

明 細 書

発明の名称：細胞分析装置システムおよび細胞分析方法

技術分野

[0001] 本開示は、細胞を分析する装置システムおよび細胞分析方法に関する。

背景技術

[0002] 多細胞生物における生体組織は種々細胞が役割を分担して全体として調和の取れた機能を維持している。あるいは、細胞の一部ががん化（ここでは腫瘍も含め、一括してがんと呼ぶ。）すると、周辺領域と異なる新生物となるが、がん領域とそこから遠く離れた正常組織部分とはある境界を持って必ずしも区切れるものではなく、がん周辺領域も何らかの影響を受けている。したがって、臓器組織における機能を解析するには狭い領域に存在する少数の細胞を短時間のうちになるべく簡単に、かつ損失を最小にして分離して分析する必要がある。

[0003] また、再生医療の分野では、組織の中から臓器幹細胞を分離し、これを再培養して分化誘導し目的の組織、ひいては臓器を再生しようとする試みがなされている。

[0004] 細胞を識別したり分離したりしようとすると、何らかの指標に従い区別する必要がある。一般に細胞の区別には、以下が用いられている。

1) 目視による形態学的な細胞分類：例えば尿中に出現する異型細胞検査による膀胱がんや尿道のがんなどの検査や血中の異型細胞分類、組織中における細胞診によるがん検査などをあげることができる。

2) 蛍光抗体法による細胞表面抗原（マーカー）染色による細胞分類：一般にCDマーカーと呼ばれる細胞表面抗原を、それに特異的な蛍光標識抗体で染色するもので、セルソーターによる細胞分離やフローサイトメーターや組織染色によるがん検査などに用いられている。もちろんこれらは、医療面のみならず、細胞生理研究用や、工業的な細胞利用の上でも多用されている。

3) あるいは、幹細胞の分離に関しては、細胞内に取り込まれる蛍光色素を

レポーターとして幹細胞を含む細胞を大まかに分離し、更にその後で実際に培養を行うことで目的の幹細胞を分離する例がある。これは、幹細胞の有効なマーカーがまだ確立されていないので、実際に培養し、分化誘導したもののみを利用することで、実質的に目的細胞を分離しているのである。

[0005] このように培養液中の特定の細胞を分離し回収することは、生物学・医学的な分析においては重要な技術である。細胞の比重の違いで細胞を分離する場合には速度沈降法によって分離することができる。しかし、未感作の細胞と感作した細胞とを見分けるような、細胞の比重の違いがほとんど無い場合には、蛍光抗体で染色した情報あるいは目視の情報を基に細胞を1つ1つ分離する必要がある。

[0006] この細胞を分離する技術については、例えば、セルソーターがある。セルソーターは、蛍光染色処理後の細胞を電荷を持たせた液滴中に1細胞単位で単離して滴下し、この液滴中の細胞の蛍光の有無、光散乱量の大小を基に、液滴が落下する過程で、落下方向に対して法平面方向に高電界を任意の方向に印加することで、液滴の落下方向を制御して、下部に置かれた複数の容器に分画して回収する技術である（非特許文献1）。

[0007] しかし、この技術の装置は高価であること、装置が大型であること、数千ボルトという高電界が必要であること、一定以上の濃度まで濃縮された試料が多量に必要であること、液滴を作製する段階で細胞に損傷を与える可能性があること、直接試料を観察できないことなどの問題がある。これらの問題を解決するため、近年、マイクロ加工技術を用いて微細な流路を作製し、流路内の層流中を流れる細胞を直接顕微鏡観察しながら分離するセルソーターが開発されている（非特許文献2～3）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特許3898103号公報

特許文献2：特許4420900号公報

特許文献3：特許4630015号公報

特許文献4：特許4677254号公報

特許文献5：特許5170647号公報

特許文献6：特許5320510号公報

特許文献7：特許5580117号公報

特許文献8：特許5712396号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Kamarck, M.E., Methods Enzymol. Vol.151, p150-165 (1987)

非特許文献2：A. Wolff et al., Micro Total Analysis, 98, pp.77-80 (Kluwer Academic Publishers, 1998)

非特許文献3：S. Fiedler et al., Analytical Chemistry, 70, pp.1909-1915 (1998)

発明の概要

課題を解決するための手段

[0010] 本開示は、臨床現場において、血中循環がん細胞（CTCs）はがん転移に関して存在を確認する事が重要視されていることに鑑み、これをがん転移の指標とした診断基準を提供し、確立した。それ自体の多様性・希少性のため、採血後の試料を均一な組織と見なし、その中の稀少な変異遺伝子の存在の有無を検査する従来方法では非常に高い検出感度が求められる点を本開示は解決した。

[0011] 特にこれまでは、蛍光標識した血中のがん細胞が他の細胞と細胞塊となっているか、あるいは孤立した1細胞であるかを確認せず、細胞内の遺伝子、発現解析を行っていたため、ターゲットとなるがん細胞以外の細胞の情報を含んだ集団平均としての情報を獲得していたため、対象となるがん細胞の正確な情報が得られないという課題を本開示は解決した。

[0012] また、1細胞単位での回収手段に加えて、希少な細胞を選別・濃縮後、微量の細胞単位で遺伝子診断、発現解析する手段によって、よりS/N比の高い診断を行うことを本開示は不要とする。

[0013] また、これまでの細胞を基盤とした血中がん細胞では、細胞のサイズや多

核細胞など、ある基準を満たす細胞の有無のみに着目したが、本開示は、血中の細胞の大きさの分布などの全量検査によって得られる細胞サイズの分布の異変などについて着目した。

[0014] 一方、がん細胞を確認する手法としては、本開示者らがすでに出願した細胞クラスターの画像認識による解析手段（特許文献１～８）があるが、画像ベースでより正確に細胞の形状や周囲長、面積を取得して、また、より正確に細胞を回収するには、正確な細胞の流速を同時に取得して、セルソーターの画像取得手段や細胞回収手段をその得られた流速に合わせて常時最適化することを、本開示は不要とする。

[0015] また、対象となる細胞を画像によって全量観察するためには、より短時間で全量観察をするために、対象候補となるサイズの細胞および細胞クラスターのみを目詰まりをすることなく連続して濃縮することができる前処理技術を、本開示は不要とする。またこの技術を実現するために必要と考えられていた、使用する部材の製造のために直立した微細構造を構築する加工技術を、本開示は不要とする。

[0016] さらに、画像観察して回収する細胞の分離回収後の遺伝子解析や再培養時のコンタミネーションを防ぐために細胞を内包するカプセルに細胞を詰める前処理を、本開示は不要とする。

[0017] また、画像取得についてより詳細な細胞情報を同時に取得するために、同時に細胞のより多数の波長の吸光あるいは蛍光画像を連続して取得するための手段を、本開示は不要とする。

[0018] すなわち、本開示は、被験体由来の細胞試料中の異常細胞を分離・同定する技術を提供する。

[0019] マイクロ加工技術を用いて作製するセルソーターでは観察手段に対する試料分離の応答速度が遅く、実用化するために必要とされていた、試料に損傷を与えず、かつ、より応答の速い分離処理方法を、本開示は不要とする。また、利用するサンプル溶液中の細胞濃度も一定以上の濃度に事前に高めることをしないと、希薄な細胞濃度であっては、十分に装置の分離効率を高める

ことができないという課題を本開示は解決した。さらに微量なサンプルの濃縮を別装置で行った場合には、その濃縮液をロスなく回収することが困難であるだけでなく、煩雑な前処理段階において、細胞が汚染されるなどの再生医療等では望ましくない問題が発生するという課題を、本開示は解決した。

[0020] 本発明者が、このような問題点を解消するために開発した、マイクロ加工技術を活用して、試料の微細構造と試料中の蛍光分布に基づいて試料を分画し、回収する試料に損傷を与えることなく、簡便に細胞試料を分析分離することのできる細胞分析分離装置（特許文献1～8）において、実験室レベルでは十分に実用的なセルソーターであることを越えて、本開示は、より効果的に効率を上げて実用的に使用することができ、微細流路中を流れる細胞の流速を正確に計測する方法や、画像の取得方法や、画像処理の方法、細胞の液搬送法や回収法、試料調製などの前処理についての、新たな技術開発を提供する。

[0021] がん組織の検出はMRI(核磁気共鳴画像法)やCT(コンピュータ断層撮影法)の改良によって飛躍的に改善されているところ、本開示は、良性・悪性腫瘍の同定については、バイオプシーによる評価を超える手法を提供する。悪性腫瘍の問題点として、がん細胞自身の組織から血管あるいはリンパ管に浸潤する能力により他臓器に転移することが知られている。このように末梢血を循環する悪性腫瘍細胞は末梢血循環がん細胞(Circulating Tumor Cells: CTCs)と呼ばれ、血液細胞(赤血球を含む)10万細胞に数百細胞程度のがん細胞が存在すると考えられている。近年、特定のターゲットに対する制がん剤が次々と開発されており、血液中の悪性腫瘍の種類が同定できれば、その細胞を効果的に死滅させる制がん剤を選択できるようになってきた。本開示は、血液中を流れるCTCsをモニターする技術が実現させ、血液中を流れる転移がんの原因となる悪性腫瘍細胞の存在を定量的に計測することができ、それによって投与した制がん剤の効果を定量的に継続して評価することができ、不要な制がん剤の投与、過剰な制がん剤の投与を防ぐことができるのみならず、再発の有無についても検知することができる世界初の手法を提供する。

[0022] 以上のように、本発明者は、転移能力を持って血中を流れるがん細胞の種類と状態、そして数（血中濃度）を高速に同定することができる細胞分析装置システムを提供する。

[0023] より具体的には、本開示は、細胞を連続濃縮する機能と、引き続き、連続して細胞を流路の特定の領域に連続配置する機能と、画像ベースで1細胞単位でその明視野の形状と蛍光の形状を同時に認識する機能と、前記形状を細胞の流れ速度にあわせて補正をした形状と蛍光の発光の情報に基づいて認識を行って細胞を分離精製する機能を有する細胞分析装置システムおよび該装置で使用する細胞分析方法を提供する。

[0024] さらに具体的には、本開示は、以下の装置、システムおよび方法を提供する。

[0025] 本開示は、

(A) 被験体からの細胞試料液から候補となるサイズ領域の細胞を精製し、濃縮し、染色し、及び／又は洗浄する処理を行う第1の装置と、

(B) 前記第1の装置で処理された細胞をカプセル中に封入したカプセル粒子を作製する第2の装置と、

(C) 前記第1の装置で処理された細胞または前記第2の装置でカプセル粒子中に封入された細胞の画像を取得して判別し、この細胞の流速を連続で流速データとして取得して、該流速データに基づいて正確な細胞形状を取得し、この細胞形状に基づく細胞の画像の情報を連続で解析し、被験試料全量の細胞情報の分布を出力し、かつ、標的となる細胞を判別して回収する第3の装置と

(D) 前記第1～第3の各装置の動作を制御し、前記細胞試料液についての判定を行う制御・判断部とを備える細胞分析装置システムを提供する。

[0026] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、

(a) 前記第1の装置が、被験体からの細胞試料液から得られる細胞を濃縮し、染色し、洗浄するメンブレンフィルターを備えたチャンバーと、前記細胞

を含む溶液、染色液および洗浄液をそれぞれ収容する容器と、各前記容器中の各液を前記チャンバー中に順次導入する細胞濃縮・染色・洗浄機構とを備え、または、

(a') 前記第1の装置が、前記細胞試料液中の細胞を選択的に連続してサイズ分画できる、サイズ分画したい細胞サイズに合わせて間隔を調整され流路の流れに対して傾斜して微小流路中に配置されたピラーアレイと、該微小流路に直交する両側壁面に対向して配置された正弦交流電場を微小流路中に印加できる一対の電極とを含む交流電場印加機構を備え、

(b) 前記第2の装置が、微小管の出口よりゾル状態のアルギン酸と前記細胞を含む溶液を二価イオンを含む溶液中に吐出することで細胞を含むアルギン酸のカプセル粒子を構築するカプセル粒子構築機構を備え、かつ、前記微小管の内部と外部に微小電流を流して抵抗値の変化から吐出速度を計測して制御することでアルギン酸のカプセル粒子の粒径を揃えるカプセル粒子粒径選別機構と、細胞を含むカプセル粒子と細胞を含まないカプセル粒子とを判別して選択的に細胞を含むカプセル粒子を回収する細胞・カプセル粒子回収機構とを備え、

(c) 前記第3の装置が、対象細胞を含む細胞または対象細胞を含有するカプセル粒子の試料液を流す流路を備え、前記流路が、細胞またはカプセル粒子を1列に配置して下流に流すための両脇からのシース液と合流する合流領域と、該1列に並んだ細胞またはカプセル粒子の検出および前記対象細胞の選別が行われる検出・選別領域と、イオン電流を印加して細胞または細胞を含むカプセル粒子を移動させて前記合流領域に続く分岐した流路に選択的に移動させることで標的となる細胞を回収する流路の組み合わせと、イオン電流を印加するイオン電流印加ツールとを含む、画像検出型1細胞分離・精製部（以下、「セルソーティング部」とも記載する）を有するモジュールであって、前記合流領域にて、細胞の流速を判定する光学的ツールと、光学的に得られた細胞の流速に基づいて補正された細胞の像から特徴を取得して解析する解析ツールとを備える場合がある。

[0027] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、

前記第3の装置が、対象細胞またはカプセル粒子を含む試料液を流す流路を備え、該流路が、前記細胞またはカプセル粒子を1列に配置して下流に流すための両脇からのシース液と合流する合流領域と、前記1列に並んだ細胞またはカプセル粒子の検出が行われる観察領域とを有する画像検出型1細胞分離・精製部を有するモジュールであって、

2つ以上の異なる波長の光を照射する照射領域における照射時間を撮影カメラの撮影時間インターバルより短い時間でそれぞれ異なる時間長さに発光するように時間制御できる光源と、該光源からの光を該照射領域に照射するコンデンサー光学系と、得られた2つ以上の異なる波長の画像を波長の違いによって分割し、それぞれの波長の画像として取得する画像取得カメラ機構と、得られた2つ以上の波長の画像の細胞の流れ方向での長さや光源の照射時間の差の比較から細胞の流速を取得する細胞流速取得機構と、この取得した細胞の流速から、得られた細胞の形状情報を補正する細胞形状補正機構と、光学的に得られた細胞の流速に基づいて補正された細胞の形状から細胞の特徴を取得して解析する細胞解析ツールと、得られた流速から「光源のフラッシュ時間＝画像を取得するカメラの画素サイズ／得られた細胞の流速」の関係で光源のフラッシュ時間を制御することで画像ブレを抑える画像ブレ抑制機構とを備える場合がある。

[0028] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、

前記第3の装置が、前記観察領域の下流に、イオン電流を印加して細胞またはカプセル粒子を移動させて前記合流領域に続く分岐した流路に選択的に移動させることで標的となる細胞または標的となる細胞を含有するカプセル粒子を回収する流路の組み合わせとイオン電流を印加するイオン電流印加ツールとを含む画像検出型1細胞分離・精製部を有するモジュールであって、

前記合流領域において、前記細胞流速取得機構によって取得した流速に基づいて、回収する細胞またはカプセル粒子にイオン電流を印加するタイミングを制御する印加タイミング制御ツールとを備える場合がある。

- [0029] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、前記光源および観察像に蛍光を用いる場合がある。
- [0030] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、対象細胞またはカプセル粒子を含む試料液を流す流路を備え、前記流路が、前記細胞を1列に配置して下流に流すための両脇からのシース液と合流する合流領域と、前記1列に並んだ細胞またはカプセル粒子の検出が行われる観察領域とを有する画像検出型1細胞分離・精製部を有するモジュールであって、
細胞またはカプセル粒子を観察するための光を連続照射して照射領域に照射するコンデンサー光学系と、得られた画像を結像する画像取得面上に、細胞またはカプセル粒子の流れに沿って配置された流速測定用1次元フォトセンサーアレイと、その最下端に細胞の流れに直交する向きに流路幅をカバーして細胞像をすべて取得できる長さの細胞画像取得用1次元フォトセンサーアレイを有し、測定された流速測定用1次元フォトセンサーアレイの細胞像の移動速度情報から流速を算定し、この速度情報とデータ取得時間を組み合わせて細胞画像取得用1次元フォトセンサーアレイの情報から2次元の画像情報を再構成する画像再構成機構を備える場合がある。
- [0031] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、前記観察領域の下流に、イオン電流を印加して細胞またはカプセル粒子を移動させて前記合流領域に続く分岐した流路に選択的に移動させることで標的となる細胞または標的となる細胞を含有するカプセル粒子を回収する流路の組み合わせとイオン電流を印加するイオン電流印加ツールとを含む画像検出型1細胞分離・精製部を有するモジュールであって、
前記合流領域において、前記流速の算定によって取得した流速に基づいて、回収する細胞またはカプセル粒子にイオン電流を印加するタイミングを制御する印加タイミング制御尾ツールを備える場合がある。
- [0032] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、前記光源および観察像に蛍光を用いる場合がある。

- [0033] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、前記画像取得面上に、前記細胞画像取得用1次元フォトセンサーアレイに加えて、1つ以上の別の異なる高さにて平行に配置し配列することで異なる結像高さの画像を同時に取得できる画像ボケ抑制機構を有する場合がある。
- [0034] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、前記光源の波長を複数にし、かつ、前記細胞画像取得用1次元フォトセンサーアレイに加えて前記画像取得面上に複数の細胞画像取得用1次元フォトセンサーアレイを配置して、それぞれの1次元フォトセンサーアレイの上に特定の波長の光のみを透過するバンドパスフィルターを配置して、複数の異なる波長域の画像を同時に取得できる画像分割機構1を有する場合がある。
- [0035] 本開示の細胞分析装置システムにおいて、
前記第3の装置が、前記光源の波長を複数にし、また、得られた流れに直交する帯状の領域の線状の光を波長スペクトルとして分離する波長スペクトル分離機構と、これを前記画像取得面上で、各波長スペクトルの位置に細胞画像取得用1次元フォトセンサーアレイをそれぞれ配置することで複数の異なる波長域の画像を同時に取得できる画像分割機構2を有する場合がある。
- [0036] また、本開示は、前記細胞分析装置システムを用いて、溶液中の細胞または微粒子の形状の全量でのサイズ、周囲長、及び／又は内部の微細構造の粒子量割合の分布を測定し、該分布の変化から異常の有無を判定する細胞分析方法を提供する。
- [0037] さらに本開示は、以下を提供する。
(項目A1) 被験者由来の細胞を分析する方法であって、前記方法は以下の工程：
a) 前記細胞の画像を取得するステップと、
b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成するステップと、
c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成するステップと

- 、
- d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析するステップと
- 、
- e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力するステップと、
- f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別するステップと
- を包含する、方法。

(項目 A 2) 被験者由来の細胞を分析する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムであって、前記方法は以下の工程：

- a) 前記コンピュータに、細胞の画像を取得させるステップと、
- b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、
- c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状のデータを生成させるステップと、
- d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、
- e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、
- f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップとを包含する、プログラム。

(項目 A 3) 被験者由来の細胞を分析する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムを格納する記録媒体であって、前記方法は以下の工程：

- a) 前記コンピュータに、細胞の画像を取得させるステップと、
- b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、
- c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状のデー

タを生成させるステップと、

d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、

e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、

f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップとを包含する、記録媒体。

(項目 A 4) 被験者由来の細胞を分析するシステムであって、

a) 前記細胞の画像を取得する手段と、

b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成する手段と、

c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状のデータを生成する手段と、

d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析する手段と、

e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力する手段と、

f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別する手段と

を包含する、システム。

(項目 B) 細胞の大きさ、細胞の形状、細胞が凝集体（クラスター）となっているかどうかという集団化の有無、集団サイズ（構成する細胞数と種類）、細胞内の核のサイズ、および多核細胞の有無からなる群より選択される、少なくとも 1 つの指標の、細胞分析のための使用。

(項目 C 1) ある細胞の明視野の細胞形状の画像と、該細胞中の蛍光画像とを、少なくとも 1 つの波長の画像として同時取得することを含む、該細胞が有核細胞および／または多核細胞であるかを判定する方法。

(項目 C 2) 細胞の形状や大きさ、細胞が塊となっている状態の有無、細胞塊となっているときの細胞集団の個数の概数などを取得することをさらに含む、項目 C 1 に記載の方法。

(項目 C 3) 核を特異的に染色する蛍光色素を用いることで細胞内部の核の

個数と核それぞれの面積を求めることをさらに含む、項目C 1またはC 2に記載の方法。

(項目C 4) 得られた細胞クラスターの細胞の核の蛍光の情報から、多核細胞を同定することにより、がん細胞の存在を同定することをさらに含む、項目C 1～3に記載の方法。

