

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-530094

(P2011-530094A)

(43) 公表日 平成23年12月15日(2011.12.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 2 B 21/00 (2006.01)	GO 2 B 21/00	2 G O 5 9
GO 1 N 21/17 (2006.01)	GO 1 N 21/17	2 H O 5 2

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2011-521539 (P2011-521539) (86) (22) 出願日 平成21年7月30日 (2009.7.30) (85) 翻訳文提出日 平成23年3月31日 (2011.3.31) (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/059881 (87) 国際公開番号 W02010/015563 (87) 国際公開日 平成22年2月11日 (2010.2.11) (31) 優先権主張番号 0814297.8 (32) 優先日 平成20年8月5日 (2008.8.5) (33) 優先権主張国 英国 (GB)	(71) 出願人 398048914 ジーイー・ヘルスケア・ユーケイ・リミテッド イギリス国 エイチ ビー 7 9 エヌ エイ バッキンガムシャー リトル チ ョーフォント アメルシャム プレイス (無番地) (74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎 (74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰 (74) 代理人 100080137 弁理士 千葉 昭男 (74) 代理人 100096013 弁理士 富田 博行
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための画像システム及び方法

(57) 【要約】

本発明は、一態様によれば、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための画像システム(100)に関する。画像システム(100)は、光(120a)を生成するための光源(102)と、画像化される細胞を収容するための試料ホルダ(109)と、試料ホルダ(109)内の焦点面への光(120b)を、画像化される細胞に集束するための集光レンズ104と、光(120b)の焦点面を、試料ホルダ(109)に対して移動するための移動メカニズムと、試料ホルダ(109)内の個々の焦点面において複数の画像を捕捉し、且つ、向上された処理画像を提供するために、これらの画像を処理するよう構成された検出システム(112)とを備えている。

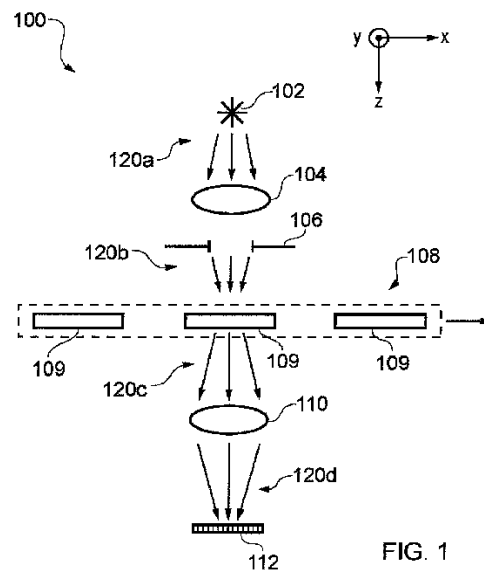


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための画像システム（１００）であって、該システムは、

光（１２０ａ）を生成するための光源（１０２）と、

画像化される細胞を収容するための試料ホルダ（１０９）と、

試料ホルダ（１０９）内の焦点面への光（１２０ｂ）を、画像化される細胞に集束するための集光レンズ（１０４）と、

光（１２０ｂ）の焦点面を、試料ホルダ（１０９）に対して移動するための移動機構と

、

試料ホルダ（１０９）の個々の焦点面における複数の画像を捕捉し、且つ、該複数の画像の暗特性及び明特性の両方を解析することによって、画質が向上された処理画像（ U_r ）を提供するために、該複数の画像を処理するよう構成された検出システム（１１２）とを備えることを特徴とする画像システム。

【請求項 2】

請求項 1 記載の画像システム（１００）において、検出システム（１１２）はさらに、試料ホルダ（１０９）内で最良の焦点を特定し、かつ、最良の焦点の付近で、試料ホルダ（１０９）内の個々の焦点面で複数の画像を捕捉するよう構成されたことを特徴とする画像システム。

【請求項 3】

請求項 2 記載の画像システム（１００）において、該システムはさらに、光源（１０２）と検出システム（１１２）との間に設けられた開口絞り（１０６）を備えていることを特徴とする画像システム。

