

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4568499号
(P4568499)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月13日(2010.8.13)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F
請求項の数 50 (全 48 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-568480 (P2003-568480)	(73) 特許権者	309021320
(86) (22) 出願日	平成15年2月14日(2003.2.14)		ベリデックス・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(65) 公表番号	特表2005-537781 (P2005-537781A)		Veridex, LLC
(43) 公表日	平成17年12月15日(2005.12.15)		アメリカ合衆国ニュージャージー州ラリタ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004468		ン、ルート202、1001番
(87) 国際公開番号	W02003/069421	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成15年8月21日(2003.8.21)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成17年8月3日(2005.8.3)	(74) 代理人	100106231
(31) 優先権主張番号	60/357,170		弁理士 矢野 正樹
(32) 優先日	平成14年2月14日(2002.2.14)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100156122
			弁理士 佐藤 剛
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 低コストで細胞計数するための方法およびアルゴリズム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 生物標本内の標的集団を、該標的集団のメンバーを特異的に標識することができ、かつ、非標的集団を排除することができる、平均直径が180nmの磁性粒子で磁氣的に標識し；

b) 画像を獲得するための観察表面まで上方に垂直方向で該標識した標的集団を移動させる磁気勾配を発生する高勾配磁気分離システムを用いて、該標識した標的集団を磁氣的に単離し；

c) 該標識した標的集団を含む該生物標本の画像を獲得し；ついで

d) 該画像を解析して該標識した標的集団を検出および計数することを含み、生物標本内の標的集団を検出および計数する方法。

【請求項2】

該標的集団のメンバーが細胞からなる請求項1記載の方法。

【請求項3】

該細胞がCD4+細胞からなる請求項2記載の方法。

【請求項4】

該標識工程が該生物標本に非特異的蛍光色素を導入することを含み、ここに該色素が該標的集団のメンバーを標識する請求項1記載の方法。

【請求項5】

該色素がアクリジン・オレンジ、ヘキスト33258 (Hoechst 33258)およびヘキスト

3 3 3 4 2 (Hoechst 33342)よりなる群から選択される請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

該磁性粒子がコロイド状ナノ粒子、強磁性流体、磁性マイクロスフェアおよび強磁性高密度粒子よりなる群から選択される請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

該磁性粒子が C D 4 抗原に対して特異的である請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

該単離工程が該標的集団の該磁氣的に標識したメンバーを磁氣的に操作することを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

該磁氣的操作が該標的集団のメンバーを観察表面に近接して位置させることを生じる請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

該観察表面が水平面に対して傾斜していて、泡を該観察表面から離れて浮揚させることができる請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

該画像獲得工程が C C D カメラを用いて該生物標本のデジタル画像をキャプチャすることを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

該解析工程が該デジタル画像を処理するための 1 またはそれを超えるアルゴリズムを含む請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

該 1 またはそれを超えるアルゴリズムを用いて S N 比を低減させ、ここに該シグナルが該標的集団の陽性に標識したメンバーに対応する請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

該 1 またはそれを超えるアルゴリズムを用いてシグナルを検出および計数し、ここに該シグナルが該標的集団の陽性に標識したメンバーの存在を示す請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

該生物標本を落射照明、直接照明、斜照明および垂直明視野照明よりなる群から選択される方法によって照明する請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

該照明の光源が L E D、レーザー、水銀アーク灯および石英ハロゲン灯よりなる群から選択される請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

該画像が生物標本全体の知られた部分を表す請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

該分割した画像を解析することが、該標的集団のメンバーを計数することおよび該知られた部分の結果を外挿して生物標本全体を表すことを含む請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

さらに、該生物標本中に存在する非標的集団基に結合することができるマイクロビーズを添加する工程を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 20】

該マイクロビーズが C D 1 4 抗原に対して特異的である請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

さらに、該標的集団のメンバーに対して特異的である遊離生物特異的リガンドを添加する工程を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 22】

該遊離生物特異的リガンドが抗体である請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

該抗体が C D 4 抗原に対して特異的である請求項 22 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

a) 照明手段；
 b) 画像を獲得するための観察表面を含む試料チャンバー；
 c) 画像を獲得するための手段；
 d) 生物標本を含む試料チャンバーを受容することができる磁石配置（ここに該磁石配置はさらに試料チャンバーが照射され、イメージされることを可能にすることができる）；

e) 該標的集団のメンバーを特異的に標識することができ、かつ、非標的集団を排除することができる、平均直径が 180 nm の磁性粒子で磁氣的に標識された該生物標本内の標的集団を、画像を獲得するための観察表面まで上方に垂直方向で移動させる磁気勾配を発生する高勾配磁気分離システム；

f) 該画像に対して 1 またはそれを超える解析アルゴリズムを実行するプロセッサ；および

g) 結果を表示するための出力手段

を含み、ここに、該試料チャンバーの高さおよび観察表面の面積が既知であることを特徴とする生物標本内の標的集団を検出および計数するための装置。

10

【請求項 2 5】

該照明手段が 1 またはそれを超える発光ダイオードである請求項 2 4 記載の装置。

【請求項 2 6】

該発光ダイオードが 470 nm の中心波長で発光する請求項 2 5 記載の装置。

20

【請求項 2 7】

該画像獲得手段がデジタルカメラおよび CCD カメラよりなる群から選択される請求項 2 4 記載の装置。

【請求項 2 8】

該試料チャンバーが透明観察表面を有する請求項 2 4 記載の装置。

【請求項 2 9】

該磁石配置が繰り返し可能な正確な位置に該試料チャンバーを位置決定することができる請求項 2 8 記載の装置。

【請求項 3 0】

該磁石配置が該標的集団の磁氣的に応答するメンバーを該観察表面に運搬する請求項 2 8 記載の装置。

30

【請求項 3 1】

該試料チャンバーが水平面に対して傾斜していて、泡を該観察表面から離れて浮揚させることができる請求項 2 8 記載の装置。

【請求項 3 2】

a) 平均直径が 180 nm の磁性粒子；
 b) 非特異的蛍光色素；
 c) 画像を獲得するための観察表面を含む試料チャンバー；および
 d) 1 またはそれを超える好適な生物緩衝液

を含み、ここに、該試料チャンバーの高さおよび観察表面の面積が既知であることを特徴とする生物標本内の標的集団を検出および計数するキット。

40

【請求項 3 3】

該磁性粒子がコロイド状ナノ粒子、強磁性流体、磁気マイクロスフェアおよび強磁性高密度粒子よりなる群から選択される請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 3 4】

該磁性粒子が該標的集団のメンバーに特異的に結合することができる請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 3 5】

該磁性粒子が CD 4 抗原に対して特異的である請求項 3 4 記載のキット。

【請求項 3 6】

50

1 またはそれを超える試薬が凍結乾燥形態で存在する請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 3 7】

該凍結乾燥した試薬が該試料チャンバー内に含まれる請求項 3 6 記載のキット。

【請求項 3 8】

1 またはそれを超える試薬が錠剤形態で存在する請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 3 9】

該試料チャンバーが透明観察表面を有する請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 4 0】

該試料チャンバーを、該生物標本の収集デバイスとして用いる請求項 3 2 記載のキット

。

10

【請求項 4 1】

該非特異的蛍光色素がアクリジン・オレンジ、ヘキスト 3 3 2 5 8 (Hoechst 33258) およびヘキスト 3 3 3 4 2 (Hoechst 33342) よりなる群から選択される請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 4 2】

さらに、該生物標本中に存在する非標的集団基に結合することができるマイクロビーズを含む請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 4 3】

該マイクロビーズが CD 1 4 抗原に対して特異的である請求項 4 2 記載のキット。

【請求項 4 4】

さらに、該標的集団のメンバーに対して特異的である遊離生物特異的リガンドを含む請求項 3 2 記載のキット。

20

【請求項 4 5】

該遊離生物特異的リガンドが抗体である請求項 4 4 記載のキット。

【請求項 4 6】

該抗体が CD 4 抗原に対して特異的である請求項 4 5 記載のキット。

【請求項 4 7】

さらに、既知量の蛍光ビーズを含有する通常の試料チャンバーを含むキャリブレーション・チャンバーを含む請求項 3 2 記載のキット。

【請求項 4 8】

該ビーズがポリマーマトリクスに包埋されている請求項 4 7 記載のキット。

30

【請求項 4 9】

a) 照明手段；
b) 画像を獲得するための観察表面を含む試料チャンバー；
c) 画像を獲得するための手段；
d) 生物標本を含む試料チャンバーを受容することができる磁石配置（ここに該磁石配置はさらに試料チャンバーが照射され、イメージされることを可能にすることができる）；

e) 該標的集団のメンバーを特異的に標識することができ、かつ、非標的集団を排除することができる、平均直径が 180 nm の磁性粒子で磁氣的に標識された該生物標本内の標的集団を、画像を獲得するための観察表面まで上方に垂直方向で移動させる磁気勾配を発生する高勾配磁気分離システム；

f) 該画像に対して 1 またはそれを超える解析アルゴリズムを実行するプロセッサ；

g) 結果を表示するための出力手段；および

h) リチャージャブル・バッテリー

を含み、ここに、該試料チャンバーの高さおよび観察表面の面積が既知であることを特徴とする低コストでリモート細胞解析を行うためのポータブル装置。

40

【請求項 5 0】

a) HIV 陽性患者からの血液を、画像を獲得するための観察表面を含む試料チャンバーに導入し、ここに、該試料チャンバーの高さおよび観察表面の面積が既知であり；

50

- b) 蛍光細胞色素で該血液試料中の細胞を非特異的に標識し；
- c) 該血液試料中に存在するCD4+白血球を、平均直径が180nmの磁性粒子で免疫磁氣的に標識し；
- d) 前記画像を獲得するための観察表面まで上方に垂直方向で移動させる磁気勾配を発生する高勾配磁気分離システムを用いて、該免疫磁氣的に標識されたCD4+白血球を該試料チャンバーの観察表面に向けて磁氣的に操作し；
- e) 該血液試料の画像を獲得し；ついで
- f) 該画像を解析して該CD4+細胞集団を検出および計数することを含むHIV陽性患者からの血液試料を分析する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、部分的に、出典明示して本明細書の一部とみなす2002年2月14日に出願された米国仮特許出願番号60/357,170号に基づく優先権を主張する非仮特許出願である。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般的に、二次元平面に分散した微視的粒子を計数するためのシンプルかつ低コストのエレクトロニック・オプティカルデバイス、方法、およびアルゴリズムに関する。新規なカウンティング技術は、安価なセルサイトメーターによって、血液のごとき複雑な生物標本中の磁氣的に選択した蛍光細胞の計数に特に適用することができる。

【0003】

発明の背景

体液中の細胞およびそのサブセットの絶対レベルの計数は、一般にヒトおよび哺乳動物の健康状態を判断することにおいて主に重要なものである。かかる分析を行うための主たる分析プラットフォームは、標本を直接的または希薄な細胞分析において先に富化した後のいずれかに注入するフローサイトメトリーである。フローサイトメトリーおよび同様な複雑な分析システムは、高価な機器および試薬コスト、技術的支援の不足、頻繁なサービスを必要とする強固さの不足およびAC電源の必要性に起因して、資源が乏しい国においては日常的な臨床用途にたいして得難いままである。緊急用DCバッテリーで操作可能なよりシンプルで、よりコンパクトでかつあまり高価でなく、しかも好ましくは匹敵する性能特性を示すシステムに対する明らかな要望が存在する。

【0004】

Becton DickinsonおよびBeckman-Coulterから入手可能な前記に引用したフルサイズのフローサイトメトリー・システムに加えて、これらの販売業者は、スケールダウンしたあまり高価でないバージョンのものも販売しており、これらは他の引用した制限にまだ苦しむ。同様の制限はPartec GmbH (Munster, Germany)から市販されているコンパクトなCy Flow (登録商標)およびGuava Personal Cytometer (Burlingame, CA)に当てはまる。米国特許第6,097,485号(Integrated Wave Guides, Brookings, SDに譲渡された)は、より低コストであることを訴求した超小型パーソナルフローサイトメーター(pFCM)を開示しているが、いまだむしろ複雑な電子回路、光学設計、データ減少を示しており、これらはすべて第三世界の配置に対して許容し得ない複雑性の一因となっている。これらのシステムはすべてフロー概念を用いており、それは装置の設計を明らかに複雑にする。フローサイトメトリー・システムのこれらのスケールダウンしたバージョンは、真に単純で、コンパクトで、頑丈で、バッテリー作動可能で、入手可能なセルアナライザーに対する明らかな要望に合致しない。

【0005】

単純なセルアナライザーに関する膨大な臨床適用の中で、HIVにおけるCD4細胞の計数、化学療法で処理した患者における顆粒球および血小板の計数、ならびに、血液パッ

10

20

30

40

50

グ中の白血球の計数は最も重要である。細胞分析に関する最近のシステムおよび方法は幾つかの重要な欠点を有している。一般的にそれらには高度の技術が必要であり、それには、初期コストおよび維持の両方の面において高価である機器の使用ならびに高度に訓練された個人の使用が含まれる。このことは、資源が乏しい国々の研究室における使用に従来のシステムを不適なものとしている。したがって、例えば、CD4細胞計数に対して、低コストで、使用するのが簡単な方法が必要とされる。かかる方法は、試験することならびに屋外の設置に加えて、医師の実施に適当であろう最近の細胞分析システムに対するコンパクトな代替物として作用し得る。

【0006】

HIVおよびAIDSはアフリカにおける主要な死因であり、全世界の4番目に主要な死因である。最も冒された国々においては、期待寿命は10歳下がり、新生児死亡率は2倍になった。ボツワナ、南アフリカおよびジンバブエのような最も高いHIV罹患率の国においては、伝染性の完全な影響はいまだ感じられていない。最近感染したものはいまだに明白な症状を発病していないからである。同等に重要なことは、家族、社会システムおよび国の生産および発展に対するHIV死亡の影響である。国の国内総生産に実質的に寄与する若年成人が、最も一般に罹患している。HIVに感染した個人に対する最も有効な介入療法は、抗レトロウイルス剤の組合せの使用である。しかしながら、これらの様式の高いコストおよびその使用をモニターするのに必要なインフラストラクチャーは、これらの薬物療法を多くのHIV感染個人の手の届く範囲を超えるものとしている。これらの薬物の価格は下落し、より多数の個人を治療することが可能になっているが、これらの薬物療法の有効な使用を指示するためのインフラストラクチャーは不十分のままであり、強化する必要がある。見積もり予測および計画療法の目的で個人における疾患を特徴付けするためには、医師はどの位疾患が進行しているかを知る必要がある。

【0007】

HIV疾患においては、最近、CD4計数によってこれが最も有用に示されている。HIVはTリンパ球のCD4陽性サブセットに感染し、結局それらの枯渇およびAIDSに現れる種々の日和見感染の開始につながる。HIV感染の過程の間に、CD4+Tリンパ球の数は500~1300細胞/ μ lの正常な値から200細胞/ μ l未満まで低下する。典型的な未治療患者の自然の過程は、血中のウイルスの鋭い上昇で始まり、その後CD4+T細胞が低下する。しかしながら、すぐに免疫系はある程度まで回復し、数年間、HIVレベルはかなり安定に維持される。にもかかわらず、最終的にはウイルスが優勢となる。いずれが早く起こるにせよ、CD4+T細胞レベルが血液1mm³あたり200細胞未満まで低下した場合または日和見感染(免疫不全を反映する)が上昇した場合にAIDSが診断される。したがって、CD4+T細胞レベルを用いてHIV疾患の進行を判断し得る。さらに、絶対CD4カウントの日常的なモニタリングは、療法の有効性を判断することならびに療法に対する応答についての重要な情報を与える。

【0008】

要求に基づいて、本発明を用いてHIV患者中のCD4細胞を計数することに関して以下の設計基準を確立した：

1. 計数は100~2500のCD4+T細胞/ μ l血液で可能であるが、100~500の範囲においては最もきわどいこと。500細胞/ μ lを超えるカウントは不適切である。また、200細胞/ μ l未満は療法の臨床参加が主張される真の臨界的なレベルでもある(資源が乏しい環境におけるWHO治療を参照されたい)。これらの最近のガイドラインはCD4を非常にシンプルに等級別に分類し、ヘモグロビン(Hb)を使用して患者を臨床的に等級別に分類する。
2. 10%未満の偽陽性の数(単球、他の細胞)。これは、例えばTBとの同時感染のような単球が高くなり得る場合にとりわけ重要である。TBは200 μ / μ L未満のAIDSを定義する疾患とみなされており、南アフリカの症例の経験においては、CD4カウントの大部分は200~400の範囲内にある。
3. \$1000以下のハードウェアコスト価格。

10

20

30

40

50

4. \$ 1 以下の試験あたりの最大コスト（化学物質、抗体ほかを含む）。試験あたり \$ 1 ~ 2 未満の一般的試薬を用いるフローサイトメトリックコスト。

5. 最小限量の研究室取り扱いしか要求されないこと。それは、資源に乏しい環境における適用には重要な点である。

6. 清掃段階を回避し、安全性の理由により、ディスポーザブル（キュベットほか）を使用すること。これは、ディスポーザブルなシステムのみを開発しなければならないことを意味するものではない。非常に資源が乏しい環境においては、ディスポーザブルは手が届かない場合があり、その場合には清掃可能なチャンバーがより良好となり得る。"全ての"（ディスポーザブル物および血液）が一般廃棄物に行き、あるいは浪費されることを避けるためには、ディスポーザブル物用の単純な滅菌システムを含めることはよいアイデアとなり得る。

10

7. 総合的なシステムは頑丈かつポータブルであるべきであり；低電力消費を有し（バッテリー作動可能である）、自動データ登録を有しているべきである。

【 0 0 0 9 】

本明細書に記載する発明は前記の基準に合致する。本発明は、CCDカメラを用いて試料をイメージする。対象検出アルゴリズムはキャプチャした画像上で行って、試料中に存在する標的物質の数をカウントする。

【 0 0 1 0 】

従来技術は多くのコンピュータ支援の顕微鏡を含んでいる。米国特許第 5, 0 1 8, 2 0 9 号は、使用者が画像を見ながら陽性事象を手動で選択するコンピュータ駆動顕微鏡を教

20

【 0 0 1 1 】

米国特許第 5, 2 8 7, 2 7 2 号においては、自動化細胞学的標本分類システムおよび方法が記載されている。このシステムは形態に基づく細胞の画像を処理する複雑なニューラルネットワークに頼っている。画像で対象物を分類することについては非常に有効であるが、それは多量のコンピュータ資源を必要とする。さらに、ヒトの入力およびその後の分析がいまだ必要である。米国特許第 5, 0 7 3, 8 5 7 号および第 5, 0 7 7, 8 0 6 号に記載されているものごとき他のデバイスは、所定の閾値を用いることによって、ウィンドウ・サブイメージ・ピクセル・カウンティング・アルゴリズムを画像解析に用いる。

