

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4921356号
(P4921356)

(45) 発行日 平成24年4月25日(2012.4.25)

(24) 登録日 平成24年2月10日(2012.2.10)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N	15/14	(2006.01)	GO 1 N	15/14	P
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	GO 1 N	15/14	C
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	A
			C 1 2 Q	1/06	

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-510369 (P2007-510369)	(73) 特許権者	390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成18年3月14日 (2006.3.14)	(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/305012	(72) 発明者	石坂 正樹 日本国兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(87) 国際公開番号	W02006/103920	(72) 発明者	井邨 泰之 日本国兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(87) 国際公開日	平成18年10月5日 (2006.10.5)	(72) 発明者	岸 和希 日本国兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
審査請求日	平成21年3月3日 (2009.3.3)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2005-95238 (P2005-95238)		
(32) 優先日	平成17年3月29日 (2005.3.29)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 癌・異型細胞および凝集粒子を弁別する方法および細胞分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の子宮頸部細胞をフローサイトメータにて計測し、個々の細胞について散乱光信号を取得し、各散乱光信号の波形を解析することにより、前記波形の幅、半値幅、面積、差分積分値/ピーク値、正規化2次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれか2つ以上の特徴パラメータを算出し、その特徴パラメータを組合わせて用いて前記複数の子宮頸部細胞から癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞凝集塊とを弁別する方法。

【請求項2】

前記弁別する工程はさらに、癌・異型細胞と白血球凝集塊とを弁別する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記特徴パラメータは、差分積分値/ピーク値、正規化2次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれかである請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記弁別する工程はさらに、癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞とを弁別する、請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記特徴パラメータは、幅、半値幅、差分積分値/ピーク値、正規化2次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれかである請求項4記載の方法。

【請求項6】

子宮頸部細胞を含む試料流を形成するためのフローセルと、
 フローセル中の前記試料流に光を照射するための光源と、
 前記試料流からの細胞の散乱光を検出して散乱光信号を出力する検出部と、
 出力された前記散乱光信号の波形を解析することにより、前記波形の幅、半値幅、面積、差分積分値 / ピーク値、正規化 2 次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれか 2 つ以上の特徴パラメータを算出する波形解析部と、
算出された前記特徴パラメータを組合わせて用いて前記子宮頸部細胞から癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞凝集塊とを弁別するための制御部と、を備えた細胞分析装置。

【請求項 7】

前記特徴パラメータは、差分積分値 / ピーク値、正規化 2 次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれかであり、前記制御部は、前記特徴パラメータに基づいて、癌・異型細胞と白血球凝集塊とを弁別する請求項 6 記載の細胞分析装置。

10

【請求項 8】

前記特徴パラメータは、幅、半値幅、差分積分値 / ピーク値、正規化 2 次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれかであり、前記制御部は、前記特徴パラメータに基づいて、癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞を弁別する請求項 6 記載の細胞分析装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、生体から採取された細胞群（検体）から癌・異型細胞を弁別する方法およびその弁別に必要な凝集粒子の弁別方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

癌・とくに子宮頸癌の早期発見のためのスクリーニング法として、健康診断等では、細胞診が有効に利用されている。

【0003】

ここで、子宮頸癌の細胞診は、子宮頸部表面を綿棒やスクレーパー等で擦過し、擦過した細胞を、直ちにスライドガラス上に塗抹して標本を作り、顕微鏡等で観察することにより診断を行っている。顕微鏡による細胞の形態観察による診断は、細胞検査士が、検体毎に行っているのが実情であり、精度、処理速度の点で、改善が求められている。

30

【0004】

近年、細胞検体を自動的に検査して、癌細胞の有無を判断する装置が知られている。

この自動判別装置は、子宮頸癌細胞を含む検体をスライドガラスに塗抹して塗抹標本作製し、標本の細胞核及び細胞質をパパニコウロウ染色で染色し、標本細胞の形態イメージを処理した形態情報から癌細胞の有無を判別している。しかし、この自動細胞判別装置の性能は、正常細胞の除外効率が 25%、処理速度が 8 ~ 10 検体 / 時間程度である。このような精度、処理速度は、健康診断で癌の有無を判別する現場担当者にとって、満足のゆくものではない。

【0005】

一方、細胞形態観察によらず、癌細胞に特異的なマーカーを検出することにより、癌細胞の有無を判断する細胞診断方法がある。

40

【0006】

例えば、特許文献 1 には、子宮頸癌及びその前癌状態に特異的なマーカーとして、子宮頸癌関連タンパク質及びそれを認識する抗体を用いたイムノアッセイが提案されている。

【0007】

特許文献 2 には、子宮頸部塗抹標本だけでなく、個々に分散された細胞群の検体について、腫瘍細胞及びそれらの前駆細胞の自動検出方法が提案されている。これは、癌細胞における 2 種以上のマーカーを、マーカーに特異的に反応する抗体又は核酸プローブに蛍光標識した試薬を用いて、前記マーカーと結合した試薬の蛍光シグナルの有無を自動的に測定することにより癌細胞の有無を検出する方法である。

50

【0008】

しかしながら、このようなマーカーを用いる方法でも、癌・異型細胞の弁別において、操作の簡便性や、測定の精度や速度などがまだ十分に満足できるものではない。

【特許文献1】特表2001-500609号公報

【特許文献2】特開2002-296274号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

この発明はこのような事情を考慮してなされたもので、フローサイトメトリーを用い、得られる光学信号の波形を分析することにより、癌・異型細胞を能率よく高精度に分別する方法と、癌・異型細胞の分別に必要な凝集粒子の弁別方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