(項目C 5) がんの診断法である項目C 4に記載の方法。

(項目D) 細胞が流れていないときの背景画像データを取得することと、細胞が流れているときの明視野像データを取得することと、

該明視野像データから該背景画像データを差し引くことにより細胞塊のみの像を抽出することと、

該抽出された像の境界線(細胞あるいは細胞塊の周囲線)の長さと同境界線で囲まれた領域の面積を取得することとを組み合わせ、細胞塊のデータを抽出することを含む、細胞塊の判別を行う方法。

(項目E 1) (1) 健常な血液中では存在しない細胞クラスター(塊)を血中がん細胞が存在すると同定する工程、

(2) 健常な血液中では存在しない多核細胞を血中がん細胞が存在すると同定する工程、

(3) 健常な血液中では存在しない巨大細胞を血中がん細胞が存在すると同定する工程、および

(4) 血中の白血球(血液から赤血球成分を除去したあとに残った細胞の全体)のサイズ分布図から健常者の特徴と異なる転移がん患者に特徴的なサイズ分布を持ったサイズ分布を持っている場合にがん細胞が存在すると同定する工程、

からなる群より選択される少なくとも1つの工程と、必要に応じて

(5) 蛍光強度計測で計測したがん細胞のバイオマーカー(たとえばEpCam抗体やK-ras抗体、サイトケラチン抗体など)のひとつあるいは複数に対する蛍光抗体の蛍光強度の存在と組み合わせた解析でがん細胞と同定する工程を含む、血中がん細胞を同定する方法。

(項目 E 2) 前記方法において、

(1) 細胞 (クラスター) の約 $150\mu\text{m}^2$ 以上の核の面積が取得画像から計測されること

(2) 細胞 (クラスター) の約 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積が取得画像から計測されること

(3) 細胞 (クラスター) の 3 つ以上の核の存在が取得画像から計測されること

のいずれか 1 つあるいは、上記 3 つの条件の AND での組み合わせ、すなわち (1) かつ (2)、あるいは、(1) かつ (3)、あるいは、(2) かつ (3) あるいは、(1) かつ (2) かつ (3) を、血中がん細胞の存在の判断基準として用いることを特徴とする、項目 E 2 に記載の方法。

(項目 E 3) 微小細胞用の PCR 解析技術などの遺伝子解析手段を組み合わせ、遺伝子変異の計測、あるいは再培養して細胞機能を評価することによって、最終的にがん細胞であるかどうか、また、がん細胞であった場合にはどのような特徴を持ったがん細胞であるかを最終的に同定することの少なくとも 1 つのことをさらに含む、項目 E 1 または E 2 に記載の方法。

(項目 F 1) 被験体由来の細胞を分析する方法であって、

(A) 被験体由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理する工程と、

(B) 処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製する工程と、

(C) 処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得する工程と

(D) 前記画像に対して上述の項目 A 1 の方法を実施する、判別工程と、を含む、方法。

(項目 F 2) 前記処理する工程は、候補となるサイズ領域の細胞を精製し、濃縮し、染色し、及び／又は洗浄することを含む、項目 F 1 に記載の方法。

(項目 F 3) 前記処理する工程は、前記細胞試料液中の細胞を選択的に連

続いてサイズ分画する、項目 F 1 または F 2 に記載の方法。

(項目 F 4) 前記カプセル粒子を作製する工程は、ゾル状態のアルギン酸と前記細胞とを含む溶液を、二価イオンを含む溶液中で混合させることで、細胞を含むアルギン酸のカプセル粒子を構築する、項目 F 1 ～ F 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 F 5) 前記カプセル粒子を作製する工程は、前記アルギン酸のカプセル粒子の粒径を揃え、細胞を含むカプセル粒子と細胞を含まないカプセル粒子とを判別して選択的に細胞を含むカプセル粒子を回収する、項目 F 1 ～ F 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 F 6) 前記回収が、細胞または細胞を含むカプセル粒子にイオン電流を印加することによって標的となる細胞または細胞を含むカプセル粒子を回収する、項目 F 5 に記載の方法。

(項目 F 7) 前記判別工程は、細胞の流速を光学的に判定し、光学的に得られた細胞の流速に基づいて補正された細胞の像から特徴を取得して解析する、項目 F 1 ～ F 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 F 8) 前記細胞試料液中の細胞の形状の全量でのサイズ、周囲長、及び／又は内部の微細構造の粒子量割合の分布を測定し、当該分布の変化から異常の有無を判定するための、項目 F 1 ～ F 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 F 9) 被験体由来の細胞試料中の異常細胞を分離・同定するための、項目 F 1 ～ F 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 G 1) 被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する方法であって、

(A) 被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理する工程と、

(B) 処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製する工程と、

(C) 前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する工程であって、前記判別は、

- a) 処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得するステップと、
 - b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成するステップと、
 - c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成するステップと、
 - d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析するステップと、
 - e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力するステップと、
 - f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別するステップと
- を含む、工程と、
- を含む、方法。

(項目 G 2) 前記処理する工程は、候補となるサイズ領域の細胞を精製し、濃縮し、染色し、及び／又は洗浄することを含む、項目 G 1 に記載の方法。

(項目 G 3) 前記処理する工程は、前記細胞試料液中の細胞を選択的に連続してサイズ分画する、項目 G 1 または G 2 に記載の方法。

(項目 G 4) 前記カプセル粒子を作製する工程は、ゾル状態のアルギン酸と前記細胞とを含む溶液を、二価イオンを含む溶液中で混合させることで、細胞を含むアルギン酸のカプセル粒子を構築する、項目 G 1 ～ G 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 G 5) 前記カプセル粒子を作製する工程は、前記アルギン酸のカプセル粒子の粒径を揃え、細胞を含むカプセル粒子と細胞を含まないカプセル粒子とを判別して選択的に細胞を含むカプセル粒子を回収する、項目 G 1 ～ G 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 G 6) 前記回収が、細胞または細胞を含むカプセル粒子にイオン電流を印加することによって標的となる細胞または細胞を含むカプセル粒子を

回収する、項目 G 5 に記載の方法。

(項目 G 7) 前記判別する工程は、細胞の流速を光学的に判定し、光学的に得られた細胞の流速に基づいて補正された細胞の像から特徴を取得して解析する、項目 G 1 ～ G 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 G 8) 被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムであって、前記方法は以下の工程：

(A) 前記コンピュータに、被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理させる工程と、

(B) 前記コンピュータに、処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製させる工程と、

(C) 前記コンピュータに、前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定させる工程であって、前記判別は、

a) 前記コンピュータに、処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得させるステップと、

b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、

c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成させるステップと、

d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、

e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、

f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップと

を含む、工程と、

を含む、プログラム。

(項目 G 9) 被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する方法の

処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムを格納する記録媒体であって、前記方法は以下の工程：

（Ａ）前記コンピュータに、被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理させる工程と、

（Ｂ）前記コンピュータに、処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製させる工程と、

（Ｃ）前記コンピュータに、前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定させる工程であって、前記判別は、

a) 前記コンピュータに、処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得させるステップと、

b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、

c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成させるステップと、

d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、

e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、

f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップと

を含む、工程と、

を含む、記録媒体。

（項目 G 1 0） 被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定するシステムであって、

（Ａ）被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理する手段と、

（Ｂ）処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製する手段と、

（Ｃ）前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する手段であ

って、前記判別は、

a) 処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得する手段と、

b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成する手段と、

c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成する手段と、

d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析する手段と、

e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力する手段と、

f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別する手段と

を含む、手段と、

を含む、システム。

発明の効果

[0038] 本開示により、被験体由来の細胞試料中の異常細胞を分離・同定することができる。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]本開示の細胞分析装置システムを用いて行われる細胞分析について、細胞分析装置のシステムが行う画像を基準とした細胞選別技術の概要の一例を概念的に示す模式図ならびに写真である。

[図2]本開示の細胞分析装置システムを用いて行われる細胞分析の全体のプロセス、ならびに個々の工程に対応する装置内の手段の一例を概念的に示す模式図である。

[図3]図2における本開示の細胞分析装置システムの全体構成の1例を模式的に示す図である。

[図4]図3における細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュールの構成の1例を模式的に示す図である。

[図5]図3における細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュールの構成の別の1例（ピラーアレイ方式）を模式的に示す図である。

[図6]図3における細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュールの構成の別の1例（ピラーアレイ方式）の動作原理を模式的に示す図である。

[図7]図3における細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュールで用いる微細加工技術の1例を模式的に示す図である。

[図8]図3における細胞・細胞塊カプセル化部モジュールの構成を模式的に示す図である。

[図9]図3における画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールの構成の1例を模式的に示す図である。

[図10]図3における画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールの構成の別の1例を模式的に示す図である。

[図11]図9における画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールの構成要素の組み合わせの1例を模式的に示す図である。

[図12]図10における画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールの構成要素の組み合わせの別の1例を模式的に示す図である。

[図13]高速明視野顕微鏡画像取得と高速蛍光顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の構成の一例を模式的に示した図である。

[図14]蛍光強度計測と高速明視野顕微鏡画像取得と高速蛍光顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の構成の一例を模式的に示した図である。

[図15]蛍光強度計測と高速明視野顕微鏡画像取得と高速蛍光顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の光学モジュール部分の構成の別の一例の外観を模式的に示した図である。

[図16]本開示における画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールのチップ構成の1例を模式的に示す図である。

[図17]画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおける高速フラッシュ光源の発光タイミングと電子シャッターの関係の1例を模式的に示す図である。

[図18]画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおける画像ボケを防ぐための光学系の構成の1例を模式的に示す図である。

[図19]画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおけるラインセンサーセットを用いた連続高速画像取得システムの構成の1例を模式的に示した図である。

[図20]画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおけるラインセンサーセットを用いた連続高速画像取得システムにおいて複数の結像面の像を同時取得するラインセンサーアレイセットの構成、および多色蛍光の同時取得をするラインセンサーアレイセットの構成の1例を模式的に示した図である。

[図21]高速明視野顕微鏡画像と高速蛍光顕微鏡画像を同時に取得した後の画像処理のプロセスを説明した図と、高速明視野顕微鏡画像と核蛍光染色した高速蛍光顕微鏡画像を同時に取得した画像の例を示した写真である。

発明を実施するための形態

[0040] 本開示の実施形態は細胞分析装置システム、および、該細胞分析装置システムをもいいた細胞分析方法である。これらの好ましい実施形態について図面の説明に併せて実施例の説明と共に以下に説明する。

[0041] なお、本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。ここに記述される実施例は本開示の実施形態を例示するものであり、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

[0042] <1. 細胞分析装置のシステムが行う細胞選別技術の概念の概要>

図1は、本開示の細胞分析装置システムを用いて行われる細胞分析について、細胞分析装置のシステムが行う画像を基準とした細胞選別技術の概念の概要の一例を概念的に示す図である。

[0043] 図1Aは、本開示において、実際にシステムが取得した細胞像101に対して、この取得画像自体から直接、詳細な細胞を分析するための指標（すなわちイメージングバイオマーカー）として用いることを説明している。ここで指標となるのは、まず明視野顕微鏡観察で判別できる情報である細胞の大きさや形状の特徴だけでなく、細胞が凝集体（クラスター）となっているかど

うかという集団化の有無と集団サイズ（構成する細胞数と種類）などの情報がある。そして核染色などによって蛍光顕微鏡観察で判別できる情報である細胞内の核のサイズや多核細胞となっているかどうかという情報がある。特に、細胞の形状やクラスター化の情報については、従来の光散乱計測や光吸収、あるいは電氣的インピーダンスの変化の解析技術などでは得ることは難しく画像を取得してこれを解析する技術が必要である。

[0044] 図1Bは、上記図1Aの説明で述べた手法を実現するため、本開示の細胞分析装置システムを用いて行われる細胞分析について説明をした図である。対物レンズを通して得られた入力画像100は複数の波長の光の情報が重ね合わされた細胞101のデータとなっているが、波長を分離する手段を経ることによって、たとえば明視野の出力画像110と、蛍光標識された核の蛍光像からなる出力画像120を同時に取得することができる。そのため、細胞像101は、同じ拡大率で同時に各光波長に分解され、たとえば明視野の細胞形状の画像111と細胞中の蛍光染色された核成分の蛍光画像121を同時にそれぞれの波長の画像として同時に取得されることで、これらを同じ並行した2つの2次元相対座標軸 x_1-y_1 と x_2-y_2 上の座標として比較することが可能となり、蛍光を持った核成分121の位置が、細胞111のどの位置に該当するかを推定することが可能である。この機能を用いることで、たとえば明視野像で得られた細胞像111が有核細胞であるかどうか、あるいは多核細胞であるかを明らかにすることが可能である。また、明視野画像111では、細胞の形状や大きさ、細胞が塊となっている状態の有無、細胞塊となっているときの細胞集団の個数の概数などを取得することができる。また、蛍光画像121では、たとえば核を特異的に染色する蛍光色素を用いることで細胞内部の核の個数と核それぞれの面積などを取得することができる。

[0045] 図1Cから図1Eは、高速明視野顕微鏡画像と核蛍光染色した高速蛍光顕微鏡画像とを1つの超高速カメラ受光面を分割して同時に取得した2枚の画像の例を示した顕微鏡写真である。上記、図1Bにて述べたように、本開示では予め2つの画像の相対座標を一致させておくことで、蛍光像によって同定で

きる核の位置について、明視野像の細胞像あるいは細胞クラスター像の中のどの部位に核が分布しているかを、互いの相対座標を用いて照らし合わせることができる。この相対座標の照らし合わせによって、たとえば図1Cの顕微鏡写真に示したように、明視野像と蛍光像を同時に取得することができ、健康者の正常細胞では、滑らかな細胞表面と正常なサイズの細胞中で、1つの核が正常な断面積サイズを示す蛍光で光っていることがわかる。他方、がん細胞では、多核化がひとつのがん細胞の指標であるが、図1Dの写真で示したように、相対座標の照らし合わせによって、左写真の明視野像では正常細胞と同様な形状およびサイズである孤立1細胞中で、分裂した2つの核が光っていることがわかる。また、正常な血液中では存在しないが、図1Eの写真で示したように、がん転移症例の血液では、細胞クラスターと、そのクラスター中での各細胞の核の蛍光によって、クラスター内での複数の核の蛍光が観察され、このような複数の核の蛍光からクラスターであることがわかる。またこのような細胞がクラスター形状を取っていることの判別はこの写真からもわかるように画像取得からの解析であれば容易に判断できるが、従来技術である光散乱やインピーダンス計測手法などでは、大きさが違うという情報が得られても、これが細胞サイズの違いであるのか、複数の細胞が凝集した細胞塊であるのかの判別は難しい。さらに、同時に明視野像と蛍光像を同じ画像から波長分離して取得することによって、空間情報に基づいた核と細胞の位置関係を比較できることも画像をベースにした解析法の特徴である。取得した画像について流れ方向 y_1 、 y_2 ともに正確な細胞の体積（ここでは2次元に射影された面積）を求めるために、画像として取得した画像について流れ方向での長さを変換することで流れ方向（ y_1, y_2 ）、流れに垂直な方向（ x_1, x_2 ）の長さが等しくなるように変換して、正確な2次元像を取得する。

[0046] また、本開示では、たとえば図1Eの細胞クラスターの明視野像から、あらかじめ細胞が流れていないときに取得した背景画像データを画像処理によって差し引くことで、細胞あるいは細胞塊の像のみを抽出する手順と、その抽出された像の境界線（細胞あるいは細胞塊の周囲線）の長さや境界線で囲ま

れた領域の面積を取得する手段とを組み合わせ、明視野像だけを用いても細胞塊の判別が可能である。これは観察領域が同じところで定点観察している連続画像に細胞が流れてくるというセルソーターの特徴を効果的に利用したものである。ここでは背景像と同じ像となる画素はすべて引き算によってゼロとなるため、背景像と異なる細胞の画像の各画素のデータのみが自動的に抽出されることとなり、従来の溶液中の細胞と溶液との境界線を複雑なコントラスト比較によって相対的に求めるような手法は必要なく、画素のデータがゼロとならない境界線の2次元座標から容易に取得された細胞あるいは細胞塊の境界線の実測周囲長 L と、また、あわせてこの境界線で囲まれた細胞の領域全体の実測面積 S を、前者は境界線の画素数の計数によって、後者は境界線内の領域の全画素数の計数によってそれぞれ求めることができる。また、細胞塊の判別の手順は、たとえば次のような手順で行う。実測面積 S から、まず、この面積 S を細胞が半径 R の真球であったときの射影像として仮定した仮想半径 R を求める。 R は画像から実測した断面積 S から $R = (S/\pi)^{1/2}$ で求めることができ、次に、このときの円換算での仮想周囲長 L_0 を $L_0 = 2\pi R = 2(\pi S)^{1/2}$ によって求める。実測した周囲長 L と仮想周囲長 L_0 の比を D としたとき、 $D = L/L_0$ が1であれば細胞は真球であることとなり、細胞あるいは細胞塊の形状が真球からずれるほど周囲長 L は長くなることから D が大きくなる。これに計測した細胞あるいは細胞塊の実測面積 S によって1細胞より大きなサイズとなっているかどうかを併せて確認をして、その結果が共に満たした場合に、細胞クラスターであるという判定をすることができる。すなわちたとえば「 $(D > 1.1)$ かつ $(S > 800 \mu\text{m}^2)$ 」という指標を用いることで細胞クラスターであることを、蛍光像を用いなくても明視野像だけを用いても判定可能である。

[0047] 同様に、本開示では、たとえば図1C、図1D、および図1Eの細胞クラスターの蛍光像から、あらかじめ細胞が流れていないときに取得した背景画像データを画像処理によって差し引くことで、細胞あるいは細胞塊の像のみを抽出する手順と、その抽出された像の境界線（細胞あるいは細胞塊の周囲線）の長さ（周囲長）と境界線で囲まれた領域の面積を取得する手段とを組み合わせ、た

例えば核を蛍光染色した場合であれば、核の個数、サイズを簡単に計数することが可能である。これも上に述べた明視野像の場合と同様に観察領域が同じところで定点観察している連続画像に細胞が流れてくるというセルソーターの特徴を効果的に利用したものである。ここでも同様に背景像と同じ像となる画素はすべて引き算によってすべてゼロとなるため、背景像と異なるゼロとならない画素部分のみが細胞の画像の各画素のデータとして自動的に抽出されることとなり、画素のデータがゼロとならない境界線の2次元座標から容易に取得された細胞あるいは細胞塊の境界線の実測周囲長 L と、また、あわせてこの境界線で囲まれた細胞の領域全体の実測面積 S を、前者は境界線の画素数の計数によって、後者は境界線内の領域の全画素数の計数によってそれぞれ求めることができる。また、ここでは1細胞あるいは1細胞塊が1つの取得画像に入るように細胞あるいは細胞塊を流れの中心に間隔を持って1列に直列させたかたちで流れるようにしたため、明視野像では1画面に1細胞あるいは1細胞塊となっていたが、蛍光像では複数の核が観察されることとなる。そのため、蛍光観察では複数の独立した領域（核）とそれら各々の境界線（周囲線）を取得することとなる。それぞれの核について、これらが正常な核であるかを明視野像のときと同様な手順で各々の領域（核）の周囲長と断面積との比較解析から判断する。核サイズの判別の手順は、たとえば次のような手順で行う。実測面積 S から、まず、この面積 S を細胞が半径 R の真球であったときの射影像として仮定した仮想半径 R を求める。 R は画像から実測した断面積 S から $R=(S/\pi)^{1/2}$ で求めることができ、次に、このときの円換算での仮想周囲長 L_0 を $L_0=2\pi R=2(\pi S)^{1/2}$ によって求める。

[0048] 実測した周囲長 L と仮想周囲長 L_0 の比を D としたとき、 $D=L/L_0$ が1であれば核は真球であることとなり、形状が真球からずれるほど周囲長 L は長くなることから D が大きくなる。したがって $D>1.2$ を超えた場合には、核の状態が異常であるという判断をすることが可能である。また、核の個数については、各蛍光の面積を算出するとともに、それぞれの核とみなされる面積の重心を合わせて取得して、それぞれの核の重心の位置が $3\mu\text{m}$ 以上離れている時、個別の

