータの集団についてスピルオーバー拡散の尺度を決定することと、

決定されたスピルオーバー拡散に基づいて前記蛍光フローサイトメータデータの集団を調整して、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することと、

蛍光フローサイトメータデータの前記別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立して、蛍光フローサイトメータデータの前記別個のスピルオーバー拡散調整集団を分類することと

を行わせる、プロセッサと

を含む、システム。

【請求項 1 5】

方法によって蛍光フローサイトメータデータを分類するための命令が記憶された非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、

前記方法は、教師付きアルゴリズムを用いて前記蛍光フローサイトメータデータを処理することを含んでおり、

前記教師付きアルゴリズムは、

前記蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、

前記蛍光フローサイトメータデータの集団についてスピルオーバー拡散の尺度を決定することと、

決定されたスピルオーバー拡散に基づいて前記蛍光フローサイトメータデータの集団を調整して、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することと、

蛍光フローサイトメータデータの前記別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立して、蛍光フローサイトメータデータの前記別個のスピルオーバー拡散調整集団を分類することと

を行うように構成されている、

非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

フローサイトメトリは、血液サンプルの細胞または別のタイプの生体サンプルもしくは化学的サンプル中の目的の粒子などの生体材料を特徴付け、しばしば選別するために使用される技術である。フローサイトメータは、通常、流体サンプルを受容するためのサンプルリザーバと、シース流体を含むシースリザーバとを含む。フローサイトメータは、流体サンプル中の粒子（細胞を含む）を細胞流としてフローセルに輸送する一方で、シース流体もフローセルに向ける。フローストリームの成分を特徴付けるために、フローストリームは光で照射される。フローストリーム中の形態または蛍光標識の存在などの材料の変動は、観察される光の変動を引き起こす可能性があり、これらの変動により、特徴付けおよ

10

20

30

40

50

び分離が可能となる。

【0002】

例えば、流体懸濁液中の分子、分析物結合ビーズ、または個々の細胞などの粒子は、検出領域を通過し、そこで粒子は、典型的には1つ以上のレーザからの励起光に曝露され、粒子の光散乱および蛍光特性が測定される。粒子またはその成分は、典型的には、検出を容易にするために蛍光染料で標識される。多数の異なる粒子または成分は、スペクトル的に別個の蛍光染料を使用して、異なる粒子または成分を標識することによって、同時に検出され得る。一部の実装形態では、測定される散乱パラメータの各々に対して1つ、および検出される別個の染料の各々に対して1つ以上の、複数の検出器が、分析器に含まれる。例えば、一部の実施形態は、1色素当たり2つ以上のセンサまたは検出器が使用されるスペクトル構成を含む。得られたデータは、光散乱検出器および蛍光放射の各々に対して測定された信号を含む。

10

【0003】

フローサイトメータは、測定されたデータを記録し、データを分析するための手段をさらに含み得る。例えば、データの記憶および分析は、検出エレクトロニクスに接続されたコンピュータを使用して実行され得る。例えば、データは、表形式で記憶することができ、各行は、1つの粒子に関するデータに対応し、列は、測定された特徴の各々に対応する。粒子分析器からのデータを記憶するための「FCS」ファイル形式などの標準ファイル形式の使用は、別個のプログラムおよび／または機械を使用してデータを分析することを容易にする。現行の分析方法を使用して、データは、典型的には、視覚化を容易にするために一次元ヒストグラムまたは二次元(2D)プロットで表示されるが、他の方法を使用して、多次元データを視覚化してもよい。

20

【0004】

例えばフローサイトメータを使用して測定されるパラメータには、典型的には、前方散乱(FSC)と称される、ほぼ前方方向に沿った狭い角度で粒子によって散乱された励起波長の光、側方散乱(SSC)と称される、励起レーザに対して直交方向に粒子によって散乱された励起光、およびある範囲のスペクトル波長にわたって信号を測定する1つ以上の検出器において蛍光分子から、またはその特定の検出器または検出器アレイにおいて主に検出される蛍光染料によって発せられた光が含まれる。様々な細胞タンパク質または他の成分を蛍光染料標識抗体または他の蛍光プローブで標識することから生じる光散乱特性および蛍光放射によって、異なる細胞のタイプを識別することができる。

30

【0005】

フローサイトメータおよび走査サイトメータの両方が、例えば、BD Biosciences (San Jose, Calif.) から市販されている。フローサイトメトリは、例えば、Landy et al. (編), Clinical Flow Cytometry, Annals of the New York Academy of Sciences Volume 677 (1993)、Bauer et al. (編), Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications, Williams & Wilkins (1993)、Ormerod (編), Flow Cytometry: A Practical Approach, Oxford Univ. Press (1994)、Jaroszeski et al. (編), Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology No. 91, Humana Press (1997)、および Practical Shapiro, Flow Cytometry, 4th ed., Wiley-Liss (2003) に記載されており、すべて参照により本明細書に組み込まれる。蛍光撮像顕微鏡は、例えば、Pawley (編), Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd Edition, Plenum Press (1989) に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0006】

50

フローサイトメータデータが1つ以上の検出器から受信された後、多くの場合、ユーザがデータを理解できるようにするためのデータ分析プロセスが行われる。一部の場合において、フローサイトメータデータ分析は、フローサイトメータにおいて照射されている分析物（例えば、細胞、粒子）に関連する表現型を決定することを含む。すべてのサイトメトリサンプルの大部分について、詳細な分析が可能になる前に、細胞型のサブセット（すなわち、表現型）を特定する必要がある。典型的なワークフローでは、事前に計画されたゲーティング階層は、細胞型の普遍的に受け入れられている定義を要約し、（生物学的効果、バッチ効果、および任意の他の特異性を説明するために）各サンプルのデータに適合するように手動で調整する必要がある。調整アプローチは、「教師なし」または「教師付き」のいずれかであり得る。教師なしアプローチは、フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることから始まり、次いで、特定の分析物と特定のパラメータ（例えば、蛍光）との関連に関する何らかの先験的知識を使用して、細胞型標識（すなわち、表現型）を各集団クラスタに割り当てることを試みる。一方、教師付きアプローチは、典型的には、ゲーティング階層、すなわち、1つ以上のパラメータに関するその状態に基づいて個々の細胞がどのように分類される（すなわち、表現型決定される）かを支配する規則のセットを確立することから始まる。続いて、フローサイトメータデータは、個々のデータ点が階層上のどこかに収まるように、ゲーティング階層に「適合」される。DAFiアルゴリズムは、例えば、事象のクラスタを、それらの重心に基づいて既存のゲーティングツリーに適合させ、これにより、細胞型を、固定ゲート境界ではなくデータ内の自然境界に沿って定義することが可能になる。DAFiアルゴリズムは、例えば、Lee et al. (2018). DAFI: a directed recursive data filtering and clustering approach for improving and interpreting data clustering identification of cell populations from polychromatic flow cytometry data. Cytometry Part A, 93 (6), 597-610に記載されており、これは、参照により本明細書に組み込まれる。一方、FlowDensityは、あらかじめ定義された階層のためのゲート境界として使用するために、データ内の密度トラフを見出すものである。FlowDensityアルゴリズムは、例えば、Malek et al. (2015). FlowDensity: reproducing manual gating of flow cytometry data by automated density-based cell population identification. Bioinformatics, 31 (4), 606-607に記載されており、これは、参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、DAFiアルゴリズムは、小さなサンプル間変動を説明することができるのみであり、FlowDensityアルゴリズムは、パネル毎に調整する、手作業による自動表現型決定エキスパートを必要とする。

【0007】

エクバラム (Ek' Balam) アルゴリズムは、エクバラムアルゴリズムが調整が容易であり、大きなサンプル間変動を扱うことができるという点で、DAFiおよびFlowDensityアルゴリズムを改善するフローサイトメータデータ調整へのアプローチを表す。しかしながら、エクバラムアルゴリズムなどの2つ以上のパラメータ（例えば、蛍光信号）の測定を伴うフローサイトメトリデータ解析プロトコルは、特定の蛍光色素を示す微粒子変調光が、そのパラメータを測定するように構成されていない1つ以上の検出器によって受信される現象であるスピルオーバーによって複雑となる。したがって、光は、「スピルオーバー」し、オフターゲット検出器によって検出することができる。スピルオーバーはアンミキシングによって補正することができ、アンミキシングでは、観測されたスピルオーバーのレベルを介して蛍光色素強度値を測定された検出器値に関連付ける連立方程式を解くことによって、新しい蛍光色素毎の強度値が計算される。アンミキシングは、検出器の数がアンミキシングされる蛍光色素の数に等しい場合、「補償」と称されることが多い。アンミキシングは、各蛍光色素から他の蛍光色素への強度寄与を補正するが、ノイズ

10

20

30

40

50

寄与、すなわち、スピルオーバーによって蛍光フローサイトメータデータに寄与する誤差を補正することができない。このノイズは「スピルオーバー拡散」と称される。一部の例では、スピルオーバー拡散ノイズは建設的であり、その結果、他の場合に観察される信号強度よりも高い信号強度が得られ、他の例では、ノイズは破壊的であり、その結果、強度は低くなる。例えば、図 1 は、蛍光色素 B を測定するために使用される検出器上の蛍光色素 A からのノイズの存在に起因して、集団 101 がどのように拡散するかを実証するものである。集団拡散に起因して、データ分析プロトコルによる蛍光フローサイトメータデータの分類（すなわち、表現型決定）が不正確になり得る。例えば、図 2 A および図 2 B は、フローサイトメータデータの別個の集団クラス間を正確に区別するエクバラムアルゴリズムの性能に対するスピルオーバー拡散の効果を示している。図 2 B に示すように、集団 101 は不正確に区分され、集団の一部は結果的に不正確な表現型に割り当てられる（すなわち、 A^+B^- ではなく、 A^+B^+ ）。このように、フローサイトメータデータ分析におけるスピルオーバー拡散のための解決策が必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

本発明の態様は、蛍光フローサイトメータデータを分類するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングするように構成された教師付きアルゴリズムを用いてフローサイトメータデータを処理することを含む。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、階層に対する各データ点の状態に基づいてクラスタリングされる。かかる実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素に対する蛍光フローサイトメータデータの陽性または陰性に基づいて集団にクラスタリングされる。一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、閾値に対する蛍光フローサイトメータデータの関係に基づいて、特定の蛍光色素について陽性または陰性であると判定される。データがクラスタリングされた後、本方法の実施形態は、スピルオーバー拡散の尺度を決定することを含む。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散を決定することは、第 1 の検出器によって第 1 の蛍光色素から収集された光の強度が、同じ検出器による第 2 の蛍光色素からの光の同時収集によって影響を受ける程度を定量化するスピルオーバー拡散係数を計算することを含む。実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、特定の蛍光色素から放出される光が所与の検出器において収集される程度を決定するために、蛍光検出器および蛍光色素の各可能な組み合わせについて計算される。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わされる。特定の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの集団は、スピルオーバー拡散行列において決定されたスピルオーバー拡散の大きさを説明するように調整される。本方法を実施することは、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を区分することをさらに含み得る。実施形態では、集団を区分することは、マシユーの相関係数を計算することと、各関連閾値に対してマシユーの相関係数を最適化する方法で、別個の集団（すなわち、異なる蛍光パラメータを呈する集団）間を描写する区分を確立することとを伴う。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの区分された集団は、その後、別個の集団がそれぞれのサブタイプ（すなわち、表現型）に関連付けられるように分類される。

【0009】

本発明の態様はまた、蛍光フローサイトメータデータを分類するためのシステムを含む。一部の実施形態では、システムは、蛍光フローサイトメータデータを生成するように構成された粒子分析器を含む。システムはまた、プロセッサに動作可能に結合されたメモリを有するプロセッサを含んでもよく、メモリは、メモリに記憶された命令を含み、命令は、プロセッサによって実行されると、プロセッサに、蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングするように構成された教師付きアルゴリズムを用いてフローサイトメータデータを処理させる。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、階層に対する各データ点の状態に基づいてクラスタリングされる。かかる実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素に対する蛍光フローサイトメータデータの陽性ま

たは陰性に基づいて集団にクラスタリングされる。一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、閾値に対する蛍光フローサイトメータデータの関係に基づいて、特定の蛍光色素について陽性または陰性であると判定される。データがクラスタリングされた後、プロセッサは、スピルオーバー拡散の尺度を決定するように構成され得る。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散を決定することは、第1の検出器によって第1の蛍光色素から収集された光の強度が、同じ検出器による第2の蛍光色素からの光の同時収集によって影響を受ける程度を定量化するスピルオーバー拡散係数を計算することを含む。実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、特定の蛍光色素から放出される光が所与の検出器において収集される程度を決定するために、蛍光検出器および蛍光色素の各可能な組み合わせについて計算される。一部の実施形態では、プロセッサは、スピルオーバー拡散行列においてスピルオーバー拡散係数を組み合わせるように構成される。特定の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの集団は、スピルオーバー拡散行列において決定されたスピルオーバー拡散の大きさを説明するように調整される。プロセッサは、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を区分するようにさらに構成され得る。実施形態では、集団を区分することは、マシユーの相関係数を計算することと、各関連閾値に対してマシユーの相関係数を最適化する方法で、別個の集団（すなわち、異なる蛍光パラメータを呈する集団）間を描写する区分を確立することとを伴う。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの区分された集団は、その後、別個の集団がそれぞれのサブタイプ（すなわち、表現型）に関連付けられるように分類される。

10

【0010】

20

本開示の態様は、コンピュータ制御システムをさらに含み、システムは、完全自動化または部分自動化のための1つ以上のコンピュータをさらに含む。一部の実施形態では、システムは、コンピュータプログラムが記憶されたコンピュータ可読記憶媒体を有するコンピュータを含み、コンピュータプログラムは、コンピュータにロードされると、1つ以上の異なるパラメータ（すなわち、蛍光色素）に従って蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、各検出器-パラメータ対の間のスピルオーバー拡散を（すなわち、スピルオーバー拡散係数を計算することによって）決定することと、その対応する検出器による特定の蛍光色素の検出が他の蛍光色素からのスピルオーバーによってどのように影響を受けるかを示すスピルオーバー拡散行列を作成することと、スピルオーバー拡散行列によって決定されるスピルオーバー拡散の大きさを減算することによってスピルオーバー拡散を補償するように蛍光フローサイトメータデータを調整することと、所与のパラメータに対して陽性である集団と所与のパラメータに対して陰性である集団とを区別する閾値に対するマシユー相関係数を計算することによって蛍光フローサイトメータデータの別個の集団を分離する異なる区分の質を評価することと、蛍光フローサイトメータデータの調整された集団を分類する（すなわち、表現型決定する）こととを行うための命令を含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0011】

本発明は、添付の図面と併せて読む場合、以下の詳細な説明から最も理解することができる。図面には、以下の図が含まれる。

【0012】

40

【図1】 蛍光フローサイトメータデータにおけるスピルオーバー拡散を示す図である。

【図2A】 スピルオーバー拡散が、蛍光フローサイトメータデータの別個の集団クラスタ間を正確に区別するアルゴリズムの性能をどのように阻害するかを示す図である。

【図2B】 スピルオーバー拡散が、蛍光フローサイトメータデータの集団を分類する（すなわち、表現型）アルゴリズムの性能をどのように阻害するかを示す図である。

【図3】 CD4またはCD8の存在に関して細胞の陽性または陰性を決定することによってT細胞を表現型決定するための階層を示す図である。

【図4】 閾値に対する蛍光フローサイトメータデータのクラスタリングを示す図である。

【図5】 スピルオーバー拡散行列を示す図である。

【図6】 スピルオーバー拡散に基づいてフローサイトメータデータの集団を調整するプロセ

50

スを示す図である。

【図 7 A】スピルオーバー拡散に基づいて調整されたフローサイトメータデータを示す図である。

【図 7 B】スピルオーバー拡散に基づいて調整されたフローサイトメータデータの分類（すなわち、表現型決定）を示す図である。

【図 8】特定の実施形態によるフローサイトメータを示す図である。

【図 9】特定の実施形態によるプロセッサの一例の機能ブロックを示す図である。

【図 10】特定の実施形態によるコンピューティングシステムを示すブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

蛍光フローサイトメータデータを分類するための方法が提供される。一部の例では、本方法は、関連する閾値に対するデータ点の関係に従って、蛍光フローサイトメータデータを別個の集団にクラスタリングするように構成された教師付きアルゴリズムを用いてフローサイトメータデータを処理することを含む。実施形態では、本方法は、スピルオーバー拡散係数を計算し、それらをスピルオーバー拡散行列に組み合わせることによってスピルオーバー拡散の尺度を決定することを含む。一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの集団は、スピルオーバー拡散行列によって決定されるスピルオーバー拡散の大きさを減算するように調整される。実施形態では、スピルオーバー拡散調整集団は、潜在的な区分が閾値に対して評価された後に区分される。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの区分された集団は、階層に従って分類される（すなわち、表現型決定される）。蛍光フローサイトメータデータを分類するためのシステムおよびコンピュータ可読媒体も提供される。

【0014】

本発明がより詳細に説明される前に、本発明は、説明される特定の実施形態に限定されるものではなく、したがって、もちろん、変化し得ることが理解されるべきである。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書で使用される専門用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであることも理解されたい。

