

(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2014-524013

(P2014-524013A)

(43) 公表日 平成26年9月18日(2014.9.18)

(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 E	2 G O 4 3
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	4 B O 2 9
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-514018 (P2014-514018)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月4日 (2012.6.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月30日 (2014.1.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/060499
 (87) 国際公開番号 W02012/168184
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日 (2012.12.13)
 (31) 優先権主張番号 11168799.2
 (32) 優先日 平成23年6月6日 (2011.6.6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 510132392
 メディバン・ゲーエムベーハー
 ドイツ連邦共和国、ベルリン/ダーレヴィ
 ッツ 1 5 8 2 7、ルードヴィッヒエ
 ルハルトーリング 3
 (74) 代理人 100071010
 弁理士 山崎 行造
 (74) 代理人 100118647
 弁理士 赤松 利昭
 (74) 代理人 100138438
 弁理士 尾首 亘聰
 (74) 代理人 100138519
 弁理士 奥谷 雅子
 (74) 代理人 100123892
 弁理士 内藤 忠雄

最終頁に続く

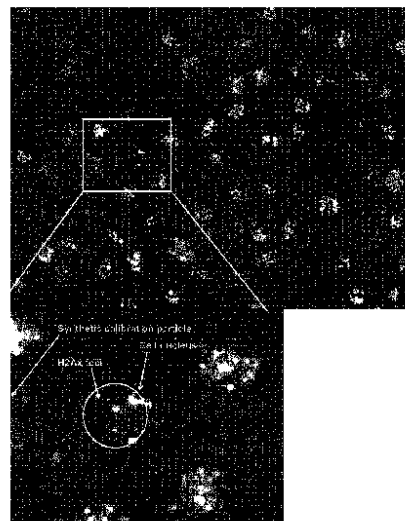
(54) 【発明の名称】 合成校正用粒子を用いた細胞に基づく免疫蛍光アッセイによる免疫蛍光病巣を自動的に判定するための方法及びシステム

(57) 【要約】

本発明は、免疫蛍光アッセイにより細胞の免疫蛍光病巣を自動的に判定する方法に関し、発明を実施するためにシステム及びキットに加えて合成校正用粒子を用いる。好ましい実施の態様においては、この方法において前記免疫蛍光病巣はガンマH2Ax病巣である。

【選択図】 図 1

Fig. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫蛍光アッセイの手段により細胞免疫蛍光病巣を自動的に判定する方法であり、

- a. 解析される細胞及び合成校正用粒子の混合物を提供し、その細胞及び粒子は固相に固定される；
 - b. 合成校正用粒子を検出し、続いて合成校正用粒子の検出に基づき蛍光顕微鏡装置及び自動評価システムを校正し及び焦点調節をする；
 - c. 前記混合物を細胞の標的基質に結合する一以上の抗体と共に培養する；
 - d. 前記蛍光顕微鏡装置により前記基質に結合した抗体を検出する；及び
 - e. 前記自動評価システムを用いて前記蛍光顕微鏡装置により生成される画像データから免疫蛍光病巣を判定する
- ステップを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記免疫蛍光病巣はガンマH2A x 病巣である、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記合成校正用粒子は微小粒子であり、好ましくはその直径が 1 - 100 μm である、請求項 1 または 2 の方法。

【請求項 4】

前記合成校正用粒子及び/又は抗体は、蛍光マーカーを用いて特にマークされている、請求項 1 乃至 3 のいずれかの方法。

20

【請求項 5】

前記抗体は、細胞の標的基質に結合する一以上の一次抗体であり、及び蛍光マークされそして一次抗体に結合する一以上の二次抗体であり、それにより、結合された基質を免疫蛍光病巣として検出することを容易にさせる、請求項 1 乃至 4 のいずれかの方法。

【請求項 6】

前記細胞が、リンパ球、単球、及び/又はマクロファージの様な単核血球、線維芽細胞の様なインビトロ培養細胞、又は実験細胞株から得られる細胞から選択される、請求項 1 乃至 5 のいずれかの方法。

【請求項 7】

ステップb)の前記校正又はステップe)の前記判定には、更に、染色され又はマークされた細胞核の検出を介して、好ましくはDAPI染色細胞核の検出を介して、細胞を検出し及び位置を決めることを含む、請求項 1 乃至 6 のいずれかの方法。

30

【請求項 8】

前記判定は細胞あたりの病巣の数を判定することを含む、請求項 1 乃至 7 のいずれかの方法。

【請求項 9】

ステップe)の前記自動評価システムはソフトウェアとして実行可能な命令を格納するコンピュータ可読メモリを持つコンピュータ装置を含み、前記ソフトウェアは、コンピュータによって実行されたときは、オートフォーカス制御、自動化された画像取得、自動画像解析及び/又は自動化されたパターン認識の機能を実行するモジュールを含む、請求項 1 乃至 8 のいずれかの方法。

40

【請求項 10】

蛍光顕微鏡装置の焦点調節及び自動評価システムが顕微鏡画像の動的自動焦点化により行われる、請求項 1 乃至 9 のいずれかの方法。

【請求項 11】

細胞および/または細胞集団におけるDNA二本鎖切断数の判定のための請求項 1 乃至 10 のいずれかの方法の使用であって、前記ガンマH2AX病巣の数は、DNA二本鎖切断の数に比例する、前記方法の使用。

【請求項 12】

細胞及び/又は細胞集団におけるDNA損傷を判定するための、請求項 1 乃至 11 のいずれか

50

の方法の使用であって、前記方法の使用は

- a. 試験細胞におけるガンマH2Ax病巣の数は、対照細胞におけるガンマH2AX病巣の数と比較され、及び
- b. 対照細胞と比較して試験細胞における細胞当たりのガンマH2Ax病巣の数が多いほど、試験細胞におけるDNA損傷が増大していることを示す、方法の使用。

【請求項 1 3】

細胞及び/又は細胞集団をイオン化照射又は他の任意の種類放射線曝露、または任意の他のDNA損傷物質または処置への暴露を判定するための、請求項 1 乃至 1 2 のいずれかの方法の使用。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 乃至 1 3 のいずれかの方法による免疫蛍光アッセイの手段により免疫蛍光病巣を自動的に判定するシステムであって、

- a. 解析されるべき細胞および合成校正用粒子の混合物であって、それらの細胞および粒子が固相に固着される、
- b. カメラ、電動走査ステージおよびマルチチャンネル発光ダイオード (LED) を備えた蛍光顕微鏡を含む蛍光顕微鏡装置、及び
- c. ソフトウェアとして実行可能な命令を格納するコンピュータ可読メモリを持つコンピュータ装置を含む自動評価システムであり、前記ソフトウェアはコンピュータによって実行されたときに、オートフォーカス制御、自動化された画像取得、自動画像解析及び/又は自動化されたパターン認識の機能を実行するモジュールを含み、その場合二つ以上のカラーチャンネルが解析され、それぞれは合成校正用粒子または標的基質に関連した免疫蛍光病巣のいずれかに対応する、ことを含む前記システム。

20

【請求項 1 5】

請求項 1 乃至 1 4 のいずれかの方法に基づく免疫蛍光アッセイの手段により免疫蛍光病巣の自動的な判定のための方法を実施するためのキットであり

- a. その上に解析されるべき細胞が固定される固相の表面に固定された合成校正用粒子を含む、1種以上の固相体
- b. 好ましくは、二次抗体として使用するために、蛍光標識と結合した免疫グロブリン特異抗体を含む一以上の複合体、及び任意選択的に
- c. 合成校正用粒子、一次抗体および/または二次抗体用の洗浄バッファ、カバースリッパ、被覆媒体、および/または蛍光標識、を含む前記キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫蛍光アッセイにより細胞の免疫蛍光病巣を自動的に判定する方法に関し、同方法は、解析される細胞及び合成校正用粒子の混合物であり、その細胞及び粒子は固相に固着されている混合物を提供すること、合成校正用粒子を検出することを含み、続いて、合成校正用粒子の検出に基づく、蛍光顕微鏡機器及び自動評価システムの校正及び焦点調整、細胞の標的基質に結合する一以上の抗体による前記混合物の培養、蛍光顕微鏡機器による前記基質に結合している抗体の検出、及び前記自動評価システムを用いて蛍光顕微鏡機器により生成された画像データから免疫蛍光病巣を判定することを含む。好ましい実施の態様においては、この方法において、前記免疫蛍光病巣はガンマH2Ax病巣である。

