

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-521979

(P2014-521979A)

(43) 公表日 平成26年8月28日(2014.8.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 21/64 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/64	F 2GO43
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	P 2GO45
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2014-525441 (P2014-525441)	(71) 出願人	390041542
(86) (22) 出願日	平成24年8月15日 (2012.8.15)		ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月14日 (2014.2.14)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 123
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/065943		45、スケネクタデー、リバーロード、1
(87) 国際公開番号	W02013/024115		番
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013.2.21)	(74) 代理人	100137545
(31) 優先権主張番号	13/211,725		弁理士 荒川 聡志
(32) 優先日	平成23年8月17日 (2011.8.17)	(74) 代理人	100105588
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小倉 博
		(74) 代理人	100129779
			弁理士 黒川 俊久
		(74) 代理人	100113974
			弁理士 田中 拓人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光画像を用いて明視野画像を生成するためのシステム及び方法

## (57) 【要約】

蛍光画像を用いて、生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似する明視野型画像を生成する方法が提供される。生物学的試料上の所定領域の2つ以上の蛍光画像を取得する段階、前記蛍光画像を明視野色空間にマッピングする段階、明視野画像を生成する段階、及び任意選択で鮮明化変換補正を適用する段階が含まれる。また、蛍光画像を用いて生物学的試料の明視野型画像を生成するための画像解析システムが提供される。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

明視野染色プロトコルに類似する明視野型画像を生成する方法であって、  
 生物学的試料上の所定領域の2つ以上の蛍光画像の画像データを取得する段階、  
 特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を少なくとも部分的に利用して画像データを  
 解析することにより、非線形推定モデルを含むマッピングパラメータを生成する段階、  
 前記マッピングパラメータを蛍光画像に適用する段階、  
 2つ以上の蛍光画像を明視野色空間に変換する段階、及び  
 明視野型画像を生成する段階  
 を含む方法。

10

## 【請求項 2】

前記非線形推定モデルが、  

$$R = 255 \exp(-a [Dye 1] * z [Dye 1] - a [Dye 2] z [Dye 2] - \dots - a [Dye n] z [Dye n])$$

$$G = 255 \exp(-b [Dye 1] * z [Dye 1] - b [Dye 2] z [Dye 2] - \dots)$$

$$B = 255 \exp(-c [Dye 1] * z [Dye 1] - c [Dye 2] z [Dye 2] - \dots)$$
 (式中、R、G及びBは前記明視野型画像で生じる赤色、緑色及び青色のピクセル値であり、  
 zは所定のピクセル位置で観測される蛍光色素量に関するスケーリング係数であり、  
 a、b及びcは前記明視野色空間に対応する減衰係数であり、  
 a [Dye n]、b [Dye n]、c [Dye n]の3つの数は、予め選択した色又は所望の色を用いて定義した仮想染色におけるn番目の色素の減衰係数の定数倍である)として定義される、請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 3】

定数 [Dye n] が、  

$$\min(\exp(-a [Dye n] * z [Dye n]), \exp(-b [Dye n] * z [Dye n]), \exp(-c [Dye n] * z [Dye n])) = 1 / 255$$
 となるように選択される、請求項2記載の方法。

30

## 【請求項 4】

鮮明化変換補正を前記明視野型画像に適用することを更に含む、請求項1乃至請求項3のいずれか記載の方法。

## 【請求項 5】

前記鮮明化変換補正が畳み込みフィルタを含み、畳み込みフィルタのカーネルが行列  
 【数 1】

$$\begin{bmatrix} -0.25 & -0.25 & -0.25 \\ -0.25 & 3.00 & -0.25 \\ -0.25 & -0.25 & -0.25 \end{bmatrix}$$

40

である、請求項4記載の方法。

## 【請求項 6】

前記明視野型画像が赤色、緑色及び青色の3チャンネル色空間を有する免疫染色型画像に対応する、請求項1乃至請求項5のいずれか記載の方法。

## 【請求項 7】

前記2つ以上の蛍光画像の内の1つ以上の画像が自己蛍光性である、請求項1乃至請求

50

項 6 のいずれか記載の方法。

【請求項 8】

前記明視野画像を取得する段階が、前記生物学的試料を 2 つ以上の組織化学的染色剤又は免疫組織化学的染色剤で逐次に染色する段階を含む、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか記載の方法。

【請求項 9】

前記特徴ベース情報が核、上皮及び間質から成る群から選択される 1 つ以上の特徴を含む、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか記載の方法。

【請求項 10】

マッピングパラメータを第 2 の所定領域の 2 つ以上の蛍光画像に適用する段階であって、前記第 2 の所定領域は同じ生物学的試料又は異なる生物学的試料に由来する段階を更に含む、請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 11】

前記明視野型画像を用いて病理学的診断をする段階を更に含む、請求項 1 乃至請求項 10 のいずれか記載の方法。

【請求項 12】

前記病理学的診断が癌に関する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記明視野型画像を用いて定量解析する段階を更に含む、請求項 1 乃至請求項 12 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 14】

前記定量解析する段階が、分子経路を核、上皮及び間質から成る群から選択される 1 つ以上の形態学的構造の関数として識別することを含む、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

蛍光画像を用いて、生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似する明視野型画像を生成するための画像解析システムであって、生物学的試料上の所定領域の 2 つ以上の蛍光画像を取得するように構成されているデジタルイメージング装置と、処理装置であって、

特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を少なくとも部分的に利用して画像データを解析することにより、非線形推定モデルを含むマッピングパラメータを生成し、前記マッピングパラメータを前記蛍光画像に適用し、前記 2 つ以上の蛍光画像を明視野色空間に変換し、明視野型画像を生成するように構成されている処理装置と、前記明視野画像を表示する表示装置とを含むシステム。

30

【請求項 16】

前記非線形モデルが、

$$R = 255 \exp(-a [Dye 1] * z [Dye 1] - a [Dye 2] z [Dye 2] - \dots - a [Dye n] z [Dye n])$$

40

$$G = 255 \exp(-b [Dye 1] * z [Dye 1] - b [Dye 2] z [Dye 2] - \dots)$$

$$B = 255 \exp(-c [Dye 1] * z [Dye 1] - c [Dye 2] z [Dye 2] - \dots)$$

(式中、R、G及びBは前記明視野型画像で生じる赤色、緑色及び青色のピクセル値であり、

zは所定のピクセル位置で観測される蛍光色素量に関するスケーリング係数であり、

a、b及びcは前記明視野色空間に対応する減衰係数であり、

a [Dye n]、b [Dye n]、c [Dye n]の3つの数は、予め選択した色又は所望の色を用いて定義した仮想染色におけるn番目の色素の減衰係数の定数倍である)とし

50

て定義される、請求項 15 記載のシステム。

【請求項 17】

前記定数 [Dyen] が、

$$\min(\exp(-a[\text{Dyen}] * z[\text{Dyen}]), \exp(-b[\text{Dyen}] * z[\text{Dyen}]), \exp(-c[\text{Dyen}] * z[\text{Dyen}])) = 1 / 255$$

となるように選択される、請求項 16 記載のシステム。

【請求項 18】

鮮明化変換補正を前記明視野型画像に適用することを更に含む、請求項 15 乃至請求項 17 のいずれか 1 項記載のシステム。

【請求項 19】

前記鮮明化変換補正は畳み込みフィルタを含み、畳み込みフィルタのカーネルが行列

【数 2】

$$\begin{bmatrix} -0.25 & -0.25 & -0.25 \\ -0.25 & 3.00 & -0.25 \\ -0.25 & -0.25 & -0.25 \end{bmatrix}$$

10

20

である、請求項 18 記載のシステム。

【請求項 20】

前記処理装置が、既に分析した 1 つ以上の生物学的試料由来のマッピングパラメータを記憶するように更に構成されている、請求項 15 乃至請求項 19 のいずれか 1 項記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に、蛍光顕微鏡で取得した 1 組のバイオマーカー画像を新しい色空間にマッピングする方法であって、マッピングした画像の強度値が明視野モダリティを表す方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) による伝統的な組織学的染色では、好塩基性色素ヘマトキシリン (H) を用いて細胞核を青色に染色し、好酸性色素エオシン (E) を対比染色剤として用いて細胞質、結合組織 (コラーゲン)、筋線維、結合組織及び赤血球を染色する。エオシンは組織中の様々な細胞成分と相互作用し、エオシンが結合している分子の帯電性に基づいて様々な色合いのピンク色を生じる。免疫診断及び分析での可視化には別の色素産生染色剤 (chromogenic stain) が用いられており、例えばブラウンジアミノベンジジン (DAB) 染色が一般的である。

