

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6031513号  
(P6031513)

(45) 発行日 平成28年11月24日(2016.11.24)

(24) 登録日 平成28年10月28日(2016.10.28)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 H
GO 1 N 33/72 (2006.01)	GO 1 N 33/72 A
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 21/27 A
GO 6 T 7/00 (2006.01)	GO 1 N 21/27 E

請求項の数 42 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-521678 (P2014-521678)	(73) 特許権者	514017758
(86) (22) 出願日	平成24年7月13日(2012.7.13)		ロッシュ ダイアグノスティクス ヘマト
(65) 公表番号	特表2014-525040 (P2014-525040A)		ロジー インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成26年9月25日(2014.9.25)		アメリカ合衆国、01581 マサチュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/046787		セッツ州、ウェストボロー、ミルク スト
(87) 国際公開番号	W02013/016039	(74) 代理人	110001896
(87) 国際公開日	平成25年1月31日(2013.1.31)		特許業務法人朝日奈特許事務所
審査請求日	平成27年4月3日(2015.4.3)	(74) 代理人	100098464
(31) 優先権主張番号	61/510, 614		弁理士 河村 洵
(32) 優先日	平成23年7月22日(2011.7.22)	(74) 代理人	100149630
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤森 洋介
(31) 優先権主張番号	61/510, 710	(74) 代理人	100184826
(32) 優先日	平成23年7月22日(2011.7.22)		弁理士 奥出 進也
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 網赤血球の同定および測定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2つの異なる波長の入射光を用いてサンプルを照射し、前記波長のうちの第一の波長に対応する、サンプルの2次元画像を得、および、前記波長のうちの第二の波長に対応する、サンプルの2次元画像を得る工程、

代表的な赤血球細胞のセットを同定するために画像を分析する工程、

前記セットの中の赤血球細胞のそれぞれの面積を決定する工程、

前記セットの中の赤血球細胞のそれぞれの明度を決定する工程、および

前記セットの中の一つ一つの赤血球細胞において、赤血球細胞の面積が面積カットオフ値を超えており、かつ、赤血球細胞の明度が明度カットオフ値よりも小さい場合に、赤血球細胞を網赤血球と同定する工程

を含む、基板上に配置された血液サンプル中の網赤血球を同定するための方法であって、前記一つ一つの赤血球細胞の明度が、前記2つの照射波長における赤血球細胞の光学濃度値のあいだの差異を含んでいる方法。

【請求項 2】

前記波長の一つが、400nm~475nmのあいだであり、および、他の波長が、575nm~600nmのあいだである請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記同定された赤血球細胞のそれぞれの明度を決定する工程が、一つ一つの赤血球細胞において、

- 細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定する工程、  
 前記ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第一の波長に対応する光学濃度を決定する工程、  
 前記ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第二の波長に対応する光学濃度を決定する工程、  
 前記ピクセルのセットにおいて第一の波長に対応する平均光学濃度を決定する工程、  
 前記ピクセルのセットにおいて第二の波長に対応する平均光学濃度を決定する工程、および  
 細胞の明度を決定するために、前記平均光学濃度のあいだの差異を計算する工程を含む請求項 1 記載の方法。 10
- 【請求項 4】  
 前記セットの中の赤血球細胞のそれぞれの面積を決定する工程が、一つ一つの赤血球細胞において、  
 細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定する工程、および  
 前記セットの中のピクセルの数をカウントすることによって細胞の面積を決定する工程を含む請求項 1 記載の方法。
- 【請求項 5】  
 前記セットの中のそれぞれの赤血球細胞の面積を決定する工程が、一つ一つの赤血球細胞において、  
 細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定する工程、および  
 前記ピクセルのセットの周囲を取り囲む多角形を決定する工程、および  
 前記多角形の面積を計算することによって細胞の面積を決定する工程を含む請求項 1 記載の方法。 20
- 【請求項 6】  
 前記明度カットオフ値が、赤血球細胞の明度の分布のパーセンタイルに基づいている請求項 1 記載の方法。
- 【請求項 7】  
 前記パーセンタイルが、赤血球細胞の明度の分布内の 70 パーセンタイルに対応する請求項 6 記載の方法。
- 【請求項 8】 30  
 前記明度カットオフ値が、パーセンタイルと明度オフセット値との和に対応する請求項 6 記載の方法。
- 【請求項 9】  
 網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準として、前記パーセンタイルおよび前記明度オフセット値を決定する工程をさらに含む請求項 8 記載の方法。
- 【請求項 10】  
 前記面積カットオフ値が、赤血球細胞の面積の分布のパーセンタイルに基づいている請求項 1 記載の方法。
- 【請求項 11】 40  
 前記パーセンタイルが、赤血球細胞の面積の分布の 20 パーセンタイルに対応する請求項 10 記載の方法。
- 【請求項 12】  
 前記面積カットオフ値が、パーセンタイルおよび面積オフセット値の和に対応する請求項 10 記載の方法。
- 【請求項 13】  
 網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準として、前記パーセンタイルおよび前記面積オフセット値を決定する工程をさらに含む請求項 12 記載の方法。
- 【請求項 14】 50  
 前記 2 つの波長のうちの 1 つの波長における、赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差が、カットオフ値よりも大きい場合に、前記代表的なセットから赤血球

細胞を除外する工程をさらに含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 2 つの波長とは異なる波長における、赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差が、カットオフ値よりも大きい場合に、前記代表的なセットから赤血球細胞を除外する工程をさらに含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、網赤血球の容積を決定する工程をさらに含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 7】

複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度に基づき、網赤血球の容積を決定する工程をさらに含む請求項 1 6 記載の方法。

10

【請求項 1 8】

サンプルの平均網赤血球容積パラメータを決定する工程をさらに含む請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定する工程をさらに含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

網赤血球の面積、複数の照射波長に対応する網赤血球の容積、および、複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度の重み付け組合せに基づき、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定する工程をさらに含む請求項 1 9 記載の方法。

20

【請求項 2 1】

サンプルの平均網赤血球ヘモグロビン値を決定する工程をさらに含む請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 2】

2 つの異なる波長の入射光を用いてサンプルを照射するように構成されている光源、前記波長のうちの第一の波長に対応するサンプルの 2 次元画像を得るように、および、前記波長のうちの第二の波長に対応するサンプルの 2 次元画像を得るように構成されている検出器、ならびに

代表的な赤血球細胞のセットを同定するために画像を分析する、

30

前記セットの中のそれぞれの赤血球細胞の面積を決定する、

前記セットの中のそれぞれの赤血球細胞の明度を決定する、および

前記セットの中の一つ一つの赤血球細胞において、赤血球細胞の面積が面積カットオフ値を超えており、かつ、赤血球細胞の明度が明度カットオフ値よりも小さい場合に、赤血球細胞を網赤血球と同定する

ように構成されている電子プロセッサであって、一つ一つの赤血球細胞の明度を、2 つの照射波長における赤血球細胞の光学濃度値のあいだの差異に基づいて決定するように構成されている電子プロセッサを備える、基板上に配置された血液サンプル中の網赤血球を同定するためのシステム。

【請求項 2 3】

40

前記第一の波長が、400 nm ~ 475 nm のあいだであり、および、前記第二の波長が、575 nm ~ 600 nm のあいだである請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記セットの中の赤血球細胞の一つ一つにおいて、前記電子プロセッサが、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定すること、

前記ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第一の波長に対応する光学濃度を決定すること、

前記ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第二の波長に対応する光学濃度を決定すること、

前記ピクセルのセットにおいて第一の波長に対応する平均光学濃度を決定すること、

50

前記ピクセルのセットにおいて第二の波長に対応する平均光学濃度を決定すること、および

細胞の明度を決定するために、平均光学濃度のあいだの差異を計算することによって細胞の明度を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 2 5】

前記セットの中の赤血球細胞の一つ一つにおいて、前記電子プロセッサが、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定すること、および

前記セットの中のピクセルの数をカウントすることによって細胞の面積を決定することによって細胞の面積を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 2 6】

前記赤血球細胞の一つ一つにおいて、前記電子プロセッサが、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定すること、

前記ピクセルのセットの周囲を取り囲む多角形を決定すること、および

前記多角形の面積を計算することによって細胞の面積を決定すること

によって細胞の面積を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 2 7】

前記電子プロセッサが、赤血球細胞の明度の分布のパーセンタイルに基づき明度カットオフ値を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 2 8】

前記パーセンタイルが、赤血球細胞の明度の分布内の 7 0 パーセンタイルに対応する請求項 2 7 記載のシステム。

【請求項 2 9】

前記電子プロセッサが、パーセンタイルおよび明度オフセット値の和として明度カットオフ値を決定するように構成される請求項 2 7 記載のシステム。

【請求項 3 0】

前記電子プロセッサが、網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準としてパーセンタイルおよび明度オフセット値を決定するように構成される請求項 2 9 記載のシステム。

【請求項 3 1】

前記電子プロセッサが、赤血球細胞の面積の分布のパーセンタイルに基づき面積カットオフ値を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 3 2】

前記パーセンタイルが、赤血球細胞の面積の分布の 2 0 パーセンタイルに対応する請求項 3 1 記載のシステム。

【請求項 3 3】

前記電子プロセッサが、パーセンタイルおよび面積オフセット値の和として面積カットオフ値を決定するように構成される請求項 3 1 記載のシステム。

【請求項 3 4】

前記電子プロセッサが、網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準としてパーセンタイルおよび面積オフセット値を決定するように構成される請求項 3 3 記載のシステム。

【請求項 3 5】

前記電子プロセッサが、前記 2 つの波長のうちの 1 つの波長における赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差がカットオフ値よりも大きい場合に、代表的なセットから赤血球を除外するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 3 6】

前記電子プロセッサが、前記 2 つの波長とは異なる波長における赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差がカットオフ値よりも大きい場合に、代表的なセットから赤血球細胞を除外するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 3 7】

10

20

30

40

50

網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、前記電子プロセッサが、網赤血球の容積を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

【請求項 3 8】

前記電子プロセッサが、複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度に基づき、網赤血球の容積を決定するように構成される請求項 3 7 記載のシステム。

【請求項 3 9】

前記電子プロセッサが、サンプルの平均網赤血球容積パラメータを決定するように構成される請求項 3 8 記載のシステム。

【請求項 4 0】

網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、前記電子プロセッサが、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定するように構成される請求項 2 2 記載のシステム。

10

【請求項 4 1】

前記電子プロセッサが、網赤血球の面積と、複数の照射波長に対応する網赤血球の容積と、複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度との重み付け組合せに基づき、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定するように構成される請求項 4 0 記載のシステム。

【請求項 4 2】

前記電子プロセッサが、サンプルの平均網赤血球ヘモグロビン値を決定するように構成される請求項 4 0 記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

[ 関連出願の相互参照 ]

本出願は、以下の米国仮出願：2 0 1 1 年 7 月 2 2 日に出願された米国仮出願第 6 1 / 5 1 0 , 6 1 4 号、および 2 0 1 1 年 7 月 2 2 日に出願された米国仮出願第 6 1 / 5 1 0 , 7 1 0 号に対して米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) に基づく優先権を主張するものである。上述の出願のそれぞれの内容は参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

【0 0 0 2】

[ 技術分野 ]

本開示は、血液を含む生物学的サンプル中、および血液を模倣するようにデザインされる精度管理組成物中の網赤血球の同定、カウント、および特性の測定に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

網赤血球は、典型的には、成熟赤血球細胞と比較して RNA の上昇したレベルによって特徴付けられる未成熟赤血球細胞である。血液サンプルにおいて行われる網赤血球カウントは、患者の骨髄がどの位迅速に赤血球を産生しているのかに関する重要な情報を提供し得る。したがって、患者の血液中の網赤血球の量は、重要な診断的指標として機能し、そして、全血球計算の典型例な一つのパラメータである。例えば、高い網赤血球カウントは、器官内外傷、血液損失、または、ある種の貧血の可能性を示し得る。低い網赤血球カウントは、特定の食事性欠乏症（例えば鉄分不足など）、または、癌などの骨髄に影響を及ぼしている疾病を示し得る。本明細書中に開示されることは、血液を含む生物学的サンプル中および血液を模倣するようにデザインされる精度管理組成物中の、網赤血球の同定、定量、および成分測定を含む、細胞サンプルの自動化された測定のための方法およびシステムである。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

本明細書中に開示される方法およびシステムは、分光イメージングを使用して、血液サンプル中の網赤血球の、自動化された同定および定量を可能にする。この同定および定量は、そのイメージが種々の光学波長で取得されている、一またはそれ以上の細胞のイメージに基づく。具体的には、開示される方法およびシステムは、患者から抽出された血液サ

50

ンプル中の網赤血球の特性を同定および測定するために使用され得る。特性としては例えば、網赤血球の形および外観、例えば、面積、周囲長、円形度、光学濃度などに関連する様々なパラメータ、ならびに、種々の波長における様々なスペクトル特性が挙げられる。網赤血球は、技術者に、選択的に表示され（例えば、成熟赤血球細胞からそれらを識別するためにハイライトされるなど）得る。網赤血球から獲得される診断的情報はまた、さらなる判断のため（例えば、患者が患っているかもしれない症状を見つけ出すため、および、適切な治療方針を選択するため、など）に技術者に表示され得、および/または、他の自動化された装置へ伝達され、患者の電子カルテへと保存され、そして、他の医療従事者へと伝送され得る。

【課題を解決するための手段】

10

【0005】

一般的に、第一の態様において、本開示は、基板上に配置された血液サンプル中の網赤血球を同定するための方法の特徴としており、前記方法は、2つの異なる波長の入射光を用いてサンプルを照射する工程、サンプルの、波長のうちの第一の波長に対応する2次元画像を得る工程、および、サンプルの、波長のうちの第二の波長に対応する2次元画像を得る工程、代表的な赤血球細胞のセットを同定するために画像を分析する工程、セットの中の赤血球細胞のそれぞれの面積を決定する工程、セットの中の赤血球細胞のそれぞれの明度を決定する工程、および、セットの中の一つ一つの赤血球細胞において、赤血球細胞の面積が面積カットオフ値を超えており、かつ、赤血球細胞の明度が明度カットオフ値よりも小さい場合に、赤血球細胞を網赤血球と同定する工程であって、一つ一つの赤血球細胞の明度が、2つの照射波長における赤血球細胞の光学濃度値のあいだの差異を含んでいる工程を含む。

20

【0006】

本発明の実施態様は、本明細書中で開示される特徴の一またはそれ以上を含む。

【0007】

波長の一つは、400nm～475nmのあいだであり得、そして、他の波長は、575nm～600nmのあいだであり得る。

【0008】

同定された赤血球細胞のそれぞれの明度を決定する工程は、一つ一つの赤血球細胞において、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定する工程、ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第一の波長に対応する光学濃度を決定する工程、ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第二の波長に対応する光学濃度を決定する工程、ピクセルのセットにおいて第一の波長に対応する平均光学濃度を決定する工程、ピクセルのセットにおいて第二の波長に対応する平均光学濃度を決定する工程、および、細胞の明度を決定するために、平均光学濃度のあいだの差異を計算する工程を含む。

