

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第5259305号  
(P5259305)

(45) 発行日 平成25年8月7日 (2013.8.7)

(24) 登録日 平成25年5月2日 (2013.5.2)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14 D
GO 1 N 21/49 (2006.01)	GO 1 N 15/14 B
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/49 Z
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 21/64 Z
	GO 1 N 33/48 M

請求項の数 11 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2008-222537 (P2008-222537)	(73) 特許権者	390014960
(22) 出願日	平成20年8月29日 (2008.8.29)		シスメックス株式会社
(65) 公開番号	特開2009-103687 (P2009-103687A)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(43) 公開日	平成21年5月14日 (2009.5.14)	(72) 発明者	福田 正和
審査請求日	平成23年8月17日 (2011.8.17)		兵庫県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
(31) 優先権主張番号	特願2007-259777 (P2007-259777)	(72) 発明者	石坂 正樹
(32) 優先日	平成19年10月3日 (2007.10.3)		兵庫県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
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
前置審査		審査官	島田 英昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞分析装置及び細胞分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

子宮頸部から採取した上皮細胞を分析するための細胞分析装置であって、  
核が染色された前記上皮細胞を含む測定試料を流すフローセルと、  
このフローセルを流れる測定試料に光を照射する光源部と、  
前記測定試料の流れ方向の径が4～7 μmであり、当該測定試料の流れに直交する方向の径が300～600 μmであるビームスポットを、前記フローセルを流れる測定試料上に形成し得る光学系と、  
前記測定試料からの光を受光し、前記フローセルを流れる測定試料からの散乱光を検出する散乱光検出器および前記フローセルを流れる測定試料からの蛍光を検出する蛍光検出器を有する受光部と、  
前記散乱光検出器から出力される散乱光信号から前記上皮細胞の大きさを反映した値を取得するとともに、前記蛍光検出器から出力される蛍光信号から前記上皮細胞の核の大きさを反映した値を取得する信号処理部と  
を備え、  
前記信号処理部が、前記上皮細胞の大きさを反映した値として、散乱光信号のパルス幅を取得するとともに、前記上皮細胞の核の大きさを反映した値として、蛍光信号のパルス幅を取得するように構成されていることを特徴とする細胞分析装置。

【請求項 2】

前記信号処理部で得られた、前記上皮細胞の大きさを反映した値及び前記上皮細胞の核

の大きさを反映した値に基づいて、前記上皮細胞が異常であるか否かを判定する分析部をさらに備えている請求項 1 に記載の細胞分析装置。

【請求項 3】

前記分析部が、前記散乱光信号のパルス幅および前記蛍光信号のパルス幅の比を取得するように構成されている請求項 2に記載の細胞分析装置。

【請求項 4】

前記信号処理部は、前記蛍光検出器から出力された蛍光信号から、前記上皮細胞の核の DNA 量を反映した値を取得し、

前記信号処理部で得られた、前記上皮細胞の核の大きさを反映した値及び前記上皮細胞の核の DNA 量を反映した値に基づいて、前記上皮細胞が異常であるか否かを判定する分析部をさらに備えている請求項 1 に記載の細胞分析装置。

10

【請求項 5】

測定試料の流れ方向に絞られた光の焦点深度が  $20 \sim 110 \mu\text{m}$  となるようにビームスポットが形成される請求項 1 ～ 4のいずれか一項に記載の細胞分析装置。

【請求項 6】

前記信号処理部は、前記蛍光検出器から出力された蛍光信号から、前記上皮細胞の核の DNA 量を反映した値を取得し、

前記信号処理部で得られた、前記上皮細胞の核の DNA 量とその出現頻度の分布を指標とし、前記上皮細胞が異常であるか否かを判定する分析部をさらに備えている請求項 1 に記載の細胞分析装置。

20

【請求項 7】

子宮頸部から採取され、核が染色された上皮細胞を含む測定試料をフローセルに流し、前記測定試料に光を照射して、当該測定試料からの光を利用して前記上皮細胞を分析する細胞分析方法であって、

前記測定試料の流れ方向の径が  $4 \sim 7 \mu\text{m}$  であり、当該測定試料の流れに直交する方向の径が  $300 \sim 600 \mu\text{m}$  であるビームスポットを、前記フローセルを流れる測定試料上に形成し、前記測定試料から散乱光及び蛍光を検出する検出工程と、

前記散乱光から生成された散乱光信号から前記上皮細胞の大きさを反映した値を取得するとともに、前記蛍光から生成された蛍光信号から前記上皮細胞の核の大きさを反映した値を取得する取得工程と、を備え、

30

前記上皮細胞の大きさを反映した値として、散乱光信号のパルス幅を取得するとともに、前記上皮細胞の核の大きさを反映した値として、蛍光信号のパルス幅を取得することを特徴とする細胞分析方法。

【請求項 8】

前記上皮細胞の大きさを反映した値及び前記上皮細胞の核の大きさを反映した値に基づいて、前記上皮細胞が異常であるか否かを判定する判定工程を含む請求項 7に記載の細胞分析方法。

【請求項 9】

前記判定工程において、前記散乱光信号のパルス幅および前記蛍光信号のパルス幅の比に基づいて判定を行う請求項 8に記載の細胞分析方法。

40

【請求項 10】

前記取得工程において、前記蛍光から生成された蛍光信号から前記上皮細胞の核の DNA 量を反映した値を取得し、

前記上皮細胞の核の大きさを反映した値及び前記上皮細胞の核の DNA 量を反映した値に基づいて、前記上皮細胞が異常であるか否かを判定する判定工程を含む請求項 7に記載の細胞分析方法。

【請求項 11】

前記取得工程において、前記蛍光から生成された蛍光信号から前記上皮細胞の核の DNA 量を反映した値を取得し、

前記信号処理部で得られた、前記上皮細胞の核の DNA 量とその出現頻度の分布を指標

50

とし、前記上皮細胞が異常であるか否かを判定する判定工程を含む請求項 7 に記載の細胞分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞分析装置及び細胞分析方法に関する。さらに詳しくは、フローセルを流れる測定試料にレーザー光を照射し、当該測定試料からの光を利用して測定試料に含まれる細胞の分析を行う細胞分析装置及び細胞分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

