

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502369  
(P2005-502369A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int.CI.<sup>7</sup>

**C12Q 1/06**  
**G01N 15/00**  
**G01N 21/03**  
**G01N 33/48**  
**G01N 33/483**

F 1

C 12 Q 1/06  
G O 1 N 15/00  
G O 1 N 21/03  
G O 1 N 33/48  
G O 1 N 33/483

テーマコード(参考)

2 G O 4 5  
2 G O 5 7  
4 B O 6 3  
5 B O 5 7  
C

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 237 頁) 最終頁に続く

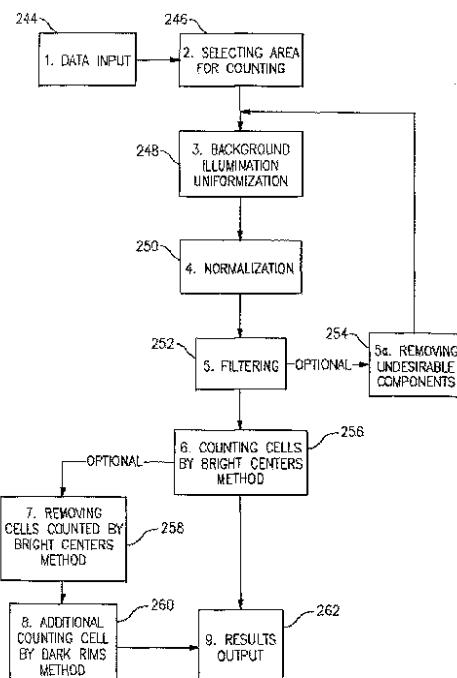
(21) 出願番号	特願2003-527562 (P2003-527562)	(71) 出願人	501074711 バースタイン テクノロジーズ, インコ ポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 926 18, アーバイン, テクノロジー ドライ ブ 163, スイート 200
(86) (22) 出願日	平成14年9月11日 (2002. 9. 11)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月12日 (2004. 3. 12)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/028958	(74) 代理人	100098268 弁理士 永田 豊
(87) 國際公開番号	W02003/023571	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
(87) 國際公開日	平成15年3月20日 (2003. 3. 20)		
(31) 優先権主張番号	60/322,863		
(32) 優先日	平成13年9月12日 (2001. 9. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/353,300		
(32) 優先日	平成14年1月31日 (2002. 1. 31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/353,921		
(32) 優先日	平成14年1月31日 (2002. 1. 31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】分画細胞計数方法ならびにそれを実行するための関連する装置およびソフトウェア

## (57) 【要約】

本発明は、細胞、特に血球を画像化する光学的方法、システムおよびソフトウェアを提供する。一実施形態では、血球を含む実験室サンプルをバイオディスク上に被着する。バイオディスクは、血球の種々のコンポーネントを結合するための特異抗原を含む混合チャンバーを有する特製のディスクである。ディスクは、光ドライブに入れられた後、回転され、サンプルおよび抗原が他の溶液と混合される。続いて電磁ビームが特定の捕捉ゾーンのサンプルと相互作用するようにバイオディスクに当てられ、結果として生じるビームが検出器により収集される。そして、ビームに含まれる情報がプロセッサに送られ、プロセッサはデジタル画像を生成する。2値化、バックグラウンド均一化、規格化およびフィルタリング等の種々の画像処理方法を実行して、調査データ内の細胞を増強し、計数の精度を高める。泡やぼやけた細胞のような不整部分を補正するために他の技法が設計される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞を計数する方法であって、  
細胞のサンプルの調査データを取得し、  
前記調査データ内で評価矩形を選択し、  
前記評価矩形内の前記調査データを増強し、そして  
前記評価矩形内の細胞を計数するステップ、  
を含む方法。

**【請求項 2】**

前記選択するステップは、前記評価矩形のカスタムサイズを選択するステップをさらに含む請求項 1 に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

前記選択するステップは複数の評価矩形を選択する請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記調査データ領域を増強する前記ステップが、  
前記調査データに対してバックグラウンド照度均一化を実行し、  
前記調査データに対して規格化を実行し、そして  
前記調査データをフィルタリングするステップ、  
をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記バックグラウンド照度均一化を実行するステップが、  
近傍矩形のサイズを選択し、  
前記調査データ内の点を選び、  
水平走査を実行し、それによって、前記点を中心とする前記近傍矩形内に配置されたすべての隣接点に対する第 1 スライド平均を計算し、  
垂直走査を実行し、それによって、前記点を中心とする前記近傍矩形内に配置されたすべての隣接点に対する第 2 スライド平均を計算し、  
前記第 1 スライド平均および第 2 スライド平均を組み合わせ、それによって、全平均を生成し、  
前記全平均と前記点のもとの値との差を求めて該差をバックグラウンド値に加算することにより計算される結果値に、前記点のもとの値を再割当て、そして 30  
前記調査データ内のすべての点について、前記水平走査を実行するステップ、前記垂直走査を実行するステップ、2 つの前記平均を組み合わせるステップおよび前記もとの値を再割当てするステップを繰り返すステップ、  
をさらに含む請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記バックグラウンド照度均一化を実行するステップは、  
前記調査データに対してフーリエ変換を実行し、それによって、周波数領域関数を生成し、  
前記周波数領域関数から低波長関数を除去し、  
前記周波数領域関数から長波長関数を除去し、そして 40  
前記周波数領域関数に対して逆変換を実行するステップであって、それによって、前記調査データの修正バージョンを求める、逆変換を実行するステップ、  
をさらに含む請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記規格化を実行するステップは、  
前記調査データ内のすべての点の値の平均および標準偏差を計算し、  
前記平均および前記標準偏差を用いて前記調査データ内のすべての点の前記値を規格化し、そして  
必要であればいくつかの点の前記値を切り捨てるステップ、 50

をさらに含む請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記フィルタリングするステップは、

近傍矩形のサイズを選択し、

前記調査データ内の点を選び、

前記点を中心とする前記近傍矩形内に配置されたすべての十分に異なる点を見つけ、

前記十分に異なる点の数が所定のフィルタリング基準より大きい場合に前記点の値を再割当て、そして

前記調査データ内のすべての点について、前記すべての十分に異なる点を見つけるステップおよび前記値を再割当てするステップを繰り返すステップ、

をさらに含む請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記フィルタリングステップの後に前記調査データから不要なコンポーネントを除去し、そして

前記バックグラウンド照明を実行するステップ、前記規格化を実行するステップおよび前記フィルタリングするステップを繰り返すステップ、

をさらに含む請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記不要なコンポーネントを除去するステップは、

しきい値を選択し、

前記しきい値を用いて前記調査データに対して 2 値化を実行し、

前記調査データに対して規格化を実行し、

連結コンポーネントを抽出し、

サイズしきい値を選択し、そして

前記サイズしきい値を満たさないコンポーネントを除去するステップ、

をさらに含む請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記規格化を実行するステップは、複数の侵食および膨張を実行するステップをさらに含む請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記連結コンポーネントを抽出するステップは、

前記調査データのすべての黒点に初期コンポーネント番号を割り当て、

開始点を選び、

走査方向を設定し、

前記調査データのすべての点を走査し、それによって、隣接する黒点のコンポーネント番号に一致するように前記黒点のそれぞれのコンポーネント番号を再割当てし、

所定ルールのセットに従って前記走査方向を変更し、そして

連結黒点の前記コンポーネント番号が同一になるように前記走査するステップおよび前記変更するステップを繰り返すステップ、

をさらに含む請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記評価矩形内の細胞を計数する前記ステップは、

前記調査データに対して畳込みを実行し、

前記調査データの複数の局所最大値を探索し、

前記複数の局所最大値から冗長な局所最大値を除去し、

残りの最大を細胞の輝中心であると宣言し、そして

前記細胞の輝中心を認識することにより細胞を計数するステップ、

をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記畳込みを実行するステップは円形近傍を定義する指標関数を使用し、該円形近傍は

10

20

30

40

50

細胞の予想サイズの限界を定める請求項 1 3 に記載の細胞を計数する方法。

【請求項 1 5】

前記畳込みを実行するステップはガウス指標関数を使用する請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記冗長な局所最大値を除去するステップは、

距離しきい値を選択し、そして

前記距離しきい値を使用するステップであって、それによって、局所最大値が冗長であるかどうかを判断するステップ、

をさらに含む請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

統計分析を実行するステップをさらに含み、該ステップは、

計数された細胞に基づいて細胞の分布を取得し、そして

細胞が凝集しているか、または視認性が低い領域内の細胞数を推定するステップ、

を含む請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 8】

高分解能で前記調査データを再サンプリングし、そして

前記畳込みを実行し、前記複数の局所最大値を探索し、前記冗長な局所最大値を除去し、前記残りの最大を細胞の輝中心であると宣言し、そして前記細胞の輝中心を認識することにより細胞を計数するステップを繰り返すステップ、

をさらに含む請求項 1 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

輝中心により計数された前記細胞を前記調査データから除去し、

暗縁を認識することにより細胞を計数し、

前記輝中心を認識することにより細胞を計数するステップからの合計を、前記暗縁を認識することにより計数するステップからの合計に加算するステップ、

をさらに含む請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記暗縁を認識することにより細胞を計数するステップは、

前記調査データに対して反転を実行し、

シフトした円環との複数の畳込みを実行し、

前記複数の畳込みからの結果の和をとり、

局所最大値を見つけ、

最大を細胞の中心であると宣言し、そして

前記細胞の中心を計数するステップ、

をさらに含む請求項 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

前記複数の畳込みを実行するステップはシフトした円環なしで畳込みを実行する請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記畳込みを実行するステップはガウス指標関数を使用する請求項 2 0 に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

前記畳込みを実行するステップは平滑化関数を使用する請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記評価矩形において示される細胞を計数するステップは、

前記調査データに対して反転を実行し、

シフトした円環との複数の畳込みを実行し、

前記複数の畳込みからの結果の和をとり、

局所最大値を見つけ、

最大を細胞の中心であると宣言し、そして

前記細胞の中心を計数するステップ、

50

をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記複数の畳込みを実行するステップはシフトした円環なしで畳込みを実行する請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記増強するステップは、

前記調査データに対して規格化を実行し、

前記調査データに対してフィルタリングを実行し、

しきい値数を選択し、

前記調査データが前記しきい値数より大きい値だけ所定バックグラウンド値と異なっているかどうかを判断することにより前記調査データに対して 2 値化を実行し、10

前記調査データに対して規格化を実行し、そして

前記調査データ内の 1 ピクセル幅境界を抽出し、

前記 1 ピクセル幅境界により画定される領域を調査データで塗りつぶし、

前記塗りつぶされた領域に畳込みを適用するステップ、

をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記調査データの画像表現をコンピュータモニタに表示するステップをさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記表示するステップは、

前記調査データに対して高速フーリエ変換を実行し、それによって、周波数領域内の調査データを生成し、

前記周波数領域内のスペクトルの一部を除去し、そして

前記周波数領域内の前記調査データに対して逆変換を実行するステップであって、それによって、表示のために前記調査データを増強するステップ、20

をさらに含む請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記細胞のサンプルの調査データを取得するステップは、

1 種または数種の捕捉剤を有する 1 つまたは複数の捕捉ゾーンを含む光ディスク表面上に30  
血液サンプルを用意し、

前記光ディスクを光リーダに装填し、

前記光ディスクを回転させ、

電磁放射の入射ビームを前記捕捉ゾーンの 1 つに光源から当て、

前記入射ビームが前記捕捉ゾーンで前記ディスクと相互作用した後に形成される電磁放射の結果ビームを検出器で検出し、

検出されたビームをアナログ出力信号に変換し、そして

前記アナログ出力信号を、前記捕捉ゾーンに捕捉された細胞を含むデジタルデータに変換するステップ、40

を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記アナログ出力を前記デジタルデータに変換する前記ステップは、

一定間隔で前記アナログ信号の振幅をサンプリングし、

前記サンプリング振幅を一次元配列に記録し、

前記サンプリングするステップおよび前記記録するステップを用いて複数の一次元配列を作成し、そして

前記複数の一次元配列を組み合わせるステップであって、それによって、前記サンプルのデジタルデータを含む 2 次元配列を作成するステップ、50

をさらに含む請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記光ディスクは、前記捕捉に当てられる光が前記検出器へ反射されるように反射層を備えて構成される請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記検出器は下部検出器である請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記光ディスクは、前記捕捉ゾーンに当てられる光が前記光ディスクを透過するように構成され、前記ディスクは前記光源と前記検出器の間にある請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記検出器は上部検出器である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記検出器は分割検出器である請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 1つまたは複数の捕捉ゾーンは、前記光ディスク内の 1つまたは複数のチャンバー内に配置される請求項 29 に記載の方法。

【請求項 37】

前記光ディスクは、前記捕捉ゾーンに対応する複数のウィンドウを備える請求項 29 に記載の方法。

【請求項 38】

前記評価矩形を選択するステップは、

前記調査データ内で前記複数のウィンドウの 1つを見つけ、そして  
前記ウィンドウ内で標準サイズの評価矩形をクロッピングするステップ、  
をさらに含む請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記複数のウィンドウの 1つを見つける前記ステップは、

前記調査データに対して圧縮を実行し、

前記調査データに対してしきい値評価を実行し、

前記調査データに対して 2 値化を実行し、

前記調査データに対して規格化を実行し、

前記調査データから連結コンポーネントを抽出し、そして

前記連結コンポーネントからウィンドウに対応するコンポーネントを見つけるステップ、  
をさらに含む請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記連結コンポーネントを抽出するステップは、

前記調査データのすべての黒点に初期コンポーネント番号を割り当て、

開始点を選び、

走査方向を設定し、

前記調査データのすべての点を走査し、それによって、隣接する黒点のコンポーネント番号に一致するように前記黒点のそれぞれのコンポーネント番号を再割当てし、

所定ルールのセットに従って前記走査方向を変更し、そして

連結黒点の前記コンポーネント番号が同一になるように前記走査するステップおよび前記  
変更するステップを繰り返すステップ、

をさらに含む請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記光ディスクの表面は前記捕捉ゾーンの位置をマーキングするダークスポットを含む請  
求項 29 に記載の方法。

【請求項 42】

前記評価矩形を選択するステップは、

前記調査データ内で前記ダークスポットの 1つを見つけ、そして

前記ダークスポットから所定距離シフトすることにより求められる点を中心とする標準サ  
イズの評価矩形を作成するステップ、

をさらに含む請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記ダークスポットの 1 つを見つける前記ステップは、

前記調査データに対して圧縮を実行し、

前記調査データに対してしきい値評価を実行し、

前記調査データに対して 2 値化を実行し、

前記調査データに対して規格化を実行し、

前記調査データから連結コンポーネントを抽出し、そして

前記連結コンポーネントからダークスポットに対応するコンポーネントを見つけるステップ、

10

をさらに含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記連結コンポーネントを抽出するステップは、

前記調査データのすべての黒点に初期コンポーネント番号を割り当て、

開始点を選び、

走査方向を設定し、

前記調査データのすべての点を走査し、それによって、隣接する黒点のコンポーネント番号に一致するように前記黒点のそれぞれのコンポーネント番号を再割当てし、

所定ルールのセットに従って前記走査方向を変更し、そして

連結黒点の前記コンポーネント番号が同一になるように前記走査するステップおよび前記変更するステップを繰り返すステップ、

をさらに含む請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記ダークスポットの 1 つを見つける前記ステップは、位置情報を読み出すステップをさらに含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記光ディスクは、前記捕捉ゾーンを位置特定するためのコンピュータ可読位置情報を含む請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 4 7】

コンピュータモニタ上に前記ウィンドウの画像を表示するステップをさらに含む請求項 3 30 7 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記ウィンドウの前記画像を表示する前記ステップは、

前記画像が歪んでいるかどうかを判断し、

歪みの方向を求め、そして

前記画像の歪みを補正するステップ、

をさらに含む請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

細胞の前記サンプルの調査データを取得する前記ステップは、アーカイブからサンプルの事前に格納されている調査データを取り出すことを含む請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 0】

前記アーカイブは、患者の特徴に従って前記格納されている調査データを登録する請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記サンプルの事前に格納されている調査データを取り出すステップは、患者の前記特徴から選択される複数の基準に適合するサンプルを選択するステップをさらに含み、それによって、母集団健康動向研究が行われる請求項 5 0 に記載の細胞を計数する方法。

【請求項 5 2】

前記細胞を計数するステップからの結果を出力するステップをさらに含む請求項 1 に記載の方法。

50

**【請求項 5 3】**

前記細胞は白血球である請求項 5 2 に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記結果は C D 4 + 細胞および C D 8 + 細胞の計数、ならびに C D 4 + 細胞数の C D 8 + 細胞数に対する比を含む請求項 5 3 に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記結果は、C D 3 + 細胞および C D 4 5 + 細胞の計数をさらに含む請求項 5 4 に記載の方法。

**【請求項 5 6】**

前記細胞を計数するステップは、

泡トラックについて細胞の分布を分析し、  
小さすぎる局所細胞密度を有する領域を無視し、そして  
細胞数を再計算するステップ、  
をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****[発明の背景]****1 . 発明の分野**

本発明は、信号検出装置、データ処理方法、ならびに関連するコンピュータソフトウェア 20 および検定法アルゴリズムに関する。特に、本発明は、細胞サンプル等の生物学的サンプルを画像化すること、および収集された画像を分析することに関する。より具体的には、以下で最良の実施の形態により記載される特定の実施形態には制限されないが、本発明は、白血球を含む分画細胞計数方法およびこのような細胞計数を実行するための光バイオディスク(optical bio-disc)の使用に関する。

**【0 0 0 2】****[関連出願の相互参照]**

本出願は、以下の出願に基づく優先権の利益を主張する：2001年9月12日出願の米国仮特許出願第60/322,863号；2002年1月31日出願の米国仮特許出願第60/353,300号；同じく2002年1月31日出願の米国仮特許出願第60/353,921号；2002年2月5日出願の米国仮特許出願第60/355,644号；2002年2月8日出願の米国仮特許出願第60/355,304号；2002年2月19日出願の米国仮特許出願第60/358,479号；2002年3月12日出願の米国仮特許出願第60/363,949号；および2002年8月21日出願の米国仮特許出願第60/404,921号。これらの出願およびそれらに提供されている開示は全体として参考により本明細書に援用される。

**【0 0 0 3】****[著作権で保護された資料に関する陳述]**

本特許文書の開示の一部は、著作権保護を受ける資料を含む。著作権者は、特許文書または特許開示の何人による複製に対しても、それが米国特許商標庁のファイルまたは記録にある通りである限り異議はないが、さもなければいかなるものであれすべての著作権を留保する。

**【背景技術】****【0 0 0 4】****2 . 関連技術の説明**

多くの研究および診断場面で、細胞の混合物から特定の細胞を単離し分析することが必要となる。このような混合物の出所としては、血液、髄液、骨髓、腫瘍ホモジエネート、リンパ系組織、およびその他の細胞物質を含むサンプルがあり得る。

**【0 0 0 5】**

全血球計数(CBC)は、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球ヘモグロビン量、 50

平均赤血球ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、血小板数、および白血球数を含む検査の全体である。最も一般的に用いられる臨床検査は、健康状態の評価ならびに臨床的な診断、治療、およびフォローアップのために日常的に使用される全CBC計数である。

#### 【0006】

白血球(WBC)は、感染と闘い異物を攻撃することによって体を保護する。分画白血球計数は、人の血液中の白血球数および各タイプの白血球の百分率を決定する。WBCすなわち白血球の数は、病気の存在についての手がかりを提供する。これらの検査は、一般的な健康診断に含まれ、感染、アレルギー、および白血病等のさまざまな病気を調べるために役立つ。追加の白血球が必要とされる時には、骨髄が産生を増大させる。

#### 【0007】

次の5つのタイプの白血球があり、それぞれ異なる機能を有する：好中球、リンパ球、単球、好酸球、および好塩基球。分画は、これらの細胞が通常の分布で存在するかどうか、またはある細胞タイプが増減しているかどうかを明らかにする。健常人では通常、WBC数は1マイクロリットル( $\mu l$ )当たり $4,000 \sim 10,800$ 個である。運動、ストレス、および疾病のような因子がこれらの値に影響を及ぼし得る。この情報は、特定のタイプの病気を診断するのに役立つ。WBCが高い場合、感染、白血病、または組織損傷の可能性がある。WBCが1マイクロリットル当たり $1,000$ 個を下回る場合、感染のおそれが高い。AIDSや化学療法のような免疫系を弱める条件や投薬が、白血球の減少を引き起こす。病気からの回復は、白血球数により監視することができる。数が異常レベルまで上昇または下降し続けることは、健康状態の悪化を示す。数が正常レベルに復帰することは増強を示す。

#### 【0008】

白血球分画検査は、白血球数自体から得られる以上の情報を集めるために不可欠である。白血球分画計数は、新たな感染や発熱の疑い(たとえCBCが正常であっても)、異常に伴う障害の疑い、異常白血球数、白血病の疑い、その他、好酸球、単球、好塩基球等の異常を評価するために使用される。(例えば薬物療法に付随する)重篤な白血球減少がある場合には、白血球または白血球分画の検査が繰り返し実行されることもある。例えば化学療法や放射線療法の治療中には、治療が癌細胞以外に正常な血球を消耗させているかどうかを判定するために、血球数は非常に重要である。

#### 【0009】

分画白血球数は、コンピュータ化された細胞計数機器によって決定される。機械は、5つの主要な白血球タイプの総数および百分率を決定する。正常人では、大部分が好中球(50~60%)であり、リンパ球(20~40%)、単球(2~9%)がそれに続き、好酸球(1~4%)および好塩基球(0.5~2%)は少数である。

#### 【0010】

リンパ球のカテゴリ内には、さらに細胞のサブタイプがある。例えば、リンパ球はT細胞(胸腺由来リンパ球)とB細胞(囊相当リンパ球)に大別され、これらはそれぞれ主として細胞性および体液性免疫を受け持つ。白血球のグループを分類するためには形態的特徴が使用されているが、リンパ球サブタイプの多くの機能的能力を区別するには形態だけでは不十分であることが分かっている。さまざまな機能を有するリンパ球を区別するには、ロゼット法、免疫蛍光顕微鏡法、酵素組織化学法、および最近では固有の細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体による分析等の技法が開発されている。

#### 【0011】

好中球は感染と闘うために重要である。好中球数が1マイクロリットル当たり $1,000$ 個を下回っている時、その状態を好中球減少症という。リンパ腫治療が好中球減少症を引き起こすことがある。肥満および喫煙は好中球数を増加させる。リンパ球はB(骨髄成熟)およびT(胸腺成熟)リンパ球に分けられる。リンパ球数が、成人で1マイクロリットル当たり $1,500$ 個、または子供で1マイクロリットル当たり $3,000$ 個を下回っている時、その状態をリンパ球減少症という。リンパ腫がリンパ球減少症を引き起こすことがある。

10

20

30

40

50

**【 0 0 1 2 】**

血小板（栓球）は、出血が起きている部位に集まることによって出血を止める細胞様粒子である。その場合、血小板は活性化し、互いに凝集して、出血を止め、凝固を促進する。激しい運動中、患者に感染、炎症、悪性腫瘍等の骨髄増殖性障害がある場合や、脾臓が除去されている場合、血小板数は増大する。血小板数の過剰を血小板血症という。

**【 0 0 1 3 】**

血液の標準サンプル中の血小板数は通常、1マイクロリットル( $\mu l$ )当たり133,000~333,000個である。血小板数の過剰を血小板血症という。標準以上の血小板数は、反応性応答または骨髄機能不全に起因している可能性がある。反応性応答は通常、出血、感染、腫瘍形成、および骨髄増殖性障害によって引き起こされる。骨髄機能不全は通常、汎血球減少症と呼ばれる血球の損失を伴う。他方、血小板数の減少は、免疫血小板減少症に起因する。血小板減少症は、血小板数が30,000を下回る結果、異常出血を生じる場合に起こる。数が5,000を下回ると、生命にかかわるとみなされる。

**【 0 0 1 4 】**

CBCは、ヘモグロビンレベル、ヘマトクリット、全白血球数、および赤血球数を測定する市販の手動または電子機器によってなされ得る。変形として、血小板数、白血球分画数、および細胞指数があり得る。血液学分析装置は完全自動化され、CSF、胸膜液、腹水、心膜液、および胃吸引等の体液中の細胞数、細胞タイプについて結果は正確である。

**【 0 0 1 5 】**

従来の方法およびシステムと比較して、本発明者らは、細胞およびそのコンポーネントを画像化し分析するための簡単で、小型で、超高感度で、安価なシステムを開発した。このシステムは、光バイオディスク、関連する検出アセンブリ、ならびに情報および信号処理の方法およびソフトウェアを使用する。

**【 発明の開示 】****【 発明が解決しようとする課題 】****【 0 0 1 6 】****[ 発明の概要 ]**

本発明は、実験室サンプル中の細胞物質の画像化および計数のための方法、装置およびソフトウェアを対象とする。本発明の実施形態は、サンプル中の細胞のデジタル画像を作成し、その画像に対してコンピュータ分析を実行する。本発明は、血液等の生体液に感染する寄生虫や病原体を含めて、細胞、特に血球を画像化する。他の検定法では、画像化は、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ（ビーズ検定法）、凝集物質、沈殿（酵素反応）、または他の生物学的レポーターに対して実行される。このシステムは、光バイオディスク、関連する検出アセンブリ、ならびに情報および信号処理の方法およびソフトウェアを使用する。

**【 0 0 1 7 】**

本発明は、バイオディスク、バイオドライブ、および関連方法も対象とする。本発明またはそのさまざまな態様は、以下の同一譲受人に譲渡された同時係属中の特許出願に開示されているディスク、検定法、およびシステムにおいて容易に実施され、それらに適応し、またはそれらとともに使用され得る：「Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs」と題する1999年8月23日出願の米国特許出願第09/378,878号；「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する1999年8月23日出願の米国仮特許出願第60/150,288号；「Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material」と題する1999年10月26日出願の米国特許出願第09/421,870号；「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する2000年8月21日出願の米国特許出願第09/643,106号；「Optical Biodiscs with Reflective Layers」と題する2001年11月15日出願の米国特許出願第09/99,274号；「Methods and Apparatus for Detecting and Quantifying Lymphocyte

10

20

30

40

50

s with Optical Biodiscs」と題する2001年11月20日出願の米国特許出願第09 / 988,728号;「Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-discs」と題する2001年11月19日出願の米国特許出願第09 / 988,850号;「Apparatus and Methods for Separating Agglutinants and Disperse Particles」と題する2001年11月20日出願の米国特許出願第09 / 989,684号;「Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto」と題する2001年11月27日出願の米国特許出願第09 / 997,741号;「Apparatus and Methods for Separating Components of Particulate Suspension」と題する2001年11月30日出願の米国特許出願第09 / 997,895号;「Optical Discs for Measuring Analytes」と題する2001年12月7日出願の米国特許出願第10 / 005,313号;「Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers」と題する2001年12月10日出願の米国特許出願第10 / 006,371号;「Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes」と題する2001年12月10日出願の米国特許出願第10 / 006,620号;「Optical Disc Assemblies for Performing Assays」と題する2001年12月10日出願の米国特許出願第10 / 006,619号;「Detection System For Disk-Based Laboratory and Improved Optical Bio-Disc Including Same」と題する2001年12月14日出願の米国特許出願第10 / 020,140号;「Surface Assembly for Immobilizing DNA Capture Probes and Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto」と題する2001年12月21日出願の米国特許出願第10 / 035,836号;「Dual Bead Assays Including Covalent Linkages for Improved Specificity and Related Optical Analysis Discs」と題する2002年1月4日出願の米国特許出願第10 / 038,297号;「Optical Disc Analysis System Including Related Methods for Biological and Medical Imaging」と題する2002年1月10日出願の米国特許出願第10 / 043,688号;「Optical Disc Analysis System Including Related Signal Processing Methods and Software」と題する2002年1月14日出願の米国特許出願第60 / 348,767号;「Methods for DNA Conjugation Onto Solid Phase Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems」と題する2002年2月26日出願の米国特許出願第10 / 086,941号;「Methods for Decreasing Non-Specific Binding of Beads in Dual Bead Assays Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems」と題する2002年2月28日出願の米国特許出願第10 / 087,549号;「Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus」と題する2002年3月14日出願の米国特許出願第10 / 099,256号;「Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets」と題する同じく2002年3月14日出願の米国特許出願第10 / 099,266号;「Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto」と題する2002年4月11日出願の米国特許出願第10 / 121,281号;「Variable Sampling Control for Rendering Pixelization of Analysis Results in a Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto」と題する2002年5月16日出願の米国特許出願第10 / 150,575号;「Surface Assembly For Immobilizing DNA Capture Probes in Genetic Assays Using Enzymatic Reactions to Generate Signals in Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto」と題する2002年5月17日出願の米国特許出願第10 / 150,702号;「Optical Disc System and Related Detecting and Decoding Methods for Analysis of Microscopic Structures」と題する2002年7月12日出願の米国特許出願第10 / 194,418号;「Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Various Reporting Agents for Use Therewith」と題する同じく2002年7月12日出願の米国特許出願第10 / 194,396号;「Transmissive Optical Disc Assemblies for Performing Physical Measurements an

d Methods Relating Thereto」と題する2002年7月19日出願の米国特許出願第10/199,973号;「Optical Analysis Disc and Related Drive Assembly for Performing Interactive Centrifugation」と題する2002年7月22日出願の米国特許出願第10/201,591号;「Method and Apparatus for Bonded Fluidic Circuit for Optical Bio-Disc」と題する2002年7月24日出願の米国特許出願第10/205,011号;「Magnetic Assisted Detection of Magnetic Beads Using Optical Disc Drives」と題する同じく2002年7月24日出願の米国特許出願第10/205,005号。これらのすべての出願は全体として参照により本明細書に援用される。したがってそれらは、本明細書において完全に繰り返されているかのごとく、本明細書の裏づけとして背景および関連する開示を提供する。

10

#### 【0018】

検定法を実行する本発明の一方法は、光バイオディスク上に配置された特別のチャネル内の血球の光画像化を行うという原理に基づく。約7マイクロリットルの全血をディスク上の特別に設計されたチャネルに注入する。これらの種々の白血球サブタイプを同定し白血球分画数を生成する細胞認識ソフトウェアで画像を分析する。本方法は、特定の細胞に対する細胞特異抗体(specific antibody)を用いた特異的な細胞(specific cell)捕捉に基づく。この具体的な場合に、抗体はリンパ球(CD2、CD19)、単球(CD14)、好酸球(CD15)等に対するものである。これらの白血球サブタイプ特異抗体は、フローチャンバーを含むバイオディスク内の固体表面に集められるか、または被着される。

20

#### 【0019】

バイオディスクドライブアセンブリが、ディスクを回転させ、ディスク上に格納されている符号化情報の読み出しおよび処理を行い、バイオディスクのフローチャンバー内の細胞捕捉ゾーンを分析するために使用される。バイオディスクドライブは、バイオディスクを回転させるモーターと、ディスクの回転速度を制御するコントローラと、ディスクからの戻り信号を処理するプロセッサと、処理された信号を分析する分析器とを備える。回転速度は可変であり、速さ、方向、および回転時間のいずれに関しても綿密に制御され得る。バイオディスクは、フローチャンバーおよびターゲットゾーン内の検査物質がドライブの読み出しビームによって問合せされ、分析器によって分析される前、最中、または後のいずれにおいても、バイオディスクに情報を書き込むために利用されてもよい。バイオディスクは、ディスクの回転を制御し、行われる免疫型判定検定法のタイプに固有の処理情報を提供し、およびバイオドライブに関連するモニタ上に所望の結果を表示するための、符号化された情報を含んでもよい。

30

#### 【0020】

包括的に分画細胞計数プロトコールが、そして特に分画白血球計数プロトコールが、CD、CD-R、またはDVDフォーマット、これらのフォーマットの修正バージョン、およびそれらの代替フォーマット用に開発される。ドライブの読み出しそうなわち問合せビームは、分析サンプル中の種々の細胞を検出し、分画細胞計数ソフトウェアで分析可能な画像を生成する。

40

#### 【0021】

これらの面倒な細胞計数検定法を実行するためには、顕微鏡的方法または高性能の細胞計数器が不可欠である。本発明により行われる他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。

#### 【0022】

本方法は、光バイオディスクおよび関連するディスクアセンブリを使用する。分析チャンバー中で遊離している、または特異抗体法により捕捉された種々の白血球サブタイプの光画像が、血液等の体液中の種々の細胞要素をそれらの光散乱特性により同定する細胞認識ソフトウェアプログラムによって生成され分析される。本方法は、細胞染色、RBC除去等の面倒なプロトコールのような、分析前のサンプルの処理を必要としない。これらの方針は、上部検出器、下部検出器、イベント計数器、または細胞計数器を用いたCD型リー

50

ダ、DVD型リーダ等の光ディスクリーダにおける顕微鏡分析または細胞検出を含む。

【0023】

CD4 / CD8 比を求める等の表面抗原分析に関連する以下の概要は、本方法、装置、システム、およびディスクアセンブリの応用に適した関連検定法の一特定グループを表す。

【0024】

ディスク準備：エアガンを用いて金製の反射ディスクまたは透過ディスクからちり粒子を除去して清浄にする。スピンドルを用いてディスクをイソプロパノールで2回すすぐ。2%ポリスチレンをディスク上にスピンドルコートし、全面にわたり比較的厚いコーティングを形成する。

【0025】

化学物質の被着：一実施形態は、以下のものを培養する3ステップ被着プロトコールを含む：ストレプトアビジン（30分培養）；ビオチン化された第1の抗体（60分培養）；および第2の捕捉抗体（30分培養）。すべてのステップは、好ましくは、被着と被着の間に厳しい洗浄および乾燥ステップを用いて、湿潤チャンバー（humidity chamber）内で室温で実行する。

【0026】

簡単に述べると、1mg / ml のストレプトアビジンを含むリン酸緩衝生理食塩水を1μlずつ各ウインドウ上に積層し、30分培養する。蒸留水を用いて余分なストレプトアビジンをすすぎ落とし、ディスクを乾燥する。等量のビオチン化 IgG (PBS中125μg / ml) とアルデヒド活性化デキストラン (200μg / ml) を混合することによりビオチン化 IgG デキストラン複合体を調製する。デキストラン・アルデヒド・ビオチン化 IgG 複合体を各捕捉ウインドウ内のストレプトアビジン上に積層し、60分または一晩冷蔵庫で培養する。余分な試薬をすすぎ落とし、ディスクをスピンドル乾燥する。バイオディスクスロット上の指定スポットに捕捉抗体を積層することによって、特定のバーコード捕捉パターンを作成する。分画計数のため、抗好中球（CD128等）、抗リンパ球（CD2、CD19、CD56等）、抗好酸球（CD15）、抗単球（CD14）、抗好塩基球（CD63）および抗血小板（CD32およびCD151）を各スロットの指定スポットに積層する。下記の表1に、捕捉層アセンブリのさまざまな捕捉パターンの例を掲げる。冷蔵庫で30分または一晩培養する。25μm、50μmまたは100μm (50μm チャネルに必要なサンプル容積は25μm チャンバーに必要なサンプル容積の2倍である) の、直線形、U字形、または他のチャネルフォーマットを用いたディスクと、透明な（上部検出器用）または反射性のカバーディスク（下部検出器用）を組み立てる。

【0027】

【表1】

10

20

30

## 捕捉層アセンブリおよび変形物

ウインドウ	1	2	3	4	5	6
第1層 (活性層)	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン
第2層		ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン
二次抗体		B抗マウスIgG+DCH O				
一次抗体	基準ドット	リンパ球特異抗体	好中球特異抗体	好酸球特異抗体	好塩基球特異抗体	単球特異抗体

10

20

30

40

50

## 【0028】

ディスクの漏れチェック：通常、バイオハザード物質である血液が分析されるので、これらのディスクは、*in situ*サンプルを有するディスクのスピンドル中にどのチャンバーも漏れないことを確かめる漏れチェックがなされる。それぞれのチャネルに、ブロッキング剤であるStabil Guardを満たし、1時間ブロッキングする。ディスクを5,000 rpmで5分回転させ、漏れおよびディスク安定性を検査する。漏れをチェックした後、ディスクを真空チャンバーに24時間入れる。真空処理後、チャンバーを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)緩衝液で満たし、または別法として空のまま放置してから、真空パウチに入れ、使用時まで冷蔵保存する。

## 【0029】

全血からのバフィーコート層の単離：静脈血をエチレンジアミン四酢酸(EDTA)やクエン酸デキストラン(ACD)のような抗凝固剤とともに遠心チューブに入れ、1,500×gで15分遠心することにより、バフィーコートを調製する。血漿と赤血球の界面に白血球がバフィーコート層と呼ばれる層を形成する。血漿を細いピペットで慎重に取り除いてから、バフィーコート層を採取する。遠心なしで血液からバフィーコートを得る別法として、血液をフィブリノーゲン、デキストラン、アラビアゴム、フィコールまたはメチルセルロースのような沈降促進剤で沈降させる方法がある。Boyum試薬(メチルセルロースとメトリゾ酸ナトリウム)が、赤血球汚染のない白血球調製品を得るために特に好適である。

## 【0030】

ディスク上の検定法基礎技術の説明：分画白血球計数ディスク検査の好ましい一実施形態は、3つの個別のコンポーネント、すなわち(1)化学物質を含むベースディスク、(2)チャネル層、および(3)カバーディスクを含む。

## 【0031】

バフィーコートまたは全血(7マイクロリットルのPBS溶液)をディスクチャンバーに注入し、チャンバーの入口および出口を密閉タブで密封し、ディスクを室温で15分培養する。第1の方法では、上部または下部検出器を有する光ドライブの標準780 nmレーザを用いてディスク上の所与の領域(例えば面積1平方ミリメートル)を走査する。本発明による細胞認識ソフトウェアは、1平方ミリメートルに等しい捕捉画像から分画数を出力するように自動化されており、得られた値を補外して全血の1立方ミリメートル当たり

の計数を決定する。また第2のバーコード法では、標準780nmレーザを用いてディスクを走査して捕捉ゾーン（リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、単球、および血小板）を画像化する。本発明の細胞認識ソフトウェアは、とりわけ、以下のルーチンを実行する：（a）ディスクを遠心して余分な結合していない細胞をスピン除去し、（b）それぞれの特異的な細胞捕捉ゾーン内の画定領域を画像化し、（c）各捕捉ゾーン内の特定して捕捉された細胞を計数する等のデータ処理を行い、（d）異なる白血球のサブセットについて全血の1立方ミリメートル当たりの白血球数を導出する。

#### 【0032】

本発明の一態様によれば、処理ステップ中に、認識ソフトウェアは各捕捉ゾーンを読み出し、遭遇した細胞をマーキングする。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ（ビーズ検定法）、凝集物質、沈殿（酵素反応）、または他の生物学的レポーターであってもよい。各捕捉ゾーンからのデータを処理した後、ソフトウェアは、容積1マイクロリットルすなわち1立方ミリメートルの血液当たりのリンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、単球、および血小板ゾーンの数を表示する。プロセス全体にかかる時間は、ディスクを光ドライブに挿入してから所望の計数または比を求めて表示するまで約10～15分である。本発明のこの態様の別の実施形態では、捕捉ゾーンから電気的応答を読み出し、ディスクまたはメモリに格納してデータファイルを得る。これは、以下でさらに詳細に説明するように、認識目的で後処理してもよい。

#### 【0033】

ディスクの仕様：以下のサブセクションは、本発明とともに有利に使用可能ないくつかの光バイオディスクの特定の実施形態について概説することを目的とする。

#### 【0034】

（A）トラッキング設計：本発明の好ましい一実施形態では、ディスクは、300nmの金で被覆したフォワードウォブルセット（forward Wobble Set）F DL 21 : 13707またはF DL 21 : 1270である。この反射ディスク上に、サイズ $2 \times 1\text{ mm}$ の長円形データウィンドウをリソグラフィによりエッチングする。U字形チャネルを用いて、高さ25～100マイクロメートルのチャンバーを作成する。入口および出口を含むチャンバー全体を満たすには約 $7\mu\text{l}$ のサンプルを要する。4ウィンドウ/4チャネルのフォーマットを用いるのが好ましいであろう。しかし、透過ディスク上にはデータウィンドウはエッチングされず、ディスク全体が利用可能である。

#### 【0035】

（B）接着剤および接合：FraylockのU字形接着剤DBL 201 Rev C 3M94661または直線状チャネルを用いてチャンバーを作成する。

#### 【0036】

（C）カバーディスク：直径0.040インチのサンプルインレット48個が半径26mmで等間隔に配置された完全反射性の透明ディスクを用いる。

#### 【0037】

データの捕捉および処理：データディスクは、本発明のソフトウェアにより、特定の細胞認識方法を用いて、4倍速、サンプルレート2.67MHzで走査され読み出される。

#### 【0038】

ソフトウェア：本発明は、さらに、処理方法ならびに関連する細胞認識および画像化ソフトウェアを含む。このソフトウェアは、細胞計数および分画細胞計数を実行し表示することを対象とする。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ（ビーズ検定法）、凝集物質、沈殿（酵素反応）、または他の生物学的レポーターであってもよい。本ソフトウェアは、光バイオディスク上や光ディスクドライブリーダデバイス内に格納されてもよく、別法として安全なサーバから光リーダによってのみアクセス可能であってもよい。このサーバは、ローカルエリアネットワーク（LAN）、広域ネットワーク（WAN）のようなコンピューティングネットワークで実施されてもよく、または規定された条項のもとでインターネットを通じて利用可能とされてもよい。このような配布方法は、同一譲受人に譲渡された「Interactive Method and S

10

20

30

40

50

ystem for Analyzing Biological Samples and Processing Related Medical Information Using Specially Prepared Bio-Optical Disc, Optical Disc Drive, and Internet Connections」と題する2000年11月8日出願の米国仮出願第60/246,824号および対応する米国特許出願第09/986,078号に開示されている。

#### 【0039】

本明細書に開示されるさまざまな好ましい実施形態を実施するために使用される資材には、フォワードウォブル金メタライズドフォトレジストディスク、透過性金メタライズドディスク、ピペットおよびチップ、スピンドル、遠心機、スイングローター、クエン酸ナトリウムやエチレンジアミン四酢酸(EDTA)のような抗凝固剤を添加したvacutainer(商標)CPTチューブ、恒温チャンバー、絞り機、接着剤、カバーディスク、透明カバーディスク、テープまたは同等品、真空装置、イエローチップ、および真空チャンバーがある。

#### 【0040】

本発明の一実施形態では、血球を含む実験室サンプルをバイオディスク上に、またはディスクアセンブリに形成された流体チャネル内に被着する。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。バイオディスクは、血球の成分を適所に結合させるための特異抗原を含む流体チャネルおよび/または混合チャンバーを有する特製のCDサイズのディスクである。バイオディスクは、慎重に積層した金属および基板からなるため、被着された検査サンプルと電磁ビームが相互作用することを可能にする特定の光学的性質を有する。バイオディスクを光ドライブに挿入すると、ドライブはディスクを回転させ、いくつかの実施形態では、他の必要な溶液とサンプルを混合してもよい。ドライブ内のバイオディスクに電磁ビームが当たられる。反射ディスクと称する一実施形態では、ビームはバイオディスクの反射面で反射し、光ドライブ内の検出器が反射ビームを収集する。透過ディスクと称する別の実施形態では、ビームの一部がバイオディスクを通過し、光ドライブ内のもう1つのタイプの検出器へと透過する。いずれの場合でも、検出器によって収集されるビームは、バイオディスク上の実験室サンプルに関する情報を含む。次にその情報はアナログ-デジタルプロセッサに送られ、そこで検出器からの電気信号を表すデジタルデータが生成される。このデジタルデータは、リアルタイムで処理され、メモリまたはディスクに格納されてから、全部または一部が生データとして処理されてもよく、または画像フォーマットを含む種々のフォーマットへとエクスポートされてもよい。これらのフォーマットのいずれも、意図する結果を生成するために他のアプリケーションまたは手段によってさらに処理されてよい。このデジタルデータは、自動式、電気式、コンピュータ制御式、および/または機械式の計数および分析に有用である。デジタルデータは、専門家による手計数、認識等の手作業の分析に好適な可視画像を生成するためにも使用可能である。本発明の別の実施形態では、画像を含み得る生データ、デジタルデータ、エクスポートされたデータがアーカイブに格納される。このように、本発明の方法は一般に「調査データ」に適用可能である。「調査データ」としては、本明細書で使用される場合、生の検出器出力データ、生の信号データ、デジタルデータ、エクスポートされたデータ、または画像もしくは画像データを含むエクスポートされたデータがあるが、これらには限定されない。アーカイブは、調査データが登録され、所望であれば、例えば人口統計的、地理的、医学的、歴史的、または個人的データのような他の識別情報と関連づけられる場所を提供する。その後、例えばさまざまな母集団グループの健康動向研究を行うために、調査データのグループを分析することができる。

#### 【0041】

本発明の一実施形態は、血球を計数するという要求に対処する。本発明は、処理方法ならびに関連する細胞認識および画像化ソフトウェアを含む。このソフトウェアは、細胞計数を実行し、対応する結果を表示することを対象とする。本発明の一実施形態では、2値化、バックグラウンド均一化、規格化およびフィルタリング等の種々の画像処理方法を実行して、調査データ内の細胞の外観を増強(enhance)し、細胞計数のプロセスを支援する

10

20

30

40

50

。調査データ内の閉じ込められた泡、クラック、およびぼやけた細胞のような不整部分について細胞計数を補正するために、他の技法が実行される。

【0042】

本発明の実施形態は、光バイオディスク上や光ディスクドライブリーダデバイス内にソフトウェアを格納し、または別法としてソフトウェアは安全なサーバから光リーダによってのみアクセス可能である。このサーバは、ローカルエリアネットワーク（LAN）、広域ネットワーク（WAN）のようなコンピュータネットワークで実施されてもよく、または規定された条項のもとでインターネットを通じて利用可能とされてもよい。このような配布方法は、同一譲受人に譲渡された「Interactive System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Information and the Use Thereof」と題する2001年11月7日出願の米国特許出願第09/986,078号に開示されており、これは参考により本明細書に援用される。10

【0043】

より具体的には、本発明は、細胞等の調査特徴物を計数する方法に関する。この方法は、細胞のサンプルの調査データを取得するステップと、調査データ内で評価矩形を選択するステップと、評価矩形内で調査データを増強するステップと、評価矩形に示される細胞を計数するステップとを含む。この方法の特定の一実施形態では、細胞計数は、輝中心（bright center）、または別法として暗縁（dark rim）を認識することによって実行される。20

【0044】

本発明の別の態様は、評価矩形のカスタムサイズを選択する方法に関する。

【0045】

さらに本発明の別の態様は、複数の評価矩形を選択する方法に関する。

【0046】

本発明のさらなる態様は、調査データに対してバックグラウンド照度均一化を実行するステップと、調査データに対して規格化を実行するステップと、調査データをフィルタリングするステップを通じて評価矩形内の調査データを増強することに関する。

【0047】

本発明のさらなる態様は、調査データに対して近傍矩形のサイズを選択するステップと、調査データ内の点を選ぶステップと、水平走査を実行するステップであって、それによって、点を中心とする近傍矩形内に配置されたすべての隣接点に対する第1スライド平均を計算するステップと、垂直走査を実行するステップであって、それによって、点を中心とする近傍矩形内に配置されたすべての隣接点に対する第2スライド平均を計算する、垂直走査を実行するステップと、第1スライド平均および第2スライド平均を組み合わせるステップであって、それによって、全平均を生成するステップと、全平均と点のもとの値の差を求めて該差をバックグラウンド値に加算することにより計算される結果値に、点のもとの値を再割当てるステップと、調査データ内のすべての点について、水平走査を実行するステップ、垂直走査を実行するステップ、2つの平均を組み合わせるステップおよびもとの値を再割当てるステップを繰り返すステップを通してバックグラウンド照度均一化を実施することに関する。30

【0048】

本発明の別の態様において、調査データに規格化を実行するステップは、調査データ内のすべての点の値の平均および標準偏差を計算するステップと、平均および標準偏差を用いて調査データ内のすべての点の値を規格化するステップと、必要であればいくつかの点の値を切り詰めるステップとをさらに含む。

【0049】

本発明のさらなる別の態様において、調査データをフィルタリングする方法がさらに提供され、該方法は、近傍矩形のサイズを選択するステップと、調査データ内の点を選ぶステップと、点を中心とする近傍矩形内に配置されたすべての十分に異なる点を見つけるステップと、十分に異なる点の数が所定のフィルタリング基準より大きい場合に点の値を再割

10

20

30

40

50

当てるステップと、調査データ内のすべての点について、すべての十分に異なる点を見つけるステップおよび値を再割当てるステップを繰り返すステップとをさらに含む。

【0050】

本発明のさらに別の態様において、処理方法が提供され、該方法は、調査データから不要なコンポーネントを除去するステップを含み、不要なコンポーネントを除去するステップは、しきい値を選択するステップと、しきい値を用いて調査データに対して2値化を実行するステップと、調査データに対して規格化を実行するステップと、連結コンポーネントを抽出するステップと、サイズしきい値を選択するステップと、サイズしきい値を満たさないコンポーネントを除去するステップとをさらに含む。

【0051】

本発明のもう1つの追加的態様は、輝中心によって調査データ内の細胞を計数する方法に関する。この方法は、調査データに対して畳込みを実行するステップと、複数の局所最大値を探索するステップと、複数の局所最大値から冗長な局所最大値を除去するステップと、残りの最大を細胞の中心であると宣言するステップと、細胞の中心を計数するステップとを含む。

【0052】

本発明の別の態様によれば、輝中心によって調査データ内の細胞を計数する方法が提供される。この代替的な方法は、上記調査データに対して反転を実行するステップと、シフトした円環との複数の畳込みを実行するステップと、複数の畳込みからの結果の和をとるステップと、局所最大値を見つけるステップと、最大を細胞の中心であると宣言するステップと、細胞の中心を計数するステップとをさらに含む。

【0053】

さらに、本発明のもう1つの態様は、輝中心により計数された細胞を調査データから除去するステップと、細胞をそれらの暗縁により計数するステップと、輝中心を認識することにより細胞を計数するステップからの合計を暗縁を認識することにより計数するステップからの合計に加算するステップとを含む方法に関する。

【0054】

本発明のさらに別の態様は、調査データ内の暗縁により細胞を計数する方法を含む。本方法は、調査データに対して反転を実行するステップと、シフトした円環との複数の畳込みを実行するステップと、複数の畳込みからの結果の和をとるステップと、最大を細胞の中心であると宣言するステップと、細胞の中心を計数するステップとを含む。

【0055】

本発明の別の態様において、細胞を計数増強する方法は、調査データに対して規格化を実行するステップと、調査データをフィルタリングするステップと、しきい値数を選択するステップと、調査データが上記しきい値数だけ所定バックグラウンド値と異なっているかどうかを判断することにより調査データに対して2値化を実行するステップと、調査データに対して規格化を実行するステップと、調査データ内の1ピクセル幅境界を抽出するステップと、1ピクセル幅境界により画定される領域を塗りつぶすステップと塗りつぶされた領域に畳込みを適用するステップとをさらに含む。

【0056】

本発明のもう1つの態様は、細胞のサンプルのデジタルデータを取得する方法に関する。この方法は、(1)光ディスク表面上に血液サンプルを用意するステップと、(2)光ディスクを光リーダに装填するステップと、(3)光ディスクを回転させるステップと、(4)光ディスク上の捕捉ゾーンの1つに電磁放射の入射ビームを当てるステップとを含む。表面は、1種または数種の捕捉剤を有する1つまたは複数の捕捉ゾーンを備える。この方法は、続いて、(5)捕捉ゾーンでディスクと相互作用した後に形成される電磁放射のビームを検出器で検出するステップと、(6)検出されたビームをアナログ出力信号に変換するステップと、(7)アナログ出力信号を、捕捉ゾーンに捕捉された細胞を含むデジタルデータに変換するステップとを含む。

【0057】

10

20

30

40

50

本発明の別の態様によれば、アナログ出力をデジタルデータに変換する方法が提供される。この変換方法は、一定間隔でアナログ信号の振幅をサンプリングするステップと、サンプリング振幅を一次元配列に記録するステップと、サンプリングするステップおよび記録するステップを用いて複数の一次元配列を作成するステップと、複数の一次元配列を組み合わせるステップであって、それによって、サンプルのデジタルデータを含む2次元配列を作成するステップとを含む。

#### 【0058】

本発明のさらにもう1つの態様は、細胞のサンプルのデジタルデータを取得する方法に関する。この方法は、光ディスク表面（この表面は1種または数種の捕捉剤を有する1つまたは複数の捕捉ゾーンを含む）上に血液サンプルを用意するステップと、光ディスクを光リーダに装填するステップと、光ディスクを回転させるステップと、光ディスク上の捕捉ゾーンの1つに電磁放射の入射ビームを当てるステップと、捕捉ゾーンでディスクと相互作用した後に形成される電磁放射のビームを検出器で検出するステップと、検出されたビームをアナログ出力信号に変換するステップとを含む。本方法のこの特定の実施形態は、アナログ出力信号を、捕捉ゾーンに捕捉された細胞を含むデジタルデータに変換するステップで終わる。捕捉ゾーンに当たられる光が検出器へ反射されるように、光ディスクは反射層を備えて構成され、検出器は下部検出器である。本発明のもう1つの態様では、上部検出器または分割検出器が使用される。

#### 【0059】

本発明のもう1つの態様は、評価矩形を選択する方法に関する。この方法は、（1）調査データ内で複数のウィンドウの1つを見つけるステップと、（2）ウィンドウ内で標準サイズの評価矩形をクロッピングするステップとを含む。この方法の特定の一実施形態では、複数のウィンドウの1つを見つけるステップは、（a）調査データに対して圧縮を実行するステップと、（b）画像に対してしきい値評価を実行するステップと、（c）調査データに対して2値化を実行するステップと、（d）調査データに対して規格化を実行するステップと、（e）調査データから連結コンポーネントを抽出するステップと、（f）連結コンポーネントからウィンドウに対応するコンポーネントを見つけるステップとを含む。

#### 【0060】

本発明のさらにもう1つの態様は、調査データから連結コンポーネントを抽出する方法に関する。この方法は、調査データのすべての黒点のコンポーネントに初期コンポーネント番号を割り当てるステップと、初期走査方向を設定するステップと、調査データを走査して連結黒点のコンポーネント番号が同一になるようにコンポーネント番号を再割当てるステップとを含む。

#### 【0061】

本発明のさらに追加的な態様は、ダークスポットを有する光ディスク実施形態からの調査データ内で評価矩形を選択する方法に関する。この方法は、調査データ内で少なくとも1つのダークスポットを見つけるステップと、ダークスポットから所定距離シフトすることによって求められる点を中心とする標準サイズの評価矩形を作成するステップとを含む。

#### 【0062】

本発明の表示態様によれば、調査データの画像の表示を増強する方法が提供される。この方法は、調査データに対して高速フーリエ変換を実行するステップと、周波数領域でデータのスペクトルの一部を除去するステップと、逆変換を実行して調査データの修正バージョンを回復するステップとを含む。

#### 【0063】

本発明の表示態様によれば、調査データの画像の表示を増強する別の方法が提供される。本方法は、画像が歪んでいるかどうかを判断するステップと、歪みの方向を求めるステップと、画像の歪みを補正するステップとを含む。

#### 【0064】

本発明のもう1つの態様は、以前に格納された調査データをアーカイブから取り出し、調

10

20

30

40

50

査データに対して分析を実行する方法に関する。このようなアーカイブは、検査サンプルを提供した患者の特徴に従って、格納される調査データを登録することができる。本発明の一態様では、患者の特徴から選択された複数の基準に適合するサンプルが、母集団健健康動向研究を行うために選択される。

#### 【0065】

本発明のもう1つの態様は、白血球計数においてさまざまなコンポーネントを計数し、 $C D 4^+$ 細胞および $C D 8^+$ 細胞の計数、ならびに $C D 4$ 細胞数の $C D 8$ 細胞数に対する比を表示することに関する。

#### 【0066】

本発明のさらなる目的、態様、および方法は、それらに寄与する追加的特徴およびそれから生じる利点とともに、添付図面に示される本発明の好ましい実施形態の以下の説明から明らかとなるであろう。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0067】

##### [発明の詳細な説明]

本発明は、実験室サンプル中の細胞物質の画像化および計数のための方法および装置を対象とする。これらの方針および方法は、光ディスクの上または内部にある、対象とするいかなるタイプの調査特徴物を画像化し計数することに適用されてもよい。本発明の実施形態は、サンプル中の調査特徴物すなわち細胞の調査データを作成し、その調査データに対してコンピュータ分析を実行する。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。

#### 【0068】

以下の説明では、本発明の実施形態をさらに詳細に説明するために、数多くの具体的な詳細が記載される。しかし、当業者には明らかなはずであるが、本発明はこれらの具体的な詳細なしに実施され得る。他の場合には、本発明を不明瞭にしないために、既知の特徴については詳述しない。

#### 【0069】

本明細書では、光ディスクデータを用いた白血球計数のためのいくつかの実施形態がさらに詳細に説明される。これらの実施形態は、白血球のみを画像化し計数することに限定されず、いかなるタイプの細胞物質の計数を行うことにも容易に適用され得る。これには、以下のものには限定されないが、赤血球、白血球、ビーズ、および光リーダによって検出可能な類似の光シグネチャ(signature)を生成する、生物学的か非生物学的かを問わずいかなる他の物体も含まれ得る。他の検定法では、対象となる調査特徴物は、細胞である代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。白血球以外の物質に対して本発明を使用するのに必要ないいくつかの変更については、以下で細胞計数の議論においてさらに詳細に説明する。

#### 【0070】

以下の議論では、本発明のデータ収集およびデータ分析の態様を説明するために、2つの主要なセクションが提示される。第1セクションは、実験室サンプルから調査データを収集し、当該調査データを配列型のストレージに変換するために用いられる装置、方法、およびアルゴリズムの詳細な説明を提示する。第2セクションは、調査データの分析に関する方法およびアルゴリズムの詳細な説明を提示する。その2つのセクションに続いて、白血球計数検定法を実行する方法に関するセクションが与えられる。

#### 【0071】

##### I . データ収集

本発明の実施形態は、実験室サンプル中の細胞物質からの調査データの取得を含む。図1は本発明による光バイオディスク110の斜視図である。この光バイオディスク110は、光ディスクドライブ112およびディスプレイモニタ114とともに示されている。検

10

20

30

40

50

査サンプルがバイオディスク 110 上の指定領域に被着される。バイオディスクが光ディスクドライブ 112 に挿入されると、ディスクドライブは、検査サンプルとの相互作用により修正または変調された電磁放射ビームを用いることによりサンプルから情報を収集することを受け持つ。情報が分析され処理された後、コンピュータモニタ 114 がその結果を表示する。

#### 【0072】

本発明で使用可能な光バイオディスク 110 の 2 つの主要な実施形態がある。図 2、図 3 および図 4 は光バイオディスク 110 の反射実施形態を示す一方、図 5、図 6 および図 7 は光バイオディスク 110 の透過実施形態を示している。

#### 【0073】

##### A. 反射実施形態

図 2 は、光バイオディスク 110 の一実施形態の構造要素の分解斜視図である。図 2 は、本発明において使用可能な反射ゾーン光バイオディスク 110 (以下「反射ディスク」) の一例である。構造要素は、キャップ部分 116、接着すなわちチャネル部材 118、および基板 120 を含む。キャップ部分 116 は、1 つまたは複数の入口 122 および 1 つまたは複数の通気口 124 を含む。キャップ部分 116 は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図 2 の斜視図で見た場合の下部が反射面 146 (図 4 にさらに分かりやすく示されている) で被覆される。好ましい実施形態では、トリガマーキング 126 が反射層 142 (図 4) の表面上に含まれる。トリガマーキング 126 は、情報が符号化された、バイオディスクの 3 層すべてで透明なウインドウ、不透明領域、または反射もしくは半反射領域を含んでもよい。符号化情報は、データをプロセッサ 166 (図 10A に示す) に送るために使用され、プロセッサ 166 は図 8 および図 10A に示す問合せすなわち入射ビーム 152 の作用機能と相互作用する。図 2 に示す第 2 の要素は、流体回路 128 すなわち U 字形チャネルが形成された接着すなわちチャネル部材 118 である。流体回路 128 は、好ましくは、メンブレンを打ち抜きまたは切削してプラスチックフィルムを除去し、図示のような形状を形成することによって形成される。流体回路 128 のそれぞれは、フローチャネル 130 および戻りチャネル 132 を含む。図 2 に示す流体回路 128 のいくつかは、混合チャンバー 134 を含む。2 つの異なるタイプの混合チャンバー 134 が例示されている。第 1 のものは、対称混合チャンバー 136 であり、フローチャネル 130 に関して対称的に形成される。第 2 のものはオフセット混合チャンバー 138 である。オフセット混合チャンバー 138 は、図示のようにフローチャネル 130 の片側に形成される。図 2 に示す第 3 の要素は、ターゲットすなわち捕捉ゾーン 140 を含む基板 120 である。基板 120 は、好ましくはポリカーボネートからなり、その上部に反射層 142 が被着される (図 4)。ターゲットゾーン 140 は、反射層 142 を図示の形状に、または別法として、除去することによって所望の形状に形成される。別法として、ターゲットゾーン 140 は、反射層 142 を付ける前にターゲットゾーン 140 領域をマスキングすることを含むマスキング技法によって形成されてもよい。反射層 142 は、アルミニウムまたは金のような金属から形成されてもよい。

#### 【0074】

図 3 は、図 2 に示す光バイオディスク 110 の上面図である。ディスク内に位置する流体回路 128、ターゲットすなわち捕捉ゾーン 140 およびトリガマーキング 126 が見えるように、キャップ部分 116 の上の反射層 142 が透明に示されている。各捕捉ゾーンは、サンプル中の異なるコンポーネント (または異なる細胞) を結合するための 1 種または数種の特異抗原を有するので、検定法処理後、チャンバー内の各捕捉ゾーンはあるタイプの細胞または細胞コンポーネントを含む。結合すなわち捕捉は、血球の特定コンポーネントに「結合」(lock)することによりその特異的な細胞を捕捉する化学構造を有する 1 種または数種の抗原を有することによって達成される。細胞コンポーネントの分離は、血球、例えば白血球の分画計数を実行するために極めて重要である。他の検定法では、調査特徴物は、細胞である代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ (ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿 (酵素反応)、または他の生物学的レポーターで

