

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4982385号
(P4982385)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N	15/14	(2006.01)	GO 1 N	15/14	C
GO 1 N	33/49	(2006.01)	GO 1 N	33/49	H
GO 1 N	21/64	(2006.01)	GO 1 N	21/64	F
GO 1 N	21/27	(2006.01)	GO 1 N	21/27	A
			GO 1 N	33/49	Y

請求項の数 16 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2007-554187 (P2007-554187)
(86) (22) 出願日	平成18年2月1日(2006.2.1)
(65) 公表番号	特表2008-533440 (P2008-533440A)
(43) 公表日	平成20年8月21日(2008.8.21)
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/003573
(87) 國際公開番号	W02006/083969
(87) 國際公開日	平成18年8月10日(2006.8.10)
審査請求日	平成21年2月2日(2009.2.2)
(31) 優先権主張番号	60/649,373
(32) 優先日	平成17年2月1日(2005.2.1)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	503138189 アムニス コーポレイション アメリカ合衆国 98121 ワシントン 州 シアトル サード アベニュー 25 05 スイート 210
(74) 代理人	110001243 特許業務法人 谷・阿部特許事務所
(72) 発明者	ウィリアム オーティン アメリカ合衆国 98110 ワシントン 州 ベーンブリッジ アイルランド マツ プレイス 11546
(72) 発明者	デビッド バシジ アメリカ合衆国 98103 ワシントン 州 シアトル グリーンウッド アベニュー ノース 6538

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イメージングフローサイトメータを使用した血液及び細胞の分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞サンプル集団から収集された画像により疾患状態を検出する疾患状態検出方法であつて、

(a) サンプル画像データが、同時に収集された個々の細胞の複数の画像を含み、前記疾患状態の存在が未知であるような前記サンプル画像データを収集するために前記細胞サンプル集団を画像化するステップと、

(b) 前記疾患状態を示唆する画像データを取得するように、前記疾患状態を示すことが知られている疾患細胞集団を画像化するステップと、

(c) 前記疾患細胞集団の画像化によって取得された画像データ中に前記疾患状態を示唆する少なくとも1つの測光又は形態的マーカーを同定するステップと、

(d) 前記疾患状態が前記細胞サンプル集団中に存在するという決定によってなされるように、前記疾患状態を示唆するように同定された少なくとも1つの測光又は形態的マーカーが、前記サンプル画像データ中に存在するならば、検出するために集められた前記サンプル画像データを自動的に分析するステップと、

を含むことを特徴とする疾患状態検出方法。

【請求項 2】

前記同時に収集された個々の細胞の複数の画像が、少なくとも

(a) 複数スペクトル画像と、

(b) 複数モード画像からなる群から選択された少なくとも1つのタイプの画像と

10

20

を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 3】

前記疾患状態を示唆する少なくとも 1 つのマーカーを同定するステップが、測光パラメータを含む少なくとも 1 つのマーカーを同定するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 4】

前記疾患状態を示唆する少なくとも 1 つのマーカーを同定するステップが、形態パラメータを含む少なくとも 1 つのマーカーを同定するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 5】

前記疾患状態を示唆する少なくとも 1 つのマーカーを同定するステップが、前記疾患細胞集団には存在するが健常細胞集団には存在しない細胞タイプを同定するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 6】

前記疾患状態を示唆する少なくとも 1 つのマーカーを同定するステップが、前記疾患状態を示唆する第 1 の細胞タイプと第 2 の細胞のタイプとの比率を同定し、健常状態を示唆する比率が前記疾患状態を示唆する比率と異なるステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 7】

前記画像データを取得するように、前記細胞サンプル集団を画像化するステップが、前記細胞サンプル集団と前記細胞サンプル集団を画像化するために使用されるイメージングシステムが相対動作をしている間に、前記細胞サンプル集団を画像化するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 8】

前記疾患状態が、慢性リンパ性白血病であることを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 9】

前記画像データを分析するステップが、健常細胞集団に存在するよりも高い割合のリンパ細胞を前記細胞集団が含むかどうかを判断するステップを含むことを特徴とする請求項 8 記載の疾患状態検出方法。

【請求項 10】

前記細胞集団を画像化する前に前記細胞集団に試薬を加えるステップをさらに含み、前記試薬は、

- (a) 1 つ又は複数の細胞特徴の同定を容易にするように標識化し、
- (b) 疾患細胞の同定を容易にするように標識化し、
- (c) 異常細胞の同定を容易にするように標識化し、

(d) 独自の光学信号を有する反応基質からなる群から選択される少なくとも 1 つの試薬を含み、前記反応基質は前記疾患状態を示唆する遊離生体分子に選択的に結合するよう構成され、それにより前記独自の光学信号を前記画像データ内で検出することによって前記疾患状態が存在することを示すことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 11】

(a) 前記細胞サンプル集団中に検出された疾患状態が処置された後、患者から新しい細胞集団を収集するステップと、

- (b) 新しい画像データを収集するために前記新しい細胞集団を画像化するステップと、
- (c) 前記処置の有効性を評価するために前記新しい画像データを分析するステップとをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の疾患状態検出方法。

【請求項 12】

前記画像データを取得するように前記細胞集団を画像化するステップが、紫外線光を発

10

20

30

40

50

生する光源を使用して前記細胞集団を照射するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の疾患状態検出方法。

【請求項13】

前記画像データを収集するように、前記細胞集団を画像化するステップが、明視野画像、暗視野画像及び蛍光画像というタイプの画像からなる群から選択される、少なくとも2つのタイプの画像を同時に収集するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の疾患状態検出方法。

【請求項14】

細胞集団から収集された画像データを取得及び分析するように構成されたイメージングシステムであって、前記画像データは、同時に取得された個々の細胞の複数の画像を含み、疾患状態を検出することを可能にし。
10

(a) 個々の細胞から移動する光を通過し、集光経路に沿って移動するように配設された集光レンズと、

(b) 前記集光レンズを通過した光を分散し、それにより分散光を生成するように、前記集光経路に配設された光分散要素と、

(c) 光学要素を介して前記光分散要素によって生成された前記分散光を焦点合わせするように配設され、焦点合わせされた分散光を生成するイメージングレンズと、

(d) 前記イメージングレンズによって生成され、前記焦点合わせされた分散光が前記個々の細胞の複数の画像からなり、前記複数の画像が前記画像データを含むように、前記焦点合わせされた分散光を受け取るように配設されたT D I 検出器と、
20

(e) 前記光分散要素によって分散された他方の分散光を、前記細胞の速度に対応する変調タイミング信号を生成する光学回折格子を介して受け取るように配設された光検出器と、

(f) 前記画像データが、前記細胞集団が前記疾患状態を示唆する少なくとも1つのマーカーを含むかどうかを判断し、前記光検出器によって生成された前記変調タイミング信号に応答する前記T D I 検出器のクロック速度を調整するように、前記細胞集団の個々の細胞から収集された前記複数の画像の前記画像データを分析するように構成されたプロセッサと

を備えたことを特徴とするイメージングシステム。

【請求項15】

(a) 個々の細胞に伝達する紫外線光を発生するレーザー光源と、

(b) 400～460 nmスペクトルバンドで回折制限されたイメージング性能を容易にするように構成された光学要素と

をさらに備えたことを特徴とする請求項14に記載のイメージングシステム。
30

【請求項16】

前記プロセッサが、前記疾患状態が存在する範囲を定量化するようにさらに構成されていることを特徴とする請求項14に記載のイメージングシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞集団から収集された画像により疾患状態を検出する疾患状態(disease condition)検出方法に関し、より詳細には、イメージングフローサイトメータを使用した血液及び細胞の分析に係る疾患状態検出方法に関する。
40

【背景技術】

【0002】

細胞血液病理学(cellular hematopathology)は、従来、マイグリュンワルド/ギムザ染色又はライト/ギムザ染色による血液塗抹標本(stained blood film)の形態的分析(morphological analysis)及び細胞酵素学(cytoenzymology)を含む、様々なスライドベースの手法によって同定及び検査が行われてきた。さらに、これらの病理を理解するために
50

、フローサイトメトリー (flow cytometry) による細胞集団分析など他の手法、及び遺伝子の発現、遺伝子の突然変異、染色体の転座及び複製を判定するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; polymerase chain reaction) やイン・サイチュー (in situ) ハイブリダイゼーションなどの分子的方法が加わった。

【0003】

このような手法を使用することによって、診断能力の向上、疾患のメカニズム及び進行の理解、ならびに新しい治療法の評価に進歩がもたらされたが、そのような技術は、それぞれ標準化及び頑健性に関する問題を抱えており、ほとんどは日常的な臨床検査で使用されるには至っていない。

10

【0004】

従来の血液学的臨床検査には、最小限の人的介入で多数の末梢血試料を迅速かつ自動的に分析する技術を含んでいる。Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois)、Beckman Coulter Inc. (Fullerton, CA)、及びTOA Corporation (Kobe, Japan)などの企業では、処理量、分析の正確度、ならびに各試料検査時に収集する情報内容を適度に増加することに関して、これらの技術は進歩し続けている。しかし、細胞血液病理を示唆、すなわち、ある特定のパラメータに関して変動の許容範囲から外れている試料に関しては、従来のスライドベースの手法が広く使用され、考え得る異常の原因が判断される。

20

【0005】

血液学 (hematology) では、診断基準は、細胞の数、サイズ、形状及び染色パターンの異常の形態的同定に基づいて行われる。これらは数十年間にわたって、細胞集団分析で、モノクローナル抗体を用いた様々な細胞表面の決定基の染色、及びフローサイトメトリーによるデータの収集により補われてきたが、診断的評価の最も重要な要素は、末梢血塗抹標本の目視検査、顕微鏡を使用した骨髄及びリンパ節の生検であり、これにより推定される異常の主観的分類が可能になる。

【0006】

患者の組織及び血液の塗抹標本を手作業で評価することは、煩雑で時間がかかり、検査室間及び観察者間での変動性が非常に大きい。このプロセスは、染色の変動性（縦断的分析に悪影響を及ぼす）、評価者の偏り、及び最適未満の試料の作製（血液塗抹標本に「汚染」細胞及び変則的なリンパ球が多い）を含む、多くの変動性及び過失の原因による影響を受ける。数百個の細胞を形態的概観によって手作業で分類することは、経時的に観察される変化、又は治療の結果としての変化の評価において、統計力が乏しく信頼性が低い。

30

【0007】

慢性リンパ性白血病 (CLL; Chronic Lymphocytic Leukemia) は、悪性の形質転換事象（例えば、染色体転座）により骨髄が過剰なリンパ球（白血球の一種）を産生する癌の一種である。このCLLは、欧米社会で最も多いタイプの白血病である。通常、幹細胞（未成熟細胞）は骨髄で起きる命令による分化のプロセスによって、成熟血液細胞へと成長する。成熟血液細胞には次の3種類がある。それは、（1）体内の全組織に酸素を運ぶ赤血球；（2）感染と闘う白血球；及び（3）血栓を形成して出血の防止を助ける血小板である。一般に、これらの血液細胞の数及びタイプは厳密に規定されている。CLLでは、リンパ球と呼ばれる白血球の一種が慢性的に病的に過剰産生される。リンパ球には次の3種類がある。それは、（1）感染との闘いを助ける抗体を産生するBリンパ球；（2）感染と闘う抗体をBリンパ球が産生することを助けるTリンパ球；及び（3）癌細胞及びウイルスを攻撃するキラー細胞である。CLLは、一般に悪性転換したCD5+Bリンパ球細胞のクローン増殖を表す、末梢血のBリンパ球細胞数の増加を伴う疾患である。

40

【0008】

現在、この病状は確立された化学療法を使用して治療されているが、CLL細胞上

50

に発現した細胞表面抗原を標的とするモノクローナル抗体（例えば、Rituximab）を含む、多くの新しい治療法が開発されている。National Cancer Data Baseの最近のデータによれば、この疾患に関する5年生存率は約48%であり、10年後まで生存するこの疾患の患者はわずか23%に過ぎない。近年、患者集団を個々の臨床アウトカムを有する2つのサブ集団に層化することのできる、多くの予後因子が同定されている。生存率の減少と相關傾向のある因子は次の通りである。それは、ZAP70の発現（Tリンパ球細胞のシグナリングに必要なチロシンキナーゼ）、CD38発現、非突然変異IgVh遺伝子、及び染色体異常の増加である。しかし、これらの因子の日常的な評価は、データの標準化及び解釈における技術的な問題により、標準的な臨床試験までにはなっていない。

10

【0009】

形態的評価が依然として血液病理の「ゴールドスタンダード（gold standard）」であり、CLLの患者は形態的な不均一性を示す。特定の形態的プロファイルを臨床的予後と相關させる試みが行われているが、現在のところ広く認められている関連性はなく、CLLの形態的サブ分類及びその臨床的予後との相関は、依然として探索中である。

【0010】

【特許文献1】米国特許第6,249,341号明細書

【特許文献2】米国特許第6,211,955号明細書

【特許文献3】米国特許第6,473,176号明細書

20

【特許文献4】米国特許第6,583,865号明細書

【特許文献5】米国特許出願第09/989,031号明細書

【特許文献6】米国特許第6,608,682号明細書

【特許文献7】米国特許第6,532,061号明細書

【特許文献8】米国特許第6,763,149号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、血液関連の疾患及び異常の調査をしやすくするように、末梢血白血球を含む血液、及び骨髄及びリンパ節などの細胞成分（細胞を懸濁液中で処理しやすい）を自動的に分析するのに適切な方法及び装置を提供することが望ましい。血液及び他の体液（及び細胞コンパートメント）からの画像を迅速に収集するための方法及び装置を提供し、そのような画像を分析して、疾患に関連する細胞異常又は細胞分布異常を同定するためのソフトウェアツールを提供することが特に望ましい。

30

【0012】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたもので、その目的とするところは、細胞集団から収集された画像により疾患状態を検出する疾患状態検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本願明細書に開示された概念の実施態様は、細胞集団からの複数スペクトル画像の収集及び画像の収集において、同定可能な測光及び／又は形態的マーカーを使用する、集団の少なくとも1つの特徴を測定するための収集された画像の分析に関し、マーカーは疾患状態と関連する。マーカーという用語は、細胞（又は細胞群）の1つ又は複数の画像を使用して判断される、細胞（又は細胞群）の光学的又は空間的特徴をいう。例示的な適用では、細胞は体液及び細胞コンパートメントから取得され、特に好ましい実施では血液から取得され、最も好ましくは細胞コンパートメントが骨髄及びリンパ節であり、さらに特に好ましい実施では測光及び形態的マーカーの両方を分析に使用する。特に好ましくは、実施を制限するものではないが、個々の物体の複数の画像がそれぞれ同時に収集される。