フローサイトメトリー法を用いて、血球を含む測定試料にレーザー光を照射し、測定試料からの散乱光や蛍光を利用して、血液中の白血球および当該白血球の核を測定する分析装置が知られている（例えば、特許文献 1 参照）。

前記特許文献 1 に記載のフローサイトメトリー法は、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 前後の大きさの白血球を測定するために用いられている。したがって、特許文献 1 に記載の分析装置においては、例えば子宮頸部の上皮細胞のように、 $20\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 程度の大きさを有する細胞を高精度に測定することは困難であった。

【0003】

【特許文献 1】特開平 2 - 93342 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであり、フローサイトメトリー法を用いて、子宮頸部から採取した  $20\sim 100\text{ }\mu\text{m}$  程度の大きさを有する上皮細胞を高精度に測定することができる細胞分析装置及び細胞分析方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の細胞分析装置は、子宮頸部から採取した上皮細胞を分析するための細胞分析装置であって、核が染色された前記上皮細胞を含む測定試料を流すフローセルと、このフローセルを流れる測定試料に光を照射する光源部と、前記測定試料の流れ方向の径が  $4\sim 7\text{ }\mu\text{m}$  であり、当該測定試料の流れに直交する方向の径が  $300\sim 600\text{ }\mu\text{m}$  であるビームスポットを、前記フローセルを流れる測定試料上に形成し得る光学系と、前記測定試料からの光を受光し、前記フローセルを流れる測定試料からの散乱光を検出する散乱光検出器および前記フローセルを流れる測定試料からの蛍光を検出する蛍光検出器を有する受光部と、前記散乱光検出器から出力される散乱光信号から前記上皮細胞の大きさを反映した値を取得するとともに、前記蛍光検出器から出力される蛍光信号から前記上皮細胞の核の大きさを反映した値を取得する信号処理部とを備え、前記信号処理部が、前記上皮細胞の大きさを反映した値として、散乱光信号のパルス幅を取得するとともに、前記上皮細胞の核の大きさを反映した値として、蛍光信号のパルス幅を取得するように構成されていることを特徴としている。

【0006】

本発明の細胞分析方法は、子宮頸部から採取され、核が染色された上皮細胞を含む測定試料をフローセルに流し、前記測定試料に光を照射して、当該測定試料からの光を利用して前記上皮細胞を分析する細胞分析方法であって、前記測定試料の流れ方向の径が  $4\sim 7\text{ }\mu\text{m}$  であり、当該測定試料の流れに直交する方向の径が  $300\sim 600\text{ }\mu\text{m}$  であるビームスポットを、前記フローセルを流れる測定試料上に形成し、前記測定試料から散乱光及び蛍光を検出する検出工程と、前記散乱光から生成された散乱光信号から前記上皮細胞の大きさを反映した値を取得するとともに、前記蛍光から生成された蛍光信号から前記上皮細胞の核の大きさを反映した値を取得する取得工程と、を備え、前記上皮細胞の大きさを反映した値として、散乱光信号のパルス幅を取得するとともに、前記上皮細胞の核の大きさ

10

20

30

40

50

を反映した値として、蛍光信号のパルス幅を取得することを特徴としている。

【発明の効果】

【0007】

本発明の細胞分析装置及び細胞分析方法によれば、フローサイトメトリー法を用いて、 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ 程度の大きさを有する細胞を高精度に測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、添付図面を参照しつつ、本発明の細胞分析装置及び細胞分析方法の実施の形態を詳細に説明する。

10

[細胞分析装置の全体構成]

図1は、本発明の一実施の形態に係る細胞分析装置10の斜視説明図である。この細胞分析装置10は、患者から採取した細胞を含む測定試料をフローセルに流し、このフローセルを流れる測定試料にレーザ光を照射し、測定試料からの光（前方散乱光、側方蛍光など）を検出・分析することで、前記細胞に癌・異型細胞が含まれているか否かを判断するのに用いられ、具体的には、子宮頸部の上皮細胞を用いて子宮頸癌をスクリーニングするのに用いられる。細胞分析装置10は、試料の測定などを行う装置本体12と、この装置本体12に接続され、測定結果の分析などを行うシステム制御部13とを備えている。

【0009】

図2は、図1に示される細胞分析装置10の構成を示すブロック図である。細胞分析装置10の装置本体12は、測定試料から細胞や核のサイズなどの情報を検出するための光学検出部3と、信号処理回路4と、測定制御部16と、モータ、アクチュエータ、バルブなどの駆動部17と、各種センサ18とを備えている。信号処理回路4は、光学検出部3の出力をブリアンプ（図示せず）により増幅したものに対して増幅やフィルタ処理等を行うアナログ信号処理回路と、アナログ信号処理回路の出力をデジタル信号に変換するA/Dコンバータと、デジタル信号に対して所定の波形処理を行うデジタル信号処理回路とを備えている。また、測定制御部16が、センサ18の信号を処理しつつ駆動部17の動作を制御することにより、測定試料の吸引や測定が行われる。子宮頸癌をスクリーニングする場合、測定試料としては、患者の子宮頸部から採取した細胞（上皮細胞）に遠心（濃縮）、希釈（洗浄）、攪拌（タッピング）、PI染色などの公知の処理を施して調製されたものを用いることができる。調製された測定試料は試験管に収容され、装置本体12のピペット（図示せず）下方位置に設置され、当該ピペットにより吸引されてフローセルに供給される。上記PI染色は、蛍光染色液であるヨウ化プロピジウム（PI）により行われる。PI染色では核に選択的に染色が施されるため、核からの蛍光が検出可能となる。

20

30

【0010】

[測定制御部の構成]

測定制御部16は、マイクロプロセッサ20、記憶部21、I/Oコントローラ22、センサ信号処理部23、駆動部制御ドライバ24、及び外部通信コントローラ25などを備えている。記憶部21は、ROM、RAMなどからなり、ROMには、駆動部17を制御するための制御プログラム、及び、制御プログラムの実行に必要なデータが格納されている。マイクロプロセッサ20は、制御プログラムをRAMにロードし、又はROMから直接実行することが可能である。

40

【0011】

マイクロプロセッサ20には、センサ18の信号がセンサ信号処理部23及びI/Oコントローラ22を通じて伝達される。マイクロプロセッサ20は、制御プログラムを実行することにより、センサ18の信号に応じて、I/Oコントローラ22及び駆動部制御ドライバ24を介して駆動部17を制御することができる。