10

20

30

40

50

あってもよい。ターゲットすなわち捕捉ゾーン 140 は、電磁問合せビームが検査サンプルと相互作用する場所を画定する。

#### 【0075】

図4は、本発明の一実施形態による反射ゾーン型光バイオディスク110の拡大斜視図である。この図は、それぞれの層、基板、コーティング、またはメンブレンの部分断面図を示すように切り取られた、その種々の層の一部を含む。図4は、反射層142で被覆された基板120を示している。活性層144が反射層142を覆う。好ましい実施形態では、活性層144はポリスチレンから形成されてもよい。別法として、ポリカーボネート、金、活性ガラス、改質ガラス、または改質ポリスチレン、例えばポリスチレン・無水マレイン酸共重合体を使用してもよい。さらに、ヒドロゲルを使用可能である。この特定の実施形態に示されているように、プラスチック接着部材118が活性層144を覆う。プラスチック接着部材118の露出部分は、流体回路128を作り出す切削または打ち抜きされたU字形状を示している。本バイオディスクのこの反射ゾーン実施形態における最後の構造層はキャップ部分116である。キャップ部分116は、その下部に反射面146を含む。反射面146は、アルミニウムまたは金のような金属からなってもよい。

10

#### 【0076】

##### B. 透過実施形態

図5は、本発明による透過型の光バイオディスク110の構造要素の分解斜視図である。透過型の光バイオディスク110の構造要素は、同様に、キャップ部分116、接着すなわちチャネル部材118、および基板120層を含む。キャップ部分116は、1つまたは複数の入口122および1つまたは複数の通気口124を含む。キャップ部分116は、ポリカーボネート層から形成されてもよい。図7および図8に最も分かりやすく示されているように、任意のトリガマーキング126が、薄い半反射層143の表面に含まれてもよい。トリガマーキング126は、情報が符号化された、バイオディスクの3層すべてで透明なウインドウ、不透明領域、または反射もしくは半反射領域を含んでもよい。符号化情報は、データをプロセッサ166(図10Aに示す)に送るために使用され、プロセッサ166は図8および図10Aに示す問合せすなわち入射ビーム152の作用機能と相互作用する。

20

#### 【0077】

図5に示す第2の要素は、流体回路128すなわちU字形チャネルが形成された接着すなわちチャネル部材118である。流体回路128は、メンブレンを打ち抜きまたは切削してプラスチックフィルムを除去し、図示のような形状を形成することによって形成される。流体回路128のそれぞれは、フローチャネル130および戻りチャネル132を含む。図5に示す流体回路128のいくつかは、混合チャンバー134を含む。2つの異なるタイプの混合チャンバー134が例示されている。第1のものは、対称混合チャンバー136であり、フローチャネル130に関して対称的に形成される。第2のものはオフセット混合チャンバー138である。オフセット混合チャンバー138は、図示のようにフローチャネル130の片側に形成される。

30

#### 【0078】

図5に示す第3の要素は基板120であり、これはターゲットすなわち捕捉ゾーン140を含んでもよい。基板120は、好ましくはポリカーボネートからなり、その上部に薄い半反射層143が被着される(図8)。図5および図8に示すディスク110の基板120に関連する半反射層143は、図2、図3および図4に示す反射ディスク110の基板120上の反射層142よりも大幅に薄い。半反射層143がより薄いため、図11に示すように、問合せビーム152の一部が透過ディスクの構造層を透過することができる。薄い半反射層143は、アルミニウムまたは金のような金属から形成されてもよい。

40

#### 【0079】

図6は、図4の透過型光バイオディスク110の上面図である。キャップ部分116が透明なので、ディスク内に位置する流体回路、トリガマーキング126およびターゲットすなわち捕捉ゾーン140が見えている。ターゲットすなわち捕捉ゾーン140は、電磁ビ

50

ームが検査サンプルと相互作用する場所である。ディスクの回転後、サンプル中の細胞の特定コンポーネントが、チャンバー内にあらかじめ装填された種々の捕捉剤または抗原によって、異なる捕捉ゾーンに捕捉される。

#### 【0080】

図7は、本発明の透過ディスク実施形態による光バイオディスク110の拡大斜視図である。ディスク110は、その種々の層の一部が、それぞれの層、基板、コーティング、またはメンブレンの部分断面図を示すように切り取られて示されている。図7は、透明なキャップ部分116、基板120上の薄い半反射層143、およびトリガーマーキング126を有する透過ディスクフォーマットを示している。トリガーマーキング126は、キャップの上部に配置される不透明材料を含む。別法として、トリガーマーキング126は、ディスクの薄い反射層143上にエッチングされた透明な非反射性ウインドウによって、またはトリガ検出器160(図10A)から来る信号を吸収し、もしくは反射しないいかなるマークによって形成されてもよい。また、図7は、図示の形状、または別法として所望の形状の指定領域をマーキングすることによって形成されるターゲットゾーン140も示している。ターゲットゾーン140を指示するためのマーキングは、基板120上の薄い半反射層143上に、または基板120の下部(ディスクの下)に形成されてもよい。別法として、ターゲットゾーン140は、ターゲットゾーン140を除く薄い半反射層143全体をマスキングすることを含むマスキング技法によって形成されてもよい。この実施形態では、ターゲットゾーン140は、薄い半反射層143上にインクをシルクスクリーン加工することによって作成してもよい。活性層144が薄い半反射層143を覆う。好ましい実施形態では、活性層144は厚さ40~200μmの2%ポリスチレン層である。別法として、ポリカーボネート、金、活性ガラス、改質ガラス、または改質ポリスチレン、例えばポリスチレン-無水マレイン酸共重合体を使用してもよい。さらに、ヒドロゲルを使用可能である。この実施形態に示されているように、プラスチック接着部材118が活性層144を覆う。プラスチック接着部材118の露出部分は、流体回路128を作り出す切削または打ち抜きされたU字形状を示している。本バイオディスク110のこの透過実施形態における最後の構造層は、入口122および通気口124を含む透明な非反射性のキャップ部分116である。

#### 【0081】

#### C. ディスク実施形態の光学的性質

2つのディスク実施形態の主な相違点の1つは、光ディスクの上部層のコーティングの厚さである。透過ディスクの場合、薄い半反射層143が基板層120の上に被着される。反射ディスクの場合、実質的により厚い反射層が基板層120の上に被着される。図8に示す好ましい実施形態では、透過ディスクの薄い半反射層143は厚さ約100~300

であり、400を超えない。この理由は、金被膜層は800以上の厚さでは完全反射性であり、光はおよそ400以下の厚さの金被膜を透過することができるからである。下記の表2に、被膜の厚さに関して、金被膜の反射および透過特性を示す。

#### 【0082】

#### 【表2】

10

20

30

## Au被膜の反射性および透過性（絶対値）

厚さ (オングストローム)	厚さ (nm)	反射率	透過率
0	0	0. 0505	0. 9495
50	5	0. 1683	0. 7709
100	10	0. 3981	0. 5169
150	15	0. 5873	0. 3264
200	20	0. 7142	0. 2057
250	25	0. 7959	0. 1314
300	30	0. 8488	0. 0851
350	35	0. 8836	0. 0557
400	40	0. 9067	0. 0368
450	45	0. 9222	0. 0244
500	50	0. 9328	0. 0163
550	55	0. 9399	0. 0109
600	60	0. 9488	0. 0073
650	65	0. 9482	0. 0049
700	70	0. 9505	0. 0033
750	75	0. 9520	0. 0022
800	80	0. 9531	0. 0015

10

20

30

40

## 【0083】

金被膜の光の透過に対するしきい値密度は約400である。表2に加えて、図9は、金の厚さに基づく薄い半反射層143の反射性と透過性の逆比例関係のグラフィカル表示を提供している。図9のグラフで用いられている反射性および透過性の値は絶対値である。図8に示すように、より薄い半反射層143のために、入射すなわち問合せビーム152の一部が侵入し通り抜けることができる。こうして、入射すなわち問合せビーム152は、図10Aに示すような上部検出器158によって検出され得る。同時に、光の一部は入射路に沿って反射すなわち逆戻りする。

## 【0084】

反射光バイオディスクの場合、戻りビーム154が、生物学的サンプルに関する情報を伝達する。上記のように、生物学的サンプルに関するこのような情報は、入射ビームがフローチャネル130またはターゲット（すなわち捕捉）ゾーン140内にあるためにサンプルと接触する時に実質的に限って、戻りビームに含まれる。戻りビーム154は、反射層142の中または上に符号化された、さもなければ図13および図14に示すウォブル溝170に符号化された情報を伝達してもよい。当業者には明らかのように、対応する入射ビームが反射層142と接触する時にのみ、あらかじめ記録された情報が、ターゲットすなわち捕捉ゾーンを有する反射ディスクの戻りビーム154に含まれる。情報を含む反射層142が除去されたか、さもなければ存在しない領域に入射ビーム152がある時には、このような情報は戻りビーム154に含まれない。

## 【0085】

本発明の方法は、同一の譲受人に譲渡された「Optical Discs Including Equi-Radial and/or Spiral Analysis Zones and Related Disc Drive Systems and Methods」と題する2002年1月29日出願の米国仮出願第60/353,014号（これは参照により本明細書に援用される）に開示されているような等半径(equi-radial)チャネルを含むバイオディスクにも容易に適用され得る。

## 【0086】

## D. システム装置

図10Aは、斜視ブロック図によりシステム装置の動作を説明する表示である。これは、

50

光アセンブリ 148、入射すなわち問合せビーム 152 を生成する光源 150、戻りビーム 154、および透過ビーム 156 を含む。反射バイオディスク実施形態の場合、戻りビーム 154 は、光バイオディスク 110 のキャップ部分 116 の反射面 146 で反射される。本光バイオディスク 110 のこの反射実施形態では、戻りビーム 154 が下部検出器 157 によって検出され、信号作用物質が存在するかどうかが分析される。透過バイオディスク実施形態では、透過ビーム 156 が上部検出器 158 によって検出され、同じく信号作用物質が存在するかどうかが分析される。透過実施形態では、上部検出器 158 として光検出器を用いてもよい。

#### 【0087】

図 10A は、ディスク上のトリガマーキング 126 およびトリガ検出器 160 を含むハードウェアトリガ機構も示している。ハードウェアトリガ機構は、反射バイオディスクおよび透過バイオディスクの両方で使用される。トリガ機構により、プロセッサ 166 は、問合せビーム 152 がそれぞれのターゲットすなわち捕捉ゾーン 140 上にある時にのみデータを収集することができる。さらに、透過バイオディスクシステムでは、ソフトウェアトリガを使用してもよい。ソフトウェアトリガは、下部検出器を用いて、問合せビーム 152 がそれぞれのターゲットすなわち捕捉ゾーン 140 の端に当たったらすぐにデータを収集するようにプロセッサ 166 に通知する。図 10A は、光バイオディスク 110 の回転を制御するドライブモーター 162 およびコントローラ 164 も示している。図 10A はさらに、透過光バイオディスクに関連する戻りビーム 154 および透過ビーム 156 を処理するために別法として実施されるプロセッサ 166 および分析器 168 も示している。透過光バイオディスクの場合、透過ビーム 156 が生物学的サンプルに関する情報を伝達する。この実施形態では、あらかじめ記録された情報がディスク上にある。検出器 158 がビームを収集する。

#### 【0088】

本発明の別の実施形態では、分割上部検出器を用いて透過ビーム 156 を収集する。図 10B に、本発明の一実施形態による分割検出器を示す。検出器 170 は、2 個の検出器コンポーネント 172 および 174 を有する。2 個の検出器コンポーネントは、物体 186（例えば細胞）で屈折した透過ビーム 156 を集め、2 つの信号 A および B を生成する。物体 186 は、例えば赤血球や白血球等の生物細胞のような調査特徴物であり得る。一方の信号を他方から減算する（すなわち A - B または B - A）ことによって差分信号を得ることができる。検出器コンポーネントが、入射ビーム 152 を散乱する物体を有する領域の上方にある時、それらは信号の変化を検出する。各検出器には、他方の検出器とは逆の変化が見える。すなわち、光が一方の検出器のほうへ曲がると、その検出器には信号が増大して見える一方、他方の検出器には信号が減少して見える。この性質のため、2 つの検出器のそれぞれによって生成される信号の差である信号を生成することによって、信号対雑音比を大幅に増大させることができる。この差信号は 2 つの利点を有する。第 1 に、両方の検出器に等しく生じるシステム内の雑音（光学的または電気的）が、差信号では消去される。第 2 に、光を単に吸収するのではなく屈折するディスク上の対象物体により、差信号において大きく、容易に検出される変化が生じる。これは、対象物体によって生成された信号をバックグラウンド雑音から分離しなければならない分析作業の助けとなる。

#### 【0089】

分割検出器についてのさらに詳細な議論は、同一出願人の「Segmented Area Detector for BioDrive and Methods Relating Thereto」と題する 2002 年 2 月 14 日出願の米国仮特許出願第 60 / 355,090 号、ならびに同一名称のそれぞれ 2001 年 10 月 10 日、2002 年 1 月 28 日、2002 年 1 月 30 日、および 2002 年 2 月 7 日出願の関連する仮出願第 60 / 335,123 号、第 60 / 352,649 号、第 60 / 353,739 号、および第 60 / 355,090 号に提示されており、これらはすべて参照により本明細書に援用される。本発明とともに使用可能な異なるタイプの検出器についてのさらに詳細な議論は、同一出願人の「Optical Disc Analysis System Including Related Methods for Biological and Medical Imaging」と題する 2002 年 1 月 10 日出願の

10

20

30

40

50

米国特許出願第10/043,688号に提示されており、これも参考により本明細書に援用される。

【0090】

図11～図16は、ディスクの光学的性質および検出器がディスクからの情報伝達ビームを収集するためにどのようにして使用されるかを説明するための、反射および透過の両方の実施形態の断面図を示している。

【0091】

ここで特に図11を参照すると、本発明による光バイオディスク110の反射ディスク実施形態の部分断面図が示されている。図11は、基板120および反射層142を示している。上記のように、反射層142は、アルミニウム、金または他の好適な反射材料のような材料から形成することができる。この実施形態では、基板120の上面は滑らかである。図11は、反射層142を覆う活性層144も示している。図11に示されているように、ターゲットゾーン140が、所望の位置で反射層142の一領域すなわち一部を除去することによって、または別法として、反射層142を施す前に所望の領域をマスキングすることによって、形成される。さらに図11に示すように、プラスチックチャネル部材118が活性層144を覆う。図11は、キャップ部分116およびそれに関連する反射面146も示している。このように、キャップ部分116が、所望の切り抜き形状を含むプラスチックチャネル部材118に施されると、それによってフローチャネル130が形成される。図11に示す矢印によって指示されているように、入射ビーム152の経路は最初はディスク110の下から基板120へ向かっている。次いで入射ビームは反射層142に近い点に集束する。この集束は、ターゲットゾーン140における反射層142の一部が存在しない場所で起こるので、入射は活性層144を通りフローチャネル130に入る経路に沿って続く。続いて入射ビーム152はフローチャネルを通って上方へ進み、最終的に反射面146に入射する。この点で、入射ビーム152は、入射経路に沿って逆戻りすなわち反射することにより、戻りビーム154を形成する。

【0092】

図12は、本発明によるバイオディスク110の透過実施形態の部分断面図である。図12は、基板120上に透明なキャップ部分116および薄い半反射層143のある透過ディスクフォーマットを示している。図12は、薄い半反射層143を覆う活性層144も示している。好ましい実施形態では、透過ディスクは、厚さ約100～300オングストロームのアルミニウムまたは金のような金属からなる薄い半反射層143を有し、好ましくは400オングストロームを超えない。この薄い半反射層143により、光源150(図10A)からの入射すなわち問合せビーム152の一部がディスクに侵入しそれを上方へ通り抜けて上部検出器158により検出される一方、光の一部は入射ビームと同じであるが逆方向の経路に沿って反射される。この配置では、戻りすなわち反射ビーム154は半反射層143で反射される。このように、戻りビーム154はフローチャネル130に入らない。反射光すなわち戻りビーム154は、図13および図14に関連してさらに詳細に説明するように、半反射層143の中または上に形成されたあらかじめ記録された情報トラック上で入射ビーム152をトラッキングするために使用可能である。図12に示すディスク実施形態では、画定したターゲットゾーン140があってもなくてもよい。ターゲットゾーン140が、基板120上の薄い半反射層143上に形成された直接マーキングにより作成されてもよい。これらのマーキングは、シルクスクリーン加工またはいかなる同等の方法を用いてなされてもよい。ターゲットゾーンを画定するためにいかなる物理的印も使用しない代替実施形態では、フローチャネル130は事実上、調査特徴物の検査が行われる限定されたターゲット領域として利用される。

【0093】

図13は、本発明によるバイオディスク110の反射ディスク実施形態のトラックを横切る断面図である。この図は、ディスクの半径およびフローチャネルに沿って縦断した図である。図13は、基板120および反射層142を含む。この実施形態では、基板120は一連の溝170を含む。溝170は、ディスクの中心付近から外縁に向かって延びるら

10

20

30

40

50

せんの形態である。溝 170 は、問合せビーム 152 がディスク上でらせん溝 170 に沿ってトラッキングすることができるよう実施される。このタイプの溝 170 は「ウォブル溝」として知られている。波状すなわち波形の側壁を有する下部が溝 170 を形成する一方、隆起したすなわち高い部分が、らせんの隣接する溝 170 を分離する。この実施形態で溝 170 を覆う反射層 142 は、図示のように、本質的にコンフォーマルである。図 13 は、反射層 142 を覆う活性層 144 も示している。図 13 に示されているように、ターゲットゾーン 140 が、所望の位置で反射層 142 の一領域すなわち一部を除去することによって、または別法として、反射層 142 を施す前に所望の領域をマスキングすることによって、形成される。さらに図 13 に示すように、プラスチック接着すなわちチャネル部材 118 が活性層 144 を覆う。図 13 は、キャップ部分 116 およびそれに関連する反射面 146 も示している。このように、キャップ部分 116 が、所望の切り抜き形状を含むプラスチック接着部材 118 に施されると、それによってフローチャネル 130 が形成される。

#### 【0094】

図 14 は、図 12 に記載した本発明によるバイオディスク 110 の透過ディスク実施形態のトラックを横切る断面図である。この図は、ディスクの半径およびフローチャネルに沿って縦断した図である。図 14 は、基板 120 および薄い半反射層 143 を示している。この薄い半反射層 143 により、光源 150 からの入射すなわち問合せビーム 152 がディスクに侵入しそれを通り抜けて上部検出器 158 により検出される一方、光の一部は戻りビーム 154 の形式で反射される。薄い半反射層 143 の厚さは、ディスククリーダがそのトラッキング能力を維持するのに必要な反射光の最小量によって決定される。この実施形態における基板 120 は、図 13 で説明したものと同様に、一連の溝 170 を含む。この実施形態における溝 170 もまた、好ましくは、ディスクの中心付近から外縁に向かって延びるらせんの形態である。溝 170 は、問合せビーム 152 がらせんに沿ってトラッキングすることができるよう実施される。図 14 は、薄い半反射層 143 を覆う活性層 144 も示している。さらに図 14 に示すように、プラスチック接着すなわちチャネル部材 118 が活性層 144 を覆う。図 14 は、反射面 146 なしのキャップ部分 116 も示している。このように、キャップが、所望の切り抜き形状を含むプラスチックチャネル部材 118 に施されると、それによってフローチャネル 130 が形成され、入射ビーム 152 の一部が実質的に反射されずにそれを通ることができる。

#### 【0095】

図 15 は、反射ディスクの全厚およびその初期屈折特性を示す、図 11 に類似の図である。図 16 は、透過ディスクの全厚およびその初期屈折特性を示す、図 12 に類似の図である。図 15 および図 16 では、断面が溝 170 に沿って切ってあるため、溝 170 は見えない。図 15 および図 16 は、これらの実施形態で溝 170 に垂直に位置する狭いフローチャネル 130 の存在を示している。図 13、図 14、図 15、および図 16 は、それぞれの反射および透過ディスクの全厚を示している。これらの図で、入射ビーム 152 は最初に基板 120 と相互作用するように示されている。基板 120 は、図示のように入射ビームの経路を変える屈折特性を有し、反射層 142 または薄い半反射層 143 上でビーム 152 を集束させる。

#### 【0096】

##### E . アナログ - デジタル変換処理

反射ディスクの戻りビーム 154 または透過ディスクの透過ビーム 156 のいずれから得られるかを問わず、生体検査サンプルに関する情報は信号処理のためにプロセッサ 166 (図 10A 参照) に送られる。この処理は、下部検出器 157 (反射ディスク) または上部検出器 158 (透過ディスク) によって検出されたアナログ信号から離散デジタル形式への変換を含む。

#### 【0097】

図 17 は、図 10B に示した装置に関連する情報取り出しプロセスの概要フローチャートである。ステップ 270 で、実施形態が透過バイオディスクである場合、生物学的サンプ

10

20

30

40

50

ルに関する情報を伝達する透過ビームが検出器 158 によって検出される。ステップ 272 で、実施形態が反射バイオディスクである場合、反射ビーム 154 が検出器 157 によって検出される。いずれの場合でも、ステップ 274 で、情報はアナログ - デジタル変換に送られる。ステップ 276 で、結果として得られるデジタルデータは配列である。

#### 【0098】

図 18 に、プロセッサ 166 によって実行されるアナログ - デジタル変換を示す。変換は、一定時間間隔 212 でアナログ信号 210 をサンプリングすること、および、信号の対応する瞬間アナログ振幅 214 を離散 2 進整数 216 として符号化することを含む。サンプリングはある開始時刻 218 に開始され、ある終了時刻 220 に終了する。いかなるアナログ - デジタル変換プロセスにも関連する 2 つの一般的な値は、サンプリング周波数およびビット深度である。サンプリング周波数は、サンプリングレートとも呼ばれるが、単位時間当たりに取られるサンプルの数である。サンプリング周波数が高いほど、連続するサンプル間の時間間隔 212 は短くなり、その結果、もとのアナログ信号 210 と比べてデジタル信号 222 の忠実度が高くなる。ビット深度は、アナログ信号 210 のサンプリングされた振幅 214 を符号化するために各サンプル点で使用されるビット数である。ビット深度が大きいほど、2 進整数 216 によるもとのアナログ振幅 214 の近似が良くなる。本発明の一実施形態では、サンプリングレートは 8 MHz、ビット深度はサンプル当たり 12 ビットであり、 $0 \sim 4,095$  ( $0 \sim 2^n - 1$ 、ここで  $n$  はビット深度) の整数サンプル範囲が可能となる。

#### 【0099】

ビット深度およびサンプリング周波数の組合せは、他の実施形態では必要な特定の精度に対応するようにカスタマイズすることができる。例として、限定ではないが、一般に細胞より小さいビーズを計数する方法に関わる実施形態では、サンプリング周波数を高くするのが望ましいかもしれない。アナログ - デジタル変換中に、レーザー経路に沿ったそれぞれの連続するサンプル点 224 が連続的にディスク上に、またはメモリ内に一次元配列 226 として格納される。それぞれの連続するトラックが、独立の一次元配列を与える。すべての一次元配列が組み合わされて、一般的な画像表現に類似する 2 次元配列 228 (図 21B に示す) を形成する。

#### 【0100】

ここで、バイオディスクからのデータ収集に関する詳細をさらに説明するために、データ収集例を提供する。図 19 は、本発明の光バイオディスク 110 の斜視図を示している。図 19 は、光バイオディスクのトラック 232 を基準として配置されている捕捉された白血球 230 を示すために、指示部分の拡大詳細斜視図を含む。図示のように、入射ビーム 152 と白血球 230 との相互作用により、反射ディスクの戻りビーム 154 または透過ディスクの透過ビーム 156 のいずれかの形式で信号含有ビームが得られ、これが下部検出器 157 または上部検出器 158 のいずれかによって検出される。

#### 【0101】

図 20A、図 20B および図 21A ~ 図 21D は、細胞がどのようにしてデジタルデータへと捕捉されるかを示している。他の検定法では、対象となる調査特徴物は、細胞の代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ (ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿 (酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。図 20A は、光バイオディスク 110 のトラック 232 を基準として位置決めされている白血球 230 のグラフィカル表示である。細胞 230 は、図 19 に示したディスクに類似のディスク上に配置される。図 20B は、本発明による図 20A の白血球 230 から導出される一連のシグネチャトレースである。図 20B は、A、B、C および D とラベル付けされた対応するトレースを示している。次に、アナログシグネチャトレース (信号) 210 は、対応するデジタル信号 222 に変換 (図 21A ~ 図 21D に示す) するためにプロセッサ 166 に送られる。図 20B はさらに、白血球 230 全体の走査が、検出され処理されことが可能な入射ビームの運動 231 を生じることも明らかにしている。

#### 【0102】

10

20

30

40

50

図21は、図21A、図21B、図21C、および図21Dの間の配置関係を示すグラフィカル表示であり、これらの図が全体として、図20Bの4個のトレースA、B、CおよびDがどのようにして単一の2次元デジタルデータ配列228に変換されるかを示している。

#### 【0103】

ここで具体的に図21Aを参照すると、図20Aに示した光バイオディスクのトラックAおよびBからサンプリングされたアナログ信号210が示されている。プロセッサ166は、アナログ信号210の対応する瞬間アナログ振幅214を離散2進整数216(図12)として符号化する。結果として得られる一連のデータ点は、サンプリングされたアナログ信号210に類似するデジタル信号222である。

10

#### 【0104】

次に図21Bに進むと、トラックAおよびBからのデジタル信号222(図21A)が、独立の一次元メモリ配列226として格納される。それぞれの連続するトラックが対応する一次元配列を与え、前の一次元配列と組み合わされると、デジタルデータの2次元配列228を生じる。次にデジタルデータは、サンプル領域内の特定の点における戻りビーム154または透過ビーム156(図19)の相対強度を表すサンプル点224(図18)の2次元配列228として、メモリ内またはディスク上に格納される。そして2次元配列は、生ファイル、データファイル、または画像ファイル240の形式でメモリ内またはディスク上に格納される。その後、ファイル240に格納されたデータは、メモリ242から取り出され、分析器168(図10A)へのデータ入力244として使用される。

20

#### 【0105】

図21Cは、図20Aに示した光バイオディスクのトラックCおよびDからサンプリングされたアナログ信号210を示している。プロセッサ166は、アナログ信号210の対応する瞬間アナログ振幅214を離散2進整数216(図18)として符号化する。結果として得られる一連のデータ点は、サンプリングされたアナログ信号210に類似するデジタル信号222である。

#### 【0106】

次に図21Dを参照すると、トラックCおよびDからのデジタル信号222(図21C)が、独立の一次元メモリ配列226として格納される。それぞれの連続するトラックが対応する一次元配列を与え、前の一次元配列と組み合わされると、画像に類似する2次元配列228(図21B)を生じる。次に、上記と同様、デジタルデータは、サンプル領域内の特定の点における戻りビーム154または透過ビーム156(図19)の相対強度を表すサンプル点224(図18)の2次元配列228として、メモリ内またはディスク上に格納される。そして2次元配列は、生ファイル、データファイル、または画像ファイル240の形式でメモリ内またはディスク上に格納される。その後、ファイル240に格納されたデータは、メモリ242から取り出され、分析器168(図10A)へのデータ入力244として使用される。

30

#### 【0107】

光バイオディスクからデータを捕捉し、このデータを整数の2次元配列に変換するさらなる方法およびアルゴリズムは、一般的適用可能性を有し、同一譲受人に譲渡された「Variable Sampling Control for Rendering Pixelation of Analysis Results in Optical Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto」と題する2001年5月16日出願の米国仮出願第60/291,233号(これは参考により本明細書に援用される)に開示されている。

40

#### 【0108】

本発明の別の実施形態は、調査データをアーカイブに格納する。アーカイブは、調査データを登録することができる場所を提供する。その後、さまざまな母集団グループの健康動向研究を行うために、データのグループを分析することができる。例えば、調査データと患者情報との相関をとり、患者の属性によって分類され得る調査データのカタログを作成することができる。例えば年齢、性別、人種、および血液型のような情報を用いて調査デ

50

ータを分類することができる。アーカイブは、検索可能な関係データベースの機能を利用することができる。このようなアーカイブが構築された後、あるカテゴリの調査データについて分析を行うことができる。例えば、ある都市の患者から提供されたサンプルから抽出された調査データを検索し、これらの調査データを分析することによって、母集団健康動向研究を行うことができる。利益として、母集団の人々自身の参加がなくても研究を実行することができる。長期にわたり歴史的アーカイブを構築することが可能であり、長期間にわたり特定の母集団について研究を行い、長期動向を分析することができる。

### 【0109】

#### I I . データ分析

以下のセクションは、本発明のデータ分析態様に関する。これらは、具体的には図22～図71Dに関連して議論され、一般的には前の図1～図21を参照する。 10

### 【0110】

#### A . データの収集および処理

一実施形態では、デジタルデータの配列の形式で格納されているバイオディスクからの調査データが、細胞計数のために分析される。別の実施形態では、他の形式の調査データが分析のために使用される。他の検定法では、調査データは、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ（ビーズ検定法）、凝集物質、沈殿（酵素反応）、または他の生物学的レポーターを計数するための情報を含んでもよい。本発明の一実施形態は、調査データをリアルタイムでデータ分析器へ送る。別の実施形態では、調査データは格納され、後で分析のために取り出される。両方の実施形態で、本発明の計算および処理アルゴリズムは分析器168（図10A）に格納され、入力調査データ244に適用され、ディスプレイモニタ114（図10A）に表示され得る有益な出力結果262（図22）を生成する。例として、限定ではないが、以下では、デジタルデータ配列の形式の調査データに対する分析方法を説明する。本開示を考慮して、当業者は、本発明の方法がデジタルデータ配列のフォーマット以外のさまざまな形式の調査データに適用可能であることを認識するであろう。 20

### 【0111】

ここで図22に進むと、本発明の処理方法および計算アルゴリズムによるデータ分析のステップの全般的概観を提示するフローチャートが示されている。本処理方法の第1ステップは、入力調査データ244を受け取ることに関わる。上記のように、データ分析は、0～4,095の範囲内の整数の2次元配列から開始される。次のステップ246は、計数のためにディスクの評価矩形を選択することである。この矩形が画定された後、目的は、矩形内部に含まれる全白血球の実際の計数を行うことが目的となる。この領域を「調査データ領域」という。ステップ246の実施態様は、ディスクの構成に左右される。2つの可能なディスク構成として、ウインドウ付きディスクおよびウインドウなしディスクがある。 30

### 【0112】

例として、限定ではないが、図2および図4に示したターゲットすなわち捕捉ゾーン140のようなウインドウ付きのディスクを用いた本発明の実施形態では、ソフトウェアがウインドウを認識し、分析および計数のためにその一部をクロッピングする。図2に示したような好ましい一実施形態では、各ウインドウ（すなわち捕捉ゾーン）は $1 \times 2\text{ mm}$ の矩形の形状であり、その両端に半円形部分を有する。この実施形態では、ソフトウェアは、それぞれのウインドウ内の $1 \times 2\text{ mm}$ 領域の標準サイズの評価矩形をクロッピングする。この実施形態の一態様では、リーダが、数個の異なるウインドウ内の細胞数を比較するために数個の連続するサンプル値を取ってもよい。 40

### 【0113】

図4に示したようなウインドウなし透過ディスクを用いる本発明の実施形態では、ステップ246は、2つの異なる方法のうちの1つで実行される。標準矩形の位置が、固定座標を有する点を基準としてその中心を位置決めすること、または較正ドット（これは好ましくは、固有の特徴を有する濃い色素のスポットである）を見つけることのいずれかによっ 50

て選択される。較正ドットを使用する場合、所望のコントラストを有する色素を、細胞の2つのクラスタに関してディスク上の特異的な位置に沈着させる。そして、光ディスクライダが、一方の細胞クラスタの中心へスキップするように指示されてから、標準サイズ( $1 \times 2 \text{ mm}$ )の評価矩形が、選択されたクラスタを中心として位置決めされる。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。

#### 【0114】

両方のタイプのディスクに対応する以外に、ステップ246は、ユーザの選択の余地も見込んでいる。ユーザは、細胞計数のために、マウス選択等による直接対話によって、矩形領域のような所望のサンプル領域形状を指定してもよい。ソフトウェアの本実施形態では、これは、マウスを用いて、モニタ114(図1)に表示されている調査データのグラフィカル表示の所望の部分の上をクリック・アンド・ドラッグすることを含む。評価領域選択方法の如何に関わらず、それぞれの矩形領域が次のステップ248で計数のために評価される。

#### 【0115】

図22における第3ステップはステップ248であり、これはバックグラウンド照度均一化に関する。このプロセスは、いくつかのハードウェア構成によって引き起こされる可能性のあるバックグラウンド一様性変動を補正する。バックグラウンド照度均一化は、バックグラウンド全体、または調査データのうち細胞でない部分が、任意のバックグラウンド値 $V_{background}$ を有する平面に近づくように、各サンプル点の強度レベルをずらす。 $V_{background}$ は、標準矩形サンプル領域にわたる平均値をとる等の多くの方法で決定することができるが、本実施形態では $V_{background}$ は2,000に設定される。選択された矩形サンプル領域の各点Pにおける値Vは、数( $V_{background} + (V - P)$ の近傍にわたる平均値))で置き換えられる。必要であれば、結果として得られるVを、実際の可能な値の範囲(これは本発明の好ましい一実施形態では0~4,095である)に合うように切り詰めてもよい。近傍矩形の寸法は、細胞のサイズより十分に大きく、標準矩形のサイズより十分小さくなるように選択される。他の検定法では、近傍矩形は、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターに合わせて選択される。

#### 【0116】

図22のフローチャートにおける次のステップは規格化ステップ250である。規格化ステップ250を実行する際に、標準矩形サンプル領域内のデータについて、平均が2,000、標準偏差が600となるように線形変換が実行される。必要であれば、値は、範囲0~4,095に合うように切り詰められる。このステップ250は、バックグラウンド照度均一化ステップ248とともに、ソフトウェアがハードウェアの変更および調整から影響を受けにくいようにする。例として、限定ではないが、上部検出器158(図13)のような検出回路における信号利得は、結果として得られる細胞計数に大幅に影響を及ぼさずに変更可能である。

#### 【0117】

図22に示すように、フィルタリングステップ252が次に実行される。標準矩形内の各点Pについて、Pの近傍(その寸法はステップ248で指示されるものより小さい)内の点で、その値が $V_{background}$ とは十分に異なるものの個数を計算する。計算された点の個数は、調査データ内の細胞のサイズを近似するはずである。他の検定法では、計算される点の個数は、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーター等の対象物体を近似するはずである。求められた異なる点の個数が十分に大きい場合、Pにおける値はそのままにされるが、そうでない場合、その値には $V_{background}$ が割り当てられる。このフィルタリング操作は、雑音を除去するために実行され、最適な場合には

10

20

30

40

50

、細胞のみが調査データにとどまる一方、バックグラウンドは一様に  $V_{background}$  に等しくなる。

**【0118】**

図22に示すように、不良なコンポーネントを除去するための任意のステップ254を実行してもよい。きず、泡、汚れ、およびその他の同様の不整部分のような欠陥がフィルタリングステップ252を通過するかもしれない。これらの欠陥は、直接的に、または調査データのヒストグラムにおける全体の分布に影響を及ぼすことによって間接的に、細胞計数エラーを引き起こし得る。このステップは、これらの欠陥が細胞に比べてサイズが十分に大きいという事実を利用して、適当なアルゴリズムを用いてそれらを除去する。他の検定法では、これは、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ（ビーズ検定法）、凝集物質、沈殿（酵素反応）、または他の生物学的レポーターのような他の調査特徴物に容易に適用され得る。それらのサイズは、欠陥を除去するにはどうするのが最善かを判断する際に考慮される。任意ステップ254の後、好ましくは、ステップ248、250、および252が繰り返される。  
10

**【0119】**

図22に示す次の処理ステップはステップ256であり、輝中心によって細胞を計数することに関する。計数ステップ256はいくつかのサブステップからなる。それらは（1）畳込みを用いることであって細胞の中心をより良く見えるようにする、畳み込みを用いること、（2）これらの中心をマーキングすること、および（3）細胞の実際の計数を実行すること、に関する。ハードウェア構成によっては、一部の細胞は輝中心がないように見えるかもしれない。このような場合、暗縁のみが見えるので、以下の2つの任意ステップ258および260が有益である。  
20

**【0120】**

ステップ258は、見つかった細胞を画像から除去することに関する。ステップ258で、見つかった各細胞の中心の周りの円形領域を値2,000（バックグラウンドデフォルト）で満たし、輝中心および暗縁の両方を有する細胞が2度見つからないようにする。ステップ260は、暗縁を認識することによりさらなる細胞を計数することに関する。ステップ258の後、調査データに対して2つの変換が実行される。その目標は、暗縁をよりはっきりさせ、ステップ256で輝中心法によって計数されなかった細胞を計数できるようすることである。別の実施形態では、輝中心によって細胞を計数する方法の代わりに、暗縁によって細胞を計数する方法を使用することができる。  
30

**【0121】**

計数ステップ256の後、または計数ステップ260が任意に使用された場合にはその後、図22に示す最終ステップは、結果出力ステップ262である。標準矩形内に見つかった細胞の数が図1に示したモニタ114に表示される。同定された各細胞は、表示されている光バイオディスクから導出された調査データ上で十字印を用いてマーキングされる。

**【0122】**

図22に示した各ステップのさらに詳細な説明は、サブステップを詳細に記載した対応するプロック図とともに、以下で与えられる。

**【0123】**

ステップ1：データ入力

ステップ244は、0から4,095までの範囲の2次元配列に格納されているデータを取り出す。黒セグメントは定数値0で埋められる一方、光が検出された領域は1から4,095までの範囲にある。結果のデータ評価において、0は無視される。  
40

**【0124】**

ステップ2a：ウィンドウ付きディスクにおける評価矩形の選択

図23に、評価矩形を選択するプロセス（図22のステップ246）の詳細を示す。ステップ300で、選択のタイプを判断する。第1の選択肢302は、図2および図4に示したターゲットすなわち捕捉ゾーン140のような物理的に埋め込まれたウィンドウを有するバイオディスクから評価矩形を選択することを含む。図24に、本発明の一実施形態に  
50

よるソフトウェアによって表示された、ウィンドウ 326 および 328 を有するディスクの調査データ例のグラフィカル表示を示す。

#### 【0125】

一実施形態によるステップ 304 の詳細なプロセスを図 25 に示す。ステップ 330 ( 図 25 ) で、調査データ配列を、n 行につき 1 行および n 列につき 1 列が考慮されるように圧縮する。次にステップ 332 で、圧縮された調査データを 1 行ずつ走査して、2 値化ステップで使用されることになるしきい値を決定する。図 26 は、説明のための一例を提供している。例示的行 342 で、各セルは調査データ上の点を表し、各セル内の値はその点で検出された光強度を表す。走査は、調査データ配列の各行について長さ L のすべての可能なセグメントを選択することによって開始される。そこで図 26 は、調査データ配列からのこの例示的行についての長さ L のすべての可能なセグメントを示している。実際の配列は多くのこのような例示的行を有するであろう。L は、ディスク上のウィンドウの幅よりわずかに小さく選択される。次に、各セグメントについて、当該セグメント内のすべての整数値を用いて平均値を計算する。セグメントは行に沿って「スライド」されるので、このプロセスは「スライド平均」を求めると言葉される。すべての行の長さ L の全セグメントについて平均を求めた後、平均の最小および最大を求める。しきい値 T を、( min ( 平均 ) + max ( 平均 ) ) / 2 として計算する。このプロセスは、検索ウィンドウを、ウィンドウ領域を覆うセグメントに狭める。ウィンドウ領域は非ウィンドウ領域より明るいので、これらのセグメントの平均はしきい値 T より高くなり、後のステップで、より容易に同定することができる。

10

20

30

40

#### 【0126】

一実施形態は、以下のようにして、セグメント L の平均値の計算を加速する。セグメント n 内の K + 1 から K + L までのすべての値の和 a ( n ) を計算する場合 ( K + 1 はセグメントの開始点である ) 、 a ( K + L ) を和 a ( n ) に加算し、 a ( K ) を和 a ( n ) から減算する。これを K のすべての値について繰り返す。これにより、アルゴリズムは、セグメントが行を 1 ユニット移動するたびにセグメントのすべての値の和を初めから足し上げずに済む。しきい値を求めるこのプロセス全体を、すべての行がこのように走査されるまで各行について繰り返す。

#### 【0127】

図 25 に戻って、ステップ 334 で 2 値化を実行する。このステップで、しきい値 T を超える値を有する点が黒と宣言される一方、残りは白と宣言される。これで、調査データは、白黒画像であるかのように扱うことができる。2 値化の後、ステップ 336 で、調査データに対して規格化を実行する。規格化は、侵食および膨張という 2 つのステップからなる。侵食は以下のように実行される。画像 P に対して、対応する画像 P' を構成する。P' 内の点 X' は、( 1 ) P 内の対応する点 X が白である場合、または ( 2 ) X のいずれかの隣接点が白である場合、に白と宣言される。いずれの条件も満たされない場合、X' は黒と宣言される。P' は、侵食の結果得られる画像である。膨張は逆の形で作用する。画像 R に対して、対応する画像 R' を構成する。R' 内の点 Y' は、( 1 ) R 内の対応する点 Y が黒である場合、または ( 2 ) Y のいずれかの隣接点が黒である場合、に黒と宣言される。いずれの条件も満たされない場合、Y' は白と宣言される。R' は、膨張の結果得られる画像である。数回の侵食および膨張の合成によって、2 値画像はより規則的になる ( 単一の黒点および単一の白点が消失する ) 。

#### 【0128】

規格化を実行した後、結果として得られる調査データを、連結コンポーネントの抽出を行うステップ 338 に渡す。このステップで、調査データは、連結コンポーネントが画定されるように走査される。調査データ内の所与の黒点の対に対して、その対は、その 2 点の間を黒点の連鎖によって連結することができる場合に同一コンポーネントに属すると定義される。このステップの主な目的は、調査データを、白い空間で互いに分離された連結した黒コンポーネントの集まりに分解することである。

#### 【0129】

50

図27に、連結コンポーネントの抽出におけるサブステップを示す。第1ステップ350は、初期コンポーネント番号を割り当てることを含む。調査データは、走査中に遭遇した最初の黒点に「0」を割り当て、次に「1」を割り当て、というように走査される。白点にはすべて「-1」を割り当てる。ステップ352で、初期走査方向が設定される。次の4つの方向がある：

- (1) 「++」は、上から下、左から右を表す。
- (2) 「+-」は、上から下、右から左を表す。
- (3) 「-+」は、下から上、左から右を表す。
- (4) 「--」は、下から上、右から左を表す。

最初に、走査方向は「++」に設定される。これは、上から下、左から右を意味する。  
10ステップ354で、調査データを以下のように走査する。黒点Pについて、その隣接黒点P'の(ステップ350で割り当てられた)割当て番号がPの割当て番号より小さいようなあらゆる黒点Pが、P'の割当て番号をとる。例えば、Pの番号が7であり、その隣接点P'に番号6を有するものがある場合、Pの新たな番号は6である。

#### 【0130】

次に、変更判断ステップ356に進む。アルゴリズムは、ステップ354で調査データ内のいづれかの黒点に新しい番号が割り当てられたかどうかをチェックする。その通りである場合、ステップ358で、走査方向が変更される。方向の変更は以下のルールに従う：

- (1) 現在の方向が「++」である場合、新しい方向は「+-」である。
- (2) 現在の方向が「+-」である場合、新しい方向は「-+」である。
- (3) 現在の方向が「-+」である場合、新しい方向は「--」である。
- (4) 現在の方向が「--」である場合、新しい方向は「++」である。

ステップ354で、新しい方向を用いて走査が再び開始される。このサイクルは、コンポーネント番号の変化を検出せずに走査を完了することができるまで継続する。コンポーネント番号変化時に走査方向を変えることにより、プロセスに必要な走査パス数が少なくなる。

#### 【0131】

ステップ356の後、連結コンポーネント内のすべての点は同じ番号を有するはずである。ステップ360で、コンポーネント内の点の番号を再割当てする。このステップが必要であるのは、いくつかの番号が消失しているかもしれないからである。例えば、初期調査データ中に20個の黒点があった場合、各点は0から19までの番号を取っていたであろう。走査後に5個のコンポーネントがあることが分かった場合、20個の初期番号のうちの5個は消失しているであろう。これにより、例えば番号1、4、9、16、および18を有する5個のコンポーネント内の黒点が残る。再付番(re-enumeration)ステップは、これらの5個のコンポーネント内の点に0から4までの番号を再割当てする。一般に、調査データ内にN個のコンポーネントがある場合、0からN-1までの付番が行われる。これにより、連結コンポーネント抽出のプロセスが完了する。

#### 【0132】

図25に戻って、連結コンポーネントの抽出(ステップ338)の後、ウィンドウ内に入るコンポーネントを見つけるステップ(ステップ340)に進む。ある一定の論理的制限を満たす最大の黒コンポーネントが選択される。論理的制限としては、ディスク上に存在し得るウィンドウ数およびウィンドウ間の近似的距離がある。これにより、ウィンドウを見つけるプロセスが完了し、(図23における)矩形選択の全プロセスは、次のステップであるウィンドウ内で標準矩形をクロッピングするステップ(ステップ306)に移る。

#### 【0133】

(1) 最大合計照度を有し、(2) ウィンドウに対応するコンポーネントの点の1つを中心とする、標準矩形を見つけるために、このコンポーネントを含む領域を以下のように走査する。まず、アルゴリズムは水平方向に走査を行い、図26に示したようなスライド平均を計算する。次にアルゴリズムは垂直方向に走査を行いスライド平均を計算する。これは、調査データ配列内のいくつかの行にわたり垂直に連なるセグメントを作成することを

10

20

30

40

50

含む。セグメントは、ウィンドウの高さにほぼ等しい長さを有するであろう。水平スライド平均および垂直スライド平均のうちの最大平均の交点を、評価矩形の中心と宣言する。この点は、ウィンドウ内の最も明るいスポットであるので、最大値を有する。その点が評価矩形の中心として選択される。中心を画定した後、ステップ312で、中心点から測ることによって、 $1 \times 2\text{ mm}$ （標準サイズ）の評価矩形を作成する。図28に、本発明の一実施形態によるソフトウェアディスプレイ上で、ウィンドウを見つけた後の評価矩形のクロッピングの結果を示す。

#### 【0134】

中心点を見つける他の技法としては、エッジ追跡を用いてウィンドウを見つける技法、ウィンドウの（点の値を用いた）重心を見つける技法、および調査データを表す画像を調べることによって手動で点を選択する技法がある。10

#### 【0135】

##### ステップ2b：ウィンドウなしディスクにおける評価矩形の選択

評価矩形を選択する際の第2の選択肢は、図23のウィンドウなしバイオディスクのステップ308の場合である。一実施形態は、評価矩形のための所望の位置を見つけるために、ディスク上のダーカススポットを使用する。アルゴリズムはステップ310（図23）から開始され、ディスク上のサンプルのさまざまな領域をインデックス付けするためのインデックスマークーとして働くダーカススポットを見つける。ダーカススポットは、図26に関連して説明したウィンドウを見つける際に使用されるスライド平均を用いたプロセスと同様に見つけることができる。今度はターゲットが（ウィンドウではなく）はるかに小さいダーカススポットであるので、ダーカススポットを見つける際に使用されるセグメントははるかに短い。それらの長さはダーカススポットのサイズにほぼ等しい。しかし、スライド平均を求める動作原理は同じままである。最小のスライド平均を有するセグメントがダーカススポットとして同定される。20

#### 【0136】

図29に、ダーカススポット366の一例を示す。ステップ312（図23）で、ダーカススポットが見つかった後、アルゴリズムは、ダーカススポットからシフトして評価矩形を作成する。標準サイズの評価矩形をクロッピングする。ここで矩形の中心は、見つかったダーカススポットから所定距離シフトすることによって見出される点に位置する。図30に、見つかったダーカススポット366から所定距離シフトした後にクロッピングされた評価矩形368の一例を示す。破線の構円368、370、および372は、他の細胞領域を同定している。本発明の好ましい一実施形態では、評価矩形の位置情報をディスクに埋め込むことができる。ダーカススポットを見つける代わりに、システムはディスクから位置情報を読み出し、評価矩形を配置するための領域を見つけることができる。30

#### 【0137】

##### ステップ2c：ユーザ選択オプションを含む評価矩形の選択

最後に、評価矩形の選択における第3の選択肢は、図23のステップ316に示すように、ソフトウェアユーザインターフェースを通じてのユーザからの入力を含む。画面上に、調査データに基づいて作成されたバイオディスクの画像がユーザに対して示され、ユーザは画像上で矩形を画定することによって評価矩形を選択する。ステップ316で、ユーザが選択した矩形が標準サイズより大きいかどうかを判断する。大きくない場合、ユーザの矩形が標準サイズより小さいことを意味する（ステップ318、図23）。この場合、ユーザが選択した矩形をステップ322での計数のために使用する。ユーザの矩形が標準サイズより大きい場合（ステップ320、図23）、ステップ324で、ユーザが選択した矩形から標準サイズ評価矩形をクロッピングする。40

#### 【0138】

##### ステップ3：バックグラウンド照度均一化

図31は、図22のステップ248のさらに詳細な説明を与えており、評価矩形が選択された後、評価矩形を境界とする領域（「調査データ領域」という）でバックグラウンド照度均一化を実行する。このステップの主な目的は、バックグラウンド雑音を除去すること50

により、バックグラウンドをより一様にすることである。これを達成するため、バックグラウンド照度均一化は、ソフトウェアアルゴリズムを用いて、電気的実施態様における利得制御の効果をシミュレートする。

#### 【0139】

図31のステップ380で、(評価矩形内の)近傍矩形の標準サイズを選択する。なお、近傍矩形を評価矩形と混同しないように注意されたい。近傍矩形は、単一の評価点の周りにあるように形成される。そのサイズは、細胞よりは十分に大きいが、バックグラウンド照度の非一様性によって影響を受ける程度には小さいように選択される。他の検定法では、調査特徴物は、細胞である代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。したがって、近傍矩形のサイズは、行われる検定法のタイプに基づいて選択される。近傍矩形のサイズは、所与の点Pに対して、Pの近くのいくつの点がバックグラウンド照度均一化のプロセスのために評価されるかを決定する。

#### 【0140】

ステップ382および384でそれぞれ垂直走査および水平走査を実行して、調査領域内の各点に対する平均Kを計算する。

#### 【0141】

Kは以下のように導出される。まず、垂直走査を実行する。一実施形態では、調査データ領域内のすべての点に対する垂直平均をまず計算する。点(x, y)に対する垂直平均K<sub>vert</sub>は、(x, y - dy)から(x, y + dy)までの範囲内のすべての点の平均値である。結局、すべての列が垂直方向に走査される。項dyは、ステップ380で決定したサイズを有する近傍矩形の高さの半分である。図26で説明したスライド平均計算技法をここで適用する。ただし、今の場合以外、プロセスは垂直方向に進む。

#### 【0142】

すべての点に対してK<sub>vert</sub>が求められた後、水平走査を以下のように実行する。点(x, y)に対して、その点に対する最終平均Kは、(x - dx, y)から(x + dx, y)までの範囲内の点に対するすべてのK<sub>vert</sub>の平均を取ることによって与えられる。結局、行が水平方向に走査される。項dxは、ステップ380で決定したサイズを有する近傍矩形の幅の半分である。全体の効果は、特定の点Pに対して、Pと同じ行にありPの近傍矩形内にあるすべての事前に計算されたK<sub>vert</sub>の値を平均してPに対する最終平均を得ることである。K<sub>vert</sub>の値の事前計算は計算時間を短縮する。計算時間は、調査データ領域内のサイズに近傍矩形のサイズを乗じたものに比例するのではなく、調査データ領域にのみ比例する。

#### 【0143】

引き続き図31を参照すると、ステップ386で、各点Pの値VをV<sub>background</sub> + (V - K<sub>neighbor</sub>)に再割当てすることによって均一化を実行する。ここでK<sub>neighbor</sub>は、Pの近傍矩形の境界内のすべての点にわたる平均値である。一実施形態では、バックグラウンド値V<sub>background</sub>は、調査データ領域全体にわたる平均値であるように設定される。別の実施形態では、V<sub>background</sub>は2,000に設定される。Pの新しい値が4,000より大きい場合、4,000が使用される。Pの新しい値が1より小さい場合、1が使用される。前に0であったPの値は2,000で置き換えられる。このステップの後、調査データのいかなる大きい領域内の平均値も約2,000となる。すなわち、バックグラウンド全体が任意のバックグラウンド値V<sub>background</sub>を有する平面に近づく。図32はバックグラウンド照度均一化前にソフトウェアによって表示された調査データを示し、図33はバックグラウンド照度均一化後にソフトウェアによって表示される調査データを示している。画像化された調査データ572は、ある画像フォーマットでレンダリングされた調査データであるが、調査対象のデータを示している。図32および図33の両方において、画像化された調査データ572は捕捉された細胞をマーキングし、またはそれに対応している。スライド平均を使用する代わりに、別の実施形態は、バックグラウンド照度均一化のステップでフーリエ変換(

10

20

30

40

50

F T ) を使用する。フーリエ変換を実行する際には、まず調査データを周波数領域に変換する。次に、周波数領域におけるスペクトルの一部を除去する。これは、バイオディスクおよび回路における電気的雑音およびその他の不整動作によって発生するバックグラウンド雑音の一部を除去する。一実施形態では、非常に短い、または非常に長い波長のスペクトルを除去する(周波数は波長分の1である)。これらの除去される波長のしきい値は実験的に決定される。最後に、逆変換を実行してデータを空間領域に戻す。

#### 【0144】

##### ステップ4：規格化

図34に、図22のステップ250に関わるステップを詳細に示す。本明細書において上記の概要で述べたように、標準偏差の値を約600に等しくし、調査データの平均の値を約2,000に等しくするために、規格化が必要である。規格化はまた、ソフトウェアがハードウェアの変更および調整から影響を受けにくいようにする。例えば、図10Aの上部検出器158のような検出回路における信号利得は、結果として得られる細胞計数に実質的に影響を及ぼさずに変更可能である。

10

#### 【0145】

これを達成するため、一実施形態では、ステップ390でプロセスが開始され、前のステップ(バックグラウンド照度均一化)の結果として得られた調査データに対する平均Aおよび標準偏差Sの計算を行う。値が0の点は無視される。ステップ392(図34)で、調査データ内の各点に対して規格化を以下のように実行する。一実施形態では、あらゆる点Pに対して、Pの値vを $v = A + (v - A) \times 600 / S$ で置き換える。 $(v - A)$ のコンポーネントは各点を中心とし、コンポーネント( $600 / S$ )は振幅を調節する。その結果をバックグラウンド値2,000に加算する。600という値は、所望の振幅範囲を得るために調節することができる。図36の値グラフ400に、規格化後のグラフの一例を示す。なお、値グラフは2,000前後を推移し、変動の振幅は600付近にとどまっていることに留意されたい。

20

#### 【0146】

Pの値が規格化された後、以下のように切り詰め(ステップ394)を実行する。1) Pの新しい値が4,000を超える場合、値を4,000に切り詰める。2) Pの新しい値が1を下回る場合、値を1に切り詰める。

30

#### 【0147】

一実施形態では、ソフトウェアのグラフィカルユーザインターフェースが、調査データ内のすべての点のヒストグラムを表示して、ユーザに規格化のプロセスを見せる。図35に、規格化ステップ中にソフトウェアによって表示される調査データ例の一部を示す。画像化された調査データ572は調査対象のデータを示している。図35で、画像化された調査データ572は捕捉された細胞を表し、またはそれに対応している。入力ボックスは、規格化の範囲を尋ねている。表示されているように、1~4,000の値が使用されている。所望に応じていかなる値範囲も使用可能であることは理解されよう。

#### 【0148】

図36に、規格化ステップ後のソフトウェアディスプレイを示す。上側ウィンドウ396は調査データ例の一部の拡大図を示している。画像化された調査データ572は捕捉された細胞を表している。下側グラフ400は、ウィンドウ396内の水平点線398によってたどられる点の対応する値を示している。下側グラフ400は、調査データのバックグラウンド領域が規格化されている(すなわち、小さい雑音を伴う定常値)一方、細胞の領域はグラフ内で顕著な「スパイク」を有することを示している。例えば、下側グラフ400において、スパイク信号402はその特定位置における特異的な細胞例404に対応する。スパイク信号402は、バックグラウンド雑音406とは明瞭に異なる。これが細胞認識のプロセスを容易にする。

40

#### 【0149】

##### ステップ5：フィルタリング

図37に、図22のステップ252に関わるステップを詳細に示す。図37のステップ4

50

10で、近傍矩形のサイズを選択する。これらの近傍矩形は、概念的には、バックグラウンド照度均一化のステップ(図22のステップ248)で使用されるものと類似している。しかし、このステップで使用される近傍矩形はおよそ細胞のサイズであり、バックグラウンド照度均一化で使用されるものより小さい。ステップ412で、調査データ領域内の各点Pに対して、Pの近傍内で $V_{background}$ とは「十分に異なる」値を有する点の個数を計算する。一実施形態では、 $V_{background}$ の値は2,000に設定される。(当該点と $V_{background}$ との間の)どの程度の差が「十分に異なる」かの判断はしきい値数によって定義される。一実施形態では、しきい値数は、調査データの信号パターンを調べてバックグラウンド値と細胞(またはサンプル中の他の対象物体)の値との間の差を記録することによって決定される。他の検定法では、調査特徴物は、細胞である代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。他の実施形態では、しきい値数は、変動する条件に基づいてバックグラウンド雑音およびバックグラウンド値を決定する較正機構によって生成される。このような条件には、バイオディスクの反射率、バイオディスクドライブ内でのバイオディスクのアンバランス、バイオディスクのガタつき、振動または不安定性、電気的雑音、バイオディスクのメタライゼーション、関与するサンプルのタイプ(白血球かそれ以外か)、および較正調節による補償や補正を必要とするいかなる他の条件も含まれる。

#### 【0150】

ステップ414で、「十分に異なる」点の個数について、当該個数が所定のフィルタリング基準より大きいかどうかをテストする。大きい場合、Pの値はステップ416の時まとまる。そうでない場合、ステップ418で、Pの値は $V_{background}$ (または2,000)に変更される。このステップの所望される効果は、雑音を除去して、細胞のみが調査データに残り、バックグラウンドが一様に $V_{background}$ に等しくなるようすることである。図38に、フィルタリングステップ後にソフトウェアによって表示される調査データ例を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞をマーキング、すなわち示している。なお、バックグラウンドが調査データ内の細胞と良好なコントラストを有することに留意されたい。図39は、図39の調査データの一部の拡大図を提供している。画像化された調査データ572は捕捉された細胞をマーキングし、またはそれに対応している。図39の下側グラフ420によって示されているように、バックグラウンドがここでは水平線値を有し、細胞の領域がスパイク422によって明確に画定されている。向上したコントラストは、次のステップにおける細胞計数に役立つ。

#### 【0151】

##### ステップ5a：不要コンポーネントの除去

図40に、図22のステップ254に関わるステップを詳細に示す。これは、細胞計数を妨害し得る空気泡、汚れ、およびクラックのような不要コンポーネントを除去するように設計された任意のステップである。ここで使用されるプロセスは、図25に関連して説明したウィンドウを見つける際に使用されるプロセスに類似している。ステップ428(図40)で、しきい値Tを選択する。一実施形態では、Tはバックグラウンド照度均一化のステップで求められる $V_{background}$ に設定される。次にステップ430で、2値化を実行する。ウィンドウを見つける際に使用される2値化ステップ(図25のステップ334)と同様、ステップ430で、しきい値Tを超える値を有する点が黒と宣言される一方、残りは白と宣言される。これで調査データは白黒画像とみなすことができ、1ビットで表すことができる。ステップ432で、図25のステップ336と同様にして、調査データに対して規格化を実行する。

#### 【0152】

規格化を実行した後、結果として得られる調査データを、連結コンポーネントの抽出を行うステップ434に渡す。このステップで、調査データは、連結コンポーネントが画定されるように走査される。調査データ内の所与の黒点の対に対して、その対は、その2点の間を黒点の連鎖によって連結することができる場合に同一コンポーネントに属すると定義

10

20

30

40

50

される。このステップの主な目的は、調査データを、白い空間で互いに分離された連結した黒コンポーネントの集まりに分解することである。ここで使用される連結コンポーネント抽出プロセスは、図27で詳細に示したものと同一であってもよい。

#### 【0153】

この除去プロセスにおける次のステップはステップ436であり、不整サイズのコンポーネントを除去することに関する。ユーザが選択したサイズしきい値をすべての連結コンポーネントに適用する。コンポーネントがサイズしきい値より小さいか、または大きい場合、そのコンポーネント全体が調査データから除去される。この手法が有効であるのは、不整コンポーネント（例えば泡、クラック）のサイズが通常、典型的な細胞サイズよりはるかに大きいからである。また、ユーザは、いかなるタイプの細胞が計数されるかに応じてしきい値を選択することができる。一実施形態では、除去は、コンポーネントのすべての点を一定値2,000（バックグラウンド値）で置き換えることによって達成される。好みしくは、図40の全ステップの完了時に、調査データは再処理のためにステップ248～ステップ252（図22）に戻されるべきである。

10

20

30

40

50

#### 【0154】

図41に、クラックの除去前の調査データの一例を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞に対応している。図示のように、クラック574が領域全体にわたって分布している。図42に、クラックの除去後の、図41と同じ調査データを示す。画像化された調査データ572のうち、捕捉された細胞をマーキングしているもののみが残っている。

#### 【0155】

##### ステップ6：輝中心による細胞計数

次に図43を参照すると、図22のステップ256に関わるステップが詳細に示されている。ステップ440（図43）で、調査データに対して畳込みを実行する。畳込み中に、畳込み画像を表す補助配列が形成される。畳込み画像内の各点Pは、Pの円形近傍におけるフィルタリング後の調査データの積分の結果である。当業者には理解されるように、画像処理で使用される一般的な畳込み方法は2つの関数に関わる。2つの関数  $f, g : R^2 \rightarrow R$  の畳込みは次の関数である。

#### 【0156】

#### 【数1】

$$F(x, y) = f \circ g(x, y) = \iint_{R^2} f(x+u, y+v) g(u, v) du dv.$$

#### 【0157】

より正確には、本発明の一実施形態では、積分される関数fは次の関数である。

$f(x, y) = h(x, y) - 2,000$   $h(x, y) > 2,000$  の場合、または  
 $= 0$   $h(x, y) \leq 2,000$  の場合

