

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4387201号
(P4387201)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G 0 6 T	5/00	(2006.01)	G 0 6 T 5/00
G 0 6 T	7/00	(2006.01)	G 0 6 T 7/00 Z
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34 C

請求項の数 6 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-576927 (P2003-576927)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月13日(2003.3.13)
 (65) 公表番号 特表2005-519625 (P2005-519625A)
 (43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/007968
 (87) 国際公開番号 W02003/078965
 (87) 国際公開日 平成15年9月25日(2003.9.25)
 審査請求日 平成18年1月25日(2006.1.25)
 (31) 優先権主張番号 60/363,889
 (32) 優先日 平成14年3月13日(2002.3.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504347267
 キュー3ディーエム エルエルシー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
 ディエゴ スイート ビー ソレント パ
 リー ロード 10110
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ハンター エドワード エイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
 ディエゴ #13 5ス アベニュー 3
 821

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞内区画の分画局在強度の測定のための自動化呈色セグメント化および最小有意応答のためのシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬剤で処理した蛍光で染色された細胞の拡大された画像において表される細胞活性を測定するための、コンピュータによって実行可能な方法であって、該拡大された画像は自動化顕微鏡プラットフォームのカメラを用いて得られ、該方法は、

コントラスト増強フィルターアルゴリズムを用いて、プログラムされたコンピュータにより、画像において蛍光で染色された細胞内構成成分をセグメント化して、細胞内区画マスクおよび核マスクを見出す工程；

モザイク化アルゴリズムを用いて、プログラムされたコンピュータにより形成された平面図のメッシュで、画像において重複する蛍光で染色された細胞内区画を分離する工程であって、細胞内区画マスクおよび核マスクが前記モザイク化アルゴリズムにインプットされる工程；および

前記細胞内区画マスクおよび核マスクにより同定された画像内のピクセルの合計に応じて、画像測定アルゴリズムを用いて、プログラムされたコンピュータにより第1の細胞内区画と第2の細胞内区画との間の前記薬剤に応じた細胞内物質の移行を測定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】

セグメント化する工程が、プログラムされたコンピュータが細胞内区画マスクと画像のバックグラウンドとの間および核マスクと画像のバックグラウンドとの間のコントラストを増強するためのコントラスト増強アルゴリズムを用いることを包含する、請求項1に記

載の方法。

【請求項3】

前記細胞内区画マスクが膜マスクを含み、測定する工程が、
第1の膜マスクを用いて画像測定アルゴリズムを用いてプログラムされたコンピュータ
により、第1の細胞材料におけるピクセルの強度を測定する工程；
第2の膜マスクを用いて画像測定アルゴリズムを用いてプログラムされたコンピュータ
により、第2の細胞材料におけるピクセルの強度を測定する工程；ならびに
画像測定アルゴリズムを用いてプログラムされたコンピュータにより、第1の細胞材料
の強度および第2の細胞材料の強度を比較する工程、
 を包含する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

薬剤で処理した細胞の画像において表される細胞活性を測定するためのシステムであつて、画像は自動化顕微鏡プラットフォームを用いて得られ、該システムは、
画像において蛍光で染色された細胞内区画をセグメント化して、細胞内区画マスクおよび核マスクを見出すためのコントラスト増強フィルターアルゴリズムを含むプログラムされたコンピュータ；
モザイク化アルゴリズムを含み、平面図のメッシュで、画像において重複する細胞のセグメント化された構成成分を分離するために、モザイク化アルゴリズムへのインプットとして細胞内区画マスクおよび核マスクを用いるプログラムされたコンピュータ；および
セグメント化された分離された画像において、移行を測定するために細胞内区画マスク
および核マスクにより同定された画像におけるピクセルの合計を得る、画像測定アルゴリズムを含むプログラムされたコンピュータ、
 を備える、システム。

20

【請求項5】

コントラスト増強フィルターアルゴリズムが、細胞内区画マスクと画像のバックグラウンドとの間、および核マスクと画像のバックグラウンドとの間のコントラストをさらに増強するためである、請求項4に記載のシステム。

【請求項6】

画像測定アルゴリズムが、第1の膜マスクを用いて第1の細胞内区画におけるピクセルの強度を測定し、第2の膜マスクを用いて第2の細胞内区画におけるピクセルの強度を測定し、そして強度を比較することにより第1の細胞内区画と第2の細胞内区画との間の細胞材料の移行を測定する、請求項4に記載のシステム。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2002年3月13日に出願された、米国特許仮出願第60/363,889号からの優先権を主張する。

【0002】

技術分野

本願は、拡大された画像における細胞内構成成分の分画局在強度を使用する、高速、ハイスループットのサイトメトリーによる生物学的物質のアッセイ法に関する。

40

【背景技術】

【0003】

背景技術

薬物探索スクリーニングは、ハイスループットのリード化合物を取り扱うための単純で十分に根拠のある読み出し情報を歴史的に使用してきた。しかし、所定のアッセイ法は、現在、薬物が、測定された応答を生じる細胞内プロセスのいくつかに影響を与える情報のみを提供する。薬物についての標的の正確な性質は示されていない。細胞に基づくアッセイ法は、選択された分子標的と特定の様式で相互作用する化合物を同定するために設計さ

50

れたモデル系である。細胞に基づくアッセイ法は、これらが生理的条件に近づくこと、およびこれらが高度に複雑な情報を生じ得るという点で頑強である。これは、洗練された画像分析ツールおよび合理化されたデータの取り扱いを必要とする。複数パラメータの細胞アッセイ法（ここでは、応答が多重化されたレポーター分子ならびに形態学的判断基準によって測定される）が、細胞内の詳細を画像化することおよび分析することの労力のかかる性質によって制限されてきた。スクリーニングプロセスのより初期において、より複雑な情報を得る性能は、このボトルネック（進行を妨げる問題）に対する有効な解決を必要とする。

【0004】

細胞内経路において工程を分割することは重要である。なぜなら、複数の経路が、重複性（細胞内調節不全の場合のためのバックアップ）を提供するため、および協調した応答として、集中しかつ分岐しているからである。所定の薬物は、例えば、サイトカイン（例えば、ウェルプレート中で単一パラメータの応答として測定されるインターロイキン2（IL-2））の分泌を生じ得るのに対して、研究者は、どのシグナル伝達経路が使用されたか、またはどのような他の細胞内応答が開始されたかがわからない。使用されるシグナル伝達経路がまた、細胞死をもたらすものである場合、候補薬物の効力は損なわれ、および費用のかかるかつ議論の余地がある動物試験において失敗する。多重化細胞応答は、薬物探索におけるこの種の偽陽性リード化合物を除外するために研究される必要がある。

【0005】

真の細胞応答の複雑性はまた、細胞周期の進行のような他の因子に依存して、クローン化された細胞株においてさえ、細胞間の不均一性をもたらす。従って、DNA合成の一部である細胞内プロセスに作用するリード化合物は、薬物が付加された時点でS期にあった細胞においてのみ応答を誘発する。臨床的な状況において、連続注入はすべての細胞が処理されることを確実にし得、従ってリード化合物は実行可能な候補化合物である。ウェル中のすべての細胞からの平均的な応答が測定される場合、それは、検出のための閾値に達し得ず、偽陰性を生じ得る。有効な薬物が見落とされる。

【0006】

製薬会社は、スクリーニング試験のより迅速な分析を連続して必要とする。自動化は、データ収集を増加させる必要性に応じてきたが、正確性、特異性、および高感度のためのストリンジентな要求性が残っている。予備的なデータは、アッセイの読み出しの情報の中身がより高度になれば、応答する集団における個々の細胞間の可変性がより小さくなることを示す。従って、信頼度レベルを達成するために実験によって必要とされる細胞の総数が減少すると、処理能力の増加を生じる。より正確な分析は、より良好な応答情報を生じる。より高い品質のデータは、より良好なデータ収集および顕著な臨床的影響を有する薬物の同定を生じる。

【0007】

細胞内解像度での無傷の細胞の集団における多重化蛍光レポーターの自動化定量的分析が知られている。正確な蛍光の定量は、Q3DM（本願の譲受人）によって所有されている技術的な進歩によって可能にされる。かつ、この複雑な画像データの迅速な処理は、次には、Q3DMによって開発された独特なコンピュータプロセスに依存する。ハイスループット顕微鏡法は、オートフォーカス、ランプの安定化、画像のセグメント化、およびデータ管理（例えば、米国特許第5,548,661号、同第5,790,692号、同第5,790,710号、同第5,856,665号、同第5,932,872号、同第5,995,143号、ならびに米国特許出願第09/703,455号および同第09/766,390号）における新しい技術的な進歩を用いて、最近になってやっと可能になった。正確な高速オートフォーカスは、完全に自動化された、任意の大きなスキャン領域の「楽勝（walk-away）」スキニングを可能にした。定量は照射の強度を制御することにより劇的に改善され、正確なオートフォーカスに依存する。画像のセグメント化の進歩は、かすかに染色された細胞と明るく染色された細胞の両方の検出を単純にし、その結果、不均一な細胞集団が統計学的に意味のある結果を伴ってアッセイされ得る。最後に、高度な情報の中身のデータの迅速な流れは、効率的な画像データの形式およびキャッシングに

10

20

30

40

50

依存する。総合すると、これらの技術的な進歩は、多重化された細胞に基づくアッセイ法からの、高品質の、画像に基づく実験結果の検索を可能にする。

【発明の開示】

【0008】

発明の要約および利点

現時点で生物学的薬物発見が有し得る最も包括的なツールセットは、分子的、細胞構造的、および細胞活性的なデータの獲得を包含する技術を統合し得るものである。このようなツールセットの生物学的プログラムへの適用は、現在の最終点である細胞アッセイ法を間接的な読み出し（例えばIL-2）から細胞内構造的同時局在化分析までに、および細胞機能活性の低速度画像化を変えさせる。定量的細胞画像化技術は、合理的薬物スクリーニングおよび設計の次のレベルに道を開く。

10

【0009】

発見のパイプラインにおけるこの律速段階の自動化を用いて、全体の細胞の文脈において行われるハイスループットの細胞に基づくアッセイ法を設計する可能性、ならびに多重化レポーター分子に対する能力が得られ、その結果、複雑な細胞内相互作用が考慮に入れられ得る。これらのアッセイ法は、測定可能な経済的な利点を有する。なぜなら、より多くのデータをより迅速に得る際に、それらは細胞応答における不均一性に起因する偽陽性および偽陰性を除去する可能性を提供するからである。薬物発見に対する利点は、リード化合物が、費用がかかりかつ議論の余地がある動物実験に入る前に、より良好に認定されることである。

20

【0010】

これらの改善および利点が本発明によって提供され、本発明は、細胞内区画の分画局在強度の測定における自動化呈色セグメント化および最小限の有意な応答のためのアッセイ系および方法として実現される。

【0011】

アッセイ法の開発は予期せぬ結果を生じ得、それゆえに、本発明は複数パラメータのデータプロット上で同定された細胞を目視検査する能力を提供する。関心対象の細胞のゲーティングは、ディスプレイスクリーン上で即時的なモンタージュを生成し、かつスキニングステージの再配置によって、ユーザは確認のために顕微鏡の接眼レンズを通して見ることができる。

30

【0012】

新しいアッセイ法開発は、新規なレポーター分子、新しい細胞型、および細胞応答の視覚的な性質に適合性のあるアッセイ系を必要とする。この目的のために、本発明のアッセイ系は、オープンでかつ拡張可能なオブジェクト指向のソフトウェアフレームワークを使用し、その結果、ハードウェア、測定、またはデータベースの機能のような特色、および細胞分類のスキームが、存在するソフトウェアの大きな部分を明らかにしなくてもよく、付加され得る。特に、本発明のアッセイ系に組み入れられる、適合性のあるオブジェクト認識アルゴリズム（画像のセグメント化およびモザイク化を含む）は、ユーザが、何がアッセイ法における関心対象のオブジェクトを構成するかを対話式に規定することを可能にする。対話式に実行されるので、これらのアルゴリズムは、そのアッセイ法のためのスキニングパラメータに取り込まれて、その結果、自動化された画像セグメント化およびモザイク化が、ハイスループットスクリーニングのための必要なスピードを可能にし得る。

40

【0013】

蛍光測定の正確さは、高性能の特徴、著しくは、オートフォーカス、ランプの安定化、画像セグメント化、画像モザイク化、および画像測定アルゴリズムに起因して増強される。データのシグナル対ノイズ比の得られる増加は、最適曲線における誤差の減少において明らかであり、感度の増大をもたらす。

【0014】

詳細な説明

細胞内区画の分画局在強度（FLIC）

50

細胞内移行事象についての複数の区画モデルの開発：多くの潜在的に重要な分子標的は、それらの発現レベルにおいてのみならず、それらの細胞内局在または空間的局在によってもまた、調節される。ポストゲノム時代においては、遺伝子の機能を解明することは迅速に新規なデータを生成しており、古い教義をひっくり返しつつある。細胞の一般に普及している絵は、もはや膜の袋の内部に浮遊しているタンパク質、脂質、およびイオンの懸濁物ではなく、細胞骨格、小胞体、ゴルジ装置、イオンチャネル、および膜の孔によって提供される構造的骨格またはクロマチンに結合したタンパク質複合体を含む。細胞表面受容体は、それらが細胞外分子に結合し得、かつ細胞質に応答を開始し得るように原形質膜内に配向される。細胞質中のタンパク質複合体は、特定のDNA結合タンパク質を放出するための調節されたタンパク質分解後に解離され得る。次いで、これらのタンパク質は核孔を通過し、クロマチン組織化と相互作用し、かつ遺伝子転写を調節する。次いで、タンパク質は、それらが機能性のために準備されるゴルジ装置を通して輸送される。これらのプロセスのいずれかは、臨床的効力の改善および副作用の減少のための標的であり得、それ自体理解することが重要である。

10

【0015】

この目的のためのアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするための代表的なアッセイ法は、複合体から核への既知のDNA結合タンパク質の移動を測定する。しかし、レポーター分子を多重化することによって、同じアッセイ法がまた、受容体内部移行に対する情報を提供し得る。従って、ユーザは、下流の効果が媒介される場合に、どの受容体が薬物に応答しているかを確信し得る。大ざっぱに言えば、標的シグナル伝達分子、具体的にはそれらのリガンド（または薬物）を結合し、および内部移行する外膜上の受容体の活性化への応答としてタンパク質の移動、ならびに、細胞質から核への移動する転写因子を可視化する必要が存在する。個々の区画の限定は、区画特異的標的（色素）によって達成されてきた。原形質膜は親油性カルボシアニン色素で標識され、細胞質は、生細胞に浸透するが細胞質で切断される色素で標識され、その結果それは拡散できず、かつ核は膜透過DNA挿入剤で標識される。

20

【0016】

リンパ球のような円形細胞は、核、細胞質、および膜の区画を同定する際に難問を提供する。低密度の細胞質区画の解像は、高解像度画像処理を必要とし、これは、高数値の開口対物レンズを使用して達成されるが、これはまた、視野の奥行きを狭める。これもまた高解像度画像を必要とする多くの細胞内構成成分、オルガネラ、またはパターンが存在する。頑強なオートフォーカスが必要となる。これは、ハイスループットスクリーニングの要求を満たすため、および蛍光強度の正確な定量を確実にするために迅速に行われなければならない。本発明は、利用可能な他のシステムよりも1オーダー迅速であるオートフォーカスメカニズムを使用する。なぜなら、これは、ビデオ信号から直接的に画像の鮮明さを測定するための専用の経路を使用するからである。このようなオートフォーカスメカニズムは頑強である。なぜなら、これは、細胞画像に固有のコントラストの反転を回避する範囲で光学的伝達関数（OTF）の変化を測定するからである。

30

【0017】

予備的なデータを生成するために使用されるアッセイ法は、別々のタンパク質を検出する第2のレポーター分子を含み得る。所望されるように、より多くのパラメータが、所定の時間の間にわたって同じ細胞において測定され得る。オブジェクト指向ソフトウェアフレームワークの使用によって、本発明によって使用されるプラットフォームは、最大のフレキシブル性のための拡張可能かつアルゴリズムにより駆動される。仮想的な場合を与えるために、2つの空間的なパターン（例えば、核および細胞質の蛍光）の単純比較は、標的に対するリード化合物の抗力を決定するためには不十分であり得る。たとえ正の応答が起こるとしても、これが細胞の形態学または代謝の変化に付随しない場合、その効力は疑問であり得るか、または毒性がより重要な制限であり得る。これらの細胞特性のためのレポーターの付加は、一連の細胞内応答を分類するさらなる画像分析アルゴリズムを必要とする。好ましくは、本発明は、基本のプラットフォームおよび存在するアッセイ法の画像

40

50

分析能力への、新規な、アッセイ法特異的プロセッシングモジュールの開発を支持することによってこれらの必要性を満たすために、ソフトウェアプラグインアーキテクチャを使用する。

【 0 0 1 8 】

本発明の実施において使用される、ハイスループットの顕微鏡プラットフォームは図1に図示されている。このプラットフォームは、市販の蛍光顕微鏡の周りに付属システムとして製作された高性能の研究グレードの装置を備える。このプラットフォームは、プログラム可能なデジタル(ホスト)コンピュータ110、好ましくは、Windows(登録商標)オペレーティングシステム上で走る高性能の規格品のPentium(登録商標)ワークステーションを備える。開発され、および確認されたアッセイ法は、よく知られたWindows(登録商標)モチーフに基づく、簡単なポイントおよびクリック操作を使用してこのシステム上で実行され得る。このプラットフォームの他の構成要素には以下が含まれる: ライブモニタ115、ロボット操作のステージ118を備える付属物を伴う、逆さにしたNikon TE300蛍光顕微鏡117、CCD(電荷結合素子)カメラ120、およびLED位相差光源125。安定化された水銀アークランプメカニズム131は、光ファイバーハウジング132および光ファイバー133を経由して顕微鏡の操作のための照明を提供する。制御装置137は、これがホストコンピュータ110によって発せられたコマンドにตอบสนองしてステージ118上に配置された構造139(例えば、マイクロタイタープレートまたは別の等価なアッセイデバイス)を支持する間に、ステージ118を駆動する。オートフォーカス回路142はCCDカメラ120によって得られた画像にตอบสนองし、ホストコンピュータ110にプロセスされた情報を提供する。圧電フォーカスメカニズム148は最も良好なフォーカスを得るために顕微鏡117のレンズメカニズムの位置付けを制御する。ホストコンピュータ110は、顕微鏡117をフォーカスすること、安定化された水銀アークランプメカニズム131を制御すること、ステージ118を移動させることによって構造139をスキャンすること、CCD120によって産生される構造139上の生物学的物質の拡大された画像の系列を取り込みおよび保存すること、セグメント化および切り出し加工による拡大された画像のプロセッシング、ならびに、以下により詳細に記載される移行プロセッシングを実行することについて日常的な業務を実行するためにプログラムされる。

