

(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2021-526220
(P2021-526220A)

(43) 公表日 令和3年9月30日(2021.9.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F 2 G O 4 3
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	M 2 G O 4 5
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2021-510296 (P2021-510296)
 (86) (22) 出願日 令和1年5月3日 (2019.5.3)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月24日 (2020.12.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/030735
 (87) 国際公開番号 W02019/213618
 (87) 国際公開日 令和1年11月7日 (2019.11.7)
 (31) 優先権主張番号 62/666,697
 (32) 優先日 平成30年5月3日 (2018.5.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 520428650
 アコヤ・バイオサイエンシズ・インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・940
 25・メンロー・パーク・オブライエン・
 ドライブ・1505・スイート・エー-1
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチスペクトルサンプル画像化

(57) 【要約】

本開示は、N個のサンプル画像を取得するために、生物学的サンプルを照明光に曝露し、サンプルからの発光を測定するステップであって、各サンプル画像が、照明光の波長バンドと発光の1つまたは複数の波長バンドとの異なる組合せに対応し、発光の1つまたは複数の波長バンドが波長範囲を定義し、N>1である、ステップと、サンプルのバックグラウンド画像を取得するために、サンプルをバックグラウンド励起バンドにおける照明光に曝露し、バックグラウンドスペクトルバンドにおけるサンプルからの発光を測定するステップであって、バックグラウンドスペクトルバンドが波長範囲内の波長に対応する、ステップとを含む方法の特徴とする。

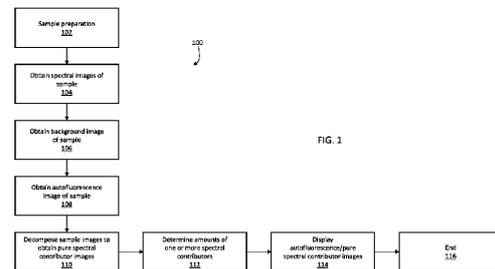


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

N個のサンプル画像を取得するために、生物学的サンプルを照明光に曝露し、前記サンプルからの発光を測定するステップであって、各サンプル画像が、前記照明光の波長バンドと前記発光の1つまたは複数の波長バンドとの異なる組合せに対応し、前記発光の前記1つまたは複数の波長バンドが波長範囲を定義し、 $N>1$ である、ステップと、

前記サンプルのバックグラウンド画像を取得するために、前記サンプルをバックグラウンド励起バンドにおける照明光に曝露し、バックグラウンドスペクトルバンドにおける前記サンプルからの発光を測定するステップであって、前記バックグラウンドスペクトルバンドが前記波長範囲内の波長に対応する、ステップと

10

を含む方法であって、

前記バックグラウンド励起バンドにおける前記照明光に曝露された前記サンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるスペクトル発光強度が、前記照明光の前記波長バンドおよび前記バックグラウンド励起バンドの各々における前記サンプルの励起後の前記非内因性スペクトル寄与因子の最大測定スペクトル発光強度の10%以下である、方法。

【請求項2】

前記バックグラウンド画像から前記サンプルの自家蛍光画像を取得するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

20

前記バックグラウンド励起バンドにおける前記照明光に曝露された前記サンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長における前記スペクトル発光強度が、前記照明光の前記波長バンドおよび前記バックグラウンド励起バンドの各々における前記サンプルの励起後の前記非内因性スペクトル寄与因子の前記最大測定スペクトル発光強度の4%以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記バックグラウンド励起バンドにおける前記照明光に曝露された前記サンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長における前記スペクトル発光強度が、前記照明光の前記波長バンドおよび前記バックグラウンド励起バンドの各々における前記サンプルの励起後の前記非内因性スペクトル寄与因子の前記最大測定スペクトル発光強度の2%以下である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項5】

前記バックグラウンドスペクトルバンドが、半値全幅(FWHM)スペクトル幅 $\Delta\lambda$ と中心波長 λ_c とを有する波長の分布を含み、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の前記波長が、 $\lambda_c - \Delta\lambda/2$ から $\lambda_c + \Delta\lambda/2$ までの範囲内の波長に対応する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

$N>3$ である、請求項1に記載の方法。

40

【請求項7】

$N>5$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記サンプルが、M個の非内因性スペクトル寄与因子を含み、 $M \geq N$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

$M>4$ である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

$M>6$ である、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

50

前記自家蛍光画像をディスプレイデバイス上に表示するステップをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項12】

前記サンプル内の複数の場所の各々において、前記サンプルからの自家蛍光発光の量を決定するステップをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項13】

前記サンプル内の前記複数の場所の各々において、および、前記N個のサンプル画像の1つまたは複数について、

前記複数の場所の各々における前記自家蛍光発光の量と、前記サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとに基づいて、前記サンプルからの自家蛍光発光を補正するために、サンプル発光強度に対応する値を調整するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

10

【請求項14】

前記自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルが、自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルを含み、前記自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルが、各々、前記複数の場所の異なるサブセットに対応する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

M個のスペクトル寄与因子画像を取得するために、前記複数の場所の各々における前記サンプルからの前記自家蛍光発光の量に基づいて、前記N個のサンプル画像のうちの少なくともいくつかを分解するステップであって、前記M個のスペクトル寄与因子画像の各々が、前記非内因性スペクトル寄与因子の異なる1つからのみの発光に対応する、ステップと、

20

複数の場所の各々において、前記サンプル内の前記M個の非内因性スペクトル寄与因子の量を決定するステップと

をさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルに基づいて、前記N個のサンプル画像のうちの前記少なくともいくつかを分解するステップをさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルが、自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルを含み、前記自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルが、各々、前記複数の場所の異なるサブセットに対応する、請求項16に記載の方法。

30

【請求項18】

前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長における前記サンプル内の各非内因性スペクトル寄与因子のスペクトル発光強度の合計が、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の全蛍光発光強度の10%以下である、請求項9に記載の方法。

【請求項19】

前記自家蛍光画像から導出された情報に基づいて、前記サンプル画像のうちの1つまたは複数のサンプル画像のピクセルを異なるクラスに分類するステップをさらに含む、請求項2に記載の方法。

40

【請求項20】

前記異なるクラスが、前記サンプル内の異なる細胞タイプに対応する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記M個の非内因性スペクトル寄与因子が、前記サンプル内の異なる化学部分に選択的に結合する1つまたは複数の蛍光種を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項22】

前記1つまたは複数の蛍光種が、1つまたは複数の免疫蛍光プローブを含む、請求項21に記載の方法。

50

【請求項 2 3】

前記M個の非内因性スペクトル寄与因子が、1つまたは複数の対比染色を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 2 4】

処理デバイスによって実行されると、前記処理デバイスに、

サンプルの1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子画像を取得するために、前記サンプルに関する自家蛍光情報を使用して、生物学的サンプルの複数のサンプル画像を分解させ、

前記1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子画像に基づいて、前記サンプル内の複数の場所における1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の量を決定させ、

前記処理デバイスに接続されたディスプレイデバイス上に、前記非内因性スペクトル寄与因子画像のうちの少なくとも1つを含む出力表示を生成させる

命令を備えるコンピュータ可読記憶媒体であって、

各サンプル画像が、前記サンプルを照明するために使用される照明光の波長バンドと、前記サンプルからの発光の1つまたは複数の波長バンドとの異なる組合せに対応し、前記発光の1つまたは複数の波長バンドが波長範囲を定義し、

前記バックグラウンド画像が、バックグラウンド励起バンド内の光による前記サンプルの照明と、バックグラウンドスペクトルバンド内の前記サンプルからの発光の測定とに対応し、

前記バックグラウンド励起バンド内の光で照明された前記サンプル内の前記1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるスペクトル発光強度が、前記照明光の各波長バンドおよび前記バックグラウンド励起バンドにおける前記サンプルの励起後の前記非内因性スペクトル寄与因子の最大測定スペクトル発光強度の10%以下である、

コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 2 5】

前記処理デバイスによって実行されると、前記処理デバイスに前記サンプルのバックグラウンド画像から前記サンプルに関する前記自家蛍光情報取得させる命令をさらに備える、請求項24に記載の記憶媒体。

【請求項 2 6】

各非内因性スペクトル寄与因子画像が、前記サンプル内の前記非内因性スペクトル寄与因子のうちの異なる1つからの発光のみに対応する、請求項25に記載の記憶媒体。

【請求項 2 7】

前記バックグラウンド励起バンド内の光で照明された前記サンプル内の前記1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長における前記スペクトル発光強度が、前記照明光の各波長バンドおよび前記バックグラウンド励起バンドにおける前記サンプルの励起後の前記非内因性スペクトル寄与因子の前記最大測定スペクトル発光強度の4%以下である、請求項25に記載の記憶媒体。

【請求項 2 8】

前記バックグラウンド励起バンド内の光で照明された前記サンプル内の前記1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長における前記スペクトル発光強度が、前記照明光の各波長バンドおよび前記バックグラウンド励起バンドにおける前記サンプルの励起後の前記非内因性スペクトル寄与因子の前記最大測定スペクトル発光強度の2%以下である、請求項25に記載の記憶媒体。

【請求項 2 9】

前記サンプルは、M個の非内因性スペクトル寄与因子を含み、M \leq Nである、請求項24に記載の記憶媒体。

【請求項 3 0】

M>4である、請求項29に記載の記憶媒体。

【請求項 3 1】

M>6である、請求項29に記載の記憶媒体。

【請求項 3 2】

前記自家蛍光情報が、前記サンプル内の前記複数の場所の各々における前記サンプルからの自家蛍光発光の量を含む、請求項25に記載の記憶媒体。

【請求項 3 3】

前記処理デバイスによって実行されると、前記処理デバイスに、前記自家蛍光情報と、前記サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとを使用して、前記複数のサンプル画像を分解させる命令をさらに備える、請求項32に記載の記憶媒体。

10

【請求項 3 4】

前記処理デバイスによって実行されると、前記処理デバイスに、前記バックグラウンド画像から前記自家蛍光の少なくとも1つの純粋なスペクトルを決定させる命令をさらに備える、請求項33に記載の記憶媒体。

【請求項 3 5】

前記サンプルからの前記自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルが、前記サンプルからの自家蛍光発光の2つ以上の異なる純粋なスペクトルを含み、前記異なる純粋なスペクトルの各々が、前記複数の空間的位置の異なるサブセットに対応する、請求項33に記載の記憶媒体。

20

【請求項 3 6】

前記処理デバイスによって実行されると、前記処理デバイスに、前記複数の場所の各々における前記自家蛍光発光の量と、前記サンプルからの前記自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとに基づいて、前記サンプルからの自家蛍光発光を補正するために、前記サンプル画像の各々におけるサンプル発光強度に対応する値を調整させる命令をさらに備える、請求項33に記載の記憶媒体。

【請求項 3 7】

前記バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長における前記サンプル内の各非内因性スペクトル寄与因子のスペクトル発光強度の合計が、前記バックグラウンドスペクトルバンド内の全蛍光発光強度の10%以下である、請求項24に記載の記憶媒体。

【請求項 3 8】

前記処理デバイスによって実行されると、前記処理デバイスに、前記自家蛍光情報に基づいて、前記サンプル画像のうちの1つまたは複数のサンプル画像のピクセルを異なるクラスに分類させる命令をさらに備える、請求項24に記載の記憶媒体。

30

【請求項 3 9】

前記異なるクラスが、前記サンプル内の異なる細胞タイプに対応する、請求項38に記載の記憶媒体。

【請求項 4 0】

前記M個の非内因性スペクトル寄与因子が、前記サンプル内の異なる化学部分に選択的に結合する1つまたは複数の蛍光種を含む、請求項27に記載の記憶媒体。

【請求項 4 1】

前記M個の非内因性スペクトル寄与因子が、1つまたは複数の対比染色を含む、請求項40に記載の記憶媒体。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018年5月3日に提出した米国仮特許出願第62/666,697号の優先権を主張するものである。

【0002】

本開示は、特に蛍光顕微鏡法による、生物学的サンプルのマルチスペクトル画像化に関

50

する。

【背景技術】

【0003】

蛍光顕微鏡技法は、疾患と患者の反応とに関する情報を提供し、研究環境における人間の理解を促進し、臨床環境における個々の患者の治療を導くために、病理学において使用される。大部分の蛍光顕微鏡技法は、既知の励起および発光特性を有する強力な蛍光信号を提供するように設計または選択された色素を利用する。免疫蛍光標識化技法は、タンパク質、抗体、核酸、ならびに他の組織および細胞の成分が、比較的少量で存在する場合であっても検査され得るように、サンプル内の個々のエピトープが特異的に標的化されることを可能にする。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願公開第2014/0193061号

【特許文献2】米国特許第7,321,791号

【特許文献3】PCT特許出願公開第WO2005/040769号

【特許文献4】米国特許第10,126,242号

【特許文献5】米国特許第8,634,607号

【特許文献6】米国特許第7,555,155号

【特許文献7】米国特許第8,103,331号

20

【特許文献8】米国特許出願公開第2014/0193050号

【特許文献9】米国特許出願第15/837,956号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

マルチスペクトル画像化では、複数の色素または染色剤がサンプルに適用され、次いで、サンプルが、広範囲の波長にわたって画像化され、空間測定およびスペクトル測定の組み合わせされたセットをもたらす。色素または染色剤は、各染色剤が対象のサンプル成分に特異的に結合するようにサンプルに適用され得る。サンプル成分の各々の寄与は、サンプル内の対象の成分の各々の量と空間分布とを決定するために、空間測定とスペクトル測定のセットを分析することによって分離される。特定の蛍光色素は、比較的明確に定義された励起バンドと発光バンドとを有する。したがって、いくつかのサンプルについて、発光バンド間の過度のクロストークなしにスペクトルフィルタリングを介して検出され得るように、十分に異なる発光バンドを有するいくつかの色素、典型的には、3または4つの色素を選択することができる場合がある。

30

【0006】

組織サンプルは、自家蛍光と呼ばれる、ある程度の内因性の蛍光応答を示す。自家蛍光は、おそらく固定化学物質または固定プロセスの結果として、新鮮な冷凍サンプルにおけるよりもホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded)サンプルにおけるほうが強い可能性がある。設計された色素とは異なり、自家蛍光は、自然現象であり、明確に定義された励起バンドと発光バンドとを持たない。反対に、自家蛍光は、可視範囲の大部分に及ぶ広い発光を有し、サンプル内の対象の成分に特異的に結合された色素のために、その発光を蛍光発光と区別するのを困難にする。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、1つまたは複数の色素または染色剤が適用されたサンプル内の自家蛍光を測定するための方法およびシステムを特徴とする。一般に、複数の色素または染色剤が適用されたサンプルについて、蛍光発光は、いくつかのスペクトル波長バンドにおいて測定され、スペクトル波長バンドの各々は、色素または染色剤のうちの単一のもののみからの蛍光発光に主として対応する場合がある。蛍光発光は、適用された色素または染色剤のいず

50

れからの有意な発光にも対応しない発光バンドにおいても測定される。このバンドにおける発光は、主にサンプルからの自家蛍光に対応する。このバンドにおける蛍光発光の測定から導出された情報に基づいて、サンプル全体の自家蛍光が定量化され得る。定量化された自家蛍光は、次いで、色素または染色剤の一部またはすべてに関する蛍光発光測定を補正するために使用され得、サンプル内の異なる場所において色素または染色剤の一部またはすべてを定量的に測定するためにさらに使用され得る。

【 0 0 0 8 】

一態様において、本開示は、N個のサンプル画像を取得するために、生物学的サンプルを照明光に曝露し、サンプルからの発光を測定するステップであって、各サンプル画像が、照明光の波長バンドと発光の1つまたは複数の波長バンドとの異なる組合せに対応し、発光の1つまたは複数の波長バンドが波長範囲を定義し、 $N > 1$ である、ステップと、サンプルのバックグラウンド画像を取得するために、サンプルをバックグラウンド励起バンドにおける照明光に曝露し、バックグラウンドスペクトルバンドにおけるサンプルからの発光を測定するステップであって、バックグラウンドスペクトルバンドが波長範囲内の波長に対応する、ステップとを含む方法であって、バックグラウンド励起バンドにおける照明光に曝露されたサンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるスペクトル発光強度が、照明光の波長バンドおよびバックグラウンド励起バンドの各々におけるサンプルの励起後の非内因性スペクトル寄与因子の最大測定スペクトル発光強度の10%以下である、方法を特徴とする。

