



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0131047
(43) 공개일자 2015년11월24일

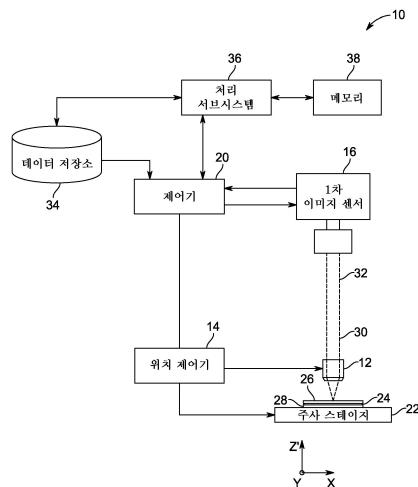
- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
G06T 3/00 (2006.01) **G02B 21/26** (2006.01)
G06K 9/32 (2006.01) **G06T 3/40** (2006.01)
G06T 3/60 (2006.01) **G06T 7/00** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G06T 3/00 (2013.01)
G02B 21/26 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7025281
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년09월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/030970
- (87) 국제공개번호 WO 2014/153320
국제공개일자 2014년09월25일
- (30) 우선권주장
13/846,490 2013년03월18일 미국(US)
- (71) 출원인
제너럴 일렉트릭 캄파니
미합중국 뉴욕, 쉐베테디, 원 리버 로우드
- (72) 발명자
케니 케빈 베나드
미국 12309 뉴욕주 니스카유나 원 리서치 서클
코원 알렉스 테이비드
미국 12309 뉴욕주 니스카유나 원 리서치 서클
- (74) 대리인
양영준, 류현경

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 멀티-취득 슬라이드 이미징에서의 참조

(57) 요 약

다수의 이미징 라운드에서 취득된 이미지의 참조가 개시된다. 특정 구현예에서, 기준선 이미지 라운드가 취득되고 서로 정합되어 전역 변환 행렬을 설정한다. 후속의 이미지 취득 라운드에서, 제한된 수의 시야 이미지가 초기에 취득되고 병진, 회전, 및 스케일을 해석하기 위해 대응 기준선 이미지에 정합된다. 풀 세트의 기준선 이미지는 이어서 후속의 라운드에 대해 취득되고, 각각의 이미지는 이미지의 부분집합에 대해 결정된 변환에 기초하여 미리 회전되고 미리 스케일링된다. 미리 회전되고, 미리 스케일링된 이미지는 이어서 병진-전용 변환을 사용하여 정합된다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

G06K 9/3208 (2013.01)

G06T 3/0075 (2013.01)

G06T 3/40 (2013.01)

G06T 3/60 (2013.01)

G06T 7/0012 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이미지를 정합하기 위한 컴퓨터 구현식 방법이며,

스테이지 상에 위치된 슬라이드 상에 샘플의 제1 세트의 이미지를 취득하는 단계로서, 각각의 이미지는 상이한 시야에서 취해지는, 제1 세트의 이미지 취득 단계와,

합성 이미지를 형성하도록 상기 제1 세트의 이미지를 서로 정합함으로써 전역 변환 행렬을 생성하는 단계와,

상기 슬라이드가 상기 스테이지로부터 제거되고 교체된 후에 상기 슬라이드 상의 샘플의 이미지의 부분집합을 취득하는 단계로서, 상기 이미지의 부분집합은 상기 제1 세트 내의 이미지의 수보다 작은, 샘플의 이미지의 부분집합 취득 단계와,

병진, 회전, 및 스케일 팩터를 결정하기 위해 상기 제1 세트의 대응 이미지와 상기 부분집합의 각각의 이미지를 정합하는 단계와,

상기 제1 세트의 이미지를 취득하는데 사용된 동일한 각각의 시야에서 상기 샘플의 제2 세트의 이미지를 취득하는 단계와,

상기 이미지의 부분집합에 대해 결정된 회전 및 스케일 팩터를 사용하여 상기 제2 세트의 이미지의 각각의 이미지를 회전하고 스케일링하는 단계와,

상기 제2 세트의 회전되고 스케일링된 이미지를 상기 제1 세트의 대응 이미지에 정합하는 단계를 포함하는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 세트의 이미지의 각각의 이미지는 상기 제1 세트의 하나 이상의 각각의 인접한 이미지에 중첩하는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 세트의 이미지 및 상기 제2 세트의 이미지는 공간 위치의 균일한 그리드에 걸쳐 취해지는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제1 세트의 이미지, 상기 이미지의 부분집합, 및 상기 제2 세트의 이미지는 디지털 현미경 시스템을 사용하여 취득되는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 샘플은 상기 스테이지 상에 교체되기 전에 상이하게 염색되는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 전역 변환 행렬은 상기 샘플이 배치되어 있는 슬라이드로부터 좌표를 합성 이미지 및 상기 제1 세트의 각각의 개별 이미지의 모두에 맵핑하는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 부분집합의 각각의 이미지는 로그-극 고속 푸리에 변환을 사용하여 상기 제1 세트의 이미지의 대응 이미지와 정합되는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제2 세트의 회전되고 스케일링된 이미지를 제1 세트의 대응 이미지에 정합하는 단계는 부가의 회전 또는 스케일링 없이 상기 제2 세트의 회전되고 스케일링된 이미지를 병진하는 단계를 포함하는 컴퓨터 구현식 방법.

청구항 9

이미지 분석 시스템이며,
 하나 이상의 루틴을 저장하는 메모리와,
 상기 메모리 내에 저장된 하나 이상의 루틴을 실행하도록 구성된 처리 구성 요소를 포함하고,
 상기 하나 이상의 루틴은, 상기 처리 구성 요소에 의해 실행될 때,
 샘플로부터 취득된 제한된 세트의 이미지와 상기 샘플의 이전에 취득된 풀 세트의 이미지 사이의 정렬 동작을 수행하는 동작으로서, 상기 정렬 동작은 풀 세트의 이미지의 대응 이미지에 대한 제한된 세트의 이미지에 관한 적어도 회전을 생성하는 정렬 동작 수행 동작,
 상기 회전에 의해 이후에 취득된 풀 세트의 이미지를 회전하는 동작, 및
 상기 이전에 취득된 풀 세트의 이미지의 대응 이미지와 회전된 이미지를 정합하도록 이후에 취득된 풀 세트의 이미지의 회전된 이미지를 병진하는 동작
 을 포함하는 동작이 수행되게 하는 이미지 분석 시스템.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제한된 세트의 이미지는 샘플의 3, 4 또는 5개의 이미지를 포함하는 이미지 분석 시스템.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 정렬 동작은 로그-극 고속 푸리에 변환을 포함하는 이미지 분석 시스템.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 정렬 동작은 또한 스케일 팩터를 생성하고, 상기 이후에 취득된 풀 세트의 이미지는 병진에 앞서 스케일 팩터에 의해 스케일링되는 이미지 분석 시스템.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 이후에 취득된 풀 세트의 이미지의 각각의 이미지는 이전에 취득된 풀 세트의 이미지의 각각의 이미지에 대응하는 이미지 분석 시스템.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 하나 이상의 루틴은, 상기 처리 구성 요소에 의해 실행될 때,
 상기 이전에 취득된 풀 세트의 이미지 또는 이후에 취득된 풀 세트의 이미지로부터 적어도 하나의 합성 이미지를 생성하여 표시하는 동작을 포함하는 추가의 동작이 수행되게 하는 이미지 분석 시스템.

청구항 15

디지털 현미경 이미징 시스템이며,
 슬라이드를 유지하도록 구성된 스테이지와,
 존재할 때, 상기 슬라이드의 부분의 이미지를 취득하도록 구성된 대물 렌즈 및 이미지 센서와,
 상기 대물 렌즈 및 상기 스테이지 중 하나 또는 모두를 이미징 프로토콜에 따라 서로에 대해 이동시키도록 구성된 위치 제어기와,
 상기 위치 제어기 및 상기 이미지 센서 중 하나 또는 모두의 작동을 제어하도록 구성된 제어기와,
 하나 이상의 루틴을 저장하는 메모리와,

상기 메모리 내에 저장된 하나 이상의 루틴을 실행하도록 구성된 처리 구성 요소를 포함하고,
 상기 하나 이상의 루틴은, 상기 처리 구성 요소에 의해 실행될 때,
 상기 슬라이드의 적어도 일부의 제1 풀 세트의 이미지를 취득하는 동작으로서, 각각의 이미지는 적어도 하나의
 인접한 이미지와 중첩하는 제1 풀 세트의 이미지 취득 동작,
 상기 슬라이드가 상기 스테이지로부터 제거되어 교체된 후에 상기 슬라이드의 적어도 일부의 제2 풀 세트의 이
 미지를 취득하는 동작,
 미리 회전된 이미지의 세트를 생성하도록 미리 결정된 각도만큼 상기 제2 풀 세트의 이미지 중의 이미지를 회전
 하는 동작, 및
 상기 제1 풀 세트의 이미지 중 대응 이미지에 미리 회전된 이미지를 정합하도록 미리 회전된 이미지를 병진하는
 동작
 을 포함하는 동작이 수행되게 하는 디지털 현미경 이미징 시스템.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 제1 및 제2 풀 세트의 이미지는 균일한 그리드에 걸쳐 취득되는 디지털 현미경 이미징 시스템.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 루틴은, 상기 처리 구성 요소에 의해 실행될 때,
 미리 회전된 이미지를 병진하기 전에 미리 결정된 스케일 팩터에 의해 상기 제2 풀 세트의 이미지 중의 이미지
 를 스케일링하는 동작을 포함하는 추가의 동작이 수행되게 하는 디지털 현미경 이미징 시스템.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 루틴은, 상기 처리 구성 요소에 의해 실행될 때,
 상기 슬라이드가 상기 스테이지로부터 제거되어 교체된 후에 상기 슬라이드의 제한된 세트의 이미지를 취득하는
 동작, 및
 상기 제1 풀 세트의 이미지 내의 대응 이미지에 제한된 세트의 이미지를 정합함으로써 미리 결정된 각도를 계산
 하는 동작을 포함하는 추가의 동작이 수행되게 하는 디지털 현미경 이미징 시스템.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제한된 세트의 이미지는 3, 4 또는 5개의 이미지를 포함하는 디지털 현미경 이미징 시스템.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 미리 결정된 각도는 로그-극 고속 푸리에 변환을 사용하여 계산되는 디지털 현미경 이미징 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서에 개시된 요지는 별개의 취득 동작에서 슬라이드 이미지의 세트의 참조(referencing)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암, 감염성 질병, 생리학적 장애 등과 같은 다양한 생리학적 조건에 대해, 검출 및 모니터링은 부분적으로 환자로부터의 생물학적 검체(specimen)의 분석에 기초할 수도 있다. 예를 들어, 샘플은 질병 또는 장애를 지시할 수도 있는 이상(abnormal) 수 또는 유형의 세포 및/또는 생체(organism)의 존재를 검출하도록 분석될 수도 있다. 다양한 유형의 현미경이 이러한 분석을 위해 채용될 수도 있다. 또한, 다양한 염색(stain) 및 염색 프

로토콜이 질병 또는 장애의 검출 또는 진단을 보조할 수도 있는 상이한 구조체, 화학물 또는 환경의 시각화를 허용하도록 이 분석의 부분으로서 채용될 수도 있다.