30

【0009】

セットの中の赤血球細胞のそれぞれの面積を決定する工程は、一つ一つの赤血球細胞において、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定する工程、および、セットの中のピクセルの数をカウントすることによって細胞の面積を決定する工程を含む。セットの中のそれぞれの赤血球細胞の面積を決定する工程は、一つ一つの赤血球細胞において、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定する工程、ピクセルのセットの周囲を取り囲む多角形を決定する工程、および、多角形の面積を計算することによって細胞の面積を決定する工程を含む。

40

【0010】

明度カットオフ値は、赤血球細胞の明度の分布のパーセンタイルに基づき得る。パーセンタイルは、赤血球細胞の明度の分布内の70パーセンタイルに対応し得る。明度カットオフ値は、パーセンタイルおよび明度オフセット値の和に対応し得る。本方法は、網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準としてパーセンタイルおよび明度オフセット値を決定する工程を含んでもよい。面積カットオフ値は、赤血球細胞の面積の分布のパーセンタイルに基づき得る。パーセンタイルは、赤血球細胞の面積の分布の20パー

50

センタイルに対応し得る。面積カットオフ値は、パーセンタイルおよび面積オフセット値の和に対応し得る。本方法は、網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準としてパーセンタイルおよび面積オフセット値を決定する工程を含んでいてもよい。

【0011】

本方法は、2つの波長のうちの1つの波長における赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差がカットオフ値よりも大きい場合に、代表的なセットから赤血球細胞を除外する工程を含み得る。本方法は、2つの波長とは異なる波長における赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差がカットオフ値よりも大きい場合に、代表的なセットから赤血球細胞を除外する工程を含み得る。

【0012】

本方法は、網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、網赤血球の容積を決定する工程を含み得る。本方法は、複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度に基づき、網赤血球の容積を決定する工程を含み得る。本方法は、サンプルの平均網赤血球容積パラメータを決定する工程を含み得る。

【0013】

本方法は、網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定する工程を含み得る。本方法は、網赤血球の面積、複数の照射波長に対応する網赤血球の容積、および複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度の重み付け組合せに基づき、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定する工程を含み得る。本方法は、サンプルの平均網赤血球ヘモグロビン値を決定する工程を含み得る。

【0014】

本方法の実施態様はまた、本明細書中に開示される他の任意の特徴および工程を、必要に応じて任意の組合せで、含み得る。

【0015】

別の態様において、本開示は、基板上に配置された血液サンプル中の網赤血球を同定するためのシステムを特徴としており、前記システムは、2つの異なる波長の入射光を用いてサンプルを照射するように構成されている光源、波長のうちの第一の波長に対応するサンプルの2次元画像を得るように、そして、波長のうちの第二の波長に対応するサンプルの2次元画像を得るように構成されている検出器、および、代表的な赤血球細胞のセットを同定するために画像を分析する、セットの中のそれぞれの赤血球細胞の面積を決定する、セットの中のそれぞれの赤血球細胞の明度を決定する、赤血球細胞の面積が面積カットオフ値を超えており、かつ、赤血球細胞の明度が明度カットオフ値よりも小さい場合に、赤血球細胞を網赤血球と同定するように構成されている電子プロセッサであって、一つ一つの赤血球細胞の明度を、2つの照射波長における赤血球細胞の光学濃度値のあいだの差異に基づいて決定するように構成されている電子プロセッサを備える。

【0016】

本システムの実施態様は、一またはそれ以上の以下の特徴を含み得る。

【0017】

第一の波長は、400 nm ~ 475 nmのあいだであり得、そして、第二の波長は、575 nm ~ 600 nmのあいだであり得る。

【0018】

セットの中の赤血球細胞の一つ一つにおいて、電子プロセッサは、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定すること、ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第一の波長に対応する光学濃度を決定すること、ピクセルのセットのうちの一つ一つにおいて第二の波長に対応する光学濃度を決定すること、ピクセルのセットにおいて第一の波長に対応する平均光学濃度を決定すること、ピクセルのセットにおいて第二の波長に対応する平均光学濃度を決定すること、および、細胞の明度を決定するために、平均光学濃度のあいだの差異を計算することによって細胞の明度を決定するように構成され得る。

【0019】

セットの中の赤血球細胞の一つ一つにおいて、電子プロセッサは、細胞に関連付けられ

10

20

30

40

50

るピクセルのセットを決定すること、および、セットの中のピクセルの数をカウントすることによって細胞の面積を決定することによって細胞の面積を決定するように構成され得る。赤血球細胞の一つ一つにおいて、電子プロセッサは、細胞に関連付けられるピクセルのセットを決定すること、ピクセルのセットの周囲を取り囲む多角形を決定すること、多角形の面積を計算することによって細胞の面積を決定すること、によって細胞の面積を決定するように構成され得る。

【0020】

電子プロセッサは、赤血球細胞の明度の分布のパーセンタイルに基づき明度カットオフ値を決定するように構成され得る。パーセンタイルは、赤血球細胞の明度の分布内の70パーセンタイルに対応し得る。電子プロセッサは、パーセンタイルおよび明度オフセット値の和として明度カットオフ値を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準としてパーセンタイルおよび明度オフセット値を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、赤血球細胞の面積の分布のパーセンタイルに基づき面積カットオフ値を決定するように構成され得る。パーセンタイルは、赤血球細胞の面積の分布の20パーセンタイルに対応し得る。電子プロセッサは、パーセンタイルおよび面積オフセット値の和として面積カットオフ値を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、網赤血球の数が既知である訓練データのセットを基準としてパーセンタイルおよび面積オフセット値を決定するように構成され得る。

10

【0021】

電子プロセッサは、2つの波長のうちの1つの波長における赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差がカットオフ値よりも大きい場合に、代表的なセットから赤血球を除外するように構成され得る。電子プロセッサは、2つの波長とは異なる波長における赤血球細胞に関連付けられるピクセルの光学濃度の標準偏差がカットオフ値よりも大きい場合に、代表的なセットから赤血球細胞を除外するように構成され得る。

20

【0022】

網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、電子プロセッサは、網赤血球の容積を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度に基づき、網赤血球の容積を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、サンプルの平均網赤血球容積パラメータを決定するように構成され得る。

【0023】

網赤血球と同定された赤血球細胞のそれぞれにおいて、電子プロセッサは、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、網赤血球の面積と、複数の照射波長に対応する網赤血球の容積と、複数の照射波長に対応する網赤血球の積分光学濃度との重み付け組合せに基づき、網赤血球のヘモグロビン含有量を決定するように構成され得る。電子プロセッサは、サンプルの平均網赤血球ヘモグロビン値を決定するように構成され得る。

30

【0024】

本システムの実施態様はまた、本明細書中に開示される他の任意の特徴を、必要に応じて任意の組合せで、含み得る。

【0025】

別段の定義がない限り、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で記載されたものと類似または同等の方法および材料が、実地でまたは試験に使用され得るが、適切な方法および材料は以下に記載される。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の文献は、参照によってその全体が本明細書中に組み込まれる。不一致のある場合、定義を含む本願発明の明細書が統制するであろう。加えて、材料、方法および実施例は、例示のみを目的とし、そして、限定を目的とするものではない。

40

【0026】

一またはそれ以上の実施態様の詳細は、添付の図面および以下の記載に開示される。他

50



の特徴および有利点は、明細書、図面およびクレームから明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】生物学的サンプル中の網赤血球の同定、定量、および特徴の測定のためのシステムの概略図である。

【図2】サンプル中の網赤血球を同定するための一連の工程を示す概略図である。

【図3A】サンプル中の赤血球細胞からの網赤血球同定のための色カットオフ値を示すプロットである。

【図3B】サンプル中の赤血球細胞からの網赤血球同定のための面積カットオフ値を示すプロットである。

【図4】サンプルの一またはそれ以上の画像から代表的な赤血球細胞のセットを選択するための一連の工程を示す概略図である。

【図5】細胞境界線を示している細胞の模式的な画像である。

【図6】2つの細胞およびそれぞれの細胞において決定された凸包を示す概略図である。

【図7】細胞ピクセルのあいだの光学濃度において変動を示している細胞の模式的な画像である。

【図8】自動化されたサンプル処理システムの概略図である。

【図9】網赤血球の容積、成分、および他の特徴を測定するためのコンピュータを用いたシステムの概略図である。

【0028】

様々な図面における類似の参照符号は、類似のエレメントを示している。

【発明を実施するための形態】

【0029】

網赤血球は、典型的には、成熟赤血球細胞と比較してRNAの上昇したレベルによって特徴付けられる未成熟赤血球細胞である。血液サンプルにおいて行われる網赤血球カウントは、患者の骨髄がどの位迅速に赤血球を産生しているのかに関する重要な情報を提供し得る。したがって、患者の血液中の網赤血球の量は、重要な診断的指標として機能し、そして、全血球計算の典型例な一つのパラメータである。例えば、高い網赤血球カウントは、器内外傷、血液損失、または、ある種の貧血の可能性を示し得る。低い網赤血球カウントは、特定の食事性欠乏症（例えば鉄分不足など）、または、癌などの骨髄に影響を及ぼしている疾病を示し得る。本明細書中に開示されることは、サンプル中の網赤血球の同定、定量、および成分測定を含む、細胞サンプルの自動化された測定のための方法およびシステムである。本開示はヒト患者からの血液サンプル中の網赤血球の同定に焦点合わせているものの、本開示は、このような応用に限定されているわけではない。具体的には、本明細書中で開示される方法およびシステムは、サンプルを測定し、そして、自動化された実験室分析機器での使用を目的とする精度管理組成物中の、または、動物から採取されたサンプルを含む他の様々な種々のサンプル中の網赤血球を、自動化された様式で、同定するために使用され得る。本明細書中で開示される方法およびシステムは、特別な染色または網赤血球の同定のために特異的に設計された他の造影剤の必要性なしに、患者から抽出された様々な生物学的サンプルのハイスループットな、完全自動化された分析を可能にする。

【0030】

分析のためのサンプルを調製するための自動化されたシステムが、以下により詳細に記載されるであろう。いったんサンプルが調製されると、それは自動化された測定システムへと移送される。測定システムは、サンプル中の細胞の一またはそれ以上の2次元画像を獲得し、そして、画像（複数の画像）中の赤血球細胞および血液の他の有形成分中の網赤血球を特定するために、そして、いくつかの実施態様においては、例えば、網赤血球の容積、面積、周囲長、光学濃度などの同定された網赤血球中に関連する量、および/または、同定された網赤血球中の一またはそれ以上の成分（例えばヘモグロビンなど）の量を計測するために、画像（複数の画像）を使用する。これらの量は、入射光を網赤血球上へ

10

20

30

40

50

と導き、そしてその後、網赤血球を透過するか、またはそこから反射される入射光の割合を検出することによって得られる網赤血球の画像由来の情報から決定され得る。それぞれの画像は、2次元画像であり、画像内の個々のピクセル強度値は、ピクセルに対応する網赤血球上の空間的位置から現れる透過光または反射光の量に対応する。

#### 【0031】

##### 一般的考察

網赤血球は典型的には、成熟赤血球細胞を含む他の細胞型中よりも網赤血球中により高い濃度で存在するリボソームRNAのネットワークを含む。アズールBおよびメチレンブルーなどの特定の染色が網赤血球に適用される場合、染色剤はRNAと結合する。顕微鏡検査下において、染色されたRNAは、容易に視認され得、そして、網赤血球は成熟赤血球細胞と比べて、わずかにより青く、そして大きく見える。染色されたRNAの量は、他の細胞型から網赤血球を識別するために使用され得る一つの基準である。

10

#### 【0032】

自動化されたサンプル調製システムは、血液サンプルに様々な種々の染色を適用し得る。網赤血球を同定するためのいくつかの従来技術が、細胞のRNAへの結合に特異的である染色、または、網赤血球の同定を特に目的とする他の機序に依存しているのに対し、本明細書中で開示される方法およびシステムは、ロマノスキー染色を含む、全血球カウントの全ての他のパラメータの自動化された検出および測定を可能にする染色に有利に依存する。したがって、細胞RNAおよびDNAの両方を標的とする染色が、網赤血球に適用され得、上に記載されるリボソームRNAの染色されたネットワークに起因して他の細胞型から識別され得る。より一般的には、赤血球細胞を含む細胞（例えば成熟赤血球、網赤血球など）は、典型的には、血液サンプルに一またはそれ以上の染色を適用することによって（血液サンプルの一部として）調製され得る。染色剤は、細胞質に結合し、そして、細胞イメージにおける細胞質のためのマーカーとして機能する。細胞が入射光によって照射される場合、染色剤が入射光の一部を吸収し、サンプル中の特定の位置における吸収量は、その位置に存在する染色剤の量に依存する。

20

#### 【0033】

網赤血球を同定することに加えて、本明細書中で開示される方法およびシステムは、同定された網赤血球の様々な特性を測定するために使用され得る。例えば、網赤血球容積は、細胞厚みの推定値を、局在的に変化する細胞成分（例えばヘモグロビンなど）の濃度および適用された様々な染色剤の吸収効果から分離することによって、2次元の網赤血球画像から得られる情報をもとに決定され得る。このような分離を行うために、ピクセル強度は、それぞれの細胞において最大ピクセル強度にしたがって基準化される。以下にさらに記載されるように、網赤血球容積計算は、網赤血球画像を獲得するために使用された照射のそれぞれの色における光学濃度値と、網赤血球面積との重み付け組合せに基づき得る。本明細書中に記載されるプロセスは、容積測定のために選択される網赤血球のセットのそれぞれの要素において繰り返され得、そしてその結果は、サンプルの平均網赤血球容積を計算するために使用され得る。網赤血球成分の量、例えば網赤血球のヘモグロビン含有量などはまた、網赤血球画像を獲得するために使用される照射のそれぞれの色における光学濃度値に基づく計算から決定され得、これは以下にさらに記載されるであろう。

30

40

#### 【0034】

以下の開示の目的のために、少なくとも2つの染色剤：エオシンおよびアズール、がサンプルに適用されると想定する。しかしながら、本明細書中に開示される方法およびシステムは、2つの染色剤のみの適用またはエオシンおよびアズールのみに限定されるわけではない。反対に、本方法およびシステムは、サンプルにより少ない数の染色剤（例えば1つの染色剤など）またはより多くの染色剤（例えばエオシンを含む赤色染色剤ならびにアズールおよびメチレンブルーを含む青色染色剤、3つまたはそれ以上の染色剤、4つまたはそれ以上の染色剤、5つまたはそれ以上の染色剤など）が適用されたサンプル上での測定を行うことも可能である。

