(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2012-208004
(P2012-208004A)
(43)公開日　平成24年10月25日(2012.10.25)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 15/14	(2006.01)	G01N 15/14	A	

審査請求 有　請求項の数 9　ＯＬ　（全 10 頁）

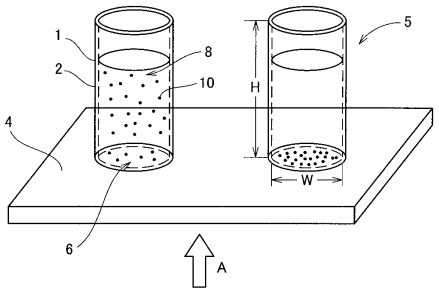
(21)出願番号　特願2011-73660(P2011-73660)
(22)出願日　平成23年3月29日(2011.3.29)

(71)出願人　503360115
独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　四方　哲也
大阪府吹田市山田丘１－５　国立大学法人大阪大学内
(72)発明者　鈴木　宏明
大阪府吹田市山田丘１－５　国立大学法人大阪大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】低濃度粒子測定装置および方法

(57)【要約】
【課題】溶液中に含まれる低濃度の微小粒子を測定または計数するための装置および方法を提供することを本発明の課題とする。
【解決手段】上記課題は、微小粒子を含む溶液が収容される収容部を備え、収容部の底部の下面側から溶液中の微小粒子を顕微鏡にて観察可能である微小粒子の測定装置であって、収容部の底部は透明な板材にて形成され、収容部の高さ寸法は収容部の底部の幅寸法よりも長い、微小粒子の測定装置、ならびに、この装置を用いる測定方法を提供することによって、上記課題は解決された。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
微小粒子を含む溶液が収容される収容部を備え、該収容部の底部の下面側から該溶液中の微小粒子を顕微鏡にて観察可能である微小粒子の測定装置であって、
該収容部は、筒状の周壁部を有し、
該収容部の底部は透明な板材にて形成され、該収容部の高さ寸法は該収容部の底部の幅寸法よりも大きい、微小粒子の測定装置。
【請求項２】
前記収容部の高さ寸法が前記収容部の底部の幅寸法の２倍以上である、請求項１に記載の測定装置。
【請求項３】
前記収容部の底部の厚さが０．１～１０ｍｍである、請求項１に記載の測定装置。
【請求項４】
前記底部の下面側から前記収容部内を見たときに、前記底部に格子が形成されている、請求項１に記載の測定装置。
【請求項５】
さらにガラスプレートを有し、該ガラスプレートの上面に前記収容部が設けられている、請求項１に記載の測定装置。
【請求項６】
微小粒子を含む溶液中における該微小粒子の濃度を測定する方法であって、以下の工程：
（ａ）請求項１に記載の測定装置の収容部に、微小粒子を含む溶液を添加する工程；
（ｂ）該溶液中の該微小粒子を沈降させる工程；および、
（ｃ）該沈降した微小粒子を、該収容部の底部の下面側から顕微鏡にて計数する工程；
を包含する方法。
【請求項７】
前記沈降させる工程が、自然落下による沈降である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記沈降させる工程が、遠心力による沈降である、請求項６に記載の方法。
【請求項９】
前記微小粒子が細胞である、請求項６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、溶液中に含まれる低濃度粒子を測定するための装置および方法の分野に関連する。より詳細には、本発明は、溶液中に低濃度に分散して含まれる細胞を測定するための装置および方法に関連する。
【背景技術】
【０００２】
全血などの溶液中に含まれる細胞数の測定は、一般的には、血球計算盤が利用される。細胞濃度が十分に高い場合、細胞懸濁液を直接、血球計算盤に適用し、細胞数を計数する。細胞濃度が低い場合には、遠心分離または濃縮カラムを利用して細胞を濃縮し、濃縮後のサンプルを血球計算盤に適用して細胞数を計数することが一般的である。しかしながら、細胞数が低濃度の場合（例えば、１ｍｌあたり１０００個未満の場合）、細胞の濃縮時に遠心分離に用いる遠心管の側面や底部に細胞が付着したり、濃縮カラムのメンブレンに細胞が吸着するために、細胞数を正確に計数することが困難であった。そのため、低濃度の細胞を測定または計数するための装置および方法が求められている。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
低濃度の細胞を測定または計数するための装置および方法を提供することが本発明の解