10

20

【 0 0 0 9 】

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

【 0 0 1 0 】

方法は、バックグラウンド画像からサンプルの自家蛍光画像を取得するステップを含むことができる。バックグラウンド励起バンドにおける照明光に曝露されたサンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるスペクトル発光強度は、照明光の波長バンドおよびバックグラウンド励起バンドの各々におけるサンプルの励起後の非内因性スペクトル寄与因子の最大測定スペクトル発光強度の4%以下(例えば、2%以下)であり得る。バックグラウンドスペクトルバンドは、半値全幅(FWHM: full width at half maximum)スペクトル幅 $\Delta\lambda$ と中心波長 λ_c とを有する波長の分布を含むことができ、バックグラウンドスペクトルバンド内の波長が、 $\lambda_c - \Delta\lambda/2$ から $\lambda_c + \Delta\lambda/2$ までの範囲内の波長に対応することができる。

30

【 0 0 1 1 】

Nは、3よりも大きくすることができる(例えば、5よりも大きくすることができる)。サンプルは、M個の非内因性スペクトル寄与因子を含むことができ、 $M \geq N$ である。Mは、4よりも大きくすることができる(例えば、6よりも大きくすることができる)。方法は、自家蛍光画像をディスプレイデバイス上に表示するステップを含むことができる。

【 0 0 1 2 】

方法は、サンプル内の複数の場所の各々において、サンプルからの自家蛍光発光の量を決定するステップを含むことができる。方法は、サンプル内の複数の場所の各々において、および、N個のサンプル画像の1つまたは複数について、複数の場所の各々における自家蛍光発光の量と、サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとに基づいて、サンプルからの自家蛍光発光を補正するために、サンプル発光強度に対応する値を調整するステップを含むことができる。自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルは、自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルを含むことができ、自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルは、各々、複数の場所の異なるサブセットに対応することができる。方法は、M個のスペクトル寄与因子画像を取得するために、複数の場所の各々におけるサンプルからの自家蛍光発光の量に基づいて、N個のサンプル画像のうちの一つを分解するステップであって、M個のスペクトル寄与因子画像の各々が、非内因性スペクトル寄与因子の異なる1つからのみの発光に対応する、ステップと、複数の場所の

40

50

各々において、サンプル内のM個の非内因性スペクトル寄与因子の量を決定するステップとを含むことができる。

【0013】

方法は、サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルに基づいて、N個のサンプル画像のうちの少なくともいくつかを分解するステップを含むことができる。自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルは、自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルを含むことができ、自家蛍光発光の複数の純粋なスペクトルは、各々、複数の場所の異なるサブセットに対応することができる。

【0014】

バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるサンプル内の各非内因性スペクトル寄与因子のスペクトル発光強度の合計は、バックグラウンドスペクトルバンド内の全蛍光発光強度の10%以下であり得る。

【0015】

方法は、自家蛍光画像から導出された情報に基づいて、サンプル画像のうちの1つまたは複数のピクセルを異なるクラスに分類するステップを含むことができる。異なるクラスは、サンプル内の異なる細胞タイプに対応することができる。

【0016】

M個の非内因性スペクトル寄与因子は、サンプル内の異なる化学部分に選択的に結合する1つまたは複数の蛍光種を含むことができる。1つまたは複数の蛍光種は、1つまたは複数の免疫蛍光プローブを含むことができる。M個の非内因性スペクトル寄与因子は、1つまたは複数の対比染色を含むことができる。

【0017】

方法の実施形態は、特に明記しない限り、異なる実施形態に関連して個別に説明した特徴の任意の組合せを含む、本明細書で説明した他の特徴のいずれかを含むこともできる。

【0018】

別の態様では、本開示は、処理デバイスによって実行されると、処理デバイスに、サンプルの1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子画像を取得するために、サンプルに関する自家蛍光情報を使用して、生物学的サンプルの複数のサンプル画像を分解させ、1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子画像に基づいて、サンプル内の複数の場所における1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の量を決定させ、処理デバイスに接続されたディスプレイデバイス上に、非内因性スペクトル寄与因子画像のうちの少なくとも1つを含む出力表示を生成させる命令を含むコンピュータ可読記憶媒体であって、各サンプル画像が、サンプルを照明するために使用される照明光の波長バンドと、サンプルからの発光の1つまたは複数の波長バンドとの異なる組合せに対応し、発光の1つまたは複数の波長バンドが波長範囲を定義し、バックグラウンド画像が、バックグラウンド励起バンド内の光によるサンプルの照明と、バックグラウンドスペクトルバンド内のサンプルからの発光の測定とに対応し、バックグラウンド励起バンド内の光で照明されたサンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるスペクトル発光強度が、照明光の各波長バンドおよびバックグラウンド励起バンドにおけるサンプルの励起後の非内因性スペクトル寄与因子の最大測定スペクトル発光強度の10%以下である、コンピュータ可読記憶媒体を特徴とする。

【0019】

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

【0020】

記憶媒体は、処理デバイスによって実行されると、処理デバイスにサンプルのバックグラウンド画像からサンプルに関する自家蛍光情報取得させる命令を含むことができる。各非内因性スペクトル寄与因子画像は、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子のうちの異なる1つからの発光のみに対応することができる。

【0021】

10

20

30

40

50

バックグラウンド励起バンド内の光で照明されたサンプル内の1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の各々について、バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるスペクトル発光強度は、照明光の各波長バンドおよびバックグラウンド励起バンドにおけるサンプルの励起後の非内因性スペクトル寄与因子の最大測定スペクトル発光強度の4%以下(例えば、2%以下)であり得る。

【0022】

サンプルは、M個の非内因性スペクトル寄与因子を含むことができ、 $M \leq N$ である。Mは、4よりも大きくすることができる(例えば、6よりも大きくすることができる)。

【0023】

自家蛍光情報は、サンプル内の複数の場所の各々におけるサンプルからの自家蛍光発光の量を含むことができる。記憶媒体は、処理デバイスによって実行されると、処理デバイスに、自家蛍光情報と、サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとを使用して、複数のサンプル画像を分解させる命令を含むことができる。記憶媒体は、処理デバイスによって実行されると、処理デバイスに、バックグラウンド画像から自家蛍光の少なくとも1つの純粋なスペクトルを決定させる命令を含むことができる。

10

【0024】

サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルは、サンプルからの自家蛍光発光の2つ以上の異なる純粋なスペクトルを含むことができ、異なる純粋なスペクトルの各々は、複数の空間的位置の異なるサブセットに対応することができる。

【0025】

記憶媒体は、処理デバイスによって実行されると、処理デバイスに、複数の場所の各々における自家蛍光発光の量と、サンプルからの自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとに基づいて、サンプルからの自家蛍光発光を補正するために、サンプル画像の各々におけるサンプル発光強度に対応する値を調整させる命令を含むことができる。

20

【0026】

バックグラウンドスペクトルバンド内の各波長におけるサンプル内の各非内因性スペクトル寄与因子のスペクトル発光強度の合計は、バックグラウンドスペクトルバンド内の全自家蛍光発光強度の10%以下であり得る。

【0027】

記憶媒体は、処理デバイスによって実行されると、処理デバイスに、自家蛍光情報に基づいて、サンプル画像のうちの1つまたは複数のピクセルを異なるクラスに分類させる命令を含むことができる。異なるクラスは、サンプル内の異なる細胞タイプに対応することができる。

30

【0028】

M個の非内因性スペクトル寄与因子は、サンプル内の異なる化学部分に選択的に結合する1つまたは複数の蛍光種を含むことができる。M個の非内因性スペクトル寄与因子は、1つまたは複数の対比染色を含むことができる。

【0029】

記憶媒体の実施形態は、特に明記しない限り、異なる実施形態に関連して説明した特徴の任意の組合せを含む、本明細書で説明した他の特徴のいずれかを含むこともできる。

40

【0030】

特に定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で説明したものと類似のまたは同等の方法および材料が、本明細書の主題の実施またはテストにおいて使用され得るが、適切な方法および材料について以下に説明する。本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照によって組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。加えて、材料、方法、および例は、例示に過ぎず、限定であることを意図していない。

【0031】

1つまたは複数の実施形態の詳細は、添付図面および説明において記載されている。他

50

の特徴および利点は、説明、図面、および特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】サンプルの自家蛍光を測定するための例示的なステップを示すフローチャートである。

【図2】サンプルの自家蛍光を測定するための例示的なシステムの概略図である。

【図3】サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子による蛍光発光と、サンプルの自家蛍光とを測定するために使用され得るスペクトル発光バンドの例示的なセットを示す概略図である。

【図4】サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子からの蛍光発光を示す概略図である。

10

【図5A】サンプルの蛍光を測定するために使用され得る4つの落射(epi)フィルタキューブのスペクトル特性を示すグラフである。

【図5B】サンプルの蛍光を測定するために使用され得る4つの落射フィルタキューブのスペクトル特性を示すグラフである。

【図5C】サンプルの蛍光を測定するために使用され得る4つの落射フィルタキューブのスペクトル特性を示すグラフである。

【図5D】サンプルの蛍光を測定するために使用され得る4つの落射フィルタキューブのスペクトル特性を示すグラフである。

【図6A】免疫蛍光標識として使用される対比染色および6つの色素に関する色素励起応答を示すグラフである。

20

【図6B】図6Aの対比染色および色素に関する蛍光発光応答を示すグラフである。

【図6C】387nmにおいて励起されたとき、および425nmにおいて640として励起されたときの、ホルマリン固定パラフィン包埋肺癌サンプルからの自家蛍光発光を示すグラフである。

【図7A】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図7B】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

30

【図7C】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図7D】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図7E】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図7F】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

40

【図7G】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図7H】スペクトル励起波長バンドとスペクトル発光波長バンドとの異なる組合せにおける、サンプルの励起およびサンプルの蛍光の測定後に取得されたサンプル画像およびバックグラウンド画像を示す図であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図8A】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図7A~図7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、

50

画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 B】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 C】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 D】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 E】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 F】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 G】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 8 H】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプルの一部を示す。

【図 9 A】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 B】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 C】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 D】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 E】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 F】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 G】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 9 H】サンプル画像およびバックグラウンド画像をアンミキシングして取得された図 7A～図 7Hのサンプルに関する純粋なスペクトル寄与因子画像および自家蛍光画像であり、画像の各々は、サンプル全体を示す。

【図 10 A】画像のセットを示す図であり、各セットは、それぞれ、複数の非内因性色素で調製されたサンプルおよび未染色のサンプルに関する、自家蛍光画像と、二項分類マスクと、FoxP3存在量画像と、しきい値セグメンテーションマスクと、FoxP3陽性細胞のみを示す画像とを含む。

10

20

30

40

50

【図10B】画像のセットを示す図であり、各セットは、それぞれ、複数の非内因性色素で調製されたサンプルおよび未染色のサンプルに関する、自家蛍光画像と、二項分類マスクと、FoxP3存在量画像と、しきい値セグメンテーションマスクと、FoxP3陽性細胞のみを示す画像とを含む。

【発明を実施するための形態】

【0033】

様々な図面における同様の参照記号は、同様の要素を示す。

【0034】

自家蛍光の存在下で免疫蛍光標的を正確に測定するために、様々な技法が開発されてきた。1つの手法は、マルチスペクトル画像化を含み、マルチスペクトル画像化では、免疫蛍光標識に関連する色素の寄与をサンプルの自家蛍光による蛍光発光から区別するために、様々な波長においてサンプル画像が取得される。これらの信号は、スペクトル的に重なるが、各信号のスペクトル形状は、異なる。測定された蛍光信号への寄与を個々の色素に対応する個々のスペクトル成分に分離するために、スペクトルアンミキシングまたは他のスペクトル分離ステップが実行され、スペクトル的に広い自家蛍光発光の存在にもかかわらず、複数の色素の測定を可能にする。スペクトルアンミキシング技法は、色素からの蛍光発光がスペクトル的に重なっている場合であっても、サンプル内のいくつかの色素からの寄与を区別することができ、重要な多重サンプル標識の利点を提供する。

10

【0035】

多重免疫蛍光標識は、1つのサンプルにおいて複数の一次抗体を標的化することを指し、様々な方法において達成され得る。概念的に最も簡単なものは、直接標識であり、直接標識では、一次抗体分子が色素に結合され、異なる色素は、異なる一次抗体に結合される。この標識プロセスは、典型的には、標的ごとに1つの色素分子を生じるので、標的自体が豊富でない限り、信号レベルが低くなる可能性がある。関節標識は、標的ごとに複数の色素分子を結合する方法を提供し、より弱い標的が研究されることを可能にする。相互標識(cross-labeling)を回避するために、一般に、異なる二次抗体のアイソタイプまたは種が各標的に使用され、標識プロセスをより複雑にする。

20

【0036】

複数の特定の色素を導入するための別の手法は、色素ポリマに結合された相補的配列によって認識されるヌクレオチド配列に一次抗体を結合することである。この技法は、利用可能な二次抗体種の数によって制限されない。

30

【0037】

サンプルに選択的に結合する各蛍光色素の量を増やすために、色素は、チラミドシグナル増幅(TSA: tyramide signal amplification)を使用して、サンプルに順次選択的に適用され得る。TSAでは、シンナミドまたはチラミド分子を介する色素分子の周囲組織への共有結合を触媒するために、単一の一次抗体が、ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合された二次抗体とともに使用される。色素分子は、組織に共有結合されているので、一次抗体および二次抗体は、その後除去され得、プロセスは、他の一次抗体および色素分子を用いて繰り返され得、多重化された特定の手法で、より高濃度の色素分子がサンプルに導入されることを可能にする。

40

【0038】

いくつかのTSAベースの染色プロトコルでは、シンナミドまたはチラミド分子を介して、小分子リガンドをサンプル組織に選択的に共有結合し、その後、複数の色素分子に結合されたりリガンド結合タンパク質を用いてサンプルをインキュベートすることによって、さらなる増幅が達成され得る。例えば、ビオチンがリガンドとして導入され得、ストレプトアビジンがリガンド結合タンパク質として使用され得るが、他のリガンド-タンパク質の組合せも使用され得る。色素分子は、組織に共有結合されていないので、リガンド結合プロテインを用いたリガンド結合サンプルのインキュベーションは、典型的には、多重染色プロトコルの最後に行われる。

【0039】

50

スライドサンプル全体のマルチスペクトル画像化を実行する目的のために、方法およびシステムが開発されてきた。特に、そのような方法およびシステムは、サンプル全体にわたる2次元における数センチメートルの視野を有する回折限界マルチスペクトル画像を用いてモザイク画像を生成することができる。そのようなシステムは、マルチバンドフィルタと、LEDもしくはレーザーなどの選択可能な光源、複数の落射フィルタセット、またはそれら2つの組合せとを使用する。複数の落射フィルタが使用される場合、シームレスなモザイクを形成するために、サンプルの異なる部分に対応する画像が組み合わせられることを可能にするので、マルチスペクトル画像の位置合わせが重要である。米国特許出願公開第2014/0193061号は、各々が対比染色バンド(例えば、DAPI対比染色バンド)ならびに他のバンドなどの共通バンドにおいてサンプルを画像化する複数のフィルタを使用し、サンプル画像化バンドのすべてに対応する画像を位置合わせするために、共通バンドにおいて測定された画像を使用することによって、画像をサンプルのモザイク画像に結合するための方法を説明している。このようにして、サンプルは、画像化および位置合わせすることができる10以上の別個の発光バンドにおいて画像化され得る。米国特許出願公開第2014/0193061号の全内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0040】

マルチスペクトル画像化を実行するための前述の方法は、スペクトルアンミキシング中にサンプル自家蛍光からの寄与を決定することができる。例えば、サンプル自家蛍光の純粋なスペクトルの推定値を使用して、スペクトルアンミキシングプロセスは、サンプル内の自家蛍光の空間分布を表す自家蛍光存在量画像をもたらすことができる。自家蛍光画像は、サンプルに適用された色素に起因しないサンプル蛍光を説明する一種の「残余」画像とみなされ得る。

【0041】

しかしながら、特定のサンプルについて、スペクトルアンミキシングから純粋に導出された自家蛍光の存在量推定値が完全に正確ではない場合がある。特に、そのような測定値は、特に、サンプルが複数の蛍光色素も含み、特定の固定プロトコルに従って保存されている場合、対象の特定のサンプルにおける自家蛍光に完全には対応しない場合がある純粋な自家蛍光スペクトルの推定値を使用して導出される。さらに、自家蛍光は、サンプル内で、異なるサンプル領域間で、特に、異なるタイプの細胞、および異なるタイプの細胞の特徴(例えば、間質、細胞質、細胞膜、核)などの、サンプル内の異なる構造間で変動する可能性があり、この変動は、純粋な自家蛍光スペクトルの単一の推定値によって適切に表されない場合がある。