[0003] 이러한 병리학 또는 조직학 샘플의 분석을 용이하게 하기 위해, 이미지 취득 프로세스의 다양한 태양을 자동화하는 자동화 현미경 시스템이 개발되어 왔다. 특히, 디지털 광학 현미경이 이러한 자동화 시스템에 사용되고 각각의 취득을 위한 디지털 이미지 출력을 제공할 수도 있다. 특정의 이러한 시스템은 변위된 이미지의 시퀀스가 취득되고 함께 연계되어 [예를 들어, 함께 "타일링되고(tiled)" 또는 "스티칭됨(stitched)"] 관심 샘플 영역의 합성물을 형성하는 주사 현미경을 채용한다. 예를 들어, 병리학 및 조직학 이미징 동작에 있어서, 조직 샘플 슬라이드는 고배율 및/또는 해상도에서 소형의 인접 또는 중첩 영역의 디지털 이미지를 취득하기 위해 이미징을 경험할 수도 있다. 인접 또는 중첩 이미지는 이어서 결합되거나 연계되어 디지털 디스플레이 장치 상에 네비게이팅될 수도 있는 더 대형의 이미지를 형성할 수도 있다. 이 방식으로, 샘플의 합성 또는 모자이크 이미지가 생성되고, 표시되고, 리뷰어에 의해 네비게이팅될 수도 있다.

[0004] 이미지 생성 및 리뷰 프로세스에서 복합 인자는 샘플이 다수의 염색(staining) 동작을 경험하는 프로토콜에 기인할 수도 있다. 이러한 경우에, 각각의 염색 단계는 현미경 스테이지로부터 슬라이드를 제거하는 것, 임의의 현존하는 염료를 제거하기 위해 샘플을 처리하고 다음의 염료를 인가하는 것, 및 새로운 염료로 샘플의 이미징을 위해 현미경 스테이지 상에 슬라이드를 교체하는 것과 연계된다. 그러나, 현미경 스테이지 상의 슬라이드의 제거 및 교체의 동작은 일반적으로 슬라이드가 각각의 이미징 라운드에 대해 약간 상이한 위치에 있게 한다. 그 결과, 각각의 이미징 라운드로부터 대응 이미지가 정렬되지 않을 수도 있다. 또한, 각각의 이미징 라운드에 대해 생성된 합성 이미지는 또한 서로에 대해 오정렬될 수도 있다. 그 결과, 상이한 염료를 사용하여 취득된 이미지를 사용하여 수행된 분석 또는 비교가 어렵거나 다른 방식으로 저지될 수도 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0005] 일 실시예에서, 이미지를 정합하기 위한 컴퓨터 구현식 방법이 제공된다. 이 방법에 따르면, 샘플의 제1 세트의 이미지가 스테이지 상에 위치된 슬라이드 상에서 취득된다. 각각의 이미지는 상이한 시야에서 취해진다. 전역 변환 행렬이 합성 이미지를 형성하도록 제1 세트의 이미지를 서로 정합함으로써 생성된다. 슬라이드가 스테이지로부터 제거되고 교체된 후에 슬라이드 상의 샘플로부터 이미지의 부분집합이 취득된다. 이미지의 부분집합은 제1 세트 내의 이미지의 수보다 작다. 부분집합의 각각의 이미지는 병진, 회전, 및 스케일 팩터를 결정하기 위해 제1 세트의 이미지의 대응 이미지와 정합된다. 제2 세트의 이미지가 제1 세트의 이미지를 취득하는 데 사용된 동일한 각각의 시야에서 샘플로부터 취득된다. 제2 세트의 이미지의 각각의 이미지는 이미지의 부분집합에 대해 결정된 회전 및 스케일 팩터를 사용하여 회전되고 스케일링된다. 제2 세트의 회전되고 스케일링된 이미지는 제1 세트의 대응 이미지에 정합된다.

[0006] 다른 실시예에서, 이미지 분석 시스템이 제공된다. 이미지 분석 시스템은 하나 이상의 루틴을 저장하는 메모리와, 메모리 내에 저장된 하나 이상의 루틴을 실행하도록 구성된 처리 구성 요소를 포함한다. 하나 이상의 루틴은, 처리 구성 요소에 의해 실행될 때, 샘플로부터 취득된 제한된 세트의 이미지와 샘플의 이전에 취득된 풀 세트의 이미지 사이의 정렬 동작을 수행하는 동작으로서, 정렬 동작은 풀 세트의 이미지의 대응 이미지에 대한 제한된 세트의 이미지에 관한 적어도 회전을 생성하는 정렬 동작 수행 동작, 회전에 의해 이후에 취득된 풀 세트의 이미지를 회전하는 동작, 및 이전에 취득된 풀 세트의 이미지의 대응 이미지와 회전된 이미지를 정합하도록 이후에 취득된 풀 세트의 이미지의 회전된 이미지를 병진하는 동작을 포함하는 동작이 수행되게 한다.

[0007] 부가의 실시예에서, 디지털 현미경 이미징 시스템이 제공된다. 디지털 현미경 이미징 시스템은 슬라이드를 유지하도록 구성된 스테이지와, 존재할 때, 슬라이드의 부분의 이미지를 취득하도록 구성된 대물 렌즈 및 이미지 센서와, 대물 렌즈 및 스테이지 중 하나 또는 모두를 이미징 프로토콜에 따라 서로에 대해 이동시키도록 구성된 위치 제어기와, 위치 제어기 및 이미지 센서 중 하나 또는 모두의 작동을 제어하도록 구성된 제어기를 포함한다. 게다가, 디지털 현미경 이미징 시스템은 하나 이상의 루틴을 저장하는 메모리와, 메모리 내에 저장된 하나 이상의 루틴을 실행하도록 구성된 처리 구성 요소를 포함한다. 하나 이상의 루틴은, 처리 구성 요소에 의해 실행될 때, 슬라이드의 적어도 일부의 제1 풀 세트의 이미지를 취득하는 동작으로서, 각각의 이미지는 적어도 하나의 인접한 이미지와 중첩하는 제1 풀 세트의 이미지 취득 동작, 슬라이드가 스테이지로부터 제거되어 교체된 후에 슬라이드의 적어도 일부의 제2 풀 세트의 이미지를 취득하는 동작, 미리 회전된 이미지의 세트를 생성하도록 미리 결정된 각도만큼 제2 풀 세트의 이미지 중의 이미지를 회전하는 동작, 및 제1 풀 세트의 이미

지 중 대웅 이미지에 미리 회전된 이미지를 정합하도록 미리 회전된 이미지를 병진하는 동작을 포함하는 동작이 수행되게 한다.

도면의 간단한 설명

[0008] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 태양 및 장점은 유사한 도면 부호가 도면 전체에 걸쳐 유사한 부분을 표현하는 첨부 도면을 참조하여 이하의 상세한 설명이 속독될 때 더 양호하게 이해될 것이다.

도 1은 본 발명의 태양에 따른 디지털 광학 현미경 시스템과 같은 이미징 시스템의 블록 다이어그램이다.

도 2는 본 발명의 태양에 따른, 개별의 중첩 시야 이미지가 취득될 수도 있는 중첩 이미지 영역을 갖고 샘플이 배치되어 있는 슬라이드의 평면도이다.

도 3은 본 발명의 태양에 따른, 다수의 이미지 취득 라운드를 갖는 이미징 프로토콜 내의 슬라이드 핸들링과 연계된 단계의 흐름도를 도시한다.

도 4는 본 발명의 태양에 따른, 기준선 이미지 취득 라운드와 연계된 단계들의 흐름도를 도시한다.

도 5는 본 발명의 태양에 따른, 인접한 이미지들을 위치결정하기 위한 접근법을 도시한다.

도 6은 다양한 점이 샘플의 시야 이미지의 부분집합을 취득하기 위해 식별되는 샘플의 예를 도시한다.

도 7은 본 발명의 태양에 따른 현재 및 기준선 이미지 취득 라운드로부터 이미지들을 정합하는데 수행될 수도 있는 단계들의 흐름도를 도시한다.

도 8은 본 발명의 태양에 따른, 동일한 시야의 연속적인 이미지를 정렬하기 위한 접근법을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 본 발명의 접근법의 특정 실시예에서, 이미지(예를 들어, 기준선 이미지)의 세트는 초기 이미징 라운드에서 슬라이드 상의 샘플로부터 취득된다. 기준선 이미지의 세트는 공간 위치의 균일한 그리드에 걸쳐 중첩 시야로 취득된다. 일 구현예에서, 시야 이미지는 병진-전용(translation-only) 고속 푸리에 변환(Fast Fourier Transform: FFT)을 사용하여 서로 정합된다. 정합의 결과는 개별 시야 및 합성[즉, "스티칭된(stitched)"] 캔버스의 모두에서 이미지 좌표에 대해 전역 변환 행렬 맵핑 슬라이드 좌표를 설정하는데 사용된다.