【 0 0 1 9 】

オートフォーカスは、顕微鏡のスライドおよびカバーガラス表面の相違ならびに機械的なフォーカスの不安定性(特に熱膨張)に起因して大きな領域のスキャンするために決定的である[M Brabo-ZanogueraおよびJH Price. Analog autofocus circuit design for scanning microscopy. Proceedings, International Society for Optical Engineering (SPIE), Optical Diagnostics of Biological Fluids and Advanced Techniques in Analytical Cytology, 第2982巻、468-475頁、1997]。これらの効果は、細胞がその上で分析されなくてはならない不均一な表面にわたって有効に作製されるために組み合わせる。この不均一な表面の例は図2にプロットされており、これは、オートフォーカスの必要性を実証する、最も良好なフォーカスの表面の3Dプロット(9×15mm²領域)である。このプロットは減算された平均平面を有する最も良好なフォーカスの表面を表し、6μmの範囲を示す[M Bravo-Zanoguera, B von Massenbach, A Kellner, およびJH Price. High Performance autofocus circuit for biological microscopy. Review of Scientific Instruments, 69(11): 3966-3977, 1988]。この図を参照して理解され得るように、フォーカスは全体の顕微鏡スライドにわたって±10μmの範囲を通して容易に変化し得る。これは、細胞を位置決めするための能力に対して劇的な効果を有し得る。Nikon Fluor 0.75 NA 20×対物レンズを使用して、例えば、平均蛍光強度が、フォーカスから±10μmで約35%低下することが示された[JH PriceおよびDA Gough. Comparison of digital autofocus functions for phase-contrast and fluorescence scanning microscopy. Cytometry, 16(4): 283-297, 1994年8月]。

【 0 0 2 0 】

図3は、増分スキャニングを実証する図である。以前のフィールドからの最も良好なフォーカスは、次のフィールドについてオートフォーカス探索範囲の中心を提供する。次い

10

20

30

40

50

で、フォーカスの程度（鮮明さ）は、ビデオ走査フィールド速度60Hzで、いくつかの試験平面（代表的には5-9）について測定され、圧電ポジショナーは最も良好なフォーカスに移動される。ステージ移動およびオートフォーカスは全部で0.3秒を必要とする。

【 0 0 2 1 】

増分スキヤニングはステージをフィールドに移動させること、ステージを停止させること、オートフォーカスを実行すること、画像を得ること、および次のフィールドで反復することによって実行される。この系列は図3に示されている。フォーカスが1つの極端な探索範囲に接近しすぎて存在する場合、その範囲の中心は再位置決めされ得、かつオートフォーカスが反復される。

【 0 0 2 2 】

単一のフィールド上のオートフォーカスが広範に使用されかつ再検討されてきた [PriceおよびGough]。さらなる研究は、大きな数の顕微鏡フィールドにこの技術を拡張し、およびリアルタイム画像プロセッシングを用いて高速オートフォーカスを実行する [PriceおよびGough]。拡大およびサンプリングに対する慎重な注意は、0.25秒で達成されたフォーカスを用いて何千もの顕微鏡フィールドのスキヤンにおいて約100nmの精度をもたらした（標準偏差によって測定された場合）。この技術のさらなる開発は、きわめて大きくオートフォーカスの費用を減少させ、かつ平均56nmまでフォーカスの精度を改善させた、オートフォーカス回路の設計および実施をもたらした [Bravo-Zanogueraら]。スルーフォーカスOTFに関するさらなる理論的および実験的研究は、フォーカス測定のための高周波数を単離する際に使用する正確なフィルターの選択をさらに支持することを補助した [MA Oliva, M.Bravo-Zanoguera、およびJH Price. Filtering out constrast reversals for microscopy autofocus. Applied Optics, 38(4): 638-646, 1999年2月]。

【 0 0 2 3 】

(表1) スキヤニングにおけるオートフォーカスの性能

実験条件						結果				
実験	領域 (mm x mm)	フィールド	試験範囲			最も良好なフォーカス範囲		組み合わせσ		平均
			Z(μm)	位置 ^a	ズーム	最大-最小(μm)	デジタル	アナログ	デジタル	
			生の値	非平面状 ^b	(μm)	(μm)	(μm)			
1 ^{c,d}	3.25 x 1.91	1200	1.465	11	2.0	6.2	2.8	0.146	0.106	0.144
2 ^{d,e}	3.48 x 2.05	1728	2.197	11	2.25	7.3	2.4	0.144	0.052	0.088
3 ^{d,e}	2.60 x 2.05	1296	2.196	11	1.1	7.9	1.5	0.036	0.027	0.043
4 ^{d,e}	3.63 x 2.84	2500	2.196	11	1.1	16.9	4.1	0.075	0.067	0.006
5 ^{d,e}	3.87 x 3.04	1296	2.196	11	1.5	10.5	2.1	0.031	0.027	0.074
6 ^{d,e}	4.00 x 3.12	1369	2.196	11	1.5	12.8	1.6	0.028	0.023	0.068
7 ^{d,i}	3.87 x 3.04	1296	2.196	9	1.5	11.3	2.9	0.051	0.042	0.122

a. フォーカス時間は（位置+2）/60秒、または、9および11の試験位置ではそれぞれ0.18秒および0.22秒である

b. 平面は直線回帰および減算によってデータにフィットする

c. フォーカス平面間の直線上間隔

d. デジタルトラッキング

e. 17、10、7、6、6、6、6、7、10、および17デジタルユニットのフォーカス平面間の非直線状間隔

f. 連続フィールド間の48%重複

g. アナログトラッキング

h. アナログおよびデジタルの平均によるトラッキング

i. 22、10、7、6、6、7、10、および22デジタルユニットのフォーカス平面間の非直線状間隔

【 0 0 2 4 】

図4a、4b、および4cは、細胞なしで少ない量の細片のみを用いる顕微鏡フィールドを使用して実証された（左）オートフォーカス回路ダイナミックレンジおよび感度を図示する。（中央）はオートゲイン使用停止（ゲイン1.0）でのプロットを示し、かつ（右）はオ

ートゲイン100でのプロットを示す。

【 0 0 2 5 】

図5に図示されるオートフォーカス回路は代表的なスキャニング条件下で試験された [M Bravo-Zanoguera, B von Massenbach, A Kellner, および JH Price. High performance autofocus circuit for biological microscopy. Review of Scientific Instruments, 69(11): 3966-3977, 1998]。このスキャニング実験の目的は、このシステムのフォーカスを追跡する能力を決定すること、ならびに、精度を測定すること、およびデジタルシステムに対してアナログ回路を比較することであった。1200~2500フィールドの範囲の7つの長方形領域がラスタパターンでスキャンされた。結果は表1に示される。最初の6つの実験において、フォーカスは、11の異なる垂直方向の位置からのフォーカス測定の出力で重みを付けた平均から計算した。最後の実験において、この数値は9の垂直方向の位置に減少させた。オートフォーカスは各顕微鏡フィールドで20回実行された。各実験におけるすべての試行(20フィールド)の組み合わせた標準偏差()は表1に示される。すべての実験のために、精度()によって測定される)は、デジタルシステムよりもアナログ回路についてより良好であった。7つすべての実験についての合わせた は0.056(アナログ)および0.087(デジタル)であった。これは、フィールドの奥行き0.528 μm よりも良好なオーダーに匹敵し(Franconの判断基準に従い [M Francon編、Progress in Microscopy. Row and Peterson, Evanston, Ill, 1961])、かつ最小の垂直方向のステップ0.024 μm に近い(PIFOC piezoelectric objective positioner, Polytec PI, Irvine, CA)。

【 0 0 2 6 】

表1はまた、スキャンされた各領域についての最も良好なフォーカスの範囲を示す2つのカラムを含む。1つのカラムにおいて、生のデータの範囲が提示されるのに対して、次のカラムにおいて、減算された平均表面を有する範囲が示される(非平面)。生のデータの範囲は6.2-16.9 μm であり、最大の領域について最も大きかった。非平面範囲は1.6-4.1 μm であり、高いNA対物レンズのフィールドの奥行きよりもなおはるかに大きい。他の実験(データ示さず)は、フラット間の絶対的な変動が予測された領域で増大することを示した。例えば、より大きな10 \times 15mm²スキャンは6 μm 範囲を示し、さらなる経験のより大きな領域のスキャニングは全体のスライドにわたる \pm 10 μm のフォーカス範囲と同程度であることの予測を本発明者らにもたらした。この範囲は、多くの工業用顕微鏡適用に優位を占めるウェルプレート形式について、なおより大きい(数百ミクロンと同程度)。

【 0 0 2 7 】

図5のオートフォーカス回路は非常に高い感度を提供する。しかし、アナログ感度が、引き続き12ビットA/D変換を用いて利用可能であるよりもずっと大きいことは、設計プロセスの初期において明らかになった。従って、オートゲイン回路がダイナミックレンジを増強するために付加された。図4a、4b、および4cは、小さな細片のみを含む顕微鏡フィールド上での、回路のオートゲイン、ならびにダイナミックレンジおよび感度の利点を実証する。本発明者らは、この回路が非常に高感度であるので、これは、フィールド内に何が存在する限り、細胞が損傷しない場合、たとえ最小限の細片のみが存在するとしても、フォーカスを追跡することができることを見出した。

【 0 0 2 8 】

単純な強度の閾値が、比較的明るい蛍光色素を用いて染色された細胞の定量的な細胞に基づくアッセイ法のために十分であれば、これは便利である。不運にも、蛍光染色された細胞は、染色においていつも広範な相違を示す。細胞サイズおよび蛍光色素の密度が変化するためである。従って、リアルタイム画像セグメント化が、蛍光の強度または可変性にさほど依存していない細胞内区画の同定および位置決めを行うために、染色された細胞内区画について本発明において使用される [JH Price, EA Hunter, および DA Gough. Accuracy of least squares designed spatial FIR filters for segmentation of images of fluorescence stained cell nuclei. Cytometry, 25(4)303-316, 1996]。この研究は、図6a-6bにおいて図示されており、ここでは非直線状に向けられた(パーセプトロン判断基準)2D画像フィルターによる、ヒトの組織分類の可能性を最適に概算するための増強が

図示される。図6aにおいて、3つのDAPI染色された3T3細胞核の元の画像が示される。図6bは、適切なコントラスト増強を提供しない画像フィルターの適用を伴って得られた結果を図示する。図6cにおいて、直線状に設計された2Dフィルターもまた、十分なコントラスト増強を提供しない。図6dは、最終的なセグメント化工程のための単純な強度閾値設定を可能にする動的コントラスト増強を提供する非直線的に設計されたフィルターを用いて得られた結果を図示する。この方法は、非直線的な最小二乗最適画像フィルターを使用して、自動化ヒストグラムに基づく閾値設定のためのマークした対象 - バックグラウンドコントラストを作製する。このコントラストは、最終的な画像セグメント化をはるかにより閾値非依存性にし、かつ、以前に可能であったより大きな強度範囲を超えて、薄暗い細胞を明るく細胞と同じ正確さでセグメント化することを可能にする。この方法に従うと、フィルター設計のための誤差関数はあらかじめ定められた最小コントラストからの誤差のみを合計することが許容される。正確な一致ではなくこの範囲を超えて広がる強度を許容して、実質的に改善された性能である（図6a-6dを参照されたい）。この方法は何年にもわたって広範に試験されてきた。例えば、Price、Hunter、およびGoughは、1,070の合わせた蛍光染色した細胞核を含む10個のモニタージュ画像を試験した。各画像は手動でセグメント化されて標準を提供した。次いで、 $3 \times 3 \sim 25 \times 25$ エレメント2Dフィルターを、パーセプトロン判断基準および非直線状最小二乗を使用して方向付け、ヒト標準の最適な概算を行った。各フィルターは、画像がこの監督された設計技術に偏向しないことを確実にするために他の9の画像に対しても試験された。非常に高いセグメント化の正確さがこの方法を使用して達成され、この設計画像に対して正確さの依存性はほとんどないか、またはなかった。さらに、正確さの改善は 7×7 フィルターサイズで平らにすることで開始し、かつ 15×15 フィルターサイズを超えては改善しなかった。一般的な目的のCPUはプロセッシングのパワーが進歩しているので、現在、可能である。いかなる付加的なハードウェアもなしで、 7×7 フィルターを使用してオンライン画像処理を実行することが可能である。大きなフィルターが必要でないという事実は、リアルタイム操作のための利点である。

【0029】

この画像セグメント化メカニズムは、焦点の合っている画像の流れから、完全に自動化された、リアルタイムサイトメトリーの基礎を提供する。この方法の精度および正確さの利点は、改善された測定の実験忠実度を生じ、以下に調べられるようにシステムのスループットおよび解像度を改善する。

【0030】

最小二乗設計のコントラスト増強フィルターを使用する、バックグラウンドからの対象物のセグメント化は、一連の蛍光画像から、任意の細胞内区画または一連の区画を見い出すために使用され得る。次いで、モザイク化が使用されて細胞に各細胞内区画を割り当てし得る。細胞核の画像のセグメント化は、各細胞についての単一の対象物を作製する。次いで、核のマスクがモザイク化アルゴリズムに与えられて、各細胞に属する領域をマッピングし、かつ残りの区画はこれらの領域に基づいて細胞に割り当てられる。従って、モザイク化は、細胞内区画を細胞に割り当てるための客観的手段を提供する。

【0031】

バックグラウンドからの対象物の画像のセグメント化はまた、重複する対象物を分離しない。慎重に制御された細胞培養物においてさえ、細胞は重複し得る。多くのサイトメトリー適用において、測定は、重複する対象物を切断して分けることによって改善され得る。モザイク化は、重複する対象物を分けるために使用され得る。一旦細胞核の画像がコントラスト増強フィルターを使用してセグメント化されたならば、核の位置（例えば、図心）がモザイク化アルゴリズムに入力され得、他の重複する細胞内区画の画像を切断して分け、測定の実験忠実度を改善する。数学形態学技術（侵食および拡大）および転換点アルゴリズムもまた、しばしば、重複する対象物を分離するために使用される。例えば、細胞膜染色（例えば、DiIまたはDiD, Molecular Probes, Eugene OR）またはアミン全細胞染色（Alexa 488, Molecular Probes, Eugene OR）が使用され得、細胞質および核の区画を一緒に同定する（細胞質区画は核区画を減算することによって決定され得る）。次いで、侵食

10

20

30

40

50

ノ拡大または転換点が重複する細胞を分離するために使用され得る。次いで、他の細胞内区画（例えば、小胞体、ER）またはベシクルが、生じる画像のセグメント化マスクに基づいて細胞に割り当てられ得る。しかし、非常に薄暗い細胞の非常に薄い細胞内領域はセグメント化されないかもしれないし、生じるマスクに存在しないかもしれない。失われた領域にある細胞内区画（例えば、ERまたはベシクル）は細胞に割り当てられない。次いで、モザイク化が使用されて割り当てを完了し得る。細胞質を同定するために染色を付加することは不便であり得るか、または非常に困難であり得る。細胞マスクの非存在下では、モザイク化は細胞に細胞内区画を割り当てるために使用され得る（核マスク）。

【0032】

本発明において、一旦細胞核の拡大された画像がコントラスト増強フィルターを使用してセグメント化されたならば、他の重複する細胞内区画の画像を切断して分けるため、および性能を改善するために、セグメント化された画像のモザイク化が使用されて核の位置（例えば、図心）を正確に規定する。モザイク化とは、完全なメリアム-ウェブスターオンライン辞書によれば、「ギャップまたは重複なしに、1種類または数種類の一致する平面図形によって無限に幾何学的な平面の覆いをする事」である。

【0033】

本質的に、本明細書中における拡大された画像のモザイク化は、細胞の拡大された画像上での平面図形のモザイクまたはメッシュの形成に関し、ここでは、モザイクまたはメッシュの各平面図形は、細胞内に1つの対象物または区画を含む。このような対象物または区画には、限定することなく、核、膜、小胞体、ゴルジ、ミトコンドリア、および何らかの方法で組織化されるタンパク質を有する他の細胞内領域が含まれる。さらに、このような拡大された画像は、バックグラウンドおよび他のすべての細胞内区画から核のような同一の細胞内区画を区別するためのセグメント化によって加工される。次いで、この加工されセグメント化された画像は、すぐ近くのおよび重複する隣接するものから区別された細胞構成要素の各々を分離するためにモザイク化される。例えば、図7を参照されたい。この図において、セグメント化された細胞核は平面図形のモザイク化メッシュによって分離され、ここで各平面図形は1つの核を含む。この図において、例えば、多角形710に含まれるセグメント化された核700が分離され、それゆえに多角形730に含まれるその近接する隣の核720とは区別可能である。モザイク中の各平面図形の位置、形状、および寸法を知ることによって、拡大された画像中の核が規則的な様式でモザイクを横断することによって迅速にアクセスされ得る。図7におけるメッシュは、モザイク化の理解を補助するためにのみ、可視化されている。実際には、モザイク化から得られるメッシュは慣習的な画像処理、手動の入力、およびディスプレイ手段を使用して可視化され得る。プログラムされた手段によって拡大された画像の加工において、メッシュは、当然、1つまたはそれ以上の保存されたデータ構造としても存在する。これらのデータ構造は、ホストコンピュータ110のプログラミングによるモザイク化の自動化を可能にする。

【0034】

図1のプラットフォームはまた、エピ蛍光のための安定な照射源を備える。光源の安定化は、画像サイトメトリーシステムにおいて決定的である。多くの他の機器（例えば、分光光度計およびフローサイトメーター）は光源の変動をモニタリングおよび較正することによってこの問題を克服することができるのに対して、画像フローサイトメトリーはことなる。なぜならCCDカメラにおける250,000またはそれ以上の検出器についてモニタリングおよび較正することは困難であるからである。従って、（アークの揺らぎからの）空間的な変動を回避するための光ファイバーおよび残っている一時的な不安定を除去するためのフィードバックコントロールを使用する、光源は安定な100W Hg蒸気光源から構成される [S Heynen, DA Gough, およびJH Price. Optically stabilized mercury vapor short arc lamp as uv-light source for microscopy. Proceedings, International Society for Optical Engineering (SPIE), Optical Diagnostics of Biological Fluids and Advanced Techniques in Analytical Cytoogy, 第2982巻、430-434頁、1997年]。供給される照射の安定性は図8に示される。灰色のトレースは不安定なランプのものであり、暗いト

10

20

30

40

50

レースは本発明者らのシステムを用いるフィードバック安定化の結果を示す。両方のレースが10秒間隔で記録された最小および最大の強度値を示す包絡線である。これらの強度は、Imaging Technology, Inc. Series 151 image processorを使用して30Hzで測定された。この長期的な安定性は例外的である。フィードバックを用いると、相違の強度計数が30倍を超えて減少した。この強度制御は、例えば、細胞機能アッセイ法において、蛍光強度に直接的に依存する測定を大きく改善する。

【0035】

本発明はさらに、関心対象の画像領域(AOI)のデータ構造およびキャッシングアルゴリズムを使用する。スキヤニングサイトメトリーの1つの局面は、データの固有の視野が、何万もの顕微鏡フィールドおよびギガバイトの生の画像データ(代表的には、通常の32ビットアドレス可能空間より大きい)から構成される、スライド試料の連続した画像であることである。これらのデータにおけるAOIへの効率的なアクセスは、グラフィカルインターフェースを通じたフロントエンドユーザによって、ならびにアプリケーションプログラマーおよびアッセイ法開発者によっての両方で得られる。このアクセスは、スキャンされた試料中のディスクに存在するAOIを組織化し、かつ必要とされる場合にRAMの内外でそれらをシャッフルする、新規なデータ構造およびキャッシングアルゴリズムによってのみ提供され得る。「画像テーブル」データ構造が開発され[EA Hunter, WS Callaway, およびJH Price. A software framework for scanning cytometry. Proceedings, International Society for Optical Engineering (SPIE), Optical Techniques in Analytical Cytology IV, San Jose, CA, 第3924巻、22-28頁、2000年1月]、最も普及している用途のシナリオ(連続的(ユーザスクロール可能)、不連続(任意の長方形)、およびデータベース駆動(クエリ応答)の試料ブラウジングおよびクエリを含む)による効率的なアクセスのために画像データを組織化および管理してきた。図9および10は、AOIメタデータ構造および関連するキャッシングアルゴリズムの設計を図示する。画像テーブルは、ビューポートオーバーレイジオメトリーに基づく効率的なAOIリコールを容易にするために設計された形式で関心対象の画像領域管理に責任がある。効率的なキャッシングアルゴリズムは、必要に応じて、ディスクに存在するAOIからRAMに移動する。このことは、標準的なPCワークステーション上で数十ギガバイトまたはそれ以上の画像データのブラウジングまたは連続的アクセスをユーザに可能にする。