【0015】

値の範囲が提供される場合、文脈が明確に別段の指示をしない限り、その範囲の上限と下限との間の、下限の単位の10分の1までの各中間値、およびこの記載の範囲内の任意の他の記載される値または中間値が本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、独立して、より小さい範囲に含まれてもよく、記載された範囲内の任意の具体的に除外された限界に従うことを条件として、本発明内にも包含される。記載された範囲が限定の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限定のいずれかまたは両方を除外する範囲も、同様に本発明に含まれる。

【0016】

ある特定の範囲は、「約」という用語によって先行される数値を伴って本明細書において提示される。「約」という用語は、本明細書において、それが先行する正確な数、ならびにその用語が先行する数に近い、または近似しているその数についての文字どおりの裏付けを提供するために使用される。ある数が具体的に列挙された数に近い、または近似するか否かを判定するとき、その近いまたは近似する列挙されない数は、それが提示されている文脈において、具体的に列挙されている数の実質的な等価物を提供する数であり得る。

【0017】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法および材料も、本発明の実施または試験に使用され得るが、代表的な例示的な方法および材料が、以下に記載される。

【0018】

本明細書で引用されるすべての刊行物および特許は、あたかも各個々の刊行物または特

10

20

30

40

50

許が、参照することによって組み込まれるように具体的かつ個々に示されているかのように、参照することによって本明細書に組み込まれ、方法および／または材料を開示および記載するために、参照によって本明細書に組み込まれ、それらの方法および／または材料に関連して刊行物が引用される。いかなる刊行物の引用も、出願日以前のその開示に関するものであり、本発明が、先行発明を理由に、かかる刊行物に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、独立して確認する必要がある実際の刊行日とは異なる場合がある。

【0019】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、冠詞「a」、「an」、および「the」は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。特許請求の範囲は、あらゆる選択肢的要素を除外するように起草され得ることにさらに留意されたい。したがって、この記述は、特許請求要素の列挙に関連した「もっぱら (solely)」および「のみ (only)」などの排他的用語の使用のための、または「消極的な」限定の使用のための先行詞として機能することが意図される。

【0020】

本開示を読むと当業者には明らかであるように、本明細書に記載および例証される別個の実施形態の各々は、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、他の様々な実施形態のいずれかの特徴から容易に分離され得るか、またはこれらと組み合わせられ得る別個の構成要素および特徴を有する。任意の列挙された方法は、列挙された事象の順序、または論理的に可能な任意の他の順序で実行され得る。

【0021】

システムおよび方法は、文法的な流動性のために機能的説明とともに記述されてきた、または記述されるが、米国特許法第112条に基づいて明確に記載されていない限り、特許請求の範囲は、必ずしも「手段」または「ステップ」の限定の解釈によって限定されると解釈すべきではなく、法的均等論の下で特許請求の範囲によって提供される定義の意味および等価物の完全な範囲を付与されるべきであり、特許請求の範囲が米国特許法第112条に基づいて明確に記載されている場合には、米国特許法第112条に基づく完全な法的等価物を付与されるべきであることを明確に理解されたい。

【0022】

蛍光フローサイトメータデータを分類するための方法

上記で考察したように、本開示の態様は、蛍光フローサイトメータデータを分類するための方法を含む。「蛍光フローサイトメータデータ」とは、粒子分析器内の任意の数の蛍光検出器によって収集されるフローセル内のサンプル（例えば、細胞、粒子）のパラメータに関する情報を意味する。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、複数の異なる蛍光色素（例えば、2～20個の異なる蛍光色素の範囲であり、3～5個の異なる蛍光色素を含む）からの信号を含む。一部の実施形態では、複数の異なる蛍光色素は、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、および20個以上の異なる蛍光色素を含む、2個以上の異なる蛍光色素を含む。蛍光フローサイトメータデータは、以下に記載されるものを含む任意の好都合なプロトコルによって得ることができる。

【0023】

一部の実施形態では、本方法は、サンプル中の分析物（例えば、細胞、粒子）の決定されたパラメータ（例えば、蛍光）に基づいて、1つ以上の集団クラスタを生成することを含む。本明細書中で使用される場合、分析物（例えば、細胞または他の粒子）の「集団」または「亜集団」は、概して、測定された蛍光パラメータデータがデータ空間においてクラスタを形成するように、1つ以上の測定されたパラメータに関する特性（例えば、光学特性、インピーダンス特性、または時間特性）を有する分析物の群を指す。したがって、集団はデータ内のクラスタとして認識される。逆に、ノイズまたはバックグラウンドに対応するクラスタも典型的に観察されるが、各データクラスタは、概して、特定のタイプの細胞または分析物の集団に対応するものとして解釈される。クラスタは、次元のサブセッ

10

20

30

40

50

ト内で、例えば、サンプルの測定値から抽出された、測定されたパラメータまたは特徴のサブセット内のみで異なる集団に対応する、測定された蛍光パラメータ（すなわち、蛍光色素）のサブセットに関して、定義され得る。

【0024】

本発明の態様は、蛍光フローサイトメータデータの教師付きクラスタリングを含む。任意の好都合な教師付き表現型決定アルゴリズムが、このステップのために使用され得る。一部の実施形態では、教師付き表現型決定アルゴリズムは、エクバラムアルゴリズムである。エクバラムアルゴリズムは、Amir et al. (2019). Development of a comprehensive antibody staining database using a standardized analytics pipeline. *Frontiers in immunology*, 10, 1315に記載されており、これは、参照により本明細書に組み込まれる。したがって、特定の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの集団は、階層に対する各データ点の状態に基づいてクラスタリングされる。本明細書に記載される階層は、蛍光フローサイトメータデータが特定の集団に分類される基準を定義する。一部の実施形態では、階層は、同じパラメータに対して陽性または陰性であるデータ点がどのように一緒にグループ化されるかを確立する。例えば、図3は、CD4およびCD8の存在に関して細胞の陽性または陰性を決定することによってT細胞をクラスタリングするための階層を示している。CD4に対して陽性であるがCD8に対して陰性である細胞は「CD4 T細胞」であり、一方、両方のマーカに対して陽性である細胞は「二重陽性T細胞」であり、以下同様である。

【0025】

一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータをクラスタリングすることは、蛍光フローサイトメータデータを閾値と比較することを含む。「閾値」とは、特定の蛍光色素に対する陽性／陰性の蛍光フローサイトメータデータを区別する値を意味する。換言すれば、閾値より上にある蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素について陽性として説明され得、一方、閾値より下にある蛍光フローサイトメータデータは、同じ蛍光色素について陰性として説明され得る。例えば、図4は、フローサイトメータデータが、陽性データと陰性データとを区別する閾値に従ってどのようにクラスタリングされるかを示している。閾値401は、CD8に対して陽性であるフローサイトメータデータを、CD8に対して陰性であるフローサイトメータから区別する。同様に、閾値402は、CD4に対して陽性であるフローサイトメータデータを、CD4に対して陰性であるフローサイトメータから区別する。クラスタリングは、任意の好都合な方法によって実行することができる。一部の実施形態では、クラスタリングはFlowSOMアルゴリズムによって実行される。FlowSOMは、Van Gassen et al. (2015). FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A*, 87 (7), 636-645に記載されており、これは、参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、クラスタリングは、Kohonen, The self-organizing map, *Proceedings of the IEEE* (1990) 78:1464-1480に記載されたSOM、Hartigan&Wong, Algorithm AS 136: A K-Means Clustering Algorithm, *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* (1979) 28: pp. 100-108に記載されたK-means、Sanderson&Curtin, An open source C++ implementation of multi-threaded Gaussian mixture models, k-means and expectation maximisation, 2017 11th International Conference on Signal Processing and Communication Systems (ICSPCS) (<https://doi.org/10.11>

09/ICSPCS. 2017. 8270510)に記載されたGaussian Mixture Models、Ye&Ho, Ultrafast clustering of single-cell flow cytometry data using FlowGrid, BMC Syst Biol 13, 35 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12918-019-0690-2>に記載されたFlowGrid、またはSamusik et al., Automated mapping of phenotype space with single-cell data, Nat Methods (2016) 13: 493–496に記載されたX-shiftから選択されるアルゴリズムによって実行される。

【0026】

フローサイトメータデータがクラスタリングされた後、本発明の実施形態は、蛍光フローサイトメータデータの集団についてのスピルオーバー拡散の尺度を決定することを含む。前述し、図1および図2A～2Bに示すように、収集点（すなわち、1つ以上の蛍光検出器によって受信される点）における蛍光フローサイトメータデータは、スピルオーバー拡散を受ける。スピルオーバーとは、特定の蛍光色素を示す粒子変調光が、そのパラメータを測定するように構成されていない1つ以上の検出器によって受け取られる現象である。したがって、光は、「スピルオーバー」し、オフターゲット検出器によって検出することができる。したがって、スピルオーバー拡散は、スピルオーバーによって引き起こされる蛍光フローサイトメータデータに存在するノイズである。したがって、一部の実施形態では、調整されていないフローサイトメータデータは、1つ以上の検出器による特定の波長の光の意図しない検出のために誤検出される。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散の尺度を決定することは、第1の検出器によって第1の蛍光色素から収集された蛍光フローサイトメータデータが、同じ検出器による第2の蛍光色素からの光の同時収集によって影響を受ける程度を定量化することを含む。一部の例では、スピルオーバー拡散を受ける蛍光フローサイトメータデータは、他の場合に観察されるよりも高い信号強度によって影響を受ける（すなわち、スピルオーバー拡散ノイズは建設的である）。他の例では、スピルオーバー拡散を受ける蛍光フローサイトメータデータは、他の場合に観察されるよりも低い信号強度によって影響を受ける（すなわち、スピルオーバー拡散ノイズは破壊的である）。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散の尺度を決定することは、スピルオーバー拡散係数を計算することを含む。スピルオーバー拡散係数は、Nguyen et al. (2013). Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design. Cytometry Part A, 83 (3), 306–315に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算される。

【0027】

【数1】

$$SS = \frac{\Delta\sigma_f}{\sqrt{\Delta d}} = \frac{\sqrt{(\sigma_{pos})^2 - (\sigma_{neg})^2}}{\sqrt{d_{pos} - d_{neg}}}$$

【0028】

上記式にあって、SSはスピルオーバー拡散係数であり、 $\Delta\sigma_f$ は、蛍光色素から収集された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の発光の拡散を示す増分標準偏差であり、 Δd は、蛍光検出器によって受信された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の蛍光の強度の差である。

【0029】

したがって、スピルオーバー拡散係数は、所与の蛍光検出器によって収集された蛍光フロ

ーサイトメータデータが、特定の蛍光色素に関連する光の存在によって影響を受ける程度を測定する。換言すれば、スピルオーバー拡散係数は、所与の検出器によって収集されている関連する蛍光色素から放出される光によって蛍光フローサイトメータデータに寄与する誤差（すなわち、ノイズ）を推定する。実施形態では、より高いスピルオーバー拡散係数は、所与の蛍光色素－検出器対に対するより多くのスピルオーバー拡散に対応する。

【0030】

一部の実施形態では、スピルオーバー拡散の尺度を決定することはまた、各検出器で収集された蛍光フローサイトメータデータが各蛍光色素に関連付けられた光の存在によってどのように影響を受けるかを判定することができるように、各可能な蛍光検出器－蛍光色素の組み合わせについてスピルオーバー拡散係数を計算することを含む。実施形態では、各蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わせられる。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散行列は、その対応する検出器による特定の蛍光色素の検出が、他の蛍光色素からのスピルオーバーによってどのように影響を受けるかを実証する。例えば、図5は、23個の異なる蛍光色素に対するスピルオーバー拡散係数を提供するスピルオーバー拡散行列の一実施形態を提示している。行列内の各列は、23個の異なる蛍光色素のうちの1つを検出するように構成された検出器に対応し、行列内の各行は、検出されるフローサイトメータデータのパラメータに対応する。列および行が交差するセルは、問題の蛍光色素が関連する検出器に誤差を与える程度を示す蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数で埋められる。蛍光色素がスピルオーバー拡散を引き起こす全程度は、その行内のすべての値を合計することによって近似することができ、検出器がスピルオーバー拡散によって影響を受ける全程度は、その列内のすべての値を合計することによって計算することができる。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、総拡散効果（すなわち、蛍光フローサイトメータデータの特定のサブセットに対するスピルオーバー拡散の累積効果）を計算するために合計される。

【0031】

一部の実施形態では、スピルオーバー拡散行列は、自動拡散アルゴリズムによって計算される。AutoSpreadアルゴリズムは、Becton Dickinsonによって作成されたものであり、参照により本明細書に組み込まれる米国仮出願第63／020,758号に記載されており、所与の蛍光色素に関して陽性であるフローサイトメータの集団と陰性であるフローサイトメータの集団との間の区別を必要とせずに、（例えば、上述のような）スピルオーバー拡散行列を作成するように構成されている。AutoSpreadは、同じフローサイトメトリパネルに第2の蛍光色素を含めることによって、第1の蛍光色素の検出信号に寄与した拡散を特徴付ける。AutoSpreadは、蛍光検出器と蛍光色素との間の各相互作用に対して1つの係数を生成し、係数を上記のスピルオーバー拡散行列に類似した行列に配列する。実施形態では、スピルオーバー拡散係数を計算することは、フローサイトメータデータの陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であり、対応する標準偏差が未知の量であると仮定することを含む。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算される。

【0032】

【数2】

$$SS = \frac{\sqrt{\sigma^2 - \sigma_0^2}}{\sqrt{d}}$$

【0033】

上記式にあって、SSはスピルオーバー拡散係数であり、 σ^2 は蛍光フローサイトメータデータの陽性集団の標準偏差であり、 σ_0^2 は蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値であり、dは蛍光検出器によって収集された光の強度である。

【0034】

一部の実施形態では、フローサイトメータデータ (σ_0^2) の陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であると仮定されるとき、蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値を取得するために、スピルオーバー拡散係数は、線形回帰のシーケンスに従って計算される。蛍光フローサイトメータデータは、最初に、蛍光検出器によって検出される強度値に従って分位数に分類される。分位数はデフォルトでは256であるが、各分位が標準偏差の信頼できる推定を可能にするために十分な数のデータ点を有することを確実にするために、8程度に下方調整される。次に、蛍光色素から放出された光のロバスト標準偏差を、各分位について検出された光の強度中央値の平方根に対して回帰させる。通常の最小二乗適合のy切片は、陰性集団について検出された光の強度が0であると仮定される場合、フローサイトメータデータの陰性集団における標準偏差の推定値として取得される。蛍光色素から放出される光の標準偏差の推定値を使用して、新しいゼロ調整標準偏差が得られる。蛍光色素についてのゼロ調整標準偏差は、蛍光検出器によって検出された各分位数の蛍光中央値の平方根に対して回帰される。通常の最小二乗適合 (式2によって計算される) の傾きは、スピルオーバー拡散係数として取得される。

【0035】

本開示の態様は、スピルオーバー拡散を説明するために蛍光フローサイトメータデータを調整することをさらに含む。「調整する」とは、フローセル内で照射されているサンプル (例えば、細胞、粒子) 中の蛍光色素の存在をより正確に定量化するようにデータを変更することを意味する。一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、スピルオーバー拡散から生じる実質的にすべての建設的誤差を除去するように調整される。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータを調整することは、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することを含む。特定の実施形態では、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することは、フローサイトメータデータの関連集団からスピルオーバー拡散の大きさを減算すること、すなわち、スピルオーバー拡散によって影響を受ける信号の建設的効果を打ち消すことを含む。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散の大きさは、スピルオーバー拡散行列から決定される。一部の実施形態では、フローサイトメータデータを調整することは、フローサイトメータデータの関連部分から総拡散効果を減算することを含む。例えば、図6は、スピルオーバー拡散が考慮されるようなフローサイトメータデータの調整を示している。矢印601は、集団クラスタの中央値がどのように下方にシフトされているかを示している。換言すれば、スピルオーバー拡散の大きさは、集団クラスタ内のデータ点から減算され、それによって、他の集団クラスタに対するクラスタの位置を変更する。図7Aは、上述のプロセスによって調整されたフローサイトメータデータを示している。一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、スピルオーバー拡散を含むすべての既知のノイズ源に従って、各細胞が閾値を上回る可能性を計算することによって調整される。

【0036】

蛍光フローサイトメータデータの集団が (例えば、上述したように) スピルオーバー拡散に対して調整された後、本発明の態様は、スピルオーバー拡散調整された蛍光フローサイトメータデータの集団を区分することをさらに含む。「区分」とは、複数の異なる蛍光色素に対する陽性または陰性に基づいて別々であると判定されたフローサイトメータデータの集団間を描写することを意味する。換言すれば、区分は、異なって分類される (例えば、異なる表現型を表す) 蛍光フローサイトメータデータの集団間を形式的に区別するように作成される。

【0037】

実施形態では、フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を区分することは、マシュウ相関係数 (MCC) を計算することを含む。この係数は、バイナリ分類の品質の尺度であり、所与の閾値がフローサイトメータデータの陽性群と陰性群とをどれだけ正確に区別するかの定量化を提供する。マシュウの相関係数は、Matthews, B. W. (1975). Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* (