40

【0014】

50

本願明細書に開示された概念の一実施態様に従って生体細胞を分析するために使用することのできる例示的なステップは、細胞集団から画像データを収集し、画像データから1つ又は複数の細胞サブ集団を同定することを含んでいる。一実施形態では、疾患状態に関連する異常を示す細胞に対応するサブ集団が同定される。そのようなサブ集団は、1つ又は複数の測光及び／又は形態的特徴が一般に疾患状態に関連する細胞異常に関連することを示す実験的証拠に基づいて同定することができる。例えば、収集された画像からの測光及び／又は形態的データを分析する。そのようなデータは、細胞の1つ又は複数の特徴に関連することができる。特徴という用語は、細胞の1つ又は複数の画像から容易に区別することができる特定の構造、領域、特徴、特性、又は細胞の部分のこと指すことが意図されている。選択された特徴の少なくとも1つの特徴を測定することを可能にするように、収集された画像からの測光及び／又は形態的データを分析する。特定の疾患状態において見られる細胞異常と実験的に関連する特徴を、データ中に検出することができ、最初に画像化された細胞集団に特定の疾患状態が見られるかどうかを判断する。

【0015】

さらに他の実施形態では、細胞自体が測光及び／又は形態的パラメータによって同定することのできる異常を示していなくても、疾患状態を検出することができる。そのような実施では、試料は、正常な特徴的な形態及び測光的マーカーによってそれぞれが同定される複数の異なるサブ集団を含んでいる。疾患状態が存在しない場合、サブ集団同士の互いに対する比率は、測定可能な範囲で患者ごとに異なる。悪性の疾患状態が存在する場合、疾患状態は、サブ集団同士の比率を変化させることができ、比率の変化が正常範囲を超えることによって疾患状態が存在することを示すことができる。例えば、C LL（上述した背景技術で述べた疾患状態）は、血液中のリンパ細胞の比率を変化させる。リンパ細胞自体は異常を示さないが、感染に対する正常な反応又は悪性の転換事象の結果として考えられるリンパ細胞数の増加が正常範囲を超えることによって、疾患状態が示唆される。

【0016】

健常な患者の血液細胞集団について検討する。他のタイプの血液細胞に対するリンパ細胞の比率は、血液細胞タイプに従って画像を分類するように血液細胞の全集団の画像データを分析することによって、測定することができる。同じプロセスをC LL患者の血液細胞集団に適用すると、他のタイプの血液細胞に対するリンパ細胞の比率は、C LLに罹患していない患者で同定された比率と大きく異なる。したがって、細胞集団を分析して集団に存在するサブ集団を同定し、疾患状態の存在を示すサブ集団の比率の変化を測定することによって、疾患状態を検出することができる。

【0017】

さらに他の実施形態では、無特徴の細胞タイプの存在によって疾患状態を検出することができる。そのような実施形態では、試料は、特徴的な形態及び測光的マーカーによってそれぞれが同定される複数の異なるサブ集団を含んでいる。疾患状態が存在しない場合、測定可能な範囲内で患者ごとに異なるが、試料内で予想されるサブ集団のみが明らかとなる。疾患状態が存在する場合、試料内で完全に変則的な細胞タイプを明白にすることはできる。例えば、乳癌の転移は血液中のあるレベルの明らかな上皮細胞の存在によって証明される。したがって、細胞集団を分析して集団に存在するサブ集団を同定し、疾患状態の存在を示す変則的なサブ集団の有病率を測定することによって、疾患状態を検出することができる。疾患状態は、変則的な細胞の集団の形態及び測光的マーカーを分析して特徴的なサブ集団を含んでいるかどうかを判断することによって、さらに明確にすることができます。例えば、細胞サイズに対する核サイズの高い比率を定義するマーカーによって証明されるように、大部分の細胞が速い速度で分裂すると、癌が侵攻性であることを特徴付けることができる。

【0018】

さらに他の実施形態では、細胞サブ集団及びその相対的な存在度を分析するだけではなく、細胞試料中に浮遊する（細胞に関連しない）生体分子を分析することによっても疾患状態を検出することができ、そのような実施形態では試薬を細胞試料に加えることができ

10

20

30

40

50

、試薬は特定の生体分子の存在度をそれぞれが示す反応基質を含んでいる。各反応基質（例えば、微小球体）は、それが優先的に結合する生体分子の種類を同定するとともに、試料中の生体分子の存在度を示す、独自の光学特徴を含んでいる。反応基質と細胞が混ざり合った試料画像を分析することによって、反応基質と細胞を区別し、複合的な方法で試料中の分子及び細胞の分析を実施することができる。

【0019】

集団及びサブ集団の画像データはいくつかの異なる手法を使用して操作することができる。例示的な手法はゲーティング（gating）と呼ばれ、測光又は形態的イメージングに関するデータの操作である。他の例示的な手法はバックゲーティングであり、ゲーティングされたデータのサブセットをさらに定義することを含んでいる。厳密に必要ではないが、好ましくは、収集された画像データ、特に同時複数チャンネルイメージングを使用して収集された画像データに信号処理を実施して、クロストークを低減して空間分解能を強化する。

10

【0020】

特に好ましい実施形態では、疾患状態を示す細胞集団からの画像データが収集される。疾患状態に関連した1つ又は複数の測光又は形態的マーカーが同定される。上述したように、そのようなマーカーは、健常細胞（health cell）と疾患細胞（diseased cell）の間のいくつかのパラメータの測定可能な差異を示唆することができる。健常細胞を疾患細胞と区別するために使用されるそのような測光又は形態的マーカーは、一般に特定の特徴と関連している。同定されたマーカーは、疾患細胞から収集された画像データに存在するデータを示すことができるが、健常細胞から収集された画像データには存在しない可能性が高い。同定されたマーカーは、また、疾患状態を示す細胞から収集された画像データに存在するデータを示すことができ、健常細胞から収集された画像データにも存在するが、定量化可能及び同定可能な程度は異なる可能性が高い。マーカーは、疾患状態がないことに関連するサブ集団ではなく、疾患状態に関連するサブ集団の測定可能な変化を表すことができる。上述した例を使用して、他の血液細胞タイプに対する血液のリンパ細胞数の増加は、CLL疾患状態を示唆する。

20

【0021】

1つ又は複数の同定マーカーが実験的に確立された後、細胞集団を画像化し分析して、同定マーカーが試料集団中に存在するかどうかを判断し、疾患状態が存在するかどうかを判断することができる。特に好ましくは、実施を制限するものではないが、疾患状態は慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia）であり、マーカーはリンパ細胞サブ集団のサイズ又は形状の増加に関する。

30

【0022】

分析を容易にするために、本願明細書に開示された概念の少なくとも1つの態様は、疾患細胞又は健常細胞のいずれかを標識化（labeling）し、健常細胞及び疾患細胞の混合集団とともに画像化することを対象とし、それにより同定マーカーが細胞の混合集団から測定されるようになっている。標識化によって、標識化された細胞のサブ集団を、混合集団試料から収集された画像化されたデータから抽出することが可能になる。したがって、標識化によって集合画像データを疾患細胞に対応する画像及び健常細胞に対応する画像に分離することが容易になり、疾患細胞に対応する測光及び/又は形態的マーカーをより簡単に同定することが可能になる。

40

【0023】

本願明細書に開示された手法のさらに他の実施態様は、疾患状態を示す患者の治療の監視に関する。治療前に患者の細胞集団を画像化することによって、ベースラインデータを収集する。好ましくは、細胞集団は血液などの体液から取得される。治療の間、治療プロセスの様々な段階の間及び後に患者から収集した追加の細胞集団を画像化することによって追加データを取得する。そのようなデータは、疾患状態対正常細胞を表す細胞の量、又は集団に存在するサブ集団の比率の変化のいずれかによって示されるように、疾患状態にある患者の改善状態を定量的に示唆する。そのような量化は、標準的な顕微鏡及び/又

50

は従来のフローサイトメトリーでは実行不可能であることが重要である。

【0024】

本願明細書に開示された手法の好ましい実施では、生体細胞の集団から収集された画像は複数モード画像の収集を含んでいる。すなわち、収集された画像は以下のタイプの画像の少なくとも2つを含んでいる。それは、細胞から放射された光に対応する1つ又は複数の画像、細胞によって伝達された光に対応する1つ又は複数の画像、及び細胞によって散乱された光に対応する1つ又は複数の画像である。そのような複数モードイメージングは以下のタイプの画像のいずれか又は組合せを包含することができる。それは、(1)1つ又は複数の蛍光画像及び少なくとも1つの明視野画像；(2)1つ又は複数の蛍光画像及び少なくとも1つの暗視野画像；(3)1つ又は複数の蛍光画像、明視野画像、及び暗視野画像；及び(4)明視野画像である。(スペクトルによって分離された)複数の異なる蛍光画像の同時収集は、(2つの異なるスペクトルフィルタで伝送された光を使用した)複数の異なる明視野画像の同時収集と同様に、有益であり得る。好ましくは、複数モード画像が同時に収集される。10

【0025】

この発明の開示は、いくつかの概念を簡略化された形態で導入するために示したが、以下の発明を実施するための最良の実施形態でさらに詳細に説明される。しかし、この発明の開示は、特許請求に範囲に記載された主題の主要又は重要な特徴を特定するものではなく、特許請求に記載された主題の範囲を判断する際の助けとして使用されるものでもない。20

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

1つ又は複数の例示的な実施形態の様々な態様及び付随する利点、ならびにその修正は、添付の図面と併せて読むと以下の詳細な説明を参照することによってより理解しやすくなるとともに、以下で容易に明らかとなるであろう。

【0027】

<図及び開示された実施形態は限定的ではない>

例示的な実施形態が、図面の参照した図において例示されている。本願明細書で開示された実施形態及び図は、限定的ではなく例示的であるとみなすべきである。

【0028】

30

<概要>

本発明の開示は、フローサイトメトリーの速度、試料の取扱い、細胞ソーティング能力を、複数の形態の顕微鏡の画像、感度、及び分解能ならびに完全な可視／近赤外線スペクトル分析と組み合わせて、血液の病患状態に関連するデータを収集及び分析し、特に慢性リンパ性白血病を検出及び監視することができる、フローイメージングシステムの使用方法を包含する。

【0029】

本願明細書に開示された概念の一実施態様は、流体のフロー中に巻き込まれた生体細胞を画像化及び分析するためのシステム及び方法に関する。少なくとも1つの実施形態では、複数の生体細胞の画像、すなわち、以下のタイプの画像の少なくとも2つを含む、複数の画像を同時に収集する。それは、明視野画像、暗視野画像、及び蛍光画像である。画像は生体細胞の集団のために収集される。画像が収集された後、画像を処理して画像のサブ集団を同定することができ、サブ集団では病患状態との関連が実験的に測定される光度及び／又は外形特性を共有する。40

【0030】

以下の開示、及びそれに添付される特許請求の範囲に関して「細胞集団(population of cells)」という用語は、複数の物体を含む細胞群のことをいう。したがって、細胞集団は複数の細胞を含まなくてはならない。

【0031】

本願明細書に開示される技術を実行するために必要な画像データの収集に使用される好50

ましい画像システムは、以下の原理特性を組み込んでいる：

1. 高速測定；
2. 大量又は連続的な試料を処理する能力；
3. 高スペクトル分解能及び帯域；
4. 良好な空間分解能；
5. 高感度；及び
6. 低い測定変動性。

【0032】

特に、Image Stream（商標）機器（Amnis Corporation、Seattle WA）で具現化されている、最近開発されたイメージングフローサイトメータ技術は、上述した原理の特性をそれぞれ達成する上で大きな進歩を成し遂げている。Image Stream（商標）機器は、図1に関して以下に詳述するフローイメージングシステムの商業的な実施形態である。フローサイトメトリーの技術分野におけるこれらの重大な進歩は、本発明の譲受人に譲渡された特許（例えば、特許文献1乃至5参照）に記載されている。Image Stream（商標）のプラットフォームは、本願明細書に開示された概念に従って処理される画像データを収集するための特に好ましいイメージング機器を表しているが、本願明細書に開示された概念は特定の機器の使用のみに限定されるものではない。

【0033】

上述したように、生体細胞集団から画像データを収集するステップに加えて、本願明細書に開示された概念の一実施態様は、画像化された細胞集団において病患状態に関連する少なくとも1つの特性を測定するように、収集された画像データを処理するステップを含んでいる。好ましい画像分析ソフトウェアパッケージは、IDEAS（商標）（Amnis Corporation、Seattle WA）である。IDEAS（商標）パッケージは、細胞集団を規定及び特徴付けるために使用することのできる、複数の形態及び蛍光強度測定を含む約200の特徴をすべての細胞で評価する。IDEAS（商標）パッケージによって使用者は、生物学的に関連のある細胞のサブ集団を規定し、ゲーティング及びバックゲーティングなど標準的なサイトメトリー分析を使用して、サブ集団を分析することが可能である。しかし、本願明細書に開示された概念を適用するために他の画像分析法又はソフトウェアパッケージを実施することもでき、開示された好ましい画像分析ソフトウェアパッケージは、本願明細書に開示された概念を制限するのではなく例示的なものである。

【0034】

<好ましいイメージングシステムの概要>

図1は、フロー中の物体から複数の画像を同時に収集するために使用することのできる例示的なフローイメージングシステムを示す概略図である。つまり、流体フロー504内に巻き込まれた物体502（生体細胞など）の画像を収集するときにTDIを使用する、好ましいフローイメージングシステム510（Image Stream（商標）プラットフォームを機能的に記述）の概略図である。

