

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6704390号
(P6704390)

(45) 発行日 令和2年6月3日 (2020. 6. 3)

(24) 登録日 令和2年5月14日 (2020. 5. 14)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/49 (2006. 01)

GO 1 N 33/49 A

GO 1 N 15/00 (2006. 01)

GO 1 N 15/00 B

請求項の数 30 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2017-517029 (P2017-517029)	(73) 特許権者	511102240
(86) (22) 出願日	平成27年9月29日 (2015. 9. 29)		バイオサーフィット、 ソシエダッド ア
(65) 公表番号	特表2017-534858 (P2017-534858A)		ノニマ
(43) 公表日	平成29年11月24日 (2017. 11. 24)		ポルトガル国 アザンブジャ 2050-
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/072392		317、ナンバー 66、ルア 25 デ
(87) 国際公開番号	W02016/050755		アブリル
(87) 国際公開日	平成28年4月7日 (2016. 4. 7)	(74) 代理人	100105924
審査請求日	平成30年9月25日 (2018. 9. 25)		弁理士 森下 賢樹
(31) 優先権主張番号	1417178.9	(72) 発明者	コレイア デ マトス ノラスコ ラマス
(32) 優先日	平成26年9月29日 (2014. 9. 29)		、フランシスコ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		ポルトガル国 リスボン ピー-1300
(31) 優先権主張番号	107931T		-251、11 3 エスク.、トラヴ
(32) 優先日	平成26年9月29日 (2014. 9. 29)		ダス フロリンダス
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ポルトガル (PT)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血球計数

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液試料中の血球を分類する方法であって、
前記試料が画像取込装置の視野を流れるときに、前記画像取込装置で前記試料の一連のフレームを取込むこと、
各フレームをオブジェクトおよびバックグラウンドにセグメント化すること、
前記フレームの少なくとも一部にわたって各セグメント化オブジェクトを追跡すること、
各追跡されたオブジェクトおよび前記フレームの少なくとも一部の各々についての分類結果を得るために、前記フレームの少なくとも一部の各々における前記追跡されたオブジェクトを分類すること、および
各追跡されたオブジェクトを複数のオブジェクトの種類の中の1つとして分類するために、前記フレームの前記少なくとも一部の各々から得られた個々の分類結果に基づいて、各追跡されたオブジェクトの全体的な分類結果を計算することであって前記オブジェクトの種類は1つ以上の細胞の種類を含む計算することを含む方法。

【請求項 2】

全体的な分類結果を計算することが、フレームにわたる前記個々の分類結果の平均値を求めること、または中央値を計算することを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

全体的な分類結果を計算することが、各オブジェクトの前記フレームの少なくとも一部から計算された個々の一連の分類結果に、1つ以上のルールを適用することを含む請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

各追跡されたオブジェクトおよび前記フレームの少なくとも一部の各々の前記分類結果が、前記オブジェクトの種類の各々に属する個々の可能性を示す請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記複数のオブジェクトの種類のうちのあるオブジェクトの種類が非等方性の特徴を有し、前記フレームの少なくとも一部の予め設定された数で当該のオブジェクトの種類に属する当該の追跡されたオブジェクトの分類結果が閾値を超えるか、前記フレームの少なくとも一部の間で当該のオブジェクトの種類に属する当該の追跡されたオブジェクトの分類結果の変化が閾値を超える場合に、当該のオブジェクトの種類に追跡されたオブジェクトを割り当てることを含む請求項4に記載の方法。

10

【請求項6】

前記1つまたは複数の細胞の種類のうちのいずれか1つとして分類されたオブジェクト数から、各々の細胞の種類として分類されたオブジェクト数の個々の割合を計算することを含む請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記1つまたは複数の細胞の種類のいずれか1つのオブジェクトの数を推定すること、および前記1つまたは複数の細胞の種類のうちのいずれか1つのオブジェクトの推定数および前記個々の割合に基づいて、前記1つまたは複数の細胞の種類の各々のオブジェクト数を計算することを含む請求項6に記載の方法。

20

【請求項8】

個数を推定することが、各フレームの前記1つまたは複数の細胞の種類のいずれかのオブジェクトを特定すること、

前記一連のフレームの複数のフレームを選択して各選択されたフレームの特定されたオブジェクトのフレーム細胞数を判定すること、および

前記判定されたフレーム細胞数を組み合わせて前記1つまたは複数の細胞の種類のいずれか1つのオブジェクトの推定数を計算すること

30

を含む請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記判定されたフレーム細胞数を結合することが、前記判定されたフレーム細胞数に分布関数を適合させ、前記適合された分布に基づいて推定細胞数を計算することを含む請求項8に記載の方法。

【請求項10】

フレームが、1つまたは複数のフレームにおける細胞速度の推定に基づいて選択される請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記1つまたは複数の細胞の種類が、白血球または白血球の種類である請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項12】

前記1つまたは複数の細胞の種類が、好中球、好塩基球、好酸球、リンパ球、および単球のうちの1つまたは複数を含む請求項11に記載の方法。

【請求項13】

視野を有する画像取込装置と、画像プロセッサとを備える、血液試料中の細胞数を推定するためのシステムであって、前記画像プロセッサは、

前記試料が前記画像取込装置の視野を流れるときに、前記画像取込装置で前記試料の一連のフレームを取込み、

各フレームをオブジェクトおよびバックグラウンドにセグメント化し、

50

前記フレームの少なくとも一部にわたって各セグメント化オブジェクトを追跡し、
各追跡されたオブジェクトおよび前記フレームの少なくとも一部の各々についての分類結果を得るために、前記フレームの少なくとも一部の各々における前記追跡されたオブジェクトを分類し、

各追跡されたオブジェクトを複数のオブジェクトの種類の中の1つとして分類するために、フレームの前記少なくとも一部の各々から得られた個々の分類結果に基づいて、各追跡されたオブジェクトの全体的な分類結果を計算するように構成され、

前記オブジェクトの種類は1つ以上の細胞の種類を含む、
システム。

【請求項14】

全体的な分類結果を計算することが、フレームにわたる前記個々の分類結果の平均値を求めること、または中央値を計算することを含む請求項13に記載のシステム。

【請求項15】

全体的な分類結果を計算することが、各オブジェクトの前記フレームの少なくとも一部から計算された個々の一連の分類結果に、1つ以上のルールを適用することを含む請求項13または請求項14に記載のシステム。

【請求項16】

各追跡されたオブジェクトおよび前記フレームの少なくとも一部の各々の前記分類結果が、前記オブジェクトの種類各々に属する個々の可能性を示す請求項13～15のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項17】

前記複数のオブジェクトの種類のうちのあるオブジェクトの種類が非等方性の特徴を有し、前記画像プロセッサが、前記フレームの少なくとも一部の予め設定された数で当該のオブジェクトの種類に属する当該の追跡されたオブジェクトの分類結果が閾値を超えるか、または前記フレームの少なくとも一部の間で当該のオブジェクトの種類に属する当該の追跡されたオブジェクトの分類結果の変化が閾値を超える場合に、当該のオブジェクトの種類に追跡されたオブジェクトを割り当てるように構成された請求項16に記載のシステム。

【請求項18】

前記プロセッサが、前記1つまたは複数の細胞の種類の中のいずれか1つとして分類されたオブジェクト数から、各細胞の種類として分類された前記オブジェクト数の個々の割合を計算するように構成される請求項13～17のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項19】

前記プロセッサが、前記1つまたは複数の細胞の種類の中のいずれか1つのオブジェクトの数を推定し、前記1つまたは複数の細胞の種類の中のいずれか1つのオブジェクトの推定数および前記個々の割合に基づいて、前記1つまたは複数の細胞の種類各々のオブジェクト数を計算するように構成されている請求項18に記載のシステム。

【請求項20】

個数を推定することが、各フレームの前記1つまたは複数の細胞の種類の中のいずれかのオブジェクトを特定すること、

前記一連のフレームの複数のフレームを選択して各選択されたフレームの特定したオブジェクトのフレーム細胞数を判定すること、および

前記判定されたフレーム細胞数を組み合わせて前記1つまたは複数の細胞の種類の中のいずれか1つのオブジェクトの推定数を計算すること

を含む請求項19に記載のシステム。

【請求項21】

前記1つまたは複数の細胞の種類が、白血球または白血球の種類である請求項13～20のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項22】

前記1つまたは複数の細胞の種類が、好中球、好塩基球、好酸球、リンパ球、および単

10

20

30

40

50

球のうちの1つまたは複数を含む請求項21に記載のシステム。

【請求項23】

推定細胞数および前記視野に関連する流量に基づいて、体積当たりの個数を計算することを含む請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

流れの障害物が存在する前記視野内の閉塞した領域を検出することと、前記閉塞した領域に関連する体積のために前記視野に関連付けられた閉塞していない体積を補正することによって、前記流量を判定することを含む請求項23に記載の方法。

【請求項25】

閉塞した領域を検出することが、前記視野を候補領域に分割することと、当該の候補領域内の前記一連のフレームにわたって閾値量未満の細胞が特定された場合、候補領域を閉塞した領域としてマークすることを含む請求項24に記載の方法。

10

【請求項26】

前記画像プロセッサが、推定細胞数および前記視野に関連する流量に基づいて、体積当たりの個数を計算するよう構成されている請求項13～22のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項27】

前記画像プロセッサが、流れの障害物が存在する前記視野内の閉塞した領域を検出することと、前記閉塞した領域に関連する体積のために前記視野に関連付けられた閉塞していない体積を補正することによって、前記流量を判定するように構成される請求項26に記載のシステム。

20

【請求項28】

閉塞した領域を検出することが、前記視野を候補領域に分割することと、当該の候補領域内の前記一連のフレームにわたって閾値量未満の細胞が特定された場合、候補領域を閉塞した領域としてマークすることを含む請求項27に記載のシステム。

【請求項29】

プロセッサで実行するときに、請求項1～12、23～25のいずれか一項に記載の方法を実装する、コード化された命令を含むコンピュータプログラム製品。

【請求項30】

請求項29に記載のコンピュータプログラム製品を含むコンピュータ可読記憶媒体。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液試料中の細胞の計数に関する。

【背景技術】

【0002】

血液試料の細胞の計数は重要な診断ツールである。

【0003】

血液試料の細胞を計数する既知の手法の例は、フローサイトメトリーである。フローサイトメトリーでは、血液試料が毛細管を流れて、細胞が光源および検出装置の前を1つずつ通過する。反射光および／または透過光を検出し、分析する。検出された光の特性は、試料中の細胞の特徴およびそれらがいかに染色されているかに依存しており、このようにして細胞を分類し、計数する。しかし、フローサイトメトリーを用いても細胞の形態学的情報は得られない。形態学的分析は、2枚のスライドの間に試料を挟み、顕微鏡下で試料を調べることによって、血液試料に対して行うことができる。予め準備されたスライドのカートリッジを使用する血球計数用の自動システムが知られている。このようなスライドは、分析されるべき各試料について手動で準備する必要がある。これは、一部自動化されているにもかかわらず、時間を要する工程である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0004】

細胞の形態学的情報が失われず、それどころか血球計数工程の精度を向上させるために使用され、さらにスライドの準備を必要としない血球計数用のシステムを有することは、望ましいであろう。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の態様は、独立請求項に記載されている。さらに、本発明の随意による特徴は、従属請求項に記載されている。

【0006】

いくつかの実施形態で、血液試料中の血球を分類する方法を提供する。方法は、以下を含む： 10

－試料が画像取込装置の視野を流れるときに、画像取込装置で試料の一連のフレームを取込むこと、

－各フレームをオブジェクトおよびバックグラウンドにセグメント化すること、

－フレームの少なくとも一部にわたって各セグメント化オブジェクトを追跡すること、

－各追跡されたオブジェクトおよびフレームの個々の少なくとも一部の各々についての分類結果を得るために、フレームの個々の少なくとも一部の各々における追跡されたオブジェクトを分類すること、および

－各追跡されたオブジェクトを複数のオブジェクトの種類の中の1つとして分類するために、フレームの少なくとも一部の各々から得られた個々の分類結果に基づいて、各追跡されたオブジェクトの全体的な分類結果を計算することであって、オブジェクトの種類は1つ以上の細胞の種類を含む、計算すること。 20

【0007】

いくつかの実施形態で、視野を有する画像取込装置と、画像プロセッサとを備える、血液試料中の血球を分類するためのシステムが提供されている。画像プロセッサは、上記の方法を実行するように構成されている。

【0008】

好都合なことに、2つ以上の取込まれたフレームのオブジェクトの分類結果を得ることによって、血球計数の精度が向上する。そうすることで、試料が視野を横切って流れるとき、複数の独立した観察が得られ、各オブジェクトを異なる角度から見ることができ、豊富な形態学的データのセットを作成することができる。細胞のサイトメトリーと比較すると、形態学的情報が失われず、公知の形態学的方法と比較すると、手動のスライドの準備が必要ではない。 30

【0009】

いくつかの実施形態では、各追跡オブジェクトおよび個々のフレームの各々についての分類結果は、単純ロジスティックモデルを使用して取得することができる。他の実施形態では、関連分野の当業者に知られている他の分類子を使用する場合がある。例については、S. B. Kotsiantis, 「Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques」、Informatica, vol. 31, number 3, October 2007, pages 249–268を参照されたい。 40

【0010】

いくつかの実施形態では、全体的な分類結果を計算することは、フレームにわたる個々の分類結果の平均値を求めること、または中央値を計算することを含む。他の実施形態では、全体的な分類結果を計算することが、オブジェクトが追跡される各個々のフレームから得られた分類結果に、1つ以上のルールを適用することを含む。これにより、平均を求める工程で失われる、各フレームから得られるいずれかの分類結果を、全体的な分類工程を判定する際に、考慮することが可能になる。例えば、このようなルールを設定することにより、1つまたは複数のフレームで検出されるあるオブジェクトの種類の任意の識別特性が、比較的少数のフレームでしか検出されない場合であっても、オブジェクトの全体的 50

な分類で考慮されることが可能になる。例えば、これは、いくつかの方向から見た場合にのみ核が高度に特徴的な構成である細胞を検出することについて、改善することができる。

【0011】

いくつかの実施形態では、当該のオブジェクトが追跡される各フレームに関する各追跡されたオブジェクトの分類結果は、オブジェクトの種類のそれぞれに属する当該のオブジェクトのクラス所属スコアのセット（例えば、クラスに所属尤度または確率のセット）または分類、つまりクラス所属のバイナリ表示、または割り当てられたオブジェクトの種類の識別子を含む。同様に、全体的な分類結果は、オブジェクトの種類のそれぞれに属する当該のオブジェクトのクラス所属スコアのセット（例えば、クラスに所属尤度または確率のセット）または分類、つまりクラス所属のバイナリ表示または割り当てられたオブジェクトの種類であってよい。クラス所属スコアのセットは、さらなる計算で 사용할 ことができる。

10

【0012】

他の実施形態では、所与のオブジェクトの全体的な分類結果を得る際に、当該のオブジェクトが現れる各々の個々のフレームが票を投じている。そして、これらの投票に基づいて全体的な分類が得られる。いくつかの実施形態では、オブジェクトは、最も多くの票を有するオブジェクトの種類として分類される。他の実施形態では、1つまたは複数のルールを実行して、残りのフレームからの票を、オブジェクトの種類の所定の選択のために、所定の数の票によって無効にすることができるようにする。いくつかの実施形態では、オブジェクトを全体的に分類する際に、各オブジェクトの種類の投票数を考慮するが、上で概説したような1つまたは複数のルールも実行する。

20

【0013】

追跡される各オブジェクトおよびフレームの分類結果は、少なくともいくつかのフレーム内のすべてのオブジェクトについて、追跡する前に計算してもよく、オブジェクトを追跡したら、（フレーム毎の）分類結果が直ちに利用可能となるようにする。あるいは、（フレーム毎の）分類結果は、追跡後に計算してもよく、その場合、追跡されたオブジェクトについてのみ、また各追跡されるオブジェクトを追跡した個々のフレームにおいてのみ、計算してもよい。

【0014】

いくつかの実施形態では、オブジェクトの種類が非等方性の特徴を有し、方法が、当該のオブジェクトの種類に属する当該のオブジェクトのクラス所属スコアが1つまたは複数のフレームについて閾値を超える場合に、当該のオブジェクトの種類に追跡されたオブジェクトを割り当てることを含む。これにより、1つまたは複数のフレームについて、所与のオブジェクトの種類に対するオブジェクトのクラス所属スコアが十分に高い場合、他の各フレームから得られた他の分類結果を「無効にすること」が可能になる。オブジェクトの種類が非等方性の特徴を有する他の実施形態では、方法は、2つのフレーム間のそのオブジェクトの種類のクラス所属スコアの変化が閾値を超える場合、追跡されたオブジェクトをそのオブジェクトの種類に割り当てることを含む。つまり、所与のオブジェクトの種類のオブジェクトのスコアが十分に「ジャンプ」している場合、そのオブジェクトはそのオブジェクトの種類に属するものとして分類される。各フレームの分類結果が平均化された場合、この情報は失われる可能性がある。

30

40

【0015】

上述したように、オブジェクトの種類は、1つまたは複数の細胞の種類を含む。いくつかの実施形態では、これらの細胞の種類は白血球である。いくつかの実施形態では、これらの細胞の種類は、好中球、好塩基球、好酸球、リンパ球、および単球を含む。いくつかの実施形態では、方法は細胞の種類のうちのいずれか1つとして分類されたオブジェクトの総数から、各細胞の種類として分類されたオブジェクト数の割合を計算することを含む。これらの割合は、細胞分画として知られている。いくつかの実施形態では、オブジェクトの種類は、赤血球、赤血球断片、細胞凝集体などの非白血球のタイプも含む。

50

【0016】

いくつかの実施形態では、この方法は、白血球の種類の一つに属するオブジェクト（試料の単位体積当たりのオブジェクト）の絶対数を推定することを含む。これは、次いで、白血球の種類の一つに属するオブジェクトの総数の推定および白血球各種に属するオブジェクトの数の割合に基づいて、白血球各種に属するオブジェクトの絶対数を計算するために使用される。

【0017】

いくつかの実施形態では、白血球の絶対数を推定することは、各フレーム中の白血球の種類の一つに属するオブジェクトを特定することを含む。複数のフレームを選択し、各選択されたフレームにおけるこれらの特定された白血球の球数を判定する。次いで、これらのフレームの数を組み合わせて、白血球の種類の一つに属する白血球の推定合計数を計算する。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、絶対的細胞数は、

- －複数のフレームを選択すること、
- －各選択されたフレーム内の細胞数を計数すること、および
- －それらの個数を組み合わせて推定細胞数を計算すること

によって推定される。

【0019】

個数を組み合わせることは、フレーム細胞数に分布関数を適合させ、適合させた分布に基づいて推定細胞数を計算することを含むことができる。推定細胞数は、適合させた分布の1つまたは複数のパラメータを使用して導出し得る。適合させる分布は、ガンマ分布でもポアソン分布でもよい。

20

【0020】

推定細胞数を計算することは、一連のフレームをサブセットのブロックに分割し、それぞれの分布を各ブロックに適合させることによって、個々の推定細胞数を計算することに関与し得る。次いで、推定された個々の細胞数のうちの1つを利用して、結果として、一連のフレームにおけるサブセットのうちのブロックの1つ以上の位置、個々の推定数の大きさ、および適合度の指標に基づいて選択することによって、記憶（またはリターン）させることができる。いくつかの実施形態では、いずれかのブロックに対する適合度の指標が十分に良好でない場合、すなわち、それが所定の閾値よりも低い場合、そのブロックのそれぞれの推定細胞数は棄却される。

30

【0021】

あるいは、フレーム細胞数を組み合わせることは、フレーム細胞数の平均または中央値を計算することを含むことができる。

【0022】

代替の実施形態では、フレームは、細胞速度の推定に基づいて選択される。細胞速度を考慮することによって、選択されたフレームのサブセット内の次のフレームは、前のフレーム内のオブジェクトが視野を離れた可能性が高くなるように選択することができる。これを行うのに、前のフレーム内のオブジェクトが視野を離れた可能性があるときよりも前に、必要なフレーム数を計算することが伴う場合がある。これにより、二重計数の可能性が低下する可能性がある。