BBA) - Protein Structure, 405 (2), 442-451に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の潜在的な区分が、閾値の各々に関して評価される。かかる実施形態では、マシューの相関係数は、閾値の各々について計算され、それによって、閾値と区分との間の一致のレベルを評価する。したがって、本発明の実施形態は、マシューの相関係数が、特定の蛍光色素に関してフローサイトメータデータの陽性集団と陰性集団とを区別する関連閾値に関して最適化されるように集団を区分することを含む。換言すれば、蛍光フローサイトメータデータを区分することは、別々の集団（すなわち、蛍光パラメータの異なる組み合わせを示す集団）が、関連する閾値に対するそれらの関係によって決定される（例えば、マシューの相関係数によって定量化される）ように互いに区別される程度を最大化することを含む。実施形態では、このプロセスを反復して、フローサイトメータデータの各関連パラメータについて陽性集団と陰性集団とを区別する最適な区分を決定する。実施形態では、マシューの相関係数は、下記式に従って計算される。

【0038】

【数3】

$$MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

【0039】

上記式にあって、MCCはマシューの相関係数であり、TPは真陽性事象を表し、TNは真陰性事象を表し、FPは偽陽性事象を表し、FNは偽陰性事象を表す。

【0040】

本開示によれば、真陽性事象とは、閾値および区分の両方によって特定の蛍光色素について陽性であると評価される蛍光フローサイトメータデータであり、真陰性事象とは、閾値および区分の両方によって特定の蛍光色素について陰性であると評価される蛍光フローサイトメータデータであり、偽陽性事象とは、区分によって特定の蛍光色素について陽性であり、閾値によって陰性であると評価される蛍光フローサイトメータデータであり、偽陰性事象とは、区分によって特定の蛍光色素について陰性であり、閾値によって陽性であると評価される蛍光フローサイトメータデータである。

【0041】

本発明の一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素について陽性である信号を含まない。換言すれば、蛍光色素から発せられる蛍光は検出されない。かかる実施形態では、別個のスピルオーバー拡散調整された蛍光フローサイトメータデータを区分することは、最適な区分を決定するための代替メトリックとして、各区分の平衡精度を計算することを含み得る。平衡精度は、陽性事象を決定する精度と陰性事象を決定する精度との平均であり、下記式に従って計算される。

【0042】

【数4】

$$BA = \frac{\left(\frac{TP}{TP + FN}\right) + \left(\frac{TN}{TN + FP}\right)}{2}$$

【0043】

上記式にあって、BAは平衡精度であり、TPは真陽性事象を表し、TNは真陰性事象を表し、FPは偽陽性事象を表し、FNは偽陰性事象を表す。

【0044】

本発明の実施形態はまた、蛍光フローサイトメータデータの区分された集団を分類すること、すなわち、フローサイトメータデータの各別個のスピルオーバー拡散調整集団によっ

て指定される細胞または粒子のサブタイプを決定することを含む。実施形態では、分類は、階層（上述）に基づいて決定される。したがって、（例えば、上記のように）区分された蛍光フローサイトメータデータの集団は、それが示す蛍光パラメータの組み合わせに基づいて分類を割り当てられる（すなわち、表現型決定される）。例えば、図7Bは、図7Aに示されるスピルオーバー拡散調整された蛍光フローサイトメータデータがどのように区分され、別個の集団クラスタがそれぞれの表現型に正しく割り当てられるかを示す。図2Bに示すように、序論のセクションで考察したように、集団クラスタ101の一部には、データ調整なしで不正確な表現型が割り当てられる。しかしながら、（例えば、図6に示されるように）スピルオーバー拡散のために集団が調整された後（矢印601）、集団701の一部のみが正しい表現型を割り当てられるのとは対照的に、集団701の全体が正しい表現型を割り当てられる（すなわち、 $A+B^-$ ）。

10

【0045】

上記で要約したように、本発明の方法で使用される蛍光データは、任意の好都合なプロトコルを使用して得ることができる。一部の実施形態では、粒子を有するサンプルが光源で照射され、サンプルからの光が検出されて、検出された光の測定値に少なくとも部分的に基づいて関連粒子の集団が生成される。一部の例では、サンプルは生体サンプルである。「生体サンプル」という用語は、その従来の意味で、全生物、植物、菌類、または、場合によっては、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、気管支肺胞洗浄、羊水、羊膜臍帯血、尿、膿液、および精液中に見られ得る動物の組織、細胞、または構成成分のサブセットを指すために使用される。したがって、「生体サンプル」は、天然有機体またはその組織のサブセットの両方、ならびに、例えば、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚の切片、呼吸管、胃腸管、心血管、および泌尿器管、涙液、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、臓器を含むが、これらに限定されない、生物またはその組織のサブセットから調製されたホモジネート、溶解物、または抽出物を指す。生体サンプルは、健康組織と、疾患組織（例えば、がん性、悪性、壊死性など）との両方を含む、任意のタイプの生体組織であり得る。特定の実施形態では、生体サンプルは、血液またはその誘導体、例えば、血漿、涙液、尿、精液などの液体サンプルであり、一部の例では、サンプルは、静脈穿刺またはフィンガースティックから取得された血液など、全血を含む血液サンプルである（血液は、アッセイの前に、防腐剤、抗凝固剤などの任意の試薬と組み合わせられてもよく、または組み合わせられなくてもよい）。

20

【0046】

特定の実施形態では、サンプルのソースは、「哺乳動物（mammal）」または「哺乳動物（mammalian）」であり、これらの用語は、肉食動物目（例えば、イヌおよびネコ）、げっ歯目（例えば、マウス、モルモット、およびラット）、ならびに霊長目（例えば、ヒト、チンパンジー、およびサル）を含む、哺乳綱内の生物を示すために広く使用される。一部の例では、被験体はヒトである。方法は、両方の性別のヒト被検体から、発達の任意の段階（すなわち、新生児、乳幼児、年少者、青年、成人）で取得されたサンプルに適用され得、特定の実施形態では、ヒト被検体は、年少者、青年、または成人である。本発明は、ヒト被検体からのサンプルに適用され得るが、以下に限定されるものではないが、鳥、マウス、ラット、イヌ、ネコ、家畜、およびウマなどの他の動物被検体からの（すなわち、「非ヒト被検体」内の）サンプルに対しても実施され得ることを理解されたい。

30

40

【0047】

本発明の方法の実施において、粒子を有するサンプル（例えば、フローサイトメータのフローストリーム中）は、光源からの光で照射される。一部の実施形態では、光源は、例えば100nm以上、例えば150nm以上、例えば200nm以上、例えば250nm以上、例えば300nm以上、例えば350nm以上、例えば400nm以上、および500nm以上にわたることを含む、例えば50nm以上にわたるなど、広範囲の波長を有する光を発する広帯域光源である。例えば、ある好適な広帯域光源は、200nm～1500nmの波長を有する光を放出する。好適な広帯域光源の別の実施例は、400nm～

50

1000 nmの波長を有する光を放出する光源を含む。方法が広帯域光源で照射することを含む場合、対象の広帯域光源プロトコルは、他の広帯域光源またはそれらの任意の組み合わせの中でもとりわけ、ハロゲンランプ、重水素アークランプ、キセノンアークランプ、安定化繊維結合広帯域光源、連続スペクトルの広帯域LED、超発光ダイオード、半導体発光ダイオード、ワイドスペクトルLED白色光源、マルチLED一体型白色光源を含み得るが、これらに限定されない。

【0048】

他の実施形態では、本方法は、例えば40 nm以下、例えば30 nm以下、例えば25 nm以下、例えば20 nm以下、例えば15 nm以下、例えば10 nm以下、例えば5 nm以下、例えば2 nm以下、および特定の光の波長（すなわち、単色光）を発する光源を含む、50 nm以下の範囲のような狭波長範囲の光を発する光源など、特定の波長または狭い範囲の波長を発する狭帯域光源で照射することを含む。方法が、狭帯域光源で照射することを含む場合、対象の狭帯域光源プロトコルは、狭波長LED、レーザダイオード、または1つ以上の光学バンドパスフィルタ、回折格子、モノクロメータ、またはこれらの任意の組み合わせに結合された広帯域光源を含んでもよいが、これらに限定されない。

【0049】

本発明の態様は、蛍光検出器を用いて蛍光を収集することを含む。蛍光検出器は、一部の例では、フローセル内の粒子に関連付けられた蛍光分子、例えば、標識された特異的結合メンバー（対象のマーカーに特異的に結合する標識抗体など）からの蛍光放射を検出するように構成されてもよい。特定の実施形態では、本方法は、1つ以上の蛍光検出器、例えば、2つ以上、例えば、3つ以上、例えば、4つ以上、例えば、5つ以上、例えば、6つ以上、例えば、7つ以上、例えば、8つ以上、例えば、9つ以上、例えば、10個以上、例えば、15個以上、および25個以上の蛍光検出器を用いて、サンプルからの蛍光を検出することを含む。実施形態では、蛍光検出器の各々は、蛍光データ信号を生成するように構成される。サンプルからの蛍光は、200 nm～1200 nmの波長範囲のうちの1つ以上にわたって、独立して、各蛍光検出器によって検出され得る。一部の例では、本方法は、200 nm～1200 nmなど、300 nm～1100 nmなど、400 nm～1000 nmなど、500 nm～900 nmなど、600 nm～800 nmを含む波長範囲にわたってサンプルからの蛍光を検出することを含む。他の例では、本方法は、1つ以上の特定の波長で各蛍光検出器を用いて蛍光を検出することを含む。例えば、蛍光は、本発明の光検出システムにおける異なる蛍光検出器の数に応じて、450 nm、518 nm、519 nm、561 nm、578 nm、605 nm、607 nm、625 nm、650 nm、660 nm、667 nm、670 nm、668 nm、695 nm、710 nm、723 nm、780 nm、785 nm、647 nm、617 nmおよびそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上で検出されてもよい。特定の実施形態では、本方法は、サンプル中に存在する特定の蛍光色素の蛍光ピーク波長に対応する光の波長を検出することを含む。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、1つ以上の蛍光検出器（例えば、1つ以上の検出チャンネル）、例えば2つ以上、例えば3つ以上、例えば4つ以上、例えば5つ以上、例えば6つ以上、さらには8つ以上の蛍光検出器（例えば、8つ以上の検出チャンネル）から受信される。

【0050】

蛍光フローサイトメータデータを分類するためのシステム

本開示の態様は、蛍光フローサイトメータデータを分類するためのシステムを含む。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、クラスタリングされ、スピルオーバー拡散のために調整され、別個の集団が異なって分類されるように区分される。一部の実施形態では、システムは、蛍光フローサイトメータデータを生成するように構成される粒子分析器と、蛍光フローサイトメータデータを分析するように構成されるプロセッサとを含む。

【0051】

一部の実施形態では、本粒子分析器は、フローセルと、フローセル内の粒子を照射するように構成されたレーザとを有する。実施形態では、レーザは、連続波レーザなどの任意

の好都合なレーザであってもよい。例えば、レーザは、紫外線ダイオードレーザ、可視ダイオードレーザおよび近赤外線ダイオードレーザなどのダイオードレーザであってもよい。他の実施形態では、レーザは、ヘリウムネオン（HeNe）レーザであり得る。一部の例では、レーザは、ヘリウムネオンレーザ、アルゴンレーザ、クリプトンレーザ、キセノンレーザ、窒素レーザ、CO₂レーザ、COレーザ、アルゴンフッ素（ArF）エキシマレーザ、クリプトンフッ素（KrF）エキシマレーザ、キセノン塩素（XeCl）エキシマレーザ、またはキセノンフッ素（XeF）エキシマレーザ、もしくはそれらの組み合わせなどのガスレーザである。他の例では、本フローサイトメータは、スチルベン、クマリンまたはローダミンレーザなどの色素レーザを含む。さらに他の例では、対象のレーザは、ヘリウム-カドミウム（HeCd）レーザ、ヘリウム-水銀（HeHg）レーザ、ヘリウム-セレン（HeSe）レーザ、ヘリウム-銀（HeAg）レーザ、ストロンチウムレーザ、ネオン-銅（NeCu）レーザ、銅レーザ、または金レーザ、およびそれらの組み合わせなどの金属蒸気レーザを含む。さらに他の例では、本発明のフローサイトメータは、ルビーレーザ、Nd:YAGレーザ、NdCrYAGレーザ、Er:YAGレーザ、Nd:YLFレーザ、Nd:YVO₄レーザ、Nd:YCa₄O(BO₃)₃レーザ、Nd:YCOBレーザ、チタンサファイアレーザ、スリムYAGレーザ、イッテルビウムYAGレーザ、Y₂O₃レーザ、またはセリウムドープレーザ、およびそれらの組み合わせなどの固体レーザを含む。

【0052】

本発明の態様はまた、前方散乱光を検出するように構成された前方散乱検出器を含む。本発明のフローサイトメータにおける前方散乱検出器の数は、必要に応じて変化し得る。例えば、本粒子分析器は、1つの前方散乱検出器、または2つ以上、3つ以上、4つ以上、および5つ以上を含む、複数の前方散乱検出器を含んでもよい。特定の実施形態では、フローサイトメータは、1つの前方散乱検出器を含む。他の実施形態では、フローサイトメータは2つの前方散乱検出器を含む。

【0053】

収集された光を検出するための任意の好都合な検出器が、本明細書に説明される前方散乱検出器において使用されてもよい。対象となる検出器は、他の検出器の中でも特に、アクティブ画素センサ（APS）、アバランシェフォトダイオード、画像センサ、電荷結合素子（CCD）、増感電荷結合素子（ICCD）、発光ダイオード、光子計数器、ボロメータ、焦電検出器、フォトレジスタ、光電池、フォトダイオード、光電子増倍管（PMT）、フォトトランジスタ、量子ドット光導電体、またはフォトダイオード、およびそれらの組み合わせなどの光学センサまたは検出器を含んでもよいが、それらに限定されない。特定の実施形態では、収集された光は、電荷結合素子（CCD）、半導体電荷結合素子（CCD）、アクティブ画素センサ（APS）、相補型金属酸化膜半導体（CMOS）画像センサ、またはN型金属酸化膜半導体（NMOS）画像センサを用いて測定される。特定の実施形態では、検出器は、0.01cm²~10cm²、例えば0.05cm²~9cm²、例えば0.1cm²~8cm²、例えば0.5cm²~7cm²の範囲であり、1cm²~5cm²を含む各領域の活性検出表面積を有する光電子増倍管などの光電子増倍管である。

【0054】

本粒子分析器が複数の前方散乱検出器を含む場合、各検出器は同じであってもよく、または検出器の集合は異なる種類の検出器の組み合わせであってもよい。例えば、本粒子分析器が2つの前方散乱検出器を含む場合、一部の実施形態では、第1の前方散乱検出器は、CCD型デバイスであり、第2の前方散乱検出器（または撮像センサ）は、CMOS型デバイスである。他の実施形態では、第1および第2の前方散乱検出器の両方が、CCD型デバイスである。さらに他の実施形態では、第1および第2の前方散乱検出器の両方が、CMOS型デバイスである。さらに他の実施形態では、第1の前方散乱検出器はCCD型デバイスであり、第2の前方散乱検出器は光電子増倍管（PMT）である。さらに他の実施形態では、第1の前方散乱検出器はCMOS型デバイスであり、第2の前方散乱検出

器は光電子増倍管である。さらに他の実施形態では、第1および第2の前方散乱検出器の両方が、光電子増倍管である。

【0055】

実施形態では、前方散乱検出器は、連続的にまたは離散間隔で光を測定するように構成される。一部の例では、対象の検出器は、収集された光の測定を連続的に行うように構成される。他の例では、対象の検出器は、0.001ミリ秒毎、0.01ミリ秒毎、0.1ミリ秒毎、1ミリ秒毎、10ミリ秒毎、100ミリ秒毎、および1000ミリ秒毎を含む、または一部の他の間隔毎に光を測定するなど、別個の間隔で測定するように構成される。

【0056】

本発明の実施形態は、フローセルと前方散乱検出器との間に位置決めされた光分散／分離モジュールも含む。対象となる光分散デバイスは、他の波長分離デバイスの中でも、着色ガラス、バンドパスフィルタ、干渉フィルタ、ダイクロイックミラー、回折格子、モノクロメータ、およびそれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない。一部の実施形態では、フローセルと前方散乱検出器との間にバンドパスフィルタが位置決めされる。他の実施形態では、フローセルと前方散乱検出器との間に、例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上を含む、2つ以上のバンドパスフィルタが位置決めされる。実施形態では、バンドパスフィルタは、2nm～100nm、例えば3nm～95nm、例えば5nm～95nm、例えば10nm～90nm、例えば12nm～85nm、例えば15nm～80nmの範囲の最小帯域幅を有し、20nm～50nmの範囲の最小帯域幅を有するバンドパスフィルタを含み、他の波長を有する光を前方散乱検出器に反射する。

【0057】

本発明の特定の実施形態は、光（例えば、粒子の表面および内部構造から屈折および反射された光）の側方散乱波長を検出するように構成された側方散乱検出器を含む。他の実施形態では、フローサイトメータは、複数の側方散乱検出器、例えば2つ以上、例えば3つ以上、例えば4つ以上、および5つ以上を含む側方散乱検出器を含む。

