(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2014-29346
(P2014-29346A)
(43)公開日　平成26年2月13日(2014.2.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	Y	2G045
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	P	2G054
G01N 33/574	(2006.01)	G01N	33/53	K	2G059
G01N 33/532	(2006.01)	G01N	33/574	D	
G01N 21/27	(2006.01)	G01N	33/53	D	

審査請求 有　請求項の数 10　ＯＬ　（全 55 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-226607 (P2013-226607)
(22)出願日　平成25年10月31日 (2013.10.31)
(62)分割の表示　特願2009-511073 (P2009-511073)の分割
原出願日　平成19年5月17日 (2007.5.17)
(31)優先権主張番号　60/801,035
(32)優先日　平成18年5月17日 (2006.5.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　507034894
セルーメン、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ペンシルヴァニア州　１５２３８、ピッツバーグ、ウイリアム　ピット　ウェイ　３１８０
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳
(72)発明者　ゴフ，アルバート，エイチ．
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　１５１１６　グレンショー，ルイーズ　ドライブ　２０１４
(72)発明者　ジュリアーノ，ケネス，エイ．
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　１５２０９　ピッツバーグ，ホーソーン　ロード　３５１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】自動化組織分析のための方法

(57)【要約】
【課題】自動化組織分析のための方法を提供すること。
【解決手段】a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；
c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
f) 第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが生じる、
を含み、それにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；
c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
f) 第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが生じる、
を含み、それにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法。
【請求項２】
少なくともe)およびf)の工程が自動化される、請求項1記載の方法。
【請求項３】
2つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、2つ以上の組織試料の類似性、相違またはその組み合わせを同定する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。
【請求項４】
2つ以上の組織試料が1つの組織被検物質由来の連続切片である、請求項3記載の方法。
【請求項５】
1つ以上の組織試料が1種類以上の動物から単離される、請求項1記載の方法。
【請求項６】
1種類以上の動物が1人以上のヒトである、請求項5記載の方法。
【請求項７】
2つ以上の組織試料が1つ以上の時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点で該ヒト患者から単離される、請求項6記載の方法。
【請求項８】
組織学的染色が、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）、マッソン三色、トルイジンブルー、ライト/ギムザ染色、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。
【請求項９】
蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識タンパク質、蛍光標識アプタマー、蛍光標識オリゴヌクレオチド、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。
【請求項１０】
蛍光標識核酸プローブが蛍光標識RNAである、請求項9記載の方法。
【請求項１１】
蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、請求項1記載の方法。
【請求項１２】
画像化が、広視野顕微鏡使用法または共焦点顕微鏡使用法を用いて行われる、請求項1記載の方法。
【請求項１３】

第1の光学様式が透過光顕微鏡使用法である、請求項1記載の方法。
【請求項１４】
第2の光学様式が蛍光顕微鏡使用法である、請求項1記載の方法。
【請求項１５】
第1の組のデータ、第2の組のデータまたはそれらの組み合わせがデジタルデータである請求項1記載の方法。
【請求項１６】
参照について細胞システム生物プロフィールがデータベースに保管され、データベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、請求項1記載の方法。
【請求項１７】
データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよび参照細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、請求項16記載の方法。
【請求項１８】
相関のグラフ表示、クラスター解析または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項17記載の方法。
【請求項１９】
i) 少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iii) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；
iv) 第3の組みデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。
【請求項２０】
1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、少なくとも1つの末梢血試料が得られる、請求項19記載の方法。
【請求項２１】
1つより多くの末梢血試料が異なる時点で得られ、1つより多くの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項19記載の方法。
【請求項２２】
i) 1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程；
iii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iv) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；

v) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第4の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第4の組のデータが作製される；

vi) 第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれで少なくとも1つ特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項２３】

1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で1つ以上の末梢血試料が得られる、請求項22記載の方法。

【請求項２４】

2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項22記載の方法。

【請求項２５】

a) 1つ以上の組織試料から少なくとも1つの切片を得る工程；

b) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

c) 蛍光標識された切片を少なくとも第1の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；

d) 第1の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、第1の組のデータにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールのための方法が提供される、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法。

【請求項２６】

少なくともc)およびd)の工程が自動化される、請求項25記載の方法。

【請求項２７】

2つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、2つ以上の組織試料の類似性、相違、またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、請求項25記載の方法。

【請求項２８】

2つ以上の組織試料が、1つの組織被検物質由来の連続切片である、請求項27記載の方法。

【請求項２９】

1つ以上の組織試料が1種類以上の動物から単離される、請求項25記載の方法。

【請求項３０】

1種類以上の動物が1人以上のヒトである、請求項29記載の方法。

【請求項３１】

2つ以上の組織試料が1つ以上の時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点でヒト患者から単離される、請求項30記載の方法。

【請求項３２】

蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識ポリペプチド、蛍光標識アプタマー、蛍光標識核酸プローブ、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項25記載の方法。

【請求項３３】

蛍光標識核酸プローブが蛍光標識RNAである、請求項32記載の方法。
【請求項３４】
蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、請求項25記載の方法。
【請求項３５】
広視野顕微鏡使用法または共焦点顕微鏡使用法を使用して画像化が行われる、請求項25記載の方法。
【請求項３６】
第1の光学様式が蛍光顕微鏡使用法である、請求項25記載の方法。
【請求項３７】
第1の組のデータがデジタルデータである、請求項1記載の方法。
【請求項３８】
細胞システム生物プロフィールが参照のためにデータベースに保管されて、データベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、請求項25記載の方法。
【請求項３９】
データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよび参照細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、請求項38記載の方法。
【請求項４０】
相関のグラフ表示、クラスター解析または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項39記載の方法。
【請求項４１】
i）少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程；
ii）少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iii）蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第2の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
iv）第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、請求項25記載の方法。
【請求項４２】
1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、少なくとも1つの末梢血試料が得られる、請求項41記載の方法。
【請求項４３】
1つより多くの末梢血試料が異なる時点で得られ、1つより多い末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項42記載の方法。
【請求項４４】
i）1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程；
ii）少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程；
iii）少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに

特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

iv) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；

v) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；

vi) 第2の組のデータおよび第3の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第2の組のデータおよび第3の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム細胞プロフィールを作製する工程をさらに含む、請求項25記載の方法。

【請求項４５】

1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、1つ以上の末梢血試料が得られる、請求項44記載の方法。

【請求項４６】

2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項45記載の方法。

【請求項４７】

a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；

b) 少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；

c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬はバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが

i) 少なくとも4種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；

ii) 少なくとも4種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；

iii)

A) 少なくとも3種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；および

B) 少なくとも3種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬

の組み合わせ；ならびに

iv) それらの組み合わせ

からなる群より選択される蛍光標識試薬を含み、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；

e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；

f) 第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、

を含み、

それにより癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組合せのためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせのためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法。

【請求項４８】

癌が乳癌である、請求項47記載の方法。

【請求項４９】

癌細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬が、HER2/neu、エストロゲンレセプター（ER）、Ki-67、Cox-2およびp16からなる群より選択される癌細胞バイオマーカーを検出する、請求項47記載の方法。

【請求項５０】

移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬が、NK細胞バイオマーカー、LAK細胞バイオマーカー、TRAIL、PD1および免疫細胞アポトーシスのバイオマーカーからなる群より選択される移動性免疫細胞バイオマーカーを検出する、請求項47記載の方法。

【請求項５１】

1つの特徴が、移動性免疫細胞バイオマーカーにより検出される種々の移動性免疫細胞サブタイプの比であり、それにより比が癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後、またはそれらの組み合わせを示す、請求項47記載の方法。

【請求項５２】

1つ以上の組織試料が、癌であることが疑われる組織、リンパ節およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の方法。

【請求項５３】

i）少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程；

ii）少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

iii）蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；

iv）第3の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、請求項52記載の方法。

【請求項５４】

1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、少なくとも1つの末梢血試料が得られる、請求項53記載の方法。

【請求項５５】

2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項53記載の方法。

【請求項５６】

a）1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程；

b）少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程；

c）少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

d) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第4の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第4の組のデータが作製される；
f) 第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより癌の有無、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせのためにプロファイルされる、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせのためにプロファイルされる、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、請求項52記載の方法。

【請求項５７】
1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、1つ以上の末梢血試料が得られる、請求項56記載の方法。

【請求項５８】
2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、請求項56記載の方法。

【請求項５９】
少なくともd)、e)およびf)の工程が自動化される、請求項47記載の方法。

【請求項６０】
1つ以上の組織試料が1つより多い時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点で同じ患者から単離される、請求項47記載の方法。

【請求項６１】
組織学的染色が、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）、マッソン三色、トルイジンブルー、ライト/ギムザ染色、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の方法。

【請求項６２】
蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識タンパク質、蛍光標識アプタマー、蛍光標識オリゴヌクレオチド、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の方法。

【請求項６３】
蛍光標識試薬のパネルが蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、請求項47記載の方法。

【請求項６４】
第1の組のデータ、第2の組のデータまたはそれらの組み合わせがデジタルデータである、請求項47記載の方法。

【請求項６５】
参照について細胞システム生物プロフィールがデータベースに保管され、それによりデータベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、請求項47記載の方法。

【請求項６６】
データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料および参照の細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、請求項65記載の方法。

【請求項６７】
相関のグラフ表示、クラスター解析、または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生

物プロフィールを比較する、請求項66記載の方法。
【請求項６８】
a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を組織染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；
c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが、
i) 細胞代謝バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
ii) DNA損傷バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
iii) 細胞形態バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
iv) DNA損傷バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
v) 細胞分化バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
vi) ストレス誘導型の転写活性または抑制バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
vii) ストレスキナーゼバイオマーカーのリン酸化状態に特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
viii) アポトーシスまたはネクローシスのバイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
ix) 細胞骨格バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
x) オルガネラバイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
xi) 免疫細胞バイオマーカーの存在または活性化に特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；および
xii) それらの組み合わせ
からなる群より選択された蛍光標識試薬の組を含み、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
f) 第1の組データおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより組織毒性の存在、重症度または非存在のためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、組織毒性の存在、重症度または非存在のためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法。
【請求項６９】
1つ以上の組織試料が1つ以上の肝臓組織試料である、請求項68記載の方法。
【請求項７０】
少なくともd)、e)およびf)の工程が自動化される、請求項68記載の方法。
【請求項７１】
1つ以上の組織試料が1つより多くの時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点で同じ患者から単離される、請求項68記載の方法。
【請求項７２】
組織学的染色が、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）、マッソン三色、トルイジンブルー、ライト/ギムザ染色ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項68記載の方法。

【請求項７３】
蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識ポリペプチド、蛍光標識アプタマー、蛍光標識核酸プローブ、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項68記載の方法。
【請求項７４】
蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、請求項68記載の方法。
【請求項７５】
第1の組のデータ、第2の組のデータまたはそれらの組み合わせがデジタルデータである、請求項68記載の方法。
【請求項７６】
参照について細胞システム生物プロフィールがデータベースに保管され、それによりデータベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、請求項68記載の方法。
【請求項７７】
データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料および参照細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、請求項76記載の方法。
【請求項７８】
相関のグラフ表示、クラスター解析、または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールを比較する、請求項76記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、自動化組織分析のための方法に関する。
【０００２】
（関連出願）
本出願は、2006年5月17日に出願された米国特許仮出願第60/801,035号の恩典を主張する。
【０００３】
上述の出願の全教示は参照により本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００４】
（発明の背景）
病理における適用のための多色蛍光での能力(capability)の開発は、10年以上前に導入された[3(非特許文献１)、6(非特許文献２)、7(非特許文献３)、8(非特許文献４)]が、市場ではまだ広く容認されていない。特に、Dow et al. [7(非特許文献３)]には、多色蛍光を用いて、ヒューマンインタラクティブ画像解析プロセスにより黒色腫組織切片におけるリンパ球表現型および活性化状態を測定した研究が記載されている。つい最近では、多色蛍光が病理において適用され[9(非特許文献５)]、HistoRx, Inc.(New Haven、CT)により、これらのアプローチのいくつかが商品化された。これらの刊行物および適用には、組織細胞分析において蛍光に基づく画像化技術を使用することが示されているが、その適用に限定されており、組織の系統的または細胞システム生物学の理解の必要性は示されていない。
【０００５】
薬物発見のための細胞分析を自動化するため、高成分スクリーニング(High content screening)(HCS)および多パラメータHCS技術が開発されたが、HCS技術は、特に、試験化合物で処理された培養細胞のアレイ内の個々の標的または経路の測定に集中している。しかしながら、HCSツール単独では、組織系細胞システム生物学の完全なワークフローは示さ

れない。
【０００６】
したがって、細胞生物学系の系統的で複雑な相互作用をより充分に理解するために、細胞システム生物プロフィールを作製および分析するための方法を提供する必要性が存在する。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】Toxicol Pathol, 1994. 22(2) p.145-59
【非特許文献２】Algorithms and Techniques. 1993: SPIE
【非特許文献３】Cytometry, 1996. 25(1): p.71-81
【非特許文献４】Cytometry, 1991. 12(7): p.579-96
【非特許文献５】Nat Med, 2002. 8(11): p.1323
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
本発明の課題は、自動化組織分析のための方法を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
即ち、本発明の要旨は、
〔１〕a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；
c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
f) 第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが生じる、
を含み、それにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法、
〔２〕少なくともe)およびf)の工程が自動化される、〔1〕記載の方法、
〔３〕2つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、2つ以上の組織試料の類似性、相違またはその組み合わせを同定する工程をさらに含む、〔1〕記載の方法、
〔４〕2つ以上の組織試料が1つの組織被検物質由来の連続切片である、〔3〕記載の方法、
〔５〕1つ以上の組織試料が1種類以上の動物から単離される、〔1〕記載の方法、
〔６〕1種類以上の動物が1人以上のヒトである、〔5〕記載の方法、
〔７〕2つ以上の組織試料が1つ以上の時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点で該ヒト患者から単離される、〔6〕記載の方法、
〔８〕組織学的染色が、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）、マッソン三色、トルイジンブルー、ライト/ギムザ染色、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔1〕記載の方法、

〔９〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識タンパク質、蛍光標識アプタマー、蛍光標識オリゴヌクレオチド、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔1〕記載の方法、
〔１０〕蛍光標識核酸プローブが蛍光標識RNAである、〔9〕記載の方法、
〔１１〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、〔1〕記載の方法、
〔１２〕画像化が、広視野顕微鏡使用法または共焦点顕微鏡使用法を用いて行われる、〔1〕記載の方法、
〔１３〕第1の光学様式が透過光顕微鏡使用法である、〔1〕記載の方法、
〔１４〕第2の光学様式が蛍光顕微鏡使用法である、〔1〕記載の方法、
〔１５〕第1の組のデータ、第2の組のデータまたはそれらの組み合わせがデジタルデータである〔1〕記載の方法、
〔１６〕参照について細胞システム生物プロフィールがデータベースに保管され、データベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、〔1〕記載の方法、
〔１７〕データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよび参照細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、〔16〕記載の方法、
〔１８〕相関のグラフ表示、クラスター解析または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールが比較される、〔17〕記載の方法、
〔１９〕i) 少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iii) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；
iv) 第3の組みデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、〔1〕記載の方法、
〔２０〕1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、少なくとも1つの末梢血試料が得られる、〔19〕記載の方法、
〔２１〕1つより多くの末梢血試料が異なる時点で得られ、1つより多くの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、〔19〕記載の方法、
〔２２〕i) 1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程；
iii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iv) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；

v) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第4の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第4の組のデータが作製される；

vi) 第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれで少なくとも1つ特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、〔1〕記載の方法、

〔２３〕1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で1つ以上の末梢血試料が得られる、〔22〕記載の方法、

〔２４〕2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、〔22〕記載の方法、

〔２５〕a) 1つ以上の組織試料から少なくとも1つの切片を得る工程；

b) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

c) 蛍光標識された切片を少なくとも第1の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；

d) 第1の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、第1の組のデータにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールのための方法が提供される、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法、

〔２６〕少なくともc)およびd)の工程が自動化される、〔25〕記載の方法、

〔２７〕2つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、2つ以上の組織試料の類似性、相違、またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、〔25〕記載の方法、

〔２８〕2つ以上の組織試料が、1つの組織被検物質由来の連続切片である、〔27〕記載の方法、

〔２９〕1つ以上の組織試料が1種類以上の動物から単離される、〔25〕記載の方法、

〔３０〕1種類以上の動物が1人以上のヒトである、〔29〕記載の方法、

〔３１〕2つ以上の組織試料が1つ以上の時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点でヒト患者から単離される、〔30〕記載の方法、

〔３２〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識ポリペプチド、蛍光標識アプタマー、蛍光標識核酸プローブ、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔25〕記載の方法、

〔３３〕蛍光標識核酸プローブが蛍光標識RNAである、〔32〕記載の方法、

〔３４〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、〔25〕記載の方法、

〔３５〕広視野顕微鏡使用法または共焦点顕微鏡使用法を使用して画像化が行われる、〔25〕記載の方法、

〔３６〕第1の光学様式が蛍光顕微鏡使用法である、〔25〕記載の方法、

〔３７〕第1の組のデータがデジタルデータである、〔1〕記載の方法、

〔３８〕細胞システム生物プロフィールが参照のためにデータベースに保管されて、データベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、〔25〕記載の方法、

〔３９〕データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物

プロフィールおよび参照細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、〔38〕記載の方法、
〔４０〕相関のグラフ表示、クラスター解析または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールが比較される、〔39〕記載の方法、
〔４１〕i) 少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iii) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第2の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
iv) 第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、〔25〕記載の方法、
〔４２〕1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、少なくとも1つの末梢血試料が得られる、〔41〕記載の方法、
〔４３〕1つより多くの末梢血試料が異なる時点で得られ、1つより多い末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、〔42〕記載の方法、
〔４４〕i) 1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程；
iii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iv) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
v) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；
vi) 第2の組のデータおよび第3の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第2の組のデータおよび第3の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム細胞プロフィールを作製する工程をさらに含む、〔25〕記載の方法、
〔４５〕1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、1つ以上の末梢血試料が得られる、〔44〕記載の方法、
〔４６〕2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、〔45〕記載の方法、
〔４７〕a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を