この発明は、複数の子宮頸部細胞をフローサイトメータにて計測し、個々の細胞について散乱光信号を取得し、各散乱光信号の波形を解析することにより、前記波形の幅、半値幅、面積、差分積分値/ピーク値、正規化2次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれか2つ以上の特徴パラメータを算出し、その特徴パラメータを組合わせて用いて前記複数の子宮頸部細胞から癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞凝集塊とを弁別する方法を提供するものである。ここで、散乱光信号とは、前方および側方散乱光を表す信号の内の少なくとも1つを含む。

【0011】

別の観点からこの発明は、子宮頸部細胞を含む試料流を形成するためのフローセルと、フローセル中の前記試料流に光を照射するための光源と、前記試料流からの細胞の散乱光を検出して散乱光信号を出力する検出部と、出力された前記散乱光信号の波形を解析することにより、前記波形の幅、半値幅、面積、差分積分値/ピーク値、正規化2次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれか2つ以上の特徴パラメータを算出する波形解析部と、算出された前記特徴パラメータを組合わせて用いて前記子宮頸部細胞から癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞凝集塊とを弁別するための制御部と、を備えた細胞分析装置を提供するものである。

【発明の効果】

【0012】

フローサイトメータから得られる子宮頸部細胞の散乱光信号の波形からその波形の幅、半値幅、面積、差分積分値/ピーク値、正規化2次モーメントおよび波打ち度合いのうちのいずれか2つ以上の特徴パラメータを算出し、その特徴パラメータを組合わせて用いて、癌・異型細胞の弁別を行うので、顕微鏡で観察する方法やマーカーのみによって弁別する方法に比べて、多量の細胞に対して簡単に、能率よく、また、高精度に行うことができる。

【0013】

また、以下に述べる本発明の実施形態におけるフローサイトメータの構成では、散乱光信号に加えて蛍光信号を検出できるようになっており、本発明の方法に前記蛍光標識されたマーカーによって検出する方法を組み合わせることも可能である。その場合には蛍光標識されたマーカーのみによって検出する方法における前記測定精度の問題を本発明により大幅に改善できることが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】この発明に用いるフローサイトメータの光学系の構成図である。

【図2】この発明に用いるフローサイトメータの制御系のブロック図である。

【図3】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。

【図4】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。

【図5】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。

10

20

30

40

50

- 【図 6】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。
 【図 7】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。
 【図 8】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。
 【図 9】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。
 【図 10】この発明の信号波形と特徴パラメータとの関係を示す説明図である。
 【図 11】この発明の処理手順を示すフローチャートである。
 【図 12】この発明による撮像画像の一例である。
 【図 13】この発明による撮像画像の一例である。
 【図 14】この発明による撮像画像の一例である。
 【図 15】この発明による撮像画像の一例である。 10
 【図 16】この発明の第 1 実施例の弁別能を示す説明図である。
 【図 17】この発明の第 2 実施例の弁別能を示す説明図である。
 【図 18】この発明の第 3 実施例の弁別能を示す説明図である。
 【図 19】この発明の第 3 実施例の弁別能を示す説明図である。
 【図 20】この発明の第 3 実施例の弁別能を示す説明図である。

【符号の説明】

【0015】

- | | | |
|-----|------------|----|
| 100 | フローセル | |
| 101 | レンズ | |
| 102 | ビームストッパ | 20 |
| 103 | 対物レンズ | |
| 104 | ダイクロイックミラー | |
| 105 | 検出器 | |
| 106 | 検出器 | |
| 107 | 対物レンズ | |
| 108 | ダイクロイックミラー | |
| 109 | ダイクロイックミラー | |
| 110 | 干渉フィルタ | |
| 111 | 検出器 | |
| 112 | ダイクロイックミラー | 30 |
| 113 | 干渉フィルタ | |
| 114 | 検出器 | |
| 115 | ダイクロイックミラー | |
| 116 | 干渉フィルタ | |
| 117 | 検出器 | |
| 118 | 干渉フィルタ | |
| 119 | 検出器 | |
| 120 | パルスレーザ | |
| 121 | カメラ | |
| 123 | A r イオンレーザ | 40 |

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、図面に示す実施形態を用いてこの発明を詳述する。これによってこの発明が限定されるものではない。

フローサイトメータの構成

光学系

まず、この発明には、例えば、図 1 に示すような光学系を有するフローサイトメータが用いられる。

このフローサイトメータでは、フローセル 100 を通過する細胞又は粒子からの前方蛍光 (FFL) および側方蛍光 (FL1 ~ FL3) を検出するとともに、前方散乱光 (FS

C) および側方散乱光 (SSC) を検出し、カメラ 121 で細胞 (粒子) 画像を撮像している。また、このフローサイトメータでは、フローセル 100 で細胞又は粒子が 1 個ずつ流れるように細胞又は粒子を含む試料流が形成され、形成された試料流中の細胞又は粒子から光を検出するようにしている。

【0017】

さらに詳述すると、まず連続発光の Ar イオンレーザー 123 から出射された 488 nm の発振波長を持つ青色レーザーがレンズ 101 を経ることにより、短径 10 μm、長軸 100 μm 程度の扁平な楕円形ビームプロファイルを持つように整えられて、フローセル 100 に入射する。