40

【0003】

蛍光色素と共に分子マーカー (色素及び抗体) を用いて細胞成分を択一的に標識することができることが多い。例えば、DAPI (DNA に特異的に結合する蛍光色素) で細胞核を染色することができる一方で、直接コンジュゲートされた抗体により、又は一次二次増幅検出により検査対象の分子が標的化されている組織中の別の領域を免疫蛍光的に標識することができる。赤血球 (RBC) 等のいくつかの構造に関して、1 組のフィルタによって捕捉された組織の自己蛍光を検出に用いることができる。蛍光イメージングモダリティは、これらの組織構造の各々を個別に捕捉してそれにより正確な局在化及び定量化を可能にするという利点を有する。

【0004】

50

しかしながら、蛍光画像に基づく組織病理学的診断は一般的な方法ではなく、その理由は、病理学者の診断に不可欠である構造的細部及び形態学的細部を蛍光画像が提供しないからである。ブラウン染色技法と組み合わせられることが多い明視野H&E染色も好まれることが多いが、その理由は、数十年にわたって病理学検査室に集められた、これらの技法に関する大量の知識が存在するからである。

【0005】

蛍光画像を疑似明視野画像に変換するための方法は公知である。しかしながら、この方法では一般に、特定の色空間(波長)が各蛍光色素に再割当てされ、その結果、蛍光画像が明視野空間で再着色される。この方法では、蛍光画像は、生物学的試料がH&E等の特定の明視野染色プロトコルに供された場合に得られるであろう生物学的試料の画像を表す画像には転換されない。2009年9月29日に出願された「Systems and Methods for Generating a Brightfield Image Using Fluorescent Images」と題する米国特許出願第12/569396号には、特定の明視野染色プロトコルから画像が直接得られたかのように、生物学的試料の構造的特徴及び構造的細部が識別される明視野画像を蛍光画像から作成する方法が開示されている。この米国特許出願は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0006】

しかしながら、コントラストを高めると共に細胞境界等の構造的特徴を識別する必要がある。核、細胞膜及び細胞質等の内部の特徴を区別して識別する能力を向上させる必要もあり、その理由は、これらの領域ではフル解像度がない可能性があるからである。そのようなものとして、エッジコントラスト等の先鋭度を高めた仮想染色画像(VSI)が望ましい。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第98/55026号

【発明の概要】

【0008】

述べたように、これまでは蛍光マーカーを単独で用いて核、上皮及び間質を識別することにより、細胞コンパートメントに関する情報を得ていた。本方法では蛍光マーカーの形態学的機能が蛍光バイオマーカーの形態学的機能と組み合わせられており、本方法は、細胞形態学経路及び生物学的経路に部分的に基づいて組織中のタンパク質の発現及び疾患経路を確認するために用いられる。本開示の発明は、蛍光顕微鏡によって取得した1組のバイオマーカー画像及び自己蛍光画像を新しい色空間にマッピングする方法であって、マッピングした画像の強度値がH&E染色等の明視野モダリティを表す方法を説明する。

30

【0009】

一実施形態において、蛍光画像を用いて、生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似する明視野型画像を生成する方法が提供される。本方法は、生物学的試料上の所定領域の2つ以上の蛍光画像の画像データを取得する段階、特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を少なくとも部分的に利用して画像データを解析することにより、非線形推定モデルを含むマッピングパラメータを生成する段階、前記マッピングパラメータを蛍光画像に適用する段階、2つ以上の蛍光画像を明視野色空間に変換する段階、明視野型画像を生成する段階、及び鮮明化変換補正を明視野型画像に適用する段階を含む。

40

【0010】

別の実施形態において、蛍光画像を用いて、生物学的試料の明視野染色プロトコルに類似する明視野型画像を生成するための画像解析システムが提供される。本システムは、生物学的試料上の所定領域の2つ以上の蛍光画像を取得するように構成されているデジタルイメージング装置と、マッピングパラメータを適用して、2つ以上の蛍光画像を、鮮明化変換を含む明視野型画像に変換するように構成されている処理装置とを含む。

【0011】

50

本発明のこれらの及び別の特徴、態様及び利点は、添付の図面を参照して以下の詳細な説明を読む際により理解されるようになるであろう。添付の図面において、複数の図面にわたって同一の部分が同一の符号で表される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ヘマトキシリン対比染色剤でDAB染色した2つの代表的な細胞ペレットの明視野顕微鏡から得たカラー画像のモノクロ表現を示す図であり、(a)は赤色のチャンネルを表し、(b)は緑色のチャンネルを表し、(c)は青色のチャンネルを表す。

【図2】蛍光顕微鏡から得た免疫染色試料のモノクロ蛍光画像を示す図である。画像(a)は細胞核を選択的に標識するDAPI波長における蛍光強度を表し、(b)は上皮成長因子受容体を標識する、コンジュゲートした抗体により放射された波長における蛍光強度を表す。

【図3】本明細書で教示した方法に従って蛍光画像を処理することにより得たカラーVSIのモノクロ表現を示す図である。画像(a)は赤色のチャンネルを表し、(b)は緑色のチャンネルを表し、(c)は青色のチャンネルを表す。視野内の細胞を図1の画像と同じペレットから得る。

【発明を実施するための形態】

【0013】

特許請求した本発明の主題をより明確且つ簡潔に説明すると共に示すために、以下の説明及び添付の特許請求の範囲中で用いる特定の用語に関して以下に定義を説明する。

【0014】

用語「抗体」は、別の分子の特定の空間的構成及び極性構成と特異的に結合し、それにより前記構成と相補的であると定義される免疫グロブリンを指す。抗体はモノクローナル又はポリクローナルであることができる。宿主の免疫化及び血清(ポリクローナル)の回収等の当分野で公知の技法により、連続したハイブリッド細胞株を作製し、分泌されたタンパク質(モノクローナル)を回収することにより、又は少なくとも天然抗体の特異的結合に必要なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列又はその突然変異型をクローニングして発現させることにより、抗体を作製することができる。抗体は完全な免疫グロブリン又はそのフラグメントを含むことができ、免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3及びIgM等の様々なクラス及びアイソタイプを含む。機能性抗体フラグメントは、完全長の抗体と同等の親和性で結合を保持することができる抗体の一部(例えばFab、Fv及びF(ab')<sub>2</sub>又はFab')を含むことができる。更に、特定の分子に対する結合親和性を実質的に維持される限り、免疫グロブリン又はそのフラグメントの凝集体、ポリマー及びコンジュゲートを必要に応じて用いることができる。

【0015】

用語「結合剤」は、生物学的試料中の1種以上の標的と結合することができる分子を指す。結合剤は標的と特異的に結合することができる。好適な結合剤は、天然ペプチド又は修飾ペプチド、タンパク質(例えば抗体、アフィボディ又はアプタマー)、核酸(例えばポリヌクレオチド、DNA、RNA又はアプタマー)、多糖(例えばレクチン、糖)、脂質、酵素、酵素基質又は酵素阻害剤、リガンド、受容体、抗原又はハプテンの1種以上含むことができる。分析する試料及び検出に使用可能な標的に応じて適切な結合剤を選択することができる。例えば、試料中の標的がリガンドを含み、共に結合剤が受容体を含むことができ、又は標的が受容体を含み、結合剤がリガンドを含むことができる。同様に、標的が抗原を含み、結合剤が抗体若しくは抗体フラグメントを含むことができ、又はその逆も可能である。いくつかの実施形態において、標的が核酸を含み、結合剤が相補的な核酸を含むことができる。いくつかの実施形態において、標的及び結合剤の両方が互いに結合可能なタンパク質を含むことができる。

