

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 229**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 33/48</b>	(2006.01)
<b>G01N 15/14</b>	(2006.01)
<b>G01N 21/64</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/483</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/574</b>	(2006.01)
<b>G06F 19/00</b>	(2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2012 PCT/JP2012/067128**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO2013015089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2012 E 12816916 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2735872**

54 Título: **Método para proporcionar información de oncogénesis y dispositivo para proporcionar información de oncogénesis**

30 Prioridad:

**22.07.2011 JP 2011160746**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.06.2017**

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)  
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome  
Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**EBI, RYUICHIRO;  
TAJIMA, KOKI;  
ABE, SHIGEKI y  
KAWANO, MASANORI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 617 229 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para proporcionar información de oncogénesis y dispositivo para proporcionar información de oncogénesis

**5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para proporcionar información de oncogénesis que analiza células y proporciona información relativa a la oncogénesis de las celdas, y a un dispositivo para proporcionar información de oncogénesis.

10

**Antecedentes de la técnica**

Es conocido un analizador para analizar automáticamente las células de un sujeto y proporcionar información relativa a la oncogénesis de las células (véase, por ejemplo, los Documentos de Patente 1 a 2). El Documento de Patente 1 describe un dispositivo que hace fluir una muestra de medida que incluye células recogidas de un sujeto hacia una celda de flujo, irradia la muestra de medida que fluye a través de la celda de flujo con luz para adquirir la señal de luz dispersada para la célula individual, extrae un parámetro característico del análisis de la forma de onda de cada señal de luz dispersada, y discrimina una célula cancerosa/atípica de entre una pluralidad de células usando el parámetro característico.

15

20

El Documento de Patente 2 describe un dispositivo para soportar la diagnosis patológica: capturar una imagen de células que fluyen a través de una celda de flujo; estimar la distribución de los núcleos y citoplasmas de los datos de la imagen adquirida; y estimar la distribución de lugares oncogénicos en un espécimen patológico basándose en una relación (relación N/C) del área de la distribución estimada del núcleo y el citoplasma.

25

**Documentos de la técnica anterior**

Documentos de patente

30 Documento de Patente 1: Publicación internacional PCT N° WO 2006/103920.

Documento de Patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública N° 2004-286666

35

Pratik Shah et al: "*Morphometric pattern analysis of basal cell nuclei for oral cancer screening*", Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE), presenta un enfoque cuantitativo para la discriminación de Fibrosis Submucosa Oral (OSF, Oral Submucous Fibrosis) de la Mucosa Oral Normal (NOM, Normal Oral Mucosa) con relación a las propiedades de forma y tamaño de la capa basal, la primera capa en el epitelio. Prácticamente, el compartimiento proliferativo del epitelio está formado por células basales, y por tanto cambios en la morfometría de las células basales pueden tener serias implicaciones en el comportamiento futuro de la célula, incluyendo la transformación maligna de acuerdo con la visión de los patólogos oncológicos. En vista de esto, se han estudiado aquí los cambios en la forma y tamaño de los núcleos en la capa celular basal del epitelio oral mediante el desarrollo de un analizador de imágenes automático. Se han extraído momentos geométricos y Zernike y características basadas en la transformación para análisis del patrón morfométrico de los núcleos. Estas características se analizan estadísticamente junto con una visualización 3D para discriminar los grupos. Los resultados muestran un incremento de las dimensiones (área y perímetro) y parámetros de forma de los núcleos de mucosa normal en comparación con OSF con displasia. Finalmente, el analizador de patrones utilizado emplea un enfoque bayesiano y una red neuronal de propagación hacia atrás de errores.

40

45

**Sumario de la invención**

50

**Problemas que resuelve la invención**

Por ejemplo, en la diagnosis de tejidos del cérvix uterino, el proceso desde el estado normal al canceroso tiene una pluralidad de etapas, "Normal", "CIN1", "CIN2", "CIN3", y "Cáncer" en orden desde el estado normal. Entre ellas, las etapas "CIN1", "CIN2" y "CIN3" están en el estado denominado "neoplasia intraepitelial cervical (CIN, Cervical Intraepitelial Neoplasia).

55

"CIN1" es un estado en el que las células parabasales atípicas están creciendo en un tercio desde una capa basal a una capa superficial, y es un estado en el que la posibilidad de retorno espontáneo es alta. Por tanto, en "CIN1" se determina que es innecesario un tratamiento. "CIN2" es un estado en el que las células parabasales atípicas están creciendo en dos tercios desde la capa basal a la capa superficial. En "CIN2" se determina que el tratamiento es necesario. "CIN3" es un estado en el que las células parabasales atípicas están creciendo completamente desde la capa basal a la capa superficial. En "CIN3" se determina que el tratamiento es necesario. Para iniciar el tratamiento oncológico en la etapa inicial, es preferible detectar la probabilidad de cáncer en las etapas iniciales del cáncer tal como "CIN2" y "CIN3", antes de la etapa "Cáncer". Es preferible distinguir entre la célula en el estado anterior al

60

65

estado "CIN1" donde el tratamiento se determina innecesario y la célula en el estado después del estado "CIN2" donde el tratamiento se determina necesario.

En el estado "CIN1", donde el tratamiento se determina innecesario, o en el estado "CIN2", donde el tratamiento se determina necesario, las células normales, células cancerosas o células atípicas están mezcladas. Por tanto, incluso si se recogen las células de la cervix uterina de un sujeto de "CIN1" para preparar una muestra de medida o si se recogen las células de la cervix uterina de un sujeto de "CIN2" para preparar una muestra de medida, las células normales células cancerosas o células atípicas están mezcladas en ambas muestras de medida. Incluso si sólo se detectan células atípicas, es difícil detectar con alta precisión la probabilidad de cáncer en el estado inicial.

Incluso si el analizador descrito en los Documentos de Patente 1 y 2 analiza una muestra de medida preparada mediante la recogida del cervix uterino de un sujeto en el estado inicial del cáncer, disminuye un porcentaje de las células cancerosas o células atípicas en el número total de células a analizar. Por tanto, es difícil detectar la probabilidad de cáncer en el estado inicial con una alta precisión.

La presente invención se ha realizado en vista de tales circunstancias y un objeto de la misma es proporcionar un método para proporcionar información de oncogénesis que pueda detectar la probabilidad de cáncer en el estado inicial con una alta precisión y un dispositivo para proporcionar información de oncogénesis.

## **Solución a los problemas**

El método para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención está definido por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones 2-11 describen realizaciones de la misma. El dispositivo para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención está definido por la reivindicación independiente 12. Las reivindicaciones 13 y 14 describen realizaciones del mismo.

En cuanto a las células en lugares tales como el cervix uterino y la cavidad oral, existe una pluralidad de tipos de células en forma de capa desde el lado de la capa superficial hacia el lado de la membrana basal. Por ejemplo, en las células epiteliales del cervix uterino, una capa (capa basal) formada por la célula basal, una capa (capa parabasal) formada por la célula parabasal, una capa (capa intermedia) formada por la célula de capa intermedia, y una capa (capa superficial) formada por la célula de capa superficial existen en este orden desde el lado de la membrana basal hacia el lado de la capa superficial. La célula basal cerca de la membrana basal se diferencia a la célula parabasal, la célula parabasal se diferencia a la célula de capa intermedia, y la célula de capa intermedia se diferencia a la célula de capa superficial. La célula que relativa a oncogénesis es la célula basal en las células epiteliales del cervix uterino. En el proceso de convertirse en un cáncer, la célula basal adquiere la formación atípica y se convierte en la célula atípica. La célula atípica adquiere la capacidad de proliferar, y ocupa desde el lado de la capa basal hasta el lado de la capa superficial. Además, la célula basal atípica se diferencia, y de ese modo la célula parabasal atípica y la célula de capa intermedia aparecen en el proceso de convertirse en un cáncer. En el estado inicial hasta convertirse en un cáncer, existe un gran número de células atípicas en el lado de la capa basal, las células atípicas son extremadamente pocas en el lado de la capa superficial, y existe un gran número de células normales en el lado de la capa superficial. Los presentes inventores han estudiado lo anterior para completar la presente invención.

En el método para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención, en el paso de extraer los datos, la medida de datos de células que se van a analizar, que son al menos algunas de las células situadas en dirección al lado de la membrana basal que existen en la capa superficial y tienen la posibilidad de ser las células cancerosas, se extrae de las células en la muestra de medida. En otras palabras, se excluyen las células existentes en la capa superficial donde la cantidad de ADN no es anormal. Entonces, después de la extracción de los datos de medida las células son analizadas, y se emite la información relativa a la oncogénesis de las células. Por tanto, puede aumentarse un porcentaje de las células cancerosas o células en el proceso de oncogénesis en el número total de células que se van a analizar, y puede mejorarse la sensibilidad de detección de células cancerosas o células en el proceso de oncogénesis.

## **Efectos de la invención**

De acuerdo con el método y el dispositivo para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención, puede detectarse con una gran precisión la posibilidad de un cáncer en el estado inicial.

## **Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 es una vista explicativa en perspectiva de un dispositivo para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 2 es un diagrama de bloques que muestra una configuración del dispositivo para proporcionar información de oncogénesis mostrado en la Fig. 1.

La Fig. 3 es un diagrama de bloques de un ordenador personal que configura un dispositivo de procesamiento de datos en el dispositivo para proporcionar información de oncogénesis mostrado en la Fig. 1.

5 La Fig. 4 es un diagrama de bloques que muestra una configuración de un citómetro de flujo en el dispositivo para proporcionar información de oncogénesis mostrado en la Fig. 1.

La Fig. 5 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del flujo del método para proporcionar información de oncogénesis.

10 La Fig. 6 es una vista explicativa de datos de medida.

La Fig. 7 es una vista que muestra un ejemplo del diagrama de dispersión.

15 La Fig. 8 es una vista explicativa que muestra una relación entre forma de onda de la señal y parámetro característico.

La Fig. 9 es una vista que muestra un ejemplo de pantalla de una unidad de pantalla del dispositivo de procesamiento de datos.

20 La Fig. 10 es un diagrama del aspecto de células epiteliales del cérvix uterino.

La Fig. 11 es una vista que muestra una relación entre el tamaño de las células y la relación N/C para varias células epiteliales del cérvix uterino.

25 La Fig. 12 es un histograma de la cantidad de ADN en las células extraídas.

La Fig. 13 es una vista para explicar el ciclo de la célula con relación al histograma de la cantidad de ADN.

30 La Fig. 14 es una vista para explicar una relación entre etapas en el ciclo de la célula y las cantidades de ADN.

La Fig. 15 es una vista que muestra un ejemplo de pantalla de la unidad de pantalla del dispositivo de procesamiento de datos.

35 La Fig. 16 es una vista que muestra un ejemplo de pantalla de la unidad de pantalla del dispositivo de procesamiento de datos.

La Fig. 17 es una vista que muestra un ejemplo del histograma creado de todas las células individuales.

40 La Fig. 18 es una vista que muestra otro ejemplo del histograma creado de todas las células individuales.

La Fig. 19 es una vista que muestra un ejemplo del histograma que se va a crear en el Paso S9.

La Fig. 20 es una vista que muestra otro ejemplo del histograma que se va a crear en el Paso S9.

#### 45 **Realizaciones de la invención**

En adelante, se describirán en particular haciendo referencia a las figuras realizaciones del dispositivo para proporcionar información de oncogénesis y el método para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención.

50 Configuración completa del dispositivo para proporcionar información de oncogénesis

Un dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis que se muestra en la Fig. 1 o la Fig. 2 determina si  
55 "células cancerosas" están incluidas al hacer fluir una muestra de medida que contiene células recogidas de  
pacientes (sujetos) hacia una celda de flujo, irradiar la muestra de medida a través de la celda de flujo con luz láser,  
y detectar y analizar la luz de la muestra de medida (por ejemplo, luz dispersada hacia adelante y fluorescencia  
lateral), y emite el resultado. Específicamente, el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis se  
60 utiliza para detectar cáncer cervical utilizando células epiteliales del cérvix uterino recogidas de las pacientes. El  
dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis comprende un dispositivo 2 de medida que mide una  
muestra y un dispositivo 4 de procesamiento de datos que está conectado al dispositivo 2 de medida y analiza y  
muestra (emite) el resultado de la medida. Como se muestra en la Fig. 1, el dispositivo 1 para proporcionar  
información de oncogénesis incluye además una unidad 50 de colocación de muestra para colocar una pluralidad de  
65 tubos de ensayo (no mostrados) que contienen una solución de mezcla que tiene una solución conservante que  
contiene metanol como componente principal y una muestra biológica recogida del paciente.

