

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7501532号
(P7501532)

(45)発行日 令和6年6月18日(2024.6.18)

(24)登録日 令和6年6月10日(2024.6.10)

(51)国際特許分類	F I
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64 Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 B
	C 1 2 M 1/34 D

請求項の数 10 (全25頁)

(21)出願番号	特願2021-528241(P2021-528241)	(73)特許権者	000002185 ソニーグループ株式会社 東京都港区港南1丁目7番1号
(86)(22)出願日	令和2年6月16日(2020.6.16)	(74)代理人	110002147 弁理士法人酒井国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/023499	(72)発明者	丸山 務 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー イメージングプロダクツ&ソリューションズ株式会社内
(87)国際公開番号	WO2020/262092	(72)発明者	原 雅明 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー イメージングプロダクツ&ソリューションズ株式会社内
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)	審査官	嶋田 行志
審査請求日	令和5年5月2日(2023.5.2)		
(31)優先権主張番号	特願2019-119128(P2019-119128)		
(32)優先日	令和1年6月26日(2019.6.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 光学測定装置及び光学測定システム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体検体から放射した蛍光を、波長ごとに異なる角度へ向けて出射する分散光に変換する分光光学系と、

前記分光光学系で変換された前記分散光を受光して蛍光情報を生成する1つのイメージセンサと、

前記イメージセンサで生成された前記蛍光情報を評価する信号取得部と、

前記信号取得部による前記蛍光情報の評価結果に基づいて前記生体検体を解析する解析部と、

を備え、

前記イメージセンサは、それぞれ前記分散光のうちの異なる波長成分を受光して前記波長成分ごとの蛍光情報を生成する複数の領域に分割されており、

前記複数の領域は、前記分散光の広がり方向に沿って並んでおり、

前記信号取得部は、前記イメージセンサで生成された前記蛍光情報における前記複数の領域それぞれの画素値を合算することで、前記蛍光情報の評価値を算出し、

前記解析部は、前記評価値を表示する、

光学測定装置。

【請求項2】

前記複数の領域のうち二つ以上の前記領域のそれぞれの前記分散光の広がり方向の幅は、前記領域ごとに異なっている請求項1に記載の光学測定装置。

【請求項 3】

前記複数の領域のそれぞれの前記分散光の広がりの方の幅は、波長に応じて設定されている請求項 2 に記載の光学測定装置。

【請求項 4】

前記分光光学系は、前記イメージセンサに所定の波長範囲の前記分散光が入射するように、前記蛍光を前記分散光に変換する請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 5】

前記蛍光情報は、前記イメージセンサの画素ごとの画素値を前記領域ごとに合算した値、又は、前記画素ごとの画素値よりなる画像データである請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 6】

前記信号取得部は、前記蛍光情報を前記複数の領域として前記分散光の広がりの方に沿って配列する複数のチャンネル領域に分割し、前記複数のチャンネル領域それぞれの画素値を合算することで、前記蛍光情報の評価値を算出する請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 7】

前記信号取得部は、前記蛍光情報における前記複数の領域としての複数のフィルタ領域それぞれの画素値を合算することで、前記蛍光情報の評価値を算出する請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 8】

前記分光光学系は、前記蛍光を前記分散光に分光するプリズムを含み、
前記複数の領域のうち、前記分散光のうちの第 1 波長成分が入射する第 1 領域の前記分散光の広がりの方の幅は、前記分散光のうちの前記第 1 波長成分よりも長い第 2 波長成分が入射する第 2 領域の前記分散光の広がりの方の幅よりも狭い請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 9】

前記イメージセンサは、
行列状に配列する複数の光電変換素子と、
前記複数の光電変換素子それぞれに発生した電荷に基づいて前記蛍光情報を構成する複数の前記画素値を生成する検出回路と、
を備える請求項 5 に記載の光学測定装置。