30

【 0 0 1 2 】

先行技術におけるもう 1 セットの機器は、ベンチトップアナライザーとして設計されている。米国特許第 5, 0 7 3, 8 5 7 号においては、パブ塗抹標本がコンピュータ制御顕微鏡およびカメラならびにコンピュータ駆動画像分析によって分析されている。米国特許第 6, 2 2 1, 6 0 7 号においては、生物標本におけるイン・サイチュ (in situ) ハイブリダイゼーションを分析するための自動化顕微鏡が記載されている。

【 0 0 1 3 】

前記した先行技術のデバイスはスライドをイメージするために設計されている。本明細書中で明らかにするような生物標本内の標的集団を検出および計数することができるものは存在しない。さらに、ポータブルまたは高スループットなデバイスと考えられるものも存在しない。これらの機器はデスクトップ・コンピュータに頼って顕微鏡およびカメラを制御し、画像解析アルゴリズムを行うように設計されている。本発明は、先行技術に存在した多くの困難を克服した。

40

【 0 0 1 4 】

発明の概要

本発明（本明細書中ではそのプロジェクト名である"イージーカウント (Easy Count)" という場合もある）は、磁気的に標識した標的細胞または粒子を検出および計数するためのコンパクトなエレクトロニック・オプティカル機器、分析方法、画像の獲得およびデータ削減アルゴリズムを記載する。例えば、全血を用いる場合、血球はDNA染色色素のごとき 1 またはそれを超える標的的特異的な蛍光色素を用いて蛍光標識する。血液試料中の関

50

心のある細胞または標的細胞は、強磁性粒子にコンジュゲートしたモノクローナル抗体とインキュベートすることによって標識する。ついで、試料は適当な光学的検出チャンパーまたはキュベットに入れ、ついでこれを磁場勾配に置き、これは磁氣的に標識した細胞をチャンパーの上部の観察表面まで動かす。標的細胞を収集し、チャンパーの光学的に透明な表面に実質的に均一に固定化する。この表面のセグメントおよびその上の標識した標的細胞は、1またはそれを超えるLED（発光ダイオード）によって照明される。その後、個々の標的細胞から発せられた光はCCD（電荷結合素子）によってキャプチャされる。とりわけ本明細書に開示するこのシステムに対して考案された、新規な画像獲得方法、処理方法、およびアルゴリズムを用いて、キャプチャされた光を発する細胞の数をカウントする。ついで、データ出力をチャンパー中の試料のマイクロリットルあたりの標的細胞に関連付け、最終的にもとの標本に関連付ける。

10

【0015】

本発明の1の具体例は、全血試料からの免疫磁氣的に標識した細胞の所定の高さの試料チャンパーの上部ガラス観察表面に向けての磁氣的操作である。システムは所定の領域の観察表面上に存在する細胞の数をカウントする。チャンパーの高さおよび観察領域の面積は知られているので、細胞が抽出される体積を決めることができ、観察表面に存在する細胞の数を試料中の細胞の絶対数に直接的に変換し得る。

【0016】

簡単には、1のアッセイ方法具体例は、つぎのように行う：特定の型の細胞が存在するかまたはどの位存在するかを調べたい試料を得る。試料中の全細胞または核酸を含む全細胞を標識する蛍光プローブを試料に加える。この細胞型を試料中の他の細胞から区別する生物基（bioentity）で標識した免疫磁氣粒子を試料に添加する。細胞標識は分析に用いたキュベットまたはチャンパー中で行うか、または細胞標識ができるようになる十分な時間放置した後にかかるキュベットまたはチャンパーに移す。キュベットまたはチャンパーは、すべての磁氣的に標識した細胞が上部観察表面に移動するように設計された2のくさび型の磁石の間に置く。LEDによって励起されるように、および、観察する表面で細胞によって発せられる蛍光がCCDカメラによってキャプチャされた画像で個々の細胞を同定し得るように蛍光標識を選択する。画像に当てはめられたアルゴリズムは、対象または細胞の各々を同定および計数する。好ましくは、アルゴリズムは、CCDカメラ中の埋め込まれたプロセッサにプログラムする。最後に、試料1マイクロリットルあたりの細胞カウントがLCD上に表示される。

20

30

【0017】

細胞は、バックグラウンドとのその蛍光強度の差異に基づいてカウントする。励起光源としては、蛍光標識の吸収スペクトルに合致する470nmの最大発光を有するLEDを用いる。発せられた蛍光はCCDカメラにイメージされる。画像解析のルーチンでは、システムの内部にコードされたハードが存在する細胞の数を決定し、ついで単位体積あたりの細胞の数を決定する。画像獲得用のアルゴリズムの開発およびデータ削減にはかなり労力のかかる実験および最適化を要した。これによって、本明細書中に記載する優れた性能特性、特に予想だにできなかった高いS/Nを示す本発明の構造が得られた。

【0018】

40

本発明の1の特に有利な態様は、細胞生物学における研究ツールおよび多様な細胞、菌類および限定されるものではないがHIVを含むウイルス病理学およびガンの診断における臨床ツールとしての両方の有用性である。本発明によって提供されるさらなる利点は、デザインにおける機能的シンプルさ、頑丈さ、コンパクトであること、ACまたはDC電源を任意に選択可能であること、ならびに、匹敵する性能特性を有する従来の市販のデバイスに対して、実質的に低い購入および操作コストである。コンパクトな臨床セルサイトメーターとして具体化される本発明のデバイスの特色および改善点は、旧式の研究室または資源が乏しい国々で一般的に行われている現場条件下における操作に特に有用なものとしている。

【0019】

50

本発明によるこれらの発見が当業者によって構想され得る装置、方法およびアルゴリズムの多くのさらなる潜在的な適用の例示を説明することのみを目的とするもので、したがって本発明の範囲を限定することを意図するものでないことは理解されるべきである。したがって、本発明の他の目的および利点は、添付する請求の範囲と一緒に詳細な説明に従えば当業者であれば明らかであろう。

【0020】

図面の簡単な説明

図1：オプティカルおよび発光構造の概略図。(A)においては、LEDからの光が集光器、一連のフィルタおよび10×対物レンズを通して試料上に集光される。細胞の蛍光の画像は投射され、CCDカメラによってキャプチャされる。(B)においては、2のLEDの光は試料上に直接的に投射されている。

10

【0021】

図2：(A) x - および z - 方向におけるチャンパー中の磁気勾配。勾配の x - 成分は無視し得る。(B) 磁気的に標識した白血球はチャンパー中を上方に移動し、一方非標識赤血球は下方に移動する。

【0022】

図3：異なる細胞速度分布に対する時間の関数としての表面の細胞の数。曲線の最初の傾斜は平均細胞速度を表し： a . 0.02 mm / 秒の一定の平均細胞速度、の異なる値。 b . 0.02 mm / 秒の一定値に対する異なる平均細胞速度。

【0023】

図4：典型的な細胞画像およびその強度プロファイルの拡大図。これらの画像に基づいて、細胞を二次元Gaussianスポットとしてモデル化し得ることが予想される。

20

【0024】

図5：カメラから得られた3の細胞画像からの閾値レベル曲線。カウントした細胞の数は選択した閾値レベルに強く依存する。

【0025】

図6：正規化したテンプレート $h(x, y)$ の断面。テンプレートはゼロ平均値を有する。

【0026】

図7：フィルタテンプレート $h(x, y) C_0(x, y) = 0$ の断面。

30

【0027】

図8：フィルタ幅の関数としての、無限積分およびフィルタテンプレートの限定の使用に起因して導入された打切り誤差(%)。ガウス分布下の面積は $(x, y) > W$ の場合には比較的小さいので、この誤差は $W /$ のより大きな値については無視し得る。

【0028】

図9：シグナル $f(x, y)$ とフィルタテンプレート $h(x, y)$ との織り込みの結果。

【0029】

図10：ガウス白色雑音に対するフィルタの効果。フィルタはノイズを顕著に抑制している。

【0030】

図11：フィルタリング前後の典型的な細胞画像からの線軌跡。一定のバックグラウンド・レベルは抑制され、細胞は強められている。負の値は画像の中でゼロに設定されている。

40

【0031】

図12：3の典型的な細胞画像の閾値レベル曲線。(a) フィルタリング前、カウントした細胞の数は選択した閾値レベルに強く依存している。(b) フィルタリング後、フィルタは閾値曲線のプラトーを伸長し、すべての画像について所定の閾値レベル

【0032】

図13：異なるフィルタリング工程における典型的な細胞画像からの線軌跡。ラプラシアン・プレフィルタは画像中の細胞を強く増強し、マッチしたフィルタはノイズを抑制して

50

いる。

【0033】

図14：ラプラシアン・プレフィルタおよびマッチしたフィルタの適用後の閾値レベル曲線。フィルタの効果はより長い水平プラトーで、これによりカウンティング・アルゴリズムが非常に強固なものにする。

【0034】

図15：完全カウンティング・アルゴリズムのブロック図。

【0035】

図16：画像処理アルゴリズムの異なるステージにおける細胞画像。(a)元の細胞画像。(b)ラプラシアン・プレフィルタ後。(c)マッチしたフィルタ後。(d)閾値設定後。

10

【0036】

図17：光学システムの概略図。エポキシレンズ製として示すLEDチップW'は10×対物レンズの後焦点面に像形成し、試料面の平行ビーム発光を生じる。

【0037】

図18：BB'のサイズに対する2の限定状態。(a)BB'が対物レンズの入射瞳よりも大きい場合。(b)BB'が非常に小さく、大きなビーム系を生じ、光が試料面において消失する場合。BB'の最適値はこれらの2の限定状態の間のいずれかに存在すると予想される。

【0038】

図19：幾何学的光線トレーシング・アルゴリズムの視覚化。赤色光線は妨害された光線であり、緑色光は試料面の視野内に残存する。通過した光線の相対数は発光効率に対応する(画像は一定比率で描かれていない)。

20

【0039】

図20：光線トレーシング・アルゴリズムからのデータにフィットした正規化発光効率の実験データ。実験値は、アルゴリズムによって予想された値とよく合致している。

【0040】

図21：カメラからの暗電流雑音の平均値および標準偏差。より長い積算時間でカメラは飽和を獲得した。

【0041】

図22：LEDからの出力シグナルを補正するために、フォトダイオードを試料面に設置し、放射電力を異なるLED電流について測定した。既知のLEDシグナルに対するカメラ応答を測定するために、CCDカメラを試料面に設置し、平均ピクセル強度を測定した。

30

【0042】

図23：ある種のSNを生じる積算時間tと電力密度とのコンビネーション。

【0043】

図24：3の"ゼロ"画像を含む45の細胞画像の閾値レベル。これらの曲線に基づいて、100ないし150の確実な閾値レベル間隔を確立した。

【0044】

図25：異なるSN比(SNR)を用いてシミュレートした細胞画像、これらを用いてカウンティング精度に対するSNRの影響を調べた。(a)SNR=3、(b)SNR=10、(c)SNR=20。

40

【0045】

図26：2のシミュレートした画像の閾値レベル曲線。これらの曲線と図24における実際の画像から得られた曲線との間の類似に注意されたい。

【0046】

図27：シミュレートした画像のSN比の関数としての細胞カウンティングの誤差パーセンテージ。実際の細胞画像における平均SN比(SNR=20)において、データはほぼ2%の誤差を示す。

50

【 0 0 4 7 】

図 2 8 : 予想された細胞の数に対するカウントした細胞の数。システムは約 1 5 0 0 細胞 / 画像まで線形に上昇している (傾き = 0 . 9 8、 $R^2 = 0 . 9 9$)。より高い細胞密度においては、細胞カウントはシステムによって実際より少なく見積もられている。低いサンプルサイズに起因してより低い細胞密度においては誤差が上昇する。

【 0 0 4 8 】

図 2 9 : チャンバー表面の異なる側方位置における細胞の数 / 画像。表面の縁部においては細胞密度が低下する。磁石は、磁石間の中間点で細胞カウントの精度が最も高くなるように設計する。

【 0 0 4 9 】

図 3 0 : イメージング・システムと S y s m e x (登録商標) 血液アナライザーとの間の絶対白血球カウントの間の相関。傾き 0 . 9 7、 $R^2 = 0 . 9 5$ が 1 0 0 細胞 / μl ないし 1 6 , 0 0 0 細胞 / μl の範囲の細胞カウントについて見出された。

【 0 0 5 0 】

図 3 1 : 本発明のイメージング・システムと B D T r u c o u n t (登録商標) システムを用いたフローサイトメトリー分析との間の C D 4 カウントの相関。

【 0 0 5 1 】

図 3 2 : C D 4 - 標識磁石粒子で分離した R N A 含量に対する D N A 含量の分散プロット。2 の異なるクラスターは C D 4 + リンパ球および単球を表す。

【 0 0 5 2 】

図 3 3 : 全白血球カウントについての画像中の細胞数の時間軌跡。モデルはデータにフィットし、合計 $N_0 = 1 1 1 3$ の細胞について平均細胞速度 $v_0 = 0 . 2 4 \text{ mm / 秒}$ 、標準偏差 $= 0 . 2 1 \text{ mm / 秒}$ を生じた。

【 0 0 5 3 】

図 3 4 : 均一分布に対する単球およびリンパ球の $N(t)$ 。

$N_{\text{monocyte}} = N_{\text{lymphocyte}} = 5 0 0$ 、 $V_{\text{monocyte}} = 0 . 2 \text{ mm / 秒}$; $V_{\text{lymphocyte}} = 0 . 0 6 \text{ mm / 秒}$

(a) monocyte = リンパ球 = 0

(b) monocyte = 0 . 0 2 mm / 秒 ; lymphocyte = 0 . 0 6 mm / 秒

【 0 0 5 4 】

図 3 5 : 均一分布に対する単球およびリンパ球の $N(t)$ のシミュレーション

$N_{\text{monocyte}} = 4 0 0$ 、 $N_{\text{lymphocyte}} = 6 0 0$ 、 $V_{\text{monocyte}} = 0 . 0 7 \text{ mm / 秒}$; $V_{\text{lymphocyte}} = 0 . 2 \text{ mm / 秒}$ 。(a) monocyte = 0 . 0 0 2 mm / 秒、lymphocyte = 0 . 0 6 mm / 秒

【 0 0 5 5 】

図 3 6 : チャンバーの下で出発したすべての細胞を用いた単球およびリンパ球との $N(t)$ および $DN(t)$ $N_{\text{monocyte}} = 4 0 0$ 、 $N_{\text{lymphocyte}} = 6 0 0$ 、 $V_{\text{monocyte}} = 0 . 0 7 \text{ mm / 秒}$; $V_{\text{lymphocyte}} = 0 . 2 \text{ mm / 秒}$

(a) monocyte = 0 . 0 0 2 mm / 秒、lymphocyte = 0 . 0 0 6 mm / 秒

(b) monocyte = 0 . 0 2 mm / 秒、lymphocyte = 0 . 0 6 mm / 秒

【 0 0 5 6 】

好ましい具体例の詳細な説明

本明細書中で用いる生物学的、臨床的、電子工学的、数学的および統計学的な表現に関する技術用語は、慣用的に許容されている定義に適合する。

【 0 0 5 7 】

"試料"または"標本"なる語は本明細書中で互換的に用い、組織、髄液、骨髓、血液、または他の源から得られた生物材料をいう。試料には、ウイルス、細菌または他の病原菌も含まれ得る。生物標本の典型的な例は、対象から引き出された血液であろう。本明細書中で用いる"細胞"なる語は、分離してまたは集合物中で同定可能である動物または植物の細胞、細胞からなる細菌、菌類をいう。例えば、細胞はヒトの赤血球 (R B C) および白血

10

20

30

40

50

球(WBC)集合、ガンまたは他の異常な細胞とし得る。"標的"または"標的集合"なる語は、本明細書中では、分析する生物標本中に存在し得る関心のある生物物質をいう。標的集団のメンバーの典型的な例は、血液試料中のCD4陽性細胞であろう。反対に、本明細書中で用いる"非標的"または"非標的集団"なる語は、生物標本中に存在するが、分析の対象ではない物質をいう。

【0058】

システム・デザイン

装置の異なるコンポーネント(本明細書中ではそのプロジェクト名"EasyCount"という場合もある)を図1に示す。装置のイメージング部分は落射照明型蛍光顕微鏡をベースとしている。試料チャンバーの表面は、470nmの中心波長を有する発光ダイオード(NSPB500S, Nichia Corp., Japan)によって照明される。チャンバーの内側表面の蛍光標識細胞から発せられた光は対物レンズによって集光され、CCDカメラ(EDC2000-N, Electrim Corp., Princeton, NJ)上にフォーカスされる。これは、0.55mm²の試料面積に対応する652×494ピクセルの画像を生じ、そこでは細胞は暗色バックグラウンドに対する明るい光点として見える。

【0059】

免疫磁気標識

本明細書中で用いる"特異的結合ペア"なる語は、互いに結合アフィニティーを有して他の分子または基を実質的に排除する分子をいう。特異的結合ペアの例には、抗原-抗体、受容体-ホルモン、受容体-リガンド、アゴニスト-アンタゴニスト、レシチン-炭水化物、核酸(RNAまたはDNA)ハイブリダイズ配列、Fc受容体またはマウスIgG-プロテインA、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチンおよびウイルス-受容体相互作用が含まれる。"実質的に排除"なる句は、生物特異的リガンドまたは生物特異的試薬とその対応する標的決定基との間の結合反応の特異性をいう。生物特異的リガンドおよび試薬は、それらの標的決定基に対して比較的高いアフィニティーの特異的結合活性を有し、いまだ他の試料成分に対して、実質的に低いアフィニティーの低レベルの非特異的結合も示し得る。

【0060】

前記の標的生物基のいずれかに関して用いる場合の"決定基"なる語は、異種親和性免疫応答を誘導する場合がある巨大分子抗原上に存在する化学的モザイクを広くいう。したがって、決定基は"生物特異的リガンド"または"生物特異的試薬"によって特異的に結合され得、特異的結合物質に対する選択的結合に関与および寄与する標的生物基の部分を行い、選択的結合が起こるにはその存在が必要である。したがって、基本用語においては、決定基とは、特異的結合ペア反応において結合アフィニティーを有する因子、リガンドおよび/または試薬によって認識される標的生物基上の分子定常領域である。

【0061】

"検出可能に標識"なる語を本明細書中で用いて、物理学的または化学的手段によって直接的または間接的のいずれかによるその検出または測定が試験試料中の標的生物基の存在の指標であるいずれかの物質をいう。有用な検出可能な標識の代表的な例には、限定されるものではないが以下のものが含まれる: 吸光、蛍光、反射率、光散乱、リン光またはルミネセンス特定に基づいて直接的または間接的に検出可能である分子またはイオン; その核磁気共鳴または常磁性特定によって検出可能な分子またはイオン。例えば、吸光または蛍光に基づいて間接的に検出可能な分子のグループに含まれるのは、適当な基質を変換させる、例えば非吸光性の分子を吸光性の分子にまたは非蛍光性の分子を蛍光性分子に変換する種々の酵素である。

