

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-536001
(P2019-536001A)

(43) 公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	Z 2 G O 4 3
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14	B 2 G O 5 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 2 G O 5 9
GO 1 N 21/47 (2006.01)	GO 1 N 15/14	C
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 15/14	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-511628 (P2019-511628)
 (86) (22) 出願日 平成29年9月7日 (2017.9.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月18日 (2019.4.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/050537
 (87) 国際公開番号 WO2018/049064
 (87) 国際公開日 平成30年3月15日 (2018.3.15)
 (31) 優先権主張番号 62/385,055
 (32) 優先日 平成28年9月8日 (2016.9.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

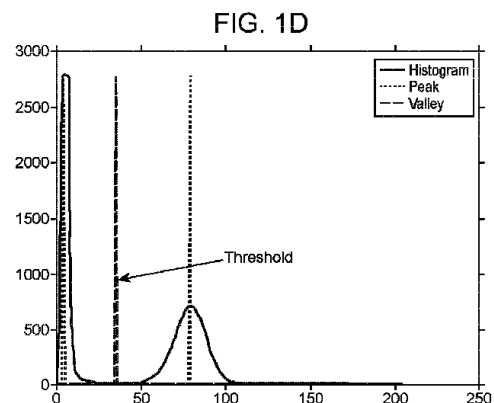
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 10
 0
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (72) 発明者 リー, ウェンジン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
 086, サニーベール, アパートビー, イ
 ースト マッキンリー 529

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自動体液分析

(57) 【要約】

体液サンプルの自動細胞分析のための方法、デバイス、及びシステムが開示される。方法、デバイス、及びシステムは、体液サンプルをフローサイトメータに流すことにより生成されたデータにwatershed変換を適用して、データの分析に用いられる閾値を決定する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を含有する体液を分析するための方法であって、当該方法は、エネルギー源による照射で体液サンプルから放出されたシグナルを収集し、前記体液サンプルは蛍光染料で染色され、前記蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成すること、収集したシグナルに watershed 変換を適用することにより、収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定すること、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用すること、ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定すること、及び、体液中の異なる細胞タイプを区別するべく閾値を上回るシグナルを分析すること、を含む方法。

10

【請求項 2】

前記方法が、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用することを含み、前記ドミナントな谷は、複数のピークに watershed 変換を反復的に適用することにより得られる 2 つのドミナントなピーク間に位置する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ドミナントな谷が、有核細胞イベントの第 1 の組に対応する第 1 のドミナントなピークを、有核イベントの第 2 の組に対応する第 2 のドミナントなピークから分離する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記収集したシグナルが散乱光を含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記散乱光が前方散乱光を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記散乱光が側方散乱光を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記側方散乱光が偏光した側方散乱光を含む、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記側方散乱光が偏光解消した側方散乱光を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記収集したシグナルが蛍光シグナルを含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法が、散乱光を含む第 1 の複数のシグナル及び蛍光シグナルを含む第 2 の複数のシグナルを収集すること、

(a) 収集した第 1 の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した散乱光の分析に関する閾値を設定し；細胞イベントを非細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、及び、

40

(b) 収集した第 2 の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した蛍光シグナルの分析に関する閾値を設定し；有核細胞イベントを非有核細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、を含む、請求項 1 から請求項 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

有核細胞イベントを単核細胞イベント及び非白血球イベントに分類することをさらに含む、請求項 1 から請求項 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ステップ (b) が、前記ステップ (a) で区別された細胞イベントに対応する蛍光シグナルに対して実行される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

有核細胞イベントを単核細胞イベント、多形核細胞イベント、及び非白血球イベントに分類することをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

単核細胞イベントをリンパ球及び単球 / マクロファージに分類することをさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記体液が、血液、脳脊髄液、胸膜液、腹水、心膜液、滑液、又は連続携行式腹膜透析流体を含む、請求項 1 から請求項 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記体液サンプルを蛍光染料で染色することを含む、請求項 1 から請求項 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記染色された体液サンプルを血液分析器のフローセルに流すことを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記体液サンプルに前記エネルギー源を照射することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

体液中の細胞を分析するための自動システムであって、
 体液中の細胞を分析することに関する命令を記憶するためのメモリを備えるコンピュータを備え、前記命令が、
 エネルギー源による照射で体液サンプルから放出されたシグナルを収集し、前記体液サンプルは蛍光染料で染色され、前記蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成すること、
 収集したシグナルに watershed 変換を適用することにより、収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定すること、
 ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用すること、
 ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定すること、及び、
 体液中の異なる細胞タイプを区別するべく閾値を上回るシグナルを分析すること、
 に関してプロセッサにより実行される、自動システム。

【請求項 2 0】

フローセルと、
 前記フローセルに導入された細胞に照射するためのエネルギー源と、
 前記フローセル内の細胞により放出されたシグナルを検出するための複数の検出器と、
 を備える血液分析器をさらに備え、前記メモリが、前記血液分析器に、
 前記体液サンプルを蛍光染料で染色させ、
 前記染色された体液サンプルを前記フローセルに流させ、
 前記エネルギー源を用いて前記フローセルを通して流れる細胞に照射させる、
 ことに関する命令をさらに備える、請求項 1 9 に記載の自動システム。

【請求項 2 1】

前記命令が、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用することに関する命令を含み、前記ドミナントな谷は、複数のピークに watershed 変換を反復的に適用することにより得られる 2 つのドミナントなピー

10

20

30

40

50

ク間に位置する、請求項 19 又は請求項 20 のいずれか一項に記載の自動システム。

【請求項 22】

前記ドミナントな谷が、有核細胞イベントに対応する第 1 のドミナントなピークを、非有核イベントに対応する第 2 のドミナントなピークから分離する、請求項 19 から請求項 21 のいずれか一項に記載の自動システム。

【請求項 23】

前記収集したシグナルが散乱光を含む、請求項 19 から請求項 22 のいずれか一項に記載の自動システム。

【請求項 24】

前記散乱光が前方散乱光を含む、請求項 23 に記載の自動システム。

10

【請求項 25】

前記散乱光が側方散乱光を含む、請求項 23 に記載の自動システム。

【請求項 26】

前記側方散乱光が偏光した側方散乱光を含む、請求項 25 に記載の自動システム。

【請求項 27】

前記側方散乱光が偏光解消した側方散乱光を含む、請求項 25 に記載の自動システム。

【請求項 28】

前記収集したシグナルが蛍光シグナルを含む、請求項 19 から請求項 22 のいずれか一項に記載の自動システム。

【請求項 29】

前記命令が、散乱光を含む第 1 の複数のシグナル及び蛍光シグナルを含む第 2 の複数のシグナルを収集すること、

20

(a) 収集した第 1 の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した散乱光の分析に関する閾値を設定し；細胞イベントを非細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、

(b) 収集した第 2 の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した蛍光シグナルの分析に関する閾値を設定し；有核細胞イベントを非有核細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、に関する命令を含む、請求項 19 から請求項 22 のいずれか一項に記載の自動システム。

30

【請求項 30】

前記命令が、有核細胞イベントを単核細胞イベント及び非白血球イベントに分類することに関する命令を含む、請求項 29 に記載の自動システム。

【請求項 31】

前記ステップ (b) が、前記ステップ (a) で識別された細胞イベントに対応する蛍光シグナルに対して実行される、請求項 29 に記載の自動システム。

【請求項 32】

前記命令が、有核細胞イベントを単核細胞イベント、多形核細胞イベント、及び非白血球イベントに分類することに関する命令を含む、請求項 31 に記載の自動システム。

40

【請求項 33】

単核細胞イベントをリンパ球及び単球 / マクロファージに分類することをさらに含む、請求項 32 に記載の自動システム。

【請求項 34】

前記体液が、血液、脳脊髄液、胸膜液、腹水、心膜液、滑液、又は連続携行式腹膜透析流体を含む、請求項 19 から請求項 33 のいずれか一項に記載の自動システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる2016年9月8日に出願された米国仮特許出願第62/385,055号の利益を主張するものである。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

体液の分析は、細胞のタイプ、異なる細胞タイプの計数、異常な細胞の存在、感染粒子（例えば、プリオン、ウィルス、細菌など）の存在を含み、体液の組成に関する重要な情報を提供する。このような情報は、臨床診断及び予後診断を提供するのに重要である。

【 0 0 0 3 】

種々の生物流体サンプル中の細胞の分析のために様々な方法が用いられる。細胞分析のための方法は、光学顕微鏡法又は蛍光顕微鏡法による目視検査及び/又は自動検査を含む。これらのタイプの細胞検査及び分析は、サンプルの細胞系統、成熟のステージ、及び/又は細胞カウントに関する情報を得るために一般に実施される。

【 0 0 0 4 】

顕微鏡法による生体サンプル中の細胞の分析は費用及び時間がかかることがある。フローサイトメトリは、生物流体サンプル中の異なる細胞タイプを識別及び区別し、異なる細胞タイプを計数するための代替的な方法を提供する。フローサイトメータでは、細胞が1つずつ又はほぼ1つずつ検知領域を通過し、その際に各細胞はエネルギー源により照射される。典型的には、単一波長光源（例えば、レーザなど）がエネルギー源として用いられ、様々な検出器のうちの1つ又は複数が、細胞と印加されたエネルギーとの相互作用に基づくデータを記録する。フローサイトメトリは、血液学でよく用いられ、血液の癌を含む血液の病気の診断において奏功している。

【 0 0 0 5 】

フローサイトメトリにおける課題は、小さい細胞イベントに類似する望ましくないシグナル（例えば、ノイズ）を除去しながら粒子イベント（例えば、細胞イベント）を捕捉することを含む。フローサイトメトリデータの品質に悪影響を及ぼす他の因子は、例えば、サンプル間の有核細胞カウントの変動を含み、これは結果的に蛍光シグナルの変動を生じる。ゆえに細胞イベントに関連するシグナルが異なるサンプルタイプにわたって広く変動することになる。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