【0036】

細胞質から核へのNF- κ B移行研究における細胞機能分析のための自動化蛍光顕微鏡法

この節は細胞刺激にตอบสนองした調節タンパク質核因子 κ B (NF- κ B) の細胞内分布を定量するための研究の結果を記載する。刺激に際して、例えば、プロ炎症性サイトカインによって、NF- κ Bの阻害サブユニットはリン酸化され、引き続いてプロテアソームによって破壊される。阻害サブユニットの損失は、修飾された他のp65調節サブユニットが細胞質から核(ここでこれは細胞外刺激にตอบสนองして防御遺伝子を活性化し得る)に移行することを自由にする。

【0037】

顕微鏡画像からの免疫蛍光標識されたNF- κ Bの正確かつ厳格な細胞内での定量は、刺激の存在下での細胞機能を阻害する化合物の能力を評価する直接的手段を提供する。本研究は、腫瘍壊死因子 (TNF) にตอบสนองしたHUVEC細胞におけるNF- κ Bの細胞質から核への移行を、画像に基づく細胞機能アッセイ法の原型として試験する。いかなる他の細胞内区画も単離され得、かつ上記の画像獲得および分析技術と提携して機能する特異的免疫蛍光標識によって正確に定量されるので、ここで実証される速度および正確さの利点は、細胞機能アッセイ法に一般的に利用可能である。この実験はまた、忠実度およびシステムのスループットによって測定されるように、異なる技術を使用する以前に公開された結果[G Ding, P Fischer, R Boltz, J Schmidt, J Colaianne, A Gough, R Rubin, およびD Uiller. Characterization and quantitation of NF- κ B nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-. Journal of Biological Chemistry, 273(44): 28897-28905, 1998]に対して、図1に記載のプラットフォームを使用する本発明者ら

の発明の実施によって達成される結果の直接的比較を可能にする。本発明者らは、実質的に減少した十分な集団の標準偏差（これは、測定技術および固有の生物学的不均一性の両方の関数である）において細胞内区画測定と比較を示す。本発明者らは、いかにして応答の可変性が分画応答を容易に検出するために必要とされる細胞の数の減少に翻訳されるか、また、いかにしてそれが阻害剤応答の概算に影響を与えるか（モデル応答 IC_{50} 分布のモンテカルロシミュレーションを介して）を示す。形態学的応答に基づく細胞画像を分離する能力は、均一に応答する亜集団に測定を集中することによってさらなる改善をもたらす。次いで、スキャンングおよび分析は、3つのBIP1移行阻害剤化合物の応答を分析することによって検査される。最後に、システムスループットが説明され、見積もられたスキャン速度は典型的な実験パラメータについて与えられる。

10

【0038】

実験手順

これらの研究において使用される細胞は、Clonetics Corporationから入手した初代ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）であった。これらの細胞は、標準的な条件下で培養に維持し、かつCloneticsの製品であるEGM培地および試薬系を使用して継代した。これらは形質転換されないため、HUVECは、一般的に、9または10の継代後に老化する。これらの研究において使用される細胞は初期の継代からであり、老化関連の形態学的変化を示さなかった。

【0039】

アッセイ法に先立って、細胞を96ウェルプレート（Packard black ViewPlate）に移し、一晩インキュベートして約25%コンフルエントであった細胞単層を生じた。アッセイ法のための統計学的に最適な細胞密度を決定するために使用したプレートは、ウェルあたり5000細胞、2500細胞、および1000細胞でウェルに播種することによって作製し、一晩インキュベートした。3つの選択した化合物を、HUVECにおけるTNF 刺激されたNF B移行の阻害のために使用した。3つの化合物および対照を、表2および表3において示されるようにプレート中に配置した。試験化合物をDMSOストック溶液から培地に直接希釈して、0.7%未満のDMSOを含む60mM化合物溶液を生じた。これらの溶液を、培地中で段階的に希釈して、0.1mMまで低い化合物濃度を生成した。培地を試験プレートから除去した後、100 μ lの各化合物希釈液のアリコートをして3つ組のウェルに分注した。刺激していない対照およびTNF 刺激対照には、それぞれ、120 μ lおよび100 μ lの培地を加えた。細胞を30分間、37 でプレインキュベーションし、その後、これらを各ウェルに20mlのTNF （1200U/ml培地）を付加することによって刺激した。このアッセイ法において使用されたTNF の最終刺激濃度は200U/mlであった。15分間のインキュベーション後、細胞を3.7%のホルムアルデヒドで固定し、次いで、NF Bキット試薬およびCellomics（Pittsburgh, PA）を使用して処理し、細胞NF Bについて染色した。手短に述べると、細胞を透過処理し、洗浄し、ウサギ抗NF B一次抗体とともに1時間インキュベートし、洗浄し、二次抗ウサギIgG抗体 - Alexa Flour 488結合体とともに1時間インキュベートし、かつ再度洗浄した。核を、二次抗体溶液中に含まれるHoechst色素またはDAPIを用いて染色した。使用される場合、DAPIを最終洗浄バッファー溶液に100~400ng/mlで加え、その場所に保存および試験の間保持した。NF Bの細胞質から核への移行を、共焦点顕微鏡システムを用いて試料ウェルの視覚検査によって評価した。

20

30

40

【0040】

（表2）96ウェルNF B対照プレートについてのテンプレート

行	ウェルあたりの細胞数
A	ブランク
B	5000
C	5000
D	2500
E	2500
F	1000
G	1000
H	ブランク

50

行B、D、Fは刺激なし；行C、E、Gは200U/ml TNF で15分間刺激

【 0 0 4 1 】

(表3) 96ウェルBIPI阻害剤プレートについてのテンプレート

行	行 1-3	行 4-6	行 7-9	行 10-12
A	200 U/ml TNF α	200 U/ml TNF α	刺激なし	刺激なし
B	0.1 μ M A	0.1 μ M B	0.1 μ M C	ブランク
C	0.3 μ M A	0.3 μ M B	0.3 μ M C	ブランク
D	1 μ M A	1 μ M B	1 μ M C	ブランク
E	3 μ M A	3 μ M B	3 μ M C	ブランク
F	10 μ M A	10 μ M B	10 μ M C	ブランク
G	30 μ M A	30 μ M B	30 μ M C	ブランク
H	60 μ M A	60 μ M B	60 μ M C	ブランク

10

行Aは対照：200U/ml TNF で15分間刺激（列1-6）、刺激なし（列7-12）。行B-H：化合物A、B、およびCの3つ組のウェル、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M、60 μ M濃度。

【 0 0 4 2 】

図1において上記に図示されているハイスループット顕微鏡法プラットフォームを使用して、蛍光画像の取り込みおよびNF Bアッセイ法の分析を自動化した。主要なシステム構成要素は、蛍光倒立顕微鏡（Nikon TE-300）；Pentium IIIワークステーション；制御システム（これは多くの電子的構成要素を収納する）；ならびに、取り込みのためのシステムを制御し、および取り込まれた画像を分析するソフトウェアからなる。スキャンにおいて使用される対物レンズは、Nikon CFI60 20 \times .5 NA Plan Fluorであった。空間的かつ時間的に安定化された蛍光光源は、その光源として100ワットOsram HBO 103 W/2水銀アークランプを使用し、Nikon蛍光アタッチメントで顕微鏡に接続する。ロングパス放射フィルターを備える標準Chroma Dapi/Hoechstフィルターキューブを核チャンネルのために使用した。ロングパス放射フィルターを備える標準FITCフィルターキューブを、Alexa488-標識NF Bチャンネルのために使用した。Cohu 640 \times 480ピクセル10ビットプログレッシブカメラ（モデル6612-3000；9.9 μ m²ピクセル）を画像取り込みのために使用した。

20

【 0 0 4 3 】

細胞内区画の分布または分画局在強度（FLI）の測定

細胞内物質は細胞応答の間に劇的に分布される。数十万から数百万の異なる細胞内物質が存在するかもしれないが、細胞応答は応答に関連する物質のサブセットを特異的に標識することによって測定され得る。時間の任意の点において、区画の同定と特異的に標識された物質の組み合わせは、分布のスナップショットを撮るために使用され得る。画像のセグメント化は、各細胞内区画についての画像のマスクを作製する。例えば、最小二乗設計されたコントラスト増強フィルターは、各々の細胞内区画の画像上で、セグメント化マスクを作製するために使用される。次いで、核のセグメント化がモザイク化を使用して重複する区画を分離するためのガイドとして使用される。これらの画像セグメント化技術は、多くの型の細胞画像上で最も良好に働く。しかし、他のセグメント化技術もまた、各細胞内区画についてセグメント化されたマスクを生成するために使用され得る。次いで、測定の論理が区画のマスクによって同定された各ピクセルのセットを通して繰り返し実行され、ピクセル強度 $I(x; y)$ を合計する。例として、それぞれサイズ N_c 、 N_n 、および N_m を有する、膜、細胞質、および核のマスク、 m 、 c 、および n を考えてみる。区画にわたる分布は各区画の分画局在強度として定義される。細胞質 F_c の分画局在強度は

30

40

$$F_c = \frac{\sum_{(x,y) \in c} I(x,y)}{\sum_{(x,y) \in c, m, n} I(x,y)} \quad (1)$$

である。この方程式は核 F_n および膜 F_m の分画局在強度についても類似であり、ならびに、 $F_c + F_n + F_m = 1$ である。蛍光画像形成の物理学は、細胞内分布を定量するための積分強度

50

の使用に導く。画像表面におけるピクセル位置 (x, y) での放射強度は

$$I(x, y) = \int_0^z I_0 Q \epsilon u' dz = I_0 Q \epsilon u' z \quad (2)$$

であり、ここで入射（励起）強度 I_0 、量子収率 Q 、吸光計数、局所およびカラム平均蛍光団濃度 u および u' 、ならびにカラム厚 z である。フィールドの奥行きが細胞よりも大きい場合、画像形成は有効に z 、光軸の方向において試料を積分する。高NA、共焦点およびマルチフォトン光学機器を用いる場合のようにフィールドの奥行きが細胞よりも小さい場合、 z における明白な積分はより正確に強度を表し得る。この積分がすでにフィールドの大きな奥行きを用いて光学的に、またはフィールドの小さな奥行きを用いて計算的にのい

10

$$\sum_{(x,y)} I(x, y) = I_0 Q \epsilon \sum_{(x,y)} u'(x, y) z(x, y) \quad (3)$$

であり、これはモル蛍光団に比例する単位を有する。 F_c は以下ようになる

$$F_c = \frac{\sum_{(x,y) \in c} u'(x, y) z(x, y)}{\sum_{(x,y) \in c} u'(x, y) z(x, y) + \frac{Q_n}{Q_c} \sum_{(x,y) \in n} u'(x, y) z(x, y) + \frac{Q_m}{Q_c} \sum_{(x,y) \in m} u'(x, y) z(x, y)} \quad (4)$$

20

これはモル蛍光団の単位を有する。前のように、方程式は核 F_n および膜 F_m の分画局在強度と類似である。量子収率は潜在的には区画特異的であり（すなわち、pH、イオン強度、および他の局所的物理的パラメータとともに変化する）、プロトコル開発の一部として実験的に確立され得る。区画画像セグメントにわたる直接的積分は、米国特許第5,989,835号において使用された平均区画強度比または差よりも好ましいことに注意されたい。なぜなら、領域の比は、 $N_c = N_n = N_m$ （これは、代表的には $N_c, N_n > N_m$ であるため、細胞質および核のシグナルの大部分を廃棄することによって人工的にのみ達成され得る）でなければ、直接的な解釈を混同させる偏向的因子を引き起こすからである。細胞内（または、細胞内区画）領域は、体積が固定されている場合でさえ、高さの関数である。同じ量の細胞内物質が異なる体積または領域にわたって分布され得る。従って、領域を超える強度を平均することは、標識された物質の量と無関係である何かに対する依存性を導入する。方程式（1）および（4）において F_c が、他に対する1つの区画の分画ではなく、すべての区画にわたる蛍光の全体の積分の画分であることにもまた注意されたい。

30

【0044】

さらに一般的には、区画の任意の数 η における区画 k は、

$$F_{\zeta_k} = \frac{\sum_{(x,y) \in \zeta_k} I(x, y)}{\sum_{i=1}^{\eta} \sum_{(x,y) \in \zeta_i} I(x, y)} \quad \text{and} \quad \sum_{i=1}^{\eta} F_{\zeta_i} = 1 \quad (5a)$$

40

である。同様に、区画の任意のサブセットは、多 - 区画分画局在強度を産生するための付加によって組み合わせられ得る。例えば、区画1および3の分画局在強度は

$$F_{\zeta_{1,3}} = F_{\zeta_1} + F_{\zeta_3} \quad (5b)$$

等である。

【0045】

FLICにおける結果および誤差

TNF 誘導NF B細胞質 - 核移行に対する分画局在強度測定：NF B p65調節サブユニッ

50

トの免疫蛍光染色は、スキヤニングの間に得られた画像の目視検査による細胞間NF B分布の容易な特徴付けを可能にする。蛍光の大部分は、刺激していない細胞中の核領域の外側に存在するのに対して、実質的な量は、TNF を用いる最大刺激に続く核マスクとともに共存している（図11）。図11のパネルは、細胞質NF B p65調節サブユニット（未刺激；左の画像）の、TNF を用いるHUVEC細胞の刺激に続く細胞核への移行（刺激；右の画像）を示す。細胞密度は、5000細胞/ウェル（上；行B、C）、2500細胞/ウェル（中；行D、E）、および1000細胞/ウェル（下；行F、G）であった。明確に大多数のAlexa488標識p65が、阻害サブユニットに結合しながら、刺激前には細胞質に遍在する。TNF を用いる刺激は、リン酸化およびp65の阻害サブユニットからの分離を引き起こし、移行が起きることを可能にする。最大刺激の際に、総計のわずか約20%のp65が移行する（画像の定性的目視検査は、刺激された細胞の核におけるより高い蛍光濃度を強調し過ぎ、より高い移行を示唆する傾向がある）。バックグラウンド蛍光がウェル間で変動することに注意されたい。以前の報告において明記されたように、刺激の際のp65の移行する分画は、未刺激細胞の細胞質中に含まれる総計のわずか約20%を表す [Dingら]。バックグラウンド蛍光に起因する効果は、平均バックグラウンド画像強度を概算および減算することによって補正され、これは、画像から画像でおよそ一定であるが、ウェルからウェルでは変動し得ることが見い出された。従って、相関はウェルあたりを基礎として実行された。

【 0 0 4 6 】

p65免疫蛍光の核マスクとの共存は、画像情報が光軸に平行な三次元試料を通してp65結合蛍光団放射を取り込むので、未刺激の細胞において起こり得、従って、核の体積の上下に寄与しやすい。同様に、刺激された細胞画像は、核マスクと共存した、残渣の細胞質p65免疫蛍光の寄与を有する。この効果は小さいかもしれないが、これは、分画局在強度測定において偏向を導入する。この効果が無視できない場合の適用において、補正手順が、未刺激の細胞における核および細胞質の絶対組み込み強度を相関させて、細胞質強度の関数として核測定への細胞質に存在する蛍光団の平均の寄与を確立することによって開発され得る。

【 0 0 4 7 】

図12は、図1のシステムにおける画像取り込み処理ステージを図示する。図12の画像を得るために、核チャンネル（Hoechst 33342またはDAPI）を、各ウェルにおける10×10フィールド領域にわたってスキャンし、核強度画像を有する画像テーブルを形成する（左上）。右上のパネルは、焦点の合っている取り込み画像のフィルター処理およびインテリジェント閾値設定によって産生された関連する核マスク画像を示す。主観的には、マスクは、顕著な局所的画像の相違にも関わらず正確かつ厳格な核マスク、および細胞から細胞への広範な核強度をを裏付した、Price、Hunter、およびGoughによって行われた定量的研究と一致している。このような相違は、単純な技術を混同させ得る。なぜなら、得られるマスクの正確さおよび厳格さは、局在化した強度測定を実質的に偏向させるからである。ヒトセグメント化方向および試験データを使用して、このフィルタリング技術は、>93%のピクセルの分類の正確さ、および約1%未満の相違の係数の厳密さを達成することが示された [Price、Hunter、およびGough]。これは受容可能であり、かつおそらく、限定性能レベルである。なぜなら、手動でセグメント化された例におけるヒト-ヒトの同意が比較し得るらしいからである。核の図心によってモザイク化されたスキャン領域は、図12に示される（左下）。次いでこのモザイク化構造は、個々の核画像を伴って、定量的p65チャンネル（Alexa488）を、劇的に集合させかつ関連付けるために使用される。チャンネル間の信頼できるアラインメントは、正確な分画局在強度のための基礎を提供する。

【 0 0 4 8 】

図12において、Hoechst33342またはDAPI標識された細胞核の個々にアドレス可能な画像を、スキヤニングの間に産生された画像のストリームから同定および抽出する。これらの画像を、各々の核の相対的位置（左上）を維持する画像テーブルデータ構造（図9）を使用してディスクに保存した。バイナリ核マスク画像（右上）は、達成された核セグメント化処理の正確さを示し、これは、区画局在化測定のために決定的である。核図心のポロノ

10

20

30

40

50

イ (Voronoi) モザイク化 (左下) は、すべての細胞からのシグナルを最大化するために、データ構造およびスキャン領域を、引き続きチャンネルを個々の核に相関させるために使用される多角形領域に分配した (右下)。

【 0 0 4 9 】

HUVEC細胞の200U/ml TNF 刺激の後の最大NF B移行を、スキャン領域内のすべての細胞について完全に、核における分画局在強度 (FLIN) を測定することによって定量した (細胞質における分画局在強度 (FLIC) は本研究において使用される2区画移行モデルにおいて等価である: FLIC+FLIN=1) (表4)。異なる細胞密度において、FLIN試料の平均、標準偏差 ()、標準誤差 (SE)、および変動係数 (CV) は、12の複製ウェルにおいて計算された (表4)。ウェル内試料平均FLINの6つすべての密度 x 刺激処理についてのウェル - ウェル試料統計は表5に報告され、図13における定常的な水平線によって図示される。図13は、HUVEC細胞におけるTNF 誘導NF B活性化についての集団統計学を図示する。FLIN応答 (μ ± 2 σ) を未刺激 (より低いFLIN) および最大刺激 (増加したFLIN) 細胞 (200U/ml TNF) で、5000細胞 / ウェル (上; 行B、C)、2500細胞 / ウェル (中; 行D、E)、および1000細胞 / ウェル (下; 行F、G) についてプロットする。水平方向の線は、列を横切った平均の平均 ± 2 x SEを与えた。

