

(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2013-540260

(P2013-540260A)

(43) 公表日 平成25年10月31日(2013.10.31)

(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	F 2 G O 4 3
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P 2 G O 4 5
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	D 2 G O 5 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 21/27	A

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2013-523368 (P2013-523368)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月5日 (2011.8.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年4月3日 (2013.4.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/046808  
 (87) 国際公開番号 W02012/019133  
 (87) 国際公開日 平成24年2月9日 (2012.2.9)  
 (31) 優先権主張番号 61/371, 151  
 (32) 優先日 平成22年8月5日 (2010.8.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513027709  
 ケンブリッジ・リサーチ・アンド・インス  
 トルメンテーション・インコーポレーテッ  
 ド  
 アメリカ合衆国・マサチューセッツ・01  
 801・ウォバーン・カボット・ロード・  
 35-B  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料の強調視覚評価

(57) 【要約】

生物学的試料を撮像するための方法およびシステムが開示され、方法は、(a)エオシンおよび少なくとも一つの追加の染色剤を含む第1の染色剤で試料を染色するステップと、(b)染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、試料に励起光を向けるステップと、(c)試料における染色剤から発光した蛍光の画像を記録するステップとを含み、試料におけるエオシンの量は、試料が緑色波長において0.10未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されている。

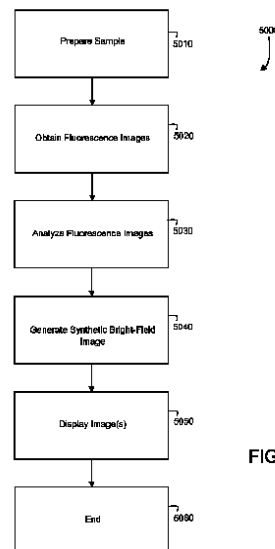


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生物学的試料を撮像するための方法であって、

- a. エオシンおよび少なくとも1つの追加の染色剤を含む第1の染色剤で前記試料を染色するステップと、
  - b. 前記染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、前記試料に励起光を向けるステップと、
  - c. 前記試料における前記染色剤から発光した前記蛍光の画像を記録するステップとを含み、
  - d. 前記試料におけるエオシンの量は、前記試料が緑色波長において0.10未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されている、
- 方法。

10

**【請求項 2】**

前記試料におけるエオシンの量は、前記試料が緑色波長において0.05未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されている、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

エオシンを含む前記第1の染色剤で前記試料を染色する前記ステップが、前記試料を溶液100mLにつきエオシン0.01g以下のエオシン濃度を有する溶液に1秒以下の間接触させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記試料におけるエオシンの量が、前記励起光にตอบสนองした前記エオシンによる、検出可能な蛍光を生み出すのに十分である、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記緑色波長が、530nmから570nmまでである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記エオシンが、エオシンY、エオシンB、およびフロキシンのうちの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記記録された画像が、異なるスペクトル帯域にスペクトル的に分解される、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

前記スペクトル帯域のうちの少なくともいくつかは、前記染色剤のそれぞれ1つに対する蛍光波長範囲に対応する、請求項5に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記生物学的試料が、血液、細胞、または組織切片を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記少なくとも1つの追加の染色剤が、蛍光性の核対比染色剤を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記蛍光性の対比染色剤が、DAPIまたはHoechstを含む、請求項10に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記少なくとも1つの追加の染色剤が、少なくとも1つの免疫蛍光染色剤をさらに含む、請求項10に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記免疫蛍光染色剤が、量子ドットを含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記励起光を向ける前記ステップが、異なるスペクトル帯域において、前記試料に励起光を順次向けるステップを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記蛍光の画像を記録する前記ステップが、複数の異なるスペクトル帯域のそれぞれに

50

における前記蛍光の画像を記録するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記試料に関する情報を得るために、前記記録された画像をコンピュータによって処理するステップをさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記記録された画像を処理する前記ステップが、前記記録された画像を非混合画像にスペクトル的にアンミックスするステップを含み、それぞれの非混合画像が、前記染色剤のそれぞれ1つからの蛍光に対応する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記記録された画像を処理する前記ステップが、前記記録された蛍光画像から前記試料の明視野画像を生成するステップを含む、請求項16に記載の方法。

10

【請求項19】

前記明視野画像が、エオシンを局在化する前記試料の領域に対応するピンク色領域と、核を含む前記試料の領域に対応する青色領域とを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記明視野画像が、免疫蛍光染色剤を局在化する前記試料の領域に対応するためにレンダリングされた追加の領域をさらに含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記試料に関する前記情報を出力するステップをさらに含む請求項16に記載の方法。

【請求項22】

前記出力された情報が、前記記録された画像から引き出された合成画像を含む、請求項21に記載の方法。

20

【請求項23】

前記緑色波長における前記試料の前記平均光学濃度と、赤色波長における前記試料の平均光学濃度との差が、0.08以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項24】

前記赤色波長が、610nmから650nmまでである、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記試料の前記平均光学濃度に対する前記エオシンの寄与が、0.05未満である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項26】

生物学的試料を撮像するための方法であって、

a. エオシン、核対比染色剤、および少なくとも1つの免疫蛍光染色剤を含む第1の染色剤で前記試料を染色するステップであって、前記試料におけるエオシンの量は、前記試料が緑色波長において0.10未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されている、染色するステップと、

b. 前記染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、前記試料に励起光を向けるステップであって、前記試料におけるエオシンの量が、前記励起光に応答した前記エオシンによる、検出可能な蛍光を生み出すのに十分である、励起光を向けるステップと、

c. 前記試料における前記染色剤から発光した前記蛍光の画像を記録するステップと、

d. 合成画像を生み出すために前記記録された画像をコンピュータによって処理するステップと、

40

e. 前記合成画像を表示するステップと

を含む方法。

【請求項27】

前記合成画像が、エオシンを局在化する前記試料の領域に対応するピンク色領域と、核を含む前記試料の領域に対応する青色領域と、前記免疫蛍光染色剤を局在化する前記試料の領域に対応するためにレンダリングされた追加の領域とを含む、明視野画像を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

50

前記記録された画像を処理する前記ステップが、前記記録された画像を非混合画像にスペクトル的にアンミックスするステップを含み、それぞれの非混合画像が、前記染色剤のそれぞれ1つからの蛍光に対応する、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記生物学的試料が、血液を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

前記試料における前記エオシンが、530nmから580nmの間の波長において0.05未満の平均光学濃度を有する、請求項26に記載の方法。

【請求項31】

前記緑色波長における前記試料の前記平均光学濃度と、赤色波長における前記試料の平均光学濃度との差が、0.08以下である、請求項26に記載の方法。

10

【請求項32】

前記赤色波長が、610nmから650nmまでである、請求項26に記載の方法。

【請求項33】

前記試料の前記平均光学濃度に対する前記エオシンの寄与が、0.05未満である、請求項26に記載の方法。

【請求項34】

生物学的試料を撮像するための方法であって、

a. エオシンおよび少なくとも1つの追加の染色剤を含む第1の染色剤で前記試料を染色するステップと、

20

b. 前記染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、前記試料に励起光を向けるステップと、

c. 前記試料における前記染色剤から発光した前記蛍光の画像を記録するステップとを含み、

d. 前記試料におけるエオシンの量が、従来の明視野H&E染色のために使用されるものよりも少ない、

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

関連出願の相互参照

本出願は、2010年8月5日に出願された米国仮特許出願第61/371,151号の優先権を主張するものであり、その全内容を参照により本明細書に組み込む。

【0002】

本開示は、細胞および組織を含む生物学的試料の染色、視覚化、および分析に関する。

【背景技術】

【0003】

細胞および組織試料の分析は、組織学的染色剤または免疫蛍光(IF)プローブを含む染色剤で試料を調製することと、次いで、試料におけるさまざまな位置に存在する染色剤の量を特定することとを含むことができる。

40

【0004】

そのような試料の自動画像分析は、組織試料内での対象エリアを見つけること、細胞の特定のタイプを突き止める、および/または対象細胞内での細胞内区画を突き止めること、ならびに、さまざまな領域、細胞、および/または細胞内区画における染色剤の量を特定することを含むことができる。多くのケースにおいて、ユーザの介入はわずかに必要であるか、または必要ない。

【0005】

IFプローブは分子特異性を有し、それにより、プローブは、標的化合物が存在する試料の領域のみに結合し、プローブ結合の量は、存在する標的化合物の量におよそ比例する。複数のIFプローブが単一の試料に適用されうることから、所与の細胞または組織切片にお

50

いて、いくつかの検体を測定することが可能である。

【0006】

視覚的な調査または自動画像分析のために、細胞試料もしくは組織試料を調製する一般的なやり方は、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色プロトコールを介するものであり、このプロトコールは、透過光顕微鏡で試料を見るときに、鮮明な色の対比を生み出す。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

概して、第一の態様において、本開示は、生物学的試料を撮像するための方法を特徴とし、方法は、(a)エオシンおよび少なくとも1つの追加の染色剤を含む第1の染色剤で試料を染色するステップと、(b)染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、試料に励起光を向けるステップと、(c)試料における染色剤から発光した蛍光の画像を記録するステップとを含み、試料におけるエオシンの量は、試料が緑色波長において0.10未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されている。

10

【0008】

方法の実施形態は、以下の特徴のうちの任意の1つまたは複数を含むことができる。

【0009】

試料におけるエオシンの量は、試料が緑色波長において0.05未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されていてよい。緑色波長は、530nmから570nmまでであってよい。

20

【0010】

エオシンを含む第1の染色剤で試料を染色するステップは、試料を溶液100mLにつきエオシン0.01g以下のエオシン濃度を有する溶液に1秒以下の間接触させるステップを含むことができる。

【0011】

試料におけるエオシンの量は、励起光に応答したエオシンによる、検出可能な蛍光を生み出すのに十分であってよい。エオシンは、エオシンY、エオシンB、およびフロキシンのうちの少なくとも1つを含むことができる。

【0012】

記録された画像は、異なるスペクトル帯域にスペクトル的に分解されてよい。スペクトル帯域のうちの少なくともいくつかは、染色剤のそれぞれ1つに対する蛍光波長範囲に対応することができる。

30

【0013】

生物学的試料は、血液、細胞、または組織切片を含むことができる。

【0014】

少なくとも1つの追加の染色剤は、蛍光性の核対比染色剤を含むことができる。蛍光性の対比染色剤は、DAPIまたはHoechstを含むことができる。少なくとも1つの追加の染色剤は、少なくとも1つの免疫蛍光染色剤を含むことができる。免疫蛍光染色剤は、量子ドットを含むことができる。

【0015】

励起光を向けるステップは、試料に異なるスペクトル帯域にある励起光を順次向けるステップを含むことができる。蛍光の画像を記録するステップは、複数の異なるスペクトル帯域のそれぞれにおける蛍光の画像を記録するステップを含むことができる。

40

【0016】

方法は、試料に関する情報を得るために、記録された画像をコンピュータによって処理するステップを含むことができる。記録された画像を処理するステップは、記録された画像を非混合画像にスペクトル的にアンミックスする(spectrally unmixing)ステップを含むことができ、それぞれの非混合画像は、染色剤のそれぞれ1つからの蛍光に対応する。記録された画像を処理するステップは、記録された蛍光画像から試料の明視野画像を生成するステップを含むことができる。明視野画像は、エオシンを局在化する試料の領域に対

50

応するピンク色領域と、核を含む試料の領域に対応する青色領域とを含むことができる。明視野画像は、免疫蛍光染色剤を局在化する試料の領域に対応するためにレンダリングされた追加の領域を含むことができる。

【0017】

方法は、試料に関する情報を出力するステップを含むことができる。出力された情報は、記録された画像から引き出された合成画像を含むことができる。

【0018】

緑色波長における試料の平均光学濃度と、赤色波長における試料の平均光学濃度との差は、0.08以下であってよい。赤色波長は、610nmから650nmまでであってよい。

【0019】

試料の平均光学濃度に対するエオシンの寄与は、0.05未満であってよい。

【0020】

方法の実施形態はまた、本明細書で開示する他の特徴のうちのいずれかを、任意の組み合わせにおいて、適宜含むことができる。

【0021】

別の態様において、本開示は、生物学的試料を撮像するための方法の特徴とし、方法は、(a)エオシン、核対比染色剤、および少なくとも1つの免疫蛍光染色剤を含む第1の染色剤で試料を染色するステップであって、試料におけるエオシンの量は、試料が緑色波長において0.10未満の平均光学濃度を有するように十分に希釈されている、染色するステップと、(b)染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、試料に励起光を向けるステップであって、試料におけるエオシンの量が、励起光にตอบสนองしたエオシンによる、検出可能な蛍光を生み出すのに十分である、励起光を向けるステップと、(c)試料における染色剤から発光した蛍光の画像を記録するステップと、(d)合成画像を生み出すために記録された画像をコンピュータによって処理するステップと、(e)合成画像を表示するステップとを含む。

【0022】

方法の実施形態は、以下の特徴のうちの任意の1つまたは複数を含むことができる。

【0023】

合成画像は、エオシンを局在化する試料の領域に対応するピンク色領域と、核を含む試料の領域に対応する青色領域と、免疫蛍光染色剤を局在化する試料の領域に対応するためにレンダリングされた追加の領域とを特徴とする、明視野画像を含むことができる。

【0024】

記録された画像を処理するステップは、記録された画像を非混合画像にスペクトル的にアンミックスするステップを含むことができ、それぞれの非混合画像は、染色剤のそれぞれ1つからの蛍光に対応する。

【0025】

生物学的試料は、血液を含むことができる。

【0026】

試料におけるエオシンは、530nmから580nmの間の波長において0.05未満の平均光学濃度を有することができる。緑色波長における試料の平均光学濃度と、赤色波長における試料の平均光学濃度との差は、0.08以下であってよい。赤色波長は、610nmから650nmまでであってよい。

【0027】

試料の平均光学濃度に対するエオシンの寄与は、0.05未満であってよい。

【0028】

方法の実施形態はまた、本明細書で開示する他の特徴のうちのいずれかを、任意の組み合わせにおいて、適宜含むことができる。

【0029】

さらなる態様において、本開示は、生物学的試料を撮像するための方法の特徴とし、方法は、(a)エオシンおよび少なくとも1つの追加の染色剤を含む第1の染色剤で試料を染色

10

20

30

40

50

するステップと、(b)染色剤のそれぞれが蛍光を発光するように、試料に励起光を向けるステップと、(c)試料における染色剤から発光した蛍光の画像を記録するステップとを含み、試料におけるエオシンの量は、従来の明視野H&E染色のために使用されるものよりも少ない。

【0030】

方法の実施形態はまた、本明細書で開示する他の特徴のうちのいずれかを、任意の組み合わせにおいて、適宜含むことができる。

【0031】

別段定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的な用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で言及されるすべての発行物、特許出願書、特許、および他の参考文献を、その全体において参照により組み込む。矛盾する場合には、定義を含め、本明細書が支配するものとする。加えて、材料、方法、および実施例は、例示のみであり、限定することを意図しない。

10

【0032】

1つまたは複数の実施形態の詳細を、添付の図面および以下の説明において記載する。他の特徴および効果は、説明、図面、および特許請求の範囲から、明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】試料の評価のための方法における一連のステップを示す流れ図である。

20

【図2A】DAPI、およびHer2にコンジュゲートされたAlexa Fluor 594からなるIF標識で調製した試料の透過光画像である。

【図2B】図2A同様に、DAPI、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識で調製した試料の、さらに20秒間の0.0011%エオシンYおよび0.00011%フロキシニンBの希釈エオシン染色プロトコールに従って作成した透過光画像である。

【図2C】図2A同様に、DAPI、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識で調製した試料の、さらに20秒間の0.112%エオシンYおよび0.0112%フロキシニンBの従来のエオシン染色プロトコールに従って作成した透過光画像である。