核と判断することができる。

[0049] また、図1FからHに、本開示の装置で計測したときの血液から赤血球成分を除去した後の白血球成分（赤血球を除いた残りの血液中の細胞の全体）の細胞の明視野顕微鏡で観察した場合の面積のサイズ分布図の例を模式的に示す。図1Fは、健常者の血液のサイズ分布を模式的に示したものであるが正常な1細胞ごとに孤立した状況で流れており、その分布140は $50\mu\text{m}^2$ から $100\mu\text{m}^2$ のサイズ領域に1つの細胞数ピーク141を持つ分布となっている。これは細胞サイズとして直径 $10\mu\text{m}$ 程度のものが該当する。図1Gは、転移がんを発症している患者の血液の白血球成分のサイズ分布を模式的に示したものである。この分布142は健常者の血液の分布140では見られなかった第2のピーク144が一旦、 $100\mu\text{m}^2$ から $150\mu\text{m}^2$ の領域に極小値143があったのちに $150\mu\text{m}^2$ から $200\mu\text{m}^2$ の領域に発生する。これは細胞サイズに換算して直径 $16\mu\text{m}$ 程度のものが該当する。また併せて特徴的なものとして $300\mu\text{m}^2$ を超えるサイズ領域のもの（矢印145）が発生する。これらの存在は図1Hに示したように血液中の白血球成分の分布（140あるいは142）の違いを微分した結果となる増減からより容易に求めることができる。このグラフを用いれば、細胞サイズが $150\mu\text{m}^2$ を超えたところで増加する場合（矢印143）があれば転移がん患者の血液であることを推定することができる。

[0050] 具体的には、たとえば転移がんモデル（コペンハーゲンラット）の血液サンプルの処方前から化学療法が完了するまでの血中の細胞サイズ分布の変化を図1Iから図1Kに示す。化学療法を開始する前の転移がんモデルの血液のサイズ分布は図1Iのような分布を持っており、細胞サイズ $150\mu\text{m}^2$ から $200\mu\text{m}^2$ の領域に明確な第2のサイズのピーク（矢印144）が存在し、また、細胞サイズが $300\mu\text{m}^2$ を超えるものも多数存在している（矢印145）。この後、化学療法薬（ドセタキセル水和物）を処方して112日目の血液サンプルの細胞サイズ分布の図1Jを見ると、処方開始前の図1Iでは存在していた細胞サイズ $150\mu\text{m}^2$ から $200\mu\text{m}^2$ の領域の明確な第2のサイズのピークが消失し、また、細胞サイズが $300\mu\text{m}^2$ を超えるものの数も減少が見られる。そして、化学療法

開始 161 日目には、転移がんはモデルから消失し、また、図 1 K の細胞サイズの分布図からもわかるように、細胞サイズ $150\ \mu\text{m}^2$ から $200\ \mu\text{m}^2$ の領域に明確な第 2 のサイズのピークが完全に消失し、また、細胞サイズが $300\ \mu\text{m}^2$ を超えるものも消失している。また、図 1 L は、健常なモデルの血液の細胞サイズ分布である。健常なモデルの血液のサイズ分布は、上記、図 1 K の治療成功した転移がんモデルと同様に、細胞サイズ $150\ \mu\text{m}^2$ から $200\ \mu\text{m}^2$ の領域に明確な第 2 のサイズのピークは存在せず、また、細胞サイズが $300\ \mu\text{m}^2$ を超えるものも存在しない。

[0051] また、図 1 M は感染症に罹患した動物モデル（コペンハーゲンラット）の血液の細胞サイズ分布である。感染症にかかった場合には、細胞サイズ $150\ \mu\text{m}^2$ から $200\ \mu\text{m}^2$ の領域に小さな第 2 のサイズのピークが発生するが、細胞サイズが $300\ \mu\text{m}^2$ を超えるものの顕著な増大は確認できない。このように細胞サイズ $150\ \mu\text{m}^2$ から $200\ \mu\text{m}^2$ の領域の明確な増大と細胞サイズが $300\ \mu\text{m}^2$ を超えるものの顕著な増大の有無の違いから、血液の診断において、転移がん、感染症の感染を識別して判断することが可能であることを示している。

[0052] このようにして本開示の装置システムの画像解析判別の手段を用いて（１）健常な血液中では存在しない細胞クラスター（塊）を血中がん細胞候補として同定する手法、（２）健常な血液中では存在しない多核細胞を血中がん細胞候補として同定して選択的に回収する手法、（３）健常な血液中では存在しない巨大細胞を血中がん細胞候補として同定して選択的に回収する方法、（４）血中の白血球（血液から赤血球成分を除去したあとに残った細胞の全体）のサイズ分布図から健常者の特徴と異なる転移がん患者に特徴的なサイズ分布を持ったサイズ分布を持っていることを判定する手法ならびに特徴的なサイズ分布領域の細胞を選択的に回収する方法、（５）上記（１）（２）（３）あるいは（４）に加えて蛍光強度計測で計測したガン細胞のバイオマーカー（たとえば EpCam 抗体や K-ras 抗体、サイトケラチン抗体など）の 1 つあるいは複数に対する抗体に蛍光を標識した蛍光標識抗体の存在を表す蛍光強度の検出と組み合わせた解析でがん細胞と同定して選択的に回収する手

法、によって血液中に転移がんが存在するかを確認し、また、血中がん細胞を、従来の分子バイオマーカーではなく、「細胞の形状や集団化状態、あるいは多核化などの内部構造などの画像イメージ」という新しいバイオマーカーで同定して選択回収することが可能となる。また、上記手法で回収した血中がん細胞候補は、引き続き、上記、微小細胞用のPCR解析技術などの遺伝子解析手段を組み合わせることで遺伝子変異の計測を行ったり、あるいは再培養して細胞機能を評価することによって、最終的にがん細胞であるかどうか、また、がん細胞であった場合にはどのような特徴を持ったがん細胞であるかを最終的に同定することが可能である。

[0053] (1) については、明視野像による細胞像の $D > 1.1$ および $S > 800 \mu\text{m}^2$ による評価、あるいは、明視野像によるサイズと蛍光像による核の数と分布（すなわち隣接する複数の核の像について、その重心の距離が互いに $3 \mu\text{m}$ 以上離れている事）および核の $D > 1.3$ による評価によって判別することができる。（2）については、明視野像によって $D < 1.1$ で $S < 800 \mu\text{m}^2$ 、かつ、核の数と分布（すなわち隣接する複数の核の像について、その重心間の距離が互いに $3 \mu\text{m}$ 以内で離れている事）および核の $D < 1.3$ による評価によって判別することができる。（3）については、明視野像によって、 $D < 1.1$ かつ、細胞サイズが $S > 800 \mu\text{m}^2$ によって判別できる。（4）については、図1Fから図1Mで説明したように、細胞サイズ $150 \mu\text{m}^2$ から $200 \mu\text{m}^2$ の領域に明確な第2のサイズのピーク（矢印144）が存在し、また、細胞サイズが $300 \mu\text{m}^2$ を超えるものが多数存在していることによって判別できる。この条件については、上記（1）から（3）の条件と異なり、細胞サイズ分布のヒストグラムを取得するのに必要な細胞数分の血液中の白血球細胞の全量のデータ取得が必要であり、これは最低5000個の白血球細胞が必要である。また、特に、上記（1）から（4）を組み合わせ、1つ以上の合致条件があったものをがん細胞として判定することができる。

[0054] < 2. 典型的な実施形態の概要（装置の概要） >

図1にて説明した画像データを基盤とした細胞判別を行うために、本開示

の細胞分析装置システムは、概して、図2に模式的に示したように以下の3つの要素からなる。すなわち、

(1) 細胞の濃縮、細胞のサイズ分画、蛍光抗体標識（あるいは再培養を行う場合は必要に応じてアプタマー等の可逆蛍光標識マーカー）での染色、洗浄を含むプロセスを連続で行う細胞濃縮・染色・洗浄部と、1細胞あるいは1細胞塊単位でカプセル化を行う細胞・細胞塊カプセル化部からなる細胞前処理部と、

(2) チップ基板上に形成したマイクロ流路を流れる細胞から、細胞像の画像データを高速に取得して、その画像情報の分析結果に基づいて細胞の種類の数量的分布解析を行い、また、リアルタイムで高速に細胞を分離精製する画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）と、

(3) 上記各部の動作を制御し、上記解析を行うための制御解析部を備える。

[0055] また、分画された細胞を1細胞単位で解析するために、これらの後段に

(4) 1細胞あるいは1細胞塊レベルでの細胞内状態を計測する遺伝子解析・発現解析部と、

(5) 精製した細胞あるいは細胞塊を、コンタミネーションを防ぎながらそれぞれ個別に再培養するコンタミネーションフリー再培養部などを加えることができる。

[0056] 本開示の細胞分析装置システムの典型的な実施形態は、上記3つのモジュールのうち(1)～(2)を、上記の順序で連続して組み合わせたことを特徴とし、かつ、微小流路および微小容器によって連続して細胞が処理されるため、微量の細胞をコンタミネーションや操作による消失を最小限にすることができる。

[0057] この本開示の細胞分析装置システムを用いることによって、細胞の種類を判別するために明視野顕微鏡画像を用いて、その形状の特徴および2次元像から得られたサイズ（体積、体積の2次元像）、ならびに周囲長から、細胞を1細胞レベルで検出して確認し、細胞がクラスター化していない孤立1細胞

であるか、あるいはクラスター化した細胞集団であるかを確認し判定することができる。したがって、本開示の細胞分析装置システムによれば、従来の散乱光検出型セルソーター技術では識別できなかった指標に基づいて、細胞と凝集した細胞集団を識別して計数し、また選択的に分離・精製することができる。

[0058] また本開示の細胞分析装置システムを用いることによって、細胞の種類を判別するための核染色による細胞の蛍光標識の有無を1細胞レベルで検出して確認し、蛍光標識された細胞について、細胞がクラスター化していない孤立1細胞であることを確認し、また、多核細胞であるかどうかを確認し判定することができる。したがって、本開示の細胞分析装置システムによれば、従来の散乱光検出型セルソーター技術では識別できなかったイメージングに基づいた核の形状、サイズ、および各核の空間配置の状況という指標に基づいて細胞を判別して計数し、さらに分離・精製することができる。

[0059] また本開示の細胞分析装置システムを用いることによって、細胞の種類を判別するための蛍光標識抗体での細胞の蛍光標識の有無を1細胞レベルで検出して確認し、蛍光標識された細胞について、細胞がクラスター化していない孤立1細胞であることを確認し、さらに細胞でアポトーシスが発生しているかどうかを判定することができる。したがって、本開示の細胞分析装置システムによれば、従来の散乱光検出型セルソーター技術では識別できなかった指標に基づいて、細胞を分離・精製することができる。

[0060] 本開示の細胞分析装置システムによれば、正確に1細胞単位で特定の形状あるいは細胞塊、あるいは特定の領域が特定の形状で染色された細胞を判定して計数し、さらにこれらを選択回収し、また、回収する細胞のアポトーシス等の細胞状態を確認し、各細胞の蛍光情報および細胞状態の情報と併せて、遺伝子解析・発現解析装置を組み合わせれば、細胞の遺伝子情報、発現情報を解析することができる。

[0061] また本開示の細胞分析装置システムによれば、正確に1細胞あるいは1細胞塊の単位で特定の形状の特徴を持つもの、あるいは特定の領域が特定の形状

で染色された細胞を判定して計数し、この全数量に対する各指標に合致する細胞の数量の割合の分布を取得して解析することができる。

[0062] 上記で述べた機能を実現するための構成の概要を図2を用いて説明をする。ただし、図2に示した構成は、上記3つのモジュール(1)～(3)を組み合わせることによって構成された細胞分析装置システムが行う画像を基準とした細胞選別技術の構成の概要の一例を模式的に示したものである。また、これに(4)の遺伝子解析・発現解析部、あるいは(5)のコンタミネーションフリー再培養部を加える場合を示している。たとえば(1)のサイズ分画の構成のみを用いて、これを細胞サイズが $300\mu\text{m}^2$ を超えるものの回収に最適化させ、選択的に回収されたものを(4)の遺伝子変異解析に用いたり、あるいは(1)の細胞の前処理を行わず(2)の細胞像の画像データを高速に取得してその画像情報の分析結果に基づいて細胞の種類の数量的分布解析を行うことでの血中の異常細胞および異常な細胞クラスターの存在の確認を用いるという用法もある。

[0063] (1)から(5)のモジュールをこの順序で連続して組み合わせることによって構成された細胞分析装置システムの詳細の一例を以下に説明する。

[0064] まず(1)では、患者から採取した血液サンプルは細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部に導入される。ここで血液から細胞成分のみを濃縮し抽出する手順がなされる。ここでは、特に、赤血球成分とその他の成分を連続的に分離して、白血球成分(血液中の赤血球成分を除いた他の細胞の全量)を選択回収する。あるいは、特に白血球細胞塊を選択的に回収したい場合は、細胞サイズの閾値を体積換算で細胞サイズが $300\mu\text{m}^2$ を超えるものと設定することで、細胞クラスターのみをこの前処理段階で選択回収することもできる。その後、これに蛍光がんマーカーなどの蛍光標識剤を添加して、試料細胞と反応をさせた後、反応しなかった余剰の蛍光標識剤を洗浄除去する。

[0065] 次に1細胞あるいは1クラスター単位でアルギン酸カプセルに封入する細胞・細胞塊カプセル化部へと導入される。ここではアルギン酸ゲルカプセルに細胞を封入させることによって、その後の細胞への外界からのコンタミネ

ーションを防ぐことが可能となり、また、後段の細胞検出抽出部の画像検出型1細胞分離精製部（セルソーティング部）において、電気泳動力によって選択回収を行うときに、細胞の表面電荷に依存しないで、これら細胞を内包するアルギン酸カプセルの安定した一定の表面電荷によってカプセル内部の細胞への損傷を防ぎながら安定した選択回収を可能にする付加的な性能の改善を実現するものである。ただし、このアルギン酸カプセル化がなくても本装置での一連の画像検出型1細胞分離精製部（セルソーティング部）での作業は可能である。また、このときアルギン酸カプセルに粒径 $100\mu\text{m}$ 以下のサイズの鉄やマンガンなどの強磁性体微粒子を磁区構造を作らないサイズまで粉碎されたものを混ぜることによってアルギン酸カプセルが超常磁性体として磁場に吸引される機能を付加することができ、これによって選択的な回収を容易にすることができる。また、アルギン酸ゲルからなるアルギン酸カプセルの屈折率と同じ屈折率となるように調製された溶液を用いることによって溶液中のアルギン酸カプセルを擬似的に透明化させ、カプセル内の細胞の光学的顕微鏡観察を容易にすることができる。具体的には、たとえばアルギン酸カプセルの屈折率が1.4であるとき溶液にショ糖を40wt%加えることで同じ屈折率となり、上記、鉄ナノ粒子をアルギン酸カプセルに含有させることで浮力も調製することができる。

[0066] 次に、（2）の画像検出型1細胞分離精製部（セルソーティング部）では、2つの光学画像による指標での検出を行う。まず1細胞レベルでの明視野顕微鏡像によって細胞の外形状、細胞内部の細胞内オルガネラの形状、細胞内部の核と細胞質とのサイズの比、細胞塊の状況を確認する。併せて、明視野像で得られた細胞の位置に対応する座標における蛍光標識に基づいた蛍光の発光の有無とそれらの位置および大きさを確認する。これによって細胞が対象となる細胞かどうかを確認することができる。

[0067] この細胞検出機能は、細胞を画像として捕らえて評価する場合は流路分岐部分の上流に高速カメラで観測する部位を設け、必要に応じてその下流に細胞分離領域を設置する構造とする。画像によらず、流路を通過する細胞にレ

ーザーなどを照射し、細胞が横切るときの散乱光や細胞を蛍光で修飾している場合はその蛍光を光検出器で検出することもできる。この場合も、検出部の下流に細胞分離領域となる分離流路点を設置する構造とする。

[0068] この画像取得機構には、高速で流れる細胞の取得画像から正確な細胞および細胞クラスターの形状を再構成するために、各細胞の流速を同時に計測する機能が備わっており、この取得した細胞の流速の情報にあわせて細胞形状の情報を補正した正確な再構成された細胞形状情報を得て、この結果に基づいてたとえば図1で説明した細胞形状に基づいた細胞サイズや周囲長や内部構造などの指標によって判定を行う。

[0069] 細胞の流速を計測するには、具体的には、高速カメラを用いる場合には、たとえばある瞬間の細胞画像を同時に2つの異なる波長で異なる照射時間での明視野光源の画像として2波長画像分割光学系を経由して各々別の画像として高速カメラで同時取得して、その形状の違いから1回の画像取得によって細胞の移動速度を算出し、この結果に基づいて、たとえば周囲長および体積（の2次元射影像）を得る場合には、得られた細胞の輪郭形状のうち流れの下流側の先端部の境界線の流れの上流側に（移動速度×光源の照射時間）分の距離、平行移動させることで元の細胞の輪郭像および体積が正確に算出できる。画像取得については、2百分の1秒以下の時間分解能を持った高速カメラが用いられ、高速カメラのシャッター周期に合わせて、光源の発光が調整され、各シャッターが切られる周期期間のうちの一定の時間だけ光源の光を発光させる。例えば、シャッタースピードが1万分の1秒である場合は、その10分の1の期間だけ、LED光源あるいはパルスレーザー光源等の高速発光制御が可能な光源で対象となる細胞に光を照射することで、細胞の精細な形状を獲得することができる。これを基準に2つの波長の可視光源を同時に発光させる場合は、たとえば10万分の1秒と5万分の1秒の2つの照射時間を設定して照射時間の差から生まれる流れ方向での細胞の見かけの全長の違いから流速を算出する。

[0070] また、高速リニアセンサーを用いる場合には、流れ方向に配置したリニア

センサーにて検出された細胞の移動速度に基づいて、流れ方向に垂直に配置されたりニアセンサーで連続検出された細胞の断面データを流れ方向に再構成配置して取得することができる。

[0071] このようにして取得した高速カメラあるいは高速ニアセンサーで取得した画像を静止時と同じ形状情報として再構成して採取した画像をリアルタイムで分析することで、1) 細胞が、核を1つ持つ孤立細胞であるか、多核細胞であるか、無核細胞あるいは細胞分裂中の細胞であるか、あるいは他の細胞との細胞塊となっているかを判別し、また、2) 蛍光を発する細胞が健全な状態であるか、細胞の核と細胞形状が変形しているアポトーシス等の状態となっているかを判別し、目的に応じて、健全な細胞の回収、細胞塊の回収、多核細胞の回収、あるいは、アポトーシスを起こしている細胞の回収を行うことができる。

[0072] また、本開示では、細胞を判定し、さらに分離・精製するために、高速カメラで観察する領域の上流にて、細胞が流れている流路の中央に細胞あるいは細胞クラスターが直線状に配列するようにさせるため、細胞を含む溶液が流れてくる上流域で、その両脇から同速度の溶液を加えて流路幅を狭めて配列させる手段を用いる。さらに、観察する領域の下流にて、非対称な流路幅の2つに分岐する構造を持ち、細胞に対して外力を加えない場合は、中央を含む幅の広い分岐に細胞が流れ、外力を加えた場合には細胞の位置を中央から幅の狭い分岐側に移動させ、狭い分岐に細胞が流れることができるようにし、それに引き続いて、配列して流れてきた細胞のうち回収したい細胞のみに、さらに外力を加えて細胞の流れる位置を移動させることで、上記2つに分岐する流路のうち、この外力を加えたときのみ細胞が別の流路に導入される。ここで、具体的には外力としては、たとえば流路の外力を加えたい領域に組み込んだナトリウムイオンなどの電解質を含有した1対のゲル電極を利用することができる。ゲル電極を用いることによって大きなイオン電流が流れても、流路中で蒸着電極などに見られるような電気分解による気泡の発生や蒸着電極の消失は発生しないという利点を有する。またその他の外力とし

て低電圧あるいは誘電電気泳動力を用いるための交流電場を用いる場合には、蒸着電極を用いても良い。

[0073] また、上記の装置構成は、細胞を分離・精製を行うことを目的とした構成の一例を記述したものであり、細胞の判定を行うことを目的とした構成の場合は外力を与える手段および分岐した下流流路を持たない構成を用いる。

[0074] 回収した細胞は、それぞれの細胞の形態について別々に（４）の遺伝子解析、発現解析、あるいは（５）のコンタミネーションを防いだかたちで再培養ができるように次段の高速・微量対応の遺伝子解析・発現解析部に導入することができる。

[0075] また、この段階で識別し、精製された細胞については、アルギン酸カプセルに封入された細胞を用いる場合は、そのまま遺伝子解析・発現解析部に導入してコンタミネーションを防いで高速PCR解析などを行うことが可能である。また、再培養を行う場合も、精製された細胞単位で、コンタミネーションフリーにて再培養を行う容器までアルギン酸カプセルに入れたまま細胞を移動させ、その後、アルギン酸をゲル化させているカルシウム等の金属イオンをEDTA等の薬剤でキレートすることでアルギン酸カプセルを除去して再培養を行うことができる。