【請求項 4】

請求項 3 記載の画像システム（１００）において、開口絞り（１０６）のサイズは可変であることを特徴とする画像システム。

【請求項 5】

請求項 1 - 4 いずれかに記載の画像システム（１００）において、複数の画像を処理するステップは、

暗画像（ U_1^{dark} ）を識別するために、複数の画像のそれぞれに、ピクセルバイピクセルの最小化動作を適用するステップと、

中間画像（ U_2^{dark} ）を取得するために、暗画像（ U_1^{dark} ）に非線形トップハット変換を適用するステップと、

画質が向上された出力画像（ U_r ）を生成するために、中間画像（ U_2^{dark} ）を処理するステップと

を含んでいることを特徴とする画像システム。

【請求項 6】

請求項 5 記載の画像システム（１００）において、

暗画像は、

$$U_1^{\text{dark}} = \min_k \{U(Z_k)\}$$

ただし、 $U(Z_k)$ は、 z 平面における k 番目の画像によって定義され、

中間画像は、

$$U_2^{\text{dark}} = \text{NTH}(\text{inv}[U_1^{\text{dark}}]; \quad |.)$$

ただし、NHT は、反転された暗画像に適用された非線形のピクセルのトップハット処理であり、

$\text{inv}[\quad]$ は、画像反転動作である

によって定義され、

画質が向上された出力画像は、

$$U_r = U_T + \{(U_2^{\text{dark}} - U_T) + |U_2^{\text{dark}} - U_T|\} / 2$$

10

20

30

40

50

ただし、 U_T は、所定の閾値画像を定義する
を適用することによって取得される
ことを特徴とする画像システム。

【請求項 7】

請求項 1 - 6 いずれかに記載の画像システム (1 0 0) において、複数の画像を処理する
ステップは、

明画像 (U_1^{bright}) を識別するために、複数の画像のそれぞれに、ピクセルバイピクセルの
最小化動作を適用するステップと、

中間画像 (U_2^{bright}) を取得するために、明画像 (U_1^{bright}) に非線形トップハット変換
を適用するステップと、

画質が向上された出力画像 (U_r) を生成するために、中間画像 (U_2^{bright}) を処理するステ
ップと

を含んでいることを特徴とする画像システム。

【請求項 8】

請求項 7 記載の画像システム (1 0 0) において、

明画像は、

$$U_1^{bright} = \max_k \{U(Z_k)\}$$

ただし、 $U(Z_k)$ は z 平面における k 番目の画像
によって定義され、

中間画像は、

$$U_2^{bright} = NTH(U_1^{bright}; \quad | \cdot)$$

ただし、NHTは明画像に適用された非線形の ピクセルの
トップハット動作である

によって定義され、

画質が向上された出力画像は、

$$U_r = U_T + \{ (U_2^{bright} - U_T) + |U_2^{bright} - U_T| \} / 2$$

ただし、 U_T は、所定の閾値画像を定義する
を適用することによって取得される
ことを特徴とする画像システム。

【請求項 9】

請求項 1 - 8 いずれかに記載の画像システム (1 0 0) において、複数の画像を処理する
ステップはさらに、画質が向上された処理画像 (U_r) に、閾値化を適用するステップを含
んでいることを特徴とする、画像システム。

【請求項 1 0】

請求項 9 記載の画像システム (1 0 0) において、閾値化は、

$$U_r = 1 \quad U_2^{dark} > U_T \text{ 及び } U_2^{bright} > U_T \text{ の場合} \\ = 0 \quad \text{その他の場合}$$

のアルゴリズムに従って、1 又は複数の中間暗画像及び / 又は中間明画像に適用されるこ
とを特徴とする画像システム。

【請求項 1 1】

非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための方法 (2 0 0) であって、方法 (2 0 0) は
、

試料ホルダ (1 0 9) 内の個々の焦点面において、複数の画像を捕捉するステップ (2
0 2) と、

複数の画像の暗特性及び明特性の両方を解析することによって、向上された処理画像 (U_r)
を提供するために、該複数の画像を処理するステップ (2 1 0) と
を含んでいることを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 記載の方法 (2 0 0) において、該方法はさらに、複数の画像を捕捉するステ
ップの前に、開口絞りを設定するステップを含んでいることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 11 又は 12 記載の方法 (200) において、複数の画像を処理するステップ (210) は、

暗画像 (U_1^{dark}) を識別するために、複数の画像のそれぞれに、ピクセルバイピクセルの最小化動作を適用するステップと、

中間画像 (U_2^{dark}) を取得するために、暗画像 (U_1^{dark}) に非線形トップハット変換を適用するステップと、

画質が向上された出力画像 (U_r) を生成するために、中間画像 (U_2^{dark}) を処理するステップと

を含んでいることを特徴とする方法。

10

【請求項 14】

請求項 13 記載の方法 (200) において、

暗画像は、

$$U_1^{\text{dark}} = \min_k \{U(Z_k)\}$$

ただし、 $U(Z_k)$ は、 z 平面における k 番目の画像によって定義され、

中間画像は、

$$U_2^{\text{dark}} = \text{NTH}(\text{inv}[U_1^{\text{dark}}]; \quad |.)$$

ただし、NHT は、反転された暗画像に適用された非線形のピクセルのトップハット処理であり、

20

$\text{inv}[\quad]$ は、画像反転動作である

によって定義され、

画質が向上された出力画像は、

$$U_r = U_T + \{(U_2^{\text{dark}} - U_T) + |U_2^{\text{dark}} - U_T|\} / 2$$

ただし、 U_T は、所定の閾値画像を定義する
を適用することによって取得される
ことを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 11 - 14 いずれかに記載の方法 (200) において、複数の画像を処理するステップ (210) は、

30

明画像 (U_1^{bright}) を識別するために、複数の画像のそれぞれに、ピクセルバイピクセルの最小化動作を適用するステップと、

中間画像 (U_2^{bright}) を取得するために、明画像 (U_1^{bright}) に非線形トップハット変換を適用するステップと、

画質が向上された出力画像 (U_r) を生成するために、中間画像 (U_2^{bright}) を処理するステップと

を含んでいることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 記載の方法 (200) において、

明画像は、

$$U_1^{\text{bright}} = \max_k \{U(Z_k)\}$$

ただし、 $U(Z_k)$ は z 平面における k 番目の画像によって定義され、

中間画像は、

$$U_2^{\text{bright}} = \text{NTH}(U_1^{\text{bright}}; \quad |.)$$

ただし、NHT は明画像に適用された非線形のピクセルの
トップハット動作である

によって定義され、

画質が向上された出力画像は、

$$U_r = U_T + \{(U_2^{\text{bright}} - U_T) + |U_2^{\text{bright}} - U_T|\} / 2$$

50

ただし、 U_T は、所定の閾値画像を定義する
を適用することによって取得される
ことを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 11 - 16 いずれかに記載の方法 (200) において、複数の画像を処理するステップ (210) はさらに、向上された処理画像 (U_r) に、閾値化を適用するステップを含んでいることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 記載の方法 (200) において、閾値化は、

$$U_r = \begin{cases} 1 & U_2^{\text{dark}} > U_T \text{ 及び } U_2^{\text{bright}} > U_T \text{ の場合} \\ 0 & \text{その他の場合} \end{cases}$$

10

のアルゴリズムに従って、1 又は複数の中間暗画像及び / 又は中間明画像に適用されることを特徴とする方法。

【請求項 19】

コンピュータプログラム製品であって、請求項 11 - 18 いずれかに記載の方法を実行する画像システムを構成するよう動作可能なコンピュータプログラム製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、顕微鏡法に関し、特に、画像コントラストを向上させるための顕微鏡画像の画像処理に関する。

20

【背景技術】

【0002】

生体細胞を画像化するための技術としての顕微鏡法は、何百年も用いられており、その間に、多くの技術が開発されて、さまざまな顕微鏡を使用して取得された生体細胞の画像の質を向上させてきた。

歴史的に、顕微鏡技術については、画像を向上させるための複雑な光学ベースのソリューション [1 ~ 6] から、画像を向上させるために、取得された画像に種々の画像処理を技術 [7 ~ 9] を適用するような最近の発展へと、進化が見られる。

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、現代光学及び画像処理技術の組み合わせによって、顕微鏡画像の向上が可能になってはきたが、従来の技術が画像を向上させるための最適なものとはいえない応用も、依然として存在している。