体液サンプルの自動細胞分析のための方法、デバイス、及びシステムが開示される。これらの方法、デバイス、及びシステムは、体液サンプルをフローサイトメータに流すことにより生成されたデータにwatershed変換を適用して、データの分析に用いる閾値を決定する。

【 0 0 0 7 】

或る実施形態では、細胞を含有する体液を分析するための方法が開示される。その方法は、エネルギー源により照射により体液サンプルから放出されたシグナルを収集すること、この場合、体液サンプルは蛍光染料で染色され、蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成する；収集したシグナルにwatershed変換を適用することにより、収集したシグナルにおける複数のピーク(peak)及び谷(valley)を決定すること；ドミナントな谷(dominant valley)が得られるまで複数のピーク及び谷にwatershed変換を反復的に適用すること；ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定すること；及び、体液中の異なる細胞タイプを区別するべく閾値を上回るシグナルを分析することを含み得る。或る実施形態では、体液サンプルは溶解されない、すなわち、体液中に含まれる細胞は溶解されない。

【 0 0 0 8 】

或る実施形態では、当該方法は、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷にwatershed変換を反復的に適用することを含んでよく、ドミナントな谷は、複数

10

20

30

40

50

のピークに watershed 変換を反復的に適用することにより得られる 2 つのドミナントなピーク間に位置する。

【0009】

或る実施形態では、ドミナントな谷は、有核イベントの第 2 の組に対応する第 2 のドミナントなピークから、有核細胞イベントの第 1 の組に対応する第 1 のドミナントなピークを分離し得る。

【0010】

或る実施形態では、収集したシグナルは、散乱光を含んでよい。散乱光は、前方散乱光又は側方散乱光を含んでよい。側方散乱光は、偏光した側方散乱光又は偏光解消した側方散乱光を含んでよい。或る実施形態では、収集したシグナルは、蛍光シグナルを含んでよい。

10

【0011】

或る実施形態では、当該方法は、散乱光を含む第 1 の複数のシグナル及び蛍光シグナルを含む第 2 の複数のシグナルを収集することと、及び、(a) 収集した第 1 の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した散乱光の分析に関する閾値を設定し；細胞イベントを非細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、及び (b) 収集した第 2 の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した蛍光シグナルの分析に関する閾値を設定し；有核細胞イベントを非有核細胞イベントから区別するのに閾値を用いることを含んでよい。

20

【0012】

或る実施形態では、当該方法は、有核細胞イベントを単核細胞イベント及び非白血球イベントに分類することを含んでよい。

【0013】

或る実施形態では、ステップ (b) は、ステップ (a) で区別された細胞イベントに対応する蛍光シグナルに対して実行されてよい。

【0014】

或る実施形態では、当該方法は、有核細胞イベントを単核細胞イベント、多形核細胞イベント、及び非白血球イベントに分類することを含んでよい。或る実施形態では、当該方法は、単核細胞イベントをリンパ球及び単球 / マクロファージに分類することを含んでよい。

30

【0015】

或る実施形態では、体液は、血液、脳脊髄液、胸膜液、腹水、心膜液、滑液、又は連続携行式腹膜透析流体を含んでよい。或る実施形態では、当該方法は、体液サンプルを蛍光染料で染色することを含んでよい。或る実施形態では、当該方法は、染色された体液サンプルを血液分析器のフローセルに流すことを含んでよい。或る実施形態では、当該方法は、体液サンプルにエネルギー源を照射することを含んでよい。

40

【0016】

同じく本明細書で開示されるのは、体液中の細胞を分析するための自動システムである。当該システムは、体液中の細胞を分析するための命令を記憶するメモリを備えるコンピュータを含んでよい。前記の命令は、エネルギー源による照射により体液サンプルから放出されたシグナルを収集すること、この場合、体液サンプルは蛍光染料で染色され、蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成する；収集したシグナルに watershed 変換を適用することにより、収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定すること；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用すること；ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定すること；及び、体液中の異なる細胞タイプを区別するべく

50

閾値を上回るシグナルを分析するためにプロセッサによって実行される。

【0017】

自動システムは、フローセルと、フローセルに導入された細胞に照射するためのエネルギー源と、フローセル内の細胞により放出されたシグナルを検出するための複数の検出器を含む血液分析機を含んでよい。メモリは、血液分析機に、体液サンプルを蛍光染料で染色させ、染色された体液サンプルをフローセルに流させ、エネルギー源を用いてフローセルを通して流れる細胞に照射させるための命令をさらに備える。

【0018】

或る実施形態では、命令は、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用することに関する命令を含んでよい。ドミナントな谷は、複数のピークに watershed 変換を反復的に適用することにより、得られる2つのドミナントなピーク間に位置する。或る実施形態では、ドミナントな谷は、非有核イベントに対応する第2のドミナントなピークから有核細胞イベントに対応する第1のドミナントなピークを分離し得る。

10

【0019】

収集したシグナルは、前方散乱光及び/又は側方散乱光などの散乱光を含んでよい。側方散乱光は、偏光した側方散乱光及び/又は偏光解消した側方散乱光を含んでよい。収集したシグナルは、蛍光シグナルを含んでよい。

【0020】

或る実施形態では、命令は、散乱光を含む第1の複数のシグナル及び蛍光シグナルを含む第2の複数のシグナルを収集すること、及び、(a) 収集した第1の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し; ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し; ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した散乱光の分析に関する閾値を設定し; 細胞イベントを非細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、及び、(b) 収集した第2の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより、複数のピーク及び谷を決定し; ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し; ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した蛍光シグナルの分析に関する閾値を設定し; 有核細胞イベントを非有核細胞イベントから区別するのに閾値を用いるための命令を含んでよい。命令は、有核細胞イベントを単核細胞イベント及び非白血球イベントに分類するための命令を含んでよい。ステップ(b)は、ステップ(a)で識別された細胞イベントに対応する蛍光シグナルに対して実行されてもよい。

20

30

【0021】

或る実施形態では、命令は、有核細胞イベントを単核細胞イベント、多形核細胞イベント、及び非白血球イベントに分類するための命令を含んでよい。或る実施形態では、命令は、単核細胞イベントをリンパ球及び単球/マクロファージに分類するための命令を含んでよい。体液は、血液、脳脊髄液、胸膜液、腹水、心膜液、滑液、又は連続携行式腹膜透析流体であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1A~図1Dは、一次元シグナルにおけるドミナントなピーク及び谷を識別するための watershed 変換の例示的な適用を提供する。

【図2】体液分析のための例示的な方法を示すフローチャートである。

【図3】未知のイベントが可能性のある有核イベントから精製(リファイン: refine)された(図2のステップ3)、脳脊髄(CSF)体液の、軸方向の光損失(ALL)に対する蛍光1(FL1)(対数スケール)の散布図である。

【図4】図4A及び図4Bは、有核細胞イベントの、リンパ球、単球/マクロファージ、多形核(PMN)細胞イベント、及び非白血球(NWBC)への分類を例示する。図4Aは、胸膜液中の有核細胞のデータを示す。図4Bは、NWBCを含有する腹水中の有核細胞のデータを示す。

40

50

【図5】図5A～図5Dは、プリセット閾値を用いる従来の方法と比較した、本明細書に記載のwatershed変換から特定された閾値を用いて得られた細胞カウント間の相関を例示する。図5Aは、RBC(細胞/μl)であり、図5Bは、WBC(細胞/μl)であり、図5Cは、単核細胞のパーセンテージ(MN%)であり、図5Dは、多形核細胞のパーセンテージ(PMN%)である。

【図6】本開示の方法を用いる分析のためのデータの生成において使用される、一実施形態に係るフローサイトメータの第1の例の概略図である。

【図7】本開示の方法を用いる分析のためのデータの生成において使用される、一実施形態に係るフローサイトメータの第2の例の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

定義

「watershed変換」又は「watershedアルゴリズム」という文言は交換可能に用いられ、Luc Vincent and Pierre Soille, Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 13(6), 1991, pp. 583 - 598に記載されたアルゴリズムを意味する。

【0024】

本明細書で用いられる場合の「体液」という用語は、一般に、個体又は個体群から得られる様々なサンプルタイプを包含する「生体サンプル」から導出され、診断、モニタリング、又はスクリーニングアッセイの際に用いることができる流体を意味する。この定義は、血液サンプル及び生物由来の他の液体サンプルを包含する。この定義は、個々のサンプルの混合又はプール、試薬での処理、可溶化、又は有核細胞、非有核細胞、病原体などの特定の成分の豊富化(enrichment)などにより、それらの調達後に何らかの操作がなされているサンプルも含む。

【0025】

「生体サンプル」という用語は、臨床サンプルを包含し、また、培養細胞、細胞上清、細胞溶解産物、血清サンプル、血漿サンプル、生物流体サンプル、及び組織サンプルを含む。「生体サンプル」という用語は、尿、唾液、脳脊髄液(CSF)、間質液、眼液、滑液、血漿及び血清などの血液分画物などを含む。

【0026】

本明細書で用いられる場合の「データ処理ユニット」とは、それに要求される機能を行うことになる任意のハードウェア及び/又はソフトウェアの組み合わせを意味する。例えば、ここでの任意のデータ処理ユニットは、例えば、電子コントローラの形態で利用可能なプログラマ可能なデジタルプロセッサ(例えば、マイクロプロセッサ)、メインフレーム、サーバ、クラウド、又はパーソナルコンピュータ(デスクトップ又はポータブル)であり得る。データ処理ユニットがプログラム可能ならば、適切なプログラミングを遠隔地からデータ処理ユニットに通信することができ、又はコンピュータプログラム製品(磁気、光学、又はソリッドステートデバイスに基づく、ポータブル又は固定のコンピュータ可読記憶媒体など)に前もって保存することができる。

【0027】

詳細な説明

体液サンプルの自動細胞分析のための方法、デバイス、及びシステムが開示される。方法、デバイス、及びシステムは、体液サンプルをフローサイトメータに流すことにより生成されたデータにwatershed変換を適用して、データの分析に用いられる閾値を決定する。