【0035】

フローイメージングシステム510は、TDIイメージング検出器508とフローイメージングシステム510を通る流体のフローを同期させるために使用する速度検出サブシステムを含んでいる。このイメージングシステム510は、物体の複数の画像を同時に収集することができることが重大である。また、イメージングシステム510の特に好ましい実行は、複数スペクトルイメージング用に構成され、次の6つのスペクトルチャンネルで操作することができる。それは、DAPI蛍光（400～460nm）、暗視野（460～500nm）、FITC蛍光（500～560nm）、PE蛍光（560～595nm）、明視野（595～650nm）、及び深赤色（650～700nm）である。TDI検出器508は、ピクセルあたり10ビットデジタル分解能が可能である。好ましいイメージングシステム510の開口数は、一般に0.75であり、ピクセルサイズは約0.50

5ミクロンである。しかし、このフローイメージングシステム510は、6スペクトルチャネルに限定されるものでも、上述した開口数又はピクセルサイズ及び解像度に限定されるものでもないことを、当業者であれば理解するであろう。

【0036】

移動物体502は、光源506を使用して照らされる。この光源506は、レーザー、発光ダイオード、フィラメントランプ、ガス放電アーク灯又は他の適切な発光源とすることができ、フローイメージングシステム510は、広帯域又は1つ又は複数の望ましい光波長を物体の速度及び1つ又は複数の他の特徴の検出に必要な強度で物体に照射するよう10に使用される、レンズ、開口、及びフィルタなどの光学調整要素を含むことができる。物体からの光は、ビームスプリッター503によって2つの光路に分割される。一方の光路に沿って移動する光は、速度検出器サブシステムの方向に向かい、他方の光路に沿って移動する光は、TDIイメージング検出器508の方向に向かう。光を所望の方向に向かわせ、光の焦点を合わせるために、複数のレンズ507を使用する。図示されていないが、例えば、物体内／物体上の蛍光又は燐光分子によって発せられる波長に対応する狭帯域の波長の光、又は光源506によってもたらされる波長を有する光のみを速度検出サブシステム及び／又はTDIイメージング検出器508に到達させるために、1つ又は一揃いのフィルタを有することができる。その結果、所望しない光源からの光が実質的に排除される。

【0037】

速度検出器サブシステムは、物体からの変調光を増幅する光学回折格子505a、光感知検出器505b（光電子増倍管又はソリッドステート光検出器）、信号調整ユニット505c、速度計算ユニット505d、及びシステムを通る流体のフロー504にTDIイメージング検出器508を確実に同期させるタイミング制御ユニット505eを含んでいる。光学回折格子は、好ましくは、物体から受け取った光を変調する交互になった複数の透明及び不透明のバーを含み、光を送った物体の速度に対応する変調周波数を有する変調光を形成する。好ましくは、光回折格子の光学倍率及び刻線ピッチは、照射しようとする物体のサイズとバーの幅がほぼ同じになるように選択される。したがって、細胞又は他の物体から収集された光は、物体がインテロゲーション領域、すなわち、視野を横切るとき、光学回折格子の刻線を通って交互に遮断及び通過する。変調光は、光感知検出器の方向に向かい、物体の速度を測定するためにプロセッサが解析することのできる信号を発生する。速度計測サブシステムを使用して、タイミング信号がTDIイメージング検出器508に送られる。20

【0038】

好ましくは、信号調整ユニット505cは、プログラマブル計算デバイスを含むが、この目的でASICチップ又はデジタルオシロスコープを使用することもできる。光検出器の周波数が計測され、その周波数の関数として物体の速度が計算される。TDIイメージング検出器508のクロック速度を調整するように、速度依存信号がTDI検出器タイミング制御505eに周期的に送られる。当業者であれば、TDI検出器の出力信号における縦軸方向の画像のスマーリングが許容範囲内となるように選択されたわずかな公差の範囲内に、TDI検出器を通る物体の画像の速度を一致させるように、TDI検出器のクロック速度が調整される。速度の更新速度は、フロー（物体）の速度が変化するときクロック周波数を公差バンド内に維持するのに十分な頻度で行われなければならない。30

【0039】

物体502から光感知検出器505bへの光部分、及び物体502aからTDIイメージング検出器508への光部分に分割するために、ビームスプリッター503が使用されている。TDIイメージング検出器508に向かう光路には、物体502aからの光を複数の波長に分離する、複数の積層された2色フィルタ509がある。レンズ507の1つを使用して、TDIイメージング検出器508に物体502aの画像を形成する。

【0040】

フローイメージングシステム510に使用されているようなTDI検出器の操作理論は40

10

20

30

40

50

次の通りである。物体がフロー管 511(図1)を通って移動しTDI検出器によって画像化される体積を通過すると、物体からの光が物体の画像を形成し、これらの画像がTDI検出器の表面を移動する。TDI検出器は、好ましくは、所定の電荷列が画像内のある列に固定されたまま、又はそれと同期されたままとなるように電荷が各クロック周期にrow-by-row方式で移動することができる特別に設計された電荷結合素子(CCD)アレイを含んでいる。電荷の列は、アレイの最下層に到達するとアレイからメモリへと移動する。画像及び対応する生成された信号がCCDアレイを通って伝播すると、物体の画像に対応する、TDI検出器によって生成された信号の各行の強度が時間とともに積分される。この手法は、非積分タイプの検出器に比べてTDI検出器の信号雑音比を大きく改善する。これは物体の低レベル蛍光放射による画像に応答することを目的とした検出器の大きな利点となる特徴である。TDI検出器の適正な操作では、CCDアレイを通って移動する物体の画像の速度と同期される際に、CCDアレイ全体にわたって電荷信号をクロック制御する必要がある。この同期を容易にする正確なクロック信号は物体の速度を測定することによって提供することができ、本願明細書に開示された概念では、物体の速度、したがって、TDI検出器のCCDアレイを通って移動するときの画像の速度の正確な推定を使用する。このタイプのフローイメージングシステムは、本発明の譲受人に譲渡された特許(例えば、特許文献1参照)に開示されており、その完全な開示、明細書、及び図面を、参照によって本願明細書に特に援用する。

【0041】

図2は、図1に示したフローイメージングシステムによって記録(生成)された画像を表す図である。図1のフローイメージングシステムによって生成された画像を表す図である。列520は「BF」とラベル付けされ(labelled)、流体フロー504に巻き込まれた球体物体502が光源506からの光を吸収することによって形成される画像を含んでいる。「BF」ラベルとは、画像にコントラストを形成する方法に由来する用語である「明視野(bright field)」のことをいい、それにより光が領域を通過し、領域での物体による光の吸収によって画像に暗領域が形成される。したがって、この画像では、背景は明るくなり、物体は暗くなる。したがって、列520は「明視野チャンネル」である。明視野画像を含むことは、本願明細書に開示された概念の範囲を制限するものではなく、例示的なものである。好ましくは、本願明細書に開示された概念は明視野画像と蛍光画像の組合せ、又は暗視野画像と蛍光画像の組合せを使用する。

【0042】

図2に示す残りの3つの列522、524、526は、それぞれ「1」、「2」及び「3」とラベル付けされている。これらの列は、流体フロー内に巻き込まれた物体によって放出された光を使用して生成された画像を含んでいる。好ましくは、そのような光は(透過光を使用して生成される画像とは対照的に)蛍光プロセスを通して放射される。当業者には明らかなように、蛍光は、入射光の吸収によって励起された物体による光の放射(又は他の電磁放射線)である。一般に、蛍光は励起放射が続いている間のみ持続する。蛍光発光するときに生成される光のスペクトルに基づいて、多くの物質(特に蛍光色素)を同定することができる。したがって、列522、524、及び526を「蛍光チャンネル」という。

【0043】

他の例示的なフローイメージングシステムが、本発明の譲受人に譲渡された特許(例えば、特許文献2及び特許文献6参照)に開示されており、その完全な開示、明細書、及び図面を、背景材料として参照によって本願明細書に特に援用する。上記及びこれら2つの特許に詳述され本願明細書に参照によって援用されたイメージングシステムは、生体細胞集団の画像を取得するために使用される従来のイメージングシステムに比べて大きな利点を有する。これらの利点は、光学分散システムのいくつかの画像システムを、TDI検出器の方向に向かう細胞及び他の物体の画像に応答して出力信号を生成するTDI検出器と併せて使用することによって得られる。単一の物体の複数の画像を同時に収集できることが重要である。各物体の画像は、分析のための共通のTDI検出器を使用して、物体の特

10

20

30

40

50

徴を吸收、散乱、反射又は放射によって区別するようにスペクトルに分解することができる。他のフローイメージングシステムは、複数の検出器を含み、それぞれが単一のスペクトルチャンネル専用である。

【0044】

これらのフローイメージングシステムを使用して、光散乱、反射、吸収、蛍光、燐光、ルミネセンスなどを含む光信号を測定することによって、細胞及び他の物体の形態、測光及びスペクトル特性を測定することができる。形態的パラメータは、面積、外周、テクスチャ、又は空間周波数、重心位置、形状（すなわち、円形、橢円形、バーベル形など）、体積、及びこれらのパラメータの選択された対（又はサブセット）の比率を含んでいる。同様のパラメータを使用して、本願明細書に開示された概念によって核、細胞質、又は細胞の他のサブコンパートメントを測定することもできる。好ましいイメージングシステムでの光度測定によって、核の光学的密度、細胞質の光学的密度、背景の光学的密度、及びこれらの値の選択された対の比率を測定することができる。本願明細書に開示された概念によって画像化される物体は、光を放射するように蛍光又は燐光へと励起することもでき、励起を伴わずに光を発生するルミネセント光とすることもできる。それぞれの場合において、物体からの光は、本願明細書に開示された概念を使用するT D I 検出器上で画像化されて、放射された光の存在及び振幅、光信号を発生する細胞又は他の物体における離散位置の数、信号源の相対的位置、及び物体の各位置で放出された光の色（波長又は帯域）を測定する。

【0045】

<イメージングシステムを利用した体液の疾患状態に関する分析>

上述したように、本願明細書に開示された概念の実施態様は、疾患状態との関連が実験的に測定された少なくとも1つの測光又は形態的特徴を同定するための、生体細胞集団からの複数スペクトル画像の収集、及び収集した画像の分析の両方を含んでいる。したがって、本発明の開示する一実施態様は、細胞集団中の細胞の特徴を識別し、疾患状態の存在を検出しやすくするように、フロー中の物体（例えば、細胞）のマルチモード画像から得られた、測光及び形態的特徴の両方の使用に関する。例えば、正常細胞及び疾患細胞の両方によって提示される特徴の量子化を可能にして、疾患状態を示唆する疾患又は異常細胞を検出しやすくするように、形態的及び測光的データを提供する総合的な複数スペクトルイメージングと組み合わせることのできる、懸濁液又はフロー中の細胞を分析するための方法を以下に詳細に述べる。これまで、そのような方法は標準的な顕微鏡及び／又はフローサイトメトリーでは可能ではなかった。

【0046】

上述したように、好ましいフローイメージングシステム（例えば、Image Stream（商標））を使用して、フロー中の細胞の複数スペクトル画像を同時に取得し、明視野、暗視野、及び蛍光の4チャンネルに対応する画像データを収集することができる。Image Stream（商標）は、上述したイメージングシステムに基づいた商業的実施形態である。一般に、細胞はコアストリームへと流体力学的に集束され、暗視野及び蛍光画像のために直角に照射される。細胞は明視野イメージングのためにスペクトル制限された光源（例えば、フィルタリングされた白色光又は発光ダイオード）によって同時に透過照明される。光はイメージング対物レンズで細胞から収集され、CCDアレイ上に投影される。光学システムは開口数が0.75、物体空間のCCDピクセルサイズが0.5ミクロン²であり、1秒あたりほぼ100細胞のイベント速度で、高い分解能イメージングを可能にしている。この例では各ピクセルは10ビットの強度分解能でデジタル化され、ピクセルあたり30の最低ダイナミックレンジを提供する。実際には、複数ピクセルにわたって信号が分布することによって、一般に画像あたり40を超える有効ダイナミックレンジが得られる。さらに、CCDの感度は複数スペクトル画像ごとに独立して制御することができ、1つの物体に関連するすべての画像にわたって合計約60のダイナミックレンジが得られる。Image Stream（商標）は、本願明細書に開示された概念に従って画像データを取得するために特に好ま

10

20

30

40

50

しいフローイメージングシステムを表すが、Image Stream (商標) プラットフォームは開示された概念を制限するものではなく、例示的なイメージングシステムを表すものである。以下に詳述されている、画像分析を可能にするのに十分な、生体細胞集団の画像を収集することのできるイメージング機器は、本願明細書に説明された概念に従って実行することができる。

【0047】

好みいイメージングシステム、Image Stream (商標) プラットフォームを再び参照すると、光はCCDに投影される前に、様々なスペクトルバンドを検出器の様々な横方向位置に方向付ける、スペクトル分解光学システムを通過する（そのようなスペクトル分解は、イメージングシステムの様々な好みい実施形態の説明と併せて上述されている）。この技術を使用して、画像は一組の複数のサブ画像（好みくは、明視野、暗視野及び4つの異なる蛍光画像を含む6つのサブ画像）へと光学的に分解され、各サブ画像は異なるスペクトル（すなわち、色）成分に対応し、残りのサブ画像から空間的に分離される。このプロセスは、細胞の重なり部分から発生することのある検出器信号を物理的に分離することによって細胞内の信号の同定及び量子化を容易にする。スペクトル分解は、また、マルチモードイメージング、すなわち、明視野、暗視野及び複数色の蛍光の同時検出も可能にする。スペクトル分解のプロセスは、従来の複合画像のデジタル画像処理によってではなく、画像作成プロセスの間に行われる。

【0048】

CCDは、検出器と画像化される物体の間の相対動作が速くても感度及び画質を維持するように、TDIを使用して操作することができる。あらゆるCCDと同様に、画像の光子はピクセルのアレイで光電荷に変換される。しかし、TDI操作では、光電荷は検出器を下ってフローの軸と平行にピクセルからピクセルへと連続的に移動する。光電荷の移動速度が細胞の画像の速度と同期されると、カメラを物理的にパンすることと同様の効果となる。信号の積分時間が従来のフローサイトメトリーより長いオーダーの大きさであるにもかかわらず、画像の縞模様は避けられる。例えば、機器は毎秒約30メガピクセルの連続的データ速度で作動し、各物体から10ミリ秒の信号を積分することができ、取得する細胞画像内のわずかな蛍光プローブでも比較的高速で検出することが可能である。高い層流の非脈動流を達成するためのポンプ及び流体システム設計に注意をはらうことによって、イメージングプロセスの時間スケール上での細胞の回転又は横方向移動が排除される（例えば、特許文献7参照）。