10

【 0 0 5 0 】

(表4) ウェルに関するおよび行で集めたFLIN統計学。CVは (標準偏差) / 平均として定義する

20

ウェル	n	平均	σ	SE	CV	ウェル	n	平均	σ	SE	CV
1B	964	0.147846	0.048122	0.001550	0.325484	1C	1123	0.290729	0.075713	0.002259	0.260423
2B	1132	0.130526	0.042521	0.001284	0.325768	2C	1226	0.286024	0.076772	0.002193	0.268410
3B	1309	0.134470	0.043876	0.001213	0.326291	3C	1443	0.318096	0.085135	0.002241	0.267640
4B	1263	0.132960	0.043633	0.001228	0.328090	4C	1265	0.346417	0.077291	0.002173	0.223114
5B	1089	0.137363	0.045115	0.001367	0.328437	5C	1410	0.342634	0.081898	0.002181	0.239025
6B	1297	0.138022	0.045132	0.001253	0.328990	6C	1149	0.338805	0.081211	0.002396	0.239627
7B	1261	0.138656	0.050421	0.001426	0.363893	7C	1367	0.309078	0.082221	0.002224	0.266019
8B	1163	0.134308	0.046321	0.001364	0.344884	8C	1330	0.305640	0.081423	0.002233	0.266401
9B	1283	0.132846	0.046153	0.001289	0.347419	9C	1260	0.314321	0.080458	0.002267	0.255975
10B	1127	0.132862	0.044833	0.001335	0.337442	10C	1311	0.322215	0.080099	0.002212	0.248589
11B	994	0.126178	0.040244	0.001276	0.318942	11C	1108	0.328182	0.083463	0.002507	0.254319
12B	1234	0.129016	0.043913	0.001250	0.340386	12C	1044	0.336819	0.082491	0.002553	0.244912
行B	14096	0.1345	0.0454	0.0004	0.3374	行C	15036	0.3199	0.0829	0.0007	0.2592
1D	192	0.165380	0.055621	0.004007	0.335721	1E	488	0.350999	0.088568	0.004009	0.252331
2D	228	0.169188	0.066621	0.004412	0.393770	2E	533	0.352654	0.076766	0.003325	0.217679
3D	273	0.177909	0.062334	0.003773	0.350374	3E	591	0.350479	0.074646	0.003071	0.212983
4D	330	0.167759	0.063749	0.003509	0.380006	4E	562	0.371006	0.077932	0.003287	0.210056
5D	356	0.219419	0.086005	0.004558	0.391968	5E	615	0.368168	0.077079	0.003108	0.209359
6D	367	0.211853	0.082027	0.004282	0.387188	6E	589	0.361819	0.080731	0.003326	0.223064
7D	349	0.184329	0.068234	0.003706	0.375601	7E	594	0.361462	0.077352	0.003174	0.213998
8D	319	0.183501	0.068811	0.003853	0.374990	8E	542	0.366526	0.081884	0.003517	0.221593
9D	311	0.219387	0.092681	0.005255	0.422455	9E	622	0.359408	0.089347	0.003473	0.248594
10D	382	0.150226	0.052488	0.002886	0.349390	10E	644	0.352375	0.079729	0.003142	0.226263
11D	354	0.158438	0.058115	0.003089	0.366802	11E	534	0.367225	0.082335	0.003563	0.224207
12D	277	0.149743	0.051306	0.003083	0.342629	12E	396	0.374030	0.091069	0.004576	0.243482
行D	3739	0.1809	0.0735	0.0006	0.4062	行E	6750	0.3613	0.0816	0.0010	0.2259
1F	199	0.171691	0.052991	0.003758	0.308639	1G	279	0.336876	0.086114	0.005155	0.255624
2F	109	0.154424	0.075078	0.007191	0.488179	2G	332	0.406467	0.077388	0.004247	0.190391
3F	204	0.147685	0.056180	0.003693	0.380404	3G	306	0.340088	0.076636	0.004495	0.231235
4F	182	0.146932	0.049610	0.003677	0.330882	4G	296	0.348505	0.068383	0.003975	0.196218
5F	177	0.163247	0.058143	0.004370	0.379411	5G	310	0.359116	0.070316	0.003994	0.195803
6F	174	0.156887	0.051666	0.003916	0.331348	6G	339	0.346658	0.077604	0.004215	0.223862
7F	200	0.151608	0.056382	0.003987	0.371893	7G	329	0.354841	0.075766	0.004177	0.213521
8F	172	0.183963	0.068814	0.005247	0.374063	8G	290	0.349761	0.074941	0.004401	0.214263
9F	163	0.146976	0.056036	0.004389	0.381262	9G	281	0.362293	0.075045	0.004477	0.207145
10F	171	0.146951	0.049964	0.003821	0.340006	10G	292	0.344575	0.077994	0.004564	0.226347
11F	176	0.156161	0.051188	0.003858	0.329902	11G	317	0.341355	0.076450	0.004294	0.223961
12F	160	0.158985	0.049600	0.003921	0.311977	12G	235	0.347623	0.089314	0.004522	0.198394
行F	2087	0.1664	0.0570	0.0012	0.3642	行G	3606	0.3537	0.0779	0.0013	0.2203

30

【 0 0 5 1 】

本発明者らは標識されたNF Bの18.18% -19.68% (平均18.80%) の発生を測定した。本発明者らは、行あたり、12の行複製ウェルFLIN試料平均を平均すること、ならびに各細胞密度での刺激したおよび未刺激の平均を区別することによって計算した。TNF 刺激に対する細胞応答の不均一性は、得られた画像の目視検査によって明らかであり、図13における ± 2 σ の信頼区間幅において要約される (各ウェル平均周辺のより大きな間隔)。刺激されたおよび未刺激のウェル集団は応答において有意な重複を有する。しかし、18.80% の平均応答は、表4におけるウェル中で計算され、図13において図解的に示されるFLIN標準誤差 (各ウェル平均に関してより小さな間隔) と比較して大きい。例えば、行Eにおける平均SE、3.46 x 10⁻³ は、0.0139FLIN増分の4SEの経験的応答解像、または18.80% のシ

50

グナルダイナミックレンジを超える約7.4%の増分を与える。

【0052】

ウェルからウェルのウェル平均FLIN測定の幅を分析することによって、本発明者らは、実験のウェル-ウェル変動性および再現性を評価し得る。行集合FLIN試料平均（各行における12の複製ウェル試料平均を平均することによって計算）は、 1.6×10^{-3} - 7.20×10^{-3} の標準誤差を有する（2.34% - 13.93%のCV）（表5）。このウェルからウェルの試料平均可変性は、図13における水平集合平均および $\pm 2SE$ の線によって可視化される。この領域からの個々のウェル応答の偏差は、個々のウェル環境におけるプロトコル摂動の効果を示す。統計的に有意な差異が存在するが、測定された移行に対する効果による物理的または科学的な重要性は、代表的にはこの実験においては小さく、複製ウェルの数を制限することの可能性は、最適化および制限されるプロトコルにおいて必要とされることを示す。定量的な例として、表4においてD列についてのウェルCV間に切りつめると、変動性が13.93%から4.76%に減少する。D列が最も高いCVを有すること、およびその数は6つの中間のウェルに調整されていることに注意されたい（大部分のヒトの調製エラーを有するウェルは分布の端にあるという仮定を使用している）。ウェルからウェルへの変動性の効果を緩和するウェル平面複製レイアウトは、特異的アッセイ法開発の間に決定され得る。

10

【0053】

（表5）ウェル平均FLIN値（n=12）のウェルからウェルへの統計学

行	平均	σ	SE	CV
B	0.1346	0.0055	0.0016	0.0412
C	0.3199	0.0198	0.0057	0.0618
D	0.1798	0.0250	0.0072	0.1393
E	0.3616	0.0085	0.0024	0.0234
F	0.1564	0.0110	0.0032	0.0704
G	0.3532	0.0184	0.0053	0.0521

20

各行を横切ったの、FLINウェル試料平均の平均、標準偏差、標準誤差、および変動係数。

【0054】

最小有意応答に達するために必要とされる細胞/ウェルの自動決定

薬物応答達成の理論：

経験的な用量応答達成を理論的に実証するため、および異なる技術を使用して産生される結果とのデータのベースライン比較を適切に行うために、応答達成の意味の客観的定義およびその測定忠実度に対する依存性、試料サイズおよびエラーの制御が必要である。阻害応答は、阻害濃度の範囲を横切って分布する実験的に良好な平均測定の収集から非線形回帰によって見積もられる。曲線の見積もりにおける変動性の源は、応答における高集団の変動性（不均一性）、細胞から細胞への変動性、および阻害剤濃度の不十分なサンプリングを含む。これらの因子は天然に依存性であり；測定の正確さは応答における測定可能な差異に制限を与える。実験設計はウェルのデータ点の複製にわたって連帯して最適化すること、および個々のウェル測定の品質（ウェルあたりの細胞の数の関数）を含む。

30

【0055】

システムの達成の直接的な測定は、信頼して測定され得る最小限の統計学的に有意な応答である。システムの性能の等価な測定は、応答モデルパラメータを信頼して見積もるための各阻害剤濃度で必要とされる、阻害応答モデルの選択、細胞数の測定によって関連付けられる特定の最小限の有意な応答についてである。応答する細胞の2つの集団について、本発明者らは、システム達成の測定として信頼して検出され得る平均FLINにおけつ最小限の差異を決定したい。このため、本発明者らは2つの試料仮説試験を定義する

40

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0 \quad (6)$$

$$H_a: \mu_1 - \mu_2 > 0 \quad (7)$$

ここで μ_1 および μ_2 は真の（観察していない）平均FLIN応答であり、 H_0 および H_a は帰無仮説および対立仮説である。これは、決定基準 $z > z_{\alpha}$ のアッパーテイルド検定であり、ここ

50

で、

$$z = (x_1 - x_2) / (\sigma \sqrt{2/n})$$

が、試料平均 x_1 および x_2 についての単位分散正規化検定統計学であり、かつ z は レベル検定の拒絶のための閾値であり、

$$\alpha = \Pr(z > z_\alpha | H_0) = 1 - \int_{-\infty}^{z_\alpha} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx = 1 - \Phi(z_\alpha) \quad (8)$$

タイプI誤差の確率()は2つの同じく阻害される試料が天然の相違によって測定において最小限に有意な応答の違いを示す。タイプI誤差の確率は、アッセイ法の要件によって決定されるように、前もってその値を、例えば $\alpha = 0.05$ に固定することによって制御される。同様に、タイプII誤差の確率()は、最小の異なる応答を有する2つの試料が測定において有意な差を示さない確率であり、かつこれは同様に決定され、アッセイ法要件によって固定される。これらのアッセイ法パラメータを述べるため、および正確な測定を導くために、本発明者らは確率 を数学的に表現し、絶対最小有意応答 (MSR) μ を仮定する

$$\Pr(z < z_\alpha | \mu_1 - \mu_2 = \Delta\mu) = \beta(\Delta\mu) \quad (9)$$

$$\Pr\left(\frac{x_1 - x_2 - \Delta\mu}{\sigma\sqrt{2/n}} < z_\alpha - \frac{\Delta\mu}{\sigma\sqrt{2/n}} | \mu_1 - \mu_2 = \Delta\mu\right) = \beta(\Delta\mu, \sigma, n) \quad (10)$$

$$\Phi\left(z_\alpha - \frac{\Delta\mu}{\sigma\sqrt{2/n}}\right) = \beta(\Delta\mu, \sigma, n) \quad (11)$$

これは、 μ 、 σ (FLIN集団標準偏差) および n (試料サイズ) の関数として表現する。両方の集団が同じ μ を共有するという仮定は合理的である。なぜなら、極限において、最小検出可能差異は同じ集団に接近するからである (x_1 x_2 についての式は導くのは容易であるが、しかし、本発明者らが非常に別個の応答を検出するための試料サイズの要件の見積もりを必要とする場合である)。本発明者らが z について行ったように、 α を例えば、 $\alpha = 0.05$ と特定することによって、本発明者らはタイプII誤差確率を制御しかつ z を固定する

$$\Phi(z_\beta) = \beta \quad (12)$$

$$z_\beta = z_\alpha - \frac{\Delta\mu}{\sigma\sqrt{2/n}} \quad (13)$$

$$\Delta\mu = (z_\alpha - z_\beta)\sigma\sqrt{2/n} \quad (14)$$

MSRはアッセイ法または実験のダイナミックレンジを関数として発現される

$$MSR = \frac{\Delta\mu}{\mu_{max} - \mu_{min}} = \frac{(z_\alpha - z_\beta)\sigma\sqrt{2/n}}{\mu_{max} - \mu_{min}} \quad (15)$$

特定されたMSRおよびアッセイ法パラメータについて、試料サイズに対応する最小値は

$$n = 2 \left(\frac{(z_\alpha - z_\beta)\sigma}{\Delta\mu MSR} \right)^2 \quad (16)$$

【 0 0 5 6 】

この正確な測定の理解を得るために、 $\alpha = 0.05$ とし、次いで、MSRはアッセイ法ダイナミックレンジに対して最小有意用量応答であり、その結果

1. 集団平均応答間の真の差異が存在しない、 $z_\alpha > z_\beta$ または

10

20

30

40

$$x_1 - x_2 \leq z_{\alpha} \sigma \sqrt{2/n} = \Delta\mu / 2$$

(試料平均間で測定される有意な差異がない)という95%の可能性が存在し、および
2. $\mu_1 - \mu_2 = \mu > 0$, $x_1 - x_2 > \mu / 2$ である(試料平均間で測定された有意な差異)という95%の可能性が存在する。

【0057】

それゆえにMSRの詳述およびプロトコールパラメータは、用量応答点測定の変動性を制御するための最小限必要とされる資料サイズについて客観的な保証を行うことを可能にし、その結果、それらは、重複しないようである(本発明者らの、の詳述に従って)。n(MSR)曲線のファミリーは図14にプロットされる。列Eにおける平均集団は $= 8.1453 \times 10^{-2}$ 、これはnが約742について7.4%MSRを許容する。 10

【0058】

このスキームにおけるタイプIエラーおよびタイプIIエラーの確率の制御は、実験的な正確さの測定としてのその使用による最も伝統的な仮説試験とは異なる意味合いを有する。阻害剤アッセイ法におけるタイプIエラーは、複製測定が実験的にセットされた制御間隔の外側で応答を生じることを示す。タイプIIエラーは非複製測定(異なる阻害剤濃度)が同じ制御間隔中で測定された応答を生じることを示す。阻害応答モデルにおける非線形回帰は、これらのエラーの異なる意味を区別しない。データ点の散乱を生じ、およびパラメータ概算を複雑化することの両方のみである。それゆえに、阻害応答を含む実験について、に制約することが示唆される。 20

【0059】

図14は、 $= \{ .02, .04, .06, .08, .1, .12, .14 \}$ (上昇、 $= 0.05$ (タイプIエラー確率))、 $= 0.05$ (タイプIIエラー確率)について、理論的用量応答達成を示す曲線ファミリーである。この図において、必要とされる細胞の数(y軸)は、達成される(x軸)全体のNF B移行の分画に対してプロットされる。本発明に従う測定は、表4に示されるように、 $= 0.06$ と $= 0.08$ の間に入る(底から第3の曲線と第4の曲線との間)。これらの関連は、改善されたかまたは分解された測定の忠実度の効果の容易な可視化および細胞数の要件に対する達成を可能にする。

【0060】

試料サイズの要件： 30

Dingら [G Ding, P Fischer, R Boltz, J Schmidt, J Colaianne, A Gough, R Rubin, およびD Uiller. Characterization and quantitation of NF B nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-. Journal of Biological Chemistry, 273(44): 28897-28905, 1998]は、画像化プラットフォーム上で実行される同様のNF B移行実験についての試料サイズ要件を報告する。ここで報告した技術の優れた細胞測定の忠実度を実証するために、表6は、Dingらによって公開された結果を表4における生の測定データに基づく同様の計算、および以前のサブセクションにおける誘導物に対して比較する。表6は、所定のレベルの刺激応答(約19%FLIN変化の全体の移行振幅の2%-100%)を測定するために必要とされる細胞測定の数の比較的な概算を、95%および99%のタイプI信頼度でのNF B蛍光団移行の関数として提供する($= 0.05$, 0.01 ; $= 0.20$) 40。実験のパラメータはここで複製され、細胞測定の忠実度に直接的な比較を提供する。さらなる応答レベル2%-10%およびさらなるカラム($= = 0.001$)を、本発明に従う結果をさらに実証するために加えた。一般的な集団において、同じ数の細胞はDingらにおいて報告される技術を使用して100%応答(19%移行事象)を測定することが必要とされ、本発明者らの発明の原始を使用して約25%の応答の測定を可能にした。合理的な用量応答曲線の見積もりは20%またはそれ以上の達成を必要とし得、これは、 $= 0.05$ 、 $= 0.20$ で、本発明者らの発明の原理を使用して達成するために約12x、より少ない測定を必要とする。

【0061】

(表6)制御されたエラー確率(タイプI、タイプII)での、本発明を用いて得られた 50

全体の（最大刺激）NF B移行（19%FLIN変化）の%を測定するために必要であった最小細胞数の、Dingらにおいて報告されたそれとの比較

最大応答率 (%)	Dingら (0.05,0.20)	本発明 (0.05,0.20)	Dingら (0.01,0.20)	本発明 (0.01,0.20)	本発明 (0.001,0.001)
2%	データなし	3970	データなし	6445	24528
5%	データなし	640	データなし	1039	3952
10%	データなし	162	データなし	263	1000
20%	> 500	42	> 500	68	256
30%	388	< 30	> 500	31	117
35%	220	< 30	331	< 30	87
45%	141	< 30	213	< 30	54
55%	99	< 30	149	< 30	37
65%	73	< 30	111	< 30	< 30
70%	57	< 30	86	< 30	< 30
80%	45	< 30	68	< 30	< 30
90%	37	< 30	56	< 30	< 30
100%	31	< 30	47	< 30	< 30

10

応答のカラムは、測定 of 完全なダイナミックレンジの応答の%を与える（18.8%）。本発明者らの計算は、n = 30について、ガウス分布の、中心極限定理によって保証されたウェル試料平均測定を前提とする。n < 30については、学生t分布が適切である。しかし、単純化のために30細胞の最小値は常に測定される。本発明者らの計算は、μ = 0.1818であり、およびσが0.0650（未刺激）と0.0800（刺激後）の間に直線的に内挿されていると仮定している。

20

【 0 0 6 2 】

モンテカルロ応答曲線概算：

概算された阻害剤応答パラメータに対する測定精度の直接的な効果を定量するために、モンテカルロシミュレーションを、図15に示されるモデル応答（これは、IC₅₀ = 8.895 × 10⁻⁵を有する理論的用量応答曲線を示し、μ_{max}、μ_{min}およびσはシミュレートされる測定手順によって特定される）を使用して実行した。図15についてはμ_{max} = 1.0、およびμ_{min} = 0.0である。円形の点はシミュレーションにおいて使用された11の阻害剤濃度を示す。これらの11の部位は対数的に阻害剤濃度範囲を横切って選択され、そこに偏差

30

$$\sigma / \sqrt{n}$$

を伴うガウ斯拉ンダムノイズが加えられ、500のシミュレートされた実験結果を作成した。図16および17は、シミュレートされたデータセットを図示し、各々がガウス-ニュートン手順を使用して図15におけるモデルに非線形的に回帰された[例えば、WH Press, SA Teukolsky, WT Vetterling, およびBP Flannery. Numerical Recipes in C, 第2版、Cambridge University Press, New York, NY, 1992を参照されたい]。

