

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6781989号

(P6781989)

(45) 発行日 令和2年11月11日(2020. 11. 11)

(24) 登録日 令和2年10月21日(2020. 10. 21)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 15/14 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 C

GO 1 N 27/26 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 K

C 1 2 Q 1/00 (2006. 01)

GO 1 N 15/14 P

GO 1 N 27/26 P

C 1 2 Q 1/00 Z

請求項の数 20 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2017-514177 (P2017-514177)

(86) (22) 出願日 平成28年4月21日(2016. 4. 21)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2016/062591

(87) 国際公開番号 W02016/171198

(87) 国際公開日 平成28年10月27日(2016. 10. 27)

審査請求日 平成31年4月18日(2019. 4. 18)

(31) 優先権主張番号 特願2015-87021 (P2015-87021)

(32) 優先日 平成27年4月21日(2015. 4. 21)

(33) 優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(出願人による申告) 平成25年度独立行政法人科学技術振興機構 研究成果 展開事業 研究成果最速展開支援プログラム シーズ顕在化 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 504137912

国立大学法人 東京大学

東京都文京区本郷七丁目3番1号

(73) 特許権者 000004112

株式会社ニコン

東京都港区港南二丁目15番3号

(74) 代理人 100161207

弁理士 西澤 和純

(74) 代理人 100140774

弁理士 大浪 一徳

(74) 代理人 100175824

弁理士 小林 淳一

(72) 発明者 一木 隆範

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微粒子検出システム及び微粒子検出プログラム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微粒子を含む試料が移動可能な流路を備えた流体デバイスが設置されうる設置面を有するステージ部と、

前記流路を移動する前記微粒子の粒子径を判定する粒子径判定部と、

前記流路を移動する前記微粒子のゼータ電位を判定するゼータ電位判定部と、

前記粒子径判定部が判定した前記微粒子毎の前記粒子径と、前記ゼータ電位判定部が判定した前記微粒子毎の前記ゼータ電位とを、前記微粒子毎に関連付けする相関部と、

前記粒子径の基準範囲と、前記ゼータ電位の基準範囲とをそれぞれ示す基準範囲情報を記憶する基準記憶部と、

前記相関部が前記微粒子毎に前記粒子径と前記ゼータ電位とを関連付けて得た相関情報と、前記基準記憶部が記憶する前記基準範囲情報とに基づいて、前記微粒子の種類又は状態の少なくとも一方を判定する状態判定部と、

を備える微粒子検出システム。

【請求項2】

前記流路に照明光を照射する照射部と、

前記照明光の照射により生ずる散乱光を撮像する撮像部と、

前記撮像部が撮像した画像に基づいて、前記画像に含まれる前記微粒子を前記微粒子毎に識別する識別部と、

を更に備え、

前記粒子径判定部と前記ゼータ電位判定部は、それぞれ、前記識別部が識別した前記微粒子毎に、前記粒子径と前記ゼータ電位とを判定する、請求項1に記載の微粒子検出システム。

【請求項3】

前記状態判定部は、前記基準範囲情報が示す前記粒子径の基準範囲及び前記ゼータ電位の基準範囲によって区分される少なくとも1つの領域について、当該領域に含まれる前記微粒子の種類又は状態のうち少なくとも一方を判定する、

請求項2に記載の微粒子検出システム。

【請求項4】

前記基準範囲情報が示す前記粒子径のしきい値及び前記ゼータ電位のしきい値によって区分される領域毎に、当該領域に含まれる前記微粒子の数を計数する計数部 10

を更に備える請求項3に記載の微粒子検出システム。

【請求項5】

前記計数部が計数する前記微粒子の数の、前記領域間の比率を算出する比率算出部と、ある物質と反応させる前の前記微粒子について、前記比率算出部が算出する前記領域間の前記微粒子の数の比率と、前記物質と反応させた後の前記微粒子について、前記比率算出部が算出する前記領域間の前記微粒子の数の比率との変化率を算出する変化率算出部とを更に備える請求項4に記載の微粒子検出システム。

【請求項6】

前記微粒子は、表面の生体分子と別の物質が結合した複合体を含み、 20

前記状態判定部は、

前記相関情報と前記基準範囲情報とに基づいて、前記複合体の種類を特定する

請求項2から請求項5のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項7】

前記微粒子はエクソソームであって、

前記状態判定部は、特定した前記複合体の種類に基づいて、前記エクソソームの表面に特異的に結合した特異的結合物質を検出する

請求項6に記載の微粒子検出システム。

【請求項8】

前記状態判定部は、複数の前記微粒子について、前記微粒子毎の前記粒子径及び前記ゼータ電位に関する分布を出力する 30

請求項2から請求項7のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項9】

前記状態判定部の判定に基づいて前記微粒子の種類又は状態の少なくとも一方の分布を評価する評価部

を更に備える請求項2から請求項8のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項10】

前記基準範囲情報は、前記状態判定部の判定に用いられる前記微粒子の状態の前記分布毎に予め記憶される

請求項8または請求項9に記載の微粒子検出システム。 40

【請求項11】

前記基準範囲情報は、表面の生体分子に物質が結合していない複数の前記微粒子の前記粒子径及び前記ゼータ電位の分布に基づいて定められる

請求項2から請求項10のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項12】

前記粒子径判定部は、

前記識別部が識別した前記微粒子のブラウン運動に基づいて前記粒子径を判定する

請求項2から請求項11のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項13】

前記ゼータ電位判定部は、 50

前記識別部が識別した前記微粒子の移動速度に基づいて前記ゼータ電位を判定する
請求項2から請求項12のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項14】

前記照射部は、前記設置面と直交し前記流路と平行な面と交差する第1方向に平行な光軸に沿って前記流路に照明光を照射し、

前記流路の内部において、前記照明光の前記第1方向と直交する第2方向の幅が最小となり、かつ、前記流路の照射光入射側の側面の位置における照射領域が前記側面内に収まるように前記照明光を収束させる調整部

を更に備える請求項2から請求項13のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項15】

前記微粒子は、別の物質が結合していない又は結合している、エクソソーム又は細胞外小胞体である

請求項2から請求項14のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項16】

前記識別部は、識別した前記微粒子毎に、固有の微粒子識別子を付与し、

前記相関部は、前記粒子径判定部が粒子径を判定した前記微粒子に対して付与された前記微粒子識別子と、前記ゼータ電位判定部がゼータ電位を判定した前記微粒子に対して付与された前記微粒子識別子との一致に基づいて、前記微粒子毎の前記粒子径と、前記ゼータ電位判定部が判定した前記微粒子毎の前記ゼータ電位とを、前記微粒子毎に関連付けする

請求項2から請求項14のいずれか一項に記載の微粒子検出システム。

【請求項17】

微粒子を含む試料を移動可能な流路を備えた流体デバイスが設置されうる設置面を有するステージ部を備えるコンピュータに、

前記流路を移動する前記微粒子の粒子径を判定する粒子径判定ステップと、

前記流路を移動する前記微粒子のゼータ電位を判定するゼータ電位判定ステップと、

前記微粒子の前記粒子径と前記ゼータ電位とを、前記微粒子毎に関連付けする相関ステップと、

前記粒子径のしきい値と前記ゼータ電位のしきい値とに基づいて区分される領域を表示するステップと、

前記微粒子毎に前記粒子径と前記ゼータ電位との分布を表示するステップと、

を実行させるための微粒子検出プログラム。

【請求項18】

前記粒子径のしきい値及び前記ゼータ電位のしきい値によって区分される領域のうち、特定の当該領域に含まれる前記微粒子の数を計数する計数ステップ

を更に実行させる請求項17に記載の微粒子検出プログラム。

【請求項19】

前記流路に照明光を照射する照射ステップと、

前記照明光の照射により生ずる散乱光を撮像する撮像ステップと、

前記撮像ステップにおいて撮像された画像に基づいて、前記画像に含まれる前記微粒子を前記微粒子毎に識別する識別ステップと、

を更に実行させ、

前記粒子径判定ステップと前記ゼータ電位判定ステップは、それぞれ、前記識別ステップで識別された前記微粒子毎に、前記粒子径と前記ゼータ電位とを判定する、

請求項18に記載の微粒子検出プログラム。

【請求項20】

前記照射ステップは、前記設置面と直交し前記流路と平行な面と交差する第1方向に平行な光軸に沿って前記流路に照明光を照射し、

前記流路の内部において、前記照明光の前記第1方向と直交する第2方向の幅が最小となり、かつ、前記流路の照射光入射側の側面の位置における照射領域が前記側面内に収ま

10

20

30

40

50

るように前記照明光を調整する、

請求項19に記載の微粒子検出プログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微粒子検出システム及び微粒子検出プログラムに関するものである。

本願は、2015年4月21日に、日本に出願された特願2015-087021号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

媒質中を移動する微粒子を暗視野照明のもとでの顕微鏡観察により撮像し、撮像した画像を処理することによって、その微粒子の数や移動速度を計測する装置が知られている（例えば、特許文献1参照）。このような装置においては、異なるタイミングで撮像された複数枚の画像に基づいて、微粒子の移動の軌跡を追跡することにより、微粒子の数や移動速度を計測している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2009-229103号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、例えば、特許文献1記載の技術では、媒質中に存在する複数の微粒子のゼータ電位と、微粒子径との相関までは、判定することができなかった。

本発明は、媒質中に存在する細胞外小胞体などの微粒子のゼータ電位と、微粒子径との相関を判定することができる微粒子検出システム及び微粒子検出プログラムを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の一態様は、微粒子を含む試料が移動可能な流路を備えた流体デバイスが設置されうる設置面を有するステージ部と、前記流路を移動する前記微粒子の粒子径を判定する粒子径判定部と、前記流路を移動する前記微粒子のゼータ電位を判定するゼータ電位判定部と、前記粒子径判定部が判定した前記微粒子毎の前記粒子径と、前記ゼータ電位判定部が判定した前記微粒子毎の前記ゼータ電位とを、前記微粒子毎に関連付けする相関部と、前記相関部が前記微粒子毎に前記粒子径と前記ゼータ電位とを関連付けて得た相関情報と、前記基準記憶部が記憶する前記基準範囲情報とに基づいて、前記微粒子の種類又は状態の少なくとも一方を判定する状態判定部と、を備える微粒子検出システムである。

【0006】

また、本発明の一態様は、微粒子を含む試料を移動可能な流路を備えた流体デバイスが設置されうる設置面を有するステージ部を備えるコンピュータに、前記流路を移動する前記微粒子の粒子径を判定する粒子径判定ステップと、前記流路を移動する前記微粒子のゼータ電位を判定するゼータ電位判定ステップと、前記微粒子の前記粒子径と前記ゼータ電位とを、前記微粒子毎に関連付けする相関ステップと、前記粒子径のしきい値と前記ゼータ電位のしきい値とに基づいて区分される領域を表示するステップと、前記微粒子毎に前記粒子径と前記ゼータ電位との分布を表示するステップと、を実行させるための微粒子検出プログラムである。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本実施形態に係る粒子検出システムの概略的な平面図である。

【図2】本実施形態に係る粒子検出装置の概略的な正面図である。

【図3】本実施形態に係る細胞外小胞体分析チップの基本構造を示す斜視図である。

10

20

30

40

50

【図４】図３におけるⅠⅠ－ⅠⅠ線断面図である。

【図５】本実施形態に係るステージ部の設置面に流体デバイスが設置された平面図である。

。

【図６】本実施形態に係る流体デバイスをy z平面で部分的に断面した部分断面図である。

。

【図７】図６におけるA－A線断面図である。

【図８】本実施形態に係る照射部及び調整部の概略構成を示す図である。

【図９】本実施形態に係る調整部および流体デバイスの部分詳細図である。

【図１０】本実施形態に係る照明光がリザーバ部材の端面および流路の側面を通過する光路を模式的に示す図である。

10

【図１１】本実施形態に係る制御装置の概略構成を示す図である。

【図１２】本実施形態に係る記憶部が記憶する粒子リストの一例を示す図である。

【図１３】本実施形態に係る記憶部が記憶する粒子相関リストの一例を示す図である。

【図１４】本実施形態の記憶部が記憶するしきい値の一例を示す図である。

【図１５】本実施形態の制御装置の動作の一例を示す図である。

【図１６】本実施形態の評価部が出力する粒子径及びゼータ電位の分布の一例を示す図である。

【図１７】本実施形態の制御装置の構成の一例を示す構成図である。

【図１８】本実施形態の制御装置の動作の変形例を示す図である。

【図１９】本実施形態のしきい値及び領域の一例を示す図である。

20

【図２０】本実施形態の計数部による計数結果の一例を示す表である。

【図２１】本実施形態の複数のレーンにそれぞれ種類が異なる抗体を添加する場合の一例を示す模式図である。

【図２２】本実施形態の疾患の判定パネルの一例を示す表である。

【図２３】本実施形態の疾患の診断及び指導パネルの一例を示す表である。

【図２４】本実施形態のゲート領域の一例を示す図である。

【図２５】本実施形態の演算部による微粒子の物性評価の動作の一例を示す図である。

【図２６】本実施形態の評価部による評価の一例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【０００９】

30

本実施形態の粒子検出システム１は、粒子検出装置１００と、制御装置５とを備えている。なお、以下の説明において、粒子検出システム１が検出する粒子が、細胞外小胞体である場合には、この粒子検出システム１を細胞外小胞体検出システムとも称する。まず、粒子検出装置１００について、図１から図１０を参照して説明する。

【００１０】

[粒子検出装置の構成]