40

【0023】

両方のタイプの実施形態（分布の適合、速度に基づく選択）において、フレームの選択は、カットオフ位置を設定することを含むことができ、この場合、カットオフ位置を超えてビデオを構成する一連のフレーム内の位置を有するフレームは選択されない。

【0024】

いくつかの実施形態では、推定細胞数および画像取込装置の視野内に含まれる試料の体積に基づいて絶対的細胞数を推定することができる。いくつかの実施形態では、視野内に含まれる試料の体積は、視野内で見出される流れに対する任意の障害物に対し、補正をす

50

ることができる。これは、最初に障害物を検出し、次いでその体積を推定することによって行われ得る。次いで、視野に関連付けられた閉塞されていない体積から障害物の推定の体積を差し引くことができる。閉塞した領域を検出することは、視野を候補領域に分割することと、その候補領域内の一連のフレームにわたって閾値量未満の細胞が特定された場合、候補領域を閉塞された領域としてマークすることを含むことができる。

【0025】

いくつかの実施形態では、血液試料中の細胞数を推定するためのシステムが提供され、このシステムは、視野を有する画像取込装置と画像プロセッサとを含み、画像プロセッサは、上述の方法ステップのいずれかまたはすべて、またはそれらの組み合わせを実行するように構成される。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、血液試料中の細胞数を評価するための上記システムと共に使用するための装置が提供される。この装置は、入口ポートと、接続導管と、廃棄チャンバとを有する装填チャンバを備える、微小流体的液体処理構造を備える。装填チャンバは、接続導管を介して廃棄チャンバに接続される。接続導管は、準備部と検出部とを含む。準備部は、装置が動作しているときに、試料と反応して赤血球の溶解および白血球の示差的(differential)染色を引き起こす1つ以上の試薬を含む。いくつかの実施形態では、これらの試薬は、試料による再懸濁のために、乾燥形態で準備部に提供し得る。あるいは、いくつかの実施形態では、試薬は、微小流体的液体処理構造の別の領域に保持されてもよいが、依然として画像取込装置の視野に入る前に試料の溶解および染色が起こるようにする。他の実施形態では、試料は、微小流体的液体処理構造に導入される前に、微小流体的液体処理構造の外部の試薬と混合する場合がある。

20

【0027】

検出部は、システムが動作しているときに、画像取込装置によって試料が画像化できるように構成されている。いくつかの実施形態では、検出部は、画像取込装置の視野に垂直な深さを有し、画像取込装置の視野の深さ内に、視野の試料を制約する。検出部の深さは、0.030mm未満であってもよく、0.020mm未満であってもよい。いくつかの実施形態では、検出部は、幅が少なくとも深さと同じである。

【0028】

上記のことは、検出部の深さが、検出部を流れるすべての細胞が画像取込装置によって画像化し得るようにすることを意味する。これは、深さが白血球の大きさのオーダーである場合、例えば、最大細胞寸法の2倍未満の場合である。

30

【0029】

上述したように、細胞速度は、1つのフレームから次のフレームまで細胞を追跡することによって推定することができる。いくつかの実施形態では、追加的または代替的に、微小流体的液体処理構造の寸法および構成は、血液試料が最初に検出部に到達してから一定期間、例えば3秒間が経過した後検出部を通る試料の流速が実質的に一定と考えられるように設計することができる。次いで、この一定の流速は、いくつかの実施形態では、試料中のオブジェクト、例えば細胞の速度であると考えられる。

【0030】

40

いくつかの実施形態では、装置は、画像取込装置に対してカートリッジを保持するための保持構造に挿入するように構成された、微小流体的液体処理装置を提供するカートリッジを含むことができる。いくつかの実施形態では、カートリッジは、実質的に円盤形状であってもよく、いくつかの実施形態では、カートリッジは回転軸を中心に回転するよう構成させてもよく、回転軸は、装置を回転させるための駆動機構と係合するための装置の特徴によって画定される。いくつかの実施形態では、カートリッジは、カートリッジの別の部分の同じ試料または異なる試料を処理するために、回転軸を中心に回転する。

【0031】

いくつかの実施形態では、画像取込装置は、接続導管の検出部の上方に配置されてもよく、他の実施形態では、検出部の下方に配置されてもよい。

50

【0032】

動作中、試料は、入口ポートから微小流体的液体処理構造に導入し、試料を装填チャンバに流入させる。次いで、試料は、毛細管現象によって接続導管内に引き込まれ、毛細管現象の力の作用下で導管を流れる。いくつかの実施形態では、微小流体的液体処理構造を通る試料の流れは、圧力差によって、または関連分野の当業者に周知のその他の手段によって駆動され得る。

【0033】

上記のように、試料は、画像取込装置の視野に入る前に、溶解剤および染色剤と反応し得る。試料が視野に入ると、画像取込装置と一緒にビデオを形成する試料のフレームの取込みを開始する。いくつかの実施形態では、フレームを取得する速度は、特定のアッセイのパラメータに従って、例えば、視野にわたる試料の流速に基づいて適合させることができる。追加または代替で、取得されたフレームの総数をアッセイのパラメータに適合させることができる。

10

【0034】

試料のフレームを取込むと、画像プロセッサは、上で概説したように、フレームに対していくつかの処理ステップを実行する。いくつかの実施形態では、フレームはオブジェクトとバックグラウンドにセグメント化され、セグメント化されたオブジェクトはできるだけ多くのフレームにわたって追跡される。いくつかの実施形態では、この追跡は、第1のフレームのオブジェクトが、第1のフレームのオブジェクトの位置に最も近い位置の次のフレームのオブジェクトと同じオブジェクトであるという仮定に基づいている。いくつかの実施形態では、第2のフレーム内のオブジェクトから所定の「安全距離」内にオブジェクトがない場合、オブジェクトは第1のフレームから次のフレームまで追跡されるだけである。

20

【0035】

本発明のさらなる態様では、プロセッサで実行されると、上記の方法ステップのいずれかまたはすべて、またはそれらの任意の組み合わせを実行する、コード化された命令を記憶するコンピュータ可読媒体（複数可）が提供されている。このコンピュータ可読媒体（複数可）は、任意の種類のデータ記憶媒体、例えば磁気ディスクまたは光ディスク、ハードディスク、ソリッドステートまたは他のデータ記憶装置、例えばRAM、ROM、EPROM、EEPROMまたはフラッシュのうちの1つまたは複数を含むことができる。

30

【0036】

本発明のさらに別の態様では、血球数を得る方法が提供され、該方法は、血液試料が画像取込装置を流れ過ぎるときに、血液試料を画像化して一連のフレームを取込むこと、各フレームをオブジェクトおよびバックグラウンドにセグメント化すること、複数のオブジェクトの種類のうちの1つに属するものとして各フレームのオブジェクトを分類することであって、オブジェクトの種類は1つまたは複数の細胞の種類を含む分類すること、および分類に基づいて血球数を得ることであって、血球数を得ることは、1つまたは複数の細胞の種類のうちの1つに属するものとして分類されたオブジェクトの計数を含む得ることを備える。

40

【0037】

上に記載した態様および実施形態に従って、細胞を計数して分画または絶対数を得ることができる。

【0038】

本発明の態様は、画像取込装置と、このさらに別の態様によるこのような方法を実行するように構成されたプロセッサとを備えるシステムにも及ぶ。記載された方法ステップのいずれかは、いくつかの実施形態では、プロセッサの制御によって、またはプロセッサの制御下で実行されてもよい。

【0039】

本発明の態様は、以下に示す区分化方法の様々な実施形態に記載されているような画像区分化方法、ならびにこのような方法を実行するための手段を含むシステム、例えばこの

50

ような方法を実行するように構成されたプロセッサを含むシステムにさらに及び、またそのような方法を実行するためのコード化された命令を有するコンピュータプログラム製品およびコンピュータ可読媒体にも及ぶ。

【0040】

説明の大部分は、白血球、より具体的には種々の健常な白血球集団に対応する細胞の種類を分類するという観点からなされているが、本発明はこれに限定されず、他の細胞の種類、例えば病んだ白血球または癌の白血球または赤血球を分類および計数し得る。

【0041】

いくつかの実施形態では、血液試料中の細胞数を推定する方法が提供される。この方法は、

—試料が画像取込装置の視野を流れるときに、画像取込装置で試料の一連のフレームを取込むこと、

—各フレーム内の細胞を特定すること、

—一連のフレームのうちの複数のフレームを選択すること、

—各選択されたフレーム内の特定された細胞のフレーム細胞数を判定すること、および

—判定されたフレーム細胞数を組み合わせて推定細胞数を計算すること

を含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、各フレーム内の細胞を特定することは、各フレーム内のオブジェクトを分類することを含む。各オブジェクトのパラメータはフレームから抽出され、

いくつかの実施形態では、各オブジェクトの分類結果は、単純ロジスティックモデルを使用して取得することができる。他の実施形態では、関連分野の当業者に知られている他の分類子を使用する場合がある。例については、S. B. Kotsiantis, 「Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques」、Informatica, vol. 31, number 3, October 2007, pages 249–268を参照されたい。フレーム内の各オブジェクトを分類すると、フレーム内の細胞の数を計数する。このようにして、フレーム細胞数が各フレームについて見出される。

【0043】

いくつかの実施形態では、個数を組み合わせることは、分布関数をフレーム細胞数に適合させ、適合させた分布に基づいて推定細胞数を計算することを含むことができる。推定細胞数は、適合させた分布の1つまたは複数のパラメータを使用して導出し得る。適合させる分布は、ガンマ分布でもポアソン分布でもよい。

【0044】

推定細胞数を計算することは、いくつかの実施形態では、一連のフレームをサブセットのブロックに分割し、個々の分布を各ブロックに適合させることによって、個々の推定細胞数を計算することを伴うことができる。次いで、推定された個々の細胞数のうちの1つを利用して、結果として、一連のフレームにおけるサブセットのうちのブロックの1つ以上の位置、個々の推定数の大きさ、および適合度の指標に基づいて選択することによって、記憶（またはリターン）させることができる。いくつかの実施形態では、いずれかのブロックに対する適合度の指標が十分に良好でない場合、すなわち、それが所定の閾値よりも低い場合、そのブロックのそれぞれの推定細胞数は棄却される。

【0045】

あるいは、フレーム細胞数を組み合わせることは、フレーム細胞数の平均または中央値を計算することを含むことができる。

【0046】

代替の実施形態では、フレームは、細胞速度の推定に基づいて選択される。細胞速度を考慮することによって、選択されたフレームのサブセット内の次のフレームは、前のフレーム内のオブジェクトが視野を離れた可能性が高くなるように選択することができる。これを行うのに、前のフレーム内のオブジェクトが視野を離れた可能性があるときよりも前

10

20

30

40

50

に、必要なフレーム数を計算することが伴う場合がある。これにより、二重計数の可能性が低下する可能性がある。

【0047】

いくつかの実施形態では、細胞速度は、1つのフレームから次のフレームまでオブジェクトを追跡することによって推定される。この工程について、細胞速度を推定する別の方法と共に、以下に記載する。

【0048】

両方のタイプの実施形態（分布の適合、速度に基づく選択）において、フレームの選択は、カットオフ位置を設定することを含むことができ、この場合、カットオフ位置を超えてビデオを構成する一連のフレーム内の位置を有するフレームは選択されない。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、推定細胞数および画像取込装置の視野内に含まれる試料の体積に基づいて絶対的細胞数を推定することができる。いくつかの実施形態では、視野内に含まれる試料の体積は、視野内で見出される流れに対する任意の障害物に対し、補正をすることができる。これは、最初に障害物を検出し、次いでその体積を推定することによって行われ得る。次いで、視野に関連付けられた閉塞されていない体積から障害物の推定の体積を差し引くことができる。閉塞した領域を検出することは、視野を候補領域に分割することと、その候補領域内の一連のフレームにわたって閾値量未満の細胞が特定された場合、候補領域を閉塞された領域としてマークすることを含むことができる。

20

【0050】

いくつかの実施形態では、血液試料中の細胞数を推定するためのシステムが提供され、このシステムは、視野を有する画像取込装置と画像プロセッサとを含み、画像プロセッサは、上述の方法ステップのいずれかまたはすべて、またはそれらの組み合わせを実行するように構成される。

【0051】

いくつかの実施形態では、血液試料中の細胞数を評価するための上記システムと共に使用するための装置が提供される。この装置は、入口ポートと、接続導管と、廃棄チャンバとを有する装填チャンバを備える、微小流体的液体処理構造を備える。装填チャンバは、接続導管を介して廃棄チャンバに接続される。接続導管は、準備部と検出部とを含む。準備部は、装置が動作しているときに、試料と反応して赤血球の溶解および白血球の示差的染色を引き起こす1つ以上の試薬を含む。いくつかの実施形態では、これらの試薬は、試料による再懸濁のために、乾燥形態で準備部に提供することができる。あるいは、いくつかの実施形態では、試薬は、微小流体的液体処理構造の別の領域に保持されてもよいが、依然として画像取込装置の視野に入る前に試料の溶解および染色が起こるようにする。他の実施形態では、試料は、微小流体的液体処理構造に導入される前に、微小流体的液体処理構造の外部の試薬と混合する場合がある。

30

【0052】

検出部は、システムが動作しているときに、画像取込装置によって試料が画像化できるように構成されている。いくつかの実施形態では、検出部は、画像取込装置の視野に垂直な深さを有し、画像取込装置の視野の深さ内に、視野の試料を制約する。検出部の深さは、0.030mm未満であってもよく、0.020mm未満であってもよい。いくつかの実施形態では、検出部は、幅が少なくとも深さと同じである。

40

【0053】

上記のことは、検出部の深さが、検出部を流れるすべての細胞が画像取込装置によって画像化し得るようにすることを意味する。これは、深さが白血球の大きさのオーダーである場合、例えば、最大細胞寸法の2倍未満の場合である。

【0054】

上述したように、細胞速度は、1つのフレームから次のフレームまで細胞を追跡することによって推定することができる。いくつかの実施形態では、追加的または代替的に、微小流体的液体処理構造の寸法および構成は、血液試料が最初に検出部に到達してから一定

50

期間、例えば3秒間が経過した後に検出部を通る試料の流速が実質的に一定と考えられるように設計することができる。次いで、この一定の流速は、いくつかの実施形態では、試料中のオブジェクト、例えば細胞の速度であると考えられる。

【0055】

いくつかの実施形態では、装置は、画像取込装置に対してカートリッジを保持するための保持構造に挿入するように構成された、微小流体的液体処理装置を提供するカートリッジを含むことができる。いくつかの実施形態では、カートリッジは、実質的に円盤形状であってもよく、いくつかの実施形態では、カートリッジは回転軸を中心に回転するよう構成させてもよく、回転軸は、装置を回転させるための駆動機構と係合するための装置の特徴によって画定される。いくつかの実施形態では、カートリッジは、カートリッジの別の部分の同じ試料または異なる試料を処理するために、回転軸を中心に回転する。

10

【0056】

いくつかの実施形態では、画像取込装置は、接続導管の検出部の上方に配置されてもよく、他の実施形態では、検出部の下方に配置されてもよい。

【0057】

動作中、試料は、入口ポートから微小流体的液体処理構造に導入し、試料を装填チャンバに流入させる。次いで、試料は、毛細管現象によって接続導管内に引き込まれ、毛細管現象の力の作用下で導管を流れる。いくつかの実施形態では、微小流体的液体処理構造を通る試料の流れは、圧力差によって、または関連分野の当業者に周知のその他の手段によって駆動され得る。

20

【0058】

上記のように、試料は、画像取込装置の視野に入る前に、溶解剤および染色剤と反応し得る。試料が視野に入ると、画像取込装置と一緒にビデオを形成する試料のフレームの取込みを開始する。いくつかの実施形態では、フレームを取得する速度は、特定のアッセイのパラメータに従って、例えば、視野にわたる試料の流速に基づいて適合させることができる。追加または代替で、取得されたフレームの総数をアッセイのパラメータに適合させることができる。

【0059】

試料のフレームを取込むと、画像プロセッサは、上で概説したように、フレームに対していくつかの処理ステップを実行する。いくつかの実施形態では、フレームはオブジェクトとバックグラウンドにセグメント化され、セグメント化されたオブジェクトはできるだけ多くのフレームにわたって追跡される。いくつかの実施形態では、この追跡は、第1のフレームのオブジェクトが、第1のフレームのオブジェクトの位置に最も近い位置の次のフレームのオブジェクトと同じオブジェクトであるという仮定に基づいている。いくつかの実施形態では、第2のフレーム内のオブジェクトから所定の「安全距離」内にオブジェクトがない場合、オブジェクトは第1のフレームから次のフレームまで追跡されるだけである。

30

【0060】

本発明のさらなる態様では、プロセッサで実行されると、上記の方法ステップのいずれかまたはすべて、またはそれらの任意の組み合わせを実行する、コード化された命令を記憶するコンピュータ可読媒体（複数可）が提供されている。このコンピュータ可読媒体（複数可）は、任意の種類（複数可）のデータ記憶媒体、例えば磁気ディスクまたは光ディスク、ハードディスク、ソリッドステートまたは他のデータ記憶装置、例えばRAM、ROM、EPROM、EEPROMまたはフラッシュのうちの1つまたは複数を含むことができる。

40

【0061】

本発明のさらに別の態様では、血球数を得る方法が提供され、該方法は、血液試料が画像取込装置を流れ過ぎるときに、血液試料を画像化して一連のフレームを取込むこと、各フレームをオブジェクトおよびバックグラウンドにセグメント化すること、複数のオブジェクトの種類のうちの1つに属するものとして各フレームのオブジェクトを分類することであって、オブジェクトの種類は1つまたは複数の細胞の種類を含む分類すること、およ

50

び分類に基づいて血球数を得ることであって、血球数を得ることは、1つまたは複数の細胞の種類のうちの1つに属するものとして分類されたオブジェクトの計数を含む得ることを備える。

【0062】

細胞は、上述の態様および実施形態に従って、絶対数を得るために計数することができる。白血球の絶対数は、血液の単位体積当たりの推定白血球数である。

【0063】

本発明の態様は、画像取込装置と、このさらに別の態様によるこのような方法を実行するように構成されたプロセッサとを備えるシステムにも及ぶ。記載された方法ステップのいずれかは、いくつかの実施形態では、プロセッサの制御によって、またはプロセッサの制御下で実行されてもよい。

10

【0064】

本発明の態様は、以下に示す区分化方法の様々な実施形態に記載されているような画像区分化方法、ならびにこのような方法を実行するための手段を含むシステム、例えばこのような方法を実行するように構成されたプロセッサを含むシステムにさらに及び、またそのような方法を実行するためのコード化された命令を有するコンピュータプログラム製品およびコンピュータ可読媒体にも及ぶ。

【0065】

説明の大部分は、白血球、より具体的には種々の健常な白血球集団に対応する細胞の種類を分類するという観点からなされているが、本発明はこれに限定されず、他の細胞の種類、例えば病んだ白血球または癌の白血球または赤血球を分類および計数し得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0066】