Como se muestra en la Fig. 2, el dispositivo 2 de medida del dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis comprende una unidad 3 de detección óptica que incluye un citómetro de flujo, que es una unidad de adquisición de información óptica para detectar información tal como las células y el tamaño del núcleo de la muestra de medida, un circuito 5 de procesamiento de señal, una unidad 16 de control de medida, una unidad 17 de accionamiento que incluye un motor, un actuador, y una válvula, varios sensores 18, y una unidad 26 de captura de imagen que captura imágenes de células. El circuito 5 de procesamiento de señal comprende un circuito de procesamiento de señal analógica que somete la salida de un citómetro 3 de flujo amplificada mediante un preamplificador (no mostrado) a una amplificación o filtrado, un convertidor A/D que convierte la salida del circuito de procesamiento de señal analógica en una señal digital, y un circuito de procesamiento de señal digital que somete la señal digital a un procesamiento de forma de onda predeterminado. La unidad 16 de control de medida procesa la señal del sensor 18 y controla el funcionamiento de la unidad 17 de accionamiento para aspirar y medir la muestra de medida. Cuando se detecta el cáncer cervical, se puede usar como muestra de medida una preparada sometiendo las células recogidas de la cervix uterina (células epiteliales) de pacientes a centrifugación, dilución, mezclado y tinción PI. La muestra de medida preparada contenida en un tubo de ensayo se dispone en una posición predeterminada de la unidad 50 de colocación de muestra. Posteriormente, es transportada hasta la posición inferior de una pipeta (no mostrada) del dispositivo 2 de medida y aspirada por la pipeta. La muestra aspirada y una solución envolvente son alimentadas a la celda de flujo. Por tanto, se forma un flujo de muestras en la celda de flujo. Se lleva a cabo la tinción PI (tinción ADN) con yoduro de propidio (PI), que es una solución de tinción fluorescente que contiene pigmento rojo. Como los núcleos son tintados selectivamente en la tinción PI, puede detectarse la fluorescencia roja de los núcleos.

#### Configuración de la unidad de control de medida

La unidad 16 de control de medida comprende un microprocesador 20, una unidad 21 de memoria, un controlador 22 de E/S, una unidad 23 de procesamiento de señal de sensor, un controlador 24 de unidad de accionamiento, y un controlador 25 de comunicación externa. La unidad 21 de memoria incluye una Memoria de Solo Lectura (ROM, Read Only Memory), una Memoria de Acceso Aleatorio (RAM, Random Access Memory), y similares. Los programas de control para controlar la unidad 17 de accionamiento y los datos requeridos para ejecutar los programas de control se almacenan en la ROM. El microprocesador 20 es capaz de ejecutar los programas de control cargados en la RAM o de ejecutar directamente los programas de control en la ROM.

La señal del sensor 18 es transmitida al microprocesador 20 a través de la unidad 23 de procesamiento de señal de sensor y el controlador 22 de E/S. El microprocesador 20 ejecuta los programas de control para poder controlar la unidad 17 de accionamiento a través del controlador 22 de E/S y el controlador 24 de unidad de accionamiento en respuesta a la señal del sensor 18. Los datos procesados por el microprocesador 20 y los datos necesarios para el procesamiento del microprocesador 20 son transmitidos y recibidos con un dispositivo externo tal como el dispositivo 4 de procesamiento de datos a través del controlador 25 de comunicación externo.

#### Configuración del dispositivo de procesamiento de datos

Como se muestra en la Fig. 3, el dispositivo 4 de procesamiento de datos incluye un ordenador personal y similar, y está configurado principalmente por un cuerpo 27 principal, una unidad 28 de pantalla, y una unidad 29 de entrada. El cuerpo 27 principal está configurado principalmente por una Unidad 27a de Procesamiento Central (CPU, Central Processing Unit), una ROM 27b, una RAM 27c, un disco duro 27d, un dispositivo 27e de lectura, una interfaz 27f de E/S, y una interfaz 27g de salida de imagen. Tales componentes están conectados de modo que pueden comunicarse a través de un bus 27h.

La CPU 27a ejecuta programas de ordenador almacenados en la ROM 27b y los programas de ordenador almacenados en la RAM 27c. La CPU 27a sirve como una unidad de adquisición de datos para adquirir los datos del tamaño del núcleo de célula que se describirá más adelante y los datos del tamaño del citoplasma o una unidad de control para analizar las células extraídas y emitir información relativa a la oncogénesis.

La ROM 27b está configurada por una mask ROM, PROM, EPROM, EEPROM, y similares, y almacena programas de ordenador que serán ejecutados por la CPU 27a y datos utilizados por los mismos. La RAM 27c está configurada por una SRAM, DRAM, y similares. La RAM 27c se utiliza para leer los programas de ordenador almacenados en la ROM 27b y el disco duro 27d. En la ejecución del programa de ordenador, se utiliza la RAM 27c como una región de trabajo de la CPU 27a.

En el disco duro 27d se instalan varios programas de ordenador que serán ejecutados por la CPU 27a, tal como el sistema operativo y programas de aplicación, así como datos que se utilizan para la ejecución del programa de ordenador. Por ejemplo, en el disco duro 27d se instala un sistema operativo que proporciona un entorno de interfaz gráfica de usuario tal como Windows (marca registrada) fabricado y vendido por US Microsoft Co. Además, en el disco duro 27d se instala un programa de ordenador para producir datos de forma de onda que serán descritos más adelante o calcular una relación N/C y los datos utilizados para la ejecución del programa de ordenador.

En el disco duro 27d se instala un programa de operación para llevar a cabo la transmisión de una orden de medida (comando de operación) a la unidad 26 de control de medida del dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis y procesar el resultado de la medida en el dispositivo 2 de medida, mostrar el resultado del análisis procesado, y similar. El programa de operación opera en el sistema operativo.

5 El dispositivo 27e de lectura está configurado por una unidad de disco flexible (unidad de disco), una unidad CD-ROM, o similar, y es capaz de leer programas de ordenador o datos almacenados en un medio de almacenamiento portátil. La interfaz 27f de E/S está configurada por una interfaz serie tal como USB, IEEE1394, RS-232C; una interfaz paralelo tal como SCSI, IDE, IEEE1284; una interfaz analógica tal como un convertidor D/A, convertidor A/D, y similares. La unidad 29 de entrada tal como un teclado y ratón está conectada a la interfaz 27f de E/S, de modo que el usuario puede introducir datos de entrada en el ordenador personal operando la unidad 29 de entrada. La interfaz 27f de E/S está conectada al dispositivo 2 de medida y puede transmitir y recibir datos con el dispositivo 2 de medida.

15 La interfaz 27g de salida de imagen está conectada a la unidad 28 de pantalla configurada por un LCD, CRT, o similar, y está configurada para emitir una señal de imagen correspondiente a los datos de imagen proporcionados por la CPU 27a a la unidad 28 de pantalla. La unidad 28 de pantalla muestra una imagen (pantalla) en respuesta a la señal de imagen de entrada y la señal de forma de onda.

20 Configuración del citómetro de flujo y unidad de captura de imágenes

La Fig. 4 es una vista que muestra la unidad 3 de detección óptica que incluye la unidad de adquisición de información óptica y la configuración de la unidad 26 de captura de imágenes. La unidad 3 de detección óptica que incluye un citómetro de flujo comprende una fuente 53 de luz que incluye un láser de semiconductor. Un sistema 52 de lentes recoge la luz láser emitida desde la fuente 53 de luz en la muestra de medida que fluye a través de la celda 51 de flujo. La luz dispersada hacia adelante generada por las células de la muestra de medida debido a la luz láser es detectada por un fotodiodo (unidad de recepción de luz) 55 a través de una lente 54 de objetivo y un filtro 57. El sistema 52 de lentes está configurado por un grupo de lentes que incluye una lente de colimadora, una lente cilíndrica, una lente condensadora, y similares.

30 Además, la fluorescencia lateral y la luz dispersada lateralmente de las células pasan a través de la lente 56 de objetivo dispuesta en el lado de la celda 51 de flujo y entra en un espejo 61 dicróico. La fluorescencia lateral y la luz dispersada lateralmente reflejada por el espejo 61 dicróico entran en un espejo 62 dicróico.

35 La fluorescencia lateral que pasa por el espejo 62 dicróico también pasa a través de un filtro 63 y es detectada por un fotomultiplicador 59. La luz dispersada lateralmente reflejada por el espejo 62 dicróico pasa a través de un filtro 64 y es detectada por un fotomultiplicador 58.

40 El fotodiodo 55, el fotomultiplicador 58 y el fotomultiplicador 59 convierten la luz detectada en señales eléctricas y respectivamente emiten una señal de luz dispersada hacia adelante (FSC, Forward Scattered), una señal de luz dispersada lateralmente (Side Scattered), y una señal de fluorescencia lateral (SFC, Side Fluorescent). Estas señales son amplificadas mediante preamplificadores que no se muestran en los dibujos, y a continuación las señales amplificadas son transmitidas al circuito 5 de procesamiento de señal (véase la Fig. 2).

45 Como se muestra en la Fig. 2, el circuito 5 de procesamiento de señal lleva a cabo un procesamiento de señal tal como un procesamiento con filtro y un procesamiento por conversión A/D y similares para obtener los datos de luz dispersada hacia adelante, los datos de luz dispersada lateralmente, y los datos de fluorescencia lateral. Los datos anteriores son transmitidos por el microprocesador 20 al dispositivo 4 de procesamiento de datos a través del controlador 25 de comunicación externo, donde los datos se almacenan en el disco duro 27d. En el dispositivo 4 de procesamiento de datos, la anchura del citoplasma o núcleo, la relación N/C y similares se calculan basándose en los datos de luz dispersada hacia adelante, los datos de luz dispersada lateralmente, y los datos de fluorescencia lateral.

55 Como fuente 53 de luz, también se puede utilizar un láser de gas en lugar del láser de semiconductor, y se utiliza preferiblemente el láser de semiconductor desde el punto de vista de bajo coste, pequeño tamaño y baja potencia. Con el uso del láser de semiconductor se consigue una reducción del coste del producto así como una miniaturización y un ahorro de potencia eléctrica del dispositivo. En la presente realización, se utiliza un láser de semiconductor azul de longitud de onda corta que tiene como ventaja el estrechamiento del haz. El láser de semiconductor azul también es efectivo debido a una longitud de onda de excitación de fluorescencia tal como PI. Entre los láseres de semiconductor, puede usarse como la fuente 53 de luz un láser de semiconductor rojo que tiene las ventajas de bajo coste, gran duración, y un suministro estable de los fabricantes.

60 En la presente realización, se proporciona la unidad 26 de captura de imágenes además del citómetro 3 de flujo. La unidad 26 de captura de imágenes comprende una fuente 66 de luz de láser pulsado y una cámara 65 CCD tal como se muestra en la Fig. 4. La luz láser del láser 66 pulsado pasa a través del sistema 60 de lentes y entra en la celda 51 de flujo, luego pasa a través de la lente 56 de objetivo y el espejo 61 dicróico para formar una imagen en la

cámara 65. El láser 66 pulsado emite láser según una temporización predeterminada para poder formar una imagen mediante la cámara 65.

5 Como se muestra en la Fig. 2, la imagen de las células capturadas por la cámara 65 es transmitida por el microprocesador 20 al dispositivo 4 de procesamiento de datos a través del controlador 25 de comunicación externo. En el dispositivo 4 de procesamiento de datos, la imagen de las células se asocia entonces a los anteriormente mencionados datos de luz dispersada hacia adelante, datos de luz dispersada lateralmente, y datos de fluorescencia, y se almacena en el disco duro 27d según las células.

10 Método para proporcionar información de oncogénesis

A continuación, se describirá haciendo referencia a la Fig. 5 un ejemplo del método para proporcionar información de oncogénesis utilizando el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la presente realización.

15 En el análisis utilizando el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis, el usuario primero extrae células agregadas de las células (células epiteliales) recogidas de la cervix uterina de las pacientes y lleva a cabo un pretratamiento tal como una tinción PI para preparar una muestra de medida. A continuación, el usuario coloca un tubo de ensayo que contiene la muestra de medida pretratada y la solución conservante que contiene metanol como componente principal en la unidad 50 de colocación de muestras para comenzar el análisis mediante el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis.

