

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年7月5日(05.07.2018)



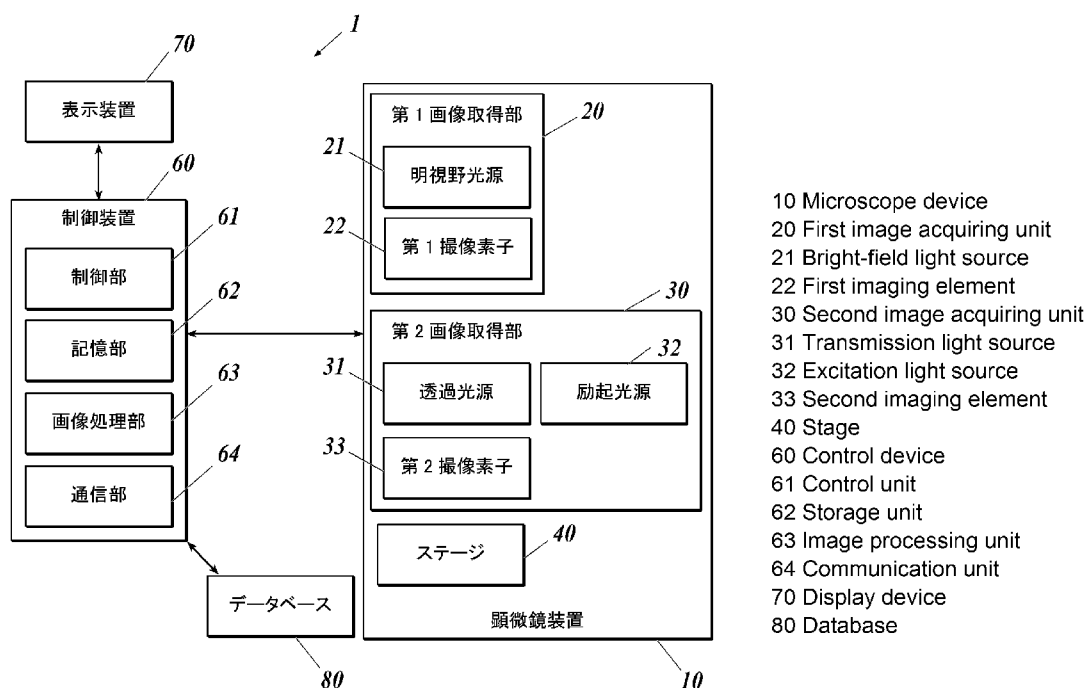
(10) 国際公開番号

WO 2018/123677 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G06T 7/00 (2017.01)
G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/045257
- (22) 国際出願日: 2017年12月18日(18.12.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-253698 2016年12月27日(27.12.2016) JP
- (71) 出願人: コニカミノルタ株式会社 (KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 剣持 紘明 (KEMMOCHI, Hiroaki); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).
元杭 康之(MOTOKUI, Yasuyuki); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).
小山 昇(KOYAMA, Noboru); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人光陽国際特許事務所(KOYO INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目1番3号 東京宝塚ビル17階 Tokyo (JP).

(54) Title: IMAGE PROCESSING METHOD AND IMAGE PROCESSING SYSTEM

(54) 発明の名称: 画像処理方法及び画像処理システム



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing an image processing method and an image processing system by which an entire image of a specimen can be acquired at a high resolution without fading during image-capturing in a fluorescent antibody method. The image processing method comprises: a fluorescent image-capturing step for capturing a fluorescent image of a fluorescently labeled tissue specimen; a creating step for creating a fluorescent whole slide image on the basis of the captured fluorescent image; and a storing step for storing the created fluo-

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

rescent whole slide image. The fluorescently labelled tissue specimen is formed using, as a staining reagent, fluorescent substance-accumulated nano-particles obtained by binding a biological substance recognition part to fluorescent particles on which a plurality of fluorescent substances are accumulated.

(57) 要約: 本発明の課題は、蛍光抗体法において、撮影中に退色することなく、高解像度で標本の全体画像を取得可能な画像処理方法及び画像処理システムを提供することである。蛍光標識された組織標本の蛍光画像を撮影する蛍光画像撮影工程と、撮影された蛍光画像をもとに蛍光ホールスライドイメージを作成する作成工程と、作成された蛍光ホールスライドイメージを記憶する記憶工程と、を備え、組織標本は、蛍光物質を複数集積した蛍光粒子に生体物質認識部位を結合した蛍光物質集積ナノ粒子を染色試薬として用いて蛍光標識されたものである。

明 細 書

発明の名称：画像処理方法及び画像処理システム

技術分野

[0001] 本発明は、画像処理方法及び画像処理システムに関する。

背景技術

[0002] 近年、病理学等の分野で、バーチャル顕微鏡が先端技術として注目されている。バーチャル顕微鏡とは、光学顕微鏡によって観察される画像をデジタルデータ化し、ディスプレイ上で、実際に光学顕微鏡を用いているかのように組織標本を観察可能なシステムである。

[0003] 詳細には、スライドガラス上の組織標本全体を撮影し、得られた画像をデジタルデータ化してデータベースに保存し、パーソナルコンピュータ等にインストールされたビューアソフトを用いて観察を行う。この時、光学顕微鏡を用いた観察と同様に、上下左右の移動や拡大縮小などの操作を行いながら観察することができるのが、バーチャル顕微鏡と呼ばれる所以である。ホールスライドイメージ (whole slide image: WSI) と呼ばれる、組織標本全体のデジタル画像データは、データベースに保存される。保存されたデジタル画像データは、インターネット等によってアクセスすることができるため、例えば遠隔地にいる病理医による迅速な病理診断や、希少な組織標本を誰もが閲覧可能にすることができる。

[0004] ところで、スライドガラス上の組織標本全体の撮影は、WSI作成システムと呼ばれる画像処理システムによって行われる。WSI作成システムは、顕微鏡画像を撮影する顕微鏡装置、撮影された画像をもとにWSIを作成する制御装置等を備え、例えば特許文献1のように、スキャナーによってスライドの部分画像を撮影し、得られた部分画像データを張り合わせて組織標本全体の画像データを作成する。

[0005] 観察対象となる組織標本の染色には、例えばHE染色や、酵素抗体法や蛍光抗体法といった免疫組織化学染色などが用いられる。

特に蛍光抗体法は、がん診断方法として組織標本中の抗原を高感度で検出することができるため、近年使用されることが多くなっている。蛍光抗体法とは、抗体に蛍光物質を標識しておき、組織標本の染色（抗原抗体反応）後にその組織標本に励起光を照射し蛍光発光させ、これを蛍光顕微鏡で観察する手法である。特許文献2には、蛍光抗体法によって染色された標本の画像データを作成するWSI作成システムが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2005-164815号公報

特許文献2：特開2008-51772号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] バーチカル顕微鏡での観察を実現するためには、組織標本の画像を高解像度で得る必要があるため、高倍率の対物レンズを用いて撮影を行う。高倍率では観察可能な視野が狭いため、組織標本全体の撮影には時間を要するものであった。

しかしながら、蛍光抗体法の場合、従来用いられてきた蛍光色素や量子ドット等の蛍光物質は耐光性が低く、長時間励起光に照射させると退色してしまう。即ち、フォーカシングや組織標本全体の撮影中に励起光照射によって退色すると、WSIを取得できないばかりか、WSIをもとに画像解析を行う場合、蛍光輝度情報が損なわれたことで、定量的な解析が困難となる。

[0008] 本発明は上記課題を鑑みてなされたものであって、蛍光抗体法において、撮影中に退色することなく、高解像度で標本の全体画像を取得可能な画像処理方法及び画像処理システムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上記課題を解決するため、請求項1に記載の画像処理方法は、
蛍光標識された組織標本の蛍光画像を撮影する蛍光画像撮影工程と、

撮影された蛍光画像をもとに蛍光ホールスライドイメージを作成する作成工程と、

作成された蛍光ホールスライドイメージを記憶する記憶工程と、を備え、
前記組織標本は、蛍光物質を複数集積した蛍光粒子に生体物質認識部位を結合した蛍光物質集積ナノ粒子を染色試薬として用いて蛍光標識されたものである

ことを特徴とする。

- [0010] 請求項 2 に記載の発明は、請求項 1 に記載の画像処理方法において、
蛍光画像の合焦位置を特定する特定工程を備え、
前記特定工程において、前記蛍光物質集積ナノ粒子の蛍光輝点を蛍光合焦位置として特定し、
前記蛍光画像撮影工程において、前記蛍光合焦位置に基づいて合焦した蛍光画像を撮影することを特徴とする。

- [0011] 請求項 3 に記載の発明は、請求項 2 に記載の画像処理方法において、
前記組織標本の明視野画像を撮影する明視野画像撮影工程を備え、
前記特定工程において、前記明視野画像上の任意の座標を明視野合焦位置として特定し、
前記蛍光画像撮影工程において、前記明視野合焦位置及び前記蛍光合焦位置に基づいて合焦した蛍光画像を撮影することを特徴とする。

- [0012] 請求項 4 に記載の発明は、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の画像処理方法において、
前記組織標本は、前記蛍光物質集積ナノ粒子を用いた染色試薬及び他の染色試薬を用いて多重に蛍光標識されたことを特徴とする。

- [0013] 請求項 5 に記載の発明は、請求項 4 に記載の画像処理方法において、
前記他の染色試薬に用いられる蛍光物質の励起波長及び発光波長は、それぞれ前記蛍光物質集積ナノ粒子が有する蛍光物質の励起波長及び発光波長と重複しないことを特徴とする。

- [0014] 請求項 6 に記載の発明は、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の画像処

理方法において、

前記蛍光標識された組織標本における生体物質を検出する検出工程を備え

、

前記検出工程において、前記生体物質の発現レベルを、輝点数の計測により行うことを特徴とする。

[0015] 請求項 7 に記載の発明は、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の画像処理方法において、

前記蛍光標識された組織標本における生体物質を検出する検出工程を備え

、

前記検出工程では、前記生体物質の発現レベルを、蛍光輝度の強弱を色の濃淡で表した蛍光輝度マップとして表示することを特徴とする。

[0016] 請求項 8 に記載の発明は、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の画像処理方法において、

前記組織標本の明視野画像を撮影する明視野画像撮影工程を備え、

前記明視野画像は、特定の細胞種類、特定の領域若しくは特定の組織構造を認識可能な、一又は複数の染色剤により染色された前記組織標本を撮影して得られたことを特徴とする。

[0017] 請求項 9 に記載の画像処理システムは、

蛍光標識された組織標本の蛍光画像を撮影する撮影手段と、

前記撮影手段によって撮影された蛍光画像をもとに蛍光ホールスライドイメージを作成する作成手段と、

前記作成手段によって作成された蛍光ホールスライドイメージを記憶する記憶手段と、

を備え、

前記組織標本は、蛍光物質を複数集積した蛍光粒子に生体物質認識部位を結合した蛍光物質集積ナノ粒子を染色試薬として用いて蛍光標識されたものである

ことを特徴とする。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、蛍光抗体法において、撮影中に退色することなく、高解像度で標本の全体画像を取得可能な画像処理方法及び画像処理システムを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明に係る画像処理システムの概略構成を示す図である。