[0010] 샘플이 상이한 제제(agent)로 염색되고 슬라이드가 스테이지로 복귀된 후와 같은, 후속의 이미징 라운드에서, 이미징 시스템은 제한된 수의 개별 점(예를 들어, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개 이상의 점)에서 이미지를 취득한다. 이를 개별 이미지는 병진, 회전 및 스케일을 해석하기 위해, 로그-극(log-polar) FFT을 사용하는 것과 같이, 대웅 기준선 라운드 시야 이미지에 정합된다. 일 구현예에서, 최소 제곱 피팅(least squares fit)이 기준선의 각각의 시야 이미지의 중심(즉, 초기 이미징 라운드)과 현재 이미징 라운드 사이에 선형 변환을 생성하는데 사용된다. 일 이러한 실시예에서, 변환은 단지 회전, 병진 및 스케일만을 포함하도록 구속된다.

[0011] 일단, 이 제한된 이미지의 세트가 취득되고 선형 변환을 생성하도록 처리되면, 현재 이미징 라운드에 대한 이미지의 전체 그리드가 취득될 수도 있다. 일 구현예에서, 현재 이미징 라운드에서 취득된 각각의 시야 이미지는 현재 이미징 라운드를 위해 생성된 선형 변환에 기초하여 미리 회전되고 미리 스케일링된다. 대웅 기준선 라운드 시야 이미지는 이어서 병진 전용 FFT를 사용하는 것과 같이, 미리 회전되고, 미리 스케일링된, 현재 라운드 이미지에 정합된다. 최종적인 변환은 시야 이미지의 현재 라운드에서의 이미지 좌표와 슬라이드 좌표 사이의 맵핑을 생성하도록 미리 회전 및 미리 스케일링으로 구성된다.

[0012] 스티칭된 또는 합성 이미지가 현재 이미징 라운드에 대해 생성될 때, 각각의 시야 이미지는 그 연계된 변환 행렬에 따라 샘플링된다. 최종 화소는 공통 데이터 평면에 놓이고, 특정 실시예에서, 자동형광 제거를 위해 감산되고, 거짓-컬러 이미지에서 조합되고, 통계 분석을 위해 공통으로 사용되고, 또는 오버레이된(즉, 중첩된) 방식으로 표시되어 리뷰어가 대웅 공간 위치들을 비교할 수 있게 한다.

[0013] 이 접근법을 병리학 환경에 적용하는 것은 현미경의 시야의 크기로 표시를 제한하지 않고, 동일한 셀 내에 다수의 바이오마커(biomarker)의 동시의 표시를 허용한다(직렬 섹션에 대조적으로). 대신에, 전체 슬라이드까지 그리고 전체 슬라이드를 포함하여, 이미지(예를 들어, 현미경)의 시야보다 훨씬 큰 이미징이 취득되고 통합될 수 있다.

[0014]

상기 설명을 명심하여, 도 1은 본 발명의 태양에 따라 사용될 수도 있는 디지털 광학 혼미경과 같은 이미징 시스템(10)의 실시예를 도시한다. 도시된 이미징 시스템(10)은 대물 렌즈(12), 이미지 센서(16), 제어기(20), 및 주사 스테이지(22)를 포함한다. 도시된 실시예에서, 샘플(24)은 커버 슬립(26)과 슬라이드(28) 사이에 배치된다. 샘플(24), 커버 슬립(26), 및 슬라이드(28)는 주사 스테이지(22) 상에 위치된다. 커버 슬립(26) 및 슬라이드(28)는 유리와 같은 투명 재료로 제조될 수도 있다. 특정 실시예에서, 이미징 시스템(10)은 자동화 슬라이드 주사 시스템의 부분일 수도 있고, 매거진(magazine)으로부터 동시에 이미징을 위해 슬라이드를 이송하여 로딩하는 것이 가능한 자동화 슬라이드 이송기를 포함할 수도 있다.

[0015]

특정 실시예에서, 샘플(24)은 병리학 또는 조직학 기술을 사용하여 분석을 위한 조직 샘플과 같은 생물학적 샘플일 수도 있다. 다른 경우에, 샘플(24)은 집적 회로칩 또는 마이크로전기기계 시스템(MEMS)과 같은 산업용 물품일 수도 있다. 예로서, 이러한 샘플은 약 5 미크론 내지 약 7 미크론으로 평균화하는 두께를 가질 수도 있고, 수 미크론만큼 변동할 수도 있다. 이러한 샘플의 예는 또한 대략 15 mm×15 mm의 측면 표면적을 가질 수도 있다.

[0016]

실제로, 대물 렌즈(12)는 Z(수직) 방향으로 광축을 따라 샘플(24)로부터 분리되고, 슬라이드(28)와 공동 평면인 X-Y 평면에 초점 평면을 갖는다. 대물 렌즈(12)는 특정 시야에서 샘플(24)에 의해 투과되거나 반사된 광(30)을 집광하고 광(30)을 이미지 센서(16)에 유도한다. 본 명세서에 사용될 때, 용어 "광"은 육안으로 또는 다른 방식으로 가시 가능한지에 무관하게, 이미징 동작을 위한 임의의 지정된 파장 또는 관심 파장의 범위(즉, 스펙트럼)를 포함한다. 일 실시예에서, 이미지 센서(16)는 이미지가 1차 광로(32)에 기초하여 취득될 때에 각각의 시야에 대응하는 샘플(24)의 하나 이상의 이미지를 생성한다. 특정 실시예에서, 이미지 센서(16)는 상업적으로 입수 가능한 전자 결합 소자(CCD)와 같은 임의의 적합한 디지털 이미징 장치일 수도 있다.

[0017]

시스템(10)에 채용된 대물 렌즈(12)는 이미징된 샘플 특징의 용례 및 크기와 같은 고려 사항에 기초하여 배율이 다양할 수도 있다. 일 실시예에서, 대물 렌즈(12)는 20x 이상의 배율을 제공하고, 0.5 또는 0.5 초과의 개구수를 갖는(작은 초점 깊이) 고배율 대물 렌즈일 수도 있다. 이해될 수 있는 바와 같이, 다른 실시예에서, 대물 렌즈(12)는 상이한 정도의 배율을 제공할 수도 있고 그리고/또는 더 크거나 작은 개구수를 가질 수도 있다. 예로서, 일 실시예에서, 대물 렌즈(12)는 약 200 미크론 내지 약 수 밀리미터의 범위의 거리만큼 Z-방향으로 샘플(24)로부터 이격될 수도 있고, 초점 평면에서 750 μ x 750 μ의 시야로부터 광(30)을 집광할 수도 있다. 이해될 수 있는 바와 같이, 용례에 따라, 작업 거리, 시야, 및 초점 평면은 시스템(10)의 구성 및/또는 이미징된 샘플(24)의 특성에 따라 다양할 수도 있다. 또한, 본 명세서에 설명된 바와 같이, 이미징 프로세스의 태양이 자동화되는 실시예에서, 예를 들어 샘플(24)과 관련하여 다수의 이미지의 순차적인 취득을 허용하기 위해, 시스템(10)은 압전 액추에이터와 같은 위치 제어기(14)를 포함할 수도 있어, 미세한 모터 제어 및 대물 렌즈(12)에 대한 신속한 작은 시야 조정을 제공하고 그리고/또는 슬라이드(28) 또는 슬라이드(28)가 위치되는 주사 스테이지(22)의 위치를 조정한다.

[0018]

이미징 프로토콜 또는 용례에 따라, 이미징 시스템(10)은 명시야(bright field), 위상차(phase contrast), 미분 간섭 콘트라스트(differential interference contrast) 및 형광법을 포함하여, 광범위한 이미징 모드 중 하나 이상을 사용하여 샘플(24)을 조명할 수도 있다. 따라서, 광(30)은 명시야, 위상차 또는 미분 간섭 콘트라스트 용례에서 샘플(24)로부터 투과되거나 반사될 수도 있고, 또는 광(30)은 형광법 이미징 용례에서 샘플(24)(형광식으로 라벨링되거나 고유함)로부터 방출될 수도 있다. 또한, 광(30)은 투조(transillumination)[광원 및 대물 렌즈(12)가 샘플(24)의 대향측들에 있음] 또는 낙사 조명(epi-illumination)[광원 및 대물 렌즈(12)가 샘플(24)의 동일측에 있음]을 사용하여 제공될 수도 있다. 따라서, 이해될 수 있는 바와 같이, 이미징 시스템(10)은 특정 실시예에서 광원(고강도 LED 또는 수은 또는 제논 아크 또는 금속 할로겐화물 램프)을 포함할 수도 있다.

[0019]

전술된 바와 같이, 일 실시예에서, 이미징 시스템(10)은 고속 이미징 시스템으로서 구성될 수도 있다. 이러한 고속 시스템은 샘플(24)의 더 많은 수의 디지털 이미지를 신속하게 캡처하도록 구성될 수도 있고, 각각의 이미지는 샘플(24)의 특정 시야에 대응한다. 특정 용례에서, 이미지와 연계된 특정 시야는 전체 샘플(24)의 단지 제한된 분율만을 표현할 수도 있다. 또한, 이미지의 시퀀스와 연계된 각각의 시야는 서로 인접할 수도 있고 또는 서로 중첩할 수도 있다. 이러한 실시예의 예에서, 슬라이드(28)는 인접한 또는 중첩하는 영역에서 반복적으로 이미징되고 또는 이미지 취득 영역, 즉 시야를 통해 주사 스윕(scanning sweep)으로 통과된다. 일 이러한 실시예에서, 이미지가 취득되고, 스테이지(22)는 인접한 또는 중첩 영역이 시야 내로 이동되는 위치로 X 및 Y 방향으로 진행되고, 다른 이미지가 취득된다.

[0020]

또한, 본 명세서에 설명된 바와 같이, 특정 취득 시퀀스와 연계된 디지털 이미지의 세트[샘플(24)]이 소정의 염료로 염색되는 동안 취득된 일련의 이미지와 같은]는 전체 샘플(24)의 디지털 표현, 즉 합성 또는 모자이크 이미지 또는 캔버스를 형성하도록 함께 디지털식으로 조합되거나 스티칭될 수도 있다. 일 실시예에서, 이미징 시스템(10)은 복수의 취득된 이미지, 뿐만 아니라 취득된 이미지를 사용하여 생성된 임의의 합성 또는 모자이크 이미지를 데이터 저장소(34) 및/또는 메모리(38) 내에 저장할 수도 있다.

