

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5631999号
(P5631999)

(45) 発行日 平成26年11月26日 (2014.11.26)

(24) 登録日 平成26年10月17日 (2014.10.17)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 6 T 11/60 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M
	GO 6 T 11/60 1 2 O A

請求項の数 10 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2012-530846 (P2012-530846)	(73) 特許権者	390041542
(86) (22) 出願日	平成22年9月29日 (2010. 9. 29)		ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ
(65) 公表番号	特表2013-506129 (P2013-506129A)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3
(43) 公表日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)		4 5、スケネクタデイ、リバーロード、1
(86) 国際出願番号	PCT/SE2010/051046		番
(87) 国際公開番号	W02011/040872	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成23年4月7日 (2011. 4. 7)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成25年9月24日 (2013. 9. 24)	(74) 代理人	100105588
(31) 優先権主張番号	12/569, 396		弁理士 小倉 博
(32) 優先日	平成21年9月29日 (2009. 9. 29)	(74) 代理人	100129779
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 黒川 俊久
		(74) 代理人	100113974
			弁理士 田中 拓人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光画像を用いて明視野画像を生成するためのシステム及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛍光画像を用いて生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似した明視野型画像を生成するための方法であって、当該方法が、
 生物学的試料上の所定領域の2以上の蛍光画像をデジタルイメージング装置によって取得する段階、
 前記蛍光画像を明視野色空間にマッピングする段階、及び
 明視野型画像を生成する段階
 を含んでおり、
 マッピング段階が、
 生物学的試料の所定領域の明視野画像を取得する段階と、
 少なくとも部分的には特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を用いて明視野画像及び2以上の蛍光画像の画像データを解析することで、2以上の蛍光画像を明視野色空間に変換するためのマッピングパラメータを生成する段階と、
 前記マッピングパラメータを2以上の蛍光画像に適用する段階と
 を含んでいて、マッピングパラメータを生成する段階が、次式の線形推定モデルを使用することを含んでいる、方法。

【数 1】

$$\hat{A} = \arg \min_A (HE - A \cdot FL)^2$$

(式中、 \hat{A} は推定マッピングパラメーターであり、HEはH&E画像の色チャンネルにおける強度値を表し、FLは蛍光画像の2以上の色チャンネルの強度値である。)

【請求項 2】

明視野型画像が、赤、緑及び青の3チャンネル色空間を有するH&E型画像に対応している、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

2以上の蛍光画像のうち、少なくとも1つの画像が自己蛍光性のものである、請求項1又は請求項2記載の方法。

【請求項 4】

明視野画像を取得する段階が、生物学的試料をヘマトキシリン及びエオシンで順次に染色してH&E型画像を生成する段階を含む、請求項1乃至請求項3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

特徴ベース情報が、核、上皮及び間質からなる群から選択される1以上の特徴を含む、請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項 6】

さらに、同一の生物学的試料又は異なる生物学的試料に由来する第2の所定領域の2以上の蛍光画像にマッピングパラメーターを適用する段階を含む、請求項1乃至請求項5のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

さらに、前記明視野型画像を用いて定量解析を行う段階を含む、請求項1乃至請求項6のいずれか1項記載の方法。

【請求項 8】

定量解析段階が、分子経路を核、上皮及び間質からなる群から選択される1以上の形態学的構造の関数として識別することを含む、請求項7記載の方法。

30

【請求項 9】

蛍光画像を用いて生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似した明視野型画像を生成するための画像解析システムであって、当該画像解析システムが、生物学的試料上の所定領域の2以上の蛍光画像を取得するのに適合したデジタルイメージング装置、及びマッピングパラメーターを適用して2以上の蛍光画像を明視野型画像に変換するのに適合した処理装置を含んでおり、

処理装置がさらに、生物学的試料の所定領域の明視野画像を取得する段階と、少なくとも部分的に明視野画像及び2以上の蛍光画像の特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を解析して2以上の蛍光画像を明視野色空間に変換する段階とによってマッピングパラメーターを計算するように構成されており、解析段階が次式の線形推定モデルを含んでいる、画像解析システム。

40

【数 2】

$$\hat{A} = \arg \min_A (HE - A \cdot FL)^2$$

(式中、 \hat{A} は推定マッピングパラメーターであり、HEはH&E画像の色チャンネルにおける強度値を表し、FLは蛍光画像の2以上の色チャンネルの強度値である。)

【請求項 10】

処理装置がさらに、1以上の以前に分析された生物学的試料からのマッピングパラメーターを記憶するように構成されている、請求項9記載のシステム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、蛍光顕微鏡によって取得された1組のバイオマーカー画像を新しい色空間にマッピングすることで、マッピングされた画像の強度値が明視野モダリティを表す色空間を得るための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)による伝統的な組織学的染色では、好塩基性色素ヘマトキシリン(H)を用いて細胞核が青色に染色され、好酸性色素エオシン(E)を対比染色剤として用いて細胞質、結合組織(コラーゲン)、筋繊維、結合組織及び赤血球が染色される。エオシンは組織中の様々な細胞構成要素と相互作用し、エオシンが結合する分子の帯電性に基づいて様々な色合いのピンク色を生じる。これらの細胞構成要素は、分子マーカー(色素及び抗体)を蛍光色素と共に用いて択一的に標識することができる。例えば、細胞核はDAPI(DNAと特異的に結合する蛍光色素)で染色できる一方、検査対象分子が直接にコンジュゲートされた抗体或いは一次又は二次増幅検出によって標的化される場合には、組織中の他の領域を免疫蛍光的に染色できる。赤血球(RBC)のような若干の構造に関しては、1組のフィルターによって捕捉された組織自己蛍光を検出のために使用できる。蛍光イメージングモダリティは、これらの組織構造の各々を個別に捕捉し、したがって正確な局在化及び定量化を可能にするという利点を有する。

20

30

【0003】

しかし、蛍光画像に基づく組織病理学的診断は普通のやり方でない。これは、蛍光画像が病理学者による診断のために不可欠な構造的及び形態学的細部を提供しないからである。明視野H&E染色技法も好まれることが多いが、これは数十年間にわたって病理学検査室に集められたこれらの技法に関する大量の知識が存在するからである。