【図3A】電磁スペクトルの青色領域における図2Bの試料の蛍光発光画像である。

【図3B】電磁スペクトルの緑色領域における図2Bの試料の蛍光発光画像である。

30

【図3C】電磁スペクトルの赤色領域における図2Bの試料の蛍光発光画像である。

【図3D】電磁スペクトルの青色領域における図2Cの試料の蛍光発光画像である。

【図3E】電磁スペクトルの緑色領域における図2Cの試料の蛍光発光画像である。

【図3F】電磁スペクトルの赤色領域における図2Cの試料の蛍光発光画像である。

【図4A】試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、Her2成分信号に対応した図2Bの試料の成分画像である。

【図4B】試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、DAPI成分信号に対応した図2Bの試料の成分画像である。

【図5A】試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、Her2成分信号に対応した図2Cの試料の成分画像である。

40

【図5B】試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、DAPI成分信号に対応した図2Cの試料の成分画像である。

【図6A】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、Alexa Fluor 594、および組織自己蛍光の寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図2Bの試料の合成透過光H&E画像の青色チャネルに対応した画像である。

【図6B】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、Alexa Fluor 594、および組織自己蛍光の寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン信号

50

をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図2Bの試料の合成透過光H&E画像の緑色チャンネルに対応した画像である。

【図6C】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、Alexa Fluor 594、および組織自己蛍光の寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図2Bの試料の合成透過光H&E画像の赤色チャンネルに対応した画像である。

【図7A】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、Alexa Fluor 594、および組織自己蛍光の寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図2Cの試料の合成透過光H&E画像の青色チャンネルに対応した画像である。

【図7B】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、Alexa Fluor 594、および組織自己蛍光の寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図2Cの試料の合成透過光H&E画像の緑色チャンネルに対応した画像である。

【図7C】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、Alexa Fluor 594、および組織自己蛍光の寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図2Cの試料の合成透過光H&E画像の赤色チャンネルに対応した画像である。

【図8A】DAPI、およびHer2にコンジュゲートされた605nmで発光する量子ドットで調製し、続いて20秒間、0.0011%エオシンYおよび0.00011%フロキシシンBの希釈エオシン染色プロトコールを行った試料からの、青色蛍光発光に対応した画像である。

【図8B】DAPI、およびHer2にコンジュゲートされた605nmで発光する量子ドットで調製し、続いて20秒間、0.0011%エオシンYおよび0.00011%フロキシシンBの希釈エオシン染色プロトコールを行った試料からの、緑色蛍光発光に対応した画像である。

【図8C】DAPI、およびHer2にコンジュゲートされた605nmで発光する量子ドットで調製し、続いて20秒間、0.0011%エオシンYおよび0.00011%フロキシシンBの希釈エオシン染色プロトコールを行った試料からの、赤色蛍光発光に対応した画像である。

【図9】図8A～図8Cの試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、Her2成分蛍光信号の画像である。

【図10A】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、および量子ドットの寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号をレンダリングし、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図8A～図8Cの試料の合成透過光H&E画像の青色チャンネルに対応した画像である。

【図10B】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、および量子ドットの寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号をレンダリングし、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図8A～図8Cの試料の合成透過光H&E画像の緑色チャンネルに対応した画像である。

【図10C】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン、および量子ドットの寄与の推定値を生み出し、白色背景の上に、青色でDAPI信号をレンダリングし、ピンク色でエオシン信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図8A～図8Cの試料の合成透過光H&E画像の赤色チャンネルに対応した画像である。

【図11】試料についての蛍光発光信号から、試料の合成透過光画像を調製するための一連のステップを含む流れ図である。

10

20

30

40

50

【図12A】DAPI、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識で調製した試料の、さらに20秒間の0.02%フロキシシンBの希釈エオシンプロトコールに従って作成した試料の透過光画像である。

【図12B】DAPI、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識で調製した試料の、さらに20秒間の1%フロキシシンBの従来のエオシンプロトコールに従って作成した透過光画像である。

【図13A】図12Aの試料からの青色蛍光発光に対応した画像である。

【図13B】図12Aの試料からの緑色蛍光発光に対応した画像である。

【図13C】図12Aの試料からの赤色蛍光発光に対応した画像である。

【図13D】図12Bの試料からの青色蛍光発光に対応した画像である。

【図13E】図12Bの試料からの緑色蛍光発光に対応した画像である。

【図13F】図12Bの試料からの赤色蛍光発光に対応した画像である。

【図14A】図12Aの試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、Her2成分信号の画像である。

【図14B】図12Aの試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、DAPI成分信号の画像である。

【図15A】図12Bの試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、Her2成分信号の画像である。

【図15B】図12Bの試料のマルチスペクトル蛍光画像をアンミックスすることによって得られた、DAPI成分信号の画像である。

【図16A】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン(フロキシシンB)、およびAlexa Fluor 594の寄与の推定値を生み出し、白色背景に対して、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン(フロキシシンB)信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図12Aの試料の合成透過光H&E画像の青色チャンネルに対応した画像である。

【図16B】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン(フロキシシンB)、およびAlexa Fluor 594の寄与の推定値を生み出し、白色背景に対して、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン(フロキシシンB)信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図12Aの試料の合成透過光H&E画像の緑色チャンネルに対応した画像である。

【図16C】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン(フロキシシンB)、およびAlexa Fluor 594の寄与の推定値を生み出し、白色背景に対して、青色でDAPI信号を、ピンク色でエオシン(フロキシシンB)信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図12Aの試料の合成透過光H&E画像の赤色チャンネルに対応した画像である。

【図17A】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン(フロキシシンB)、およびAlexa Fluor 594の寄与の推定値を生み出し、白色背景に対して、青色でDAPI信号を、ピンク色染色でエオシン(フロキシシンB)信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図12Bの試料の合成透過光H&E画像の青色チャンネルに対応した画像である。

【図17B】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン(フロキシシンB)、およびAlexa Fluor 594の寄与の推定値を生み出し、白色背景に対して、青色でDAPI信号を、ピンク色染色でエオシン(フロキシシンB)信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図12Bの試料の合成透過光H&E画像の緑色チャンネルに対応した画像である。

【図17C】全マルチスペクトル画像キューブが取得され、次いでスペクトル的にアンミックスされて、各画素におけるDAPI、エオシン(フロキシシンB)、およびAlexa Fluor 594の寄与の推定値を生み出し、白色背景に対して、青色でDAPI信号を、ピンク色染色でエオシン(フロキシシンB)信号をレンダリングすることによって合成透過光H&E画像を生み出した、図12Bの試料の合成透過光H&E画像の赤色チャンネルに対応した画像である。

10

20

30

40

50

【図18】スペクトル画像システムの概略図である。

【図19】図6A～図6Cの組み合わせられた画像に対応した画像である。

【図20】図7A～図7Cの組み合わせられた画像に対応した画像である。

【図21】図10A～図10Cの組み合わせられた画像に対応した画像である。

【図22】図16A～図16Cの組み合わせられた画像に対応した画像である。

【図23】図17A～図17Cの組み合わせられた画像に対応した画像である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

さまざまな図面における同様の参照記号は、同様の要素を示す。

【0035】

10

エオシンは、試料の明視野画像を生成するために、ヘマトキシリンおよびエオシン調製の一部として、細胞および組織に一般的に適用される染色剤である。本明細書で使用する時、染色剤は、生物学的試料に適用されるときに、試料の中のどこに組成物が局在化されるかを空間的に識別するのに十分な、光学的に検出可能なシグネチャを生み出す任意の組成物であり、試料の明視野画像は、試料を通して透過する光のビューに対応した画像である。試料を通して伝播する光が、エオシンなどの染色剤に遭遇すると、視覚的な色および対比が、光吸収および/または光散乱の機構によって生み出される。

【0036】

本明細書で開示する方法およびシステムは、検出器で(またはオペレータの目の中で)画像を形成する光が、試料からの蛍光発光に対応する、試料の蛍光撮像に使用されてよい。蛍光画像を得るために、試料は、通常、試料中の分子を励起する特定の波長帯域の入射光にさらされる。励起した分子は、異なる、より長い波長の蛍光性の光を放射し、この放射光は検出されて、1つまたは複数の試料の画像を形成するために使用される。たとえば、異なる波長帯域の発光を検出することによって、複数の励起帯および発光帯を使用することができ、いくつかの異なる分子種を撮像することが可能である。試料から発光した蛍光は、暗い背景に対して見られるので、蛍光画像は、「暗視野画像」の例である。

20

【0037】

本明細書で開示するシステムおよび方法は、たとえば、生物学的試料の蛍光撮像に適用してよい。とりわけ、本方法およびシステムは、他の蛍光化合物もまた含むことができる生物学的試料をエオシンで染色するために使用してよい。本明細書で使用する時、生物学的試料は、血液、細胞、および/または組織などの、(ヒトを含む)動物から抽出された材料を含む試料である。さらに、本明細書で使用する時、蛍光は、より短い波長の入射放射線に応答して物質が放射した可視または不可視の放射線である。

30

【0038】

典型的には、本明細書で開示する方法およびシステムを使用し、やはり免疫蛍光(IF)標識化を使用して調製される試料に希釈量のエオシンを適用し、その後蛍光撮像技法を使用して撮像する。本明細書で使用する時、免疫蛍光染色剤は、生物学的試料中の特定の抗原または抗体に選択的であり、蛍光を示す染色剤である。いくつかの実施形態において、IF標識化は、他の蛍光化合物または蛍光構造体の代わりに、またはそれらに加えて、量子ドットを利用する。

40

【0039】

いくつかの実施形態において、試料は、希釈量のエオシンで、および蛍光性の核対比染色剤で調製され、次いで蛍光撮像技法を使用して撮像される。試料の合成H&Eビューは、試料の1つまたは複数の画像から得られる、エオシンと、核対比染色剤とに対応した別箇の蛍光信号に基づいて、生み出されてよい。観察者には、合成画像における試料が、従来のH&Eプロトコールに従って染色され、透過光顕微鏡において見られる試料であるかのように見えるように、合成画像が作成される。合成画像は、分析のために、または自動試料分類の確認のために、研究者または臨床医に提示されてよい。

【0040】

特定の実施形態において、試料は、希釈量のエオシンで、核対比染色剤で、およびIF標

50

識化により調製される。試料の蛍光撮像は、試料の成分画像として、エオシンに、および核対比染色剤に対応した蛍光発光信号をもたらし、これらの成分画像を、自動分類器に提示する、または臨床医もしくは研究者に提示するための試料の合成H&E画像を生成するのに使用することができる。試料中のIF標識からの蛍光発光に対応した1つまたは複数の画像は、IF標識が標的とする化合物の存在または分布などの、試料に関するさらなる情報を提供することができる。

**【0041】**

したがって、たとえば、本明細書で開示する方法およびシステムは、試料からの蛍光発光に基づいた、試料の視覚化を提供する。本システムおよび方法はまた、蛍光発光信号に基づいての自動画像分析の改善、ならびに蛍光発光に基づいた個々の試料の視覚的な調査および自動画像分析を可能にする。

10

**【0042】**

いくつかの実施形態において、本明細書で開示する方法およびシステムは、蛍光撮像によって、循環腫瘍細胞などの希少事象の細胞を突き止め、識別するために使用されてよい。これらの事象を識別するために検査される細胞は、最初に核対比染色剤および/または1つもしくは複数のIF標識を適用した後に、エオシンで非常に弱く染色される。エオシンからの蛍光発光、および少なくとも1つの他の蛍光実体に対応した画像が取得され、これらの画像は、自動分類を改善するために、または臨床医もしくは研究者による視覚評価のための細胞の合成H&Eビューを作成するために、使用されてよい。

**【0043】**

細胞および組織試料中の細胞核および核領域の識別は、試料分類の目的のため、および細胞の核領域を冒す状態の診断のために、しばしば重要である。核領域を識別するために、試料を、細胞内で核に優先的に結合するHoechstおよび/またはDAPIなどの蛍光化合物を使用して調製することができる。そのような化合物からの蛍光発光は、対象の核領域を識別するために使用されてよい。

20

**【0044】**

さらに、幅広いさまざまなIF標識が、試料中の、特定のタンパク質、核酸、および他の化学的部分および/もしくは構造的実体を識別するために使用されてよい。試料内でのこれらのIF標識の分布から引き出された情報と、蛍光性の核染色剤によって提供された核情報との組み合わせにより、染色された組織試料の自動分類および評価が可能になる。

30

**【0045】**

細胞および組織試料の分類および評価は、細胞質および特定の他の構造体に優先的に結合するエオシンの試料への適用を介して、追加の構造情報を提供することによって、向上しうる。これは、分類目的および視覚評価のために使用することができる、試料に関する情報を提供する。エオシンは、一般的に、試料を通して透過した光を観察することによって染色された試料を見るために設計されたプロトコールを使用して、発色染色剤(最も顕著にはヘマトキシリン)と組み合わせて使用される。透過光撮像の幾何学的配置において、エオシンは、緑色の光を強力に吸収することから、薄い(たとえば、4ミクロンの)組織切片においてさえ、鮮やかなピンク色として見える。結果として、エオシンは、人間の目によって、またはCCDカメラなどの検出器によって、容易に検出される。

40

**【0046】**

しかしながら、多くの状況において、蛍光撮像は、透過光撮像よりも一層有用な結果をもたらす。たとえば、蛍光撮像は、特定の試料においてより多くのプローブの使用(たとえば、「多重化」効果)を可能にし、それにより、より多くの数のタンパク質、核酸、および/または他の部分を測定することができる。代替として、またはそれに加えて、たとえば、蛍光撮像は、試料内の特定の構成物質の濃度などの測定可能なパラメータのための、より正確な定量的結果をもたらすことができる。特定の実施形態において、有利な蛍光標識化プロトコールが、対象の特定のアッセイのために既に確立されていることがある。

**【0047】**

試料が従来のエオシンプロトコールに従って調製され、かつ1つもしくは複数の蛍光染

50

色剤またはIF標識がさらに試料に適用されたとき、適用された他の染色剤またはマーカからの蛍光発光に対応した高品質な画像を得ることは難しいことが、実験で明らかにされている。とりわけ、従来の染色プロトコールに従って適用されたときのエオシンは、試料に適用された他の染色剤からの蛍光発光と干渉する。理論に拘束されることを望むものではないが、この干渉は、他の染色剤からの蛍光発光がエオシンによって消失することから、またはエオシンからの独立した蛍光発光によって、またはこれらの要因の組み合わせから、生じるものと考えられる。結果として、エオシンに起因しうる信号が優位に立つ傾向があり、他の蛍光染色剤およびIF標識からの寄与を目立たなくすることから、概して、試料の画像を正確に分析することは難しい。そのような画像に基づいた視覚的な調査は、臨床医および研究者にとって満足のいくものではない。

10

#### 【0048】

##### 一般的方法論

概して、従来のエオシン染色プロトコールは、試料に著しい量のエオシンを適用して、エオシンが結合する化合物および構造体の高感度な検出および定量的測定を可能にするように設計されている。本明細書で使用するとき、「従来の明視野H&E撮像」は、生物学的試料をヘマトキシリンおよびエオシンで染色して、病理学者による視覚検査のための試料の明視野画像を生み出すプロセスを指す。使用するエオシンの量は、電磁スペクトルの緑色領域において光を吸収し、エオシン染色領域がピンク色に見える画像を生み出すのに十分に多い。上で説明したように、そのような分量のエオシンの使用は、正確な定量測定値をもたらすことが観察されている一方で、適用されたエオシンは、存在しうる他の染色剤および/またはIFマーカからの蛍光発光と干渉する。しかしながら、標準的な発色染色プロトコールにおいて適用されるエオシンの量と比較して、試料に適用されるエオシンの量を大幅に減らした場合、エオシンは、蛍光核染色剤およびIFマーカと組み合わせで首尾よく使用されることが分かっている。驚くべきことに、エオシンの量を著しく減らしたとしても、エオシン成分に関連付けられた測定の空間的および定量的な精度には影響しない。さらに、エオシンが大量に適用された場合に存在するであろう著しい混同作用なしに、蛍光染色剤および/またはIF標識からの寄与の測定を実施することができる。

