

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-217888

(P2016-217888A)

(43) 公開日 平成28年12月22日 (2016. 12. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14 C	2GO45
GO 1 N 15/00 (2006.01)	GO 1 N 15/14 A	
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 15/14 P	
	GO 1 N 15/14 D	
	GO 1 N 15/14 K	
審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-103254 (P2015-103254)
 (22) 出願日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)

(71) 出願人 390014960
 シスメックス株式会社
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 (74) 代理人 100111383
 弁理士 芝野 正雅
 (72) 発明者 田端 誠一郎
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 柳田 匡俊
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 Fターム(参考) 2G045 AA24 FA14 FA37

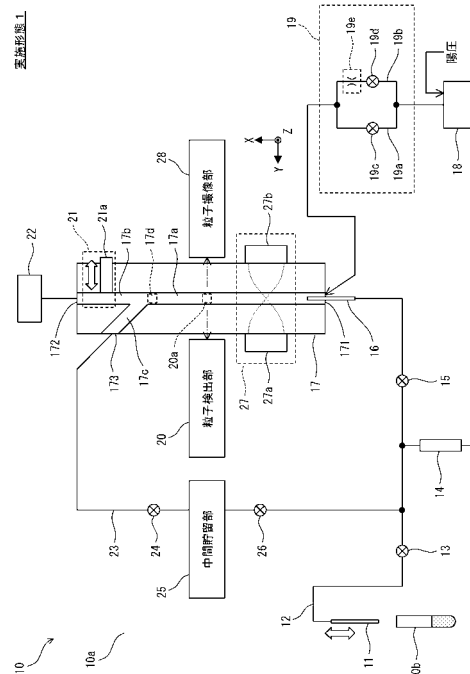
(54) 【発明の名称】 細胞検出装置および細胞検出方法

(57) 【要約】

【課題】測定対象となる細胞の画像を効率良く取得できる細胞検出装置および細胞検出方法を提供する。

【解決手段】細胞検出装置10は、粒子を含む測定試料を流すためのフローセル17と、フローセル17に供給された測定試料中の粒子を検出するための粒子検出部20と、粒子検出部20による検出結果に基づいて、検出条件を満たす粒子とその他の粒子とを選別するための粒子選別部21と、粒子選別部21により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料をフローセル17に供給するための試料供給部10aと、フローセル17に供給された選別後の撮像用試料中の粒子を撮像するための粒子撮像部28と、を備える。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

粒子を含む測定試料を流すためのフローセルと、
前記フローセルに供給された測定試料中の粒子を検出するための粒子検出部と、
前記粒子検出部による検出結果に基づいて、検出条件を満たす粒子とその他の粒子とを選別するための粒子選別部と、
前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を前記フローセルに供給するための試料供給部と、
前記フローセルに供給された選別後の撮像用試料中の粒子を撮像するための粒子撮像部と、を備える、細胞検出装置。

10

【請求項 2】

前記試料供給部は、前記粒子選別部による粒子の選別が完了した後に、前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を前記フローセルに供給する、請求項 1 に記載の細胞検出装置。

【請求項 3】

前記試料供給部は、前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を貯留するための中間貯留部を備える、請求項 1 または 2 に記載の細胞検出装置。

【請求項 4】

前記中間貯留部は、前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を濃縮して前記フローセルに供給する、請求項 3 に記載の細胞検出装置。

20

【請求項 5】

前記試料供給部は、前記粒子検出部の検出位置を通過した試料を前記検出位置に対して前記フローセルの上流側に帰還させて撮像用試料として前記フローセルに再び流入させるための帰還流路を備える、請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 6】

前記粒子検出部は、所定波長の光を検出位置に照射するための光源と、前記光の照射により前記測定試料から生じる光を受光する受光部と、を備える、請求項 1 ないし 5 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 7】

前記受光部は、前記光の照射により前記測定試料から生じる散乱光を受光する第 1 検出器および前記光の照射により前記測定試料から生じる蛍光を受光する第 2 検出器を備える、請求項 6 に記載の細胞検出装置。

30

【請求項 8】

前記粒子撮像部は、前記第 1 検出器からの検出信号に基づく撮像タイミングで、前記粒子に対する撮像を行う、請求項 7 に記載の細胞検出装置。

【請求項 9】

前記フローセルの流路は、前記測定試料が流れる方向に垂直な第 1 方向の幅が前記第 1 方向に垂直な第 2 方向の幅よりも大きく設定され、

前記粒子撮像部は、前記第 2 方向から前記撮像用試料中の粒子の画像を撮像する、請求項 1 ないし 8 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

40

【請求項 10】

前記粒子検出部は、所定波長の光を検出位置に照射するための光源と、前記光が照射された前記検出位置を撮像するカメラと、を備え、

前記カメラの撮像信号に基づいて前記粒子を検出する、請求項 1 ないし 6 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 11】

前記粒子検出部は、前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を前記カメラにより撮像し、同一の前記粒子に対して前記粒子撮像部により取得される画像とは異なる他の画像を取得する、請求項 10 に記載の細胞検出装置。

【請求項 12】

50

前記粒子検出部の前記カメラが前記粒子撮像部の撮像に共用され、

前記粒子撮像部として取得する前記粒子の画像と前記粒子検出部として取得する前記粒子の画像とを前記カメラの撮像画像上において分離させる光学ユニットをさらに備える、請求項 10 または 11 に記載の細胞検出装置。

【請求項 13】

前記粒子検出部の検出位置と前記粒子撮像部の撮像位置が、前記フローセルにおける前記測定試料の流れ方向において一致する、請求項 1 ないし 12 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 14】

前記フローセルを流れる測定試料の速度を変化させる速度変更部をさらに備え、

10

前記速度変更部は、

前記フローセルに前記測定試料を流して前記粒子検出部により前記粒子を検出する場合、前記測定試料を第 1 速度で流し、

前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を前記フローセルに流して前記粒子撮像部により前記粒子を撮像する場合、前記撮像用試料を前記第 1 速度よりも低速の第 2 速度で流す、請求項 1 ないし 13 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 15】

前記測定試料とともに流れるシース液を前記フローセルに供給するシース液供給部をさらに備え、

20

前記速度変更部は、前記フローセルに供給される前記シース液の流量を変化させることにより、前記フローセルを流れる前記測定試料の速度を変化させる、請求項 14 に記載の細胞検出装置。

【請求項 16】

前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子が前記フローセルの前記粒子撮像部の撮像位置を通過するように整列させる粒子整列部をさらに備える、請求項 1 ないし 15 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 17】

前記粒子整列部は、

前記フローセルに前記測定試料を流して前記粒子検出部により前記粒子を検出する場合には動作せず、

30

前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を前記フローセルに流して前記粒子撮像部により前記粒子を撮像する場合に動作する、請求項 16 に記載の細胞検出装置。

【請求項 18】

前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を回収する回収部をさらに備える、請求項 1 ないし 17 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 19】

前記粒子撮像部により取得された画像に基づいて前記撮像用試料に被検細胞が含まれるか否かを判定する制御部を備え、

40

前記制御部は、前記被検細胞を含む前記撮像用試料を前記回収部に回収させる、請求項 18 に記載の細胞検出装置。

【請求項 20】

前記試料供給部は、前記粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を前記フローセルに複数回帰還させ、

前記制御部は、

第 1 の帰還において前記粒子撮像部により取得された画像に基づいて前記撮像用試料に第 1 被検細胞が含まれるか否かを判定し、前記第 1 被検細胞を含む前記撮像用試料を前記回収部に回収させ、

前記第 1 の帰還とは異なる第 2 の帰還において前記粒子撮像部により取得された画像

50

に基づいて前記撮像用試料に前記第 1 被検細胞と異なる第 2 被検細胞が含まれるか否かを判定し、前記第 2 被検細胞を含む前記撮像用試料を前記回収部に回収させる、請求項 19 に記載の細胞検出装置。

【請求項 21】

前記粒子撮像部により取得された画像を出力する出力部をさらに備える、請求項 1 ないし 20 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

【請求項 22】

被検細胞は、血中循環腫瘍細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、または抗原特異的 T 細胞である、請求項 1 ないし 21 の何れか一項に記載の細胞検出装置。

10

【請求項 23】

粒子を含む測定試料をフローセルに流す工程と、
前記フローセルに供給された測定試料中の粒子を検出する工程と、
前記粒子の検出結果に基づいて、検出条件を満たす粒子とその他の粒子とを選別する工程と、

選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料を前記フローセルに供給する工程と、

前記フローセルに供給された選別後の撮像用試料中の粒子を撮像する工程と、を備える細胞検出方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞検出装置および細胞検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

フローサイトメータを用いた検体測定装置として、フローセルを流れる測定試料中の粒子を検出する粒子検出部およびフローセルを流れる測定試料中の粒子を撮像する撮像部を備えるものが知られている。たとえば、特許文献 1 に記載の検体測定装置は、細胞検出部の下流側に、細胞を撮像するための構成が配置される。検体測定装置は、フローセルを流れる測定試料中の細胞にレーザ光を照射し、細胞から発せられる信号をトリガーとして C

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開昭 63 - 94156 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記の構成では、粒子画像の品質を高めるためにフローセルを流れる粒子の速度を遅くすると、たとえば数 10 万個の細胞の中に 1 つといった測定試料中にごく僅かに含まれる細胞の画像を取得したい場合には、多量の測定試料を測定する必要があるため、細胞画像の取得にかかる時間が非常に長くなるといった問題があった。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第 1 の態様に係る細胞検出装置は、粒子を含む測定試料を流すためのフローセルと、フローセルに供給された測定試料中の粒子を検出するための粒子検出部と、粒子検出部による検出結果に基づいて、検出条件を満たす粒子とその他の粒子とを選別するための粒子選別部と、粒子選別部により選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料をフローセルに供給するための試料供給部と、フローセルに供給された選別後の撮像用試料中の粒子を撮像するための粒子撮像部と、を備える。

50

【0006】

本発明の第2の態様に係る細胞検出方法は、粒子を含む測定試料をフローセルに流す工程と、フローセルに供給された測定試料中の粒子を検出する工程と、粒子の検出結果に基づいて、検出条件を満たす粒子とその他の粒子とを選別する工程と、選別された検出条件を満たす粒子を含む撮像用試料をフローセルに供給する工程と、フローセルに供給された選別後の撮像用試料中の粒子を撮像する工程と、を備える。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、測定対象となる細胞の画像を効率良く取得できる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、実施形態1に係る細胞検出装置の構成を示す模式図である。

【図2】図2は、実施形態1に係る粒子検出部および粒子撮像部の構成を示す模式図である。

【図3】図3は、実施形態1に係る細胞検出装置の構成を示すブロック図である。

【図4】図4は、実施形態1に係る細胞検出装置が行う処理を示すフローチャートである。

【図5】図5(a)、(b)は、実施形態1に係る検出処理によって開始される処理を示すフローチャートである。

【図6】図6(a)は、実施形態1に係る撮像処理によって開始される処理を示すフローチャートであり、図6(b)は、実施形態1に係る細胞検出装置が行う表示処理を示すフローチャートである。

【図7】図7(a)、(b)は、実施形態1に係る出力部に表示される画面を示す図である。

【図8】図8は、実施形態2に係る粒子検出部および粒子撮像部の構成を示す模式図である。

【図9】図9(a)、(b)は、実施形態2に係る出力部に表示される画面を示す図である。

【図10】図10は、実施形態3に係る粒子検出部および粒子撮像部の構成を示す模式図である。

【図11】図11は、実施形態3に係るカメラの受光面上の領域を示す模式図である。

【図12】図12は、実施形態4に係る粒子検出部および粒子撮像部の構成を示す模式図である。

【図13】図13は、実施形態4に係るカメラの受光面上の領域を示す模式図である。

【図14】図14(a)は、実施形態5に係る細胞検出装置の構成を示すブロック図であり、図14(b)は、実施形態5に係る細胞検出装置が行う処理を示すフローチャートである。

【図15】図15は、実施形態5に係る撮像処理によって開始される処理を示すフローチャートである。

【図16】図16(a)は、実施形態6に係る速度変更部の構成を示す模式図であり、図16(b)は、実施形態6に係る細胞検出装置が行う処理を示すフローチャートである。

【図17】図17は、実施形態6に係る撮像処理によって開始される処理を示すフローチャートである。

【図18】図18は、実施形態7に係る細胞検出装置が行う処理を示すフローチャートである。

【図19】図19(a)は、実施形態7に係る活性化ありと判定されたCECの画像を示す図であり、図19(b)は、実施形態7に係る活性化なしと判定されたCECの画像を示す図である。

【図20】図20(a)、(b)は、実施形態7に係る出力部に表示される画面を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 2 1】図 2 1 は、実施形態 8 に係る細胞検出装置の構成を示す模式図である。

【図 2 2】図 2 2 は、実施形態 8 に係る細胞検出装置が行う処理を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0009】

<実施形態 1>

実施形態 1 は、血液検体に含まれる血中循環腫瘍細胞を被検細胞として撮像するための装置に本発明を適用したものである。以下、血中循環腫瘍細胞を、CTC (Circulating Tumor Cell) と称する。進行したがん細胞から由来する CTC は血液やリンパ液の流れに乗って循環しており、離れた臓器に転移をする。血液中の CTC は、乳がん、前立腺がん、大腸がん等の転移性のがん患者において、治療効果の判定および予後予測因子として有用性が認められている。CTC を測定することは、治療による効果の判定、無増悪生存率、全生存率等、予後の予測をしたい場合に有効である。血液中に循環している CTC は極微量であり、血液 10 mL 中に数個～数十個程度となっている。