フローセル 100 に入射した光は、フローセル 100 を経てビームストップ 102 に集光し、ここで遮られる。細胞又は粒子からの前方蛍光 (FFL) および前方散乱光 (FSC) は対物レンズ 103 で集められ、530 nm 以上の波長の光が通過する性質を持ったダイクロイックミラー 104 を経て、10 度前後の立体角の前方蛍光 (FFL) は検出器 (光電子増倍管) 105 に入射され、そこで検出される。530 nm 以下の波長を持つ 10 度前後の立体角の前方散乱光 (FSC) が検出器 (フォトダイオード) 106 に入射され、そこで検出される。

【0018】

一方、細胞又は粒子から発せられた側方蛍光および側方散乱光は、フローセル 100 の側方に配置された高い開口数 (NA) をもつ対物レンズ 107 で集められる。対物レンズ 107 を出射した光は、まず 740 nm より短い波長の光を反射する性質を持ったダイクロイックミラー 108 に入射する。このミラー 108 を反射した側方蛍光および側方散乱光は、まず 500 nm 以下の波長をもつ光を反射する性質を持ったダイクロイックミラー 109 に入射する。ミラー 109 を反射した光は、中心波長 474 nm、通過波長 49 nm の干渉フィルタ 110 を経て検出器 (光電子増倍管) 111 に入射され、そこで側方散乱光 (SSC) 検出がされる。

ダイクロイックミラー 109 を透過した光は、550 nm 以下の波長を持つ光を反射する性質を持ったダイクロイックミラー 112 に入射する。ミラー 112 を反射した光は、中心波長 534 nm、通過波長 26 nm の干渉フィルタ 113 を経て検出器 (光電子増倍管) 114 に入射され、そこで、側方緑蛍光 (FL1) が検出される。

【0019】

ダイクロイックミラー 112 を通過した光は、ダイクロイックミラー 115 で 630 nm 以下と 630 nm 以上の光に分けられる。630 nm 以下の光は、中心波長 597 nm、通過波長 49 nm の干渉フィルタ 116 を経て検出器 (光電子増倍管) 117 に入射され、そこで側方橙蛍光 (FL2) が検出される。630 nm 以上の光は、中心波長 689 nm、通過波長 46 nm の干渉フィルタ 118 を経て、検出器 (光電子増倍管) 119 に入射され、そこで側方赤蛍光 (FL3) が検出される。

【0020】

捕捉された前方散乱光 (FSC)、前方蛍光 (FFL)、側方散乱光 (SSC)、側方緑蛍光 (FL1)、側方橙蛍光 (FL2)、側方赤蛍光 (FL3) を表す電気信号波形は A/D 変換器 124 (図 2) により A/D 変換後、分析装置 200 (図 2) に入力される。細胞 (粒子) がフローセルを通過中に、必要に応じて 780 nm の発振波長を持つ近赤外のパルスレーザー 120 が発光する。このパルスレーザー 120 からのレーザー光は透過照明として働き、フローセル 100 から出射した光は、ダイクロイックミラー 108 を通過し、カメラ 121 に結像する。このようにして細胞又は粒子の静止画像の捕捉が可能となる。

【0021】

なお、上記実施形態においては、散乱光信号を用いて、癌・異型細胞を弁別する方法を述べたが、細胞を癌や異型細胞と特異的に反応する蛍光マーカーで染色し、前記蛍光マーカーと結合した細胞の蛍光信号を取得し、蛍光強度、蛍光パルス幅及び蛍光パルス面積等の蛍光パラメータを算出し、これら蛍光パラメータのうち少なくとも 1 つと、以下に述べ

10

20

30

40

50

る散乱光の特長パラメータの少なくとも1つと組み合わせることにより、より高精度に癌・異型細胞を弁別することができる。例えば、腺癌細胞検出用マーカーとして、R - P E 標識サイトケラチン8抗体、子宮頸部扁平上皮系異型細胞用マーカーとして、Alexa488標識NMP179抗体を用いることができる。これらのマーカーを用いて細胞を染色し、例えば図1に示すような光学系を有するフローサイトメータで測定し、各標識由来の蛍光(R - P E 標識の場合は橙色蛍光、Alexa488標識の場合は緑色蛍光)を検出して、ある一定量以上の蛍光強度を有する細胞について散乱光の特長パラメータを用いて解析することにより、腺癌あるいは扁平上皮異型細胞以外の細胞を効率よく除外することができる。

【0022】

制御系

次に、図2はフローサイトメータの制御系を示すブロック図である。同図に示すように、制御部200は、検出器105、106、111、114、117、119からの信号波形をA/D変換器124を介して受け、得られた波形データを波形データ格納部201に一旦格納し、格納したデータを波形データ分析部202で分析し、分析結果に基づいて細胞(粒子)を細胞(粒子)弁別部203で弁別し、弁別結果を出力部400に出力させる。

さらに、制御部200では、入力部300からの設定条件に基づき、撮像制御部204がパルスレーザー120を発光させる。

それによって、カメラ121は細胞(粒子)を撮像し、その画像データは画像データ格納部204に格納され、必要に応じて、出力部400から出力される。また、波形データ格納部201に格納された信号波形とデータ格納部204に格納された撮像された細胞(粒子)画像とは対応付けられたテーブルが制御部205に記憶されている。

【0023】

ここで、制御部200は、マイクロコンピュータやパーソナルコンピュータにより一体的に構成される。

入力部300は、主に波形データ分析部202の分析条件、細胞(粒子)弁別部203の弁別条件および、撮像制御部204の撮像条件などを入力設定するためのものであり、キーボード、タッチパネル、又はマウスなどにより構成される。