【0004】

蛍光画像をH&Eのような明視野画像に類似した色ドメインに変換する方法は、病理学者が同じ1組の蛍光画像に関して定量解析及び病理学的診断の両方を実施できるようにするために望ましい。

40

【発明の概要】

【0005】

上述の通り、以前には蛍光マーカーを単独で使用して核、上皮及び間質を識別することで、細胞コンパートメントに関する情報が得られていた。本方法は蛍光マーカーの形態学機能を蛍光バイオマーカーの機能と組み合わせるものであり、部分的に細胞形態学及び生物学的経路に基づいて組織中のタンパク質及び疾患経路の発現を確認するために使用される。開示される本発明は、蛍光顕微鏡によって取得された1組のバイオマーカー画像及び自己蛍光画像を新しい色空間にマッピングすることで、マッピングされた画像の強度値がH&E染色のような明視野モダリティを表す色空間を得るための方法を記載している。

【0006】

50

一実施形態では、蛍光画像を用いて生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似した明視野型画像を生成するための方法が提供される。かかる方法は、生物学的試料上の所定領域の2以上の蛍光画像を取得する段階、前記蛍光画像を明視野色空間にマッピングする段階、及び明視野画像を生成する段階を含んでいる。

【0007】

別の実施形態では、蛍光画像を用いて生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似した明視野型画像を生成するための画像解析システムが提供される。かかるシステムは、生物学的試料上の所定領域の2以上の蛍光画像を取得するのに適合したデジタルイメージング装置、及びマッピングパラメータを適用して2以上の蛍光画像を明視野型画像に変換するのに適合した処理装置を含んでいる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

本発明の上記その他の特徴、態様及び利点は、添付の図面を参照しながら以下の詳細な説明を読んだ場合に一層よく理解されよう。添付の図面中では、図面全体を通じて類似の部分は同一の符号で示されている。

【図1】図1は、結腸組織試料(試料A)の5つの蛍光画像の単色実施形態及び対応する生成H&E型画像を示している。

【図2】図2は、結腸組織試料(試料B)の5つの蛍光画像の単色実施形態及び対応する生成H&E型画像を示している。

【図3】図3は、H&E染色結腸組織の3チャンネル(赤、緑、青)色画像の単色実施形態を蛍光画像から生成されたH&E型画像と比較して示している。

【発明を実施するための形態】

【0009】

特許請求される発明の主題を一層明確で簡潔に記載するため、以下の説明及び添付の特許請求の範囲中で使用される特定の用語に関して以下に定義を示す。

【0010】

本明細書中で使用する「抗体」という用語は、別の分子と特異的に結合し、したがってその特定の空間構成及び極性構成と相補的なものと定義される免疫グロブリンをいう。抗体はモノクローナルでもポリクローナルでもよく、宿主の免疫化及び血清(ポリクローナル)の回収のような当技術分野で公知の技法により、或いは連続したハイブリッド細胞株を作製して分泌されるタンパク質(モノクローナル)を回収することにより、或いは少なくとも天然抗体の特異的結合のために必要なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列又はその突然変異バージョンをクローニングして発現させることによって製造できる。抗体は完全な免疫グロブリン又はそのフラグメントを含み得ると共に、免疫グロブリンはIgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3及びIgMのような様々なクラス及びアイソタイプを包含する。機能性抗体フラグメントは、完全長抗体に類似した親和性で結合を保持できる抗体部分(例えば、Fab、Fv及びF(ab')₂又はFab')を含み得る。さらに、特定の分子に対する結合親和性の実質的に維持される限り、免疫グロブリン又はそのフラグメントの凝集体、ポリマー及びコンジュゲートを必要に応じて使用することができる。

【0011】

本明細書中で使用する「結合剤」という用語は、生物学的試料中の1種以上の標的と結合し得る分子をいう。結合剤は標的と特異的に結合し得る。好適な結合剤は、天然又は修飾ペプチド、タンパク質(例えば、抗体、アフィボディ又はアプタマー)、核酸(例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNA又はアプタマー)、多糖(例えば、レクチン、糖類)、脂質、酵素、酵素基質又は阻害剤、リガンド、受容体、抗原或いはハプテンの1以上を含み得る。好適な結合剤は、分析すべき試料及び検出のために利用できる標的に応じて選択できる。例えば、試料中の標的がリガンドを含み、結合剤が受容体を含むか、或いは標的が受容体を含み、結合剤がリガンドを含むことができる。同様に、標的が抗原を含み、結合剤が抗体又は抗体フラグメントを含むことができ、或いはその逆も可能である。若

10

20

30

40

50

干の実施形態では、標的が核酸を含み、結合剤が相補的な核酸を含むことができる。若干の実施形態では、標的及び結合剤の両方が互いに結合し得るタンパク質を含むことができる。

【 0 0 1 2 】

本明細書中で使用する「生物学的試料」という用語は、インビボ又はインビトロで得られた生物学的組織又は液体由来の試料を含む、生物学的被験体から得られた試料をいう。かかる試料は、特に限定されないが、ヒトを含む哺乳動物から分離された体液（例えば、血液、血漿、血清又は尿）、器官、組織、破片及び細胞であり得る。生物学的試料はまた、組織を含む生物学的試料の切片（例えば、器官又は組織の断片）も含み得る。生物学的試料はまた、生物学的試料からの抽出物、例えば生物学的液体（例えば、血液又は尿）からの抗原も含み得る。

10

【 0 0 1 3 】

生物学的試料は、原核生物由来のものでも真核生物（例えば、昆虫、原生動物、鳥類、魚類、爬虫類）由来のものでもよい。若干の実施形態では、生物学的試料は哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウシ、イヌ、ロバ、モルモット又はウサギ）由来のものである。ある種の実施形態では、生物学的試料は霊長類（例えば、チンパンジー又はヒト）由来のものである。