10

【0010】

図 1 に示すように、細胞検出装置 10 は、試料供給部 10 a と、フローセル 17 と、シース液供給部 18 と、速度変更部 19 と、粒子検出部 20 と、粒子選別部 21 と、廃液貯留部 22 と、粒子整列部 27 と、粒子撮像部 28 と、を備える。試料供給部 10 a は、ノズル 11 と、供給流路 12 と、バルブ 13 と、シリンジ 14 と、バルブ 15 と、ジェットノズル 16 と、帰還流路 23 と、バルブ 24 と、中間貯留部 25 と、バルブ 26 と、を備える。細胞検出装置 10 が備えるバルブは、電磁的に開閉可能に構成されている。

20

【0011】

試料供給部 10 a は、試料容器 10 b に収容された測定試料をフローセル 17 に供給し、粒子選別部 21 による粒子の選別が完了した後に、粒子選別部 21 により選別された検出条件を満たす粒子を含む測定試料をフローセル 17 に供給する。粒子選別部 21 により選別された検出条件を満たす粒子を含む測定試料を、以下「撮像用試料」と称する。

【0012】

試料容器 10 b は、粒子を含む測定試料を収容する。測定試料は、人から採取された末梢血である検体に、以下に示す試薬を混和して予め調製される。

- ・赤血球を溶血させる溶血剤
- ・白血球を検出するための CD 45 の標識抗体を含む試薬
- ・17 番染色体上に結合する Ch 17 プローブを含む試薬
- ・Her 2 遺伝子上に結合する Her 2 プローブを含む試薬
- ・色素 Alexa 488 で標識された Ch 17 プローブに結合する抗体を含む試薬
- ・色素 PE で標識された Her 2 プローブに結合する抗体を含む試薬
- ・核を染色する色素 7 A A D を含む試薬

30

【0013】

検体に上記試薬が混和されると、溶血剤の作用によって赤血球が溶血される。白血球の表面に発現している CD 45 抗原は、CD 45 の標識抗体により標識される。17 番染色体は、色素 Alexa 488 で標識される。Her 2 遺伝子は、色素 PE で標識される。核は、色素 7 A A D によって染色される。色素 Alexa 488、PE、7 A A D に対して、後述する光源 121 から出射される波長が 488 nm の光が照射されると、異なる波長の蛍光が励起される。色素 Alexa 488 に代えて、色素 FITC が用いられても良く、色素 PE に代えて、色素 PE - Cy 7 が用いられても良い。

40

【0014】

Ch 17 プローブに結合する抗体を標識する色素と、Her 2 プローブに結合する抗体を標識する色素と、核を染色する色素の励起波長が異なる場合、後述する光源 121 は、色素の励起波長に応じた複数の光を出射する光源に変更される。このような光源として、基板に複数の発光素子がマウントされたマルチ発光レーザが用いられ得る。あるいは、光源 121 が、複数の半導体レーザから出射されたレーザ光をダイクロイックミラーで結合

50

する構成であっても良い。たとえば、色素 Alexa 488 と励起波長が異なる色素として、色素 Alexa 647、色素 HOECHST が挙げられる。色素 Alexa 647 は、Her 2 遺伝子の標識に用いられ、色素 HOECHST は、核の標識に用いられ得る。

【0015】

細胞検出装置 10 は、測定試料を自動的に調製するための試料調製部を備えても良い。この場合、試料調製部は、検体に上記試薬を混和して自動的に測定試料を調製する。

【0016】

供給流路 12 は、ノズル 11 とジェットノズル 16 を接続する流路である。供給流路 12 には、バルブ 13、15 とシリンジ 14 が配置されている。ジェットノズル 16 の先端は、フローセル 17 の入口 171 に挿入されている。シリンジ 14 は、供給流路 12 に陽圧および陰圧を加えることが可能に構成されている。シリンジ 14 が陰圧駆動されることにより、試料容器 10b 内の測定試料が、ノズル 11 から吸引されてシリンジ 14 内に引き込まれる。シリンジ 14 が陽圧駆動されることにより、シリンジ 14 に引き込まれた測定試料が、ジェットノズル 16 から吐出されフローセル 17 に送り出される。

10

【0017】

フローセル 17 は、入口 171 と、廃棄出口 172 と、帰還出口 173 と、を備え、内部に流路 17a、17b、17c を備える。流路 17a は入口 171 に繋がっており、流路 17b は廃棄出口 172 に繋がっており、流路 17c は帰還出口 173 に繋がっている。フローセル 17 は、透光性を有するガラスや合成樹脂によって構成される。図 1 には、便宜上、互いに直交する XYZ 軸が示されている。フローセル 17 において、X 軸負側がフローセル 17 の上流側であり、X 軸正側がフローセル 17 の下流側である。流路 17a、17b は、直線状に並ぶように形成されている。流路 17b は、流路 17a の下流側に位置する。流路 17c は、流路 17a と流路 17b との間において、流路 17a から分岐している。ジェットノズル 16 から送り出された測定試料は、流路 17a に流され、その後、流路 17b または流路 17c に流される。

20

【0018】

シース液供給部 18 は、シース液を貯留するとともに、速度変更部 19 を介してフローセル 17 の流路 17a にシース液を供給する。シース液供給部 18 には、後述する空圧源 36 が接続されている。シース液供給部 18 は、空圧源 36 から陽圧が供給されることにより、シース液を速度変更部 19 に送り出す。ジェットノズル 16 から流路 17a に送り出される測定試料は、シース液に包まれた状態で下流へと流される。これにより、測定試料に含まれる粒子は、一列に整列した状態で検出位置 20a を通る。

30

【0019】

速度変更部 19 は、流路 19a、19b と、バルブ 19c、19d と、オリフィス 19e と、を備える。流路 19a、19b は、シース液供給部 18 とフローセル 17 とを繋ぐ流路において、並列に配置されている。流路 19a には、バルブ 19c が配置されており、流路 19b には、バルブ 19d とオリフィス 19e が配置されている。流路 19a、19b の断面の径は同じである。オリフィス 19e の断面の径は、流路 19a、19b の断面の径よりも小さい。

40

【0020】

バルブ 19c が開けられバルブ 19d が閉じられた状態のとき、シース液供給部 18 から送り出されたシース液は、流路 19a を通ってフローセル 17 に供給される。他方、バルブ 19c が閉じられバルブ 19d が開けられた状態のとき、シース液供給部 18 から送り出されたシース液は、流路 19b を通ってフローセル 17 に供給される。シース液が流路 19a、19b を通る場合にフローセル 17 に供給されるシース液の単位時間当たりの流量を、それぞれ V1、V2 とすると、オリフィス 19e によって、V2 は V1 よりも小さくなる。

【0021】

ジェットノズル 16 から流路 17a に供給される測定試料は、上述したように、シース液に包まれた状態で下流へと流される。したがって、流路 17a を流れる測定試料は、フ

50

ローセル 17 に供給されるシース液の単位時間当たりの流量によって決められる。ここで、フローセル 17 に供給されるシース液の単位時間当たりの流量が V_1 、 V_2 のとき、流路 17 a を流れる測定試料の速度を、それぞれ、第 1 速度および第 2 速度とすると、 V_2 は V_1 よりも小さいため、第 2 速度は第 1 速度よりも低速となる。このように、速度変更部 19 は、フローセル 17 に供給するシース液の流量を切り替えることにより、流路 17 a を流れる測定試料の速度を第 1 速度と第 2 速度に切り替えることができる。測定試料は、第 1 速度で流路 17 a に流され、撮像用試料は、第 2 速度で流路 17 a に流される。

【0022】

粒子検出部 20 は、流路 17 a を流れる粒子を検出する。具体的には、粒子検出部 20 は、流路 17 a の検出位置 20 a に位置付けられた粒子に光を照射して、生じた前方散乱光および蛍光を検出する。粒子検出部 20 の構成については、追って図 2 を参照して説明する。

10

【0023】

粒子選別部 21 は、粒子検出部 20 による検出結果に基づいて、被検細胞の検出条件を満たす粒子とその他の粒子とを選別する。被検細胞の検出条件を満たさない粒子を含む測定試料は、流路 17 b を介して廃液貯留部 22 に送られ、被検細胞の検出条件を満たす粒子を含む測定試料は、流路 17 c を介して帰還流路 23 に送られる。

【0024】

粒子選別部 21 は、部材 21 a と、部材 21 a を流路 17 b に突出させるための駆動部と、を備える。部材 21 a が流路 17 b を開放する位置に位置付けられると、流路 17 a を流れる測定試料は流路 17 b を経由して廃液貯留部 22 へと送られる。廃液貯留部 22 は、フローセル 17 の廃棄出口 17 2 と繋がっており、不要となった測定試料を貯留する。他方、部材 21 a が流路 17 b を塞ぐ位置に位置付けられると、流路 17 a を流れる測定試料は流路 17 c を経由して帰還流路 23 へと送られる。被検細胞の検出条件を満たす粒子が流路 17 a の分岐位置 17 d に位置付けられると、粒子選別部 21 が部材 21 a を駆動して流路 17 b を塞ぐ。これにより、分岐位置 17 d にある粒子は、流路 17 c を経由して帰還流路 23 へと送られる。

20

【0025】

粒子選別部 21 は、図 1 に示す構成に代えて、バブル発生器を備えても良い。この場合、粒子選別部 21 は、バブル発生器から生じるバブルにより、X 軸正方向に流れる粒子の進行方向を流路 17 c の方向へと変化させる。また、粒子選別部 21 は、図 1 に示す構成に代えて、圧電体と電極を有するピエゾアクチュエータや、圧電結晶基板と櫛形電極を有する超音波発生部を備えても良い。この場合、粒子選別部 21 は、ピエゾアクチュエータや超音波発生部により発生させる超音波を粒子に付与し、X 軸正方向に流れる粒子の進行方向を流路 17 c の方向へと変化させる。

30

【0026】

帰還流路 23 は、フローセル 17 の帰還出口 17 3 と、バルブ 13 とシリンジ 14 の間の供給流路 12 と、を接続する。帰還流路 23 には、バルブ 24、26 と中間貯留部 25 が配置されている。帰還流路 23 は、粒子検出部 20 の検出位置 20 a を通過した測定試料を、検出位置 20 a に対してフローセル 17 の上流側に帰還させて、撮像用試料としてフローセル 17 に再び流入させる。

40

【0027】

中間貯留部 25 は、流路 17 c から帰還流路 23 に供給された撮像用試料を貯留する。また、中間貯留部 25 は、貯留した撮像用試料を濃縮することができるように構成されている。中間貯留部 25 は、エルトリエータローターや、遠心分離機により構成するのが好ましい。また、撮像用試料の濃縮にあたっては、フィルタ等を用いてもよい。

【0028】

中間貯留部 25 は、流路 17 c から帰還流路 23 に供給された撮像用試料をノズルを介して反応管に吐出し、反応管により撮像用試料を貯留しても良い。反応管に貯留した撮像用試料をフローセル 17 に送る場合には、中間貯留部 25 は、ノズルを介して反応管から

50

撮像用試料を吸引する。そして、吸引された撮像用試料が、シリンジ 1 4 によりフローセル 1 7 に送られる。

【 0 0 2 9 】

試料容器 1 0 b からフローセル 1 7 に供給される測定試料はシース液と混ぜられるため、帰還流路 2 3 を通って中間貯留部 2 5 に送られた撮像用試料の濃度は低くなっている。たとえば、中間貯留部 2 5 は、濃度が低くなった撮像用試料を濃縮して、試料容器 1 0 b に収容される測定試料の濃度と同程度の濃度に戻す。このように、中間貯留部 2 5 によれば、シース液により低くなった撮像用試料の濃度を高めることができる。中間貯留部 2 5 により濃縮された撮像用試料は、測定試料の場合と同様にシリンジ 1 4 が駆動されることにより、再度同一のジェットノズル 1 6 に戻され、ジェットノズル 1 6 からフローセル 1 7 の流路 1 7 a に送り出される。

10

【 0 0 3 0 】

粒子整列部 2 7 は、流路 1 7 a の側面に配されたピエゾアクチュエータ 2 7 a、2 7 b を備える。ピエゾアクチュエータ 2 7 a、2 7 b は、圧電体と電極を有する。粒子整列部 2 7 は、粒子撮像部 2 8 による撮像方向である Z 軸方向と粒子の流れ方向である X 軸方向とに垂直な Y 軸方向において、ピエゾアクチュエータ 2 7 a、2 7 b により、流路 1 7 a の両側から流路 1 7 a を流れる粒子に超音波を付与する。これにより、ピエゾアクチュエータ 2 7 a、2 7 b の間において、点線で示すように超音波定在波が形成される。超音波定在波の節は、流路 1 7 a の中心軸に位置付けられる。

20

【 0 0 3 1 】

帰還流路 2 3 を介して流路 1 7 a に帰還された撮像用試料に含まれる粒子は、超音波が付与されることにより、流路 1 7 a の中心軸に沿って流れるように整列される。このように粒子が整列されると、粒子が、粒子撮像部 2 8 による撮像位置である検出位置 2 0 a を精度良く通るようになる。よって、粒子撮像部 2 8 がより精度の高い画像を撮像できる。

【 0 0 3 2 】

粒子整列部 2 7 は、超音波定在波を形成可能であればよく、ピエゾアクチュエータ 2 7 a、2 7 b に代えて、圧電結晶基板と楕形電極を有する超音波発生部であっても良い。

【 0 0 3 3 】

粒子撮像部 2 8 は、帰還流路 2 3 を介してフローセル 1 7 に供給された選別後の撮像用試料中の粒子を、検出位置 2 0 a において撮像する。具体的には、粒子撮像部 2 8 は、検出位置 2 0 a に位置付けられた粒子に光を照射して、生じた蛍光を撮像する。粒子撮像部 2 8 の構成については、追って図 2 を参照して説明する。検出位置 2 0 a を通り過ぎた撮像用試料は、全て廃液貯留部 2 2 へと送られる。こうして、細胞検出装置 1 0 による処理が終了する。