40

【背景技術】

【0002】

異なる免疫蛍光装置及び方法を用いている異なる実験機関について、免疫蛍光アッセイを標準化及び自動化することは、バイオアッセイ及び診断における極めて有意義な挑戦である。蛍光による信号を高感度及び高選択性を持って検出しそして評価すること、特に細

50

胞ベースアッセイにおいて実施することは、バイオアッセイ及び診断において用いられる幾つかの最も重要な検出法として、蛍光アッセイの発展をもたらした。蛍光による検出方法の有利な点は、例えば、蛍光顕微鏡検査方法を用いた場合検出が高感度で行われ、細胞において標的対象物を蛍光マーキングする比較的簡単な方法を実施することができ、そして複数のパラメーターの解析を同時並行して行うことができることであり、この場合異なる標的対象物を異なるマーカーにより複数のマーキングすることができる。したがって、この方法は、吸収測定法及び複雑な、問題を含む放射線による測定法の様により複雑な方法に取って変わるものである。

【0003】

しかし、間接的免疫蛍光試験（IIF）において手動による判定及び評価は種々の主観的要素に影響され、更に機器特有の技術パラメーターにより影響される。通常使用される細胞基質及び試薬・物質に加えて、顕微鏡技術は蛍光フィルター、対物レンズ、光源、及び調査対象となる蛍光パターンの解析を含んでおり、特に異なる各実験機関の間における異なる顕微鏡装置及び方法を対比することを考慮すると、これらの要素が各々信頼に値しそして比較可能な結果を提供できるようにするためには、標準化が必要となる。

その解析に関して利用の可能性が大きいことを示す免疫蛍光アッセイの一つの例は健康産業がある。しかし異なる実験機関の間に十分な標準化及び/又は自動化を欠いている免疫蛍光アッセイの例としては、DNAの損傷をDNAの二重鎖切断（DSB）の検出により解析することであり、その場合ガンマH2Axは知られたマーカーである。

DNAは、モノヌクレオチドを含む重合体を表し、モノヌクレオチド自身が塩基、デオキシリボ糖及びリン酸基を含む。核DNAは遺伝情報の共通のキャリアである。細胞核において、DNAはヒストンタンパク質により複雑な構造を形成するが、ヒストンタンパク質はヌクレオソームの形で存在し、ヌクレオソームはクロマチンの配置構造により種々の核のプロセスを制御することができる。例えば、核分裂の間に、特定の形態変化がクロマチンで起きるが、その変化により凝縮した染色体が形成され、これは続いて起こる染色体の娘細胞への分離を確実なものにするために必須である。DNAの複製及び転写は、その機能を実施するためにまたクロマチンと相互反応をする必要のある酵素の複雑なシステムによって制御されており、その機能は細胞代謝を維持するための基礎を成している。DNA分子自身及び内部でコード化された情報は、その幾つかを上げると、例えば、転写、複製及び細胞分裂等の種々の細胞及び核プロセスを通じて安定していることが必須である。

【0004】

細胞のDNAは、種々の代謝プロセスの直接又は間接的な影響下にあり、そのためそのプロセスはDNAの分子構造を潜在的に変え得る。DNAの構造の変化はDNAの機能を維持又は実行するために必須であり、例えば、抗体生成細胞の生成中、又は個々の塩基がメチル化される場合の複製の直後に、一時的な鎖の切断が現われる。

しかし、例えば、DSBの様な圧倒的な数のその様な変化は重要であるとは見做されず又は予期した事象とは見られず、むしろ全体の生命体にとって潜在的に危険である変異の原因とみられる。DNAの損傷は、例えば、自由ラジカルの様な代謝物による内因性プロセスに加えて、外因性プロセス、例えば、イオン化、紫外線照射又は変異原性化学品などにより起こることもある。

【0005】

イオン化照射はヒトにおいて多くの損傷的効果を引き起こし得るが、その場合DNA DSBはその最も重要なもの（1 - 3）の一つである。イオン化照射の生体組織に与える影響はエネルギーの細胞への移転によるものであり、その際細胞への損傷の程度は複数の要因による。最も重要なものは、放射線核種の放射物理特性、吸収線量、露出時間、生体系の放射線感受性、放射線のエネルギー密度に加えて領域的なエネルギー蓄積（線エネルギー付与、LET）(4-7)などである。細胞の生存の可能性はそのDNAの完全性（統合性）（integrity）によるが、その場合悪性細胞の根絶は、DNAへの損傷を広く引き起こすことになる。物理的な変化の結果多くの化学的变化がDNAに起きる。そしてそれによりDNAに損傷が起き、したがって、細胞の変異及び細胞の潜在的死亡が起きる（8, 9）。この意味での最も

10

20

30

40

50

生物学的に関連する損傷はDSB及びDNAの一本鎖切断（SSB）に関する。

【0006】

真核細胞ではDNAは高度に凝縮し、クロマチン構造に局地化されており、その場合クロマチンの基本要素はヌクレオソームであり、タンパク質コア（ヒストン八量体）の周囲に1.7倍で巻き付いている146のDNA塩基対を含む。ヌクレオソームのタンパク質コアは八量体から形成され、それはヒストンH2A、H2B、H3及びH4を各々二つ含んでいる。各ヌクレオソームは更にH1ヒストンと結合しており、H1ヒストンは隣接するヌクレオソームをつなぐDNAを結合している。アセチル化、非アセチル化、又はリン酸化の様なヒストンの修飾により、局地クロマチン構造が修飾され、ヒストンの修飾は、複製、転写又はDNAの修復の様な、種々の核機能の制御において役割を果たしている。

10

【0007】

DSB後のヒストン修飾の一つの例は、セリン139上のヒストンH2Axのリン酸化である。セリン139上のリン酸化されたH2Axは通常ガンマH2Axと呼ばれる。H2AxはクロマチンのH2A群の約10%を占め、均一に分散している様に見える。もしDSBが起きた場合は、その後数分内にH2Axタンパク質はリン酸化されガンマH2Axを形成する。リン酸化はプロテインキナーゼ、（毛細血管拡張性運動失調症変異タンパク質（ATM））、DNA依存性プロテインキナーゼ（DNA-PK）、毛細血管拡張性運動失調及びRAD3関連タンパク質（ATR）（10-12）によって起きる。リン酸化はDSBの直近の領域で開始されそこから拡大するため、結果的にDSB自身から数メガ塩基対までのH2Ax分子がリン酸化される。病巣として検出され得る核複合体は、ガンマH2Ax、修復タンパク質及び細胞サイクルのためのチェックポイント制御タンパク質として機能するタンパク質を含むタンパク質複合体に関係する。

20

【0008】

DNA二重鎖切断は、パルスフィールドゲル電気泳動法、コメット解析、及びトンネル解析等の多くの方法を用いて数量化が可能である。しかし、これらの方法は全て比較的感度が低く、そのため一細胞あたり僅かしかDSBを判定することができない。コメット解析については、背景事象から信頼性を持って識別できるDSBの閾値は、約4 Gyの照射線量の場合である。この照射線量で約160のDNA DSBが測定される。

免疫化学的研究を通して、免疫蛍光を用いてガンマH2Ax病巣の測定によりDNA DSBの数量化が可能であることが示された（13）。この方法を用いて、重イオンによる照射及びイオン化された光子の照射後に検出可能な病巣の数は、DNA DSBの予想された数に比例し及び予想された位置にあることが分かる。DNA DSBを数量化するこの方法は十分な感度があり、そのためDNA DSBをマイクロGy範囲で測定することが可能である。免疫蛍光を用いてセリン139上のリン酸化されたヒストンH2Ax（ガンマH2Ax）の染色により病巣を数量化する方法は、イオン化放射の効果の後にDNA DSBの数を数量化するための比較的新しい、かつ感度の優れた方法である。

30

【0009】

ガンマH2Axを用いてDSBを検出する実験はその多くが、蛍光顕微鏡検査法を用いた免疫細胞化学の実験及び評価及び/又は解析を含む。このアプローチを通して、実験用の細胞株から得られる細胞に加えて、患者から採取したヒトの単核細胞が、イオン化放射に曝された後に試験された。しかし、蛍光顕微鏡検査法を用いてガンマH2Ax病巣を判定する方法は、未だ比較的時間を要する方法であり、そして使用者の好み及び技術装置での差異の影響を受け、一般的に主観的な解析方法である（14）。ガンマH2Ax病巣を検出するために、以前より唯一手動による顕微鏡検査のアプローチが採用されていた。