【0016】

用語「生物学的試料」は、インビボ又はインビトロで得られる生物学的組織又は生体液

10

20

30

40

50

起源の試料を含む、生物学的被験体から得られる試料を指す。そのような試料は、ヒトを含む哺乳類から分離された体液（例えば血液、血漿、血清又は尿）、器官、組織、断片及び細胞であることができるがそれらに限定されない。生物学的試料はまた、組織（例えば器官又は組織の一部）を含む生物学的試料の切片を含むこともできる。生物学的試料はまた、生物学的試料からの抽出物、例えば生体液（例えば血液又は尿）由来の抗原を含むこともできる。

【0017】

生物学的試料は、原核生物起源又は真核生物（例えば昆虫、原生動物、鳥類、魚類、爬虫類）起源であることができる。いくつかの実施形態において、生物学的試料は哺乳動物（例えばラット、マウス、ウシ、イヌ、ロバ、モルモット又はウサギ）起源である。特定の

10

【0018】

用語「発蛍光団」又は「蛍光信号ジェネレータ」は、特定波長の光が照射されて励起した際に異なる波長で光を放射する化合物を指す。発蛍光団をその発光プロファイル又は「色」の観点から説明することができる。緑色の発蛍光団（例えばCy3、FITC及びオレゴングリーン）は一般的に515～540ナノメートルの範囲の波長で発光すると特徴付けられ得る。赤色の発蛍光団（例えばテキサスレッド、Cy5及びテトラメチルローダミン）は一般的に590～690ナノメートルの範囲の波長で発光すると特徴付けられ得る。発蛍光団の例として、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸、アクリジン、アクリジン及びアクリジンイソチオシアネートの誘導体、5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、4-アミノ-N-[3-ビニルスルホニル)フェニル]ナフタルイミド-3, 5ジスルホネート(ルシファーイエローVS)、N-(4-アニリノ-1-ナフチル)マレイミド、アントラニルアミド、プリリアントイエロー、クマリン、クマリン誘導体、7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC、クマリン120)、7-アミノ-トリフルオロメチルクマリン(7-amino-trifluoromethylcoumarin)(クマラン151(Coumaran 151))、シアノシン; 4', 6-ジアミノジノ-2-フェニルインドール(DAPI)、5', 5"-ジブロモピロガロール-スルホンフタレイン(ブロモピロガロールレッド)、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)4-メチルクマリン、4, 4'-ジイソチオシアナトジヒドロ-スチルベン-2, 2'-ジスルホン酸、4, 4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸、5-[ジメチルアミノ]ナフタレン-1-スルホニルクロリド(DNS、ダンシルクロリド)、エオシン、エオシン誘導体(例えばエオシンイソチオシアネート)、エリスロシン、エリスロシン誘導体(例えばエリスロシンB及びエリスロシンイソチオシアネート); エチジウム; フルオレセイン及び誘導体(例えば5-カルボキシフルオレセイン(FAM))、5-(4, 6-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン(DTAF)、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、QFITC(XRITC); フルオレスカミン誘導体(アミンとの反応時に蛍光を発する); IR144; IR1446; マラカイトグリーンイソチオシアネート; 4-メチルウンベリフェロン; オルトクレゾールフタレイン; ニトロチロシン; パラロサニリン; フェノールレッド、B-フィコエリトリン; o-フタルジアルデヒド誘導体(アミンとの反応時に蛍光を発する); ピレン及び誘導体(例えばピレン、ピレンブチレート及びスクシンイミジル1-ピレンブチレート); リアクティブレッド4(Cibacron RTM、プリリアントレッド3B-A)、ローダミン及び誘導体(例えば6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX))、6-カルボキシローダミン(R6G)、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン(Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101及びスルホローダミン101のスルホニルクロリド誘導体(テキサスレッド); N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAM

20

30

40

50

RA) ; テトラメチルローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) ; リボフラビン ; ロゾール酸及びランタニドキレート誘導体、量子ドット、シアニン、ピレリウム色素、並びにスクアラインが挙げられるがそれらに限定されない。

【0019】

用語「インサイチュ」は原位置で、例えばインタクトな器官若しくは組織で、又は器官若しくは組織の代表的部分で起こる事象を一般的に指す。いくつかの実施形態において、生体、器官、組織試料又は細胞培養物を含む様々な源に由来する細胞に関して標的のインサイチュ分析を行なうことができる。インサイチュ分析は、標的が起源の部位から取り出された際に失われる可能性がある背景情報を提供する。したがって、標的のインサイチュ分析とは、細胞膜が完全にインタクトであるか又は標的と結合したプローブが細胞内に残るといった部分的にインタクトであるかに関わらず、全細胞又は組織試料中にある、標的と結合したプローブの分析を表す。更に、本明細書に開示した方法を用いることにより、固定されている又は未固定の細胞又は組織試料中において標的をインサイチュで分析することができる。

10

【0020】

用語「プローブ」は、結合剤と信号ジェネレータ又は酵素等の標識とを有する作用剤を指す。いくつかの実施形態において、結合剤及び標識 (信号ジェネレータ又は酵素) は単一のエンティティ中で具体化される。結合剤及び標識を直接的に (例えば結合剤中に組み込まれた蛍光分子を介して)、又は間接的に (例えば切断部位を含むことができるリンカーを介して) 取り付けて単一の段階で生物学的試料に適用することができる。代替実施形態において、結合剤及び標識は別々のエンティティ中で具体化される (例えば、標識と結合することができる一次抗体、及び一次抗体に結合することができる酵素又は信号ジェネレータ標識二次抗体)。結合剤及び標識 (信号ジェネレータ又は酵素) が別々のエンティティである場合、結合剤及び標識を単一の段階又は複数の段階で生物学的試料に適用することができる。用語「蛍光プローブ」は、蛍光信号ジェネレータとカップリングした結合剤を有する作用剤を指す。

20

【0021】

用語「信号ジェネレータ」は、1つ以上の検出技法 (例えば分光測定、比色分析、分光分析又は目視検査) を用いて検出可能な信号を生じることができる分子を指す。検出可能な信号の好適な例として、光信号及び電気信号又は放射性信号を挙げることができる。信号ジェネレータの例として、発色団、発蛍光団、ラマン活性タグ及び放射性標識の内の1種以上が挙げられる。前述したように、プローブに関して、いくつかの実施形態では信号ジェネレータ及び結合剤が単一のエンティティ (例えば蛍光標識を有する標識結合タンパク質) 中に存在することができる。また、結合剤及び信号ジェネレータは別々のエンティティ (例えば受容体タンパク質、及び特定の受容体タンパク質に対する標識抗体) であることができ、別々のエンティティは試料への導入前又は導入時に互いに結合する。

30

【0022】

用語「固体担体」は、その上で生物学的試料中に存在する標的を固定することでき、続いて本明細書に開示した方法で検出することができる物体を指す。物理吸着により、共有結合を形成することにより、又はそれらの組み合わせにより、固体担体上に標的を固定することができる。固体担体としてポリマー材料、ガラス材料又は金属材料を挙げることができる。固体担体の例として、膜、マイクロタイプレート、ビーズ、フィルタ、テストストリップ、スライド、カバースリップ及び試験管が挙げられる。

40

【0023】

用語「特異的結合」は、2つの異なる分子の内の一方の分子を、他方の分子と比して特異的に認識し、他方の分子に対する認識は実質的により低いことを指す。これらの分子は、1つ以上の静電的相互作用、水素結合又は疎水性相互作用から生じる2つの分子間の特異的認識をもたらす領域を分子の表面又はキャビティ内に有することができる。特異的結合の例として、抗体 - 抗原相互作用、酵素 - 基質相互作用、ポリヌクレオチド相互作用等が挙げられるがそれらに限定されない。いくつかの実施形態において、約6 ~ 約8のpH

50

及び約 0 ~ 約 37 の範囲の温度等の周囲条件下で、結合剤分子は標的に対して約  $10^5 M^{-1}$  以上の固有平衡会合定数 (K A) を有することができる。

【0024】

用語「標的」は、生物学的試料中に存在する場合に検出することができる生物学的試料の成分を指す。標的は、それに対する特異的結合剤 (例えば抗体) が天然に存在している、又はそれに対する特異的結合剤 (例えば小分子結合剤又はアプタマー) を調製することができる任意の物質であってよい。一般的に、結合剤は、標的の1つ以上の別々の化学的部分、又は標的の三次元構造成分 (例えばペプチドの折り畳みに起因する3D構造) を介して標的に結合することができる。標的は、天然ペプチド又は修飾ペプチド、タンパク質 (例えば抗体、アフィボディ又はアプタマー)、核酸 (例えばポリヌクレオチド、DNA、RNA 又はアプタマー)、多糖 (例えばレクチン又は糖)、脂質、酵素、酵素基質、リガンド、受容体、抗原又はハプテンを1種以上含むことができる。いくつかの実施形態において、標的はタンパク質又は核酸を含むことができる。