【0062】

"磁氣的に応答性"および"磁氣的に標識"なる語は本明細書中で互換的に用いて、それに結合した磁性粒子を有する基をいう。例えば、これらの磁気標識は生物標本中に存在する細胞の表面に、または細胞内基に結合し得る。本明細書中に記載する大部分の具体例においては、磁性粒子は所望の標的集団のメンバーに特異的に結合し、非標的基は実質的に排除

10

20

30

40

50

する。"磁気操作"なる語は、磁気標識した物体を非 - 磁気標識した物体から磁氣的に分離する意図で磁場勾配に生物標本を置くことをいう。電磁石を用いる場合のごとき、生物標本の周囲に磁場勾配が発生する場合にも磁気操作を行い得る。

【 0 0 6 3 】

例えば全血試料から関心のある標的細胞を選択および分離するためには、各々出典明示して本明細書の一部とみなす米国特許第 5, 5 7 9, 5 3 1 号および第 5, 6 9 8, 2 7 1 号および米国特許出願第 1 0 / 2 0 8, 9 3 9 に開示されているごとく、それを磁性粒子、強磁性流体または強常磁性粒子にコンジュゲートした標的の特異的抗体で免疫磁氣的に標識する。磁性粒子は典型的には直径約 1 8 0 n m

でストレプトアビジンがコンジュゲートされる第 1 ポリマー層によって取り囲まれた磁性酸化鉄コアからなる。ついで、標的の特異的な抗体をビオチニル化抗体によってストレプトアビジンにカップリングし得る。しかしながら、同様または約 5 μ m までより大きなサイズの他の強磁性材料、例えばニッケルから製造される超常磁性粒子を同様にコートし、標的細胞の磁性標識に使用し得る。

【 0 0 6 4 】

最後に、標的細胞上のグリコシド受容体を認識するレクチンおよびボロネート誘導体のごとき代替バインダーをかかると磁気捕捉粒子上の抗体の代わりにまたはそれに加えて使用することもできる。

【 0 0 6 5 】

例えば、関心のある細胞が全白血球集団である場合、血液試料中のすべての白血球集団に実質的に特異的に結合するパン (pan) - 白血球 C D 4 5 モノクローナル抗体を用い得る。細胞標識反応は試験管またはバイアル中で行うことができ、そのアリコットを試料チャンバーに移し得る。あるいは、チャンバー自体を約 2 0 0 μ l までの体積の標本をインキュベートするために使用し得る。未結合非磁性材料は磁気分離後に上清中で容易に除去可能である。標的細胞の磁気標識効率を向上するために、磁性インキュベーションまたはインフィールド (in-field) ・インキュベーションを使用し得る (出典明示して本明細書の一部とみなす P C T / U S 0 0 / 0 2 0 3 4)。これを行うためには、試験管中で試料を磁性鉄流体と混合し、四重極高グラジエント磁気セパレータ (H G M S) 磁石 (出典明示して本明細書の一部とみなす米国特許第 5, 1 8 6, 8 2 7 号 ; 第 5, 4 6 6, 5 7 4 号 ; 第 5, 6 4 1, 0 7 2 号) の内部に短時間入れる。その後、それを磁石から取り出し、ポルテックス攪拌によって再混合する。この工程をさらに 2 回繰り返す。四重極磁石はインキュベーションの間に放射磁気グラジエントをデリバリーし、したがって、磁性粒子は壁表面に蓄積する前に試料全体をスイープするビーズ鎖として側方に移動させられる。磁性粒子のこの多重強制移動により、試料中の磁性粒子および標的細胞の単なる分散またはブラウン運動衝突と比較して、磁性粒子がより大きな実質的に非運動性の細胞と衝突または出くわす確率が増大する。試料全体を均一にスイープする他の磁性構造を用いることもできる。

【 0 0 6 6 】

試料チャンバーおよび磁石ホルダー

本明細書中で用いる "観察表面" なる語は、試料チャンバーの光学的に透明な壁をいう。生物標本を視覚的に分析する場合、標的集団が観察表面に隣接して存在することが必要である。これにより、正確な分析を得るために標的集団に明らかに焦点を合わせた光学配置が許容される。標的集団のメンバーを磁氣的に標識したら、それらは視覚的分析のために観察表面まで操作し得る。

【 0 0 6 7 】

チャンバーおよび磁性ヨークホルダーは以前に記載されている (各々、出典明示して本明細書の一部とみなす米国特許第 5, 9 8 5, 1 5 3 号 ; 第 6, 1 3 6, 1 8 2 号 ; P C T / U S 0 2 / 0 4 1 2 4 号)。チャンバーは内部寸法 3 0 × 2 . 7 × 4 ㎝、各々長さ × 幅 × 高さの成形体からなる。それは、必要ならばリムーバブルなプラグ・キャップによってシール可能である P y r e x ガラス (7 7 4 0 P y r e x (登録商標) ; Corning Inter

10

20

30

40

50

national, Germany) の光学的に透明な平らな上面を有する。垂直光線で走査するために水平面に方向付けられた試料チャンバーを示す(図2)。しかしながら、別の機器設計も、垂直に方向付けられた磁性ホルダーおよび水平に方向付けられた光線を有する非キャップの検出チャンバーまたは他の試料キュベットに適合するであろう。

【0068】

磁性チャンバーのホルダーまたはヨークは、チャンバーが2の磁極片の頂部より2mm下方に位置するように設計する。磁極片は13,700ガウスの内部磁化を有するネオジウム・鉄・ボロン合金からなる(Crumax Magnetics Inc., Elizabethtown, KT)。2の片は搭載されて、z軸に対して70°角度が付けられたそれらの面の間に3mmのギャップを形成する。図2Aおよび2Bに描かれたこの配置は、チャンバーの内側に磁気勾配を発生し、これはz-方向に付き出しており、x-方向においては無視し得る成分を有する。したがって、免疫磁氣的に標識した細胞および非結合の強磁性流体粒子は上面まで垂直方向で移動する。イメージされた表面積はイメージされた面積の下の体積画分と直接的に相關する(図2B)。単位体積あたりの代表的かつ正確な細胞数を得るためには、細胞を均一に分散し、見える表面上に固定化することが重要であり、それにはガラス表面の全面積にわたって磁場状態も均一にすることが必要である。

10

【0069】

前記した磁性配置に対するさらなる改良点は、ヨーク・アセンブリーを"バネ上げ(spring load)"することであった。これによって、各試料カートリッジが繰り返し可能な場所に位置付けられる。このため、分析される標本はそれらがイメージされる場合に常にZ-軸で焦点が合う。このことは、高速アナライザーとしての本発明の装置を用いるために極めて重要である。各試料カートリッジについて独立して焦点合わせすることが最早必要でないからである。試料カートリッジは正確に製造されるため、ヨーク・アセンブリーはすべての試料を常に焦点を合わせて位置付けし得る。

20

【0070】

チャンバー中の細胞ダイナミクス

試料中のすべての細胞を磁氣的に収集することが極めて重要であるため、細胞を収集表面に到達させるために要する時間を知ることは重要である。磁場に置かれた免疫磁氣的に標識した細胞の運動は、細胞にはたらく合計力Fに依存する。

この力は等式(1)によって得られる：

30

【0071】

【数1】

$$F_{total} = |m|\nabla B - M'g - 6\pi\eta v \quad (1)$$

【0072】

合計力は磁場、引力および粘性抵抗力(viscous drag force)の結果である。この表現中、 $|m|$ は細胞の磁気モーメントの大きさと、 B は磁気誘導である。 M' は(細胞の凝塊)-(細胞が懸濁されている等体積の血清の凝塊)であり、 g は重力加速度である。抵抗力をストークス法によって概算し、ここに η は媒体の粘度であり、 R は細胞径であって v は細胞の速度である。細胞についてy-方向の運動の対応する式は等式(2)によって表される：

40

【0073】

【数2】

$$M' \frac{d^2 y}{dt^2} + 6\pi\eta R \frac{dy}{dt} = |m|\nabla B_y - M'g \quad (2)$$

【0074】

この二階微分方程式は、(3)に示すごとく初期位置 $y(0) = 0$ および初期速度 $v(0) = 0$ を用いて解くことができる。

【0075】

50

【数3】

$$y(t) = \frac{M'(|m|\nabla B_y - M'g)}{(6\pi\eta R)^2} \exp\left(-\frac{6\pi\eta R}{M'}t\right) + \frac{|m|\nabla B_y - M'g}{6\pi\eta R}t - \frac{M'(|m|\nabla B_y - M'g)}{(6\pi\eta R)^2} \quad (3)$$

【0076】

細胞の体積および直径ならびに媒体の粘度は一定値である。細胞の磁気モーメントは細胞膜に存在する磁性粒子の数に依存し、したがって磁氣的標識に用いた抗体の型に依存する。細胞の磁気モーメントを計算するためには、細胞あたり100の磁性粒子の数を仮定する。磁気誘導は磁極の材料および形状によって決まる。磁氣的に標識した細胞に作用する力および磁場における細胞の運動の計算に用いるパラメータは、4 μmの細胞径R、77 kg/m³の相対細胞密度M'、9.32 × 10⁻¹⁴ Am²の磁気モーメント、1.8 × 10⁻³ Paの血漿の粘度 およびチャンパー底部の250 Gauss/mmからチャンパー頂部の400 Gauss/mmの範囲の磁気勾配 B (低い値を計算に用いた)である。等式(3)から、細胞は数マイクロ秒以内でその最終速度に到達することを計算し得る。したがって、チャンパー中の細胞の速度v_iは、実質的に一定である。明らかに、細胞の速度は細胞表面に存在する磁性粒子の数に依存する。すべての細胞がその表面上に同一のエピトープ密度または抗原の数を有してはいないので、細胞の磁性粒子の数に(したがって、速度においても)分布が存在するであろう。チャンパー中の細胞のある種の亜集団の速度は、平均速度v₀および標準偏差σを有する正規分布によって表され得る。初期位置y_{0,i}および速度v_iを有する試料中の特定の細胞に関して、時間tにおけるチャンパー中の位置は(4)として書くことができる：

【0077】

【数4】

$$y_i(t) = y_{0,i} + v_i t \quad (4)$$

【0078】

細胞がチャンパーの表面に到達していることの確率は時間および細胞の速度の関数である。後者は正規分布(5)によって決まる確率パラメータである：

【0079】

【数5】

$$P(v_i = v_0) = \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{(v_i - v_0)^2}{\sigma^2}\right) \quad (5)$$

【0080】

ある時間tにおいて、細胞iが表面に到達している確率は(6)によって与えられる：

【0081】

【数6】

$$P_i(y_i = y_{surf}, y_{0,i}, t) = P_i\left(v_i \geq \frac{(y_{surf} - y_{0,i})}{t}, y_{0,i}, t\right) = \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \int_{\frac{y_{surf} - y_{0,i}}{t}}^{\infty} \exp\left(-\frac{(v_i - v_0)^2}{\sigma^2}\right) dv \quad (6)$$

【0082】

式中、y_{surf}はチャンパーの高さである

【0083】

試料はチャンパーに入れた直後に磁場に曝されるため、試料中の細胞の分布は均一であると仮定する。大きな集団の細胞に関しては、表面の細胞の期待数(N)は、(7)によ

って得られるチャンバー中のすべての細胞についての個々の確率 (individual probability) P_i の積分によって見出すことができる。

【0084】

【数7】

$$N(t) = \frac{N_0}{y_{surf}} \int_0^{y_{surf}} P_i(y_i = y_{surf}) dy_0 = \frac{N_0}{y_{surf} \sigma \sqrt{\pi}} \int_0^{y_{surf}} \int_{\frac{y_{surf}-y_0}{t}}^{\infty} \exp\left(-\frac{(v-v_0)^2}{\sigma^2}\right) dv dy_0 \quad (7)$$

【0085】

式中、 N_0 は試料中に存在する細胞の合計数である

【0086】

一定の細胞集団に関する時間の関数として表面に存在する細胞の期待数 ($N_0 = 500$) を図3にプロットし、ここで異なる曲線は異なる速度分布を表している。図3aにおいては、平均細胞速度 v_0 は一定であるが、 σ について異なる値を用いている。図3bにおいては、 σ は一定に維持され、異なる平均細胞速度を用いている。曲線の初期傾きがチャンバー中の平均細胞速度に対応することが観察されるべきであり、事実、等式(7)を解くと等式(8)になる：

【0087】

【数8】

$$\frac{dN(t)}{dt} \approx \frac{N_0 v_0}{y_{surf}} \quad t \ll \frac{y_{surf}}{v_0 + \sigma} \quad \text{について} \quad (8)$$

【0088】

他の試料チャンバーのデザインも同様に構想される。例えば、より浅いカートリッジはより短い分離時間を可能とし得、分析を標的基につきより選択的とし得る。非標的基は、おそらく低レベルの抗原発現を通してまたは磁性粒子の非特異的な結合を通して、磁氣的に標識されることが観察された。しかしながら、これらの磁氣的に標識された非標的基は、特異的に標識された標的基よりも遙かに低い磁気応答である。試料チャンバーを異なるサイズにし得るなら、これらのより弱い磁性基は試料チャンバーの観察表面まで移動せず、“偽陽性”カウントに寄与しないであろう。

【0089】

試料の透明さ

試料チャンバーの観察または画像キャプチャ領域に空気泡が導入されることを回避するために、磁石/チャンバーアセンブリーを水平面に対して約 8° の角度で置いた。ついで、細胞カウントに対する影響を約 0° 、 10° 、 20° および 90° の角度で評価した。種々の高さ角度において顕著な差異は全く観察されなかった。

【0090】

イメージング・システム

白血球の蛍光染色

凝集した細胞を検出可能にするために、試料を生細胞の核ならびに細胞質の幾つかの構成物を染色する生命に関する色素であるアクリジンオレンジ (AO; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を用いて染色する。アクリジンオレンジは 490 nm にその吸収ピークを有し、DNAに結合した場合には 520 nm で発する。Hoechst 33258 および Hoechst 33343 のごとき他の蛍光色素を用い得る。一般的に、細胞、細胞質、細胞質核物質または核自体を非特異的に染色するいずれの蛍光色素も使用し得る。本明細書中においてこれらの色素は“非特異的蛍光色素”という。

【0091】

10

20

30

40

50

一般的に、蛍光顕微鏡の照明は水銀アークまたは石英 - ハロゲンランプによって達成されている。ある種の顕微鏡システムにおいては、照明により高価なレーザーが用いられている場合もある。しかしながら、半導体における最近の進歩により、白熱光源およびレーザーに匹敵し得る低出力で高輝度の発光ダイオードが開発につながっている。光源としてLEDを用いる利点は、それが比較的コンパクトかつ安価であって、長寿命、および簡単に置き換えられることである。LEDのスペクトル出力分布は、基体材料に依存して約20ないし50nmの半値幅を有して実際に狭い。LEDは非常に飽和したほぼ単色の光を生成し、本発明のコンパクトかつ安価なサイトメーターデバイスを組み立てるのに理想的である。

【0092】

オプティクス

LEDからの光は27mmの焦点距離を有する集光レンズによって集められ、455DF70バンドパス・フィルタ(Omega Optical Inc., Brattleboro, VT)を通り、515DRLPダイクロイック・ミラー(Omega Optical)によって反射され、10x、0.25NAの対物レンズ(Nikon Corporation, Japan)の後焦点面に焦点合わせされる。この光学構成によって、試料エリアの均一な照明が生じる。チャンバーのガラス表面の下側に集められた蛍光細胞から発せられた光は対物レンズによって集められ、その後550DF30バンドパス・フィルタ(Omega Optical)によってフィルタリングされ、CCDカメラ(EDC2000-N, Electrim Corp., Princeton, NJ)上にフォーカスされる。図1Aは従来の落射照明(epi-illumination)モードのものである。図1Bは"フラッドライト"配置の1またはそれを超えるLEDを有する直接側方照明の観察表面を示し、これは十分な励起エネルギーを提供し、よりシンプルかつあまり高価でない照明モードを提供する。

【0093】

カメラ

このセットアップに用いたカメラ(EDC2000-N, Electrim Corp, Princeton, NJ)は0-30,000エレクトロンのダイナミックレンジを有する。製造業者によって得られたものとして、その読出しノイズのr.m.s.(二乗平均)は20エレクトロンである。暗電流ノイズおよびアンプノイズに関するデータは提供されていない。画像はソフトウェアによってカメラから復元され、8ビットTIFF画像としてコンピュータメモリーに保存される。

【0094】

画像処理および画像解析

光学システムから得た画像中の細胞をカウントするためにアルゴリズムを開発した。最初に、モデルを提示して細胞画像を説明する。ついで、画像のスポット検出の方法を導入する。まず、これらのアルゴリズムをデスクトップ・コンピュータ上で実行する。本発明の改良された具体例では、CCDカメラ内に埋め込まれたプロセッサを用いて画像を分析する。

【0095】

画像モデル

このシステムにおいては、蛍光標識した細胞は対象面のランダムなポジションに位置する。これらの細胞は画像面中の約20-50ピクセルをカバーするスポットとして画像化される。図4Aに提示した細胞画像のサンプルでは、画像の細胞を幅 ρ を有する二次元ガウスとしてモデル化し得る：

【0096】

10

20

30

40

【数 9】

$$p(x, y) = \exp\left[\frac{-(x^2 + y^2)}{\sigma_p^2}\right] \quad (9)$$

【0097】

バックグラウンドおよびノイズシグナルを含む、ランダムに分布した細胞を含む全体画像 $f(x, y)$ は以下のモデルによって記載される：

【0098】

10

【数 10】

$$f(x, y) = C_0(x, y) + \sum_i C_i p(x - x_i, y - y_i) + \underline{n(x, y)} \quad (10)$$

【0099】

式中、 C_i は細胞のピーク強度であり、 C_0 は徐々に変化するバックグラウンド・レベルであり、これは細胞に加わる。このバックグラウンド・シグナルは試料中の遊離した、非結合の色素によって発生し、同質でない照明の結果として徐々に動揺し得る。推計ホワイトノイズ (stochastic white noise) 成分は成分 n によってモデル化し得る。ノイズの発生源には CCD カメラからの熱および読出しノイズが含まれる。このモデルに基づき、本発明者らは画像中の細胞 i の SN 比 (SNR) を決めることができる：

20

【0100】

【数 11】

$$SNR_i = \frac{C_i - \overline{C_0}}{\sigma_n} \quad (11)$$

【0101】

式中、 σ_n はノイズ成分 n の標準偏差である。

30

【0102】

画像モデルには、存在する細胞画像を分析することによって予測することができるパラメータが含まれる。この目的のために、10の画像を分析し、これは機器によって得られた典型的な画像を表している。表1中に、10のテスト画像についての画像パラメータを示す。画像には、異なるピーク強度を有する細胞が含まれる。平均SNRは、画像中の平均ピーク強度を有する細胞のSN比である。

