

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第6986083号
(P6986083)

(45) 発行日 令和3年12月22日(2021. 12. 22)

(24) 登録日 令和3年11月30日(2021. 11. 30)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 15/14 (2006. 01)	GO 1 N 15/14 D
GO 1 N 33/49 (2006. 01)	GO 1 N 15/14 C
GO 1 N 21/17 (2006. 01)	GO 1 N 15/14 B
GO 6 M 11/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/49 H
C 1 2 Q 1/06 (2006. 01)	GO 1 N 21/17 A
請求項の数 20 (全 24 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2019-533217 (P2019-533217)	(73) 特許権者 510132347
(86) (22) 出願日 平成29年12月20日 (2017. 12. 20)	コミサリア ア レネルジ アトミク エ
(65) 公表番号 特表2020-514704 (P2020-514704A)	オウ エネルジ アルタナティヴ
(43) 公表日 令和2年5月21日 (2020. 5. 21)	フランス国 7 5 0 1 5 パリ リュ ル
(86) 国際出願番号 PCT/FR2017/053725	ブラン 2 5 パティマン ル ポナン
(87) 国際公開番号 W02018/115734	デ
(87) 国際公開日 平成30年6月28日 (2018. 6. 28)	
審査請求日 令和2年12月2日 (2020. 12. 2)	
(31) 優先権主張番号 1663028	
(32) 優先日 平成28年12月21日 (2016. 12. 21)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 フランス (FR)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レンズレス撮像によるサンプル内の粒子の計数方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル（10）内に配置された対象粒子（10a）の計数方法であって、

a）前記サンプル（10）に向かって伝播する入射光波（12）を発する光源（11）を用いて、前記サンプル（10）を照明するステップと、

b）当該照明の影響下で、暴露波として知られている光波（14）に曝される画像センサ（16）を用いて、前記光源（11）と前記画像センサ（16）の間に配置された前記サンプル（10）の画像であって、検出面（P₀）に形成され、前記光波（14）を表す画像（I₀）を取得するステップと、を含み、

さらに、

c）ステップb）中に取得した前記画像（I₀）に基づいて、伝播演算子（h）を適用して、前記検出面（P₀）の反対側に延びる再構成面（P_z）に沿って、前記暴露波（14）の複素式（A_z）を計算するステップと、

d）前記再構成面に沿った前記複素式の絶対値又は位相の分布を表す再構成画像として知られる画像（I_z、M_z、φ_z）を形成するステップと、

e）互いに離間し、全て又は一部が少なくとも1つの対象粒子に関連付けられた関心領域（ROI）を含むセグメンテーション画像（I_z^{*}）を取得するために、ステップd）中に形成された前記画像のセグメンテーションを行うステップと、

f）関心領域のサイズを決定すると共に、

当該関心領域に単一の対象粒子が含まれるクラスと、当該関心領域に1より大きい整数の

対象粒子が含まれるクラスとの少なくとも 1 つによるサイズの関数として当該関心領域を分類するステップと、

g) ステップ f) 中に分類された前記関心領域に基づいて対象粒子を計数するステップと、を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

ステップ f) において、分類の前に、
各関心領域の少なくとも 1 つの形態学的基準を決定し、
前記形態学的基準の関数として関心領域 (ROI) を選択し、
選択された関心領域を分類する、

10

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの形態学的基準が、各関心領域の直径、サイズ、又は形状因子の中から選択される、

請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ f) が、所定数の対象粒子を表す基準サイズ (S_{ref}) を考慮することを含み、前記基準サイズの関数として分類する、
請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

ステップ f) は、

f i) 所定の対象粒子の数に対応する第 1 の基準サイズ (S_{ref-1}) の関数として実行される関心領域を分類するサブステップ (第 1 の分類) と、

f i i) 前記第 1 の分類の後、サブステップ f i) 中に分類された関心領域に基づいて、事前に定義された数の対象粒子を含むとして、第 2 の基準サイズ (S_{ref-2}) を決定するサブステップと、

f i i i) サブステップ f i i) で決定された第 2 の基準サイズ (S_{ref-2}) の関数として実行される、関心領域を分類するサブステップ (第 2 の分類) と、を含む、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

ステップ f) において、分類の前に、

いくつかの関心領域 (ROI) の信号ノイズ比 (S/N) を計算し、

各関心領域に対して計算された前記信号ノイズ比 (S/N) の関数としての関心領域 (ROI) を選択し、

選択された関心領域を分類する、

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

対象粒子 (10a) の形状を修正して球形にするために、ステップ b) の前にサンプルを球状化試薬と混合する、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8】

ステップ c) は、

c i) 前記画像センサによって取得された前記画像 (I_0) に基づいて、前記検出面内の前記サンプルの初期画像 ($A_0^{k=0}$) を定義するサブステップと、

c i i) サブステップ c i) 中に定義された前記サンプルの初期画像 ($A_0^{k=1}$)、又は前の反復 ($k-1$) の結果である前記検出面での前記サンプルの画像 (A_0^{k-1}) に対し、伝播演算子を適用することにより、再構成面 (P_z) における前記サンプルの複素画像 (A_z^k) を決定するサブステップと、

c i i i) サブステップ c i i) で決定された前記複素画像 (A_z^k) に基づいて、当該複素画像 (A_z^k) に影響する再構成ノイズに依存するノイズ指標 (ε^k) を計算する

50

サブステップと、

c i v) 前記画像のピクセルの位相値 ($\varphi_0^k(x, y)$) に従って、サブステップ c i i) 中に計算された前記指標の変化の関数として、前記位相値を調整することによって、前記検出面 (P_0) における前記サンプルの画像 (A_0^k) を更新するサブステップと、

c v) 前記検出面 (P_0) 及び前記再構成面 (P_z) における前記サンプル (10) の複素画像を取得するために、収束基準に達するまでサブステップ c i i) ~ c i v) を繰り返すサブステップと、を含む、

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

10

前記サンプル (10) と前記画像センサ (16) との間に画像形成光学素子が配置されていない、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

対象粒子が血球である、

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ d) 中において、

前記対象粒子 (10a) は赤血球又は白血球であり、前記再構成画像は、前記再構成面 (P_z) に沿った複素式 (A_z) の絶対値の分布を表しているか、

20

前記対象粒子 (10a) は血小板であり、前記再構成画像は、前記再構成面 (P_z) に沿った複素式 (A_z) の位相の分布を表している、

請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ c) が、前記再構成面 (P_z) が延びる再構成の距離に対応する集束距離を決定するために、デジタルフォーカシングアルゴリズムを適用することを含む、

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ c) 中に、ステップ b) 中に取得された画像が、互いに異なるゾーンに分割され、デジタルフォーカシングアルゴリズムが各ゾーンに適用され、それぞれのために集束距離 (d_p) を取得し、

30

さらに、ステップ c) において、

最大ばらつき指標 (δ_{max}) を考慮に入れ、

得られた集束距離 (d_p) のばらつきを表すばらつき指標 ($\delta(d_p)$) を計算し、

計算されたばらつき指標 ($\delta(d_p)$) と前記最大ばらつき指標 (δ_{max}) とを比較し、

比較の関数として、

各ゾーンで得られた集束距離 (d_p) の平均又は中央値 (d_p^*) を計算し、ステップ c) 中に使用される前記集束距離を形成するか、

又は、ステップ c) 中に使用される前記集束距離 (d_{mean}) を確立するために、記憶された集束距離を考慮する、

40

請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ばらつき指標 ($\delta(d_p)$) は、最大集束距離 (d_{p-max}) と最小集束距離 (d_{p-min}) との差、又は得られた集束距離 (d_p) の分散又は標準偏差である、

請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ c) 中に、ステップ b) 中に取得された画像が、互いに異なるゾーンに分割され、デジタルフォーカシングアルゴリズムが各ゾーンに適用され、それぞれのために集束距離 (d_p) を取得し、

50

さらに、ステップ c) において、
 フォーカシング下限 (d_{inf}) を考慮に入れ、
 フォーカシング上限 (d_{sup}) を考慮に入れ、
 各集束距離 (d_p) と前記フォーカシング下限 (d_{inf}) 及び前記フォーカシング上限 (d_{sup}) とを比較し、
 比較の関数として、
 前記集束距離が前記フォーカシング下限 (d_{inf}) と前記フォーカシング上限 (d_{sup}) との間にある場合、各ゾーンで得られた集束距離 (d_p) の平均又は中央値 (d_p^*) を計算し、ステップ c) で使用される集束距離を形成し、
 前記集束距離 (d_p) が前記フォーカシング下限 (d_{inf}) 以下又は前記フォーカシング上限 (d_{sup}) 以上の場合、ステップ c) 中に使用される前記集束距離 (d_{mean}) を確立するために、記憶された集束距離を考慮する、
 請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ e) において、
 前記再構成画像の最大ピクセル数の強度に対応する前記再構成画像 (I_z, M_z, φ_z) のヒストグラムのモードを決定し、
 再構成画像のセグメンテーションが行われるセグメンテーション閾値を取得するために、大津閾値処理を実行し、
 前記セグメンテーション閾値が前記ヒストグラムのモードの 90% を超える場合、セグメンテーション閾値は前記ヒストグラムのモードの 80 ~ 85% のパーセンテージに設定されるように、前記ヒストグラムのモードとセグメンテーション閾値とを比較する、
 請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ e) において、
 所定の最大面積 (A_{max}) を考慮に入れ、
 前記セグメンテーション画像 (I_z^*) の全ての関心領域 (ROI) の面積 (A) を決定し、
 全ての関心領域の面積 (A) と最大面積 (A_{max}) とを比較し、
 前記セグメンテーション画像 (I_z^*) の比較、拒否又は検証の関数として、
 前記セグメンテーション画像 (I_z^*) の品質 (Q) の基準の決定する、
 請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記セグメンテーション画像 (I_z^*) が有効化され、関心領域の面積 (A) が最大面積 (A_{max}) の近くに位置する場合、
 所定の最小信号ノイズ比 (SNR_{min}) を考慮し、
 前記関心領域 (ROI) における平均強度又は中央値強度 (I_{ROI}) と前記関心領域外における前記セグメンテーション画像のノイズレベル (N_{out}) との比の形式で、前記セグメンテーション画像 (I_z^*) の信号ノイズ比 ($SNR(I_z^*)$) を計算し、
 前記セグメンテーション画像の前記信号ノイズ比 ($SNR(I_z^*)$) と前記最小信号ノイズ比 (SNR_{min}) とを比較し、
 前記セグメンテーション画像 (I_z^*) の比較、拒否又は検証の関数として、品質の補助的な基準 (Q') を決定する、
 請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ f) 中に、サイズが所定の最大サイズ (S_{max}) を超える関心領域が拒否され、
 ステップ f) 中に拒否された関心領域の数を決定し、
 所定の許容レベル (L_{max}) を考慮に入れ、
 ステップ f) 中に拒否された関心領域の数と、ステップ g) で実行された対象粒子の計