【 0 0 1 4 】

本明細書中で使用する「発蛍光団」又は「蛍光シグナルジェネレーター」という用語は、特定波長の光への暴露によって励起された場合に異なる波長の光を発生する化合物をいう。発蛍光団はその発光プロファイル又は「色」を用いて記述できる。緑色の発蛍光団（例えば、Cy 3、FITC及びOregon Green）は、一般に515～540ナノメートルの範囲内の波長での発光によって特徴づけることができる。赤色の発蛍光団（例えば、Texas Red、Cy 5及びテトラメチルローダミン）は、一般に590～690ナノメートルの範囲内の波長での発光によって特徴づけることができる。発蛍光団の例には、特に限定されないが、4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、アクリジン、アクリジン及びアクリジンイソチオシアネートの誘導体、5 - (2' - アミノエチル) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)、4 - アミノ - N - [3 - ビニルスルホニル] フェニル] ナフタルイミド - 3, 5 - ジスルホネート (Lucifer Yellow VS)、N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル) マレイミド、アントラニルアミド、Brilliant Yellow、クマリン、クマリン誘導体、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC、Coumarin 120)、7 - アミノ - トリフルオロメチルクマリン (Coumaran 151)、シアノシン、4', 6 - ジアミニジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI)、5', 5'' - ジブロモピロガロール - スルホンフタレイン (Bromopyrogallol Red)、7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン、4, 4' - ジイソチオシアナトジヒドロスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、5 - [ジメチルアミノ] ナフタレン - 1 - スルホニルクロリド (DNS、ダンシルクロリド)、エオシン、エオシン誘導体（例えば、エオシンイソチオシアネート）、エリスロシン、エリスロシン誘導体（例えば、エリスロシン B 及びエリスロシンイソチオシアネート）、エチジウム、フルオレセイン及び誘導体（例えば、5 - カルボキシフルオレセイン (FAM)、5 - (4, 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル) アミノフルオレセイン (DTAF)、2', 7' - ジメトキシ - 4', 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 及び QFITC (XRITC))、フルオレスカミン誘導体（アミンと反応して蛍光を発する）、IR 144、IR 1446、マラカイトグリーンイソチオシアネート、4 - メチルウンベリフェロン、o - クレゾールフタレイン、ニトロチロシン、パラロサニリン、Phenol Red、B - フィコエリトリン、o - フタルジアルデヒド誘導体（アミンと反応して蛍光を発する）、ピレン及び誘導体（例えば、ピレン、ピレンブチレート及びスクシンイミジル 1 - ピレンブチ

20

30

40

50

レート)、Reactive Red 4 (Cibacron, RTM, Brilliant Red 3B-A)、ローダミン及び誘導体(例えば、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシローダミン(R6G)、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン(Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101及びスルホローダミン101のスルホニルクロリド誘導体(Texas Red)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、テトラメチルローダミン及びテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC))、リボフラビン、ロゾール酸及びランタニドキレート誘導体、量子ドット、シアニン類、ピレリウム色素並びにスクアリン類がある。

10

【0015】

本明細書中で使用する「インサイチュ」という用語は、一般に、元の場所で、例えばインタクトな器官又は組織で、或いは器官又は組織の代表的な部分で起こる事象をいう。若干の実施形態では、標的のインサイチュ分析は、生物、器官、組織試料又は細胞培養物を含む各種の源に由来する細胞に関して実施することができる。インサイチュ分析は、標的がその起源部位から取り除かれた場合に失われることがある文脈情報を提供する。したがって、標的のインサイチュ分析とは、細胞膜が完全にインタクトであっても部分的にインタクトであっても標的に結合したプローブが細胞内に残存する場合、全細胞又は組織試料中にある標的結合プローブの分析を述べている。さらに、本明細書中に開示される方法を使用すれば、固定又は未固定の細胞又は組織試料中において標的をインサイチュで分析で

20

【0016】

本明細書中で使用する「プローブ」という用語は、結合剤及びシグナルジェネレーター又は酵素のような標識を有する薬剤をいう。若干の実施形態では、結合剤及び標識(シグナルジェネレーター又は酵素)は単一の実在物において実現される。結合剤及び標識は、直接に(例えば、結合剤中に組み込まれた蛍光分子を介して)又は間接に(例えば、切断部位を含み得るリンカーを介して)結合し、そして単一の段階で生物学的試料に適用することができる。別の実施形態では、結合剤及び標識は別々の実在物(例えば、標的を結合し得る一次抗体及び一次抗体を結合し得る酵素又はシグナルジェネレーター標識二次抗体)において実現される。結合剤及び標識(シグナルジェネレーター又は酵素)が別々の実在物である場合、これらは単一の段階又は複数の段階で生物学的試料に適用できる。本明細書中で使用する「蛍光プローブ」という用語は、蛍光シグナルジェネレーターと結合した結合剤を有する薬剤をいう。

30

【0017】

本明細書中で使用する「シグナルジェネレーター」という用語は、1以上の検出技法(例えば、分光測定、比色定量、分光分析又は目視検査)を用いて検出可能なシグナルを生じ得る分子をいう。検出可能なシグナルの好適な例としては、光学信号、電気信号及び放射性信号が挙げられる。シグナルジェネレーターの例には、発色団、発蛍光団、ラマン活性タグ又は放射性標識の1以上がある。上述の通り、プローブに関して言えば、若干の実施形態では、シグナルジェネレーター及び結合剤は単一の実在物(例えば、蛍光標識を有する標的結合タンパク質)中に存在し得る。別法として、結合剤及びシグナルジェネレーターは別々の実在物(例えば、受容体タンパク質及びその特定の受容体タンパク質に対する標識抗体)であってよく、これらは試料への導入前又は導入後に互いに結合する。

40

【0018】

本明細書中で使用する「固体担体」という用語は、生物学的試料中に存在する標的を固定化し、次いで本明細書中に開示される方法によって検出できる物品をいう。標的は、物理吸着により、共有結合形成により、又はこれらの組合せによって固体担体上に固定化できる。固体担体としては、ポリマー、ガラス又は金属材料が挙げられる。固体担体の例には、膜、マイクロタイタープレート、ビーズ、フィルター、テストストリップ、スライド、カバースリップ及び試験管がある。