これから、添付の図面を参照して、実施形態を例により詳細に説明する。

【図1a】微小流体的液体処理構造の図を示す。

【図1b】微小流体的液体処理構造の図を示す。

【図1c】微小流体的液体処理構造の図を示す。

【図2】検出部における白血球の概略図を示す。

【図3】フレーム内のオブジェクトの分類結果を取得する方法を表す流れ図である。

【図4】オブジェクトの分類で使用し得るオブジェクトのパラメータのリストを提供する図である。

30

【図5】所与のオブジェクトに対する各フレームのオブジェクト各種に対するクラス所属スコアの例を示す。

【図6】細胞分画を推定するための全体的な方法を示す。

【図7】複数のフレームにわたってオブジェクトを追跡する方法を示す。

【図8】血液試料の2つの連続フレームを示す。

【図9】単球およびリンパ球の概略図を示す。

【図10】複数のフレームにわたる2つの異なるオブジェクトの種類「A」および「B」に対するオブジェクトのクラス所属スコアのグラフ表示を示す。

【図11】統計的分析によって絶対的白血球数を推定する方法を示す。

40

【図12】障害物を補正する目的で領域に分割された画像取込装置の視野の概略図である。

【図13】連続するフレームのセットの概略図を示す。

【図14】速度適合型フレーム試料採取によって絶対的白血球数を推定する方法を示す。

【図15】白血球各種の絶対数を推定する方法を示す。

【図16a】微小流体的液体処理構造の図を示す。

【図16b】微小流体的液体処理構造の図を示す。

【図16c】微小流体的液体処理構造の図を示す。

【図17】検出部における白血球の概略図を示す。

【図18】フレーム内のオブジェクトの分類結果を取得する方法を表す流れ図を示す。

50

【図 19】オブジェクトの分類で使い得るオブジェクトのパラメータのリストを提供する図である。

【図 20】複数のフレームにわたってオブジェクトを追跡する方法を示す。

【図 21】血液試料の 2 つの連続フレームを示す。

【図 22】統計的分析によって絶対的白血球数を推定する方法を示す。

【図 23】障害物を補正する目的で領域に分割された画像取込装置の視野の概略図である。

【図 24】連続するフレームのセットの概略図を示す。

【図 25】速度適合型フレーム試料採取によって絶対的白血球数を推定する方法を示す。

【0067】

10

図面は、縮尺通りではなく、さらに、明確にするために正確な比率で描かれてはいない。

【発明を実施するための形態】

【0068】

[第 I 部]

[概要]

本開示には、4 つの主要な工程が記載されている。この工程を使用し、白血球が流れるときに画像化される試料のビデオフレームを取得することによって、2 つの種類の白血球数のうちの 1 つを得る。その 2 つの種類とは、白血球分画と絶対的白血球数である。分画は、白血球の種類が占める全白血球に対する割合として定義される。本件で検討する 5 種類の白血球は、単球、リンパ球、好酸球、好塩基球、および好中球である。所与の細胞の種類の数、血液の単位体積当たりのその種類の細胞の総数である。

20

【0069】

4 つの主要な工程は、以下のように要約できる：

(1) 流れる血液試料の各フレーム内のオブジェクトの分類結果を得るために、フレーム毎にオブジェクトを分類する。

(2) 分画を得るために、複数のフレームにわたって 1 つのフレームから次のフレームへとオブジェクトを追跡し、各追跡されたオブジェクトの全体的なオブジェクトの分類を得ることによって、分画を行う。

(3) 取込まれたフレームの速度適合型試料採取または統計的分析を用いて、5 つの白血球の種類の中の 1 つに属するということを分類結果が示すすべてのオブジェクトから、絶対的白血球数を得ることによって、すべての白血球の種類について、絶対数を得る。

30

(4) 5 つの白血球の種類それぞれについての絶対的白血球数を得るために、工程 (2) および (3) から得られた結果を使用することにより、各種白血球の絶対数の計数を行う。

【0070】

これから、工程 (1) ~ (4) を実施するための装置の実施形態の構造および動作について説明する。

【0071】

[装置の構造と動作]

40

図 1 A および図 1 B を参照すると、血液試料内の白血球の分類および計数のための装置 2 が記載されている。装置 2 は、微小流体的液体処理構造 10 を含む。図 1 A および 1 B は、微小流体的液体処理構造 10 を含む、装置 2 の相互に垂直な断面を示す。図 1 C は、装置 2 を上方から見た図を示す。

【0072】

図 1 C を参照すると、微小流体的液体処理構造 10 は、以下の主要な要素、すなわち装填チャンバ 12、接続導管 20、および廃棄チャンバ 14 を含む。装填チャンバ 12 は、血液試料を微小流体的液体処理構造 10 に導入することができる試料の入口 16 を有する。入口 16 は、封止されたときに、いったん試料が微小流体的液体処理構造 10 内にくると、試料が出て行くことを防ぐように、封止可能である。廃棄チャンバ 14 および装填チャ

50

ンバ12は、チャンバが大気開放されるようにするため、通気孔17、18を有する。これによって、血液試料は、毛細管作用により、装填チャンバ12から導管20を通して廃棄チャンバ14に流れることができる。微小流体的液体処理構造は、画像取込装置28に対してカートリッジを保持するための保持構造の中に挿入できる、カートリッジの一部を形成している。いくつかの実施形態で、カートリッジは、微小流体的液体処理構造へ適用するのに適切な体積の血液を計量するためのカスタムの計量器具、例えばピペットを備えていてもよい。

【0073】

いくつかの実施形態では、入口16が封止され、微小流体的液体処理構造が、装填チャンバ12と廃棄チャンバ14とを接続する空気回路を含む空気チャネルのネットワークを含むとき、微小流体的液体処理構造10は大気から封止される。空気回路によって、血液試料が装填チャンバ12から流れて廃棄チャンバ14を満たすとき、廃棄チャンバ14から装填チャンバ12に空気が出ることが可能になる。空気回路は、毛細管現象により試料が空気回路に入るのを防止するために、1つ以上の流動障壁バルブを含む。その例として、空気回路の突然の膨張がある。

【0074】

微小流体的液体処理構造10内の鋭角部は、試料の流れに対する障害を減らし、廃棄チャンバ14が血液試料で充填されている間、接続導管20内に気泡を取込むのを防止することを避けることが好ましい。接続導管20は、準備部22と検出部24という2つの部分を含む。準備部22は、赤血球の溶解および白血球の染色のために構成されている。試料が準備部22を通して移動すると、一連の乾燥試薬32、34、36のパッチに遭遇する。図1Aでは、3つの乾燥試薬のパッチが提供されているが、任意の数（1つまたは複数）のパッチを準備部22内に提供することができることは理解されるであろう。血液試料が1つまたは複数のパッチにわたって流れると、試薬（複数可）は溶解し、血液（blood volume）を経て徐々に拡散し、化学反応を促す。そのような反応の動態は、主に、血流の速度や乾燥試薬のパッチ（複数可）の長さ（複数可）に依存する。準備部22に貯蔵された乾燥試薬の内容物およびそれが血液中どの程度容易に溶解するかということも、動態に影響を与える。乾燥試薬は、例えば、赤血球を選択的に溶解するための溶血剤を含み、染色剤は、白血球と染色剤の示差的染色をするためのものである。ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色におけるファミリーの染色剤、ローマノスキー染色、異染性の染色、またはそれらの任意の組合せを使用することができる。細胞の細胞質および核の粒状性、大きさ、形状のような形態学的特徴に色の情報を組み合わせてから、検討中の垂集団のそれぞれについて、独自のサインのセットを得ることが可能である。試薬を使用することに関するさらなる考察は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013135713号パンフレットという出願に見出すことができる。

【0075】

1つの具体的な実施形態では、準備部22は、界面活性剤と溶解剤（それぞれサーフィノールとサポニン）との混合物を含む長さ10mmの第1の反応部位と、染色用混合物を含む10mmの長さの反応部位とを含む2つの一連の連続的な試薬を含有する。この実施形態では、染色用の混合物は、エオシン、メチレンブルーおよび塩基性オレンジ21の混合物を含み、白血球の5つの分類のため示差的な色に導く。リンパ球は青い色に染色し、単球は青／紫色に染色し、好中球は青い色の核と淡黄色の細胞質を示し、好酸球は青い色の核と濃い黄色の顆粒を示し、好塩基球は明るいピンク色に染色する。

【0076】

接続導管20の検出部24は、動作中に細胞を画像化し、計数する場所である。検出部24が、画像取込装置28の視野26と位置合わせされているので、検出部24を流れる血液は、画像取込装置28の視野26を横切って流れる。検出部24の幅の約2/3は、画像取込装置28の視野26内にある。画像取込装置28は、検出部24の上方に配置されている。画像取込装置28は、検出部24にあるときに、溶解および染色された試料を画像化するために、検出部24に流入した血液試料に焦点を合わせるレンズ装置および集

10

20

30

40

50

束機構を含む。

【0077】

検出部24は、画像取込装置28の視野26を横切って移動する単一層のオブジェクトを収容するように、準備部22よりも浅く構成される。各オブジェクトが計数される機会を増やし、オブジェクトの分類を容易にするために、単一層のオブジェクトが画像取込装置28の視野を横切って移動するのを確実にすることが好ましい。複数の層のオブジェクトが視野内に提供された場合、一部のオブジェクトが完全に視野から遮られる可能性があり、他にも、別のオブジェクトによって部分的に隠される可能性がある。また、単一層のオブジェクトがあると、取込まれるオブジェクト（細胞を含む）の特徴を任意に定めるのが容易になる。準備部22は、検出部24よりも深く、試薬32、34、36の処理を容易にし、その表面積を増大させる。準備部22から検出部24まで深さが減少することから、検出部24までの毛細管現象による試料の流れが促される。さらに、準備部の深さを増加することにより、血球の溶解および染色の均質性が促される。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、検出部24は、検出される任意のオブジェクトの推定最大寸法の少なくとも2倍の幅であり、その深さはこの最大寸法の2倍未満である。一実施形態では、検出部24は、長さ15mm、幅0.06mm、および深さ0.02mmである。この構成により、0.018μLという検出部24の体積が定まる。図2は、そのような検出部でいくつかの染色された白血球37、38、39について得られる画像の種類を概略的に示す。

20

【0079】

装置2には、細胞数を得るために必要なデータ処理を実行するように構成されたプロセッサ40が関連付けられている。処理のステップを以下に説明する。

【0080】

これから装置2の動作について説明する。試料を、入口16から微小流体的液体処理構造10に導入し、その後、入口を封止する。試料は装填チャンバ12に入り、毛細管作用によって準備部22に引き込まれ、続いて検出部24に引き込まれる。したがって、血液試料が検出部24に入ると、それは赤血球溶解剤および白血球用の示差的染色剤とすでに反応している。

【0081】

画像取込装置28は、最初は焦点が合っていないなくてもよいが、試料が検出部24に入り、続いて画像取込装置28の視野に入ると、焦点機構により画像取込装置28が試料に焦点を合わせ、画像取込装置28はビデオのフレームとして画像の取込みを開始する。ソフトウェアおよび／またはハードウェアで実行されるフォーカシング方法は、一般に周知である。装置2と使用するように適合された特定の例は、英国特許第1417170.6号明細書に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれている。1つの具体的な実施形態では、ビデオは每秒15フレームの速度で4分間撮影され、その結果、各細胞について約15～30フレームが取込まれる。フレーム取得期間および速度は、その後の分析のため、細胞当たり十分な数のフレームを取込むべく、微小流体的液体処理構造10内の特定の流れに適合される。期間および時間は、状況に応じてデータ収集を最適化するために、当業者が容易に適合させる。アッセイの間、約1500個の細胞が、健常な試料について、一例では画像取込装置28の視野26を横切って移動する。ビデオから得られたデータは、一連のフレーム（約4000）からなり、各フレームは、1つまたは複数の細胞、および細胞のクラスターや血小板などの他のオブジェクトを含む画像を含む。一部のフレームにはオブジェクトがまったく含まれていない場合があり、それらのフレームは棄却される。

30

40

【0082】

試料中の細胞を計数するために、細胞（および画像取込装置28の視野を横切って移動する任意の他のオブジェクト）を分類しなければならない。画像取込装置28は、細胞が視野を横切って移動するときにフレームを取込むので、視野26内の異なる位置にある細

50

胞のいくつかの画像が得られる。また、細胞が視野 26 を横切って移動するとき、細胞は典型的には回転もする。細胞が非等方性である場合、すなわち、すべての方向から同じようには見えない場合、細胞が回転するときに細胞に取込まれるフレームは異なるものになる。いくつかの細胞の種類が非等方性であることが知られており、以下に説明するように、細胞および他のオブジェクトを分類および計数するために、採取されたフレームが異なるという事実を本発明では利用する。また、フレームは、試料を画像化するために使用される不完全な光学系のために、異なっている。

【0083】

上で簡単に紹介した様々な工程で使用される装置を説明したので、そのような工程をここで詳細に説明する。

【0084】

[オブジェクトの分類]

フレーム内のオブジェクトを分類するために使用される方法を、図 3 を参照してこれから説明する。ステップ 42 において、いくつかの実施形態で閾値処理、例えば Otsu の方法を使用して、各フレームを最初にオブジェクトおよびバックグラウンドピクセルにセグメント化し、ステップ 44 で、フレーム内のオブジェクトを、画像処理の技術分野で周知のように特定する。ステップ 46 で、各オブジェクトに当該のオブジェクトおよびフレームに固有の識別子が与えられ、ステップ 48 で、オブジェクトの識別子およびそれらに関連するオブジェクトの位置のリストが取得される。ステップ 50 において、オブジェクトの位置を中心とする画像パッチが抽出される。次に、ステップ 52 において、第 1 の画像パッチについて、画像パッチが別個のオブジェクト領域にセグメント化される。これらの領域は、概観するとバックグラウンド、細胞の核、細胞質である。

【0085】

いくつかの実施形態では、色彩の RGB 値に基づく k-平均クラスタ化法のアルゴリズムが区分化に使用される。各画像パッチのピクセルは、3つのクラスタを定義するためにピクセルの RGB 値に対して k-平均（または他の任意の適切なクラスタ化アルゴリズム）を使用してクラスタ化される。これにより、各ピクセルについてクラスタ識別子（クラスタ 1、クラスタ 2、クラスタ 3）のマスクが得られる。最も暗い（例えば平均）ピクセル強度または色彩を有するクラスタは核として標識化され、最も明るい（例えば平均）ピクセル強度または色彩を有するクラスタはバックグラウンドとして標識化され、残りのクラスタは細胞質として標識化される。したがって、区分化アルゴリズムは、各領域の強度または色彩に従って、バックグラウンド、核、および細胞質として特定される 3つの領域を出力する。

【0086】

いくつかの実施形態では、改良として、k-平均クラスタ化法を再度利用し、以前に核として特定されたピクセルを分割して、これらのピクセルを 2つのサブピクセル、つまり核と「細胞質領域 2」にクラスタ化する。これは、核と細胞質の境界をより正確に画定するのに役立つ。このステップでは、核として標識化されたピクセルは「核」として残されるか、「細胞質領域 2」として再分類される。

【0087】

いくつかの実施形態では、代替的な区分化手法を適用することができ、好都合なことに画像の多様性に対してより堅牢であり得る。このアプローチは、各画像パッチに対して以下のステップを伴う。

- 1) 細胞（暗めのピクセル）とバックグラウンド（明るめのピクセル）を分離するための $k=2$ における k-平均クラスタ化法；
- 2) バックグラウンドのピクセルをバックグラウンドとマスクに標識化する（事前に定義されている色、例えば緑に設定）；
- 3) 核（最も暗い）、細胞質（明るめ）、そして今や、例えば緑のバックグラウンドを得るための、 $k=3$ での k-平均クラスタ化法；
- 4) 細胞質のピクセルを細胞質領域 1 として標識化し、細胞質のピクセルを所定の色に

10

20

30

40

50

設定することにより、バックグラウンドに加えて細胞質をマスクする；

5) 核のピクセル（最も暗い）、細胞質領域2、および今やマスクされたバックグラウンド（今や以前の細胞質領域1の領域を含む）を得るための $k = 3$ での k - 平均クラスタ化法；

6) 核のピクセルを核と標識化し、細胞質領域2のピクセルを細胞質領域2と標識化する。

【0088】

1つの細胞質領域のみがセグメント化される実施形態では、クラスタ化は、核および細胞質のピクセルをそれ相応に標識化してステップ3の後に停止する。

【0089】

いくつかの実施形態では、「細胞質領域2」の領域は、第1のパス（「細胞質領域1」）で特定された細胞質に溶け込み、さらなる分析／細胞の分類のため全体の細胞質として標識化される。他の実施形態では、「細胞質領域1」は細胞質の代表とみなされる。「細胞質領域2」が、細胞の核と細胞質との間の移行領域であることに留意しながら、いくつかの実施形態では、この領域のオブジェクトのパラメータを全体の細胞質に加えてオブジェクトの分類に用いる。

【0090】

全体として、各オブジェクトは、実施形態に応じて、3つまたは4つの領域、つまり核、バックグラウンド、細胞質、細胞質領域2、または核、バックグラウンド、細胞質に分割される。

【0091】

血球を特定するための他のクラスタリングに基づくアルゴリズムの例は、Congcong Zhang et al.による「White Blood Cell Segmentation by Color-Space-Based K-Means Clustering」、Sensors 2014, 14, 16128–16147; doi:10.3390/s140916128、およびHerbert Ramoser et al.による「Leukocyte segmentation and classification in blood-smear images」、Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, Shanghai, China, September 1–4, 2005で見出すことができ、そのすべては、参照により本明細書に組み込まれ、いくつかの実施形態でオブジェクトの区分化に使用することがある。いくつかの実施形態では、クラスタ化などの技術を使用して、監督されたまたは監督されない他の任意の適切な区分化方法が使用され得ることが理解される。具体的には、上記の実施形態のいずれかにおいて、 k - 平均以外の任意の適切な代替クラスタ化アルゴリズムを使用することがある。

【0092】

細胞ではなく、したがって核も細胞質も有しないオブジェクトについては、 k - 平均アルゴリズムは依然としてオブジェクトを複数の領域に分割するが、これらの領域は意味を持たず、 k - 平均アルゴリズムの収束は、非細胞のオブジェクトにとっては、細胞のオブジェクトほど良好ではない。非細胞オブジェクトは、以下に説明する分類子で特定される。

【0093】

ステップ54において、個々のオブジェクトのそれぞれについて、各画像パッチから、特定された細胞領域について、オブジェクトのパラメータが抽出される。これらのパラメータには次のものが含まれる：

- ・ 関連するピクセルについて平均を求めた画像の彩度とその標準偏差
- ・ 関連するピクセルについて平均を求めた強度とその標準偏差
- ・ 関連するピクセルについて平均を求めた色彩とその標準偏差
- ・ オブジェクトの真円度

10

20

30

40

50

・例えば、
【数 1】

$$\text{密集度} = 2 \frac{\sqrt{\pi * \text{object area}}}{\text{object perimeter}}$$

・例えば、
【数 2】

$$\text{形状の因子} = \frac{4\pi * \text{object area}}{(\text{object perimeter})^2}$$

10

- ・オブジェクトの周長
- ・オブジェクトの領域、および
- ・画像のフォーカスの質。

【0094】

図4は、オブジェクトが4つの領域に分割される実施形態において、個々のオブジェクトのそれぞれについて抽出され得るオブジェクトのパラメータのリストを示す。

【0095】

いくつかのパラメータの値、例えば、オブジェクトの真円度とオブジェクトの周長などは、全体としてのオブジェクトのために抽出される。マスクを使用して、各領域を順番に分離するために、他のパラメータの値、例えば強度および色彩、およびそれらの標準偏差が各オブジェクトの領域で抽出される。バックグラウンドの領域の値は較正で使用される。例えば、それらは、視野26の1つの領域で別の領域よりも多くの染色を占めるために使用される。画像のフォーカスの質があまりにも劣悪な場合、例えば所定の閾値未満である場合、その画像は棄却される。

20

【0096】

次いでステップ56で、抽出されたパラメータの値は、分類結果を得るためにロジスティック・モデル・ツリー (Logistic Model Tree) 分類子で使用されるが、その議論は、N. Landwehr, M. Hall and E. Frank による、「Logistic Model Trees」、Machine Learning, vol. 59, pages 161-205, 2005で見出すことができ、これらは参照により本明細書に組み込まれている。分類子は、標識化されたエキスパートの訓練データを用いて、分類するために使用する前に、訓練される。ロジスティック・モデル・ツリー分類子は、各オブジェクトのクラス所属スコア、例えばオブジェクト各種に属する各オブジェクトの確率を得るために使用される。いくつかの実施形態では、機械学習アルゴリズムのWekaコレクションによって提供されるSimple Logisticのクラスを利用している (<http://weka.sourceforge.net/doc/dev/weka/classifiers/functions/SimpleLogistic.html>と、<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>とを参照されたい。両方とも参照により本明細書に組み込まれている)。当業者には明らかであるように、任意の適切な分類器、例えばSupport Vector Machineを使用することができる。ステップ52～56は、フレームの各オブジェクトに対して繰り返される。