【請求項 10】

生体検体から放射した蛍光を、波長ごとに異なる角度へ向けて出射する分散光に変換する分光光学系と、
前記分光光学系で変換された前記分散光を受光して蛍光情報を生成する 1 つのイメージセンサと、
前記イメージセンサで生成された前記蛍光情報を評価する信号取得部と、
前記信号取得部による前記蛍光情報の評価結果に基づいて前記生体検体を解析する解析部と、
を備え、
前記イメージセンサは、それぞれ前記分散光のうちの異なる波長成分を受光して前記波長成分ごとの蛍光情報を生成する複数の領域に分割されており、
前記複数の領域は、前記分散光の広がりの方に沿って並んでおり、
前記信号取得部は、前記イメージセンサで生成された前記蛍光情報における前記複数の領域それぞれの画素値を合算することで、前記蛍光情報の評価値を算出し、
前記解析部は、前記評価値を表示する、
光学測定システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、光学測定装置及び光学測定システムに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

従来、細胞、微生物、リポソームなどの生体関連微小粒子の蛋白質を分析するための方法として、フローサイトメトリー (Flow Cytometry) が存在する。このフローサイトメトリーに用いられる装置は、フローサイトメータ (Flow Cytometer : FCM) と称される。フローサイトメータでは、流路内を 1 列になって流れる微小粒子に特定波長のレーザー光を照射して、各微小粒子から発せられた蛍光や前方散乱光や側方散乱光などの光を光検出器で電気信号に変換して数値化し、その結果に対して統計解析を行うことにより、個々の微小粒子の種類、大きさ、構造などが判定される。

【 0 0 0 3 】

また、近年では、基礎医学及び臨床分野の要請に基づき、複数の蛍光色素を使用したマルチカラー分析が可能なフローサイトメータが開発されている。

10

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 文献 】 特開 2 0 1 7 - 5 8 3 6 1 号 公 報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

しかしながら、従来のフローサイトメータでは、光検出器として光電子増倍管 (Photomultiplier Tube) が使用されていたため、マルチカラー分析を可能とした場合の装置構成が大型化してしまうという課題が存在した。

20

【 0 0 0 6 】

そこで本開示では、大型化を抑制しつつマルチカラー分析を可能とした光学測定装置及び光学測定システムを提案する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

上記の課題を解決するために、本開示に係る一形態の光学測定装置は、生体検体から放射した蛍光を分光する分光光学系と、前記分光光学系で分光された前記蛍光を受光して蛍光情報を生成するイメージセンサと、を備え、前記イメージセンサは、それぞれ前記蛍光のうちの異なる波長成分を受光して前記波長成分ごとの蛍光情報を生成する複数の領域に分割されている。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 8 】

【 図 1 】 第 1 の実施形態に係るフローサイトメータの概略構成例を示す模式図である。

【 図 2 】 図 1 における分光光学系の一例を示す模式図である。

【 図 3 】 第 1 の実施形態に係るイメージセンサの概略構成例を示すブロック図である。

【 図 4 】 図 3 における画素アレイ部と検出回路アレイとの位置関係の一例を示す図である。

【 図 5 】 図 3 における画素と検出回路との接続関係の一例を示す図である。

【 図 6 】 第 1 の実施形態に係る画素の回路構成例を示す回路図である。

【 図 7 】 第 1 の実施形態に係る画素の動作例を示すタイミングチャートである。

40

【 図 8 】 第 1 の実施形態の変形例に係る画素の動作例を示すタイミングチャートである。

【 図 9 】 第 1 の実施形態に係るフローサイトメータにおけるパルス光検出のオペレーション例を説明するためのタイミングチャートである。

【 図 1 0 】 第 1 の実施形態に係る画素アレイ部上の位置と分散光の波長との関係の一例を示す図である。

【 図 1 1 】 第 1 の実施形態に係るイメージセンサをマルチチャンネル化する場合の例を示す図である。

【 図 1 2 】 波長 4 8 8 n m の励起光で励起された 4 種類の蛍光色素から放射された蛍光のスペクトルを示す図である。

【 図 1 3 】 図 1 2 に示す蛍光に対して実現される第 1 の実施形態に係るバーチャルフィル

50

タの一例を示す図である。

【図 1 4】第 2 の実施形態に係る光学測定装置（システム）の概略構成例を示すブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下に、本開示の一実施形態について図面に基づいて詳細に説明する。なお、以下の実施形態において、同一の部位には同一の符号を付することにより重複する説明を省略する。