10

【0025】

用語「仮想染色画像」(VSI) は、明視野染色プロトコルから得た画像をシミュレートする生物学的試料の画像を指す。仮想染色画像は、明視野画像と同様のコントラスト、強度及び発色を有する。これにより、核、上皮、間質又は任意の種類 of 細胞外マトリックス材料の特徴を含むがそれらに限定されない生物学的試料中の特徴を、明視野染色プロトコルを生物学的試料に直接用いたかのように特徴付けることができる。

20

【0026】

本発明は、検体検出、組織化学、免疫組織化学又は免疫蛍光等の分析、診断又は予後診断の用途に適用することができる方法に一般的に関する実施形態を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示した方法を、組織化学、免疫染色、免疫組織化学、免疫アッセイ又は免疫蛍光に特に適用することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示した方法を、免疫プロッティング法、例えばウェスタンブロット又は免疫アッセイ (例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)) に特に適用することができる。

【0027】

生物学的試料中の複数の標的を逐次染色して検出する方法は、2007年9月28日に出願された「Sequential Analysis of Biological Samples」と題する米国特許出願第11/864085号でより詳細に説明されており、この出願は参照により本明細書に組み込まれる。試料中の標的を共局在化する方法は、2007年3月15日に提出された「System and Methods for Analyzing Images of Tissue Samples」と題する米国特許出願第11/686,649号、2006年8月7日に提出された「System and Method for Co-Registering Multi-Channel Images of a Tissue Micro Array」と題する米国特許出願第11/500028号、2006年11月30日に提出された「System and Methods for Scoring Images of a Tissue Micro Array」と題する米国特許出願第11/606582号、及び2007年2月28日に提出された「Automated Segmentation of Image Structures」と題する米国特許出願第11/680063号で説明されており、各出願は参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0028】

蛍光画像を疑似明視野画像に変換する方法は公知である。しかしながら、これらの方法では一般に、特定の色空間 (波長) が各蛍光色素に再割当てされ、その結果、蛍光画像が明視野空間に再着色される。これらの方法では、蛍光画像は、生物学的試料が H & E 等の特定の明視野染色プロトコルに供された場合に得られたであろう生物学的試料の画像を表す画像に転換されない。特定の明視野染色プロトコルから画像が直接得られたかのように、生物学的試料の構造的な特徴及び構造的な細部が識別される明視野画像を蛍光画像から作成する方法も公知である。明視野染色プロトコルに類似する画像を仮想染色画像 (VSI)

50

と称することができる。そのような方法は、前述した米国特許出願第 1 2 / 5 6 9 3 9 6 号で説明されている。

#### 【0029】

本開示の発明は、蛍光顕微鏡で取得した 1 組のバイオマーカー画像を新しい色空間にマッピングする方法であって、マッピングした画像の強度値が明視野モダリティを表し、VSI を生成するために用いることができる方法を説明する。本方法は、2 つ以上の蛍光画像中の対応する点及び校正関数から取得したデータを用いることを含み、校正関数は、生物学的試料の明視野画像から得られるか、又は予め選択した色若しくは所望の色を用いて定義される。標準的な生物学的染色プロトコルに精通している病理学者又は顕微鏡使用者であることができるオペレータにより、予め選択した色又は所望の色を選択することができる。校正関数により、「減衰係数」と呼ばれる  $a$  [赤]、 $a$  [緑]、 $a$  [青] の 3 つのパラメータを用いて蛍光画像を明視野色空間にマッピングする強度変換が推定される。

10

#### 【0030】

ヘマトキシリン、エオシン又はジアミノベンジジン (DAB) 等の可視色素で標識された、検査対象のバイオマーカーにおける幅広い染色強度を有する 1 つ以上の生体試料を調製することにより、推定パラメータを得ることができる。次いで、試料を明視野でイメージングすることができ、並びに赤色、緑色及び青色のピクセル強度レベルの分布を算出することができる。ピクセル強度レベルは区間  $[0, 1]$  に正規化される。平均 ( $\log$  強度) に関して最小値の色が識別される。一般性を失うことなく、特定の色を仮定することができる。例えば、色が緑色である場合、 $(\log \text{赤} / \log \text{緑})$  及び  $(\log \text{青} / \log \text{緑})$  の平均値が算出され、3 つの数 (平均  $[\log \text{赤} / \log \text{緑}]$ 、1、平均  $[\log \text{青} / \log \text{緑}]$ ) が減衰係数として用いられる。

20

#### 【0031】

代替実施形態において、実際の明視野色素を参照することなく減衰係数を得ることができる。代わりとして、設計者は適度に強い染色に用いるべき色を選ぶことができる。その色が、チャンネル R、G 及び B が区間  $[0, 1]$  に正規化されている線形色モデルにおける (R、G、B) である場合、その時には減衰係数は単純である ( $\log R$ 、 $\log G$ 、 $\log B$ )。この手法により、本方法において天然には存在しない色素を用いる明視野染色をシミュレートすることができる。

#### 【0032】

次に、2 つの方法、即ち強度ベース及び特徴ベースにより、複数の蛍光画像における点を対応させることができる。

30

#### 【0033】

特徴ベース法では、蛍光画像及び明視野画像の両方に関して、核、上皮、間質又は任意の種類 of 細胞外マトリックス材料の画像が取得される。手動プロセスを用いて、又は自動的に特徴ベースの構造を選択することができる。両方のモダリティからの画像において、対応する構造が選択される。蛍光画像に関しては、所定のバイオマーカーに合わせて調整された適切な励起エネルギー源と、放射光を収集するのに適したフィルタとを備えた蛍光顕微鏡を用いて画像を捕捉することができる。同様に、顕微鏡下で試料を移動させることなく同時に、又は逐次に複数のバイオマーカーをイメージングすることができる。述べたように、異なるバイオマーカーに関しては励起波長及びフィルタを変更することができる。特定の実施形態において、明視野画像及び蛍光画像の両方を取得することができるように顕微鏡を設計することができる。そのような顕微鏡の一例は、校正された複数の光路及び複数のカメラを含むことができる。その場合、試料の明視野画像を得ることができ、次いでこれを赤色 (R)、緑色 (G) 及び青色 (B) のチャンネルに分割することができ、特徴ベースの構造の色及び強度が測定される。

40

#### 【0034】

強度ベース法では、電子的センサ、磁氣的センサ、光学的センサ又は機械的センサにより顕微鏡下で試料領域の位置を制御することができ、そのため、次の画像を取得するために試料領域を同じ位置に近接して繰り返し配置することができる。一般的に、強度ベース

50

の位置合わせを広範な種類のバイオマーカーに適用することができる。一般的に、基材（例えばTMA、スライド、ウェル又はグリッドが挙げられるがそれらに限定されない）上に固定されるか、又は別の方法で設けられる生物学的試料は分子バイオマーカーで標識され、蛍光顕微鏡によりイメージングされる。

#### 【0035】

一実施形態において、抗体又はタンパク質に結合した蛍光色素等の様々な分子バイオマーカーを用いることができる。その場合、所定のバイオマーカーに合わせて調整された励起エネルギー源を用いて、及び放射光を最適に収集するのに適した様々なフィルタを用いて、蛍光顕微鏡下で試料がイメージングされる。顕微鏡下で試料を移動させることなく同時に、又は逐次に複数のバイオマーカーをイメージングすることができる。異なるバイオマーカーに関しては励起波長及びフィルタを変更することができる。バイオマーカーとして下記リストのマーカーを挙げることができるがそれらに限定されず、下記リストでは、各マーカーの1つ以上の機能が簡単に説明されているが、必ずしも全ての機能が説明されているわけではない。