作製する工程；
c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬はバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが
i) 少なくとも4種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；
ii) 少なくとも4種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；
iii)
A) 少なくとも3種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；および
B) 少なくとも3種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬
の組み合わせ；ならびに
iv) それらの組み合わせ
からなる群より選択される蛍光標識試薬を含み、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
f) 第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、
それにより癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組合せのためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせのためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法、
〔４８〕癌が乳癌である、〔47〕記載の方法、
〔４９〕癌細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬が、HER2/neu、エストロゲンレセプター（ER）、Ki-67、Cox-2およびp16からなる群より選択される癌細胞バイオマーカーを検出する、〔47〕記載の方法、
〔５０〕移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬が、NK細胞バイオマーカー、LAK細胞バイオマーカー、TRAIL、PD1および免疫細胞アポトーシスのバイオマーカーからなる群より選択される移動性免疫細胞バイオマーカーを検出する、〔47〕記載の方法、
〔５１〕1つの特徴が、移動性免疫細胞バイオマーカーにより検出される種々の移動性免疫細胞サブタイプの比であり、それにより比が癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後、またはそれらの組み合わせを示す、〔47〕記載の方法、
〔５２〕1つ以上の組織試料が、癌であることが疑われる組織、リンパ節およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔47〕記載の方法、
〔５３〕i) 少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

iii) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；
iv) 第3の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、〔52〕記載の方法、
〔５４〕1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、少なくとも1つの末梢血試料が得られる、〔53〕記載の方法、
〔５５〕2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、〔53〕記載の方法、
〔５６〕a) 1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程；
b) 少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程；
c) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第3の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第4の光学様式で画像化する工程、ここで画像化により第4の組のデータが作製される；
f) 第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより癌の有無、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせのためにプロファイルされる、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせのためにプロファイルされる、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む、〔52〕記載の方法、
〔５７〕1つ以上の組織試料が得られるのと同じまたは異なる時点で、1つ以上の末梢血試料が得られる、〔56〕記載の方法、
〔５８〕2つ以上の末梢血試料が異なる時点で得られ、2つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される、〔56〕記載の方法、
〔５９〕少なくともd)、e)およびf)の工程が自動化される、〔47〕記載の方法、
〔６０〕1つ以上の組織試料が1つより多い時点でヒト患者から単離され、少なくとも1つの組織試料がそれぞれの時点で同じ患者から単離される、〔47〕記載の方法、
〔６１〕組織学的染色が、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）、マッソン三色、トルイジンブルー、ライト/ギムザ染色、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔47〕記載の方法、
〔６２〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識タンパク質、蛍光標識アプタマー、蛍光標識オリゴヌクレオチド、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔47〕記載の方法、
〔６３〕蛍光標識試薬のパネルが蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、〔47〕記載の方法、
〔６４〕第1の組のデータ、第2の組のデータまたはそれらの組み合わせがデジタルデータである、〔47〕記載の方法、

〔６５〕参照について細胞システム生物プロフィールがデータベースに保管され、それによりデータベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、〔47〕記載の方法、
〔６６〕データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料および参照の細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、〔65〕記載の方法、
〔６７〕相関のグラフ表示、クラスター解析、または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールを比較する、〔66〕記載の方法、
〔６８〕a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を組織染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；
c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが、
i) 細胞代謝バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
ii) DNA損傷バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
iii) 細胞形態バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
iv) DNA損傷バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
v) 細胞分化バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
vi) ストレス誘導型の転写活性または抑制バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
vii) ストレスキナーゼバイオマーカーのリン酸化状態に特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
viii) アポトーシスまたはネクローシスのバイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
ix) 細胞骨格バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
x) オルガネラバイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；
xi) 免疫細胞バイオマーカーの存在または活性化に特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；および
xii) それらの組み合わせ
からなる群より選択された蛍光標識試薬の組を含み、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4種類のバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作製される；
e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作製される；
f) 第1の組データおよび第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより組織毒性の存在、重症度または非存在のためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される、組織毒性の存在、重症度または非存在のためにプロファイルされる1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールの作製方法、
〔６９〕1つ以上の組織試料が1つ以上の肝臓組織試料である、〔68〕記載の方法、
〔７０〕少なくともd)、e)およびf)の工程が自動化される、〔68〕記載の方法、
〔７１〕1つ以上の組織試料が1つより多くの時点でヒト患者から単離され、少なくとも1

つの組織試料がそれぞれの時点で同じ患者から単離される、〔68〕記載の方法、
〔７２〕組織学的染色が、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）、マッソン三色、トルイジンブルー、ライト/ギムザ染色ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔68〕記載の方法、
〔７３〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識抗体、蛍光標識ペプチド、蛍光標識ポリペプチド、蛍光標識アプタマー、蛍光標識核酸プローブ、蛍光標識化学物質、蛍光化学物質およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、〔68〕記載の方法、
〔７４〕蛍光標識試薬のパネルが、蛍光標識された切片中のバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布またはそれらの組み合わせを示す、〔68〕記載の方法、
〔７５〕第1の組のデータ、第2の組のデータまたはそれらの組み合わせがデジタルデータである、〔68〕記載の方法、
〔７６〕参照について細胞システム生物プロフィールがデータベースに保管され、それによりデータベースの参照細胞システム生物プロフィールが提供される、〔68〕記載の方法、
〔７７〕データベースの参照細胞システム生物プロフィールと1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールを比較して、1つ以上のさらなる試料および参照細胞システム生物プロフィールの類似性、相違またはそれらの組み合わせを同定する工程をさらに含む、〔76〕記載の方法、
〔７８〕相関のグラフ表示、クラスター解析、または統計学的手段の1つ以上を使用して、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールおよびデータベースの細胞システム生物プロフィールを比較する、〔76〕記載の方法
に関する。

【発明の効果】

【００１０】

本発明により、自動化組織分析のための方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】図1は、組織プロファイリングのためのスライドの例である。図1Aは、試料番号01であり、H&E染色で標識された組織切片、および特異的バイオマーカーの蛍光タグで標識された連続切片を合わせたスライドを示す。図1Bは、試料番号02であり、H&E染色された切片、蛍光標識された切片および患者組織から単離され、蛍光タグで標識された、いくつかの細胞を有するスライドを示す(切片および細胞の写真はすべて、例示の目的のため拡大している)。

【図２】図2は、プロフィールを作製するために特徴を同定するのに使用される種々の組の細胞バイオマーカーの分析を含む、システム細胞生物学(本明細書において、細胞システム生物学ともいう)にプロファイリングの概略図である。図2Aは、例えば、健常、疾患を有する、または薬物で治療中もしくは治療されたことがある患者由来の細胞を示す。図2Bは、一組のバイオマーカーの分析を概略的に示す。図2Cは、細胞システム生物プロフィールを作製するために使用される細胞バイオマーカーのパネルを示す。これらのプロフィールは、参照データベースとして使用され得るデータベース(図2Dに概略的に示す)に保存される。患者プロフィールと参照プロフィールとの比較は、例えば、予測的ツールとして、またはバイオマーカー、特徴もしくはプロフィールを特定の病状と関連させるため、または新しいプロフィールを評価するために使用される。

【図３】図3は、バイオマーカーを、高レベルの器官および生物体効果と相関させるのに充分な複雑性を捕捉するとともに、ハイスループットおよび費用効果の高いプロファイリングを可能にするシステム細胞生物学の相互関係を示す概略図である。細胞システム生物学およびシステム生物学は、相互作用および「～オミクス(-omics)」で表される生体系の基本構成要素間の関係に基づき、特異的細胞バイオマーカーの選択は、研究される細胞(セロミクス(cellomics))との関連におけるゲノミクス、プロテオミクスおよびメタボロミクスの組み合わせから得られる。

【図４】図4は、細胞がどのようにして、遺伝子発現、エネルギー代謝などの例示した多くのプロセスを統合し、正常な機能をもたらすかの概略図である。疾患は、これらの細胞プロセスの1つ以上の調節異常に起因し、しばしば、複雑な症状をもたらす。これらのプロセスの多くは、経路、シグナルおよびタンパク質を共有し、したがって、細胞系(組織内の異なる型の細胞の集合を含む)の一部として調査すべきである。
【図５】図5は、例えば、(A)ストレス経路；(B)オルガネラ機能；(C)細胞周期；(D)形態；(E)アポトーシス；および(F)DNA損傷、ならびにマイクロRNA、および移動性免疫細胞を含む機能分類から選択された患者組織プロファイリングにおける使用のためのバイオマーカーの例を示す。本明細書に記載の特定の疾患状態の分析のためのバイオマーカーの特異的な組み合わせが選択される。
【図６】図6は、組織切片において使用され得るものなどのバイオマーカーのパネルでの細胞の多重化標識の一例である。標識は組織内で多重化されており、これにより、同じ組織内でのバイオマーカー活性化の相関の分析が可能になり、調製および解析しなければならない切片の数が少なくなる。特定の態様において、少なくとも4つ以上のバイオマーカーが各切片において解析される。
【図７】図7は、本発明の一態様に記載の参照プロフィールデータベースを作製するプロセスの概略フローチャートである。ボックス1：連続組織切片を調製し、マウントする。ボックス2(a)：1つの切片を、透過光画像化または検討のためにH&E染色で標識する。ボックス2(b)：第２の切片を蛍光標識のパネルで標識し、バイオマーカーを測定する。ボックス3(aおよびb)：切片を解釈のために画像化または視覚化する。ボックス4(aおよびb)：切片を解析および／または解釈し、データを作製する。ボックス5：連続切片からのデータを比較し結合する。ボックス6：細胞システムプロフィールをデータベースに加える。ボックス7：データベース内の組織プロフィールをクラスター化し、類似性を同定する。ボックス8：プロフィール分類を同定する。ボックス9：システムプロフィールと組織学的データ間の相関を用いて分類体(classifier)を構築し、これをデータベースに保存する。
【図８】図8は、例えば、患者由来の組織を分析および分類するプロセスを示すフローチャートである。
【図９】図9A～Iは、本発明の一態様における自動化組織プロファイリングのための全体的なプロセスを示すフローチャートである。図9(A)プロセスは、既知の病歴を有する参照組織から開始する。図9(B)蛍光分析のプロフィールを、病歴とともに染色切片のヒト解釈の結果と組み合わせる。分類体を構築するための図9(C)と図9(D)とで参照データベースが構成(populate)される。図9(E)患者組織を調製し、解析し（図9(F)）、分類して（図9(G)）、他の患者プロフィール(患者層別化)との類似性を同定し（図9(H)）、病状または病状の結果に関する予測を行なう（図9(I)）。
【図１０】図10は、癌組織プロファイリングパネルのバイオマーカーを選択するためのプロセスのフローチャートである。ボックス(1)患者由来の正常組織を遺伝子発現プロファイリングによって解析する(ボックス2)。ボックス(3)同じ患者由来の腫瘍組織の試料を、遺伝子発現プロファイリングによって解析し(ボックス4)、従来の様式で病期分類する(ボックス5)。「正常」組織を患者腫瘍組織と比較するこの組み合わせ情報を用いて(ボックス6)、潜在的バイオマーカーを同定する。ボックス(7)遺伝子産物は、Her2/Neuを含む既知の参照点に基づいて優先順位を決定し、次いで、試験群を作製するために抗体を取得または作製する(ボックス8)。バイオマーカーパネルの設計は、蛍光系免疫組織化学(IHC)のために多重化された癌細胞バイオマーカーの組み合わせの選択に基づく。
【図１１】図11は、本発明の一態様の概要である。健常組織、腫瘍組織、他の疾患組織または血液被検物質が含まれ得る患者由来の組織試料(A)を、個々の切片または組織マイクロアレイのいずれかとして、スライド(B)上にマウントするための標準的な方法によって処理する。スライドを顕微鏡または他の画像化システムにおいて画像化する(C)。画像を、病理学者または画像解析アルゴリズムの適用のいずれかによって解釈してデータを作製し(D)、これは、データベースに保存され得る。単一の被検物質からのデータの組み合わせにより、該被検物質の細胞システムプロフィールが形成される。多重細胞システムプロ

フィールからのデータは、統計学的方法、例えば、クラスター解析、主成分解析、および他の多因子法を用いて解析され、クラスター化ヒートマップ(heat map)で表され得る(E)プロフィール間の類似性が同定され、ある種の生物学的または医学的状態を示すプロフィール内のパターンが同定され、プロフィール内の類似性に基づいて組織状態が分類される。細胞システム生物学プロファイリングによって提供される情報は、医師または科学者(F)によって、生物学または疾患状態もしくは生物学的状態の進行を、より良好に理解するため、臨床試験において、患者をより正確に階層化するため、および／または状態の治療に対する治療アプローチ(G)を最適化するために使用される。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

（発明の要旨）

細胞は、最も単純な生体系である。組織は、相互作用する細胞群を形成している特定の細胞型の集合体である。細胞および組織は、完全な生物体よりは複雑ではないが、相当な機能の複雑性を有し、生物体全体に影響を及ぼす多くの側面、例えば、疾患の細胞的根拠、治療有効性および治療の潜在的毒性の詳細な理解を可能にする。検索可能なデータベースを多重化バイオマーカーの多色蛍光と連結させると、細胞システム生物学(本明細書において、システム細胞生物学ともいう)プロファイリングおよび分析の基礎が提供される。

【００１３】

本発明は、組織系細胞システム生物学の分析方法およびプロファイリング方法、組織系細胞システム生物学の分析、ならびに組織系細胞システム生物学のプロファイリング手段を提供する。従来の組織学的染色を蛍光染色と組み合せ、蛍光によって標識され得る細胞マーカーおよび組織マーカーを関連させることを含む細胞システム生物学アプローチは、ここに本明細書において記載する時点では、これまでに他者によって適用されていない。本明細書に記載の多数の蛍光系試薬のより良好な解釈(interpretation)のために、「参照」画像または「マップ」として病理学者によって使用される従来の組織学的染色に基づいた透過光画像を使用することにより、病理学者によるシステムアプローチの容認が増大し、蛍光分析のための特定の組のバイオマーカーの選択が可能になる。

【００１４】

本発明の一態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される。本明細書で使用されるように、「細胞システム生物学」(本明細書において、システム細胞生物学ともいう)は、正常および異常細胞機能の原因となる遺伝子、タンパク質および代謝産物の統合された相互作用性のネットワークの研究である。したがって、細胞システム生物プロフィールは、細胞が、組織内の種々の細胞と組織の生物学的または医学的状態との関係に依存性の特定の特性を有するような組織構成に関連する細胞の系統的な特徴付けである。プロフィールを構築するために使用される細胞システム生物特徴をもたらすのは、組織内の細胞の構成成分の相互作用、関係および状態である。細胞システム生物プロフィールにおける相互関係は、例えば、数学的（例えば、細胞システム生物特徴の値間の比、和もしくは差)、または統計学的（例えば、細胞システム生物特徴の値の組み合わせの階層的クラスター化方法もしくは主成分解析)のいずれかで規定される。特定の態様において、細胞システム生物プロフィールは、同じ試料由来の1つ以上の組織切片内の細胞から回収された少なくとも５つの細胞システム生物特徴の組み合わせ間の相互関係を規定する。

【００１５】

一態様において、本発明は、1つ以上の組織試料から少なくとも２つの切片を得る工程を含む、1つ以上の組織試料に対して1つ以上の細胞システム生物プロフィールを作製する方法に関する。少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する。少なくとも1つの他の切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する。いくつかの態様において、組織学的に染色された切片および蛍光により染色された切片は、同じまたは異なる。特定の態様において、組織学的に染

色された切片および蛍光により染色された切片は異なる切片である。各蛍光標識試薬は、バイオマーカーに特異的である。本明細書で使用されるように、「バイオマーカー」は、細胞機能および／または組織機能の尺度を提供する分子である。例えば、限定されないが、バイオマーカーは、エストロゲンレセプター発現レベル、Her2/neu発現、転写因子活性化、タンパク質、ポリヌクレオチド、オルガネラなどの位置または量または活性、タンパク質のリン酸化状態などの尺度であり得る。本発明の一態様において、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出する。

【００１６】

1つ以上の切片におけるバイオマーカーの検出は、組織の1つ以上の特徴の読み出しである。本明細書で使用されるように、「特徴(feature)」は、ある時間内および／または細胞および組織の空間内で測定された特定のバイオマーカーの測定値または一連の測定値(これは、生物学的機能を示し得る)を提供する特性である。生物学的機能としては、限定されないが、タンパク質の翻訳後修飾、例えば、リン酸化、タンパク質分解性切断、メチル化、ミリストイル化、および炭水化物の結合；細胞内の区画間または細胞間のイオン、代謝産物および巨大分子の移動；オルガネラの構造および活性の変化；ならびにコーディングおよびノンコーディングRNAならびにタンパク質などの巨大分子の発現レベル、形態、分化状態の改変などが挙げられる。単一のバイオマーカーが1つより多くの特徴の読み出しを提供し得る。例えば、ヘキスト色素を用いてDNA（例えば、バイオマーカー)が検出され得、組織の多数の特徴（例えば、核の大きさ、細胞周期の段階、核の数、アポトーシス核の存在など)が、ヘキスト色素で検出されるDNAによって同定され得る。

【００１７】

該方法は、第１の光学様式を用いて組織学的に染色された切片を画像化し、第1の組のデータを作製する工程、および第２の光学様式を用いて蛍光標識された切片を画像化し、第２の組のデータを作製する工程をさらに含む。第1の組のデータおよび第２の組のデータを解析して、第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定されるように、5つ以上の特徴を同定する。5つ以上の特徴の組み合わせにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが生じる。

【００１８】

本発明のさらなる態様において、細胞システム生物プロフィールは、参照のためにデータベースに保存され、それにより、データベースにおいて参照細胞システム生物プロフィールが提供される。

【００１９】

本発明のさらなる態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。

【００２０】

別の態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも1つの切片を得る工程を含む。各蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であるような少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する。一態様において、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、蛍光標識された切片を少なくとも第１の光学様式で画像化して第1の組のデータを作製し、これを解析して少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定する工程をさらに含み、ここで、第1の組のデータにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである。したがって、該方法により、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが作製される。該方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含み得る。

