

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7291717号

(P7291717)

(45)発行日 令和5年6月15日(2023.6.15)

(24)登録日 令和5年6月7日(2023.6.7)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/48

M

G 0 1 N 15/00 (2006.01)

G 0 1 N 15/00

B

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

G 0 1 N 15/00

C

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

B

C 1 2 M 1/34

B

請求項の数 17 (全26頁)

(21)出願番号 特願2020-548900(P2020-548900)

(86)(22)出願日 平成31年3月11日(2019.3.11)

(65)公表番号 特表2021-518527(P2021-518527
A)

(43)公表日 令和3年8月2日(2021.8.2)

(86)国際出願番号 PCT/EP2019/055965

(87)国際公開番号 WO2019/175082

(87)国際公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)

審査請求日 令和4年3月8日(2022.3.8)

(31)優先権主張番号 18162033.7

(32)優先日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 516308401

シーメンス ヘルスケア ゲゼルシャフト

ミット ベシユレンクテル ハフツング

ドイツ連邦共和国 9 1 0 5 2 エアラン

ゲン、ヘンケシュトラッセ 1 2 7

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 ルーカス・リヒター

ドイツ連邦共和国 9 6 1 1 4 ヒルシャイ

ト・ビュクシュトラッセ 1 4

(72)発明者 マティース・ウーゲル

ドイツ連邦共和国 8 4 0 2 8 ランツフー

ト・アム・シュミードラッカー 3 0 エフ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標識せずに白血球の細胞種を決定するための In v i t r o 方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的サンプルにおいて標識せずに白血球の細胞種を決定するための in v i t r o 方法であって、顕微鏡観察器具が細胞のイメージングを行い、細胞の物理的パラメータは、自動イメージ分析によって細胞のイメージ表示から確認され、白血球の細胞種は、物理的パラメータに基づいておよび主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）に基づいて決定され、該主成分分析パラメータは、該物理的パラメータのうちの少なくとも一部の一次結合を含み、該方法は、非染色細胞を使用して実行される、
前記 in v i t r o 方法。

【請求項 2】

白血球の決定された細胞種は、以下の白血球の主要な種類、すなわち、単球、好中球、好塩基球、好酸球、およびリンパ球を含む群のうちの1つである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

決定された細胞種は、骨髄球、後骨髄球、前骨髄球、芽球、巨核球、形質細胞、非定型リンパ球、およびセザリー細胞を含む群からの、白血球の主要な種類ならびに / または白血球の亜型のうちの1つである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプル中の多様な白血球のそれぞれの細胞種の決定を使用して、それぞれの細胞集団を特徴づけ、本細胞集団を使用して、サンプルが由来する患者において急性骨髄性白血病

(A M L)、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、または慢性リンパ球性白血病 (C L L) が存在するかどうかを決定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

細胞の物理的パラメータは、細胞に覆われた面積、細胞の周囲長、細胞の幅、細胞の高さ、細胞の幅対高さの比、細胞の幾何学的形状の円に対する類似度、細胞の平均半径、細胞の半径の分散、細胞の被覆の度合、細胞の覆われた面積に対応する当量直径、細胞の光学的体積、細胞の最大の光学的高さ、細胞の最小の光学的高さ、細胞の光学的高さの平均、細胞の光学的高さの分散、細胞の両凹性、細胞の真球度、細胞の質量中心のシフト、細胞のコントラスト、細胞の相違度、細胞の均一性、細胞のエネルギー、細胞のエントロピーを含む群からのパラメータを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

細胞のイメージングは、参照波を対象波上にオーバーレイし、生じるインターフェログラムおよび / またはコンピュータで実行した数学的再構成を記録することを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

顕微鏡観察器具は、デジタルホログラフィー顕微鏡観察 (D H M)、干渉位相顕微鏡観察、または定量的位相顕微鏡観察を行うための顕微鏡である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

20

白血球は、フローセルにおいて顕微鏡観察器具によってイメージングされる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

フローセルが、長方形または正方形の横断面を有するチャンネルを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

白血球は、層状シース流によって集中される、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

層状シース流が 4 つの層状シース流である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

30

白血球を顕微鏡観察器具によってイメージングする前に、赤血球を選択的溶解によってサンプルから除去する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

非染色および非乾燥細胞を使用して実行する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

以下の工程：
- 標識を用いて細胞を表現型決定すること、および / または
- 細胞のさらなる割当てのために事前に決定された受容体を発現させること
をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 15】

全血サンプルを使用して行う、ならびに / または、生物学的サンプルは血液細胞、単球、好中球、好塩基球、好酸球、および / もしくはリンパ球を含有する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法を実行するように構成されているマイクロチップまたはマイクロコントローラーを含む、細胞分析装置。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の細胞分析装置を含む、生物学的サンプルの細胞の細胞種を標識せずに決定するための顕微鏡観察器具。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、顕微鏡観察器具を使用することによって、生物学的サンプルにおいて標識せずに白血球の細胞種を決定するための *in vitro* 方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞を決定し、これらを細胞種に割り当てることは、細胞学において非常に重要である。たとえば、血液学的検査では、細胞性血液成分、すなわち、赤血球、血小板、および白血球を決定および定量する。白血球の数（「白血球数」、WBC）の確認で、包括的な診断のために白血球の主要集団を鑑別することができるであろう。白血球を、顆粒細胞（好中球、好酸球、好塩基球）および非顆粒性細胞（リンパ球、単球）に応じて鑑別する。顆粒性に加えて、細胞は、細胞核の断片化（断片化なし：単核細胞、すなわち、リンパ球および単球；多形核細胞：好酸球、好塩基球、および好中球）ならびに細胞サイズに関する異なる。染色を、顆粒細胞、特に好酸球および好塩基球を鑑別するために使用する。細胞集団は通常、完全自動の血液学的分析計または顕微鏡観察によって評価する。完全自動の分析計では、設定されたアルゴリズムに従って集団を分析しなければならない（たとえば、インピーダンス、迷光、および吸収の測定の助けを借りる）。しかし、これはしばしば、たとえば病理学的サンプルの場合に、エラーメッセージの表示をもたらす。通常は、血液学的分析計によって不正確に決定された細胞の妥当性確認方法として、顕微鏡観察を次の工程で実行する。この工程は、サンプル調製、顕微鏡観察、および手動で実行するさらなる作業に加えて手動の評価も必要とするため、複雑かつ高価である。

【0003】

血球数の変化は多くの疾患に付随する現象であり、したがって、これらの変化は重要な鑑別診断への寄与を行う。血球数は最も一般的な実験室検査のうちの1つであり、とりわけ、ヘモグロビンの決定、ならびに赤血球、白血球、および血小板細胞の数の確認を含む。全血球数は、白血球鑑別も含まれる鑑別血球数をさらに含有する。

【0004】

用いる方法（たとえばミー散乱）が理由で、複雑なサンプル調製（細胞の染色または部分的な溶解）が、特に白血球を分析するために必要である。しかし、病理学的血液サンプルの場合、溶解などのサンプル調製は、多くの場合は不十分にしか実施されず、したがって、たとえばスミアリングおよび染色による、血液細胞の手動検査が必要である。しかし、この方法は定性的でしかなく、計数される細胞が少数であることが理由で（スライド1枚あたり約100～200個の細胞）、珍しい白血球には制限された使用しか有さない。しかし、たとえば白血病などの病理学的サンプルの初期診断では、血液スミアおよび続く血液細胞の染色が現在の標準方法である。

【0005】

全血における機械化された白血球鑑別は、たとえば、抵抗測定、コンダクタンス測定、レーザー迷光測定、フローサイトメトリー、または細胞化学的ペルオキシダーゼ反応によって実施することができる。ここでは、赤血球を最初に溶解し、白血球をフローセルにおいて単個化する。

【0006】

例として、定量的血液細胞診断を実行するために、血液学的分析計を省略し、その代わりに顕微鏡観察をそれぞれの個々の細胞に適用することが可能である。これにより、設定した評価アルゴリズムおよびフラグとは独立して、血球数の定量的決定が可能となる。しかし、この手法の不利点は、血液学的分析計の場合よりも低いサンプルスループット、ならびに目的担体上の細胞の固定および染色に関連する、依然として存在する出費である。さらに、これらの染色は制限された再現性しか有しておらず、湿度、染色時間、温度などに高い依存性を示す。血液学的分析計において使用するフローサイトメーターと比較した、純粋な顕微鏡観察の不利点は、細胞体積の定量にある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

手動血球数を生じるために、たとえばライト - ギムザ染色などの、全血の分析用に設計された特異的染色技法を利用する。この目的を達成するために、全血を目的担体上にスミアリングし、たとえば約 1 0 0 個の白血球まで、困難な事例では必要な場合は約 $3 \times 1 0 0$ 個の細胞まで計数して、鑑別血球数を生じる。

【 0 0 0 8 】

血液スミアおよび続く血液細胞の染色が、病理学的サンプルの初期診断の標準方法である。白血病の場合、鑑別血球数に基づいて、特徴的に発生している細胞集団によって、「急性骨髄性白血病 (A M L)」、「急性リンパ芽球性白血病 (A L L)」、「慢性骨髄性白血病 (C M L)」、および「慢性リンパ球性白血病 (C L L)」の型の間で区別を行うことができる。

