

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5069245号
(P5069245)

(45) 発行日 平成24年11月7日(2012.11.7)

(24) 登録日 平成24年8月24日(2012.8.24)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/02	(2006.01) C 12 Q 1/02
C 12 M 1/34	(2006.01) C 12 M 1/34 A
G 01 N 21/64	(2006.01) G 01 N 21/64 E
G 06 F 19/12	(2011.01) G 01 N 21/64 F
G 06 T 7/00	(2006.01) G 06 F 19/12

請求項の数 9 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-540324 (P2008-540324)
(86) (22) 出願日	平成18年11月8日 (2006.11.8)
(65) 公表番号	特表2009-515533 (P2009-515533A)
(43) 公表日	平成21年4月16日 (2009.4.16)
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/060646
(87) 國際公開番号	W02007/097816
(87) 國際公開日	平成19年8月30日 (2007.8.30)
審査請求日	平成21年10月9日 (2009.10.9)
(31) 優先権主張番号	60/736,345
(32) 優先日	平成17年11月12日 (2005.11.12)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	390041542 ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ アメリカ合衆国、ニューヨーク州、スケネクタディ、リバーロード、1番
(74) 代理人	100137545 弁理士 荒川 智志
(74) 代理人	100105588 弁理士 小倉 博
(74) 代理人	100129779 弁理士 黒川 俊久
(72) 発明者	リツツシャー、ジエンズ アメリカ合衆国、ニューヨーク州、120 19、ボールストン・レイク、シェルダン ・ドライブ、4番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】非染色核の微速度細胞周期解析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞の細胞周期相を自動的に追跡するための方法であって、当該方法が、
1以上の中の細胞の経時的に取得した一連の二次元画像から三次元時空的体積を生成する段階と、

三次元時空的体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類する段階と

を含んでおり、上記セグメンテーション解析を実施する段階が、

三次元時空的体積内に明るい管及び暗い管を認定する段階と、

暗い管に関するレベルセットを用いて三次元セグメンテーションを実施して細胞を細胞周期のG2期に分類する段階と、

リンクング解析を用いて明るい管を細胞周期のG1期、M期又はS期に分類する段階とを含んでいて、上記リンクング解析を実施する段階が、1以上の細胞の娘細胞を認定するためのユークリッド距離測定法、又は1以上の細胞の娘細胞を認定するための高速前進法を含んでいる、方法。

【請求項2】

1以上の細胞がイメージング剤で標識される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記イメージング剤が、細胞周期進行中に細胞内で位置を変えるように構成された動的細胞マーカーからなる、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

細胞の細胞周期相を自動的に追跡するためのコンピューター読み取り可能な媒体であって、当該コンピューター読み取り可能な媒体が、

1以上の細胞の経時的に取得した一連の二次元画像から三次元時空的体積を生成するためのコードと、

三次元時空的体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類するためのコードと

を含んでおり、上記セグメンテーション解析を実施するためのコードが、

三次元時空的体積内に明るい管及び暗い管を認定するためのコードと、

暗い管に関するレベルセットを用いて三次元セグメンテーションを実施して細胞を細胞周期のG2期に分類するためのコードと、

リンクリング解析を用いて明るい管を細胞周期のG1期、M期又はS期に分類するためのコードと

を含んでいて、上記リンクリング解析を実施するためのコードが、1以上の細胞の娘細胞を認定するためのユークリッド距離測定法に関するコード、又は1以上の細胞の娘細胞を認定するための高速前進法に関するコードを含んでいる、コンピューター読み取り可能な媒体。

【請求項 5】

細胞の細胞周期相を自動的に追跡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

イメージヤーと、

イメージヤーから1以上の細胞の経時的に取得した一連の二次元画像を受信するように構成されたプロセッサーと

を含んでいて、上記プロセッサーが、

上記一連の二次元画像から三次元時空的体積を生成するための命令と、

三次元時空的体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類するための命令と

を実行するように構成されており、上記プロセッサーが、

三次元時空的体積内に明るい管及び暗い管を認定するための命令と、

暗い管に関するレベルセットを用いて三次元セグメンテーションを実施して細胞を細胞周期のG2期に分類するための命令と、

リンクリング解析を用いて明るい管を細胞周期のG1期、M期又はS期に分類するための命令と

を実行するように構成されており、上記リンクリング解析を実施するための命令が、1以上の細胞の娘細胞を認定するためのユークリッド距離測定法に関するコード、又はリンクリング解析を実施するための命令が、1以上の細胞の娘細胞を認定するための高速前進法に関するコードを含んでいる、画像解析システム。

【請求項 6】

前記イメージヤーが共焦点顕微鏡からなる、請求項5記載の画像解析システム。

【請求項 7】

細胞周期進行に対する化合物の効果をスクリーニングするための方法であって、当該方法が、

1以上の細胞を上記化合物で処理する段階と、

1以上の細胞の経時的に取得した一連の二次元画像から三次元時空的体積を生成する段階と、

三次元時空的体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞の進行を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に特徴づける段階と、

上記進行を対照と比較する段階と

を含んでおり、上記セグメンテーション解析を実施する段階が、

三次元時空的体積内に明るい管及び暗い管を認定する段階と、

10

20

30

40

50

暗い管に関するレベルセットを用いて三次元セグメンテーションを実施して細胞を細胞周期のG2期に分類する段階と、

リンクング解析を用いて明るい管を細胞周期のG1期、M期又はS期に分類する段階とを含んでいて、上記リンクング解析を実施する段階が、1以上の細胞の娘細胞を認定するためのユークリッド距離測定法、又は1以上の細胞の娘細胞を認定するための高速前進法を含んでおり、上記進行を対照と比較する段階が、1以上の細胞の細胞周期進行の画像出力を対照と比較することを含んでいる、方法。

【請求項8】

前記進行を対照と比較する段階が、対照に関する保存データを検索することを含む、請求項7記載の方法。

10

【請求項9】

細胞の細胞周期相の進行を表示するためのコンピューター読取り可能な媒体であって、当該コンピューター読取り可能な媒体が、

1以上の細胞の経時的に取得した一連の二次元画像から三次元時空的体積を生成するためのコードと、

三次元時空的体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類するためのコードと、

1以上の細胞の細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期のリンクング解析を実施するためのコードと、

1以上の細胞の細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期を経時的に含む画像を表示するためのコードと

20

を含んでおり、上記セグメンテーション解析を実施するためのコードが、

三次元時空的体積内に明るい管及び暗い管を認定するためのコードと、

暗い管に関するレベルセットを用いて三次元セグメンテーションを実施して細胞を細胞周期のG2期に分類するためのコードと、

リンクング解析を用いて明るい管を細胞周期のG1期、M期又はS期に分類するためのコードと

を含んでいて、上記リンクング解析を実施するためのコードが、1以上の細胞の娘細胞を認定するためのユークリッド距離測定法に関するコード、又は1以上の細胞の娘細胞を認定するための高速前進法に関するコードを含んでいる、コンピューター読取り可能な媒体

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に特定細胞の細胞周期相を決定するように設計された画像解析に関する。さらに詳しくは、本発明は、二次元微速度画像の三次元セグメンテーションを用いて細胞を細胞周期相に自動的にセグメント化することに関する。

【背景技術】

【0002】

真核細胞が増殖する場合、それは細胞周期として知られる厳密に調節された一連の事象を通って進行する。細胞周期は、一般に4つの相、即ちG1期、S期、G2期及びM期を含んでいる。細胞周期の各相は、DNAが複製されて細胞が2つの娘細胞に分裂するのに伴い、細胞形態及び総DNA含有量の点で際立った特徴を有している。