【0058】

収集された光を検出するための任意の好都合な検出器が、本明細書に説明される側方散乱検出器において使用されてもよい。対象となる検出器は、他の検出器の中でも特に、アクティブ画素センサ（APS）、アバランシェフォトダイオード、画像センサ、電荷結合素子（CCD）、増感電荷結合素子（ICCD）、発光ダイオード、光子計数器、ボロメータ、焦電検出器、フォトレジスタ、光電池、フォトダイオード、光電子増倍管（PMT）、フォトトランジスタ、量子ドット光導電体、またはフォトダイオード、およびそれらの組み合わせなどの光学センサまたは検出器を含んでもよいが、それらに限定されない。特定の実施形態では、収集された光は、電荷結合素子（CCD）、半導体電荷結合素子（CCD）、アクティブ画素センサ（APS）、相補型金属酸化膜半導体（CMOS）画像センサ、またはN型金属酸化膜半導体（NMOS）画像センサを用いて測定される。特定の実施形態では、検出器は、 $0.01\text{ cm}^2 \sim 10\text{ cm}^2$ 、例えば $0.05\text{ cm}^2 \sim 9\text{ cm}^2$ 、例えば $0.1\text{ cm}^2 \sim 8\text{ cm}^2$ 、例えば $0.5\text{ cm}^2 \sim 7\text{ cm}^2$ の範囲であり、 $1\text{ cm}^2 \sim 5\text{ cm}^2$ を含む各領域の活性検出表面積を有する光電子増倍管などの光電子増倍管である。

【0059】

本粒子分析器が複数の側方散乱検出器を含む場合、各側方散乱検出器は同じであってもよく、または側方散乱検出器の集合は異なる種類の検出器の組み合わせであってもよい。例えば、本粒子分析器が2つの側方散乱検出器を含む場合、一部の実施形態では、第1の側方散乱検出器は、CCD型デバイスであり、第2の側方散乱検出器（または撮像センサ）は、CMOS型デバイスである。他の実施形態では、第1および第2の側方散乱検出器の両方が、CCD型デバイスである。さらに他の実施形態では、第1および第2の側方散乱検出器の両方が、CMOS型デバイスである。さらに他の実施形態では、第1の側方散乱検出器はCCD型デバイスであり、第2の側方散乱検出器は光電子増倍管（PMT）である。さらに他の実施形態では、第1の側方散乱検出器はCMOS型デバイスであり、第

2の側方散乱検出器は光電子増倍管である。さらに他の実施形態では、第1および第2の側方散乱検出器の両方が、光電子増倍管である。

【0060】

本発明の実施形態は、フローセルと側方散乱検出器との間に位置決めされた光分散／分離モジュールも含む。対象となる光分散デバイスは、他の波長分離デバイスの中でも、着色ガラス、バンドパスフィルタ、干渉フィルタ、ダイクロイックミラー、回折格子、モノクロメータ、およびそれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない。

【0061】

実施形態では、本粒子分析器はまた、1つ以上の蛍光波長の光を検出するように構成された蛍光検出器を含む。他の実施形態では、粒子分析器は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、10個以上、15個以上など、および20個以上を含む、複数の蛍光検出器を含む。

【0062】

収集された光を検出するための任意の好都合な検出器が、本明細書に記載される蛍光検出器において使用され得る。対象となる検出器は、他の検出器の中でも特に、アクティブ画素センサ（APS）、アバランシェフォトダイオード、画像センサ、電荷結合素子（CCD）、増感電荷結合素子（ICCD）、発光ダイオード、光子計数器、ポロメータ、焦電検出器、フォトレジスタ、光電池、フォトダイオード、光電子増倍管（PMT）、フォトトランジスタ、量子ドット光導電体、またはフォトダイオード、およびそれらの組み合わせなどの光学センサまたは検出器を含んでもよいが、それらに限定されない。特定の実施形態では、収集された光は、電荷結合素子（CCD）、半導体電荷結合素子（CCD）、アクティブ画素センサ（APS）、相補型金属酸化膜半導体（CMOS）画像センサ、またはN型金属酸化膜半導体（NMOS）画像センサを用いて測定される。特定の実施形態では、検出器は、 $0.01\text{ cm}^2 \sim 10\text{ cm}^2$ 、例えば $0.05\text{ cm}^2 \sim 9\text{ cm}^2$ 、例えば $0.1\text{ cm}^2 \sim 8\text{ cm}^2$ 、例えば $0.5\text{ cm}^2 \sim 7\text{ cm}^2$ の範囲であり、 $1\text{ cm}^2 \sim 5\text{ cm}^2$ を含む各領域の活性検出表面積を有する光電子増倍管などの光電子増倍管である。

【0063】

本粒子分析器が複数の蛍光検出器を含む場合、各蛍光検出器は同じであってもよく、または蛍光検出器の集合は異なる種類の検出器の組み合わせであってもよい。例えば、本粒子分析器が2つの蛍光検出器を含む場合、一部の実施形態では、第1の蛍光検出器は、CCD型デバイスであり、第2の蛍光検出器（または撮像センサ）は、CMOS型デバイスである。他の実施形態では、第1および第2の蛍光検出器の両方が、CCD型デバイスである。さらに他の実施形態では、第1および第2の蛍光検出器の両方が、CMOS型デバイスである。さらに他の実施形態では、第1の蛍光検出器はCCD型デバイスであり、第2の蛍光検出器は光電子増倍管（PMT）である。さらに他の実施形態では、第1の蛍光検出器はCMOS型デバイスであり、第2の蛍光検出器は光電子増倍管である。さらに他の実施形態では、第1および第2の蛍光検出器の両方が、光電子増倍管である。

【0064】

本発明の実施形態は、フローセルと蛍光検出器との間に位置決めされた光分散／分離モジュールも含む。対象となる光分散デバイスは、他の波長分離デバイスの中でも、着色ガラス、バンドパスフィルタ、干渉フィルタ、ダイクロイックミラー、回折格子、モノクロメータ、およびそれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない。

【0065】

本開示の実施形態では、対象の蛍光検出器は、1つ以上の波長、例えば2つ以上の波長、例えば5つ以上の異なる波長、例えば10個以上の異なる波長、例えば25個以上の異なる波長、例えば50個以上の異なる波長、例えば100個以上の異なる波長、例えば200個以上の異なる波長、例えば300個以上の異なる波長で収集された光を測定するように構成され、400個以上の異なる波長でフローストリーム中のサンプルによって放出された光を測定することを含む。一部の実施形態では、本明細書に説明されるようなフローサイトメータ内の2つ以上の検出器は、収集された光の同一または重複波長を測定するよ

うに構成される。

【0066】

一部の実施形態では、対象の蛍光検出器は、ある波長範囲（例えば、200nm～1000nm）にわたって収集された光を測定するように構成される。特定の実施形態では、対象の検出器は、ある範囲の波長にわたって光のスペクトルを集めるように構成される。例えば、粒子分析器は、200nm～1000nmの波長範囲のうちの1つ以上にわたって光のスペクトルを収集するように構成される、1つ以上の検出器を含んでもよい。さらに他の実施形態では、対象の検出器は、1つ以上の特定の波長でフローストリーム内のサンプルによって発せられた光を測定するように構成される。例えば、粒子分析器は、450nm、518nm、519nm、561nm、578nm、605nm、607nm、625nm、650nm、660nm、667nm、670nm、668nm、695nm、710nm、723nm、780nm、785nm、647nm、617nm、およびそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上で光を測定するように構成される、1つ以上の検出器を含んでもよい。特定の実施形態では、1つ以上の検出器は、蛍光アッセイでサンプルとともに使用されるものなどの特定のフルオロフォアと対になるように構成され得る。

【0067】

好適なフローサイトメトリシステムとしては、Ormerod（編），Flow Cytometry: A Practical Approach, Oxford Univ. Press（1997）、Jaroszeski et al.（編），Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology No. 91, Humana Press（1997）、Practical Flow Cytometry, 3rd ed., Wiley-Liss（1995）、Virgo, et al.（2012）Ann Clin Biochem. Jan, 49（pt 1）: 17-28、Linden, et. al., Semin Throm Hemo st. 2004 Oct, 30（5）: 502-11、Alison, et al. J Pathol, 2010 Dec, 222（4）: 335-344、およびHerbig, et al.（2007）Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 24（3）: 203-255に記載されているものが挙げられ得るが、これらに限定されない。これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。特定の例では、対象となるフローサイトメトリシステムは、BD Biosciences FACSCanto（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences FACSCanto（商標）IIフローサイトメータ、BD Accuri（商標）フローサイトメータ、BD Accuri（商標）C6 Plusフローサイトメータ、BD Biosciences FACSCelesta（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences FACSLytic（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences FACSVerse（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences FACSsymphony（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences LSRFortessa（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences LSRFortessa（商標）X-20フローサイトメータ、BD Biosciences FACSPresto（商標）フローサイトメータ、BD Biosciences FACSVia（商標）フローサイトメータおよびBD Biosciences FACSCalibur（商標）細胞ソータ、BD Biosciences FACSCount（商標）細胞ソータ、BD Biosciences FACSLytic（商標）細胞ソータ、BD Biosciences Via（商標）細胞ソータ、BD Biosciences Influx（商標）細胞ソータ、BD Biosciences Jazz（商標）細胞ソータ、BD Biosciences Aria（商標）細胞ソータ、BD Biosciences FACSAria（商標）II細胞ソータ、BD Biosciences FACSAria（商標）III細胞ソータ、BD Biosciences FACSAria（商標）融合細胞ソータおよびBD Biosciences FACSMelody（商

10

20

30

40

50

標)細胞ソータ、BD Biosciences FACSymphony (商標) S6細胞ソータなどを含む。

【0068】

一部の実施形態では、本システムは、フローサイトメトリシステム、例えば、米国特許第10,663,476号、同第10,620,111号、同第10,613,017号、同第10,605,713号、同第10,585,031号、同第10,578,542号、同第10,578,469号、同第10,481,074号、同第10,302,545号、同第10,145,793号、同第10,113,967号、同第10,006,852号、同第9,952,076号、同第9,933,341号、同第9,726,527号、同第9,453,789号、同第9,200,334号、同第9,097,640号、同第9,095,494号、同第9,092,034号、同第8,975,595号、同第8,753,573号、同第8,233,146号、同第8,140,300号、同第7,544,326号、同第7,201,875号、同第7,129,505号、同第6,821,740号、同第6,813,017号、同第6,809,804号、同第6,372,506号、同第5,700,692号、同第5,643,796号、同第5,627,040号、同第5,620,842号、同第5,602,039号、同第4,987,086号、同第4,498,766号に記載されている。

10

【0069】

特定の例では、本発明のフローサイトメトリシステムは、Diebold, et al. Nature Photonics Vol. 7 (10)、806-810 (2013)に記載されているもの、ならびに米国特許第9,423,353号、同第9,784,661号、同第9,983,132号、同第10,006,852号、同第10,078,045号、同第10,036,699号、同第10,222,316号、同第10,288,546号、同第10,324,019号、同第10,408,758号、同第10,451,538号、同第10,620,111号、ならびに米国特許公開第2017/0133857号、同第2017/0328826号、同第2017/0350803号、同第2018/0275042号、同第2019/0376895号および同第2019/0376894号に記載されているものなど、高周波タグ付き発光(FIRE)を使用する蛍光撮像によってフローストリーム中の粒子を撮像するように構成されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0070】

特定の実施形態では、本システムは、プロセッサに動作可能に結合されたメモリを有するプロセッサをさらに含み、メモリは、メモリに記憶された命令を含み、命令は、プロセッサによって実行されると、プロセッサに、蛍光フローサイトメータデータをクラスタリングし、スピルオーバー拡散の尺度を決定し、スピルオーバー拡散のために蛍光フローサイトメータデータを調整し、スピルオーバー拡散調整された蛍光フローサイトメータデータを区分することを行わせる。

【0071】

一部の実施形態では、プロセッサは、サンプル中の分析物(例えば、細胞、粒子)の決定されたパラメータに基づいて、1つ以上の集団クラスタを生成するように構成される。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、複数の異なる蛍光色素(例えば、2~20個の異なる蛍光色素の範囲であり、3~5個の異なる蛍光色素を含む)からの信号を含む。一部の実施形態では、複数の異なる蛍光色素は、2個以上の異なる蛍光色素を含み、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上を含み、20個以上の異なる蛍光色素を含む。したがって、集団はデータ内のクラスタとして認識される。逆に、ノイズまたはバックグラウンドに対応するクラスタも典型的に観察されるが、各データクラスタは、概して、特定のタイプの細胞または分析物の集団に対応するものとして解釈される。クラスタは、次元のサブセット内で、例えば、サンプルの測定値から抽出された、測定されたパラメータまたは特徴のサブセット内のみで異なる集団に対応する、測定

40

50

された蛍光パラメータ（すなわち、蛍光色素）のサブセットに関して、定義され得る。

【0072】

実施形態では、プロセッサは、蛍光フローサイトメータデータの教師付きクラスタリングを実行するための命令を含む。したがって、特定の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの集団は、階層に対する各データ点の状態に基づいてクラスタリングされる。一部の実施形態では、階層は、同じ蛍光色素について陽性または陰性であるデータ点が一緒にグループ化される方法を確認する。一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータをクラスタリングすることは、蛍光フローサイトメータデータを閾値と比較することを含む。換言すれば、閾値より上にある蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素について陽性として説明され得、一方、閾値より下にある蛍光フローサイトメータデータは、同じ蛍光色素について陰性として説明され得る。

10

【0073】

フローサイトメータデータがクラスタリングされた後、プロセッサは、蛍光フローサイトメータデータの集団に対するスピルオーバー拡散の尺度を決定するように構成され得る。一部の実施形態では、未調整フローサイトメータデータは、1つ以上の検出器による特定の波長の光の意図しない検出に起因するノイズ（すなわち、スピルオーバー拡散）を含む。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散の尺度を決定することは、第1の検出器によって第1の蛍光色素から収集された光の強度が、同じ検出器による第2の蛍光色素からの光の同時収集によって影響を受ける程度を定量化することを含む。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散の尺度を決定することは、スピルオーバー拡散係数を計算することを含む。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算される。

20

【0074】

【数5】

$$SS = \frac{\Delta\sigma_f}{\sqrt{\Delta d}} = \frac{\sqrt{(\sigma_{pos})^2 - (\sigma_{neg})^2}}{\sqrt{d_{pos} - d_{neg}}}$$

【0075】

上記式にあって、SSはスピルオーバー拡散係数であり、 $\Delta\sigma_f$ は、蛍光色素から収集された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の発光の拡散を示す増分標準偏差であり、 Δd は、蛍光検出器によって受信された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の蛍光の強度の差である。

30

【0076】

したがって、スピルオーバー拡散係数は、所与の蛍光検出器によって収集された蛍光フローサイトメータデータが、特定の蛍光色素に関連する光の存在によって影響を受ける程度を測定する。換言すれば、スピルオーバー拡散係数は、所与の検出器によって収集されている関連する蛍光色素から放出される光によって蛍光フローサイトメータデータに寄与する誤差（すなわち、ノイズ）を推定する。実施形態では、より高いスピルオーバー拡散係数は、所与の蛍光色素－検出器対に対するより多くのスピルオーバー拡散に対応する。

40

【0077】

一部の実施形態では、スピルオーバー拡散の尺度を決定することはまた、各検出器で収集された蛍光フローサイトメータデータが各蛍光色素に関連付けられた光の存在によってどのように影響を受けるかを判定することができるように、各可能な蛍光検出器－蛍光色素の組み合わせについてスピルオーバー拡散係数を計算することを含む。実施形態では、各蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わせられる。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散行列は、その対応する検出器による特定の蛍光色素の検出が、他の蛍光色素からのスピルオーバーによってどのように影響を受けるかを実証する。列および行が交差するセルは、問題の蛍光色素が関連

50

する検出器に誤差を与える程度を示す蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数で埋められる。蛍光色素がスピルオーバー拡散を引き起こす全程度は、その行内のすべての値を合計することによって近似することができ、検出器がスピルオーバー拡散によって影響を受ける全程度は、その列内のすべての値を合計することによって計算することができる。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、総拡散効果（すなわち、蛍光フローサイトメータデータの特定のサブセットに対するスピルオーバー拡散の累積効果）を計算するために合計される。

【0078】

一部の実施形態では、スピルオーバー拡散行列は、自動拡散アルゴリズムによって計算される。AutoSpreadアルゴリズムは、所与の蛍光色素に関して陽性であるフローサイトメータの集団と陰性であるフローサイトメータの集団との間の区別を必要とせずに、（例えば、上述のような）スピルオーバー拡散行列を作成するように構成されている。AutoSpreadは、同じフローサイトメトリパネルに第2の蛍光色素を含めることによって、第1の蛍光色素の検出信号に寄与した拡散を特徴付ける。AutoSpreadは、蛍光検出器と蛍光色素との間の各相互作用に対して1つの係数を生成し、係数を上記のスピルオーバー拡散行列に類似した行列に配列する。実施形態では、スピルオーバー拡散係数を計算することは、フローサイトメータデータの陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であり、対応する標準偏差が未知の量であると仮定することを含む。一部の実施形態では、スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算される。

【0079】

【数6】

$$SS = \frac{\sqrt{\sigma^2 - \sigma_0^2}}{\sqrt{d}}$$

【0080】

上記式にあって、SSはスピルオーバー拡散係数であり、 σ^2 は蛍光フローサイトメータデータの陽性集団の標準偏差であり、 σ_0^2 は蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値であり、dは蛍光検出器によって収集された光の強度である。