10

20

30

40

50

数が有効化又は無効化される関数としての許容レベル (L_{max}) とを比較する、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

サンプル (10) 内に配置された対象粒子 (10a) を計数するための装置であって、サンプル (10) に向かって伝搬する入射光波 (12) を放射できる光源 (11) と、サンプル (10) を光源 (11) と画像センサ (16) との間に保持するように設計された支持体 (10s) と、

画像センサ (16) によって取得されたサンプルの画像を受け取り、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法のステップ c) ~ g) を実行するように設計されたプロセッサ (20) と、を含む、

装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レンズレス撮像装置を用いて、サンプル内に配置された粒子、特に血球を計数するための光学的方法である。

【背景技術】

【0002】

血液学の分野では、赤血球や白血球などの血球の計数は日常的な手順である。分析研究所には、信頼できるヘモグラムを作成できる自動機械が装備されている。このような機械によって行われる原理は、インピーダンスの変化又は光線の拡散に基づくサイトメトリー測定である。ただし、このような機械は一般に高価であり、その使用は研究室に限定されたままである。

【0003】

血液学以外では、サンプル内の対象粒子の識別及び計数は一般的に行われている。

【0004】

国際公開第 2008/090330 号には、レンズレス撮像によって、細胞を含むサンプルの観察を可能にする装置が記載されている。サンプルと画像センサの間に光学拡大レンズを設けずに、サンプルは光源と画像センサの間に配置される。そのため、画像センサは、サンプルによって送られた光波の画像を収集する。ホログラムとも呼ばれるこの画像は、光源から発せられサンプルから送られる光波と、光源から発せられた光波のサンプルによる回折から生じる回折波との干渉パターンから形成される。これらの干渉パターンは、通常、一連の同心円状のリングによって形成される。これらは回折パターンとも呼ばれる。そのため、観察範囲が顕微鏡よりも明らかに大きな画像が得られる。サンプル内の細胞の濃度が十分に低い場合、各細胞は干渉パターンに関連付けられ、これらを計数することにより、サンプル内に存在する細胞を計数できる。しかしながら、濃度が増加した場合、ホログラムによる細胞の計数は信頼できない。

【0005】

画像センサによって取得されたホログラムは、サンプルを通過して画像センサに向かって伝播する光波の吸収又は位相シフト値など、サンプルの光学特性を推定するために、ホログラフィック再構成アルゴリズムによって処理され得る。このタイプのアルゴリズムは、ホログラフィック再構成の分野でよく知られている。ホログラフィック再構成アルゴリズムの一例は、Ryleらの論文「生物学的標本のデジタルインラインホログラフィ」(Proc. SPIE Vol. 6311 (2006)) に記載されている。しかしながら、そのようなアルゴリズムでは、再構成画像において、「ツイン画像」として知られる再構成ノイズが出現する虞がある。したがって、それらのアプリケーションでは、何らかの予防措置を必要とする。米国特許出願公開第 2012/0218379 号には、サンプルの複素画像 (この画像は振幅及び位相に関する情報を含む) の再構成を可能にする方法が記載されている。米国特許出願公開第 2012/0148141 号では、米国特許出願公開第 2012/0218379 号に記載された方法を適用し、精子の複素画像を再構成し、精子の可動性を特徴付け

10

20

30

40

50

ている。国際公開第2016/151249号では、レンズレス撮像を適用し、細胞を含むサンプルを分析している。

【0006】

サンプル観察のための代替方法は、ホログラフィー顕微鏡法である。例えば米国特許出願公開第2013/0308135号に記載されている。また、国際公開第2015/195642号では、血液粒子に適用され、特に赤血球又は白血球の体積の推定について記載されている。ホログラフィック顕微鏡法は、実装が比較的複雑である。米国特許出願公開第2008/0160566号では、標準的な光学装置を用いて画像を形成し、予め着色試薬で標識された白血球の体積を決定するための単純な代替案が提案されている。上述の3つの文献に記載された方法では、小さな観察野であることが共通している。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明者らは、レンズレス撮像によって可能になった広い観察領域を利用することにより、サンプル内の対象粒子を計数するための単純で安価な代替案を提案する。血液サンプルに適用される場合、本発明は、血液中の細胞の計数に現在利用可能な血液学機械の代替物を提供し得る。本発明は、特に粒子の濃度が高く、場合によってはマイクロリットルあたり数十万個の粒子に達するサンプルに適している。

【課題を解決するための手段】

【0008】

20

本発明の1つの目的は、サンプル内に配置された粒子、特に血球の計数方法である。

当該方法は、

a) 前記サンプルに向かって伝播する入射光波を発する光源を用いて、前記サンプルを照明するステップと、

b) 当該照明の影響下で、暴露波として知られている光波に曝される画像センサを用いて、前記光源と前記画像センサの間に配置された前記サンプルの画像であって、検出面に形成され、前記光波を表す画像を取得するステップと、を含む。

【0009】

さらに、

c) ステップb) 中に取得した前記画像に基づいて、伝播演算子を適用して、前記検出面の反対側に延びる再構成面に沿って、前記暴露波の複素式を計算するステップと、

30

d) 前記再構成面に沿った前記複素式の絶対値又は位相の分布を表す再構成画像として知られる画像を形成するステップと、

e) 互いに離間し、全て又は一部が少なくとも1つの対象粒子に関連付けられた関心領域を含むセグメンテーション画像を取得するために、ステップd) 中に形成された前記画像のセグメンテーションを行うステップと、

f) 関心領域のサイズを決定すると共に、当該関心領域に単一の対象粒子が含まれるクラスと、当該関心領域に1より大きい整数の対象粒子が含まれるクラスとの少なくとも1つによるサイズの関数として当該関心領域を分類するステップと、

40

g) ステップf) 中に分類された対象粒子を計数するステップと、を含んでもよい。

【0010】

分類することによって、選択した関心領域を単純に計数するよりも、より正確に対象粒子を定量化できる。

【0011】

ステップf) において、分類の前に、

各関心領域の少なくとも1つの形態学的基準を決定し、

前記形態学的基準の関数として関心領域(ROI)を選択し、

選択された関心領域を分類してもよい。

【0012】

50

形態学的基準が、特に、各関心領域の直径、サイズ、又は形状因子の中から選択されてもよい。いくつかの形態学的基準を組み合わせてもよい。

【 0 0 1 3 】

ステップ f) が、所定数の対象粒子を表す基準サイズ及び / 又は基準形状を考慮することを含み、前記基準サイズの関数として分類してもよい。

【 0 0 1 4 】

ステップ f) は、

f i) 所定の対象粒子の数に対応する第 1 の基準サイズの関数として実行される関心領域を分類するサブステップ (第 1 の分類) と、

f i i) 前記第 1 の分類の後、サブステップ f i) 中に分類された関心領域に基づいて、事前に定義された数の対象粒子を含むとして、第 2 の基準サイズを決定するサブステップと、

f i i i) サブステップ f i i) で決定された第 2 の基準サイズ (S r e f - 2) の関数として実行される、関心領域を分類するサブステップ (第 2 の分類) と、を含んでもよい。

【 0 0 1 5 】

ステップ f) において、分類の前に、

いくつかの関心領域の信号ノイズ比を計算し、

例えば閾値との比較に基づいて、各関心領域に対して計算された前記信号ノイズ比の関数としての関心領域を選択し、

選択された関心領域を分類してもよい。

【 0 0 1 6 】

対象粒子の形状を修正して球形にするために、ステップ b) の前にサンプルを球状化試薬と混合してもよい。

【 0 0 1 7 】

ステップ c) は、

c i) 前記画像センサによって取得された前記画像に基づいて、前記検出面内の前記サンプルの初期画像を定義するサブステップと、

c i i) サブステップ c i) 中に定義された前記サンプルの初期画像、又は前の反復の結果である前記検出面での前記サンプルの画像に対し、伝播演算子を適用することにより、再構成面における前記サンプルの複素画像を決定するサブステップと、

c i i i) サブステップ c i i) で決定された前記複素画像に基づいて、当該複素画像に影響する再構成ノイズに依存するノイズ指標を計算するサブステップと、

c i v) 前記画像のピクセルの位相値に従って、サブステップ c i i i) 中に計算された前記指標の変化の関数として、前記位相値を調整することによって、前記検出面における前記サンプルの画像を更新するサブステップと、

c v) 前記検出面及び前記再構成面における前記サンプルの複素画像を取得するために、収束基準に達するまでサブステップ c i i) ~ c i v) を繰り返すサブステップと、を含んでもよい。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、前記サンプルと前記画像センサとの間に画像形成光学素子又は拡大光学素子が配置されていない。

【 0 0 1 9 】

対象粒子は血球でもよい。

一実施形態によれば、ステップ d) 中において、

前記対象粒子は赤血球又は白血球であり、前記再構成画像は、前記再構成面に沿った複素式の絶対値の分布を表しているか、

前記対象粒子は血小板であり、前記再構成画像は、前記再構成面に沿った複素式の位相の分布を表している。

【 0 0 2 0 】

この方法は、添付の特許請求の範囲に記載された特徴を含んでもよい。

【0021】

本発明の他の1つの目的は、サンプル内に配置された対象粒子を計数するための装置である。

当該装置は、

サンプルに向かって伝搬する入射光波を放射できる光源と、

サンプルを光源と画像センサとの間に保持するように設計された支持体と、

画像センサによって取得されたサンプルの画像を受け取り、本願に記載の方法のステップc)～g)を実行するように設計されたプロセッサと、を含む。

【0022】

他の利点及び特徴は、非限定的な例として与えられ、以下に列挙される図に表される本発明の特定の実施形態の以下の説明からより明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】本発明の実施を可能にする装置例を示している。