30

40

【0097】

オブジェクトの種類には、白血球の5つの種類、計数される白血球以外のオブジェクトで使用される9つの他のオブジェクトの種類、および「細胞のクラスター」という分類が含まれる。オブジェクトの種類には、以下のものがある。

- ・リンパ球
- ・単球
- ・好中球

50

- ・好塩基球
- ・好酸球
- ・「無染色細胞」
- ・「細胞のクラスタ」
- ・「バックグラウンドのオブジェクト」
- ・「大きなデブリ」（例えば、血小板の凝集体、溶解していない染色液）
- ・「焦点の合っていない細胞」
- ・「赤血球」
- ・「有核赤血球」
- ・「範囲外」
- ・「その他」
- ・「クラスタ内の好酸球」

10

【0098】

上記のオブジェクトの種類またはクラスは、大部分が自明である。「範囲外」は、フレーム内に完全には存在していないオブジェクトを示し、そのため、オブジェクトの一部のみが見える。「その他」とは、他の分類の1つに該当しないいかなるデブリをも示す。

【0099】

血液試料に非白血球（すなわち、最初の5つ以外）という分類のうちのいずれか1つのオブジェクトがあまりにも多く含まれている場合（例えば、「その他」の種類として分類されたオブジェクトの割合が閾値を超えた場合）、アッセイの結果は棄却してもよい。

20

【0100】

好酸球がすべての白血球に占める割合が非常に少ないので、「クラスタ内の好酸球」という分類は有用である。細胞のクラスタに含まれるそうした好酸球が無視され、計数されない場合、所与のアッセイでは、好酸球は極めてわずかにしか計数されないか、またはまったく計数されない。

【0101】

典型的には、細胞のクラスタは、例えば500ピクセル以上の大きなオブジェクト領域によって特徴付けられる。したがって、オブジェクトの領域は細胞のクラスタを区別する。好酸球には明確な色のサインがあり、そのため、全体としてのクラスタの色の平均（または中央値または他の全体的な尺度）がシフトする。この色のシフトを特定することにより、クラスタ内に好酸球が存在していることが検出される。他のオブジェクトを検出するのは対照的に、クラスタ内の好酸球を検出することは比較的稀な事象であり、いくつかの実施形態では、クラスタの色のシフトが検出された場合、クラスタには1つの好酸球が含まれると推定される。特定されたクラスタの好酸球を計数するさらなる処理が、他の実施形態で使用される。上記の方法ステップのいずれも、プロセッサの制御によって、またはプロセッサの制御下で実行することができる。

30

【0102】

細胞数を推定する際にクラスタ内に細胞を含めることは、単独で、または他の開示された特徴およびステップと組み合わせて実行することができる。この技術は、他の細胞の種類、例えば好塩基球にも適用することができる。

40

【0103】

図3を参照して説明した工程は、必要なだけ多くのフレームに対して繰り返される。所与のオブジェクトに対して得られたデータの例を図5に示す。

【0104】**[分画]**

分画を得る方法を、これから図6を参照して説明する。ステップ60において、上述の方法に従って、血液試料を多数のフレームを含むビデオに取込む。ステップ62では、各フレーム内のオブジェクトが特定され、クラス所属スコアが単純ロジスティックモデルを使用して取得される。この工程は、図3を参照して上述されている。ステップ64で、各オブジェクトは、図6を参照してこれから説明するように、できるだけ多くのフレームに

50

わたって追跡される。試料が視野 26 を横切って流れるとき、試料中の各オブジェクトは、典型的には、1～2 秒間、画像取込装置 28 の視野 26 内にとどまる。したがって、所与のオブジェクトは約 15～30 フレーム表示される。次いで、オブジェクトは、1つのフレームから次のフレームまで追跡される。この追跡工程を、図 7 および図 8 を参照してこれから説明する。

【0105】

図 7 を参照すると、上述したように、オブジェクトをフレーム毎に分類する間にオブジェクトの位置のリストを取得してから、ステップ 74 で、フレーム 1 のオブジェクトの位置のリストとフレーム 2 のオブジェクトの位置のリストを比較する。第 1 のフレームの位置 (x、y) の第 1 のオブジェクト 88 (図 8 参照) に対して、位置 (x、y) に最も近い位置である第 2 のフレームのオブジェクト 94 が特定される。ステップ 78 では、任意の他のオブジェクトが、予め規定されている「安全距離」に等しい半径である、オブジェクト 94 に中心を置いた円の中にあるかどうかを判定するためのチェックが実行される。この「安全距離」は、2つのオブジェクトが近過ぎて、1つのフレームから次のフレームまで互いに信頼性を備えて区別することができない距離として定義される。ステップ 80 において、オブジェクト 96 がオブジェクト 94 から安全な距離以内にある場合、オブジェクト 88 は第 2 のフレームで特定することができず、オブジェクト 88 の追跡は停止する。ステップ 80 において、オブジェクト 94 から安全な距離以内にはオブジェクトが見つからない場合、オブジェクト 94 は、前のフレームのオブジェクト 88 と同じオブジェクトであると特定される。ステップ 76～84 は、第 1 のフレームのすべてのオブジェクトに対して繰り返され、その結果各オブジェクトはフレーム 1 からフレーム 2 まで追跡されるか、フレーム 2 において十分に確実に特定されない場合がある。後者の場合（安全な距離以内でオブジェクトが競合する）、これらのオブジェクトの追跡は停止する。次いで、工程はステップ 86 で次のフレームに移り、フレーム 2 と 3 の位置のリストを比較する。ステップ 74～86 は、最後にフレーム n-1 および n のオブジェクトの位置のリストが比較されるまで、データセット内のすべてのフレームについて繰り返される。ここで、データセットは n 個のフレームからなる。

【0106】

いくつかの実施形態では、追跡を改善するためにオブジェクト速度が使用されている。ステップ 76 で、フレーム 1 のオブジェクト 88 に最も近いフレーム 2 のオブジェクト 94 を選択するのではなく、フレーム 1 および 1 つ以上の前のフレームから判定されたオブジェクト 88 の速度に基づいて、オブジェクト 88 の予測位置に最も近いオブジェクトが選択され、安全距離を減らすことが可能になる。なぜなら、より多くの情報が追跡に使用されるからである。いくつかの実施形態では、これは、第 2 フレームから第 3 フレームまで、およびその後のフレームのオブジェクトの追跡において実行されるが、第 1 フレームから第 2 フレームへの追跡では実行されない。なぜなら、オブジェクトの速度は、1 つ超のフレームを分析することで推定されるからである。

【0107】

オブジェクトの追跡が画像取込装置 28 の視野 26 を離れる前に停止する場合、またはステップ 80 において「衝突」が検出される場合、任意の所与のオブジェクトが 15～30 のフレームで表示されるが、フレームのすべてを使用してオブジェクト进行分类することはできないことが理解されるであろう。

【0108】

オブジェクトを追跡する際に、追跡された各オブジェクトの画像パッチのセットが取得される。言い換えれば、図 3 を参照して上述した方法で得られたオブジェクト（画像パッチ）は、同じオブジェクトに対応する他のオブジェクト（画像パッチ）と「マッチアップ」される。

【0109】

図 6 に戻ると、各個々のフレームに関する各々追跡されたオブジェクトのクラス所属スコアを取得した（ステップ 62 および 64）ので、ステップ 66 で、各細胞の全体的な分

10

20

30

40

50

類が判定される。これは、以下で説明するいくつかの方法で行うことができる。

【0110】

いくつかの実施形態では、クラス所属スコアは、所与のオブジェクトについてすべてのフレームにわたる平均が求められる。最高の点数のクラスは、そのオブジェクトが属するクラス、つまり第1の種類、例えば、「リンパ球」であると受け取られ、「リンパ球」のオブジェクトの種類に対するオブジェクトについての点数は、全フレームにわたる平均が求められる。同じことが「単球」、「好酸球」...などのすべてのオブジェクトの種類で行われる。その場合、オブジェクトは、最高平均点を有する種類に属すると判定される。

【0111】

他の実施形態では、上述の平均化を実行するが、平均化の結果が1つまたは複数の事前設定された事象によって「無効」にされ得るように、ルールが設定される。図9を参照すると、単球が、典型的には、「豆の形の」核100を有するのに対し、リンパ球の核102は、より円形に近い。しかし、ある角度（例えば、核の「豆」の形が特定できない所）から見た単球104は、外観がリンパ球106と類似している可能性がある。例えば、画像取込装置28の視野を横切って移動する単球も回転しているので、単球は、大部分のフレームにおいて、その核の「豆」の形が見えない角度で取込まれ得る。単球が回転するとき、核の「豆」の形が1つまたは2つのフレームで見えることがあるが、単球が回転を続けると、再びリンパ球のように見える場合がある。したがって、そのオブジェクトが実際に単球である場合、12フレームのうち10は、オブジェクトがリンパ球であることを示し得るが、2つだけが単球であることを示している。上記の平均化法を用いた場合、細胞は全体的にリンパ球として誤って分類される可能性がある。しかし、この分類を無効にするようにルールが設定されている場合、例えば、少なくとも1つのフレームが、オブジェクトが単球であることを示している場合に、細胞は単球として正しく分類される。この理由のために、いくつかの実施形態では、少なくとも1つのフレーム（または少なくとも2つの、または少なくとも別の所定の数のフレーム）のオブジェクトの種類が「単球」である細胞のクラス所属スコアが、閾値、例えば90%を超えていると、他のフレームおよび細胞の種類についての点数の値を問わず、細胞は単球であると判定される。

【0112】

他の実施形態では、「投票」工程を採用することができる。この実施形態では、各フレームは票が与えられ、各フレームの票は、そのフレームのクラス所属スコアが最も高いオブジェクトの種類に対応する。次に、オブジェクトは、最も多くの票を有するオブジェクトの種類に属すると判定される。

【0113】

さらなる実施形態では、前の実施形態の「投票」システムを採用することができるが、特定のオブジェクトの種類は、無効化する票を有する。少なくとも1つのフレーム、または予め設定されたフレーム数より多い数のフレームが例えば「単球」に投票する場合、そのオブジェクトは、他のフレームからの投票を問わず、全体で単球として分類される。

【0114】

さらなる実施形態では、平均化は実行されず、細胞の全体的な分類は、上記のようなルールのみに基づいて判定してもよい。

【0115】

図10を参照すると、いくつかの実施形態では全体的な分類を判定するために移動平均を計算する。例えば、3つのフレームのウィンドウが、フレームのセットの開始に配置され、クラス所属スコアは、これらの3つのフレームにわたる平均が求められる。次に、ウィンドウが1フレームだけ沿ってシフトされ、次の平均が計算される。この工程は、セット内のすべてのフレームに及ぶまで繰り返される。このような移動平均を計算することは、オブジェクトが画像取込装置28の視野を横切るその動きと比較して比較的ゆっくりと回転する可能性があるため、有利であり得る。言い換えれば、オブジェクトが1つのフレーム内で1つの向きにあり、次のフレームでは突然完全に異なる向きに切り替わる可能性

は低い。図9を参照すると、型「A」の特定のオブジェクトに対するクラス所属スコアが領域108で落ちると同時に、型「B」のクラス所属スコアが領域110で上がる。この型のシグネチャは、オブジェクトが画像取込装置28の視野26を横切って移動するときにオブジェクトが回転し、単球の核の「豆」の形状のような、オブジェクトの種類の識別特性が検出可能になるときに生じ得る。したがって、いくつかの実施形態では、上に記したもののような特徴のパターンを使用して、全体的な分類を導出することができる。

【0116】

さらに別の実施形態では、全体的なオブジェクトの分類を判定するために加重平均を使用することができる。各フレームには、フレームの光学的性質およびフレームのセット内のフレームの位置に依存する重みが与えられる。一実施形態では、フレームに与えられる重みは、そのフレームの光学的性質と共に増加し、フレームセット内の中央フレームからの距離に反比例して変化する。したがって、セット内の最初および最後のフレームは、介在フレームよりも軽い重みが与えられる。

【0117】

オブジェクトの全体的な分類を判定するための上記の方法のいずれかの結果が決定的でない場合、そのオブジェクトは「未知」として分類され得る。これは、例えば、所与のオブジェクトのフレームの半分が、そのオブジェクトが1つのオブジェクトの種類に属することを示し、残りの半分がそのオブジェクトが別のオブジェクトの種類に属することを示すときに発生し得る。この場合、オブジェクトがどのクラスに属しているかを確実に判断することができない可能性があるため、オブジェクトは「未知」として分類される。多くのオブジェクトが「未知」として分類されるアッセイは棄却することができ、その結果は信頼性がないとみなされる。これは、例えば、「未知」として分類されたオブジェクトの割合が、予め設定された閾値を超える場合に行われる。

【0118】

細胞分画は、各々の細胞の種類として分類された細胞の総数に基づいて計算される。白血球分画を得るために、5つの白血球クラス、すなわちリンパ球、単球、好酸球、好中球、および好塩基球のそれぞれの細胞数を合計することにより、白血球の総数を最初に計算する。所与の細胞の種類の細胞数を、検出された白血球の総数で割ることによって、各クラスが構成する白血球の割合が見出される。白血球分画の典型的な値を以下の表に示す。

【表1】

細胞の種類	割合
好中性球	0.6
リンパ球	0.3
単球	0.06
好酸球	0.035
好塩基球	0.005

【0119】

いったん細胞各種が占める細胞の割合が分かると、試料の総量が分かっている場合、細胞各種の絶対数を判定することができる。しかし、試料の総体積が正確には分かっている可能性はある。試料の体積は、接続導管20を通る血流速度、接続導管20の寸法、およびフレーム取得中の流れの時間について知っている事柄に基づいて判定できるが、流速は可変であり、微小流体的液体処理構造の気泡などの要因により、試料の体積を正確に判定することが困難になる。総体積の情報が不足する可能性があることに対応するために、いくつかの実施形態で、絶対的細胞数を得るために異なる方法を用いることがある。これらの方法のいくつかを後述する。まず（すべての種類の）全白血球の絶対数を得る方法に話を移す。

【0120】

[絶対数]

[絶対数の方法1－統計的分析]

上記のように、判定すべき別の有用な量は絶対的白血球数である。これは、血液の単位体積当たりの推定白血球数である。アッセイで使用される血液試料の全体積は正確には分かっていないが、任意の一時点での画像取込装置28の視野にある血液の体積は、視野の面積と検出部24の深さの積である。この事実は、絶対数の推定に使用される。

【0121】

上記のことは、検出部の深さは、検出部を流れるすべてのオブジェクトを画像取込装置で画像化できるようにするということを意味する。これは、深さが白血球の大きさのオーダーである場合、例えば、最大細胞寸法の2倍未満の場合である。検出部がそれよりも深い場合、一部の実施形態では、検出部の深さが、画像取込装置の焦点の深さによって置き換えられ、その全体にわたって、対応する断面を流れるすべてのオブジェクトを画像化することができ、それは任意の一時点で画像取込装置28の視野にある血液の体積を計算することを目的とする。

10

【0122】

実施形態では、統計的分析を使用して絶対的白血球数を推定する。絶対的白血球数を推定するこの工程を図11を参照して説明する。

【0123】

ステップ112において、血液試料のビデオを撮影する際に得られたフレームのセットの最初の400フレームが棄却される。これは、これらの最初の400フレームには、典型的には、血小板のような、かなりの量のデブリが含まれているからである。

20

【0124】

ステップ114において、各フレーム内の白血球が特定され、各フレームにおいて計数される。上記の方法で、すでにオブジェクトのクラス所属スコアを取得しているので、5種類の白血球のうちの1つについて最高のクラス所属スコアを有する場合、オブジェクトは白血球として計数される。あるいは、すべての白血球クラス所属スコアを合計し、その合計が非白血球のタイプのオブジェクトの点数の合計よりも大きい場合（または、固定閾値、例えば点数が確率であれば0.5）に分類を行うことによって、オブジェクトは計数目的で白血球として分類される。

30

【0125】

ステップ116において、残りのフレームのセットはブロックに分割され、各ブロックは約1200フレームを含む。ブロック1は最初の1200個のフレームを含み、ブロック2は2番目の1200個のフレームを含み、以下同様である。ステップ118において、各ブロックについて、パラメータ α および β を有するガンマ分布が、そのブロック内の各フレームの白血球数の分布（ヒストグラム）に適合される。各適合の適合度の測定値が得られる。次いで、ステップ120において、各ブロック内のフレーム当たりの平均細胞数 μ は、

【数3】

$$\mu = \alpha\beta \quad (1)$$

40

として求められ、ここで、 α 、 β は、それぞれのブロックの計数データに適合されたガンマ分布のパラメータである。

【0126】

別の実施形態では、パラメータ λ （分布下で見込まれるフレーム当たりの計数に対応する）を有するポアソン分布は、各ブロックのフレームにわたる白血球数の分布（ヒストグラム）に適合され、以前と同様に、適合度の測定値が得られる。各ブロック内のフレーム当たりの平均細胞数は、ポアソン分布のパラメータ λ とみなされる。

【0127】

ステップ122において、ブロックのうちの1つについて判定された平均値が、絶対的

50

白血球数の全体的な推定を判定するために使用されるように選択される。平均値そのものの値と対応する分布の適合度を、使用する値を選択する際に考慮する。開始点として、フレームの第1のブロックの平均値を考慮する。後続のブロックの方が適合度の測定値が高く、そのブロックの平均値が第1のブロックの平均値よりも大幅には低くない（例えば、第1のブロックの値の10%以内）場合、その次のブロックから得た平均値を使用して、絶対的白血球数の全体的な推定値を判定する。例えば、第2のブロックの値が第1のブロックに対応する値と類似している場合、例えば、これはわずかに低い第2の値の方が適合度の測定値が高い場合、第2のブロックの値が使用される。平均値は、例えば、その値の10%以内であれば、別の値と「類似」していると判定することができる。適合度の測定値がより高く平均が類似しているこのような後続ブロックが存在しない場合、第1のブロックに由来する平均値を使用する。このようにしてフレームのブロックに適合する分布からの平均細胞数の推定値を得るには、血液試料の流速が実質的に一定であるフレームに分布を適合させることが有効である。流速が実質的に一定であることは、すべてのオブジェクトが概ね同じ数のフレームに現れる可能性が高いことを意味する。逆に、流速が可変であることにより、多くのフレームに遅い動きの細胞が現れ、比較的少数のフレームに速く動く細胞が現れる結果となる。分布が適合されるフレームにわたって流れが実質的に一定である可能性を高めるために、いくつかの実施形態では、閾値を下回る平均オブジェクト速度のフレームを棄却する。例えば、上述のように、オブジェクトは、フレームにわたって追跡され、各フレームのオブジェクト速度の平均が評価される。次いで、オブジェクト速度の平均が所定の閾値を下回るいかなるフレームも棄却し、フレーム当たりの平均白血球数の推定には考慮しない。

【0128】

いくつかの実施形態では、追加または代替で、微小流体的構造の寸法および構成は、血液試料が最初検出部に到達してから一定期間、例えば3秒間が経過した後に、検出部を通る血液試料の流速が実質的に一定と考えられるように設計することができる。次いで、この時間間隔が経過した後のフレームのみを含む、フレーム当たりの平均細胞数を推定する目的で、フレームのブロックを選択することができる。さらに別の実施形態では、流れをモニタし、そうでなければ、流れがあまりに遅いフレーム、または閾値を超える流速において流れの変動があるフレームのブロックを棄却する。

【0129】

1フレーム当たりの平均細胞数の推定値を得た後、絶対的な白血球総数の推定値が得られる。絶対数は、平均（推定）数と、計数に関連する血液の体積との両方に基づく。単一のフレーム内に「取込まれた」血液の体積、すなわち V_{FOV} と呼ばれる画像取込装置28の視野内に含まれる血液の体積は、式（2）

【数4】

$$V_{FOV} = d * w * h \quad (2)$$

を用いて計算することができる。式中、上述したように d = 検出部24の深さ、 w = 血流の方向に沿った画像取込装置28の視野の幅、および h = 視野の高さ、すなわち検出部24を横切る視野の範囲内にある検出部の深さである。