例えば、種々の応用においては、透過光を用いた非染色細胞の可視化が、画像化の望ましい方法であると考えられている。しかし、細胞が周囲の媒体とのコントラストを欠いている場合には、細胞の画像化が難しい。さらには、蛍光マーカ [6, 8] の使用等の、この問題に対処するために用いられるある種の従来技術を使用することは、ハイスループットスクリーニング (HTS) 顕微鏡解析等の種々の応用にはあまり適していない。なぜなら、これらの従来技術では、生体細胞を傷つけるか、又は生体細胞の中で起こっている生化学プロセスに影響を与える可能性のある、化学造影剤の使用を必要とするからである。

40

【0004】

本発明のさまざまな態様及び実施形態は、上述した従来の顕微鏡システムの欠点を念頭において開発されたものである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第 1 の態様では、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための画像システムが提供される。この画像システムは、光を発生するための光源と、画像化される細胞を収容するための試料ホルダと、試料ホルダ内の焦点面への光を、画像化される細胞に集束する

50

ための集光レンズと、試料ホルダに対して光の焦点面を移動するための移動メカニズムと、最良の焦点に近い試料ホルダ内の各焦点面で、複数の画像を捕捉するよう構成された検出システムと、を備えている。

【0006】

本発明の第2の態様では、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための方法が提供される。該方法は、試料ホルダ内の各焦点面で複数の画像を捕捉するステップと、向上された処理画像を提供するために、該複数の画像を処理するステップとを含んでいる。

【0007】

このような画像システム及び方法は、細胞の画像化のための画像の捕捉及び向上処理の自動化を可能にする。これにより、非熟練者が、本発明の態様を利用して、ハイスループットスクリーニング解析において、潜在的関心のある効果を示している細胞の変化を、より正確に識別することができることになる。例えば、さまざまなタイプの細胞に効果のある、潜在的に有用な薬剤化合物が、これらの細胞を自動的に画像化することにより特定することができる。さらに、これらの細胞の体内を正確に画像化することができるので、例えば、向上された処理画像を捕捉するために、蛍光マーカ又は放射性アイソトープを用いて細胞の染色又はタグ付けをする必要がない。

10

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本発明の一実施形態に係る、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための画像システムを示す図である。

20

【図2】本発明の一実施形態に係る、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための方法を示すフロー図である。

【図3】本発明のさまざまな実施形態で用いる光学システムの一部を示す図である。

【図4】細胞のレンズ化(cell lensing)によってもたらされる暗コントラストを示す図である。

【図5】本発明に係る方法によって取得された原画像及び処理画像を示す図である。

【図6】本発明に係る方法によって取得された図5の画像について、処理画像に閾値フィルタを適用した画像を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

30

図1は、本発明の一実施形態に係る、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための画像システム100を示している。明確にするために概略的に示した画像システム100は、光120aを生成するための光源102を備えている。光源102は、明視野ケーラ照明(bright-field Kohler illumination)を提供する。

【0010】

光120aは、集光レンズ104によって試料ホルダ109上に集束される。試料ホルダ109は、画像化される細胞を収容するために用いられ、集光レンズ104は、光120bを試料ホルダ109内の焦点面に集束する。1又は複数の試料ホルダ109は、試料ホルダトレイ108内にマトリックス状に提供される。例えば、試料ホルダは、数多くの試料ホルダを有するコンシューマブルスポットプレート(consumable spot plate)上のスポットとして提供され、それぞれのスポットには、特定の1又は複数の生化学反応を識別するのに適した1又は複数の細胞型(cell type)が提供される。

40

【0011】

画像システム100はさらに、検出システム112及び移動メカニズム(不図示)を備えている。移動メカニズムは、試料ホルダ109に対して光120bの焦点を移動する(例:試料ホルダトレイ108の深さ方向すなわちz方向に移動する)よう構成される。これにより、複数の画像が、さまざまな試料ホルダ109内からの複数の個別の焦点面(z方向と垂直の)で捕捉される。また、移動メカニズムは、例えば、複数の試料ホルダ109に焦点を合わせるために、図1に示すように、試料ホルダトレイ108を種々のx-y平面において、1次元又は2次元のいずれかにおいて移動するよう動作する。

50

【 0 0 1 2 】

検出システム 1 1 2 は、試料ホルダ 1 0 9 内の最良の焦点を特定するために用いられる。検出システム 1 1 2 は、試料ホルダ 1 0 9 内の（例：最良の焦点の近くで）個別の焦点面（例：z 位置）で複数の画像を捕捉して、該複数の画像を処理して向上された処理画像を提供するよう動作する。このような機能を実施するための種々の方法を、以下で詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】

開口絞り 1 0 6 は、光源 1 0 2 と検出システム 1 1 2 との間に設けられるが、そのサイズは可変である。例えば、多様な異なるサイズの可動絞りを回転して位置させるか、又は連続的に変化する虹彩型絞りが設けられてもよい。画像コントラストは、開口絞り 1 0 6 の絞りの設定を変更することによって制御することができる。

【 0 0 1 4 】

開口絞り 1 0 6 を通過した集光（集光された光）1 2 0 b は、透過画像モードで試料ホルダトレイ 1 0 8 を通過する。各試料ホルダ 1 0 9 に保持された任意の細胞に関する画像情報によって変調された、発生光(emergent light) 1 2 0 c は、対物レンズ 1 1 0 によって集められ、検出システム 1 1 2 上に集光される(1 2 0 d)。

【 0 0 1 5 】

変形形態の 1 つでは、複数の画像の処理がプロセッサ（不図示）によって実行される。プロセッサは、検出システム 1 1 2 を制御して、検出システムによって取得された画像を捕捉、記憶、かつ処理するよう動作する。さらに、プロセッサは、移動メカニズムを制御して、試料ホルダ 1 0 9 に対する光源 1 0 2 の焦点（すなわち、z 方向である深さ方向の位置）を移動して、かつオプションで最良の焦点（すなわち、最適 z 位置設定）を特定するよう構成される。プロセッサは、例えば、これらのタスクを実行するよう適切にプログラムされた、コンピュータシステムの一部として提供される。