図１は、実施形態に係る粒子検出システム１の概略的な平面図である。図２は、実施形態に係る粒子検出装置１００の概略的な正面図である。

【００１１】

粒子検出装置１００は、流体デバイスＣを検出対象として流体デバイスＣに照明光Ｌ１を照射し、流体デバイスＣからの散乱光Ｌ２を観察することにより、流体デバイスＣ内の粒子に関する情報を検出する。粒子検出装置１００は、光源部ＬＳ、照射部２０、調整部ＣＬ、ステージ部ＳＴ、検出部３０、送信部４０、および制御装置５を備えている。粒子検出装置１００および流体デバイスＣによって粒子検出システム１が構成される。

40

【００１２】

以下の説明においては、ステージ部ＳＴの設置面ＳＴａと直交し、照明光Ｌ１と平行な面（不図示）と直交する方向をx方向（x軸；第３方向）、設置面ＳＴａと平行でx方向と直交する方向をy方向（y軸）、x方向およびy方向と直交する鉛直方向をz方向（z軸；第２方向）として適宜説明する。

【００１３】

50

まず、検出対象である流体デバイスCについて説明する。

本実施形態における流体デバイスCは、一例として、検体を分析する際に用いられる電気泳動分析チップである。検体となる微粒子としては、細胞、細菌、ウィルス、細胞外小胞体（細胞外ベシクル）、合成高分子、無機物、若しくは金属を基材とする微粒子、磁性微粒子、高分子ミセル構造を有する微粒子等が挙げられる。合成高分子を基材とする微粒子としては、例えばポリスチレン等のラテックス粒子が挙げられる。無機物を基材とする微粒子としては、例えばシリカ粒子が挙げられる。金属を基材とする微粒子としては、例えば鉄製ビーズが挙げられる。磁性微粒子としては、例えば鉄、酸化鉄、ニッケル等を含む磁性を有するビーズが挙げられる。合成高分子、無機物、若しくは金属を基材とする微粒子、及び磁性微粒子のいずれも、ペプチド、タンパク質、細胞、各種化合物等で表面を修飾された粒子を含む。

10

本実施形態では、電気泳動分析チップとして、細胞外小胞体を分析するための細胞外小胞体分析チップを用いる場合について説明する。本明細書において、細胞外小胞体とは、エクソソーム（エキソソーム）、アポトーシス小体、マイクロベシクル等を含む、脂質小胞を意味するものとする。細胞外小胞体の大きさは直径30 nmから1 µm程度である。細胞外小胞体は、細胞の分泌物であり、その表面に分泌源の細胞由来のタンパク質を発現している。

以下に、エクソソームを分析する場合を例として、本実施形態に係る細胞外小胞体分析チップ（電気泳動分析チップ）について説明する。

【0014】

20

[エクソソーム]

エクソソームは、直径30～200 nm程度の脂質小胞であり、エンドソームと細胞膜との融合体として、腫瘍細胞、樹状細胞、T細胞、B細胞等、種々の細胞から、血液、尿、唾液等の体液中に分泌される。

生体内に存在する癌細胞等の異常細胞は、その細胞膜に特有のタンパク質を発現している。エクソソームは細胞の分泌物であり、その表面に分泌源の細胞由来のタンパク質を発現している。

【0015】

そこで、エクソソームの表面に発現しているタンパク質を分析することで、分泌源の細胞の異常を検出することができる。ここで、エクソソームの表面とは、細胞から分泌される脂質小胞の膜表面であって、分泌されたエクソソームが生体内の環境と接する部分をいう。

30

【0016】

エクソソームは、生体内で循環している血液中で検出されるため、エクソソームを分析することで、バイオプシー検査をしなくとも、生体内の異常を検出することができる。

【0017】

[エクソソームの分析]

細胞外小胞体分析チップを用いたエクソソームの分析は、一例として次のようにして行うことができる。まず、検出対象のエクソソームを精製する。次に、エクソソームと特異的結合物質とを接触させる。ここで、特異的結合物質とは、エクソソームの表面に存在する分子に特異的に結合することができる物質を意味し、詳細は後述する。次に、細胞外小胞体分析チップを用いて、エクソソームのゼータ電位を計測し、分析を行う。本分析は、エクソソームに限らず、広く細胞外小胞体一般の分析にも適用できる。

40

【0018】

(特異的結合物質)

特異的結合物質としては、例えば、抗体、改変抗体、アプタマー、リガンド分子等が挙げられる。抗体としては、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM等が挙げられる。IgGとしては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等が挙げられる。IgAとしては、IgA1、IgA2等が挙げられる。IgMとしては、IgM1、IgM2等が挙げられる。改変抗体としては、Fab、F(ab')₂、scFv等が挙げられる。アプタ

50

マーとしては、ペプチドアプタマー、核酸アプタマー等が挙げられる。リガンド分子としては、エクソソームの表面に存在する検出対象分子が、レセプタータンパク質である場合の、当該レセプタータンパク質のリガンド等が挙げられる。例えば、エクソソームの表面に存在する分子がインターロイキンである場合、リガンド分子としてはGタンパク質等が挙げられる。

【0019】

また、特異的結合物質は、標識物質で標識されていてもよい。標識物質としては、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、グルタチオン、蛍光色素、ポリエチレングリコール、メリト酸等の電荷分子等が挙げられる。

10

【0020】

(エクソソームの精製)

本分析の各工程について説明する。まず、エクソソームを含有する試料から該エクソソームを精製する。試料としては、目的に応じて、血液、尿、母乳、気管支肺胞洗浄液、羊水、悪性滲出液、唾液、細胞培養液等が挙げられる。中でも、血液及び尿からは、エクソソームを精製しやすい。

【0021】

エクソソームを精製する方法としては、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、クロマトグラフィー、 μ -TAS (Micro-Total Analysis Systems) デバイスを使用する方法等が挙げられる。

20

【0022】

(エクソソームと特異的結合物質との反応)

次に、エクソソームと特異的結合物質(抗体、アプタマー等)とを接触させる。エクソソームの表面に検出対象の分子が存在した場合、特異的結合物質-エクソソーム複合体が形成される。特異的結合物質を適切に選択することにより、例えば、癌、肥満、糖尿病、神経変性疾患等の疾患に関連する異常を検出することができる。また、例えば人工的に膜表面にあるペプチドやタンパク質を発現させたエクソソームに対し、そのペプチドやタンパク質に対して特異的に結合する特異的結合物質を用いるなど、機能を改変したエクソソームを評価することもできる。

【0023】

(ゼータ電位の計測)

一例として、特異的結合物質として抗体を使用した場合について説明する。エクソソームと抗体とを反応させた後、抗体と反応させたエクソソームのゼータ電位を計測する。ゼータ電位とは、溶液中の微粒子の表面電荷である。例えば、エクソソームが負に帯電しているのに対し、抗体は正に帯電している。このため、抗体-エクソソーム複合体のゼータ電位は、エクソソーム単独のゼータ電位と比較して正にシフトしている。したがって、抗体と反応させたエクソソームのゼータ電位を測定することによって、エクソソームの膜表面における抗原の発現を検出することができる。これは、抗体に限らず、正に帯電した特異的結合物質でも同様である。

30

【0024】

エクソソームのゼータ電位 ζ は、一例として、細胞外小胞体分析チップのマイクロ流路内で、エクソソームの電気泳動を行い、エクソソームの電気泳動速度 S を光学的に測定し、測定されたエクソソームの電気泳動速度 S に基づいて、以下の式(1)に示すスモルコフスキー(Smoluchowski)の式を用いて算出することができる。

40

【0025】

【数 1】

$$U = \left(\frac{\varepsilon}{\eta} \right) \zeta \quad \dots (1)$$

【0026】

式(1)中、Uは測定対象のエクソソームの電気泳動移動度、 ε 及び η は、それぞれ、サンプル溶液の誘電率及び粘性係数である。また、電気泳動移動度Uは、電気泳動速度Sをマイクロ流路内の電界強度で除して算出することができる。

10

【0027】

エクソソームの電気泳動速度Sは、一例として、エクソソームを、細胞外小胞体分析チップのマイクロ流路内で電気泳動し、一例として、レーザー光を、マイクロ流路内を流れるエクソソームに照射して、レイリー散乱光による粒子画像を取得することにより、測定することができる。レーザー光としては、一例として、波長405nm、強度150mWのものが挙げられる。

【0028】

(粒子径の計測)

エクソソームの粒子径dは、一例として、細胞外小胞体分析チップのマイクロ流路内で、エクソソームの電気泳動を行い、エクソソームの電気泳動速度Sを光学的に測定し、測定されたエクソソームの電気泳動速度Sに基づいて、以下の式(2)に示すアインシュタイン・ストークスの式を用いて算出することができる。

20

【0029】

【数 2】

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \dots (2)$$

【0030】

式(2)中、dはエクソソームの粒子径、kはボルツマン定数、Tは絶対温度、 η はサンプル溶液の粘性係数、Dは微粒子の拡散係数である。すなわち、エクソソームの粒子径dは、測定対象のエクソソームのブラウン運動の状態に基づいて、算出することができる。

30

【0031】

[細胞外小胞体分析チップの基本構造]

図3は、実施形態に係る細胞外小胞体分析チップの基本構造を示す斜視図である。図4は、図3におけるI I-I I線断面図である。細胞外小胞体分析チップCHは、第1リザーバ110と、第2リザーバ120と、第1リザーバ110と第2リザーバ120とを接続する泳動流路150と、基材160とを備えている。泳動流路150は、例えば、ミリ流路やマイクロ流路である。泳動流路150は、一例として、幅200 μ m、高さ400 μ m、長さ10mm程度の大きさである。泳動流路150の断面は矩形でなくてもよく、例えば、円、楕円、多角形、又はトンネル形状としてもよい。泳動流路150は、細胞外小胞体、あるいは、細胞外小胞体の表面に存在する生体分子に特異的に結合する特異的結合物質と細胞外小胞体とが相互作用してなる、特異的結合物質-細胞外小胞体複合体(一例として、抗体-エクソソーム複合体)を電気泳動するものである。特異的結合物質の一例として、抗体、アプタマー、またはこれらの組み合わせからなるものが挙げられる。アプタマーは例えば、核酸アプタマー、ペプチドアプタマーなどである。特異的結合物質が認識する分子としては、例えば抗原、膜タンパク質、核酸、糖鎖、糖脂質等が挙げられる。

40

50

【0032】

泳動流路150は、その一方の端部が第1リザーバ110と接続され、その他方の端部が第2リザーバ120と接続されている。また、第1リザーバ110及び第2リザーバ120は、基材160に設けられ、それぞれ電極130及び電極140を有している。例えば、電極130は第1リザーバ110の底部に設けられ、電極140は第2リザーバ120の底部に設けられている。図4に示すように、電極130及び電極140は、それぞれ泳動流路150の端部の近傍に設けられている。また、例えば、第1リザーバ110は検体（例、分析対象のエクソソーム）が導入され、第2リザーバ120は緩衝液が導入される。なお、その緩衝液は第1リザーバ110に導入されてもよい。

【0033】

本細胞外小胞体分析チップCHは、細胞外小胞体のゼータ電位を計測するのに好適である。以下に、検体又は細胞外小胞体としてエクソソームを分析する場合を例として、本細胞外小胞体分析チップを用いた、エクソソームのゼータ電位の測定方法について説明する。

【0034】

まず、分析対象のエクソソームを含む試料液が、第1リザーバ110に導入される。分析対象のエクソソームは、特異的結合物質と反応させたものであってもよい。エクソソームは例えば培養上清や血清から抽出したものであり、試料液は、例えば、リン酸緩衝液（Phosphate Buffered Saline、PBS）等の緩衝液にエクソソームが懸濁されたエクソソーム懸濁液である。次に、エクソソームを含む試料液が泳動流路150に導入される。一例として、シリンジを第2リザーバ120に接続して試料液を吸引することにより、エクソソームを泳動流路150に導入することができる。次に、緩衝液を、第1リザーバ110及び第2リザーバ120に入れる。後述する液位調整手段により、第1リザーバ110と第2リザーバ120との液位（液面高）を調整して揃え、泳動流路150に生じる静水圧流の発生を防ぎ、ゼータ電位測定の精度を向上させることが可能となる。続いて、制御部（例、後述の制御装置5、又はコンピュータなど）によって電極130及び140の間に電圧を印加し、エクソソームを電気泳動する。一例として、制御部は約50V/cmの電界強度の電圧を約10秒間印加する。

【0035】

電気泳動中に、泳動流路150にレーザー光を照射し、泳動流路150からの出射光であるエクソソームを介した散乱光を、対物レンズ等を用いて集光し、受光センサ（例、高感度カメラ）を用いて、エクソソーム又は特異的結合物質－エクソソーム複合体を撮影する。対物レンズの倍率は、一例として60倍程度である。レーザーの波長及び強度は、一例として、波長405nm、強度150mWである。

【0036】

本実施形態における細胞外小胞体分析チップを用いることにより、特異的結合物質－エクソソーム複合体のゼータ電位の平均値だけでなく、特異的結合物質－エクソソーム複合体のゼータ電位を1粒子レベルで計測することができる。そのため、ゼータ電位の平均値からは、特異的結合物質が認識する分子（例えば、抗原等）を有するエクソソームが試料中に存在しないように思われる場合であっても、マイナーポピュレーションとして存在する、該抗原を有するエクソソームを検出することができる。

【0037】

〔流体デバイスCの構造〕

図5は、実施形態に係るステージ部STの設置面STaに流体デバイスCが設置された平面図である。図6は、実施形態に係る流体デバイスCをxz平面で部分的に断面した部分断面図である。図7は、図6におけるA－A線断面図である。

【0038】

図5に示すように、流体デバイスCは、平面視矩形状に形成されている。図6に示すように、流体デバイスCは、z方向に順次積み重ねられたリザーバ部材（第1基材）10および底板（第2基材）11を備えている。例えば、本実施形態における流体デバイスCは