【0028】

本発明がさらに詳細に説明される前に、この発明は、当然に変化する可能性があるもの

10

20

30

40

50

として、記載された特定の実施形態に限定されない。本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態を説明する目的のためだけのものであって、本発明の範囲が添付の請求項によってのみ特定され、限定するものとなることを意図しない。

【0029】

数値の範囲が与えられる場合、文脈上他の意味に明白に限定される場合を除き、下限の単位の10分の1までの中間にある各値、該範囲の上限と下限との間、及び表記された範囲内のあらゆる他の表記された値又は中間にある値は、本発明内に包含されることが理解される。これらの、より小さい範囲の上限及び下限は、より小さい範囲に独立して含まれてもよく、且つまた本発明内に包含され、表記された範囲内のあらゆる具体的に除外される限定の対象になる。表記された範囲が限界の一方又は両方を含む場合、これらの含まれた限界のいずれか又は両方を除外する範囲もまた本発明に含まれる。

10

【0030】

特定の範囲が、「約」という用語に先行される数値により本明細書で提示されている。「約」という用語は、それが先行する正確な数値、ならびに、この用語が先行する数値に近い又は近似的な数値を文言上の裏付けを提供するために本明細書で使用される。数値が具体的に記載された数値に近い又は近似的であるかどうかを判断する際に、近い又は近似的な記載されていない数値は、それが提示されている文脈において、具体的に記載された数値の実質的均等物を提供する数値であり得る。

【0031】

他に定めのない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語及び科学用語は、この発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味をもつ。本明細書に記載のものと類似した又は等価なあらゆる方法及び材料もまた本発明の実施又は試験に用いることができるが、代表的な例証となる方法及び材料がここで説明される。

20

【0032】

本明細書で挙げられたすべての刊行物及び特許は、個々の各刊行物又は特許が参照により組み入れられるように特異的に及び個々に示されたかのように参照により本明細書に組み入れられ、且つ挙げられた刊行物との関連において方法及び/又は材料を開示し及び説明するために参照により本明細書に組み入れられる。あらゆる刊行物の引用は、出願日よりも前のその開示のためであって、本発明が先願発明の理由に基づきこうした公開の日付を実際より早める権利をもたないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供された公開日は、実際の公開日とは異なる場合があり、独立して確認される必要がある場合がある。

30

【0033】

本明細書及び付属の請求項で用いられる、単数形の「ひとつの(a、an)」、及び「当該、前記(the)」は、文脈上他の意味に明白に限定される場合を除き、複数形の指示対象を含むことに留意されたい。請求項は、あらゆる任意の要素を除外するように起草されてもよいことにさらに留意されたい。従って、この記述は、請求項の要素の列挙又は「消極的な」限定の使用との関連において「単独で」、「のみ」などのような排他的用語の使用のための先行詞基準として作用することを意図される。

【0034】

本開示を読めば当業者には明らかとなるように、本明細書で説明され例証される個々の実施形態の各々は、本発明の範囲又は精神から逸脱することなく、他の幾つかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離または結合されてもよい個別の構成要素及び特徴を有する。あらゆる列挙される方法は、列挙される事象の順番で、又は論理的に可能なあらゆる他の順番で実行することができる。

40

【0035】

方法

体液サンプルの分析のための方法が開示される。これらの方法は、体液サンプル中に存在する細胞のタイプの自動分析を提供する。これらの方法は、血液分析機などの自動フローサイトメータと併せて用いてよい。

50

【0036】

或る実施形態では、本明細書で開示される方法は、体液サンプルを分析するのに用いられる閾値を特定するのに用いられる。或る実施形態では、本方法は、エネルギー源による照射で体液サンプルから放出されたシグナルを収集すること、この場合、体液サンプルは蛍光染料で染色され、蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成する；収集したシグナルにwatershed変換を適用することにより収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定すること；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷にwatershed変換を反復的に適用すること；ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定すること；及び、体液中の異なる細胞タイプを識別するべく閾値を上回るシグナルを分析することを含んでよい。或る実施形態では、体液サンプルは溶解されない、すなわち、体液中に含まれる細胞は溶解されない。

10

【0037】

或る実施形態では、方法は、体液サンプルを蛍光染料で染色することを含んでよく、蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成する。或る実施形態では、方法はまた、染色された体液サンプルを、血液分析器、蛍光フローサイトメータなどのフローサイトメータのフローセルに流すことを含んでよい。流れている体液サンプルを照射するためのエネルギー源は、光源などの任意の適切なエネルギー源であり得る。或る実施形態では、蛍光フローサイトメータは、米国特許第5,631,165号で説明されるように構成される。フローセルを通して流れる体液サンプルを照射するための光源は、レーザービームを放出してよい。或る実施形態では、標準のアルゴンイオンレーザーが、流れている体液サンプルを照射するのに用いられる。

20

【0038】

エネルギー源による照射で体液サンプルにより放出されたシグナルを収集するステップは、シグナル検出ユニットにより実行されてよい。シグナル検出ユニットは、データ処理ユニットに作動的に結合されてよい。一部の実施形態では、シグナル検出ユニットにより収集されたデータの分析は、本明細書で提供されるデータ分析のための方法を用いてデータ処理ユニットにより行われる。

【0039】

シグナル検出ユニットは、フローサイトメータ（例えば、血液分析機）のフローセル内の光ビームを通して流れる体液サンプルの光インテロゲーションにより生成された光シグナルを検出するための1つのシグナル検出器又は複数のシグナル検出器を含んでよい。例示的なシグナル検出器は、蛍光シグナル、軸方向の光損失（ALL、前方消光としても知られている）、中角散乱（IAS、該角度での散乱光）、小角前方散乱（SAS）、偏光解消した側方散乱光（DSS）、及び/又は偏光した側方散乱光（PSS）などの光シグナルを測定するための検出器を含む。収集したシグナルは、蛍光シグナル、ALL、IAS、SAS、DSS、及びPSSのうちの1つ又は複数を含んでよい。

30

【0040】

ALLは、一般に、レーザービームの前を通過する細胞による光エネルギーの減少であり、検出器（例えば、光ダイオード）により検出される。光損失は、一般には散乱に起因し、光ビーム（例えば、レーザービーム）の経路内で細胞がビームを通過することによる検出器に到達する光エネルギーの減少として定義される（一般に、ALLは、約0°～約1°の角度で検出される）。これに対して、小角前方散乱光（SAS）は、ビームを通過する細胞からの散乱に起因して入射レーザービームの外部で（しかし約1°～3°の狭角内で）検出器に到達する光エネルギーである。レーザービームが検出器に入射しないようにするために、一般に、ビームストップが設けられる。ALL測定系は、レーザー照射の入射コーン内の光を収集する一方、小角散乱系は、当該コーン外の光を収集する。ALL測定系では、関心あるシグナルは、定常状態のレーザーシグナルから差し引かれる負のシグナルである一方、小角前方散乱光の測定では、シグナルは、非常に低いバックグラウンド光レベルで課される小さい正のシグナルである。中角前方散乱（IAS）は、光が入射レーザービーム

40

50

からより大きい角度で散乱されること以外は、小角前方散乱と類似している。より詳細には、IASは、レーザビームの入射又は中心線から約3°から15°の間だけ離れたリング内で散乱された光に関係する。一部の実施形態では、ALLは、水平方向に約0.3°未満且つレーザ軸から垂直方向に約1.2°未満の角度で収集され、IASは、レーザ軸から約3°から10°の間の角度で収集される。或るケースでは、DSSシグナル及びPSSシグナルは、フローセルに入射する光ビームに対して約90°で測定される。

【0041】

収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定するべく収集したシグナルにwatershed変換を適用するステップは、収集したシグナルをwatershed変換アルゴリズムの適用に適した任意のフォーマットに編成することを含んでよい。或る実施形態では、収集したシグナルは、ヒストグラムフォーマット、散布図、又は他の多次元プロットに編成されてよい。開示された方法の或る態様では、収集したシグナルは、側方散乱光、例えば、DSS及び/又はPSSなどの散乱光を含んでよく、散乱光の強度は、ヒストグラムとしてプロットされてよい。例えば、散乱光の強度は、体液サンプルがフローセルを流れている間の時間にわたってプロットされてよい。或る実施形態では、散乱光の強度は、Y軸上にプロットされてよく、散乱光の強さに対応するイベントの数(細胞イベント及び非細胞イベントであり得る)は、X軸上にプロットされてよく、又はその逆であってもよい。或る実施形態では、X軸は、異なる範囲の散乱光の強さ(例えば、binへ分割される)であってよく、Y軸は、散乱光の強さの対応する範囲内に入るイベントの数であってよい。細胞イベント(例えば、血球)に関して測定される散乱光の強度は、非細胞イベント(例えば、溶解した網赤血球からのRNA、ハウエルジョリー小体、網血小板、巨大血小板、白血球(WBC)からのDNA、及び巨核球分画、寄生虫、赤血球(RBC)分画、赤血球ゴースト、凝集タンパク質などの細胞残屑)に関して測定される散乱光の強度よりも高い。したがって、シグナルの二次元又は三次元プロットにwatershed変換を適用することは、シグナルにおける複数のピーク及び複数の谷を決定することになる。ピークのうちのいくつか、普通はあまり強くないピークは、非細胞イベントからのシグナルに対応し得る。しかしながら、watershed変換を使用せずに、データ分析システムは、細胞イベントを非細胞イベントから区別するためにプリセット閾値を適用してよい。しかしながら、このプリセット閾値は、体液のタイプ、希釈の量、分析のために体液サンプルを調製するのに用いられる試薬などに依りて変わることがある。watershedアルゴリズムの適用は、特定のサンプルの特徴を考慮に入れた、分析されているサンプルのカスタム閾値の特定を支援する。単一のドミナントな谷が残るまで、最初に識別されたピーク及び谷にwatershedアルゴリズムが反復的に適用される。閾値は、ドミナントな谷のシグナルに基づいて選定される。次いで、カットオフとして閾値を用いて細胞イベントを非細胞イベントから区別するべく光散乱シグナルが分析され、例えば、閾値よりも高い強度の散乱光は、細胞イベントに対応するものとしてカウントされ、閾値よりも低い強度の散乱光は、非細胞イベントに対応するものとしてカウントされる。