[図2]第1画像取得部の概略構成を示す図である。

[図3]第2画像取得部の概略構成を示す図である。

[図4]フォーカシング時の制御を示すフローチャートである。

[図5]撮像領域の設定方法を示す図である。

[図6]明視野画像における焦点計測位置の設定方法を示す図である。

[図7]フォーカスマップの一例を示す図である。

[図8]蛍光画像における焦点計測位置の設定方法を示す図である。

[図9]蛍光画像取得時の制御を示すフローチャートである。

[図10]部分画像取得方法の一例を示す図である。

[図11]蛍光物質集積ナノ粒子の高輝度性を説明する図である。

[図12]蛍光物質集積ナノ粒子の高耐光性を説明する図である。

[図13]本発明を適用した生体物質検出方法の有効性を説明する図である。

[図14]蛍光物質集積ナノ粒子の輝度分布を示す図である。

[図15A]本発明を適用した蛍光輝度マップの一例を示す図である。

[図15B]図15Aの蛍光輝度マップを50画素ごとに平均化して示した図である。

[図15C]図15Aの蛍光輝度マップを1000画素ごとに平均化して示した図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、図面を参照しながら本発明の好ましい実施形態について説明する。

[画像処理システム]

図1に、本発明における画像処理システム1（WSI作成システム）の概

略構成を示す。図 1 に示すとおり、画像処理システム 1 は、顕微鏡装置 10、制御装置 60、表示装置 70 及びデータベース 80 を備えている。

[0021] 顕微鏡装置 10 は、第 1 画像取得部 20、第 2 画像取得部 30、及びステージ 40 を備えて構成される。

ステージ 40 には免疫染色後の組織標本 50 が設置される。組織標本 50 は生体サンプルの一例である。

[0022] 図 2 に、第 1 画像取得部 20 の概略構成を示す。

第 1 画像取得部 20 は、組織標本 50 の明視野画像を取得する。第 1 画像取得部 20 は、明視野光源 21、第 1 撮像素子 22、導光レンズ 23 を備えている。

[0023] 明視野光源 21 は、組織標本 50 に対して明視野画像取得用の光像を生成するための光を照射する光源であり、ステージ 40 の下方から光を照射するように設置されている。明視野光源 21 によって組織標本 50 が照射され光像が生成されると、導光レンズ 23 を介して光像が第 1 撮像素子 22 へと導かれ、第 1 撮像素子 22 によって組織標本 50 の明視野画像が撮影される。

なお、第 1 撮像素子 22 は、組織標本 50 の光像による 2 次元画像が取得可能な 2 次元 CCD センサーなどの撮像素子である。

[0024] 図 3 に、第 2 画像取得部 30 の概略構成を示す。

第 2 画像取得部 30 は、組織標本 50 の蛍光画像を取得する。

第 2 画像取得部 30 は、透過光源 31、励起光源 32、第 2 撮像素子 33、対物レンズ 34、蛍光キューブ 35、結像レンズ 36 を備える。蛍光キューブ 35 は、励起フィルター 351、ダイクロイックミラー 352 及び吸収フィルター 353 を備えている。

透過光源 31 は、組織標本 50 の透過観察画像を取得する際に用いられる光源であり、ステージ 40 の下方から光を照射するように設置されている。

[0025] 励起光源 32 は、放電管などの光源によって励起光を出射するランプである。励起フィルター 351 は励起光だけを透過するフィルターである。ダイクロイックミラー 352 は所定波長の光を境界として反射または透過するミ

ラーであって、ここでは励起光を反射し蛍光を透過するものである。吸収フィルター３５３は励起光を遮断し蛍光だけを透過するフィルターである。

[0026] 第２画像取得部３０では、励起光源３２が点灯すると、励起光が励起フィルター３５１を透過しダイクロイックミラー３５２で反射され、対物レンズ３４を通過し組織標本５０に照射される。その結果組織標本５０で蛍光が発光され、蛍光は対物レンズ３４で集光されダイクロイックミラー３５２および吸収フィルター３５３を透過する。その後、蛍光は蛍光像として結像レンズ３６を介して第２撮像素子３３へと導かれ、第２撮像素子３３に撮像される。なお、対物レンズ３４として、低倍率の対物レンズ（例えば、２０倍）及び高倍率の対物レンズ（例えば、４０倍）を有する。

第２撮像素子３３は、所定の方角を長手方角とする１次元画像又は２次元画像を取得可能な１次元ＣＣＤカメラ等の撮像素子であり、組織標本５０の高解像度での蛍光画像を取得することができる。

[0027] 顕微鏡装置１０にはこれらを制御する制御装置６０が接続されている。制御装置６０は制御部６１、記憶部６２、画像処理部６３及び通信部６４を備えている。

[0028] 制御部６１は、ＣＰＵ（Central Processing Unit）、ＲＡＭ（Random Access Memory

）等を備えて構成され、記憶部６２に記憶されている各種プログラムとの協働により各種処理を実行し、顕微鏡装置１０の動作を統括的に制御する。

制御部６１はステージ４０と接続され、ステージ４０の昇降を制御しステージ４０に設置される組織標本５０の合焦位置（Ｚ座標）を制御する。また、制御部６１は第１画像取得部２０と接続され、明視野光源２１及び第１撮像素子２２を制御して明視野画像の撮影を行う。さらに、制御部６１第２画像取得部３０と接続され、透過光源３１、励起光源３２、第２撮像素子３３を制御して蛍光画像の撮影を行う。

[0029] 記憶部６２は、例えばＨＤＤ（Hard Disk Drive）や半導体の不揮発性メモリ等で構成されている。記憶部６２には明視野画像撮影及び蛍光画像撮影

を行うためのプログラムが記憶されている。

[0030] 画像処理部 63 は、顕微鏡装置 10 によって撮影された蛍光画像に画像処理を施し、ホールスライドイメージ (WSI) を作成する。後述するように、制御部 61 の指示にしたがって、撮影された部分画像を合成して組織標本 50 の全体画像を作成し、さらに画像データを A/D 変換してデジタル画像化し、WSI を作成する。また、作成された WSI をもとに、目的生体物質の定量的解析に用いる蛍光輝度マップを作成する。

[0031] 通信部 64 は、パーソナルコンピューター等の外部装置との間でデータ送受信を行なうためのインターフェースである。WSI を参照したいユーザーは、通信部 64 を介してデータベース 80 に保存された WSI をパーソナルコンピューター等に読み込み、ディスプレイ上で観察を行うことができる。

[0032] 制御装置 60 には表示装置 70 が接続されている。

表示装置 70 は、例えば、CRT (Cathode Ray Tube) や LCD (Liquid Crystal Display) 等のモニタを備えて構成されており、制御部 61 から入力される表示信号の指示にしたがって、各種画面を表示する。本実施形態において、表示装置 70 は、撮影された蛍光画像等を出力するための出力手段として機能する。

[0033] 制御装置 60 にはさらに、データベース 80 が接続されている。データベース 80 は、例えば HDD (Hard Disk Drive) 等を備え、画像処理部 63 によって合成された WSI を保存する。

[0034] [組織標本]

続いて、組織標本 50 について説明する。

組織標本 50 は目的生体物質を含む組織切片であって免疫染色剤で染色され、染色後の組織標本 50 がステージ 40 に設置される。

[0035] (1) 目的生体物質

目的生体物質とは、主に病理診断の観点からの検出または定量的ために、蛍光標識体を用いた免疫染色の対象とするものをいい、組織切片に発現している生体物質、特にタンパク質 (抗原) である。

典型的な目的生体物質としては、各種の癌組織の細胞膜で発現しており、バイオマーカーとして利用することができる生体物質が挙げられる。

[0036] (2) 免疫染色剤（抗体－蛍光ナノ粒子の結合体）

免疫染色剤としては、蛍光標識の効率を向上させて蛍光の劣化につながる時間経過をなるべく抑えるために、一次抗体および蛍光ナノ粒子が間接的に、つまり抗原抗体反応などを利用した、共有結合以外の結合によって連結される複合体を用いることが好ましい。染色操作を簡便にするため、免疫染色剤として、一次抗体または二次抗体に蛍光ナノ粒子が直結している複合体を用いることもできる。

[0037] 免疫染色剤の一例として、〔目的生体物質に対する一次抗体〕…〔一次抗体に対する抗体（二次抗体）〕～〔蛍光ナノ粒子〕が挙げられる。

“…”は抗原抗体反応により結合していることを表し、“～”が示す結合の態様としては特に限定されず、たとえば、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、抗原抗体結合、ビオチンアビジン反応、物理吸着、化学吸着などが挙げられ、必要に応じてリンカー分子を介していてもよい。

[0038] (3) 抗体

一次抗体には、目的生体物質としてのタンパク質を抗原として特異的に認識して結合する抗体（IgG）を用いることができる。たとえば、HER2を目的生体物質とする場合は抗HER2抗体を、HER3を目的生体物質とする場合は抗HER3抗体を、それぞれ用いることができる。

二次抗体には、一次抗体を抗原として特異的に認識して結合する抗体（IgG）を用いることができる。

一次抗体および二次抗体はいずれも、ポリクローナル抗体であってもよいが、定量の安定性の観点から、モノクローナル抗体が好ましい。抗体を産生する動物（免疫動物）の種類は特に限定されるものではなく、従来と同様、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどから選択すればよい。

[0039] (4) 蛍光ナノ粒子

蛍光ナノ粒子とは、励起光の照射を受けて蛍光発光するナノサイズの粒子であって、目的生体物質を1分子ずつ輝点として表すのに十分な強度の蛍光を発光しうる粒子である。

蛍光ナノ粒子として、本発明においては、蛍光物質集積ナノ粒子（P I D : P h o s p h o r I n t e g a t e d D o t n a n o p a r t i c l e s）が使用される。

[0040] （4. 2）蛍光物質集積ナノ粒子

P I Dは、有機物または無機物でできた粒子を母体とし、複数の蛍光物質（たとえば、上記量子ドット、有機蛍光色素など）がその中に内包されている及び／又はその表面に吸着している構造を有する、ナノサイズの粒子である。P I Dとしては、量子ドット集積ナノ粒子、蛍光色素集積ナノ粒子などが使用される。

P I Dに用いられる蛍光物質としては、200～700nmの範囲内の波長の紫外～近赤外光により励起されたときに、400～900nmの範囲内の波長の可視～近赤外光の発光を示すことが好ましく、母体と蛍光物質とが、互いに反対の電荷を有する置換基または部位を有し、静電的相互作用が働くものであることが好適である。

[0041] 本発明で用いられるP I Dの平均粒径は特に限定されないが、30～800nm程度のものを用いることができる。平均粒径が30nm未満の場合には、集積粒子に含まれる蛍光物質が少なく、目的生体物質の定量的評価が困難となり、800nmを超える場合には、病理組織での目的生体物質との結合が困難となるためである。なお、平均粒径は、40～500nmの範囲内であることがより好ましい。ここで、平均粒径を40～500nmとしたのは、40nm未満の場合には、高価な検出系が必要となり、500nmを超える場合には、物理的な大きさから定量範囲が狭まるためである。

[0042] なお、粒径のばらつきを示す変動係数（＝（標準偏差／平均値）×100％）は特に限定されないが、15％以下のものを用いることが望ましい。粒径のばらつきは小さい程、蛍光輝点の輝度のばらつきが小さく、後述するよ

