レーザー光広角散乱パターン分析による生体細胞識別法 II

A Method for Biological Cell Discrimination by Means of Wide-Angle Laser Scattering Pattern Analysis II

井澤庄次, 山岸昭雄, 稲場文男

Shoji Izawa, Akio Yamagishi and Humio Inaba

東北大学電気通信研究所 仙台市片平 2 - 1 - 1

Research Institute of Electrical Communication,

Tohoku University, 2-1-1, Katahira, Sendai

The laser light scattering patterns from various biological cells in a wide solid-angle were measured and analyzed using the light scattering pattern analyzing system developed for this purpose. The system was designed and constructed using a microscope, a He-Ne laser, a photodiode array, a transient recorder, a mini-computer and some optics. For the single cell analyzing method in a short time which enables us to realize automated real time cell discrimination, we developed two scattering pattern analyzing methods. One is to detect the scattered light intensity distribution as a function of the scattering angle θ , which contains useful informations concerning the outer size of the cell as well as the average size of the internal or surface structures. The another one is to detect the scattered light intensity distribution as a function of the azimuthal angle φ , which includes mostly informations of the asymmetry of the cell itself or its internal structure.

Based on these two schemes, we have analyzed the wide-angle laser light scattering patterns of various biological cells and thus obtained results which could be used to discriminate, for instance, lymphocyte from granulocyte, lymphocyte from red blood cell and T-lymphocyte from B-lymphocyte.

This novel technique should provide shape and morphological informations of various single biological cells which allows one to perform desirable discrimination among cell types and properties. Moreover, it is to be noted that employing a simple data processing system for the short-time analysis of the wide-angle laser scattering pattern developed in this work, we could apply this method to the flowing automated cytology system.

1. はじめに

近年の医学、生命科学の発展に伴い、生体細胞検査項目の種類やその処理量が増加し、また質的な改善が望まれている。最近、自動化された生体細胞分析装置の研究開発が各国で進められているが、¹⁾中でもレーザー光を利用する方式は、ここ数年来その発達が著しく、基礎及び臨床医学の両分野で多大の成果をもたらしつつある。レーザー光を用いる利点は短時間で多量の細胞を個別に検査出来ることで、これまで実用の域に達したものとしては、細胞のサイズを識別する前方微小角散乱光検出法²⁻⁶⁾や、細胞に色素を取りこませ、その蛍光強度から細胞の機能や成分を識別する蛍光検出^{3,7)}などを挙げることができる。さらに現在では、細胞のより多くの情報を同時に抽出して、細胞の有する機能をより詳細に識別すると共に、分析後に分離培養を行なうことを考慮して、細胞に損傷を与えることなく、かつ色素とり込みなどの前処理を必要としない、分析分離法の開発が切望されている。

ところで生体細胞はその種類に応じて特定の機能を有し、形態的にもさまざまな特徴がある。そのような細胞にレーザー光を照射した場合、広い散乱角にわたる散乱光には細胞の形態に関する詳細な情報が含まれている。そのため、単一の細胞からの散乱光を広い角度にわたって有効に検出することにより、細胞に色素をとり込ませることなく、細胞の形態的識別、あるいは正常や異常などの判定が可能になるものと考

えられる。

このような観点から、我々はレーザー光広角散乱パターン分析法による生体細胞識別法の研究開発を進めているが、第3回医用レーザー研究会においては、単一の人工粒子及び生体細胞からの広角にわたる光散乱パターンを分析する装置とそれを用いた基礎的な実験について報告した。⁸⁾今回は引き続き、各種の生体細胞によるレーザー光散乱パターン検出を行い、それぞれの形態的特徴に適した情報抽出についての実験的検討の結果を述べる。