【0042】

本明細書で説明する方法およびシステムは、サンプル内の自家蛍光が、スペクトルアンミキシングプロセス中に単に抽出されるのではなく、直接測定されることを可能にする。自家蛍光を直接測定することによって、特定の抗体、タンパク質、核酸、ならびに他のサンプル構造および細胞成分を標的にするためにサンプルに適用された1つまたは複数の色素を表すマルチスペクトル画像の分析中に、サンプル固有の自家蛍光応答が適切に測定および説明され得る。特に、個々の適用された色素に対応するスペクトル発光バンドにおける測定された蛍光信号は、画像分析の前またはその最中に、サンプル自家蛍光を説明するために補正され得、個々の適用された色素の各々のより正確な存在量測定値を提供する。これらの改善を可能にするために、サンプル内の複数の場所におけるサンプル自家蛍光の存在量と空間分布の両方が、個々の適用された色素に対応するマルチスペクトル画像のスペクトル分解の前に決定される。

【0043】

サンプル画像化システムは、典型的には、1つまたは複数のディスプレイを含み、これらのディスプレイ上には、サンプル内の疾患および他の状態を診断する目的のために病理医または他の医師もしくは技術者に表示される個々の適用された色素に対応するスペクトル寄与を表すサンプル画像が表示される。色素は、典型的には、特定の条件の有無を示し得、細胞移動、タンパク質発現、調節ネットワーク、突然変異、およびサンプル内の他の

イベントに関する複雑な生理学的情報を提供し得る、対象の特定の抗体、タンパク質(例えば、膜貫通タンパク質)、核酸フラグメント、および/または細胞構造に対するレポーターとして機能するように選択される。本明細書で説明する方法およびシステムは、より正確なスペクトル寄与因子画像が表示されることを可能にし、それによって、従来のサンプル画像化および表示システムを大幅に改善し、そのことは、そのようなシステムによってレンダリングされる診断情報を改善する。

【0044】

本明細書で説明する方法およびシステムに従って測定される自家蛍光画像は、追加の目的のためにも使用され得る。例えば、測定された自家蛍光画像は、サンプル内の様々なタイプの細胞または細胞構造を識別し、対象ではない特定のタイプの細胞または細胞構造に対応するサンプルの領域を除外するために、訓練されたピクセルベースの分類器を使用して分析され得る。例えば、対象ではない場合があるが、対象の特定のサンプル標的を標的にするためにサンプルに適用された1つまたは複数の色素に対応するスペクトル領域内の蛍光を発光する場合があるサンプル内の赤血球を識別するために、訓練された分類器が使用され得る。訓練された分類器は、(限定はしないが)リンパ球、好中球、好酸球、単球、および好塩基球などの様々なタイプの白血球、網状赤血球、ならびに腫瘍細胞を含む、他のタイプの細胞を識別するためにも使用され得る。

10

【0045】

対象ではないサンプルの領域は、後続の分析(例えば、サンプル画像のスペクトルアンミキシング)から除外され得、それによって、さもなければ適用された色素のうちの1つまたは複数に関する偽陽性検出を表す領域と、したがって、それらの適用された色素によって標的とされる細胞成分とをサンプルから除外する。測定された自家蛍光画像に対して実行される分類操作を介する分析から特定のサンプル領域を除外することによって、本明細書で説明する方法およびシステムは、より正確なスペクトル寄与因子画像が表示されることを可能にし、それによって、従来のサンプル画像化および表示システムをさらに大幅に改善し、次に、そのようなシステムによってレンダリングされる診断情報の品質および有用性を改善する。

20

【0046】

本明細書で説明する方法およびシステムは、免疫腫瘍学アッセイ、細胞内信号伝達研究、および、一般的な多重免疫蛍光病理学実験を含む用途における正確かつ定量的な分析のために、多重染色サンプルの比較的迅速な、全スライド、マルチスペクトル画像化を可能にする。方法およびシステムは、(限定はしないが)様々な異なる方法を使用して標識されたホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)サンプルなどの生物学的サンプルを含む、多種多様なサンプルに適用され得る。

30

【0047】

図1は、サンプルを画像化するための一連の例示的なステップを示すフローチャート100である。第1のステップ102において、1つまたは複数の非内因性色素をサンプルに適用することによって画像化するためにサンプルが準備される。本明細書で使用する場合、「色素」は、サンプル内の構造/化学部分に結合し、照明光に曝露されると、蛍光を発する非内因性物質である。「色素」という用語は、「染色剤」という用語と同じ意味で使用され、本開示の目的のために、「色素」および「染色剤」は、同じ物質に対応する。

40

【0048】

一般に、ステップ102において、1つまたは複数の色素がサンプルに適用される。例えば、適用される色素の数は、2つ以上(例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10個以上、12個以上、15個以上、20個以上、またはそれ以上)であり得る。適用された色素は、サンプル内の特定のタイプの抗体、タンパク質、核酸、小胞、脂質、または他の物質に結合され得る。適用された色素は、サンプル内の特定の細胞タイプ(例えば、赤血球、リンパ球、T細胞、B細胞)にも結合され得る。さらに、適用された色素は、サンプル内の特定の細胞構造または区画(例えば、間質、細胞膜、細胞質、細胞核、ミトコンドリア、ゴルジ体)に結合され得る。

50

【0049】

いくつかの実施形態では、サンプルに適用される1つまたは複数の色素は、サンプル細胞内の複数の構造、領域、または成分に結合する1つまたは複数の対比染色を含むことができる。適切な対比染色の例は、限定はしないが、DAPI、DRAQ5、Hoechst33258、Hoechst33342、およびHoechst34580を含む。

【0050】

特定の実施形態では、サンプルに適用される1つまたは複数の色素は、スペクトル的に分離された発光バンドを有する。この特性を有する色素を選択することによって、各色素からの蛍光発光は、他の色素による発光から容易に分離され、適切な発光フィルタを使用して測定され得、色素間のスペクトル発光クロストークから生じる干渉を最小限に抑えることができる。例として、いくつかの実施形態では、色素は、各々が発光スペクトルと、それぞれ、色素の発光スペクトル内の波長 λ_{D1} および λ_{D2} において最大発光強度 $D1_{max}$ および $D2_{max}$ とを有する色素 $D1$ および $D2$ の所与の対について、 λ_{D2} における色素 $D1$ の発光強度が $D1_{max}$ の10%未満(例えば、8%未満、6%未満、4%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満、0.25%未満)であり、 λ_{D1} における色素 $D2$ の発光強度が $D2_{max}$ の10%未満(例えば、8%未満、6%未満、4%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満、0.25%未満)であるように選択される。色素は、上記の対での関係が、3つ以上の色素、4つ以上の色素、5つ以上の色素、6つ以上の色素、8つ以上の色素、10個以上の色素、12個以上の色素、15個以上の色素、20個以上の色素、またはそれ以上の色素のグループのすべてのメンバー間で成り立つように選択され得る。

【0051】

上記で説明したように、ステップ102において、多種多様な異なるサンプル調製プロトコルが使用され得る。適切な調製プロトコルの一例について以下に説明する。しかしながら、多くの異なる色素をサンプルに適用する多くの異なるプロトコルが使用され得ることが理解されるべきである。

【0052】

サンプルは、サンプル内の多種多様な分子標的を標識するために使用され得るOpal(登録商標)Multiplex免疫組織化学(IHC:immunohistochemical)試薬(Akoya Biosciences、カリフォルニア州、メンローパークから入手可能)を使用してマルチスペクトル画像化用に調製され得る。FFPE組織サンプルは、60℃で1時間焼成した後、パラフィンを除去するためにキシレンで10分間3回洗浄することによって、Opal試薬で染色するために調製される。サンプルは、次いで、エタノールグラジエントを介して脱イオン水に再水和され、10%中性緩衝ホルマリンを使用して20分間固定された後、脱イオン水で洗浄される。

【0053】

Opal Multiplex IHC染色手順は、マイクロ波処理を介してバッファAR6(抗原賦活化pH6)またはAR9(抗原賦活化pH9)のいずれかを使用して実行され得る1ラウンドの抗原賦活化を開始する。抗原賦活化の後、各サンプル標的は、ブロッキング、一次抗体インキュベーション、二次抗体インキュベーション、チラミド沈着、および抗体ストリッピングの5つのステップを含むサイクルにおいて順次標識される。

【0054】

ブロッキングは、サンプルをOpal Antibody Diluent内で室温で10分間インキュベートすることによって達成される。一次抗体は、標的に応じて様々な時間および温度でインキュベートされ得る。例えば、肺癌サンプルについて、表1は、様々な異なるサンプル標的に関する一次抗体および希釈率の例をリストしている。

【0055】

【表 1】

染色順序	標的	一次抗体ベンダー、 カタログ番号、 クローン、種	一次抗体 希釈率	チラミド 試薬および ベンダー	チラミド 希釈率
1	FoxP3	Abcam(英国ケンブリッ ッジ)、ab20034、236 A/E7、a-Ms	1:100	Opal 570(Akoya Biosciences、カリ フォルニア州 メンローパーク)	1:300
2	PD-L1	CST(マサチューセッ ツ州ダンバース)、13 684、E1L3N、a-Rb	1:300	Opal 520(Akoya Biosciences、カリ フォルニア州 メンローパーク)	1:150
3	PD-1	AbCam(英国ケンブ リッジ)、ab137132、 EPR4877(2)、a-Rb	1:300	Opal 690(Akoya Biosciences、カリ フォルニア州 メンローパーク)	1:100
4	CD68	Dako(カリフォルニ ア州サンタクララ)、 M0876、PG-M1、a- Ms	1:100	Opal 620(Akoya Biosciences、カリ フォルニア州 メンローパーク)	1:150
5	CD8	AbD Serotec(英国オ ックスフォード)、M CA1817、4B11、a-M s	1:300	Dy430(Dyomics 、ドイツ国イエ ナ)	1:450
6	Pan-Cytokerati n	Novus(コロラド州リ トルトン)、NBP2-29 429、AE1/AE2、a-M s	1:300	TSA-biotin(Akoya Biosciences、カリ フォルニア州 メンローパーク)	1:50

Table 1

【 0 0 5 6 】

抗体の各々は、室温で約30分間インキュベートされ得る。一次抗体のインキュベーションに続いて、Opal Polymer HRP Ms+Rb溶液(Akoya Biosciences、カリフォルニア州、メンローパーク)を使用して室温で10分間、二次抗体のインキュベーションが実行され、続いて、0.1M TRIS-HCl、pH7.5、0.15M NaCl、および0.05%Tween(登録商標)20(Sigma-Aldrich、ミズーリ州、セントルイス)から構成されるTBSTバッファで3回リンスする。チラミド沈着は、室温で10分間実行され、続いて、TBSTで3回リンスする。選択された標的と、選択された標的を調べるために選択された色素とに従って、異なるチラミド試薬が各一次抗体と対にされる。染色サイクルは、AR6またはAR9におけるマイクロ波処理を介する抗体ストリッピングによって完了する。前述の5ステップサイクルは、サンプル内の各標的に対して繰り返され得る。前述の手順と直接類似して、リガンドベースのチラミド試薬がサンプル調製手順において使用される場合、色素結合されたリガンド結合タンパク質とのインキュベーションは、最終的な抗体ストリッピングステップ後に生じる。

【 0 0 5 7 】

サンプル内の特定の標的に対応する色素の各々が適用された後、1つまたは複数の対比染色が、サンプルを対比染色とインキュベートすることによってサンプルにオプションで適用され得る。例えば、DAPI対比染色をサンプルに適用するために、サンプルは、DAPI溶液(4滴/mL)内で室温で5分間インキュベートされ得、続いて、脱イオン水で1回洗浄され、

TBSTで1回洗浄される。

【0058】

特定のサンプル標的に関連付けられた1つまたは複数の色素と、オプションで1つまたは複数の対比染色とが適用された染色サンプルは、封入剤(例えば、ThermoFisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサムから入手可能なProLong(登録商標)Diamond)を適用することによって画像化用にさらに調製され得る。

【0059】

いくつかの実施形態では、サンプル調製は、自家蛍光測定を実行するために使用され得る未染色サンプルの調製を含むこともできる。一般に、未染色サンプルは、染色サンプルを調製するための手順に類似した手順に従い、蛍光色素を含むインキュベーションステップを単に省略することによって調製され得る。上記で説明した例では、表1の第5列に示す様々な色素を用いるインキュベーションステップが省略されるが、ステップは、その他の点で同じである。そのような調製プロトコルは、染色スライドが受けるのと同じ温度変化、抗体追加、およびpH変化で処理された未染色サンプルをもたらし、これらの処理ステップがサンプルからの内因性自家蛍光発光に影響を与える範囲内で、効果は、染色サンプルと未染色サンプルの両方について同様であるべきである。

【0060】

一般に、特定のサンプル標的、対比染色、および他のサンプル標識部分に固有の色素の異なる組合せを使用する多種多様な異なるサンプル調製技法が使用され得る。特定の目的のための特定の多重免疫蛍光サンプル調製プロトコルの開発は、典型的には、一次抗体の選択と、抗体および色素希釈の改善/最適化と、サンプルの完全性を維持し、サンプルへの選択的な色素結合を強化するための他の免疫組織化学的プロセス開発ステップとを含む。すべてのそのようなプロトコルは、一般に、特に明記されている場合を除いて、以下で説明する方法およびシステムにおいて使用され得る。

【0061】

図1に戻り、ステップ102においてサンプル調製が完了した後、調製されたサンプルは、1つまたは複数のサンプル画像を取得するために、ステップ104において画像化される。ステップ104において取得されたサンプル画像の各々は、励起バンド内の照明光と、1つまたは複数の発光バンド内で測定された、照明光に応答したサンプルからの蛍光発光との選択された組合せに対応する。

【0062】

サンプル画像を取得するために、様々な異なるサンプル画像化システムが使用され得る。蛍光顕微鏡として実装された1つのサンプル画像化システム200の一例を、図2に示す。システム200は、光源202と、ダイクロイックミラー204と、(励起フィルタ206aおよび発光フィルタ206bとして実装された)光学フィルタ206と、対物レンズ208と、ステージ210と、検出器212とを含む。これらの構成要素の各々は、処理デバイス216を含むコントローラ214に結合されている。

【0063】

コントローラ214は、システム構成要素の各々からの制御信号およびデータ信号を送受信し、したがって、構成要素の各々を制御することができる(より具体的には、処理デバイス216がシステム構成要素の各々を制御する)。特定の実施形態では、システム200に関連して説明するステップおよび/または制御のすべてがコントローラ214によって実行される。代替的には、いくつかの実施形態では、特定のステップがシステム200の人間のオペレータによって実行され得る。

【0064】

光源202は、照明波長の可変分布を有する光を生成することができる調整可能な光源である。いくつかの実施形態では、例えば、光源202は、所望のスペクトル特性を有する照明光を生成するためにコントローラ214によって選択的に活性化され得る異なる波長の複数のLEDを含む。特定の実施形態では、光源202は、1つまたは複数のレーザダイオード、レーザ、白熱光源、および/または蛍光光源を含み、これらの各々は、コントローラ214に

10

20

30

40

50

よって制御可能である。

【0065】

光源202によって生成された照明光は、ダイクロイックミラー204から反射し、光学フィルタ206に入射する。フィルタ206は、典型的には、複数のフィルタを含み、フィルタの各々は、照明光の経路に選択的に挿入され得る。フィルタの各々は、関連する励起スペクトルバンドと、1つまたは複数の発光スペクトルバンドとを有する。コントローラ214は、適切な波長分布の光がサンプルに入射することを可能にするために、光源202によって生成された照明光に基づいてフィルタ206を調整する。

【0066】

フィルタ206は、様々な方法において実装され得る。いくつかの実施形態では、例えば、フィルタ206は、複数の異なる落射フィルタキューブを含み、落射フィルタキューブの各々は、コントローラ214によって照明光の経路に選択的に回転され得る。特定の実施形態では、フィルタ206は、励起スペクトルバンドおよび発光スペクトルバンドがコントローラ214によって選択的に選択され得る調整可能なフィルタリング要素(例えば、液晶ベースの要素)を含む。フィルタ206の他の実装形態も、システム200において使用され得る。

【0067】

フィルタ206から出てくるフィルタリングされた照明光は、次いで、レンズ208によって、ステージ210上に取り付けられたスライド252によって支持されたサンプル250の表面に集束される。ステージ210は、x方向およびy方向の各々におけるサンプル250の移動を可能にし、コントローラ214によって制御可能である。x方向およびy方向におけるステージ210の動きは、フィルタリングされた照明光がサンプルの異なる領域に向けられることを可能にする。照明光の焦点領域に対してサンプルを移動させることによって、照明光は、サンプルの複数の異なる領域に向けられ得、サンプル250の全スライド画像化を可能にする。