[0076] 本開示において検出対象として想定している細胞は、小さいものではバクテリア、大きいものでは血中を流れる転移がん細胞クラスターなどである。したがって、細胞サイズとしては典型的には直径で約 $0.5\mu\text{m}$ から約 $200\mu\text{m}$ 程度の範囲となる。細胞濃縮機能および細胞分離機能の両方を組み込んだ流路を基板の一面に形成して細胞濃縮および分離を連続して行う場合に、まず問題になるのが流路幅（断面形状）である。また、流路は基板表面の一つに基板の厚み方向で約 $10\sim 200\mu\text{m}$ の流路空間を使用したものが最も典型的なサイズとなる。

[0077] また、本開示では、試料液の流路内への導入圧力が、液の移動の駆動力となっているため、分岐した複数の導入流路および複数の排出流路の圧力がほぼ同じになるように構成することが望ましい。そのために、これらの入り口

、出口の重力に対する高さ方向の位置を同じ高さにしている。

[0078] また、本開示の細胞認識と分離のアルゴリズムに関しては次のような特徴がある。まず上記説明を行った手段によって細胞の流速を求め、細胞の形状を補正し再構成する。次に、補正された正しい細胞像の各画素を2値化し、その輝度重心を求める。2値化した細胞の輝度重心、面積、周囲長、長径、短径を求め、これらのパラメーターを用いて各細胞の画像を取得した順にナンバリングする。各細胞像をこの時点で画像として自動保存することも使用者にとって利益があるので自動保存を行えるようにする。

[0079] つぎに、細胞分離に使用する場合であるが、ナンバリングした細胞のうち、特定の細胞のみを分離しなくてはならない。分離の指標は上記説明をした輝度重心、細胞の面積、周囲長、長径、短径などの情報でもよいし、画像とは別に蛍光検出を行うことを併用して蛍光を利用した上記図1の説明で述べた情報を得てもよい。いずれにせよ、検出部で得た細胞をナンバリングに従い分離する。具体的には、上記、得られた細胞の移動速度（流速 v ）にあわせて、細胞を画像取得した検出部位置から外力を加える選別部までの距離を（ A ）、印加時間（ t ）によって、印加タイミングを（ A/v ）から（ $A/v+t$ ）までとすることでちょうど目的のナンバーの細胞が電極間に来た時に細胞を上記述べたように外力を加えて振り分けて分離する。

[0080] また、本開示において用いる上記（4）の高速での遺伝子解析・発現解析部での1細胞ゲノム解析・発現解析の手段については、上記目的を達成するために、例えば、使用する反応制御装置は、サンプル液の温度変化について、変化させたい複数の温度について、各温度が維持された熱容量の大きな液体を熱交換の媒体に用いて、この熱容量の大きな複数の異なる温度の液体を高速で変化させる手段と、この熱容量の大きな液体とサンプル液との熱交換が迅速に行われる微小反応槽と、それぞれの液体を交換する機構を備える。

[0081] また、遺伝子解析・発現解析部は、上記（1）の前処理部にてアルギン酸カプセルに細胞あるいは細胞塊を封入したままPCR反応を進めるときには、コンタミネーションフリーでアルギン酸カプセルに導入された細胞を、微量の

カプセル内の細胞単位で、画像検出型1細胞分離精製部の情報に基づいて同一の細胞と判別された細胞1細胞として、あるいは同一細胞の集団単位で遺伝子の同定、あるいは、発現の同定を行うことができる。

[0082] たとえば図1Lに示した実験結果より、健常な血液において約 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積を持つ細胞あるいは細胞塊（クラスター）は検出されなかったことより、医療診断を行う場合には $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積を持つ細胞あるいは細胞塊（クラスター）を画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）にて選別し、これを回収して、再培養、あるいは遺伝子変異検査、あるいは発現解析検査、によって、この細胞クラスターを同定する事で、血中に転移がん細胞が存在するか、あるいはがんではなく、肝臓、腎臓等の臓器が疾病によって損傷を受けたことによって発生する細胞塊であるのかを判定を進めることができる。あるいは、 $150\mu\text{m}^2$ 以上 $250\mu\text{m}^2$ 未満の面積を持つ細胞のピークが発生する場合は、 $150\mu\text{m}^2$ 以上 $250\mu\text{m}^2$ 未満の細胞を回収して、これらが感染症によって肥大化した白血球細胞であるのかを確認するとともに、感染症の場合は白血球中に取り込まれた異物の遺伝子から原因細菌の同定を含めて明らかにする診断装置として利用する事が可能である。特に、血中転移がんの検出については、各クラスター単位で、その遺伝子変異をより詳細に比較解析にて確認する事で、各クラスターが同一遺伝子変異物であった場合には、がんの進行程度が、原発性がんからの転移が開始した初期であることが推定され、また、各クラスターの変異の履歴が同一でありながら、多くの異なる変異点がそれぞれのクラスター間にある場合には、転移がんの所在が多数領域に及んでいる進行が進んでいる事が推定できる。

[0083] また転移がん患者の血液に対して、化学療法やホルモン療法を処置した後の効果を確認することも可能である。この手法は、図1Iから図1Kまでの化学療法に対する変化の経緯を参照すれば、化学療法を処方する前に、まず微量の患者血液を採取し、その細胞サイズ分布図を取得し、特に $150\mu\text{m}^2$ 以上 $250\mu\text{m}^2$ 未満の面積を持つ細胞のピークの存在と、 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積を持つ細胞あるいは細胞塊（クラスター）の存在の割合を記録する。次に化学療法を各

回処方したのちに、同様に微量の患者血液を採取し、その細胞サイズ分布図を取得し、特に $150\mu\text{m}^2$ 以上 $250\mu\text{m}^2$ 未満の面積を持つ細胞のピークの存在と、 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積を持つ細胞あるいは細胞塊（クラスター）の存在の割合を記録して、毎回、前回取得した試料との差を比較する。このとき両方の減少が確認できた場合は、化学療法が有効に機能していることが推定される。そこで投与量を抗がん機能が確認できる最小量まで減らすことで副作用を最小限に抑えながら薬効を最大化させることが可能となる。他方、減少が確認されなかった場合は、薬剤の許容最大量まで投与を試みて、その場合であっても効果がない場合は、別の抗がん剤あるいは別の手法への変更を判断することが推奨される。

[0084] また、転移がん患者の外科的手術後のがん残留の可能性の検査、ならびに再発の早期発見にも本手法を用いることができる。具体的には、外科的手術を行う前に、まず微量の患者血液を採取し、その細胞サイズ分布図を取得し、特に $150\mu\text{m}^2$ 以上 $250\mu\text{m}^2$ 未満の面積を持つ細胞のピークの存在と、 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積を持つ細胞あるいは細胞塊（クラスター）の存在の割合を記録する。次に外科的手術を終了したのちに、同様に微量の患者血液を採取し、その細胞サイズ分布図を取得し、特に $150\mu\text{m}^2$ 以上 $250\mu\text{m}^2$ 未満の面積を持つ細胞のピークの存在と、 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積を持つ細胞あるいは細胞塊（クラスター）の存在の有無を確認する。これらが存在する場合は、これらの細胞を回収して、これらの遺伝子検査を行うことで、転移がんの残留であるかどうかを確認する。存在しなかった場合も、たとえば半年に1回程度の周期で定期的に、血液を採取して、前回との差を比較して転移がんの再発の有無を確認することができる。

[0085] また、転移がん診断のみならず、血中を流れる細胞クラスターが肝臓組織片であると同定できる場合は、肝臓の疾患を推定することができ、また、同様に他の臓器切片と同定出来る場合には、それら各臓器の疾患であることが推定できる。

[0086] さらに、特にマクロファージ等の貪食性白血球について、サイズが通常よ

り肥大した細胞を回収し、その細胞中のバクテリア等の異種細胞の遺伝子を検査同定することによって、短時間での感染症診断も可能である。あるいは、B細胞の活性化によって内部形状が複雑化したもの、サイズが増大したものを選択的に回収し、そのB細胞が産生している抗体の遺伝子情報を次世代シーケンサー等で解析して抗原を明らかにする事で免疫系が何に反応しているのか診断を行うことも可能である。

[0087] <3. 上記図1で示した手順を実現する細胞分析装置システム1の全体像の一例>

図3は、上記図2で示した手順を実現する細胞分析装置システムの全体像の一例を示したものである。この例では、細胞分析装置システム301は、血液サンプル等の試料は、上から下に重力に合わせた方向に流れるように構成されており、血液サンプルを導入して細胞の前処理を行う細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュール310、細胞・細胞塊カプセル化部モジュール320、細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部モジュール330、精製された細胞の1細胞あるいは1細胞塊レベルでの細胞内状態を計測する遺伝子解析・発現解析部340、精製された細胞を再培養するコンタミネーションフリー再培養部モジュール350、およびシステム全体の動作を制御し、かつ、解析結果を分析する制御解析部モジュール（コンピュータ）360を備える。

以下に、図3で示した例における各モジュールの構成の一例を具体的に示す。

[0088] <4. 細胞の前処理を行う細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部の構成の一例>

[0089] 図4は、がん患者等の被験体由来の血液サンプルを導入して細胞の前処理を行う細胞濃縮・染色・洗浄部モジュール310の構成の一例を示したものである。図4Aの例において、細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄機構としての細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュール400は、シャーシ414の上に一体となって配置されており、モジュール内には、試料細胞サンプ

ル、染色剤、洗浄剤の各溶液を保持する容器またはリザーバ（４０１、４０２、４０３）があり、ここから回転アーム４１５に取り付けられた分注ヘッド４０４によって、溶液をターンテーブル４０５上に配置した濃縮チャンバー４０８に導入することができる。図４Ｂに示したように、濃縮チャンバー４０８は、底面に濃縮・脱色フィルター４０６が配置された底面に向けて傾斜を持った試料液体保持チャンバー４０７と合わせて濃縮チャンバー４０８となっている。

[0090] 濃縮チャンバー４０８には、まず血液などの試料細胞サンプルが導入され、圧力ポンプ４０９によって濃縮チャンバーの上面から気体で圧力を加えることによって液体成分を濃縮・脱色フィルター４０６を通じて下に置かれた廃液回収チューブ４１０に排出することによって、細胞の濃縮が行われる。次に、分注ヘッド４０４を使って、染色液が導入され、一定の時間反応させた後に、再度、圧力ポンプ４０９によって染色液は濃縮チャンバー４０８から排出される。次に、脱色剤を濃縮チャンバー４０８に導入することで、過剰な染色剤は洗浄されて排出される。その後、一般には洗浄剤を兼ねる希釈液を導入して、細胞を希望の濃度に希釈して、先端に回収チップ４１３を備えた回収ヘッド４１１を通じて、細胞を回収チューブ４１２に導入する構成となっている。この手法の利点は、目詰まりを起こす可能性のあるサイズの試料成分が少ない試料をメンブレンフィルターを効果的に利用することで効率的に分画、染色、洗浄できるところにある。

[0091] <５．細胞の前処理を行う細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部の構成の別の一例の構成>

[0092] 図５は、上記図４で示したようなメンブレンフィルターでの細胞精製を行った場合に頻繁に発生する目詰まりや細胞の圧壊が発生する可能性があるサイズ分布を持った試料の場合の、微細流路系を用いた細胞サイズ分画機能を持った細胞濃縮技術の一例である。図５Ａは、この濃縮技術を実現するための微細流路の構造５００の上面図である。流路の上流から、細胞を含まないバッファ液５０１を流路幅の $3/4$ 以上の領域を占めるように流し込み、残りの

流路幅 $1/4$ 以下の領域を占めるようにさまざまなサイズの細胞が混在する試料溶液 502 を流路 507 に流れ 506 の方向に流し込む。この流路 507 中には、この流路の両端を傾斜を持ってピラーアレイ 503 が上流から下流まで、最終出口である出口 508 の上流位置を除いて全域に配置されており、また、交流電場印加機構として、流路 506 の流れに直交する両側壁には一対の電極 504 が配置されており、流路 507 を流れ 506 の方向に流れる細胞に流れに直交する方向に交流電場を印加することで、細胞が正弦波状に揺れながら下流に流れるようにすることができる。流路 507 の下流では、2つの回収出口 508 と 509 が配置されており、上記ピラーアレイ 503 の隣接する柱間の距離（隙間）より大きな粒子は正弦波電場によって流路を下流に流れるときにピラーアレイに捕獲されて、階段状にひとつずつピラーを登ってゆき、最終的に出口 508 にて回収される。他方、ピラーアレイ 503 の隣接する柱間の距離（隙間）より小さな粒子は正弦波電場によって流路を下流に流れるときにもピラーアレイに捕獲されることなく、流路に入った時と同じ位置を中心に上下に振動しながら下流に流れるため、最終的に出口 509 にて回収される。ここで、下流出口 508 と 509 の流路幅は、それぞれ流路幅全体の $1/4$ 以下、 $3/4$ 以上とすることで、ピラーアレイ 503 の隣接する柱間の距離（隙間）より大きな粒子が回収される出口 508 に、ピラーアレイ 503 の隣接する柱間の距離（隙間）より小さな粒子が混入することを防ぐことができる。また、細胞に印加する交流電場の強さは、細胞の振動する振幅が隣接するピラーアレイの傾斜よりも大きく、かつ流路幅の $1/4$ 以下となるように設定するものとする。

[0093] 図 5 B は隣接するピラーアレイの配置の上面からの拡大図の一例を示したものである。円柱型のピラーを、その間隔を分画したい細胞サイズに設定して配置することで通過できる細胞のサイズを制御することができる。

[0094] 図 5 C はピラーアレイの空間配置の別の一例を示したものである。初期の上流側の傾斜を少なめにして下流側での傾斜を高くすることでより効率よく分画ができるようになっている。

[0095] 本技術は、メンブレンフィルターがメンブレンのポアサイズを超える細胞を捕獲して通過を妨げることによってサイズ分画をするという技術の仕様によって、メンブレンフィルター表面のポアがすべて埋められて枯渇したところでメンブレンフィルターの機能が消失する問題点を解決するために、ポアサイズを通過できなかった細胞を再度ポアから引き離して回収流路まで階段状に移動させながら誘導してポアが目詰まりを起こすことを防ぎながら連続して処理をすることを可能にしたものであり、特に微量の細胞クラスターを選択的に回収するなど、一定の閾値を超えるサイズの微量細胞を回収するときに特に効果的である。

[0096] また図5Dに示したように、異なる間隔を持った複数のピラーアレイを隣接する柱間の距離（隙間）が広いものから狭いものに段階的に配置することによって、複数の異なる複数のサイズ領域の細胞を同時に分離して回収することができる。大きなサイズの細胞を回収する下流出口508では、そのための柱間の距離を大きめに設定した1段目のピラーアレイ503が配置されており、これによってピラーアレイの間隔より大きな細胞あるいは細胞塊はすべて下流出口508に誘導される。次に、1段目のピラーアレイの間隔よりは小さく設定された2段目のピラーアレイ513によって、2段目のピラーアレイの柱間の間隔よりは大きくこれを通過できない中間のサイズの細胞を下流出口510に導くことができる。そしてこれらのいずれよりも小さな細胞はすべて下流出口509に導かれる。この例では上に述べた2種類の間隔のピラーアレイを組み合わせることで3種類の分画の例を示したが、同様に、より大きな柱間の間隔から小さな柱間の間隔へと順番に配置したピラーアレイをより多数並べることで、より細かく多くのサイズ分画を実現することができる。

[0097] <6. 細胞の前処理を行う細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部の別の一例の動作原理>

図6は、図5で示したピラーアレイによる回収方法の原理を模式的に示したものである。まず分画するための細胞を含む試料の溶液の流れ600は全

体の流路の上側の一部とし、下流の大きな細胞を回収する下流出口とは十分に間が空いている配置となっており、他方、細胞を含まない溶液の流れ601が流路の下側の大半を占めており、この領域内に、大きな細胞を回収する下流出口611が配置されている。ピラーアレイ602が試料溶液の流れ600に対して斜めに配置されているところで、ピラーアレイの柱間の間隔より大きな細胞604はピラーに挟まって流れることができない。他方、ピラー間隔より小さな細胞606、608は、流れ方向607、609にそのまま流れて下流出口610にて、柱間隔より小さな細胞として回収される。他方、ピラー間隔より大きいためピラーに挟まった細胞は、試料溶液の流れ600に直交する正弦波の電場が印加されることでピラーから電場方向に浮遊し、その都度、次のピラー間隔に挟まれることを続けて斜めに配置されたピラーをピラーの配置に沿って進んでゆく（矢印605）。これによって、最終的に、下流出口611まで誘導されて、分画されることとなる。ここで電場603がもたらす試料の流れ600方向に直交した方向成分の細胞の正弦波状の移動の大きさは、隣接したピラーの間隔より大きな振幅をもたらす程度以上とし、これによって斜めに配置したピラー上を矢印605で示したように段階的に進行して出口611で回収できることとなる。

[0098] <7. 細胞の前処理を行う細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部で用いる微細加工技術>

図7は、光硬化性樹脂を用いて高さ100 μm 以上の直立したピラー構造を作るための手法を模式的に説明した図である。図5および図6で示したピラーアレイを用いた細胞のサイズ分画では、分画する細胞のサイズの同時処理できる領域を広くするために高さ100 μm 以上のピラーを連続して配置する必要がある。このピラーが正しくサイズ分画できるようにするためには、ピラーの太さが高さによらず同じになることが重要である。しかし、フォトリソを用いてSU8などの光硬化性樹脂を用いたときには、光の回折現象から開口部から遠距離になるに従って広がってゆき、高さ100 μm を越えると台形の形状が顕著になってくる。これを防ぐためには、光硬化性樹脂の底面に全反射

面を配置することで台形から直立した形状にすることができる。図7Aは、上記の概念を実現するための配置の1例である。フォトマスク701に構成したいピラーアレイの形状より10%程度小さな開口702をデザインし、たとえば、これをガラス基板705の上に全反射面704となるようにクロムを10nm蒸着したのち、金を200nm蒸着し、この上にSU8などの光硬化性樹脂を高さ100 μ mほど配置する。これに密着するように、上記フォトマスク701を置いて光硬化をさせるための紫外光を照射すればよい。図7Bは、実際に回折によって底面からの全反射がない場合の硬化する領域の形状707と、全反射がある場合の硬化する領域の形状706をシミュレーションで示したものである。線707と線706の間の線は、それぞれ反射率が0%から100%の間の値を取った場合のものである。また、希望するピラーの直径となる形状を実現するための実際の開口の大きさは、実際に光硬化させた柱の直径を確認して最終的に決める。このようにして製作した直立した光硬化性樹脂を鋳型として用いてPDMS等の別の硬化性樹脂を用いることで直立したピラーアレイを持つ微細流路形状を効果的に作製することができる。

[0099] <8. 細胞のカプセル化を行う細胞・細胞塊カプセル化部の構成の一例>

図8は、細胞をアルギン酸ゲルのカプセルに内包させるカプセルを製作するカプセル化部800の構成機構を説明するものである。

[0100] 図8Aは、カプセル粒子構築機構として、細胞のカプセル化を行う手法の一例を示したものである。キャピラリー管801中を流れるゾル状態のアルギン酸を含む溶液802中の細胞803あるいは細胞塊がキャピラリー管の先端を通過して、カルシウム等の2価イオンを含む溶液809を入れている容器807に吐出されることで、アルギン酸がゲル化し、細胞を含むカプセル810、あるいは含まないカプセル811を作ることができる。ここでキャピラリー管内の電極804と、溶液809中に配置した電極805の間の電流の変化から計測器806で得られた抵抗の大きさの変化からキャピラリー管を通過する細胞の有無と通過した細胞あるいは細胞塊のサイズと実際に通過に要した時間を流速として見積もることができる。また、このときの各電

極の電位を安定して計測できるように接地電極 808 も溶液 809 中に配置してある。得られた流速データから、実際に吐出する溶液 802 の吐出圧力をフィードバック制御して、最適なアルギン酸カプセルとなるサイズにすることができる。ここでアルギン酸ゲルのカプセルを作るための溶液 809 に入れる二価イオンは、カルシウムやマグネシウムでも良いが、アルギン酸カプセルの内部が中空となる特性を持つバリウムを用いることが好ましい。