10

20

30

40

50

、少なくともリザーバ部材 10、底板 11 で構成された、積層構造（積層体）である。
この場合、流体デバイス C の積層構造は二層構造となっている。また、例えば、このような流体デバイス C の積層構造は、リザーバ部材 10 と、底板 11 とを互いに貼りあわせて形成される。

【0039】

リザーバ部材 10 は、外力などによって少なくとも一方向に弾性変形可能な材料で形成してもよい。リザーバ部材 10 の材料には、一例として、エラストマーであり、シリコンゴム、PDMS（ポリジメチルシロキサン）などが挙げられる。底板 11 は、照明光 L1 の照射によって発生した散乱光 L2 が透過する材料で形成されている。底板 11 は、一例として、ガラス材で形成されている。

10

【0040】

流体デバイス C は、長さ方向（x 方向）に配列された複数（図 5 では 3 つ）のレーン 2 を備えている。各レーン 2 は、第 1 リザーバ 12 A、第 2 リザーバ 12 B、流路 13 および電極 18 A、18 B を備えている。第 1 リザーバ 12 A 及び第 2 リザーバ 12 B は、x 方向に間隔をあけて配置されている。例えば、第 1 リザーバ 12 A 及び第 2 リザーバ 12 B は、流路 13 の流路方向に間隔をあけて配置されている。このように、複数のレーンが流路方向に（直列に）配列されていることによって、側方からの光の照射が容易となる。複数のレーンをレーンごとに順番に分析してもよく、また、複数の検出系によって同時に分析してもよい。なお、複数のレーン 2 は高さ方向（z 方向）に配列されていてもよい。この場合、溶液は長さ方向（x 方向）から注入されてもよく、y 方向から注入されてもよい。照射光源は例えば複数あって、それぞれの光源が対応する高さのレーン 2 を流れる微粒子を照射する。また、少なくとも一つの照射光源から照射方向を変えることでレーン 2 を流れる微粒子を照射してもよい。

20

【0041】

ここで、レーン 2 が複数ある場合には、対物レンズの移動により照明光の形状を調整することにより、各レーン 2 に照射される照明光を調整してもよい。また、レーン 2 が複数ある場合には、流体デバイス C が載置されるステージの移動によって、複数レーン 2 のうち測定対象のレーン 2 を選択（切換え）する構成であってもよい。

【0042】

第 1 リザーバ 12 A は、x y 平面と平行な面での断面が円形状で z 方向に延在する保持空間 14 A と、保持空間 14 A の +z 側端部から +z 方向に向かうに従って漸次拡径する漏斗状の導入部 15 A とを備えている。保持空間 14 A は、-z 側の端部が底板 11 と対向して開口する。保持空間 14 A は、流路 13 と接続される。

30

【0043】

第 2 リザーバ 12 B は、x y 平面と平行な面での断面が円形状で z 方向に延在する保持空間 14 B と、保持空間 14 B の +z 側端部から +z 方向に向かうに従って漸次拡径する漏斗状の導入部 15 B とを備えている。保持空間 14 B は、-z 側の端部が底板 11 と対向して開口する。保持空間 14 B は、流路 13 と接続される。

【0044】

流路 13 は、電気泳動用流路（電気泳動のための流路）である。流路 13 は、流体デバイス C の長さ方向である y 方向に延在する。流路 13 は、底板 11 と対向する側の面に保持空間 14 A と保持空間 14 B とを接続するように設けられている。流路 13 は、図 7 に示すように、リザーバ部材 10 に形成された溝部 10 A と、底板 11 の表面（第 2 面）11 a とで囲まれた断面矩形に形成されている。溝部 10 A は、x 方向に対向する側面（第 1 面）16 a、16 b と、底板 11 の表面 11 a と z 方向に対向する底面（第 2 面）16 c に囲まれて形成される。側面 16 a、16 b、底面 16 c および溝部 10 A を構成する表面 11 a は鏡面加工されている。第 1 面は、第 1 側面である側面 16 a と第 2 側面である側面 16 b とを含む。側面 16 a と側面 16 b とは、互いに向かい合っており、第 1 方向である x 方向に互いに離間している。

40

【0045】

50

レーン 2 は、流体デバイス C の幅方向である照明光 L 1 の光軸方向（入射方向）について、中心よりも +x 側の端面 1 7 に近い側に偏って配置されている。レーン 2 は、入射する照明光 L 1 の光軸方向である流体デバイス C の幅方向（図 5 における x 方向）について、中心よりも照明光 L 1 の入射側の端面 1 7 に近い側に偏って配置されている。端面 1 7 は、y 方向に関して少なくともレーン 2 が設けられる範囲が鏡面加工されている。流路 1 3 は、一例として、幅 200 μm 、高さ（溝部 10 A の深さ）400 μm 、長さ 10 mm 程度の大きさに形成されている。

【0046】

底板 11 の表面 11 a には、保持空間 14 A に臨んで電極 18 A が設けられている。底板 11 の表面 11 a には、保持空間 14 B に臨んで電極 18 B が設けられている。電極 18 A 及び電極 18 B の素材としては、金、白金、カーボン等が挙げられる。図 7 に示すように、底板 11 における照明光 L 1 の入射側に位置する端面（第 2 端面）19 は、x 方向について、リザーバ部材 10 の端面 1 7 の位置よりも、照明光 L 1 の入射側とは逆側である -x 側に離間している。

【0047】

図 1 に戻り、光源部 L S は、粒子に対して悪影響を及ぼさない波長として、上述したように、一例として、波長 405 nm、強度 150 mW でビーム径（ピーク値に対して $1/e^2$ となる径）0.8 mm で z 方向を偏向方位とするレーザー光を照明光 L 1 として発光する。なお、照明光 L 1 は、偏光（例えば、直線偏光など）であっても、無偏光であってもよいが、本実施形態では、垂直偏光を用い、レイリー散乱の指向性が無い構成を採る。

照明光 L 1 は、上述した直交面と交差する方向に延びる光軸に沿って流体デバイス C に照射される。本実施形態では、照明光 L 1 の光軸は、x 方向と平行である。本実施形態の照明光 L 1 は、x 方向に延びる光軸に沿って流体デバイス C に照射される。

【0048】

図 8 は、実施形態に係る照射部 20 及び調整部 C L の概略構成を示す図である。照射部 20 は、照明光 L 1 の光軸に沿って順次配置された $\lambda/2$ 板 21 およびエキスパンダレンズ 22 を備えている。なお、図 1 に示される光源部 L S および照射部 20 は、照明光 L 1 の光軸が y 方向に延びているが、最終的に流体デバイス C（流路 13）を照射する照明光 L 1 は x 方向に沿った光軸であるため、図 8 に示す照明光 L 1 は、光軸が x 方向に沿うものとして図示している。

【0049】

光源部 L S が発光した照明光 L 1 は、 $\lambda/2$ 板 21 を透過することで偏光方位が y 方向に回転する。なお、光源部 L S が y 方向を偏向方位とする照明光 L 1 を発光する場合には $\lambda/2$ 板 21 は不要である。エキスパンダレンズ 22 は、対向するシリンドリカルレンズ 22 A、22 B を備える。シリンドリカルレンズ 22 A、22 B は、y 方向についてはパワーを有していないため、照明光 L 1 は y 方向の幅が一定である。照明光 L 1 の z 方向の幅は、シリンドリカルレンズ 22 A、22 B の光軸方向の距離に応じて拡大または縮小する。本実施形態では、エキスパンダレンズ 22 は、照明光 L 1 の z 方向の幅を、一例として、2 倍に拡大する。

【0050】

調整部 C L は、エキスパンダレンズ 22 で z 方向の幅が拡大されて入射した照明光 L 1 を調整する。調整部 C L は、光源部 L S と対物レンズ 31 との間の光路に配置されている。また、調整部 C L は、 $\lambda/2$ 板 21 又はエキスパンダレンズ 22 と対物レンズ 31 との間の光路に配置されている。調整部 C L は駆動機構を備えていてもよく、調整部 C L が移動することで収光点を調整できてもよい。調整部 C L は例えば x 方向に駆動可能である。この場合、流路 13 の位置が異なるチップを用いた場合であっても、流路 13 内に収光点が位置するように調整することが可能である。また、収光点と流路 13 の中心とがほぼ一致するように調整してもよく、検出部の中心部と収光点とがほぼ一致するように調整してもよい。

図 9 は、実施形態に係る調整部 C L および流体デバイス C の部分詳細図である。調整部

10

20

30

40

50

CLは、一例として、シリンドリカルレンズで構成される。調整部CLは、照明光L1のz方向の幅が流路13の内部において最小となり、且つ、流路13の照射光入射側の側面16aの位置における照明光L1の通過領域が側面16a内に限定されるように収束する収束角度に調整している。調整部CLは、照明光L1のz方向の幅が流路13の内部において最小となり、且つ、流路13の照射光入射側の側面16aの位置における照明光L1の照射領域が側面16a内に集光するような収束角度に照明光L1を調整している。また、調整部CLは、流路13の照射光射出側の側面16bの位置における照明光L1（照射光束）の通過領域が側面16b内に限定されるように収束する収束角度に調整している。調整部CLは、流路13の照射光射出側の側面16bの位置における照明光L1（照射光束）の照射領域が側面16b内に集光するような収束角度に照明光L1を調整している。また、調整部CLは、リザーバ部材10の端面17の位置における照明光L1の照射領域が端面17内に収束する収束角度に調整している。さらに、調整部CLは、照明光L1が流路13内の検出領域において収束点が存在するような収束角に調整している。例えば、流路13の検出領域において検出部30の焦点深度外の照明光L1の照明光束は焦点深度内の照明光束よりも少なくなるような収束角を有する。なお、例えば、上述の直交面は、リザーバ部材10の端面17、流路13の照射光入射側の側面16a、又は流路13の照射光射出側の側面16bを含む。

10

【0051】

ここで、照明光L1が光軸方向（x方向）について、流路13の中央（ $x=0$ とする）でz方向の幅が最小幅 ω_0 となる場合、照明光L1の流路13内の媒質での収束角を θ 、照明光L1の波長を λ 、位置xおよび収束角 θ でのz方向のビーム幅を $\omega(x, \theta)$ 、照明光L1のビームプロファイルファクタをM2、最小幅 ω_0 となるx方向の位置から側面16aまでの距離を x_L とすると、下記の式（3）、式（4）において、式（5）を満足する必要がある。

20

【0052】

【数3】

$$\omega(x, \theta) = \omega_0 \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda x M^2}{\pi \omega_0^2} \right)^2} \quad \dots(3)$$

30

【0053】

【数4】

$$\omega_0 = \frac{\lambda M^2}{\pi \theta} \quad \dots(4)$$

40

【0054】

【数5】

$$\frac{d\omega(x_L, \theta)}{d\theta} = 0 \quad \dots(5)$$

【0055】

従って、調整部CLは、少なくとも式（3）～（5）を満足し、且つ $x = x_L$ のときのビーム幅 $\omega(x_L, \theta)$ が側面16aのz方向の長さよりも小さく、側面16a内に収束

50

する収束角 θ で照明光 L 1 を収束させるように調整された光学特性を有するものが設置される。

【0056】

なお、照明光 L 1 がガウシアン光である場合には、上記の式 (3) ~ (5) に含まれるビーム幅 $\omega(x, \theta)$ は、照明光 L 1 の強度がピーク値に対して $1/e^2$ となる幅で規定される。収束角 θ が式 (1) ~ (3) を満足する場合でも、ピーク値に対して $1/e^2$ 以下となる強度の照明光 L 1 がビーム幅 $\omega(x_L, \theta)$ の外側で側面 16a の位置に入射するため、収束角 θ を設定する際はピーク値に対して $1/e^2$ 以下となる強度の照明光 L 1 のビーム幅も考慮する。

【0057】

また、検出部 30 によって照明光 L 1 の光軸方向 (x 方向) について、流路 13 の全域を検出領域とするには、流路 13 の全体に亘って照明光 L 1 の光束内に検出部 30 の焦点深度 DOF が入る必要がある。照明光 L 1 の光束内に検出部 30 の焦点深度 DOF が入る照明光 L 1 の光束内に検出部 30 の焦点深度 DOF が入るためには、リザーバ部材 10 の端面 17 および流路 13 の側面 16a の光軸に対する傾きも考慮する必要がある。図 10 は、実施形態に係る照明光 L 1 がリザーバ部材 10 の端面 17 および流路 13 の側面 16a を通過する光路を模式的に示す図である。流路 13 の幅全体に亘って照明光 L 1 の光束内に検出部 30 の焦点深度 DOF (図 9 参照) が入るためには、下記の式 (6) を満足する必要がある。

【0058】

【数 6】

$$|\delta_3| \leq \left| \frac{\omega(x_L, \theta) - DOF/2}{x_L} \right| \quad \dots(6)$$

【0059】

ここで、角度 δ_3 は、焦点面 F から見た照明光軸の仰角であり、焦点面 F から反時計回り方向を正方向とする。一方で、界面での入射角・出射角、リザーバ部材 10 の端面 17 及び流路 13 の側面 16a の yz 平面に対する傾斜角、空气中・流路デバイス C の材質中・流路中の照明光束の焦点面 F に対する仰角、および流路デバイス C の外側の媒質・流路デバイス C の材質・流路 13 内の媒質の屈折率には以下の関係が成立している。

