

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年10月5日(05.10.2017)

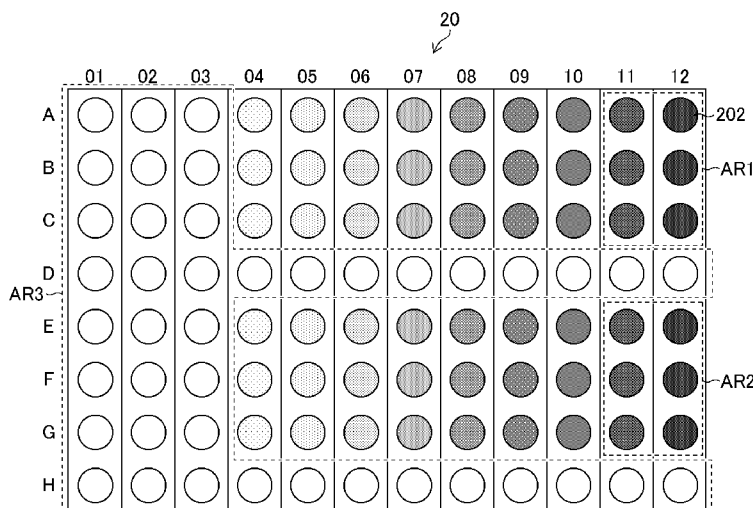


(10) 国際公開番号  
WO 2017/169770 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 15/14 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)  
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)  
G01N 21/27 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
  - (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/010359
  - (22) 国際出願日: 2017年3月15日(15.03.2017)
  - (25) 国際出願の言語: 日本語
  - (26) 国際公開の言語: 日本語
  - (30) 優先権データ:  
特願 2016-064094 2016年3月28日(28.03.2016) JP
  - (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30号 Tokyo (JP).
  - (72) 発明者: 松原 兼太(MATSUBARA, Kenta); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
  - (74) 代理人: 松浦 憲三(MATSUURA, Kenzo); 〒1630223 東京都新宿区西新宿二丁目6番1号 新宿住友ビル23階 私書箱第176号 新都市国際特許事務所 Tokyo (JP).
  - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
  - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: CELL ANALYSIS SYSTEM

(54) 発明の名称: 細胞分析システム



(57) Abstract: Provided is a cell analysis system whereby target cells alone can be maintained in a fresh state. The cell analysis system 1 comprises: a detector 10 which detects staining intensity of stained cells; a collection container 20 in which a plurality of cells, the staining intensity of which is detected by the detector 10, are collected; a control unit 40 which sets a priority order to acquire image data on the basis of the staining intensity detection results of the stained cells; and an imaging device 30 which acquires the image data of the cells collected in the collection container 20 in accordance with the priority order set by the control unit 40.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/169770 A1

---

目的の細胞のみを新鮮な状態に維持することができる細胞分析システムを提供する。細胞分析システム 1 は、染色された細胞の染色強度を検出する検出装置 10 と、検出装置 10 により染色強度が検出された複数の細胞を回収する回収容器 20 と、染色された細胞の染色強度の検出結果に基づいて、画像データを取得する優先順位を決定する制御部 40 と、制御部 40 により決定された優先順位に基づいて、回収容器 20 に回収された細胞の画像データを取得する画像撮像装置 30 と、を備える。

## 明 細 書

**発明の名称**：細胞分析システム

### 技術分野

[0001] 本発明は細胞分析システムに関する。

### 背景技術

[0002] 検体の網羅的な遺伝子発現を高精度に解析するために、全細胞（数百万個）を解析することは非効率であるため、細胞の特定遺伝子やタンパクの発現状態を計測して選別することが行なわれている。例えば、細胞が持つ遺伝子やタンパクと結合する蛍光色素により細胞を染色し、細胞を含む試料液にレーザー光を照射し、強度を計測することにより目的とする細胞を分取するフローサイトメトリーを用いた細胞分析装置が知られている。

[0003] 特許文献1には、フローサイトメトリーを用いて、個々のドナー細胞上に存在する最大4種の細胞表面マーカーの同時発現を調べ、細胞がドナー由来であることを確認するために、対象細胞集団を細胞選別装置で分取することが開示されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：特表2003-530899号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0005] 一般的に、フローサイトメトリーにより目的の細胞を分取する場合、マルチウェルプレートと称される容器の各ウェルに細胞が滴下され、回収される。細胞が回収されたマルチウェルプレートの状態でポリメラーゼ連鎖反応（PCR：Polymerase Chain Reaction）され、遺伝子解析が行われている。

[0006] しかしながら、フローサイトメトリーでは、得られた光学的な情報に基づいて細胞を分取するため、ウェルにゴミ、又は目的とは異なる細胞が回収される場合がある。ゴミ、又は目的とは異なる細胞を取り除くため、マルチウ

エルプレートの各ウェルを顕微鏡等で観察することも考えられる。しかしながら、マルチウェルプレートを観察するには時間がかかるため、ウェル内の細胞を新鮮な状態に維持することが難しくなる。

[0007] 細胞が新鮮でない場合でも、遺伝子解析することはできるが、遺伝子解析の誤差を招く問題がある。

[0008] また、遺伝子解析の費用が掛かるため、目的の細胞を、新鮮な状態下で遺伝子解析することが望まれている。

[0009] 本発明は、このような事情に鑑みてなされたもので、目的の細胞のみを新鮮な状態に維持することができる細胞分析システムを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明の一態様によると、細胞分析システムは、染色された細胞の染色強度を検出する検出装置と、検出装置により染色強度が検出された複数の細胞を回収する回収容器と、染色された細胞の染色強度による検出結果に基づいて、画像データを取得する優先順位を決定する制御部と、制御部により決定された優先順位に基づいて、回収容器に回収された細胞の画像データを取得する画像撮像装置と、を備える。

[0011] 好ましくは、制御部は、染色された細胞の染色強度による検出結果に基づいて画像データ取得の条件を決定する。

[0012] 好ましくは、制御部は、染色された細胞の染色強度による検出結果と、回収容器に回収された細胞の数とに基づいて、画像データを取得する細胞の数を制限する。

[0013] 好ましくは、制御部は、染色された細胞の染色強度による検出結果と、回収容器に細胞が回収されている時間とに基づいて、画像データを取得する細胞の数を制限する。

[0014] 好ましくは、細胞が複数の染色種により染色される。

[0015] 好ましくは、制御部は、画像データに基づいて、回収容器に回収された細胞を、細胞解析するか否かを判定する。

[0016] 好ましくは、細胞が血球細胞である。

[0017] 好ましくは、条件が、画像データを取得する際の露光時間、観察倍率、照明光の波長、及び観察光の波長の少なくとも1つを含む。

[0018] 好ましくは、画像データに基づいて、細胞の形態、色、大きさ、及び染色強度の少なくとも1つ以上を解析する。

### 発明の効果

[0019] 本発明の細胞分析システムによれば、目的の細胞のみを新鮮な状態に維持することができ、細胞分析を効率的に行うことができる。

### 図面の簡単な説明

[0020] [図1]細胞分析システムの概略構成図である。

[図2]検出装置の原理図である。

[図3A]回収容器の拡大斜視図である。

[図3B]回収容器の拡大斜視図である。

[図4]画像撮像装置の概略構成図である。

[図5]B S C - A を縦軸、F S C - A を横軸とするスキャッタグラムである。

[図6]F S C - A を縦軸、C D 4 5 抗体の B r i l l i a n t V i o l e t 4 2 1 を横軸とするスキャッタグラムである。

[図7]C D 7 1 抗体の F I T C を縦軸、D R A Q 5 の A P C を横軸とするスキャッタグラムである。

[図8]画像撮像装置に載置された回収容器の平面図である。

[図9]ウェルに回収された細胞に標識された色素の蛍光色を、二値化により表現したイメージ図である。

[図10A]回収容器の特定のウェルの画像データである。

[図10B]回収容器の別のウェルの画像データである。

### 発明を実施するための形態

[0021] 以下、添付図面にしたがって本発明の好ましい実施の形態について説明する。本発明は以下の好ましい実施の形態により説明される。本発明の範囲を逸脱すること無く、多くの手法により変更を行うことができ、本実施の形態

以外の他の実施の形態を利用することができる。したがって、本発明の範囲内における全ての変更が特許請求の範囲に含まれる。

[0022] ここで、図中、同一の記号で示される部分は、同様の機能を有する同様の要素である。また、本明細書中で、数値範囲を“～”を用いて表す場合は、“～”で示される上限、下限の数値も数値範囲に含むものとする。

[0023] <細胞分析システム>

本発明の実施形態について、図1から4を参照して説明する。図1は、細胞分析システムの概略構成図である。

[0024] 細胞分析システム1は、検出装置10と、回収容器20と、画像撮像装置30と、制御部40を含むパーソナルコンピューター50と、を備える。パーソナルコンピューター50は、検出装置10及び画像撮像装置30と電氣的に接続される。制御部40を含むパーソナルコンピューター50は、細胞分析システム1の全体の動作を制御する。パーソナルコンピューター50は、操作入力部であるキーボード52、及び表示部であるディスプレイ54と、を備える。なお、制御部40は、各種の処理を行う演算部、各種プログラム、及びデータ等が格納された記憶部等を備える。