マイクロプロセッサ20が処理したデータや、マイクロプロセッサ20の処理に必要なデータは、外部通信コントローラ25を介してシステム制御部13などの外部の装置との間で送受信される。

50

## 【 0 0 1 2 】

## [ システム制御部の構成 ]

図 3 は、システム制御部 1 3 のブロック図である。システム制御部 1 3 は、パーソナルコンピュータなどからなり、本体 2 7 と、表示部 2 8 と、入力部 2 9 とから主に構成されている。本体 2 7 は、CPU 2 7 a と、ROM 2 7 b と、RAM 2 7 c と、ハードディスク 2 7 d と、読出装置 2 7 e と、入出力 ( I / O ) インターフェース 2 7 f と、画像出力インターフェース 2 7 g と、から主に構成されている。これらの間は、バス 2 7 h によって通信可能に接続されている。

## 【 0 0 1 3 】

CPU 2 7 a は、ROM 2 7 b に記憶されているコンピュータプログラム及び RAM 2 7 c にロードされたコンピュータプログラムを実行することが可能である。ROM 2 7 b は、マスク ROM、PROM、EPROM、EEPROM などによって構成されており、CPU 2 7 a に実行されるコンピュータプログラム及びこれに用いるデータなどが格納されている。RAM 2 7 c は、SRAM 又は DRAM などによって構成されている。RAM 2 7 c は、ROM 2 7 b 及びハードディスク 2 7 d に記録されているコンピュータプログラムの読み出しに用いられる。また、これらのコンピュータプログラムを実行するときに、CPU 2 7 a の作業領域として利用される。

## 【 0 0 1 4 】

ハードディスク 2 7 d は、オペレーティングシステム及びアプリケーションプログラムなど、CPU 2 7 a に実行させるための種々のコンピュータプログラム及びそのコンピュータプログラムの実行に用いるデータがインストールされている。例えば、ハードディスク 2 7 d には、米マイクロソフト社が製造販売する Windows (登録商標) などのグラフィカルユーザーインターフェース環境を提供するオペレーティングシステムがインストールされている。

また、ハードディスク 2 7 d には、細胞分析装置 1 0 の測定制御部 1 6 への測定オーダ (動作命令) の送信、装置本体 1 2 で測定した測定結果の受信及び処理、処理した分析結果の表示などを行う操作プログラムがインストールされている。この操作プログラムは、当該オペレーティングシステム上で動作するものとしている。

## 【 0 0 1 5 】

読出装置 2 7 e は、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROM ドライブ、又は DVD-ROM ドライブなどによって構成されており、可搬型記録媒体に記録されたコンピュータプログラム又はデータを読み出すことができる。I/O インターフェース 2 7 f は、例えば、USB、IEEE 1394、RS-232C などのシリアルインタフェース、SCSI、IDE、IEEE 1284 などのパラレルインタフェース、及び D/A 変換器、A/D 変換器などからなるアナログインタフェースなどから構成されている。I/O インターフェース 2 7 f には、キーボード及びマウスからなる入力部 2 9 が接続されており、ユーザーが入力部 2 9 を使用することにより、パーソナルコンピュータにデータを入力することが可能である。また、I/O インターフェース 2 7 f は、装置本体 1 2 と接続されており、装置本体 1 2 との間でデータ等の送受信を行うことが可能である。

画像出力インターフェース 2 7 g は、LCD 又は CRT などによって構成された表示部 2 8 に接続されており、CPU 2 7 a から与えられた画像データに応じた映像信号を表示部 2 8 に出力するようになっている。表示部 2 8 は、入力された映像信号にしたがって、画像 (画面) を表示する。

## 【 0 0 1 6 】

## [ 光学検出部の構成 ]

図 4 は、光学検出部 3 の構成を示す図である。図において、レンズ系 (光学系) 5 2 は、光源である半導体レーザ 5 3 から放射されたレーザ光を、フローセル 5 1 を流れる測定試料に集光し、集光レンズ 5 4 は測定試料中の細胞の前方散乱光を散乱光検出器であるフォトダイオード 5 5 に集光する。上記レンズ系 5 2 は、簡単のために単一のレンズとして図示しているが、より詳細には、図 8 及び図 9 に示すように、半導体レーザ 5 3 側からコ

10

20

30

40

50

リメータレンズ52a、シリンダーレンズ系（平凸シリンダーレンズ52b + 両凹シリンダーレンズ52c）及びコンデンサレンズ系（コンデンサレンズ52d + コンデンサレンズ52e）からなるレンズ群として構成することができる。

【0017】

図8に示されるように、光学検出部3を側面から見ると、半導体レーザ53から発せられた放射状のレーザ光は、コリメータレンズ52aで平行光に変換され、平凸シリンダーレンズ52b及び両凹シリンダーレンズ52cを屈折することなく通過し、コンデンサレンズ52d及びコンデンサレンズ52eによりフローセル51を流れる測定試料中の第1集光点Aに集光される。

【0018】

一方、図9に示されるように、光学検出部3を上方から見ると、半導体レーザ53から発せられた放射状のレーザ光は、コリメータレンズ52aで平行光に変換され、平凸シリンダーレンズ52bにより測定試料の流れに直交する方向に収束され、両凹シリンダーレンズ52cにより測定試料の流れに直交する方向に発散され、コンデンサレンズ52d及びコンデンサレンズ52eによりフローセル51の後方の第2集光点Bに集光される。

【0019】

このようなレンズ系52により、第1集光点Aにおけるビーム形状（半導体レーザ53側から見たビーム形状）は、測定試料の流れ方向に収束し、測定試料の流れに直交する方向に延びた長楕円形状となる。具体的には、フローセル51を流れる測定試料の流れ方向の径が3～8μmであり、測定試料の流れに直交する方向の径が300～600μmであるビームスポットが、その第1集光点Aを測定試料の流れ方向を通る平面上に形成しつつ、フローセル51を流れる測定試料に照射される。

【0020】

なお、フローセル51を流れる測定試料上に形成される光（ビームスポット）を、測定試料の流れ方向の径を3～8μmに形成し、測定試料の流れに直交する方向の径を300～600μmに形成することができるのであれば、レンズ系52は上記の構成に限定されるものではなく、適宜変更してもよい。