【００２１】

本発明のさらなる態様では、本明細書において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後および／または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法が提供される。当業者によって理解されるように、種々の癌は、その病理に従って分類および病期分類され得る。本明細書に記載の方法によって、例えば、癌の有無の確認、癌の同定、癌の病期の分類、癌の結果または予後および任意の治療に対する癌の応答の予測および／または測定が可能になる。該方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも２つの切片を得る工程を含む。少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する。少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する。各蛍光標識試薬は、バイオマーカーに特異的である。蛍光標識試薬のパネルは、i)少なくとも4種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；ii)少なくとも4種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬；iii)A)少なくとも3種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、およびB)少なくとも3種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬の組み合わせ、ならびにiv)上記の組み合わせからなる群より選択され得、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出するような蛍光標識試薬を含む。バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、組織学的に染色された切片を少なくとも第１の光学様式で画像化して第1の組のデータを作製する工程、および蛍光標識された切片を少なくとも第２の光学様式で画像化して第２の組のデータを作製する工程をさらに含む。第1の組のデータおよび第２の組のデータを解析して、第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定されるように、少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定する。5つ以上の特徴の組み合わせは、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールであり、したがって、該方法により、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが作製され、ここで、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる。一態様において、1つ以上の組織試料は、癌であることが疑われるか、癌であることが既知の癌性組織、リンパ節およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【００２２】

本発明のまたさらなる態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後および／または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。

【００２３】

本発明の別の態様において、本明細書において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、組織毒性の存在、重篤度または非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法が提供される。該方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも２つの切片を得る工程を含む。少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製し、少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルであり、蛍光標識された切片を作製する。各蛍光標識試薬は、バイオマーカーに特異的である。蛍光標識試薬のパネルは、i)　細胞代謝バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、ii)DNA損傷バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、iii)細胞形態バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、iv)DNA損傷バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、v)細胞分化バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、vi)ストレス誘導型の転写活性化または抑制バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、vii)ストレスキナーゼバイオマーカーのリン酸化状態に特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、viii)アポトーシスまたはネクローシスバイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、ix)細胞骨格バイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、x)オルガネラバイオマーカーに特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、xi)免疫細胞バイオマーカーの存

在または活性化に特異的な1つ以上の蛍光標識試薬、およびxii)その組み合わせからなる群より選択され、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出するような一組の蛍光標識試薬を含み、ここで、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。組織学的に染色された切片を少なくとも第１の光学様式で画像化して第1の組のデータを作製する。蛍光標識された切片を少なくとも第２の光学様式で画像化して第２の組のデータを作製する。該方法は、第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定する工程をさらに含み、ここで、第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定される。5つ以上の特徴の組み合わせは、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである。したがって、該方法により、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが作製され、ここで、組織毒性の存在、重篤度または非存在に関して組織試料がプロファイルされる。一態様において、1つ以上の組織試料は、1つ以上の肝臓組織試料である。

【００２４】

前述のことは、添付の図面によって示される本発明の実施例の態様の以下のより具体的な記載から明白であろう。図において、同様の参照符号は、異なる図において同じ部分を示す。図面は、必ずしも同じ縮尺ではなく、本発明の態様を例示することに重点が置かれている。

【００２５】

（発明の詳細な説明）

「細胞システム生物学」は、機能および生命をもたらす遺伝子、タンパク質および代謝反応の統合された相互作用性のネットワークの研究と定義される。組織内の細胞は、複雑な系として、細胞状態を特徴付けするために多くの要素の分析を必要とする創発性(emergent properties)として知られる、個々の成分の分析から予測されない特性を示す。TaylorおよびGiuliano[10]には、薬物発見へのインビトロ細胞系分析の適用が記載されている。この分析では、薬物治療に対する細胞応答を同定および解釈するのに、個々の細胞の測定間の相関が必要であった。

【００２６】

「細胞システム生物特徴」は、ある時間内および／または細胞および組織の空間内で測定された特定の生物学的機能（典型的に、1つ以上のバイオマーカーの存在、非存在および／またはレベルによって証明される)のデータ測定値または一連の測定値と定義される。生物学的機能の例としては、限定されないが、タンパク質の翻訳後修飾、例えば、リン酸化、タンパク質分解性切断、メチル化、ミリストイル化、および炭水化物の結合；細胞内の区画間または細胞間のイオン、代謝産物および巨大分子の移動；オルガネラの構造および活性の変化；ならびにコーディングおよびノンコーディングRNAおよびタンパク質などの巨大分子の発現レベルの改変が挙げられる。

【００２７】

組織内の細胞の細胞システム生物学分析は、高成分スクリーニング(HCS)のために開発された細胞分析アルゴリズムのいくつかを利用する。「HCS」は、薬物治療に応答した生細胞における遺伝子、タンパク質、および他の細胞構成成分の時間的および空間的活性を測定するために設計された技術基盤と定義される(Giuliano, K. A.；Haskins, J. R.；Taylor, D. L., Advances in 高成分スクリーニング for drug discovery. ASSAY and Drug Development Technologies 2003, 1, 565-577)。HCSおよび多パラメータHCSは、薬物治療に応答するアレイ状の培養細胞において個々の標的または経路を測定するために開発された。しかしながら、本明細書に記載のように、HCS画像解析ツールもまた、生細胞および組織において生じ得る複雑で創発的な特性の特徴付けを可能にし得る細胞システム生物学プロファイリングアプローチの一部として、組織内の細胞からデータを抽出するために使用され得る。また、数多くの他の画像解析ソフトウェアパッケージ、例えば、顕微鏡スライドスキャンシステムが備えられたものが、組織の画像から細胞の特徴を抽出し、細胞システム生物プロフィールを構築するために適用され得る。

【００２８】
「細胞システム生物プロフィール」は、同じ試料由来の1つ以上の組織切片内の細胞から回収された少なくとも約5つの細胞システム生物特徴の組み合わせ間の相互関係と定義される。これらの相互関係は、数学的（例えば、細胞システム生物特徴の値間の比、和もしくは差)または統計学的（例えば、細胞システム生物特徴の値の組み合わせの階層的クラスター化方法もしくは主成分解析)のいずれかで計算される。細胞システム生物プロフィールを用いて、細胞系応答の創発性を特徴付けすることにより、疾患および種々の治療に対する細胞および組織の複雑な応答が理解され得る。
【００２９】
「創発性」は、複雑な系内の自己組織化のプロセス中に新規で整合的(coherent)な構造、パターン、および性質が生じることをいう(Goldstein, Jeffrey (1999) ,"Emergence as a Construct：History and Issues", Emergence；Complexity and Organization 1：49-72)。細胞および組織の創発性（例えば、増殖および分裂、腫瘍表現型への変換など)は、複雑な細胞機能の系統的な分析が行なわれるまで、定義することが開始できない。創発性は、個々の成分の分析から予測されないが、細胞状態を特徴付けするための多くの要素の分析を必要とする。
【００３０】
組織切片における単一の個々の特徴の分析は値を有するが、本明細書において提供される、組織の多数の特徴（例えば、少なくとも約4つの特徴、少なくとも約5つの特徴、少なくとも約6つの特徴、少なくとも約7～12個の特徴、またはそれ以上)が解析される「システムアプローチ」の適用により、細胞、組織、および生物体全体としての状態のより正確な測定が可能になる。さらにまた、このアプローチは、例えば、組織分析の自動化、およびより正確な腫瘍病期分類の組織プロフィールの作製、個別治療、治療有効性の評価、および副作用の早期徴候、ならびに薬物発見における動物毒性学研究での解析の改善を容易にする。
【００３１】
システム生物学および細胞システム生物学：細胞は、最も単純な生体系である。組織は、相互作用する細胞群を形成している特定の細胞型の集合体である。細胞および組織は、完全な生物体よりは複雑ではないが、相当な機能の複雑性を有し、疾患の細胞的根拠、治療有効性および治療の潜在的毒性の詳細な理解を可能にする。検索可能なデータベースを多重化バイオマーカーの多色蛍光と連結させると、システム細胞分析の基礎が提供される。
【００３２】
本発明以前は、組織系細胞システム生物学の分析およびプロファイリングは記載されていなかった。従来の組織学的染色を蛍光染色と組み合せ、蛍光によって標識され得る細胞マーカーおよび組織マーカーを関連させることを含む細胞システム生物学アプローチは、ここに本明細書において記載する時点では、これまでに他者によって行なわれていない。本明細書に記載の多数の蛍光系試薬のより良好な解釈のために、「参照」画像または「マップ」として病理学者によって使用される従来の(非蛍光)組織学的染色に基づいた透過光画像を使用することにより、病理学者によるシステムアプローチの容認が増大し、蛍光分析のための特定の組のバイオマーカーの選択が可能になる。
【００３３】
本発明の一態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される。本明細書で使用されるように、「細胞システム生物学」(本明細書において、システム細胞生物学ともいう)は、正常および異常細胞機能の原因となる遺伝子、タンパク質および代謝産物の統合された相互作用性のネットワークの研究である。したがって、細胞システム生物プロフィールは、細胞が、組織内の種々の細胞と組織の生物学的または医学的状態との関係に依存性の特定の特性を有するような組織構成に関連する細胞の系統的な特徴付けである。プロフィールを構築するために使用される細胞システム生物特徴をもたらすのは、組織内の細胞の構成成分の相互作用、関係および状態である

。細胞システム生物プロフィールにおける相互関係は、例えば、数学的（例えば、細胞システム生物特徴の値間の比、和もしくは差)、または統計学的（例えば、細胞システム生物特徴の値の組み合わせの階層的クラスター化方法もしくは主成分解析)のいずれかで規定または計算される。特定の態様において、細胞システム生物プロフィールは、同じ試料由来の1つ以上の組織切片内の細胞から回収された少なくとも約５つの細胞システム生物特徴の組み合わせ間の相互関係を規定する。別の態様において、細胞システム生物プロフィールは、少なくとも約6、7、8、9、10、11、12個またはそれ以上の特徴の組み合わせである。

【００３４】

本発明の一態様において、該方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも２つの切片を得る工程を含む。任意の適当な組織試料が本明細書に記載の方法において使用され得る。例えば、組織は、上皮、筋肉、器官組織、神経組織、腫瘍組織、およびその組み合わせであり得る。一態様において、血液は組織試料ではない。組織の試料は、任意の標準的な手段（例えば、当業者によって認識されよう生検、コア穿刺、解剖など）によって得られ得る。少なくとも1つの切片が組織学的染色で標識され、組織学的に染色された切片が作製される。本明細書に記載の発明に使用されるように、組織学的染色は、当該技術分野で認識されているような任意の標準的な染色であり得、限定されないが、アルシアンブルー、フクシン、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)、マッソン三色染料、トルイジンブルー、ライト/ギームザ染色、ならびにその組み合わせが挙げられる。当業者によって認識されるように、従来の組織学的染色は蛍光ではない。少なくとも1つの他の切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する。本明細書に記載の発明に使用されるように、蛍光標識試薬のパネルは、蛍光標識された抗体、蛍光標識されたペプチド、蛍光標識されたポリペプチド、蛍光標識されたアプタマー、蛍光標識されたオリゴヌクレオチド(例えば、核酸プローブ、DNA、RNA、cDNA、PNAなど)、蛍光標識された化学物質および蛍光化学物質（例えば、ヘキスト33342、ヨウ化プロピジウム(propidium)、Draq-5、ナイルレッド、蛍光標識されたファロイジン)、およびその組み合わせなどの多数の試薬を含む。各蛍光標識試薬は、少なくとも1つのバイオマーカーに特異的である。本明細書で使用されるように、「バイオマーカー」は、細胞機能および／または組織機能の尺度を提供する分子である。例えば、限定されないが、バイオマーカーは、レセプター発現レベル（例えば、エストロゲンレセプター発現レベル、Her2/neu 発現)；転写因子活性化；タンパク質、ポリヌクレオチド、オルガネラなどの位置または量または活性；タンパク質のリン酸化状態などの尺度であり得る。一態様において、バイオマーカーは、核酸（例えば、DNA、RNA、例えば、マイクロRNA、snRNA、mRNA、rRNAなど)、レセプター、細胞膜抗原、細胞内抗原、および細胞外抗原、シグナル伝達分子、タンパク質などである。本発明の一態様において、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出する。本発明の別の態様において、蛍光標識試薬のパネルにより、少なくとも約4～約6、～約10、～約12個またはそれ以上の異なるバイオマーカーが検出される。本発明の別の態様において、蛍光標識試薬のパネルにより、少なくとも約3つの異なるバイオマーカーが検出される。さらなる態様において、各蛍光標識試薬は、群内の異なる蛍光標識試薬を識別するのに充分な異なる蛍光特性を有する。

【００３５】

1つ以上の切片におけるバイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。本明細書で使用されるように、「特徴」は、ある時間内および／または細胞および組織の空間内で測定された特定のバイオマーカーの測定値または一連の測定値(これは、生物学的機能を示し得る)を提供する特性である。生物学的機能としては、限定されないが、タンパク質の翻訳後修飾、例えば、リン酸化、タンパク質分解性切断、メチル化、ミリストイル化、および炭水化物の結合；細胞内の区画間または細胞間のイオン、代謝産物および巨大分子の移動；オルガネラの構造および活性の変化；ならびにコーディングおよびノンコーディングRNAならびにタンパク質などの巨大分子の発現レベル、形態、分化状態の改変などが挙げられる。単一のバイオマーカーが1つより多く

の特徴の読み出しを提供し得る。例えば、ヘキスト色素により、バイオマーカーの一例であるDNAが検出され得る。多数の特徴、例えば、核の大きさ、細胞周期の段階、核の数、アポトーシス核の存在などが、組織試料においてヘキスト色素によって同定され得る。

【００３６】

該方法は、組織学的に染色された切片を第１の光学様式を用いて画像化し、第1の組のデータを作製する工程、および第２の光学様式を用いて蛍光標識された切片を画像化し、第２の組のデータを作製する工程をさらに含む。当業者によって認識されるように、本明細書に記載の発明に使用される場合、画像化のための光学様式は、この使用に適した任意の様式、例えば、透過光顕微鏡使用法、蛍光顕微鏡使用法、広視野顕微鏡使用法、共焦点顕微鏡使用法、および適宜その組み合わせであり得る。一態様において、第1の組のデータおよび第２の組のデータのいずれか、または両方で作製されるデータは、デジタルデータであり得る。第1の組のデータおよび第２の組のデータを解析して、少なくとも1つの特徴が第1の組のデータで同定され、第２の組のデータで少なくとも1つの特徴が同定されるように、5つ以上の特徴を同定する。5つ以上の特徴の組み合わせにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが生じる。

【００３７】

本発明の一態様において、画像化手順は自動化される。さらにまた、データの分析は、人力で、自動化によって、またはその組み合わせで行なわれ得る。当業者によって認識されるように、組織学的に染色された切片の画像化および蛍光標識された切片の画像化は、連続的または同時に行なわれ得る。また、組織学的標識および蛍光標識は、連続的または同時に行なわれ得る。いくつかの態様において、組織試料から1つ以上の切片を得た後、該方法が完全に自動化される。

【００３８】

本発明のさらなる態様において、該方法は、2つ以上の組織試料の類似性、違いまたはその組み合わせを確認するため、2つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを比較する工程をさらに含む。一態様において、2つ以上の組織試料は、単一の組織被検物質由来の連続切片である。単一の組織試料の連続切片は、組織試料由来の2つ以上の切片の調製において互いに隣接していた組織切片である。

【００３９】

本発明の一態様において、1つ以上の組織試料は、１種類以上の動物から単離される。例えば、一態様において、１種類以上の動物は１名以上のヒトである。特定の態様において、1つ以上の組織試料は、１回以上の時点でヒト患者から、各時点で同じ患者から少なくとも1つの組織試料が単離されるように単離する。

【００４０】

本発明の別の態様において、蛍光標識試薬のパネルは、蛍光標識された切片におけるバイオマーカーの存在、量、位置、活性、分布、またはその組み合わせを示す。バイオマーカーの位置は、細胞内、細胞外、特定の細胞内の位置、特定の細胞外の位置、およびその組み合わせであり得る。バイオマーカーの活性は、バイオマーカーの活性化状態(例えば、そのリン酸化状態、コンホメーション状態、または細胞内の位置などによって示されるものなど)であり得る。

【００４１】

本発明のさらなる態様において、細胞システム生物プロフィールは、参照のためにデータベースに保存され、それにより、データベースにおいて参照細胞システム生物プロフィールが提供される。一態様において、データベースはコンピュータである。別の態様において、データベースはサーバー上に保存される。一態様において、データベース内の参照細胞システム生物プロフィールは、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールと比較される。これにより、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールと参照細胞システム生物プロフィールの類似性、違いまたはその組み合わせの同定が可能になる。種々の方法は、1つ以上のさらなる試料の細胞システム生物プロフィールと、データベースの細胞システム生物プロフィールを、相関のグラフ表示、クラスター解析、

または統計学的手段およびその組み合わせなどによって比較するために使用され得る。

【００４２】

本発明のさらなる態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの血液試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。一態様において、血液試料は末梢血試料である。末梢血は、血液の循環プール中に見られ、リンパ系、脾臓、肝臓または骨髄内で捕捉されない赤血球、白血球および血小板からなる血液の細胞成分である。該方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源由来の少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程を含む。本明細書に記載の発明に使用されるように、末梢血試料は、任意の標準的な手順によって得られ得る。少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して蛍光標識された血液試料スメアを作製し、ここで、各蛍光標識試薬はバイオマーカーに特異的である。一態様において、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出する。バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式で、画像化によって第3の組のデータが作製されるように画像化する工程をさらに含む。第3の組のデータを解析して少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定し、ここで、5つ以上の特徴は、少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである。この方法により、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される。一態様において、少なくとも1つの末梢血試料は、1つ以上の組織試料を得たときと同じまたは異なる時点で採取される。別の態様において、1つより多くの末梢血試料が異なる時点で採取され、1つより多くの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される。

【００４３】

本発明の別の態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。該方法は、1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程を含む。少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色で標識して組織学的に染色された血液試料スメアを作製する。また、少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して蛍光標識された血液試料スメアを作製する。各蛍光標識試薬はバイオマーカーに特異的であり、ここで、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式で画像化して第3の組のデータを作製する。蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第4の光学様式で画像化して第4の組のデータを作製する。第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールとなるように少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定し、ここで、第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定される。したがって、該方法により、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される。上記のように、一態様において、1つ以上の末梢血試料は、1つ以上の組織試料を得たときと同じまたは異なる時点で採取される。さらにまた、別の態様において、1つ以上の末梢血試料が異なる時点で採取される場合、1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される。

【００４４】

本発明のさらなる態様において、本明細書において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法が提供される。該方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも1つの切片を得る工程を含む。少なくとも1つの切片を、各蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であるような蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する。一態様において、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマ

ーカーを検出し、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、蛍光標識された切片を少なくとも第１の光学様式で画像化して第1の組のデータを作製し、これを解析して少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定する工程をさらに含み、ここで、第1の組のデータにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせは細胞システム生物プロフィール1つ以上の組織試料である。したがって、該方法により1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが作製される。さらなる態様において、該方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。該方法は、少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメア得る工程を含む。少なくとも1つの血液試料スメアを、各蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であるような蛍光標識試薬のパネルで標識して蛍光標識された血液試料スメアを作製する。蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第２の光学様式で画像化し、第２の組のデータを作製する工程をさらに含む。第２の組のデータを解析して、5つ以上の特徴が少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールであるような少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定する。したがって、該方法により、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される。任意の態様において、該方法は、少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色で標識して組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程をさらに含む。組織学的に染色された血液試料スメアを画像化してさらなる組のデータを作製し、これを解析して少なくとも1つの特徴を同定し、ここで、組織学的に染色された血液試料スメアの組み合わせにおいて5つ以上の特徴の組み合わせが同定され、蛍光染色された血液試料スメアが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである。

【００４５】

本発明のさらなる態様において、本明細書において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後および／または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法が提供される。当業者によって理解されるように、種々の癌は、その病理に従って分類および病期分類され得る。本明細書に記載の方法によって、例えば、癌の有無の確認、癌の同定、癌の病期の分類、癌の結果または予後および任意の治療に対する癌の応答の予測および／または測定が可能になる。該方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも２つの切片を得る工程を含む。少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する。少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する。各蛍光標識試薬は、バイオマーカーに特異的である。蛍光標識試薬のパネルは、i)少なくとも4種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；ii)少なくとも4種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；iii)A)少なくとも3種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、およびB)少なくとも3種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬の組み合わせ、ならびにiv)上記の組み合わせからなる群より選択され得、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出するような蛍光標識試薬を含む。バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、組織学的に染色された切片を少なくとも第１の光学様式で画像化して第1の組のデータを作製する工程、および蛍光標識された切片を少なくとも第２の光学様式で画像化して第２の組のデータを作製する工程をさらに含む。第1の組のデータおよび第２の組のデータを解析して、第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定されるように、少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定する。5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールであり、したがって、該方法により、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが作製さ

れ、ここで、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる。一態様において、癌は乳癌である。

【００４６】

さらなる態様において、癌細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬により、例えば、HER2/neu、エストロゲンレセプター(ER)、Ki-67、Cox-2、p16などの癌細胞マーカーが検出される。別の態様において、移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬により、NK細胞バイオマーカーなどの移動性免疫細胞バイオマーカー、LAK細胞バイオマーカー、TRAIL、PD1、免疫細胞アポトーシスのバイオマーカーなどが検出される。さらなる態様において、特徴は、移動性免疫細胞バイオマーカーによって検出される種々の移動性免疫細胞サブタイプの比であって、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後、癌の非存在およびその組み合わせを示すような比である。

【００４７】

さらなる態様において、1つ以上の組織試料は、癌であることが疑われるか、癌であることが既知の癌性組織、リンパ節およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【００４８】

移動性免疫細胞は、典型的に、白血球(white blood cell/leukocyte)である。一態様において、移動性免疫細胞バイオマーカーの例としては、限定されないが、腫瘍、腫瘍排出リンパ節、非センチネルリンパ節および末梢血中の特定の移動性免疫細胞のパーセンテージおよび比が挙げられる。正常な血液中の移動性免疫細胞の例としては、(1)T細胞(種々のサブタイプ)、B細胞(種々のサブタイプ)、およびナチュラルキラー(NK)細胞を含むリンパ球(白血球の25%)；(2)好中球（白血球の65%)；(3)好酸球(白血球の4%)ならびに(4)マクロファージ(種々のサブタイプ)を含む単球(白血球の6%)が挙げられる。一態様において、細胞システム生物学プロファイリングのための組織内の免疫細胞のパーセンテージ範囲は、以下：約1%～約90%のリンパ球(当業者によって認識されるように、このパーセンテージの範囲には種々のサブタイプを含む)；約1%～約90%の好中球；約0.01%～約50%の好酸球；約0.01%～約50%の単球(当業者によって認識されるように、このパーセンテージの範囲には種々のサブタイプを含む)の1つ以上を含む。本発明の別の態様において、細胞システム生物学プロファイリングのための組織内の免疫細胞の比の範囲は、以下：約0.1～約1000のT細胞リンパ球/B細胞リンパ球；約0.01～約1000の樹状細胞/リンパ球；約0.01～約1000のマクロファージ/リンパ球；約0.01～約1000のリンパ球サブセット/リンパ球サブセットの1つ以上を含む。

【００４９】

本発明またさらなる態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後および／または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。該方法は、少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得る工程、および少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程を含む。各蛍光標識試薬はバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出する。バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法は、蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式で画像化して、第3の組のデータを作製する工程をさらに含む。第3の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定し、ここで、5つ以上の特徴は、少なくとも1つの血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールである。したがって、該方法により、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製される。一態様において、少なくとも1つの末梢血試料は、1つ以上の組織試料を得たときと同じまたは異なる時点で採取される。別の態様において、1つより多くの末梢血試料が異なる時点で採取され、1つより多くの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される。

【００５０】
本発明のまたさらなる態様において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後および／または癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法は、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作製する工程をさらに含む。該方法は、1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得る工程、および少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色で標識して組織学的に染色された血液試料スメアを作製する工程を含む。該方法は、少なくとも1つの血液試料スメアを、各蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であるような蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製する工程をさらに含む。蛍光標識試薬のパネルは少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。該方法はまた、組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式で画像化し、第3の組のデータを作製する工程、および蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第４の光学様式で画像化し、第4の組のデータを作製する工程を含む。第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の血液試料スメアの細胞システム生物プロフィールとなるように少なくとも約5つまたはそれ以上の特徴を同定し、第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定される。したがって、該方法により、1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の(one the or more)末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作製され、ここで、癌の有無、癌の病期、癌の診断、癌の予後または(of)癌の非存在に関して組織試料がプロファイルされる。一態様において、1つ以上の末梢血試料は、1つ以上の組織試料を得たときと同じまたは異なる時点で採取される。別の態様において、1つより多くの末梢血試料は、異なる時点で採取され、1つより多くの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが比較される。

【００５１】
本発明の別の態様において、本明細書において、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作製する方法であって、組織毒性の存在、重篤度または非存在に関して組織試料がプロファイルされる方法が提供される。該方法は、1つ以上の組織試料から少なくとも２つの切片を得る工程を含む。少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製し、少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルであり、蛍光標識された切片を作製する。各蛍光標識試薬は、バイオマーカーに特異的である。蛍光標識試薬のパネルは、i)細胞代謝バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、ii)DNA損傷バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、iii)細胞形態バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、iv)DNA損傷バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、v)細胞分化バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、vi)ストレス誘導型の転写活性化または抑制バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、vii)ストレスキナーゼバイオマーカーのリン酸化状態に特異的な一組の蛍光標識試薬、viii)アポトーシスまたはネクローシスバイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、ix)細胞骨格バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、x)オルガネラバイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬、xi)免疫細胞バイオマーカーの存在または活性化に特異的な一組の蛍光標識試薬、ならびにxii)その組み合わせからなる群より選択され、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも約4つの異なるバイオマーカーを検出するような一組の蛍光標識試薬を含み、ここで、バイオマーカーの検出は、細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである。組織学的に染色された切片を少なくとも第１の光学様式で画像化して第1の組のデータを作製する。蛍光標識された切片を少なくとも第２の光学様式で画像化して第２の組のデータを作製する。該方法は、第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して少なくとも約5つ以上の特徴を同定する工程をさらに含み、ここで、第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれで少なくとも1つの特徴が同定される。5つ以上の特徴の組み合わせは、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである。した

がって、該方法により、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールが作製され、ここで、組織毒性の存在、重篤度または非存在に関して組織試料がプロファイルされる。一態様において、1つ以上の組織試料は、1つ以上の肝臓組織試料である。

【００５２】

当業者によって理解されるように、本明細書に記載の本発明の方法は、多くの適用に使用され得る。本発明は、本明細書においてその一部の概要を示す現在実施されている技術を発展させる。

【００５３】

病理学、毒性学および個別医療における染色および透過光画像化：病理学者および毒性学者が切片を見て、経験と知識に基づいた決定を行なう必要性を満たすため、病理学および毒性学における組織切片の染色および画像化のための標準的な組織学的方法が開発された。H&E(ヘマトキシリンおよびエオシン)、コンゴレッド、細菌のグラム染色などの染色により、種々の細胞型および構造を標識するため、および解釈を容易にするための手段が提供される。熟練病理学者は、染色パターンの解釈を学習できるが、このパターンの解釈を自動化するための作業には、多くの困難が伴ってきた。蛍光標識技術は、特に、抗体または他の分子特異的バイオマーカーもしくはタグ、例えばアプタマーと組み合わせる場合、細胞成分の非常に特異的な標識、バックグラウンドに対して高いシグナル、単一の被検物質上の多数の標識の識別能、および各細胞内の比較的少数の標的の検出能を可能にする。これらの性質は、自動画像化について蛍光をほぼ理想的なものとするが、視覚的解釈における蛍光の使用は、色あせ、目のスペクトル応答の制限、および目のダイナミックレンジの制限のため、より制限されている。病理学を自動化するための活動は、主に、病理学者によって使用されている染色および解釈方法によって導かれた。

【００５４】

組織切片からの画像の取得および管理を自動化するためのソフトウェアツールが開発されている。例えば、Bacus Laboratories, Inc. (Chicago、IL)では、透過光組織切片および組織アレイを解析するソフトウェアが、画像共有および遠隔解析のためのソフトウェアツールとともに開発された。

【００５５】

薬物発見：平均すると、製薬会社は、新規薬物を市場に出すのに10億ドル以上を費やすが、この大きな時間と資源の投資にもかかわらず、薬物が不充分である頻度は高い。不充分な有効性および薬物誘導毒性は、これらの不充分性の主な原因であり続ける[11、12]。さらにまた、多くの候補薬物は、後に、開発に相当な投資をしたにもかかわらず、動物試験または臨床試験で不合格となる。明らかに、薬物発見、ならびに環境衛生および工業安全性などの他の分野において、機能評価の改善された方法が必要である。有効性および毒性研究は、薬物開発、例えば、細胞系アッセイ、ADME動物研究および臨床試験中数回の時点で行なわれる。組織分析の信頼性における改善により、薬物試験の信頼性および安全性の改善が期待される

【００５６】

個別医療：ゲノミクスおよびプロテオミクスは、個々の各患者にカスタマイズされる診断的および治療的処置の基礎となっている。この個別医療は、疾患に対して全患者のプロフィールを考慮するシステムアプローチに基づき、最も有効な治療を決定する[2]。ゲノミクスおよびプロテオミクスから導かれた分子情報、特に、特定の疾患状態と相関していた遺伝子およびタンパク質から導かれた分子情報は、しばしば、バイオマーカーとよばれ、確実に貴重な患者データ源であるが、治療のカスタマイズは、個々の全てのゲノムについて治療を試験することはできないため、充分特徴付けされた種類のバイオマーカーに限定されている。

【００５７】

環境毒性学：環境毒性学における課題は、リストが増大している天然物質および人工物質のヒトの健康に対する影響を評価することである。いくつかの要素により、問題は複雑化する：増加する多数の物質を試験しなければならない；環境への曝露の複雑性により、

広範な曝露機構、濃度および時間にわたる試験が必要である；ならびに結果に関する年齢および遺伝的ばらつきの影響に関する不確実性。試験の有効性および評価を改善するための信頼性のある手段は、米国立衛生研究所において米国家毒性プログラムで活発に探求されている。

【００５８】

生物医学的研究：細胞分析は、基礎生物学的研究ならびに医学研究において、通常に使用されている。両方の場合において、複雑な多成分系の応答の解析に利用可能なツールが制限されているため、細胞分析は、通常、単一の細胞プロセスに的が絞られる。

【００５９】

システム生物学は、系の成分と経路の相互作用を中心とした新たに出現した研究分野である。

【００６０】

機能評価：インビボ毒性学では、いくつかの領域、例えば、突然変異誘発力、器官細胞傷害性、免疫毒性、神経毒性、催奇形性、および安全性薬理学において急性および慢性の毒性が測定される。CYP450誘導、エイムス試験、MTTアッセイなどのインビトロ毒性学アッセイは、これらの機能的応答を測定するために使用される。インビトロ毒性学アッセイは、典型的に、種々の細胞型、例えば、肝細胞、心筋細胞などを使用する細胞系アッセイである。

【００６１】

トキシコゲノミクスでは、毒性効果と関連する遺伝子発現パターンを同定するために、従来の遺伝学および毒性学の組み合わせが使用される。トキシコゲノミクス プロフィールは、典型的に、ヌクレオチド配列、遺伝子発現レベル、タンパク質合成、タンパク質機能およびいくつかの表現型応答などの情報を含む。トキシコゲノミクスの目的の１つは、毒性生物学的応答を誘導するゲノム事象の流れを同定することである[13]。

【００６２】

細胞傷害性の細胞系アッセイ：細胞傷害性の既存の細胞系アッセイは、細胞集団において特定のエンドポイントを検出するように設計されている。例としては、トリパンブルー染色が挙げられ、生細胞によって排除されるトリパンブルー色素の取込みを測定することにより、細胞死が顕微鏡により評価される。同様に生細胞から排除される他のバイタル染色およびDNA結合色素もまた使用され得る。別のアッセイ形式では、生細胞を、細胞が死ねと放出されるプローブで標識する。毒性はまた、特定の細胞機能を測定することにより評価され得る。より一般的なアッセイの１つはMTTアッセイであり、この場合、ミトコンドリア酵素の活性によって細胞増殖が測定される。他のアッセイでは、特定の細胞マーカーが測定される。例としては、PGE-2、TNFα、IL1bおよび他のインターロイキンなどの炎症と関連するマーカーの活性化の測定が挙げられる。アッセイ形式は、生細胞、固定細胞または細胞抽出物におけるものであり得る。これらのアッセイに使用される多くの同じバイオマーカーが組織系細胞バイオマーカーパネルの成分として有用である。

【００６３】

代謝：代謝に対する薬物の効果は、放射性前駆物質、チミジン、ウリジン(または細菌ではウラシル)およびアミノ酸のDNA、RNAおよびタンパク質内への取込みによって測定される。炭水化物および脂質合成は、適当な前駆物質を用いて同様に測定される。核酸もしくはタンパク質の代謝回転、または特定の細胞成分の分解は、予備標識(またはパルス標識)した後、残留標識の精製工程および定量を行ない、場合によっては、成分の化学物質量を測定することにより測定される。最適細胞増殖に関するエネルギー源代謝もまた解析される。

【００６４】

光学顕微鏡使用法により、細胞の一般状態が示され、トリパンブルー排除と組み合わせると、生存可能細胞の割合が示される。光学的に密な小さい細胞はネクローシスを示し、一方、泡状突起を伴う、膨らんだ「爆発性」細胞はアポトーシスを示す。位相差顕微鏡使用法により、間接光で細胞が見え、反射光は、より詳細な特定の細胞内構造を示す。蛍光

顕微鏡使用法では、選択的色素または特異的抗体で標識した後、細胞内の個々の成分が検出され、代謝状態と関連する細胞の特徴を同定するために使用され得る。

【００６５】

高成分スクリーニング：高成分スクリーニング(HCS)は、1つ以上の細胞の特徴を細胞のアレイで測定および解析して細胞の機能的応答を同定する方法として開発された[5、14、15]。例えば、HCSアッセイは、特定のレセプターの活性化[16]、ミトコンドリア活性 [17]、アポトーシスの発生[5、18]、または別の細胞機能を測定するために使用され得る。

【００６６】

これらの細胞の各特徴は、特定の細胞成分の測定を表す。いくつかのHCSアッセイでは、単一の細胞の特徴は、単一の細胞機能または応答を示すのに充分である。他の場合では、細胞応答を具体的に示すために、いくつかの特徴の測定が必要とされる。例えば、市販のアポトーシスアッセイでは、アポトーシスをより具体的に示すために4つの細胞特徴が使用される。これらの特徴は、アポトーシスの生物学の知識に基づいて解釈される。

【００６７】

多パラメータ細胞傷害性アッセイが、HCS技術のほぼすべての販売元によって開発された。これらのアッセイは、典型的に2～4パラメータアッセイであり、ネクローシスまたはアポトーシスのいずれかによって細胞死に関する細胞の特徴が測定される。これらのアッセイは、薬物発見において、ならびに生物兵器の環境薬剤試験において培養細胞および一次細胞調製物に適用されている[19]。HCSで使用されるバイオマーカーの多くが、組み合わせでも、組織切片および他の組織被検物質において細胞状態の特徴ベクターの成分として使用され得る。

【００６８】

試薬技術：多数の試薬技術が細胞機能のアッセイに利用可能である。蛍光試薬技術はここ20年で成熟し、プローブは、サブ区画の標識、タンパク質の位置決定、膜の標識、膜電位への応答、局所化学物質環境への応答、分子移動の読み出し、および多くの他の測定の提供に利用可能である[20]。抗体と組み合わせると、免疫蛍光標識により、タンパク質またはリン酸化タンパク質などのタンパク質バリアントを検出および位置決定するための容易な方法が提供される。細胞は、任意の蛍光タンパク質の着色バリアントでタグ化されたタンパク質を発現するように操作され[21、22]、これらの蛍光タンパク質は、特定の細胞機能のインジケータであるようにバイオセンサーが作製されるようにさらに操作され得る[16、23～25]。種々の標識が単一の試料調製物と組み合わされ、集団内の個々の各細胞の、ならびに集団全体としての多くの特徴の測定が提供され得る[10、26]。量子ドットは、その単一の励起波長および狭い発光バンドにより、アッセイ内でさらに高度の多重化の可能性を提供する[27]。蛍光プローブの多様性に加え、細胞系アッセイで有効に使用され得る多数の生物発光試薬および化学発光試薬がある[28、29]。