[0025] 検出装置10は、染色された細胞の染色強度を検出することができる装置であり、検出装置10としてフローサイトメータを挙げることができる。フローサイトメータは、フローサイトメトリーに用いられる装置を意味する。また、染色された細胞とは、色素、染料等の染色情報を有する化学物質が結合した細胞を意味するものであり、好ましい一態様として、蛍光色素で標識した抗体が結合した細胞が挙げられる。また、染色強度は細胞の構造や機能に関連する情報であり、好ましい一態様として、細胞核に特異的に結合する蛍光色素からの蛍光強度が挙げられ、細胞核に関連する情報となる。

[0026] 図2に検出装置10の原理について簡単に説明する。分析対象試料は、蛍光色素で標識した抗体が結合した細胞Cを含む。細胞Cを含む試料液Sがノズル102からフローセル104に導入される。また、シース液Lがフローセル104に導入される。フローセル104内で試料液Sが絞られることに

より、細胞Cが一行に配列される。細胞Cに光源106から、例えばレーザー光が照射される。レーザー光の照射により細胞Cを標識した蛍光色素が励起され、蛍光を発光する。この蛍光強度が検知器108により検知される。細胞Cの蛍光強度の検出結果が制御部40に入力され、記憶される。

[0027] さらに、レーザー光の照射による細胞Cからの散乱光（前方散乱光、側方散乱光等）が検知器110により検知される。細胞Cからの散乱光による蛍光強度の検出結果が制御部40に入力され、記憶される。前方散乱光では測定対象の細胞の大きさが、また側方散乱光および蛍光により、測定対象の細胞の構造などを測定することができる。

[0028] フローセル104には超音波が印加された細胞Cを含む液滴が形成される。制御部40は、上記の検出結果に基づいて、液滴をプラス、又はマイナスに荷電する。制御部40は、廃棄する液滴については荷電しない。偏向電極板112及び114の間を通過する際、偏向電極板112及び114の何れかに引き寄せられることにより、荷電された液滴は分取され、回収容器20に回収される。

[0029] 蛍光色素を励起させる光源106として、波長の異なる複数のレーザー光源を使用することができる。例えば、405nmの波長を持つレーザー光源と、488nmの波長を持つレーザー光源と、561nmの波長を持つレーザー光源と、683nmの波長を持つレーザー光源と、を備えることが好ましい。

[0030] また、同時に蛍光強度を検出するためレーザー光源の励起光をカットし、蛍光色素からの蛍光波長を選択的に透過させる蛍光フィルタを使用することが好ましい。

[0031] また、細胞Cを複数の蛍光色素により染色することができる。例えば、細胞がヒトの血球細胞である場合には、血球細胞が有するCD3, CD4, CD14, CD25, CD127等の抗原と特異的に結合する抗体に対して、それぞれ蛍光色素で標識し、標識された抗体を細胞に結合させることにより染色することが好ましく、また、細胞核のデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid : DNA) に結合する蛍光色素であるDAPI (4' 6-ジ

アミジノー 2-フェニルインドール<sup>4',6-diamidino-2-phenylindole</sup>) で染色することが好ましい。細胞 C の抗原に特異的に結合する抗体を標識した蛍光色素や DNA を染色した蛍光色素に応じて、使用する光源 106 の励起波長と蛍光フィルタとの組み合わせを決定することが好ましい。

[0032] 本実施形態で使用できる他の蛍光色素として、ヨウ化プロピジウム (PI : Propidium Iodide)、ピロニン Y (Pyronin Y)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC : Fluorescein Isothiocyanate)、フィコエリスリン (PE : Phycoerythrin)、アロフィコシアニン (APC : Allophycocyanin)、テキサスレッド (TR (登録商標))、Hoechst 33342、7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD)、2'-デオキシシチジン 5'-三リン酸 (Cy3)、スルホインドシアニンスクシンイミジルエステル (Cy5)、DRAQ5 (登録商標)、Brilliant Violet 570、及び Brilliant Violet 421、複数の染色種を挙げることができる。

[0033] 図 3 A 及び図 3 B は回収容器 20 の拡大斜視図である。図 3 A に示されるように、回収容器 20 は、複数の細胞を回収するため、開口と底面とを有する複数のウェル 202 と、ウェル 202 と一体構造の側壁 204 と、を有している。複数のウェル 202 は行と列とに配置される。各々のウェル 202 の位置を特定するために、行を示す数値、及び列を示す英字が回収容器 20 のウェル 202 の開口側に表示されている。図 3 A に示される回収容器 20 では、各々のウェル 202 に細胞が回収される。さらに、回収容器 20 を特定するため、回収容器 20 の側壁には、例えば、バーコード等の識別標識 206 が表示される。

[0034] 図 3 B に示されるように、図 3 A とは別の形態の回収容器 20 は、複数の細胞を回収するための開口と底面とを有する複数のチューブ 208 と、複数のチューブ 208 を保持するための複数の孔 212 を備える支持部材 210 と、を有している。

[0035] 複数の孔 212 は行と列とに形成される。各々の孔 212 の位置を特定す

るために、行を示す数値、及び列を示す英字が、回収容器 20 の孔 212 の形成される側に表示されている。図 3 B に示される回収容器 20 では、支持部材 210 に保持された各々のチューブ 208 に細胞が回収される。さらに、回収容器 20 を特定するため、支持部材 210 の側壁には、例えば、バーコード等の識別標識 206 が表示される。なお、チューブ 208 は、例えば、1 個単位のチューブであっても良いし、複数個が連結されたチューブであっても良い。また、チューブ 208 はキャップ（不図示）を有するチューブであっても良い。

[0036] 画像撮像装置 30 として、撮像装置を備える顕微鏡を挙げることができる。図 4 は画像撮像装置 30 の概略構成図である。画像撮像装置 30 は、回収容器 20 に回収された細胞 C の画像データを取得することができる。細胞 C の画像データとして、染色された細胞 C の蛍光発光を撮像した画像データ、及び細胞 C の光透過画像を撮影した明視野の画像データの少なくとも一方が含まれる。

[0037] 画像撮像装置 30 は、細胞 C の蛍光を測定するための励起用の第 1 光源 302 と、回収容器 20 を載置するためのテーブル 304 と、回収容器 20 のウェル 202 の側に配置されたレンズ 306 と、励起フィルタ 308、ダイクロイックミラー 310 および蛍光フィルタ 312 とから構成されるフィルタ群と、回収容器 20 のウェル 202 の反対側に配置された第 2 光源 314 と、細胞 C からの蛍光および透過光を撮像する撮像装置 316 と、を備えている。第 2 光源 314 は透過光を測定するための光を細胞 C に照射する。

[0038] 第 1 光源 302 として、例えば、高圧水銀ランプ、高圧キセノンランプ、発光ダイオード、レーザダイオード、タングステンランプ、ハロゲンランプ、白色発光ダイオードなどを用いることができる。これらの光源を用いても励起フィルタ 308 により、目的の波長のみ透過させることができる。細胞 C に結合する抗体を標識する蛍光色素に対して、目的の励起波長の光を照射させることができる。なお、第 2 光源 314 として、第 1 光源 302 と同様の光源を用いることができる。

[0039] 細胞Cに結合する抗体を標識する蛍光色素からの蛍光強度を得るために、撮像装置316により画像データを取得する場合について説明する。第1光源302から照射された光は、励起フィルタ308により、目的とされる波長領域の光のみ透過される。励起フィルタ308を透過した光は、ダイクロイックミラー310により、回収容器20の方向に反射される。ダイクロイックミラー310により反射された光は、レンズ306を透過し、ウェル202に回収された細胞Cに照射される。細胞Cに照射される光は、細胞Cに結合する抗体を標識する蛍光色素を励起する波長領域とされている。細胞Cに結合する抗体を標識する蛍光色素は光により励起され、照射された励起波長とは異なる波長の蛍光を発する。細胞Cに結合する抗体を標識する蛍光色素からの蛍光は、レンズ306、ダイクロイックミラー310、及び蛍光フィルタ312を経て撮像装置316により撮像され、画像データが取得される。取得された蛍光の画像データは制御部40に入力され、記憶される。励起光とその励起光により発する蛍光と比較すると、蛍光の方が励起光より波長が長くなるので、ダイクロイックミラー310により、励起光の波長の光を回収容器20に反射させ、蛍光の波長の光を撮像装置316の側に透過させることができる。また、蛍光フィルタ312は、励起光を透過させず、蛍光のみを透過させることができる。したがって、撮像装置316において、細胞Cに結合する抗体を標識する蛍光色素の蛍光を撮像することができる。蛍光フィルタ312により、蛍光のみを透過させることにより、撮像装置316で撮像される画像が励起光に影響されることがないので、正確な画像データを取得することができる。

[0040] 本実施形態の画像撮像装置30は、回収容器20を任意の位置に移動（例えば、X方向、Y方向、及びZ方向）させるため、テーブル304と駆動装置（不図示）とを備えている。テーブル304と駆動装置とにより、回収容器20の特定のウェル202を、観察位置に移動させることができる。駆動装置は、テーブル304を、X方向、Y方向、及びZ方向に移動できることが好ましい。