20 La extracción de las células agregadas se lleva a cabo para evitar la caída en la precisión del análisis que se produce cuando la cantidad medida de ADN indica un valor anormal cuando se agrega una pluralidad de células aunque la cantidad de ADN sea normal en una célula individual. La extracción de las células agregadas puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, un proceso de combinación de una operación de dispersión que comprende la rotación de un árbol de rotación rotativo dispuesto en una muestra biológica por medio de un motor para dispersar las células de la muestra biológica y una operación de filtrado que comprende hacer pasar la muestra biológica dispersada a través de un filtro para extraer las células agregadas, un proceso de aplicación de vibraciones de ultrasonidos a la muestra biológica, o similar. En este último caso, el choque (fluctuación de presión) asociado a la cavitación en la muestra biológica provocada por las vibraciones ultrasónicas (formación de pequeñas burbujas de aire y rotura de las burbujas de aire) permite la dispersión de las células agregadas.

25 La Fig. 5 es un diagrama de flujo que muestra el procesamiento desde cuando el usuario proporciona una instrucción para iniciar la medida a la CPU 27a del dispositivo 4 de procesamiento de datos hasta cuando se proporciona la información de oncogénesis, que es ejecutado por el microprocesador 20 del dispositivo 2 de medida y la CPU 27a del dispositivo 4 de procesamiento de datos del dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con esta realización. La instrucción de comenzar la medida por el usuario se lleva a cabo después del encendido del dispositivo 4 de procesamiento de datos y de la inicialización del programa de ordenador almacenado en el dispositivo 4 de procesamiento de datos. Cuando el usuario da la instrucción de iniciar la medida a la CPU 27a, la CPU 27a transmite la instrucción del comienzo de la medida al microprocesador 20 del dispositivo 2 de medida. Cuando el microprocesador 20 recibe el orden de comenzar la medida, en el dispositivo 2 de medida, la muestra de medida alojada en el tubo de ensayo es aspirada por la pipeta, alimentada a la celda 51 de flujo mostrada en la Fig. 4, y se forma un flujo de muestra (Paso S1).

30 Las células en la muestra de medida que fluye a través de la celda 51 de flujo son irradiadas con luz láser, la luz dispersada hacia adelante de las células es detectada por el fotodiodo 55, la luz dispersada lateralmente es detectada por el fotomultiplicador 58, y la fluorescencia lateral es detectada por el fotomultiplicador 59.

35 A continuación, la señal de luz dispersada hacia adelante, la señal de luz dispersada lateralmente, y la señal de fluorescencia lateral emitidas por el citómetro 3 de flujo son transmitidas al circuito 5 de procesamiento de señal y sometidas a un procesamiento determinado mediante el circuito 5 de procesamiento de señal para obtener los datos de luz dispersada hacia adelante que muestran la intensidad de la luz dispersada hacia adelante, los datos de la luz dispersada lateralmente que muestran la intensidad de la luz dispersada lateralmente, y los datos de la fluorescencia lateral que muestran la intensidad de la fluorescencia lateral así como el parámetro característico que se describe a continuación (Paso S2).

40 La Fig. 6 es una vista explicativa de los datos de medida que se obtienen en el Paso S2. La Fig. 6 muestra un diagrama del aspecto de una célula que contiene un núcleo, la forma de onda de la señal de luz dispersada hacia adelante obtenida de la célula, y la forma de onda de la señal de fluorescencia lateral. En la Fig. 6, un eje vertical del gráfico representa una intensidad de cada luz. La anchura de la forma de onda de la intensidad de la luz dispersada hacia adelante representa el valor numérico que indica la anchura del citoplasma (el segundo dato es relativo al tamaño del citoplasma). La anchura de la forma de onda de la intensidad de la fluorescencia lateral representa el valor numérico que indica la anchura del núcleo de la célula (el primer dato es relativo al tamaño del núcleo de la célula). En la Fig. 6, el área rayada, que está rodeada por la forma de onda de la intensidad de la fluorescencia lateral y una línea de base predeterminada, representa la cantidad de ADN de la célula. La CPU 27a calcula la

relación N/C en las células que es una relación entre el primer dato y el segundo dato, es decir, una relación entre el tamaño del núcleo de la célula y el tamaño de la célula (= una relación de la anchura de la forma de onda de la señal de fluorescencia lateral y la anchura de la forma de onda de la señal de luz dispersada hacia adelante).

5 Después del Paso S2, el microprocesador 20 transmite los datos de medida incluyendo los datos de luz dispersada hacia adelante, los datos de luz dispersada lateralmente, los datos de fluorescencia lateral, y el parámetro característico obtenido en el Paso S2 al dispositivo 4 de procesamiento de datos a través del controlador 25 de comunicación externa (Paso S3) y termina el procesamiento.

10 Posteriormente, la CPU 27a determina si los datos de medida son recibidos desde el microprocesador 20 (Paso S4). En el Paso S4, cuando la CPU 27a determina que no se han recibido los datos de medida del microprocesador 20 (No en el Paso S4), la CPU 27a repite el procesamiento del Paso S4 hasta que se reciben los datos. Por otro lado, en el Paso S4, cuando la CPU 27a determina que se han recibido los datos del microprocesador 20 (Si en el Paso S4), la CPU 27a avanza el proceso al Paso S5.

15 En el Paso S5, la CPU 27a crea un diagrama de dispersión tal como se muestra en la Fig. 7. El diagrama de dispersión creado puede mostrarse a través de la unidad 28 de pantalla del dispositivo 4 de procesamiento de datos. El eje vertical del diagrama de dispersión representa el tamaño de la célula, y el eje horizontal representa la relación N/C. Cuando se analizan células epiteliales de la cervix uterina de la paciente recogidas de una persona normal mediante el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis, el diagrama de dispersión creado en el Paso S5 se distribuye para formar una forma creciente desde la parte superior izquierda a la inferior derecha, tal como se muestra en la Fig. 7.

20 Entonces, cuando se ha creado el diagrama de dispersión en el Paso S5, la CPU 27a determina si hay o no 5000 (el cuarto umbral) células epiteliales o más en las células obtenidas en los datos de medida obtenidos en el Paso S6. En la presente realización, se realiza la determinación mediante el siguiente método descrito en el Documento de Patente 1.

25 Es decir, se puede llevar a cabo utilizando el momento secundario normalizado del parámetro característico B (valor integrado de diferencia / valor de pico) o el parámetro característico M, que se obtienen a partir de la señal de forma de onda de la luz dispersada hacia adelante. El convertidor A/D (no mostrado) muestra una señal de forma de onda, por ejemplo, en los puntos de tiempo X0, X1, X2, ... y Xn según intervalos de muestreo de 20 nseg, y cuenta las tensiones medidas con una resolución de 8 bits entre una tensión máxima de 10 V y una tensión de línea de base de 0,05 V para convertir las tensiones medidas en señales digitales.

35 El parámetro característico B está representado por la Ecuación (1) siguiente.

Ecuación 1

$$40 \quad B \equiv \sum_{i=1}^n (\max(x_i, x_{i-1}) - \min(x_i, x_{i-1})) \div Pico \dots \dots (1)$$

Aquí, el valor integrado de diferencia es una suma acumulativa de valores absolutos de diferencias entre datos de muestreos vecinos, el valor de pico (Pico) indica el valor máximo de la forma de onda (véase la Fig. 8) y está representado por la Ecuación (2) siguiente.

45 Ecuación 2

$$Pico \equiv \max_{0 \leq i \leq n} (x_i) \dots \dots (2)$$

50 El parámetro característico M está representado por la Ecuación (3) siguiente.

Ecuación 3

$$55 \quad M \equiv \frac{\sum_{i=0}^n (\max(x_i, 0) \cdot (p-i)^2)}{Pico \cdot Anchura^2} \dots \dots (3)$$

donde P es un sufijo que significa que Xp es el valor de pico, la Anchura indica la anchura de una porción de la forma de onda por encima de la banda de base tal como se muestra en la Fig. 8, y se representa por medio de la Ecuación (4) siguiente.

60 Ecuación 4

$$Anchura \equiv \operatorname{argmax}_{p \leq i \leq n} (x_i; x_i > Línea\_de\_base) - \operatorname{argmin}_{p \leq i \leq n} (x_i; x_i > Línea\_de\_base) \dots \dots (4)$$

65 donde P es un sufijo que significa que Xp es el valor de pico. Se establece un umbral para determinar si una célula es o no una célula individual de acuerdo con los experimentos de los parámetros. En la presente realización, por

ejemplo, se utiliza el parámetro característico B. Cuando el parámetro característico B es mayor o igual que 2,2, se determina que la célula es la célula agregada. Cuando el parámetro característico B es menor que 2,2, se determina que la célula es la célula individual. En el caso de utilizar el parámetro característico M, cuando el parámetro característico M es mayor o igual que 2100, se determina que la célula es una célula agregada, cuando el parámetro característico M es menor que 2100, se determina que la célula es la célula individual.

El número (umbral) de "5000" descrito anteriormente es el número que se utilizará generalmente como un indicador que determina la idoneidad del diagnóstico citológico. En la presente realización, el número de "5000" se utiliza como el umbral para asegurar la precisión del análisis.

En el Paso S6, cuando se determina que el número de células individuales es menor que 5000, la CPU 27a no extrae las células a analizar en el Paso S7 que se describe más adelante y pasa al Paso S13. En el Paso S13, la CPU 27a permite que la información de imposibilidad de determinar la muestra de medida preparada en el Paso S1 se muestre en la unidad 28 de pantalla tal como se muestra en la Fig. 9 (Paso S13).

En el Paso S6, cuando se determina que el número de células individuales es mayor o igual que 5000, la CPU 27a extrae datos de medida de las células para su análisis utilizando dos parámetros tales como el tamaño de la célula y la relación N/C (Paso S7).

Extracción de datos de medida de células a analizar (Paso S7)

En los tejidos epiteliales del cérvix uterino y la mucosa oral que principalmente se analizan mediante el método y dispositivo para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención, existe una pluralidad de células en forma de una capa en orden desde la membrana basal. En la presente memoria, cuando se utiliza la membrana basal como una capa inferior, el lado situado en la capa superior indica el lado de la capa superficial. En el cérvix uterino y la mucosa oral, el lado adyacente al exterior corresponde al lado de la capa superficial.

En el cérvix uterino, como se muestra en la Fig. 10, una capa (capa basal) formada por la célula basal, una capa (capa parabasal) formada por la célula parabasal, una capa (capa intermedia) formada por la célula de capa intermedia, y una capa (capa superficial) formada por la célula de capa superficial están formadas en este orden desde el lado de la membrana basal. La célula basal cerca de la membrana basal se diferencia de la célula parabasal, la célula parabasal se diferencia de la célula de capa intermedia, y la célula de capa intermedia se diferencia de la célula de capa superficial. En la mucosa oral, la capa de célula basal, la capa de célula espinosa, la capa de célula granulosa, y la capa córnea están formadas en este orden desde el lado de la membrana basal. Esto se resume en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

	Nombre de célula		Relación N/C	
	Epitelio escamoso de cérvix uterino	Epitelio de mucosa oral	Epitelio escamoso de cérvix uterino	Epitelio de mucosa oral
Lado de capa superficial	Célula de capa superficial Célula de capa intermedia	Capa córnea Célula granulosa  Célula espinosa	Bajo	Bajo
Lado de membrana basal	Célula parabasal Célula basal	Célula basal	Alto	Alto

Como se ha descrito anteriormente, la célula relativa a la oncogénesis de una pluralidad de tipos de células en el tejido epitelial es la célula basal en el tejido epitelial del cérvix uterino, y es la célula basal en el tejido epitelial de la mucosa oral. En el proceso de convertirse en un cáncer, la célula basal adquiere la formación atípica y se convierte en una célula atípica. La célula atípica adquiere la capacidad de proliferar, y ocupa desde el lado de la capa basal al lado de la capa superficial. Por tanto, en el estado inicial de convertirse en un cáncer, existe un gran número de células cancerosas en las células existentes en la capa basal, la capa parabasal, y la capa intermedia en el tejido epidérmico del cérvix uterino. En el tejido epitelial de la mucosa oral, existe un gran número de células cancerosas en las células existentes en la capa de célula basal y la capa de célula espinosa. En contraste, en el estado inicial de convertirse en un cáncer, las células cancerosas son extremadamente pocas en las células existentes en el lado de la capa superficial del tejido epitelial, tal como la capa superficial del tejido epitelial del cérvix uterino y la capa córnea del tejido epitelial de la mucosa oral.