30

【 0 0 3 4 】

実施形態 1 では、粒子検出部 2 0 が粒子の検出を行う検出位置 2 0 a と、粒子撮像部 2 8 が粒子の撮像を行う撮像位置とが、流路 1 7 a における測定試料の流れ方向において一致する。これにより、フローセル 1 7 を小型化できる。小型化の必要がなければ、粒子撮像部 2 8 は、検出位置 2 0 a とは異なる流路 1 7 a の位置において粒子を撮像しても良い。なお、粒子撮像部 2 8 の設置位置はこれに限られず、流路 1 7 b や流路 1 7 c 等、分岐位置 1 7 d の下流とすることもできる。

40

【 0 0 3 5 】

このように、測定試料に含まれる粒子は、検出位置 2 0 a を最初に通るときに、粒子検出部 2 0 により検出される。粒子検出部 2 0 による検出結果に基づいて、被検細胞の検出条件を満たす粒子のみが、帰還流路 2 3 へ送られる。その後、帰還流路 2 3 を介してフローセル 1 7 に帰還された粒子は、検出位置 2 0 a を 2 回目に通るときに、粒子撮像部 2 8 により撮像される。すなわち、粒子の検出は 1 巡目で行われ、粒子の撮像は 2 巡目で行われる。これにより、効率良く細胞画像を取得できる。

【 0 0 3 6 】

図 2 に示すように、粒子検出部 2 0 は、光源 1 0 1 と、照射レンズ 1 0 2 と、対物レン

50

ズ103と、ダイクロイックミラー104、105と、集光レンズ106、107と、受光部108と、を備える。受光部108は、第1検出器108aと第2検出器108bを備える。粒子撮像部28は、光源121と、照射レンズ122と、ダイクロイックミラー123、124、125と、集光レンズ126、127、128と、カメラ129、130、131と、を備える。

【0037】

図2には、図1のXYZ軸に対応するXYZ軸が示されている。測定試料が流れる方向に垂直な第1方向をY軸方向とし、第1方向と垂直な第2方向をZ軸方向とする。流路17aは、第1方向の幅W1が、第2方向の幅W2よりも大きくなるよう構成されている。

【0038】

光源101は、半導体レーザ光源である。光源101から出射される光は、波長1のレーザ光である。波長1は、赤色波長帯域の波長である。照射レンズ102は、光源101から出射された光を集光して、流路17aに照射させる。光源101から出射された光は、第2方向、すなわちZ軸方向から流路17aに入射される。流路17aに入射する波長1の光は、検出位置20aに位置付けられた粒子に照射される。これにより、粒子から波長1の前方散乱光が生じ、CD45の標識抗体から波長2の蛍光が生じる。

【0039】

対物レンズ103は、波長1の前方散乱光および波長2の蛍光を集光し、後述する波長4、5、6の蛍光を集光する。ダイクロイックミラー104は、波長1の前方散乱光および波長2の蛍光を反射し、波長4、5、6の蛍光を透過する。ダイクロイックミラー105は、波長1の前方散乱光を反射し、波長2の蛍光を透過する。集光レンズ106は、波長1の前方散乱光を集光する。第1検出器108aは、波長1の前方散乱光を受光する。第1検出器108aは、フォトダイオードであり、受光した前方散乱光の強度に応じた電気信号を出力する。集光レンズ107は、波長2の蛍光を集光する。第2検出器108bは、波長2の蛍光を受光する。第2検出器108bはアバランシェフォトダイオードであり、受光した蛍光の強度に応じた電気信号を出力する。

【0040】

光源121は、半導体レーザ光源である。光源121から出射される光は、波長3のレーザ光である。波長3は、約488nmである。照射レンズ122は、光源121から出射された光を集光して、流路17aに照射させる。光源121から出射された光は、第1方向、すなわちY軸方向から流路17aに入射される。流路17aに入射する波長3の光は、検出位置20aに位置付けられた粒子に照射される。これにより、色素Alexa488から波長4の蛍光が生じ、色素PEから波長5の蛍光が生じ、色素7AADから波長6の蛍光が生じる。

【0041】

このように、光源121から出射された蛍光励起用の光が第1方向から流路17aに入射されると、効率的に蛍光を生じさせることができる。すなわち、流路17aを流れる粒子は、短辺方向においてふらつきにくい。このため、流路17aの短辺側から蛍光励起用の光を入射させる場合、蛍光励起用の光の広がり小さく絞っても、蛍光励起用の光を検出位置20aの粒子に照射できる。よって、蛍光励起用の光を粒子に効率的に照射できるため、効率的に蛍光を生じさせることができる。

【0042】

波長4、5、6の蛍光は、対物レンズ103により集光される。図2では、粒子撮像部28は、対物レンズ103を粒子検出部20と共用している。対物レンズ103により集光された波長4、5、6の蛍光は、ダイクロイックミラー104を透過する。ダイクロイックミラー123は、波長4の蛍光を反射し、波長5、6の蛍光を透過する。ダイクロイックミラー124は、波長5の蛍光を反射し、波長6の蛍光を透過する。ダイクロイックミラー125は、波長6の蛍光を反射する。ダイクロイックミラー125が反射ミラーに置き換えられても良い。

10

20

30

40

50

【0043】

集光レンズ126、127、128は、それぞれ、波長4、5、6の蛍光を集光する。カメラ129、130、131は、それぞれ、波長4、5、6の蛍光を受光して、検出位置20aに位置付けられた粒子の画像情報を撮像信号として出力する。カメラ129、130、131は、TDI (Time Delay Integration) カメラであっても良い。TDIカメラが用いられると、より精度の高い画像情報を取得できる。

【0044】

ここで、カメラ129、130、131が粒子を撮像する方向は、Z軸方向である。流路17aは、上述したように、撮像方向であるZ軸方向の幅W2よりも、撮像方向と粒子の流れ方向とに垂直な方向であるY軸方向の幅W1が大きくなるよう構成されている。よって、Z軸方向における粒子の位置がばらつきにくいため、撮像倍率を上げて被写界深度が短くなったとしても、粒子に対してピン트가合いやすくなる。よって、粒子画像を精度良く取得できる。

10

【0045】

図3に示すように、細胞検出装置10は、図1に示した粒子検出部20と、粒子選別部21と、中間貯留部25と、粒子整列部27と、粒子撮像部28と、を備える。さらに、細胞検出装置10は、制御部31と、記憶部32と、入力部33と、出力部34と、駆動部35と、空圧源36と、を備える。制御部31は、たとえばCPUである。制御部31は、細胞検出装置10の各部から信号を受信して、細胞検出装置10の各部を制御する。制御部31は、記憶部32に記憶されたプログラムに従って、各部を制御する。記憶部32は、ROM、RAM、ハードディスク等である。

20

【0046】

制御部31は、粒子検出部20の第1検出器108aおよび第2検出器108bから出力された信号波形のピーク値を取得することにより、粒子ごとに、波長1の前方散乱光の強度および波長2の蛍光の強度を取得する。制御部31は、波長1の前方散乱光の強度および波長2の蛍光の強度を、粒子ごとに記憶部32に記憶する。制御部31は、粒子撮像部28のカメラ129、130、131から出力された信号に基づいて粒子の画像を生成し、生成した画像を粒子ごとに記憶部32に記憶する。

【0047】

制御部31は、入力部33を介してオペレータからの指示を受け付け、粒子の画像等を出力部34に表示させる。入力部33は、マウスやキーボードであり、出力部34は、液晶パネル等のディスプレイである。

30

【0048】

駆動部35は、図1に示すバルブを個別に駆動するための機構と、シリンジ14を駆動するための機構と、ノズル11を昇降させるための機構と、を含む。空圧源36は、細胞検出装置10の各部に陽圧および陰圧を供給する。

【0049】

次に、細胞検出装置10が行う処理について、図4～図6(a)に示すフローチャートを参照して説明する。

【0050】

図4に示すように、オペレータにより開始指示が入力されると、ステップS1において、制御部31は検出処理を行う。具体的には、制御部31は、後述する図5(a)、(b)に示す処理を並行して開始する。これにより、試料容器10bの測定試料がフローセル17に供給され、この測定試料に含まれる粒子が、粒子検出部20により検出される。被検細胞の検出条件を満たす粒子のみが、帰還流路23に供給される。図5(a)、(b)の処理が終了すると、制御部31は、処理をステップS2に進める。

40

【0051】

ステップS2において、制御部31は濃縮処理を行う。これにより、中間貯留部25に貯留された撮像用試料の濃縮が行われる。濃縮が行われた撮像用試料は、中間貯留部25に貯留される。

50

【 0 0 5 2 】

ステップ S 3 において、制御部 3 1 は撮像処理を行う。具体的には、制御部 3 1 は、後述する図 6 (a) に示す処理を開始する。これにより、中間貯留部 2 5 により濃縮が行われた撮像用試料が、再度フローセル 1 7 に供給される。再度フローセル 1 7 に供給された撮像用試料に含まれる粒子が、粒子撮像部 2 8 により撮像される。図 6 (a) の処理が終了し、フローセル 1 7 に帰還された撮像用試料が全て廃液貯留部 2 2 に送られると、図 4 に示す細胞検出装置 1 0 の処理が終了する。

【 0 0 5 3 】

図 5 (a) に示すように、ステップ S 1 0 1 において、制御部 3 1 は、第 1 速度で測定試料をフローセル 1 7 に流す。具体的には、制御部 3 1 は、バルブ 1 9 c を開けてバルブ 1 9 d を閉じ、シース液供給部 1 8 からフローセル 1 7 にシース液を供給する。そして、制御部 3 1 は、試料容器 1 0 b 内の測定試料をジェットノズル 1 6 から流路 1 7 a に送り出す。

10

【 0 0 5 4 】

ステップ S 1 0 2 において、制御部 3 1 は、粒子検出部 2 0 による検出を開始する。具体的には、制御部 3 1 は、光源 1 0 1 から検出位置 2 0 a に光を照射して、波長 1 の前方散乱光および波長 2 の蛍光をそれぞれ第 1 検出器 1 0 8 a および第 2 検出器 1 0 8 b により受光する。制御部 3 1 は、検出位置 2 0 a の粒子について、波長 1 の前方散乱光の強度および波長 2 の蛍光の強度を取得する。

20

【 0 0 5 5 】

ステップ S 1 0 3 において、制御部 3 1 は、検出位置 2 0 a の粒子が、被検細胞の検出条件を満たす粒子であるか否かを判定する。具体的には、波長 2 の蛍光の強度が所定の閾値以下であり、かつ、波長 1 の前方散乱光の強度が所定の閾値以上である場合に、制御部 3 1 は、検出位置 2 0 a の粒子が被検細胞の検出条件を満たす粒子であると判定する。これにより、波長 2 の蛍光の強度が所定の閾値より大きい粒子および波長 1 の前方散乱光の強度が所定の閾値より小さい粒子が除外される。粒子が被検細胞の CTC である場合、粒子は CD 4 5 の標識抗体と結合しないため、波長 2 の蛍光の強度は所定の閾値以下となる。また、粒子が被検細胞の CTC である場合、粒子のサイズが大きくなるため、波長 1 の前方散乱光の強度は所定の閾値以上となる。

30

【 0 0 5 6 】

このように、検出した粒子が白血球以外の粒子である場合、かつ、検出した粒子のサイズが大きい場合に、制御部 3 1 は、検出した粒子が被検細胞である可能性が高いとして、ステップ S 1 0 3 において YES と判定する。

【 0 0 5 7 】

測定試料の調製において、赤血球を溶血するための溶血剤が用いられなくても良い。この場合であっても、赤血球はサイズが小さく、波長 1 の前方散乱光の強度は所定の閾値より小さくなることから、測定試料中の赤血球は除外されることとなる。

【 0 0 5 8 】

ステップ S 1 0 3 で YES と判定すると、ステップ S 1 0 4 において、制御部 3 1 は、ステップ S 1 0 3 において被検細胞の検出条件を満たすと判定した粒子が、検出位置 2 0 a を通過したタイミングを記憶する。ステップ S 1 0 5 において、制御部 3 1 は、試料容器 1 0 b 内の測定試料が全てフローセル 1 7 に供給され、全ての粒子が検出位置 2 0 a を通過したか否かを判定する。制御部 3 1 は、全ての粒子が検出位置 2 0 a を通過するまで、ステップ S 1 0 3、S 1 0 4 の処理を繰り返す。全ての粒子が検出位置 2 0 a を通過すると、図 5 (a) の処理が終了する。

40

【 0 0 5 9 】

図 5 (b) に示すように、ステップ S 2 0 1 において、制御部 3 1 は、分岐位置 1 7 d に帰還対象の粒子が到達したか否かを判定する。具体的には、制御部 3 1 は、図 5 (a) のステップ S 1 0 4 で記憶したタイミングから所定の時間が経過している場合、図 5 (a) のステップ S 1 0 3 で被検細胞の検出条件を満たすと判定した粒子が、分岐位置 1 7 d

50

に到達したと判定する。

【0060】

分岐位置17dに帰還対象の粒子が到達すると、ステップS202において、制御部31は、所定時間だけ部材21aが流路17bを塞ぐように粒子選別部21を駆動する。これにより、被検細胞の検出条件を満たす粒子は、流路17cを経由して帰還流路23に送られる。図5(b)の処理は、図5(a)の処理が終了した後、所定時間が経過するまで繰り返し行われる。こうして、測定試料に含まれる被検細胞の条件を満たす全ての粒子が、帰還流路23に送られる。

【0061】

被検細胞の検出条件を満たさない粒子が分岐位置17dを通過する場合に、流路17cが塞がれても良い。この場合、粒子選別部21は、流路17cを塞ぐ部材を備える。制御部31は、ステップS202において、流路17cを塞ぐ部材で流路17cを塞ぎ、かつ、流路17bから部材21aを退避させる。

