

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6605506号
(P6605506)

(45) 発行日 令和1年11月13日(2019.11.13)

(24) 登録日 令和1年10月25日(2019.10.25)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N	33/574 (2006.01)	GO 1 N	33/574 A
GO 1 N	33/483 (2006.01)	GO 1 N	33/483 C
GO 1 N	33/48 (2006.01)	GO 1 N	33/48 P
GO 1 N	33/53 (2006.01)	GO 1 N	33/53 Y
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04

請求項の数 16 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2016-570181 (P2016-570181)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月20日 (2015.2.20)
 (65) 公表番号 特表2017-511488 (P2017-511488A)
 (43) 公表日 平成29年4月20日 (2017.4.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053643
 (87) 国際公開番号 W02015/124737
 (87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015.8.27)
 審査請求日 平成30年2月6日 (2018.2.6)
 (31) 優先権主張番号 61/943,939
 (32) 優先日 平成26年2月24日 (2014.2.24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(73) 特許権者 511286517
 ヴェンタナ メディカル システムズ,
 インク.
 アメリカ合衆国 アリゾナ 85755,
 ツーソン, イースト イノベーション
 パーク ドライブ 1910
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 セバスチャン, ノエミ
 アメリカ合衆国 アリゾナ 85718,
 ツーソン, ノース マウンテン シャ
 ドーズ 7318

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD3、CD8、CD20及びFoxP3の同時検出によりがんに対する免疫応答をスコア化するための方法、キット、及びシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織浸潤リンパ球を使用するがんにおける免疫応答をスコア化するための方法であって、
 サンプルをCD3、CD8、CD20、及びFoxP3特異的結合成分と接触させる工程と、
 前記サンプルから過剰の特異的結合成分を除去する工程と、
 前記特異的結合成分を検出する工程と、
 前記サンプル内の前記特異的結合成分について存在と分布を評価する工程と、
 前記特異的結合成分の存在と分布を解析することによって組織浸潤リンパ球を使用して
 がんをスコア化する工程と
 を含む、方法。

【請求項2】

組織浸潤リンパ球を使用するがんにおける免疫応答をスコア化することを補助するための方法であって、
 サンプルをCD3、CD8、CD20、及びFoxP3特異的結合成分と接触させる工程と、
 前記サンプルから過剰の特異的結合成分を除去する工程と、
 前記特異的結合成分を検出する工程と、
 前記サンプル内の前記特異的結合成分について存在と分布を評価する工程と、

前記特異的結合成分の存在と分布を解析することによって組織浸潤リンパ球を使用してがんをスコア化する工程とを含む、方法。

【請求項 3】

前記サンプルを腫瘍マーカーに対する特異的結合成分と接触させる工程を更に含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記腫瘍マーカーに対する前記特異的結合成分が、上皮性腫瘍（癌腫）のためのサイトケラチンに対する抗体とメラノーマのための S 1 0 0 に対する抗体から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

C D 3 に対する前記特異的結合成分が抗 C D 3 ウサギ又はマウスモノクローナル抗体である、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

C D 8 に対する前記特異的結合成分が抗 C D 8 ウサギ又はマウスモノクローナル抗体である、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

C D 2 0 に対する前記特異的結合成分が抗 C D 2 0 ウサギ又はマウスモノクローナル抗体である、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

F o x P 3 に対する前記特異的結合成分が抗 F o x P 3 ウサギ又はマウスモノクローナル抗体である、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

サンプルを C D 3、C D 8、C D 2 0、及び F o x P 3 特異的結合成分と接触させる工程が、前記サンプルを、ウサギ又はマウスモノクローナル抗体から選択される C D 3、C D 8、C D 2 0、及び F o x P 3 特異的結合成分と接触させることを含む、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

検出する工程が、前記サンプルを、前記ウサギ又はマウスモノクローナル抗体に特異的な抗種抗体(anti-species antibody)と接触させることを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記抗種抗体がハプテン化された請求項 1 0 に記載の方法、あるいは前記特異的結合成分がハプテン化され、該ハプテン化された抗体又は前記特異的結合成分を検出する工程が、前記サンプルを、酵素にコンジュゲートされた抗ハプテン抗体と接触させる工程を更に含む請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

検出する工程が前記サンプルを検出化合物と接触させる工程を更に含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記検出化合物が色原体又はフルオロフォアから選択される、請求項 1 2 に記載の方法

【請求項 1 4】

複数の容器に収容された、

C D 3 特異的結合成分と C D 3 検出試薬、

C D 8 特異的結合成分と C D 8 検出試薬、

C D 2 0 特異的結合成分と C D 2 0 検出試薬、

F o x P 3 特異的結合成分と F o x P 3 検出試薬と、

組織サンプル内の C D 3、C D 8、C D 2 0、及び F o x P 3 を検出し、該組織上の前記検出試薬の存在と分布に基づいてスコア化することを記載しているスコア化の指示書とを含む、請求項 1 に記載の方法のためのキット。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

ガラススライド上に配された組織サンプルを調べることによりがんをスコア化するためのシステムにおいて、

CD3 特異的結合成分、CD3 検出試薬、CD8 特異的結合成分、CD8 検出試薬、CD20 特異的結合成分、CD20 検出試薬、FoxP3 特異的結合成分、及びFoxP3 検出試薬を含む試薬、

自動染色装置、及び

画像装置

を含み、

前記自動染色装置が、CD3、CD8、CD20、及びFoxP3の存在と分布が特異的に決定されるような形で前記スライド上に前記試薬を送達するように構成され、前記画像装置が、CD3、CD8、CD20、及びFoxP3の存在と分布がスコアを作成するために使用できるように構成されている、システム。

10

【請求項 16】

多重アッセイで染色されている単一の組織検体中の細胞の型の数を計数するためのコンピュータ実装方法であって、

リンパ球マーカーCD3、CD8、CD20、FoxP3と腫瘍検出マーカーを含む、多重アッセイで染色されている前記単一の組織検体を画像化する工程、

多重アッセイで染色されている単一の組織検体の画像を前記多重アッセイの各マーカーに対する別個の画像チャンネル中にアンミキシングする工程、

20

各チャンネル内の強度情報に基づいて各画像チャンネル内の対象の領域を特定する工程であって、各チャンネル内の低強度の領域が除去され、高強度の領域が細胞シグナルを表す工程、

単一のサロゲート画像を作成する工程であって、サロゲート画像が全リンパ球マーカーの画像チャンネル情報の組合せである工程、

細胞検出アルゴリズムを適用する工程であって、該細胞検出アルゴリズムが膜発見アルゴリズム又は核発見アルゴリズムである工程、

各画像チャンネル又は結合チャンネルの画像、あるいはグレースケール又は吸光度画像等の変換画像、あるいはサロゲート画像におけるリンパ球及びリンパ球の組合せの特徴を特定する工程、

30

既知のリンパ球及びリンパ球の組合せの特徴に基づいて分類アルゴリズムをトレーニングする工程、

検出細胞を擬陽性細胞、CD3 オンリーT細胞、CD3 及びCD8 T細胞、FoxP3 T細胞の少なくとも一つ、及びCD20 B細胞として検出細胞を分類するように特定された、各画像チャンネル又は結合チャンネルの画像、あるいはグレースケール又は吸光度画像等の変換画像、あるいはサロゲート画像におけるリンパ球及びリンパ球の組合せの特徴に、トレーニングされたアルゴリズムを適用する工程、

分類された細胞のそれぞれの異なった型の数を計数する工程、

前記組織検体にスコアをつける工程であって、スコアが計数された各細胞型の数に基づく工程、

40

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この開示は、組織浸潤リンパ球(TIL)の検査によってがんに対する免疫応答をスコア化するための方法、キット、及びシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

組織学検体のような生物学的サンプルは、明視野照明を使用して光学顕微鏡により組織病理学的に検査することができる一方；分子病理学は、疾患に関連する生体分子の、分子

50

レベルでの検査である。病理組織学的検査から、患者の診断、予後、及び治療選択肢に関する重要な情報を明らかにすることができる。病理学者は、組織病理学的アーキテクチャ、組織形態、及び/又は特定の生体分子（例えば、核酸又はタンパク質）の検出に関連するシグナルを研究する。現在利用可能な多くのアッセイは、タンパク質（すなわち、免疫組織化学（IHC））、核酸（すなわち、インサイツハイブリダイゼーション（ISH））、糖（すなわち、組織化学（HC））、及び酵素（すなわち、酵素組織化学（EHC））を検出し、及び/又は定量する。

【0003】

様々な由来や様々な患者からのヒト固形腫瘍における不定量の免疫浸潤物の存在が以前から証明されているが、これらの成分の予後の重要性は未だ完全には理解されていない。21世紀の変わり目から今までに転換があり、免疫と炎症ががんの顕著な特徴であると考えられている。つまり、刊行されたデータを考慮すると、局所炎症ががんの発生に強く影響を与えることが知られている。一例では、急性の局所炎症の形成は、BCGによる表在性膀胱がんのアジュバント療法に使用されている。このアプローチは、今や、この悪性腫瘍に対する最先端の技術である。対照的に、慢性炎症は、多くの腫瘍（頭頸部、胃、結腸直腸等々）のアウトカム及び進行に影響を与えることが理解される。同様に、免疫不全は、ネガティブな予後指標として見られている。

10

【0004】

しかしながら、従来技術に鑑みると、多重IHCスライドのセット画像又は蛍光染色スライドの画像から免疫スコアを自動計算するための画像解析システムが望ましい。

20

【発明の概要】

【0005】

組織浸潤リンパ球（TIL）の検査によってがんをスコア化するための方法、キット、及びシステムが開示され、そこでは、CD3、CD8、CD20、及びFoxP3のパネルが、高リスクのメラノーマ、結腸直腸がん、及び乳がんを含む多くのがんに対する予後マーカーとして有用であることが見出された。

【0006】

腫瘍微小環境に浸潤する免疫細胞（TIL）は腫瘍の進行を制限し又は促進しうる。原発腫瘍内のTILの数、種類及び位置が予後の役割を有しうることを示す証拠が増えている。これらの知見が、組織中の免疫コンテキストから導出され、特定のリンパ球集団の同定と評価に基づく潜在的な新スコア化システムの開発につながった。CD3、CD8、CD20、及びFOX P3の潜在的な予後の重要性を、広く利用できる標準化された技術を利用するであろうメラノーマ患者のための「イムノスコア（Immunoscore）」として探求した。

30

【0007】

ヒト腫瘍の増殖及び再発の制御における適応免疫応答の役割が広く研究されている。遺伝子発現プロファイリングとインサイツ免疫組織化学的染色によるがんにおける腫瘍浸潤性免疫細胞の特徴付けが示されている。しかしながら、集合的に、免疫学的データ（腫瘍サンプル内の免疫細胞のタイプ、密度、及び位置）は、例えば、結腸直腸がんをステージ分類するために現在使用されている組織病理学的方法よりも患者の生存の良好な予測因子であることが見出された。その結果は、二つの更なる患者集団において検証された。これらのデータは、適応免疫応答がヒト腫瘍の挙動に影響を与えるという仮説を裏付ける。よって、腫瘍浸潤性免疫細胞のインサイツ分析は、結腸直腸がんとおそらくは他の悪性腫瘍の治療における貴重な予後ツールでありうる。

40

【0008】

腫瘍の自然経過は、「インサイツ」増殖、浸潤、血管外漏出及び転移の段階を含んでいる。これらの段階中、腫瘍細胞は、それらの微小環境と相互作用し、間質、内皮細胞、炎症及び免疫細胞から入ってくるシグナルによって影響される。実際、腫瘍はしばしば、様々な数のリンパ球、マクロファージ又はマスト細胞によって浸潤される。後者は慢性炎症を維持し腫瘍増殖を促進する因子を産生する一方、リンパ球は、マウスモデルにおいて証