10

【 0 0 0 9 】

血液スミアの場合 (スライド 1 枚あたり約 1 0 0 ~ 2 0 0 個の細胞) における小規模な統計学が理由で、診断を検証するため、および白血病の亜型のより正確な決定のために、概してフローサイトメトリーを使用する。この方法では、白血球を特異的な (蛍光) 抗体で標識し、鑑別は特徴的な発現パターンによって実施し、これらは散乱イメージに反映される。さらに、複雑な事例において正確な診断のために骨髄穿刺が必要であり得る。

【 0 0 1 0 】

異なる (血液) 細胞間を鑑別するための、色素の使用は、1 8 6 0 年代に既に開発されていた。グスタフ・ギムザは、自身にちなんで命名された染色方法を開発し、これは、最初はマラリア寄生虫を可視化させるものであり、後に梅毒の原因である梅毒トレポネーマの染色用に改変された。現在使用されているライト - ギムザ染色は、白血球が識別されることを可能にし、したがって白血病疾患の初期診断を表す。

20

【 0 0 1 1 】

白血病の免疫表現型を正確に決定するために、フローサイトメトリー (蛍光活性化細胞分取、F A C S) を標準として使用する。ここでは、多様な様々な (蛍光) 抗体を使用し; 末梢血および骨髄サンプルの両方をサンプルとして使用する。評価は、F A C S データを分析するための特定のプログラム (たとえばカルーツァ) によって実施する。ここでは、「ゲート」とも呼ばれる事前に設定した領域中のデータ点の存在によって、様々な臨床像間を識別することが可能である。染色 / 標識せずに、純粋な顕微鏡方法を使用することによって 4 つの前述した白血病の形態間を識別することは、現在までに知られていない。

30

【 0 0 1 2 】

特許文献 1 は、白血球の鑑別を直接決定することができ、それを用いたイメージングフローサイトメーターを開示している。しかし、この場合では、特に好酸球と好塩基球とを識別するために、染色も使用されている。その結果、前述の不利点がここでも生じる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 3 】

【 文献 】 U S 8 4 0 6 4 9 8 号

【 発明の概要 】

40

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明の目的は、白血球を鑑別するためのより効率的かつ頑強方法、具体的には血液細胞の染色および / または標識を必要としないものを提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 5 】

この目的は、本発明による方法、本発明による細胞分析装置、および独立特許クレームによる顕微鏡観察器具によって達成される。本発明の有利な展開は従属クレームによって指定される。

【 0 0 1 6 】

50

生物学的サンプルにおいて標識せずに血液細胞の細胞種を決定するための、本発明による *in vitro* 方法は、顕微鏡観察器具および細胞分析装置の助けにより実行する。ここでは、顕微鏡観察器具とは、非常に小さな対象を高い拡大率下で観察することを可能にする用具であり、たとえば、光学顕微鏡、走査電子顕微鏡、位相差顕微鏡、デジタルホログラフィー顕微鏡、または超音波センサーを備えた顕微鏡（たとえば音波顕微鏡）を含む。この方法では、顕微鏡観察器具が細胞のイメージングを行う。細胞の物理的パラメータは、自動イメージ分析によって細胞のイメージ表示から確認される。

【0017】

細胞分析装置、すなわち、電子データ処理に適しており、自動イメージ分析によって細胞のイメージ表示から細胞の物理的パラメータを確認するように構成されている用具または用具構成要素は、以下により詳述するように、本発明による方法を実行する。

10

【0018】

発明の主題は、生物学的サンプルにおいて標識せずに白血球の細胞種を決定するための *in vitro* 方法であって、顕微鏡観察器具が細胞のイメージングを行い、細胞の物理的パラメータは、自動イメージ分析によって細胞のイメージ表示から確認され、白血球の細胞種は、物理的パラメータに基づいておよび主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）に基づいて決定され、主成分分析パラメータは、物理的パラメータのうちの少なくとも一部の一次結合を含む、方法に関する。

【0019】

好ましくは、白血球の細胞種は、物理的パラメータおよび主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）に関して事前に決定された基準に基づいて決定され、それぞれの事前に決定された基準が満たされている場合に対応する細胞種が存在する。

20

【0020】

語句「事前に決定された基準」とは、1つまたはそれ以上の物理的パラメータおよび/または主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）のために決定する、基準または複数の基準に関する。ここでは、それぞれの基準は、好ましくは、識別する様々な白血球種の対応するイメージ表示間の比較に基づいて決定する。

【0021】

染色方法の省略が理由で、この方法は、高いサンプルスループットならびに細胞の定性および/または定量的決定を可能にする。これにより、高いサンプルスループットを有する顕微鏡観察方法が促進され、慣用の血液学的分析計を省略することが可能である。

30

【0022】

好ましくは、白血球の決定された細胞種は、以下の白血球の主要な種類、すなわち、単球、好中球、好塩基球、好酸球、およびリンパ球を含む群のうちの1つである。

【0023】

本発明による方法のさらなる好ましい実施形態では、決定された細胞種は、骨髓球、後骨髓球、前骨髓球、芽球、巨核球、形質細胞、非定型リンパ球、およびセザリー細胞を含む群からの、白血球の主要な種類ならびに/または白血球の亜型のうちの1つである。

【0024】

さらなる好ましい実施形態では、サンプル中の多様な白血球のそれぞれの細胞種の決定を使用して、それぞれの細胞集団を特徴づけ、本細胞集団を使用して、サンプルが由来する患者において急性骨髓性白血病（AML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性骨髓性白血病（CML）、または慢性リンパ球性白血病（CLL）が存在するかどうかを決定する。

40

【0025】

好ましくは、細胞の物理的パラメータは、細胞に覆われた面積（細胞面積）、細胞の周囲長（周囲長）、細胞の幅（幅）、細胞の高さ（高さ）、細胞の幅対高さの比（アスペクト比）、細胞の幾何学的形状の円に対する類似度（真円度）、細胞の平均半径（半径平均）、細胞の半径の分散（半径分散）、細胞の被覆の度合（剛率）、細胞の覆われた面積に対応する当量直径（当量直径）、細胞の光学的体積（光学的体積）、細胞の最大の光学的

50

高さ（光学的高さ最大）、細胞の最小の光学的高さ（光学的高さ最小）、細胞の光学的高さの平均（光学的高さ平均）、細胞の光学的高さの分散（光学的高さ分散）、細胞の両凹性（両凹性）、細胞の真球度（真球度）、細胞の質量中心のシフト（質量中心シフト）、細胞のコントラスト（コントラスト）、細胞の相違度（相違度）、細胞の均一性（均一性）、細胞のエネルギー（エネルギー）、細胞のエントロピー（エントロピー）を含む群からのパラメータを含む。

【 0 0 2 6 】

好ましくは、細胞の物理的パラメータは、以下に記載のように定義される。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

10

表現	単位	定義/注記
細胞面積	μm^2	輪郭の面積
周囲長	μm	輪郭の周囲長
幅	μm	最小面積を有する回転バウンディング長方形の幅
高さ	μm	最小面積を有する回転バウンディング長方形の高さ
アスペクト比		最大(幅, 高さ)/最小(幅, 高さ);
真円度	[0, 1]	$4\pi * \text{細胞面積} / \text{周囲長}^2$ 。円の真円度は1である。0に近づけば近づくほど、輪郭はより円ではなくなる。
半径平均	μm	輪郭の質量中心とそれぞれの輪郭の支持点との間の平均距離。質量中心は輪郭モーメントから計算する。数点のみによって定義される輪郭では、これはそれぞれの輪郭ピクセルの半径に一致しないが、支持点(たとえば、長方形は4つの支持点によって定義することができる)のみにおいて、算出が高速化されることに留意されたい。
半径分散		輪郭の質量中心とそれぞれの輪郭の支持点との間の距離の分散。
剛率		剛率とは、輪郭面積対その凸包面積の比である。まず、輪郭の凸包を計算する。剛率は細胞面積/凸包面積によって計算する。剛率は不規則な形状の対象で大きくなる。
当量直径	μm	当量直径とは、その面積が輪郭面積と同じである円の直径である。平方根($(4 * \text{細胞面積}) / \pi$)によって計算する。
光学的体積	μm^3	単一ピクセルの体積は、位相値 $*0.53$ (波長)/(2π) $*0.345$ (ピクセルサイズ)によって計算することができる。全体的な光学的体積は、すべての輪郭体積ピクセルの和である。
光学的高さ最大		輪郭内の最大位相値。
光学的高さ最小		輪郭内の最小位相値。