【0103】

【表1】

表1：10の典型的な細胞画像からの画像パラメータ

画像	細胞の数	平均 C_i	平均 C_0	平均 σ_n	平均 SNR
1	800	99	51	2.5	19.2
2	932	114	53	3.5	17.4
3	631	131	60	3	23.7
4	470	127	59	3.4	20.0
5	737	130	48	2.7	30.4
6	261	129	56	3.8	19.2
7	320	99	43	2.8	20.0
8	611	109	49	2.5	24.0
9	396	104	46	2.8	20.7
10	426	110	47	2.5	25.2
平均値	558	115	51	3	22

10

20

【0104】

スポット検出

表1に示すごとく、画像のSN比(約22)は驚くべく高く、全観察エリアにわたってほぼ一定である。このことは、細胞のカウントを高い特異性で行い得ることを示唆している。最適化された方法は閾値をあてはめて二元画像を作成することからなり、ここでは細胞は値1(白色)を得、バックグラウンドおよびノイズは値0(黒色)を得、画像中の"白色"スポットをカウントする。明らかに、細胞をカウントする最も簡単な方法は、プレ

30

【0105】

図5中の曲線は、カウントされた対象の数の初期の増加が示されており、そこでは閾値レベルは画像のノイズレベルと同じ範囲内に存在する。これは、多くのノイズピクセルが1を割り当てられるからである。さらに閾値レベルを増加させることによって、最大に達し、つづいてプラトーになる。このプラトーにおいては、ノイズは閾値よりも小さく、すべての細胞は閾値より大きい。したがって、このプラトーは細胞の実際の数に対応する。しかしながら、このプラトーが比較的フラットであるところでは、制限された閾値レベルの範囲しか存在しない。これは：

40

【0106】

1. 細胞の強度分布。かすかな蛍光細胞はノイズレベルのすぐ上に存在する一方で、より明るい細胞は大きなSN比を有し、閾値レベルが増加するに従ってカウントされる細胞の数が徐々に減少する。

【0107】

2. CCDカメラ中のブライト(ブロークン)・ピクセル(bright (broken) pixel)

50

のごとき典型的でないアーティファクトの存在。閾値レベルが画像の最大ピクセル強度である225まで増加するに従って、曲線は徐々にゼロまで低下する。図5は、予め設定したレベルが正確な細胞カウントを生じる場合に狭いレンジしか利用し得ないことを示している。さらに、バックグラウンド強度における変動は曲線を水平にシフトし、したがって細胞カウントを選択した閾値レベルに非常に強く依存するものとしてしまう。したがって、カウントをより確固とし、選択した閾値レベルにあまり依存しない方法が望まれている。したがって、図5中の細胞の実際の数に対応するプラトーを広げる方法を開発する必要があり、選択したアプローチはマッチしたフィルタ・アルゴリズムを用いて閾値設定前に画像を高める。このアルゴリズムは非線形ラプラシアン・プレフィルタリング工程で拡張して、細胞カウントプロセスをさらに改善した。また、細胞がクラスター中で一緒に接近しているように見える場合には、画像解析用の以下の方法が個々の細胞を識別するのに極めて首尾よいことも予期せぬことに観察された。

10

【0108】

マッチしたフィルタ・アルゴリズム

マッチしたフィルタ・アルゴリズムは観察された画像 $f(x, y)$ と好適に選択されたテンプレート $h(x, y)$ の間の相関を計算する。相関はテンプレートと画像との間の類似性の測定である。画像 $f(x, y)$ と $h(x, y)$ との間の相関は、2の関数を畳込むことによって計算する：

【0109】

【数12】

20

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x - \xi, y - \eta) h(\xi, \eta) d\xi d\eta \quad (12)$$

相関は細胞の位置において最大化されるべきである。

【0110】

【数13】

$$g(0, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(-\xi, -\eta) h(\xi, \eta) d\xi d\eta \quad (13)$$

30

【0111】

細胞の良好な検出は、真の細胞を見逃す確率が低いこと、および、真の細胞でない画像ポイントをカウントする確率が低いことを意味する。これはSN比(SNR)により数学的に表現される。両方の確率は、単調に低下するSNRの関数である。したがって、良好な検出にはSNRを最大化することが必要である。

【0112】

さしあたりバックグラウンドを無視すると、画像中のスポット i のSNRは、細胞ピーク強度およびノイズの標準偏差の比率によって決まる：

【0113】

【数14】

40

$$SNR_i = \frac{C_i}{\sigma_n} \quad (14)$$

【0114】

画像とテンプレート $h(x, y)$ とを畳込むと、SNRを：

【0115】

【数15】

$$SNR_i = \frac{C_i \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p(-x, -y) h(x, y) dx dy}{\sigma_n \sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h^2(x, y) dx dy}} \quad (15)$$

【0116】

に変化するであろう。

【0117】

$h(x, y) = p(-x, -y)$ の場合に SNR が最大化されることは、シュワルツ不等式を用いることによって示し得る。これは、最適なテンプレートが単純に細胞の鏡像であることを意味している。これは、方法を、通常はマッチしたフィルタリングまたはテンプレート・マッチングとする理由である。本発明者らの細胞モデルに関しては、バックグラウンド・シグナルが存在しない場合、 $C_0(x, y)$ 、 $h(x, y)$ は対称で、したがって $p(x, y)$ に等しい：

【0118】

【数16】

$$h(x, y | C_0(x, y) = 0) = \frac{1}{\pi \sigma_p^2} \exp\left[-\frac{(x^2 + y^2)}{\sigma_p^2}\right] \quad (x, y) \in [-W, W] \quad (16)$$

【0119】

ここで、ガウス下の体積は単位に正規化する。テンプレートの断面を図6に示す。徐々に変化するバックグラウンド・レベル $C_0(x, y)$ の影響を排除するためは、DC除去が必要である。これは、テンプレート $h(x, y)$ がゼロ平均値を有するようにそれを正規化することによって達成し得る(図7を参照されたい)。

【0120】

【数17】

$$h(x, y) = h(x, y | C_0(x, y) = 0) - \frac{1}{4W^2} \int_{-W}^W \int_{-W}^W h(x, y | C_0(x, y) = 0) dx dy$$

$$= \frac{1}{\pi \sigma_p^2} \exp\left[-\frac{(x^2 + y^2)}{\sigma_p^2}\right] - E_h \quad (x, y) \in [-W, W] \quad (17)$$

【0121】

式中、 E_h は $h(x, y | C_0(x, y) = 0)$ の平均値である。一定のシグナルはフィルタリング後のゼロ値を与え、これは $h(x, y)$ を一定値と畳込むことによって簡単に示し得る。

【0122】

$C_0(x, y)$ は不均一な照明の結果であるため、照明プロフィールを決定し、それを画像 $f(x, y)$ から差し引くことによっても DC 除去を行い得る。しかしながら、DC 除去を空間フィルタリングと同時にやり得るという事実はそれを好ましい方法とする。 $C_0(x, y)$ がテンプレートのエリア内でほぼ一定であるようにバックグラウンドの空間周波数が十分に低い限りは、 $C_0(x, y)$ は排除されるであろう。

【0123】

テンプレートは有限であるので、 h および f の積分は $-W$ から W までである。下記計算においては、無限積分を用いて(有限)マッチしたフィルタの効果概算する。これは打

10

20

30

40

50

ち切り誤差を導入する。しかしながら、後に示すような場合である $W > 2 \sigma_p$ である限り、 $|x| > W$ のガウス下の面積が比較的小さいため、誤差は無視し得るであろう。有限テンプレートをを用いながら無限積分を計算することによって作成される誤差を図 8 に示す。

【 0 1 2 4 】

画像 $f(x, y)$ にマッチしたフィルタ $h(x, y)$ をあてはめると、フィルタした画像 $g(x, y)$ が得られる：

【 0 1 2 5 】

【数 1 8】

$$g(x, y) = h(x, y) \otimes f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} [C_0 + C_i p(x - \xi, y - \eta) + n(x - \xi, y - \eta)] h(\xi, \eta) d\xi d\eta \quad (18) \quad 10$$

【 0 1 2 6 】

細胞 i の中央位置の $g(x, y)$ のシグナル部分は f および h の積として記載し得る：

【 0 1 2 7 】

【数 1 9】

$$g_{s,i}(0,0) = h(x, y) \cdot f_{s,i}(x, y) = h(x, y | C_0(x, y) = 0) \cdot f_{s,i}(x, y) - E_h \cdot f_{s,i}(x, y) \quad (19)$$

【 0 1 2 8 】

$W > 2 \sigma_p$ については $E_h \sim 1 / 4 W^2$ であると認めると、フィルタリング後の細胞 i のピーク値を：

【 0 1 2 9 】

【数 2 0】

$$\begin{aligned} g_{s,i}(0,0) &= \frac{C_0}{\pi \sigma_p^2} \int_{-W}^W \int_{-W}^W \exp\left[-\frac{\xi^2 + \eta^2}{\sigma_p^2}\right] d\xi d\eta + \frac{C_i}{\pi \sigma_p^2} \int_{-W}^W \int_{-W}^W \exp\left[-2\frac{\xi^2 + \eta^2}{\sigma_p^2}\right] d\xi d\eta \\ &\quad - C_0 \int_{-W}^W \int_{-W}^W E_h d\xi d\eta - C_i \int_{-W}^W \int_{-W}^W E_h \exp\left[-\frac{\xi^2 + \eta^2}{\sigma_p^2}\right] d\xi d\eta \quad (20) \quad 30 \\ &\approx \left(C_0 + \frac{C_i}{2}\right) - \left(C_0 + \frac{\pi \sigma_p^2}{4W^2} C_i\right) = C_i \left(\frac{1}{2} - \pi \sigma_p^2 E_h\right) \approx C_i \left(\frac{1}{2} - \frac{\pi \sigma_p^2}{4W^2}\right) \end{aligned}$$

【 0 1 3 0 】

と概算し得る。

【 0 1 3 1 】

図 9 中に畳込みの結果を提示する。この場合、 $\sigma_p = 2$ および $W = 4.5$ である。 g の最大値は、モデルから予想される f の最大値のほぼ 0.34 倍である。負のサイドローブは、フィルタ・テンプレートの負の部分の結果としてのようである。 f の一定のバックグラウンドは g において抑制されている。

【 0 1 3 2 】

ノイズはゼロの予想値を有する固定の、シグナル依存性のホワイト・ガウスノイズと仮定する。フィルタをあてはめた後のその標準偏差 σ_n は：

【 0 1 3 3 】

10

20

30

40

【数 2 1】

$$\sigma_n \sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h^2(\xi, \eta) d\xi d\eta} =$$

$$\sigma_n \sqrt{\int_{-W}^W \int_{-W}^W \left[\frac{1}{\sigma_p^2 \pi^2} \exp\left(-2 \frac{(\xi^2 + \eta^2)}{\sigma_p^2}\right) - \frac{2E_h}{\pi \sigma_p^2} \exp\left(-\frac{(\xi^2 + \eta^2)}{\sigma_p^2}\right) + E_h^2 \right] d\xi d\eta} \approx \quad (21)$$

10

$$\sigma_n \sqrt{\left(\frac{1}{2\pi\sigma_p^2} - \frac{1}{4W^2} \right)}$$

【0 1 3 4】

と記載し得る。

【0 1 3 5】

フィルタはノイズの高周波数成分を抑制し、それによって σ_n を低減している。それを、ガウス・ホワイトノイズをフィルタリングの前後にシミュレートしている図 10 に示す。フィルタリング後の標準偏差はモデルと一致して $0.17 \sigma_n$ である。

20

【0 1 3 6】

したがって、細胞 i の SNR はここでは $W > 2 \sigma_p$ に関して：

【0 1 3 7】

【数 2 2】

$$SNR_i = \frac{C_i \left(\frac{1}{2} - \frac{\pi \sigma_p^2}{4W^2} \right)}{\sigma_n \sqrt{\left(\frac{1}{2\pi\sigma_p^2} - \frac{1}{4W^2} \right)}} \quad (22)$$

30

【0 1 3 8】

である。フィルタリング前は、 $SNR_i = C_i / \sigma_n$ であり、したがって SNR における利得は：

【0 1 3 9】

【数 2 3】

$$A = \frac{SNR_i}{SNR_0} = \frac{\left(\frac{1}{2} - \frac{\pi \sigma_p^2}{4W^2} \right)}{\sqrt{\left(\frac{1}{2\pi\sigma_p^2} - \frac{1}{4W^2} \right)}} \quad (23)$$

40

【0 1 4 0】

である。

【0 1 4 1】

50

$p = 2$ であって $W = 4.5$ 、 $A = 2.1$ の場合、 SNR における利得はガウス分布の幅 p に比例する。ガウス分布の幅が増加する場合により多くのノイズが濾過される傾向があることが観察された。したがって、マッチしたフィルタを用いた画像のフィルタリングは SN 比を向上することが判明した。さらに、フィルタは検出を向上した。分離したブライต์・ピクセルのようにテンプレートに合致しない対象は効率的に抑制されるからである。

【0142】

アルゴリズム・パラメータ

試料中の細胞は異なって形作られ、異なる大きさとなり得るが、細胞画像中のすべての細胞は同様の形のものであってほぼ等しいサイズのものである。これは光学システムの倍率およびポイント・スプレッド関数の生じる影響に起因するものである。画像中の細胞の概算幅 p は知られているので、それはマッチしたフィルタ・アルゴリズムに直接用い得る。フィルタが細胞サイズに正確に合致する場合にはフィルタが最良に働くことが以前のセクションで示されている。細胞画像中の幾つかの細胞を視覚検査することによって $p = 2$ の平均値を決定した。最適化するために残されている最終パラメータは、テンプレート・ウィンドウの幅、 W である。テンプレートの境界のピクセルの寄与は、 $W > 2p$ の場合には、それらはゼロに近い非常に小さいであろう。小さいテンプレートを用いる場合、より少ないノイズおよびアーティファクトしかフィルタされないであろう。経験的には、 $W = 4.5$ が細胞検出に最適であることが判明した。これにより、 9×9 ピクセルのテンプレートを生じる。 $W > 2p$ のため、以前のセクションの概算条件は満たされる。

【0143】

図 11 は典型的な細胞画像のオリジナルバージョンおよびフィルタ済みバージョンからの線軌跡である。 $W = 4.5$ および $p = 2$ に関するマッチしたフィルタの効果を示す。図 11 においては負の値をゼロに設定していることに注意されたい。

【0144】

閾値

フィルタ済み画像はすでに必要な段階である閾値化に対して準備が整っている。対象のカウントは二元画像においてのみ行い得るからである。以下の操作を $g(x, y)$ にあてはめる：

【0145】

【数 2 4】

$$g_{TH} = \begin{cases} 1 & g \geq t_0 \\ 0 & g < t_0 \end{cases} \quad 0 < t_0 < 255 \quad (24)$$

【0146】

これはバックグラウンドおよびノイズから細胞を分離するにちがいない。 t_0 の選択が細胞カウントプロセスにおいて極めて重要であることは明らかである。 t_0 が小さすぎると真の細胞に対応しない対象を導入する一方、 t_0 が高すぎると過小または不正確な細胞カウントを生じる。

【0147】

アルゴリズムの性能

テンプレートに合致するアルゴリズムの効果を図 12 に示す。ここでも、画像中のカウントされた対象の数を閾値レベルに対してプロットしている。この場合、 9×9 ピクセルのテンプレートを $p = 2$ で用いた。フィルタは 3 の異なる細胞画像に対してあてはめた。図は、一定数の細胞が存在する閾値範囲がフィルタしない場合よりもより長いことを示している。また、DC 除去の結果として曲線は左にシフトしている。このことは予期せぬ利点である。オリジナルの画像中のバックグラウンド・レベルにかかわらず、プラトーは常に同じ出発点を有するからである。この発見により、すべての画像にあてはめることが

可能な所定の閾値レベルを遙かに簡単に確立することができる。

【0148】

非線形ラプラシアン・プレフィルタリング

以前のセクションに示した閾値曲線は、マッチしたフィルタ単独によってカウントプロセスがより強固となるが、曲線の徐々の低下がより高い閾値レベルでいまだ観察されることを示している。これは、画像中の細胞強度に顕著な変動が存在するという事実に起因する。線形のマッチしたフィルタはこの変動を変化しない。アルゴリズムの強固さをさらに改善するための1の方法は、マッチしたフィルタリングの前にプレフィルタリング工程をあてはめることであり、それは細胞強度における変動を低減する。これは、画像の縁部を強力に増幅するラプラシアン・フィルタによって行った。それは、以下の5×5の零空間を有する：

10

【0149】

【数25】

-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	24	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	-1	-1	-1

(25)

20

【0150】

このフィルタは画像中の細胞を強力に強めるであろう。そして、ノイズの標準偏差を増大させる。事実、SNRはこのフィルタをあてはめることによって僅かに低下する。しかしながら、このフィルタが有用である理由は、細胞の形状はほぼ変化しないままであることが判明しており、大部分の細胞が画像の最高の強度レベルに留まるほど増幅が大きいことである。このことは、フィルタをあてはめた後は、細胞の強度における変動が低減する、すなわち、すべての細胞がほぼ同じ弱いピーク強度を有することを意味している。

【0151】

マッチしたフィルタを再度あてはめるが、この時点ではプレフィルタリングした画像にあてはめる。マッチしたフィルタは僅かに上昇したノイズレベルから細胞を抽出する。それはフィルタに"マッチした"対象のみを増幅するからである。細胞をフィルタに合致させるが、ノイズはたいてい高周波数のものである。これは、3の異なる段階の画像の線軌跡を示している図13において観察される。ピークを留めるという事実は、マッチしたフィルタの性能に実際には影響しなかった。

30

【0152】

図14は、ラプラシアン・プレフィルタおよびマッチしたフィルタをあてはめた後の閾値レベルの曲線を示している。ここでは細胞が多かれ少なかれ同じ強度を有することに起因してプラトーはより長い。3の画像の閾値レベル曲線しか示していないが、膨大な数の画像を分析し、驚くべきことにすべてのケースにおいてアルゴリズムが非常に強固であることが判明した。

40

【0153】

細胞カウンティング

二元画像で対象をカウントすることはよく知られている方法であり、ソフトウェアで容易に実行される。したがって、カウンティング・アルゴリズムの簡単な説明だけを供する：

【0154】

1．二元画像はピクセル単位でスキャンする（頂部から底部および左から右まで）。

【0155】

2．スキャンのオペレータが値1を有するピクセルpをヒットした場合は、それに標識

50

を割り当てる。見出された最初の p は標識 1 を得る。

【 0 1 5 6 】

3 . オペレータは、スキャンですでに出くわしている p の近隣 (すなわち、p の左、p の上方、および 2 の斜上方の限界点の近隣) を調べる。この情報に基づいて、p の標識を以下のように行う :