【0060】

$$n_1 \sin \alpha_1 = n_2 \sin \alpha_2$$

$$n_2 \sin \alpha_3 = n_3 \sin \alpha_4$$

$$\alpha_1 + \beta_1 = \delta_1$$

$$\alpha_2 + \beta_1 = \delta_2$$

$$\alpha_3 + \beta_2 = \delta_2$$

$$\alpha_4 + \beta_2 = \delta_3$$

【0061】

ここで、

α_1 : 自由空間からリザーバ部材 10 の端面 17 への照明光 L 1 の入射角

α_2 : 端面 17 からリザーバ部材 10 内の照明光 L 1 の出射角

α_3 : リザーバ部材 10 内から流路 13 の壁面 16a への照明光 L 1 の入射角

α_4 : 壁面 16a から流路 13 内部への照明光 L 1 の出射角

β_1 : 端面 17 の傾斜角

β_2 : 壁面 16a の傾斜角

δ_1 : 自由空間においての照明光 L 1 の焦点面 F からの仰角

δ_2 : リザーバ部材 10 内においての照明光 L 1 の焦点面 F からの仰角

δ_3 : 流路 13 内における照明光 L1 の焦点面 F からの仰角

n_1 : 自由空間媒質の屈折率

n_2 : リザーバ部材 10 材質の屈折率

n_3 : 流路 13 内の媒質の屈折率

であり、

入射角・出射角：端面 17 および壁面 16 a への垂線からの角度

傾斜角：焦点面 F の垂線からの角度

仰角：焦点面 F からの角度

としている。また、符号は全て反時計回り方向を正とする。

【0062】

上記の式から流路 13 における照明光 L1 の仰角 δ_3 は、以下の式 (7) で表される。

【0063】

【数 7】

$$\delta_3 = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_3} \sin \left(\left(\sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \sin(\delta_1 - \beta_1) \right) \right) + \beta_1 - \beta_2 \right) \right) + \beta_2 \quad \dots(7)$$

【0064】

従って、流路 13 の x 方向の幅全体に亘って、照明光 L1 の光束内に検出部 30 の焦点深度 DOF が入るためには、以下の式 (8) を満足する必要がある。

【0065】

【数 8】

$$\left| \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_3} \sin \left(\left(\sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \sin(\delta_1 - \beta_1) \right) \right) + \beta_1 - \beta_2 \right) \right) + \beta_2 \right| \leq \left| \frac{\omega(x_L, \theta) - DOF/2}{x_L} \right| \quad \dots(8)$$

【0066】

従って、リザーバ部材 10 の端面 17 および流路 13 の壁面 16 a の傾斜角、照明光 L1 の仰角 δ_3 は、自由空間媒質の屈折率 n_1 、リザーバ部材 10 の材質の屈折率 n_2 および流路 13 内の媒質の屈折率 n_3 に応じて、式 (8) を満足するように、選択・製造・調整されている必要がある。

【0067】

ステージ部 ST は、図 2 に示すステージ駆動部 60 の駆動によって、x 方向、y 方向および z 方向に移動する。ステージ駆動部 60 の駆動は、制御装置 5 によって制御される。図 5 に示すように、ステージ部 ST は、流体デバイス C が設置される設置面 STa を備える。設置面 STa は、xy 平面と平行の面である。設置面 STa は、y 方向に間隔をあけて配置されている。設置面 STa は、流路デバイス C のレーン 2 が設けられていない y 方向の両端部を -Z 側から支持する。流体デバイス C は、レーン 2 が配される領域が検出部 30 による -Z 側からの観察に支障を来すことなく設置面 STa に支持される。また、流体デバイス C におけるレーン 2 に照射されるまでの照明光 L1 の光路にステージ部 ST が存在しないため、流体デバイス C に入射する照明光 L1 の一部がステージ部 ST に入射して、後述する粒子検出に悪影響を及ぼすことを抑制できる。

10

20

30

40

50

【0068】

設置面STaには、固定ピン51が突出して設けられている。固定ピン51は、流体デバイスCの長辺に当接する二つの固定ピン51aと、流体デバイスCの短辺に当接する一つの固定ピン51bとから構成される。固定ピン51aは流体デバイスCのy方向の両側の近傍にそれぞれ配置される。固定ピン51bは、+y側に位置する短辺に当接する。当該+y側に位置する固定ピン51aと固定ピン51bとが配置された角部と対角に位置する角部には、押し付けコマ52が設けられている。押し付けコマ52は、ステージ部STに対して流体デバイスCを対角方向に押し付ける。押し付けられた流体デバイスCは、固定ピン51a、51bに当接することで、流路13（レーン2）がy方向と平行になるように、xy方向に関してステージ部STに位置決めされた状態で固定される。

10

【0069】

検出部30は、対物レンズ31、撮像部32を備えている。対物レンズ31は、ステージ部STおよび流体デバイスCの-Z側に配置されている。図9に示すように、対物レンズ31は、検出軸31aがx方向について流路13の中心を通る位置に配置される。検出軸31aは、照明光L1の光軸と直交する。撮像部32は、一例として、EMCCD（Electron Multiplying Charge Coupled Device）カメラを備えており、入射する光の画像を撮像する。撮像部32は、対物レンズ31を介して入射する側方散乱光の画像情報を取得する。

送信部40は、撮像部32で撮像された画像情報を制御装置5へ送信する。

20

【0070】

[粒子検出装置の動作]

粒子検出装置100の動作は、設置工程、導入工程、照射工程、検出工程を含む。

設置工程は、流体デバイスCをステージ部STの設置面STaに設置する工程である。

具体的には、図5に示したように、押し付けコマ52により流体デバイスCを対角方向に押し付けることにより、流体デバイスCは、固定ピン51a、51bに押し付けられ、流路13（レーン2）がy方向と平行になるように、ステージ部STに位置決めされた状態で設置面STaに設置される。

【0071】

導入工程は、粒子を含む試料を流体デバイスCの保持空間14A、14Bおよび流路13に導入する工程である。試料としては、一例として、リン酸緩衝液等の緩衝液（媒質）にエクソソームが懸濁されたエクソソーム懸濁液を用いることができる。

30

試料が流路13に導入されたら、制御装置5はステージ駆動部60を駆動して、検出対象となるレーン2が照明光L1の光路および検出部30の検出軸31a上に位置させる。検出対象となるレーン2が検出位置に移動すると、制御装置5は、電源部BTを制御して電極18A及び電極18Bに電界を印加させ、エクソソームを流路13に沿って電気泳動させる力を付与する。一例として、制御装置5は、約50V/cmの電界強度の電圧を約10秒間印加する。エクソソームの移動方向は、y方向と平行である。

【0072】

照射工程は、照明光L1をx方向と平行に流路デバイスCの流路13に照射する工程である。

40

照明光L1を照射する照射部20および調整部CLは、y方向の幅が一定で、上述した式（3）～式（8）を満足する収束角 θ でz方向に収束するシートビーム状の照明光L1を照射する。照明光L1の最小ビーム厚（z方向のビーム幅）は、一例として、10 μ mである。照明光L1の最小ビーム厚（z方向のビーム幅）方向は、図7および図9のz方向またはz方向と平行な方向である。照明光L1の最小ビーム厚（z方向のビーム幅）方向は、入射面（端面17および側面16a）における照明光L1の光軸方向及び流路方向とは異なる方向であり、該光軸方向及び流路方向と直交する方向である。流路方向は、流路13が延在する方向である。流路方向は、流路13を流体が流れる方向である。

照射された照明光L1は、流体デバイスCの一方の端面（照明光入射側端面）17、流路13の側面（照明光入射側側面）16a、流路13の内部、流路13の側面（照明光射

50

出側側面) 16b、流体デバイスCの他方の端面(照明光射出側端面) 27(図5参照)を順次通過する。照明光L1は、エクソソームの移動方向と直交する方向に照射される。照射された照明光L1は、図9に示すように、流路13の内部においてz方向の幅が最小となるように収束し、且つ、流路13の側面16aの位置における照射光束の通過領域が側面16a内に限定されるように収束する。さらに、照射された照明光L1は、流路13の照明光射出側の側面16bの位置における照射光束の通過領域が側面16a内に限定されるように収束する。照明光L1は、側面16aの位置における照射領域が側面16a内に集光し、側面16bの位置における照射領域が側面16b内に集光するような収束角に調整されている。また、照射された照明光L1は、流路13における検出部30の検出領域において収束点が存在する。

10

【0073】

検出工程は、照明光L1のx方向と平行な照射によって流路13内部の粒子から生じる散乱光を検出部30によって観察(イメージング)し検出する。検出部30における対物レンズ31の検出軸31aが照明光L1の光軸と直交しているため、検出部30は粒子から生じる側方散乱光を検出する。検出部30は、x方向と平行に照射された照明光L1の照射によって、x方向と垂直なz方向に向かって散乱した光を検出する。散乱光が観察された粒子の像は撮像部32で撮像される。送信部40は、撮像部32で撮像された画像情報を制御装置5へ送信する。

【0074】

[制御装置の構成]

20

制御装置5は、粒子検出システム1を統括的に制御する。制御装置5は、ステージ駆動部60を介してステージ部STおよび流体デバイスCの移動を制御する。制御装置5は、電源部(印加部)BTを制御して、電極18A、18Bに流路13に沿った方向の電界を印加させる。また、制御装置5は、粒子検出装置100が撮像した画像を処理することにより、種々の判定を行う。この制御装置5の構成の詳細について、図11から図16を参照して説明する。

【0075】

図11は、本実施形態の制御装置5の概略構成を示す図である。制御装置5は、演算部500と、記憶部520とを備えている。この記憶部520は、フラッシュメモリ、HDD(Hard Disk Drive)、RAM(Random Access Memory)、ROM(Read Only Memory)、レジスタなどの記憶装置を備えている。記憶部520には、演算部500が実行するプログラム(ファームウェア)が予め格納される。また、記憶部520には、演算部500が演算処理を行った演算結果が格納される。

30

【0076】

演算部500は、CPU(Central Processing Unit)を備えており、各種の演算を行う。この演算部500は、その機能部として、取得部501と、識別部502と、ゼータ電位判定部503と、粒子径判定部504と、相関部505と、状態判定部506と、評価部507とを備えている。

【0077】

40

取得部501は、粒子検出装置100が撮像した画像を取得する。具体的には、上述したように、粒子検出装置100の撮像部32は、対物レンズ31を介して入射する側方散乱光の画像を撮像して、撮像した画像の画像情報を、送信部40に出力する。取得部501は、撮像部32が撮像した側方散乱光の画像の画像情報を、送信部40を介して取得する。取得部501は、取得した画像を識別部502に出力する。

【0078】

識別部502は、粒子検出装置100が撮像した画像のなかから、微粒子の画像を抽出する。例えば、識別部502は、取得部501から供給される画像に対して既知のフィルタ処理やパターンマッチング処理を施すことにより、微粒子の画像を抽出する。このとき、識別部502は、抽出した微粒子の画像に対して、微粒子ごとに粒子番号を付与しても

50

よい。なお、識別対象の微粒子が細胞外小胞体である場合には、この粒子番号とは、細胞外小胞体識別子であってもよい。つまり、識別部502は、微粒子の粒子に対してラベリングを行ってもよい。このことによって後述する関連部において、微粒子のゼータ電位 ζ と微粒子の粒子径 d との関連付けが容易となる。このラベリングの際には、取得部が取得した複数の画像のうち、第1の時刻において撮像された画像に含まれる第1の微粒子の画像と、第1の時刻とは異なる第2の時刻において撮像された画像に含まれる第2の微粒子の画像とが、同一の微粒子を示す画像であるか否かを、媒質中のブラウン運動による微粒子の移動量に基づいて判定してもよい。また、識別部502は、ラベリングした微粒子の粒子について、粒子検出装置100が撮像した画像のフレーム間の差分に基づいて、トラッキングを行う。ここで、トラッキングとは、画像内の粒子の座標の経時的变化を追跡することをいう。識別部502が、微粒子のトラッキングを行った結果の一例を図12に示す。

10

【0079】

図12は、本実施形態の記憶部520が記憶する粒子リストLS1の一例を示す図である。この粒子リストLS1には、行方向をラベリングされた粒子番号とし、列方向を撮像時刻として、各時刻における各微粒子の画像の座標(X、Y)が記憶される。この一例においては、時刻 t_0 から、時刻 t_{50} までの各時刻における、微粒子P1から微粒子Pnまでの、各微粒子の座標が粒子リストLS1に記憶される。

【0080】

図11に戻り、ゼータ電位判定部503は、識別部502がトラッキングした結果に基づいて、微粒子毎のゼータ電位 ζ を判定する。例えば、ゼータ電位判定部503は、識別部502が行った微粒子P1についてのトラッキング結果のうち、時刻 t_0 から、時刻 t_1 までの微粒子P1の移動速度 v_1 に基づいて、微粒子P1のゼータ電位 ζ_1 を判定する。

20

ゼータ電位判定部503は、上述の式(1)に基づいてゼータ電位 ζ を判定する。なお、この一例では、サンプル溶液の誘電率 ϵ 及びサンプル溶液の粘性係数 η は、予め記憶部520に記憶されている。ゼータ電位判定部503は、記憶部520に記憶されているサンプル溶液の誘電率 ϵ 及びサンプル溶液の粘性係数 η と、識別部502によるトラッキング結果から求めた微粒子の移動速度とに基づいて、微粒子のゼータ電位 ζ を判定する。

【0081】

30

粒子径判定部504は、サンプル溶液中のブラウン運動による微粒子の移動量と、上述の式(2)とに基づいて、微粒子の径を判定する。ここでは、粒子径判定部504が、微粒子P1の粒子径を判定する場合の具体例について説明する。なお、この一例においては、ボルツマン定数 k 及びサンプル溶液の絶対温度 T は、予め記憶部520に記憶されている。粒子径判定部504は、識別部502がトラッキングした結果に基づいて、微粒子P1の移動量を算出する。また、粒子径判定部504は、算出した微粒子P1の移動量と、記憶部520に記憶されているボルツマン定数 k 及び絶対温度 T と、上述の式(2)とに基づいて、微粒子P1の粒子径 d_1 を判定する。