ここで、 $h(x, y)$  は前のステップで  $x, y$  にある点の値を記述する関数である。 $f(x, y)$  が確定した後、円形近傍指標関数(indicator function)gとの畳込みを実行する。ここで：

$g(u, v) = 1 \quad u^2 + v^2 \leq r^2$  の場合、または  
 $= 0$  その他の場合

であり、rは細胞の予想半径である。畳込み積分は次の通りである。

#### 【0158】

#### 【数2】

$$F(x, y) = \iint_{\{(u-x)^2 + (v-y)^2 \leq r^2\}} f(x+u, y+v) du dv.$$

#### 【0159】

積分は、次式で定義される円形近傍内にあるすべての格子点( $u, v$ )におけるfの値の和をとることで置き換えられる。

$$(u - x)^2 + (v - y)^2 < r^2$$

畳込み後、ステップ442(図43)で、畳込み画像に対して局所最大値の探索を実行する。畳込みステップは、調査データ内の輝中心を局所最大値として目立たせ、より容易に認識されるようにする。整数値が使用されるので、丸めが冗長な局所最大値を生じことがある。これを補正するため、ステップ444で、同一閑近傍内にある冗長な局所最大値を除去する。次にステップ446で、残りのすべての局所最大値を細胞の中心と宣言する。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。局所最大値は、これらの検定法でターゲットとなるこれらの物体すなわち調査特徴物の中心を見つけるために使用される。本発明の他の実施形態では、計数方法は細胞凝集の効果を考慮する。互いに近い最大は自動的には無視されない。一実施形態では、付近にくぼみのある局所ピークが細胞の中心と宣言される。凝集した細胞が調査データに現れる場合に、冗長な局所最大値を定義する距離しきい値がより小さく調節されるように、パラメータを調節することができる。同様に、計数される細胞のタイプに応じて距離しきい値を調節することができる。例えば、赤血球はより一貫性のあるサイズを有するので、仮定される細胞サイズを距離しきい値とすることができます。

10

#### 【0160】

別の実施形態では、細胞の分布に対して統計分析を実行することができる。この場合、視認性が低かったり細胞が凝集していたりして他の方法では計数できない領域で細胞数を推定するために、面積当たりの平均細胞数を使用することができる。他の検定法では、細胞は代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターであってもよい。別の実施形態では、ユーザがより高い解像度で調査データ領域を再サンプリングして、より完全で正確な計数を実行することができる。

20

#### 【0161】

図44に、輝中心法により計数された細胞で満たされている調査データ例を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞をマーキングしている。輝中心法で実行されるステップは、細胞がバックグラウンドの暗いコントラストに対して明るく見えるように細胞を強調するのに役立つ。ソフトウェアによって示されているように、細胞は個別にマーキングされ計数される。図45は、図44に示されている調査データの一部の拡大図および値トレースグラフを示している。画像化された調査データ572は捕捉された細胞に対応している。

30

#### 【0162】

##### ステップ7および8：暗縁による細胞マーキングおよび細胞の追加計数

ステップ7および8(図22)は、細胞計数の精度を向上させるために実行可能な任意のステップである。図22で、それらはステップ258および260として参照されている。これらの2つの任意ステップは、細胞に輝中心がないままとなり得るハードウェア構成の場合に細胞の過小計数を補正するために使用可能である。他の検定法では、本方法を細胞に適用する代わりに、本発明の光学系の入射ビームにより検出可能なサイズのビーズ(ビーズ検定法)、凝集物質、沈殿(酵素反応)、または他の生物学的レポーターに適用してもよい。別法として、これらの2つのステップは、輝中心を認識することによって細胞を計数する代わりに使用されてもよい。

40

#### 【0163】

一部の細胞が輝中心を認識する方法によって計数されている場合、ステップ7を実行して、これらの計数された細胞をマーキングし、それらを調査データから除去する。次に、暗縁を有する細胞を認識することによる計数を行うことができる。図46Aに、図22のステップ260(主要ステップ8)に関わるステップを詳細に示す。ステップ450で、調査データに対して反転を実行する。各点Pにおける値vを2,000-vで置き換える。結果として得られる値が負の場合、それを0で置き換える。数式の形で反転を表すと、次のようになる。

50

$h(x, y)$  を前の調査データとすると、 $f(x, y)$  を次のように作る。

これは、低いデータ値を有する暗縁が、畳込みを実行する時に高い値を有することを保証する。ステップ 4 5 2 で、シフトした円環との畳込みを実行する。当業者には理解されるように、画像処理で使用される一般的な畳込み方法は 2 つの関数に関わる。2 つの関数  $f$ ,  $g : R^2 \rightarrow R$  の畳込みは次の関数である。

( 0 1 6 4 )

〔数3〕

$$F(x, y) = f \circ g(x, y) = \int \int_{\mathbb{R}^2} f(x+u, y+v) g(u, v) du dv.$$

10

[ 0 1 6 5 ]

畳込みを数式の形で表すと、次のような。)

[ 0 1 6 6 ]

【数4】

$$F(x, y) = \iint_{\mathbf{r}(u, v)} f(x+u, y+v) \, du \, dv.$$

〔 0 1 6 7 〕

円形近傍指標関数  $g$  との畳込みを実行する。ここで：

$g(u, v) = 1 - u^2 - v^2 - r^2$  の場合、または

= 0 その他の場合

であり、 $r$  は細胞の予想半径である。この実施形態では、 $g$  は内側半径  $r_1$  および外側半径  $r_2$  を有する円環の指標関数であり、 $r_1$  および  $r_2$  は  $r$ 、すなわち細胞の予想半径の限界である。これにより次式が得られる。

( 0 1 6 8 )

〔数5〕

$$F(x, y) = \iint_{r^2 \leq (u-x)^2 + (v-y)^2 \leq R^2} f(x+u, y+v) \, du \, dv$$

30

〔 0 1 6 9 〕

積分は、円環内にあるすべての格子点 ( $u$ ,  $v$ ) における  $f$  の値の和をとることで置き換える。置込みを 4 回実行するため、次の 4 つの関数をとる。

$$f_1(x, y) = f(x + h_x, y)$$

$$f_2(x, y) = f(x - h_x, y)$$

$$f_3(x, y) = f(x, y + h_y)$$

$$f_4(x, y) = f(x, y - h(y))$$

ここで、 $h_x$  および  $h_y$  は  $x$  および  $y$  方向の特定のシフトである。それらは細胞の推定サイズの半分に等しい。4つの関数は、内側半径  $r_1$  および外側半径  $r_2$  を有する円環の指標関数と畳込みを4回実行することを意味している。値  $r_1$  および  $r_2$  はそれぞれ、細胞

の予想半径  $r$  の最小値および最大値の限界である。畳込みの 4 回のパスが、左、右、上、および下方向に距離  $r$  だけシフトした円環と実行される。図 4.6 B にこのような一例を示す。まず、細胞の暗縁の境界となる円環 458 を作成する。4 個のシフトした畳込みが 4 個の円環を作り出す。ステップ 4.5.4 (図 4.6 A) で、4 個のシフトの結果の和をとる。

再び図46Bに戻ると、和をとった円環が点457に局所最大値を作り出しているのが分かる。そこで、点457をこの細胞の局所最大値であると宣言し、計数する。なお、図46Bは細胞に適用された一例であることに留意されたい。置込み円環が細胞の暗縁の境界となっていない場所には、最大は存在しないであろう。このように、置込みステップは、細胞の暗縁を強調することによって潜在的な細胞を見出す。ステップ456(図46A)

40

50

で、計数ステップは畳込み後の調査データを調べ、局所最大値を計数する。

【0170】

図47に、この方法により見つかった（計数された）細胞が十字印でマーキングされた調査データの画像を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞に対応している。十字印580は計数された細胞をマーキングしている。

【0171】

別法として、畳込みステップは、次の形の式に従って実行することができる。

$F(x, y) = f_1(x, y) + f_2(x, y) + f_3(x, y) + f_4(x, y)$  10  
 $f_1, f_2, f_3, \text{または} f_4$  の少なくとも3個（または別法として、2個）が0より大きい場合、および

$F(x, y) = 0$  その他の場合

なお、この畳込みは、関数のうちの2個または3個が0より大きい場合に、円環をシフトせずに実行されることに留意されたい。畳込みステップに対する別の別法として、関数  $f$  との畳込みをとるために、広く知られている平滑化関数を使用するものがある。この畳込みステップおよび輝中心を認識する際に使用されるものの両方に適用可能なさらにもう1つの別法では、異なる指標関数  $g$  が使用される。その特定の一実施形態では、 $g$  は、次の形のガウス関数：

【0172】

【数6】

$$g(u, v) = e^{-\frac{(u^2 + v^2)}{a^2 + b^2}}$$
20

【0173】

または、細胞の特徴を強調する目的で畳込みを実行するための他の好適な関数であり得る。

【0174】

ステップ9：データ出力

ステップ9で、適当なディスプレイ機構にデータを出力する。ソフトウェアの一実施形態は、評価矩形を境界とする調査データ領域に対する細胞計数の結果を表示するためのユーザインターフェースを有する。別の実施形態は、図47に示されているように各細胞が十字印でマーキングされた調査データ領域の画像を表示する。

【0175】

B. 赤血球の例

当業者には理解されるように、データ分析の種々のステップおよび方法を、種々のタイプの調査データを分析するために異なる形で組み合わせることができる。図48は、調査データ内の赤血球を計数する一例を示すフローチャートを提供している。ステップ460で、しきい値を選択し、2値化を実行する。ここで、しきい値を超える値を有する点が黒と宣言される一方、残りは白と宣言される。この2値化のステップは、通常は細胞を表す高めの値の点と、通常はバックグラウンドまたはバックグラウンド雑音を表す低めの値の点とを分離する。

【0176】

図49に、ステップ460が実行される前の調査データの画像表示を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞に対応している。図50に、2値化（ステップ460）の結果を示す。2値の画像化されたデータ576は調査対象のデータをマーキングし、または示している。この場合、2値の画像化されたデータ578は細胞を示している。細胞をマーキングしていない2値の画像化されたデータ578は細胞を表していないデータを示している。

【0177】

次にステップ462（図48）で、規格化、侵食、および膨張を構成する2つの部分を実行して、細胞境界の欠損部分を塗りつぶす。ここでの目標は、個別の細胞を明確に区画す

10

20

30

40

50

る細胞境界を得ることである。図51に、侵食および膨張（ステップ462）の結果を示す。2値の画像化されたデータ576は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2値の画像化されたデータ576は細胞をマーキングしている。細胞をマーキングしていない2値の画像化されたデータ578は、細胞を表していないデータを示している。

#### 【0178】

図48のステップ464で、各細胞について1ピクセル幅細胞境界を抽出する。図52に、1ピクセル幅境界を抽出（ステップ464、図48）した結果を示す。2値の画像化されたデータ576は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2値の画像化されたデータ576は、細胞をマーキングしている。細胞をマーキングしていない2値の画像化されたデータ578は細胞を表していないデータを示している。1ピクセル幅境界を抽出する際に、黒および白の両方の隣接点を有するすべての黒点はそれらの黒色を保持するように選択される。両方の色の隣接点を持たない黒点は白に変換される。これにより、数ピクセル幅の場所にある粗い境界ができる。次に、細線化プロセスを適用して、調査データ内の形状の輪郭に1ピクセルだけが残るまで境界の余分な点を除去する。細線化プロセスは、それぞれの黒領域の境界を区画するのが1ピクセル幅の線だけになるまで、境界から冗長な黒点を除去する。図52に示すように、図51には存在した、細胞をマーキングしていない2値の画像化されたデータ578が今度は存在しない。

#### 【0179】

細線化プロセスは、まず粗い境界から出発する。粗い境界は、細胞の内側および外側の両方の隣接ピクセルを含むすべてのピクセルからなる。粗い境界の抽出後、データは次の3つのカテゴリからなる。

- (1) 細胞の内部のピクセル、
- (2) 細胞の境界を区画するピクセル、および
- (3) 細胞の外部にあるピクセル。

この3つは、次の3つの条件によって関連づけられている。

(A) 3つともすべて連結である、

(B) (1)は(2)によって(3)から切断されている、そして最後に、

(C) (2)の各点は(1)または(2)に隣接点を持つが、その両方には持たない。

次に、細線化プロセスは、(2)内のピクセルを1個ずつ調べる。(2)内のピクセルPが(1)または(3)に隣接点を有する場合、Pの色を(例えば黒から白へ)付け替えて(2)から(1)または(3)に移しても条件(A)、(B)、および(C)が保たれるかどうかのチェックを実行する。保たれる場合、色の付け替えを行う。この色の付け替えは、各細胞について1ピクセル幅の境界が得られるまで実行される。

#### 【0180】

1ピクセル幅境界が抽出された後、1ピクセル幅境界によって画定される領域を黒点で塗りつぶす（ステップ466、図48）。図53に、ステップ466の結果を示す。2値の画像化されたデータ576は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2値の画像化されたデータ576は細胞をマーキングしている。細胞をマーキングしていない2値の画像化されたデータ578は、例えば図51に見られるように、細胞を表していないデータを示している。この白黒の点集合をマスクとして用いて、もとのデータ点を充填して黒点を置き換える。こうして、細胞領域が分離され、分析の準備が整うことになる。

#### 【0181】

図54に、もとのデータ点を充填した結果を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞をマーキングしている。この方法の利点は、細胞を精度良く抽出することにある。この抽出により、ユーザは、細胞径を測定し、染色された細胞核の形態等の細胞内の他の特徴を調べることができる。このタイプの応用に関するさらなる詳細は、同一譲受人に譲渡された「Nuclear Morphology Based Identification and Quantification of White Blood Cell Types Using Optical Bio-Disc Systems」と題する2002年9月6日出願の米国特許出願第10/xxxx, xxx号（これは参照により本明細書に援用される）に記載されている。

## 【0182】

画像化された細胞を調べるために加えて、ユーザは、本発明のユーザ機能を使用することにより細胞をマーキングし計数することができる。図55は、図49～図54の調査データのもとの画像表示の拡大図であり、赤血球が十字印でマーキングされ、それらが計数されたことを示している。画像化された調査データ572は捕捉された細胞に対応している。十字印580は計数された細胞をマーキングしている。

## 【0183】

C. 代替アルゴリズム

本発明は、細胞計数の作業中に生じ得る特殊な状況を扱うためのいくつかの代替アルゴリズムを含む。

10

## 【0184】

図56A～図64は、明瞭な輝中心または暗縁のない細胞を計数する場合を扱う本発明の一実施形態を示している。この方法は「絶対値計数」と呼ばれ、細胞に明瞭な輝中心または暗縁がないように見える場合を主として扱う。輝中心法は、調査データ内の高い値の領域（ライトスポット）を分離して細胞を計数することに基づいている。暗縁法は、調査データ内の低い値の領域（ジムスポット）を分離して細胞を計数することに基づいている。これに対して、この絶対値計数法は、前の2つの方法のいずれかによって検出可能な明瞭に高いまたは低い値を有していないかも知れないが、それにも関わらずバックグラウンド雑音から識別可能な値パターンを含むような領域を分離する。

20

## 【0185】

図56Aは、絶対値計数法によって十字印でマーキングされる前のばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。画像化された調査データ572は捕捉された細胞を表している。図56Bは、絶対値計数に関わるステップを示すフローチャートである。ステップ480で、調査データに対して規格化およびフィルタリングを実行する。図57は、規格化およびフィルタリングのステップ（ステップ480、図56B）の後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。画像化された調査データ572は捕捉された細胞に対応している。規格化およびフィルタリングのプロセスは、本明細書において上記で説明したものと同じプロセスである。

30

## 【0186】

規格化およびフィルタリングの後、次のステップはバックグラウンド除去および2値化（ステップ482、図56B）に関わる。図58は、バックグラウンド除去および2値化のステップの後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。2値の画像化されたデータ576は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2値の画像化されたデータ578は、細胞を表していないデータを示している。バックグラウンドは除去され、細胞が位置する場所が分離されている。次に、調査データに対して2値化を実行し、調査データ内の白黒の点を生成する。2値化のプロセスは以下のように進行する。まず、各点の値を調べる。点の値とバックグラウンド値との差が所定しきい値数より大きい場合、その点を黒と宣言する。そうでない場合、その点を白と宣言する。一実施形態では、しきい値数は、バックグラウンド値とはほとんど異なる点（バックグラウンドまたはバックグラウンド雑音）が白となり、バックグラウンド値とは大きく異なる点（細胞の暗または明領域）が黒となるように選択される。他の実施形態では、しきい値数は、変動する条件に基づいてバックグラウンド雑音およびバックグラウンド値を決定する較正機構によって生成される。このような条件には、バイオディスクの反射率、バイオディスクドライブ内でのバイオディスクのアンバランス、バイオディスクのガタつき、振動または不安定性、電気的雑音、バイオディスクのメタライゼーション、関与するサンプルのタイプ（白血球かそれ以外か）、および補償や補正をするいかなる他のタイプの条件も含まれる。

40

## 【0187】

規格化（ステップ484、図56B）がプロセスにおける次のステップである。図59は

50

、規格化のステップの後の、当初は図 5 6 A に示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。2 値の画像化されたデータ 5 7 6 は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2 値の画像化されたデータ 5 7 6 は、細胞を表している。細胞をマーキングしていない 2 値の画像化されたデータ 5 7 8 は細胞を表していないデータを示している。規格化は、侵食および膨張からなる。侵食は以下のように実行される。画像 P に対して、対応する画像 P' を構成する。P' 内の点 X' は、(1) P 内の対応する点 X が白である場合、または(2) X のいずれかの隣接点が白である場合、に白と宣言される。いずれの条件も満たされない場合、X' は黒と宣言される。P' は、侵食の結果得られる画像である。膨張は逆の形で作用する。画像 R に対して、対応する画像 R' を構成する。R' 内の点 Y' は、(1) R 内の対応する点 Y が黒である場合、または(2) Y のいずれかの隣接点が黒である場合、に黒と宣言される。いずれの条件も満たされない場合、Y' は白と宣言される。R' は、膨張の結果得られる画像である。数回の侵食および膨張の合成によって、2 値画像はより規則的になる（単一の黒点および単一の白点が消失する）。

10

20

30

30

40

50

### 【 0 1 8 8 】

1 ピクセル幅境界抽出が次のステップである。この抽出ステップは、図 5 6 B ではステップ 4 8 6 として参照されている。図 6 0 は、1 ピクセル幅境界抽出のステップ 4 8 6 を適用した後の、当初は図 5 6 A に示されている通りであったばらばらの細胞の一部の画像スクリーンショットである。2 値の画像化されたデータ 5 7 6 は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2 値の画像化されたデータ 5 7 6 は、細胞に対応している。細胞をマーキングしていない 2 値の画像化されたデータ 5 7 8 は細胞を表していないデータを示している。1 ピクセル幅境界を抽出する際に、黒および白の両方の隣接点を有するすべての黒点はそれらの黒色を保持するように選択される。両方の色の隣接点を持たない黒点は白に変換される。これにより、数ピクセル幅の場所にある粗い境界ができる。次に、細線化プロセスを適用して、調査データ内の形状の輪郭に 1 ピクセルだけが残るまで境界の余分な点を除去する。細線化プロセスは、それぞれの黒領域の境界を区画するのが 1 ピクセル幅の線だけになるまで、境界から冗長な黒点を除去する。

### 【 0 1 8 9 】

細線化プロセスは、まず粗い境界から出発する。粗い境界は、細胞の内側および外側の両方の隣接ピクセルを含むすべてのピクセルからなる。粗い境界の抽出後、データは次の 3 つのカテゴリからなる。

- (1) 細胞の内部のピクセル、
- (2) 細胞の境界を区画するピクセル、および
- (3) 細胞の外部にあるピクセル。

これらの 3 つのカテゴリは、次の 3 つの条件によって関連づけられている。

(A) 3 つともすべて連結である、

(B) (1) は (2) によって (3) から切断されている、そして最後に、

(C) (2) の各点は (1) または (2) に隣接点を持つが、その両方には持たない。

次に、細線化プロセスは、(2) 内のピクセルを 1 個ずつ調べる。(2) 内のピクセル P が (1) または (3) に隣接点を有する場合、P の色を（例えば黒から白へ）付け替えて (2) から (1) または (3) に移しても条件 (A)、(B)、および (C) が保たれるかどうかのチェックを実行する。保たれる場合、色の付け替えを行う。この色の付け替えは、各細胞について 1 ピクセル幅の境界が得られるまで実行される。

### 【 0 1 9 0 】

1 ピクセル幅境界が抽出された後、1 ピクセル幅境界によって画定される領域を黒点で塗りつぶす（ステップ 4 8 8、図 5 6 B）。図 6 1 は、本方法によるコンポーネントを塗りつぶすステップ 4 8 8 を実行した後の、当初は図 5 6 A に示されている通りであったばらばらの細胞の一部の画像スクリーンショットである。2 値の画像化されたデータ 5 7 6 は調査対象のデータをマーキングしている。この場合、2 値の画像化されたデータ 5 7 6 は細胞を示している。細胞をマーキングしていない 2 値の画像化されたデータ 5 7 8 は細胞

を表していないデータを示している。この白黒の点集合をマスクとして用いて、もとのデータ点を充填して黒点を置き換える（ステップ 490、図 56B）。こうして、細胞領域が分離され、計数が可能となる。一実施形態では、調査データ内の分離された領域に畳込みを適用して、局所最大値をマーキングし細胞を同定する。前に示した実施形態と同様、円形近傍との畳込みを適用することができる。畳込みで使用される円形近傍のサイズはおよそ細胞のサイズであるので、局所最大値は細胞の中心であると判断することができる。図 62 は、調査データを塗りつぶすステップの後の、当初は図 56A に示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。画像化された調査データ 572 は捕捉された細胞をマーキングしている。最後に、図 63 に、図 56B のステップ 492 によって計数され十字印でマーキングされた細胞を示す。画像化された調査データ 572 は捕捉された細胞に対応する。十字印 580 は計数された細胞をマーキングしている。図 63 は凝集した細胞のみを示しているが、図 64 は、単一細胞およびいくつかの凝集した細胞領域で疎に充填されたサンプルに、絶対値計数方法を適用したものを見ている。これも同様に、画像化された調査データ 572 は捕捉された細胞に対応し、十字印 580 は計数された細胞をマーキングしている。

#### 【0191】

本発明の別の実施形態は、細胞計数のために区画された評価矩形の画面表示を増強する。細胞計数の過程で、評価矩形の画像をユーザに対して表示するのが望ましいことがある。サンプルの可視表現を提供することに加えて、高品質画像が、細胞を計数し分析するためにはどの方法を使用すべきかをユーザが決める際に役立ち得る。例えば、明確な画像が、輝中心のない多くの細胞が存在することをユーザに警告するかもしれない。そこで、ユーザは暗縁法でも細胞を計数することを選択することができる。本実施形態は、高速フーリエ変換により画像の品質を向上させる。本開示を考慮すれば当業者には理解されるように、高速フーリエ変換（FFT）はフーリエ変換（FT）の一変種である。フーリエ変換のいかなる変種もここで同様に適用可能である。フーリエ変換についてはバックグラウンド照度均一化に関連して前に説明した。図 65 は、本発明のこの実施形態を説明するフローチャートを提供している。ステップ 520 で、調査データに対して高速フーリエ変換を実行する。調査データは周波数領域に変換される。次にステップ 522 で、周波数領域におけるスペクトルの一部を除去する。最後にステップ 524 で、逆変換を実行する。図 66 に、高速フーリエ変換前の調査データ例を示す。画像化された調査データ 572 は捕捉された細胞を表している。図 67 に、高速フーリエ変換後の同じ調査データを示す。画像化された調査データ 572 は捕捉された細胞を示し、十字印 580 は計数された細胞をマーキングしている。こうして画面表示が増強される。

#### 【0192】

本発明の別の実施形態は、ウィンドウ領域の画面表示を扱う。ウィンドウ付きディスク上の細胞計数の過程で、ウィンドウ領域をユーザに対して表示するのが望ましいことがある。時には、ウィンドウ領域の画像は図 68 に示すように歪んでいる。ウィンドウ領域を正しく表示するためには、歪みを補正する必要がある。補正方法の第 1 ステップは歪みの方向を求める。この歪みを求めるステップは、ウィンドウが、それ以外の暗いバックグラウンド（ここでは便宜上、白で示す）内にある明るい領域であることを利用する。用語を明確にするため、ウィンドウとは、上下に半円が付いた矩形であり、この矩形の幅を以下ではウィンドウの幅と呼ぶ。歪みを求めるステップは以下のように進行する。まず、画像のラインごとにその上の点を数値微分する。これは、あらゆる点（x, y）に対して、（x - dx, y）から（x, y）までの区間内のすべての点の平均値を（x, y）から（x + dx, y）までの区間内の平均値から減算することを意味する。ここで dx は、雑音を除去するように選択された特定の区間長である。

#### 【0193】

ウィンドウと重なる画像のラインについて、この減算の結果は、ウィンドウの左の境界で極大値をとり、右の境界で極小値をとる。この理由は、明るいウィンドウ内の平均値は暗いバックグラウンド内の平均値よりはるかに高いからである。ウィンドウの外部にある画

10

20

30

40

50

像のラインにおいては、これらの最大値および最小値はどこか他の任意の場所で起こり得る。というのは、平均値は暗いバックグラウンドから、おそらくは多少雑音を伴って得られるからである。この性質を利用して、次のステップでは、最大値と最小値の間の距離Dをラインごとに計算する。次に、プロセスは、標準ウィンドウ幅に近いDの値を有するラインを選択する。その後、これらの選択されたラインにおける最大点をマーキングする。最後に、これらの最大点の全体に直線を当てはめる。この直線の方向が歪みの方向である。図69に、求められた方向直線とともに結果を示す。最後に、この方向直線をガイドとして用い、すべての点をそれに従って移動して、歪みを補正する。画像は正しく配列され、図70に示すようにユーザに対して表示される。

## 【0194】

10

本発明の一実施形態は、調査データから泡トラックを除去する方法に関わる。時には、空気泡がディスク上のチャネル内にトラップされることがある。空気泡は、サンプル中を通過し、それが捕捉ゾーンを通る間にその経路上の一部の細胞を除去する。この細胞の除去が不整な細胞分布を引き起こすかもしれない。報告される最終結果は1平方ミリメートル( $\text{mm}^2$ )の面積当たりの細胞数の形式であるので、このような不整細胞分布は補正しなければならない。補正は以下のように実行される。図71Aにプロセスのフローチャートを示す。ステップ540で、細胞計数を前述のように実行する。次にステップ542で、細胞の分布を分析する。ステップ544で、細胞の局所密度が小さすぎる領域を無視する。というのは、これらの領域内の細胞は泡によって拭い去られた可能性が高いからである。

20

## 【0195】

一実施形態では、計数される領域全体を、ボックスからなるグリッドに分割する。図71Bにその一例を示す。画像化された調査データ572は捕捉された細胞(円で表す)をマーキングしている。泡トラック548が、ボックス550、552、554、および556を境界とする領域を通り抜けている。トラック548より幅広い、もう1つの泡トラック558が、ボックス560、562、および564を境界とする領域を通り抜けている。これらのボックスを境界とする領域は無視される。このような領域を無視した後、図71Aのステップ546で、細胞数を再計算する。図71Cおよび図71Dに泡トラックの例を示す。図71Cは、顕微鏡倍率5倍で見たサンプルを通る泡トラック(トラック548および558を含む)を示している。図71Dは、もう1つの例を示しており、サンプルを通る泡トラック548が顕微鏡倍率40倍で示されている。

30

## 【0196】

I I I . 白血球計数方法

図72は、血液サンプル中のCD4+およびCD8+のリンパ球の絶対数およびCD4+/CD8+リンパ球数の比の迅速な決定のため的一般的な均質固相細胞捕捉検定法が本発明の方法を利用してどのように実行され得るかの一例を提供している。バイオディスクに組み込まれた小さいフローチャネル内で行われる検査が、全血から単離された7~15 $\mu\text{l}$ の单核細胞(MNC)中の、捕捉ゾーン上の特異抗体によって捕捉されたCD4+、CD8+、CD2+、CD3+、CD19+、およびCD45+細胞の数を決定する。検査は、ディスク上の局在位置での特異細胞捕捉の原理に基づいている。特定の血球表面抗原に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体に基づく捕捉化学物質を局在させることにより、いくつかの特異細胞捕捉ゾーンをディスク上に作成する。25~100 $\mu\text{l}$ チャンバーをMNC血(10,000~30,000細胞/ $\mu\text{l}$ )で満たした後、CD4、CD8、CD2、CD3、CD19、およびCD45抗原を発現している細胞をディスク内の捕捉ゾーンに捕捉する。捕捉ゾーン内には、画定した負および正の対照領域も組み込まれる。

40

## 【0197】

図72のステップ1で、血液(4~8 $\text{m}\text{l}$ )を、4または8 $\text{m}\text{l}$ のBecton Dickinson CPT Vacutainer(商標)およびEDTA、ACD、またはヘパリン等の抗凝固剤中に直接採取する。本発明の別の実施形態の等価なステップでは、抗凝固剤中の血液3 $\text{m}\text{l}$ をHistop

50

aque 1077のような分離勾配 176 を含むチューブ 172 内に重層する。いずれの場合でも、血液サンプル 174 は採取から 2 時間以内に使用するのが好ましい。分離勾配 176 に血液サンプル 174 を重層したものを含むチューブ 172 を、水平ローターおよびスイングパケットを備えたバイオハザード遠心機で、1,500 ~ 1,800 RCF (2,800 rpm) で室温で 25 分遠心する。遠心後、単核細胞 (MNC) 分画 180 の上に血漿を約 2 mm 残して血漿層 178 を除去する (ステップ 2)。MNC 層 180 を採取し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄する。残っている血小板を除去するために、細胞を 300 RCF (1200 rpm) で室温で 10 分遠心してペレットにする。上澄みを除去してから、チューブを軽くたたいて MNC ペレット 180 を PBS 中に再懸濁する。最終ペレット 180 を、バイオディスク 110 のフローチャネル 130 の高さに応じて、細胞数 10,000 ~ 30,000 細胞 / μl に再懸濁する (ステップ 3)。

10

20

**【0198】**  
バイオディスク 110 のフローチャネル 130 を 7 μl の MNC 懸濁液で満たし、チャンバーの入口 122 および通気口 124 (図 3 および図 5) を密封タブで密封する (ステップ 4)。バイオディスク 110 を室温で 15 分培養してから、光ドライブ 112 で 780 nm レーザを用いて走査し、捕捉視野を画像化する (ステップ 5)。透過バイオディスク 110 を使用する場合、光ドライブ 112 は、捕捉視野を画像化するための上部検出器 158 (図 10A) を任意に含むことを理解されたい。好ましくは、以下の作業を自動的に実行するようにドライブに命令するためのソフトウェアがディスク上に符号化される：(a) 1 つまたは複数の段階で、ディスクを遠心して余分な結合していない細胞をスピン除去し、(b) 特異捕捉ウィンドウをディスプレイモニタ 114 上に画像化し、(c) データを処理する。データ処理としては、各捕捉ゾーン内の特異的に捕捉された細胞を計数すること、および CD4+ / CD8+ の比等の適宜プログラムされ得る所要の計数または比を導出することがあるが、これに限定されない。

20

30

**【0199】**  
さらに図 72 に示されているように、本発明は、光ディスクおよびディスクドライブを用いて表面抗原 (cluster designation) 計数を実行する方法に関する。本方法は、分離勾配を含む第 1 チューブに血液サンプルを提供するステップと、血液サンプルを各層に分離するのに十分な時間および速度で第 1 チューブを回転させるステップと、T 細胞を含む MNC 層を再懸濁して MNC 懸濁液を形成するステップと、少なくとも 1 種の捕捉剤を含む少なくとも 1 つの捕捉ゾーンを含むディスク面上に MNC 懸濁液のサンプルを用意するステップと、ディスクを光リーダに装填するステップと、ディスクを回転させるステップと、捕捉ゾーンに電磁放射の入射ビームを当てるステップと、捕捉ゾーンでディスクと相互作用した後に形成される電磁放射のビームを検出するステップと、検出されたビームを出力信号に変換するステップと、出力信号を分析して捕捉ゾーンに捕捉された細胞の数に関する情報を抽出するステップとを含む。この方法の一実施形態では、捕捉ゾーンに当てられ細胞と相互作用する光が反射されるように、光ディスクは反射層を備えて構成される。この方法の別の実施形態では、光ディスクは、捕捉ゾーンに当てられ細胞と相互作用する光が光ディスクを透過するように構成される。

30

40

**【0200】**  
分析 / 処理ステップ中に、ソフトウェアは各捕捉ゾーン画像を読み出し、細胞画像に遭遇するごとにそれをマーキングする。例えば、ソフトウェアは、CD4+ および CD8+ の細胞数の推定後、CD4+ / CD8+ の細胞数の比を計算し、全血 1 マイクロリットル当たりの CD4+、CD8+、CD3+、および CD45+ 捕捉ゾーン内の細胞の絶対数とともに CD4+ / CD8+ 比を表示する。プロセス全体にかかる時間は、ディスクを光ドライブに挿入してから個数および比を得るまで約 12 分である。

40

**【0201】**  
一実施形態では、ディスクは、符号化情報層として 300 nm の金で被覆したフォワード ウォブルセット (forward Wobble Set) FDL 21 : 13707 または FDL 21 : 1270 CD-R ディスクである。反射ディスク上に、サイズ 2 × 1 mm の長円形の観察窓

50

ンドウを反射層から既知のリソグラフィ技法によりエッティングする。透過ディスクのいくつかの設計では、別個の観察ウインドウはエッティングされず、ディスク全体が利用可能である。接着層は、F r a y l o c k 接着剤 D B L 2 0 1 R e v C 3 M 9 4 6 6 1 である。カバーは、直径 0 . 0 4 0 インチのサンプル入口 4 8 個が半径 2 6 m m で等間隔に配置された透明ディスクである。データディスクは、C D 4 + / C D 8 + 計数ソフトウェアを用いて、4倍速、サンプルレート 2 . 6 7 M H z でソフトウェアにより走査され読み出される。

### 【 0 2 0 2 】

#### I V . 結論

以上、実験室サンプル中の細胞を画像化し、当該画像を分析する方法および装置が、1つまたは複数の特定の実施形態とともに記載されている。本発明は、いくつかの好ましい実施形態を参照して詳細に説明されているが、本発明は記載通りの実施形態に限定されないことが理解されるべきである。むしろ、本発明を実施するための現在の最良の形態を記載している本開示を考慮すれば、当業者には、多くの変更および変形が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく自ずから明らかとなるであろう。したがって、本発明の範囲は、上記の説明によってではなく添付の特許請求の範囲によって示される。請求項の均等の意味および範囲内に入るすべての変化、変更、および変形は、特許請求の範囲内にあるとみなされるべきである。

#### 【 図面の簡単な説明 】

### 【 0 2 0 3 】

【図1】本発明によるバイオディスクシステムの画像表示である。

【図2】本発明とともに利用される反射バイオディスクの分解斜視図である。

【図3】図2に示したディスクの上面図である。

【図4】ディスクの相異なる層を切取断面で示した図2および図3のディスクの斜視図である。

【図5】本発明とともに使用される透過バイオディスクの分解斜視図である。

【図6】図5に示したディスクの上面図である。

【図7】図8に示すタイプの半反射層を含むディスクの相異なる層を切取断面で示した図5および図6の透過ディスクの斜視図である。

【図8】ディスクの半反射層の機能的態様を切取断面で示した図7のディスクを表す斜視図である。

【図9】金被膜の厚さと透過率の関係を示すグラフィカル表示である。

【図10A】本発明の一実施形態によるシステムの動作を示す斜視ブロック図表示である。

【図10B】本発明の一実施形態による分割検出器および透過バイオディスクの断面を示す図である。

【図11】形成されたフローチャネルを示す図2、図3および図4の反射光バイオディスクの半径に垂直にとった部分断面図である。

【図12】形成されたフローチャネルおよび单一の上部検出器を示す図5、図6および図7の透過光バイオディスクの半径に垂直にとった部分断面図である。

【図13】形成されたウォブル溝を示す図2、図3および図4の反射光バイオディスクの部分縦断面図である。

【図14】形成されたウォブル溝および上部検出器を示す図5、図6および図7の透過光バイオディスクの部分縦断面図である。

【図15】反射ディスクの全厚およびその初期屈折特性を示す図11に類似の図である。

【図16】透過ディスクの全厚およびその初期屈折特性を示す図12に類似の図である。

【図17】本発明の方法を用いたバイオディスクからのデータ収集のプロセスを示すフローチャートである。

【図18】サンプリングされたアナログ信号から一次元配列として格納される対応するデジタル信号への変換の画像グラフィカル表示である。

10

20

30

40

50

【図19】光バイオディスクのトラックを基準として配置されている捕捉白血球が入射ビームとの相互作用後に信号含有ビームを生じる様子を示す光ディスクの斜視図と、指示部分の拡大詳細図である。

【図20】Aは、本発明による光バイオディスクのトラックを基準として配置されている白血球のグラフィカル表示である。Bは、本発明による図20Aの白血球から導出される一連のシグネチャトレースである。

【図21A】図21AからDを統合すると、図20Bのシグネチャトレースから、一次元配列として格納されデータ入力用に2次元配列へと組み合わされるデジタル信号への変換の画像グラフィカル表示である。

【図21B】図21AからDを統合すると、図20Bのシグネチャトレースから、一次元配列として格納されデータ入力用に2次元配列へと組み合わされるデジタル信号への変換の画像グラフィカル表示である。

【図21C】図21AからDを統合すると、図20Bのシグネチャトレースから、一次元配列として格納されデータ入力用に2次元配列へと組み合わされるデジタル信号への変換の画像グラフィカル表示である。

【図21D】図21AからDを統合すると、図20Bのシグネチャトレースから、一次元配列として格納されデータ入力用に2次元配列へと組み合わされるデジタル信号への変換の画像グラフィカル表示である。

【図21E】図21A、図21B、図21C、および図25Dの間の関係を示すグラフィカル表示である。

【図22】本発明の処理方法および計算アルゴリズムによるデータ評価のためのステップを示すフローチャートである。

【図23】本発明の一実施形態による評価矩形を選択することに關与するステップを示すフローチャートである。

【図24】本発明の特定の一実施形態によるソフトウェアによって表示されるウィンドウ付きバイオディスクのグラフィカル表示である。

【図25】本発明の一実施形態によるウィンドウ付きバイオディスクから収集された調査データについてウィンドウを見つけることに関与するステップを示すフローチャートである。

【図26】本発明の一態様によるしきい値を見つける目的で走査プロセスを受ける調査データ配列からの例的行を示す図である。

【図27】本発明のもう1つの態様による調査データから連結コンポーネントを抽出することに關与するサブステップを示すフローチャートである。

【図28】本発明の一実施形態によるソフトウェアディスプレイ上でウィンドウを見つけた後、評価矩形をクロッピングした結果を示す図である。

【図29】捕捉された細胞を有するウィンドウおよびターゲットゾーンのないディスク上のダークスポット例を示す図である。

【図30】本発明の一実施形態による、細胞を見つけるためにウィンドウなしディスクでダークスポット例がどのように利用されるかを示す図29に類似の図である。

【図31】本発明のいくつかの態様による調査データに対してバックグラウンド照度均一化を実行することに關与するステップを示すフローチャートである。

【図32】本発明のソフトウェアによって表示されるバックグラウンド照度均一化前の調査データの一例を示す図である。

【図33】本発明のソフトウェアによって表示されるバックグラウンド照度均一化後の調査データの一例を示す図である。

【図34】本発明の一特定実施態様による調査データに対して規格化を実行することに關与するステップを示すフローチャートである。

【図35】規格化ステップ中にソフトウェアによって表示される調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

【図36】本発明のソフトウェアによって表示される規格化後の調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

10

20

30

40

50

カル表示を示す図である。

【図37】本発明の好ましい一実施形態による調査データ例に対してフィルタリングを実行することに関与するステップを示すフローチャートである。

【図38】本発明のソフトウェアによって表示されるフィルタリングステップ後の調査データ例のグラフィカル表示である。

【図39】図38のグラフィカル表示の拡大図および付随する点の値グラフトレースである。

【図40】本発明のいくつかの態様の特定の実施形態による調査データから不要コンポーネントを除去することに関与するステップを示すフローチャートである。 10

【図41】本発明のソフトウェアによって表示されるクラックの除去前の調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

【図42】本発明のソフトウェアによって表示されるクラックの除去後の図41の調査データ例のグラフィカル表示である。

【図43】本発明の輝中心法による細胞をマーキングし計数することに關与するステップを示すフローチャートである。

【図44】輝中心法により計数された細胞で満たされた調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

【図45】図44のグラフィカル表示の一部の拡大図および値グラフトレースである。

【図46A】本発明の暗縁法による細胞をマーキングし計数することに關与するステップを示すフローチャートである。 20

【図46B】シフトした円環との疊込みのグラフィカル表示である。

【図47】本発明のソフトウェアによって表示される、計数された細胞が十字印によってマーキングされている調査データ例のグラフィカル表示である。

【図48】本発明のさまざまな方法で利用されるアルゴリズムを用いて赤血球を抽出することに關与するステップを示すフローチャート例である。

【図49】図48に略述したアルゴリズムが実行される前の赤血球を含む調査データのグラフィカル表示を示す図である。

【図50】図48に略述したアルゴリズムの第1ステップが実行された後の図49の調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

【図51】図48に略述したアルゴリズムの第2ステップを適用した後の図49の調査データ例のグラフィカル表示である。 30

【図52】図48に略述したアルゴリズムの第3ステップが実行された後の図49の調査データ例を視覚的に示す図である。

【図53】図48に略述したアルゴリズムの第4ステップを実行した後の図49の調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

【図54】図48に略述したアルゴリズムの第5ステップの適用が実行された後の図49の調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

【図55】図48に略述したアルゴリズムによって計数された赤血球を示す拡大図である。 40

【図56A】本発明の絶対値計数方法によって計数される前のばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図56B】本発明の絶対値計数方法の一実施形態によって細胞を計数することに關与するステップを示すフローチャートである。

【図57】本発明の絶対値計数方法のこの実施形態による規格化およびフィルタリングのステップを実行した後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図58】本発明の絶対値計数方法によるバックグラウンド除去および2値化のステップを適用した後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図59】本発明の絶対値計数方法により規格化のステップが実行された後の、当初は図 50

56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図60】本発明の絶対値計数方法の例示的実施形態による1ピクセル幅境界抽出のステップを適用した後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図61】本発明の絶対値計数方法によるコンポーネントを塗りつぶすステップを実行した後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図62】本発明の絶対値計数方法のこの特定の実施形態による調査データを塗りつぶすステップを適用した後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

10

【図63】本発明の方法により計数され十字印によってマーキングされた後の、当初は図56Aに示されている通りであったばらばらの細胞の画像スクリーンショットである。

【図64】凝集した、およびばらばらの赤血球を計数することに適用された絶対値計数方法の結果を示す図である。

【図65】本発明の一代替実施形態による画像に対して高速フーリエ変換を実行することに関与するステップを示すフローチャートである。

【図66】本発明により高速フーリエ変換が実行される前の調査データ例のグラフィカル表示である。

【図67】高速フーリエ変換が実行された後の図66の調査データ例のグラフィカル表示を示す図である。

20

【図68】再配列前の調査データの歪んだグラフィカル表示の一例を示す図である。

【図69】図68のグラフィカル表示の歪み方向を示す図である。

【図70】再配列後の図68のグラフィカル表示を示す図である。

【図71A】泡トラック状況に対して細胞計数を補正することに関与するステップを示すフローチャートである。

【図71B】本発明のもう1つの態様による泡トラック状況に対して細胞計数を補正する画像表示である。

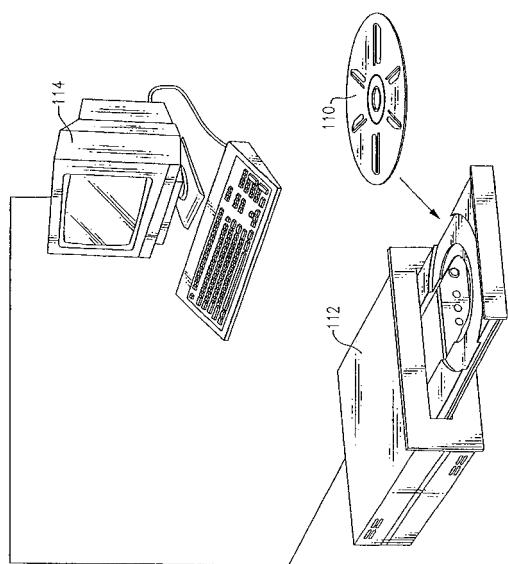
【図71C】顕微鏡倍率5倍で見られる捕捉された赤血球のターゲットゾーンを通る泡トラックの一例である。