#### 【0035】

50

図1は、血液サンプル中の網赤血球の自動化された同定および測定を行うための、(より大きなサンプル処理および分析システムの一部であってもよい)システム100の概略図を示す。システム100は、光源102、検出器106、および電子制御システム108を備える。電子制御システム108は、ディスプレイ110、ヒューマンインターフェースユニット112、および電子プロセッサ114を備え得る。電子制御システム108は、光源102へと、および検出器106へと、それぞれ制御ライン120および122を介して連結される。

【0036】

サンプルが分析のために調製されている(以下にさらに説明されるように)と仮定すると、調製されたサンプル104(例えば、顕微鏡スライド上に配置され、そして続いて固定され、染色され、リンスされそして乾燥された)は、光源102に近接して自動的に配置される。光源102は、入射光116をサンプル104へと導く。入射光の一部はサンプル104を通して透過光118として透過し、そして、検出器106によって検出される。透過光118は、検出器106の活性表面上にサンプル104の画像を形成し、検出器は画像を取り込み、そして、電子制御システム108へと画像情報を伝達する。一般的に、電子制御システム108は光源102が入射光116を作製するように導き、そしてまた、検出器106がサンプル104の画像を検出するように導く。制御システム108は、検出器106が透過光118からサンプル104の画像を獲得した場合、光源102に異なる照射波長を使用するよう指示し得る。

【0037】

上で説明されたプロセスは、必要に応じて、サンプル104の複数の画像において繰り返され得る。新しい画像を獲得するに先立ち、電子制御システム108は、光源102によってもたらされる入射光116の波長を変化させ得る。したがって、サンプル104の画像は、それぞれ、入射光116の異なる波長、したがって、透過光118の異なる波長に相当する。プロセスは、網赤血球の候補を含む赤血球細胞の正確な同定を行うため、および/または、同定された赤血球細胞および/または網赤血球と関連付けられる特性を決定するために少なくとも十分な情報が獲得されるまで繰り返される。

【0038】

典型的には、網赤血球の正確な同定および/または定量をもたらす情報の量は、校正プロセスにおいて決定される。例えば、校正プロセスは、正確な網赤血球の同定および定量が、得られたサンプルの画像の数がサンプル分析に考慮されるスペクトル寄与因子(例えば吸収体など)の数と等しいかまたはそれより大きい場合に達成され得ることを確定するために使用され得る。例として、天然に存在する吸収体としてヘモグロビン、ならびに、(全部で3つのスペクトル寄与因子のために)適用される染色剤としてエオシンおよびアズールを含む、赤血球細胞を含む調製されたサンプルのために、システム100は、最低でも3つの異なる波長における画像を得るまでサンプル画像を獲得し続け得る。追加の画像(さらに異なる波長に対応する)がまた、得られ得、そして、網赤血球の同定および定量において使用され得る。

【0039】

光源102は、サンプル中に入射光を導くための、一つの光源または複数の同じもしくは異なる光源を備え得る。いくつかの実施態様において、光源102は、例えばダイオード(LEDs)、レーザーダイオード、蛍光灯、白熱灯、および/またはフラッシュランプなどの複数の光放射エレメントを備えていてもよい。例えば、光源102は、電磁スペクトルの赤色、黄色、緑色および青色領域の出力波長(例えば、635、598、525、および415nm)、または、より一般的には、約620~750nm(赤色)、約575~600nm(黄色)、約525~570nm(緑色)、および約400~475nm(青色)をそれぞれ有する4つのLEDを備えていてもよい。ある実施態様において、光源102は、一またはそれ以上のレーザー源を備えていてもよい。複数の発光体を備える代わりに、他の実施態様において、光源102は、単一の広帯域放射体を備えていてもよく、その結果、その出力波長を変える(例えば、電子制御システム108の制御下

10

20

30

40

50

において)ように構成され得る。例えば、光源102は、設定可能なフィルターシステム(例えば、複数の機械的に調整可能なフィルター、および/または液晶ベースの電子的に調整可能なフィルターなど)に連結されている、電子制御システム108の制御下において可変出力スペクトルをもたらす広帯域光源(例えば、白熱灯など)を備えていてもよい。一般的に、光源102は、単一の波長の照射光116を出力せず、中心波長(例えばバンド中の最大強度の波長)を中心とした波長のバンドを出力する。本発明の記載が照射光116の波長に言及している場合、その言及は、照射バンドの中心波長に向けられている。

#### 【0040】

検出器106は、様々な種々のタイプの検出器を備え得る。いくつかの実施態様において、検出器106は、電荷結合素子(CCD)を備え得る。ある実施態様において、検出器106は、フォトダイオード(例えば、2次元フォトダイオードアレイなど)を備えていてもよい。いくつかの実施態様において、検出器106は、例えばCMOSベースのセンサ-および/または光電子増倍管などの、他の光感受性エレメントを備えていてもよい。検出器106はまた、光源102に関して上で記載されたような、一またはそれ以上のフィルターエレメントを備えていてもよい。いくつかの実施態様において、種々の波長に対応するサンプル画像は、サンプル104を、比較的広範囲な波長分布を有する照射光116を用いて照射することによって、そしてその後、小さな波長バンドに対応する透過光の部分のみを選択するために透過光118をフィルタリングすることによって得られる。フィルタリングは、励起側(例えば光源102中)および検出側(例えば検出器106中)のどちらかまたはその両方において、検出器106を用いて得られる画像が特定の中心波長をもつ波長の光の特定の分布にそれぞれ対応していることを確実なものとするために実行され得る。

#### 【0041】

一般的な網赤血球同定の手順

本明細書中に開示されるシステムおよび方法は、サンプル(例えば、顕微鏡スライド上に配置され、そして続いて固定剤および染色剤を用いる自動化された顕微鏡イメージングのために調製される)中の細胞の画像を獲得し、そして、細胞画像の中から網赤血球を同定および定量する。図2は、このような画像中の網赤血球を同定するための様々な工程を含むフローチャート200を示す。第一の工程202において、代表的な赤血球細胞のセットが、一またはそれ以上の獲得されたサンプル画像において、白血球細胞、赤血球細胞、血小板、ならびに、細胞性および非細胞性アーチファクトの全てから特定される。次の工程204において、網赤血球が、代表的な赤血球細胞のセットにおいて同定される。その後、任意的には工程206において、網赤血球容積などの網赤血球の特徴および基準、ヘモグロビンなどの網赤血球成分の量、および網赤血球の幾何学的パラメータが、工程204においてその位置が示された網赤血球に基づいて決定され得る。プロセスは工程208で完了する。フローチャート200中の各ステップが以下により詳細に記載される。

#### 【0042】

(i) 網赤血球の同定

上記で説明されるように、血液サンプル中の網赤血球を同定するための第一の工程は、一またはそれ以上の獲得されたサンプル画像における、白血球細胞、赤血球細胞、血小板、ならびに、細胞性および非細胞性アーチファクトの全てからの代表的な赤血球細胞のセット(その中で網赤血球が小集団を形成している)の同定である。この工程は、副題「(ii) 代表的な赤血球細胞のセットの同定」のもと、より詳細に記載され、そして、赤血球細胞、白血球細胞、および血小板を含むサンプルの画像から赤血球細胞を同定するための、一またはそれ以上の特徴測定およびアーチファクト除去技術を含み得る。代表的な赤血球細胞のセットが同定された後、網赤血球が代表的な赤血球細胞から、赤血球細胞のセットのそれぞれの要素のさらなる分析によって同定される。網赤血球は未成熟な赤血球細胞であるため、他の細胞型(例えば白血球、血小板など)から、サンプル中の赤血球細胞を区別する方法は、網赤血球および成熟赤血球細胞両方を一緒に、代表的な赤血球細胞のセ

ットとして同定し得る。網赤血球の位置を示す工程は、代表的なセットの中の網赤血球と他のより成熟した赤血球細胞とを区別する工程を含む。

【0043】

いくつかの実施態様において、網赤血球は、それらの吸収スペクトルに基づいて、場合によっては色素または染色剤の助けにより（例えば、2012年6月18日に出願され、その全ての開示が参照によって本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第13/526,164号明細書に開示されている固定剤、染色剤およびリンス製剤の組合せを用いることなどにより）、代表的なセットの中でのその位置が示され得る。例えば、網赤血球はリボソームRNAのネットワークを含むため、そしてRNAは一般的に網赤血球中で上昇した濃度で存在しているため、核酸に結合する染色剤が網赤血球を同定するために使用され得る。

10

【0044】

代表的な赤血球細胞のセットからの網赤血球の同定は、電磁スペクトルの一またはそれ以上の波長領域において獲得された画像からのセットにおける個々の細胞の光学濃度に基づいて確定され得る。例えば、いくつかの実施態様において、網赤血球は、スペクトルの黄色領域中で獲得されたサンプル画像中の代表的な赤血球細胞のそれぞれの光学濃度を試験することによってその位置が示され得る。網赤血球は、赤血球細胞に適用される核酸染色がスペクトルの黄色領域中に吸収ピークを有しているため、黄色領域において、典型的には、成熟赤血球細胞と比較してより強い吸収を有する。例えば、ロマノスキー染色がしばしば、サンプル中の赤血球細胞（網赤血球を含む）中のRNAをマークするために使用される。

20

【0045】

ある実施態様において、網赤血球は、スペクトルの青色領域中で獲得されたサンプル画像中の代表的な赤血球細胞のそれぞれの光学濃度を試験することによってその位置が示され得る。典型的には、網赤血球を同定する目的のためのスペクトルの青色領域は、400nm~470nmである。網赤血球は一般的に、網赤血球中のヘモグロビンがまだ完全に形成されていないため、成熟赤血球細胞と比較して青色領域においてより弱い吸収をもつ。代表的な赤血球細胞のそれぞれの青色領域中の積分光学濃度を、網赤血球と関連していることが知られている（例えば標準サンプルのフローサイトメトリー分析からの）光学濃度値の範囲と比較することによって、代表的な赤血球細胞のそれぞれが、網赤血球または成熟赤血球細胞のどちらかとして分類され得る。

30

【0046】

ある実施態様において、複数のスペクトル領域中の赤血球細胞の光学濃度は、網赤血球を同定するために使用され得る。例えば、網赤血球は、スペクトルの青色および黄色領域においてそれぞれ獲得された画像中の、代表的な赤血球細胞の光学濃度（例えば、青色および黄色の照射波長を用いて獲得される細胞の画像から導かれる）のそれぞれを比較することによって同定され得る。

【0047】

代表的な赤血球細胞のその細胞が網赤血球であるかどうかを決定する第一の工程は、細胞の色（C）を決定することである。例えば、細胞の色は、以下の式：

40

【数1】

$$C = OD_{平均}(b) - OD_{平均}(y) \quad (1)$$

式中、 $OD_{平均}(b)$  は、スペクトルの青色領域内の照射光を用いた、赤血球細胞に対応するピクセルの全セットの平均光学濃度であり、 $OD_{平均}(y)$  は、スペクトルの黄色領域内の照射光を用いた、赤血球細胞に対応するピクセルの全セットの平均光学濃度である。赤血球細胞に対応するピクセルのセットの決定は、赤血球細胞がサンプル画像中で個々に同定される際に起こり、そしてこれは以下で説明されるであろう。

【0048】

代表的な赤血球細胞のその細胞が網赤血球であるかどうかを決定する第二の工程は、細

50

胞に対応するピクセルのセットに基づいて細胞の面積（A）を決定することである。ピクセルのセットに基づく細胞面積は、以下でさらに詳細に述べられるように、様々な方法で決定され得る。いくつかの実施態様において、細胞面積は、ピクセルのセットが同定された際に自動的に決定される。

【0049】

細胞の色Cおよび面積Aはその後、これらのパラメータの値を、代表的な赤血球細胞の全個体群中でのこれらのパラメータの値の統計的分布に基づいてカットオフ値と比較することによって、細胞が網赤血球であるかどうかを決定するために使用され得る。ある特定の細胞は、以下の式：

【数2】

$$C < C_{\text{カット}} \text{ and } A > A_{\text{カット}} \quad (2)$$

式中、 $C_{\text{カット}}$ は、色カットオフ値であり、そして、 $A_{\text{カット}}$ は、面積カットオフ値である

である場合に、網赤血球として同定され得る。色および面積カットオフ値はともに、典型的には、代表的な赤血球細胞中での色および面積の分布内の特異的なパーセントイルマーカに対応する。網赤血球は、一般的には、成熟赤血球細胞と比較してスペクトルの青色面積においてより弱い吸収しかもたないもので、カラーカットオフ値 $C_{\text{カット}}$ よりも小さい色Cである細胞は、網赤血球である可能性が高い。さらに、網赤血球は成熟赤血球細胞よりも大きいため、面積カットオフ値 $A_{\text{カット}}$ よりも大きな面積Aをもつ細胞は、網赤血球である可能性が高い。両方の条件を満たす細胞を網赤血球と同定するだけで、網赤血球は、代表的な赤血球細胞のより大きなセット内で高い正確性をもってその位置が示され得る。

【0050】

いくつかの実施態様において、網赤血球を同定するために式（2）における条件の一つのみが用いられてもよい。例えば、色カットオフ値よりも小さな色値を有する（すなわち、 $C < C_{\text{カット}}$ ）細胞が、細胞の面積が考慮されることなしに、網赤血球として同定され得る。別の実施例として、面積カットオフ値 $A_{\text{カット}}$ よりも大きな面積を有する（すなわち、 $A > A_{\text{カット}}$ ）細胞が、細胞の色値が考慮されることなしに、網赤血球として同定され得る。

【0051】

上述されるように、色および面積カットオフ値は、典型的には、代表的な赤血球細胞のあいだの色および面積の分布内の特異的なパーセントイルに対応する。パーセントイルを使用することにより（例えば、絶対値よりも）、本明細書に開示の方法は、染色プロトコールが変化するサンプル中および/または細胞のサイズが予想される細胞のサイズから自然に変化している（例えば、細胞サイズの患者間での変動などで典型的に見られるような）サンプル中で使用され得る。例えば、他の患者からの赤血球細胞と比較して、平均で、より大きい網赤血球の位置を代表的な赤血球細胞のセットにあいだで示すために使用され得る。

【0052】

いくつかの実施態様において、パーセントイル分布は、色および面積カットオフ値を製作するためにオフセット値を用いて調整される。例えば、色および面積カットオフ値は、以下の式：