出力部はCRTやLCD又はプリンタなどで構成される。

【0024】

なお、A/D変換器124は、1つのアナログ信号波形を、20nsecのサンプリング周期で時刻X0, X1, X2, …, Xnにおいてサンプリングし、最大電圧10Vとベースライン(Baseline)電圧0.05Vの間の計測電圧を8ビットの分解能で量子化してデジタル信号に変換するようになっている。

【0025】

そこで、波形データ分析部202では、次の(1)~(10)に示す10種類の特徴パラメータについて分析計算を行う。

(1) ピーク値〔Peak〕：図3に示すように波形の最大値であり、

【数1】

$$\text{Peak} \equiv \max_{0 \leq i \leq n} (x_i) \quad \dots (1)$$

で表される。

【0026】

(2) 幅〔Width〕：図3に示すようにベースラインBaselineより大きい部分の幅であり、

【数2】

$$\text{Width} \equiv \arg \max_{p \leq i \leq n} (x_i; x_i > \text{BaseLine}) - \arg \min_{0 \leq i < p} (x_i; x_i > \text{BaseLine}) \quad \dots (2)$$

10

20

30

40

50

で表される。但し、PはX pがピーク値になる添字である。

【0027】

(3) 半値幅〔HW〕：図4に示すようにPeak/2の高さにおける波形幅であり、
【数3】

$$HW \equiv \arg \max_{p \leq i \leq n} \left(x_i; x_i > \frac{Peak}{2} \right) - \arg \min_{0 \leq i < n} \left(x_i; x_i > \frac{Peak}{2} \right) \quad \dots (3)$$

で表される。但し、PはX pがピーク値になる添字である。

【0028】

(4) 面積〔Area〕：図5に示すように波形の面積に対応し、
【数4】

$$Area \equiv \sum_{i=0}^n \max(x_i, 0) \quad \dots (4)$$

で表される。

【0029】

(5) 差分積分値÷ピーク値〔B〕
【数5】

$$B \equiv \sum_{i=1}^n (\max(x_i, x_{i-1}) - \min(x_i, x_{i-1})) \div Peak \quad \dots (5) \quad 20$$

で表される。ここで、差分積分値とは、隣り合うサンプリングデータの差の絶対値の累積加算値を表す。

【0030】

(6) 正規化2次モーメント〔M〕
【数6】

$$M \equiv \frac{\sum_{i=0}^n (\max(x_i, 0) \cdot (p-i)^2)}{Peak \cdot Width^2} \quad \dots (6)$$

で表される。但し、PはX pがピーク値となる添字である。

30

Mは波形の波打ち度合い、特に左右(時間軸)方向に離れた部位にピーク値(山なり又は隆起)が存在する度合いを評価する。図6(a)の波形のMは横軸のiにおいて値が大きくなるが、図6(b)ではMの値は小さい。

なお、式(6)では、Mの値を正規化するために分母の値で除算している。

【0031】

(7) 波打ち度合い〔J〕
【数7】

$$\begin{aligned} \mathbf{a} &= \sum_{i=0}^{p-1} \max \left(x_i - i \cdot \frac{Peak}{p}, 0 \right) \\ \mathbf{b} &= -1 \cdot \sum_{i=0}^{p-1} \min \left(x_i - i \cdot \frac{Peak}{p}, 0 \right) \\ \mathbf{c} &= \sum_{i=p}^n \max \left(x_i - (n-i) \cdot \frac{Peak}{n-p}, 0 \right) \\ \mathbf{d} &= -1 \cdot \sum_{i=p}^n \min \left(x_i - (n-i) \cdot \frac{Peak}{n-p}, 0 \right) \end{aligned} \quad 40$$

とするとき、

$$J = (\mathbf{a} + \mathbf{c}) \times (\mathbf{b} + \mathbf{d}) \quad \dots (7)$$

50

で表される。但し、 p は X_p がピーク値となる添字である。

J は波形の波打ち度合、特に三角形から乖離度合を評価するためのパラメータである。つまり、 J は図 7 (a) に示すように破線の上にある部分の面積と下にある部分の面積との積であり、図 7 (b) のような波形では J の値は非常に小さくなる。

【 0 0 3 2 】

(8) 幅 ÷ ピーク値 [C] : 波形の形状、特に扁平度合を評価するものであり、
【数 8】

$$C \equiv \frac{Width}{Peak} \quad \dots (8)$$

10

で表される。つまり、図 8 (a) の場合は図 8 (b) の場合に比べて C の値が大きくなる。

(9) 面積 ÷ (幅 × ピーク値) [D] : 図 9 に示すように波形の形状、特に三角形に近いのか、方形に近いのかを評価するパラメータであり、

【数 9】

$$D \equiv \frac{Area}{Peak \cdot Width} \quad \dots (9)$$

で表される。

図 9 (a) の場合にはその値は大きくなり、図 9 (b) の場合にはその値は小さくなる

20

【 0 0 3 3 】

(1 0) ピーク左側面積 ÷ ピーク右側面積 [E] : 波形の形状、特にピーク値の (時間軸での) 位置およびその左右での不均衡度合を評価するものであり、

【数 1 0】

$$E \equiv \frac{\sum_{i=0}^{p-1} \max(x_i, 0)}{\sum_{i=p}^n \max(x_i, 0)} \quad \dots (10)$$

で表される。

30

P は X_p がピーク値となる添字である。図 1 0 (a) の場合、 E は大きく、図 1 0 (b) の場合、 E は小さくなる。

図 1 ~ 1 0 に示されるように、散乱光信号波形は、複雑な形態したものを含み、前述した特徴パラメータは複雑な散乱光信号波形の形態的特徴を反映したものとなっている。