【0081】

一部の実施形態では、フローサイトメータデータ（ σ_0^2 ）の陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であると仮定されるとき、蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値を取得するために、スピルオーバー拡散係数は、線形回帰のシーケンスに従って計算される。蛍光フローサイトメータデータは、最初に、蛍光検出器によって検出される強度値に従って分位数に分類される。分位数はデフォルトでは256であるが、各分位が標準偏差の信頼できる推定を可能にするために十分な数のデータ点を有することを確実にするために、8程度に下方調整される。次に、蛍光色素から放出された光のロバスト標準偏差を、各分位について検出された光の強度中央値の平方根に対して回帰させる。通常、最小二乗適合のy切片は、陰性集団について検出された光の強度が0であると仮定される場合、フローサイトメータデータの陰性集団における標準偏差の推定値として取得される。蛍光色素から放出される光の標準偏差の推定値を使用して、新しいゼロ調整標準偏差が得られる。蛍光色素についてのゼロ調整標準偏差は、蛍光検出器によって検出された各分位数の蛍光中央値の平方根に対して回帰される。通常、最小二乗適合（上記式によって計算される）の傾きは、スピルオーバー拡散係数として取得される。

【0082】

一部の実施形態では、プロセッサは、スピルオーバー拡散を説明するために蛍光フローサイトメータデータを調整するように構成される。一部の実施形態では、フローサイトメータデータは、スピルオーバー拡散からの建設的誤差を排除するように調整される。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータを調整することは、別個のスピルオーバー拡散調整集

団を生成することを含む。特定の実施形態では、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することは、フローサイトメータデータの関連集団からスピルオーバー拡散の大きさを減算すること、すなわち、建設的スピルオーバー拡散誤差に起因して増加する信号の影響を打ち消すことを含む。特定の実施形態では、スピルオーバー拡散の大きさは、スピルオーバー拡散行列から決定される。一部の実施形態では、フローサイトメータデータを調整することは、フローサイトメータデータの関連部分から総拡散効果を減算することを含む。

【0083】

蛍光フローサイトメータデータの集団が（例えば、上述したように）スピルオーバー拡散に対して調整された後、プロセッサは、蛍光フローサイトメータデータのスピルオーバー拡散調整集団を区分するように構成され得る。区分は、異なって分類される（例えば、異なる表現型を表す）蛍光フローサイトメータデータの集団間を形式的に区別するために作成される。実施形態では、フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を区分することは、マシユーの相関係数を計算することを含む。実施形態では、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の潜在的な区分が、閾値の各々に関して評価される。かかる実施形態では、マシユーの相関係数は、閾値の各々について計算され、それによって、閾値と区分との間の一致のレベルを評価する。したがって、本発明の実施形態は、マシユーの相関係数が、特定の蛍光色素に関してフローサイトメータデータの陽性集団と陰性集団とを区別する関連閾値に関して最適化されるように集団を区分することを含む。換言すれば、蛍光フローサイトメータデータを区分することは、別々の集団（すなわち、蛍光パラメータの異なる組み合わせを示す集団）が、関連する閾値に対するそれらの関係によって決定される（例えば、マシユーの相関係数によって定量化される）ように互いに区別される程度を最大化することを含む。実施形態では、プロセッサは、フローサイトメータデータの各関連パラメータについて陽性集団と陰性集団とを区別する最適な区分を決定するために、このプロセスを繰り返す。実施形態では、マシユーの相関係数は、下記式に従って計算される。

【0084】

【数7】

$$MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

【0085】

上記式にあって、MCCはマシユーの相関係数であり、TPは真陽性事象を表し、TNは真陰性事象を表し、FPは偽陽性事象を表し、FNは偽陰性事象を表す。

【0086】

本開示によれば、真陽性事象とは、閾値および区分の両方によって特定の蛍光色素について陽性であると評価される蛍光フローサイトメータデータであり、真陰性事象とは、閾値および区分の両方によって特定の蛍光色素について陰性であると評価される蛍光フローサイトメータデータであり、偽陽性事象とは、区分によって特定の蛍光色素について陽性であり、閾値によって陰性であると評価される蛍光フローサイトメータデータであり、偽陰性事象とは、区分によって特定の蛍光色素について陰性であり、閾値によって陽性であると評価される蛍光フローサイトメータデータである。

【0087】

本発明の一部の実施形態では、蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素について陽性である信号を含まない。換言すれば、蛍光色素から発せられる蛍光は検出されない。かかる実施形態では、スピルオーバー拡散調整された蛍光フローサイトメータデータの別個の集団を区分することは、最適な区分を決定するための代替メトリックとして、各区分の平衡精度を計算することを含み得る。平衡精度は、陽性事象を決定する精度と陰性事象を決定する精度との平均であり、下記式に従って計算される。

【0088】

【数 8】

$$BA = \frac{\left(\frac{TP}{TP+FN}\right) + \left(\frac{TN}{TN+FP}\right)}{2}$$

【0089】

上記式にあって、BAは平衡精度であり、TPは真陽性事象を表し、TNは真陰性事象を表し、FPは偽陽性事象を表し、FNは偽陰性事象を表す。

【0090】

本発明の実施形態はまた、蛍光フローサイトメータデータの区分された集団を分類すること、すなわち、フローサイトメータデータの各別個のスピルオーバー拡散調整集団によって指定される細胞または粒子のサブタイプを決定することを含む。実施形態では、分類は、階層（上述）に基づいて決定される。したがって、（例えば、上記のように）区分された蛍光フローサイトメータデータの集団は、それが示す蛍光パラメータの組み合わせに基づいて分類を割り当てられる（すなわち、表現型決定される）。

【0091】

図8は、本発明の例示的な実施形態によるフローサイトメトリのためのシステム800を示している。システム800は、フローサイトメータ810、コントローラ／プロセッサ890、およびメモリ895を含む。フローサイトメータ810は、1つ以上の励起レーザ815a～815c、集束レンズ820、フローチャンバ825、前方散乱検出器830、側方散乱検出器835、蛍光収集レンズ840、1つ以上のビームスプリッタ845a～845g、1つ以上のバンドパスフィルタ850a～850e、1つ以上のロングパス（「LP」）フィルタ855a～855b、および1つ以上の蛍光検出器860a～860fを含む。

【0092】

励起レーザ815a～cは、レーザビームの形態で光を放出する。励起レーザ815a～815cから放出されるレーザビームの波長は、図8の例示的なシステムにおいて、それぞれ488nm、633nm、および325nmである。レーザビームは、最初に、ビームスプリッタ845aおよび845bのうちの1つ以上のものを通して指向される。ビームスプリッタ845aは、488nmの光を透過し、633nmの光を反射する。ビームスプリッタ845bは、UV光（10～400nmの範囲の波長を有する光）を透過し、488nmおよび633nmの光を反射する。

【0093】

次に、レーザビームは、集束レンズ820に指向され、集束レンズは、フローチャンバ825内で、サンプルの粒子が位置する流体流の部分にビームを集束させる。フローチャンバは、流体力学システムの一部であり、流体力学システムは、粒子を、典型的には一度に1つずつ、照会のために集束されたレーザビームにストリーム中で指向させる。フローチャンバは、ベンチトップサイトメータ内のフローセルまたはストリームインエアサイトメータ内のノズルチップを含み得る。

【0094】

レーザビームからの光は、回折、屈折、反射、散乱、および吸収によってサンプル中の粒子と相互作用し、粒子のサイズ、内部構造、および粒子に付着した、または粒子上もしくはは粒子内に自然に存在する1つ以上の蛍光分子の存在などの粒子の特性に応じて、種々の異なる波長で再放出する。蛍光発光ならびに回折光、屈折光、反射光、および散乱光は、ビームスプリッタ845a～845g、バンドパスフィルタ850a～850e、ロングパスフィルタ855a～855b、および蛍光収集レンズ840のうちの1つ以上を通して、前方散乱検出器830、側方散乱検出器835、および1つ以上の蛍光検出器860a～860fのうちの1つ以上に送られ得る。

【0095】

蛍光収集レンズ840は、粒子－レーザビーム相互作用から放出された光を収集し、そ

の光を1つ以上のビームスプリッタおよびフィルタに向かって送る。バンドパスフィルタ850a~850eなどのバンドパスフィルタは、狭い範囲の波長がフィルタを通過することを可能にする。例えば、バンドパスフィルタ850aは510/20フィルタである。第1の数は、スペクトル帯域の中心を表す。第2の数は、スペクトル帯域の範囲を提供する。したがって、510/20フィルタは、スペクトル帯域の中心の各側に10nm、すなわち500nmから520nmまで延在する。ショートパスフィルタは、特定の波長以下の波長の光を透過する。ロングパスフィルタ855a~855bなどのロングパスフィルタは、指定された光の波長以上の光の波長を透過させる。例えば、670nmロングパスフィルタであるロングパスフィルタ855aは、670nm以上の光を透過させる。フィルタは、特定の蛍光染料に対する検出器の特異性を最適化するように選択されることが多い。フィルタは、検出器に透過される光のスペクトル帯域が蛍光染料の発光ピークに近くなるように構成することができる。

10

【0096】

ビームスプリッタは、異なる波長の光を異なる方向に指向させる。ビームスプリッタは、ショートパスおよびロングパスなどのフィルタ特性によって特徴付けることができる。例えば、ビームスプリッタ805gは620SPビームスプリッタであり、これは、ビームスプリッタ845gが、620nm以下の波長の光を透過し、620nmより長い波長の光を異なる方向に反射することを意味する。一実施形態では、ビームスプリッタ845a~845gは、ダイクロイックミラーなどの光学ミラーを備えることができる。

【0097】

前方散乱検出器830は、フローセルを通る直接ビームから軸外に位置決めされ、回折光、すなわち、主に順方向に粒子を通して、またはその周囲を進行する励起光を検出するように構成される。前方散乱検出器によって検出される光の強度は、粒子の全体的なサイズに依存する。前方散乱検出器は、フォトダイオードを含み得る。側方散乱検出器835は、粒子の表面および内部構造から屈折および反射された光を検出するように構成され、構造の粒子複雑性の増加とともに増加する傾向がある。粒子に関連付けられた蛍光分子からの蛍光発光は、1つ以上の蛍光検出器860a~860fによって検出され得る。側方散乱検出器835および蛍光検出器は、光電子増倍管を含み得る。前方散乱検出器830、側方散乱検出器835および蛍光検出器で検出された信号は、検出器によって電子信号（電圧）に変換することができる。このデータは、サンプルに関する情報を提供することができる。

20

30

【0098】

動作中、サイトメータ動作は、コントローラ/プロセッサ890によって制御され、検出器からの測定データは、メモリ895に記憶され、コントローラ/プロセッサ890によって処理され得る。明示的に示されていないが、コントローラ/プロセッサ890は、検出器に結合されて、そこから出力信号を受信し、また、フローサイトメータ800の電気および電気機械構成要素に結合されて、レーザ、流体流動パラメータなどを制御してもよい。入力/出力(I/O)機能897もシステム内に提供され得る。メモリ895、コントローラ/プロセッサ890、およびI/O897は、フローサイトメータ810の一体部分として完全に提供され得る。かかる実施形態では、ディスプレイはまた、実験データをサイトメータ800のユーザに提示するためのI/O機能897の一部を形成してもよい。代替的に、メモリ895およびコントローラ/プロセッサ890およびI/O機能の一部または全部は、汎用コンピュータなどの1つ以上の外部デバイスの一部であってもよい。一部の実施形態では、メモリ895およびコントローラ/プロセッサ890の一部または全部は、サイトメータ810と無線通信または有線通信することができる。コントローラ/プロセッサ890は、メモリ895およびI/O897と併せて、フローサイトメータ実験の準備および分析に関連する種々の機能を行うように構成され得る。

40

【0099】

図8に示されるシステムは、フローセル825から各検出器へのビーム経路内のフィルタおよび/またはスプリッタの構成によって画定される、6つの異なる波長帯域（本明細

50

書では、所与の検出器のための「フィルタ窓」と称され得る) 内の蛍光を検出する6つの異なる検出器を含む。フローサイトメータ実験に使用される異なる蛍光分子は、それら自体の特徴的な波長帯の光を放出する。実験のために使用される特定の蛍光標識およびそれらの関連する蛍光発光帯は、検出器のフィルタ窓と概して一致するように選択され得る。しかしながら、より多くの検出器が提供され、より多くの標識が利用されるので、フィルタ窓と蛍光発光スペクトルとの間の完全な対応は不可能である。特定の蛍光分子の発光スペクトルのピークは、1つの特定の検出器のフィルタウィンドウ内に存在し得るが、概して、その標識の発光スペクトルの一部はまた、1つ以上の他の検出器のフィルタウィンドウと重複するという事実がある。これはスピルオーバーと称されることがある。I/O 897は、蛍光標識のパネルおよび複数のマーカを有する複数の細胞集団を有するフローサイトメータ実験に関するデータを受信するように構成することができ、各細胞集団は複数のマーカのサブセットを有する。I/O 897はまた、1つ以上のマーカを1つ以上の細胞集団に割り当てる生体データ、マーカ密度データ、発光スペクトルデータ、標識を1つ以上のマーカに割り当てるデータ、およびサイトメータ構成データを受信するように構成され得る。フローサイトメータ実験データ(例えば、標識スペクトル特性およびフローサイトメータ構成データ)もまた、メモリ895に記憶され得る。コントローラ/プロセッサ890は、マーカへのラベルの1つ以上の割り当てを評価するように構成され得る。

【0100】

当業者は、本発明の実施形態に従うフローサイトメータが、図8に示されるフローサイトメータに限定されず、当技術分野で既知の任意のフローサイトメータを含み得ることを認識する。例えば、フローサイトメータは、任意の数のレーザ、ビームスプリッタ、フィルタ、および検出器を、種々の波長および種々の異なる構成で有し得る。

【0101】

図9は、データを分析し表示するためのプロセッサ900の一例の機能ブロック図を示している。プロセッサ900は、生体事象のグラフィック表示を制御するための種々のプロセスを実装するように構成され得る。フローサイトメータ902は、(例えば、上述したように) 生体サンプルを分析することによって蛍光フローサイトメータデータを取得するように構成することができる。装置は、生体事象データをプロセッサ900に提供するように構成することができる。データ通信チャンネルは、フローサイトメータ902とプロセッサ900との間に含まれ得る。データは、データ通信チャンネルを介してプロセッサ900に提供することができる。プロセッサ900は、プロット(例えば、上記で説明されるような)を含むグラフィカル表示をディスプレイ906に提供するように構成され得る。プロセッサ900は、例えば、プロット上にオーバーレイされた、表示デバイス906によって示される蛍光フローサイトメータデータの集団の周りにゲートをレンダリングするようにさらに構成され得る。一部の実施形態では、ゲートは、単一パラメータヒストグラムまたは二変量プロット上に描かれた1つ以上のグラフィカル関心領域の論理的組み合わせであり得る。一部の実施形態では、ディスプレイは、分析物パラメータまたは飽和検出器データを表示するために使用され得る。

【0102】

プロセッサ900はさらに、ゲート外の蛍光フローサイトメータデータ内の他の事象とは異なって、ゲート内の表示デバイス906上に蛍光フローサイトメータデータを表示するように構成され得る。例えば、プロセッサ900は、ゲート内に含まれる蛍光フローサイトメータデータの色を、ゲート外の蛍光フローサイトメータデータの色とは異なるようにレンダリングするように構成することができる。このようにして、プロセッサ900は、データの各一意の集団を表すために異なる色をレンダリングするように構成され得る。表示デバイス906は、モニタ、タブレットコンピュータ、スマートフォン、またはグラフィカルインターフェースを提示するように構成された他の電子デバイスとして実装され得る。

【0103】

プロセッサ900は、第1の入力デバイスからゲートを識別するゲート選択信号を受信

するように構成することができる。例えば、第1の入力デバイスは、マウス910として実装することができる。マウス910は、プロセッサ900へのゲート選択信号を開始して、（例えば、カーソルがそこに位置決めされたときに所望のゲート上または内をクリックすることによって）表示デバイス906を介して表示または操作される集団を識別することができる。一部の实装形態では、第1のデバイスは、キーボード908、またはタッチスクリーン、スタイラス、光検出器、もしくは音声認識システムなど、プロセッサ900に入力信号を提供するための他の手段として実装され得る。一部の入力デバイスは、複数の入力機能を含み得る。かかる実装形態では、入力機能は各々、入力デバイスとみなされ得る。例えば、図9に示されるように、マウス910は、右マウスボタンおよび左マウスボタンを含むことができ、それらの各々は、トリガ事象を生成することができる。

10

【0104】

トリガ事象は、プロセッサ900に、蛍光フローサイトメータデータが表示される方法を変更させ、データのどの部分が実際に表示デバイス906上に表示されるか、および／または分析のための対象集団の選択などのさらなる処理に入力を提供させることができる。

【0105】

一部の实施形態では、プロセッサ900は、ゲート選択がマウス910によって開始されたときを検出するように構成することができる。プロセッサ900は、ゲーティングプロセスを容易にするためにプロット視覚化を自動的に修正するようにさらに構成され得る。修正は、プロセッサ900によって受信されたデータの特定の分布に基づき得る。