【0082】

関連部505は、ゼータ電位判定部503が判定した微粒子のゼータ電位 ζ と、粒子径判定部504が判定した微粒子の粒子径 d とを関連付ける。具体的には、ゼータ電位判定部503において第1の微粒子に対して判定した第1のゼータ電位 ζ_1 と、粒子径判定部504において第1の微粒子に対して判定した第1の粒子径 d_1 とを、関連部505において第1の微粒子に関するデータとして相互に結び付ける。この関連部505が関連付けた結果である粒子相関リストLS2の一例を、図13に示す。

40

【0083】

図13は、本実施形態の記憶部520が記憶する粒子相関リストLS2の一例を示す図である。この粒子相関リストLS2において、識別部502によって付与された粒子番号毎に、粒子径 d と、ゼータ電位 ζ とが関連付けられている。関連部505は、微粒子P1について、微粒子P1の粒子径 d_1 と、微粒子P1のゼータ電位 ζ_1 とを関連付けて、粒

50

子相関情報PC1 (d1、 ζ 1)として、粒子相関リストLS2に記憶させる。また、相関部505は、微粒子P2について、微粒子P2の粒子径d2と、微粒子P2のゼータ電位 ζ 2とを関連付けて、粒子相関情報PC2 (d2、 ζ 2)として、粒子相関リストLS2に記憶させる。

このように、本実施形態によれば、媒質中に存在する微粒子の状態の相関を判定することができる。

【0084】

状態判定部506は、相関部505が生成した粒子相関リストLS2に基づいて、微粒子の状態を判定する。記憶部520には、粒子径dの基準範囲と、ゼータ電位 ζ の基準範囲とをそれぞれ示す基準範囲情報が記憶されている。ここでは、状態判定部506による

10

状態判定の一例として、エクソソーム以外の粒子が含まれる試料において、識別部502が識別した微粒子を、エクソソームであるか否かを判定する場合について説明する。エクソソームの特徴として、粒径が直径30～200nm程度の微粒子であること、そしてまた、構成因子としてシャペロン分子であるHsc70、Hsc90やテトラスパン

ン(CD9、CD63、CD81)が特異的に存在していることが挙げられる。この場合、記憶部520には、粒子径のしきい値Thdが、基準範囲情報として記憶されている。また、記憶部520には、ゼータ電位のしきい値Th ζ が、基準範囲情報として記憶されている。これらの場合、記憶部520を基準記憶部と言い換えてもよい。このしきい値Thd、及びしきい値Th ζ の一例を図14に示す。

【0085】

20

図14は、本実施形態の記憶部520が記憶するしきい値の一例を示す図である。ここで、一例として、エクソソームの粒子径が、直径30～100nm程度であり、判定対象の微粒子のうち、エクソソーム以外の微粒子の粒子径が、直径100nmを超える場合について説明する。また、ここでは、一例として、エクソソームのゼータ電位 ζ が、しきい値Th ζ 以下であり、エクソソーム以外の微粒子のゼータ電位 ζ が、しきい値Th ζ を超える場合について説明する。この一例の場合には、状態判定部506は、微粒子の粒子径、及び微粒子のゼータ電位 ζ に基づいて、微粒子の判定を行うことができる。なお、状態判定部506が行う微粒子の判定を、微粒子の特定と言い換えてもよい。

具体的には、この一例の場合、記憶部520には、粒子径のしきい値Thdとして、100nmが記憶されている。また、記憶部520には、ゼータ電位のしきい値Th ζ として、-6mVが記憶されている。状態判定部506は、粒子相関リストLS2に記憶されている粒子相関情報PCのうち、粒子径dが、しきい値Thd以下である微粒子であり、かつ、ゼータ電位 ζ がしきい値Th ζ 以下である微粒子を、エクソソームであると判定する。一方、状態判定部506は、粒子相関リストLS2に記憶されている粒子相関情報PCのうち、粒子径dが、しきい値Thdを超える微粒子や、ゼータ電位 ζ が、しきい値Th ζ を超える微粒子を、エクソソームでないと判定する。

30

【0086】

また、一例として、エクソソームの粒子径が、直径30～100nm程度であり、判定対象の微粒子のうち、エクソソーム以外の微粒子の粒子径が、直径200nmを超える場合がある。この場合には、一例として、粒子径dのしきい値Thdを150nmにすることにより、状態判定部506は、粒子径のみに基づいて微粒子の状態を判定することができる。

40

【0087】

また、直径100～200nmの範囲には、エクソソーム以外の微粒子が含まれる場合がある。この場合には、粒子径のしきい値Thd(200nm)は、微粒子がエクソソームであるか否かを判定するための一要素として、利用することができる。

また、直径が200nmよりも大きい範囲には、単一のエクソソームが含まれていない場合がある。この場合には、粒子径のしきい値Thd(200nm)は、微粒子が単一のエクソソームであるか否かを判定するための一要素として、利用することができる。

また、直径が200nmよりも大きい範囲には、単一のエクソソームが複数個凝集した

50

微粒子が含まれている場合がある。この場合には、粒子径のしきい値 $T h d$ (200 nm) は、微粒子が単一のエクソソームであるか、凝集したエクソソームであるかを判定するための一要素として、利用することができる。

このように、基準記憶部において記憶される基準値となるしきい値を、微粒子の状態の判定のための要因として用いることができる。

【0088】

また、状態判定部 506 は、識別部 502 が識別した微粒子がエクソソームである場合に、このエクソソームが、抗体と反応しているか否かを判定する。この一例の場合、記憶部 520 には、ゼータ電位のしきい値 $T h \zeta$ が、基準範囲情報として記憶されている。上述したように、抗体-エクソソーム複合体のゼータ電位は、エクソソーム単独のゼータ電位と比較して正にシフトしている。この場合、記憶部 520 には、エクソソーム単独のゼータ電位と、抗体-エクソソーム複合体のゼータ電位との間のゼータ電位（例えば、 -6 mV ）が、ゼータ電位のしきい値 $T h \zeta$ として記憶されている。状態判定部 506 は、粒子相関リスト $L S 2$ に記憶されている粒子相関情報 $P C$ のうち、微粒子のゼータ電位が、しきい値 $T h \zeta$ 未満である微粒子を、抗体と反応していない単独のエクソソームであると判定する。一方、状態判定部 506 は、粒子相関リスト $L S 2$ に記憶されている粒子相関情報 $P C$ のうち、微粒子のゼータ電位が、しきい値 $T h \zeta$ 以上である微粒子を、抗体-エクソソーム複合体であると判定する。

【0089】

また、ゼータ電位のしきい値 $T h \zeta$ （例えば -6 mV ）の付近には、単体のエクソソーム及び、抗体-エクソソーム複合体以外の微粒子が存在している場合がある。この場合には、ゼータ電位のしきい値 $T h \zeta$ (-6 mV) は、微粒子が単体のエクソソームであるか否かを判定するための一要素として、利用することができる。

【0090】

また、状態判定部 506 は、粒子径 d のしきい値とゼータ電位 ζ のしきい値とを組み合わせ、微粒子の状態を判定することもできる。具体的には、抗体-エクソソーム複合体は、単独のエクソソームと比較して、ゼータ電位が低い。このため、微粒子間に働くクーロン力は、抗体-エクソソーム複合体の方が、単独のエクソソームと比較して、弱い。この微粒子間に働くクーロン力は、微粒子間の間隔を遠ざける斥力として作用する。つまり、抗体-エクソソーム複合体の方が、単独のエクソソームと比較して、微粒子間に働く斥力が弱い。このため、抗体-エクソソーム複合体の方が、単独のエクソソームと比較して、凝集しやすい傾向がある。ここで、微粒子どうしが凝集すると、凝集した複数の微粒子が1つの微粒子として振る舞うため、ブラウン運動の運動量に変化が生じる。したがって、粒子径判定部 504 は、凝集した複数の微粒子を1つの微粒子として判定することにより、凝集していない場合に比べて、粒子径 d が大きくなる方向にシフトする。

ここで、粒子径 d が 200 nm 以下の微粒子をエクソソームであると判定する場合を一例にして説明する。粒子径判定部 504 は、抗体-エクソソーム複合体を直径が 200 nm を超える微粒子であると判定することがある。このため、状態判定部 506 が粒子径 d のみによって判定した場合には、抗体-エクソソーム複合体の粒子径 d が、エクソソームであるか否かの粒子径 d のしきい値 $T h d$ を超えるため、抗体-エクソソーム複合体がエクソソームではないと判定される場合がある。そこで、状態判定部 506 は、粒子径 d が 200 nm 以下の微粒子をエクソソームであると判定するとともに、粒子径 d が 200 nm を超える微粒子であっても、ゼータ電位 ζ がしきい値 $T h \zeta$ 以下である場合には、その微粒子をエクソソームであると判定する。つまり、状態判定部 506 は、粒子径 d のしきい値 $T h d$ とゼータ電位 ζ のしきい値 $T h \zeta$ とを組み合わせ、微粒子がエクソソームであるか否かを判定する。

【0091】

また、微粒子がエクソソームであるか否かの判定には、テトラスパニン (CD9, CD81 など) のように、エクソソームに特異的に結合される抗体を利用することができる。つまり、エクソソームに対して抗体を作用させることによるゼータ電位 ζ 及び粒子径 d の

、それぞれの変化に基づいて、微粒子がエクソソームであるか否かを判定することができる。

本実施形態の粒子検出システム1は、ゼータ電位 ζ 及び粒子径dに基づく、上述のような評価条件を様々な組み合わせで、微粒子の評価を行うことができる利点を有する。

【0092】

また、状態判定部506は、粒子径dのしきい値 Th_d とゼータ電位 ζ のしきい値 Th_ζ とを組み合わせた上で、識別部502によるトラッキングの結果に基づいて、微粒子の状態を判定することもできる。具体的には、状態判定部506は、単独のエクソソームに抗体を反応させ、さらに抗体-エクソソーム複合体どうしが凝集するまでの経過を、識別部502によるトラッキングの結果に基づいて追跡する。具体的には、状態判定部506は、各微粒子の粒子径dとゼータ電位 ζ とが、時間の経過により、図14に示す領域DM1～領域DM4のうち、いずれの領域からいずれの領域に移動するかによって、微粒子の状態を判定する。一例として、状態判定部506は、領域DM3に存在する微粒子（例えば、単独のエクソソーム）が、領域DM2に移動した場合には、エクソソームが抗体と反応して、抗体-エクソソーム複合体に変化したと判定する。また、状態判定部506は、このエクソソームが、領域DM2から領域DM1に移動した場合には、抗体-エクソソーム複合体どうしが凝集したと判定する。

10

【0093】

評価部507は、微粒子の状態の良否を評価する。一例として、評価部507は、状態判定部506が判定した微粒子の状態に基づいて、微粒子の状態をAランク、Bランク、Cランクにランク付けする。ここで、Aランクとは、微粒子の粒子径d及びゼータ電位 ζ のいずれもが、基準範囲内に含まれる場合である。また、Bランクとは、微粒子の粒子径d及びゼータ電位 ζ のいずれか一方が基準範囲内に含まれない場合である。また、Cランクとは、微粒子の粒子径d及びゼータ電位 ζ のいずれもが基準範囲内に含まれない場合である。

20

【0094】

一例として、評価部507が、微粒子が単独のエクソソームであるか否かを評価する場合について説明する。この場合、評価部507は、微粒子が領域DM3に存在する場合には、この微粒子のランクを、ランクAであると判定する。また、評価部507は、微粒子が領域DM2又は領域DM4に存在する場合には、この微粒子のランクを、ランクBであると判定する。また、評価部507は、微粒子が領域DM1に存在する場合には、この微粒子のランクを、ランクCであると判定する。

30

【0095】

[制御装置の動作]

次に、図15を参照して、制御装置5の動作について説明する。

図15は、本実施形態の制御装置5の動作の一例を示す図である。ここでは、粒子検出装置100が、所定の時間間隔によって側方散乱光の画像を撮像する場合について説明する。

【0096】

取得部501は、粒子検出装置100の撮像部32が撮像した画像を、粒子検出装置100から1枚ずつ取得する（ステップS10）。この画像には、泳動流路150を電気泳動する微粒子の画像が含まれている。また、この微粒子の画像には、エクソソームの画像が含まれている。

40

【0097】

次に、識別部502は、ステップS10において取得された画像の中から、微粒子の画像を抽出し、微粒子毎に固有の粒子番号を付与する。つまり、識別部502は、微粒子をラベリングする（ステップS20）。識別部502は、すべての撮像済み画像について、ラベリングが終了したか否かを判定する（ステップS30）。識別部502は、すべての撮像済み画像について、ラベリングが終了していないと判定した場合（ステップS30；NO）には、処理をステップS10に戻し、次の画像についてラベリングを行う。識別部

50

502は、すべての撮像済み画像について、ラベリングが終了したと判定した場合（ステップS30；YES）には、処理をステップS40に進め、識別した微粒子についてトラッキングを行う。

【0098】

次に、ゼータ電位判定部503は、識別部502がトラッキングした結果に基づいて、微粒子毎のゼータ電位 ζ を判定する（ステップS50）。また、粒子径判定部504は、識別部502がトラッキングした結果に基づいて、微粒子毎の粒子径を判定する（ステップS60）。なお、ステップS50と、ステップS60とは、順序が逆であってもよく、並列して実行されてもよい。