なお、波形分析部 2 0 2 で分析された各特徴パラメータは、画像データ格納部に記憶された細胞 (粒子) 画像と対応付けられて、制御部 2 0 5 に記憶される。

次に、図 2 における細胞 (粒子) 弁別部 2 0 3 は、波形データ分析部 2 0 2 で算出された上記の各特徴パラメータを予めそれぞれ設定されたしきい値 (入力部 3 0 0 から入力される) と比較し、そのしきい値以上、又は未満のものを求め、フローサイトメータで検出された全細胞 (全粒子) に対して除外することによって所望の細胞 (粒子) を弁別する。例えば、単一細胞 (粒子) と凝集塊との弁別、癌・異型細胞と白血球凝集塊との弁別、癌・異型細胞と正常扁平上皮細胞との弁別、および癌・異型細胞と扁平上皮細胞凝集塊との弁別などを行う。

40

【 0 0 3 4 】

測定動作

このような構成における全体的な測定動作の流れを図 1 1 に示すフローチャートを用いて説明する。

まず、測定用試料を調製し (ステップ S 1) 、調製した試料を図 1 および図 2 に示すフローサイトメータに供給して測定を行う (ステップ S 2) 。

次に、各検出器から得られる信号波形を制御部 2 0 0 の波形データ格納部 2 0 1 に格納

50

し(ステップS3)、格納した信号波形から波形データ分析部202が特徴パラメータを算出する(ステップS4)。そして、細胞(粒子)弁別部203は、算出された特徴パラメータを用いて測定用試料に含まれる細胞(粒子)の種類を弁別し、その結果を出力部400に出力させる。なお、撮像制御部204は必要な細胞(粒子)画像をカメラ121に撮像させ、画像データ格納部205に画像データを格納させると共に、画像を出力部400に出力させる。

【実施例1】

【0035】

癌・異型細胞は、検体中に白血球凝集塊、正常扁平上皮細胞、および正常扁平上皮細胞凝集塊などと混在する。従って、その中から癌・異型細胞を弁別するためには、凝集塊から単一細胞を弁別することが必要条件となる。

そこで、この発明によるその弁別能を模擬的に調べるため、細胞の代わりに人工粒子、つまりビーズを用いて測定を行った。

図11に示す手順に従い、まず、粒径9 μ mの単一ビーズ(ラテックス粒子)約12000個をレットシース液(シスメックス(株)製)に懸濁させ、測定試料(1)を調製した。続いて、若干の自然凝集を生じている粒径5 μ mの単一ビーズ(ラテックス粒子)約12000個をレットシース液(シスメックス(株)製)に懸濁させ、測定試料(2)を調製した(ステップS1)。そして、各測定試料をフローサイトメータで測定した(ステップ2)。

【0036】

次に、図11のステップS3に示すように、前方散乱光による信号波形のとり込みを行い、同時にカメラ121(図1)による撮像を行った。ここで、各粒子に対応する信号波形は、撮像された粒子画像と対応付けられて記憶される。

ステップS4において、前述の10種類の特徴パラメータを算出した。ここで、特徴パラメータは、撮像された画像と対応付けられて記憶される。各粒子の特徴パラメータは、各粒子の撮像画像と対応付けて記憶されているので、弁別する対象粒子を画像データ格納部204に記憶された撮像画像から選択し、選択された撮像画像に対応する特徴パラメータとしきい値を比較することによって、特徴パラメータによる弁別能が分かる。

そして、しきい値を適当に設定し撮像画像と比較した結果、特徴パラメータB(差分積分値 \div ピーク値)、又はM(正規化2次モーメント)を用いると、ビーズ凝集(粒子凝集)から単一ビーズ(単一粒子)が比較的良好に弁別できることが確認された。

撮像された画像から5 μ mビーズのビーズ凝集を選択し、選択された画像に対応する特徴パラメータBとしきい値を比較した。しきい値は、ビーズ凝集と単一ビーズを良好に弁別できる値を設定し、しきい値2.2以上のものをビーズ凝集とし、しきい値2.2未満のものを単一ビーズとして、判定するようにした。その結果、撮像画像にて確認した5 μ mビーズのビーズ凝集に対して11.4%がしきい値2.2未満のものであり、単一ビーズとして判定された。また、撮像された画像から9 μ mビーズの単一ビーズを選択し、選択された画像に対応する特徴パラメータBとしきい値を比較した。しきい値は、ビーズ凝集と単一ビーズを良好に弁別できる値を設定し、しきい値2.2以上のものをビーズ凝集とし、しきい値2.2未満のものを単一ビーズとして、判定するようにした。その結果、撮像画像で確認した9 μ m単一ビーズに対して97.1%がしきい値2.2未満のものであり、単一ビーズとして判定された。従って、結果的に85.7%の精度(図16において(2)の%値が大きく、(1)の%値が小さいほど弁別能が良いことになるので(2)-(1)の値を便宜的に「精度」と定義した。以下同様。)で単一ビーズが弁別されることが分かる。そのデータを図16に示す。

【0037】

また、特徴パラメータMを用いた場合、しきい値2100以上のものをビーズ凝集とし、しきい値2100未満のものを単一ビーズとして、判定するようにした。その結果、撮像画像にて確認した5 μ mビーズのビーズ凝集に対して2.9%がしきい値2100未満のものであり、単一ビーズとして判定された。また、撮像画像にて確認した9 μ mビーズの

10

20

30

40

50

単一ビーズに対して99.7%がしきい値2100未満のものであり、単一ビーズとして判定された。従って、結果的に96.8%の精度で単一ビーズが弁別されることが分かる。