20

30

40

50

【表 2】

光学的高さ平均		輪郭内の平均位相値。
光学的高さ分散		輪郭内の位相値の分散。
両凹性	$[-1, 1]$	輪郭のバウンディング長方形の中央を通る水平および垂直のカットのピクセル位相値を抽出する。ピクセル値と同じ長さにスケールした多項式 $-4*x^4+4*x^2+0.5$ との相関を調査する。2つのカットの最小値を返す。
真球度	$[-1, 1]$	輪郭のバウンディング長方形の中央を通る水平および垂直のカットのピクセル位相値を抽出する。ピクセル値と同じ長さにスケールした多項式 $-x^2+1$ との相関を調査する。2つのカットの最小値を返す。
質量中心シフト		幾何学的な質量中心と質量の質量中心との間のユークリッド距離。質量の質量中心は二乗位相値から計算する。xおよびyの値は、それぞれの軸に沿った1D質量中心を得ることによって計算する。軸質量中心は、(たとえばx軸では) $mc=1/(m1+\dots+mn)*(x1*m1+\dots+xm*mn)$ によって計算し、 $m1\dots mn$ はそれぞれのx値の合計の位相値である。
コントラスト		5つの機能をグレースケール共起行列から抽出する。方法を加速するために、行列を構成する前にグレースケール値を1/4にスケールする(64個のみの可能な値が生じる)。コントラストまたはローカル強度変化は、対角から離れる $P(i, j)$ からの寄与を好む。
相違度		細胞輪郭内のピクセルの6ビットのグレースケールイメージに変換した、位相値のGLCMに基づく相違度測定。
均一性		均一なシーンはわずかなグレースケールしか含有せず、わずかであるが比較的高い $P(i, j)$ の値がGLCMに与えられる。
エネルギー		秩序を測定する。
エントロピー		無秩序を測定する。

【0028】

コントラスト、およびグレースケール共起行列から抽出される5つの機能の定義に関する詳細は、カルガリー大学(University of Calgary)のウェブページの<http://www.fp.ucalgary.ca/mhallbey/tutorial.htm>(Url <http://hdl.handle.net/1880/51900>)の下、「GLCM Texture: A Tutorial v.3.0、2017年3月」中に見つけることができる。

【0029】

さらに好ましい実施形態では、顕微鏡観察方法に応じて追加で利用可能な追加の情報を

獲得することができる。例として、強度分布、偏光コントラスト、または蛍光コントラストを追加で使用して、より良好な鑑別を促進することができる。

【0030】

好ましくは、主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）は、パラメータの1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの異なる一次結合を含む。

【0031】

好ましくは、主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）は、以下に記載のパラメータの一次結合を含む。

【0032】

少なくとも1つのPCAパラメータは、好ましくは、細胞面積、周囲長、幅、高さ、アスペクト比、真円度、半径平均、半径分散、剛率、当量直径、光学的体積、光学の高さ最大、光学の高さ最小、光学の高さ平均、光学の高さ分散、両凹性、真球度、質量中心シフト、コントラスト、相違度、均一性、エネルギー、エントロピーのパラメータの一次結合を含む。

10

【0033】

具体的には、PCAパラメータは合計6つのPCAパラメータを含み、PCAパラメータのそれぞれは、それぞれ好ましくは細胞面積、周囲長、幅、高さ、アスペクト比、真円度、半径平均、半径分散、剛率、当量直径、光学的体積、光学の高さ最大、光学の高さ最小、光学の高さ平均、光学の高さ分散、両凹性、真球度、質量中心シフト、コントラスト、相違度、均一性、エネルギー、およびエントロピーのパラメータの一次結合を含む。

20

【0034】

好ましくは、主成分分析パラメータ（PCAパラメータ）は以下のパラメータVal1～Val6を含む。

【0035】

Val1 = $-0.2514235930087 * ((\text{細胞} \cdot \text{細胞面積} - (42.9755016744)) / 10.5788867263146) + -0.249974748498971 * ((\text{細胞} \cdot \text{周囲長} - (24.576753500494)) / 3.20109088487221) + -0.237593744589169 * ((\text{細胞} \cdot \text{幅} - (7.35723468359436)) / 1.00790834623485) + -0.241385243730167 * ((\text{細胞} \cdot \text{高さ} - (7.28724864632538)) / 1.00167379952967) + 0.0500690750767191 * ((\text{細胞} \cdot \text{アスペクト比} - (1.0727084035923)) / 0.0503940328943091) + -0.0325934362800635 * ((\text{細胞} \cdot \text{真円度} - (0.879203898319695)) / 0.0171374141190303) + -0.251748682215606 * ((\text{細胞} \cdot \text{半径平均} - (3.67481430203961)) / 0.47807494523509) + -0.0358686373697572 * ((\text{細胞} \cdot \text{半径分散} - (0.534334347573423)) / 0.135861132157575) + -0.0713429028935052 * ((\text{細胞} \cdot \text{剛率} - (0.973653367948167)) / 0.00642977966295229) + -0.251801959117612 * ((\text{細胞} \cdot \text{当量直径} - (7.33498993492049)) / 0.957125629695256) + -0.271859966910455 * ((\text{細胞} \cdot \text{光学的体積} - (10.9434893272532)) / 4.39789306763487) + -0.264893256207984 * ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ最大} - (4.0508608252182)) / 1.13386516864492) + -0.019499726282544 * ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ最小} - (0.917628988325119)) / 0.00943812184922224) + -0.263403666244868 * ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ平均} - (2.56913326007255)) / 0.578640046049587) + -0.264398202286343 * ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ分散} - (0.891494679587935)) / 0.319599313085186) + 0.0683113$

30

40

50

$521964872 * ((\text{細胞. 両凹性} - (-0.1590427888386)) / 0.0878662330982137) + 0.0532706264409643 * ((\text{細胞. 真球度} - (0.952179340809924)) / 0.0556215659482945) + -0.135017569551957 * ((\text{細胞. 質量中心シフト} - (0.321787377964238)) / 0.279787203971966) + -0.23775558906941 * ((\text{細胞. コントラスト} - (5.99415440523299)) / 3.28737834908757) + -0.245223436384692 * ((\text{細胞. 相違度} - (1.8261947255628)) / 0.524533027046986) + 0.241198017846531 * ((\text{細胞. 均一性} - (0.421196396914475)) / 0.0787508131258171) + 0.258958179846163 * ((\text{細胞. エネルギー} - (0.106234099933335)) / 0.0303777835437848) + -0.267352762571249 * ((\text{細胞. エントロピー} - (4.85017551257248)) / 0.552270252441689) + 0;$

【0036】

$Val2 = -0.168670616411677 * ((\text{細胞. 細胞面積} - (42.9755016744)) / 10.5788867263146) + -0.205776175336618 * ((\text{細胞. 周囲長} - (24.576753500494)) / 3.20109088487221) + -0.186558934231474 * ((\text{細胞. 幅} - (7.35723468359436)) / 1.00790834623485) + -0.183141003655306 * ((\text{細胞. 高さ} - (7.28724864632538)) / 1.00167379952967) + -0.0928942621464152 * ((\text{細胞. アスペクト比} - (1.0727084035923)) / 0.0503940328943091) + 0.505899790631485 * ((\text{細胞. 真円度} - (0.879203898319695)) / 0.0171374141190303) + -0.169985535864666 * ((\text{細胞. 半径平均} - (3.67481430203961)) / 0.47807494523509) + -0.377167185427535 * ((\text{細胞. 半径分散} - (0.534334347573423)) / 0.135861132157575) + 0.416007969970529 * ((\text{細胞. 剛率} - (0.973653367948167)) / 0.00642977966295229) + -0.166991998607427 * ((\text{細胞. 当量直径} - (7.33498993492049)) / 0.957125629695256) + -0.00731744872935898 * ((\text{細胞. 光学の体積} - (10.9434893272532)) / 4.39789306763487) + 0.106456651440064 * ((\text{細胞. 光学の高さ最大} - (4.0508608252182)) / 1.13386516864492) + 0.20085391219078 * ((\text{細胞. 光学の高さ最小} - (0.917628988325119)) / 0.00943812184922224) + 0.122345079558179 * ((\text{細胞. 光学の高さ平均} - (2.56913326007255)) / 0.578640046049587) + 0.101062869417052 * ((\text{細胞. 光学の高さ分散} - (0.891494679587935)) / 0.319599313085186) + 0.217089205338001 * ((\text{細胞. 両凹性} - (-0.1590427888386)) / 0.0878662330982137) + -0.0619295694253695 * ((\text{細胞. 真球度} - (0.952179340809924)) / 0.0556215659482945) + 0.0156956887744252 * ((\text{細胞. 質量中心シフト} - (0.321787377964238)) / 0.279787203971966) + 0.198114038338057 * ((\text{細胞. コントラスト} - (5.99415440523299)) / 3.28737834908757) + 0.180425506176449 * ((\text{細胞. 相違度} - (1.8261947255628)) / 0.524533027046986) + -0.13540052657736 * ((\text{細胞. 均一性} - (0.4$

10

20

30

40

50

2 1 1 9 6 3 9 6 9 1 4 4 7 5)) / 0 . 0 7 8 7 5 0 8 1 3 1 2 5 8 1 7 1) + - 0 .
 0 2 6 7 9 4 2 7 0 9 7 1 9 7 6 7 * ((細胞 . エネルギー - (0 . 1 0 6 2 3 4 0 9 9
 9 3 3 3 3 5)) / 0 . 0 3 0 3 7 7 7 8 3 5 4 3 7 8 4 8) + 0 . 0 7 2 2 8 0 4 0 2
 6 4 0 4 8 0 7 * ((細胞 . エントロピー - (4 . 8 5 0 1 7 5 5 1 2 5 7 2 4 8)) /
 0 . 5 5 2 2 7 0 2 5 2 4 4 1 6 8 9) + 0 ;