Her2/neu：乳癌及び胃癌において過剰に発現する上皮増殖因子、モノクローナル抗体による治療は腫瘍の増殖を遅らせる

EGF-R/erbB：上皮増殖因子受容体

ER：一部の乳癌の腫瘍の増殖に必要であり、核中に位置しており、陽性患者においてエストロゲンを制限する療法を決定するためにISHで検出されるエストロゲン受容体

PR：DNAに結合するホルモンであるプロゲステロン受容体

AR：アンドロゲン受容体はアンドロゲン依存性腫瘍増殖に関与する

P53：腫瘍抑制遺伝子は、DNAの損傷を感知し、ヒトの癌の50%で不活性されている

- カテニン：癌の発癌遺伝子は、細胞膜から核に転位し、細胞付着において、及び潜在遺伝子調節タンパク質としての両方で機能する

ホスホ - - カテニン： カテニンのリン酸化体は、サイトゾル中で分解し、核に転位しない

GSK3：Wnt経路中のグリコーゲンシンターゼキナーゼ - 3 タンパク質は、 - カテニンをリン酸化して、ホスホ - - カテニンとし、プロトソーム中で急速に分解する

PKC：メディエータGタンパク質結合受容体

NFKB：核に転位した際の炎症に関する核因子カッパBマーカー

Bcl-2：B細胞リンパ腫発癌遺伝子2は、アポトーシス阻害剤として作用する

サイクリンD：細胞周期の制御

VEGF：血管形成に関する血管上皮増殖因子

E-カドヘリン：上皮細胞で発現する細胞 - 細胞相互作用分子であり、その機能は上皮癌で失われる

c-met：チロシンキナーゼ受容体

この段階では、コンパートメント情報を保有する1種以上の追加の蛍光形態学的マーカーを含むこともできる。このマーカーは、次の段階と共通の情報を保有するように選択され、逐次染色が含まれる場合には画像を位置合わせするために用いられる。その場合、生物学的試料の領域は、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)色素等の明視野色空間で可視的である1つ以上の形態学的マーカーで再標識され、再びイメージングされる。

#### 【0036】

いくつかの実施形態において、形態学的マーカーとして下記のを挙げるができるがそれらに限定されない。

ケラチン：上皮細胞に対するマーカー

Pan-カドヘリン：細胞膜に対するマーカー

平滑筋アクチン：筋肉に対するマーカー

DAPI：核に対するマーカー

ヘマトキシリン：DNAに対するマーカー（青色染色剤）

エオシン：細胞質に対するマーカーであり、pHに依存する（赤色染色剤）

これらの形態学的マーカーの一部を、明視野顕微鏡を用いてイメージングすることができ、一部を蛍光顕微鏡でイメージングすることができる。いずれの場合にも、形態学的マーカーは前の段階と共通の情報を有するように選択される。例えば、前の段階で核をイメージングするためにDAPIが用いられる場合、次の段階では明視野顕微鏡下で核をイメージングするためにヘマトキシリンを用いることができる。両方とも同じコンパートメントを染色することから、画像の位置合わせ技法により画像を合わせることができる。核染色剤であるDAPIを追加の蛍光形態学的マーカーとして用いて、明視野画像においてヘマトキシリンで染色された核を蛍光画像と位置合わせすることができる。ハードウェア及びソフトウェア位置合わせ技法の両方を用いて試料領域の画像が重ね合わされて情報が記憶され、それによる技術的效果は、位置合わせ又は別の方法で試料領域のマルチチャンネル画像を生成することである。

10

【0037】

したがって、強度ベース法により、逐次イメージング及び共位置合わせ技法を用いて同じ生物学的試料から分子マーカー及び形態学的マーカーの両方をイメージングすることができる。続いて、蛍光画像及び明視野画像の両方に関して、生物学的試料の領域上の所定の点に関するピクセル強度を位置合わせして比較することができる。特徴ベース法と同様に、明視野画像は赤色（R）、緑色（G）及び青色（B）のチャンネルに分割される。

【0038】

強度ベース法又は特徴ベース法のいずれにおいても、蛍光画像から明視野色空間への変換では非線形変換式において推定マッピングパラメータが用いられる。赤色、緑色、青色の値又は色空間（R、G、B）を用いて非線形変換式を表すことができ、変換は下式で表される。

20

$$R = 255 \exp(-a[Dye1] * z[Dye1] - a[Dye2] z[Dye2] - \dots)$$

$$G = 255 \exp(-b[Dye1] * z[Dye1] - b[Dye2] z[Dye2] - \dots)$$

$$B = 255 \exp(-c[Dye1] * z[Dye1] - c[Dye2] z[Dye2] - \dots)$$

式中、スカラー  $z[Dye1]$ 、 $z[Dye2]$ 、 $\dots$  は、所定のピクセル位置で観測される蛍光色素の分位値である。3つの数（ $a[Dye_n]$ 、 $b[Dye_n]$ 、 $c[Dye_n]$ ）は、予め選択した色又は所望の色を用いて定義した仮想染色における  $n$  番目の色素の減衰係数の定数倍である。出力色値（R、G、B）が画像において読取り可能な範囲のコントラストを表示することができるように定数が選択される。

30

【0039】

一実施形態において、 $z[Dye1]$ 、 $z[Dye2]$ 、 $\dots$  に関して  $0.995$  の分位値が見出され、

$$\min(\exp(-a[Dye_n] * z[Dye_n]), \exp(-b[Dye_n] * z[Dye_n]), \exp(-c[Dye_n] * z[Dye_n])) = 1/255$$

となるように定数が選択される。この実施形態では、出力色のダイナミックレンジで8ビット画像の可能なダイナミックレンジがほとんど満たされ、結果として強いコントラストが生じる。

40

【0040】

仮想染色画像が作成された後に鮮明化変換を仮想染色画像に適用することができる。一実施形態において、カーネルが行列

【0041】

## 【数 1】

$$\begin{bmatrix} -0.25 & -0.25 & -0.25 \\ -0.25 & 3.00 & -0.25 \\ -0.25 & -0.25 & -0.25 \end{bmatrix}$$

## 【0042】

である線形畳み込みフィルタとして鮮明化変換を実施することができる。鮮明化変換の適用により、エッジがよりはっきりとした、より鮮明な外観である出力画像が得られ、より細部を見ることができる。

10

## 【0043】

変換パラメータが算出されると、試料の1つ以上の選択領域を用いて、仮想H&Eマッピング、又はブラウンDAB染色等の同様の仮想画像を用いて1組の蛍光画像からVSIに変換することができる。分子バオマーカは好都合なことに、明視野画像のみを用いては見るできない機能情報及びコンパートメント情報を提供する。例えば、画像解析アルゴリズムは、病理学者又はオペレータに明視野モダリティ(H&E)を表す画像強度値を提供しながら、試料コンパートメントを分離するために追加されたチャンネルを利用することができる。例えば、ケラチンに対するDAB染色プロトコルを表すVSIでは、細胞核が紫色の色合いで示され、上皮細胞及び線維芽細胞の細胞骨格が茶色の色合いで示されるであろう。

20

## 【0044】

別の実施形態において、マッピングパラメータを推定すると、変換アルゴリズムを別の蛍光画像に適用してVSIを生成することができる。別の蛍光画像は、同じ生物学的試料の異なる領域由来であることができる。例えば、生物学的試料の供給源は、新鮮な、凍結された及び/又は保存された器官若しくは組織試料又は生検若しくは吸引物から得た固体組織；血液又は任意の血液成分；脳脊髄液、羊水、腹水又は間質液等の体液；又は被験体の妊娠若しくは成長における任意の時点からの細胞であることができる。いくつかの実施形態において、組織試料は初代又は培養した細胞又は細胞株を含むことができる。

30

## 【0045】

別の実施形態において、VSIを生成するために用いられる別の蛍光画像は、異なる生物学的試料由来であることができる。異なる生物学的試料は、類似の機能を有することができる生物学的被験体の組織から得た類似の細胞の集合体を含むことができる。ヒト組織の好適な例として(1)上皮、(2)血管、骨、及び軟骨を含む結合組織、(3)筋肉組織並びに(4)神経組織が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0046】

いくつかの実施形態において、生物学的試料は、健常な組織試料又は疾患の組織試料に由来する組織切片(例えば結腸、乳房組織及び前立腺に由来する組織切片)を含む。組織切片は組織試料の一部又は一片、例えば組織試料から切り取られた組織又は細胞の薄片を含むことができる。いくつかの実施形態において、組織試料の複数の切片を採取して分析することができる。