[0041] 異なる蛍光色素により標識された複数の抗体が細胞Cに結合している場合、異なるフィルタ群（励起フィルタ308、ダイクロイックミラー310および蛍光フィルタ312）に切り替えることにより、異なる蛍光波長の画像データを取得することができる。

[0042] なお、第2光源314により、細胞Cの透過光を撮像する場合、フィルタ群を取り外した状態で撮像する。透過光を撮像装置316で撮像することにより、明視野の画像データを取得することができる。取得された明視野の画像データは制御部40に入力され、記憶される。

[0043] <細胞分析システムの動作>

次に、細胞分析システム1の動作について説明する。分析対象試料として、血球細胞を含む末梢血と、細胞を染色する2種類の蛍光色素標識抗体（たとえば、CD45抗体についてBrilliant Violet 421で標識、CD71抗体についてFITCで標識）と、二本鎖DNAに高親和性のアントラキノン色素であるDRAQ5及びAPCとを準備し、これらを混合してインキュベーションすることにより血球細胞を染色する。

[0044] 分析対象試料を検出装置10にセットし、蛍光色素により標識された抗体が結合した細胞の、蛍光色素からの蛍光強度（蛍光、前方散乱光、及び側方散乱光）をフローサイトメトリーにより、検出する。各々の細胞について検出された蛍光強度は制御部40に入力される。制御部40は、検出した細胞と蛍光強度とを関連付けて記憶する。制御部40には解析プログラムが記憶されている。解析プログラムは各々の細胞と蛍光強度のデータとに基づいて解析を行うことができる。

[0045] 例えば、図5に示されるように、制御部40は、各細胞の蛍光強度から側方散乱光の光強度の相対値であるBSC-Aを縦軸、前方散乱光の光強度の相対値であるFSC-Aを横軸とするスキャッタグラムを作成する。このスキャッタグラムから、有核赤血球をゲートし（取り込み）、有核赤血球の出現する領域（P）を画分する。

[0046] 図6に示されるように、制御部40は、ゲートされた有核赤血球に対して

、FSC-Aを縦軸、CD45抗体：Brilliant Violet 421を横軸とするスキャッタグラムを作成する。ゲートされた有核赤血球から白血球が出現する領域（Q1）及び（Q2）をゲートアウトし（抽出し）、白血球を除く有核赤血球の出現する領域（Q3）を画分する。

[0047] 図7に示されるように、制御部40は、白血球がゲートアウトされた有核赤血球に対して、CD71抗体のFITCの蛍光強度の相対値を縦軸、細胞核の情報であるDRAQ5（アントラキノ色素）の蛍光強度の相対値を横軸とするスキャッタグラムを作成する。なお、波長領域が他の蛍光色素と重なるので、各波長の検出器への漏れ込み量が補償（Compensate）される。ゲートされた有核赤血球からCD71陽性で、かつDRAQ5陽性の有核赤血球細胞の出現する領域（R）を画分する。最終的にCD71陽性有核赤血球細胞を測定する。

[0048] 蛍光色素により標識された抗体が結合した細胞が検出装置10により蛍光強度に基づいて解析される。解析結果に基づいて、蛍光色素により標識された抗体が結合した細胞が、図5から図7に示されるスキャッタグラムにより、CD71陽性有核赤血球細胞が出現する領域（R）に画分される。

[0049] なお、上述のスキャッタグラムの説明において、陽性は蛍光強度が高いことを意味し、陰性は蛍光強度が低いことを意味する。

[0050] 領域（R）に含まれる約500個の細胞が、例えば、1個当たり96個のウェル202を有する複数の回収容器20に回収され、1個のウェルに1個の細胞が回収される。

[0051] 約500個の細胞を複数の回収容器20に回収する際、回収容器20の識別表示と、回収容器20のウェル202の位置と、各細胞の蛍光強度とを関連付けし、この関連付けられた関連データが制御部40に入力、及び記憶される。

[0052] 複数の回収容器20に回収された細胞を全て、画像観察せずに遺伝子解析することは可能である。しかしながら、そのような場合、費用は高くなる。また、目的とする細胞以外が回収されている場合がある。

- [0053] 複数の回収容器20に回収された全ての細胞を画像観察することは可能である。しかしながら、全ての細胞を画像観察すると、時間がかかり、細胞の新鮮度を失う場合がある。その結果、遺伝子解析の良好な精度を維持できなくなる場合がある。
- [0054] そこで、本実施形態では、細胞が回収された領域（R）に関して、細胞の染色強度による検出結果に基づいて、目的の細胞である可能性が高い領域を推定する。目的の細胞である可能性が高い領域に対し、制御部40は画像データを取得する優先順位を決定する。
- [0055] 優先順位の決定方法として、領域（R）の中で、CD71抗体：FITCの蛍光強度が高く、かつDRAQ5の蛍光強度が高い順に約500個の細胞を格付けする。次に、制御部40は、格付け情報に基づいて画像データを取得する優先順位を決定する。
- [0056] 本実施形態では、CD71抗体のFITCの蛍光強度が高く、かつDRAQ5の蛍光強度が高い順に格付けすることを説明したが、これに限定されない。例えば、格付けとして、 $\alpha \times \text{CD71抗体のFITCの蛍光強度} + \beta \times \text{DRAQ5の蛍光強度}$ （ $\alpha$ 、及び $\beta$ は、あらかじめ設定した任意の係数）として蛍光強度の重みを変えることもできる。 $\alpha$ 、及び $\beta$ の係数は、フローサイトメトリーで回収された細胞の全数と回収したい細胞数から決めることができる。赤血球の幼弱性を重視する場合は、CD71抗体のFITCの蛍光強度の $\alpha$ の係数を高くし、核が検出されていることを重視する場合は、DRAQ5の蛍光強度を高くすることにより、格付けの優先順を変更することができる。
- [0057] 複数の回収容器20が、検出装置10から画像撮像装置30に搬送される。回収容器20を画像撮像装置30に搬送する手段は特に限定されない。
- [0058] 回収容器20が画像撮像装置30のテーブル304に載置される。図8は画像撮像装置30のテーブル304に載置された状態の回収容器20の平面図である。回収容器20をテーブル304に載置する際、回収容器20の識別標識206が、例えば、バーコードリーダ等から読み込まれ、回収容器2

0の情報が制御部40に入力される。回収容器20の情報をキーボード52から制御部40に入力することもできる。

[0059] また、回収容器20をテーブル304に載置する際、回収容器20の形状に関する情報、回収容器20の外形の大きさ、ウェル202の開口径、ウェル202間のピッチ、ウェル202の数等の情報が制御部40に入力される。

[0060] 制御部40は、回収容器20の情報から、ウェル202に回収された細胞の蛍光強度、及び格付けの情報を読み出す。制御部40は読み出された情報に基づいて、回収容器20の中で優先順位の高いウェル202の位置を特定する。本実施形態では、制御部40は、実線で囲まれた領域AR1(A11, A12, B11, B12, C11, C12)と、実線で囲まれた領域AR2(E11, E12, F11, F12, G11, G12)を優先順位が高いウェル202であると特定する。一方、破線で囲まれた領域AR3(O1, O2, O3, D04~D12, H04~H12)は優先順位が低いウェル202として特定される。制御部40は、優先順位に基づいて、テーブル304を駆動し、撮像対象のウェル202を観察位置に移動する。本実施形態では、制御部40は、A11に位置するウェル202を観察位置に移動し、次いで、画像撮像装置30の撮像装置316により細胞の画像データを取得する。取得された画像データは制御部40に入力され、制御部40は画像データを記憶する。

[0061] 制御部40は、回収容器20の中に、画像データを取得すべき細胞があるか否かを判断する。制御部40は画像データを取得すべき細胞があると判断すると、制御部40は、テーブル304を駆動することにより、画像データの取得を終えていない、例えば、A12のウェル202を、観察位置に移動する。画像撮像装置30の撮像装置316により細胞の画像データを取得する。取得された画像データは制御部40に入力され、制御部40は画像データを記憶する。

[0062] 制御部40は画像データを取得すべき細胞が無いと判断するまで、制御部

40はウェル202の移動と画像データの取得とを繰り返す。

[0063] 本実施形態では、画像撮像装置30は、回収容器20の96個のウェル202の中で、6個のウェル202のみの画像データを取得し、載置された回収容器20の画像データの取得を終了する。

[0064] 上述したように、本実施形態では、回収容器20のウェル202に回収された全ての細胞について、画像データを取得する必要が無いので、画像データを取得する時間を短くすることが可能になる。

[0065] 図9は、ウェル202に回収された細胞に標識された色素の蛍光色を、二値化により表現したイメージ図である。イメージ図においては、検出装置10により取得された細胞の染色強度（蛍光強度）に基づき、ウェル202内の細胞の蛍光色が再現されている。

[0066] 図9において、色の濃いウェル202は、目的の細胞が回収されている可能性が高く、色の薄いウェル202は、目的の細胞が回収されている可能性が低いと推定される。