50

明されているように、がんのアウトカムを制御しようとして一般に信じられている。この研究において、我々は、ヒト腫瘍の大規模コホートからのデータを分析し、特にTh1及び細胞毒性タイプのメモリーT細胞による原発腫瘍の浸潤が、疾患からの解放の面で最強の予後因子であり、臨床疾患の全ての段階で全生存期間であることを明確に樹立する。我々は、腫瘍に隣接し、成熟樹状細胞（胚中心として組織化されたT細胞及びB細胞）からなる三次リンパ構造が、抗腫瘍反応の部位でありうることを示唆しているデータをレビューする。我々は、腫瘍のリンパ節転移のステージ分類に加えて、無病生存期間を予測し、早期ヒトがんにおけるアジュバント療法に関する決定を支援するために、新たな予後因子としてリンパ球浸潤物のタイプ、密度及び位置に基づいての免疫スコアリングを提案する。

【0009】

10

満たされていない医療上の必要性は、患者の免疫応答の測定値に基づくものではない、節浸潤を伴うどのメラノーマ患者が転移に進行するかを決定する能力である。実務の現在の標準は、これらの患者を監視し、モニターするか、又は過酷なインターフェロン治療で患者を治療するかの何れかである。

【0010】

多重IHCスライドは、複数のスライドでの単一のバイオマーカー標識とは異なり、組織切片中の複数のバイオマーカーを同時に同定するという潜在的な利点を有している。多重IHCスライドのスライド解釈プロセスで病理医を支援するために、デジタル病理が、T細胞とB細胞の異なる型のような、免疫細胞に対するバイオマーカーを視覚的に分離し定量的にスコア化するのに役立つ。次の文献は、組織を評価し及び/又はスコア化する

20

ための方法を開示しているが、多重スライドには十分ではない：Manual tumor microenvironment assessment with CD3, CD8, CD45RO and FoxP3: Paolo Ascierto, "The Medical Need for an Immune Scoring/Profiling for Melanoma and Other Cancer Patients," Invited talk, Tucson Symposium, Mar 12-13, Tucson, AZ, 2013; Manual/semi-automatic CD3/CD8 counting: Galon J Costes A Sanchez-Cabo F Kirilovsky A Mlecnik B Lagorce-Pages C Tosolini M Camus M Berger A Wind P Zinzindohoue F Bruneval P Cugnenc PH Trajanoski Z Fridman WH Pages F "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome," Science 29;313(5795):1960-4, 2006; Flow cytometry counting of CD8 and FoxP3: F. Stephen Hodi, "Recent Advances in Combinatorial Therapies," Invited talk, Tucson Symposium, Mar 12-13, Tucson, AZ, 2013; Immune scoring from H&E: Sherene Loi, Nicolas Sirtaine, Fanny Piette, Roberto Salgado, Giuseppe Viale, Françoise Van Eenoo, Ghizlane Rouas, Prudence Francis, John P.A. Crown, Erika Hitre, Evandro de Azambuja, Emmanuel Quinaux, Angelo Di Leo, Stefan Michiels, Martine J. Piccart, and Christos Sotiropoulos, "Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98," Journal of Clinical Oncology 31(7), pp 860-867, 2013.

30

技術的なハードルは一つのスライド上の免疫細胞応答を定量し、必要な免疫マーカーを組み込むことであった。がんに対する患者の現在の免疫応答の状況を十分に理解するためには、腫瘍マーカー、B細胞、全T細胞、細胞傷害性T細胞、及び調節性T細胞集団が全て一緒に見られるべきであり、スコア化と解釈は、臨床的概念として現実的に機能するためには自動化され測定可能でなければならない。

40

【0011】

幾つかのマーカーを多重化する方法はあるが、我々の知る限り、アッセイにこれら5つのマーカーを組み入れ、この特定の医学的必要性に取り組み、デジタルアルゴリズムを含むアッセイは研究域又は商業域の何れにおいても提示されていない。

【0012】

我々は、研究プロトタイプ of 多重化アッセイと、臨床、生物学、及び統計の入力に基づく対応するデジタルスコア化アルゴリズムを開発した。我々のアッセイは、一つの腫瘍マ

50

ーカー、並びに4つの免疫マーカーを含む。

【0013】

まとめると、免疫学的データ（腫瘍サンプル内の免疫細胞の型、密度、及び位置）は、がんのステージ分類に現在使用されている組織病理学的方法よりも良好な患者の生存の予測因子であることが見出された。結腸直腸がんでは、その結果は2つの患者集団において検証された。このデータは、適応免疫応答がヒト腫瘍の挙動に影響を与えるという仮説を裏付ける。従って、腫瘍浸潤免疫細胞のインサイト分析は、結腸直腸がん及び他の悪性腫瘍の治療における価値のある予後ツールでありうる。

【0014】

多重IHCスライド及び/又は蛍光染色スライドのセット画像から免疫スコアを自動的に計算する画像解析アルゴリズム及び/又はシステムが開発された。該画像解析アルゴリズムは、多重アッセイで染色されている単一の組織検体中の細胞の型の数を計数するためのコンピュータ実装方法であって、リンパ球マーカーCD3、CD8、CD20、FoxP3と腫瘍検出マーカーを含む、多重アッセイで染色されている前記単一の組織検体を画像化する工程；多重アッセイで染色されている単一の組織検体の画像を前記多重アッセイの各マーカーに対する別個の画像チャンネル中にアンミキシングする工程；各チャンネル内の強度情報に基づいて各画像チャンネル内の対象の領域を特定する工程であって、各チャンネル内の低強度の領域が除去され、高強度の領域が細胞シグナルを表す工程；単一のサロゲート画像を作成する工程であって、サロゲート画像が全リンパ球マーカーの画像チャンネル情報の組合せである工程；細胞検出アルゴリズムを適用する工程であって、該細胞検出アルゴリズムが膜発見アルゴリズム又は核発見アルゴリズムである工程；各画像チャンネル又は結合チャンネルの画像、あるいはグレースケール又は吸光度画像等の変換画像、あるいはサロゲート画像におけるリンパ球及びリンパ球の組合せの特徴を特定する工程；既知のリンパ球及びリンパ球の組合せの特徴に基づいて分類アルゴリズムをトレーニングする工程；検出細胞を擬陽性細胞、CD3オンリーT細胞、CD3及びCD8 T細胞、FP3 T細胞の少なくとも一つ、及びCD20 B細胞として検出細胞を分類するように特定された、各画像チャンネル又は結合チャンネルの画像、あるいはグレースケール又は吸光度画像等の変換画像、あるいはサロゲート画像におけるリンパ球及びリンパ球の組合せの特徴に、トレーニングされたアルゴリズムを適用する工程；分類された細胞のそれぞれの異なった型の数を計数する工程；前記組織検体にスコアをつける工程であって、スコアが計数された各細胞型の数に基づく工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1(A)-(B)は、(A)20倍対物レンズ及び(B)40倍対物レンズで撮影された原発性メラノーマ組織(A)及び(B)の顕微鏡写真であり、暗褐色で検出されたFoxP3(図1(B)において「DB」と標記された矢印で例示的に示される)、暗灰色/黒色で検出されたCD8(図1(B)において「DGB」と標記された矢印で例示的に示される)、青色で検出されたCD3(図1(B)において「B」と標記された矢印で例示的に示される)、赤/赤紫色で検出されたCD20(図1(B)において「RM」と標記された矢印で例示的に示される)及び緑色で検出されたS100(図1(A)において「G」と標記された矢印で例示的に示される)を伴う5重染色を示し、(B)は原発腫瘍の左側に見ることができるリンパ球細胞に焦点を当てている。

【0016】

【図2】図2(A)-(B)は、(A)20倍対物レンズ及び(B)40倍対物レンズで撮影された結腸がん組織(A)及び(B)の顕微鏡写真であり、暗褐色で検出されたFoxP3(図2(B)において「DB」と標記された矢印で例示的に示される)、暗灰色/黒色で検出されたCD8(図2(B)において「DGB」と標記された矢印で例示的に示される)、青色で検出されたCD3(図2(B)において「B」と標記された矢印で例示的に示される)、赤/赤紫色で検出されたCD20(図2(B)において「RM」と標記された矢印で例示的に示される)及び緑色で検出されたサイトケラチン(OSCAR)(

10

20

30

40

50

図 2 (B) において「 G 」と標記された矢印で例示的に示される)を伴う 5 重染色を示す。

【 0 0 1 7 】

【図 3】図 3 は舌がん組織の顕微鏡写真であり、暗褐色で検出された F o x P 3 (「 D B 」と標記された矢印で例示的に示される)、暗灰色 / 黒色で検出された C D 8 (「 D G B 」と標記された矢印で例示的に示される)、青色で検出された C D 3 (「 B 」と標記された矢印で例示的に示される)、赤 / 赤紫色で検出された C D 2 0 (「 R M 」と標記された矢印で例示的に示される)及び緑色で検出されたサイトケラチン (O S C A R) (「 G 」と標記された矢印で例示的に示される)を伴う 5 重染色を示す。

【 0 0 1 8 】

【図 4】図 4 は 2 0 倍対物レンズで撮られた肺腺がん組織の顕微鏡写真であり、暗褐色で検出された F o x P 3 (「 D B 」と標記された矢印で例示的に示される)、暗灰色 / 黒色で検出された C D 8 (「 D G B 」と標記された矢印で例示的に示される)、青色で検出された C D 3 (「 B 」と標記された矢印で例示的に示される)、赤 / 赤紫色で検出された C D 2 0 (「 R M 」と標記された矢印で例示的に示される)及び緑色で検出されたサイトケラチン (O S C A R) (「 G 」と標記された矢印で例示的に示される)を伴う 5 重染色を示す。

【 0 0 1 9 】

【図 5】図 5 は、サイトケラチン腫瘍マーカー (黄色) (「 Y 」と標記された矢印で例示的に示される)及び浸潤 C D 8 + 細胞傷害性 T 細胞 (緑色) (「 G 」と標記された矢印で例示的に示される)に対する抗体で染色された卵巣腺がん組織 (5 重)の顕微鏡写真 (2 0 倍対物レンズ)であり、 C D 8 細胞が如何にして腫瘍全体に浸潤したかを更に示している。

【 0 0 2 0 】

【図 6】図 6 は、増殖マーカー K i - 6 7 (緑色) (「 G 」と標記された矢印で例示的に示される)、 C D 8 + T 細胞 (紫色) (「 P 」と標記された矢印で例示的に示される)、及び C D 3 + T 細胞 (黄色) (「 Y 」と標記された矢印で例示的に示される)に対する抗体で染色された正常な扁桃腺組織の顕微鏡写真である。この画像は、 C D 8 及び C D 3 細胞を伴う胚中心における K i - 6 7 + 細胞の局在化を確認するもので、 F o x P 3 は暗褐色で検出され、 C D 8 は周囲の外殻帯で検出された。倍率 × 2 0 0 。

【 0 0 2 1 】

【図 7】図 7 は、乳がん組織の顕微鏡写真 (2 0 倍対物レンズ)で、紫色で腫瘍 (「 P 」と標記された矢印で例示的に示される)、緑色で浸潤 C D 8 + 細胞 (「 G 」と標記された矢印で例示的に示される)、及び青色で C D 6 8 + マクロファージ (「 B 」と標記された矢印で例示的に示される)、及び赤色で検出された C D 2 0 (「 R 」と標記された矢印で例示的に示される)を示している。

【 0 0 2 2 】

【図 8】図 8 (A) - (D) は、(A) 図 7 と同様の顕微鏡写真で、(B) 及び (D) ではその成分色にアンミキシングされ、(C) では再結合され、疑似色化されている。