【００６９】

多パラメータ高成分スクリーニングプロフィール：細胞傷害性アッセイのパネル、例えば、DNA合成、タンパク質合成、グルタチオン枯渇、スーパーオキシド誘導、カスパーゼ-3誘導、膜完全性および細胞生存可能性の性能の最近の比較により、これらのアッセイは、平均して、動物研究の予測力の半分したもたないことがわかった[11]。対照的に、ヒト肝細胞を使用する比較的単純な4パラメータ高成分スクリーニングアッセイは、動物系毒性アッセイよりも予測的であることがわかった(O'Brien, P. J.；Irwin, W.；Diaz, D.；Howard-Cofield, E.；Krejsa, C. M.；Slaughter, M. R.；Gao, B.；Kaludercic, N.；Angeline, A.；Bernardi, P.；Brain, P.；Hougham, C, High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. Arch Toxicol 80:580-604 (2006))。

【００７０】

しかしながら、これらのアッセイは独立して実施され、最小活性濃度についてのみ解析され、全体的な予測性を改善するために読み値を任意の定量的様式で組み合わせる試みは行なわれなかった。いくつかの研究により、細胞系アッセイからの多次元細胞応答は、標

準的な方法を用いてクラスター化され、類似した活性を有する化合物が同定され得ることが示された[10、30、31]。これらの研究では、化合物応答をクラスター化するための原理の証拠が示されたが、これらの同定されたクラスターを特定の応答プロフィールと相関させ、次いで、該応答を用いて未知物質の生理学的影響を予測する試みはなされなかった。同様に、組織または他の被検物質の細胞状態の多次元特徴付けを用いて、特定の疾患状態と関連する細胞状態のパターンまたは治療に対する患者応答が確認され得る。

【００７１】

分類ツール：いくつかの市販のアッセイによる使用のための簡単な自動化分類体が開発されている。この分類体により、数種類のアッセイ特徴のアウトプットを1つの結果に組み合わせるためのブール演算の使用が可能となる[32]。これらのブール演算により、アッセイの開発者が数種類の特徴の測定値を組み合わせるアウトプットを規定することが可能となる。これは、いくつかのHCSアッセイの範囲の拡大に有用であるが、限定的な特徴を有し、多面的な特徴の使用により確実に設計されることはなく、それと共に使用することも容易ではない。

【００７２】

患者組織試料の細胞システム生物プロフィールの多重化蛍光：本明細書に記載される発明は、特異的蛍光標識システムと組織マーカープロフィールを作製するための画像取得および画像解析の統合に基づく患者の組織標本を特徴付けるための改善された方法である。また、本発明は、腫瘍病期および他の疾患の病期、ならびに治療に対する応答などの患者の医学的状態を同定するために、組織標本を分類するためのプロフィールの使用を開示する。

【００７３】

本発明の一局面は、従来の組織学的染色および透過光ベースの画像の使用を、分子特異的な蛍光標識バイオマーカーと組み合わせて、形態測定解釈と「細胞システム生物プロフィール」において多重化するバイオマーカーを相関することである。この結果は、装置が高速であり、ソフトウェアが単純である強力な機械学習プラットフォームである。

【００７４】

多くの装置は、組織切片の透過光画像化に利用可能である。例えば、Hamamatsu（Bridgewater, NJ）NanoZoomer装置は、一日当たりに多くのスライドの自動化処理を可能にする。共焦点顕微鏡、広視野画像化、およびHCSシステムを含むスライドの蛍光画像化に、多くの装置が利用可能である。広視野画像化システムおよびHCSシステムは共に、切片の特徴の解像度を向上させるためにソフトウェア解析または構造図示法をさらに使用し得る。したがって、スライドまたはマイクロプレート上の切片において、従来の蛍光レポーターおよびより強力な分子特異的蛍光レポーターの両方を画像化することができる。

【００７５】

図3は、システム生物学、細胞システム生物学、セロミクス、ゲノミクス、プロテオミクスおよびメタボロミクスの関係を図示する。システム生物学は、遺伝子、タンパク質、および生化学経路から開始して生命を生じる、統合されて相互作用するコンポーネントのネットワークと見なされる、生物の研究である。生物学的システムは複雑であるために、システムコンポーネント間の相互作用から創発性が生じる。これらの創発性は、コンポーネントの特性からは予想されない特性ではあるが、コンポーネント間の相互作用の結果であり、そのため測定および解析についてのシステムアプローチを必要とする。

【００７６】

細胞システム生物学は、生命の基本的な単位としての細胞の研究である：統合されて相互作用する遺伝子、タンパク質および生化学反応のネットワークは、機能および生命を生じる。細胞は最も単純な機能的生物システムであるので、そこから生物システムに関する知識を抽出するための理想的なシステムである。細胞システム生物学は、細胞コンポーネントの相互作用が細胞機能に寄与する複雑な生化学的かつ分子的なプロセスをどのようにして生じるのかを理解するために、細胞解析技術の適用を伴う。これらの細胞機能には、環境変化および実験処理に対する細胞の複雑な応答行動が含まれる。図3に図示されるよ

うに、細胞システム生物学はシステム生物学の構成要素である。

【００７７】

本発明は、血液を含む、組織調製物、例えば切片、スメアおよびその他の細胞組織調製物の細胞および/または組織特徴の「システムベース」パネルまたは測定値のパネルから、ヒトを含む高等生物の生物学的状態を同定するための方法に関する。同一の試料中の測定値の「システムベース」パネルは、個体または測定値に対するわずかなパラメーターおよび調査される組織由来のその後のシステム応答プロフィールの解析に焦点を当てた本発明の方法を劇的に拡大する。本発明の方法はまた、組織システムプロフィールに基づく生物学的状態の類似性および作用の予想様式を定量するための手段を提供する。薬物開発および環境衛生における動物試験、医学的診断およびヒト臨床試験などの、本発明の使用から利益を得る多くの応用が存在する。この技術の適用は、薬物開発の効率を向上し、コストを低減する。本発明はまた、環境毒性試験の効率を向上させる。

【００７８】

本発明は、プロトコル、試薬パネル、データベースおよびインフォマティクスソフトウェアなどの種々の態様を含む。

【００７９】

図5は、毒性をプロファイルするために使用されるアッセイ機能分類のパネルを含む本発明の態様の例を図示する。これらの機能分類には、ストレス経路、オルガネラ機能、細胞周期段階、形態変化、アポトーシスおよびDNA損傷が含まれる。そのほかの機能分類は、当業者に理解されるように、毒性評価およびこの方法のその他の機能的応用に使用することができる。本発明の方法は、本発明の特定の態様の感度、特異性または利用可能性の範囲を改善するためのプロフィールに追加可能なさらなるアッセイおよび機能分類の検証に使用することができる。

【００８０】

これらのアッセイ機能分類のそれぞれにおいて、1つ以上のアッセイを選択して、アッセイ機能分類の応答の指標として、組織中の細胞の1つ以上の細胞システム生物特徴の測定に使用する。細胞システム生物特徴測定値がどのようにして細胞または組織上に作製され得るかを説明するために、アレイ中の細胞について、複数の特徴を有する同様の高成分スクリーニングアッセイを図6中に説明する。この例示的アッセイにおいて、多重化された高成分スクリーニングのそれぞれのチャネル由来の代表的な画像を示す。画像から情報を抽出して、核の大きさおよび形状、細胞周期分布、DNA分解、微小管細胞骨格の状態、腫瘍サプレッサーp53の活性化状態、およびヒストンH3のリン酸化状態、細胞周期の制御に含まれるタンパク質などの、少なくとも4種類の細胞特徴のアウトプットを作製するためにアルゴリズムを使用する。アッセイは2つ以上のアッセイプレート中で組み合わせて、6個以上の特徴を有する化合物プロフィールを作製することができる。複数のアウトプット特徴を有する画像解析アルゴリズムを含むこのようなアッセイは、種々の市販供給源、特にCellomics（Pittsburgh, PA）、GE Healthcare（Piscataway, NJ）、Molecular Devices（Sunnyvale, CA）およびその他などのHCS技術業者から入手可能であり、任意の標準的画像解析ソフトウェアパッケージのいずれか1つにて実施され得る。市販アッセイおよび特注で開発されたアッセイの組み合わせからのアウトプット特徴を組み合わせて、1つの応答プロフィールを作製する。一態様において、図5の少なくとも約4種類の機能分類からアッセイを選択し、高レベルの統合機能を予想するための十分に広いプロフィールを提供する。本発明の一態様は、これらの機能分類の1つを有するアッセイのパネルを使用する。これらそれぞれのアッセイは、まず予想される毒性知識ベースを構築するため、その後試験化合物のプロフィールを作製して、知識ベースの分類を比較し、それにより試験物質の毒性影響を予想するために使用される。本発明の別の態様は、より正確なプロフィールを作製するために図5に列挙される全てのアッセイを使用し、その後主成分解析などの統計的方法を使用して毒性パラメーターの選択されたプロフィールについて、最も高い予想潜在性を有する特徴を同定する。

【００８１】

いくつかのプロフィールにおいて、より広範囲に応答に関連する組織を示すために、複数の細胞型が同定および解析される。また、当業者に理解されるように、解析には、組織細胞の一群または組織切片の領域が、形態計測、組成、強度、またはその他の特徴について全体として解析される高出力アッセイにより、個々の組織細胞が測定されるアッセイの組み合わせが含まれ得る。

【００８２】

図7および8は、本発明の2つの態様についてのフローチャートを示す。図7および8の手順は別々の手順を示す。図7の手順は、組織プロフィールデータベースを集合させ、組織学的測定に関連する応答プロフィールの分類を作製するために使用される手順を示す。図8の手順は、分類組織を予測して、医学的状態を同定するためのプロフィールデータベースを使用する方法を示す。図8の手順は以下の工程を含む：1.スライドまたは他の担体上に組織試料を調製する。2.組織切片を固定して目的のバイオマーカーに特異的な標識で染色する。3.スライドを、HCSリーダー、高出力スライドスキャンリーダー、自動顕微鏡またはその他の検出器などの画像化システムで読み込む。4.アッセイアルゴリズムを適用して粗製の画像データをアッセイデータポイントに変換する。5.アッセイデータポイントをクラスター化して応答分類を作製する。6.応答分類を使用して、それぞれの分類についての応答プロフィールを作製する。7.各スライドセットの対照組織標本の細胞について応答プロフィールを確立する。8.応答プロフィールをクラスター化して機能的応答の分類および予測に使用可能な特有のプロフィールを同定する。

【００８３】

図8に示される手順を使用して、生理学的効果について物質を評価する。これは工程の順序を含む：1．スライドまたはその他の担体上に試料を調製する。2．細胞を固定して、目的のバイオマーカーに特異的な標識で染色する。3．HCSリーダー、高出力スライドスキャンリーダー、自動化顕微鏡またはその他の検出装置などの画像化システムでプレートを読む。4．アッセイアルゴリズムを適用して粗製画像データをアッセイデータポイントに変換する。5．アッセイデータポイントに基づいて組織細胞特徴を分類する。6．細胞応答プロフィールに適合する生理学的応答プロフィールについてデータバースを検索する。7．応答プロフィールの類似性に基づいて生理学的応答についての予想を作製する。8．レポートを作成して、物質の応答データに基づいてそれぞれの生理学的応答の可能性を表に記入する。

【００８４】

図7は、組織切片を処理して細胞システム生物プロフィールを作製する全体的な試料の流れを図示する。スライドセットは2つ以上の組織切片を含み、それぞれを細胞システム生物プロフィールの収集に使用する。一組のそれぞれの組織切片から、解析されるそれぞれの波長で、各組織切片の1つ以上の視野由来の画像の画像セットを作製する。画像セットの解析により、一組の細胞システム生物特徴を作製する。細胞システム生物特徴を処理およびクラスター化して、データベースに組み込まれるか、または生理学的応答の有力な様式を同定するためのデータベースの検索もしくは患者の階層化のための優先事項の設定に使用される細胞システム生物プロフィールを作製する。

【００８５】

組織中の細胞の集団は、別々の応答分類を占有し、疾患または治療が進行するに従ってある分類から別の分類へと移動し得る。一例において、細胞システム生物プロフィールは、コルモグロフ-スミルノフ（KS）類似性解析の適用により構築することができる。KS値は集団を特徴づけ、多くの患者由来の試料またはその他の組織供給源由来の試料をクラスター化するために使用することが可能な測定値を提供するための1つの手段である。例えば、KS値に基づく細胞システム生物特徴は、集積クラスタリング（agglomerative clustering）またはその他のクラスタリング法によりクラスター化され、同様の細胞システム生物プロフィールにより組織を同定する細胞システム生物プロフィールを構築し得る。クラスタリングの前にデータを処理するためにKS解析以外の他の方法を使用することができ、種々のクラスタリングアルゴリズムを有用に適合することができる。

【００８６】
図8は、組織試料または組織アッセイのパネルについて応答プロフィールを作製するためにデータフローが使用される本発明の一態様を図示する。公知の状態または医療の結果を有する供給源由来の試料を処理して細胞応答プロフィールを生成し、それを生理学的状態のほかの情報と重ね合わせる。それぞれの組織の組み合わされたプロフィールをクラスター化して、応答の分類を識別するために使用することが可能な特有のプロフィールを同定する。試験試料の分類に使用するために、応答分類をデータベースに保存する。試験組織試料は、次いでデータベースの細胞応答プロフィールに適合する細胞応答プロフィールを生成するために処理され、データベースプロフィールに対する応答の類似性に基づいてデータベース中のそれぞれの参照応答プロフィールについての可能性を計算し、類似性プロフィールを生成する。

【００８７】
アルゴリズム：特注されるか、またはHCS業者もしくは他の画像化ソフトウェア販売元により提供されるアプリケーションソフトウェア中に組み込まれるアルゴリズムは、光学視野内のそれぞれの細胞について細胞内目的物の強度、形状および局在などの複数の数値的特徴（細胞システム生物特徴）を生成する。vHCS™ Discovery Toolbox（Cellomics, Inc）、Metamorph（Molecular Devices）、GE Healthcareのソフトウェアおよびその他のHCSならびに画像解析パッケージは、画像のバッチ解析およびその後の画像取得に使用することができる。組織試料およびその調製の種類を条件として、試料当たりの測定される細胞の総数は、通常、細胞応答の不均一性およびアッセイの感度に依存して少なくとも約100～少なくとも約10000の範囲である。アッセイ出力パラメーターの例はアプリケーションソフトウェアの機能を示す。例えば、核の形態の変化を計算するために、それぞれの細胞についての平均核強度値を使用することができる。正常細胞と比較して、核の凝集により大きい平均核強度値が生じ、DNA分解を伴う核の拡大により小さい平均核強度値が生じる。先述したホスホヒストンH3に特異的な抗体で標識した細胞の平均核強度を使用して、ヒストンH3リン酸化の測定値を得る。画像化および細胞解析の当業者は、容易に利用可能な多くのかかるアルゴリズムが存在すること、ならびに細胞/組織機能を測定するために細胞および組織の画像化ベース解析に従った多くのかかる細胞処理が存在することを理解するであろう。

【００８８】
応答のクラスタリングおよび分類：健常組織、腫瘍組織、およびその他の異常組織などの組織の集団において誘導される細胞システム生物特徴応答の差を定量するために、いくつかの異なる方法が効果的に使用可能である。類似細胞の集団または組織中の細胞の集合中で、多くの異なる個々の細胞応答プロフィールが可能であり、細胞応答における周知の不均一性を含む[33、34]。一態様において、組織切片由来の各細胞パラメーターについての細胞システム生物特徴応答分布は、適合解析（fit analysis）のKSの良好性（KS値）を用いて対照と比較することができる[35]。蛍光由来ヒストグラムの有意な変化についての試験を用いて、反復対照試料についてのKS値を計算し、これらのデータを用いて細胞システム生物特徴応答が有意であるとみなされる上述の閾値（例えば臨界値）を設定する[36]。

【００８９】
多重化組織由来の細胞集団分布データの組織特徴における疾患または治療依存的変化または患者に特異的な差の有意検定を実行するために、Peacock [37] に記載され、Fasano and Franceschini [38]によりさらに改良される二次元に、一次元KS検定を適用することができる。細胞システム生物特徴セットの生理学的な二種類のパラメーターを示す二次元細胞集団データ分布を、複数の標本から得られた二次元細胞集団データ分布と比較する。第1に、それぞれの分布を、未処理細胞データ分布から計算されるメジアンx軸値およびy軸値により規定される四分円に分割する。次いで二次元KS値は、全ての4つの四分円にわたる範囲で見られ、それぞれの処理された四分円の細胞の画分とそれぞれの未処理の四分円に対応する細胞の画分の間の最大の差が見られた。

【００９０】
また、組織中の細胞集団の不均一性は、細胞システム生物プロフィールを評価するための他の統計学的方法により解析することができる。本発明の別の態様において、各細胞からの全ての細胞特徴値を組み合わせて、細胞システム生物プロフィールを作製する。細胞システム生物プロフィールは、標準的方法により同定される、実際の測定値、および/または測定された値の主要な成分からなり得る[39、40]。組織細胞のそれぞれの集団および異なる試料由来の細胞システム生物特徴は、標準的方法を使用してクラスター化され[39、40]、細胞システム生物プロフィールが生成される。これらのプロフィールを使用して分類体が構築される。単一の組織試料中、およびそのための同一の医学的状態にあることを特徴とする全ての細胞は、これらの応答分類に分類される。次いで、これらの分類のそれぞれの占有率は、かかる試料についての集団応答プロフィールとなる。一例において、該試料由来の細胞システム生物プロフィールを、参照試料由来の細胞システム生物プロフィール（例えば、毒性応答プロフィール）と結びつけ、データベース中に保存する。試験試料由来の細胞システム生物プロフィールは、データベース中の参照試料の細胞システム生物プロフィールに基づく見込み分類体を使用して分類され、毒物学的応答を予想するかまたは患者を階層化する。他の態様は、代替的な解析アルゴリズムまたは方法を使用して、細胞応答プロフィールをクラスター化し、組織切片の試験セットの公知の特性に基づいて分類体を作製する。

【実施例】

【００９１】
具体的な組織の例として肝臓を使用したヒトおよび動物の正常、疾患および治療組織の組織試料プロファイリングの例：

【００９２】
多数の細胞型で構成される腺である肝臓は、精密に組み合わされた細胞活性により調節される外分泌および内分泌機能の両方を実行する。さらに、肝臓はまた、その多くが肝臓に存在する1つ以上の細胞型に対して毒性を有する薬物およびステロイドの代謝に重要である。肝臓の他の重要な機能としては、トリヨードサイロニンおよびチロキシンの脱ヨウ素化、糖新生および糖原分解、血中の正常グルコース濃度の維持、遊離脂肪酸のトリグリセリドへのエステル化、グリコーゲン、脂肪、および鉄の貯蔵、毒物および過酸化水素の解毒、ならびに子宮内生命の2ヶ月～8ヶ月の間の造血が挙げられる。