[0021]

본 실시예에 도시된 바와 같이, 이미징 시스템(10)은 자동화된 이미징 프로토콜의 실행 및/또는 이미징 시스템(10)에 의해 취득된 이미지 데이터의 처리를 용이하게 할 수도 있는 예시적인 처리 서브시스템(36)을 또한 포함할 수도 있다. 예를 들어, 처리 서브시스템(36)은 일련의 취득된 이미지에 기초하여 합성 이미지를 통합하고, 샘플(24)이 상이한 화합물로 염색된 후에, 동일한 샘플(24)에 대해 생성된 합성 이미지 또는 다른 이미지와 관련하여 참조 또는 정합 동작을 수행하도록 구성될 수도 있다. 처리 서브시스템(36)은 또한 취득된 이미지 또는 취득된 이미지를 사용하여 생성된 합성 이미지의 표시를 야기하기 위해 디스플레이 장치(즉, 스크린 또는 모니터)와 통신할 수도 있다. 메모리(38)는 도시된 예에서 처리 서브시스템(36)으로부터 분리된 것으로서 도시되어 있지만, 특정 실시예에서, 처리 서브시스템(36) 및 메모리(38)는 함께, 즉 단일의 또는 동연의 구성 요소로서 제공될 수도 있다. 부가적으로, 본 예는 제어기(20)로부터 개별 구성 요소인 것으로서 처리 서브시스템(36)을 도시하고 있지만, 다른 실시예에서, 처리 서브시스템(36)은 제어기(20)와 조합될 수도 있고 또는 제어기(20)로서 기능할 수도 있다.

[0022]

또한, 특정 실시예에서, 이미징 시스템(10)은 상이한 시간 또는 이미징 라운드에 또는 다르게는 상이한 이미지에 캡처된 샘플(24)의 각각의 복수의 취득된 이미지에 대한 정량적 특성을 결정하는데 사용될 수도 있다는 것이 또한 이해되어야 한다. 본 명세서에 사용될 때, 정량적 특성은 이미지 품질의 정량적 척도를 표현하고, 감도 지수(figure of merit)라 또한 칭할 수도 있다. 특히, 특정 실시예에서, 이러한 감도 지수는 본 명세서에 설명된 바와 같이, 취득된 이미지 내의 필터링 특징에 사용될 수도 있다. 일 실시예에서, 감도 지수는 구배 벡터(gradient vector)의 이산 근사치를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 일 실시예에서, 감도 지수는 각각의 채널의 공간 위치에 대한 특정 채널(예를 들어, 녹색 채널)의 강도의 구배 벡터의 이산 근사치를 포함할 수도 있다. 이에 따라, 특정 실시예에서, 이미징 시스템(10) 또는 이미징 시스템(10)의 적합한 구성 요소[처리 서브시스템(36)과 같은]는 복수의 취득된 이미지의 각각 내의 각각의 화소에 대한 각각의 컬러 채널의 공간 위치와 관련하여 컬러 채널의 강도의 구배 벡터로의 이산 근사치의 형태의 감도 지수를 결정하도록 구성될 수도 있다. 특정 실시예에서, 저역 통과 필터가 구배의 계산 중에 노이즈를 평활화하도록 구배에 적용될 수도 있다. 전술된 감도 지수의 예는 각각의 컬러 채널의 공간 위치와 관련하여 컬러 채널의 강도의 구배 벡터의 이산 근사치이지만, 다른 감도 지수의 사용이 또한 고려된다. 예를 들어, 다른 감도 지수는 라플라시안 필터(Laplacian filter), 소벨 필터(Sobel filter), 캐니 에지(Canny edge) 검출기, 국부 이미지 콘트라스트의 추정, 또는 임의의 다른 적합한 정량화 가능한 환경에 기초할 수도 있다. 특정 환경에서, 감도 지수는 정합 품질의 지시로서 사용될 수도 있고, 따라서 시야 이미지가 재취득되는지 또는 부가의 시야 이미지가 수용 가능한 정합을 성취하도록 요구되는지를 판정하는데 사용될 수도 있다.

[0023]

상기 내용을 명심하여, 도 2는 도 1과 관련하여 설명된 바와 같이 이미징 시스템(10)을 사용하여 이미지 취득을 경험하는 슬라이드(28) 상의 샘플(24)을 도시한다. 본 예에서, 이미지(42)의 그리드 또는 어레이는 중첩 시야의 세트에 대해 취득되고, 각각의 이미지(42)는 특정 세트의 슬라이드 좌표에서의 이산 이미지 취득에 대응한다. 각각의 이미지 취득 사이에, 슬라이드(28) 또는 이미징 대상 중 하나 또는 모두는 다음의 슬라이드 위치에서 이미지 취득을 허용하도록 이동된다. 도 2에 도시된 예에서, 각각의 이미지(42)는 하나 이상의 에지(40)에서 서로 중첩한다. 이미지(42)의 에지(40)에서 중첩은 합성 또는 모자이크 이미지를 생성하기 위해, 본 명세서에 설명된 바와 같이, 이미지(42)의 병합 또는 스티칭을 허용한다.

[0024]

본 명세서에 언급된 바와 같이, 슬라이드(28)가 주사 스테이지(22)로부터 주기적으로 제거되어 멀티-이미지 취득 프로토콜의 부분으로서 교체되는 특정 이미징 환경에서 문제점이 발생할 수도 있다. 예로서, 이러한 문제점은 소정의 샘플(24)이 다수의 염색 동작을 경험하는 조직학 또는 병리학 환경에서 발생할 수도 있고, 이미지는 새로운 염색 또는 염색의 세트의 각각의 적용 후에 샘플로(24)로부터 취득된다. 예를 들어, 바이오마커의 공간적 분포가 생물학적 샘플에서 프로파일링되는 용례에서, 다단계 프로세스가 도 3의 흐름도(48)에 도시된 바와 같이 채용될 수도 있다. 이러한 예에서, 샘플(24)을 갖는 슬라이드(28)는 초기에 하나 이상의 제제(예를 들어, 특정 바이오마커를 라벨링하는 하나 이상의 형광식으로 표기된 제제와 같은)로 염색된다(블록 50).

[0025]

슬라이드(28)는 이어서 이미징 시스템(10)의 스테이지(22) 상에 배치되고(블록 52), 이미지(42)가 복수의 상이한 위치에서 취득된다(블록 54). 일 실시예에서, 취득된 이미지(42)는 중첩 시야에 대응하여, 취득된 이미지들

이 본 명세서에 설명된 바와 같이, 5%, 10%, 또는 소정의 다른 적합한 중첩 영역에 의해 중첩한다. 본 예에서, 일단 이미지(40)가 현재 이미지 취득 라운드와 연계된 염색 또는 염색들에 대해 취득되면, 슬라이드(28)는 스테이지(22)로부터 제거되고(블록 56), 커버슬립(26)(존재하면)이 슬라이드(28)로부터 제거되고, 예를 들어 샘플로부터 형광성 라벨을 표백함으로써, 샘플(24) 상에 존재하는 염료들 중 하나 이상이 제거된다(블록 58). 특정 구현예에서, 염료 또는 제제는 다른 염료가 단계 58에서 제거된 후에도 잔류할 수도 있다. 이러한 구현예에서, 잔류하는 염료 또는 제제는 모든 이미지 취득 라운드에 공통일 수도 있고, 이미징 라운드들 사이에 공통 또는 기준 염료로서 사용될 수도 있다. 또한, 특정 구현예에서, 커버슬립(26)은 염료의 제거 후에 슬라이드(28) 상에(예를 들어, 표백된 샘플 상에) 교체될 수도 있고, 자동 형광성 제거를 위한 이미지를 얻도록 재이미징될 수도 있다.

[0026] 더 이상의 이미지 취득이 수행되지 않으면(블록 60), 이미지 취득 프로세스는 종료된다(블록 62). 그러나, 라벨링된 샘플(24)의 부가의 이미지(40)가 취득되려고 하면, 다음의 이미징 라운드(블록 64)에서 사용될 염료 또는 염료들(예를 들어, 상이한 세트의 형광적으로 라벨링된 제제)이 얻어져서 샘플(24)에 적용된다(블록 50). 새롭게 라벨링된 슬라이드(28)는 이어서 스테이지(28) 상에서 교체되고(블록 52), 이미징 프로세스가 반복된다. 이 이미지 취득 프로세스는 원하는 바이오마커의 프로파일을 얻기 위해, 필요한만큼 다수회(예를 들어, 5, 10, 12, 15, 또는 20회 또는 필요한만큼 다수회) 반복될 수도 있다.

[0027] 설명되는 바와 같이, 도 3과 관련하여 설명된 조준 프로세스(aiming process)의 일 태양은 이미징 시스템(22)의 스테이지(22) 상의 슬라이드(28)의 제거 및 교체이다. 스테이지(22) 상의 슬라이드(28)의 각각의 배치는 배율 하에서 현저할 수도 있는 스테이지(22) 상의 슬라이드(28)의 위치 및 배향의 에러를 받게 된다. 그 결과, 후속의 취득된 이미지 세트는 이전에 취득된 이미지 세트와 관련하여 병진되고 그리고/또는 회전될 수도 있다. 병진 및/또는 회전은 또한, 기계적 스테이지(22)의 백래시(backlash) 및 런아웃(runout), 카메라의 경사, 및/또는 스테이지축의 비직교성에 관련된 효과들과 조합될 수도 있다.

[0028] 따라서, 본 명세서에 설명된 바와 같이, 다수의 시야로서 취득된 합성 또는 스티칭된 이미지 내의 대응 위치를 식별하고 표시하기 위해, 2개의(또는 그 이상의) 이미지 세트 내의 대응 위치가 평면 내의 동일한 점에서 나타나고, 이에 의해 다수의 이미지 세트를 정합하도록 공통 데이터 평면에 양 이미지 세트를 맵핑하는 것이 유용할 수도 있다.