Se ha descubierto que, en el tejido epitelial descrito anteriormente, el tamaño de la célula disminuye secuencialmente pero el tamaño del núcleo de la célula crece secuencialmente desde la capa en el lado de la capa superficial en dirección a la capa en el lado de la membrana basal. Por tanto, la relación N/C del tamaño del núcleo de la célula con respecto del tamaño de la célula también crece secuencialmente desde la capa en el lado de la capa superficial en dirección a la capa en el lado de la membrana basal. En la presente realización, los datos de medida de las células a analizar se extraen usando el tamaño de la célula y la relación N/C. Específicamente, en el

paso S7, se extraen los datos de medida en los que el tamaño de las células está dentro de un rango de 10 a 50  $\mu\text{m}$  y la relación N/C está dentro del rango de 0,2 a 1.

El tamaño de la célula (el segundo valor umbral) y la relación N/C (el primer valor umbral) que se convierten en criterios para determinar si las células extraídas como las células a analizar pueden disponerse para la observación y análisis de muestras de tejidos de acuerdo con el tipo de tejidos epiteliales a analizar. Por ejemplo, en el caso del cribado de carcinoma de cérvix uterino usando el tejido epitelial del cérvix uterino como el tejido a analizar, se pueden usar los criterios de determinación en los que la relación N/C es mayor o igual que 0,2 y la anchura de la célula (el tamaño de la célula) es menor o igual que 50  $\mu\text{m}$ . La forma y tamaño de las células que forman el tejido epitelial del cérvix uterino y el tamaño del núcleo se resumen en la Tabla 2 siguiente. La Fig. 11 muestra las células representadas en unas coordenadas donde el eje horizontal representa la relación N/C y el eje vertical representa el tamaño de la célula.

Tabla 2

Nombre	Forma de célula	Tamaño de citoplasma	Tamaño de núcleo
Célula de capa superficial	Poligonal	50-60 $\mu\text{m}$	5 $\mu\text{m}$
Célula de capa intermedia	Tipo poligonal a ovalado	30-50 $\mu\text{m}$	8 $\mu\text{m}$
Célula parabasal	Tipo ovalado	20 $\mu\text{m}$	9 $\mu\text{m}$
Célula basal	Tipo redondo a ovalado	12-14 $\mu\text{m}$	8-10 $\mu\text{m}$

En la Fig. 11 y la Tabla 2 se descubre que, en el caso del tejido epitelial del cérvix uterino, se extraen las células que tienen una relación N/C de menos o igual que 0,3 y una anchura de célula de menos o igual que 50  $\mu\text{m}$  para excluir casi todas las células de capa superficial existentes en la capa superficial donde las células cancerosas son muy poco numerosas de las células a analizar, y se obtienen la célula de capa intermedia, la célula parabasal, y la célula basal existentes en la capa donde existen un gran número de células cancerosas en comparación con la capa superficial como las células a analizar. En la Fig. 11, un porcentaje de la célula de capa superficial en el número total de células es pequeño para una mejor comprensión. Sin embargo, el número de la célula de capa superficial en el tejido epitelial del cérvix uterino realmente recogidas de un sujeto es más alta que el de otras células. Por tanto, cuando se utilizan todas las células recogidas como las células a analizar, incluso si las células cancerosas están incluidas en las células, su presencia se diluye. Se considera que no se determina necesario para el reexamen (positivo). Es decir, cuando se utilizan todas las células recogidas como las células a analizar, es difícil mejorar la sensibilidad de la detección.

Sin embargo, las células de capa superficial que existen en la capa superficial en la que las células cancerosas son extremadamente escasas se excluyen de las células recogidas, de modo que se excluyen sustancialmente de las células que se analizan. Por tanto, es posible aumentar un porcentaje de las células cancerosas en el número total de células. Como resultado, se puede incrementar la sensibilidad de detección de las células cancerosas.

En el método para proporcionar información de oncogénesis de la presente invención, en el paso de extraer la célula para extraer los datos de medida de las células a analizar, se extraen las células que tienen un cierto nivel alto de la relación N/C incluyendo las células existentes en la capa cercana a la membrana basal. Como hay variaciones en el tamaño y la relación N/C de la célula, en el método de extracción anterior es en realidad imposible excluir únicamente todas las células de la capa superficial de las células a analizar. Pueden extraerse algunas de las células de la capa superficial como células a analizar. Por el contrario, pueden excluirse de las células a analizar algunas de entre la célula de capa intermedia, célula parabasal, y célula basal. Sin embargo, el tamaño y relación N/C de la célula (como el criterio de determinación para la extracción) se seleccionan adecuadamente de modo que casi las células de capa superficial que tienen una alta posibilidad de ser la célula cancerosa pueden excluirse de las células a analizar.

En la presente invención, por ejemplo, en el cérvix uterino, la célula basal, la célula parabasal, y la célula de capa intermedia son extraídas de la población de la célula basal, la célula parabasal, la célula de capa intermedia, y la célula de capa superficial. En la mucosa oral, la célula basal y la célula espinosa son extraídas de la población de la célula basal, la célula espinosa, la célula granulosa, y la célula córnea.

Volviendo al diagrama de flujo de la Fig. 5, en el Paso S7, la CPU 27a extrae los datos de medida de las células que tienen una relación N/C mayor o igual a 0,2 y una anchura de célula menor o igual a 50  $\mu\text{m}$ . Entonces, en el Paso S8 la CPU 27a determina si el número de células que tienen una relación N/C mayor o igual que 0,2 y una anchura de célula menor o igual que 50  $\mu\text{m}$  es mayor o igual que 1000 (el tercer umbral). Cuando al CPU 27a determina que el número de células que tienen una relación N/C mayor o igual que 0,2 y una anchura de célula menor o igual que 50  $\mu\text{m}$  es mayor o igual que 1000 (Si en el Paso S8), la CPU 27a continua el procesamiento al Paso S9 y crea un histograma que se describirá más abajo (un histograma de la cantidad de ADN) en el Paso S9. Por otro lado, cuando la CPU 27a determina que el número de células que tiene una relación N/C mayor o igual que 0,2 y una anchura de célula menor o igual que 50  $\mu\text{m}$  es menor que 1000 en el Paso S8 (Ni en el Paso S8), la CPU 27a no lleva a cabo los Pasos S11 y S12 que se describen a continuación y pasa al Paso S13. En el Paso S13, la CPU 27a muestra información de la imposibilidad de determinar la muestra de medida preparada en el Paso S1 en la unidad 28 de

pantalla, como se muestra en la Fig. 9 (Paso S13). El valor (el tercer umbral) de 1000 es un valor seleccionado mediante diversos tipos de experimentos y verificaciones, teniendo en cuenta la precisión y fiabilidad del análisis, y no está particularmente limitado en la presente invención.

5 La Fig. 12 muestra un ejemplo del histograma que se crea en el Paso S9. La Fig. 12 muestra el histograma creado para las células que tienen una relación N/C mayor o igual que 0,2 y una anchura de célula menor o igual que 50  $\mu\text{m}$  extraídas en el Paso S7. El eje vertical representa el número de células, y el eje horizontal representa la cantidad de ADN de las células. El rango que indica la cantidad normal de ADN (aquí referido como "2C") se calcula a partir de los datos de muchas muestras negativas. En esta realización, el rango que indica la cantidad normal de ADN se establece como el rango que va desde a hasta b. El rango de la cantidad anormal de ADN (aquí referido como "mayor o igual que el período S") se establece como el rango mayor que la cantidad normal de ADN, y se ajusta al rango mayor que b y menor o igual que c. El rango de la cantidad normal de ADN y el rango de la cantidad anormal de ADN no están particularmente limitados en la presente invención, y están formados por valores seleccionados a través de diversos tipos de experimentos y verificaciones, teniendo en cuenta la precisión y fiabilidad del análisis.

15 La célula se convierte en dos células y vuelve al punto de inicio a través de eventos tales como la replicación de ADN, distribución de cromosoma, división nuclear, y división de citoplasma de acuerdo con un cierto ciclo (ciclo de célula), tal como se describe en la Fig. 13. El ciclo de la célula puede dividirse en los siguientes cuatro períodos de acuerdo con la etapa. Si se añade a los cuatro períodos un período G0 (período de descanso) en el que la proliferación de la célula está en descanso, la célula está en una de las etapas de los cinco períodos. Período G1 (tiempo de preparación e inspección para entrar en el período S); período S (período de síntesis de ADN); período G2 (tiempo de preparación e inspección para entrar en el período M); y período M (período mitótico).

20 Cuando la célula prolifera de acuerdo con el ciclo de la célula, el cromosoma del núcleo de la célula también aumenta, y por tanto puede estimarse en qué estado del ciclo de la célula está la célula mediante la medida de la cantidad de ADN en la célula. En el caso de una célula normal, la cantidad de ADN en el período G1 es un valor constante, la cantidad de ADN aumenta gradualmente en el siguiente período S, la cantidad de ADN es un valor constante en el período G2, y dicho valor se mantiene en el período M, como se muestra en la Fig. 14. Cuando se crea un histograma de la cantidad de ADN para la célula normal, se obtiene el histograma mostrado en la Fig. 13. Una colina que presenta el pico más alto corresponde a la célula en el período G0 o G1 en el que la cantidad de ADN es la mínima, una colina que tiene el segundo pico más alto corresponde a la célula en el período G2 o M en el que la cantidad de ADN es la máxima, y un período entre ellas corresponde a la célula en el período S.

25 En el caso de células normales, una relación del número de células en el estado del período S, el período G2 o M y el número de células en el período G0 o G1 es un valor que está dentro de un rango constante. Sin embargo, en el caso de células cancerosas o células en el proceso de oncogénesis, el número de cromosomas de la célula crece anormalmente, y por tanto la cantidad de ADN aumenta. Como la capacidad de proliferación de las células cancerosas es mayor que la de las células normales, el número de células que tienen una gran cantidad de ADN aumenta.

30 El número de la célula normal en el período G0 o el período G1 se usa como criterio, y la relación del número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal con respecto de este número de célula se usa como criterio de determinación, de modo que es posible estimar si las células que se analizan son células cancerosas. Específicamente, en el histograma de la cantidad de ADN mostrado en la Fig. 12, la colina en el lado más a la izquierda corresponde a la célula normal en el período G0 o el período G1 cuando la cantidad de ADN es baja, y las tres colinas en el lado derecho corresponden a la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal en el período G0 o el período G1. Se considera que las tres colinas en el lado derecho corresponden a la célula en el período S mostrado en la Fig. 13 (las dos colinas en el centro) o la célula en el período G2/M (la colina en el lado más a la derecha). Si las células cancerosas se incluyen en las células a analizar, las células cancerosas también estarán incluidas en las dos colinas. El número de células cancerosas aumenta, y por tanto se considera que las tres colinas se hacen más altas. En la Fig. 12, se ilustra el ejemplo con las tres colinas para una mejor comprensión. Cuando se crea un histograma de la cantidad de ADN en el tejido epitelial del cérvix uterino realmente recogido por un sujeto, la formación de las colinas depende del estado del sujeto.

35 Entonces, se puede seleccionar la relación que se utilizará como criterio de determinación mediante la realización de experimentos y verificación utilizando una pluralidad de muestras clínicas que contienen muestras positivas y negativas. En la presente realización, desde el punto de vista de obtener una sensibilidad mayor o igual al 90%, el criterio de determinación es si la relación del número de célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (la célula en el rango que indica la cantidad de ADN anormal) con respecto del número de la célula normal en el período G0 o el período G1 (la célula en el rango que indica la cantidad de ADN normal) es mayor o igual al 16% (el quinto umbral). Es decir, se establece un valor de corte del 16% para determinar si es necesario un reexamen de la muestra (positivo) o si no es necesario un reexamen de la muestra (negativo). El valor de corte (16%) no está particularmente limitado en la presente invención. Puede ajustarse adecuadamente teniendo en cuenta un equilibrio entre la sensibilidad del test clínico y la especificidad.