【0021】

他の集光レンズ56は前記細胞又は細胞中の核の側方散乱光と側方蛍光とをダイクロイックミラー57に集光する。ダイクロイックミラー57は、側方散乱光を散乱光検出器であるフォトマルチプライヤ58へ反射し、側方蛍光を蛍光検出器であるフォトマルチプライヤ59の方へ透過させる。これらの光は、測定試料中の細胞や核の特徴を反映したものとなっている。そして、フォトダイオード55、フォトマルチプライヤ58及びフォトマルチプライヤ59は、検出した光を電気信号に変換し、それぞれ、前方散乱光信号（FSC）、側方散乱光信号（SSC）及び側方蛍光信号（SFL）を出力する。これらの出力は、図示しないプリアンプにより増幅された後、前述した信号処理回路4（図2）に供される。

【0022】

信号処理回路4でフィルタ処理やA/D変換処理等の信号処理が施されて得られた前方散乱光データ、側方散乱光データ及び側方蛍光データ（SFL）は、マイクロプロセッサ20によって、外部通信コントローラ25を介して、前述したシステム制御部13へ送られる。システム制御部13では、前方散乱光データ、側方散乱光データ及び側方蛍光データに基づいて、細胞や核を分析するためのスクアットグラムが作成される。また、システム制御部13は、信号処理回路4から受信した測定データを用いて、測定試料中の細胞が異常であるか否か、具体的には、癌化した細胞又は異型細胞であるか否かを判断する。

なお、光源として、前記半導体レーザに代えてガスレーザを用いることもできるが、低コスト、小型、且つ低消費電力である点で半導体レーザを採用することが好ましく、半導体レーザの採用により製品コストを低減させるとともに、装置の小型化及び省電力化を図ることができる。本実施の形態では、ビームを狭く絞ることに有利な波長の短い青色半導体レーザを用いている。青色半導体レーザは、PI等の蛍光励起波長に対しても有効であ

10

20

30

40

50

る。なお、半導体レーザのうち、低コスト且つ長寿命であり、メーカーからの供給が安定している赤色半導体レーザを用いてもよい。

【 0 0 2 3 】

本発明では、光学系である前記レンズ系 5 2 によって、特定の大きさのビームスポットが形成される。具体的には、フローセル 5 1 を流れる測定試料の流れ方向の径が 3 ~ 8  $\mu$  m であり、測定試料の流れに直交する方向の径が 3 0 0 ~ 6 0 0  $\mu$  m である、略楕円形のビームスポットが測定試料上に形成される。図 5 はビームスポットを通過する細胞の説明図であり、図において上下方向がフローセルを流れる測定試料の流れ方向である。図 5 において、右側のビームスポットは血液中の赤血球や白血球を検出するのに用いられている従来の一般的装置におけるビームスポットであり、左側のビームスポットは本発明の細胞分析装置の光学系により形成されるビームスポットである。作図上、ビームスポットの長手方向の寸法は、これと直交する方向（図において上下方向）の寸法に比べて縮小して描いているが、本発明の実際のビームスポットは、非常に細長い断面形状を呈している。

【 0 0 2 4 】

子宮頸部の上皮細胞の大きさは約 6 0  $\mu$  m であり、また核の大きさは 5 ~ 7  $\mu$  m である。この細胞が癌化・異型化すると細胞分裂の頻度が異常に多くなり、核は 1 0 ~ 1 5  $\mu$  m の大きさとなる。これにより、N / C 比（核の大きさ / 細胞の大きさ）が正常な細胞に比べて大きくなる。したがって、細胞と核の大きさを検出することによって、細胞が癌化・異型化したか否かの判断指標とすることができる。

【 0 0 2 5 】

そこで、本実施の形態では、フローセルを流れる測定試料からの散乱光をフォトダイオード 5 5 で検出するとともに、フローセルを流れる測定試料からの蛍光をフォトマルチプライヤ 5 9 で検出し、信号処理回路 4 で、フォトダイオード 5 5 から出力された散乱光信号から測定対象細胞の大きさを反映した値である散乱光信号のパルス幅を取得するとともに、フォトマルチプライヤ 5 9 から出力された蛍光信号から測定対象細胞の核の大きさを反映した値である蛍光信号のパルス幅を取得している。図 1 0 は光学検出部 3 により検出された光の信号波形を示す図であり、縦軸は検出された光の強度を示し、横軸は光の検出時間を示している。図 1 0 に示されるように、パルス幅とは信号波形の幅を表し、本実施の形態では、ベースラインより大きい強度を示す信号波形の幅をパルス幅として用いている。ベースラインは適宜設定することができる。散乱光信号のパルス幅は、測定対象細胞がフローセル中の感知領域を通過している間の通過時間を示し、蛍光信号のパルス幅は、測定対象細胞の核がフローセル中の感知領域を通過している間の通過時間を示す。この信号処理回路 4 で得られた、測定対象細胞の大きさを反映した値（散乱光信号のパルス幅）及び測定対象細胞の核の大きさを反映した値（蛍光信号のパルス幅）に基づいて、測定対象細胞が異常であるか否かを分析部であるシステム制御部 1 3 で行うように構成されている。具体的には、システム制御部 1 3 は、蛍光信号のパルス幅を散乱光信号のパルス幅を除いた値が所定の閾値より大きい場合に、測定対象細胞が異常であると判定する。

【 0 0 2 6 】

ビームスポットにおける、測定試料の流れ方向の径を 3 ~ 8  $\mu$  m としていることから、核検出の S / N 比を向上させることができ、核の大きさを高精度に検出することができる。本実施の形態では、核に P I 染色を施し、核の大きさを反映した値として核からの蛍光信号のパルス幅を用いているが、P I 染色では、核以外に細胞膜も若干染色され、また、染色に用いた染料の残りがフローセルを流れることから、核以外からも蛍光が生じる。そのため、蛍光検出器であるフォトマルチプライヤ 5 9 は、核以外からのノイズとなる蛍光も検出することになる。しかしながら、光学検出部 3 のレンズ系 5 2 によりビームスポットにおける測定試料の流れ方向の径が 3 ~ 8  $\mu$  m と小さくされるため、核から生じる蛍光と核以外から生じる蛍光とをより明確に峻別することができる。すなわち、核の大きさ（5 ~ 7  $\mu$  m）を考慮してビームスポットの径を 3 ~ 8  $\mu$  m と小さくすることによって、ノイズを減らして蛍光信号のパルスの立ち上がりをシャープにしてパルス幅を精度よく測定することができる。その結果、核の大きさを高精度に検出することができる。