【 0 0 3 7 】

V a l 3 = - 0 . 1 5 2 2 4 5 6 5 8 7 9 3 8 0 7 * ((細胞 . 細胞面積 - (4 2 . 9
 7 5 5 0 1 6 7 4 4)) / 1 0 . 5 7 8 8 8 6 7 2 6 3 1 4 6) + - 0 . 1 3 7 7 4 4 3
 4 5 2 3 5 4 3 8 * ((細胞 . 周囲長 - (2 4 . 5 7 6 7 5 3 5 0 0 4 9 4)) / 3 . 2
 0 1 0 9 0 8 8 4 8 7 2 2 1) + - 0 . 1 3 9 0 4 6 3 8 2 5 6 1 8 9 6 * ((細胞 . 幅
 - (7 . 3 5 7 2 3 4 6 8 3 5 9 4 3 6)) / 1 . 0 0 7 9 0 8 3 4 6 2 3 4 8 5) + -
 0 . 1 3 6 6 4 0 0 6 4 3 7 7 9 9 5 * ((細胞 . 高さ - (7 . 2 8 7 2 4 8 6 4 6 3 2
 5 3 8)) / 1 . 0 0 1 6 7 3 7 9 9 5 2 9 6 7) + 0 . 1 4 3 0 7 1 9 7 3 6 6 1 9 2
 4 * ((細胞 . アスペクト比 - (1 . 0 7 2 7 0 8 4 0 3 5 9 2 3)) / 0 . 0 5 0 3 9
 4 0 3 2 8 9 4 3 0 9 1) + - 0 . 3 1 1 8 3 2 8 4 6 4 1 4 7 8 9 * ((細胞 . 真円度
 - (0 . 8 7 9 2 0 3 8 9 8 3 1 9 6 9 5)) / 0 . 0 1 7 1 3 7 4 1 4 1 1 9 0 3 0 3
) + - 0 . 1 5 8 4 0 5 7 2 2 2 9 9 1 4 6 * ((細胞 . 半径平均 - (3 . 6 7 4 8 1 4
 3 0 2 0 3 9 6 1)) / 0 . 4 7 8 0 7 4 9 4 5 2 3 5 0 9) + 0 . 2 1 4 7 3 6 5 7 9
 6 4 9 5 * ((細胞 . 半径分散 - (0 . 5 3 4 3 3 4 3 4 7 5 7 3 4 2 3)) / 0 . 1 3
 5 8 6 1 1 3 2 1 5 7 5 7 5) + - 0 . 2 9 0 3 4 8 8 3 1 3 1 8 2 6 9 * ((細胞 . 剛
 率 - (0 . 9 7 3 6 5 3 3 6 7 9 4 8 1 6 7)) / 0 . 0 0 6 4 2 9 7 7 9 6 6 2 9 5 2
 2 9) + - 0 . 1 6 0 4 3 6 0 6 0 9 3 2 5 5 3 * ((細胞 . 当量直径 - (7 . 3 3 4 9
 8 9 9 3 4 9 2 0 4 9)) / 0 . 9 5 7 1 2 5 6 2 9 6 9 5 2 5 6) + - 0 . 0 2 8 3 2
 3 1 7 5 6 7 4 6 5 7 4 * ((細胞 . 光学の体積 - (1 0 . 9 4 3 4 8 9 3 2 7 2 5 3 2
)) / 4 . 3 9 7 8 9 3 0 6 7 6 3 4 8 7) + 0 . 1 0 8 9 0 4 8 2 6 1 6 9 9 7 9 * ((細胞 . 光学の高さ最大 - (4 . 0 5 0 8 6 0 8 2 5 2 1 8 2)) / 1 . 1 3 3 8 6 5 1
 6 8 6 4 4 9 2) + - 0 . 0 5 4 1 0 4 1 9 1 5 7 7 1 9 1 3 * ((細胞 . 光学の高さ最
 小 - (0 . 9 1 7 6 2 8 9 8 8 3 2 5 1 1 9)) / 0 . 0 0 9 4 3 8 1 2 1 8 4 9 2 2 2
 2 4) + 0 . 0 4 8 2 8 9 8 9 2 8 9 8 2 7 0 1 * ((細胞 . 光学の高さ平均 - (2 . 5
 6 9 1 3 3 2 6 0 0 7 2 5 5)) / 0 . 5 7 8 6 4 0 0 4 6 0 4 9 5 8 7) + 0 . 0 7 4
 0 5 6 5 2 1 6 5 8 1 2 8 5 * ((細胞 . 光学の高さ分散 - (0 . 8 9 1 4 9 4 6 7 9 5
 8 7 9 3 5)) / 0 . 3 1 9 5 9 9 3 1 3 0 8 5 1 8 6) + 0 . 3 3 2 6 8 0 6 2 3 5 9
 0 3 6 * ((細胞 . 両凹性 - (- 0 . 1 5 9 0 4 2 7 8 8 8 3 8 6)) / 0 . 0 8 7 8 6
 6 2 3 3 0 9 8 2 1 3 7) + - 0 . 4 8 6 4 9 6 4 2 8 5 9 7 7 1 2 * ((細胞 . 真球度
 - (0 . 9 5 2 1 7 9 3 4 0 8 0 9 9 2 4)) / 0 . 0 5 5 6 2 1 5 6 5 9 4 8 2 9 4 5
) + 0 . 4 0 4 0 7 1 8 4 7 5 7 2 0 9 2 * ((細胞 . 質量中心シフト - (0 . 3 2 1 7
 8 7 3 7 7 9 6 4 2 3 8)) / 0 . 2 7 9 7 8 7 2 0 3 9 7 1 9 6 6) + 0 . 2 0 0 2 1
 4 3 4 6 1 2 4 1 4 8 * ((細胞 . コントラスト - (5 . 9 9 4 1 5 4 4 0 5 2 3 2 9 9
)) / 3 . 2 8 7 3 7 8 3 4 9 0 8 7 5 7) + 0 . 1 6 8 5 4 6 8 3 4 7 4 9 0 7 1 * ((細胞 . 相違度 - (1 . 8 2 6 1 9 4 7 2 5 5 6 2 8)) / 0 . 5 2 4 5 3 3 0 2 7 0 4
 6 9 8 6) + - 0 . 1 1 4 7 4 8 4 3 5 5 3 9 5 7 1 * ((細胞 . 均一性 - (0 . 4 2 1
 1 9 6 3 9 6 9 1 4 4 7 5)) / 0 . 0 7 8 7 5 0 8 1 3 1 2 5 8 1 7 1) + - 0 . 0 1
 4 3 5 7 6 7 4 1 9 3 6 6 5 9 * ((細胞 . エネルギー - (0 . 1 0 6 2 3 4 0 9 9 9 3
 3 3 3 5)) / 0 . 0 3 0 3 7 7 7 8 3 5 4 3 7 8 4 8) + 0 . 0 7 0 6 0 6 5 6 2 2 4
 9 3 8 7 * ((細胞 . エントロピー - (4 . 8 5 0 1 7 5 5 1 2 5 7 2 4 8)) / 0 . 5
 5 2 2 7 0 2 5 2 4 4 1 6 8 9) + 0 ;

【 0 0 3 8 】

V a l 4 = - 0 . 2 6 1 6 1 0 6 7 7 6 1 1 7 4 6 * ((細胞 . 細胞面積 - (2 9 . 4
 3 9 5 2 0 1 5 8 0 3 1 1)) / 5 . 1 1 0 0 5 1 2 1 9 0 8 8 5 5) + - 0 . 2 6 1 0
 9 4 2 0 3 4 4 6 5 8 3 * ((細胞 . 周囲長 - (2 0 . 4 7 1 4 4 6 9 0 1 0 9 9 4))