決課題である。また、細胞に限定されることなく、微小粒子全般について、低濃度であっても測定ないし計数するための装置および方法を提供することもまた、本発明の解決課題である。

【課題を解決するための手段】

【０００４】

上記課題は、例えば、以下を提供することによって解決された。

（項目１）

微小粒子を含む溶液が収容される収容部を備え、該収容部の底部の下面側から該溶液中の微小粒子を顕微鏡にて観察可能である微小粒子の測定装置であって、

該収容部は、筒状の周壁部を有し、

該収容部の底部は透明な板材にて形成され、該収容部の高さ寸法は該収容部の底部の幅寸法よりも大きい、微小粒子の測定装置。

（項目２）

前記収容部の高さ寸法が前記収容部の底部の幅寸法の２倍以上である、項目１に記載の測定装置。

（項目３）

前記収容部の底部の厚さが０．１～１０ｍｍである、項目１に記載の測定装置。

（項目４）

前記底部の下面側から前記収容部内を見たときに、前記底部に格子が形成されている、項目１に記載の測定装置。

（項目５）

さらにガラスプレートを有し、該ガラスプレートの上面に前記収容部が設けられている、項目１に記載の測定装置。

（項目６）

微小粒子を含む溶液中における該微小粒子の濃度を測定する方法であって、以下の工程：

（ａ）項目１に記載の測定装置の収容部に、微小粒子を含む溶液を添加する工程；

（ｂ）該溶液中の該微小粒子を沈降させる工程；および、

（ｃ）該沈降した微小粒子を、該収容部の底部の下面側から顕微鏡にて計数する工程；

を包含する方法。

（項目７）

前記沈降させる工程が、自然落下による沈降である、項目６に記載の方法。

（項目８）

前記沈降させる工程が、遠心力による沈降である、項目６に記載の方法。

（項目９）

前記微小粒子が細胞である、項目６に記載の方法。

【０００５】

以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

【０００６】

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【０００７】

（定義）

本明細書において使用する場合、用語「微小粒子」とは、肉眼での観察が不可能であるが、光学顕微鏡での観察が可能である粒子をいう。微小粒子としては、例えば、原核細胞、真核細胞、リポソーム、プラスチックビーズ、重金属粒子、エマルションの分散質、および、その他コロイド粒子、が挙げられるがこれらに限定されない。

【０００８】

本発明が対象とする溶液は、全血、血清、血漿、脳脊髄液、痰、気管支洗液、気管支吸引液、尿、リンパ液、外分泌物（例えば、気道、腸管および尿生殖路の種々の外分泌物）、涙、唾液、乳、白血球、骨髄腫、細胞懸濁液、細胞培養液、エマルション、コロイド溶

液、および、廃液、が挙げられるがこれらに限定されない。

【０００９】

（本発明の装置の製造）

本発明の装置としては、限定されることはないが、微小粒子を含む溶液が収容される収容部を備え、該収容部の底部の下面側から該溶液中の微小粒子を顕微鏡にて観察可能である微小粒子の測定装置であって、該収容部は、筒状の周壁部を有し、該収容部の底部は透明な板材にて形成され、該収容部の高さ寸法（Ｈ）は該収容部の底部の幅寸法（Ｗ）よりも長い、微小粒子の測定装置が挙げられる。ここで、好ましくは、収容部の高さ寸法は、収容部の底部の幅寸法の、１．２倍以上、１．５倍以上、２倍以上、２．５倍以上、３倍以上、４倍以上、５倍以上、６倍以上、７倍以上であり、好ましくは、１０倍以下、７倍以下、５倍以下、４倍以下、３倍以下、２倍以下、１倍以下、１．５倍以下である。