【 0 0 6 3 】

図16のパネルは、ウェル-ウェル平均FLIN応答についての経験的なIC₅₀分布によって達成された最も悪い場合のシミュレートされた用量応答実験を比較的に図示する。上の3つのパネルは真の値を用いた概算のIC₅₀のスカッタープロットを示す。中央の3つのパネルはIC₅₀頻度ヒストグラムである（表7における5パーセンタイル値および95パーセンタイル値との比較）。下のパネルは合計500のシミュレーションからの20の概算用量応答曲線のサンプルを図示する。一番左の3つのパネルは、本発明者らの発明についての最も悪い場合における、完全な集団、σ = 0.093での、90%のIC₅₀信頼区間を示す。しかし、本発明者らの最も悪い場合は一番右の3つのパネル（Dingら）よりも約3.62倍良好である（より狭い）。本発明者らのG₁亜集団（中央；最も悪い場合 σ = 0.066）についての結果は、この亜集団の均一性を利用して5.07倍良好な90%のIC₅₀信頼区間を与える。シミュレーションのための実験パラメータは表7に示される。

40

【 0 0 6 4 】

図17において、最も良好なシミュレートされた用量応答実験がウェル-ウェル平均FLIN

50

応答についての経験的な曲線のIC₅₀分布を図示する。真の値を用いた概算のIC₅₀のスクエ
 ッタープロット(上の3つのパネル)、IC₅₀頻度ヒストグラム(中央の3つのパネル;表7
 における5パーセンタイル値および95パーセンタイル値との比較)、および合計500のシミ
 ュレーションからの20の概算用量応答曲線のサンプル(下の3つのパネル)が示される。
 左側についての90%のIC₅₀信頼区間(本発明によって生成された結果のシミュレーション
 ;最も良好な場合、完全な集団、 $\sigma=0.040$)は、右側(Dingらに従って生成された結果の
 シミュレーション)よりも約8.81倍良好である(より狭い)。本発明者らのG₁亜集団(中
 央;最も良好な場合 $\sigma=0.021$)についての結果は、この亜集団の均一性を利用して16.3倍
 良好な90%のIC₅₀信頼区間を与える。シミュレーションのための実験パラメータは表7に
 示される。

10

【0065】

応答点の概算についての標準誤差は0.0093(最も悪い場合、表4の標準偏差)、0.004(最
 も良好な場合、表4の標準偏差)、および8.354(Dingらにおいて報告された統計的有意
 性について、細胞数から計算し、および表6において複製した)であった。両方の標準誤
 差はn=100を想定している。表7は、3つすべての結果についての90%のモンテカルロ信頼
 区間の幅を 5.8585×10^{-5} 、 2.4063×10^{-5} 、および 2.1202×10^{-5} と報告し、これは、本発明
 者らの発明について得られたIC₅₀概算において、3.62倍(最も悪い場合)および8.81倍(最
 も良好な場合)のより強い信頼度を示す。図18および19に示されるさらなるシミュレー
 ションは、実験的濃度のサンプリングに対するIC₅₀概算の感度を実証する。

【0066】

20

例えば、図18において、用量応答回帰のモンテカルロシミュレーションは、IC₅₀概算が
 実験的濃度の範囲が減少するにつれて細胞測定の正確さに対してより感度が高くなること
 を明らかにする。左のカラムのパネルは、実験において使用されたモデルシグモイドを示
 し、11の濃度(上;円形)から3の濃度(下;円形)の範囲である。500のうちの20の実行
 が本発明(中央のカラム; $\sigma=0.0665$ 、 $\mu=.18$)およびDingら(右のカラム; $\sigma=83.545$
 $\mu=56$)について図式的にプロットされる。

【0067】

さらに図19aおよび19bを参照すると、これは、試料濃度(3、5、7、9、11)に対するDi
 ngら(円形; $\sigma=83.545$ 、 $\mu=56$)および本発明(プラス; $\sigma=0.0665$ 、 $\mu=.18$)のIC₅₀
 モンテカルロ信頼区間幅を示す。図19bは図19aのズームである。明白に、測定精度はサ
 ンプリングおよび関連する濃度範囲が減少するにつれてより重要になる。グラフの肘の部
 分は、回帰の破壊に対応し、これは、頑健な回帰が本発明の測定精度によって維持された
 結果を示す。

30

【0068】

(表7)モンテカルロシミュレートされた用量応答パラメータおよび概算の結果、500
 の実行についてn=100細胞測定、異なる測定精度下でのIC₅₀90%モンテカルロ信頼区間
 の可変性を示す

標準偏差	範囲	CV	IC ₅₀ 5%	IC ₅₀ 95%	ΔIC_{50}
0.093	[.15,.33]	51%	6.2930×10^{-5}	1.2151×10^{-4}	5.8585×10^{-5}
0.040	[.15,.33]	22.2%	7.8407×10^{-5}	1.0247×10^{-4}	2.4063×10^{-5}
0.066	[.15,.33]	35.1%	7.0982×10^{-5}	1.1109×10^{-4}	4.1808×10^{-5}
0.021	[.15,.33]	11.7%	8.2296×10^{-5}	9.5332×10^{-5}	1.3036×10^{-5}
83.545	[0,55]	152%	3.3819×10^{-5}	2.4584×10^{-4}	2.1202×10^{-4}

40

ウェルからウェルの平均FLIN応答標準誤差:0.0093(本発明;最も悪い場合での完全な細胞
 集団)、0.0040(本発明;最も良好な場合での完全な細胞集団)、0.0066(本発明;最
 も悪い場合でのG₁亜集団)、0.0021(本発明;最も良好な場合でのG₁亜集団)、および8.
 3545(Dingら)。

【0069】

均一な亜集団分析

条件的に特定の形態学的亜集団上での関心対象の量を概算する本発明の能力を例証する

50

ために、経験的に決定された分類スキームが、S、M、G₂細胞および蛍光アーティファクトからG₁細胞を単離するために開発された。6ルール分類子(表9)が、Hoechst 33342またはDAPI核チャンネルにおいて取られた標準細胞測定の設定(表8)から開発された。移行実験データの分析を、このG₁亜集団について2500細胞/ウェル(列D、E)で反復し、かつ表10(生のデータ)、表11(ウェル平均の統計)、および図20(ここではG₁亜集団の移行応答がプロットされている)において報告する。列の集合(すべてのウェル平均亜集団FLIN応答の平均)は0.1418(未刺激)および0.3317(刺激後)である。

【0070】

改善された均一性の細胞応答は、明確に減少した±2 集団間隔において見られる(図13中央を図20と比較されたい)。表9によって規定される亜集団は、完全な細胞集団の約2倍均一に応答するのに対して、平均応答はほぼ同一であった。ウェルからウェルの変動性は完全集団の分析と一致して見られる。

【0071】

表12は、NF B移行実験についての試料サイズ要件を報告し、測定はG₁亜集団に限定されていることが前提とされている、20%応答達成での完全集団要件を超えた改善(用量応答回帰において使用される最小5試料を与える)は、 $\sigma_s = 0.05$ 、 $\sigma_F = 0.20$ で42細胞から<30細胞(29%の減少); $\sigma_s = 0.01$ 、 $\sigma_F = 0.20$ で68から<30(56%の減少); および $\sigma_s = 0.001$ 、 $\sigma_F = 0.001$ で256から47(82%の減少)である。亜集団分析は、細胞数要件をDingらによって報告されたデータ(20%応答の場合について $\sigma_s = 0.05$ 、 $\sigma_F = 0.01$)よりも94%減少させた。

【0072】

モンテカルロシミュレーションはまた、G₁亜集団統計を使用して反復された。実験的パラメータおよび表7に与えられる数値的IC₅₀ 90%信頼区間幅は、同じ細胞数n=100について完全集団の分析を超えて、区間幅において28.6% - 45.8%の減少を示す。Dingら(上記のような)に基づくシミュレーションに対する比較は、図16において可視化されているように、最も悪い場合において5.07倍の改善(中央のカラムと右のカラムを比較されたい)、および図17において可視化されているように、最も良好な場合において16.3倍の改善を示す。

【0073】

これらの結果は、改善された応答が、得られたスキャン領域を減少させることおよび特定の達成を維持すること(システムのスループットを最適化すること)、またはスキャン領域、従ってスループットを固定し、しかしインテリジェントな様式で細胞測定を破棄し、均一な応答集団を選択し、かつ応答の達成を改善することによって利用され得ることを示す。これらの利点は、亜集団を規定する細胞の分画が応答達成の式によって定義される閾値を超える場合にのみ利用可能である。例えば、以下の場合:

$$n_s < n_{Ff} \text{ または } \frac{n_s}{n_F} = \frac{\sigma_s^2}{\sigma_F^2} < f \quad (17)$$

は常に、スキャン領域は完全集団n_Fを測定するために必要である最小値から減少され得る。ここで、fは均一な亜集団を含む細胞の分画である。これが真である場合、スキャン領域は細胞密度およびfに依存するフィールド数の任意の数によって減少され得る。従って、亜集団分析は、十分に均一および十分に大きな亜集団が存在する場合にはいつでもシステムのスループットに直接影響を与え得る。同様に、最小有意応答は、以下の場合:

$$MSR_s - MSR_F > 0 \text{ または } \sigma_s - \sigma_F \sqrt{f} > 0 \quad (18)$$

は常に改善される。これらの規則は図14における曲線を調べることによって確認され得る。

【0074】

(表8) 標準細胞測定

10

20

30

40

測定	定義
1 シリアル番号	i
2 核境界ボックス中心の x 座標	x_b
3 核境界ボックス中心の y 座標	y_b
4 核境界ボックスの x サイズ	Δx_b
5 核境界ボックスの y サイズ	Δy_b
6 核領域	$a_n = \#$ 核ピクセル
7 核領域のルート	
8 積分核強度	$I_n = \sum_n I(x,y)$
9 平均核強度	$\bar{I}_n = I_n / a_n$
10 最小核強度	$p_0 = \min[I_n(x,y)]$
11 5パーセンタイルの核強度	$p_5 = 5\%[I_n(x,y)]$
12 25パーセンタイルの核強度	$p_{25} = 25\%[I_n(x,y)]$
13 50パーセンタイルの核強度	$p_{50} = 50\%[I_n(x,y)]$
14 75パーセンタイルの核強度	$p_{75} = 75\%[I_n(x,y)]$
15 95パーセンタイルの核強度	$p_{95} = 95\%[I_n(x,y)]$
16 最大核強度	$p_{100} = \max[I_n(x,y)]$
17 核強度の四分位範囲	$IQ_n = p_{75} - p_{25}$
18 核強度の分散	
19 核強度の標準偏差	σ_n
20 核強度の三分中心積率	$m_{n,3} = (a_n - 1)^{-1} \sum_n (I(x,y) - \bar{I}_n)^3$
21 核強度の三分中心積率の3乗根	$m_{n,3}^{1/3}$
22 核強度の四分中心積率	$m_{n,4} = (a_n - 1)^{-1} \sum_n (I(x,y) - \bar{I}_n)^4$
23 核強度の四分中心積率の4乗根	$m_{n,4}^{1/4}$
24 核の周長	$l_n = \#$ 核ピクセル (8連結)
25 核の振動	$w = l_n / a_n$
26 正規化された核の振動	$\bar{w} = l_n / \sqrt{a_n}$
27 チャンネル j 積分核強度	$I_j = \sum_j I_j(x,y)$
28 チャンネル j 積分核強度	$I_{n,j} = \sum_j I_j(x,y)$
29 チャンネル j 積分細胞質強度	$I_{c,j} = \sum_j I_j(x,y)$
30 チャンネル j FLIN	$I_n / (I_{c,j} + I_{n,j})$

10

20

【 0 0 7 5 】

(表9) 表8に定義された細胞測定に基づく G_1 亜集団についての6規則定義

規則	効果(除外される細胞の特性)
1 $22.73 \leq \sqrt{a_n} \leq 31.85$	核領域が異型の休止細胞核である
2 $10^5 \leq I_j \leq 4 \times 10^5$	<i>NFKB</i> 蛍光団がほとんどないかもしくはないか、または大きな明るい蛍光アーティファクト
3 $m_{n,3} < 0$	分裂しているか、異常な核形状を有するか、または死滅しつつある
4 $.11 \leq w \leq .2$	2つまたはそれ以上の集合核または不規則な形状の核
5 $10 \leq IQ_n \leq 60$	不規則な核の構成
6 $w < 4.8$	不規則な形状の核

30

【 0 0 7 6 】

(表10) 表8および9における分類子によって定義された G_1 亜集団の、ウェル関連および行で集めたFLIN統計学

ウェル	n	平均	標準偏差	標準誤差	CV	ウェル	n	平均	標準偏差	標準誤差	CV
D1	53	0.139494	0.026964	0.003704	0.193301	E1	204	0.328162	0.064145	0.004491	0.195469
D2	79	0.135942	0.021481	0.002417	0.158018	E2	236	0.330019	0.058368	0.003799	0.176861
D3	85	0.142980	0.029554	0.003206	0.206699	E3	257	0.329866	0.056664	0.003535	0.171778
D4	128	0.137386	0.027846	0.002461	0.202687	E4	230	0.350588	0.066655	0.004395	0.190124
D5	70	0.154410	0.027970	0.003343	0.181141	E5	269	0.349991	0.060755	0.003704	0.173590
D6	75	0.153748	0.027003	0.003118	0.175630	E6	255	0.324779	0.055980	0.003506	0.172363
D7	88	0.142782	0.025264	0.002693	0.176942	E7	241	0.337747	0.058013	0.003737	0.171766
D8	102	0.145129	0.029421	0.002913	0.202720	E8	227	0.327979	0.060758	0.004033	0.185250
D9	72	0.153787	0.025640	0.003022	0.166723	E9	290	0.322116	0.061913	0.003636	0.192207
D10	114	0.127378	0.023832	0.002232	0.187094	E10	278	0.325874	0.058762	0.003524	0.180322
D11	106	0.136946	0.026416	0.002566	0.192890	E11	204	0.331738	0.064243	0.004498	0.193656
D12	107	0.131305	0.025726	0.002487	0.195925	E12	162	0.320942	0.047253	0.003713	0.147232
行D	1029	0.1406	0.0277	0.0008	0.1969	行E	2853	0.3318	0.0606	0.0011	0.1821

40

CVは(標準偏差) / 平均で定義される。これらの結果は、細胞応答の変動性の有意な減少

50

を示し、これは、各ウェルにおける全体の細胞集団の中ではるかにより均一に応答する亜集団を示す。このデータの視覚化のために図20を参照されたい。

【 0 0 7 7 】

(表11) 表8および9における分類子によって定義された、ウェル亜集団平均FLIN (n=12) のウェル - ウェル統計学

行	平均	標準偏差	標準誤差	CV
D	0.1418	0.0088	0.0026	0.0624
E	0.3317	0.0097	0.0028	0.0295

FLINウェル試料の平均、標準偏差、標準誤差、および変動係数は各行を横切ることを意味する。標準誤差が亜集団平均における関与する細胞の数の減少に起因して増大するが、ウェル - ウェルの変動性は表5において報告した完全集団データと一致する。このデータの視覚化のための図20を参照されたい。

【 0 0 7 8 】

(表12) 制御されたエラー確率 (タイプI、タイプII) での、本明細書および [6] において報告された、最大刺激での全体のNF B移行%を達成するために必要であったG₁亜集団の最小細胞数

最大応答率 (%)	Dingら (0.05,0.20)	本発明 (0.05,0.20)	Dingら (0.01,0.20)	本発明 (0.01,0.20)	本発明 (0.001,0.001)
2%	データなし	624	データなし	1013	3855
5%	データなし	103	データなし	168	637
10%	データなし	<30	データなし	44	168
20%	>500	<30	>500	<30	47
30%	388	<30	>500	<30	<30
35%	220	<30	331	<30	<30
45%	141	<30	213	<30	<30
55%	99	<30	149	<30	<30
65%	73	<30	111	<30	<30
70%	57	<30	86	<30	<30
80%	45	<30	68	<30	<30
90%	37	<30	56	<30	<30
100%	31	<30	47	<30	<30

本発明者らの計算は、 $\mu=0.1818$ を前提とし、およびは0.0267 (未刺激) と0.0542 (刺激後) の間に直線的に入っている。さらなる前提については表6の説明文を参照されたい。

【 0 0 7 9 】

図21aおよび21bは、BIPI化合物AによるNF B核移行の阻害を図示する。これらの図において、核における分画局在強度 (FLIN) は、10×10フィールドスキャン領域 (図21a) および100細胞集団 (図21b) において見いだされる完全細胞集団について阻害剤濃度に対してプロットされる。細胞調製は上記に示した通りである。図21aは、HUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いる全体の細胞集団分析を図示し、ここで $K_i(\text{Cmpd}_A)=6.95\text{E}-05$ 、 $R_{\text{max}}=3.86\text{E}-01$ 、および $R_{\text{min}}=0.212$ である。図21bは、HUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いる100細胞集団分析を図示し、ここで $K_i(\text{Cmpd}_A)=8.09\text{E}-05$ 、 $R_{\text{max}}=4.21\text{E}-01$ 、および $R_{\text{min}}=0.212$ である。

【 0 0 8 0 】

図22aおよび22bは、BIPI化合物BによるNF B核移行の阻害を図示する。これらの図において、核における分画局在強度 (FLIN) は、10×10フィールドスキャン領域 (図22a) および100細胞集団 (図22b) において見いだされる完全細胞集団について阻害剤濃度に対してプロットされる。細胞調製は上記に示した通りである。図22aは、HUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いる全体の細胞集団分析を図示し、ここで $K_i(\text{Cmpd}_B)=5.08\text{E}-05$ 、 $R_{\text{max}}=3.77\text{E}-01$ 、および $R_{\text{min}}=0.212$ である。図22bは、HUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いる100細胞集団分析を図示し、ここで $K_i(\text{Cmpd}_B)=6.65\text{E}-05$ 、 $R_{\text{max}}=4.12\text{E}-01$ 、および

びRmin=0.212である。図23aおよび23bは、BIPI化合物CによるNF B核移行の阻害を図示する。核における分画局在強度 (FLIN) は、10×10フィールドスキャン領域 (図23a) および100細胞集団 (図23b) において見い出される完全細胞集団について阻害剤濃度に対してプロットされる。細胞調製は上記に示した通りである。図23aは、HUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いる全体の細胞集団分析を図示し、ここでKi (Cmpd_C)=1.01E-06、Rmax=3.99E-01、およびRmin=0.212E-01である。図23bは、HUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いる100細胞集団分析を図示し、ここでKi (Cmpd_C)=1.36E-06、Rmax=4.20E-01、およびRmin=0.212である。

【 0 0 8 1 】

図24は、表8および9によって規定されたG₁細胞亜集団におけるBIPI化合物BによるNF B核移行の阻害を、10×10フィールドスキャン領域において見い出される完全細胞集団について阻害剤濃度に対してプロットされる、核における分画局在強度 (FLIN) を用いて図示する。細胞調製は上記に示した通りである。この図において、G₁細胞集団分析はHUVEC細胞におけるNF B核移行の阻害を用いて示され、ここでKi (Cmpd_B)=3.70E-05、Rmax=3.82E-01、およびRmin=0.212である。