50

【 0 0 1 9 】

本明細書中で使用する「特異的結合」という用語は、他の分子の認識が実質的に低いことに比べ、2種の分子の一方が他方を特異的に認識することをいう。かかる分子は、静電相互作用、水素結合又は疎水的相互作用の1以上から生じる2種の分子間の特異的認識をもたらす領域をその表面上又はキャビティ内に有し得る。特異的結合の例には、特に限定されないが、抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチド相互作用などがある。若干の実施形態では、結合剤分子は周囲条件（例えば、約6～約8のpH及び約0～約37の範囲内の温度）下で標的に対して約 10^5M^{-1} 以上の固有平衡会合定数（ K_A ）を有し得る。

【 0 0 2 0 】

本明細書中で使用する「標的」という用語は、生物学的試料中に存在する場合に検出できる生物学的試料の成分をいう。標的は、それに対する天然の特異的結合剤（例えば、抗体）が存在するか、或いはそれに対する特異的結合剤（例えば、小分子結合剤又はアプタマー）を製造できる任意の物質であり得る。一般に、結合剤は標的の1以上の異なる化学的部分又は標的の三次元構造成分（例えば、ペプチドの折りたたみから生じる3D構造）を介して標的に結合し得る。標的は、天然又は修飾ペプチド、タンパク質（例えば、抗体、アフィボディ又はアプタマー）、核酸（例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNA又はアプタマー）、多糖（例えば、レクチン又は糖類）、脂質、酵素、酵素基質、リガンド、レセプター、抗原及びハプテンの1以上を含み得る。若干の実施形態では、標的はタンパク質又は核酸を含み得る。

【 0 0 2 1 】

本明細書中で使用する「仮想染色画像」（VSI）という用語は、明視野染色プロトコルから得られる画像をシミュレートする生物学的試料の画像をいう。かかる画像は、明視野画像と同様なコントラスト、強度及び着色を有している。これにより、特に限定されないが核、上皮、間質又は任意のタイプの細胞外マトリックス材料を含む生物学的試料中の特徴を、まるで明視野染色プロトコルを生物学的試料に対して直接に使用したかのように特徴づけることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明は、一般に、検体検出、組織化学、免疫組織化学又は免疫蛍光のような分析、診断又は予後診断用途に適用し得る方法に関する実施形態を含んでいる。若干の実施形態では、本明細書中に開示される方法は、特に組織化学、免疫染色、免疫組織化学、免疫アッセイ又は免疫蛍光用途に適用し得る。若干の実施形態では、本明細書中に開示される方法は、特に免疫プロットング技法、例えばウェスタンブロット又は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）のような免疫アッセイに適用し得る。

【 0 0 2 3 】

生物学的試料中の複数の標的を順次に染色して検出するための方法は、2007年9月28日に提出された、“Sequential Analysis of Biological Samples”と称する米国特許出願第11/864085号に一層詳しく記載されており、その開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。試料中の標的を共局在化するための方法は、2007年3月15日に提出された、“System and Methods for Analyzing Images of Tissue Samples”と称する米国特許出願第11/686649号、2006年8月7日に提出された、“System and Method for Co-Registering Multi-Channel Images of a Tissue Micro Array”と称する米国特許出願第11/500028号、2006年11月30日に提出された、“System and Methods for Scoring Images of a Tissue Micro Array”と称する米国特許出願第11/606582号、及び2007年2月28日に提出された、“Automated Segmentation of Image Structures”と称する米国特許出願第11/680063号に記載されており、これらの開示内容は援用によって本明細書の内容の一部

をなす。

【 0 0 2 4 】

蛍光画像を擬似明視野画像に変換するための方法は公知である。しかし、これらの方法では通例、特定の色空間（波長）を各蛍光色素に再割当てすることで蛍光画像が明視野空間に再着色される。これらの方法は、蛍光画像を、生物学的試料を規定の明視野染色プロトコル（例えば H & E）に付したならば得られるであろう生物学的試料の画像を表す画像に転換するのではない。それとは対照的に、本明細書中に記載される発明は、まるで画像が規定の明視野染色プロトコルから直接に得られたかのようにして生物学的試料の構造的特徴及び細部が識別される明視野画像を蛍光画像から生み出す。明視野染色プロトコルに類似した画像は、仮想染色画像（V S I）と呼ばれることがある。

10

【 0 0 2 5 】

開示される本発明は、蛍光顕微鏡によって取得された 1 組のバイオマーカー画像を新しい色空間にマッピングすることで、マッピングされた画像の強度値が明視野モダリティを表し、それを用いて V S I を生成できる色空間を得るための方法を記載している。本方法は、生物学的試料上の 2 以上の蛍光画像及び明視野画像中の対応点から取得されたデータを使用することを含んでいる。

【 0 0 2 6 】

【 数 1 】

かかるデータは、推定されたマッピングパラメーター \hat{A} を用いて蛍光画像を明視野色空間にマッピングする未知の強度変換を推定するために使用される。

20

明視野色空間が H & E 形態学的染色剤を用いて得られる実施形態では、

【 0 0 2 7 】

【 数 2 】

\hat{A} は次式によって定義できる。

$$\hat{A} = \arg \min_A (HE - A \cdot FL)^2$$

30

式中、A は未知のマッピングパラメーターであり、H E 及び F L はそれぞれ対応する H & E ピクセル及び蛍光ピクセルの既知集合を記憶する行列を表す。さらに詳しくは、H E は H & E 画像の色チャンネル中の強度値を表し、F L は蛍光画像色空間内の対応点における蛍光マーカー又は自己蛍光の 1 以上の強度値である。推定マッピングパラメーターは、特に限定されないが、普通の線形最小二乗法（O L S）、一般化最小二乗法（G L S）、反復再重み付き最小二乗法（I R L S）又は直交推定法を含む各種の回帰分析モデルを用いて計算できる。