【 0 0 2 3 】

【図 9】図 9 は、本開示に従ったスコア化アルゴリズムのワークフローを示す概略図である。

【 0 0 2 4 】

【図 1 0】図 1 0 は、本発明に従ったスコア化アルゴリズムの実行例を示す概略図である。

【 0 0 2 5 】

【図 1 1】図 1 1 (A) - (B) は、本発明によるフィルタバンク (A) とリング検出器 (B) を示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 6 】

10

20

30

40

50

患者の免疫応答の測定値に基づくものではない、節浸潤を伴うどのメラノーマ患者が転移に進行するかを決定する能力を開発する満たされていない医療上の必要性がある。実務の現在の標準は、これらの患者を監視し、モニターするか、又は過酷なインターフェロン治療で患者を治療するかの何れかである。

【 0 0 2 7 】

技術的なハードルは一つのスライド上の免疫細胞応答を定量し、必要な免疫マーカーを組み込むことであった。がんに対する患者の現在の免疫応答の状況を十分に理解するためには、腫瘍マーカー、B細胞、全T細胞、細胞傷害性T細胞、及び調節性T細胞集団が全て一緒に見られるべきであり、スコア化と解釈は、臨床的概念として現実的に機能するためには自動化され測定可能でなければならない。

10

【 0 0 2 8 】

幾つかのマーカーを多重化する方法はあるが、我々の知る限り、アッセイにこれら5つのマーカーを組み入れ、この特定の医学的必要性に取り組み、デジタルアルゴリズムを含むアッセイは研究空間又は商業空間の何れにおいても提示されていない。我々のアッセイは、一つの腫瘍マーカー、並びに4つの免疫マーカーを含む。

【 0 0 2 9 】

多重アッセイは、画像解析アルゴリズムと共に、乳がん及び/又はメラノーマの免疫スコア計算のためのツールキットを潜在的に提供する。コンピュータによって作成される最終レポートは、患者の個人的な免疫応答の臨床分析を裏付け、更なる治療を補助するために使用されうるが、更なる研究がこの仮説を実証するために必要とされる。

20

【 0 0 3 0 】

T I L

腫瘍微小環境に浸潤する免疫細胞(T I L)は腫瘍の進行を制限し又は促進しうる。原発腫瘍内のT I Lの数、種類及び位置が予後の役割を有しうることを示す証拠が増えている。これらの知見が、組織中の免疫コンテキストから導出され、特定のリンパ球集団の同定と評価に基づく潜在的な新スコア化システムの開発につながった。我々は、C D 3、C D 8、C D 2 0、及びF O X P 3の潜在的な予後の重要性を、広く利用できる標準化された技術を利用するであろうメラノーマ患者のための「イムノスコア(Immunoscore)」として探求した。

【 0 0 3 1 】

我々は、研究プロトタイプ of 多重化アッセイと、臨床、生物学、及び統計の入力に基づく対応するデジタルスコア化アルゴリズムを開発した。

30

【 0 0 3 2 】

多重I H Cスライドは、複数のスライドでの単一のバイオマーカー標識とは異なり、組織切片中の複数のバイオマーカーを同時に同定するという潜在的な利点を有しており、それによって組織の一小片内でより多くの情報を実証する。この目的を念頭において、多重アッセイが、他の腫瘍型と共に、乳がん及びメラノーマに罹患している患者に対して免疫スコアを提供するように開発された。スライド解釈プロセスで病理医を支援するために、デジタル病理が、異なる型のT I Lのような、免疫細胞に対するバイオマーカーを視覚的に分離し定量的にスコア化するのに役立つ。

40

【 0 0 3 3 】

C D 3

C D 3は、一般にT細胞のための「ユニバーサルマーカー」である。更なる分析(染色)が、T細胞の型、例えば調節性又は細胞傷害性T細胞を特定するためになされなければならない。C D 3 + T細胞数の分析は、免疫応答の良好な指標である。

【 0 0 3 4 】

C D 8

C D 8は、細胞傷害性Tリンパ球の特異的マーカーである。これらは、腫瘍細胞を実際に「殺す」エフェクター細胞である。それらは直接の接触によって作用して、腫瘍細胞の細胞質に消化酵素グランザイムBを導入し、それによってそれを殺す。従って、その全体

50

の数だけでなく、腫瘍自体に対するその位置を知ることが重要である。腫瘍細胞と直接接触している細胞のみが細胞死滅に有効であろう。

【 0 0 3 5 】

C D 2 0

C D 2 0 は、抗体産生 B 細胞のマーカーである。而して、それはより完全に発現された（成熟）免疫応答の指標である。これら抗体産生エフェクター細胞の総数と位置特定が重要でありうる。

【 0 0 3 6 】

F o x P 3

F o x P 3 は、調節性 T 細胞（いわゆる T r e g）の最も特異的なマーカーである核転写因子である。T r e g は免疫応答を緩和するように機能する。おそらく、T r e g の存在が、腫瘍に対する抑制性の免疫応答を示すことになる。

【 0 0 3 7 】

腫瘍マーカー

上皮性腫瘍（癌腫）では、サイトケラチン染色が、腫瘍細胞並びに正常上皮を識別する。この情報は、腫瘍細胞が正常な上皮細胞と比較して、サイトケラチンを異常に過剰発現するという事実と共に、腫瘍対正常組織を識別することを可能にする。神経外胚葉由来のメラノーマ組織では、S 1 0 0 バイオマーカーが同様の目的を果たす。

【 0 0 3 8 】

一次染色 / ブルーイング / 対比染色

例示的な実施態様では、前記方法は、サンプルが特異的に染色されるように発色性試薬を適用することを含む。一実施態様では、特異的染色は、疎水性、インターカレーション、又は他の非認識会合に関連した接着を介してサンプルの一部を選択的に染色する一次染色剤の適用を含む。例えば、ヘマトキシリン及びエオシン染色（H & E 染色）は、当該技術分野において周知である。ヘマトキシリン及び一次染色に関連する開示について出典明示によりここに援用される米国特許出願公開 2 0 0 8 / 0 2 2 7 1 4 3 が参照される。H & E 染色は、細胞形態の評価に使用され、がんを病理学的に診断するための主要なツールである。

【 0 0 3 9 】

検出

該方法は、免疫組織化学（I H C）結合試薬又はインサイツハイブリダイゼーション（I S H）結合試薬を、I H C 結合試薬又は I S H 結合試薬がサンプルに接触するように適用することを含む。I S H は、遺伝子異常又は疾患の存在、あるいは標準からの過剰もしくは過少発現を診断するために使用することができる。例えば、I S H は、特定の疾患に関連した遺伝子増幅、欠失、又は転座を検出するために使用されうる。I S H は、感染細胞内の微生物及びウイルス配列の検出を可能にするので、感染症の診断にまた有用である。I H C は、関心のあるエピトープに特異的に結合する抗体を含む。抗原又は抗原配列とも呼ばれるエピトープは、臨床的に関心のあるマーカーとして樹立されているタンパク質の部分である。例えば、エピトープは、タンパク質の変異形態、タンパク質 - タンパク質結合部位、又は対照サンプルにおけるように、通常よりも高い又は低い濃度の何れかで発現される正常タンパク質でありうる。様々な生物学的サンプル中のエピトープの検出及び / 又は定量は、膨大な数の臨床目的のために使用されている。

【 0 0 4 0 】

I H C 及び I S H の両方が核酸プローブ（I S H）又は抗体（I H C）とサンプル内の標的との間の特異的認識事象を伴う。この特異的な相互作用は標的を標識する。標識は、直接的に可視化され（直接標識）、又は更なる検出化学を使用して間接的に観察されうる。標識の近傍での発色性物質の沈着を伴う発色検出は、シグナルの強度を増幅して視覚化を容易にする更なる検出工程を含む。増幅されたシグナルの可視化（例えば、レポーター分子の使用）は、観察者がサンプル中の標的を限局化することを可能にする。

【 0 0 4 1 】

10

20

30

40

50

発色検出は、簡単でかつ費用対効果の高い検出方法を提供する。発色性基質は、伝統的には、適切な酵素により作用させられたときに沈殿することによって機能していた。すなわち、伝統的な発色性物質は、酵素との接触時に可溶性試薬から不溶性の着色沈殿物に転換される。得られる着色沈殿物は処理や可視化のために特別な装置を必要としない。表1は、本開示の範囲内で有用な色原体系の非網羅的なリストである。

表1: 発色検出試薬

略語	試薬名	色	酵素
DAB	3,3'-ジアミノ-ベンジジン + H ₂ O ₂	褐色 - 黒	ペルオキシダーゼ
AEC	3-アミノ-9-エチル-カルバゾール + H ₂ O ₂	赤	ペルオキシダーゼ
CN	4-クロロ-1-ナフトール + H ₂ O ₂	青	ペルオキシダーゼ
BCIP/NBT	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホス フェート + ニトロブルー テトラゾリウム	藍 - 黒	アルカリホスファターゼ
FAST RED	4-クロロ-2-メチルベンゼンジアゾニウ ム + 3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 2,4-ジ メチルアニリドホスフェート	赤	アルカリホスファターゼ
FAST BLUE	ナフトール AS-MX ホスフェート ニナト リウム塩 + ファストブルー BB 塩ヘミ (塩化亜鉛)塩	青	アルカリホスファターゼ
FUCHSIN	ナフトール AS-BI + ニューフクシン	赤	アルカリホスファターゼ
NBT	ニトロブルーテトラゾリウム + フェナジンメトサルフェート	青 - 紫	デヒドロゲナーゼ
ALK GOLD†	リン酸二水素 3-メチル-1-フェニル- 1H-ピラゾール-5-イル + ファストブルー BB	黄 - 金色	アルカリホスファターゼ

10

20

30

【 0 0 4 2 】

表1は、網羅的ではないが、現在入手可能な様々な種類の発色性物質への知見を提供する(国際公開第2012/024185号、Kelly等“Substrates for Chromogenic detection and methods of use in detection assays and kits”)。

【 0 0 4 3 】

40

本発明への重要な進歩は、新規のカラースキームのこれまで新規の色原体の沈着と共有結合を可能にするチラミド-色原体コンジュゲートの使用である。この共有結合は、一連の増加濃度のアルコール溶液と続くキシレンで検体スライドを脱水することができ、永久保存のために硬化プラスチックにマウントできるという追加の利点をまた有している。これは、この一般的な組織学的処理により抽出される染料を用いる他の色原体染料染色技術と比較して、改善された染色の形態及び解像度を生じる。

【 0 0 4 4 】

本開示の一態様は、色原体コンジュゲートが、伝統的に利用可能な色原体よりもより選択的に光を吸収するように構成されうることである。検出は、シグナリングコンジュゲートによる光の吸収によって実現される；例えば、入射光の少なくとも約5%の吸光度が、

50

標的の検出を容易にするであろう。他のより暗い染色では、入射光の少なくとも約20%が吸収されるであろう。可視スペクトル内の光の不均一な吸光度が、着色して見える発色団を生じる。ここに開示されたシグナリングコンジュゲートは、その吸光度のために着色して見えることがある；シグナリングコンジュゲートは、アッセイで使用されるとき、任意の色を提供するように見えることがあり、ある特定の色は、発色団部分に関連するスペクトル吸光度に応じて、赤、オレンジ、黄、緑、藍、又は紫を含む。別の態様によれば、発色団部分は、伝統的に使用される色原体（例えば、DAB、ファストレッド、ファストブルー）の吸光度よりも狭いスペクトル吸光度を有する。例示的な実施態様では、第一のシグナリングコンジュゲートの第一の発色団部分に関連するスペクトル吸光度が、30 nmから250 nmの間、30 nmから150 nmの間、30 nmから100 nmの間、又は20 nmと60 nmの間の半値全幅（FWHM）を有する。