【0068】

フィルタリングされた照明光は、サンプル250から蛍光発光を生成し、レンズ208の方向に放射された蛍光は、レンズ208によってコリメートされ、フィルタ206を通過する。上記で説明したように、コントローラ214によって調整され得るフィルタ206は、1つまたは複数の発光スペクトルバンドを定義する。サンプル250からの蛍光発光は、それら1つまたは複数の発光スペクトルバンド内の光のみがフィルタ206によって透過されるように、フィルタ206によってフィルタリングされる。フィルタリングされた蛍光発光は、ダイクロイックミラー204によって透過され、検出器212によって検出される。

【0069】

検出器212は、様々な方法において実装され得る。いくつかの実施形態では、例えば、検出器212は、CCDベースの検出要素を含む。特定の実施形態では、検出器212は、CMOSベースの検出要素を含む。検出器212は、フィルタリングされた蛍光発光の波長選択的検出を可能にするために、1つまたは複数のプリズム、格子、回折素子、および/またはフィルタなどのスペクトル選択性光学要素もオプションで含むことができる。入射するフィルタリングされた蛍光発光に反応して、検出器212は、フィルタリングされた蛍光発光の定量的測定値を表す1つまたは複数の電子信号を生成する。信号は、サンプル250に対応する測定情報を抽出するために信号を処理するコントローラ214に送信される。

【0070】

動作中、システム200は、典型的には、N個の異なるサンプル画像をキャプチャし、サンプル画像の各々は、(サンプル250に入射する照明光のスペクトル分布を制御する)フィルタ206の励起波長バンドと、(検出器212によって検出されるサンプル250からの蛍光発光のスペクトル分布を制御する)フィルタ206の1つまたは複数の発光波長バンドとの異なる組合せに対応する。Nは、1以上であり、一般に、任意の整数(例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、12以上、15以上、20以上、またはそれ以上)であり得る。

【0071】

特定の実施形態では、Nは、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の数に関連し得

10

20

30

40

50

る。本明細書で使用する場合、「非内因性スペクトル寄与因子」は、サンプルに追加され、光源202からの照明光によって励起されると蛍光を発するサンプル250の成分である。非内因性スペクトル寄与因子は、上記で説明したように、サンプル250に適用された1つまたは複数の色素を含む。例として、Nは、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の数であるM以上であり得る。

【0072】

図1に戻り、ステップ106において、システム200は、典型的には、サンプルの1つまたは複数のバックグラウンド画像もキャプチャする。バックグラウンド画像は、ステップ104におけるサンプルのスペクトル画像のキャプチャの後、前、またはそれと交互にキャプチャされ得る。バックグラウンド画像は、フィルタ206の励起波長バンドとフィルタ206のバックグラウンドスペクトルバンドとの組合せに対応する。バックグラウンドスペクトルバンドの重要な側面は、サンプル250内の非内因性スペクトル寄与因子がバックグラウンドスペクトルバンド内で有意な蛍光発光を生成しないように選択されることである。

10

【0073】

蛍光発光スペクトル波長バンドおよびバックグラウンドスペクトル波長バンドのセットの一例を、図3に概略的に示す。図3において、7つの異なる蛍光発光スペクトル波長バンドB1~B7が、バックグラウンドスペクトル波長バンドXとともに示されている。バンドの各々は、それぞれ、それぞれの波長 $\lambda_1 \sim \lambda_7$ および λ_x に対応し、 λ_x は、各バンドの半値全幅(FWHM)スペクトル形状から決定されるスペクトルバンドの中心波長を表す。以下の説明は、説明のみを目的とする7つの発光スペクトル波長バンドB1~B7に言及していること

20

【0074】

波長 $\lambda_1 \sim \lambda_7$ は、蛍光発光スペクトル波長バンドB1~B7の波長範囲を定義する。いくつかの実施形態では、バックグラウンドスペクトルバンドXは、波長 λ_x が蛍光発光スペクトル波長バンドB1~B7の波長範囲内に入るように選択される。代替的には、特定の実施形態では、 λ_x は、この範囲外にある。このようにバックグラウンドスペクトル波長バンドを選択することは、より大きいスペクトル範囲が蛍光発光スペクトル波長バンド専用になされることを可能にし、サンプル250からの様々な蛍光発光信号の分離をより容易にするので、特定の装置形態において、 λ_x が蛍光発光スペクトル波長バンドB1~B7の波長範囲内にあることが有利である可能性がある。

30

【0075】

図3で、バックグラウンドスペクトルバンドXは、スペクトル波長バンドB1~B7からスペクトル的に分離されているが、これは、必ずしもこの状況ではないことが留意されるべきである。いくつかの実施形態では、バックグラウンドスペクトルバンドXは、1つまたは複数のスペクトル波長バンドB1~B7の一部と重なる。一般に、バックグラウンドスペクトルバンドXは、非内因性スペクトル寄与因子に対応するスペクトル波長バンドのいずれともスペクトル的に重ならないように、または代替的には、非内因性スペクトル寄与因子に対応するスペクトル波長バンドのうちの1つまたは複数(例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、またはそれ以上)とスペクトル的に重なるように選択され得る。以下に説明するように、バックグラウンドスペクトルバンドXとスペクトル波長バンドB1~B7のうちの1つまたは複数との間にスペクトル的な重なりが生じた場合であっても、選択された波長バンドにおいてサンプルを励起し、次いで、バックグラウンドスペクトルバンドXにおいてサンプル自家蛍光を測定することによって、依然として内因性サンプル自家蛍光が測定され得る。

40

【0076】

一般に、サンプルのバックグラウンド画像は、バックグラウンドスペクトルバンドXにおいてサンプルからの蛍光発光を検出することによって取得される。特定の装置形態では、サンプルのいくつかまたはすべてのバックグラウンド画像は、2つ以上のバックグラウンドスペクトルバンドにおいてサンプルからの蛍光発光を検出することによって取得され

50

る。サンプルからの蛍光発光を検出するために使用されるバックグラウンドスペクトルバンドの各々は、一般に共通の属性を共有し、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の各々は、サンプルが特定の励起波長バンドにおいて励起されたときに、バックグラウンドスペクトルバンド内で有意な蛍光発光を生成しない。したがって、選択された励起波長バンドにおいてサンプルを励起し、バックグラウンドスペクトルバンドにおいてサンプル蛍光を測定することによって、適用された色素および対比染色などの非内因性スペクトル寄与因子からの有意な寄与なしに、実質的にサンプル自家蛍光のみからのスペクトル寄与を含むサンプルのバックグラウンド画像が取得され得る。

【0077】

図4は、非内因性スペクトル寄与因子からの蛍光発光とバックグラウンドスペクトルバンドとの間の関係の性質の例を示す概略的である。サンプルを画像化するために、サンプルは、バンド $W_{exc,i}$ における照明光に曝露され、励起されたサンプルからの蛍光発光が、発光バンド $W_{emi,j}$ において測定される。この手順は、各々が励起バンド $W_{exc,i}$ と発光バンド $W_{emi,j}$ の異なる組合せに対応するN個のサンプル画像を取得するために繰り返される。サンプルのバックグラウンド画像を取得するために、この例は、バックグラウンド励起バンド $W_{back,exc}$ の照明光に曝露され、サンプル蛍光が、バックグラウンドスペクトルバンド $W_{back,emi}$ において測定される。

【0078】

サンプル内の各非内因性スペクトル寄与因子について、スペクトル寄与因子は、発光バンド $W_{emi,j}$ によって定義された波長範囲内の特定の波長において最大蛍光強度 I_{max} を示す。最大蛍光強度 I_{max} は、励起バンド $W_{exc,i}$ および $W_{back,exc}$ のうちの1つにおける光による励起から生じる。本明細書で説明する方法およびシステムにおいて、バックグラウンド励起バンド $W_{back,exc}$ およびバックグラウンドスペクトルバンド $W_{back,emi}$ は、バックグラウンドスペクトルバンド $W_{back,emi}$ における任意の波長について、各非内因性スペクトル寄与因子からの蛍光発光の強度が、その非内因性スペクトル寄与因子の最大蛍光強度 I_{max} の10%以下(例えば、8%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、0.25%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.01%以下、またはさらにそれ以下)であるように選択される。

【0079】

図4において、バックグラウンド励起バンド $W_{back,exc}$ 内の照明光によって励起された非内因性スペクトル寄与因子に関する蛍光発光強度スペクトル $E(\lambda)$ が示されている。バックグラウンドスペクトルバンド $W_{back,emi}$ (スペクトルバンドXに対応する)も示されている。バックグラウンドスペクトルバンド $W_{back,emi}$ は、波長 λ_x (上記で説明した)に対応し、波長 $\lambda_{x1} \sim \lambda_{x2}$ のバンドを含む。バックグラウンドスペクトルバンド内の蛍光発光クロストークを回避するために、 $\lambda_{x1} \sim \lambda_{x2}$ の範囲内の各波長について、非内因性スペクトル寄与因子の蛍光発光強度 $E(\lambda)$ は、波長バンド $W_{exc,i}$ および $W_{back,exc}$ のいずれかにおいて励起された非内因性スペクトル寄与因子に関する最大蛍光発光強度 I_{max} の10%以下(例えば、8%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、0.25%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.01%以下、またはさらにそれ以下)である。このようにバックグラウンドスペクトルバンドXを選択することによって、システムによってキャプチャされたサンプルのバックグラウンド画像は、サンプルからの自家蛍光発光にほぼ完全に(または完全に)対応する。

【0080】

一般に、バックグラウンド励起バンドおよびバックグラウンドスペクトルバンドは、上記の関係がサンプル内の一部またはすべての非内因性スペクトル寄与因子に関して成り立つように選択され得る。さらに、サンプルのバックグラウンド画像が複数のバックグラウンドスペクトルバンドにおける蛍光発光を検出することによってキャプチャされる場合には、複数のバックグラウンドスペクトルバンドは、前述の関係が、バックグラウンドスペクトルバンドの一部またはすべて(および、非内因性スペクトル寄与因子の一部またはすべて)に関して成り立つように選択され得る。

10

20

30

40

50

【0081】

図4におけるバックグラウンドスペクトルバンドは、正方形または「シルクハット」分布にほぼ対応するスペクトル形状を有する。したがって、分布のエッジは、バックグラウンドスペクトルバンドに関連付けられた波長範囲 $\lambda_{x1} \sim \lambda_{x2}$ を定義する。バックグラウンドスペクトルバンドがより複雑な形状を有する場合、バックグラウンドスペクトルバンドに関連付けられた波長範囲は、バックグラウンドスペクトルバンドのFWHMスペクトル範囲に基づいて決定される。具体的には、波長 λ_c を中心とする、 λ_c のFWHMスペクトル範囲を有するバックグラウンドスペクトルバンドについて、次いで、バックグラウンドスペクトルバンドに関連付けられた波長範囲は、 $\lambda_{x1} = \lambda_c - \text{FWHM}/2$ から $\lambda_{x2} = \lambda_c + \text{FWHM}/2$ まで広がる。バックグラウンドスペクトルバンドは、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子からの蛍光発光とバックグラウンドスペクトルバンドとの間の上記で説明した関係が λ_{x1} から λ_{x2} までの波長範囲内で成り立つように選択され得る。

10

【0082】

バックグラウンド励起バンドおよびバックグラウンドスペクトルバンドはまた、バックグラウンドスペクトルバンドへの蛍光発光クロストークが比較的低いままであることを保証するために、他の基準に従って選択され得る。いくつかの実施形態では、例えば、バックグラウンド励起バンドおよびバックグラウンドスペクトルバンドは、一部またはすべての非内因性スペクトル寄与因子について、バックグラウンド励起バンドにおける励起後のバックグラウンドスペクトルバンドにおける非内因性スペクトル寄与因子の積分強度(すなわち、波長 λ_{x1} と波長 λ_{x2} との間で合計された発光強度)が、非内因性スペクトル寄与因子が励起バンド $W_{exc,i}$ において励起されたときの、発光バンド $W_{emi,j}$ によって定義された波長範囲内のすべての波長にわたる非内因性スペクトル寄与因子に関する最大積分蛍光発光強度の5%以下(例えば、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、0.3%以下、0.2%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.01%以下)であるように選択され得る。

20

【0083】

いくつかの実施形態では、バックグラウンド励起バンドおよびバックグラウンドスペクトルバンドは、サンプルがバックグラウンド励起バンド内の光で照明されたとき、サンプル内のすべての非内因性スペクトル寄与因子からの蛍光発光の積分強度が、バックグラウンドスペクトルバンド内のすべての測定された蛍光発光の(すなわち、非内因性スペクトル寄与因子とサンプル自家蛍光の両方による)積分強度の10%以下(例えば、8%以下、6%以下、4%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、0.25%以下、0.1%以下、0.05%以下、またはさらにそれ以下)であるように選択され得る。

30

【0084】

いくつかの実施形態では、バックグラウンド励起バンドおよびバックグラウンドスペクトルバンドは、前述の条件のうち2つ以上が満たされるように選択され得ることも認識されるべきである。

【0085】

図1に戻り、次のステップ108において、サンプルの自家蛍光画像が取得される。いくつかの実施形態では、バックグラウンドスペクトルバンドXの選択により、サンプルのバックグラウンド画像は、実質的にサンプルからの自家蛍光のみに効果的に対応する。したがって、サンプル自家蛍光画像は、いかなるさらなる処理もなしに、サンプルバックグラウンド画像に直接対応する。

40

【0086】

特定の実施形態では、サンプル自家蛍光画像は、スペクトルアンミキシングなどの技法を使用してバックグラウンド画像を分解することによって、バックグラウンド画像から抽出され得る。スペクトルアンミキシングにおいて、バックグラウンド画像(マルチスペクトル画像キューブを形成するために、バックグラウンドスペクトルバンドX内の波長の各々、および対象のサンプル位置の各々における発光強度測定値を含むマルチスペクトル画像であり得る)は、サンプルの自家蛍光画像を取得するために、サンプル自家蛍光スペクトルの純粋な推定値と、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の各々の蛍光発光スペ

50

クトルの純粋な推定値とを使用してアンミキシングされ得る。サンプルのバックグラウンド画像は、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の各々からの小さい寄与のみを含むので、アンミキシングプロセスは、典型的には、サンプル自家蛍光を分離し、自家蛍光画像を生成するのに非常に効果的である。スペクトルアンミキシングのための適切な方法は、例えば米国特許第7,321,791号およびPCT特許出願公開第WO2005/040769号において記載されており、これらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0087】

図1に戻り、ステップ104において取得されたサンプル画像は、純粋なスペクトル寄与因子画像のセットを取得するためにステップ110において分解され、純粋なスペクトル寄与因子画像の各々は、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子のうちの1つからの寄与のみを実質的に含む。図1では、ステップ108は、順次発生することができ(すなわち、自家蛍光画像が最初に取得され、続いて純粋なスペクトル寄与因子画像が取得され得る)、または代替的には、ステップ108および110は、同時に発生することができる(すなわち、自家蛍光画像と純粋なスペクトル寄与因子画像の両方が、単一のスペクトルアンミキシング手順などを介して同時に取得され得る)ことが留意されるべきである。

10

【0088】

分解ステップ110を実行することによって、サンプル内の適用された色素の各々の分布が決定され得、したがって、色素の各々に関連付けられた分子標的の分布が決定され得る。ステップ110において分解を実行するために、スペクトルアンミキシングが使用され得る。特定の実施形態では、サンプル自家蛍光分布がステップ108からすでに知られている場合、ステップ110において使用されるスペクトルアンミキシングプロセスは、自家蛍光存在量情報を考慮に入れることができる。以前に決定された自家蛍光存在量情報を使用する2ステップスペクトルアンミキシング手順について以下に説明する。代替的には、ステップ108および110は、1ステップスペクトルアンミキシング手順において同時に実行され得る。

20

【0089】

次に、ステップ112において、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子のうちの1つまたは複数の量が決定される。事実上、このステップは、1つまたは複数の非内因性スペクトル寄与因子の分布、したがって、サンプル内の1つまたは複数の標的の定量的分布を定量的に決定することに対応する。非内因性スペクトル寄与因子の量は、存在量行列内のエントリとして、スペクトルアンミキシングを使用して直接決定され得る。したがって、特定の実施形態では、スペクトルアンミキシングは、サンプル内の一部またはすべての場所における非内因性スペクトル寄与因子の空間分布と定量的量の両方をもたらすので、ステップ110および112は、一緒に実行される。