[0067] 図10AはG12のウェル202の画像データであり、図10BはG02のウェル202の画像データである。図10Aに示されるように、G12のウェル202を撮像した画像データによれば、複数色の蛍光発光と細胞の外形の輪郭とが確認された。G12のウェル202には目的とする細胞が回収されている可能性が高いと判断できる。図10Bに示されるように、G02のウェル202を撮像した画像データによれば、蛍光発光と細胞の外形の輪郭とは確認されなかった。G02のウェル202には、ゴミ、若しくは死亡細胞が回収されたと判断できる。本実施形態では、目的の細胞について高い確率で画像データを取得することができる。

[0068] 画像撮像装置30は細胞の蛍光強度の画像データを取得する。制御部40は、検出結果に基づいて、画像データ取得の条件を決定することが好ましい。制御部40は、画像データを取得する際の露光時間、観察倍率、照明光の波長、及び観察光の波長の少なくとも1つ以上を決定することが好ましい。その例について説明する。

[0069] 例えば、多重免疫染色用のCy5 (Sulfoindocyanine succinimidyl ester) により細胞を染色する場合、検出装置10では、650nmの波長領域の光を励起光として細胞に照射する。650nmの光により励起され、Cy5により染色された細胞は670nmの波長領域の蛍光を発現する。検出装置10は、670nmの波長領域の蛍光強度を検知器（例えば、PMT: Photomultiplier Tube）により検知する。この検出結果から、細胞から発している蛍光強度を推定する。

[0070] 例えば、制御部40は、露光時間を100msecに、倍率を20倍に、設定する。露光時間が長くなれば明るくなり、倍率が高くなれば明るくなる。また、制御部40は、励起光となる650nmの波長領域の光を透過する励起フィルタを選択する。ここで励起光は細胞を照らす照明光となり、照明光の波長が決定される。制御部40は、励起光を透過せず、蛍光の670nmの波長領域の光を透過する蛍光フィルタを選択する。ここで、蛍光は細胞から発光され、撮像装置316で観察される観察光となるため、観察光の波長が決定される。上述したように蛍光強度の検出結果に基づいて、画像データ取得の条件を決定することにより、精度の高い画像データを取得することが可能となる。照明光と観察光とは、異なる波長を有する場合でも、同じ波長を有する場合でも良い。

[0071] また、制御部40により、染色された細胞の染色強度による検出結果と、回収容器20に回収された細胞の数とに基づいて、画像データを取得する細胞の数を制限することが好ましい。例えば、遺伝子解析を行う細胞数が予め決められている場合がある。遺伝子解析したい細胞個数に到達した場合に優先順位の高い複数の細胞の全てについて画像データを取得することなく、画像データの取得を終了することが好ましい。本実施形態によれば、優先順位の高い複数の細胞の中から、予め決められた数だけ画像データを取得し、全ての細胞について画像データを取得しないことも可能となる。画像データを取得する細胞の数を制限することにより画像データを取得する時間を短縮することができる。

- [0072] また、制御部40により、染色された細胞の染色強度による検出結果と、回収容器20に細胞が回収されている時間とに基づいて、画像データを取得する細胞の数を制限することが好ましい。遺伝子解析を行うためには、細胞の鮮度が必要とされる場合がある。回収容器20に優先順位の高い複数の細胞が回収されている場合であっても、優先順位の高い複数の細胞の中から、細胞が回収容器に回収されている時間、つまり細胞が回収容器に回収されてから一定期間内の細胞の画像データを取得することが好ましい。本実施形態によれば、画像データを取得する時間を制限することにより、細胞の鮮度を維持することが可能となる。特に、細胞がヒト末梢血に含まれる血球細胞である場合、採血から遺伝子解析までの時間が長い場合、解析できない等の問題が生じる場合がある。遺伝子解析にいたるまでの時間を、本実施形態の細胞分析システムによれば短縮することが可能となる。
- [0073] また、遺伝子解析を行う細胞数が予め決められている場合であって、時間の制限を加えることにより、必要数の細胞に達する前に遺伝子解析することも可能となる。つまり、細胞の鮮度を優先した態様が可能となる。
- [0074] また、制御部40により、画像データに基づいて、回収容器20に回収された細胞を、細胞解析するか否かを判定することが好ましい。画像データを取得した結果、その細胞が目的の細胞でない場合もある。制御部40により、細胞解析するか否かを判定することにより、目的の細胞のみを細胞解析することができる。細胞解析は、遺伝子解析等を挙げることができる。
- [0075] また、画像データに基づいて、細胞の形態、色、大きさ、及び染色強度の少なくとも1つ以上を解析することが好ましい。これらの要素を解析することにより、例えば、誤差のない遺伝子解析が可能となる。
- [0076] 以下、遺伝子解析する優良な有核赤血球を決定するための解析手順について説明する。
- [0077] 画像データに基づいて、細胞の大きさから遺伝子解析の優先順位のランクを決める。例えば、極端に小さい場合には、ウェルに細胞ではなくゴミが格納されていると判断できる。また、極端に大きい場合には、複数の細胞が1

個のウェルに格納されている可能性があるとは判断できる。適切な大きさである場合、1個の細胞である可能性が高いと判断できる。

[0078] 画像データに基づいて、細胞の色から赤血球である可能性を示すランクを決める。赤い場合、赤血球であり、有核赤血球の可能性が高くなるので回収対象として高いランクを付ける。一方、白い場合、白血球や好中球の可能性が高くなるので回収対象として低いランクを付ける。

[0079] 画像データに基づいて、細胞の形態（形）から遺伝子解析の優先順位のランクを決める。丸い場合、良質な赤血球と判断でき、丸くない場合白血球やダメージを受けた赤血球と判断できる。

[0080] 上記の解析手順を少なくとも一つ、又はそれぞれを組み合わせることにより、制御部40により、遺伝子解析に適した細胞か否かを判定することができる。

[0081] 本実施形態では、細胞が血球細胞である場合を例示したが、これに限定されない。また、ウェルに回収された細胞について説明したが、チューブに回収された細胞であっても良い。

## 符号の説明

- [0082] 1 細胞分析システム
- 10 検出装置
  - 20 回収容器
  - 30 画像撮像装置
  - 40 制御部
  - 50 パーソナルコンピューター
  - 52 キーボード
  - 54 ディスプレイ
  - 102 ノズル
  - 104 フローセル
  - 106 光源
  - 108 検知器

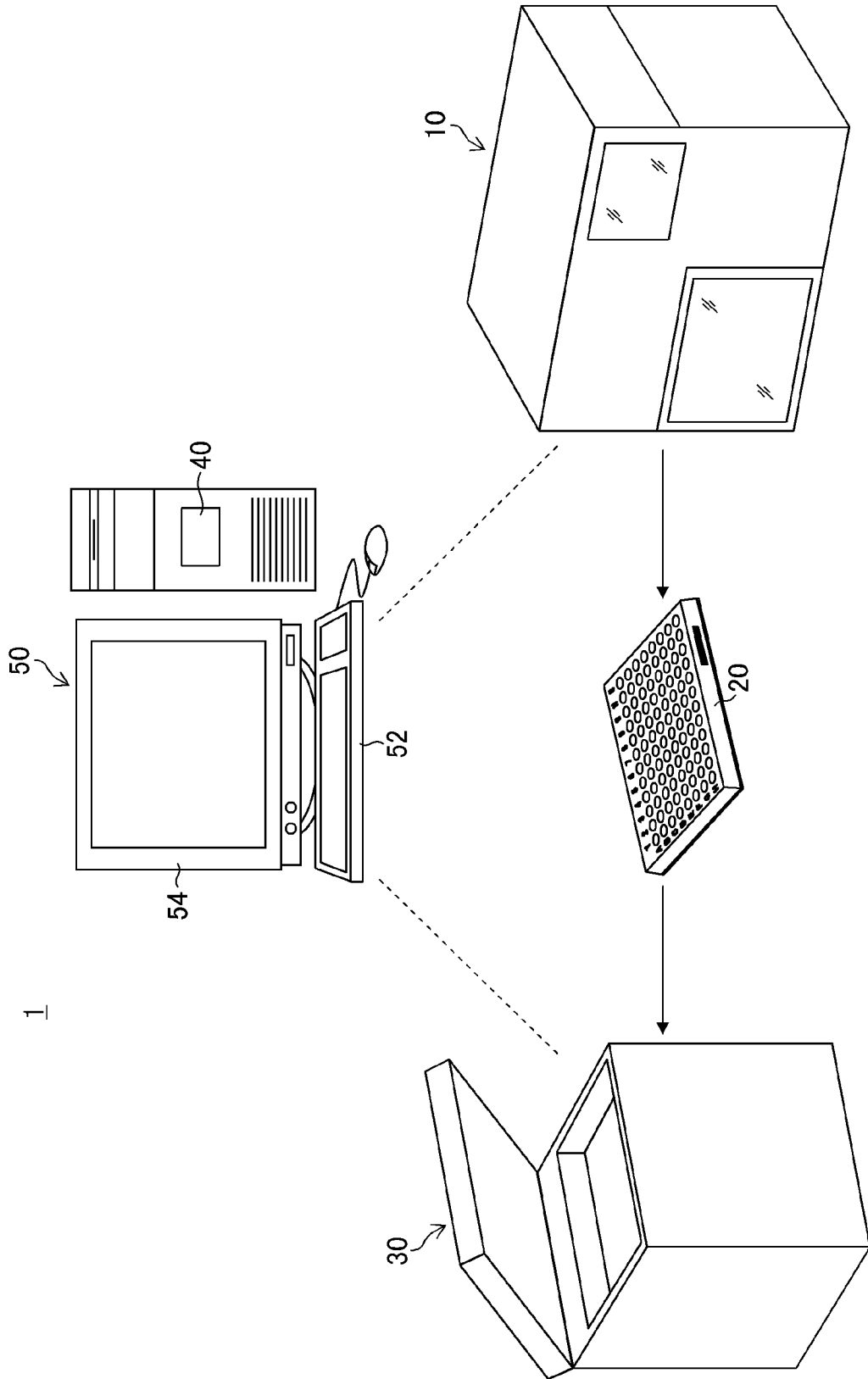
- 1 1 0 検知器
- 1 1 2、1 1 4 偏向電極板
- 2 0 2 ウェル
- 2 0 4 側壁
- 2 0 6 識別標識
- 2 0 8 チューブ
- 2 1 0 支持部材
- 2 1 2 孔
- 3 0 2 第1光源
- 3 0 4 テーブル
- 3 0 6 レンズ
- 3 0 8 励起フィルタ
- 3 1 0 ダイクロイックミラー
- 3 1 2 蛍光フィルタ
- 3 1 4 第2光源
- 3 1 6 撮像装置