10

【0045】

狭いスペクトル吸光度により、シグナリングコンジュゲート発色団部分を伝統的な色原体とは異なった形で分析することが可能になる。伝統的な色原体と比較して向上した特徴を持っているが、シグナリングコンジュゲートの検出は簡単なままである。例示的な実施態様では、検出は、明視野顕微鏡又は等価なデジタルスキャナを使用することを含む。狭いスペクトル吸光度により、伝統的な色原体の能力を越えるレベルでの発色性多重化が可能になる。例えば、伝統的な色原体はいくらか日常的に二重化される（例えば、ファストレッドとファストブルー、ファストレッドとブラック（シルバー）、ファストレッドとDAB）。しかしながら、三重又は三色への応用、又はそれ以上は、ある色原体を他のものと識別することが、特にそれらが重なるか又は共存している場合、難しくなるので、普通ではない。ここに開示される技術の例示的な実施態様では、該方法は、異なったシグナリングコンジュゲート又はその組合せを使用して、少なくとも2つから6又はそれ以上までを検出することを含む。一実施態様では、生物学的サンプルを光で照明することは、生物学的サンプルをスペクトル幅の狭い光源で照明することを含み、該スペクトル幅の狭い光源は、30 nmと250 nmの間、30 nmと150 nmの間、30 nmと100 nmの間、又は20 nmと60 nmの間の第二の半値全幅（FWHM）を持つスペクトル放射を有する。他の実施態様では、生物学的サンプルを光で照明することは、LED光源で生物学的サンプルを照明することを含む。他の実施態様では、生物学的サンプルを光で照明することは、生物学的サンプルをフィルタをかけた光源で照明することを含む。

20

30

【0046】

その全体が出典明示によりここに援用される米国特許出願公開第20130260379号が参照される。その全体が出典明示によりここに援用される米国特許出願第61/831552号がまた参照される。

【0047】

自動スコア化；アルゴリズム

例示的な一実施態様では、本主題の開示は、アルゴリズムをトレーニングし、スコアを計算し、そしてアンミキシングすることを含む演算を実行するためにプロセッサによって実行されるコンピュータで実行可能な命令を格納するための非一時的なコンピュータ可読媒体である。他の例示的な実施態様では、本主題の開示は、プロセッサと、該プロセッサに連結されたメモリとを含むデジタル病理システムであり、該メモリは、プロセッサによって実行されると、アルゴリズムトレーニング、スコア計算、及びアンミキシングを含む演算をプロセッサに実行させるコンピュータ実行可能命令を格納する。

40

【0048】

本発明は、多重アッセイ（例えば、多重IHCスライドのセット）又は蛍光染色スライド又はスライド群に対して、スコア、例えば免疫スコアを自動的に計算する画像解析システムを含む。該画像解析システムは、多重アッセイで染色された組織の画像を解析するため、また解析に基づいてスコアを生成するために例えばプロセッサによって実行されるコンピュータで実行可能な命令を含む、ソフトウェアモジュールとアルゴリズムを含む。画像解析システムは、同一の生物学的検体中、例えば単一の組織検体中の複数のバイオマー

50

カーを同定することができ、任意の組織型に対する多重アッセイに適用可能である。

【0049】

例示目的のために、本発明の画像解析アルゴリズムが、多重アッセイにより染色されているがん組織スライドに関連して説明される。本発明の画像解析アルゴリズムの実施化の一例として、乳房組織スライドが分析される。本発明の例示的な実施態様では、染色された組織スライドが画像化及び/又はスキャンされ、対応するカラー画像が作成され、画像解析システム中に入力される。別法では、画像は、ある供給源から得られる。

【0050】

本発明は、明視野及び蛍光画像に適用可能であり、顕微鏡システム（例えば、明視野顕微鏡システム）又はスキャナーが、スライドを画像化又はスキャンし、明視野画像を得るために利用される。マルチスペクトル画像を作成するために、マルチスペクトル画像化システム（例えば、蛍光顕微鏡又はスキャナー（例えば、全スライドスキャナー）がマルチスペクトル蛍光画像を得るために使用される。

【0051】

作成され又は得られた画像を解析するために、本発明の画像解析アルゴリズム及び/又はシステムは、バイオマーカーに対する個々の構成色素と該色素がカラー画像中に現れる割合を特定する、アンミキシングモジュールに含めうるカラーアンミキシングアルゴリズムを含む。該アンミキシング作業は、その開示の全体が出典明示によりここに援用される I M A G E A D A P T I V E P H Y S I O L O G I C A L L Y P L A U S I B L E C O L O R S E P A R A T I O N との発明の名称で 2013 年 6 月 3 日に 出願された 米 国 仮 出 願 第 6 1 / 8 3 0 6 2 0 号 に 開 示 された アンミキシング法に従って実施されうる。各マーカーに対して分離された画像チャンネルに基づいて、検出アルゴリズムは、区別される I H C マーカーの各々に対して T 及び B リンパ球の異なる組合せを自動的に特定するように開発されている。例えば、異なる T 細胞マーカーが共存し、異なった組合せの色素量を作り出すかもしれない。加えて、腫瘍マーカー、例えばサイトケラチンマーカー（例えば O s c a r）を、（例えば、核及び腫瘍領域を識別するために）腫瘍、腫瘍内及び/又は腫瘍周囲の領域を特定して組織コンテキストを得るために、アッセイにまた含めることができる。例示的な実施態様では、画像解析は、バイオマーカー、例えば、O s c a r、C D 3、C D 8 及び F o x P 3 マーカーを同定し、定量し、及び/又はスコアを生成するために、アンミキシング後に実施される。本発明の例示的な実施態様では、各マーカーに対するスコアは、出力として、組織コンテキスト情報と共に、報告されうる。

【0052】

図 9 は、本発明の画像解析方法及びシステムのワークフローを示す。図 9 は、本発明に係る画像解析方法の実行例を示し、乳がん免疫スコアの計算に適用されている画像解析方法に関する詳細を示している。

【0053】

本発明の画像解析方法は、トレーニング段階モジュールに組み込まれうるトレーニング段階を含む。トレーニング段階では、リンパ球の異なる型並びに偽陽性細胞の例の識別が、各マーカーについて最初に実施されうる。例えば、図 9 において、自動検出後、細胞内シード（例えば、真陽性 T 細胞）と細胞外シード（例えば、偽陽性 T 細胞）に手作業で注釈が付される。

【0054】

次に、特徴抽出モジュールに組み込みうる、本発明に係る一又は複数の特徴抽出アルゴリズムが、シード周りの画像パッチに適用され、細胞の各型（例えば、C D 3 細胞、C D 8 細胞及び C D 2 0 細胞）に対する特徴セットが取得される。該特徴は、異なる画像チャンネル、例えば、画像の R G B チャンネル、吸光度空間、アンミキシングチャンネル及びグレースケール画像から抽出される。ここでは、異なる特徴抽出アルゴリズムを使用することができる。例えば、図 9 に示されるように、辞書学習が、異なる細胞外観に対するコードブックを構築するために適用されうる。

【0055】

10

20

30

40

50

本発明の例示的な実施態様では、分類モジュールに含めうる、分類アルゴリズムが、画像、例えば多重アッセイで染色された組織の画像中に存在する細胞の異なった型を分類するようにトレーニングされうる。本発明の例示的な実施態様では、異なった分類アルゴリズム、例えば、SVM、ランダムフォレスト及びブースティング等のアルゴリズムが適用されうる。本発明の例示的な実施態様では、SVMアルゴリズムが、図9に示されるように特徴にその特徴に対するラベルを関連づけるために、分類アルゴリズムにおいて利用される。

【0056】

本発明に係る分類アルゴリズムが適用される、試験段階及び/又は実行段階では、全スライド画像又はその一部が本発明の画像解析方法/システム中に入力される。全スライド画像又はその一部中の各対象領域に対して、アンミキシング、腫瘍関連ノイズの除去、サロゲート画像の作成、リング又は小塊検出(例えば、膜マーカーを持つリンパ球を見出すため)、特徴抽出、分類、及び細胞又はリンパ球の型の計数の工程が適用される。リンパ球のサロゲート画像(すなわち、全てのT細胞を含む画像)が最初に得られうる。そうすることによって、我々は最初に全てのT細胞を検出し、ついで細胞型を同定するために分類アルゴリズムを使用することができる。サロゲート画像を作成するために、log変換が利用されて、RGB画像が吸光度空間に変換され、ついで、我々は腫瘍細胞を検出していないので、図9に示されるように、Oscarチャンネルがノイズ(腫瘍細胞)を除去するために利用されうる。本発明の例示的な実施態様では、腫瘍細胞情報を含むOscarチャンネル情報が、腫瘍細胞を計数するために、メモリに保存される。多重アッセイ、例えば5以上のマーカーを有するアッセイのアンミキシングは画像にわたる大きな色の変動のため信頼できない場合があるので、各アンミキシングチャンネルの代わりにサロゲート画像が検出を行うために利用される。本発明の例示的な実施態様では、ある他の種類の合成画像、例えば、変換画像(例えば、吸光度画像又はグレースケール画像)又は様々なチャンネルを組み合わせた画像が利用されうる。次に、入力画像(例えば、RGB画像)は、バイオマーカーの異なるチャンネル、例えばOscar、FoxP3、CD3、CD8、HTX及びCD20チャンネル中にアンミキシングされうる。

【0057】

細胞検出アルゴリズム(例えば、図10のリング検出器に対応)を細胞検出モジュールに含めてもよく、リンパ球を検出するためにサロゲート画像に適用される。本発明の例示的な実施態様では、細胞検出アルゴリズムのリング形状が、リング形状膜マーカーの捕捉をもたらす(例えば、全ての可能なT細胞候補と偽陽性の検出を含みうる)。我々は、リング形状膜マーカーを検出するために実行例(図9)においてサロゲート画像としてオスカー補正を伴う吸光度画像を使用する。実行段階では、非常に感度がよい細胞検出アルゴリズム、例えば、全ての可能な細胞を捕捉し、偽陽性の検出を含みうるアルゴリズムが、望ましい。本発明の例示的な実施態様では、リング検出器は、細胞を同定するために利用される、膜マーカーを検出するためにサロゲート画像に適用されうる。図10は、リング検出器の単純な例を示している。他の異なるタイプの細胞検出アルゴリズムが細胞を検出するために画像(サロゲート又はそれ以外)に適用されうるということが当業者によって理解されるべきである。

【0058】

分類器、例えば、トレーニング段階から学習され又は作成された分類器は、ついで、カテゴリ間の全ての細胞候補シード、例えば偽陽性細胞、CD3オンリーT細胞、CD3/CD8 T細胞、FP3 T細胞及びB細胞を分類するために使用されうる。

【0059】

例示的な実施態様では、CD3、CD8、FP3及びCD20チャンネルからの情報、例えば各チャンネルにおける細胞の色及び形状に関する情報を、分類のための特徴として使用することもできる。図9は、辞書学習アルゴリズムの実行例を示す。この例では、(1)学習された外観の特徴、例えば、シードの周りの局所パッチから得られた細胞の形状は、真陽性リンパ球と偽陽性リンパ球を区別するために利用され、(2)染色量の特徴は

10

20

30

40

50

、例えば、CD3オンリーT細胞とCD3/CD8 T細胞を分類するために利用される。

【0060】

特に、サロゲート画像中の検出された各真陽性T細胞に対しては、CD3及びCD8アンミキシングチャンネルからのT細胞の近傍周りのCD3及びCD8ピクセルを得ることができ、2つの染色の比が、(1)CD陽性及びCD8陽性細胞と(2)CD3陽性オンリー細胞間を分類するために計算される。本発明の例示的な実施態様では、(CD8画素数)/(CD3画素数)<閾値ならば、サロゲート画像において同定される細胞は、CD3オンリー細胞として標識され、それ以外の場合、CD3/CD8細胞として標識される。