【００１０】

本発明の装置の収容部は、水密性を有するように筒状の周壁部と、該周壁部の下方の開口した底を閉塞する底部と、を結合させて形成してもよい。あるいは、本発明の装置の収容部は、筒状の周壁部と底部とを一体に形成されてもよい。あるいは、本発明の装置の収容部は、底部を有する収容部を、平板上に配置して作製してもよい。この場合には、収容部の底部と平板とを合わせた部分が、収容部の底部を構成する。

【００１１】

本発明の装置の収容部の容量は、使用するサンプルを収容できる限り、特に限定されないが、好ましくは、１０μｌ以上、２５μｌ以上、５０μｌ以上、７５μｌ以上、１００μｌ以上、２５０μｌ以上、５００μｌ以上、７５０μｌ以上、１ｍｌ以上、２．５ｍｌ以上、または、５ｍｌ以上である。また、本発明の装置の収容部の容量は、好ましくは、１０ｍｌ以下、７．５ｍｌ以下、５ｍｌ以下、２．５ｍｌ以下、１ｍｌ以下、７５０μｌ以下、５００μｌ以下、２５０μｌ以下、１００μｌ以下、７５μｌ以下、５０μｌ以下、２５μｌ以下、１０μｌ以下である。

【００１２】

本発明の装置の収容部の底部の材質は、微小粒子がある面の反対側から（底部の下面側から）の顕微鏡観察が可能である限り、特に限定されないが、好ましくはガラスまたは透明なアクリルなどのプラスチックである。本発明の装置の収容部の底部の「幅寸法」とは、底部の幅のうちで最も長い寸法を意味し、例えば、底部の形状が真円形であるときは、その直径の寸法を意味し、底部の形状が楕円形であるときは、その長径の寸法を意味し、底部の形状が三角形であるときは、各頂点から対辺に対して引いた垂線の中で最も長い垂線の寸法を意味し、底部の形状が三角形以外の多角形であるときは、対角線のうちで最も長い対角線の寸法を意味する。ここで、幅寸法は、収容部の周壁部の対抗する内面間の間隔を意味し、周壁部の厚みを含まない。

【００１３】

本発明の装置の収容部の底部の厚さは、微小粒子がある面の反対側からの顕微鏡観察が可能である限り、特に限定されないが、好ましくは、０．１～１０ｍｍである。

【００１４】

好ましくは、底部は格子を備える。この格子は、底部を下面側から見たときに底部に格子が形成されていることをいう。該格子は、底部の下面に形成してもよく、底部の上面（内面）に形成してもよく、あるいは底部の内部に形成してもよいが、好ましくは、格子は底部の上面（内面）に形成される。格子を形成するには、印刷、凹凸、キズなどによって形成することができる。

【００１５】

格子によって囲まれた四角形の面積は、既知の面積を示す。底部の面積は、特に限定されることはないが、好ましくは、０．１ｃｍ^{2}以上、０．２５ｃｍ^{2}以上、０．５ｃｍ^{2}以上、０．７５ｃｍ^{2}以上、１ｃｍ^{2}以上、２ｃｍ^{2}以上、５ｃｍ^{2}以上、７．５ｃｍ^{2}以上であり、１０ｃｍ^{2}以下、７．５ｃｍ^{2}以下、５ｃｍ^{2}以下、２ｃｍ^{2}以下、１ｃｍ^{2}以下、０．７５ｃｍ^{2}以下、０．５ｃｍ^{2}以下、０．２５ｃｍ^{2}以下である。