【0042】

或る実施形態では、watershed変換の反復適用は、ドミナント性の低い(less dominant)ピークを当該ドミナント性の低いピークに隣接するドミナント性の高い(more dominant)なピークと統合することを含む。或る実施形態では、watershed変換の反復適用は、ドミナント性の低い谷を当該ドミナント性の低い谷に隣接するドミナント性の高い谷と統合することを含む。或る実施形態では、統合される隣接する谷又は隣接するピークは、それらが事前定義された距離未満で離間しているときに統合してもよい。例えば、X軸は、1~10、>10~20、>20~30、>30~40などの或るインターバルだけ離間するシグナル範囲を有してよい。ドミナントな谷が1~10の範囲に対応し、ドミナント性の低い谷が>10~20の範囲に対応するとき、これらの2つの谷は統合してよい。統合された谷の値は、ドミナント性の高い谷の値に対応し得る又は2つの谷の平均であり得る。或る実施形態では、ドミナント性の低いピークをドミナント性の高いピ

10

20

30

40

50

ークと統合することは、谷を統合することと同様の様態で実行されてよい。或る実施形態では、ドミナント性の低い谷をドミナント性の高い谷と統合することは、ドミナント性の低い谷を除去することを含んでよい。同様に、或る実施形態では、ドミナント性の低いピークをドミナント性の高いピークと統合することは、ドミナント性の低いピークを除去することを含んでよい。したがって、或るケースでは、watershed変換の反復適用は、単一のドミナントな谷が残るまでドミナント性の低い谷を除去することを含んでよい。或る実施形態では、ドミナント性の低い谷は、或るシグナルを上回る谷であってよく、該シグナルは、所定のシグナル、例えば、細胞イベントに関連することが分かっているシグナルであってよい。或る実施形態では、ドミナント性の高い谷は、或るシグナルを下回る谷であってよく、該シグナルは、所定のシグナル、例えば、非細胞イベントに関連することが分かっているシグナルであってよい。或る実施形態では、ドミナント性の低いピークは、或るシグナルを下回るピークであってよく、該シグナルは、所定のシグナル、例えば、非細胞イベントに関連することが分かっているシグナルであってよい。或る実施形態では、ドミナント性の高いピークは、或るシグナルを上回るピークであってよく、該シグナルは、所定のシグナル、例えば、細胞イベントに関連することが分かっているシグナルであってよい。他の実施形態では、所定のシグナルは、ドミナントなピーク及び/又は谷の判定に用いられず、むしろ、ドミナントなピーク及び/又は谷の判定は、デノボで、例えば、サンプル毎になされる。

10

【0043】

別の例では、収集したシグナルは、蛍光シグナルを含んでよい。或る実施形態では、蛍光シグナルの強度は、ヒストグラムとしてプロットされてよい。例えば、蛍光の強度は、体液サンプルがフローセルを流れている間の時間にわたってプロットされてよい。或る実施形態では、蛍光の強度は、Y軸上にプロットされてよく、蛍光の強さに対応するイベント（有核細胞及び非有核細胞であり得る）の数は、X軸上にプロットされてよく、又はその逆であってもよい。或る実施形態では、X軸は、蛍光の強度（例えば、binへ分割される）の範囲であってよく、Y軸は、X軸上にプロットされた範囲内に入るイベントの数であってよい。

20

【0044】

別の例では、特定のシグナル強度（例えば、蛍光強度又は散乱光の強さ）に関連するイベントの数の頻度を表すグラフが生成されてよい。理論ヒストグラムが図1Aに表され、異なる光の強さ（異なる範囲又はbinへ分割される）に関連するイベントがX軸上にプロットされ、これらのイベントの発生の頻度がY軸上にプロットされる。図1Aは、特定の光の強さに関連するイベントが最も高い頻度であり、一方、異なる光の強さに関連する他のイベントがより低い頻度であることを示す。しかしながら、異なる光の強さに関連するイベントのうちのどれが真のイベント（例えば、光シグナルが散乱光であるときには細胞、又は光シグナルが蛍光であるときには有核細胞）に対応し、どれが非イベント（例えば、光シグナルが散乱光であるときには細胞残屑又は光シグナルが蛍光であるときには非有核細胞）に対応するかを識別するために、閾値が用いられる必要がある。上で述べたように、所定の閾値が使用される従来の閾値又はゲーティング手法は、誤差を導入することがある。watershed変換の適用は、ここでは、分析されているデータセットのカスタム閾値を特定するのに用いられる。図1Bは、図1Aにプロットされた生データへのwatershed変換の適用からの結果を示す。図1Bは、watershedアルゴリズムの適用は、複数のピーク及び谷を識別することを示す。図1Cは、図1Bで識別されたピーク及び谷へのwatershed変換の反復適用の最終結果を示す。図1Cに示すように、単一のドミナントな谷が残るまでwatershed変換を反復的に適用することは、イベントを非イベントから区別し、体液サンプルの分析を提供するべくデータを分析するのに用いることができる閾値に対応するものとしてドミナントな谷を識別する。

30

40

【0045】

図1Dは、別のデータセットへのwatershed変換の適用の最後の反復からの結果を提供する。図1A～図1Cでのデータセットの閾値を得ることに関する説明と同様に

50

、ピーク及び谷の識別と、ドミナントな谷を識別するための watershed 変換の反復適用は、このデータセットに固有の閾値の判定を容易にする。この閾値は、次いで、このデータセットが生成された体液サンプル中に存在する細胞の分析に用いられる。

【0046】

或る実施形態では、エネルギー源により照射された体液サンプルからのシグナルへの watershed 変換の反復適用は、所望の結果が達成されるまで、例えば、単一のドミナントな谷及び / 又は単一のドミナントなピークが残るまで実行されてよい。他の実施形態では、watershed 変換の反復適用は、単一のドミナントな谷と複数のドミナントなピーク（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個などの2~10、2~5、又は2~3個）が残るときに停止されてよい。別の実施形態では、watershed 変換の反復適用は、単一のドミナントなピークと複数のドミナントな谷（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個などの2~10個、2~5個、又は2~3個）が残るときに停止されてよい。或る実施形態では、ドミナントな谷は閾値に対応し得る。他の実施形態では、ドミナントなピークは閾値に対応し得る。

10

【0047】

或る実施形態では、watershed アルゴリズムの各反復は、watershed アルゴリズムの以前の適用から得られたピーク及び / 又は谷の数に比べてその数を減少させ得る。一部の実施形態では、ピーク及び / 又は谷の数は、それぞれ類似のピークを統合すること及び / 又は類似の谷を統合することにより、ドミナントなピーク及び / 又は谷を識別するのに減少され得る。それぞれ類似のピークを統合すること及び / 又は類似の谷を統合することによりドミナントなピーク及び / 又は谷を識別するのにピーク及び / 又は谷の数を減少させることに加えて、又は代替的に、ドミナント性の低いピークがドミナント性の高いピークと統合されてよく、ドミナント性の低い谷がドミナント性の高い谷と統合されてよい。上で述べたように、所定の距離未満だけ離間したピークは統合されてよい（例えば、よりドミナントなピークから所定の距離未満だけ離間したドミナント性の低いピークは除去されてよく、ドミナント性の高いピークは保持される）。一部の実施形態では、ピーク及び / 又は谷の数は、アーチファクト又はノイズと判断されるシグナルに対応するピーク及び / 又は谷を除去することにより減少され得る。一部の実施形態では、隣接する谷から良好に分離されない谷は、隣接する谷と統合されてよい又は除去されてよい。同様の繰返しが、隣接するピークで行われてよい。

20

30

【0048】

或る実施形態では、本方法は、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用することを含み、ドミナントな谷は、複数のピークに watershed 変換を反復的に適用することにより得られる2つのドミナントなピーク間に位置する。

【0049】

或る実施形態では、照射された体液サンプルから得られた蛍光シグナルへの watershed 変換の反復適用は、第1の複数の有核細胞イベントに対応する第1のドミナントなピークを第2の複数の有核イベントに対応する第2のドミナントなピークから分離するドミナントな谷を識別してよく、ドミナントな谷は非有核イベントからのシグナルに対応する。第1のドミナントなピークは、第2のドミナントなピークよりも高いシグナル強度を有してよく、WBC から発生したシグナルに対応してよく、一方、第2のドミナントなピークは、幼若 RBC（網赤血球）から発生したシグナルに対応してよい。或る実施形態では、照射された体液サンプルから記録された散乱光への watershed 変換の反復適用は、第1の複数のより大きい細胞（例えば、WBC）に対応する第1のドミナントなピークを第2の複数のより小さい細胞（例えば、血小板）に対応する第2のドミナントなピークから分離するドミナントな谷を識別してよく、ドミナントな谷は非細胞イベントからのシグナルに対応する。

40

【0050】

或る実施形態では、本方法は、散乱光を含む第1の複数のシグナル及び蛍光を含む第2

50

の複数のシグナルを収集すること、及び、(a) 収集した第1の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した散乱光の分析に関する閾値を設定し；細胞イベントを非細胞イベントから区別するのに閾値を用いること、及び、(b) 収集した第2の複数のシグナルに watershed 変換を適用することにより複数のピーク及び谷を決定し；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用し；ドミナントな谷のシグナルに基づいて収集した蛍光シグナルの分析に関する閾値を設定し；有核細胞イベントを非有核細胞イベントから区別するのに閾値を用いることを含んでよい。或る実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)は、同時に実行されてよい。或る実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)は、任意の順序で順次に実行されてよい。或る実施形態では、ステップ(b)は、ステップ(a)で識別された細胞イベントに対応する蛍光シグナルに対してのみ実行されてよい。