10

20

30

40

50

$/ 1.73763119886254) + -0.222861676546857^* (($
 細胞．幅 - (6.12959751130435)) / 0.5954851868713
 3) + -0.229916753106545^* ((細胞．高さ - (6.0515042
 1944159)) / 0.591609173525849) + 0.011807520
 590896^* ((細胞．アスペクト比 - (1.0869912949338)) / 0.
 0546526376570488) + 0.0262225683553752^* ((細胞．真円度 - (0.876941946272043)) / 0.01795214396
 05036) + -0.261160667395425^* ((細胞．半径平均 - (3.0
 5876819557268)) / 0.255900843697689) + -0.09
 41868494695694^* ((細胞．半径分散 - (0.516064433989
 357)) / 0.111459058693624) + -0.011071800257
 0505^* ((細胞．剛率 - (0.971597800798176)) / 0.0072
 0404258117219) + -0.260831711849364^* ((細胞．当
 量直径 - (6.10101233363755)) / 0.51113980083079
 4) + -0.283417789826245^* ((細胞．光学の体積 - (5.4963
 7143295321)) / 1.39356683120867) + -0.280410
 71625337^* ((細胞．光学の高さ最大 - (2.78997632108204)
) / 0.357459556742829) + 0.00345191681990364
 ^* ((細胞．光学の高さ最小 - (0.916982544759395)) / 0.011
 4607243403515) + -0.267687084654929^* ((細胞．光
 学の高さ平均 - (1.90610826785609)) / 0.17631907956
 1605) + -0.279755464234688^* ((細胞．光学の高さ分散 - (0
 .531938907690763)) / 0.107019179729975) + 0.
 121035300134979^* ((細胞．両凹性 - (-0.11874291555
 068)) / 0.0878957408234967) + -0.01615135565
 41555^* ((細胞．真球度 - (0.955634909899621)) / 0.04
 264168644697) + -0.107830413342139^* ((細胞．質量
 中心シフト - (0.205413097350611)) / 0.14326649340
 6051) + -0.216912000881217^* ((細胞．コントラスト - (2.
 94739193186445)) / 0.852979848483421) + -0.2
 33161325461211^* ((細胞．相違度 - (1.3123186961968
 1)) / 0.185666125635144) + 0.222121616068744
 ^* ((細胞．均一性 - (0.499177299392145)) / 0.0439293
 43763229) + 0.237462579736086^* ((細胞．エネルギー - (0.
 141919956703913)) / 0.0213959679195142) +
 -0.268766115142943^* ((細胞．エントロピー - (4.203171
 34129727)) / 0.263391471017291) + 0 ;

【0039】

Val5 = 0.277185206648515^* ((細胞．細胞面積 - (29.43
 95201580311)) / 5.11005121908855) + 0.289025
 861167001^* ((細胞．周囲長 - (20.4714469010994)) / 1
 .73763119886254) + 0.27869771372156^* ((細胞．幅
 - (6.12959751130435)) / 0.59548518687133) + 0
 .226791977731385^* ((細胞．高さ - (6.051504219441
 59)) / 0.591609173525849) + -0.0154016557869
 195^* ((細胞．アスペクト比 - (1.0869912949338)) / 0.054
 6526376570488) + -0.104962015198417^* ((細胞．真
 円度 - (0.876941946272043)) / 0.01795214396050
 36) + 0.280118171306254^* ((細胞．半径平均 - (3.05876
 819557268)) / 0.255900843697689) + 0.1220717

10

20

30

40

50

$37825644^* ((\text{細胞} \cdot \text{半径分散} - (0.516064433989357)) / 0.111459058693624) + -0.0757806415365649^* ((\text{細胞} \cdot \text{剛率} - (0.971597800798176)) / 0.00720404258117219) + 0.279776181994244^* ((\text{細胞} \cdot \text{当量直径} - (6.10101233363755)) / 0.511139800830794) + 0.127079667257615^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の体積} - (5.49637143295321)) / 1.39356683120867) + -0.166674686515488^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ最大} - (2.78997632108204)) / 0.357459556742829) + -0.0801206102287044^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ最小} - (0.916982544759395)) / 0.0114607243403515) + -0.13904585273397^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ平均} - (1.90610826785609)) / 0.176319079561605) + -0.157320201651437^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ分散} - (0.531938907690763)) / 0.107019179729975) + -0.0137496049824385^* ((\text{細胞} \cdot \text{両凹性} - (-0.11874291555068)) / 0.0878957408234967) + -0.0124754663656207^* ((\text{細胞} \cdot \text{真球度} - (0.955634909899621)) / 0.04264168644697) + -0.00354707655665248^* ((\text{細胞} \cdot \text{質量中心シフト} - (0.205413097350611)) / 0.143266493406051) + -0.337317104471527^* ((\text{細胞} \cdot \text{コントラスト} - (2.94739193186445)) / 0.852979848483421) + -0.351605489070963^* ((\text{細胞} \cdot \text{相違度} - (1.31231869619681)) / 0.185666125635144) + 0.324115001671015^* ((\text{細胞} \cdot \text{均一性} - (0.499177299392145)) / 0.043929343763229) + 0.20286086484872^* ((\text{細胞} \cdot \text{エネルギー} - (0.141919956703913)) / 0.0213959679195142) + -0.208528317348662^* ((\text{細胞} \cdot \text{エントロピー} - (4.20317134129727)) / 0.263391471017291) + 0 ;$

【0040】

$Val6 = -0.0822117013411024^* ((\text{細胞} \cdot \text{細胞面積} - (29.4395201580311)) / 5.11005121908855) + -0.0136983441801879^* ((\text{細胞} \cdot \text{周囲長} - (20.4714469010994)) / 1.73763119886254) + -0.0421965767155267^* ((\text{細胞} \cdot \text{幅} - (6.12959751130435)) / 0.59548518687133) + -0.0105097694602176^* ((\text{細胞} \cdot \text{高さ} - (6.05150421944159)) / 0.591609173525849) + 0.0829553453256781^* ((\text{細胞} \cdot \text{アスペクト比} - (1.0869912949338)) / 0.0546526376570488) + -0.601802580015178^* ((\text{細胞} \cdot \text{真円度} - (0.876941946272043)) / 0.0179521439605036) + -0.0832961277585592^* ((\text{細胞} \cdot \text{半径平均} - (3.05876819557268)) / 0.255900843697689) + 0.312125036264253^* ((\text{細胞} \cdot \text{半径分散} - (0.516064433989357)) / 0.111459058693624) + -0.548644911166917^* ((\text{細胞} \cdot \text{剛率} - (0.971597800798176)) / 0.00720404258117219) + -0.0887226111099722^* ((\text{細胞} \cdot \text{当量直径} - (6.10101233363755)) / 0.511139800830794) + -0.065558074724381^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の体積} - (5.49637143295321)) / 1.39356683120867) + 0.00635200779277076^* ((\text{細胞} \cdot \text{光学の高さ最大} - (2.78997632108204)) / 0.357459556742829) + -0.2082427517$

10

20

30

40

50

$46043^* ((\text{細胞・光学の高さ最小} - (0.916982544759395)) / 0.0114607243403515) + -0.052855467177894^* ((\text{細胞・光学の高さ平均} - (1.90610826785609)) / 0.176319079561605) + 0.0139425503541623^* ((\text{細胞・光学の高さ分散} - (0.531938907690763)) / 0.107019179729975) + 0.0212708260463394^* ((\text{細胞・両凹性} - (-0.11874291555068)) / 0.0878957408234967) + -0.281890905467496^* ((\text{細胞・真球度} - (0.955634909899621)) / 0.04264168644697) + 0.258391327626016^* ((\text{細胞・質量中心シフト} - (0.205413097350611)) / 0.143266493406051) + 0.0744517932956948^* ((\text{細胞・コントラスト} - (2.94739193186445)) / 0.852979848483421) + 0.0587637354201565^* ((\text{細胞・相違度} - (1.31231869619681)) / 0.185666125635144) + -0.0404667518409852^* ((\text{細胞・均一性} - (0.499177299392145)) / 0.043929343763229) + -0.0159289744001^* ((\text{細胞・エネルギー} - (0.141919956703913)) / 0.0213959679195142) + 0.0247292136860108^* ((\text{細胞・エントロピー} - (4.20317134129727)) / 0.263391471017291) + 0;$

【0041】

好ましくは、細胞のイメージングは、参照波を対象波上にオーバーレイし、生じるインターフェログラムおよび／またはコンピュータで実行した数学的再構成を記録することを含む。

【0042】

ここでは、対象の位相情報の定量的獲得を可能にするため、デジタルホログラフィー顕微鏡観察の適用が特に有利である。本発明による方法のさらなる実施形態によれば、白血球のイメージ表示は、したがって、デジタルホログラフィー顕微鏡観察、干渉位相顕微鏡観察、および／または定量的位相顕微鏡観察によって確認される。これらの顕微鏡観察方法は、特に高い距離分解能、すなわち、顕微鏡の光学軸の方向のものを促進する。デジタルホログラフィー顕微鏡観察はz方向に1nmまでの分解能を促進する。これは、他の既知の光学顕微鏡方法（たとえば共焦点顕微鏡）よりも100～1000倍高い精度に対応している。その結果、高さプロファイルの正確な確認が理由で、細胞種のより正確な決定が可能である。

【0043】

したがって、顕微鏡観察器具は、好ましくは、デジタルホログラフィー顕微鏡観察（DHM）、干渉位相顕微鏡観察、または定量的位相顕微鏡観察を行うための顕微鏡である。

【0044】

好ましくは、白血球は、フローセルにおいて顕微鏡観察器具によってイメージングし、該フローセルは、好ましくは長方形または正方形の横断面を有するチャンネルを含む。

【0045】

好ましくは、白血球は、層状シース流によって、好ましくは4つの層状シース流によって集中される。

【0046】

好ましくは、白血球を顕微鏡観察器具によってイメージングする前に、赤血球を選択的溶解によってサンプルから除去する。

【0047】

1つまたはそれ以上の非染色および／または非乾燥細胞を使用して方法を実行する場合に、さらなる利点が得られる。細胞の活力は本発明による方法によって損なわれないため、本方法によって決定された細胞は、決定方法が完了した後、続く分析にさらに使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