20

#### 【0049】

透過光撮像のための典型的なエオシン染色プロトコールは、組織試料を、重量で0.12%~1.0%濃度のエオシンYを含有する溶液に、20から120秒の間の時間さらす。いくつかのプロトコールはまた、重量で0.01%のフロキシシンBを含む。それほど一般的ではないが、エオシンYに加えて、またはエオシンYの代わりに、エオシンBが使用される。この処理の後で、エオシンが吸収された試料領域は、視覚検査時に人間の目には強く色づいて見える。図2Cは、DAPI、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識の組み合わせで染色され、さらに、重量で0.112%のエオシンYおよび重量で0.0112%のフロキシシンBからなる従来のエオシン調製で20秒間染色された、透過光撮像モダリティで見た、胸部組織試料の画像を示す。

30

#### 【0050】

対照的に、本明細書で開示する蛍光撮像のための方法およびシステムは、試料に対するはるかに少ない分量のエオシンの適用を含む。いくつかの実施形態において、たとえば、試料を、先程説明した従来のプロトコールで使用されるエオシンよりも、約20倍薄い(たとえば、重量で0.005%のエオシン)、約50倍薄い(たとえば、重量で0.002%のエオシン)、約100倍薄い(たとえば、重量で0.001%)、またはさらに薄いエオシン溶液にさらす。フロキシシンBは、典型的には、重量でおよそ0.0005%濃度か、それよりも低濃度(たとえば、重量でおよそ0.0002%、重量でおよそ0.0001%)で存在する。

40

#### 【0051】

試料をエオシン溶液にさらす時間は、概してさまざまであってよい。典型的には、たとえば、試料を、1秒から3秒の間の時間(たとえば、3.0s以下、2.5s以下、2.0s以下、1.5s以下、1.0s以下の間)さらす。概して、エオシン染色溶液の濃度および/または試料の露出時間を減らすことによって、より少量のエオシンが試料に適用される。

#### 【0052】

50

試料に適用されるエオシンの量が従来の染色剤プロトコールよりも著しく少なくても、細胞内および組織内のエオシンの分布は、特異性を有し続ける。一様なかすかな淡彩(wash)を形成しないものの、むしろ選択的に局在化し続け、より短い適用時間で、より低濃度にもかかわらず、エオシンは、従来のプロトコールが使用されるときと同じ構造体において、優先的に局在化する。

#### 【0053】

このやり方で適用するとき、エオシンによる光吸収は、試料におけるその比較的低い濃度のために、著しく減衰される。概して、エオシンによる光吸収は、試料検査時に、目では容易に観察されない。したがって、透過光顕微鏡の画像においては、エオシンの存在は、不可視、または弱い可視にすぎない。図2Bは、DAPI、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識、ならびに0.0011%エオシンYおよび0.00011%フロキシンBの溶液を20秒間適用することを含んだ希釈エオシン染色剤プロトコールに従って調製した試料の例示的な画像を示す。図2Bでは、特定の試料構造が可視であるが、エオシンの存在は、概して認められず、試料の全体の見た目にわずかな寄与を行うにすぎない。比較の目的のために、エオシンなしの組織試料の透過光画像を図2Aに示す。

10

#### 【0054】

比較的low濃度のエオシンにもかかわらず、本明細書で開示する希釈エオシンプロトコールに従って染色した試料からの蛍光発光の測定は、エオシンの存在および分布を直ちに明らかにする。図3Aは、図2Aに示すのと同じ試料からの、電磁スペクトルの緑色領域における蛍光発光の例示的な画像を示す。比較的高感度の蛍光検出技法の使用により、上で開示したさまざまな態様に従って、幅広く異なる希釈エオシン染色プロトコールを試料に使用することが可能になる。

20

#### 【0055】

蛍光撮像において、エオシンは、通常、他の蛍光化合物からの発光が検出されるのと同じ一般的なやり方で検出されてよい。青色の光によって励起されるとき、エオシンは蛍光を発し、蛍光発光の色は、緑色から黄色である。したがって、蛍光画像におけるエオシンの見た目は、明視野画像においてエオシンが有するピンク色の見た目とは異なる。しかしながら、入射光のその吸収に基づいて透過光において検出されるにせよ、その蛍光発光に基づいて検出されるにせよ、エオシンは同じ試料構造体に結合する。したがって、エオシン吸収またはエオシン蛍光の検出のいずれも、試料に関する実質的に同じ構造情報を提供する。

30

#### 【0056】

上で論じたように、エオシンに加えて、1つまたは複数の蛍光性の核対比染色剤を、分析の前に組織試料に適用することができる。本明細書で使用するとき、核対比染色剤は、細胞核内での構造体に優先的に結合する化合物である。例示的な蛍光性の核対比染色剤は、Hoechst 33258、Hoechst 33342、および4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含む。核対比染色剤で組織試料を調製するための方法は、たとえば、文献「DAPI Nucleic Acid Stain」に開示されており、インターネットアドレス<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/cell-and-tissue-analysis/dapi-protocol/dapi-nucleic-acid-stain.html>にて入手可能である。この文献の全内容を参照により本明細書に組み込む。

40

#### 【0057】

さらに、上で論じたように、1つまたは複数の追加の蛍光マーカールを試料に適用して、試料内の構造要素または生物学的部分に関する追加の情報を提供することができる。蛍光を発する有機化合物を組み込むIFプローブに加えて、IF蛍光マーカールは、量子ドットベースのプローブを含むことができる。これらのプローブは、そのスペクトル特性(たとえば、発光波長)に従って選択されてよく、概して、異なるタイプの構造体に、または異なる化合物に選択的に結合する複数の異なるプローブが、試料に適用されてよい。

#### 【0058】

いくつかの実施形態において、マーカールは、比較的狭帯域の入射放射線を使用して、す

50

べてが励起されうるように、選択されてよい。したがって、染色剤およびマーカのそれぞれから蛍光発光を誘導することは、共通の線源からの励起放射線によって達成されてよく、染色剤およびマーカのそれぞれからの蛍光は、別々に測定されて、試料に関する幅広い情報をもたらすことができる。たとえば、DAPIで20000:1に希釈した希釈エオシンを使用し、かつ605nmで発光する量子ドットに基づいたIF標識を使用して、試料を調製することができる。次いで、340~400nmの範囲における紫外(UV)線の線源を使用して、試料を励起することができる。画像システムにおいて、ロングパスフィルタを使用して、430nmから680nmの範囲のみの光の透過を許可し、紫外線を遮断することができる。次いで、すべての種(たとえば、エオシン、DAPI、およびIF標識)からの蛍光発光を、試料の単一の蛍光画像において観察することができる。

10

**【0059】**

いくつかの実施形態において、異なる波長において励起されたマーカを、試料に適用することができる。マルチバンドフィルタを使用して、広帯域励起源からの光をフィルタして、多波長帯域のエネルギーを有する光線を生み出すことができ、試料に適用されたすべてのマーカからの蛍光発光を同時に撮像することができる。代替として、特定の実施形態において、シングルバンドフィルタを連続して使用して、適用されたマーカのそれぞれからの蛍光発光を順次測定することができる。多波長励起および蛍光発光の検出についての技法は、蛍光顕微鏡検査法の分野において知られている。

**【0060】**

試料の染色が完了すると、染色された試料は、さまざまな半自動および全自動の方法を使用して撮像され、評価されてよい。図1は、試料の評価を実施するための一連のステップを特徴とする流れ図5000を示す。流れ図5000の第1のステップ5010は、試料を調製することである。上で論じたように、試料の調製は、エオシン、核対比染色剤、およびオプシオンで、1つもしくは複数の追加の蛍光染色剤またはIFプローブを、試料に適用するステップを含む。

20

**【0061】**

調製されると、ステップ5020で、試料は入射光にさらされ、試料からの蛍光発光(たとえば、試料の1つまたは複数の蛍光画像を得ることによって)測定される。とりわけ、色カメラなどのスペクトル的に高感度な検出器を使用して、試料の単一の蛍光画像を得ることができる。代替として、試料に適用されたさまざまな染色剤についての発光波長に対応する一連の光学フィルタを使用することによって、試料の一連の蛍光画像を得ることができる。いくつかの実施形態において、試料画像のスペクトルキューブを得ることができ、ここで、キューブの各平面は、特定の蛍光波長における試料画像に対応し、試料が1つまたは複数のスペクトル帯域における光によって励起される間に、キューブの平面を得ることができる。

30

**【0062】**

ステップ5030で、試料に存在するそれぞれの染色成分に対応した成分画像を得るために、画像が分析される。理想的には、それぞれの成分画像は、試料中の単一の蛍光成分からの寄与に主に対応する。たとえば、本明細書で開示するように調製した試料の画像を、エオシンに対応した成分画像、適用した核染色剤のそれぞれに対応した成分画像、ならびに追加の蛍光染色剤および免疫蛍光マーカのそれぞれに対応した成分画像をもたらすように分析することができる。試料の画像はまた、1つまたは複数の自己蛍光成分画像をもたらすように分析されてもよい。

40

**【0063】**

いくつかの実施形態において、分析は、特定の画像または色平面を試料成分に割り当てることを含むことができる。たとえば、DAPI、希釈エオシン、およびAlexa Fluor 594に基づいたIF標識で調製した試料を、トリプルバンドフィルタ(たとえば、Chroma Technology Corp.、ペローズフォールズ、バーモント州から、フィルタ番号69002として入手可能)を使用して撮像することができる。結果として得られた色蛍光画像の青色信号は、DAPI蛍光に割り当てられてよく、緑色信号は、エオシン蛍光に割り当てられてよく、赤色信号は

50

、Alexa Fluor 594に基づいたIF標識からの蛍光に割り当てられてよい。この手法は、分かりやすいという利点を有し、求められる成分の数が比較的少なく(たとえば、3つ以下)、背景自己蛍光が少ない場合に使用することができる。

#### 【0064】

特定の実施形態において、いくつかのフィルタを次々に使用して、試料を撮像することができる。この技法は、1つの成分を優先的に励起して他の成分を励起しない、好適な光の波長範囲が識別される場合に、改善された成分画像をもたらすことができる。たとえば、一連の励起フィルタを使用して上で説明した試料を撮像するために、第1の画像は、試料が、350nmを中心とする光で励起され、435~480nmの範囲における光を透過するバンドパスフィルタ(フィルタ番号49000、Chroma Technologies Corp.から入手可能)を用いて見られる間に、得られてよい。第2の画像は、試料が、500nmを中心とする光で励起され、520~700nmの範囲における光を透過するロングパスフィルタ(フィルタ番号49029、Chroma Technologies Corp.から入手可能)を用いて見られる間に、得られてよい。第3の画像は、試料が、530~560nmの範囲における光で励起され、570~640nmの範囲における光を透過するフィルタ(フィルタ番号49006、Chroma Technologies Corp.から入手可能)を用いて見られる間に、得られてよい。この例において、分析は、第1の画像をDAPI蛍光に対応した成分画像として割り当て、第2の画像をエオシン蛍光に対応した成分画像として割り当て、第3の画像をAlexa Fluor 594からの蛍光に対応した成分画像として割り当てることからなる。

10

#### 【0065】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のフィルタセットを使用して試料からの蛍光発光を測定することによって、スペクトル画像キューブを得ることができ、分析は、成分の異なる蛍光信号に対応した成分画像を生成するために、画像キューブをアンミックスすることを含む。試料のスペクトル撮像のための方法、およびスペクトル画像をアンミックスするための方法は、たとえば、同一出願人が所有する米国特許第7,555,155号および7,321,791号、ならびに米国特許出願公開第2008/0294032号に広く開示されており、これらのそれぞれの全内容を参照により本明細書に組み込む。スペクトル非混合技法が用いられるとき、試料に適用されたマーカーおよび染色剤の蛍光発光信号から、自己蛍光の寄与を分離するやり方として、非混合計算は、試料中の自己蛍光に関連付けられた基準スペクトルデータを含むことができる。

20

30

#### 【0066】

オプションのステップ5040で、試料の合成明視野画像が生成されてよい。合成明視野画像を生成するために、適用された染色剤およびマーカーのうちの1つまたは複数に対応した成分画像が、合成成分吸収画像に変換される。蛍光成分画像において、各画素における信号は、その画素における蛍光強度に対応する。蛍光強度情報を使用して、蛍光発光成分画像を成分吸収画像に変換し、ここで、各画素における強度は、その画素における試料の成分による入射光の吸収に関連する。合成画像におけるそれぞれの成分は、標的色を割り当てられてよく、標的色は、自由に、たとえば、試料の特定の構造的特徴をハイライトすること、試料中の特定の成分の分布を見せること、および/または試料吸収の直接測定によって得られることになる画像に類似した合成吸収画像を生み出すことができる。すなわち、適切に選択された標的色および成分画像を使用することによって、試料の合成吸収画像をレンダリングすることができ、合成画像は、所望の標的色を有する吸収性染色剤が透過光顕微鏡で見られた場合に観察されることになる試料の画像に対応する。例として、核対比染色剤およびエオシンで染色した試料の合成吸収画像を作成することができ、ここで、核対比染色剤をレンダリングするための標的色は青色であり、エオシンをレンダリングするための標的色はピンク色である。これらの色が選択されるのは、これらの色が、従来のH&E調製を使用して調製され、透過光顕微鏡で見られる試料において、ヘマトキシリンおよびエオシンに関連付けられているからである。より一般的には、画像における改善された鋭敏さを含んださまざまな目的のために、他の色が選ばれてもよい。

40

#### 【0067】

50

合成H&Eビューに加えて、試料中の単一の成分(または2つ以上の成分)の見た目を、それを分離して見るようにレンダリングすることができる。概して、合成ビューにおいて示される成分の数は、試料中の実際の成分の数と一致する必要はない。試料中にいくつかの蛍光成分が存在するとき、試料成分からの蛍光寄与のさまざまな有用な組み合わせが、試料画像としてレンダリングされてよい。たとえば、核対比染色剤からの寄与およびIFプローブからの寄与を含む試料画像が、ヘマトキシリンおよびDABの免疫組織化学的(IHC)染色の透過光画像をシミュレートするために作成されてよい。いくつかの実施形態において、試料の蛍光成分画像は、個々の成分の明視野画像としてレンダリングされてよい。

【0068】

たとえば、各画素における色が、多くの用途に好まれうる赤色、緑色、青色(RGB)値のトリプレットとして表される、吸収画像が計算されてよい。しかしながら、色はまた、色相飽和強度色空間などの他の色空間において表されてもよい。いくつかの実施形態において、色は、個々のエントリが特定の波長に対応したスペクトルを使用して表されてよい。色を表すこれらの異なる方法は、比色法およびコンピュータグラフィックスの分野においてよく知られている。

10

【0069】

図11は、試料の吸収画像を構築するための一連のステップを含む流れ図5105を示す。第1のステップ5110において、以下でより詳細に論じるように、好適な成分画像が選択される。通常、成分画像は、試料内の個々の成分(たとえば、試料に適用された染色剤および/またはマーカー、ならびに自己蛍光)からのスペクトル寄与に対応する。

20

【0070】

次に、ステップ5120で、成分ごとに標的色が選択される。色は、試料の画像を見るオペレータによって観察されることになる色を模倣するように選択されても、または、適用された染色剤のうちの1つまたは複数の局在化など、試料の特定の特徴をハイライトするように選択されてもよい。たとえば、蛍光成分画像から試料の合成明視野画像を生成するために、選択されたエオシン成分の標的色はピンク色であってよく、選択されたDAPI成分の標的色は青色であってよい。というのは、これらの色が、エオシンおよびDAPIが透過光H&E画像において見える色だからである。