【0049】

リアルタイムアルゴリズムは、物体の画像の存在を検出し、データ保存の基準として使用することのできる基本的な形態及び測光特徴の数を計算するように、CCDから読み出されたすべてのピクセルを分析する。10,000～20,000細胞を包含するデータファイルは、一般に約100MBの大きさであり、したがって、標準的なパーソナルコンピュータを使用して保存し分析することができる。TDIの読み出しプロセスは「デッドタイム」なしに連続的に作動し、このことはすべての細胞を画像化することができることを意味し、2つ以上の細胞を接触式又は非接触式に同時に画像化することは、データ取得に対する障害がないことを示す。

【0050】

このようなイメージングシステムを使用して、光散乱、反射、吸収、蛍光、熒光、ルミネセンスなどを含む光信号を測定することによって、細胞及び他の物体の形態、測光及びスペクトル特性を測定することができる。本明細書で使用されるとき、形態パラメータ（morphological parameter）（すなわち、形態測定）は、基本的（例えば、核の形状）又は複合的（例えば、細胞のサイズと核のサイズの差として細胞質のサイズを同定）とすることができます。例えば、形態パラメータは、核面積、外周、テクスチャー又は空間周波数成分、重心位置、形状（すなわち、円形、橢円形、バーベル形など）、体積、及びこれらの形態パラメータの選択された対の比率を含むことができる。細胞の形態パラメータは、また、細胞質のサイズ、テクスチャー又は空間周波数成分、体積

10

20

30

40

50

などを含むことができる。本明細書で使用されるとき、上述したイメージングシステムでの光度測定によって、核の光学的密度、細胞質の光学的密度、背景の光学的密度、及びこれらの値の選択された対の比率を測定することができる。画像化する物体を蛍光又は燐光へと励起して光を放射させ、又は励起せずに光を発生するルミネセントとすることができ、それぞれの場合において物体からの光をイメージングシステムのT D I 検出器で画像化して放射光の存在及び振幅、光信号を発生する細胞又は他の物体における離散位置の数、信号源の相対的位置、及び物体の各位置で放出された光の色（波長又は帯域）を測定することができる。

【0051】

本発明の開示は、フロー中の物体のマルチモード画像から得られた測光的特徴及び形態の両方を使用する方法を提供する。そのような方法は、画像化される細胞集団に疾患状態に対応するマーカーが存在するかどうかを測定するための細胞分析装置として使用することができる。上述したように、マーカーは疾患状態に関連した細胞の異常を示唆することができ、又はマーカーは画像化される細胞集団に存在するサブ集団の比率の変化を示唆することができ、比率の変化は疾患状態を示唆する。好ましくは、細胞集団は、イメージングシステムを通じて流れる流体に巻き込まれている間に画像化される。本明細書で使用されるとき、ゲーティングとは測光又は形態的イメージングに関連するデータのサブセットのことをいう。例えば、ゲートは、さらに分析しようとする粒子の特徴を規定するために使用することのできる、データのサブセットの数値的な又は形状的な境界とすることができる。ここで、ゲートは、例えば「イン・フォーカス (in focus)」細胞、又は尾部のある精子細胞、又は尾部のない精子細胞、又は精子細胞以外の細胞、又は精子細胞集団又は細胞デブリを包含するプロット境界として規定されている。さらに、バックゲーティングはサブセットデータのサブセットとすることができます。例えば、他のマーカーからのヒストグラムと組み合わせた前方散乱対側方散乱プロットを使用して、最初の細胞のサブセット内の細胞のサブセットをバックゲートすることができる。

【0052】

本明細書に記載のイメージングシステムを使用する際、物体がルミネセントである場合（すなわち、物体が光を発生する場合）、物体（細胞）の画像を作成するために他の光源を必要としないことは明らかであろう。ただし、本願明細書に説明された多くのイメージングシステムの適用は、画像化される物体への入射光を提供するために1つ又は複数の光源を使用する必要がある。当業者であれば、光源の位置が物体の入射光及び検出器を使用して画像から得られる情報の種類の相互作用に実質的に影響を及ぼすことを理解するであろう。

【0053】

物体に入射光を照射して画像化することのほかに、光源は物体からの光の放射を励起するためには使用することもできる。例えば、蛍光色素（FITC、PE、APC、Cy3、Cy5、又はCy5.5）と結合したプローブに接触した細胞は、光によって励起されると蛍光発光し、対応する特徴的な放射スペクトルが、励起した蛍光色素プローブから発生し、T D I 検出器上で画像化することができる。あるいは、光源を使用して蛍光色素プローブを物体上で励起させ、T D I 検出器が、プリズムによってもたらされた物体からの光のスペクトル分散の結果として、プローブによって作成された蛍光スポットをT D I 検出器上の異なる位置で画像化できるようにする。T D I 検出器の表面上のこれらの蛍光スポットの配置は、物体における放射スペクトル及びその位置によって決まる。

【0054】

各光源は、所望されるイメージングシステムの適用に応じて、コヒーレント、非コヒーレント、広帯域、又は狭帯域光のいずれかとすることができます。したがって、狭帯域光源が必要でない適用にはタンゲステンフィラメント光源を使用することができる。プローブからの蛍光の放射を励起するなどの適用には狭帯域レーザー光が、好ましく、これは狭帯域レーザー光が物体によって散乱された光から発生される物体のスペクトル分解された歪みのない画像も可能にするためである。この散乱光画像は、い

10

20

30

40

50

すれかのスポットの放射スペクトルがレーザー光の波長と異なる波長である限り、T D I 検出器上に生成された蛍光スポットから別個に分解される。光源は、連続波(C W)又はパルスレーザーなどのパルスタイプのいずれかとすることができます。パルスタイプの照明源を使用する場合、T D I 検出に関連した積分期間を延長することによって複数パルスからの信号の積分が可能になる。さらに、光をT D I 検出器と同期させてパルスさせる必要がない。

【0055】

特に、血液などの体液中に見られる細胞集団の画像データを収集する際の使用では、光源として360 nmのUVレーザーを使用し、イメージングシステムの光学システムを400~460 nm(DAPI放射)スペクトルバンドに回折制限された画像性能に最適化することが望ましいといえる。10

【0056】

本願明細書の開示と一致した実施形態では、画像化される物体とイメージングシステムの間に相対動作が存在することを理解されたい。ほとんどの場合、イメージングシステムを動かすより物体を動かす方がより簡便である。いくつかの場合では、物体を静止させたままとし、物体に対してイメージングシステムを動かすことが企図されている。さらに代替案として、イメージングシステム及び物体の両方を動かすことができ、それらの動作を異なる方向及び/又は異なる速度とすることができる。

【0057】

<例示的な高レベル方法のステップ>

図3は、本願明細書に開示された概念の一実施態様で実行される全体的な方法ステップのフロー・チャートを示す図である。つまり、疾患状態を同定するために細胞集団の画像に基づいて細胞集団を分析するために使用することのできる例示的なステップを概略的に示すフロー・チャート400である。20

【0058】

特に好ましい実施形態では、細胞集団は血液などの体液から取得される。まずブロック402では、上述した例示的なイメージングシステムなどのイメージングシステムを使用して、疾患状態が存在することが知られている第1の生体細胞集団から画像データを収集する。ブロック404では、疾患状態に関連した少なくとも1つの測光又は形態マーカーが同定される。後述する実験的試験では、2つの個々に異なるタイプのマーカーを開発した。1つのタイプのマーカーは健常細胞と疾患細胞の測光及び/又は形態的差異の同定に関する。そのようなマーカーを同定する1つの技術は、癌細胞を蛍光標識で標識化し、蛍光標識された癌細胞の画像を健常細胞の画像と比較して、癌細胞に関連した複数の測光及び形態的マーカーを同定することである。以下に詳述するように、そのようなマーカーは健常細胞と癌細胞の平均的な核の大きさの差異、及び健常細胞と癌細胞の蛍光画像の差異を含んでいる。これらの差異は、癌細胞の画像である可能性が高い画像を同定し、健常細胞の画像である可能性が高い画像を同定するように、細胞集団の画像データの処理に基づいて定量化することができる。30

【0059】

他のタイプのマーカーは、疾患状態のない細胞集団に見られるサブ集団と、疾患状態にある細胞集団に見られるサブ集団とのいくつかの差異の同定に関する。例えば、C L Lは血液中のリンパ細胞の数が他の種類の血液細胞の数に比べて増加する疾患状態である。したがって、リンパ細胞と他の種類の血液細胞の数の比率の変化によって疾患状態を示唆することができる。40

【0060】

疾患状態に関連した測光及び/又は形態的マーカーが同定されると、疾患状態が存在する、又は存在しないことが知られていない、第2の細胞集団から画像データが収集される。ブロック408では、第2の細胞集団から画像データが収集され、次いで、先に同定されたマーカーの存在について画像データが分析され、第2の細胞集団に疾患状態が存在するかどうかを判断する。50

【0061】

上述したイメージングシステムを使用して細胞集団から画像データを収集する場合、画像データは、非常に迅速に収集することができることが重要である。一般に、分析（すなわち、最初にマーカーを同定する、又は細胞集団における先に同定されたマーカーの存在を判断するための、収集された画像データの分析）は、オフライン、すなわち、画像データの収集後に実施される。現在実施されているイメージング処理ソフトウェアは、簡単に利用できるパーソナルコンピュータを使用して、数十分以内に比較的大きい細胞集団（すなわち、数万個の細胞）を分析することができる。しかし、より強力な計算システムが開発され、簡単に利用可能になると、画像データをリアルタイムで分析することが可能になるであろう。したがって、画像データのオフライン処理は限定的ではなく例示的であるものであり、画像データのリアルタイム処理が代替的であることが企図されている。10

【0062】

マーカーが健常細胞と疾患細胞のいくつかの測光及び／又は形態的差異に関する場合、特に第1の集団が疾患細胞及び健常細胞の両方の混合を含む場合、イメージング機器を使用して第1の細胞集団（疾患状態と関連することが知られている集団）の画像データを収集する前に、疾患細胞又は健常細胞のいずれかを標識化することが望ましいといえる。この方法は、収集された画像データを疾患細胞に対応する画像及び健常細胞に対応する画像に分離することを容易にし、2つを区別するために使用することのできる測光及び／又は形態的マーカーの同定を容易にする。ただし、第1の集団は疾患細胞のみを含むことができ、健常細胞のみを含むことが知られている細胞集団の画像データと第1の集団の画像データを比較する場合、疾患細胞を健常細胞から区別するために使用することのできる測光及び／又は形態的マーカーを容易に同定することができる。20

【0063】

マーカーが、疾患状態のない細胞集団に見られるサブ集団と、疾患状態と関連した細胞集団に見られるサブ集団とのいくつかの測光及び／又は形態的差異に関する場合、第1の細胞集団（疾患状態と関連することが知られている集団）に対応する画像データを分析して、健常細胞集団（*healthy cellular population*）に見られるサブ集団と、疾患状態を有する細胞集団（*cellular population having the disease condition*；疾患細胞集団）に見られるサブ集団とのいくつかの測光及び／又は形態的差異を同定することができる前に、健常細胞集団に見られるサブ集団に対応する画像データを提供しなければならない。30

【0064】

厳密に必要ではないが、本願明細書に説明された技術の作業実施形態では、他の処理を実施して複数チャンネルイメージングのクロストーク及び空間分解能を低減した。実施されたクロストークの低減処理は、本発明の譲受人に譲渡された特許（例えば、特許文献8参照）に説明されており、その明細書、開示及び図面を背景材料として参照することによって本願明細書に特に援用する。当業者であれば、他のタイプのクロストークの低減法を代替的に実施することができる。

【0065】

<例示的な測光／形態的疾患状態マーカーの同定>

本発明の開示の内容では、上述した複数スペクトルのイメージングフローサイトメータは、慢性リンパ性白血病などの疾患状態を検出し監視する目的で、DNA含有量及び核の形態を定量化するためにUV励起性能及びアルゴリズムを使用する。360nmUVレーザー及び400～460nm(DAPI放射)スペクトルバンドに回折制限されたイメージング性能に最適化された光学システムを含むフローイメージング機器を使用するほかに、画像データを処理するためにイメージング処理システムが使用される。パーソナルコンピュータで実行する画像処理ソフトウェアは、例示的なイメージング処理システムを示している。イメージング処理ソフトウェアは細胞の画像に基づいて細胞の測光及び／又は形態的特性の判断を可能にするアルゴリズムを組み込んでいる。例示的なアルゴリズムは、マスキングアルゴリズム、核の形態を規定するアルゴリズム、細胞周期定量化ヒストグラ4050

ムのためのアルゴリズム、DNA含有量を分析するためのアルゴリズム、不均一な色度を分析するためのアルゴリズム、N/C比率を分析するためのアルゴリズム、粒状度を分析するためのアルゴリズム、CD45の発現を分析するためのアルゴリズム、及び他のパラメータを分析するためのアルゴリズムを含んでいる。さらに、イメージング処理ソフトウェアは、細胞の試料集団を評価して疾患状態マーカーが存在するかどうかを判断するように構成されたソフトウェアに基づいた分析ツールである、分類装置といわれるアルゴリズムを組み込んでいる。癌細胞の存在の判断では、分類装置は先に同定された癌細胞に関連した測光及び／又は形態的特性に対応する測光及び／又は形態的特性を有する画像について、試料集団の画像を分析する。

【0066】

CLLを検出するために分析される細胞集団の試料の場合、画像を（血液細胞の異なるタイプに基づいて）異なる細胞サブ集団へと分離し、サブ集団の比率がCLLの存在を示唆するかどうか（例えば、リンパ細胞の数が通常より多いなど）を判断するように、分類装置で試料集団の画像を分析する。好ましくは、CLLを検出するように構成された分類装置は血液細胞を以下のサブ集団へと分離する。それは、リンパ細胞、単球、好塩基球、好中球、及び好酸球である。CLLを検出するように構成された分類装置は、健常患者及びCLL患者からの実験的データに基づく。分類装置のCLLのプロファイルは、同じ診断を受けた様々な患者の分類装置データを収集し比較することによって改善することができる。好ましくは、分類装置の最適化のために、CLL細胞のサブ集団の存在及び診断的有意性を評価するために、各患者から多量（10,000～20,000細胞）のデータセットを収集する。そのように最適化された分類装置を使用して、患者の治療反応を監視し、治療後の残留疾患を評価することができる。