40

【0003】

基礎研究及び薬物発見研究では、薬剤が細胞の成長及び分裂にいかなる影響を与えるかを理解することで貴重な情報を得ることができる。多くの場合、この情報は化合物に関連する作用機序を多少とも表示する。例えば、特定の部類の薬物及び遺伝的操作はG2期(第二間期)で細胞成長を停止させることがあり、特定の1組の作用機序によって作用する可能性がある。別の部類の薬物及び遺伝的操作は有糸分裂中にある細胞を拘束することがあり、したがって異なる機序によって作用する可能性がある。細胞集団がG2期又は有糸

50

分裂（或いはその他何らかの段階）のいずれにおいて遮断又は拘束されるかを迅速に判定できれば、細胞集団について試験した特性不明の化合物の作用機序を評価するための貴重なツールが得られる。正常細胞を攪乱することなしに急速に増殖する癌細胞の複製を阻止する化合物を特定することが望ましいので、これは癌の研究及び治療において特に有用である。さらに、特性未定の化合物が細胞周期を通しての進行を増進させる効果を有するか否かを判定することも有用であり、これはかかる化合物が潜在的に発癌性であり得るからである。

【 0 0 0 4 】

通例、細胞周期の進行は蛍光細胞画像の画像解析によって評価される。かかる解析には、細胞を核染料（一般に蛍光染料）で染色して細胞核を識別することで、細胞セグメンテーション及び他の画像解析手順のための参照点を得ることが含まれる場合がある。蛍光染料の通常の使用は、長期の細胞イメージングにとって障害となる。例えば、細胞を十分に染色するためには、蛍光染料は何らかのやり方でDNAに結合することに依存している。かかる染料は固定細胞アッセイ又は短時間（例えば、数時間）の生細胞アッセイのために好適であり得るが、蛍光染料は長期研究を妨げる毒性の副作用を有している。細胞を核染料で染色して長期間にわたり培養すると、染色が挿入された場合にはDNAを複製できなくなるか、或いは有糸分裂中の染色体分離が染料によって妨げられるために細胞は死ぬ。

10

【 0 0 0 5 】

核を染色しかつ2以上の細胞周期を通じて細胞を生きたままに保つための別法は、細胞を操作することで核局在配列に結合した蛍光タンパク質（例えば、グリーン・フルオレセント・プロテイン（GFP））を発現させ、かかるタンパク質が核染料として働くようになることである。GFP染色は挿入蛍光染料と同様にしてDNA複製を妨げることはないが、このアプローチは細胞の遺伝的操作を必要とする。このアプローチはまた、細胞周期の様々な相を識別しない。さらに詳しくは、GFPタンパク質マーカーは有糸分裂の様々な相（例えば、前期、中期、末期及び終期）を区別して染色するが、間期の3つの相（即ち、G1期、S期及びG2期）を区別しない。

20

【 0 0 0 6 】

細胞周期を通しての長期進行を妨げない染色方法に加えて、かかる染色細胞の迅速で自動的な評価に対するニーズも存在している。多くの基礎研究及び薬物発見が「高スループット」ベースで実施されているので、長期研究のために染色細胞画像を手作業で評価していたのでは手に負えない。例えば、細胞アッセイウェルは数百の細胞を有することがあり、これらは数日間にわたり毎時数回モニターされることがある。加えて、研究される各々の薬剤又は潜在的な治療用化合物に関し、統計的に有意な結果を得るために複数のウェルが用意されることがある。したがって、細胞周期進行の信頼可能で正確で自動的な判定を可能にする技法に対するニーズも存在している。

30

【非特許文献1】Padfield, D.R. et al., "Spatio-Temporal Cell Cycle Analysis Using 3D Level Set Segmentation of Unstained Nuclei in Line Scan Confocal Fluorescence Images", Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2006. 3rd IEEE International Symposium on April 6, 2006, pages 1036-1039

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

一般に、本発明は画像解析を容易にする画像解析技法及び装置に関する。本発明はまた、本発明の方法を実施するための命令、データ構造などを設けた機械読み取り可能な媒体にも関する。本技法に従えば、特定のアルゴリズムの使用によって細胞の画像を評価できる。こうして解析された画像を用いて、本発明の装置は経時的な細胞の細胞周期相に関する結論を自動的に引き出すことができる。また、本技法を使用することで、細胞周期を通しての1以上の細胞の経時的な進行を図式的に表現できる処理画像結果（例えば、ツリー形又は他の適切な表示）を生成することもできる。

50

【0008】

本発明の一態様に従えば、細胞の細胞周期相を自動的に追跡するための技法であって、1以上の細胞の複数の二次元画像から三次元体積を生成する段階と、三次元体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類する段階とを含んでなる方法が提供される。

【0009】

本発明の別の態様に従えば、細胞の細胞周期相を自動的に追跡するためのコンピューター読み取り可能な媒体であって、1以上の細胞の複数の二次元画像から三次元体積を生成するためのコードと、三次元体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類するためのコードとを含んでなるコンピューター読み取り可能な媒体が提供される。 10

【0010】

本発明のさらに別の態様に従えば、細胞の細胞周期相を自動的に追跡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は、イメージヤーと、イメージヤーから1以上の細胞の複数の二次元画像を受信するように構成されたプロセッサーとを含み、プロセッサーは、複数の二次元画像から三次元体積を生成するための命令と、三次元体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類するための命令とを実行するように構成されている画像解析システムが提供される。

【0011】

本発明のさらに別の態様に従えば、細胞周期進行に対する化合物の効果をスクリーニングするための方法であって、1以上の細胞を該化合物で処理する段階と、1以上の細胞の複数の二次元画像から三次元体積を生成する段階と、三次元体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞の進行を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に特徴づける段階と、該進行を対照と比較する段階とを含んでなる方法が提供される。 20

【0012】

本発明のさらに別の態様に従えば、細胞の細胞周期相の進行を表示するためのコンピューター読み取り可能な媒体であって、1以上の細胞の複数の二次元画像から三次元体積を生成するためのコードと、三次元体積のセグメンテーション解析を実施して1以上の細胞を経時的に細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期に分類するためのコードと、1以上の細胞の細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期のリンク解析を実施するためのコードと、1以上の細胞の細胞周期のG1期、S期、G2期又はM期を経時的に含む画像を表示するためのコードとを含んでなるコンピューター読み取り可能な媒体が提供される。 30

【0013】図面の簡単な説明

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むことで一層良く理解されよう。図面全体を通じて、同じ符号は類似の部分を表している。

【0014】

図1は、本技法の態様に従って細胞の画像データを取得する際に使用するための例示的なシステムの略図である。 40

【0015】

図2は、本技法に従って細胞画像をセグメント化する方法を示すフローチャートである。

【0016】

図3は、本技法に従って得られた例示的な二次元細胞画像である。

【0017】

図4は、本技法に従って三次元画像体積を生成する方法を示すフローチャートである。

【0018】

図5は、本技法に従って得られた例示的な三次元細胞画像体積である。 50

【0019】

図6は、細胞周期進行中にどの点でセグメント化及びリンクング段階が実施されるかを示す例示的なツリー形表示である。

【0020】

図7は、細胞画像に関して高速行進技法を実施する方法を示すフロー チャートである。

【0021】

図8は、細胞周期を通しての母細胞及び娘細胞の経時的な進行を示す例示的なコード化ツリー形表示である。

【0022】

図9は、細胞周期を通しての母細胞及び娘細胞の経時的な進行を示す別のツリー形表示である。 10

【発明を実施するための最良の形態】**【0023】**

医学の分野では、細胞周期の様々な相を通して細胞の経過を追跡できることが望ましい場合が多い。一般に、細胞周期は4つの異なる相に分けることができる。細胞核中のDNAは、細胞周期の（「合成」を意味する）「S期」中に複製される。細胞分裂期全体は（「有糸分裂」を意味する）「M期」として表される。残りは、M期とDNA合成（S期）の開始との間の期間（「G1期」（第一間期）という）、及びDNA合成の完了と次のM期との間の期間（「G2期」という）である。間期は細胞周期の非分裂期を表す用語であり、G1期、S期及びG2期を含んでいる。典型的な細胞では、間期は細胞周期時間全体の90%以上を占めことがある。しかし、1種以上の細胞周期変更化合物又は薬剤及び／又は細胞周期変更刺激（例えば、照射又は超音波処理）で処理された細胞では、細胞周期を通しての正常な進行が遮断される結果、特定の細胞周期相で費やされる相対時間が未処理細胞に比べてはるかに長くなる。かくして、既知の又は推定される細胞周期変更薬剤又は化合物の効果を評価する一方法は、該化合物で処理された細胞集団に関する細胞周期進行を調べることである。生細胞での細胞周期進行は、本発明でに提供されるイメージング技法及び装置によって自動的に評価できる。 20