【0106】

プロセッサ900は、ストレージデバイス904に接続することができる。ストレージデバイス904は、プロセッサ900からデータを受信して記憶するように構成することができる。ストレージデバイス904は、プロセッサ900による蛍光フローサイトメータデータなどのデータの検索を可能にするようにさらに構成され得る。

20

【0107】

表示デバイス906は、プロセッサ900から表示データを受信するように構成され得る。表示データは、蛍光フローサイトメータデータのプロットおよびプロットのセクションの輪郭を描くゲートを含み得る。表示デバイス906は、装置902、ストレージデバイス904、キーボード908、および／またはマウス910からの入力と併せてプロセッサ900から受信された入力に従って提示される情報を変更するようにさらに構成され得る。

30

【0108】

一部の实装形態では、プロセッサ900は、ソートのための例示的な事象を受信するためのユーザインターフェースを生成することができる。例えば、ユーザインターフェースは、例示的な事象または例示的な画像を受信するためのコントロールを含み得る。例示的な事象もしくは画像または例示的なゲートは、サンプルについての事象データの収集の前に、またはサンプルの一部についての事象の初期セットに基づいて提供され得る。

【0109】

コンピュータ制御システム

本開示の態様は、コンピュータ制御システムをさらに含み、システムは、完全自動化または部分自動化のための1つ以上のコンピュータをさらに含む。一部の实施形態では、システムは、コンピュータプログラムが記憶されたコンピュータ可読記憶媒体を有するコンピュータを含み、コンピュータプログラムは、コンピュータにロードされると、1つ以上の異なるパラメータ（すなわち、蛍光色素）に従って蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、各検出器-パラメータ対の間のスピルオーバー拡散を（すなわち、スピルオーバー拡散係数を計算することによって）決定することと、その対応する検出器による特定のパラメータの検出が他のパラメータからのスピルオーバーによってどのように影響を受けるかを示すスピルオーバー拡散行列を作成することと、スピルオーバー拡散行列によって決定されるスピルオーバー拡散の大きさを減算することによってスピルオーバー拡散を補償するように蛍光フローサイトメータデータを変更することと、所与のパラメー

40

50

タに対して陽性である集団と所与のパラメータに対して陰性である集団とを区別する閾値に対するマシユ相関係数を計算することによって蛍光フローサイトメータデータの別個の集団を分離する異なる区分の質を評価することと、蛍光フローサイトメータデータの調整された集団を分類する（すなわち、表現型決定する）ことを行うための命令を含む。

【0110】

実施形態では、システムは、FlowJo（登録商標）（Ashland, OR）などのフローサイトメータデータまたは核酸配列データを分析するためのソフトウェアまたは分析ツール内でデータを分析するように構成される。FlowJo（登録商標）は、フローサイトメータデータを分析するためにFlowJo LLC（Becton Dickinsonの子会社）によって開発されたソフトウェアパッケージである。ソフトウェアは、フローサイトメータデータを管理し、それに関するグラフィカルレポートを作成するように構成される（[https://www\(dot\)flowjo\(dot\)com/learn/flowjo-university/flowjo](https://www(dot)flowjo(dot)com/learn/flowjo-university/flowjo)）。初期データは、データ分析ソフトウェアまたはツール（例えば、FlowJo（登録商標））内で、手動ゲーティング、クラスタ分析、または他のコンピュータ技術などの適切な手段によって分析することができる。本システムまたはその一部は、FlowJo（登録商標）などのデータを分析するためのソフトウェアのソフトウェア構成要素として実装することができる。これらの実施形態では、本開示によるコンピュータ制御システムは、FlowJo（登録商標）などの既存のソフトウェアパッケージのためのソフトウェア「プラグイン」として機能することができる。

【0111】

実施形態では、システムは、入力モジュール、処理モジュール、および出力モジュールを含む。主題のシステムは、ハードウェア構成要素およびソフトウェア構成要素の両方を含むことができ、ハードウェア構成要素は、1つ以上のプラットフォームの形態、例えば、サーバの形態をとることができ、それにより、機能要素、すなわち、システムの特定のタスク（情報の入出力の管理、情報の処理など）を実行するシステムの要素は、システムで表される1つ以上のコンピュータプラットフォーム上で、およびそれにわたってソフトウェアアプリケーションを実行することによって実行することができる。

【0112】

システムは、ディスプレイと、オペレータ入力デバイスとを含み得る。オペレータ入力デバイスは、例えば、キーボード、マウスなどであってもよい。処理モジュールは、主題の方法のステップを実行するために記憶された命令を有するメモリにアクセスするプロセッサを含む。処理モジュールは、オペレーティングシステム、グラフィカルユーザインターフェース（GUI）コントローラ、システムメモリ、メモリ記憶デバイス、および入出力コントローラ、キャッシュメモリ、データバックアップユニット、ならびに多くの他のデバイスを含み得る。プロセッサは、市販のプロセッサであってもよいし、利用可能であるかまたは利用可能になる他のプロセッサのうちの1つであってもよい。プロセッサは、オペレーティングシステムを実行し、オペレーティングシステムは、周知の様式でファームウェアおよびハードウェアとインターフェースし、当技術分野で既知のように、Java、Perl、C++、他の高レベルまたは低レベル言語、ならびにそれらの組み合わせなどの様々なプログラミング言語で書かれ得る様々なコンピュータプログラムの機能をプロセッサが協調することと、実行することとを容易にする。オペレーティングシステムは、通常、プロセッサと協調して、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また、すべて既知の技術に従って、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、ならびに通信制御および関連サービスを提供する。プロセッサは、任意の好適なアナログまたはデジタルシステムであり得る。一部の実施形態では、プロセッサは、ユーザが第1および第2の光信号に基づいて光源をフローストリームと手動で整列させることを可能にするアナログ電子機器を含む。一部の実施形態では、プロセッサは、例えば、負帰還制御などのフィードバック制御を提供するアナログ電子機器を含む。

【0113】

システムメモリは、様々な既知または将来のメモリ記憶デバイスのいずれかであり得る。例としては、任意の一般的に入手可能なランダムアクセスメモリ（RAM）、常駐ハードディスクもしくはテープなどの磁気媒体、リードライトコンパクトディスクなどの光学媒体、フラッシュメモリデバイス、または他のメモリ記憶デバイスが挙げられる。メモリ記憶デバイスは、コンパクトディスクドライブ、テープドライブ、リムーバブルハードディスクドライブ、またはディスクドライブを含む、様々な既知または将来のデバイスのいずれかであり得る。かかるタイプのメモリ記憶デバイスは、通常、それぞれ、コンパクトディスク、磁気テープ、リムーバブルハードディスク、またはフロッピーディスクなどのプログラム記憶媒体（図示せず）から読み出し、および／またはプログラム記憶媒体に書き込む。これらのプログラム記憶媒体のいずれか、または現在使用されている、もしくは後に開発され得る他のものは、コンピュータプログラム製品とみなされ得る。理解されるように、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称さ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、および／またはメモリ記憶デバイスと併せて使用されるプログラム記憶デバイスに記憶される。

10

【0114】

一部の実施形態では、コンピュータプログラム製品は、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て記載される。制御ロジックは、プロセッサによって実行されるとコンピュータ、プロセッサに、本明細書に記載された機能を実行させる。他の実施形態では、一部の機能は、例えば、ハードウェアステートマシンを使用して、主にハードウェア内に実装される。本明細書に記載される機能を実行するためのハードウェアステートマシンの実装形態は、関連技術分野の当業者には明らかである。

20

【0115】

メモリは、磁気、光学、またはソリッドステート記憶デバイス（磁気もしくは光学ディスク、またはテープ、またはRAM、または固定型もしくは携帯型のいずれかの任意の他の好適なデバイスを含む）などの、プロセッサがデータを記憶し、取り出すことができる任意の好適なデバイスであり得る。プロセッサは、必要なプログラムコードを担持するコンピュータ可読媒体から好適にプログラムされた汎用デジタルマイクロプロセッサを含み得る。プログラミングは、通信チャネルを介してプロセッサにリモートで提供され得るか、またはメモリまたは何らかの他の携帯型もしくは固定型のコンピュータ可読記憶媒体などのコンピュータプログラム製品に、メモリと一緒にそれらのデバイスのいずれかを使用して、あらかじめ保存され得る。例えば、磁気ディスクはまたは光学ディスクは、プログラミングを担持し得、ディスクライタ／リーダによって読み取ることができる。本発明のシステムは、例えば、コンピュータプログラム製品の形態のプログラミング、上記の方法を実施する際に使用するためのアルゴリズムも含む。本発明によるプログラミングは、コンピュータ可読媒体、例えば、コンピュータによって直接読み取りおよびアクセスすることができる任意の媒体に記録され得る。かかる媒体としては、以下に限定されないが、フロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープなどの磁気記憶媒体、CD-ROMなどの光学記憶媒体、RAMおよびROMなどの電気記憶媒体、ポータブルフラッシュドライブ、ならびに磁気／光学記憶媒体などのこれらのカテゴリーのハイブリッドが挙げられる。

30

40

【0116】

プロセッサはまた、リモート位置でユーザと通信するための通信チャネルへのアクセスを有し得る。リモート位置とは、ユーザがシステムと直接接触せず、広域ネットワーク（「WAN」）、電話ネットワーク、衛星ネットワーク、または携帯電話（すなわち、スマートフォン）を含む任意の他の好適な通信チャネルに接続されたコンピュータなどの外部デバイスから入力情報を入力マネージャに中継することを意味する。

【0117】

50

一部の実施形態では、本開示によるシステムは、通信インターフェースを含むように構成され得る。一部の実施形態では、通信インターフェースは、ネットワークおよび／または別のデバイスと通信するための受信機および／または送信機を含む。通信インターフェースは、無線周波数（RF）通信（例えば、無線周波数特定（RFID）、ジグビー通信プロトコル、Wi-Fi、赤外線、無線ユニバーサルシリアルバス（USB）、超広帯域（UWB）、Bluetooth（登録商標）通信プロトコル、および符号分割多元接続（CDMA）またはモバイル通信のためのグローバルシステム（GSM）などのセルラー通信を含むが、これらに限定されない、有線通信または無線通信のために構成され得る。

【0118】

一実施形態では、通信インターフェースは、主題のシステムと、同様の補完的データ通信のために構成される（例えば、診療所または病院環境における）コンピュータ端末などの他の外部デバイスとの間のデータ通信を可能にするために、例えば、USBポート、RS-232ポート、または任意の他の好適な電気接続ポートなどの物理ポートまたはインターフェースなど、1つ以上の通信ポートを含むように構成される。

【0119】

一実施形態では、通信インターフェースは、赤外線通信、Bluetooth（登録商標）通信、または任意の他の好適な無線通信プロトコルのために構成されて、主題のシステムが、コンピュータ端末および／またはネットワーク、通信可能な携帯電話、パーソナルデジタルアシスタント、またはユーザが併せて使用し得る任意の他の通信デバイスなど、他のデバイスと通信することを可能にする。

【0120】

一実施形態では、通信インターフェースは、携帯電話ネットワーク、ショートメッセージサービス（SMS）、インターネットに接続されるローカルエリアネットワーク（LAN）上のパーソナルコンピュータ（PC）への無線接続、またはWi-FiホットスポットでのインターネットへのWi-Fi接続を介して、インターネットプロトコル（IP）を利用するデータ転送のための接続を提供するように構成される。

【0121】

一実施形態では、主題のシステムは、例えば802.11もしくはBluetooth（登録商標）RFプロトコル、またはIrDA赤外線プロトコルなどの共通標準を使用し、通信インターフェースを介してサーバデバイスと無線で通信するように構成される。サーバデバイスは、スマートフォン、パーソナルデジタルアシスタント（PDA）もしくはノートブックコンピュータなどの別のポータブルデバイス、またはデスクトップコンピュータ、アプライアンスなどのより大きなデバイスであってもよい。一部の実施形態では、サーバデバイスは、液晶ディスプレイ（LCD）などのディスプレイ、ならびにボタン、キーボード、マウス、またはタッチスクリーンなどの入力デバイスを有する。

【0122】

一部の実施形態では、通信インターフェースは、上述の通信プロトコルおよび／または機構のうちの1つ以上を使用して、ネットワークまたはサーバデバイスと、主題のシステム、例えば、任意のデータ記憶ユニットに記憶されたデータを自動的にまたは半自動で通信するように構成される。

【0123】

出力コントローラは、人間であろうと機械であろうと、ローカルであろうとリモートであろうと、ユーザに情報を提示するための様々な既知の表示デバイスのいずれかのためのコントローラを含み得る。表示デバイスのうちの1つが視覚情報を提供する場合、この情報は、通常、ピクチャ要素のアレイとして論理的および／または物理的に編成され得る。グラフィカルユーザインターフェース（GUI）コントローラは、システムとユーザとの間にグラフィカル入力および出力インターフェースを提供するための、およびユーザ入力を処理するための様々な既知または将来のソフトウェアプログラムのいずれかを含み得る。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し得る。これらの通信のいくつかは、ネットワークまたは他のタイプのリモート通信を使用して、代替の実施形態

10

20

30

40

50

で達成され得る。出力マネージャはまた、既知の技術に従って、例えば、インターネット、電話、または衛星ネットワークを介して、リモート位置でユーザに、処理モジュールによって生成された情報を提供し得る。出力マネージャによるデータの提示は、様々な既知の技術に従って実装され得る。一部の例として、データは、SQL、HTML、もしくはXMLドキュメント、電子メールもしくは他のファイル、または他の形態のデータを含み得る。データは、ユーザが追加のSQL、HTML、XML、または他のドキュメントもしくはデータをリモートソースから取り出すことができるように、インターネットURLアドレスを含み得る。主題のシステム内に存在する1つ以上のプラットフォームは、通常、一般的にサーバと称されるコンピュータのクラスのものであるが、任意のタイプの既知のコンピュータプラットフォームまたは将来開発されるタイプであってもよい。また一方、それらは、メインフレームコンピュータ、ワークステーション、または他のコンピュータタイプであってもよい。それらは、任意の既知または将来のタイプのケーブル配線、またはネットワーク化された、もしくはされていない無線システムを含む、他の通信システムを介して接続され得る。それらは、同一場所に配置され得るか、または物理的に分離され得る。場合により、選択されたコンピュータプラットフォームのタイプおよび／または構成に応じて、様々なオペレーティングシステムが、コンピュータプラットフォームのいずれかで用いられ得る。適切なオペレーティングシステムには、Windows NT、Windows XP、Windows 7、Windows 8、iOS、Sun Solaris、Linux（登録商標）、OS/400、Compaq Tru64 Unix、SGI IRIX、Siemens Reliant Unixなどが含まれる。

【0124】

図10は、特定の実施形態による例示的なコンピューティングデバイス1000の一般的なアーキテクチャを示している。図10に示されるコンピューティングデバイス1000の一般的なアーキテクチャは、コンピュータハードウェアおよびソフトウェア構成要素の配置を含む。しかしながら、実施可能な開示を提供するために、これらの概して従来の要素のすべてを示す必要はない。図示されるように、コンピューティングデバイス1000は、処理ユニット1010と、ネットワークインターフェース1020と、コンピュータ可読媒体ドライブ1030と、入力／出力デバイスインターフェース1040と、ディスプレイ1050と、入力デバイス1060とを含み、これらはすべて、通信バスによって互いに通信することができるネットワークインターフェース1020は、1つ以上のネットワークまたはコンピューティングシステムへの接続性を提供することができる。したがって、処理ユニット1010は、ネットワークを介して他のコンピューティングシステムまたはサービスから情報および命令を受信することができる。処理ユニット1010はまた、メモリ1070と通信し、入力／出力デバイスインターフェース1040を介して任意選択のディスプレイ1050に出力情報をさらに提供することができる。例えば、分析システムの非一時的メモリに実行可能命令として記憶された分析ソフトウェア（例えば、FlowJo（登録商標）などのデータ分析ソフトウェアまたはプログラム）は、フローサイトメトリ事象データをユーザに表示することができる。入力／出力デバイスインターフェース1040はまた、キーボード、マウス、デジタルペン、マイクロフォン、タッチスクリーン、ジェスチャ認識システム、音声認識システム、ゲームパッド、加速度計、ジャイロスコープ、または他の入力デバイスなどの任意選択の入力デバイス1060からの入力を受け入れることができる。

【0125】

メモリ1070は、1つ以上の実施形態を実装するために処理ユニット1010が実行するコンピュータプログラム命令（一部の実施形態ではモジュールまたは構成要素として群化される）を含み得る。メモリ1070は、概して、RAM、ROM、および／または他の永続的、補助的もしくは非一時的コンピュータ可読媒体を含む。メモリ1070は、コンピューティングデバイス1000の一般的な管理および動作において処理ユニット1010によって使用されるコンピュータプログラム命令を提供するオペレーティングシステム1072を記憶することができる。データは、データストレージデバイス1090に