40

## 【0047】

本明細書に開示した方法を生物学及び医学における分析、診断及び治療の用途に適用することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示した方法を組織化学、特に免疫組織化学に適用することができる。本明細書で説明した方法に従って、患者からの細胞試料又は組織試料の分析を診断的に(例えば特定の疾患を有する、特定の毒素に曝された、又は特定の治療若しくは臓器移植によく反応する患者を識別するために)、及び予後診断的に(例えば特定の疾患を発症する可能性がある、特定の治療によく反応する可能性がある、又は特定の臓器移植を受け入れる可能性がある患者を識別するために)用いることができる。本明細書に開示した方法により、同じ生物学的試料由来の複数(例えば潜

50

在的には無限の数)の標的(例えば疾患マーカー)の正確且つ確実な分析を促進することができる。

【0048】

特定の実施形態において、生成されるVSIを病理学的診断に用いることができ、疾患を示す1つ以上の分子経路を分子マーカーに基づいて識別する段階を更に含むことができる。本方法を様々な疾患に用いることができるが、本方法が特に適している疾患の一種は癌であり、癌として上皮癌が挙げられるがそれに限定されない。上皮癌として乳癌、前立腺癌及び結腸癌が挙げられるがそれらに限定されない。

【0049】

特定の実施形態において、核、上皮及び間質から成る群から選択される1つ以上の形態学的構造の関数として分子経路を識別することを含む定量解析に、生成されたVSIを用いることができる。例えば、染色された蛍光画像をH&E座標系に変換し、共に観察することにより解析を向上させることができる。

10

【0050】

本方法を実施するための画像解析システムは一般的に、蛍光空間及び明視野空間の両方において分子マーカー及び形態学的染色剤で染色したデジタル画像を少なくとも一時的に記憶する手段と、逐次染色が含まれる場合には1回以上の位置合わせを用いて画像を共位置合わせするための処理装置とを含む。処理装置はまた、明視野画像及び2つ以上の蛍光画像の特徴ベース情報又はピクセル強度データ情報を少なくとも部分的に解析してマッピングパラメータを算出することにより2つ以上の蛍光画像をVSIに変換するように構成されている。

20

【0051】

本システムは、1つ以上の画像を表示する手段、インタラクティブビューア、仮想顕微鏡、及び/又は通信ネットワークを介して1つ以上の画像を送信する手段を更に含むことができる。処理装置はまた、形態学的特徴の分割に少なくとも部分的に基づいて1つ以上の画像を互いに重ねることもできる。

【0052】

特定の実施形態において、処理装置はまた、既に分析した1つ以上の生物学的試料由来のマッピングパラメータを記憶するように構成されている。これにより、変換アルゴリズムを別の蛍光画像に適用してVSIを生成するための手段が提供される。別の蛍光画像は、同じ生物学的試料の異なる領域由来であることができ、又は異なる生物学的試料由来であることができる。本システムではまた、ユーザが多く利用可能な変換から選択すること、及び期待される出力(生成されるVSI)の目視検査にインタラクティブに基づいて変換パラメータを更に調整することができる。

30

【0053】

いくつかの実施形態では、上述した1つ以上を自動化し、及び自動化システムを用いて実施することができる。いくつかの実施形態において、自動化システムを用いて全ての段階を実施することができる。

実施例：細胞ペレット試料に関する仮想染色と実際のDAB染色との比較

細胞の遠心分離、細胞のアガロースゲル中への固定、ホルマリン固定、及び抗原賦活化により、異なるレベルの発現を示す15のヒト細胞株の試料を調製した。次いで、従来の免疫ペルオキシダーゼ+DAB染色を用いて、及び直接コンジュゲートした蛍光抗体により細胞ペレットの連続切片を調製し、両抗体は、ヒト上皮成長因子受容体(EGFR)を対象にしている。DAB染色試料はヘマトキシリンで対比染色し、明視野顕微鏡を用いてカラーでイメージングした。免疫蛍光試料はDAPIで対比染色し、DAPI及び蛍光抗体の波長で、自動化蛍光顕微鏡においてイメージングした。

40

【0054】

免疫蛍光画像のピクセル強度及びDAPI波長における蛍光画像のピクセル強度の両方を直線的にスケールリングし、そのため、入射光が加えられていない場合に検出器により返された平均ピクセル強度を0.0の値にマッピングし、所定の波長での全ての画像にお

50

るピクセル強度の 0.995 の分位値を 1.0 の値にマッピングした。次いで、式

$$R = 255 \exp[-0.8 \text{EGFR} \log(255) - 0.6 \text{DAPI} \log(255)]$$

$$G = 255 \exp[-1.0 \text{EGFR} \log(255) - 1.0 \text{DAPI} \log(255)]$$

$$B = 255 \exp[-1.428 \text{EGFR} \log(255) - 0.34 \text{DAPI} \log(255)]$$

(式中、EGFR は免疫蛍光波長においてスケーリングしたピクセル強度を表し、DAPI は DAPI 波長においてスケーリングしたピクセル強度を表す) を用いて VSI を作成した。

【0055】

この作成後、

【0056】

【数2】

$$\begin{bmatrix} -0.25 & -0.25 & -0.25 \\ -0.25 & 3.00 & -0.25 \\ -0.25 & -0.25 & -0.25 \end{bmatrix}$$

【0057】

のカーネルを有する畳み込みフィルを適用して VSI を鮮明化した。

【0058】

図1は、ヘマトキシリン対比染色剤で DAB 染色した2つの代表的な細胞ペレットの明視野顕微鏡から得たカラー画像のモノクロ表現を示す。示すように、(a) は赤色のチャンネルを表し、(b) は緑色のチャンネルを表し、(c) は青色のチャンネルを表す。左側のペレットでは、EGFR 抗原に対する発現が強く染色されており、右側のペレットでは弱く染色されており、又は全く染色されていない (EGFR に対して陰性である)。蛍光画像及び仮想染色画像は両方とも顕微鏡上の同じ画像から得られている。

【0059】

図2は、蛍光顕微鏡から得た免疫染色試料のモノクロ蛍光画像を示す。画像(a) は細胞核を選択的に標識する DAPI 波長における蛍光強度を表し、(b) は上皮成長因子受容体を標識する、コンジュゲートした抗体により放射された波長における蛍光強度を表す。

【0060】

図3は、本明細書で教示した方法に従って蛍光画像を処理することにより得たカラー VSI のモノクロ表現を示す。画像(a) は赤色のチャンネルを表し、(b) は緑色のチャンネルを表し、(c) は青色のチャンネルを表す。視野内の細胞は図1の画像と同じペレットから得られている。左側のペレットでは EGFR 抗原に対する陽性が強く染色されているが、右側のペレットでは弱く染色されており、又は全く染色されていない。図3における染色パターンを観察して図1におけるものと同じ細胞特徴を示すことができるが、細部がより鮮明である。図3は、図2に示すのと同じ情報を正確に表示するが、ヒトの目がより容易に読み取ることができる形態である。

【0061】

これらの方法は、分子病理学と標準的な解剖学的病理学とを統合させる。H & E に基づく染色は、標準的な病理学で用いられる最も一般的な明視野顕微鏡染色技法である。前述したように、ヘマトキシリンは細胞核を青色に染色するが、対比染色剤としてのエオシンは細胞質及び結合組織をピンク色に染色する。明視野顕微鏡用の代替染色として用いることができる多数の別の公知の染色剤の組み合わせが存在している。例えば、核酸をイメージングするためにフォイルゲン染色を用いることができ、又は結合組織の繊維をイメージ