10

【0061】

核を同定するために、我々は核マーカチャンネル、例えばFoxP3は核マーカであるので、FoxP3チャンネル画像を評価する。我々は、FoxP3核を見出すためにFoxP3チャンネル内において、小塊検出モジュールに含められうる小塊検出アルゴリズムを適用する。本発明の別の実施態様では、放射状対称モジュールに含められうる放射状対称アルゴリズムが、核を検出するために利用されうる。しかしながら、例えば、円変換を利用して他の小塊検出方法を達成してもよいことは、当業者によって理解されるべきである。

【0062】

腫瘍領域を特定するために、Oscarチャンネルが利用される。本発明の例示的な実施態様では、領域検出アルゴリズムが、腫瘍領域を特定するために使用されうる。(図11)に示される実行例では、Otsu閾値法が、腫瘍領域を見出すためにOscarチャンネルに適用される。Otsu閾値法は、フォアグラウンドとバックグラウンドのための最良の閾値を見出す方法によって腫瘍領域を特定する。Oscarチャンネルはまた腫瘍領域に関連したノイズを除去するために利用される。Oscarチャンネルはまたリング状の腫瘍細胞質マーカを除去するために利用される。細胞質マーカは時々リング状の外観をつくるので、我々はリング検出を適用する前にその領域を最初に除去する必要がある。我々は、本発明の画像解析アルゴリズム、方法、及び/又はシステムの工程の順序は変わりうることに留意する。

20

【0063】

図11(B)は、我々の実施においてリンパ球検出に利用されうる、本発明に係る例示的なリング検出器を示している。リング検出器を実装するためには、フィルタバンク、すなわち、図11(A)に示されるように、12の方向を含むマスクのセットが構築される。ブラック領域はリング中心をカバーする-1のピクセルを示し、グレー領域はリングの境界を覆う1のピクセルに対応し、その結果、このマスクが画像と共に畳み込み処理されると、我々はリング境界と中心との間の強度差を得る。この例では、フィルタの幅は3ピクセルであり、ブラック領域の長さは5ピクセルであり、グレー領域の長さは10ピクセルである。例えば、フィルタの方向の数、幅と長さを含むパラメータは、例えば、検出が望まれる異なった細胞サイズに対応するように、調整可能である。画像内の各位置(x,y)に対して、図11(B)に示されるように、投票 $V(x,y) = V(x,y) + [sum(I(A)) - sum(I(B))]$ が計算される。投票は、フィルタのブラック領域とフィルタのグレー領域内の全画素強度の強度値の差に対応する。この投票は、リングの中心に12の方向に沿って(x,y)に蓄積される。12は方向の単なる一例の数であり、異なる数を使用することができることに留意のこと。本発明の例示的な実施態様では、複数スケールの検出(すなわち、異なる大きさのリング)を利用して、フィルタのパラメータを調整することにより、異なるサイズの細胞を捕捉することができる。

30

40

【0064】

一実施態様は、本発明に係る画像解析システム及び/又は方法に関連したユーザーインターフェイスと機能に関する。ユーザーインターフェイスは次の機能を提供する：

【0065】

50

「Load Data Dir」ボタンを介してFOV又は全スライド画像のロードを可能にする画像ロード機能。例えば「File List」パネル内のファイル名をクリックすることにより、リンパ球と腫瘍領域の検出及び/又は検出結果の表示を可能にする組織領域検出機能。

【0066】

ユーザーが細胞検出結果を変更し、注釈を追加し、及び/又は削除することを可能にする細胞変更機能。本発明の例示的な実施態様では、ユーザーは、最初に細胞の型を選択してポップアップリストから変更し、ついで「Modify Cell」ボタンをクリックして編集を開始することができ、マウスの左クリックは、例えば、シードを削除することができることに対応し、マウスの右クリックは、例えばシードを追加することができることに対応する。編集がなされた後、キーボード上の「Enter」キーの起動が、編集が完了したことを示す。

10

【0067】

腫瘍修正機能は、ユーザーが腫瘍の検出結果を変更することを可能にする。本発明の例示的な実施態様では、「Add Region」及び「Remove Region」アイコン又はユーザーインターフェースの領域をクリックすることにより、ユーザーはポリゴンの描写を開始することができ、例えばマウスの左ダブルクリックにより、ユーザーが、ポリゴンの描画が完了したことを示すことを可能にする。

【0068】

変更セーブ機能は、ユーザーが「Save Modification」ボタンの起動を介して変更を保存することを可能にする。

20

【0069】

最終レポート作成機能は、ユーザーが—又は複数の細胞型の数に基づく、例えば免疫スコアを含む最終レポートを作成することを可能にする。例えば、ユーザーは、最終レポートを作成するために「Get Report」ボタン又はユーザーインターフェースの領域をクリックすることができる。ボタン、アイコン、画面領域を、機能を有効にするために利用することができ、全てを他のものの代替として利用することができるが、当業者によって理解されるべきである。

【0070】

本開示に従って使用されるコンピュータシステムの例示的な実施態様は、任意の数のコンピュータプラットフォーム又は複数のタイプのコンピュータプラットフォーム、例えばワークステーション、パーソナルコンピュータ、サーバー、ハンドヘルドデバイス、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベース又はプログラム可能な家庭用電化製品、ネットワークPC、ミニコンピュータ、メインフレームコンピュータ、あるいは任意の他の現在又は将来のコンピュータを含みうる。例示的な実施態様は、また、タスクが通信ネットワークに（例えば、ハードワイヤード接続、無線接続、又はそれらの組合せによって）接続されているローカル及び/又はリモート処理装置によって実行される分散コンピューティング環境においても実施することができる。分散コンピューティング環境では、プログラムモジュールを、記憶保存装置を含むローカルとリモート双方のコンピュータ記憶媒体に配置することができる。しかしながら、ここに記載された前述のコンピュータプラットフォームは、記載された発明の特殊な操作を実行するように特に構成されており、汎用コンピュータとは考えられないことは当業者によって理解されるであろう。

30

40

【0071】

コンピュータは、典型的には、既知のコンポーネント、例えばプロセッサ、オペレーティングシステム、システムメモリ、記憶保存装置、入出力コントローラ、入出力装置、及びディスプレイ装置を含む。コンピュータの多くの可能な構成及びコンポーネントが存在し、キャッシュメモリ、データバックアップユニット、及び多くの他の装置をまた含むことは関連分野の当業者によってまた理解されるであろう。入力装置の例には、キーボード、カーソル制御装置（例えば、マウス）、マイクロフォン、スキャナ等々が含まれる。出力装置の例には、表示装置（例えば、モニタ又はプロジェクタ）、スピーカ、プリン

50

タ、ネットワークカード等々が含まれる。表示装置は、視覚的な情報を提供する表示装置を含み得、この情報は典型的には画素アレイとして論理的及び/又は物理的に編成される。入力及び出力インターフェイスを提供するための様々な既知の又は将来のソフトウェアプログラムの何れかを含みうるインタフェースコントローラがまた含まれうる。例えば、インタフェースは、ユーザーに一又は複数のグラフィック描写を提供する「グラフィカルユーザーインターフェイス」(しばしばGUIと称される)と一般に称されるものを含みうる。インタフェースは、典型的には、関連する技術分野の当業者に知られている選択又は入力の手段を使用するユーザー入力を受け入れるようになされる。インタフェースはまたタッチスクリーン装置とすることができる。同じ又は別の実施態様では、コンピュータ上のアプリケーションは、「コマンドラインインターフェイス」(しばしばCLIと称される)と称されるものを含むインタフェースを用いる。CLIは典型的にはアプリケーションとユーザー間のテキストベースのインタラクションを提供する。典型的には、コマンドラインインターフェイスは、表示装置を介してのテキストラインとして出力を提示し入力を受け取る。例えば、幾つかの実施化例は、「シェル」と称されるもの、例えば関連分野の当業者に知られているUnix Shell、あるいはMicrosoft .NETフレームワークのようなオブジェクト指向型プログラミングアーキテクチャを用いるMicrosoft Windows Powershellを含みうる。

【0072】

関連分野の当業者は、インタフェースが一又は複数のGUI、CLI又はそれらの組合せを含みうることを理解するであろう。

【0073】

プロセッサは、市販のプロセッサ、例えばインテル社製造のCeleron、Core、又はPentiumプロセッサ、サン・マイクロシステムズ製造のSPARCプロセッサ、AMD社製造のAthlon、Sempron、又はOpteronプロセッサを含み得、あるいは入手できるか又は入手できるようになる他のプロセッサの一つでありうる。プロセッサの幾つかの実施態様は、マルチコアプロセッサと称されるものを含み、及び/又はシングル又はマルチコア構成で並列処理技術を用いることが可能にされうる。例えば、マルチコアアーキテクチャは、典型的には、2以上のプロセッサ「実行コア(execution cores)」を含みうる。本例では、各実行コアは、複数のスレッドの並列実行を可能にする独立プロセッサとして実行しうる。また、関連の当業者は、プロセッサが、32又は64ビットアーキテクチャと一般に称されるもの、又は現在知られ、又は将来開発されうる他のアーキテクチャ構成で構成されうることを理解するであろう。

【0074】

プロセッサは、典型的には、例えば、マイクロソフト社製のWindowsタイプのオペレーティングシステム；アップルコンピュータ社製のMac OS Xオペレーティングシステム；多くの供給業者から入手可能なUNIX又はLinuxタイプのオペレーティングシステムあるいはオープンソースと称されるもの；他の又は将来のオペレーティングシステム；又はそれらの幾つかの組合せでありうるオペレーティングシステムを実行する。オペレーティングシステムは、周知の方法でファームウェア及びハードウェアとインターフェイスし、様々なプログラミング言語で記述することができる様々なコンピュータプログラムの機能をプロセッサが統合し実行するのを容易にする。オペレーティングシステムは、典型的にはプロセッサと協働して、コンピュータの他のコンポーネントを統合しその機能を実行する。オペレーティングシステムはまた、全て既知の技術に従って、スケジューリング、入出力制御、ファイル及びデータ管理、メモリ管理、並びに通信制御及び関連サービスを提供する。

【0075】

システムメモリは、所望される情報を格納するために使用でき、コンピュータによってアクセスできる様々な既知の又は将来の記憶保存装置の何れかを含みうる。コンピュータ可読記憶媒体は、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュール、又は他のデータなどの情報を記憶するための任意の方法又は技術で実装される揮発性及び不揮発性

10

20

30

40

50

、リムーバブル及び非リムーバブル媒体を含みうる。例としては、任意の一般的に利用可能なランダムアクセスメモリ（RAM）、読み出し専用メモリ（ROM）、電気的消却・プログラム可能型読取専用メモリ（EEPROM）、デジタル多用途ディスク（DVD）、磁気媒体、例えば、常駐ハードディスクもしくはテープ、光学媒体、例えば、読み書きコンパクトディスク、又は他の記憶保存装置が含まれる。記憶保存装置は、コンパクトディスクドライブ、テープドライブ、リムーバブルハードディスクドライブ、USB又はフラッシュドライブ、あるいはディスクドライブを含む様々な既知の又は将来の装置の何れかを含みうる。記憶保存装置のかかるタイプは、典型的には、例えばコンパクトディスク、磁気テープ、リムーバブルハードディスク、USBもしくはフラッシュドライブ、又はフロッピーディスクのようなプログラム保存媒体から読み取り、及び/又はそれに書き込む。これらのプログラム記憶媒体、又は現在使用され又は以降に開発されうる他のものの何れも、コンピュータプログラム製品と考えることができる。