記憶されてもよい。メモリ1070は、本開示の態様を実装するためのコンピュータプログラム命令および他の情報をさらに含み得る。

【0126】

コンピュータ可読記憶媒体

本開示の態様は、主題の方法を実施するための命令を有する非一時的コンピュータ可読記憶媒体をさらに含む。コンピュータ可読記憶媒体は、本明細書に説明される方法を実践するためのシステムの完全自動化または部分自動化のために、1つ以上のコンピュータ上で採用されてもよい。一部の実施形態では、本明細書で説明される方法による命令は、「プログラミング」の形態でコンピュータ可読媒体上にコード化することができ、本明細書で使用される「コンピュータ可読媒体」という用語は、実行および処理のために命令およびデータをコンピュータに提供することに関与する任意の非一時的記憶媒体を指す。好適な非一時的記憶媒体の例は、フロッピーディスク、ハードディスク、光ディスク、光磁気ディスク、CD-ROM、CD-R、磁気テープ、不揮発性メモリカード、ROM、DVD-ROM、ブルーレイディスク、ソリッドステートディスク、およびネットワーク接続ストレージ(NAS)を含み、かかるデバイスがコンピュータの内部にあるか外部にあるかを問わない。一部の例では、命令は集積回路デバイス上に提供され得る。対象の集積回路デバイスは、特定の例では、再構成可能なフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)、特定用途向け集積回路(ASIC)、または複合プログラマブル論理デバイス(CPLD)を含み得る。情報を含むファイルは、コンピュータ可読媒体上に「保存」することができ、ここで、「保存」とは、コンピュータによって後日アクセス可能および検索可能であるように情報を記録することを意味する。本明細書で説明されるコンピュータ実装方法は、任意の数のコンピュータプログラミング言語のうちの1つ以上で記述することができるプログラミングを使用して実行することができる。かかる言語は、例えば、Java(Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, CA)、Visual Basic(Microsoft Corp., Redmond, WA)、およびC++(AT&T Corp., Bedminster, NJ)、ならびに任意の多くの他の言語を含む。

【0127】

一部の実施形態では、対象のコンピュータ可読記憶媒体は、その上に記憶されたコンピュータプログラムを含み、コンピュータプログラムは、コンピュータにロードされると、1つ以上の異なるパラメータに従って蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、各検出器-パラメータ対の間のスピルオーバー拡散を(すなわち、スピルオーバー拡散係数を計算することによって)決定することと、その対応する検出器による特定のパラメータの検出が他のパラメータからのスピルオーバーによってどのように影響を受けるかを示すスピルオーバー拡散行列を作成することと、スピルオーバー拡散行列によって決定されるスピルオーバー拡散の大きさを減算することによってスピルオーバー拡散を補償するように蛍光フローサイトメータデータを変更することと、所与のパラメータに対して陽性である集団と所与のパラメータに対して陰性である集団とを区別する閾値に対するマッシュー相関係数を計算することによって蛍光フローサイトメータデータの別個の集団を分離する異なる区分の質を評価することと、蛍光フローサイトメータデータの調整された集団を分類する(すなわち、表現型決定する)こととを行うための命令を含む。

【0128】

実施形態では、システムは、FlowJo(登録商標)などのフローサイトメータデータまたは核酸配列データを分析するためのソフトウェアまたは分析ツール内でデータを分析するように構成される。初期データは、データ分析ソフトウェアまたはツール(例えば、FlowJo(登録商標))内で、手動ゲーティング、クラスタ分析、または他のコンピュータ技術などの適切な手段によって分析することができる。本システムまたはその一部は、FlowJo(登録商標)などのデータを分析するためのソフトウェアのソフトウェア構成要素として実装することができる。これらの実施形態では、本開示によるコンピュータ制御システムは、FlowJo(登録商標)などの既存のソフトウェアパッケージ

のためのソフトウェア「プラグイン」として機能することができる。

【0129】

コンピュータ可読記憶媒体は、ディスプレイおよびオペレータ入力デバイスを有する1または複数のコンピュータシステム上で使用することができる。オペレータ入力デバイスは、例えば、キーボード、マウスなどであってもよい。処理モジュールは、主題の方法のステップを実行するために記憶された命令を有するメモリにアクセスするプロセッサを含む。処理モジュールは、オペレーティングシステム、グラフィカルユーザインターフェース（GUI）コントローラ、システムメモリ、メモリ記憶デバイス、および入出力コントローラ、キャッシュメモリ、データバックアップユニット、ならびに多くの他のデバイスを含み得る。プロセッサは、市販のプロセッサであってもよいし、利用可能であるかまたは利用可能になる他のプロセッサのうちの1つであってもよい。プロセッサは、オペレーティングシステムを実行し、オペレーティングシステムは、周知の様式でファームウェアおよびハードウェアとインターフェースし、当技術分野で既知のように、Java、Perl、C++、他の高レベルまたは低レベル言語、ならびにそれらの組み合わせなどの様々なプログラミング言語で書かれ得る様々なコンピュータプログラムの機能をプロセッサが協調することと、実行することとを容易にする。オペレーティングシステムはまた、すべて既知の技術に従って、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、ならびに通信制御および関連サービスを提供する。

【0130】

ユーティリティ

本発明の装置、方法、およびコンピュータシステムは、生体サンプル中の分析物（例えば、細胞、粒子）のパラメータの決定において解像度および精度を高めることが望ましい様々な用途に使用される。例えば、本開示は、スピルオーバー拡散によって影響を受けるデータを分析する際に使用される。フローサイトメトリは、多くの場合、複数の検出器による複数の蛍光パラメータの収集を伴うため、検出された蛍光強度は、複数の検出器によって同じ光が検出されることに起因して、誤って増加され得る。したがって、本開示は、複数の蛍光色素からの信号を含むフローサイトメータデータの分析中に用途が見出される。主題のデバイス、方法、およびコンピュータシステムはまた、通常、スピルオーバー拡散の影響に起因して誤って特徴付けられるフローサイトメータデータの集団を分類する（すなわち、表現型決定する）際の使用が見出される。一部の実施形態では、主題の方法およびシステムは、完全に自動化されたプロトコルを提供し、その結果、データに対する調整は、あったとしても、ほとんど人間の入力を必要としない。

【0131】

本開示は、多くのタイプの分析物、特に、患者をケアするための医療診断またはプロトコルに関連する分析物を特徴付けるために使用することができ、これには、タンパク質（遊離タンパク質、ならびに細胞などの構造の表面に結合したタンパク質およびタンパク質の両方を含む）、核酸、ウイルス粒子などが含まれるが、これらに限定されない。さらに、サンプルは、インビトロまたはインビボの供給源由来であり得、そしてサンプルは、診断用サンプルであり得る。

【0132】

キット

本開示の態様はキットをさらに含み、キットは、フロッピーディスク、ハードディスク、光ディスク、光磁気ディスク、CD-ROM、CD-R、磁気テープ、不揮発性メモリカード、ROM、DVD-ROM、ブルーレイディスク、ソリッドステートディスク、およびネットワーク接続ストレージ（NAS）などの記憶媒体を含む。これらのプログラム記憶媒体のいずれか、または現在使用されている、もしくは後に開発され得る他のものが、本キットに含まれてもよい。実施形態では、プログラム記憶媒体は、蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスターリングし、集団のスピルオーバー拡散を決定し、スピルオーバー拡散に基づいてフローサイトメータデータを調整し、ならびに（例えば、上述のように）調整されたフローサイトメータデータ間の区分を決定するための命令を含む。実施形態

では、主題のキットまたはその一部に提供されるコンピュータ可読媒体に含まれる命令は、FlowJo（登録商標）などのデータを分析するためのソフトウェアのソフトウェア構成要素として実装され得る。これらの実施形態では、本開示によるコンピュータ制御システムは、FlowJo（登録商標）などの既存のソフトウェアパッケージのためのソフトウェア「プラグイン」として機能することができる。

【0133】

上記の構成要素に加えて、主題のキットは、（一部の実施形態において）例えば、FlowJo（登録商標）などの既存のソフトウェアパッケージにプラグインをインストールするための命令をさらに含み得る。これらの説明書は、様々な形態で主題のキット内に存在し得、そのうちの1つ以上が、キット内に存在し得る。これらの説明書が存在し得る1つの形態は、例えば、情報が印刷される1枚または複数枚の紙などの好適な媒体または基板上、キットのパッケージ中、添付文書などの中の印刷情報としてである。これらの説明書のさらに別の形態は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えば、ディスク、コンパクトディスク（CD）、ポータブルフラッシュドライブなどである。存在し得る、これらの説明書のさらに別の形態は、隔たったサイトで情報にアクセスするために、インターネットを介して使用され得るウェブサイトアドレスである。

【0134】

添付の特許請求の範囲にもかかわらず、本開示はまた、以下の付記によっても定義される。

1. 蛍光フローサイトメータデータを分類する方法であって、
教師付きアルゴリズムを用いて蛍光フローサイトメータデータを処理することを含んでおり、

教師付きアルゴリズムは、

蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、

蛍光フローサイトメータデータの集団についてスピルオーバー拡散の尺度を決定することと、

決定されたスピルオーバー拡散に基づいて蛍光フローサイトメータデータの集団を調整して、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することと、

蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立して、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を分類することとを行うように構成されている、方法。

2. 蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素に対する蛍光フローサイトメータデータの陽性または陰性に基づいて集団にクラスタリングされる、付記1に記載の方法。

3. 蛍光フローサイトメータデータは、閾値に対する蛍光フローサイトメータデータの関係に基づいて、特定の蛍光色素について陽性または陰性であると判定される、付記1または2に記載の方法。

4. スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器によって収集された蛍光フローサイトメータデータが特定の蛍光色素から放出される光の収集によって増加する程度を定量化することを含む、付記1～3のいずれか一つに記載の方法。

5. スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器－蛍光色素対のスピルオーバー拡散係数を計算することを含む、付記1～4のいずれか一つに記載の方法。

【0135】

6. スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【0136】

【数9】

$$SS = \frac{\Delta\sigma_f}{\sqrt{\Delta d}} = \frac{\sqrt{(\sigma_{pos})^2 - (\sigma_{neg})^2}}{\sqrt{d_{pos} - d_{neg}}}$$

10

20

30

40

50

【0137】

式中、

SSは、スピルオーバー拡散係数であり、

$\Delta\sigma_f$ は、蛍光色素から収集された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の発光の拡散を示す増分標準偏差であり、

Δd は、蛍光検出器によって受信された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の蛍光強度の差である、付記5に記載の方法。

7. スピルオーバー拡散係数を計算することは、フローサイトメータデータの陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であると仮定することを含む、付記5に記載の方法。

8. スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【0138】

【数10】

$$SS = \frac{\sqrt{\sigma^2 - \sigma_0^2}}{\sqrt{d}}$$

【0139】

式中、

SSは、スピルオーバー拡散係数であり、

σ^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陽性集団の標準偏差であり、

σ_0^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値であり、

dは、蛍光検出器によって収集された光の強度である、付記7に記載の方法。

9. σ_0^2 は、線形回帰によって計算される、付記8に記載の方法。

10. 蛍光フローサイトメータデータは、複数の異なる蛍光色素から放出された光から収集される、付記1～9のいずれか一つに記載の方法。

【0140】

11. 複数の異なる蛍光色素は、2～20個の異なる蛍光色素の範囲である、付記10に記載の方法。

12. 複数の異なる蛍光色素は、3～5個の異なる蛍光色素の範囲である、付記10または11に記載の方法。

13. スピルオーバー拡散係数は、各蛍光検出器－蛍光色素対について計算される、付記10～12のいずれか一つに記載の方法。

14. 各蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わせられる、付記10～13のいずれか一つに記載の方法。

15. スピルオーバー拡散行列に基づいて、複数の異なる蛍光色素の各々についてスピルオーバー拡散の大きさを計算することをさらに含む、付記14に記載の方法。

【0141】

16. 蛍光フローサイトメータデータを調整することは、複数の異なる蛍光色素の各々についてのスピルオーバー拡散の大きさを、その蛍光色素に対応する蛍光フローサイトメータデータの集団から減算することを含む、付記15に記載の方法。

17. 蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立することは、閾値に対する別個のスピルオーバー拡散調整集団の分離を評価することを含む、付記1～16のいずれか一つに記載の方法。

18. 別個のスピルオーバー拡散調整集団の閾値に対する分離を評価することは、マシユの相関係数を計算することを含む、付記17に記載の方法。

19. 蛍光フローサイトメータデータは、少なくとも1つの蛍光色素についての陽性データを含まない、付記18に記載の方法。

20. 別個のスピルオーバー拡散調整集団の閾値に対する分離を評価することは、平衡精度を計算することを含む、付記19に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0142】

21. 蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団は、階層に従って区分される、付記1～20のいずれか一つに記載の方法。

22. 階層は、特定の蛍光色素について陽性または陰性を示す蛍光フローサイトメータデータのスピルオーバー拡散調整集団と、対応する表現型との間の関連付けを指定する、付記21に記載の方法。

【0143】

23. システムであって、

蛍光フローサイトメータデータを取得するように構成された粒子分析器構成要素と、
プロセッサであって、プロセッサに動作可能に結合されたメモリを備え、メモリは、メモリに記憶された命令を含み、命令は、プロセッサによって実行されると、プロセッサに、
蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、
蛍光フローサイトメータデータの集団についてスピルオーバー拡散の尺度を決定することと、

決定されたスピルオーバー拡散に基づいて蛍光フローサイトメータデータの集団を調整して、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することと、

蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立して、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を分類することとを行わせる、プロセッサとを含む、システム。

24. 蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素に対する蛍光フローサイトメータデータの陽性または陰性に基づいて集団にクラスタリングされる、付記23に記載のシステム。

25. 蛍光フローサイトメータデータは、閾値に対する蛍光フローサイトメータデータの関係に基づいて、特定の蛍光色素について陽性または陰性であると判定される、付記23または24に記載のシステム。

26. スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器によって収集された蛍光フローサイトメータデータが特定の蛍光色素から放出される光の収集によって増加する程度を定量化することを含む、付記23～25のいずれか一つに記載のシステム。

27. スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器－蛍光色素対のスピルオーバー拡散係数を計算することを含む、付記23～26のいずれか一つに記載のシステム。

【0144】

28. スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【0145】

【数11】

$$SS = \frac{\Delta\sigma_f}{\sqrt{\Delta d}} = \frac{\sqrt{(\sigma_{pos})^2 - (\sigma_{neg})^2}}{\sqrt{d_{pos} - d_{neg}}}$$

【0146】

式中、

SSは、スピルオーバー拡散係数であり、

$\Delta\sigma_f$ は、蛍光色素から収集された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の発光の拡散を示す増分標準偏差であり、

Δd は、蛍光検出器によって受信された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の蛍光強度の差である、付記27に記載のシステム。

29. スピルオーバー拡散係数を計算することは、フローサイトメータデータの陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であると仮定することを含む、付記27に記載のシステム。

30. スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、
 【0147】
 【数12】

$$SS = \frac{\sqrt{\sigma^2 - \sigma_0^2}}{\sqrt{d}}$$

【0148】

式中、

SSは、スピルオーバー拡散係数であり、

σ^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陽性集団の標準偏差であり、

σ_0^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値であり、

dは、蛍光検出器によって収集された光の強度である、付記29に記載のシステム。

31. σ_0^2 は、線形回帰によって計算される、付記30に記載のシステム。

32. 蛍光フローサイトメータデータは、複数の異なる蛍光色素から放出された光から収集される、付記23～31のいずれか一つに記載のシステム。

【0149】

33. 複数の異なる蛍光色素は、2～20個の異なる蛍光色素の範囲である、付記32に記載のシステム。

34. 複数の異なる蛍光色素は、3～5個の異なる蛍光色素の範囲である、付記32または33に記載のシステム。

35. スピルオーバー拡散係数は、各蛍光検出器－蛍光色素対について計算される、付記32～34のいずれか一つに記載のシステム。

36. 各蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わせられる、付記32～35のいずれか一つに記載のシステム。

37. スピルオーバー拡散行列に基づいて、複数の異なる蛍光色素の各々についてスピルオーバー拡散の大きさを計算することをさらに含む、付記36に記載のシステム。

【0150】

38. 蛍光フローサイトメータデータを調整することは、複数の異なる蛍光色素の各々についてのスピルオーバー拡散の大きさを、その蛍光色素に対応する蛍光フローサイトメータデータの集団から減算することを含む、付記37に記載のシステム。

39. 蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立することは、閾値に対する別個のスピルオーバー拡散調整集団の分離を評価することを含む、付記23～38のいずれか一つに記載のシステム。

40. 別個のスピルオーバー拡散調整集団の閾値に対する分離を評価することは、マシュエの相関係数を計算することを含む、付記39に記載のシステム。

41. 蛍光フローサイトメータデータは、少なくとも1つの蛍光色素についての陽性データを含まない、付記40に記載のシステム。

42. 別個のスピルオーバー拡散調整集団の閾値に対する分離を評価することは、平衡精度を計算することを含む、付記41に記載のシステム。

【0151】

43. 蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団は、階層に従って区分される、付記23～42のいずれか一つに記載のシステム。

44. 階層は、特定の蛍光色素について陽性または陰性を示す蛍光フローサイトメータデータのスピルオーバー拡散調整集団と、対応する表現型との間の関連付けを指定する、付記43に記載のシステム。

【0152】

45. 方法によってフローサイトメータデータを分類するための命令が記憶された非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、

10

20

30

40

50

本方法は、教師付きアルゴリズムを用いてフローサイトメータデータを処理することを含んでおり、

教師付きアルゴリズムは、

蛍光フローサイトメータデータを集団にクラスタリングすることと、

蛍光フローサイトメータデータの集団についてスピルオーバー拡散の尺度を決定することと、

決定されたスピルオーバー拡散に基づいて蛍光フローサイトメータデータの集団を調整して、別個のスピルオーバー拡散調整集団を生成することと、

蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立して、蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団を分類することとを行うように構成されている、非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