【0071】

ステップ5130で、初期の背景色値が選ばれる。背景色は、各画素における赤色、緑色、および青色信号の初期量を定義し、それは、試料が存在しない画像の領域において見える色である。背景色は、通常、各原色の等量を意味する白色であるが、そうである必要はない。次いで、各画素において、特定の色信号(たとえば、赤色)の量が、第1の選択された成分画像の対応する画素の信号値、およびその成分についての標的色に依存する量だけ減衰される。これは、標的色を有する染色剤による光の吸収を、成分画像の信号によって表される染色剤の量でシミュレートする。

30

【0072】

次に、合成画像が画素ごとに作成される。各画像画素内で、すべての成分からの寄与が計算され、成分ごとに、すべての色チャンネルにおける寄与が決定される。プロセスは、画素位置、成分、および色チャンネルが選択されるステップ5140で開始される。

40

【0073】

よく知られたランベルトベールの法則は、吸収性材料を通過する光の強度が、 $I=I_0 \cdot 10^{-OD}$ によって与えられることを述べており、ここで、光の強度 $I$ は、指数関数的減衰に従って、吸収のために初期値 $I_0$ から減少し、これは従来、光学濃度の単位、すなわちODで表される。吸収の度合いは、概して、波長に依存する。この表記法は、実際の物理的試料において測定された吸収を表すために、または本明細書で説明するような合成画像を生成するときなどにシミュレートされた吸収を表すために、使用されてよい。

【0074】

所与の画素における特定の色の量を計算するために、画素において測定された蛍光信号(存在する染色剤の量を示す)に比例し、さらに、その色に関連付けられた成分の標的表示

50

色に関連付けられた特有の吸収係数 $K$ に比例する光のその色に、光学濃度を指定することができる。たとえば、所与の画素の赤色チャンネルにおいて、赤色信号の光学濃度、 $OD(\text{Red})$ を、以下のように計算することができる。

$$OD(\text{Red}) = K_{\text{red}} * C$$

ここで、 $C$ は、成分信号強度であり、 $K_{\text{red}}$ は、成分についての吸収係数である。ステップ5150でこの計算が実施されて、特定の色チャンネル(たとえば、赤色)に関連付けられた光学濃度を決定する。

#### 【0075】

次いで、ステップ5160で、結果としての色チャンネル信号(たとえば、赤色)が、 $I_{\text{Red}} = I_0 \cdot 10^{-OD(\text{Red})}$ として計算され、ここで、 $I_0$ は、背景赤色値である。この計算は、赤色、緑色、および青色のチャンネルについて実施され、あるいは他の色空間では、色空間におけるスペクトルチャンネルごとに実施される。

#### 【0076】

いくつかの実施形態において、蛍光信号強度と吸収量との比例係数 $K$ は、標的色に応じて、異なる色チャンネルについて変化してよい。たとえば、青色標的色を生み出すためには、所与の蛍光信号強度について、青色チャンネルよりも、緑色および赤色チャンネルに、より高い $K$ 値が通常割り当てられる。したがって、概して、 $K_{\text{red}}$ 、 $K_{\text{green}}$ 、および $K_{\text{blue}}$ についての値は、すべて互いに異なっていてもよく、または値のいくつか(または全部)が等しくてもよい。

#### 【0077】

次に、ステップ5170で、計算された吸収度が、選択された色チャンネル(たとえば、赤色)に適用されて、合成画像に対する、その色チャンネルにおいて選択された成分の吸収寄与を表す。

#### 【0078】

流れ図5105のステップ5180および5190に示すように、画像におけるすべての色チャンネルおよび画素について、同じプロセスが実施される。結果は、成分が選択された標的色を有する吸収性染色剤であった場合に、選ばれた色の背景に対して見えることとなるような、その成分のシミュレートされた透過光画像である。

#### 【0079】

次いで画像は、流れ図5105のステップ5200で示すように、所望に応じて、試料中に存在する他の成分の作用をシミュレートするためにさらに処理される。追加の成分ごとに、各画素における赤色信号は、その成分画像における信号値およびその成分についての標的色に依存する量だけ、さらに減衰される。これは、緑色および青色のチャンネルについて繰り返され、画像におけるすべての画素について同じプロセスが実施される。結果は、それぞれの成分がその要求された標的色を有する吸収性染色剤であった場合に、かつ試料が選ばれた背景色の背景に対して透過光で見られる場合に、選択された成分を有する試料の見た目を表す画像である。

#### 【0080】

すべての色チャンネル、画素、および成分が処理されると、流れ図5105に示す手順は、ステップ5210で終了する。

#### 【0081】

計算上の効率のために、あらかじめ、標的色ごとの吸収係数をさまざまな成分信号強度で計算し、これらをルックアップテーブル(LUT)に保存することが有用である。次いで、レンダリングされる成分ごとに、所与の画素における成分信号強度を使用して、その成分についての色に関する吸収値を含むエントリを、対応するLUTから選ぶことができる。次いですべての成分についての吸収値が背景色で乗じられて、所与の画素における結果としての色をもたらす。ルックアップテーブルは、概して、一連の要素(たとえば、256要素)を含み、ルックアップテーブルにおける個々の要素 $LUT_i$ を以下のように計算することができる。

$$LUT_i = \{ (Tr / 255)^{i / 255}, (Tg / 255)^{i / 255}, (Tb / 255)^{i / 255} \}$$

10

20

30

40

50

ここで、 $LUT_i$  は、テーブル(たとえば、256要素テーブル)における  $i$  番目のエントリであり、 $Tr$ 、 $Tg$ 、および  $Tb$  は、標的色のRGB値であり、色は、 $\{255, 255, 255\}$  に相当する白色に対して  $0 \sim 255$  段階上で表されている。

#### 【0082】

プロセスは、試料の合成明視野画像を生成し、ここで、画像における各画素の強度は、試料を通して「透過した」光の量(たとえば、試料の吸収性成分のいずれによっても吸収されない光の量)に対応する。この画像は、たとえば、オプションのステップ5050に示すようにシステムオペレータに表示される、および/または、さらなる処理のために記憶されてもよい。

#### 【0083】

ステップ5040で、試料のシミュレートされたヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)画像を生成することができる。これは、青色およびピンク色の標的色それぞれによる、核対比染色剤画像およびエオシン成分画像に基づいた、先程説明した合成明視野計算方法を使用して行われてよい。シミュレートされたH&E画像は、臨床医、病理学者、または研究者でありうるシステムオペレータに表示することができるため、有用でありうる。そのような人々は、H&E画像において、疾患状態および組織構造を認識するように訓練されており、このタイプのイメージは、しばしば、研究室の臨床分析で最も一般的に使用されている。臨床および研究実践におけるH&Eイメージの独自の役割を認識することによって、本明細書のシステムおよび方法は、オペレータが、画像分割およびオブジェクト分類が正確に実施されたことを確認するのを手助けする独自に有用なデータを提供する。結果として、臨床医、研究者、および病理学者が、そうでなければ組織試料の自動評価での、重要な品質管理の機能を果たすことができる。全体として、本明細書で開示する方法およびシステムは、蛍光染色剤およびマーカーの使用を可能にして、IFマーカーの局在化に基づいた特異的分子情報を同時に収集しながら、人間のオペレータが組織構成および疾病状態を識別するのを支援するための合成H&E様の画像を生成する。

#### 【0084】

代替として、またはそれに加えて、ステップ5050で、蛍光画像または明視野画像のいずれかとしての成分画像のうちの1つまたは複数を含む、他の画像がまた表示されてもよい。さらに、そのような画像は、共通のスクリーンの異なる領域上に、または異なるスクリーン上に、別々に表示されてもよく、および/または、互いに重ね合わせて表示されてもよい。ユーザインターフェースにより、ユーザが異なる表示オプションを選択することが可能になる。全体のプロセスは次いで、ステップ5060で終了する。

#### 【0085】

希釈エオシン染色プロトコールに使用されるエオシンの量は、通常、ある範囲の波長にわたって特定の平均光学濃度を有する画像をもたらすように選択される。本明細書で使用するとき、ある範囲の波長にわたる平均光学濃度は、波長範囲の幅によって分割された波長範囲にわたる、波長依存の光学濃度の積分または総和に等しい。いくつかの実施形態において、たとえば、試料におけるエオシンの量は、試料が、緑色波長において0.10未満の平均光学濃度(たとえば、緑色波長において0.08未満、緑色波長において0.06未満、緑色波長において0.05未満、緑色波長において0.03未満)を有するように、十分に希釈されている。緑色波長は、たとえば、530~570nmの範囲における波長を含むことができる。

#### 【0086】

特定の実施形態において、一組の波長における試料の平均光学濃度と、別の組の波長における試料の平均光学濃度との差が、特定の範囲内に入る、または特定の閾値を下回るように、試料が染色される。たとえば、緑色波長における試料の平均光学濃度と、赤色波長における試料の平均光学濃度の差は、0.08以下(たとえば、0.07以下、0.06以下、0.05以下、0.04以下、0.03以下、0.01以下)であってよい。赤色波長は、たとえば、610~650nmの範囲内の波長を含むことができる。

#### 【0087】

いくつかの実施形態において、試料の平均光学濃度に対するエオシンの寄与が特定の閾

10

20

30

40

50

値未満であるように、十分に少ない分量のエオシンが使用されて試料が染色されてよい。たとえば、試料の平均光学濃度に対するエオシンの寄与は、0.08未満(たとえば、0.06未満、0.05未満、0.04未満、0.03未満、0.02未満、0.01未満)であってよい。

【0088】

本明細書で開示する方法およびシステムにおいて使用するのに好適なエオシン溶液を調製するために、比較的少量のエオシンが使用されてよい。たとえば、いくつかの実施形態において、100mLの溶液におけるエオシンの量は、0.015g以下(たとえば、0.01g以下、0.008g以下、0.006g以下、0.004g以下、0.002g以下)である。

【0089】

スペクトル撮像システム

さまざまなシステムおよび技法を使用して、スペクトル画像を得て、スペクトル画像キューブを形成することができる。たとえば、いくつかの実施形態において、照明光のある範囲の波長が試料に届くことを可能にする、および/または試料からの光のある範囲の波長が撮像デバイスに届くことを可能にするための、1つまたは複数の波長選択フィルタリング素子を備えた撮像デバイス(たとえば、CCDカメラなどのカメラ)を使用することによって、スペクトル画像を得ることができる。照明光および/または試料からの光の異なる範囲の波長が通るのを可能にするように、1つまたは複数の波長選択フィルタリング素子を変化させることによって、試料の複数の2次元画像を得ることが可能となり、2次元画像のいくつかまたは全部は、異なる照明波長および/または測定波長に対応する。

【0090】

これらの2次元画像を、3次元画像キューブを形成するように組み立てることができる。画像キューブにおける3次元のうち2次元は、2次元画像のそれぞれに共通な2つの空間次元に対応する。画像キューブの3番目の次元は、スペクトル次元に対応する。すなわち、画像キューブにおけるそれぞれの画素位置において、キューブの3番目の次元に沿って広がる画素値は、異なる照明波長および/または試料からの光の異なる波長における、試料中の同じ空間的位置の測定値に対応する。試料の2次元空間画像における画素ごとに、画像キューブの3番目の次元に沿って広がる画素値は、試料中の特定の空間的位置の波長依存特性に関する情報に対応する。いくつかの実施形態において、たとえば、波長依存情報は、画素のいくつかまたは全部についてのスペクトルに対応する。したがって、概して、画像キューブは、複数の個々の画像平面を含み、それらうちのいくつかまたは全部は、波長選択素子に適用される異なる設定によって取得される。

【0091】

画像キューブは、スペクトル非混合方法の使用によるやり方を含む、さまざまなやり方で分析されてよい。通常、スペクトル非混合技法は、スペクトルライブラリと共に使用して、画像キューブを分析することができる。スペクトルライブラリは、たとえば、一組の波長依存関数を含むことができ、そのそれぞれは、試料中の異なる成分に関連付けられていてよい。

【0092】

図18は、試料のスペクトル画像を取得するためのシステム100を示す概略図である。光源102が、光調整光学部品104に光122を提供する。光122は、たとえば、フィラメント源から生成される光などのインコヒーレント光であってよく、または光122は、レーザによって生成される光などのコヒーレント光であってもよい。光122は、連続波(CW)、または時間ゲートの(たとえば、パルス状の)光のいずれであってもよい。さらに、光122は、電磁スペクトルの選択された部分において提供されてよい。たとえば、光122は、紫外線、可視線、赤外線、またはスペクトルの他の領域内に入る、中心波長および/または波長の分布を有することができる。

【0093】

光調整光学部品104は、いくつかのやり方で、光122を変換するように構成されていてよい。たとえば、光調整光学部品104は、光122をスペクトル的にフィルタリングして、スペクトルの選択された波長領域の出力光を提供することができる。代替として、またはそれ

10

20

30

40

50

に加えて、光調整光学部品は、光122の空間的分布および光122の時間的特性を調節することができる。入射光124は、光調整光学部品104の素子の動作によって、光122から生成される。

【0094】

入射光124は、照明ステージ106に載せられた試料108に入射するように向けられる。ステージ106は、載置クリップまたは他の留め付けデバイスなどの、試料108を固定するための手段を提供することができる。代替として、ステージ106は、複数の試料108が付けられる可動式のトラックまたはベルトを含むことができる。入射光124が当たるステージ106上の照明領域を通して、複数の試料を連続して1つずつ平行移動させるように、トラックを動かすための駆動体機構が構成されていてよい。ステージ106はさらに、照明ステージ106の固定された位置に対して試料108を平行移動させるための平行移動軸および平行移動機構を含むことができる。平行移動機構は、手動で操作(たとえば、ねじ棒)されてもよく、または電氣的な作動(たとえば、電動式駆動体、圧電アクチュエータ)を介して自動的に可動であってもよい。

10

【0095】

入射光124に応答して、放射光126が試料108から現れる。放射光126は、入射光124に応答した、試料108からの蛍光発光に対応する。特定の実施形態において、試料108は、ルミネセンスであってよく、入射光124が一時的にない場合であっても放射光126を生み出すことができる。いくつかの実施形態において、放射光126は、上述した機構のうちの2つ以上を介して生み出された光を含むことができる。

20

【0096】

試料108は、組織片(たとえば、病理学のために使用される試料)、または細胞学研究におけるような細胞懸濁液もしくは塗抹標本、あるいは、組織培養における生細胞もしくは固定細胞などの生物学的試料であってよい。本発明は、これらのタイプの試料を分析するための方法および装置を提供する。

【0097】

試料108は、循環腫瘍細胞などの希少事象の細胞である場合があり、これは、スライドの上にあっても、またはそのような細胞の捕獲、濃縮、または撮像用に設計された試料チャンバの中に収容されていてもよい。本発明は、これらのタイプの試料を分析するための方法および装置を提供する。

30

【0098】

光収集光学部品110が、試料108からの放射光126を受信するように位置付けられる。光収集光学部品110は、たとえば、放射光126が広がるときに、光126を平行にするように構成されていてよい。光収集光学部品110はまた、放射光126をスペクトル的にフィルタリングするように構成されていてよい。+フィルタリング動作は、たとえば、上で論じた機構のうちの1つを介して生じた放射光126の部分を、他のプロセスを介して生じた光から分離するために、有用でありうる。さらに、光収集光学部品110は、実施形態における特定の目的のために、放射光126の空間的特性および/または時間的特性を変更するように構成されていてよい。光収集光学部品110は、放射光126を、検出器112に入射する出力光128に変換する。

40

【0099】

検出器112は、出力光128を検出するように構成された、CMOSまたはCCDセンサなどの1つまたは複数の素子を含む。いくつかの実施形態において、検出器112は、光128の空間的特性および/または時間的特性および/またはスペクトル特性を測定するように構成されていてよい。検出器112は、出力光128に対応した電気信号を生成し、電気信号は、電気通信線130を介して電子制御システム114に伝達される。

【0100】

電子制御システム114は、プロセッサ116と、ディスプレイデバイス118と、ユーザインタフェース120とを含む。検出器112によって検出された出力光128に対応した信号を受信することに加えて、制御システム114は、電気信号を検出器112に送信して、検出器112