【0024】

細胞周期を通しての細胞の経過に関する情報を生成するため、本技法は経時的な細胞変化を追跡する。標準的な追跡アプローチでは、一般に、対象物の外観又は軌跡が変化しないことを仮定している。しかし、細胞周期中では、細胞の外観及び軌跡の両方が経時に変化する。したがって、標準的な追跡技法を用いてこの問題にアプローチすることは難しい。本技法では、経時的に採取された二次元画像スライスを時空体積として考察し、次いで細胞を細胞周期の様々な相に分類するためにこの体積中の核をセグメント化する。 30

【0025】

本技法に従って動作し得る例示的なイメージングシステム10を図1に示す。一般に、イメージングシステム10は、信号を検出し、信号をダウンストリームプロセッサーで処理できるデータに変換するイメージヤー12を含んでいる。一層詳しく後述される通り、イメージヤー12は画像データを生み出すための様々な物理的原理に従って動作し得る。しかし、一般にイメージヤー12は、ここにはマルチウェル培養プレート中で成長させたものとして示される細胞集団14を表す画像データを通常の媒体（例えば、写真フィルム）又はデジタル媒体中に生み出す。 40

【0026】

イメージヤー12は、システム制御回路16の制御下で動作する。システム制御回路16は、放射線源制御回路、タイミング回路、データ取得を試料の移動と協調させる回路、放射線源及び検出器の位置を制御する回路などのような広範囲の回路を含み得る。本発明に関しては、システム制御回路16は、システム制御回路16又はシステム10の付属部品によって実行されるプログラム及びルーチンを保存するためのメモリー要素（例えば、磁気又は光記憶媒体）も含み得る。保存されるプログラム又はルーチンは、本技法の全部又は一部を実施するためのプログラム又はルーチンを含み得る。 50

【0027】

イメージヤー12によって取得された画像データは、様々な目的のため（例えば、取得されたデータ又は信号をデジタル値に変換するため）イメージヤー12によって処理してからデータ取得回路18に提供できる。データ取得回路18は、広範囲の処理機能（例えば、デジタルダイナミックレンジの調整、データのスムージング又はシャープニング、並びに所望ならばデータストリーム及びファイルのコンパイリング）を果たすことができる。

【0028】

データ取得回路18はまた、取得画像データをデータ処理回路20に転送することができ、そこで追加の処理及び解析を実施できる。即ち、データ処理回路20は、順序付け、スムージング、シャープニング、特徴認識などを含む画像の実質的な解析を実施できる。加えて、データ処理回路20は1以上の試料源（例えば、マルチウェルプレートの複数のウェル）に関するデータを受信できる。処理された画像データは、イメージングシステム10内に又はそれから遠く離れて位置し得る短期又は長期記憶デバイス（例えば、画像保存通信システム）中に保存し、及び／又は（例えば、オペレーターワークステーション22の位置で）オペレーターのために再構成して表示することができる。10

【0029】

再構成された画像を表示することに加えて、オペレーターワークステーション22は、通例はシステム制御回路16とのインターフェースを介して、イメージングシステム10の上述の動作及び機能を制御できる。オペレーターワークステーション22は、1以上のプロセッサー系部品（例えば、汎用又は特定用途向けコンピューター24）を含み得る。プロセッサー系部品に加えて、オペレーターワークステーション22は、磁気及び光大容量記憶デバイス、RAMチップのような内部メモリをはじめとする各種のメモリ及び／又は記憶部品も含み得る。メモリ及び／又は記憶部品は、本明細書中に記載された技法を実施するためのプログラム及びルーチンであって、オペレーターワークステーション22又はシステム10の付属部品によって実行されるプログラム及びルーチンを保存するために使用できる。別法として、かかるプログラム及びルーチンは、オペレーターワークステーション22から遠く離れているが、オペレーターワークステーション22上に存在するネットワーク及び／又は通信インターフェースによってアクセスできるコンピューターアクセス可能な記憶装置及び／又はメモリ上に保存することもできる。20

【0030】

オペレーターワークステーション22はまた、各種の入出力（I/O）インターフェース並びに各種のネットワーク又は通信インターフェースも含み得る。各種のI/Oインターフェースは、環境設定情報を観察しあつ入力するため、及び／又はイメージングシステム10を操作するために使用できるユーザーインターフェースデバイス（例えば、ディスプレイ26、キーボード28、マウス30及びプリンター32）との通信を可能にする。各種のネットワーク及び通信インターフェースは、ローカルエリア及びワイドエリアのインターネット及び記憶装置ネットワーク並びにインターネットへの接続を可能にする。各種のI/O及び通信インターフェースは、該当する場合又は所望される場合に応じ、ワイヤ、回線又は適当なワイヤレスインターフェースを使用できる。30

【0031】

イメージングシステム10用として、2以上のオペレーターワークステーション22を設けることもできる。例えば、イメージングスキャナー又はステーションが画像データ取得手順に関連するパラメーターの調整を可能にするオペレーターワークステーション22を含み得る一方、結果及び再構成画像を操作し、増強し、観察するために異なるオペレーターワークステーション22を設けることができる。40

【0032】

生細胞の画像の検出及び細胞周期の様々な相を通しての細胞の進行の評価は、様々なやり方で実施できる。イメージヤー12は、蛍光顕微鏡、共焦点蛍光顕微鏡、レーザー走査共焦点顕微鏡又は内部全反射顕微鏡をはじめとする任意適宜のイメージングデバイスであ50

り得る。特定の実施形態では、イメージングシステム10は、96ウェルプレート内で成長しかつイメージング期間全体を通じて標準培養条件(37 / 5%CO₂)下で計器上に維持される細胞に関して488nmの励起及び535nm発光フィルターを用いるIN Cell Analyzer 1000又はIN Cell Analyzer 3000(GE Healthcare社)を含み得る。