【0067】

上皮細胞癌（epithelial cell carcinomas）の検出には、高速のデータ取得が必要であることが重要である。そのような細胞は、末梢血リンパ細胞（peripheral blood leukocyte）の100,000細胞から1,000,000に1つであることが報告されている。上述されたImage Stream（商標）サイトメータ及びIDEAS（商標）分析ソフトウェアパッケージはこの適用に理想的に適している。末梢血リンパ細胞からの画像は、一般にアーチファクトがない血液塗抹標本の作製において得ることができる。試料あたり多数の細胞（数万から数十万）を集積し、サブ集団の分析により高い信頼度をもたらすことができる。認められたマーカー（CD5、CD19など）で免疫蛍光染色することによって、形態学との相関がより簡単になる。定量的細胞分類装置は、人の評価による主観性を排除し、以前は取得できなかつた信頼度を患者間の比較に与える。縦断的研究もまた定量的分析によって非常に有益となり、特に顕微鏡スライド及び／又は比較的少数の細胞のデジタル写真を検索する従来の方法と比較すると、大量の細胞画像ファイルをデジタルで保存し検索することができる。

【0068】

<蛍光法を使用した形態的特徴の識別>

体液からの細胞集団の画像データに基づく体液中の癌細胞の検出に使用される技術は、明視野及び蛍光画像の同時形態的分析のための初期吸光率及び蛍光染色プロトコルの開発であった。

【0069】

まず、試験では色素染色及び蛍光色素の同時使用が考えられた。上述したイメージングシステムは、明視野画像ならびに各細胞の複数色の蛍光画像を生成する能力があるため、分析のための従来の色素染色及び蛍光色素の両方を同時に使用する可能性が考えられた。しかし、色素染色は、通常生存可能な細胞の細胞膜には浸透しないため、かつ上述した光学システムは、レーザーの側方散乱画像を収集できるため、従来エオシンなどの色素によって取得された細胞粒状度に関する多くの情報を、細胞染色をする必要なしに、レーザーの側方散乱画像を使用して取得することができた。数多くの細胞透過蛍光色素によって、

10

20

30

40

50

固定及び色素染色をする必要なしに核の形態が得られる。これらの考慮に基づいて、形態的特徴の識別の蛍光による代替案によって従来の染色法より優れた方法が提供されることが明らかになった。

【0070】

上述した光学システムとの併用に有用な、蛍光による色素染色の主な代替案は蛍光DNA結合色素である。そのような多様な色素は488 nmで励起可能であり、いくつかのSYTO色素(Molecular Probes)、DRAQ5(BioStatus)、7-AAD、Propidium Iodide(PI)などを含んでいる。これらの色素はToluidine Blue、Methyl Green、Crystal Violet、Nuclear Fast Red、Carmalum、Celestine Blue、及びHematoxylinなどの核染色色素の代替案である。蛍光DNA結合色素は核の形状及び境界、その領域、そのテクスチャー(不均一な色度の類似性)を規定するため、ならびにDNA含有量情報を提供する目的で、一般に上述の光学システムでの使用のために開発された分析プロトコルに含まれる。

【0071】

上述したソフトウェア画像分析プログラムであるIDEAS(商標)は、蛍光核画像の利用を拡大するために、同じ細胞の異なる画像から特徴の組合せを評価することを可能にする。例えば、細胞質領域のみを含むマスクを生成するための手段として、核画像のマスクを(細胞全体をカバーする)明視野画像のマスクから除去することができる。規定された後、細胞質マスクを使用して、細胞質領域、N/C比率、細胞質と核のプローブの相対的蛍光強度などを直感的な「Feature Manager」によって計算することができる。N/C比率の定義のためのFeature Managerセッションの例が、図4に示されている。図4は、図3に示した方法ステップを実行するために使用される例示的なグラフィカルユーチューブを示す図である。細胞画像に関連した基本的な特徴はリストから選択され、単純なexpression builderを使用して代数的に結合される。

【0072】

<測光パラメータ及び/又は形態的パラメータの測定>

本願明細書に開示された概念の例示的な実施形態では、Image Stream(商標)データ分析及び細胞分類はIDEAS(商標)ソフトウェアパッケージを使用した取得後に実施される。注釈したIDEAS(商標)ソフトウェアスクリーンでのヒト末梢血の分析のキャプチャ画像が図5に示されている。IDEAS(商標)ソフトウェアは数万個の細胞からの画像を含むデータファイルの可視化及び測光/形態分析を可能にし、それにより定量的画像分析とフローサイトメトリーの統計力を結合する。

【0073】

図5は、ヒトの末梢血の分析に適用される、図3の方法ステップを実行するために使用される例示的なグラフィカルユーチューブを示す図である。図5に示す例示的なスクリーンショットは、20,000個のヒト末梢血单核細胞からの画像及び定量的データを含んでいる。全血を赤血球溶解剤で処理し、細胞を抗CD45 - PerCP mAb(赤色)及びDNA結合色素(緑色)で標識化した。FL1及びFL4スペクトルバンドを使用して、各細胞を蛍光ならびに暗視野及び明視野に画像化した。この図では、暗視野チャンネル51a、緑色蛍光チャンネル51b、明視野チャンネル51c、及び赤色蛍光チャンネル51dでの複数の細胞の画像を簡単に同定することができる。そのようなサムネイル画像ギャラリー(インターフェースの左上方)によって、細胞集団の「リストモード」検査が可能になる。細胞画像は、4つの異なる細胞タイプ(好酸球53a、NK細胞53b、単球53c及び好中球53d)を、画像ギャラリーにおいて可視化するために擬似染色する及び重ね合わせる、又はインターフェースの下方に示すように拡大することができる。

【0074】

ソフトウェアは、また、画像から計算された特徴の1次元及び2次元プロットも可能に

10

20

30

40

50

する。2次元プロットでの細胞を表すドット55を「クリック」して、ギャラリーの関連画像を見ることができる。同様に逆も可能である。細胞画像は、その細胞が表示される全プロットで対応するドットを強調表示するように選択することができる。さらに、「バーチャル細胞ソート」機能を使用して、ゲート57をプロット上に引いて次いでギャラリーで検査することのできるサブ集団を規定することができる。画像から計算され、又はユーザによって定義された（すなわち、基本的及び単純なexpression build erを代数的に使用して自動的に結合されたリストから選択された）特徴をプロットすることができる。ドットプロット59a（図5の中心左側に表示する）は、従来のフローサイトメトリーで測定された側方散乱強度と同様である暗視野粒状度測定（y軸）に対するCD45発現（x軸）の分析から得られたクラスターを示している。プロット59aは、10
リンパ細胞（フルカラー画像では緑色）、単球（フルカラー画像では赤色）、好中球（フルカラー画像ではターコイズ色）、及び好酸球（フルカラー画像ではオレンジ色）を表している。ドットプロット59b（図5の中心右側に表示する）は、x軸にCD45発現の「核周波数（nuclear frequency）」である核テクスチャーパラメータ（nuclear texture parameter）を代用し、推定されるNEC細胞集団（フルカラー画像では紫色）を表している。左側のドットプロットで紫色の集団を背景表示することによって、この集団がリンパ細胞集団（フルカラー画像では緑色）と同じCD45発現の平均値を有することが示される。この周波数パラメータは、開発されIDEAS（商標）ソフトウェアパッケージに組み込まれた形態的及び測光的特徴のセットの1つである。以下の表1は、全画像（又は適切であればサブ集団）について同定する20
ことのできる、測光的定義及び形態的定義の例示的な一覧を示す。図5は、その複製を簡単にするために修正されていることを理解されたい。フルカラー画像では、細胞及びデータを見やすくするために、細胞を含む各フレームの背景は黒色であり、各ドットプロットの背景は黒色である。

【0075】

【表1】

表1 形態的及び測光的定義

画像の特徴	各画像（物体あたり6画像）のパラメータの説明
面積	マスクのピクセル単位の面積
アスペクト比	マスクのアスペクト比
アスペクト比強度	強度の重み付けをしたマスクのアスペクト比
背景の平均強度	マスク外部のピクセルの平均強度
背景の強度の標準偏差	マスク外部のピクセルの強度の標準偏差
重心X	横軸上のマスク重心
重心X強度	強度の重み付けをした横軸上のマスク重心
重心Y	縦軸上のマスク重心
重心Y強度	強度の重み付けをした縦軸上のマスク重心
マスク強度合計	6つの画像マスクすべての論理「OR」を使用した画像の合計強度
周波数	マスク内部のピクセルの強度の変異度
勾配最大値	マスク内部のピクセルの強度勾配の最大値
勾配RMS	マスク内部のピクセルの強度勾配のRMS
強度	背景を修正したマスク内部のピクセル強度の合計
長軸	ピクセル単位のマスクの長軸
長軸強度	強度の重み付けをしたピクセル単位のマスクの長軸
平均強度	マスクの面積で割った画像強度合計
最小強度	マスク内部の最小ピクセル強度
短軸	ピクセル単位のマスクの短軸
短軸強度	強度の重み付けをしたピクセル単位のマスクの短軸
物体回転角度	フローの軸に対する長軸の角度
物体回転角度強度	フローの軸に対する強度の重み付けをした長軸の角度
ピーク強度	マスク内部の最大ピクセル強度
外周	マスクの外縁ピクセルの数

【0076】

【表2】

表1の続き

スポットラージ最大値	大型の明るいスポット内部の最大ピクセル強度
スポットラージ合計	大型の明るいスポット内部のピクセル強度の合計
スポットミディアム最大値	中型サイズの明るいスポット内部の最大ピクセル強度
スポットミディアム合計	中型の明るいスポット内部のピクセル強度の合計
スポットロー最大値	正規化していない大型の明るいスポット内部の最大ピクセル強度
スポットロー合計	正規化していない大型の明るいスポット内部のピクセル強度の合計
スポットスマール最大値	小型の明るいスポット内部の最大ピクセル強度
スポットスマール合計	小型の明るいスポット内部のピクセル強度の合計
合計強度	マスク内部のピクセル強度の合計
スポット数	画像内で検出されたスポット数
マスク面積の組合せ	ピクセル単位の6つの画像マスクすべての論理「OR」の面積
フロー速度	物体を画像化するときのカメララインのヘルツ単位の読み出し速度
物体数	独自の物体の数
類似性	同じ物体の2つの画像間のピクセル強度の相関
ユーザ定義特徴	画像及びマスクの代数的な任意の組合せ
ユーザ定義マスク	侵食、膨張、閾値、ブル組合せ
ユーザ定義集団	定義された集団の任意のブル組合せ

【0077】

形態を定量化した特徴は表1にイタリック体で示されている。各特徴は、画像データセットがソフトウェアへとロードされると、各細胞の6タイプの画像（同時に取得された暗視野、明視野、及び4つの蛍光画像）について自動的に計算される。

【0078】

画像ごとに35を超える特徴が計算され、6つの画像をすべて使用する分析では、ユーザ定義による特徴を入れずに細胞あたり合計200を超える特徴となる。各細胞には独自の連続番号及びタイムスタンプも割り当てられており、細胞集団の動的検査が可能になる。

【0079】

<癌細胞に関する測光／形態的マーカーの選択>

膀胱の上皮細胞を使用して正常細胞と上皮癌細胞の形態的差異を検査することが最初に提案された。しかし、分析された膀胱洗浄の初期試料は、試料あたりの細胞数が非常に変動的であり、一般にImage Stream（商標）機器で実際に使用するには少なすぎる事が示された。したがって、膀胱細胞の代わりに乳房の上皮細胞を使用した。乳房細胞は、この種の正常な主要な細胞が商業的に利用可能であり（Clonetics / Invitrogen）、専用の成長媒体で短期間組織培養して接着細胞として増殖するので選択された。さらに、乳癌患者の転移から採取した乳房上皮癌細胞は、American Type Tissue Culture Collection (ATCC) から入手可能である。腫瘍ごとの変動性をより良く管理するために、3つの異なる乳房上皮癌細胞株を試験した。それは、HCC-1500、HCC-1569、及びHCC-1428である。これらの細胞株は3人の別個の患者の転移から樹立され、ATCCから凍結ストックとして購入した。細胞株はプラスチックに固定して成長させ、通常の組織培養法

10

20

30

40

50

によって増殖し、実験的に使用した。

【0080】

正常及び癌性の乳房上皮細胞を、37でトリプシン/E D T Aで短期間培養することによって別個に採取した。細胞は1%F C Sを含む冷たいリン酸緩衝液(P B S)で1回洗浄し、計数し、実験的に使用した。3つの別個の乳房上皮癌細胞株を、以下に述べる実験のために等比率でプールした。

【0081】

正常な乳房上皮細胞を、細胞を適切な所定のm A bの希釈液で、4で30分間培養することによって、H L A クラスI M H C 細胞表面タンパク質のフルオレセイン結合モノクローナル抗体で染色した。乳癌はクラスI M H C の発現をダウンレギュレートすることが知られているが、予防措置として正常細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定し、癌細胞への受動的変化を制限した。結合された乳癌細胞株も1%パラホルムアルデヒドで固定し、正常乳房細胞集団に加えた。Image Stream(商標)機器を作動させる前に、488 nmレーザーで励起させることができ赤色帯域で放射するD N A 結合色素であるD R A Q 5(B i o S t a t u s . L t d、Leicester shire、U K)を試料に加えた。正常乳房上皮細胞の抗クラスI M H C m A bでの標識化によって、正常細胞と癌細胞の混合中で正常細胞を同定することができ、それにより客観的な「真実」が得られ、正常上皮細胞を上皮癌細胞から区別する画像特徴の同定がしやすくなる。