65

En el Paso S10, cuando se determina que una relación del número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (segundo grupo) con respecto del número de la célula en el rango que indica la cantidad normal de ADN (primer grupo) es mayor o igual que 16% (Si en el Paso S10), se determina que la muestra de medida utilizada para el análisis debe ser reexaminada (positivo) en el Paso S11. El resultado se muestra a través de la unidad 28 de pantalla del dispositivo 4 de procesamiento de datos, tal como se muestra en la Fig. 15. Por otro lado, en el Paso S10, cuando se determina que la relación es menor que el 16% (No en el Paso S10), se determina que no es necesario que la muestra de medida utilizada para el análisis sea reexaminada (negativo) en el Paso S10. El resultado se muestra a través de la unidad 28 de pantalla del dispositivo 4 de procesamiento de datos, como se muestra en la Fig. 16.

La Fig. 17 es un histograma creado cuando las células recogidas del tejido epitelial del cérvix uterino de un sujeto de CIN3 (estado diagnosticado como el estado inicial a convertirse en un cáncer en la diagnosis del tejido) son analizadas en el dispositivo que crea un histograma de la cantidad de ADN de todas las células epiteliales individuales sin ejecutar la extracción de datos de medida de las células a analizar (Paso S7) y el Paso S8 y crea un histograma de la cantidad de ADN de todas las células epiteliales individuales, en el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 18 es un histograma creado cuando las células recogidas del tejido epitelial del cérvix uterino de un sujeto de NILM (estado diagnosticado como Normal en el diagnóstico citológico) son analizadas en el dispositivo que crea un histograma de la cantidad de ADN en todas las células epiteliales individuales sin ejecutar la extracción de datos de medida de las células a analizar (Paso S7) y el Paso S8 y crea un histograma de la cantidad de ADN de todas las células epiteliales individuales, en el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 19 es un histograma creado en el Paso S9 cuando las células recogidas del tejido epitelial del cérvix uterino de un sujeto de CIN3 (estado diagnosticado como el estado inicial a convertirse en un cáncer en la diagnosis del tejido) son analizadas en el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con una realización de la presente invención. La Fig. 20 es un histograma creado en el Paso S9 cuando las células recogidas del tejido epitelial del cérvix uterino de un sujeto de NILM (estado diagnosticado como Normal en el diagnóstico citológico) son analizadas en el dispositivo 1 para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con una realización de la presente invención.

Cuando se calcula el número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (mayor o igual que el período S) con respecto del número de la célula en el rango (2C) que indica la cantidad normal de ADN basándose en el histograma de la Fig. 17, se obtiene el 3,2%. Cuando se calcula el número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (mayor o igual que el período S) con respecto del número de la célula en el rango (2C) que indica la cantidad normal de ADN basándose en el histograma de la Fig. 18, se obtiene el 1,1%. Esto muestra que, cuando se crea un histograma de la cantidad de ADN de todas las células epiteliales individuales sin ejecutar la extracción de los datos de medida de las células a analizar (Paso S7) y el Paso S8, es poco probable que se obtenga una gran diferencia entre el sujeto de CIN3 y el sujeto de NILM en la relación del número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (mayor o igual que el período S) con respecto del número de la célula en el rango (2C) que indica la cantidad normal de ADN.

Por otro lado, cuando se calcula el número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (mayor o igual que el período S) con respecto del número de la célula en el rango (2C) que indica la cantidad normal de ADN basándose en el histograma de la Fig. 19, se obtiene el 57,9%. Cuando se calcula el número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (mayor o igual que el período S) con respecto del número de la célula en el rango (2C) que indica la cantidad normal de ADN basándose en el histograma de la Fig.20, se obtiene el 7,4%. Esto muestra que cuando se ejecuta la extracción de datos de medida de células que se van a analizar (Paso S7) y el paso S8 para crear un histograma de la cantidad de ADN, es probable que esto dé como resultado una gran diferencia entre el sujeto de CIN3 y el sujeto de NILM en la relación el número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal (mayor o igual que el período S) con respecto del número de la célula en el rango (2C) que indica la cantidad normal de ADN. Cuando el umbral de corte para determinar si es necesario un reexamen de la muestra (positivo) o no es necesario un reexamen de la muestra (negativo) se establece en el 16%, como se describe en la presente invención, se determina que el sujeto de CIN3 requiere un reexamen (positivo) y se determina que el sujeto de NILM no requiere un reexamen (negativo). El resultado concuerda con la determinación del tejido o diagnóstico citológico.

Otros ejemplos modificados

Las realizaciones descritas son ilustrativas y no restrictivas en todos los aspectos. El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas y no por las realizaciones, y están incluidas en este documento todos los cambios que estén dentro del significado y alcance equivalente al alcance de las reivindicaciones.

Por ejemplo, en la realización que se ha descrito anteriormente, se obtiene la anchura de la forma de onda de la intensidad de la luz dispersada hacia adelante como el dato que representa el tamaño de la célula. Puede ser el pico de la forma de onda de la intensidad de la luz dispersada hacia adelante o el área de la región rodeada por la forma de onda de la intensidad de la luz dispersada hacia adelante y una línea de base predeterminada. En la realización descrita anteriormente, se obtiene la anchura de la forma de onda de la intensidad de la fluorescencia lateral como el dato que representa el tamaño del núcleo de la célula. Puede ser el pico de la forma de onda de la intensidad de la fluorescencia lateral o el área de la región rodeada por la forma de onda de la intensidad de la fluorescencia lateral y una línea de base predeterminada.

En la realización descrita anteriormente, cuando se determina "NO" en el Paso S6, se emite la información de imposibilidad de determinación, y no se lleva a cabo el procesamiento del Paso S11 y el paso S12. Sin embargo, la presente invención no está limitada a esto. En la presente invención, incluso cuando se determina "NO" en el Paso S6, se ejecuta el procesamiento posterior al Paso S7, se añade información sobre un número de célula inferior al resultado de la determinación que se emite en el Paso S11 o el Paso S12, y se puede emitir el resultado. En la realización que se ha descrito anteriormente, cuando se determina "NO" en el Paso S8, se emite la información de imposibilidad de determinación, y no se lleva a cabo el procesamiento del Paso S11 y el Paso S12. Sin embargo, la presente invención no está limitada a esto. En la presente invención, incluso cuando se determina "NO" en el Paso S8, se ejecuta el procesamiento posterior al Paso S9, se añade información sobre un número inferior de célula al resultado de la determinación que se emite en el Paso S11 o el Paso S12, y se puede emitir el resultado.

En la realización que se ha descrito anteriormente, se obtiene la anchura del núcleo de la célula, la cantidad de ADN de la célula, y los datos correspondientes a la anchura del citoplasma utilizando la información óptica obtenida por el citómetro de flujo. La anchura del núcleo de la célula, la cantidad de ADN de la célula, y los datos correspondientes a la anchura del citoplasma pueden obtenerse analizando la imagen de la célula capturada por la unidad de captura de imágenes.

En la realización que se ha descrito anteriormente, se usa el histograma que se muestra en la Fig. 12 y se usa la relación del número de la célula que tiene la cantidad de ADN mayor que la cantidad de ADN de la célula normal con respecto del número de la célula normal en el período G0 o el período G1 como el criterio de determinación para analizar las células extraídas. En lugar del análisis usando el histograma, las células pueden analizarse usando el diagrama de dispersión mostrado en la Fig. 7. Específicamente, en el diagrama de dispersión de la Fig. 7, basándose en una relación de las células que pertenecen a la región donde aparecen la célula de capa intermedia, célula parabasal, y célula basal (región rodeada por un triángulo en un cuadrángulo de la Fig. 7) con respecto de las células que pertenecen a la región donde aparecen las células cancerosas (región que excluye la región triangular del cuadrángulo), puede determinarse si la muestra de medida debe ser reexaminada (positivo) o no debe ser reexaminada (negativo). La región en el cuadrángulo es una región donde aparecen las células extraídas usando parámetros tales como el tamaño de la célula y la relación N/C. En la región triangular anterior, puede establecerse un punto R donde el lado del triángulo corta el eje horizontal mediante experimentos y verificación utilizando una pluralidad de muestras clínicas que contienen muestras positivas y negativas. La región excepto por la región triangular en el cuadrángulo es una región donde aparecen las células que tienen una cantidad de ADN anormalmente alta. Cuando la relación de las células que pertenecen a esta región es mayor o igual que un valor predeterminado, se puede determinar que la muestra de medida debe ser reexaminada (positivo).

En la realización descrita anteriormente, se utiliza la relación de la anchura del núcleo de la célula / la anchura del citoplasma como la relación N/C, y se puede utilizar la relación del área del núcleo de la célula / el área del citoplasma como la relación N/C.

En la realización descrita anteriormente, en el proceso de extraer las células que se van a analizar, se extrae la célula de capa intermedia, la célula parabasal, y la célula basal. Sin embargo, la presente invención no está limitada a esto y es suficiente con que contenga algunas de las células situadas en dirección al lado de la capa basal de las células de la capa superficial. Específicamente, por ejemplo, puede extraerse la célula parabasal y la célula basal, puede extraerse la célula intermedia y la célula parabasal, puede extraerse solo la célula de capa intermedia, puede extraerse sólo la célula parabasal, o puede extraerse sólo la célula basal. Además de la célula de capa intermedia, puede incluirse en la célula a extraer una parte de la célula de capa superficial.

En la realización descrita anteriormente, se usan como los parámetros para la extracción tanto la relación N/C como la anchura del citoplasma. Sin embargo puede usarse como el parámetro para la extracción solo la relación N/C. En este caso, se reduce ligeramente la sensibilidad de detección de las células cancerosas. La velocidad del análisis puede aumentar excluyendo la anchura del citoplasma del parámetro para extracción. Como se muestra en la Fig. 7, cuando el eje horizontal representa la relación N/C y el eje vertical representa la anchura del citoplasma, las células de la muestra de medida se distribuyen para formar una forma creciente desde la parte superior izquierda a la parte inferior derecha. Por tanto, se selecciona adecuadamente la relación N/C como el valor de corte de modo que es posible extraer las células casi en el mismo número que cuando se usan como los parámetros tanto la relación N/C como la anchura del citoplasma.

En las realizaciones que se han descrito anteriormente, se usan las células epiteliales del cérvix uterino como las células a analizar, y se pueden utilizar como células a analizar células de otros lugares, tal como la cavidad oral.

**Descripción de símbolos de referencia**

- 5 1: Aparato para proporcionar información de oncogénesis
- 2: Dispositivo de medida
- 3: Citómetro de flujo (unidad de detección óptica)
- 4: Dispositivo de procesamiento de datos
- 10 5: Circuito de procesamiento de señal
- 16: Unidad de control de medida
- 17: Unidad de accionamiento
- 18: Sensor
- 20: Microprocesador
- 15 25: Controlador de comunicación externa
- 26: Unidad de captura de imágenes
- 27: Cuerpo principal
- 27a: CPU
- 28: Unidad de pantalla
- 20 29: Unidad de entrada
- 51: Celda de flujo

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para proporcionar información de oncogénesis para proporcionar información relativa a la oncogénesis de células, llevándose a cabo el método por medio de un dispositivo para proporcionar información de oncogénesis, comprendiendo el método:
  - 5 adquirir (S2) datos de medida que incluyen primeros datos relativos al tamaño del núcleo de una célula y segundos datos relativos al tamaño del citoplasma para cada célula contenida en la muestra de medida que incluye células recogidas del tejido epitelial;
  - 10 extraer (S7) los datos de medida de células a analizar, donde dichas células son al menos algunas de las células situadas en dirección al lado de la membrana basal de las células existentes en la capa superficial del tejido epitelial, a partir de los datos de medida de una pluralidad de células en la muestra de medida basándose en los primeros datos y los segundos datos adquiridos para cada célula de modo que las células existentes en la capa superficial donde la cantidad de ADN no es anormal son sustancialmente excluidas; y
  - 15 donde analizar (S10) los datos de medida extraídos y emitir la información relativa a la oncogénesis de las células,
    - el primer dato es un valor numérico que indica el tamaño del núcleo de la célula, el segundo dato es un valor numérico que indica el tamaño del citoplasma, y
    - el paso de extraer (S7) los datos comprende:
      - 20 calcular una relación del primer dato y el segundo dato para cada célula contenida en la muestra de medida; y
      - extraer los datos de medida de la célula a analizar basándose en la relación calculada.
  
2. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso de extraer los datos comprende:
  - 25 extraer los datos medidos de la célula a analizar mediante la comparación de la relación calculada con un primer valor umbral.
  
3. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde el paso de extraer los datos comprende:
  - 30 extraer los datos de medida de la célula a analizar basándose en la relación calculada y el segundo dato.
  
4. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 3, donde el paso de extraer los datos comprende:
  - 35 extraer los datos de medida de la célula en la que el segundo dato es menor o igual que un segundo valor umbral como los datos de medida de la célula a analizar.
  
5. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso de adquirir los datos comprende:
  - 40 adquirir una señal de luz dispersada que indica la intensidad de la luz dispersada y una señal fluorescente que indica la intensidad de la fluorescencia, que se generan mediante la irradiación de la muestra medida con luz, donde
    - 45 el primer dato es un dato relativo al tamaño del núcleo de la célula basándose en la forma de onda de la señal fluorescente adquirida mediante el paso de adquisición de la señal y el segundo dato es un dato relativo al tamaño del citoplasma basándose en la forma de onda de la señal de luz dispersada adquirida mediante el paso de adquisición de la señal.
  
6. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso de emitir la información comprende:
  - 50 calcular el valor que refleja la cantidad de ADN en las células extraídas como las células a analizar en el paso de extracción de los datos; y
  - determinar la información relativa a la oncogénesis de células basándose en el valor calculado.
  
7. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 6, donde el paso de emitir la información comprende:
  - 55 clasificar las células extraídas como las células a analizar en un primer grupo en el que se indica la cantidad normal de ADN y un segundo grupo en el que la cantidad de ADN es mayor que el rango que indica la cantidad normal de ADN basándose en el valor que refleja la cantidad de ADN;
  - 60 calcular una relación de un número de las células en el primer grupo y un número de las células en el segundo grupo; y
  - determinar la información relativa a la oncogénesis de las células basándose en la relación calculada.
  
8. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:
  - comparar un número de las células extraídas como las células a analizar con un tercer umbral; y

cuando el número de las células es menor que el tercer umbral, omitir la emisión de la información relativa a la oncogénesis de las células, o bien emitir la información relativa a la oncogénesis de las células además de información que indica que el número de células es pequeño.

- 5 9. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:  
dispersar células agregadas en la muestra de medida antes del paso de adquirir los datos.
- 10 10. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:  
comparar un número de células epiteliales individuales con un cuarto umbral; y  
cuando el número de células epiteliales individuales es menor que un cuarto umbral, omitir la emisión de la información relativa a la oncogénesis de las células, o emitir la información relativa a la oncogénesis de las células además de información que indica que el número de células es pequeño.
- 15 11. El método para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paso de emitir la información comprende:  
emitir la información relativa a si es necesario o no el reexamen como la información relativa a la oncogénesis de las células.
- 20 12. Un dispositivo para proporcionar información de oncogénesis para proporcionar información relativa a la oncogénesis de unas células, que comprende:  
una unidad (27) de adquisición de datos que está configurada para adquirir datos de medida que incluyen primeros datos relativos al tamaño del núcleo de una célula y segundos datos relativos al tamaño del citoplasma de una célula para cada célula contenida en una muestra de medida que incluye células recogidas del tejido epitelial; y  
un controlador (27) configurado para  
extraer los datos de medida de las células a analizar, donde dichas células son al menos algunas de las células situadas en dirección al lado de la membrana basal de las células existentes en la capa superficial en el tejido epitelial, a partir de los datos de medida de una pluralidad de células en la muestra de medida basándose en los primeros datos y los segundos datos adquiridos para cada célula de modo que las células existentes en la capa superficial en las que la cantidad de ADN no es anormal son sustancialmente excluidas;  
analizar los datos de medida extraídos; y  
emitir la información relativa a la oncogénesis de las células, donde  
el primer dato es un valor numérico que indica el tamaño del núcleo de la célula, el segundo dato es un  
35 valor numérico que indica el tamaño del citoplasma, y  
el controlador (27) está además configurado para:  
calcular una relación del primer dato y el segundo dato para cada célula contenida en la muestra de medida; y  
extraer los datos de medida de la célula a analizar basándose en la relación calculada.
- 40 13. El dispositivo para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 12, que además comprende:  
una celda de flujo a través de la cual fluye la muestra de medida; y  
una unidad de adquisición de información óptica configurada para irradiar la muestra de medida que fluye a  
45 través de la celda de flujo con luz y adquirir información óptica de las células contenidas en la muestra de medida, donde  
la unidad de adquisición de datos está configurada para adquirir los primeros datos y los segundos datos basándose en la información óptica.
- 50 14. El dispositivo para proporcionar información de oncogénesis de acuerdo con la reivindicación 13, que además comprende:  
una unidad (26) de captura de imágenes configurada para capturar una imagen de las células contenidas en la muestra de medida que fluye a través de la celda de flujo, donde  
el primer dato es un área del núcleo de la célula capturada por la unidad (26) de captura de imágenes y el  
55 segundo dato es un área del citoplasma capturada por la unidad (26) de captura de imágenes.