【0033】

細胞14は任意適宜の細胞タイプであり得る。イメージング可能な細胞としては、哺乳動物細胞、ヒト細胞、不死化細胞系、高増殖性細胞、癌細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞、幹細胞、配偶子などが挙げられる。上述の通り、細胞14は様々な条件下で成長させることができる。単一の供給源からの細胞のアリコート又は複数の供給源からの細胞を並行して処理でき、この場合に細胞は同一の刺激又は様々な刺激(例えば、化学薬剤への暴露)にさらされる。即ち、複数の細胞試料をマルチウェルプレート内で処理できる。この場合、一部のウェルは推定される治療用化合物のような化合物を含む一方、他のウェルは化合物を含まない(即ち、対照細胞)。若干の実施形態では、ロスコビチン又はノコダゾールのような既知の細胞周期プロッカーで細胞を処理することができる。本明細書中で使用する「試験化合物」又は「薬物候補品」又は「モジュレーター」という用語或いは文法的同義語によれば、直接又は間接に細胞周期に影響を及ぼす能力について試験すべき任意の分子(天然物又は合成物)、例えばタンパク質、オリゴペプチド(例えば、長さ約5~約25アミノ酸)、小有機分子、多糖、脂質、脂肪酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドなどが記述される。試験化合物は、十分な範囲の化合物構造多様性を与える組合せライブラリ又はランダム化ライブラリのような試験化合物のライブラリの形態を有することができる。さらに、若干の実施形態では、特定の遺伝子を「ノックアウト」又は沈黙させることで細胞を遺伝的に変更することができる。また、細胞周期進行に対する特定遺伝子の除去又は変更の効果を評価することが適当な場合もある。

【0034】

若干の実施形態では、分析的に関連する遺伝子にリンクした細胞周期相マーカーを安定して発現する細胞系のイメージングを行うことが有用であり得る。即ち、例えば、本明細書中に記載した方法は、DNAヘリカーゼBのC末端PSLDドメインに融合したGFPを含む融合タンパク質(国際公開第2006/008542号に記載されているように、GE Healthcare社(旧Amersham Biosciences社)から入力可能)を発現するように形質転換した細胞系を研究するために使用できる。細胞周期相マーカーは、非同調集団中の個々の細胞の細胞周期状態を表示する蛍光タンパク質系センサーである。融合タンパク質のヘリカーゼBドメインは細胞周期進行中に核と細胞質との間で移動する結果、細胞が細胞周期を通して進行するのに伴って異なる蛍光パターンを生み出す。G1期細胞では、核蛍光が細胞質蛍光より大きい(N > C)のに対し、S期細胞は均等に分布した蛍光(N = C)を有し、G2期細胞は暗い核と共に明るい細胞質(C > N)を有する。本技法では、このような異なる染色効果に基づいて核を自動的にセグメント化し、結果の簡単で意味深い表現を生み出すためのコンピューター解析アルゴリズムが使用される。

【0035】

細胞を細胞周期の様々な段階に分類するために使用するコンピューター解析方法40を図2に示す。段階42では、イメージングシステム10は適当な染色マーカーで染色された細胞の二次元画像(図3参照)を経時的に得る。画像の数及び画像のサイズは様々に変化し得るが、一般に、イメージングシステム10は段階46で三次元画像体積48を生成するのに十分な長い時間にわたって十分な数の画像を得ることができる。例えば、イメージングシステムは、約30秒間隔で撮影された1280×1280ピクセルサイズの画像をおよそ100枚得ることができる。段階50では、三次元画像体積は暗い核51及び明るい核52にセグメント化される。暗い核51は、展開面が核からバックグラウンドにリーケするのを防止するため、高い曲率及びエッジに対する強い引力で束縛されたレベルセットの三次元インプリメンテーションを用いてセグメント化される。レベルセットのパラ

10

20

30

40

50

ダイムは、それが輪郭及び表面の展開を追跡するための数値的方法であることである。輪郭を直接に操作する代わりに、輪郭はレベルセット関数 (X, t) と呼ばれる高次元関数のゼロレベルセットとして埋め込まれる。次いで、レベルセット関数は微分方程式の制御下で展開される。任意の時点において、出力からゼロレベルセット $((X), t) = \{ (X, t) = 0 \}$ を抽出することで展開輪郭を得ることができる。レベルセットを用いることの主な利点は、任意の複雑な形状をモデル化でき、マージングやスプリッティングのようなトポロジー的変化を暗黙のうちに取り扱えることである。

【0036】

例示的なレベルセット方程式を下記に示す。

【0037】

【数1】

10

$$(d/dt)\psi = \alpha A(x) \cdot \nabla \psi - \beta P(x) |\nabla \psi| + \gamma Z(x) \kappa |\nabla \psi|$$

式中、 A は移流項であり、 P は伝播（膨張）項であり、 Z は平均曲率 κ に対する空間変更子項である。スカラー定数 α 及び β は、界面の移動に対する各項の相対影響力を重みを付ける。

【0038】

20

別の実施形態では、レベルセット方程式は下記のように表現することができる。

【0039】

【数2】

$$(d/dt)\psi = \alpha \nabla g \cdot \nabla \psi - \beta (\lambda g + (1-\lambda)s(D)) |\nabla \psi| + \gamma g \kappa |\nabla \psi|$$

ここでは、 g は画像勾配の減少関数であり、 λ は重み付けパラメーターであり、 $s(D)$ は下記に記載される。この関数 g は、低勾配領域で 1 に近く、高勾配領域で 0 に近い結果、エッジにおいてレベルセットが遅くなる速度画像を与える。関数 g はシグモイド関数に基づいて設定できる。レベルセットがリークすると、それはバックグラウンド中に急速に進行し、そのまま伝播させれば、これらの弱エッジ核からのレベルセットは結局のところ他の核と結合し、使用できないセグメンテーションをもたらす。本技法では、移流力を増大させることができ、これがレベルセットをエッジに引きつけ、リークが実質的に減少する。動的細胞周期センサーの絶えず変化する強度プロファイルは、しばしば核の内部に勾配を生じ、したがって高い移流力はレベルセットを核の内部の局所極小に固着せざることがある。核の境界にエッジが存在せず、移流力がレベルセットを束縛しなくてよい実施形態では、サイズの束縛を実行することができ、或いは核位置に関する以前の知識をレベルセットに組み込むことができる。

30

【0040】

40

1 組のシード点を用いて三次元レベルセット展開を初期化することができる。複数スケールのテンプレートと 1 組の低レベルフィーチャーとの正規化相互関係を用いるシード配置段階では、細胞の中央軸付近にシード点が配置される。このような観察結果に基づき、レベルセット関数の速度に影響を与えるシードからの距離関数のマッピングから核エッジの位置のモデルが構築される。マッピング関数としては、円滑に変化する速度値を与えるという理由でシグモイドが使用でき、パラメーターは予想核サイズで速度関数のゼロ交差が起こるように設定すればよい。使用するシグモイド関数は下記のものであり得る。

【0041】

【数3】

$$s(D) = (2 * 1 / (1 + \exp(-(D - \beta) / \alpha)) - 1$$

式中、 $s(D)$ は距離 D に依存する速度であり、 α は予想細胞サイズに設定され、 β は曲線の勾配を調節する。スカラー乗算及び減算因子は、1 ~ -1の速度を与える関数を生み出す。かくして、若干の他の方法のように繰り返すたびにモデルを更新するのではなく、これは最初から計算しさえすればよく、計算効率の向上をもたらす。上述のシグモイド関数をレベルセット方程式の伝播項に適用することで、レベルセットが膨張する際にこの項を遅らせることができる。この束縛をレベルセット方程式中に組み込むためには、この方程式を既に伝播項が掛けられている g エッジ関数とバランスさせればよい。変数 α により、これらのエッジ力及び距離力の相対重みを調節できる。 α が増加するのに伴い、エッジ関数に多くの重みが与えられ、距離関数に少ない重みが与えられる。

【0042】

曲率項及び移流項はシグモイド関数による影響を受けていないので、これらの項はそれぞれ、曲線を正則化し続け、また曲線をエッジに引きつけることができる。かくして、強い勾配の存在下では、前述のようにレベルセットが展開してエッジ上に固着するので移流力が優勢になる。しかし、弱いエッジの存在下では、形状/サイズの束縛によってレベルセットが無制限に成長することが抑えられる。