30

【0090】

ステップ114において、ステップ108において取得された自家蛍光画像は、オプションで、コントローラ214に接続されたディスプレイインターフェースまたはデバイス218上に表示され得る。さらに、ステップ114において、ステップ110において取得された純粋なスペクトル寄与因子画像のいずれかが、インターフェース218上にオプションで表示され得る。上記で説明したように、これらの画像の一部またはすべてを表示するシステムは、同じ方法でサンプル自家蛍光を決定し、純粋なスペクトル寄与因子画像を取得することができない従来の蛍光顕微鏡および他のマルチスペクトルサンプル画像化デバイスに対する顕著な改善を表す。特に、本明細書で説明するようにサンプル自家蛍光を決定し、純粋なスペクトル寄与因子画像を取得するシステムは、従来のデバイスと比較してデータ記憶要件を低減して、従来のサンプル画像化デバイスよりも迅速にこの情報を取得することができる。例えば、正確な内因性自家蛍光の定量的決定を取得するためにサンプル蛍光が測定されるスペクトルバンドおよび/または波長の数は、従来のサンプル画像化デバイスと比較して大幅に減少する。結果として、サンプルから測定されるスペクトル情報の量が減少し、スペクトルアンミキシングなどの計算集約的動作がより迅速に進行する。

40

【0091】

50

フローチャート100における手順は、次いで、ステップ116において終了する。

【0092】

フローチャート100に示すステップは、サンプル分析フローワークにおいて実行され得る唯一のステップではないことが留意されるべきである。図1に示すステップのいずれかの前、それと同時に、またはその後、他のステップも実行され得る。例えば、ステップ110とステップ116との間に、図1に示す手順は、サンプルおよび/またはその分子標的の1つまたは複数の特性を決定するために、純粋なスペクトル寄与因子画像の一部またはすべてが定量的に分析される追加の分析ステップを含むことができる。一般に、例えば、様々な分子標的の分布に関連する統計的属性を定量的に決定することを含む、任意の分析手順が実行され得る。

10

【0093】

一般に、図1に記載の手順は、サンプル自家蛍光が定量的に決定されることを可能にする。自家蛍光は、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の各々の定量的分布の決定とは別に決定され得る。さらに、いくつかの実施形態では、自家蛍光は、サンプル内の非内因性スペクトル寄与因子の各々の定量的分布の決定の前に決定され得る。代替的には、特定の実施形態では、自家蛍光、および非内因性スペクトル寄与因子の各々の定量的分布は、同時に決定される。

【0094】

結果として、いくつかの実施形態では、サンプル自家蛍光は、非内因性スペクトル寄与因子の各々の生のスペクトル蛍光測定値を補正するために使用される。特定の実施形態では、上記で説明したように、この補正は、分解(例えば、スペクトルアンミキシング)中に発生し、そこでサンプル自家蛍光分布が2段階アンミキシング手順において使用される。

20

【0095】

代替的には、いくつかの実施形態では、サンプル画像における測定された強度値を直接調整するために、サンプル画像のアンミキシングの前にサンプル自家蛍光が使用され得る。例えば、生のマルチスペクトルサンプル画像の一部またはすべてにおいて(およびオプションで、画像内の空間位置の一部またはすべてにおいて)、測定されたスペクトル蛍光強度値は、サンプル内の対応する場所における自家蛍光発光の量と、サンプル自家蛍光発光の少なくとも1つの純粋なスペクトルとに基づいて調整され得る。調整は、例えば、測定されたスペクトル蛍光強度値から自家蛍光寄与を減算することによって実行され得る。(例えば、以下に説明するように、異なるサンプル領域における自家蛍光発光の違いにより)2つ以上のサンプル自家蛍光発光スペクトルが存在するサンプルにおいて、対応するサンプル領域において補正を実行するために、サンプル自家蛍光発光の異なる純粋なスペクトルが使用され得る。

30

【0096】

一般に、本明細書で説明する方法およびシステムは、サンプルの純粋な寄与因子および自家蛍光画像を取得するための適切なスペクトル励起バンドおよび発光バンドを選択するために、多種多様な異なるフィルタを使用することができる。さらに、いくつかの実施形態では、サンプルバックグラウンド画像は、2つ以上のバックグラウンドスペクトルバンドにおける蛍光発光測定値に基づいて取得され得る。例えば、サンプルバックグラウンド画像は、2つ以上(例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上)のバックグラウンドスペクトルバンドにおける蛍光発光測定値から取得され得る。一般に、サンプルバックグラウンド画像は、2つ以上のバックグラウンドスペクトルバンドにおける蛍光発光測定値から取得され、バックグラウンドスペクトルバンドのうちの一部またはすべてが上記で説明した基準を満たす。

40

【0097】

スペクトルアンミキシング動作について、色素およびサンプル自家蛍光に関する純粋なスペクトル推定値が、様々な方法において取得され得る。例えば、色素スペクトルは、以下に説明するように色素およびフィルタの測定された特性に基づいてモデル化され得るが

50

、それらは、直接測定もされ得る。例えば、米国特許第10,126,242号は、測定のために使用されたサンプル内の自家蛍光の存在にもかかわらず、単一に染色されたアーティファクトサンプルから純粋な成分スペクトルを抽出するための方法を記載している。米国特許第10,126,242号の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0098】

特定の実施形態では、アンミキシングの精度を改善するために、ピクセルタイプの分類が、適応型アンミキシングと組み合わせられ得る。言い換えれば、自家蛍光画像内のピクセルが、各ピクセルにおいてサンプル材料のタイプ(例えば、間質、細胞外マトリックス、赤血球、コラーゲン)に従って分類され得、続いて、アンミキシング精度を改善するために、タイプ固有の純粋なスペクトル推定値を用いて各ピクセルにおいてアンミキシングし得る。代替的には、または加えて、サンプル画像内の特定のピクセルは、それらに対応するサンプル材料のタイプ(すなわち、ピクセルに対して決定された分類タイプ)に基づいて、さらなる分析から除外され得る。例えば、赤血球および/またはコラーゲンおよび/または細胞外マトリックスに対応するものとして分類されたピクセルは、対象ではない場合がある。それらのピクセルは、サンプルに関する関心領域の外側として指定され得、これらのピクセルに対応する測定情報(例えば、スペクトル情報)は、その後無視され得る。これは、サンプルに関する分析時間における大幅な短縮をもたらすことができる。それらのピクセルについて測定された情報はまた、オプションで削除され得、データ記憶要件を低減する。

10

【0099】

逆に、特定の実施形態では、コラーゲン、間質、細胞外マトリックス、および赤血球などのサンプル構造に対応するピクセルは、優先的に分析され、対象ではないサンプル構造に対応するピクセルが除外される(すなわち、暗いピクセルとして表示される)自家蛍光画像を表示することによって視覚化され得る。

20

【0100】

スペクトルアンミキシングの一部として、各サンプル材料タイプの自家蛍光スペクトルが測定され得、サンプルに関するタイプ固有の自家蛍光スペクトルをもたらす。これらの測定は、最も典型的なデータを提供するために、同じサンプルの隣接する連続切片において実行され得る。代替的には、測定は、同じ臓器タイプ、または同じ固定条件、または同じ病態、または、サンプルの典型としてそれを推奨するなにか他の特性を共有する異なるサンプルの切片に基づき得る。

30

【0101】

スペクトルは、サンプルの自家蛍光画像内のピクセル領域を選択し、次いで、各タイプのピクセルの選択されたグループに関するスペクトルを取得する人間のオペレータによって取得され得る。代替的には、ピクセル領域選択を実行するために、(例えば、処理デバイス216内に実装されたニューラルネットワークなどの訓練された機械分類器が使用され得、材料タイプ固有の自家蛍光スペクトルが、完全に自動化された方法で抽出され得る。タイプ固有の自家蛍光スペクトルを使用して、サンプル材料の各タイプのピクセルをアンミキシングするために、S行列が各タイプについて作成され、S⁺行列のセットをもたらすために反転され得る。

40

【0102】

タイプ固有の自家蛍光スペクトルを使用してサンプル画像を処理するために、サンプルの自家蛍光画像は分類され、各ピクセルに関連付けられたタイプ情報は、そのタイプのサンプル材料のための適切なS⁺行列を選択するために使用され、存在量ベクトルAを作成するためにピクセルがアンミキシングされる。実際のサンプル自家蛍光が全体の平均よりもそのタイプ固有のスペクトルとよりよく一致する程度まで、結果として生じるアンミキシングされた画像は、真のサンプル存在量をより正確に示す。

【0103】

前述の手順は、サンプル画像内のピクセルが様々なタイプのサンプル構造に対応し、異なる構造に関連付けられた内因性自家蛍光に変動がある場合に使用され得る。自家蛍光画

50

像から識別された特定のサンプル構造を除外するために、前述の手順と組み合わせてセグメンテーションマスク(または他の空間フィルタリング技法)が使用され得る。例えば、適応型アンミキシングが、赤血球および/またはコラーゲンに対応するピクセルのダウンストリーム分析からの除外と組み合わせられ得る。好ましくは赤血球が分析から省略される場合、赤血球を識別および除外することが有利である可能性がある。さらに、適応型アンミキシングは、間質細胞または細胞外マトリックスに対応するピクセルなどの、平均的なサンプル自家蛍光スペクトルとは異なる自家蛍光スペクトルを有する残余ピクセルに関するより正確な定量的情報を提供することができる。

【0104】

1つまたは複数の自家蛍光画像が他の用途にも使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で説明する方法に従って取得されるサンプルの自家蛍光画像は、サンプルの合成H&M画像(または他のタイプの合成画像)を生成するために使用され得る。サンプルの異なる領域がスキャンパターンに従ってスキャンされ、次いで、サンプルのより大きい画像(例えば、全スライド画像)を形成するためにサンプル画像およびバックグラウンド画像が組み立てられる特定の形態では、サンプルの異なる領域に対応する自家蛍光スペクトルは、異なる領域に対応するマルチスペクトルサンプル画像のセットを位置合わせするために使用され得る。すなわち、自家蛍光スペクトルは、サンプル画像の異なるセットのピクセルベースの位置合わせのために使用され得る。

10

【0105】

複数のサンプルが検査される状況では、本明細書で説明する方法およびシステムは、内因性自家蛍光が各サンプルについて測定されることを可能にするが、内因性自家蛍光スペクトルはまた、サンプルのサブセットのみについて、または、1つもしくは複数のウィットネスサンプルもしくは参照サンプルから測定され得、次いで、測定された内因性自家蛍光スペクトルは、他のサンプルからのサンプル画像のセットに対して実行されるスペクトルアンミキシング動作において使用され得、それらの他のサンプルに関する内因性自家蛍光は、独立して測定されない、ことが理解されるべきである。

20

【0106】

本明細書で説明する方法およびシステムは、連続的な染色および画像化プロトコルと互換性があり、そのようなプロトコルにおける検出感度を改善することができる。このタイプのプロトコルでは、サンプルは、一度にn個の抗体とインキュベートされ、それらは、DNAバーコード技術を用いて色素と抗体とを選択的に係合することによって、一度にm個検出される。これらのプロトコルは、画像化動作の数が2から8まで、またはそれ以上の範囲になり得るように、30以上までのn個を画像化しようとする場合があり、mは、3または4である。他のプロトコルは、同じ広い原理だが、色素と抗体とを選択的に係合するためのDNAバーコード技術以外の技術を使用することができる。プロトコルでは、典型的には一度にm個の信号のみが画像化されるため、色素信号を互いにまたは対比染色から分離することは、通常、それほど困難ではない。しかしながら、測定された信号レベルは、特に弱い種に関して、中程度または低い場合がある。本明細書で説明する方法およびシステムは、さもなければより弱い信号の検出を混乱させるであろうサンプル自家蛍光を分離するのに特に有用であり得る。さらなる利益として、取得されたサンプル自家蛍光画像は、連続する画像化セッションからのサンプル画像を位置合わせするために使用され得る。

30

40

【0107】

サンプル画像を取得するためのシステムならびにスペクトル画像を分析および分類するための方法の他の特徴および態様は、例えば、以下の参考文献、米国特許第8,634,607号、米国特許第7,555,155号、米国特許第8,103,331号、米国特許出願公開第2014/0193061号、米国特許出願公開第2014/0193050号、および米国特許出願第15/837,956号に記載されており、これらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0108】

本明細書で説明する方法ステップおよび他の機能のいずれも、コントローラ214によって(例えば、コントローラ214の処理デバイス216によって)、および/またはソフトウェア

50

プログラムもしくはハードウェア符号化された命令を実行する1つもしくは複数の追加の処理デバイス(コンピュータまたは事前にプログラムされた集積回路など)によって実行され得る。(限定はしないが)CD-ROMもしくはDVD媒体などの光記憶媒体、磁気記憶媒体、および/または永続的なソリッドステート記憶媒体を含む、多種多様な有形の処理デバイス可読記憶媒体上に記憶され得るソフトウェアプログラム。プログラムは、処理デバイス216によって(またはより一般的には、コントローラ214によって)実行されると、処理デバイス(またはコントローラ)に、本明細書で説明する制御、計算、および出力機能のうちの任意の1つまたは複数を実行させる。

【0109】

処理デバイス216に加えて、コントローラ214は、ディスプレイまたは出力ユニット、入力ユニット(例えば、ポインティングデバイス、音声認識インターフェース、キーボード、および他のそのようなデバイス)、記憶ユニット(例えば、プログラム、およびシステムによって測定されたデータ、ならびに、校正および制御設定を記憶することができる永続的または非永続的な記憶ユニット)、ならびに、他のコンピューティングデバイスを含む他の電子構成要素にデータおよび制御信号を送信および受信するための送信および受信ユニットを含む、他の構成要素をオプションで含むこともできる。

【0110】

実施例

(1)肺癌サンプル

表1においてリストされている試薬を使用して肺癌サンプルが調製された。TSAビオチン(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)が、パンサイトケラチンを染色するために使用され(表1参照)、ストレプトアビジン、Alexa Fluor(商標)750結合体(ThermoFisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム)との最終的なインキュベーションが、室温で1時間、1:200希釈において実行された。

【0111】

サンプル画像が、図2に示すシステムを使用して取得された。それぞれ、図5A~図5Dに示す光学応答を有する4つの落射フィルタキューブが、フィルタ206において使用された。各バンドについて調整可能な輝度および電子シャッタ機能を有する光源202が、6つの独立して制御された波長バンドにおいて光を生成した。バンドを表2にまとめた。

【0112】

【表2】

LED チャンネル	中心波長	バンド幅 (FWHM)
UV	385 ± 5nm	11
紫色	430 ± 5nm	18
青色	475 ± 5nm	22
黄色	550 ± 5nm	82
赤色	638 ± 5nm	18
NIR	735 ± 5nm	32

Table 2

【0113】

図2のシステムの実装形態は、無限共役において動作する複合落射照明蛍光顕微鏡を形成した。すべての構成要素は、可視および近赤外線範囲(780nm)において高い横方向分解能と高い透過率とを有するように選択された。対物レンズ208は、20mmの焦点距離と0.45

の開口数とを有するNikon10倍プランアポクロマト(Nikon USA、ニューヨーク州メルビル)であった。チューブレンズ(検出器212の一部)は、焦点距離145.2mmのアポクロマティックレンズであり、検出器は、3.63ミクロン平方のピクセルサイズを有するSCMOS Flash2.8センサ(Hamamatsu US、ニュージャージー州ブリッジウォーター)であった。全体の倍率は、7.26であり、各ピクセルは、サンプルにおいて0.5ミクロンに対応していた。

【0114】

第1のフィルタキューブは、3つの異なる励起バンドと発光バンドとを有するトリプルバンドフィルタであった。光源のどのバンドがアクティブであるかを選択することによって、各励起バンドは、他のバンドを励起することなく個別にアクティブにされた。光源は、電子制御されているので、システムは、機械的な動きなしに、励起バンドを迅速に循環することができた。

10

【0115】

3つの励起バンドの各々に対するサンプルの応答に対応する3つのサンプル画像が連続して取得された。蛍光発光は、図5Aに示す3つの発光ピークにおいて検出された。したがって、3つのフィルタ発光バンドすべてにわたって合計されたサンプル蛍光が、各画像において検出されたが、一度に1つのフィルタバンドのみが励起された。

【0116】

次いで、第2のフィルタキューブが光路内に配置された。第2のフィルタキューブは、別のトリプルバンドフィルタであり、光源がこのフィルタキューブにおける励起バンドに対応するLEDをアクティブにして第1のフィルタキューブと同じように使用された。これは、その3つの発光バンドを介して記録された、これらの3つの励起バンドの各々に応答するサンプル蛍光に対応するサンプルの別の3つの画像を提供した。

20

【0117】

第3および第4のフィルタキューブは、各々が1つの励起バンドおよび発光バンドを有するシングルバンドフィルタであった。これらは、各々が光路に循環され、各々を用いて1つの画像がキャプチャされた。