- ・ 4 の近隣のすべてが 0 である場合には、新たな標識を p に割り当てるほか
- ・ 1 の近隣のみが値 1 を有する場合には、その標識を p に割り当てるほか
- ・ 1 またはそれを超える近隣が値 1 を有する場合には、標識のうちの 1 を p に割り当て、2 の近隣の標識が同等であることを注意する。

【 0 1 5 7 】

スキャンを行った後、第 2 のパスを行い、そこではすべての等価な標識がユニークな標識と置換される。ここで、標識の数は、画像中の領域の数に対応する。完全なセルカウンティング・アルゴリズムの概略表示は図 1 5 に示す。ラプラシアン・フィルタを用いた最初のたたみこみの後、画像値は 0 ないし 2 2 5 の間の値に制限される (8 - ビットフォーマット)。ついで、マッチしたフィルタをあてはめる。その結果、負の値および 2 5 5 よりも大きな値が生じることが観察された。ついで、画像を 8 - ビットフォーマットの尺度に戻して、それを元の画像と両立可能にし、元の画像とフィルタリングした画像とを比較し得るようにする。図 1 6 は典型的な非処理細胞画像、ならびに異なる処理工程の細胞カウントプロセス後の劇的に改善された画像を示す。これらのイメージング工程は画像の品質および解像度を改善することにおいて驚くべきかつ予期されないほど非常に有効であり、それは本発明のアルゴリズムの本質である。

【 0 1 5 8 】

単純化されたテンプレートマッチ解析

画像解析のもう 1 の方法を以下に記載するごとく開発し、適用した。画像を獲得し (Sony ICX0185AL センサーを備えた CCD カメラ) メモリーに保存した後では、画像サイズは 1 3 0 0 × 1 0 3 0 ピクセルである。光学配置によって、各ピクセルが 6 . 7 × 6 . 7 μ m の面積を表示することが可能である。ついで、専用の画像解析ルーチンを適用して、あまり明るくないバックグラウンドに対して明るい対象 (細胞) を見出す (白色は 2 5 5、黒色は 0)。この画像解析方法は 2 の領域、内部の方形 (零空間) および回りの領域を解析することに依存している。最新の倍率を用いると、零空間は 7 × 7 ピクセルであって、外側領域は内部零空間方形を取り囲む 1 3 × 1 3 ピクセルの方形である。

【 0 1 5 9 】

最初に、零空間を含まない外側領域の平均輝度を算出する。ついで、零空間の平均輝度を算出する。これらの平均を毎ピクセルを取り囲む領域について算出する (零空間の中心はピクセル番号を同定する)。つぎに、内部零空間領域の平均を外側領域の平均から差し引く。差が閾値よりも大きい場合、事象が見出され、記録される。ついで、1 ピクセルごと解析領域をシフトし、再度、平均値を算出する。差が閾値よりも大きい場合には、新たな事象が見出されるであろう。

【 0 1 6 0 】

つぎに、事象間の距離が 7 ピクセルよりも小さい場合には、2 の事象は同一の対象に帰属する。対象の中心は、零空間領域と外側領域との間の平均強度の差が最大となるピクセルを決定することによって見出される (ベストフィット)。取り囲む領域のサイズは 1 3 × 1 3 ピクセルであるため、画像の対象の中心から縁部までの最小距離 (水平および垂直) は $13 / 2 = 7$ ピクセルである。最初の 7 ピクセルに存在する事象は検出されない。

【 0 1 6 1 】

この修飾型テンプレート・マッチング法は以前のテンプレート・マッチング法を超える幾つかの利点を有している。最初に、これにはより小さな計算電力および時間しか要しない。典型的なテンプレート・マッチング・アルゴリズムは対象形状の完全なガウス分布プロファイルを見るため、デスクトップ・ワークステーションを用いる場合は画像を処理するための時間が時間単位となる。しかしながら、単純化されたテンプレート・マッチング

10

20

30

40

50

・アルゴリズム（内側方形および外側の取り囲む領域）を用いた場合、分析時間はおよそ数分である。さらに、この解析はCCDカメラに内在するプロセッサ上で行い得る。

【0162】

単純化されたテンプレート・マッチング・アルゴリズムのもう1の利点は、プレフィルタリングがもはや必要でないことである。単純化された方法は、それが取り囲む領域に対して零空間領域を比較するため、本質的にバックグラウンド・ノイズを除去する。単純化された方法を用いた解析時間の減少は、プレフィルタリング工程が必要でないことの結果でもある。

【0163】

ユーザーインターフェース

1の具体例において、処理された画像からのデータは従来のLabViewユーザーインターフェースを介して評価する。幾つかの他の専用インターフェースも開発されており、各々それ自体のアプリケーションを有する。1のかかるインターフェースは、ユーザーが画像をロードし、フィルタ・パラメータを調整し、フィルタリングおよび閾値設定工程を行い、閾値曲線を得て画像中の細胞の数を評価することを許容する。また、多重画像を処理し、画像ヒストグラムを得て、カメラからの画像をリアルタイムでキャプチャすることを含む、他の目的に開発された他のユーザーインターフェースもある。

【0164】

最初に、カメラから得られた画像を処理するためにデスクトップ・コンピュータが必要である。しかしながら、資源に乏しい設定における細胞カウンティングのごとき適用においては、AC電源供給および高価なコンピュータ知識に依存せず、しかも簡単に実行し得るシステムを使用することが好ましい。最近使用されているコンピュータに置き換え得る可能なコンポーネントは、"スマートカメラ"、すなわち、オン・ボード統合画像処理ハードウェアおよびソフトウェアを有するデジタルカメラである。かかるカメラは画像処理アルゴリズムを行い、その結果を例えばパームトップコンピュータまたはデジタルディスプレイに出力し得るものでなければならない。かかるスマートデジタルカメラは最近では市販されている。それらは、通常、CCD、および画像処理タスクのプログラミングを可能にするデジタル信号プロセッサからなる。コンピュータの代わりにかかるカメラを用いる場合、光源および電子部品の両方に対する電源としてバッテリーを使用することが可能である。また、装置の物理学的寸法および占める面積も処理において顕著に減少し、それによって本発明において開示するコンパクト装置の構成が可能になる。

【0165】

照明効率

光源

2の異なるLEDの発光スペクトルは、冷却CCDカメラ（Princeton Instruments Inc., Monmouth Junction, NJ）と組み合わせたモノクロメータ（HR460, Jobin Yvon SA, France）を用いて測定する。モノクロメータは、LED光を回折し、それをCCDカメラに投射する1200ライン/mmの回折格子を備えている。ネオンランプのスペクトル線を波長スケールのキャリブレーションに用いた。測定は1、25および50mAの駆動電流で行った。測定したスペクトルは、LED1（NSPB500S, Nichia Corp., Japan）およびLED2（110106, Marl International Ltd., Ulverston, UK）がほぼ同じスペクトル特性を有することを示している。これは、LEDが異なる会社から得られたにもかかわらず、両方とも同様のダイオードを含むことを示唆している。顕微鏡による視覚での調査はこの推測を支持している：両方のダイオードは構造および形状において同じである。470nmから467nmのスペクトル青色シフトならびにスペクトルのブロードニングが駆動電流を上昇すると観察された。これは、GaN物質における局在状態のバンド・フィリング（band filling）に寄与し得る。

【0166】

照明モデル

照明光学経路の概略図を図17に示す。ダイオードの正面のエポキシレンズはダイオー

10

20

30

40

50

ドチップによって発せられた光を平行にする。これは、 15° の発光角度を有するビームを生じる。集光レンズ ($f = 27 \text{ mm}$ 、 30 mm) は、試料面の平行ビーム照明を生じる、 5 mm の入射瞳 $a_o b_j$ を有し、 $10\times$ 対物レンズの後焦点面にダイオードの発光エリアの画像を作り出す。ダイオードとエポキシレンズとの間の距離はこのレンズの焦点距離よりも短く、エポキシレンズの正面にダイオードの拡大された虚像画像を生じる。次のレンズ、集光レンズの物体距離は：

【0167】

【数26】

$$v_{\text{condensor}} = b_{\text{LED}} + d \quad (26)$$

10

【0168】

と記載することができ、式中、 d はエポキシレンズと集光レンズとの距離である。これは、像距離 $b_{\text{condenser}}$ について下記の表現を生じる：

【0169】

【数27】

$$b_{\text{condenser}} = \frac{(b_{\text{LED}} + d)f_{\text{condensor}}}{b_{\text{LED}} + d - f_{\text{condensor}}} \quad (27)$$

20

【0170】

式27から $b_{\text{LED}} + d = f_{\text{condensor}} (= 27 \text{ mm})$ の場合、 $b_{\text{condenser}}$ は無限大になる。

【0171】

d に関して異なる値の $b_{\text{condenser}}$ を決定することによって、 b_{LED} は 19 mm であることが実験的に判明した。均一な照明を維持しつつ変化させる唯一のパラメータは BB' 、対物レンズ正面のダイオードのサイズである。試料面における光強度を最大化するためには、 BB' の最適値を決定する必要がある。2の制限状態は区別し得る：

1. $BB' \gg a_o b_j$: ダイオード像が対物レンズの入射瞳よりも遙かに大きく、入射角が小さい。これは、対物レンズに入るすべての光が視野内に閉じ込められる。しかしながら、一部分の光は対物レンズの正面、入射瞳の外側で実際に失われる (図18a)。
2. $BB' \gg a_o b_j$: ダイオード像は点光源のようである。光は大きな角度で対物レンズに入射するが、小さい入射角を有する光のみが最後に視野になる。一部分の光は試料面において失われる (図18b)。

30

【0172】

本発明者らは軸外し光線を生じる伸長した (extended) 光源を扱っているため、照明効率について分析表現を確立することは容易でない。また、エポキシレンズ、対物レンズ入射瞳および試料面の視野で、異なる開口絞りを用いている。これらの開口絞りは一部分の光を遮断するが、実際の量は光学コンポーネントの構造に依存する。

40

【0173】

分析的な解法を得ることは困難なため、基本的幾何学光線トレース・アルゴリズムを開発して照明の効率を予想した。光源は 2 mm の直径を有する円形ディスクとしてモデル化した (VV' と等しい)。光源はその領域にわたってかつすべての方向に均一に発光する。効率を計算するために、光源から生じる多数の光線を光学システムを介してトレースし、開口絞り毎に光線が妨害されているかまたは通過し得たかをチェックした。効率は、(試料面に達する光線の数) / (LEDのエポキシレンズを離れる光線の総量) として定義した。アルゴリズムの視覚化を図19に示す。ここでは、妨害された光線および試料面に達する光線の両方が示されている。図19においては、LEDからの光線の最大角度がエポキシレンズによって決まること、および、幾分か光線が対物レンズの正面で遮断され

50

ることが観察される。さらに、幾分かからの光線は試料面の視野の外側になる。照明効率を異なるサイズの BB' について算出した。 BB' を制御するためには、物体距離 $V_{\text{condenser}}$ および像距離 $b_{\text{condenser}}$ を変化させた。実際に BB' について最適値が存在し、そこで照明は最も明るく、この最適値は $BB' = 4 \text{ mm}$ に見出される。

【0174】

キャリブレーション・カートリッジ

既知量の合成傾向ビーズを含有するキャリブレーション試料チャンバーを製造し、システムの CCD によって検出可能であることを示した。これらの対照チャンバーはポリマーマトリクスに埋め込まれたビーズを有する。これらのカートリッジをイメージすることによって、機器を試験して各システム（照明、オブティクス、検出、計数および報告）が適正に機能していることを確かめことができる。さらに、これらのカートリッジは機器製造の間の品質制御および初期キャリブレーションに非常に有用であろう。

10

【0175】

システムを最適化および特徴付けするために行った種々の実験の記載を提供する。広範囲の実験および測定を行って、光源のスペクトル特性、照明の最適方法および CCD カメラの性能を決定した。さらに、先のセクションに記載した画像解析アルゴリズムの性能を試験し、非常に有効であることが判明した。下記の実施例に記載する実験を用いて、本発明の能力を説明する。それらは本発明の範囲またはその使用を限定することを意図するものではない。

【0176】

20

実施例 1

システム特徴付け

理論的予測を評価するために、以下の実験を行った。フォトダイオードは対物レンズの正面、試料面に設置した。ダイアフラムは、フォトダイオード上の発光領域を 1.6 mm の直径を有するディスクに限定した。LED および集光レンズは、ダイオードクリップの像が対物レンズの後焦点面に作り出され、この像のサイズがほぼピンポイントの光源から 2.5 mm まで変化するように、異なる配置で設置した。実験の結果を図 20 に示し、ここでは光線トレーシングアルゴリズムから得られた曲線を実験データと一緒に示している。アルゴリズムによって予想されるように、最適値は、対物レンズの後焦点面の像のサイズについて見出された。曲線の形状は BB' の大きな値を除いてアルゴリズムによって予想される状態に類似しており、ここで実験はほぼゼロの効率を示している。これは、実際の光源は均一かつ円形の代わりに不均一および四角であるという事実の結果であるかもしれない。モデルおよび実験の両方の結果は、両方とも BB' についての最適値が 4 mm であることを示すことで一致している。これは、以下のパラメータ、 $V_{\text{condenser}} = 4.6 \text{ mm}$ および $b_{\text{condenser}} = 8.3 \text{ mm}$ を用いて実現した。構成の物理学的寸法がこれらのパラメータを可能にした。したがって、最適照明を得るためにそれらを選択した。

30

【0177】

倍率

光学システムの倍率は、キャリブレーション・グリッド (calibration grid) をイメージングすることによって決定する。グリッドの間隔は $2.5 \mu\text{m}$ / ラインである。したがって、視野は $0.65 \text{ mm} \times 0.85 \text{ mm}$ であり、像サイズは 494×652 ピクセルであり、したがって単一のピクセルは試料面における $1.7 \mu\text{m}^2$ に相当する。画像に含まれる試料面の総面積は 0.55 mm^2 である。

40

【0178】

測定体積

試料中の遊離および非結合色素は、CCD カメラにおいてバックグラウンド・シグナルを発生する。このシグナルは LED によって照射された試料体積に依存し、また、試料の光学特性にも依存することが判明した。全血の $10 \times$ 希釈液の試料に関する照射された体積を測定するために、例えばアクリジンオレンジを添加して最終濃度 $5 \mu\text{M}$ とし、試料をくさび形状チャンバーに入れた。このチャンバーを異なる位置でイメージし、得られた画

50

像の平均強度を測定した。バックグラウンド・シグナルは4ないし5 mmの深さまで増大することが判明した。より大きなチャンパーの深さでは、バックグラウンド・シグナルは一定のままであった。これは測定深度が約4 mmであり、これは同時に通常用いる標準的なチャンパーの深度と同じであることを示している。

【0179】

カメラ

カメラの入力シグナル(すなわち試料面からの光子)と出力シグナル(8ビット画像の強度レベル)との間の関係を測定することが望ましい。この関係がわかれば、例えば、デジタル画像中のピクセルの測定した強度に基づいて試料中の細胞の蛍光強度を測定することができる。リニアなカメラ応答性の場合、画像中のピクセルの強度レベルは下式によって記載することができる：

10

【0180】

【数28】

$$I_{\text{pixel}}(P, t) = AP_{\text{pixel}}t + bt + c + n(t) \quad (28)$$

【0181】

式中、Aはカメラの利得であり、 P_{pixel} はピクセル領域にわたるラジアント・パワー(radiant power)であり、tは積算時間であり、bは暗電流であり、cは読出しノイズであって、nはショットノイズ、積算時間の関数である。ピクセル強度の単位はDN(デジタルの数)である。暗電流および読出しノイズパラメータは、カメラ開口を被覆し、CCDの全ピクセルの平均出力シグナルを測定することによって簡単に測定する。bとtとの関係を図21に示す。暗電流偏差 b_b も図に示す。熱ノイズのために予想される平均暗電流ノイズレベルが積算時間とともに直線的に上昇すること、および、それがカメラの読出しノイズに起因するオフセットを有することが図21から観察される。図から下記のパラメータを導き出した：

20

【0182】

【数29】

$$\begin{aligned} b &= 8.1 \\ c &= 4.5 \end{aligned} \quad t < 20 \text{ 秒} \quad (29)$$

30

【0183】

20秒よりも長い積算時間では、カメラはノイズによって飽和された。暗電流ノイズの標準偏差は積算時間の平方根の関数であると予想される。熱電子の分布はポアソンプロセスだからである。しかしながら、予期せぬことに図21中のデータは僅かに異なる挙動を示し、積算時間に対する依存性はむしろ直線であることが判明した。この知見の理由は明らかでないままであるが、それがカメラまたはエレクトロニクス中の他のノイズ源によって引き起こされた可能性がある。標準偏差はカメラの飽和に再度起因して $t > 20$ 秒で低下する。 b_b に関しては、以下の表現が得られる：

40

【0184】

【数30】

$$\sigma_b(t) = 3.8t + 0.8 \quad t < 20 \text{ 秒} \quad (30)$$

【0185】

利得パラメータAを決定するためには、既知の出力シグナルに対するカメラの応答を測定する必要がある。入力シグナルが強度または露出時間によって制御される場合、得られる直線の曲線の傾きを測定することによってAを導くことができる。設定の標準的光源を

50

用いて、カメラの入力シグナルを発生した。これを行うために、CCDカメラを対物レンズの直接的に正面の試料面に設置した。ラジアント・パワーはLEDに対する駆動電流を変化することによって制御した。駆動電流と試料面のLEDのラジアント・パワーとの間の関係は、対物レンズの正面に直接設置した既知の応答性を有するケイ素フォトダイオードを用いてまず伽リプレートした。この関係が確立されたら、CCD画像中のピクセル強度をLED光のラジアント・パワーの関数として測定した。既知の減衰率を有するGreyフィルタを用いてLEDからのシグナルを減衰した。カメラが飽和することを防ぐためにこれが必要であった。カメラ出力シグナルが積算時間にもなって直線的に上昇するという仮説を確認するために、色素溶液(AO)を試料として使い、異なる積算時間でイメージした。結果は実際に線状関係であった。

10

【0186】

カメラの応答性は下記のように記載し得る：

【0187】

【数31】

$$I_{pixel} = (4.7 \times 10^{14} P_{pixel} + 8.1)t + 4.5 \quad (31)$$

【0188】

または

【0189】

【数32】

20

$$P_{pixel} = 2.1 \times 10^{-15} \frac{I_{pixel} - 8.1t - 4.5}{t} \quad [W] \quad (32)$$

【0190】

ここで、感度およびノイズに対するカメラの特性は決まっているので、パラメータを用いて画像に検出可能なシグナルを得るのに必要な最低ラジアント・パワーを決定した。画像中の単一ピクセルについてのSN比(SNR)は下記のように記載し得る：