【図1B】本発明の実施を可能にする別の装置例を示している。

【0024】

【図2】図2Aは、本発明による方法の主要なステップを示すフローチャートである。図2Bは、赤血球を含むサンプルの振幅画像として知られる再構成画像を示している。図2Cは、セグメンテーション後の図2Bの画像を示し、画像内に分布するいくつかの関心領域を示している。図2Dは、各関心領域の分類後の図2Cの画像を示している。図2Eは、関心領域ごとに決定された信号ノイズ比のヒストグラムを表している。

【0025】

【図3】図3A及び3Bは、信号ノイズ比の値の関数としての閾値処理の前後の関心領域をそれぞれ示している。図3Cと3Dは、それぞれ画像3Aと3Bの信号ノイズ比のヒストグラムである。

【0026】

図3Eは、特定の実施形態の主要なステップを示している。

【0027】

【図4】図4Aは、再構成面で再構成画像として知られるサンプルの複素画像の取得を可能にする方法の主要なステップを示している。図4Bは、図4Aに関連して説明したステップを示している。

【0028】

【図5】図5A、5B及び5Cは、本発明を実施し、それぞれ青、緑及び赤のスペクトル帯域で発光する発光ダイオードを使用することにより、参照方法を用いて実行される計数の関数として、赤血球の計数を表す曲線である。

【0029】

図5Dは、本発明を実施し、レーザー光源を使用することにより、参照方法を用いて実行される計数の関数として、赤血球の計数を表す曲線である。

【0030】

【図6】図6Aは、いわゆる再構成された振幅画像を示しており、サンプルには白血球が含まれている。図6Bは、セグメンテーション後の図6Aの画像を示している。図6Cは、いわゆる再構成された振幅画像を示しており、サンプルには白血球が含まれている。図6Dは、セグメンテーション後の図6Cの画像を示している。

【0031】

【図7】図7Aは、ガラスビーズを含むサンプルと呼ばれる、再構成された振幅画像を示している。図7Bは、セグメンテーション後の図7Aの画像を示している。

【0032】

【図8】図8A及び8Bは、赤血球に対応する関心領域の信号ノイズ比の分布を表すヒストグラムである。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0033】

図1Aは、本発明による装置の一例を示している。光源11は、伝搬軸Zに沿ってサンプル10に向かって伝搬する、入射光波として知られる光波12を放射できる。光波は、スペクトル帯域 $\Delta\lambda$ で放射される。

【0034】

サンプル10は、粒子を含むサンプルであり、その中には、計数する対象粒子10aがある。粒子とは、例えば細胞、特に血球を意味するが、微生物、ウイルス、孢子、又はマイクロビーズであってもよく、通常生物学的応用、又は微細藻類でさえ使用される場合がある。それらは、水相に分散した油滴などの、液体媒体10mに不溶性の液滴でもある。好ましくは、粒子10aは、100 μm 未満、好ましくは50 μm 又は20 μm 未満の直径を有するか、そのような直径の円に内接する。好ましくは、粒子は、500nm又は1 μm より大きい直径を有するか、そのような直径の円に内接する。

10

【0035】

図1Aに表される例では、サンプルは、対象粒子10aが浸される媒体10mを含む。この例の粒子10aは、血液細胞、例えば赤血球（赤血球）又は白血球（白血球）である。粒子が浸される媒体10mは、特に、希釈された血漿などの液体であってもよい。

【0036】

この例のサンプル10は、流体チャンバ15に含まれている。流体チャンバ15は、例えば、厚さ $e = 100\mu\text{m}$ のCountess（登録商標）タイプの流体チャンバである。伝播軸Zに沿ったサンプル10の厚さ e は、典型的には10 $\mu\text{m} \sim 1\text{cm}$ の間で変化し、好ましくは20 $\sim 500\mu\text{m}$ の間である。サンプル10は、サンプルの平面として知られる平面 P_{10} に沿って延び、好ましくは伝播軸Zに垂直である。それは、画像センサ16から離れた支持体10s上に維持される。

20

【0037】

光源11とサンプル10との間の距離Dは、好ましくは1cmより大きい。これは、2 $\sim 30\text{cm}$ であることが好ましい。有利なことに、サンプルから見た光源は点状であると考えられる。これは、その直径（又はその対角線）が、サンプルと光源間の距離の10分の1未満、好ましくは100分の1未満であることを意味する。光源11は、図1Aに示されるような発光ダイオードであってもよい。それは、絞り18すなわち空間フィルターに関連付けられてもよい。絞りの開口部は通常、5 $\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ 、好ましくは50 $\sim 500\mu\text{m}$ である。この例では、絞りはThorlabs社製P150Sであり、その直径は150 μm である。絞りは、光ファイバに置き換えてもよく、その第1の端部は光源11の反対側に配置され、その第2の端部はサンプル10に面して配置される。

30

【0038】

この装置は、光源11と絞り18との間に配置された拡散板17を含んでもよい。そのような拡散板の使用により、絞り18の開口に対する光源11の中心合わせの制約を克服できる。このような拡散板の機能は、光源によって生成された光ビームを角度 α の円錐に沿って分配することである。好ましくは、拡散角 α は10 $\sim 80^\circ$ の間で変化する。拡散板を設けることによって、装置において、絞りに対する光源の偏心が許容され易くなり、サンプルの照明が均一化される。特にレーザー光源の場合、光源が十分に点状である場合、絞りは必要ない。

40

【0039】

光源11は、レーザーダイオードなどのレーザー光源であってもよい。この場合、空間フィルター18又は拡散板17と関連付けることは役に立たない。このような構成を図1Bに示す。

【0040】

好ましくは、入射光波12のスペクトル放射帯域 $\Delta\lambda$ は、100nm未満の幅を有する。スペクトル帯域幅とは、そのスペクトル帯域の中間高さでの幅を意味する。

【0041】

50

サンプル 10 は、光源 11 と前述の画像センサ 16 との間に配置される。画像センサ 16 は、サンプルの拡張面 P_{10} と平行又は実質的に平行に伸びることが好ましい。実質的に平行という用語は、2つの要素が厳密に平行ではない可能性があることを意味し、 20° 又は 10° 未満の数度の角度公差が許可される。画像センサ 16 は、検出面 P_0 に沿って画像 I_0 を形成できる。示した例では、CCDタイプ又はCMOSのピクセルアレイを含む画像センサである。検出面 P_0 は、好ましくは、入射光波 12 の伝播軸 Z に垂直に延びる。サンプル 10 と画像センサ 16 のピクセルアレイとの間の距離 d は、有利には $50\ \mu\text{m} \sim 2\ \text{cm}$ 、好ましくは $100\ \mu\text{m} \sim 2\ \text{mm}$ である。

【0042】

なお、画像センサ 16 とサンプル 10 との間に拡大光学素子などの画像形成光学素子は存在しない。これは、画像センサ 16 の各ピクセルの領域に集束マイクロレンズが存在する可能性を排除するものではなく、画像センサ 16 は取得した画像の拡大機能を有していない。

【0043】

入射光波 12 の影響下で、サンプル内に存在する粒子は回折波 13 を生成し、検出面 P_0 の領域で、サンプルが透過する入射光波 12 の一部 $12'$ と干渉する可能性がある。さらに、サンプルは入射光波 12 の一部を吸収してもよい。したがって、サンプル 10 によって送られ、画像センサ 16 が曝される暴露波として知られる光波 14 は、以下を含むことができる。

- ・サンプルの各粒子による入射光波 12 の回折から生じる成分 13。
- ・サンプルによる入射光波 12 の透過から生じるコンポーネント $12'$ 。

【0044】

これらのコンポーネントは、検出面に干渉を生じる。したがって、画像センサ 16 によって取得された画像 I_0 は、干渉パターン（又は回折パターン）を含み、各干渉パターンは、サンプル 10 の粒子 10a によって生成される。

【0045】

マイクロプロセッサなどのプロセッサ 20 は、画像センサ 16 によって取得された各画像 I_0 を処理するように設計されている。特に、プロセッサは、この説明で説明する画像処理及び計算操作を実行するための一連の命令が記憶されているプログラム可能なメモリ 22 に接続されたマイクロプロセッサである。プロセッサは、画像センサ 16 によって取得された画像又はプロセッサ 20 によって計算された画像の表示を可能にするスクリーン 24 に結合されてもよい。

【0046】

従来技術に関連して述べたように、ホログラムとしても知られる画像センサ 16 で取得された画像 I_0 は、観察されるサンプルの十分に正確な式を得ることができない。暴露波 14 を表す量を計算するために、画像センサによって取得された各画像に伝播演算子 h を適用できる。ホログラフィック再構成として知られるそのような手順は、検出面 P_0 に平行な再構成面、特にサンプルの拡張面 P_{10} において、光波 14 の絶対値 (modulus) 又は位相の画像の再構成を可能にする。このために、画像センサ 16 によって取得された画像 I_0 と伝播演算子 h との畳み込み積を作成する。次に、空間座標 (x, y, z) の全てのポイントで、特に画像センサの反対側に延びる再構成面に沿って、光波 14 の複素式 A を計算できる。再構成面は、画像センサ 16 から、特にサンプルの平面 P_{10} から距離 $|z|$ に位置する再構成面 P_z であってもよい。

【数 1】

$$A(x, y, z) = I_0(x, y, z) * h$$

* はコンボリューションから生成された演算子を示す。

【0047】

この説明の残りの部分では、座標 (x, y) は、伝播軸 Z に垂直な平面内の半径方向の位置を示す。座標 z は、伝播軸 Z に沿った座標を示す。

【 0 0 4 8 】

複素式 A は、その偏角と絶対値がそれぞれ画像センサ 16 が曝される光波 14 の位相と強度を表す複素量である。画像 I_0 と伝播演算子 h との畳み込み積により、検出面 P_0 の座標 z に及び、再構成面 P_z における複素式 A の空間分布を表す複素画像 A_z が得られる。この例では、検出面 P_0 の方程式は $z = 0$ である。複素画像 A_z は、再構成面 P_z のサンプルの複素画像に対応する。同様に、暴露波 14 の光学特性の 2 次元空間分布を表す。伝播演算子 h は、画像センサ 16 と画像センサ 16 からの距離 $|z|$ に位置する座標点 (x, y, z) との間の光の伝播を記述する。したがって、再構成の距離として知られるこの距離 $|z|$ で、暴露波 14 の絶対値 $M(x, y, z)$ 及び ϕ 又は位相 $\phi(x, y, z)$ を決定できる。