【0062】

図6(a)に示すように、ステップS301において、制御部31は、中間貯留部25によって濃縮された撮像用試料を、第1速度よりも遅い第2速度でフローセル17に流す。具体的には、制御部31は、バルブ19cを閉めてバルブ19dを開け、シース液供給部18からフローセル17にシース液を供給する。そして、制御部31は、中間貯留部25によって濃縮された撮像用試料をジェットノズル16から流路17aに送り出す。

【0063】

ステップS302において、制御部31は、粒子整列部27を駆動して、流路17aに対して超音波を付与する。これにより、流路17aを流れる粒子は、流路17aの中心軸に沿って流れる。ステップS303において、制御部31は、図5(a)のステップS102と同様、粒子検出部20による検出を開始する。

【0064】

図5(a)の処理では、図6(a)の処理とは異なり、粒子整列部27は駆動されない。これは、粒子整列部27が駆動されなくても、測定試料が第1速度で流路17aに流されると、測定試料に含まれる粒子は流路17aの中心軸に位置付けられやすいためである。しかしながら、帰還された撮像用試料は、第1速度よりも低速な第2速度で流路17aに流されるため、粒子がふらつく可能性がある。よって、図6(a)の処理では、粒子整列部27が駆動される。

【0065】

ステップS304において、制御部31は、第1検出器108aが受光する前方散乱光の強度に基づいて、検出位置20aに粒子が位置付けられたか否かを判定する。具体的には、制御部31は、前方散乱光の強度が所定の閾値を超えると、検出位置20aに粒子が位置付けられたと判定する。検出位置20aに粒子が位置付けられると、ステップS305において、制御部31は、粒子撮像部28により検出位置20aに位置付けられた粒子を撮像する。具体的には、制御部31は、光源121から検出位置20aに光を照射して、波長3、4、5の蛍光をそれぞれカメラ129、130、131により受光する。制御部31は、カメラ129、130、131が出力する撮像信号に基づいて、検出位置20aの粒子の画像を生成する。ステップS305において、複数の画像がカメラ129、130、131で撮像されても良く、また、動画が撮像されても良い。

【0066】

ステップS306において、制御部31は、中間貯留部25によって濃縮された撮像用試料が全てフローセル17に供給され、全ての粒子が検出位置20aを通過したか否かを判定する。制御部31は、全ての粒子が検出位置20aを通過するまで、ステップS304、S305の処理を繰り返す。全ての粒子が検出位置20aを通過すると、図6(a)の処理が終了する。こうして、フローセル17に帰還された撮像用試料に含まれる全ての粒子について、画像が取得される。

【0067】

10

20

30

40

50

このように、1巡目で粒子がCTCである可能性が高いか否かの判定が行われ、2巡目で粒子の撮像が行われるため、速度変更部19により、1巡目における測定試料の速度を、2巡目における撮像用試料の速度よりも高速に設定できる。よって、細胞検出装置10による処理のスループットを高めることができる。

【0068】

オペレータは、図4～図6(a)の処理が終了すると、入力部33を介して細胞検出装置10に対して結果の表示指示を入力する。

【0069】

図6(b)に示すように、ステップS401において、制御部31は、オペレータにより結果の表示指示が入力されたか否かを判定する。ステップS401でYESと判定すると、ステップS402において、制御部31は、図6(a)のステップS305において取得した全ての粒子の画像を解析して、核内に17番染色体に基づく輝点とHer2遺伝子に基づく輝点とを含む細胞を抽出する。さらに、ステップS402において、制御部31は、抽出した細胞の画像を解析して、細胞ごとにHer2遺伝子の増幅がある細胞かを判定し、Her2遺伝子の増幅がある細胞をCTCとして抽出する。ここで、制御部31は、17番染色体に基づく2個の輝点と、Her2遺伝子に基づく3個以上の輝点とを核内に含む細胞を、Her2遺伝子の増幅がある細胞、すなわちCTCとして抽出する。

【0070】

ステップS403において、制御部31は、ステップS402の抽出結果に基づいて、輝点を含む細胞の数と、Her2遺伝子の増幅がある細胞(CTC)の数とを、出力部34に表示する。ステップS404において、制御部31は、ステップS402で抽出した輝点を含む細胞の画像を、出力部34に表示する。

【0071】

図7(a)、(b)に示すように、ステップS403、S404において、出力部34には画面40が表示される。画面40には、輝点を含む細胞の数と、Her2遺伝子の増幅がある細胞(CTC)の数と、輝点を含む細胞の画像が表示される。オペレータは、細胞数を参照することにより、Her2遺伝子の増幅が発生しているか否かを知ることができるため、医師等が最適な治療薬を決定するための有用な情報を提供できる。

【0072】

横方向に並ぶ4枚の画像は、同じ1つの粒子についての画像である。左から順に4枚の画像は、それぞれ、17番染色体の遺伝子を標識する色素により生じた蛍光の画像41と、Her2遺伝子を標識する色素により生じた蛍光の画像42と、核を染色する色素により生じた蛍光の画像43と、画像41～43をマージした画像44と、を示している。画像41～44は、階調の反転を行った後、グレースケールに変換したものである。

【0073】

図7(a)に示す粒子の画像は、Her2遺伝子の増幅がない細胞の画像であり、図7(b)に示す粒子の画像は、Her2遺伝子の増幅がある乳がん細胞の画像である。輝点を含む粒子の画像が複数ある場合、オペレータは、画面40上で粒子の画像を切り替えて表示できる。さらに、Her2遺伝子の増幅がある細胞の画像の表示と、Her2遺伝子の増幅がない細胞の画像の表示とを個別に表示可能なボタン等を、画面40上に別途設けても良い。

【0074】

画像41の輝点の数は、17番染色体の遺伝子の数を表している。画像42の輝点の数は、Her2遺伝子の数を表している。画像43の輝点は核を表している。これにより、オペレータは、実際に画像を参照することにより、核内に、17番染色体の遺伝子とHer2遺伝子とが存在するか否かを知ることができる。また、Her2遺伝子の増幅がないと、図7(a)に示すように、画像41、42の輝点は2個になり、Her2遺伝子の増幅があると、図7(b)に示すように、画像41の輝点は2個になり、画像42の輝点は2個よりも多くなる。これにより、オペレータは、実際に画像を参照することにより、Her2遺伝子の増幅が発生しているか否かを知ることができる。

10

20

30

40

50

【0075】

なお、CTCに発現するEpCAM抗原に特異的であり、かつ、磁性流体粒子と結合した抗体により、EpCAM抗原を発現したCTCを磁気標識することもできる。このようにCTCを磁気標識する場合、測定試料を収容したチャンバに磁気勾配を印加する。こうすると、磁気標識されたCTCがチャンバの観察表面に整列するため、観察表面を観察することにより、CTCの有無を検出できる。しかしながら、CTCにはEpCAM抗原を発現していないものが存在する場合があります。この手法では、EpCAM抗原を発現していないCTCを見逃してしまうことがある。実施形態1によれば、粒子撮像部28により撮像される画像に基づいてHer2遺伝子の増幅の有無が判定され、CTCであるか否かが判定される。よって、実施形態1によれば、CTCを見逃してしまう可能性を低減させることができる。

10

【0076】

<実施形態2>

図8に示すように、実施形態2では、実施形態1と比較して、粒子撮像部28は、集光レンズ141とカメラ142をさらに備え、ダイクロイックミラー104、123~125の機能が変更されている。細胞検出装置10の他の構成は、実施形態1と同様である。

【0077】

実施形態2のダイクロイックミラー104は、波長1の前方散乱光の半分を反射し半分を透過する。検出位置20aの粒子から生じた波長1の前方散乱光のうち、半分はダイクロイックミラー104により反射され、半分はダイクロイックミラー104を透過し、さらにダイクロイックミラー123~125を透過する。集光レンズ141は、波長1の前方散乱光を集光する。カメラ142は、波長1の前方散乱光を受光して、検出位置20aに位置付けられた粒子の画像情報を撮像信号として出力する。制御部31は、帰還流路23からフローセル17に撮像用試料を帰還させた場合に、第1検出器108aが受光する前方散乱光の強度に基づいて検出位置20aに粒子が位置付けられたと判定すると、カメラ142が出力する撮像信号に基づいて明視野画像を生成する。

20

【0078】

実施形態2では、図6(b)のステップS403、S404において、出力部34に、図9(a)、(b)に示す画面40が表示される。図9(a)、(b)に示す画面40には、図7(a)、(b)に示す画像41~44に加えて、明視野の画像45が示されている。実施形態2では、オペレータは、画像41~44に加えて画像45も併せて参照することにより、細胞の種類等を確認できる。

30

【0079】

<実施形態3>

図10に示すように、実施形態3では、実施形態1と比較して、粒子検出部20の構成が相違する。実施形態3では、波長1の前方散乱光と波長2の蛍光を検出する構成として、光学ユニット151と、集光レンズ152と、カメラ153が用いられる。細胞検出装置10の他の構成は、実施形態1と同様である。

【0080】

光学ユニット151は、2枚のダイクロイックミラーが組み合わせられた構成を有する。光学ユニット151の2枚のダイクロイックミラーは、波長1の前方散乱光および波長2の蛍光を、互いに僅かに異なる角度で反射し、後述するカメラ153の受光面153a上において分離させる。光学ユニット151は、波長4、5、6の蛍光を透過する。集光レンズ152は、波長1の前方散乱光および波長2の蛍光を集光する。カメラ153は、波長1の前方散乱光および波長2の蛍光を受光して、検出位置20aに位置付けられた粒子の画像情報を撮像信号として出力する。

40

【0081】

図11に示すように、カメラ153は、受光面153a上の領域161、162において、それぞれ、波長1の前方散乱光および波長2の蛍光を受光する。受光面153aは、カメラ153に配されたCMOSイメージセンサ等の撮像素子の受光面である。受光

50

面 1 5 3 a に照射される光の位置は、粒子が流路 1 7 a を移動することに合わせて、矢印で示すように、それぞれ領域 1 6 1、1 6 2 内で移動する。このように、光学ユニット 1 5 1 により 2 つの光が受光面 1 5 3 a 上において分離されるため、制御部 3 1 は、カメラ 1 5 3 が出力する撮像信号から各光に対応する信号を抽出できる。

【0082】

制御部 3 1 は、波長 1 の前方散乱光の強度と波長 2 の蛍光の強度を取得する場合、領域 1 6 1 から出力される信号を加算して波長 1 の前方散乱光の強度を取得し、領域 1 6 2 から出力される信号を加算して波長 2 の蛍光の強度を取得する。制御部 3 1 は、取得した各強度を、図 5 (a) のステップ S 1 0 3 において粒子の検出の際に参照する。粒子の画像を取得する場合、制御部 3 1 は、上記と同様にして前方散乱光の強度を取得し、取得した強度を、図 6 (a) のステップ S 3 0 4 において粒子が検出位置 2 0 a に位置付けられたか否かの判定の際に参照する。このとき、同時に、制御部 3 1 は、領域 1 6 1 からの撮像信号を処理して、粒子の明視野画像を生成する。制御部 3 1 は、生成した明視野画像を、図 9 (a)、(b) と同様に表示する。

10

【0083】

明視野画像が出力部 3 4 に表示されると、実施形態 2 と同様、オペレータは、明視野画像も併せて参照することにより、細胞の種類等を確認できる。粒子検出部 2 0 は、カメラ 1 5 3 に代えて、波長 1 の前方散乱光および波長 2 の蛍光をそれぞれ個別に受光するカメラを備えても良い。

20

【0084】

< 実施形態 4 >

図 1 2 に示すように、実施形態 4 では、実施形態 3 と比較して、ダイクロイックミラー 1 2 3 ~ 1 2 5 と、集光レンズ 1 2 6 ~ 1 2 8 と、カメラ 1 2 9 ~ 1 3 1 とが省略され、光学ユニット 1 5 1 の構成が変更されている。カメラ 1 5 3 の受光面には、後述する領域 1 6 3、1 6 4、1 6 5 がさらに追加されている。細胞検出装置 1 0 の他の構成は、実施形態 3 と同様である。

【0085】

光学ユニット 1 5 1 は、5 枚のダイクロイックミラーが組み合わせられた構成を有する。光学ユニット 1 5 1 の 5 枚のダイクロイックミラーは、波長 1 の前方散乱光および波長 2、4 ~ 6 の蛍光を、互いに僅かに異なる角度で反射し、カメラ 1 5 3 の受光面 1 5 3 a 上において分離させる。集光レンズ 1 5 2 は、波長 1 の前方散乱光および波長 2、4 ~ 6 の蛍光を集光する。カメラ 1 5 3 は、波長 1 の前方散乱光および波長 2、4 ~ 6 の蛍光を受光して、検出位置 2 0 a に位置付けられた粒子の画像情報を撮像信号として出力する。

30

【0086】

図 1 3 に示すように、カメラ 1 5 3 は、受光面 1 5 3 a 上の領域 1 6 1 ~ 1 6 5 において、それぞれ、波長 1 の前方散乱光および波長 2、4 ~ 6 の蛍光を受光する。このように、光学ユニット 1 5 1 により 5 つの光が受光面 1 5 3 a 上において分離されるため、制御部 3 1 は、カメラ 1 5 3 が出力する撮像信号から各光に対応する信号を抽出できる。領域 1 6 1、1 6 2 からの信号に基づく処理は、実施形態 3 と同様である。制御部 3 1 は、帰還流路 2 3 からフローセル 1 7 に撮像用試料を帰還させた場合に、検出位置 2 0 a に粒子が位置付けられたと判定すると、カメラ 1 5 3 が出力する撮像信号に基づいて、領域 1 6 1 に照射される前方散乱光に対応する明視野画像と、領域 1 6 3 ~ 1 6 5 に照射される蛍光に対応する画像を生成する。