## 請求の範囲

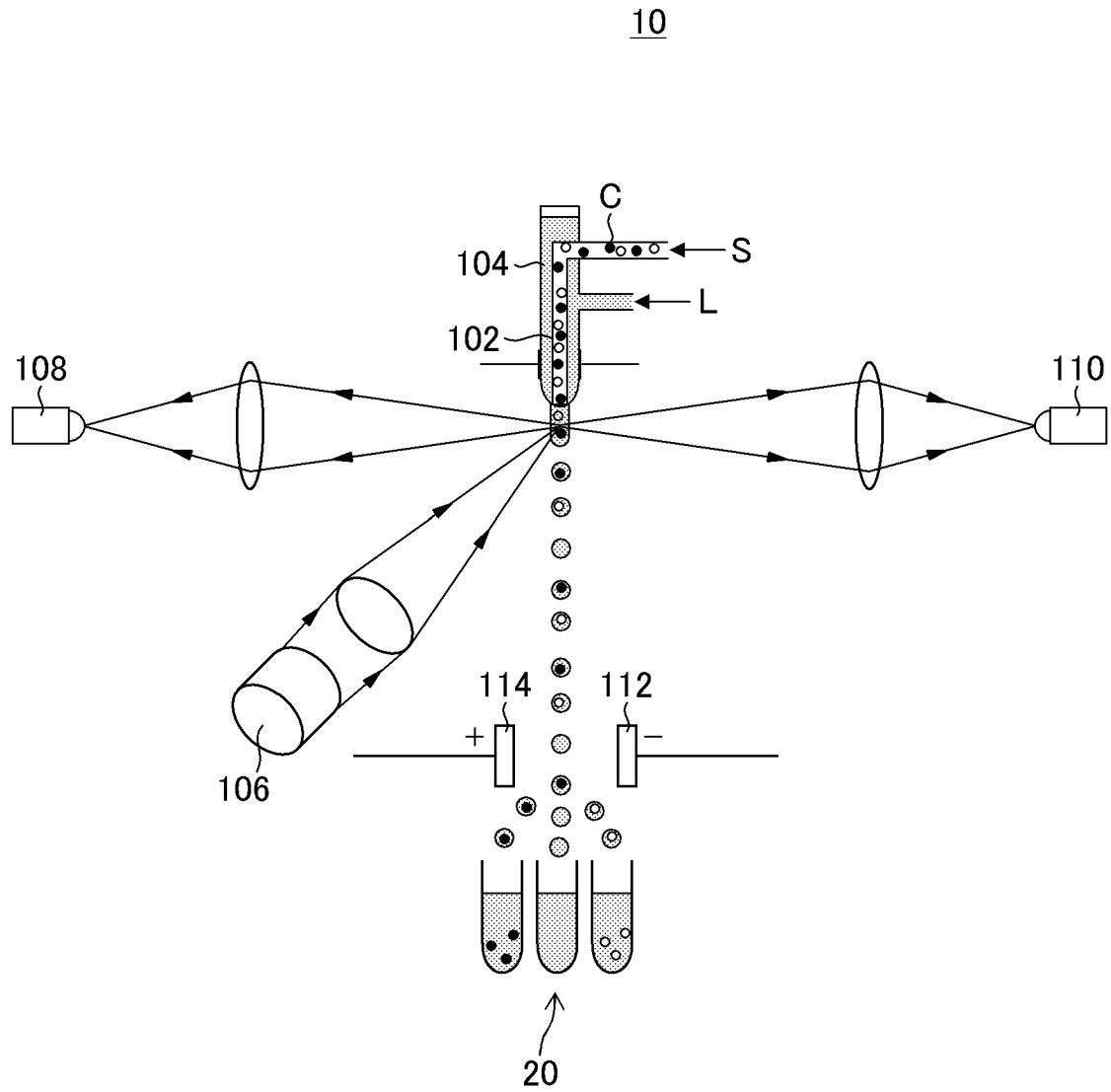
- [請求項1] 染色された細胞の染色強度を検出する検出装置と、  
前記検出装置により染色強度が検出された複数の細胞を回収する回収容器と、  
前記染色された細胞の染色強度の検出結果に基づいて、画像データを取得する優先順位を決定する制御部と、  
前記制御部により決定された優先順位に基づいて、前記回収容器に回収された細胞の画像データを取得する画像撮像装置と、  
を備える細胞分析システム。
- [請求項2] 前記制御部は、前記染色された細胞の染色強度の検出結果に基づいて画像データ取得の条件を決定する請求項1に記載の細胞分析システム。
- [請求項3] 前記条件が、前記画像データを取得する際の露光時間、観察倍率、照明光の波長、及び観察光の波長の少なくとも1つ以上を含む請求項2に記載の細胞分析システム。
- [請求項4] 前記制御部は、前記染色された細胞の染色強度の検出結果と、前記回収容器に回収された細胞の数とに基づいて、前記画像データを取得する前記細胞の数を制限する請求項1から3の何れか一項に記載の細胞分析システム。
- [請求項5] 前記制御部は、前記染色された細胞の染色強度の検出結果と、前記回収容器に前記細胞が回収されている時間とに基づいて、前記画像データを取得する前記細胞の数を制限する請求項1から3の何れか一項に記載の細胞分析システム。
- [請求項6] 前記細胞が複数の種類の染料により染色される請求項1から5の何れか一項に記載の細胞分析システム。
- [請求項7] 前記制御部は、前記画像データに基づいて、前記回収容器に回収された細胞を、細胞解析するか否かを判定する請求項1から6の何れか一項に記載の細胞分析システム。

- [請求項8] 前記細胞が血球細胞である、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の細胞分析システム。
- [請求項9] 前記画像データに基づいて、前記細胞の形態、色、大きさ、及び染色強度の少なくとも 1 つ以上を解析する請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の細胞分析システム。

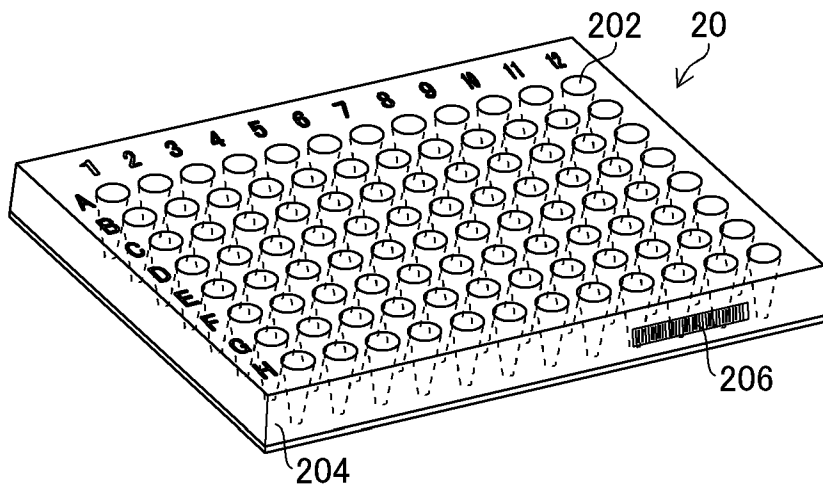
[図1]