2. レーザー光広角散乱パターン分析システム

Fig.1 に生体細胞によるレーザー光広角散乱パターン分析システムの光学系の構成を示す。He-Ne レーザー光を顕微鏡の光学軸に沿って送り、コンデンサレンズで絞リ、その焦点位置（ビームスポットサイズ $60\mu\text{m}$ ）でスライドガラス上の単独の生体細胞に照射する。細胞により散乱された光は対物レンズ（ $\times 40$ ）の開口角内で集められ、レンズ1、2、3を通過して、細胞の置かれた面のフーリエ変換面Pd1に達する。さらにこの光散乱パターンは円筒レンズ系で、面Pd2に変換され、ラインスキャンカメラ（松下通信 VS-6301）に内臓された直線型のフォトダイオードアレイでその空間強度分布が検出される。この円筒レンズ系は、光散乱パターンを自由に回転させて、二次元的なデータを得るために用いられるものである。本装置を用

Fig. 1 レーザー光広角散乱パターン分析システムの光学系の構成

Fig. 2 レーザー光広角散乱パターン分析システムのパターン検出および信号処理系の構成

いて検出し得る光散乱パターンの最大散乱角は対物レンズにより制限され約 30° である。

Fig. 2 に Fig. 1 の光学系に接続する本システムの光散乱パターン検出、および信号処理系の構成を示す。フォトダイオードアレイからの信号はトランジェントレコーダ (Datalab DL 905) でデジタル変換されてミニコンピュータ (NOVA 3) に転送され、後の分析のために磁気ディスクに記憶される。

3. 生体細胞のレーザー光広角散乱パターンの測定とモデルに基づく解析との比較

試作した広角光散乱パターン分析システムを用いて、単一の生体細胞の形態とその光散乱パターンの比較検討を行った。リンパ球のような球形粒子やヒトの赤血球のような円板状粒子の場合、その光散乱パターンは同心のリング状となり、リングの空間周波数から粒子径が球められることは、すでに報告した。^{8,9)}より複雑な形態を有する生体細胞の光散乱パターンはその形態の特徴に対応して、各々独特の空間分布を示す。各種の散乱体の光散乱パターンの測定結果と顕微鏡写真の様子を Fig. 3 に示す。(a-i), (b-i), (c-i) および (d-i) は、それぞれ2つのラテックス球、ヒトのリンパ球に羊赤血球を付着させたロゼット、犬のランゲルハンス島組織細胞、およびエキノサイト (赤血球表面に突起の現われたもの) の光学顕微鏡像である。一方、(a-ii), (b-ii), (c-ii) および (d-ii) はそれぞれ前述の光散乱パターン分析システム

の検出面で写真撮影した光散乱パターンである。又、(a-iii), (b-iii), (c-iii) および (d-iii) は顕微鏡像から細胞モデル (各図左上の挿入図) を作り、各部から回折された光の干渉効果を取り入れて、電子計算機を用いて数値計算により得られた光散乱パターンを表示したものである。実測、解析のそれぞれのパターンの外周は、散乱角約 30° に対応している。

(a-ii) および (a-iii) 図は同心のリング状のパターンに縦縞が重なった散乱光分布を示している。同心のリングは各々の球の直径についての情報を与え、縦縞は2つの球からの散乱波の干渉効果を表わしていると考えられる。

(a-iii) の比較的簡単な解析によって得られた光散乱パターンが実測の光散乱パターン (a-ii) と良く対応していることがわかる。また (b-ii) および (b-iii) に示される光散乱パターンは、2つのラテックス球の場合にみられた干渉効果がさらに重なって現われているように見える。リンパ球のみでは、単純な同心のリング状の光散乱パターンが得られ、付着した羊の赤血球の数が増すほど、より細かな斑点状構造が観測された。内部顆粒を有する (c-i) や表面突起を有する (d-i) のような細胞の場合にも、(c-ii), (c-iii) あるいは (d-ii), (d-iii) に見られるように実測の光散乱パターンは散乱体である生体細胞の有する形態的特徴を十分に反映していることが、比較的簡単な解析から確かめられ、光散乱パターンの特徴抽出によって細胞の形態的特性についての情報を得ることが可能である

Fig. 3 ラテックス粒子および各種の生体細胞の光学顕微鏡像と実測のレーザー光広角散乱パターン、およびモデルに基づくフーリエ変換法による数値解析パターンとの比較