40

【0010】

知的ソフトウェアアルゴリズムを用いたガンマH2Ax病巣のパターン認識についての記述は現在のところ幾つかの学術的な研究に限定されている（14、15）。これらの研究はガンマH2Ax病巣の自動的な検出及び評価の可能性について示している。しかし、現在のところ商業的に用いることの出来る仕組みを用いてガンマH2Ax病巣を自動的に評価するためのアルゴリズムを適用したと言う例は見当たらない。細胞中の病巣（光の点）を数える必要があり（0から40）、そしてその結果は試験された極めて多数の細胞（1スライドに

50

ついて100細胞)について確認することが必要である。免疫蛍光スクリーニングにおける現在の進展について言えば、測定の標準化が可能な、個別に構成することの出来る、モジュール式の、柔軟なそしてコンパクトなシステムに向っている。AKLIDESの様な自動化された解釈システムは、高感度で、意味のある方法で蛍光信号を検出することの出来る蛍光、光学測定システムである。その様なシステムは、モータ駆動の逆蛍光顕微鏡、デジタルカメラ、モータ駆動のx yテーブル、及び評価及び解析のための好適なソフトウェアを備えたコンピュータを含む。ビーズ又は細胞構造の様な検出対象物は、標準化された方法によりデジタル画像処理アルゴリズムを用いて自動的に認識され記述することができる。

【0011】

これまでのところ、自動検出システムを用いてガンマH2Ax病巣のパターン認識が可能であるかについて満足すべき例又は報告がなされていない(16)。

10

【0012】

ガンマH2Ax病巣の自動的パターン認識における困難さは、その様な解析を通して起きる複雑な免疫蛍光パターンに加えて、細胞ベースアッセイの複雑な構造に関する。さらに、この方法の標準化において基本的な重要性を持つ校正(calibration)が明確にされていなかった。自動化された解釈システムを用いたH2Ax病巣の判定及び解析を可能にする適切な校正試薬・物質に対する強い要望が存在する。

ガンマH2Ax検出を校正する場合の技術上の問題は、信号を数量化するために用いられる免疫蛍光画像の多様性にある。特に重要な点は別々のガンマH2Ax病巣の間での重複及び間隔(layover)の存在がある。これらによる影響は数量化において重大な問題を起こす可能性がある。更に、ガンマH2Ax病巣を解析するために使用されるシステムの細胞ベースの試験の特性が種々ありまた異なることであり、これが手順の標準化に重大な課題をもたらす(17、18)。

20

自動化された微視的解釈システムは、解析システムの技術要素、例えば、校正剤(例えば、合成微小粒子)の様な通常フローサイトメトリーで使用される要素を用いて標準化することができる。

【0013】

その様な自動化標準に使用される知的アルゴリズムは、それが提供するガイドラインにより規定される(19-20)。自動的された、客観的な方法は、主観によって影響される要因を排除することによりその様な標準化に適している様に見える。この意味において、自己学習システムは最初の判断としては技術的に適しているように見える。しかし、より詳細に検討してみると、自己学習システムは、事実、ガンマH2Ax病巣の解析の標準化には適していないと思われる。自己学習ソフトウェア(特に既知のパターンを修飾することができ、また新しいパターンに関してユーザからインプットを得ることができるソフトウェア)を備えた装置を世界的に広めることは、各個々の実験機関の個々の分類上の成功例を向上させると思われる。しかし、現在の状況は、各個々の自己学習システムはお互いから遠ざかる方向に向っており、そのため学習プロセスは、システムにおいて提供される元のデータから一層更に離れる傾向にある(20, 21)。その結果は自己学習システムは、実験機関の間に共通の標準化を増進させることなく、局地的(その実験機関に特有の)な改善をもたらすことになる。

30

40

【0014】

したがって、ガンマH2Ax病巣の世界的な規模での分類標準は、方法を校正するために、例えば、微小粒子の様な標準化された解析参照試薬・物質を用いて、統計的に定義された方法によってのみ可能であり、その方法は自動化された光学的な解釈の基礎を提供するものである。

【発明の概要】

【0015】

標準化された試薬・物質及び方法を組み入れることにより、世界中の技術的状況が異なるにも拘わらず互いに両立することの可能な解析的プラットフォームを確立することができる。技術的状況の違いは顕微鏡についての違い、蛍光の生成方法の違い、又は蛍光病巣の検

50

出のための使用ソフトウェアの違いに係する。

【0016】

標準化されたアプローチは、これら違いを克服し最終的に生物サンプルにおいて正確な、信頼できる蛍光病巣の測定を可能にする。ひいては、これは発明のある面においては、例えば、DNA二重鎖切断の数の増大の様な、免疫蛍光病巣の修飾された数により示される疾病の様な、疾病の診断において診断の正確度の向上を可能とする。蛍光病巣の測定が疾病をマーカーにより示し、そして標準化されたアプローチが、その様なマーカーを調べるために大規模に適用される場合、解析及び診断の信頼性は大幅に増大する。更に、データが時間と共に集積され、以後の診断のために利用可能な大規模なデータセットとなる。標準化されたアプローチによってのみ、自動的された診断はその精確性が向上するが、そのためには、異なる顕微鏡の使用状況での数量化に信頼性を以て適用され、そしてその結果は同一の数量化された結果をもたらすことのできる、新しい方法を必要とする。現状では蛍光病巣の数を標準化された方法により評価するための信頼できるアプローチであって、本願明細書に記載された生物学的サンプルの解析に好適なものは、従来技術には見当たらない。

10

【0017】

従来技術に鑑み、本願発明の技術的解決課題は、免疫蛍光アッセイの手段により免疫蛍光病巣を客観的、自動的に判定するための方法を提供することである。この課題は独立請求項の特徴によって解決される。本願発明の好ましい実施の態様は従属請求項により提供される。

20

【0018】

したがって、本願発明の目的は、免疫蛍光アッセイの手段により細胞免疫蛍光病巣を自動的に判定する方法を提供することであり、以下を含む。

- a. 解析される細胞及び合成校正用粒子の混合物を提供し、その細胞及び粒子は固相に固定される；
- b. 合成校正用粒子を検出し、続いて合成校正用粒子の検出に基づき蛍光顕微鏡装置及び自動評価システムを校正し及び焦点調節をする；
- c. 前記混合物を細胞の標的基質に結合する一以上の抗体と共に培養する；
- d. 前記蛍光顕微鏡装置により前記基質に結合した抗体を検出する；及び
- e. 前記自動評価システムを用いて前記蛍光顕微鏡装置により生成される画像データから免疫蛍光病巣を判定する

30

本願発明は蛍光顕微鏡法に現れる全ての免疫蛍光病巣を自動的に判定するために使用することができる。好ましい実施の態様においては、本方法では、前記免疫蛍光病巣はガンマH2A x 病巣である。H2A x 病巣は、その細胞核内のサイズ及び他の視覚的及び物理的特徴から本願発明の方法による解析及び/又は判定に特に適している。H2A x 病巣のサイズより、核内のクラスター化した空間分布をする、潜在的に重複する病巣を考慮すると、数量化することが非常に困難となり得る。本願発明はこの問題を解決し、H2A x 病巣の信頼できる自動的な数量解析を可能とし、そしてその発明はこれまで知られて来た方法と比べ、驚くべきまた優れた特徴を持つものである。

【0019】

ある好ましい実施の態様においては、この方法では、前記合成校正用粒子は微小粒子であり、好ましくはその直径が1 - 100 μm である。粒子の直径1 - 100 μm の範囲には、その直径が約1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 又は100 μm の粒子を含み、またこの範囲の任意の数値のものを含む。しかし、粒子が前記顕微鏡システムの焦点調節及び校正に適している限り任意のサイズであって良い。この特定サイズ(直径1 - 100 μm)の粒子は、解析される病巣のサイズに関わらず、顕微鏡装置の適当な校正を可能にするため、驚くべき優位性を持つ。H2A x 病巣は、その病巣がより大きい又は小さいサイズである場合に加えて、このサイズの粒子により校正されたシステムを用いて高い信頼度で解析が可能である。