【 0 0 1 6 】

プロセッサは、ピクセルバイピクセル（画素毎）の最小化動作を、複数の画像のそれぞれに適用することによって、いわゆる暗画像である U_1 を識別する。それから非線形トップハット（NTH: non-linear top-hat）変換が暗画像 U_1 に適用されることにより、中間画像 U_2 が取得され、そして中間画像 U_2 が処理されて、向上された出力画像 U_r が生成される。

NTHセグメンテーションの基準は、以下に示すピクセル単位の画像変換である。

$$NTH(U; |K) = U \cdot \langle U \rangle / (\langle U \rangle_K)^2 \quad (1)$$

ただし、 $K > 1$

【 0 0 1 7 】

スケールパラメータ（検出スケール）は、関心対象の物体のサイズに関連している。上記した式（1）によって示された変換は、次の局所処理に関する発見的数式（heuristic formula）、すなわち「あるピクセルが明(bright)であり、ピクセルのすぐ付近（サイズ）が明であり、かつピクセルから離れた付近(K サイズ）が薄暗(dim)であれば、そのピクセルは画質向上処理される」を実行する。

【 0 0 1 8 】

多様な実施形態において、暗画像は、

$$U_1 = \min_k \{U(Z_k)\} \quad (2)$$

によって定義される。ここで、 $U(Z_k)$ は z 平面における k 番目の画像である。

また、中間画像は、

$$U_2 = NTH(inv[U_1]; |.) \quad (3)$$

によって定義される。ここで、NHTは、反転された暗画像に適用された、非線形のピクセルサイズ（例： $m=9$ ）のトップハット動作であり、 $inv[]$ は、画像反転動作である。セグメント化された出力画像 U_r は、以下の変換を適用することによって取得される。

$$U_r = U_T + \{(U_2 - U_T) + |U_2 - U_T|\} / 2 \quad (4)$$

ここで、 U_T は閾値画像を定義している。例えば、いくつかの実施形態では、全てのピクセル値に関して、 U_T は、 $U_T = 1$ に設定されている。

10

20

30

40

50

【0019】

従来の顕微鏡法では、コントラストはデフォーカス量に比例している。しかし、明特性情報を除去して暗特性情報を用いることにより、細胞のレンズ化効果(cell lensing effect)を用いて画像コントラストを向上することができることを示すために、本出願人は、ある種の細胞はレンズの役割を果たすという理論を応用している。このクライテリアが満足されると、以下で概説するように、さまざまな作用効果が得られる。このように、本発明に係るさまざまな実施形態において、以下にさらに詳述するように、明特性及び/又は暗特性の情報を、可能であれば組み合わせて、用いることが可能である。

【0020】

細胞のレンズ化効果を利用した種々のシステム及び方法を、単純なやり方で細胞のコントラスト比を最適化するために用いることができる。さらに、良好なコントラスト画像を、比較的厚めの試料(たとえば、試料の厚みが、画像化される細胞の平均的な細胞直径である約2x、5x、10x、20x、50x、100x、等よりも大きい場合)から取得することができ、かつ、マークのないすなわちタグのない、光学的コントラストの低い細胞を用いることができる。例えば、レンズ化効果を生じさせるのに適した細胞は、ある種の血管新生細胞、血液細胞、精子細胞、各膜実質細胞、幹細胞、又は通常の正曲率を有する袋状の種々の他の細胞等、ほぼレンズ状の形状をしている。

【0021】

さらに、さまざまな細胞核及び細胞体が画像化され、かつ/又は、多数のz平面セクションが、簡単に自動的又は半自動的に解析できるように、単一の画像にまとめられる。このようにして、関心対象の種々の細胞特性の迅速かつ正確な識別がもたらされるので、本発明のさまざまな実施形態は、HTSを含むアプリケーションに特に適している。

【0022】

図2は、本発明の種々の様態及び実施形態に係る、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるための方法200を示している。方法200は、画質が向上した処理画像を提供するために、一連の画像を捕捉し処理するステップを含み、該方法は、軸方向のデフォーカシングを用いて、z方向において複数の画像を取得することにより、非染色細胞の顕微鏡画像を向上させるために用いられる。

【0023】

ステップ202では、画像が第1の焦点面で取得される。例えば、この画像は、上述の図1に関して説明されたタイプの画像システムを使用して取得される。オプション的に、例えば画像のコントラストを向上させるために、画像を取得する前段で開口絞りを設定する追加ステップを実行してもよい。

画像が取得されると、ステップ204で画像は記憶される。そしてステップ206で、さらに追加の画像を捕捉する必要があるかどうかが決定的される。

【0024】

追加的な画像を捕捉する必要がある場合は、試料内の焦点面の位置を修正するために、ステップ208でZステージの移動(z方向へのステージの移動)がなされる。次に、方法200はステップ202に戻って、追加的な画像が捕捉される。それから、ステップ204で追加的な画像が記憶されて、決定ステップ206は、一連のk個の画像が取得されるまで、zステージの移動、画像の捕捉、及び記憶のステップを繰り返す(ここでkは2以上の整数である)。複数のk個の画像が取得されると、方法200は処理ステップ210に進む。処理ステップ210は、暗画像 U_1 を識別するために、ピクセルバイピクセルの最小化動作を、複数の画像のそれぞれに適用するステップと、次に中間画像 U_2 を取得するために、反転された暗画像 U_1 に非線形トップハット変換を適用するステップと、最後にセグメント化された出力画像 U_r を生成するために、中間画像 U_2 を処理するステップと、を含んでいる。種々の実施形態では、 U_1 、 U_2 、及び U_r の値は、上述で定義した式(2)~(4)のそれぞれに従って決定される。

【0025】

図3は、本発明のさまざまな実施形態での使用に最適なシステムの一部を示している。

この最適なシステムの一部は、検出システム 1 1 2 の一部を形成するカメラ上に集光するための上側対物レンズ 1 1 0 と、画像システム 1 0 0 の最適中央軸(central optical axis)である z 軸に沿ったさまざまな位置にある、直径 D_{cell} のレンズ状細胞 1 5 0 を示している。

【 0 0 2 6 】

図 3 の左側の図では、細胞 1 5 0 は、 z 軸に沿って対物レンズ 1 1 0 から離れる方向へ、対物レンズ 1 1 0 の焦点面 F から距離 P_{cell} ずれた位置にある。これによって、カメラで暗画像（図 3 の左下に図示）が生成される。