10

【 数 2 】

$$M(x, y, z) = \text{abs}[A(x, y, z)] \cdot \cdot \cdot (1)$$

【 数 3 】

$$\phi(x, y, z) = \text{arg}[A(x, y, z)] \cdot \cdot \cdot (2)$$

【 0 0 4 9 】

演算子 abs と arg は、それぞれ絶対値と偏角を表している。

【 0 0 5 0 】

換言すると、空間座標 (x, y, z) の全ての点での暴露波 14 の複素式 A は、次のようになる。

20

【 数 4 】

$$A(x, y, z) = M(x, y, z)e^{j\phi(x, y, z)} \cdot \cdot \cdot (3)$$

検出面 P_0 の反対側に延びる表面に、複素式 A の絶対値又は位相の分布をそれぞれ表す画像 M_z 及び ϕ_z を形成することが可能である。そのような表面は、特に検出面 P_0 から距離 $|z|$ に位置する平面 P_z であってもよい。平面 P_z では、 $M_z = \text{abs}(A_z)$ 及び $\phi_z = \text{arg}(A_z)$ が成立する。前述の表面は必ずしも平面ではないが、検出面に実質的に平行に延びてもよく、検出面に平行な平面 P_z であることが好ましい。説明の残りの部分では、複素画像 A_z の絶対値及び ϕ 又は位相から取得した画像を「再構成画像」と呼び、 I_z で示す。

30

【 0 0 5 1 】

本発明者らは、図 2 A ~ 2 E を参照して説明する手順により、サンプル内に存在する粒子 10 a を計数する方法を開発した。この手順の主な手順は次の通りである。

【 0 0 5 2 】

ステップ 100 : サンプルの照明。

このステップ中、サンプルは光源 11 によって照らされる。

【 0 0 5 3 】

ステップ 110 : 画像センサ 16 によるサンプル 10 の画像 I_0 の取得。

この画像はホログラムを形成する。図 1 A 又は 1 B に示すように、レンズレス構成の興味深い特徴の 1 つは、広い観察野であり、大量のサンプルを同時に処理できる。観察野はセンサのサイズに依存するが、センサとサンプルとの間隔を設けるため、センサの検出面よりわずかに小さくなる。観察野は一般に 10 mm^2 さらには 20 mm^2 より大きい。

40

【 0 0 5 4 】

ステップ 120 : 再構成面 P_z における複素画像 A_z の計算。

複素画像は、画像センサ 16 が曝される暴露波 14 の位相と振幅に関する情報を運ぶ。再構成面は、サンプルの拡張面 P_{10} である。ステップ 120 は、取得された画像 I_0 から生じる画像に前述の伝播演算子 h を適用することにより実行され得る。ただし、取得した画像に伝播演算子を適用すると、多くの場合、ツイン画像として知られる実質的な再構成ノイズを含む複素画像 A_z が生成され得る。再構成ノイズを制限して、使用可能な複素

50

画像を取得するために、反復アルゴリズムを実行できる。これらのアルゴリズムの1つを、図4A及び4Bを参照して以下に説明する。

【0055】

複素画像 A_z から、再構成面 P_z 内の暴露波 14 の絶対値 M_z 及び / 又は位相 ϕ_z に基づいて再構成画像 I_z を得ることができる。画像センサ 16 に関する再構成距離は、画像センサ 16 に関するサンプル 10 の位置を知って演繹的に決定されるか、又はデジタルフォーカシングアルゴリズムに基づいて決定される。最適な再構成距離は、再構成画像 I_z が最も明確になる距離である。デジタルフォーカシングアルゴリズムは、当業者に知られている。

【0056】

図2Bは、図4A及び4Bに関連して説明されたステップを実施する方法によって得られた複素画像 A_z の絶対値 M_z に基づく再構成画像 I_z の一部の例である。この図では、コントラストが逆になっている。計数する対象粒子 10a は赤血球である。それらは、再構成画像において分散され、互いに分離された関心領域 RO I の形で表示される。サンプルと実験条件については、実験試行に関連して以下でより正確に説明する。

【0057】

ステップ 130 : セグメンテーション。

ステップ 120 中に形成された画像は、粒子に対応する関心領域 RO I を分離するためにセグメンテーションにかけられる。画像のセグメンテーションとは、例えば強度の関数として、ピクセルを再グループ化するための画像の分割を意味する。画像セグメンテーションの結果、セグメンテーション画像 I_z^* が生成される。この画像では、互いに離間した関心領域 RO I が区切られる。各関心領域は、以下に説明するように、粒子又は粒子のクラスターに対応する。セグメント化の異なる方法は、当業者に知られている。例えば、画像のヒストグラムから強度閾値の値を決定することからなる大津閾値処理を適用できる。この閾値は、2つのクラス（関心領域を表すピクセルのクラスと画像の背景を表すピクセルのクラス）に従ってピクセルの最適な分離を可能にする。図2Cは、大津アルゴリズムに従って閾値処理を適用することにより、図2Bの画像を分割した結果を示している。得られた画像は2値化され、画像の背景を表すピクセルは暗く（最小グレーレベル）、各関心領域 RO I を表すピクセルは明るい（最大グレーレベル）。

【0058】

この例では、このステップで得られたセグメンテーション画像 I_z^* は、暴露波 14 の複素振幅 A_z の絶対値の画像 M_z のセグメンテーションから生じる。変形例として、このステップで得られる画像は、暴露波の位相の画像 ϕ_z の分割から得られる。セグメンテーション画像 I_z^* は、同様に、絶対値の画像 M_z のそれぞれのセグメンテーションの後に現れる関心領域と、暴露波の位相の画像 ϕ_z とを組み合わせてもよい。

【0059】

セグメンテーション画像 I_z^* に表示される関心領域の単純な計数による対象粒子の計数は、対象粒子の量に関して1桁の大きさを提供する。しかし、発明者は、そのような計数がかかなり不正確な結果をもたらすことを発見した。実際、特定の関心領域は、数えたい粒子とは異なる粒子に対応している。さらに、特定の関心領域は、クラスターを形成するいくつかの対象粒子を集める。これは、特定の対象粒子が互いに近く、同じ関心領域にマージされるという事実によるものである。図1A及び1Bでは、2つの粒子を含むクラスター 10a₂ と3つの粒子を含むクラスター 10a₃ が描かれている。これらのエラーの原因は、以下で説明する手順で処理される。

【0060】

ステップ 140 : 選択。

このステップ中、前のステップでモルフォロジーに応じて、つまり面積、形状、サイズなどの形態学的基準に応じて決定された関心領域の選択が行われる。これにより、計数したい対象粒子に対応する関心領域を選択できる。

【0061】

このステップは、対象粒子を代表する関心領域を選択するために、前述の形態学的基準の関数としての各関心領域のフィルタリングを含んでもよい。例えば、対象粒子が赤血球の場合、フィルタリングにより、直径が $100\mu\text{m}$ 未満か、そのような直径の円に内接する関心領域を選択できる。これにより、赤血球のクラスターを保持しながら、大きな塵埃や痕跡を考慮しなくてよい。

【0062】

対象粒子間の凝集の影響を考慮するために、選択された関心領域の分類は、例えば単一の対象粒子（シングルレット）に対応する関心領域を表す基準面積などの基準サイズ S_{ref} に特に基づいて、その面積及び/又は形状の関数として行われ得る。基準面積は、例えば各関心領域 ROI の面積の平均又は中央値を計算し、関心領域の大部分が単一粒子に対応すると仮定することにより、セグメンテーション画像 I_z^* から事前に決定又は取得できる。次に、各関心領域のサイズは、各関心領域に多数の粒子が割り当てられる関数として、基準サイズ S_{ref} と比較される。サイズとは、直径、面積、又は別の特徴的な寸法を意味する。

例えば、図2Dに関連して、

- ・ 関心領域のサイズが基準サイズ S_{ref} の $0.5 \sim 1.5$ 倍の場合、 ROI_1 と付された関心領域のように、関心領域はシングルレットに対応する単一の対象粒子を表す。図2Dでは、シングルレットは白い点で表されている。
- ・ 関心領域のサイズが基準サイズ S_{ref} の $1.5 \sim 2.5$ 倍の場合、関心領域は2つの対象粒子を表すと見なされる。図2Dでは、ダブルレットに対応するこのような関心領域 ROI_2 は、白い楕円形の輪郭で表されている。
- ・ 関心領域のサイズが基準サイズ S_{ref} の $2.5 \sim 3.5$ 倍の場合、関心領域は3つの粒子を表すと見なされる。図2Dでは、このような関心領域 ROI_3 は白い枠で表されている。

【0063】

表記 ROI_n は、分類ステップの後、 n 個の粒子を含むと見なされる関心領域に対応する。 n は厳密に正の整数である。

【0064】

代替的又は補足的な方法では、分類の前に、各関心領域の形状の関数として、選択を行ってもよい。例えば、関心領域ごとに最大直径と最小直径を決定する。最大直径と最小直径の比率により、対象となる関心領域の形状因子を定量化できる。この選択により、形状が球形であると見なせない関心領域を識別できる。これらの関心領域は、対象粒子の代表とは見なされず、計数では考慮されない。したがって、選択は、各関心領域の形状と、検出された対象粒子又は対象粒子のクラスターを表す形状との比較を伴い得る。

【0065】

セグメンテーション画像 I_z^* に存在する関心領域ごとに、信号ノイズ比(S/N)を確立できる。このような信号ノイズ比は、関心領域の中心に位置する中心ピクセルと呼ばれるピクセル（例えば9個の中心ピクセル）の平均値と、関心領域のない再構成画像に対応する画像の背景に対して計算された標準偏差との比を生成することによって計算できる。図2Eは、図2C及び2Dに示すサンプルで特定されたさまざまな関心領域について計算された信号ノイズ比の値のヒストグラムである。関心領域の大部分は4を超える信号ノイズ比を持っている。これは、検出が信頼でき、関心領域の選択での信頼度も高く、よって計数も信頼できることを意味する。ステップ140は、同様に、それらの信号ノイズ比の関数としての関心領域のフィルタリングを含み得る。実際、特定の閾値を下回ると、信号ノイズ比が低すぎて、関心領域が1つの粒子に対応していると効果的に判断できないと考えられる。図3A及び3Bは、 1.5 に等しい信号ノイズ比の閾値に基づいた関心領域のフィルタリングの例を示している。図3A及び3Bに示された関心領域の信号ノイズ比のヒストグラム（図3C及び3D）に見られるように、図3Aの太い円で囲まれた信号ノイズ比が低い関心領域を閾値処理により除去できる。信号ノイズ比が低い関心領域は、図3Bには表示されていない。この例では、信号ノイズ比に基づく関心領域のフィルタリン