うに蛍光輝度をもとに目的生体物質の発現量を定量的に評価することができる。平均粒径は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて電子顕微鏡写真を撮影し十分な数の粒子について断面積を計測し、各計測値を円の面積としたときの円の直径を粒径として求めることができる。

[0043] （４．１．１）母体

母体のうち、有機物としては、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂、フラン樹脂など、一般的に熱硬化性樹脂に分類される樹脂；スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS樹脂（アクリロニトリルスチレン共重合体）、ASA樹脂（アクリロニトリルスチレンーアクリル酸メチル共重合体）など、一般的に熱可塑性樹脂に分類される樹脂；ポリ乳酸等のその他の樹脂；多糖を例示することができる。

母体のうち、無機物としては、シリカ、ガラスなどを例示することができる。

[0044] （４．１．２）量子ドット集積ナノ粒子

量子ドット集積ナノ粒子とは、上記量子ドットが、上記母体の中に内包されている、および／またはその表面に吸着している構造を有する。

量子ドットが母体に内包されている場合、量子ドットは母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していてもよいし、していなくてもよい。

[0045] 量子ドットとしては、Ⅲ－Ⅴ族化合物、Ⅱ－Ⅴ族化合物またはⅢⅤ族元素を含有する半導体ナノ粒子が使用される。たとえば、CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Geなどが挙げられる。

[0046] 上記量子ドットをコアとし、その上にシェルを設けた量子ドットを用いることもできる。以下、本明細書中シェルを有する量子ドットの表記法として、コアがCdSe、シェルがZnSの場合、CdSe/ZnSと表記する。例えば、CdSe/ZnS、CdS/ZnS、InP/ZnS、InGaP

／ZnS、Si／SiO₂、Si／ZnS、Ge／GeO₂、Ge／ZnS等を用いることができるが、これらに限定されない。

[0047] 量子ドットは必要に応じて、有機ポリマー等により表面処理が施されているものを用いてもよい。例えば、表面カルボキシ基を有するCdSe／ZnS（インビトロジェン社製）、表面アミノ基を有するCdSe／ZnS（インビトロジェン社製）等が挙げられる。

[0048] 量子ドット集積ナノ粒子は、公知の方法により作成することが可能である。例えば、量子ドットを内包したシリカナノ粒子は、ニュー・ジャーナル・オブ・ケミストリー 33巻 561ページ（2009）に記載されているCdTe内包シリカナノ粒子の合成を参考に合成することができる。

量子ドットを外包したシリカナノ粒子は、ケミカル・コミュニケーション 2670ページ（2009）に記載されているCdSe／ZnSを5-amino-1-pentanolとAPSでキャッピングした粒子を表面に集積したシリカナノ粒子の合成を参考に合成することができる。

量子ドットを内包したポリマーナノ粒子は、ネイチャー バイオテクノロジー 19巻631ページ（2001）に記載されているポリスチレンナノ粒子への量子ドットの含浸法を用いて作製することができる。

[0049] （4．1．3）蛍光色素集積ナノ粒子

蛍光色素集積ナノ粒子とは、蛍光色素が、上記母体の中に内包されている、及び／又はその表面に吸着している構造を有する。

蛍光色素としては、ローダミン系色素分子、スクアリリウム系色素分子、シアニン系色素分子、芳香環系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子、ピロメセン系色素分子などの有機蛍光色素を例示することができる。

[0050] 具体的には、Alexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、Cy（登録商標、GEヘルスケア社製）系色素分子、HiLyte（登録商標、アナスペック社製）系色素分子、DyLight（登録商標、サー

モサイエンティフィック社製）系色素分子、ATT O（登録商標、ATT O-TEC社製）系色素分子、MFP（登録商標、Mobi t e c社製）系色素分子、CF（登録商標、B i o t i u m社製）系色素分子、DY（登録商標、DYOMICS社製）系色素分子、CAL（登録商標、B i o S e a r c h T e c h n o l o g i e s社製）系色素分子などを用いることができる。

[0051] なお、蛍光色素が母体に内包されている場合、蛍光色素は母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していてもよいし、していなくてもよい。

[0052] 蛍光色素集積ナノ粒子は、公知の方法により作成することが可能である。例えば、蛍光色素を内包したシリカナノ粒子は、ラングミュア 8巻 2921ページ（1992）に記載されているFITC内包シリカ粒子の合成を参考に合成することができる。FITCの代わりに所望の蛍光色素を用いることで種々の蛍光色素集積ナノ粒子を合成することができる。

蛍光色素を内包したポリスチレンナノ粒子は、米国特許4326008（1982）に記載されている重合性官能基をもつ有機色素を用いた共重合法や、米国特許5326692（1992）に記載されているポリスチレンナノ粒子への蛍光色素の含浸法を用いて作製することができる。

[0053] （5）組織切片の染色方法

染色方法の一例について説明する。

この染色方法が適用できる組織切片（単に「切片」ともいい、病理切片などの切片も含まれる。）の作製法は特に限定されず、公知の手順により作製されたものを用いることができる。

[0054] （5. 1）標本作製工程

（5. 1. 1）脱パラフィン処理

キシレンを入れた容器に、切片を浸漬させ、パラフィン除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でキシレ

ンを交換してもよい。

[0055] 次いでエタノールを入れた容器に切片を浸漬させ、キシレン除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

[0056] 水を入れた容器に、切片を浸漬させ、エタノール除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

[0057] (5. 1. 2) 賦活化処理

公知の方法に倣い、目的生体物質の賦活化処理を行う。

賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01Mのクエン酸緩衝液(pH6.0)、1mMのEDTA溶液(pH8.0)、5%尿素、0.1Mのトリス塩酸緩衝液などを用いることができる。

pH条件は用いる組織切片に応じてpH2.0~13.0の範囲から、シグナルが出て、組織の荒れがシグナルを評価できる程度となる条件で行う。通常はpH6.0~8.0で行うが、特殊な組織切片ではたとえばpH3.0でも行う。

加熱機器はオートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバスなどを用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は50~130℃、時間は5~30分で行うことができる。

[0058] 次いでPBSを入れた容器に、賦活処理後の切片を浸漬させ、洗浄を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

[0059] (5. 2) 免疫染色工程

免疫染色工程では、目的生体物質を染色するために、目的生体物質に直接

的または間接的に結合しうる部位を有する蛍光ナノ粒子を含む免疫染色剤の溶液を、切片に載せ、目的生体物質との反応を行う。免疫染色工程に用いる免疫染色剤の溶液については、この工程の前にあらかじめ調製しておけばよい。

[0060] なお、複数の目的生体物質を検出しようとする場合は、目的生体物質に対応した複数の免疫染色剤によって免疫染色を行う。この場合に用いる複数の免疫染色剤は、P I Dを用いた免疫染色剤（P I D染色剤）を少なくとも1つ含むものであればよく、抗体と蛍光物質（蛍光波長）とが互いに異なれば、P I D染色剤を複数用いた多重染色や、P I D染色剤と有機蛍光物質や量子ドット等の蛍光標識体を用いた免疫染色剤とのを組み合わせた多重染色によって、複数の目的生体物質を検出することも可能である。この場合は、各免疫染色剤の溶液をそれぞれ調製し、切片に載せ、目的生体物質との反応を行うが、切片に載せる際にそれぞれの免疫染色剤の溶液を予め混合してもよいし、別々に順次載せてもよい。

複数の免疫染色剤を用いる場合、P I Dの励起／発光波長と、他の免疫染色剤の蛍光標識体の励起／発光波長は、クロストークを無視できる程度に離れていることが望ましい。

[0061] 免疫染色工程を行う上での条件、すなわち免疫染色剤の溶液に組織切片を浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は、30分以上24時間以下であることが好ましい。

上述したような処理を行う前に、B S A含有P B Sなど公知のブロッキング剤やT w e e n 2 0などの界面活性剤を滴下することが好ましい。

[0062] （5．3）標本後処理工程

免疫染色工程を終えた組織標本は、観察に適したものとなるよう、固定化・脱水、透徹、封入などの処理を行うことが好ましい。

[0063] 固定化・脱水処理は、組織切片を固定処理液（ホルマリン、パラホルムア

ルデヒド、グルタルアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノールなどの架橋剤）に浸漬すればよい。透徹処理は、固定化・脱水処理を終えた組織切片を透徹液（キシレンなど）に浸漬すればよい。封入処理は、透徹処理を終えた組織切片を封入液に浸漬すればよい。

これらの処理を行う上での条件、たとえば組織切片を所定の処理液に浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

[0064] (5. 4) 明視野形態観察染色工程

免疫染色工程とは別に、明視野において細胞、組織、臓器などの形態を観察することができるようにするための、形態観察染色を行う。

形態観察染色工程は、常法にしたがって行うことができる。

組織標本50の形態観察に関しては、細胞質・間質・各種線維・赤血球・角化細胞が赤～濃赤色に染色される、エオジンを用いた染色が標準的に用いられている。細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色～淡青色に染色される、ヘマトキシリンを用いた染色も標準的に用いられている（これら2つの染色を同時に行う方法はヘマトキシリン・エオジン染色（H E 染色）として知られている）。本実施形態においては、H E 染色法により形態観察染色を行うものとする。このH E 染色画像は赤色などに細胞が染まって見るとともに、細胞の輪郭を見て取ることが出来るので、細胞の大きさや核の大きさ核の数、細胞サイクルの段階や癌化の程度、細胞集団の性格や集団同士の関係といった情報も得ることが出来る。まこのような情報は、免疫染色法によりさらに詳細に得ることもできる。すなわち、形態観察染色工程には、H E 染色法と免疫染色法とを組み合わせた染色方法も用いることができる。一般的には、目的生体物質の観察には高倍率で画像を取得し、細胞種の特定や腫瘍領域・間質領域などの領域の観察には中倍率で画像を取得し、領域や各領域における血管・リンパ管などの組織構造の観察には低倍率で画像を取得することになるが、このような情報をすべて獲得し、保管し、将来にわたって利用するのにホールスライドは有用である。

なお、形態観察染色工程を含める場合は、免疫染色工程の後に行うようにしてもよいし、免疫染色工程の前に行うようにしてもよい。

[0065] [フォーカシング]

続いて、WS 1 作成におけるフォーカシング方法について説明する。

本実施形態においては、第 1 画像取得部 20 によって組織標本 50 の明視野画像を取得し、これに基づいて WS 1 の作成対象となる撮像領域を設定し、明視野画像を基準にフォーカシングを行う。さらに、第 2 画像取得部 30 によって組織標本 50 に蛍光標識された P I D に励起光を照射し、検出された P I D の蛍光輝点を基準にしてさらに厳密なフォーカシングを行う。

[0066] 具体的な制御について、図 4 のフローチャートを用いて説明する。

まず、制御部 61 は第 1 画像取得部 20 を制御して、スライドガラス全体のフォーカシング用の明視野画像を取得する（ステップ S 1：明視野画像撮影工程）。この明視野画像は、後述する蛍光画像等の高解像度の撮影条件の設定に用いるものであり、低倍率の対物レンズを用いた低倍率画像である。得られた明視野画像に基づいて、制御部 61 は、図 5 に示すような組織標本 50 を含む撮像領域 R を設定する（ステップ S 2）。