40

【0020】

50

ある実施の態様において、前記方法では、前記合成校正用粒子及び/又は抗体は、蛍光マーカーを用いて特にマークされていることに特徴がある。好ましい実施の態様においては、前記方法又はシステムが使用される前に、粒子は既に蛍光試薬によりマークを付されている。粒子はまた、蛍光によりマークされた抗体又は他のそのような手段を用いてマークを付されても良く、その場合粒子は校正のために検出されそして測定されうる。その各々の病巣が異なる蛍光マークを表しており、粒子又は病巣に対応する細胞基質に結合する個々の抗体は、もし必要ならば校正の前に固相表面上の細胞及び粒子と共に培養され (co-incubate) ても良い。形状、色彩又は反射特性のような粒子の物理的及び他の特徴は、また粒子の検出及び続く校正のために使用しても良く、顕微鏡装置の校正及び焦点調節が蛍光によるものでなく、むしろ、任意の好適な手段を用いた粒子の検出に基づくものであっても良い。

【0021】

好ましい実施の態様においては、前記方法において、前記抗体は、細胞の標的基質に結合する一以上の一次抗体であっても良く、及び蛍光マークされそして一次抗体に結合する一以上の二次抗体であっても良く、それによって結合された基質を免疫蛍光病巣として検出することが容易になるという特徴がある。

ある実施の態様において、前記方法では、前記細胞が、リンパ球、単球、及び/又はマクロファージの様な単核血球、線維芽細胞の様なインビトロ培養細胞、又は実験細胞株からの細胞から選択される。

血液又は本願明細書に記載の他の細胞から得られる細胞の解析によって、細胞が容易にかつ確実に及び迅速に解析のための固相に固着しうると言う予想しなかった有利な点があり、そのため、粒子と組み合わせられて解析される対象物は、固定された位置におかれ、確実な数量化が可能となる。

【0022】

好ましい実施の態様においては、前記方法においては、ステップb)の前記校正又はステップe)の前記判定には、更に、染色され又はマークされた細胞核の検出を介して、好ましくはDAPI染色細胞核の検出を介して、細胞を検出し及び位置を決めることを含む。

他の染色は、例えば、ヘキスト染色、または他のDNA結合性またはDNA識別試薬の様な、DNAを検出し、したがって、細胞核の位置を判定するために使用することができる。

【0023】

好ましい実施の態様においては、前記方法においては、前記判定は細胞あたりの病巣の数を判定することを含む。細胞あたりの病巣の計算は、最終的には他のデータセットとの比較を可能にする自動解析における情報を提供する。そのような数量化は、病巣数の数量的変化に関連付けられた任意の疾病の診断のために用いることができる。

【0024】

ある実施の態様においては、前記方法では、ステップe)の前記自動評価システムはソフトウェアとして実行可能な命令を格納するコンピュータ可読メモリを持つコンピュータ装置を含み、前記ソフトウェアは、コンピュータによって実行されたときは、オートフォーカス制御、自動化された画像取得、自動画像解析及び/又は自動化されたパターン認識の機能を実行するモジュールを含む。前記評価システムは、顕微鏡装置によって生成される画像データに基づいて病巣の解析及び病巣数の計算を可能にする。この評価と病巣数の決定を行うために、画像は自動的に個々の病巣の形状、サイズ、および強度について解析される。

【0025】

従って、病巣を同定するための規則は、評価システムのコンピュータ装置上で実行されるコンピュータプログラムにおいて実現される。

【0026】

ある実施の態様において、前記方法は、蛍光顕微鏡装置の焦点調節及び自動評価システムが顕微鏡画像の動的自動焦点化により行われる。

本発明はさらに、細胞および/または細胞集団におけるDNA二本鎖切断数の判定のために本

明細書に記載の方法の使用に関し、その場合ガンマH2AX病巣の数は、DNA二本鎖切断の数に比例する。上述したように、DNA損傷と言う文脈におけるH2AX形成の基礎をなす関係および生物学的機構が理解される。しかし、このような病巣の信頼性の高い自動化された数量化のための方法はまだ利用されるに至っていない。

【0027】

本発明は、さらに、細胞及び/又は細胞集団におけるDNA損傷を判定するための、本明細書に記載される方法の使用に関する。その場合、

- a. 試験細胞におけるガンマH2Ax病巣の数は、対照細胞におけるガンマH2AX病巣の数と比較され、及び
- b. 対照細胞と比較して試験細胞における細胞当たりのガンマH2Ax病巣の数が多いほど、試験細胞におけるDNA損傷が増大していることを示している。

10

【0028】

ある好ましい実施の態様においては、本明細書に記載の方法は、細胞及び/又は細胞集団をイオン化照射又は他の任意の種類放射線曝露、または任意の他のDNA損傷物質または処置への曝露についての判定のために適用される。

本明細書に記載された方法を用いて、細胞又は細胞集団で発生したDNAの損傷についての数量的な情報が得られ、それにより、例えば、本方法をがんまたはがんリスクのある患者を同定するための診断に適用する場合、原因となる疾患の仕組みについて、または疾患を識別するための機構についても識見を得ることができる。

DSB誘発の範囲を判定するためにガンマH2Ax検出法を用いることは、前がん細胞を検出すること、がんの進展段階の判断、がん治療の有効性をモニターすること及び新規な抗がん剤を開発するために役立つ。

20

【0029】

本発明はさらに、本明細書に記載の方法に従って、免疫蛍光アッセイの手段により免疫蛍光病巣を自動的に判定するシステムに関し、以下を含む：

- a. 解析されるべき細胞および合成校正用粒子の混合物であって、それらの細胞および粒子が固相に固着されること、
- b. カメラ、電動走査ステージおよびマルチチャンネル発光ダイオード(LED)を備えた蛍光顕微鏡を含む蛍光顕微鏡装置、及び
- c. ソフトウェアとして実行可能な命令を格納するコンピュータ可読メモリを持つコンピュータ装置、を含む自動評価システムであり、前記ソフトウェアはコンピュータによって実行されたときに、オートフォーカス制御、自動化された画像取得、自動画像解析及び/又は自動化されたパターン認識の機能を実行するモジュールを含み、その場合二つ以上のカラーチャンネルが解析され、それぞれは、合成校正用粒子または標的基質に関連した免疫蛍光病巣のいずれかに対応する。

30

【0030】

本発明のシステムは、特に本明細書に記載の方法を実施するために開発された。このシステムは、前記方法に直接かつ特異的に関連する構成要素を含み、したがって、単一性を有する発明を形成する。

前記システムの内容及び本明細書に記載の方法で適用される試薬・物質は従来技術に対して固有の貢献をするものであり、したがって、発明の単一性を有する。本発明はまた、明確に本発明の方法を実施するために開発されたキットにも関する。

40

【0031】

システムに関しては、前記キットは、本発明のために調製されたコンテンツ(例えば、粒子が固定されたスライド)を含み、従って、これは単一性を有する本発明の一面を表す。

したがって、本発明はさらに、本明細書に記載された方法に基づいて免疫蛍光アッセイの手段により免疫蛍光病巣の自動的な判定のための方法を実施するためのキットに関し、以下を含む：

- a. その上に解析されるべき細胞が固定されている固相の表面に固定された合成校正用粒

50

子を含む、1種以上の固相体

b. 好ましくは、二次抗体として使用するために、蛍光標識と結合した免疫グロブリン特異抗体を含む一以上の複合体、及び任意選択的に

c. 合成校正用粒子、一次抗体および/または二次抗体用の洗浄バッファ、カバースリップ、被覆媒体、および/または蛍光標識。

【発明の詳細な説明】

【0032】

合成校正用粒子が微小粒子、ビーズまたは任意の物質または材料の担体に関し、例えば、本発明の方法に適している当技術分野において知られているもの、たとえば微小粒子、天然または人工ポリマーの粒子またはビーズ、セファロース、セルロース、ガラス又は金属酸化物からなるビーズ等がある。校正用粒子は、蛍光マーカでマークされることが可能であるか、または追加の蛍光マーキングが必要とされないように、好ましくはすでに蛍光性がある。蛍光マーキングは、例えばGFPの様な蛍光タンパク質、又はローダミン、フルオレセイン又はその誘導体、例えば、FITC、TRITC、又は任意の種類の好適なフルオロフォアのような当技術分野で一般に知られているものを含むことができる。

検出すべき標的基質は、抗体結合および/または検出後に免疫蛍光病巣形成をもたらす細胞内および/または細胞上の空間分布の細胞構造に関する。

【0033】

したがって本発明の細胞性免疫蛍光病巣は、任意の直径または形状の免疫蛍光点として検出するに十分に区別される、任意の免疫蛍光画像対象物であり、それは、画像の背景から識別可能であることを特徴とする。また病巣の大きさ、形状、または他の視覚上の特徴は測定され、本発明の方法の解析のために組み込むことができる。