【0191】

【数33】

30

$$SNR = \frac{I_{signal} - I_{bg}}{\sqrt{I_{signal} + \sigma_{noise}^2}} = \frac{4.7 \times 10^{14} Pt - 8.1t - 4.5}{\sqrt{4.7 \times 10^{14} Pt + (3.8t + 0.8)^2}} \quad (33)$$

【0192】

画像中の単一ピクセルは試料面中の $1.7 \mu m^2$ から光を受け、したがって試料面中の対応する電力密度は：

【0193】

【数34】

40

$$M = \frac{P}{1.7 \times 10^{-12}} \quad [W/m^2] \quad (34)$$

【0194】

である。

【0195】

SN比と電力密度との間の関係は下記のように記載し得る：

【0196】

【数 3 5】

$$SNR = \frac{8 \times 10^2 Mt - 8.1t - 4.5}{\sqrt{8 \times 10^2 Mt + (3.8t + 0.8)^2}} \quad (35)$$

【0197】

図 2 3 は、 $SNR = 3$ 、 $SNR = 5$ および $SNR = 10$ の SN 比を得るために必要な M および t の組合せを示す。

【0198】

画像解析

画像に適用したフィルタが閾値レベルに顕著に依存しない強固なカウンティング・アルゴリズムを生じることが示された。すべての状況においてアルゴリズムが良好に実行することを確認するために、異なる細胞数の膨大な数の画像を解析した。画像処理段階の精度および安定性をさらに調べるために、シミュレートした細胞画像を用いた。シミュレートした画像は CCD カメラから得た真の細胞画像に似ているが、その特性は知られている。真の画像およびシミュレートした画像の両方の解析により、最適な閾値レベルを選択することが可能となる。

【0199】

閾値レベル

最適閾値レベルを決定するために、7 細胞 / 画像から 1 15 0 細胞 / 画像の範囲の細胞数を含む 4 5 の細胞画像を解析し、閾値曲線を計算した。細胞を含まない 3 の画像も解析した。結果を図 2 4 に示す。図中に、あてはまる閾値レベルを示す。下限はゼロ画像が細胞カウントにさらに寄与しない位置によって決定し、上限は閾値曲線の形状によって決定している。それが徐々に劣化 (decay) するためである。画像中の SN 比を制御し、カウンティング精度に対する SN 比の影響を調べるために、シミュレートした画像を用いた。シミュレートした細胞画像は、平均値 I_0 および標準偏差 σ を有する普通の強度分布を有する既知数の細胞 N からなる。細胞は二次元ガウス分布としてモデル化する。画像は真の細胞画像に類似する一定のバックグラウンド・レベル C_0 、ノイズ成分 n および明るい単離したピクセルの数をも有する。多数の細胞画像を、1 ないし 2 5 で変化する異なる SN 比でシミュレートした。シミュレートした画像の幾つかを図 2 5 に示す ($SNR = 3$ 、 $SNR = 10$ 、 $SNR = 20$)。シミュレートした画像の画像パラメータは、真の細胞画像のパラメータから導いた。これは値について、 $I_0 = 110$ 、 $\sigma = 20$ 、 $C_0 = 50$ および $N = 600$ を生じた。ついで、画像処理ソフトウェアによってシミュレートした細胞を解析した。図 2 6 は 2 のシミュレートした細胞画像の閾値曲線を示す：細胞を含まない画像および 6 0 0 の細胞を含む画像。 SN 比は 2 0 であり、これは真の画像に同様である。図中に観察されるごとく、シミュレートした画像の閾値曲線の形状は図 2 4 中の真の画像曲線の形状と同様である。シミュレートした画像を解析して、カウンティング・アルゴリズムの性能を評価した。検出誤差は下記式によって定義した：

【0200】

【数 3 6】

$$\text{誤差} = \frac{|\text{カウントした細胞の数} - N|}{N} * 100\% \quad (36)$$

【0201】

図 2 7 は 4 の異なる閾値レベル：8 0、1 0 0、1 2 0 および 1 4 0 についての結果を示す。誤差は SN 比が上昇するに従って低下する。真の細胞画像中の SN 比は典型的には 2 0 である。これらの知見は、これらのシミュレーションに基づいて、画像処理の不正確さに起因する誤差は約 2 % と予想されることを示している。

【0202】

実施例 2

総白血球カウンティング

単離した白血球を5ないし30,000細胞/μlの範囲の既知の白血球濃度で白血球濁濁した赤血球濃縮物に加えた。ついで、下記の総白血球選択プロトコールに従って試料を処理した。12×75mmのガラス管中の100μlのEDTA抗凝集処理全血に、20μlの100μ/mlのビオチニル化CD45モノクローナル抗体を添加した。室温にて30分間インキュベートした後に、10μlの0.4mg/mlのストレプトアビジン-磁性流体を添加した。ついで、試料をHGMS磁気四重極(QMS13(登録商標), Immunicon Corp., PA)の中および外に3回設置した(各回につき10秒)。さらに30分間放置した後に、5μlの3mg/mlのアクリジンオレンジを添加し、Cell Buffer(Immunicon Corp., 主としてリン酸生理緩衝液またはPBSからなる)を用いて2mlの最終体積まで希釈し、ついで、試料の320μlアリコットを試料チャンバーに挿入した。チャンバーをキャップし、直ちに磁気チャンバー・ホルダー中に置いた。試料毎に3の画像を作成した。

【0203】

別のモードにおいては、試料チャンバーは水平光線を有する照明に対して水平よりも垂直に配向し得る光学的にフラットな表面を担持するキャップしていないキュベットからなるであろう。

【0204】

直線性

血液μlあたりの細胞の数は、個人により顕著に変化し、また、疾患によってはその数が顕著に減少または増加し得る。これは、幾つかの適用においては、少なくとも3桁の程度の範囲を予想し得ることを意味している。白血球濃度の広範囲にわたる直線性に関するシステムの性能は、既知数の白血球を含む血液試料を測定することによって評価した。

【0205】

関連する実験の結果を図28に示す。0.90($R^2 = 0.99$)の傾きが観察された。この低い傾きは、約1500細胞/画像の最高細胞濃度における3の基準から外れた測定値を含む結果を示している。これらの高いデータ点を無視した場合には、線の傾きは0.98($R^2 = 0.99$)まで顕著に増加する。かくして、約1500細胞/画像を、システムが正確に実行される上限とみなし得る。画像当たりの細胞数が低い場合にはエラーバーが顕著に大きくなり、したがって、システムのダイナミックレンジの下限を設定した。表面における細胞の密度は、血液試料の希釈率に基づいている。試料中の細胞の適当な濃度が知られている場合には、最適細胞密度を得るために希釈率を増減し得る。しかしながら、希釈率は1より小さくし得ないため、<5%の統計学的精度でカウントし得る細胞/μlの最小限数は、1を超える表面位置をイメージ化しない限りは約180細胞/μlである。

【0206】

再現性

細胞カウントの再現性は、試料を繰り返して再カウントした場合にカウントされる細胞の数における変動に対応する。磁気構成は、チャンバーの中央線に沿って、表面セグメント上の細胞が表面セグメントより下方の部分的なチャンバー体積から生じるように設計した。しかしながら、チャンバーの側方位置に沿った細胞密度には幾分かの変動が存在し得ることが予想される。

【0207】

また、試料を異なる表面位置またはセグメントあるいは異なるタイプのチャンバーで解析する場合にも変動が存在し得る。理想的なシステムにおいては、これらの変動はポアソン分布統計学になりやすく、変動はカウントした細胞の数に依存するであろう。他の因子も細胞カウントにおける変動に寄与し得る。側方位置の細胞の分布は、異なる側方位置またはセグメントで4の画像を撮り(部分的に重複している)、細胞の数の移動平均を算出することによって決定した。結果を図29に示す。図から観察し得るように、表面の側方

10

20

30

40

50

位置に依存して細胞表面密度に実際に変動が存在する。これらの変動はチャンバーの中央線に沿って測定する限りは重大でないように見える。縦の線に沿った表面上の細胞密度における変動も、この線に沿って異なる位置で画像を撮ることによって測定した。ポアソン統計学の3%の予想した値と比較してこの変動は約5%であった。5%のより高い変動は、試料における細胞の初期の不均一性、チャンパー寸法の不正確さ、磁気構成の均一性の不足または画像解析それ自体によって引き起こされ得る。

【0208】

精度

この実験においては、細胞カウンティングに関するシステムの精度を15の異なる血液試料の細胞カウントを市販の血液分析器によって得たデータと相関することによって評価した。異なる患者からの15のEDTA抗凝固血液試料を収集し、同日に解析を行った。各試料から、5パート示差血液分析器(Sysmex(登録商標)SE9500, Sysmex(登録商標)Corp., Long Grove, IL)における分析用にアリコットを採り、前記したシステムにおける分析用にアリコットを採った。12×75mmのガラス管中の100μlのEDTA抗凝固処理した全血に、40μlの25μg/mlのビオチニル化CD45モノクローナル抗体を添加した。室温にて30分間インキュベートした後に、25μlの0.4mlのストレプトアビジン-強磁性流体を添加した。ついで、試料を磁気四重極(QMS13, Immunicon Corp., PA)の中および外に各回につき10秒3回設置した。さらに30分間放置した後に、5μlの3mg/mlのアクリジンオレンジを添加し、試料をCell Buffer(Immunicon(登録商標)Corp.)で最終体積2mlまで希釈した。ついで、その試料の320μlのアリコットを試料チャンパーに挿入した。チャンパーをキャップした後に、それを磁気ホルダーに直接設置した。10分後に、チャンパーの表面上の異なる位置の3の画像が作成され、細胞カウンティング・ソフトウェアを用いて画像中の細胞数を測定した。細胞分析システム上のカウントと血液分析器上のカウントとの間の相関を算出した。2のシステム間の相関を図30に示す。細胞の数が100~15,000細胞/μlの範囲で変動する場合、 R^2 は0.95で、回帰線は0.98の傾きを有していた。垂直のエラーバーは以前の実験で論じた測定誤差を表している。

【0209】

実施例3

CD4+細胞カウンティング

すべての正常な個人の95%のCD4+リンパ球の数は355~1298細胞/μlの間に入る。AIDS患者においては、500細胞/μlのCD4カウントを用いて抗レトロウイルス両方を開始する場合があります。200のCD4/μlのカウントを用いて予防的な抗微生物治療を開始し、100のCD4/μlのカウントを日和見感染の増加と関係付ける場合があります。50のCD4/μl未満のカウントはHIV関連死の高発生を有する。したがって、CD4を発現しているリンパ球の数を正確に測定することは重要である。

【0210】

直線性

Becton DickinsonのTruCount(登録商標)フローサイトメーターおよび以下に概説する本発明の方法によって10人のドナーからの全血試料中のCD4カウントを測定した。全血(200μl)を12mm×75mmのポリスチレン製試験管に添加し、20μlの0.1mg/mlの10×ビオチニル化抗CD4 Mab(2μgのMabを添加)および8.5μlの0.47mg/mlのストレプトアビジン強磁性流体(4μgの鉄を添加)と一緒に混合した。試料を混合し、QMS13中で10分間インキュベートした。インキュベート後に40μlの1mMのアクリジンオレンジ色素(最終濃度=20μM)および1731μlのCell Buffer、すなわち最終体積=2mlを添加し、混合し、~350μlの試料をチャンパーに入れた。チャンパーを磁気ヨークにインサートし、10分後に5の異なるチャンパー場所の数(細胞/μl)としてカウントを得た。相関係数 $R=0.96$ 、傾きは1.15であったが、53の切片は本発明の方法が参照法よりもより多い細胞をカウントしたことを示している。

【 0 2 1 1 】

発光の差異に基づく CD 4 + 単球とリンパ球との区別

CD 4 マーカーは単球およびリンパ球の双方で発現されている。したがって、磁気分離用の CD 4 モノクローナル抗体を用いれば、チャンバー表面上の単球およびリンパ球の双方の存在を生じるであろう。両方の細胞集団の絶対カウントを得るためには、アクリジンオレンジでの染色における差異に基づいてそれらを区別することが可能である。総白血球カウントにも使用されるアクリジンオレンジは異染性であることが知られている。当該色素は、二本鎖 (ds) 対一本鎖 (ss) 核酸に結合した場合、その発光スペクトルにおける大きなシフトを示す。アクリジンオレンジはインターカレーションによって ds - 核酸に結合し、インターカレートした形態は青色光で励起した場合に緑色の蛍光を発する。DNA に対してインターカレーションによって結合したアクリジンオレンジの最大吸収は 500 ないし 506 nm で、発光は 520 ないし 534 nm である。アクリジンオレンジと ss - 核酸との相互作用は複雑であり、隣接する塩基間のアクリジンオレンジのインターカレーションによって開始し、カチオン性色素によるポリマー電荷の中和、およびその後の産物の凝縮および凝塊形成 (沈澱 : 溶質から固体状態への転移) へと続く多段階のプロセスである。これらの沈澱した産物におけるアクリジンオレンジの吸収スペクトルはインターカレートしたアクリジンオレンジのものと比較して青色にシフトし、核酸の塩基組成に依存して 426 ~ 458 nm の範囲の最大吸収を有する。これらのコンプレックスにおけるアクリジンオレンジの発光も 630 ~ 644 nm の間で変化し、これも塩基組成に依存する。

10

20

【 0 2 1 2 】

【表 2】

表 2 : アクリジン・オレンジおよび核酸-色素コンプレックスのスペクトル特性

色素またはコンプレックス	最大吸収 (nm)	推奨される励起 (nm)	最大発光 (nm)
AO (モノマー)	492	—	525
AO-ds DNA (インターカレーションした)	502	488	520-524
AO-ss DNA (沈澱した)	426-458	457	630-644

30

【 0 2 1 3 】

正確な区別を得るためには色素の濃度も極めて重要であるが、このアクリジンオレンジの異染性挙動を用いてリンパ球から単球を区別し得る。単球はリンパ球よりもより多量の RNA を有するからである。したがって、約 630 ~ 644 nm の範囲のアクリジンオレンジの発光はリンパ球におけるよりも単球における方がより大きいことが予想される。アクリジンオレンジの異染性および細胞の 2 のサブ集団の RNA 含量における差異を利用することによって単一の標識工程を用いて CD 4 + 単球およびリンパ球を別々にカウントし得るかを調べるために以下の実験を行った。同一の標識プロトコルを総白血球カウントに関する限り用いたが、ここでは、CD 4 5 抗体の代わりに CD 4 + リンパ球および単球を標識するために抗 - CD 4 モノクローナル抗体を用いた。磁気セパレータ内側での 10 分間の収集後に、チャンバー表面の画像を 455 df 30 バンドパス・フィルタを用いて作成した。この画像では、細胞の DNA 含量にコンジュゲートした色素の蛍光 (これは全白血球に関しても用いる) のみを検出する。ついで、640 df 20 バンドパス・フィルタを用いてもう 1 の画像を作成し、これを用いて細胞中の RNA 含量を測定した。

40

50

第1の画像を用いて、全細胞の位置を位置決定し、これらの位置をコンピュータメモリーに保存した。第2の画像においては、すべての位置における細胞のRNA含量に起因する平均ピクセル強度を測定した。図32は磁気的に標識したCD4+細胞の試料から得た散乱プロットを示している。緑色チャンネルの画像中の細胞の平均ピクセル強度として測定したDNA含量を、赤色チャンネルの画像中の平均ピクセル強度として測定したRNA含量に対してプロットしている。単球はリンパ球よりも赤色チャンネルにおいてより高い強度を有するので、2の集団は区別し得る。単球およびリンパ球の数は、フローサイトメトリーで一般的に行われているごとく散乱プロットから引き出し得る。

【0214】

磁気ローディング/抗原密度における差異に基づくCD4+単球およびリンパ球の間の区別

10

表面に到着する細胞の数が時間の関数として測定される場合には、チャンパー中の磁気収集の間の細胞の平均速度を決定し得る。これは、CCDカメラから得た画像を連続的に処理するリアルタイム画像処理アルゴリズムを用いて行い得る。かかるアルゴリズムが開発され、0.25画像/秒の最大速度で細胞カウント測定が可能になっている。予想ダイナミクスに基づいて、時間軌跡を等式7にフィットして、細胞の平均速度(v_0)、速度分布の標準偏差()および収集前にイメージした表面下の体積中に存在していた細胞の総数(N_0)を概算し得る。図33は総白血球カウントで得た典型的な時間軌跡を示しており、一緒に非線形最小二乗フィッティング・アルゴリズムの結果(点線)を示している。細胞の平均速度は $v_0 = 0.24 \text{ mm/秒}$ と概算され、標準偏差 $= 0.21 \text{ mm/秒}$ および細胞総数 $N_0 = 1113$ と概算された。この曲線フィッティング・アルゴリズムを用いれば、すべての細胞が表面に到達するのに十分に磁性でなくても、総数(細胞/ μl)の概算値を得ることが可能である。しかしながら、抗原発現(およびしたがって磁気運動)は白血球のサブ集団に関して異なるかもしれない、さらなる改善なしにモデルをすべての白血球集団に厳密に適用し得ないことは注意しなければならない。モノクローナル抗体CD4+抗体を用いて白血球を磁気的に標識する場合、CD4+単球およびリンパ球の両方を標識する。HIV感染症の進行をモニターするのにCD4+リンパ球カウントだけが臨床的に適当なので、総CD4+カウント中の単球およびリンパ球の数を区別する方法が必要である。CD4抗原の発現はCD4+単球およびリンパ球において異なるため、磁気的標識の量も異なり、したがって標識した単球に関してはより低い磁気運動およびより低い平均速度を生じるであろう。細胞の数を時間の関数としてカウントする場合、単球およびリンパ球の数は $N(t)$ 曲線の形状から推定し得る。CD4+リンパ球上の正常な抗原密度は $47 \pm 14 \times 10^3 / \text{細胞}$ 、CD4+単球上のそれは $17 \pm 5 \times 10^3 / \text{細胞}$ であると報告されている。単球およびリンパ球の両方の表面抗原の同じパーセントが占められていること、および、両方が同様の重量および形状を有することを想定すると、抗原密度をその平均収集速度に関連付けることができる。より初期の実験から、CD4+単球に関する平均速度は 0.2 mm/秒 であることが判明しており、したがって単球に関しては 0.07 mm/秒 の平均速度が予想される。図34には総細胞カウントが示されており、一緒に単球およびリンパ球の数が示されている。 N_1 、 N_2 、 T_1 および T_2 が決定されたら、 $N_{\text{monocytes}}$ および $N_{\text{lymphocytes}}$ は以下のようにして算出し得る：

20

30

40

【0215】

【数37】

$$N_{\text{lymphocytes}} = \frac{N_2 T_1 - N_1 T_2}{T_1 - T_2}, N_{\text{monocytes}} = N_2 - N_1 \quad (37)$$