[0029] 이 설명을 명심하고, 도 4를 참조하면, 본 발명의 접근법의 일 구현예에서, 이미지(42)는 제1 이미징 라운드에서 규칙적인 그리드 상의 대응 시야에 대해 취득된다(블록 78). 일 실시예에서, 이미지(42)는 인접한 이미지의 에지가 필드의 5% 내지 20%와 같은 실질적인 마진만큼 이웃하는 이미지들과 중첩하도록 취득된다. 일 실시예에서, 시야의 이미지(42)는 이어서 중첩하는 각각의 이미지 쌍의 중첩 영역들 사이의 제로-평균 정규화된 크로스파워 상관을 최대화하는 변위를 발견함으로써, 단지 병진만을 고려하여 서로에 대해 위치될 수도 있다.

[0030] 도 5에 도시된 바와 같이, 이는 푸리에 영역에서 즉시 행해질 수도 있고, 여기서 제1 및 제2 중첩 이미지(100, 102)는 개별적으로 푸리에 변환되어(블록 104) 각각의 값 a 및 b 를 산출한다. 푸리에 값(a 및 b)은 정규화될 수도 있고(블록 106), 결과는 역 푸리에 변환되어(블록 108) 원하는 상관(r)(110)을 산출한다. 결과적인 값(r)은 x 및 y 방향에서의 변위의 함수이고, 중첩 이미지(100, 102)가 가장 양호하게 상관될 때 최대화된다. 통상적으로, r 의 값은 정확한 오프셋에서 단일의 날카로운 피크를 나타낸다.

[0031] 일 구현예에서, 중첩 이미지(42)의 세트에 대한 이를 r 함수가 제공되면, 허리스틱(heuristic) 접근법이 전체 합성 또는 모자이크 이미지(84)에 대해 전역적으로 상관의 합을 최대화하도록 채용될 수도 있다. 예를 들어, 일 실시예에서, 알고리즘은 탐욕적(greedy) 영역-성장 기술로서 구현될 수도 있다. 그러나, 다른 실시예에서, 트렐리스 코딩(trellis coding), 축차 가속 완화법(successive over-relaxation) 또는 시뮬레이션된 어닐링(simulated annealing)과 같은 다른 기술이 채용될 수도 있다. 채용된 기술에 무관하게, 초기 이미징 라운드의 이미지(42)는 서로 참조되어, 초기 라운드의 이미지(40)가 함께 "스티칭되게" 하여(블록 80) 합성 또는 스티칭된 이미지(84)를 형성한다.

[0032] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 화소 공간 내의 각각의 이미지(42)의 좌표는 이미지 캔버스 공간 내의 좌표[즉, 합성 이미지(84) 내의 좌표](U, V)로 맵핑될 수 있는 (u_i, v_i) 에 의해 아래와 같이 특징화될 수 있다.

$$(1) \quad U = u_i + e_i$$

[0034] (2) $V = v_i + f_i$

[0035] 또는

(3) $[U \ V \ 1] = [u_i \ v_i \ 1] \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ e_i & f_i & 1 \end{bmatrix} = [u_i \ v_i \ 1] B_i$

[0036] [0037] 합성 이미지(84) 내의 좌표(U, V)를 밀리미터(mm)와 같은 통상의 공간 척도 또는 단위로 슬라이드(28) 상의 좌표로 변환하는 것이 또한 적절할 수도 있다. 이를 성취하기 위해, 일 실시예에서, 이미징 시스템(10)은 각각의 이미징된 시야의 중심의 (x, y) 위치를 기록한다. 이 중심은 대응 시야의 각각의 취득된 이미지(42) 내의 화소 위치 $\left(\frac{w-1}{2}, \frac{h-1}{2}\right)$, 또는 합성 이미지(84) 내의 $\left(\frac{w-1}{2} + e_i, \frac{h-1}{2} + f_i\right)$ 에 대응하고, 여기서 w는 폭이고, h는 각각의 이미지(42)의 높이이다. 따라서, 이 지점에서, 맵핑은 개별 이미지(42)로부터 생성된 개별 이미지(42) 또는 합성 이미지(84) 중 하나 또는 모두 내의 화소 좌표와 공간 슬라이드 위치 사이에서 가능하다.

[0038] 취득된 시야를 위한 이 맵핑이 제공되면, 선형 변환의 해석될 수 있고, 여기서

[0039] (4) $[U \ V \ 1] = [x \ y \ 1] C$

[0040] 그리고, 여기서

[0041] (5) $C = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & 0 \\ c_{21} & c_{22} & 0 \\ c_{31} & c_{32} & 1 \end{bmatrix}$ 이다.

[0042] 일 구현예에서, 선형 변환은 최소 제곱의 방법에 의해 해석될 수 있다. 이러한 구현예에서, 문제는 최소화될 2 개의 하위문제로 분해되는데,

[0043] (6) minimize $\|A\mathbf{p} - \mathbf{x}\|_2^2$, where $\mathbf{x} = [c_{11} \ c_{21} \ c_{31}]^T$ 및

[0044] (7) minimize $\|A\mathbf{q} - \mathbf{y}\|_2^2$, where $\mathbf{y} = [c_{12} \ c_{22} \ c_{32}]^T$

[0045] 여기서,

[0046] (8) $A = \begin{bmatrix} x_1 & y_1 & 1 \\ x_2 & y_2 & 1 \\ \vdots & & \\ x_n & y_n & 1 \end{bmatrix}$

[0047] (9) $\mathbf{x} = \begin{bmatrix} \frac{w-1}{2} + e_1 \\ \frac{w-1}{2} + e_2 \\ \vdots \\ \frac{w-1}{2} + e_n \end{bmatrix}$ 및

$$(10) \quad \mathbf{y} = \begin{bmatrix} \frac{h-1}{2} + f_1 \\ \frac{h-1}{2} + f_2 \\ \vdots \\ \frac{h-1}{2} + f_n \end{bmatrix}$$

[0048] 이다.

[0049] 이해될 수 있는 바와 같이, 행렬 A는 양 하위문제에 공통이기 때문에, 그 인수분해는 단지 1회 연산될 수도 있다. 이 접근법에 의해, 슬라이드 좌표와 이미지 좌표 사이의 병진, 회전, 스케일 팩터, 및 스테이지축의 비직교성으로부터 발생하는 전단이 해석될 수도 있다.

[0050] 특정 상황에서, 취득된 시야 이미지(42)의 중심은 동일선상에 있는데, 즉 공통 라인 상의 라인일 수도 있다. 이러한 상황에서, 행렬 A는 랭크 부족(rank deficient)일 것이고, 알고리즘은 전단을 해석하는 것이 불가능할 것이다. 일 실시예에서, 알고리즘은 이러한 상황에서 대안 식을 채용할 수도 있는데,

$$(11) \quad \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & 0 \\ -c_{12} & c_{11} & 0 \\ c_{31} & c_{32} & 1 \end{bmatrix}$$

[0051]

[0052] 최소 제곱 문제를 제공하면,

$$(12) \quad \text{minimize } \|\mathbb{A}\mathbf{x} - \mathbf{b}\|_2^2, \text{ where } \mathbf{x} = [c_{11}, c_{12}, c_{31}, c_{32}]^T$$

[0053]

[0054] 여기서,

$$(13) \quad \mathbb{A} = \begin{bmatrix} x_1 & -y_1 & 1 & 0 \\ y_1 & x_1 & 0 & 1 \\ x_2 & -y_2 & 1 & 0 \\ y_2 & x_2 & 0 & 1 \\ \vdots & & & \\ x_n & -y_n & 1 & 0 \\ y_n & x_n & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

[0055] 및

$$(14) \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} U_1 + (w-1)/2 \\ V_1 + (h-1)/2 \\ U_2 + (w-1)/2 \\ V_2 + (h-1)/2 \\ \vdots \\ U_n + (w-1)/2 \\ V_n + (h-1)/2 \end{bmatrix}$$

[0056]

[0057] 이는 모든 (x,y) 쌍들이 별개이면 풀 랭크(full rank)일 것이다.

[0058] 따라서, 이 방식으로, 기준선 시야 이미지(42)의 초기 세트가 취득되고 함께 스티칭되어 각각의 변환 행렬들이 프로세스 중에 계산되는, 합성 이미지(84)를 형성할 수도 있다. 예를 들어, 실제로, 자동화된 이미지 취득 주사는 이미지 취득 동작과 동시에 시야 이미지를 사이의 상관을 또한 연산하는 데스크탑 또는 다른 컴퓨터에 의해 제어될 수도 있다. 슬라이드 좌표와 시야 이미지 화소 사이의 변환을 허용하는 각각의 행렬(86)이 규정될 수도 있고, 슬라이드 좌표와 합성 이미지 화소 사이의 변환을 허용하는 행렬(88)이 규정될 수도 있다. 행렬들은 개별적으로 또는 소정 조합된 또는 합성 형태로 채용될 수도 있어, 시야 이미지 공간, 합성 이미지 공간, 및 슬라이드 좌표 사이에 허용할 수도 있다. 게다가, 기준선 이미징 중에 적합한 이미지 메트릭(metrics)이 각각

의 시야 이미지에 대해 취득되어 후속의 이미징 라운드에 오버슛 영역의 식별을 용이하게 할 수도 있다.

[0059] 후속의 라운드에서, 샘플(24)은 전술된 바와 같이, 특정 바이오마커를 라벨링하는 형광제와 같은, 하나 이상의 상이한 제제로 염색될 수도 있다. 이미지(42)는 새롭게 염색된 샘플(24)의 특정 시야에서 취득될 수도 있다.

[0060] 이 내용을 명심하여, 특정 실시예에서, 모든 이미징 라운드를 통해 일정한 하나의 이미징 채널이 존재하고, 따라서 각각의 이미징 라운드에서 공통 또는 일정한 특징으로서 기능하고 라운드들 사이의 비교를 용이하게 한다. 이러한 구현예에서, 라운드들 사이에 일정한 이미징 채널은 정합 프로세스에서 사용되는 것이다. 예를 들어, 일 실시예에서, 정합을 위해 사용된 채널은 표백 단계 후에 지속하거나 또는 주기적으로 재도포되는 핵산 염료 (DAPI 또는 Hochst)이다. 다른 대안은 비특정 산 염료(플루오로세인, FITC 또는 에오신과 같은), 비특정 라벨의 1차 아민(에피코코노과 같은), 또는 조직 자체의 선천적인 자체 형광성을 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 특정 구현예에서, 후속의 이미징 라운드에서 캡처된 시야 이미지(42)와 초기 또는 기준선 이미징 라운드에서 캡처된 시야 이미지를 사이의 중첩을 최대화하는 것이 바람직할 수도 있다. 이 목표를 용이하게 하기 위해, 특정 구현예에서, 초기 또는 기준선 이미징 라운드로부터 스테이지 좌표의 세트를 취하고 후속의 이미징 라운드에서 동일한 또는 대응 위치에 이들 좌표를 맵핑하는 선형 맵핑이 설정된다. 실제로, 후속의 라운드에서 슬라이드 배치는 위치의 불확실성이 시야의 크기보다 작도록 충분히 양호하게 제어될 수 있는 것으로 가정될 수도 있다. 예를 들어, 슬라이드 위치는 이미징 시스템의 시야의 1/3 이내로 복제될 수 있는 것으로 가정될 수도 있다.