【００１６】
該収容部の断面形状としては、円形、楕円形あるいは多角形であってもよい。また、収容部の底部の面積が収容部の上端開口部の面積より小さくなるようにフラスコ状に形成してもよい。
【００１７】
周壁部の高さ（Ｈ）は、収容部の底部とともに収容部の容量を決定することから、微小粒子を含む溶液を収容できる容量を提供する限り、特に限定されないが、好ましくは、０．５ｃｍ以上、０．７５ｃｍ以上、１ｃｍ以上、２ｃｍ以上、５ｃｍ以上、７．５ｃｍ以上であり、１０ｃｍ以下、７．５ｃｍ以下、５ｃｍ以下、２ｃｍ以下、１ｃｍ以下、０．７５ｃｍ以下、０．５ｃｍ以下、０．２５ｃｍ以下である。
【００１８】
収容部の底部は板状に形成されている。すなわち、底部の下面および上面は平坦面に形成されている。顕微鏡観察時の光の乱反射を防止できるように底部の下面および上面は平滑面に形成することが望ましい。
【００１９】
本発明の装置の収容部の底部以外（例えば、筒状の周壁部）は、光透過性であっても、光透過性でなくてもよい。材質は、特に限定されないが、細胞などの微小粒子の付着を防ぐ材質が好ましい。好ましい材質としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリル、が挙げられるがこれらに限定されない。筒状の周壁部の厚さは、特に限定されない。
【００２０】
必要に応じて、本発明の装置の収容部の一部（例えば、底部以外、または、筒状の周壁部の全部もしくは一部）あるいは、全部は、細胞などの微小粒子の付着を防ぐためにコーティングされてもよい。
【００２１】
（本発明の装置の使用）
本発明の装置は、測定対象となる溶液中に分散して存在する微小粒子の沈降を利用する。この沈降は、重力による自然落下であっても、遠心力による沈降であってもよい。
【００２２】
微小粒子が自然落下する場合、落下後すぐに重力と浮力と粘性抵抗がつりあうことから、沈降に必要な時間（τ［分］）は、以下の式によって計算することができる。
【００２３】
【数１】

$$\tau = \frac{18\eta L}{D^2\left(\rho_p - \rho_f\right)g}$$

【００２４】
ここで、
η：粘性計数（０．８９×１０$^{-3}$Ｐａ・ｓ）
Ｌ：沈降距離（すなわち、液面の高さ）（ｍ）
Ｄ：粒子直径（ｍ）
ρ_p：粒子密度（細胞の場合、１１００ｋｇ／ｍ^3）
ρ_f：流体密度（水溶液の場合、１０００ｋｇ／ｍ^3）
ｇ：重量加速度（９．８ｍ／ｓ^2）
である。例えば、微小粒子の直径が３０μｍであり、液面の高さが３ｃｍの場合、上記式

の計算の結果、τは約９分となる。
【００２５】
測定対象となる微小粒子の直径のおよその値は容易に理解できることから、本発明の装置および方法において自然落下をするために必要な時間は、上記の式によって容易に計算できる。
【００２６】
サンプルである溶液中で測定対象である微小粒子が沈降した後に、本発明の装置の底部について微小粒子がある面の反対側からの顕微鏡観察を行い、沈降した微小粒子を測定ないし計数する。そのため、本発明の装置の底部は、好ましくは、面積を示す格子を含む。すなわち、顕微鏡視野において一定の面積（Ｓ）あたりの微小粒子数を測定し（ｎ）、サンプル容量（ｖ）および底部面積（Ｓｔ）から、微小粒子濃度（ｃ）を、
ｃ＝（ｎ／ｖ）×（Ｓｔ／Ｓ）
として求めることができる。
【００２７】
上記「Ｓ」は、例えば、格子に囲まれた四角形の面積であり、そして、「Ｓｔ」は既知の数値である。そのため、格子内の微小粒子を計数して「ｎ」を決定し、その格子に囲まれた面積「Ｓ」、底部面積「Ｓｔ」、および、サンプルの容量「ｖ」を用いて、上記式によって微小粒子濃度「ｃ」を算出する。
【発明の効果】
【００２８】
本発明によれば、溶液中に存在する微小粒子が沈降によって収容部の底部上面に集まるので、この底部の上面に集まった微小粒子を底部の下面側から顕微鏡によって観察し、微小粒子の数を測定することができる。従って、溶液中に存在する微小粒子の濃度が低い場合であっても、底面上に密集した微小粒子として測定することができる。また、底部の上面は平坦面に形成されているので、顕微鏡の焦点をこの底部の上面に集めて、精度良く微小粒子を測定することができる。よって、細胞のような微小粒子が低濃度でサンプル中に存在する場合であっても、その測定および計数が可能となった。
【図面の簡単な説明】
【００２９】
【図１】本発明に係る測定装置の斜視図である。
【図２】本発明に係る測定装置の上面図である。
【図３】矢印Ａ方向から見た測定装置の拡大図である。
【図４】本発明に係る測定装置の断面図である。
【発明を実施するための形態】
【００３０】
以下に本発明を実施するための形態について説明する。
【００３１】
図１は、本発明の実施形態の一つである微小粒子の測定装置５の斜視図であり、図２は、その上面図である。図１に記載の装置５の収容部１は、円筒状の周壁部２および底部６を備える。底部６は、プレート４の一部であっても、プレート４とは異なる部材であっても、周壁部２と一体として形成されてもよい。底部６の下面には、好ましくは、顕微鏡観察下での面積を示すための格子が印刷によって形成される。この実施形態では、複数の収容部１，１がプレート４上に設けられている。
【００３２】
サンプルの溶液８は、微小粒子１０を含む。収容部１に溶液８を添加した時点では、微小粒子１０は、溶液全体にわたり均一に分散して存在する（図１中の左側）。時間の経過により微小粒子１０は、重力によって自然落下して、底部６の上面に沈降する（図１中の右側）。必要に応じて、遠心力を用いて沈降を促進してもよい。
【００３３】
微小粒子が自然落下する場合、落下後すぐに重力と浮力と粘性抵抗がつりあうことから