【００９３】
従って、肝臓の完全な構造における細胞の細胞システム生物特徴は、正常または疾患組織の最も関連のあるプロフィールの1つ、および化合物が生体システムとしての肝臓上で有する効果を提供する。

【００９４】
他の腺のように、完全な肝臓は、支質および高度に血管形成されて神経支配された実質で構成される。従って、肝臓の組織切片は：
1．鱗状上皮細胞および線維芽細胞-支質の一部を形成
2．神経線維-実質を神経支配するための血管を伴う細胞プロセス
3．毛細管上皮-血管の壁を形成する細胞
4．クッパー細胞-特殊マクロファージ
5．脂肪細胞-トリグリセリドを貯蔵する
6．血液細胞-赤血球、免疫細胞および血小板を含む細胞
7．肝細胞-肝臓における最も主要な細胞型を含む数種類の細胞からなる。肝細胞は上述の肝臓の機能のほとんどを実行する。

【００９５】
腫瘍切片の細胞学に基づく従来の透過光顕微鏡使用法と多重化された蛍光ベースを組み合わせる原理：1．病理学者が直接関連する試験。2．現在のH&E染色された切片の視覚化調査および他の手動で検出可能な組織化学染色により標識された切片の直接比較が可能になる。3．組織の形成が維持され免疫細胞の浸潤の解析が可能になる。4．システムの自動

画像取得の実行が可能になる。5．移動性免疫細胞の存在および活性化の状態とリンパ節および末梢血中の免疫細胞の存在および活性化の状態の相関が可能になる。6．組織系プロフィールデータに基づく組織系プロフィールまたは末梢血プロフィールのいずれか/またはから組織毒性プロフィールを生成し得る。7．多重化、蛍光ベースバイオマーカーが、具体的なタンパク質およびタンパク質の翻訳後修飾、コーディングRNAまたはノンコーディングRNA、およびマイクロRNAを含む特異的RNA種を検出する特異的試薬の組み合わせであり得る。

【００９６】

以下は、疾患または化合物処理に対する肝臓組織のシステム応答をプロファイルするための、種々の組み合わせにおいて組み合わされ得るバイオマーカーのリストである：

1．代謝バイオマーカー：

・シトクロムP450アイソタイプ-肝細胞中の発現レベルおよびアイソタイプの比。

・P糖タンパク質活性-細胞、特に肝細胞外の複数の化合物基質を排出する膜結合タンパク質。

2．DNA損傷バイオマーカー：

・細胞周期調節-組織切片中に含まれる細胞の核内の全DNA含量の分布は、ヘキスト33342、Draq-5、またはヨウ化プロピジウムなどの核標識を使用して測定することができる。

・核形態およびクロマチン凝集-核の損傷はしばしば核の形態の変化またはクロマチンの凝集状態と相関可能である。組織切片に含まれる核のクロマチンの形態（例えば、形状および大きさ）または構造（単位面積当たりの明るさ）は、ヘキスト33342、Draq-5、またはヨウ化プロピジウムなどの核標識を使用して測定可能である。

・8-オキソグアニン - DNAに対する酸化的損傷はしばしばグアニンの酸化アナログを生じる。細胞中のDNAが損傷されたという8-オキソグアニンシグナルの上昇。

・DNA修復タンパク質（APE/ref-1）の活性化-肝細胞またはDNAを含む肝臓中の他の任意の細胞中のDNAは疾患または化合物処理により損傷し易い。細胞中のDNA損傷応答機構が活性化されたというAPE/ref-1シグナルの発現レベルの変化。

・ヒストンH2A.Xリン酸化-肝細胞またはDNAを含む肝臓中の他の任意の細胞中のDNAは、疾患または化合物処理により損傷し易い。細胞中のDNA損傷応答機構が活性化されたというヒストンH2A.Xシグナルのリン酸化。

・p53タンパク質活性化。

・Rbタンパク質リン酸化

3．細胞形態および分化バイオマーカー：

・細胞拡散および肥大

・細胞-細胞または細胞支質の接着

・新規血管の脈管形成

・神経支配神経線維のリモデリング

4．ストレス誘導型転写因子活性化または抑制バイオマーカー：

・NF-κB

・ATF-2

・CREB

・AP-1

・MSK

・NFAT

・Stat1、2、3

・Oct-1

5．ストレスキナーゼバイオマーカーのリン酸化状態の変化：

・ERK

・JNK

・p38

・RSK90

・MEK
6．アポトーシスまたはネクローシスバイオマーカーの誘導：
・DNA含量および分解
・核形態
・カスパーゼ活性化（複数のサブタイプ）
・ミトコンドリア機能（質量-電位）
・Baxのミトコンドリアへの移行
・ミトコンドリアのシトクロムcの放出
・PARP活性化
7．細胞骨格バイオマーカーのリモデリング：
・アクチン細胞骨格の安定性
・微小管細胞骨格の安定性
8．オルガネラ形態バイオマーカー：
・ミトコンドリアの大きさ、数、および形状
・ゴルジ体の大きさおよび局在
・ペルオキシソームの大きさおよび数
・グリコーゲン粒子の大きさおよび数
・リソソームの大きさおよび数
・脂肪滴の大きさおよび数
・内質小網の形状および局在
・タイトジャンクションの数および局在
9．免疫細胞の存在および活性のバイオマーカー：
・肝細胞、リンパ系、および血液供給中の特定の移動性免疫細胞の割合および比率。
・抗腫瘍および腫瘍支持機能のいずれかを反映する肝臓癌組織の重要な免疫細胞の表現型。
・免疫細胞のアポトーシス
・TRAILなどのデスレセプターリガンドの発現
・リンパ球中のPD1などの免疫細胞機能不全に関連するバイオマーカーの発現
・抗腫瘍サーベイランスを特徴付けるためのNKおよびLAK細胞活性

【００９７】

組織調製の例：一態様において、マウスまたはラットなどの小動物を1種類以上の試験化合物で種々の時間（1分～21日）処理する。別の態様において、糖尿病、癌などの代謝モデルを含む疾患の小動物モデル、または肝臓に直接もしくは間接的に関連する他のモデルを使用する。さらに別の態様において、疾患または化合物処理患者由来のヒト肝臓を使用する。正常、疾患および処理組織試料を調製する。組織試料は凍結切片またはホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片のいずれかで処理する。また、組織試料は遺伝子発現解析についても得る。

【００９８】

明確さについて、他の主要な組織型を同様に処理する。一般的な細胞応答およびより組織特異的な応答の両方のバイオマーカーのパネルが生成され適合される。

【００９９】

肝臓組織バイオマーカーの最良の組み合わせ（多重化）は、最適化された組織の細胞システム生物プロフィールを生成するために重要である。最良の数の（number of number of）の多重化バイオマーカーは、約4～約12バイオマーカーの範囲である。正常、疾患および処理組織試料を調製する。凍結切片またはホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片のいずれかで組織試料を処理する。また、組織試料は遺伝子発現解析についても得る。

【０１００】

1．以下は肝臓組織解析の例である：
a．遺伝子発現プロファイリングは、「正常」肝臓組織と疾患または化合物処理動物由来の組織を比較するように実施する。

b．遺伝子発現インフォマティクス-遺伝子発現プロフィールは、疾患または化合物処理の機能としての遺伝子発現を特徴付けるためおよび遺伝子産物を同定するためのインフォマティクスツールにより解析される。
c．遺伝子産物は公知の参照ポイントに基づいて正常肝臓組織よりも優先され、その後抗体を取得するか作製して試験パネルを作製する。
2．組織学的染色および重要なバイオマーカーの組み合わせを「機能的」バイオマーカーの蛍光ベース免疫細胞化学について多重化する：
a．複数の5μm切片を肝臓組織から調製する。第一の切片をH&Eまたは従来の病理解析についての他の組織学的染色で標識する。多重化蛍光ベース細胞学について、連続切片を処理する。
b．遺伝子発現プロファイリングに基づく潜在的バイオマーカーのパネルに加えて、重要な移動性免疫細胞（リンパ球（例えば、CD3およびCD8）を含む）についての抗体の多重化したパネルによりいくつかの切片を標識する。免疫細胞活性化のレベル、濃度および器官形成はプロフィールの重要な要素である。

【０１０１】

肝臓組織をプロファイルするためのバイオマーカー組み合わせの例：一態様において、肝臓組織切片を2つ以上のバイオマーカーについて標識して、非疾患性と疾患性または未処理動物と処理動物の間の差をプロファイルする。組織のシステムプロフィールについて幅をもたらすために、広範囲な組織機能のバイオマーカーが好ましい。一態様におけるバイオマーカーの数は約4～約10バイオマーカーであり、同一の組織切片を複数のバイオマーカーで標識する事が可能である。これにより同一の細胞におけるいくつかのバイオマーカーの比較が可能となる。

【０１０２】

一つの例において、ラットを、パクリタキセルまたはカンプトセシンなどのアポトーシス誘導化合物で、約30分～約21日間、約1μg/kg～約100mg/kgの複数の用量で処理する。処理後、動物を屠殺して肝臓組織を凍結して切片化するか、または切片化の前に標準的方法を使用してホルムアルデヒドなどの化学物質で固定してパラフィンを含浸させる。次いで、1つ以上の切片でヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色を実施して、従来の透過光ベース病理解釈のための試料を提供し得る。他の連続切片は、画像ベース解析について蛍光免疫試薬および生理学的インジケーター色素の組み合わせで標識し得る。例えば：
連続切片#1
1．核を標識して核形態、細胞周期調節、クロマチン凝集の測定を提供するためのヘキスト33342。
2．酸化DNA損傷のバイオマーカーとしての抗ホスホヒストンH2A.X
3．DNA損傷応答のバイオマーカーとしての抗p53。
4．ストレスキナーゼ誘導のバイオマーカーとしての抗ホスホc-jun。
連続切片#2
1．ヘキスト33342
2．ミトコンドリア数、大きさ、形状のバイオマーカーとしての抗シトクロムc
3．微小管細胞骨格リモデリングのバイオマーカーとしての抗αチューブリン。
4．アクチン細胞骨格リモデリングのバイオマーカーとしての蛍光標識ファロイジン。
連続切片#3
1．ヘキスト33342
2．細胞周期チェックポイント活性のバイオマーカーとしての抗ホスホレチノブラストーマタンパク質。
3．炎症関連細胞シグナリングのバイオマーカーとしての抗NF-κB。
4．組織へのリンパ球浸潤のバイオマーカーとしての抗CD3。
連続切片#4
1．ヘキスト33342
2．アポトーシスのバイオマーカーとしての抗活性化カスパーゼ3。

3．ペルオキシソームの大きさおよび数のバイオマーカーとしての抗PMP70。
4．肝細胞代謝活性のバイオマーカーとしての抗シトクロムP450。

【０１０３】

乳癌についての患者試料プロファイリングの例：癌は、より良好な診断および治療について個々の患者のより良好な階層を作製するためのシステム生物学アプローチを必要とする、システム生物学疾患である。癌はまた、全範囲の免疫応答を伴う炎症プロセスである。従って、腫瘍は、進行の異なる病期の癌細胞、正常細胞、ならびに樹状細胞、マクロファージおよびリンパ球などの移動性免疫細胞の浸潤の組み合わせを含む。そのために、腫瘍「細胞システム生物」特徴は、腫瘍細胞バイオマーカーおよび免疫細胞バイオマーカーの組み合わせであるはずである。腫瘍細胞システム生物についての鍵は、多重化された癌細胞についての腫瘍バイオマーカーおよび患者をより良好に階層化する免疫細胞の多重化されたパネルの使用である。また、リンパ節および末梢血細胞解析の相関により、循環免疫細胞が、非常に単純な血液試験を作製し得る腫瘍特異的な情報を有するかどうかが決定される。血液中の移動性免疫細胞の数、種類および活性化のレベルはまた、腫瘍自体の「窓」となり得る。

【０１０４】

腫瘍切片の従来の透過光顕微鏡および多重化蛍光ベース細胞学の組み合わせの原理：1．病理学者が直接関連する試験。2．H&E染色された切片の現在の視覚化調査および形態測定解析により病期決定された腫瘍の直接的な相関が可能である。3．単一の「機能的タンパク質」バイオマーカーとしてHer2/Neuの成功を構築するが、これは患者の小サブセットを同定するだけである。4．組織形成を維持することで、免疫細胞の侵入が可能になる。5．多重化された乳癌バイオマーカーおよび移動性免疫細胞の存在および活性化の状態を含む腫瘍の「システム」プロフィールの開発が可能である。6．システムの自動画像定量の実行が可能である。7．移動性免疫細胞の存在および活性化の状態とリンパ節および末梢血中の免疫細胞の存在および活性化の状態を相関する事が可能である。8．いずれか/または組織系プロフィールまたは組織系プロフィールデータに基づく末梢血プロフィールから階層化および診断試験を生成することが可能である。9．多重化蛍光ベースバイオマーカーは、細胞中の特異的タンパク質およびタンパク質の翻訳後修飾、マイクロRNA、コーディングRNAまたはノンコーディングRNAのいずれかを含む特異的RNA種を検出する試薬の組み合わせであり得る。

【０１０５】

細胞および組織中の特異的なタンパク質発現および活性化の状態ならびに特異的マイクロRNAの存在の測定は、重要な「機能的」読み出しである。遺伝子の発現は、システム生物学の唯一の要因であり、本発明のゲノム試験は、何ら機能的な情報を伴うことのないただの遺伝子発現の相関である。細胞の機能は、主に、その発現レベル、細胞内局在および翻訳後修飾が正常および異常な機能の原因となるタンパク質によって実行される。特異的マイクロRNAはまた、疾患特異的であることが示されており、制御タンパク質と同様に遺伝子発現の制御に重要である。また、腫瘍は、正常細胞、遺伝的に変化した癌細胞の範囲および移動性免疫細胞の複雑な統合であるシステムである。従って、複数のタンパク質および/またはマイクロRNAバイオマーカーの細胞システム生物プロフィールが重要である。

【０１０６】

乳癌における免疫系の重要性の背景：癌発生の初期段階で、免疫系は機能不全となり、転移性の疾患をもたらす癌の病期進行の間中それが続く。移動性の免疫細胞は、後炎症性サイトカインおよび走化性因子により、成長中の腫瘍に引き付けられる。腫瘍侵入性のリンパ球は、腫瘍の成長を実際に促進する成長因子およびサイトカインを放出し、抗腫瘍性機能が弱まるかまたは存在しなくなる。腫瘍中に存在する樹状細胞および腫瘍関連マクロファージは、腫瘍成長の支持的役割を示す表現型を表す。調節性T細胞は、患者の腫瘍および腫瘍排出リンパ節および末梢血中に蓄積する。これらの後者の細胞は、「自己認識」免疫プロセスの一部として実際に腫瘍細胞を保護する。従って、免疫系は、ほぼ腫瘍促進系となり多くの癌の進行および転移を支持する。

【０１０７】
腫瘍試料由来の遺伝子発現フィンガープリントは、乳癌のサブタイプの識別、およびいくつかの予後的指標の割り当てに使用されている。これらの遺伝子発現プロフィールは、通常、移動性免疫細胞の侵入を示す、遺伝的プロフィール「サイン（signature）」を同定する。望ましくないことに、全体的な組織構造および腫瘍細胞-移動性免疫細胞構造の関係が消失するために、遺伝子発現プロファイリングなどの方法において、解離性の腫瘍試料、「システムとしての腫瘍」は消失する。
【０１０８】
腫瘍「システム」は病理学および腫瘍学において標準的である、移動性免疫細胞および癌細胞の両方のより機能的なパラメーターの多重化された蛍光ベースバイオマーカーと一緒になった従来の透過光染色の統合された使用により解析および定量する事ができるので、患者の階層化および診断試験に使用される組織マイクロアレイ（TMA）を含む組織切片は価値のあるものである。従って、病理学からの従来の情報は、多重化された蛍光を使用するバイオマーカーのパネルと組み合わせることがきる。
【０１０９】
原発性の腫瘍に加えて、腫瘍排出リンパ節および非センチネルリンパ節は、「機能的細胞システム生物サイン」を補助し得る腫瘍および免疫系相互作用の重要な場所である。例えば、腫瘍排出リンパ節中の腫瘍細胞の存在は、リンパ節中の免疫細胞の種類および数に影響する。さらに、CD4 T細胞および樹状細胞の計数が乳癌患者の生存の予測に使用されることが示されているので、非センチネル補助リンパ節も、局所的な腫瘍の成長に影響を受け得る。また、循環白血球、循環T細胞およびその他の免疫細胞の解析によっても、末梢免疫系における腫瘍の進行を観察できることが明らかである。従って、腫瘍「系」およびリンパ節「系」に相関のある末梢血中の患者の循環免疫細胞の解析は、腫瘍、リンパ節および血液における有力な試験を生成するための極めて良好な機会を生じる。
【０１１０】
以下は、乳癌についての最適な病期決定および診断のための様々な組み合わせにおいて、組み合わせが可能なバイオマーカーのリストである（一態様において、癌細胞および免疫バイオマーカーの組み合わせは最も適切である）：
【０１１１】
癌細胞バイオマーカーの例：
・Her2/Neuタンパク質（現在単一のバイオマーカーとして使用されている）
・エストロゲンレセプタータンパク質（ER）
・Ki-67
・Cox-2
・P16
・主要なタンパク質または癌プロセスに相関するタンパク質の翻訳後修飾の増加数
・特定の癌に関連するマイクロRNAの増加数
【０１１２】
免疫バイオマーカーの例：
・腫瘍、腫瘍排出リンパ節、非センチネルリンパ節および末梢血中の特異的な移動性免疫細胞の割合および比率
・抗腫瘍機能または腫瘍支持機能を反映する、乳癌患者における主要な免疫細胞型の表現型
・免疫細胞のアポトーシス
・TRAILなどのデスレセプターリガンドの発現
・腫瘍侵入性リンパ球中のPD1などの免疫細胞機能不全に関連するバイオマーカーの発現。
・抗腫瘍サーベイランスを特徴付けるためのNKおよびLAK細胞活性
【０１１３】
特に腫瘍における、癌細胞および免疫バイオマーカーの最適な組み合わせ（本明細書に