【0099】

次に、相関部505は、ゼータ電位判定部503が判定した微粒子のゼータ電位 ζ と、粒子径判定部504が判定した微粒子の粒子径 d とを関連付ける（ステップS70）。相関部505は、関連付けした結果を示す粒子相関リストLS2を生成し、生成した粒子相関リストLS2を記憶部520に記憶させる。相関部505は、すべての微粒子について関連付けが終了していないと判定した場合（ステップS80；NO）には、処理をステップS40に戻す。相関部505は、すべての微粒子について関連付けが終了したと判定した場合（ステップS80；YES）には、処理をステップS90に進める。

【0100】

次に、状態判定部506及び評価部507は、ステップS70において生成された粒子相関リストLS2に基づいて、粒子の状態の判定及び評価を行う。これら、状態判定部506による粒子の状態の判定、及び評価部507による評価の具体例について、以下説明する。

【0101】

[評価の例（その1）：物質の作用前後の比較]

評価部507は、微粒子に対して物質を作用させる前の粒子径及びゼータ電位の分布と、作用させた後の粒子径及びゼータ電位の分布とを比較評価することができる。具体例として、微粒子がヒト繊維肉芽腫由来のエクソソームである場合に、評価部507は、このエクソソームに抗CD81抗体を作用させた場合の粒子径及びゼータ電位の分布を評価する。この具体例の場合、相関部505は、抗CD81抗体を作用させる前のエクソソームについて、ゼータ電位 ζ と、粒子径 d とを関連付けて、粒子相関リストLS2-1を生成する。次に、相関部505は、抗CD81抗体を作用させた後のエクソソームについて、ゼータ電位 ζ と、粒子径 d とを関連付けて、粒子相関リストLS2-2を生成する。評価部507は、抗CD81抗体を作用させる前のエクソソームについての粒子相関リストLS2-1と、抗CD81抗体を作用させた後のエクソソームについての粒子相関リストLS2-2とに基づいて、図15に示すように、粒子径及びゼータ電位の分布を出力する。

【0102】

図16は、本実施形態の評価部507が出力する粒子径及びゼータ電位の分布の一例を示す図である。同図に示すように、評価部507は、エクソソームに対して抗CD81抗体を作用させる前の粒子径及びゼータ電位の分布と、作用させた後の粒子径及びゼータ電位の分布とを重ねて出力する。これにより、粒子検出システム1は、微粒子に物質を作用させた場合の粒子径及びゼータ電位の分布の変化を提示することができる。

【0103】

[評価の例（その2）：評価しきい値（基準範囲情報）の算出]

これまで、粒子径及びゼータ電位の評価のしきい値は、予め定められているとして説明した。評価部507は、微粒子の状態に基づいて、評価のしきい値を算出する構成であってもよい。具体例として、評価部507が、物質を作用させる前のエクソソームの状態に基づいて、評価のしきい値を算出し、この算出したしきい値に基づいて、物質を作用させた後のエクソソームについて評価する場合について、図17から図19を参照して説明する。

【0104】

図17は、本実施形態の制御装置5aの構成の一例を示す構成図である。制御装置5aは、制御装置5の演算部500が備える各機能部に加え、計数部508と、比率算出部509と、変化率算出部510とを備える。

計数部508は、基準範囲情報が示す粒子径のしきい値 Thd 及びゼータ電位のしきい値 Thz によって区分される領域毎に、当該領域に含まれる細胞外小胞体の数を計数する。ここで、領域の一例には、図14を参照して説明した、領域DM1～領域DM4がある。

比率算出部509は、計数部508が計数する細胞外小胞体の数の、領域間の比率を算出する。具体的には、比率算出部509は、計数部508が計数した細胞外小胞体の数を100%とした場合の、各領域内の細胞外小胞体の数の割合を、領域毎に算出する。

変化率算出部510は、物質を作用させる前の細胞外小胞体の比率と、物質を作用させた後の細胞外小胞体の比率との変化率を、領域毎に算出する。例えば、変化率算出部510は、抗CD81抗体を作用させる前のエクソソームの領域毎の比率と、抗CD81抗体を作用させた後のエクソソームの領域毎の比率との間の変化率を、領域毎に算出する。

【0105】

次に、制御装置5aの動作の一例について説明する。図18は、本実施形態の制御装置の動作の変形例を示す図である。図19は、本実施形態のしきい値及び領域の一例を示す図である。

粒子径判定部504は、抗体作用前のエクソソームについて、粒子径 d を判定する。評価部507は、粒子径判定部504が判定した粒子径 d の平均値を算出する（ステップS110）。この一例では、評価部507は、平均粒径を120nmとして算出する。評価部507は、算出した平均粒径120nmを、粒子径のしきい値 Thd として、記憶部520に記憶させる（ステップS120）。図19に、評価部507が算出したしきい値 Thd の一例を示す。

ゼータ電位判定部503は、抗体作用前のエクソソームについて、ゼータ電位 ζ を判定する。評価部507は、ゼータ電位判定部503が判定したゼータ電位 ζ の平均値を算出する（ステップS130）。この一例では、評価部507は、平均ゼータ電位を-（マイナス）13mVとして算出する。評価部507は、算出した平均ゼータ電位-13mVを、粒子径のしきい値 Thz として、記憶部520に記憶させる（ステップS140）。図19に、評価部507が算出したしきい値 Thz の一例を示す。

ステップS110からステップS140の処理によって、記憶部520にしきい値が記憶される。

【0106】

次に、計数部508は、抗体作用前のエクソソームの各領域毎の粒子数を計数する（ステップS150）。この計数部508による計数結果の一例を、図20に示す。

【0107】

図20は、本実施形態の計数部508による計数結果の一例を示す表である。具体的には、計数部508は、抗体作用前のエクソソームについて、領域DM1～領域DM4の粒子数を、24個、28個、16個、19個と計数する。

次に、比率算出部509は、計数部508が計数したエクソソームの粒子数に基づいて、領域間の粒子数の比率を算出する。具体的には、図20に示すように、比率算出部509は、領域DM1～領域DM4の粒子数の比率を、28%、31%、19%、22%と算出する。

【0108】

次に、計数部508は、抗体作用後のエクソソームの各領域毎の粒子数を計数する（ステップS160）。具体的には、計数部508は、抗体作用後のエクソソームについて、領域DM1～領域DM4の粒子数を、13個、0個、6個、26個と計数する。

【0109】

次に、比率算出部509は、計数部508が計数したエクソソームの粒子数に基づいて、領域間の粒子数の比率を算出する。具体的には、図20に示すように、比率算出部50

10

20

30

40

50

9 は、領域 DM 1 ～領域 DM 4 の粒子数の比率を、29%、0%、13%、58%と算出する。

【0110】

次に、変化率算出部 510 は、ステップ S150 において算出された比率と、ステップ S160 において算出された比率との変化率を算出する（ステップ S170）。具体的には、図 20 に示すように、変化率算出部 510 は、領域 DM 1 ～領域 DM 4 の変化率を、+3.5%、-100%、-32%、+163%と算出する。

評価部 507 は、算出された変化率と、予め求められている変化率の傾向との比較により、微粒子の状態を評価する。

【0111】

なお、ここでは、評価部 507 は、粒子径のしきい値 $T h d$ を、粒子径の平均値に基づいて算出し、ゼータ電位のしきい値 $T h z$ を、ゼータ電位の平均値に基づいて算出したが、これに限られない。評価部 507 は、粒子径分布の最大値と最小値の間から選択される、粒子径を示す軸と平行な線分を、粒子径のしきい値 $T h d$ として算出してもよい。また、評価部 507 は、ゼータ電位分布の最大値と最小値の間から選択される、ゼータ電位を示す軸と平行な線分を、ゼータ電位のしきい値 $T h z$ として算出してもよい。

【0112】

[評価の例（その 3）：各領域の増減の要因に基づく評価]

評価部 507 は、抗体の作用前後における各領域の粒子数の増減について、次に示すような傾向に基づいて、微粒子の状態を評価してもよい。すなわち、領域 DM 1 について、粒子数の増加要因には、凝集発生があり、減少要因には、抗体結合、及び凝集発生がある。また、領域 DM 2 について、粒子数の増加要因には、凝集解消があり、減少要因には、抗体結合、及び凝集発生がある。また、領域 DM 3 について、粒子数の増加要因には、抗体結合があり、減少要因には、凝集発生がある。また、領域 DM 4 について、粒子数の増加要因には、抗体結合及び凝集発生があり、減少要因には、凝集解消がある。

また、評価部 507 は、抗体結合によって予測される各領域の粒子数の増減について、次に示すような傾向に基づいて、微粒子の状態を評価してもよい。すなわち、領域 DM 1 について、抗体作用の結果、粒子が領域 DM 4 に移行する。この場合、想定される機構は、抗体結合である。また、領域 DM 2 について、抗体作用の結果、粒子数が減少する。この場合、想定される機構は、抗体結合及び凝集発生である。また、領域 DM 3 について、抗体作用の結果、粒子が領域 DM 4 に移行する。この場合、想定される機構は、抗体結合及び凝集発生である。また、領域 DM 4 について、抗体作用の結果、粒子数が増加する。この場合、想定される機構は、抗体結合及び凝集発生である。

【0113】

この一例の場合、上述の傾向を示すしきい値が、変化率のしきい値として記憶部 520 に記憶されている。評価部 507 は、図 18 から図 20 に示した手順により算出した増減率と、記憶部 520 に記憶されている変化率のしきい値とを比較することにより、微粒子の状態を評価する。

【0114】

[評価の例（その 4）：流路毎に異なる種類の抗体を反応させることによる評価]

また、粒子検出システム 1 は、複数のレーンを備えているため、レーンごとに微粒子の種類及び抗体の種類を変えることができる。具体例を図 21 から図 23 に示す。

図 21 は、本実施形態の複数のレーンにそれぞれ種類が異なる抗体を添加する場合の一例を示す模式図である。

図 22 は、本実施形態の疾患の判定パネルの一例を示す表である。

図 23 は、本実施形態の疾患の診断及び指導パネルの一例を示す表である。

これら図 21 から図 23 に示すように、評価部 507 は、レーンごとに異なる抗体を添加し、それぞれのレーンにおける微粒子の状態を評価することもできる。すなわち、粒子検出システム 1 によれば、目的の疾患の診断に最適な抗体の組合せを任意に選択して検査することができる。また、粒子検出システム 1 によれば、複数レーンを同時に評価するこ

10

20

30

40

50

とができるため、単一のレーンによって評価する場合に比べて、評価時間を短縮することができる。

【0115】

[評価の例（その5）：機能改変したエクソソームの物性評価]

評価部507は、微粒子の物性評価を行うこともできる。具体例として、評価部507が、機能を改変したエクソソームの物性評価を行う場合について、図24から図26を参照して説明する。

【0116】

図24は、本実施形態のゲート領域Gの一例を示す図である。ここで、ゲート領域Gとは、粒子径dの下限しきい値 T_{hd1} 及び上限しきい値 T_{hd2} と、ゼータ電位 ζ の下限しきい値 $T_{h\zeta1}$ 及び上限しきい値 $T_{h\zeta2}$ とに囲まれた領域をいう。本実施形態の評価部507は、粒子径dの下限しきい値 T_{hd1} と、粒子径dの上限しきい値 T_{hd2} の間を、粒子径dのゲート領域 G_d として、粒子の物性を評価する。また、評価部507は、ゼータ電位 ζ の下限しきい値 $T_{h\zeta1}$ と、ゼータ電位 ζ の上限しきい値 $T_{h\zeta2}$ の間を、ゼータ電位 ζ のゲート領域 G_ζ として、粒子の物性を評価する。以下、これらの各しきい値は、記憶部520に予め記憶されているとして説明するが、これに限られない。これらの各しきい値は、演算部500が演算によって算出してもよいし、制御装置5の外部から供給されてもよい。

【0117】

次に、図25を参照して、演算部500による微粒子の物性評価の動作の一例を説明する。

図25は、本実施形態の演算部500による微粒子の物性評価の動作の一例を示す図である。

評価部507は、記憶部520から、粒子径dの下限しきい値 T_{hd1} 及び上限しきい値 T_{hd2} と、ゼータ電位 ζ の下限しきい値 $T_{h\zeta1}$ 及び上限しきい値 $T_{h\zeta2}$ とを読み出す（ステップS210）。

評価部507は、ステップS210において読み出した各しきい値に基づいて、ゲート領域を示す情報を、ディスプレイ（不図示）に表示する（図24のゲート領域Gを参照）（ステップS220）。

次に、ゼータ電位判定部503は、評価対象の微粒子のゼータ電位 ζ を判定する。また、粒子径判定部504は、評価対象の微粒子の粒子径dを判定する（ステップS230）。この具体例において、評価対象の微粒子とは、機能改変されたエクソソームである。

次に、相関部505は、ステップS230において判定されたゼータ電位 ζ と、粒子径dとを、微粒子毎に関連付けする（ステップS240）。また、相関部505は、関連付けしたゼータ電位 ζ と、粒子径dとを、微粒子毎にディスプレイ（不図示）に表示する。

計数部508は、ゲート領域G内に存在する微粒子の粒子数を計数する（ステップS250）。また、計数部508は、ゲート領域G外に存在する微粒子の粒子数を計数する（ステップS260）。

比率算出部509は、計数部508が計数した粒子数に基づいて、ゲート領域G内の粒子数と、ゲート領域G外の粒子数との比率を算出して（ステップS270）、処理を終了する。