【 0 0 2 8 】

線形最小二乗推定を使用する実施形態では、

【 0 0 2 9 】

【 数 3 】

\hat{A} はさらに次式によって計算できる。

$$\hat{A} = (HE \cdot FL^T)(FL \cdot FL^T)^{-1}$$

40

式中、 FL^T は F L 行列の転置であり、 (-1) は行列の反転を表す。

【 0 0 3 0 】

マッピングパラメーターを計算するために使用した、蛍光画像及び明細書画像中の点の対応は、2 つの方法（即ち、強度ベース及び特徴ベースの方法）を用いて確認できる。

【 0 0 3 1 】

50

特徴ベースの方法では、蛍光画像及び明視野画像の両方に関して、核、上皮、間質又は任意のタイプの細胞外マトリックス材料の画像が取得される。特徴ベースの構造は、手動プロセスを用いて又は自動的に選択すればよい。両モダリティからの画像中において、対応する構造が選択される。蛍光画像に関しては、所定のバイオマーカーに合わせて調整された適当な励起エネルギー源及び放射光を収集するのに適したフィルターと共に蛍光顕微鏡を使用して画像を捕捉できる。同様にして、複数のバイオマーカーを、顕微鏡下で試料を移動させることなく同時に、又は順次にイメージングすることができる。上述の通り、異なるオマーカーに対しては励起波長及びフィルターを変更することができる。特定の実施形態では、明視野画像及び蛍光画像の両方を取得できるように顕微鏡を設計することができる。かかる顕微鏡の一例は、較正された複数の光路及び複数のカメラを含み得る。その場合、試料の明視野画像を得ることができ、次いでこれを赤（R）、緑（G）及び青（B）チャンネルにセグメント化し、特徴ベースの構造の色及び強度を測定できる。

10

【0032】

強度ベースの方法では、電子的、磁氣的、光学的又は機械的センサーを用いて顕微鏡下の試料領域の位置を制御することで、次の画像取得のために試料領域を繰り返し同じ位置に近接して配置することができる。強度ベースの位置合わせは、一般に、広範なクラスのバイオマーカーに適用できる。一般に、基体（例えば、特に限定されないが、TMA、スライド、ウェル又はグリッド）上に固定されるなどのやり方で提供される生物学的試料は、分子バイオマーカーで標識され、蛍光型顕微鏡によってイメージングされる。

20

【0033】

一実施形態では、抗体又はタンパク質に結合された蛍光色素のような各種の分子バイオマーカーが使用できる。その場合、所定のバイオマーカーに合わせて調整された励起エネルギー源を使用すると共に、放射光を最適に収集するのに適合した様々なフィルターを使用して、試料が蛍光顕微鏡下でイメージングされる。複数のバイオマーカーを、顕微鏡下で検体を移動させることなく同時に、又は順次にイメージングすることができる。異なるバイオマーカーに対しては、励起波長及びフィルターを変更することができる。バイオマーカーとしては、特に限定されないが、下記のリストのマーカーをに挙げることができる。ここには、各マーカーの1以上の機能が簡単に述べられているが、必ずしもすべての機能が述べられているわけではない。

Her2/neu：モノクローナル抗体による乳癌及び胃癌療法において過剰発現され、腫瘍増殖を遅らせる上皮増殖因子。

30

EGF-R/erbB：上皮増殖因子受容体。

ER：核中に位置する、ある種の乳癌腫瘍の増殖に必要なエストロゲン受容体であって、陽性患者におけるエストロゲン療法を決定するためISHで検出される。

PR：DNAに結合するホルモンであるプロゲステロン受容体。

AR：アンドロゲン依存腫瘍増殖に関与するアンドロゲン受容体。

p53：DNA損傷を感知する腫瘍抑制遺伝子であって、50%のヒト癌で不活性化される。

- カテニン：細胞膜から核に転位する癌の腫瘍遺伝子であって、細胞付着において及び潜在遺伝子調節タンパク質として機能する。

40

ホスホ - - カテニン： - カテニンのリン酸化体であって、サイトゾル中で分解して核に転位しない。

GSK3：Wnt経路中のグリコーゲンシンターゼキナーゼ - 3 タンパク質であって、 - カテニンをリン酸化し、プロトソーム中で急速に分解するようにホスホ - - カテニンをマークする。

PKC：メディエーターGタンパク質結合剤受容体。

NF：核に転位した場合の炎症に対する核因子カッパBマーカー。

Bcl-2：アポトーシス阻害剤として作用するB細胞リンパ腫の腫瘍遺伝子2。

サイクリンD：細胞周期調節。

VEGF：血管形成に関係する血管内皮増殖因子。

50

E - カドヘリン：上皮細胞で発現される細胞 - 細胞相互作用分子であって、その機能は上皮癌で失われる。

c - m e t：チロシンキナーゼ受容体。

【 0 0 3 4 】

この段階には、コンパートメント情報を担持する 1 以上の追加蛍光形態学的マーカーを含めることもできる。このマーカーは、次の段階と共通の情報を担持するように選択され、順次染色を伴う場合には画像を位置合わせするために使用される。その場合、生物学的試料の領域が明視野色空間で見える 1 以上の形態学的マーカー（例えば、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）色素）で再標識され、そして再びイメージングされる。

【 0 0 3 5 】

若干の実施形態では、形態学的マーカーとしては、特に限定されないが以下のものが挙げられる。

ケラチン：上皮細胞に対するマーカー。

P a n - カドヘリン：細胞膜に対するマーカー。

平滑筋アクチン：筋肉に対するマーカー。

D A P I：核に対するマーカー。

ヘマトキシリン：D N A に対するマーカー（青色染料）。

エオシン：p H に依存する、細胞質に対するマーカー（赤色染料）。

【 0 0 3 6 】

形態学的マーカーの一部は明視野顕微鏡を用いてイメージングすることができ、一部は蛍光型顕微鏡を用いてイメージングすることができる。いずれの場合にも、形態学的マーカーは前の段階と共通の情報を有するように選択される。例えば、前の段階で核をイメージングするために D A P I を使用した場合、次の段階では明視野顕微鏡下で核をイメージングするためにヘマトキシリンを使用することができる。両者とも同一のコンパートメントを染色するので、画像位置合わせ技法によって画像を整列させることができる。核染色剤である D A P I を追加の蛍光形態学的マーカーとして使用することで、明視野画像中にヘマトキシリンで染色された核を蛍光画像と位置合わせすることができる。ハードウェア及びソフトウェア位置合わせ技法の両方を用いて試料領域の画像が重ね合わされ、情報が記憶される。それによる技術的効果は、位置合わせなどの方法で試料領域のマルチチャンネル画像を生成することである。