40

【0087】

実施形態 4 では、実施形態 3 と比較して、粒子撮像部 2 8 のカメラ 1 2 9 ~ 1 3 1 が省略され、粒子検出部 2 0 のカメラ 1 5 3 が粒子撮像部 2 8 の撮像に共用されている。よって、実施形態 3 と比較して、細胞検出装置 1 0 の構成を簡素化できる。

【0088】

< 実施形態 5 >

50

図14(a)に示すように、実施形態5では、実施形態1と比較して、回収流路51と、バルブ52と、ダイヤフラムポンプ53と、回収部54と、が追加されている。細胞検出装置10の他の構成は、実施形態1と同様である。

【0089】

回収流路51は、中間貯留部25とバルブ26の間の帰還流路23と、回収部54と、を接続する。回収流路51には、バルブ52とダイヤフラムポンプ53が配置されている。ダイヤフラムポンプ53は、回収流路51に陽圧および陰圧を加えることが可能に構成されている。ダイヤフラムポンプ53が陰圧駆動されることにより、中間貯留部25に貯留されている濃縮された撮像用試料が、ダイヤフラムポンプ53内に引き込まれる。ダイヤフラムポンプ53が陽圧駆動されることにより、ダイヤフラムポンプ53に引き込まれた撮像用試料が、回収部54に送り出される。

10

【0090】

図14(b)に示すように、実施形態5では、実施形態1と比較して、図4の処理において、ステップS3に代えて、ステップS11、S12が追加されている。

【0091】

ステップS11において、制御部31は、撮像処理を行う。具体的には、制御部31は、後述する図15に示す処理と、図5(b)に示す処理とを並行して開始する。これにより、中間貯留部25により濃縮が行われた撮像用試料が、再度フローセル17に供給される。そして、再度フローセル17に供給された撮像用試料に含まれる粒子は、粒子撮像部28により撮像される。撮像された画像に基づいてCTCであると判定された粒子のみが、再度、帰還流路23に送られて中間貯留部25に貯留され、それ以外の粒子は廃液貯留部22に送られる。ステップS12において、制御部31は、濃縮処理と回収処理を行う。これにより、中間貯留部25に貯留された撮像用試料の濃縮が行われる。そして、濃縮が行われた撮像用試料は、回収部54に送られ、回収部54に回収される。ステップS12において、濃縮が行われることなく、撮像用試料が回収部54に回収されても良い。

20

【0092】

図15に示す処理では、図6(a)に示す処理と比較して、ステップS305の後段に、ステップS311、S312が追加されている。

【0093】

ステップS311において、制御部31は、ステップS305において生成した画像を解析して、この画像が示す粒子の判定を行う。具体的には、制御部31は、画像が示す粒子が、17番染色体に基づく2個の輝点と、Her2遺伝子に基づく3個以上の輝点とを核内に含む細胞であるか否か、すなわちCTCであるか否かを判定する。ステップS312において、制御部31は、粒子がCTCであると判定した場合に、この粒子が検出位置20aを通過したタイミングを記憶する。

30

【0094】

CTCであると判定された粒子は、図5(b)に示す処理において、粒子選別部21により帰還流路23に送られる。こうして、CTCであると判定された全ての粒子が帰還流路23に送られ、これら粒子を含む撮像用試料が、中間貯留部25により濃縮された後、回収部54に回収される。このように、CTCであると判定された粒子が回収部54に回収されると、オペレータは、CTCであると判定された粒子に対して、顕微鏡で観察する等の診断が可能となる。

40

【0095】

制御部31は、帰還流路23により帰還され粒子撮像部28により撮像された撮像用試料を、全て帰還流路23に送る処理を行っても良い。この場合、粒子撮像部28により撮像され帰還流路23に送られた撮像用試料は、中間貯留部25により濃縮された後、回収部54に回収される。こうすると、オペレータは、撮像された全ての粒子を顕微鏡で確認できる。

【0096】

<実施形態6>

50

図16(a)に示すように、実施形態6では、実施形態1と比較して、速度変更部19は、流路19fと、バルブ19gと、オリフィス19hと、をさらに備える。細胞検出装置10の他の構成は、実施形態1と同様である。

【0097】

流路19fは、シース液供給部18とフローセル17とを繋ぐ流路において、流路19a、19bと並列に配置されている。流路19fには、バルブ19gとオリフィス19hが配置されている。流路19fの断面の径は、流路19a、19bの断面の径と同じである。オリフィス19hの断面の径は、流路19fの断面の径よりも小さく、オリフィス19eの断面の径よりも大きい。バルブ19gのみが開けられた状態のとき、シース液供給部18から送り出されたシース液は、流路19fを通過してフローセル17に供給される。

10

【0098】

ここで、シース液が流路19fを通る場合にフローセル17に供給されるシース液の単位時間当たりの流量をV3とすると、オリフィス19hによって、V3は、V1よりも小さく、V2よりも大きくなる。したがって、フローセル17に供給されるシース液の単位時間当たりの流量がV1、V3、V2のとき、流路17aを流れる測定試料の速度を、それぞれ、第1速度、第2速度、第3速度とすると、第2速度は、第1速度よりも低速で、第3速度よりも高速となる。

【0099】

図16(b)に示すように、実施形態6では、実施形態1と比較して、図4の処理において、ステップS3に代えて、ステップS21~S23が追加されている。

20

【0100】

ステップS21において、制御部31は、撮像処理を行う。具体的には、制御部31は、図15に示す処理と、図5(b)に示す処理とを並行して開始する。これにより、中間貯留部25により濃縮が行われた撮像用試料が、再度フローセル17に供給される。そして、再度フローセル17に供給された撮像用試料に含まれる粒子は、粒子撮像部28により撮像される。撮像された画像に基づいてCTCであると判定された粒子のみが、帰還流路23に送られ、それ以外の粒子は廃液貯留部22に送られる。

【0101】

ステップS22において、制御部31は、CTCであると判定された粒子のみを含む撮像用試料を、中間貯留部25により濃縮する。ステップS23において、制御部31は、撮像処理を行う。具体的には、制御部31は、図17に示す処理を開始する。これにより、中間貯留部25により濃縮された撮像用試料が、再度フローセル17に供給される。そして、再度フローセル17に供給された撮像用試料に含まれる粒子は、粒子撮像部28により撮像される。ステップS23において撮像された撮像用試料は、廃液貯留部22に送られる。ステップS23において撮像された撮像用試料が、図14(a)に示すような回収部により回収されても良い。

30

【0102】

図17に示す処理では、図6(a)に示す処理と比較して、ステップS301に代えて、ステップS321が追加されている。ステップS321において、制御部31は、中間貯留部25によって濃縮された撮像用試料を、第2速度よりも遅い第3速度でフローセル17に流す。

40

【0103】

このように、2巡目においてCTCであると判定された粒子が、3巡目においてさらに低速でフローセル17に流されるため、CTCと判定された粒子のみを高い解像度で撮像できる。また、3巡目の撮像の前に、2巡目で高速にCTCの判定が行われCTC以外の粒子が除外される。これにより、3巡目において低速で撮像を行っても全体の処理時間を短く維持できる。

【0104】

第3速度による撮像を行うか否かをオペレータが設定可能であっても良い。第3速度による撮像を行わない場合、第2速度で撮像が行われる。また、第2速度による撮像の解析

50

結果に基づいて、制御部 3 1 が、第 3 速度による撮像を行うか否かを決定する構成であっても良い。この構成において、制御部 3 1 は、第 3 速度による撮像を行わないと決定した場合、図 1 6 (b) のステップ S 2 2 で濃縮した撮像用試料を、たとえば、実施形態 5 と同様、回収部 5 4 に回収する処理を実行する。測定試料および撮像用試料をフローセル 1 7 に流す速度は、4 段階以上であっても良い。

【 0 1 0 5 】

< 実施形態 7 >

被検細胞は、C T C に限られない。病状の判定および投薬の確認においては、たとえば、血管内皮細胞 (C E C : Circulating Endothelial Cell)、血管内皮前駆細胞 (E P C : Endothelial Progenitor Cell)、間葉系幹細胞 (M S C : Mesenchymal Stem Cell)、造血幹細胞 (H S C : Hematopoietic Stem Cell)、または抗原特異的 T 細胞等を撮像および検出することも有効である。これらの細胞は、これらの細胞に発現する表面抗原に対して蛍光標識された抗体を特異的に結合させることにより検出され得る。被検細胞は、実施形態 1 と同様、粒子撮像部 2 8 で撮像された撮像画像を解析することにより検出される。

10

【 0 1 0 6 】

実施形態 7 では、さらに、被検細胞に含まれるシグナル分子の細胞内の状態を確認することで、被検細胞の活性化状態が判定される。シグナル分子は、その挙動により被検細胞の機能性を評価可能な分子とされ得る。蛍光標識された抗体をシグナル分子に特異的に結合させることにより、シグナル分子が検出される。検出されたシグナル分子の状態を確認することにより、被検細胞の活性化状態等が判定される。シグナル分子の検出および活性化状態等の判定は、粒子撮像部 2 8 で撮像された撮像画像を解析することにより行われる。

20

【 0 1 0 7 】

被検細胞およびシグナル分子の蛍光標識に用いる色素は、実施形態 1 に例示された色素を用いても良いし、他の色素を用いても良い。蛍光標識に用いる抗体および色素に応じて、測定試料の調製で用いる試薬が変更される。また、これらの色素を励起する光の波長は、実施形態 1 のように単一の波長でも良く、あるいは、異なる波長であっても良い。各色素に蛍光を励起させる波長が互いに異なる場合、たとえば、図 2 に示す光源 1 2 1 は、マルチ発光レーザとされる。

【 0 1 0 8 】

実施形態 7 においても、実施形態 1 と同様、まずは、図 5 (a)、(b) のフローチャートにより被検細胞の選別が行われる。

30

【 0 1 0 9 】

被検細胞が、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞または間葉系幹細胞である場合、測定試料の調製において、所定の試薬が検体に混和される。ここで混和される試薬は、赤血球を溶血する試薬と、白血球を検出するための C D 4 5 の標識抗体を含む試薬と、被検細胞に発現する表面抗原に特異的に結合し色素で蛍光標識された抗体を含む試薬と、シグナル分子に特異的に結合し色素で蛍光標識された抗体を含む試薬と、核を染色する試薬である。実施形態 1 と同様、赤血球を溶血する試薬は省略されても良い。

【 0 1 1 0 】

図 5 (a) のステップ S 1 0 3 において、制御部 3 1 は、実施形態 1 と同様の処理を実行する。制御部 3 1 は、蛍光の強度が所定の閾値以下であり、かつ、前方散乱光の強度が所定の閾値以上である場合に、検出位置 2 0 a の粒子は被検細胞、すなわち血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞または間葉系幹細胞である可能性が高いと判定する。粒子が被検細胞である場合、粒子は C D 4 5 の標識抗体と結合しないため、蛍光の強度は所定値以下となる。ステップ S 1 0 3 において、制御部 3 1 は、白血球以外の粒子であり、かつ、粒子のサイズが大きい場合に、粒子が被検細胞、すなわち血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞または間葉系幹細胞である可能性が高いと判定する。

40

【 0 1 1 1 】

被検細胞が、造血幹細胞である場合、測定試料の調製において、所定の試薬が検体に混

50

和される。ここで混和される試薬は、赤血球を溶血する試薬と、造血幹細胞から分化する全ての血球を検出するための標識抗体を含む試薬と、造血幹細胞に発現する表面抗原に特異的に結合し色素で蛍光標識された抗体を含む試薬と、造血幹細胞中のシグナル分子に特異的に結合し色素で蛍光標識された抗体を含む試薬と、核を染色する試薬である。造血幹細胞から分化する全ての血球を検出するための標識抗体を含む試薬は、一般に、Lineageマーカーと呼ばれている。ここでは、Lineageマーカーの各抗体が同一の色素で標識される。実施形態1と同様、赤血球を溶血する試薬は省略されても良い。

【0112】

図5(a)のステップS103において、制御部31は、蛍光の強度が所定の閾値以下であり、かつ、前方散乱光の強度が所定の閾値以上である場合に、検出位置20aの粒子は被検細胞、すなわち造血幹細胞である可能性が高いと判定する。粒子が被検細胞である場合、粒子はLineageマーカーと結合しないため、蛍光の強度は所定値以下となる。また、造血幹細胞は、造血幹細胞から分化した他の全ての血球よりも大きい。したがって、ステップS103において、蛍光の強度が所定の閾値以下であり、かつ、前方散乱光の強度が所定の閾値以上である場合、検出位置20aの粒子は、造血幹細胞である可能性が高い。

10

【0113】

被検細胞が、抗原特異的T細胞である場合、測定試料の調製において、所定の試薬が検体に混和される。ここで混和される試薬は、赤血球を溶血する試薬と、LineageマーカーからCD2、CD3の抗体を除いた試薬と、T細胞に発現する表面抗原に特異的に結合するCD3の標識抗体を含む試薬と、T細胞のうち抗原特異的T細胞に発現する表面抗原に特異的に結合し色素で標識されたMHCテトラマーを含む試薬と、抗原特異的T細胞中のシグナル分子に特異的に結合し色素で蛍光標識された抗体を含む試薬と、核を染色する試薬である。ここでは、LineageマーカーからCD2、CD3を除いた抗体は同一の色素で標識される。実施形態1と同様、赤血球を溶血する試薬は省略されても良い。

20

【0114】

図5(a)のステップS103において、制御部31は、蛍光の強度が所定の閾値以下である場合に、検出位置20aの粒子はT細胞である可能性が高いと判定する。粒子がT細胞である場合、粒子はLineageマーカーと結合しないため、蛍光の強度は所定値以下となる。したがって、ステップS104において、蛍光の強度が所定の閾値以下である場合、検出位置20aの粒子は、T細胞である可能性が高い。