[0062] 이는 특정 실시예에서, 현재 이미지 취득 라운드에서 시야 이미지(42)를 취득하고 기준선 또는 초기 라운드로부터 대응 시야 이미지(42)에 현재 라운드에서의 각각의 시야 이미지(42)를 정합함으로써 성취될 수도 있다. 일 실시예에서, 정합 알고리즘은 회전 뿐만 아니라 병진에 내성이 있다. 일 이러한 예에서, 알고리즘은 회전각(Θ), 스케일 팩터(s), 및 병진(Δu , Δv)을 판독하고, 이 병진은 합성될 때 현재 시야 이미지 내의 대응 위치에 각각의 기준선 시야 이미지를 맵핑한다. 복귀된 회전 및 스케일은 비교적 짧은 기준선에 걸쳐 생성될 수도 있기 때문에, 특정 구현예에서, 이들 값은 무시되거나 폐기될 수도 있다.

[0063] 예로서, 회전각, 스케일 팩터, 및 병진은 몇몇 실시예에서, 도 8에 도시된 계산에 의해, 얻어질 수도 있다. 본 예에서, 소정의 시야의 기준선 이미지(160) 및 동일한 시야의 대응 현재 이미지(162)는 개별적으로 푸리에 변환되어(블록 164, 블록 166) 주파수 영역 이미지를 산출한다. 회전 및 스케일을 결정하기 위한 초기 계산에서, 양 푸리에 변환된 이미지의 진폭은 성분마다 추출되고(블록 168), 결과적인 실제 이미지는 로그-극 변환을 받게 되고(블록 170), 로그-극 이미지는 개별적으로 푸리에 변환된다(블록 172). 결과적인 이미지는 성분마다 곱해지고(블록 174), 역 푸리에 변환을 받게 되어(블록 176), 그 좌표축이 회전 및 로그(스케일)이고 그 값들이 소정의 회전 및 스케일에서 성취된 상관인 실제 이미지를 산출한다. 알고리즘은 상관을 최대화하는(물리적으로 적당한 것들로 값들을 구속함) 회전 및 스케일(179)을 추출한다(블록 178).

[0064] 제2 단계에서, 알고리즘은 연산된 양만큼 기준선 이미지(160)의 푸리에 변환을 회전하고 스케일링하여(블록 180)[또는 다른 실시예에서, 네거티브 양만큼 현재 이미지(162)의 푸리에 변환을 회전하고 왕복 양만큼 이를 스케일링함], 미리 회전되고 미리 스케일링된 주파수 영역 이미지를 산출한다. 병진은 이어서 도 5의 것에 동일한 알고리즘을 사용하여 연산되고, 여기서 크로스-파워 상관이 주파수 영역에서 연산된다(블록 182). 결과적인 이미지는 역변환되고(블록 184), 상관 함수의 최대값이 위치지정된다(블록 186, 188). 최대값(190)의 독립변수 (argument)는 이미지가 병진되어야 하는 화소의 수를 제공하고, 최대값(192)은 정합의 품질의 지시기이다.

[0065] 상기 일반화된 개요 및 예를 명심하여, 일 실시예에서, 알고리즘은 복수의 점(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 또는 임의의 다른 적합한 수의 점)에서 변위(Δu , Δv)를 취득하고, 여기서 각각의 점은 시야 이미지(42) 내의 점(예를 들어, 중심점)에 대응한다. 일 예에서, 점들의 간격은 축을 따라 실행 가능한 정도로 최대화된다. 예로서, 도 6을 참조하면, 일 구현예에서, (a) 기준선 또는 초기 이미징 라운드에서 가장 양호한 이미지 품질을 갖는 시야(이 점이 적절한 상관을 산출하지 않으면, 차선의 상관을 선택함), (b) 점 (a)로부터 최대 유클리드 거리(Euclidean distance)에 있고 초기 또는 기준선 라운드에서 적절한 이미지 품질을 갖는 점(이 점이 적절한 상관을 산출하지 않으면, 다음의 가장 먼 것을 선택함), (c) 점 (a)와 (b)를 연결하는 라인(120) 상의 그 직교 투영이 가능한 한 긴 점(상관이 부적절하면, 차선으로 진행함), (d) 점 (b)와 (c)를 연결하는 라인(122)의 좌측으로 가능한 한 가장 먼 점(상관이 부적절하면, 차선으로 진행함), 및 (e) 점 (b)와 (c)를 연결하는 라인(122)의 우측으로 가능한 한 가장 먼 점(상관이 부적절하면, 차선으로 진행함)과 같은 5개의 점이 선택될 수도 있다. 이러한 구현예에서, 점 (b)-(c)는 하나의 축 상에서 가능한 최대 간격을 성취하고[즉, 라인(122)], 점 (d)-(e)는 제1 축에 법선인 다른 축 상의 최대 간격을 성취한다. 실제로, 2개의 점은 슬라이드(28)의 병진 및

회전을 결정하기에 실제로 충분할 수도 있고, 2개 초과의 임의의 수의 점이 회전 및 병진 해결책의 과정 결정을 허용할 수도 있다.

[0066] 이전의 설명에서 언급된 이미지 품질 결정과 관련하여, 작동시에, 이미지 품질은 브레너 구배(Brenner's gradient) 및 임계치 또는 컷오프 기준과 같은 적합한 척도를 사용하여 정량적으로 평가될 수도 있다. 예를 들어, "적절한" 이미지 품질은 상기 예에서 점(a)의 시야의 것의 적어도 0.1배의 브레너 구배를 갖는 것으로서 지정될 수도 있다. 유사하게, 2개의 점들이 "적절하게" 또는 "충분히" 정합되어 있다는 결정은 정량적 및 임계화된 기초에 기초할 수도 있다. 예를 들어, "적절한" 정합은 적어도 0.005의 제로-평균 정규화된 크로스-파워 상관 계수를 산출하는 해당의 2개의 등록된 점들로서 작동적으로 규정될 수도 있다. 이해될 수 있는 바와 같이, 다른 적합한 메트릭 및/또는 임계치가 채용될 수도 있다.

[0067] 도 7을 참조하면, 상기 예는 흐름도(140)에 도시된 바와 같이 일반화될 수도 있다. 도 7의 도시된 단계에서, 슬라이드(28)는 예를 들어, 제1 세트의 염색제를 행굼 제거하고 제2 세트의 염색제를 적용한 후에, 이미징 시스템 스테이지(22) 상에 복제된다(블록 142). 통상적으로 이미징될 총 영역(예를 들어, 샘플 24 영역)과 관련하여 이격되어 있는 제한된 수의 점(예를 들어, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개 이상)에 대해 중심설정된 시야 이미지(42a)의 부분집합이 취득된다(블록 144). 시야 이미지(42a)의 각각의 부분집합은 대응 기준선 시야 이미지(42b)에 비교된다(블록 146). 이들 비교에 기초하여, 병진[즉, $(\Delta u, \Delta v)$](148), 회전(Θ)(150), 및 스케일 조정(152)이 초기 및 후속의 이미지 세트와 관련하여 유도될 수도 있다. 이 방식으로, 상이한 이미징 라운드로부터 대응 시야 이미지의 부분집합의 중심점은 맵핑되고 이들의 각각의 대응부와 정렬되어, 기준선 라운드로부터 현재 이미징 라운드로 시야 중심점의 각각의 병진을 얻을 수도 있다. 일 실시예에서, 정렬 동작은 로그-극 좌표 내의 푸리에 변환을 상관함으로써 수행된다.

[0068] 따라서, 각각의 시야(i)에 대해, 대응 기준선 또는 초기 라운드 시야로부터 오프셋된 점($\Delta u_i, \Delta v_i$)이 특징화될 수도 있다. 게다가, 회전(Θ) 및 스케일 팩터(s)가 또한 결정될 수도 있다.

$$(15) \quad [u_i^{cur} \quad v_i^{cur} \quad 1] = [u_i^{base} \quad v_i^{base} \quad 1] \begin{bmatrix} \cos\theta & -\sin\theta & 0 \\ \sin\theta & \cos\theta & 0 \\ \Delta u & \Delta v & 1 \end{bmatrix} \\ = [u_i^{base} \quad v_i^{base} \quad 1] \mathbb{M}$$

[0069] [0070] 현재 시야 이미지의 중심 $\left(\frac{h-1}{2}, \frac{v-1}{2}\right)$ 은 대응 기준선 시야 이미지에서 $\left[\frac{(h-1)}{2}, \frac{(v-1)}{2}, 1\right] \mathbb{M}^{-1}$ 또는 슬라이드 좌표에서 $\left[\frac{(h-1)}{2}, \frac{(v-1)}{2}, 1\right] \mathbb{M}^{-1} \mathbb{C}^{-1}$ 로 맵핑된다.