【0216】

抗原密度の標準偏差を用いれば、速度の標準偏差は単球に関しては 0.02 mm/秒 およびリンパ球に関しては 0.06 mm/秒 であることが予想される。図34bでは、速度におけるこれらの偏差を用いて同じ細胞カウントシミュレーションが示されている。図か

50

ら N_1 、 N_2 、 T_1 および T_2 の値を正確に決定し得ないことは明らかである。より良好な選択肢は、2の細胞型に関する $N(t)$ の解析解法に基づいて非線形曲線フィッティング・アルゴリズムにあてはめることである。1の細胞型に関して、解法は：

【0217】

【数38】

$$N(t) = \frac{1}{2} \left(\left(y_{surf} \sqrt{\pi} + t v_0 \operatorname{erf} \left(\frac{v_0}{\sigma_0} \right) \sqrt{\pi} + \sigma_0 t e^{\left(-\frac{v_0^2}{\sigma_0^2} \right)} + y_{surf} \sqrt{\pi} \operatorname{erf} \left(\frac{v_0 t - y_{surf}}{\sigma_0 t} \right) - \sqrt{\pi} v_0 t \operatorname{erf} \left(\frac{v_0 t - y_{surf}}{\sigma_0 t} \right) - \sigma_0 t e^{\left(-\frac{(v_0 t - y_{surf})^2}{t^2 \sigma_0^2} \right)} \right) N_0 \right) / (y_{surf} \sqrt{\pi}) \quad (38)$$

【0218】

であり、式中、 y_{surf} はチャンバーのサイズであり、 v_0 は細胞の平均速度であり、 σ_0 は偏差であって、 erf は誤差関数である。このアルゴリズムはニュートン繰返し法 (Newton iteration method) に基づいている。図35においては、"既知"として設定された v_0 、 v_1 、 σ_0 および σ_1 を用い、 N_1 および N_2 を概算した (シミュレートした) フィットが示されている。しかしながら、現実の測定においては、生物試料の速度に対する v の依存性、標識した表面抗原のパーセントにおける差、および磁性粒子の磁気運動における差に起因して、 v_0 および v_1 が正確に知られていることを仮定し得ない。すべてのこれらの関係が直線状であると仮定すると、 v_0 / v_1 の比は一定のままでなければならない。したがって、フィッティング・アルゴリズムを修飾して、 v_0 、 v_1 、 σ_0 および σ_1 の前に位置する速度定数 C_v も概算する。図36においては、コンパートメントの底部で出発するすべての標識した細胞を用いたシミュレーションが示されている。これは磁場を十分な時間逆転することによって行い得る。 N_1 および N_2 は図から極めて正確に概算し得る。

【0219】

同じ非線形曲線フィッティング法をあてはめる場合、図36から観察されるごとく、均一な試料を用いて行った曲線フィッティングよりも結果は全体的に良好である。この図においては、カウントした細胞の数の差も示されている。ガウス関数は低いシグマ値で区別し得、予想されたシグマを有する関数は用いた小さい時間セグメント (0.57秒) の間に表面に到達した細胞における大きな変動に起因してノイジーである。

【0220】

単球から臨床的に適当な $CD4+$ リンパ球を区別するさらなる意味を以下に列挙する：

1. $CD4+$ リンパ球の移動速度を高めるための異なるサイズの磁性粒子を用いた示差磁気ローディング；
2. 単球と比較して $CD4+$ リンパ球の示差結合を増大させるための磁気配置中のギャップ幅およびしたがって磁場強度を最適化すること；
3. 遊離 $CD4$ Mab を添加して、 $CD4$ - 特異的磁性粒子が単球に結合するのを阻害することを支援すること；
4. 単球に特異的である非磁気ビーズを導入すること；
5. $CD4$ リンパ球を優先させるために磁気捕捉粒子上の抗体密度を変化させること；および
6. リンパ球検出を高めるために、 $CD45$ 磁気捕捉およびアクリジンオレンジと組み合わせさせたさらなる標識した $CD45$ 、例えば抗 $CD45$ フルオレセインを用いること。

【0221】

実施例4

フラッドライト直接照明

以前に記載した具体例において、LEDは照明光を発生する。光は集光レンズ、455 50

D F 7 0 バンドパス・フィルタを通過し、試料の方向に 5 1 5 D R L P ダイクロイック・ミラーによって反射される。集光レンズは光を対物レンズの後焦点面上にフォーカスし、試料の平行照明を生じる。

【 0 2 2 2 】

コンポーネントの大部分を削除する素直な方法は、直接試料照明であり、その場合は 2 の L E D の光が試料に対して直接的に投射される。以前のシステムと比較した性能は、照明の強度および均一性における低下、およびバックグラウンド・シグナルの上昇によって影響され得る。

【 0 2 2 3 】

照明の強度および均一性

10

光はもはやフォーカスされないため、照明強度は L E D の指向性によって制限される。最近使用されている L E D (N S P B 5 0 0 S , Nichia Corp. , Japan) は 3 0 ° の指向性 ($2_{1/2}$) を有する。これは、1 5 ° 角度の L E D 軸で 5 0 % 強度が低下することを意味する。

【 0 2 2 4 】

ガウス強度分布を想定すると、($d < l$) に関する正規化した強度分布関数 $I (\theta)$ は下式によって得られる：

【 0 2 2 5 】

【数 3 9】

20

$$I(\theta) = \frac{\sqrt{\ln(2)}}{\theta_1 \sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{\ln(2)\theta^2}{\theta_1^2}\right) \quad (39)$$

【 0 2 2 6 】

距離 l (m) のサイズ d (m) の表面に投射される合計光 (total light power) の率 (P / P_{tot}) は：

【 0 2 2 7 】

【数 4 0】

30

$$\frac{P}{P_{tot}} = \left(\operatorname{erf}\left(\frac{d\sqrt{\ln 2}}{2\theta_1 l}\right) \right)^2 \quad (40)$$

【 0 2 2 8 】

である。

【 0 2 2 9 】

また、均一係数 H を $H = I (\theta = \theta_{max}) / I (\theta = 0)$ と定義することもでき、これは表面の縁部における強度に対する中心部の強度の間の比を定義している。

【 0 2 3 0 】

【数 4 1】

40

$$H = \frac{I(\theta = \theta_{max})}{I(\theta = 0)} = \exp\left(-\frac{d^2 \ln(2)}{4l^2 \theta_1^2}\right) \quad (41)$$

【 0 2 3 1 】

励起フィルタなしの高いバックグラウンド

L E D の発せられた光の小さい部分 (図 2 . 4 を参照されたい) は、アクリジンオレンジ (A O) の発せられた蛍光のスペクトル領域中に存在する。ローパス・フィルタを用い

50

なければ、発光は蛍光シグナルのバックグラウンドとして検出されるであろう。ロングパスまたはバンドパス・フィルタ（以前の照具体例で用いた中心波長550nmバンドパス30mm）はこのバックグラウンドを低下し得る。530nmロングパス・フィルタがこの照具体例に最適であることが判明している。

【0232】

器具および試験

前記の数学的処理はLEDの均一な照明場を想定しており、これは非常に現実的ではない；LEDの構造およびエポキシ封入のフォーカス特性は接近している範囲（<1cm）においては非常に不規則な場を生じる。したがって、最適な位置は経験的に表面から~4mmに存在することが判明している。2のLEDをこの設定に用いた。これは単一のLEDよりもより均一な照明を作り出すからである。また、より高い照明強度も達成し得る。適用によって要求される照明に依存して、より多くのLEDを用いることができる。

10

【0233】

照明の両方の方法の性能を試験するために、それらをアクリジンオレンジの溶液および非蛍光性の吸光性試料を用いて試験した。両方の方法において、LEDはその最大推奨電流40mAで駆動した。強度の測定としては、電気エネルギー消費で除したCCDカメラからの出力としてのDigital Unitsの数[DU's/ジュール]。この値は試料中のAO濃度に依存するため、それは相対的比較についてのみ使用し得る。画像に見出される最大強度によって除した最小強度は%で示す（蛍光試料）。非蛍光試料の最大強度はDU'sで示す。

20

【0234】

【表3】

表3：両方のタイプの照明の性能

照明タイプ	効率 (DU's/ジュール)	均一性 (Imin/Imax*100%)	バックグラウンド レベル (DU's)
落射照明	3.1*10 ³	80.2%	10
直接照明	3.1*10 ³	80.5%	12

30

【0235】

結果を表3に示し、これは効率および均一性は両方のタイプの照明について同様であるが、バックグラウンドのレベルは僅かに高い（試験した試料について2DU's）ことを示している。

【0236】

他の具体例

本発明のアルゴリズムのさらなる例および適用により、資源に乏しい環境における使用に好適であるコンパクトで、頑丈で、低コストのシステムにおける正確な細胞計数が可能となる。システムの性能は血液細胞の分析を包含する多数の臨床的に適当な適用において確立されているが、多くの他の適用も想像し得る。例えば、すでに前記したごとく、ミルク中のウシ白血球（体細胞カウント）は重要な適用になり得る。現在、ミルクの分析はフローサイトメトリー・システムによって行われているが、これはミルク試料を専門化された研究室まで運搬する必要があり、これは不経済であり、時間を浪費することにもなる。本明細書に記載する分析は、現場で、使用地環境において、または従来の研究室において容易に行い得る。

40

【0237】

さらに広義の適用には、ヒトまたは動物における細菌、真菌類およびウイルス病原菌、水供給物および空気サンプルの検出が包含される。細胞以外の対象物も、適当な蛍光染色

50

試薬を用いることによって、本発明の方法およびアルゴリズムのシステムによってカウントし得る。当該システムは、高速免疫アッセイ分析を行うのに理想的であろう。例えば、分析物に対して特異的な磁性粒子を、細胞について記載した方法と同様に磁気標識するために使用し得る。ついで、蛍光ポリスチレンビーズのごとき検出可能な標識を添加し得る。磁性粒子 - 分析物 - 検出可能な標識のコンプレックスは観察表面まで磁氣的に操作するため、装置は分析物を検出し、計数し得るであろう。

【0238】

流体力学またはポンプの欠如、シールしたまたはシール可能な容器中の性能および本発明のデバイスのコンパクトさは、宇宙容器および他の地球外適用における低 g 条件および限られた空間における操作を可能にする。

10

【0239】

前記したごとき、改良を取り込む本発明の好ましい具体例は、予期せぬことに、前記に引用したものに加えてさらに多くの分野および適用において本発明を用いることができることも見出された。

【0240】

他の適用

以下は、システムの可能性のある適用の幾つかを掲載している。

研究：

- ・流体中の免疫学的に明らかにされたサブセットの一般的細胞カウンター、例えば、
 - ・細胞生存、
 - ・CD20、
 - ・B - リンパ球、
 - ・CD3 T - リンパ球、
 - ・CD8 サプレッサー T - リンパ球、
 - ・CD14単球、
 - ・CD83樹状細胞

20

【0241】

血液学：

- ・白血球カウント (CD45)
- ・顆粒球カウント (CD15、より低い抗原密度に基づく単球の区別)
- ・レフト・シフト (Left Shift) (CD64抗原密度に基づく未成熟 / 成熟顆粒球)
- ・シフト網状赤血球 (CD71)
- ・前駆細胞カウント (CD34)
- ・前駆細胞カウント (CD34)

30

【0242】

血液バンク：

- ・赤血球バッグ中の残余白血球
- ・ロイコフェレシス産物中の前駆細胞カウント
- ・心血管疾患：
 - ・活性化血小板カウント (CD62P)
 - ・内皮細胞カウント (CD146)

40

【0243】

リウマチ学

- ・ジョイント・アスピレート中の細胞サブセット
- ・感染性の疾患：
 - ・CD4カウント (HIV)
 - ・唾液 / 尿中の白血球すら上皮細胞 / RBC細胞カウント
 - ・唾液 / 尿中の細菌カウント

【0244】

環境：

50

・生物戦争剤

【0245】

農業：

ウシにおける乳腺炎（ミルク中の白血球）

【0246】

大気圏外空間プログラム：

・臨床分析

・環境分析

【0247】

本明細書中には本発明の特定の具体例を説明し、記載したが、これらは本発明をかか
開示に限定することを意図するものではない。以下の特許請求の範囲の範囲内でそれらに
対して変化および修飾を作成し得る。

10

【図面の簡単な説明】

【0248】

【図1】図1はオプティカルおよび発光構造の概略図である。(A)においては、LED
からの光がコンデンサー、一連のフィルタおよび10×対物レンズを通して試料上に集光
される。細胞の蛍光の画像は投射され、CCDカメラによってキャプチャされる。(B)
においては、2のLEDの光は試料上に直接的に投射されている。

【図2】図2はx-およびz-方向におけるチャンバー中の磁気勾配である(A)。勾配
のx-成分は無視し得る。磁氣的に標識した白血球はチャンバー中を上方に移動し、一方
非標識赤血球は下方に移動する(B)。

20

【図3】図3は異なる細胞速度分布に対する時間の関数としての表面の細胞の数である。
曲線の最初の傾斜は平均細胞速度を表し：a. 0.02 mm/秒の一定の平均細胞速度、
の異なる値。b. 0.02 mm/秒の一定値に対する異なる平均細胞速度。

【図4】図4は典型的な細胞画像およびその強度プロフィールの拡大図である。これらの
画像に基づいて、細胞を二次元Gaussianスポットとしてモデル化し得ることが予想される
。

【図5】図5はカメラから得られた3の細胞画像からの閾値レベル曲線である。カウント
した細胞の数は選択した閾値レベルに強く依存する。

【図6】図6は正規化したテンプレート $h(x, y)$ の断面である。テンプレートはゼロ
平均値を有する。

30

【図7】図7はフィルタテンプレート $h(x, y)$ $C_0(x, y) = 0$ の断面である。

【図8】図8はフィルタ幅の関数としての、無限積分およびフィルタテンプレートの限定
の使用に起因して導入された打ち切り誤差(%)である。ガウス分布下の面積は (x, y)
> Wの場合については比較的小さいので、この誤差はW/ のより大きな値については無
視し得る。

【図9】図9はシグナル $f(x, y)$ とフィルタテンプレート $h(x, y)$ との織り込みの
結果である。

【図10】図10はガウス白色雑音に対するフィルタの効果である。フィルタはノイズを
顕著に抑制している。

40

【図11】図11はフィルタリング前後の典型的な細胞画像からの線軌跡である。一定の
バックグラウンド・レベルは抑制され、細胞は強められている。負の値は画像の中でゼロ
に設定されている。

【図12】図12は3の典型的な細胞画像の閾値レベル曲線である。(a)フィルタリン
グ前、カウントした細胞の数は選択した閾値レベルに強く依存している。(b)フィルタ
リング後、フィルタは閾値曲線のプラトーを伸長し、すべての画像について所定の閾値レ
ベル。

【図13】図13は異なるフィルタリング工程における典型的な細胞画像からの線軌跡で
ある。ラプラシアン・プレフィルタは画像中の細胞を強く増強し、マッチしたフィルタは
ノイズを抑制している。

50

【図14】図14は：ラプラシアン・プレフィルタおよびマッチしたフィルタの適用後の閾値レベル曲線である。フィルタの効果はより長い水平プラトーで、これによりカウンティング・アルゴリズムが非常に強固なものにする。

【図15】図15は完全カウンティング・アルゴリズムのブロック図である。

【図16】図16は画像処理アルゴリズムの異なるステージにおける細胞画像である。(a)元の細胞画像。(b)ラプラシアン・プレフィルタ後。(c)マッチしたフィルタ後。(d)閾値設定後。

【図17】図17は光学システムの概略図である。エポキシレンズ製として示すLEDチップW'は10×対物レンズの後焦点面に像形成され、試料面の平行ビーム発光を生じる。

10

【図18】図18はBB'のサイズに対する2の限定状態である。(a)BB'が対物レンズの入射瞳よりも大きい場合。(b)BB'が非常に小さく、大きなビーム系を生じ、光が試料面において消失する場合。BB'の最適値はこれらの2の限定状態の間のいずれかに存在すると予想される。

【図19】図19は幾何学的光線トレーシング・アルゴリズムの視覚化である。赤色光線は妨害された光線であり、緑色光は試料面の視野内に残存する。通過した光線の相対数は発光効率に対応する(画像は一定比率で描かれていない)。

【図20】図20は光線トレーシング・アルゴリズムからのデータにフィットした正規化発光効率の実験データである。実験値は、アルゴリズムによって予想された値とよく合致している。

20

【図21】図21はカメラからの暗電流ノイズの平均値および標準偏差である。より長いインテグレーション・タイムでカメラは飽和を獲得した。

【図22】図22はLEDからの出力シグナルを補正するために、フォトダイオードを試料面に設置し、放射電力を異なるLED電流について測定した図である。既知のLEDシグナルに対するカメラ応答を測定するために、CCDカメラを試料面に設置し、平均ピクセル強度を測定した。

【図23】図23はある種のSNを生じる積算時間tと電力密度とのコンビネーションである。

【図24】図24は3の"ゼロ"画像を含む45の細胞画像の閾値レベルである。これらの曲線に基づいて、100ないし150の妥当な閾値レベル間隔を確立した。

30

【図25】図25は異なるSN比(SNR)を用いてシミュレートした細胞画像であり、これらを用いてカウンティング精度に対するSNRの影響を調べた。(a)SNR=3、(b)SNR=10、(c)SNR=20。

【図26】図26は2のシミュレートした画像の閾値レベル曲線である。これらの曲線と図24における実際の画像から得られた曲線との間の類似に注意されたい。

【図27】図27はシミュレートした画像のSN比の関数としての細胞カウンティングの誤差パーセンテージである。実際の細胞画像における平均SN比(SNR=20)において、データはほぼ2%の誤差を示す。

【図28】図28は予想細胞数に対するカウントした細胞数である。システムは約1500細胞/画像まで線形に上昇している(傾き=0.98、 $R^2=0.99$)。より高い細胞密度においては、細胞カウントはシステムによって実際より少なく見積もられている。低いサンプルサイズに起因してより低い細胞密度においては誤差が上昇する。

40

【図29】図29はチャンパー表面の異なる側方位置における細胞の数/画像である。表面の縁部においては細胞密度が低下する。磁石は、磁石間の中間点で細胞カウントの精度が最も高くなるように設計する。

【図30】図30はイメージング・システムとSysmex(登録商標)血液アナライザーとの間の絶対白血球カウントの間の相関である。傾き0.97、 $R^2=0.95$ が100細胞/ μl ないし16,000細胞/ μl の範囲の細胞カウントについて見出された。

【図31】図31は本発明のイメージング・システムとBD Trucount(登録商標)システムを用いたフローサイトメトリー分析との間のCD4カウントの相関である。

50

【図32】図32はCD4-標識磁性粒子で分離したRNA含量に対するDNA含量の分散プロットである。2の異なるクラスターはCD4+リンパ球および単球を表す。

【図33】図33は全白血球カウントについての画像中の細胞数の時間軌跡である。モデルはデータにフィットし、合計 $N_0 = 1113$ の細胞について平均細胞速度 $v_0 = 0.24$ mm/秒、標準偏差 = 0.21 mm/秒を生じた。