【0118】

次に、評価部507による評価の一例について、図26を参照して説明する。

図26は、本実施形態の評価部507による評価の一例を示す図である。同図に示すように、評価部507は、ゲート領域G内に存在する粒子が比較的多い場合に、適合と判定し、ゲート領域G内に存在する粒子が比較的少ない場合に、不適合と判定する。つまり、評価部507は、ゲート領域G内の粒子数と、ゲート領域G外の粒子数に基づいて、評価対象の微粒子の適合性を判定する。

【0119】

ここで、エクソソームを疾病の治療目的に応じて、その機能を改変する技術が知られて

10

20

30

40

50

いる。例えば、エクソソームをドラッグデリバリーシステムにおける薬剤のキャリアとして利用することができる。一例として、遺伝子工学的手法を用いて、ウイルスベクターを用いて任意のタンパク質遺伝子を細胞に導入し、その細胞からエクソソームを回収する。このことによって siRNA や miRNA などのデリバリーキャリアとしてエクソソームを利用することが可能である。また、例えばエクソソームに特異的結合物質を結合させた機能改変エクソソームを作製し、使用することも可能である。

上述の評価部 507 によれば、機能改変したエクソソームが、上述のドラッグデリバリーシステムに適合するものであるか否かについて、評価することができる。

【0120】

[まとめ]

以上説明したように、本実施形態に係る粒子検出システム 1 は、微粒子の粒子径と、ゼータ電位とを、微粒子毎に求めるとともに、求めた粒子径とゼータ電位とを相関づける。これにより、粒子検出システム 1 によれば、粒子径又はゼータ電位のいずれか一方だけでは判定が困難であった微粒子の状態を判定することができる。

また、本実施形態に係る粒子検出システム 1 は、照明光をレーン 2 の側面から入射させることにより、微粒子から生ずる散乱光を精度よく検出することができる。これにより、粒子検出システム 1 によれば、微粒子の粒子径やゼータ電位を精度よく判定することができる。したがって、粒子検出システム 1 によれば、微粒子の状態を精度よく判定することができる。

【0121】

なお、上記実施形態では、電界による力を付与して粒子に流路 13 内を移動させる構成を例示したが、これに限定されるものではなく、媒質に流速を付与することにより、粒子を所定方向に移動させる構成、または粒子を所定方向に移動させる力を与えない構成であってもよい。

【0122】

なお、上記実施形態では、粒子から -Z 側に向けて発生する散乱光を検出する構成としたが、これに限られず、例えば、+y 側または -y 側または +z 側に向けて散乱する散乱光を検出する構成であってもよい。検出部は流路の底面側に限られず、流路の側面側でもよい。例えば、流路の側面から照明光を照射した場合に、流路の底面側から側方散乱光を検出してもよいし、流路の上面側から側方散乱光を検出してもよい。また、前方散乱光を検出する構成であってもよい。例えば、流路の側面から照明光を照射した場合に、流路の照明光出射側から後方散乱光を検出してもよく、流路の照明光出射側から前方散乱光を検出してもよい。

【0123】

なお、上記実施形態では、長さ方向 (y 方向) に配列された複数のレーン 2 を備えた流体デバイス C を例示したが、複数のレーン 2 は高さ方向 (z 方向) に配列されていてもよい。この場合、溶液は長さ方向 (x 方向) から注入されてもよく、y 方向から注入されてもよい。照射光源は例えば複数あって、それぞれの光源が対応する高さのレーン 2 を流れる微粒子を照射する。また、少なくとも一つの照射光源から照射方向を変えることでレーン 2 を流れる微粒子を照射してもよい。

【0124】

なお、照明光 L1 の z 方向の幅が最小サイズとなる位置を調整するには、例えば、第 2 調整部として、焦点距離が異なる複数の調整部 CL (レンズ) をターゲット板に設け、ターゲット板を回転させて所望の焦点距離を有するレンズを照明光 L1 の光路に位置させる構成や、ズームレンズを用いる構成を採ることができる。また、有効径の異なる調整部 CL を複数用い、所望の有効径を有するレンズを照明光 L1 の光路に位置させる構成や可変 NA 絞りをを用いて集光レンズの有効径を可変としてもよい。さらに、倍率の異なるエキスパンダレンズ 22 を複数用い、所望の有効径を有するエキスパンダレンズ 22 照明光 L1 の光路に位置させる構成や、ズームレンズを用いる構成を採って、倍率を可変としてもよい。

【0125】

なお、照明光L1の光軸がx軸と平行である構成を例示したが、これに限定されるものではなく、上述した直交面と交差する範囲であれば、例えば、x軸に対して±10度、または±5度で傾いてもよい。照明光L1の光軸がx軸と平行で側面16aと直交して入射した場合には、原理的にはレイリー散乱光の散乱角依存性が最も弱くなるが、上述したように、測定対象の粒子よりも大きい粒子からのミー散乱光をカットした場合にはノイズが低減され、照明光L1の光軸がx軸に対して傾いていた方がレイリー散乱光の信号強度が高くなる可能性がある。

【0126】

なお、上記実施形態では、粒子としてエクソソームを用いる構成を例示したが、本装置および本システムは、エクソソーム以外にも適用できることは言うまでもない。例えば、本装置および本システムは、エクソソーム（細胞外小胞体）のような自己細胞由来粒子、細菌・ウィルスのような外来粒子、に代表される有機物粒子のみならず、金属・シリカのような無機物粒子まで適用範囲を広げることが可能である。

【0127】

なお、上記実施形態では、粒子検出システム1が、微粒子の状態の判定と、微粒子の種類の特定を行う場合について例示した。ここで、粒子検出システム1が判定する微粒子の状態には、微粒子どうしの凝集や、微粒子と抗体との結合状態等が含まれる。また、粒子検出システム1が特定する微粒子の種類には、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体、細胞、高分子ミセル等が含まれる。

【0128】

粒子検出装置100は、粒子から生じる側方散乱光を検出しているため、前方散乱光を受光した場合と比較してノイズの少ない画像情報が得られる。また、例えば、照明光L1が側面16aの位置における照射光束の通過領域が側面16a内に限定されずに、照明光L1の一部Kが底板11を介して流路13の内部に入射した場合には、側面16bまたは底面16cで散乱光が発生する可能性がある。側面16bまたは底面16cで発生した散乱光の信号強度は、観察対象の粒子で発生した散乱光の信号強度よりも数桁以上大きく、撮像部32のダイナミックレンジを超えてしまう。粒子を観察する状態においては、側面16bまたは底面16c（以下、壁面と称する）で発生した散乱光は撮像部32を飽和させる可能性がある。そして、この散乱光がz方向について広範囲から発生する場合、デフォーカスによる拡がりの発生のため、撮像部32上において散乱光が流路内の観察領域を大きく浸食することになる。本実施形態では、側面16aの位置において照明光L1の通過領域が側面16a内に限定され、且つ、端面17の位置において照明光L1の通過領域が端面17内に限定されるように照明光L1を収束させているため、信号強度の大きい散乱光の発生を抑制することができる。そのため、粒子検出装置100は、流路13内の粒子に関する情報を高精度で検出することができる。

【0129】

また、検出部30の焦点深度DOFの外側の粒子からの散乱光は、デフォーカスのためにバックグラウンド光となり、粒子状に検出することができない。本実施形態では、流路13の内部でz方向の幅が最小となり、流路13内の観察領域外におけるバックグラウンド光を抑えているため、照明光L1で照明された粒子を高精度に検出することが可能になる。また、本実施形態では、端面17が鏡面加工されているため、端面17で散乱光がノイズとなり粒子検出精度に悪影響が及ぶことを抑制できる。また、本実施形態では、照明光L1が端面17に直交して入射しているため、光軸調整が容易になる。さらに、本実施形態では、底板11の端面19がリザーバ部材10の端面17よりも照明光L1の入射側とが逆側に離間しているため、照明光L1の一部が端面17に入射する前に端面19に入射することを回避できる。

【0130】

なお、上述した実施形態における粒子検出装置100において、電気泳動によって微粒子を所定方向に移動させる場合について説明したが、これに限られない。例えば、粒子検

10

20

30

40

50

出装置 100 は、媒質に流速を与えることによって、微粒子を所定方向に移動させてもよい。また、粒子検出装置 100 は、微粒子を所定方向に移動させる力を与えない構成であってもよい。

【0131】

また、上述した実施形態において、粒子検出装置 100 と制御装置 5 とが別体である場合について説明したが、これに限られない。粒子検出システム 1 において、粒子検出装置 100 と制御装置 5 とが、一体の装置であってもよい。例えば、粒子検出システム 1 において、制御装置 5 が粒子検出装置 100 に組み込まれるコンピュータとして構成されていてもよい。このように構成することにより、粒子検出システム 1 は、別体構成の場合に比較して、装置の大きさや設置面積を低減することができる。

10

【0132】

なお、上述した実施形態における粒子検出装置 100 の一部をコンピュータで実現するようにしてもよい。その場合、この制御機能を実現するためのプログラムをコンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録して、この記録媒体に記録されたプログラムをコンピュータシステムに読み込ませ、実行することによって実現してもよい。なお、ここでいう「コンピュータシステム」とは、粒子検出装置 100 に内蔵されたコンピュータシステムであって、OS や周辺機器等のハードウェアを含むものとする。また、「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」とは、フレキシブルディスク、光磁気ディスク、ROM、CD-ROM 等の可搬媒体、コンピュータシステムに内蔵されるハードディスク等の記憶装置のことをいう。さらに「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」とは、インターネット等のネットワークや電話回線等の通信回線を介してプログラムを送信する場合の通信線のように、短時間、動的にプログラムを保持するもの、その場合のサーバやクライアントとなるコンピュータシステム内部の揮発性メモリのように、一定時間プログラムを保持しているものも含んでもよい。また上記プログラムは、前述した機能の一部を実現するためのものであってもよく、さらに前述した機能をコンピュータシステムにすでに記録されているプログラムとの組み合わせで実現できるものであってもよい。また、上述した実施形態における粒子検出装置 100 の各機能ブロックの一部、または全部を、LSI (Large Scale Integration) 等の集積回路として実現してもよい。粒子検出装置 100 の各機能ブロックは個別にプロセッサ化してもよいし、一部、または全部を集積してプロセッサ化してもよい。また、集積回路化の手法は LSI に限らず専用回路、または汎用プロセッサで実現してもよい。

20

また、半導体技術の進歩により LSI に代替する集積回路化の技術が出現した場合、当該技術による集積回路を用いてもよい。

30

【0133】

以上、添付図面を参照しながら本発明に係る好適な実施形態について説明したが、本発明は係る例に限定されないことは言うまでもない。上述した例において示した各構成部材の諸形状や組み合わせ等は一例であって、本発明の主旨から逸脱しない範囲において設計要求等に基づき種々変更可能である。

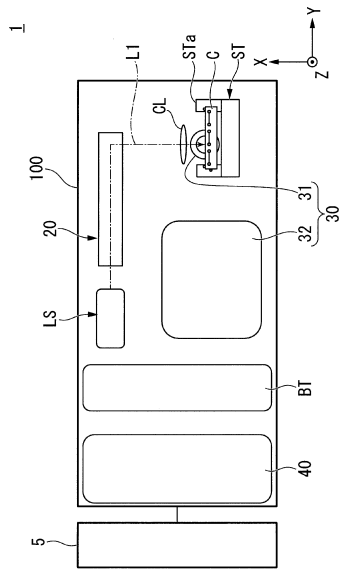
【符号の説明】

【0134】

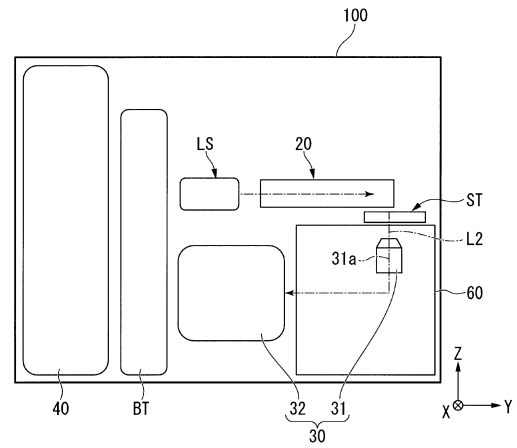
1…粒子検出システム、5…制御装置、100…粒子検出装置、501…取得部、502…識別部、503…ゼータ電位判定部、504…粒子径判定部、505…相関部、506…状態判定部、507…評価部