【図71D】顕微鏡倍率40倍で見られる図71Cの泡トラックの1つおよび周囲の捕捉された赤血球の拡大図である。

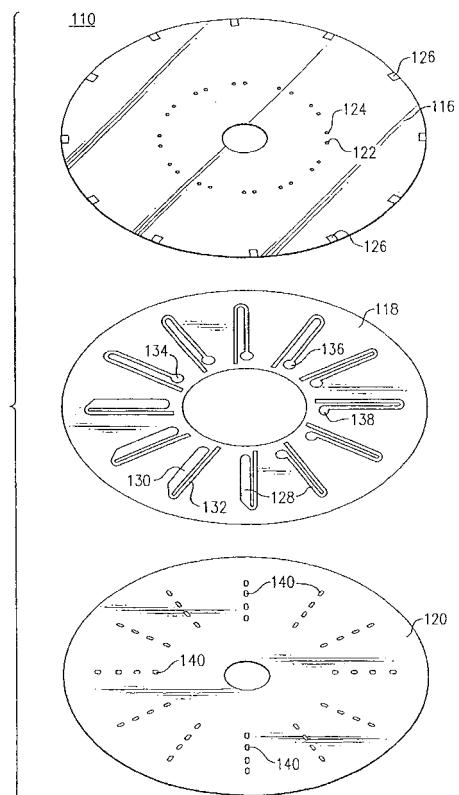
30

【図72】本発明の方法を用いた血液サンプルの分析を示す画像フローチャートである。

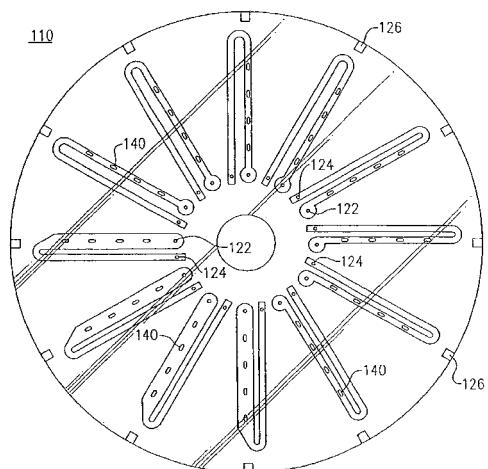
【図1】



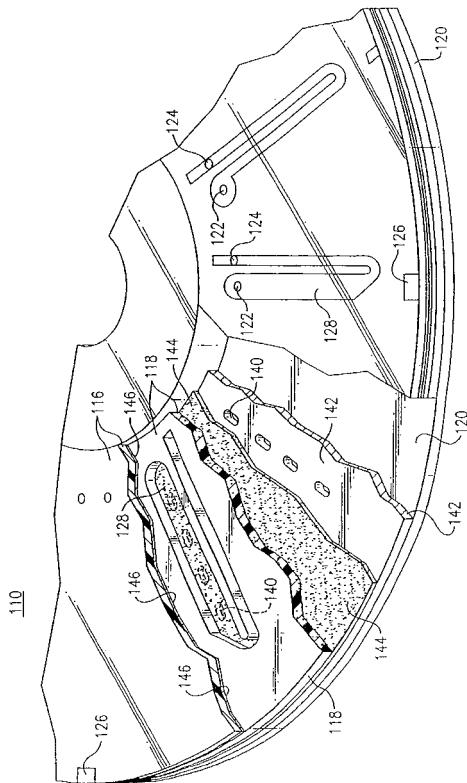
【図2】



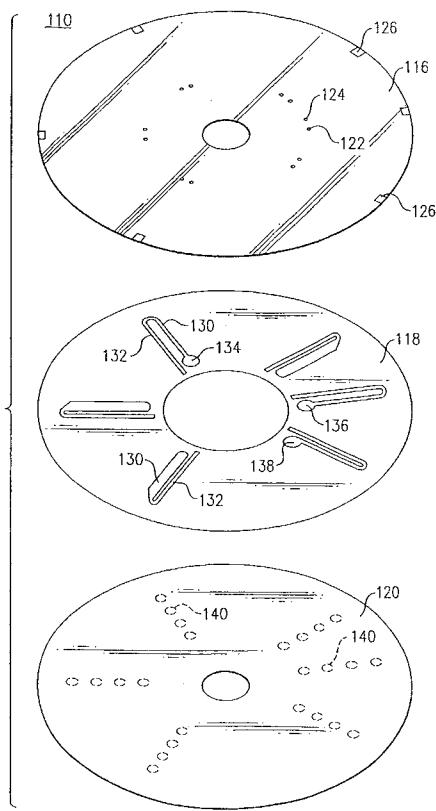
【図3】



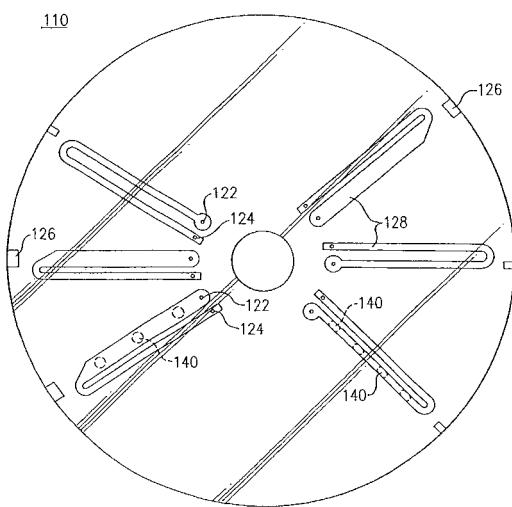
【図4】



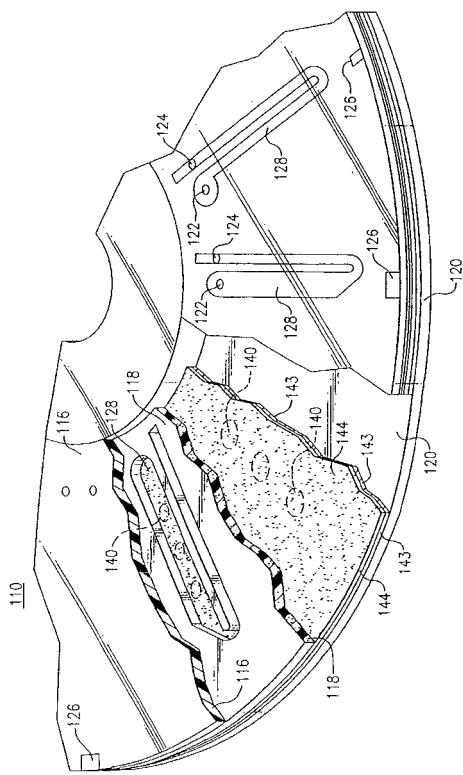
【図5】



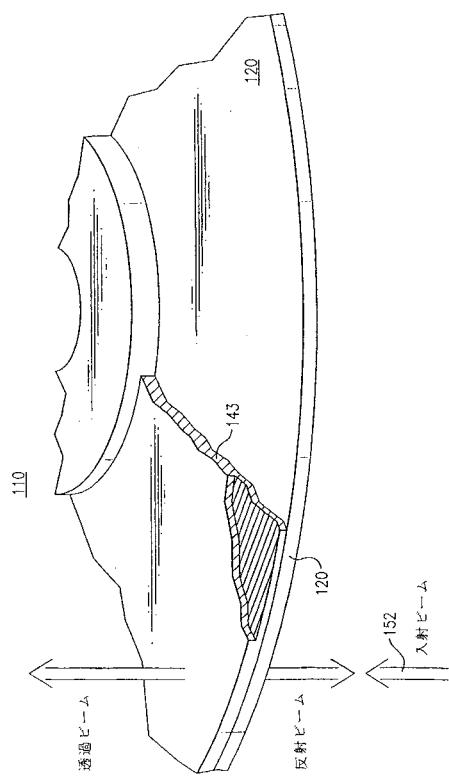
【図6】



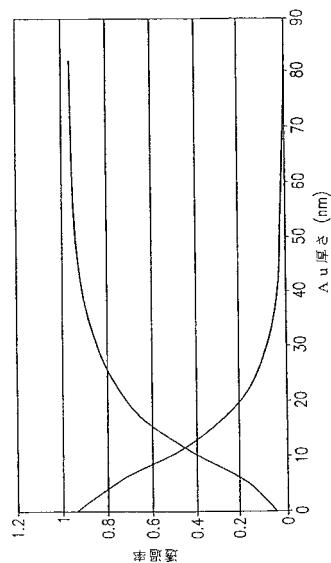
【図7】



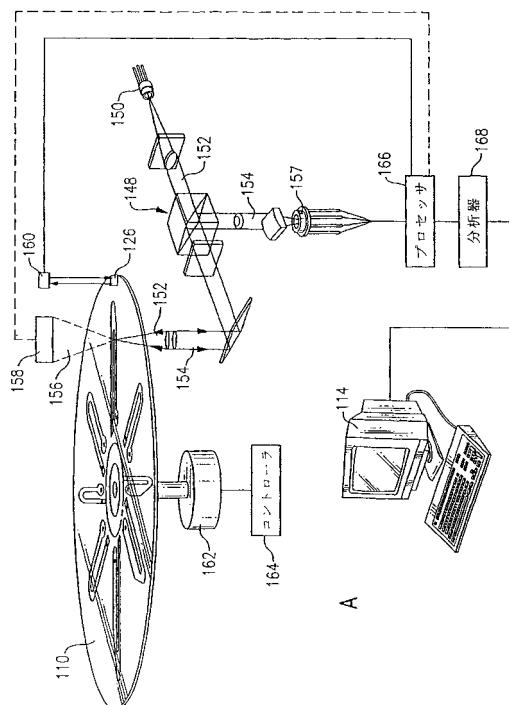
【図8】



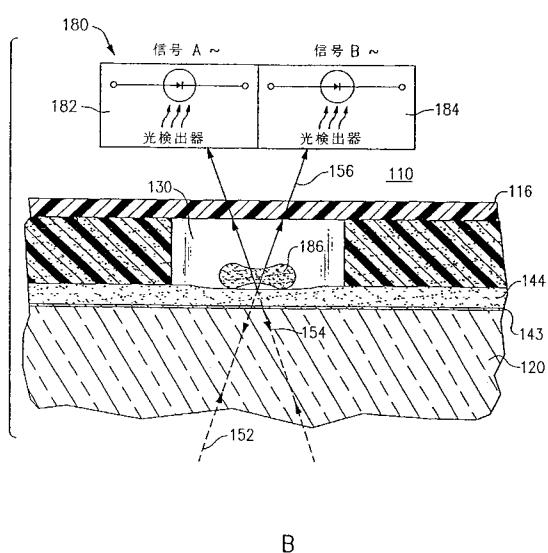
【図 9】



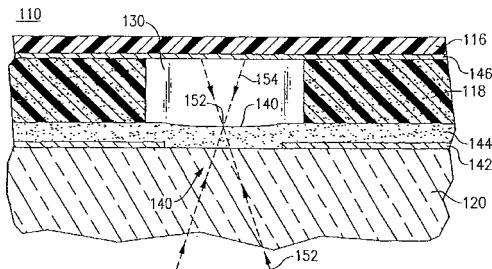
【図 10A】



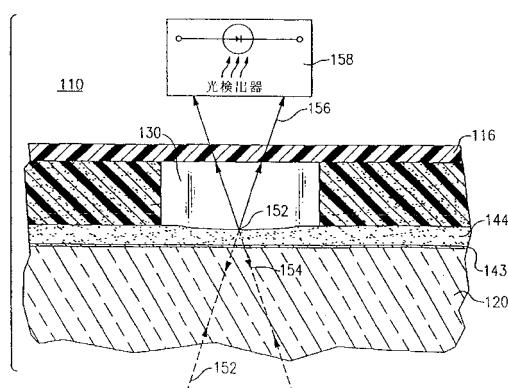
【図 10B】



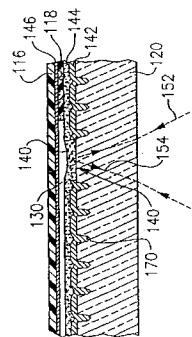
【図 11】



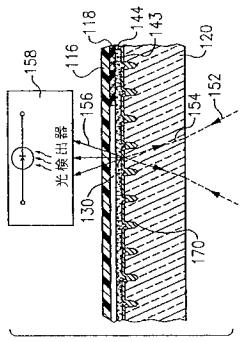
【図 12】



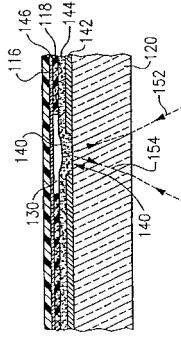
【図13】



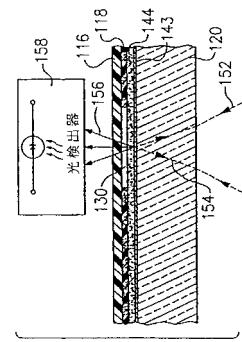
【図14】



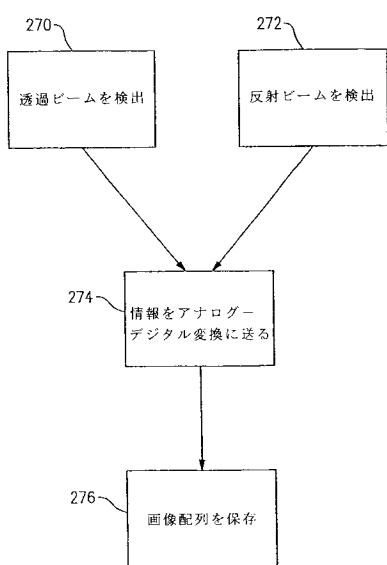
【図15】



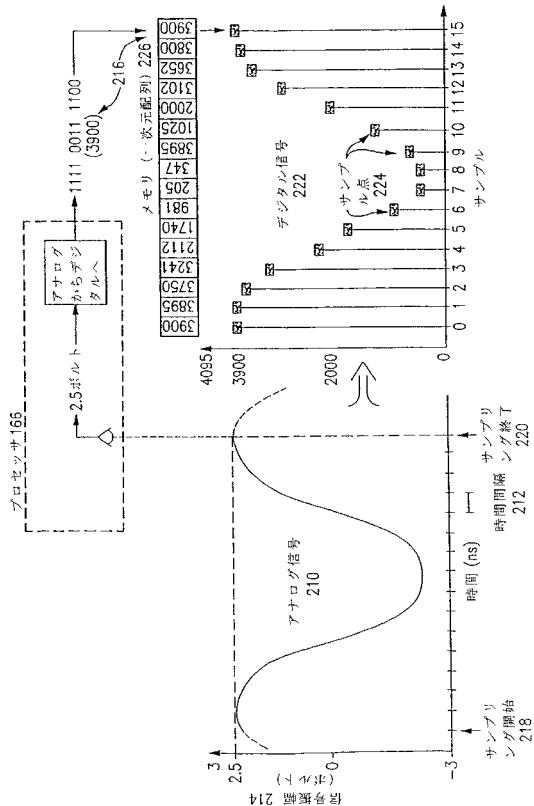
【図16】



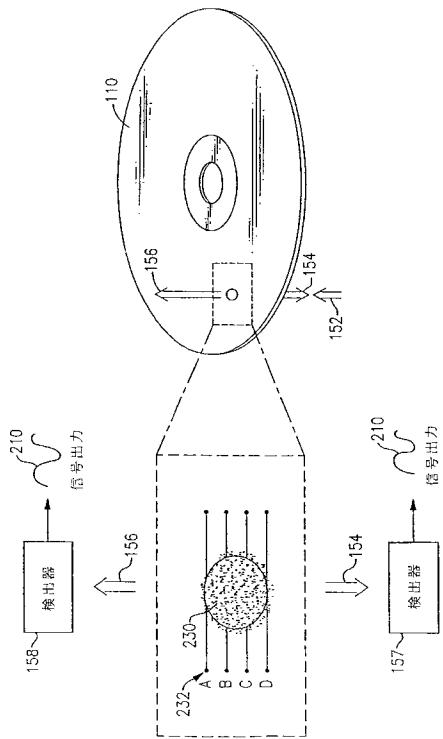
【図17】



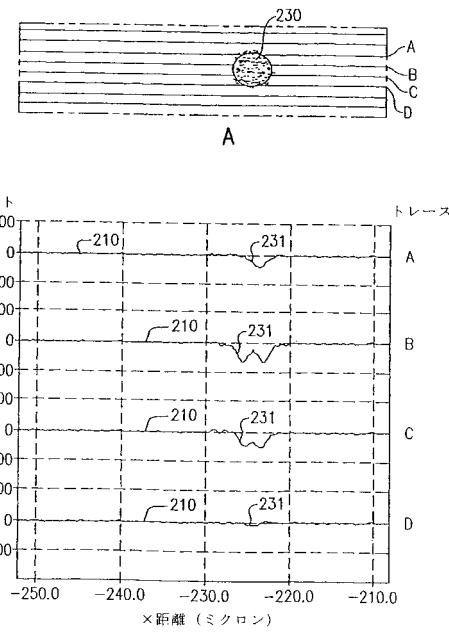
【図18】



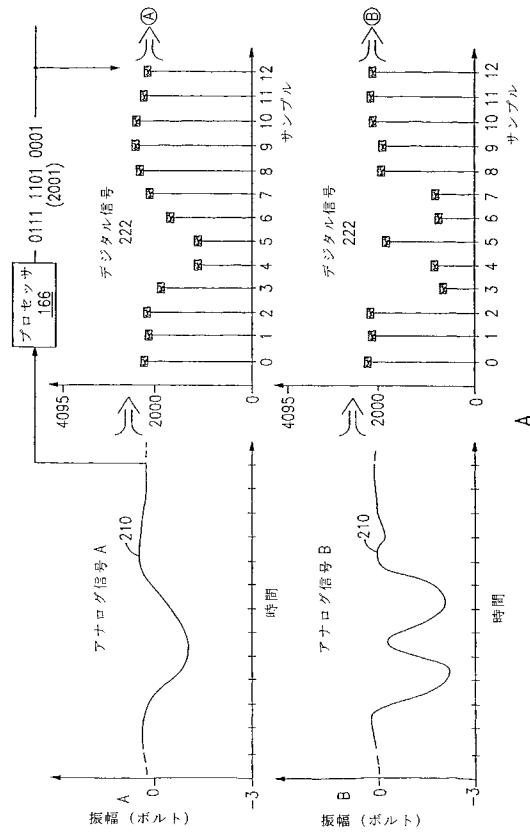
【 図 1 9 】



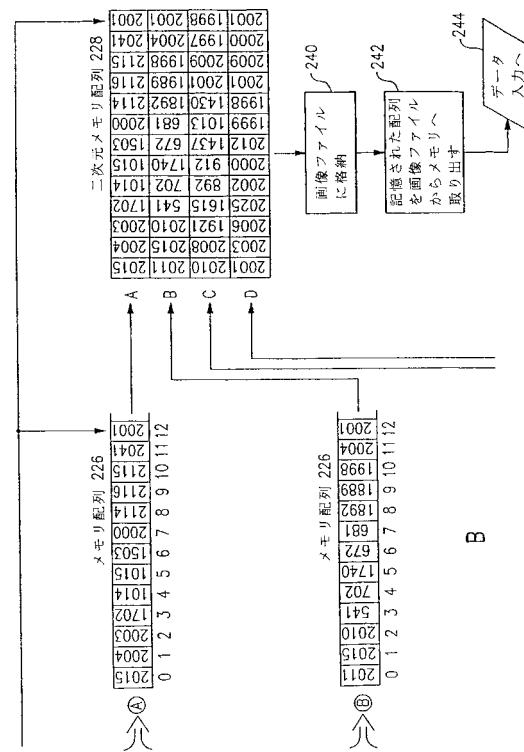
【 図 2 0 】



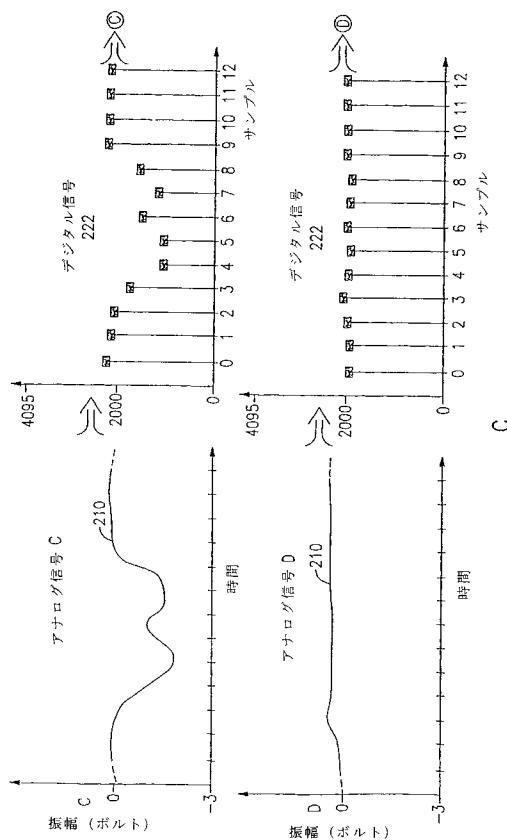
【図21A】



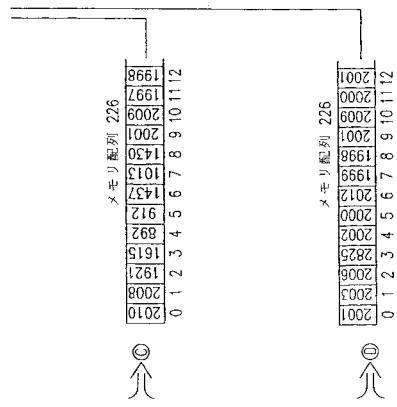
【図21B】



【図 2 1 C】

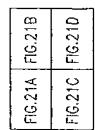


【図 2 1 D】



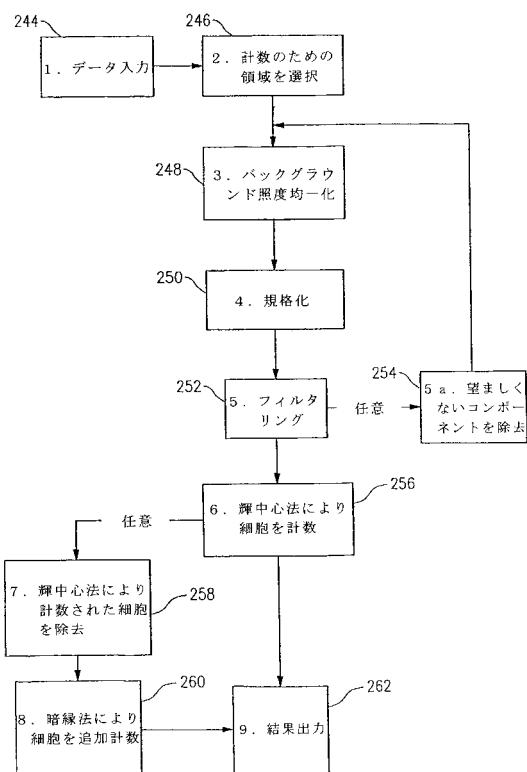
D

【図 2 1 E】

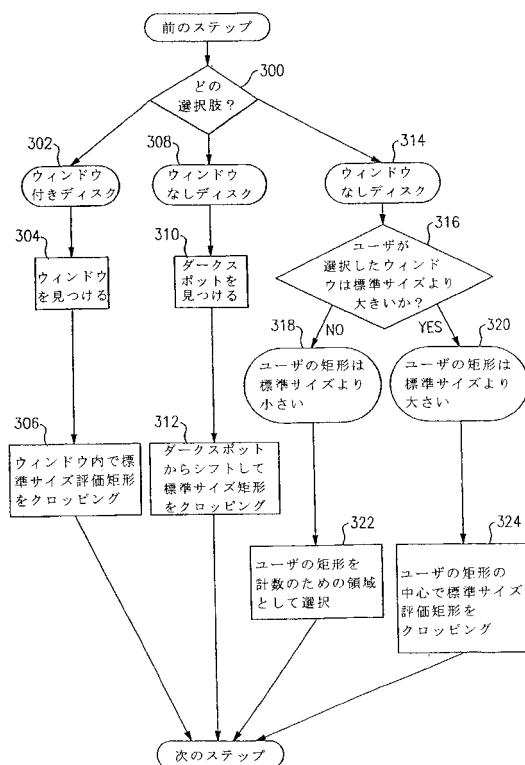


E

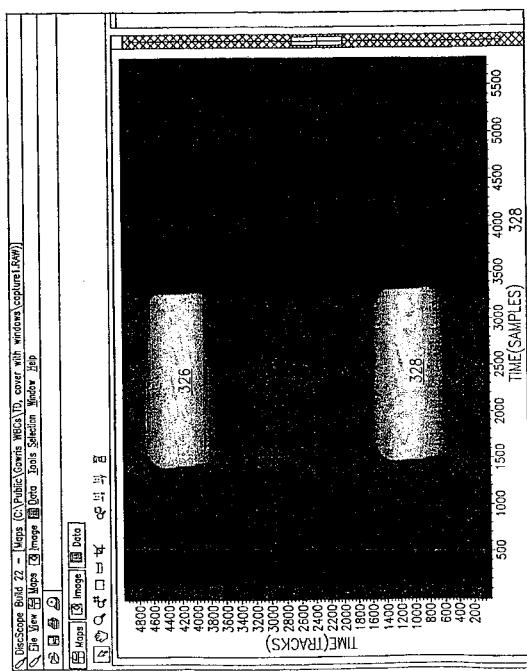
【図 2 2】



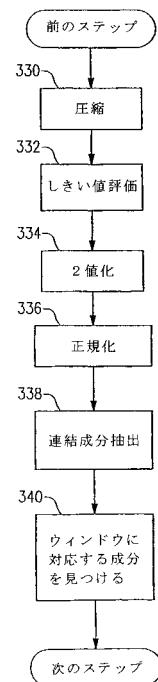
【図 2 3】



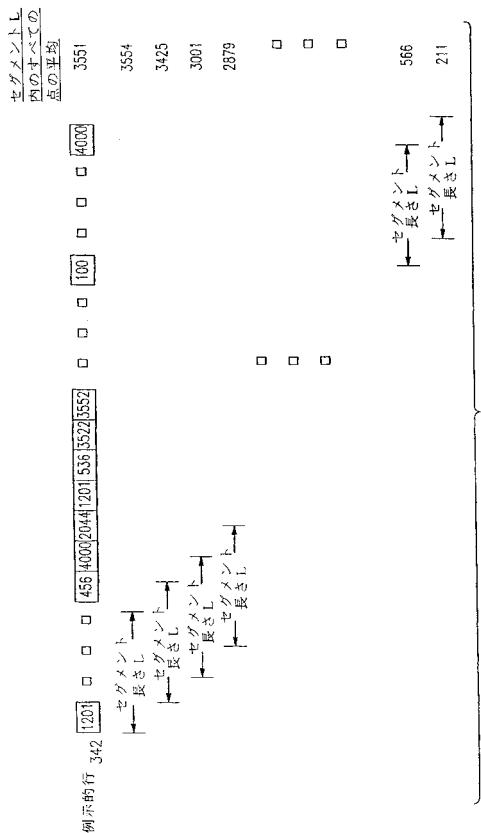
【図24】



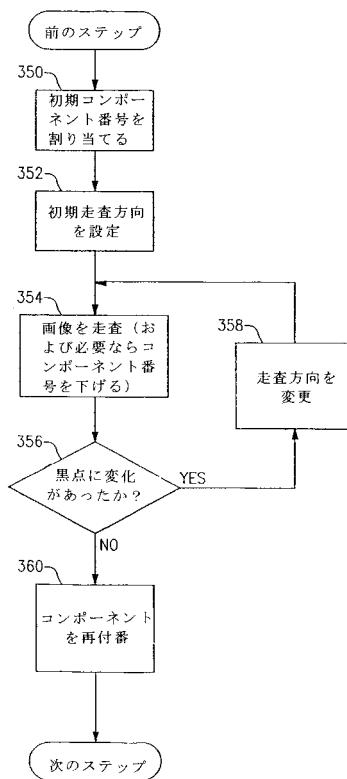
【図25】



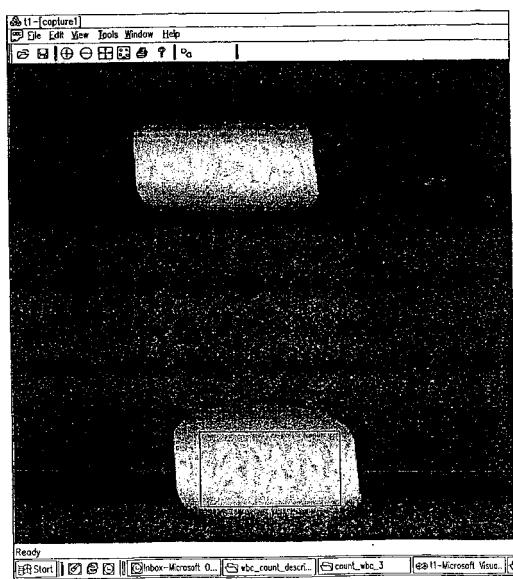
【図26】



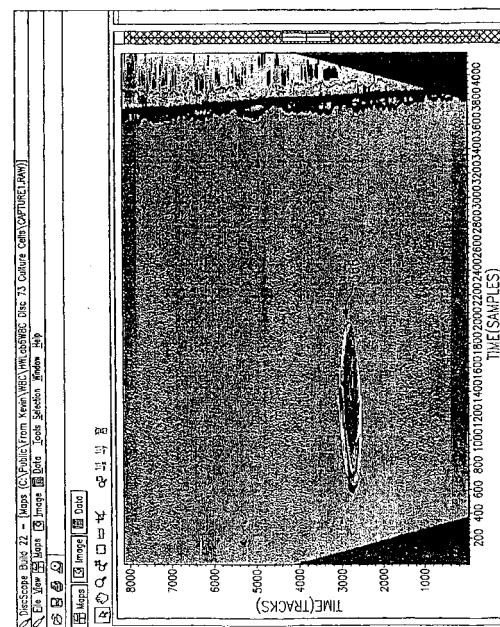
【図27】



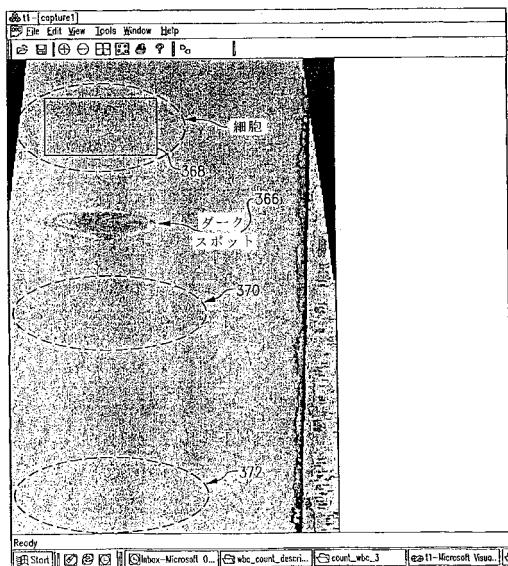
【図28】



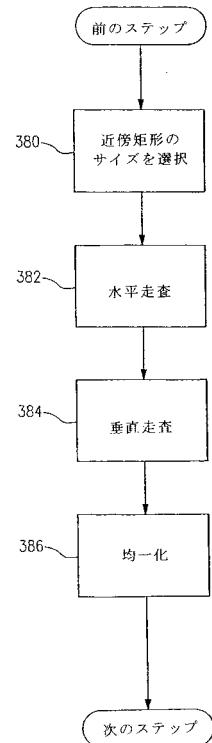
【図29】



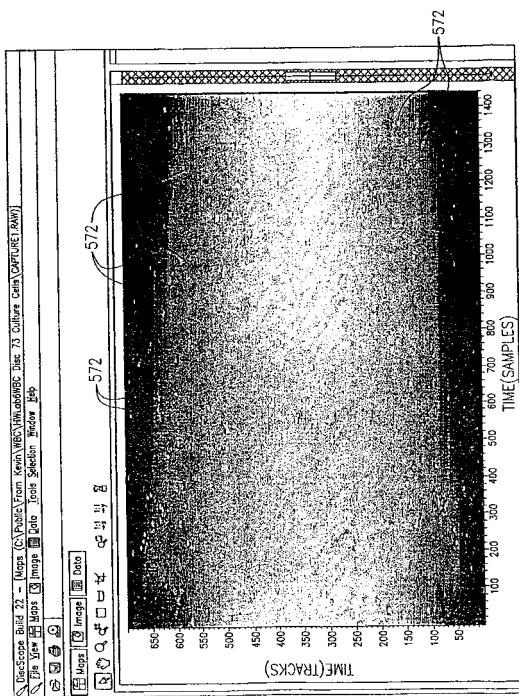
【図30】



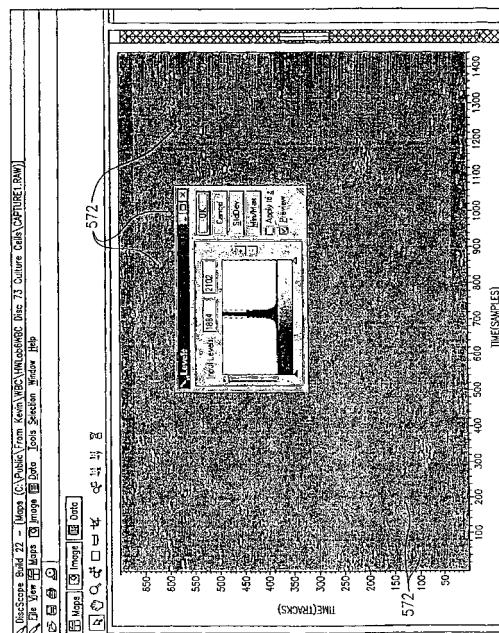
【図31】



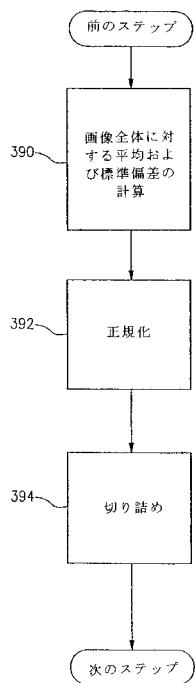
【図32】



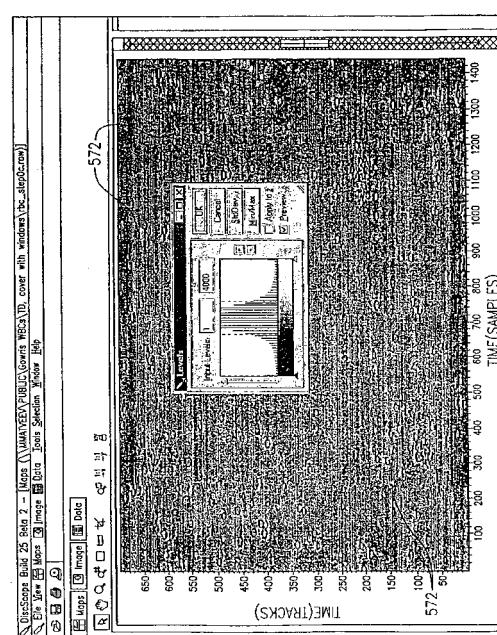
【図33】



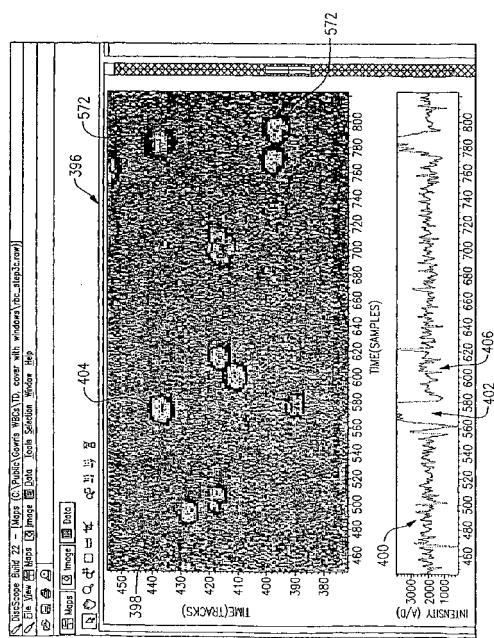
【図34】



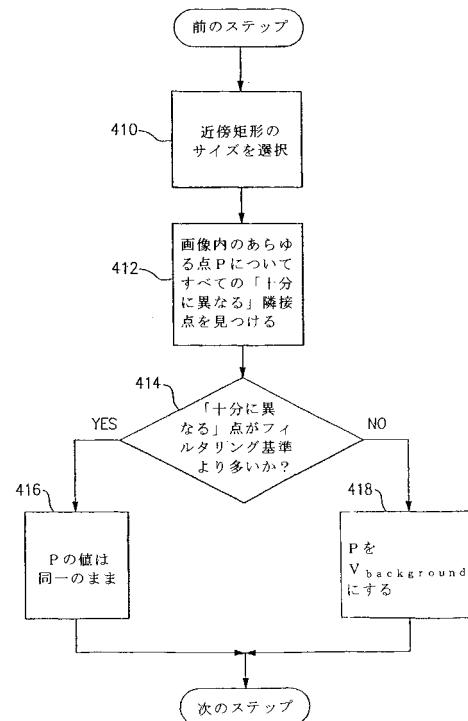
【図35】



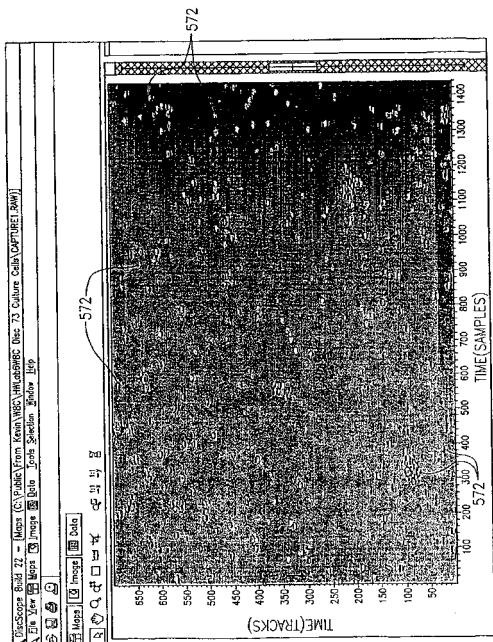
【図36】



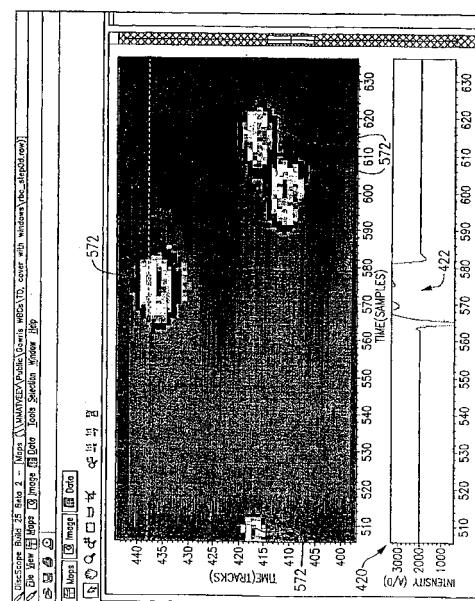
【図37】



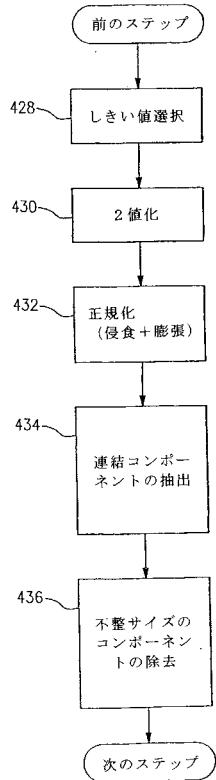
【図38】



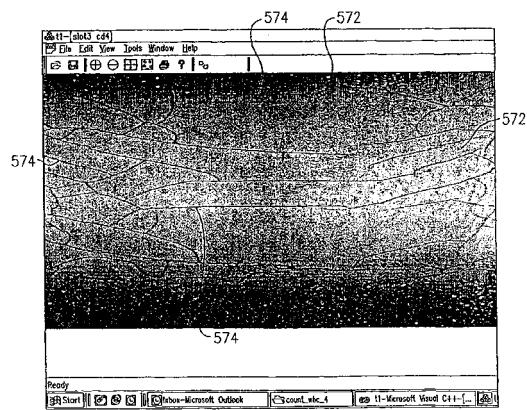
【図39】



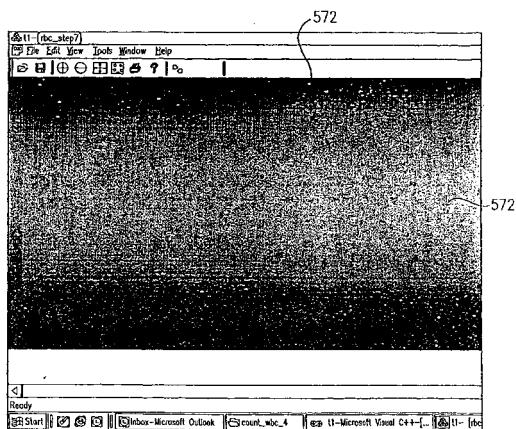
【図40】



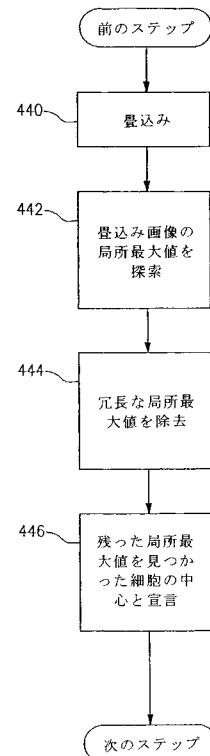
【図41】



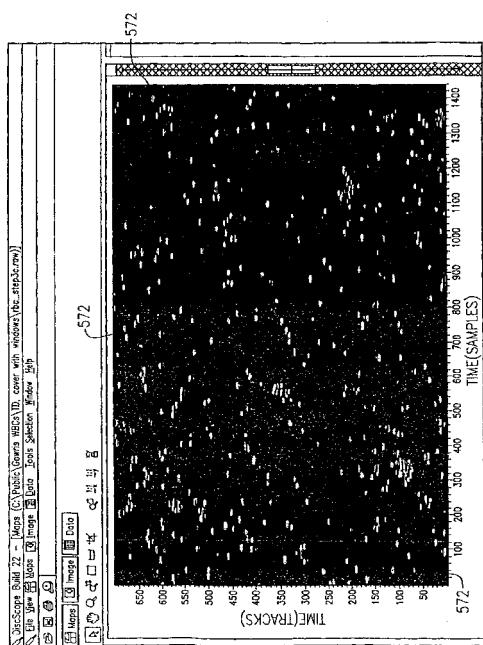
【図42】



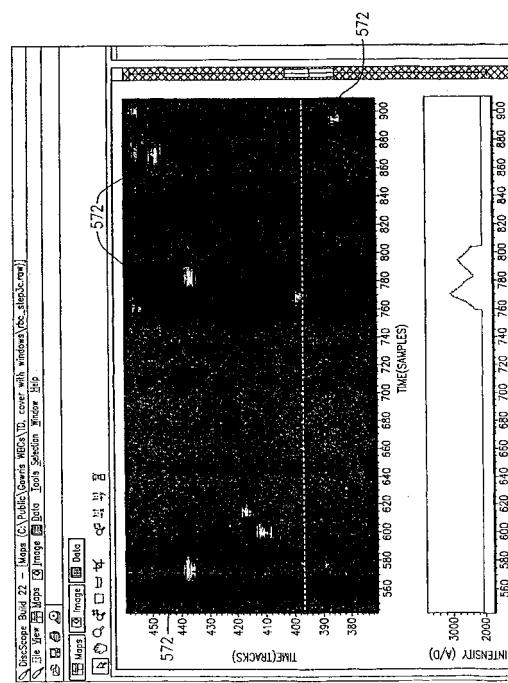
【図43】



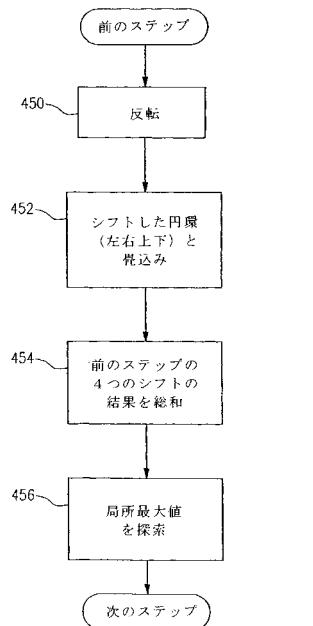
【図44】



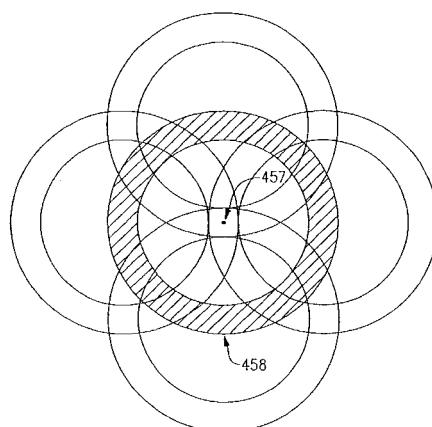
【図45】



【図46A】

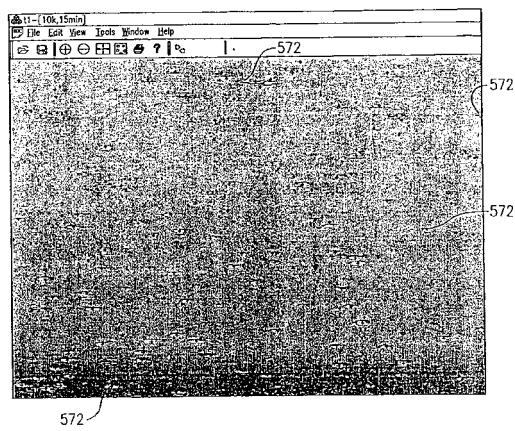


【図46B】

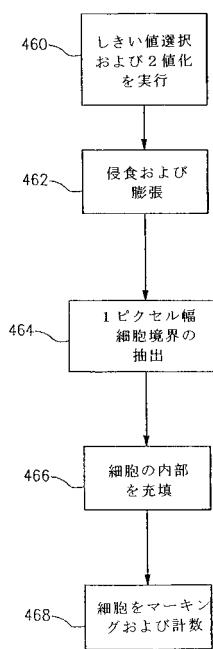


B

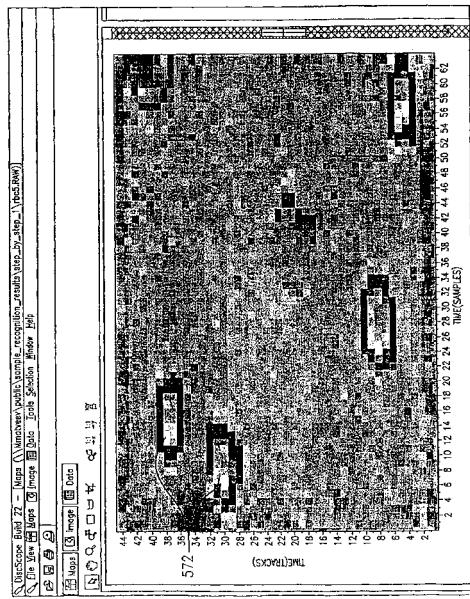
【図47】



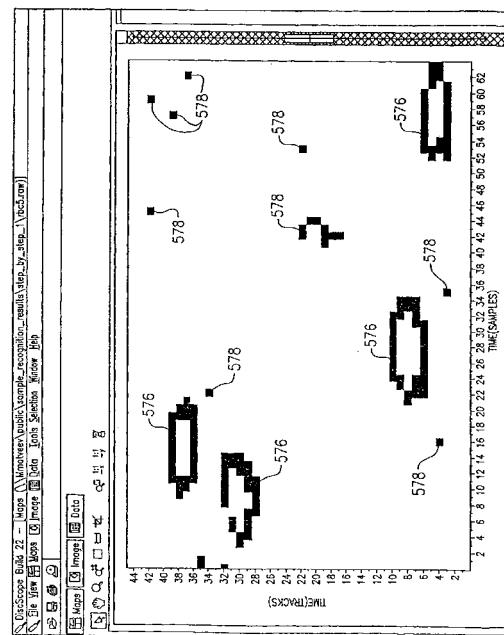
【図48】



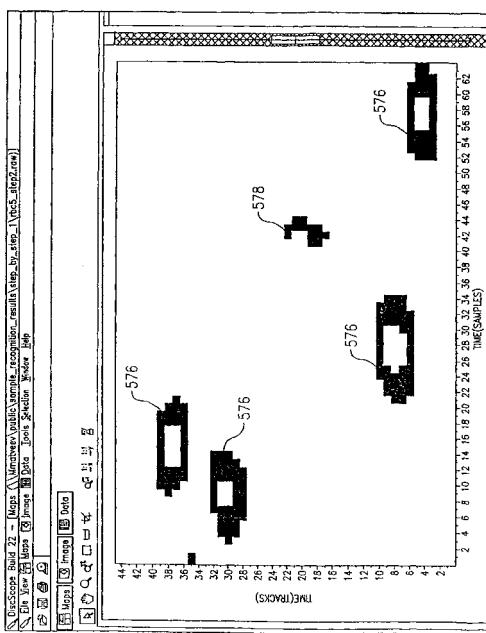
【図49】



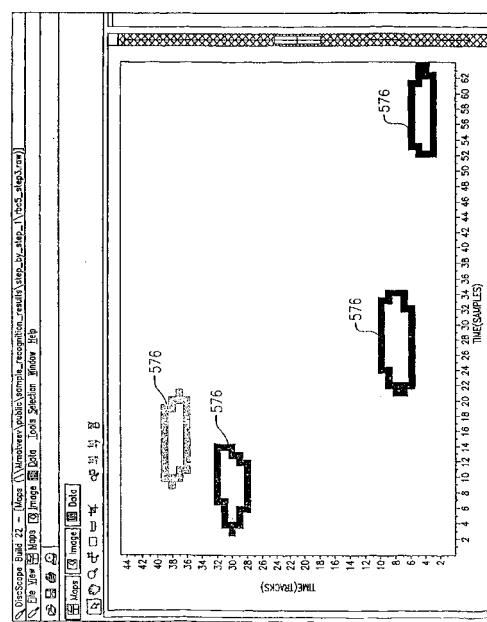
【図50】



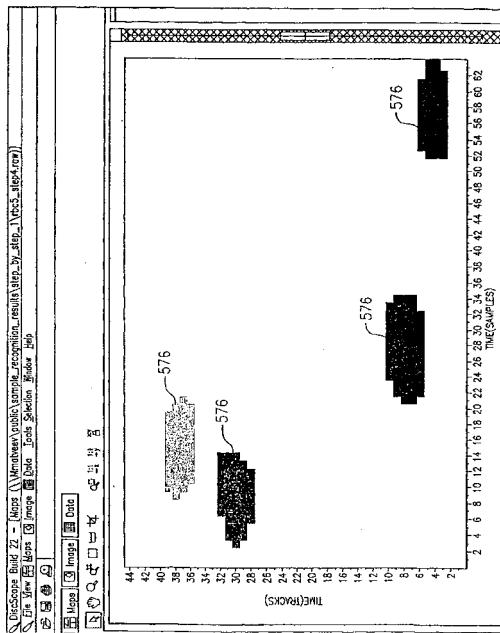
【 図 5 1 】



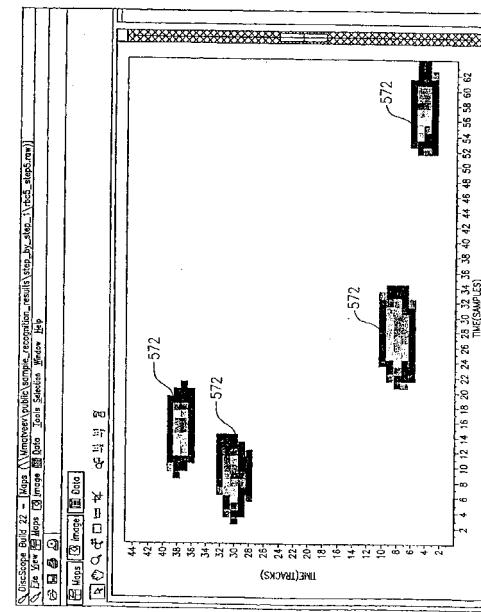
【図52】



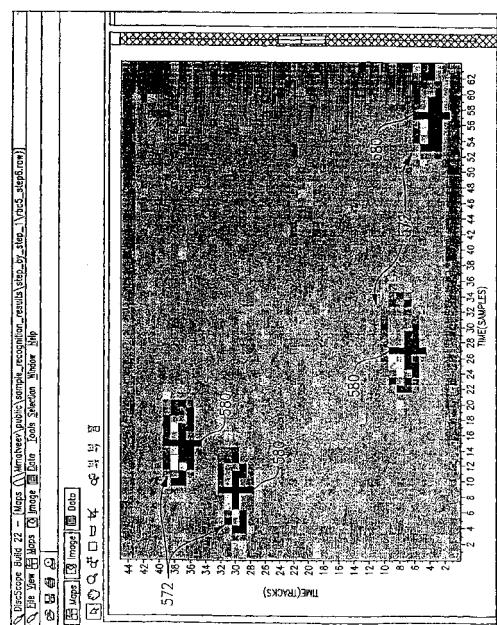
【図 5 3】



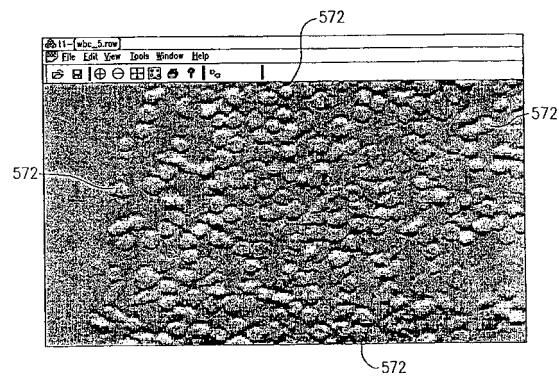
【図54】



【図 5 5】

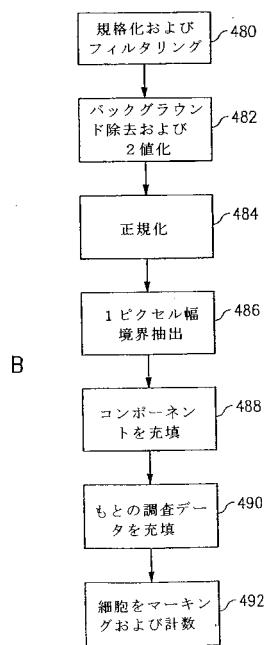


【図 5 6 A】

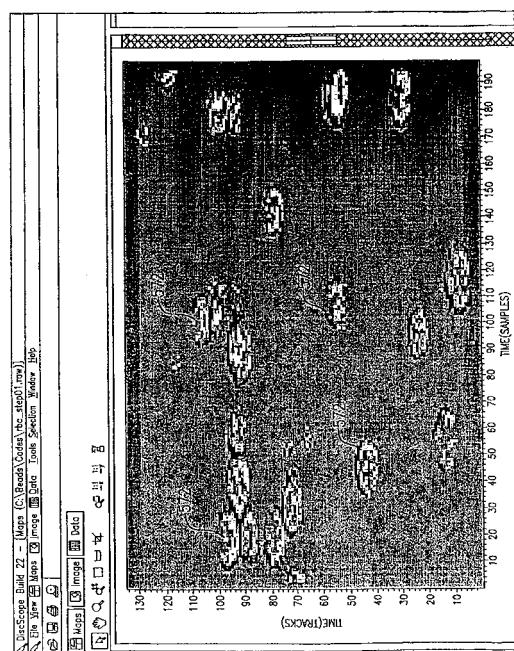


A

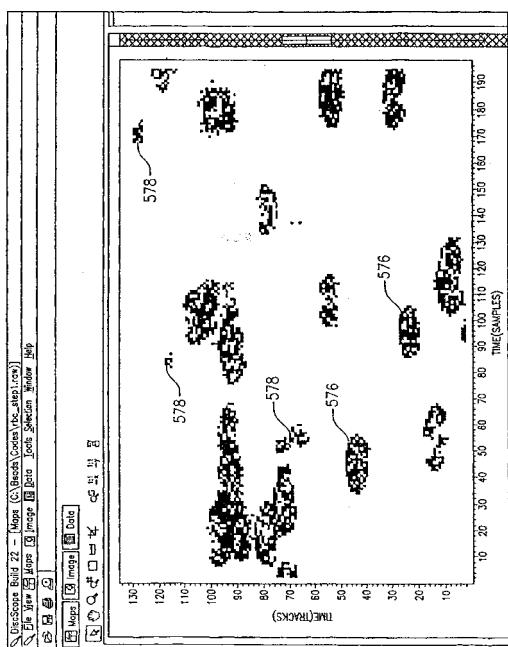
【図 5 6 B】



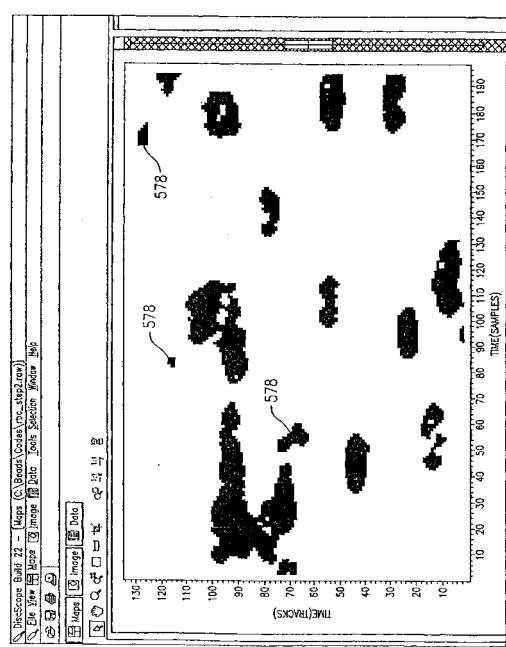
【図 5 7】



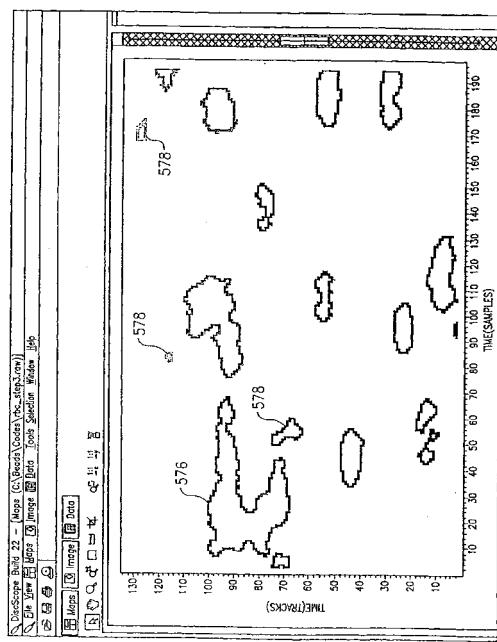
【図58】



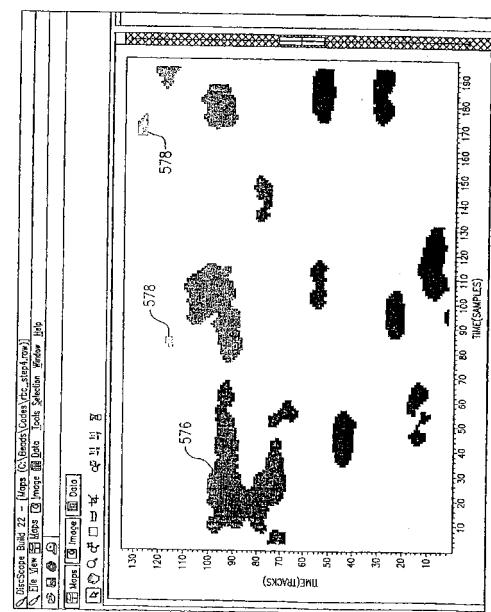
【図59】



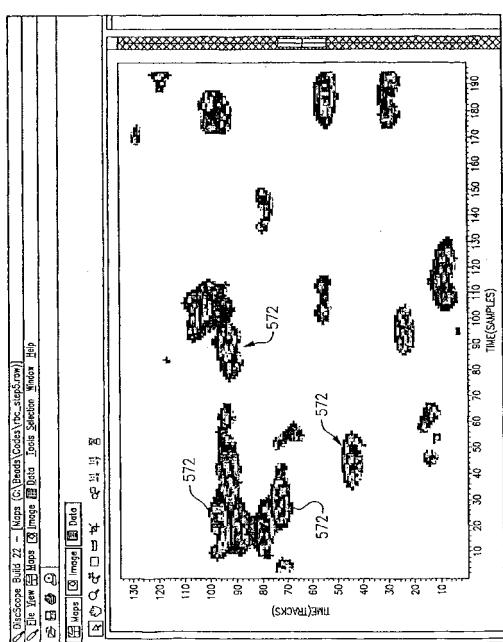
【図60】



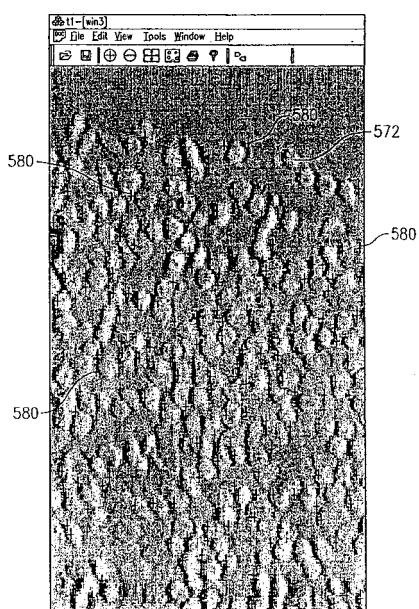
【図61】



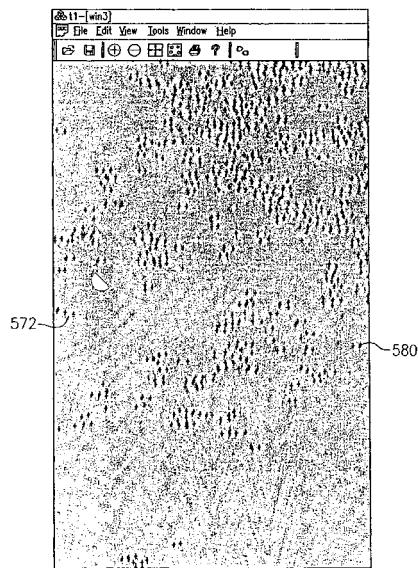
【図 6 2】



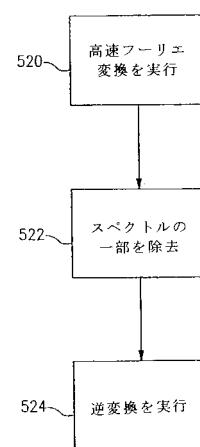
【図 6 3】



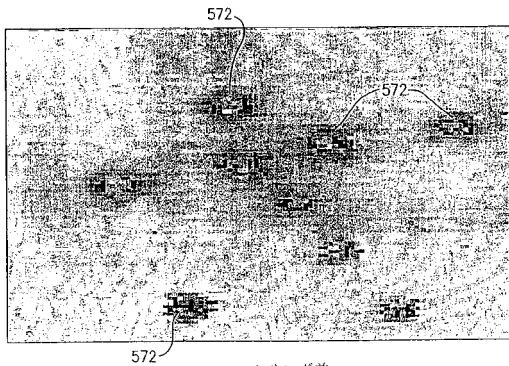
【図 6 4】



【図 6 5】

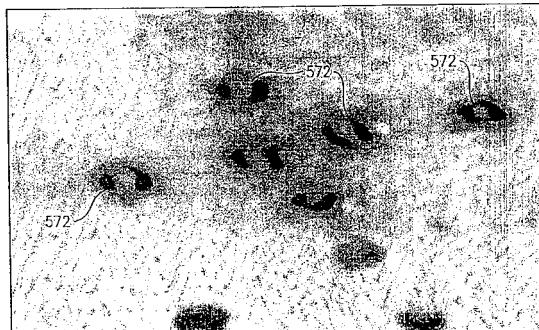


【図66】



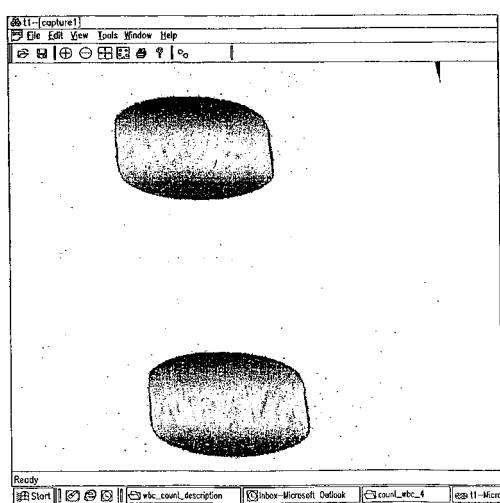
フィルタリング前

【図67】

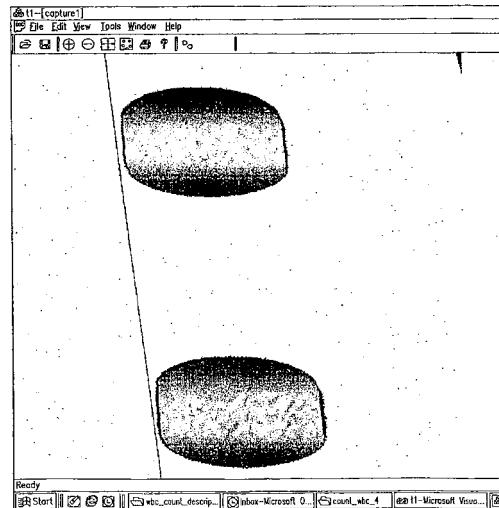


フィルタリング後

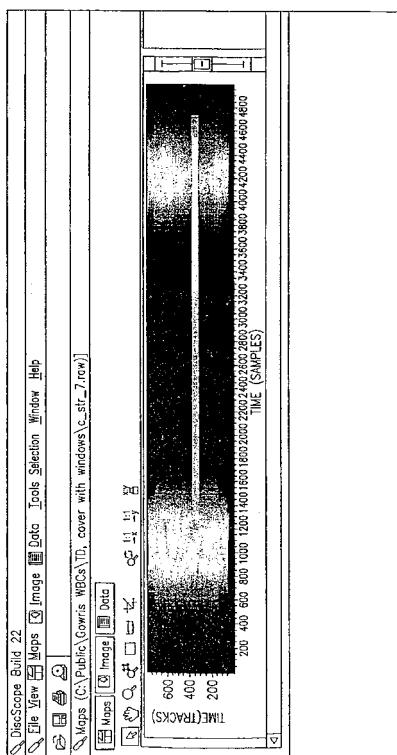
【図68】



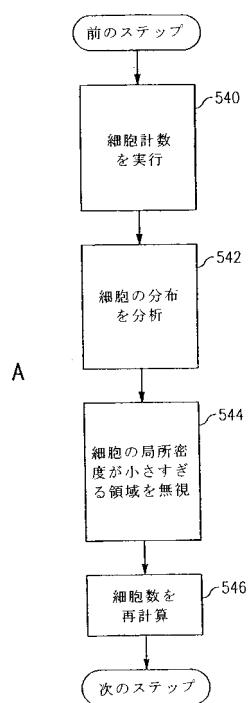
【図69】



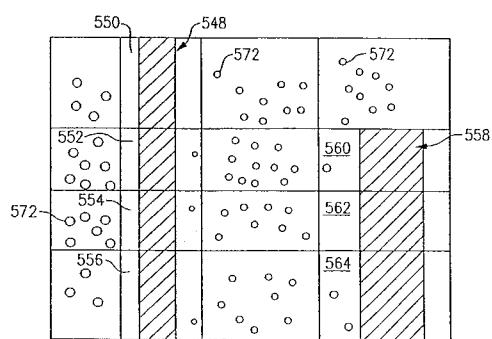
【図 7 0】



【図 7 1 A】

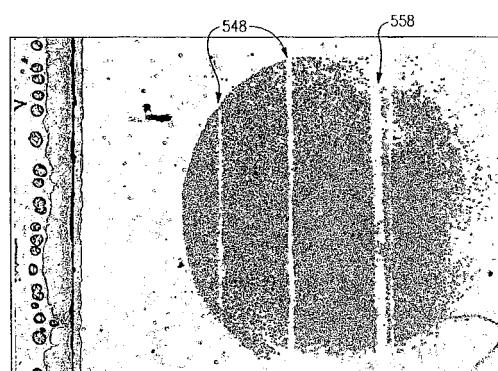


【図 7 1 B】



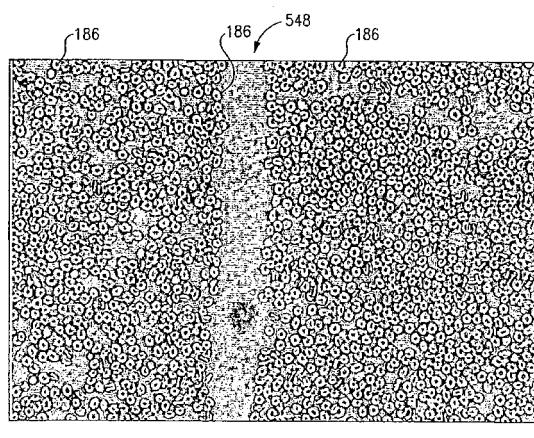
B

【図 7 1 C】



C

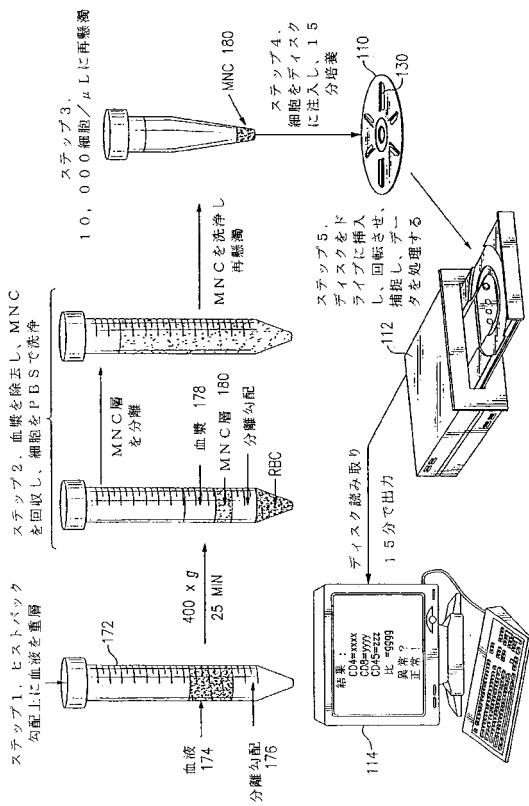
【図71D】



1トラック40X

D

【図72】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/023571 A2

(51) International Patent Classification' G06F

(71) Applicant: BURSTEIN TECHNOLOGIES, INC.  
[US/US]; 163 Technology Drive, Suite 200, Irvine, CA  
92618 (US)

(21) International Application Number: PCT/US02/28958

(72) Inventors: MATVEEV, Mikhail; 114 Oxford, Irvine, CA  
92612 (US); PAL, Andrew, Attila; 20 Calle Estero, Rancho Santa Margarita, CA 92688 (US).

(22) International Filing Date:

11 September 2002 (11.09.2002)

(74) Agents: HARRIMAN, J., D., II et al.; Coudert Brothers  
LLP, 333 South Hope Street, Suite 2300, Los Angeles, CA  
90071 (US).

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

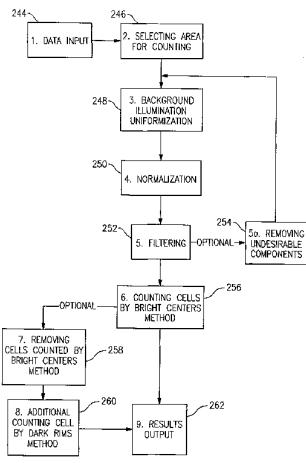
60/322,863	12 September 2001 (12.09.2001)	US
60/353,300	31 January 2002 (31.01.2002)	US
60/353,921	31 January 2002 (31.01.2002)	US
60/355,644	5 February 2002 (05.02.2002)	US
60/355,304	8 February 2002 (08.02.2002)	US
60/358,479	19 February 2002 (19.02.2002)	US
60/363,949	12 March 2002 (12.03.2002)	US
60/404,921	21 August 2002 (21.08.2002)	US

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EH, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, ME, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

*[Continued on next page]*

(54) Title: METHODS FOR DIFFERENTIAL CELL COUNTS INCLUDING RELATED APPARATUS AND SOFTWARE FOR PERFORMING SAME

WO 03/023571 A2



(57) Abstract: The present invention provides an optical method, system and software for imaging cells, in particular blood cells. In one embodiment, laboratory samples containing blood cells are deposited onto bio-discs, which are specially manufactured discs with mixing chambers that contain specific antigens to lock down various components of the blood cells. Once in the optical drive, the disc is spun and the samples and antigens are mixed with other solutions. Electromagnetic beams are then directed at the bio-disc to interact with the samples at specific capture zones and the resulting beams are collected by a detector. The information contained in the beams is then sent to a processor that produces a digital image. Various image processing methods such as binarization, background uniformization, normalization and filtering are performed to enhance cells in the investigational data for accurate counting. Other techniques are designed to correct for irregularities such as bubbles and dim cells.

---

**WO 03/023571 A2**

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CL, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NH, SN, TD, TG).

**Published:**  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

**METHODS FOR DIFFERENTIAL CELL COUNTS INCLUDING RELATED APPARATUS AND SOFTWARE FOR PERFORMING SAME**

5

**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

The present application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/322,863 filed September 12, 2001; U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/353,300 filed January 31, 2002; U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/353,921 also filed January 31, 2002; U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/355,644 filed February 5, 2002; U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/355,304 filed February 8, 2002; U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/358,479 filed February 19, 2002; U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/363,949 filed March 12, 2002; and U.S. Provisional Pat. App. Serial No. 60/404,921 filed August 21, 2002. These applications and the disclosures provided therein are hereby fully incorporated herein by reference.

**STATEMENT REGARDING COPYRIGHTED MATERIAL**

Portions of the disclosure of this patent document contain material that is subject to copyright protection. The copyright owner has no objection to the facsimile reproduction by anyone of the patent document or the patent disclosure as it appears in the Patent and Trademark Office file or records, but otherwise reserves all copyright rights whatsoever.

25 **BACKGROUND OF THE INVENTION****1. Field of the Invention**

This invention relates to signal detection apparatus, data processing methods, and related computer software and assay algorithms. The present invention is more particularly directed to imaging biological samples such as cellular samples and analyzing the collected images. More specifically, but without restriction to the particular embodiments hereinafter described in accordance with the best mode of practice, this invention relates to methods for differential cell counts including leukocytes and the use of optical bio-discs for performing such cell counts.

35

WO 03/023571

PCT/US02/28958

**2. Discussion of the Related Art**

A number of research and diagnostic situations require isolation and analysis of specific cells from a mixture of cells. The source of such mixtures may include blood, spinal fluid, bone marrow, tumor homogenates, lymphoid tissue, and other samples containing cellular material.

5 A complete blood count (CBC) is a collection of tests including hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, platelet count, and white blood cell count. The most commonly used clinical test is the total CBC counts that are routinely used  
10 for assessment of health and for clinical diagnosis, treatment, and follow-up.

White blood cells (WBCs) protect the body by fighting infection and attacking foreign material. A differential white blood cell count determines the number of white blood cells and the percentage of each type of white blood cell in a person's blood. WBC or leukocyte count provides a clue to the presence of illness. These tests are  
15 included in general health examinations and help investigate a variety of illnesses, including infection, allergy, and leukemia. When extra white cells are needed, the bone marrow increases production.

There are five types of white cells, each with different functions: neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils. The differential reveals if these  
20 cells are present in a normal distribution, or if one cell type is increased or decreased. In a normal healthy person, typically the WBC counts are 4,000 to 10,800 cells per microliter ( $\mu\text{l}$ ). Factors such as exercise, stress, and disease can affect these values. This information helps diagnose specific types of illness. A high WBC may indicate  
25 infection, leukemia, or tissue damage. There is increased risk of infection if it falls below 1,000 cells per microliter. Conditions or medications that weaken the immune system, such as AIDS or chemotherapy, cause a decrease in white cells. Recovery from illness can be monitored by the white cell count. Counts continuing to rise or fall to abnormal levels indicate a worsening condition; counts returning to normal indicate improvement.

30 Leukocyte differential testing is essential to gather information beyond that obtainable from the leukocyte count itself. Leukocyte differential count is used to evaluate newly suspected infection or fever (even if the CBC is normal), suspicion of a disorder associated with abnormalities, an abnormal leukocyte count, suspected

WO 03/023571

PCT/US02/28958

leukemia, other abnormalities such as eosinophilia, monocytosis, basophilia. Repeated testing for leukocyte or leukocyte differential may be performed in the presence of severe leukopenia (e.g., secondary to drug therapy). During treatment, for example chemotherapy or radiation therapy, blood counts are very important to determine if the treatment is depleting healthy blood cells in addition to cancerous cells.

Differential leukocyte counts are determined by computerized cell counting equipment. The machine determines the total count and the percentages of the five major white cell types. In normal individuals, there are a majority of neutrophils (50-60%), followed by lymphocytes (20-40%), then monocytes (2-9%), with a few eosinophils (1-4%) and basophils (0.5-2%).

Within the category of lymphocytes there are further sub-types of cells. For example, lymphocytes can be broadly divided into T-cells (thymus-derived lymphocytes) and B-cells (bursal-equivalent lymphocytes), which are largely responsible for cell-mediated and humoral immunity respectively. Although morphological characteristics have been used to classify groups within the leukocytes, morphology alone has proved inadequate in distinguishing the many functional capabilities of lymphocyte sub-types. To distinguish lymphocytes with various functions, techniques including analysis by rosetting, immuno-fluorescence microscopy, enzyme histochemistry, and recently, monoclonal antibodies against unique cell surface markers have been developed.

Neutrophils are important for fighting infection. When neutrophil numbers fall below 1,000 cells per microliter the condition is called *neutropenia*. Lymphoma treatment can cause neutropenia. Obesity and smoking increase neutrophil count. Lymphocytes are divided into B (bone marrow matured) and T (thymus matured) lymphocytes. When the lymphocyte count falls below 1,500 cells per microliter for adults or 3,000 cells per microliter in children the condition is called *lymphocytopenia*. Lymphomas can cause *lymphocytopenia*.

Platelets (thrombocytes) are cell-like particles that stop bleeding by gathering at a site where bleeding is occurring. They then activate and clump together to stop bleeding and promote clotting. Platelet counts increase during strenuous activity, if the patient has myeloproliferative disorders including infection, inflammation, malignancy,

WO 03/023571

PCT/US02/28958

and if the spleen has been removed. An excess number of platelets is called thrombocytopenia.

The number of platelets in a standard sample of blood typically is 133,000 to 333,000 platelets per microliter ( $\mu$ l). An excess number of platelets is called thrombocytopenia. Above normal platelet counts may be due to a reactive response or bone marrow failure. Reactive responses are typically caused by bleeding, infection, neoplasia, and myeloproliferative disorders. Bone marrow failure usually involves loss of blood cells known as pancytopenia. On the other hand, decreased platelet counts are due to immune thrombocytopenia. *Thrombocytopenia* occurs if the platelet count fall below 30,000, which results in abnormal bleeding. Counts below 5,000 are considered life threatening.

A CBC may be done by commercially available manual or electronic instruments that measure hemoglobin level, hematocrit, total leukocyte, and erythrocyte count. Variations may include a platelet count, a leukocyte differential count, and cellular indices. The hematology analyzers are fully automated and results are accurate for cell counts, types of cells in body fluids like CSF, pleural fluid, ascetic fluid, pericardial fluid, and gastric aspiration.