具体的には、制御部 61 は組織標本 50 の全体画像を、組織標本 50 の有無により 2 値化して、X 軸方向、Y 軸方向それぞれに組織標本 50 の存在する領域を検出することで、撮像領域 R を決定する。なお、撮像領域 R は、ユーザーが組織標本 50 全体の明視野画像を観察しながら、表示装置 70 上で手動によって設定するものとしてもよい。

[0067] 次に、明視野画像に基づいて、組織標本 50 のフォーカシングを行う。明視野画像に基づいたフォーカシングは、ユーザーが手動で行うものとしてもよいし、制御部 61 による制御下で自動的に行うものとしてもよい。以下、制御部 61 による制御下で自動的にフォーカスマップを作成し、フォーカシングを行う方法について説明する。

[0068] まず、撮像領域 R 上に第 1 の焦点計測位置 P_1 を設定する（ステップ S 3）。

制御部 61 は、図 6 に示すように撮像領域 R を X 軸方向、Y 軸方向それぞれに分割して小領域を設定し、各小領域の X Y 座標を求める。ここでは、X Y 座標は各小領域の中心座標とするが、これに限らず、例えば各小領域の左上端の座標を X Y 座標とすることも可能である。

さらに、図 6 に示すように、制御部 61 は各小領域に対して X 軸方向、Y 軸方向それぞれに 1、2、3、・・・といった番号を割り当て、配列番号を設定する。即ち、配列番号は、例えば撮像領域 R の左上端の小領域は、(X 軸, Y 軸) = (1, 1) である。

次に、制御部 61 は、各小領域に対して第 1 の焦点計測位置 P_1 を設定する。 P_1 は、本実施形態においては各小領域の中心座標位置とするが、これに限定されず、例えば各小領域の左上端を第 1 の焦点計測位置 P_1 とすることも可能である。また、例えば図 6 の配列番号 (1, 1) の領域のように、中心座標上に組織標本 50 が存在しない場合がある。この場合は、第 1 の焦点計測位置 P_1 を組織標本 50 上の任意の座標へ移動させることが可能である。

[0069] 続いて、各小領域の第 1 の焦点計測位置 P_1 に対してフォーカシングを行う (ステップ S4 : 特定工程)。ここでは、制御部 61 は、ステージ 40 を X Y 方向に移動制御させながら、光軸位置を第 1 の焦点計測位置 P_1 に合わせ、各第 1 の焦点計測位置 P_1 に対して実測による明視野合焦位置 (Z 座標) を求める。

[0070] このようにして求められた明視野合焦位置をもとにして、制御部 61 は、図 7 に示すようなフォーカスマップを作成する (ステップ S5)。フォーカスマップには、各小領域の配列番号と、それに対応するステージ座標が格納される。ステージ座標は、X 軸、Y 軸については各小領域の中心座標が、Z 軸については明視野合焦位置が対応する。

以上で、明視野画像に基づいた組織標本 50 のフォーカシングが完了する。

[0071] ステップ S6 以降は、明視野画像に基づいて得られたフォーカシング情報を基準に、PID 輝点に対してフォーカシングを行う。即ち、上述のように

ステップS 1～S 3の処理によって、明視野画像を基準とした組織標本50の明視野合焦位置が特定されているが、これを基準にしてさらにP I D輝点に対してフォーカシングを行うことで、より厳密に合焦された蛍光画像を得ることができる。

[0072] まず、フォーカシング用のP I Dの蛍光画像を取得する（ステップS 6：蛍光撮影工程）。即ち、制御部61は、励起光源32を制御して組織標本50に対してP I Dの励起光を照射し、第2撮像素子33によってP I Dの蛍光画像を取得する。

[0073] 次に、得られた蛍光画像上の任意のP I Dの蛍光輝点を選出し、第2の焦点計測位置 P_2 を設定する（ステップS 7）。ここでは、ユーザーが手動によって第2の焦点計測位置 P_2 を設定するものとし、図8のように、組織標本50上の1つまたは複数の第2の焦点計測位置 P_2 を設定する。

[0074] 次に、設定された第2の焦点計測位置 P_2 に対して、フォーカシングを行う（ステップS 8：特定工程）。具体的には、制御部61はステージ40をX Y方向に移動制御させながら、光軸位置を第2の焦点計測位置 P_2 に合わせ、ステップ3で作成されたフォーカスマップの合焦位置を参照しながら、Z座標方向に微調整して第2の焦点計測位置 P_2 に対する蛍光合焦位置（Z座標）を求める。

[0075] これをすべての第2の焦点計測位置 P_2 に対して行くと、得られた新たな合焦位置を利用して、制御部61はステップS 3で作成されたフォーカスマップを修正する（ステップS 9）。

以上により、組織標本50に対するフォーカシングが完了する。

[0076] [ホールスライドイメージの作成]

上述のようにフォーカシングが完了すると、組織標本50全体の蛍光画像の作成、即ちWS 1の作成に移行する。

WS 1作成方法について、図9のフローチャートを用いて説明する。

[0077] まず、組織標本50に標識された蛍光標識体を励起させる（ステップS 10）。具体的には、制御部61は励起光源32を制御して、組織標本50に

標識されたP I Dを励起させる励起光を照射させる。

[0078] 次に、組織標本50の部分画像を取得する（ステップS11：蛍光画像撮影工程）。

ここでは、ステップS9で完成したフォーカスマップの情報をもとに、制御部61はステージ40を移動制御させて、撮影手段としての第2画像取得部30を制御して部分的な蛍光画像を取得する。即ち、光軸位置及び合焦位置を、フォーカスマップに格納されたステージ座標が示すXYZ座標へと移動させ、撮影手段としての第2撮像素子33を制御して、小領域ごとの画像を撮像する。ここでは、対物レンズ34として高倍率の対物レンズを用いることで、高解像度の画像を取得することができる。

[0079] 具体的には、部分画像として図10に示すような帯状のスキャン画像を取得する。まず、組織標本50に対して、左上端から撮像を開始する。制御部61は、励起光を照射させるとともに、第2撮像素子33による撮像位置を組織切片51のY軸の正の方向に移動しながらスキャンさせ、部分画像Aを取得する。続いて、制御部61は第2撮像素子33による撮像位置をX軸の正の方向に移動させて、部分画像Bを取得する。同様に、部分画像C、・・・部分画像Nの順に部分画像を取得すると、撮像が完了する。

[0080] 次に、制御部61は作成手段としての画像処理部63を制御して、撮像された部分画像を合成して、撮像領域Rの全体の蛍光画像を作成させる（ステップS12：作成工程）。即ち、部分画像A～NをX軸方向に並べて貼り合わせることで、組織標本50の全体の高解像度の蛍光画像が得られる。

さらに、画像処理部63は得られた撮像領域Rの全体の蛍光画像をA/D変換して、デジタル画像化する（ステップS13：作成工程）。以上により、WS1の作成が完了する。

[0081] [ホールスライドイメージの利用]

作成されたWS1は、記憶手段としてのデータベース80によって保存される（記憶工程）。WS1を参照したいユーザーは、通信部64を介してパーソナルコンピュータ等に画像データを読み込み、ディスプレイ上で観察

を行うことができる。

[0082] [P I Dの高輝度性及び高耐光性]

従来の蛍光物質は蛍光輝度が弱く目的生体物質との結合を輝点として検出するのが難しいうえに、耐光性が低いためフォーカシング時や蛍光画像撮影時の励起光照射による退色が速いことが問題であった。これに対し、P I Dは高輝度・高耐光性有し、長時間の励起光照射を要する蛍光ホールスライドイメージの作成にも耐え得る。

[0083] 図11及び図12に、従来の蛍光色素単体、量子ドット単体及びP I Dの蛍光輝度及び耐光性の比較結果を示す。図11に示すように、蛍光標識体1分子当たりの蛍光輝度は、P I Dの場合は、量子ドット単体に比べて約1000倍の輝度を有し、蛍光色素単体に比べては30000倍以上の輝度を有しており、P I Dの蛍光輝度は、蛍光色素及び量子ドットと比較して大幅に向上していることが明らかである。

[0084] 図12に、従来の蛍光色素及びP I Dの耐光性の違いを示す。

蛍光色素にはT e x a s R e dを用い、封入剤を溶媒として色素濃度0.33 [μ M]に調整し、組織切片を載せたスライドガラス上に滴下し、カバーガラスを載せて暗所で2時間静置した。P I Dは、色素濃度0.001~0.01 [nM]に調整し、組織切片を載せたスライドガラス上に滴下し暗所で10分静置後、洗浄・封入剤塗布を行い、カバーガラスを載せて作成した。

これらの組織標本を、励起波長580nm、励起光強度20~30mWの励起光に照射させ、耐光性を観察した。

[0085] 図12に示すように、露光開始時の蛍光輝度を100%とし、蛍光輝度の経時的な変化を、耐光率として表した。

蛍光色素の場合、露光開始から10分経過後に、耐光率は10%を下回った。これに対してP I Dの場合は、露光から10分経過しても80%の耐光率を維持していることから、露光開始時点の蛍光輝点が露光開始10分後にも十分観察可能な蛍光輝度を有していることが明らかである。

[0086] 以上説明したように、PIDは従来用いられてきた蛍光物質単体に比べて高輝度・高耐光性を有しているため、高感度で蛍光観察を行うことができる。即ち、WSI作成のようにフォーカシング及び蛍光画像の撮影に時間を要し、蛍光標識体への励起光の照射時間が長くなる場合にも適用可能であるといえる。

[0087] [定量解析]

次に、本発明を適用した画像処理システムにおける、目的生体物質の定量解析方法を説明する。

[0088] 上述したように、PIDの蛍光輝点は高輝度であり、また一つひとつを個別に検出可能であるため、目的生体物質の発現を輝点として検出可能である（検出工程）。

図13に、PIDと蛍光色素とによる目的生体物質の検出感度を輝点数として計測し、計測された1細胞当たりの輝点数を示した。

[0089] 免疫染色には、抗ヒトER抗体を用いた免疫染色剤を用い、ヒト乳房組織を染色した。なお、PIDとして、Cy5内包・シリカナノ粒子（平均粒径103nm）、テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子（平均粒径104nm）、FITC内包・シリカナノ粒子（平均粒径106nm）、蛍光色素として、Cy5、テトラメチルローダミン、FITCのそれぞれを単体で蛍光標識体として用いた。各免疫染色剤によって染色された組織切片を、蛍光顕微鏡を用いて観察し、蛍光輝点数の計測を行った。

なお、スポット番号は染色濃度の違いを示し、スポット番号8が最も高濃度である。

[0090] 図13において、「－」は、バックグラウンドレベル以上の輝点がないことを示し、「＋」は、発光が強く、周囲の輝点と区別がつかないことを示している。

図13から、蛍光色素単体を用いて組織染色を行った場合には、スポット番号1～4の組織切片では、バックグラウンドレベル以上の輝点がなく、スポット番号5～8の組織切片では、周囲の輝点と区別がつかないため、微量

の目的生体物質に対する輝点レベルの定量的評価が不可能なことがわかる。

一方、標識体としてPIDを用いた場合には、微量の目的生体物質に対しても、精度良く定量的に検出することができる。

[0091] したがって、PIDを用いた蛍光染色によると、従来の蛍光色素単体を用いた蛍光染色に比べて、1細胞当たりの目的生体物質の発現レベルを定量的に評価可能であることが明らかである。即ち、本発明における画像処理システムによれば、組織標本全体の蛍光画像を取得可能であるため、上述した検出方法を用いて組織標本全体の目的生体物質発現レベルの定量的評価することが可能となる。