【0082】

正常な末梢血は、A l l C e l l s(San Diego、C A)から入手した。すべての末梢白血球細胞にあるレベルで発現する、F I T C 結合抗C D 4 5 m A bで全血を培養した。次いで、B e c t o n D i c k i n s o n F A C S L y s e(商標)で、室温で3分間全血を培養することによって、赤血球細胞を溶解した。細胞はP B Sで洗浄し、計数し、1%パラホルムアルデヒドで固定した。乳房上皮癌細胞を上記のように作製し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、末梢血細胞に加えた。次いで、D R A Q 5を核色素として加え、細胞をImage Stream(商標)機器で分析した。

【0083】

上述した細胞混合物(通常は乳房上皮細胞と乳癌細胞の混合、及び正常な末梢血細胞と乳癌細胞の混合)の画像データを含む画像ファイルを、I D E A S(商標)ソフトウェアパッケージを使用して分析し、以下の結果が得られた。

【0084】

データファイルにスペクトル補償を実施した後、正常乳房上皮細胞(抗H L A - F I T C陽性)を癌細胞(抗H L A - F I T Cが非染色)と比較する最初の視覚検査を実施した。図6は、正常な(すなわち、健常な)乳房上皮細胞の画像を示す図で、図7は、蛍光チャンネルのデータの定量化が疾患状態のマーカーとしてどのように機能するかを示す、乳癌(すなわち、疾患)細胞の画像を示す図である。それぞれの図では、各水平行は単一細胞の同時に取得された4つの画像を含んでいる。

【0085】

列6 1 a及び7 1 aの画像は、青色レーザーの側方散乱画像(すなわち、暗視野画像)に対応し、列6 1 b及び7 1 bの画像は、緑色のH L A - F I T C 蛍光画像に対応し、列6 1 c及び7 1 cの画像は、明視野画像に対応し、列6 1 d及び7 1 dの画像は赤色の核蛍光画像に対応する。上述したように、好みのイメージングシステムは、単一細胞の6つの異なるタイプの画像(暗視野画像、明視野画像、及び4つの蛍光画像)を同時に収集することができ、図6及び図7では、蛍光チャンネルの2つが使用されていない。図6及び図7は、その複製を簡単にするために修正されている。フルカラー画像では、図6及び図7の背景は黒色であり、列6 1 a及び7 1 aの画像は青色であり、列6 1 b及び7 1 bの画像は緑色であり、列6 1 c及び7 1 cの画像はグレーの背景にグレースケール画像であり、列6 1 d及び7 1 dの画像は赤色である。

【0086】

図6及び図7のフルカラー画像を視覚的に比較すると、図6の列6 1 cの正常乳房上皮

10

20

30

40

50

細胞の画像（緑色の蛍光チャンネル）が鮮明であり、図7の列71cの癌細胞の画像（緑色の蛍光チャンネル）はほとんど区別できないことが、すぐに明らかとなろう。暗視野画像（列61a及び71a）のいずれも特に強くはなく、図6の正常乳房上皮細胞の暗視野画像（列61a）は、図7の癌細胞の暗視野画像（列71a）より有意に強度が高いことも明らかとなろう。容易にできるさらに他の定的観察は、図7の癌細胞の赤色蛍光画像（列71d）の平均強度が、図6の赤色蛍光画像（列61a）の平均強度より非常に高いことである。他の定性的観察によれば、正常細胞は高い異質性を有し、一般により大きく、核の強度がより低いことが示される。その後の分析では、これらの差異を定量化し、識別能力を有する可能性のある別のパラメータを発見することが求められる。対応するIDEAS（商標）分析のスクリーンキャプチャが図8に示されている。

10

【0087】

図8は、健常な乳房上皮細胞の画像を乳癌細胞の画像と自動的に区別するために使用することのできる複数の異なる測光及び形態的ディスクリプタを示す図で、図3に示した方法ステップを実行するために使用される例示的なグラフィカルユーチューブインターフェースを示す図である。

【0088】

図8に示す分析は、図の左上方のドットプロット81から進んだ。明視野領域対アスペクト比と定義された、ドットプロット81に基づいて、単細胞が最初に同定された。面積がデブリを除外するのに十分な大きさであり、アスペクト比が-0.5より大きい、という基準に基づいて推定される単一細胞を含む集団の周りにゲート（別個に示さず）を設定し、細胞のダブルレット及びクラスターを排除した。クリック・オン・ドット可視化機能を使用してゲート内外のランダム細胞を調べることによって、ゲーティングの正確度を試験した。

20

【0089】

次いで、正常細胞にのみ適用される抗HLA-FITCマーカーを使用して、正常な乳房細胞を乳癌細胞と区別した。FITC強度の実線の黄色のヒストグラム85aを生成しドットプロット81の右側に示した。FITC陽性（正常乳房上皮細胞）及びFITC陰性（乳房上皮癌細胞）の周りにゲート83を設定し、それにより2031の正常細胞のサブ集団及び611の癌細胞のサブ集団が得られた。次いで、これらのサブ集団を使用して、微分ヒストグラムに基づいて正常細胞と癌細胞を定量的に識別する特徴を同定した。図8は、その複製を簡単にするために修正されている。フルカラー画像では、細胞及びデータを見やすくするために、細胞を含む各フレームの背景は黒色であり、各ドットプロット及びヒストグラムの背景は黒色である。この修正によりドット81aの均一な分布が得られたが、そのような均一な分布はフルカラー画像には見られなかった。

30

【0090】

図8の残りの10のヒストグラム（すなわち、ヒストグラム85b～85k）は、正常細胞87a（フルカラー画像では緑色で表示）及び癌細胞87b（フルカラー画像では赤色で表示）の微分ヒストグラムであり、各ヒストグラムは異なる定量的特徴を示す。10の識別特徴は次の5つの個別のクラスに分類される。それは、散乱強度、散乱テクスチャー、形態、核強度、及び核テクスチャーである。微分ヒストグラム85b、85c、及び85dは、異なるが関連する次の3つの散乱強度特徴を使用して、2つの集団間の差異を示す。それは、「散乱平均強度」（強度合計を細胞面積で割る）、「散乱強度」（強度合計から背景を引く）、及び「散乱スポット小計」（部分的最大値の強度合計）である。3つの散乱強度特徴はすべて良好な識別を示したが、「散乱平均強度」（ヒストグラム85b）が最も選択的であった。

40

【0091】

微分ヒストグラム85e及び85fは、強度プロファイル勾配測度（「散乱勾配RMS」；ヒストグラム85e）又はより選択的なピクセル強度の変動性（「散乱周波数」；ヒストグラム85f）のいずれかを使用して、散乱テクスチャーを定量化した。

【0092】

50

微分ヒストグラム 85g、85h 及び 85i は、細胞面積（明視野、ヒストグラム 85g）、核面積（DNA 蛍光画像から、ヒストグラム 85h）、及び細胞質面積（細胞 / 核面積、ヒストグラム 85i）をプロット化した。癌細胞株は明視野では全般的に小さく、細胞画像からの定性的観察を確認した。癌細胞株の核面積は正常細胞の面積より比例的に小さかった（例えば、核 / 細胞面積比率は識別的ではなかった）が、細胞質面積は癌細胞で有意に小さかった。

【0093】

最後に、微分ヒストグラム 85j 及び 85k は、核平均強度（ヒストグラム 85j）及び核周波数（不均一な色度、ヒストグラム 85k）をそれぞれプロット化した。散乱の場合と同様に、これらの特徴は両方ともいくらかの識別力があった。

10

【0094】

この工学的実験で Image Stream (商標) 機器によって収集され、IDEAS (商標) ソフトウェアパッケージを使用して分析された複数スペクトル / 複数モード画像によって、暗視野散乱、形態、及び核染色において正常な上皮細胞と上皮癌細胞の間に多数の有意な差異が示された。組織培養に適合された細胞は、その細胞特徴を変化させた可能性のある選択プロセスを受けたことが十分に理解されているが、これらのデータは、同定された上述した形態及び測光的特徴を使用して、正常細胞を転換された上皮細胞及び可能であれば他の種類の細胞と分離する、自動化された分類装置を設けることが可能であることを示している。

【0095】

他の実験的調査では、正常末梢血細胞及び乳癌細胞の混合物から収集した画像データを分析した。図 5 に示すように、ヒト末梢血の細胞分類は、各細胞の複数の画像を同時に取得するように構成されたフローイメージングシステムを使用して、かつ自動画像分析プログラム（例示的なイメージングシステムは Image Stream (商標) 機器であり、例示的な画像分析プログラムは IDEAS (商標) ソフトウェアパッケージである）を使用して、達成することができる。暗視野の光散乱特性の分析と組み合わせた CD45 の発現を使用して、フローイメージングシステムによって収集された画像データに基づいて、細胞を次の 5 つの個々の集団に分離することができる。それは、リンパ細胞、単球、好中球、好酸球、及び好塩基球である。ヒト末梢血の個々のサブ集団へのこの分離は、図 9 により詳細に示されており、様々なサブ集団の例示的な相対的存在量データを含んでいる。

20

【0096】

図 9 は、ヒト末梢血の細胞を測光的特性に基づいて様々なサブ集団へと分離することを図式的に示す図である。分類の正確度は、集団に特異的なモノクローナル抗体マーカー、及び散乱におけるバックグーティングマーカー陽性細胞対 CD45 のプロット、ならびに関連画像の形態分析を使用して判断した。図 9 に示すグラフの x 軸は、抗 CD45 - FITC 強度に対応し、y 軸は、暗視野散乱強度に対応する。

30

【0097】

本願明細書に開示された技術（Image Stream (商標) 機器で例示される上述のフローイメージング機器システム、及び IDEAS (商標) ソフトウェアパッケージで例示される画像分析ソフトウェアの使用）が上皮癌細胞を正常な PBMC と識別できるかどうか判断するために、腫瘍細胞と正常 PBMC の人工的な混合物を上記の通り作製した。細胞混合物は、一般に上述したように、PBMC サブ集団を区別するために抗 CD45 - FITC mAb 及び蛍光 DNA 結合色素で標識化した。正常末梢血の单核細胞及び癌細胞のスパイクを示す PBMC 試料での散乱対 CD45 の二变量プロットの比較が、図 10A 及び 10B に示されている。

40

【0098】

図 10A は、細胞集団から収集された画像データに基づいて正常末梢血の单核細胞（PBMC）の分布をグラフで示す図で、乳癌細胞は含まない。図 10B は、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データに基づいて正常 PBMC 及び乳癌細胞の分布をグラフで示す図で、乳癌細胞の分布が正常 PBMC 細胞の分布とどのように区別可能で

50

あるかを示している。この分析では、外れ値集団を目視検査することによって確認されるように、癌細胞 101a は正常に定義された P B M C 集団 101b のかなり外側にある。

【0099】

図 11A は、乳癌細胞の細胞質面積の分布が正常 P B M C 細胞の細胞質面積の分布とどのように区別可能であるかを示し、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データから得られた細胞質面積の測定に基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布を図式的に示す図で、図 11B は、乳癌細胞の散乱周波数の分布が正常 P B M C 細胞の散乱周波数の分布とどのように区別可能であるかを示し、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データから得られた散乱周波数の測定に基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布を図式的に示す図である。

10

【0100】

癌細胞 111a は、また、図 8 で同定された形態的及び測光的特徴（例えば、核面積、細胞質面積、散乱強度、及び散乱周波数）のいくつかを使用して、正常 P B M C 111b と識別することができる。図 11A は、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データから得られた細胞質面積の測定に基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布をグラフで示し、乳癌細胞の細胞質面積の分布が正常 P B M C 細胞の細胞質面積の分布とどのように区別可能であるかを示す。図 11B は、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データから得られた散乱周波数の測定に基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布をグラフで示し、乳癌細胞の散乱周波数の分布が正常 P B M C 細胞の散乱周波数の分布とどのように区別可能であるかを示している。これらの特徴は、当初正常乳房細胞と乳癌細胞を識別するために同定されたが、乳房上皮癌細胞と P B M C の間の高レベルの識別を示した。正常上皮細胞はより明確に P B M C と区別され、これらのパラメータを使用して上皮癌細胞と識別されることが重要である。

20

【0101】

図 10A、図 10B、図 11A 及び図 11B は、複製を簡単にするために修正されている。フルカラー画像では、細胞及び / 又はデータを見やすくするために、ドットプロットを含む各フレームの背景は黒色であり、P B M C 細胞及び癌細胞を表すドットは異なる色で表される。

【0102】

上述した結果は、個々の画像（すなわち、1つ又は複数の上記の同定された測光及び / 又は形態的パラメータを使用して、癌細胞及び健常細胞に対応するサブ集団に分離された画像）を目視検査することによって確認した。上述したスパイクを示す P B M C データから画像ギャラリーデータを生成した。

30

【0103】

図 12 は、乳癌細胞の明視野及び蛍光画像を組み合わせることによって生成された細胞の合成画像を示す図である。明視野及び D R A Q 5 DNA 蛍光（画像分析ソフトウェアで画像処理を行ったもので赤色）のオーバーレイ合成を使用して得られた癌細胞集団からの代表的な画像を含んでいる。図 13 は、細胞集団の画像データから得られた散乱データによって定義することのできる、5つの異なる P B M C 集団の代表的な画像を示す図である。核の形態について暗視野散乱、C D 45（緑色）、及び D R A Q 5（赤色）を使用して定義された、5つの末梢血单核細胞集団の画像を含んでいる。2つの図はサイズスケールが異なることに留意されたい。図 12 は、その複製を簡単にするために修正されていることを理解されたい。フルカラー画像では、図 12 の背景は黒色であり、細胞を含む各フレームは茶色 / 灰色であり、各細胞の核は赤色である。図 13 も同様にその複製を簡単にするために修正されている。フルカラー画像では、図 13 の背景は黒色であり、各細胞の外周は緑色であり、各細胞の核は赤色である。

40

【0104】

上述した試験は、画像データが同時に収集される、細胞の混合集団からの複数スペクトル / 複数モード画像データを分析することによって、正常上皮細胞のサブ集団を、転換した細胞のサブ集団から光学的に識別することができる可能性を実証していることが重要で

50

ある。上述した試験は、また、画像データが同時に収集される、細胞の混合集団からの複数スペクトル／複数モード画像データを分析することによって、血液中の上皮癌細胞を検出することができる可能性を実証している。

【0105】

本願明細書に説明された概念を特定の疾患状態の概念に適用することに関して、例示的なイメージングシステムの作動速度が比較的高いため（約100細胞／秒又は約350,000細胞／時間）、かつ各細胞で収集された画像情報の量が比較的多いため（高分解能の明視野画像、暗視野画像、及び4つの蛍光画像）、本願明細書に開示された概念は慢性リンパ性白血病の検出及び監視に特に適している。