50

のさまざまな特性を調節する。たとえば、検出器112がCCDセンサを含む場合、制御システム114は、電気信号を検出器112に送信して、CCDセンサの露出時間、アクティブエリア、利得設定、および他の特性を制御することができる。

#### 【0101】

電子制御システム114は、電気通信線132、134、136、および138を介して、それぞれ、光源102、光調整光学部品104、照明ステージ106、および光収集光学部品110と、通信することができる。制御システム114は、システム100のこれらの要素のそれぞれに電気信号を提供して、要素のさまざまな特性を調節する。たとえば、光源102に提供される電気信号は、光122の強度、波長、繰り返し率、および/または他の特性を調節することができる。光調整光学部品104および光収集光学部品110に提供される信号は、たとえば、光の空間的特性を調節するデバイス(たとえば、空間光変調器)の特性を構成するための信号、およびスペクトルフィルタリングデバイスを構成するための信号を含むことができる。照明ステージ106に提供される信号は、たとえば、ステージ106に対する試料108の位置決め、および/またはステージ106の照明のための試料の適所への移動を提供することができる。

10

#### 【0102】

制御システム114は、システム特性およびパラメータを表示するための、および試料108を捕えた画像を表示するための、ユーザインターフェース120を含む。ユーザインターフェース120は、オペレータがシステム100と対話する、およびシステム100を制御するのを円滑化するために提供される。プロセッサ116は、通常、検出器112を使用して捕えた画像データを記憶するための記憶デバイスに接続され、またコンピュータソフトウェアを含んでおり、コンピュータソフトウェアは、たとえば、上で論じたような制御機能をプロセッサ116に実行させる、プロセッサ116に対する命令を具体化する。さらに、ソフトウェア命令は、プロセッサ116に、検出器112によって捕えられた画像を数学的に操作させて、測定したスペクトル画像から引き出された試料108の成分の画像を提供させる。

20

#### 【0103】

システム100は、しばしば、試料108の複数のスペクトル画像を取得するように構成されている。複数のスペクトル画像は、光の1つまたは複数の波長において試料108を照明すること、および試料108によって生み出された光の強度を検出することに対応することができる。代替として、複数のスペクトル画像は、同様のスペクトル特性を有する光で試料108を照明すること、およびそれぞれの画像が放射光126の異なる波長に対応した、試料108の複数の画像を収集することに対応することができる。光調整光学部品104および光収集光学部品110のスペクトルフィルタリング素子は、概して、スペクトル的に分解されたデータを得るために使用される。いくつかの実施形態において、複数のスペクトル画像は、光の異なる波長による試料108の照明に対応した画像と、試料108からの放射光の異なる波長に対応した画像との両方を含むことができる。

30

#### 【0104】

いくつかの実施形態において、連続して捕えた画像の間で光学構成要素(たとえば、光学フィルタ)の構成を調節することにより、試料108の画像を次々に収集することができる。特定の実施形態において、複数の画像を、複数の試料ビューを検出するように構成された検出システムを使用して、同時に捕えることができる。たとえば、検出システムは、CMOSセンサまたはCCDカメラなどの検出器上に、異なる照明波長または発光波長に対応した試料の異なるビューを投影するように構成されていてよく、複数のビューを同時に捕えることができる。

40

#### 【0105】

いくつかの実施形態において、光調整光学部品104は、フィルタホイールまたは液晶スペクトルフィルタなどの、調節可能なスペクトルフィルタ素子を含む。フィルタ素子は、異なる光波長帯域を使用して、試料108の照明を提供するように構成されていてよい。光源102は、スペクトル波長成分の広い分布を有する光122を提供することができる。この広い波長分布の選択された領域が、光調整光学部品104のフィルタ素子によって入射光124として通過し、試料108の上に入射するように向けられることが可能である。

50

## 【0106】

概して、本明細書で使用するとき、画像は、試料内での位置の関数として、試料によって放射された光の強度分布の測定結果である。通常、測定された画像は、2次元であり、それにより、強度分布は、2つの位置座標の関数として表現される。

## 【0107】

光調整光学部品104および光収集光学部品110の両方で使用することができる、例示的なスペクトルフィルタリング素子は、たとえば、液晶同調フィルタ(LCTF)および音響光学同調フィルタ(AOTF)を含む。他の例示的なスペクトルフィルタリング素子は、(たとえば、ホイールを回転することによって)次々に作動することができる複数の光学フィルタを有する機械式のフィルタホイールを含む。例示的な波長選択素子はまた、光122を生成する、1つまたは複数の構成可能な光源102を含むことができる。光源102は、たとえば、1つまたは複数の選択された波長帯域の光122を生み出すように調節されてよい。光源は、そのいくつかまたは全部が電磁スペクトルの異なる領域で光を放射する、複数の発光ダイオード(LED)を使用して構築されてよい。代替として、またはそれに加えて、光源102は、回折格子および空間光変調器(たとえば、Texas Instruments、ダラス、テキサス州から入手可能なデジタルマイクロミラーデバイス(DMD))などの、波長選択素子と組み合わせた広帯域光源を含むことができる。波長選択素子は、広帯域源によって生成された光の特定の波長のみが試料108に入射するように、構成されていてよい。

10

## 【0108】

いくつかの実施形態において、波長選択フィルタリングは、Sagnac干渉計、液晶干渉計、または別のタイプの撮像干渉計ベースの検出システムによって実施されてよい。選択した時間に、干渉計は、単一の明確に定義された波長帯域ではなく、波長の周期関数である、試料についてのスペクトル応答を測定する。干渉計の応答は、周期波長関数を定義する光路差によって特徴付けられる。干渉計による画像は、直接アンミックスされて、周波数空間における成分推定値をもたらすことができる。代替として、フーリエ変換または類似した演算を画像に適用することによって、干渉計を使用して得られた画像を、特定の波長(たとえば、中心波長)における一組のスペクトル画像に変換することができる。干渉計からの画像を変換することによって得られたスペクトル画像は、特定の波長帯域に対応した画像キューブの平面を形成することができ、非混合を重ね合わせるための入力データとして使用されてよい。さらに、干渉計画像から引き出されたスペクトル画像は、増分する非混合演算のための入力データとして使用されてもよい。

20

30

## 【0109】

光調整光学部品104と光収集光学部品110との両方が構成可能なスペクトルフィルタ素子を含むことができるため、スペクトル分解(spectral resolution)は、(たとえば、光調整光学部品104を介した)試料108の励起側、または(たとえば、光収集光学部品110を介した)試料108の発光側のいずれか、あるいはその両方で提供されてよい。試料108の複数のスペクトル的に分解された画像は、上で論じたような画像キューブを形成し、ここで、キューブの各画像は、特定の波長に対応した、試料の2次元画像である。3番目のキューブ次元は、スペクトル波長に対応し、試料内での特定の空間的位置に関する(たとえば、スペクトル画像における画素によって表されるような)波長依存情報が、3番目の次元に沿って広がる。本明細書で使用するとき、画素は、名目上、画像キューブにおいて、スペクトル画像のそれぞれについての試料の共通の空間的位置に対応する。

40

## 【0110】

## スペクトル非混合

スペクトル非混合は、試料中に存在するいくつかの成分のそれぞれの量の定量的な推定値を提供するために、画像キューブに実施される数学的演算である。いくつかの実施形態において、スペクトル非混合技法は、試料成分のスペクトル特性に関する情報を含む、1つまたは複数のスペクトルライブラリを参照する。通常、スペクトル非混合技法は、画像キューブの2つの空間次元のそれぞれに沿った各画素に適用される。非混合演算の結果は、試料中に存在する成分のそれぞれ(たとえば、化学的実体および/または化学的状態)の

50

高分解能マップである。

【0111】

例として、試料は、それぞれが異なる染料で標識付けされた、3つの異なるタイプの構造を含むことがある。3つの異なる染料は、それぞれが異なる吸収スペクトルを有することができる。通常、染料の個々の吸収スペクトルは、それらが(たとえば、スペクトルライブラリから)使用される前に既知である、またはそれらを測定することができる。照明された試料の画像は、最も一般的なケースにおいて、3つの染料のそれぞれからのスペクトル寄与を含むことになる。たとえば、同じような状況は、複数の異なる蛍光標識を含み、蛍光標識のそれぞれが試料からの測定された蛍光発光に寄与している試料において生じる。

10

【0112】

スペクトル非混合は、複数のスペクトル源からの寄与を含む1つまたは複数の画像を、試料内のスペクトル実体のそれぞれからの寄与に対応した一組の成分画像(「非混合画像」)に、分解(decompose)する。したがって、試料が、それぞれが特定の構造的実体に固有な3つの異なる染料を含む場合、試料の画像は、3つの非混合画像に分けられて、それぞれの非混合画像は、主として染料のうちの一つのみからの寄与を反映することができる。概して、本明細書で使用するとき、用語「成分」は、試料から検出された放射線に寄与する実体(化学的部分、生物学的実体、または任意の他の実体)を指す。したがって、試料の成分それぞれは、試料から発する放射線に寄与する。成分のそれぞれは、その純粋なスペクトル特性(たとえば、他の成分が存在しない成分のスペクトル特性)を表す、スペクトルシグネチャまたはスペクトル固有状態を有する。さらに、用語「成分画像」は、本明細書で使用するとき、試料の単一の成分からの寄与のみを(実質的に)含む試料の画像、すなわち、単一の成分のスペクトルシグネチャまたはスペクトル固有状態の観点から表現されてよいスペクトル特性を有する試料の画像を指す。「非混合」のプロセスは、本明細書で使用するとき、複数の成分からの寄与を含む試料画像が、一組の非混合画像に分けられるプロセスを指し、それぞれの非混合画像は、試料中の成分のサブセットのみからの寄与を含む。非混合画像それぞれが試料中の一つのみからの寄与を含む場合、非混合画像は成分画像である。

20

【0113】

非混合手順は、本質的には、画像を、一組のスペクトル固有状態に分解することに対応する。いくつかの実施形態において、固有状態は、上で論じたようにあらかじめ既知である。特定の実施形態において、固有状態は、時に、主要成分分析などの技法を使用して決定されてよい。いずれのケースにおいても、固有状態が識別されると、または推定されると、全体画像における固有状態のそれぞれの相対的重み付けに対応した、通常は係数行列としての、一組の値を計算することによって、画像を分解することができる。次いで個々の固有状態のそれぞれの寄与が分けて取り出されて、非混合画像の組をもたらすことができる。

30

【0114】

例として、一組の異なる励起波長  $\lambda_k$  において試料を照明することによって、 $x$ および $y$ 座標を有する一連の2次元画像が、試料について測定されてよい。上で説明したように、2次元画像は、3次元画像キューブ $S(x, y, k)$ を形成するように組み合わせられてよく、ここで、画像キューブの最初の2つの指数は、座標方向を表し、3番目の指数は、照明光の波長に対応したスペクトル指数である。単純化するために、試料の画像のそれぞれが、2つの異なるスペクトル源 $F(\lambda_k)$ および $G(\lambda_k)$ からのスペクトル寄与を含むと想定すると、3次元画像キューブ $S(x, y, k)$ における値は、以下によって与えられてよい。

40

$$S(x, y, k) = a(x, y) \cdot F(\lambda_k) + b(x, y) \cdot G(\lambda_k) \quad (1)$$

ここで、 $\lambda_k$ は、所与の波長(または波長帯域)を表すために使用される。関数 $a(x, y)$ および $b(x, y)$ は、試料中の2つの異なるスペクトル源からのスペクトル寄与の空間存在量を表す。

【0115】

50

式(1)に従って、3次元画像キューブの任意の位置における(たとえば、任意の2次元画素座標、および特定の照明波長における)正味信号は、それぞれの相対存在量によって重み付けられた、2つの寄与の合計である。これは、以下で表現されてよい。

$$S(\lambda_k) = aF(\lambda_k) + bG(\lambda_k) \quad (2)$$

【0116】

関数FおよびGは、それらが、変化する比率で組み合わせられて試料の測定されたスペクトル画像を生み出す、試料中のスペクトル源のための純粋なスペクトルに対応することから、システムのための「スペクトル固有状態」と呼ばれてよい。したがって、試料スペクトルは、2つのスペクトル源からの別個の寄与に対応した、重み付け重ね合わせである。

【0117】

スペクトルF( $\lambda_k$ )およびG( $\lambda_k$ )が既知である(または、推論されうる)場合、スペクトルIが少なくとも2つの要素を含むことを条件として(たとえば、少なくとも2つの波長 $\lambda_k$ についてのデータを有することを条件として)、式(2)を反転させて、aおよびbについて解くことができる。式(2)を、 $S=EA$ として行列形式で書き換えることができ、その結果、

$$A = E^{-1}S \quad (3)$$

であり、ここで、Aは、成分aおよびbを有する列ベクトルであり、Eは、その列がスペクトル固有状態、すなわち[F G]である、行列である。

【0118】

式(3)を使用して、試料の測定されたスペクトル画像を使用して、特定の画素位置において、純粋に源Fから、および純粋に源Gから生じる、画像への寄与を計算することができる。源Fのみからの寄与を含む試料の画像、および源Gのみからの寄与を含む試料の別の画像を生み出すために、プロセスは、選択された画像における画素位置ごとに(たとえば、Sにおける値xおよびyの範囲の全体を通して)繰り返されてよい。

【0119】

上の議論において、スペクトル源の数は2つ(たとえば、FおよびG)である。しかしながら、概して、非混合技法は、いかなる特定の源の数にも制限されない。たとえば、試料は、概して、N個の異なるスペクトル源を含むことができる。データが収集される波長の数がM、すなわち、 $k=1\dots M$ である場合、行列Eは、上の議論でのような $M \times 2$ 行列の代わりに、 $M \times N$ 行列である。非混合アルゴリズムは次いで、上で説明したのと同じやり方で、N個のスペクトル固有状態のそれぞれから、画像の中の各画素位置における固有の寄与を分離するために用いられてよい。

【0120】

異なるスペクトル固有状態からの寄与を区別するためのアルゴリズムの能力を限定する1つの要因は、固有状態間でのスペクトル区別の度合いである。2つのスペクトル固有状態 $I_1$ および $I_2$ などの、2つのスペクトル間の相関関係を、スペクトル角度 $\theta$ によって表すことができる。

【0121】

【数1】

$$\theta = \cos^{-1} \left[ \frac{I_1 \cdot I_2}{\|I_1\| \|I_2\|} \right] \quad (4)$$

【0122】

2つの辺についての $\theta$ が小さいスペクトルの組は、その成分に容易に分離されない。物理的に、これに対する理由は容易に理解される。2つのスペクトルがかろうじて異なるにすぎない場合、それぞれの相対存在量を特定することはより難しい。

【0123】

いくつかの技法を使用して、スペクトル源FおよびG(および、試料が3つ以上のスペクトル源を含む場合には、他のスペクトル源)の純粋なスペクトルを測定する、または推定することができる。概して、十分な精度のスペクトル固有状態をもたらす任意の方法を使用

10

20

30

40

50

することができる。いくつかの試料は、発行された参考文献において入手可能な既知のスペクトルが存在する、染料、蛍光標識、または他の化学的部分などのスペクトル源を含むことができる。代替として、1つまたは複数の測定システムを使用して、源成分のスペクトルを直接測定することが可能であってもよい。いくつかの試料において、試料の特定の領域が、1つの特定のスペクトル源のみを含むことが既知であることがあり、その源のスペクトルを、試料の識別された領域にのみ行われた測定結果から抽出することができる。