As compared to prior methods and systems, we have developed a simple, miniaturized, ultra-sensitive, inexpensive system for imaging and analyzing cells and their components. This system uses optical bio-discs, related detection assemblies, as well as information and signal processing methods and software.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to methods, apparatus and software for the imaging and counting of cellular matter in laboratory samples. Embodiments of the present invention create digital images of cells in samples and perform computational analysis on the images. The present invention images cells, in particular blood cells, inclusive of the parasites and pathogens that infest the blood and other biological fluids. In other assays, the imaging is performed on beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. This system uses optical bio-discs, related detection assemblies, as well as information and signal processing methods and software.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

The present invention is also directed to bio-discs, bio-drives, and related methods. This invention or different aspects thereof may be readily implemented in, adapted to, or employed in combination with the discs, assays, and systems disclosed in the following commonly assigned and co-pending patent applications: U.S. Patent 5 Application Serial No. 09/378,878 entitled "Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs" filed August 23, 1999; U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/150,288 entitled "Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers" filed August 23, 1999; U.S. Patent Application Serial No. 09/421,870 entitled 10 "Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material" filed October 26, 1999; U.S. Patent Application Serial No. 09/643,106 entitled "Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers" filed August 21, 2000; U.S. Patent Application Serial No. 09/999,274 entitled "Optical Biodiscs with Reflective Layers" filed November 15, 2001; U.S. Patent Application 15 Serial No. 09/988,728 entitled "Methods and Apparatus for Detecting and Quantifying Lymphocytes with Optical Biodiscs" filed November 20, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 09/988,850 entitled "Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-discs" filed November 19, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 09/989,684 entitled "Apparatus and Methods for Separating Agglutinants and Disperse Particles" 20 filed November 20, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 09/997,741 entitled "Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto" filed November 27, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 09/997,895 entitled "Apparatus and Methods for Separating Components of Particulate Suspension" filed November 30, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 10/005,313 entitled "Optical Discs for 25 Measuring Analytes" filed December 7, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 10/006,371 entitled "Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers" filed December 10, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 10/006,620 entitled "Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes" filed December 10, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 10/006,619 entitled "Optical Disc Assemblies for Performing Assays" filed December 10, 2001; U.S. Patent 30 Application Serial No. 10/020,140 entitled "Detection System For Disk-Based Laboratory and Improved Optical Bio-Disc Including Same" filed December 14, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 10/035,836 entitled "Surface Assembly for

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Immobilizing DNA Capture Probes and Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto" filed December 21, 2001; U.S. Patent Application Serial No. 10/038,297 entitled "Dual Bead Assays Including Covalent Linkages for Improved Specificity and Related Optical Analysis Discs" filed January 4, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/043,688 entitled "Optical Disc Analysis System Including Related Methods for Biological and Medical Imaging" filed January 10, 2002; U.S. Provisional Application Serial No. 60/348,767 entitled "Optical Disc Analysis System Including Related Signal Processing Methods and Software" filed January 14, 2002 U.S. Patent Application Serial No. 10/086,941 entitled "Methods for DNA Conjugation Onto Solid Phase Including Related Optical Biodisks and Disc Drive Systems" filed February 26, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/087,549 entitled "Methods for Decreasing Non-Specific Binding of Beads in Dual Bead Assays Including Related Optical Biodisks and Disc Drive Systems" filed February 28, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/099,256 entitled "Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus" filed March 14, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/099,266 entitled "Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets" also filed March 14, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/121,281 entitled "Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto" filed April 11, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/150,575 entitled "Variable Sampling Control for Rendering Pixelization of Analysis Results in a Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto" filed May 16, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/150,702 entitled "Surface Assembly For Immobilizing DNA Capture Probes in Genetic Assays Using Enzymatic Reactions to Generate Signals in Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto" filed May 17, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/194,418 entitled "Optical Disc System and Related Detecting and Decoding Methods for Analysis of Microscopic Structures" filed July 12, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/194,396 entitled "Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Various Reporting Agents for Use Therewith" also filed July 12, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/199,973 entitled "Transmissive Optical Disc Assemblies for Performing Physical Measurements and Methods Relating Thereto" filed July 19,

WO 03/023571

PCT/US02/28958

2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/201,591 entitled "Optical Analysis Disc and Related Drive Assembly for Performing Interactive Centrifugation" filed July 22, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/205,011 entitled "Method and Apparatus for Bonded Fluidic Circuit for Optical Bio-Disc" filed July 24, 2002; U.S. Patent Application Serial No. 10/205,005 entitled "Magnetic Assisted Detection of Magnetic Beads Using Optical Disc Drives" also filed July 24, 2002. All of these applications are herein incorporated by reference in their entireties. They thus provide background and related disclosure as support hereof as if fully repeated herein.

One method of the present invention for performing assays is based upon the principle of optical imaging of blood cells in special channels located on the optical bio-disc. Approximately seven microliters of whole blood is injected into specially designed channels on the disc. The images are analyzed with cell recognition software that identifies these various leukocyte sub-types and generates a white cell differential count. The method is based on specific cell capture using cell specific antibodies against specific cell. In this particular case, antibodies directed against lymphocytes (CD2, CD19), monocytes (CD14), eosinophils (CD15) and so on. These leukocyte sub-type specific antibodies are assembled or attached to the solid surface within a bio-disc that includes a flow chamber.

A bio-disc drive assembly is employed to rotate the disc, read and process any encoded information stored on the disc, and analyze the cell capture zones in the flow chamber of the bio-disc. The bio-disc drive is provided with a motor for rotating the bio-disc, a controller for controlling the rate of rotation of the disc, a processor for processing return signals from the disc, and analyzer for analyzing the processed signals. The rotation rate is variable and may be closely controlled both as to speed, direction, and time of rotation. The bio-disc may also be utilized to write information to the bio-disc either before, during, or after the test material in the flow chamber and target zones is interrogated by the read beam of the drive and analyzed by the analyzer. The bio-disc may include encoded information for controlling the rotation of the disc, providing processing information specific to the type of immunotyping assay to be conducted, and for displaying any desired results on a monitor associated with the bio-drive.

Differential cell count protocol in general and in particular differential white blood cell counting protocol is developed for CD, CD-R, or DVD formats, modified

WO 03/023571

PCT/US02/28958

versions of these formats, and alternatives thereto. The read or interrogation beam of the drive detects the various cells in the analysis sample and generates images that can be analyzed with differential cell counter software.

Microscopic methods or sophisticated cell counters are essential to perform these laborious cell-counting assays. In other assays conducted according to the invention, the cell could instead be a bead (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention.

The present methods use optical bio-discs and related disc assemblies. Optical images of the various leukocyte sub-types free in the analysis chamber or those captured by specific antibody methods are generated and analyzed by cell recognition software programs that identify the various cellular elements in the blood or other body fluids by their light scattering properties. The present methods do not require any processing of the sample prior to analysis like cell staining, RBC elimination and other laborious protocols. These methods include microscopic analysis or cell detection in a CD-type reader, DVD-type reader, or other optical disc reader using a top detector, bottom detector, event counter, or cell counter.

The following summary relating to cluster designation analysis, such as obtaining a CD4/CD8 ratio, represents one particular group of related assays amenable to application of the present methods, apparatus, systems, and disc assemblies.

*Disc Preparation:* Gold reflective discs or transmissive discs are cleaned using an air gun to remove any dust particles. The disc is rinsed twice with iso-propanol, using the spin coater. A 2% polystyrene is spin coated on the disc to give a relatively thick coating throughout.

*Deposition of Chemistry:* One embodiment includes a three step deposition protocol that incubates: streptavidin, 30 minute incubated; biotinylated first antibody incubated for 60 minutes; and second capture antibody incubated for 30 minutes. All the steps are preferably performed at room temperature in a humidity chamber using stringent washing and drying steps between depositions.

Briefly, 1  $\mu$ l of 1 mg/ml streptavidin in phosphate buffered saline is layered over each window and incubated for 30 minutes. Excess streptavidin is rinsed off using distilled water and the disc is dried. Biotinylated IgG-dextran complex is prepared by

WO 03/023571

PCT/US02/28958

combining equal volumes of biotinylated IgG (125 µg/ml in PBS) and aldehyde-activated dextran (200 µg/ml). Dextran-aldehyde biotinylated-IgG complex is layered over streptavidin in each capture window and incubated for 60 minutes or overnight in a refrigerator. Excess reagent is rinsed off and the disc spun-dry. Specific barcode 5 capture patterns are created by layering capture antibodies on designated spots on the bio-disc slot. For a differential count, anti-neutrophil (CD128 or others), anti- lymphocyte (CD2, CD19, CD56, and others), anti-eosinophil (CD15), anti-monocyte (CD14), anti-basophil (CD63) and anti-platelets (CD32 and CD151) are layered in 10 designated spot of each slot. Table 1, below, list examples of variations of capture patterns for capture layer assembly. Incubate for 30 minutes or overnight in the refrigerator. Assemble the disc using a 25 µm, 50 µm or 100 µm (50 µm channel requires twice the volume of sample as that needed for 25 µm chamber), straight, U-shaped, or other channel formats and a clear (for use with the top detector) or reflective cover disc (for use with the bottom detector).

15

**Table 1: Capture Layer Assembly and Variations**

Window	1	2	3	4	5	6
1 <sup>st</sup> Layer (Active Layer)	Poly-styrene	Poly-styrene	Poly-styrene	Poly-styrene	Poly-styrene	Poly-styrene
2 <sup>nd</sup> Layer		Streptavidin	Streptavidin	Streptavidin	Streptavidin	Streptavidin
Secondary Antibody		B-anti-Mouse IgG + DCHO	B-anti-Mouse IgG + DCHO	B-anti-Mouse IgG + DCHO	B-anti-Mouse IgG + DCHO	B-anti-Mouse IgG + DCHO
Primary Antibody	Reference Dot	Lymphocyte Specific antibody	Neutrophil Specific antibody	Eosinophil Specific antibody	Basophil Specific antibody	Monocyte Specific antibody

*Leak-Checking the Disc:* Since blood, a biohazardous material, is typically being analyzed, these discs are leak checked to make sure none of the chambers leak 20 during spinning of the disc with the sample *in situ*. Each channel is filled with StabilGuard, a blocking agent, and blocked for at an hour. The disc is spun at 5,000 rpm for 5 minutes and inspected for leaks and disc stability. After checking for leaks, the disc is placed in a vacuum chamber for 24 hours. After vacuuming, the chambers

WO 03/023571

PCT/US02/28958

filled with phosphate buffered saline (PBS) buffer, or alternatively left empty, are placed in a vacuum pouch and stored under refrigeration until use.

*Isolation of Buffy-coat Layer from Whole Blood:* Buffy coat is prepared by centrifuging venous blood with an anti-coagulant like ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) or acid citrate dextran (ACD) in a centrifuge tube for 15 minutes at 1,500 x g. White cells form a layer at the interface of the plasma and the red blood cells called the buffy coat layer. The plasma is carefully removed using a fine pipette and then the buffy coat layer is collected. An alternate way to obtain the buffy coat from the blood without centrifugation is to allow the blood to sediment with sedimentation-enhancing agents such as fibrinogen, dextran, gum acacia, Ficoll or methylcellulose. Boyum's reagent (methylcellulose and sodium metrizoate) is particularly suitable for obtaining leukocyte preparation without any red cell contamination.

*Assay on Disc--Description of Base Technology:* One preferred embodiment of the differential white cell count disc test includes three individual components, (1) base disc including the chemistry, (2) channel layer, and (3) cover disc.

Buffy coat or whole blood (7 microliters in PBS) is injected into the disc chamber, the inlet and outlet ports of the chamber are sealed with closure tabs and the disc is incubated for 15 minutes at room temperature. For the first method, a given area (e.g., one millimeter square in area) on the disc is scanned using the standard 780 nm laser of the optical drive with the top or bottom detector. The cell recognition software according to the present invention is automated to give a differential count from the captured image which is equal to a millimeter square and the values obtained are extrapolated to determine counts per cubic milliliter of whole blood. And for the second barcode method, the disc is scanned using the standard 20 780 nm laser to image the capture zone (lymphocytes, neutrophils, basophils, 25 eosinophils, monocytes, and platelets). The cell recognition software of this invention performs, *inter alia*, the following routines: (a) centrifuge the disc to spin off excess unbound cells, (b) image defined areas in each specific cell capture zones, (c) process data that includes counting the specifically captured cells in each capture zone, and 30 (d) derive the numbers of different sub-sets of leukocytes per cubic milliliter of whole blood.

According to one aspect of the present invention, during the processing step, the recognition software reads across each capture zone and marks cells as it

WO 03/023571

PCT/US02/28958

encounters. In other assays, the cell could instead be a bead (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Following processing data from each capture zone, the software displays 5 the number lymphocytes, neutrophils, basophils, eosinophils, monocytes, and platelets zones per micro-liter or cubic milliliter volume of blood. The entire process takes about 10-15 minutes from inserting the disc into the optical drive to obtaining and displaying the desired counts or ratios. In another embodiment of this aspect of 10 the present invention, the electrical response is read from the capture zone and stored on disc or in memory resulting in a data file which may be post-processed for recognition purposes as described in further detail below.

*Disc Specifications:* The following subsections are directed to summarizing particular embodiments of some of the optical bio-discs that may be advantageously employed in conjunction with the present invention.

15 *(A) Tracking Design:* In one preferred embodiment of the present invention, the disc is a forward Wobble Set FDL21 :13707 or FDL21 :1270 coating with 300 nm of gold. On this reflective disc, oval data windows of size 2x1 mm are etched out by Lithography. U-shaped channels are used to create chambers that are 25 to 100 micrometers in height. It takes about 7  $\mu$ l of sample to fill the entire chamber including 20 the inlet and outlet ports. A 4-window/4-channel format may be preferably used. However on the transmissive disc, no data windows are etched, and the entire disc is available for use.

*(B) Adhesive and Bonding:* Fraylock U-shaped adhesive DBL 201 Rev C 3M94661 or straight channels are used to create the chambers.

25 *(C) Cover Disc:* Clear disc, fully reflective with 48 sample inlets with a diameter of 0.040 inches location equidistant at radius 26 mm are used.

*Data Capture and Processing:* The data disc is scanned and read with the software of the present invention at speed X4 and sample rate 2.67 MHz using specific cell recognition methods.

30 *Software:* The present invention further includes processing methods and related cell recognition and imaging software. This software is directed to conducting and displaying cell counts and differential cell counts. In other assays, the cell could instead be a bead (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme

WO 03/023571

PCT/US02/28958

reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. The present software may be stored on the optical bio-disc, in the optical disc drive reader device, or alternatively only accessible by the optical reader from a secured server. This server may be 5 implemented in a computing network such as a Local Area Network (LAN), a Wide Area Network (WAN), or otherwise made available over the Internet under prescribed terms and conditions. Such distribution methods are disclosed in commonly assigned U.S. Provisional Application No. 60/246,824 entitled "Interactive Method and System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Medical Information Using 10 Specially Prepared Bio-Optical Disc, Optical Disc Drive, and Internet Connections" filed November 8, 2000 and the corresponding U.S. Patent Application Serial No. 09/986,078.

The materials employed to practice different preferred embodiments disclosed herein include a forward wobble gold metalized photo-resist disc, a transmissive gold metalized disc, pipettes and tips, spin coater, centrifuge, swing-out rotor, Vacutainer™ CPT tubes with an anti-coagulant such as sodium citrate or ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), humidity chamber, wringer, adhesive, cover disc, clear cover disc, tape or equivalent, vacuum apparatus, yellow tips, and vacuum chamber.

In one embodiment on the present invention, laboratory samples containing 20 blood cells are deposited on to bio-discs or in a fluidic channel formed in the disc assembly. In other assays, the cell could instead be a bead (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Bio-discs are specially manufactured CD-size discs with fluidic channels 25 and/or mixing chambers that contain specific antigens to lock components of the blood cells in place. Because they are made of carefully layered metals and substrates, bio-discs have specific optical properties that allow electromagnetic beams to interact with the deposited test samples. Once a bio-disc is inserted into an optical drive, the drive spins the disc and in some embodiments may mix the samples along with other 30 necessary solutions. Electromagnetic beams are directed at the bio-disc inside the drive. In one embodiment termed the reflective disc, the beams reflect off the reflective surface of the bio-disc and the detector within the optical drive collects the reflected beams. In another embodiment termed the transmissive disc, portions of the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

beams go through the bio-disc and are transmitted to another type of detector within the optical drive. In either case, the beams collected by the detector contain information about the laboratory samples on the bio-discs. The information is then sent to an analog to digital processor where digital data representing the electrical signal from the detector is produced. This digital data may be processed in real time, stored in memory or on disc and then processed in whole or in part as raw data, or exported into various formats including image formats. Any of these formats may be further processed by other applications or means to generate intended results. This digital data is useful for automatic, electrical, computer controlled, and/or machine counting or analysis. The digital data may also be used to produce viewable images suitable for expert hand counts, recognition, or other manual analysis. In another embodiment of the invention, the raw data, digital data, exported data that may include images are stored in an archive. Thus the methods of the present invention may generally apply to "investigational data" which as used herein includes, but is not limited to, raw detector output data, raw signal data, digital data, exported data, or exported data including images or image data. The archive provides a place where investigational data can be cataloged and, if desired, associated with other identifying information such as, for example, demographic, geographic, medical, historic, or personal data. Subsequently, groups of investigational data can be analyzed to conduct health trend studies of, for example, different population groups.

One embodiment of the invention addresses the need to count blood cells. The present invention includes processing methods and related cell recognition and imaging software. This software is directed to conducting cell counts and displaying the corresponding results. In one embodiment of the invention, various image processing methods such as binarization, background uniformization, normalization and filtering are performed to enhance the appearance of the cells in the investigational data to aid the process of cell counting. Other techniques are performed to correct the cell counts for irregularities such as trapped bubbles, cracks, and dim cells in the investigational data.

Embodiments of the present invention store the software on the optical bio-disc, in the optical disc drive reader device, or alternatively only accessible by the optical reader from a secured server. This server may be implemented in a computer networks such as a Local Area Network (LAN), a Wide Area Network (WAN), or

WO 03/023571

PCT/US02/28958

otherwise made available over the Internet under prescribed terms and conditions. Such distribution methods are disclosed in commonly assigned U.S. Application No. 09/986,078 entitled "Interactive System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Information and the Use Thereof" filed November 7, 2001 which is 5 herein incorporated by reference.

More specifically, the present invention is directed to a method of counting cells or other investigational features. This method includes the steps of obtaining investigational data of a sample with cells, selecting an evaluation rectangle in the investigational data, enhancing the investigational data inside the evaluation 10 rectangle, and counting cells shown in the evaluation rectangle. In one specific embodiment of this method, cell counting is performed by recognizing bright centers or alternatively dark rims.

Another aspect of the present invention is directed to a method of selecting a custom size for the evaluation rectangle.

15 Yet another aspect of the present invention is directed to a method of selecting a plurality of evaluation rectangles.

Still a further aspect of the present invention is directed to enhancing investigational data inside an evaluation rectangle through the steps of performing background illumination uniformization on the investigational data, performing 20 normalization on the investigational data, and filtering the investigational data.

An additional aspect of the present invention is directed to performing background illumination uniformization on the investigational data through the steps of 25 choosing a size for a neighborhood rectangle, picking a point in the investigational data, performing horizontal scanning to calculate a first sliding average for all neighbor points located within the neighborhood rectangle centered at the point, performing vertical scanning to calculate a second sliding average for all neighbor points located within the neighborhood rectangle centered at the point, combining the first sliding average and second sliding average to create an overall average, reassigning the original value of the point to a resultant value calculated by obtaining the difference 30 between the overall average and the original value and adding the difference to a background value, and repeating the steps of performing horizontal scanning, performing vertical scanning, combining the two averages and reassigning the original value for all points in the investigational data.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

In another aspect of the present invention, the step of performing normalization on investigational data further includes the steps of calculating an average and a standard deviation of the value all points in the investigational data, normalizing the value of all points in the investigational data using the average and standard deviation and truncating the value of some points if necessary.

According to yet another aspect of the present invention there is provided a method of filtering investigational data that includes the steps of choosing a size for a neighborhood rectangle, picking a point in the investigational data, finding all sufficiently distinct points located in the neighborhood rectangle centered at the point, reassigning the value of the point if the number of the sufficiently distinct points is greater than a pre-determined filtering criteria, and repeating the steps of finding all sufficiently distinct points and reassigning the value for all points in the investigational data.

In accordance with still a further aspect of the present invention, there is provided a processing method including the steps of removing undesirable components from the investigational data comprising the steps of selecting a threshold value, performing binarization on the investigational data using the threshold value, performing regularization on the investigational data, extracting connected components, selecting a size threshold, and removing components that fail to meet the size threshold.

Another additional aspect of the present invention is directed to a method of counting cells in investigational data by bright centers. This method includes the steps of performing convolution on the investigational data, searching for a plurality of local maxima, removing redundant local maxima from the plurality of local maxima, declaring remaining maxima to be centers of cells; and counting the centers of cells.

According to another aspect of this invention, there is provided another method of counting cells in investigational data by bright centers. This alternative method includes the steps of performing inversion on said investigational data, performing a plurality of convolutions with shifted rings, summing results from said plurality of convolutions, finding local maxima, declaring maxima to be centers of cells, and counting said centers of cells.

Furthermore, another aspect of the present invention is directed to a method including the steps of removing cells counted from investigational data that have been

WO 03/023571

PCT/US02/28958

counted by the bright centers, counting cells by their dark dims, and adding total from the step of counting cells by recognizing bright centers to the total from the step of counting by recognizing dark rims.

Yet another aspect of the present invention includes a method of counting cells 5 by dark rims in investigational data. This method includes the steps of performing inversion on the investigational data, performing a plurality of convolutions with shifted rings, summing results from the plurality of convolutions, declaring maxima to be centers of cells, and counting the cells.

In another aspect of the invention, the method of enhancing investigational data 10 for the purpose of cell counting further includes the steps of performing normalizing on the investigational data, performing filtering on the investigational data, selecting a threshold number, performing binarization on the investigational data by determining if the investigational data differs from a set background value by said threshold number, performing regularization on the investigational data, extracting one-pixel wide 15 boundaries in the investigational data, filling in areas defined by the one-pixel boundaries, and applying convolution in the filled in areas.

Another aspect of the present invention is directed to a method of obtaining a digital data of a sample with cells. This method includes the steps of (1) providing a blood sample on an optical disc surface, (2) loading the optical disc into an optical 20 reader, (3) rotating the optical disc, and (4) directing an incident beam of electromagnetic radiation to one of the capture zones on the optical disc. The surface is provided with one or more capture zones having one or more capture agents. This method continues with the steps of (5) detecting with a detector a beam of electromagnetic radiation formed after interacting with the disc at the capture zone, (6) 25 converting the detected beam into an analog output signal, and (7) converting the analog output signals into digital data containing cells captured at the capture zone.

According to another aspect of the present invention there is provided a method 30 of converting an analog output to digital data. This conversion method includes the steps of sampling amplitudes of the analog signals at fixed intervals, recording the sampling amplitudes in an one-dimensional array, creating a plurality of one-dimensional arrays using the steps of sampling and recording, and combining the plurality of one-dimensional arrays to create a two-dimensional array containing digital data of the sample.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Still another aspect of the present invention is directed to a method of obtaining digital data of a sample with cells. This method includes the steps of providing a blood sample on an optical disc surface (with the surface including one or more capture zones with one or more capture agents), loading the optical disc into an optical reader, 5 rotating the optical disc, directing an incident beam of electromagnetic radiation to one of the capture zones on the optical disc, detecting with a detector a beam of electromagnetic radiation formed after interacting with the disc at the capture zone, and converting the detected beam into an analog output signal. This particular embodiment of the present method concludes with the step of converting the analog 10 output signals into digital data containing cells captured at the capture zone. The optical disc is constructed with a reflective layer such that light directed to the capture zone is reflected to the detector and detector is a bottom detector. In another aspect of the present invention, a top detector or a split detector is used.

Another aspect of the present invention is directed to a method of selecting 15 evaluation rectangles. This method includes the steps of (1) finding one of a plurality of windows in the investigational data, and (2) cropping an evaluation rectangle of standard size inside the window. In one particular embodiment of this method, the step of finding one of the plurality of windows includes the steps of (a) performing compression on the investigational data, (b) performing threshold evaluation on the 20 image, (c) performing binarization on the investigational data, (d) performing regularization on the investigational data, (e) extracting connected components from the investigational data, and (f) finding a component from the connect components that corresponds to a window.

Still yet a further aspect of the present invention is directed to a method of 25 extracting connected components from the investigational data. This method includes the steps of assigning initial component numbers to components to all black points on the investigational data, setting an initial scanning direction, and scanning the investigational data to reassign the component numbers so that the component numbers of connected black points become the same.

30 And still an additional aspect of the present invention is directed to a method of selecting evaluation rectangles in investigational data from optical disc embodiments with dark spots. This method includes the steps of finding at least one of the dark spots in the investigational data, and creating an evaluation rectangle of standard size

WO 03/023571

PCT/US02/28958

with a center located at a point found by shifting a pre-determined distance from the dark spot.

According to the display aspects of the present invention, there is provided a method of enhancing the display of an image of investigational data. This method includes the steps of performing Fast Fourier Transform on the investigational data, removing some part of the spectrum of the data in the frequency domain, and performing an inverse transform to recover a modified version of the investigational data.

Also according to the display aspects of the present invention, there is provided another method of enhancing the display of an image of investigational data. This method includes the steps of determining if the image is skewed, finding the direction of the skew, and correcting the skew of the image.

Another aspect of the present invention is directed to a method of retrieving previously stored investigational data from an archive and performing analysis on the investigational data. Such archive can catalog stored investigational data according to characteristics of patients who donated the test samples. In one aspect of the present invention, the samples matching a plurality of criteria chosen from the characteristics of patients are selected to conduct a population health trends study.

Another aspect of the present invention is directed to counting different components in white blood cell counts and displaying the counts of CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells, and a ratio of CD4 to CD8 cells.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

Further objects, aspects, and methods of the present invention together with additional features contributing thereto and advantages accruing therefrom will be apparent from the following description of the preferred embodiments of the invention which are shown in the accompanying drawing, wherein:

Fig. 1 is a pictorial representation of a bio-disc system according to the present invention;

Fig. 2 is an exploded perspective view of a reflective bio-disc as utilized in conjunction with the present invention;

Fig. 3 is a top plan view of the disc shown in Fig. 2;

Fig. 4 is a perspective view of the disc illustrated in Figs. 2 and 3 with cut-away sections showing the different layers of the disc;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 5 is an exploded perspective view of a transmissive bio-disc as employed in conjunction with the present invention;

Fig. 6 is a top plan view of the disc shown in Fig. 5;

Fig. 7 is a perspective view of the transmissive disc illustrated in Figs. 5 and 6  
5 with cut-way sections showing the different layers of the disc including the type of semi-reflective layer shown in Fig. 8;

Fig. 8 is a perspective view representing the disc shown in Fig. 7 with a cut-away section illustrating the functional aspects of a semi-reflective layer of the disc;

Fig. 9 is a graphical representation showing the relationship between thickness  
10 and transmission of a thin gold film;

Fig. 10A is a perspective and block diagram representation illustrating the operation of a system according to one embodiment of the present invention;

Fig. 10B shows a split detector and the cross section of a transmissive bio-disc according to an embodiment of the invention;

15 Fig. 11 is a partial cross sectional view taken perpendicular to a radius of the reflective optical bio-disc illustrated in Figs. 2, 3 and 4 showing a flow channel formed therein;

Fig. 12 is a partial cross sectional view taken perpendicular to a radius of the transmissive optical bio-disc depicted in Figs. 5, 6 and 7 showing a flow channel formed therein and a single top detector;

20 Fig. 13 is a partial longitudinal cross sectional view of the reflective optical bio-disc shown in Figs. 2, 3 and 4 illustrating a wobble groove formed therein;

Fig. 14 is a partial longitudinal cross sectional view of the transmissive optical bio-disc shown in Figs. 5, 6 and 7 illustrating a wobble groove formed therein and a top detector;

25 Fig. 15 is a view similar to Fig. 11 showing the entire thickness of the reflective disc and the initial refractive property thereof;

Fig. 16 is a view similar to Fig. 12 showing the entire thickness of the transmissive disc and the initial refractive property thereof;

30 Fig. 17 is a flow chart showing the process of data collection from a bio-disc using methods of the present invention;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 18 is a pictorial graphical representation of the transformation of a sampled analog signal to a corresponding digital signal that is stored as a one-dimensional array;

5 Fig. 19 is a perspective view of an optical disc with an enlarged detailed view of the section indicated showing a captured white blood cell positioned relative to the tracks of an optical bio-disc yielding a signal-containing beam after interacting with an incident beam;

Fig. 20A is a graphical representation of a white blood cell positioned relative to the tracks of an optical bio-disc according to the present invention;

10 Fig. 20B is a series of signature traces derived from the white blood cell of Fig. 20A according to the present invention;

Fig. 21 is a graphical representation illustrating the relationship among Figs. 21A, 21B, 21C, and 25D;

15 Figs. 21A, 21B, 21C, and 21D, when taken together, are pictorial graphical representations of transformation of the signature traces from Fig. 20B into digital signals that are stored as one-dimensional arrays and combined into a two-dimensional array for data input;

Fig. 22 is a flow chart depicting the steps for data evaluation according to the processing methods and computational algorithms of the present invention;

20 Fig. 23 is a flow chart showing the steps involved in selecting evaluation rectangles according to an embodiment of the invention;

Fig. 24 is a graphical representation of a bio-disc with windows as displayed by the software in accordance with a particular embodiment of the invention;

25 Fig. 25 is a flow chart illustrating the steps involved in finding windows on investigational data collected from bio-discs with windows according to an embodiment of the invention;

Fig. 26 shows an example row from an investigational data array undergoing a process of scanning for the purpose of finding a threshold value according to an aspect of the present invention;

30 Fig. 27 is a flow chart showing the sub-steps involved in extracting connected components from investigational data according to another aspect of the invention;

Fig. 28 depicts the results of cropping an evaluation rectangle after finding the windows on the software display according to an embodiment of the present invention;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 29 shows an example dark spot on a disc without windows and target zones with captured cells;

Fig. 30 is a view similar to Fig. 29 showing how an example dark spot is utilized in a disc without windows to find the cells according to an embodiment of the present invention;

Fig. 31 is a flow chart showing the steps involved in performing background illumination uniformization on investigational data according to certain aspects of the invention;

Fig. 32 presents an example of investigational data before background illumination uniformization as displayed by the software of the present invention;

Fig. 33 shows an example of investigational data after background illumination uniformization as displayed by the software of the present invention;

Fig. 34 is a flow chart illustrating the steps involved in performing normalization on investigational data according to a particular implementation of the present invention;

Fig. 35 shows a graphical representation of example investigational data as displayed by the software during the step normalization;

Fig. 36 shows a graphical representation of example investigational data after normalization as displayed by the software of the present invention;

Fig. 37 is a flow chart showing the steps involved in performing filtering on example investigational data according to a preferred embodiment of the invention;

Fig. 38 presents a graphical representation of example investigational data after the filtering step as displayed by the software of the present invention;

Fig. 39 is a close-up view of the graphical representation shown in Fig. 38 with an accompanying point value graph trace;

Fig. 40 is a flow chart showing the steps involved in removing undesirable components from investigational data according to a specific embodiment of certain aspects of the present invention;

Fig. 41 shows a graphical representation of example investigational data before the removal of cracks as displayed by the software of the present invention;

Fig. 42 is a graphical representation of the example investigational data of Fig. 41 after the removal of cracks as displayed by the software of the present invention;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 43 is a flow chart showing the steps involved in marking and counting cells according to the bright center method of the invention;

Fig. 44 shows a graphical representation of example investigational data filled with cells counted by the bright center method;

5 Fig. 45 presents a up-close view and a value trace graph of a portion of the graphical representation shown in Fig. 44;

Fig. 46A is a flow chart showing the steps involved in marking and counting cells according to the dark rims method of the present invention;

Fig. 46B is a graphical representation of convolution with shifted rings;

10 Fig. 47 is a graphical representation of example investigational data in which counted cells are marked by crosses as displayed by the software of the present invention;

Fig. 48 presents an example flow chart showing the steps involved in extracting red blood cells using an algorithm utilized in different methods of the present invention;

15 Fig. 49 shows a graphical representation of investigational data containing red blood cells before the algorithm outlined in Fig. 48 is performed;

Fig. 50 illustrates a graphical representation of the example investigational data of Fig. 49 after the first step of the algorithm outlined in Fig. 48 is performed;

20 Fig. 51 depicts a graphical representation of the example investigational data of Fig. 49 after applying the second step of algorithm outlined in Fig. 48;

Fig. 52 represents visually the example investigational data of Fig. 49 after the third step of the algorithm outlined in Fig. 48 is performed;

25 Fig. 53 shows a graphical representation of the example investigational data of Fig. 49 after performing the fourth step of algorithm outlined in Fig. 48;

Fig. 54 illustrates a graphical representation of the example investigational data of Fig. 49 after applying the fifth step of the algorithm outlined in Fig. 48 is performed;

Fig. 55 is a close-up view showing red blood cells that are counted by the algorithm outlined in Fig. 48;

30 Fig. 56A is a pictorial screen shot of discrete cells before they are counted by the absolute value counting method of the present invention;

Fig. 56B is a flow chart showing the steps involved in counting cells by one embodiment of the absolute value counting method of the invention;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 57 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after performing the step of normalization and filtering according to this embodiment of the absolute value counting method of the present invention;

5 Fig. 58 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after applying the step of background removal and binarization in accordance with the absolute value counting method of the invention;

Fig. 59 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after the step of regularization is performed according to the absolute value counting method of the invention;

10 Fig. 60 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after applying the step of one-pixel wide boundary extraction in accordance with the illustrated embodiment of the absolute value counting method of the invention;

Fig. 61 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after performing the step of filling in components according to the absolute value counting method of the present invention;

15 Fig. 62 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after applying the step of filling in investigational data according to this particular embodiment of the absolute value counting method of the invention;

Fig. 63 is a pictorial screen shot of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after they are counted and marked by crosses in accordance with the methods of 20 the present invention;

Fig. 64 shows the results of the absolute value counting method applied to counting clumped and discrete red blood cells;

25 Fig. 65 is a flow chart showing the steps involved in performing Fast Fourier Transform on an image according to an alternative embodiment of the present invention;

Fig. 66 is a graphical representation of example investigational data before a 30 Fast Fourier Transform is performed according to the present invention;

Fig. 67 shows a graphical representation of the example investigational data of Fig. 66 after the Fast Fourier Transform is performed;

Fig. 68 illustrates an example of a skewed graphical representation of 35 investigational data before realignment;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 69 depicts the skew direction of the graphical representation shown in Fig. 68;

Fig. 70 shows the graphical representation of Fig. 68 after realignment; Fig. 71A is a flow chart depicting the steps involved in correcting cell counts for bubble track situations;

Fig. 71B is a pictorial representation of correcting cell counts for bubble track situations according to another aspect of the present invention;

Fig. 71C is an example of bubble tracks through a target zone of captured red blood cells as would be seen under microscope power 5X;

Fig. 71D is an enlarged view of one of the bubble tracks and surrounding captured red blood cells of Fig. 71C as would be seen under microscope power 40X; and

Fig. 72 is a pictorial flow chart showing the analysis of a blood sample using the methods of the present invention.

15

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to methods and apparatus for the imaging and counting of cellular matters in laboratory samples. These methods and methods may be applied to imaging and counting any type of investigational features of interest on or in an optical disc. Embodiments of the present invention create investigational data of investigational features or cells in samples and perform computational analysis on the investigational data. In other assays, the cell could instead be a bead (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention.

In the following description, numerous specific details are set forth to provide a more thorough description of embodiments of the invention. It should be apparent, however, to one skilled in the art that the invention may be practiced without these specific details. In other instances, well known features have not been described in detail so as not to obscure the invention.

A number of embodiments for white blood cell counting using optical disc data are herein discussed in further detail. These embodiments are not limited to the imaging and counting white blood cells only, but may be readily applied to conducting

WO 03/023571

PCT/US02/28958

counts of any type of cellular matter. This can include, but is not limited to, red blood cells, white blood cells, beads, and any other objects, both biological and non-biological, that produce similar optical signatures that can be detected by an optical reader. In other assays, the investigational features of interest, rather than being a  
5 cells, could instead be beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters having a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Some of the modifications needed to use the present invention on matter other than white blood cells are described in further detail below in the discussion of cell counting.

10 In the following discussion, two main sections are presented to illustrate the data collection and data analysis aspects on the present invention. The first section presents a detailed description of the apparatus, methods, and algorithms used to collect investigational data from the laboratory samples and transform such investigational data into an array-based storage. The second section presents a  
15 detailed description of the methods and algorithms directed to analysis of the investigational data. Following the two sections, a section on a method of conducting a white blood cell count assay is given.

#### I. DATA COLLECTION

20 Embodiments of the present invention involve the retrieval of investigational data from cellular matter in laboratory samples. Fig. 1 is a perspective view of an optical bio-disc 110 according to the present invention. The present optical bio-disc 110 is shown in conjunction with an optical disc drive 112 and a display monitor 114. Test samples are deposited onto designated areas on bio-disc 110. Once the bio-disc  
25 is inserted into optical disc drive 112, the disc drive is responsible for collecting information from the sample through the use of electromagnetic radiation beams that have been modified or modulated by interaction with the test samples. After the information is analyzed and processed, computer monitor 114 displays the results.

There are two main embodiments of optical bio-disc 110 that can be used in the  
30 present invention. Figs. 2, 3 and 4 illustrate the reflective embodiment of optical bio-disc 110 while Figs. 5, 6 and 7 illustrate the transmissive embodiment of optical bio-disc 110.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

A. Reflective Embodiment

Fig. 2 is an exploded perspective view of the structural elements of one embodiment of the optical bio-disc 110. Fig. 2 is an example of a reflective zone optical bio-disc 110 (hereinafter "reflective disc") that may be used in the present invention. The structural elements include a cap portion 116, an adhesive or channel member 118, and a substrate 120. The cap portion 116 includes one or more inlet ports 122 and one or more vent ports 124. The cap portion 116 may be formed from polycarbonate and is preferably coated with a reflective surface 146 (as better illustrated in Fig. 4) on the bottom thereof as viewed from the perspective of Fig. 2. In the preferred embodiment, trigger markings 126 are included on the surface of the reflective layer 142, Fig. 4. Trigger markings 126 may include a clear window in all three layers of the bio-disc, an opaque area, or a reflective or semi-reflective area encoded with information. The encoded information is used to send data to a processor 166 (shown in Fig. 10A) that in turn interacts with the operative functions of the interrogation or incident beam 152 shown in Figs. 8 and 10A. The second element shown in Fig. 2 is an adhesive or channel member 118 having fluidic circuits 128 or U-channels formed therein. The fluidic circuits 128 are preferably formed by stamping or cutting the membrane to remove plastic film and form the shapes as indicated. Each of the fluidic circuits 128 includes a flow channel 130 and a return channel 132. Some of the fluidic circuits 128 illustrated in Fig. 2 include a mixing chamber 134. Two different types of mixing chambers 134 are illustrated. The first is a symmetric mixing chamber 136 that is symmetrically formed relative to the flow channel 130. The second is an off-set mixing chamber 138. The off-set mixing chamber 138 is formed to one side of the flow channel 130 as indicated. The third element illustrated in Fig. 2 is a substrate 120 including target or capture zones 140. The substrate 120 is preferably made of polycarbonate and has a reflective layer 142 deposited on the top thereof, Fig. 4. The target zones 140 are formed by removing the reflective layer 142 in the indicated shape or alternatively in any desired shape. Alternatively, the target zone 140 may be formed by a masking technique that includes masking the target zone 140 area before applying the reflective layer 142. The reflective layer 142 may be formed from a metal such as aluminum or gold.

Fig. 3 is a top plan view of the optical bio-disc 110 illustrated in Fig. 2 with the reflective layer 142 on the cap portion 116 shown as transparent to reveal the fluidic

WO 03/023571

PCT/US02/28958

circuits 128, the target or capture zones 140 and trigger markings 126 situated within the disc. Since each capture zone has one or more specific antigens to lock down different components (or different cells) in the samples, after assay processing, each capture zone inside the chamber contains a type of cells or cell components. The locking or capturing is accomplished by having one or more antigens with chemical structure that can "lock" onto a specific component of blood cells and thereby capture that specific cell. The separation of cell components is critical for performing a differential count in blood cells, for example, white blood cells. In other assays, rather than cells, the investigational features could instead be beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. The target or capture zones 140 are define the location where the electromagnetic interrogation beam will interact with the test samples.

Fig. 4 is an enlarged perspective view of the reflective zone type optical bio-disc 110 according to one embodiment of the present invention. This view includes a portion of the various layers thereof, cut away to illustrate a partial sectional view of each layer, substrate, coating, or membrane. Fig. 4 shows the substrate 120 that is coated with the reflective layer 142. An active layer 144 is applied over the reflective layer 142. In the preferred embodiment, the active layer 144 may be formed from polystyrene. Alternatively, polycarbonate, gold, activated glass, modified glass, or modified polystyrene, for example, polystyrene-co-maleic anhydride, may be used. In addition hydrogels can be used. As illustrated in this specific embodiment, the plastic adhesive member 118 is applied over the active layer 144. The exposed section of the plastic adhesive member 118 illustrates the cut out or stamped U-shaped form that creates the fluidic circuits 128. The final structural layer in this reflective zone embodiment of the present bio-disc is the cap portion 116. The cap portion 116 includes the reflective surface 146 on the bottom thereof. The reflective surface 146 may be made from a metal such as aluminum or gold.

30 B. Transmissive Embodiment

Fig. 5 is an exploded perspective view of the structural elements of a transmissive type of optical bio-disc 110 according to the present invention. The structural elements of the transmissive type of optical bio-disc 110 similarly include the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

cap portion 116, the adhesive or channel member 118, and the substrate 120 layer. The cap portion 116 includes one or more inlet ports 122 and one or more vent ports 124. The cap portion 116 may be formed from a polycarbonate layer. Optional trigger markings 126 may be included on the surface of a thin semi-reflective layer 143, as best illustrated in Figs. 7 and 8. Trigger markings 126 may include a clear window in all three layers of the bio-disc, an opaque area, or a reflective or semi-reflective area encoded with information. The encoded information is used to send data to a processor 166 (shown in Fig. 10A) that in turn interacts with the operative functions of the interrogation or incident beam 152 shown in Figs. 8 and 10A.

10 The second element shown in Fig. 5 is the adhesive or channel member 118 having fluidic circuits 128 or U-channels formed therein. The fluidic circuits 128 are formed by stamping or cutting the membrane to remove plastic film and form the shapes as indicated. Each of the fluidic circuits 128 includes the flow channel 130 and the return channel 132. Some of the fluidic circuits 128 illustrated in Fig. 5 include the mixing chamber 134. Two different types of mixing chambers 134 are illustrated. The first is the symmetric mixing chamber 136 that is symmetrically formed relative to the flow channel 130. The second is the off-set mixing chamber 138. The off-set mixing chamber 138 is formed to one side of the flow channel 130 as indicated.

20 The third element illustrated in Fig. 5 is the substrate 120, which may include the target or capture zones 140. The substrate 120 is preferably made of polycarbonate and has the thin semi-reflective layer 143 deposited on the top thereof, Fig. 8. The semi-reflective layer 143 associated with the substrate 120 of the disc 110 illustrated in Figs. 5 and 8 is significantly thinner than the reflective layer 142 on the substrate 120 of the reflective disc 110 illustrated in Figs. 2, 3 and 4. The thinner semi-reflective layer 143 allows for some transmission of the interrogation beam 152 through the structural layers of the transmissive disc as shown in Fig. 11. The thin semi-reflective layer 143 may be formed from a metal such as aluminum or gold.

25 Fig. 6 is a top plan view of the transmissive type optical bio-disc 110 illustrated in Fig. 4 with the transparent cap portion 116 revealing the fluidic channels, the trigger markings 126 and the target or capture zones 140 as situated within the disc. The target or capture zones 140 are where the electromagnetic beam will interact with the test samples. After the spinning of the disc, specific components of cells in the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

samples are captured in different capture zones by various capture agent or antigens pre-loaded inside the chamber.

Fig. 7 is an enlarged perspective view of the optical bio-disc 110 according to the transmissive disc embodiment of the present invention. The disc 110 is illustrated with a portion of the various layers thereof cut away to illustrate a partial sectional view of each layer, substrate, coating, or membrane. Fig. 7 illustrates a transmissive disc format with the clear cap portion 116, the thin semi-reflective layer 143 on the substrate 120, and trigger markings 126. Trigger markings 126 include opaque material placed on the top portion of the cap. Alternatively the trigger markings 126 may be formed by clear, non-reflective windows etched on the thin reflective layer 143 of the disc, or any mark that absorbs or does not reflect the signal coming from the trigger detector 160, Fig. 10A. Fig. 7 also shows, the target zones 140 formed by marking the designated area in the indicated shape or alternatively in any desired shape. Markings to indicate target zone 140 may be made on the thin semi-reflective layer 143 on the substrate 120 or on the bottom portion of the substrate 120 (under the disc). Alternatively, the target zones 140 may be formed by a masking technique that includes masking the entire thin semi-reflective layer 143 except the target zones 140. In this embodiment, target zones 140 may be created by silk screening ink onto the thin semi-reflective layer 143. An active layer 144 is applied over the thin semi-reflective layer 143. In the preferred embodiment, the active layer 144 is a 40 to 200  $\mu\text{m}$  thick layer of 2% polystyrene. Alternatively, polycarbonate, gold, activated glass, modified glass, or modified polystyrene, for example, polystyrene-co-maleic anhydride, may be used. In addition hydrogels can be used. As illustrated in this embodiment, the plastic adhesive member 118 is applied over the active layer 144. The exposed section of the plastic adhesive member 118 illustrates the cut out or stamped U-shaped form that creates the fluidic circuits 128. The final structural layer in this transmissive embodiment of the present bio-disc 110 is the clear, non-reflective cap portion 116 that includes inlet ports 122 and vent ports 124.

30 C. Optical Properties of the Disc Embodiments

One of the main differences between the two disc embodiments is the thickness of the coating of the top layer on the optical disc. In the case of the transmissive disc, a thin semi-reflective layer 143 is deposited on the top of the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

substrate layer 120. In the case of the reflective disc, a substantially thicker reflective layer is deposited on top of its substrate layer 120. In the preferred embodiment illustrated by Fig. 8, the thin semi-reflective layer 143 of the transmissive disc is approximately 100 to 300 Å thick and does not exceed 400 Å. This is because the gold film layer is fully reflective at a thickness greater than 800 Å and allows for the light to transmit through the gold film at a thickness of approximately below 400 Å. As indicated below, Table 2 presents the reflective and transmissive characteristics of a gold film relative to the thickness of the film.

10

**TABLE 2**  
**Au film Reflection and Transmission (Absolute Values)**

Thickness (Angstroms)	Thickness (nm)	Reflectance	Transmittance
0	0	0.0505	0.9495
50	5	0.1683	0.7709
100	10	0.3981	0.5169
150	15	0.5873	0.3264
200	20	0.7142	0.2057
250	25	0.7959	0.1314
300	30	0.8488	0.0851
350	35	0.8836	0.0557
400	40	0.9067	0.0368
450	45	0.9222	0.0244
500	50	0.9328	0.0163
550	55	0.9399	0.0109
600	60	0.9488	0.0073
650	65	0.9482	0.0049
700	70	0.9505	0.0033
750	75	0.9520	0.0022
800	80	0.9531	0.0015

The threshold density for transmission of light through the gold film is approximately 400 Å. In addition to Table 2, Fig. 9 provides a graphical representation 15 of the inverse proportion of the reflective and transmissive nature of the thin semi-reflective layer 143 based upon the thickness of the gold. Reflective and transmissive values used in the graph illustrated in Fig. 9 are absolute values. As shown in Fig. 8, the thinner semi-reflective layer 143 allows a portion of the incident or interrogation beam 152 to penetrate and pass through. The incident or interrogation beam 152 can

WO 03/023571

PCT/US02/28958

thus be detected by a top detector 158 as shown in Fig. 10A. At the same time, some of the light is reflected or returned back along the incident path.

In the case of the reflective optical bio-disc, the return beam 154 carries the information about the biological sample. As discussed above, such information about the biological sample is contained in the return beam essentially only when the incident beam is within the flow channel 130 or target (or capture) zones 140 and thus in contact with the sample. The return beam 154 may also carry information encoded in or on the reflective layer 142 or otherwise encoded in the wobble grooves 170 illustrated in Figs. 13 and 14. As would be apparent to one of skill in the art, pre-recorded information is contained in the return beam 154 of the reflective disc with target or capture zones, only when the corresponding incident beam is in contact with the reflective layer 142. Such information is not contained in the return beam 154 when the incident beam 152 is in an area where the information bearing reflective layer 142 has been removed or is otherwise absent.

The methods of the present invention may also be readily applied to bio-discs including equi-radial channels such as those disclosed in commonly assigned U.S. Provisional Application Serial No. 60/353,014 entitled "Optical Discs Including Equi-Radial and/or Spiral Analysis Zones and Related Disc Drive Systems and Methods" filed January 29, 2002 which is herein incorporated by reference.

20

#### D. System Apparatus

Fig. 10A is a representation in perspective and block diagram illustrating the operation of the system apparatus which includes an optical assembly 148, a light source 150 that produces the incident or interrogation beam 152, a return beam 154, and a transmitted beam 156. In the case of the reflective bio-disc embodiment, the return beam 154 is reflected from the reflective surface 146 of the cap portion 116 of the optical bio-disc 110. In this reflective embodiment of the present optical bio-disc 110, the return beam 154 is detected and analyzed for the presence of signal agents by a bottom detector 157. In the transmissive bio-disc embodiment, the transmitted beam 156 is detected by a top detector 158 and is also analyzed for the presence of signal agents. In the transmissive embodiment, a photo detector may be used as a top detector 158.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 10A also shows a hardware trigger mechanism that includes the trigger markings 126 on the disc and a trigger detector 160. The hardware triggering mechanism is used in both reflective bio-discs and transmissive bio-discs. The triggering mechanism allows the processor 166 to collect data only when the 5 interrogation beam 152 is on a respective target or capture zone 140. Furthermore, in the transmissive bio-disc system, a software trigger may also be used. The software trigger uses the bottom detector to signal the processor 166 to collect data as soon as the interrogation beam 152 hits the edge of a respective target or capture zone 140. Fig. 10A also illustrates a drive motor 162 and a controller 164 for controlling the 10 rotation of the optical bio-disc 110. Fig. 10A further shows the processor 166 and analyzer 168 implemented in the alternative for processing the return beam 154 and transmitted beam 156 associated the transmissive optical bio-disc. In the case of the transmissive optical bio-disc, the transmitted beam 156 carries the information about the biological sample. In this embodiment, there is pre-recorded information on disc.

15 Detector 158 collects the beam.

In another embodiment of the present invention, a split top detector is used to collect the transmitted beam 156. Fig. 10B shows a split detector according to an embodiment of the present invention. Detector 170 has two detector components 172 and 174. The two detector components gather transmitted beam 156 that is refracted by object 186 (e.g. cell) and generate two signals A and B. Object 186 can be an investigational feature such as a biological cell, for example, a red or white blood cell. A differential signal can be obtained by subtracting one signal from the other (i.e. A-B or B-A). When the detector components are over an area that has an object that scatters the incident beam 152, they detect changes in the signal. Each detector sees a change that is opposite to that of the other detector. In other words, when the light bends toward one detector, it sees an increase in signal while the other detector sees a decrease in signal. Because of this property, signal to noise ratio can be increased significantly by generating a signal that is the difference of the signals produced by each of the two detectors. This difference signal has two advantages. First, any noise 20 (optical or electric) in the system that effects both detectors equally is eliminated in the difference signal. Second, objects of interest on the disc that refract light, rather than just absorb it, will cause a large and easily detected change in the difference signal.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

This aids the task of analysis, which requires isolation signals generated by objects of interest from background noise.

A more thorough discussion of the split detector is presented in commonly owned U.S. Provisional Patent Application No. 60/355,090 filed Feb. 14, 2002, entitled "Segmented Area Detector for BioDrive and Methods Relating Thereto" and related Provisional Applications of the same title having Serial Nos. 60/335,123; 60/352,649; 60/353,739; and 60/355,090 respectively filed on October 10, 2001; January 28, 2002; January 30, 2002; and February 7, 2002 all of which are hereby incorporated herein by reference. A more thorough discussion of the different types of detector that can be used in conjunction with the present invention is presented in commonly owned U.S. Patent Application No. 10/043,688, filed Jan. 10, 2002, entitled "Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging" which is also hereby incorporated herein by reference.

Figs. 11 to 16 show cross-sectional views of both reflective and transmissive embodiments to illustrate the optical properties of the discs and how detectors are used to collect information-carrying beams from the disc.

With reference now more particularly to Fig. 11, there is shown a partial cross sectional view of the reflective disc embodiment of the optical bio-disc 110 according to the present invention. Fig. 11 illustrates the substrate 120 and the reflective layer 142. As indicated above, the reflective layer 142 may be made from a material such as aluminum, gold or other suitable reflective material. In this embodiment, the top surface of the substrate 120 is smooth. Fig. 11 also shows the active layer 144 applied over the reflective layer 142. As shown in Fig. 11, the target zone 140 is formed by removing an area or portion of the reflective layer 142 at a desired location or, alternatively, by masking the desired area prior to applying the reflective layer 142. As further illustrated in Fig. 11, the plastic channel member 118 is applied over the active layer 144. Fig. 11 also shows the cap portion 116 and the reflective surface 146 associated therewith. Thus when the cap portion 116 is applied to the plastic channel member 118 including the desired cutout shapes, flow channel 130 is thereby formed. As indicated by the arrowheads shown in Fig. 11, the path of the incident beam 152 is initially directed toward the substrate 120 from below the disc 110. The incident beam then focuses at a point proximate the reflective layer 142. Since this focusing takes place in the target zone 140 where a portion of the reflective layer 142

WO 03/023571

PCT/US02/28958

is absent, the incident continues along a path through the active layer 144 and into the flow channel 130. The incident beam 152 then continues upwardly traversing through the flow channel to eventually fall incident onto the reflective surface 146. At this point, the incident beam 152 is returned or reflected back along the incident path and thereby forms the return beam 154.

Fig. 12 is a partial cross sectional view of the transmissive embodiment of the bio-disc 110 according to the present invention. Fig. 12 illustrates a transmissive disc format with the clear cap portion 116 and the thin semi-reflective layer 143 on the substrate 120. Fig. 12 also shows the active layer 144 applied over the thin semi-reflective layer 143. In the preferred embodiment, the transmissive disc has the thin semi-reflective layer 143 made from a metal such as aluminum or gold approximately 100 to 300 Angstroms thick and preferably does not exceed 400 Angstroms. This thin semi-reflective layer 143 allows a portion of the incident or interrogation beam 152 from the light source 150, Fig. 10A, to penetrate and pass upwardly through the disc 10 to be detected by a top detector 158, while some of the light is reflected back along the same path as the incident beam but in the opposite direction. In this arrangement, the return or reflected beam 154 is reflected from the semi-reflective layer 143. Thus in this manner, the return beam 154 does not enter into the flow channel 130. The reflected light or return beam 154 may be used for tracking the incident beam 152 or 15 20 pre-recorded information tracks formed in or on the semi-reflective layer 143 as described in more detail in conjunction with Figs. 13 and 14. In the disc embodiment illustrated in Fig. 12, a defined target zone 140 may or may not be present. Target zone 140 may be created by direct markings made on the thin semi-reflective layer 143 on the substrate 120. These marking may be done using silk screening or any 25 equivalent method. In the alternative embodiment where no physical indicia are employed to define a target zone, the flow channel 130 in effect is utilized as a confined target area in which inspection of an investigational feature is conducted.

Fig. 13 is a cross sectional view taken across the tracks of the reflective disc embodiment of the bio-disc 110 according to the present invention. This view is taken 30 longitudinally along a radius and flow channel of the disc. Fig. 13 includes the substrate 120 and the reflective layer 142. In this embodiment, the substrate 120 includes a series of grooves 170. The grooves 170 are in the form of a spiral extending from near the center of the disc toward the outer edge. The grooves 170

WO 03/023571

PCT/US02/28958

are implemented so that the interrogation beam 152 may track along the spiral grooves 170 on the disc. This type of groove 170 is known as a "wobble groove." A bottom portion having undulating or wavy sidewalls forms the groove 170, while a raised or elevated portion separates adjacent grooves 170 in the spiral. The reflective 5 layer 142 applied over the grooves 170 in this embodiment is, as illustrated, conformal in nature. Fig. 13 also shows the active layer 144 applied over the reflective layer 142. As shown in Fig. 13, the target zone 140 is formed by removing an area or portion of the reflective layer 142 at a desired location or, alternatively, by masking the desired area prior to applying the reflective layer 142. As further illustrated in Fig. 13, 10 the plastic adhesive or channel member 118 is applied over the active layer 144. Fig. 13 also shows the cap portion 116 and the reflective surface 146 associated therewith. Thus, when the cap portion 116 is applied to the plastic adhesive member 118 including the desired cutout shapes, the flow channel 130 is thereby formed.

Fig. 14 is a cross sectional view taken across the tracks of the transmissive disc embodiment of the bio-disc 110 according to the present invention, as described in Fig. 12. This view is taken longitudinally along a radius and flow channel of the disc. Fig. 14 illustrates the substrate 120 and the thin semi-reflective layer 143. This thin semi-reflective layer 143 allows the incident or interrogation beam 152, from the light source 150, to penetrate and pass through the disc to be detected by the top 15 detector 158, while some of the light is reflected back in the form of the return beam 154. The thickness of the thin semi-reflective layer 143 is determined by the minimum amount of reflected light required by the disc reader to maintain its tracking ability. The substrate 120 in this embodiment, like that discussed in Fig. 13, includes the 20 series of grooves 170. The grooves 170 in this embodiment are also preferably in the form of a spiral extending from near the center of the disc toward the outer edge. The grooves 170 are implemented so that the interrogation beam 152 may track along the spiral. Fig. 14 also shows the active layer 144 applied over the thin semi-reflective 25 layer 143. As further illustrated in Fig. 14, the plastic adhesive or channel member 118 is applied over the active layer 144. Fig. 14 also shows the cap portion 116 without a reflective surface 146. Thus, when the cap is applied to the plastic channel 30 member 118 including the desired cutout shapes, the flow channel 130 is thereby formed and a part of the incident beam 152 is allowed to pass therethrough substantially unreflected.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 15 is a view similar to Fig. 11 showing the entire thickness of the reflective disc and the initial refractive property thereof. Fig. 16 is a view similar to Fig. 12 showing the entire thickness of the transmissive disc and the initial refractive property thereof. Grooves 170 are not seen in Figs. 15 and 16 since the sections are cut along the grooves 170. Figs. 15 and 16 show the presence of the narrow flow channel 130 that is situated perpendicular to the grooves 170 in these embodiments. Figs. 13, 14, 15, and 16 show the entire thickness of the respective reflective and transmissive discs. In these views, the incident beam 152 is illustrated initially interacting with the substrate 120 which has refractive properties that change the path of the incident beam as illustrated to provide focusing of the beam 152 on the reflective layer 142 or the thin semi-reflective layer 143.

#### E. Analog-to-Digital Processing

Whether obtained from the return beam 154 of the reflective disc or the transmitted beam 156 of the transmissive disc, the information about the biological test sample is directed to a processor 166 (see Fig. 10A) for signal processing. This processing involves transformation of the analog signal detected by the bottom detector 157 (reflective disc) or the top detector 158 (transmissive disc) to a discrete digital form.

Fig. 17 is a summary flow chart of the information retrieval process related to the apparatus shown in Fig. 10B. In step 270, if the embodiment is a transmissive bio-disc, a transmissive beam carrying the information on the biological sample is detected by detector 158. If the embodiment is a reflective bio-disc, reflected beam 154 is detected by detector 157 in step 272. In either case, in step 274 the information is sent to analog-to-digital transformation. In step 276, the resulting digital data is an array.

Fig. 18 shows the analog-to-digital transformation performed by processor 166. The transformation involves sampling the analog signal 210 at fixed time intervals 212 and encoding the corresponding instantaneous analog amplitude 214 of the signal as a discrete binary integer 216. Sampling is started at some start time 218 and stopped at some end time 220. The two common values associated with any analog-to-digital conversion process are sampling frequency and bit depth. The sampling frequency, also called the sampling rate, is the number of samples taken per unit time. A higher

WO 03/023571

PCT/US02/28958

sampling frequency yields a smaller time interval 212 between consecutive samples, which results in a higher fidelity of the digital signal 222 compared to the original analog signal 210. Bit depth is the number of bits used in each sample point to encode the sampled amplitude 214 of the analog signal 210. The greater the bit depth, the better the binary integer 216 will approximate the original analog amplitude 214. In one embodiment of the present invention, the sampling rate is 8 MHz with a bit depth of 12 bits per sample, allowing an integer sample range of 0 to 4,095 (0 to  $2^n - 1$ , where n is the bit depth).

The bit depth and sampling frequency combination can be customized to accommodate the particular accuracy necessary in other embodiments. By way of example and not limitation, it may be desirable to increase sampling frequency in embodiments involving methods for counting beads, which are generally smaller than cells. During the analog-to-digital transformation, each consecutive sample point 224 along the laser path is stored consecutively on disc or in memory as a one-dimensional array 226. Each consecutive track contributes an independent one-dimensional array. All the one dimensional arrays are combined to form a two-dimensional array 228 (shown in Fig. 21B) that is analogous to a common image representation.

A data collection example is offered here to illustrate further the details involved in data collection from bio-discs. Fig. 19 shows a perspective view of an optical bio-disc 110 of the present invention. The Fig. 19 includes an enlarged detailed perspective view of the section indicated to show a captured white blood cell 230 positioned relative to the tracks 232 of the optical bio-disc. As shown, the interaction of incident beam 152 with white blood cell 230 yields a signal-containing beam, either in the form of a return beam 154 of the reflective disc or a transmitted beam 156 of the transmissive disc, which is detected by either of bottom detector 157 or top detector 158.

Figs. 20A, 20B and Figs. 21A to 21D illustrate how a cell is captured into digital data. In other assays, the investigational feature of interest could instead of a cell, be a bead (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Fig. 20A is a graphical representation of a white blood cell 230 positioned relative to the tracks 232 of an optical bio-disc 110.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

The cell 230 is located on a disc similar to the disc shown in Fig. 19. Fig. 20B is a series of signature traces derived from the white blood cell 230 of Fig. 20A according to the present invention. Fig. 20B depicts the corresponding traces labeled A, B, C and D. The analog signature traces (signals) 210 are then directed to processor 166 for transformation to a corresponding digital signal 222 (shown in Figs. 21A-21D). Fig. 20B further reveals that a scan over a white blood cell 230 yields perturbations 231 of the incident beam that can be detected and processed.