10

【0076】

理解されるように、これらのプログラム格納媒体は、典型的には、コンピュータソフトウェアプログラム及び/又はデータを格納する。コンピュータ制御論理回路とも呼ばれるコンピュータソフトウェアプログラムは、典型的には、システムメモリ及び/又は記憶保存装置に関連して使用されるプログラム記憶装置に格納される。幾つかの実施態様では、そこに格納された制御論理回路（プログラムコードを含むコンピュータソフトウェアプログラム）を有するコンピュータが使える媒体を含むコンピュータプログラム製品が記載される。制御論理回路は、プロセッサによって実行されると、ここに記載の機能をプロセッサに実行させる。他の実施態様では、幾つかの機能が、例えばハードウェアステーションを使用してハードウェアに主に実装される。ここに記載された機能を実施するようにハードウェアステーションを実装することは、関連分野の当業者には明らかであろう。入出力コントローラは、人であれ機械であれ、ローカルであれリモートであれ、ユーザーからの情報を受け取り、処理するための様々な既知の装置の任意のものを含むことができるであろう。そのような装置は、例えば、モデムカード、ワイヤレスカード、ネットワークインターフェースカード、サウンドカード、又は様々な既知の入力装置の何れかのための他のタイプのコントローラを含む。

20

【0077】

出力コントローラは、人であれ機械であれ、ローカルであれリモートであれ、ユーザーに情報を提示するための様々な既知の表示装置の何れかのためのコントローラを含みうる。ここに記載の実施態様では、コンピュータの機能素子はシステムバスを介して互いにやりとりする。コンピュータの幾つかの実施態様では、ネットワーク又は他のタイプのリモート通信を使用して、幾つかの機能素子とやりとりしうる。関連分野の当業者には明らかであるように、機器制御及び/又はデータ処理アプリケーションは、ソフトウェアで実施される場合、システムメモリ及び/又は記憶保存装置にロードされ、そこから実行される。

30

【0078】

機器制御及び/又はデータ処理アプリケーションの全て又は一部は、記憶保存装置の読み出し専用メモリ又は同様のデバイス内に常駐し得、そのようなデバイスは、機器制御及び/又はデータ処理アプリケーションが入出力コントローラを介して最初にロードされることを必要としない。機器制御及び/又はデータ処理アプリケーション、又はその一部は、実行に有利なように、システムメモリ、又はキャッシュメモリ、又はその両方に既知の方法でプロセッサによってロードされうることは、関連分野の当業者によって理解されるであろう。また、コンピュータは、システムメモリに格納された一又は複数のライブラリファイル、実験データファイル、及びインターネットクライアントを含みうる。例えば、実験データは、一又は複数の実験又はアッセイに関連したデータ、例えば検出されたシグナル値、又は合成（SBS）実験又はプロセスによる一又は複数のシーケンシングに関連した他の値を含みうるであろう。

40

【0079】

50

加えて、インターネットクライアントは、ネットワークを使用して別のコンピュータ上のリモートサービスにアクセスさせるアプリケーションを含み得、例えば「ウェブブラウザ」と一般に称されるものを含みうる。本例では、幾つかの一般的に使用されるウェブブラウザは、Microsoft社から入手可能なMicrosoft Internet Explorer、Mozilla社からのMozilla Firefox、アップルコンピュータ社からのSafari、Google社からのGoogle Chrome、又は現在知られておりもしくは将来開発される他のタイプのウェブブラウザが含まれる。また、同じ又は他の実施態様では、インターネットクライアントは、生物学的用途のためのデータ処理アプリケーションなどのネットワークを介して遠隔の情報にアクセスすることを可能にする特殊なソフトウェアアプリケーションを含んでいてもよく、又はそのアプリケーションの一要素でありうる。

10

【0080】

ネットワークは、当業者によく知られている多くの様々なタイプのネットワークの又は複数を含みうる。例えば、ネットワークは、通信するためにTCP/IPプロトコル群と一般に称されるものを用いることができるローカル又は広域ネットワークを含みうる。ネットワークは、一般にインターネットと称される相互接続されたコンピュータネットワークの世界的なシステムを含むネットワークを含み得、あるいは様々なイントラネットアーキテクチャをまた含みうる。関連分野の当業者は、ネットワーク環境内の一部のユーザーが、ハードウェア及び/又はソフトウェアシステムに対する情報トラフィックを制御するために「ファイアウォール」（時にはパケット、フィルタ、又は境界保護デバイスとも称される）と一般に称されるものを用いることを好むことをまた理解するであろう。例えば、ファイアウォールは、ハードウェア又はソフトウェア構成要素又はそれらの何らかの組合せを含み得、典型的には、例えばネットワーク管理者等のユーザーがセキュリティポリシーを導入することを強いるように設計されている。

20

【0081】

自動染色システム

ヴェンタナメディカルシステムズ社（Tucson, AZ）を介して入手可能な例示的自動システムは、SYMPHONY（登録商標）染色システム（カタログ#：900-SYM3）、VENTANA（登録商標）Benchmark自動スライド調製システム（カタログ#：N750-BMKXT-FS、N750-BMKU-FS、VENTANA）、及び

VENTANA（登録商標）Benchmark特殊染色自動スライドステイナーを含む。これらのシステムは、放射状に位置させられたスライドを支持する回転カルーセルを含むマイクロプロセッサ制御システムを用いている。ステッピングモータがカルーセルを回転させ、スライドの上方に位置する一連の試薬ディスペンサーのうちの一つの下に各スライドを配する。スライド及び試薬ディスペンサー上のバーコードが、様々な組織サンプルのそれぞれについて異なった試薬処理をコンピュータの適切なプログラミングによって実施できるように、ディスペンサーとスライドのコンピュータ制御による位置決めを可能にする。

30

【0082】

例示的な計装システムは、制御された環境条件下で1/3インチのガラス顕微鏡スライド上に乗せられた組織片に試薬を逐次適用するように設計されている。機器は幾つかの基本的機能、例えば試薬適用、（以前に適用された試薬を除去するための）洗浄、ジェット排出（洗浄の後のスライド上の残留バッファ量を低減させる技術）、試薬を含め蒸発を防止するために使用される軽油の適用、及び他の機器の機能を実施しなければならない。例示的な染色機器は回転カルーセル上のスライドを処理する。スライドは静止位置を維持し、ディスペンサーカルーセルは、固定スライド上で試薬を回転させる。ここに記載されたプロセスは、様々な物理的構成を使用して実施されうる。スライド上の組織を清浄にし、染色するプロセスは、上述の基本的な機器の機能の逐次的な繰り返しからなる。本質的には、試薬が組織に適用され、ついで特定の温度で特定の時間、インキュベートされる。インキュベーション時間が完了すると、試薬の全てが適用され、染色プロセスが完了する

40

50

まで、試薬はスライドから洗浄されて除去され、次の試薬が適用され、インキュベートされ、洗い流し等がなされる。

【0083】

関連する開示については、ヴェンタナメディカルシステムズに譲渡された Richards 等の米国特許第 6296809 号が参照され、これは、個別化された染色又は処理プロトコルを、該プロトコルが異なる温度パラメータを必要とする場合でも各サンプルが受けることができるように、顕微鏡スライドにマウントされた複数の組織サンプルを自動的に染色又は処理するための装置及び方法を開示している。より具体的には、記載されているものは、標準的なガラス顕微鏡スライドにマウントされ又は取付けられた組織又は細胞に化学的及び生物学的試薬を自動的に適用する、コンピュータ制御され、バーコード駆動される染色機器を備えた装置である。コンピュータにより指令されて、分配位置まで回転し、スライドの上方に位置する第二回転カールセル上の一連の試薬ディスペンサーの内の一つの下に各スライドを位置させる、カールセル上に円形配列で複数のスライドがマウントされる。各スライドは、選択された試薬（例えば、DNAプローブ）を受けとり、最適な順序で、必要な時間の間、洗浄され、混合され、及び/又は加熱される。

10

【実施例】

【0084】

次の実施例は、実施可能な実施形態と一般的プロトコルのある特定の特徴を例証するために提供される。本発明の範囲は次の実施例によって実証される特徴に限定されるものではない。

20

【0085】

IHC手順

次のプロトコルが、NexES V10.6 を備えた VENTANA (登録商標) ベンチマーク XT (VMSI カタログ番号: N750-BMKXT-FS) で実行に移された。その範囲は例示的なプロセス変動値を提供し、括弧内の値は例示的な値を表す:

【0086】

(1) 特に新しい切片スライドに対して、スライドに組織を付着させるためにベーキングが実施されうる; 温度: 60 - 75 ; インキュベーション時間: 4 - 32 分; オンラインベーキングでは、使用されるパラフィンブランドの融点より 2 - 4 度、高い温度に設定、[ベーキングなし];

30

【0087】

(2) 脱パラフィンを実施して、試薬浸透のためにワックスを除去した; 独特の脱パラフィン選択肢は、標準、拡張及び拡張 II を含む; これらの手順は、困難な組織の最適化に対して大きな成功を可能にする改善された柔軟性をもたらす; 標準はデフォルトであり、EZ Prep (VMSI カタログ番号: 950-102) を使用して古典的な脱パラフィンプロトコルを再現する; 拡張は、選択される場合、HER2 DDISH (VMSI カタログ番号: 780-4422) からの脱パラフィンを再現するであろう (標準プロトコルに 5 つの追加の EZ Prep すすぎ工程を加える; 拡張 II は、選択される場合、LCS (VMSI カタログ#: 650-010)、[標準脱パラフィン、75、4分; EZ Prep リンス; 76、4分; リンス] を使用するであろう;

40

【0088】

(3) 前処理; スライド上で固定後、オプションの前処理、過剰なタンパク質の除去 (熱と酵素); 使用者が充填可能な固定試薬; 37 から 60 の温度; 反応バッファー中 4 - 32 分の使用者が充填可能な「固定剤 1」から「固定剤 10」のインキュベーション時間; [前処理なし];

【0089】

(4) 細胞コンディショニング; CC1 (VMSI カタログ番号: 950-124)、CC2 (VMSI カタログ番号: 950-123) 又は反応バッファー (VMSI カタログ番号: 950-300) を使用; 熱 + バッファー回収のために僅かにアルカリ性の pH を持つ CC1 を使用; 熱 + バッファー回収のために pH 6.0 の CC2 を使用、熱のみ回

50

収のために反応バッファーを使用；1から5サイクルが選択可能；インキュベーション時間：4 - 16分；温度：60 - 100、[95で32分間 - 8分と続き100で24分間の間、CC1]；

【0090】

(5) プロテアーゼ処理：熱回収を使用する細胞コンディショニングは、固定から架橋を解放する；プロテアーゼはタンパク質に「孔を開ける」；組合せはより良いサンプル浸透を可能にしうる；酵素の選択とインキュベーション時間は、試薬製造業者、推奨、実験、酵素選択肢によって決定されうる；ユーザー充填可能なディスペンサーが酵素1 - 10、事前希釈プロテアーゼ1 - 3 (VMSIカタログ番号：760 - 2018、760 - 2019、760 - 2020)；事前希釈ISH - プロテアーゼ1 - 3 (VMSIカタログ番号：780 - 4147、780 - 4148、780 - 4149)と共に使用される；インキュベーション時間4 - 32分、[プロテアーゼ非使用]；

10

【0091】

(6) プレ一次ペルオキシダーゼ阻害及びポスト一次ペルオキシダーゼ阻害 (VMSIカタログ番号：253 - 4578)；一次が抗原に結合した後、内因性ペルオキシダーゼの阻害を可能にする；幾つかの抗原は過酸化水素の影響を受けうる；この選択肢は、その抗体の染色を改善できる、[ペルオキシダーゼ阻害は不使用]。