【数3】

$$C_{\text{カット}} = C_{\%} + C_{\text{オフセット}} \quad (3)$$

【数4】

$$A_{\text{カット}} = A_{\%} + A_{\text{オフセット}} \quad (4)$$

式中、 $C_{\%}$ および $A_{\%}$ は、それぞれ、色および面積パーセントイルであり、ならびに

10

20

30

40

50

C オフセットおよびA オフセットは、それぞれ、色および面積オフセット値であるで表され得る。図3は、代表的な赤血球細胞のセットから網赤血球の位置を示すために使用される色カットオフ値C<sub>カット</sub>を示すヒストグラムである。図3Aにおいて、全ての代表的な赤血球細胞からの色パラメータCの分布値390が示されている。色パーセントイルマーカ- C<sub>%</sub>がまた、分布内に示されている。網赤血球は成熟赤血球細胞に比べて典型的にはより小さい色値を有しているため、色オフセット値C<sub>オフセット</sub>は、負の値であり、色パーセントイルマーカ-と比較してより小さい色カットオフ値C<sub>カット</sub>をもたらす。分布における網掛け領域392は、その色カットオフ値に基づき網赤血球として同定される赤血球細胞に対応する。

【0053】

10

図3Bは、代表的な赤血球細胞のセットから網赤血球の位置を確定するために使用される面積カットオフ値A<sub>カット</sub>を示すヒストグラムである。図3Bにおいて、全ての代表的な赤血球細胞からの面積の分布395が示されている。面積パーセントイルマーカ- A<sub>%</sub>がまた、分布内に示されている。網赤血球は、成熟赤血球細胞の面積より典型的には大きな面積を有しているため、面積オフセット値A<sub>オフセット</sub>は、正の値であり、面積パーセントイルマーカ-と比較して大きい面積カットオフ値A<sub>カット</sub>をもたらす。分布における網掛け面積397は、その面積カットオフ値に基づき網赤血球として同定される赤血球細胞に対応する。

【0054】

色および面積パーセントイルおよびオフセットのための特異的な値は、成熟赤血球細胞および網赤血球の既知の個体数を有するサンプルを含む訓練データを分析することによって決定され得る。訓練データセットは、典型的には、何百または何千ものサンプルを含んでおり、成熟赤血球細胞および網赤血球の個体数は、これらのサンプル中で、検査技師によって手動で、または適切に較正されたフローサイトメトリーシステムを使用することによって測定され得る。その後、訓練セットは、本明細書に開示される方法およびシステムを用いて分析され、そして、パーセントイルおよびオフセット値が、実験解析結果が訓練データからの既知の測定結果に最も良好に一致するように選択される。

20

【0055】

例として、いくつかの実施態様において、色パーセントイルマーカ-は、70パーセントイルであり、そして、色オフセット値は、-0.09である。より一般的には、色パーセントイルマーカ-は、80パーセントイルまたはそれ以下（例えば、60パーセントイルまたはそれ以下、50パーセントイルまたはそれ以下、40パーセントイルまたはそれ以下など）である。典型的には、しかし必ずしもそうとは限らないが、色パーセントイルマーカ-が70パーセントイルよりも小さい場合、色オフセット値は、-0.09より大きい。

30

【0056】

別の実施例として、いくつかの実施態様において、面積パーセントイルマーカ-は、20パーセントイルであり、そして面積オフセット値は、12.4である。より一般的には、面積パーセントイルマーカ-は、10パーセントイルまたはそれ以上（例えば、30パーセントイルまたはそれ以上、40パーセントイルまたはそれ以上、50パーセントイルまたはそれ以上、60パーセントイルまたはそれ以上など）である。典型的には、しかし必ずしもそうとは限らないが、面積パーセントイルマーカ-が20パーセントイルよりも大きい場合、面積オフセット値は、12.4より小さい。

40

【0057】

いくつかの実施態様において、一またはそれ以上のアーチファクト除去工程が、代表的な赤血球細胞のセットからの網赤血球の同定をさらに改良するために任意的に行われる。これらのアーチファクト除去工程は、上記の色および面積カットオフ値の比較の前に、比較の後に、または比較の前および後の両方で行われ得る。例として、種々の波長での特定の代表的な細胞に対応するピクセルの光学濃度の統計的分析に基づくアーチファクト除去工程は、細胞としてよりむしろアーチファクトとして細胞を除外するために使用され得る

50

。様々な波長（例えば、照射波長など）における光学濃度は、アーチファクト除去のために使用され得る。例えば、青色、黄色、および緑色波長がこの目的のために有用であることが判明した。

【 0 0 5 8 】

一般的に、ピクセルの光学濃度の標準偏差が大きい、関連し合うピクセルのセットを有する細胞は、細胞というよりもアーチファクトとして分類され得るが、これは、高い標準偏差が、異常な細胞形態、重なり合った細胞、および/または質の良くない細胞保存を示している可能性があるからである。このような細胞は、一般的にさらなる分析に不適である。例として、以下の式：

【 数 5 】

$$\sigma_{OD(y)} > \sigma_y \text{ or } \sigma_{OD(g)} > \sigma_g \text{ or } \sigma_{OD(b)} > \sigma_b \quad (5)$$

式中、 $\sigma_{OD(y)}$ 、 $\sigma_{OD(g)}$ 、および  $\sigma_{OD(b)}$  は、それぞれ、黄色、緑色、および青色照射波長を用いて獲得される画像に対応するピクセルのセットの光学濃度の標準偏差であり、ならびに

$\sigma_y$ 、 $\sigma_g$ 、および  $\sigma_b$  は、カットオフ値の標準偏差である  
である場合、関連し合うピクセルのセットを有する細胞は、アーチファクトとして除去され得る。一般的に、適切な標準偏差カットオフ値は、上述のように、訓練データの分析から、および/または過去のデータ（例えば、細胞画像の以前の分析からのデータなど）から決定され得る。いくつかの実施態様において、例えば、適切な標準偏差カットオフ値は、 $\sigma_y = 0.1$ 、 $\sigma_g = 0.099$ 、および  $\sigma_b = 0.058$  である。これらの値は、サンプルの性質、染色手順、およびイメージング条件によって変化し得る。例えば、ある実施態様において、適切な標準偏差カットオフ値は、 $\sigma_y = 0.079$ 、 $\sigma_g = 0.085$ 、および  $\sigma_b = 0.060$  である。

【 0 0 5 9 】

上記の網赤血球同定の実施態様はまた、本明細書中で開示されるシステムなどの自動化されたサンプル計測システムと共に使用することを目的とする精度管理組成物中の網赤血球を同定するためにも使用され得る。精度管理成分は、典型的には、様々な種類の保存哺乳類血液細胞を含み、そして、自動化されたシステム上で処理される場合に全血サンプルを再現するようにデザインされている。同様に、これらのサンプルの解析結果は、自動化されたシステムの性能、例えば、システムの網赤血球の同定に関する正確性および再現性などを評価するために使用され得る。ある精度管理組成物において、保存プロセスは対照サンプル中の網赤血球のサイズを患者の血液サンプル中の網赤血球と比較して顕著に減少させ、場合によっては、このような組成物中の網赤血球は、成熟赤血球細胞成分よりも小さい。したがって、面積分析を使用することのない、上述した色分析に依存している網赤血球同定の実施態様は、特定の精度管理組成物内において網赤血球を正確に検出するために使用され得る。

【 0 0 6 0 】

(ii) 代表的な赤血球細胞のセットの同定

図 2 に戻って、フローチャート 200 の第一の工程 202 は、本明細書中で開示されるシステムおよび方法を用いて獲得されるサンプルの画像（複数の画像）における細胞のあいだから、代表的な赤血球細胞のセットを同定する工程を含む。工程 204 における網赤血球の同定は、代表的な赤血球細胞のセットがサンプルの画像から同定された後に起こり、したがって、代表的な赤血球細胞のセットは典型的には成熟赤血球および網赤血球を含んでいる。その後、任意的な工程 206 において、一またはそれ以上の特徴および基準が、例えば、網赤血球のヘモグロビン測定などにより決定される。この開示の目的のため、網赤血球の特徴および基準の決定が別個の工程 206 として示されている。しかしながら、いくつかの実施態様において、例えば面積、周囲長、および形などのいくつかの網赤血球の特徴および基準は、工程 202 の一部分（例えば、代表的な赤血球細胞のセットの同定など）として測定される。この、代表的な赤血球細胞のセットを同定する工程 202 は



、ここで、以下により詳細に記載されるであろう。

【 0 0 6 1 】

検出器 1 0 6 を介して獲得される画像、サンプル画像中のそれぞれのピクセルの強度値の使用は、代表的な細胞のセットの選択、およびそれに続くアーチファクト除去、特徴測定、および網赤血球同定において使用される光学濃度値に関連付けられ得る。任意の画像ピクセル ( x , y ) における透過光強度 T ( x , y ) は、以下の式：

【 数 6 】

$$T(x,y) = 10^{-\alpha \varepsilon(x,y)} \quad (6)$$

であるピクセルに対応する、サンプル部分を透過する入射光の吸収係数 および光路長 ( x , y ) に関連している。画像中のそれぞれのピクセルにおいて、ピクセル強度の最大可能ピクセル強度 (例えば、8ビット分解能におけるピクセル強度 / 2 5 5 ) に対する比が、ピクセルの空間的位置において透過した光の割合を示している。透過光の割合は、以下の式 ( 6 ) :

【 数 7 】

$$OD(x,y) = -\log(T) = \alpha \cdot \varepsilon(x,y) \quad (7)$$

の対数をとることによって、光学濃度 ( O D ) 単位で表され得る。このプロセスは、サンプル画像のそれぞれのピクセルに対して繰り返され得る。この方法において、それぞれの画像中のそれぞれのピクセルにおける光学強度は、ピクセルに対応する位置におけるサンプル中の吸収性材料の総量 (例えば、生成物の吸収係数および厚みなど) に対応する。

【 0 0 6 2 】

図 4 は、調製された血液サンプルの画像からの代表的な赤血球細胞のセットを選択するための一連の工程を挙げている。サンプルの画像を獲得した後、電子制御システム 1 0 8 、具体的には電子プロセッサ 1 1 4 が、代表的な赤血球細胞のセット内への算入のための細胞を他の細胞型 (例えば白血球細胞および血小板など)、細胞クラスター、およびサンプル中に存在するアーチファクトなどから区別するための画像情報を処理する。

【 0 0 6 3 】

第一に、図 4 の工程 4 2 2 において、システム 1 0 0 は、さらなる処理のために、またはそれ以上のサンプル画像において赤血球細胞 (例えば、成熟赤血球および網赤血球など) の位置を確定する。赤血球細胞は、典型的には、細胞中のヘモグロビンの存在に起因して青色光 (例えば 4 1 5 n m など) を吸収する。しかしながら、白血球細胞は、ヘモグロビンを含まないため、したがって、赤血球細胞と同じ様式では青色光を吸収しない。青色光下で獲得されるサンプルの画像は、赤血球細胞を同定するために使用され得る：そのような画像中に白血球細胞は、これらの細胞が青色光を最小限にしか吸収しないためにかすかにしか現れず、そして歪んでおり、したがって、画像への寄与は減少し、そして典型的には、それらを識別不能にさせている。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施態様において、閾値処理工程は、システム 1 0 0 が、さらなる分析のために赤血球細胞のみを同定することを確実にするように使用され得る。例えば、システム 1 0 0 は、1 6 0 の強度 (またはグレイ) 値 (8ビット分解能で捕捉された画像において) より低い画像ピクセルのみを利用し得る。1 0 0 から 1 8 0 までの範囲の他の強度値閾値が、さらなる分析から白血球細胞を排除しつつ、画像から赤血球細胞を同定するために使用され得る。

【 0 0 6 5 】

次に、工程 4 2 4 において、システム 1 0 0 は、サンプル画像中のそれぞれの赤血球細胞のピクセルのセットを同定する。様々な種々の方法が、細胞に関連付けられるピクセルのセットを同定するために使用され得る。例えば、いくつかの実施態様において、システム 1 0 0 は、関連付けられる成分ラベル化プロセスを使用して、同定工程を実行する。この工程は、サンプル画像からの個々のピクセルを画像中のオブジェクトに関連付ける。例

10

20

30

40

50

えば、バックグラウンドに割り当てられている1つのピクセルによって分離されていない画像内の任意の2つのピクセルは、同一の細胞に割り当てられる。

【0066】

加えて、システム100は、例えば、細胞容積または成分分析などに関連する特定の測定から細胞の境界領域内に位置するピクセルを排除し得る。具体的には、赤血球細胞は、しばしば、これらの細胞が照射光を屈折させる様式に起因して、厚く、暗い境界線を有する。これらのピクセルの光学濃度は、典型的には、この屈折により信頼性に欠ける。関連付けられる成分ラベル化プロセスの完了後、システム100は、最外部のn層のピクセル（例えば、屈折が最大である境界領域に対応するピクセル（複数のピクセル）など）を除去するために同定された細胞へピクセル縮小マスクを適用し得る。一般的に、ピクセル縮小マスクは、画像の大きさに依存して、任意の数nのピクセル層（例えば1つのピクセル層またはそれ以上、2つのピクセル層またはそれ以上、3つのピクセル層またはそれ以上、4つのピクセル層またはそれ以上、5つのピクセル層またはそれ以上、6つのピクセル層またはそれ以上、八つのピクセル層またはそれ以上、10個のピクセル層またはそれ以上、など）を除去するように選択され得る。例えば、赤血球細胞縁の最外部0.5 μmを含むピクセル縮小マスクが、赤血球細胞の細胞容積およびヘモグロビン含有量の測定への誤った寄与を顕著に減少させるために一般的に適切であることが実験によって見出されており、ここで、それぞれのピクセルは0.148 μm × 0.148 μmである細胞の部分に対応する。縮小マスクによって較正されたピクセルのセットを利用することによって、例えばそれぞれの細胞の平均および最大の光学濃度などの、細胞容積および成分分析に寄与する、様々な細胞特性が測定され得る。

【0067】

工程426において、システム100は、セットが完全かつ通常の形およびサイズである赤血球細胞のみを含んでいることを確認することによって、サンプル画像からの代表的な赤血球細胞のセットを同定するプロセスを継続する。一般的に、工程426は、代表的な赤血球細胞のセット中の包含物から、部分的な細胞、重なり合っている細胞、細胞クラスター、血小板、および非細胞性アーチファクトを除外するように機能する。例えば、画像フレームの縁にかかって切れた、または掛かっている細胞がさらなる分析から排除され得、これによって、不正確な測定が阻止され得る。加えて、歪んだ形の細胞（それらの非標準的形に関連する、決定された細胞容積中における変動量を示し得る）が、分析から排除され得る。さらに、細胞の容積または成分含有量を計算するために使用された場合に信頼性に欠け得る、重なりあった細胞から得られる測定結果が、代表的な細胞のセットから除外され得る。このような理由のため、同定される細胞のそれぞれの形が工程426において調べられ、そして、歪んだ形のおよび/または重なり合っている細胞がさらなる分析から除外される。