【 0 0 8 2 】

(表13) 非線形回帰分析によって得られた阻害剤応答パラメータの概算および標準誤差

化合物	R _{max} (FLIN) (SE)	R _{min} (FLIN) (SE)	IC ₅₀ (FLIN) (SE)
A	0.386 (8.17 x 10 ⁻³)	0.212*	6.95 x 10 ⁻⁵ (2.2 x 10 ⁻⁵)
A (n=100)	0.421 (6.70 x 10 ⁻³)	0.212*	8.09 x 10 ⁻⁵ (1.8 x 10 ⁻⁵)
B	0.377 (3.63 x 10 ⁻³)	0.212*	5.08 x 10 ⁻⁵ (6.8 x 10 ⁻⁶)
B (n=100)	0.412 (5.85 x 10 ⁻³)	0.212*	6.65 x 10 ⁻⁵ (1.3 x 10 ⁻⁵)
B (G ₁)	0.382 (3.28 x 10 ⁻³)	0.212*	3.70 x 10 ⁻⁵ (4.1 x 10 ⁻⁶)
C	0.399 (6.90 x 10 ⁻³)	0.212 (3.78 x 10 ⁻³)	1.02 x 10 ⁻⁶ (1.6 x 10 ⁻⁷)
C (n=100)	0.424 (8.96 x 10 ⁻³)	0.212*	1.15 x 10 ⁻⁶ (2.2 x 10 ⁻⁷)

「変曲点での単一の傾き」シグモイドモデルを7つの濃度の三つ組みのウェルに適合させ、BIPI阻害剤である化合物A、B、およびCについての応答特性を決定した。各化合物を、各ウェル内で10×10フィールドスキャン領域において見い出される完全細胞集団の細胞測定を使用して、およびまた、各ウェルにおいて測定する細胞数を100まで制限することで評価した。R_{min}は化合物A、Bについては独立して確立することができず (図21a/22bおよび23a/23bを参照されたい) 従ってR_{min}はこれらの化合物については、化合物Cの完全集団分析によって決定されるように、0.212に固定した (固定したR_{min}を用いた化合物をアスタリスクでマークした)。G₁亜集団応答はまた、化合物Bについて測定した。細胞を上記のように調製した。

【 0 0 8 3 】

阻害剤化合物の分析：

別のウェルプレートにおいて、細胞を異なる濃度の3つの阻害剤化合物 (A、B、およびC) を用いて処理し、次いで、NF B移行の阻害を評価するために分析した。これらの実験において、10×10フィールドスキャン領域および100細胞セットの両方において見い出される完全細胞の数を測定および比較した。すべての化合物は明確に応答し (図21a-23b)、これは、0.3772-0.4239の範囲におけるほぼ同一の阻害されない移行 (R_{max}) を伴った。化合物AおよびBは、最大阻害濃度でプラトーになり損ない、応答の概算は浮動するR_{min}パラメータを収束させることに失敗した。化合物Cは、R_{min}=0.212 (完全細胞集団) および0.220 (100細胞集団) の最大阻害を達成し；R_{min}は続いて化合物AおよびBへの応答の収束を達成するために固定した。表13は、非線形最適化 (応答モデルにおいて反曲点での単一の傾きが仮定される) によって計算されたすべての概算応答パラメータを要約する。IC₅₀は、化合物Cについて1.02 x 10⁻⁶ - 1.15 x 10⁻⁶で変動し、かつ化合物AおよびBについては、およそ32-80の係数でより大きい。

【 0 0 8 4 】

(表14) 定義および概算デフォルト値を有するスキャン速度時間モデル構成要素

時間の構成要素	時間が必要とされる理由	概算値
$t_{plate, M \times N}$	$M \times N$ 平面をスキャンする	式を参照されたい
$t_{well, Q \times R}$	ウェル内部の $Q \times R$ フィールド領域をスキャンする	式を参照されたい
t_{field}	単一のフィールドを画像化する	式を参照されたい
$t_{I,k}$	k^{th} 画像チャンネルを積分する	$\geq 0.0167s$
t_{MW}	隣接するウェルの間を移動し、セットアップスキャンとの間を移動する	1.00s
t_{MF}	隣接するフィールド間を移動する	0.30s
t_{RW}	ウェル内のフィールド行の終端から戻る	0.50s
t_F	単一フィールドでフォーカスする	0.40s
t_T	カメラから画像データを移動する	0.11s
t_E	放射/励起フィルターを再構成する	0.20s
t_S	シャッターの開閉	0.03s
t_C	カメラパラメータの調整	0.10s

10

【0085】

(表15) アッセイ法および細胞調製プロトコールに対して代表的なシステムスループット依存性を示し、2つのチャンネルスキャン、 3×3 ウェルスキャン領域、96ウェルプレート、および表14に列挙された概算構成成分時間を仮定するシステムタイミング例

$t_{1,2}$	t_{field}	$t_{well, 3 \times 3}$	$t_{plate, 8 \times 12}$
0.0167s	0.9834s	11.65s	20.22m
0.5000s	1.4667s	16.0s	27.18m

20

明るい蛍光強度 ($t_{1,2}=0.0167s$) は $0.9834s / \text{ウェル}$ および $20.22m / \text{プレート}$ を必要とするのに対して、より薄暗い蛍光強度 ($t_{1,2}=0.5000s$) は、おそらくより少ない濃縮された標的への蛍光団の結合に起因して、 $16.0s / \text{ウェル}$ および $27.18m / \text{プレート}$ を必要とする。両方の第2のチャンネルは、第1のチャンネル ($t_{1,2}=0.0167s$) として明るい核蛍光団を仮定している。十分なオンライン画像処理能力が利用可能であると仮定され、その結果スループットはスキャン - ハードウェアに制限される。

【0086】

スキャン速度の概算：

スキャン速度の単純なモデルはプレート、ウェル、およびフィールドの構成要素に入り込む

30

$$t_{plate, M \times N} = MN t_{well, Q \times R} + (MN - 1) t_{MW} \quad (19)$$

$$t_{well, Q \times R} = QR t_{field} + Q(R - 1) t_{MF} + (Q - 1) t_{RW} \quad (20)$$

$$t_{field} = t_S + t_F + \sum_{k=1}^n t_{I,k} + n t_T + (n - 1) (t_E + t_C) \quad (21)$$

定義および概算値は表14に示される。このモデルにおける前提には以下が含まれる。(1) ウェルプレートはジグザグパターンでスキャンされる、(2) ウェルはラスタパターンでスキャンされフィールドの整列を最大化するために列間の戻りを必要とする、(3) オンライン処理はバックグラウンドで完全にに行われ、その結果システムはスキャン - ハードウェアに制限される。

40

【0087】

表15は、明るいおよび薄暗い(積分が必要)第2のチャンネル(両方とも明るい第1の核チャンネルを想定している)の2つの場合についての 3×3 ウェルスキャン領域を用いて、2チャンネルの96ウェルプレートについて概算するタイミングの例を示し、明るいアッセイ法については $11.65s / \text{ウェル}$ 、 $20.22m / \text{プレート}$ 、薄暗いアッセイ法については $16.0s / \text{ウェル}$ 、 $27.18m / \text{プレート}$ を生じる。これらの実験は特定の適用のために特異的ではなく、これらは、パラメータに依存してより多いかまたはより少ない時間を必要とし得るが、図1のプラットフォームのために開発されたアッセイ法に典型的であるスキャン速度の範囲を示唆することが意図される。

【0088】

50

図1のプラットフォームについてのスキャン速度と他の画像化プラットフォームを比較する場合 t_F および QxR は優勢な因子である。本発明者らは、 $t_F=0.4s$ が上記のオートフォーカス技術の速度に起因して達成されることを見出した。ウェルスキャン領域 QxR は、ある程度の最小限の有意な応答に適應するのに十分に大きな試料サイズの画像化を可能にするように選択される。必要とされる最小限の有意な応答 (MSR) が n を固定するので、本発明者らは、比較のための時間効率 (TE) として、2つのシステムまたはアッセイ法の必要とされるフィールド取得時間の比を定義し得る

$$TE(MSR) = \frac{n_A(MSR)d_B t_{field,A}}{n_B(MSR)d_A t_{field,B}} \quad (22)$$

10

ここでA、Bは比較可能なシステムであり、 d は細胞フィールド密度 (細胞/フィールド) である。TEは、システム間で必要な細胞の数の違いを説明するが、単純化のためにステージの動きに関する時間を無視している。

【0089】

NF B移行 (Bは図1のプラットフォーム) のための表6からのシステムを、 $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.20$ 、 $d_B/d_A=0.25$ 、MSR=20%で比較すること、および $t_{field,A}/t_{field,B}$ を2-6の間で変動させることは、5.95-17.85のTE範囲を与える。この効率比較は、本明細書およびDingらにおいて報告されたように、NF B移行アッセイ法と厳密に関連するが、この範囲は、Dingらにおいて記載されたプラットフォームを超える、および、他のアッセイ法 (特異的TEは各々のために計算されなければならない) において明白である画像測定 of the 忠実度における、オートフォーカスおよび画像セグメント化の速度によって提供された基礎的な利点を例証する。ここでのTE範囲の上位は、例えば、プロトコールが図1のプラットフォームのために最適化されて第2のチャンネルを明るくして、それによってオートフォーカス速度をより良好に利用する場合に可能になる。NF Bアッセイ間でのスキャン速度比較はまた、特定の細胞/フィールド密度をさらに想定することによって絶対的な時間スケールに向けられ得る。図25は、代表的実験条件下での図1のプラットフォームおよびDingらによって使用されたプラットフォームの両方についての、時間 (秒) 対MSR (全体の移行動的範囲の%) 曲線を示す。

20

【0090】

図25は、ウェルあたりの最小有意応答 (MSR) 最大刺激での全体のNF B移行の%として) を達成するために必要とされる時間をプロットすることによって生成される曲線のファミリーである。これらの曲線において (最低から最高まで)、 $\alpha=0.040$ 、図1のプラットフォームについての最も良好な場合; $\alpha=0.093$ 、図1のプラットフォームについての最も悪い場合; $\beta=0.277=2.98 \times 0.093$ 、Dingらのプラットフォーム、 $2.98=$ 測定CVの比 (表7を参照されたい) である。前提: $\alpha=0.05$ 、 $t_{field,Dingetal}=3s$ 、 $t_{field,figure1platform}=1.4667s$ 、 $d_{Dingetal}=40$ 細胞/フィールド (10倍対物拡大)、 $d_{figure1platform}=10$ 細胞/フィールド (20倍対物拡大)。

30

【0091】

薬物スクリーニングにおける最小有意応答を達成するための自動化ツール: 上記の誤差測定は所定の化合物のスクリーニングにおいて必要とされる最小有意応答に達することが必要とされている細胞の数を予測するために使用され得る。グラフィカルユーザインターフェースツールは、ユーザが対照および試験ウェルを測定する工程を通して誤差を決定することに導く。この予測的ルールは、ユーザが、細胞集団および/または亜集団についての最小有意応答の関数としてプレートのスキャンするのに必要な時間を操作することを可能にする。この自動化を用いると、その使用は、亜集団または完全集団を使用するか否か、および所定の有意さに到達するためにどれほどの時間が必要であるかを容易に決定し得る。次いで、スキャンが、必要とされる数の細胞が測定されるまで、各ウェルをスキャンすることによって自動的に進行する。

40

【0092】

ここで本発明に従う自動化薬物スクリーニングを実行する方法の理解のために図26a、2

50

6b、27、28、および29を参照する。これらの図は、本発明の原理および機能を使用して自動化薬物スクリーニングを実行するために、パラメータを選択および設定する能力をユーザに与えるように設計されたグラフィカルユーザインターフェース（GUI）のスクリーンを含む。これらはまた、本発明に従う薬物スクリーニングの初期化および実行を表すフローチャートを含む。図示した方法は、一連のソフトウェア指示を備えるホストコンピュータ110をプログラミングすることによって、図1に図示されたハイスループットプラットフォームに注がれた機能性を表す。これらの図はプログラムされたコンピュータによって実行可能な方法を図示している、ともまたいわれ得る。GUIスクリーンはモニタ115上に生成した可視的な出力を表し；これらはまた、薬物スクリーニングのユーザパラメータを同定するための、およびホストコンピュータ110にパラメータのための値をユーザがインプットすることを可能にするための機能性を表す。これらのスクリーンはまた、「GUIツール」といわれ得る。

10

【0093】

ここでこれらの図を参照すると、図26a、26b、および28は、スクリーンを制御するパラメータを初期化するために自動化薬物スクリーニングを実行する前に実行されるユーザ実行工程を示す。ユーザは、最初に、多くの日および週の間実行され得るアッセイ法を選択する。次いで、NF Bはこのようなアッセイ法の例である。タイプIおよびタイプII誤差（式8-16）を、図26aに示されるGUIツールを通してホストコンピュータ110に入力する。次いで、FLICの変動性および振幅を測定するための対照実験を実行する。これらの値が手元にある場合は、これらを図26bに示されるGUIツールを通してホストコンピュータ110に入力する。変動性はFLICの標準偏差（SD）または変動係数（CV）であり、振幅%は $100 \times (\text{最大} - \text{最小}) / (\text{機器測定範囲})$ のように計算される。最大および最小は、対照に対する細胞応答によって決定される（通常、化合物なしおよび最大に刺激される化合物を用いる）。

20

【0094】

次いで、自動化薬物スクリーニングを、図1のハイスループットプラットフォームによって実行する。このスクリーニングがいかにして実行されるかの理解のために、図27および29を参照する。第1に、スクリーニングパラメータを図27に記載されるようなGUIツールを使用して入力する。薬物スクリーニングの時間を制限することが主要な関心である場合は、ユーザは、GUIツールの時間/プレートフィールドを使用してプレートあたりの所望される時間（代表的には分で）を入力し、かつ概算されたMSRおよび細胞/ウェルが自動的に計算され、表示される。得られるMSRが不適切と見なされる場合、ユーザは所望のMSRを達成するために必要に応じて時間/プレートを短くまたは長くするように選択し得る。MSRもまた、画像あたりの細胞の数に依存し、これはまた、GUIツールの細胞/画像フィールドを使用してユーザによって入力される。実際のMSRは、薬物スクリーニングが実行されるときに得られた画像あたりの細胞の数の関数である。特定のMSRを達成することがより重要であると見なされる場合、ユーザはGUIツールのMSRフィールドを使用して所望のMSRを入力し、かつ細胞/画像フィールドを使用して細胞の平均数を入力する。次いで、細胞/ウェル値および概算された時間/プレート値が自動的に計算され、GUIツールの対応するフィールドに表示される。この場合、実際の時間は細胞/画像フィールドの値に依存し、図1のハイスループットプラットフォームは所望のMSRが達成されるまで画像を取得する。ユーザはまた、細胞/ウェルフィールドの値および細胞/画像の平均数を入力し得、MSRおよび時間/プレートが自動的に計算されて、対応するフィールドに表示される。

30

40

【0095】

図29のフローチャートは、自動化スクリーニングにおける図1のハイスループットプラットフォームによって実行される工程を示す。薬物スクリーニングは、1枚のマイクロタイタープレート（96、384、または任意の数のウェルを有する）、または複数プレートスキャンのためにプレートロボットによって送達されるマイクロタイタープレートのスタックをスキャンすることからなる。このスキャンは、ユーザによって、顕微鏡ステージ上にプレートを配置したあとで（またはプレートがロボットによってロードされる）、工程29

50

00において開始される。次いで、プラットフォームがプレートを最初のウェルまで動かし（工程2910）、オートフォーカスを実行し（工程2920）、工程2930において呈色画像を取得し（各色は異なる蛍光色素が異なる細胞内分子および/または細胞内区画を染色することを表す）、工程2940において画像セグメント化を実行し（細胞内区画のマスクを見出す）、工程2940においてまた、モザイク化を使用して重複する細胞の区画を分離し、かつ工程2950においてFLICを測定する。次いで、工程2960において、所望のMSRを達成するために十分な細胞が測定されたか、または所望の時間/プレートが達成されるために一定の数の画像が取得されたかを決定する。もしそうでない場合、工程2970において、プラットフォームが同じウェル内の次の視野（画像）に移動し、取得および分析工程を反復する。十分な画像が分析された場合、プラットフォームは工程2910の次のウェルに移動し、同じ工程を反復する。実験の最後のウェルが分析された場合（工程2980）、そのプレートは完了し、次のプレートが自動的にロードされるか（工程2990）、またはスキャンが完了する。実験のすべてのプレートが分析されたとき、薬物スクリーニングは終了する。

【0096】

モザイク化のためのシステムデザインの考慮

$O(n \log n)$ ボロノイ分割アルゴリズム：

図30a-30hを参照して、この節は平面におけるランダムな点の収集のためのボロノイ分割を作製するために使用されるアルゴリズムを記載する。この点は、スキャニングサイトメーターからの種々の対象物の位置を計算する画像分析プログラムに由来する。この対象物は、細胞核または他の画像であり得る。唯一重要な事実は、この対象物がX座標およびY座標によって特定されるノードのセットによって表され得るという事実である。細胞、細胞核、および他の対象物については、譲受人らの米国特許第5,548,661号および同第5,790,692号は、画像中の対象物を位置決めするために使用され得る画像セグメント化技術を記載する。一旦これらまたは他の画像セグメント化技術が使用されて、各対象物の対象のピクセルの位置を記載するピクセルのマスクを作製すれば、モザイク化のための対象物を表す図心または他の単ピクセルノードが計算され得る。

【0097】

有用な対象物は、拡大され、セグメント化された画像をモザイク化して、その結果、各ノードがそれ自体の多角形内部に存在するためのものである。多角形の内部は、いかなる他のノードよりもそのノードにより近接する。このモザイク化はボロノイ分割と呼ばれ、これは直接生成され得るか、またはその二重グラフ、平面のドロネー（De launay）三角化（ここでは、ノードが三角形の頂点を形成する）から生成され得る。図30aを参照すると、これは、平面3001におけるノード3000のセットを示す。本発明において使用されるモザイク化アルゴリズムにおいて、平面の4つの角3002が付加的ノードとして加えられ、図30bに示されるように、得られるノードのセットが三角形になる。

【0098】

多くの異なる三角形化が可能である。図30cに示す三角形化は「ドロネー特性」、すなわち、各三角形を囲む円がその内部にノードを含まないもの、を有する。図30cにおいて、中心に三角形を囲むこのような円3008（サーカムディスクと呼ばれる）は他のノードを含まない。各々の三角形はそれ自体のサーカムディスクを有し、かつサーカムディスクの内部にはノードが存在しない。

【0099】

図30cにおいて、各ノードがいくつかの三角形の頂点であり、これは、時計回りまたは反時計回りのいずれかで順序付けられ得ることに注意されたい。これらの三角形のサーカムディスクの中心を接続することによって（例えば、ライン3010によって）、図30dに示されるような「ボロノイ分割」が得られる。ボロノイ分割はドロネー三角化に対して双対である。多角形の端は、三角形の端の垂直二等分線である。ここでこの領域は各ノードの周りで多角形に分割される。各多角形はいかなる他のノードよりもそのノードに近いすべての点を含む。4つの角のノードはまた、それらに割り当てられるノードを有しないことに注意されたい。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

本発明者らのアルゴリズムは、平面におけるノードの任意の収集のためのドロネー三角形化およびボロノイ分割を作製するために有効なアルゴリズムである。本発明者らのアルゴリズムに従って、 n がノードの数であるならば、本発明者らのアルゴリズムは、メモリの要求において n を用いて直線的に判断し、かつ時間の要件について $n \log n$ を用いて判断する。これは最適に近い。本発明者らのアルゴリズムを使用して、本発明者らは、35MBのオーダーのメモリの要件で、100000のノードが5秒以内に三角形化および多角形化され得ることを見出した。百万のノードは、保存のために必要とされる379MBを用いて、約75秒で処理され得る。使用したマシンは800MHzで動作するWintelボックスである。