なお、9 μ m単一ビーズと5 μ mビーズの凝集の各撮像画像例を図12と図13に示す。

【実施例2】

【0038】

次に、臨床検体として子宮頸部細胞を用いて測定した場合について説明する。

まず、図11のステップS1に示すように、次の要領で測定試料を調製した。

保存液PreservCyt (Cytoc) 中に保存した臨床検体(約 2×10^5 細胞/tube)を10,000rpmの回転速度で1分間、遠心処理し、得られたペレットに10% N-アセチル-L-システイン PBS溶液を添加後、再度10,000rpmの回転速度で1分間、遠心処理し、粘液除去したペレットを得た。

このペレットに、Zamboni固定溶液(0.2% 2,4,6-トリニトロフェノール, 2% パラホルムアルデヒド)を添加し、10分間の反応後、10,000rpmの回転速度で1分間、遠心後、上清を捨て、酵素反応液(0.2% コラゲナーゼ タイプI, 0.2% コラゲナーゼ タイプII, 0.1% プロテアーゼ(SIGMA) 含有PBS)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで2分30秒間反応させた。反応後、氷上で冷やした1% プロテアーゼインヒビター(SIGMA) PBS溶液を添加し、10,000rpmの回転速度で1分間、遠心後、上清を捨て、細胞分散処理されたペレットを調製した。

さらに、PBST(0.05% Tween 20入りPBS)を添加して懸濁し、メッシュ径100 μ mのフィルターを通すことにより細胞凝集物を除去した後、10,000rpmの回転速度で1分間、遠心し、上清を捨て、レットシース液(シスメックス(株))を添加して再懸濁し、測定用試料を調製した。そして、測定試料をフローサイトメータで測定した(ステップ2)。

【0039】

次に、図11のステップS3に示すように、前方散乱光と側方散乱光による信号波形のとり込みを行い、同時にカメラ121(図1)による撮像を行った。

まず、撮像した画像の形態的特徴から、測定された白血球凝集塊、扁平上皮細胞、扁平上皮細胞凝集塊および異型細胞を確認して分類し、それぞれの数 N_1, N_2, N_3, N_4 を計数した。異型細胞と扁平上皮細胞の画像例を図14と図15に示す。

【0040】

次に、図11のステップS4において表1に示す前方散乱光と側方散乱光による特徴パラメータの算出を行い、ステップS5において表1に示す全ての特徴パラメータとしきい値を順に比較した。まず、撮像画像にて確認した白血球凝集塊を選択し、選択された画像に対して特徴パラメータMとしきい値を比較した。しきい値20,000以上のものを白血球凝集塊とし、しきい値20,000未満のものを異型細胞として、判定するようにした。次に、しきい値20,000未満のものであり、異型細胞として判定されたものに対して、特徴パラメータWidthにおいて、しきい値1,200以上のものを白血球凝集塊とし、しきい値1,200未満のものを異型細胞として、判定するようにした。このように、順番にひとつの特徴パラメータにおいてしきい値以上又は未満の細胞を異型細胞でないもの(白血球凝集塊)とし、表1の全ての特徴パラメータとしきい値の比較が終わった段階で異型細胞でないものと判定されなかったものを異型細胞として、計数された個数を n_1 とし、 $n_1 / N_1 \times 100$ を算出した。

次に、撮像画像にて確認した扁平上皮細胞を選択し、選択された画像に対して特徴パラメータMとしきい値を比較した。しきい値20,000以上のものを扁平上皮細胞とし、しきい値20,000未満のものを異型細胞として、判定するようにした。次に、しきい値20,000未満のものであり、異型細胞として判定されたものに対して、特徴パラメータWidthにおいて、しきい値1,200以上のものを扁平上皮細胞とし、しきい値1,200未満のものを異型細胞として、判定するようにした。このように、順番にひとつの特徴パラメータにおいてしきい値以上又は未満の細胞を異型細胞でないもの(扁平上

皮細胞)とし、表1の全ての特徴パラメータとしきい値の比較が終わった段階で異型細胞でない判定されなかったものを異型細胞として、計数された個数を n_2 とし、 $n_2 / N_2 \times 100$ を算出した。

次に、撮像画像にて確認した扁平上皮細胞凝集を選択し、選択された画像に対して特徴パラメータMとしきい値を比較した。しきい値20,000以上のものを扁平上皮細胞凝集とし、しきい値20,000未満のものを異型細胞として、判定するようにした。次に、しきい値20,000未満のものであり、異型細胞として判定されたものに対して、特徴パラメータWidthにおいて、しきい値1,200以上のものを扁平上皮細胞凝集とし、しきい値1,200未満のものを異型細胞として、判定するようにした。このように、順番にひとつの特徴パラメータにおいてしきい値以上又は未満の細胞を異型細胞でないもの(扁平上皮細胞凝集)とし、表1の全ての特徴パラメータとしきい値の比較が終わった段階で異型細胞でない判定されなかったものを異型細胞として、計数された個数を n_3 とし、 $n_3 / N_3 \times 100$ を算出した。

次に、撮像画像にて確認した異型細胞を選択し、選択された画像に対して特徴パラメータMとしきい値を比較した。しきい値20,000以上のものを異型細胞でないものとし、しきい値20,000未満のものを異型細胞として、判定するようにした。次に、しきい値20,000未満のものであり、異型細胞として判定されたものに対して、特徴パラメータWidthにおいて、しきい値1,200以上のものを異型細胞でないものとし、しきい値1,200未満のものを異型細胞として、判定するようにした。このように、順番にひとつの特徴パラメータにおいてしきい値以上又は未満の細胞を異型細胞でないものとし、表1の全ての特徴パラメータとしきい値の比較が終わった段階で異型細胞でない判定されなかったものを異型細胞として、計数された個数を n_4 とし、 $n_4 / N_4 \times 100$ を算出した。