【0068】

様々な種々の方法が、同定された細胞の形を調べるために使用され得る。例えば、いくつかの実施態様において、それぞれの細胞の形は、細胞の周囲長および面積を比較することによって調べられ得る。図5は、このような比較の概略図を示している。図5において、細胞500は、サンプル画像中のピクセルのセットとして同定されている。細胞500の境界に対応するピクセルは、図5において、説明の目的のために、内部のピクセルと比較してより薄く陰影が付けられているが、これらは実際の画像においてこのように見える必要はない。細胞500の面積は、セットの中のピクセルの数をカウントすることによって決定され得る。

【0069】

細胞の周囲長は、細胞500に対応するピクセルのセットを使用して境界のピクセルから決定される。これは、画像中に多角形を作り出すために周囲のピクセルのそれぞれの中心を通る線を結ぶことによって、そして、多角形の周囲長を測定することによって達成され得る。この細胞周囲長値の二乗の、細胞面積値（すなわち、多角形の面積）に対する比が、細胞の形を調べるために測定される。この比の値は、理想的な、真円の細胞において

は4である。この基準を用いて、4である最小値を閾値またはそれ以上の値で超えている周囲長の二乗の面積に対する比を有する細胞が、さらなる分析から除外される。典型的には、閾値は、4である最小値の一定の割合（例えば、5%またはそれ以上、10%またはそれ以上、15%またはそれ以上、20%またはそれ以上、25%またはそれ以上）である。

#### 【0070】

さらなる分析から歪んだ形の個々の細胞を除外する工程に加えて、上記の方法はまた、重なり合っている細胞を除外し得る。サンプル画像において、重なり合っている細胞は、典型的には大きな、歪んだ形の個々の細胞（それを通して入射光が伝播する材料の厚さの増大に起因する、透過光強度における変動をとまなう）として現れる。重なり合っている細胞は、一般的に、このような画像に分析アルゴリズムが適用された場合、不規則な境界を有する大きな単一の細胞として同定される。したがって、細胞周囲長および面積の比較がなされる場合に、比が、理想値からの許容され得る変化である閾値を優に超えるものとなり、そして、重なり合っている細胞は排除される。

#### 【0071】

同定される細胞の形を調べるための別の方法は、上記の細胞アウトラインの多角形表現の凸包を利用し、そして凸包によって取り囲まれている面積を画像ピクセルから決定される細胞面積と比較する。凸包面積の細胞面積に対する高い比が、不規則な形状の細胞を同定し、このような細胞をさらなる分析から排除するために使用され得る。図6は、2つの細胞600Aおよび600Bを含む概略図である。細胞600Aおよび600Bの周囲長は、図6において、それぞれ、602Aおよび602Bで示されている。凸包604Aが細胞600Aの周りに描かれており、そして、凸包604Bが細胞600Bの周りに描かれている。図6に示されているように、凸包面積と細胞面積とのあいだの相違は、細胞600Bに比べて細胞600Aにおいてより大きい。細胞600Aの高度の不規則性を考慮して、細胞600Aが代表的な赤血球細胞のセットから排除され得る。

#### 【0072】

いくつかの実施態様において、細胞面積測定は、代表的な赤血球細胞のセットからアーチファクトおよび重なり合っている細胞を排除するために工程426において使用され得る。例えば、35平方マイクロン～65平方マイクロンの範囲の面積を有する細胞のみが、網赤血球同定を含む赤血球細胞測定に考慮され得る。35平方マイクロンよりも小さな面積を有する撮像されたオブジェクトは、典型的には赤血球細胞ではなく、サンプル中の小さなゴミなどのアーチファクトである。同様に、65平方マイクロンよりも大きな面積を有する撮像されたオブジェクトは、典型的には赤血球細胞ではなく、このような物体は、染色剤の塊、または、いくつかの重なり合っている細胞に該当し得る。前述の実施例は、35～65平方マイクロンの面積範囲を記載しているが、他の範囲が測定のための赤血球細胞を選択するために使用されてもよく（例えば、20平方マイクロン～80平方マイクロンなど）、そして、範囲は、サンプルの平均細胞サイズを基に基準化され得るので、患者間での変動に対応する。35～65平方マイクロン範囲が多少の赤血球細胞を排除する可能性がある一方、このような範囲は、20～80平方マイクロン範囲と比較してサンプル画像からアーチファクトを除去するのにより効果的であることが実験的に見いだされた。

#### 【0073】

光学濃度値は、サンプル中の代表的な赤血球細胞のセットを選択するために使用され得る。例えば、青色光のもとで撮像されたオブジェクトの平均光学濃度値が低すぎる場合、オブジェクトは、赤血球細胞ではなく白血球細胞核であるかもしれない。平均光学濃度閾値（例えば、0.33より小さいかそれと等しい平均光学濃度）は、青色光を用いて獲得される画像においてサンプルとして代表的な赤血球細胞のセットから白血球細胞を排除するために使用され得る（例えば、0.33より小さいかまたはそれと等しい平均光学濃度を有する細胞は、白血球細胞である可能性が高い）。青色または黄色照射のもとで獲得される画像において、特定の閾値を超えている物体の平均光学濃度（例えば、0.66より大きいまたはそれと等しい平均光学濃度）が、積み重なった、重なり合った、および/

10

20

30

40

50

またはクラスター化した赤血球細胞を同定するために使用され得、これらはさらなる分析から排除され得る（例えば、0.66より大きいかまたはそれと等しい平均光学濃度を有する赤血球細胞は、別の赤血球細胞と重なり合っている可能性が高い）。

【0074】

図4に示されているプロセスは、さらなる分析のための代表的な赤血球細胞のセットの最終的な決定をとともなう工程428で完了する。上述されるように、網赤血球同定プロセスがその後、代表的なセット内の細胞の測定された特徴を使用して開始され得る。

【0075】

(iii) 網赤血球の基準および特徴の決定

図2に戻って、代表的な赤血球細胞のセットが工程202において同定され、そして工程204において網赤血球の位置が示され（そして任意には、赤血球細胞からカウントされ）た後、一またはそれ以上の網赤血球の基準および特徴が任意には工程206において決定され得る。上記で説明されるように、網赤血球の面積、形、周囲長、サイズ、および任意には密度などを含むいくつかの網赤血球の特徴が、工程202のあいだに、代表的な赤血球細胞のセットを同定しつつ、決定され得る。これらの特徴はまた、工程206においても決定され得る。加えて、網赤血球と関連付けられる他の特徴および基準が工程206において決定され得る。例えば、本明細書中で開示されるシステムおよび方法は、網赤血球の、容積などの基準、および、ヘモグロビン含有量などの成分値を計算するための網赤血球の画像特徴の組合せを使用し得る。組み合わせとしては典型的には、発明者らが、正確な再現性のある結果を多種多様のサンプルに対してもたらすことを発見した、そのような網赤血球の特徴の線形結合が挙げられる（しかし、これらに限定されるわけではない）。

【0076】

いったん上述されるように代表的な赤血球細胞のセットのあいだで網赤血球の位置が確定されると、本明細書中で開示されるいくつかまたは全ての特徴が、システム100によって得られる細胞の一またはそれ以上の画像をもとにそれぞれの網赤血球に対して計算され得る。網赤血球として計算され得る第一の特徴のセットは、色特異的積分光学濃度（ $IOD(c)$ ）であり、これは以下の式：

【数8】

$$IOD(c) = A \cdot OD_{平均}(c) \quad (8)$$

式中、 $A$ は網赤血球の面積、および

$OD_{平均}(c)$ は、網赤血球が色 $c$ の光で照射された場合の網赤血球の画像中のピクセルの平均光学濃度である

にしたがって決定され得る。網赤血球の画像が、異なる照射波長で得られている場合、 $IOD(c)$ の値は、それぞれの照射波長での網赤血球に対して計算され得る。図7は、色 $c$ の照射光を用いて得られた、フローチャート420に関連して記載されるプロセスを通じて同定される代表的な網赤血球700の概略イメージを示す。網赤血球700の画像は、複数のピクセルを包含する。網赤血球700におけるピクセルの平均光学濃度、 $OD_{平均}(c)$ は、画像中のピクセルの数で割られた図7におけるピクセル強度の和に対応する。

【0077】

各網赤血球について計算され得る第二の特徴のセットは、網赤血球の色特異的容積 $V_{ol}(c)$ である。図7における網赤血球700の容積は、網赤血球700に対応するピクセルのそれぞれに関する光学濃度値を足し合わせることによって計算される。第一に、各ピクセルにおける網赤血球700の「高さ（height）」が以下の式：

【数 9】

$$\text{高さ} = \frac{OD_{\text{ピクセル}}}{OD_{\text{最大}}} \quad (9)$$

式中、 $OD_{\text{ピクセル}}$  は、所定のピクセルに関連付けられる光学濃度であり、および、 $OD_{\text{最大}}$  は、網赤血球のピクセルと関連付けられるすべての光学濃度の中の最大光学濃度である

により見積もられ得る。したがって、例えば、網赤血球 700 の画像中のピクセル 720 は、ピクセル 710 に関連付けられる最大光学濃度よりも小さい光学濃度を有する。例えばピクセル 720 の網赤血球 700 への寄与は、比  $OD_{720} / OD_{\text{最大}}$  であり、ここで、 $OD_{720}$  はピクセル 720 の光学濃度であり、そして、 $OD_{\text{最大}}$  は、ピクセル 710 の光学濃度である。その後、色特異的網赤血球容積  $V$  が、ピクセル光学濃度の、網赤血球 700 中の全てのピクセルの最大光学濃度に対する比を合計することによって以下のように計算される：

【数 10】

$$V = \sum_{\text{ピクセル}} \frac{OD_{\text{ピクセル}}}{OD_{\text{最大}}} = \frac{\sum_{\text{ピクセル}} OD_{\text{ピクセル}}}{OD_{\text{最大}}} = \frac{N_{\text{ピクセル}} \cdot OD_{\text{平均}}}{OD_{\text{最大}}} \quad (10)$$

式中、網赤血球 700 中のそれぞれのピクセルに関連付けられる光学濃度の和は、式 (10) において、網赤血球 700 中のピクセル数、 $N_{\text{ピクセル}}$  および網赤血球 700 中のピクセルの平均ピクセル光学濃度  $OD_{\text{平均}}$  の積によって置換される。

【0078】

典型的には、網赤血球の辺縁部に近いピクセルの光学濃度値は、細胞の辺縁部において屈折される光は網赤血球の周囲に人工的に暗い境界線を作り出すため、色特異的容積測定への有効な寄与因子ではない。このような境界線上ピクセルからのこの効果を避けるために、システムは、先に記載したように、一またはそれ以上のピクセルによって網赤血球の辺縁でマスクを縮小し、平均光学濃度および網赤血球のマスクされた領域の最大光学濃度を測定し得、そして、その後、完全な、縮小されていないマスクの面積を掛けることによって網赤血球の辺縁部へと外挿し得る。

【0079】

さらに、種々の照射波長に対応する複数の画像が単一の網赤血球の画像を得るために使用される場合、網赤血球容積の計算による決定は、それぞれの色の照射光においてなされ得る。したがって、色特異的網赤血球容積は以下の式：

【数 11】

$$Vol(c) = \frac{A \cdot OD_{\text{平均}}(c)}{OD_{\text{最大}}(c)} \quad (11)$$

式中、 $A$  は細胞辺縁を含む全体の網赤血球の面積であり、 $OD_{\text{平均}}(c)$  は、網赤血球のマスクされた面積内のピクセルの色特異的の平均光学濃度であり、および  $OD_{\text{最大}}(c)$  は、網赤血球の縮小マスクのための色特異的の最大光学濃度である（例えば図 7 におけるピクセル 710）

によって決定され得る。計算された色特異的網赤血球容積  $Vol(c)$  は、適切な単位（例えばフェムトリットル）で網赤血球容積を表すために基準化され得る。

【0080】

いくつかの実施態様において、網赤血球の画像の暗さの一部は実際には網赤血球の RNA またはヘモグロビンの含有量によるものではないかもしれないという事実に応じて調整

10

20

30

40

50

するために、式(11)中に一またはそれ以上の補正因子を加えておくことが有用である。加えて、基準化因子は、容積測定値をフェムトリットル(fL)などの測定単位へと転換するために適用され得る。これらの補正および基準化因子を考慮するため、式(11)は、以下のように書き直され得る：

【数12】

$$Vol(c) = \frac{S \cdot [A \cdot OD_{平均}(c)]}{OD_{最大}(c) + J} + B \quad (12)$$

式中、Sは基準化因子または傾きに対応し、Jは最大光学濃度の決定におけるバイアスを考慮するための補正因子に対応し、および、Bは広範囲のオフセット値に対応する切片値に対応する。

【0081】

補正因子、基準化因子、および切片値は、例えば較正されたフローサイトメトリーなどで処理される複数の血液サンプルにおける既知の容積値のデータセットを使用して、実験に基づいて決定され得る。補正因子は、データセット全体にわたる結果に基づいて決定され得るが、わずかに異なる補正因子のセットが、一般的に、異なるサンプルのそれぞれに最も良好な結果を提供する。例えば、1000個の血液サンプルにおける既知の網赤血球容積値を含むデータセットに関して、全体のデータセットにわたって平均的に最も良好に機能する補正因子が、全体のデータセットにわたる、測定容積値および予測容積値のあいだの差異の二乗の和を最小にする補正因子を選択することによって決定され得る。基準化因子は、例えばフェムトリットルなどの所望の測定単位に未処理の容積値を最も良好に転換する基準化因子を選択することによって、全体のデータセットにわたって決定され得る。切片値Bは、データが2次元プロット上で表される場合に、式(12)が原点を通ることを確実なものとするようにデータセットに関して選択され得る。補正因子、基準化因子、および切片値が電子制御システム108と関連付けられるメモリユニット中に保存され得、そして新しいサンプルの分析のために、式(12)で示される色特異的網赤血球容積を決定する際にメモリから読みだされる。

【0082】

式(8)および式(11)または(12)を使用することにより、2つの特徴(例えば積分光学濃度IOD(c)および容積Vol(c)など)が、サンプル画像を得るために使用された照射光のそれぞれの色について決定され得る。例えば、4つの異なる照射光の色が使用される場合、合計で8つの異なる特徴が、代表的なセットから同定されるそれぞれの網赤血球において決定され得る。加えて、上記で説明されるように、個々の網赤血球の面積Aは、網赤血球の画像から決定され得る。色特異的積分光学濃度および網赤血球容積、および網赤血球面積は、その後それぞれの網赤血球において様々な基準を計算するために使用され得る。

【0083】

例えば網赤血球容積および成分量などの網赤血球基準は、上で開示された網赤血球のために計算されるいくつかのまたは全ての特徴の、重み付けられた組合せを基準として計算され得る。一般的には、基準Mは、以下の式：

【数13】

$$M = \sum_n [\omega_{n,i} \cdot IOD(n) + \omega_{n,v} \cdot Vol(n)] + \omega_a \cdot A + K \quad (13)$$