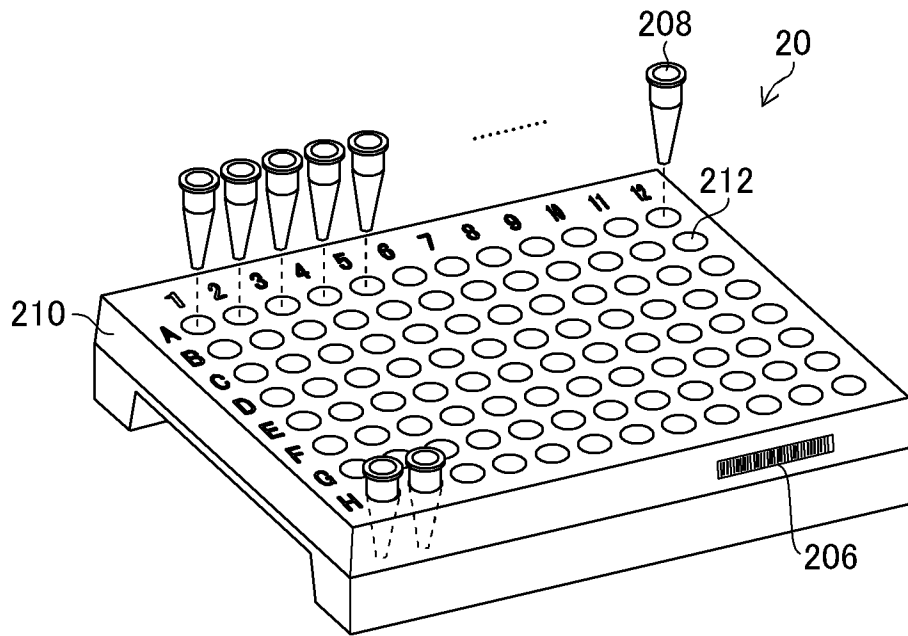
[図2]



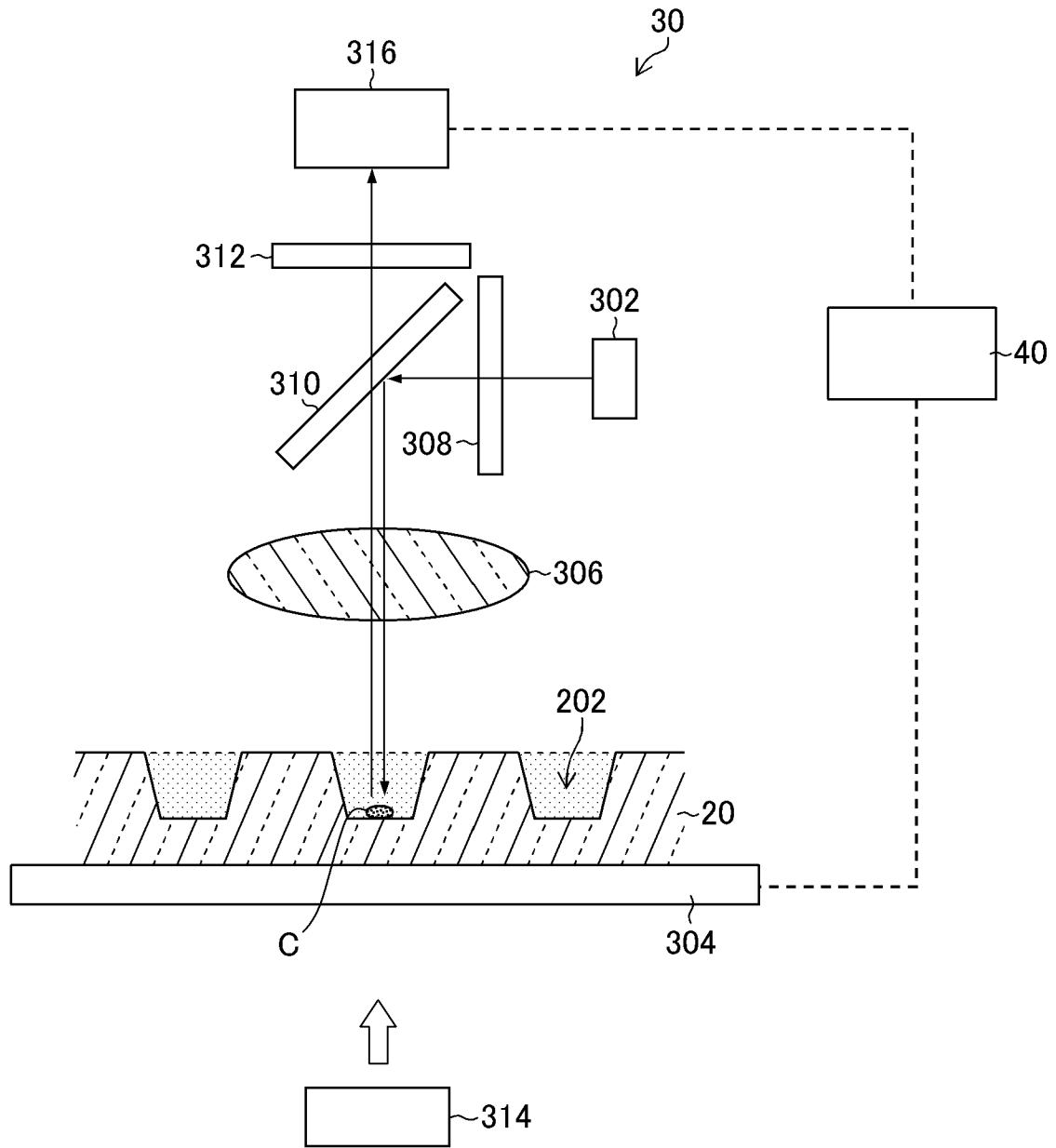
[図3A]



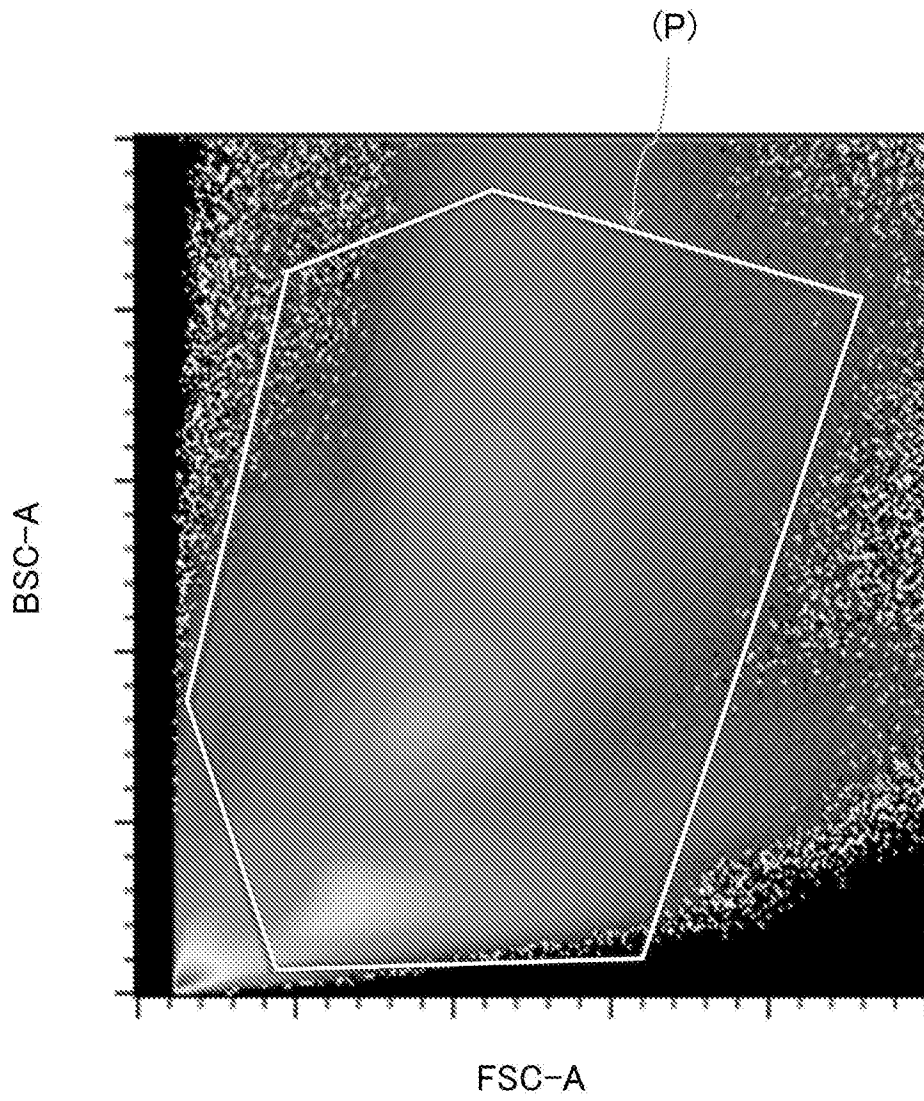
[図3B]