[0101] 図 8B は、細胞のカプセル化を行う手法の別の一例を示したものである。微細加工によって構築した構造 812 中で、ゾル状態のアルギン酸を含む細胞溶液の領域 816 から細胞 803 を含む溶液は、漏斗状に絞り込まれた領域 817 を経由して、ゲル化させカプセルを作るための二価イオンを含む溶液領域 818 に吐出され、作られた細胞を含むアルギン酸カプセル 810 や細胞を含まないアルギン酸カプセル 811 を流れ 823 とともに取り出すことができる。吐出をする漏斗状に絞り込まれた領域 817 の上面導体面 813 と下面導体面 815 の間に絶縁層 814 を挟む構成とし、この間の電流量の変化を計測器 819 で測定することで、図 8A と同様に、吐出される細胞溶液中に細胞がある場合には、同様に抵抗値の大きさと抵抗値が大きくなった時間の 2 つの情報を取得することができ、ゾル状態のアルギン酸を含む細胞溶液の領域 816 の圧力を調整することで吐出速度を調整することができる。また、二価イオンを含む溶液領域 818 に二価イオンを含む溶液を供給するための流路 820 が配置され矢印 822 の方向に供給されるようになっている。

[0102] 図 8C は、図 8A および図 8B で示した、ゾル状態のアルギン酸を含む溶液が微細な穴を通過するときに発生する抵抗値 829 の時間経過 828 に対する変化の計測結果の例 830 を模式的に示したものである。細胞が通過すると、穴のサイズに対して小さな細胞では小さな抵抗値の上昇 831、834 が発生し、中程度の細胞では中程度の抵抗値の上昇 833、836 が発生し、大きな細胞では大きな抵抗値の上昇 832、835 が発生する。ここで抵抗値の上昇をより詳細に確認すると、穴の直径に対する細胞のサイズのみで決

定する抵抗値部分 840 と、細胞が穴を通過する経過時間 837 からなる。この細胞が穴を通過する経過時間は、細胞サイズと細胞が穴を通過するときの流速の組み合わせで得られる値となる。したがって、経過時間 837 を t とし、抵抗値から得られた細胞の直径を r 、流速を v とした場合 $t=r/v$ となり、流速 v は $v=r/t$ で求められる。実際に抵抗値 840 のみで求められる細胞サイズは、溶液 802 のイオン強度と穴のサイズに依存して決まるため、最初にキャリブレーションをする必要があるが、一度、キャリブレーションをすれば溶液とキャピラリー管を交換しない限り、細胞サイズと抵抗値を一意的に再現よく求めることができる。ここで求めた v が希望するアルギン酸カプセルサイズとなるようにフィードバック制御すれば、安定したカプセルを構築することができる。

[0103] 図 8D は、細胞・カプセル粒子回収機構として、図 8A で説明したアルギン酸カプセルの構築機構に細胞入りアルギン酸カプセルのみを回収する機構を付加した構成の一例を模式的に示したものである。上記図 8A の説明でも述べた通り、キャピラリー管 801 の内部と外部の二価イオンを含む溶液の間に設置した一対の電極 804 と 805 の間の抵抗値の変化によって細胞がキャピラリー管から吐出される瞬間を判別することができる。そのため、下流で吐出されたアルギン酸カプセルを回収するキャピラリー管 841 を配置し、2つのキャピラリー管 801 と 841 の間に、つねに 1 つのアルギン酸カプセルが通過する程度の短距離の開放域をつくり、ここに電極 846 とこれに電荷を印加する電源 845 と、接地電極 808 を配置し、2つのキャピラリー管を囲む管 840 の中を溶液の流れ 844 をつくることで、細胞を含むカプセルが抵抗値の上昇から確認できたときには電場を印加せず、それ以外のときは電場を印加することで細胞を内包しないアルギン酸カプセル 811 をすべて外側の管 840 の流れに乗せて排出することができる。

[0104] 図 8E は、図 8B で説明をした構成を実際に微細加工で構築した一例の顕微鏡写真である。ゾル状態のアルギン酸を含んだ細胞溶液の流れの方向 852 に吐出し、両側面の流路 853 から供給される二価イオンを含む溶液の流れ

８５４によって下流で細胞を含むアルギン酸カプセル８５５を作ることができる。

[0105] 図８Ｆは実際に作られたアルギン酸カプセルの顕微鏡写真のひとつである。アルギン酸カプセル８６０の中に１個の細胞８６１が封入されている。また図１でも説明したように、アルギン酸ゲルに封入された細胞等を明視野顕微鏡画像として観察するとき、周囲の溶液の屈折率をアルギン酸ゲルと同じ値に調整することで、実質的にアルギン酸ゲルは明視野画像として透明となり、ゲルに封入された細胞等のみをあたかも溶液中に直接浮遊する細胞と同じように観察することができる。そのためには、たとえばショ糖を観察する水溶液に加えて屈折率を上げることでアルギン酸ゲルカプセルと同じ屈折率とすることができる。

[0106] 図８Ｇは、穴からゾル状態のアルギン酸を含む細胞溶液を吐出したときの吐出速度（粒子の生成周期）と生成されたアルギン酸ゲルカプセルのサイズの関係を示した実験結果の一例である。この例からわかるように吐出する溶液の速度を制御することで安定した粒径のアルギン酸ゲルカプセルを作ることができることがわかる。ただし、実際に作られるゲルのサイズと吐出速度の関係は、用いる溶液の粘性、穴のサイズ、溶液中のイオン強度の違いなどの要件で異なるので、カプセル粒子粒径選別機構として、実際の構成に合わせて作製したいカプセルのサイズにあわせた最適の吐出流速にあわせて、上記図８Ａから図８Ｃで説明した手法によって流速をフィードバック制御して最適化させることができる。

[0107] 図８Ｈは、ゾル状態のアルギン酸溶液中に磁区構造を持たないように磁区構造より小さく細分化された鉄やマンガンなどの強磁性体微粒子を混合させることで作られた、細胞８７２を内包する超常磁性体アルギン酸細胞カプセル８７１を模式的に示したものである。また、この超常磁性体となった強磁性体微粒子８７３をアルギン酸カプセルに加えることで、上記、溶液の屈折率を上げるためにショ糖等を加えると溶液の比重が高くなった場合でも、アルギン酸カプセルの比重の増加によってバランスを取ることができる。

[0108] < 9. 細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部の構成の一例>

図9は、図3の細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュール330の構成の一例を示したものである。図9に示すように、画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュール330は、細胞の明視野像を得るために、明視野光源901、コンデンサーレンズ902、から可視光をセルソーティング部903に照射して、対物レンズ904を経由して明視野画像検出システムユニット911で画像として取得、解析される。また、細胞の蛍光像を得るために、それぞれの蛍光にあった蛍光光源905、907、909から照射された励起光を対物レンズ904を経由してセルソーティング部903に照射して、得られた細胞の蛍光像を、再び対物レンズ904を経由して蛍光強度検出システムユニット906、908、910のそれぞれに、励起光にあわせた蛍光として検出することができる。また、励起光波長と蛍光波長を同一にすることで散乱光強度計測を行うこともできる。また、観察したい蛍光が本実施例の3色を超えてさらに複数の場合には光路分岐系を適切に調整し、複数の励起光を透過させるとともに、各々の励起光および蛍光検出のための蛍光（放射光）波長に重ならない波長を選んで、細胞に光を照射し、観察したい蛍光の種類に合わせてダイクロイックミラーやバンドパスフィルターを複数組み合わせれば良い。

[0109] < 10. 細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部の構成の別の一例>

図10は、図3の細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュール330の構成の別の一例を示したものである。図10に示すように、画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュール330は、細胞の明視野像を得るために、明視野光源1001、コンデンサーレンズ1002、から可視光をセルソーティング部1003に照射して、対物レンズ1004および画像分割システ

ムユニット1008を経由して明視野画像検出システムユニット1012で画像として取得、解析される。また、細胞の蛍光画像を得るために、それぞれの蛍光にあった蛍光光源1005、1006、1007から照射された励起光を対物レンズ1004を経由してセルソーティング部1003に照射して、得られた細胞の蛍光像（放射光像）を、再び対物レンズ1004および画像分割システムユニット1008を経由して蛍光第1画像検出システムユニット1009、蛍光第2画像検出システムユニット1010、蛍光第3画像検出システムユニット1011のそれぞれに、励起光にあわせた蛍光画像として取得することができる。

[0110] ここで、明視野顕微鏡画像、蛍光顕微鏡画像による処理と、図9で説明した蛍光強度あるいは散乱光強度による処理とを併用してもよい。また、検出系で得られた画像データはモニターに実時間で表示して、使用者の観察に供することもできる。また、観察したい蛍光が本実施例の3色を超えてさらに複数の場合には光路分岐系を適切に調整し、複数の励起光を透過させるとともに、各々の励起光および蛍光検出のための蛍光（放射光）波長に重ならない波長を選んで、細胞に光を照射し、観察したい蛍光の種類に合わせてダイクロイックミラーやバンドパスフィルターを複数組み合わせれば良い。

[0111] また、細胞の画像を得る場合、任意に、細胞が流れの中を移動することによって各フレームを取得中に細胞の各点の像が画素間をまたがって撮像されるために画像が移動ブレによってボケることを防ぐために、取得される画像を照射する光源の照射時間を、厳密に「照射時間＝画素サイズ／細胞の流速」とすることで、細胞像の各点が同一画素内にあるうちに像の受光画面への取得を完了させることができ、微細構造の像を受光画面の画素の分解能の範囲で原理的に最良の分解能で正確に記録することができる。

[0112] <10. 細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部の構成要素の組み合わせの一例>

図11は、図9に示した1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部モジュールの構成を実際に要素を組み合わせて構築した場合の

一例を示したものである。

[0113] 単色パルスレーザーや高輝度LED可視領域単色光源などの1ms以下のパルス光を周期的に照射することが可能な明視野光源1101から発信した光は、ミラー1102で進行方向を調整してコンデンサーレンズ1103によってセルソーターチップ1104の流路部分に集光される。また、複数の単色蛍光光源1109、1110から照射された蛍光励起光は、ダイクロイックミラー1111、1106を経由して対物レンズ1105によってセルソーターチップ1104の流路部分に集光される。これら明視野光源および蛍光光源から集光された光によってセルソーターチップ1104の流路内を流れる細胞および細胞塊の計測をするため、本実施例では2つの光路系に出力される。ひとつは、明視野光源および蛍光光源に直交する側方の経路に集光レンズを配置して、明視野光と同一の波長の光の側方散乱光強度を計測するダイクロイックミラー1113を経由して明視野光源の波長のみを選択的に通過されるバンドパスフィルター1114を通過した光を計測するフォトマルチプライヤーなどの高感度光検出素子側方散乱光光量計1115による散乱光計測系と、ダイクロイックミラー1113を透過して次のダイクロイックミラー1116で分岐した蛍光光源1109、1110のそれぞれの励起光で励起された蛍光を検出する2つのバンドパスフィルター1117、1119を前段に組み入れたフォトマルチプライヤーなどの高感度光検出素子からなる蛍光光量計1118、1120で計測する蛍光強度計測系である。もう一つは、明視野光源からの光路上にあるセルソーターチップ1104の流路内を流れる細胞および細胞塊の画像観察をするための経路であり、対物レンズ1105によって結像された像の光線を明視野光源の光を透過するバンドパスフィルター1107を経由して高速カメラ1108で計測する構成となっている。

[0114] また、明視野光源の照射光については、連続光を照射しても良いが、ブレの無いより画像の空間分解能を高めるために、任意に、高速カメラ1108のシャッター周期に同期して、シャッター周期の各インターバルの中でシャ

ッター周期の10分の1以下の照射時間のパルス光を発生させることで、細胞が流れることによって発生するブレを防止してより高い空間分解能の像を取得することが出来る構成となっている。

[0115] またセルソーティングを行うための細胞の判別には、高速カメラによって取得した画像による処理と、蛍光あるいは散乱光による処理との結果を併用してもよいことは言うまでもない。

[0116] また、高速カメラ1108で得られた画像データを解析装置のモニターに表示して、使用者の観察に供することもできる。また、観察したい蛍光が複数の場合には、フィルターを適切に調整し、複数の励起光を透過させるとともに、下段での蛍光検出のための蛍光波長に重ならない波長を選んで、細胞に光を照射し、観察したい蛍光の種類に合わせてダイクロイックミラーから、フィルター、蛍光検出器までの構成の装置モジュールを付加したものを複数組み合わせれば良い。また、この構成で同様にダイクロイックミラーとフィルターを観察したい波長に最適化することで蛍光での細胞像を取得することも可能であり、この蛍光観察結果をデータとして用いることもできる。

[0117] <12. 細胞の1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部の構成要素の組み合わせの一例>

図12は、図10に示した1細胞単位での識別・精製を行う画像検出型1細胞分離・精製部モジュールの構成を実際に要素を組み合わせて構築した場合の一例を示したものである。単色パルスレーザーや高輝度LED可視領域単色光源などの1ms以下のパルス光を周期的に照射することが可能でそれぞれ独立に制御可能な2つの異なる波長の明視野光源1201および1203から照射された明視野可視光と、蛍光色素励起光を照射する単色蛍光光源1205から照射された蛍光励起光は、ミラー1202およびダイクロイックミラー1204、1206で進行方向を調整してコンデンサーレンズ1207によってセルソーターチップ1208の流路部分に集光される。これら明視野光源および蛍光光源から集光された光によってセルソーターチップ1208の流路内を流れる細胞および細胞塊を計測するため、本実施例では対物レンズ

1209によって結像された明視野顕微鏡画像と蛍光顕微鏡画像とともに画像分割システムユニット1210に誘導し、それぞれの単一波長の画像に分離し、それぞれの画像を1つの高速カメラの受光画面を分割して利用して、同時に1つの画素画面で複数の波長の画像を並べて表示することで、1枚の取得画像の画像処理プロセスで複数の波長の画像を同時処理することができる。

[0118] 本実施例で異なる波長の明視野可視光源を2つ配置して2つの明視野像を撮影できるように構成したが、このように構成することで1回の取得画像で詳細な細胞の明視野画像と細胞の流れの中での移動速度を同時取得することができる。具体的には、1つめの明視野可視光源では、細胞が流れの中を移動することによって各フレームを取得中に細胞の各点の像が画素間をまたがって撮像されるために画像が移動ブレによってボケることを防ぐために、取得される画像についての照射する明視野光源のフラッシュ閃光の時間を厳密に「フラッシュ時間＝画素サイズ／細胞の流速」とすることで、細胞像の各点が同一画素内にあるうちに像の受光画面への取得を完了させることができ、微細構造の像を受光画面の画素の分解能の範囲で正確に記録することができる。

[0119] 他方、2つめの明視野光源の発光時間は、上記1つめの明視野光源の発光時間より十分に長くすることで、細胞の像を光源フラッシュが発光している時間での画素間をまたがった像の伸展として受光画面で記録することができる、その伸びの長さを上記1つめのフラッシュ光源で得られた細胞の長さと比較して、「細胞の流速＝細胞の伸びの長さ／2つの光源のフラッシュ光の発光時間の長さの差」で求めることができる。ここで得られた細胞の流速を求めて、上記1つめの明視野光源のフラッシュ閃光の発光最大時間をフィードバック制御してもよい、また、蛍光像についても蛍光光源のフラッシュ閃光が可能な場合は、上記、明視野光源と同様に「フラッシュ時間＝画素サイズ／細胞の流速」とすることができれば、像のブレは最小となり、原理的に画素レベルでの最良の空間分解の画像を取得することができる。

[0120] ここで本実施例では画像による計測法を説明したが図9および図11で示した手法と組み合わせて、画像による処理と、蛍光あるいは散乱光による処理とを併用してもよい。また、高速カメラ1211で得られた画像データはモニターに表示して、使用者の観察に供することもできる。また、観察したい蛍光が複数の場合には、フィルターを適切に調整し、複数の励起光を透過させるとともに、下段での蛍光検出のための蛍光波長に重ならない波長を選んで、細胞に光を照射し、観察したい蛍光の種類に合わせて画像分割システムユニット1210のダイクロイックミラー、フィルターを付加したものを複数組み合わせれば良い。

[0121] <13. 高速明視野顕微鏡画像取得と高速蛍光顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の構成を模式的に示した一例>

図13は、図10および図12で示した画像分割系の構造とこれを用いた画像取得系の構成の一例を模式的に示したものである。ここでは、画像分割光学系を柔軟に構成したり改造することができるように、立方体型のキューブを積み木のように組み合わせることができるようになっている。

[0122] 図13Aは、この立方体形のキューブ型容器1300の内部の断面を模式的に示したものである。キューブ容器1300は、この6面のすべてに他のキューブと接続できる窓1301が空いており、他のキューブと接続しない場合は蓋1302ができるようになっている。このキューブの中央1303に反射する方向を3次元に微調整可能な角度調整機構1305を具有したダイクロイックミラー1304と、各窓1301と中央1303の間にフィルター1306をはめ込むことができるようになっている。

[0123] 図13Bは、図13Aで示したキューブの外観を模式的に示したものである。立方体のキューブの6面のすべてに窓1301が配置されている。

[0124] 図13Cは、このキューブを用いた画像分割光学系の機構の1例を模式的に示したものである。まず、画像分割光学系に画像イメージが導入される前に、対物レンズから得られた画像は光路の中心から余分な画像領域を切り取って、分割した複数の画像が高速カメラ1314の画像イメージング素子13

16に並列して並べることができる形状に調整するための可動式の遮蔽板1312と、サイズ調整をした後に画像イメージを平行光に変換するためのレンズ1313からなる画像サイズ調整システムユニット1311に導入される。この画像サイズ調整システムユニット1311を出た画像イメージは、4つのキューブ1300が4個組み合わせられた画像分割光学系に導入される。たとえば2つの波長の単色光1317、1318が画像サイズ調整システムユニット1311に導入された時、まず同じ画像領域を同じサイズで切り取られた画像として、(波長)ハイパスフィルターあるいは(波長)ローパスフィルターが組み込まれたダイクロイックミラーaを持った第1のキューブに導入される。このダイクロイックミラーは単色光1317は透過し、単色光1318は全反射するものを選ぶ。次に単色光1317は全反射ミラーbで90度進行方向を変換して、単色光1317を反射し単色光1318は透過する(波長)ローパスフィルターあるいは(波長)ハイパスフィルターが組み込まれたダイクロイックミラーcに反射して再び画像として結像するためのレンズ1315を経て、画像イメージング素子1316で画像として取得される。ここで画像イメージング素子1316上での単色光1317の細胞画像の位置は、全反射ミラーbあるいは、ダイクロイックミラーcの角度を3次元に微調整することで自在に調整できる。他方、単色光1318は、ダイクロイックミラーaで反射してもうひとつの全反射ミラーbに導入され90度角度を変更したのち、ダイクロイックミラーcを透過して、レンズ1315を経て画像イメージング素子1316上での単色光1318の細胞画像として観察できる。ここで単色光1317の画像と画像イメージング素子1316上で重ならないように全反射ミラーbの位置を調整する。また、この実施例では、フィルター1306には特にバンドパスフィルター等の波長選択用のフィルターを入れる必要はないが、たとえば明視野像と蛍光像、あるいはフラッシュ閃光時間の異なる2つの明視野像など、像の光強度が大きく異なる2つの波長の像を観察する場合にはNDフィルターなどの吸収フィルターを強度の大きい光路側に挟むことで2つの同等の光強度の画像に調整をして画像イメ

ーシング素子 1 3 1 6 上で計測することができ、局所ごとの光強度のオフセットのカットとダイナミックレンジの増幅最適化を簡便化することができる効果を有する。

[0125] また、上記実施例では 2 つの波長の画像を分割して 1 つの高速カメラで取得する構成の一例を示したが、入力画像の両脇の余分な領域が画像分割系内の画像サイズ調整系によって必要な最小サイズまで切り取られることで、受光面上で重ならないサイズで異なる波長の複数の画像を重ねないように並べて 1 台の高速カメラを用いて 1 回の撮影ですべての波長の画像を取得することができる。ここで、複数の単色光の場合であっても各画像の高速カメラの受光面上の位置は、複数の 3 次元に微調整可能な角度調整機構 1 3 0 5 によってダイクロイックミラー 1 3 0 4 の面位置の調整を行うことで、自在に調整することができる。また、複数の明視野像、あるいは蛍光像について、光学レンズ系を波長分離後の特定の波長の像の光路にあるキューブのフィルター位置に組み入れることで拡大あるいは縮小用に用いる事で、拡大率の異なる画像を 1 つの高速カメラ受光面 1 3 1 6 に結像させることも可能である。これは、特に細胞の周囲の状態を含めて計測するために明視野像については拡大率を小さくし、細胞内の微細状況を確認するための明視野像や蛍光像については拡大率を大きくする、という用途がある。

[0126] この拡大率の異なる画像を組み合わせた光学系は、イメージングセルソーターへの用途に限定せず、イメージングセルソーターで選択回収された静止した細胞試料で同様の観察をするための一般の光学明視野／蛍光顕微鏡系に組み入れて利用することも可能である。