【0041】

【表1】

光信号の種類	特徴パラメータ	除外するしきい値
前方散乱光	M	20,000以上
	Width	1,200以上
	J	2,500以上
	B	3.0以上
	M	4,000未満
	Peak	6.5以上
	C	80未満・270以上
	D	0.5未満・0.7以上
側方散乱光	C	1,000以上
	M	2,000未満
	B	7.0以上
	M	20,000以上
	J	2,000以上
前方散乱光	E	0.3未満・2.3以上
側方散乱光	E	0.2未満・3.5以上

【0042】

その結果を図17に示す。つまり、白血球凝集塊に対し8.5%、扁平上皮細胞に対し2.8%、扁平上皮細胞凝集に対し0.9%が異型細胞として判定され、これらの平均が4.1%となり、異型細胞に対し78.8%が異型細胞として判定され、平均との差が74.7%となるので、異型細胞が効率よく弁別されることが分かる。

【実施例3】

【 0 0 4 3 】

第2実施例の測定時に得られた前方散乱光による信号波形から、前述の10種類の特徴パラメータを算出し、その各特徴パラメータの、

- (イ) 異型細胞と白血球凝集塊、
- (ロ) 異型細胞と扁平上皮細胞、
- (ハ) 異型細胞と扁平上皮細胞凝集塊、

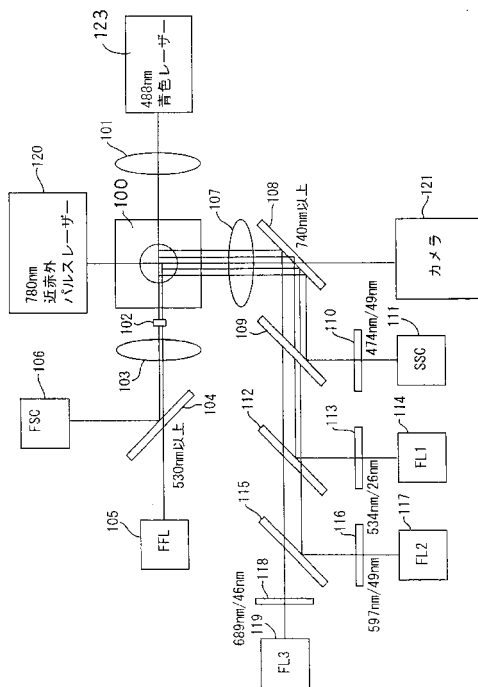
についての弁別能を調べた。なお、弁別するしきい値は最適値に設定した。

【 0 0 4 4 】

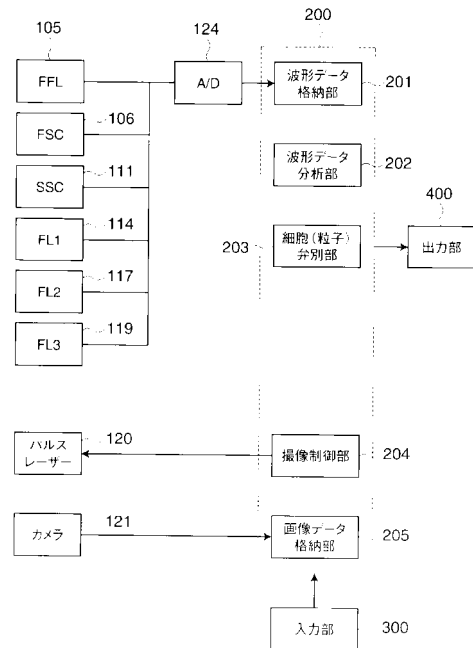
その結果、各細胞の残存率から得られた比較的弁別能の高い特徴パラメータをそれぞれ図18、19、20に示す。

つまり、前記(イ)の弁別に適した単一の特徴パラメータとしては、図18に示すようにB(差分積分値÷ピーク値)、M(正規化2次モーメント)又はJ(波打ち度合い)であり、前記(ロ)の弁別に適した単一の特徴パラメータとしては、図19に示すようにWidth(幅)、HW(半値幅)、B(差分積分値÷ピーク値)、M(正規化2次モーメント)又はJ(波打ち度合い)であり、前記(ハ)の弁別に適した単一の特徴パラメータとしては、図20に示すようにWidth(幅)、HW(半値幅)、Area(面積)、B(差分積分値÷ピーク値)、M(正規化2次モーメント)又はJ(波打ち度合い)であることが分かる。

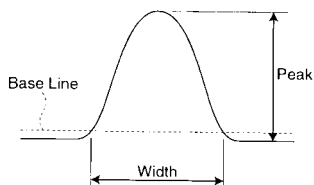
【 図 1 】



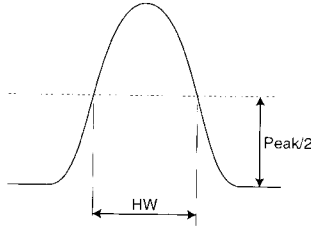
【 図 2 】



【 図 3 】



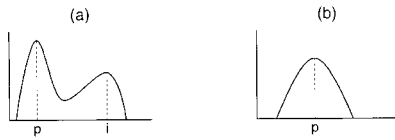
【図4】



【図5】



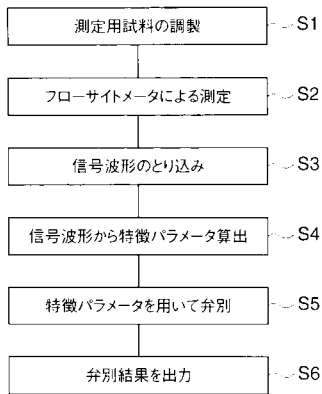
【図6】



【図7】



【図11】



【図16】

特徴	差分積分値/ピーク	正規化2次モーメント
閾値	2.2未満	2100未満
(1) 5 μ mビーズ凝集	11.4%	2.9%
(2) 9 μ m単一ビーズ	97.1%	99.7%
(2)-(1)	85.7%	96.8%