[0071] 일단, 모든 점 쌍 비교(예를 들어, 본 예에서, 5개의 점 쌍)가 연산되어 있으면, 이하가 알려질 것이다.

$$(16) \quad \begin{aligned} (x_1, y_1) &\Rightarrow (x'_1, y'_1) \\ (x_2, y_2) &\Rightarrow (x'_2, y'_2) \\ &\vdots \\ (x_5, y_5) &\Rightarrow (x'_5, y'_5) \end{aligned}$$

[0072] [0073] 여기서, (x_i, y_i) 는 기준선 이미지 취득 라운드에서 시야(i)의 중심의 슬라이드 좌표이고, (x'_i, y'_i) 는 현재 이미지 취득 라운드에서 취득된 시야(i)의 대응 중심의 슬라이드 좌표이다. 이 데이터에 기초하여, 선형 변환은, 어느 위치 $[x \ y \ 1] \mathbb{M}^{-1}$ 가 현재 라운드에서 동일한 시야 중심에 대응하는지를, 기준선 라운드에서 (x, y) 에서 취득된 시야에 대해 해석하도록 구성될 수도 있다. 즉, 기준선 행렬(\mathbb{M})은 최소 제곱 개념에서, 이하를 산출하고,

$$(17) \quad [x_i \quad y_i \quad 1] \cong [x'_i \quad y'_i \quad 1] \mathbb{M}$$

[0075] 여기서,

$$(18) \quad \mathbb{M} = \begin{bmatrix} m_1 & -m_2 & 0 \\ m_2 & m_1 & 0 \\ m_3 & m_4 & 1 \end{bmatrix} \text{이다.}$$

[0076] [0077] 최소 제곱 문제로서 표현되면, 이는 이하와 같이 되고,

$$(19) \quad \text{Minimize} \|\mathbb{A}\mathbf{x} - \mathbb{b}\|_2^2$$

[0078] [0079] 여기서,

$$(20) \quad \mathbf{x} = [m_1 \ m_2 \ m_3 \ m_4]^T$$

$$(21) \quad \mathbb{A} = \begin{bmatrix} x'_1 & -y'_1 & 1 & 0 \\ y'_1 & x'_1 & 0 & 1 \\ x'_2 & -y'_2 & 1 & 0 \\ y'_2 & x'_2 & 0 & 1 \\ \vdots \\ x'_n & -y'_n & 1 & 0 \\ y'_n & x'_n & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$(22) \quad \mathbb{b} = \begin{bmatrix} x_1 \\ y_1 \\ x_2 \\ y_2 \\ \vdots \\ x_n \\ y_n \end{bmatrix} \text{이다.}$$

[0080] [0081] [0082] [0083] 이 변환 행렬은 대응 기준선 시야 이미지와 최대 중첩을 얻기 위해 현재 이미징 라운드에서 시야 이미지(42)를 얻기 위한 위치의 세트를 제공한다. 변환 행렬은 또한 슬라이드(28)의 회전, 및 따라서 슬라이드(28)와 관련하여 뷔잉된 뷔의 개별적인 필드의 추정치를 제공한다.

$$(23) \quad \theta = \tan^{-1} \frac{m_2}{m_1}$$

[0084] [0085] 자기 정렬 절차에 기초하여, 이미징 시스템(10)은 초기 또는 기준선 시야 이미지와 최대로 중첩할 것인 정확한 위치 $[x_i \ y_i \ 1]\mathbb{M}$ 에서 현재 라운드에 대한 풀 세트의 시야 이미지를 취득하도록 진행할 수 있다. 일 구현 예에서, 일단 소정의 시야 이미지(42)가 취득되면, 시야 이미지는 $-\theta$ 의 각도만큼 회전되고(즉, 이전의 단계로부터 미리 연산된 회전), 단지 병진만을 고려하여 대응 기준선 라운드 시야 이미지에 정합된다. 이러한 구현 예에서 미리 연산된 회전의 사용은, 1) 취득된 현재 시야 이미지 및 대응 시야 이미지에 기초하여 개별적으로 회전을 해석하는 것보다 3x 내지 5x 더 빠르고, 2) 미리 연산된 회전이 긴 기준선에 걸쳐 연산되고(단일의 시야 이미지에 대해), 따라서 짜터(jitter) 및 원치 않는 수치 아티팩트를 덜 받게 되는 것을 포함하는 특정의 이익을 제공할 수도 있다. 정합을 위해 연산된 병진(Δu , Δv), θ 만큼의 회전, 및 기준선 라운드 이미지의 시야 변환은 현재 라운드의 시야 이미지(42)의 시야 변환을 산출하도록 합성된다.

$$(24) \quad \mathbb{B}' = \mathbb{B} \cdot \begin{bmatrix} \cos \theta & \sin \theta & 0 \\ -\sin \theta & \cos \theta & 0 \\ \Delta u & \Delta v & 1 \end{bmatrix}$$

[0086] [0087] 상기 내용을 명심하여, 그 이미징 라운드에 대한 합성 이미지(84)를 형성하기 위해 소정의 이미징 라운드에서 취득된 시야 이미지(42)를 스티칭하는 것과 관련하여, 합성 이미지(84)의 샘플링 화소(U, V)는 각각의 시야 이

미지(42)에서의 샘플링 화소 $[U \ V \ 1] \cdot \mathbb{C}^{-1} \cdot \mathbb{B}'$ 를 의미한다. 이 관계를 사용하여, 서로 참조되는 (즉, 정합되는), 후속의 이미징 라운드에서의 시야 이미지 및 이들 라운드에 대해 생성된 합성 이미지가 생성될 수도 있어, 상이한 이미지 취득 라운드에서 이미징된 상이하게 염색된 샘플 영역의 간단한 비교를 허용한다.

[0088] 작동 성능과 관련하여, 형광성 이미지 취득이 수행되는 구현예에서, 노출 시간은 기준선 라운드로부터 대응 시야 이미지와 비기준선 라운드에서의 미리 회전된 시야 이미지의 정합이 이미지 취득 프로세스와 중첩할 수도 있도록 충분히 높을 수도 있다. 그러나, 다른 이미징 프로토콜(예를 들어, 명시야 이미징)이 더 신속하게 발생할 수도 있고(즉, 더 짧은 노출 시간을 가짐), 따라서 취득 단계와 정합 단계 사이의 중첩을 허용하도록 더 특정화된 처리 구성 요소(예를 들어, GPGPU, FPGA, FFT 코어 등)의 사용으로부터 이익을 얻을 수도 있다. 또한, 최종 이미지 좌표는 정합 단계 후에 알려지기 때문에, 특정 구현예에서, 합성 이미지(84)를 형성하기 위한 시야 이미지(42)의 스티칭은 비기준선 이미지 취득 라운드에서 주사에 또한 중첩할 수 있다. 이러한 구현예에서, 주사 프로세스는 Y-방향 순서에서 시야 이미지를 취득할 수도 있고, 소정의 주사 라인을 혼합하기 시작하는 것이 허용 가능할 때를 결정하기 위해 시야의 최대 Y 변위를 고려하도록 논리 회로를 채용할 수도 있다.

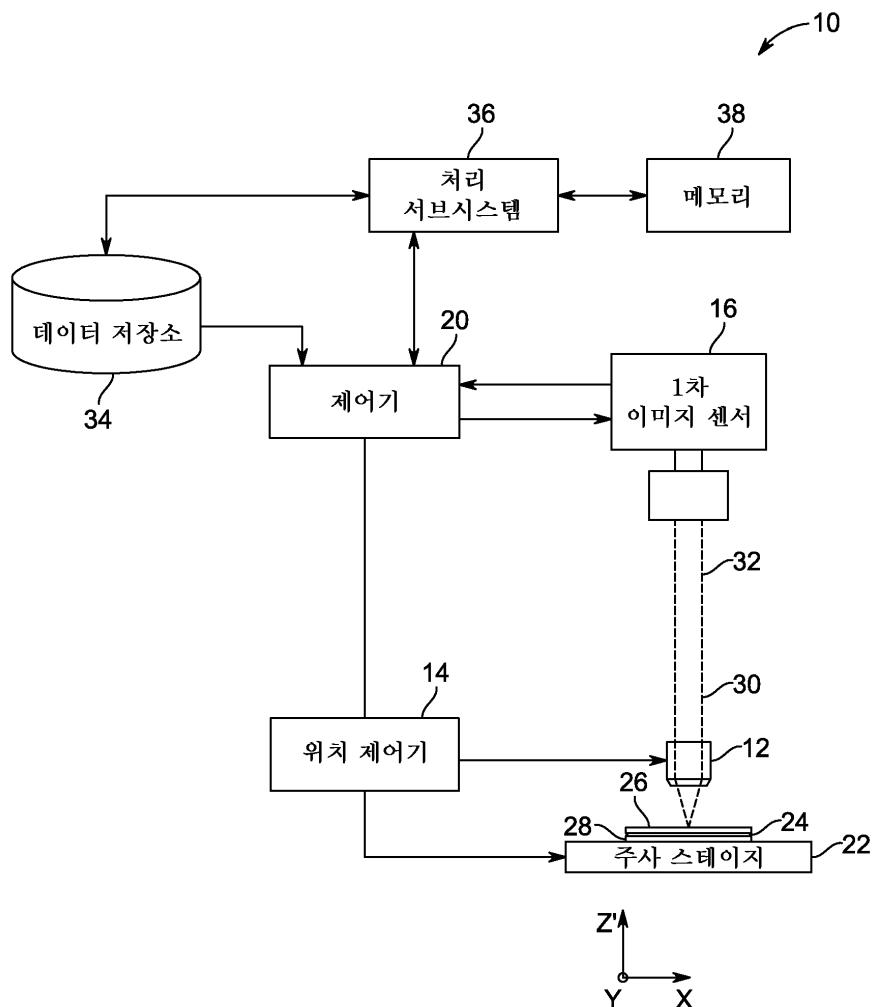
[0089] 또한, 본 명세서에 설명된 자기 정렬 절차에서, 개시된 로그-극 고속 푸리에 변환 동작은 스케일 뿐만 아니라 병진 및 회전을 취급할 수 있지만, 이 동작이 적합한 스케일의 범주는 좁을 수도 있다(예를 들어, 2의 팩터)는 것이 주목될 수도 있다. 따라서, 상이한 혼미경 대물 렌즈로(즉, 상이한 배율에서) 취득되는 이미지가 정합되어야 하는 구현예에서, 동일한 배율에서 자기 정렬 절차를 수행하는 것이 유용할 수도 있다. 대안적으로, 더 높은 배율 이미지는 부분제거됨(decelimated) 수도 있고 윈도잉(windowing) 함수가 적용된다. 결과적인 이미지는 더 낮은 배율 이미지의 크기에 제로-패딩됨(zero-padded) 수도 있어, 발생하는 병진 및 스케일링을 보상하기 위해 이미지 변환 행렬을 조정한다.