おいては多重化ともいう）は、患者の最適な細胞システム生物プロフィールの作製に決定的である。一態様において、多重化バイオマーカーの数の最適な数は約4～約12バイオマーカーである。

【０１１４】

技術工程：正常患者物質および乳癌陽性患者物質を調製する。患者の腫瘍試料は、凍結切片またはホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片として処理する。さらに、リンパ節試料は原発性腫瘍と同様に処理する。また、遺伝子発現解析について腫瘍から試料を得る。移動性免疫細胞はまた、フローサイトメトリーまたは画像サイトメトリーの両方のために血液試料から分離する。以下は本発明の一方法の工程の概要である：

1.患者腫瘍試料-従来の方法で、遺伝子発現プロファイリングにより「正常」組織と病期決定患者腫瘍を比較する。

2．遺伝子発現インフォマティクス-乳癌の病期の関数として遺伝子発現を特徴付けるためおよび遺伝子産物を同定するためのインフォマティクスツールにより遺伝子発現プロフィールを解析する（参照としてHer2/Neuを使用する）。

3．遺伝子産物はHer2/Neuを含む公知の参照点に基づいて優先され、その後試験パネルを作製するために抗体が取得または作製される。

4．選択される癌細胞バイオマーカーの組み合わせが蛍光ベース免疫組織化学について多重化される。

5．複数の5ミクロン組織切片を腫瘍試料から調製する。第一の切片は病理学者による従来の病期決定のためにH&Eについて染色される。多重化蛍光ベースサイトメトリーのために連続切片を処理する。

6．遺伝子発現プロファイリングに基づいた潜在的癌細胞バイオマーカーのパネルに加えて、いくつかの切片を、リンパ球（例えば、CD3および/またはCD8）を含む主要な移動性免疫細胞に対する抗体の多重化パネルで標識する。免疫細胞活性化のレベル、濃度および形成はプロフィールの重要な要因である。

【０１１５】

腫瘍、腫瘍排出リンパ節、非センチネルリンパ節および末梢血における特異的な移動性免疫細胞の割合および比率を計算して使用し、細胞システム生物プロフィールを構築する。組織中の免疫細胞の例示的割合範囲は以下の通りである：

リンパ球：1％～90％（この割合中の明確なサブタイプ）

好中球：1％～90％

好酸球：0.01％～50％

単球：0.01％～50％（この割合中の明確なサブタイプ）

細胞システム生物プロフィールについての組織中の免疫細胞の比率の例示的範囲：

T細胞リンパ球サブタイプI/T細胞リンパ球サブタイプII：0.01～1000

T細胞リンパ球/B細胞リンパ球：0.1～1000

樹状細胞/リンパ球：0.01～1000

マクロファージ/リンパ球：0.01～1000

リンパ球サブセット/リンパ球サブセット：0.01～1000

【０１１６】

患者試料を病期I～病期IVまで適切に階層化するバイオマーカーの最適な組み合わせは、新規の患者をプロファイリングするために選択される。新規の患者は末梢免疫細胞と腫瘍組織およびリンパ節切片の直接相関を可能にする。

【０１１７】

アルツハイマー病のバイオマーカーについて脳組織のプロファイリングの例：

この態様において、ヒト脳組織を得て、固定および切片化する。一組の切片を1つ以上の染色剤で標識して、アルツハイマー病の病理に関連する組織中の形態学的構造を可視化する。一例において、銀染色を使用して、神経突起プラークおよび神経原線維変化を有する神経などのアルツハイマー病の特徴（hallmark）を可視化する[41]。薬物による治療前、最中またはその後の複数の患者からの銀染色した組織の解析により、その後プロフィー

ルに組み込まれるデータが提供される。

【０１１８】

第2の態様において、同じ患者由来の同じ組織切片の別のサブセットを、同一の組織切片または同一の組織試料由来の連続切片のいずれかで2つ以上のバイオマーカーを標識するための試薬と反応させる。免疫蛍光アプローチを用いて標識可能なバイオマーカーの例としては、Aβ42、Aβ40、フォン ヴィレブラント因子、および微小管結合タンパク質tauが挙げられる[42]。そのほかのバイオマーカーも可能である。これらにはリン酸化APP（アミロイド前駆体タンパク質）および非リン酸化APPが含まれる。さらに、プロフィールにはその他の生物プロセスのバイオマーカーが含まれ得る。1人の患者由来の組織中で測定される複数のバイオマーカー標識から構築されるプロフィール、または複数の患者組織試料中で測定されるバイオマーカー標識から構築されるプロフィールをクラスター化して、可能性のある患者の結果、または薬物処理に対する機能的応答、またはその両方の組み合わせを分類および予想するために使用することができる特有のプロフィールを同定する。

【０１１９】

【表１－１】

参考文献

1. Hood, L. and R.M. Perlmutter, The impact of systems approaches on biological problems in drug discovery. Nat Biotechnol, 2004. 22(10): p. 1215-7.

2. Hood, L., et al., Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science, 2004. 306(5696): p. 640-3.

3. Taylor, D.L., et al., Potential of machine-vision light microscopy in toxicologic pathology. Toxicol Pathol, 1994. 22(2): p. 145-59.

4. Schroeder, K.S. and B.D. Neagle, FLIPR: A New Instrument for Accurate, High Throughput Optical Screening. J Biomol Screen, 1996. 1(2): p. 75-80.

5. Giuliano, K.A., et al., High-Content Screening: A New Approach to Easing Key Bottlenecks in the Drug Discovery Process. J Biomol Screen, 1997. 2(4): p. 249-259.

6. Dow, A., S.A. Shafer, and A.S. Waggoner. Morphological segmentation of multiprobe fluorescence images for immunophenotyping in melanoma tissue

【表１－２】

sections. in Intelligent Robots and Computer Vision XII: Algorithms and Techniques. 1993: SPIE.

7. Dow, A.I., et al., Automatic multiparameter fluorescence imaging for determining lymphocyte phenotype and activation status in melanoma tissue sections. Cytometry, 1996. 25(1): p. 71-81.

8. Galbraith, W., et al., Imaging cytometry by multiparameter fluorescence. Cytometry, 1991. 12(7): p. 579-96.

9. Camp, R.L., G.G. Chung, and D.L. Rimm, Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1323.

10. Taylor, D. and K. Giuliano, Mutiplexed high content screening assays create a cellular systems biology approach to drug discovery. Drug Discov Today, 2005. 2(2): p. 149-154.

11. Xu, J.J., D. Diaz, and P.J. O'Brien, Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. Chem Biol Interact, 2004. 150(1): p. 115-28.

12. Perlman, Z.E., T.J. Mitchison, and T.U. Mayer, High-Content Screening and Profiling of Drug Activity in an Automated Centrosome-Duplication Assay. Chembiochem, 2005. 6(2): p. 218.

13. Lee, K.M., J.H. Kim, and D. Kang, Design issues in toxicogenomics using DNA microarray experiment. Toxicol Appl Pharmacol, 2005.

14. Abraham, V.C., D.L. Taylor, and J.R. Haskins, High content screening applied to large-scale cell biology. Trends Biotechnol, 2004. 22(1): p. 15-22.

15. Giuliano, K.A., J.R. Haskins, and D.L. Taylor, Advances in high content screening for drug discovery. Assay Drug Dev Technol, 2003. 1(4): p. 565-77.

16. Conway, B.R. and K.T. Demarest, The use of biosensors to study GPCR function: applications for high-content screening. Receptors Channels, 2002. 8(5-6): p. 331-41.

17. Woollacott, A.J. and P.B. Simpson, High Throughput Fluorescence Assays for the Measurement of Mitochondrial Activity in Intact Human Neuroblastoma Cells. J Biomol Screen, 2001. 6(6): p. 413-420.

【表１－３】

18. Lovborg, H., P. Nygren, and R. Larsson, Multiparametric evaluation of apoptosis: effects of standard cytotoxic agents and the cyanoguanidine CHS 828. Mol Cancer Ther, 2004. 3(5): p. 521-6.

19. Tencza, S.B. and M.A. Sipe, Detection and classification of threat agents via high-content assays of mammalian cells. J Appl Toxicol, 2004. 24(5): p. 371-7.

20. Waggoner, A., Fluorescence probes for analysis of cell structure, function and health by flow and imaging cytometry., in Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, D. Taylor, et al., Editors. 1986, Alan R. Liss, Inc.: New York. p. 3-28.

21. Chalfie, M., et al., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 1994. 263(5148): p. 802-5.

22. Chudakov, D.M., S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. Trends Biotechnol, 2005. 23(12): p. 605-13.

23. Umezawa, Y., Genetically encoded optical probes for imaging cellular signaling pathways. Biosens Bioelectron, 2005. 20(12): p. 2504-11.

24. Giuliano, K.A. and D.L. Taylor, Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. Trends Biotechnol, 1998. 16(3): p. 135-40.

25. Giuliano, K.A. and D.L. Taylor, Measurement and manipulation of cytoskeletal dynamics in living cells. Curr Opin Cell Biol, 1995. 7(1): p. 4-12.

26. Zhang, S., C. Ma, and M. Chalfie, Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. Cell, 2004. 119(1): p. 137-44.

27. Michalet, X., et al., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. Science, 2005. 307(5709): p. 538-44.

28. Hemmila, I. and V. Laitala, Progress in lanthanides as luminescent probes. J Fluoresc, 2005. 15(4): p. 529-42.

29. Roda, A., et al., Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. Trends Biotechnol, 2004. 22(6): p. 295-303.

30. Mitchison, T.J., Small-molecule screening and profiling by using automated microscopy. Chembiochem, 2005. 6(1): p. 33-9.

31. Perlman, Z.E., et al., Multidimensional drug profiling by automated microscopy. Science, 2004. 306(5699): p. 1194-8.

【表１－４】

32. Abraham, V.C., et al., Automated Classification of Individual Cellular Responses Across Multiple Targets. Preclinica, 2004. 2(5): p. 349-355.

33. Rubin, H., Early origin and pervasiveness of cellular heterogeneity in some malignant transformations. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(16): p. 5121-5.

34. Elsasser, W.M., Outline of a theory of cellular heterogeneity. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(16): p. 5126-9.

35. Giuliano, K.A., et al., Systems cell biology knowledge created from high content screening. Assay Drug Dev Technol, 2005. 3(5): p. 501-14.

36. Giuliano, K.A., Y.-T. Chen, and D.L. Taylor, High-Content Screening with siRNA Optimizes a Cell Biological Approach to Drug Discovery: Defining the Role of P53 Activation in the Cellular Response to Anticancer Drugs. J Biomol Screen, 2004. 9(7): p. 557-568.

37. Peacock, J.A., Two-dimensional goodness-of-fit testing in astronomy. Monthly Notices of the Royal Astronomical Society, 1983. 202: p. 615-627.

38. Fasano, G. and A. Franceschini, A multidimensional version of the Kolmogorov-Smirnov test. Monthly Notices of the Royal Astronomical Society, 1987. 225: p. 155-170.

39. Witten, I.H. and E. Frank, Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques. Second ed. Morgan Kaufmann Series in Data Management Systems, ed. J. Gray. 2005, San Francisco, CA: Elsevier. 523.

40. Venables, W.N., B.D. Ripley, and W.N. Venables, Modern applied statistics with S. 4th ed. Statistics and computing. 2002, New York: Springer. xi, 495 p.

41. Switzer, R.C., III, S.K. Campbell, and L. Murdock, Histological analysis method. 1993: USA.

42. Uchihara, T., et al., Triple immunofluorolabeling with two rabbit polyclonal antibodies and a mouse monoclonal antibody allowing three-dimensional analysis of cotton wool plaques in Alzheimer disease. J Histochem Cytochem, 2003. 51(9): p. 1201-6.

43. Strategic analysis of the ADME/Tox technologies market in Europe. 2005, Frost and Sullivan.

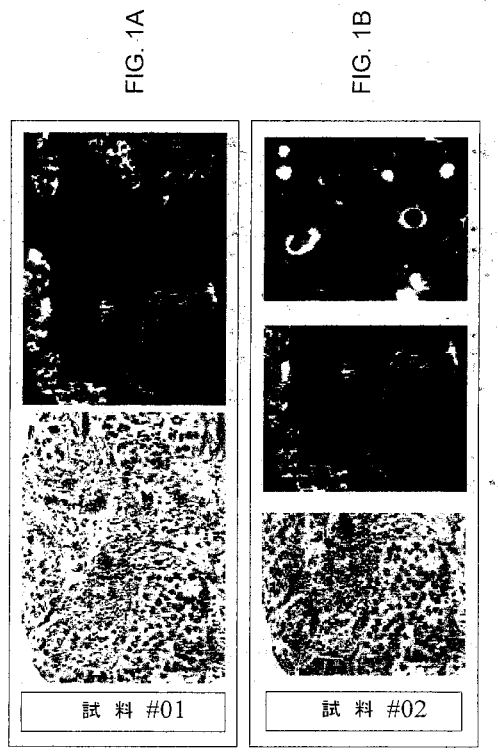
【０１２０】

本明細書に引用される全ての特許、公開特許出願および参照の教示は、その全体において参照により援用される。

【０１２１】

本発明は、その例示的態様に関して具体的に示され、説明されるが、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲を逸脱することなく、本明細書において形態および詳細において種々の変更がなされ得ることを、当業者は理解しよう。