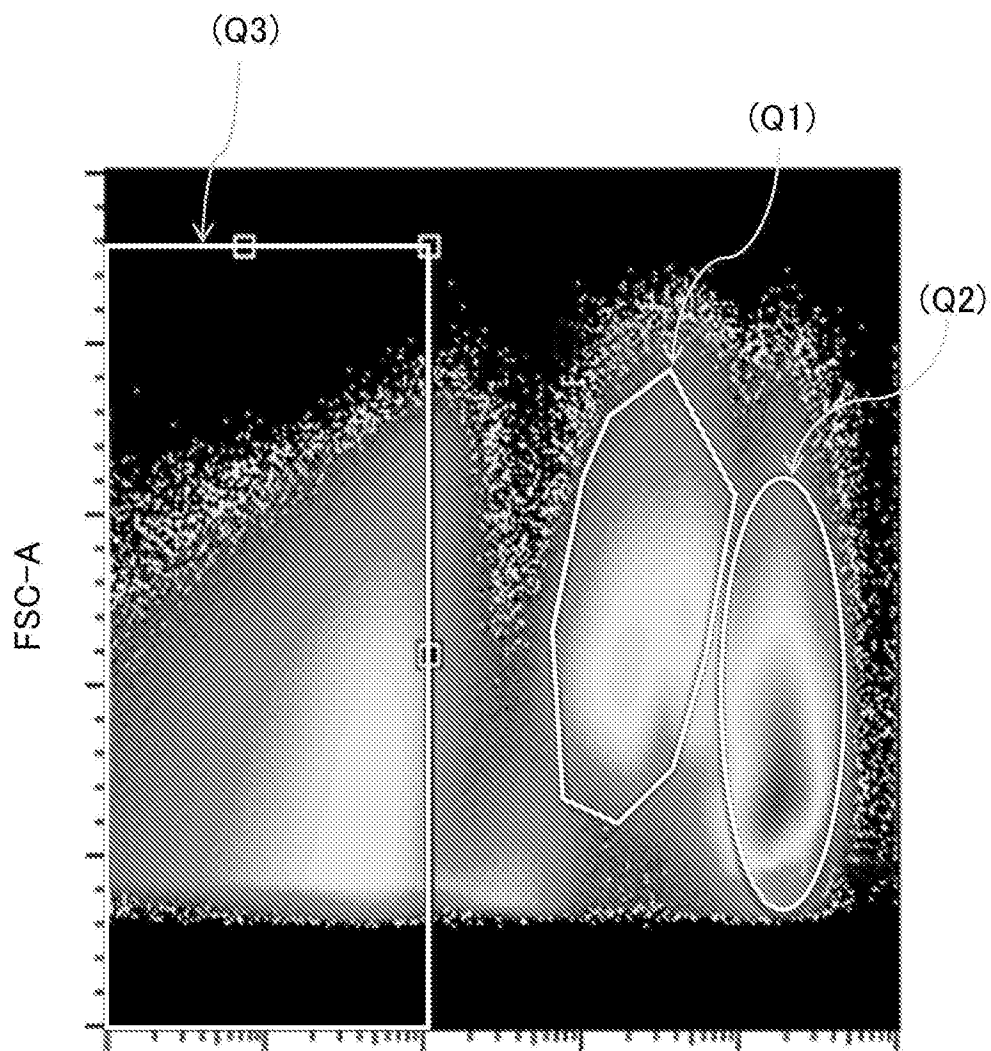
[図4]



[図5]

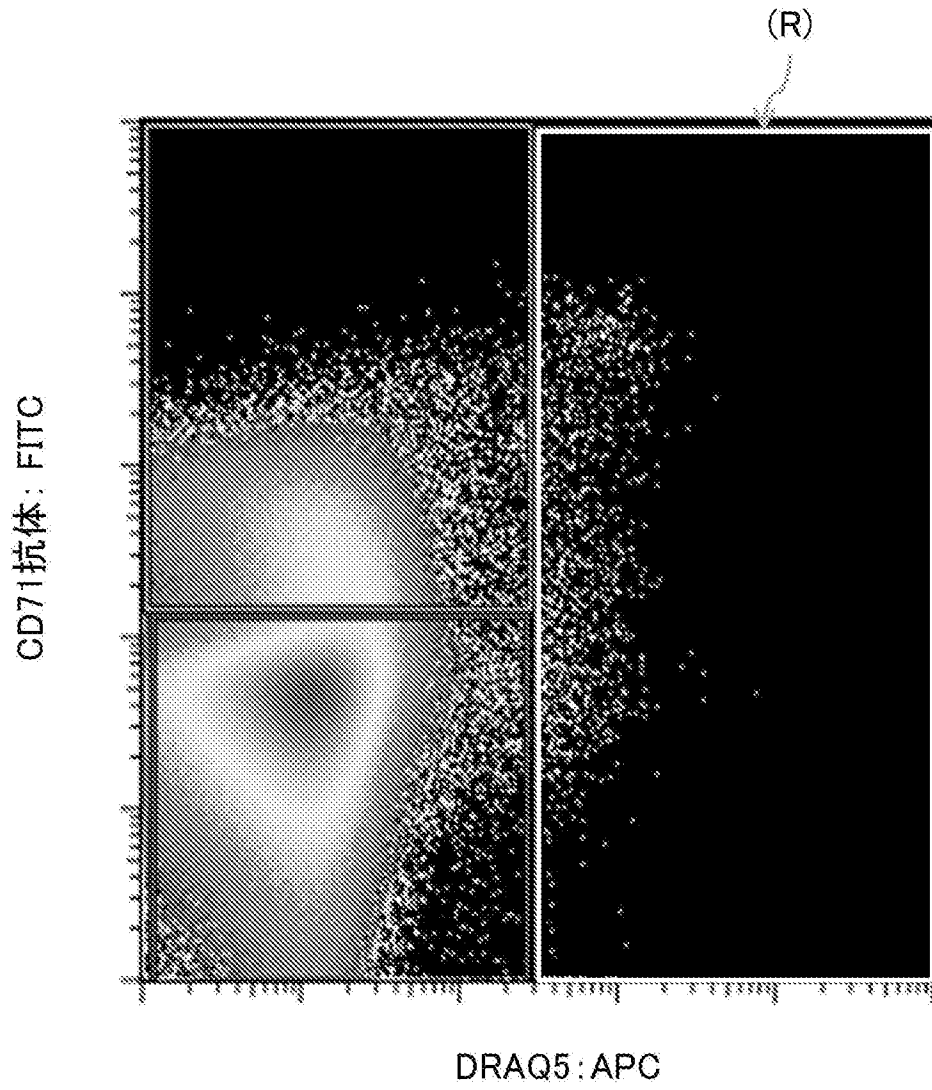


[圖6]

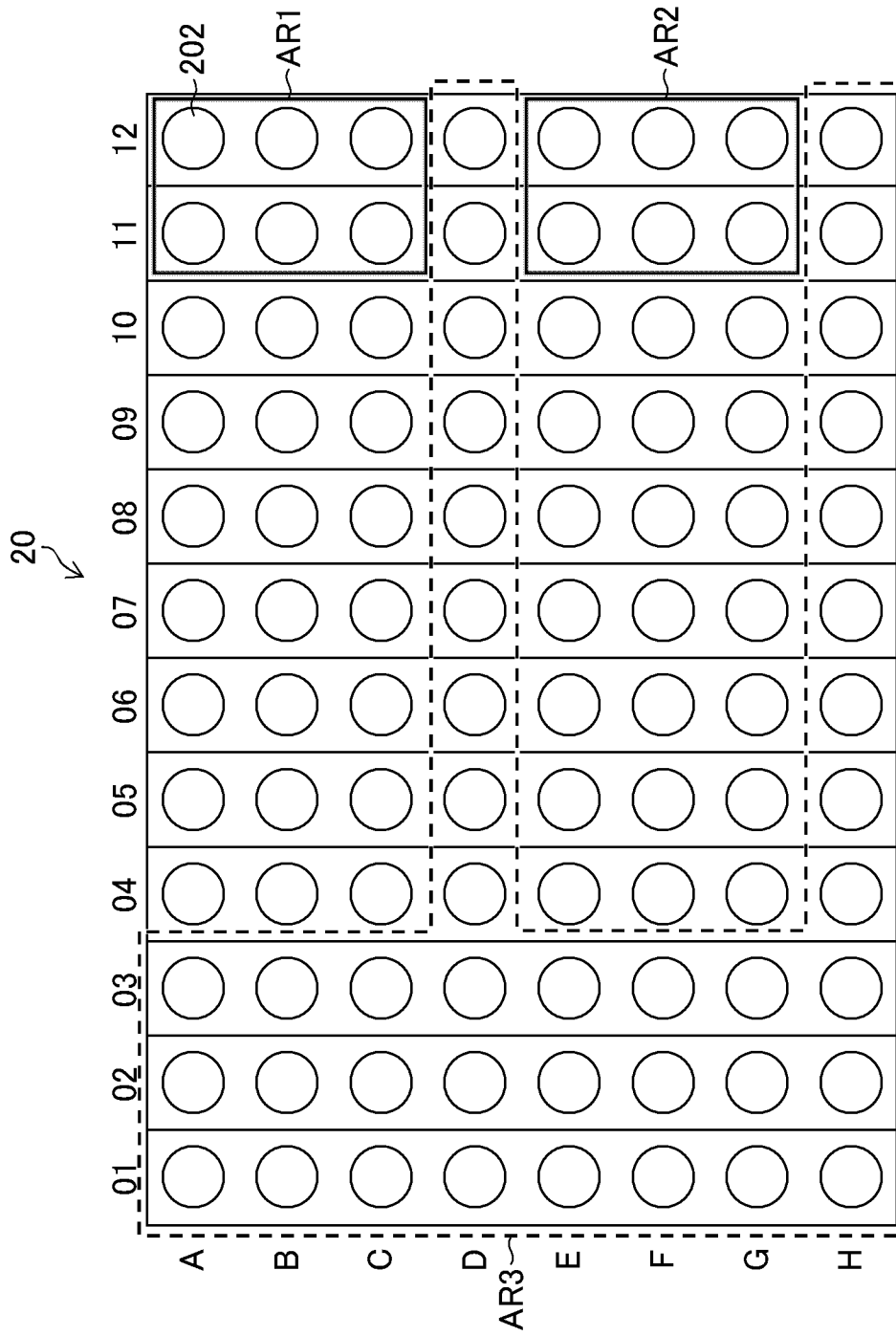


CD45抗体: Brilliant Violet 421

[図7]