さらなる例示的な実施形態によれば、本発明による方法は、標識を用いて細胞を表現型決定すること、および／または細胞のさらなる割当てのために事前に決定された受容体を発現させることを含むことができる。これにより、決定された細胞のより徹底的な分子生物学的検査が促進される。

【 0 0 4 9 】

さらなる実施形態によれば、本発明による方法では、全血サンプルを使用して行う場合、ならびに／または、生物学的サンプルが血液細胞、単球、好中球、好塩基球、好酸球、および／もしくはリンパ球を含有する場合に、特定の関連性が得られる。これは、血液学において血球数を決定する場合に主な使用が見つかる。

10

【 0 0 5 0 】

本発明のさらなる主題は、本発明による方法の上述の実施形態のうちの1つまたはそれ以上を実行するように構成されている、細胞分析装置、たとえばマイクロチップまたはマイクロコントローラを含むものに関する。

【 0 0 5 1 】

本発明のさらなる主題は、本発明による細胞分析装置を含む、標識せずに生物学的サンプルの白血球の細胞種を決定するための顕微鏡観察器具に関する。

【 0 0 5 2 】

好ましくは、顕微鏡観察器具はデジタルホログラフィー顕微鏡を含む。

【 0 0 5 3 】

20

本発明による方法のさらなる実施形態によれば、白血球種の決定は、細胞の細胞期の決定、特に、細胞齢、細胞の生理的もしくは形態学的状態、または細胞の活性状態の鑑別を含むことができる。これにより、イメージシーケンス、たとえば細胞における活性化手順のものの記録が促進される。

【 0 0 5 4 】

干渉位相顕微鏡観察とも呼ばれるデジタルホログラフィー顕微鏡観察(DHM)は、1つの記録で対象の強度および位相の両方を定量的に獲得できることによって識別される。この目的を達成するために、記録されるのは、慣用の顕微鏡観察のような対象での光の吸収および散乱によって生じる強度分布ではなく、対象波および参照波の重ね合わせから生じる波面である。このことから、対象の強度および位相情報をコンピュータの助けにより再構成することができる。

30

【 0 0 5 5 】

この顕微鏡観察方法は、さらなるサンプル調製なしに可視光に対して実質的に透明であり、したがって慣用の顕微鏡においてコントラストをわずかしき有さないため、生物学的サンプルの検査に適している。位相情報を記録することによって、細胞の形態学を非常に正確に獲得し、本情報の助けにより細胞の鑑別を行うことが可能である。

【 0 0 5 6 】

通常は対物レンズ中の位相リングおよびコンデンサ中の環状ストップによって現実化される、慣用の位相差顕微鏡と比較して、DHMは、位相を定量的に決定できるという利点を提供する。したがって、これは定量的位相差顕微鏡観察とも呼ばれる。対象の高さプロファイルの再現性のある再構成は、位相を定量することによってのみ促進され、これのみが細胞種の自動決定を可能にする。

40

【 0 0 5 7 】

光の位相シフトは対象を通る光路長によって決定される；すなわち、対象の幾何学的厚さおよび屈折率の両方がこの場合に役割を果たすことに注意されたい。真の幾何学的高さプロファイルを位相情報から得るためには、サンプルの屈折率が知られていなければならない。しかし、細胞の顕微鏡観察の好ましい応用では、概ね一定かつ知られている屈折率を仮定することができ、その結果、位相情報を高さプロファイルへと直接変換することができる。あるいは、位相情報を様々な波長で記録し、それによる計算によって屈折率の影響を除去することができる。

50

【 0 0 5 8 】

さらに、位相情報は 360° の位相角までしかユニークに決定されないことにも注意されたい。例として、測定された位相シフト 10° は、実際には 370° 、 730° などの位相シフトに対応している場合がある。したがって、ユニークさの範囲は光の波長に限定される。生体細胞は急勾配の側面を有しておらず、したがって隣接ピクセルの位相値は接続状態で利用可能なため、細胞の顕微鏡観察の選択された応用では、この限定は同様に無視できる。

【 0 0 5 9 】

本発明による方法は、鑑別血球数を作成するために現在適用されている手順を、標識せずに行うことを可能にする。鑑別血球数を作成するための例示的な手順は、たとえば、細胞サイズの確認、細胞の成熟状態、すなわち細胞年齢、核細胞質比、細胞質封入体の獲得、およびクロマチン構造の獲得を含む。

10

【 0 0 6 0 】

デジタルホログラフィー顕微鏡観察(DHM)とも呼ばれる干渉位相顕微鏡観察は、1つの記録で対象の強度および位相の両方を定量的に獲得できることによって識別される。この目的を達成するために、獲得されるのは、慣用の顕微鏡観察のような対象のイメージ表示ではなく、対象波および参照波の重ね合わせから出現する波面である。このことから、対象の強度および位相情報を細胞分析装置、たとえばコンピュータの助けにより再構成することができる。

【 0 0 6 1 】

この顕微鏡観察方法は、さらなるサンプル調製なしに可視光に対して実質的に透明であり、したがって慣用の顕微鏡においてコントラストをわずかしき有さないため、生物学的サンプルの検査に適している。位相情報を記録することによって、細胞の形態学を非常に正確に獲得し、本情報の助けにより細胞の鑑別を行うことが可能である。

20

【 0 0 6 2 】

細胞を染色することなしに、たとえば複数の細胞の再構成した位相情報に基づいて、たとえば白血球の鑑別を実行することが可能であり、作業を新鮮な乾燥していない細胞で実行することが可能となる。その結果、乾燥および染色中のサンプルの取扱いの様々な事例から生じる不必要な人為的結果が回避される。ここでは、イメージは再現性があり、自動コンピュータ支援画像処理によってより容易に識別可能である。方法の工程数が最小限となる。これにより費用および時間が節約され、信頼性がありより速い診断が促進される。

30

【 0 0 6 3 】

事前分析では、これにより、たとえば、丸め緩衝液(rounding buffer)(すなわち高希釈のSDS緩衝溶液)の使用を血液学的分析計に関して省略することが可能となる。後者は、フローサイトメーターにおいて散乱光の測定に適しているが、同時に人為的結果をもたらす、細胞の丸まりをもたらす。

【 0 0 6 4 】

本発明を添付の図面に基づいて、具体的な例示的な実施形態によって、再度、より詳細に説明する。示した例は本発明の好ましい実施形態を表す。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 6 5 】

【 図 1 】 A M L サンプルの概要を示す図であり、PCAパラメータをプロットしている。

【 図 2 】 C M L サンプルの概要を示す図であり、PCAパラメータをプロットしている。

【 図 3 】 A L L サンプルの概要を示す図であり、PCAパラメータをプロットしている。

【 図 4 】 C L L サンプルの概要を示す図であり、PCAパラメータをプロットしている。

【 図 5 】 O M F サンプルの概要を示す図であり、PCAパラメータをプロットしている。

【 図 6 】 健康なサンプルの概要を示す図であり、PCAパラメータをプロットしている。

【 図 7 】 A M L サンプルの、骨髓芽球およびリンパ芽球のゲートの特徴的な散乱パターンを示す図である。

【 図 8 】 C M L サンプルの、骨髓芽球およびリンパ芽球のゲートの特徴的な散乱パターン

50

を示す図である。

【図 9】ALL サンプルの、骨髄芽球およびリンパ芽球のゲートの特徴的な散乱パターンを示す図である。

【図 10】CLL サンプルの、骨髄芽球およびリンパ芽球のゲートの特徴的な散乱パターンを示す図である。

【図 11】OMF サンプルの、骨髄芽球およびリンパ芽球のゲートの特徴的な散乱パターンを示す図である。

【図 12】健康なサンプルの、骨髄芽球およびリンパ芽球のゲートの特徴的な散乱パターンを示す図である。

【図 13】定義された領域（「ゲート」）における特徴的な散乱パターンに基づいた、単球の識別を示す図である。PCA パラメータ（Val - X）または物理的パラメータおよび PCA パラメータの組合せをプロットしている。

10

【図 14】定義された領域（「ゲート」）における特徴的な散乱パターンに基づいた、好中球、好酸球の識別を示す図である。PCA パラメータ（Val - X）または物理的パラメータおよび PCA パラメータの組合せをプロットしている。

【図 15】定義された領域（「ゲート」）における特徴的な散乱パターンに基づいた、好塩基球、リンパ球の識別を示す図である。PCA パラメータ（Val - X）または物理的パラメータおよび PCA パラメータの組合せをプロットしている。

【図 16】定義された領域（「ゲート」）における特徴的な散乱パターンに基づいた、好酸球、前骨髄球、芽球、巨核球の識別を示す図である。PCA パラメータ（Val - X）または物理的パラメータおよび PCA パラメータの組合せをプロットしている。

20

【図 17】定義された領域（「ゲート」）における特徴的な散乱パターンに基づいた、後骨髄球の識別を示す図である。PCA パラメータ（Val - X）または物理的パラメータおよび PCA パラメータの組合せをプロットしている。