【図17】

(1) 白血球凝集塊	8.5%
(2) 扁平上皮	2.8%
(3) 扁平上皮凝集	0.9%
(4) (1)~(3)の平均	4.1%
(5) 異型細胞	78.8%
(5)-(4)	74.7%

【図8】



【図9】



【図10】



【図18】

特徴	差分積分値/ピーク	正規化2次モーメント	波打ち度合
閾値	2.4未満	13000未満	1300未満
(1) 白血球凝集塊	19.3%	28.6%	28.2%
(2) 異型細胞	84.8%	93.9%	90.9%
(2)-(1)	65.5%	65.3%	62.7%

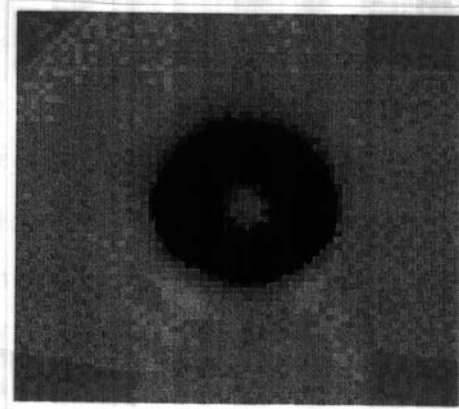
【図19】


特徴	幅	半値幅	差分積分値/ピーク	正規化2次モーメント	波打ち度合
閾値	850未満	430未満	2.4未満	20000未満	2200未満
(1) 扁平上皮	28.3%	28.1%	15.6%	22.3%	27.4%
(2) 異型細胞	100.0%	97.0%	84.8%	97.0%	97.0%
(2)-(1)	71.7%	68.9%	69.2%	74.7%	69.6%

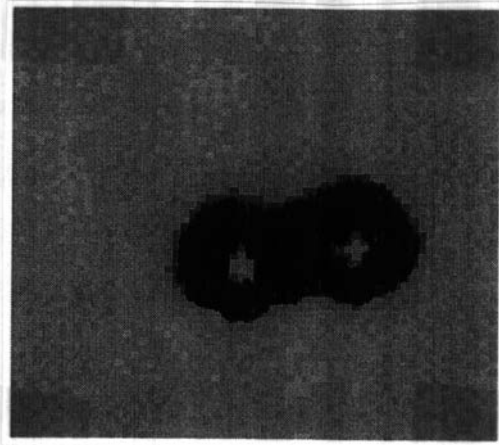
【 図 2 0 】


特徴	幅	半値幅	総和	差分積分値 /ピーク	正規化2次 モーメント	波打ち度合
閾値	540未満 0.6%	420未満 18.7%	1400未満 12.3%	2.4未満	10000未満 1.7%	800未満 8.2%
(1) 扁平上皮凝集	75.8%	93.9%	84.8%	84.8%	78.8%	84.8%
(2)	75.2%	75.2%	72.5%	70.0%	77.1%	76.6%
(2) - (1)						

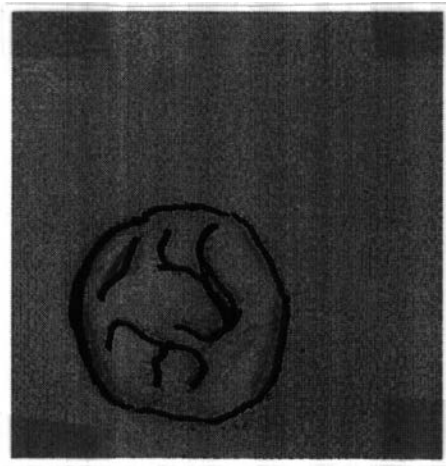
【 図 1 2 】




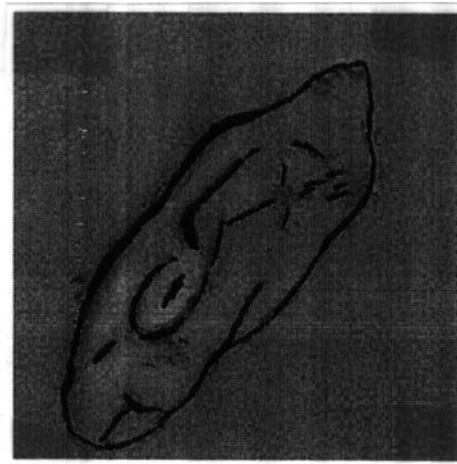
【 13】



【 14】



【 15】



フロントページの続き

審査官 西村 直史

(56)参考文献 特許第3290786(JP, B2)
特開2002-188993(JP, A)
特開平10-253624(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N15/00-15/14

G01N21/64

G01N33/48

C12Q1/02

JSTPlus(JDream)

JMEDPlus(JDreamII)

医学・薬学予稿集全文データベース