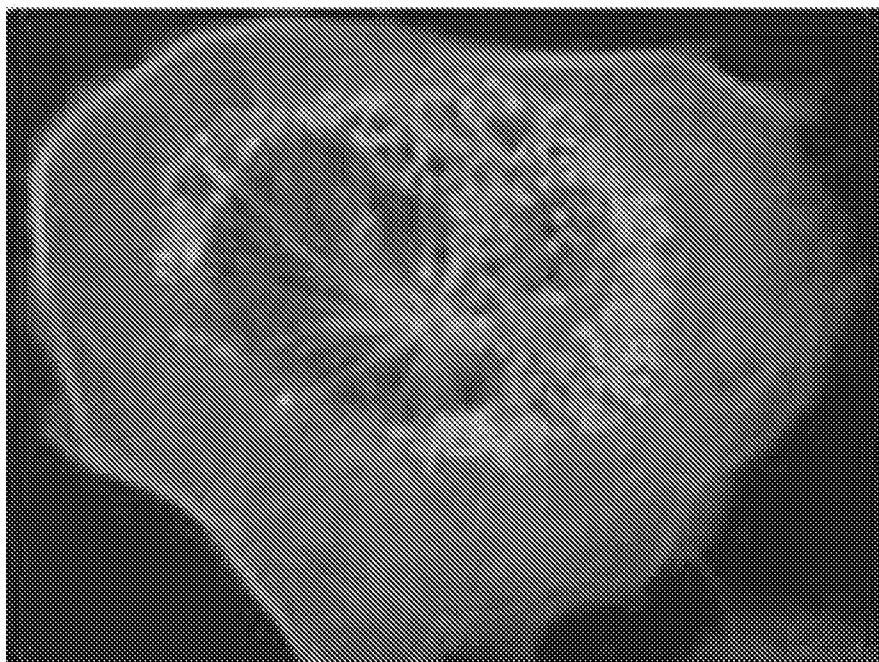


[図8]

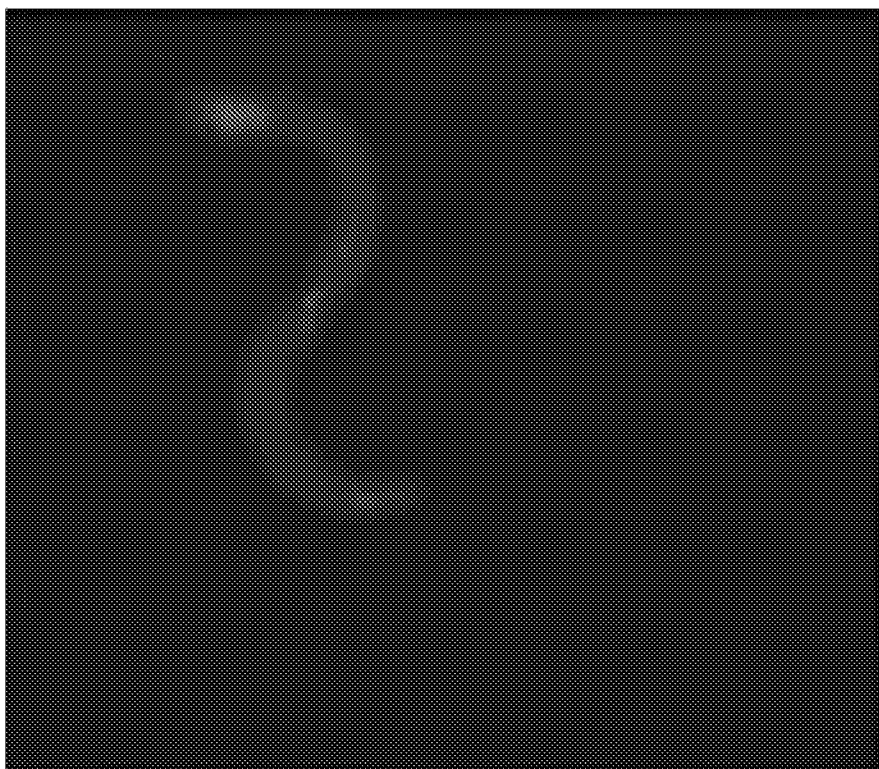




[図10A]



[図10B]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2017/010359

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N15/14(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N15/14, C12Q1/02, G01N21/27, G01N21/64, G01N33/48, G01N33/483

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-510782 A (Olympus Life Science Research Europe GmbH), 08 April 2010 (08.04.2010), paragraphs [0007] to [0010], [0014], [0022] to [0024], [0050], [0054], [0058] to [0059], [0067] to [0071]; fig. 2 to 3 & US 2011/0081684 A1 paragraphs [0006] to [0008], [0018], [0022] to [0023], [0042], [0045], [0050] to [0051], [0062] to [0064]; fig. 2, 3a & WO 2008/064730 A2	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08 May 2017 (08.05.17)	Date of mailing of the international search report 16 May 2017 (16.05.17)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/010359

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-257450 A (Sysmex Corp.), 22 September 2005 (22.09.2005), paragraph [0028] & US 2005/0219527 A1 paragraphs [0058] to [0059] & EP 1574839 A1	1-9
Y	JP 2001-526051 A (Sierra Diagnostics, Inc.), 18 December 2001 (18.12.2001), paragraphs [0011], [0044] & US 2002/0037512 A1 paragraphs [0012], [0063] & WO 1999/029904 A2	1-9
Y	JP 2010-535013 A (Sierra Molecular Corp.), 18 November 2010 (18.11.2010), paragraph [0056] & US 2010/0120078 A1 paragraph [0100] & WO 2008/111981 A1 & CN 101668854 A	1-9
A	JP 2015-078927 A (Sony Corp.), 23 April 2015 (23.04.2015), & US 2016/0245736 A1 & WO 2015/056431 A1	1-9
A	JP 2015-152439 A (Sony Corp.), 24 August 2015 (24.08.2015), & US 2017/0010203 A1 & WO 2015/122160 A1	1-9
A	WO 2015/056516 A1 (Sony Corp.), 23 April 2015 (23.04.2015), & US 2016/0266027 A1 & EP 3035030 A1	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N15/14(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N15/14, C12Q1/02, G01N21/27, G01N21/64, G01N33/48, G01N33/483

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-510782 A (オリンパス ライフ サイエンス リサーチ ヨーロッパ ゲーエムベーハー) 2010.04.08, 段落 [0007] - [0010], [0014], [0022] - [0024], [0050], [0054], [0058] - [0059], [0067] - [0071] 及び図 2 - 3 & US 2011/0081684 A1, 段落 [0006] - [0008], [0018], [0022] - [0023], [0042], [0045], [0050] - [0051], [0062] - [0064] 及び図 2、3 a & WO 2008/064730 A2	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 08.05.2017	国際調査報告の発送日 16.05.2017
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 渡邊 吉喜 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2005-257450 A (シスメックス株式会社) 2005. 09. 22, 段落 [0028] & US 2005/0219527 A1, 段落 [0058] - [0059] & EP 1574839 A1	1-9
Y	JP 2001-526051 A (シエラ ダイアグノスティクス, インク. ) 2001. 12. 18, 段落 [0011], [0044] & US 2002/0037512 A1, 段落 [0012], [0063] & WO 1999/029904 A2	1-9
Y	JP 2010-535013 A (シエラ モレキュラー コーポレイション) 2010. 11. 18, 段落 [0056] & US 2010/0120078 A1, 段落 [0100] & WO 2008/111981 A1 & CN 101668854 A	1-9
A	JP 2015-078927 A (ソニー株式会社) 2015. 04. 23, & US 2016/0245736 A1 & WO 2015/056431 A1	1-9
A	JP 2015-152439 A (ソニー株式会社) 2015. 08. 24, & US 2017/0010203 A1 & WO 2015/122160 A1	1-9
A	WO 2015/056516 A1 (SONY CORPORATION) 2015. 04. 23, & US 2016/0266027 A1 & EP 3035030 A1	1-9