30

【0115】

こうして、被検細胞である可能性が高いか否かの判定を行った粒子に対し、制御部31は、図5(b)の処理を実行する。これにより、被検細胞の可能性が高いと判定された粒子が、流路17cを介して帰還流路23へと送られる。そして、制御部31は、中間貯留部25による濃縮を行って撮像用試料を再びフローセル17に供給し、図6(a)に示す処理を実行して、被検細胞である可能性が高い粒子を順次撮像する。

【0116】

以上の処理により、制御部31は、被検細胞、すなわち、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞または抗原特異的T細胞である可能性が高い粒子の画像を生成する。生成される画像には、被検細胞に発現する表面抗原に特異的に結合する標識抗体の蛍光の画像と、被検細胞中のシグナル分子に特異的に結合する標識抗体の蛍光の画像とが含まれる。カメラ129~131は、各標識抗体から生じる異なる波長の蛍光を受光して、蛍光ごとに画像情報を出力する。図8の構成の場合には、カメラ142からの撮像信号から、さらに粒子の明視野画像が生成される。

40

【0117】

撮像処理が終了すると、オペレータは、入力部33を介して細胞検出装置10に対して結果の表示指示を入力する。

【0118】

図18に示すように、オペレータにより結果の表示指示が入力され、ステップS411

50

でYESと判定すると、ステップS412において、制御部31は、撮像した全ての粒子の画像を画像解析して、被検細胞を抽出する。

【0119】

被検細胞が血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞または造血幹細胞である場合、制御部31は、ステップS412において、被検細胞に発現する抗体と特異的に結合する標識色素の画像を粒子ごとに参照し、この画像に所定強度を超える蛍光の領域が含まれているか否かを判定する。画像に蛍光の領域が含まれている場合、制御部31は、判定対象の粒子が被検細胞であると判定する。

【0120】

被検細胞が抗原特異的T細胞である場合、制御部31は、ステップS412において、まず、T細胞に発現する抗体と特異的に結合するCD3の標識色素の画像を粒子ごとに参照し、この画像に所定強度を超える蛍光の領域が含まれているか否かを判定する。画像に蛍光の領域が含まれている場合、制御部31は、判定対象の粒子がT細胞であると判定する。さらに、制御部31は、抗原特異的T細胞に発現する表面抗原に結合するMHCテトラマーの標識色素の画像を、T細胞であると判定した粒子ごとに参照し、この画像に所定強度を超える蛍光の領域が含まれているか否かを判定する。画像に蛍光の領域が含まれている場合、制御部31は、判定対象の粒子が抗原特異的T細胞であると判定する。

【0121】

さらに、ステップS413において、制御部31は、抽出した被検細胞の画像を解析して、細胞ごとに活性化の有無を判定し、活性化がある被検細胞を抽出する。ここで、制御部31は、シグナル分子に特異的に結合する標識色素の画像を参照し、細胞内におけるシグナル分子の状態を検出する。制御部31は、検出したシグナル分子の状態に基づいて、被検細胞の活性化の有無を判定する。

【0122】

たとえば、被検細胞が血管内皮細胞(CEC)である場合、シグナル分子はNF- κ Bとされ得る。ステップS413において、制御部31は、シグナル分子であるNF- κ Bが核内に局在しているか否かにより、血管内皮細胞の活性化の有無を判定する。血管内皮細胞は、血管の内壁から剥離して血液中に流れ込む。血管内皮細胞の剥離は、炎症による刺激の他、圧迫等による圧力の変化によっても生じる。制御部31は、これらの剥離原因のうち炎症による刺激によって生じた剥離を、シグナル分子であるNF- κ Bが核内に局在しているか否かによって判定する。制御部31は、炎症による刺激によって剥離した血管内皮細胞を、活性化がある血管内皮細胞として抽出する。

【0123】

図19(a)に示すように、炎症による刺激によって剥離した血管内皮細胞では、NF- κ Bが核内に局在する傾向にある。図19(a)の左図には、核の蛍光画像が示されている。図19(a)の左図では、便宜上、核の輪郭を示す破線が付記されている。図19(a)の右図には、シグナル分子であるNF- κ Bの蛍光画像が示され、さらに、左図の核に対応する領域が破線で示されている。図19(a)の左図および右図では、それぞれ、黒に近づくほど核からの蛍光およびNF- κ Bからの蛍光の強度が高くなっている。図19(a)の例では、シグナル分子であるNF- κ Bが核内に局在していることが分かる。

【0124】

図19(b)の例では、シグナル分子であるNF- κ Bが核内には局在していない。図19(b)の右図では、破線の領域が核の領域である。このように、炎症による刺激以外の刺激によって剥離した血管内皮細胞では、NF- κ Bが核内に局在しない傾向にある。制御部31は、シグナル分子の蛍光の画像を解析し、シグナル分子であるNF- κ Bが核内に局在しているか否かによって、血管内皮細胞の活性化の有無を判定する。

【0125】

被検細胞が血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞または抗原特異的T細胞である場合も、同様に、制御部31は、シグナル分子の局在位置に基づいて、これら細胞の機能性を評価し、傷害等の要因により増加した細胞を活性化がある細胞として抽出する。た

10

20

30

40

50

例えば、被検細胞が血管内皮前駆細胞または間葉系幹細胞である場合、制御部 3 1 は、シグナル分子の局在位置に基づいて、これら細胞の修復能を評価し、修復能が高い細胞を活性化がある細胞として抽出する。

【 0 1 2 6 】

なお、被検細胞の機能性の評価は、シグナル分子の局在位置に限らず、他の要素により行われても良い。機能性の評価に用いる要素に応じて、シグナル分子の種類も適宜変更され得る。

【 0 1 2 7 】

図 1 8 に戻り、ステップ S 4 1 4 において、制御部 3 1 は、ステップ S 4 1 2、S 4 1 3 において抽出した被検細胞の数と、活性化がある被検細胞の数とを出力部 3 4 に表示する。ステップ S 4 1 5 において、制御部 3 1 は、被検細胞の画像を出力部 3 4 に表示する。例えば、被検細胞が血管内皮細胞 (C E C) である場合、ステップ S 4 1 4、S 4 1 5 において、出力部 3 4 に図 2 0 (a)、(b) に示す画面 6 0 が表示される。

10

【 0 1 2 8 】

画面 6 0 には、血管内皮細胞 (C E C) の数と、活性化がある血管内皮細胞 (C E C) の数と、血管内皮細胞 (C E C) の画像が表示される。オペレータは、血管内皮細胞 (C E C) の数を参照することにより、血液中で血管内皮細胞が増加しているか否かを知ることができる。また、活性化がある血管内皮細胞 (C E C) の数を参照することにより、活性化状態にある血管内皮細胞の割合を把握することができる。これらの情報は、医師等の治療の指針を決定するための有用な情報となり得る。

20

【 0 1 2 9 】

横方向に並ぶ 2 枚の画像は、同じ 1 つの粒子についての画像である。画像 6 1 は、核に特異的に結合する標識抗体により生じた蛍光の画像であり、画像 6 2 は、シグナル分子に特異的に結合する標識抗体により生じた蛍光の画像である。上記のように、シグナル分子は、血管内皮細胞に含まれるタンパク質である N F B である。血管内皮細胞の検出には、血管内皮細胞に発現する抗原に特異的に結合する C D 1 4 6 の標識抗体が用いられる。なお、画像 6 1、6 2 は、階調の反転を行った後、グレースケールに変換したものである。画像 6 1、6 2 とともに、明視野の画像がさらに画面 6 0 に含まれても良い

【 0 1 3 0 】

図 2 0 (a) に示す粒子の画像は、活性化がある血管内皮細胞の画像であり、図 2 0 (b) に示す粒子の画像は、活性化がない血管内皮細胞の画像である。血管内皮細胞の粒子の画像が複数ある場合、オペレータは、画面 6 0 上で粒子の画像を切り替えて表示できる。さらに、活性化がある血管内皮細胞の画像の表示と、活性化がない血管内皮細胞の画像の表示とを個別に表示可能なボタン等を、画面 6 0 上に別途設けても良い。

30

【 0 1 3 1 】

実施形態 7 では、C T C の他、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞または抗原特異的 T 細胞等の、病状の判定および投薬の確認において有用な細胞の画像が取得され、これら細胞の画像が、抽出された細胞の数とともに、オペレータの要求に応じて表示される。医師等は、表示された情報を、治療の指針の決定に役立てることができる。

40

【 0 1 3 2 】

例えば、心筋梗塞や脳梗塞に罹患した患者は、健常者に比べて血管内皮細胞の数が増加する。また、組織に損傷があると、健常者に比べて血管内皮前駆細胞および間葉系幹細胞の数が増加する。したがって、医師等は、これらの細胞の数を把握することにより、患者が心筋梗塞等の疾患に罹患している可能性や患者の組織に損傷が生じている可能性を把握できる。

【 0 1 3 3 】

さらに、実施形態 7 では、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞または抗原特異的 T 細胞の活性化状態が、シグナル分子の挙動に基づいて検出され表示される。このように、被検細胞の活性化状態がさらに表示されることにより、被検細胞の

50

検出結果の特異性がさらに高められ得る。

【0134】

たとえば、被検細胞が血管内皮細胞である場合、図20(a)、(b)に示すように、血管内皮細胞(CEC)の数とともに活性化がある血管内皮細胞(CEC)の数が表示される。これにより、医師等は、炎症による刺激によって剥離した血管内皮細胞の数を正確に把握でき、患者が心筋梗塞等の疾患に罹患している可能性をよりの確に把握できる。また、最近では、特定の抗原に应答するT細胞が免疫療法に利用されている。たとえば、癌細胞に特異的に应答できるT細胞を血中に戻し、その効能をモニタリングすることが治療法として試行されつつある。実施形態7では、このモニタリングにおいて、抗原特異的T細胞の活性化状態をその細胞数および画像により、医師等に提示できる。これにより、医師等は、この免疫治療の効果を確認できる。

10

【0135】

<実施形態8>

実施形態8では、CTCと判定された粒子およびCECと判定された粒子が回収される。実施形態8では、測定試料の調製において、実施形態1と比較して、さらに実施形態7で示したCECを検出するための試薬が混和される。また、実施形態8では、光源121は、CTCとCECをそれぞれ撮像するための、2種類の波長の光を出射するよう構成されている。

【0136】

図21に示すように、実施形態8では、実施形態1と比較して、フローセル17は、回収出口174をさらに備え、内部に流路17eをさらに備える。流路17eは、流路17aと流路17bとの間において流路17aから分岐し、回収出口174に繋がっている。粒子選別部21は、部材21b、21cをさらに備える。細胞検出装置10は、回収流路71と、バルブ72と、中間貯留部73と、バルブ74、75と、ダイヤフラムポンプ76、77と、回収部78、79と、をさらに備える。回収流路71は、フローセル17の回収出口174と繋がっている。細胞検出装置10の他の構成は、実施形態1と同様である。

20

【0137】

粒子選別部21は、部材21b、21cをそれぞれ流路17c、17eに突出させる。部材21aが流路17bを開放する位置に位置付けられると、分岐位置17dにある粒子は、流路17bを経由して廃液貯留部22に送られる。部材21bが流路17cを開放する位置に位置付けられ、部材21a、21cがそれぞれ流路17b、17eを塞ぐ位置に位置付けられると、分岐位置17dにある粒子は、流路17cを経由して帰還流路23に送られる。部材21cが流路17eを開放する位置に位置付けられ、部材21a、21bがそれぞれ流路17b、17cを塞ぐ位置に位置付けられると、分岐位置17dにある粒子は、流路17eを経由して回収流路71に送られる。

30

【0138】

図22に示すように、オペレータにより開始指示が入力されると、ステップS31において、制御部31は検出処理を行う。これにより、試料容器10bの測定試料がフローセル17に供給され、この測定試料に含まれる粒子が、粒子検出部20により検出される。受光部108が受光する前方散乱光と蛍光に基づいて、検出位置20aに位置付けられた粒子が、CTCまたはCECである可能性が高いか否かが判定される。具体的には、波長2の蛍光の強度が所定の閾値以下であり、かつ、波長1の前方散乱光の強度が所定の閾値以上である場合に、制御部31は、検出位置20aの粒子がCTCまたはCECである可能性が高い粒子と判定する。

40

【0139】

CTCまたはCECである可能性が高い粒子は、流路17cを介して帰還流路23に送られる。それ以外の粒子は、流路17bを介して廃液貯留部22に送られる。ステップS32において、制御部31は、帰還流路23に送られた撮像用試料を中間貯留部25により濃縮する。

50

【 0 1 4 0 】

ステップ S 3 3 において、制御部 3 1 は撮像処理を行う。これにより、中間貯留部 2 5 により濃縮された撮像用試料が再度フローセル 1 7 に供給され、この撮像用試料に含まれる粒子が、粒子撮像部 2 8 により撮像される。このとき、光源 1 2 1 は、CTC を撮像するための波長の光を出射する。粒子撮像部 2 8 により取得される蛍光画像に基づいて、粒子が CTC であるか否かが判定される。CTC と判定された粒子は、流路 1 7 e を介して回収流路 7 1 に送られ、CTC でないと判定された粒子は、流路 1 7 c を介して帰還流路 2 3 に送られる。

【 0 1 4 1 】

ステップ S 3 4 において、制御部 3 1 は、回収流路 7 1 に送られた撮像用試料に対して中間貯留部 7 3 による濃縮処理を行い、中間貯留部 7 3 によって濃縮された撮像用試料を回収部 7 8 に回収する。これにより、CTC と判定された粒子が、回収部 7 8 に回収される。一方、ステップ S 3 5 において、制御部 3 1 は、帰還流路 2 3 に送られた撮像用試料を中間貯留部 2 5 により濃縮する。