【0130】

いくつかの実施形態では、 V_{FOV} の値が上記のように、検出部の寸法に基づいてオンラインで計算される。他の実施形態では、 V_{FOV} に関連する情報は、例えば、微小流体的液体処理構造10が設けられているカートリッジの微小流体的液体処理構造に付随する校正データのセットの一部であってもよいし、微小流体的液体処理構造10を含むカートリッジまたはパッケージに取り付けられている装置2により、読取りが可能なタグに付随するものでもよい。いくつかの実施形態では、 V_{FOV} の判定の精度は、視野内の任意の障害物のチェックを行うことによって確認される。図12を参照すると、そのような障害物の例は、血小板の凝集体または細胞または気泡であり得る。視野26内に体積 V_{OBS} を有するそのような障害物124は、視野に関連する所の体積が血液で完全に満たされていない

ことを意味する。これは、血液試料の体積の過大評価につながり、したがって、絶対的白血球数の過小評価につながるであろう。

【0131】

この問題を克服するために、いかなるこのような障害物についてもチェックが行われる。これは、視野を領域126に分割することによって行われる。所定の時間内に各領域を通過するオブジェクトの平均数を記録する。任意の領域の平均オブジェクト数が、ある閾値よりも小さい場合、その領域に障害物があると判定される。その後、その領域は、各々が少数のピクセルを含むさらなるサブ領域128に分割される。障害物がある体積の所のピクセルには、通過するオブジェクトがないので、通過するオブジェクトがゼロであるこれらのピクセルを特定することによって、障害物によって占められた視野の領域が判定される。次いで、この領域に検出部24の深さを掛けて、障害物の体積 V_{OBS} を得る。ここで、障害物が検出部24の深さ全体に及ぶと仮定する。次いで、視野26に関連付けられた補正された体積 $V_{FOV,C}$ を得るために、視野 V_{FOV} に関連付けられた閉塞していない体積から、この体積 V_{OBS} を引く。

10

【0132】

上記の実施形態は、効率的な測定時間と障害物のある領域の良好な解像度とを組み合わせるために、個々のグリッドの寸法で2つのステップ（最初は粗く、次が細かい）を使用する。他の実施形態では、解像度と処理時間との間のトレードオフとして、粗いステップか細かいステップの1つのステップで、単一のグリッドの大きさが使用される。

視野26に障害物が検出されない場合、 $V_{OBS} = 0$ および
【数5】

20

$$V_{FOV,C} = V_{FOV}$$

視野26内に障害物が検出された場合、

【数6】

$$V_{FOV,C} = V_{FOV} - V_{OBS}$$

【0133】

絶対的白血球数の推定は、次いで図11のステップ130で、単位体積当たりの球数を得るために推定された球数をスケールリングして、例えば、フレーム毎の推定細胞数を、単一のフレーム内に含まれる血液の体積 $V_{FOV,C}$ で割ることによって、判定される。

30

【0134】

[絶対数の方法2－速度適合型試料採取]

別の実施形態では、二重計数の可能性を低減するために、血液試料のビデオのフレームのサブセット内に含まれる球数の平均を直接求めることによって、血液試料の絶対数が推定されている。これを行う方法について、これから説明する。

【0135】

血液試料から採取された各フレーム内に、少数の白血球および他のオブジェクト、例えば細胞のクラスタまたは血小板がある。通常、各フレームには1～10個のオブジェクトがあるが、フレームは20～30個のオブジェクトを含むことがある。上述のように、画像取込装置28は、1秒当たり約17フレームとなるように設定され、所与のオブジェクトは、画像取込装置28の視野を横切って移動するのに通常1～2秒かかる。したがって、各オブジェクトは複数のフレームに表示される。

40

【0136】

いくつかの実施形態では、絶対的白血球数は、フレームのサブセットを選択することによって判定し、試料中の各オブジェクトがフレームのサブセット全体に一度出現するだけにするか、または少なくとも二重計数の可能性が低減されるようにする。図13を参照すると、オブジェクト132は画像取込装置28の視野26を横切って移動し、フレーム134～140において取込まれる。フレーム134において、オブジェクト132は、画像取込装置28の視野26にちょうど入ったところであり、フレーム142において、オ

50

ブジェクト132は、視野からちょうど離れたところである。オブジェクト132の速度は、推定されて、サブセット内のどのフレームがフレーム142に対応するか、すなわち、フレーム134において取込まれたオブジェクトのすべてが視野を離れた可能性が高く、したがって再び現れない一連のフレーム内の最初のフレームを判定するために、使用される。

【0137】

具体的には、いくつかの実施形態では、フレームnにおける視野26を横切って移動するすべてのオブジェクト速度のうちの最も速い速度が、サブセットにおける次のフレーム、つまりフレームn+1を選択するために使用されている。

【0138】

ここで、絶対数を推定する工程を、図14を参照して説明する。ステップ144において、フレームmで、フレームmの中で最も速く動く細胞を特定し、その速度を推定する。これは、現在のフレーム、前のフレームまたは後のフレームの2つ以上から得られたオブジェクトの位置に基づいて行われる。ステップ146において、この速度は、すべてのオブジェクトがフレームmを離れた可能性が高い次のフレームを特定するために使用される。この次のフレームは、サブセットにおける次のフレームとして選択される。

【0139】

フレームmの最も速いオブジェクト速度vについて、フレームのサブセットにおける次のフレーム、つまりフレームm+1は、フレームmとフレームm+1との間の時間間隔を計算することによって判定される。時間間隔tは、以下の式(3)を用いて計算される。

【数7】

$$t = \frac{w}{v} \quad (3)$$

ここで、w=視野の対角範囲、v=フレームmにおける最も速く動くオブジェクトの速度である。

【0140】

いくつかの実施形態では、最も遅く動くオブジェクトの速度が、サブセットにおける次のフレームを選択するために使用される。この場合、式(3)の「w」は、血流の方向に沿った視野の範囲である。他の実施形態では、平均、例えばフレームにおけるすべてのオブジェクトの平均速度または速度の中央値が、サブセットにおける次のフレームを選択するために使用される。この場合、式(3)の「w」は、視野の対角範囲を表す。他の実施形態では、各フレームにおける最も速く動くオブジェクトの速度の平均が推定され、サブセットにおける次のフレームを選択するために使用される。

【0141】

いくつかの実施形態では、例えば、全フレームにわたる平均速度と固定の下位試料採取レートとに基づいて、または対応する可変の下位試料採取レートでフレームの速度プロファイルを使用して、フレームを下位試料採取する方法を決定するために、他の速度の尺度を利用する。同様に、最も速い速度と最も遅い速度を様々な長さのスケール(スケールの方向は対角の方向)と組み合わせることができる。

【0142】

ステップ148で、ビデオに取込まれたオブジェクトの大部分または実質的にすべてがフレームのサブセットに現れると判定されるまで、ステップ144~148は繰り返される。ある実施形態で、カットオフポイント、例えば、サブセットでいかなるさらなるフレームを選択することをも停止するフレーム数が存在し得る。いくつかの実施形態では、フレームの選択は、セットの最後のフレームに達するか、または選択される次のフレームが存在しなくなるまで続く。いくつかの実施形態では、フレーム数4300(1秒当たり17フレーム)を超えるか、または流速が一定の時間で閾値を下回る場合か、または流れが完全に停止した場合は、さらなるフレームが選択されない。

【0143】

ステップ150では、各フレームにおける白血球が上記のように特定され（ステップ112）、フレームのサブセットにおけるすべてのフレームにわたって計数される。

【0144】

ステップ152では、サブセットにおけるすべてのフレームにわたる白血球数の平均を求める（または、いくつかの実施形態では、中央値を計算する）。次に、この推定された球数は、ステップ154で、血液の単位体積当たりの推定白血球数を得るためにスケールリングされる。これが絶対的白血球数である。

【0145】

[白血球各種の絶対数]

いくつかの実施形態では、白血球の分画の値および絶対的白血球数の値を組み合わせ、5つの白血球の種類のそれぞれの絶対数を得る。白血球各種の絶対数を得る方法を、これから図15を参照して説明する。ステップ156で、絶対的白血球数が上記方法のいずれかに従って得られる。ステップ158において、白血球各種の分画が上記の方法に従って得られる。ステップ160において、各白血球の絶対数は、それぞれの分画に従った絶対的白血球の総数の割合として得られる。例えば、白血球の種類毎の各分画は、この形式でなくてもすでに、0と1との間の割合として書き換えられており、絶対的白血球数と乗算させて、白血球各種に対する絶対数の推定値が得られる。

【0146】

[工程のステップの順序]

上述した方法ステップの様々な組み合わせが実行でき、それらが実行される順序は、球数の推定に影響を及ぼすことなくある程度変更できることが理解されるであろう。

【0147】

特に、工程（1）～（4）の様々な組み合わせを実施することができることが理解されるであろう。一実施形態では、工程（1）および（2）は、血液試料の分画のみを得るために実行される。分画と絶対的白血球数の両方を得るために、工程（1）、（2）および（3）を実施することができる。上記のように、5種類の白血球のそれぞれについての絶対数を得るために、行為（4）において、分画および絶対数を組み合わせることができる。

【0148】

また、上述の工程のステップは、必ずしも特定の順序で実行する必要がないことも理解されるであろう。工程のステップは、1つまたは複数の種類の細胞数の1つまたは複数のそれぞれの推定に影響を与えることなく、ある程度再構成し得る。例えば、分画のみが得られる一実施形態では、各フレーム内のオブジェクトの分類結果が取得され、その後、複数のフレームにわたってオブジェクトが追跡される。別のそのような実施形態では、オブジェクトは最初に複数のフレームにわたって追跡され、次に分類結果が得られる。例えば、各オブジェクトの分類結果は、それが追跡されるフレームで得られるのみである。いったんそれらが別のオブジェクトに接近し過ぎると、いくつかのオブジェクトの追跡が停止するので、分画を判定する目的で、追跡される各フレーム内のオブジェクトの分類結果を取得するのみであることは、有用である。そのため、後者のオプション、すなわちオブジェクトを追跡してから分類結果を得ることは、関連するフレーム内のオブジェクトについて分類結果が得られるのみなので、計算能力をより効率的に使用することが可能になる。

【0149】

同様に、速度適合型試料採取法を使用して絶対的白血球数が判定される実施形態では、サブセット内に1回しか現れない試料において各オブジェクトの可能性が増加するように、フレームのサブセットが選択される。そのため、フレームのサブセット内のオブジェクトの分類結果を取得することが必要であるだけである。したがって、一実施形態では、フレームのサブセットは、各フレーム内のオブジェクトの分類結果が得られる前に選択され、そのため関連するオブジェクトに対して行われるのみである。これにより、計算能力をより効率的に使用することができる。しかし、サブセットを選択する前に、ビデオ全体の各フレーム内のオブジェクトの分類結果を得ることも同様に可能である。分類結果が他の

工程でも使用されている場合、これはより効率的である可能性がある。

【0150】

各フレーム内のオブジェクトの各々についての分類結果を得ることは、白血球数を判定する統計的方法にとって有用である。この工程では、すべてのオブジェクトについて結果を得ることができ、それが現れるすべてのフレームにおいてオブジェクトを計数することができる。

【0151】

また、絶対的白血球数を求めるいずれかの方法を用いると、オブジェクトは「白血球」または「非白血球」に分類する必要があるだけだが、分画を得る方法では、各白血球の種類を判定しなければならない。絶対的白血球数のみを判定する際に、（「白血球」または「非白血球」の）より単純な分類子をいくつかの実施形態で使うことができる。オブジェクトは、そのオブジェクトに関するすべての白血球のクラス所属スコアを合計し、合計が閾値（例えば、クラス所属スコアが確率である場合は0.5）より大きい場合に「白血球」の分類を行うことによって、「白血球」または「非白血球」のいずれかに分類することができる。

【0152】

追跡されたオブジェクトの全体的な分類を判定するために（分画またはその他の状況において）オブジェクトがフレームにわたって追跡されるいくつかの実施形態では、これらの全体的な分類を絶対数の推定に使うことができる。オブジェクトを追跡し、そのオブジェクトの全体的な分類を判定する際に、追跡する異なるフレームにおいてそのオブジェクトに対応するオブジェクト識別子のリスト（図3のステップ46で割り当てられる）が得られる。これらのオブジェクト識別子は同じオブジェクトに対応するため、全体的な分類は同じである。絶対数を推定することになると、所与のフレーム内の白血球は、分画の状況で上記のように得られたクラス所属スコアを、調べることによって、すなわち追跡することによって、特定することができる。他の実施形態では、オブジェクトは、白血球の種類のいずれか1つの全体的な分類（追跡されたフレームにわたる分類または分類スコアの組み合わせの結果として）を有する場合、白血球として分類され得る。全体的な分類は、追跡されるオブジェクトのクラス所属スコアを見る代わり用いることができるのみである、つまり、全体的な分類が追跡によって判定されたオブジェクトのためだけのものであることが理解されるであろう。可能であるときに全体的な分類を使用することは、複数のフレームから得られたクラス所属スコアを使用して全体的な分類が判定される場合にのみ、クラス所属スコアを見ることよりも正確である可能性がある。

【0153】

いくつかの実施形態では、上記の追跡方法を使用して、少なくとも一部の細胞の全体的な分類を判定することができる。次にこれらの分類を使用して、絶対数のみ、分画のみ、またはその両方を推定することができる。

【0154】

〔さらなる装置の実施形態〕

装置の特定の実施形態について上述したが、様々な実施形態において多くの変形形態が可能であることが理解されるであろう。

【0155】

上記の実施形態では、試料は、毛細管現象によって接続導管20を通して流れる。しかし、接続導管20を通る試料の流れは、圧力差によって、または他の任意の手段によって等しく駆動してもよい。

【0156】

上述のような微小流体的液体処理構造は、回転軸の周りを回転するように設計された「ラボ・オン・ディスク」カートリッジ上に実装することができる。いったん試料が微小流体的液体処理構造10に導入されると、試料の入口16を通り、試料の入口が封止され、装置は回転機構を含む器具に配置される。この実施形態では、画像取込装置は、カートリッジが配置される器具と一体であってもよい。回転機構により、カートリッジの角度位置

決りを制御することが可能になる。位置決めセンサを使用して、画像取込装置 28 の視野 26 と検出部 24 の精密な位置合わせを補助することができる。また、カートリッジは、個別の位置決めの目的のために固定化するか、ゆっくりと回転させることができ、すべての流体機能は、さらなる干渉／補助なしに、血液試料の細管ベースの処理によって達成し得る。試料中の細胞が上述のような実施形態に従って分類されると、カートリッジは、装置内の同じ試料または別の試料のさらなる処理のために、回転軸を中心に回転させることができる。カートリッジを回転軸の周りで回転させると、カートリッジ内の液体試料は遠心力を受ける。そのようなカートリッジの例は、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2013135713 号パンフレットという出願に見出すことができる。

【0157】

10

いくつかの実施形態では、各カートリッジに関連するのは、上記の方法で必要な場合に使用するための、その特定のカートリッジの V_{FOV} の値である。例えば、 V_{FOV} は、カートリッジの機械可読要素に記録してもよく、または他の場所に記憶させてもよい。

【0158】

本明細書に記載された流体構造のすべては、前述の回転軸に対して極座標で設計されてもよい。その結果、すべての構造は、回転軸に対して半径方向および角度方向の次元および位置決めによって特徴付けることができる。

【0159】

上述のように、いくつかの実施形態では、微小流体的液体処理構造は、カートリッジに設けられる。いくつかの実施形態では、カートリッジ、特に回転機構を使用するカートリッジは、中間の接着層によって一緒にされた 2 つの透明で平坦な円形の半分によって構成される CD/DVD 構成に類似している。この半分には、好ましくは、上述した微小流体的構造および外部への開口部が刻み込まれる。微小流体的構造の正確な位置合わせにより、3 つの部分を組み立てて結合して自己完結型カートリッジを形成することができる。

20

【0160】

準備部と検出部を含む接続導管 20 の寸法、ならびに装填チャンバ 12 および廃棄チャンバ 14 の寸法を調整できることは理解されるであろう。

【0161】

上述の実施形態は、血液試料の処理で適合されるが、上記の実施形態の少なくとも一部は、任意の液体試料、例えば、オブジェクトが計数される画像化前に 1 つ以上の試薬と反応する任意の液体を処理するのに適している。

30

【0162】

接続導管 20 の形状および長さは、例えば、蛇行形状を使用して、微小流体的液体処理構造内の省スペースを可能にするように構成してもよい。接続導管 20 の軌道は、微小流体的液体処理構造の単一平面内に設けてもよい。直線的な接続導管 20 が図 1A に描かれているが、微小流体的液体処理構造内の血流の実質的に平面の軌道を提供するのに適した任意の形状を提供できることが理解されるであろう。

【0163】

他の既知の試薬およびそれらの組み合わせを装置に使用し得ることも理解されるであろう。試薬は、準備部 22 において異なる寸法を有するように構成してもよいことも理解されるであろう。

40

【0164】

記載された工程は、任意の適切なコンピューティングプラットフォームまたはプロセッサなどの任意の適切なスタンドアロンまたは分散コンピューティング環境を使用して実装することができる。例えば自己完結型またはシステムの他の構成要素と組み合わせた集積回路、システムの他の構成要素と組み合わせた適切なカードを収容する専用のコンピューティング装置、さもなければ、パーソナルコンピュータ、タブレットコンピュータまたは携帯電話などのスタンドアロンコンピューティング装置、またはネットワーク接続を介してデータを少なくとも部分的に遠隔で交換するために必要な工程を実行するサーバが挙げられる。この処理は、クライアント-サーバアーキテクチャで実施されてもよく、処理は

50

クライアントとサーバとの間で任意の適切な方法で分散される。クライアントは、上記の装置のいずれかを含むことができる。

【0165】

説明のために特定の実施形態を説明してきたが、特に上述した特定の特徴に加えて、特定の特徴の多くの変形形態、変更形態および並置形態が、当業者には説明を読む際に思い浮かぶであろう。また、それらは本開示の範囲内にある。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。

【0166】

[第I部]

[装置の構造と動作]

図16Aおよび図16Bを参照すると、血液試料内の白血球の分類および計数のための装置2が記載されている。装置2は、微小流体的液体処理構造10を含む。図16Aおよび図16Bは、微小流体的液体処理構造10を含む、装置2の互いに垂直な断面を示す。図16Cは、装置2を上方から見た図である。

【0167】

図16Cを参照すると、微小流体的液体処理構造10は、以下の主要要素、すなわち装填チャンバ12、接続導管20、および廃棄チャンバ14を含む。装填チャンバ12は、血液試料を微小流体的液体処理構造10に導入することができる試料の入口16を有する。入口16は、封止されたときに、いったん試料が微小流体的液体処理構造10内にくると、試料が出て行くことを防ぐように、封止可能である。廃棄チャンバ14および装填チャンバ12は、チャンバが大気開放されるようにするため、通気孔17、18を有する。これにより、血液試料は、毛細管作用によって装填チャンバから導管20を通して廃棄チャンバ14に流れることができる。微小流体的液体処理構造は、画像取込装置28に対してカートリッジを保持するための保持構造の中に挿入できる、カートリッジの一部を形成している。いくつかの実施形態で、カートリッジは、微小流体的液体処理構造へ適用するのに適切な体積の血液を計量するためのカスタムの計量器具、例えばピペットを備えていてもよい。

【0168】

いくつかの実施形態では、入口16が封止され、微小流体的液体処理構造が、装填チャンバ12と廃棄チャンバ14とを接続する空気回路を含む空気チャネルのネットワークを含むとき、微小流体的液体処理構造10は大気から封止される。空気回路によって、血液試料が装填チャンバ12から流れて廃棄チャンバ14を満たすとき、廃棄チャンバ14から装填チャンバ12に空気が出ることが可能になる。空気回路は、毛細管現象により試料が空気回路に入るのを防止するために、1つ以上の流動障壁バルブを含む。その例として、空気回路の突然の膨張がある。