【0118】

これは、8つの異なる励起および発光波長バンドの組合せにおいて、サンプルの合計8つの画像を提供した。

【0119】

30

ステージ210は、サンプルの画像を撮影しながら、ラスタパターンを掃引するために使用された。速度のため、およびメカニズムのフィルタ交換動作の数を減らすために、パターンは、各フィルタに関するラスタパターンパスの4ラインのグループを順番に実行し、所与の行における各部位において画像を撮影し、いくつかの行を介してステップ実行した。次いで、次のフィルタが係合され、同じパターンが実行され、その画像が撮影された。これは、行のグループがすべてのフィルタについて画像化されるまで続けられた。次いで、ラスタパターンは、4行の次のセットについて継続された。このようにして、サンプル全体は、6グループにおいて合計24行を使用して画像化された。全体として、取得時間は12mm x 16mmを測定するサンプルスキャンについて4分35秒であった。

【0120】

40

全体的な画像化動作の一部として、コントローラ214は、サンプル位置のマッピングを作成し、サンプル領域内の点のグリッドにおいてフォーカスを測定した。このグリッドは、ラスタスキャン中にレンズ208のフォーカス機構を設定するために使用された。正規化された分散が最適なフォーカスを選択するためにシャープネス尺度として使用され、フォーカスは、結果として生じる表面に合うようにDelanay三角形メッシュを使用してラスタ内の各画像について補間された。

【0121】

コントローラ214(および具体的には、処理デバイス216)上で動作するソフトウェアは、各画像を処理し、各フィルタおよび励起の組合せに対応する8つのスペクトルチャネルを含む全スライドモザイク画像を作成するために使用された。ラスタ画像化中に取得された

50

個々の画像は、フィルタおよび励起設定ごとに異なるシェーディングパターンを使用して、シェーディングについて各々補正された。それらは、次いで、サンプルにおける既知のピクセルサイズと、ラスタパターングリッドとに基づいて、モザイクに組み立てられた。このモザイクは、512×512ピクセルタイルとLZWロスレス圧縮とを使用してピラミッド型TIFFファイルとして保存された。

【0122】

スペクトル画像化では、すべてのピクセルがいくつかのスペクトルバンドにおける測定値を含む画像を画像キューブと呼ぶのが一般的である。このモザイクは、いくつかのピラミッド型解像度レベルにおける画像キューブを含む。

【0123】

2つの追加ステップが実行された。第1に、落射フィルタは、サンプルが各フィルタを用いて順番に画像化されたときに生成されたセンサにおけるピクセルシフトを測定することによって特徴付けられた。落射フィルタ光学系は、ダイクロイックおよび発光フィルタ要素に完全にウェッジがない場合を除き、画像シフトを導入する。実際には、いわゆる「ゼロウェッジ」フィルタセットでさえ、2~10秒のアーカの画像シフトが典型的である。このシフトは、体系的で再現性がある。説明している実験では、1ピクセルは、5.5秒のアークに対応する。

【0124】

センサにおける測定されたピクセルシフトと、0.5ミクロンの既知のピクセルサイズとに基づいて、ステージの位置は、各フィルタによって生成されたウェッジに対抗するために、ラスタスキャン中に公称値からオフセットされた。したがって、ラスタ内の所与のフィールドにおいて使用されたステージの位置は、落射光学系の光学シフトに対抗するために、第1のフィルタを用いて画像化する場合、後続のフィルタの各々の場合ときわめてわずかに異なっていた。このように、画像内のピクセルは、導入された光学シフトにもかかわらず、サンプル内の正確に同じ点に対応する。

【0125】

第2に、すべてのフィルタと励起バンドとの組合せに関するサンプルの最良のフォーカスを測定することに基づいて、対物について残留色フォーカスシフトが測定された。画像化中、この影響を補正するために、落射フィルタ選択およびLEDバンド選択と同期して、フォーカス設定は、この量だけシフトされた。フォーカス次元をz方向として示す場合、この手順は、結果として生じるマルチスペクトル画像内のすべてのスペクトルチャネルにおいてz方向に沿ってサンプルの正確に同じ層を記録しようとする。

【0126】

上記で説明したように画像が取得されると、モザイクのスペクトルチャネルを各々の純粋なスペクトル寄与因子からの寄与の推定値に分離するために、アンミキシングステップが実行された。上記で説明したように、各々の純粋なスペクトル寄与因子は、適用された色素(または対比染色)のうちの1つ、またはサンプルの内因性自家蛍光に対応していた。

【0127】

スペクトル応答は、LED信号と、カメラ応答と、励起フィルタ応答および発光応答と、各色素および対比染色に関する測定された励起および発光応答とを考慮して、各色素および対比染色についてモデル化された。これは、オープンソースのRプログラミング環境(R Foundation for Statistical Computing、オーストラリア、ウィーン)において行われた。結果を、表3において、この表内のB1~B7という名前のスペクトルバンドに対応する最初の7つのデータ行として示す。

【0128】

10

20

30

40

【表 3】

フィルタ	LED	スペクトルバンド名	DAPI	Dy 431	Opal 520	Opal 570	Opal 620	Opal 690	Cy7
206	UV	B1	1.000	0.041	0.001	0.001	0.000	0.002	0.000
205b	紫色	B2	0.013	1.000	0.014	0.005	0.000	0.004	0.002
205c	青色	B3	0.000	0.059	1.000	0.002	0.000	0.000	0.000
205a	黄色	B4	0.000	0.000	0.008	1.000	0.041	0.013	0.000
205b	黄色	B5	0.000	0.000	0.000	0.031	1.000	0.005	0.021
205a	赤色	B6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	1.000	0.005
205b	NIR	B7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.021	1.000
205c	紫色	X	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.010	0.000

Table 3

【 0 1 2 9 】

図6Aは、免疫蛍光標識として使用される上記の対比染色および6つの色素に関する色素励起応答を示し、図6Bは、発光応答を示す。図6Cは、387nmにおいて励起されたとき、および425nmにおいて励起されたときの、ホルマリン固定パラフィン包埋肺癌サンプルにおける自家蛍光の発光応答を示す。

【 0 1 3 0 】

代替的には、純粋なスペクトル(またはスペクトルライブラリエントリ)が、測定情報から導出され得る。例えば、自家蛍光に関するスペクトルライブラリエントリを取得するために、免疫蛍光標識のないサンプルが、8つの個別のスペクトルバンドにおいて測定された画像を取得するために画像化され得、自家蛍光信号の強度が個々のピクセルに関して抽出され、信号強度は、正規化ステップに続いて時間正規化された自家蛍光スペクトルを生成するために、露光時間によってスケールされる。

【 0 1 3 1 】

免疫蛍光標識化において使用される個々の色素に関するスペクトルライブラリエントリを取得するために、単一に染色されたサンプルを生成するために、抗原賦活化溶液、ブロッキングバッファ、洗浄試薬、および他の補助試薬を使用して、一次抗体、二次抗体、および/または色素を用いてサンプルが調製され得る。このサンプルは、8つの個別のスペクトルバンドにおいて測定された画像を取得するために画像化され、組み合わせられた色素および自家蛍光信号の強度が個々のピクセルについて抽出され、信号強度は、露光時間によってスケールされ、信号は、時間正規化された補正された色素スペクトルを取得するために、自家蛍光寄与について補正された。

【 0 1 3 2 】

DAPIなどの対比染色に関するスペクトルライブラリエントリを取得するために、サンプルは、対比染色サンプルを生成するために対比染色を用いて調製され、サンプルは、8つの個別のバンドにおいて測定された画像を取得するために画像化され、組み合わせられた色素または対比染色信号プラス自家蛍光信号の強度が、個々のピクセルについて抽出され、信号強度が露光時間によってスケールされ、信号は、時間正規化された補正された対比染色スペクトルを取得するために、自家蛍光寄与について補正される。

【 0 1 3 3 】

2つのサンプルが調製され、1つは、Opal620のみを用いて染色され、1つは、Opal690のみを用いて染色された。これらは次いで、画像化され、相対応答が、バンドB5、B6、およびXにおいて測定された。これは、これら2つの色素に関する表3のXバンド行に入力するために使用された。他の色素に関する単一に染色された色素サンプルにおける測定値は、Xバンドにおける測定可能な応答を示さなかった。

10

20

30

40

50

【0134】

表3は、最も明るいバンドにおける信号レベルによって正規化された、すべてのスペクトルバンドが等しい露光時間を有する画像に関する各色素の相対応答を示す。露光時間によって信号カウントをスケールし、ミリ秒あたりのカウントなどの、単位時間あたりのカウントの単位において計算を実行することが、しばしば有用である。科学的なデジタルカメラにおける信号レベルは、露光時間に比例し、露光時間によるスケールは、2つの実際的な利益を提供する。第1に、スペクトルが取得条件によって影響されないように、露光でスケールされたカウントにおいて、異なるスペクトルバンドが等しくない露光時間を有する場所で撮影された画像においてスペクトル計算を実行することを可能にする。第2に、同じ理由で、画像が互いに異なる露光時間を有する、複数の画像を含むス

10

【0135】

次に、色素が適用されていない2つのFFPEサンプルが、上記で説明した同じ装置および方法を使用して画像化された。これは、スペクトルバンドB1~B7およびXを有するピラミッド型モザイク画像キューブをもたらした。一方のサンプルは、肺癌切片であり、他方のサンプルは、乳癌切片であり、各々が4~5ミクロン厚であった。

【0136】

スペクトルは、間質、赤血球、一般化された細胞外マトリックス、コラーゲンなどの、認識可能な生物学的構造に対応する様々な場所において測定された。この測定は、対象の構造を表すために選択されたピクセルのグループ内の信号のピクセル平均をとることによって行われた。これは、ピラミッド型TIFF画像からの個々のスペクトルバンド平面の各々から画像をエクスポートし、次いで、Akoya Biosciences(マサチューセッツ州ウォルサム)からのNuance(登録商標)ソフトウェアを使用して平面を画像キューブに組み立てることによって行われた。

20

【0137】

特定の生物学的構造に対応するように選択されたピクセルグループに関するスペクトルを測定することに加えて、構造平均スペクトルを取得するために、多種多様な構造にまたがる不規則な経路に沿って測定が行われた。

【0138】

結果として生じるスペクトルは、肺癌組織サンプル内の4つのタイプの構造およびその平均について表4において与えられており、乳癌組織サンプル内の7つのタイプの構造についてその平均とともに表5において与えられている。これらのすべては、ミリ秒あたりのカウントの時間スケールされた単位においてリストされている。

30

【0139】

【表 4】

		肺癌サンプル					
フィルタ	LED	コラーゲン構造	赤血球	細胞外マトリックス	間質細胞	平均	
205a	UV	5.017	4.119	2.217	2.127	2.315	
205b	紫色	5.841	4.280	0.901	1.826	1.434	
205c	青色	1.010	0.851	0.121	0.271	0.210	
205a	黄色	0.187	0.167	0.023	0.059	0.041	
205b	黄色	0.073	0.071	0.008	0.028	0.016	
205a	赤色	0.038	0.040	0.002	0.021	0.006	
205b	NIR	0.005	0.003	0.002	0.003	0.002	
205d	紫色	0.181	0.130	0.039	0.072	0.039	

Table 4

【 0 1 4 0 】

【表 5】

		乳癌サンプル							
フィルタ	LED	コラーゲン構造	赤血球	非核腫瘍	腫瘍核	間質マトリックス	間質細胞	間質点	平均
205a	UV	4.083	4.019	1.680	1.429	1.736	2.155	3.126	1.702
205b	紫色	4.101	4.762	1.400	1.061	1.258	1.846	2.948	1.326
205c	青色	0.516	0.826	0.175	0.114	0.139	0.252	0.363	0.154
205a	黄色	0.069	0.142	0.032	0.020	0.023	0.045	0.049	0.026
205b	黄色	0.027	0.061	0.017	0.012	0.011	0.020	0.018	0.012
205a	赤色	0.024	0.052	0.014	0.011	0.012	0.016	0.017	0.012
205b	NIR	0.003	0.007	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	0.003
205d	紫色	0.077	0.109	0.045	0.039	0.042	0.053	0.062	0.043

Table 5

【 0 1 4 1 】

これらに基づいて、スペクトルアンミキシングが実行された。独立したスペクトル寄与因子の線形システムでは、任意の画像ピクセルにおける測定されたスペクトルを記述するために、以下の線形代数方程式が使用され得る。

$$M=S \cdot A \quad [1]$$

【 0 1 4 2 】

Mは、所与のピクセルにおける測定されたスペクトルであり、Sは、列が個々の成分(色素、対比染色、または自家蛍光)のスペクトルである行列であり、Aは、サンプル内の構成要素の存在量を有する列ベクトルである。言い換えれば、式(1)は、測定信号Mが、それらの存在量Aに応じた、スペクトルSを有するサンプル内の成分の線形重ね合わせであることを示す。

【 0 1 4 3 】

Sについて疑似逆 S^+ が存在する場合、

10

20

30

40

50

$$S^+M=S^+S^*A=(S^+S)^*A=I^*A=A \quad [2a]$$

を得るために、式[1]の両辺にそれを左乗算することができる。

【0144】

したがって、

$$A=S^+M \quad [2b]$$

である。

【0145】

式(2b)は、中央のスペクトルアンミキシング方程式であり、これは、所与のピクセルにおける測定されたスペクトルMに疑似逆スペクトル行列 S^+ を左乗算することによって、サンプル内の純粋なスペクトル寄与因子について存在量ベクトルAを計算することを可能にする。

10

【0146】

本例では、目標は、測定された信号を、6つの免疫標識化色素、DAPI対比染色、および組織自家蛍光からの寄与にアンミキシングすることである。したがって、Sは、自家蛍光スペクトルとともに、7つの色素(または対比染色)スペクトルに対応する8つの列を有する。最も明るいバンドにおける信号レベルによって正規化された肺癌平均スペクトルが、自家蛍光スペクトルに使用された。

【0147】

各列は、バンドB1~B7およびXに対応する8つのエントリを有し、Sが 8×8 行列であることを意味する。Sは、正方であるので、 S^+ は、直接反転によって計算された。より具体的には、 S^+ は、Moore-Penrose技法などの、線形代数においてより知られている方法によって計算され得る。

20

【0148】

結果として生じた S^+ 行列は、時間スケールされた測定空間において、サンプルピクセルの生のスペクトル測定値Mを純粋な寄与因子存在量Aのベクトルに変換する係数を含んでいた。それは、各ピクセルが測定信号Mを含む生のスペクトルモザイク画像を、各ピクセルが個々の純粋なスペクトル寄与因子(すなわち、色素、対比染色、および内因性自家蛍光)の存在量Aを含むアンミキシングされたモザイク画像に変換するために使用された。

【0149】

バンドB1~B7およびXに対応する生のサンプル画像を図7A~図7Hに示し、アンミキシングされた純粋なスペクトル寄与因子画像を図8A~図8Hに示す。図7A~図7Hおよび図8A~図8Hにおける画像は、サンプルの選択された領域のみを示す。図9A~図9Hは、サンプル全体のアンミキシングされた純粋なスペクトル寄与因子画像を示す。

30

【0150】

画像のペアの比較は、サンプル内の分子標的に関する正確な定量的情報を提供する本明細書で説明する方法およびシステムの能力を実証している。例えば、図7Bは、Dy430発光が観測された一次スペクトルバンドであるB2の生の画像を示す。この色素は、サンプル内のCD8に対するマーカであった。図7Bにおいて、リンパ球の膜内、特に細胞傷害性T細胞の膜内に主に局在化している、CD8に関連付けられた寄与を見ることができる。これらは、図7Bにおいてコンパクトな明るいリングとして明らかであった。

40

【0151】

しかし、この画像をそのタイプの細胞の信頼できない指標にするサンプル内の真のCD8局在化とは無関係の図7Bにおいて見られる多くの他の構造が存在する。例えば、細胞外マトリックス、コラーゲン構造であるように見える大きくて明るく不規則な特徴、および、組織内の他の細胞において、一般的なバックグラウンド信号レベルが存在する。全体として、信号の大部分は、CD8標識以外のソースによるものであった。

【0152】

この干渉は、細胞傷害性T細胞の存在、数、または位置を正確に識別することをより困難にし、これらの測定値のうちの1つまたは複数などに基づくアッセイを劣化させる傾向がある。交絡特徴の位置および形状に基づいて、干渉は、サンプルを標識するために使用

50

される他の色素からではなく、主に内因性組織自家蛍光から発生する。

【0153】

図8Bは、色素Dy430に関連するアンミキシングされた純粋なスペクトル寄与因子画像である。これを図7Bと比較すると、内因性組織に関連する干渉信号は、弱い、または完全に存在しないかのいずれかである。さらに、図7Bの画像に見られる真のCD8関連の特徴は、強度の明らかな低下なしに存在する。また、バックグラウンド信号または干渉信号のため、図7Bにおいて位置特定するのが困難なくつかのかすかなCD8リング特徴が観察される。これは、信号を分離して自家蛍光を除去するための技法として、マルチスペクトル画像化およびスペクトルアンミキシングの利益を一度に示す。