10

20

30

40

50

ングするためにオルセインを用いることができる。

【0062】

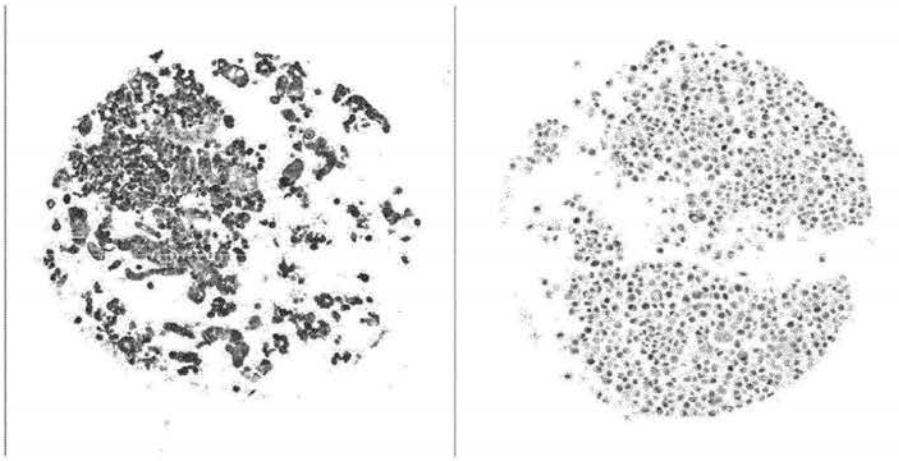
これらのマルチチャンネル法は、形態学的染色剤若しくは蛍光バイオマーカーに限定されず、又は更に病理学に限定されない。生物学的試料の何らかの情報の態様又は特徴を可視化することができ、そのためデジタルイメージングして処理することができる任意の染色剤がこれらの方法に適しているだろう。好適な染色剤として、細胞学的染色剤又は形態学的染色剤、免疫学的染色剤（例えば免疫組織化学的染色剤及び免疫細胞化学的染色剤）、細胞遺伝子学的染色剤、インサイチュハイブリダイゼーション染色剤、細胞化学的染色剤、DNAマーカー及び染色体マーカー、並びに基質結合アッセイ染色剤が挙げられるが必ずしもそれらに限定されない。別の医学的用途及び生物科学的用途も、拡張されたマルチチャンネルを利用することができる。これらのマルチチャンネル法は、光学的相互作用、化学的相互作用及び生物学的相互作用に限定されることなくマーカーを逐次にイメージングすることができる柔軟なフレームワークを提供する。

10

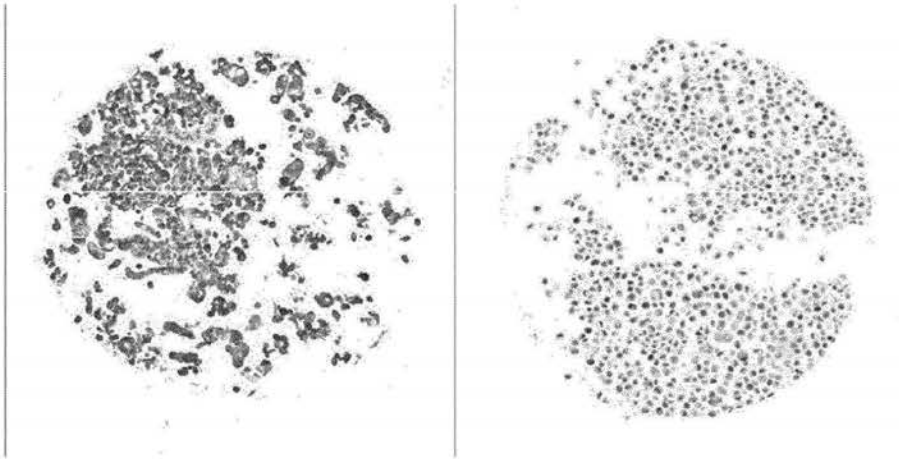
【0063】

本明細書には本発明の特定の特徴のみが例示及び説明されているが、当業者は多くの修正及び変更を想起するだろう。したがって、添付した特許請求の範囲は、本発明の範囲及び精神に含まれるそのような修正及び変更の全てを包含することを意図することを理解すべきである。