【0043】

明るい核52は、領域成長技法を用いてセグメント化される。細胞が細胞周期を通して進行するのに伴い、核の強度は明から暗に推移し、次いで細胞が娘細胞に分裂すると再び明に戻る。暗い核51がレベルセットのインプリメンテーションを用いてセグメント化されるのに対し、M期及びG1期の明るい核52は非常に明るい画像強度によって特徴づけられ、これらの明るい核52は保存閾値から始まる領域成長方法を用いてセグメント化できる。残ったS期の細胞はバックグラウンドと混和し、したがって三次元空間束縛を用いて橋渡しする必要がある。

【0044】

次に、様々な相におけるセグメント化核の三次元トラックが段階54でリンクングアルゴリズム（下記に詳述する）を用いて合体される。これらの相のすべてを合体及び橋渡しするため、リンクング方法は、細胞周期を通しての細胞の展開を記述する完全に連結された三次元核「ツリー」を与える。かくして、本方法は細胞の移動及び分裂並びに細胞周期状態のデジタル追跡を可能にし、段階56で色分け（又は他の視覚コード化）された「ツリー」を生成する。この出力画像58から、空間位置、（ツリーの横断面の形状で表される）核サイズ、及び周期中における細胞の位置を決定することができる。本アルゴリズムは、ユーザーが、細胞集団にわたって任意の動的細胞マーカー（例えば、GFP系又は他の動的マーカー）からの出力を経時的に測定すると共に、空間及び時間中の細胞の履歴を追跡することを可能にする。この場合、各三次元データ「スライス」は微速度の独立フレームに由来している。フレーム間隔は、センサーの時間的特性及び研究すべき細胞過程に応じて秒、分又は時間であり得る。かくして、遺伝的に導入される自発蛍光リポーター構築物を用いる開示技法のこれらの実施形態は、核の染色を必要とせずに長い時間にわたる細胞周期の自動コンピューター解析を可能にする。その上、本明細書中に提供される一般的追跡方法は、細胞周期の様々な段階の三次元セグメントーション及び表示を可能にする。細胞周期のかかる三次元表示によれば、イメージングデータから生物学的に関連する結論を引き出すことができる。例えば、三次元表示は細胞周期の攪乱の可視化を可能にすることがあり、これによって特定の治療用細胞周期遮断剤の有効性に関する結論を引き出すことができる。かかる可視化は、細胞集団のレベルであることもあり、或いは集団中の単一の細胞のレベルであることもある。

【0045】

10

20

30

40

50

図3は、本技法を用いてイメージングシステム10から得ることができる例示的な二次元染色細胞画像44である。独立した非動的核マーカーの不存在下で細胞追跡及び細胞周期解析を達成するための画像解析は、細胞周期を通しての蛍光分布の変化をもたらす。解析手順は、G1期細胞中の明るい核を記録すると共に、明るく染色された細胞質中の暗いスポットとして示される、G2期細胞の細胞質中に残された「穴」から核位置を推理することができる。

【0046】

一連の微速度二次元画像44が得られた後、画像44を前処理することで、ノイズを低減させると共に核シードを認定することができる。図4は例示的な前処理技法60を示している。最初に、段階62でレベルセット平滑化アルゴリズムを用いて画像44を平滑化する。次に、段階64で核の正規化相互相関モデルを用いてシードが自動的に検出され、次いでシード分類段階66が実施される。段階68で、閾値束縛、エッジ準拠束縛及び曲率束縛の組合せを用いてバックグラウンドのマスキングを行うことで、暗い核を回避しながらバックグラウンドの大部分がセグメント化される。次に、レベルセット法を用いて、二次元微速度画像中の暗い核が三次元体積48としてセグメント化される(図2参照)。

10

【0047】

段階62では、核のエッジを保持しながらスਪ-リアスノイズを除去するため、曲率準拠レベルセットアプローチを用いて二次元空間内で画像がまず平滑化される。平滑化のために選択される方法は修正曲率拡散方程式であり、これは異方性拡散方程式のレベルセット類似体である。このタイプの平滑化の方程式は下記の式で与えられる。

20

【0048】

【数4】

$$f_t = |\nabla f| \nabla \cdot c(|\nabla f|) \frac{\nabla f}{|\nabla f|}$$

ここで、コンダクタンス修正曲率項は下記の通りである。

【0049】

【数5】

30

$$k = \nabla \cdot \frac{\nabla f}{|\nabla f|}$$

レベルセットを展開するため、最初に段階64で初期シードを定義することができる。二次元シード生成のためには、二段階アプローチ(即ち、リング状カーネルとの正規化相互相関及びそれに続く点分類)が使用できる。リングバンドの内部で正、内部で負、及び外部でゼロであるリングカーネルとの正規化相互相関は、明るい細胞質で包囲された暗い構造体である核に関して高い相関値を生じる。かくして、相関画像の閾値化で核を効果的に検出できる。しかし、近くの細胞の細胞質で包囲されたバックグラウンドセグメントが核と同じように見えるので、段階64はバックグラウンド中にいくつかの検出物を生じることもある。この問題を緩和するため、点検出段階に続いてエッジ曲率尺度を用いるシード点分類段階66を実施できる。最初に、カニー(Canny)に基づくエッジ検出段階が実施される。得られたエッジは、正の曲率、負の曲率及びゼロ曲率を有するものに分けられる。次いで、1組のトレーニングシード点が、トレーニング画像から強い核、弱い核及びバックグラウンドのカテゴリーに手作業で分類される。各々のトレーニング点について、点の回りの対象領域が評価され、正の曲率を有するエッジの数及びこれらのエッジの大きさが測定される。核の回りのエッジは一般に正の曲率を有し、また核は明るい構造体

40

50

で包囲された暗い構造体からなるので、核は2つの尺度で分類される。通例、バックグラウンドの回りに正の曲率を有するエッジは一般に数及び大きさの点で少なく、したがって核の回りに正の曲率を有するエッジの分類に大きな影響は与えないであろう。

【0050】

フィッシュヤー線形識別分類子を使用することで、シード点の散乱プロットを核とバックグラウンドとに分けることができる。各トレーニング点は、この分類散乱プロット中の点として表される。 x 軸はマスク下にある正曲率エッジの数の和を表し、 y 軸はこれらのエッジの大きさの和を表す。次に、この分類線を用いて、画像を試験するための正規化相互相関段階から自動的に生成された点が分類される。

【0051】

バックグラウンドの大部分を捕獲するバックグラウンドマスキングアルゴリズムを段階68で使用することで、候補シードがさらに除去され、三次元「トンネル」レベルセットがバックグラウンド中にリークすることが防止される。画像強度特性に基づき、このアルゴリズムは画像を保存値で閾値化することで、バックグラウンド中にあるが暗い核中にはない部分を抽出する。次に、アルゴリズムは上部閾値と勾配尺度及び曲率との組合せを用いてこれらの領域をレベルセットで成長させる。次いで、平滑な画像、シード及びマスクされたバックグラウンドが所定通りに得られたならば、図2に記載した三次元画像体積48に関する三次元レベルセットセグメンテーションを実施できる。