図 3 の右側の図では、細胞 1 5 0 は、 z 軸に沿って対物レンズ 1 1 0 に向かう方向へ、対物レンズ 1 1 0 の焦点面 F から距離 P_{cell} ずれた位置にある。これによって、カメラで明画像（図 3 の右下に図示）が生成される。

10

【 0 0 2 7 】

図 3 の光学を解析すると、試料内の非均一 L の特性スケールが、入射の EM 放射の波長に匹敵する状態（すなわち、 $L \sim \lambda$ ）では、結果として生じる（相互作用の）フィールドは回折によって決定される。一方、 $L \ll \lambda$ では、屈折によって支配的な影響を受けるので、相互作用のフィールドは幾何光学的制限[9]が考慮される。

また一方で、生物細胞は、細胞質基質及び別の生物物質によって満たされたミクロンサイズの袋(sack)であることができる。したがって、幾何光学の観点からは、細胞の大多数が凸レンズに似た形状を有している。

【 0 0 2 8 】

20

そこで、以下の番号を付した種々の考察及び予測を解析に使用する。

1．試料内の細胞は、 z 軸に沿って分散される（例えば、厚い試料内で）ので、全ての細胞に同時に焦点が合うわけではない。従って、試料の厚みに渡って全体から現在の情報を収集するために、複数の z 平面が画像化される。

2．明視野ケラ照明モードが使用される。対物及び集光の開口数は、それぞれ NA_0 及び NA_c であり、対物レンズの開き角 $\theta = \arcsin(NA_0)$ である。

3．細胞は、周囲の媒体 n_m の屈折率とは若干異なる、平均的な屈折率 n_c の物質からなる、直径 D_{cell} 及び等しい曲率半径 $R_{c, cell}$ （ここで、 $R_{c, cell} = D_{cell} / 2$ ）をもつ正（凸）のミクロンサイズの薄いレンズと表現できる。その差異は、 $|n - n_m| = |n_c - n_m| \approx 0.02$ 程度である。細胞が浸されている媒体は、均一かつ透明であり、なおかつ $n_c > n_m$ であると考えられている。

30

【 0 0 2 9 】

4．物体の焦点面に正確に配置されると、該細胞は、なんらかの入射光を散乱するので、明るい背景でわずかに暗めに見える。細胞による散乱は、内部の非均一性（横方向の散乱 side directional lobes of scattering）上の回折によって生じ、かつ入射光強度の数パーセントを構成している。

5．細胞は、物体の開口絞りの閉塞に対応した距離で、物体空間の焦点面の直前に配置されると（図 3 の左側にあるように）、主にレンズ化効果によって効果的な集光開口(effective light gathering aperture)が低減されることで、ピントがずれて見え、かつ明るい背景で暗くみえる。

40

6．同様に、細胞は、物体の開口絞りの閉塞に対応した距離で、物体により近くに焦点面の直後に配置されると（図 3 の右側にあるように）、集光開口が増大することによって、細胞はピントがずれて見えるが、暗い背景でより明るく見える。しかしながら、これは $NA_c > NA_0$ である場合にのみ生じる。なぜなら、この場合は、前述した光強度の利得（ゲイン）が、 $\theta_{cell, bright}$ よりも大きい θ_{cell} の角度で集束する光線によって制限されるからである。

【 0 0 3 0 】

7．細胞のレンズ化効果によってもたらされるコントラストは、開口角 θ_{cell} の比によって図 3 に示されているように推定することができる。この比は、「細胞」対「非細胞」の強度比によるものである。

50

$$I_{Cell} / I_{NoCell} = \frac{Cell}{\{ \arctg[\tg() \pm n / n_m \cdot D_{Cell} / R_{c,Cell}] \}} \quad (5)$$

式(5)は、レンズの式及びレンズメーカの式に直接従う。(+)及び(-)の記号は、「明」視野及び「暗」視野の場合に対応する。 $|n|$ が小さい場合、 $\tg()$ 付近の(4)におけるアークタンジェントのテーラ展開は、

$$I_{Cell} / I_{NoCell} = \frac{Cell}{1 + 1 / \arcsin(NA_0) \cdot n / n_m \cdot D_{Cell} / R_{c,Cell} \cdot (1 - NA_0^2)} \quad (6)$$

である。なお、第2項のモジュールは、 NA_0 の減少関数である。言い換えると、レンズ化によって生じたコントラストは、開口絞りの設定が低いほど大きくなる。この特性は、図4に示されたプロットによって例示されている。

【0031】

上述の考察を考慮すると、以下に示すコントラスト向上のための単純なストラテジが可能である。

a) 顕微鏡を $NA_C > NA_0$ に設定する。

b) 薄い試料に関しては、2つの画像を捕捉する。その1つは焦点の合った画像であり、もう1つは、最良の焦点面に対して物体空間内の距離 $P_{Cell} = D_{Cell} / 2 \tg()$ での画像である。

c) 厚い試料に関しては、関連レンジにおいて複数の z 平面から z の間隔で画像を捕捉する。およそ $z = P_{Cell} / 2 = D_{Cell} / 4 \tg()$ である。

d) 例えば、本明細書で言及された技術を用いることにより、捕捉された z 面の画像における細胞の暗特性(dark signatures)を探す。

【0032】

他に可能なことは、 $NA_C > NA_0$ で「明化」現象を利用することである。しかし、この効果はいささかはっきりしないと考えられている(分散によるコントラストの余剰で蓄積されない)。「明化」技術の利用は、a) 顕微鏡を $NA_C > NA_0$ に設定する。d) 細胞の明特性(bright signatures)を探すという点を除けば、上述された暗特性技術と類似している。

【0033】

本明細書に記載された手順により、厚い試料の内部の異なる深度から情報を収集するために使用される、「投影」画像が作成される。

この態様によれば、この手順は、例えば、次の式(7)及び式(8)を用いて定義されるもの等のような蛍光モダリティ(fluorescence modality)のために適用される、既知の「最良の焦点」(「拡張焦点(extended focus)」)のアルゴリズムに類似している(かつ、例えば同一のGUIを用いることができる)。