【図１】



【図２】

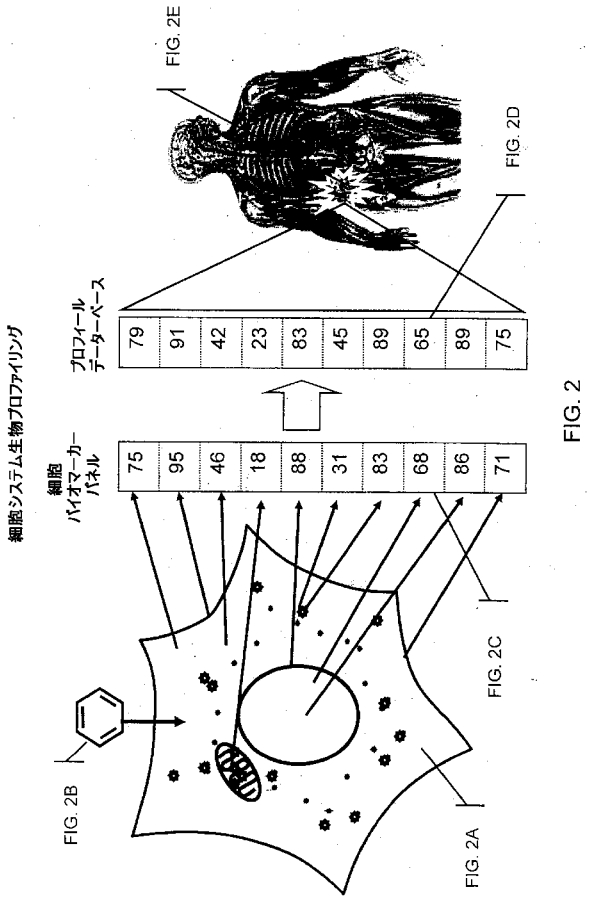


FIG. 2

【図３】

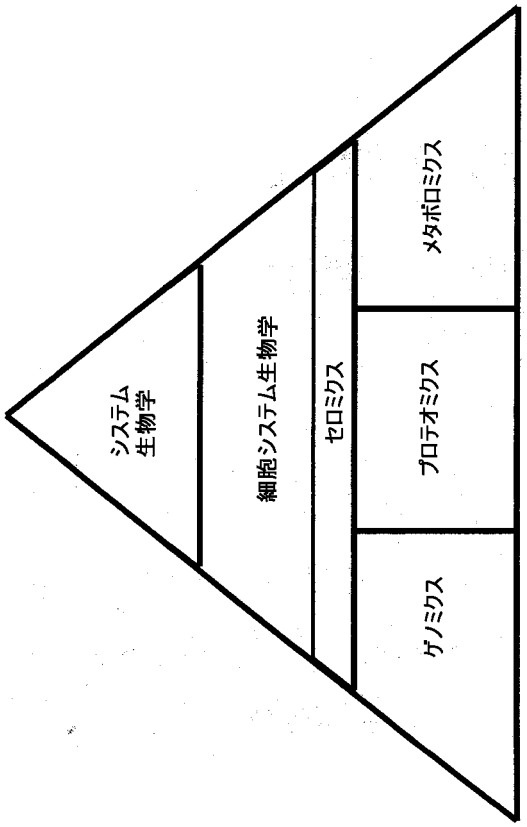


FIG. 3

【図４】

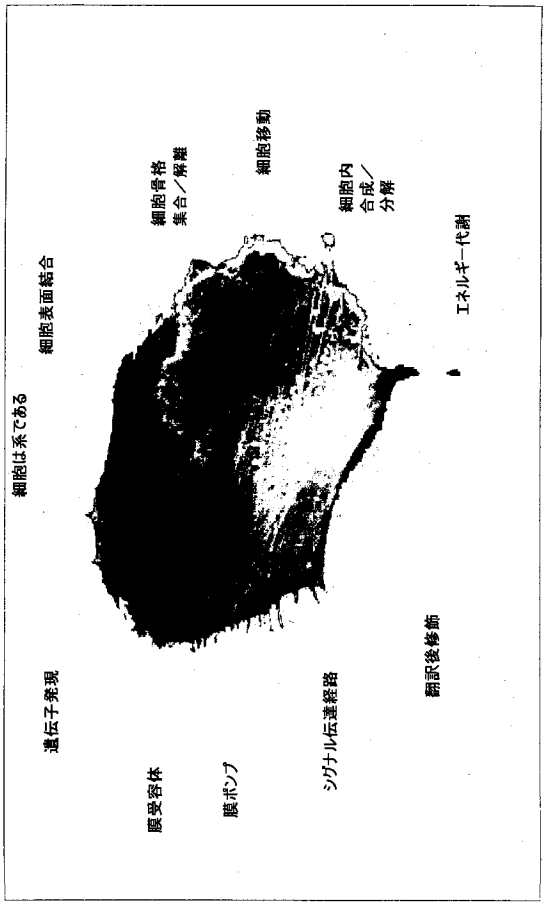


FIG. 4

【図５】

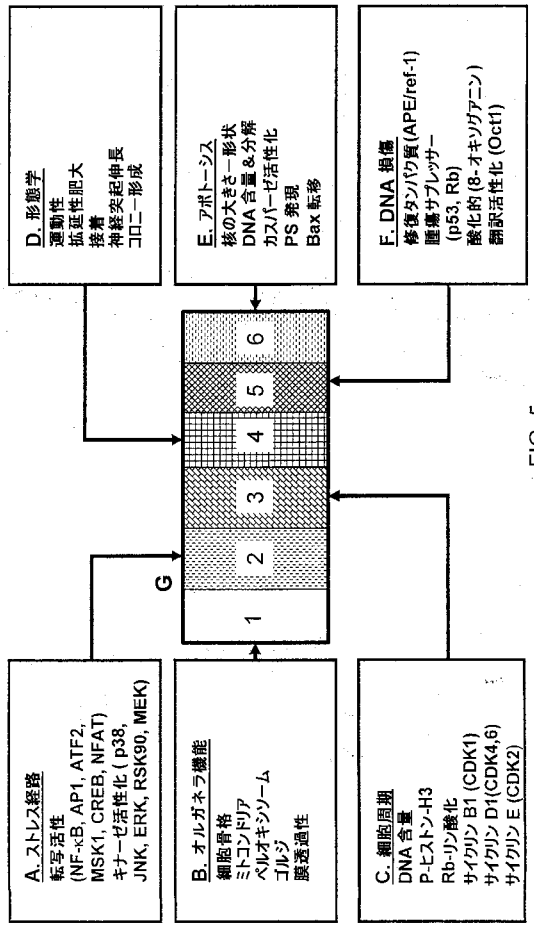


FIG. 5

【図６】

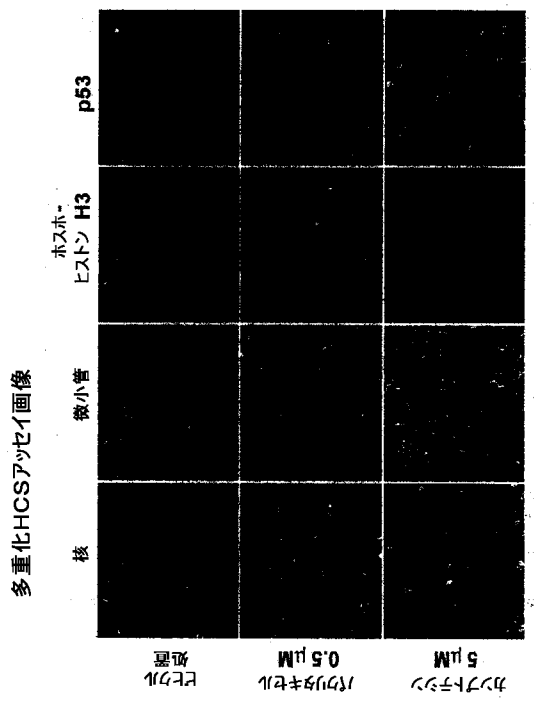


FIG. 6

【図７】

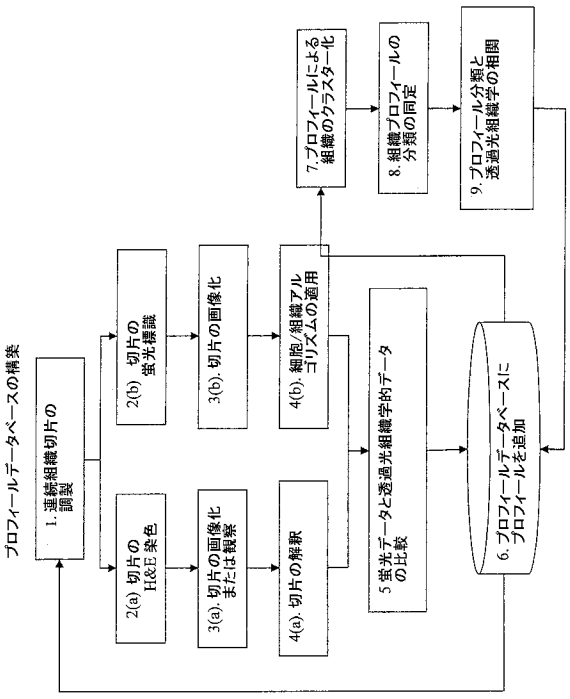


FIG. 7

【図８】

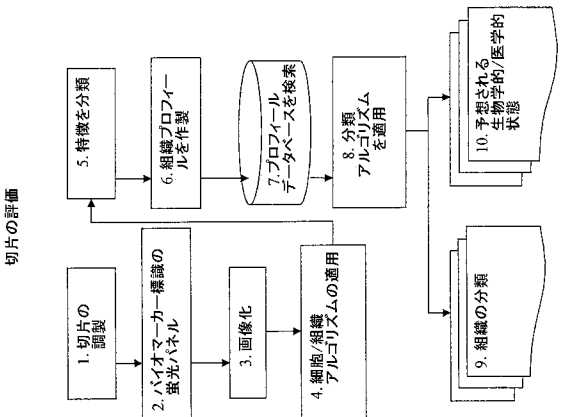


FIG. 8

【図９】

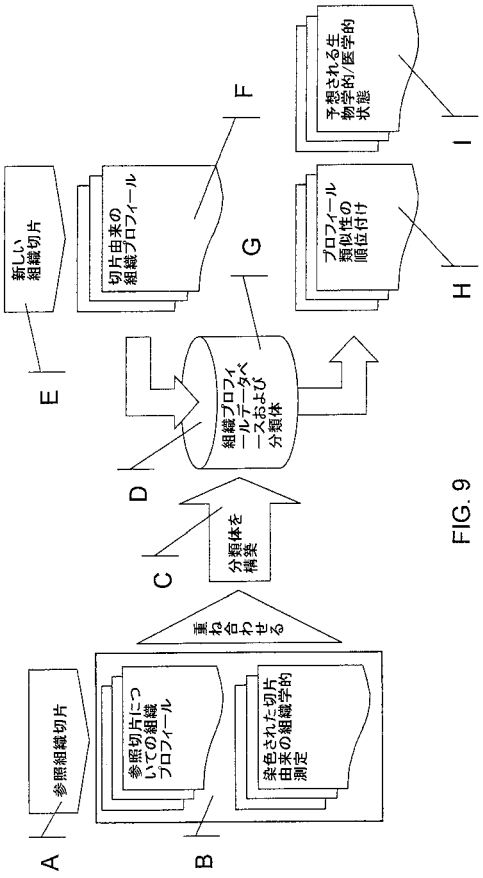


FIG. 9

【図１０】

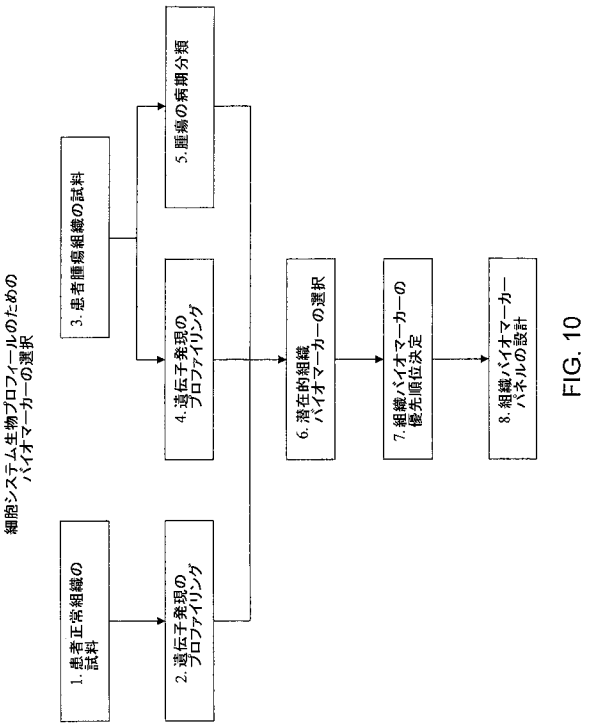


FIG. 10

【図１１】

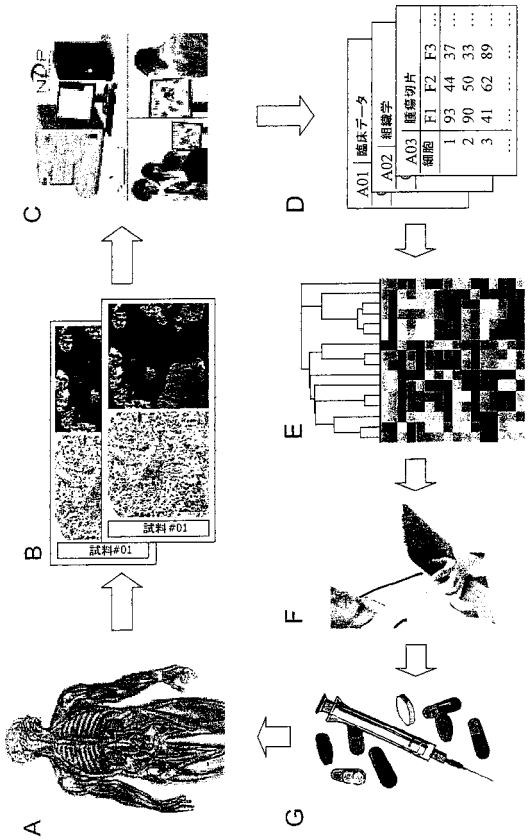


FIG. 11

【手続補正書】
【提出日】平成25年11月25日(2013.11.25)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
a) 1つ以上の組織試料から少なくとも1つの切片を得る工程；
b) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが、
i) 少なくとも3種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；および
ii) 少なくとも3種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬
の組み合わせを含み、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
c) 蛍光標識された切片を少なくとも第1の光学様式で画像化する工程、ここで、画像化により第1の組のデータが作成される；ならびに
d) 第1の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定する工程、ここで、第1の組のデータにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作成するための方法が提供され、ここで、組織試料は、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせについてプロファイルされる、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作成するための方法。
【請求項２】
1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作成する工程をさらに含み、ここで、該工程が、
i) 少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得ること；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製すること、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iii) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第2の光学様式で画像化すること、ここで画像化により第2の組のデータが作成される；ならびに
iv) 第2の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定すること、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作成される、請求項１記載の方法。
【請求項３】
1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作成する工程をさらに含み、ここで、該工程が、
i) 1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得ること；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製すること；
iii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識さ

れた血液試料スメアを作製すること、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

iv) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第2の光学様式により画像化すること、ここで画像化により第2の組のデータが作成される；

v) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化すること、ここで画像化により第3の組のデータが作成される；ならびに

vi) 第2の組のデータおよび第3の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定すること、ここで第2の組のデータおよび第3の組のデータのそれぞれにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作成される、請求項１記載の方法。

【請求項４】

a) 1つ以上の組織試料から少なくとも2つの切片を得る工程；

b) 少なくとも1つの切片を組織学的染色により標識して、組織学的に染色された切片を作製する工程；

c) 少なくとも1つの切片を蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された切片を作製する工程、ここでそれぞれの蛍光標識試薬はバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルは、

i) 少なくとも3種類の癌細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬；および

ii) 少なくとも3種類の移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な一組の蛍光標識試薬

の組み合わせを含み、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；

d) 組織学的に染色された切片を少なくとも第1の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第1の組のデータが作成される；

e) 蛍光標識された切片を少なくとも第2の光学様式により画像化する工程、ここで画像化により第2の組のデータが作成される；ならびに

f) 第1の組のデータおよび第2の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定する工程、ここで第1の組のデータおよび第2の組のデータのそれぞれにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールである、

を含み、それにより、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作成するための方法が提供され、ここで、組織試料は、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後またはそれらの組み合わせについてプロファイルされる、1つ以上の組織試料の細胞システム生物プロフィールを作成するための方法。

【請求項５】

癌が乳癌である、請求項１または４記載の方法。

【請求項６】

癌細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬が、HER2/neu、エストロゲンレセプター（ER）、Ki-67、Cox-2およびp16からなる群より選択される癌細胞バイオマーカーを検出する、請求項１または４記載の方法。

【請求項７】

移動性免疫細胞バイオマーカーに特異的な蛍光標識試薬が、NK細胞バイオマーカー、LAK細胞バイオマーカー、TRAIL、PD1および免疫細胞アポトーシスのバイオマーカーからなる群より選択される移動性免疫細胞バイオマーカーを検出する、請求項１または４記載の方法。

【請求項８】
1つの特徴が、移動性免疫細胞バイオマーカーにより検出される種々の移動性免疫細胞サブタイプの比であり、ここで、該比が、癌の存在、癌の病期、癌の診断、癌の予後、またはそれらの組み合わせを示す、請求項１または４記載の方法。
【請求項９】
1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作成する工程をさらに含み、ここで、該工程が、
i) 少なくとも1つの末梢血試料から少なくとも1つの血液試料スメアを得ること；
ii) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルにより標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製すること、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
iii) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化すること、ここで画像化により第3の組のデータが作成される；ならびに
iv) 第3の組のデータを解析して5つ以上の特徴を同定すること、ここで5つ以上の特徴が少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた少なくとも1つの末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作成される、請求項４記載の方法。
【請求項１０】
1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールを作成する工程をさらに含み、ここで、該工程が、
a) 1つ以上の末梢血試料から少なくとも2つの血液試料スメアを得ること；
b) 少なくとも1つの血液試料スメアを組織学的染色により標識して、組織学的に染色された血液試料スメアを作製すること；
c) 少なくとも1つの血液試料スメアを蛍光標識試薬のパネルで標識して、蛍光標識された血液試料スメアを作製すること、ここでそれぞれの蛍光標識試薬がバイオマーカーに特異的であり、蛍光標識試薬のパネルが少なくとも4つの異なるバイオマーカーを検出し、バイオマーカーの検出が細胞システム生物プロフィールの1つ以上の特徴の読み出しである；
d) 組織学的に染色された血液試料スメアを少なくとも第3の光学様式により画像化すること、ここで画像化により第3の組のデータが作成される；
e) 蛍光標識された血液試料スメアを少なくとも第4の光学様式で画像化すること、ここで画像化により第4の組のデータが作成される；ならびに
f) 第3の組のデータおよび第4の組のデータを解析して、5つ以上の特徴を同定すること、ここで第3の組のデータおよび第4の組のデータのそれぞれにおいて少なくとも1つの特徴が同定され、5つ以上の特徴の組み合わせが1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールである、
を含み、それにより1つ以上の組織試料と同じ供給源から得られた1つ以上の末梢血試料の細胞システム生物プロフィールが作成される、請求項４記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 21/78	*(2006.01)*	G01N 33/532	A	
		G01N 21/27	A	
		G01N 21/78	C	

(72)発明者 テイラー，ディー．，ランシング
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５２１５ ピッツバーグ，ノートル ダム プレース ９１０

Ｆターム(参考) 2G045 AA01 AA02 AA24 AA26 BA13 BA14 BB22 BB24 BB25 CA01
CA11 CA12 CA15 CA17 CA18 CA19 CA20 CA25 CB01 CB02
CB26 DA13 DA14 DA36 FA16 FA19 FB03 FB07 FB08 FB12
GB01 GC15 JA01
2G054 AA07 AA08 AB05 BB20 CA22 CE02 EA03 GA03 GA04 JA01
2G059 AA05 BB14 DD13 EE01 FF01 KK04 MM01

专利名称(译)	用于自动组织分析的方法		
公开(公告)号	JP2014029346A	公开(公告)日	2014-02-13
申请号	JP2013226607	申请日	2013-10-31
申请(专利权)人(译)	耶鲁公司		
[标]发明人	ゴフアルバートエイチ ジュリアーノケネスエイ テイラーディーランシング		
发明人	ゴフ,アルバート,エイチ. ジュリアーノ,ケネス,エイ. テイラー,ディー.,ランシング		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/574 G01N33/532 G01N21/27 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/533 G01N15/1475 G01N21/6428 G01N21/6458 G01N21/6486 G06K9/00127 G06T7/0012 G06T2207/10056 G06T2207/30024 Y10S436/809		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/53.K G01N33/574.D G01N33/53.D G01N33/532.A G01N21/27.A G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA02 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB25 2G045/CA01 2G045/CA11 2G045/CA12 2G045/CA15 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB26 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GB01 2G045/GC15 2G045/JA01 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/BB20 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/JA01 2G059/AA05 2G059/BB14 2G059/DD13 2G059/EE01 2G059/FF01 2G059/KK04 2G059/MM01		
优先权	60/801035 2006-05-17 US		
其他公开文献	JP5888521B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供自动组织分析的方法。 该方法包括以下步骤：a）从一个或多个组织样本中获得至少两个部分; b）通过组织学染色标记至少一个切片以产生组织学染色的切片; c）至少一个区段标记有荧光标记试剂的一个面板，制备荧光标记的部分的步骤，其中每一个荧光标记试剂是特异性的荧光标记试剂的至少一个生物标记物组检测到四种生物标志物，并且生物标志物的检测是细胞系统生物学谱的一个或多个特征的读数; d）用至少第一光学模式对组织学染色的切片成像，其中成像产生第一组数据; e）通过至少第二光学模式对荧光标记的部分成像，其中成像产生第二组数据; F）识别分析，以五个或更多，的步骤，其中所述第一组数据和第二组数据，每个所述第一组数据和第二组数据的方法，其中至少一个识别特征并且五个或更多个特征的组合导致一个或多个组织样本的细胞系统生物学特征， 提示，由此一个或多个蜂窝系统提供了制备组织样品的生物分布的方法的一个或多个组织样本细胞系统生物学轮廓制造方法。 系统技术领域

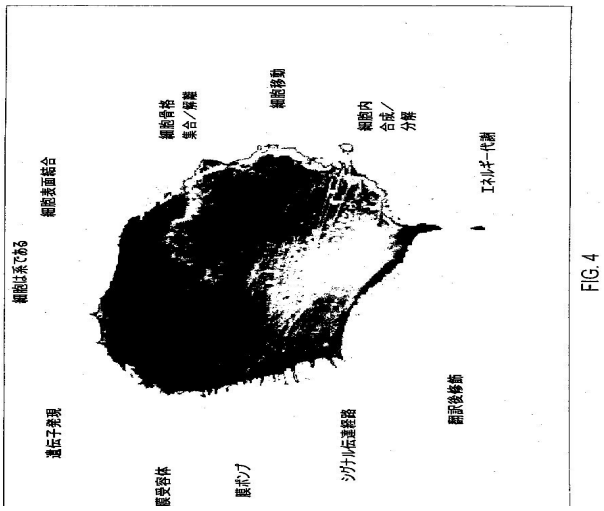


FIG. 4