【0169】

微小流体的液体処理構造10内の鋭角部は、試料の流れに対する障害を減らし、廃棄チャンバ14が血液試料で満たされている間、接続導管20内に気泡を取込むのを防止することを避けることが好ましい。接続導管20は、準備部22と検出部24という2つの部分を含む。準備部22は、赤血球の溶解および白血球の染色のために構成されている。試料が準備部22を通過して移動すると、一連の乾燥試薬32、34、36のパッチに遭遇する。図16Aでは、3つの乾燥試薬のパッチが提供されているが、任意の数（1つまたは複数）のパッチを準備部22内に提供することができることは理解されるであろう。血液試料が1つまたは複数のパッチにわたって流れると、試薬（複数可）は溶解し、血液（blood volume）を経て徐々に拡散し、化学反応を促す。そのような反応の動態は、主に、血流の速度や乾燥試薬のパッチ（複数可）の長さ（複数可）に依存する。準備部22に貯蔵された乾燥試薬の内容物およびそれが血液中どの程度容易に溶解するかということも、動態に影響を与える。乾燥試薬は、例えば、赤血球を選択的に溶解するための溶血剤、および白血球の示差的染色をするための染色剤を含む。ヘマトキシリンおよびコサイン（H&E）染色におけるファミリーの染色剤、ロマーノスキー染色、異染性の染色

10

20

30

40

50

、またはそれらの任意の組合せを使用することができる。細胞の細胞質および核の粒状性、大きさ、形状のような形態学的特徴に色の情報を組み合わせてから、検討中の亜集団のそれぞれについて、独自のサインのセットを得ることが可能である。試薬を使用することに関するさらなる考察は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013135713号パンフレットという出願に見出すことができる。

【0170】

1つの具体的な実施形態では、準備部22は、界面活性剤と溶解剤（それぞれサーフィノールとサポニン）との混合物を含む長さ10mmの第1の反応部位と、染色用混合物を含む10mmの長さの反応部位とを含む2つの一連の連続的な試薬を含有する。この実施形態では、染色用の混合物は、エオシン、メチレンブルーおよび塩基性オレンジ21の混合物を含み、白血球の5つの分類のため示差的な色に導く。リンパ球は青い色に染色し、単球は青／紫色に染色し、好中球は青い色の核と淡黄色の細胞質を示し、好酸球は青い色の核と濃い黄色の顆粒を示し、好塩基球は明るいピンク色に染色する。

10

【0171】

接続導管20の検出部24は、動作中に細胞を画像化し、計数する場所である。検出部24が、画像取込装置28の視野26と位置合わせされているので、検出部24を流れる血液は、画像取込装置28の視野26を横切って流れる。検出部24の幅の約2/3は、画像取込装置28の視野26内にある。画像取込装置28は、検出部24の上方に配置されている。画像取込装置28は、検出部24にあるときに、溶解および染色された試料を画像化するために、検出部24に流入した血液試料に焦点を合わせるレンズ装置および集束機構を含む。

20

【0172】

検出部24は、画像取込装置28の視野26を横切って移動する単一層のオブジェクトを収容するように、準備部22よりも浅く構成される。各オブジェクトが計数される機会を増やし、オブジェクトの分類を容易にするために、単一層のオブジェクトが画像取込装置28の視野を横切って移動するのを確実にすることが好ましい。複数の層のオブジェクトが視野内に提供された場合、一部のオブジェクトが完全に視野から遮られる可能性があり、他にも、別のオブジェクトによって部分的に隠される可能性がある。また、単一層のオブジェクトがあると、取込まれるオブジェクト（細胞を含む）の特徴を任意に定めるのが容易になる。準備部22は、検出部24よりも深く、試薬32、34、36の処理を容易にし、その表面積を増大させる。準備部22から検出部24まで深さが減少することから、準備部22および検出部24までの毛細管現象による試料の流れが促される。さらに、準備部の深さにより、血球の溶解および染色の均質性が促される。

30

【0173】

いくつかの実施形態では、検出部24は、検出される任意のオブジェクトの推定最大寸法の少なくとも2倍の幅であり、その深さはこの最大寸法の2倍未満である。一実施形態では、検出部24は、長さ15mm、幅0.06mm、および深さ0.02mmである。この構成により、0.018μLという検出部24の体積が定まる。図17は、そのような検出部のいくつかの染色された白血球37、38、39について得られる画像の種類を概略的に示す。

40

【0174】

装置2には、細胞数を得るために必要なデータ処理を実行するように構成されたプロセッサ40が関連付けられている。処理のステップを以下に説明する。

【0175】

これから装置2の動作について説明する。試料を、入口16から微小流体的液体処理構造10に導入し、その後、入口を封止する。試料は装填チャンバ12に入り、毛細管作用によって準備部22に引き込まれ、続いて検出部24に引き込まれる。したがって、血液試料が検出部24に入ると、それは赤血球溶解剤および白血球用の示差的染色剤とすでに反応している。

【0176】

50

画像取込装置 28 は、最初は焦点が合っていないなくてもよいが、試料が検出部 24 に入り、続いて画像取込装置 28 の視野に入ると、焦点機構により画像取込装置 28 が試料に焦点を合わせ、画像取込装置 28 はビデオのフレームとして画像の取込みを開始する。ソフトウェアおよび／またはハードウェアで実行されるフォーカシング方法は、一般に周知である。装置 2 と使用するように適合された特定の例は、英国特許第 1 4 1 7 1 7 0 . 6 号明細書に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれている。1 つの具体的な実施形態では、ビデオは毎秒 15 フレームの速度で 4 分間撮影され、その結果、各細胞について約 15 ~ 30 フレームが取込まれる。フレーム取得期間および速度は、その後の分析のため、細胞当たり十分な数のフレームを取込むべく、微小流体的液体処理構造 10 内の特定の流れに適合される。期間および時間は、状況に応じてデータ収集を最適化するために、当業者が容易に適合させる。アッセイの間、約 1500 個の細胞が、健全な試料について、一例では画像取込装置 28 の視野 26 を横切って移動する。ビデオから得られたデータは、一連のフレーム（約 4000）からなり、各フレームは、1 つまたは複数の細胞、および細胞のクラスターや血小板などの他のオブジェクトを含む画像を含む。一部のフレームにはオブジェクトがまったく含まれていない場合があり、それらのフレームは棄却される。

10

【0177】

様々な血球計数工程で使用される装置を説明したので、そのような工程をここで詳細に説明する。

【0178】

20

[オブジェクトの分類]

フレーム内のオブジェクトを分類するために使用される方法を、図 18 を参照してこれから説明する。ステップ 42 において、いくつかの実施形態で閾値処理、例えば Otsu の方法を使用して、各フレームを最初にオブジェクトおよびバックグラウンドピクセルにセグメント化し、ステップ 44 で、フレーム内のオブジェクトを、画像処理の技術分野で周知のように特定する。ステップ 46 で、各オブジェクトに当該のオブジェクトおよびフレームに固有の識別子が与えられ、ステップ 48 で、オブジェクトの識別子およびそれらに関連するオブジェクトの位置のリストが取得される。ステップ 50 において、オブジェクトの位置を中心とする画像パッチが抽出される。次に、ステップ 52 において、第 1 の画像パッチについて、画像パッチが別個のオブジェクト領域にセグメント化される。これらの領域は、概観するとバックグラウンド、細胞の核、細胞質である。

30

【0179】

いくつかの実施形態では、色彩の RGB 値に基づく k-平均クラスタ化法のアルゴリズムが区分化に使用される。各画像パッチのピクセルは、3 つのクラスタを定義するためにピクセルの RGB 値に対して k-平均（または他の任意の適切なクラスタ化アルゴリズム）を使用してクラスタ化される。これにより、各ピクセルについてクラスタ識別子（クラスタ 1、クラスタ 2、クラスタ 3）のマスクが得られる。最も暗い（例えば平均）ピクセル強度または色彩を有するクラスタは核として標識化され、最も明るい（例えば平均）ピクセル強度または色彩を有するクラスタはバックグラウンドとして標識化され、残りのクラスタは細胞質として標識化される。したがって、区分化アルゴリズムは、各領域の強度または色彩に従って、バックグラウンド、核、および細胞質として特定される 3 つの領域を出力する。

40

【0180】

いくつかの実施形態では、改良として、k-平均クラスタ化法を再度利用し、以前に核として特定されたピクセルを分割して、これらのピクセルを 2 つのサブピクセル、つまり核と「細胞質領域 2」にクラスタ化する。これは、核と細胞質の境界をより正確に画定するのに役立つ。このステップでは、核として標識化されたピクセルは「核」として残されるか、「細胞質領域 2」として再分類される。

【0181】

いくつかの実施形態では、代替的な区分化手法を適用することができ、好都合なことに

50

画像の多様性に対してより堅牢であり得る。このアプローチは、各画像パッチに対して以下のステップを伴う。

1) 細胞（暗めのピクセル）とバックグラウンド（明るめのピクセル）を分離するための $k = 2$ における k - 平均クラスタ化法；

2) バックグラウンドのピクセルをバックグラウンドとマスクに標識化する（所定の色、例えば緑に設定）；

3) 核（最も暗い）、細胞質（明るめ）、そして今や、例えば緑のバックグラウンドを得るための、 $k = 3$ での k - 平均クラスタ化法；

4) 細胞質のピクセルを細胞質領域 1 として標識化し、細胞質のピクセルを所定の色に設定することにより、バックグラウンドに加えて細胞質をマスクする；

5) 核のピクセル（最も暗い）、細胞質領域 2、および今やマスクされたバックグラウンド（今や以前の細胞質領域 1 の領域を含む）を得るための $k = 3$ での k - 平均クラスタ化法；

6) 核のピクセルを核と標識化し、細胞質領域 2 のピクセルを細胞質領域 2 と標識化する。

【0182】

1 つの細胞質領域のみセグメント化される実施形態では、クラスタ化は、核および細胞質のピクセルをそれぞれに標識化してステップ 3 の後に停止する。

【0183】

いくつかの実施形態では、「細胞質領域 2」の領域は、第 1 のパス（「細胞質領域 1」）で特定された細胞質に溶け込み、さらなる分析／細胞の分類のため全体の細胞質として標識化される。他の実施形態では、「細胞質領域 1」は細胞質の代表とみなされる。「細胞質領域 2」が、細胞の核と細胞質との間の移行領域であることに留意しながら、いくつかの実施形態では、この領域のオブジェクトのパラメータを全体の細胞質に加えてオブジェクトの分類に用いる。

【0184】

全体として、各オブジェクトは、実施形態に応じて、3 つまたは 4 つの領域、つまり核、バックグラウンド、細胞質、細胞質領域 2、または核、バックグラウンド、細胞質に分割される。

【0185】

血球を特定するための他のクラスタリングに基づくアルゴリズムの例は、Congcong Zhang et al による「White Blood Cell Segmentation by Color-Space-Based K-Means Clustering」、Sensors 2014, 14, 16128–16147; doi:10.3390/s140916128、および Herbert Ramoser et al による「Leukocyte segmentation and classification in blood-smear images」、Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, Shanghai, China, September 1–4, 2005 で見出すことができ、そのすべては、参照により本明細書に組み込まれ、いくつかの実施形態でオブジェクトの区分化に使用することがある。いくつかの実施形態では、クラスタ化などの技術を使用して、監督されたまたは監督されない他の任意の適切な区分化方法が使用され得ることが理解される。具体的には、上記の実施形態のいずれかにおいて、 k - 平均以外の任意の適切な代替クラスタ化アルゴリズムを使用することがある。

【0186】

細胞ではなく、したがって核も細胞質も有しないオブジェクトについては、 k - 平均アルゴリズムは依然としてオブジェクトを複数の領域に分割するが、これらの領域は意味を持たず、 k - 平均アルゴリズムの収束は、非細胞のオブジェクトにとっては、細胞のオブジェクトほど良好ではない。非細胞オブジェクトは、以下に説明する分類子で特定される

。

【0187】

ステップ54では、オブジェクトのパラメータが、個々のオブジェクトの各々について各画像パッチから抽出される。これらのパラメータには次のものが含まれる：

- ・ 関連するピクセルについて平均を求めた画像の彩度とその標準偏差
- ・ 関連するピクセルについて平均を求めた強度とその標準偏差
- ・ 関連するピクセルについて平均を求めた色彩とその標準偏差
- ・ オブジェクトの真円度
- ・ 例えば、

【数8】

10

$$\text{密集度} = 2 \frac{\sqrt{\pi * \text{object area}}}{\text{object perimeter}}$$

- ・ 例えば、

【数9】

$$\text{形状の因子} = \frac{4\pi * \text{object area}}{(\text{object perimeter})^2}$$

- ・ オブジェクトの周長
- ・ オブジェクトの領域、および
- ・ 画像のフォーカスの質。

20

【0188】

図19は、個々のオブジェクトのそれぞれについて抽出され得るオブジェクトのパラメータのリストを示す。

【0189】

いくつかのパラメータの値、例えば、オブジェクトの真円度とオブジェクトの周長などは、全体としてのオブジェクトのために抽出される。マスクを使用して、各領域を順番に分離するために、他のパラメータの値、例えば強度および色彩、およびそれらの標準偏差が各オブジェクトの領域で抽出される。バックグラウンドの領域の値は較正で使用される。例えば、それらは、視野26の1つの領域で別の領域よりも多くの染色を占めるために使用される。画像のフォーカスの質があまりにも劣悪な場合、例えば所定の閾値未満である場合、その画像は棄却される。

30

【0190】

次いでステップ56で、抽出されたパラメータの値は、分類結果を得るためにロジスティック・モデル・ツリー分類子で使われるが、その議論は、N. Landwehr, M. Hall and E. Frankによる、「Logistical Model Trees」、Machine Learning, vol. 59, pages 161-205, 2005で見出すことができ、これらは参照により本明細書に組み込まれている。ロジスティック・モデル・ツリーは、エキスパートの標識化した訓練データを使用した分類を使用する前に、訓練されている。ロジスティック・モデル・ツリーは、各オブジェクトのクラス所属スコア、例えばオブジェクト各種に属する各オブジェクトの確率を得るために使用される。いくつかの実施形態では、機械学習アルゴリズムのWekaコレクションによって提供されるSimple Logisticのクラスを利用している (<http://weka.sourceforge.net/doc/dev/weka/classifiers/functions/SimpleLogistic.html>と、<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>とを参照されたい。両方とも参照により本明細書に組み込まれている)。当業者には明らかであるように、任意の適切な分類器、例えばSupport Vector Machineを使用することができる。ステップ52～56は、フレームの各オブジェクトに対して繰り返される。

40

50

【0191】

オブジェクトの種類には、白血球の5つの種類、計数される白血球以外のオブジェクトで使用される9つの他のオブジェクトの種類、および「細胞のクラスタ」という分類が含まれる。オブジェクトの種類には、以下のものがある。

- ・リンパ球
- ・単球
- ・好中球
- ・好塩基球
- ・好酸球
- ・「無染色細胞」
- ・「細胞のクラスタ」
- ・「バックグラウンドのオブジェクト」
- ・「大きなデブリ」（例えば、血小板の凝集体、溶解していない染色液）
- ・「焦点の合っていない細胞」
- ・「赤血球」
- ・「有核赤血球」
- ・「範囲外」
- ・「その他」
- ・「クラスタ内の好酸球」

10

【0192】

20

上記のオブジェクトの種類またはクラスは、大部分が自明である。「範囲外」は、フレーム内に完全には存在していないオブジェクトを示し、そのため、オブジェクトの一部のみが見える。「その他」とは、他の分類の1つに該当しないいかなるデブリをも示す。

【0193】

血液試料に非白血球（すなわち、最初の5つ以外）という分類のうちのいずれか1つのオブジェクトがあまりにも多く含まれている場合（例えば、「その他」の種類として分類されたオブジェクトの割合が閾値を超えた場合）、アッセイの結果は棄却してもよい。

【0194】

好酸球がすべての白血球に占める割合が非常に少ないので、「クラスタ内の好酸球」という分類は有用である。細胞のクラスタに含まれるそうした好酸球が無視され、計数されない場合、所与のアッセイでは、好酸球は極めてわずかにしか計数されないか、またはまったく計数されない。

30

【0195】

上記のように、細胞のクラスタは分類子によって特定される。典型的には、細胞のクラスタは、例えば500ピクセル以上の大きなオブジェクト領域によって特徴付けられる。したがって、オブジェクトの領域は細胞のクラスタを区別する。好酸球には明確な色のサインがあり、そのため、全体としてのクラスタの色の平均がシフトする。この色のシフトを特定することにより、クラスタ内に好酸球が存在していることが検出される。他のオブジェクトを検出するのは対照的に、クラスタ内の好酸球を検出することは比較的稀な事象であり、いくつかの実施形態では、クラスタの色のシフトが検出された場合、クラスタには1つの好酸球が含まれると推定される。特定されたクラスタの好酸球を計数するさらなる処理が、他の実施形態で使用される。上記の方法ステップのいずれも、プロセッサの制御によって、またはプロセッサの制御下で実行することができる。

40

【0196】

細胞数を推定する際にクラスタ内に細胞を含めることは、単独で、または他の開示された特徴およびステップと組み合わせて実行することができる。この技術は、他の細胞の種類、例えば好塩基球にも適用することができる。

【0197】

いくつかの実施形態では、オブジェクトは、オブジェクトが最も高いクラス所属スコアを有するクラスとして分類される。いくつかの実施形態では、最も高いクラス所属スコア

50

が閾値未満である場合、そのオブジェクトは「未知」として分類される。

【0198】

図18を参照して説明した工程は、必要な数のフレームに対して繰り返される。

【0199】

[細胞の追跡]

上述したように、いくつかの実施形態では、血液試料の絶対数の推定は、細胞速度の推定に基づいて取込まれたフレームのサブセットを選択することによって、判定することができる。細胞速度を推定する1つの方法は、1つのフレームから次のフレームまで細胞を追跡することである。この工程を図20を参照してこれから説明する。

【0200】

上述したように、オブジェクトを分類する間にオブジェクトの位置のリストを取得してから、ステップ58で、フレーム1のオブジェクトの位置のリストとフレーム2のオブジェクトの位置のリストを比較する。第1のフレームの位置(x、y)の第1のオブジェクト72(図21参照)に対して、位置(x、y)に最も近い位置である第2のフレームのオブジェクト78が特定される。ステップ62では、その他のオブジェクトが、予め規定されている「安全距離」に等しい半径である、オブジェクト78に中心を置いた円の中にあるかどうかを判定するためのチェックが実行される。この「安全距離」は、2つのオブジェクトが近過ぎて、1つのフレームから次のフレームまで互いに信頼性を備えて区別することができない距離として定義される。ステップ64において、オブジェクト80がオブジェクト78から安全な距離以内にある場合、オブジェクト72はフレーム2で特定することができず、オブジェクト72の追跡は停止する。ステップ64において、オブジェクト78から安全な距離以内にオブジェクトが見つからない場合、オブジェクト78は、前のフレームのオブジェクト72と同じオブジェクトであると特定される。ステップ60～68は、第1のフレームのすべてのオブジェクトに対して繰り返され、その結果各オブジェクトはフレーム1からフレーム2まで追跡されるか、またはフレーム2において十分に確実に特定されない場合がある。後者の場合(安全な距離以内でオブジェクトが競合する)、これらのオブジェクトの追跡は停止する。次いで、工程はステップ70で次のフレームに移り、フレーム2と3の位置のリストを比較する。ステップ58～70は、最後にフレームn-1およびnのオブジェクトの位置のリストが比較されるまで、データセット内のすべてのフレームについて繰り返される。ここで、データセットはn個のフレームからなる。

【0201】

いくつかの実施形態では、追跡を改善するためにオブジェクト速度が使用されている。例えば、ステップ60で、フレーム1のオブジェクト72に最も近いフレーム2のオブジェクト78を選択するのではなく、フレーム1および1つ以上の前のフレームから判定されたオブジェクト72の速度に基づいて、オブジェクト72の予測位置に最も近いオブジェクトが選択され、安全距離を減らすことが可能になる。なぜなら、より多くの情報が追跡に使用されるからである。いくつかの実施形態では、これは、第2フレームから第3フレームまで、およびその後のフレームのオブジェクトの追跡において実行されるが、第1フレームから第2フレームへの追跡では実行されない。なぜなら、オブジェクトの速度は、1つ超のフレームを分析することで推定されるからである。