「自動化」という用語は、それによって、ある程度、好ましくは広範囲に、又は全くユーザの直接的な介入なしに、実行可能なプロセスを指し、そうすることによって、システムおよび/または方法が、ユーザの主観による影響を受けない様にする。

【0034】

免疫蛍光アッセイは、抗体結合または相互作用、又は抗体フラグメントまたは非抗体ペプチドの様な抗体様分子の、関心のある基質への結合及びそれによる蛍光に基づいた、続く相互作用の検出を含む任意のアッセイである。

【0035】

解析されるべき細胞および合成校正用粒子の混合物は、任意の割合の混合物であって良い。

校正用粒子の数は、顕微鏡がそれらを検出し、校正を実行し、そして焦点調節ができるような、十分な数のものであればよい。固相表面上に、細胞よりも多くの粒子が存在してもよいし又は粒子よりも細胞が多く存在してもよい。

用語「固定された」又は「不動化された」は、固相に細胞を結合又は付着させる任意の手段に関する。「固定する」は主として粒子と細胞の物理的な制約を指し、もし顕微鏡が固相の種々の領域にわたって様々な画像を取得する場合であっても信頼性の高い数量化を行うことができる。

【0036】

用語「固相」は、好ましくはスライドに関するが、粒子および細胞の解析のための表面を提供する任意の固相に関するものを含む。

ガラス又は合成材料の顕微鏡スライドを用いることができ、例えば、プラスチック又は任意のマイクロタイプレートまたは微小粒子及び細胞を固定する他のウエル様の構造を持つものを用いることができる。用語、固相、スライドまたは解析表面は、本出願においては相互交換可能に使用される。

【0037】

合成校正用粒子の「検出」は、それらのサイズ、形状、又は粒子の光や蛍光の強度の測定に関する。粒子の任意の特性は、その特性が本発明の顕微鏡装置を用いた検出を可能にする限り、検出およびその後の校正および焦点の調節のために使用することができる。

10

20

30

40

50

顕微鏡装置及び/又は評価システムの校正とは、最適な画像取得のために必要と見做される機器の状況についての必要な調整を指す。このような校正措置は、顕微鏡の技術分野の当業者には知られている。

【0038】

顕微鏡装置の焦点調節 (focusing) は鮮明な画像を得るために、当業者によって理解されるような焦点調節に関する。その一例は、以下の例において使用されるように、サンプルの微小粒子のデコンボリューション (deconvolution) を介して点広がり関数 (PSF) を計算するものであり、PSFは、続いて病巣の解析のために使用される。

蛍光顕微鏡装置及び自動評価システムは、典型的には、その技術的分野において通常使用される顕微鏡装置及び画像データの検出及び解析のためのソフトウェアベースのアルゴリズムを実行することができるコンピュータベースの評価システムである。以下に例を示す。

【0039】

図面

本発明はさらに図面に記載されている。これらの図面は本発明の範囲を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】校正用微小粒子を持つスライド上の固定照射後の細胞におけるガンマH2A x 病巣の免疫蛍光画像である。

【図2】標準化された微小粒子を用いた自動化されたガンマH2A x 測定の模式図である。

【図3】検出器で測定された蛍光強度の複雑な依存関係を考慮した微小粒子の強度測定の主要部である。

【図4】0と1 Gyの¹⁸⁸Reに曝露30分後のPC C13細胞株中のIR誘発性病巣のリン酸化ヒストンH2A x (ガンマH2A x 病巣) の免疫蛍光染色である。コントロール (パネルA-C) および1 Gyを照射した後の代表的な画像 (パネルD-F) の例である。写真は、60倍の倍率で自動化システムAKLIDESによって制作された。DAPI核染色 (A、D)、コントロールにおける背景ガンマH2A x 病巣 (B) と、照射された細胞のガンマH2A x 病巣 (E) 及び併合された蛍光画像 (C、F) である。パネルGは、デジタルカウント病巣 (ドット) の結果を含む捕獲された細胞 (丸) 画像を示す。

【図5】デジタルで記録されたデータ (AKLIDES) (セル当たり病巣の数平均 ± SD) により¹⁸⁸Reの種々の用量で照射されたPC C13細胞について得られた用量反応曲線である。

【実施例】

【0041】

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。これらは、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に記載された方法は、実施例で実証されるように本発明を実施するために使用したものである。それらは、さらに、実用的な例示として本発明を説明するために示すものであり、本発明を限定するための説明を意図するものではない。

実施例1：合成校正用粒子を用いた免疫蛍光アッセイにより免疫蛍光病巣を自動的に判定するための本明細書に記載された方法の提示

【0042】

スライド上の校正用微小粒子の不働化

アプリケーションスポットあたり10 µl/mのポリリシン (シグマ、5 µg/ml) でコーティングしたスライドガラスを湿ったインキュベーションチャンバー中で4時間培養した。PBSを用いてスライドから非結合ポリリシンをすすいで除去後、校正用微小粒子懸濁液 (アプリケーションスポットあたり6000校正用微小粒子) 10 µlを湿ったアプリケーションスポットにピペッティングした。この懸濁液は、その後、無菌フード下で乾燥させ、一晚スライド上で安静に置いた。

【0043】

10

20

30

40

50

末梢血単核細胞におけるDSBの検出のためのリンパ球懸濁液の調製

被験者の血液サンプルを2回反転した。凝固していない血液（比1:1）3mlを遠心分離管の分離膜上にピペットし、続いて、制動せずに室内温度で10分間、1000 × gで遠心分離した。単核血液細胞のバンド（band）を注意深く1000 μlのピペットを使用して取り込み、その後、新しい遠心管に移し、氷上に放置した

すべての続くステップは氷上で実施し、又は遠心分離は温度4 °Cで行った。単核血液細胞は、同容量のPBSと混合し、溶液を混合するために管を3~4回反転させた。続いて、混合物を10分間300 × g（1400 rpm）で遠心分離した。上清を、真空ポンプとピペットチップを用いて除去した。ペレットは、その後、9mlの蒸留水を用いて再懸濁し、室温で12秒間再インキュベートし、続いて1mlの冷たい10 × PBS緩衝液と混合した。全手順を二回繰り返した。

【0044】

不動化された校正用微小粒子による細胞のスライドへの固定

（カウンタチェンバーを介して）精製された細胞懸濁液中の細胞数を決定した後に150,000の細胞を不動化された校正微小粒子を含むスライドの各アプリケーションスポット上に播種した。細胞懸濁液の対応する容量が、オートクレーブ処理したガラス皿上にピペットで採られ、培養培地で必要な容量まで充填された。次いで混合懸濁液50 μlがスライドのアプリケーションスポットに移され、室温で1時間インキュベートされた。

【0045】

事前に放射性物質（例えば、¹⁸⁸Re-過レニウム酸）で処理された実験用細胞株から採られた、細胞の播種のための70,000の細胞が、アプリケーション・スポット毎に使用された。懸濁液の容量に従って提供後、スライド上の細胞を250 U/分で3分間遠心分離により沈降させた。細胞の固定は、室温で15分間、1%ホルムアルデヒドによって染色トレイで行われる。固定後、スライドを穏やかに振盪しながらPBS浴中で5分間3回洗浄する。可動化された細胞の透過処理のためにスライドを1%トリトン-X100/PBS溶液で5分間、3回インキュベートした。続いて、スライドをPBS浴中で穏やかに振盪させ、3回洗浄する。自由結合側面をブロックするため、スライドをインキュベーションチャンバーに入れ、その後乾燥させた。乾燥後、1%PBS-BSA溶液の25 μlを各アプリケーションスポットに塗布し、30分間インキュベートする。

【0046】

免疫蛍光染色

細胞で覆われたスライドをインキュベーションチャンバーに入れ、一次抗体25 μlを各アプリケーションスポット（1:1000のPBS/BSA1%で希釈）に塗布し、室温で1時間インキュベートする。続いて、スライドをPBS溶液の洗浄ボトルを使用して注意深く洗浄した後、穏やかに振盪しながらPBS中で5分間3回洗浄した。その後、蛍光標識を付された二次抗体（1:1000 PBS/BSAで希釈1%）25 μlをアプリケーションスポットにピペットし、覆う。スライドは、その後、室温で1時間インキュベートされる。スライドはインキュベーション後に再度洗浄される。AKLIDESシステムでのスライドの自動解釈のため、被覆媒体がすべてのアプリケーションスポットに適用され、カバースリップを慎重に取り付ける。画像例については、図1を参照願いたい。