【 0 0 3 7 】

したがって強度ベースの方法は、順次イメージング及び共位置合わせ技法を用いて同じ試料から分子マーカー及び形態学的マーカーの両方をイメージングすることができる。続いて、蛍光画像及び明視野画像の両方について、生物学的試料の領域上の所定点に関するピクセル強度を位置合わせして比較することができる。特徴ベースの方法と同じく、明視野画像は赤（R）、緑（G）及び青（B）チャンネルにセグメント化される。

【 0 0 3 8 】

強度ベース又は特徴ベースの方法のいずれにおいても、

【 0 0 3 9 】

【 数 4 】

蛍光画像から明視野色空間への変換には、線形変換式中で推定マッピングパラメータ \hat{A} が使用される。線形変換式は、H & E 色素を使用する場合には $HE = \hat{A} \cdot FL$ として表すことができ、或いは行列表記で下記のように表すことができる。

$$\begin{bmatrix} HE_{RED} \\ HE_{GREEN} \\ HE_{BLUE} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{1,1} & a_{1,2} & \cdots & a_{1,N} & a_{1,N+1} \\ a_{2,1} & a_{2,2} & \cdots & a_{2,N} & a_{2,N+1} \\ a_{3,1} & a_{3,2} & \cdots & a_{3,N} & a_{3,N+1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} FL_1 \\ FL_2 \\ \vdots \\ FL_N \\ 1 \end{bmatrix}$$

10

20

30

40

50

式中、「a」は推定する必要がある未知の変換パラメーターを表す。行列表記を使用すれば、明視野画像はRGB色チャンネルにセグメント化され、蛍光チャンネルの数は用途に特有であって、特定のタスクのために必要とされるコンパートメント及びタンパク質結合の数に基づいている。FL行列の最後の列は、マッピングにおいて定数項をモデル化するための一連の1を含んでいる。通常、3種又は4種の蛍光色素を容易に同時に適用できるが、それ以上を使用してもよい。例えば、100の特徴点が存在しかつ蛍光画像が4種のマーカを含む場合、FL行列のサイズは 5×100 であり、行列Aのサイズは 3×5 であり、HE行列のサイズは 3×100 である。

【0040】

ひとたび変換パラメーターが計算されれば、仮想H&Eマッピングを用いて1組の蛍光画像からVSIに変換するために試料の1以上の選択領域を使用することができる。分子バイオマーカーは、明視野画像を用いただけでは見られない機能情報及びコンパートメント情報を有利に提供する。例えば、画像解析アルゴリズムは、病理学者又はオペレーターに明視野モダリティ（H&E）を表す画像強度値を提供しながら試料コンパートメントを分離するために追加されたチャンネルを利用することができる。例えば、H&E染色プロトコルを表すVSIは、血球を赤色に、核を紫色に、結合組織をピンク色に示すであろう。

【0041】

他の実施形態では、ひとたびマッピングパラメーターが推定されれば、変換アルゴリズムを他の蛍光画像に適用してVSIを生成することができる。他の蛍光画像は、同じ生物学的試料の異なる領域からのものであってよい。例えば、生物学的試料の供給源は、新鮮な、凍結された及び/又は保存された器官又は組織試料或いは生検材料或いは吸引物からの固形組織、血液又は任意の血液成分、体液（例えば、脳脊髄液、羊水、腹水又は間質液）、或いは被検体の妊娠又は発生の任意の時点から得られる細胞であり得る。若干の実施形態では、組織試料は初代細胞又は培養細胞或いは細胞株を含み得る。

【0042】

他の実施形態では、VSIを生成するために使用される他の蛍光画像は、異なる生物学的試料からのものであってよい。異なる生物学的試料は、類似機能を有し得る生物学的被検体の組織から得られる類似細胞の集合体を含み得る。ヒト組織の好適な例には、特に限定されないが、（1）上皮、（2）血管、骨及び軟骨を含む結合組織、（3）筋肉組織、並びに（4）神経組織がある。

【0043】

若干の実施形態では、生物学的試料は健常組織試料又は疾患組織試料に由来する組織切片（例えば、結腸、乳房組織、前立腺に由来する組織切片）を含む。組織切片は、組織試料の一部又は一片、例えば、組織試料から切り出された組織又は細胞の薄片を含み得る。若干の実施形態では、組織試料の複数の切片を採取し、分析に供することができる。

【0044】

本明細書中に開示される方法は、生物学及び医学における分析、診断及び治療用途で応用できる。若干の実施形態では、本明細書中に開示される方法は組織化学、特に免疫組織化学で応用できる。本明細書中に開示される方法に従った患者からの細胞又は組織試料の分析は、診断的に（例えば、特定の疾患を有するか、特定の毒素に暴露されたか、或いは特定の治療薬又は臓器移植によく応答している患者を同定するために）及び予後診断的に（例えば、特定の疾患を発症する可能性があるか、特定の治療薬によく応答する可能性があるか、特定の治療薬によく応答する可能性があるか、或いは特定の臓器移植を許容する可能性がある患者を同定するために）使用できる。本明細書中に開示される方法は、同じ生物学的試料からの複数の（例えば、潜在的には無限の数）の標的（例えば、疾患マーカー）の正確で信頼可能な分析を容易にすることができる。

【0045】

特定の実施形態では、生成されるVSIは病理学的診断のために使用でき、本方法はさらに分子マーカーに基づいて疾患を表す1以上の分子経路を同定する段階を含むことがで

10

20

30

40

50

きる。本方法は各種の疾患に関して使用できるものの、本方法が特に適するタイプの一例は、特に限定されないが上皮癌を含む癌である。かかる上皮癌には、特に限定されないが、乳癌、前立腺癌及び結腸癌がある。

【0046】

特定の実施形態では、生成されるV S Iは、核、上皮及び間質からなる群から選択される1以上の形態学的構造の関数として分子経路を同定することを含む定量解析のために使用できる。例えば、染色された蛍光画像をH & E座標系に変換し、一緒に観察することで強化された解析を可能にすることができる。