、沈降に必要な時間（τ［分］）は、以下の式によって計算することができる。
【００３４】
【数２】

$$\tau = \frac{18\eta L}{D^2\left(\rho_p - \rho_f\right)g}$$

【００３５】
ここで、
η：粘性計数（０．８９×１０$^{-3}$Ｐａ・ｓ）
Ｌ：沈降距離（すなわち、液面の高さ）（ｍ）
Ｄ：粒子直径（ｍ）
ρ_p：粒子密度（細胞の場合、１１００ｋｇ／ｍ^3）
ρ_f：流体密度（水溶液の場合、１０００ｋｇ／ｍ^3）
ｇ：重量加速度（９．８ｍ／ｓ^2）
である。
【００３６】
図３は、微小粒子の沈降後に、図１の矢印Ａ方向、すなわち、微小粒子が沈降して存在している上面の反対側の下面側から見た測定装置５の拡大図である。溶液８中の微小粒子１０が底部上面に沈降し、その結果、顕微鏡観察による計数が可能となる。
【００３７】
顕微鏡観察によって微小粒子１０を計数して、微小粒子１０の濃度を決定する。例えば、顕微鏡視野において一定の面積（Ｓ）あたりの微小粒子数を測定し（ｎ）、サンプル容量（ｖ）および底部面積（Ｓｔ）から、微小粒子濃度（ｃ）を、
ｃ＝（ｎ／ｖ）×（Ｓｔ／Ｓ）
として求めることができる。
【００３８】
底部６が格子を備える場合、上記「Ｓ」は、格子に囲まれた四角形の面積である。「Ｓｔ」は既知の数値である。そのため、格子内の微小粒子を計数して「ｎ」を決定し、その格子に囲まれた面積「Ｓ」、底部面積「Ｓｔ」、および、サンプルの容量「ｖ」を用いて、上記式によって微小粒子濃度「ｃ」を算出する。
【００３９】
すなわち、溶液中の微小粒子濃度を決定するための代表的な方法は、以下の工程：
（ａ）測定装置の収容部１に、微小粒子１０を含む溶液８を添加する工程；
（ｂ）溶液８中の微小粒子１０を沈降させる工程；および、
（ｃ）沈降した微小粒子１０を、収容部の底部の下面側である矢印Ａ方向から顕微鏡にて計数する工程；
を包含する。
【００４０】
本発明の装置の収容部１は、サンプルである溶液８を収容できる限り、周壁部２を含んでも含まなくてもよい。
【００４１】
周壁部２を用いて収容部１を形成する場合、水密性を有するように、周壁部２と透明な板材４とを結合させて形成してもよい（図４Ａ）。透明な板材４のうちで、周壁部２に囲まれた部分は、収容部１の底部６となる。透明な板材４のうち底部６以外の領域は、光透