【0052】

図5は例示的な三次元画像体積48を示している。G2期の核は、体積を貫く暗いトンネルとして見ることができる。正常に増殖する細胞は大部分の時間をこの相で費やすので、これらの暗いトンネルのセグメント化は細胞周期中における細胞の分類を容易にする。さらに詳しい解析のため、オペレーターは三次元画像体積48の個々のセクション又は視野を選択できることが想定されている。例えば、三次元画像体積48は一連の微速度二次元画像から形成されるので、オペレーターは特定の時間段階での細胞集団を観察するために三次元画像体積48から個々の二次元画像44を選択することができる。次いでオペレーターは、三次元画像体積48内の空間を通して移動することで個々の二次元画像44をスクロールすることができる。別法として、オペレーターは三次元画像体積48内で個々の細胞を経時的に表示することもできる。かかる表示は、個々の細胞をその娘細胞にリンクする視覚コード化ツリー(図6参照)であり得る。オペレーターは、個々の細胞のツリー表示間での移動、三次元画像体積48への移動、又は一連の二次元画像44への移動を行うことができる。さらにオペレーターは、三次元画像体積48、視覚コード化ツリー又は二次元画像44の表示から移動して、個々の細胞又は細胞集団に関するデータを得ることもできる。例えば、オペレーターはツリー表示から、ツリー中に表される母細胞及び娘細胞に関するデータを含むデータファイルに切り換えることができる。三次元画像体積48は、細胞周期進行の解析及び追跡を容易にするため、オペレーターがイメージングデータの複数の視覚表示を観察することを可能にする。さらに三次元画像体積48は、オペレーターがさらなる処理のために画像から得られる生データに直接アクセスすることも可能にする。

【0053】

図6は、視覚コード化ツリーとしての細胞周期相の表示である。図示の通り、本技法は三次元画像体積48内における個々の細胞の経過をたどることができる。3つの母細胞及びこれらに対応する娘細胞のコード化ツリーが示されている。アルゴリズムは、まず最も長く続くG2期をセグメント化し、次いで他の相を飛び越えてリンクすることで対応する娘細胞の位置を決定する。完全な三次元ツリー構造を得るために、次の段階は他の相を飛び越えて追跡することで対応するG2期セグメンテーションを互いに連結する。一実施形態では、母細胞及び娘細胞はユークリッド距離を最小にすることで関連づけた。

【0054】

別の実施形態では、高速前進法を用いて母細胞及び娘細胞を関連づけることができる。図7は、かかる方法70を記述するフローチャートである。このモデルを実行するために

10

20

30

40

50

は、母細胞の G 2 期の末端に出発点が選択される。開始段階 7 2 の後、制御は段階 7 4 に移り、そこでプロセッサーは母細胞からのドメイン全体に対する速度画像を見つける。段階 7 6 では、速度画像中で高速前進アルゴリズムが実行され、プロセッサーは最も近い 2 つの娘細胞を選択して段階 7 6 で母細胞と関連づけることができる。段階 8 0 では、アルゴリズムは娘細胞から母細胞への勾配降下を用いて娘細胞への経路を抽出できる。終了段階 8 2 の後、このアルゴリズムは画像中のあらゆる点についての時間交差マップを与え、出発点が最小時間を有する 2 つのセグメント化 G 2 期を見つけることで母細胞の娘細胞を決定できる。

【 0 0 5 5 】

エイコナル (E i k o n a l) 方程式を解く過程では、勾配を生成することもできる。
次に、これらの勾配を用いて前述のような娘細胞から母細胞への勾配降下手順を実行することで、母細胞から 2 つの娘細胞への最小経路を決定できる。さらに詳しくは、高速前進法は、下記のエイコナル方程式で記述される時間到達方程式を三次元で解くための方法である。

【 0 0 5 6 】

【 数 6 】

$$|\nabla T| F = \sqrt{\left(\frac{\partial T}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial T}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial T}{\partial z}\right)^2} F(x, y, z) = 1$$

10

20

式中、 $F(x, y, z)$ は速度マップ又はコスト関数であり、 T はドメイン中のあらゆる点について得られた時間交差マップである。出発点を定めれば、高速前進法は、その展開の各段階で最小時間を選択する境界条件から外側に解を構築する。展開する曲線は各点を 1 回通過することしか許されないので、それは繰返しなしに解くことができ、非常に高速である。対象物が走行するドメインは、前線がある領域で他の領域より速く展開できるような重み付き計量を有することもある。この方法は、初期位置から最終位置への最短経路を見つけることを目標とする経路計画問題を解くために使用できる。高速前進法を使用することで、出発点 A から展開する曲線についての時間交差マップが見つけられる。次に、ドメイン中の任意の点 Z を定めれば、初期条件 $x(0) = Z$ を仮定して常微分方程式 $d x / d t = -T$ を解くことにより、勾配降下を用いて Z から A への伝播を行うことで最短経路が構築される。この方法は、コスト関数（この場合には 2 値）が壁の位置でゼロでありかつその他すべての位置で 1 であるように定義された迷路を通って物体を移動させるための最適経路を見つけるような用途で使用してきた。経路計画問題では、最も重要な部分は適当なコスト関数を定義することである。細胞周期相マーカーデータセット中の細胞相はマーカーの蛍光レベルで定義されるので、コスト関数は核強度に基づいている。換言すれば、コストは追跡の開始時には明るい核で低く（高速移動）かつ暗い領域で高く、次第に暗い核に関する低コスト及び明るい領域に関する高コストに切り換わる。速度関数は、シグモイド関数を用いて強度をマッピングすることで見つけられる。高速前進プログラム 7 0 を実行した後、三次元画像体積 4 8 内のセグメント化「トンネル」をその娘細胞にリンクすることで、図 6 に示すような粗雑な「ツリー画像」が生み出される。

30

40

【 0 0 5 7 】

図 8 及び図 9 は、細胞周期の進行に対する抗増殖性薬物の効果を調べるために別の模式的ツリー形表示である。高複雑度データのかかるツリー・アンド・プランチ表示は、細胞周期の変更を特徴づける多くのパラメーターの変化の可視化を可能にする。かかる変化としては、細胞周期相の持続時間のイントライネージ及びインターリネージ変化（枝上の色の長さ）、細胞周期の遮断（単一の色の枝の延長）、有糸分裂の加速又は遅延（枝の節点間の距離）、核の形態（枝の太さ）、DNA のエンドリデュプリケーション（S 期中にお

50

けるDNAの複製)、核の断片化(枝から小枝への分裂)及び細胞の死滅(枝の終了)が挙げられる。図8では、画像は経時的に分裂する単一の細胞を示している。この場合、時間は縦軸であり、相はコード化されている。ツリーはまた、細胞が細胞周期の各相で費やす概略時間も示している。図9は、元の画像の各々に対応し得る個々の「スライス」を示す模式的画像である。いずれの場合でも、かかる表示は細胞周期進行に対する潜在的な治療用化合物の効果に関する有用な情報を研究者に提供することができる。例えば、各三次元画像体積48は複数のツリーを生成し得るので、これらのツリーを平均することで、各細胞周期における平均時間を詳しく示す複合ツリー画像を得ることができる。かかる複合ツリーを他のツリー(例えば、対照)と比較することで、細胞周期変更の推定値を得ることができる。

10

【0058】

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、当業者には多くの修正及び変更が想起されるであろう。したがって、特許請求の範囲は本発明の真の技術思想の範囲内に含まれるすべてのかかる修正及び変更を包括するものであることを理解すべきである。

20

【0059】

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、当業者には多くの修正及び変更が想起されるであろう。したがって、特許請求の範囲は本発明の真の技術思想の範囲内に含まれるすべてのかかる修正及び変更を包括するものであることを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】本技法の態様に従って細胞の画像データを取得する際に使用するための例示的なシステムの略図である。