#### 【0124】

スペクトル非混合のための成分スペクトルを決定するために、主成分分析(PCA)などのさまざまなデータ分析技法がまた使用されてよく、PCAは、画像キューブから最も直交するスペクトル固有ベクトルを識別し、画像全体を通してそれぞれの固有ベクトルの重み付けを示すスコア画像をもたらす。これは、他の数学的な処理と組み合わせて行われてよく、低次元性のスペクトルベクトルを識別するための他の知られた技法には、たとえば、L. Jimenez and D. Landgrebe、「Hyperspectral Data Analysis and Feature Reduction Via Projection Pursuit」、IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing, Vol. 37, No. 6, 2653-2667ページ、1999年11月に記載されている技法である投射追跡などがあり、その全内容を参照により本明細書に組み込む。他の技法には、たとえば、独立成分分析(ICA)および端成分検出アルゴリズムが含まれる。

10

#### 【0125】

これらの技法は、通常、ライフサイエンスにおける応用にはあまり適さない。たとえば、いくつかの技法は、密集したスペクトル形状および明確に定義された狭いピークを有するスペクトルを含む、スペクトル撮像データセット用に最適化されている。いくつかの技法において、スペクトル範囲は、分析のために使用される個々のスペクトル特徴およびピークと比較して大きい。ピークの存在、またはピークの比は次いで、分けられるべき「端成分」を分類するために使用されてよい。通常、生物学的試料における成分は、明確に定義された狭いピークを有さない。

20

#### 【0126】

これらの技法のうちいくつかは、オリジナル画像キューブ内のどこかに純粋な形で存在するスペクトルに関連した画像を生成する。ライフサイエンスの多くのケースでは、画像キューブに存在する信号スペクトルは、成分の混合である。対象の成分が、オリジナル画像キューブのどこかで純粋な形でない場合、これらの技法が、対象の成分の存在量を正確に表す画像を生成することは考えにくい。画像の中に真の端成分が純粋な形で存在しない場合であっても、それらが何かを推定する、「凸包」アルゴリズムと呼ばれることがあるいくつかの技法があるが、その有効性は、画像キューブにおける信号スペクトルが、端成分にどのくらい近いかに左右される。

30

#### 【0127】

スペクトル固有状態のすべての先験的知識なしに、その固有状態(または、その表現)を抽出するために使用されうる1つの技法は、所与の画素についての信号スペクトル $S(k)$ を考慮すること、および、すべてのスペクトルチャンネルにおいて正定値である残りの信号をそのままにしながら、信号スペクトル $S(k)$ から最大量の第1のスペクトル源 $F(k)$ を引くことを含む。すなわち、画素ごとに、いわゆる「残余スペクトル(remainder spectrum)」 $U_a(k)$ を、

40

$$U_a(k) = S(k) - aF(k) \quad (5)$$

として定義し、次いであらゆるスペクトルチャンネルにおいて非負値を有する $U_a(k)$ と一致するパラメータ $a$ の最も大きい値を選択する。次いで結果として生じたスペクトル $U_a(k)$ を、第1のスペクトル源 $F$ に起因して寄与の抹消した、信号スペクトルとして使用する。上に挙げた厳密な非負基準には基づかないが、小さな負の分布を組み入れたなんらかの関連した基準に基づいて、パラメータ $a$ を決定して、測定システムにおけるショット雑音または検出器雑音などの考慮すべき事項を説明することもまたできる。最大量のスペクトル源 $F$ を取り除くための最適化基準の追加の例は、異なる誤差関数を使用することを含む。

#### 【0128】

50

代替として、第2のスペクトル源Gに起因する、測定されたスペクトルへの寄与を抽出するように求めることができる。式(5)と同様に、残余スペクトルを、画素ごとに、

$$U_b(k) = S(k) - bG(k) \quad (6)$$

として計算することができ、ここで、あらゆるスペクトルチャンネルにおいて非負値を有する $U_b(k)$ と一致するパラメータ $b$ の最も大きい値を選択する。

【0129】

残余技法は、試料の1つまたは複数の追加の成分についてのスペクトルが既知であり、信号へのそれらの寄与を取り除きたいケースに展開されてよい。そのようなケースでは、残余スペクトルは、追加のスペクトルに基づいた、それぞれのスペクトルチャンネルにおいて正の残余に一致する観察された信号から、そのような各成分の寄与を引くように書かれている。

10

【0130】

追加のスペクトル非混合技法は、「SPECTRAL IMAGING OF BIOLOGICAL SAMPLES」と題されたPCT特許出願公開第WO2005/040769号に説明されており、その全内容を参照により本明細書に組み込む。

【0131】

本明細書で開示したスペクトル非混合技法が、異なるスペクトル固有状態に起因する試料画像における寄与を効果的に分けるために、式(1)は、少なくとも近似的に正確であるべきである。すなわち、測定されたスペクトルデータは、重み付けされた固有状態の線形重ね合わせとして、近似的に表されるべきである。この近似値は、多くの試料およびスペクトル測定技法、特に、暗視野測定技法に当てはまる。

20

【0132】

ハードウェアおよびソフトウェア

試料からの情報を収集し、処理し、分析し、解釈し、表示するためのさまざまな方法と関連して上で説明したステップは、標準的なプログラミング技法を使用して、コンピュータプログラムにおいて実装されてよく、ステップは、スペクトル非混合に関連付けられたステップ、および試料の合成吸収画像を作成するステップを含む。そのようなプログラムは、プログラマブルコンピュータまたは特殊設計された集積回路上で実行するように設計されており、コンピュータまたは集積回路のそれぞれは、電子プロセッサ、データ記憶システム(メモリおよび/または記憶素子を含む)、少なくとも1つの入力デバイス、およびディスプレイまたはプリンタなどの少なくとも1つの出力デバイスを含む。プログラムコードを、入力データ(たとえば、検出器からの画像)に適用して、本明細書で説明した機能を実施し、ディスプレイデバイスを含むユーザインターフェースなどの1つまたは複数の出力デバイスに適用される出力情報(たとえば、試料成分の寄与を示す画像、複数の成分画像のオーバーレイなど)を生成する。そのような各コンピュータプログラムは、高水準手続き言語もしくはオブジェクト指向プログラミング言語、またはアセンブリ言語もしくは機械語で実装されてよい。さらに、言語は、コンパイラ型言語またはインタプリタ型言語であってよい。そのような各コンピュータプログラムは、コンピュータ可読記憶媒体(たとえば、CD ROMまたは磁気ディスク)に記憶されてよく、コンピュータによって読み込まれるときに、コンピュータのプロセッサに、本明細書で説明した分析機能および制御機能を実施させてよい。

30

40

【0133】

(実施例)

本開示は、特許請求の範囲を限定することを意図しない、以下の実施例を含む。この開示において、用語エオシンは、エオシンY、エオシンB、フロキシシンB、およびこれらのうちのいずれかと同様に生物学的構造を染色する(そのような構造は、エオシン好性として知られている)化合物のいずれか、ならびにそのような化合物のいずれかの混合物を意味するように使用される。エオシンYは、フルオレセインのテトラプロモ誘導体であり、エオシンBは、フルオレセインのジプロモジニトロ誘導体である。その脱プロトン化体において、エオシンYは、2-(2,4,5,7-テトラプロモ-6-オキシド-3-オキソ-3H-キサンテン-9-

50

イル)安息香酸(CAS番号17372-87-1)として表すことができる。エオシンYは、4',5'-ジブ  
ロモ-3',6'-ジヒドロキシ-2',7'-ジニトロ-1-スピロ[イソベンゾフラン-3,9'-キサンテン  
]オン(CAS番号548-24-3)として表すことができる。フロキシシンBは、二ナトリウム2',4',5  
,7'-テトラブromo-4,5,6,7-テトラクロロ-3-オキソスピロ[2-ベンゾフラン-1,9'-キサン  
テン]-3',6'-ジオラート(CAS番号18472-87-2)として表すことができる。以下の実施例に  
おいて、これらのより固有の用語が、使用される固有の化合物を表すために、いくつかの  
ケースにおいて使用される。

#### 【0134】

第1の実験において、ヒト配列から生じたマウス抗Her2抗体(Abcam, Inc., ケンブリッ  
ジ、マサチューセッツ州から入手)を1:25希釈で、およびヤギ抗マウス二次抗体にコンジ  
ュゲートされたAlexa Fluor 594染料(Invitrogen、カールズバッド、カリフォルニア州か  
ら入手)を1:50希釈で使用して、ヒトの乳癌組織試料(U.S. Biomax、ロックビル、メリー  
ランド州から入手)を免疫蛍光アッセイにより調製した。次いで試料を、1:20,000希釈のD  
API核染色剤で染色し、Olympus BX51顕微鏡上で、Nuance FXマルチスペクトル撮像カメラ  
(Caliper Life Sciences、ホプキントン、マサチューセッツ州から入手可能)を使用して  
撮像した。試料の明視野画像が得られ、Nuance 2.10ソフトウェア(Caliper Life Science  
sから入手可能)を使用して光学濃度単位に変換し、緑色チャンネルをエクスポートした。図  
2Aは、試料の1つについての緑色チャンネル画像を示す。画像は、かすかな吸収量を示し、  
組織がどこに存在するかを認めることができる一方で、全体の画像は、わずかな対比しか  
示しておらず、組織構造を識別するのは困難であった。

10

20

#### 【0135】

次に、エオシンの作業溶液を、100mLの1%エオシンY、10mLの1%フロキシシンB、780mLのエ  
タノール、および4mLの氷酢酸を使用して調製した。このプロトコールは明視野撮像のた  
めの試料を調製する際の使用をその著者により承認されており、推奨される手順は、作業  
溶液を組織に30秒から1分の間、適用することである。本プロトコールの完全な説明は、  
以下のインターネットアドレス、[http://protocolsonline.com/histology/haematoxylin-  
eosin-he-staining/](http://protocolsonline.com/histology/haematoxylin-eosin-he-staining/)で入手可能である。

#### 【0136】

次いで作業溶液を、0.0011%エオシンYおよび0.00011%フロキシシンBの正味濃度とするた  
めに、780部のエタノールおよび4部の氷酢酸の混合物を使用して、1:100に希釈した。こ  
の混合物の中に試料を20秒間置いて、次いで緩衝液ですすぎ、NuanceカメラおよびOlympu  
s顕微鏡を使用して撮像した。

30

#### 【0137】

試料の明視野画像が再び得られ、光学濃度画像が生成されて、エクスポートされた。こ  
の画像の緑色チャンネルを、図2Bに示す。視覚的には、染色前の見た目からわずかな変化が  
あり、試料を明視野モードで見たときの対比または色の視覚的な見た目の変化は、わずか  
にあるか、なかった。

#### 【0138】

次いで、200ワット金属ハロゲン化物アーク光源(Prior Scientific、ロックランド、メ  
リーランド州から入手)と共に同じ顕微鏡およびカメラを使用して、蛍光撮像を実施した  
。全体を通して20nm増分を使用しながら、Chroma 11000V3干渉フィルタセット(Chroma Te  
chnology Corp., ペロースフォールズ、バーモント州から入手)を使用して、440~660nm  
範囲における蛍光発光を撮像し、Chroma 49004 ET干渉フィルタセット(やはりChroma Tec  
hnology Corp. から入手)を使用して、560~680nm範囲における蛍光発光を撮像した。この  
やり方で得られた蛍光画像キューブを、Nuanceソフトウェアによって、色画像としてレン  
ダリングし、個々の青色、緑色、および赤色のチャンネルを、図3A、図3B、および図3Cに示  
す。

40

#### 【0139】

次いで試料を、作業エオシン溶液中に20秒さらし、同一の撮像プロトコールを使用して  
再び撮像した。この時点で、試料ははっきりと可視であり、ピンク色であった。明視野画

50

像の緑色チャンネルを図2Cに示す。次いで、前と同じフィルタセットおよび波長範囲を使用して蛍光撮像を実施し、試料についての蛍光画像キューブを得た。キューブの個々の青色、緑色、および赤色のチャンネルを、図3D、図3E、および図3Fに示す。

【0140】

乳癌組織の追加の試料に基づいて、スペクトルライブラリを展開して、蛍光画像キューブを成分画像にアンミックスした。第1の組織試料をDAPIのみで染色し、第2の組織試料をHer2標識で準備した。これらの試料を撮像し、Nuanceスペクトルライブラリソフトウェアを使用して、これらの成分を表現した代表的な領域を選択した。組織自己蛍光スペクトルの推定値を提供するために、いずれの染色剤も適用されていない別の試料を測定した。作業溶液浴にさらした後で、試料から直接エオシン混合物を測定した。

10

【0141】

1:100希釈エオシンにさらした後の試料の画像キューブと、作業強度エオシンにさらした後の試料の画像キューブとを、上で説明したスペクトルライブラリを使用するNuanceソフトウェアを使用してアンミックスした。1:100染色後の、DAPI成分およびHer2成分に対応した成分画像を図4Aおよび図4Bに示し、作業強度染色後の成分画像を図5Aおよび図5Bに示す。図4Aおよび図4Bでは、予想通り、DAPI成分画像は、核においてすぐれた局在性を示し、Her2は、試料の癌性領域内の膜構造において存在する。しかしながら、図5Aおよび図5Bでは、DAPI画像は核を示さず、Her2イメージは、癌性領域に対してほぼ局在化されるものの、低品質である。

【0142】

20

Nuanceソフトウェアの複合ツールを使用して、合成明視野画像を生成し、ここで、DAPIチャンネルが青色にマップされ、エオシンチャンネルがピンク色にマップされた。結果として得られた画像を、1:100希釈エオシン染色プロトコールについては、図6A、図6B、および図6Cに示し、作業強度エオシン染色プロトコールについては、図7A、図7B、および図7Cに示す。加えて、図19は、図6A～図6Cの画像の組み合わせに対応した画像を示し、図20は、図7A～図7Cの画像の組み合わせに対応した画像を示す。1:100希釈プロトコールのイメージは、標準H&E調製の明視野ビューとの十分な類似性を示し、一方で、作業溶液プロトコールは、認識できる形で組織ランドマークを示すことを果たせなかった。

【0143】

30

第2の実験を、上で説明したのと同じ組織ブロックからの連続切片および同じ一次抗体を使用して、実施した。しかしながら、Her2プローブは、ヤギ抗マウス二次抗体にコンジュゲートされた、605nmで発光する量子ドット(Invitrogenから入手)を使用した。これらを25:1希釈で使用した。浴中での20秒の露出時間の間、上で説明した作業溶液から、DAPIを1:50000濃度において適用し、エオシンを1:100濃度において適用した。次いで、上で説明した同じ機器を使用して蛍光撮像を実施したが、画像は、Chroma 11000V3干渉フィルタセットを使用した、440～660nm範囲においての波長でのみ得られた。Nuanceソフトウェアを使用して得られた蛍光画像キューブの青色、緑色、および赤色の成分画像を図8A、図8B、および図8Cに示す。比較を簡単にするために、上の第1の実験の場合とほぼ同じ組織の空間領域を撮像した。

【0144】

40

この染色剤のみで調製され、DAPIまたはエオシン染色を施されなかった異なる試料を撮像することによって、量子ドットプローブのスペクトル推定値を得た。DAPI、組織、エオシン、および量子ドットプローブについてのスペクトルライブラリ推定値を使用して、Nuanceソフトウェアを使用して画像キューブをスペクトル的にアンミックスした。Her2成分画像が図9に示されており、試料の癌性領域内の膜において信号の十分な局在化を見せている。

【0145】

前回通りに、DAPI成分を青色に、エオシン成分をピンク色にマップした、合成明視野ビューを作成した。これは、明視野顕微鏡で見たとき、同様の試料のH&E調製と非常によく似たビューを生み出した。合成画像の個々の色平面を、図10A、10B、および10Cに示す。

50

加えて、図21は、図10A～図10Cの画像の組み合わせに対応した画像を示す。

【0146】

同じブロックからの組織を使用して、第3の実験を実施した。第3の実験では、DAPIおよびHer2プローブは、上で説明した第1の実験で使用したものと同一であった。しかしながら、異なるエオシン調製を使用した。この実験では、1グラムのフロキシシンBを100mLの水に溶かして作業エオシン溶液を作った。次いでこの作業溶液を水で50:1比に希釈し、この浴中に試料を20秒間置いた。