(a-i), (b-i), (c-i)および(d-i)は各々、2つの球形ラテックス粒子、リンパ球に羊赤血球を付着させたロゼット、犬のランゲルハンス島組織細胞、赤血球表面に突起の現われたエキノサイトである。(a-ii), (b-ii), (c-ii)および(d-ii)はこれらの各々の試料についての実測の光散乱パターン、また(a-iii), (b-iii), (c-iii)および(d-iii)は、各試料に対しての散乱体モデル(左上挿入図)に基づき、電子計算機による数値解析によって得られた光散乱パターンある。

ことが明らかとなった。

4. 生体細胞のレーザー光広角散乱パターンの分析

4・1 光散乱パターン分析法

前節で得られたような生体細胞の光散乱パターンをそのままパターン認識的に扱うことは、取扱う情報量が多いため、処理時間がかかり、単時間に多量の細胞を分析するという目的のためには適当ではない。そこで光散乱パターンに含まれている情報を出来るだけ失うことなく、単純化して抽出するために、適当な分析法の開発が必要となる。Fig. 3 に示した各種の生体細胞による実測と解析による光散乱パターンの比較は、生体細胞の形態の特徴と光散乱パターンとの関連を考察する上で定性的であるが有用な示唆を与えてくれている。例えば、Fig. 3 の (a-ii) と (a-iii) に表示した二つの付着した粒子の光散乱パターンを取上げてみると、同図 (a-i) に示した散乱体のモデル化にあたっては、粒子径と二粒子の中心間の距離の二つのパラメータが考えられる。光散乱パターンには粒子の直径についての情報が、散乱角に対する強度変動

として反映されており、一方、粒子の中心間の距離についての情報は同図に見られる平行縞の間隔に含まれている。また、Fig. 3 の (b), (c), (d) に示した他の形態の細胞においても同様な効果が複雑に入り混じり、光散乱パターンが構成されていることが判る。このように、散乱体の各構成部分の大きさについての情報を得るには、散乱角に依存する強度分布を分析し、また散乱体の各部の構造の配置や数、あるいは形態の非対称性等についての情報を得るためには、各部から散乱される光の干渉効果を分析することが必要であると考えられる。

このような観点から、一例として外形が球形で内部に顆粒が存在する生体細胞のモデルを仮想し、フーリエ変換法を用いた解析を行った結果、散乱角方向の強度分布には細胞の外形や内部顆粒の平均径についての情報が含まれ、また光軸に対する回転角（ここでは、これを偏角と呼ぶことにする）方向の強度分布には、干渉効果や形態の非対称性についての情報が含まれていることが明らかとなった。⁸⁾ 以上のような考察から、生体細胞の広角光散乱パターン強度分布の分析法として、Fig. 4(a) および (b) に示す二通りの方法について検討を行った。Fig. 4(a) は、 X_1-Y_1 座標系の原点に置かれた細胞の光学的フーリエ変換面である X_2-Y_2 面において、散乱光強度分布を散乱角 θ の関数として分析する方法で、半影で示した領域、即ち散乱角 $\theta \sim \theta + \Delta\theta$ の半リング状の領域の散乱光強度 $I_A(\theta)$ を θ に対して測定する方法である。一方、Fig. 4(b) は半影で示した領域、即ち散乱角 $\theta_1 \sim \theta_2$ および偏角 $\varphi \sim \varphi + \Delta\varphi$ で囲まれたくさび状の領域内の散乱光強度 $I_B(\varphi)$ を偏角 φ の関数として測定する方法である。何れの方法でも、二次元的に検出した散乱光強度を電子計算機によりそれぞれの分析法に従ってデータ処理を行い、その結果をグラフに表示する。

4・2 生体細胞のレーザー光広角散乱パターン分析結果

各種の血球細胞を試料として用いて得られたレーザー光広角散乱パターンの散乱角 θ の関数としての強度分布 $I_A(\theta)$ の検出結果をFig.