式中、nは網赤血球の画像を得るために使用される照射光のそれぞれの色に対応し、 $\omega_{n,i}$ 値は、それぞれの色特異的積分光学濃度IOD(n)に対する色特異的重み係数であり、 $\omega_{n,v}$ 値は、それぞれの色特異的容積Vol(n)に対する色特異的重み係数であり、 $\omega_a$ 値は、網赤血球面積Aに対する重み係数であり、およびKはオフセット値であることによって決定され得る。例えば、4つの異なる照射波長が網赤血球の画像を得るために使

10

20

30

40

50

用される場合（例えば赤 = r、黄色 = y、緑 = g、および青 = b）、網赤血球の容積 V は、以下の式：

【数 1 4】

$$V = \omega_{r,i} \cdot IOD(r) + \omega_{y,i} \cdot IOD(y) + \omega_{g,i} \cdot IOD(g) + \omega_{b,i} \cdot IOD(b) \quad (14)$$

$$+ \omega_{r,v} \cdot Vol(r) + \omega_{y,v} \cdot Vol(y) + \omega_{g,v} \cdot Vol(g) + \omega_{b,v} \cdot Vol(b)$$

$$+ \omega_a \cdot A + K$$

として決定され得る。

【0084】

網赤血球成分の量は、類似の様式によって決定され得る。例えば、網赤血球中のヘモグロビンの濃度 H は、以下の式：

【数 1 5】

$$H = \omega_{r,i} \cdot IOD(r) + \omega_{y,i} \cdot IOD(y) + \omega_{g,i} \cdot IOD(g) + \omega_{b,i} \cdot IOD(b) \quad (15)$$

$$+ \omega_{r,v} \cdot Vol(r) + \omega_{y,v} \cdot Vol(y) + \omega_{g,v} \cdot Vol(g) + \omega_{b,v} \cdot Vol(b)$$

$$+ \omega_a \cdot A + K$$

にしたがって計算され得る。上記の式（14）および（15）のあいだの差異は、重み係数およびオフセット値 K の値にある。式（14）および（15）を使用することにより、網赤血球の容積および成分量（例えばヘモグロビンの量）が、サンプル中の複数の網赤血球に関して決定され得る。結果は、サンプルの、平均網赤血球容積および成分（例えば平均網赤血球ヘモグロビンなど）の平均濃度を決定するために平均化され得る。

【0085】

式（13）中の色特異的特徴に関連付けられる重み係数は、入手可能な訓練データに基づいて、例えば、実験的に決定されたサンプルの特徴を、そのようなサンプルのための既知の容積および/または成分濃度の値を含む訓練データ上にマッピングする線形回帰係数を決定することなどによって決定され得る。色特異的重みを決定するための線形回帰アプローチの使用は、サンプルの平均網赤血球容積および平均の網赤血球成分濃度測定値の正確性を、例えば膜厚みおよび染色剤吸収における細胞間の変動などの、測定に影響を与える制御不能な因子を補正することによって改善し得る。色特異的重み値が訓練データから決定された後、重み値は、保存され、後に、保管ユニット（例えば電子メモリユニットなど）からそれぞれのサンプルの分析に先立って読み出され得る。

【0086】

一般的に、広範な種々のサンプルが適切な重み係数を決定するために使用され得る。高度に再現性のある結果を得るために、計算される量の全ての範囲の値に及ぶ訓練データを使用することが有利であるかもしれない。さらに、分析されるサンプルが例えば細胞塊などの異常な形態的特徴を含む場合、そのような特徴を有する代表的なサンプルを含む訓練データを使用することが有利であり得る。

【0087】

例えば、網赤血球容積の決定のための訓練データのセットから、重み係数のセットを決定した後、式（14）は、以下のように書き直され得る：

【数 1 6】

$$V = (-4.04) \cdot IOD(r) + 8.49 \cdot IOD(y) + (-3.69) \cdot IOD(g) + 4.40 \cdot IOD(b) \quad (16)$$

$$+ 4.68 \cdot Vol(r) + (-8.20) \cdot Vol(y) + 3.57 \cdot Vol(g) + 0.0159 \cdot Vol(b)$$

$$+ (-0.125) A + 4.84$$

同様に、網赤血球ヘモグロビンの決定のための訓練データのセットから適切な重み係数を決定した後、式（15）は、以下のように書き直され得る：

10

20

30

40

50

【数 17】

$$\begin{aligned}
 H = & (-1.05) \cdot IOD(r) + (-2.44) \cdot IOD(y) + 1.12 \cdot IOD(g) + 2.15 \cdot IOD(b) \\
 & + 1.95 \cdot Vol(r) + (-0.112) \cdot Vol(y) + (-1.27) \cdot Vol(g) + 0.457 \cdot Vol(b) \\
 & + (-0.221) \cdot A + -5.73
 \end{aligned}
 \tag{17}$$

細胞容積および細胞成分含有量測定技術に関する追加的な詳細は、2012年4月13日に  
出願された同時係属出願、米国特許出願公開第13/446,967号明細書および米  
国特許出願公開第13/447,045号明細書に開示されており、その内容は参照によ  
りその全体が本明細書中に組み込まれる。

10

【0088】

先に記載されるように、本明細書中に開示されるシステムおよび方法は、全血サンプル  
(例えば患者から採取されるサンプル)および精度管理組成物の両方を分析するために使  
用され得る。式(14)~(17)に示される重み係数は、全血サンプルおよび精度管理  
組成物の両方を分析するために使用され得る。他の実施態様において、精度管理組成物に  
特異的な重み係数が使用されてもよい：患者の血液サンプルに関連して先に述べられてい  
るように、このような係数は、精度管理組成物中の網赤血球の既知の、測定された値を含  
む訓練データを用いて決定され得る。

【0089】

いくつかの実施態様において、装置は、装置によって作製される結果の正確性を評価す  
るための対照組成物を分析するために使用され得る。例えば、装置による対照組成物の分  
析からの結果(例えば、網赤血球量、ならびに、例えば網赤血球ヘモグロビン、網赤血球  
容積、平均網赤血球ヘモグロビン、および平均網赤血球容積などの一またはそれ以上の他  
の基準の決定など)は、装置の正確性を評価するために、対照組成物に関するこれらの量  
の参照値と比較され得る。一またはそれ以上のこれらの量に関する、測定された値と参照  
値とのあいだの差異が閾値を超えていた場合、装置は再較正され得る。再較正は、例え  
ば、参照血液サンプルからの式(14)~(17)における重み係数のいくつかまたは全て  
の値を、本明細書中で述べられるように、再測定することを含む。

20

【0090】

さらなる実施態様

式(14)~(17)において、照射光の4つの色(赤色、黄色、緑色、および青色)  
が、サンプルを照射するために使用され、そして、積分光学濃度および網赤血球容積がこ  
れらの色のそれぞれに対応する画像から計算される。色特異的積分光学濃度値および容積  
を計算するために使用される照射波長は、例えば、635nm、598nm、525nm  
、415nmであり得るが、電磁スペクトルの赤色、黄色、緑色、および青色領域内の他  
の値が他の実施態様において使用されてもよい。より一般的には、種々の数の照射波長が  
使用され得、そして、それぞれの照射波長に対応する画像が得られ、そして、積分光学濃  
度および/または網赤血球容積の色特異的値を計算するために使用され得る。例えば、い  
くつかの実施態様において、3つの異なる波長の光が、サンプルを照射するために使用さ  
れる。ある実施態様において、4つより多くの数の波長(例えば、5つの波長、6つの波  
長、7つの波長、8つの波長、10の波長など)の照射光が使用され得、そして、色特異  
的積分光学濃度、細胞容積、および重み係数が照射波長のいくつかまたは全てにおいて決  
定され得る。一般的には、照射光の波長は、異なる波長のそれぞれにおけるそれぞれの画  
像がサンプルについての異なる情報を含むように選択され得る。例えば、サンプルが3つ  
のスペクトル寄与因子を含んでいれば、照射光の3つの波長は、3つの波長のそれぞれが  
スペクトル寄与因子のうちの異なる一つによって最も強く吸収されるように使用されるた  
めに選択され得る。

30

40

【0091】

上で記載されるように、式(13)における色特異的重み係数は、多くの数(例えば1  
00個など)の血液サンプルに対して実験に基づいて決定された特徴に対する線形回帰係

50



数を、較正されたフローサイトメトリーシステムから例えば得られる、そのようなサンプルのための網赤血球容積および様々な網赤血球成分の濃度の既知の値を含む訓練データ上にマッピングすることによって決定され得る。サンプル調製パラメータの変化（例えば、染色された網赤血球の外観に影響を及ぼす染色剤成分の変化、またはどのように網赤血球が染色剤を吸収するかに影響を与える他の因子、例えば固定および染色前のサンプルの乾燥の程度など）にともなって、色特異的重みおよび式（13）の切片値を決定するプロセスは、サンプル調製パラメータの所定のセットに対する正確な容積および網赤血球成分測定値の決定が確実とされるまで繰り返され得る。しかしながら、いったんサンプル調製パラメータが特定のサンプル調製システムに関して最適化されたならば、実験的に得られた重み係数および式（13）における他のパラメータ値は、正確かつ再現性のある、網赤血球容積および/または網赤血球成分量の測定値を作製するであろう。

10

## 【0092】

式（13）において、基準Mは、色特異的積分光学濃度、色特異的容積、および網赤血球面積の重み付けられた線形結合として計算される。しかしながら、これらの特徴の全てが、全ての実施態様において基準の値を決定するために使用される訳ではない。例えば、いくつかの実施態様において、基準Mは、色特異的積分光学濃度または色特異的容積のみの重み付けられた結合として計算され得る。ある実施態様において、基準Mは、網赤血球面積と、色特異的積分光学濃度または色特異的容積のどちらかとの重み付けられた結合として計算され得る。いくつかの実施態様において、基準Mは、色特異的積分光学濃度および色特異的容積の重み付けられた線形結合として計算され得る。一般的には、特定の基準Mを計算するために使用される特徴の適切な組合せは、基準Mの値が既知である参照サンプルを用いることによって決定され得る。

20

## 【0093】

網赤血球中の特定の成分の量を決定する際、単一のスペクトル寄与因子のみがサンプル中に存在している場合（例えばヘモグロビンなどの吸収性の寄与因子）、特定の網赤血球中に存在している寄与因子の総量が、選択された網赤血球に対応する画像中のピクセルのそれぞれからの強度の寄与を足し合わせることによって決定され得る。強度の寄与はヘモグロビンによる吸収にのみに対応するため、唯一つのサンプル画像が、網赤血球中に存在するヘモグロビンの総量を決定するために必要とされるであろう。

30

## 【0094】

しかしながら、実際には、サンプルは典型的には、技術者または自動化されたイメージングシステムによる様々な細胞型の同定、カウント、および分類を助けるために一またはそれ以上の染色剤を用いて調製される。サンプル中の複数のスペクトル寄与因子により、それぞれの照射波長における吸収は、サンプル中のそれぞれの寄与因子に起因する吸収の組合せであり、特定の網赤血球の任意の波長における寄与の総計は、網赤血球を示しているピクセルのそれぞれからの、その波長における寄与の合計に依然として対応する。したがって、サンプルに存在するスペクトル寄与因子ヘモグロビン（H）、イオシン（E）、アズール（A）を用いて、そして、サンプルの3つの画像が電磁スペクトルの黄色（y）、緑色（g）、および青色（b）領域中に中心波長を有している照射光に対応すると仮定すると、特定の網赤血球の（または、一またはそれ以上の網赤血球に対応する画像中の全てのピクセルの）これらの3つの波長のそれぞれにおける光学濃度ODは、それぞれの波長におけるスペクトル寄与因子のそれぞれに起因する吸収の線形結合であると仮定される：

40

## 【数18】

$$OD(y) = H \cdot \alpha_{y,H} + E \cdot \alpha_{y,E} + A \cdot \alpha_{y,A} \quad (18)$$

$$OD(g) = H \cdot \alpha_{g,H} + E \cdot \alpha_{g,E} + A \cdot \alpha_{g,A}$$

$$OD(b) = H \cdot \alpha_{b,H} + E \cdot \alpha_{b,E} + A \cdot \alpha_{b,A}$$

式中、 $\alpha_{i,j}$ は、波長i（例えば、黄色y、緑色g、または青色bなど）における、スペ

50

クトル寄与因子  $j$  (例えば、ヘモグロビン H, イオシン E、またはアズール A など) の吸収係数である。

【0095】

光の中心波長のそれぞれは、サンプルから検出器へと既知のスペクトル光を通過させること、そして、サンプルの吸収を測定することによって決定され得る。例えば、検出器は、それぞれ黄色、緑色、および青色領域の狭い照射スペクトルを有する照射源を使用して、サンプルの3つの画像を獲得し得る。それぞれのスペクトル寄与因子が極大値を含む吸収スペクトルをもつ場合、照射源は、放射スペクトルがスペクトル寄与因子の極大値に対応する、または最もよく近似されるように選択され得る。例えば、青色照明は、サンプル中のヘモグロビンのピーク吸光度(例えば 415 nm)に対応する波長として選択され得る。黄色照明は、サンプル中のアズール染色剤のピーク吸収に対応する波長(例えば 598 nm)と関連付けられ得る。同様に、緑色照明は、サンプル中のイオシンのピーク吸収に対応する波長(例えば 525 nm)で選択され得る。追加の照射波長が、サンプル中の追加のスペクトル寄与因子にピーク吸収値を相関させるように選択され得る。

10

【0096】

光学密度量  $OD(y)$ 、 $OD(g)$ 、および  $OD(b)$  は、画像情報より決定され得、そして、吸収係数  $\mu_{i,j}$  は、文献値から得られるかまたは実験に基づいて決定され得る。したがって、式(18)のシステムは、3つの未知数(H、E、およびA)を含んでおり、そして、それぞれ特定の網赤血球中に、または、分析のために選択されたピクセルが全体として画像中の同定された細胞の全てに対応する場合、サンプル中の全ての網赤血球を含む全ての細胞に関して全体的に、存在するこれらの3つのスペクトル寄与因子のそれぞれの量をもたらすことによって解かれ得る。

20

【0097】

それにもかかわらず、本明細書中に開示される方法およびシステムは、より簡便で、より効率的な、網赤血球成分の量を決定するための方法を示している。上記で示されるように、式(13)(適切な重み係数を有する)は、興味の対象である成分のみの成分量を決定するために使用され得、サンプル分析が完了され得るスピードを増大させる。さらに、スペクトル寄与因子の数が知られていない複雑なサンプルにおいては、式(18)にあるような式のシステムを構成することは困難であるかもしれない。しかしながら、式(13)は、網赤血球中の他のスペクトル寄与因子が良好に規定されていない場合であっても、特定の網赤血球成分の量を決定することを可能にする。したがって、いくつかの実施態様において、式(18)のシステムにおけるヘモグロビン、イオシン、およびアズールからのスペクトル寄与因子は、3つの異なる照射波長における画像を得ることによって区別され得、本明細書中で記載されるように、3つより多くの特徴および/または3つより多くの照射波長を、例えば網赤血球ヘモグロビン、網赤血球容積、平均網赤血球ヘモグロビン、および平均網赤血球容積などの網赤血球基準の値を決定するために使用することは、血液サンプルを測定する際の誤差の系統的または非系統的な他の原因を補正することを可能にする。