FIG. 1

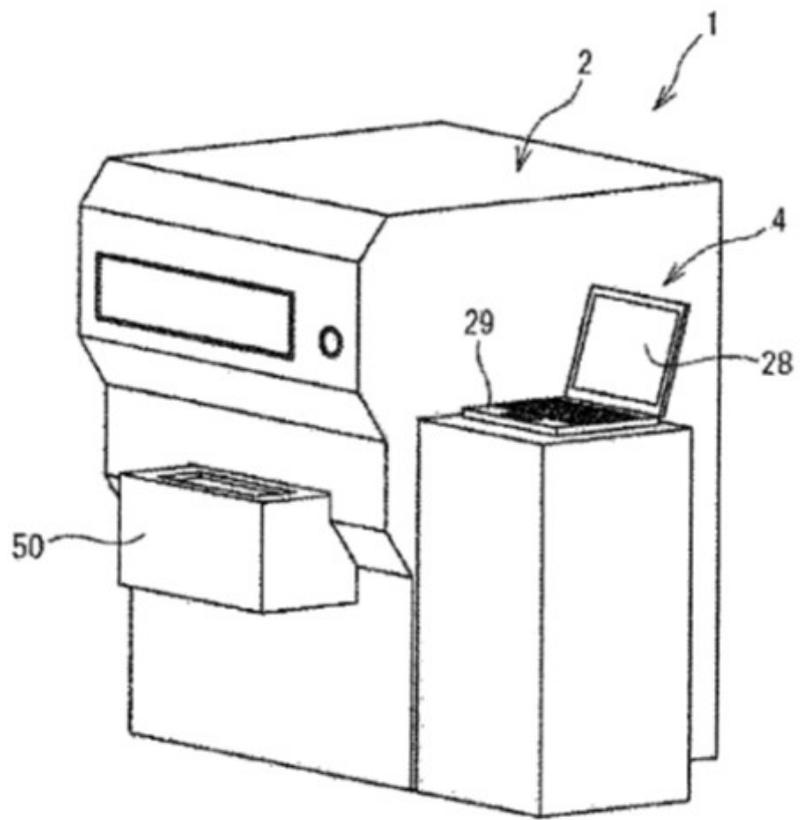


FIG. 2

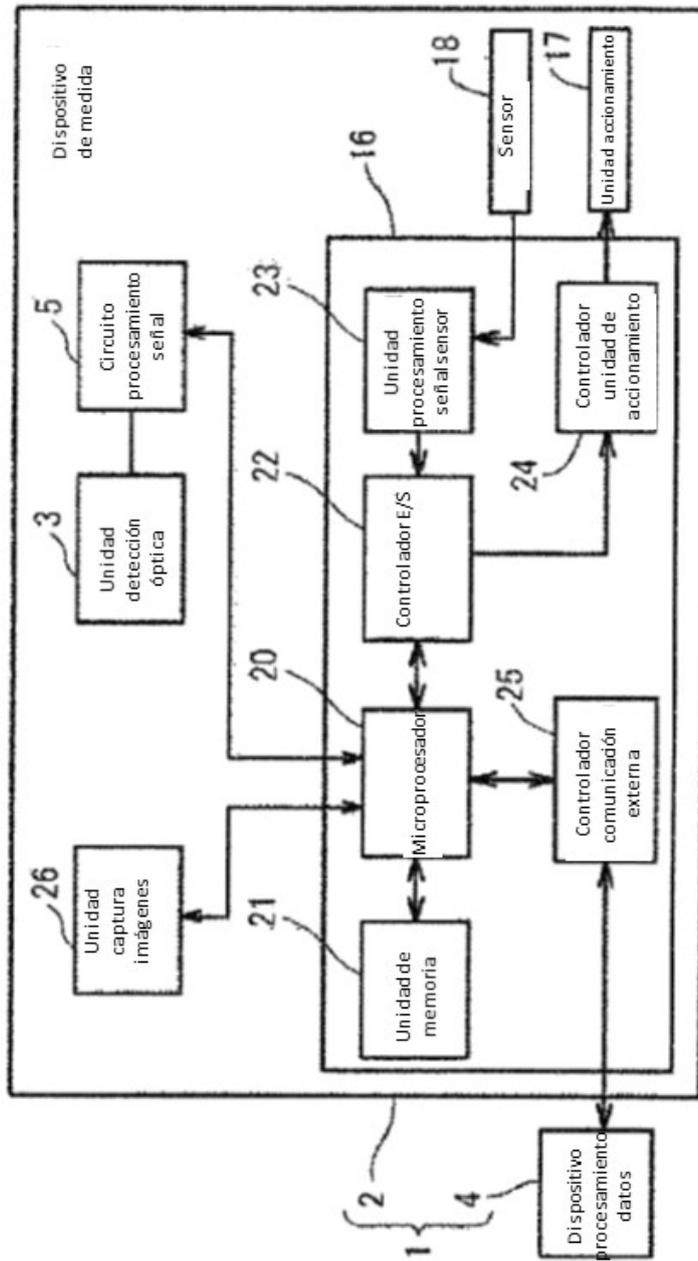


FIG. 3

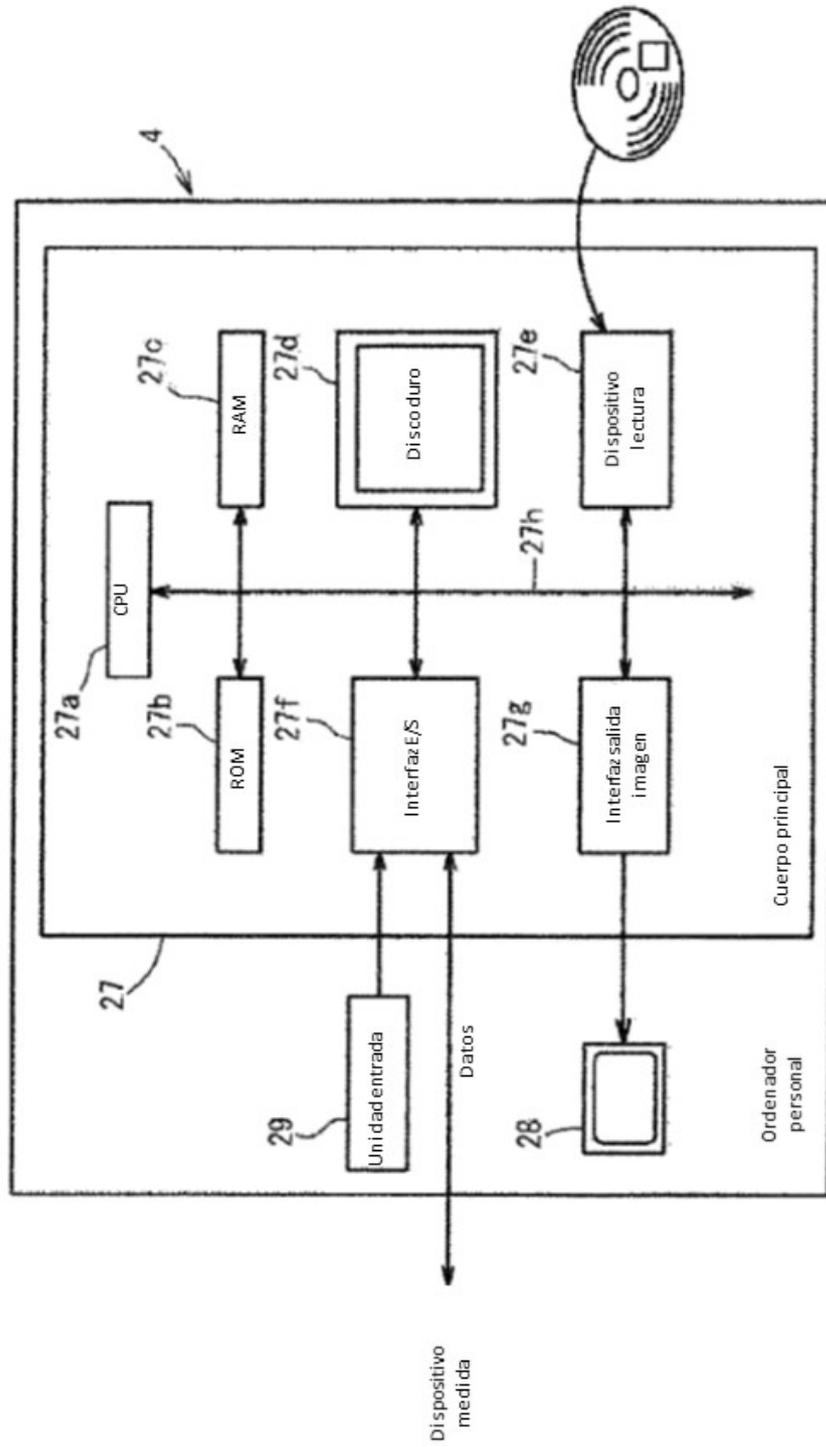


FIG. 4

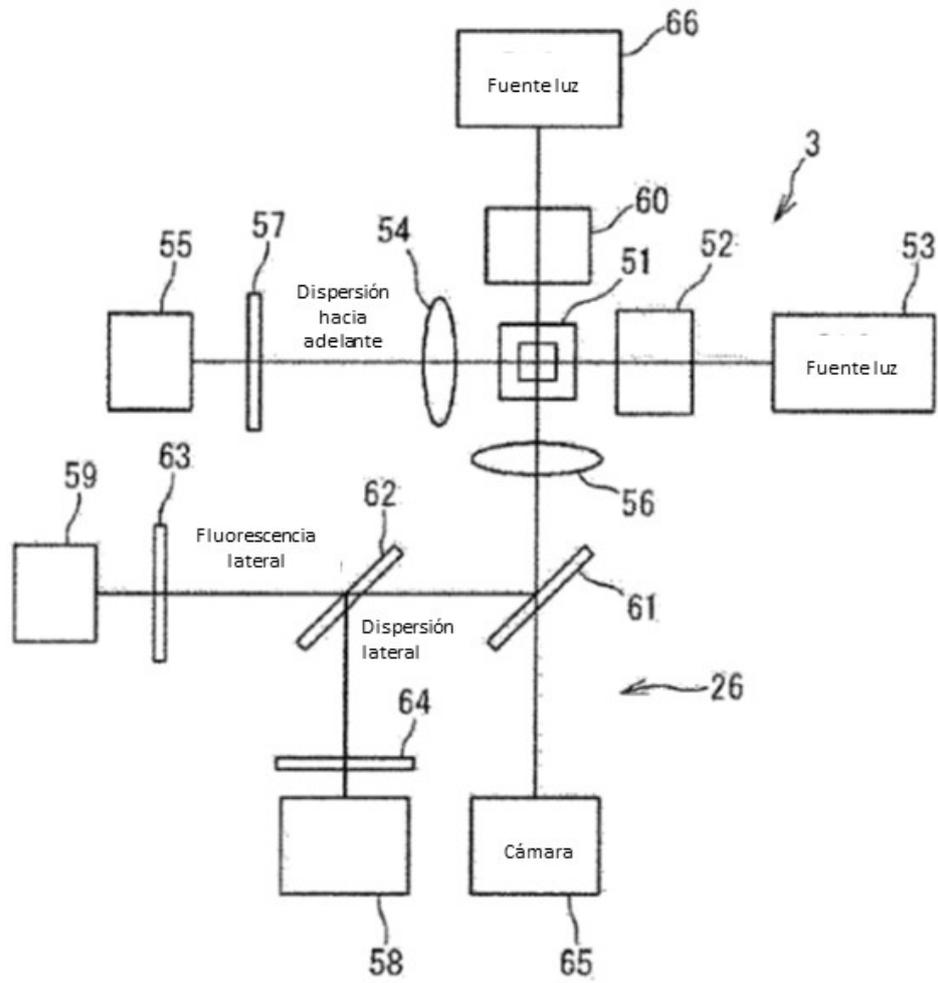


FIG. 5

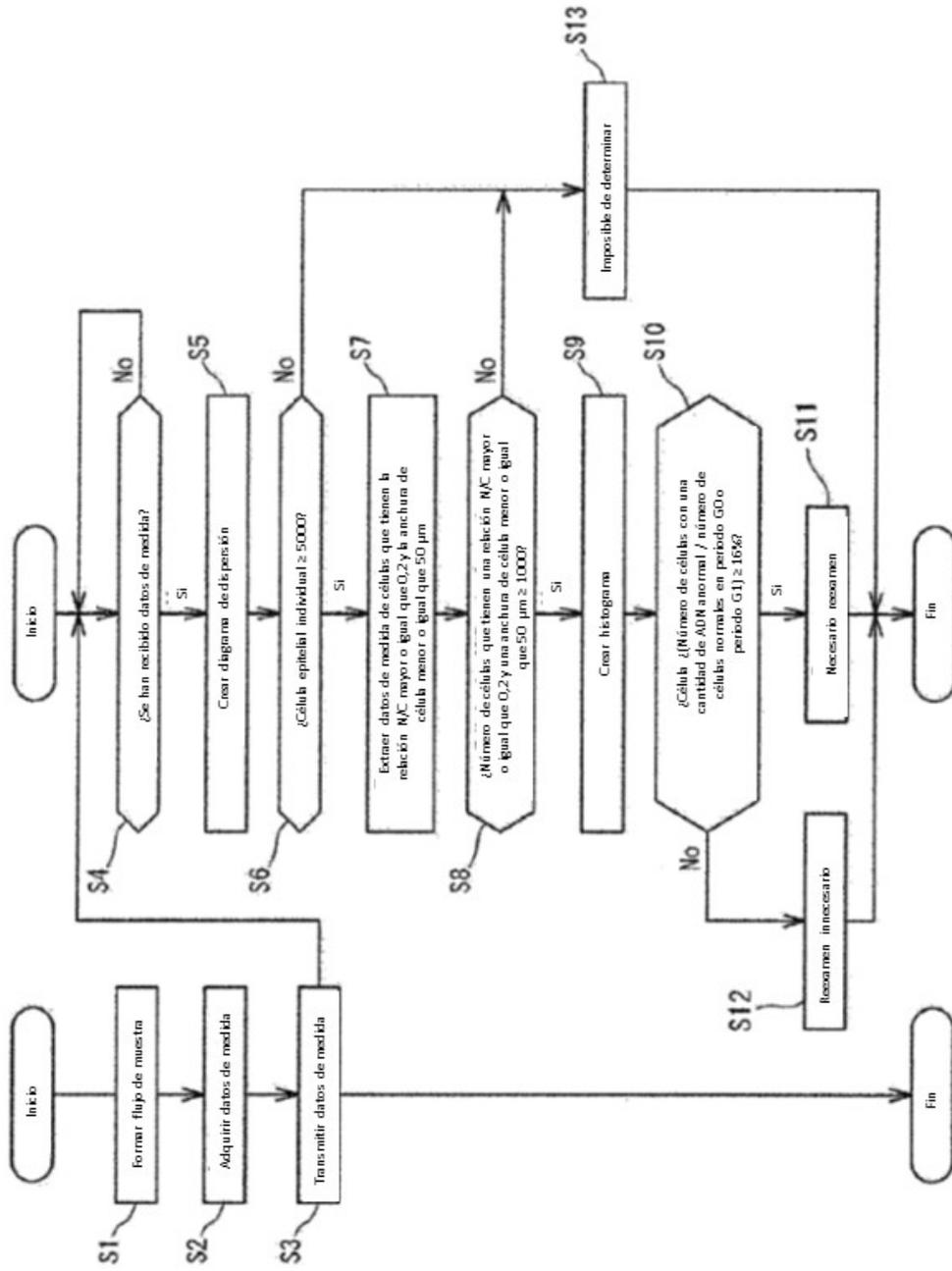


FIG. 6

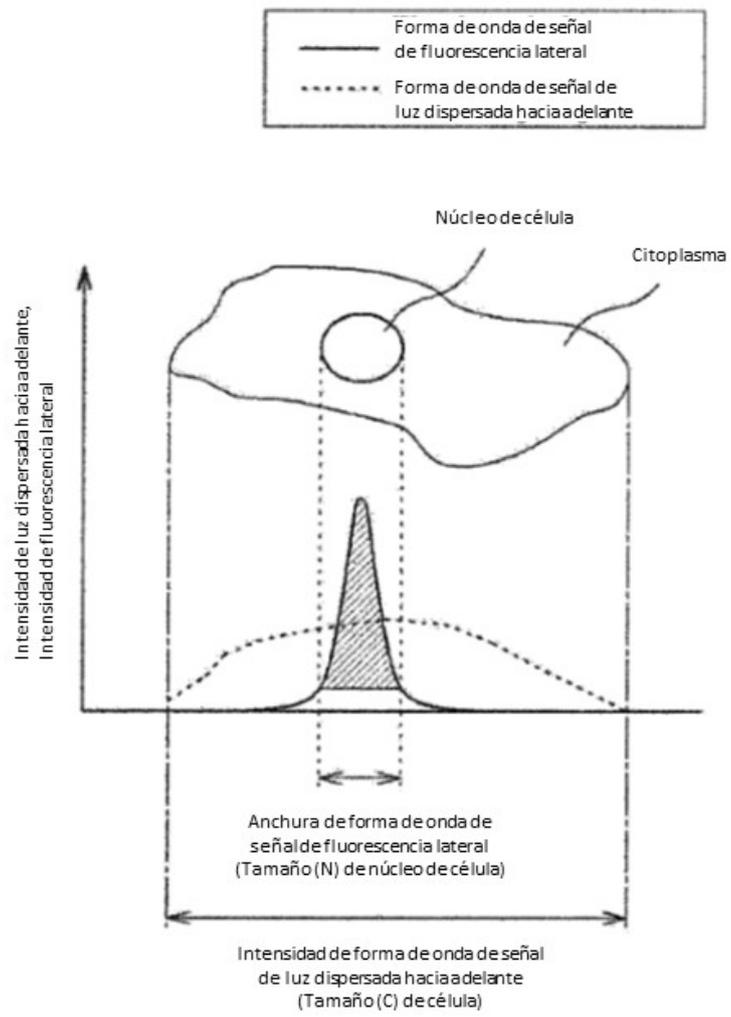


FIG. 7

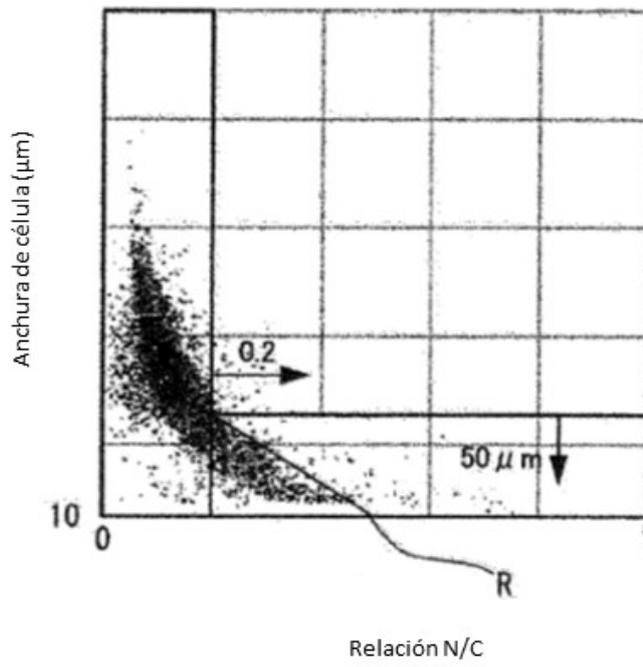


FIG. 8

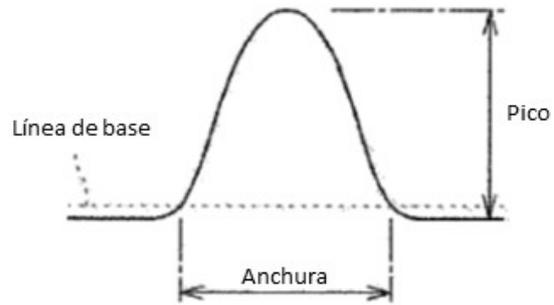


FIG. 9



FIG. 10