10

【 0 1 4 2 】

ステップ S 3 6 において、制御部 3 1 は撮像処理を行う。これにより、中間貯留部 2 5 により濃縮された撮像用試料が再度フローセル 1 7 に供給され、この撮像用試料に含まれる粒子が、粒子撮像部 2 8 により撮像される。このとき、光源 1 2 1 は、CEC を撮像するための波長の光を出射する。粒子撮像部 2 8 により取得される蛍光画像に基づいて、粒子が CEC であるか否かが判定される。CEC と判定された粒子は、流路 1 7 e を介して回収流路 7 1 に送られ、CEC でないと判定された粒子は、流路 1 7 b を介して廃液貯留部 2 2 に送られる。

20

【 0 1 4 3 】

ステップ S 3 7 において、制御部 3 1 は、回収流路 7 1 に送られた撮像用試料に対して中間貯留部 7 3 による濃縮処理を行い、中間貯留部 7 3 によって濃縮された撮像用試料を回収部 7 9 に回収する。これにより、CEC と判定された粒子が、回収部 7 9 に回収される。

【 0 1 4 4 】

実施形態 8 によれば、細胞検出装置 1 0 による 1 回の動作により、CTC の画像および CEC の画像を取得することができ、さらに CTC および CEC を個別に回収できる。これにより、CTC の撮像および回収と、CEC の撮像および回収とを別々に行う場合に比べて、オペレータの手間を省略でき、処理にかかる時間を短縮できる。回収される粒子は、CTC および CEC に限られず、EPC 等、さらに他の粒子であっても良い。

30

【 符号の説明 】

【 0 1 4 5 】

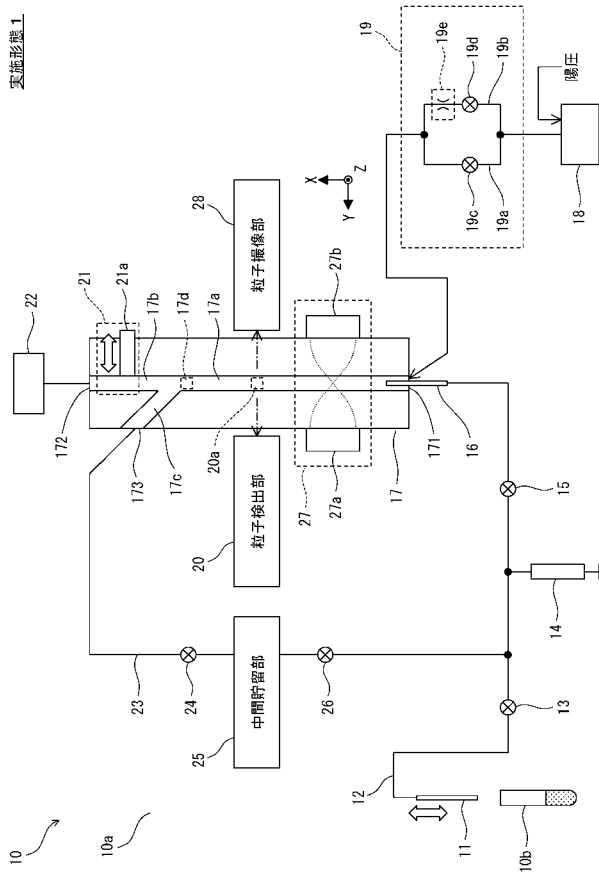
- 1 0 細胞検出装置
- 1 0 a 試料供給部
- 1 7 フローセル
- 1 7 a 流路
- 1 8 シース液供給部
- 1 9 速度変更部
- 2 0 粒子検出部
- 2 0 a 検出位置
- 2 1 粒子選別部
- 2 3 帰還流路
- 2 5 中間貯留部
- 2 7 粒子整列部
- 2 8 粒子撮像部
- 3 1 制御部
- 3 4 出力部

40

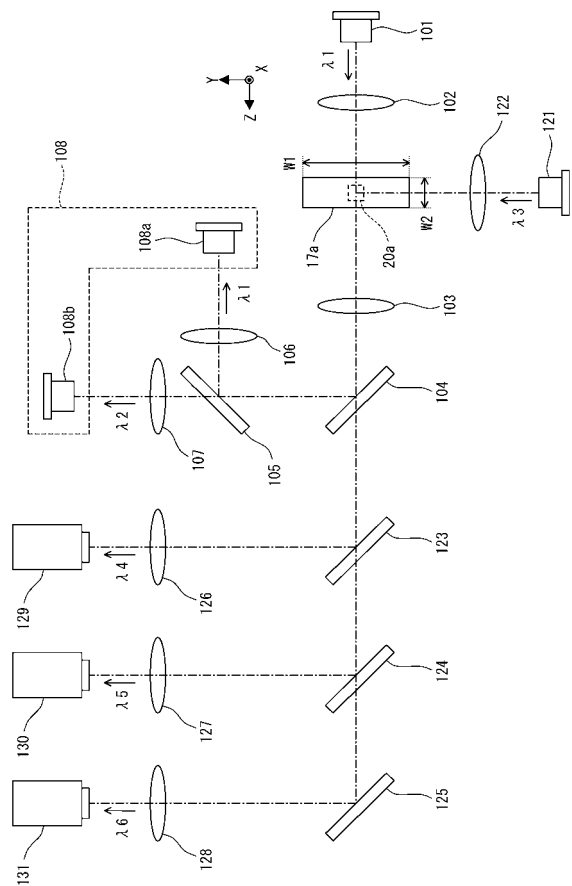
50

- 54、78、79 回収部
- 101 光源
- 108 受光部
- 108a 第1検出器
- 108b 第2検出器
- 151 光学ユニット
- 153 カメラ

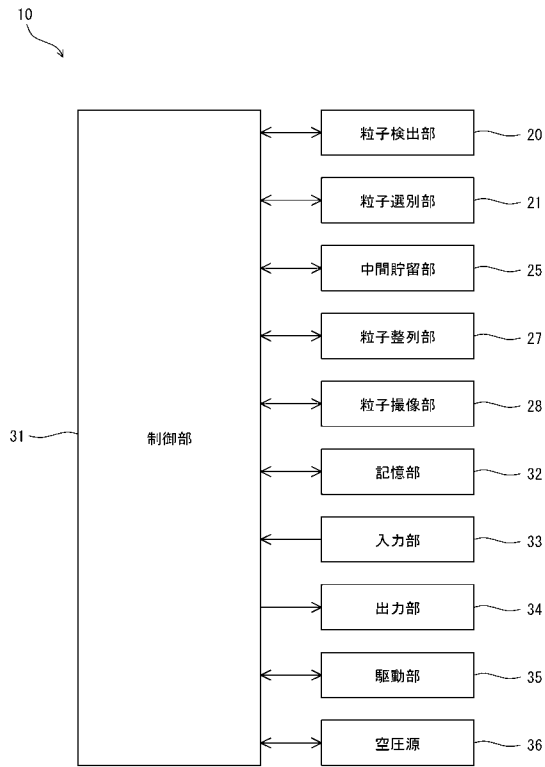
【図1】



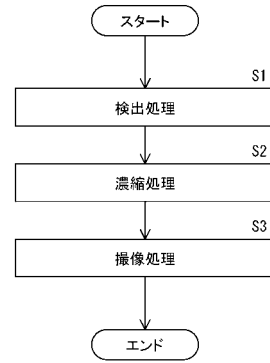
【図2】



【 図 3 】

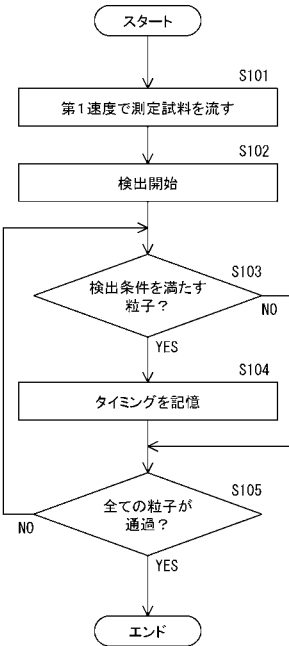


【 図 4 】

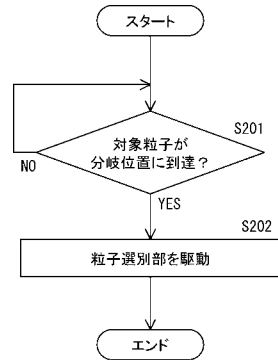


【 図 5 】

(a)

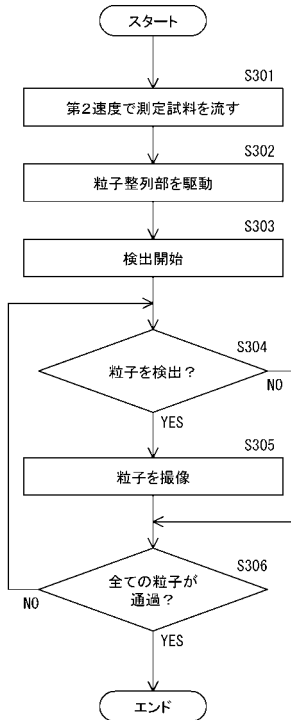


(b)

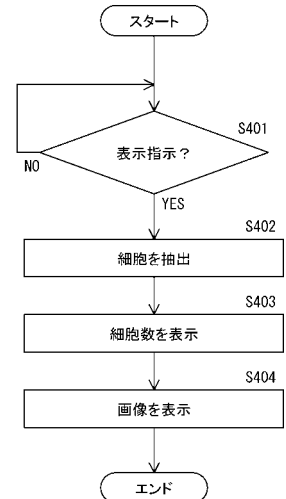


【 図 6 】

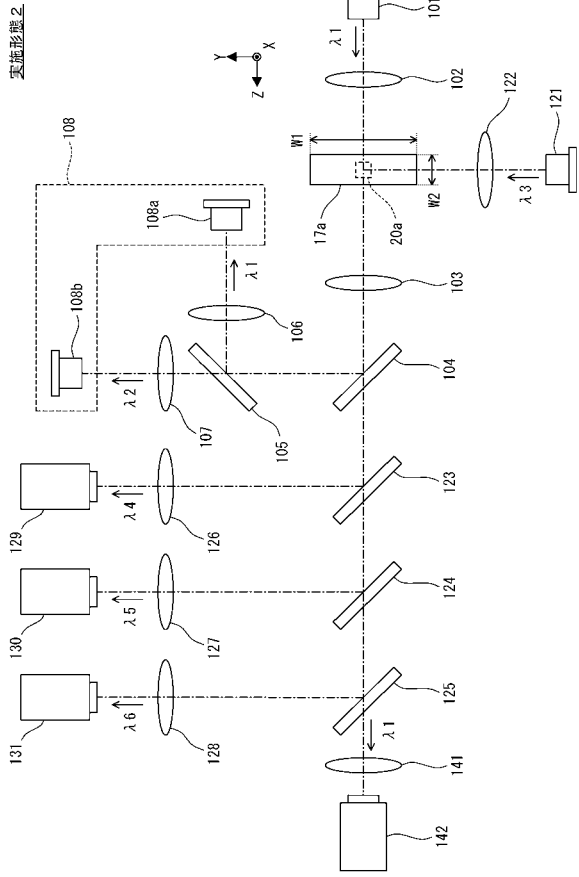
(a)



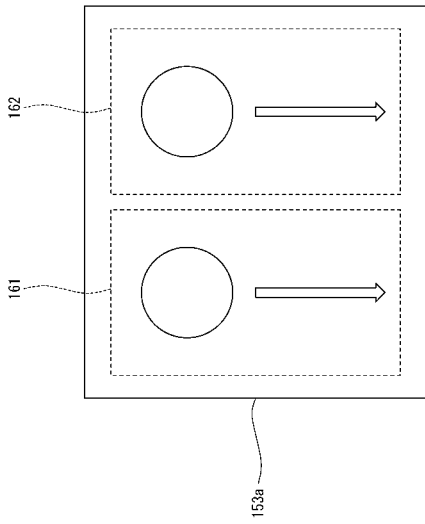
(b)