【0047】

AKLIDESシステムを用いた、校正用微小粒子を介した細胞の自動化及び標準化された解釈

AKLIDESシステムの技術的な基礎は、電動逆蛍光顕微鏡IX81（Olympus、Japan）に関するものであり、それはAKLIDESソフトウェアにより完全に制御することができる。電動XYテーブル（IM120、Marzhauser、Wetzlar）、蛍光画像用高感度グレースケールカメラ（PS4、Kappa、Gleichen）および光源（LED）として制御可能な発光ダイオード（PrecisExcite、CoolLed、UK）を組み合わせて、蛍光テストのための自動化された撮影と処理が可能である。種々のスライドまたはプレートをサンプルキャリアとして使用することができ、スライドはマイクロタイタープレート（24、48、96、384、1532ウェル）に加えて、様々

10

20

30

40

50

なフォーマット（1、6、12、18ウェル）を含む。特別に開発されたソフトウェアは各コンポーネントの相互作用を制御し、自動集束及びテストの品質管理を行う。続いて、取り込まれた画像データは、測定中に、画像解析アルゴリズムを用いて直接評価される。異なるサイズの対物レンズ（1.25倍から60倍まで）及び高透過蛍光フィルター（350～700ナノメートルのスペクトル）を用いて、膨大な数のテストや蛍光対象物を解析しおよび/またはそれらを組み合わせることができる。

【0048】

自動化されたガンマH2Ax測定の模式図については、図2を参照願いたい。標準化されたサイズと明るさの微小粒子（単位：同等の溶解性の蛍光色素のMESF分子、ソース：Schwartz 2004）が焦点の測定の初めに使用される。

焦点調整用に使われる微小粒子は、使用される細胞株とは無関係である非常に高い焦点品質が要求される。アーティファクト（artefacts）は同定し、解析から容易に除去することができる。更に、検出波長の全光路が校正される。点広がり関数（PSF）は、サンプルの微小粒子の逆重畳積分（デコンボリューション）により計算され、続いてPSFがガンマH2Ax病巣の解析のために使用される。焦点面の外側の光は、PSFの知識によって算出することができるので、測定精度はこの校正工程を経て増大する。

【0049】

病巣の測定は、強度及びサイズ校正のために使用される粒子のある第2の検出チャンネルで起こる。図3は、検出の主要部および強度の計算を示す。微小粒子は、それらのサイズおよび形状の特性により検出され、微小粒子の強度はその中心から測定される。測定された病巣のサイズと強度を参照することによって、ガンマH2Ax病巣の標準化された解析がその準備中において直接に可能となる。このアプローチによって、種々の光学的検出方法及び光学的分解能（optical dissolution）は、本明細書に記載される校正用微小粒子を用いて比較することができる。

【0050】

実施例2：細胞中のDNA二本鎖切断の数を決定するため、DNA損傷を判定するための、または細胞及び/又は細胞集団の電離放射線または他の任意の放射線への放射線被曝を判定するための、本明細書に記載の方法を使用。

【0051】

放射線核種

^{188}Re -過レニウム（ ^{188}Re ）が40 GBqのアルミナベース188W/188Reの発生元（ジェネレータ）（ITG, Munchen, Germany）の溶出により得られた。 ^{188}Re の物理的特性は以下の通り：物理的半減期16.9時間、最大ベータエネルギー2.1 MeV、ガンマ放射155 keV（15%組成）。発生元（ジェネレータ）は、キャリアフリー ^{188}Re 約1.0 GBq/mlの活性濃度を達成するように0.9%食塩水5mlにより溶出された。

【0052】

細胞培養

甲状腺ラット細胞株PC C13（Clinical Cooperation Unit Nuclear Medicine, DKFZ, Heidelberg, Germany）は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）で利用可能なFRTL5細胞株のナトリウムヨウ素共輸送体（NIS）の正の亜系（サブライン）である。細胞は日常的に、ハム（Ham）のF12培地（GibcoInvitrogen GmbH, Darmstadt, Germany）中で接着単層として増殖され、更に5%ウシ胎児血清、インスリン（10 µg/ml）、ヒドロコルチゾン（10nM）、トランスフェリン（5 µg/ml）、ソマトスタチン（10 ng/ml）、グリシン-ヒスチジン-リシン（10 ng/ml）およびTSH（10 mU/ml）を補充した。指数関数的に増殖する細胞は、アキュターゼ（accutase）（PAA Laboratories GmbH, Colbe, Germany）を用いて日常的に3日ごとに分裂させた。培養物を空気雰囲気中、加湿5%CO₂中で37℃に維持した。培地は放射線の適用前にも2～3日毎に更新させた。

【0053】

照射実験

実験のために、 0.5×10^6 細胞/ウェルのアリコート、活性のない2ml/ウェル容量の標

10

20

30

40

50

準培地中に、6ウェル組織培養プレートに播種し、照射前の二日間事前培養した。NISによって媒介される活性放射線核種の搬送を阻害するために、細胞は、 ^{188}Re (23) の競合阻害剤として作用するナトリウム-過塩素酸塩 (NaClO_4) 0.4mMの最終濃度で事前培養された。10分間の NaClO_4 による培養後、 ^{188}Re 溶液を各線量点について1つのウェル用いて細胞に添加した。5.7-57 MBq/2m ^{188}Re の活性濃度であり、0.5-5 Gy細胞外投与に対応する線量を使用された(線量点カーネルを使用して計算)(23,24)。照射は、37 で1時間行った。 ^{188}Re による露光後、細胞をPBSで洗浄して、アキュターゼ(PAA Laboratories GmbH, Colbe, Germany)を添加して、回収した。得られた細胞懸濁液は、1.5mlの培地中に約 0.5×10^6 個の細胞を含んでいた。照射直後にガンマH2A x 病巣の評価のために細胞がさらに処理された。

10

【0054】

免疫組織化学及び病巣解析

免疫染色のために、照射された細胞は、250 rpmで、3分間Cyto-spin(Hettich Universal 30 RF, Hettich GmbH, Tuttlingen, Germany)によりスポットあたり約70,000細胞をガラススライド上に遠心分離した。その後、細胞を室温で15分間、4%ホルマリンで固定した。固定後、細胞を3回PBSで洗浄した。細胞膜を透過させるため、0.1%トリトンX100を添加し、5分間、3回インキュベートし、その後PBSで3回洗浄した。

【0055】

30分間、PBS (BSA/ PBS) 中で1%ウシ血清アルブミンで培養後、抗ホスホ-ヒストンH2A.X (Ser139)、クローンJBW301 (マウス、モノクローナルIgG1、Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) を1:800のBSA/PBSの希釈液中で、室温で1時間培養した。1:400の希釈でアレクサフルーア488 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) に共役結合させた抗マウスIgGは、3回の洗浄工程の後に暗室の中で1時間培養した。DNAを染色するために、4,6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) を、別の洗浄サイクル(3×PBS)後10分後に添加した。スライドを再度2回洗浄し、蛍光封入剤を載せた(Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany)。

20

【0056】

ガンマH2A x 病巣の自動化された解釈

ガンマH2A x 病巣のような免疫蛍光パターンを評価するための完全に自動化された解釈システムAKLIDESの考え方のベースは、パターン認識のための新規の数学的ソフトウェア・アルゴリズムに基づいている。

30

ガンマH2A x 病巣は、電動走査ステージ(IM120, Marzhauser, Germany)を備えた電動逆蛍光顕微鏡(Olympus IX81, Olympus, Japan)、400 nmおよび490 nmの発光ダイオード(LED) (PrecisExcite, CoolLED、UK) 及び電荷結合素子(CCD) グレースケールカメラ(DX4, Kappa, Germany)を用いて自動的に評価された。

【0057】

解釈システムは、装置、オートフォーカス制御、及びパターン認識アルゴリズムを備えた画像解析するためのモジュールよりなるAKLIDESソフトウェア(Medipan, Germany)により制御される。グレースケール遷移を通して対象物のHaralick画像特性評価に基づく新規のオートフォーカス技術は、焦点調節、品質評価及び対象物認識のために、蛍光色素としてのDAPまたは本発明の微小粒子のいずれかを使用した。AKLIDESシステムの走査アルゴリズムは、スライドウェルの位置を順次選択し、そしてDAPIチャンネルモードで細胞層に焦点を当てる。