40

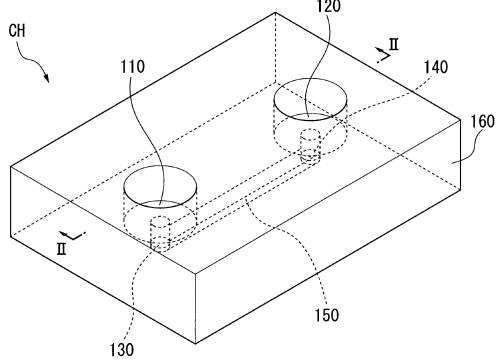
【図 1】



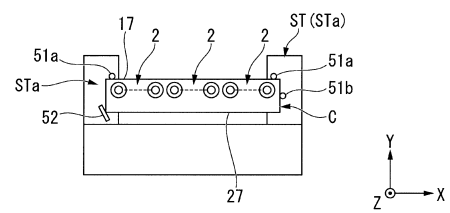
【図 2】



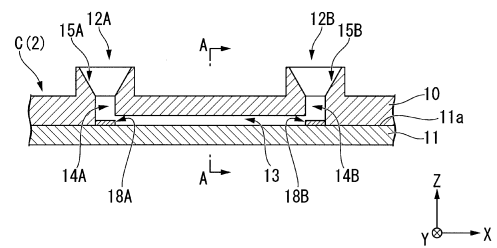
【図 3】



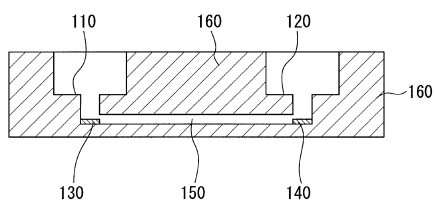
【図 5】



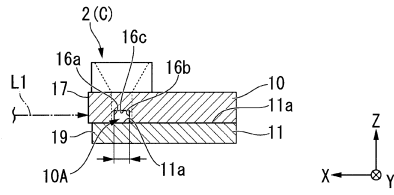
【図 6】



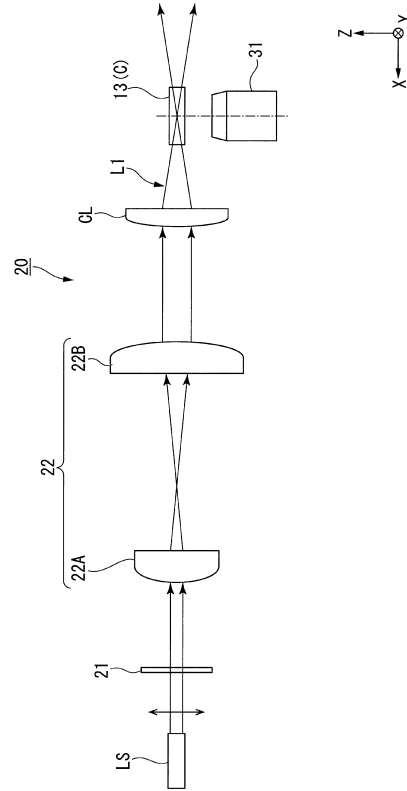
【図 4】



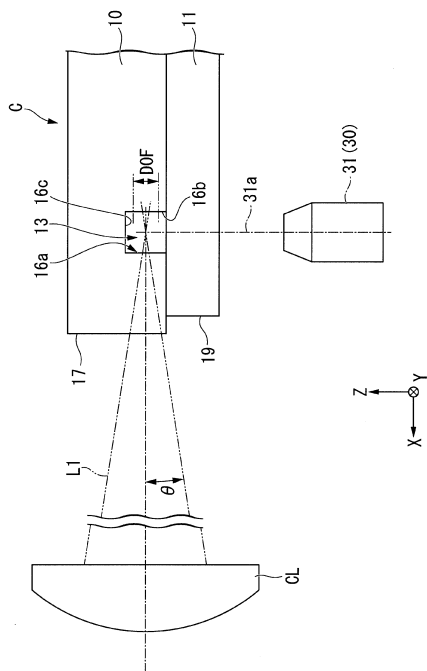
【図 7】



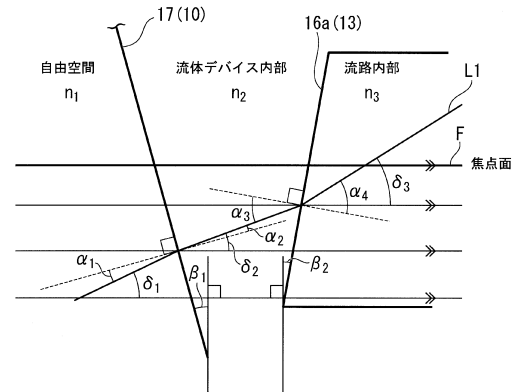
【図 8】



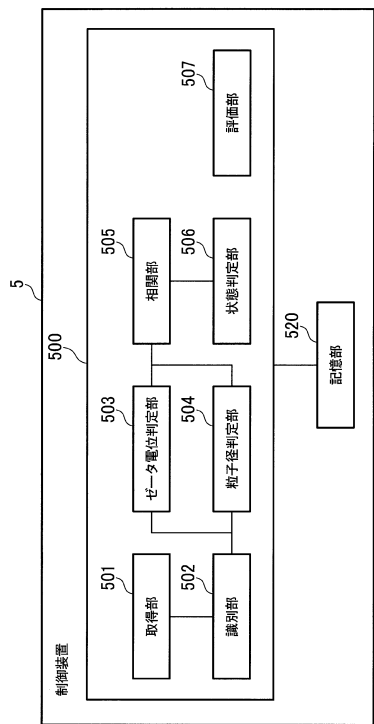
【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】

LS1

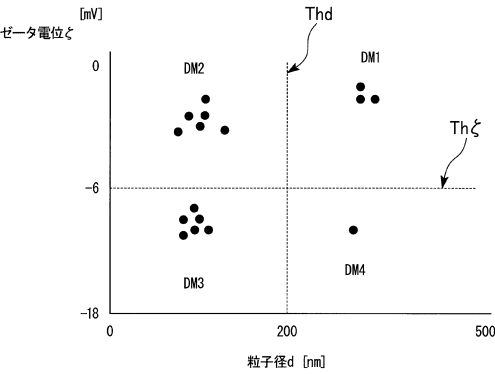
		t0	t1	t2	...	t48	t49	t50
P1	X	x10	x11	x12	...	x148	x149	x150
	Y	y10	y11	y12	...	y148	y149	y150
P2	X	x20	x21	x22	...	x248	x249	x250
	Y	y20	y21	y22	...	y248	y249	y250
...		...	...	...	...	...	...	...
Pn	X	xn0	xn1	xn2	...	xn48	xn49	xn50
	Y	yn0	yn1	yn2	...	yn48	yn49	yn50

【図 1 3】

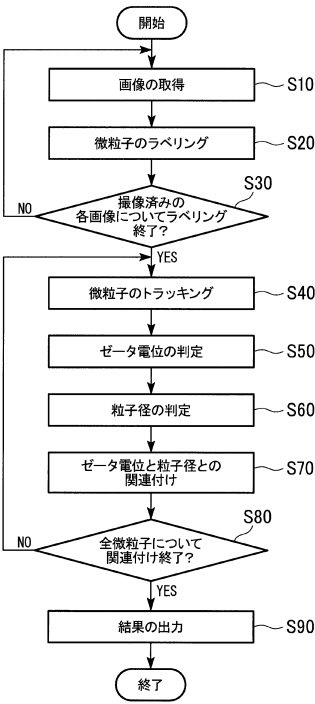
LS2

粒子番号	粒子相関情報
P1	PC1 (d1, ζ 1)
P2	PC2 (d2, ζ 2)
...	...
Pn	PCn (dn, ζ n)

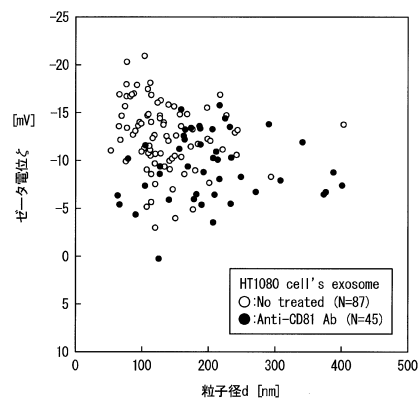
【図 1 4】



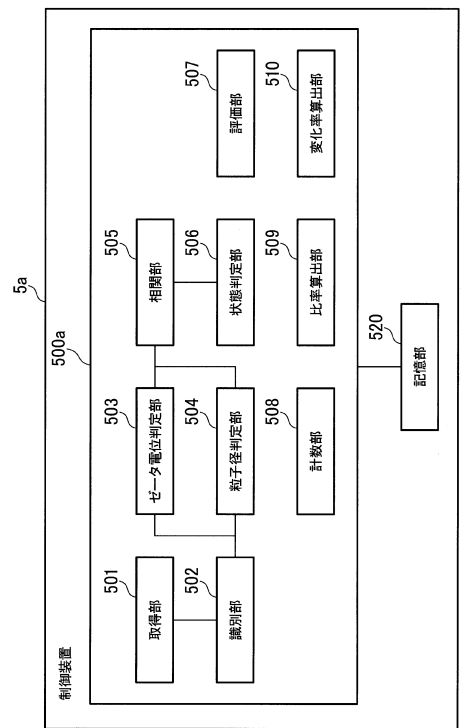
【図 1 5】



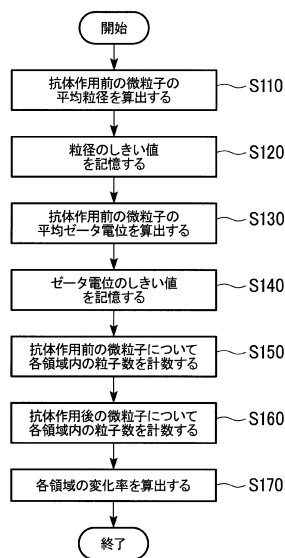
【図 16】



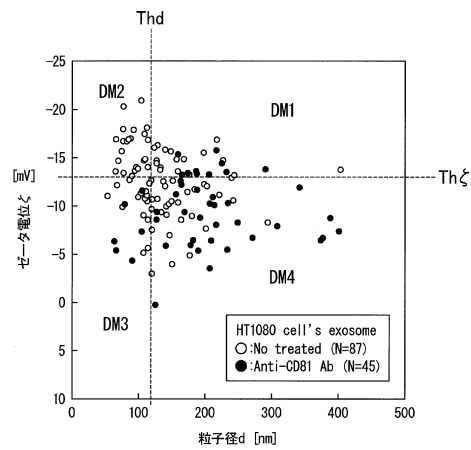
【図 17】



【図 18】



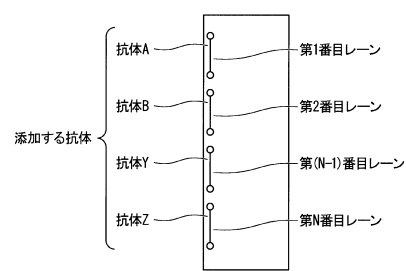
【図 19】



【図 20】

	抗体作用前○		抗体作用後●		変化率 (%)
	カウント	比率 (%)	カウント	比率 (%)	
DM 1	24	28	13	29	3.5
DM 2	28	31	0	0	>-100
DM 3	16	19	6	13	-32
DM 4	19	22	26	58	163

【図 2 1】



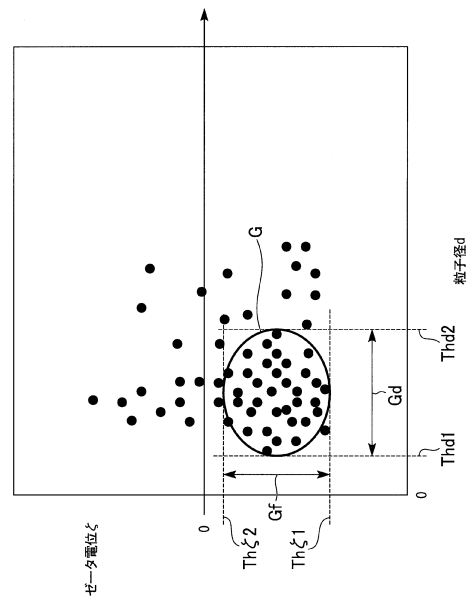
【図 2 3】

指導例	
健康	
診断	面検診断、細胞診など特定診断検査を受診する
	面検診断、細胞診など特定診断検査を受診する
	面検診断、細胞診など特定診断検査を受診する
	便検査の結果も合わせて、特定診断検査を受診する
判定例 1	乳癌・大腸癌ではない
判定例 2	乳癌・大腸がんが強く疑われる
判定例 3	乳癌の疑いが強く疑われる
判定例 4	大腸癌の可能性がある

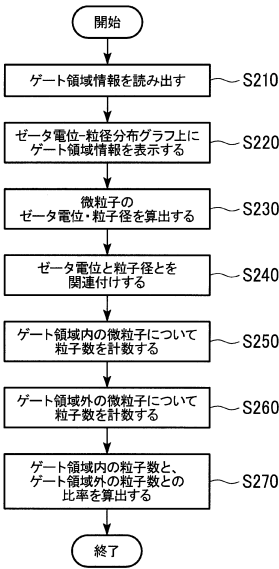
【図 2 2】

流路数	添加抗体	抗原	判定例 1	判定例 2	判定例 3	判定例 4
第1流路	抗CD9抗体	エクソソーム膜タンパク質	陽性	陽性	陽性	陰性
第2流路	抗CD81抗体	エクソソーム膜タンパク質	陽性	陽性	陰性	陰性
第3流路	抗HER2抗体	乳癌マーカー	陰性	陽性	陽性	陰性
第4流路	抗CD147抗体	大腸癌マーカー	陰性	陽性	陰性	陽性

【図 2 4】



【図 2 5】



【図 26】

	カウント		陽性率 (%)	判定
	ゲート領域G内	ゲート領域G外		
製造ロット1	1000	10	99.1	適合
製造ロット2	500	500	50.0	不適合
製造ロット3	900	100	90.0	不適合
製造ロット4	100	5	95.2	適合

フロントページの続き

- (72)発明者 鈴木 久皇
東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内
- (72)発明者 田中 大士
東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内

審査官 右田 純生

- (56)参考文献 特開2007-322329 (JP, A)
国際公開第2014/030590 (WO, A1)
特表2004-503779 (JP, A)
特開2006-276000 (JP, A)
特開2011-149793 (JP, A)
特開平05-240872 (JP, A)
特開2008-261740 (JP, A)
米国特許出願公開第2012/0135054 (US, A1)
米国特許出願公開第2014/0294909 (US, A1)
MEINHART, C. D. et al., "PIV measurements of a microchannel flow", Experiments in Fluids, 1999年10月, Vol. 27, pp.414-419

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|------|-------|
| G01N | 15/14 |
| G01N | 15/02 |
| G01N | 15/10 |
| C12Q | 1/00 |
| G01N | 27/26 |
| G01N | 33/53 |