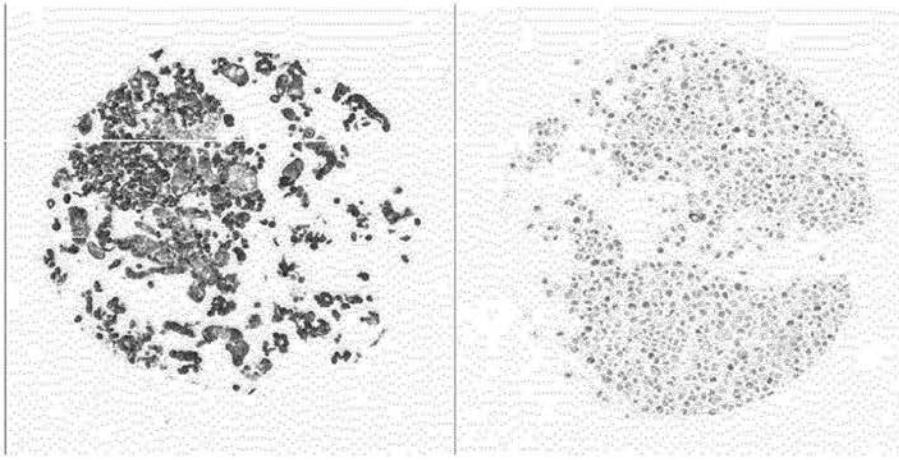
【 図 1 】



*Fig. 1A*

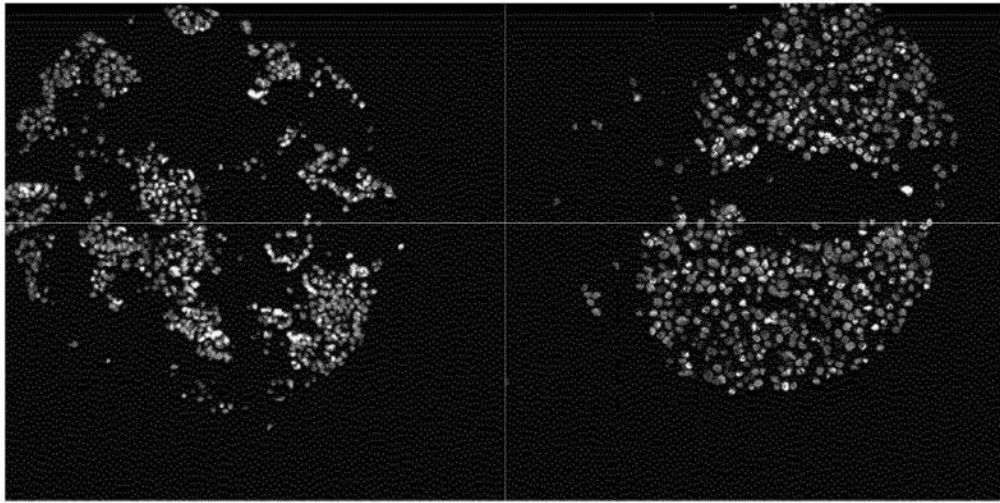


*Fig. 1B*

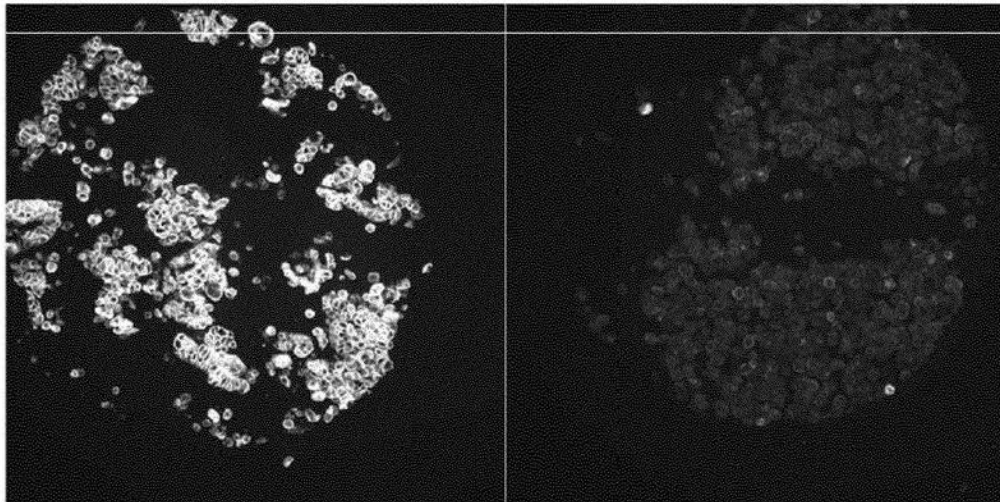


*Fig. 1C*

【 図 2 】

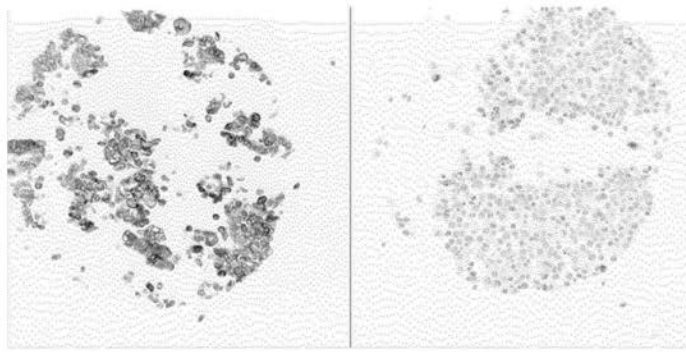


*Fig. 2A*

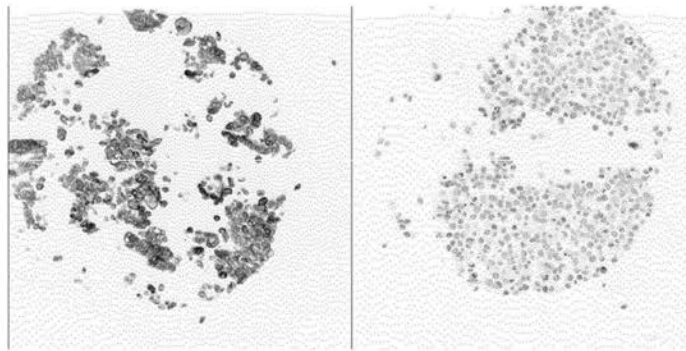


*Fig. 2B*

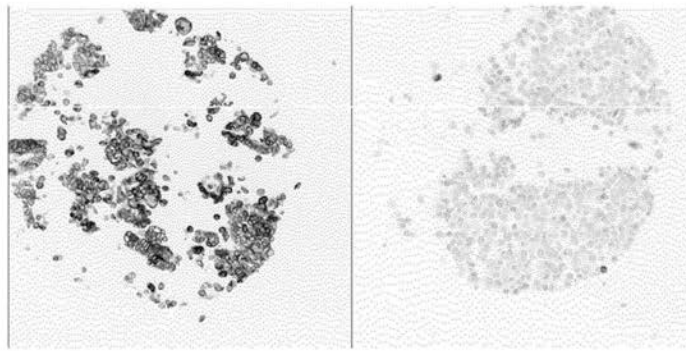
【 図 3 】



*Fig. 3A*



*Fig. 3B*



*Fig. 3C*

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/065943
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N21/64 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N G06T		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, INSPEC, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/55026 A1 (KAIROS SCIENT INC [US]) 10 December 1998 (1998-12-10)	1,2, 4-16, 18-20
A	page 12, line 8 - page 14, line 35 page 26, line 25 - page 29, paragraph 23 figures 3-5 examples 3,4	3,17
A	----- STEHLE T ET AL: "Enhancement of visual contrast in fluorescence endoscopy", MULTIMEDIA AND EXPO, 2008 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON, IEEE, PISCATAWAY, NJ, USA, 23 June 2008 (2008-06-23), pages 537-540, XP031312777, ISBN: 978-1-4244-2570-9 paragraph [0002] ----- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  7 November 2012		Date of mailing of the international search report  13/11/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rasmusson, Marcus

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/065943

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JUNJUN XIA ET AL: "Color image enhancement algorithm based on logarithmic transform coefficient histogram", PROCEEDINGS OF SPIE, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 78700Y-78700Y-10, XP55043198, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.872418 paragraph [0002]</p> <p>-----</p>	1-20
A	<p>ALEKSANDRA LEDWON ET AL: "The possibilities of improvement in the sensitivity of cancer fluorescence diagnostics by computer image processing", PROCEEDINGS OF SPIE, vol. 6859, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 68591E-68591E-8, XP55043200, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.762323 paragraph [0002]</p> <p>-----</p>	1-20
A	<p>G. C. TANG: "Ultraviolet-Visible Acousto-Optic Tunable Spectroscopic Imager for Medical Diagnosis", JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, vol. 3, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), page 80, XP55043076, ISSN: 1083-3668, DOI: 10.1117/1.429864 paragraph [0002] - paragraph [0003]</p> <p>-----</p>	1-20
A	<p>JASON BINI ET AL: "Confocal mosaicing microscopy of human skin ex vivo: spectral analysis for digital staining to simulate histology-like appearance", JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, vol. 16, no. 7, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 076008-076008, XP55042690, ISSN: 1083-3668, DOI: 10.1117/1.3596742 the whole document</p> <p>-----</p>	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/065943

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9855026	A1	10-12-1998	CA 2291730 A1
			EP 0987985 A1
			JP 2002506521 A
			US 6456734 B1
			US 2002118870 A1
			WO 9855026 A1
-----			

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ケニー、ケヴィン・バーナード

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309-1027、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル、ジーイー・グローバル・リサーチ

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA07 DA06 EA01 EA13 FA01 FA06 JA03 KA02  
LA03 MA01 NA01  
2G045 AA24 BA14 BB24 CB01 FA16 FB12 GB01

专利名称(译)	使用荧光图像产生亮场图像的系统和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014521979A</a>	公开(公告)日	2014-08-28
申请号	JP2014525441	申请日	2012-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
[标]发明人	ケニーケヴィンバーナード		
发明人	ケニー,ケヴィン・バーナード		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/6458 G01N21/643 G01N2021/6441		
FI分类号	G01N21/64.F G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA07 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/EA13 2G043/FA01 2G043/FA06 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/LA03 2G043/MA01 2G043/NA01 2G045/AA24 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB12 2G045/GB01		
代理人(译)	小仓 博 田中 拓人		
优先权	13/211725 2011-08-17 US		
其他公开文献	JP6074427B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

提供了一种使用荧光图像生成类似于生物样品的明场染色方案的明场型图像的方法。 这些步骤包括获取生物样品上固定区域的一个或多个荧光图像，将所述荧光图像映射到明场色彩空间中，生成明场图像，以及可选地应用锐化变换校正。 还提供了一种图像分析系统，用于使用荧光图像生成生物样品的明场型图像。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2012/065943
Inv. No. <b>G01N21/64</b> SUBJECT MATTER ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC In. Filing date (date) International classification established (classification system followed by classification symbol) <b>G01N 21/64</b>		
Descriptions searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, INSPEC, WPI Data		
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Referred to claim No.
X	NO 98/55026 A1 (KAIROS SCIENT INC [US]) 10 December 1998 (1998-12-10)	1,2, 4,16, 18-20
A	page 12, line 8 - page 14, line 35 page 26, line 25 - page 29, paragraph 23 figures 3-5 examples 3,4	3,17
A	STEHLE T ET AL: "Enhancement of visual contrast in fluorescence microscopy", MULTIMEDIA AND EXPD, 2008 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON, IEEE, PISCATAWAY, NJ, USA, 23 June 2008 (2008-06-23), pages 537-540, XP03192777 ISBN: 0781-4244-2570-9 paragraph [0662]	1-20
* Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> New patent family member.		
*1* Inter document published after the international filing date or priority date of the international application and the international filing date of the priority or family underlying the invention.		
*2* Document published before the international filing date or priority date of the international application and the international filing date of the priority or family underlying the invention.		
*3* Document which may have priority, or may be a divisional or a continuation-in-part of an international application, or may be a divisional or a continuation-in-part of a national application, or may be a national application of an international application, or may be a national application of a national application.		
*4* Document published after the international filing date but later than the international filing date of the priority or family underlying the invention.		
*5* Document member of the same patent family.		
Date of the search report of the international search: <b>7 November 2012</b>		Date of mailing of the international search report: <b>13/11/2012</b>
Name and mailing address of the ISA/P: <b>7/2012/EP/SEARCH</b> P. O. 5516 Palatinus 2 1110 Luxembourg LU 1110, LUXEMBOURG		Authorized officer: <b>ROUSSIGNON, MARCUS</b>