【0154】

DAPI、Opal520、およびOpal570に関するアンミキシングされた成分存在量画像に対する他の生のスペクトル画像の比較は、自家蛍光からの干渉から所望の成分を分離する際に同等の効果を示す。DAPIの純粋なスペクトル寄与因子存在量画像の図8Aでは、この核対比染色は、腫瘍細胞および間質細胞を識別、セグメント化、およびカウントするために使用される。図8AにおけるDAPI画像は、望ましくない他の内容が本質的にないこの情報を提供するが、図7Aにおける生のスペクトルは、DAPI染色に対応しない多くの小さい明るい構造を含む。これらの構造は、内因性組織自家蛍光から生じるように見える。図7Aに示すスペクトル画像は、DAPIの蛍光画像化に最適であるように選択された狭帯域励起および発光フィルタに対応する。フィルタ選択が実際に最適であった程度まで、他の交絡信号なしで所望のDAPI信号を識別する能力である、この画像に示されている信号対雑音比は、従来の全スライド画像化が達成することができる最高のパフォーマンスを示す。

【0155】

同様に、Opal570は、調節性T細胞(例えば、「Treg」細胞)の核内に局在する傾向があるサンプル内のFoxP3タンパク質を標識するために使用された。(Opal570に対応する)図8Dのアンミキシングされた純粋なスペクトル寄与因子画像は、核のクリーンな標識化を示す。これは、FoxP3の免疫蛍光標識化が高い特異性を達成したことを示している。Opal570標識は、意図した構造に局在化されているように見える。明るく標識されたTreg細胞は、150~250カウントを示し、50カウントを発現するより暗い細胞は、10カウント以下の低いバックグラウンドに対して容易に検出され得る。対照的に、図7Dにおける生のサンプル画像は、真のFoxP3に対応しない25カウントの信号レベルを有する多くの種類の構造とともに、はるかにより一般的なバックグラウンドを有する。

【0156】

次に、バンドXにおける生のサンプル画像である図7Hを検討する。このバンドに関する励起フィルタおよび発光フィルタは、任意の対比染色または色素ではなく、FFPEサンプルからの内因性自家蛍光を検出するために選択された。さらに、それらは、サンプルに適用された対比染色および色素に対して可能な限り鈍感であるように選択されたので、4つ以上の色素の存在にもかかわらず、サンプル内の内因性自家蛍光の画像を取得することが可能である。一般に、マルチスペクトルサンプル画像化プロトコルは、これらの特性を有する励起および発光波長バンドを選択することを含まない。逆に、そのようなサンプルにおける内因性自家蛍光の画像を取得するための従来の方法は、スペクトルのうちの1つが自家蛍光であるマルチスペクトル画像キューブをスペクトル的にアンミキシングし、自家蛍光存在量画像を検査することを含む。そのような場合、生のスペクトルキューブは、典型的には、サンプル内の他の蛍光信号から自家蛍光信号を分離するために、多数のスペクトルチャンネルを含む。これは、計算時間とデータストレージとを大幅に増大し、全スライドスキャンまたはデジタル病理学ワークフローなどの多くの用途に対して非実用的にする。

【0157】

対照的に、バンドXは、特に非内因性の色素および対比染色のため、他の信号によって弱く影響されるだけである。これは、多数のスペクトルチャンネルなしで、内因性サンプル自家蛍光の正確な推定値を取得することをはるかにより容易にする。例えば、いくつかの状況では、1つのスペクトルチャンネル(すなわち、単一の波長測定値)のみが各色素および

10

20

30

40

50

対比染色のために使用され、さらに1つが自家蛍光のために使用される。

【0158】

図8Hは、自家蛍光に関するアンミキシングされた存在量画像である。画像は、図7Hとほぼ同じであるように見え、Xスペクトルバンドは、内因性自家蛍光以外の信号に対して弱くしか応答しないように設計されているので、これは、驚くべきことではない。両方の画像は、コラーゲン構造、一般化された細胞外マトリックス、細胞核を含む間質構造、および赤血球に対応する特徴を示す。

【0159】

しかしながら、重要な違いが存在する。図7Hに示す生のスペクトル画像は、Opal620で標識されたCD68標的と、Opal690で標識されたPD1標識とに関連するいくつかの信号を含み、これらは、図8Hのアンミキシングされた自家蛍光存在量画像においてほとんどまたは完全に存在しない。これは、上記で説明した色素スペクトルの観点から理解され得る。Xバンドは、各色素が最も強く応答するバンドにおける時間正規化された応答と比較して、Opal620色素について1.4%の応答、Opal690色素について1.0%の応答を示す。

10

【0160】

したがって、図7Hにおける生のスペクトル画像は、Opal620成分に関連付けられたいくつかの画像と、Opal690成分に関連付けられたいくつかの画像とを含む。スペクトルアンミキシングは、真の内因性自家蛍光信号をより正確に明らかにする図8Hにおける自家蛍光画像を生成する。この特定の例では、差の量は、比較的控えめである。

【0161】

いくつかの実施形態では、自家蛍光画像は、下流の画像分析において無視または特別に処理される特定の組織構造、細胞、または領域を識別するために分析され得る。上記の図8Dの説明では、赤血球に関連する領域において、図7Dの生のスペクトル画像は、その色素成分に適切に属さない信号を示した。理論に束縛されることを望まないが、可能な説明は、赤血球の自家蛍光が平均的なサンプル構造の自家蛍光とは異なるということである。FoxP3存在量画像において存在するなんらかの信号にもかかわらず、これらがTreg細胞ではなく赤血球であることを認識することは価値がある。したがって、いくつかの実施形態では、赤血球は、自家蛍光画像に基づいて識別され、下流の分析のために赤血球としてマークされ、それらがFoxP3陽性核と間違えられないことを保証することができる。

20

【0162】

このステップは、他の分析手順において同様に使用され得る。例えば、特定の実施形態では、赤血球蛍光発光の正確な結果は、ここでの結果とは異なる可能性があるが、赤血球を認識およびセグメント化することは、依然として有利である場合がある。いくつかの実施形態では、コラーゲンに関連する構造は、特定の測定を混乱または劣化させる場合があり、コラーゲン構造に関連するサンプルの領域は、自家蛍光画像から識別され、分析手順から除外され得るか、または、異なる基準もしくはアルゴリズムに従って他の方法で分析され得る。

30

【0163】

サンプル画像を分解するために様々な方法が利用可能であることが理解されるべきである。特に、スペクトルアンミキシング計算は、特定のステップが実行される順序を変更することによること、および特定のステップを完全に省略することによることを含む、様々な方法において実行され得る。例として、任意の1つのアンミキシングされた成分を利用するために、存在量行列のすべてのメンバをアンミキシングする必要はない。アンミキシング行列の特定の行は、どの純粋なスペクトル寄与因子が明らかにされているかに応じて、アンミキシング手順のために選択的に使用され得る。

40

【0164】

さらに、本明細書で説明する方法およびシステムは、(サンプル自家蛍光画像にほぼ一致する、またはほとんど同一に対応する)サンプルのバックグラウンド画像を直接取得するので、サンプル自家蛍光画像は、純粋なスペクトル寄与因子画像を取得するためにサンプル画像をアンミキシングする前に(例えば、バックグラウンド画像から)取得され得る。

50

この2ステップ分析手順は、特定のサンプル位置における自家蛍光スペクトルの性質に依存する適応スペクトルアンミキシングを実行する場合、および/または、特定のサンプル構造(赤血球および/またはコラーゲンなど)に対応するピクセルが、例えば、さらなる分析からそれらのピクセルを除外するために、自家蛍光画像から識別され、マークされる場合、特に有用であり得る。

【0165】

純粋なスペクトル寄与因子画像の前に自家蛍光画像を取得するために、自家蛍光存在量は、2ステップアンミキシング手順において最初に単にアンミキシングされ得る。次いで、バンドXに対応するバックグラウンド画像を使用するのではなく、生のスペクトルバンド(例えば、この例ではバンドB1~B7)と自家蛍光存在量 A_x とに対応するサンプル画像に基づいて、非内因性スペクトル寄与因子(例えば、適用された色素)からの寄与がアンミキシングされる。アンミキシング行列係数は、以下のように A_x の使用を考慮して修正される。

10

$$A_x = S_x^+ * M \quad [3]$$

【0166】

ここで、 S_x^+ は、逆スペクトル行列 S^+ の行xを指す。アンミキシング行列の他の行も、 A_x を介して導入された寄与を考慮して修正され得、結果は、より対角行列になる可能性がある。行列は、より対角であるので、小さい値の項を省略し、精度に大きい影響を与えることなく、計算を高速化することができる。

【0167】

(2)細胞カウント

20

サンプル自家蛍光画像に基づいて細胞カウントを調査するために、肺癌サンプルの2つの連続切片が調整された。一方の切片は、いかなる色素沈着もなしに調製された未染色のネガティブコントロールであった。他方の切片は、表6にリストされた試薬を使用してマルチプレックスパネルを用いて染色され、室温で1時間の1:25希釈におけるOpal Polaris 780 Anti-Dig(Akoya Biosciences、マサチューセッツ州ウォルサム)を用いた最終的なインキュベーションが続けられた。すべての他のインキュベーション時間は、前の例のインキュベーション時間と同じであった。サンプル画像は、前の例で説明したのと同じシステムを使用して取得された。

【0168】

【表 6】

染色順序	標的	一次抗体ベンダー、カタログ番号、クローン、種	一次抗体希釈率	チラミド試薬	チラミド希釈率
1	PD-L1	CST(マサチューセッツ州ダンバース)、13684、E1L3N、a-Rb	1:300	Opal 520(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)	1:150
2	FoxP3	Abcam(英国ケンブリッジ)、ab20034、236A/E7、a-Ms	1:100	Opal 570(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)	1:300
3	PD-1	AbCam(英国ケンブリッジ)、ab137132、EPR4877(2)、a-Rb	1:300	Opal 690(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)	1:100
4	CD68	Dako(カリフォルニア州サンタクララ)、M0876、PG-M1、a-Ms	1:100	Opal 620(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)	1:150
5	CD8	AbD Serotec(英国オックスフォード)、MCA1817、4B11、a-Ms	1:300	Opal Polaris 480(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)	1:150
6	Pan-Cytokeratin	Novus(コロラド州リトルトン)、NBP2-29429、AE1/AE2、a-Ms	1:200	Opal TSA-Dig(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)	1:100

Table 6

【0169】

(サンプル自家蛍光画像に対応すると想定された)バックグラウンド画像の測定に続いて、inForm(登録商標)software(Akoya Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)における自動組織セグメンテーションツールを使用して赤血球を識別するためにピクセルベースの分類アルゴリズムが訓練された。自家蛍光画像のみが分類器への入力として使用された。図10Aは、表6に示す色素を用いて調製されたサンプルから導出された画像のセットを示し、図10Bは、ネガティブコントロールサンプル(色素なし)から導出された画像のセットを示す。図10Aおよび図10Bにおける画像901は、サンプルのそれぞれの自家蛍光画像を示す。

【0170】

機械学習アルゴリズムを訓練するために、赤血球に対して陽性または陰性であったピクセルを識別するために、ネガティブコントロール自家蛍光画像上に領域が手動で描画された。両方の切片に関する訓練されたアルゴリズムからの結果は、図10Aおよび図10Bにおける画像902に対応する二項分類マスクである。

【0171】

これとは別に、inForm(商標)softwareにおける適応型細胞セグメンテーションツールを使用してFoxP3陽性細胞を識別するために細胞セグメンテーションアルゴリズムが開発された。アンミキシングされたOpal570/FoxP3存在量画像(図10Aおよび図10Bにおける画像)のみが、このセグメンテーションアルゴリズムへの入力として使用された。Opal570信号と細胞核の楕円形状とを有する画像(図10Aおよび図10Bにおける画像904)内のオブジェクトを識別するために、セグメンテーションのしきい値が設定された。ネガティブコントロールサンプル(図10Bにおける画像904)において識別されたすべての細胞は、細胞核と同様の形態を有する赤血球などの自家蛍光種の偽陽性検出であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 2 】

最後に、パネル内の赤血球であると識別された任意のピクセルと重複しないFoxP3陽性細胞のみを保持するために、両方のアルゴリズムからのマスク(図10Aおよび図10Bにおける画像902および904)が組み合わせられた。結果として生じたマスク(図10Aおよび図10Bにおける画像905)は、画像904に関する偽陽性の数の減少を示す。

【 符号の説明 】

【 0 1 7 3 】

- 200 サンプル画像化システム、システム
- 202 光源
- 204 ダイクロイックミラー
- 206 光学フィルタ、フィルタ
- 206a 励起フィルタ
- 206b 発光フィルタ
- 208 対物レンズ、レンズ
- 210 ステージ
- 212 検出器
- 214 コントローラ
- 216 処理デバイス
- 218 ディスプレイインターフェースまたはデバイス、インターフェース
- 250 サンプル
- 252 スライド

10

20

【 図 1 】

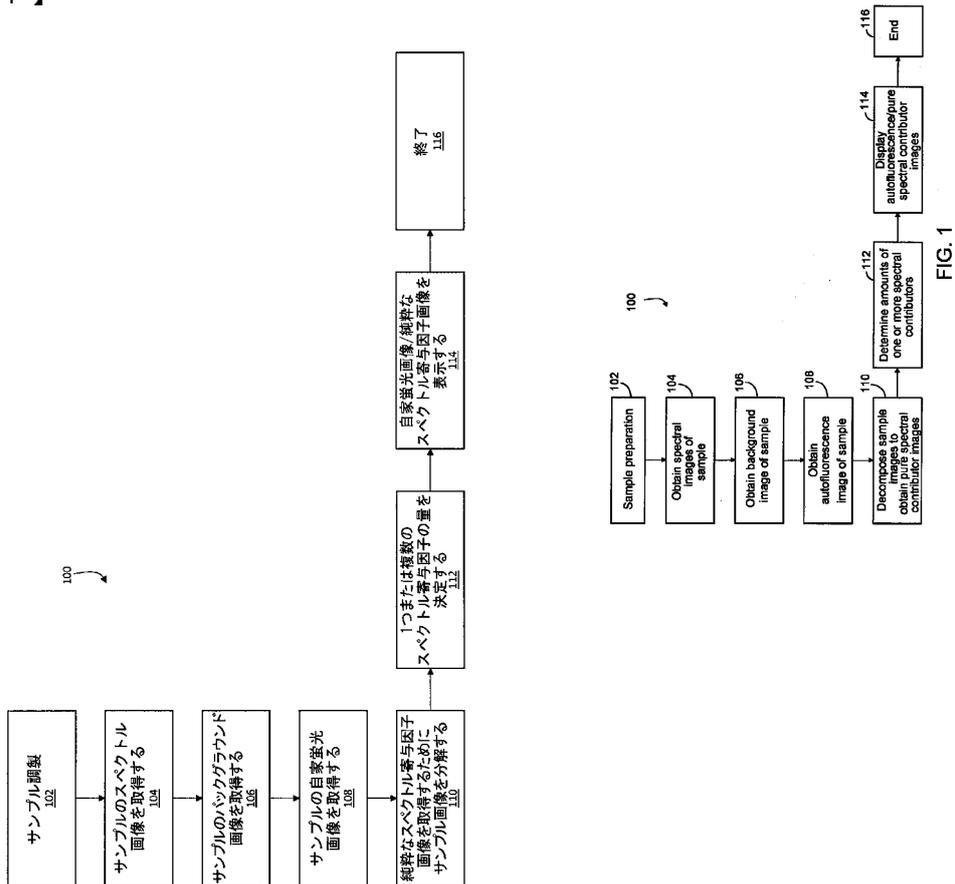


FIG. 1

【 図 2 】

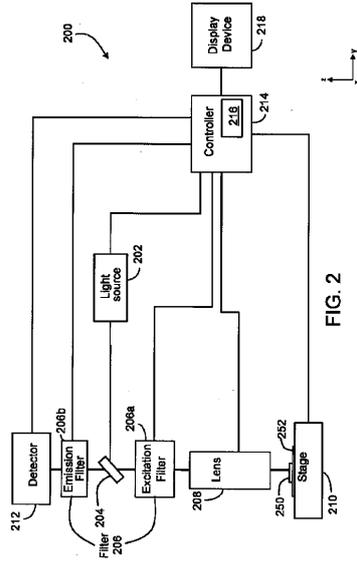
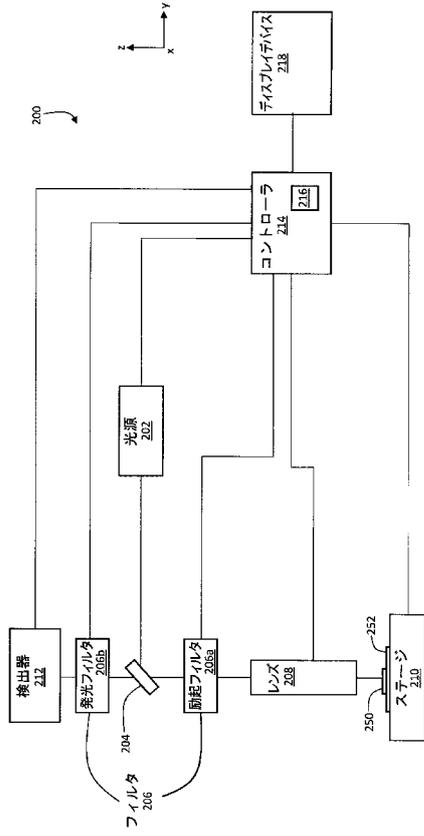