30

【0098】

色特異的積分光学濃度および容積、ならびに網赤血球面積に加えて、他の画像特徴が網赤血球容積および/または網赤血球成分の量を決定するために使用され得る。例えば、いくつかの実施態様において、式(13)は、網赤血球の周囲長と重み付け係数との積に対応する追加の項を含んでいてもよい。網赤血球の周囲長の項のための適切な重み付け係数は、上述されるように、訓練データから決定され得る。より一般的には、訓練データから決定される適切な重み付け係数をとまなう、網赤血球画像から導かれる様々な追加の項が式(13)に含まれ得る。このような項は、網赤血球の形態に関連する幾何学的な画像特徴、および/または、3または4より多くの照射波長における積分光学濃度および容積の色特異的測定値を含み得る。理論に縛られることなく、追加の項は、式(13)のモデルによっては完全に考慮されていない、画像収差、ほかのサンプル成分からの吸収、および系統的測定誤差などの効果を補正するための近似(これは、すべての重み付け因子の値を

40

50

決定するために参照サンプル情報において同時に実行される)を可能にし得る。例えば、赤色照射波長に対応する積分光学濃度および網赤血球容積の項、および、網赤血球面積に対応する項の算入が、赤色照射波長において獲得されるサンプル画像または網赤血球面積測定を使用しない測定方法と比較して、多くのサンプルにおいて網赤血球ヘモグロビンの測定における正確性を改善することが見いだされた。

#### 【0099】

一般的に、本明細書中で開示される方法およびシステムは、サンプル中に天然に存在する成分(例えば網赤血球中のヘモグロビンなど)の量および/またはサンプルへ添加された成分(例えば網赤血球に適用され、そして結合する染色剤など)の量を決定するために使用され得る。さらに、いくつかの実施態様において、本明細書中で開示される方法およびシステムは、サンプル中に存在する1つより多い成分の量を決定するために使用され得る。例えば、適切な染色剤を適用し、および/または、サンプル画像のための適切な中心波長を選択することにより、2つまたはそれ以上の成分の量が決定され得る。ヘモグロビンを天然に存在する吸収性成分として含むサンプルを考える。サンプルは、2つの幅広い吸収をもつ染色剤S(1)およびS(2)で染色され得、そして、比較的狭い吸収バンドを有する第三の染色剤S(3)で染色され得る。S(3)は、存在するS(3)の量の測定が成分の測定値を与えるように、網赤血球中の関心のある特定の成分に選択的に結合する。

10

#### 【0100】

ヘモグロビンおよびS(3)の吸収スペクトルが、例えばヘモグロビンが波長 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、および $\lambda_3$ においてのみ顕著な吸収をもち、 $\lambda_4$ ではもたず、そして、S(3)が波長 $\lambda_2$ 、 $\lambda_3$ 、および $\lambda_4$ においてのみ顕著な吸収をもち、 $\lambda_1$ ではもたないなどのように、スペクトル的に十分分離している場合、S(1)およびS(2)が4つの波長の全てで顕著な吸収をもつと仮定すれば、網赤血球ヘモグロビンの量は、照射波長 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、および $\lambda_3$ に対応するサンプルの画像から網赤血球成分の量を測定するための本明細書中で開示されている方法にしたがって決定され得、そして、S(3)の量は、照射波長 $\lambda_2$ 、 $\lambda_3$ 、および $\lambda_4$ に対応するサンプルの画像から同じ方法にしたがって決定され得る。これらの方法は、より多くの興味の対象である数の成分に対して、および、例えばS(1)およびS(2)などのより多くのまたは少ない数の広帯吸収性スペクトル寄与因子に対してさらに一般化することができる。

20

30

#### 【0101】

##### 網赤血球の結果の報告

ある実施態様において、同定された網赤血球、決定された網赤血球容積、成分量、平均網赤血球容積、および/または平均成分濃度は、例えばディスプレイ110などを用いてシステムオペレータに示され得る。容積および成分結果は、一赤血球あたりで表示されてもよく、また、全体のサンプルに対する平均された結果として表示されてもよい。また、計算された数値結果(例えば個々の網赤血球に対する)は、一またはそれ以上の網赤血球画像上に重ねられ得る。一般的に、システムオペレータは、ヒューマンインターフェースユニット112(例えば、キーボードおよび/またはマウスおよび/または他の任意の入力装置など)を使用して、結果が表示される方法を制御し得る。システムオペレータはまた、インターフェースユニット112およびディスプレイ110を介して、他の任意のパラメータ、条件および本明細書中で開示される方法と関連付けられるオプションを制御し得る。

40

#### 【0102】

一またはそれ以上の基準がまた、平均網赤血球容積および/または平均網赤血球ヘモグロビン測定値から計算され得、そして、表示され得る。いくつかの実施態様において、例えば、網赤血球分布の幅が計算され、そして人間オペレータのために表示され得る。加えて、平均網赤血球ヘモグロビン測定値が、平均網赤血球ヘモグロビン濃度を計算するためにサンプルのヘマトクリット値とともに使用され得る。網赤血球画像を表示するための方法およびシステムに関する、および、網赤血球基準に関連付けられるさらなる詳細は、2

50

012年6月18日に出願された、米国特許出願公開第13/526,223号明細書において見出され得、その内容は参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

【0103】

網赤血球容積および成分濃度測定値、および/または、それらから計算される基準は、制御システム108に関連付けられる電子記憶装置ユニット中にサンプル画像とともに保管され得る。例えば、この情報は、サンプル104に対応する患者と関連付けられる電子記録中に保管されてもよい。代わりに、または追加で、情報は、一またはそれ以上の臨床医または他の医療担当者に伝達され得る。情報は、ネットワーク(例えばコンピュータネットワークなど)を介してコンピュータデバイスへと伝達されてもよい。さらに、情報は、例えば携帯電話などの携帯端末へと伝達されてもよく、そして、伝達は、基準が所定の範囲の値から外れた場合の警報または警告を含み得る。

10

【0104】

赤血球細胞同定および測定のための方法およびシステムは、例えば、2012年4月13日に出願された米国特許出願公開第13/446,967号明細書に開示されており、その内容は参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

【0105】

自動化されたサンプル調製システム

本明細書中に開示されるシステムおよび方法は、様々な種々の自動化されたサンプル調製システムとともに使用され得る。図8は、自動化されたサンプル調製システム800の実施態様の概略図を示す。システム800は、基板を保管するため、サンプルを基板上にサンプルを配置するため、基板上に調製されたサンプルを検査するため、および調製されたサンプルを保管するための複数のサブシステムを備える。

20

【0106】

基板保管サブシステム810は、その上にサンプルが配置される前の基板を保管するように構成される、基板としては例えば、顕微鏡スライド、カバースリップ、および類似の平面状の光学的に透明な基板が挙げられる。基板は、例えば様々な種類のガラスを含む、様々な種々の非晶質または結晶性材料から形成され得る。サブシステム810は、保管コンテナから個々の基板を選択し、そして、選択された基板をサンプル配置サブシステム820へと移送するマニピュレーターを備えていてもよい。

【0107】

サンプル配置サブシステム820は、選択された量の興味の対象であるサンプル(例えば血液サンプルなど)を基板の上に配置する。サブシステム820は、一般的に、サンプルを配置するように構成されている様々な流体移送コンポーネント(例えば、ポンプ、流体チューブ、バルブなど)を備える。流体移送コンポーネントはまた、例えばリンス液、サンプルに結合する一またはそれ以上の染色剤、固定液、および/または緩衝液などを含む様々な種類の液体に基板を暴露するように構成され得る。サブシステム820はまた、流体除去コンポーネント(例えばバキュームサブシステムなど)およびサンプルが基板上に固定されていることを確実にするための乾燥装置を備え得る。基板マニピュレーターは、基板によって支持されているサンプルをイメージングサブシステム830へと移送し得る。

30

40

【0108】

検査サブシステム830は、基板上のサンプルの画像を得るため、および、サンプルについての情報を決定するために画像を分析するための様々なコンポーネントを備える。例えば、検査サブシステム830は、サンプルへと入射光を導くための一またはそれ以上の光源(例えば、光放射ダイオード、レーザーダイオード、および/またはレーザーなど)を備え得る。検査サブシステム830はまた、サンプルからの透過光および/または反射光を捉えるための光学装置(例えば顕微鏡対物レンズなど)を備え得る。光学装置に連結されている検出器(例えばCCD検出器など)は、サンプルの画像を取り込むように構成され得る。サンプルの画像の分析から得られる情報は、後の読み出しおよび/またはさらなる分析のために、さまざまな光学的および/または電子的保管メディア上に保管され得

50

る。

【 0 1 0 9 】

検査に続いて、基板マニピュレーターは、基板を保管サブシステム 8 4 0 へと移送する。保管サブシステム 8 4 0 は、例えば、基板に適用されるサンプルの供給源、分析日時、および/または分析のあいだに同定された不規則性などに関連する情報を用いて個々の基板をラベルし得る。保管サブシステムはまた、複数の基板ラックに、処理された基板を保管してもよく、これはそれが基板で一杯になった場合システム 8 0 0 から取り除かれ得る。

【 0 1 1 0 】

図 8 に示されるように、システム 8 0 0 の様々なサブシステムのそれぞれは、共通の電子プロセッサ 8 5 0 へと連結され得る。プロセッサ 8 5 0 は、システム 8 0 0 のサブシステムのそれぞれを操作を自動化された様式で、システムオペレータからの入力を比較的ほとんどなしで（または全くなしで）制御するように構成され得る。サンプルの分析からの結果は、監督オペレータのためのシステムディスプレイ 8 6 0 上に表示され得る。インターフェース 8 7 0 は、オペレータがシステム 8 0 0 にコマンドを送ること、および自動化された分析の結果を手動で精査することを可能にする。

10

【 0 1 1 1 】

自動化されたサンプル処理システムのさらなる態様および特徴は、2011年11月9日に出願された、米国特許出願公開第 1 3 / 2 9 3 , 0 5 0 号明細書に例えば開示されており、その内容は参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

20

【 0 1 1 2 】

ハードウェアおよびソフトウェア実行

本明細書中に開示される方法の工程および手順は、ハードウェア中またはソフトウェア中で、または両方の組合せ中で実行され得る。具体的には、電子プロセッサ 1 1 4 は、上述の任意の方法を行うためのソフトウェアおよび/またはハードウェア命令を備え得る。方法は、本明細書中に開示される方法の工程および図にしたがい標準のプログラミング技術を用いてコンピュータプログラム内に実装され得る。プログラムコードは、本明細書中に記載される機能を実行するためにデータを適用される。出力情報は、例えばプリンタ、またはディスプレイ装置、またはウェブサイトにアクセス可能なコンピュータモニター上のウェブページなどの一またはそれ以上の出力装置へ、例えば遠隔モニタリングのためなどに適用される。

30

【 0 1 1 3 】

それぞれのプログラムは、好ましくは、プロセッサと通信するための、高度な手続き型言語またはオブジェクト指向プログラミング言語で実装される。しかしながら、プログラムは、所望により、アセンブリ言語または機械語で実装されていてもよい。いずれにせよ、言語は、コンパイラ型言語またはインタープリタ型言語であり得る。それぞれのコンピュータプログラムは、本明細書中で記載される手順を実行するようにプロセッサを設定し、そして操作するために、プロセッサによって読み取り可能な保管媒体または装置（例えば、電子メモリなど）上に保管され得る。

【 0 1 1 4 】

40

図 9 は、ある実施態様にしたがって、本明細書中で記載されるコンピュータによって実施される任意の方法と関連付けられて記載される操作を制御するために使用され得るコンピュータシステム 9 0 0 の概略図である。システム 9 0 0 は、プロセッサ 9 1 0、メモリ 9 2 0、保管装置 9 3 0、および入力/出力装置 9 4 0 を備える。それぞれのコンポーネント 9 1 0、9 2 0、9 3 0、および 9 4 0 は、システムバス 9 5 0 を使用して相互連結される。プロセッサ 9 1 0 は、システム 9 0 0 内で実行されるための命令を処理することが可能である。ある実施態様において、プロセッサ 9 1 0 は、シングルスレッドのプロセッサである。別の実施態様において、プロセッサ 9 1 0 は、マルチスレッドプロセッサである。プロセッサ 9 1 0 は、入力/出力装置 9 4 0 上のユーザーインターフェースのための図形情報を表示するために、メモリ 9 2 0 中、または保管装置 9 3 0 上に保管されてい

50

る命令を処理することができる。プロセッサ 910 は、図 8 に関連して上述されたプロセッサ 850 と実質的に類似している。

【0115】

メモリ 920 は、システム 900 内に情報を保管する。いくつかの実施態様において、メモリ 920 は、コンピュータ読み取り可能な媒体である。メモリ 920 は、揮発性および/または非揮発性メモリを備え得る。

【0116】

保管装置 930 は、システム 900 のための大容量記憶を提供することができる。一般的に、保管装置 930 は、コンピュータ読み取り可能な命令を保管するように構成されている、任意の非一時的有体的媒体を備え得る。ある実施態様において、保管装置 930 は、コンピュータ読み取り可能な媒体である。様々な種々の実施態様において、保管装置 930 は、フロッピー（登録商標）ディスクドライブ、ハードディスクドライブ、光学ディスクドライブ、またはテープデバイスであってもよい。

【0117】

入力/出力装置 940 は、システム 900 のための入力/出力操作を提供する。いくつかの実施態様において、入力/出力装置 940 は、キーボードおよび/またはポインティングデバイスを備える。いくつかの実施態様において、入力/出力装置 940 は、グラフィカルユーザーインターフェースを表示するためのディスプレイユニットを備える。いくつかの実施態様において、入力/出力装置 940 は、図 8 に関連して上述された、一またはそれ以上のディスプレイ 860 およびインターフェース 870 を備える。