【0147】

次いで、試料を顕微鏡に置き、カメラを使用して明視野において撮像して、その吸収の光学濃度画像を得た。1つのそのような画像の緑色チャンネルを図12Aに示す。前回通りに、試料を明視野顕微鏡で見たとき、わずかな対比または色が観察可能であった。第1の実験において上で説明した波長範囲およびフィルタセットを使用して蛍光画像を撮って、蛍光スペクトルキューブを得た。キューブからの青色、緑色、および赤色の成分画像を、図13A、図13B、および図13Cに示す。

10

【0148】

次いで、試料をフロキシシンBの作業溶液中に20秒さらし、明視野モードおよび蛍光モードの両方において再び撮像した。この時点で、明視野で見たとき、試料は鮮明に色づけされ、構造は容易に目で見えた。明視野画像の緑色成分画像を、図12Bとして示す。次いで、蛍光画像キューブを得て、その青色、緑色、および赤色平面を、図13D、図13E、および図13Fとして示す。

20

【0149】

これらの画像キューブを、DAPIおよびAlexa Fluor 594についての第1の実験の場合と同じスペクトル曲線を使用して、アンミックスした。試料を作業溶液にさらした後に撮られた蛍光画像キューブの明るい領域をサンプリングすることによって、フロキシシンBスペクトルを得た。これらのスペクトルを使用して、DAPI、フロキシシンB、組織、およびHer2化合物について成分画像を得た。図14Aおよび図14Bは、試料を1:50希釈のフロキシシンBにさらした後の、試料についてのHer2およびDAPI成分画像を示し、これらは、核の、およびHer2領域のすぐれた描写を示す。対照的に、試料をフロキシシンBの作業溶液にさらした後で、試料の蛍光撮像から得られた図15Aおよび図15BにおけるHer2およびDAPI成分画像は、より低い品質である。DAPI画像では、たとえば、この染色剤が従来核を視覚化するのに使用されているにもかかわらず、核は見られない。

30

【0150】

Nuanceソフトウェアを使用して、青色にマップされたDAPI、およびピンク色にマップされたエオシンによる合成明視野H&Eビューを生成した。個々の青色、緑色、および赤色の色平面を、図16A、図16B、および図16Cとして示し、図16A～図16Cの3つの画像の組み合わせに対応した画像を図22に示す。1:50希釈後に試料から得られた合成ビューは、従来のプロトコルで処理し、明視野撮像モードで見たときの同様の試料のビューに非常によく似ている。作業フロキシシンB溶液にさらした後の試料についての合成明視野H&Eビューも生成し、このビューの個々の青色、緑色、および赤色の色平面を図17A、図17B、および図17Cに示し、図23は、図17A～図17Cの画像の組み合わせに対応した画像を示す。図16A～図16Cの画像と対照的に、図17A～図17Cの画像は、真の明視野H&Eビューと酷似していない。

40

【0151】

全体として、第3の実験の結果は、第1の実験で、エオシンYおよびフロキシシンBの混合物を使用して得られた結果と類似していた。

【0152】

他の実施形態

いくつかの実施形態を説明してきた。それでもなお、本開示の趣旨および範囲から逸脱せずに、さまざまな修正形態が行われてよいことが理解されるだろう。したがって、他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内である。

【符号の説明】

50

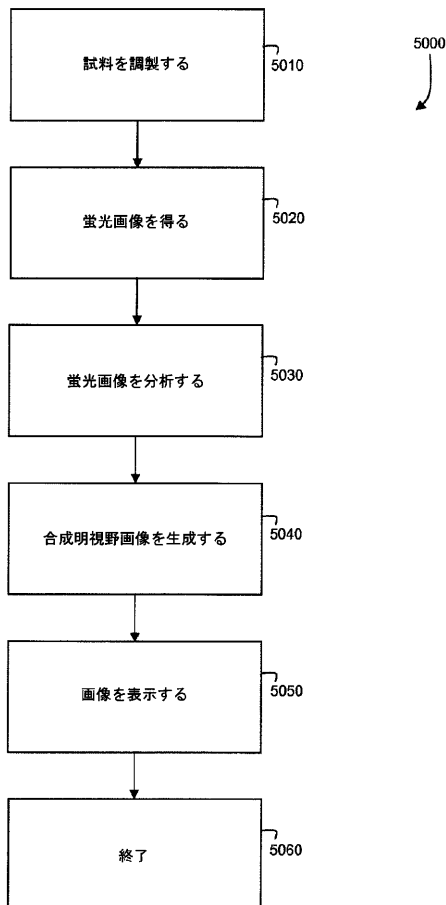
【 0 1 5 3 】

- 100 システム
- 102 光源
- 104 光調整光学部品
- 106 照明ステージ
- 108 試料
- 110 光収集光学部品
- 112 検出器
- 114 電子制御システム
- 116 プロセッサ
- 118 ディスプレイデバイス
- 120 ユーザーインターフェース
- 122 光
- 124 入射光
- 126 放射光
- 128 出力光
- 130 電気通信線
- 132 電気通信線
- 134 電気通信線
- 136 電気通信線
- 138 電気通信線