【0034】

まず、ピクセル方向の変換のFocus Measure[J]は、

$$\text{FocusMeasure}[J] = \langle (J - \langle J \rangle)^2 \rangle \quad (7)$$

$$\text{FocusMeasure}[J] = \langle J^2 \rangle \quad (8)$$

のいずれかで規定することができる。そして、N個の画像 J_i のそれぞれに関し、 $i=1, \dots, N$ で、FocusMeasure[J_i]が算出される。

【0035】

本発明のさまざまな実施形態で用いられる所定の最良の焦点アルゴリズムを、式(9)~(14)と関連して以下に簡潔に述べるが、これらのアルゴリズムは、単に非制限的な例示として提供されている。

画像合成の重み付け方法(image combination weighting method)に関しては、その計算結果resultは、合焦測定値(focus measure)を有する画像の加重和である。

$$w_i = (\text{FocusMeasure}[J_i])^p / (\text{FocusMeasure}[J_k])^p \quad (9)$$

ただし、 $p \geq 1$

は、 $k=1, 2, \dots, N$ についての加算

$$\text{result} = \sum_i w_i J_i \quad (10)$$

10

20

30

40

50

ただし、 $i = 1, 2, \dots, N$ についての加算

【 0 0 3 6 】

あるいは、ダイレクト値方法を用いた画像の合成に関しては、複数の画像における各ピクセル (x, y) に関し、焦点に最も近い $J_{k(x, y)}$ における画像が探し出されて、ピクセル値 $J_{k(x, y)}(x, y)$ が結果 $result$ として選択される。

$$k(x, y) = \arg \max_i \{ \text{FocusMeasure}[J_i](x, y) \} \quad (11)$$

$$result(x, y) = J_{k(x, y)}(x, y) \quad (12)$$

【 0 0 3 7 】

なお、両方のケースにおいて、画像 J は、 ε サイズのスクエアマスク $1Box(\varepsilon)$ で平均化される。

【 数 1 】

$$\langle J \rangle_\varepsilon = J \otimes 1Box(\varepsilon) \quad (13)$$

そして、ガウス導関数(ε サイズ)の法(modulus)の2乗は、以下の式で表される。

【 数 2 】

$$(\nabla_\sigma J)^2 = \left[\frac{\partial}{\partial x} J \otimes_x G(0, \sigma) \right]^2 + \left[\frac{\partial}{\partial y} J \otimes_y G(0, \sigma) \right]^2 \quad (14)$$

【 0 0 3 8 】

図5は、原画像502及び504並びに、本発明に係る方法によって取得された処理画像512及び514である。上段の原画像502は、非刺激の血管新生細胞を含む試料から抽出されている。下段の原画像504は、血管内非細胞増殖因子(VEGF)及び腫瘍壊死因子アルファ(TNF)によって刺激された血管新生細胞を含む試料に関するものである。

【 0 0 3 9 】

この実験では、対物の開口は $NA_0 = 0.1$ (Nikon 4x, 焦点深度は約 $50 \mu m$)であり、 z は $z = 50 \mu m$ に保たれていた。4つの明視野像 $U(Z_k)$ は、最良の焦点の付近で、 $Z_k = Z_0 + k \cdot \Delta z$ で取得された($k = 1, 2, 3, 4$)。画像の分解能は、視野 $2.78 \times 2.08 mm$ で、 $2 \mu m$ /ピクセルであった。

【 0 0 4 0 】

図5に示された、それぞれの画質向上された処理画像 U_r である512及び514を取得するために画像 $U(Z_k)$ を合成するには、まず、単純なピクセルバイピクセルの最小動作(minimum operation)が $U(Z_k)$ に適用される。次に、非線形の ε サイズのトップハット変換が、反転された最小画像に適用されて、それから信号の閾値が $U = U_T$ に設定された。すなわち、

$$i) U_1 = \min_k \{ U(Z_k) \}$$

$$ii) U_2 = NTH(inv[U_1]; \varepsilon)$$

$$iii) U_r = U_T + \{ (U_2 - U_T) + |U_2 - U_T| \} / 2$$

である。ここで $inv[\]$ は画像反転動作である。非線形トップハット変換は、典型的な細胞サイズに近い、特徴的なサイズによってパラメータ化される。非線形トップハット変換は、この場合にはシェーディングエリミネーション(shading elimination)のために適用された。なぜなら、強度比に関連する式i)は、局所的な推定のみを出すものだからである。

【 0 0 4 1 】

このようにして、 $NA_C < NA_0$ で、細胞のレンズ化効果によって画像内に存在する暗特性を検出するよう設計された、本発明のさまざまな態様に係るこの方法の応用によって、画質が向上されたグレースケール処理画像512及び514が生成される。

【 0 0 4 2 】

しかしながら、本発明のさまざまな態様及び実施形態は、 $NA_C > NA_0$ での明化現象を利用してもよい。例えば、明特性及び暗特性の両方の解析は、以下のように組み合わせることもできる。

$$i) U_1^{dark} = \min_k \{ U(Z_k) \} \text{ 及び}$$

10

20

30

40

50

- $U_1^{\text{bright}} = \max_k \{U(Z_k)\}$
 ii) $U_2^{\text{dark}} = \text{NTH}(\text{inv}[U_1^{\text{dark}}]; \quad |.)$ 及び
 $U_2^{\text{bright}} = \text{NTH}(U_1^{\text{bright}}; \quad |.)$
 iii) $U_r = 1$ $U_2^{\text{dark}} > U_T$ 及び $U_2^{\text{bright}} > U_T$ の場合
 $= 0$ その他の場合

【0043】

このような技術を適用する際には、同一の細胞が、 $NA_C < NA_O$ において試料化された時の暗特性、及び $NA_C > NA_O$ において試料化された時の明特性によって、Z平面上に充分に表現されるようにすることが望ましい。

【0044】

図6は、図5の原画像502及び504と、それらの処理画像512及び514に閾値フィルタが適用されて生成された閾値処理後の画像522及び524である。画像512及び514は、閾値が $U=1.06$ に設定され、サイズでふるいにかけられ、それから2ピクセルサイズのマスクを用いて、白黒化(black/white-closed)される。この処理のためのトップハットの特徴的なサイズは、 $=9$ であった。