Fig. 21 is a graphical representation illustrating the layout relationship among Figs. 21A, 21B, 21C, and 21D which combine to illustrate how the four traces A, B, C and D from Fig. 20B are converted into a single two-dimensional digital data array 228.

With specific reference now to Fig. 21A, there is shown sampled analog signals 210 from tracks A and B of the optical bio-disc shown in Fig. 20A. Processor 166 then encodes the corresponding instantaneous analog amplitude 214 of the analog signal 210 as a discrete binary integer 216 (Fig. 12). The resulting series of data points is the digital signal 222 that is analogous to the sampled analog signal 210.

Moving now to Fig. 21B, digital signal 222 from tracks A and B (Fig. 21A) is stored as an independent one-dimensional memory array 226. Each consecutive track contributes a corresponding one-dimensional array, which when combined with the previous one-dimensional arrays, yields a two-dimensional array 228 of digital data. The digital data is then stored in memory or on disc as a two-dimensional array 228 of sample points 224 (Fig. 18) that represent the relative intensity of the return beam 154 or transmitted beam 156 (Fig. 19) at a particular point in the sample area. The two-dimensional array is then stored in memory or on disc in the form of a raw file, data file, or image file 240. The data stored in file 240 is then retrieved from memory 242 and used as data input 244 to analyzer 168 (Fig. 10A).

Fig. 21C shows sampled analog signals 210 from tracks C and D of the optical bio-disc shown in Fig. 20A. Processor 166 then encodes the corresponding instantaneous analog amplitude 214 of the analog signal 210 as a discrete binary integer 216 (Fig. 18). The resulting series of data points is the digital signal 222 that is analogous to the sampled analog signal 210.

Referring now to Fig. 21D, digital signal 222 from tracks C and D (Fig. 21C) is stored as an independent one-dimensional memory array 226. Each consecutive

WO 03/023571

PCT/US02/28958

track contributes a corresponding one-dimensional array, which when combined with the previous one-dimensional array, yields a two-dimensional array 228 (Fig. 21B) that is analogous to an image. As above, the digital data is then stored in memory or on disc as a two-dimensional array 228 of sample points 224 (Fig. 18) that represent the 5 relative intensity of the return beam 154 or transmitted beam 156 (Fig. 19) at a particular point in the sample area. The two-dimensional array is then stored in memory or on disc in the form of a raw file, data file, or image file 240. The data stored in the file 240 is then retrieved from memory 242 and used as data input 244 to analyzer 168 (Fig. 10A).

10 Additional methods and algorithms for capturing data from the optical bio-disc and transforming this data into a two-dimensional array of integers have general broad applicability and have been disclosed in the commonly assigned U.S. Provisional Application Serial No. 60/291,233 entitled "Variable Sampling Control for Rendering Pixelation of Analysis Results in Optical Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto" filed May 16, 2001 which is incorporated herein by reference.

15 Another embodiment of the invention stores the investigational data in an archive. The archive provides a place where investigational data can be cataloged. Subsequently, groups of data can be analyzed to conduct health trend studies of different population groups. For example, the investigational data can be correlated 20 with patient information to create a catalog of investigational data that can be categorized by the attributes of the patients. Information such as age, sex, race, and blood type, for example, can be used to categorize the investigational data. The archive can take advantage of the features of a searchable relational database. Once 25 such an archive is built, analysis can be conducted on investigational data of a certain category. For example, population health trend studies may be conducted by retrieving investigational data extracted from samples donated by patients from a certain city and analyzing these investigational data. The benefit is that the study may be conducted without the presence of the population itself. Overtime, a historical archive can be built and studies can be conducted on a particular population over a 30 time period and trends over time can be analyzed.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

**II. DATA ANALYSIS**

The following sections are directed to the data analysis aspects of the present invention. These are discussed specifically in conjunction with Figs. 22 to 71D and with general reference to prior Figs. 1 to 21.

5

**A. Data Collection and Processing**

In one embodiment, the investigational data from the bio-disc that is stored in the form of an array of digital data is analyzed for cell counting. In another embodiment, investigational data in other forms are used for analysis. In other assays, 10 the investigational data could contain information for counting beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. One embodiment of the present invention sends the investigational data in real time to the data analyzer. In another embodiment, the 15 investigational data is stored and later retrieved for analysis. In both embodiments, the computational and processing algorithms of the present invention are stored in analyzer 168 (Fig. 10A) and applied to the input investigational data 244 to produce useful output results 262 (Fig. 22) that may be displayed on the display monitor 114 (Fig. 10A). By way of example of not limitation, the following describes analysis 20 methods for investigational data in the form of digital data arrays. In view of the present disclosure, those of skill in the art may appreciate that the methods of the present invention can be applied to various forms of investigational data beyond the format of digital data arrays.

Moving on now to Fig. 22, there is shown a flow chart presenting a general 25 overview of the steps for data analysis according to the processing methods and computational algorithms of the present invention. A first step of the present processing method involves receipt of the input investigational data 244. As described above, data analysis starts with a two-dimensional array of integers in the range of 0 to 4,095. The next step 246 is selecting an evaluation rectangle of the disc for 30 counting. Once this rectangle is defined, an objective then becomes making an actual count of all white blood cells contained inside the rectangle. This area is termed the "investigational data area". The implementation of step 246 depends on the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

configuration of the disc. Two possible disc configurations include discs with windows and discs without windows.

By way of example and not limitation, in embodiments of the invention using discs with windows such as the target or capture zones 140 shown in Figs. 2 and 4, 5 the software recognizes the windows and crops a section thereof for analysis and counting. In one preferred embodiment, such as that illustrated in Fig. 2, each window (or capture zone) has the shape of a 1 x 2 mm rectangle with a semicircular section on each end thereof. In this embodiment, the software crops a standard-size evaluation rectangle of 1 x 2 mm area inside a respective window. In an aspect of this 10 embodiment, the reader may take several consecutive sample values to compare the number of cells in several different windows.

In embodiments of the invention using a transmissive disc without windows, such as that as shown in Fig. 4, step 246 is performed in one of two different manners. 15 The position of the standard rectangle is chosen either by positioning its center relative to a point with fixed coordinates or by finding calibration dot, which is preferably a spot of dark dye with special characteristics. In the case where a calibration dot is employed, a dye with a desired contrast is deposited in a specific position on the disc with respect to two clusters of cells. The optical disc reader is then directed to skip to the center of one of the clusters of cells and the standard-size 20 (1x2 mm) evaluation rectangle is then centered on the selected cluster. In other assays, the cells might instead be beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters having a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention.

Besides accommodating both types of discs, step 246 also allows for a user's 25 option. The user may specify a desired sample area shape, such as a rectangular area, by direct interaction with mouse selection or otherwise, for cell counting. In the present embodiment of the software, this involves using the mouse to click and drag a shape over the desired portion of a graphical representation of the investigational data that is displayed on a monitor 114 (Fig. 1). Regardless of the evaluation area 30 selection method, a respective rectangular area is evaluated for counting in the next step 248.

The third step in Fig. 22 is step 248, which is directed to background illumination uniformization. This process corrects possible background uniformity

WO 03/023571

PCT/US02/28958

fluctuations caused by some hardware configurations. Background illumination uniformization offsets the intensity level of each sample point such that the overall background, or the portion of the investigational data that is not cells, approaches a plane with an arbitrary background value  $V_{background}$ . While  $V_{background}$  may be decided 5 in many ways, such as taking the average value over the standard rectangular sample area,  $V_{background}$  is set to 2,000 in the present embodiment. The value V at each point P of the selected rectangular sample area is replaced with the number ( $V_{background} + (V - average\ value\ over\ the\ neighborhood\ of\ P)$ ). If needed, the resulting V maybe truncated to fit the actual possible range of values, which is 0 to 4,095 in a preferred 10 embodiment of the present invention. The dimensions of the neighborhood rectangles are chosen to be sufficiently larger than the size of a cell and sufficiently smaller than the size of the standard rectangle. In other assays, the neighborhood rectangles are chosen for beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident 15 beam of the optical system in the present invention.

The next step in the flow chart of Fig. 22 is a normalization step 250. In conducting normalization step 250, a linear transform is performed with the data in the standard rectangular sample area so that the average becomes 2,000 with a standard deviation of 600. If necessary, the values are truncated to fit the range 0 to 4,095. 20 This step 250, as well as the background illumination uniformization step 248, makes the software less sensitive to hardware modifications and tuning. By way of example and not limitation, the signal gain in the detection circuitry, such as top detector 158 (Fig. 13), may change without significantly affecting the resultant cell counts.

As shown in Fig. 22, a filtering step 252 is next performed. For each point P in 25 the standard rectangle, the number of points in the neighborhood of P, with dimensions smaller than indicated in step 248, with values sufficiently distinct from  $V_{background}$  is calculated. The number of points calculated should approximate the size of a cell in the investigational data. In other assays, the number of points calculated should approximate the objects of interest including beads (bead-based assays), 30 agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters having a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. If the number of distinct points found is large enough, the value at P remains as it was; otherwise it is assigned to  $V_{background}$ . This filtering operation is

WO 03/023571

PCT/US02/28958

performed to remove noise, and in the optimal case only cells remain in the investigational data while the background is uniformly equal  $V_{background}$ .

An optional step 254 directed to removing bad components may be performed as indicated in Fig. 22. Defects such as scratches, bubbles, dirt, and other similar 5 irregularities may pass through filtering step 252. These defects may cause cell counting errors either directly or indirectly by affecting the overall distribution in the histogram of the investigational data. This step takes advantage of the fact that these defects are sufficiently larger in size than cells and use the appropriate algorithms to remove them. In other assays, this many be readily applied to other investigational 10 features such as beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Their size is taken into account in determining how best to remove defects. After the optional step 254, steps 248, 250, and 252 are preferably repeated.

15 The next processing step shown in Fig. 22 is step 256, which is directed to counting cells by bright centers. The counting step 256 consists of several substeps. They are directed to (1) using convolution to make the centers of cells more visible, (2) marking these centers, and (3) performing an actual count of the cells. In some hardware configurations, some cells may appear without bright centers. In these 20 instances, only a dark rim is visible and the following two optional steps 258 and 260 are useful.

Step 258 is directed to removing found cells from the picture. In step 258, the 25 circular region around the center of each found cell is filled with the value 2,000 (the background default) so that the cells with both bright centers and dark rims would not be found twice. Step 260 is directed to counting additional cells by recognizing dark rims. Two transforms are performed on the investigational data after step 258. The goal is to make the dark rims more apparent so cells not counted by the bright center method in step 256 can be counted. In another embodiment, the method of counting 30 cells by dark rims can be used in place of the method of counting cells by bright centers.

After counting step 256, or after counting step 260 when optionally employed, the last step illustrated in Fig. 22 is a results output step 262. The number of cells found in the standard rectangle is displayed on the monitor 114 shown in Fig. 1. Each

WO 03/023571

PCT/US02/28958

cell identified is marked with a cross on the displayed optical bio-disc-derived investigational data.

A more detailed description of each step shown in Fig. 22, with corresponding block diagrams outlining the sub-steps in detail, is given below.

5

Step 1: Data Input

Step 244 retrieves data stored in a two-dimensional array with range from 0 to 4,095. Black segments are filled with value constant zero, while area where light is detected has a range from 1 to 4,095. In consequent data evaluation, zeros are ignored.

10

Step 2a: Selecting Evaluation Rectangles in Discs with Windows

Fig. 23 shows the detailed process of selecting evaluation rectangles (step 246 of Fig. 22). In step 300, the type of selection is determined. The first option 302 involves selecting evaluation rectangles from a bio-disc with physically embedded windows such as target or capture zones 140 shown in Figs. 2 and 4. Fig. 24 shows a graphical representation of an example investigational data of a disc with windows 326 and 328 as displayed by the software according to an embodiment of the present invention.

15

The detailed process of step 304 according to one embodiment is shown in Fig. 25. In step 330, Fig. 25, the investigational data array is compressed in such a way that only every n-th line and every n-th column are considered. Then in step 332, the compressed investigational data is scanned in a row-by-row manner to determine a threshold that will be used in the binarization step. Fig. 26 offers an example for illustration. In example row 342, each cell represents a point on the investigational data and the value in each cell represents the light intensity detected at that point. The scanning begins by selecting all possible segments of length L for each row of the investigational data array. Thus Fig. 26 shows all the possible segments of length L for this example row from the investigational data array. The actual array will have many of such example rows. L is chosen to be slightly less than the width of a window on disc. Then, an average value is calculated for each segment, using all integer values within the segment in question. Because the segment is "sliding" along the row, the process is termed finding "sliding averages". Once the averages for the all the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

segments of length L of all the rows are found, the minimum and maximum of the averages are determined. A threshold value T is calculated as  $(\min(\text{averages}) + \max(\text{averages})) / 2$ . This process narrows down the search for windows to segments that cover the window areas. Because window areas are brighter than non-window areas, the averages of these segments will be higher than the threshold value T and can be more easily identified in later steps.

One embodiment speeds the calculation of the average value of a segment L as follows. When calculating the sum  $a(n)$  of all values in a segment for n from K+1 till K+L (K+1 being the starting point of the segment),  $a(K+L)$  is added to the sum  $a(n)$  and  $a(K)$  is subtracted from the sum  $a(n)$ . This is repeated for all values of K. This saves the algorithm from having to add up the sum of all values of a segment all over again each time it moves one unit down the row. This overall process of finding the threshold is repeated for each row until all rows are scanned in this manner.

Returning to Fig. 25, binarization is performed in step 334. In this step, points with value over the threshold value T are declared black while the rest are declared white. So now the investigational data can be treated as if it were a black and white image. Following binarization, regularization is performed on the investigational data in step 336. Regularization consists of two parts: erosion and expansion. Erosion is performed as follows. For an image P, a corresponding image P' is constructed. A point X' in P' is declared white if (1) the corresponding point X in P is white, or (2) any neighbor of X is white. If neither condition is met, then X' is declared black. P' is the resulting image of erosion. Expansion operates in an opposite manner. For an image R, a corresponding image R' is constructed. A point Y' in R' is declared black if (1) the corresponding point Y in R is black, or (2) any neighbor of Y is black. If neither condition is met, then Y' is declared white. R' is the resulting image of expansion. A composition of several erosions and expansions makes a binary image more regular (single black and single white points disappear).

After regularization is performed, the resulting investigational data is passed to step 338 for the extraction of connected components. In this step, the investigational data is scanned so that connected components are defined. For any given pair of black points in the investigational data, the pair is defined to be in the same component if the two points can be connected by a chain of black points between

WO 03/023571

PCT/US02/28958

them. The main purpose of this step is to decompose the investigational data into a collection of connected black components with white spaces separating them.

Fig. 27 shows the sub-steps in the extraction of connected components. The first step, 350, involves assigning initial component numbers. The investigational data is scanned in such a way that the first black point encountered in scanning is assigned a "0", the next a "1", and so forth. All the white points are assigned a "-1". In step 352, the initial scanning direction is set. There are four directions:

- (1) "++" denotes top to bottom, left to right,
- (2) "+-" denotes top to bottom, right to left,
- (3) "-+" denotes bottom to top, left to right, and
- (4) "--" denotes bottom to top, right to left.

Initially the scanning direction is set to "++", meaning from top to bottom and left to right. In step 354, the investigational data is scanned as follows. Every black point P that has a black neighbor P' with an assigned number (assigned in step 350) less than the assigned number for P gets the assigned number of P'. For example, if P has a number of 7 and it has a neighbor P' that has a number of 6, P's new number is 6.

Change determination step 356 follows. The algorithm checks to see if any black point in the investigational data has been assigned a new number by step 354. If so, the scanning direction is altered in step 358. The change of direction follows these rules:

- (1) If the current direction is "++", the new direction is "-".
  - (2) If the current direction is "+-", the new direction is "+".
  - (3) If the current direction is "-+", the new direction is "-".
  - (4) If the current direction is "--", the new direction is "++".
- 25 The scanning begins again with the new direction in step 354. This cycle continues until a scan can be completed without detecting any changes in component numbers. Alternating the scanning directions upon a component number change reduces the number of scanning passes needed for the process.
- After step 356, all points within a connected component should have the same 30 number. In step 360, the points in the components are re-numbered. This step is needed because some of numbers might have disappeared. For example, if there were 20 black points in the initial investigational data, then each point would have received a number from 0 to 19. If after scanning it was found that there were 5

WO 03/023571

PCT/US02/28958

components, 5 of the 20 initial numbers would have disappeared. This would leave the black points in the 5 components with, for example, numbers of 1, 4, 9, 16, and 18. The re-enumeration step would renumber the points in these 5 components from 0 to 4. In general, the enumeration goes from 0 to N-1 for N components in the 5 investigational data. This completes the process of connected component extraction.

Returning to Fig. 25, after the extraction of connected components (step 338) comes the step of finding components that fall within the windows (step 340). The biggest black components meeting certain logical restrictions are selected. The logical restrictions include the number of windows that can be on a disc and the 10 approximate distance between windows. This completes the process of finding windows, which brings the overall rectangle selection process (in Fig. 23) to the next 15 step of cropping standard rectangle inside window (step 306).

In order to find a standard rectangle with (1) the biggest summary illumination and (2) a center at one of the points of component corresponding to window, the area 15 including this component is scanned as follows. First the algorithm scans in the horizontal direction and calculates sliding averages as illustrated in Fig 26. Then the algorithm scans in the vertical direction and calculates sliding averages. This involves creating segments that run vertically across several rows in the investigational data array. The segments will have the length approximately to that of height of a window. 20 The intersection of the maximum averages from the horizontal sliding averages and vertical sliding averages is declared the center of the evaluation rectangle. This point has the maximum value because it is the brightest spot in the window. The point is selected as the center of the evaluation rectangle. Once the center is defined, in step 312, the 1 x 2 mm (standard size) evaluation rectangle is created by measuring from 25 the center point. Fig. 28 shows the result of cropping an evaluation rectangle after finding the windows on the software display according to an embodiment of the present invention.

Other techniques for finding the center point include using edge tracing to find 30 the windows, finding the center of gravity (using point values) of a window, and manually selecting a point by inspecting image representing the investigational data.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Step 2b: Selecting Evaluation Rectangles in Discs without Windows

The second option in selecting evaluation rectangles is for bio-discs without windows step 308 in Fig. 23. One embodiment uses the dark spots on the disc to locate the desired location for evaluation rectangles. The algorithm begins in step 5 310, Fig. 23, with finding the dark spot which serves as indexing markers for indexing the different areas of the samples on disc. The dark spot can be found in the same manner as the process using sliding averages used in finding windows as discussed in conjunction with Fig. 26. Since the targets are now the much smaller dark spots (instead of windows), the segments used in finding the dark spots are much shorter. 10 Their length approximates the size of a dark spot. However, the operating principle of finding sliding averages remains the same. The segments with the lowest of the sliding averages are identified as the dark spots.

Fig. 29 illustrates an example dark spot 366. In step 312, Fig. 23, once the 15 dark spot is found, the algorithm shifts from the dark spot to create the evaluation rectangle. A standard-size evaluation rectangle is cropped, wherein the rectangle has a center located at a point found by shifting from a pre-determined distance from the found dark spot. Fig. 30 shows an example of an evaluation rectangle 368 cropped out after shifting from a pre-determined distance from the found dark spot 366. Dashed ellipses 368, 370, and 372 identify the other areas of cells. In a preferred 20 embodiment of the invention, the location information of the evaluation rectangle can be embedded on the disc. Instead of finding the dark spot, the system can read location information from the disc to locate an area for placing the evaluation rectangle.

25 Step 2c: Selecting Evaluation Rectangles including User Selected Option

The third and final option in selecting evaluation rectangles involves input from the user through the software user interface as shown in step 316 of Fig. 23. On screen, an image of the bio-disc created based on the investigational data, is shown to the user and the user selects the evaluation rectangle by defining a rectangle on the 30 image. In step 316, a determination is made as to whether the user-selected rectangle is bigger than the standard size. If not, that means the user's rectangle is smaller than the standard size (step 318, Fig. 23). In this case, the user-selected rectangle is used for counting in step 322. If the user's rectangle is larger than the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

standard size (step 320, Fig. 23), a standard size evaluation rectangle is cropped from the user-selected rectangle in step 324.

Step 3: Background Illumination Uniformization

5 Fig. 31 gives a more detailed illustration of step 248 of Fig. 22. After the evaluation rectangle is selected, background illumination uniformization is performed in the area (termed "investigational data area") bounded by the evaluation rectangle. The main purpose of this step is to eliminate background noise and thereby make the background more uniform. To accomplish this, background illumination uniformization 10 uses software algorithms to simulate the effect of a gain control in an electrical implementation.

In step 380 of Fig. 31, a standard size for neighborhood rectangles (within the evaluation rectangle) is chosen. Note that a neighborhood rectangle is not to be confused with an evaluation rectangle. The neighborhood rectangle is made to be 15 around a single point of evaluation. Its size is chosen to be sufficiently larger than a cell, but small enough to be affected by the non-uniformity of the background illumination. In other assays, the investigational feature could instead of cells be 20 beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters having a size that is detectable by the incident beam of the optical system of the present invention. Thus the size of the neighborhood rectangle is chosen based on the type of assay conducted. The size of neighborhood rectangle determines, for a given point P, how many points near P are evaluated for the process 25 of background illumination uniformization.

Vertical scanning and horizontal scanning are performed in steps 382 and 384, respectively, to calculate an average K for each point in the investigational area.

25 K is derived in the following manner. First, the vertical scanning is performed. In one embodiment, the vertical averages for all points in the investigational data area are calculated first. The vertical average  $K_{vert}$  for a point  $(x, y)$  is the average value of 30 all points in the range from  $(x, y-dy)$  to  $(x, y+dy)$ . In effect, all the columns are scanned in the vertical direction. The term dy is half the height of the neighborhood rectangle, having a size that was determined in step 380. The sliding average calculation technique as described in Fig. 26 is applied here, except now the process goes in a vertical direction.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Once  $K_{vert}$  for all points is found, horizontal scanning is performed as follows. For a point  $(x, y)$ , the final average  $K$  for that point is given by taking an average of all  $K_{vert}$  for points within the range from  $(x-dx, y)$  to  $(x+dx, y)$ . In effect, the rows are scanned in the horizontal direction. The term  $dx$  is half the width of the neighborhood rectangle, having a size that was determined in step 380. The overall effect is that, for a particular point  $P$ , all the pre-calculated  $K_{vert}$  values that are in the same row as  $P$  and within the neighborhood rectangle of  $P$  are being averaged to get the final average for  $P$ . The pre-calculation of  $K_{vert}$  values reduces the calculation time. Instead of having a calculation time proportional to the size of the investigational data area times the size of the neighborhood rectangle, the calculation time is proportional only to the investigational data area.

With continuing reference to Fig. 31, in step 386, uniformization is performed by reassigning the value  $V$  of each point  $P$  to  $V_{background} + (V - K_{neighbor})$  where  $K_{neighbor}$  is the average value over all points bounded by neighborhood rectangle of  $P$ . In one embodiment, the background value  $V_{background}$  is set to be the average value over the entire investigational data area. In another embodiment,  $V_{background}$  is set to 2,000. If the new value of  $P$  is greater than 4,000, then 4,000 is used. If it is less than 1, then 1 is used. Values of  $P$  that were previously 0 are replaced with 2,000. After this step, the average value in any large area of the investigational data is approximately 2,000. In other word, the overall background approaches a plane with an arbitrary background value  $V_{background}$ . Fig. 32 shows the investigational data as displayed by the software before background illumination uniformization and Fig. 33 shows the investigational data as displayed by the software after background illumination uniformization. Imaged investigational data 572, which is investigational data rendered in an image format, is indicative of data of investigational interest. In both Figs. 32 and Fig. 33, imaged investigational data 572 mark or correspond to captured cells. Instead of using sliding averages, another embodiment uses Fourier Transform (FT) in the step of background illumination uniformization. In performing the Fourier Transform, the investigational data is first converted to the frequency domain. Then, a part of the spectrum in the frequency domain is removed. This removes part of the background noise generated by electrical noise and other irregularities in the bio-discs as well as in the circuitry. In one embodiment, spectrum with very short or very long wavelengths are removed (frequency is 1 divided by wavelength). The threshold for

WO 03/023571

PCT/US02/28958

these removed wavelengths are determined experimentally. Finally, the inverse transform is performed to return the data to the spacial domain.

Step 4: Normalization

5 Fig. 34 illustrates in detail the steps involved in step 250 of Fig. 22. As stated herein above in the overview, normalization is needed to make the standard deviation conform to a value of around 600 and the average of the investigational data conform to a value of around 2,000. Normalization also makes the software less sensitive to hardware modifications and tuning. For example, the signal gain in the detection 10 circuitry, such as top detector 158 of Fig. 10A, may change without significantly affecting the resultant cell counts.

To accomplish this, in one embodiment the process begins in step 390 with the calculation of average A and standard deviation S for the resulting investigational data from the last step (background illumination uniformization). Points with value of 0 are 15 ignored. In step 392, Fig. 34, normalization is performed on each point in the investigational data as follows. In one embodiment, for every point P, the value v of P is replaced by  $2,000 + (v - A) * 600 / S$ . The component of  $(v - A)$  centers each point while the component  $(600 / S)$  adjusts the amplitude. The result is added to the background value of 2,000. The value of 600 can be adjusted to get the desired range 20 of amplitude. The value graph 400 of Fig. 36 shows an example of a graph after normalization. Notice that the value graph hovers around 2,000 with the amplitude of the fluctuation staying around 600.

Once the value of P is normalized, truncation (step 394) is performed as follows: 1) if the new value of P is over 4,000, the value is truncated to 4,000; 2) if the 25 new value of P is under 1, the value is truncated to 1.

In one embodiment, the software's graphical user interface displays the histogram of all points in the investigational data to let the user see the process of normalization. Fig. 35 shows a portion of example investigational data as displayed by the software during the step normalization. Imaged investigational data 572 is 30 indicative of data of investigational interest. In Fig. 35, imaged investigational data 572 represent or correspond to captured cells. The input box is asking for a range for normalization. As displayed the value 1 to 4,000 are used. It can be appreciated that any range of values can be used as desired.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

Fig. 36 shows the software display after the step of normalization. Top window 396 shows a close-up view of a portion of an example investigational data. Imaged investigational data 572 represent captured cells. Bottom graph 400 shows the corresponding value in the points traced by horizontal dotted line 398 in window 396.

5 Bottom graph 400 shows that the background area of the investigational data is normalized (i.e. a steady value with small noises) whereas areas with cells have noticeable "spikes" in the graph. For example, in bottom graph 400, spike signal 402 corresponds to a specific example cell 404 at that specific location. Spike signal 402 is distinctly different from background noise 406. This eases the process of cell

10 recognition.

#### Step 5: Filtering

Fig. 37 illustrates in detail the steps involved in step 252 of Fig. 22. In step 410 of Fig. 37, a size for neighborhood rectangles is chosen. These neighborhood rectangles are conceptually similar to the ones used in the step of background illumination uniformization (step 248 of Fig. 22). However, the neighborhood rectangles used in this step are about the size of a cell and smaller than those used in background illumination uniformization. In step 412, for each point P in the investigation data area, the number of points in the neighborhood of P with values "sufficiently distinct" from  $V_{background}$  is calculated. In one embodiment, the value of  $V_{background}$  is set to 2,000. The determination of how much of a difference (between the point in question and  $V_{background}$ ) constitutes "sufficiently distinct" is defined by a threshold number. In one embodiment, the threshold number is determined by examining the signal pattern of the investigational data to note the difference between the background value and value of cells (or other objects of interest in the sample). In other assays, the investigational features, rather than being cells, could instead be beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. In other embodiments, the threshold number is generated by a calibration mechanism that determines the background noise and background value based on varying conditions. Such conditions include the reflectivity of the bio-discs, the imbalance of the bio-discs within the bio-disc drives, the rattle, vibration or instability of the bio-discs, electrical noise, metalization of the

WO 03/023571

PCT/US02/28958

bio-discs, the types of samples involved (white blood cells or others), and any other conditions requiring compensation or correction by calibration adjustments.

In step 414, the number of "sufficiently distinct" points is tested to see if such number is larger than a pre-determined filtering criteria. If it is, the value of P remains 5 as it is in step 416. Otherwise it is changed to  $V_{background}$  (or 2,000) in step 418. The desired effect of this step is to remove noise, so that only cells remain in the investigational data and the background is uniformly equal to  $V_{background}$ . Fig. 38 shows an example investigational data as displayed by the software after the filtering step. Imaged investigational data 572 mark or indicate captured cells. Notice that the 10 background has good contrast with the cells in the investigational data. Fig. 39 offers a close-up of a portion of the Fig. 39 investigational data. Imaged investigational data 572 mark and correspond to captured cells. As shown by bottom graph 420 of Fig. 39, the background now has a flat line value and the area with cell is well defined by 15 the spike 422. The improved contrast will help cell counting in the next step.

15

#### Step 5a: Remove Undesirable Components

Fig. 40 illustrates in detail the steps involved in step 254 of Fig. 22. This is an optional step designed to eliminate undesirable components such as air bubbles, dirt, 20 and cracks that may interfere with cell counting. The process used here is similar to the process used in finding windows, which is described in connection with Fig. 25. In step 428, Fig. 40, a threshold T is selected. In one embodiment, T is set to  $V_{background}$  found in the step of background illumination uniformization. Then in step 430, binarization is performed. Like the binarization step used in window finding (step 334 25 of Fig. 25), in step 430 points with value over the threshold value T are declared black while the rest are declared white. So now the investigational data can be considered a black and white image and can be represented by 1 bit. In step 432, regularization is performed on the investigational data in the same way as in step 336 of Fig. 25.

After regularization is performed, the resulting investigational data is passed to 30 step 434 for the extraction of connected components. In this step, the investigational data is scanned so that connected components are defined. For any given pair of black points in the investigational data, the pair is defined to be in the same component if the two points can be connected by a chain of black points between them. The main purpose of this step is to decompose the investigational data into a

WO 03/023571

PCT/US02/28958

collection of connected black components with white spaces separating them. The connected component extraction process employed here may be the same as the one shown in detail in Fig. 27.

The next step in this removal process is step 436, which is directed to removing 5 components of irregular size. A user-selected size threshold is applied to all the connected components. If a component is smaller or bigger than the size threshold, the entire component is removed from the investigational data. This approach is effective because the size of irregular components (e.g. bubbles, cracks) is usually much greater than the typical cell size. Also, the user can select the threshold 10 according to what type of cells are being counted. In one embodiment, the removal is accomplished by replacing all points with the component with constant value 2,000 (the background value). Preferably, at the completion of all steps in Fig. 40, the investigational data should be sent back to steps 248 through step 252 (Fig. 22) for re-processing.

15 Fig. 41 shows an example of investigational data before the removal of cracks. Imaged investigational data 572 correspond to captured cells. As shown, cracks 574 are distributed throughout the area. Fig. 42 shows the same investigational data of Fig. 41 after the removal of cracks. Only imaged investigational data 572 marking captured cells remains.

20

#### Step 6: Counting Cells by Bright Centers

With reference now to Fig. 43, there is shown in detail the steps involved in 25 step 256 of Fig. 22. In step 440, Fig. 43, convolution is performed on the investigational data. During convolution, an auxiliary array representing a convoluted image is formed. Each point P in the convoluted image is the result of integration of the investigational data after filtering in the circular neighborhood of P. As would be appreciated by those skilled in the art, the common convolution method used in image processing involves two functions. The convolution of two functions, f and g : R<sup>2</sup> -> R is the function:

30 
$$F(x, y) = f \circ g(x, y) = \iint_{R^2} f(x+u, y+v) g(u, v) du dv.$$

WO 03/023571

PCT/US02/28958

More precisely, in one embodiment of the present invention, the function  $f$  that is integrated, is the function:

$$\begin{aligned} f(x,y) &= h(x, y) - 2,000 && \text{if } h(x, y) > 2,000 \quad \text{or} \\ &= 0 && \text{if } h(x, y) \leq 2,000 \end{aligned}$$

5 where  $h(x, y)$  is function describing the value of the point at  $x, y$  from the prior step. Once  $f(x, y)$  is established, the convolution is performed with a circular neighborhood indicator function  $g$  where:

$$\begin{aligned} g(u, v) &= 1 && \text{if } u^2 + v^2 \leq r^2 \text{ or} \\ &= 0 && \text{otherwise,} \end{aligned}$$

10 where  $r$  is the expected radius of a cell. The convolution integration is:

$$F(x, y) = \iint_{(u-x)^2 + (v-y)^2 \leq r^2} f(x+u, y+v) du dv.$$

The integration is replaced by summing values of  $f$  in all lattice points  $(u, v)$  which are within the circular neighborhood defined by:

$$(u - x)^2 + (v - y)^2 < r^2.$$

15 After convolution, a search for the local maxima is conducted on the convoluted image in step 442, Fig. 43. The convolution step makes the bright centers in the investigational data stand out as local maxima and are thus more easily recognized. To correct this, redundant local maxima that are in the same closed neighborhood are removed in step 444. Then in step 446, all the remaining local maxima are declared 20 centers of cells. In other assays, the cells could instead be beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters being of a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. The local maxima are used to find the center of these objects 25 or investigational features targeted in these assays. In other embodiments of the present invention, the counting method takes into account the effect of cell clumping. The maxima that are close to each other are not automatically disregarded. In one embodiment, a local peak is declared the center of cells after a nearby dip. The parameter can be adjusted so that if clumped cells appear on the investigational data, 30 the distance threshold that defines local redundant maxima is adjusted to be smaller. Similarly, the distance threshold can be adjusted for the type of cell that is being

WO 03/023571

PCT/US02/28958

counted. For example, since red blood cells have a more consistent size, an assumed cell size can be made to be the distance threshold.

In another embodiment, statistical analysis can be performed on the distribution of cells. Thus an average number of cell per area can be used to estimate the amount 5 of cells in areas where the visibility is low or the cells are clumped so that they may otherwise not be countable. In other assays, the cells could instead be beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters having a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Another embodiment allows the user to re-sample the 10 investigational data area at a higher resolution to perform a more complete and accurate count.

Fig. 44 shows example investigational data filled with cells counted by the bright center method. Imaged investigational data 572 mark captured cells. The steps 15 performed in the bright center method help highlight the cells so they appear brightly against the dark contrast of the background. As shown by the software, they are individually marked and counted. Fig. 45 shows the up-close view and the value trace graph of a portion of the investigational data shown in Fig. 44. Imaged investigational data 572 correspond to captured cells.

20 Steps 7 and 8: Cell Marking and Additional Counting of Cells by Dark Rims

Steps 7 and 8, Fig. 22, are optional steps that can be performed to improve the accuracy of cell counting. In Fig. 22 they are referenced as steps 258 and 260. These two optional steps may be used to correct under-counting of cells in cases 25 where the hardware configuration may leave cells without bright centers. In other assays, rather applying the present method to cells, it could instead be applied to beads (bead-based assays), agglutinated matter, precipitate (enzyme reaction), or other biological reporters having a size that is detectable by the incident beam of the optical system in the present invention. Alternatively these two steps may be used in place of counting cells by recognizing bright centers.

30 If some cells have been counted by the method of recognizing bright centers, then step 7 is performed to mark these counted cells and remove them from the investigational data. Then counting by recognizing cells with dark rims can proceed. Fig. 46A illustrates in detail the steps involved in step 260 (principal step 8) of Fig. 22.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

In step 450, inversion is performed on the investigational data. The value  $v$  at each point  $P$  is replaced with  $2,000 - v$ . If the resulting value is negative, it is replaced by 0. Expressing inversion in equation form we have the following:

Let  $h(x, y)$  be investigational data from before, we create  $f(x, y)$  to be

$$f(x, y) = \begin{cases} 2,000 - h(x, y) & \text{if } h(x, y) < 2,000 \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases}$$

This ensures that the dark rims, which have low data values, will have high values when we perform the convolution. In step 452, convolution with shifted rings is performed. As would be appreciated by those skilled in the art, the common convolution method used in image processing involves two functions. The convolution of two functions,  $f$  and  $g : R^2 \rightarrow R$  is the function

$$F(x, y) = f \circ g(x, y) = \iint_{\mathbb{R}^2} f(x+u, y+v) g(u, v) du dv.$$

Expressing the convolution in equation form we have:

$$F(x, y) = \iint_{\Gamma(u, v)} f(x+u, y+v) \, du \, dv.$$

- 15 The convolution is performed with a circular neighborhood indicator function  $q$  where

$$g(u, v) = \begin{cases} 1 & \text{if } u^2 + v^2 \leq r^2 \text{ or} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

where  $r$  is the expected radius of a cell. In this embodiment,  $g$  is the indicator function of a ring with inner radius  $r_1$  and outer radius  $r_2$ , where  $r_1$  and  $r_2$  bound  $r$ , the expected radius of a cell. This yields:

$$F(x, y) = \iint_{r^2 \leq (u-x)^2 + (v-y)^2 \leq r^2} f(x+u, y+v) \, du \, dv$$

The integration is replaced by summing values of  $f$  in all lattice points  $(u, v)$  which are within the ring. To perform the convolution four times, we have four functions:  $f_1(x, y) = f(x+hx, y)$ ;

- 25             $f_2(x, y) = f(x-hx, y);$   
 $f_3(x, y) = f(x, y+hy)$   
 $f_4(x, y) = f(x, y-hy),$   
 where  $hx$  and  $hy$  are spec.

where  $nx$  and  $ny$  are specific shifts in the x and y directions. They equal one half of the estimated size of a cell. The four functions mean that the convolution is performed four times with an indicator function of a ring with inner radius  $r1$  and outer radius  $r2$ . The values  $r1$  and  $r2$  respectively bound the minimum and maximum of the expected

WO 03/023571

PCT/US02/28958

radius of a cell  $r$ . The four passes of convolution are performed with the ring shifted in the left, right, up, and down direction with a distance of  $r$ . Fig. 46B shows such an example. First, ring 458 is created, bounding the dark rim of the cell. The four-shifted convolution creates four rings. In step 454, Fig. 46A, the results of the four shifts are summed. Returning to Fig. 46B again, we see the summed rings create a local maxima at point 457. Point 457 is then declared to be the local maxima of this cell and is counted. Note that Fig. 46B is an example applied to a cell. In places where the convolution ring does not bound a dark rim of a cell, no maxima would exist. Thus the convolution step locates potential cells by highlighting dark rims of cells. In step 456, Fig. 46A, the counting step goes through the investigational data after convolution to count the local maxima.

Fig. 47 shows an image of investigational data in which found (counted) cells by this method are marked by crosses. Imaged investigational data 572 correspond to captured cells. Crosses 580 mark counted cells.

Alternatively, the convolution step can be performed in accordance with the equation of the form:

$F(x, y) = f1(x, y) + f2(x, y) + f3(x, y) + f4(x, y)$  if at least three (or alternatively, two) of  $f1, f2, f3$ , or  $f4$  are greater than zero, and

$F(x, y) = 0$  otherwise.

Notice that this convolution is performed without shifting the rings if two or three of the functions are greater than zero. Another alternative to the convolution step is to use commonly known smoothing functions to convolve the function  $f$ . In yet another alternative that can be applied to both this convolution step and the one used in recognizing bright centers, use of different indicator function  $g$  is employed. In one specific embodiment thereof,  $g$  can be a Gaussian of the form:

$$g(u, v) = e^{-\frac{u^2 + v^2}{\sigma^2}}$$

or another suitable function for performing convolution for the purpose of highlighting a cell's features.

#### 30 Step 9: Data Output

In step 9, data are output to appropriate display mechanism. One embodiment of the software has a user interface to display the results of the cell counting for the investigation data areas bounded by evaluation rectangles. Another embodiment

WO 03/023571

PCT/US02/28958

displays the image of the investigation data area with each cell marked by a cross as shown in Fig. 47.

B. Red Blood Cell Example

5 As would be appreciated by those skilled in the art, the various steps and methods of data analysis can be combined in different manners to analyze various types of investigational data. Fig. 48 offers a flow chart illustrating an example of counting red blood cells in investigational data. In step 460, a threshold value is selected and binarization is performed, whereas points with values over the threshold  
10 value are declared black and the rest are declared white. This step of binarization separates those points of higher values that usually represent cells and those points of lower values that usually represent the background or background noise.

Fig. 49 shows a pictorial representation of the investigational data before step 460 is performed. Imaged investigational data 572 correspond to captured cells. Fig.  
15 50 shows the result of binarization (step 460). Binary imaged data 576 mark or indicate data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 576 indicate cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells.

Then in step 462, Fig. 48, the two parts that make up regularization, erosion,  
20 and expansion are performed to fill in the missing parts of cell boundaries. The goal here is to obtain cell boundaries that clearly mark off individual cells. Fig. 51 shows the result of erosion and expansion (step 462). Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 576 mark cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells.

25 In step 464 of Fig. 48, a one-pixel wide cell boundary is extracted for each cell. Fig. 52 shows the result of extracting the one-pixel wide boundary (step 464, Fig. 48). Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 576 mark cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells. In extracting the one-pixel wide boundary, all black points  
30 that have both black and white neighbors are selected to retain their black color. Black points without neighbor points of both colors are converted to white. This yields a rough boundary that is in places several pixels wide. Then the thinning process is applied to eliminate the extra points in the boundary until only one pixel is left in

WO 03/023571

PCT/US02/28958

outlining the shapes in the investigational data. The thinning process starts by removing redundant black points from the boundary until only a one pixel wide line marks the boundary of each black area. As shown in Fig. 52, non-cell marking binary imaged data 578, which was in Fig. 51, is now absent.

5 The thinning process starts with a rough boundary first. The rough boundary consists of all pixels which have neighbor pixels both inside and outside of the cell. After the rough boundary extraction, the data consists of three categories:

- (1) pixels inside a cell,
  - (2) pixels marking the boundary of a cell, and
  - 10 (3) pixels lying outside of a cell.
- The three are related according to three conditions.
- (A) all three are connected,
  - (B) (1) is disconnected from (3) by (2) and finally,
  - (C) each point in (2) has a neighbor in (1) or (2) but not both.

15 The thinning process then examines pixels in (2) one-by-one. If a pixel P in (2) has a neighbor in (1) or (3), then a check is performed to see if re-coloring P (e.g. black to white) from (2) to (1) or (3) still preserves conditions (A), (B), and (C). If so, then the re-coloring will be done. This re-coloring is performed until a one-pixel wide boundary is obtained for each cell.

20 After the one-pixel wide boundary is extracted, the areas defined by the one-pixel wide boundaries are filled in with black points (step 466, Fig. 48). Fig. 53 shows the result of step 466. Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 576 mark cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells as seen in Fig. 51 for example. 25 Using this set of black and white points as a mask, the original data points are filled in to replace the black points. Thus the cell areas are isolated and are now ready to be analyzed.

Fig. 54 shows the results of filling in the original data points. Imaged investigational data 572 mark captured cells. The advantage of this method lies in the 30 ability to accurately extract cells. The extraction enables the user to measure the cell diameters and examine other features within cells such as the morphology of cell nuclei that have been stained. Further details relating to this type of application are discussed in commonly assigned U.S. Patent Application Serial No. 10/xxx,xxx

WO 03/023571

PCT/US02/28958

entitled "Nuclear Morphology Based Identification and Quantification of White Blood Cell Types Using Optical Bio-Disc Systems" filed September 6, 2002 which is herein incorporated by reference.

In addition to examining the imaged cells, the user can mark and count the cells  
5 by employing the user features of the present invention. Fig. 55 is a close-up view of  
an original pictorial representation of the investigational data from Figs. 49-54 with the  
red blood cells marked by crosses, showing that they have been counted. Imaged  
investigational data 572 correspond to captured cells. Crosses 580 mark counted  
cells.

10

#### C. Alternative Algorithms

The present invention includes a number of alternative algorithms for handling  
special situations that may arise during the operations of cell counting.

Figs. 56A to 64 show an embodiment of the present invention that handles the  
15 case of counting cells without distinctive bright centers or dark rims. This method,  
termed "absolute value counting", primarily deals with the case when cells appear to  
be without distinctive bright centers or dark rims. The bright center method relies on  
isolating high value areas (bright spots) in the investigational data to count cells. The  
dark rim method relies on isolating low value areas (dim spots) in the investigational  
20 data to count cells. This method of absolute value counting, in contrast, isolates areas  
that may not have distinctly high or low values detectable by either of the two prior  
methods, but nonetheless contain value patterns that can be distinguished from the  
background noise.

Fig. 56A is a pictorial screen shot of discrete cells before they are marked by  
25 crosses in accordance with the absolute value counting method. Imaged  
investigational data 572 represent captured cells. Fig. 56B is a flow chart depicting  
the steps involved in absolute value counting. In step 480, normalization and filtering  
are performed on the investigational data. Fig. 57 is a pictorial screen shot of discrete  
30 cells originally shown in Fig. 56A after the step of normalization and filtering (step 480,  
Fig. 56B). Imaged investigational data 572 corresponds to captured cells. The  
process of normalization and filtering is the same process as described herein above.

After normalization and filtering, the next step involves background removal and  
binarization (step 482, Fig. 56B). Fig. 58 is a pictorial screen shot of discrete cells

WO 03/023571

PCT/US02/28958

originally shown in Fig. 56A after the step of background removal and binarization. Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 578 indicates cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells. The background is removed to isolate where cells are located. Then binarization is performed on the investigational data to generate black and white points in the investigational data. The process of binarization proceeds as follows. The value of each point is first examined. When the difference between the value of the point and the background value is greater than a pre-determined threshold number, the point is declared black. Otherwise the point is declared white.

In one embodiment, the threshold number is selected so that points that differ little from the background value (background or background noise) become white and points that differ much from the background value (dark or bright areas of cells) become black. In other embodiments, the threshold number is generated by a calibration mechanism that determines the background noise and background value based on varying conditions. Such condition may include the reflectivity of the bio-discs, the imbalance of the bio-discs within the bio-disc drives, the rattle, vibration or instability of the bio-discs, electrical noise, metalization of the bio-discs, the types of samples involved (white blood cells or others), and any other types of conditions requiring compensation or correction.

Regularization (step 484, Fig. 56B) is the next step in the process. Fig. 59 is a pictorial screen shot of discrete cells originally shown in Fig. 56A after the step of regularization. Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 576 represents cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells. Regularization consists of erosion and expansion. Erosion is performed as follows. For an image P, a corresponding image P' is constructed. A point X' in P' is declared white if (1) the corresponding point X in P is white, or (2) any neighbor of X is white. If neither condition is met, then X' is declared black. P' is the resulting image of erosion. Expansion operates in an opposite manner. For an image R, a corresponding image R' is constructed. A point Y' in R' is declared black if (1) the corresponding point Y in R is black, or (2) any neighbor of Y is black. If neither condition is met, then Y' is declared white. R' is the resulting image of expansion. A composition of several erosions and expansions makes a binary image more regular (single black and single white points disappear).

WO 03/023571

PCT/US02/28958

One-pixel wide boundary extraction is the next step. This extraction step is referenced step 486 in Fig. 56B. Fig. 60 is a pictorial screen shot of some of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after applying the step 486 for one-pixel wide boundary extraction. Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged data 576 correspond to cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells. In extracting the one-pixel wide boundary, all black points that have both black and white neighbors are selected to retain their black color. Black points without neighbor points of both colors are converted to white. This yields a rough boundary that is in places several pixels wide. Then the thinning process is applied to eliminate the extra points in the boundary until only one pixel is left in outlining the shapes in the investigational data. The thinning process starts by removing redundant black points from the boundary until only a one pixel wide line marks the boundary of each black area.

The thinning process starts with a rough boundary first. The rough boundary consists of all pixels which have neighbor pixels both inside and outside of the cell. After the rough boundary extraction, the data consists of three categories:

- (1) pixels inside a cell,
- (2) pixels marking the boundary of a cell, and
- (3) pixels lying outside of a cell.

These three categories are related according to the following three conditions:

- (A) all three are connected,
- (B) (1) is disconnected from (3) by (2) and finally,
- (C) each point in (2) has a neighbor in (1) or (2) but not both.

The thinning process then examines pixels in (2) one-by-one. If a pixel P in (2) has a neighbor in (1) or (3), then a check is performed to see if re-coloring P (e.g. black to white) from (2) to (1) or (3) still preserves conditions (A), (B), and (C). If so, then the re-coloring will be provided. This re-coloring is performed until a one-pixel wide boundary is obtained for each cell.

After the one-pixel wide boundary is extracted, the areas defined by the one-pixel wide boundaries are filled in with black points (step 488 of Fig. 56B). Fig. 61 is a pictorial screen shot of some of the discrete cells originally shown in Fig. 56A after performing step 488 to fill in components according to the present method. Binary imaged data 576 mark data of investigational interest. In this case, the binary imaged

WO 03/023571

PCT/US02/28958

data 576 indicate cells. Non-cell marking binary imaged data 578 point out data that do not represent cells. Using this set of black and white points as a mask, the original data points are filled in to replace the black points (step 490, Fig. 56B). Thus the cell areas are isolated and can be counted. In one embodiment, convolution is applied to the isolated area in the investigational data and the local maxima are marked to identify cells. As with prior shown embodiments, convolution with circular neighborhood can be applied. Since the size of the circular neighborhood used in convolution is about the size of a cell, the local maxima can be determined to be center of cell. Fig. 62 is a pictorial screen shot of discrete cells originally shown in Fig. 56A after the step of filling in investigational data. Imaged investigational data 572 mark captured cells. Finally, Fig. 63 shows the cells as counted and marked by crosses according to step 492 of Fig. 56B. Imaged investigational data 572 correspond to captured cells. Crosses 580 mark counted cells. Whereas Fig. 63 shows only clumped cells, Figs. 64 shows the method of absolute value counting applied to a sparsely packed sample with single cells and several clumped cell areas. Similarly, imaged investigational data 572 correspond to captured cells and crosses 580 mark counted cells.

Another embodiment of the present invention improves the on-screen display of the evaluation rectangle that is marked off for cell counting. In the course of cell counting, it is sometimes desirable to display an image of the evaluation rectangle to the user. In addition to offering a visual presentation of the sample, a high quality image can aid the user in deciding what methods should be used to count and analyze the cells. For example, a clear image may alert of the user of the presence of many cells without bright centers. Thus, the user may choose to count cells also by the dark rim method. The present embodiment improves the quality of the image by way of a Fast Fourier Transform. As would be appreciated by those of skill in the art given the present disclosure, Fast Fourier Transform (FFT) is a variant of Fourier Transform (FT). Any variant of Fourier Transform can be applied here as well. Fourier Transform was discussed earlier in conjunction with background illumination uniformization. Fig. 65 offers a flow chart illustrating this embodiment of the present invention. In step 520, a Fast Fourier Transform is performed on the investigational data. The investigational data is converted to the frequency domain. Then in step 522, a part of the spectrum in the frequency domain is removed. Finally, in step 524,

WO 03/023571

PCT/US02/28958

the inverse transform is performed. Fig. 66 shows an example investigational data before the Fast Fourier Transform. Imaged investigational data 572 represent captured cells. Fig. 67 shows that same investigational data after Fast Fourier Transform. Imaged investigational data 572 indicate captured cells and crosses 580 mark counted cells. The on-screen display is thus improved.

Another embodiment of the present invention handles the on-screen display of the window areas. In the course of cell counting on discs with windows, it is at times desirable to display the window areas to the user. Sometimes the images of the window areas are skewed, as shown in Fig. 68. To properly display the window areas, the skew needs to be corrected. The first step of the correction method finds the direction of the skew. This step of finding the skew takes advantage of the fact windows are bright areas in an otherwise dark background--shown here as white for convenience. To clarify the terms, a window is a rectangle with semicircles attached on its top and bottom, and the width of this rectangle is henceforward called the width of the window. The skew finding step proceeds as follows. First, the points from every line of the image are numerically differentiated. This means, for every point  $(x, y)$ , the average value of all points in the interval from  $(x-dx, y)$  to  $(x, y)$  is subtracted from the average value in the interval from  $(x, y)$  till  $(x+dx, y)$ . Here  $dx$  is a specific interval length chosen to eliminate noise.

For lines of the image that coincide with windows, the result of this subtraction takes maximal value at the left border of the window and minimal value at the right border. This is because the average values in the bright windows are much higher than the average values in the dark background. In the lines of the image that lie outside of windows, these maximum and minimum values may happen elsewhere in arbitrary places, since the average values are from dark background with perhaps some noises. Taking advantage of this property, in the next step a distance  $D$  between the maximum and minimum values is calculated for every line. Next, the process chooses the lines with a  $D$  value that is close to the standard window width. After that, points of maxima are marked in these chosen lines. Finally a straight line is fitted across these points of maxima. The direction of this line is the direction of the skew. Fig. 69 shows the result with the direction line found. Finally the skew is corrected using this direction line as a guide and moving all the points accordingly. The image is properly aligned and displayed to the user as illustrated in Fig. 70.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

One embodiment of the present invention involves a method for removing bubble tracks from the investigational data. Sometimes an air bubble may become trapped in the channels on the disc. The air bubble may go through the sample and remove some of the cells along its path as it tracks across the capture zone. This removal of cells may cause an irregular cell distribution. Since the final result that is reported is in the form of number of cells per millimeter square ( $\text{mm}^2$ ) area, such irregular cell distribution must be corrected. The correction is performed as follows. Fig. 71A shows the flowchart of the process. In step 540, the cell counting is performed as before. Then the distribution of cells is analyzed in step 542. Areas with too small local concentration of cells are disregarded in step 544, since the cells in these areas are likely to have been wiped out by a bubble.

In one embodiment, the entire area that is being counted is divided into a grid of boxes. Fig. 71B shows such as example. Imaged investigational data 572 mark captured cells (represented by circles). Bubble track 548 runs through the area bounded by boxes 550, 552, 554, and 556. Another bubble track 558, being wider than track 548, runs through the area bounded by boxes 560, 562, and 564. The areas bounded by these boxes are disregarded. Once such areas are disregarded, the cell count is recalculated in step 546 of Fig. 71A. Figs. 71C and 71D show examples of bubble tracks. Fig. 71C shows bubble tracks (including tracks 548 and 558) through a sample as seen under microscope power 5X. Fig. 71D shows another example where a bubble track 548 through a sample is illustrated under microscope power 40X.

### III. WHITE BLOOD CELL COUNT METHOD

Fig. 72 offers an example of how a generic homogeneous solid phase cell capture assay for the rapid determination of absolute number of CD4+ and CD8+ T - lymphocyte populations and ratio of CD4+/CD8+ lymphocytes in blood samples may be performed utilizing the methods of the invention. The test, which is run within small flow channels incorporated into a bio-disc, determines the number of CD4+, CD8+, CD2+, CD3+, CD19+, and CD45+ cells captured by the specific antibodies on the capture zones in 7 to 15  $\mu\text{l}$  of mononuclear cells (MNC) isolated from whole blood. The test is based upon the principle of specific cell capture on localized locations on the disc. Several specific cell capture zones are created on the disc by localized

WO 03/023571

PCT/US02/28958

application of capture chemistries based upon monoclonal or polyclonal antibodies to particular blood cell surface antigens. Upon flooding the 25 to 100  $\mu$ l chambers with the MNC blood (10,000 to 30,000 cells/ $\mu$ l), cells expressing CD4, CD8, CD2, CD3, CD19, and CD45 antigens are captured in the capture zones within the disc. Also 5 incorporated within the capture zones are defined negative and positive control areas.

In step 1 of Fig. 72, blood (4 to 8 ml) is collected directly into a 4 or 8 ml Becton Dickinson CPT Vacutainer<sup>TM</sup> and an anticoagulant such as EDTA, ACD, or heparin. In 10 an equivalent step of another embodiment of the invention, 3 ml of blood in anticoagulant is overlaid into a tube 172 containing a separation gradient 176 such as Histopaque 1077. In any case, the blood sample 174 is preferably used within two hours of collection. The tube 172 containing the separation gradient 176 with blood 15 sample 174 overlay is centrifuged at 1,500 to 1,800 RCFs (2,800 rpm) in a biohazard centrifuge with horizontal rotor and swing out buckets for 25 minutes at room temperature. After centrifugation, the plasma layer 178 is removed (step 2), leaving about 2 mm of plasma above the mononuclear cell (MNC) fraction 180. The MNC 20 layer 180 is collected and washed with phosphate buffer saline (PBS). Cells are pelleted by centrifugation at 300 RCFs (1200 rpm) for 10 minutes at room temperature to remove any remaining platelets. The supernatant is removed and the MNC pellet 180 is re-suspended in PBS by tapping the tube gently. The final pellet 180 is re-suspended (step 3) to a cell count of 10,000 to 30,000 cells/ $\mu$ l depending upon the height of the flow channel 130 of the bio-disc 110.

The flow channel 130 of a bio-disc 110 is flooded with 7  $\mu$ l of the MNC suspension, and the inlet ports 122 and vent ports 124 (Figs. 3 and 5) of the chamber are sealed with sealing tabs (step 4). The bio-disc 110 is incubated for 15 minutes at 25 room temperature, and then scanned using a 780 nm laser in an optical drive 112 to image the capture field (step 5). It should be understood that if a transmissive bio-disc 110 is used, optical drive 112 optionally includes a top detector 158 (Fig. 10A) to image the capture field. Software is preferably encoded on the disc to instruct the drive to automatically perform the following acts: (a) centrifuge the disc to spin off 30 excess unbound cells in one or more stages, (b) image specific capture windows on a display monitor 114, and (c) process data. Data processing includes, but is not limited to counting the specifically captured cells in each capture zone and deriving the ratio

WO 03/023571

PCT/US02/28958

of CD4+/CD8+ or any other desired count or ration that may be programmed accordingly.

As is further illustrated in Fig. 72, the present invention is directed to a method of performing a cluster designation count with an optical disc and disc drive. The 5 method includes the steps of providing a blood sample in a first tube containing a separation gradient, rotating the first tube at a time and speed sufficient to separate the blood sample into layers, resuspending a MNC layer that contains T -cells to form a MNC suspension, providing a sample of the MNC suspension on a disc surface that includes at least one capture zone containing at least one capture agent, loading the 10 disc into an optical reader, rotating the disc, directing an incident beam of electromagnetic radiation to the capture zone, detecting a beam of electromagnetic radiation formed after interacting with the disc at the capture zone, converting the detected beam into an output signal, and analyzing the output signal to extract information relating to the number of cells captured at the capture zone. In one 15 embodiment of this method, the optical disc is constructed with a reflective layer such that light directed to the capture zone and interacting with a cell is reflected. In another embodiment of this method, the optical disc is constructed such that light directed to the capture zone and interacting with a cell is transmitted through the optical disc.

During the analyzing/processing step, the software reads across each capture 20 zone image and marks cell images as it encounters them. For example, following an estimation of the number of CD4+ and CD8+ cells, the software calculates the ratio of CD4+/CD8+ cells and displays both the absolute numbers of cells in CD4+, CD8+, CD3+, and CD45+ capture zones per microliter of whole blood and also the CD4+/CD8+ ratio. The entire process takes about 12 minutes from inserting the disc 25 into the optical drive to obtaining the numbers and ratios.

In one embodiment, the disc is a forward Wobble Set FDL21:13707 or FDL21:1270 CD-R disc coated with 300 nm of gold as the encoded information layer. On a reflective disc, viewing windows of size 2 x 1 mm oval are etched out of the reflective 30 layer by known lithography techniques. In some designs of transmissive disc, no separate viewing windows are etched, and the entire disc is available for use. The adhesive layer is Fraylock adhesive DBL 201 Rev C 3M94661. The cover is a clear disc with 48 sample inlets with a diameter of 0.040 inches located equidistantly at

WO 03/023571

PCT/US02/28958

radius 26 mm. The data disc is scanned and read with the software at speed 4X and sample rate 2.67 MHz using CD4+/CD8+ counting software.

IV. CONCLUSION

5 Thus methods and apparatus for imaging cells in laboratory samples and analyzing such images are described in conjunction with one or more specific embodiments. While this invention has been described in detail with reference to certain preferred embodiments, it should be appreciated that the present invention is not limited to those precise embodiments. Rather, in view of the present disclosure  
10 which describes the current best mode for practicing the invention, many modifications and variations would present themselves to those of skill in the art without departing from the scope and spirit of this invention. The scope of the invention is, therefore, indicated by the following claims rather than by the foregoing description. All changes, modifications, and variations coming within the meaning and range of equivalency of  
15 the claims are to be considered within their scope.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

We claim:

1. A method of counting cells, said method comprising the steps of:  
obtaining investigational data of a sample with cells;  
5 selecting an evaluation rectangle in said investigational data;  
enhancing said investigational data within said evaluation rectangle; and  
counting cells within said evaluation rectangle.
2. The method of claim 1 wherein said step of selecting further comprises the  
10 step of selecting a custom size for said evaluation rectangle.
3. The method of claim 1 wherein said step of selecting selects a plurality of  
evaluation rectangles.
- 15 4. The method of claim 1 wherein said step of enhancing said investigational  
data area further comprises the steps of:  
performing background illumination uniformization on said investigational data;  
performing normalization on said investigational data; and  
filtering said investigational data.
- 20 5. The method of claim 4 wherein said step of performing background  
illumination uniformization further comprises the steps of:  
choosing a size for a neighborhood rectangle;  
picking a point in said investigational data;
- 25 performing horizontal scanning to calculate a first sliding average for all  
neighbor points located within said neighborhood rectangle centered at said point;  
performing vertical scanning to calculate a second sliding average for all  
neighbor points located within said neighborhood rectangle centered at said point;  
combining said first sliding average and second sliding average to create an  
30 overall average;  
reassigning the original value of said point to a resultant value calculated by  
obtaining the difference between said overall average and said original value and  
adding said difference to a background value; and

WO 03/023571

PCT/US02/28958

repeating said steps of performing horizontal scanning, performing vertical scanning, combining two said averages and reassigning the original value for all points in said investigational data.

5        6. The method of claim 4 wherein said step of performing background illumination uniformization further comprises the steps of:

performing Fourier Transform on said investigational data to produce frequency domain functions;

removing low wavelength functions from said frequency domain functions;

10      removing high wavelength functions from said frequency domain functions; and  
performing inverse transform on said frequency domain functions to obtain a modified version of said investigational data.

15      7. The method of claim 4 wherein said step of performing normalization further comprises the steps of:  
calculating an average and a standard deviation of the value of all points in said investigational data;  
normalizing said value of all points in said investigational data using said average and said standard deviation; and  
20      truncating said value of some points if necessary.