【0092】

(7) すすぎ試薬；反応バッファーを適用；LCSを適用、[4分、加熱なし]；

【0093】

(8) 清澄化プロセス [ここに記載]；

20

【0094】

(9) 一次抗体適用；一次抗体温度及び一次抗体希釈の選択肢；一次に対するインキュベーション温度を使用者が変更することを可能にする；一次抗体適用前にスライドに更に900µLの反応バッファーを追加する；[抗V600E (クローンVE1)、37で16分間インキュベート]。

【0095】

(10) 検出はプローブに「視覚的」分子を関連づける；Ultra View又はOpti View (VMSIカタログ番号：760 - 500, 760 - 700) [Opti View]；及び

30

【0096】

(11) 対比染色及びポスト対比染色；組織に「背景」色を追加する；使用者は、希釈前VENTANA試薬並びにユーザー充填可能な対比染色ディスペンサーを含む対比試薬リストから選択できる；インキュベーション時間は4分から32分までで選択可能である；[ヘマトキシリンII (VMSIカタログ番号：790 - 2208)での対比染色4分、ブルーイング試薬 (VMSIカタログ番号：760 - 2037)での4分のポスト対比染色]。

【0097】

乳がんの例

がん性乳房組織スライドをハプテン化一次抗体カクテルで染色し、続いてHRPに連結された抗ハプテン二次抗体を使用する逐次染色を行った。異なる色の特定の色原体の沈着が一次抗体の局在化を表した。染色されたスライドをスキャンし、対応するRGBカラー画像を得た。画像を解析するために、我々は、バイオマーカーに対する個々の構成色素とそれらがカラー画像に現れている割合を特定するためにカラーアンミキシングアルゴリズムを開発した。各マーカーに対して分離された画像チャンネルに基づいて、検出アルゴリズムを、T細胞の異なった型を自動的に特定するために開発した。画像解析は、Oscar、CD3、CD8及びFP3マーカーに対して行われた。最終的な出力として、各マーカーのスコアが報告された。

40

【0098】

我々は、スライド中のT細胞分布の異なった組合せを観察し、T細胞の各型の数と位置

50

を特定することにより、我々の解析アルゴリズムを検証した。

【0099】

多重アッセイは、画像解析アルゴリズムと共に、乳がん免疫スコアの計算のためのツールキットを潜在的に提供する。コンピュータによって作成される最終レポートは、患者の個人的な免疫応答の臨床分析をサポートし、更なる乳がん治療へ導くのを助けるために使用されうるが、このアプローチを検証するために更なる研究が必要とされる。

【0100】

それぞれの場合、手動で細胞カウントと領域注釈を行った。各患者のデータを、サンプルノードにわたる中央値の式としてまとめ、ついでこれらの値を、再発群と非再発群間で比較した。CD3とCD8の双方に対して周囲/内部比に統計的に有意な差があり、該比は両方の乳房コホートについて再発患者と比較して非再発患者でより高かった。

10

【0101】

メラノーマの例

我々は、34名のメラノーマ患者からのFFPEリンパ節切除体を収集し、全部で150のリンパ節を分析した。我々は、CD3、CD8、CD20及びFoxp3（全てヴェンタナメディカルシステムズ）の免疫組織化学発現によって免疫スコアを特徴付けした。3-4µmの連続組織切片をヘマトキシリン/エオシン（H&E）に対して切除し、メラノーマの腫瘍マーカー（S100）を含む全ての多重マーカーで染色した。組織切片をVENTANAベンチマーク機器での新規な多重染色プロトコール並びに連続切片（スライド）染色を使用して染色した。初期の評価は、出血又は壊死部分を除き、高出力顕微鏡視野（オリンパスBX51）を用いて実施した。陽性細胞の数は、X400倍率を使用して5つの腫瘍周囲及び5つの腫瘍内非重複野中のそれらを計数することによって評価した。各マーカー並びにマーカーの組合せの発現は、臨床成績と相関する最も重要な臨床情報と一致していた。

20

【0102】

我々の限られたサンプルサイズは幾つかの結論を制限したが、これらの傾向の違いはまたFoxP3とCD20の双方に対して明らかであった。ついで、我々は、より大きいメラノーマについて検証することを今計画している高/低リスクスコアを仮定した。それぞれの場合、手動で細胞カウントと領域注釈を行った。各患者のデータを、サンプルノードにわたる中央値の式としてまとめ、ついでこれらの値を、再発群と非再発群間で比較した。CD3とCD8の双方に対して周囲/内部比に統計的に有意な差があり、該比は両方のタンパク質に対して再発患者と比較して非再発患者でより高かった。我々の限られたサンプルサイズは幾つかの結論を制限したが、これらの傾向の違いはまたFoxP3とCD20の双方に対しても明らかに見えた。ついで、我々は、我々が今、より大きなコホートで検証することを計画している高/低リスクスコアを仮定した。

30

【0103】

画像解析

画像データを3以上の異なる色原体から個々の寄与分に分離するカラーアンミキシングアルゴリズムと称されうるカラーアンミキシングアルゴリズムを開発した。新しく開発された多重色原体明視野アッセイシステムで染色された組織スライドを、標準的な明視野全スライドスキャナーでスキャンし、後の分析のための個々の染色特異的画像チャンネルを提供するためにカラーアンミキシングアルゴリズムを適用した。この技術を適用するモデルとして、我々は、CD3+T細胞、CD8+細胞傷害性T細胞、FoxP3+Treg細胞、CD20+B細胞、CD68+マクロファージ、及びサイトケラチン+腫瘍細胞を標的とする抗体から構成された乳がん組織のための免疫プロファイリングアッセイを設計した。

40

【0104】

我々は、異なる細胞型の点と、細胞数の点の両方で、免疫応答の範囲を観察した。また、免疫細胞は、例えば間質のみ、腫瘍の浸潤縁、及び腫瘍中心のように、組織の異なる領域に位置していた。免疫細胞分布の様々な組合せが観察されたが、臨床成績と相関してい

50

る場合、これらのデータは患者の応答を予測しうる。

【0105】

まとめ

個々のがん患者における腫瘍浸潤リンパ球(TIL)及びマクロファージの検出及び特徴付けは、患者自身の免疫系が腫瘍に応答してどの程度まで活性化されるかを証明するのに役立つ。そして、この情報は、予後又は予測試験として、あるいは更なる治療法へのガイドとして使用することができる。

【0106】

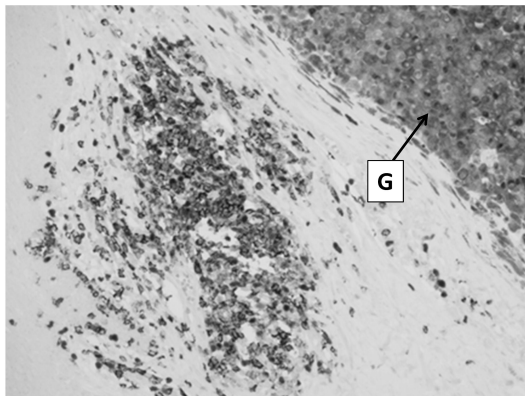
多重色原体検出システムは、明視野光学顕微鏡で複数の標的を検出するために使用することができる柔軟でかつ感度の良い技術である。例えば、柔軟性は色原体の互換性により実証され、多重化アッセイは、感度を改善し、非特異的結合又は「クロストーク」を回避するためにハプテン化抗体を使用して設計することができる。ハプテン増幅を使用することにより、生成されたシグナルはより強く、弱く発現された抗原の検出を可能にする。

【0107】

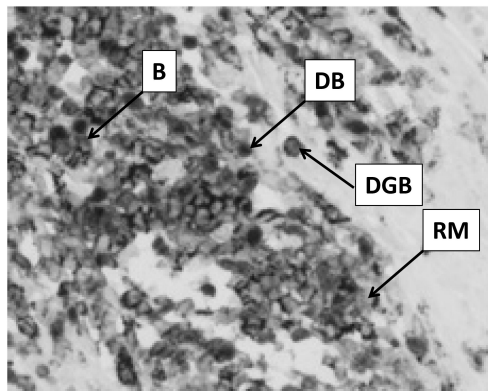
この出願で例証された免疫プロファイリングの概念は、多重色原体明視野IHCの理想的な用途となり、複数成分の腫瘍微小環境分析を可能にし、単一のスライド染色により試験効率を促進することにより、医療的価値をもたらす。

10

【図1】

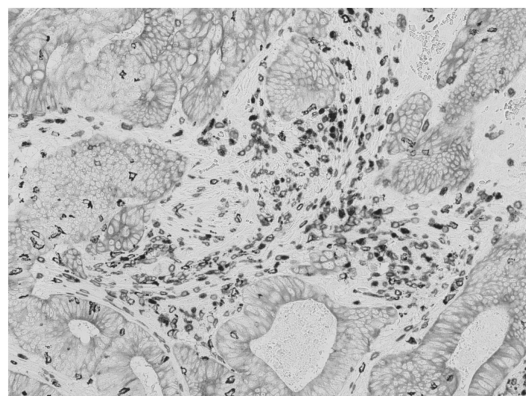


(A)

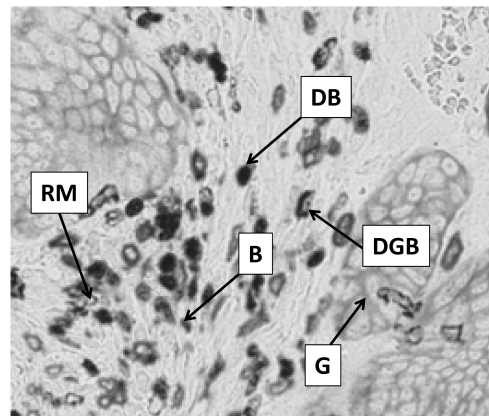


(B)

【図2】

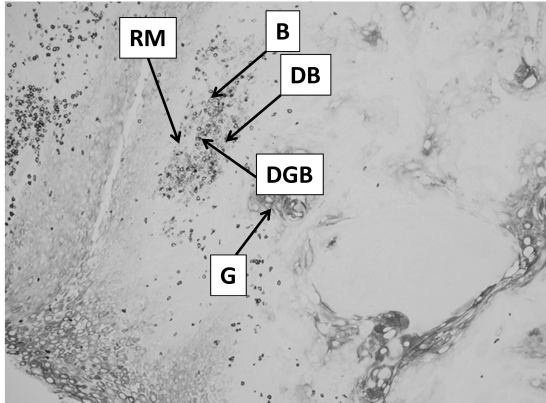


(A)

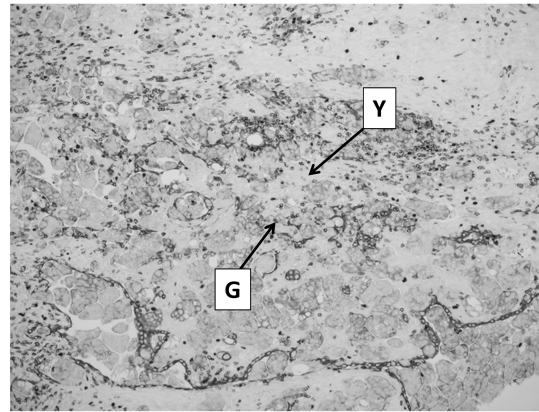


(B)