10

46. 蛍光フローサイトメータデータは、特定の蛍光色素に対する蛍光フローサイトメータデータの陽性または陰性に基づいて集団にクラスタリングされる、付記45に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

47. 蛍光フローサイトメータデータは、閾値に対する蛍光フローサイトメータデータの関係に基づいて、特定の蛍光色素について陽性または陰性であると判定される、付記45または46に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

48. スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器によって収集された蛍光フローサイトメータデータが特定の蛍光色素から放出される光の収集によって増加する程度を定量化することを含む、付記45～47のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

20

49. スピルオーバー拡散を決定することは、蛍光検出器－蛍光色素対のスピルオーバー拡散係数を計算することを含む、付記45～48のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【0153】

50. スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【0154】

【数13】

$$SS = \frac{\Delta\sigma_f}{\sqrt{\Delta d}} = \frac{\sqrt{(\sigma_{pos})^2 - (\sigma_{neg})^2}}{\sqrt{d_{pos} - d_{neg}}}$$

30

【0155】

式中、

SSは、スピルオーバー拡散係数であり、

$\Delta\sigma_f$ は、蛍光色素から収集された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の発光の拡散を示す増分標準偏差であり、

Δd は、蛍光検出器によって受信された陽性蛍光フローサイトメータデータと陰性蛍光フローサイトメータデータとの間の蛍光強度の差である、付記49に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

40

51. スピルオーバー拡散係数を計算することは、フローサイトメータデータの陰性集団について蛍光検出器によって収集された蛍光の強度が0であると仮定することを含む、付記49に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

52. スピルオーバー拡散係数は、下記式に従って計算され、

【0156】

【数14】

$$SS = \frac{\sqrt{\sigma^2 - \sigma_0^2}}{\sqrt{d}}$$

50

【0157】

式中、

SS は、スピルオーバー拡散係数であり、

σ^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陽性集団の標準偏差であり、

σ_0^2 は、蛍光フローサイトメータデータの陰性集団の標準偏差の推定値であり、

d は、蛍光検出器によって収集された光の強度である、付記51に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

53. σ_0^2 は、線形回帰によって計算される、付記52に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

54. 蛍光フローサイトメータデータは、複数の異なる蛍光色素から放出された光から収集される、付記45～53のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【0158】

55. 複数の異なる蛍光色素は、2～20個の異なる蛍光色素の範囲である、付記54に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

56. 複数の異なる蛍光色素は、3～5個の異なる蛍光色素の範囲である、付記54または55に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

57. スピルオーバー拡散係数は、各蛍光検出器－蛍光色素対について計算される、付記54～56のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

58. 各蛍光検出器－蛍光色素対について計算されたスピルオーバー拡散係数は、スピルオーバー拡散行列において組み合わせられる、付記54～57のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

59. スピルオーバー拡散行列に基づいて、複数の異なる蛍光色素の各々についてスピルオーバー拡散の大きさを計算することをさらに含む、付記58に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【0159】

60. 蛍光フローサイトメータデータを調整することは、複数の異なる蛍光色素の各々についてのスピルオーバー拡散の大きさを、その蛍光色素に対応する蛍光フローサイトメータデータの集団から減算することを含む、付記59に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

61. 蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団間の区分を確立することは、閾値に対する別個のスピルオーバー拡散調整集団の分離を評価することを含む、付記45～60のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

62. 別個のスピルオーバー拡散調整集団の閾値に対する分離を評価することは、マシユの相関係数を計算することを含む、付記61に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

63. 蛍光フローサイトメータデータは、少なくとも1つの蛍光色素についての陽性データを含まない、付記62に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

64. 別個のスピルオーバー拡散調整集団の閾値に対する分離を評価することは、平衡精度を計算することを含む、付記63に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【0160】

65. 蛍光フローサイトメータデータの別個のスピルオーバー拡散調整集団は、階層に従って区分される、付記45～64のいずれか一つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

66. 階層は、特定の蛍光色素について陽性または陰性を示す蛍光フローサイトメータデータのスピルオーバー拡散調整集団と、対応する表現型との間の関連付けを指定する、付記65に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【0161】

上記の発明は、理解を明確にするために、例示および実施例によってある程度詳細に記載されているが、本発明の教示に照らして当業者には、特定の変更および修正が添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲から逸脱することなく、本発明を実施することができるこ

10

20

30

40

50

とは容易に明らかである。

【0162】

したがって、上述は単に本発明の原理を説明したものである。当業者であれば、本明細書には明示的に記載も示されてもいないが、本発明の原理を具現化し、本発明の趣旨および範囲内に含まれる様々な変更を考案し得ることが、理解される。さらに、本明細書に列挙されるすべての例および条件付き用語は、主に、読者が、本発明の原理、および当技術分野をさらに進めるために発明者らによって提供された概念を理解することを助ける点を意図しており、かかる具体的に列挙される例および条件に限定されるものではないと解釈されるべきである。さらに、本発明の原理、態様、および実施形態を列挙する、本明細書のすべての記述、ならびにその具体例は、その構造的および機能的等価物の両方を包含することが意図される。さらに、かかる等価物は、構造に関係なく、現在知られている等価物と、将来開発される等価物との両方、すなわち、同じ機能を実行するように開発されたあらゆる要素を含むことが意図される。さらに、本明細書に開示されるいかなるものも、かかる開示が特許請求の範囲において明示的に列挙されているか否かにかかわらず、公に献呈するように意図されていない。

10

【0163】

したがって、本発明の範囲は、本明細書に示され、記載される例示的な実施形態に限定されることを意図するものではない。むしろ、本発明の範囲および趣旨は、添付の特許請求の範囲によって具現化される。特許請求の範囲においては、米国特許法第112条(f)または米国特許法第112条(6)は、「のための手段(means for)」または「のためのステップ(step for)」と完全に一致する語句が、特許請求項における限定の始まりで列挙されるときにのみ、特許請求項におけるかかる限定を喚起しているとして明確に定義されており、かかる完全に一致する語句が、特許請求項における限定に使用されていない場合、米国特許法第112条(f)も米国特許法第112条(6)も適用されない。

20

【0164】

関連出願の相互参照

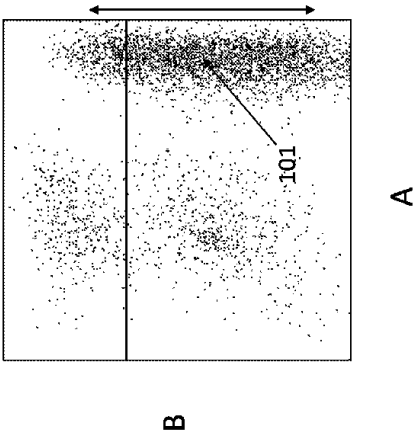
米国特許法第119条(e)に従って、本出願は、2019年1月31日に出願された米国仮特許出願第62/968,516号の出願日、および2019年7月17日に出願された米国仮特許出願第63/053,108号の出願日の優先権を主張し、これらの出願の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

50

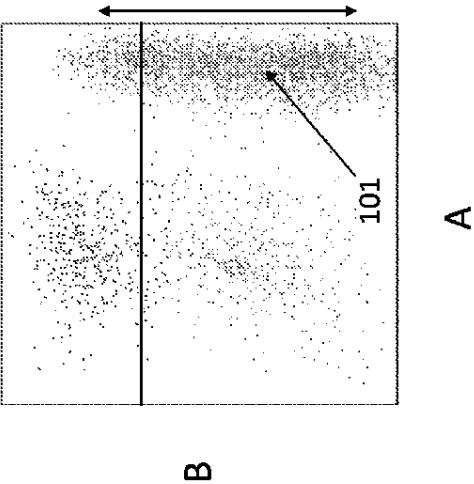
【図面】
【図 1】



【図 2 A】

Figure 1

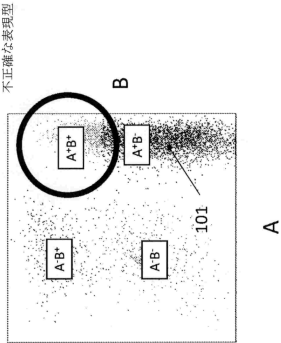
Figure 2A



10

20

【図 2 B】



【図 3】

CD4 ⁺	および	CD8 ⁻	→	CD4 ⁺ T細胞
CD4 ⁺	および	CD8 ⁺	→	CD8 ⁺ T細胞
CD4 ⁺	および	CD8 ⁺	→	二重陽性T細胞
CD4 ⁻	および	CD8 ⁻	→	二重陰性T細胞

30

40

50

【図 4】

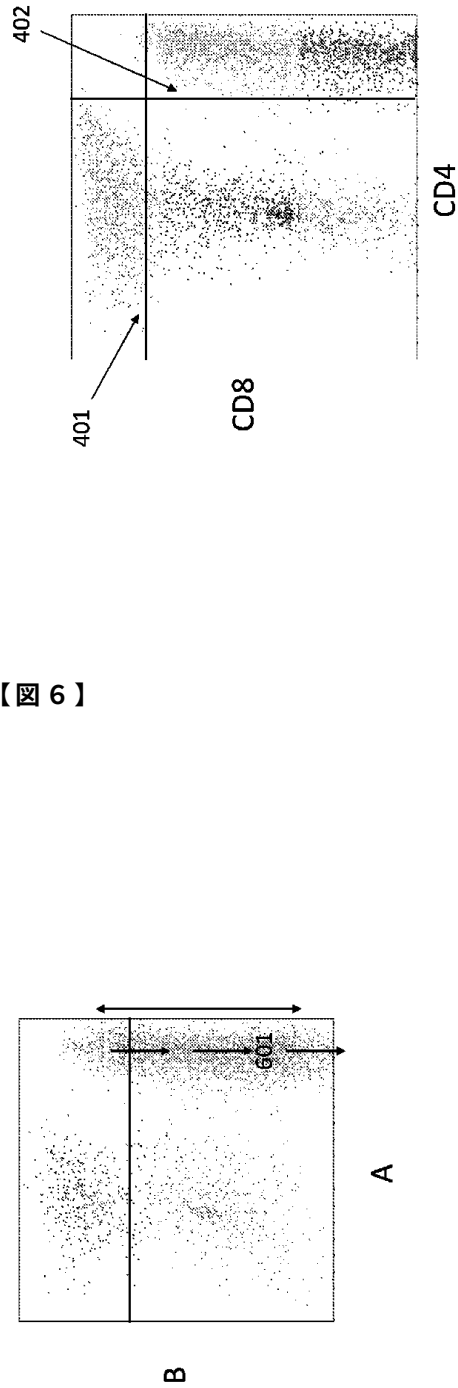


Figure 4

【図 5】

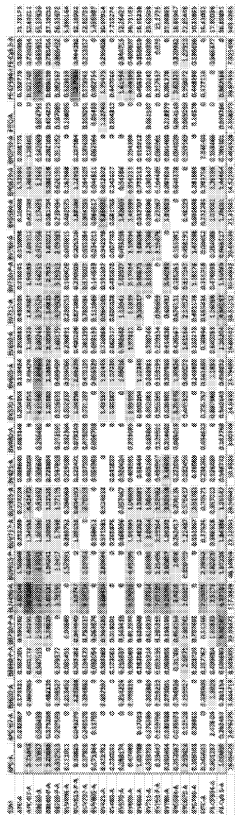


Figure 5

【図 6】

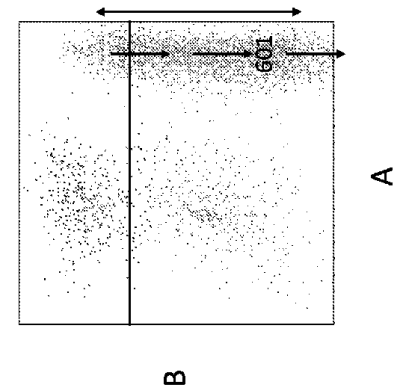
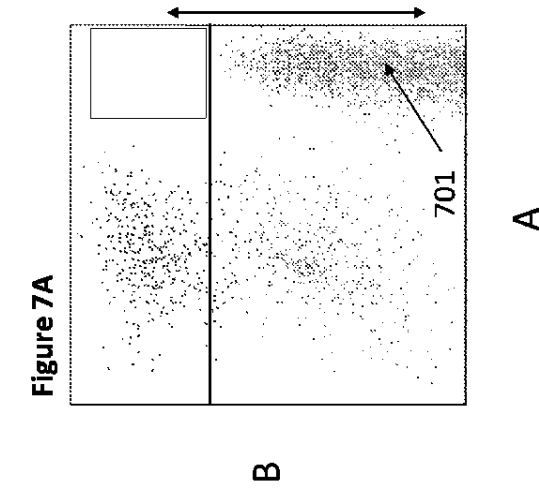


Figure 6

【図 7 A】



10

20

30

40

50

【図 7 B】

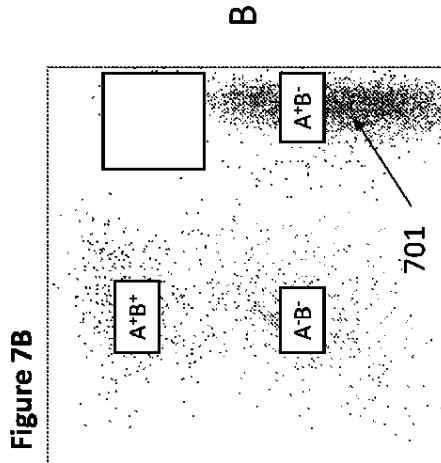
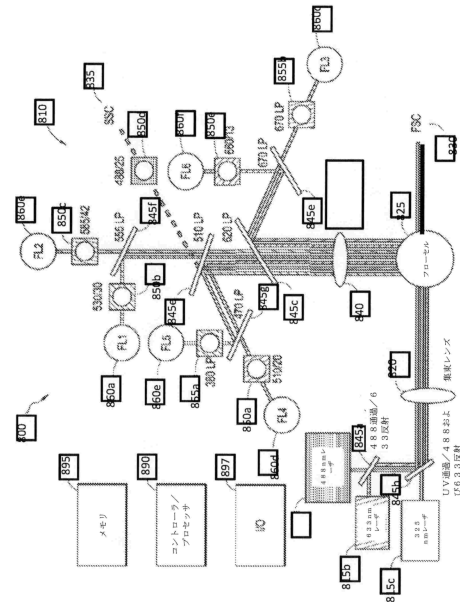


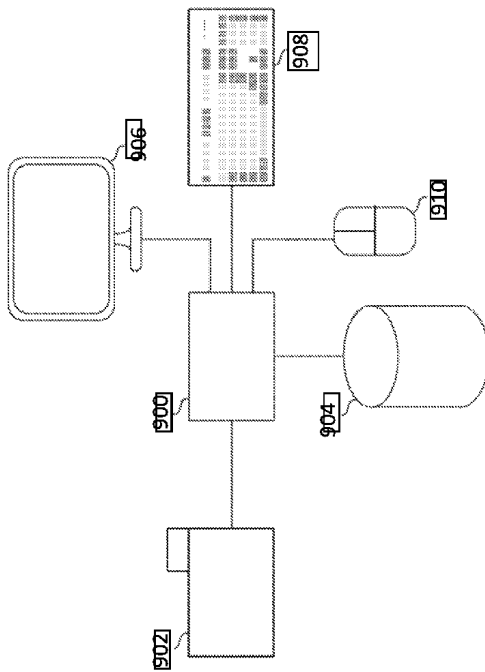
Figure 7B

【図 8】



A

【圖 9】



【図 10】

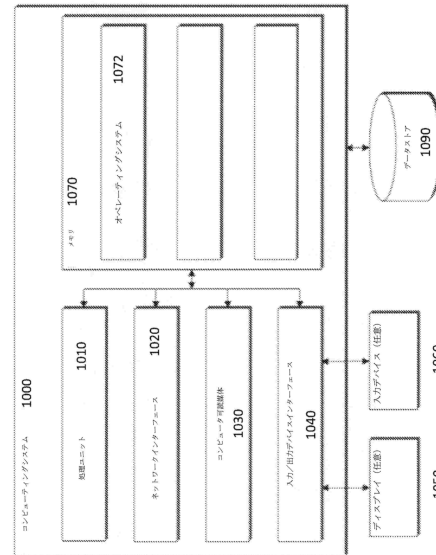


Figure 9

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ユー 1270

審査官 福田 裕司

(56)参考文献 国際公開第2018/198586 (WO, A1)

特開2009-109218 (JP, A)

特開2012-052985 (JP, A)

特開2004-205508 (JP, A)

特表2012-529033 (JP, A)

国際公開第2007/097171 (WO, A1)

国際公開第2019/177152 (WO, A1)

米国特許出願公開第2019/0120837 (US, A1)

Richard Nguyen et al., Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design, Cytometry Part A, 2013年, Vol.83, No.3, pp.306-315, DOI:10.1002/cyto.a.22251

Holden T. Maecker et al., Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity, Cytometry Part A, Vol.62, No.2, 2004年, pp.169-173, DOI:10.1002/cyto.a.20092

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N 15/1429

G01N 21/64