25      8. The method of claim 4 wherein said step of filtering further comprises the steps of:  
choosing a size for a neighborhood rectangle;  
picking a point in said investigational data;  
finding all sufficiently distinct points located in said neighborhood rectangle centered at said point;  
reassigning the value of said point if the number of said sufficiently distinct points is greater than a pre-determined filtering criteria; and  
30      repeating said steps of finding all sufficiently distinct points and reassigning the value for all points in said investigational data.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

9. The method of claim 4 further comprising the steps of:
  - removing undesirable components from said investigational data after said filtering step; and
    - repeating said step of performing background illumination, said step of performing normalization and said step of filtering.
10. The method of 9 wherein said step of removing undesirable components further comprises the steps of:
  - selecting a threshold value;
11. The method of 10 wherein said step of performing regularization further comprises the step of performing a plurality of erosion and expansion.
12. The method of 10 wherein said step of extracting connected components further comprises the steps of:
  - assigning initial component numbers to all black points on said investigational data;
  - picking a starting point;
  - setting an scan direction;
13. The method of claim 1 wherein said step of counting cells shown in said evaluation rectangle further comprises the steps of:
  - scanning all points of said investigational data to reassign the component number of each of said black points to match the component number of adjacent black points;
  - altering said scan direction according to a set of pre-determined rules; and
    - repeating said steps of scanning and altering so that said component numbers of connected black points become the same.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

performing convolution on said investigational data;  
searching for a plurality of local maxima of said investigational data;  
removing redundant local maxima from said plurality of local maxima;  
declaring remaining maxima to be bright centers of cells; and  
counting cells by recognizing said bright centers of cells.

5

14. The method of claim 13 wherein said step of performing convolution uses an indicator function that defines a circular neighborhood wherein said circular neighborhood bounds the expected size of a cell.

10

15. The method of claim 13 wherein said step of performing convolution uses a Gaussian indicator function.

15

16. The method of claim 13 wherein said step of removing redundant local maxima further comprises the steps of:  
selecting a distance threshold; and  
using said distance threshold to determine whether a local maxima is redundant.

20

17. The method of claim 13 further including a step of performing a statistical analysis comprising the steps of:  
obtaining distribution of cells based of counted cells; and  
estimating cell counts in areas where cells are clumped or visibility is low.

25

18. The method of claim 13 further comprising the steps of:  
re-sampling said investigational data at a higher resolution; and  
repeating said steps of performing convolution, searching for a plurality of local maxima, removing redundant local maxima, declaring remaining maxima to be bright centers of cells and counting cells by recognizing said bright centers of cells.

30

19. The method of claim 13 further comprising the steps of:  
removing said cells counted by bright centers from said investigational data;  
counting cells by recognizing dark dims; and

WO 03/023571

PCT/US02/28958

adding total from said step of counting cells by recognizing bright centers to total from said step of counting by recognizing dark rims.

20. The method of claim 19 wherein said step of counting cells by recognizing  
5 dark rims further comprises the steps of:  
performing inversion on said investigational data;  
performing a plurality of convolutions with shifted rings;  
summing results from said plurality of convolutions;  
finding local maxima;  
10 declaring maxima to be centers of cells; and  
counting said centers of cells.

21. The method of claim 20 wherein said step of performing a plurality of convolutions performs convolutions without shifted rings.

- 15 22. The method of claim 20 wherein said step of performing convolution uses a Gaussian indicator function.

- 20 23. The method of claim 20 wherein said step of performing convolution uses a smoothing function.

24. The method of claim 1 wherein said step of counting cells shown in said evaluation rectangle further comprises the steps of:

- 25 performing inversion on said investigational data;  
performing a plurality of convolutions with shifted rings;  
summing results from said plurality of convolutions;  
finding local maxima;  
declaring maxima to be centers of cells; and  
counting said centers of cells.

30 25. The method of claim 24 wherein said step of performing a plurality of convolutions performs convolutions without shifted rings.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

26. The method of claim 1 wherein said step of enhancing further comprises the steps of:

- performing normalizing on said investigational data;
- performing filtering on said investigational data;
- 5 selecting a threshold number;
- performing binarization on said investigational data by determining if said investigational data differs from a set background value by a value greater than said threshold number;
- performing regularization on said investigational data;
- 10 extracting one-pixel wide boundaries in said investigational data;
- filling in areas defined by said one-pixel boundaries with investigational data;
- and
- applying convolution in said filled in areas.

15 27. The method of claim 1 further comprising the step of displaying on a computer monitor image representation of said investigational data.

28. The method of claim 27 wherein said step of displaying further comprises the steps of:

- 20 performing fast Fourier Transform on said investigational data to generate investigational data in the frequency domain;
- removing part of the spectrum in the frequency domain; and
- performing inverse transform on said investigational data in the frequency domain to enhance said investigational data for display.

25 29. The method of claim 1 wherein said step of obtaining investigational data of a sample with cells comprises the steps of:  
providing a blood sample on an optical disc surface, said surface including one or more capture zones with one or more capture agents;

30 loading said optical disc into an optical reader;  
rotating said optical disc;  
directing, from a light source, an incident beam of electromagnetic radiation to one of said capture zones;

WO 03/023571

PCT/US02/28958

detecting, with a detector, a resultant beam of electromagnetic radiation formed after said incident beam interact with the disc at said capture zone;  
converting the detected beam into an analog output signal; and  
converting said analog output signals into digital data containing cells captured  
5 at said capture zone.

30. The method of claim 29 wherein said step of converting said analog output to said digital data further comprises the steps of:  
sampling amplitudes of said analog signals at fixed intervals;  
10 recording said sampling amplitudes in an one-dimensional array;  
creating a plurality of one-dimensional arrays using said steps of sampling and recording; and  
combining said plurality of one-dimensional arrays to create a two-dimensional array containing digital data of said sample.

15 31. The method according to claim 29 wherein said optical disc is constructed with a reflective layer such that light directed to said capture is reflected to said detector.

20 32. The method of claim 31 where said detector is a bottom detector.

33. The method according to claim 29 wherein the optical disc is constructed such that light directed to said capture zone is transmitted through said optical disc, said disc being between said light source and said detector.

25 34. The method of claim 33 wherein said detector is a top detector.

35. The method of claim 33 wherein said detector is a split detector.

30 36. The method of claim 29 wherein said one or more capture zones are located within one or more chambers within said optical disc.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

37. The method of claim 29 wherein said optical disc comprises a plurality of windows that correspond to said capture zones.

38. The method of claim 37 wherein said step of selecting evaluation rectangles further comprises the steps of:  
5 finding one of said plurality of windows in said investigational data; and  
cropping an evaluation rectangle of standard size inside said window.

39. The method of 37 wherein said step of finding one of said plurality of windows further comprises the steps of:  
10 performing compression on said investigational data;  
performing threshold evaluation on said investigational data;  
performing binarization on said investigational data;  
performing regularization on said investigational data;  
15 extracting connected components from said investigational data; and  
finding a component from said connected components that corresponds to a window.

40. The method of 39 wherein said step of extracting connected components further comprises the steps of:  
20 assigning initial component numbers to all black points on said investigational data;  
picking a starting point;  
setting an scan direction;  
25 scanning all points of said investigational data to reassign the component number of each of said black points to match the component number of adjacent black points;  
altering said scan direction according to a set of pre-determined rules; and  
repeating said steps of scanning and altering so that said component numbers  
30 of connected black points become the same.

41. The method of claim 29 wherein the surface of said optical disc contains dark spots that mark the location of said captured zones.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

42. The method of claim 41 wherein said step of selecting evaluation rectangles further comprises:

finding one of said dark spots in said investigational data; and

5 creating an evaluation rectangle of standard size with a center located at a point found by shifting a pre-determined distance from said dark spot.

43. The method of claim 42 wherein said step of finding one of said dark spots further comprises the steps of:

10 performing compression on said investigational data;  
performing threshold evaluation on said investigational data;  
performing binarization on said investigational data;  
performing regularization on said investigational data;  
extracting connected components from said investigational data; and  
15 finding a component from said connected components that corresponds to a dark spot.

44. The method of 43 wherein said step of extracting connected components further comprises the steps of:

20 assigning initial component numbers to all black points on said investigational data;  
picking a starting point;  
setting an scan direction;  
scanning all points of said investigational data to reassign the component  
25 number of each of said black points to match the component number of adjacent black points;  
altering said scan direction according to a set of pre-determined rules; and  
repeating said steps of scanning and altering so that said component numbers  
of connected black points become the same.

30 45. The method of claim 42 wherein said step of finding one of said dark spots further comprises the step of reading location information

WO 03/023571

PCT/US02/28958

46. The method of 29 wherein said optical disc contains computer readable location information for locating said capture zone.

47. The method of 37 further comprising the step of displaying image of said window on a computer monitor.

48. The method of 47 where said step of displaying said image of said window further comprises:

- 10 determining if said image is skewed;
- finding the direction of the skew; and
- correcting the skew of said image.

49. The method of claim 1 wherein said step of obtaining investigational data of said sample with cells comprises retrieving previously stored investigational data of 15 samples from an archive.

50. The method of claim 49 wherein said archive catalogs said stored investigational data according to characteristics of patients.

20 51. The method of claim 50 wherein said step of retrieving previously stored investigational data of samples further comprises the step of selecting samples matching a plurality of criteria chosen from said characteristics of patients so that a population health trends study is conducted.

25 52. The method of claim 1 further comprising the step of outputting results from said step of counting cells.

53. The method of claim 52 wherein said cells are white blood cells.

30 54. The method of claim 53 wherein said results include counts for CD4+ cells and CD8+ cells, and a ratio of CD4+ to CD8+ cells.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

55. The method of claim 54 wherein said results further include counts for CD3+ cells and CD45+ cells.

56. The method of claim 1 wherein said step of counting cells further comprises the steps of:

analyzing the distribution of cells for bubble tracks;  
disregarding areas with too small local cell concentration; and  
recalculating cell counts.

WO 03/023571

PCT/US02/28958

1/77

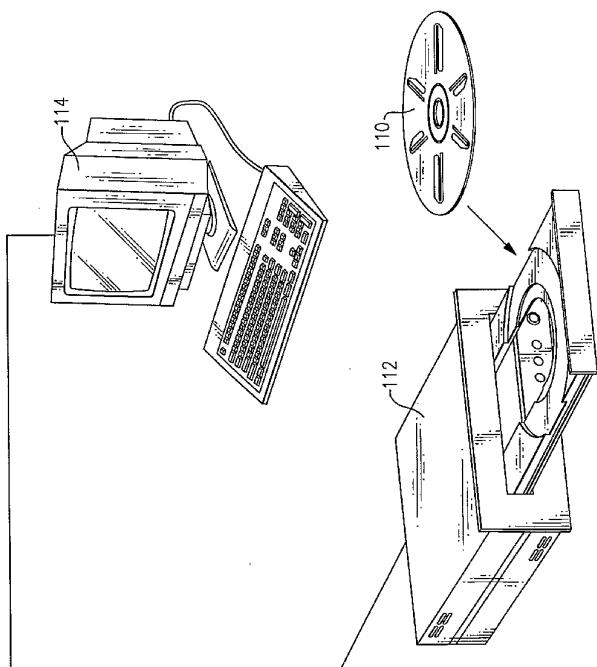
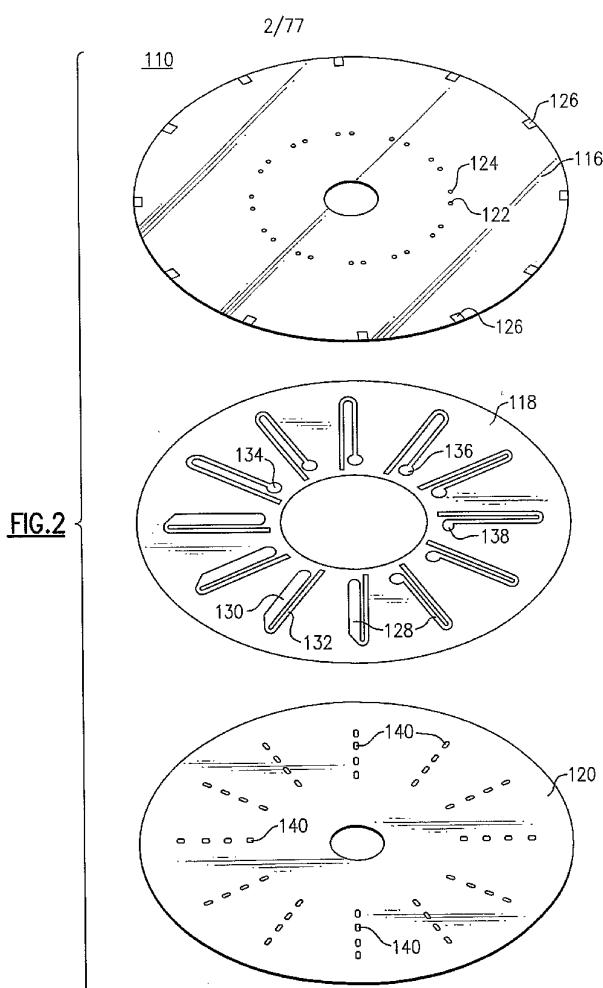


FIG.1

WO 03/023571

PCT/US02/28958



WO 03/023571

PCT/US02/28958

3/77

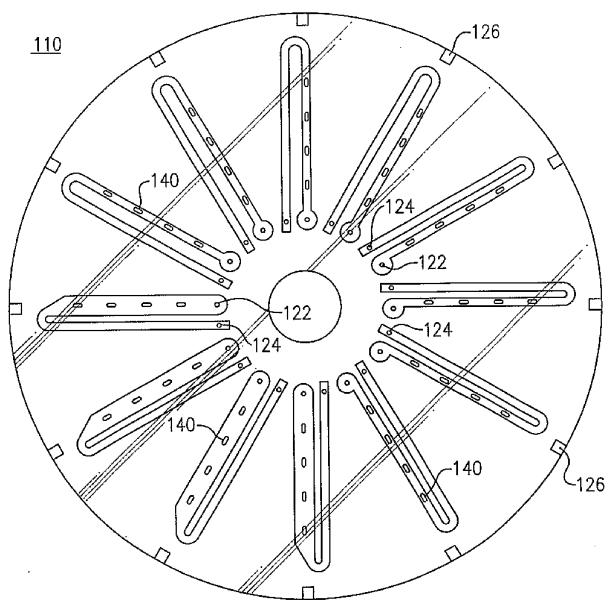


FIG.3

WO 03/023571

PCT/US02/28958

4/77

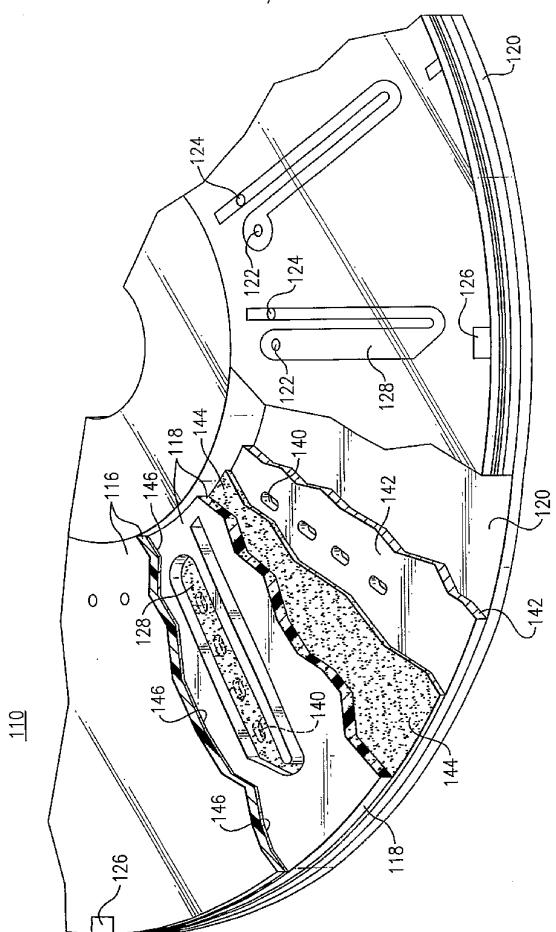
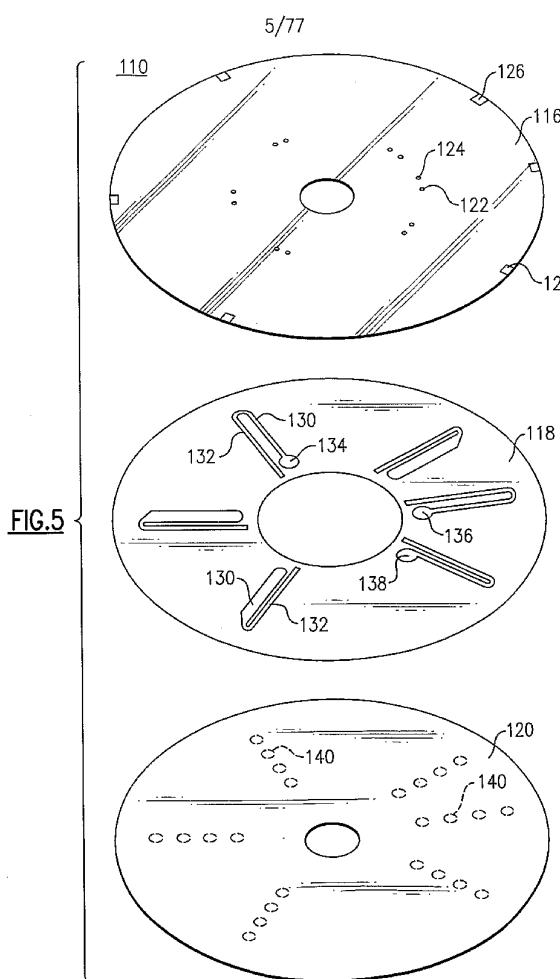


FIG.4

WO 03/023571

PCT/US02/28958



WO 03/023571

PCT/US02/28958

6/77

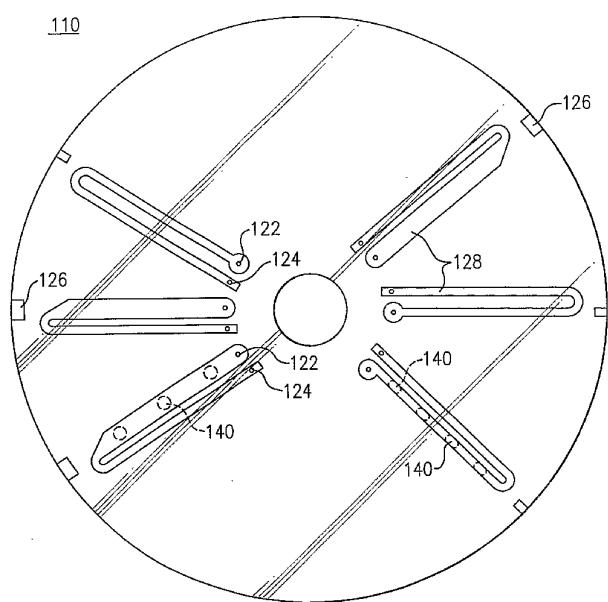


FIG.6

WO 03/023571

PCT/US02/28958

7/77

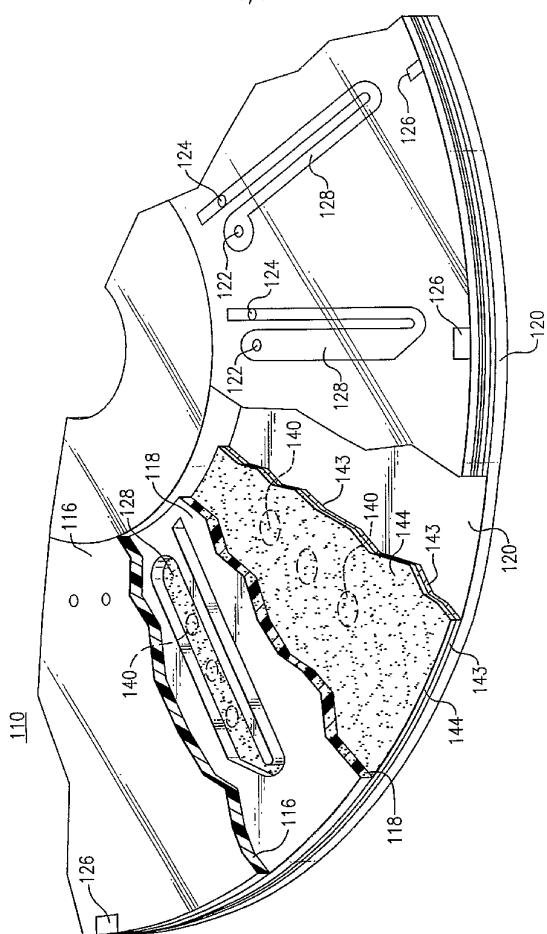
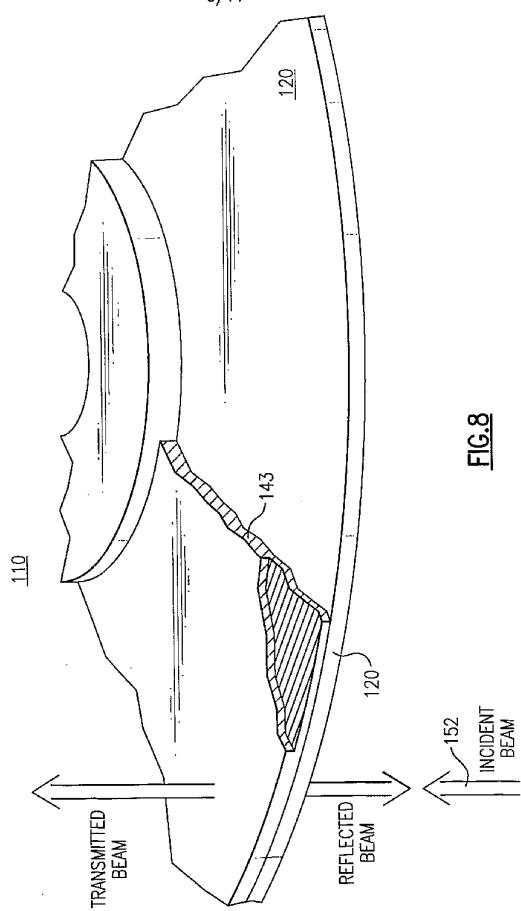


FIG.7

WO 03/023571

PCT/US02/28958

8/77



WO 03/023571

PCT/US02/28958

9/77

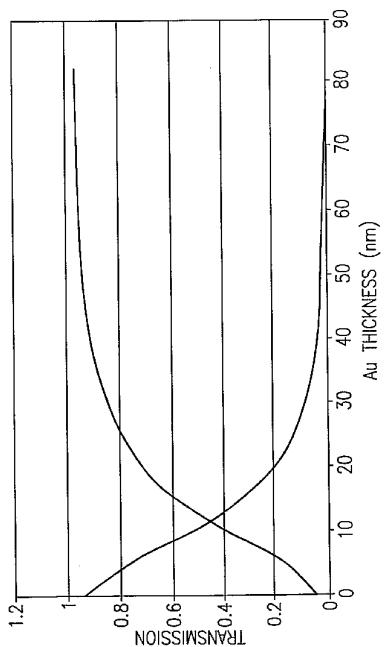


FIG.9

WO 03/023571

PCT/US02/28958

10/77

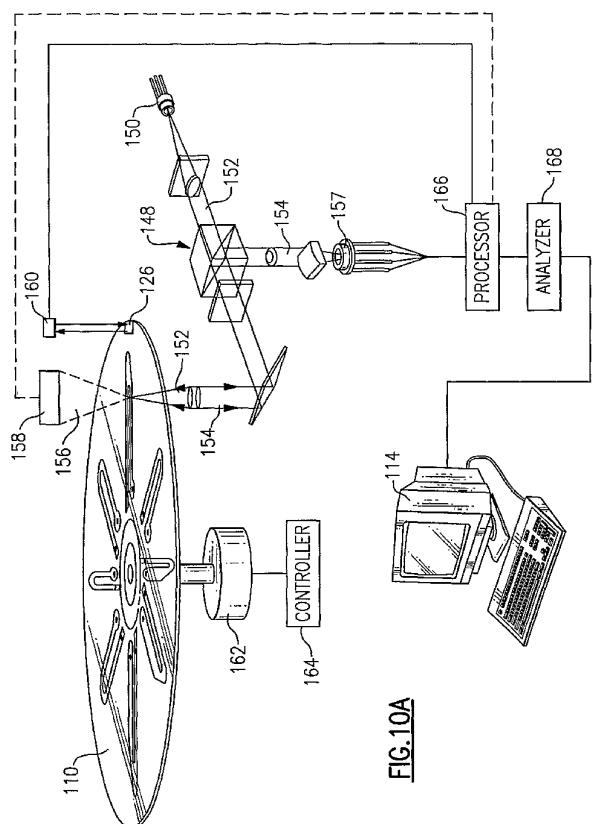


FIG. 10A

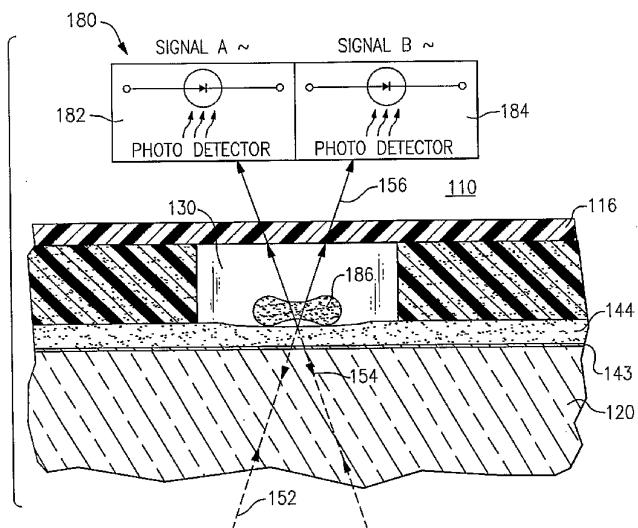


FIG.10B

WO 03/023571

PCT/US02/28958

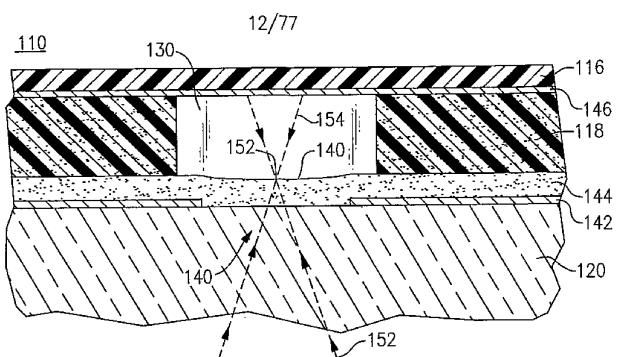


FIG.11

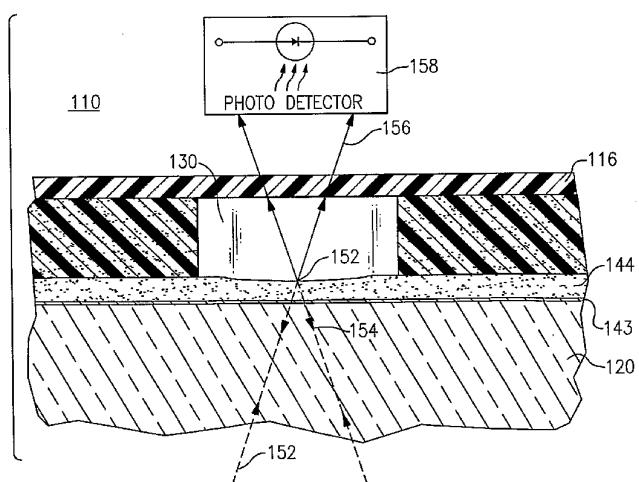
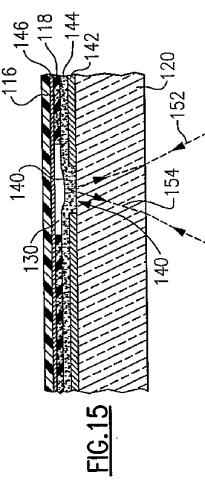
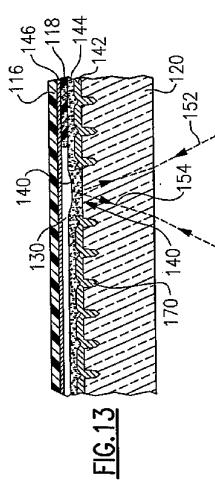
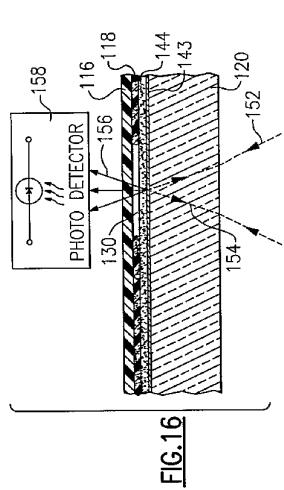
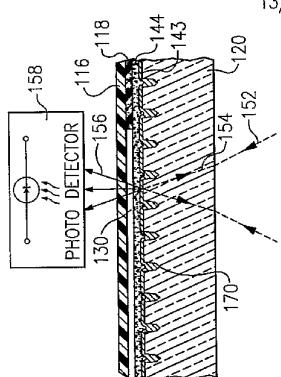


FIG.12

WO 03/023571

PCT/US02/28958

13/77



WO 03/023571

PCT/US02/28958

14/77

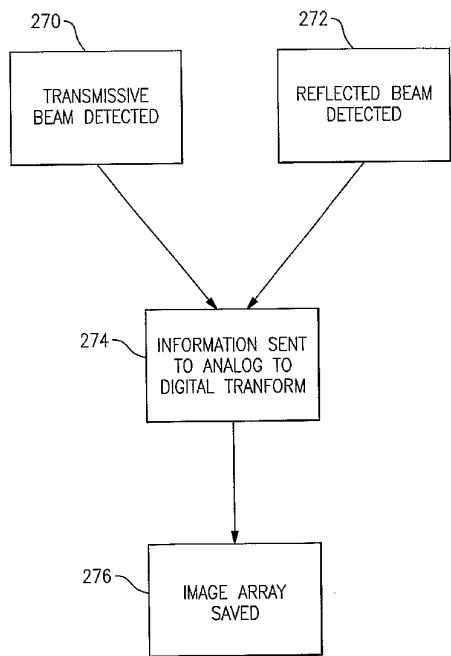
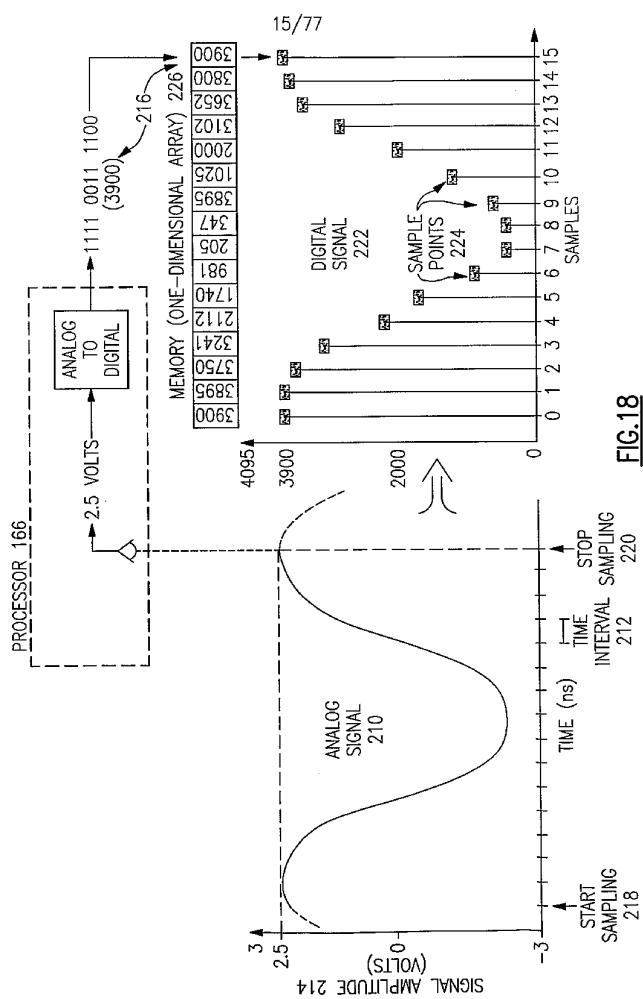


FIG.17

WO 03/023571

PCT/US02/28958



WO 03/023571

PCT/US02/28958

16/77

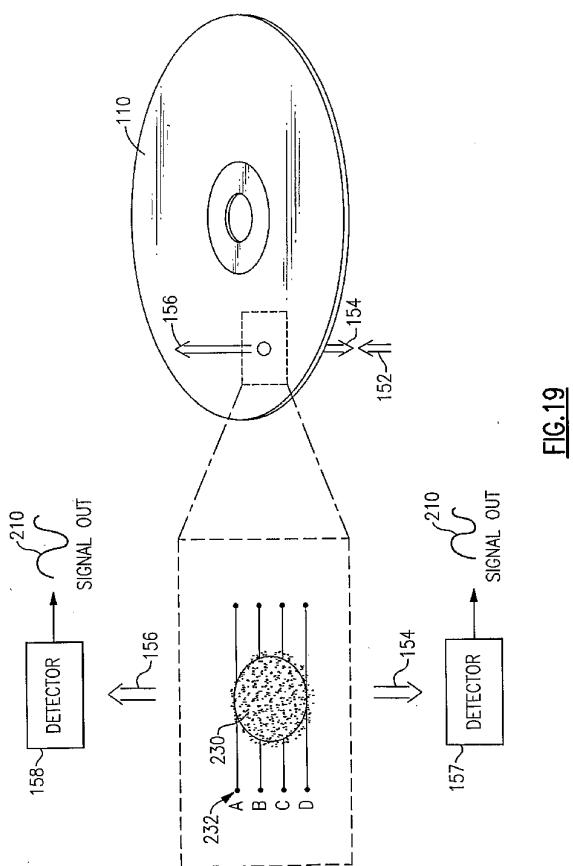


FIG.19

WO 03/023571

PCT/US02/28958

17/77

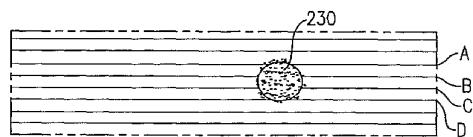


FIG.20A

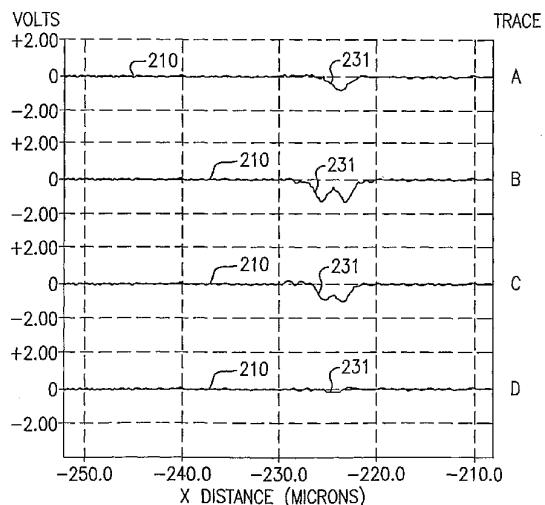
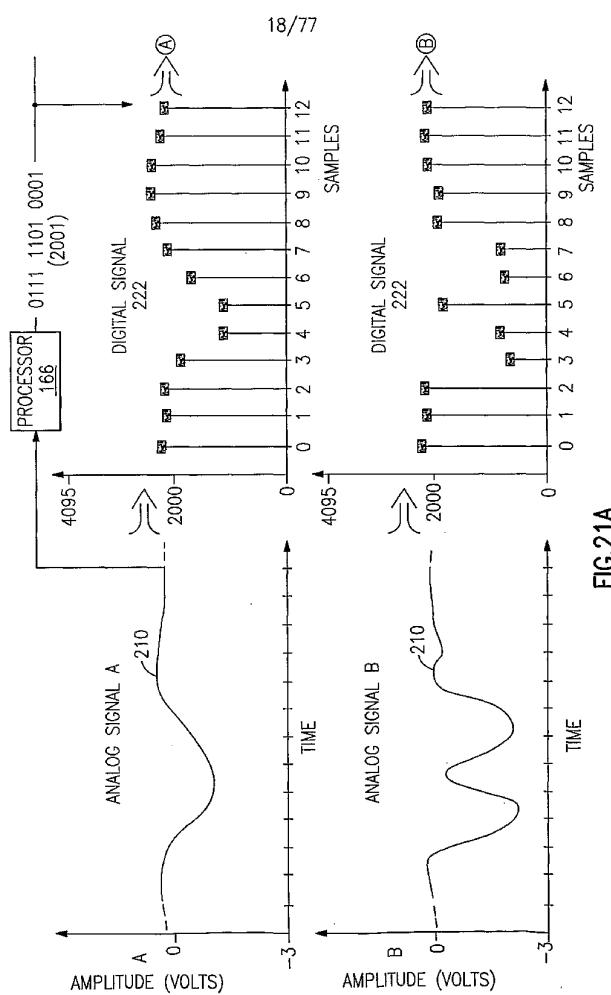


FIG.20B

WO 03/023571

PCT/US02/28958

**FIG 21A**

WO 03/023571

PCT/US02/28958

19/77

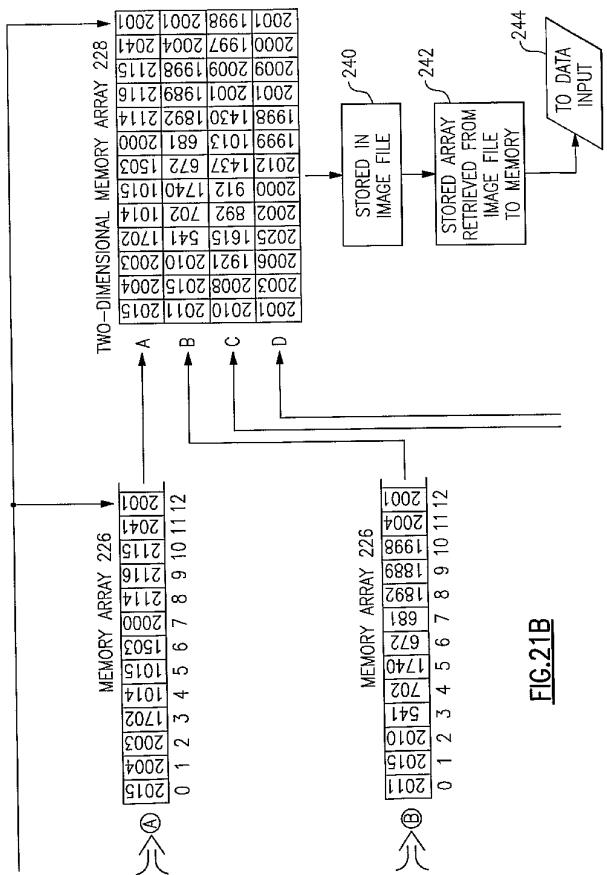


FIG.21B

WO 03/023571

PCT/US02/28958

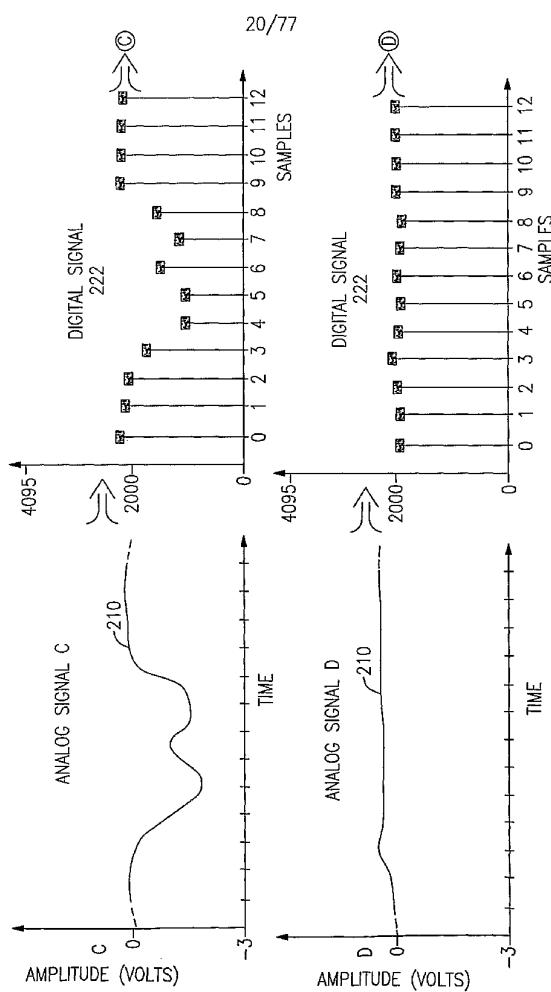


FIG.21C

FIG.21A	FIG.21B
FIG.21C	FIG.21D

FIG.21

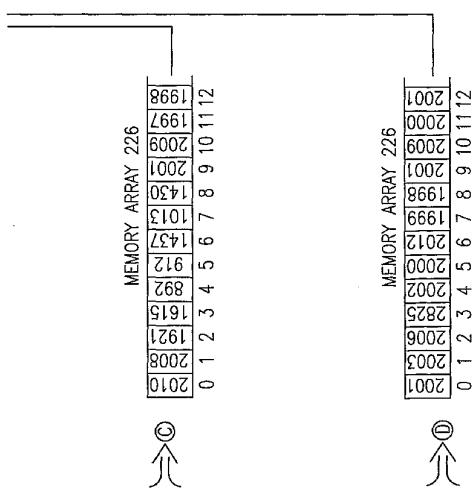


FIG.21D

WO 03/023571

PCT/US02/28958

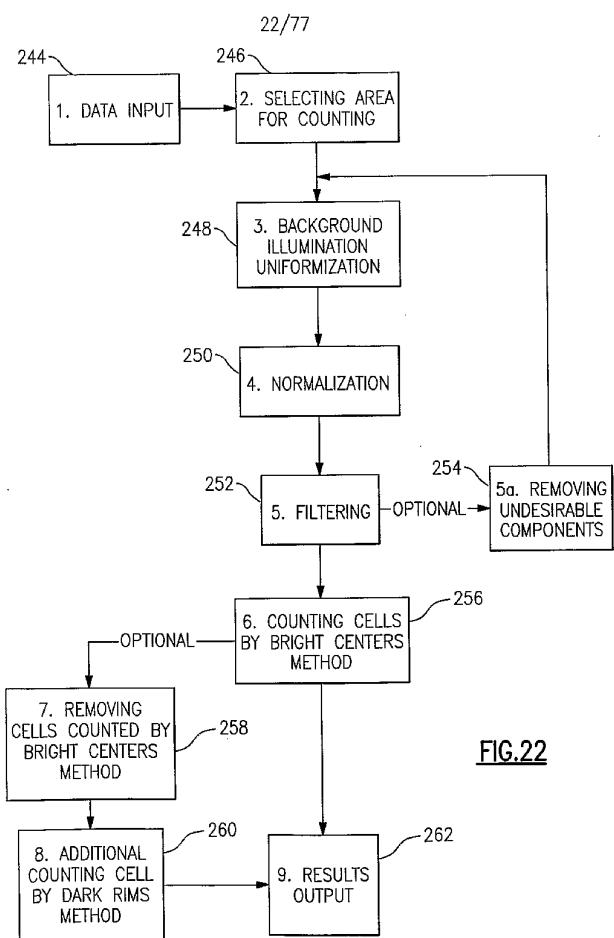
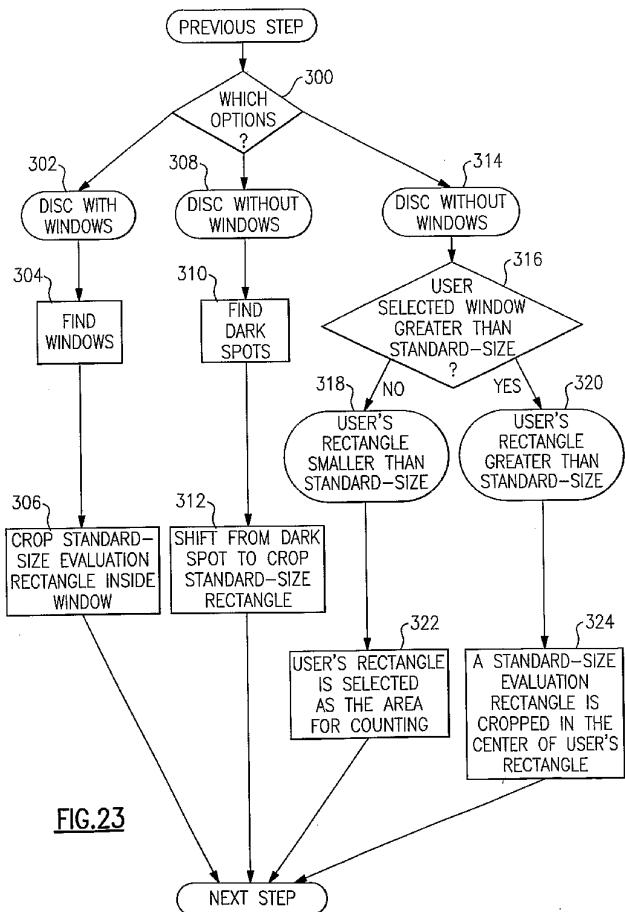


FIG.22

23/77



WO 03/023571

PCT/US02/28958

24/77

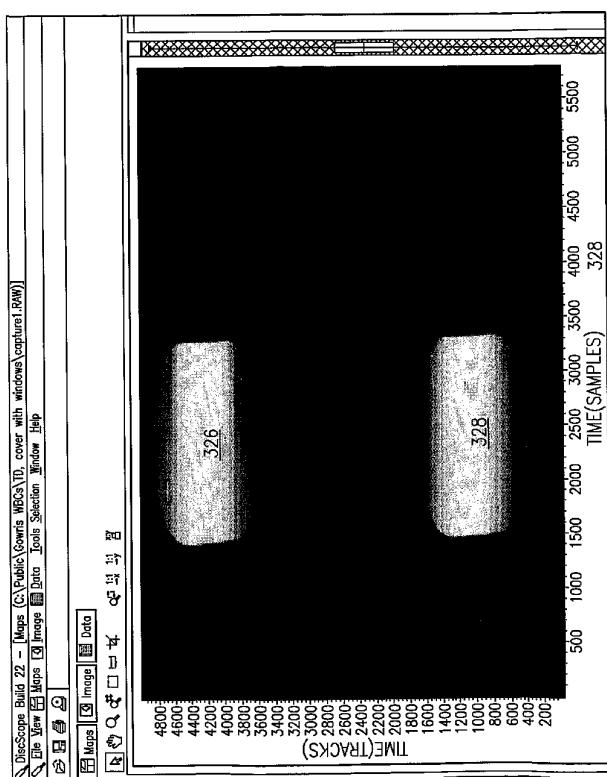
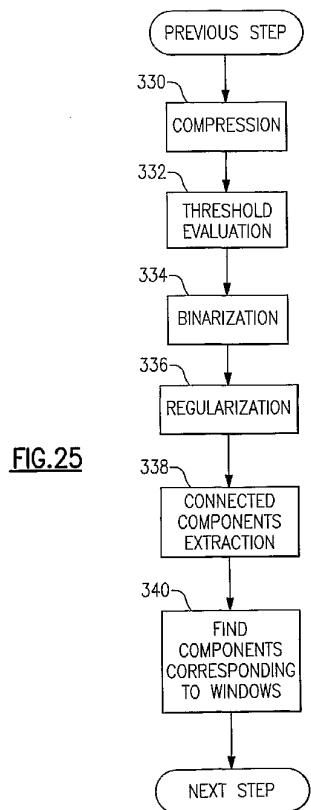


FIG.24



WO 03/023571

PCT/US02/28958

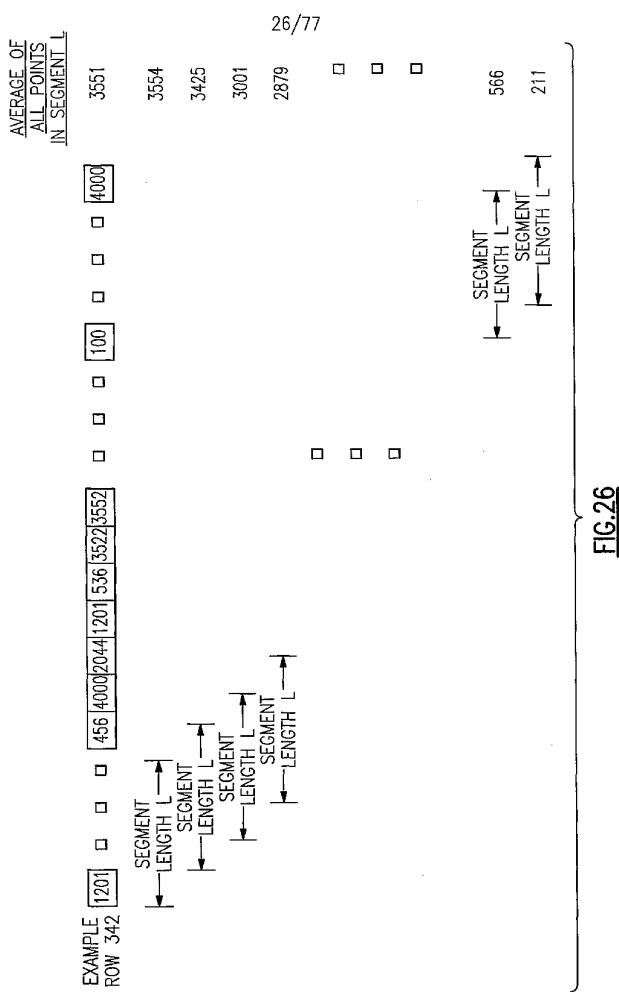


FIG. 26

WO 03/023571

PCT/US02/28958

27/77

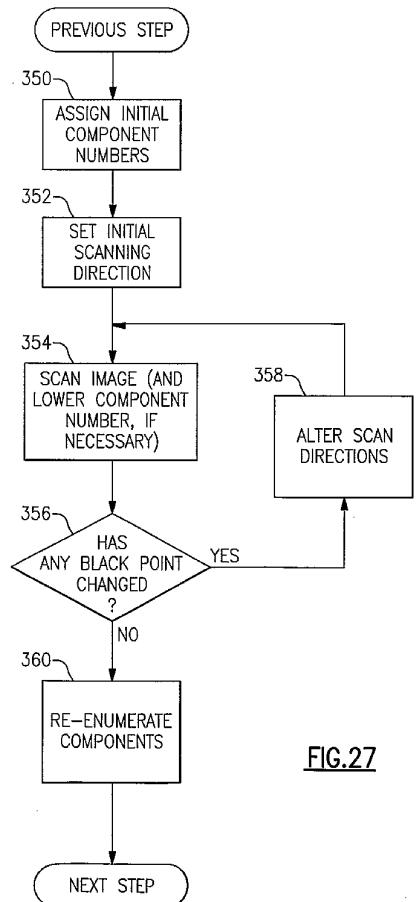


FIG.27

WO 03/023571

PCT/US02/28958

28/77

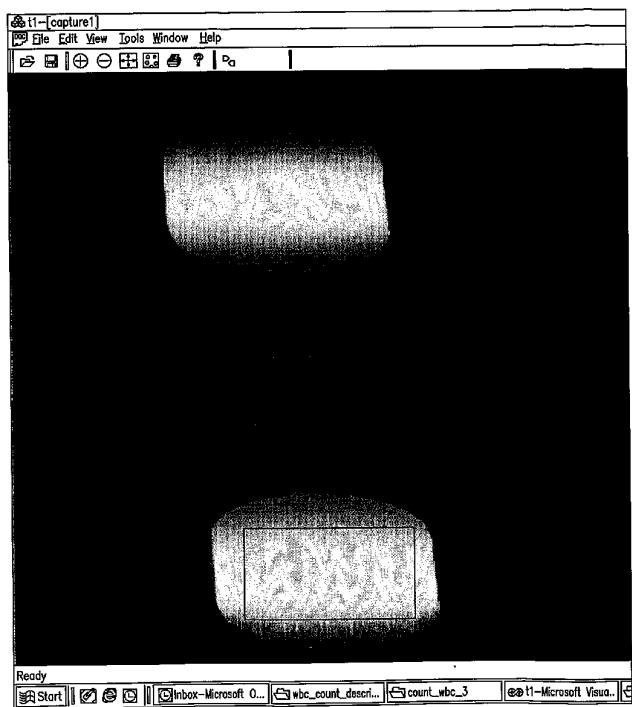


FIG.28

WO 03/023571

PCT/US02/28958

29/77

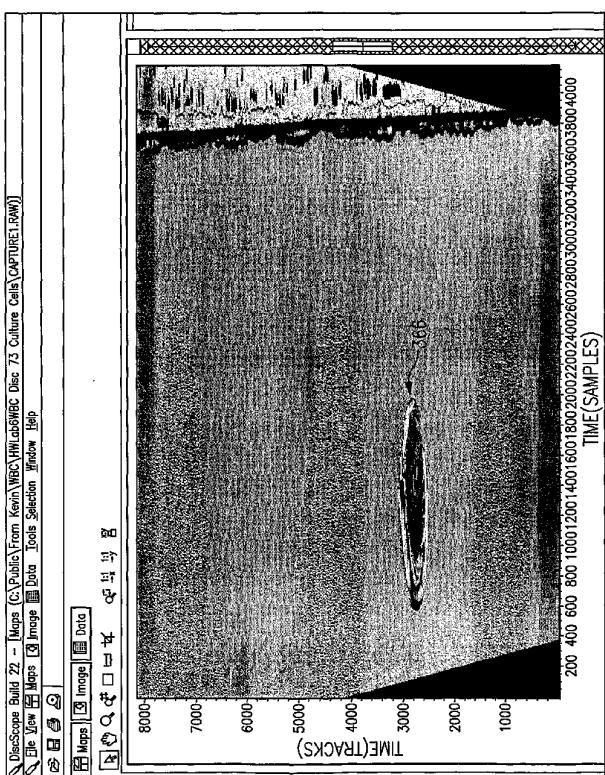


FIG 29

WO 03/023571

PCT/US02/28958

30/77

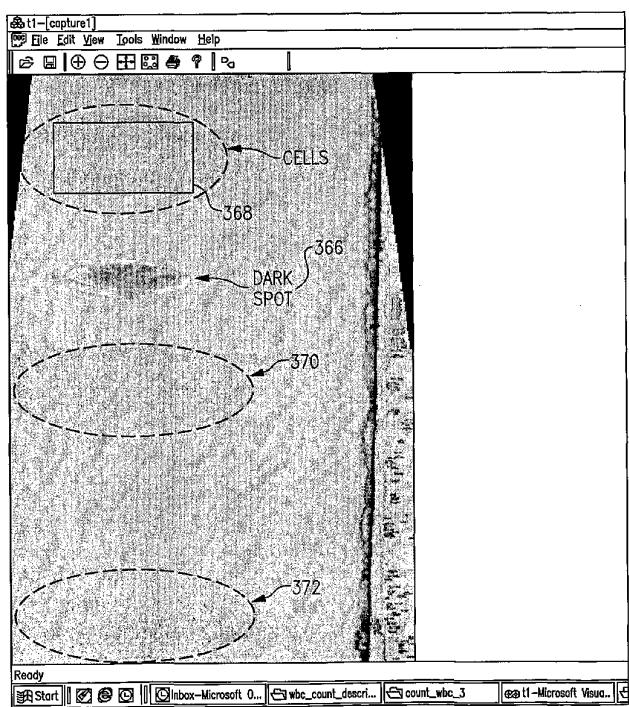


FIG.30

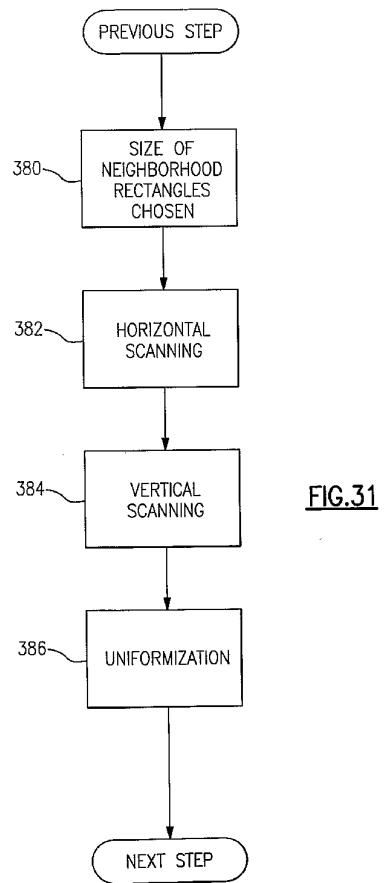


FIG.31

WO 03/023571

PCT/US02/28958

32/77

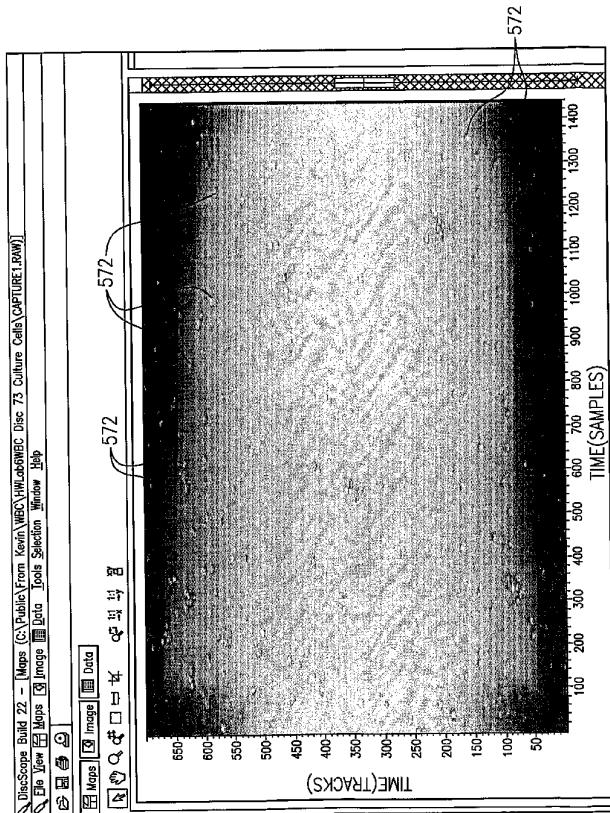


FIG.32

WO 03/023571

PCT/US02/28958

33/77

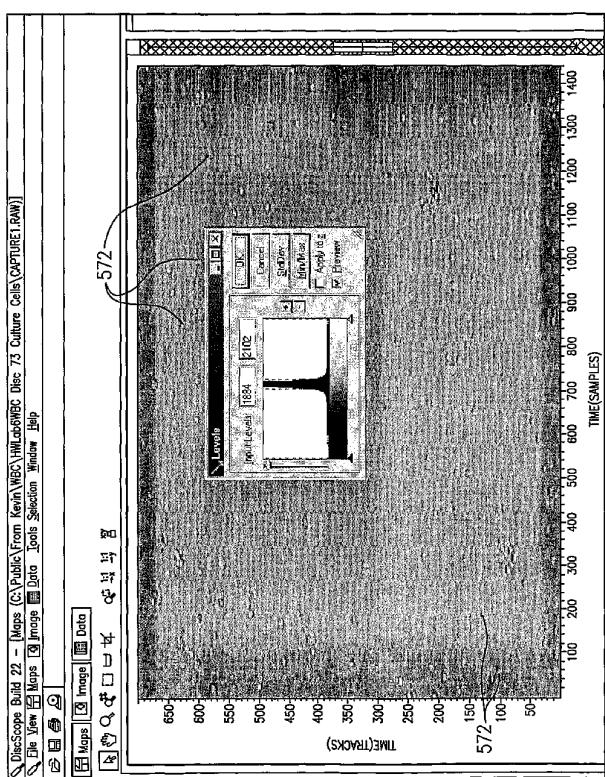


FIG.33

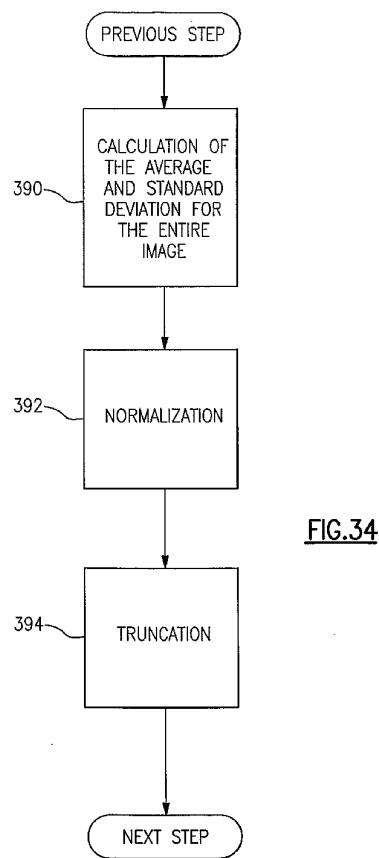


FIG.34

WO 03/023571

PCT/US02/28958

35/77

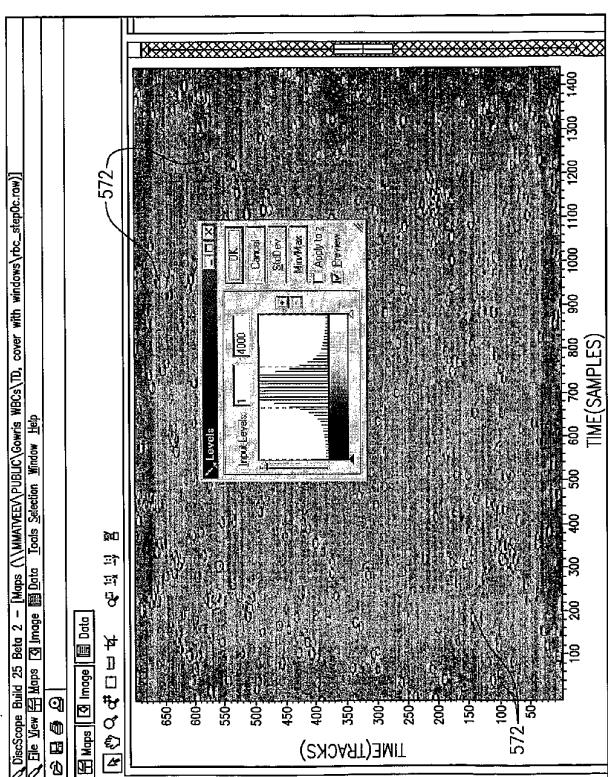


FIG.35

WO 03/023571

PCT/US02/28958

36/77

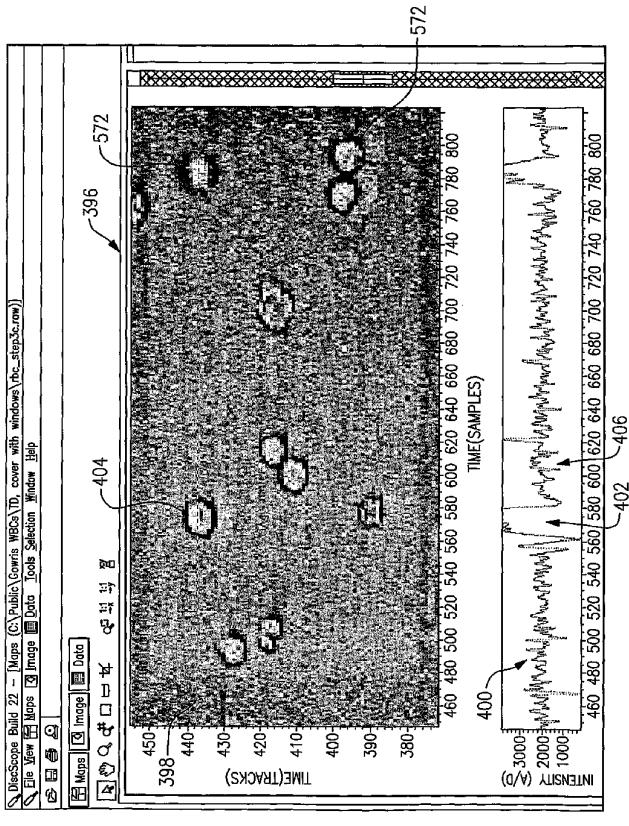
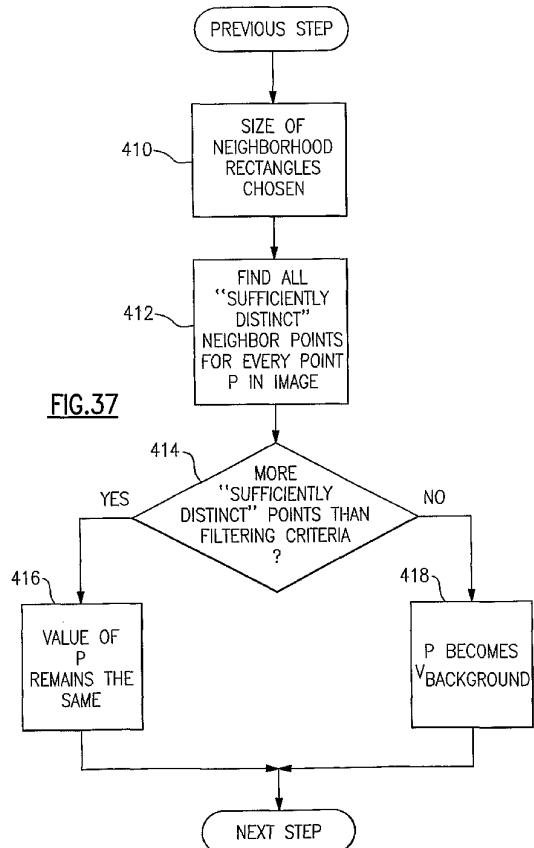