【図2】本技法に従って細胞画像をセグメント化する方法を示すフローチャートである。

【図3】本技法に従って得られた例示的な二次元細胞画像である。

【図4】本技法に従って三次元画像体積を生成する方法を示すフローチャートである。

【図5】本技法に従って得られた例示的な三次元細胞画像体積である。

【図6】細胞周期進行中にどの点でセグメント化及びリンク段階が実施されるかを示す例示的なツリー形表示である。

30

【図7】細胞画像に関して高速前進技法を実施する方法を示すフローチャートである。

【図8】細胞周期を通しての母細胞及び娘細胞の進行を経時的に示す例示的なコード化ツリー形表示である。

【図9】細胞周期を通しての母細胞及び娘細胞の進行を経時的に示す別のツリー形表示である。

【符号の説明】

【0061】

10 イメージングシステム

12 イメージャー

14 細胞集団

16 システム制御回路

18 データ取得回路

20 データ処理回路

22 オペレーターアクステーション

26 ディスプレイ

28 キーボード

30 マウス

32 プリンター

40

【図1】

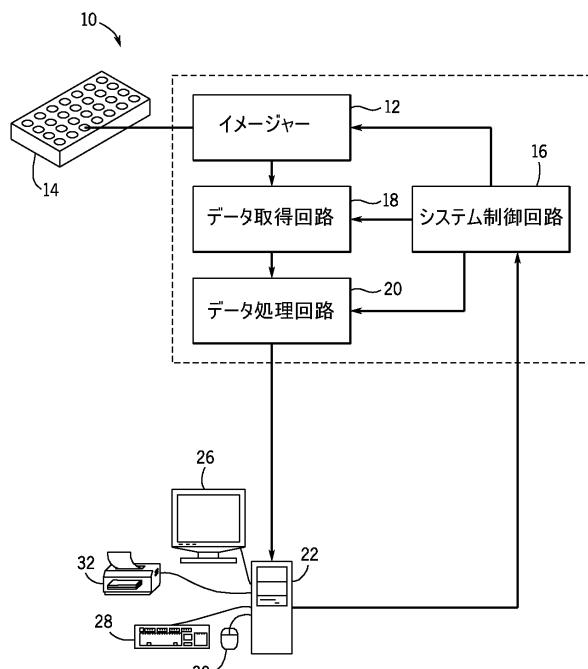


FIG. 1

【図2】

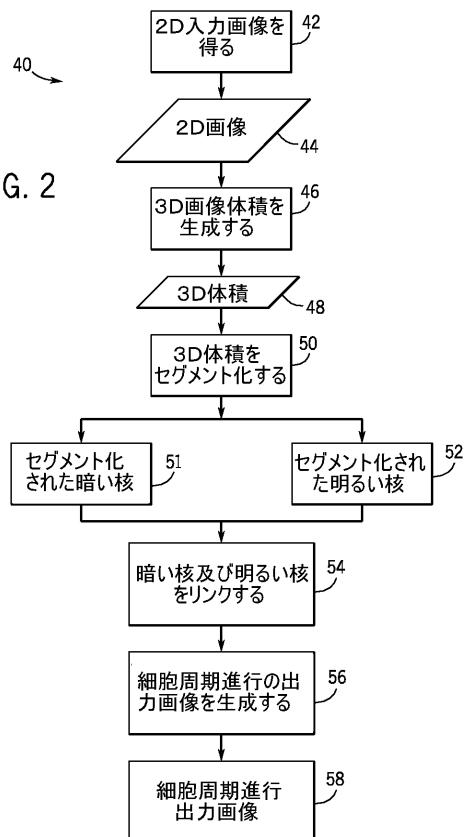


FIG. 2

【図4】

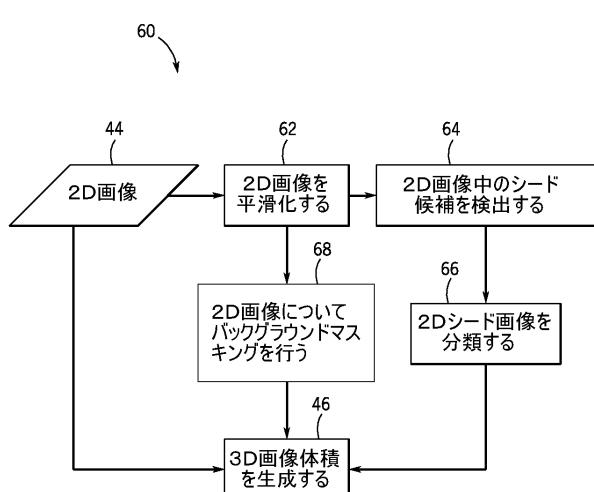


FIG. 4

【図7】

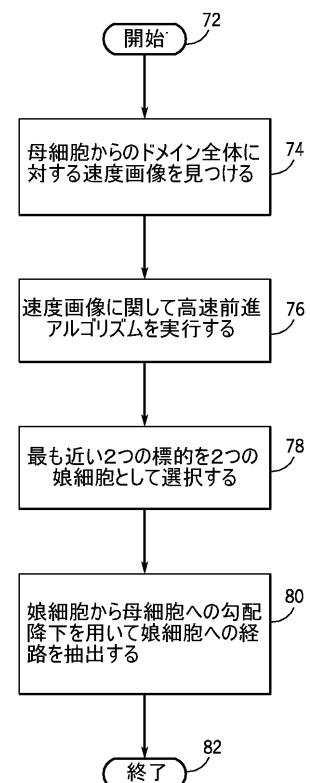
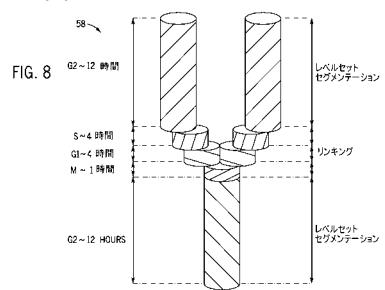
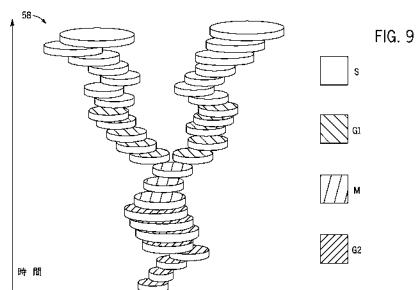