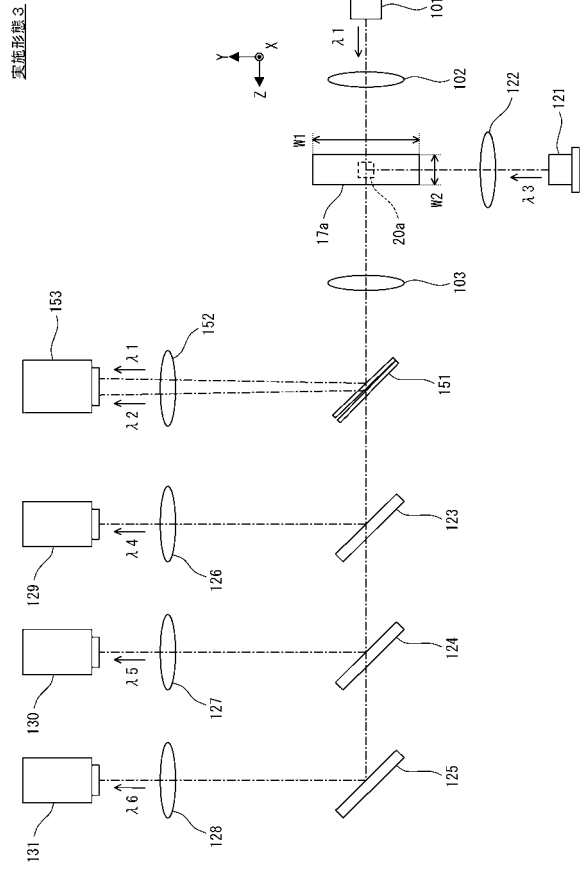
【 図 8 】



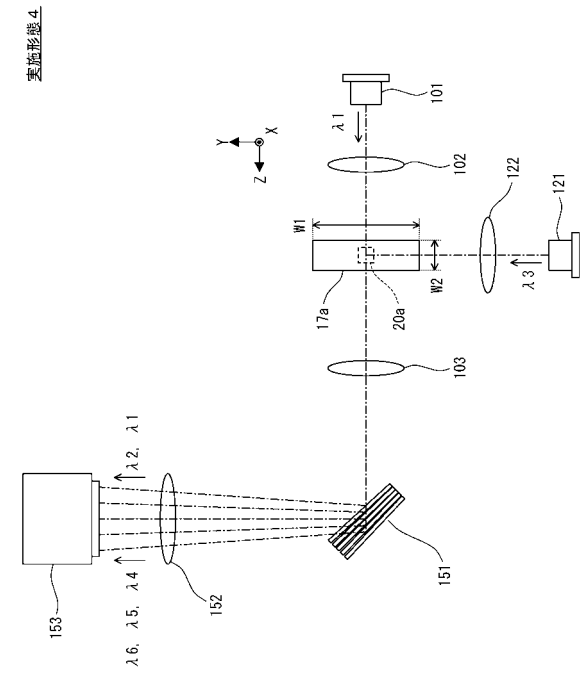
【 図 1 1 】



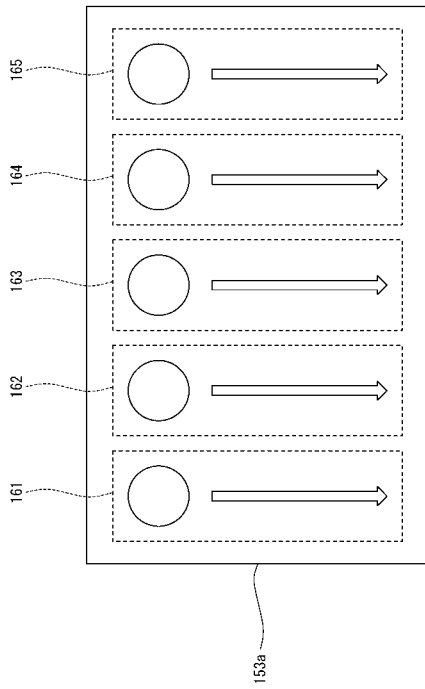
【 図 1 0 】



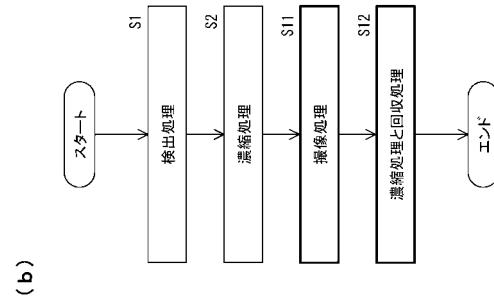
【 図 1 2 】



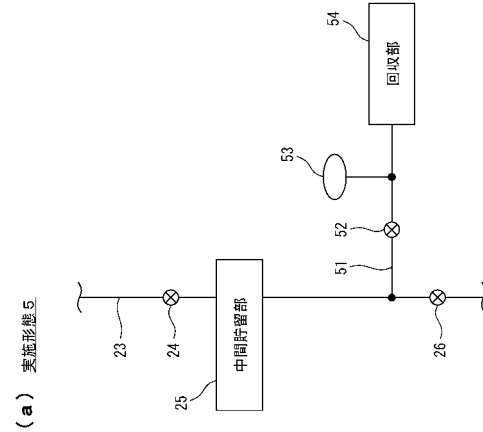
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

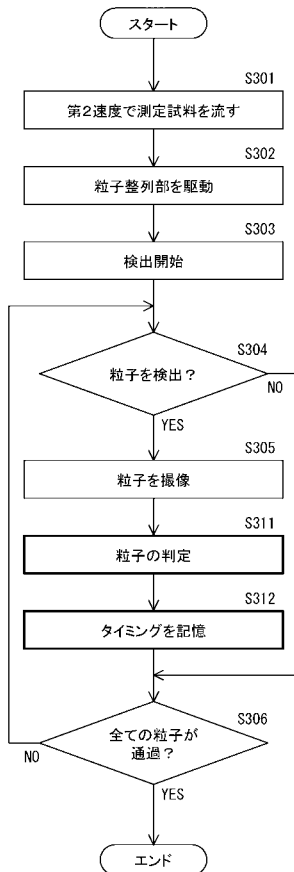


(b)

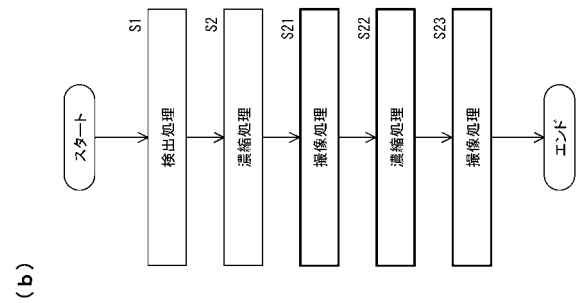


(a) 実施形態5

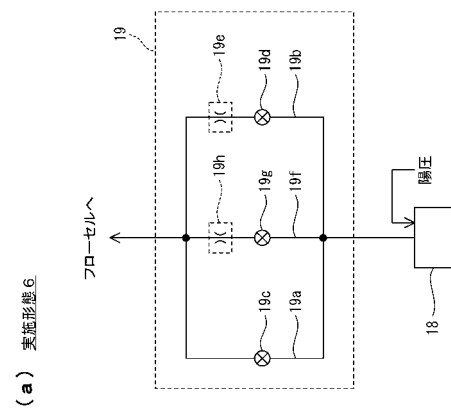
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

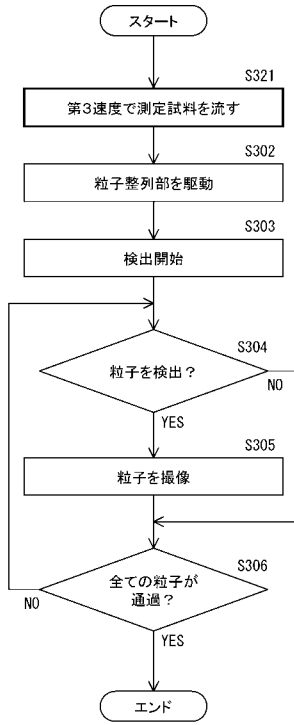


(b)



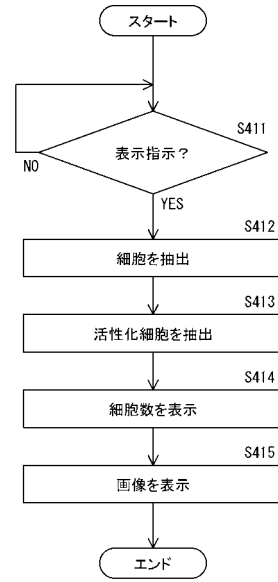
(a) 実施形態6

【 図 1 7 】

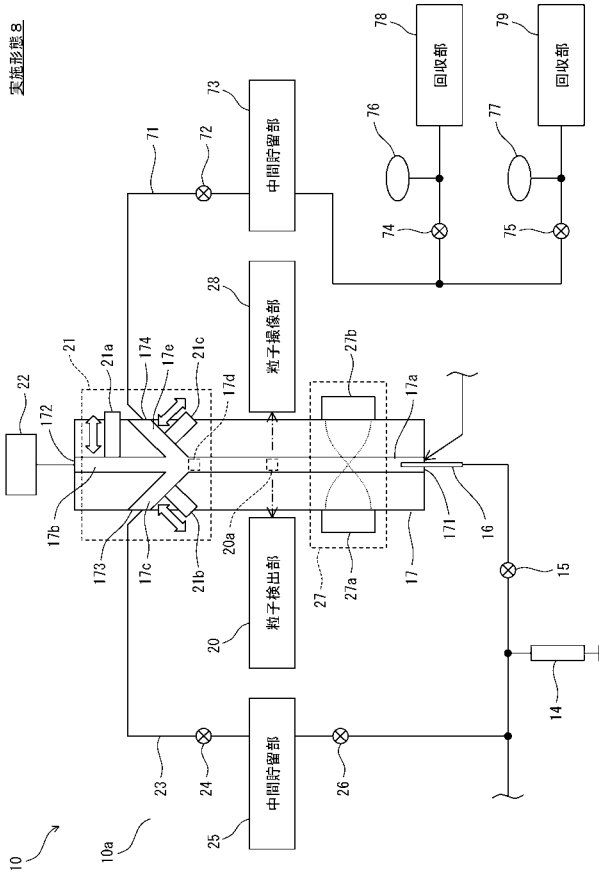


【 図 1 8 】

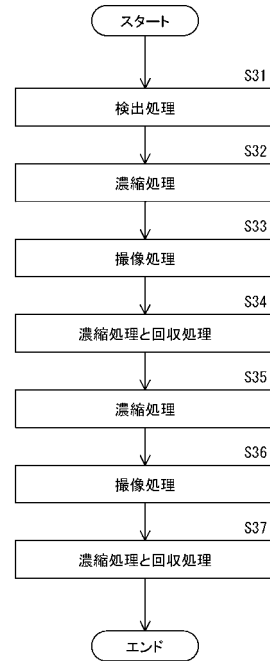
実施形態 7



【 図 2 1 】

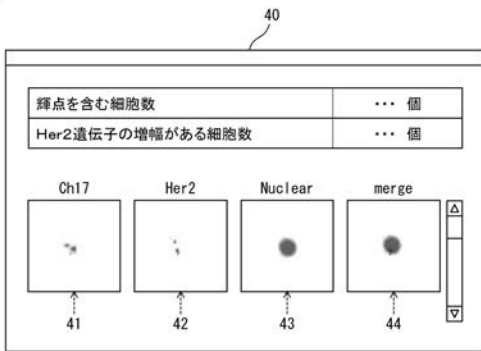


【 図 2 2 】

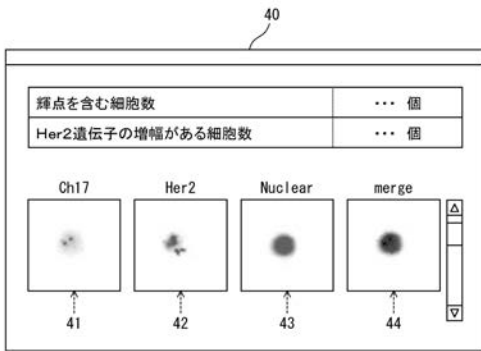


【 図 7 】

(a)

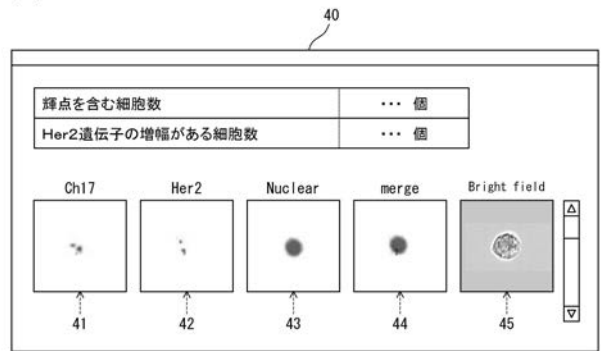


(b)

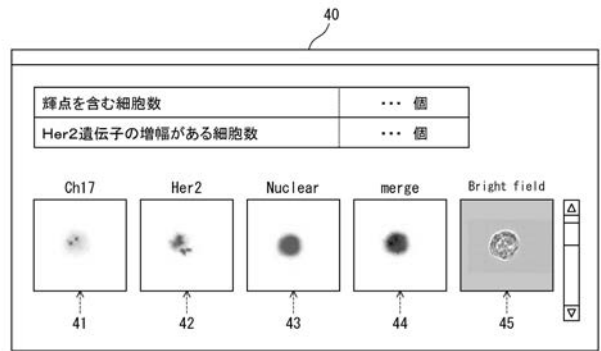


【 図 9 】

(a)

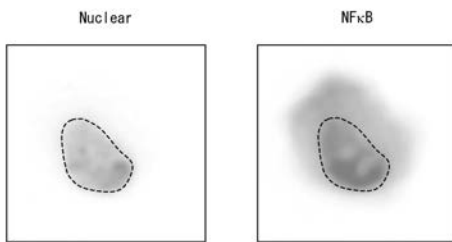


(b)

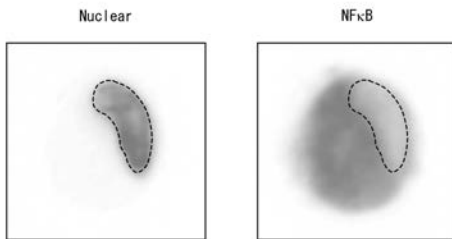


【 図 1 9 】

(a) 活性化あり

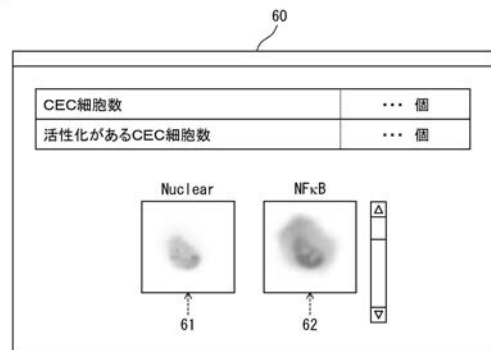


(b) 活性化なし

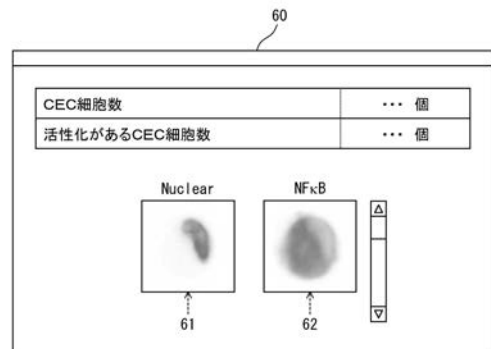


【 図 2 0 】

(a)



(b)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 15/00

C

G 0 1 N 15/00

B

G 0 1 N 33/48

M