【発明を実施するための形態】

【0066】

本発明による *in vitro* 方法の助けにより、生物学的サンプルにおいて標識せずに白血球の細胞種の決定を行うことができる。この場合、標識せずとは、細胞を、たとえば蛍光色素または放射性粒子によって、標識する必要がないことを意味する。ここでは、生物学的サンプルは、たとえば動物またはヒトの血液細胞のサンプルを含み得る。好ましくは、これは全血サンプルであり、たとえば、血液細胞 10、たとえば、白血球、好酸球、または好塩基球を含む。

30

【0067】

第 1 の実験例では、AML、CML、ALL、CLL、および OMF を、それぞれの特徴的な散乱パターンに基づいて識別する。

【0068】

図 1 から図 6 は、AML（図 1）、CML（図 2）、ALL（図 3）、CLL（図 4）、OMF（図 5）、および健康なサンプル（図 6）の特徴的な散乱パターンを示す。ここでは、「OMF」は、骨髄増殖性新生物（MPN）の群の亜型である骨髄線維症を表す。PCA パラメータ Val 4 および Val 5（対応する一次結合には上記を参照）を区別

40

【0069】

様々な種類の白血病のうちの 1 つを有する患者または健康な対象のサンプルの識別基準は、以下の通りである。

【0070】

健康な対象のサンプル：3つの明確に分離されたデータ領域：

第 1 の領域：Val 4 = 400 ~ 650、Val 5 = 200 ~ 500、

第 2 の領域：Val 4 = 600 ~ 750、Val 5 = 400 ~ 600、

第 3 の領域：Val 4 = 700 ~ 850、Val 5 = 250 ~ 400。

【0071】

50

A M Lを有する患者のサンプル：1つだけの連続的なデータ領域：
V a l 4 = 6 0 0 ~ 9 0 0、V a l 5 = 3 0 0 ~ 6 0 0。

【0072】

C M Lを有する患者のサンプル：3つの領域へと細区分することができる、隣接するデータ領域：

第1の領域：V a l 4 = 4 0 0 ~ 5 5 0、V a l 5 = 2 0 0 ~ 5 0 0の領域中の小集団、

第2の領域：V a l 4 = 5 0 0 ~ 7 0 0、V a l 5 = 2 0 0 ~ 5 0 0の領域中の支配的な主集団、

第3の領域：V a l 4 = 7 0 0 ~ 8 5 0、V a l 5 = 2 5 0 ~ 4 0 0の領域中の小集団。

【0073】

A L Lを有する患者のサンプル：大きな主集団および2つの小さな二次集団：

第1の領域：V a l 4 = 7 0 0 ~ 8 5 0、V a l 5 = 3 0 0 ~ 5 0 0の領域中の支配的な主集団、

第2の領域：V a l 4 = 5 5 0 ~ 7 0 0、V a l 5 = 3 0 0 ~ 4 5 0の領域中の小集団、

第3の領域：V a l 4 = 5 0 0 ~ 7 0 0、V a l 5 = 4 5 0 ~ 6 0 0の領域中の小集団。

【0074】

C L Lを有する患者のサンプル：大きな主集団および1つの小さな二次集団：

第1の領域：V a l 4 = 6 5 0 ~ 9 0 0、V a l 5 = 3 0 0 ~ 5 0 0の領域中の支配的な主集団、

第2の領域：V a l 4 = 4 0 0 ~ 6 0 0、V a l 5 = 3 0 0 ~ 5 0 0の領域中の小集団。

【0075】

O M Fを有する患者のサンプル：4つの領域へと細区分することができる、隣接するデータ領域：

第1の領域：V a l 4 = 7 0 0 ~ 9 0 0、V a l 5 = 2 0 0 ~ 4 0 0、

第2の領域：V a l 4 = 6 0 0 ~ 7 5 0、V a l 5 = 4 0 0 ~ 5 5 0、

第3の領域：V a l 4 = 5 0 0 ~ 6 5 0、V a l 5 = 2 5 0 ~ 4 5 0、

第4の領域：V a l 4 = 4 0 0 ~ 6 5 0、V a l 5 = 4 5 0 ~ 7 0 0の領域中の小集団。

【0076】

第2の実験例では、A M L、C M L、A L L、C L L、およびO M Fを、それぞれの特徴的な散乱パターンに基づいて識別する。

【0077】

図7から図12は、A M L（図7）、C M L（図8）、A L L（図9）、C L L（図10）、O M F（図11）、および健康なサンプル（図12）の特徴的な散乱パターンを示す。P C AパラメータV a l 3およびV a l 4（対応する一次結合には上記を参照）を区別使用する。2つの大きな領域を定義する：

第1の領域：V a l 4 = 2 3 5 ~ 9 2 0、V a l 5 = 5 7 6 ~ 8 1 6（＝「骨髄芽球」ゲート（2））、

第2の領域：V a l 4 = 2 3 5 ~ 9 2 0、V a l 5 = 8 1 6 ~ 1 0 1 5（＝「リンパ芽球」ゲート（1））。

【0078】

様々な種類の白血病のうちの1つを有する患者または健康な対象のサンプルの識別基準は、以下の通りである。

【0079】

健康な対象のサンプル：両方のゲート中にゼロまたは非常に少数のみのデータ点。

【0080】

A M Lを有する患者のサンプル：第1の領域中に顕著な集団：

第1の領域中の全データ点の>90%、

第2の領域中の全データ点の<10%。

【0081】

C M Lを有する患者のサンプル：第1の領域中に少数のデータ点：

10

20

30

40

50

第 1 の領域中の全データ点の $> 90\%$ 、

第 2 の領域中の全データ点の $< 10\%$ 。

【 0 0 8 2 】

A L L を有する患者のサンプル：顕著な集団が第 1 および第 2 の領域にわたって広がる：

第 1 の領域中の全データ点の $< 90\%$ 、

第 2 の領域中の全データ点の $> 10\%$ 。

【 0 0 8 3 】

C L L を有する患者のサンプル：第 2 の領域中に顕著な集団：

第 1 の領域中の全データ点の $< 10\%$ 、

第 2 の領域中の全データ点の $> 90\%$ 。

【 0 0 8 4 】

O M F を有する患者のサンプル：第 1 および第 2 の領域中に少数のデータ点：

第 1 の領域中の全データ点の $> 80\%$ 、

第 2 の領域中の全データ点の $< 20\%$ 。

【 0 0 8 5 】

第 3 の実験例では、標識せずに 5 つの主要な白血球の種類およびさらなる亜型間で区別される。

【 0 0 8 6 】

図 1 3 から図 1 7 は、定義された領域（「ゲート」）中の特徴的な散乱パターンに基づいて、標識せずに 5 つの主要な白血球の種類およびさらなる亜型間の区別を示す。略記「E & N & I G」（1 2）は、好酸球、好中球、および未成熟顆粒球を表す（図 1 3 を参照）。この場合、未成熟顆粒球は後骨髄球および骨髄球である。以下の領域は細胞種間を識別するために定義されている（使用パラメータおよび定義された領域（ゲート）の X / Y 座標をそれぞれの事例で指定している）：

【 0 0 8 7 】

第 1 の領域 = 「単球」ゲート（3）：単球細胞種は、V a l 4 および V a l 5 の値が理由で以下のように識別される。

【 0 0 8 8 】

【表 3】

Val4	Val5
606	483
636	522
664	538
697	527
727	496
746	435
650	361
622	438

【 0 0 8 9 】

第 2 の領域 = 「好中球」ゲート（4）：好中球細胞種は、V a l 4 および V a l 5 の値が理由で以下のように識別される。

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 4】

Val4	Val5
501	620
494	486
477	487
456	486
416	487
321	487
322	564
323	607
322	659
322	703
480	696

10

【0091】

20

第3の領域 = 「好酸球」ゲート(5) : 好酸球細胞種は、Val4およびエントロピーの値が理由で以下のように識別される。

【0092】

【表 5】

Val4	エントロピー
320	703
406	831
564	833
580	831
654	828
739	827
838	826
838	671
840	488
724	488
625	486
494	487
501	627
479	697

30

40

【0093】

第4の領域 = 「好塩基球」ゲート(6) : 好塩基球細胞種は、Val4およびVal5の値が理由で以下のように識別される。

【0094】

50

【表 6】

Val4	Val5
732	422
717	347
699	222
643	254
645	386
683	415

10

【0095】

第5の領域 = 「リンパ球」ゲート(7) : リンパ球細胞種は、Val4およびVal5の値が理由で以下のように識別される。

【0096】

【表 7】

Val4	Val5
781	438
826	436
936	426
937	223
861	223
801	218
698	212
717	347
731	424

20

30

【0097】

第6の領域 = 「巨核球」ゲート(8) : 巨核球細胞種は、Val3およびエントロピーの値が理由で以下のように識別される。

【0098】

【表 8】

Val3	エントロピー
33	233
332	805

40

【0099】

第7の領域 = 「前骨髄球」ゲート(9) : 前骨髄球細胞種は、Val3およびエントロピーの値が理由で以下のように識別される。

【0100】

50

【表 9】

Val3	エントロピー
233	846
642	805

【0101】

第8の領域 = 「骨髓球」ゲート(10) : 骨髓球細胞種は、当量直径および均一性の値が理由で以下のように識別される。

10

【0102】

【表10】

当量直径	均一性
333	534
304	534
304	493
304	436
304	272
367	273
429	274
427	408
427	470
418	524
400	532
377	534
356	534