グはシングレットに限定されている。図 3 A 及び 3 B では、図 2 D と同様に、ダブレットは楕円形の輪郭で囲まれ、トリプレットは正方形の輪郭で囲まれている。

【 0 0 6 6 】

－実施形態によれば、ステップ 1 4 0 は、図 3 E に示される以下の連続した操作を伴い得る。

・ステップ 1 4 1 : 対象粒子を表す直径範囲 (赤血球の場合は $3 \sim 12 \mu\text{m}$ など)、及び形状基準に従って、各関心領域 ROI をフィルタリングする。

・ステップ 1 4 2 : このフィルタリングから生じる関心領域の平均サイズを計算する。この平均サイズは第 1 の基準サイズ $S_{\text{ref} - 1}$ を構成する。

・ステップ 1 4 3 : 整数 n 個の粒子を各関心領域 ROI_n に割り当てるために、第 1 の基準サイズ $S_{\text{ref} - 1}$ に基づいてセグメンテーション画像の各関心領域 ROI を分類する。

・ステップ 1 4 4 : シングレットとみなされる各関心領域 ROI_1 の信号ノイズ比を計算する。

・ステップ 1 4 5 : 閾値よりも大きい十分な信号ノイズ比を有するシングレットの平均サイズ ROI_1 を計算する。閾値はおそらく 1 . 5 に等しく、この平均サイズは第 2 の基準サイズ $S_{\text{ref} - 2}$ を構成する。

・ステップ 1 4 6 : ステップ 1 4 5 から得られた第 2 の基準サイズ $S_{\text{ref} - 2}$ に基づいて、セグメンテーション画像の各関心領域 ROI を分類する。

・ステップ 1 4 7 : 分類中に決定された多数の粒子 n を各関心領域 ROI に割り当てる。

【 0 0 6 7 】

このアルゴリズムにより、関心領域の分類の基礎として使用される基準サイズを漸進的に調整できる。これにより、より正確に分類できる。

【 0 0 6 8 】

したがって、ステップ 1 4 0 は、対象粒子を表す関心領域を選択すること、及び / 又は対象粒子を表すと考えられる各関心領域に多数の粒子を割り当てることを可能にする。

【 0 0 6 9 】

ステップ 1 5 0 : 計数。

このステップ中、ステップ 1 4 0 中に選択された関心領域、すなわち粒子の代表であると考えられる領域を、それらの各々におそらく割り当てられた多くの粒子を考慮して計数する。

【 0 0 7 0 】

上述のステップ 1 2 0 は、伝播演算子と画像センサにより取得された画像との間の畳み込みを生成することにより実現され得る。ただし、このような演算子を適用すると、重大な再構成ノイズが発生し得る。再構成ノイズを制限することにより再構成を最適化するために、ステップ 1 2 0 は、2016 年 3 月 23 日に出版された仏国特許出願第 1 6 5 2 5 0 0 号に記載されたようなアルゴリズムによって実行されてもよい。図 4 A 及び 4 B を参照して、このアルゴリズムの主要なステップを説明する。それは反復アルゴリズムを含み、以下で説明されるステップ 1 2 1 ~ 1 2 5 が繰り返され、 k は反復のランクを指定する。この方法は、検出面での複素振幅 $A_0 = A_z = 0$ の推定値を段階的に取得するために、検出面 P_0 で暴露波 1 4 の位相を決定するように設計されている。各反復 k 中に、 $A_0^k \cdot 1$ として示される前の反復中に取得された検出面の複素画像は、再構成面 P_z で伝播され、再構成面 P_z で複素画像 A_z^k を形成する。各反復は、検出面 P_0 の複素画像 A_0^k の位相 ϕ_0^k を、複素画像 A_z^k から決定されたノイズ基準 ε^k の関数として調整することから成る。

【 0 0 7 1 】

ステップ 1 2 1 : 検出面の再構成面への伝播。

【 0 0 7 2 】

このステップ中、検出面 P_0 で形成された画像が利用できる。最初の反復中に、画像センサによって取得された画像 I_0 から初期画像 $A_0^k = 0$ が決定される。初期画像 A_0^k

$= 0$ の絶対値 $M_0^{k=0}$ は、画像センサによって取得された画像 I_0 に平方根演算子を適用することで取得できる。この場合、 $M_0^{k=0} = \sqrt{I_0}$ である。 0 などの任意の値が、初期画像の位相 $\phi_0^{k=0}$ に割り当てられる。次の反復中、検出面の画像は、前の反復で得られた複素画像 A_0^{k-1} である。検出面 P_0 で形成された画像は、再構成面 P_z でサンプル 10 を表す複素画像 A_z^k を取得するために、前述の伝播演算子 h の適用により、再構成面 P_z で伝播される。伝播は、画像 A_0^{k-1} と伝播演算子 h_{-z} の畳み込みによって実現される。

【数 5】

$$A_z^k = A_0^{k-1} * h_{-z}$$

10

【0073】

インデックス「 $-z$ 」は、伝播が伝播軸 Z とは反対の方向に実現されるという事実を表す。レトロプロパゲーションについて述べる。

【0074】

ステップ 122：いくつかのピクセルでの指標の計算。

【0075】

このステップ中に、複素画像 A_z^k の複数のピクセル (x, y) の各ピクセルに関連付けられた量 $\varepsilon^k(x, y)$ を計算する。この量は、計算対象のピクセル (x, y) での画像 A_z^k の値 $A_z^k(x, y)$ 又はその絶対値に依存する。同様に、このピクセルの画像の次元微分、例えばこの画像の次元微分の絶対値に依存する場合がある。この例では、各ピクセルに関連付けられている量 $\varepsilon^k(x, y)$ は、各ピクセルの画像 A_z^k と値 1 の差の絶対値である。このような量は、次式で得られる。

20

【数 6】

$$\varepsilon^k(x, y) = \sqrt{(A_z^k(x, y) - 1)(A_z^k(x, y) - 1)^*} = |A_z^k(x, y) - 1|$$

【0076】

ステップ 123：画像 A_z^k に関連付けられたノイズ指標の確立。

【0077】

ステップ 122 中、複素画像 A_z^k のいくつかのピクセルにおける量 $\varepsilon^k(x, y)$ を計算する。これらの量はベクトル E^k を形成でき、その項は各ピクセル (x, y) に関連付けられた量 $\varepsilon^k(x, y)$ である。ステップ 123 では、ベクトル E^k のノルムからノイズ指標として知られる指標を計算する。複素画像 A_z^k から計算された量 $\varepsilon^k(x, y)$ は、複素画像 A_z^k の各ピクセル (x, y) で、複素画像 A_{ref}^k に関連付けられたノイズ指標 ε^k を構成するために合計される。

30

【0078】

すなわち、

【数 7】

$$\varepsilon^k = \sum_{(x,y)} \varepsilon^k(x, y)$$

【0079】

このステップの重要な側面は、次の反復中、ノイズ指標 ε^{k+1} がノイズ指標 ε^k より小さい再構成画像 A_z^{k+1} を取得しつつ、検出面 P_0 で、サンプル平面内の画像 A_0^k の各ピクセルの位相値 $\phi_0^k(x, y)$ を決定することである。

40

【0080】

最初の反復中に利用可能な情報は、暴露波 14 の強度に関するもののみであり、その位相に関するものではない。したがって、再構成面 P_z 内の第 1 の再構成画像 $A_z^{k=1}$ は、検出面 P_0 内の光波 14 の位相に関する情報がないために、実質的な再構成ノイズを割り当てられる。その結果、指標 $\varepsilon^{k=1}$ は上昇する。後続の反復中に、アルゴリズムは検出面 P_0 で位相 $\phi_0^k(x, y)$ の漸進的調整を実行し、指標 ε^k を漸進的に最小化する。

50

【 0 0 8 1 】

検出面の画像 A_0^k は、その強度と位相の両方の観点から、検出面 P_0 の光波 14 を表している。ステップ 120 ~ 125 は、画像 A_0^k の各ピクセルの位相 $\varphi_0^k(x, y)$ の値を反復的に確立し、再構成面 P_z での画像 A_0^{k-1} の伝播によって得られた画像 A_z^k のために取得された指標 ε^k を最小化するように設計されている。

【 0 0 8 2 】

最小化アルゴリズムは、勾配降下アルゴリズムでも共役勾配降下アルゴリズムでもよく、後者については以下で説明する。

【 0 0 8 3 】

ステップ 124：検出面における位相の値の調整。

10

【 0 0 8 4 】

ステップ 124 は、次の反復 $k+1$ 中、再構成面 P_z における複素画像 A_0^k の伝播から生じる指標 ε^{k+1} を最小化するように、複素画像 A_0^k の各ピクセルの位相 $\varphi_0^k(x, y)$ の値を決定するように設計されている。このため、位相ベクトル φ_0^k が確立される。各項は、複素画像 A_0^k のピクセル (x, y) の位相 $\varphi_0^k(x, y)$ である。このベクトルの次元は $(N_{pix}, 1)$ である。ここで、 N_{pix} は考慮されるピクセル数を示す。このベクトルは、次の更新式により、各反復中に更新される。

【 数 8 】

$$\varphi_0^k(x, y) = \varphi_0^{k-1}(x, y) + \alpha^k p^k(x, y)$$

20

ここで、

- ・ α^k は整数で、「ステップ」として示され、距離を表す。
- ・ p^k は次元 $(N_{pix}, 1)$ の方向ベクトルで、各項 $p(x, y)$ は指標 ε^k の勾配 ε^k の方向を形成する。

【 0 0 8 5 】

この方程式は、次のようにベクトル形式で表現できる。

【 数 9 】

$$\varphi_0^k = \varphi_0^{k-1} + \alpha^k p^k$$

【 0 0 8 6 】

また、次のように示される。

【 数 10 】

$$p^k = -\nabla \varepsilon^k + \beta^k p^{k-1}$$

30

ここで、

- ・ ε^k は次元 $(N_{pix}, 1)$ の勾配ベクトルで、その各項は問題の未知数（すなわちベクトル φ_0^k の項）の自由度のそれぞれの関数として指標 ε^k の変化を表す。
- ・ p^{k-1} は、前の反復中に確立された方向ベクトルである。
- ・ β^k は、方向ベクトル p^{k-1} に適用されるスケール係数である。