【0106】

そのような適用では、同時複数スペクトル／複数モードイメージングシステムに360 nm UVレーザーが組み込まれ、イメージングシステムの光学が400～460 nm（D API放射）スペクトルバンドに回折制限されたイメージング性能に最適化される。上述した実験的試験で使用された例示的なイメージングシステム（すなわち、Image Stream（商標）機器）では、蛍光励起にソリッドステート、200 mW、488 nm レーザーを使用している。そのようなレーザーの波長は広域の蛍光色素を励起するが、D APIは励起できないため、DNAに化学量論的に結合する細胞周期分析には最適ではない。さらに、ビームは狭幅を有するように構成され、細胞ごとの測定誤差が増加する代わりに全体的な感度は改善される。DNA色素としてヨウ化プロピジウムを使用するフィージビリティ試験は、488 nm レーザーを使用するイメージングシステムが、約5%の変動のG0/G1ピーク係数を有する細胞周期ヒストグラムを生成できることを示す。

10

【0107】

CLLに関連したDNA含有量の変化を検出するために高分解能の細胞周期ヒストグラムを生成するためには、360 nm UVレーザーに最適化されたD APIを代わりに使用する。ビームは比較的広い照明交差部（約100ミクロン）を有するように構成され、一般的な作動条件ではD API励起の一貫性は細胞間で1%以内となる。全体的に細胞周期ヒストグラムCVは約2～3%であると考えられる。さらに、上述した実験的試験で使用される例示的な機器の光学は460～750 nmに回折制限され、D APIスペクトル放射バンドはカバーしない。したがって、形態の窪みや不均一な色素など診断値の詳細な核の特徴を測定するために、そのような光学は、400～460 nmスペクトルバンドの回折制限イメージング性能を達成するように構成されている光学に置き換えられる。

20

【0108】

特に、本願明細書に開示された概念をCLLに関連したDNA含有量の変化の検出に使用するためには、上述した以外に正常な試料の核の形態を定義する他のマスキングアルゴリズム及び特徴を組み込んだ、画像処理ソフトウェアを設けることが望ましい。

30

【0109】

上述した例示的な画像処理ソフトウェアで利用可能な形態的特徴のセットは、核のロビシティ（lobicity）、陷入部の数、及び同様のパラメータを定量化する境界輪郭の特徴を含んでいない。そのような特徴は、従来の血液病理学者が使用していた多くの核形態の定性的観察を取り込むので、白血病の分析において非常に高い有用性がある。そのようなアルゴリズム及び特徴を組み込むことによって、正常細胞、前駆体、及び転換した細胞の自動分類の改善が可能になる。

40

【0110】

上述した実験的試験で使用される境界輪郭のマスキングアルゴリズム及び関連する特徴は、イメージング平面に対する方向の関数として、それぞれのタイプの細胞の約3分の1で好酸球、好中球、単球、好塩基球、及びリンパ細胞の細胞分類を改善する。（6つの可能な方向において）2つのうち1つの好ましい方向の細胞は、先に使用されたアルゴリズム及び特徴による利益を受けない。細胞の分類を改善するために、正常細胞の分布が予想される位置内の統計的分解能を高めることによって、正常細胞と転換した細胞の間の第1

50

パス分類装置へと導き、回転方向とは関係なく正常白血球を一貫して分類するように境界輪郭アルゴリズム及び特徴を拡大することができ、それにより、予想される位置に該当しない異常細胞にフラグをつける能力が向上する。そのような分類装置は、一般に上述された技術を使用して識別をさらに改善するために、正常リンパ細胞と転換したリンパ細胞の間で観察された形態的差異の特徴を明らかにことができる。

【0111】

イメージング分析ソフトウェアを C L L に関連した D N A 含有量の変化を検出するよう構成するために、自動分類装置をソフトウェアパッケージに組み込む。自動分類装置は少なくとも 1 つ又は複数の以下の測光及び / 又は形態的パラメータを組み込む。それは、D N A 含有量、核の形態、不均一な色素、N / C 比、粒状度、C D 4 5 発現、及び他のパラメータである。上述したように、分類装置は血液細胞集団に対応する画像データを分類するように構成され、集団を以下のサブ集団へと分類する。それは、リンパ細胞、単球、好塩基球、好中球、及び好酸球である。10

【0112】

フロー中の細胞から同時に収集された複数モード画像に基づいた P B M C の自動微分分析が、上述したものと同様のイメージングシステム、及び上述したものと同様のイメージング処理ソフトウェアを使用して実施される。P B M C は、F I T C 結合抗 C D 4 5 及び D N A 結合色素、D A P I で染色される。末梢血白血球は、一般に、図 5、図 9、及び図 13 に示すように、リンパ球、単球、好塩基球、好中球、及び好酸球へと 5 部分の微分分析で分類される。20

【0113】

C L L 患者の末梢血白血球からのデータセットを上述したように取得し、分析する。正常末梢血白血球のために開発された分類法をこれらのデータセットに適用し、C L L 細胞の同定を正常なプロファイルと比較することによって判断する。様々な分類装置が評価され、一般に、図 8 のヒストグラムに関して上述したように、C L L 細胞が最も良く例示されるセグメントを判断する。これらには次のものがある。それは、細胞のサイズ、核のサイズ、核対細胞質の比率、核の輪郭、核のテクスチャー、及び細胞質の粒状度である。結果を C L L 患者試料の標準的な血液塗抹標本と比較して、技術の正確度を判断する。

【0114】

抗 C D - 4 5 をマーカーとして使用する正常染色プロトコルのほかに、画像データを収集する前に、末梢血白血球を C D 5 及び C D 2 0 へのモノクローナル抗体、ならびに D A P I で染色する。この方法は、認められたフローサイトメトリー基準に従って C L L 細胞の同定を可能にする。このように、形態的基準を免疫表現型と相関させることができる。30

【0115】

複数の C L L 患者からの多量の (1 0 , 0 0 0 ~ 2 0 , 0 0 0 個の白血球) データセットによって、血液細胞をサブ集団 (すなわち、リンパ細胞、単球、好塩基球、好中球、及び好酸球) に分類するために使用することのできる測光及び形態的マーカーの最適化及び選択が容易になる。

【0116】

C L L 細胞には形態的な不均一性が観察される。しかし、患者の末梢血の塗抹標本を一貫的に準備し評価することが技術的に困難であることから、その程度についての正確で客観的な理解はこれまで達成されていなかった。上述した複数モードのイメージングシステムを使用して C L L 患者から多量のデータセットを取得することによって、形態的な不均一性の程度を、イメージング処理ソフトウェアパッケージを使用して客観的に分析することが可能になる。上述した開発された分類装置は、これらのデータセットに適用され、特定の分類装置の程度 (例えば、核のサイズ、N / C 比など) を分析することによって評価された形態的不均一性を、C L L 細胞の多量の集団に適用する。この分析に基づいて、C L L 細胞の最大パーセンテージを最も正確に同定する分類装置が最適化され、集団全体が分類装置によって含まれるようになる。40

【0117】

10

20

30

40

50

上述したように、C L Lに適用されるとき、本願明細書で開示された技術は、細胞集団を健常細胞に対応するサブ集団及び疾患細胞に対応するサブ集団に分離するためには使用されない。その代わり、血液細胞集団から収集した画像データは、血液細胞集団を血液細胞タイプ（すなわち、リンパ細胞、単球、好塩基球、好中球、及び好酸球）に基づいてサブ集団へと分離するために使用される。C L Lは血液細胞集団に見られるリンパ細胞数の増加（すなわち、リンパ細胞サブ集団の増加）と関連するので、リンパ細胞の増加を検出することによって疾患状態（すなわち、C L L）の存在が示される。本願明細書に説明された好ましい方法は、血液細胞集団を複数の異なるサブ集団に分離することを含むが、C L L検出法は血液細胞集団を単純にリンパ細胞サブ集団及び非リンパ細胞サブ集団に分離することによって実行することもできる。健常患者での平均リンパ細胞サブ集団を示す実験的データを使用して、平均より高いリンパ細胞サブ集団を検出することによって、C L L疾患状態が示唆される。

【0118】

最初にC L L疾患状態を検出することに加えて、上述したイメージング及び分析法をC L L患者を縦断的に追跡するために適用して、治療への反応、臨床反応の安定、及び疾患の再発を判断することができる。正常及び残存C L Lの両方を含む、末梢血の集団の変化を追跡し、臨床アウトカムと相關させることができる。

【0119】

<例示的な計算環境>

上述したように、本発明の一実施態様は、細胞集団の一部から同時に収集された複数の画像の画像分析を含んでいる。例示的な画像分析ソフトウェアパッケージを参照する。図14及び以下の関連する説明は、本発明を実施するための適切な計算環境の簡略で一般的な説明を示すものであり、必要な画像処理は、一般に、図14に示すものと同様の計算デバイスを使用して実施される。当業者であれば、必要な画像処理は、ラップトップ及び他のタイプのポータブルコンピュータ、マルチプロセッサシステム、ネットワークコンピュータ、メインフレームコンピュータ、手持ち式コンピュータ、パーソナルデータアシスタント（PDA）、ならびにプロセッサ及び機械の指示を記憶するためのメモリを含み、プロセッサで実行されるとき複数の機能を実行する他のタイプの計算デバイスを含む、多くの異なるタイプの計算デバイスによって実施することができる。

【0120】

本発明で必要とされる画像処理の実行に適切な例示的な計算システム150は、入力デバイス152、及び出力デバイス162、例えば、ディスプレイに機能的に接続されている処理ユニット154を含んでいる。処理ユニット154は、本発明の機能を実行するための（測定する集団によって少なくとも1つの特徴の提示を可能にするための、物体の集団から同時に取得された複数の画像の分析）、画像処理／画像分析プログラムを含む機械の指示を実行する中央処理ユニット（CPU158）を含んでいる。少なくとも1つの実施形態では、機械の指示は、一般に、上述したものと同様の機能を実行し、図3に示すフローチャートならびに例示的なスクリーンショットを参照する。当業者であれば、この目的に適したプロセッサ又は中央処理ユニット（CPU）は、Intel Corporation、AMD Corporation、Motorola Corporation、及び他の供給者から入手可能である。

【0121】

処理ユニット154には、ランダムアクセスメモリ156（RAM）、及び一般に読み出し専用メモリ（ROM）を含む非揮発性メモリ160、ならびにハードドライブ、光学ドライブなどいくつかの形態のメモリストレージも含まれる。これらのメモリデバイスは、CPU158に双方向接続されている。そのようなストレージデバイスは、当業者には良く知られている。機械の指示及びデータは、非揮発性メモリ160から一時的にRAM156内にロードされる。メモリには、オペレーティングシステムソフトウェア及び補助ソフトウェアも保存されている。別個に示されてはいないが、計算システム150を起動するのに必要な電力を供給するために電源が必要となる。

10

20

30

40

50

【0122】

入力デバイス 152 は、限定はされないが、マウス、キーボード、マイク、モデム、ポインティングデバイス、又は他の入力デバイスを含む、オペレーティング環境への入力を容易にするどのようなデバイス又は機構とすることもできる。図 14 には特に示されていないが、計算システム 150 は、図 1 に概略的に示すようなイメージングシステムと論理的に接続されており、所望の画像処理を実施するように、収集された画像データを計算システム 150 で利用できるようになっている。もちろん、計算システムを直接イメージングシステムに論理的に接続するのではなく、イメージングシステムによって収集されたデータを、ポータブルメモリメディアなど多くの様々なデータ転送デバイスを使用して、又はネットワーク（有線又は無線）経由で、単純に計算システムに転送することもできる。

出力デバイス 162 は、出力画像を人が視覚的に認識するように設計されたモニター又はコンピュータディスプレイを最も一般に含んでいる。

【0123】

以上、本願明細書に開示された概念を、それを実行するのに好ましい実施形態及びその修正と併せて説明したが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲の範囲内において本願明細書に開示された概念に他の多くの修正を行うことができる。したがって、本願明細書に開示された概念の範囲は、上述した説明によってどのようにも制限されるものではなく、添付の特許請求の範囲を参照することによって全体的に判断されるものである。排他的な権利を主張する本発明は添付の通り定義される。

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図 1】フロー中の物体から複数の画像を同時に収集するために使用することのできる例示的なフローイメージングシステムを示す概略図である。

【図 2】図 1 に示したフローイメージングシステムによって記録（生成）された画像を表す図である。

【図 3】本願明細書に開示された概念の一実施態様で実行される全般的な方法ステップのフローチャートを示す図である。

【図 4】図 3 に示した方法ステップを実行するために使用される例示的なグラフィカルユーザインターフェースを示す図である。

【図 5】ヒトの末梢血の分析に適用される、図 3 の方法ステップを実行するために使用される例示的なグラフィカルユーザインターフェースを示す図である。

【図 6】正常な（すなわち、健常な）乳房上皮細胞の画像を示す図である。

【図 7】蛍光チャンネルのデータの定量化が疾患状態のマーカーとしてどのように機能するかを示す、乳癌（すなわち、疾患）細胞の画像を示す図である。

【図 8】健常な乳房上皮細胞の画像を乳癌細胞の画像と自動的に区別するために使用することのできる複数の異なる測光及び形態的ディスクリプタを示す図で、図 3 に示した方法ステップを実行するために使用される例示的なグラフィカルユーザインターフェースを示す図である。

【図 9】ヒト末梢血の細胞を測光的特性に基づいて様々なサブ集団へと分離することを図式的に示す図である。

【図 10 A】乳癌細胞を含まない細胞集団から収集された画像データに基づいて、正常末梢血の单核細胞（P B M C）の分布を図式的に示す図である。

【図 10 B】乳癌細胞の分布が正常 P B M C 細胞の分布とどのように区別可能であるかを示し、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データに基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布を図式的に示す図である。

【図 11 A】乳癌細胞の細胞質面積の分布が正常 P B M C 細胞の細胞質面積の分布とどのように区別可能であるかを示し、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データから得られた細胞質面積の測定に基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布を図式的に示す図である。