したがって、閾値処理後の画像522及び524は、

$$\begin{aligned}
 U_r &= 1 & U_2 > U_T \text{ の場合} \\
 &= 0 & \text{その他の場合}
 \end{aligned}$$

にyori得られたバイナリ(すなわち白黒)画像 U_r である。

【0045】

図5及び図6の両方において、種々の画像特性が、本発明の態様及び実施形態に係る種々の技術の適用によって向上されていることが明らかである。

【0046】

本発明と関連してさまざまな技術を論述したが、種々の関数はコンピュータプログラム製品を用いて実施できることが、当業者には明らかであろう。例えば、本発明の実施形態に係るさまざまなアルゴリズムの、1又は複数の方法ステップを実施する画像システムを、構成するよう動作可能なコンピュータプログラム製品が提供される。

【0047】

さまざまな実施形態は、1又は複数のソフトウェア、ハードウェア、及び/又はファームウェアの部品も含んでいる。例えば、従来の画像システムは、本発明によってその機能性を向上するために、例えばインターネットを介してこれらのシステムに送信された、ソフトウェア部品を用いることにより、アップグレードされる。

【0048】

本発明のさまざまな実施形態では、複数の画像を処理するステップは、試料内の細胞による光のデフォーカシングによって生じる、複数の画像のそれぞれの間の強度変化を識別するステップと、暗強度又は光場強度の変更を探索するステップと、を含んでいる。このような実施形態の利点の1つは、自動又は非自動のいずれかで、サイズによる細胞の検出を迅速に実行することを可能にすることである。例えば、あらかじめ特性が知られている特定の細胞が存在するか存在しないかを表す、イエス/ノー、の回答を速やかに得ることができる。

【0049】

本発明のいくつかの態様及び実施形態は、周囲との屈折率のミスマッチが少ない、非染色細胞を用いる。ハイスループットスクリーニング(例:薬剤のスクリーニングのための)も、厚い試料及び/又は薄い試料を用いて実行することができる。

【0050】

本発明のさまざまな態様及び実施形態は、例えば、英国バッキンガムシャー、リトル・チャルフォントのGEヘルスケアライフサイエンスによって市販されているGE IN Cell Analyzer 1000(商標)等において、自動顕微鏡の一部としても使用される。このような自動顕微鏡は使用が容易であり、例えば複数の細胞試料を解析するために、非熟練者であるユーザがこれを使用することができる。このような自動顕微鏡に本発明のさまざまな態様及

10

20

30

40

50

び実施形態を追加することによって、使用をさらに容易にし、かつ、その過程で向上された出力画像を提供することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明を、さまざまな態様及び実施形態によって説明したが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではなく、本出願人は、これらの変更形態及び同等物の全てもまた、添付した請求項の範囲内にあるとしている。

【 0 0 5 2 】

(参考文献)

1. M. Sernetz, A. Thaer, Immersion Refractometry on Living Cells with the Method of Refractive Index Gradient, Fresenius' Zeitschrift fur Analytische Chemie 252 (2-3), pp. 90-93, 1970 10
2. G. A. Jamjoom, Dark-field Microscopy for Detection of Malaria in Unstained Blood Films, Journal of Clinical Microbiology, 17(5), pp. 717-721, 1983
3. H. B. Steen, Simultaneous Separate Detection of Low Angle and Large Angle Light Scattering in an Arc Lamp-based Flow Cytometer, Cytometry: The Journal of the Society for Analytical Cytology, 7(5), pp. 445-449, 1986
4. 米国特許第4,577,964 (Hansen)
5. 米国特許第4,601,551 (Pettingell)
6. 米国特許第4,915,501 (Steen)
7. D. Ott, Optical Scatter Imaging Tracks Cell Changes, Biophotonics International, 9(9), pp. 23-24, 2002 20
8. 米国特許出願公開2006/0166305 (Jiang)
9. J. Degerman, E. Winterfors, J. Faijerson and T. Gustavsson, A Computational 3D Model for Reconstruction of Neural Stem Cells in Bright-Field Time-Lapse Microscopy, Proceedings of SPIE The International Society for Optical Engineering, IS & T Electronic Imaging, vol. 6498, pp. 469-483, 2007
10. M. W. Davidson et al, Darkfield Illumination, FSU primer, <http://microscopy.fsu.edu/primer/techniques/darkfield.html>

認められる場合は、上記の参考文献の内容全体を、参照によって本出願に援用する。

【図 1】

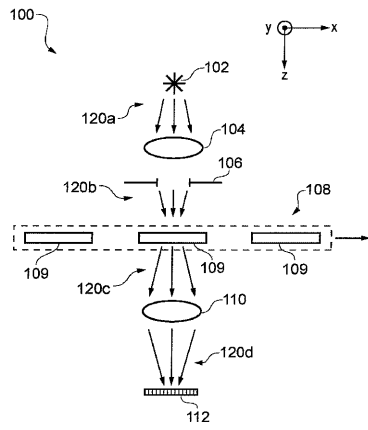
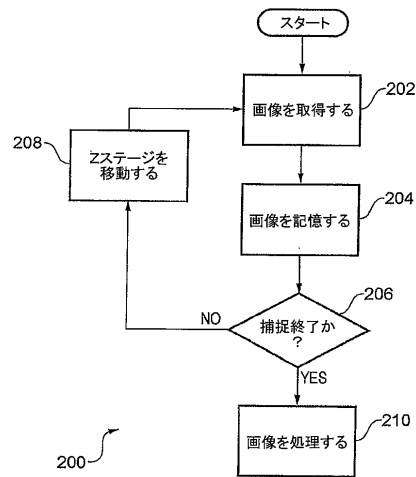
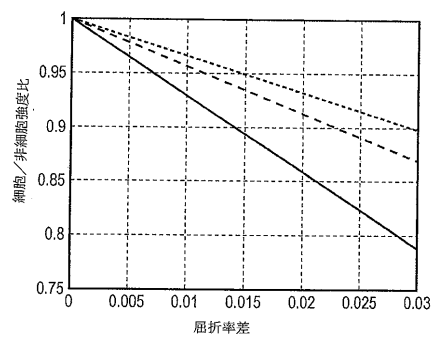