【 0 0 8 7 】

勾配ベクトル ε の各項は、次の通りである。

【 数 11 】

$$\nabla \varepsilon^k(r') = \frac{\partial \varepsilon^k}{\partial \varphi_0^k(r')} = \text{Im} \left(A_0^{k*} \right) (r') \cdot \left(\frac{(A_{ref}^k - 1)}{|A_{ref}^k - 1|} * h_z \right) (r')$$

40

ここで、 Im は虚数演算子を表し、 r' は検出面の座標 (x, y) を表す。

【 0 0 8 8 】

スケール係数 β^k は、次のように表現できる。

【数 1 2】

$$\beta^{(k)} = \frac{\nabla \varepsilon^{(k)} \cdot \nabla \varepsilon^{(k)}}{\nabla \varepsilon^{(k-1)} \cdot \nabla \varepsilon^{(k-1)}}$$

【0089】

ステップ α^k は、反復に応じて、例えば、最初の反復中の 0.03 と最後の反復中の 0.0005 との間で変化し得る。

【0090】

更新式により、ベクトル φ_0^k の調整が可能になり、複素画像 A_0^k の各ピクセルの位相 $\varphi_0^k(x, y)$ が繰り返し更新される。検出面における複素画像 A_0^k は、各ピクセルに関連付けられたこれらの新しい位相値によって更新される。

10

【0091】

ステップ 125：アルゴリズムの反復又は終了。

【0092】

収束基準が達成されていない場合、ステップ 125 において、ステップ 124 で更新された複素画像 A_0^k に基づいて、ステップ 121 ~ 125 の新しい反復によりアルゴリズムを繰り返す。収束基準は、所定の反復回数 K 、又は指標の勾配 ε^k の最小値、又は 2 つの連続する位相ベクトル φ_0^{k-1} 、 φ_0^k の間で無視できると考えられる差である。収束基準が達成されると、検出面 P_0 内のサンプルの複素画像について正しいと考えられる推定値が得られる。

20

【0093】

ステップ 126：再構成面での複素画像の取得。

【0094】

最後の反復の終わりに、この方法は、再構成面における複素画像 $A_z = A_z^k$ を取得するために、再構成面 P_z の最後の反復から生じる複素画像 A_0^k の伝播を伴う。

【0095】

実験的試験

【0096】

最初の一連の試験の過程で、赤血球を計数するために、前述の方法が希釈血液サンプルで使用された。図 5 A ~ 5 D は、自動血液学機械 ABX Pentra 120 DX によって生成された値の関数としての方法によって得られた結果を示している。実験条件は次の通りである。

- ・サンプル 10：厚さ 100 μm の Countess (登録商標) 流体チャンバに含まれる希釈血液であって、検査された容量は 3 mm^3 、又は 3 μl である。

30

- ・光源 11：発光ダイオード Cree MC-E Color、スペクトル帯域 $\Delta\lambda$ が、450 ~ 465 nm、520 ~ 535 nm、630 ~ 640 nm でそれぞれ発光する 3 つの発光ダイオードで構成される。この例では、各照明中に単一のダイオードがアクティブになる。また、図 1 B に示される実施形態によれば、405 nm の波長で放射するレーザーダイオードが使用された。

- ・画像センサ：CMOS IDS μEye モノクロセンサ、3840 × 2748 ピクセル、各ピクセルのサイズは 1 辺 1.67 μm 、検出面は約 30 mm^2

40

- ・光源 11 とサンプル 10 の間の距離 D ：光源 11 が発光ダイオードの場合は 8 cm、光源がレーザーダイオードの場合は 15 cm

- ・サンプル 10 と画像センサ 16 間の距離 d ：1500 μm

- ・流体室 15 の厚さ e ：100 μm

- ・光源 11 が発光ダイオードである場合の空間フィルター 18 の開口の直径：150 μm

【0097】

この最初の一連の試験では、ヒトの血液を球状化試薬で希釈し、赤血球の表面張力を変更して球状化させた。当業者によく知られた方法で、血液の濃度と赤血球数の計数との間の再較正を行うため、基準機を用いて予備較正を行った。この再較正では、希釈係数、チャンバの厚さ、及び画像センサに曝されたサンプルの表面が考慮される。

50

【 0 0 9 8 】

サンプル調製のプロトコルは次の通りである。

- ・球状化試薬で 1 / 6 0 0 に希釈。
- ・ 1 0 μ l の希釈血液のサンプルを採取し、画像センサの反対側に配置された流体チャンバに注入する。

【 0 0 9 9 】

各サンプルは、参照方法として使用されたABX Pentra DX 120によって計数された。

【 0 1 0 0 】

8 0 個のサンプルが測定された。図 5 A、図 5 B、図 5 C 及び図 5 D は、それぞれ、基準測定値（横軸）の関数として本発明を実施することによって得られた結果（縦軸）を示している。光源は、以下である。

- ・ 4 5 0 ~ 4 6 5 nm のスペクトル帯域で発光する発光ダイオード
- ・ 5 2 0 ~ 5 3 5 nm のスペクトル帯域で発光する発光ダイオード
- ・ 6 3 0 ~ 6 4 0 nm のスペクトル帯域で発光する発光ダイオード
- ・ レーザーダイオード

【 0 1 0 1 】

これらの各数値に対して線形回帰が確立され、各回帰式はそれぞれ次の通りである。

- ・ $y = 1.017x - 0.04$ ($r^2 = 0.98$)
- ・ $y = 1.019x - 0.07$ ($r^2 = 0.98$)
- ・ $y = 1.017x - 0.07$ ($r^2 = 0.98$)
- ・ $y = 1.027x - 0.11$ ($r^2 = 0.98$)

【 0 1 0 2 】

係数 r^2 は、Passing-Bablokタイプの各線形回帰に関連する決定係数である。

【 0 1 0 3 】

2 回目の試行では、溶解試薬を加えて赤血球を溶解した後、ヒトの血液サンプル内の白血球を計数した。画像のセグメント化は、最大エントロピー基準に基づく閾値処理に基づいて行われた。白血球の密度を考慮するために、使用された希釈係数は 1 0 だった。図 6 A は、サンプルの拡張面である再構成面 P_z の複素画像の絶対値の画像を表している。図 6 B は、2 つの白血球で構成されるクラスターのセグメンテーション、2 値化、及び検出後の図 6 A の画像を表している。これらは白いリングで囲まれている。シングレットとダブルレットとの識別により、関心領域の単純な計数と比較して、白血球をより正確に定量化できる。図 6 C 及び 6 D は、それぞれ異なるサンプルである図 6 A 及び 6 B に対応している。前述のように、取得はレーザータイプの光源を使用して行われた。

【 0 1 0 4 】

この方法は、直径 5 μ m のガラスビーズを使用して、3 回目の一連の試行中に同様にテストされた。これらは、Bangs Laboratoriesの参照ビーズSS06Nであり、PBSタイプの生理食塩水バッファで 1 / 2 0 0 0 に希釈した。前述のように、取得はレーザータイプの光源を使用して行われた。2 つのビーズを含むクラスターの検出が観察される。図 7 A は、サンプルの拡張面である再構成面 P_z の複素画像の絶対値の画像を表している。図 7 B は、2 つのビーズを含むクラスターのセグメンテーション、2 値化、及び検出後の図 7 A の画像を表しており、これらのクラスターは白い輪郭で囲まれている。

【 0 1 0 5 】

赤血球の場合、本発明者らは、計数対象の粒子の検出表面あたりの表面密度が 2 0 0 0 個 / mm^2 未満であることが好ましいと考えている。これを超えると、粒子が近すぎ、各関心領域の信号ノイズ比が低下する。したがって、問題のさまざまな場合について、最大表面密度を推定し、サンプルに適用する希釈を調整することが有利である。

【 0 1 0 6 】

意図する用途の 1 つは、赤血球、白血球、又は血小板などの血球の計数である。本発明者らは、白血球又は赤血球の場合、ステップ 1 2 0 中に、再構成画像 I_z が再構成面 P_z における複素振幅 A_z の絶対値を表すことが好ましいことを発見した。セルに対応する関

10

20

30

40

50

心領域のエッジの定義は、より明確である。一方、対象粒子が血小板である場合、再構成画像 I_z が再構成面 P_z における複素振幅 A_z の位相を表すことが望ましいようである。図 8 A 及び 8 B は、再構成された複素画像の絶対値又は位相にそれぞれ基づいた、赤血球に対応する関心領域の信号ノイズ比のヒストグラムを表す。検討された赤血球の数は、それぞれ 12166 及び 12888 であった。位相画像（平均 13.9）に基づく場合よりも、絶対値の画像（平均 18.6）に基づく場合の方が高い信号ノイズ比が観察される。これらの試験では、赤血球は青いスペクトル帯域で照らされた。

【0107】

本発明者らは実験的試験を実施した。これらの試験後、本発明者らは以下に示す変形例を定義した。各変形例は、全体又は一部を前述の手順と組み合わせることができる。

10

【0108】

第 1 の変形例によれば、前述のようにステップ 100、110、及び 120 を実行する。ステップ 120 の過程において、考慮される再構成距離は、前述のように、デジタルフォーカシングアルゴリズムを実行することにより決定される集束距離（focusing distance）に対応する。ステップ 120 は、デジタルフォーカシングの有効性の基準の決定も含む。このため、ステップ 110 で取得された画像は、 p 個のゾーンに仮想的に分割され、 p は厳密に正の整数である。通常、 p は 9 などの 1 ~ 100 の間である。各ゾーンで集束距離 d_p を取得するために、デジタルフォーカシングアルゴリズムが各ゾーンに適用される。次に、集束距離のばらつき指標 $\delta(d_p)$ を決定する。

・ばらつき指標 $\delta(d_p)$ が所定の最大ばらつき指標 δ_{max} を超える場合、デジタルフォーカシングは無効になる。この場合、集束距離は、以前に分析された k 個のサンプルの記憶された集束距離 d_k に基づいて確立された平均集束距離 d_{mean} に等しいと考えられる。例えば、平均集束距離 d_{mean} は、最後に分析された k 個のサンプルを考慮した移動平均によって計算され得る。 k は、例えば 2 ~ 100 の間の整数である。 d_{mean} は、最後に分析された k 個の各サンプルの集束距離 d_k の中央値でもよい。