[0127] 図 1 3 D は、画像取得カメラ機構として、上記図 1 3 C の構成を用いて細胞がどのように画像分割システムユニット 1 3 2 2 を経て観察されるのかを明視野像と核染色をした蛍光像の 2 つの画像としてどのように観察されるのかをミラーの組み合わせについて模式的に示したものである。細胞 1 3 2 1 の画像は対物レンズなどの光学系を経由して縦長の 1 / 2 サイズの長方形の可動式の遮蔽板 1 3 2 3 を経由して、第 1 のダイクロイックミラー 1 3 2 4 で

蛍光像は反射され、明視野像はそのまま透過して全反射ミラー1325に導入され、ここで反射して明視野像は第2のダイクロイックミラー1327によって反射されることで結像レンズ1328を経由して画像イメージング素子1329の半分1330に映し出される。他方、前記第1のダイクロイックミラー1324で反射した蛍光像は全反射ミラー1326によって反射して第2のダイクロイックミラー1327を透過して結像レンズ1328を経由して画像イメージング素子1329の残り半分1331に映し出される。

[0128] 図13Eは、本開示の構成を吸光スペクトルイメージング技術に用いた場合の一例を示したものである。光源の可視光スペクトルを単色光ではなく連続光に変更し、この光源を用いて微細流路1340を流れてきた細胞1341の像を対物レンズで取得したのち、実際に得られる画像について、可動式の遮蔽板1323で一部の領域の画像1342のみを切り取り、これを画像分割系に導入する。ここでダイクロイックミラーに加えてバンドパスフィルターを加えることで、細胞の可視光イメージのうち特定の波長の吸収を反映した像をえることができる。たとえば、核を選択的に染色する光吸収性を持った試薬で染色をすると、この吸収波長を外れた領域では細胞像1344は通常の像として観察できるが、核染色試薬での吸収波長域の波長の画像1345では、核部分が吸収によって暗くなっている。このように本技術によって、複数の波長の各波長での吸収を反映した吸光スペクトルイメージング像を取得することが可能である。この手法を用いれば、通常、細胞はG0周期にあり、核が存在しており、これは明確に細胞内での黒い球として画像認識される。他方、分裂期にある細胞は、核が消失しているため、細胞を画像認識しても明確な球状の核を細胞内に確認することができない。特に吸光性試薬は細胞毒性が低い可逆標識試薬が多数存在するため、従来の抗体標識等の標識技術では細胞の状態を確認することは困難であったところを、本開示の2波長明視野画像比較解析技術によって、細胞の形状の確認に加えて、細胞内の核の有無によって分裂中の細胞を回収することができる。一般に、血中を流れる正常細胞はすでに最終分化しているものが大半であるが、本開示により

、血中で細胞分裂をしている細胞を回収することで、血中がん細胞や幹細胞などの分裂能をもった細胞を回収することが可能となる。

[0129] また、本開示は、得られた複数の画像について、明視野像からは、たとえば、流れてきた細胞の画像から、あらかじめ記録していた細胞が流れてこないときの画像データを引き算することで、細胞画像だけを抽出することができる。そのため、その細胞サイズ（面積）および細胞周囲長は引き算をしたあとのデータが残った領域内のピクセル数の全体、あるいはデータが残った領域の境界のピクセル数の全体から、それぞれ求めることができ図1で説明したように直接得られた周囲長と細胞体積から見積もった直径から求められた換算周囲長との比較から細胞クラスターと明視野の画像のみから判定することができる。

[0130] 同様に、図1でも説明したように、蛍光像（核染色）1331から、核の蛍光像が得られ、核の数、核の面積、および、蛍光強度の全体すなわち輝度の積算値を得ることができる。また、明視野像と蛍光像は、同じ場所を異なる波長で撮影しているだけであるため、双方の座標軸は一致する。そのため、蛍光像では、細胞の形状は計測できないが、明視野像での座標を利用して、染色された核の細胞内での相対位置を見積もることもできる。そのため1つの核がある正常な単離一細胞の同定や、細胞クラスター、あるいは多核細胞でも、同様にデータ取得が可能である。また、上記、拡大率の異なる複数画像を結像させた系においても、同様に相対座標系は、同一の原点（画像中心）を中心に、拡大率の違いを考慮した相対座標系を組み合わせる用いれば、同様な処理が可能である。

[0131] また、本開示で画像サイズ調整システムユニット1311および各キューブ1300は光学的な密閉性が維持される形で固定されており、また、可動式の遮蔽板1323で切り取る入射光の像の断面積は、連結するモジュール数分の独立した画像を高速カメラ上の画像イメージング素子1329に重なり合わないよう投影するために、最後に計測する複数の波長の画像取得総数において（受光面の全面積／平行光導入モジュール）以下となる面積とな

るように調整されている。

[0132] < 1 4 . 蛍光強度計測と高速明視野顕微鏡画像取得と高速蛍光顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の構成を模式的に示した一例 >

図 1 4 は、図 9 で示した蛍光強度計測と高速明視野顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の構成に図 1 0 で示した複数の波長の画像イメージを取得する構成を加えた具体的な構成の一例を模式的に示した図である。

この例では、異なる可視領域の単色光を発する4個の高輝度LEDフラッシュ光源を明視野（高速カメラ）の光源として用い4つの波長の吸光スペクトルイメージング像を得るとともに、375nm、488nmのレーザーを蛍光色素の励起光源として用いている。ダイクロイックミラーは短波長光から長波長光へと段階的に波長が分岐されるように配置されており、それに合わせてフォトマルチプライヤーなどの高感度光検出素子からなる蛍光光量計 1 4 0 1 , 1 4 0 2 で375nm、488nmのレーザーで励起された細胞中の蛍光色素の強度を定量的に計測するとともに、4個のLEDフラッシュ光源から得られた長波長領域の細胞イメージ像をそれぞれの波長の像として画像分割系で画像を分割させ高速カメラへと配置されている。これによってマイクロチップホルダー内に配置されたセルソーターチップ中の細胞のいろいろな波長での蛍光強度と、複数の波長の明視野像を同時計測することができる。

[0133] 図 1 4 Aは、この蛍光強度計測と高速明視野顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の構成の配置の一例を模式的に示した図である。高速カメラのフレームインターバルと同期した4つのLEDフラッシュ光源等の明視野光源から照射された観察用の単色光はコンデンサレンズで集光され、血中のターゲット細胞が流れる流路と細胞ソーティング機構が組み込まれたセルソーターチップを含むセルソーティング部中の細胞に照射される。上記流路中の細胞は対物レンズで焦点を合わせることができる。ここで、任意に、図 1 8 にて後述する被写界深度改善技術を組み込んでも良い。2つの単色レーザー等の蛍光光源から対物レンズに照射された蛍光励起光によって、上記、流路中の細胞に結合した蛍光標識EpCam抗体やK-ras抗体、サイトケラチン抗体、CD抗体などの

がん細胞を同定するための蛍光抗体や、核染色蛍光色素（DAPIやHoechst33258など）で染色された核などから蛍光を発生させることができる。キューブを用いた画像分割光学系でダイクロイックミラーaによって短波長の蛍光を分岐させ、さらに2つの蛍光波長の中間のカットオフ波長に調整されたダイクロイックミラーcによって分岐された2つの蛍光は、ひとつは余分な波長を除去するバンドパスフィルターを経由してそのまま光増倍管やフォトダイオード等の蛍光強度計測系からなる蛍光光量計1401に、もう一つの蛍光波長は全反射ミラーbで光路を変更させたのち余分な波長を除去するバンドパスフィルターを経由してそのまま光増倍管やフォトダイオード等の蛍光強度計測系からなる蛍光光量計1402によってそれぞれ定量的に計測することができる。ここで蛍光の検出系について2系統を例として記載したが、複数の自由な組み合わせが可能である。さらに、この後段に、図13にて一例を示した光学顕微鏡画像を複数の波長領域に分岐させてそれぞれを画像として分割して同時に複数の画像を1枚の高速カメラ受光素子で取得するためのキューブ1300の組み合わせからなる画像分割系を経て、このように細胞の蛍光強度検出を行いながら、同時に、高速カメラ1314によって細胞の明視野像を同時に取得することができる。

- [0134] 波長によって分岐させた複数の顕微鏡画像を1つの高速カメラ受光面で同時に取得する装置構成は、以下の通りである。ダイクロイックミラーaで蛍光強度測定部へ誘導する短波長の光の分岐が完了した後の長波長側の光の画像データは、全反射ミラーbを経てまず一つの画像分割部に導入される。ここでは、反射する方向を3次元に微調整可能な角度調整機能付きダイクロイックミラーeで、特定の波長をカットオフ波長として、その波長から長波長領域、あるいは短波長領域を反射して次の光学分岐系に導入することができる。ここで後段のダイクロイックミラーおよびフィルターは、高速カメラ上での各波長の画像の強度をある程度そろえるための強度調整用NDフィルター、あるいはよりシャープな波長帯域の画像を得るためのバンドパスフィルターなどからなる。得られる複数の分割画像が、高速カメラの受光面で重ならない

ように、各キューブ1300内に配置した反射する方向を3次元に微調整可能な角度調整機能付きダイクロイックミラーの角度調整によって調整することができる。また、扱う光の光路差が発生しないようにすべての光路は同じとなるように調整されている。また、ハーフサイズのダイクロイックミラーi、hを組み入れることで、さらに複数の波長の分岐を進めることができる。

[0135] 図14Bは、実際に得られた4つの分岐画像の例を示したものである。波長分岐に応じて得られた4つの吸収波長の帯域のイメージング画像1344、1345、1404、1405を1つの画像イメージング素子上の画像として得ることができる。ここで本図では、3つの同様な構成からなる画像分割部を組み合わせたがさらにキューブ1300を組み合わせることで、必要数だけの画像分割像を組み合わせることができる。

[0136] また本実施例では、複数の波長の明視野像を分割して取得する光学系の例を示したが、波長分岐を行うダイクロイックミラーおよびバンドパスフィルターの構成を調整することで、複数の波長の蛍光画像を取得することもできる。

[0137] <15. 蛍光強度計測と高速明視野顕微鏡画像取得と高速蛍光顕微鏡画像取得を同時に行う解析系の光学モジュール部分の構成の別の一例の模式的な外観>

図15は、上記、図13および図14で述べたキューブ1300を複数組み合わせた画像分割系の外観を模式的に示したものである。3次元にキューブを配置することで効率的に分岐された光を並行して処理することが可能である。

[0138] <16. 画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールのチップ構成の一例を模式的に示した実施例>

図16は、図9および図10に示した本開示の細胞分析装置システムの画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールのセルソーティング部の構成の一例を模式的に示したものである。

[0139] 図16Aに、本開示の細胞分析装置システムにおいても使用されうる本開示

のセルソーティング部で細胞を分離するセルソーターチップの構成要素の組み合わせの一例を示す。セルソーターチップ1600においては、チップ基板上に軸対称な3つの流路がそれぞれ上流側（1601, 1602, 1603）、下流側（1614, 1615, 1616）に対称に配置されており、これら3つの流路の合流点では、3つの流路は層流を保ちながら合流し、そのままの状態を維持して下流の3つの流路に分岐してゆく。したがって、試料が流れる中央の流路の上流側1601は、下流側中央の流路1614へ、2つのサイドシースフローについてもそれぞれ、上流側流路1602が下流側1615へ、また上流側流路1603から下流側流路1616へと誘導されるようになっている。

[0140] また、図16Cにも示したように、セルソーターチップ1600および各流路は鉛直方向に設置されており、重力の方向に沿って流れるように構成されている。3つの上流側流路の入り口は、それぞれ入り口開口部のシース液で満たされたリザーバー1631につながっている。特に上流中央の流路1601は、細胞を含む試料液をシリンジ1633によって中央のリザーバーを経由して継続して導入することができる。またシース液を満たしたシリンジ1634、1635から上流側の側面の流路を流れる流路1602と1603につながった各リザーバーにシース液を追加して供給することができる。これによって大量の試料を継続して処理できる。試料溶液導入シリンジ1633、あるいはシース液導入シリンジ1634、1635、および各リザーバーの壁面に導電性の有無の計測を用いた水位計測センサーが組み込まれていることによって、水位が一定以下になると、一定の高さになるまで試料各液をシリンジを介して供給することができる。水位計測センサーは、それぞれ設定したい高さの水位の下限および水位の上限に配置した電極または電極対等で構成することができる。また、3つのリザーバー1631の上部は分配バルブ1632を経由して水面の空気圧を調整するための空気圧を印加する空気圧源となる空気シリンジ1636に接続されている。空気シリンジから得られた加圧空気は圧力センサー1637を経て、3つの分配バルブ16

32を使って圧力をより柔軟に分配することができる。流速の発生および制御に、試料リザーバーとシース液リザーバーの3つのリザーバー1631の液面の高さを揃え、また、リザーバー上面にキャップを付けて加圧空気を用いて液面に圧力を加えて流速を発生させる場合には、合流点で理想的な層流が発生するために、3つの流れの速度が同じになるように、合流点からの上流側、下流側それぞれの3つの流路については、その流路断面の形状、合流点から溶液入り口までの距離が一致しているものとするのが好適である。また、サイドシースフローのリザーバーの断面積と、試料サンプルのリザーバーの断面積の比を等しくすることが望ましい。これは、各リザーバーの液面高さの変化が異なる場合には、液面の高さの減少率が異なってしまう、これが最終的に合流点での層流の発生を破壊することとなり、これを普遍化すると、各リザーバーに結合している流路の総断面積の比が、各リザーバーの断面積の比に一致するようにすることが望ましい。

[0141] 次に、図16Aの中央に示された、上流側の3流路と下流側の3流路の6つの流路のすべてが合流する、壁のない3つの層流が合流している地点に、中央を流れる細胞の観察領域1606と、その下流に一对の電極1607が流路の側面に対向するかたちで配置されている。電極は、典型的には、ゲル電極で構成される。ゲルについては、たとえば電解質が電流キャリアーとなるようにNaClが溶け込まされたアガロースゲルを用いている。ゲルの先端が流路に直接接触できるように、ゲルは、ゲル充填のための幅広の流路1608に、入り口1609からゾル状態のアガロースゲルを入れ、これが出口1610に向かうことができるために、ゲルは主に出口1610に向かい、細管となっている電極1607には毛細管現象で伸張してゆきセルソーター流路1605の中に侵入しないで境界面で表面張力によって静止する。ゲル電極を使用する利点として、電場を印加するために電源に接続された白金線などの電線1611、1613をこのゲル導入点に差し込むことで、流路に接するゲル電極と細胞流路のシース液の境界では、通常の金属電極では気泡が流路内で発生したり金属電極が溶出する電圧以上の電圧に上げてても気泡の発

生や電極の溶出は発生せず、高いイオン電流を流路中の液体に印加できることである。

[0142] 次に、試料中の細胞がセルソーターチップ中で回収される手順は以下の通りである。上流から流れてきた試料溶液流1601は、2つのサイドシース溶液の流れ1602と1603に挟まれて、その配置を流路の中央に維持しながら直列し、細胞観察領域1606に進む。そこで各細胞の形状判別、蛍光標識の有無などを確認して、その結果に基づいて下流で細胞分離を行う。回収には2つの手法のいずれかを用いる。ひとつは、回収したい細胞には電場を印加せず、それ以外の細胞には電場を印加する手法である。ここでは、回収したい細胞が流れてきたときには、そのまま下流の選別試料回収流路1614に流し、廃棄したい細胞あるいは微粒子が流れてきた場合には、その電荷が正負のどちらであっても、対向して配置された2つのゲル電極1607に電圧を印加することで、2つのサイドシース流1605のどちらかに移動して、排除することができる。

[0143] もうひとつの回収手法は、回収したい細胞あるいは細胞塊が来た時に電場を印加する手法である。この場合は、回収したい細胞が流れてきたときには、対向して配置された2つのゲル電極1607に電圧を印加することで、2つのサイドシース流1605のどちらかに移動して回収される。他方、回収しない細胞はそのまま下流の選別試料回収流路1614に流して廃棄することができる。ここで、通常、細胞は表面電荷が負に帯電しているため、この電荷を利用する。またアルギン酸カプセルを用いた場合は、より安定して強い表面電荷を利用して回収することができる。

[0144] また、効果的に外電場によって細胞に外力を与える場合には、試料水溶液の導電率が $10^2 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下となるイオン強度となる溶液組成とすることが望ましい。このようにすることによって、電場により試料液中の微粒子を移動させることが容易になる。具体的には、特に細胞を生きたままソーティングするときにイオン強度を下げつつ浸透圧を維持する溶液組成が重要である。たとえば糖類や高分子など、直接、イオン強度の増加に寄与しない分子を細胞

精製時には試料溶液として用いる事が好ましい。

- [0145] 細胞を画像として捕らえて評価する場合は合流後の流路部分 1606 を C D カメラで観測する部位を設け、測定範囲を面に広げ画像認識で細胞の識別を行い、追跡することでより確実な細胞分離を行う。このとき重要なのは、画像の取り込み速度である。一般の 30 フレーム／秒のビデオレートのカメラでは、画像での細胞取りこぼしが生じる。最低 200 フレーム／秒の取り込みレートがあれば、流路中をかなりの速度で流れる細胞を認識できる。
- [0146] 次に画像処理法であるが、まず、細胞認識である。前記のとおり、細胞の移動速度は細胞によりまちまちで、場合によっては細胞の追い越しがある。追い越しを防ぐため、上記、2 つのサイドシースで試料溶液を挟み、細胞を 1 列に配列させることが重要である。つぎに、各細胞が最初に画像フレームに現れたときに細胞にナンバリングを施し、以下、画像フレームから消えるまで同一ナンバーで管理を行うこととする。すなわち、連続する複数枚のフレームで細胞像が移動する状況をナンバーで管理する。各フレーム内での細胞は上流側にあったものから順に下流側に移行し、画像中に認識されるナンバリングされた特定細胞の移動速度はある範囲に収まるとの条件でフレーム間の細胞をリンクさせる。細胞のナンバリングには、まず細胞像を 2 値化し、その重心を求める。2 値化した細胞の輝度重心、面積、周囲長、長径、短径を求め、これらのパラメーターを用いて各細胞をナンバリングする。各細胞像をこの時点で画像として自動保存することも使用者にとって利益があるので実施可能にする。
- [0147] 次に、細胞分離に使用する場合であるが、ナンバリングした細胞のうち、特定の細胞のみを分離しなくてはならない。分離の指標は上記した輝度重心、面積、周囲長、長径、短径などの情報でもよいし、画像とは別に蛍光検出を行うことを併用して蛍光を利用した情報を得てもよい。いずれにせよ、検出部で得た細胞をナンバリングに従い分離する。具体的には、図 17 にて詳述する手法によって取得した細胞の移動速度 (v) を計算し、細胞移動速度 (v) に対して検出部から選別部までの距離を (A)、印加時間 (T) によって

、印加タイミングを (A/v) から $(A/v+T)$ までとすることでちょうど目的のナンバーの細胞が電極間に来た時に細胞を電氣的に振り分けて分離する。

[0148] 上述したように、細胞分離精製モジュールはセルソーターチップ1600中に構成されている。セルソーターチップ基板の内部にマイクロ流路を埋め込み、流路のそれぞれの末端に開口を設け、試料や必要な緩衝液（培地）の供給や選別した細胞の回収口が設けられている。流路の作製はPMMAなどのプラスチックを金型に流し込むいわゆる射出成型で作製することもできるし、あるいは、複数のガラス基板を接着することで作製することもできる。セルソーターチップのサイズは、例えば $50 \times 70 \times 1\text{mm}$ であるがこれに限定されない。セルソーターチップの内面に刻まれた溝の流路を流れる細胞を、高倍率の光学顕微鏡で観察できるように、PMMAプラスチックを用いた場合には、蛍光を発する接着剤を用いず、例えば、 0.1mm 厚のラミネートフィルムを熱圧着して用いる。また、ガラスの場合は同様に 0.1mm のガラスを光学接着することで用いる。例えば、開口数1.4、倍率100倍の対物レンズを用いて、 0.1mm 厚のラミネートフィルムを通して流路内を流れる細胞を観察できる。プラスチックの場合、プラスチックを透光性の高いものとすれば、チップ基板の上面側からも観測できる。また、本開示で想定している細胞は、小さいものではバクテリア、大きいものではがん細胞クラスターなどである。したがって、細胞サイズとしては典型的には $0.5\mu\text{m}$ から $200\mu\text{m}$ 程度の範囲となるが、厳密にこの範囲に限定されるわけではなく、本開示が有効に使用される限り任意のサイズの細胞が使用されうる。細胞濃縮と細胞分離を基板の一面に組み込んだ流路を用いて連続して行おうとすると、まず問題になるのが流路幅（断面形状）である。また、流路1605は基板表面の一つに基板の厚み方向で典型的には $10 \sim 100\mu\text{m}$ 内外のスペースに実質2次元平面状に作製することとなる。細胞の大きさからしてバクテリア用では厚み方向で $5 \sim 10\mu\text{m}$ 、動物細胞用では厚み方向で 50 から $100\mu\text{m}$ が適当なサイズとなる。