20

30

【0103】

第9の領域 = 「後骨髓球」ゲート(11) : 後骨髓球細胞種は、当量直径および均一性の値が理由で以下のように識別される。

【0104】

40

50

【表 1 1】

当量直径	均一性
304	534
301	907
680	900
684	273
428	273
426	372
426	468
420	524
402	532
379	534

10

20

30

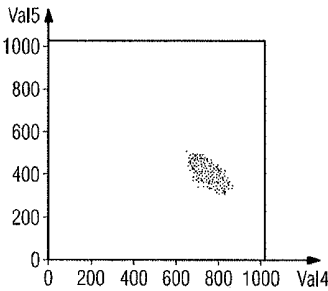
40

50

【図面】

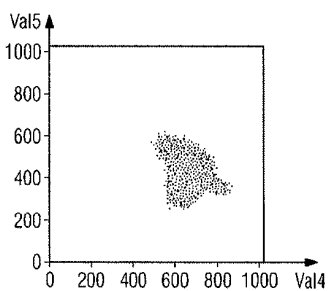
【図 1】

FIG 1



【図 2】

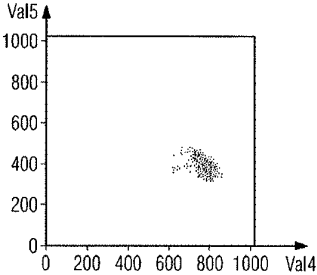
FIG 2



10

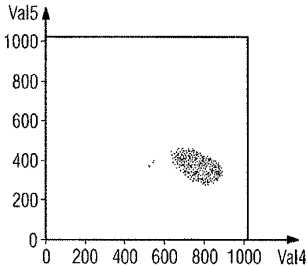
【図 3】

FIG 3



【図 4】

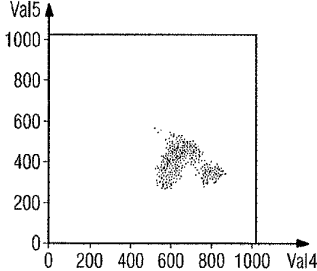
FIG 4



20

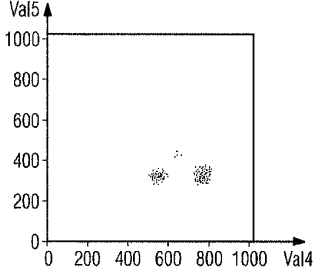
【図 5】

FIG 5



【図 6】

FIG 6

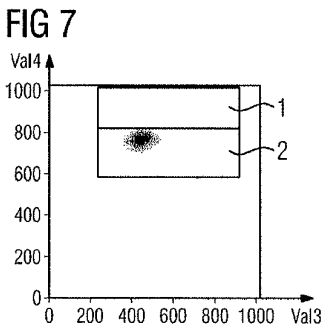


30

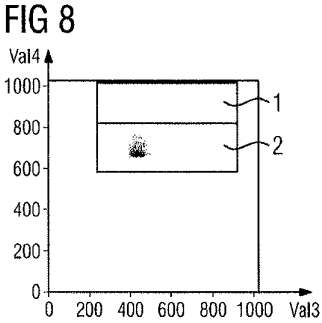
40

50

【図 7】

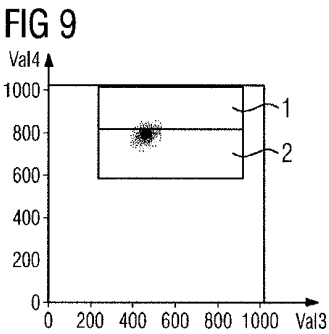


【図 8】

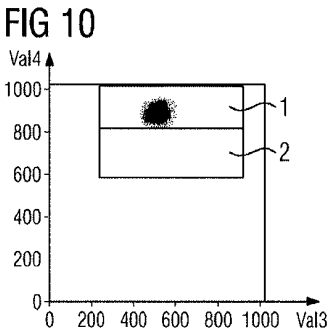


10

【図 9】

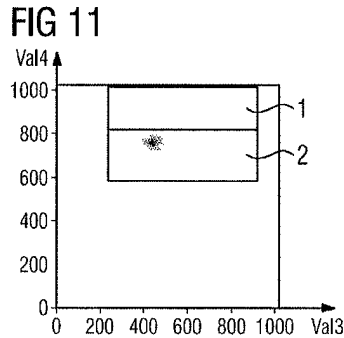


【図 10】

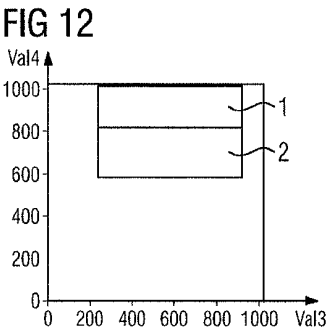


20

【図 11】



【図 12】

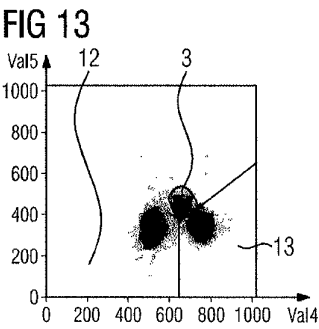


30

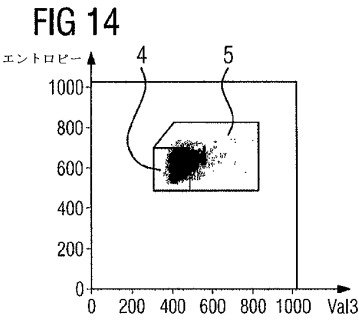
40

50

【図 1 3】

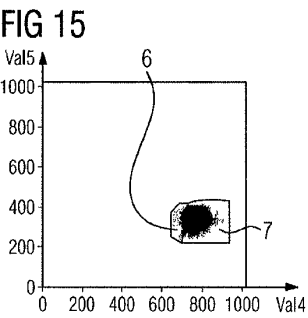


【図 1 4】

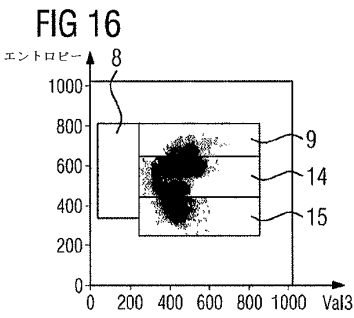


10

【図 1 5】

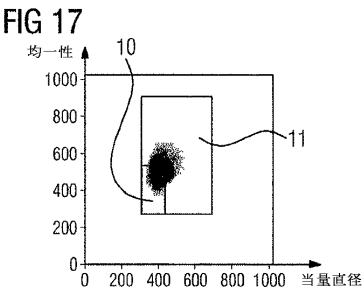


【図 1 6】



20

【図 1 7】



30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 オリヴァー・ハイデン
 ドイツ連邦共和国 8 5 3 6 8 モースブルク・イザールシュトラッセ 1 0 7
- (72)発明者 オリヴァー・シュミット
 ドイツ連邦共和国 9 1 0 5 2 エルランゲン・ペトラ - ケリー - ヴェーグ 3 2
- (72)発明者 マンフレート・シュタンツェル
 ドイツ連邦共和国 9 2 3 3 4 ベルヒング・アム・ガイスベルク 7
- (72)発明者 マルクス・ヴェニガー
 ドイツ連邦共和国 9 0 4 1 1 ニュルンベルク・グロイラインヴェーク 3 5

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 3 2 2 0 1 3 0 (E P , A 1)
 特表 2 0 1 4 - 5 0 2 7 2 0 (J P , A)
 特表平 0 6 - 5 0 5 0 9 9 (J P , A)
 特表 2 0 1 6 - 5 1 1 3 9 7 (J P , A)
 特表 2 0 0 9 - 5 3 9 0 9 7 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 2 1 9 5 6 8 (U S , A 1)
 HUANG, D.-C. et al. , A computer assisted method for leukocyte nucleus segmentation and recognition in blood smear images , JOURNAL OF SYSTEMS AND SOFTWARE , 2012年04月18日 , Vol.85/No.9 , p.2104-2118
 YAMPRI, P. et al. , White Blood Cell Classification based on the Combination of Eigen Cell and Parametric Feature Detection , 2006 1st IEEE CONFERENCE ON INDUSTRIAL ELECTRONICS AND APPLICATIONS , 2006年12月11日 , p.1-4 , DOI:10.1109/ICIEA.2006.257341
 TABRIZI, P.R. et al. , Using PCA and LVQ Neural Network for Automatic Recognition of Five Types of White Blood Cells , 2010 ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY , p.5593-5596 , DOI:10.1109/IEMBS.2010.5626788
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 G 0 1 N 1 5 / 1 4
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
 C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0