## 【 0 0 2 7 】

ビームスポットにおける前記流れ方向の径を  $3\text{ }\mu\text{m}$  よりも小さくしようとすると、レンズ系 5 2 の焦点距離を短くする必要がある、レーザ光の強度が安定な領域（焦点深度）が浅くなる。図 1 1 は、測定試料の流れ方向におけるビーム形状を示す図である。図 1 1 に示されるように、焦点深度は、ビーム径がビームスポットにおけるビーム径  $D$  の 1 . 1 倍になるまでの領域を示し、ビーム径が大きくなるにつれて光の強度は弱くなる。焦点深度が浅くなると、 $20\sim100\text{ }\mu\text{m}$  程度の大きさを有する細胞の核にレーザ光を安定的に照射することができなくなる。一方、前記流れ方向の径が  $8\text{ }\mu\text{m}$  よりも大きくなると、核以外から生じるノイズとなる蛍光の検出割合が大きくなる。そのため、蛍光信号のパルスの立ち上がりがなだらかになり、蛍光信号のパルス幅の範囲がばやけてしまうため、測定精度が低下する。また、複数の細胞の核がビームスポット内を同時に通過する頻度が多くなり、この点からも測定精度が低下する。そのため、上記の焦点深度を考慮して、ビームスポットにおける、測定試料の流れ方向の径を選定するのが好ましい。具体的には、測定試料の流れ方向に絞られたレーザ光の焦点深度が  $20\sim110\text{ }\mu\text{m}$  となるようにビームスポットを形成するのが好ましい。なお、レーザ光を安定的に核に照射するためには、ビームスポットの上記流れ方向の径は、 $3.5\sim7.5\text{ }\mu\text{m}$  であることが好ましく、より好ましいのは  $4\sim7\text{ }\mu\text{m}$  である。

10

## 【 0 0 2 8 】

また、ビームスポットにおける、測定試料の流れに直交する方向の径が  $300\sim600\text{ }\mu\text{m}$  の範囲にあることから、子宮頸部の上皮細胞（約  $60\text{ }\mu\text{m}$  程度）全体をレーザビームの安定領域（ガウス分布をなすレーザ光のピーク強度を 1 とすると、強度が 0 . 9 5 以上となる領域のこと）を通過させることができる。これにより、細胞から安定した散乱光を得ることができ、細胞の大きさを高精度に測定することができる。流れに直交する方向の径が  $300\text{ }\mu\text{m}$  よりも小さくなると、レーザビームの安定領域が狭くなり、細胞からの安定した散乱光が得られなくなる。一方、流れに直交する方向の径が  $600\text{ }\mu\text{m}$  よりも大きくなると、中心付近のレーザ光の強度が弱くなり、やはり安定した散乱光が得られなくなる。なお、細胞から安定した散乱光を得るためには、測定試料の流れに直交する方向の径は、 $350\sim550\text{ }\mu\text{m}$  であることが好ましい。

20

## 【 0 0 2 9 】

## 〔細胞分析方法〕

つぎに、細胞分析装置 1 0（図 1）を用いた細胞分析方法の実施の形態について説明する。

30

## 【 0 0 3 0 】

まず、フローセルに流す測定試料の調製が使用者の手動により行われる。具体的には、患者の子宮頸部から採取した細胞（上皮細胞）に遠心（濃縮）、希釈（洗浄）、攪拌、PI 染色などの公知の処理を施すことで測定試料が調製される。ついで、使用者により、調製された測定試料が試験管（図示せず）に収容され、試験管が装置本体のピペット（図示せず）下方位置に設置される。

## 【 0 0 3 1 】

次に、図 1 2 及び図 1 3 を参照して、システム制御部 1 3 の処理の流れについて説明する。まず、システム制御部 1 3 の電源が入れると、システム制御部 1 3 の CPU 2 7 a は、システム制御部 1 3 に格納されているコンピュータプログラムの初期化を行う（ステップ S 1）。次に、CPU 2 7 a は、使用者からの測定指示を受け付けたか否かを判断し（ステップ S 2）、測定指示を受け付けた場合には、I/O インターフェイス 2 7 f を介して、測定開始信号を装置本体 1 2 に送信する（ステップ S 3）。測定指示を受け付けなかった場合には、CPU 2 7 a は、ステップ S 6 の処理に移行する。

40

## 【 0 0 3 2 】

測定開始信号が装置本体 1 2 に送信されると、装置本体 1 2 において、試験管に収容された測定試料がピペットにより吸引されて図 4 に示すフローセル 5 1 に供給される。そして、フローセル 5 1 を流れる測定試料にレーザ光が照射され、測定試料からの前方散乱光

50



がフォトダイオード 55 により検出され、側方散乱光がフォトマルチプライヤ 58 で検出され、側方蛍光がフォトマルチプライヤ 59 により検出される。

【0033】

ついで、光学検出部 3 から出力された前方散乱光信号 (FSC)、側方散乱光信号 (SSC)、蛍光信号 (SFL) が信号処理回路 4 に供され、信号処理回路 4 で所定の処理が施されて得られた測定データは、外部通信コントローラ 25 を介して、システム制御部 13 に送信される。

【0034】

一方、システム制御部 13 の CPU 27a は、装置本体 12 から、外部通信コントローラ 25 を介して測定データを受信したか否かを判断し (ステップ S4)、測定データを受信した場合には、細胞分析処理を実行する (ステップ S5)。測定データを受信しなかった場合には、CPU 27a は、ステップ S6 の処理に移行する。

【0035】

細胞分析処理の後、CPU 27a は、シャットダウン指示を受け付けたか否かを判断し (ステップ S6)、シャットダウン指示を受け付けた場合には、処理を終了する。シャットダウン指示を受け付けなかった場合には、CPU 27a は、ステップ S2 の処理に戻る。

【0036】

次に、図 13 を参照して、ステップ S5 の細胞分析処理について説明する。まず、CPU 27a は、装置本体 12 から受信した測定データをハードディスク 27d に記憶する (ステップ S51)。