【0202】

オブジェクトを追跡する際に、追跡された各オブジェクトの画像パッチのセットが取得される。言い換えれば、図18を参照して上述した方法で得られたオブジェクト(画像パッチ)は、同じオブジェクトに対応する他のオブジェクト(画像パッチ)と「マッチアップ」される。

【0203】

画像取込装置の視野の寸法は公知であり、これらの寸法に基づいて、各オブジェクトがフレーム間を移動する距離が推定される。フレーム間の時間も公知である。このことと、フレーム間にオブジェクトが移動した距離の推定を使用して、オブジェクトの速度の推定

10

20

30

40

50

を判定する。

【0204】

[絶対数の方法1－統計的分析]

上述したように、絶対的白血球数は、血液の単位体積当たりの推定白血球数である。アッセイで使用される血液試料の全体積は正確には分かっていないが、任意の一時点での画像取込装置28の視野にある血液の体積は、視野の面積と検出部24の深さの積である。この事実は、絶対数の推定に使用される。

【0205】

上記のことは、検出部の深さは、検出部を流れるすべてのオブジェクトを画像取込装置で画像化できるようにするということを意味する。これは、深さが白血球の大きさのオーダーである場合、例えば、最大細胞寸法の2倍未満の場合である。検出部がそれよりも深い場合、一部の実施形態では、検出部の深さが、画像取込装置の焦点の深さによって置き換えられ、その全体にわたって、対応する断面を流れるすべてのオブジェクトを画像化することができ、それは任意の一時点で画像取込装置28の視野にある血液の体積を計算することを目的とする。

【0206】

実施形態では、統計的分析を使用して絶対的白血球数を推定する。絶対的白血球数を推定するこの工程を図22を参照して説明する。

【0207】

ステップ84において、血液試料のビデオを撮影する際に得られたフレームのセットの最初の400フレームが棄却される。これは、これらの最初の400フレームには、典型的には、血小板のような、かなりの量のデブリが含まれているからである。

【0208】

ステップ86において、各フレーム内の白血球が特定され、各フレームにおいて計数される。オブジェクトを分類する際には、上記の方法に従ってオブジェクトのクラス所属スコアを取得する。5種類の白血球のうちの1つについて最高のクラス所属スコアを有する場合、オブジェクトは白血球として計数される。あるいは、すべての白血球クラス所属スコアを合計し、その合計が非白血球のタイプのオブジェクトの点数の合計よりも大きい場合（または、固定閾値、例えば点数が確率であれば0.5）に分類を行うことによって、オブジェクトは計数目的で白血球として分類される。

【0209】

ステップ88において、残りのフレームのセットはブロックに分割され、各ブロックは約1200フレームを含む。ブロック1は最初の1200個のフレームを含み、ブロック2は2番目の1200個のフレームを含み、以下同様である。ステップ90において、各ブロックについて、パラメータ α および β を有するガンマ分布が、そのブロック内の各フレームの白血球数の分布（ヒストグラム）に適合される。各適合の適合度の測定値が得られる。次いで、ステップ92において、各ブロック内のフレーム当たりの平均細胞数 μ は、

【数10】

$$\mu = \alpha\beta \quad (1)$$

として求められる。ここで、 α 、 β は、それぞれのブロックの計数データに適合されたガンマ分布のパラメータである。

【0210】

別の実施形態では、パラメータ λ （分布下で見込まれるフレーム当たりの計数に対応する）を有するポアソン分布は、各ブロックのフレームにわたる白血球数の分布（ヒストグラム）に適合され、以前と同様に、適合度の測定値が得られる。各ブロック内のフレーム当たりの平均細胞数は、ポアソン分布のパラメータ λ とみなされる。

【0211】

ステップ94において、ブロックのうちの1つについて判定された平均値が、絶対的白血球数の全体的な推定を判定するために使用されるように選択される。平均値そのものの値と対応する分布の適合度を、使用する値を選択する際に考慮する。開始点として、フレームの第1のブロックの平均値を考慮する。後続のブロックの方が適合度の測定値が高く、そのブロックの平均値が第1のブロックの平均値よりも大幅には低くない（例えば、第1のブロックの値の10%以内）場合、その次のブロックから得た平均値を使用して、絶対的白血球数の全体的な推定値を判定する。例えば、第2のブロックの値が第1のブロックに対応する値と類似している場合、例えば、これはわずかに低い第2の値の方が適合度の測定値が高い場合、第2のブロックの値が使用される。平均値は、例えば、その値の10%以内であれば、別の値と「類似」していると判定することができる。適合度の測定値がより高く平均が類似しているこのような後続ブロックが存在しない場合、第1のブロックに由来する平均値を使用する。このようにしてフレームのブロックに適合する分布からの平均細胞数の推定値を得るには、血液試料の流速が実質的に一定であるフレームに分布を適合させることが有効である。流速が実質的に一定であることは、すべてのオブジェクトが概ね同じ数のフレームに現れる可能性が高いことを意味する。逆に、流速が可変であることにより、多くのフレームに遅い動きの細胞が現れ、比較的少数のフレームに速く動く細胞が現れる結果となる。分布が適合されるフレームにわたって流れが実質的に一定である可能性を高めるために、いくつかの実施形態では、閾値を下回る平均オブジェクト速度のフレームを棄却する。例えば、上述のように、オブジェクトは、フレームにわたって追跡され、各フレームのオブジェクト速度の平均が評価される。次いで、オブジェクト速度の平均が所定の閾値を下回るいかなるフレームも棄却し、フレーム当たりの平均白血球数の推定には考慮しない。

【0212】

いくつかの実施形態では、追加または代替で、微小流体的構造の寸法および構成は、血液試料が最初検出部に到達してから一定期間、例えば3秒間が経過した後に、検出部を通る血液試料の流速が実質的に一定と考えられるように設計することができる。次いで、この時間間隔が経過した後のフレームのみを含む、フレーム当たりの平均細胞数を推定する目的で、フレームのブロックを選択することができる。さらに別の実施形態では、流れをモニタし、そうでなければ、流れがあまりに遅いフレーム、または閾値を超える流速において流れの変動があるフレームのブロックを棄却する。

【0213】

1フレーム当たりの平均細胞数の推定値を得た後、絶対的な白血球総数の推定値が得られる。絶対数は、平均（推定）数と、計数に関連する血液の体積との両方に基づく。単一のフレーム内に「取込まれた」血液の体積、すなわち V_{FOV} と呼ばれる画像取込装置28の視野内に含まれる血液の体積は、式（2）

【数11】

$$V_{FOV} = d * w * h \quad (2)$$

を用いて計算することができる。式中、上述したように d = 検出部24の深さ、 w = 血流の方向に沿った画像取込装置28の視野の幅、および h = 視野の高さ、すなわち検出部24を横切る視野の範囲内にある検出部の深さである。

【0214】

いくつかの実施形態では、 V_{FOV} の値が上記のように、検出部の寸法に基づいてオンラインで計算される。他の実施形態では、 V_{FOV} に関連する情報は、例えば、微小流体的液体処理構造が設けられているカートリッジにある微小流体的液体処理構造10に付随する校正データのセットの一部であってもよいし、微小流体的液体処理構造10を含むカートリッジまたはパッケージに取り付けられている装置2により、読取りが可能なタグに付随するものでもよい。いくつかの実施形態では、 V_{FOV} の判定の精度は、視野内の任意の障害物のチェックを行うことによって確認される。図23を参照すると、そのような障害物の

例は、血小板の凝集体または細胞または気泡であり得る。視野 26 内の体積 V_{OBS} を有するそのような障害物 98 は、視野に関連する所の体積が血液で完全に満たされていないことを意味する。これは、血液試料の体積の過大評価につながり、したがって、絶対的白血球数の過小評価につながるであろう。

【0215】

この問題を克服するために、いかなるこのような障害物についてもチェックが行われる。これは、視野を領域 100 に分割することによって行われる。所定の時間内に各領域を通過するオブジェクトの平均数を記録する。任意の領域の平均オブジェクト数が、ある閾値よりも小さい場合、その領域に障害物があると判定される。その後、その領域は、それぞれが少数のピクセルを含むさらなるサブ領域 102 に分割される。障害物がある体積の所のピクセルには、通過するオブジェクトがないので、通過するオブジェクトがゼロであるこれらのピクセルを特定することによって、障害物によって占められた視野の領域が判定される。次いで、この領域に検出部 24 の深さを掛けて、障害物の体積 V_{OBS} を得る。ここで、障害物が検出部 24 の深さ全体に及ぶと仮定する。次いで、視野 26 に関連付けられた補正された体積 $V_{FOV,C}$ を得るために、視野 V_{FOV} に関連付けられた閉塞していない体積から、この体積 V_{OBS} を引く。

【0216】

上記の実施形態は、効率的な測定時間と障害物のある領域の良好な解像度とを組み合わせるために、個々のグリッドの寸法で 2 つのステップ（最初は粗く、次が細かい）を使用する。他の実施形態では、解像度と処理時間との間のトレードオフとして、粗いステップか細かいステップの 1 つのステップで、単一のグリッドの大きさが使用される。

視野 26 に障害物が検出されない場合、 $V_{OBS} = 0$ および

【数 12】

$$V_{FOV,C} = V_{FOV}$$

視野 26 内に障害物が検出された場合、

【数 13】

$$V_{FOV,C} = V_{FOV} - V_{OBS}$$

【0217】

絶対的白血球数の推定は、次いで図 22 のステップ 96 で、単位体積当たりの球数を得るために推定された球数をスケールリングして、例えば、フレーム毎の推定細胞数を、単一のフレーム内に含まれる血液量 $V_{FOV,C}$ で割ることによって、判定される。

【0218】

[絶対数の方法 2 - 速度適合型試料採取]

別の実施形態では、二重計数の可能性を低減するために、血液試料のビデオのフレームのサブセット内に含まれる球数の平均を直接求めることによって、血液試料の絶対数が推定されている。これを行う方法について、これから説明する。

【0219】

血液試料から採取された各フレーム内に、少数の白血球および他のオブジェクト、例えば細胞のクラスタまたは血小板がある。通常、各フレームには 1 ~ 10 個のオブジェクトがあるが、フレームは 20 ~ 30 個のオブジェクトを含むことがある。上述のように、画像取込装置 28 は、1 秒当たり約 17 フレームとなるように設定され、所与のオブジェクトは、画像取込装置 28 の視野を横切って移動するのに通常 1 ~ 2 秒かかる。したがって、各オブジェクトは複数のフレームに表示される。

【0220】

いくつかの実施形態では、絶対的白血球数は、フレームのサブセットを選択することによって判定し、試料中の各オブジェクトがフレームのサブセット全体に一度出現するだけにするか、または少なくとも二重計数の可能性が低減されるようにする。図 24 を参照すると、オブジェクト 104 は画像取込装置 28 の視野 26 を横切って移動し、フレーム 1

06～112において取込まれる。フレーム106において、オブジェクト104は、画像取込装置28の視野26にちょうど入ったところであり、フレーム114において、オブジェクト104は、視野からちょうど離れたところである。オブジェクト104の速度は、推定されて、サブセット内のどのフレームがフレーム114に対応するか、すなわち、フレーム106において取込まれたオブジェクトのすべてが視野を離れた可能性が高く、したがって再び現れない一連のフレーム内の最初のフレームを判定するために、使用される。

【0221】

具体的には、いくつかの実施形態では、フレームnにおける視野26を横切って移動するすべてのオブジェクト速度のうちの最も速い速度が、サブセットにおける次のフレーム、つまりフレームn+1を選択するために使用されるが、複数のフレームにわたってオブジェクトを追跡することか、または細胞速度が同じであり、検出部を通る血液試料の速度と等しいと仮定することによって、オブジェクト速度の推定が得られている。

10

【0222】

ここで、絶対数を推定する工程を、図25を参照して説明する。ステップ116において、フレームmについて、フレームmにおける最も速く動く細胞を特定し、その速度を推定する。これは、現在のフレーム、前のフレームまたは後のフレームの2つ以上から得られたオブジェクトの位置に基づいて行われる。ステップ118において、この速度は、すべてのオブジェクトがフレームmを離れた可能性が高い次のフレームを特定するために使用される。この次のフレームは、サブセットにおける次のフレームとして選択される。

20

【0223】

フレームmの最も速いオブジェクト速度vについて、フレームのサブセットにおける次のフレーム、つまりフレームm+1は、フレームmとフレームm+1との間の時間間隔を計算することによって判定される。時間間隔tは、以下の式(3)を用いて計算される。

【数14】

$$t = \frac{w}{v} \quad (3)$$

ここで、w=視野の対角範囲、v=フレームmにおける最も速く動くオブジェクトの速度である。

30

【0224】

いくつかの実施形態では、最も遅く動くオブジェクトの速度が、サブセットにおける次のフレームを選択するために使用される。この場合、式(3)の「w」は、血流の方向に沿った視野の範囲である。他の実施形態では、平均、例えばフレームにおけるすべてのオブジェクトの平均速度または速度の中央値が、サブセットにおける次のフレームを選択するために使用される。この場合、式(3)の「w」は、視野の対角範囲を表す。他の実施形態では、各フレームにおける最も速く動くオブジェクトの速度の平均が推定され、サブセットにおける次のフレームを選択するために使用される。

【0225】

いくつかの実施形態では、例えば、全フレームにわたる平均速度と固定の下位試料採取レートとに基づいて、または対応する可変の下位試料採取レートでフレームの速度プロファイルを使用して、フレームを下位試料採取する方法を決定するために、他の速度の尺度を利用する。同様に、最も速い速度と最も遅い速度を様々な長さのスケール(スケールの方向は対角の方向)と組み合わせることができる。

40

【0226】

ステップ120で、ビデオに取込まれたオブジェクトの大部分または実質的にすべてがフレームのサブセットに現れると判定されるまで、ステップ116～120は繰り返される。ある実施形態で、カットオフポイント、例えば、サブセットでいかなるさらなるフレームを選択することをも停止するフレーム数が存在し得る。いくつかの実施形態では、フレームの選択は、セットの最後のフレームに達するか、または選択される次のフレームが

50

存在しなくなるまで続く。いくつかの実施形態では、フレーム数4300（1秒当たり17フレーム）を超えるか、または流速が一定の時間で閾値を下回る場合か、または流れが完全に停止した場合、さらなるフレームは選択されない。

【0227】

ステップ122では、各フレームにおける白血球が上記のように特定され、フレームのサブセットにおけるすべてのフレームにわたって計数される。

【0228】

ステップ124では、サブセット内のすべてのフレームにわたり、白血球数の平均を求める（または、いくつかの実施形態では、中央値が計算される）。次に、この推定数は、ステップ126において、血液の単位体積当たりの推定白血球数を得るためにスケールン 10
グされる。これが絶対的白血球数である。

【0229】

[工程のステップの順序]

上述した方法ステップの様々な組み合わせが実行でき、それらが実行される順序は、球数の推定に影響を及ぼすことなくある程度変更できることが理解されるであろう。速度適合型試料採取法を使用して絶対的白血球数が判定される実施形態では、サブセット内に1回しか現れない試料において各オブジェクトの可能性が増加するように、フレームのサブセットが選択される。そのため、フレームのサブセット内のオブジェクトの分類結果を取得することが必要であるだけである。したがって、一実施形態では、フレームのサブセ 20
ットは、各フレーム内のオブジェクトの分類結果が得られる前に選択され、そのため関連するオブジェクトに対して行われるのみである。これにより、計算能力をより効率的に使用することができる。しかし、サブセットを選択する前に、ビデオ全体の各フレーム内のオブジェクトの分類結果を得ることも同様に可能である。分類結果が他の工程でも使用されている場合、これはより効率的である可能性がある。

【0230】

各フレーム内のオブジェクトの各々についての分類結果を得ることは、白血球数を判定する統計的方法にとって有用である。この工程では、すべてのオブジェクトについて結果を得ることができ、それが現れるすべてのフレームにおいてオブジェクトを計数することが 30
できる。

【0231】

さらに、絶対的白血球数を判定する際に、オブジェクトは「白血球」または「非白血球」と分類することが必要なだけである。したがって、（「白血球」または「非白血球」の）より単純な分類子をいくつかの実施形態で 사용할 30
ことができる。オブジェクトは、そのオブジェクトに関するすべての白血球のクラス所属スコアを合計し、合計が閾値（例えば、クラス所属スコアが確率である場合は0.5）より大きい場合に「白血球」の分類を行うことによって、「白血球」または「非白血球」のいずれかに分類することができる。

【0232】

[さらなる装置の実施形態]

装置の特定の実施形態について上述したが、様々な実施形態において多くの変形形態が可能であることが理解されるであろう。 40

【0233】

上記の実施形態では、試料は、毛細管現象によって接続導管20を通して流れる。しかし、接続導管20を通る試料の流れは、圧力差によって、または他の任意の手段によって等しく駆動してもよい。

【0234】

上述のような微小流体的液体処理構造は、回転軸の周りを回転するように設計された「ラボ・オン・ディスク」カートリッジ上に実装することができる。いったん試料が微小流体的液体処理構造10に導入されると、試料の入口16を通り、試料の入口が封止され、装置は回転機構を含む器具に配置される。この実施形態では、画像取込装置は、カートリ 50
ッジが配置される器具と一体であってもよい。回転機構により、カートリッジの角度位置

決りを制御することが可能になる。位置決めセンサを使用して、画像取込装置 28 の視野 26 と検出部 24 の精密な位置合わせを補助することができる。また、カートリッジは、個別の位置決めの目的のために固定化するか、ゆっくりと回転させることができ、すべての流体機能は、さらなる干渉／補助なしに、血液試料の細管ベースの処理によって達成し得る。試料中の細胞が上述のような実施形態に従って分類されると、カートリッジは、装置内の同じ試料または別の試料のさらなる処理のために、回転軸を中心に回転させることができる。カートリッジを回転軸の周りで回転させると、カートリッジ内の液体試料は遠心力を受ける。そのようなカートリッジの例は、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2013135713 号パンフレットという出願に見出すことができる。

【0235】

いくつかの実施形態では、各カートリッジに関連するのは、上記の方法で必要な場合に使用するための、その特定のカートリッジの V_{FOV} の値である。例えば、 V_{FOV} は、カートリッジの機械可読要素に記録してもよく、または他の場所に記憶させてもよい。

【0236】

本明細書に記載された流体構造のすべては、前述の回転軸に対して極座標で設計されてもよい。その結果、すべての構造は、回転軸に対して半径方向および角度方向の次元および位置決めによって特徴付けることができる。

【0237】

上述のように、いくつかの実施形態では、微小流体的液体処理構造は、カートリッジに設けられる。いくつかの実施形態では、カートリッジ、特に回転機構を使用するカートリッジは、中間の接着層によって一緒にされた 2 つの透明で平坦な円形の半分によって構成される CD/DVD 構成に類似している。この半分には、好ましくは、上述した微小流体的構造および外部への開口部が刻み込まれる。微小流体的構造の正確な位置合わせにより、3 つの部分を組み立てて結合して自己完結型カートリッジを形成することができる。

【0238】

準備部と検出部を含む接続導管 20 の寸法、ならびに装填チャンバ 12 および廃棄チャンバ 14 の寸法を調整できることは理解されるであろう。

【0239】

上述の実施形態は、血液試料の処理で適合されるが、上記の実施形態の少なくとも一部は、任意の液体試料、例えば、オブジェクトが計数される画像化前に 1 つ以上の試薬と反応する任意の液体を処理するのに適している。

【0240】

接続導管 20 の形状および長さは、例えば、蛇行形状を使用して、微小流体的液体処理構造内の省スペースを可能にするように構成してもよい。接続導管 20 の軌道は、微小流体的液体処理構造の単一平面内に設けてもよい。直線的な接続導管 20 が図 16A に描かれているが、微小流体的液体処理構造内の血流の実質的に平面の軌道を提供するのに適した任意の形状を提供できることが理解されるであろう。