10

【0051】

本開示の方法は、単核細胞イベント、多形核細胞イベント、及び非白血球イベントの数を特定するべく有核細胞イベントに対応するデータを分析することをさらに含んでよい。本方法は、リンパ球及び単球/マクロファージの数を特定することをさらに含んでよい。

【0052】

本明細書で開示される方法を用いて分析され得る体液サンプルは、血液（例えば、全血サンプル又はその分画物）、脳脊髄液（CSF）、胸膜液、腹水、心膜液、滑液、尿、唾液、涙液、精液、羊水、痰、連続携行式腹膜透析流体（CAPD）などを含んでよい。

20

【0053】

体液サンプルは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,631,165号及び米国特許第8,911,669号で説明されるプロトコルなどの任意の適切なプロトコルを用いて、血液分析機のフローセルを流れる前に処理されてよい。例えば、体液サンプルは、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成する、蛍光染料で染色されてよい。DNA又はRNAと結合する任意の適切な染料が用いられてよい。用いることができる市販の染料のうちいくつかは、YOYO-1、YOYO-3、TOTO-1、TOTO-3、BO-PRO-1、YO-PRO-1、TO-PRO-1などを含む。異なる消光（EX）極大を有する染料を、He-Ne、キセノン、又は水銀ランプなどの適切な光源で励起することができることが当業者には公知である。加えて、体液サンプルは、随意的に、RBCを溶解するための等張液に及び/又は他の試薬に曝されてよい。さらに、体液サンプルは、随意的に、分析されている体液中に存在し得る任意の有核（NRBC）を効果的に標識する生体核染色試薬に曝されてよい。処理された体液サンプルは、随意的に、血液分析器を流れる前に希釈されてよい。

30

【0054】

本開示の方法は、体液サンプルのイベントの数/マイクロリットルである患者カウントの正確な判定のための他の方法と共に用いられてよい。イベントは、赤血球（RBC）、血小板（PLT）、白血球（WBC）、及びこれらのクラス又はサブクラスを含んでよい。「イベント」とは、光インテロゲーション系により検出される場合の、粒子（例えば、細胞）がフローセルのインテロゲーションゾーンを通過することを意味する。「非イベント」又は「非細胞イベント」とは、イベントにより生じない、イベントに似た光シグナル特徴を意味する。本開示の方法は、シグナルがイベント又は非イベントのいずれからであるかを判定するのに用いることができる閾値を決定する。

40

【0055】

データ収集ユニットにより収集された生シグナルデータは、本明細書で開示される方法を用いて分析されてよい。他の実施形態では、生データは、watershed 変換を適用する前に処理されてよい。例えば、生シグナルデータは、フィルタされてよい。生シグナルデータは、逆ガウシアンフィルタ係数を用いてフィルタされてよい。生シグナルデータは、ノイズであることが分かっているシグナルを除去するべく処理されてよい（例えば

50

、特定のフローサイトメータは、ベースラインノイズの高いバックグラウンドを有し得る)。生シグナルデータはデジタル化されてよい(例えば、アナログシグナルがデジタルシグナルへ変換されてよい)。生シグナルデータ又は処理されたデータはさらに、修正、例えば、対数スケールに変換、増幅などがなされてよい。生シグナルデータ又は処理されたデータはさらに、谷及びピークの識別のためにwatershed変換を適用するのに適した任意の形式にフォーマットされてよい。

【0056】

本明細書で開示される方法の或る実施形態が図2に示される。図2は、血液分析機を用いて体液サンプルから収集されたデータを分析することに関するステップを示すフローチャートを示す。ステップ1は、細胞イベントをそれらのサイズ散乱特性に基づいてノイズから分離することを含む。細胞イベントからノイズを除去した後で、次のステップであるステップ2は、有核細胞は蛍光染料で染色するとより強い蛍光シグナルを発するので、有核細胞イベントを非有核血球から分離することを含む。従来の閾値又はゲーティング手法の代わりに、データのヒストグラムに沿ってピーク及び谷を自動的に突き止めるために反復的にwatershed変換が使用される。watershed変換は、最初に、ピーク及び谷の最初の位置を突き止めるためにシグナルに適用される。次いで、ドミナント性の低いピーク及び谷を統合するために反復手順が適用される。手順が収束すると、ドミナントなピーク及び谷だけが残る。ステップ1でドミナントな谷だけが残るまでデータにwatershed変換が適用される。ドミナントな谷は、ステップ1で異なるイベントタイプを分離するためのカットオフ閾値である。ステップ2でドミナントな谷だけが残るまでデータにwatershed変換が適用される。ドミナントな谷は、ステップ2で異なるイベントタイプを分離するためのカットオフ閾値である。

10

20

【0057】

図2のステップ3は、任意のステップである。或る体液サンプルでは、さらなるクラスタを形成するさらなる未知のイベントが有核細胞イベントに含まれることもある。図3に例示される精製手法は、正確な全有核細胞カウント(TNCC)を達成するべく未知のイベントをフィルタで除去するために採用することができる。或るケースでは、未知の細胞イベントを除去することにより有核細胞イベントを洗練する(フローチャートにおけるステップ3)ための方法は、非パラメトリック特徴クラスタリング技術(Mean Shift, Mode Seeking, and Clustering, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 17(8), 790-799, 1995)と共に蛍光シグナル及び細胞イベントのさらなるタイムスタンプを使用し得る。

30

【0058】

図2のステップ4は、全有核細胞をサブカテゴリ：リンパ球、単球/マクロファージ、多形核(PMN)細胞、及びNWBC(NWBCは、WBCではない有核細胞を含み、NWBCは、上皮細胞及び/又は腫瘍細胞を含む)に分類することを含む。リンパ球及び単球/マクロファージは、単核細胞(MNC)カウントとして計数することができ、WBCはMNC細胞及びPMN細胞を含む。図4A及び図4Bは、TNCCがリンパ球、単球/マクロファージ、PMN細胞、及びNWBCへクラスタリングされる、2つの体液サンプルを示す。或る実施形態では、有核細胞イベントを単核細胞イベント、多形核細胞イベント、及び非白血球(NWBC)イベントに分類する(フローチャートにおけるステップ4)ための方法は、効率的なk平均クラスタリングアルゴリズム(An efficient k-means clustering algorithm: analysis and implementation, IEEE Trans on Pattern Analysis and Machine Intelligence Vol. 24, 2002, 881-892)と共に多次元光散乱シグナル(前方散乱光、側方散乱光、偏光した側方散乱光、偏光解消した側方散乱光、又はこれらの組合せ)及び蛍光シグナルを使用し得る。

40

【0059】

50

図2のステップ5において、方法は、細胞タイプ毎の濃度、パーセンテージ、及びフラグを含む報告可能なパラメータを計算することをさらに含む。或る実施形態では、体液サンプルの分析のための方法は、希釈比、流量、カウント時間、及び適切な校正係数に基づいて細胞濃度を提供することをさらに含んでよい。体液サンプルは、例えば、データ品質及び/又は悪性である可能性を示す細胞カウントに起因してさらなる分析を示すべくフラグを立てられてよい。フラグを立てられたサンプルは、顕微鏡法を用いてさらに分析されてよい。顕微鏡法は、フラグを立てられたサンプルのスライドを用意し、顕微鏡を用いてスライドからデータを得るためのモジュールを有する血液分析器により行うことができる。

【0060】

図5A～図5Dは、データ分析に関する閾値を判定するべくwatershed変換を用いる体液サンプルの分析は、所定の閾値を使用する従来の方法を用いて導出されたものに密接に相関する細胞カウントを提供することを実証する。

【0061】

全有核細胞をサブカテゴリ：リンパ球、単球/マクロファージ、多形核(PMN)細胞、及びNWBCへ分類し、計数することは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,631,165号で説明される方法などの任意の信頼できる方法を用いて実行されてよい。本明細書で開示される方法の1つ又は複数のステップは、本明細書に記載のデバイス及びシステムで実行することができる。本明細書で提供される方法の態様を行う特定のデバイス及びシステムを以下でより詳細に説明する。

【0062】

デバイス及びシステム

上記で要約したように、同じく本開示により提供されるのは、例えば、本開示の方法を実施する際の使用が見出されるデバイス及びシステムである。

【0063】

本明細書で開示される方法を実施するのに用いられるデバイスは、本明細書で開示される方法の1つ又は複数のステップを実行するようにプログラムされたコンピュータであってよい。コンピュータは、体液中の細胞を分析することに関する命令を記憶するためのメモリを含んでよい。コンピュータはまた、メモリに記憶された命令を実行するためのプロセッサを含んでよい。命令は、エネルギー源により照射された体液サンプルから放出されたシグナルを収集すること、この場合、体液サンプルは蛍光染料で染色され、蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成する；収集したシグナルにwatershed変換を適用することにより収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定すること；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷にwatershed変換を反復的に適用すること；ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定すること；及び、体液中の異なる細胞タイプを区別するべく閾値を上回るシグナルを分析することに関する命令を含んでよい。本明細書で述べたように、本明細書に記載のデバイス及びシステムは、自動であってよく、したがって、人間の介入なしに本開示の方法を実行してよい。フローサイトメータを流れる体液から生成されたデータの分析に関するカスタム閾値を特定することにより体液分析を実行するこのようなデバイス及びシステムは、プリセット閾値を用いるデバイス及びシステムよりも改善される。

【0064】

或る実施形態では、前述のコンピュータは、血液分析機、蛍光フローサイトメータなどのフローサイトメータの一部であってよい。フローサイトメータは、フローセルと、フローセルに導入された細胞に照射するためのエネルギー源を含んでよく、フローサイトメータのメモリは、フロー分析器に、体液サンプルを本明細書に記載の蛍光染料で染色させ、染色された体液サンプルをフローセルに流させ、フローセルを流れる細胞に照射させることに関する命令をさらに含んでよい。