したがって、本発明における画像処理システムにより、より多くの細胞に対する目的生体物質の定量を一枚の画像を用いて行うことができ、信頼度の高い定量的評価結果を得られる。

[0092] さらに、PIDの蛍光画像を用いて、目的生体物質の発現量を一見して確認可能な蛍光輝度マップを作成することができる（検出工程）。

従来の蛍光物質単体による染色の場合、フォーカシング時や全体画像撮影時に退色し、また蛍光物質の輝度のばらつきが大きく、蛍光色素の密集領域と目的生体物質の高発現領域とが必ずしも一致しないなどの理由で、蛍光輝度マップを作成することは難しいものであった。

一方で、上述したように、PIDはフォーカシング時及び全体画像撮影時にほとんど退色がなく、また1粒子ごとの蛍光輝度のばらつきが小さい。

[0093] 図14に、縦軸を頻度（全輝点数に対する比、又は輝点数）、横軸を輝度積算値としたPIDの粒径の変動係数が5%の場合の蛍光輝点の輝度分布を示した。なお輝度積算値とは、例えば、蛍光画像から蛍光輝点を中心とした輝点領域を抽出し、当該輝点領域を複数の蛍光画像のX軸方向及びY軸方向に分割した小区画を作成し、各小区画について輝度を算出し、全小区画の輝度を積算することで得られた値である。図14に示したように、輝度積算値はt分布に近い形状の分布曲線を示し、この場合は輝度積算値 3.5×10^6 付近にピークを有する。即ち、PIDの1粒子当たりの蛍光輝度のばらつき

は小さいことがわかる。

P I D のこのような特性から、蛍光輝度の高い領域を目的生体物質の高発現領域とみなすことが可能であるため、以下のようにして蛍光輝度マップを作成することができる。

[0094] まず、P I D を用いて組織標本を染色し、W S I を作成する。作成した W S I を、画像処理ソフトで読み込み、蛍光輝度の強弱を色の濃淡などで表すことで蛍光輝度マップとして表示することができる。より具体的には、制御部 6 1 は、所定の画素ごと蛍光輝度の平均値を算出し、記憶部 6 2 に記憶された蛍光輝度に応じた色の濃度の設定値を読み出し、これに対応付けて W S I に画像処理を施す。なお、画素単位は、ユーザーが任意で指定することができる。

図 1 5 に、蛍光輝度マップの一例を示す。図 1 5 A は、P I D によって染色した組織マイクロアレイの蛍光画像を示す。蛍光輝度マップの色の濃淡は、1 画素ごとではなく、例えば 5 0 画素や 1 0 0 0 画素ごとに平均して表示してもよい。図 1 5 B は 5 0 画素ごとの平均、図 1 5 C は 1 0 0 0 画素ごとの平均によって蛍光輝度マップを作成した。このような蛍光輝度マップを一見すれば、組織標本全体のうち、目的生体物質が多く発現している箇所を、W S I から目視で選定することができる。

[0095] また、上記実施形態においては H E 染色法を用いて組織標本 5 0 上の細胞全体を染色する方法について説明したが、細胞種、領域、組織構造等を判別可能な染色剤を用いて形態観察を行った場合、細胞種毎に定量解析を行うことなどが可能となる。

例えば、特定の細胞のみを染色可能な染色剤を複数用いて組織標本 5 0 を染色することで、細胞種毎に目的生体物質の定量解析を行うことができる。特に、免疫細胞として知られているマクロファージ・T 細胞・B 細胞・樹状細胞の目的物質の発現の定量解析は、患者の免疫状態の詳細なカルテとなる可能性があり、がん免疫療法の確立の一翼をになうと考えられる。この場合の目的生体物質としては、例えば、C D 1 6 3、C D 2 0 4、C D 6 8、I

b a 1、C D 1 1 c、C D 2 0 6、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 6 3、C D 2 0 6、C D 1 8 1、C D 1 9 7、i N O S、A r g i n a s e 1、C D 3 8、E g r 2 等が挙げられる。

[0096] [効果]

本発明によれば、従来用いられてきた蛍光物質単体による染色では作成できなかった、蛍光ホールスライドイメージを作成することができる。即ち、P I D の蛍光ホールスライドイメージを用いて、組織標本全体について目的生体物質の発現の定量評価を行うことが可能となる。

[0097] また、明視野画像を、観察対象としたい細胞種、領域、細胞構造のみを可視化した細胞形態画像あるいはこれらを組み合わせて可視化した細胞形態画像とし、W S I を構築するとともに、P I D によって目的生体物質を染色した蛍光画像のW S I を構築することで、従来行われてきた明視野画像を用いた細胞種等の特定・数の計測などの解析に加え、細胞種ごとの目的生体物質の発現の定量解析を行うことが可能となる。したがって、本発明に係る解析手法は、今後の臨床支援及び薬剤開発に大きく役立つと考えられる。

[0098] [他の実施形態]

以上、本発明に係る実施形態に基づいて具体的に説明したが、上記の実施形態は本発明の好適な一例であり、これに限定されない。

[0099] 例えば、上記実施形態においては、明視野画像を基準に合焦位置を特定し、蛍光画像をもとに当該合焦位置を修正してフォーカシングを行うものとしたが、明視野画像を用いずに蛍光画像を用いてフォーカシングを行うことも可能である。即ち、組織標本全体の合焦位置特定に足る数のP I D 輝点を焦点計測位置として選出し、フォーカシングを行うことでも、本発明の効果をえられる。

[0100] また、上記実施形態においては、明視野画像及び蛍光画像は、それぞれ第1撮像素子22及び第2撮像素子33によって撮像するものとし、即ち異なる撮像素子を用いるものとしたが、同一の撮像素子を用いてもよい。

上記実施形態では、第2撮像素子33は、所定の方角を長手方向とする1

次元画像又は2次元画像を取得可能な1次元CCDカメラ等の撮像素子としたが、同一の撮像素子を用いる場合、例えば撮像素子を矩形の2次元画像を取得可能な2次元CCDセンサーとし、得られた矩形の蛍光画像を張り合わせてWSIを作成することができる。

[0101] また、上記実施形態においては、PID染色剤を含む複数の免疫染色剤によって、組織標本を多重染色するものとしたが、これに限定されず、PID染色剤を単一で用いることもできる。

[0102] また、上記実施形態においては、明視野画像をもとに撮像領域を設定するものとしたが、これに限定されず、暗視野画像をもとに行うことも可能である。この場合、第1画像取得部は暗視野光源を有するものとする。

[0103] また、上記実施形態においては、明視野画像に対するフォーカシングを自動で行うものとしたが、ユーザーによって手動で行うものとしてもよい。この場合、ユーザーは任意の座標に対して第1の焦点計測位置 P_1 を設定することで、関心のある領域をより重点的にピント調整することができる。

[0104] また、上記実施形態では、生体サンプルとして組織切片を対象とし、蛍光標識体として蛍光物質集積ナノ粒子を含む免疫染色剤で組織標本50を染色している。生体サンプルの対象は培養細胞であってもよいし、遺伝子(DNA)でもよい。

[0105] その他、画像処理システム1を構成する各装置の細部構成及び各装置の細部動作に関しても、本発明の主旨を逸脱することのない範囲で適宜変更可能である

産業上の利用可能性

[0106] 本発明は、画像処理方法及び画像処理システムに利用できる。

符号の説明

[0107] 1 画像処理システム

10 顕微鏡装置

20 第1画像取得部

21 明視野光源

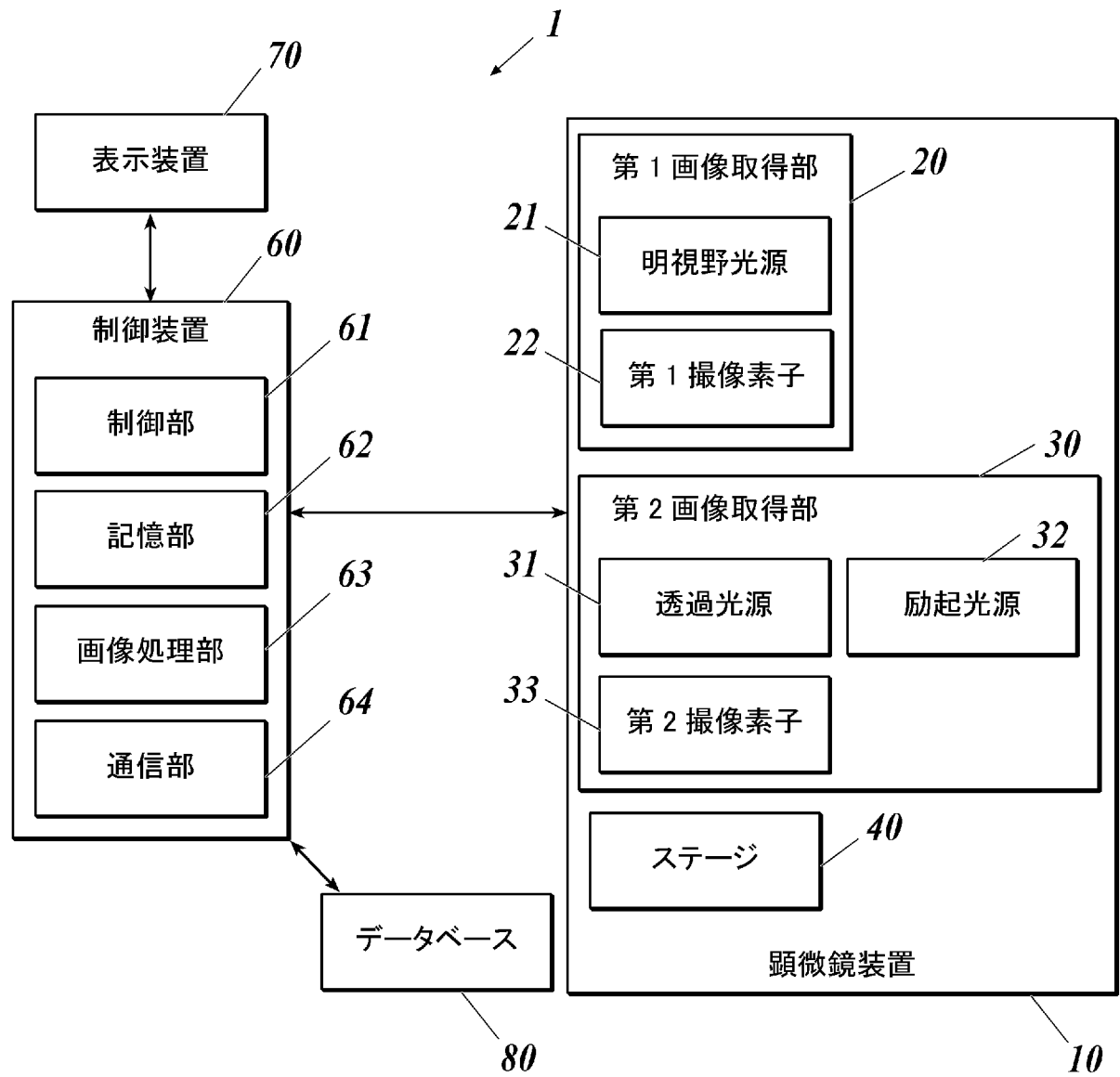
- 2 2 第1撮像素子
- 3 0 第2画像取得部（撮影手段）
- 3 1 透過光源
- 3 2 励起光源
- 3 3 第2撮像素子
- 4 0 ステージ
- 5 0 組織標本
- 6 0 制御装置
- 6 1 制御部
- 6 2 記憶部
- 6 3 画像処理部（作成手段）
- 6 4 通信部
- 7 0 表示装置
- 8 0 データベース（記憶手段）