FIG. 36



WO 03/023571

PCT/US02/28958

38/77

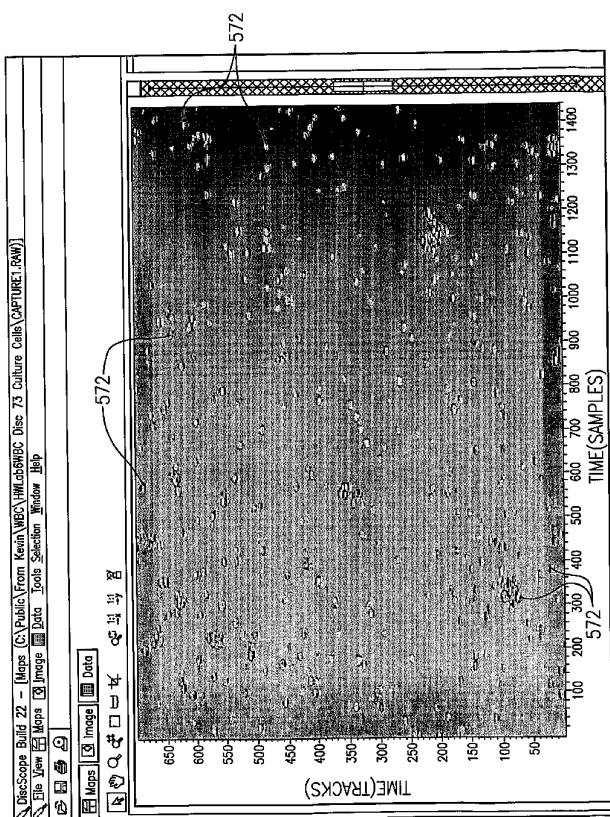


FIG.38

WO 03/023571

PCT/US02/28958

39/77

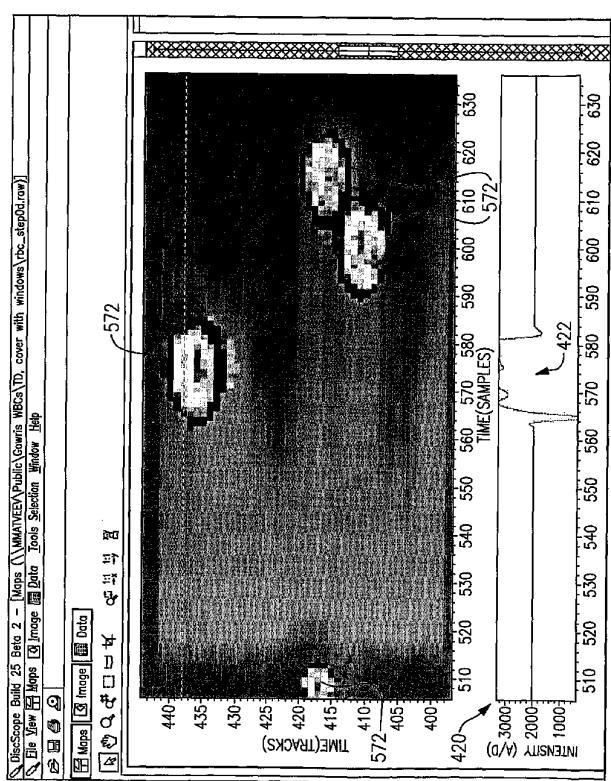
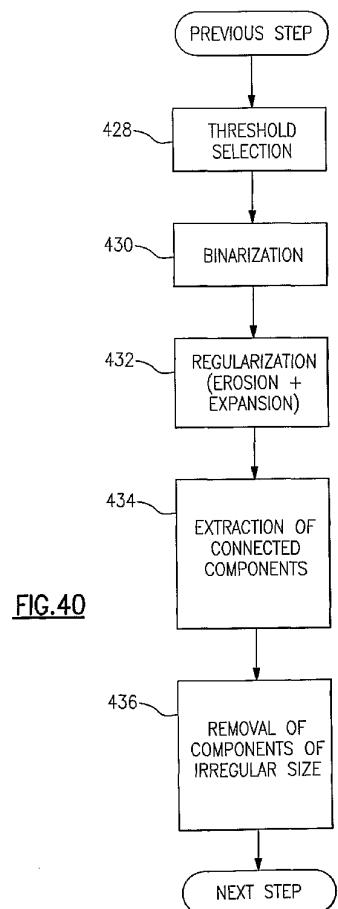


FIG.39

40/77

**FIG.40**

WO 03/023571

PCT/US02/28958

41/77

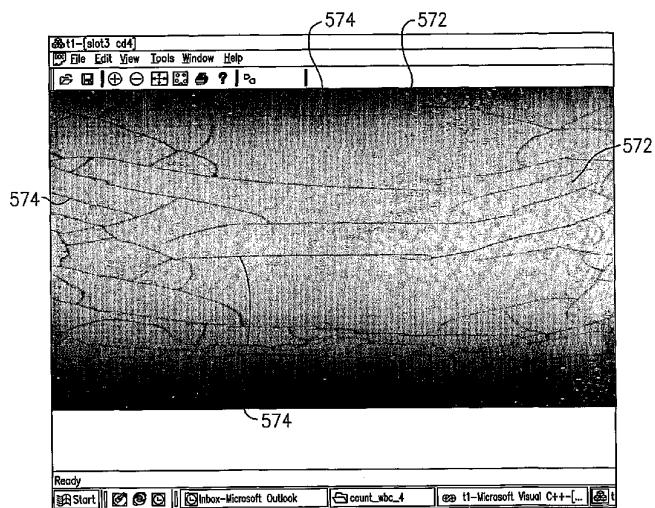


FIG.41

WO 03/023571

PCT/US02/28958

42/77

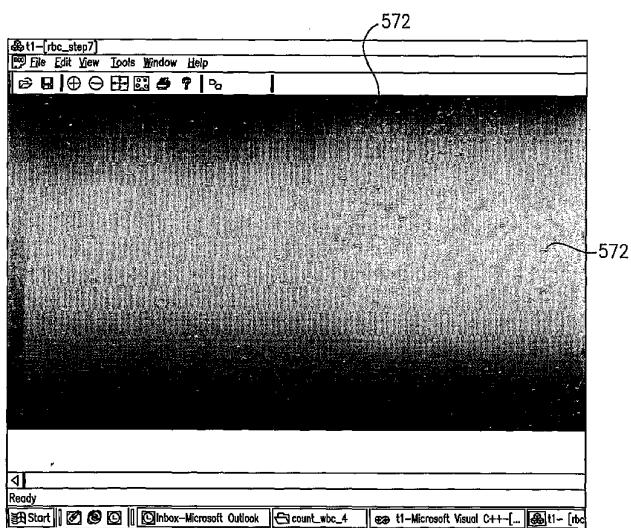
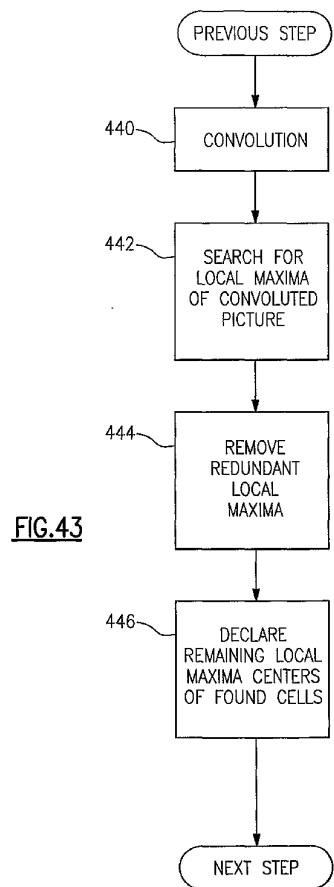


FIG.42

43/77



WO 03/023571

PCT/US02/28958

44/77

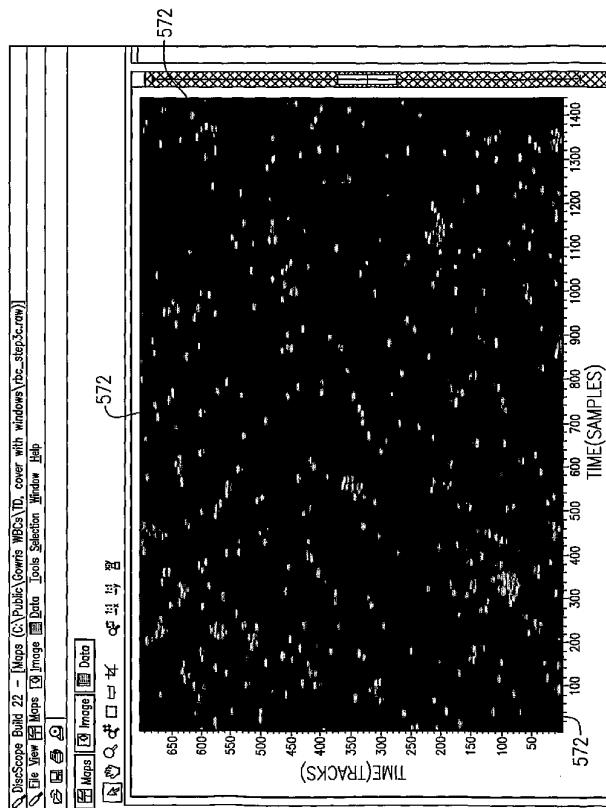


FIG.44

WO 03/023571

PCT/US02/28958

45/77

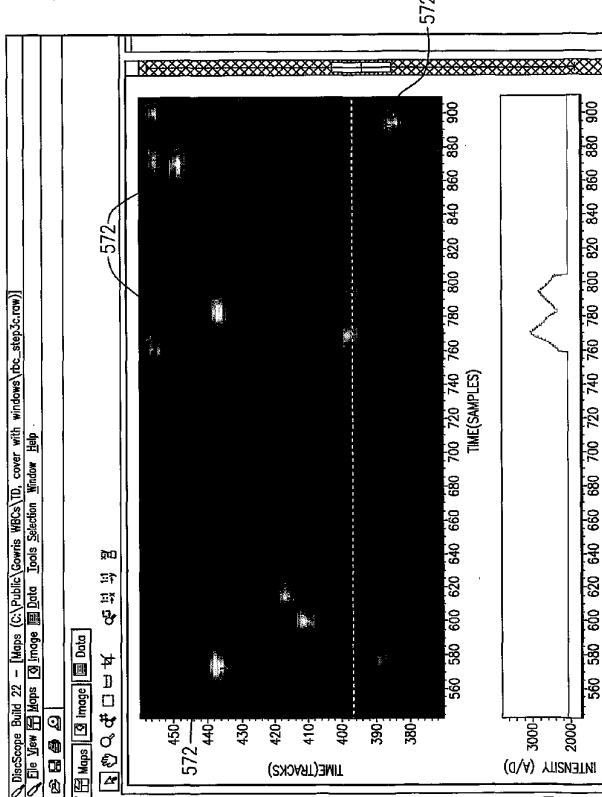


FIG.45

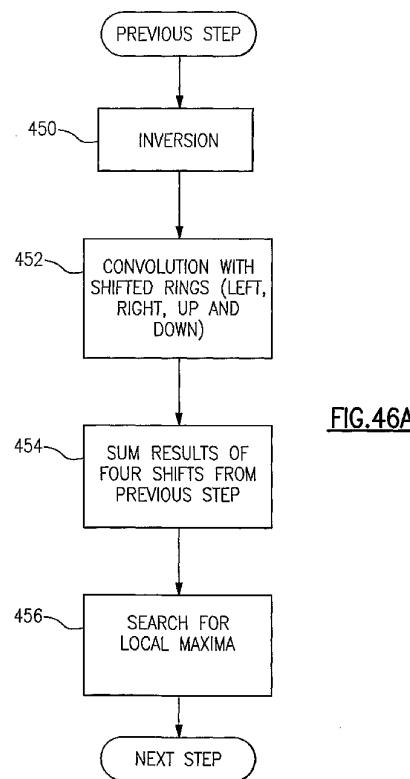


FIG.46A

WO 03/023571

PCT/US02/28958

47/77

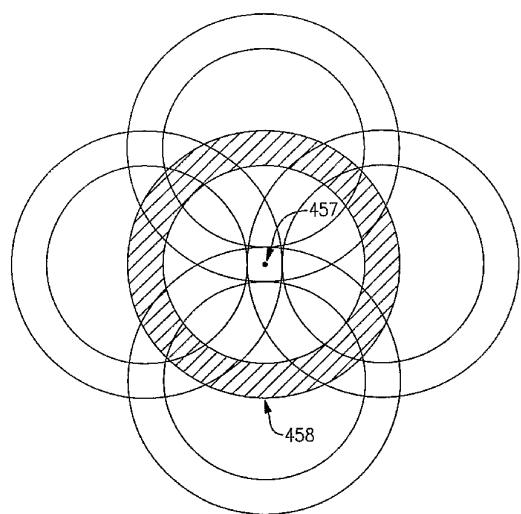


FIG.46B

WO 03/023571

PCT/US02/28958

48/77

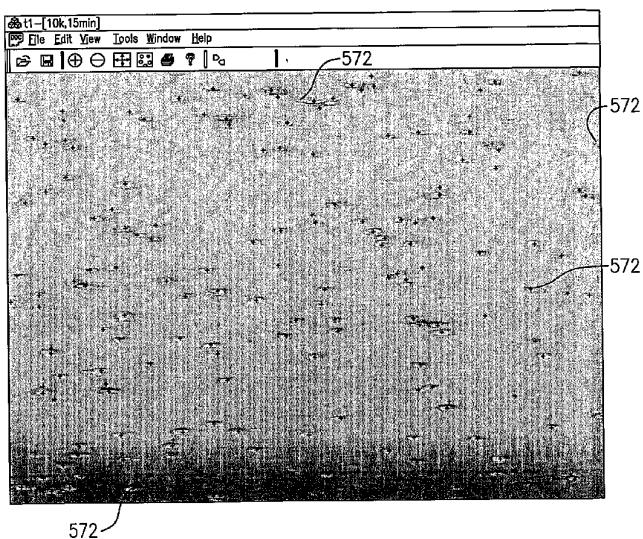


FIG.47

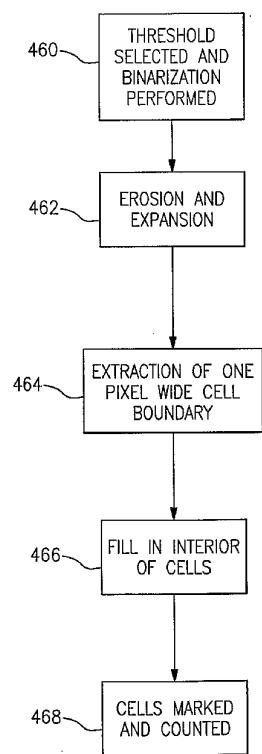


FIG.48

WO 03/023571

PCT/US02/28958

50/77

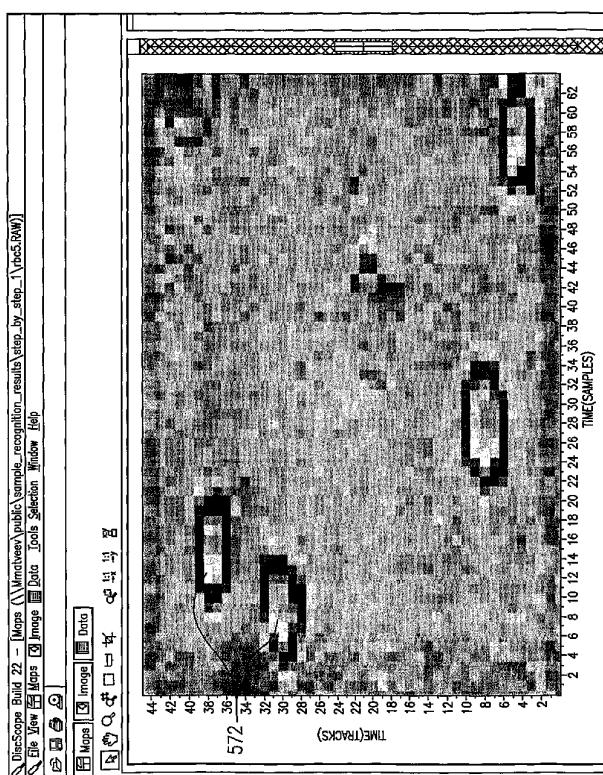


FIG. 49

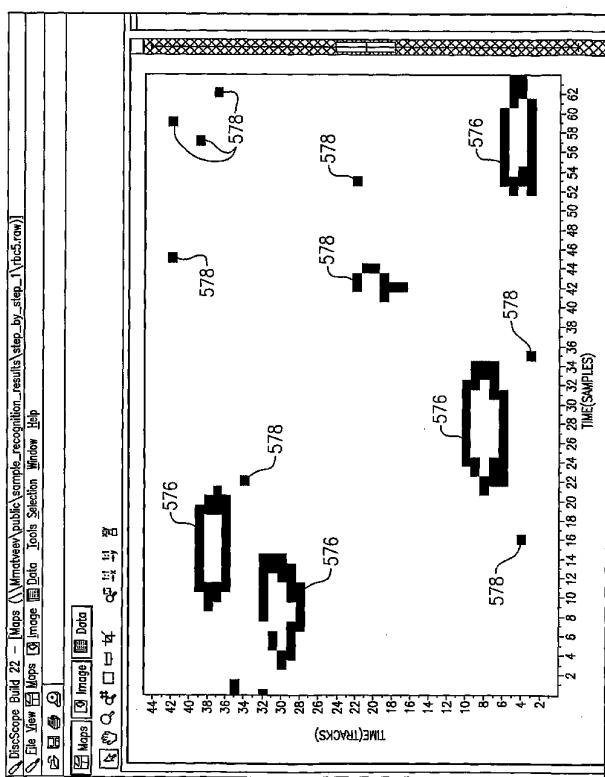


FIG.50

WO 03/023571

PCT/US02/28958

52/77

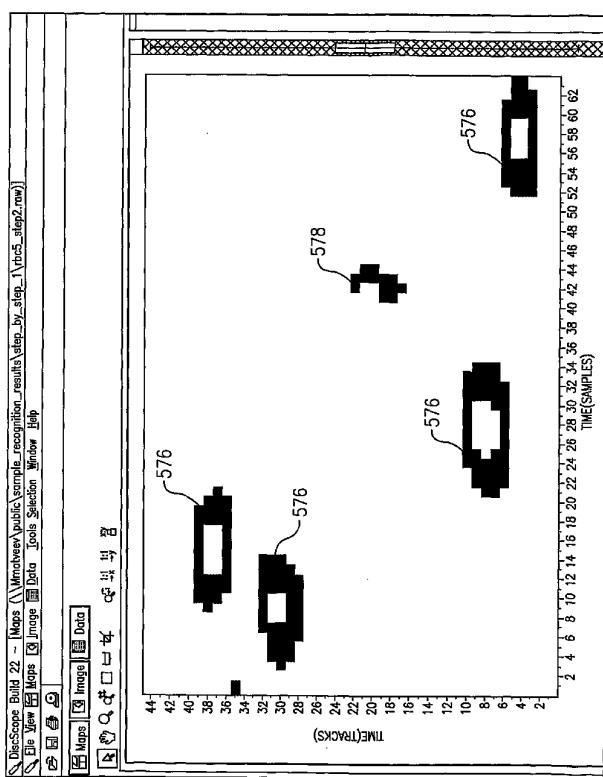


FIG.51

WO 03/023571

PCT/US02/28958

53/77

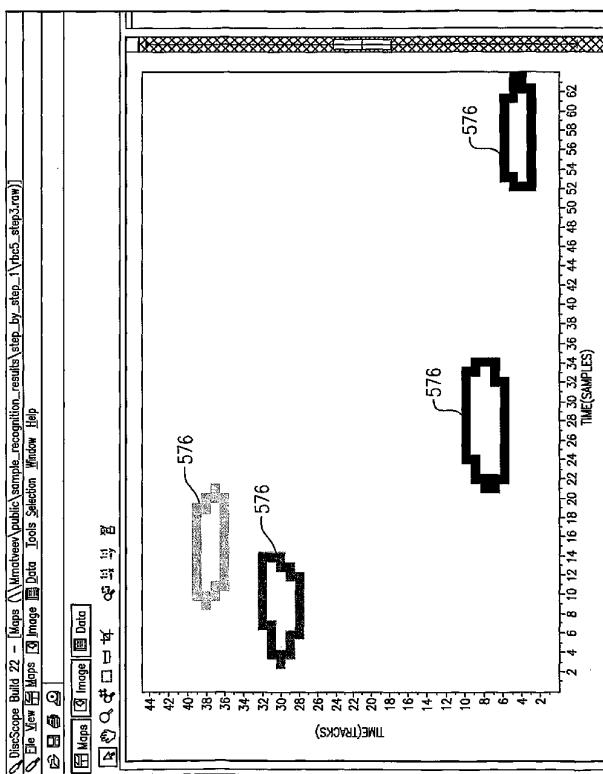


FIG.52

WO 03/023571

PCT/US02/28958

54/77

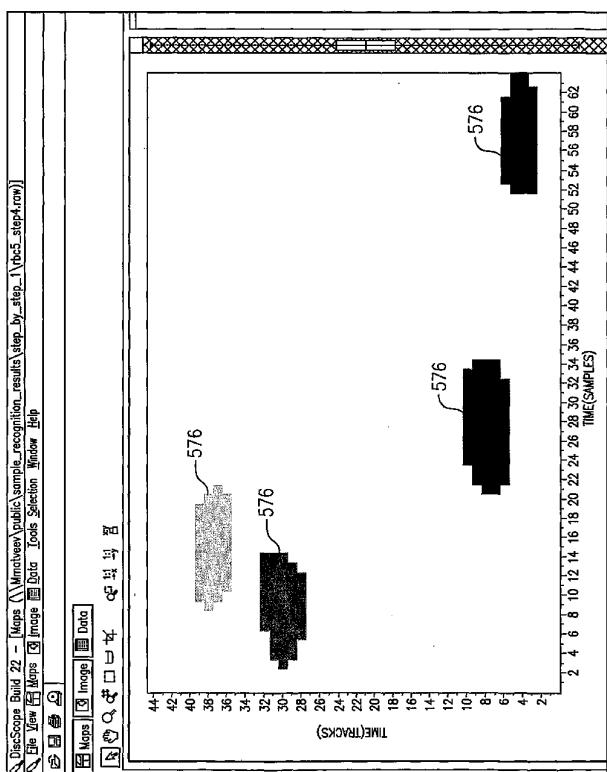


FIG.53

WO 03/023571

PCT/US02/28958

55/77

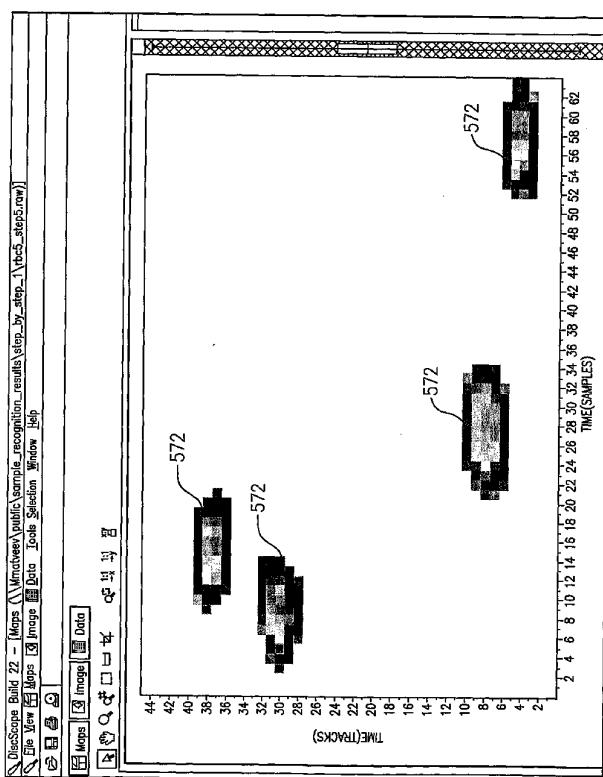


FIG.54

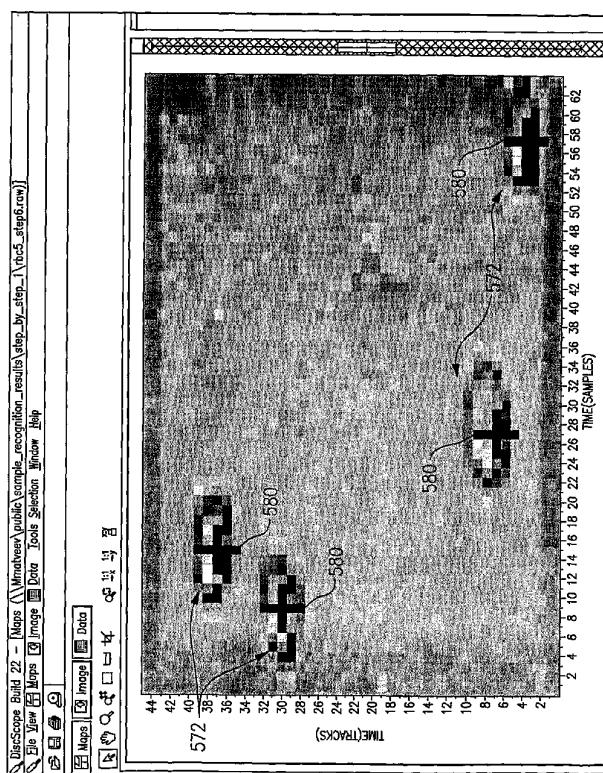


FIG. 55

WO 03/023571

PCT/US02/28958

57/77

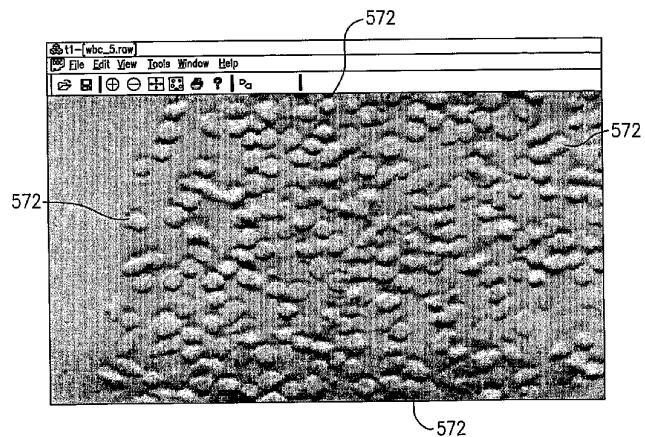
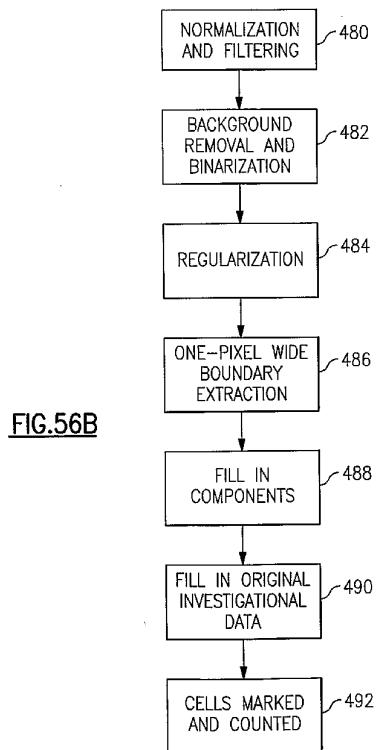


FIG.56A



WO 03/023571

PCT/US02/28958

59/77

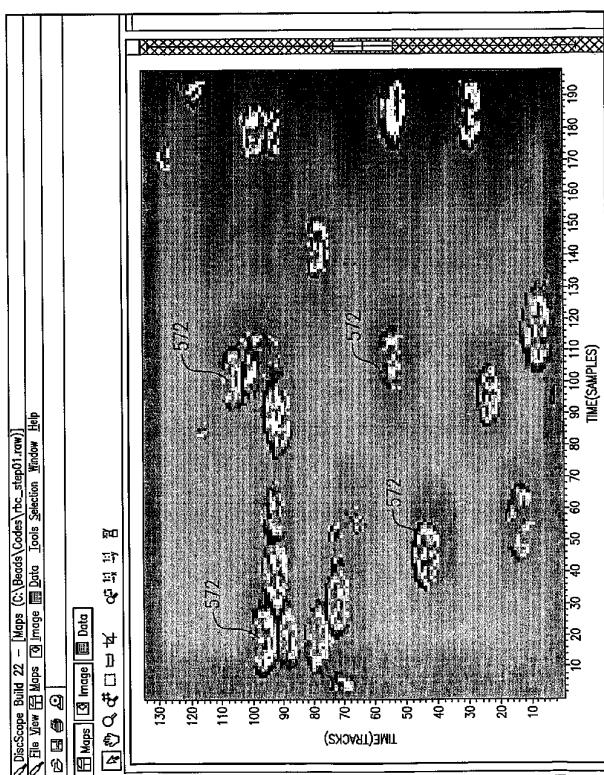


FIG.57

WO 03/023571

PCT/US02/28958

60/77

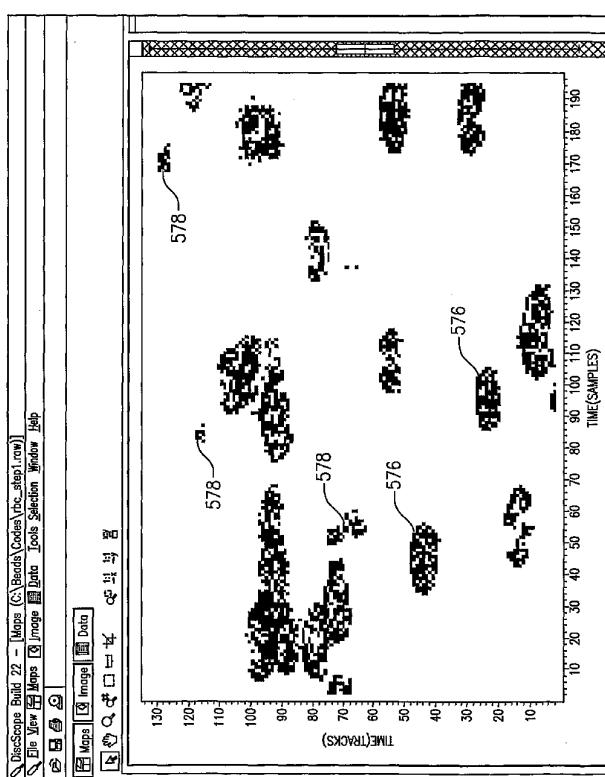


FIG. 58

WO 03/023571

PCT/US02/28958

61/77

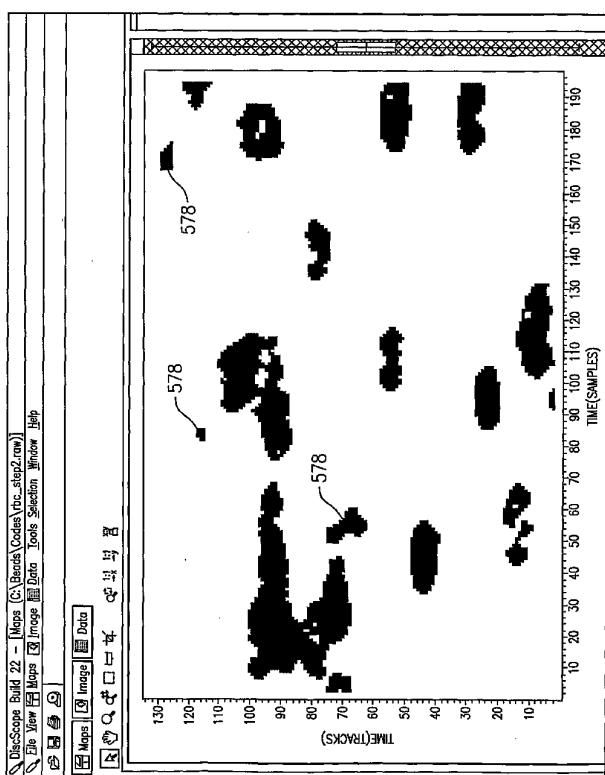
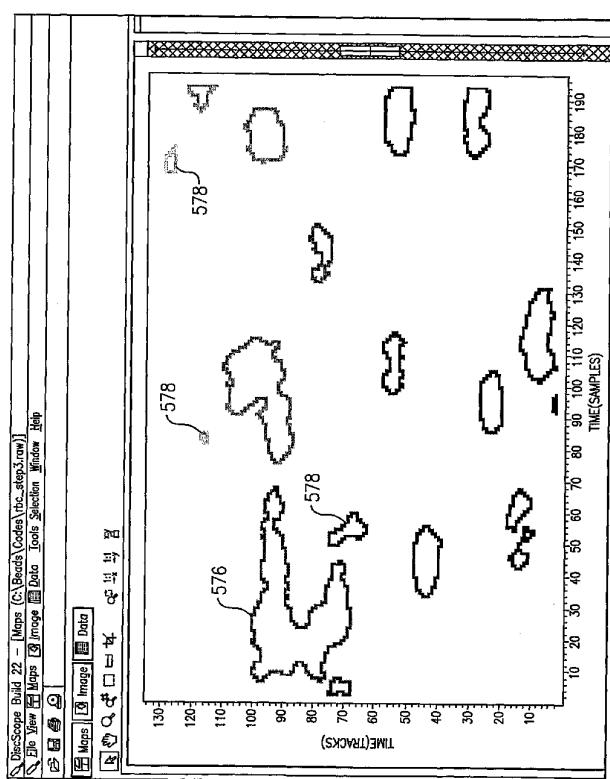


FIG.59

WO 03/023571

PCT/US02/28958

62/77



WO 03/023571

PCT/US02/28958

63/77

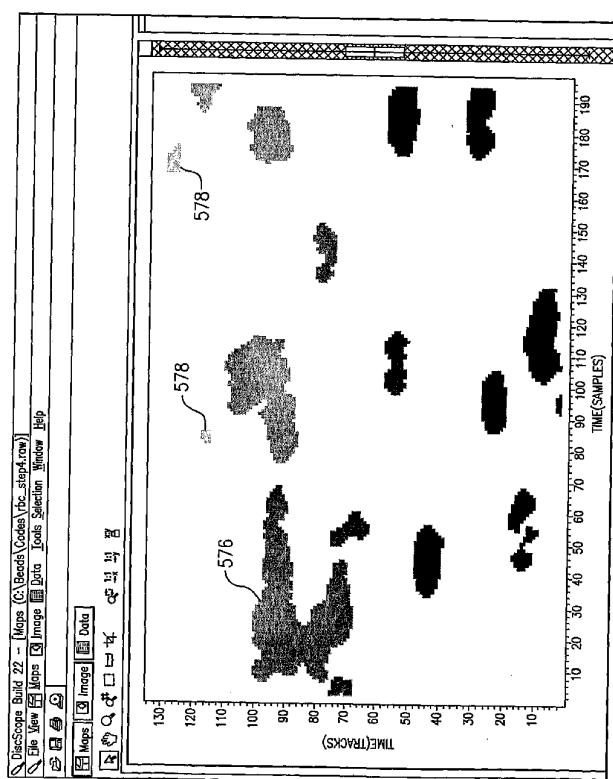


FIG.61

WO 03/023571

PCT/US02/28958

64/77

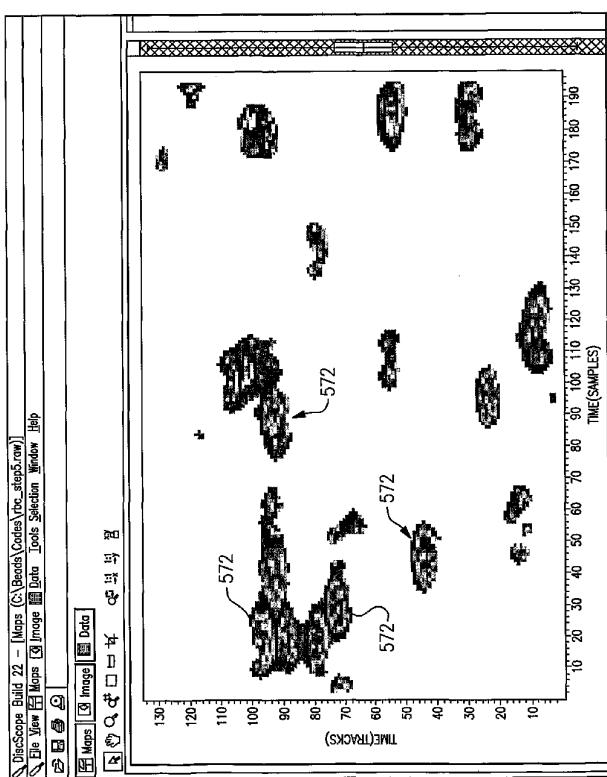


FIG. 62

WO 03/023571

PCT/US02/28958

65/77

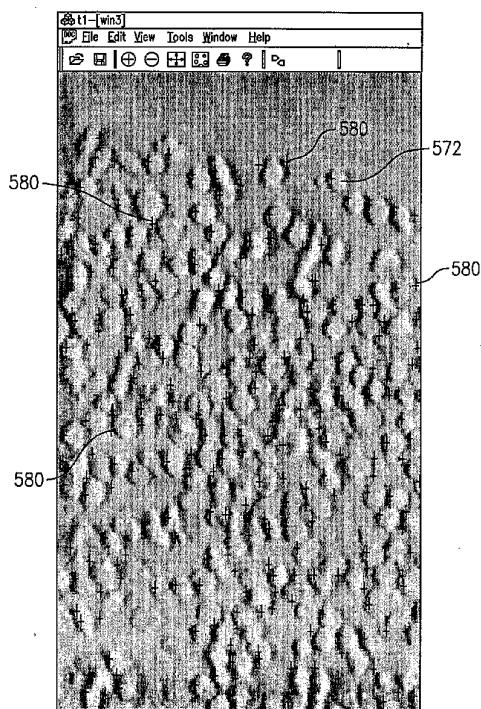


FIG.63

WO 03/023571

PCT/US02/28958

66/77

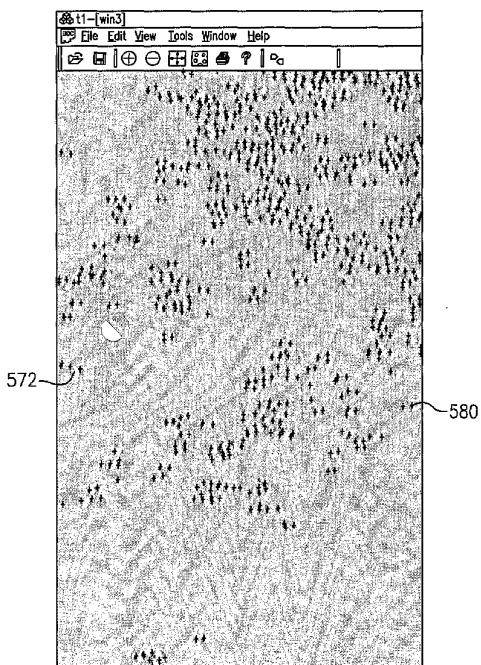


FIG.64

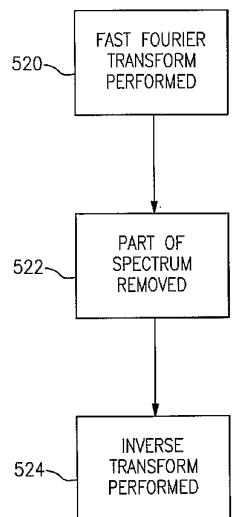
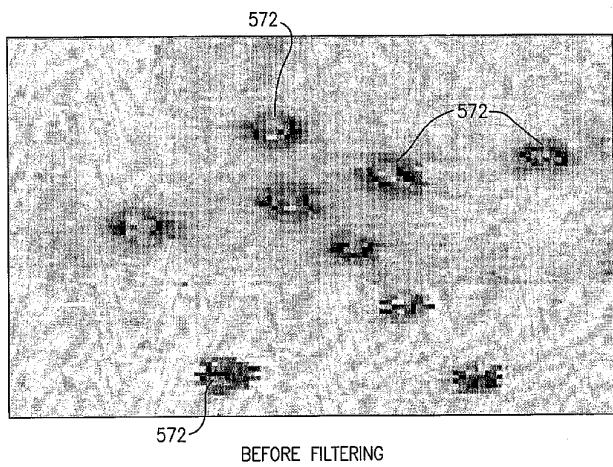


FIG.65

WO 03/023571

PCT/US02/28958

68/77



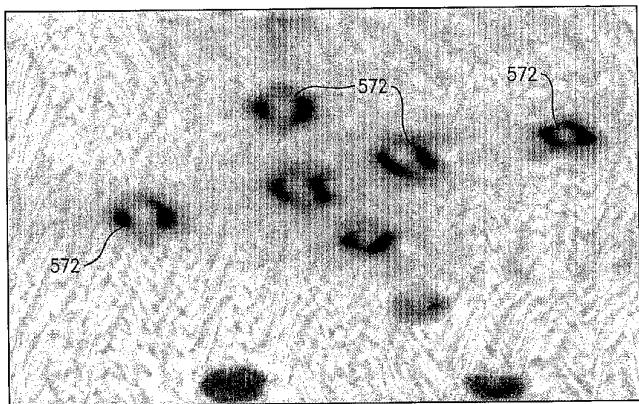
572  
BEFORE FILTERING

FIG.66

WO 03/023571

PCT/US02/28958

69/77



AFTER FILTERING

FIG.67

WO 03/023571

PCT/US02/28958

70/77

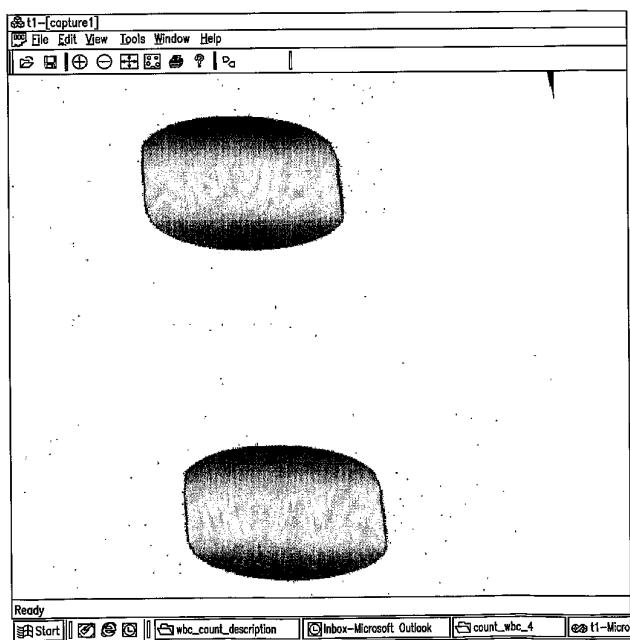


FIG.68

WO 03/023571

PCT/US02/28958

71/77

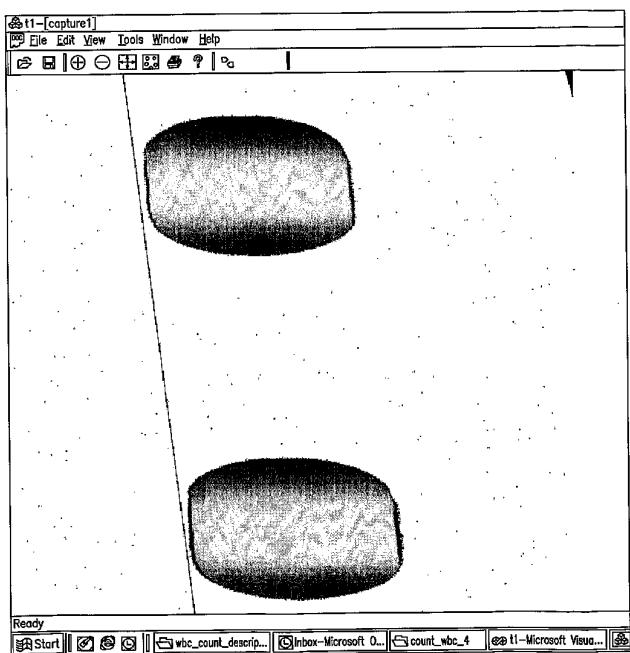


FIG.69

WO 03/023571

PCT/US02/28958

72/77

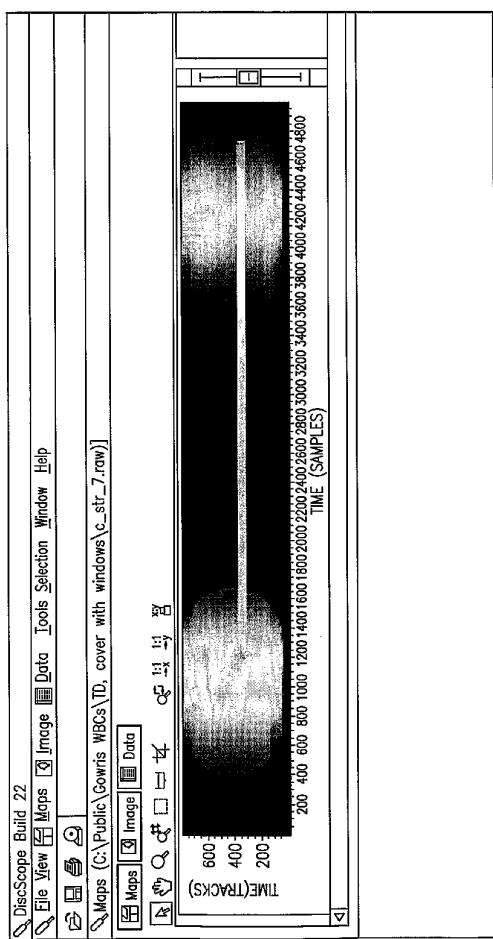
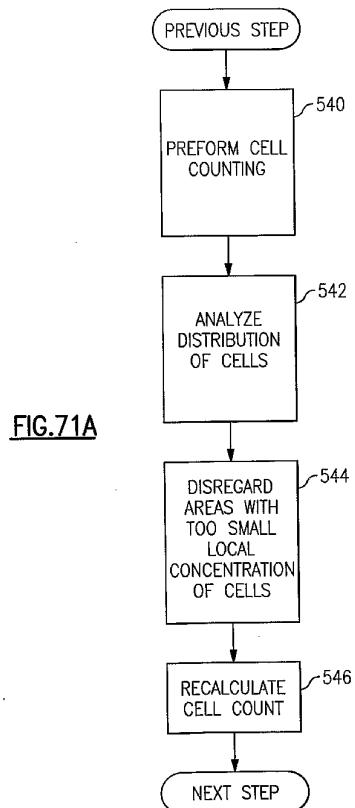


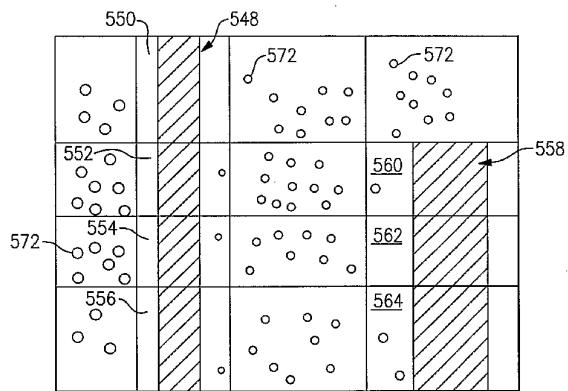
FIG.70



WO 03/023571

PCT/US02/28958

74/77

FIG.71B

WO 03/023571

PCT/US02/28958

75/77

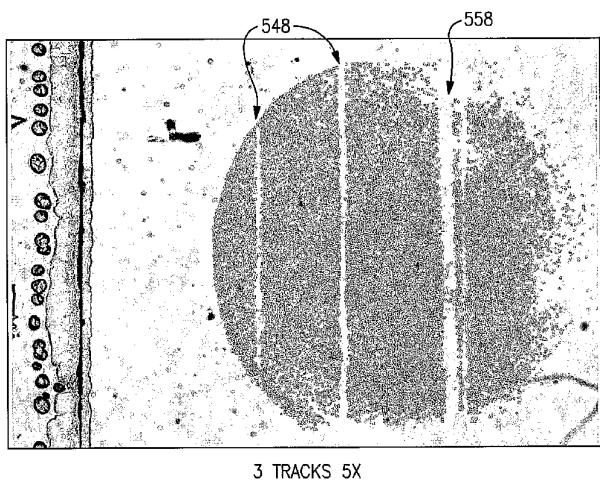
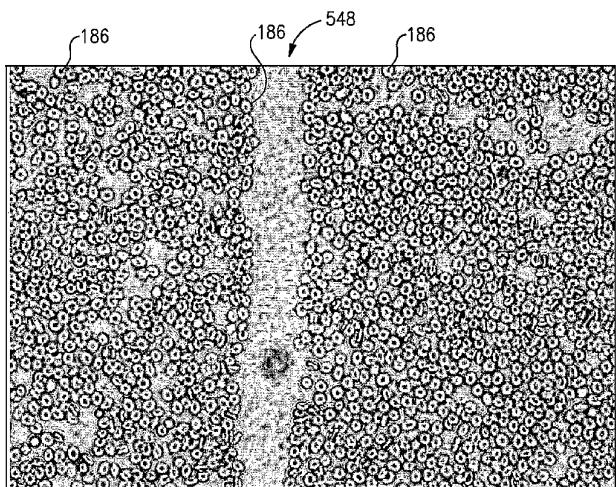


FIG.71C

WO 03/023571

PCT/US02/28958

76/77



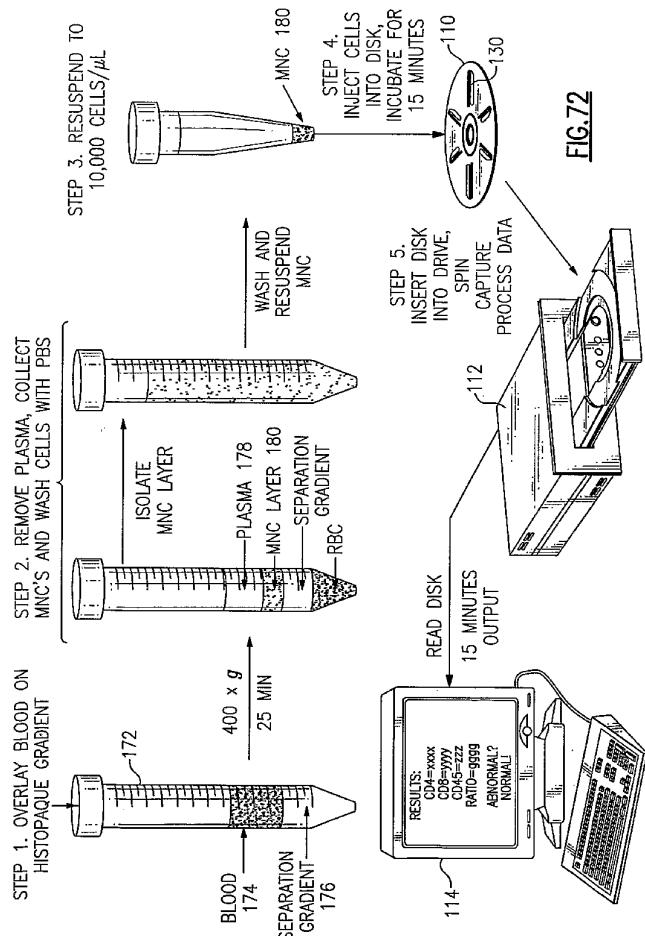
1 TRACK 40X

FIG.71D

WO 03/023571

PCT/US02/28958

77/77



## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau

(43) International Publication Date  
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/023571 A3(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: G06F 19/00

(71) Applicant: BURSTEIN TECHNOLOGIES, INC.

(21) International Application Number: PCT/US2002/028958

[US/US]; 163 Technology Drive, Suite 200, Irvine, CA 92618 (US).

(22) International Filing Date: 11 September 2002 (11.09.2002)

(72) Inventors: MATVEEV, Mikhail; 114 Oxford, Irvine, CA 92612 (US). PAL, Andrew; Attila, 20 Calle Esterio, Rancho Santa Margarita, CA 92688 (US).

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

(26) Publication Language: English

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(30) Priority Data:

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

60/322,863 12 September 2001 (12.09.2001) US

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

60/353,300 31 January 2002 (31.01.2002) US

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

60/353,921 31 January 2002 (31.01.2002) US

MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

60/355,644 5 February 2002 (05.02.2002) US

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,

60/355,304 8 February 2002 (08.02.2002) US

YU, ZA, ZM, ZW.

60/358,479 19 February 2002 (19.02.2002) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,

60/363,049 12 March 2002 (12.03.2002) US

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

60/404,921 21 August 2002 (21.08.2002) US

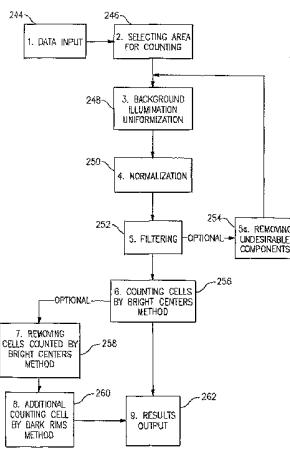
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

{Continued on next page}

(54) Title: METHODS FOR DIFFERENTIAL CELL COUNTS INCLUDING RELATED APPARATUS AND SOFTWARE FOR PERFORMING SAME

(57) Abstract: The present invention provides an optical method, system and software for imaging cells, in particular blood cells. In one embodiment, laboratory samples containing blood cells are deposited onto bio-discs, which are specially manufactured discs with mixing chambers that contain specific antigens to lock down various components of the blood cells. Once in the optical drive, the disc is spun and the samples and antigens are mixed with other solutions. Electromagnetic beams are then directed at the bio-disc to interact with the samples at specific capture zones and the resulting beams are collected by a detector. The information contained in the beams is then sent to a processor that produces a digital image. Various image processing methods such as binarization, background uniformization, normalization and filtering are performed to enhance cells in the investigational data for accurate counting. Other techniques are designed to correct for irregularities such as bubbles and dim cells.

WO 2003/023571 A3



---

**WO 2003/023571 A3**

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,  
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:  
4 March 2004

**Published:**  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/28958
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G06F19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G06F G06K G06T G06M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 275 777 B1 (SHIMIZU KOTARO) 14 August 2001 (2001-08-14) abstract; figures 1A,2A,2B,5-8,9A,11D,12-16,18 column 9, line 40 -column 18, line 45; claims 1-7 -----	1-4,27, 28,52-56 49-51
Y	US 5 548 661 A (GOUGH DAVID ET AL) 20 August 1996 (1996-08-20) abstract; figures 1,4-6,9 column 12, line 28 - line 54 column 14, line 27 - line 52 column 15, line 1 - line 30 column 19, line 17 - line 57; claims 1-29 ----- -----	1-4,27, 28,52-56 49-51 -----
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
*B* earlier document not published on or after the International filing date		
*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the priority date of another claimed invention (not for opposition)		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
** later document published after the International filing date which is cited to show that the application did not file to anticipate the principle or theory underlying the invention		
*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other prior art documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
*A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  8 December 2003	Date of mailing of the international search report  02/01/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3010, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Borotschnig, H	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) Ulm 1988

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/28958
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 137 899 A (BANNISTER WENDY R ET AL) 24 October 2000 (2000-10-24) abstract; figures 1A,2,3A-3F column 4, line 34 -column 10, line 56 ---	1-4,27, 28,52-56 49-51
Y	US 5 741 213 A (ASANO KAORU ET AL) 21 April 1998 (1998-04-21) abstract; figures 2,3 column 7, line 43 -column 12, line 55 ---	1-4,27, 28,52-56 49-51
Y	US 5 793 969 A (KAMENTSKY LOUIS A ET AL) 11 August 1998 (1998-08-11) abstract; figures 1-4 column 6, line 54 -column 10, line 28; claims 1-28 ---	49-51
Y	US 6 137 897 A (EMI RYUICHIRO ET AL) 24 October 2000 (2000-10-24) abstract; figures 1-5 ---	49-51
A	THOREN S A ET AL: "A SEMIAUTOMATIC IMAGE ANALYZER FOR CELL COUNTS IN MONOLAYERS. I. CONSTRUCTION, EXPERIMENTAL PROCEDURE, AND PRECISION OBTAINED" JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH, XX, XX, vol. 27, no. 4, 1989, pages 509-522, XP008021075 ISSN: 0098-4108 abstract; figure 1 page 511 -page 516 ---	1-56
A	DAMIR SUDAR: "SEGMENTATION METHODS IN IMAGE CYTOMETRY" BIOMEDICAL IMAGE PROCESSING. SANTA CLARA, FEB. 12 - 13, 1990, PROCEEDINGS OF SPIE, BELLINGHAM, SPIE, US, vol. 1245, 12 February 1990 (1990-02-12), pages 206-209, XP000167621 page 206 -page 207 ---	1-4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International Application No PCT/US 02/28958
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6275777	B1 14-08-2001	JP 11133021 A	21-05-1999	
US 5548661	A 20-08-1996	US 2002186874 A1 US 5790692 A US 5856665 A US 5790710 A	12-12-2002 04-08-1998 05-01-1999 04-08-1998	
US 6137899	A 24-10-2000	US 5978497 A AU 3629795 A WO 9609605 A1 US 6134354 A	02-11-1999 09-04-1996 28-03-1996 17-10-2000	
US 5741213	A 21-04-1998	JP 9173300 A	08-07-1997	
US 5793969	A 11-08-1998	US 5587833 A AU 1702397 A WO 9725678 A1 CA 2166464 A1 EP 070715 A1 IL 110257 A JP 9503868 T WO 9502024 A1 WO 9748999 A1 US 5602674 A US 5790308 A	24-12-1996 01-08-1997 17-07-1997 19-01-1995 24-04-1996 28-09-2000 15-04-1997 19-01-1995 24-12-1997 11-02-1997 04-08-1998	
US 6137897	A 24-10-2000	JP 10275150 A	13-10-1998	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 6 M 11/02	G 0 6 M 11/02	
G 0 6 T 1/00	G 0 6 T 1/00	2 9 5

(31)優先権主張番号 60/355,644  
 (32)優先日 平成14年2月5日(2002.2.5)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/355,304  
 (32)優先日 平成14年2月8日(2002.2.8)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/358,479  
 (32)優先日 平成14年2月19日(2002.2.19)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/363,949  
 (32)優先日 平成14年3月12日(2002.3.12)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/404,921  
 (32)優先日 平成14年8月21日(2002.8.21)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 マトビブ , ミハイル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 1 2 アーバイン オックスフォード 1 1 4  
 (72)発明者 パル , アンドリュー アッティラ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 8 8 ランチョ サンタ マルガリータ カール エス  
 テロ 2 0

F ターム(参考) 2G045 CA11 CB01 FA11 FB03 GA03 JA01  
 2G057 AA01 AA02 AB06 AB07 AC01 BA01 BB10 HA04  
 4B063 QA01 QQ03 QQ08 QR77 QS11 QS39 QX01  
 5B057 AA07 BA02 BA11 CA08 CA12 CA16 CB08 CC01 CD01 CE02  
 CE05 CE09 CE12 CH12 DA01 DA13 DB02 DB09 DC04 DC19