【0065】

10

20

30

40

50

或る実施形態では、命令は、ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷に watershed 変換を反復的に適用することに関する命令を含んでよい。ドミナントな谷は、複数のピークに watershed 変換を反復的に適用することにより得られる2つのドミナントなピーク間に位置する。

【0066】

同じく本開示によって提供されるのは、本開示の方法のいずれかを行うように適合されたシステム（例えば、自動血液学的システムのサブシステムであり得る、フローサイトメトリシステム）である。このようなシステムは、本明細書に記載の一時的でないコンピュータ可読媒体のいずれかを含んでよい。

【0067】

或る態様では、本開示のシステムは、フローサイトメータである。このようなシステムは、フローセルと、フローセルを流れて流れる体液サンプルを励起するように配置された励起源と、励起したサンプルから放出された光シグナルを検出するための1つ又は複数の検出器を含む。本明細書に記載の一時的でないコンピュータ可読媒体のいずれかを含み得る本開示の方法を実施するのに適するフローサイトメータの例が、図6に概略的に例示される。フローサイトメータ10は、光源12、ビームを曲げるためのフロントミラー14及びリヤミラー16、第1の円筒レンズ20及び第2の円筒レンズ22を収容しているビーム拡大器モジュール18、集束レンズ24、ビーム微調節器26、フローセル28、前方散乱光レンズ30、ブルズアイ検出器32、第1の光電子増倍管34、第2の光電子増倍管36、及び第3の光電子増倍管38を含む。ブルズアイ検出器32は、0°の光散乱のための内側検出器32aと、7°の光散乱のための外側検出器32bを有する。

【0068】

或る態様では、光源はレーザである。しかしながら、例えばランプ（例えば、水銀、キセノン）などの他の光源を用いることができる。光源12は、カリフォルニア州サンタクララの Coherent 社から市販されている垂直偏光空冷 Coherent Cube レーザとすることができる。350nm~700nmの範囲の波長を有するレーザを用いることができる。レーザの動作条件は、「CELL-DYN」自動血液分析器と共に現在用いられているレーザの動作条件と実質的に同様である。

【0069】

フローセル、レンズ、集束レンズ、ビーム微調節機構、及びレーザ集束レンズに係るさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,631,165号の、特に第41欄32行~第43欄11行で見ることができる。米国特許第5,631,165号の図2に示された前方光路系は、球面平凸レンズ30と、レンズの後焦点面内に存在する二要素フォトダイオード検出器32を含む。この構成では、二要素フォトダイオード検出器32内の各点は、フローセル28を流れて移動する細胞からの光の特異的な集光角度にマップする。検出器32は、軸方向の光損失(ALL)及び中角前方散乱光(IAS)を検出することができる、ブルズアイ検出器とすることができる。米国特許第5,631,165号の第43欄12~52行でこの検出器の種々の代替を説明する。

【0070】

第1の光電子増倍管34(PMT1)は、偏光解消した側方散乱光(DSS)を測定する。第2の光電子増倍管36(PMT2)は、偏光した側方散乱光(PSS)を測定し、第3の光電子増倍管38(PMT3)は、選択された蛍光染料及び採用された光源に応じて、440nm~680nmの蛍光発光を測定する。光電子増倍管は、シグナル強度を増加させるために広範囲の波長の蛍光シグナルを収集する。側方散乱光及び蛍光発光は、効率的な検出を可能にするために必要とされる波長で効率よく伝送及び反射するダイクロイックビームスプリッタ40及び42により、これらの光電子増倍管へ誘導される。米国特許第5,631,165号の第43欄53行~第44欄4行で光電子増倍管に係る種々のさらなる詳細を説明する。

【0071】

感度は、液浸集光系を用いることにより、蛍光を測定するときに光電子増倍管34、3

10

20

30

40

50

6、及び38で増強される。液浸集光系は、屈折率整合層によって第1のレンズ30をフローセル28に光学的に結合するものであり、広い角度にわたる集光を可能にする。米国特許第5,631,165号の第44欄5~31行でこの光学系の種々のさらなる詳細を説明する。

【0072】

コンデンサ44は、高分解能顕微鏡法で用いられる回折限界イメージングのための十分な収差補正を有する光学レンズ系である。米国特許第5,631,165号は、この光学系の種々のさらなる詳細を第44欄32~60行で説明する。

【0073】

図6に示された他の構成要素、すなわち、スリット46、視野レンズ48、及び第2のスリット50の機能は、米国特許第5,631,165号の第44欄63行~第45欄26行で説明される。検出される光の波長又は偏光或いは波長と偏光との両方を変化させるべく光電子増倍管の光路内に挿入される光学フィルタ52又は56と偏光子52又は56も米国特許第5,631,165号の第44欄63行~第45欄26行で説明される。本明細書で用いるのに適する光学フィルタは、バンドパスフィルタ及びロングパスフィルタを含む。

10

【0074】

光電子増倍管34、36、及び38は、側方散乱光(その軸が入射レーザービームにほぼ垂直なコーン内に散乱した光)か又は蛍光(入射レーザービームの波長とは異なる波長で細胞から放出された光)のいずれかを検出する。図7は、本開示の方法を用いる分析のためのデータを生成する際の使用が見出される、一実施形態に係るフローサイトメータの第2の例の概略図である。

20

【0075】

米国特許第5,631,165号の選択部分が上記で参照されるが、米国特許第5,631,165号は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。或る実施形態によれば、本開示のフローサイトメータは、光センサとしてアバランシェフォトダイオード(APD)を採用する。

【0076】

或る場合には、本明細書に記載のシステムのコンポーネントは、有線データ接続により接続されてよい。任意の適切及び適当な有線データ接続は、例えば、限定はされないが、例えば、USBケーブル、同軸ケーブル、シリアルケーブル、C2G又はCat2ケーブル、Cat5/Cat5e/Cat6/Cat6aケーブル、トークンリングケーブル(Cat4)、VGAケーブル、HDMIケーブル、RCAケーブル、光ファイバケーブルなどの市販のケーブルを含む、本明細書に記載の説明したシステムのコンポーネントの接続の際の使用が見出され得る。或る場合には、例えば、データセキュリティの心配があまりないならば、限定はされないが、例えば、無線周波数接続(例えば、PAN/LAN/MAN/WAN無線ネットワーク、UHF無線接続など)、赤外線データ伝送接続、無線光データ接続などを含む、無線データ接続が採用され得る。

30

【0077】

本開示のデバイス及びシステムは、コンピュータにより後日にアクセス可能及び取得可能であるように情報を記憶することができる「メモリ」をさらに含んでよい。記憶された情報にアクセスするのに用いられる手段に基づいて任意の便利なデータストレージ構造が選択されてよい。或る態様では、情報は、永続メモリ(すなわち、コンピュータ又はプロセッサへの電気の供給が途絶えても消去されないメモリ)又は非永続メモリに記憶されてよい。コンピュータハードドライブ、CD-ROM、フロッピーディスク、ポータブルフラッシュドライブ、及びDVDはすべて、永続メモリの例である。ランダムアクセスメモリ(RAM)は、非永続メモリの例である。永続メモリ内のファイルは、編集可能及び再書き込み可能であり得る。

40

【0078】

実質的に任意の回路を、本明細書で開示される方法を実行するためのデバイス及びシス

50

テム内の機能的アレンジメントに構成することができる。例えば、専用に構成されたコンピュータを含むこのような回路のハードウェアアーキテクチャは、当業者によく知られており、1つ又は複数のプロセッサ(CPU)、ランダムアクセスメモリ(RAM)、読出し専用メモリ(ROM)、内部又は外部データ記憶媒体(例えば、ハードディスクドライブ)を含むハードウェアコンポーネントを備えることができる。このような回路はまた、グラフィカル情報を処理しディスプレイ手段に出力するための1つ又は複数のグラフィックボードを備えることができる。上記のコンポーネントは、例えば、特定用途のコンピュータの内部の回路内のバスを介して適切に相互接続することができる。回路は、モニタ、キーボード、マウス、ネットワークなどの汎用外部コンポーネントと通信するための適切なインターフェースをさらに備えることができる。一部の実施形態では、回路は、並列処理可能とすることができ、又は本方法及びプログラムのための処理能力を増加させるべく並列又は分散計算用に構成されるネットワークの一部とすることができる。一部の実施形態では、記憶媒体から読み出されるプログラムコードを、回路に挿入される拡張ボード又は回路に接続される拡張ユニットに設けられるメモリに書き込むことができ、拡張ボード又は拡張ユニットに設けられるCPUなどが、説明した機能を達成するためにプログラミングの命令に従って動作の一部又はすべてを実際に行うことができる。

10

20

30

40

50

【0079】

例えば、前述の本開示のデバイス及びシステムのコンポーネントに加えて、本開示のシステムは、データ出力デバイス、例えば、モニタ及び/又はスピーカ、データ入力デバイス、例えば、インターフェースポート、キーボードなど、作動できるコンポーネント、電源などのいくつかのさらなるコンポーネントを含んでよい。

【0080】**コンピュータ可読媒体**

上記で要約したように、同じく本開示により提供されるのは、例えば、本開示の方法を実施する際の使用が見出される、コンピュータ可読媒体である。

【0081】

本開示は、本明細書に記載の方法に関する命令を記憶する、一時的でないコンピュータ可読媒体を含む、コンピュータ可読媒体を含む。本開示の態様は、コンピューティングデバイス(例えば、コンピューティングデバイスのプロセッサ)によって実行されるときに、コンピューティングデバイスに、本明細書に記載の方法の1つ又は複数のステップを行わせる命令を記憶するコンピュータ可読媒体を含む。或る実施形態によれば、コンピュータ可読媒体は、エネルギー源により照射された体液サンプルにより放出されたシグナルを収集することと、この場合、体液サンプルは蛍光染料で染色され、蛍光染料は、細胞膜に浸透し、核酸と結合して細胞内に染料複合体を形成し；収集したシグナルにwatershed変換を適用し、これにより、収集したシグナルにおける複数のピーク及び谷を決定することと；ドミナントな谷が得られるまで複数のピーク及び谷にwatershed変換を反復的に適用することと；ドミナントな谷のシグナルに基づいてシグナル分析に関する閾値を設定することと；体液中の異なる細胞タイプを区別するべく閾値を上回るシグナルを分析することに関する命令を含んでよい。本明細書で述べたように、本明細書に記載のデバイス及びシステムは、自動であってよく、したがって、人間を介することなく、本開示の方法を実行できる。