FIG. 7

【図8】



【図9】



【図3】

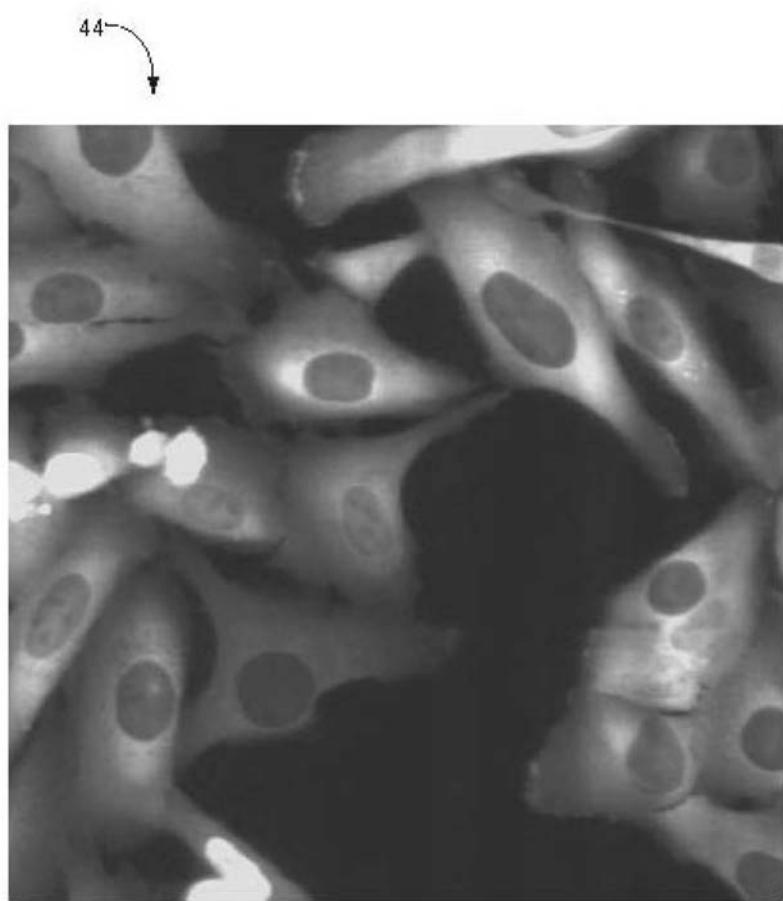


FIG. 3

【図5】

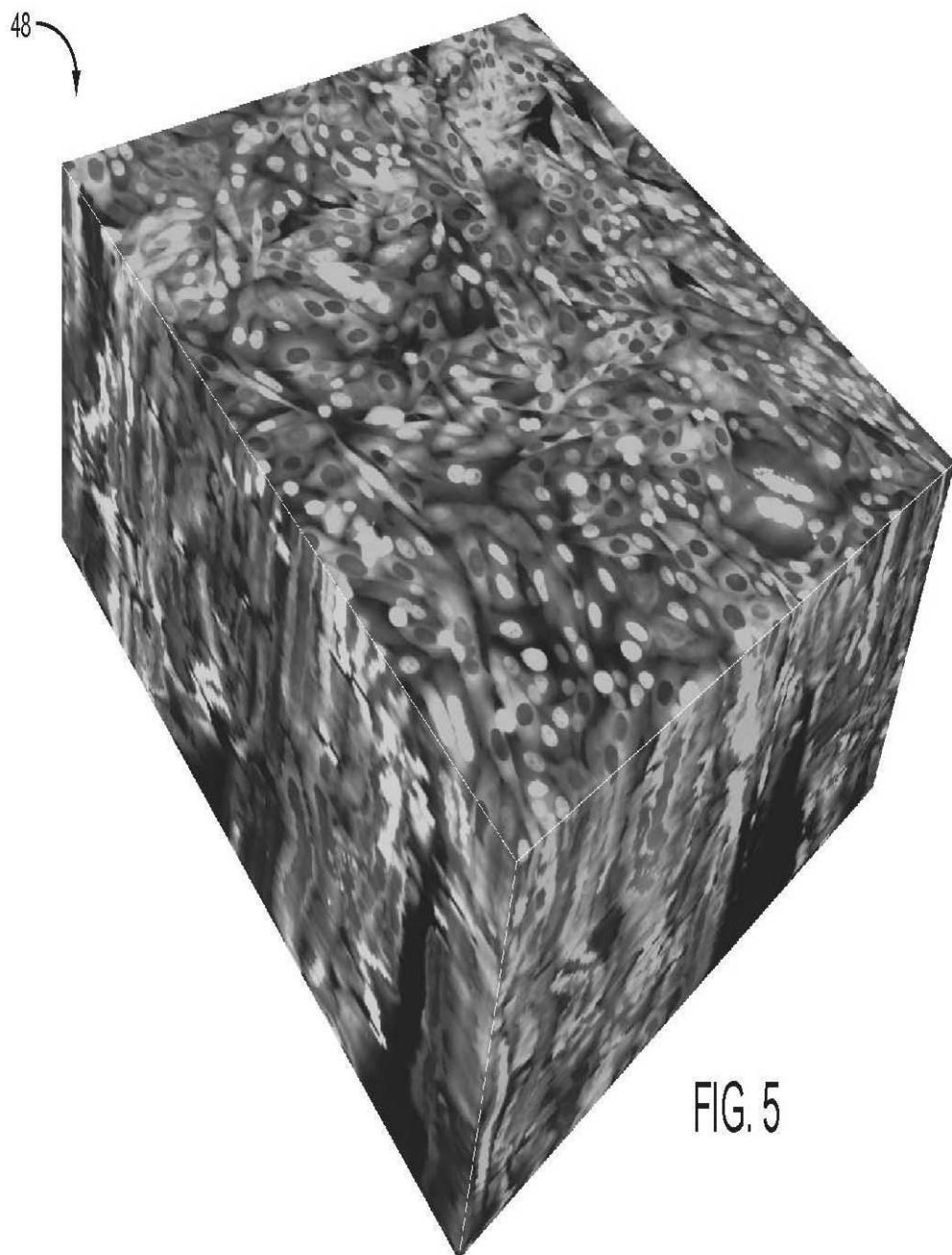


FIG. 5

【図6】

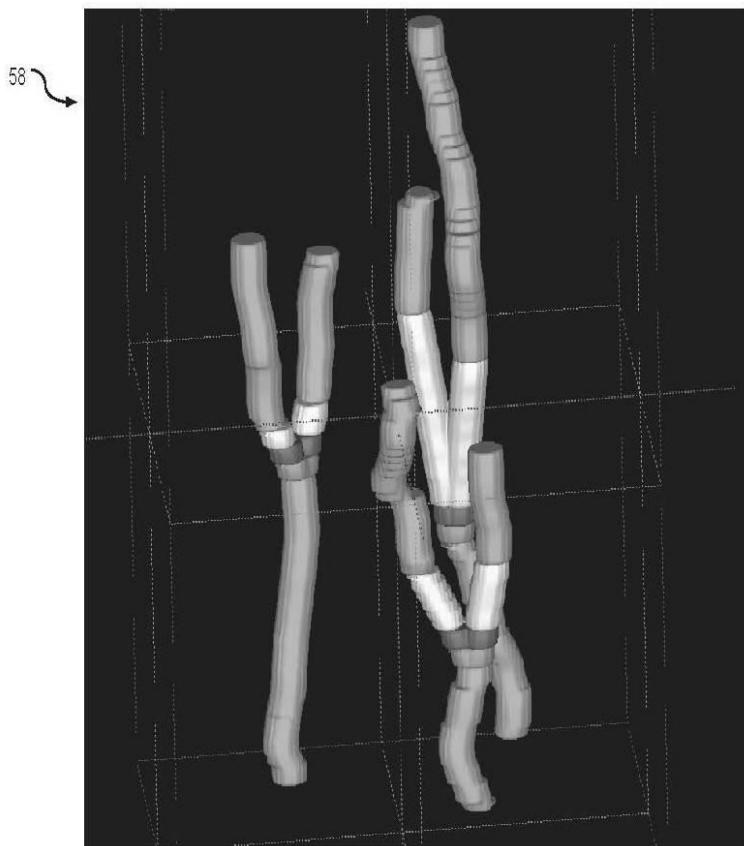


FIG. 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 6 T 7/00 3 0 0 M

- (72)発明者 パッドフィールド, ダーク・アール
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12209、アルバニー、サミット・アベニュー、11番
(72)発明者 セバスティアン, トマス
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー州・08822、フレミントン、ベッグ・ロード、1番
(72)発明者 トマス, ニコラス
英国、シーエフ14・7ワイティ、カーディフ・サウス・グラムオーガン、ホイットチャーチ、フ
ォレスト・ファーム・エステイト、ザ・メイナード・センター(番地なし)

審査官 佐久 敏

- (56)参考文献 特開2003-107081(JP, A)
特開2002-218995(JP, A)
国際公開第2004/088573(WO, A1)
ACTON S T, IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING, 米国, IEEE SERVICE CENTER, 2
005年10月, V52 N10, P1702-1712
Hadjantonakis A.K. et al., Dynamic *in vivo* imaging and cell tracking using a histone f
luorescent protein fusion in mice., BMC Biotechnology, 2004年, 4:33

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
C12M 1/00-3/10
G06T 7/00-7/60
C12N 15/00-15/90
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)