20

・ばらつき指標 $\delta(d_p)$ が最大ばらつき指標 δ_{max} より小さい場合、集束距離は、各ゾーンでそれぞれ取得された集束距離 d_p の平均 d_p （又は中央値）と見なされる。

【0109】

ばらつき指標 $\delta(d_p)$ は、最小集束距離 d_{p-min} と最大集束距離 d_{p-max} との差、すなわち $\delta(d_p) = d_{p-max} - d_{p-min}$ であり得る。また、ばらつき指標 $\delta(d_p)$ は、集束距離 d_p の標準偏差又は分散を含んでもよい。

30

【0110】

さらに、取得された画像を分割する各ゾーンでは、フォーカシング下限 d_{inf} とフォーカシング上限 d_{sup} を考慮することにより、デジタルフォーカシングアルゴリズムが確立される。デジタルフォーカシングアルゴリズムを各ゾーンに適用した後、少なくとも 1 つのゾーンについて、決定された集束距離が下限 d_{inf} 以下、又は上限 d_{sup} 以上である場合、集束距離は上記の平均（又は中央値）集束距離 d_{mean} に等しいと見なされる。実際、フォーカシングアルゴリズムが d_{inf} 以下又は d_{sup} 以上の集束距離 d_p を少なくとも 1 つ提供する場合、集束距離にエラーがある可能性がある。したがって、集束距離は、より確からしいと考えられる距離 d_{mean} に置き換えられる。

40

【0111】

第 2 の変形例によれば、ステップ 130 の過程で、セグメンテーションは大津閾値処理によって行われる。そのようにして得られたセグメンテーション閾値の値は、再構成画像の位相画像又は絶対値の画像、又はこれらの組み合わせのいずれであっても、再構成画像 I_z のヒストグラムのモードと比較される。ヒストグラムのモードは、再構成された画像のヒストグラムの最大値に対応するピクセルの強度のレベルに対応する。大津閾値処理によって決定されたセグメンテーション閾値がヒストグラムのモードの 90% より大きい場合、適用されるセグメンテーション閾値は、ヒストグラムのモードの特定のパーセンテージ、例えば、80 ~ 85% の間に設定される。実際、大津閾値がヒストグラムのモードに近い場合、ノイズのゾーンは 1 つ以上の関心領域であると見なされるため、再構成画像の

50

セグメンテーションは一般に満足できるものではない。これらの条件では、ヒストグラムのモードの80～85%の間にセグメンテーション閾値を課すという事実により、この落とし穴を回避できる。

【0112】

第3の変形例によれば、ステップ130中にセグメンテーション画像 I_z^* の品質Qの基準を決定する。品質の基準がセグメンテーション画像の品質の低下を示している場合、この方法は中断される。

【0113】

品質Qの基準は、ステップ130の過程で実行されたセグメンテーションから生じる関心領域の全体の面積に対応し得る。したがって、前述のようにステップ100、110、120、130を実行する。ステップ130の過程で、セグメンテーションにより決定された関心領域の総面積Aを決定する。セグメンテーションは、例えば、大津閾値処理の適用により実行される。

次に、

- ・総面積Aが定義済みの最大面積 A_{max} を超える場合、ステップ110で取得した画像は無効になる。

- ・総面積Aが最大面積 A_{max} より小さいが近い場合、セグメンテーション画像 I_z^* の信号ノイズ比 $SNR(I_z^*)$ に基づいて、補助基準 Q' を計算する。最大面積に近いということは、 A_{max} は、最大面積と最大面積の80%又は90%などの最大面積 A_{max} の割合との間を意味する。

【0114】

最大面積 A_{max} は、実験的試行に基づいて当業者によって決定され得る。セグメンテーション画像の信号ノイズ比 $SNR(I_z^*)$ は、ステップ130でセグメント化された異なる関心領域ROIの強度 I_{ROI} のレベルに対応し、関心領域外のノイズ N_{out} の推定によって正規化される。強度 I_{ROI} のレベルは、異なる関心領域ROIにおける強度の平均値 μ 又は中央値 med によって推定され得る。関心領域外のノイズ N_{out} は、関心領域ROI外のセグメント化画像 I_z^* の標準偏差 σ によって推定される。

したがって、

【数13】

$$SNR(I_z^*) = \frac{I_{ROI}}{N_{out}}$$

【0115】

次に、そのように定義された信号ノイズ比は、所定の信号ノイズ比閾値 SNR_{min} と比較される。信号ノイズ比 $SNR(I_z^*)$ がこの閾値より大きい場合、セグメンテーション画像は有効であると見なされる。そうでない場合、セグメンテーション画像は無効になる。

【0116】

そのような実施形態によれば、ステップ130の後、セグメンテーション画像 I_z^* に関する少なくとも1つの品質Qの基準を決定する。品質の基準は、ステップ130の過程でセグメント化された全ての関心領域の面積Aと所定の最大面積 A_{max} との間の比較に対応し得る。比較の関数として、セグメンテーション画像は有効化又は無効化される。セグメント化された全ての関心領域の面積Aが、最大面積 A_{max} より小さく、最大面積 A_{max} に近い場合、品質 Q' の補助的な基準が決定される。前に定義したように、セグメンテーション画像の信号ノイズ比 $SNR(I_z^*)$ と最小信号ノイズ比 SNR_{min} との比較が含まれ得る。この比較の関数として、セグメンテーション画像は有効化又は無効化される。

【0117】

この変形例は、赤血球である305個のサンプルに適用された。空の画像、粒子の数が少なすぎる又は多すぎる画像、又は取得中に発生した問題に起因する画像など、特定のケ

10

20

30

40

50

ースに対応する画像を無効化できた。

【0118】

以下に説明する第4の変形例は、特に血液を含むサンプルに関するものである。実験的試行の過程で、発明者は、一般に、対象粒子が赤血球である場合、ステップ140で、Nタイプの関心領域ROI_nと1の区別を提供することが望ましいと考えた。Nは一般に3～5の整数である。ステップ140に関連して説明したように、表記ROI_nは、n個の粒子を含む関心領域ROIに対応することが想起されるであろう。整数Nは、同じ関心領域内の許容可能な赤血球の最大数に対応する。N=5の場合、シングレット(n=1)、ダブレット(n=2)、トリプレット(n=3)、クワダブレット(n=4)及びクイントプレット(n=5)に対応する5種類の関心領域を区別する。サイズが上限閾値S_{max}を超える関心領域は、赤血球のクラスターに対応しないと考えられる。したがって、ステップ140は、最大サイズS_{max}を考慮に入れ、そのサイズが最大サイズS_{max}よりも大きい場合の関心領域の拒否を含む。最大サイズS_{max}は、関心領域ROI_n=Nに対応するサイズより大きいサイズである。最大サイズS_{max}はパラメーター化可能であり、例えば使用する流体チャンバなどの実験条件によって異なる。サイズが最大サイズS_{max}を超える関心領域は拒否される。分析されたサンプルに凝集素を欠く血液が含まれている場合、拒否された関心領域の数は10未満であることが分かっている。拒否された関心領域の数は、以下を比較することで決定できる。

- ・セグメンテーションステップ130の終了時の関心領域の数。
- ・選択ステップ140の終了時の関心領域の数。

【0119】

拒否された関心領域の数が事前定義された許容レベルL_{max}以下、例えば10以下である場合、対象粒子の数が有効化される。許容レベルL_{max}は、実験的学習段階の過程で、当業者によって調整され得る。拒否された関心領域の数が許容レベルL_{max}を超えると、対象粒子の計数が無効になり、この無効が報告される。そのような状況は、例えば、冷たい凝集素を含む血液に対応し得る。これにより、血液には赤血球の多くのクラスターが含まれ、赤血球の最大許容数Nよりも多くの赤血球がある。そのような場合、発明者は、拒否された関心領域の数が数十、又は数百に達し得ることを観察した。拒否された関心領域の数を考えると、赤血球の数は非常に過小評価されている。

【0120】

冷たい凝集素を含む血液を含む6サンプルの実験的試験の過程で、N=5を考慮して、発明者らは、325、379、490、508、327、423にそれぞれ等しい多数の拒否された関心領域を測定した。許容レベルL_{max}を超える拒否された関心領域の数を考えると、赤血球の数は無効になった。

【0121】

そのような実施形態によれば、ステップ130の後、画像のセグメンテーションから生じる関心領域の数を決定する。次に、ステップ140には以下が含まれる。

- ・そのサイズを超えると拒否される関心領域の最大サイズS_{max}を考慮する。
- ・拒否された関心領域の数を決定する。
- ・対象粒子の計数が有効化又は無効化される関数として、許容レベルL_{max}を考慮し、拒否された関心領域の数と許容レベルとを比較する。

【0122】

許容レベルL_{max}は、実験的試行の過程で当業者によって定義される。

【0123】

本発明は、血液中の対象粒子の計数に使用できるが、尿、唾液、精子などの他の体液にも使用できる。また、細菌又は細菌コロニーなどの微生物の定量にも使用できる。生物学又はヘルスケアを含む用途を超えて、本発明は、例えば農業又は工業用流体の検査などの工業分野におけるサンプルの検査又は環境モニタリングに使用され得る。