【0082】

或る実施形態では、本明細書に記載の方法に係る命令は、「プログラミング」の形態で、コンピュータ可読媒体上でコード化することができ、本明細書で用いられる場合の「コンピュータ可読媒体」という用語は、実行及び/又は処理のためにコンピュータに命令及び/又はデータを提供することに関係する任意のストレージ又は伝送媒体を指す。記憶媒体の例は、このようなデバイスがコンピュータの内部又は外部のいずれにあるかにかかわらず、フロッピーディスク、ハードディスク、光ディスク、光磁気ディスク、CD-ROM、CD-R、磁気テープ、不揮発性メモリカード、ROM、DVD-ROM、ブルーレイディスク、ソリッドステートディスク、及びネットワークアタッチトストレージ(N

A S) を含む。情報を含むファイルは、コンピュータ可読媒体上に「記憶」することができ、この場合、「記憶すること」は、コンピュータにより後日にアクセス可能及び取得可能であるように情報を記録することを意味する。

【0083】

本明細書に記載のコンピュータで実施される方法は、あらゆる数のコンピュータプログラミング言語のうちの一つ又は複数で書き込むことができるプログラミングを用いて実行することができる。このような言語は、例えば、Java (カリフォルニア州サンタクララの Sun Microsystems, Inc.)、Visual Basic (ワシントン州レッドモントの Microsoft Corp.)、及び C++ (ニュージャージー州ベッドミンスターの AT&T Corp.)、並びに任意の多くの他の言語を含む。

10

【0084】

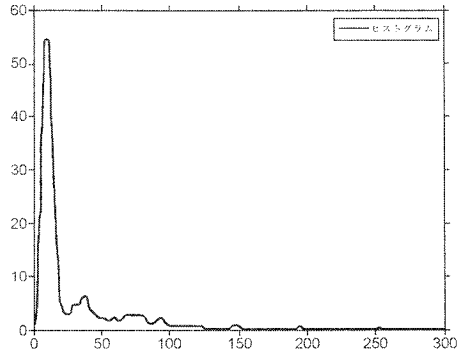
上記の発明は理解を明確にする目的での例示及び例によってある程度詳細に説明されているが、付属の請求項の精神又は範囲から逸脱することなく特定の変化及び修正が本発明に加えられてよいことは、この発明の教示に照らせば当業者には明らかである。

【0085】

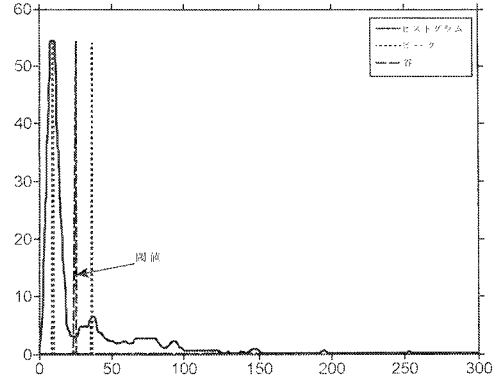
したがって、上記は本発明の原理を単に例示するだけである。本明細書で明示的に説明又は図示されないが、本発明の原理を具体化する、本発明の精神及び範囲内に含まれる種々の構成を当業者は考案できることが理解されるであろう。さらに、本明細書に列挙されるすべての例及び条件付きの文言は、当該技術分野を進展させるために本発明者らによって提供される本発明の原理及び概念を読者が理解するのを助けることを主として意図され、このような具体的に列挙される例及び条件に限定されないと解釈されるべきである。さらに、本発明の原理、態様、及び実施形態、並びにその具体例を列挙する本明細書でのすべての文は、その構造の均等物と機能の均等物との両方を包含することを意図される。加えて、このような均等物は、現在公知の均等物と将来開発される均等物、すなわち、構造に関係なく同じ機能を果たす開発される任意の要素との両方を含むことが意図される。したがって、本発明の範囲は、本明細書で図示及び説明される例示的な実施形態に限定されることを意図されない。本発明の範囲及び精神は、添付の請求項によって具体化される。