FIG. 2

【 図 3 】

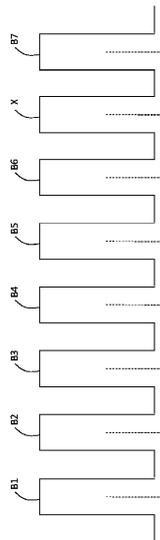


FIG. 3

【 図 4 】

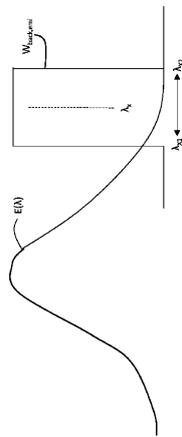


FIG. 4

【 図 5 A 】

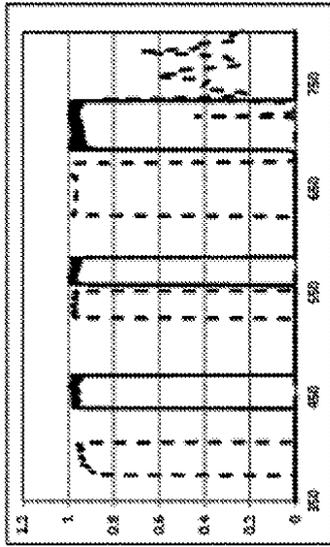


FIG. 5A

【 図 5 B 】

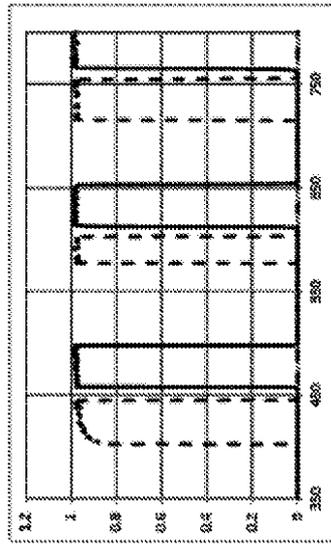


FIG. 5B

【 図 5 C 】

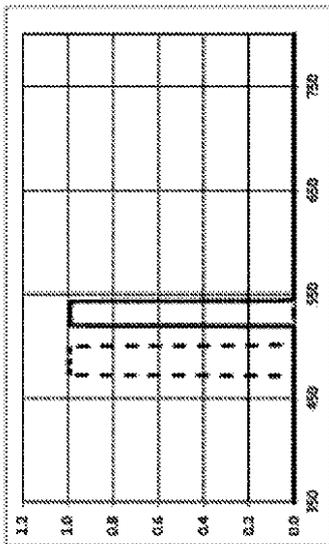


FIG. 5C

【 図 5 D 】

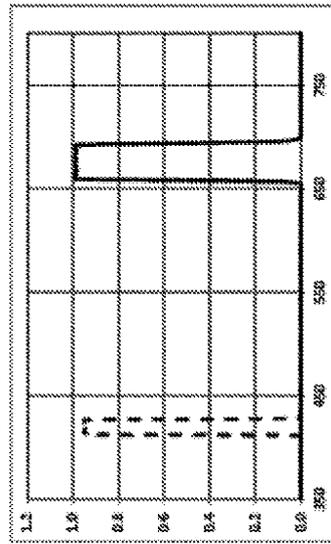


FIG. 5D

【 図 6 A 】

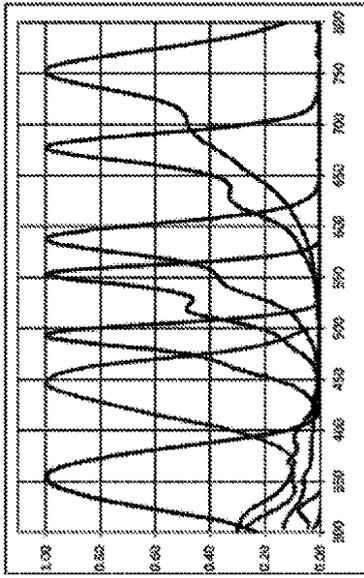


FIG. 6A

【 図 6 B 】

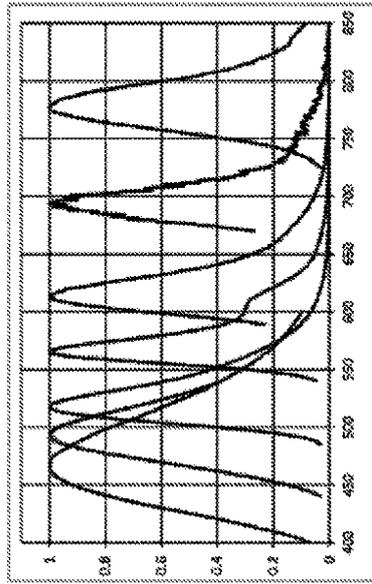


FIG. 6B

【 図 6 C 】

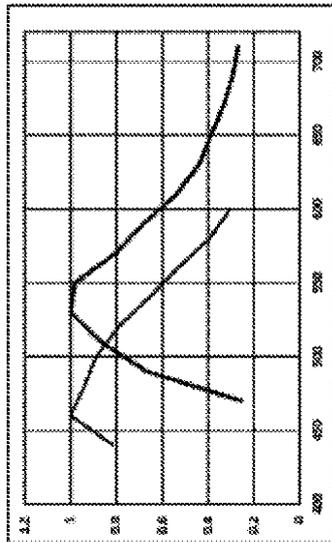


FIG. 6C

【 図 7 A 】



FIG. 7A

【 図 7 B 】

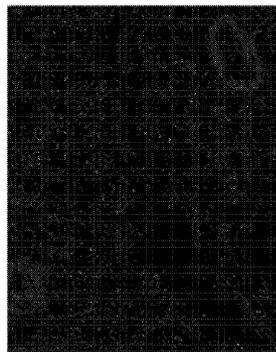


FIG. 7B

【 図 7 C 】

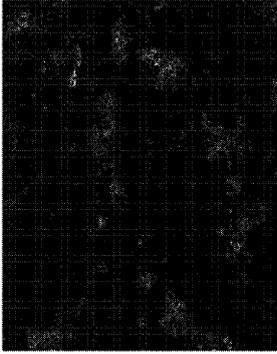


FIG. 7C

【 図 7 E 】

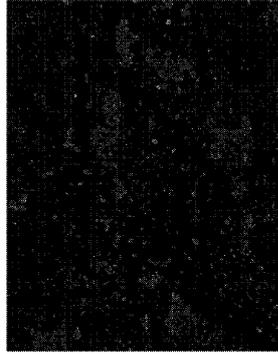


FIG. 7E

【 図 7 D 】

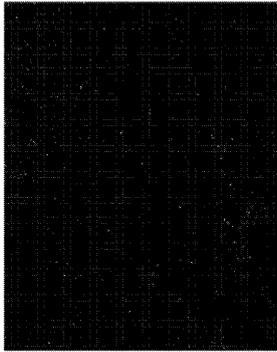


FIG. 7D

【 図 7 F 】



FIG. 7F

【 図 7 G 】

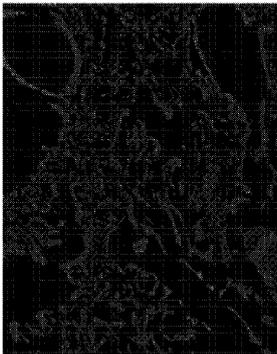


FIG. 7G

【 図 8 A 】

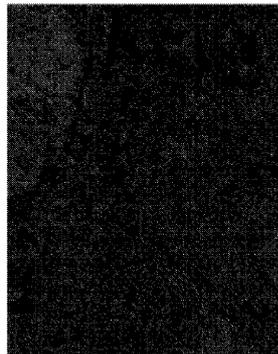


FIG. 8A

【 図 7 H 】

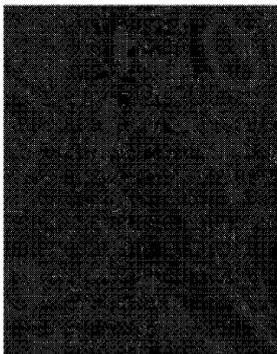


FIG. 7H

【 図 8 B 】



FIG. 8B

【 8 C 】



FIG. 8C

【 8 E 】



FIG. 8E

【 8 D 】



FIG. 8D

【 8 F 】



FIG. 8F

【 8 G 】

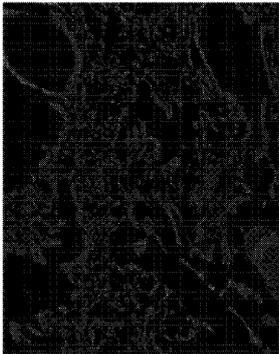


FIG. 8G

【 9 A 】

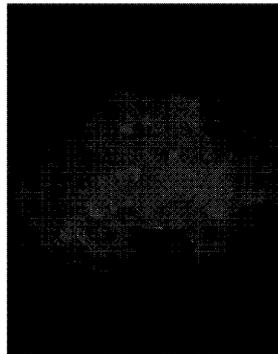


FIG. 9A

【 8 H 】

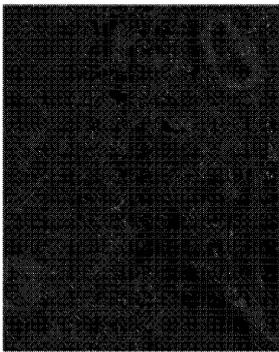


FIG. 8H

【 9 B 】

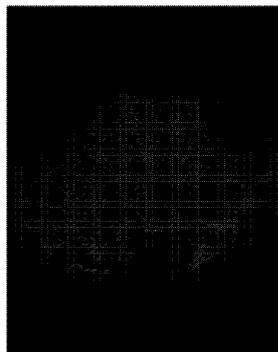


FIG. 9B

【 図 9 C 】

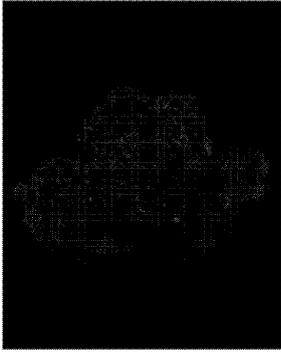


FIG. 9C

【 図 9 E 】

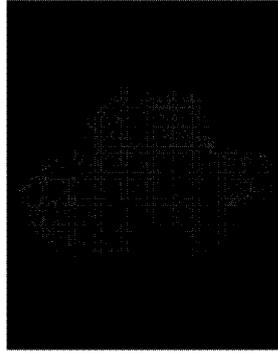


FIG. 9E

【 図 9 D 】

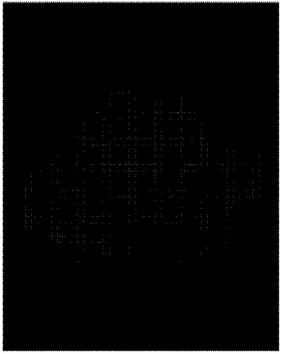


FIG. 9D

【 図 9 F 】

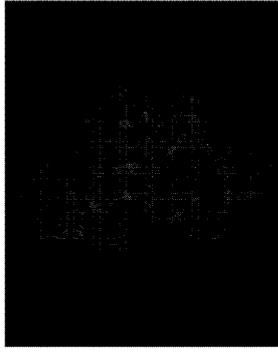


FIG. 9F

【 図 9 G 】



FIG. 9G

【 図 10 A 】

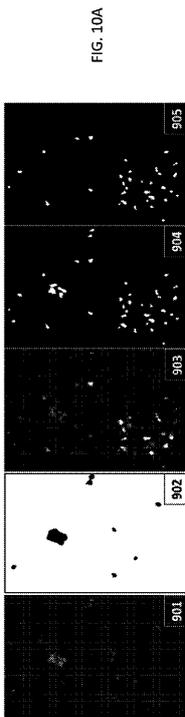


FIG. 10A

【 図 9 H 】

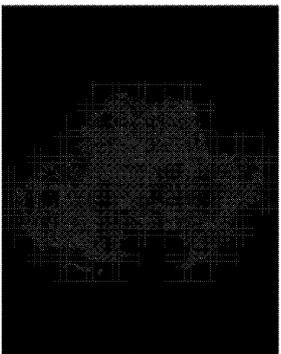
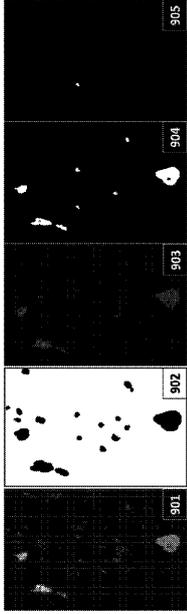


FIG. 9H

【 図 10B 】

FIG. 10B



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2019/030735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N21/64 G01J3/44 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N G01J		
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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/011116 A1 (MILLER PETER J [US] ET AL) 14 January 2016 (2016-01-14)	1-14, 18-21, 24-41
Y	abstract; paragraphs [0008], [0010], [0012], [0013], [0046], [0061], [0066] - [0069], [0077], [0089] - [0091], [0147], [0150], [0151]; figures 1-8,14,16	15-17, 19,20, 22,23
Y	----- US 2016/110870 A1 (MORIYAMA EDUARDO HIROYUKI [CA] ET AL) 21 April 2016 (2016-04-21) abstract; paragraphs [0006], [0007], [0023], [0030], [0051]; figures 1,2,5 ----- -/--	15-17
<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 17 July 2019		Date of mailing of the international search report 29/07/2019
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 Weinberger, Thorsten

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/030735

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/193061 A1 (MILLER PETER J [US]) 10 July 2014 (2014-07-10) cited in the application paragraphs [0009] - [0011], [0035], [0036], [0042], [0047], [0069] - [0070], [0074]; figures 1-6 -----	16, 19, 20, 22, 23
A	STYLIANOS PSYCHARAKIS ET AL: "Autofluorescence removal from fluorescence tomography data using multispectral imaging", PROCEEDINGS OF SPIE, vol. 6626, 5 July 2007 (2007-07-05), XP055158169, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.728305 the whole document -----	1, 24
A	JAMES R. MANSFIELD ET AL: "Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging", JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, vol. 10, no. 4, 1 January 2005 (2005-01-01), page 041207, XP055269855, ISSN: 1083-3668, DOI: 10.1117/1.2032458 the whole document -----	1, 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/030735

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016011116 A1	14-01-2016	CN 106796145 A	31-05-2017
		EP 3167278 A1	17-05-2017
		US 2016011116 A1	14-01-2016
		WO 2016007739 A1	14-01-2016

US 2016110870 A1	21-04-2016	AU 2015327665 A1	13-04-2017
		CA 2963987 A1	07-04-2016
		CN 107209118 A	26-09-2017
		EP 3201607 A1	09-08-2017
		JP 2017533415 A	09-11-2017
		KR 20170067803 A	16-06-2017
		US 2016110870 A1	21-04-2016
		US 2018120230 A1	03-05-2018
		WO 2016049756 A1	07-04-2016

US 2014193061 A1	10-07-2014	CN 105103190 A	25-11-2015
		EP 2943932 A1	18-11-2015
		US 2014193061 A1	10-07-2014
		WO 2014110025 A1	17-07-2014

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ピーター・ジェイ・ミラー

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02450・ウォルサム・ウィンター・ストリート・940

(72)発明者 ケント・エス・ジョンソン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02140・ケンブリッジ・ハリントン・ロード・18

(72)発明者 カーラ・コルサーブ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02451・ウォルサム・ウィンター・ストリート・16・
#28シー

Fターム(参考) 2G043 AA01 AA03 AA04 BA16 CA04 CA05 DA02 EA01 FA01 FA02
FA06 GA02 GA04 GA06 GA08 GB01 GB18 GB21 HA01 HA02
HA06 HA09 JA02 JA03 JA04 JA05 KA01 KA02 KA03 KA09
LA03 MA01 NA01 NA02
2G045 CB01 FA16 FA19 FA29 FB12 JA05