【図 1 A】

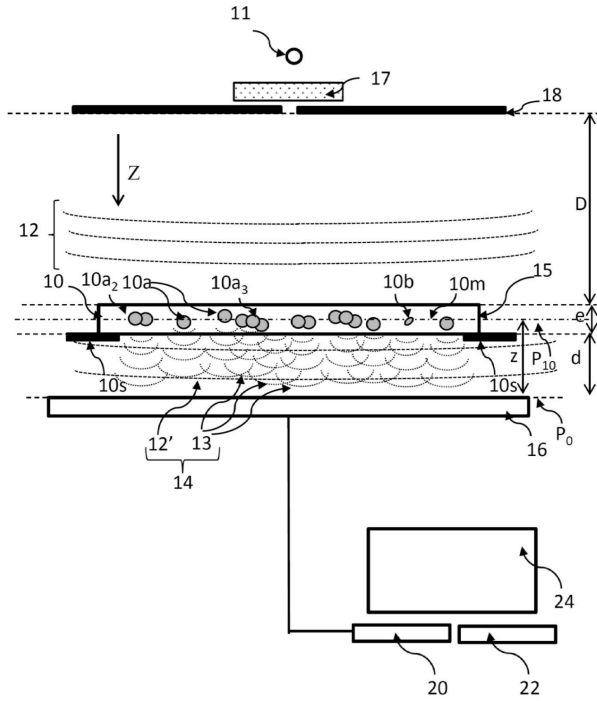


Fig. 1A

【図 1 B】

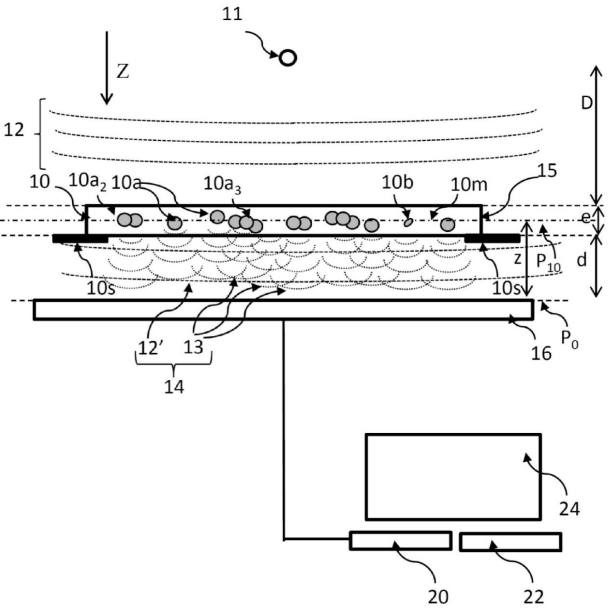


Fig. 1B

【図 2】

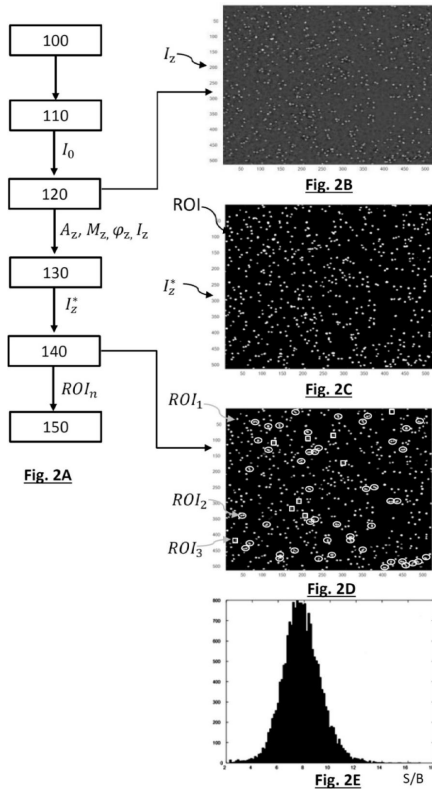


Fig. 2A

【図 3】

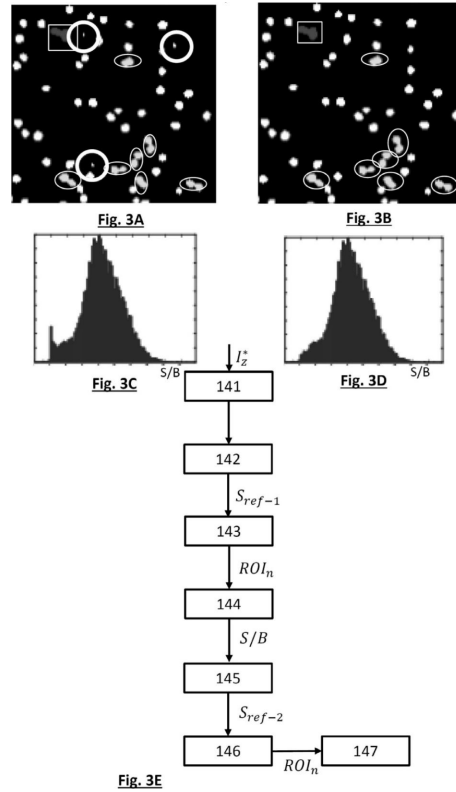


Fig. 3E

【 図 4 】

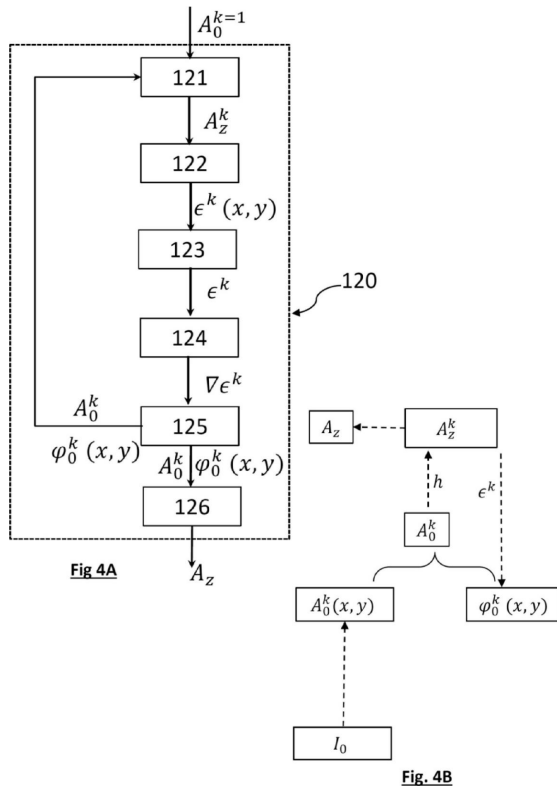


Fig. 4A

Fig. 4B

【 図 5 】

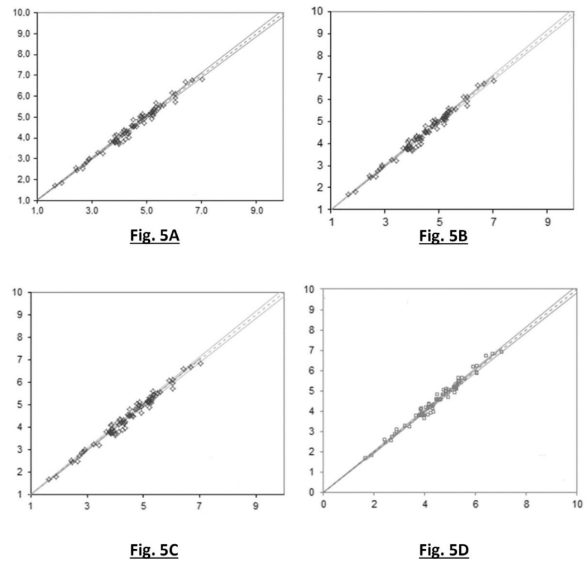


Fig. 5A

Fig. 5B

Fig. 5C

Fig. 5D

【 図 6 】

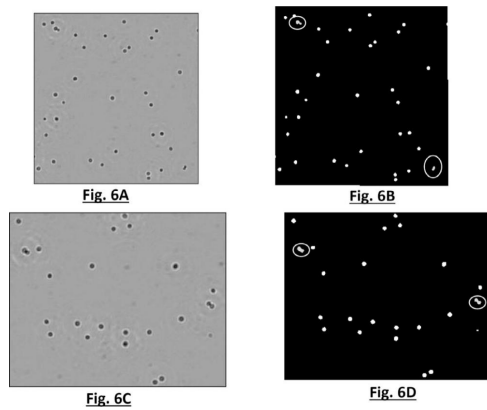


Fig. 6A

Fig. 6B

Fig. 6C

Fig. 6D

【 図 7 】

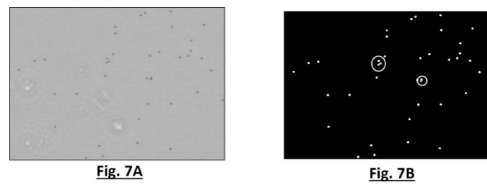


Fig. 7A

Fig. 7B

【 図 8 】

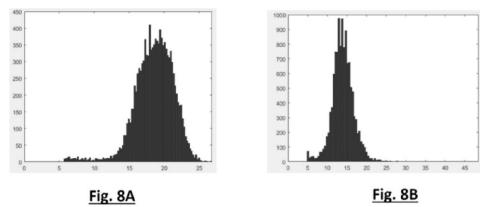


Fig. 8A

Fig. 8B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	G 0 6 M 11/00 D
G 0 3 H	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06
			C 1 2 M 1/34 Z
			G 0 3 H 1/04

(73)特許権者 313015649

ホリバ アベイクス エス アー エス

HORIBA ABX SAS

フランス国, F - 3 4 1 8 4 モンペリエ, セデックス 4, ビービー 7 2 9 0, リュ ドゥ
カデュセ, パルク ユロメドスィーヌParc Euromedecine, Rue du Caducee, BP 7 2 9 0,
F - 3 4 1 8 4 MONTPELLIER cedex 4, France

(74)代理人 100103894

弁理士 家入 健

(72)発明者 ブランディン ピエール

フランス共和国 3 8 5 0 0 クブルヴィー, シェミン デュ グロ ボワ 6 8

(72)発明者 アリ - シェリフ アナイス

フランス共和国 6 3 0 0 0 クレルモン フェラン, リュ アラン シャルティエ 2 5

(72)発明者 グレミオン エステル

フランス共和国 3 8 1 1 0 ラ トゥール デュ パン, リュ デュ 1 1 ノーヴァンブル
1 9 1 8 1 5

(72)発明者 ランボー セバスチャン

フランス共和国 3 4 3 8 0 アルジェリエ, シェミン ドゥ ラ ブラキエーレ 9

(72)発明者 チオーニ オリヴィエ

フランス共和国 3 8 1 0 0 グルノーブル, リュ ジョゼフ ブシャイエ 8

(72)発明者 ダイン オーレリアン

フランス共和国 3 4 0 9 0 モンペリエ, アヴェニュー サン シャルル 2 1 9

審査官 野田 華代

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 0 3 7 9 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 5 1 2 4 9 (W O , A 1)

特開平 8 - 1 3 6 4 3 9 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 3 9 7 6 3 (J P , A)

特表 2 0 1 4 - 5 1 1 4 9 4 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G 0 1 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 1 4

G 0 1 N 3 3 / 4 9

G 0 1 N 2 1 / 1 7

G 0 6 M 1 1 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 6

C 1 2 M 1 / 3 4

G 0 3 H 1 / 0 4