【0047】

本方法を実施するための画像解析システムは、一般に、蛍光空間及び明視野空間の両方において分子マーカー及び形態学的染色剤で染色されたデジタル画像を少なくとも一時的に記憶する手段、並びに順次染色を伴う場合には1以上の位置合わせを用いて画像を共位置合わせするための処理装置を含んでいる。処理装置はまた、少なくとも部分的に明視野画像及び2以上の蛍光画像の特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を解析してマッピングパラメーターを計算することで、2以上の蛍光画像をV S Iに変換するように構成されている。

【0048】

かかるシステムはさらに、1以上の画像を表示する手段、インタラクティブ・ビューア、バーチャル顕微鏡、及び/又は通信ネットワークを介して1以上の画像を送信する手段を含んでいる。処理装置はまた、少なくとも部分的に形態学的特徴のセグメンテーションに基づいて1以上の画像を互いに重ねることもできる。

【0049】

特定の実施形態では、処理装置はまた、1以上の以前に分析された生物学的試料からのマッピングパラメーターを記憶するように構成されている。これは、変換アルゴリズムを他の蛍光画像に適用してV S Iを生成するための手段を提供する。他の蛍光画像は、同じ生物学的試料の異なる領域からのもの又は異なる生物学的試料からのものであってよい。かかるシステムはまた、ユーザーが数多くの利用可能な変換から選択を行うこと、さらには期待される出力(生成されるV S I)の目視検査に基づいてインタラクティブに変換パラメーターを調整することを可能にする。

【0050】

若干の実施形態では、上述した段階の1以上を自動化し、自動化システムを用いて実施することができる。若干の実施形態では、自動化システムを用いてすべての段階を実施することができる。

【実施例】

【0051】

実施例：結腸組織試料に関するH & E画像の比較

ヒト成体結腸組織試料(Biochain社、T2234090)を、パラフィン中に包埋した組織スライドとして入手した。ヒト成体組織のパラフィン包埋スライドを免疫組織化学プロトコルに付すことで、染色のための前処理を行った。プロトコルは脱パラフィン化、再水和、インキュベーション及び洗浄を含んでいた。脱パラフィン化は、頻繁にかきまぜながらスライドをHistoclear(又はトルエン)で10分間洗浄することで行った。脱パラフィン化後、スライドをエタノール溶液で洗浄することで組織試料を再水和した。洗浄は、減少する濃度を有する3種のエタノール溶液を用いて行った。使用したエタノール濃度は90体積%、70体積%及び50体積%であった。次いで、スライドをリン酸緩衝食塩水(PBS、pH7.4)で洗浄した。スライドをTriton TX-100の0.1重量%溶液で洗浄することで組織の膜透過化を行った。抗原回収のためにpH6.0のクエン酸緩衝液(Vector Unmasking Solution)を使用した。スライドを圧力クッカー内で緩衝液に15分間暴露し、次いで室温で20分間冷却した。次いで、PBS及び900µLの3体積%ウシ血清アルブミン(BSA)を用いて37で45分間洗浄することで、スライドを非特異的結合に対してブロックし

10

20

30

40

50

た。二次抗体による染色（任意）のため、二次抗体宿主種からの血清 100 μL によってもスライドをブロックした。

【0052】

前処理した結腸スライドを染色し、“Sequential Analysis of Biological Samples”と称する米国特許出願第 11/864085 号に記載された方法を用いて画像化した。図 1 及び図 2 に示すような DAPI、ケラチン（Cy3）、自己蛍光（Cy3）、自己蛍光（CFP）及び自己蛍光（Cy5）を含む 5 つの蛍光画像を生成した。図 1 及び図 2 は、相異なる結腸組織試料（参照のために試料 A 及び試料 B として示す）から得られた画像を示している。一般に、結腸スライドの染色及び画像化は、3% BSA 中の色素結合抗体と共に 37 で 45 分間インキュベートすることを含んでいる。インキュベーション後、スライドを広範な一連の BSA 洗浄に付した。スライドを BSA 中の二次抗体と共に 37 で 45 分間インキュベートした。インキュベーション後、スライドを広範な一連の BSA 洗浄に付した。一次抗体又は二次抗体で染色されたスライドを、形態学的染色剤 DAPI で対比染色し、カバースリップで覆った。

【0053】

カメラを用いて、カバースリップで覆ったスライドを画像化した。使用したカメラは、Leica DMRA2 蛍光顕微鏡に装着された単色 Leica DFC 350FX 単色高解像度カメラであった。使用した倍率は、特記しない限り 20×であった。画像取得後、カバースリップを取り除き、スライドを PBS で洗浄してシグナル破壊のための前処理を行った。

【0054】

図 1 及び図 2 はまた、推定されたマッピングパラメーターを用いて生成された H & E 型画像の顕微鏡写真も示している。図 1 は、結腸組織試料の 5 つの蛍光画像の単色実施形態及び対応する生成 H & E 型画像（VSI、試料 A）を示している。図 2 は、結腸組織試料の 5 つの蛍光画像の単色実施形態及び対応する生成 H & E 型画像（VSI、試料 B）を示している。

【0055】

H & E 画像及び 1 組の蛍光画像（即ち、DAPI 画像、膜マーカー画像、並びに Cy3、Cy5 及び CFP フィルターキューブを用いて取得された 3 つの蛍光画像）に関し、1 組の対応点を手作業で確認する。蛍光画像を正規化することで、最小値を 0 に設定しかつ最大値を 1 に設定する。さらに、背景が明るくかつ前景が暗くなるように正規化蛍光画像を反転する。自己蛍光画像の 3 つのチャンネルは非常に相関している。すべての自己蛍光画像を幾何平均及び代数平均することで、マッピングで使用できる 2 つの新しい画像を生成することができる。このサンプルデータセットに関する推定変換行列は次の通りである。

【0056】

【数 5】

$$\hat{A} = \begin{bmatrix} 0.86 & 0.00 & 0.00 & 0.10 & -0.62 \\ 1.05 & 0.30 & 0.19 & 0.58 & -3.10 \\ 0.34 & 0.16 & 0.04 & 0.12 & -0.09 \end{bmatrix}$$

蛍光イメージング後、スライドを形態学的染色剤 H & E で染色し、明視野装置を用いて画像を取得した。試料 A 及び試料 B の両方に関する画像を、図 1 及び図 2 からの生成 VSI と共に図 3 に示す。