請求の範囲

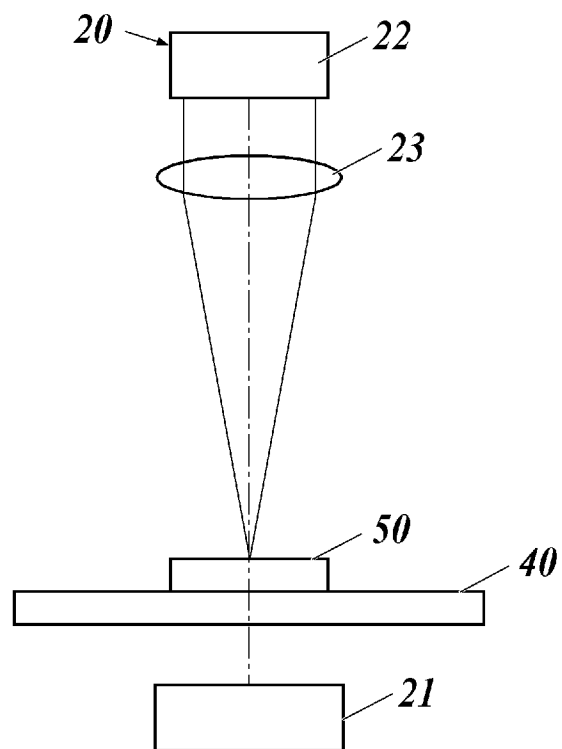
- [請求項1] 蛍光標識された組織標本の蛍光画像を撮影する蛍光画像撮影工程と、
、
撮影された蛍光画像をもとに蛍光ホールスライドイメージを作成する作成工程と、
作成された蛍光ホールスライドイメージを記憶する記憶工程と、を
備え、
前記組織標本は、蛍光物質を複数集積した蛍光粒子に生体物質認識部位を結合した蛍光物質集積ナノ粒子を染色試薬として用いて蛍光標識されたものである
画像処理方法。
- [請求項2] 蛍光画像の合焦位置を特定する特定工程を備え、
前記特定工程において、前記蛍光物質集積ナノ粒子の蛍光輝点を蛍光合焦位置として特定し、
前記蛍光画像撮影工程において、前記蛍光合焦位置に基づいて合焦した蛍光画像を撮影する請求項1に記載の画像処理方法。
- [請求項3] 前記組織標本の明視野画像を撮影する明視野画像撮影工程を備え、
前記特定工程において、前記明視野画像上の任意の座標を明視野合焦位置として特定し、
前記蛍光画像撮影工程において、前記明視野合焦位置及び前記蛍光合焦位置に基づいて合焦した蛍光画像を撮影する請求項2に記載の画像処理方法。
- [請求項4] 前記組織標本は、前記蛍光物質集積ナノ粒子を用いた染色試薬及び他の染色試薬を用いて多重に蛍光標識された請求項1から3のいずれか一項に記載の画像処理方法。
- [請求項5] 前記他の染色試薬に用いられる蛍光物質の励起波長及び発光波長は、それぞれ前記蛍光物質集積ナノ粒子が有する蛍光物質の励起波長及び発光波長と重複しない請求項4に記載の画像処理方法。

- [請求項6] 前記蛍光標識された組織標本における生体物質を検出する検出工程を備え、
前記検出工程において、前記生体物質の発現レベルを、輝点数の計測により行う請求項1から5のいずれか一項に記載の画像処理方法。
- [請求項7] 前記蛍光標識された組織標本における生体物質を検出する検出工程を備え、
前記検出工程では、前記生体物質の発現レベルを、蛍光輝度の強弱を色の濃淡で表した蛍光輝度マップとして表示する請求項1から5のいずれか一項に記載の画像処理方法。
- [請求項8] 前記組織標本の明視野画像を撮影する明視野画像撮影工程を備え、
前記明視野画像は、特定の細胞種類、特定の領域若しくは特定の組織構造を認識可能な、一又は複数の染色剤により染色された前記組織標本を撮影して得られたことを特徴とする請求項1から7のいずれか一項に記載の画像処理方法。
- [請求項9] 蛍光標識された組織標本の蛍光画像を撮影する撮影手段と、
前記撮影手段によって撮影された蛍光画像をもとに蛍光ホールスライドイメージを作成する作成手段と、
前記作成手段によって作成された蛍光ホールスライドイメージを記憶する記憶手段と、
を備え、
前記組織標本は、蛍光物質を複数集積した蛍光粒子に生体物質認識部位を結合した蛍光物質集積ナノ粒子を染色試薬として用いて蛍光標識されたものである
画像処理システム。

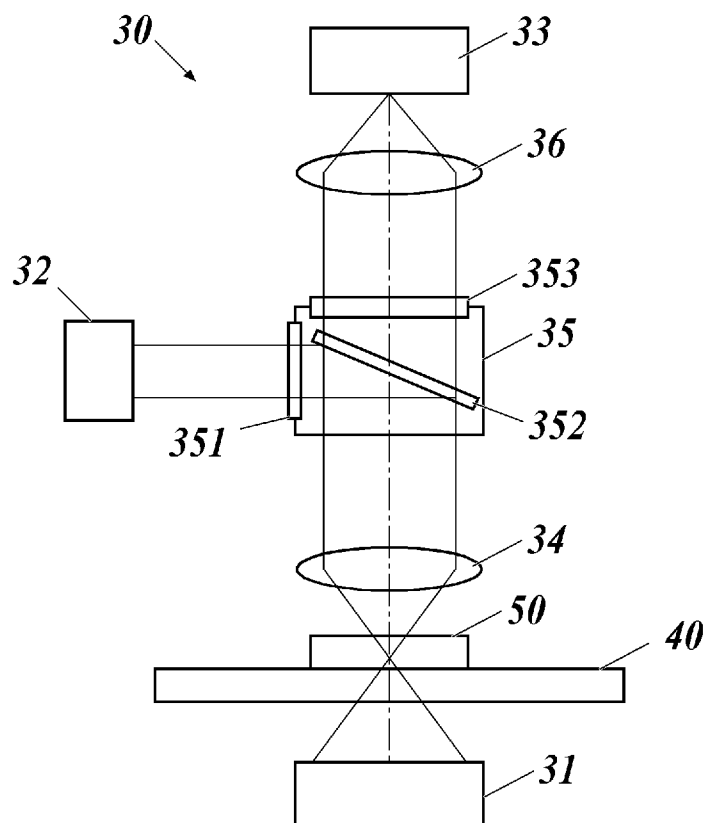
[図1]



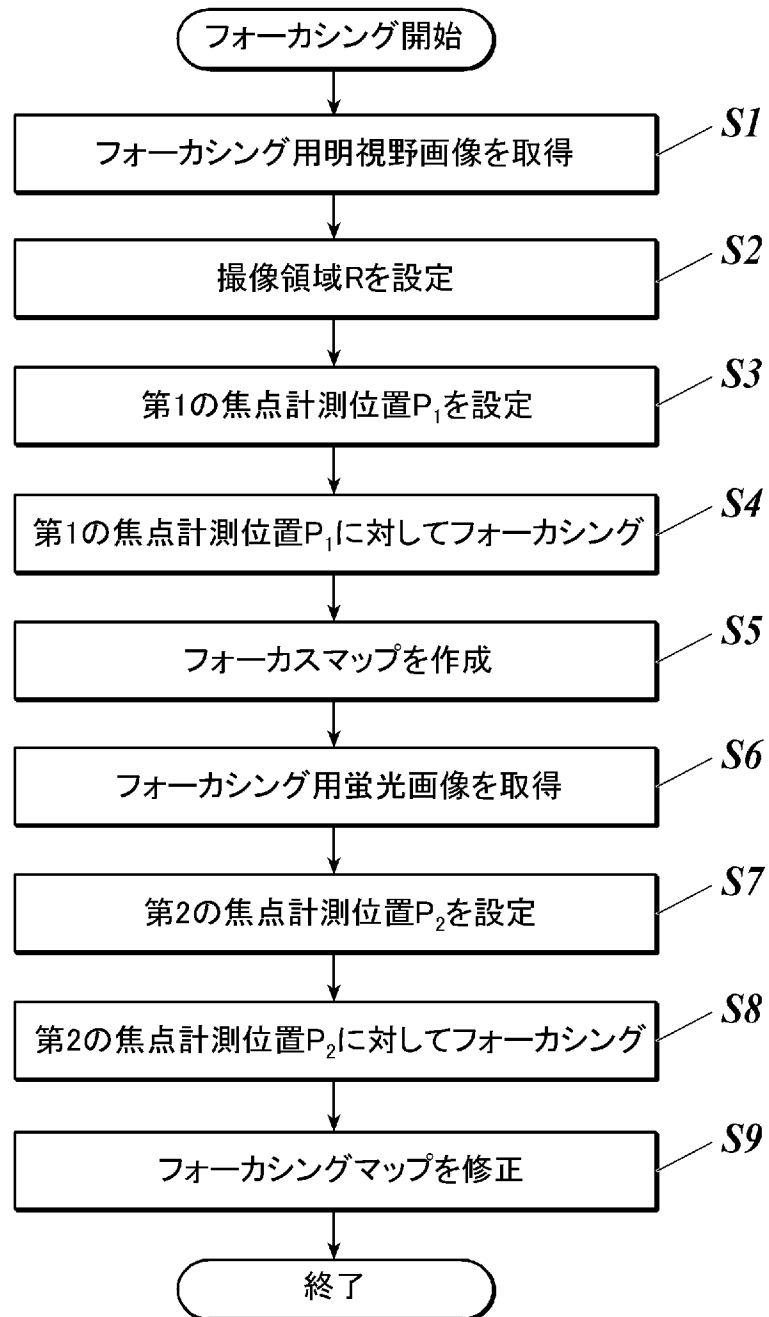
[図2]



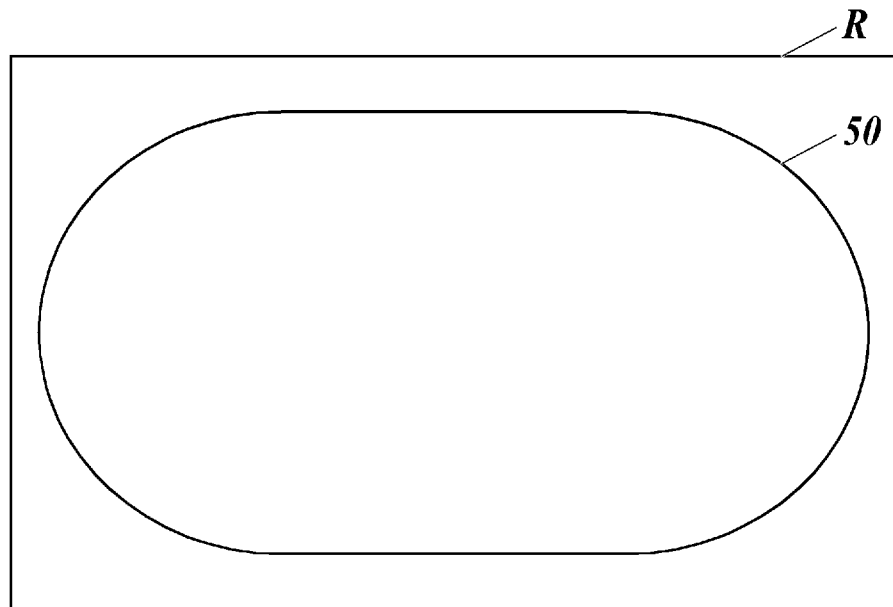
[図3]