[0090] 본 발명의 기술적인 효과는 슬라이드의 단일의 큰 이미지 내로 초점맞춤될 다수의 시야에 걸쳐 취득된 이미지를 포함하고, 다른 이미징 라운드 중에 취득된 이미지와 일 이미징 라운드 중에 취득된 이미지의 화소-정밀 정렬을 제공한다. 화소-정밀 정합은 슬라이드 배치, 스테이지의 런아웃 및 오정렬, 스테이지축의 비직교성, 스테이지에 대한 카메라의 오정렬, 및 광학 트레인 내의 원통형 왜곡과 연계된 불확실성에도 불구하고 성취된다.

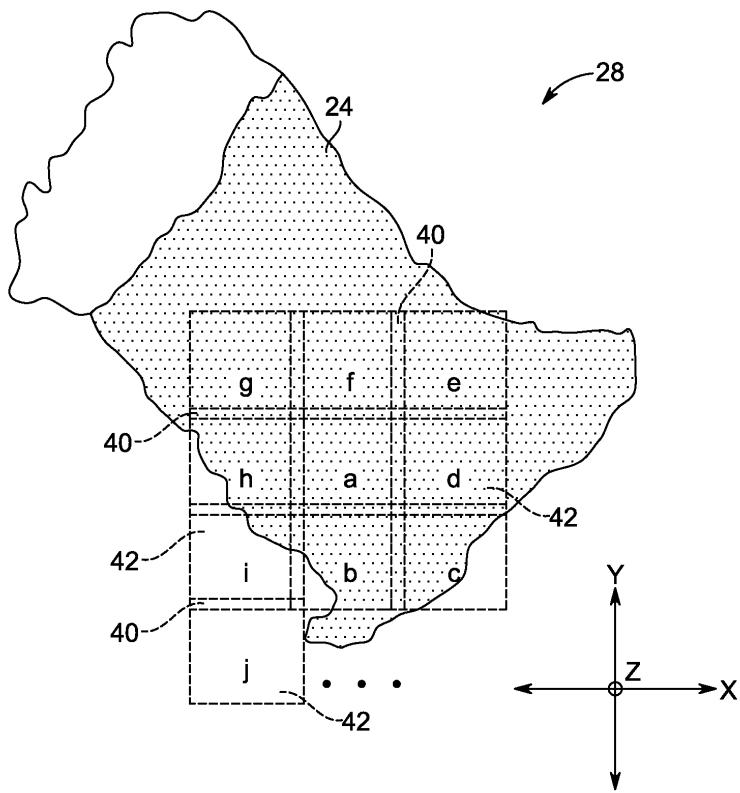
[0091] 이 기록된 설명은 최선의 모드를 포함하여, 본 발명을 개시하기 위해, 그리고 또한 임의의 장치 또는 시스템을 제조하고 사용하는 것과 임의의 구체화된 방법을 수행하는 것을 포함하여, 통상의 기술자가 본 발명을 실시하는 것을 가능하게 하기 위해 예들을 사용한다. 본 발명의 특히 가능한 범주는 청구범위에 의해 규정되고, 통상의 기술자에게 발생하는 다른 예를 포함할 수도 있다. 이러한 다른 예는 이들 예가 청구범위의 문자 언어와는 상이하지 않은 구조적 요소를 가지면, 또는 이들 예가 청구범위의 문자 언어와 비실질적인 차이점을 갖는 등가의 구조적 요소를 포함하면, 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

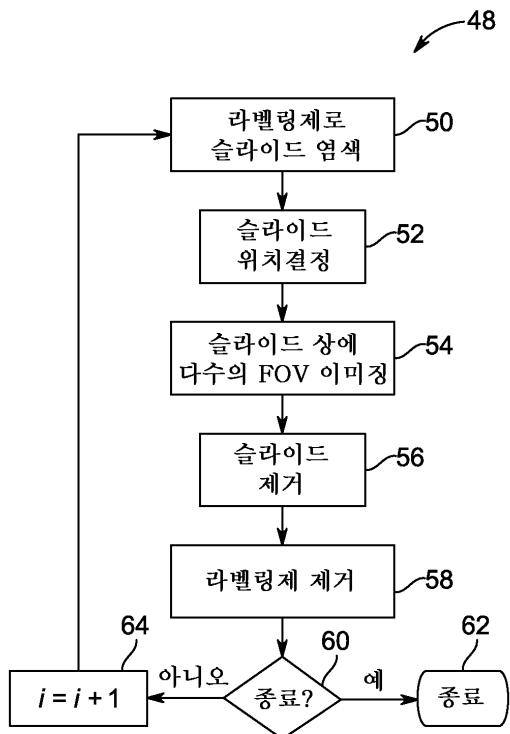
도면1



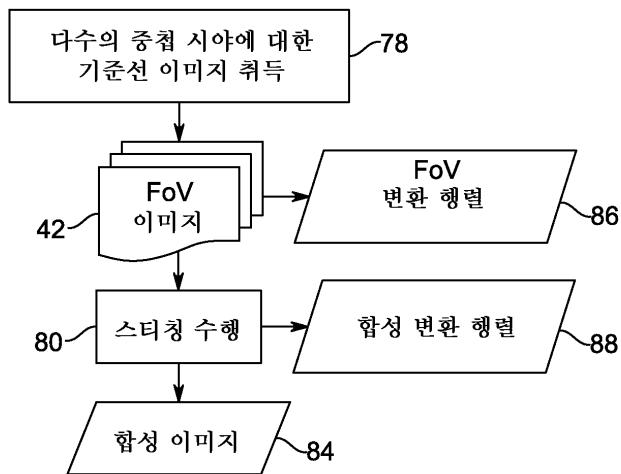
도면2



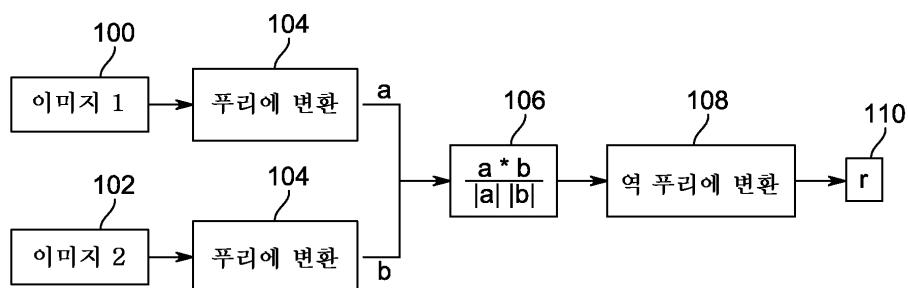
도면3



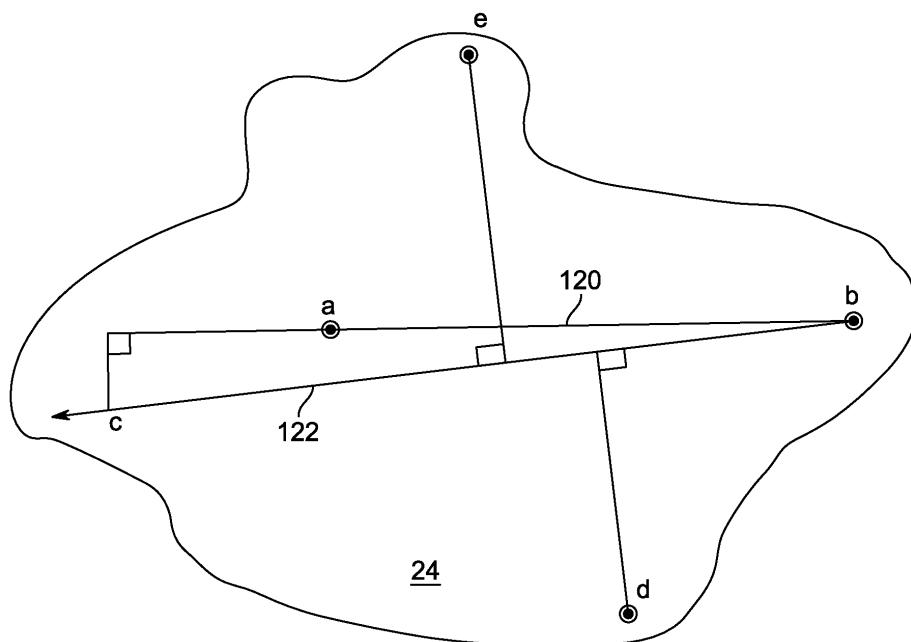
도면4



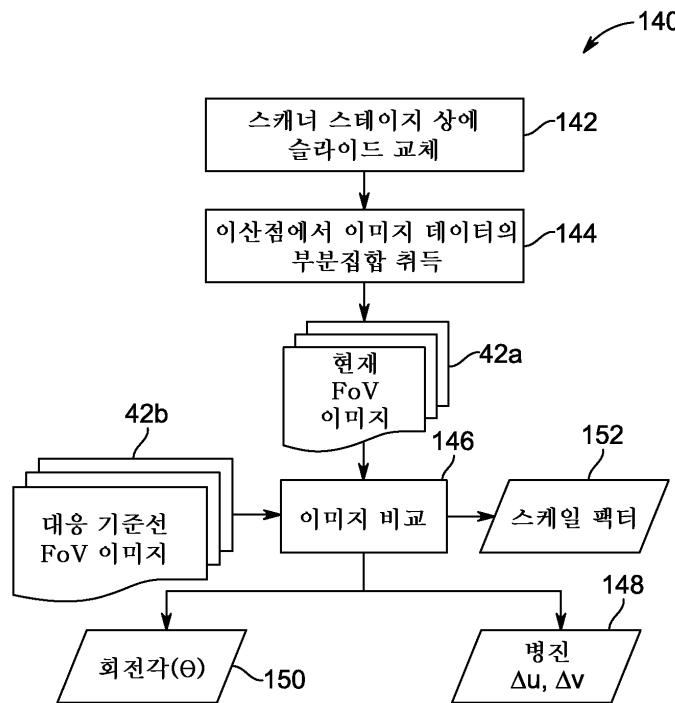
도면5



도면6



도면7



도면8