[0149] <17. 画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュール

における高速フラッシュ光源の発光タイミングと電子シャッターの関係を模式的に示す1例>

図17は、実際に1万分の1秒のインターバルで画像を取得できる高速カメラを用いた場合の、光源の照射時間とタイミング、そして画像取得のインターバルの関係を模式的に示した動作タイミングチャートである。

[0150] まず図17Aは、細胞流速取得機構として、カメラの垂直同期信号1701、電子シャッターの開放時間1711、第1の明視野像の単色光パルス光源の発光信号の発光時間1721、第2の明視野像の単色光パルス光源の発光信号の発光時間1731のタイミング信号の時間的な関係を示したものである。カメラの垂直同期信号1701が示すように、まず、 $100\mu\text{s}$ のインターバルで画像取得のインターバル1702が、このカメラでは $2\mu\text{s}$ の開始タイミング信号1703によって動作し始める。次に、電子シャッターを、上記、タイミング信号1703の $2\mu\text{s}$ 後に電子シャッターは開放時間1711の間だけ開放される。開放時間はカメラのインターバル中の時間の中でたとえば $27\mu\text{s}$ から $96\mu\text{s}$ の間で自在に調整できるが、この実施例では、たとえば $60\mu\text{s}$ の間、開放して画像を取得できるように設定している。次に、この電子シャッターの開放時間中に、2つの異なる波長の単色光の明視野光源の発光を行う。ひとつめの光源は短い発光時間1721で発光し、主に細胞の微細構造を取得するために用いられるものであり、たとえば本例ではタイミング信号1703の $20\mu\text{s}$ 後に、 $5\mu\text{s}$ の短時間の発光1722を行う。2つめの光源は、1つめの光源より長めの発光をすることで細胞が移動する流速を求めるために主に用い、第1の発光と同じくタイミング信号1703の $20\mu\text{s}$ 後に、第1の光源の発光時間に $20\mu\text{s}$ を加えて $25\mu\text{s}$ の比較的長時間の発光1732を行う。これによって、2つの波長の異なる明視野光源からの2つの明視野画像を同時に1つの高速カメラの受光画面の分割領域で取得し、光源からの照射時間の差によって細胞が流れ方向にどれだけ伸張して露光されたかを比較計測することで、細胞の流速を瞬時に測定することが可能である。また、第1の光源の発光時間は、得られた細胞の流速から、第1の光源の発

光時間中に露光される細胞の移動時間が、受光画素の1画素の大きさの範囲に収まるよう「第1の光源のフラッシュ時間(1722) = 画素サイズ/流速」を満たすようにすることで、移動による画像ブレが少ない画像を取得できる。

[0151] たとえば、1/10,000秒カメラの画素サイズは $12\mu\text{m} \times 12\mu\text{m}$ であったとき、20倍の対物レンズで観察した場合の画素分解能は $0.6\mu\text{m}/\text{pixel}$ であることから、細胞が $12\text{cm}/\text{s}$ の流れであるとき $5\mu\text{s}$ の光源のフラッシュ発火を行うことができるLED光源を用いれば、実際にブレの無い画像を取得することができる。

[0152] さらに上記、1つめの明視野光源と2つめの明視野光源の発光との比較で得られた細胞の流速を利用してフィードバック制御で第1の光源の発光時間を微調整して「第1の光源のフラッシュ時間(1722) = 画素サイズ/流速」を満たすようにする画像ブレ抑制機構を使用することで、つねに第1の光源からの明視野画像は、つねに流れによる像のブレが発生しない最良の明視野画像を取得することができる。

[0153] 図17Bは、細胞形状補正機構として、上記、細胞のパルス光源によって取得される細胞画像と、これによって高精細画像の取得と、細胞の移動速度を同時に取得する手法の原理を模式的に説明する図である。静止時に直径 L_0 の円として観察される球型の試料1751があるとき、これが流速 v で下方向1756に移動しているとする。このとき電子シャッターを開放して露光状態にしたところでパルス光源から T_s の時間だけ明視野光源の光を照射すると、円のかたちは光源の発光時間分だけ重ね合わされて円の進行方向に直行する部分が引き伸ばされた形状1752となり、全体として流れ方向にのみ長さが L_1 となる。このとき、この (L_1/L_0) が撮像する高速カメラに射影されたときの画素のサイズより小さい場合は、画像として静止したものと同一画像として取得することができる。ただし、光源の照射時間を少なくすると像を撮影する画素が十分な光量を与えることができなくなるため、光源強度を強くすると同時に可能な限り (L_1/L_0) が画素サイズと同じになる程度までの長時間の

光源の照射を選択することが好ましい。次に、第2の波長の明視野光源から T_5 よりも長時間となる T_7 の間、 T_5 を照射開始するのと同じタイミングで照射すれば、上記、第1の明視野光源の照射と同様に、照射時間分だけ球の移動によって重ね合わされた像1753が得られ、この流れ方向に伸びた長さ L_2 から(L_2/T_1) (図の1757)を求めることができ、これがちょうど球が流れる速さを v として、 $v(T_7/T_5)$ と一致するはずであることから、 $v = (L_2/T_1) / (T_7/T_5)$ で求めることができる。ここで2つの画像1752、1753を同時に取得するには、上記図10にて説明をした画像分割システムユニット1008を用いればよい。

[0154] また、球の正確なサイズ(面積および周囲長)を上記得られた球が流れる速度 v を用いて求める時、たとえば像1753から次に説明をする手順で正確に求めることができる。すなわち、 T_7 の間、明視野光源を照射したことで得られた像1753のうち、流れに対して直交する最大径の場所より下流側に位置する端点(破線)を vT_7 の距離1758だけ平行移動させ、これを新たな端点の位置とし、上流側の端点の形状はそのままとすれば、露光時間中に重ね合わされた像を元にすれば静止時と同じ像1754を得ることができる。

[0155] もし単純に像1753を流速 v から得られた伸長分だけ、流れ方向の軸成分として縮小した場合には、像1755からわかるように正確な元の静止時の像と同じ形状ではなく、像1753を流れ方向に圧縮した形状となり、正しい元の輪郭形状と周囲長および面積を求めることはできない。

[0156] このことより、正確にセルソーターチップ中を流れる試料の流速を求めることは、細胞の形状を静止状態と同じ程度に高精細に取得するために必須であるのみならず、正確な細胞の形状を取得するためにも必須であることがわかる。また、高速カメラでの画像取得では、その画像解析する細胞の移動速度を、同時に1回の画像取得のみで取得することが高精度かつ高スループットで動作させる上で非常に重要である。本技術では、観察した細胞像の像を解析のために取得するのと同時に、その細胞の流速を厳密に取得することができるため、正確な時間に下流での細胞分離操作タイミングを決定すること

ができ、高精度な細胞分離を実現できる。

[0157] また、上記実施例では明視野光源および明視野像を用いた例を説明したが、蛍光光源および蛍光像を用いてもまったく同様な機構を構築できることは言うまでもない。

[0158] < 18. 画像検出型 1 細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおける画像ボケを防ぐための光学系の構成の 1 例を模式的に示す図 >

図 18 は、画像検出型 1 細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおける画像ボケを防ぐための光学系の構成の 1 例を模式的に示す図である。通常、顕微鏡の光学系を用いてターゲット粒子を観察する場合には、対物レンズの倍率のみで対象物の像の拡大率を決めるが、この場合、光学系の焦点深度と被写界深度は、対物レンズの倍率と開口数に依存することとなり、対物レンズの倍率を上げるほど光学系の焦点深度と被写界深度は浅くなる。

[0159] 微小流路中で、対象物の観察を行う場合、対象物が細胞の場合、そのサイズが数ミクロン程度の微小なものから数十ミクロンのクラスターまで様々なサイズの試料が流れるためには、流路の幅と深さは最大のサイズの試料が流れるのに十分な大きさである必要がある。しかし、画像を認識して試料の種類を判別するためには、画像の解像度は高いほうが好ましい。一般に光学顕微鏡で倍率を高めるためには、より開口数の高い対物レンズを用いる事が通常であったが、このような手段を用いると、焦点深度が浅くなり、結果として流路での被写界深度も浅くなってしまいう問題があった。画像認識型セルソーターでより高精細な画像から試料を識別するために、対象試料の拡大率を上げて、かつ、被写界深度を流路高さ程度とするためには、まず対物レンズの焦点深度および被写界深度が流路の高さ程度となる開口数の対物レンズを選び、この対物レンズの後段にズームレンズを入れれば良い。具体的には、図 18 A に示したように、対物レンズの後段で、対物レンズから送られてきた像 1801 を、ズームレンズ 1802 によって拡大し、この拡大された像 1803 を高速カメラ等の画像取得デバイス 1804 で撮像すればよ

い。

[0160] 図18Bは、本実施例で用いたズームレンズ系の光学要素の構成の一例を示したものである。まず対物レンズから入射した像1801は、凸レンズ（フォーカシングレンズ）1811、凹レンズ（バリエーター）1812、そして2つの凸レンズ（コンペンセーター）1813、（マスターレンズ）1814を組み合わせて拡大率を変化させて拡大像1803を出力する構成となっている。このように4つのレンズを構成する場合、両端の凸レンズ1811、1814の位置を動かすことなく、中央の凹レンズ1812を移動させ、これに伴って発生する焦点移動を補正するために可動な凸レンズ1813を動かして調整を行うことで、このズームレンズの全長を一定にしたまま柔軟に拡大率を変化させることが可能である。

[0161] 図18Cは、従来の光学系で観察した微粒子の像と本開示の光学系で観察した微粒子の像の例を比較して示した図である。具体的には、開口数0.6の倍率40倍の対物レンズでは5 μ m程度で、すでに像がボケてしまうことがわかる。他方、開口数（NA）が0.28となる10倍の対物レンズを用いて、これに4倍のズームレンズ光学系を組み合わせることで、同じ程度の最終拡大率として撮像可能な高さを計測すると25 μ m程度まで問題無く像を取得することができる事がわかる。この結果は、従来、40倍の対物レンズで観察していた画像と同様な倍率の画像を画像処理型セルソーティングシステムで得る場合に、10倍の対物レンズと4倍のズームレンズを組み合わせれば、セルソーティングに最適な、流路の高さ方向についてボケが無い形での画像取得ができる構成の一例を示している。

[0162] <19. 画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおけるラインセンサーセットを用いた連続高速画像取得システムの構成の1例を模式的に示した図>

図19は、画像検出型1細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュールにおける画像取得の別の1例としてラインセンサーセットを用いた連続高速画像取得システムの構成の1例を模式的に示したものである。

[0163] 図19Aは、この手法の概念を模式的に説明したものである。

[0164] 図19Bは、ラインセンサーセットを用いた連続高速画像取得システムの構成の1例を模式的に示したものである。セルソーティング部の流路1902の中央を矢印1901の方向に1列に並んで流れるように配置された流路中を、細胞101は、光学システムユニット1903を経て画像取得プレート1900上の面に結像される。プレート面上には、この細胞の流れの方向に沿って第1の流れ方向の流速検出用1次元センサーアレイ1905が配置されており、流れに直交する方向に、流路幅全体をカバーできる長さを持った明視野画像取得用1次元センサーアレイ1906が配置されている。また、必要に応じて上記、第1の画像取得用1次元センサーアレイ1906の下流側に第2の画像取得用1次元センサーアレイ1907を配置しても良い。ここでセンサーアレイ1906の上部に明視野光のみを透過するバンドパスフィルター1908を載せ、センサーアレイ1907の上部に蛍光のみを透過するバンドパスフィルター1909を配置することで、画像分割機構1として、第1の画像取得用1次元センサーアレイ1906は明視野像の取得を、そして第2の画像取得用1次元センサーアレイ1907は蛍光像を取得することができる。2次元センサーからなる高速カメラでは一定のインターバルでの2次元画像を取得できるのみであったため、インターバルの間の空隙となる時間が存在し、この時間間隔より大きな間隔で細胞が直列して流れる必要があったが、本実施例の1次元センサーアレイを用いた場合には、切れ目なく連続した各センサー素子の情報を得ることができる。そのため流速検出用1次元センサーアレイなどの手段で、細胞の流れる速度がわかれば画像取得用1次元センサーアレイからの連続信号から細胞形状を再構成して得ることができる。

[0165] 図19Cは、1次元センサーアレイの構造を模式的に示したものである、各光センサー素子1911が1次元に配置されることで、この各素子に光が照射されると、連続的に強度情報として情報が取得される。この配列の1次元センサーアレイは、上記、流速検出用1次元センサーアレイ1905、画像

取得用１次元センサーアレイ１９０６、１９０７のいずれにも利用される。

[0166] 図１９Ｄは、図１９Ｂで示した１次元センサーアレイの各素子１９１２の配置を平面ではなく、傾斜を持たせたものであり、このように配置することで被写界深度の大きさを改善させることができる。この配列の１次元センサーアレイは、特に、上記、流速検出用１次元センサーアレイ１９０５に用いることができる。

[0167] 図１９Ｅは、実際に細胞１０１が結像した画像取得プレート１９００上に配置された各１次元センサーアレイの役割と機能を説明した概念図である。流速検出用１次元センサーアレイ１９０５上を移動する細胞１０１の像から、時刻 t_1 にグラフ（細胞の光強度軸１９２２、１９２７および１次元センサーアレイ位置の軸１９２３および１９２８）で示されたような細胞の強度スペクトル１９２４を取得することができ、つぎに時刻 t_2 にグラフ１９２７で示されたような細胞の強度分布１９２８を取得することができる。このとき強度分布１９２４が強度分布１９２８に移動した時の先端部分位置１９２５から１９３０の移動量 Δx_1 （矢印１９３１）と、末端部分位置１９２６から１９３１の移動量 Δx_2 （矢印１９３２）から、移動速度 v は、 $v = \Delta x_1 / (t_2 - t_1)$ あるいは $v = \Delta x_2 / (t_2 - t_1)$ で求めることができる。また、この細胞１０１の像が、画像取得用１次元センサーアレイ１９０６に到達すると、センサーアレイの位置の軸（ x 軸）１９３５と各センサーが測定した光強度１９３４からなるグラフに示された１次元の光強度分布１９３６を得ることができる。この強度分布を上記、流速センサーアレイから得られた空間分布（ x 軸）１９４２と速度 v にあわせて vt 軸（１９４１）として、それぞれの取得時間 t に対しての空間配置で、画像再構成機構として再構成することで、図１９Ｆで示した２次元画像１９４３として細胞１０１の像を再構成することができる。

[0168] <２０．複数の結像面の像を取得するラインセンサーアレイセットの構成、および多色蛍光の画像を同時取得するラインセンサーアレイセットの構成の１例を模式的に示した図>

図２０は、画像検出型１細胞分離・精製部（セルソーティング部）モジュ

ールにおけるラインセンサーセットを用いた連続高速画像取得システムにおいて、結像面の高さが異なる複数の画像を同時取得できるラインセンサーアレイセットの構成、および多色蛍光画像を同時取得するラインセンサーアレイセットの構成の1例を模式的に示した図である。

[0169] 図20Aは、像ボケを防ぐ画像ボケ抑制機構として、図19で説明をした画像取得用1次元センサーアレイ2002、2003、2004が画像取得プレート1900上に異なる高さでが細胞の流れの方向2001に平行に配置されている構成を模式的に示したものである。図20Bは、図20Aの断面図を示したものであり、画像取得プレートの底面2005から、互いに高さdだけ異なるように底面2005上に1次元アレイ2004が、高さdだけ高い位置2008に2つめの1次元アレイ2003が、さらに高さdだけ高い位置2007に3つめの1次元アレイ2002が配置されることで、実質的に複数の結像面の高さの像を同時に取得することができる。

[0170] また図20CおよびDは、細胞像の画像を波長ごとに分岐させて同時取得するための受光素子アレイの構成を模式的に示したものである。図20Cで示したように、波長スペクトル分離機構として、取得したい波長数と同じ数の像取得用1次元センサーアレイ2014を平行に配置し、これを図20Dで示したように、矢印2001方向に流れてくる細胞101の、流れに直交する断面2010の像2011から流れに直交する線状に光線を取得して、これを波長分岐機構に送ることで、グラフ2021に示されるような波長スペクトルが1次元に展開される。これに沿って1次元センサーアレイ2014を画像取得プレート1900上の底面2005に配置することで、図19Fで説明した場合と同様な手順で、画像分割機構2として、それぞれの各波長成分について細胞画像を同時取得することができる。

[0171] <21. 高速明視野顕微鏡画像と高速蛍光顕微鏡画像を同時に取得した後の画像処理のプロセス>

図21は、高速明視野顕微鏡画像と高速蛍光顕微鏡画像を同時に取得した後の画像処理のプロセスを模式的に示した図と、高速明視野顕微鏡画像と核

蛍光染色した高速蛍光顕微鏡画像を同時に取得した画像の例を示した写真である。

[0172] 図 2 1 Aは、実際に画像を解析するための細胞像の画像処理のプロセスを説明した概念図である。まず画像取得プロセス 2 1 0 1 で取得された細胞像 1 0 1 は、画像分割プロセス 2 1 0 2 にて 2 つ以上の異なる画像分割 2 0 1 7、2 0 1 8 によって細分化される。つぎに、分割画像処理プロセス 2 0 1 3 で細分化された各微小画像ごとにオフセットを調整し、また、強度の最大値と最小値を再構成して画像の解像度を最大化する。これは画像が大きくなるほど、オフセットおよび最大値と最小値を選ぶ最適化が平均化されて局所にとって最適な値を取られないためである。また、画像分割を異なる複数のパターンで行うことで、さらに最適化が最良となる分割が含まれる割合が改善するようになる。このようにして分割画像の処理が完了したところで、画像再構成プロセス 2 1 0 4 にて分割画像を、それぞれの分割したものについて再度全体画像に戻すことができる。また、このようにして得られたそれぞれの全体画像を画像処理プロセス 2 1 0 5 にて画像の 2 値化処理や微分処理を行うことで、細胞の周囲形状や細胞内の微細構造を抽出することができる。また、画像合成プロセス 2 1 0 6 によって画像分割 2 1 0 7、2 1 0 8 をして得られたそれぞれの再構成全体画像や画像処理画像を合成することによって、より正確な細胞画像を取得することができる。

[0173] 図 2 1 Bは、本開示の細胞分析装置システムにおいて、高速明視野顕微鏡画像と核蛍光染色した高速蛍光顕微鏡画像とを 1 つの高速カメラ受光面で同時に取得した画像の例を示した写真である。上記、述べたように、ここでは予め 2 つの画像の相対座標を一致させておくことで、蛍光像によって同定できる核の位置について、明視野像の細胞像あるいは細胞クラスター像の中のどの部位に核が分布しているかを、互いの相対座標を用いて照らし合わせることができる。この相対座標の照らし合わせによって、正常細胞では、滑らかな細胞表面と正常なサイズの細胞中で、1 つの核が蛍光で光っていることがわかる。他方、がん細胞では、多核化がひとつのがん細胞の指標であるが、

写真で示したように、相対座標の照らし合わせによって、正常細胞より巨大化した細胞中で、複数の核が光っていることがわかる。また、正常な血液中では存在しないが、がん転移症例の血液では、細胞クラスターと、そのクラスター中での各細胞の核の蛍光によって、クラスター内での複数の核の蛍光が観察され、このような複数の核の蛍光から細胞クラスターであることがわかる。また、クラスターの明視野像からも、このクラスターか、あるいは細胞と血小板等の凝集塊であるかを判別することができる。

[0174] このようにして、上記本開示の装置を用いて（１）健常な血液中では存在しない細胞クラスター（塊）を血中がん細胞候補として同定して選択的に回収する手法、（２）健常な血液中では存在しない多核細胞を血中がん細胞候補として同定して選択的に回収する手法、（３）健常な血液中では存在しない巨大細胞を血中がん細胞候補として同定して選択的に回収する方法、（４）上記（１）（２）あるいは（３）に加えて蛍光強度計測で計測したがん細胞のバイオマーカー（たとえばEpCam抗体やK-ras抗体、サイトケラチン抗体など）のひとつあるいは複数に対する蛍光抗体の蛍光強度の存在と組み合わせた解析でがん細胞と同定して選択的に回収する手法、によって血中がん細胞を、従来の分子バイオマーカーではなく、「細胞の形状や集団化状態、あるいは多核化などの内部構造などの画像イメージ」という新しいバイオマーカーで同定して選択回収することが可能となる。