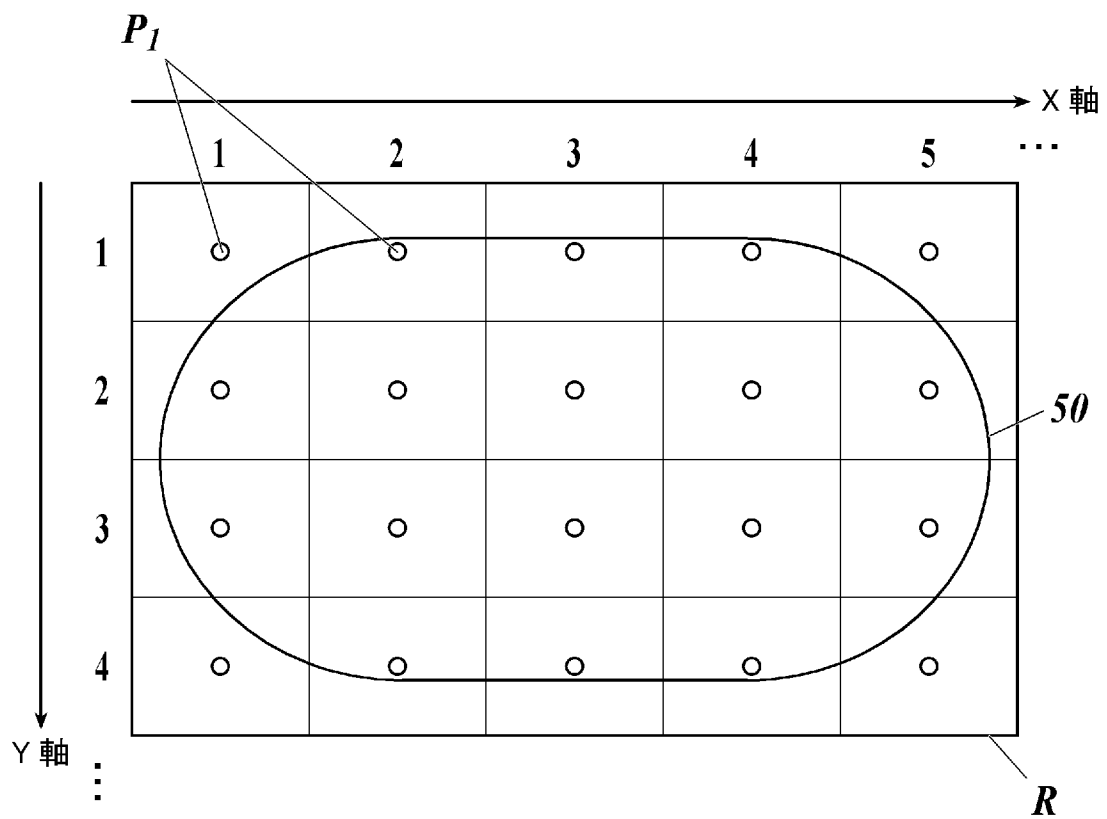
[図4]



[図5]



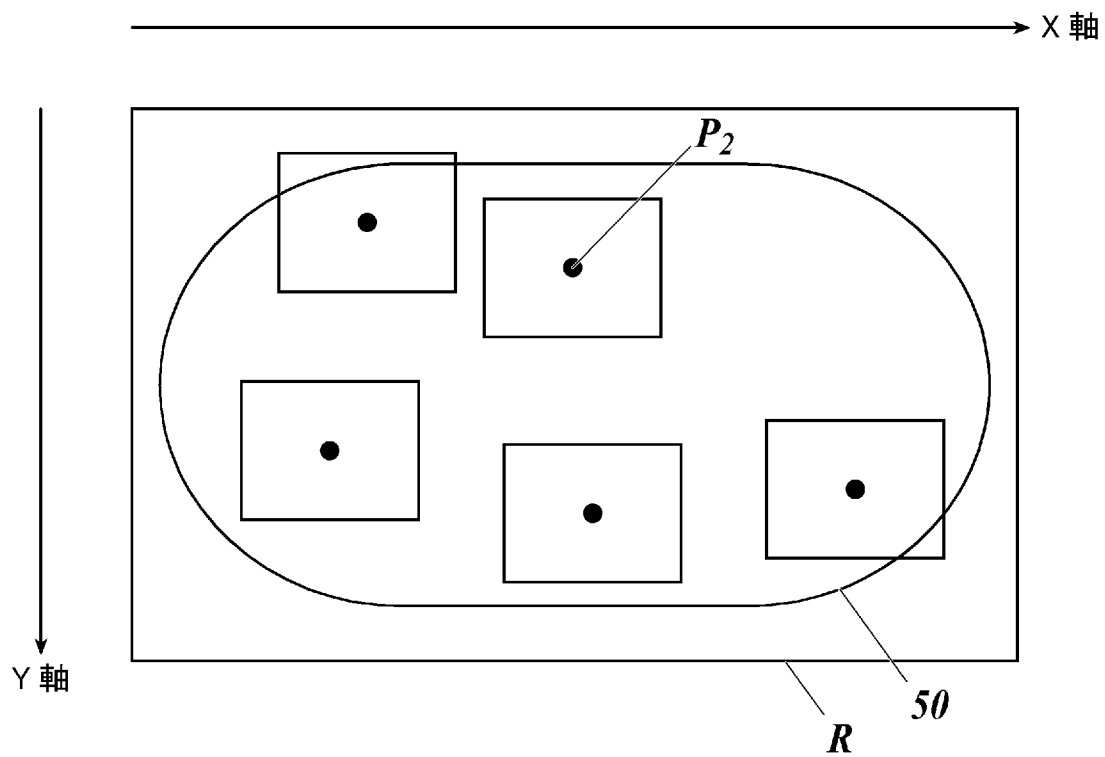
[図6]



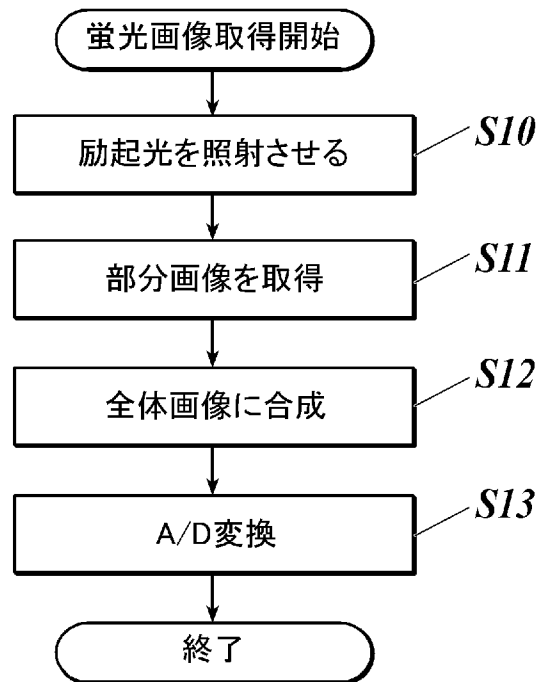
[図7]

配列番号		ステージ座標		
X軸	Y軸	X軸	Y軸	Z軸
1	1			
1	2			
1	3			
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

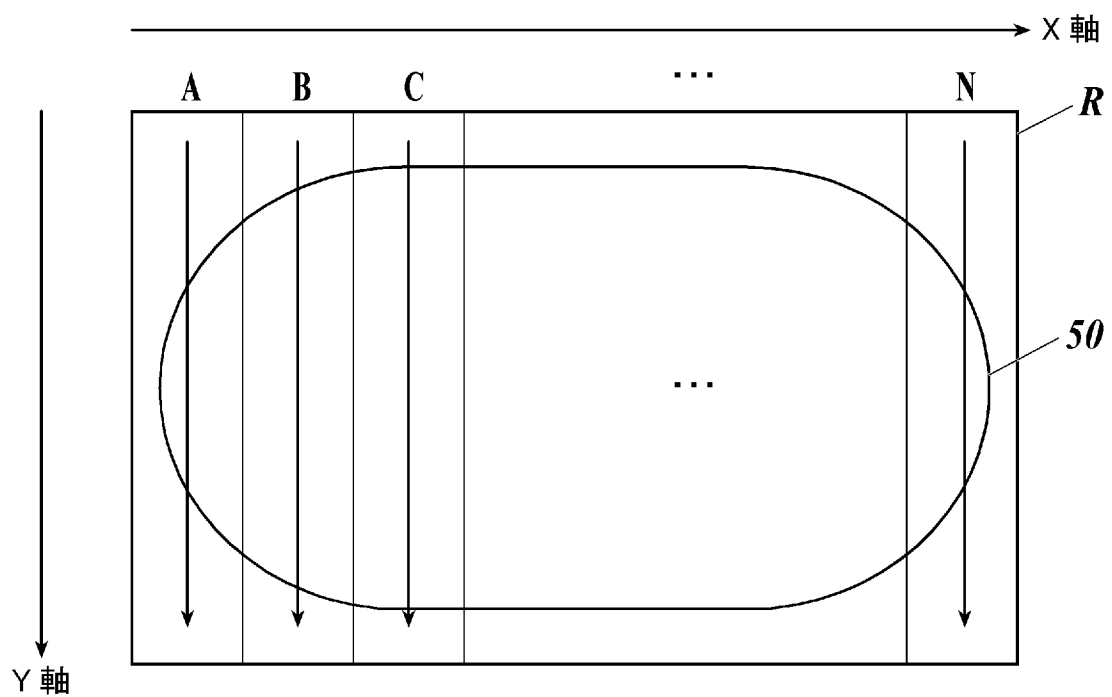
[図8]



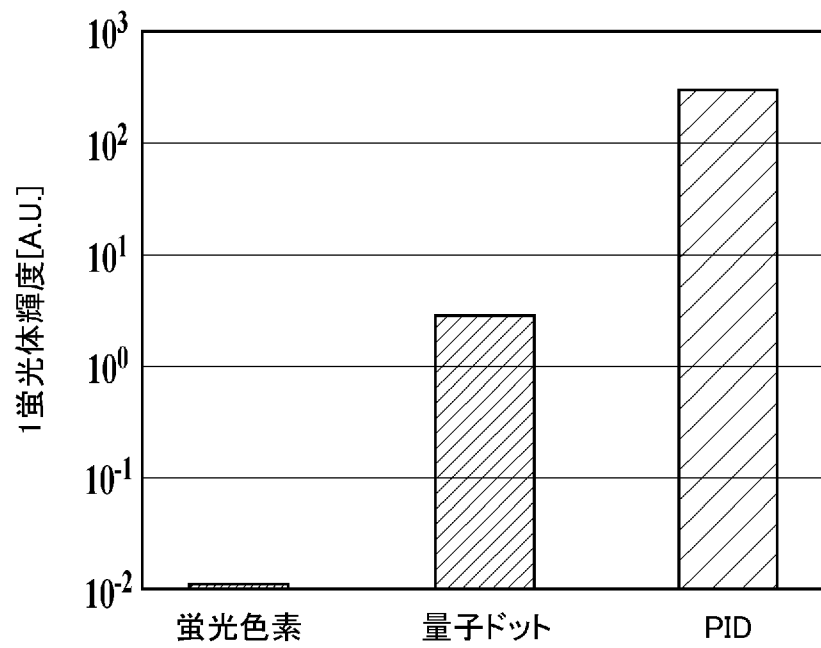
[図9]