【0118】

記載される特徴は、デジタル電子回路中に、またはコンピュータハードウェア、ファームウェア中に、またはそれらの組合せ中に実装され得る。特徴は、例えば機械読み取り可能な保管装置中など、情報担体中に、プログラム可能なプロセッサによる実行のために、実体的に一体化されているコンピュータプログラム製品中に実装されていてもよく、そして、特徴は、プログラム可能なプロセッサが、入力データに基づいて操作し、そして出力を作製することにより、記載された実施態様の機能を行うための命令プログラムを実行することによって、行われてもよい。記載されている特徴は、データ保管システム、少なくとも 1 つの入力装置、および少なくとも 1 つの出力装置からのデータおよび命令を受け取り、そしてデータおよび命令をそこへ伝達するように連結されている少なくとも 1 つのプログラム可能なプロセッサを備える、プログラム可能なプロセッサ上で実行可能である一またはそれ以上のコンピュータプログラムにおいて実行され得る。コンピュータプログラムは、特定の作業を行う、または特定の結果をもたらすための、コンピュータ中で直接的または間接的に使用され得る命令のセットを備える。コンピュータプログラムは、コンパイル型言語またはインタープリタ型言語を含む、任意の形式のプログラム言語で書かれていてもよく、そして、スタンドアロン型プログラムとして、または、モジュール、コンポーネント、サブルーチン、または、コンピュータ環境における使用に適切な他のユニットとしてなど、任意の形式で展開され得る。

【0119】

様々なソフトウェアアーキテクチャが、本出願において開示されている方法およびシステムを実行するために使用され得る。例えば、出版 - 購読型メッセージングパターンが、本明細書中で記載される方法およびシステムを実行する際に使用されてもよい。出版 - 購読型メッセージングの場合、システムはメッセージングモジュールを介してのみ通信するいくつかのハードウェアおよびソフトウェアを備える。それぞれのモジュールは、特定の機能を行うように構成され得る。例えば、システムは、一またはそれ以上のハードウェアモジュール、カメラモジュール、およびフォーカスモジュールを備え得る。ハードウェアモジュールは、イメージングハードウェアに自動焦点機能を実行させるコマンドを送信でき、これは次に、カメラに画像を取り込むよう動作させる。いくつかの実施態様において、ハードウェアモジュールは、図 1 に関連して上述された制御システム 108 を備えていてもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 0 】

カメラモジュールは、カメラからの画像を受け取り、そして、例えばシャッター時間または焦点などのカメラパラメータを決定する。画像はまた、カメラモジュールによって処理される前にコンピュータのメモリ中にバッファリングされ得る。スライドの傾斜に関する最初の検査を行う場合、カメラモジュールはまた、適切なシャッター時間または焦点を決定するために十分な画像が見られた場合に、ハードウェアモジュールを中断するメッセージを送り得る。いくつかの実施態様において、カメラモジュールは、図 1 に関連して上述された検出器 106 を備え得る。

## 【 0 1 2 1 】

システムはまた、ソフトウェア、ハードウェア、またはソフトウェアおよびハードウェアの組合せとして実行され得るフォーカスモジュールを備え得る。いくつかの実施態様において、フォーカスモジュールは、スタック中の全てのフレームを検査し、そしてスタックがどれほど理想から、また理想的な焦点距離から離れているか見積もる。フォーカスモジュールはまた、画像のスタック中のそれぞれのフレームに対するフォーカススコアの割り当てに関与し得る。

## 【 0 1 2 2 】

指示のプログラムの実行のために適切なプロセッサとしては、例えば、一般的なおよび特殊目的のマイクロプロセッサ、および任意の種類 of コンピュータの単一のプロセッサまたは複数のプロセッサのうちの一つなどが挙げられる。一般的には、プロセッサは、読み取り専用メモリまたはランダムアクセスメモリまたはそれらの両方からの指示およびデータを受け取るであろう。コンピュータは、指示を実行するためのプロセッサ、ならびに、指示およびデータを保存するための一またはそれ以上のメモリを備える。一般的には、コンピュータはまた、データファイルを保管するための一またはそれ以上の大容量記憶装置、例えば、内部ハードディスクおよびリムーバブルディスク、光磁気ディスクおよび光ディスクなどの磁気ディスクを備えた装置など、を備えるか、またはそれらと通信するように作動可能に連結されるであろう。コンピュータプログラムの指示およびデータを実体的に具体化するために適切な保管装置としては、全ての形状の不揮発性メモリが挙げられ、これには、例えば、EPROM、EEPROMなどの半導体メモリ装置、およびフラッシュメモリ装置、内部ハードディスクおよびリムーバブルディスクなどの磁気ディスク、光磁気ディスク、およびCD-ROMおよびDVD-ROMディスクなどが含まれる。プロセッサおよびメモリは、ASICs (特定用途向け集積回路) によって補完されたり、またその中に組み込まれたりし得る。

## 【 0 1 2 3 】

ユーザとの相互作用を提供するために、特徴は、例えばCRT (ブラウン管) またはLCD (液晶ディスプレイ) モニタなどの、ユーザに情報を表示するためのディスプレイ装置、および、キーボード、および、マウスまたはトラックボールなどのそれによってユーザがコンピュータに入力を提供できるようなポインティング装置を有するコンピュータ上で実行され得る。代わりに、コンピュータは、付属するキーボード、マウス、またはモニタを有していなくてもよく、そしてそれは、別のコンピュータによって遠隔的に制御され得る。

## 【 0 1 2 4 】

特徴は、例えばデータサーバーなどのバックエンド成分を備えるか、または、例えばアプリケーションサーバまたはインターネットサーバなどのミドルウェア成分を備えるか、または、グラフィカルユーザーインターフェースまたはインターネットブラウザを有する顧客用コンピュータなどのフロントエンド成分を含むか、またはそれらの任意の組合せであるコンピュータシステム中で実行され得る。システムの成分は、例えば通信ネットワークなどのデジタルデータ通信の任意の形式または媒体によって連結され得る。通信ネットワークの例としては、例えば、LAN、WAN、ならびに、インターネットを形成しているコンピュータおよびネットワークなどが挙げられる。

## 【 0 1 2 5 】

コンピュータシステムは、顧客およびサーバを含み得る。顧客およびサーバは、一般的に、お互い遠く離れており、そして、典型的には例えば上述したようなものであるネットワークを通じて相互作用しあう。顧客およびサーバの関係は、それぞれのコンピュータ上で動作し、そして、お互いに顧客 - サーバの関係を維持しているコンピュータプログラムに基づいて生じる。

【0126】

プロセッサ910は、コンピュータプログラムに関連する指示を実行する。プロセッサ910は、論理ゲート、加算器、乗算器、および計数器などのハードウェアを備え得る。プロセッサ910はさらに、算術演算および論理演算を行う、別個の算術論理演算ユニット( ALU )を備えていてもよい。

10

【0127】

他の実施態様

前述の記載は、例示を目的とするものであって、添付のクレームの範囲によって規定される開示の範囲を限定する意図はないことが理解されるべきである。他の態様、有利性、および改変は、以下のクレームの範囲内にある。例えば、先述の記載および図1における略図は、サンプルからの透過光の測定について説明しているものであるが、本明細書中に開示されている方法およびシステムはまた、サンプルの画像がサンプルからの屈折光に対応する場合にも使用され得る。あるサンプルは自然に反射性であるか、または、例えば反射光が細胞成分および/または容積の量を決定するために有用な方法を提供するような、反射マーカを用いてタグ化されてもよい。いくつかの実施態様において、サンプル10

20

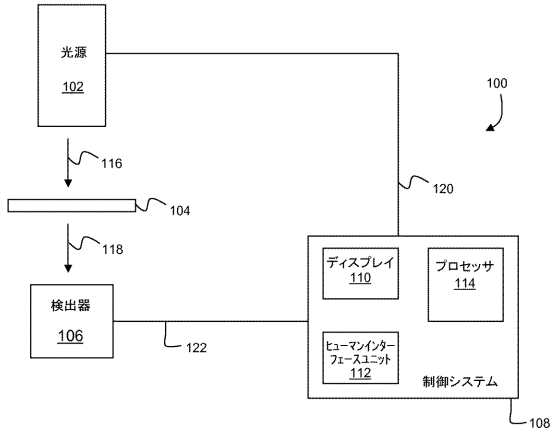
【0128】

一般的に、本明細書中に開示されている方法およびシステムは、様々な種々のサンプル型における、網赤血球カウント、網赤血球あたりの容積、成分含有量、および/またはサンプルの平均網赤血球容積または平均網赤血球成分を決定するために使用され得る。例えば、網赤血球容積、および例えばヘモグロビンまたは他のタンパク質などの成分が、血液、骨髓、尿、上皮組織、腫瘍、精液、唾などを含む体液および組織から、および、他の組

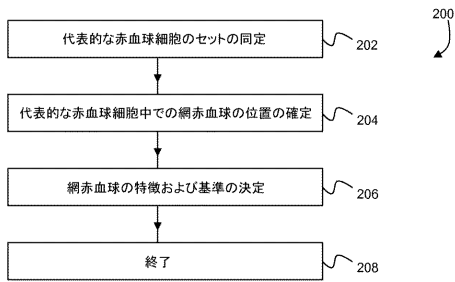
30



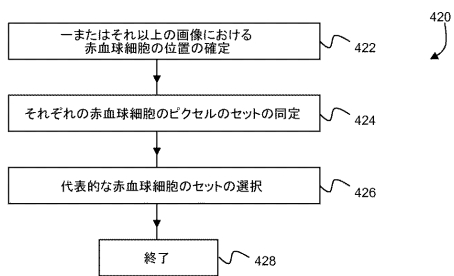
【図1】



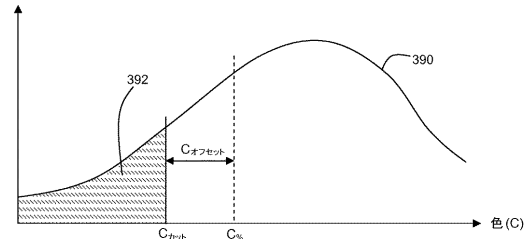
【図2】



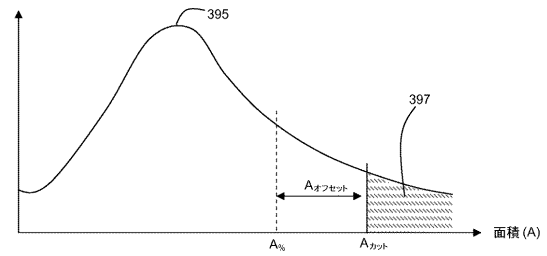
【図4】



【図3A】



【図3B】



【図5】

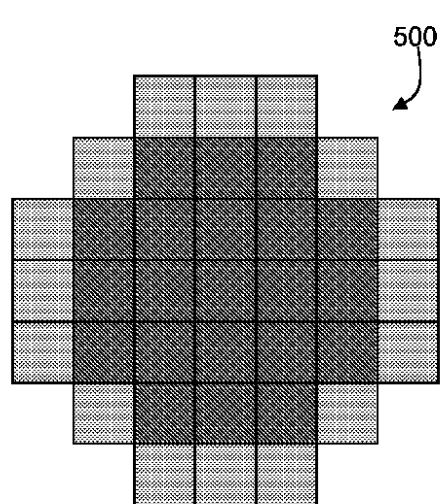


FIG. 5

【図6】

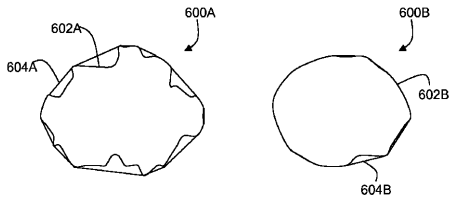


FIG. 6

【図7】

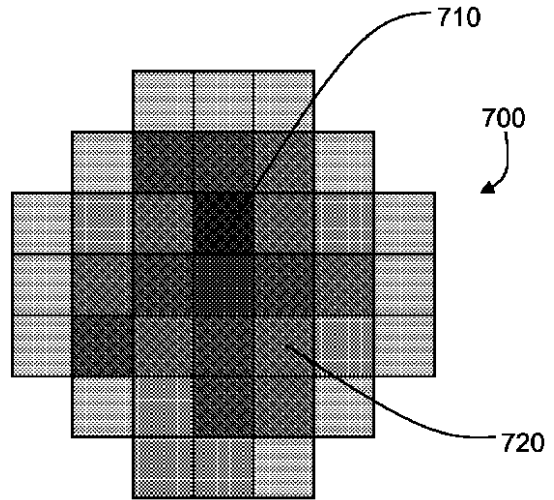
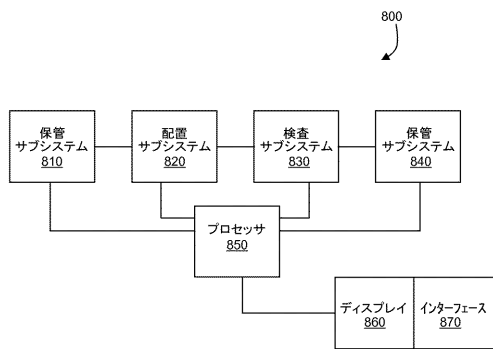
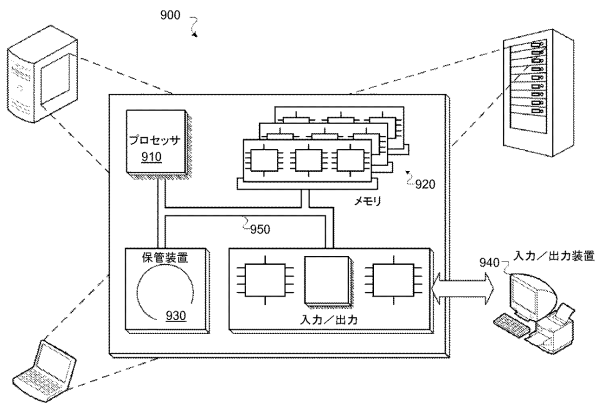


FIG. 7

【図8】



【図9】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
G 0 6 T	7/60	(2006.01)	G 0 6 T	7/00	G
G 0 6 T	1/00	(2006.01)	G 0 6 T	7/60	1 5 0 J
			G 0 6 T	1/00	2 9 5

(72)発明者 ザーニシャー、マイケル  
 アメリカ合衆国、0 2 1 3 0 マサチューセッツ州、ジャマイカ プレイン、ワチューセット ス  
 トリート 7 7

(72)発明者 ザーニシャー、ラッセル  
 アメリカ合衆国、0 2 1 2 4 マサチューセッツ州、ドーチェスター、ワルデック ストリート  
 2 8

審査官 三木 隆

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0269799(US, A1)  
 国際公開第2008/140969(WO, A1)  
 特表2011-515683(JP, A)  
 特表2011-515682(JP, A)  
 特開平02-107964(JP, A)  
 特表2002-506208(JP, A)  
 米国特許第06350613(US, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 G 0 1 N 3 3 / 4 8  
 G 0 1 N 2 1 / 2 7  
 G 0 1 N 3 3 / 4 9  
 G 0 1 N 3 3 / 7 2  
 G 0 6 T 1 / 0 0  
 G 0 6 T 7 / 0 0  
 G 0 6 T 7 / 6 0