40

【0058】

カメラ積分時間を再調整することにより、正常に露光された細胞核像を得ることが出来る。得られた画像は、その後、品質属性が評価される。アーティファクトの場合には、新たなサブウェルの位置が自動的に選択される。その後、検出された細胞の免疫蛍光が、3つのZ-層において捕えられる。各層の細胞の特徴及び特徴の組み合わせにより病巣の数の算出が可能となる(図2)。

【0059】

50

ガンマH2AX病巣の自動画像処理の技術的側面

自動画像取得プロセスが60倍対物レンズを用いてDAPI蛍光チャンネルで適切に行われた。広いz-ステップ(10ミクロン)を用いて粗焦点を合わせて、その後に狭いz-ステップ(0.5μm)による細かい焦点合わせにより、主焦点面の検出が可能となった。

【0060】

蛍光波長を変更するために、励起波長は、100ミリ秒の典型的なスイッチング時間を与えるデュアルバンドフィルターセットと組み合わせて切り替えられた。

画像の「オンザフライ」解析を重要視し、アルゴリズムは、性能、拡張性、解析の質によって選択した。

【0061】

アーティファクトを除去するために、追加の定性的画像解析が、画像コンテンツを等しいサイズのタイルに分割して、そしてその後タイルの鮮鋭度及び均一性を計算して実施された。オブジェクトのセグメント化は、ヒストグラムベースの閾値アルゴリズムによって行われ、続いて画像分離を行った。細胞集合体と大きく損傷した細胞の両方が、対象物の凸性を解析することによって除外された。セグメント化された核は、局所的、トポロジカル及びテクスチャ(texture)/表面の記述子によって特徴づけられた。ガンマH2AX病巣は、各細胞内の個々の病巣の数を数えることによって定量化した。個々の病巣の位置は、a) 8近傍画素より明るい画素、b) ある一つの画素から次の病巣までの最短距離(ピクセルサイズ:110nm)、およびc) 最小の輝度(細胞の明るさの平均値よりも明るい)により定義された。100細胞を含む最小10フィールドが各スライドで計数された。

0 Gyと1 Gy線量の¹⁸⁸Reに暴露された後の、ガンマH2AX病巣の染色とPC CL3細胞中のIR誘発性病巣の核染色による、免疫蛍光パターンの代表的な画像を図4に示す。

【0062】

もし必要なら、追加の品質評価のためにDAPIを蛍光染料として用いることができる(図4A、4D)。自動的に計数された病巣の結果を図4 Gと図5に示す。

図5から分かるように、核あたりの病巣の数が放射線量の増大に対応して増加している。

この効果は、蛍光病巣の数を手動(視覚)で評価することに加えて、本明細書に記載される自動化されたシステムで測定したときに観察された

これは、細胞におけるDNA二本鎖の切断数、DNAの損傷数又は細胞及び/又は細胞集団の放射線電離又は任意の放射線に対する曝露を判定するため本発明の自動化された方法およびシステムの有用性を実証している。

参照文献リスト

1. Olive PL, Banath JP: 「放射線感受性の尺度としてのヒストンH2AXのリン酸化」(Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity) *Int. J Radial Oncol Biol Phys* 2004, 58:331-335.
2. Banath JP, MacPhail SH, Olive PL: 「放射線感受性、H2AXのリン酸化、および照射された子宮頸がん細胞株におけるDNA鎖切断の修復の動態」(Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines) *Cancer Res* 2004, 64:7144-7149.
3. Banath JP, Fushiki M, Olive PL: 「電離放射線に曝露されたヒト白血球のDNA鎖および二本鎖切断の再結合」(Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation) *Int. J Radial Biol* 1998, 73:649-660.
4. Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A: 「DNAの二重鎖切断におけるヒストンH2Bのリン酸化」(Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks) *J Exp Med* 2004, 199:1671-1677.
5. Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A: 「H2AX病巣に焦点を当てる及びDNA損傷応答因子の漸増」(Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-dam

10

20

30

40

50

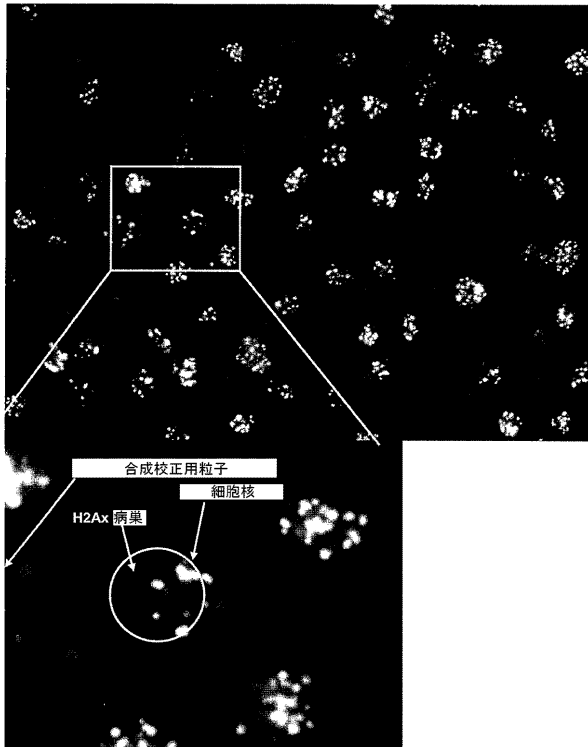
age response factors) Cell Cycle 2003, 2:426-427.

6. Foster HA, Bridger JM: 「ゲノムおよび核：進化によって作られる結婚。ゲノム組織と核アーキテクチャ」 (The genome and the nucleus: a marriage made by evolution)、Genome organisation and nuclear architecture. Chromosoma 2005, 114:212-229.
7. Frankenberg-Schwager M: 「in vitroでの電離放射線により、真核生物細胞において誘発されるDNA損傷の修復動態の検討」 (Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. Radiother Oncol 1989, 14:307-320.
8. Lohrich M, Kiefer J: 「放射線治療における重度の副作用の可能性の評価」 (Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy). Int J Cancer 2006, 118:2652-2656. 10
9. Rothkamm K, Lohrich M: 「放射線誘発のDNA二本鎖切断の誤修復及びその腫瘍形成および癌治療の関連性 (レビュー)」 (Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (review)). Int J Oncol 2002, 21:433-440.
10. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM: 「アポトーシス中のDNA断片化の開始は、セリン139でH2AXヒストンのリン酸化を誘導する」 (Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139). J Biol Chem 2000, 275:9390-9395.
11. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM: 「in vivoでのDNA二本鎖切断におけるメガベースクロマチンドメインの関与」 (Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo). J Cell Biol 1999, 146:905-916. 20
12. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM: 「DNA二本鎖切断はセリン139上のヒストンH2AXのリン酸化を誘発」 (DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139). J Biol Chem 1998, 273:5858-5868.
13. Klokov D, MacPhail SM, Banath JP, Byrne JP, Olive PL: 「単一及び分画され投与されたX線に曝露された腫瘍細胞および異種移植片における、リン酸化ヒストンH2AXの細胞生存の関係」 (Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays). Radiother Oncol 2006, 80:223-229. 30
14. Bocker W, Iliakis G: 「病巣の解析のための計算方法：ヒト細胞において放射線誘発のガンマ H2AX病巣検証」 (Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells). Radial Res 2006, 165:113-124.
15. Hou YN, Lavaf A, Huang D, Peters S, Huq R, Friedrich V, Rosenstein BS, Kao J: 「自動化されたガンマ-H2AXの免疫細胞化学アッセイの開発」 (Development of an automated gamma-H2AX immunocytochemistry assay). Radial Res 2009, 171:360-367.
16. Avondoglio D, Scott T, Kil WJ, Sproull M, Tofilon PJ, Camphausen K: 「ガンマ-H2AXのハイスループットの評価」 (High throughput evaluation of gamma-H2AX). Radial Oncol 2009, 4:31. 40
17. Costes SV, Boissiere A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH: 「ヒトの線維芽細胞における高および低LET放射線により誘発される病巣を区別する画像の特徴」 (Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts). Radial Res 2006, 165:505-515.
18. Lohrich M, Rief N, Kuhne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M: 「コンピュータ断層撮影検査後のインビボでのDNA二本鎖切断の形成および修復」 (In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations). Proc Natl Acad Sci U S A 2005, 102:8984-8989.
19. Hiemann R, Hilger N, Michel J, Nitschke J, Bohm A, Anderer U, Weigert M, Sac 50

- k U: 「HEp-2細胞の免疫蛍光パターンの自動解析」 (Automatic analysis of immunofluorescence patterns of HEp-2 cells). Ann N Y Acad Sci 2007, 1109:358-371.
20. Hiemann R, Buttner T, Krieger T, Roggenbuck D, Sack U, Conrad K: 「HEP-2細胞上の非臓器特異的自己抗体の自動スクリーニングおよびその分化のための課題」 (Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells). Autoimmun Rev 2009, 9:17-22.
21. Hiemann R, Hilger N, Sack U, Weigert M: 「自動化画像収集を最適化するための蛍光画像の客観品質評価」 (Objective quality evaluation of fluorescence images to optimize automatic image acquisition). Cytomet/3/A 2006, 69:182-184.