【図 11 B】乳癌細胞の散乱周波数の分布が正常 P B M C 細胞の散乱周波数の分布とどの

10

20

30

40

50

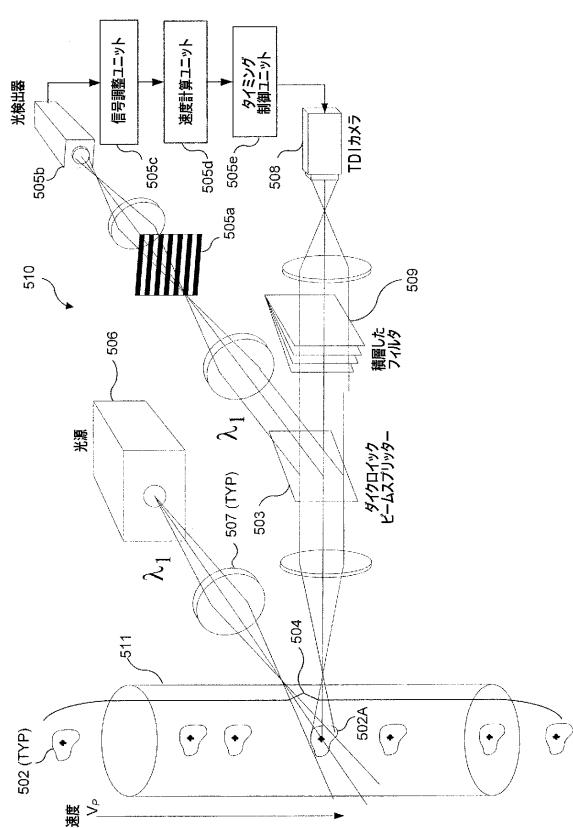
ように区別可能であるかを示し、両方の細胞タイプを含む細胞集団から収集された画像データから得られた散乱周波数の測定に基づいて正常 P B M C 及び乳癌細胞の分布を図式的に示す図である。

【図 1 2】乳癌細胞の明視野及び蛍光画像を組み合わせることによって生成された細胞の合成画像を示す図である。

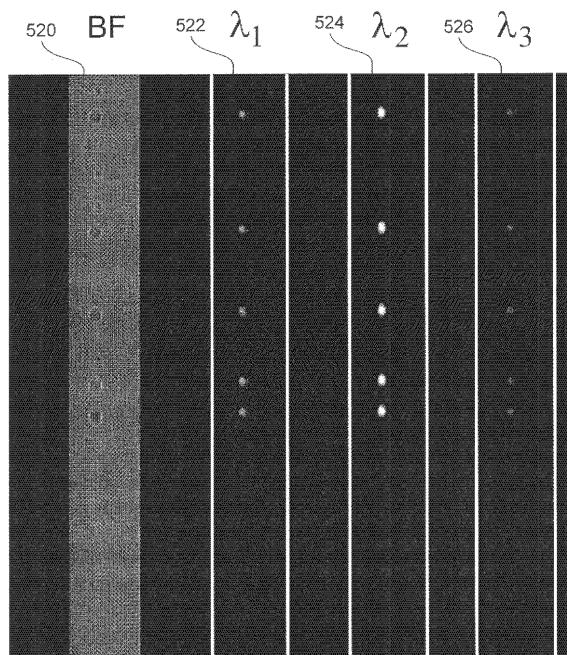
【図 1 3】細胞集団の画像データから得られた散乱データによって定義することのできる、5 つの異なる P B M C 集団の代表的な画像を示す図である。

【図 1 4】図 3 に示した方法ステップを実行するために使用される例示的な計算システムを概略的に示す図である。

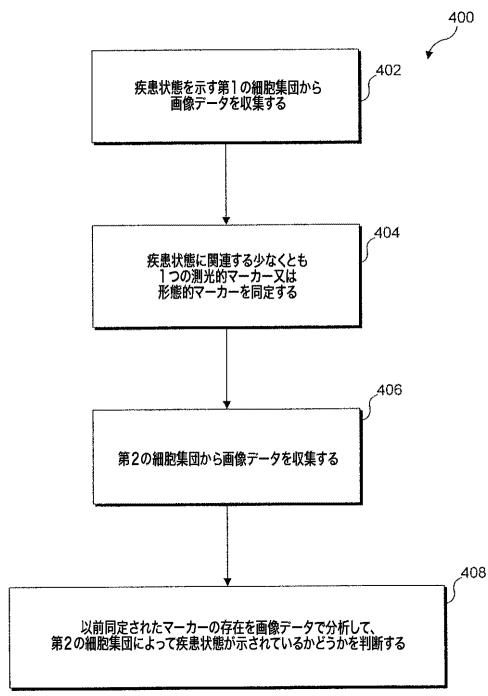
【図 1】



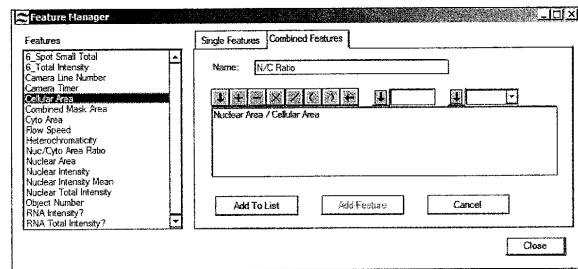
【図 2】



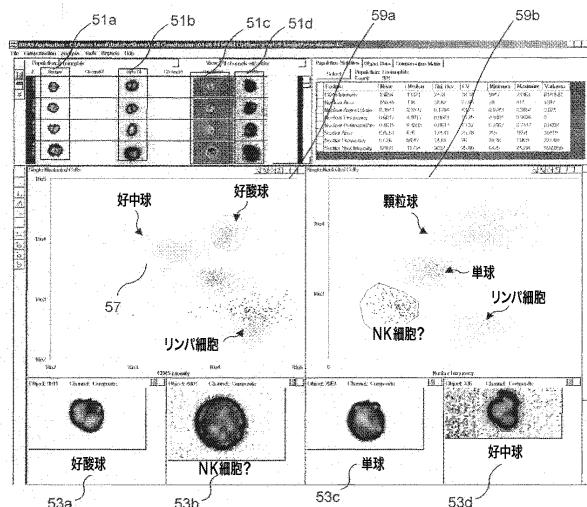
【図3】



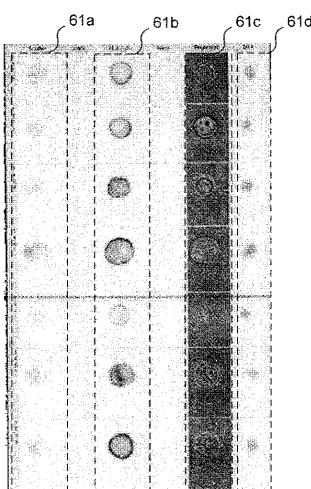
【図4】



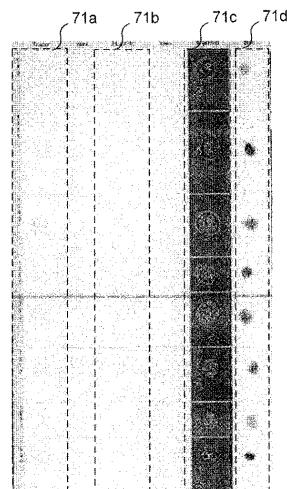
【図5】



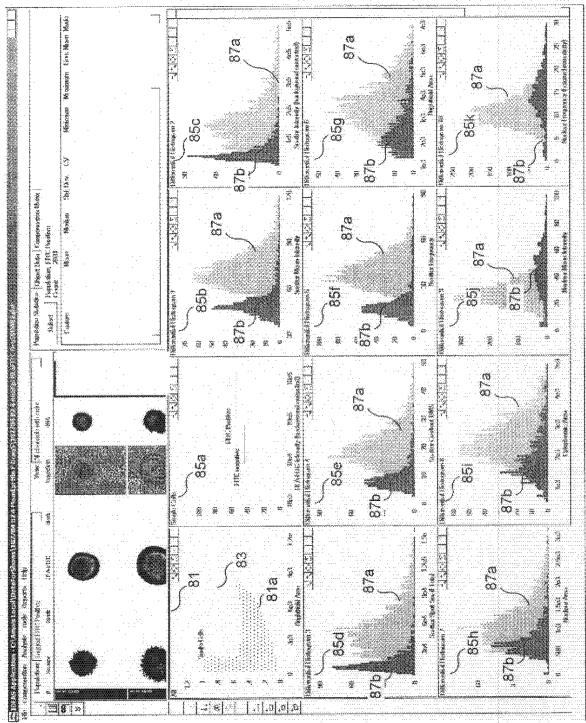
【図6】



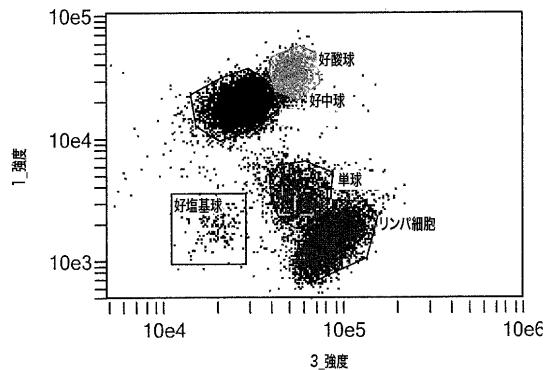
【図7】



【図8】



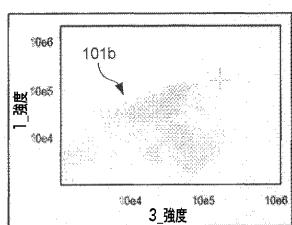
【図9】



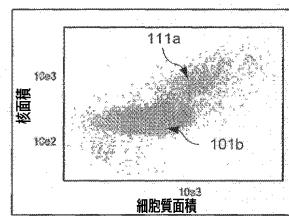
集合の統計

集合	数	合計%	ゲート%
単一細胞	17721	88.6	100
好酸球および単一細胞	1188	5.94	6.7
好中球および単一細胞	8035	40.2	45.3
单球および単一細胞	1404	7.02	7.92
リンパ細胞および単一細胞	5622	28.1	31.7
好塞性球および単一細胞	169	0.84	0.95

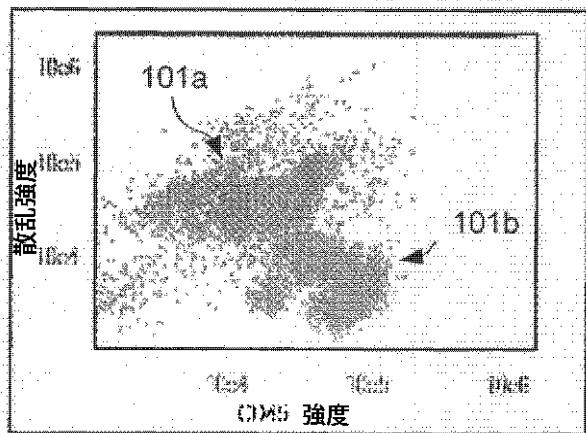
【図10A】



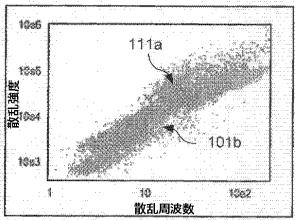
【図11A】



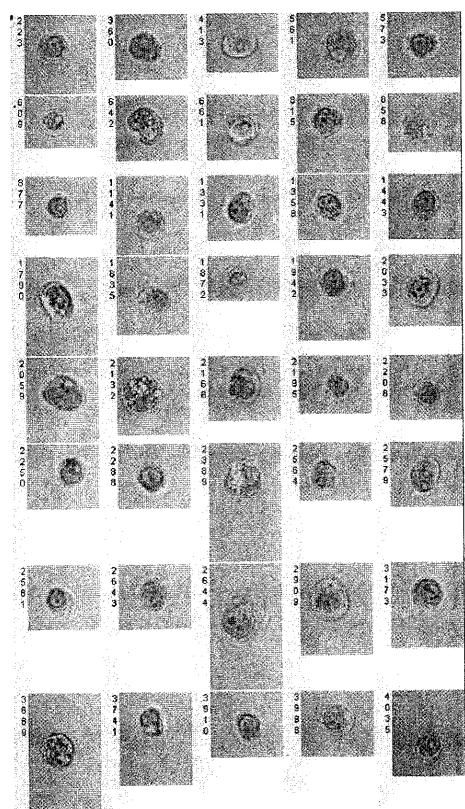
【図10B】



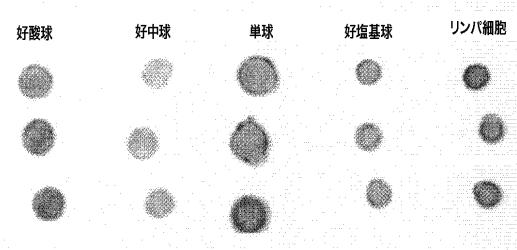
【図11B】



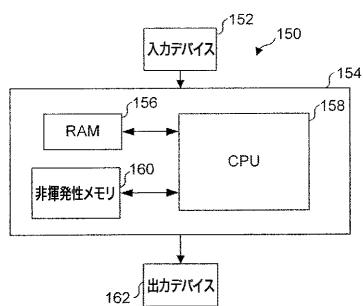
【図12】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

(72)発明者 タデオス ジョージ

アメリカ合衆国 98107 ワシントン州 シアトル ノースウェスト 63 ストリート 1
712

(72)発明者 フィリップ モリシー

アメリカ合衆国 98006 ワシントン州 ベルビュー 153 アベニュー サウスイースト
4412

(72)発明者 ブライアン ホール

アメリカ合衆国 98107 ワシントン州 シアトル ノースウェスト 56 ストリート 1
748 アパートメント 302

(72)発明者 デビッド ペリー

アメリカ合衆国 98072 ワシントン州 ウッディンビル 107 ドライブ サウスイースト
ト 24017

(72)発明者 キャスリーン ジマーマン

アメリカ合衆国 98110 ワシントン州 ベーンブリッジ アイランド ノースイースト ベ
イ ヒル ロード 7085

審査官 荒巻 慎哉

(56)参考文献 特表2004-522163(JP,A)

特開昭62-134559(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 15/00 - 15/14

G01N 21/00 - 21/01

G01N 21/17 - 21/61

G01N 33/49