【 0 1 0 1 】

ノードのセットのためのドロネー三角形化の推定的計算。これのために必要とされる最小のデータセットは以下である。

1) ノード座標：各ノードについてのX座標およびY座標、浮動小数点数として保存。これを行うための最も便利な方法は、各ノードに整数の指標を割り当てることであり、これは、0から開始して $n-1$ までとし、ここで n はノードの数である。次いで、X座標およびY座標を2つの大きな倍精度アレイで保存する。

2) 各三角形を作る三角形ノード：3つのノードの指標。このデータを保存する最も容易な方法は各三角形に整数の指標を割り当てることであり、これは、0から開始して $N-1$ までとし、ここで N は三角形の数である。 N は約 $2n$ である。次いで、三角形の周りの反時計回りの順番で、3つの整数のアレイで各三角形のノードを保存する。

【 0 1 0 2 】

各三角形のサーカムディスクの中心の座標および半径を保存することもまた便利である（絶対に必要なわけではない）。これらは、三角形指標によって指標付けされた倍精度アレイで保存される。三角形の3つのノードの各々の座標が与えられた場合、サーカムディスクの中心の座標を計算することは単純な線形代数の問題である。次いで、中心からいずれか1つのノードまでのユークリッド距離によって半径が与えられる。

【 0 1 0 3 】

本発明者らは、次に、一度の処理で図の中のすべての多角形についての座標を効率的に見い出すためのアルゴリズムを記載する。そのアルゴリズムは以下の通りである。

1) 三角形指標のリストのアレイを作製する（各ノードについて1つのリスト）。

ゆえにリストのアレイはノード指標によって指標付けされる。

2) 各三角形について、その3つのノードを得る。これらのノードの各々についてリストが存在する。これらの3つのリストの各々に、三角形指標を加える。

3) 各ノードについてボロノイ多角形を作製するために、その三角形のリストを得る。各三角形のサーカムディスクの中心がノードとともに作る角度を計算することによって、リストを反時計回りに順序付け、次いで、増加する順番にソートする。この方法において順序付けられたサーカムディスクの中心は、ノードのボロノイ多角形の頂点を形成する。

【 0 1 0 4 】

このすべてが標準テンプレートライブラリー（STL）構成成分を使用して容易に実行され得る。座標および三角形ノードは倍精度および整数を媒介して保存され得る。リストのアレイは整数を媒介して実行され得る。保存を最小化するために、媒体は媒体クラスの保存()方法を使用して前もってサイズ分けされるべきである。例えば、座標アレイは保存された n エントリーを有するべきである。三角形についてのノードのアレイは保存された N エントリーを有するべきである。リストのアレイは保存された n リストを有するべきであり、各リストは保存された8エントリーを有する。ノードが8より多くの三角形を有することはまれである。ごく少ない場合においてノードは8より多くを有し、STLベクターは自動的に再サイズ付けする。このアルゴリズムは、時を違えずにノードの数を用いて直線的に判断し、かつこれは三角形化アルゴリズムよりもより迅速に実行する。

【 0 1 0 5 】

ここで、本発明者らは、いくつかの長方形に含まれるノードのセットを三角形化するた

10

20

30

40

50

めの反復性の方法を記載する。各々のステージで、kノードの有効なドロネー三角形化が仮定され、次いで、次のノードが加えられ、端がk+1ノードのドロネー三角形化を生じるように再配列される。

【0106】

最初に、三角形を含む4つの角のノードのドロネー三角形化を構築する。これは、図30cに示される。長方形の4つの角のドロネー三角形化を用いて、同じ円のサーカムディスクを両方の三角形で作製し、その中心は対角線の midpoint である。ここで首尾よい三角形化、kノードの収集、および本発明者らが次のノードを加えたいと仮定する。新規なノードが存在する三角形化の内部に存在すると仮定する。境界ボックスを用いて開始した記載であるので、これは安全な仮定である。

10

【0107】

メッシュを修飾するためのアルゴリズムは図30fに記載されている。

1) そのサーカムディスクが新規なノードを含むすべての三角形のセットを見つける。これらの三角形は削除しなければならない。なぜなら、有効なドロネー三角形化はそれらのサーカムディスクがノードを含む三角形を有することはないからである。

2) これらの三角形の連合で新規なノードを含む多角形を形成する。この多角形の内部に含まれるすべての三角形の端を削除する。

3) この多角形の頂点の各々に新規なノードを接続して新規な端を作製する。

【0108】

ノード3050は挿入される新規なノードである。これは、全部で6つのノード3051を有する、4つのすでに存在する三角形のサーカムディスクに含まれる。ノード3051を接続する6つの外部端はそのままである。点線で示される3つの内部端は削除される。6つの新規な端(黒の実線)が作製され、各々新規なノード3050を外部ノードの1つに接続する。新規なノードを横切る新規な三角形の各々のサーカムディスクの構築によって、新規なコードは他のいかなるサーカムディスクの内部にはない。それゆえに、新規な三角形化はなおドロネーである。この操作は、ノードの総数を1つ、三角形の総数を2つ、および端の数を3つ増加させる。この計算は三角形化に加えられた各ノードについて真である。それゆえに、最終的なメッシュはおおよそ $2n$ 三角形および $3n$ 端を有し、ここで n はノードの数である。最初のメッシュは4ノード、2三角形、および5端を有することに注意されたい。従って、正確な結果は、メッシュは $2n-6$ 三角形および $3n-7$ 端を有することである。

20

30

【0109】

ここまでは、本発明者らは一般的にのみ上記のアルゴリズムを記載してきた。完全な記載は、データ構造および工程を実行するために必要な工程の詳細を必要とする。最も単純な手順は新規なデータ構造を使用することである。次いで、工程(1)はすべての三角形の総当たりサーチによって実行され得る。そのサーカムディスクが新規なノードを含む各三角形をリストに加える。実際には、このリストは小さく、これは常に10より少ないエントリーを含む。次いで、工程(2)および(3)が迅速に実施され得る。しかし、工程(1)における総当たりサーチは各三角形についての操作を必要とし、これは、おおよそ2倍のノードの数である。総当たりアプローチは各ノードについで別のサーチを必要とするので、メッシュを三角形化するための時間は n^2 操作のオーダーを必要とし、これはむしろ乏しい。

40

【0110】

これまで記載してきたアルゴリズムはWatsonのアルゴリズムとして知られており、1970年代頃以来ある。次の節では、本発明者らは大きなメッシュのための三角形化プロセスを実質的にスピードアップする、このアルゴリズムの改善を記載する。

【0111】

上記に記載した三角形化スキームのボトルネックは、挿入される新規なノードを含むすべてのサーカムディスクが見い出される場合に起きる。そのサーカムディスクが新規なノードを含む1つの三角形さえが見出され得るならば、サーチは実質的に効力を増加させる最も近接した三角形に限定され得る。従って、その問題は、最初の三角形が、そのサーカムディスクが新規なノードを含むものであるという知見に還元される。

50

【0112】

本発明者らの好ましい達成はいわゆる「スイープライン」法の使用である。ポロノイ分割を計算するためのスイープラインアルゴリズムは、S. Fortuneによって1987年に公開された。本発明者らのアルゴリズムは、ドロネー三角形化を計算するために類似の何かを使用する。そのアイデアは、X座標のオーダーを増大させたノードをソートすることである。関連性は、Y座標上でソートすることによって失われる。本発明者らはすべての(x,y)対が別個であると仮定するので、これは、挿入されるノードの独特な順序付けを規定する。次いで、本発明者らは、上記のアルゴリズムを使用して、しかし今回は総当たりサーチではなくインテリジェントサーチを使用して、この順序でノードを挿入する。垂直線が左から右に横切ってスイープするのを想像することができる。任意の時点で、垂直線を最も最近に挿入されたX座標に位置付けする。線の左のすべてのノードが挿入される。右のすべてのノードはまだ挿入されない。

10

【0113】

総当たりスイープラインアルゴリズムサーチは、三角形のリストを逆行する。このリストはリストの末尾に最も最近挿入された三角形を有する。アルゴリズムがリストの末尾で開始する場合、それは最も右側の三角形を探索し、かつそのサーカムディスクが次の挿入されるノードを含むものを迅速に見つけるようである。この単純なソリューションが良好に機能し、三角形化時間を $n \log n$ のオーダーまで減少させる。しかしより早いサーチアルゴリズムも存在し、これは、合理的に単純であり、それゆえに本発明者らはそれをここで記載する。

20

【0114】

より早いサーチアルゴリズムは、ノードが、三角形化を開始する長方形の内部に挿入されるという事実に依存する。従って、メッシュの右側は、右の2つの角ノードの1つ、北東または南東のいずれかのノードを含む、多数の長く、幅が狭い三角形からなる。本発明者らのスイープラインアルゴリズムは図30gに図示される。この図において、4つの角ノードは、領域の最大程度を規定し、最初に三角形化された。長方形の内部のノード3062は左から右に挿入されている。影を付けた領域3065は、すでに挿入された多数の(おそらく数百万)のノードを表す。垂直スイープライン3070は境界線をマークする。その左では、すべてのノードがメッシュに挿入されている。その右では、ノードが挿入されていない。赤いノードはリストにおける次のノードである。それはスイープラインの右に存在しているので、それは、北東のノード3060nまたは南東のノード3060sのいずれかを含む長く幅の狭い三角形の1つに存在するはずである(または、それは北東のノードと南東のノードの両方を含む大きな「中心の三角形」に存在し得る)。粗い角ノードに連結している \sqrt{n} 長く幅の狭い三角形が存在する。本発明者らは、これらを2つのリスト、「北東リスト」および「南東リスト」に配置し、かつそれらのより低い端の傾きによってそれらをソートする。次いで、挿入されるノードは、中心の三角形にあるか、またはバイナリサーチを使用してこれらのリストの1つに迅速に位置付けし得る。このサーチを実行するための時間は、 $\log(\sqrt{n})$ のオーダーである。すべてのノードを三角形化するための時間は $n \log(\sqrt{n})$ のオーダーであるはずである。技術的には、これはなお、 $n \log n$ のオーダーであるが、操作カウントが非常に小さいことが明らかであるべきである。

30

40

【0115】

本発明者らは、このアルゴリズムを実行し、その性能は50万までのノードまで、 $n \log n$ のオーダーである(これは、30秒未満で三角形化され得る)。本発明者らは、100万のノードについてはわずかにより多くの時間を観察したが、その理由は明らかではない。これは、メモリー配置の問題、または何らかの他の微妙なことであり得る。本発明者らは、可能な限り迅速に100000ノードをメッシュにする必要性を予測する。現在の実行は、5秒より下でメッシュを作製し得る。本発明者らは、これがコードを改良することによって10~20%減少し得ると予測する。

【0116】

ここで本発明者らは、一旦最初の三角形が上記に示されるアルゴリズムを使用して見い

50

出されたならば、そのサーカムディスクが挿入されるノードを含む三角形のリストをいかにして完了させるかを記載する。これに対するソリューションは経理が必要である。そのアイデアは、すべてのこのような三角形が隣接していることである。従って、最初のものが見い出されるとすぐに、何らかの順序だった方法ですべての最も近接した隣接する三角形のみを、すべての可能性が除去されるまで、サーチする必要がある。これは、再帰的な操作として実行される。

【 0 1 1 7 】

最初に、本発明者らは、そのサーカムディスクが新規なノードを含むすべての三角形の指標を含むSTLセットを作製する。本発明者らは、見い出された最初の三角形を用いてそれを初期化し、次いで、三角形を試験し、その3つの隣接する三角形を再帰的にチェックする方法を呼び出す。再帰は、三角形がセット中にすでにある場合、もしくはそのサーカムディスクがノードを含んでいない場合に停止する。本発明者らは、セットへの挿入の費用を回避するために、これらのセットが小さい傾向があること、およびSTLベクターを使用することは実際により早いことを実験的に見い出した。その効果は約12%のスピードブーストである。

10

【 0 1 1 8 】

次に、各三角形の隣接する三角形が見い出されなくてはならない。これを行うための最も単純な方法は、図30hに示されるように、その右側の三角形の各端のマッピングを維持することである。この図において、影を付けた三角形3080の3つのノード、 N_1 、 N_2 、および N_3 は三角形の周りに反時計回りに3つの端を規定する。順序付けた対(N_1 、 N_2)はそれらの右側の三角形3082の指標にマッピングされる。同様に、順序付けた対(N_2 、 N_1)は影を付けた三角形3080にマッピングされる。

20

【 0 1 1 9 】

このマッピングを行うための最も容易な方法は、整数の対(ノード指標)を取るSTLマッピングを第3の整数(右の三角形の指標)に規定することである。しかし、大きなメッシュについては、メモリの要求が非常に大きい。さらに、これは比較的遅い。多数の端が存在することを思い出すべきである。メッシュ中の各ノードについて、約6の方向付けされた端が存在する。

【 0 1 2 0 】

マッピングを行うためのより容易な方法は、マッピングのSTL媒体を作製することである。このアイデアは、メッシュ中の各ノードがいくつかの他のノードを指す(平均して、6つの他のノード)ことである。従って、媒体中の各エントリは整数から整数へのマッピングであり、ノード指標を三角形指標にマッピングする。これは、実質的に、整数対の整数へのマッピングよりもより効率的である。

30

【 0 1 2 1 】

しかし、より良好な結果でさえ入手可能である。整数の整数へのマッピングはなお非効率的である。なぜなら、主な操作はエントリを挿入および削除することであるからである。それらを、整数の対の媒体によって置き換えることは、より迅速かつより空間的に効率的である。対における最初のエントリはノード指標であり；対における2番目のエントリは三角形指標である。従って、本発明者らのデータ構造は整数の対の媒体の媒体である。RESERVE法(Microsoft(登録商標) Visual C++(登録商標))を使用して媒体についての空間の合理的な量を割り当てることは不可避である。さもなくば、STLが各媒体について数kBを割り当て、メモリの要求性は突飛である。

40

【 0 1 2 2 】

これは、STLを用いる作業において共通のテーマである。小さなセット(または小さなマッピング)は小さな媒体(または小さな媒体の対)ほどは効率的ではない。セットおよびマッピングは、プログラマーにとってはともに働くためにはるかにより便利であるが、それらは、手に余る商品を扱う場合に、媒体の効率とマッチすることができないだけである。通常、これは起こらない。しかし、インナーループを最適化することに取り組む場合に、空間の小さな量が媒体について保存される限り、媒体を用いるセットを置き換えることは意味

50

をなし得る。STL媒体は自動的に増殖し、必要である場合、しかし、このまれな事象を作ることが最もよい。本発明者らの場合、ノードは代表的には平均6の隣接ノードであり、8の隣接は通常でなく、かつ8より多いのはまれである。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】本発明に従う自動化顕微鏡システムのブロック図である。

【図2】9×15ミリメートル四方の領域におけるベストフォーカスの表面を示すプロットである。

【図3】本発明の実施において使用され得るベストフォーカスを得るための増分スキャンングを使用するプロセスを実証する図である。

10

【図4】オートフォーカス回路のダイナミックレンジおよび感度を図示する。

【図5】本発明の実施において使用され得るオートフォーカス測定回路のブロック図である。

【図6】非直線的に照準を合わせた（パーセプトロン（パターン認識装置）判断基準）2D画像フィルタによる拡大された画像におけるコントラストの増強を図示する。

【図7】細胞核のモザイク化を示す生物学的物質の拡大された画像である。

【図8】100W Hg蒸気アークランプの光学的フィードバック安定化を使用して得られた結果のプロットである。

【図9】本発明の実施において使用され得る画像テーブルデータ構造の図解である。

【図10】本発明の実施において使用され得る画像テーブルキャッシングアルゴリズムの図解である。

20

【図11】BIPI調製ウェルプレート上でのマルチチャンネルの画像獲得およびプロセッシングソフトウェアコンポーネントの効果を示す拡大された細胞画像の一連の3つのパネルである。

【図12】細胞核を同定および位置決めするために本発明においていかにして画像のセグメント化およびモザイク化が使用され得るかを示す4枚のパネルを含む。

【図13】HUVEC細胞におけるTNF誘導NF κ B活性化についての集団統計を図示する。

【図14】 $\alpha = \{ .02, .04, .06, .08, .1, .12, .14 \}$ （上昇系列、 $\beta = 0.05$ （タイプI誤差確率）、 $\gamma = 0.05$ （タイプII誤差確率））についての理論的用量応答達成を表す曲線のファミリーである。

30

【図15】 $\mu_{max} = 1.0$ 、 $\mu_{min} = 0.0$ 、および $IC_{50} = 8.895 \times 10^{-5}$ である理論的用量応答曲線を示す。

【図16】ウェル - ウェル平均FLIN応答について最も悪い応答を示すプロットのファミリーである。

【図17】ウェル - ウェル平均FLIN応答について最も良好な応答を示すプロットのファミリーである。

【図18】用量応答回帰のモンテカルロシミュレーションの結果を示すプロットのファミリーである。

【図19】モンテカルロ信頼区間幅対試料濃度を示す曲線である。

【図20】本発明に従うG₁亜集団の移行応答を示すプロットである。

40

【図21】BIPI化合物AによるNF κ B核移行の阻害を図示する。

【図22】BIPI化合物BによるNF κ B核移行の阻害を図示する。

【図23】BIPI化合物CによるNF κ B核移行の阻害を図示する。

【図24】規定されたG₁細胞亜集団においてBIPI化合物BによるNF κ B核移行の阻害を図示する。

【図25】ウェルあたりの最大シミュレーション上での全体のNF κ B移行の%として最小有意応答を達成するために必要とされる時間をプロットすることによって生成される曲線のファミリーである。

【図26】本発明に従う薬物スクリーニングを初期化するために使用される第1および第2のグラフィカルユーザインターフェース（GUI）ツールの図解である。

50

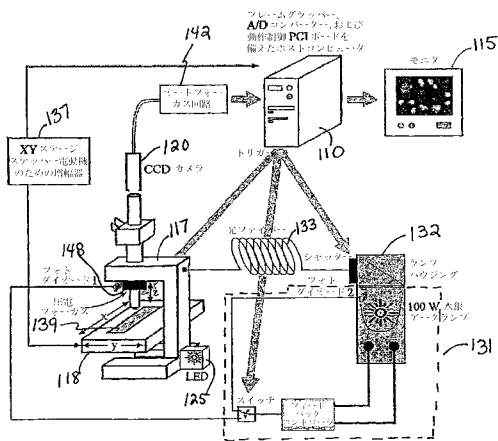
【図27】本発明に従う薬物スクリーニングを初期化するために使用される第3のGUIツールの図解である。

【図28】薬物スクリーニングを初期化の際に実行される工程を表す流れ図である。

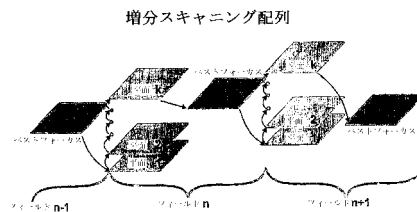
【図29】本発明に従うプログラムされたコンピュータによって実行される薬物スクリーニング方法を表し、および実行される方法を生じるためのソフトウェアプログラムもまた表す流れ図である。