【0241】

他の既知の試薬およびそれらの組み合わせを装置に使用し得ることも理解されるであろう。試薬は、準備部 22 において異なる寸法を有するように構成してもよいことも理解されるであろう。

【0242】

記載された工程は、任意の適切なコンピューティングプラットフォームまたはプロセッサなどの任意の適切なスタンドアロンまたは分散コンピューティング環境を使用して実装することができる。例えば自己完結型またはシステムの他の構成要素と組み合わせた集積回路、システムの他の構成要素と組み合わせた適切なカードを収容する専用のコンピューティング装置、さもなければ、パーソナルコンピュータ、タブレットコンピュータまたは携帯電話などのスタンドアロンコンピューティング装置、またはネットワーク接続を介してデータを少なくとも部分的に遠隔で交換するために必要な工程を実行するサーバが挙げられる。この処理は、クライアント-サーバアーキテクチャで実施されてもよく、処理は

10

20

30

40

50

クライアントとサーバとの間で任意の適切な方法で分散される。クライアントは、上記の装置のいずれかを含むことができる。

【0243】

説明のために特定の実施形態を説明してきたが、特に上述した特定の特徴に加えて、特定の特徴の多くの変形形態、変更形態および並置形態が、当業者には説明を読む際に思い浮かぶであろう。また、それらは本開示の範囲内にある。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。

【図1a】

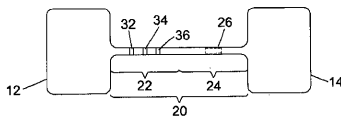


Fig. 1a

【図2】

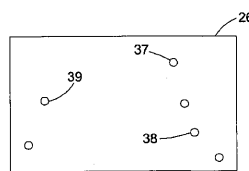
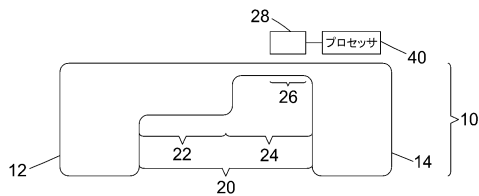
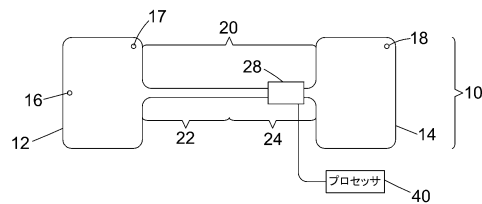


Fig. 2

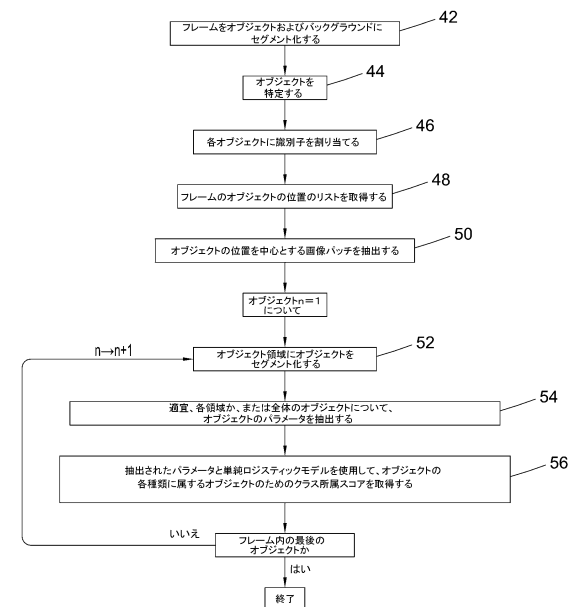
【図1b】



【図1c】



【図3】



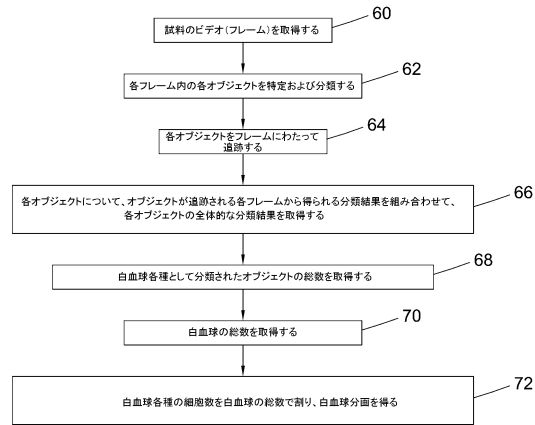
【図 4】

オブジェクトのパラメータ	
色相チャンネルの細胞質の平均	
色相チャンネルの細胞質の標準偏差	
細胞質の領域	
細胞質の周長	
細胞質の形状の因子(細胞質の形に関連する)	
細胞質の密集度(細胞質の形に関連する)	
細胞質の凸閉包(細胞質の凸状に関連する)	
飽和チャンネルの細胞質の平均	
飽和チャンネルの細胞質の標準偏差	
値チャンネルの細胞質の平均	
値チャンネルの標準偏差	
色相チャンネルの細胞質2の平均	
色相チャンネルの細胞質2の標準偏差	
細胞質2の領域	
細胞質2の周長	
細胞質2の形状の因子()	
細胞質2の密集度()	
細胞質2の凸閉包	
飽和チャンネルの細胞質2の平均	
飽和チャンネルの細胞質2の標準偏差	
値チャンネルの細胞質2の平均	
値チャンネルの細胞質2の標準偏差	
色相チャンネルの核の平均	
色相チャンネルの核の標準偏差	
核の領域	
核の周長	
核の形状の因子()	
核の密集度	
核の凸閉包	
飽和チャンネルの核の平均	
飽和チャンネルの核の標準偏差	
値チャンネルの核の平均	
値チャンネルの核の標準偏差	
細胞の領域の合計	
細胞の周長の合計	
細胞の形状の因子	
細胞の密集度	
細胞のフォーカスの計量(ひいては細胞の特徴に関連させるフレームのフォーカスの質に関連する)	
細胞内の核の数	

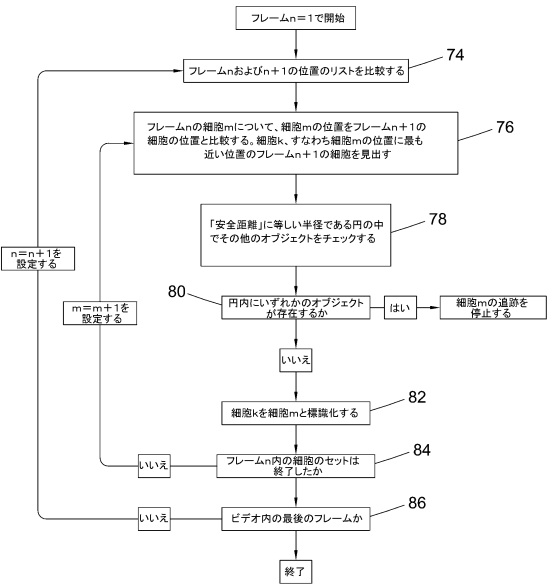
【図 5】

	フレーム1	フレーム2	フレーム3	----
リンパ球	90%	85%	5%	----
単球	5%	12%	90%	----
好酸球	1%	1%	2%	----
・	・	・	・	
・	・	・	・	
・	・	・	・	

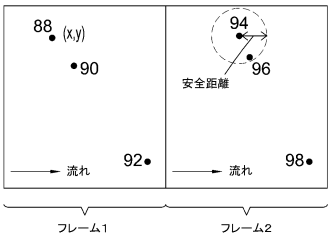
【図 6】



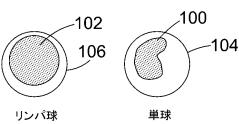
【図 7】



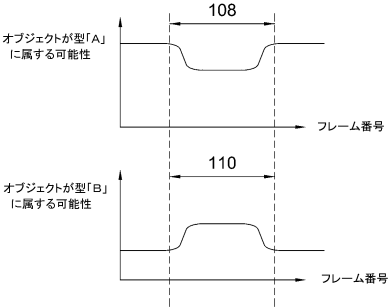
【図 8】



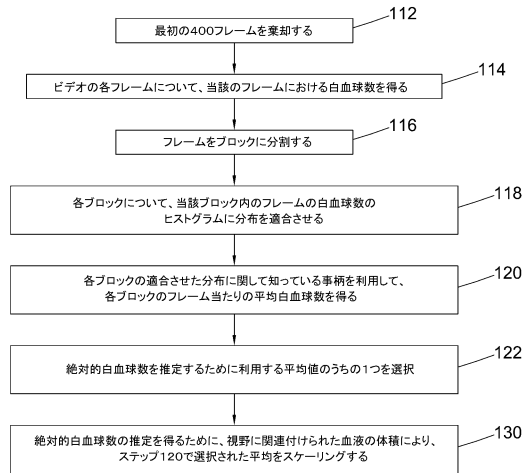
【図 9】



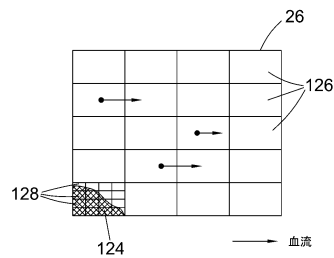
【図 10】



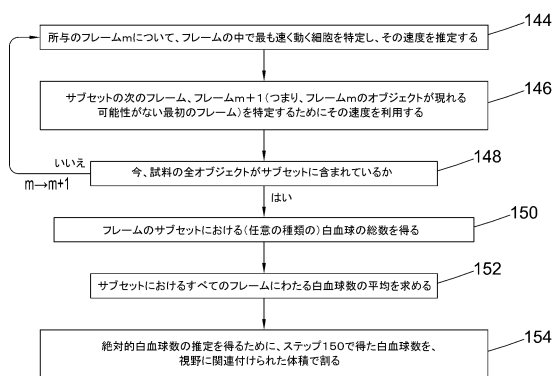
【図 1 1】



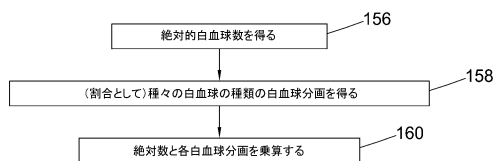
【図 1 2】



【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6 a】

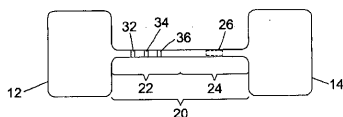


Fig. 16a

【図 1 3】

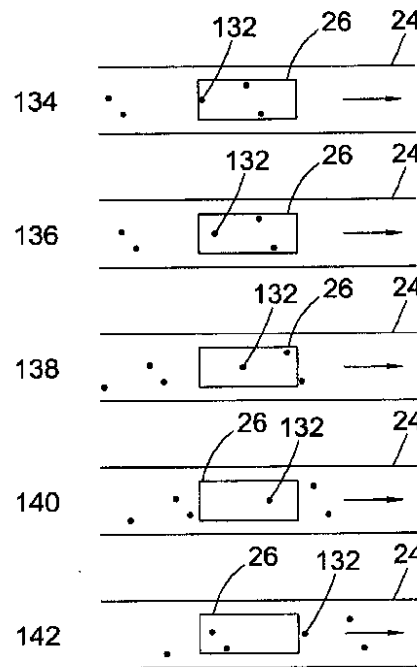
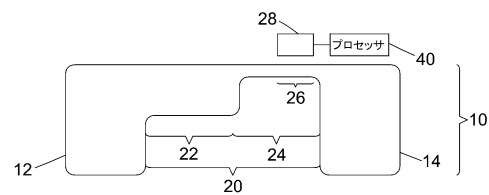
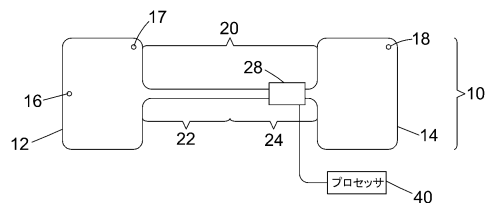


Fig. 13

【図 1 6 b】



【図 1 6 c】



【図 1 7】

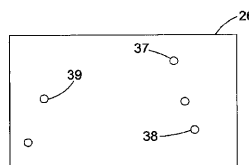
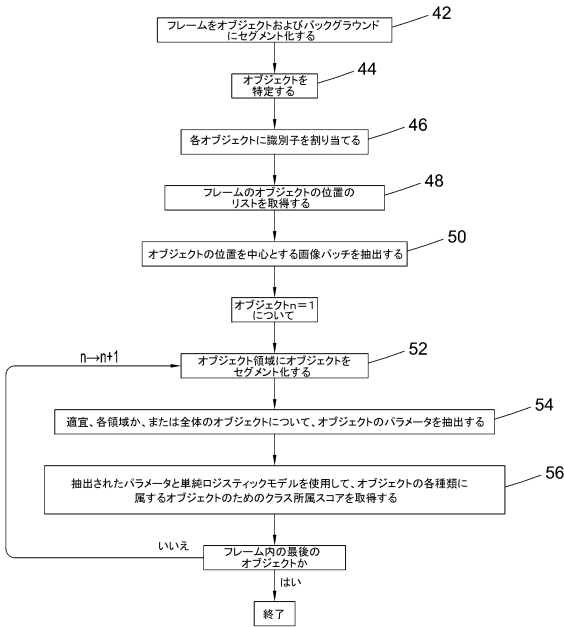


Fig. 17

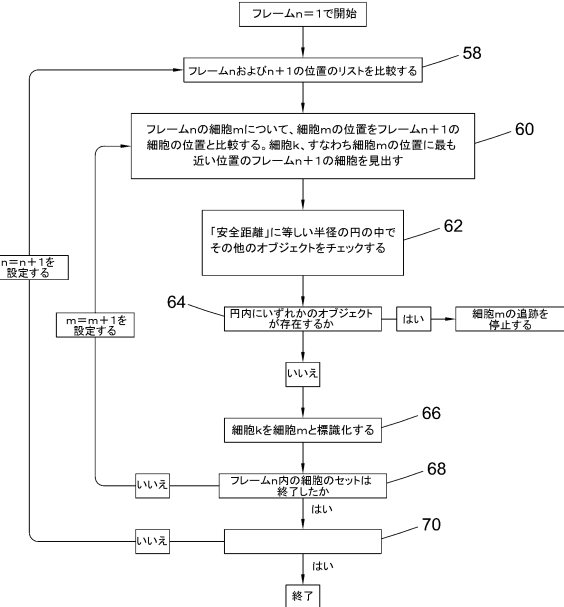
【図 18】



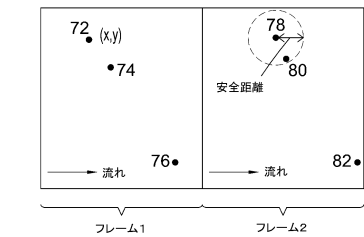
【図 19】

オブジェクトのパラメータ	
色相チャンネルの細胞質の平均	
色相チャンネルの細胞質の標準偏差	
細胞質の領域	
細胞質の周長	
細胞質の形状の因子(細胞質の形に関連する)	
細胞質の密集度(細胞質の形に関連する)	
細胞質の凸閉包(細胞質の凸状に関連する)	
飽和チャンネルの細胞質の平均	
飽和チャンネルの細胞質の標準偏差	
値チャンネルの細胞質の平均	
値チャンネルの標準偏差	
色相チャンネルの細胞質2の平均	
色相チャンネルの細胞質2の標準偏差	
細胞質2の領域	
細胞質2の周長	
細胞質2の形状の因子()	
細胞質2の密集度()	
細胞質2の凸閉包	
飽和チャンネルの細胞質2の平均	
飽和チャンネルの細胞質2の標準偏差	
値チャンネルの細胞質2の平均	
値チャンネルの細胞質2の標準偏差	
色相チャンネルの核の平均	
色相チャンネルの核の標準偏差	
核の領域	
核の周長	
核の形状の因子()	
核の密集度	
核の凸閉包	
飽和チャンネルの核の平均	
飽和チャンネルの核の標準偏差	
値チャンネルの核の平均	
値チャンネルの核の標準偏差	
細胞の領域の合計	
細胞の周長の合計	
細胞の形状の因子	
細胞の密集度	
細胞のフォーカスの計量(ひいては細胞の特徴に関連させるフレームのフォーカスの質に関連する)	
細胞内の核の数	

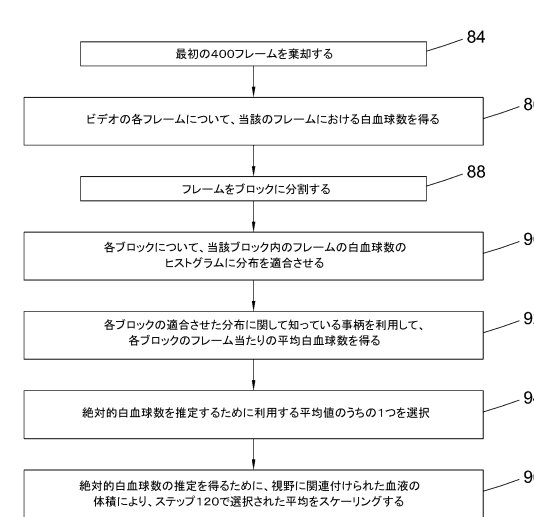
【図 20】



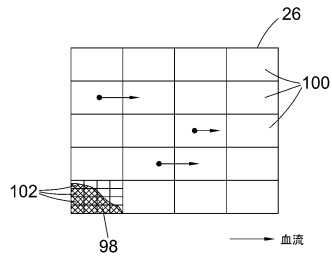
【図 21】



【図 22】



【図 2 3】



【図 2 4】

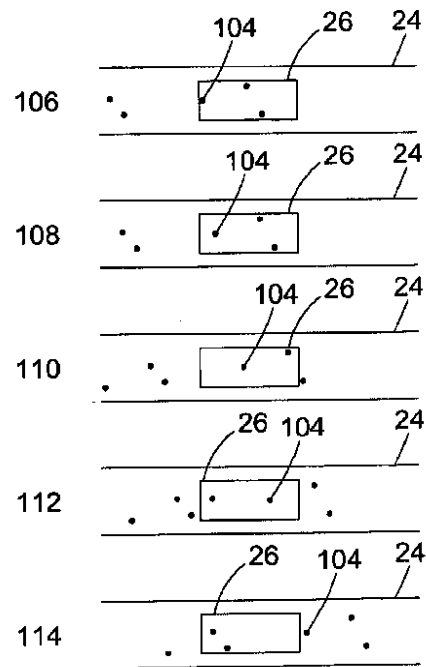
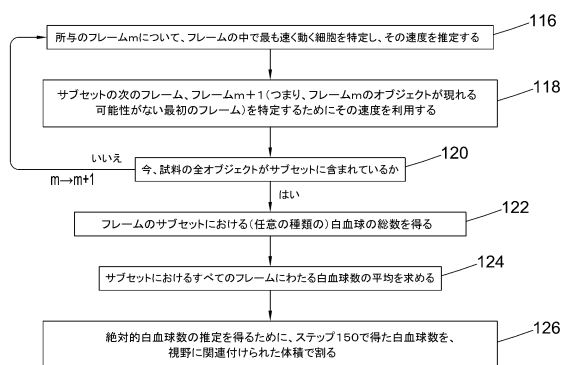


Fig. 24

【図 2 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 マニユエル デ オリヴェイラ ガルシア ダ フォンセカ、ジョアオ
ポルトガル国 アザンブジャ ピー2050-360、カサイス デ バイショ、クインタ ダ
ナセンテ
- (72)発明者 ド ロサリオ マガルヘース、アンドレ
ポルトガル国 カパリカ ピー2820-332、ルア ドス テレフォNZ ナンバー 16
- (72)発明者 ペドロ サントス マンソ コルテレーアル、ホセ
ポルトガル国 リスボン ピー1500-087、627 4エフ、エストラダ デ ベンフィ
カ
- (72)発明者 カベカ、リカルド マニユエル マルケス カレイロ
ポルトガル国 リスボン 1170-023、7-アール/シー ディート、プラカ アニセト
ド ロサリオ

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 国際公開第2012/060163 (WO, A1)
国際公開第2014/146061 (WO, A1)
特開平05-296915 (JP, A)
特表2011-503551 (JP, A)
特開2013-015357 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
G01N 15/00