【0037】

次に、CPU 27a は、測定データに含まれる前方散乱光データの特徴パラメータ情報 (散乱光信号のパルス幅 (FSCW)) 及び側方蛍光データの特徴パラメータ情報 (蛍光信号のパルス幅 (SFLW)) から、蛍光信号のパルス幅を散乱光信号のパルス幅で除した値 (FSCW/SFLW) を取得し (ステップ S52)、取得した値を RAM 27c に記憶する (ステップ S53)。

【0038】

そして、CPU 27a は、蛍光信号のパルス幅を散乱光信号のパルス幅で除した値 (FSCW/SFLW) を、所定の閾値 T と比較することにより、細胞が異常細胞か否かを判断する (ステップ S54)。ここで、次の式 (1) が成立している場合は、対象の細胞は異常細胞であり、式 (1) が成立していない場合は、対象の細胞は正常細胞である。

$$FSCW/SFLW \geq T \cdots (1)$$

【0039】

以上の実施の形態では、散乱光から求められる細胞の大きさを反映する値と、蛍光から求められる核の大きさを反映する値とから、細胞の癌化・異型化を判断しているが、核の大きさと、この核に含まれる DNA 量とから細胞の癌化・異型化を判断することもできる。以下、核の大きさと、核中の DNA 量とから細胞の癌化・異型化を判断する第 2 実施形態について説明する。

【0040】

第 2 実施形態では、装置本体 12 において、フローセルを流れる測定試料からの蛍光がフォトマルチプライヤ 59 で検出され、信号処理回路 4 で、フォトマルチプライヤ 59 から出力された蛍光信号に基づいて、測定対象細胞の核の大きさを反映した値と、核中の DNA 量を反映した値とが取得される。細胞の核の大きさを反映する値としては、前述したように、蛍光信号のパルス幅 (SFLW) とすることができ、また、核中の DNA 量を反映する値としては蛍光信号のパルスの面積 (SFLI) とすることができ、図 10 に示されるように、蛍光信号のパルスの面積 (蛍光量) は、ベースラインと蛍光信号波形とで囲まれた部分の面積を表す。ベースラインは適宜設定することができる。細胞が癌化・異型化すると、細胞分裂が活発化する結果、DNA 量が多くなるとともに核自体の大きさが大きくなる。したがって、核の大きさと DNA 量の両者を癌化・異型化の指標とすること

10

20

30

40

50

により、細胞が癌化・異型化したか否かを高精度に判断することができる。

【 0 0 4 1 】

図 6 は、大部分が癌化・異型化していない正常な細胞である測定試料を測定することにより得られた DNA 量の分布例を示しており、横軸において、出現頻度がピークを迎える DNA 量を「 1 」とし、その 2 倍の DNA 量を「 2 」としている。右側のピークは正常な細胞分裂をしている細胞によるものである。細胞が癌化・異型化して異常な細胞分裂が行われるようになると、上記「 2 」で示される位置よりも右側の DNA 量を有する細胞の分布が多くなる。

【 0 0 4 2 】

システム制御部 1 3 の CPU 2 7 a は、信号処理回路 4 で得られた、核の大きさを反映した蛍光信号のパルス幅 ( S F L W ) 及び核の DNA 量を反映した蛍光信号のパルスの面積 ( S F L I ) を含む測定データを外部通信コントローラ 2 5 を介して装置本体 1 2 から受信すると、第 2 細胞分析処理を実行する。

10

【 0 0 4 3 】

図 1 4 は、システム制御部 1 3 の CPU 2 7 a による第 2 細胞分析処理を示すフローチャートである。以下、図 1 4 を参照して、第 2 細胞分析処理について説明する。まず、CPU 2 7 a は、装置本体 1 2 から受信した測定データをハードディスク 2 7 d に記憶する ( ステップ S 5 0 1 ) 。

【 0 0 4 4 】

次に、CPU 2 7 a は、測定データに含まれる側方蛍光データの特徴パラメータ情報 ( 蛍光信号のパルス幅 ( S F L W ) 及び蛍光信号のパルスの面積 ( S F L I ) ) を RAM 2 7 c に読み出す ( ステップ S 5 0 2 ) 。

20

【 0 0 4 5 】

次に、CPU 2 7 a は、蛍光信号のパルス幅 ( S F L W ) を縦軸にとり、蛍光信号のパルスの面積 ( S F L I ) を横軸にとった S F L W - S F L I スキャッタグラムを作成する ( ステップ S 5 0 3 ) 。 S F L W - S F L I スキャッタグラムの一例を図 7 に示す。図 7 は、DNA 量と核の大きさとの関係を示しており、左下の領域に分布しているのが正常な細胞群である。細胞が癌化・異型化すると、核が大きくなるとともに、DNA 量も多くなることから、癌化・異型化した細胞は、図 7 において右上の領域に分布する。したがって、DNA 量及び核の大きさについて領域 G に含まれる細胞を癌・異型細胞と判断することができる。

30

【 0 0 4 6 】

続いて、CPU 2 7 a は、蛍光信号のパルス幅 ( S F L W ) を所定の閾値 M と比較し、蛍光信号のパルスの面積 ( S F L I ) を所定の閾値 N と比較することにより、細胞が異常細胞か否かを判別する ( ステップ S 5 0 4 ) 。具体的には、CPU 2 7 a は、次の式 ( 2 ) ( 3 ) の両方が成立している場合は、対象の細胞を異常細胞と判定し、式 ( 2 ) ( 3 ) の少なくとも一方が成立していない場合は、対象の細胞を正常細胞と判定する。

$$S F L W \quad M \cdots ( 2 )$$

$$S F L I \quad N \cdots ( 3 )$$

【 0 0 4 7 】

なお、今回開示された実施の形態は、すべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は、上記した実施の形態の説明ではなく特許請求の範囲によって示され、さらに特許請求の範囲と均等の意味および範囲内でのすべての変更が含まれる。

40

【 0 0 4 8 】

たとえば、本実施の形態では、子宮頸部の細胞の癌化・異型化を検出しているが、本発明はこれに限られない。口腔細胞、膀胱や咽頭など他の上皮細胞、さらには臓器の細胞の癌化・異型化を検出するのに用いてもよい。