Fig. 4 生体細胞の広角光散乱パターンの(a)散乱角 θ についての強度分布分析法、および、(b)偏角 φ についての強度分布分析法の説明図

Fig. 5 (a)羊赤血球, (b)ヒトの赤血球, (c)リンパ球, (d)顆粒球, のレーザー光広角散乱パターンの散乱角 θ に対する強度分布の測定結果

5に示す。Fig. 5(a)は平均直径約 $5 \mu\text{m}$ の羊赤血球, (b)は直径 $7 \sim 9 \mu\text{m}$ のヒト赤血球を試料としたものであり, これらは何れも円板状を呈している。(c)は直径 $7 \sim 8 \mu\text{m}$ のヒトのリンパ球, (d)は直径 $10 \sim 20 \mu\text{m}$ のヒトの顆粒球を試料として用いて, 同様の光散乱パターン分析を行った結果である。それぞれの図において横軸は散乱角 θ であり, 縦軸には, この場合の光強度 $I_A(\theta)$ に θ^2 を乗じ, 散乱光の空間的な広がりによる強度の減少を補正した値をとっている。散乱角の分解能は約 1° である。また一本の曲線が一つの細胞に対応しており, 各グラフはそれぞれ, $5 \sim 8$ 個の細胞を試料として測定した結果を示している。散乱角 θ に対する散乱光強度の周期的な変動は各々の細胞のサイズを反映しており, 顆粒球を除いて, 各々の種類毎にほぼ共通の周期性を示していることが判る。顆粒球は低温で保存したものをを用いたため外形は球形であるが, 多くの内部顆粒を有しており, さらに核は, 好中球, 好酸球, 好塩基球と種類によりその分葉の特徴が異なる。用いた試料はこれらの細胞が混じっていることと, 一つ一つの

Fig. 6 (a)リンパ球と, (b)顆粒球のレーザー光広角散乱パターンの偏角 ϕ 方向に対する強度分布の測定結果

細胞が個性的な内部構造を有しているため、(d)図のように共通的な散乱光強度分布の特徴が見られなかったものと考えられる。

しかし、顆粒球のように内部構造に非対称性を持つ細胞の場合には、散乱光強度の偏角 φ 方向の依存性に、より強くその特徴が現われるものと推定される。そこで、ヒトのリンパ球と顆粒球を用いて測定した光散乱パターンの偏角 φ 方向強度分布をFig. 6に示す。図の横軸は偏角 φ で、 0° から 180° にわたって角度分解能 5.6° で検出した。縦軸は、Fig. 4(b)の半影で示した、くさび状の領域の光強度 $I_B(\varphi)$ で、この測定では散乱角 $\theta_1 = 17^\circ$ から $\theta_2 = 21^\circ$ とした。リンパ球は外形も核も球形に近いので、Fig. 6(a)のように φ に対する変動が小さいが、顆粒球の測定結果は φ に対して大きく変化しており、内部顆粒や核の分葉など形態の非対称性が顕著に表われている。

Fig. 7には、リンパ球ロゼットを試料に用いた偏角 φ に対する散乱光強度分布の測定結果を示す。左側の(a-i)、(b-i)および(c-i)は

散乱体となったロゼットの光学顕微鏡写真である。これらはそれぞれリンパ球に付着した羊赤血球の数が異っており、(a-i)は4個、(b-i)は10個、(c-i)は25個程度である。(a-ii)、(b-ii)および(c-ii)は、(a-i)、(b-i)および(c-i)の各々のロゼットからの光散乱パターンの偏角 φ 方向に対する散乱光強度分布を与えるもので、横軸は偏角 φ 、縦軸はFig. 6と同様の散乱光強度 $I_B(\varphi)$ である。偏角の分解能は 2.8° とした。これらの測定結果から散乱光強度 $I_B(\varphi)$ は φ に対してかなり変動しているが、(a-ii)、(b-ii)および(c-ii)を比べてみると、付着した羊の赤血球の数が多くなるにつれて、 φ 依存性が激しくなっていることが判る。そこでこれらの測定結果を電子計算機によりフーリエ分析し、そのスペクトル分布を調べたものがそれぞれ(a-iii)、(b-iii)および(c-iii)である。横軸はフーリエ級数の次数 l 、縦軸はフーリエ係数である。(a-iii)、(b-iii)および(c-iii)の順にフーリエ係数は次数の高次側に、即ち周波数成分の高い側に広がっていることが、明らかに