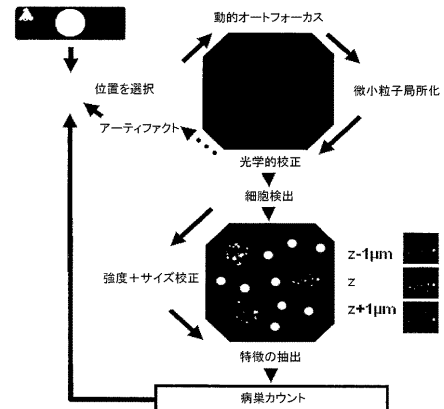
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

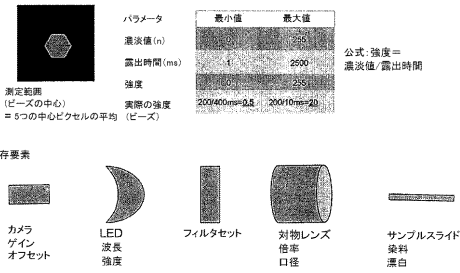
図 2



【 図 3 】

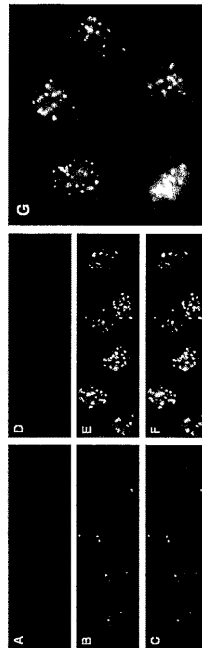
図 3

校正データ強度



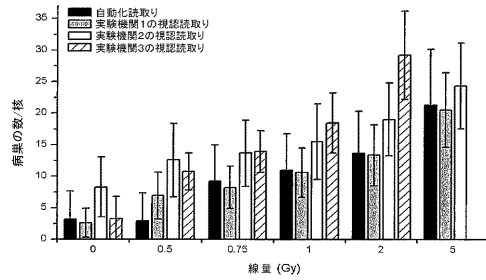
【 図 4 】

図 4



【 図 5 】

図 5



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/060499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 ADD.		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/049866 A1 (BUSHWAY PAUL [US] ET AL) 13 March 2003 (2003-03-13) abstract paragraphs [0003], [0004], [0007], [0025], [0050], [0060], [0065], [0068], [0071], [0074], [0082], [0083], [0088]; claim 42 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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 *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 8 February 2013		Date of mailing of the international search report 14/02/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Celler, Jakob

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/060499

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ERSOY ILKER ET AL: "Segmentation and classification of cell cycle phases in fluorescence imaging.", MEDICAL IMAGE COMPUTING AND COMPUTER-ASSISTED INTERVENTION : MICCAI ... INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEDICAL IMAGE COMPUTING AND COMPUTER-ASSISTED INTERVENTION 2009 LNKD- PUBMED:20426163, vol. 12, no. Pt 2, 2009, pages 617-624, XP019130506, abstract</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>PARVIN BAHRAM ET AL: "Iterative voting for inference of structural saliency and characterization of subcellular events.", IEEE TRANSACTIONS ON IMAGE PROCESSING : A PUBLICATION OF THE IEEE SIGNAL PROCESSING SOCIETY MAR 2007 LNKD- PUBMED:17357723, vol. 16, no. 3, March 2007 (2007-03), pages 615-623, XP002663742, ISSN: 1057-7149 abstract page 621; figure 13</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>DZYUBACHYK OLEH ET AL: "Automated analysis of time-lapse fluorescence microscopy images: from live cell images to intracellular foci.", BIOINFORMATICS (OXFORD, ENGLAND) 1 OCT 2010 LNKD- PUBMED:20702399, vol. 26, no. 19, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 2424-2430, XP002663743, ISSN: 1367-4811 abstract</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>QVARNSTRÖM OLOV FREDRIK ET AL: "DNA double strand break quantification in skin biopsies.", RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY : JOURNAL OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR THERAPEUTIC RADIOLOGY AND ONCOLOGY SEP 2004 LNKD- PUBMED:15450730, vol. 72, no. 3, September 2004 (2004-09), pages 311-317, XP002665266, ISSN: 0167-8140 abstract</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>ABE SCHWARTZ ET AL: "Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity", CYTOMETRY, vol. 57B, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 1-6, XP55030813, ISSN: 0196-4763, DOI: 10.1002/cyto.b.10066 abstract</p> <p>-----</p>	4-15
A	<p>abstract</p> <p>-----</p>	1-3

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/060499**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. 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:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. 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.:

4. 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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 060499

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2, 11, 12(completely); 1, 3-10, 13-15(partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 2

2. claims: 1, 3-10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 3

3. claims: 1, 4-10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 4

4. claims: 1, 5-10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 5

5. claims: 1, 6-10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 6

6. claims: 1, 7-10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 7

7. claims: 1, 8-10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 8

8. claims: 1, 9, 10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 9

9. claims: 1, 10, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 10

International Application No. PCT/ EP2012/ 060499

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. claims: 1, 13-15(all partially)

the subject matters of the above claims as characterised by
the constellation of technical features of claim 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/060499

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003049866	A1	13-03-2003	
		AU 2002364892 A1	30-06-2003
		CA 2459606 A1	26-06-2003
		EP 1438585 A1	21-07-2004
		EP 2051074 A1	22-04-2009
		JP 4213594 B2	21-01-2009
		JP 2005513440 A	12-05-2005
		US 2003049866 A1	13-03-2003
		US 2003124733 A1	03-07-2003
		US 2010069259 A1	18-03-2010
		US 2010081579 A1	01-04-2010
		WO 03052418 A1	26-06-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	A
G 0 1 N	33/483	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F
			G 0 1 N	33/483	C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 100169993

弁理士 今井 千裕

(72)発明者 ログゲンブック、ディルク

ドイツ連邦共和国、ストラウスベルク 1 5 3 4 4、フォンタンシュトラッセ 5

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA06 DA01 DA05 DA06 EA01 FA01 GA07 GB02
 HA01 JA03 KA02 LA03 NA01
 2G045 AA20 AA26 CB02 FA16 JA02
 4B029 AA07 BB11 CC02 CC03 CC08 FA01 FA02 FA15 GA08 GB06
 4B063 QA01 QA07 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QS03 QS33 QS39
 QX02

专利名称(译)	使用合成校准颗粒通过基于细胞的免疫荧光测定自动确定免疫荧光损伤的方法和系统		
公开(公告)号	JP2014524013A	公开(公告)日	2014-09-18
申请号	JP2014514018	申请日	2012-06-04
申请(专利权)人(译)	Medipan有限公司		
[标]发明人	ロッゲンブックデイルク		
发明人	ロッゲンブック、デイルク		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/574 G01N33/533 G01N33/48 C12Q1/04 C12M1/34 G01N33/483		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N33/5308 G01N33/54346		
FI分类号	G01N21/64.E G01N33/574.D G01N33/533 G01N33/48.P C12Q1/04 C12M1/34.A C12M1/34.F G01N33/483.C		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA06 2G043/DA01 2G043/DA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/GA07 2G043/GB02 2G043/HA01 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/LA03 2G043/NA01 2G045/AA20 2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/FA16 2G045/JA02 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA01 4B029/FA02 4B029/FA15 4B029/GA08 4B029/GB06 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	山崎 行造 赤松俊明 内藤忠雄 今井千寻		
优先权	2011168799 2011-06-06 EP		
其他公开文献	JP5894664B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过免疫荧光测定法自动测定细胞免疫荧光损伤的方法，以及使用合成校准颗粒以及实施本发明的系统和试剂盒。在优选的实施方式中，免疫荧光损伤是该方法中的 γ H2Ax损伤。点域1

Fig. 1