【 0 0 4 9 】

また、本実施の形態では、測定対象細胞の大きさを反映した値として散乱光信号のバル

50

ス幅を用い、測定対象細胞の核の大きさを反映した値として蛍光信号のパルス幅を用いているが、本発明はこれに限られない。測定対象細胞の大きさを反映した値として散乱光信号のパルスの高さをを用い、測定対象細胞の核の大きさを反映した値として蛍光信号のパルスの高さをを用いてもよい。

【 0 0 5 0 】

また、本実施の形態では、測定対象細胞の核の大きさを示す値を測定対象細胞の大きさを示す値で除した値が所定の閾値よりも大きい場合に、測定対象細胞を異常と判定しているが、本発明はこれに限られない。測定対象細胞の大きさを示す値を測定対象細胞の核の大きさを示す値で除した値が所定の閾値よりも小さい場合に、測定対象細胞を異常と判定してもよい。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 1 】

【図 1】本発明の細胞分析装置の一実施の形態の斜視説明図である。

【図 2】図 1 に示される細胞分析装置の構成を示すブロック図である。

【図 3】システム制御部を構成するパソコンのブロック図である。

【図 4】光学検出部の構成を示す図である。

【図 5】ビームスポットを通過する細胞の説明図である。

【図 6】DNA 量の分布例を示す図である。

【図 7】DNA 量と核の大きさとの関係を示すスキャッタグラムである。

【図 8】光学検出部の側面図である。

20

【図 9】光学検出部の平面図である。

【図 10】信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。

【図 11】測定試料の流れ方向におけるビーム形状を示す図である。

【図 12】システム制御部の CPU による処理の流れを示すフローチャートである。

【図 13】システム制御部の CPU により細胞分析処理を示すフローチャートである。

【図 14】システム制御部の CPU による第 2 細胞分析処理を示すフローチャートである。

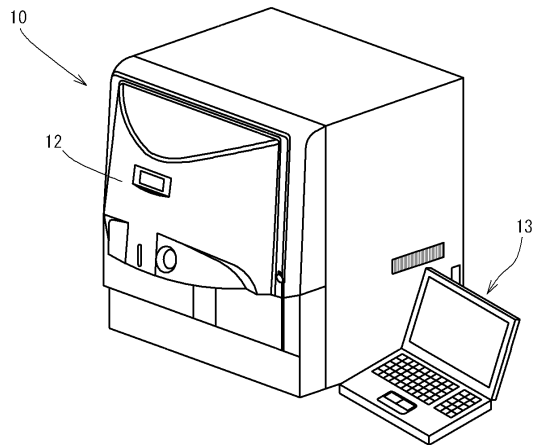
。

【符号の説明】

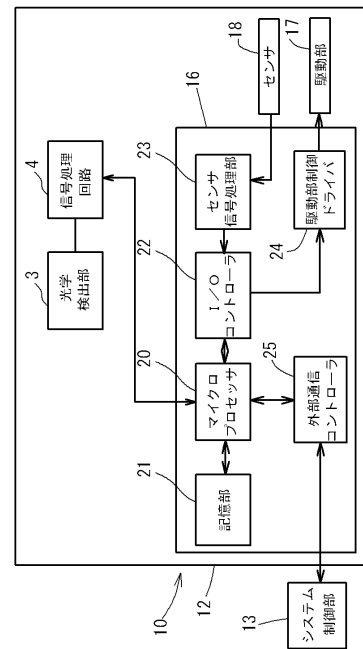
【 0 0 5 2 】

3	光学検出部	30
4	信号処理回路	
10	細胞分析装置	
12	装置本体	
13	システム制御部	
16	測定制御部	
27	本体	
28	表示部	
29	入力部	
51	フローセル	
52	レンズ系	40
53	半導体レーザ	
54	集光レンズ	
55	フォトダイオード	
56	集光レンズ	
57	ダイクロイックミラー	
58	フォトマルチプライヤ	
59	フォトマルチプライヤ	