20

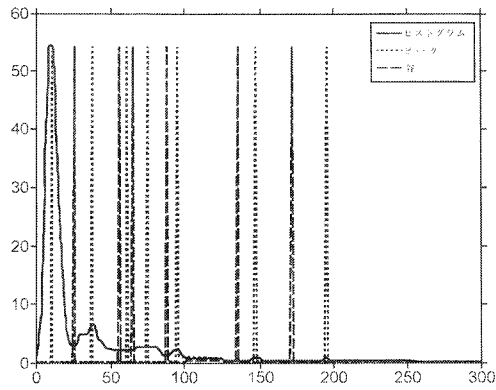
【図 1 A】



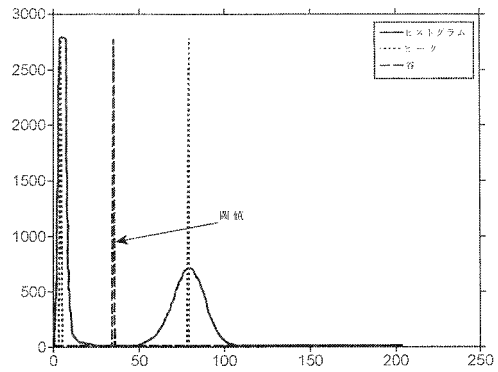
【図 1 C】



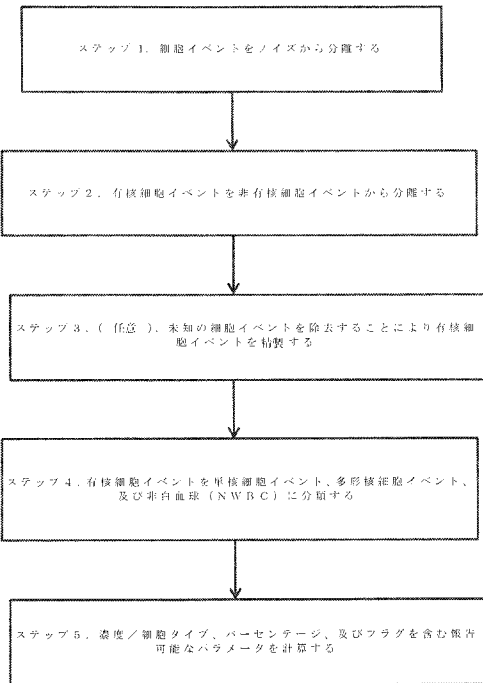
【図 1 B】



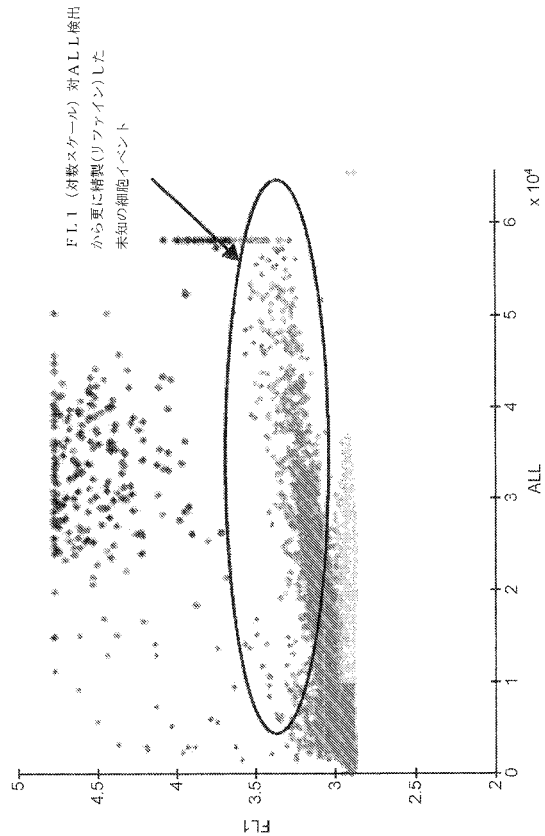
【図 1 D】



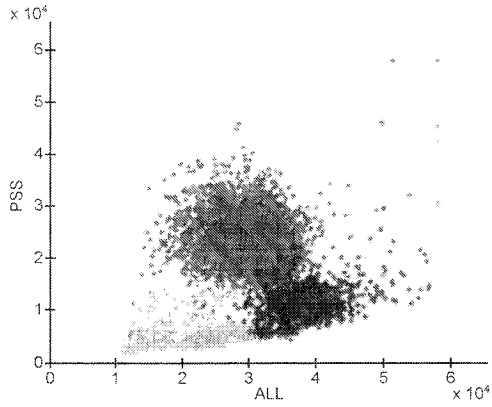
【図 2】



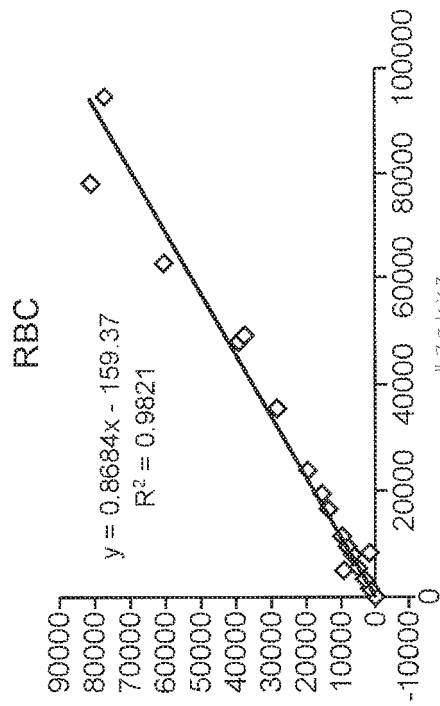
【図 3】



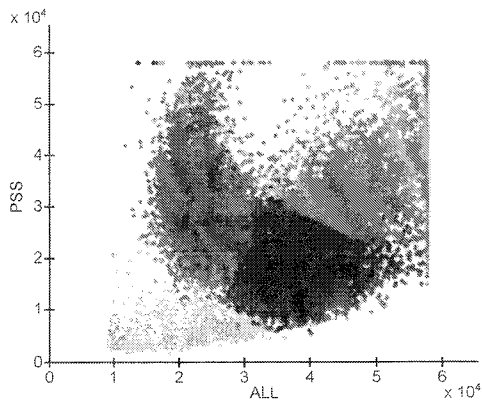
【 図 4 A 】



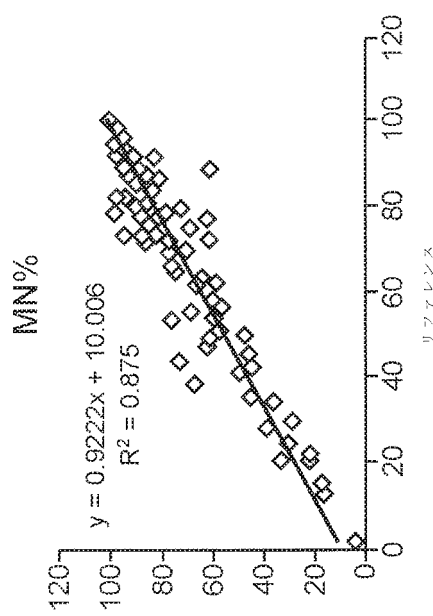
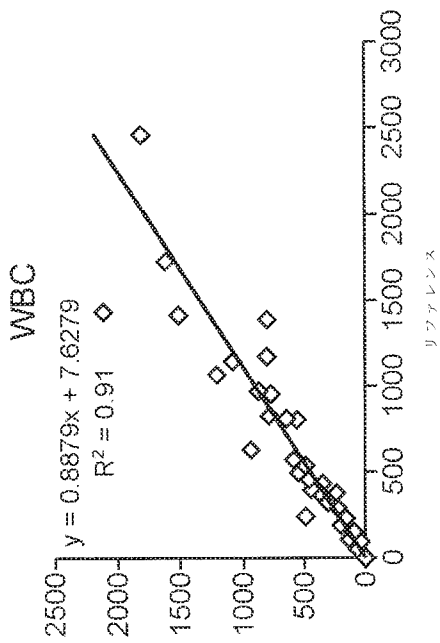
【 図 5 A 】



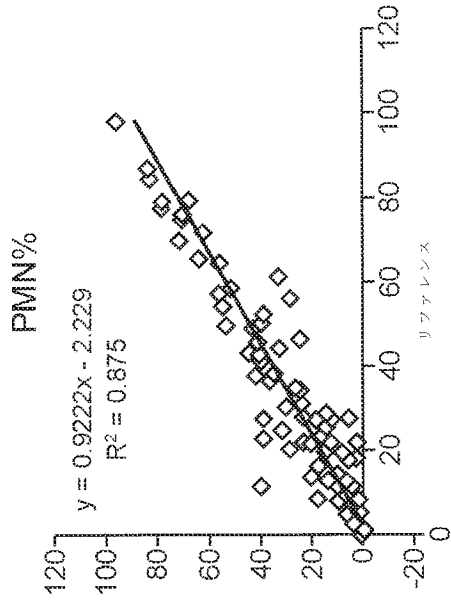
【 図 4 B 】



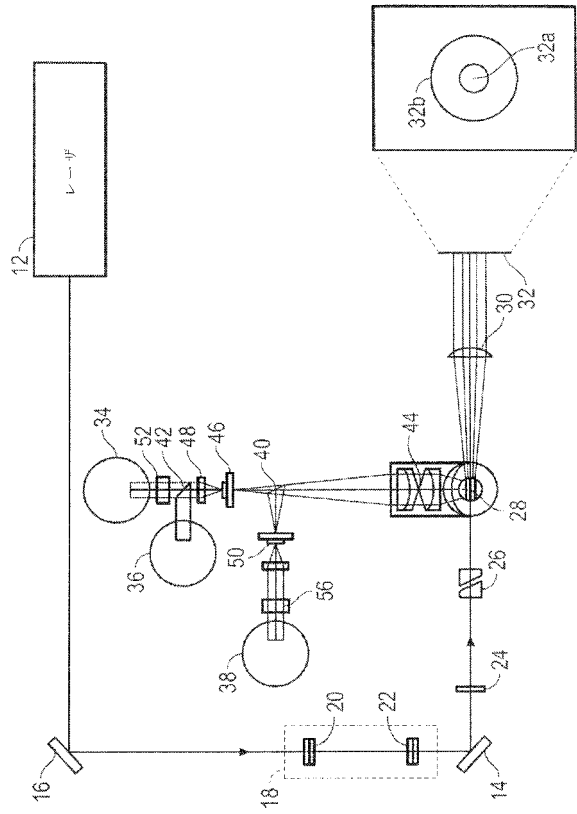
【 図 5 C 】



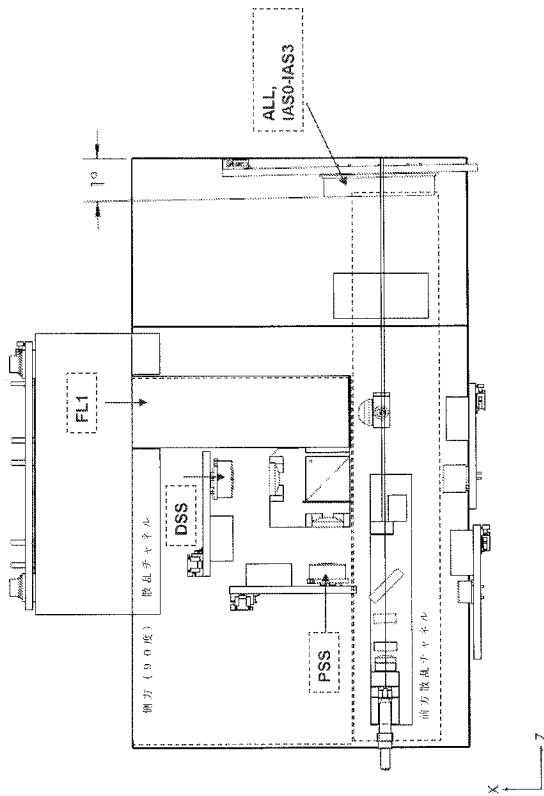
【 図 5 D 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/50537

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 10-18, 22-34 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 17/50537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12M 1/34 (2017.01) CPC - G01N 33/54366 G01N 33/54373, B01J 2219/00722, B01J 19/0046, B82Y 30/00		
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) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0164740 A1 (Abbott Laboratories) 27 June 2013 (27.06.2013) entire document (especially para [0036]-[0037],[0057], [0062], [0082]-[0088], [0097])	1-9, 19-21
Y	US 2008/0280777 A1 (Bittner et al.) 13 November 2008 (13.11.2008) (para [0045], [0096], [0104]-[0105], [0110]-[0111], [0121], [0133]-[0135])	1-9, 19-21
Y	US 2007/0211928 A1 (Weng et al.) 13 September 2007 (13.09.2007) (para [0039], [0092], [0094]-[0100])	1-9, 19-21
Y	US 2011/0178716 A1 (Krockenberger et al.) 21 July 2011 (21.07.2011) (para [0022], [0026], [0031], [0036])	5-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" 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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 06 November 2017 (06.11.2017)		Date of mailing of the international search report 21 NOV 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 21/47	Z
	G 0 1 N 21/78	C

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . H D M I

(72) 発明者 リン, エミリー エイチ.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 5 0 1 4, クパチーノ, バーンコート 2 1 9 1 0

(72) 発明者 ウー, ジオン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 5 0 3 2, ロスガトス, マットソン アベニュー 2 2 2

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01 EA14 HA01 HA02 HA09 JA02
 KA09 LA01 NA01
 2G054 AA08 AB02 AB05 CE02 EA02 EB02 JA01
 2G059 AA01 BB13 EE02 EE07 EE12 GG01 JJ02 JJ11 JJ22 KK01
 MM01

专利名称(译)	自动体液分析		
公开(公告)号	JP2019536001A	公开(公告)日	2019-12-12
申请号	JP2019511628	申请日	2017-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	リーウエンジン ウージオン		
发明人	リー,ウエンジン リン,エミリー エイチ. ワー,ジオン		
IPC分类号	G01N21/64 G01N15/14 G01N33/53 G01N21/47 G01N21/78		
CPC分类号	G01N15/1459 G01N2015/1006 G01N2015/1402 G01N2015/1488 G06K9/0014 G06K9/00147 G06K9/342 G06T7/11 G06T7/136 G06T7/155 G06T2207/10056 G06T2207/20152 G06T2207/30024 G01N33/5002 G01N33/5094 G01N33/52		
FI分类号	G01N21/64.Z G01N15/14.B G01N33/53.Y G01N15/14.C G01N15/14.D G01N21/47.Z G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA14 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA09 2G043/JA02 2G043/KA09 2G043/LA01 2G043/NA01 2G054/AA08 2G054/AB02 2G054/AB05 2G054/CE02 2G054/EA02 2G054/EB02 2G054/JA01 2G059/AA01 2G059/BB13 2G059/EE02 2G059/EE07 2G059/EE12 2G059/GG01 2G059/JJ02 2G059/JJ11 2G059/JJ22 2G059/KK01 2G059/MM01		
代理人(译)	内田直人		
优先权	62/385055 2016-09-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于体液样品的自动细胞分析的方法，装置和系统。该方法，设备和系统将分水岭变换应用于通过使体液样本流过流式细胞仪而产生的数据，以确定用于分析数据的阈值。