Fig. 7 リンパ球ロゼットの光学顕微鏡像とレーザー光広角散乱パターンの偏角 φ に対する強度分布の測定結果、およびそのフーリエ分析に基づく解析

認められる。また、羊赤血球の付着のないリンパ球ではFig. 6に見られるように、 ϕ に対する変動が小さい。以上のように、偏角 ϕ 方向の散乱光強度分布は中心のリンパ球とその周囲の羊赤血球からの散乱光の干渉による効果を反映しているものであり、その分布を分析することにより、付着した羊赤血球の多少、すなわちT型およびB型リンパ球の判定を自動的に行なえる可能性のあることを強く示唆している。

5. おわりに

本文では、各種生体細胞にレーザー光を照射した場合に生ずる広角の光散乱パターンの検出を行い、各々のパターンには細胞の形態を反映する特徴が現われることを明らかにした。散乱体の形態が複雑である場合の広角光散乱パターンには、さまざまな情報が入り混じって含まれているため、それらの情報を有効かつ迅速に検出することが実用上強く要求される。そこで我々は自動生体細胞分析に有用であろうと考えられる二種類の光散乱パターン検出法について検討した。さらに、その分析によって得られる情報について実験的検討を行い、細胞の形態についての有用な情報を抽出できることを示した。分析に費やす時間を考慮しなくとも良い場合には、電子計算機の大きな情報処理能力を利用するパターン認識的手法も考えられるが、単一細胞のセルサイクル、あるいは外部環境の変動に伴う形態変化の定量的測定や、無染色状態での細胞の自動識別など単時間での実時間処理が要求される場合、本分析法が実用上有効に使われるものと判断される。このような広角光散乱法は、生理食塩水中に細胞試料を流すフロー方式の自動分析装置への応用が考えられ、また細胞試料として血球細胞に限らず、上皮扁平細胞を使用することもできるため、現在癌細胞の高速検出への可能性も検討中である。

最後に、本研究に関して多くの有益な討論、助言をいただき、同時に本研究に使用した細胞試料を提供された東北大学医学部第二外科の葛西森夫教授、田口喜雄講師、谷村清明氏、九里孝雄氏に深謝の意を表する次第である。なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金試験研

究、および厚生省科学研究費補助金（新医療技術研究事業）によるものである。

（参考文献）

- 1) 例えば M. R. Meland and L. A. Kamentsky, "Automated Cytology", Academic Press, New York (1975)
- 2) P. F. Mullany, M. A. Van Dilla, J. R. Coulter and P. N. Dean, Rev. Sci. Instrum., 40, 1029 (1969)
- 3) J. A. Steinkamp, M. J. Fulwyler, J. R. Coulter, R. D. Hiebert, J. L. Horney and P. F. Mullany, Rev. Sci. Instrum., 44, 1301 (1973)
- 4) 山岸昭雄, 井澤庄次, 稲場文男, 田口喜雄, 九里孝雄, 谷村清明, 葛西森夫
第3回医用レーザー研究会論文集 P. 65 (1979)
- 5) 山岸昭雄, 古川康夫, 井澤庄次, 稲場文男, 田口喜雄, 九里孝雄, 谷村清明, 葛西森夫,
応用物理 49, 668 (1980)
- 6) 稲場文男, 新医療, 7, 80 (1980)
- 7) W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet and L. A. Herzenberg, Rev. Sci. Instrum., 43, 404 (1972)
- 8) 井澤庄次, 山岸昭雄, 稲場文男, 第3回医用レーザー研究会論文集 P. 33 (1979)
- 9) 井澤庄次, 山岸昭雄, 稲場文男
第26回応用物理学会関係連合講演会予稿集 P. 67 (1979)