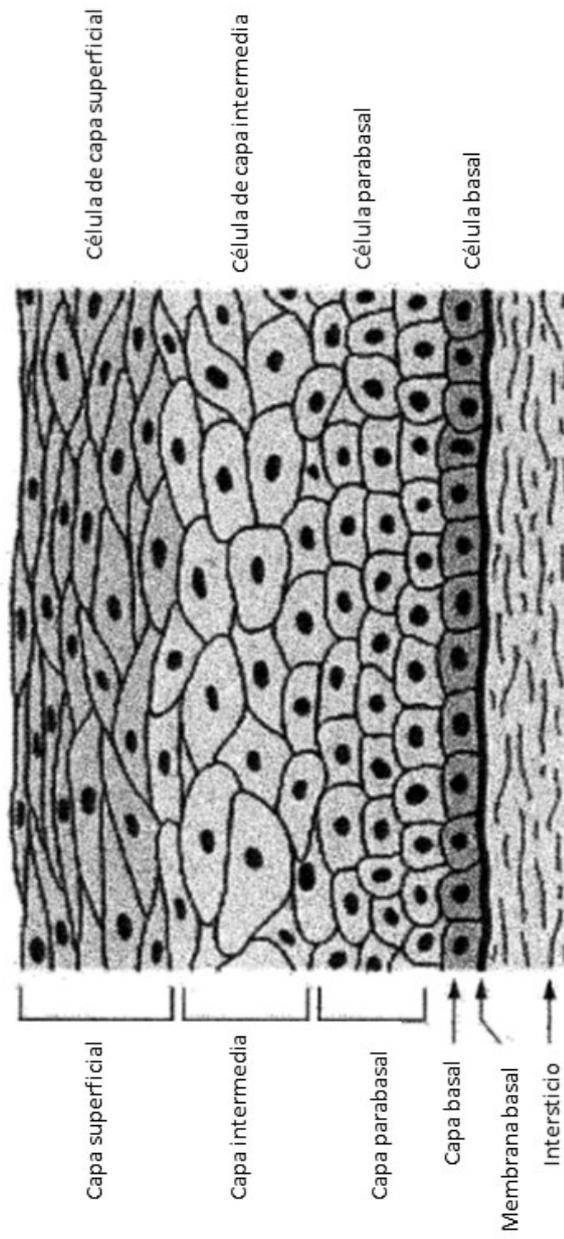


FIG. 11

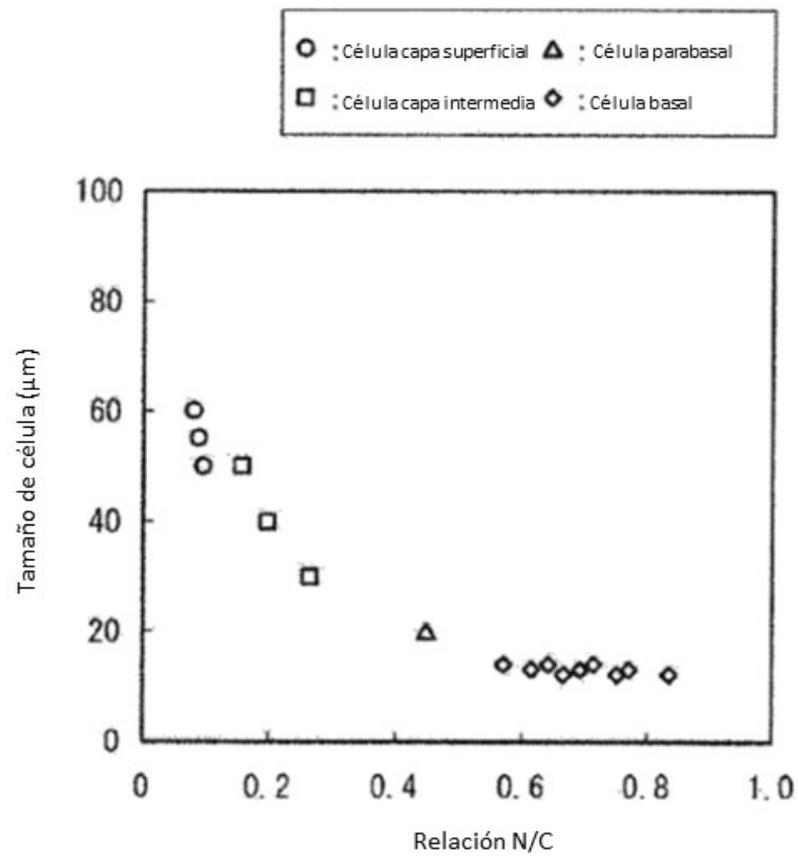


FIG. 12

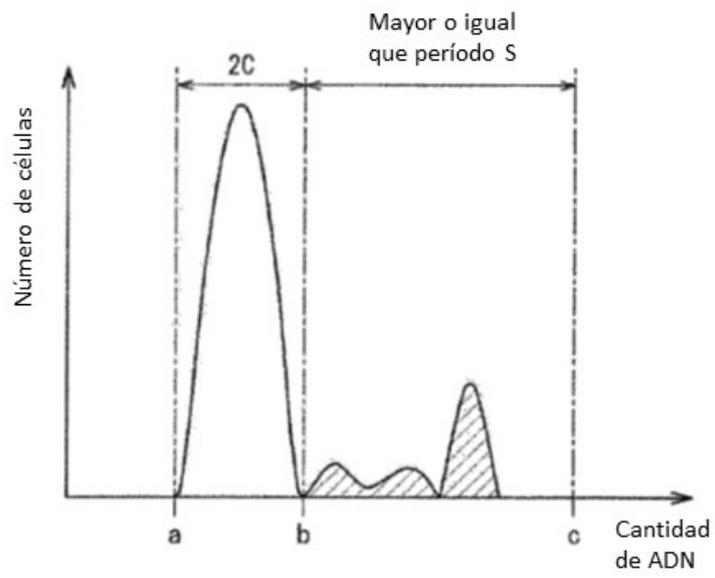


FIG. 13

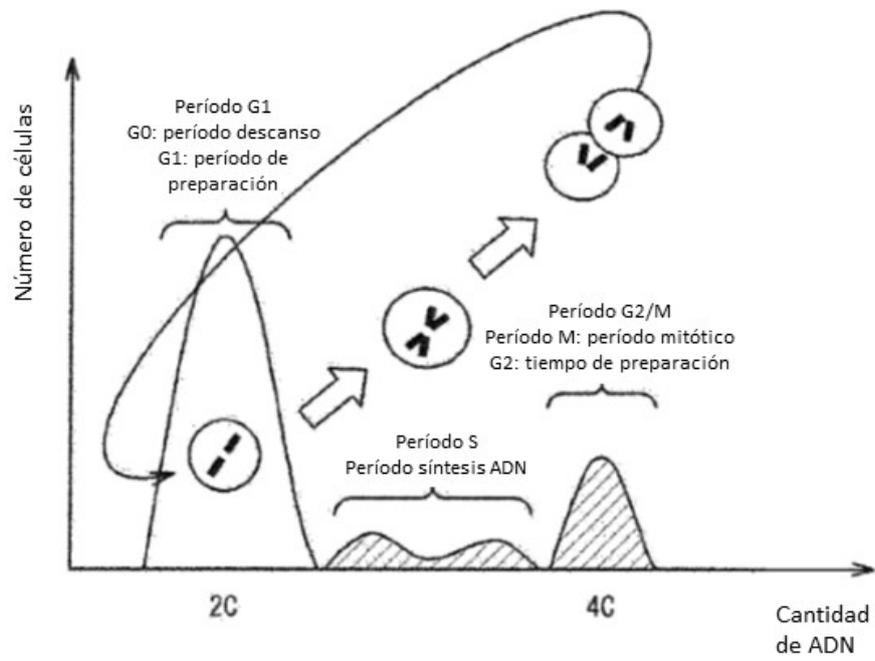


FIG. 14

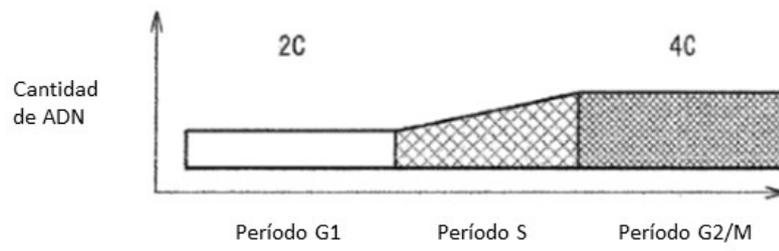


FIG. 15



FIG. 16



FIG. 17

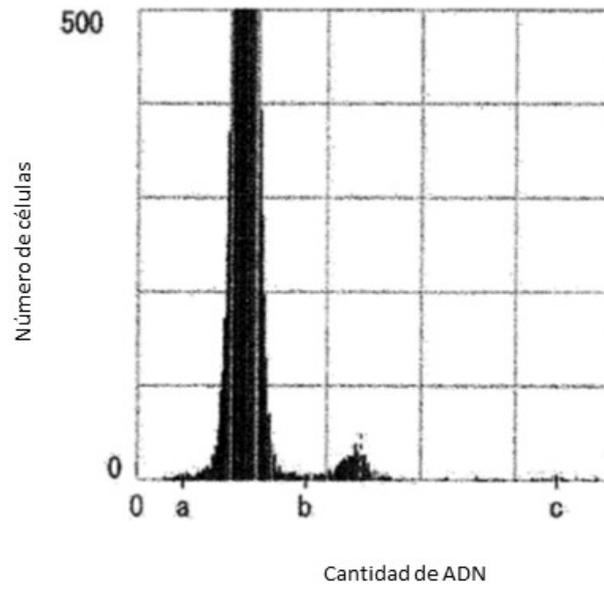


FIG. 18

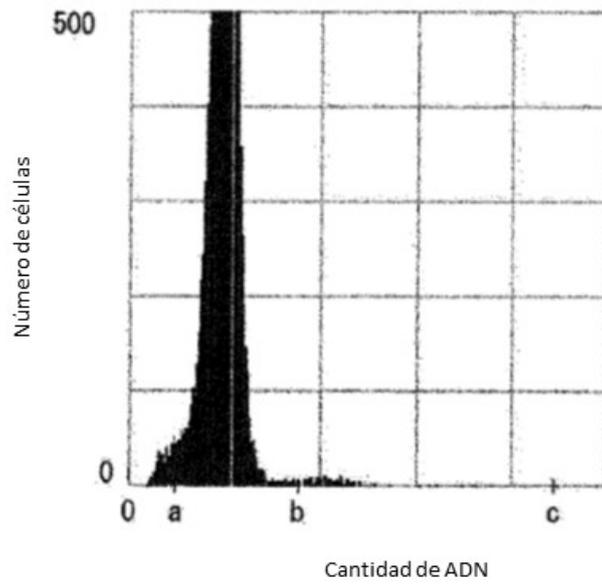


FIG. 19

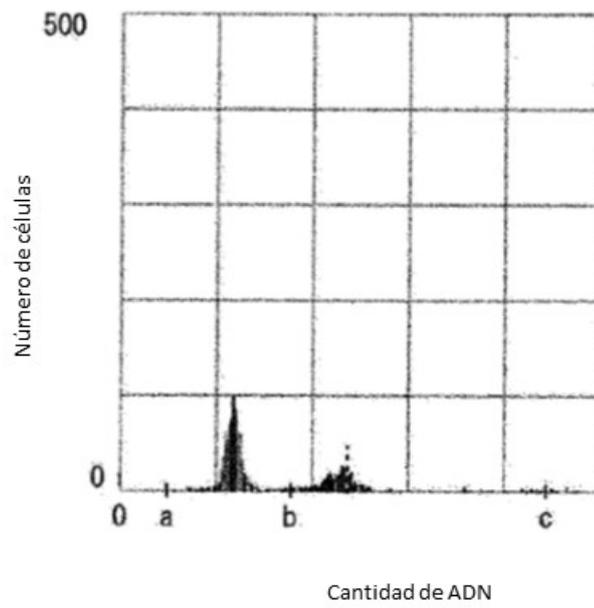


FIG. 20