【図30】本発明において使用されるモザイク化の種々の局面を図示する、ノード、端、円、および多角形を含む幾何学的図形である。

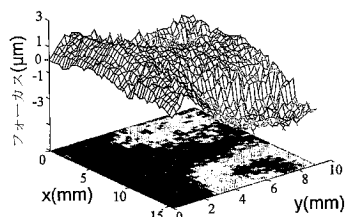
【図1】



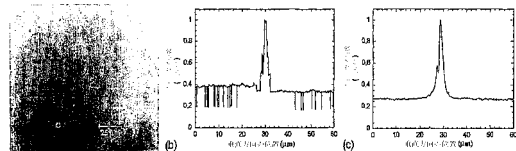
【図3】



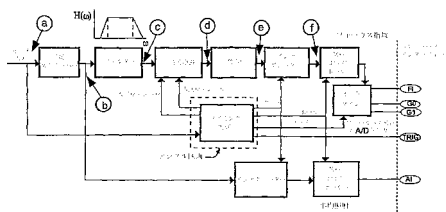
【図2】



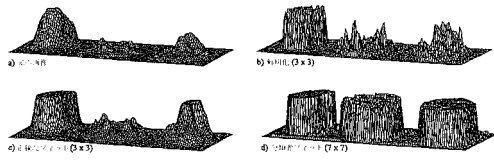
【図4】



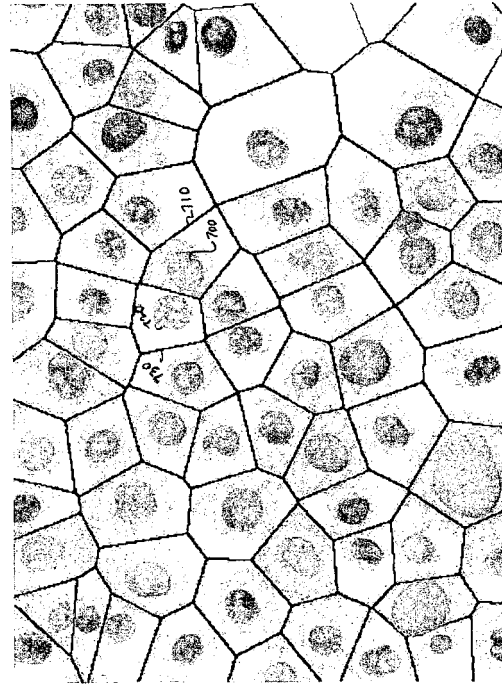
【図5】



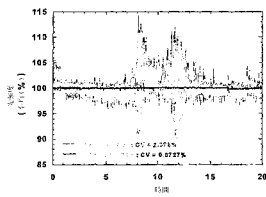
【図 6】



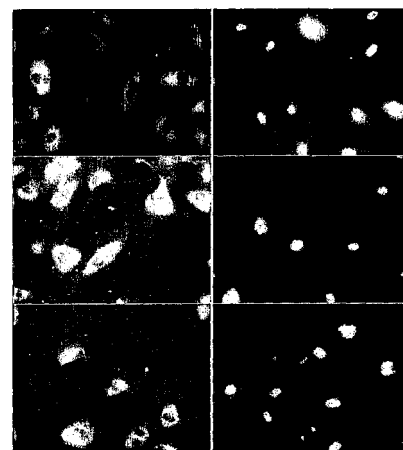
【図 7】



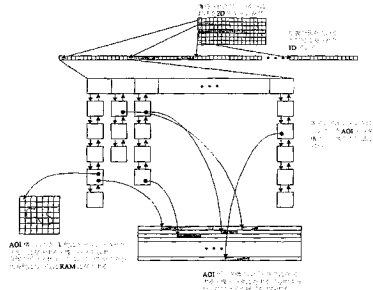
【図 8】



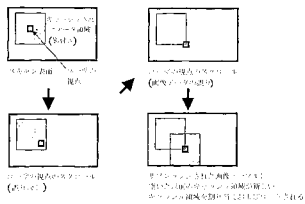
【図 11】




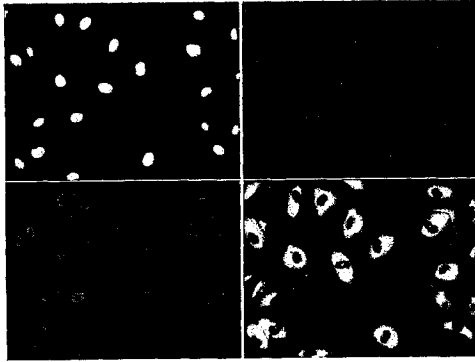
【図 9】




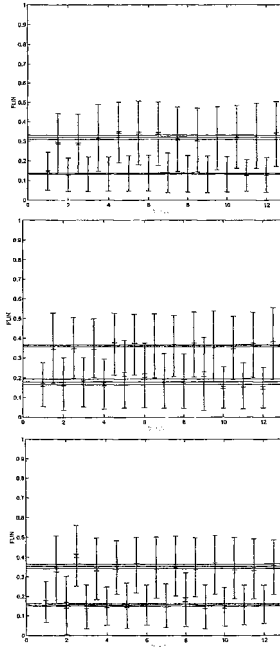
【図 10】




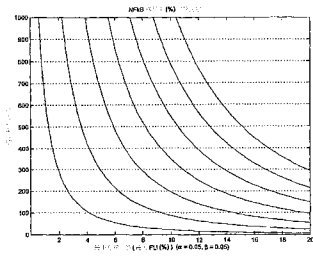
【 1 2】




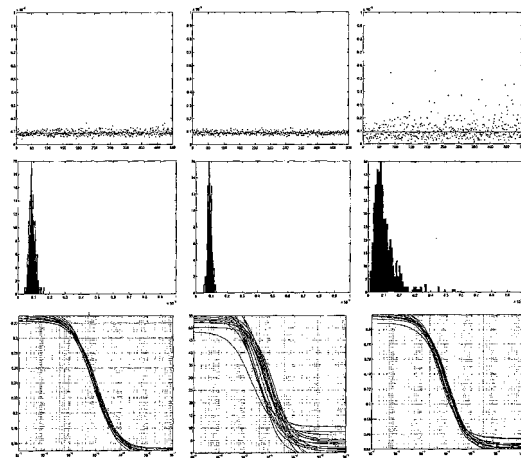
【 1 3】




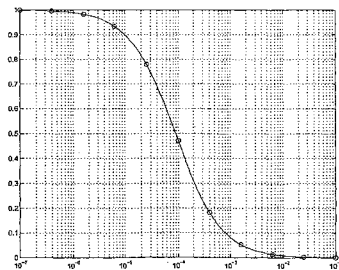
【 1 4】




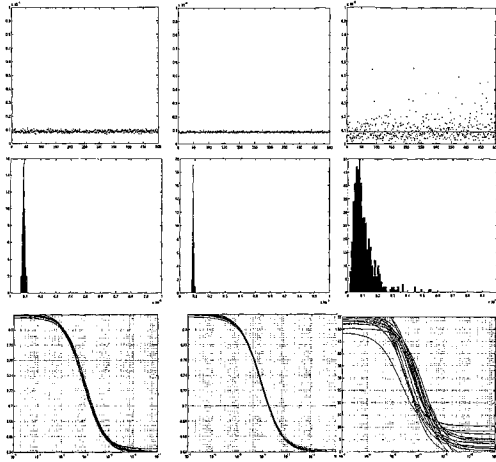
【 1 6】




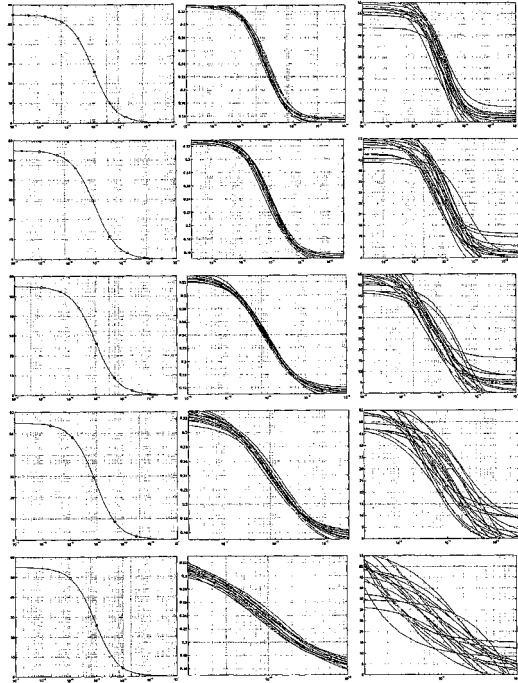
【 1 5】




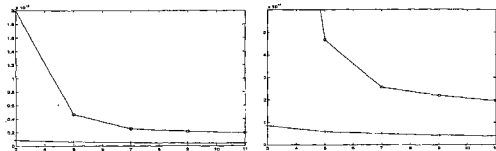
【 17】




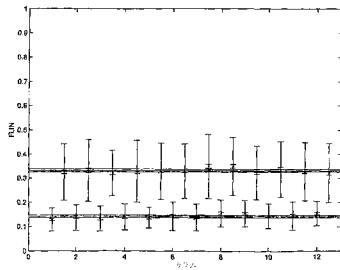
【 18】




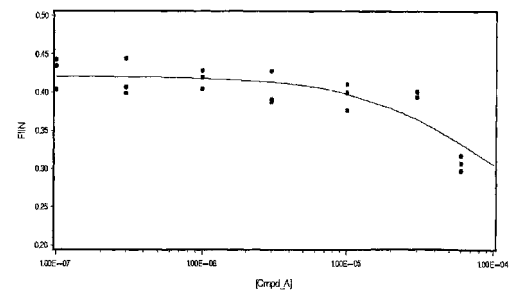
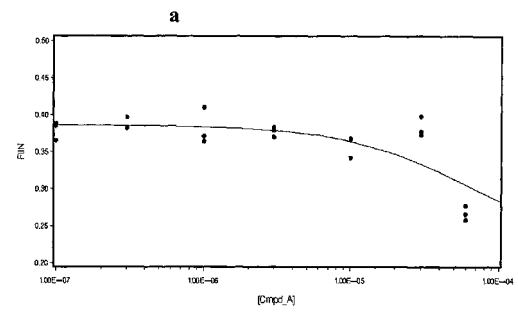
【 19】



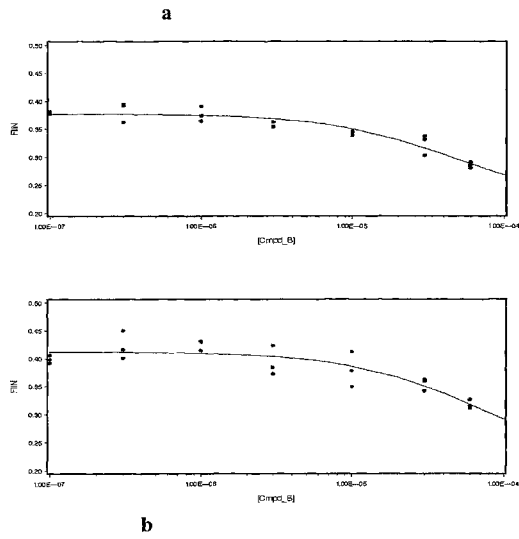
【 20】



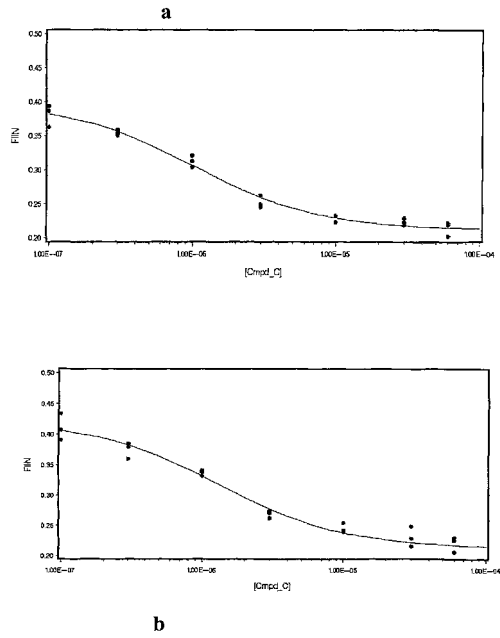
【 21】



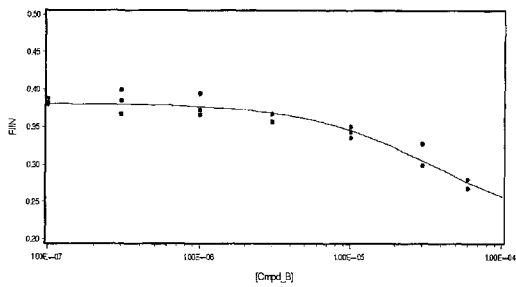
【 2 2 】



【 2 3 】



【 2 4 】

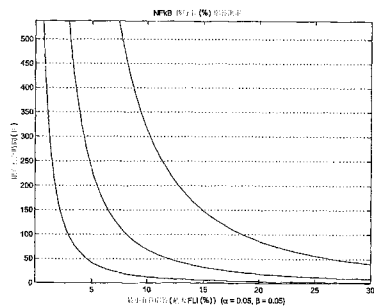


【 2 6 】

スーパーユーザー/マネージャープリセットパラメータ	
タイプI誤差	5.0%
タイプII誤差	5.0%

a

【 2 5 】



アッセイ法特異的な測定値	
FLICの可変性 (SD または CV)	1.0%
振幅 FLIC (最大 - 最小制御)	18%

b

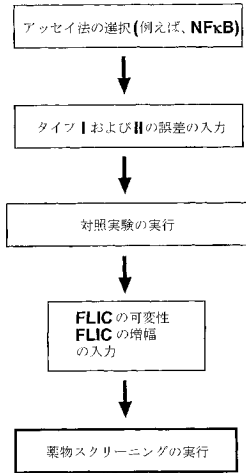
注記
標準偏差 (SD)
変動係数 (CV)
CV = (SD / 平均) x 100
SD または CV のいずれかが入力される

【図 27】

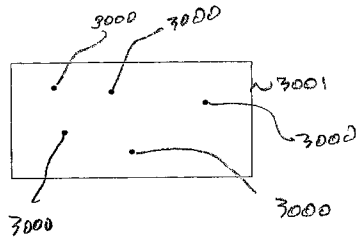
スクリーニングパラメータ	
時間 / プレート	10 m
細胞 / 画像	30
最小有意応答 (MSR)	10 %
MSR のために必要とされる細胞 / ウェル	57

注記
 時間 / プレートの入力
 MSR および細胞 / ウェルは自動的に計算され表示される
 MSR は平均的細胞 / 画像に基づく
 MSR の入力
 既定の時間 / プレートおよび細胞 / ウェルは自動的に計算され表示される
 細胞 / ウェルの入力
 既定の時間 / プレートおよび MSR は自動的に計算され、平均的細胞 / 画像に基づいて表示される

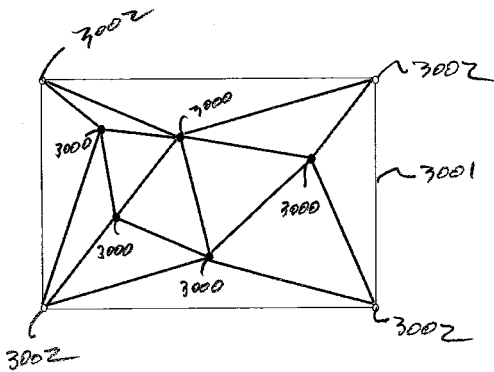
【図 28】



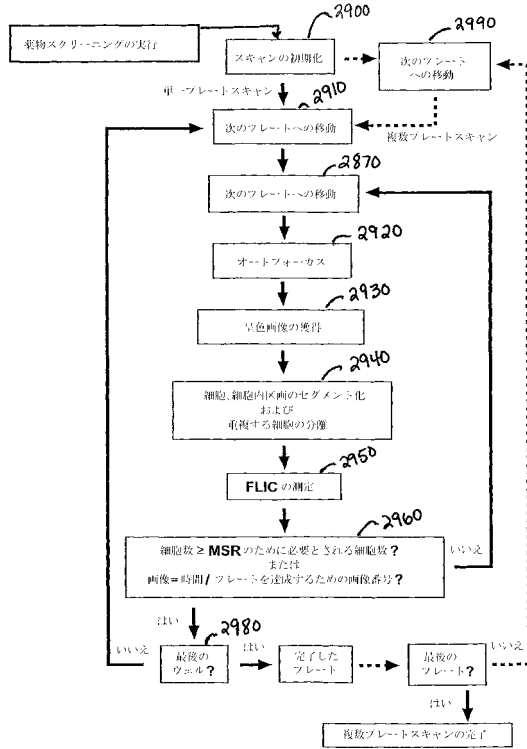
【図 30 a】



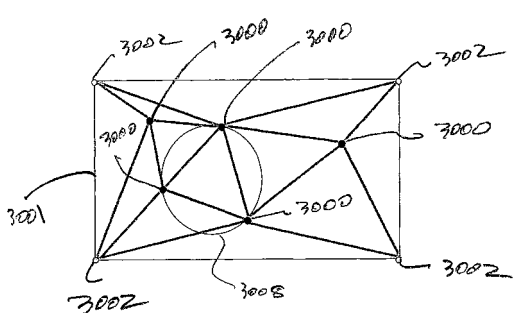
【図 30 b】



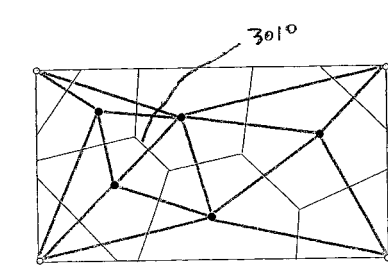
【図 29】



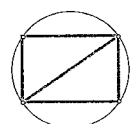
【図 30 c】



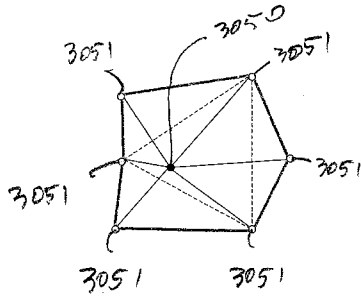
【図 30 d】



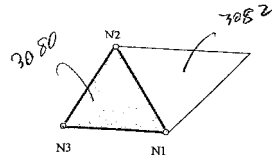
【図 30 e】



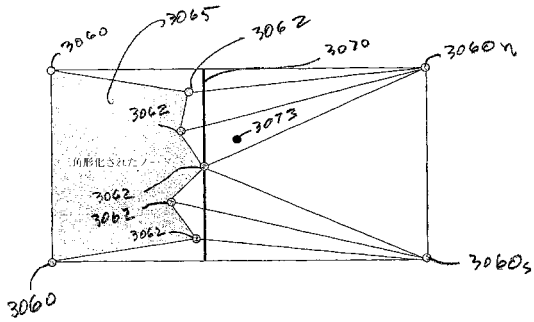
【図30f】



【図30h】



【図30g】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 15/14 (2006.01) G 0 1 N 15/14 B
G 0 1 N 15/14 C

(72)発明者 インジャーマンソン ランダル スコット
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ ユニオンタウン ロード 5 1 8 2
(72)発明者 コールアウェイ ウィリアム スコット
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ アルダー ドライブ 4 2 5 2

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第02/045018(WO,A1)
特開2003-107081(JP,A)
特開2001-258599(JP,A)
特開2001-311730(JP,A)
国際公開第02/045021(WO,A1)
特開2001-059842(JP,A)
The Journal of biological chemistry. 1998, Vol.273, No.44, p.28897-28905

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70
G06T 5/00-5/50
G06T 7/00-7/60
G02B 7/00-7/40
G02B 21/00-21/36
C12M 1/00-3/10
PubMed