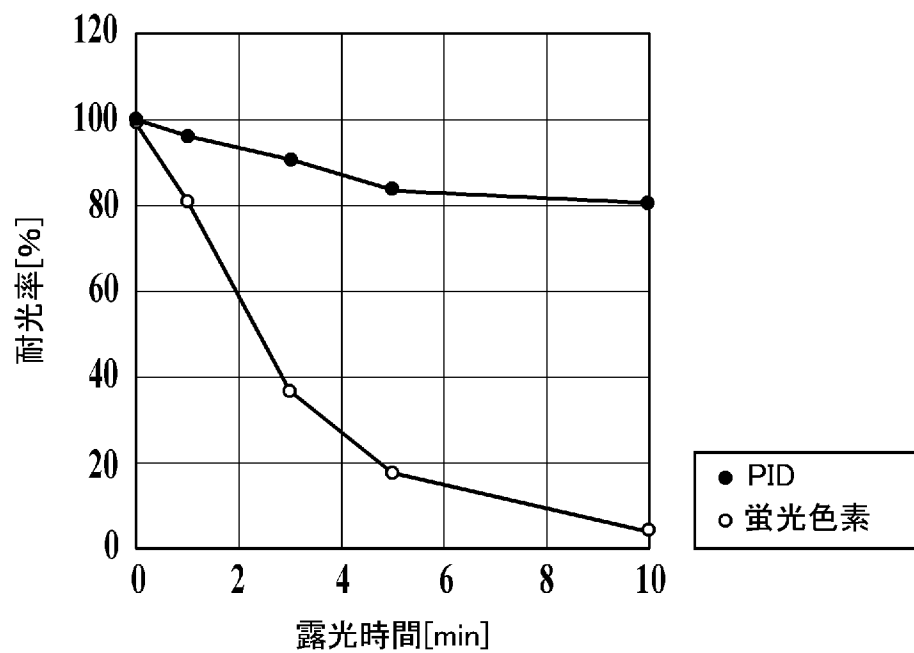
[図10]



[図11]



[図12]



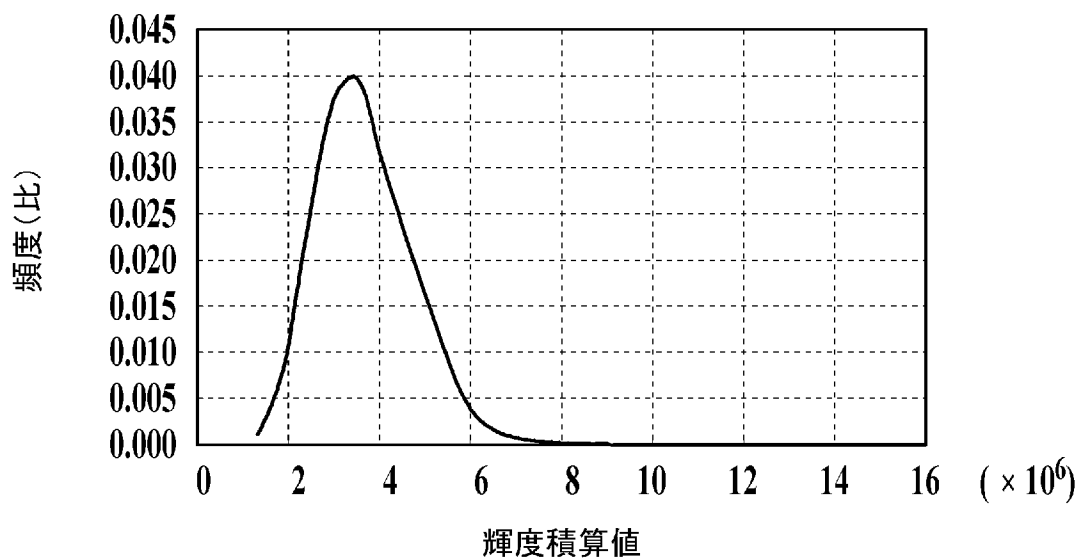
[図13]

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5内包・シリカナノ粒子	-	4	14	32	120	362	+	+
テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子	-	6	12	34	112	380	+	+
FITC内包・シリカナノ粒子	-	-	10	36	118	381	+	+
Cy5	-	-	-	-	+	+	+	+
テトラメチルローダミン	-	-	-	-	+	+	+	+
FITC	-	-	-	-	+	+	+	+

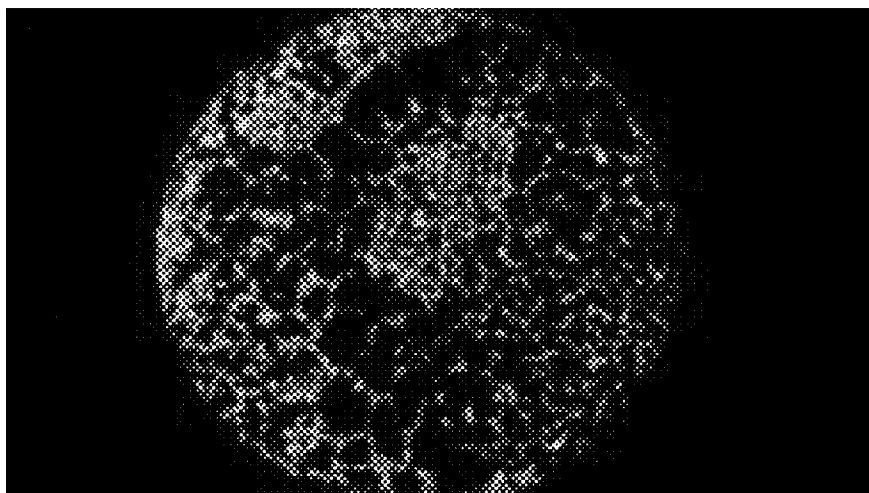
-: バックグラウンドレベル以上の輝点なし

+: 発光が強く周囲の輝点と区別がつかない

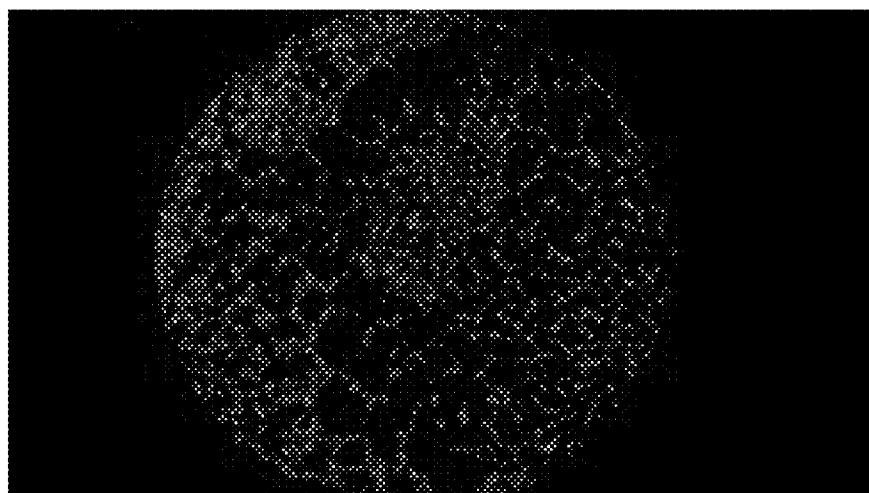
[図14]



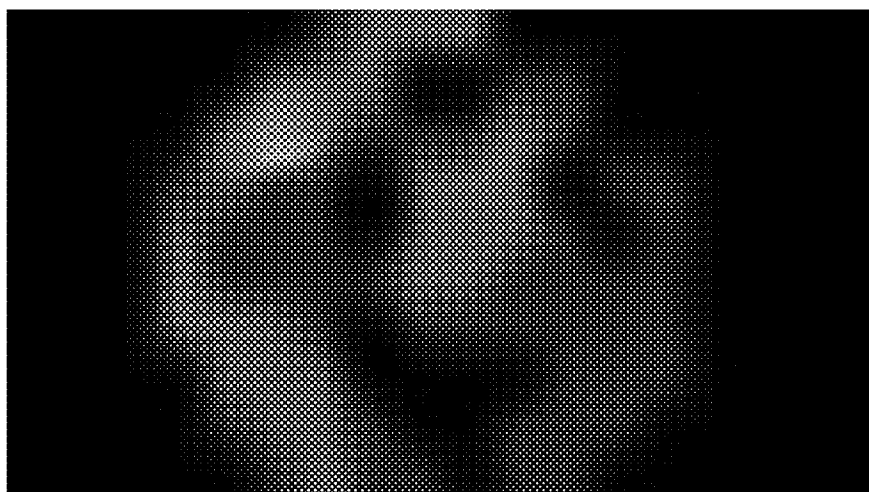
[図15A]



[図15B]



[図15C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/045257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N21/64 (2006.01)i, G01N33/48 (2006.01)i, G06T7/00 (2017.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N21/64, G01N33/48, G06T7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2016-136104 A (KONICA MINOLTA, INC.) 28 July 2016, claims 1, 3, paragraphs [0008]-[0030], [0060], [0061] (Family: none)	1, 4-6, 8, 9 2, 3, 7
Y	JP 2014-98575 A (SONY CORP.) 29 May 2014, paragraphs [0020], [0075]-[0082] & US 2014/0131592 A1, paragraphs [0019] [0111]-[0118]	2, 3
Y	JP 2013-44967 A (OLYMPUS CORP.) 04 March 2013, paragraphs [0028], [0068], [0069] (Family: none)	3
Y	WO 2016/080187 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 26 May 2016, paragraph [0080] (Family: none)	7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☐ See patent family annex.
---	---

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 February 2018 (22.02.2018)	Date of mailing of the international search report 06 March 2018 (06.03.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G06T7/00(2017.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/64, G01N33/48, G06T7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 8 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2016-136104 A (コニカミノルタ株式会社) 2016.07.28, [請求 項1] [請求項3] [0008] - [0030] [0060] [006 1] (ファミリーなし)	1, 4-6, 8, 9 2, 3, 7
Y	JP 2014-98575 A (ソニー株式会社) 2014.05.29, [0020] [0 075] - [0082] & US 2014/0131592 A1, [0019][0111]-[0118]	2, 3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 0 2 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 3 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉田 将志

2 W

4 6 3 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-44967 A (オリンパス株式会社) 2013.03.04, [0028] [0068] [0069] (ファミリーなし)	3
Y	WO 2016/080187 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2016.05.26, [00 80] (ファミリーなし)	7