過性である必要はない。

【００４２】

あるいは、本発明の装置の収容部１は、一体形成されてもよい（図４Ｂ）。すなわち、透明な板材４および周壁部２が一体形成されてもよい。透明な板材４のうちで、周壁部２に囲まれた部分は、収容部１の底部６となる。透明な板材４のうち底部６以外の領域は、光透過性である必要はない。

【００４３】

本発明の装置の収容部１は、ウェル状の凹部を有する平板として一体形成されてもよい。底部に相当する部分は、矢印Ａ方向からの顕微鏡観察を可能にする必要がある。

【００４４】

あるいは、本発明の装置の収容部１は、周壁部２および底部６を有する収容部１を、平板４上に配置して作製してもよい（図４Ｃ）。

【産業上の利用可能性】

【００４５】

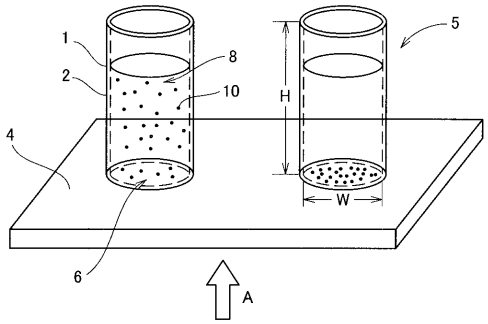
本発明の装置および方法を利用することによって、細胞などの微小粒子を低濃度で含む溶液サンプルにおける微小粒子の濃度を測定することが可能となる。

【符号の説明】

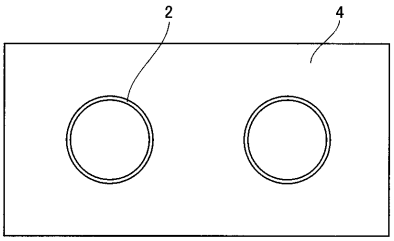
【００４６】

Ａ　本発明の装置を顕微鏡観察する際の方向
１　収容部
２　周壁部
４　透明な板材
５　微小粒子の測定装置
６　底部
８　溶液サンプル
１０　微小粒子

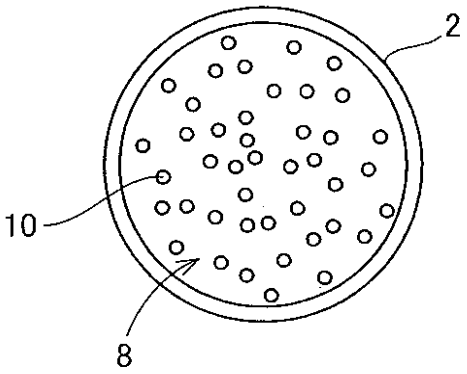
【図１】



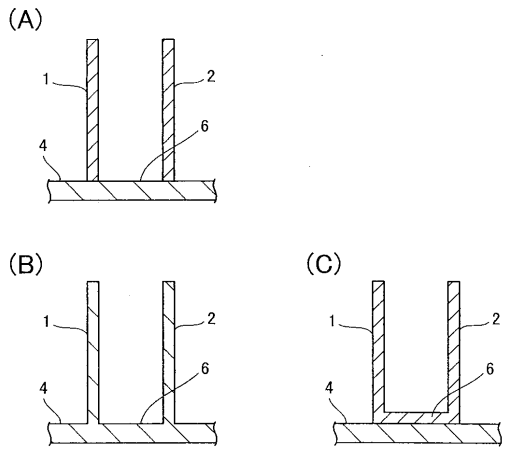
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

(72)発明者　細田　一史
大阪府吹田市山田丘１－５　国立大学法人大阪大学内