10

20

【 図 1 】



【 図 2 A 】

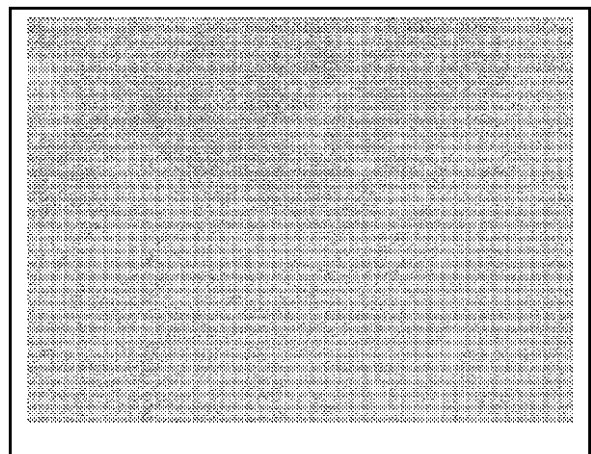


FIG. 2A

【 図 2 B 】

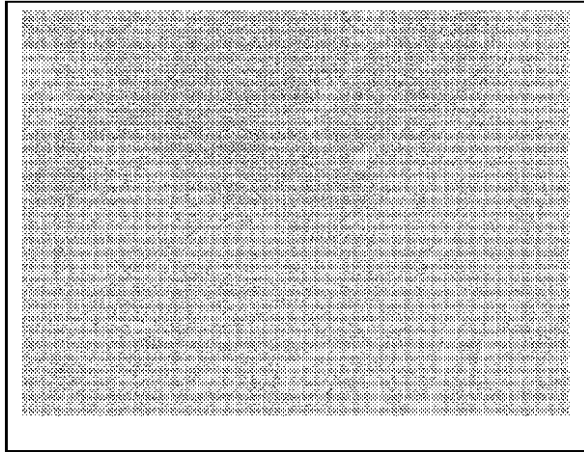


FIG. 2B

【 図 2 C 】



FIG. 2C

【 図 3 A 】

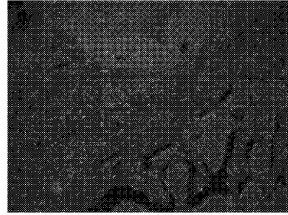


FIG. 3A

【 図 3 B 】

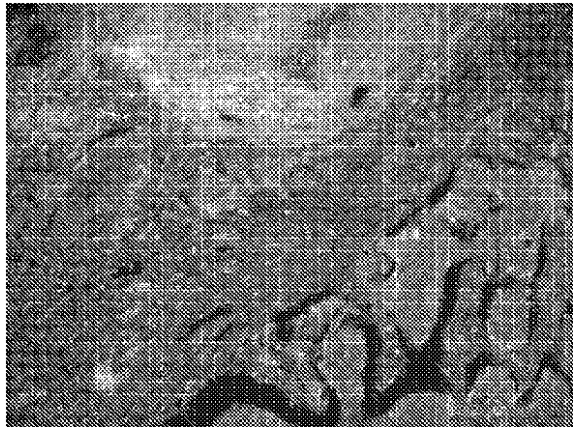


FIG. 3B

【 図 3 C 】



FIG. 3C

【 図 3 D 】

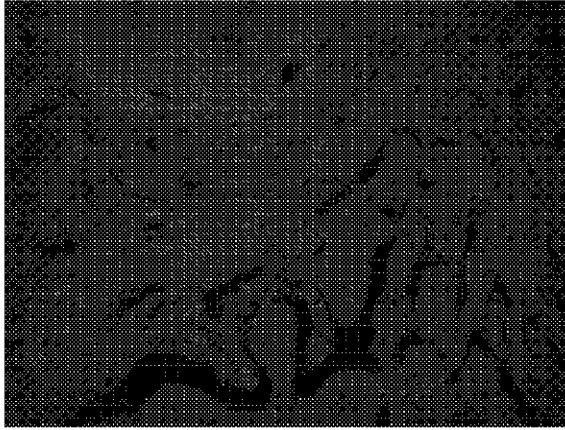


FIG. 3D

【 図 3 E 】



FIG. 3E

【 図 3 F 】



FIG. 3F

【 図 4 B 】

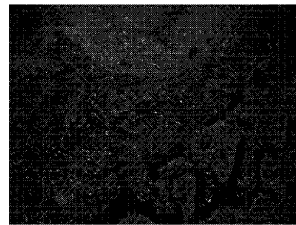


FIG. 4B

【 図 5 A 】



FIG. 5A

【 図 4 A 】

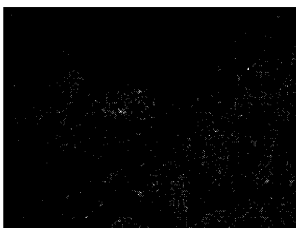


FIG. 4A

【 図 5 B 】

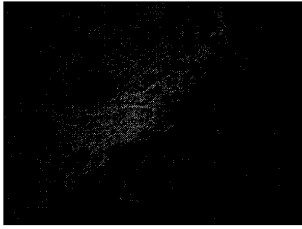


FIG. 5B

【 図 6 A 】

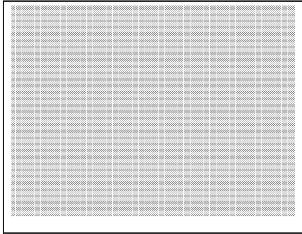


FIG. 6A

【 図 6 B 】

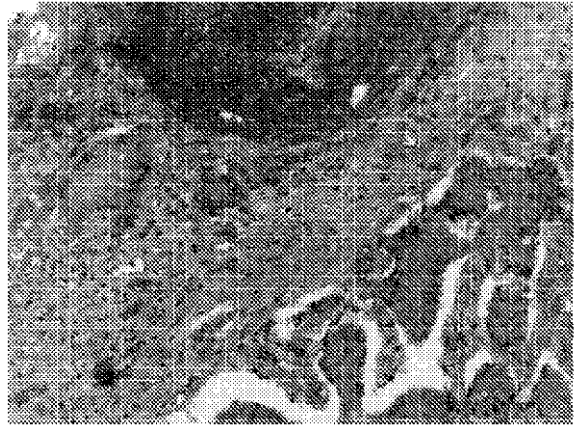


FIG. 6B

【 図 6 C 】

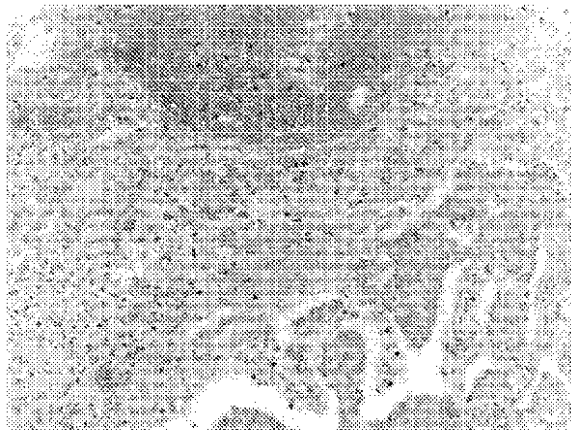


FIG. 6C

【 図 7 B 】



FIG. 7B

【 図 7 C 】

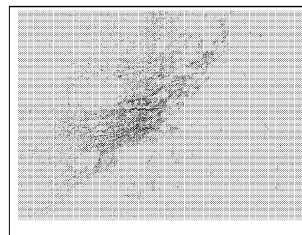


FIG. 7C

【 図 7 A 】

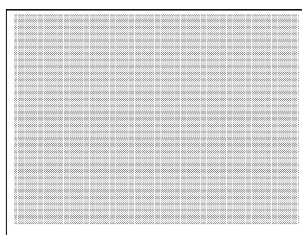


FIG. 7A

【 図 8 A 】

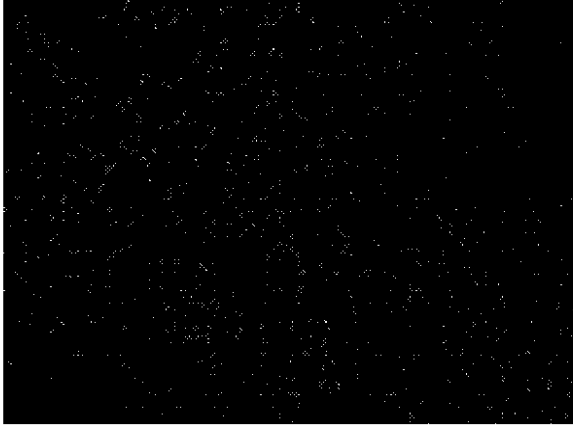


FIG. 8A

【 図 8 B 】

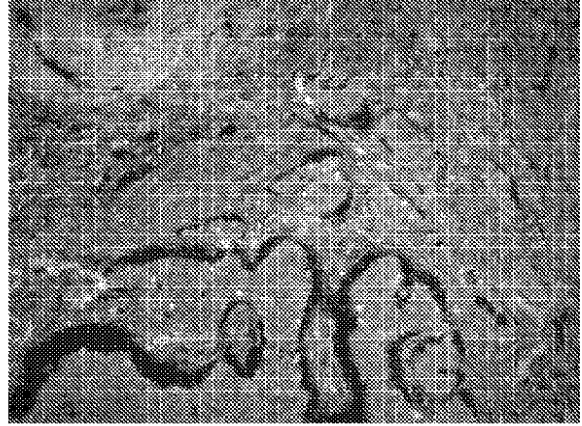


FIG. 8B

【 図 8 C 】



FIG. 8C

【 図 1 0 A 】

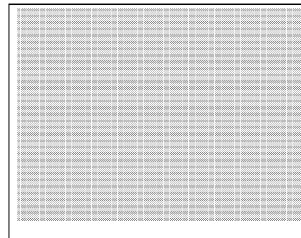


FIG. 10A

【 図 1 0 B 】



FIG. 10B

【 図 9 】



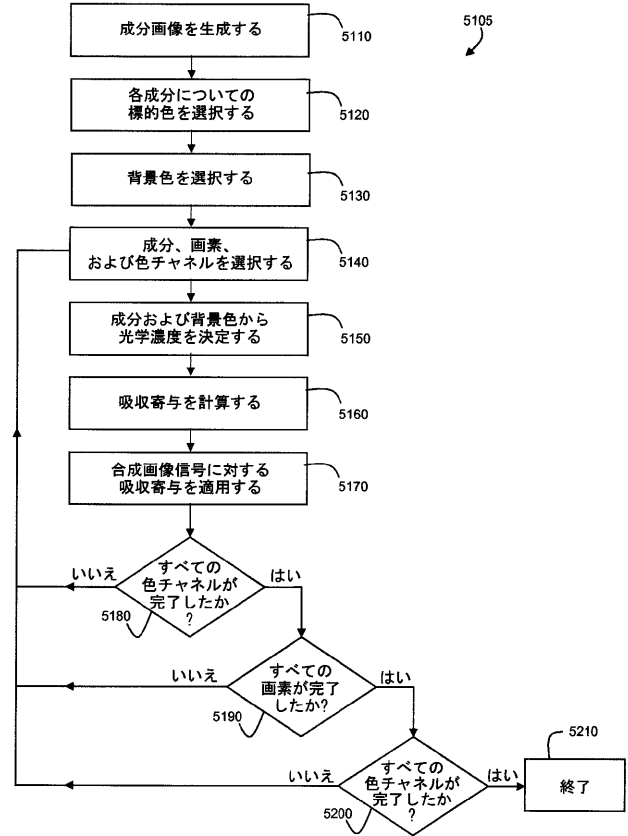
FIG. 9

【 図 1 0 C 】



FIG. 10C

【 図 1 1 】



【 図 1 2 A 】



FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

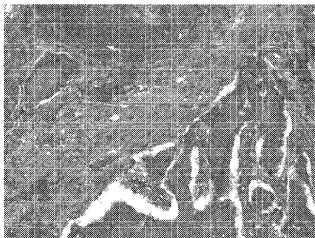


FIG. 12B

【 図 1 3 A 】

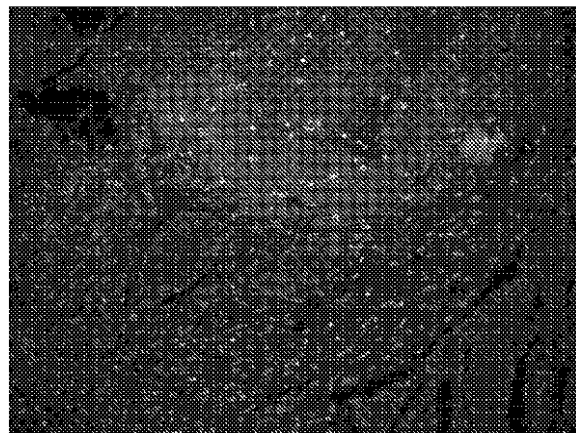


FIG. 13A

【図 13 B】

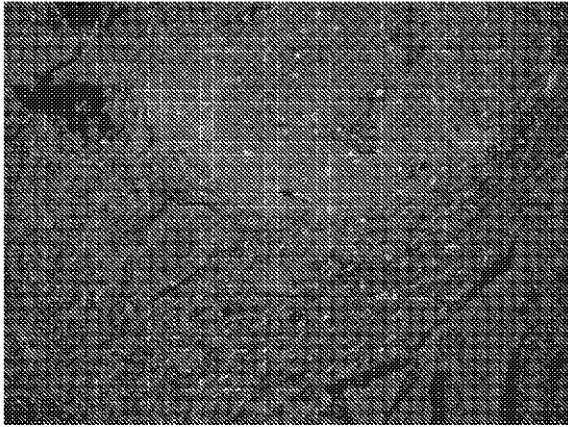


FIG. 13B

【図 13 C】



FIG. 13C

【図 13 D】

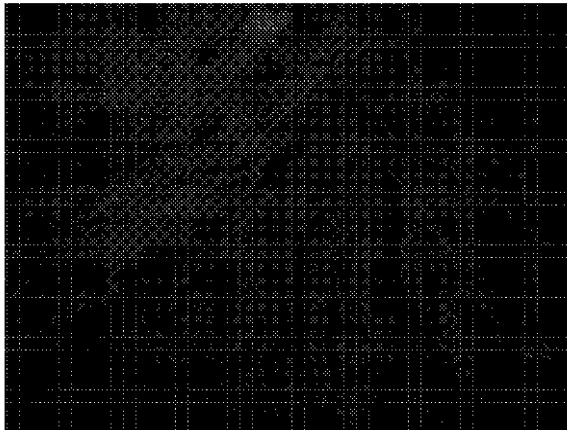


FIG. 13D

【図 13 E】

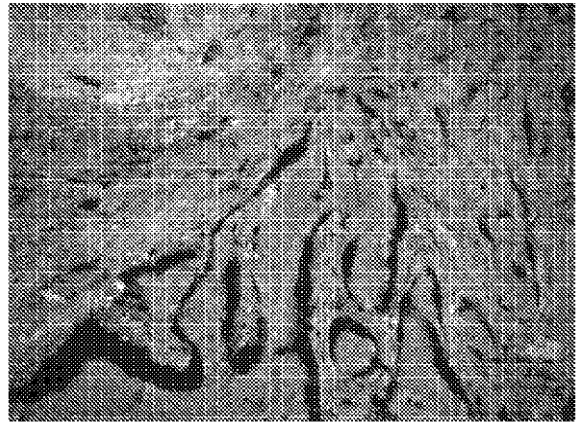


FIG. 13E

【 図 1 3 F 】

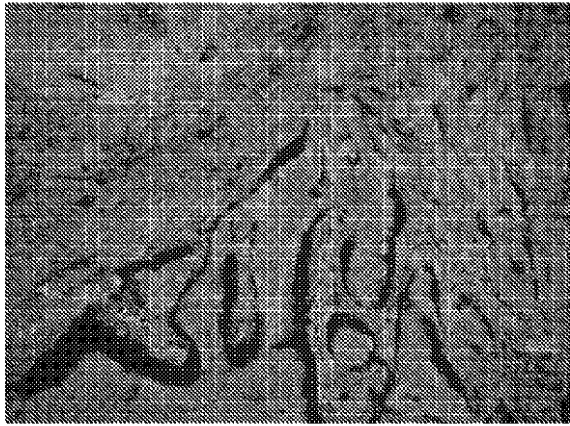


FIG. 13F

【 図 1 4 B 】



FIG. 14B

【 図 1 5 A 】



FIG. 15A

【 図 1 4 A 】

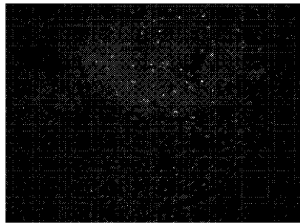


FIG. 14A

【 図 1 5 B 】



FIG. 15B

【 図 1 6 B 】



FIG. 16B

【 図 1 6 A 】

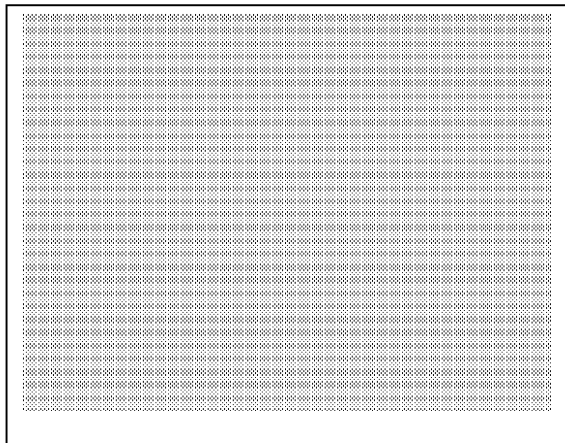


FIG. 16A

【 図 1 6 C 】

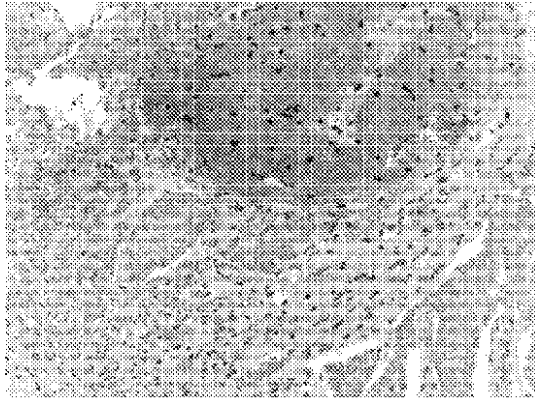


FIG. 16C

【 図 1 7 A 】

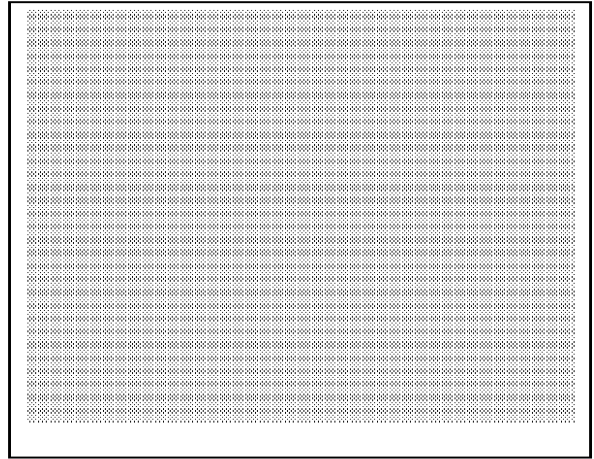


FIG. 17A

【 図 1 7 B 】

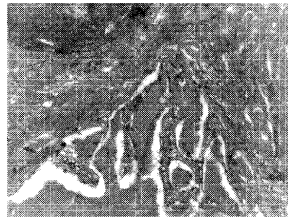


FIG. 17B

【 図 1 7 C 】

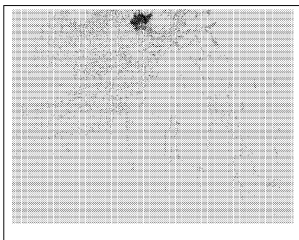


FIG. 17C

【 図 1 9 】

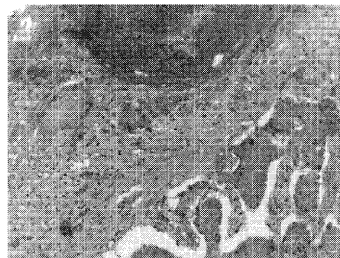


FIG. 19

【 図 1 8 】

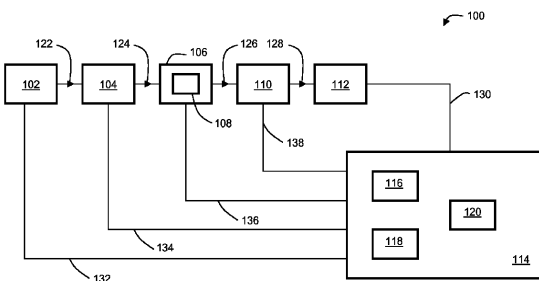


FIG. 18

【 図 2 0 】

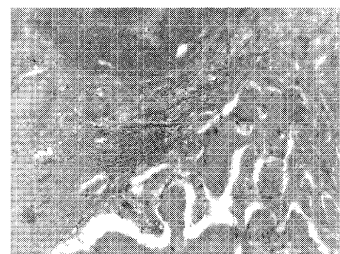


FIG. 20

【 図 2 1 】

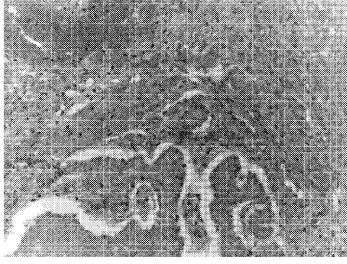


FIG. 21

【 図 2 3 】

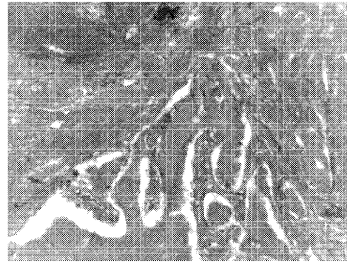


FIG. 23

【 図 2 2 】

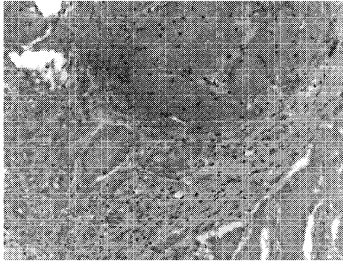


FIG. 22

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2011/046808

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. G01N21/64 G01N1/30 G06T7/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N G06T		
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 practical, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/056945 A2 (SHALON VENTURES INC [US]; SADLER JOHN W [US]; MULHOLLAND JONATHAN W [U] 20 May 2010 (2010-05-20)	34
A	page 1, line 24 - line 29 page 6, line 28 - line 34 page 8, line 15 - line 21 page 11, line 27 - line 30 page 15, line 7 - line 24 page 20, line 14 - line 34 -----	1-33
X	WO 2010/011953 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; UNIV OREGON HEALTH & SCIENCE [US]; G) 28 January 2010 (2010-01-28)	34
A	paragraph [0151] - paragraph [0153] -----	1-33
X	WO 00/70541 A1 (RESOLUTION SCIENCES CORP [US]) 23 November 2000 (2000-11-23)	34
A	page 14, line 8 - page 15, line 12 -----	1-33
	-/--	
<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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2011		Date of mailing of the international search report 08/11/2011
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 D'Alessandro, Davide

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/046808
---

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BADIR B ET AL: "Fluorescence microscopy in the detection of early myocardial infarction", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 34, no. 1-2, 1 May 1987 (1987-05-01), pages 99-102, XP026232598, ISSN: 0379-0738, DOI: 10.1016/0379-0738(87)90088-0 [retrieved on 1987-05-01] the whole document -----	1-34
A	US 5 859 700 A (YANG MARY M [US]) 12 January 1999 (1999-01-12) abstract column 14, line 24 - line 52 column 15, line 10 - line 21 -----	1-34
A	US 6 348 325 B1 (ZAHNISER DAVID J [US] ET AL) 19 February 2002 (2002-02-19) column 3, line 57 - line 65 -----	1-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/046808

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2010056945	A2	20-05-2010	US 2011224574 A1	15-09-2011
WO 2010011953	A1	28-01-2010	AU 2009273838 A1	28-01-2010
			CA 2731956 A1	28-01-2010
			EP 2318875 A1	11-05-2011
			US 2011116694 A1	19-05-2011
WO 0070541	A1	23-11-2000	AU 4841800 A	05-12-2000
			CN 1349633 A	15-05-2002
			EP 1200928 A1	02-05-2002
			JP 2002544531 A	24-12-2002
			TW 1224286 B	21-11-2004
			US 6195451 B1	27-02-2001
			US 2001017938 A1	30-08-2001
US 5859700	A	12-01-1999	US 6160617 A	12-12-2000
US 6348325	B1	19-02-2002	US 2002150967 A1	17-10-2002

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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, ID, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

(72)発明者 クリフォード・シー・ホワイト

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02481・ウェルズレイ・ワシントン・ストリート・135

Fターム(参考) 2G043 AA01 EA01 GA21 GB21 LA03 NA01  
2G045 AA24 BB25 CA25 CB01 FA19  
2G059 AA01 BB12 EE07 FF01 KK04 MM01 NN01

专利名称(译)	突出样品的视觉评估		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013540260A</a>	公开(公告)日	2013-10-31
申请号	JP2013523368	申请日	2011-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥研究与仪表公司		
申请(专利权)人(译)	剑桥研究与仪表公司		
[标]发明人	クリフォードシーホイト		
发明人	クリフォード・シー・ホイト		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/48 G01N33/536 G01N33/53 G01N21/27		
CPC分类号	G01N21/6458 B82Y30/00 G01N1/30 G01N21/6428 G01N2021/6441 G06K9/0014 G06T5/50 G06T2207/10056 G06T2207/10064 G06T2207/30024		
FI分类号	G01N21/64.F G01N33/48.P G01N33/536.D G01N33/53.Y G01N21/27.A		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/EA01 2G043/GA21 2G043/GB21 2G043/LA03 2G043/NA01 2G045/AA24 2G045/BB25 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/FA19 2G059/AA01 2G059/BB12 2G059/EE07 2G059/FF01 2G059/KK04 2G059/MM01 2G059/NN01		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	61/371151 2010-08-05 US		
其他公开文献	JP5832537B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种用于对生物样品成像的方法和系统，该方法包括以下步骤：  
 (a) 用包含曙红和至少一种另外的染色剂的第一染色剂染色样品；(b)  
 染色将激发光导向样品，使得每种药剂发出荧光，和(c) 记录样品中污  
 渍发出的荧光图像，其中样品中的曙红量是将其充分稀释至在绿色波长  
 下具有小于0.10的平均光密度。