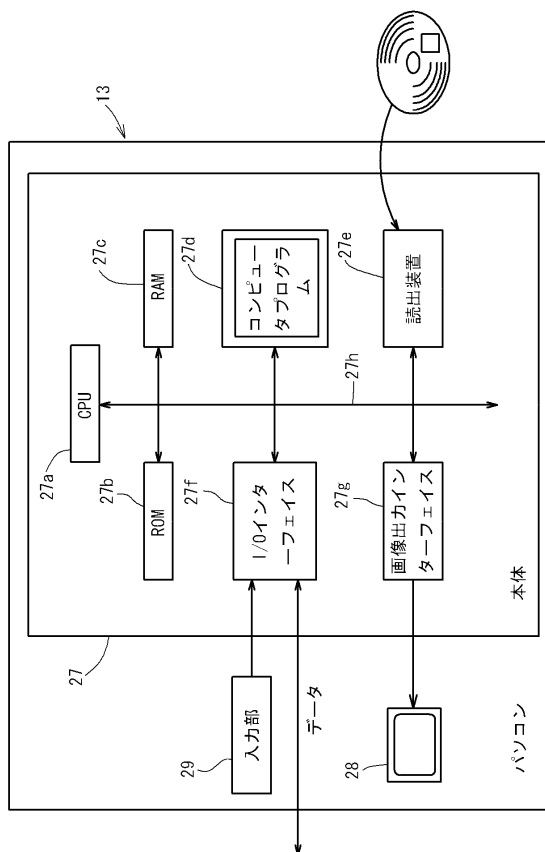
【図 1】



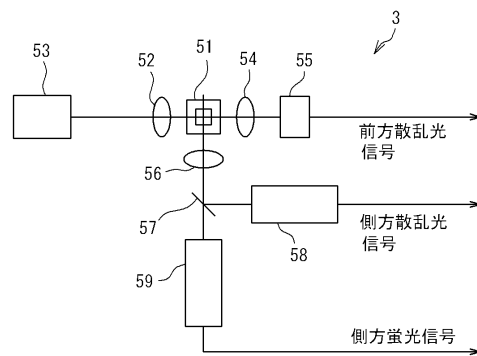
【図 2】



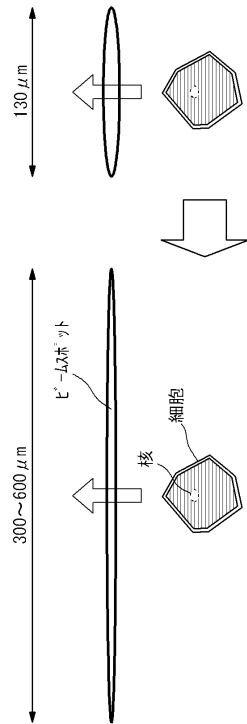
【図 3】



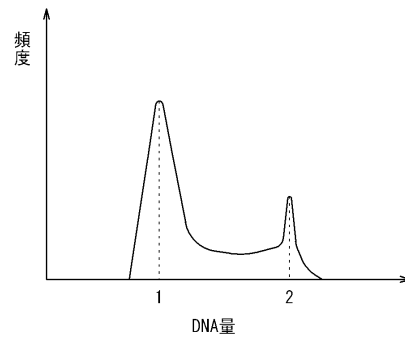
【図 4】



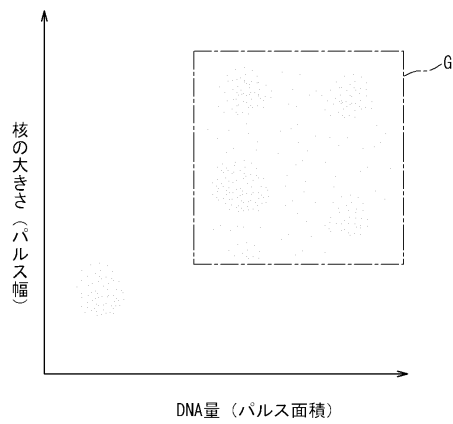
【図 5】



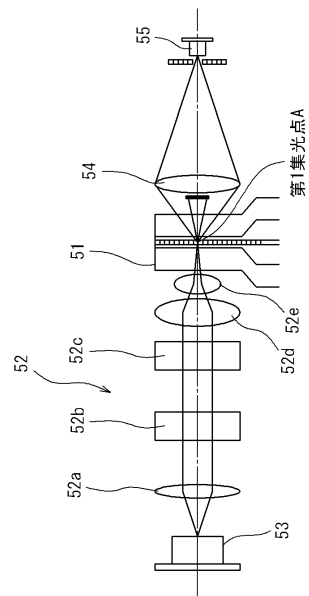
【図 6】



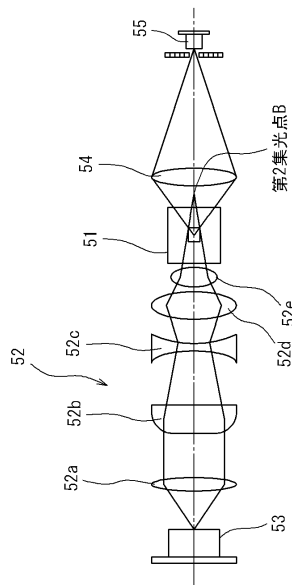
【図 7】



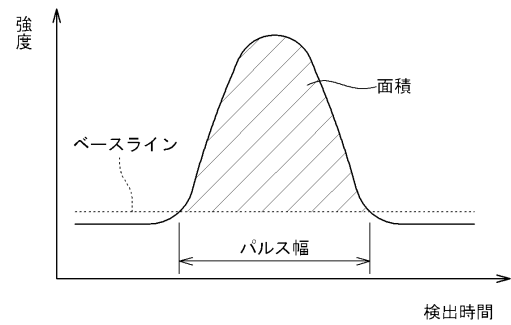
【図 8】



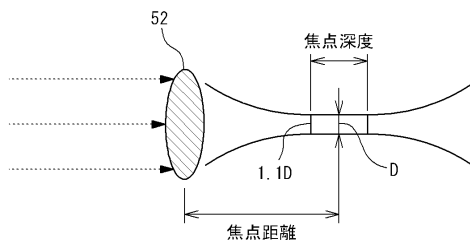
【図 9】



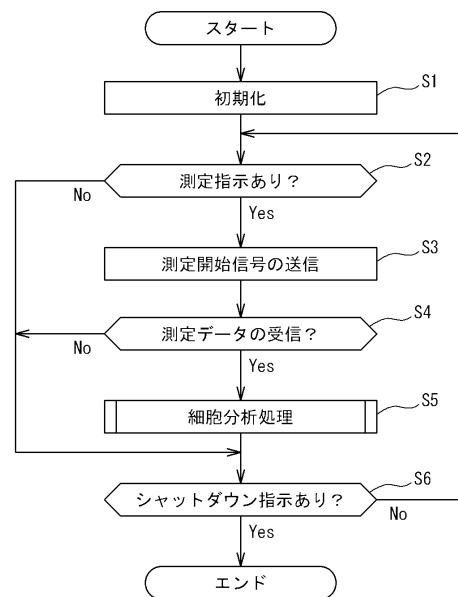
【図 10】



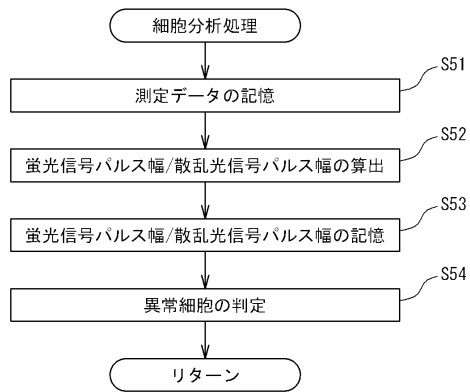
【図 11】



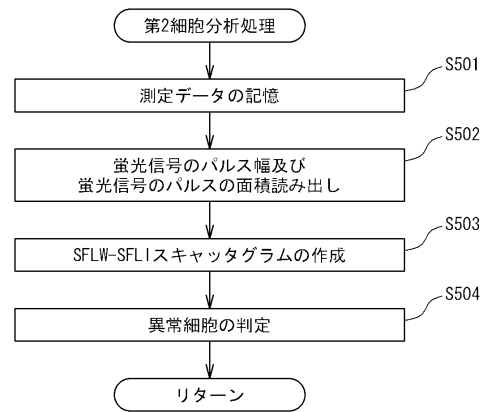
【図 12】



【図 13】



【図 14】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平09-229926(JP,A)  
特開平10-253624(JP,A)  
国際公開第2006/103920(WO,A1)  
特開2002-188993(JP,A)  
特開平07-151671(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N15/00-15/14  
G01N21/49  
G01N21/64  
G01N33/48