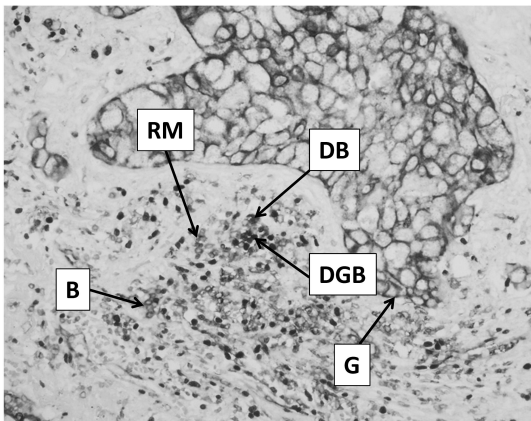
【 図 3 】



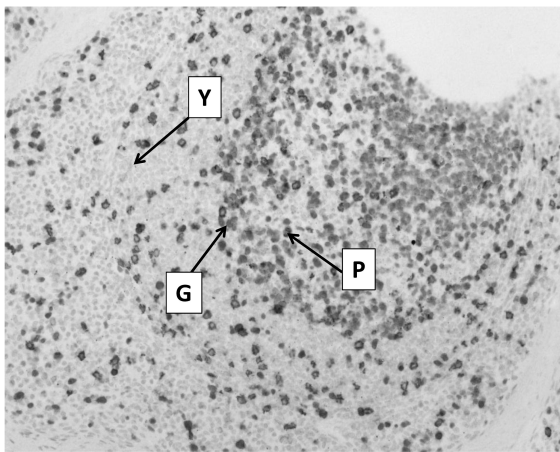
【 図 5 】



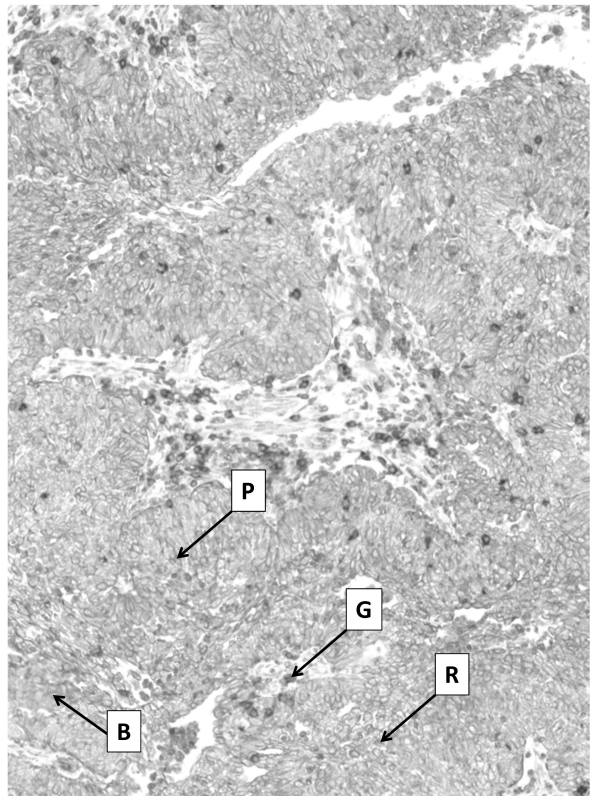
【 図 4 】



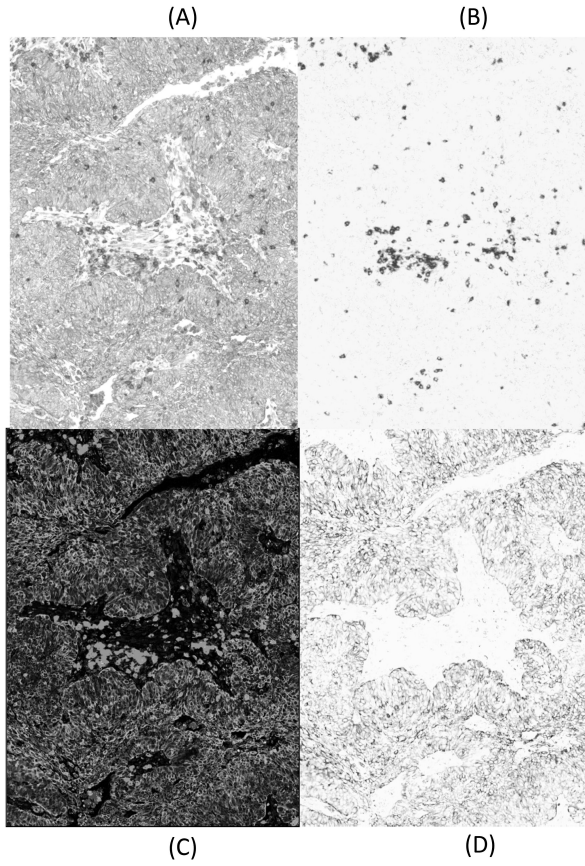
【 図 6 】



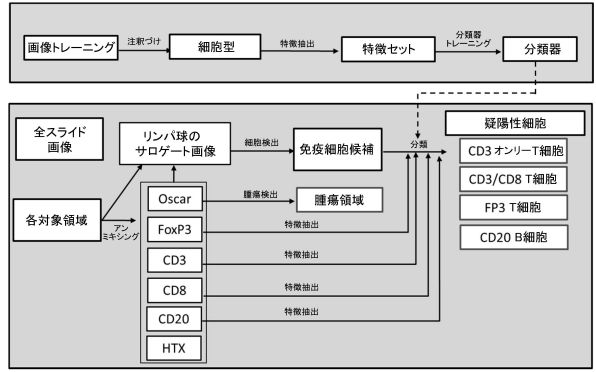
【 図 7 】



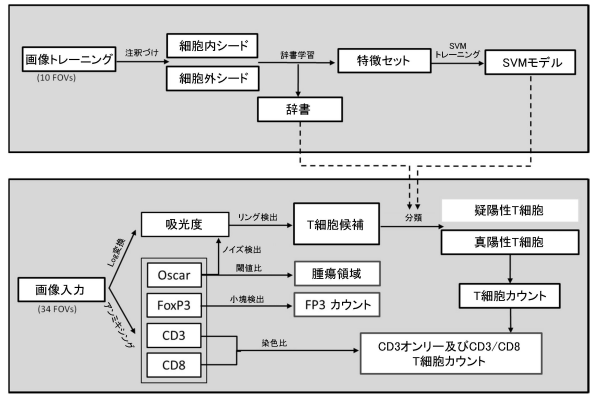
【 図 8 】



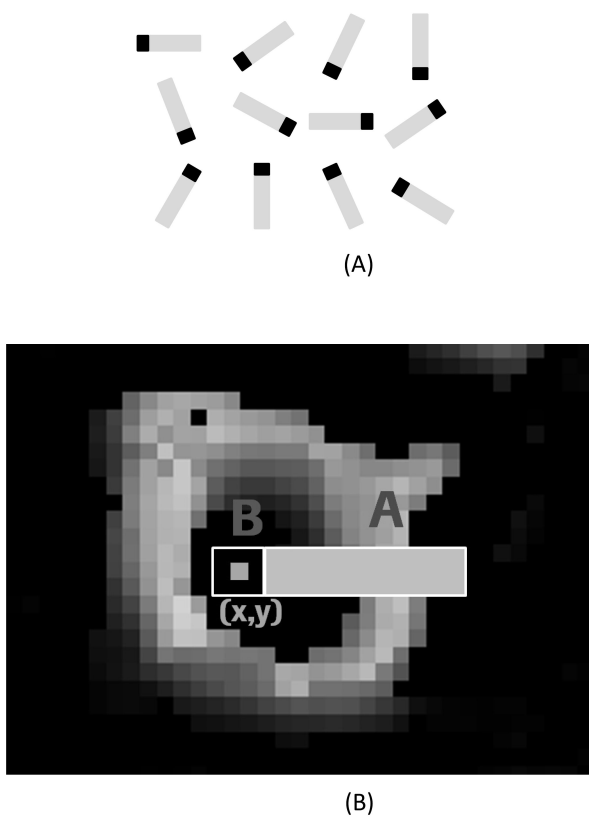
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



フロントページの続き

- (72)発明者 デイ, ウィリアム
アメリカ合衆国 アリゾナ 85704, ツーソン, チョーヤ エステート ドライブ 19
52
- (72)発明者 オークス, ロバート
アメリカ合衆国 アリゾナ 82737, オロ バレー, ノース セージ ブルック ロード
11764
- (72)発明者 チャッカ, シュリーニヴァース
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95129, サン ノゼ, オーク ツリー ドライブ 1
045
- (72)発明者 マーティン, ジム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040, マウンテン ビュー, ショワーズ ドライブ
49, アpartment ジェ-326
- (72)発明者 バーンズ, マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94112, サンフランシスコ, フェラン アヴェニュー
202
- (72)発明者 ブレノ, ジョージ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サンフランシスコ, 27番 ストリート 3
97
- (72)発明者 チェン, ティン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94043, マウンテン ビュー, トンプソン アヴェニ
ュー 487, アpartment ビー
- (72)発明者 タップズ, アリサ
アメリカ合衆国 アリゾナ 85044, フェニックス, イースト コラルー ロード 46
29
- (72)発明者 ニエ, ヤオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94087, サニーベール, ロビン ウェイ 1029

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0330325(US, A1)
米国特許出願公開第2012/0329878(US, A1)
国際公開第2013/148448(WO, A1)
特開2013-092540(JP, A)
特開2012-150253(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	通过同时检测cd3 , cd8 , cd20和foxp3来评估针对癌症的免疫反应的方法 , 试剂盒和系统		
公开(公告)号	JP6605506B2	公开(公告)日	2019-11-13
申请号	JP2016570181	申请日	2015-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统 , 墨水.		
当前申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统 , 墨水.		
[标]发明人	デイウィリアム オークスロバート バーズマイケル チェンティン		
发明人	セバスチャン, ノエミ デイ, ウィリアム オークス, ロバート チャッカ, シュリーニヴァース マーティン, ジム バーズ, マイケル ブレッノ, ジョージ チェン, ティン タップズ, アリサ ニエ, ヤオ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/483 G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/566 G01N33/57415 G01N33/5743 G01N33/6875 G01N2333/4739 G01N2333/7051 G01N2333/70517 G16B25/00 G01N15/1463 G01N33/574 G01N35/00029 G01N2015/008 G01N2015/1006 G01N2015/1486 G01N2035/00138 G01N2333/4703 G01N2333/4742 G01N2333/70503		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/483.C G01N33/48.P G01N33/53.Y C12Q1/04		
优先权	61/943939 2014-02-24 US		
其他公开文献	JP2017511488A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
本公开描述了通过检查组织浸润淋巴细胞 (TIL) 来评分对癌症的免疫应答的方法 , 试剂盒和系统。使用组织浸润淋巴细胞对癌症的免疫反应进行评分的方法包括 : 检测样品中的CD3 , CD8 , CD20和FoxP3 ; 手动对检测结果评分 ; 或者借助图像分析和算法对染色的数字图像评分。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6605506号 (P6605506)
(45) 発行日 令和1年11月13日 (2019. 11. 13)	(24) 登録日 令和1年10月25日 (2019. 10. 25)	
(5) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/483 (2006. 01)	GO 1 N 33/483	C
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	Y
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04	
請求項の数 16 (全 25 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-570181 (P2016-570181)	(73) 特許権者 511286517	
(92) (22) 出願日 平成27年2月20日 (2015. 2. 20)	ウェンタナ メディカル システムズ, インク, アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, ツーソン, イースト イノヴェーショ ン パーク ドライヴ 1910	
(63) 公表番号 特表2017-511488 (P2017-511488A)	(74) 代理人 110002077	
(43) 公表日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)	園田・小林特許業務法人	
(88) 国際出願番号 PCT/EP2015/053643	(72) 発明者 セバスチャン, ノエミ	
(87) 国際公開番号 W02015/124737	アメリカ合衆国 アリゾナ 85718, ツーソン, ノース マウンテン シェ ドーズ 7318	
(87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)		
審査請求日 平成30年2月6日 (2018. 2. 6)		
(31) 優先権主張番号 61/943, 939		
(32) 優先日 平成26年2月24日 (2014. 2. 24)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 CD3、CD8、CD20及びFoxP3の同時検出によりがんに対する免疫応答をスコア化するための方法、キット、及びシステム

最終頁に続く