【0057】

これらの方法は、分子病理学と標準の解剖学的病理学とを併合させる。H & E に基づく染色は、標準の病理学で使用される最も普通の明視野鏡検用染色技法である。上述の通り、ヘマトキシリンは細胞核を青色に染色する一方、対比染色剤としてのエオシンは細胞質

及び結合組織をピンクに染色する。明視野鏡検用の代替染色として使用できる他の公知染色剤組合せには多数のものが存在している。例えば、核酸をイメージングするためにフォイルゲン染色剤が使用でき、或いは結合組織繊維をイメージングするためにオルセインが使用できる。

【 0 0 5 8 】

これらのマルチチャンネル方法は、形態学的染色剤又は蛍光バイオマーカーのみに限定されず、さらには病理学のものにも限定されない。生物学的試料の何らかの情報態様又は情報特徴を、デジタル画像化して処理できるように可視化し得る任意の染色剤が、これらの方法にとって好適であろう。好適な染色剤には、特に限定されないが、細胞学的又は形態学的染色剤、免疫学的染色剤（例えば、免疫組織化学的染色剤及び免疫細胞化学的染色剤）、細胞遺伝学的染色剤、インサイチュハイブリダイゼーション染色剤、細胞化学的染色剤、DNA及び染色体マーカー、並びに基質結合アッセイ染色剤がある。他の医学的及び生物科学的用途も、かかる拡張されたマルチチャンネルから利益を受けることができる。これらのマルチチャンネル方法は、光学的、化学的及び生物学的相互作用に限定されることなくマーカーを順次にイメージングできる柔軟なフレームワークを提供する。

【 0 0 5 9 】

以上、本明細書中には本発明の若干の特徴のみを例示し説明してきたが、当業者には数多くの修正及び変更が想起されるであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は本発明の技術的範囲及び技術思想に含まれるこのような修正及び変更のすべてを包含することを理解すべきである。

【 図 1 】

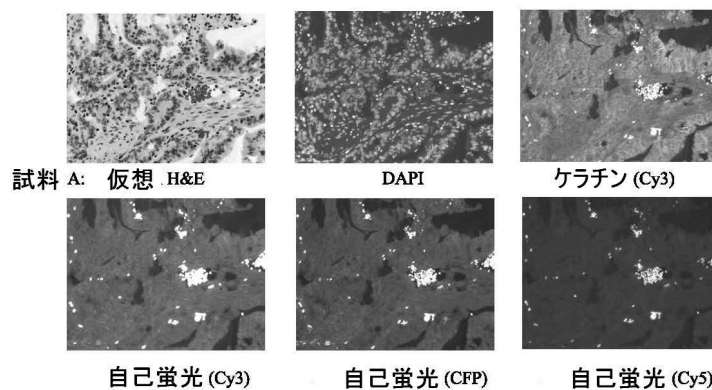
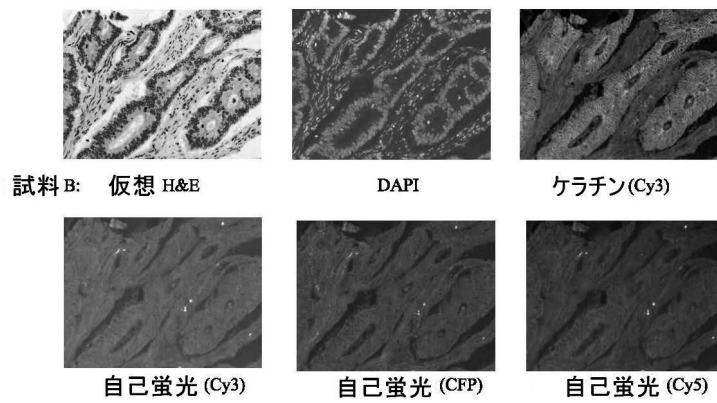
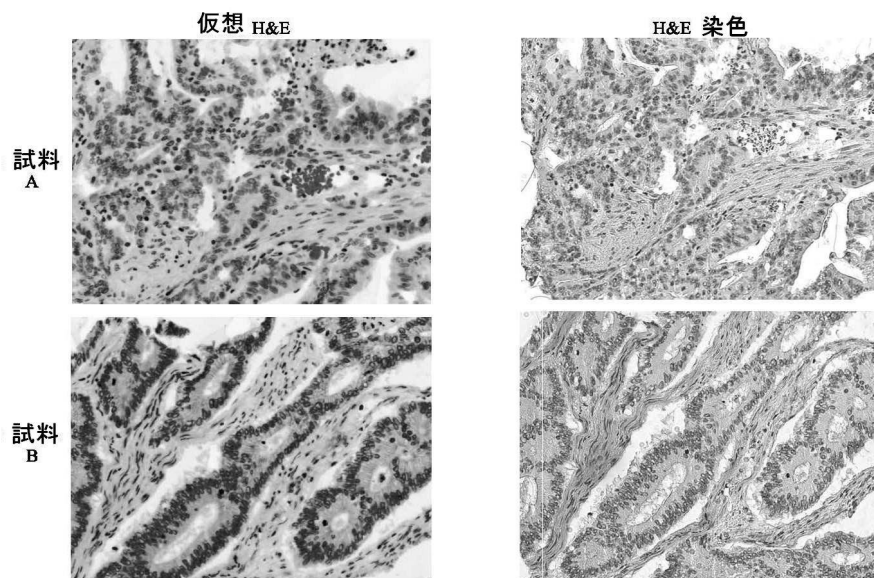


Fig. 1

【 図 2 】

**Fig. 2**

【 図 3 】

**Fig. 3**

フロントページの続き

- (72)発明者 キャン, アリ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、リサーチ・サークル、1番、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 ガーデス, マイケル・ジェイ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、リサーチ・サークル、1番、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 ベロ, モディック・オー
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、リサーチ・サークル、1番、ジーイー・グローバル・リサーチ
- (72)発明者 リー, チン
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、リサーチ・サークル、1番、ジーイー・グローバル・リサーチ

審査官 田中 洋介

- (56)参考文献 特表2002-544531(JP, A)
特表2010-512508(JP, A)
特開2008-139796(JP, A)
特表2010-500571(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 21/62 - 21/74