【図34】図34は均一分布に対する単球およびリンパ球の $N(t)$ である。 $N_{monocyte} = N_{lymphocyte} = 500$ 、 $V_{monocyte} = 0.2$ mm/秒； $V_{lymphocyte} = 0.06$ mm/秒 (a) monocyte = リンパ球 = 0 (b) monocyte = 0.02 mm/秒；lymphocyte = 0.06 mm/秒

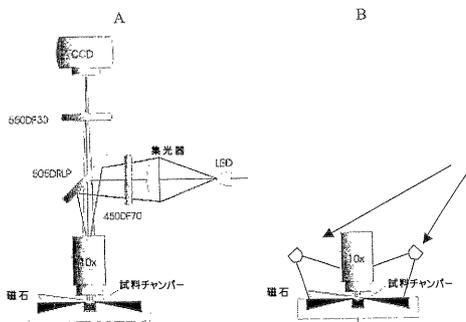
【図35】図35は均一分布に対する単球およびリンパ球の $N(t)$ のシミュレーションである。 $N_{monocyte} = 400$ 、 $N_{lymphocyte} = 600$ 、 $V_{monocyte} = 0.07$ mm/秒； $V_{lymphocyte} = 0.2$ mm/秒。(a) monocyte = 0.002 mm/秒、lymphocyte = 0.06 mm/秒。

【図36】図36はチャンバーの下で出発したすべての細胞を用いた単球およびリンパ球との $N(t)$ および $DN(t)$ である。 $N_{monocyte} = 400$ 、 $N_{lymphocyte} = 600$ 、 $V_{monocyte} = 0.07$ mm/秒； $V_{lymphocyte} = 0.2$ mm/秒 (a) monocyte = 0.002 mm/秒、lymphocyte = 0.006 mm/秒 (b) monocyte = 0.02 mm/秒、lymphocyte = 0.06 mm/秒。

10

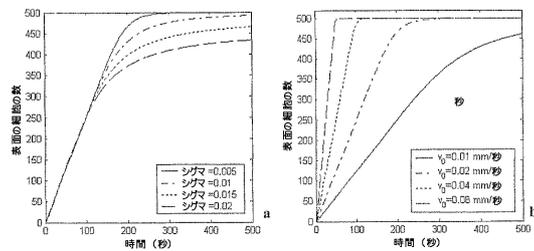
【図1】

Figure 1



【図3】

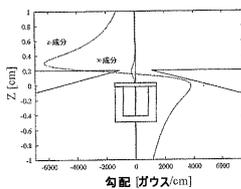
Figure 3



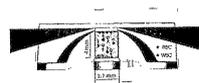
【図2】

Figure 2

A

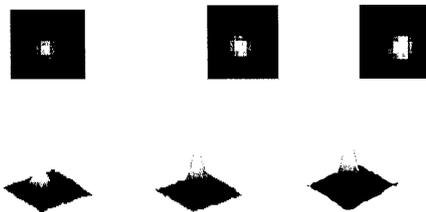


B



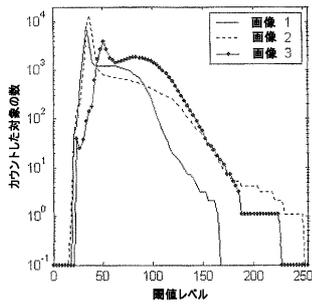
【図4】

Figure 4



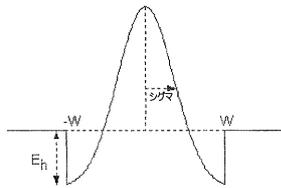
【 図 5 】

Figure 5



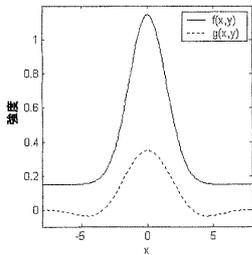
【 図 6 】

Figure 6



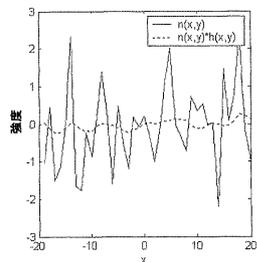
【 図 9 】

Figure 9



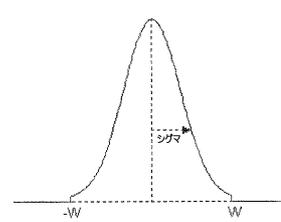
【 図 10 】

Figure 10



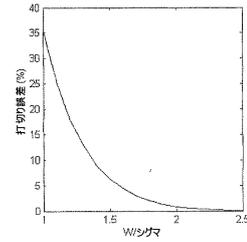
【 図 7 】

Figure 7



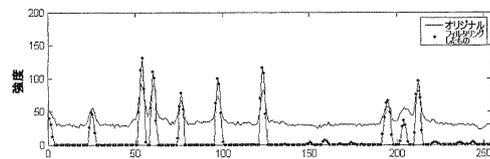
【 図 8 】

Figure 8



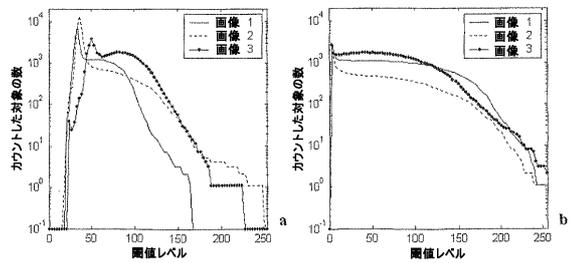
【 図 11 】

Figure 11



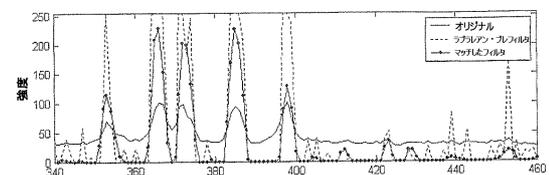
【 図 12 】

Figure 12



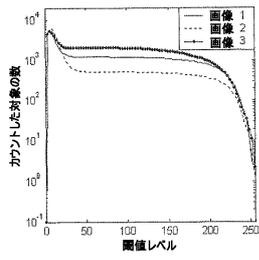
【 図 13 】

Figure 13



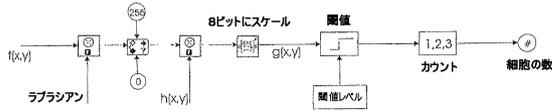
【 図 14 】

Figure 14



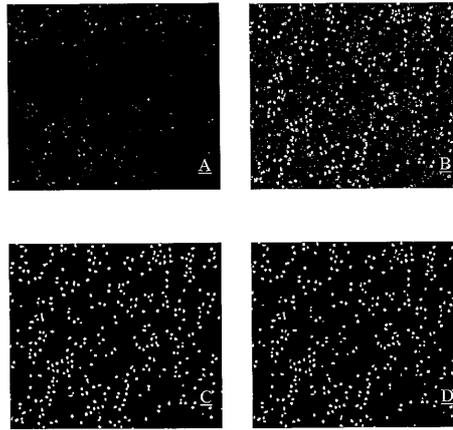
【 図 15 】

Figure 15



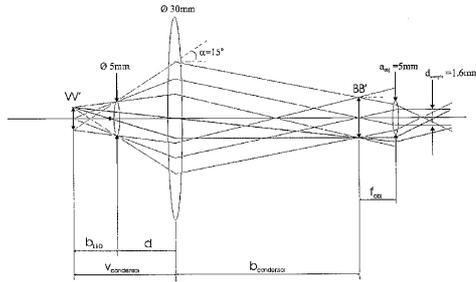
【 図 16 】

Figure 16



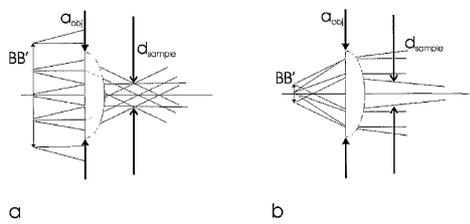
【 図 17 】

Figure 17



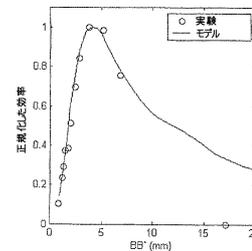
【 図 18 】

Figure 18



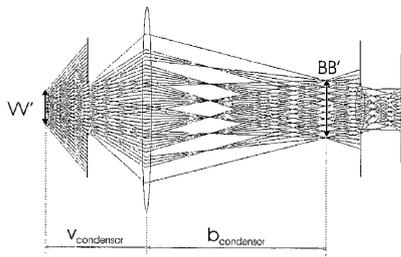
【 図 20 】

Figure 20



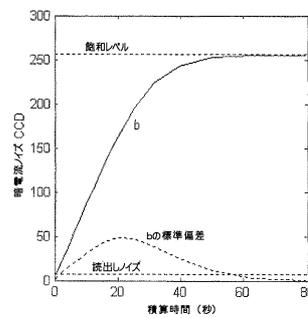
【 図 19 】

Figure 19



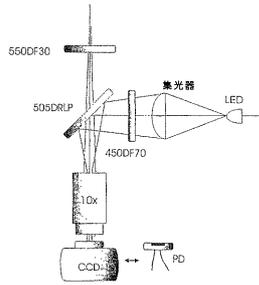
【 図 21 】

Figure 21



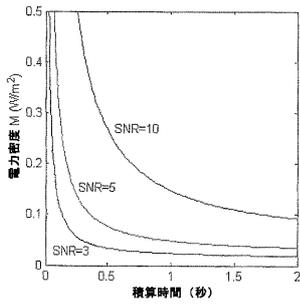
【図 22】

Figure 22



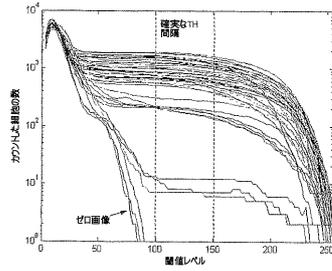
【図 23】

Figure 23



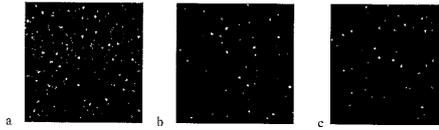
【図 24】

Figure 24



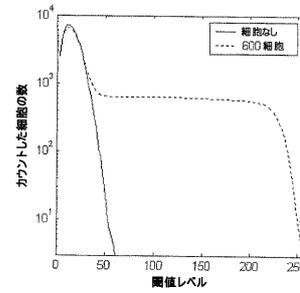
【図 25】

Figure 25



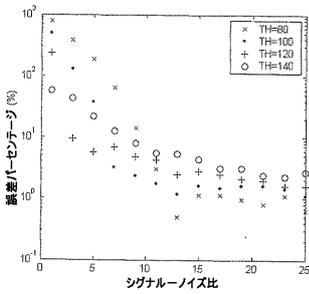
【図 26】

Figure 26



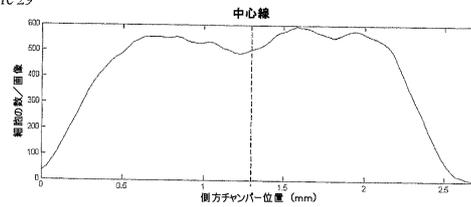
【図 27】

Figure 27



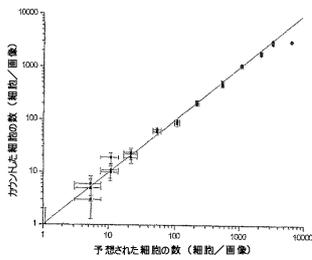
【図 29】

Figure 29



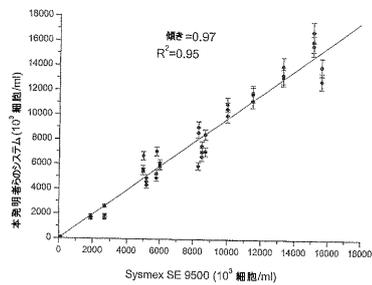
【図 28】

Figure 28



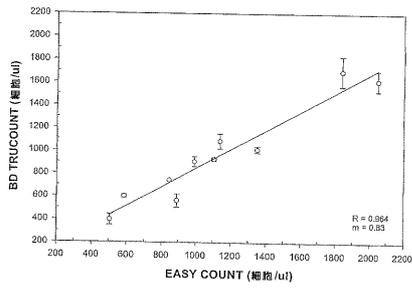
【図 30】

Figure 30



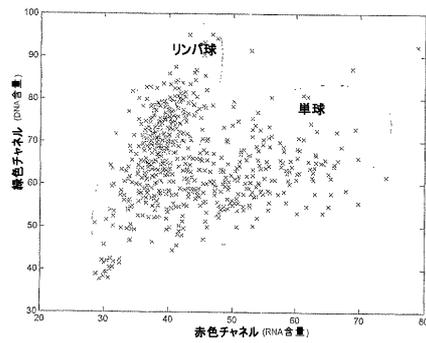
【 図 3 1 】

Figure 31



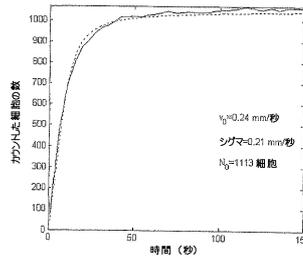
【 図 3 2 】

Figure 32



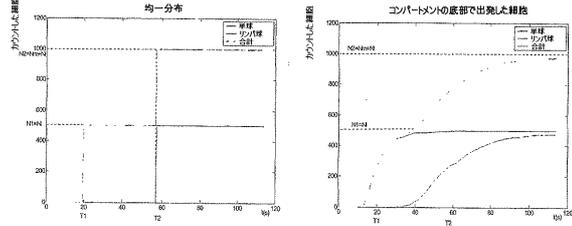
【 図 3 3 】

Figure 33



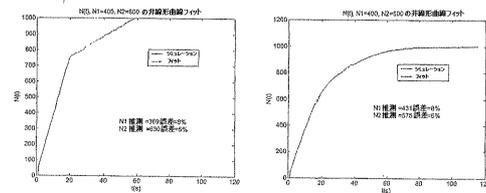
【 図 3 4 】

Figure 34



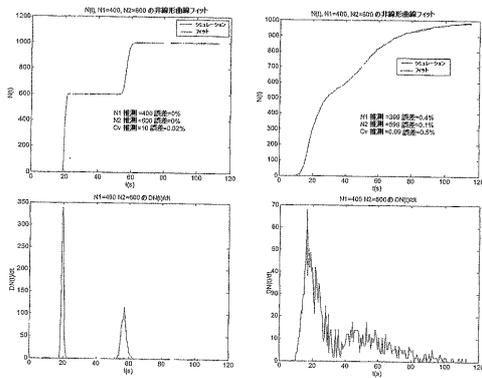
【 図 3 5 】

Figure 35



【 図 3 6 】

Figure 36



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 21/78 (2006.01)		G 0 1 N 21/78	C
C 1 2 M 1/34 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	B
		C 1 2 M 1/34	D
		C 1 2 M 1/34	F

- (72)発明者 エリック・ドロフ
スウェーデン、エス - 5 8 7 3 4 リンチェピング、クネクトガータン 3 0 番
- (72)発明者 アリアン・ティッベ
オランダ、エヌエル - 7 4 1 3 ゼットエヌ・デーフェンター、タインストラーティエ 8 番
- (72)発明者 ヤン・グレーフェ
オランダ、エヌエル - 7 5 7 6 エーエル・オルデンザール、クルエイスカンプ 3 4 番
- (72)発明者 ダネッシュ・ゴーエル
アメリカ合衆国 1 9 0 5 6 ペンシルベニア州レビットタウン、アパートメント・ナンバー・シー - 9、ニュー・ロジャーズ・ロード 2 0 0 0 番
- (72)発明者 レオン・テルスタッペン
アメリカ合衆国 1 9 0 0 6 ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、オールド・フォード・ロード 1 3 5 4 番

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 米国特許第 0 4 1 1 5 5 3 5 (U S , A)
米国特許第 0 5 6 6 5 5 8 2 (U S , A)
国際公開第 9 8 / 0 2 8 6 2 2 (W O , A 1)
米国特許第 0 6 2 5 1 6 1 5 (U S , B 1)
米国特許第 0 6 3 1 6 2 1 5 (U S , B 1)
Journal of Immunological Methods , 2 0 0 0 年 , Vol.243 , p.191-210

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12M1/00-3/10
C12Q1/00-1/68
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	低成本细胞计数的方法和算法		
公开(公告)号	JP4568499B2	公开(公告)日	2010-10-27
申请号	JP2003568480	申请日	2003-02-14
申请(专利权)人(译)	Imunibesuto公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝里指数有限责任公司		
[标]发明人	エリックドローフ アリアンティッベ ヤングレーフェ ダネッシュゴエル レオンテルスタッペン		
发明人	エリック・ドローフ アリアン・ティッベ ヤン・グレーフェ ダネッシュ・ゴエル レオン・テルスタッペン		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N33/543 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/64 G01N21/78 C12M1/34 G01N15/00 G01N15/14 G01N33/545		
CPC分类号	G01N15/1475 G01N15/1463 G01N33/5094 G01N33/54333 G01N2015/008 G01N2015/1486 Y10T436 /101666 Y10T436/25375		
FI分类号	C12Q1/06 G01N33/543.541.A G01N33/48.M G01N33/53.Y G01N21/64.F G01N21/78.C C12M1/34.B C12M1/34.D C12M1/34.F		
代理人(译)	田中，三夫 矢野正树 山崎 宏 佐藤 剛		
审查员(译)	福泽弘光		
优先权	60/357170 2002-02-14 US		
其他公开文献	JP2005537781A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

细胞在由流动的流体细胞术在体液或环境样品，多个学科，如在食品和体液细菌污染的评价在不同白细胞亚群广泛使用计数。对于许多应用，设备，规模和复杂性的成本阻断HIV监测CD4分析中有广泛的用途，例如，贫穷国家的资源。说明书中公开的新颖装置，方法和算法很大程度上克服了这些限制。简而言之，生物样品中的所有细胞都被荧光标记，但只有靶细胞被磁性标记。在腔室或比色皿的标记的样品被放置在两个楔形磁体之间以选择性地将磁性标记的细胞移动到反应杯的观察面。LED照亮细胞，CCD照相机捕获靶细胞发出的荧光图像。的表面上的细胞计数是通过使用一种新颖的算法，其可以与原始样品的靶细胞浓度相关联进行的图像分析提供。紧凑型细胞仪系统提供强大，经济且易于使用的技术，可在远程位置使用。

$$M \frac{d^2 y}{dt^2} + 6mR \frac{dy}{dt} = mVB_y - M'g$$