FIG. 1

【図 2】



【図 4】



【図 5】

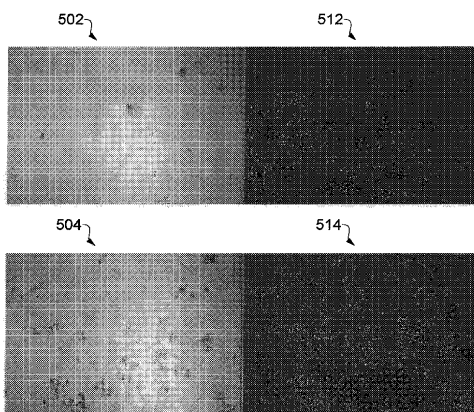


FIG. 5

【図 6】

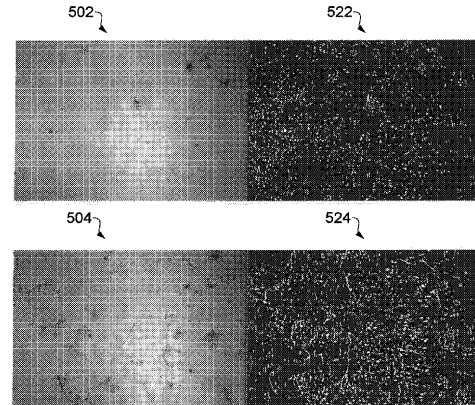
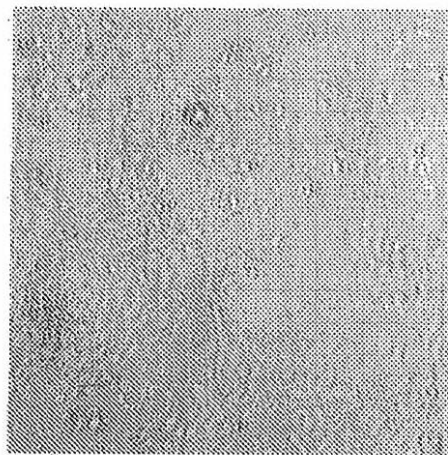
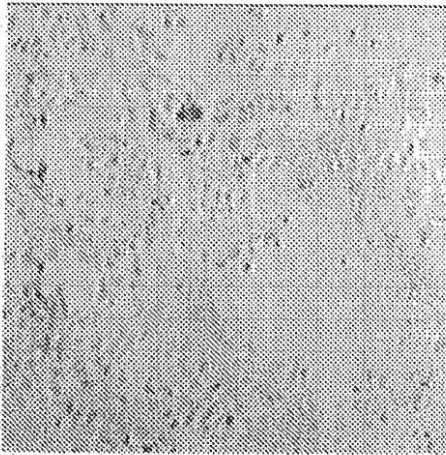
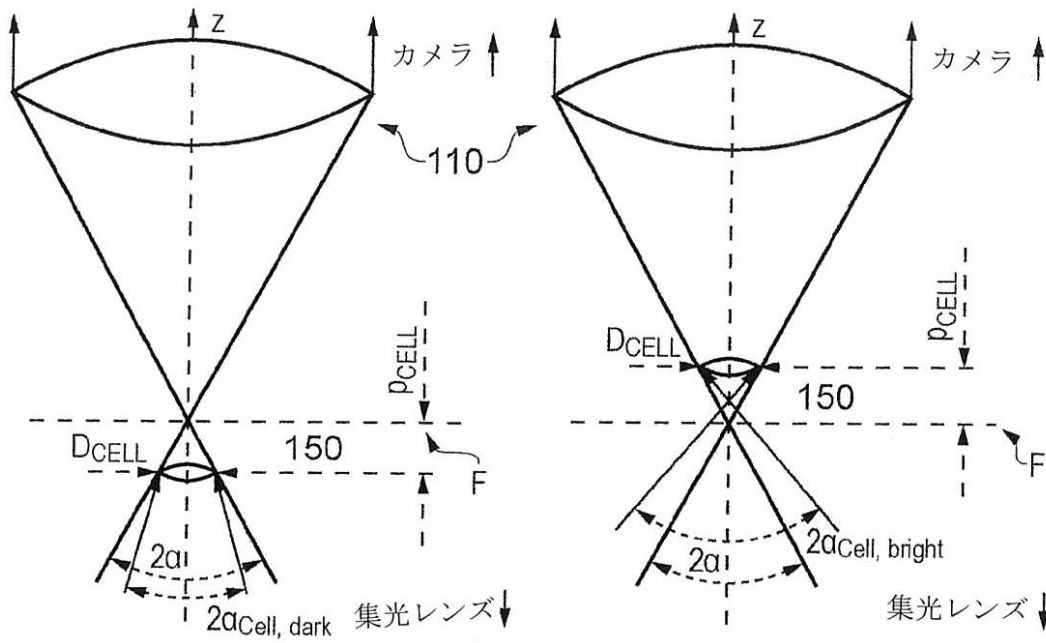


FIG. 6

【図 3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/059881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G02B21/36		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G02B C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 316 793 A (LEIST CHRISTIAN [CH]; BALZER ANDREAS [DE]) 4 June 2003 (2003-06-04) figure 1 paragraphs [0003], [0006], [0016], [0019], [0032], [0035], [0038]	1-19
A	EP 1 847 955 A (OLYMPUS CORP [JP]) 24 October 2007 (2007-10-24) figure 27 paragraph [0102]	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 October 2009		26/10/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Serbin, Jesper

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/059881

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1316793	A	04-06-2003	NONE	
EP 1847955	A	24-10-2007	WO 2006080239 A1	03-08-2006
			US 2008056610 A1	06-03-2008

フロントページの続き

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

(74)代理人 100096068

弁理士 大塚 住江

(72)発明者 アレクサンドロフ, ユーリ

イギリス国サウス・グラモーガン シーエフ147ワイティール, カーディフ, ウィッチチャーチ
, フォレスト・ファーム, ザ・メナード・センター, ジーイー・ヘルスケア

Fターム(参考) 2G059 AA05 BB14 CC16 EE01 EE17 FF01 FF03 JJ11 KK04 LL01

MM01

2H052 AC05 AD06 AD16 AD35 AF14 AF21 AF25