[0175] また、上記手法で回収した血中がん細胞候補は、引き続き、上記、微小細胞用のPCR解析技術などの遺伝子解析手段を組み合わせることで遺伝子変異の計測をすることによって、最終的にがん細胞であるかどうか、また、がん細胞であった場合にはどのような遺伝子変異の特徴を持ったがん細胞であるかを最終的に同定することが可能である。（１）については、図１の説明で述べたように明視野像による細胞あるいは細胞塊の周囲長の評価、あるいは、明視野像によるサイズと蛍光像による核の数と分布（すなわち隣接する複数の核の像について、その重心の距離が互いに例えば3 μ m以上離れている事）によって判別することができる。（２）については、図１の説明で述べたように明

視野像による細胞あるいは細胞塊の周囲長の評価、かつ、核の数と分布（すなわち隣接する複数の核の像について、その重心間の距離が互いに例えば $3\mu\text{m}$ 以内で離れている事）によって判別することができる。（３）については、図１の説明で述べたように明視野像による細胞あるいは細胞塊の周囲長の評価、かつ、細胞サイズが直径に換算して例えば $20\mu\text{m}$ を超えている事によって判別できる。あるいは、上記（１）から（３）を組み合わせ、１つ以上の合致条件があったものをがん細胞として判定することができる。

[0176] また、図１および図２１の例からもわかるように、蛍光顕微鏡画像による細胞（クラスター）の一塊の中の核数を計測したところ、蛍光で光る核数が３以上となるものは、がん組織を移植した場合の血中の細胞（Positive）にしか発見されず、比較のための健常な血中の細胞（Control）の画像については見出す事ができなかったことから、細胞（クラスター）の一塊の中の核数が３以上で計測された場合には、この細胞（クラスター）はがん細胞であると判断することができる。ただし、この場合も、上記と同様に、核数が２以下のものではがん細胞と正常細胞を識別することはできないことも示しており、上記、細胞（クラスター）の中の核数が３以上というのは、あくまでもがん細胞クラスターの存在の十分条件のひとつである。

[0177] これらの結果から、以下の３つの判断条件、

（１）細胞（クラスター）の約 $150\mu\text{m}^2$ 以上の核の面積が取得画像から計測される

（２）細胞（クラスター）の約 $250\mu\text{m}^2$ 以上の面積が取得画像から計測される

（３）細胞（クラスター）の３つ以上の核の存在が取得画像から計測される
のいずれか１つあるいは、上記３つの条件のANDでの組み合わせ、すなわち（１）かつ（２）、あるいは、（１）かつ（３）、あるいは、（２）かつ（３）あるいは、（１）かつ（２）かつ（３）を、血中がん細胞の存在の判断基準として用いることができる。

[0178] （細胞分析方法）

以上、本開示の細胞分析装置およびその装置を用いたシステムの概要を説

明した。以下においては、本開示の装置またはその一部を用いて達成可能な方法について説明する。

[0179] 本開示によれば、被験者由来の細胞を分析する方法であって、前記方法は以下の工程：

- a) 前記細胞の画像を取得するステップと、
 - b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成するステップと、
 - c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成するステップと、
 - d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析するステップと、
 - e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力するステップと、
 - f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別するステップと
- を包含する、方法が提供される。

[0180] 細胞の画像は例えば図1で説明したように取得することができる。1つの実施形態において、図1Cから図1Eで説明したとおり、高速明視野顕微鏡画像と核蛍光染色した高速蛍光顕微鏡画像とを1つの超高速カメラ受光面を分割して同時に取得した2枚の画像の顕微鏡写真として取得することもできる。1つの実施形態において、例えば図1Eの細胞クラスターの明視野像から、あらかじめ細胞が流れていないときに取得した背景画像データを画像処理によって差し引くことで、細胞あるいは細胞塊の像のみを抽出する手順と、その抽出された像の境界線（細胞あるいは細胞塊の周囲線）の長さや境界線で囲まれた領域の面積を取得する手段とを組み合わせ、明視野像だけを用いても細胞塊の判別が可能である。

[0181] 1つの実施形態において、高速で流れる細胞の取得画像から正確な細胞および細胞クラスターの形状を再構成するために、各細胞の流速を同時に計測することができ、この取得した細胞の流速の情報にあわせて細胞形状の情報

を補正した正確な再構成された細胞形状情報を得て、この結果に基づいてたとえば図1で説明した細胞形状に基づいた細胞サイズや周囲長や内部構造などの指標によって判定を行う。細胞の流速を計測するには、上記の画像取得機構について説明したとおりに行うことができる。

[0182] 1つの実施形態において、以上のようにして細胞の情報を取得した後、例えば図1FからHに模式的に示したとおり、血液から赤血球成分を除去した後の白血球成分（赤血球を除いた残りの血液中の細胞の全体）の細胞の明視野顕微鏡で観察した場合の面積のサイズ分布図を生成することができる。このグラフを用いれば、例えば、細胞サイズが $150\mu\text{m}^2$ を超えたところで増加する場合（矢印143）があれば転移がん患者の血液であることを推定することができる。

[0183] 1つの実施形態において、図1Iから図1Kに示したとおり、転移がんモデル（コペンハーゲンラット）の血液サンプルの処方前から化学療法が完了するまでの血中の細胞サイズ分布の変化を生成することができる。このようなグラフを用いることで、そのサイズ分布から、健常なモデルの血液のサイズ分布なのか、または転移がんモデルの血液のサイズ分布なのかを判定することができ、治療効果の有無を判定することもできる。

[0184] また1つの実施形態において、図1Mに示したとおり、感染症に罹患した動物モデル（コペンハーゲンラット）の血液の細胞サイズ分布を生成することができ、細胞サイズ $150\mu\text{m}^2$ から $200\mu\text{m}^2$ の領域の明確な増大と細胞サイズが $300\mu\text{m}^2$ を超えるものの顕著な増大の有無の違いから、血液の診断において、転移がん、感染症の感染を識別して判断することが可能となる。

[0185] 以上のように、本開示の細胞分析装置システムを用いて行われる細胞分析について、細胞分析装置のシステムが行う画像を基準とした細胞選別技術によれば、細胞の画像から、（1）健常な血液中では存在しない細胞クラスター（塊）を血中がん細胞候補として同定する手法、（2）健常な血液中では存在しない多核細胞を血中がん細胞候補として同定して選択的に回収する手法、（3）健常な血液中では存在しない巨大細胞を血中がん細胞候補として

同定して選択的に回収する方法、（４）血中の白血球（血液から赤血球成分を除去したあとに残った細胞の全体）のサイズ分布図から健常者の特徴と異なる転移がん患者に特徴的なサイズ分布を持ったサイズ分布を持っていることを判定する手法ならびに特徴的なサイズ分布領域の細胞を選択的に回収する方法、（５）上記（１）（２）（３）あるいは（４）に加えて蛍光強度計測で計測したガン細胞のバイオマーカー（たとえばEpCam抗体やK-ras抗体、サイトケラチン抗体など）の１つあるいは複数に対する抗体に蛍光を標識した蛍光標識抗体の存在を表す蛍光強度の検出と組み合わせた解析でがん細胞と同定して選択的に回収する手法、によって血液中に転移がんが存在するかを確認し、また、血中がん細胞を、従来の分子バイオマーカーではなく、「細胞の形状や集団化状態、あるいは多核化などの内部構造などの画像イメージ」という新しいバイオマーカーで同定して選択回収することが可能となる。また本開示は、以上のような方法をコンピュータに実行させるためのコンピュータプログラム、そのプログラムを格納する記録媒体、および以上のような方法を実行するシステムを提供する。

[0186] すなわち、本開示の他の局面において、被験者由来の細胞を分析する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムであって、前記方法は以下の工程：

- a) 前記コンピュータに、細胞の画像を取得させるステップと、
- b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、
- c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状のデータを生成させるステップと、
- d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、
- e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、
- f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞にお

ける異常を判別させるステップとを包含する、プログラムが提供される。

[0187] 本開示の他の局面において、被験者由来の細胞を分析する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムを格納する記録媒体であって、前記方法は以下の工程：

- a) 前記コンピュータに、細胞の画像を取得させるステップと、
- b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、
- c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状のデータを生成させるステップと、
- d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、
- e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、
- f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップとを包含する、記録媒体が提供される。

[0188] 本開示の他の局面において、被験者由来の細胞を分析するシステムであって、

- a) 前記細胞の画像を取得する手段と、
 - b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成する手段と、
 - c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状のデータを生成する手段と、
 - d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析する手段と、
 - e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力する手段と、
 - f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別する手段と
- を包含する、システムが提供される。

[0189] 以上のとおり、本開示の細胞分析装置またはその一部のモジュールを用いることで、被験者由来の細胞を分析して、異常細胞の有無を判定することが

できる。また本開示の他の局面においては、本開示の細胞分析装置またはその一部のモジュールを用いることで、以下の方法を達成することもできる。

[0190] すなわち、本開示の一局面において、被験体由来の細胞を分析する方法であって、

- (A) 被験体由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理する工程と、
 - (B) 処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製する工程と、
 - (C) 処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得する工程と
 - (D) 前記画像に対して上述の被験者由来の細胞を分析する方法を実施する、判別工程と、
- を含む、方法が提供される。

[0191] また本開示の他の局面において、被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する方法であって、

- (A) 被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理する工程と、
- (B) 処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製する工程と、
- (C) 前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する工程であって、前記判別は、
 - a) 処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得するステップと、
 - b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成するステップと、
 - c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成するステップと、
 - d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析するステップと、
 - e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力するステップと、

f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別するステップと

を含む、工程と、

を含む、方法が提供される。

[0192] 1つの実施形態において、細胞の処理は、細胞の濃縮、細胞のサイズ分画、蛍光抗体標識（あるいは再培養を行う場合は必要に応じてアプタマー等の可逆蛍光標識マーカー）での染色、洗浄を含むプロセスを連続で行うことを含むことができる。また1つの実施形態において、細胞のカプセル封入は、1細胞あるいは1細胞塊単位でカプセル化を行うことを含むことができる。

[0193] 1つの実施形態において、細胞の処理は、例えば、患者から採取した血液から細胞成分のみを濃縮し抽出することができ、赤血球成分とその他の成分を連続的に分離して、白血球成分（血液中の赤血球成分を除いた他の細胞の全量）を選択回収することができる。あるいは、特に白血球細胞塊を選択的に回収したい場合は、細胞サイズの閾値を体積換算で細胞サイズが $300\mu\text{m}^2$ を超えるものと設定することで、細胞クラスターのみをこの前処理段階で選択回収することもできる。その後、これに蛍光がんマーカーなどの蛍光標識剤を添加して、試料細胞と反応をさせた後、反応しなかった余剰の蛍光標識剤を洗浄除去する。

[0194] 1つの実施形態において、細胞のカプセル化は、例えば、1細胞あるいは1クラスター単位でアルギン酸カプセルに封入することができ、アルギン酸ゲルカプセルに細胞を封入させることによって、その後の細胞への外界からのコンタミネーションを防ぐことが可能となり、また、後段の細胞検出抽出部の画像検出型1細胞分離精製部（セルソーティング部）において、電気泳動力によって選択回収を行うときに、細胞の表面電荷に依存しないで、これら細胞を内包するアルギン酸カプセルの安定した一定の表面電荷によってカプセル内部の細胞への損傷を防ぎながら安定した選択回収を可能にする付加的な性能の改善を実現することができる。

[0195] 1つの実施形態において、細胞の画像の取得は、2つの光学画像による指

標での検出を行うことができる。まず1細胞レベルでの明視野顕微鏡像によって細胞の外形状、細胞内部の細胞内オルガネラの形状、細胞内部の核と細胞質とのサイズの比、細胞塊の状況を確認し、併せて、明視野像で得られた細胞の位置に対応する座標における蛍光標識に基づいた蛍光の発光の有無とそれらの位置および大きさを確認することができる。

[0196] 以上のように、本開示の細胞分析装置システムを用いて行われる細胞分析について、細胞分析装置のシステムが行う画像を基準とした細胞選別技術と、その細胞選別技術に供する細胞の前処理技術によれば、連続して細胞が処理されるため、微量の細胞をコンタミネーションや操作による消失を最小限にすることができ、細胞の種類を判別するために明視野顕微鏡画像を用いて、その形状の特徴および2次元像から得られたサイズ（体積、体積の2次元像）、ならびに周囲長から、細胞を1細胞レベルで検出して確認し、細胞がクラスター化していない孤立1細胞であるか、あるいはクラスター化した細胞集団であるかを確認し判定することができる。また細胞の種類を判別するための蛍光標識抗体での細胞の蛍光標識の有無を1細胞レベルで検出して確認し、蛍光標識された細胞について、細胞がクラスター化していない孤立1細胞であることを確認し、さらに細胞でアポトーシスが発生しているかどうかを判定することができる。また本開示は、以上のような方法をコンピュータに実行させるためのコンピュータプログラム、そのプログラムを格納する記録媒体、および以上のような方法を実行するシステムを提供する。

[0197] すなわち、本開示の他の局面において、被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムであって、前記方法は以下の工程：

（A）前記コンピュータに、被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理させる工程と、

（B）前記コンピュータに、処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製させる工程と、

（C）前記コンピュータに、前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有

無を判定させる工程であって、前記判別は、

- a) 前記コンピュータに、処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得させるステップと、
 - b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、
 - c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成させるステップと、
 - d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、
 - e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、
 - f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップと
- を含む、工程と、

を含む、プログラムが提供される。

[0198] 本開示の他の局面において、被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する方法の処理をコンピュータに実行させるコンピュータプログラムを格納する記録媒体であって、前記方法は以下の工程：

(A) 前記コンピュータに、被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理させる工程と、

(B) 前記コンピュータに、処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製させる工程と、

(C) 前記コンピュータに、前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定させる工程であって、前記判別は、

- a) 前記コンピュータに、処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得させるステップと、
- b) 前記コンピュータに、取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成させるステップと、

- c) 前記コンピュータに、前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成させるステップと、
 - d) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析させるステップと、
 - e) 前記コンピュータに、前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力させるステップと、
 - f) 前記コンピュータに、前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別させるステップと
- を含む、工程と、
- を含む、記録媒体が提供される。

[0199] 本開示の他の局面において、被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定するシステムであって、

- (A) 被験者由来の細胞試料液に含まれる細胞を処理する手段と、
 - (B) 処理された前記細胞をカプセル中に封入してカプセル粒子を作製する手段と、
 - (C) 前記被験者由来の細胞試料中の異常細胞の有無を判定する手段であって、前記判別は、
 - a) 処理された前記細胞またはカプセル粒子中に封入された前記細胞の画像を取得する手段と、
 - b) 取得した前記画像から、前記細胞の流速データを生成する手段と、
 - c) 前記流速データに基づいて正確な細胞形状データを生成する手段と、
 - d) 前記細胞形状データに基づいて細胞の情報を連続で解析する手段と、
 - e) 前記細胞形状データに基づく細胞の情報から、被験試料全体の細胞情報の分布を出力する手段と、
 - f) 前記細胞情報の分布から、前記被験者の細胞における異常を判別する手段と
- を含む、手段と、
- を含む、システムが提供される。

[0200] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は、日本国特許庁に2019年8月21日出願された特願2019-151212に対して優先権主張をするものであり、その内容はその全体があたかも本願の内容を構成するのと同様に参考として援用される。

産業上の利用可能性

- [0201] 本開示により、血中の微量な対象細胞を1細胞単位で精製して、その対象細胞の正確な遺伝子情報、発現情報の解析が実現できる。
- [0202] 本開示により、被検対象の細胞が、クラスター化しているか否か（孤立細胞であるか否か）を識別することができる。
- [0203] 本開示により、細胞でアポトーシスが発生しているか否かを判定することができる。
- [0204] 本開示により、リアルタイムで対象となる細胞あるいは細胞集団のみを分離精製して回収することができる。
- [0205] 本開示により、回収した細胞のみ、1細胞レベルで細胞内状態を計測し、1細胞レベルでゲノム解析および発現解析を行うことができる。
- [0206] 本開示により、回収した細胞のみ、再培養することができる。
- [0207] 本開示により、細胞のサイズの違い、細胞内部の核と細胞質とのサイズの比等の詳細な細胞の情報を取得して、その結果に基づいて判別をして細胞を精製することができる。
- [0208] 本開示により、血中で細胞分裂をしている細胞を回収することが可能となる。
- [0209] 本開示により、血中を循環するがん細胞の候補となる多核細胞、細胞クラスターを効果的に回収することが可能となる。

- [0210] 本開示により、複数波長の蛍光抗体で標識した細胞を複数波長の励起光で同時励起し、発せられた複数蛍光を同時検出することが可能となり、ターゲットとなる細胞を効果的に回収することが可能となる。
- [0211] 本開示により、血中の細胞からの画像イメージデータから定量的にがん細胞および疾患臓器組織切片を同定し回収することができる。
- [0212] 本開示により、血中の免疫細胞が異物を貪食したもの、あるいは血中の異物を選択的に回収し、そのゲノム解析から感染症診断を行うことができる。
- [0213] すなわち、本開示は、溶液中の微粒子を画像イメージとして取得し、その形状および光の吸収特性ならびに蛍光特性の画像イメージから特定の該当する微粒子を判別し、これを選択的に回収するために有用である。
- [0214] 本開示は、血中の微量な対象細胞を1細胞単位で精製して、その対象細胞の正確な遺伝子情報、発現情報の解析等を行うために有用である。
- [0215] 本開示はまた、血中を循環するがん細胞を識別および／または回収するための技術として有用である。本開示は、また感染症を発症させる血中の微量な対象細胞を1細胞単位で精製し、高速で、その対象細胞の正確な遺伝子情報、発現情報の解析等を行うために有用である。

符号の説明

- [0216] 1 0 0 : 入力画像
1 0 1 : 細胞
1 1 1 : 明視野の出力画像
1 2 1 : 蛍光の出力画像
3 0 1 : 細胞分析装置システム 3 0 1
3 1 0 : 細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部モジュール
3 2 0 : 細胞・細胞塊カプセル化部モジュール
3 3 0 : 画像検出型 1 細胞分離・精製部モジュール
3 4 0 : 遺伝子解析・発現解析部
3 5 0 : コンタミネーションフリー再培養部モジュール
3 6 0 : 制御解析部モジュール (コンピュータ)

- 4 0 0 : 細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部
- 4 0 1 : 試料細胞サンプル用リザーバ
- 4 0 2 : 染色剤用リザーバ
- 4 0 3 : 洗浄剤用リザーバ
- 4 0 6 : 濃縮・脱色フィルター
- 5 0 0 : 細胞濃縮・サイズ分画・染色・洗浄部の微細流路
- 5 0 3 : ピラーアレイ
- 5 0 4 : 一对の電極
- 5 0 7 : 流路
- 8 0 0 : 細胞・細胞塊カプセル化部
- 1 3 0 0 : キューブ容器
- 1 3 0 1 : 窓
- 1 3 0 4 : ダイクロイックミラー
- 1 3 0 5 : 角度調整機構
- 1 3 0 6 : フィルター
- 1 3 1 1 : 画像サイズ調整システムユニット
- 1 3 1 2 : 可動式遮蔽板
- 1 3 1 3 : レンズ
- 1 3 1 4 : 高速カメラ
- 1 3 1 5 : レンズ
- 1 3 1 6 : 画像イメージング素子
- 1 4 0 1 : 蛍光光量計
- 1 4 0 2 : 蛍光光量計
- 1 6 0 0 : 画像検出型 1 細胞分離・精製部
- 1 6 0 5 : サイドシース流
- 1 6 0 6 : 細胞観察領域
- 1 6 0 7 : ゲル電極
- 1 6 0 8 : 流路

- 1 6 0 9 : 入口
- 1 6 1 0 : 出口
- 1 6 1 1 : 電線
- 1 6 1 3 : 電線
- 1 9 0 0 : 画像取得プレート
- 1 9 0 2 : 流路
- 1 9 0 5 : 流速検出用 1 次元センサーアレイ
- 1 9 0 6 : 第 1 の画像取得用 1 次元センサーアレイ
- 1 9 0 7 : 第 2 の画像取得用 1 次元センサーアレイ
- 1 9 0 8 : バンドパスフィルター
- 1 9 0 9 : バンドパスフィルター
- 1 9 1 1 : 光センサー素子
- 1 9 1 2 : 1 次元センサーアレイ素子