【0010】

また、以下に示す項目順序に従って本開示を説明する。

1. はじめに

10

2. 第 1 の実施形態

2. 1 フローサイトメータの概略構成例

2. 2 イメージセンサの構成例

2. 3 画素の回路構成例

2. 4 画素の動作例

2. 4. 1 画素動作の変形例

2. 5 パルス光検出のオペレーション例

2. 6 画素アレイ部上の位置と分散光の波長との関係例

2. 7 イメージセンサをマルチチャンネル化する場合

2. 8 イメージセンサでバーチャルフィルタ機能を実現する場合

20

2. 9 作用・効果

3. 第 2 の実施形態

【0011】

1. はじめに

フローサイトメータを用いた分析のうち、一度の測定で複数の蛍光色素（蛍光マーカともいう）を使用するマルチカラー分析では、それぞれの光検出器に目的以外の蛍光マーカからの光が漏れ込み、分析精度が低下してしまう場合がある。そこで従来のフローサイトメータでは、目的の蛍光マーカから目的の光情報のみを取り出すために蛍光補正を行っているが、スペクトルが近接している蛍光マーカの場合、光検出器への漏れ込みが大きくなるために蛍光補正がうまくできないという問題が発生することがある。

30

【0012】

このような問題を解消するため、蛍光のスペクトルを取得して解析する、いわゆるスペクトル型のフローサイトメータが開発されている。スペクトル型フローサイトメータでは、微小粒子（検体又は生体検体ともいう）から測定された蛍光を染色に使用した蛍光マーカのスペクトル情報を使って抽出することで、各微小粒子の蛍光量を分析する。

【0013】

このようなスペクトル型フローサイトメータには、従来のフローサイトメータでは蛍光マーカの数だけ多数配置している光検出器の代わりに、スペクトル検出用のアレイ型の光検出器が設けられる。

【0014】

40

アレイ型光検出器には、例えば、複数の光電子増倍管がアレイ状に配列するマルチチャンネル PMT が用いられる。マルチチャンネル PMT のチャンネル数は、ある波長のレーザ光で励起された全ての蛍光スペクトラム情報を再現するのに必要な波長幅及び波長分解能に基づいて決定される。例えば、蛍光スペクトラム情報を再現するのに必要な波長幅が 500 ~ 800 nm のおよそ 300 nm であり、必要な波長分解能がおよそ 9 ~ 10 nm であるとする、マルチチャンネル PMT のチャンネル数は、30 ~ 32 チャンネル程度に設定される。

【0015】

これら波長幅と波長分解能とは、光学設計によりある程度変更可能ではあるが、光学調整等が必要になるため、装置が製品化された後で容易に変更することは困難である。

50

【 0 0 1 6 】

また、スペクトル型フローサイトメータで取得された蛍光スペクトラム情報を解析するための機能として、各蛍光マーカからの蛍光に最適な波長幅に相当するチャンネルを複数まとめてソフトウェア上で信号処理して、光学フィルタを疑似的に再現する、いわゆるバーチャルフィルタ機能が存在するが、上記のようなマルチチャンネルPMTを使用した場合、蛍光スペクトラム情報を再現するのに必要な波長幅とマルチチャンネルPMTで実現し得るチャンネル数とから決定される波長分解能によって各バーチャルフィルタの波長幅の取り得る値が離散した値になるため、光学フィルタの特性を忠実に再現することが困難であった。

【 0 0 1 7 】

そこで以下の実施形態では、アレイ型光検出器に2次元イメージセンサを用いることとする。2次元イメージセンサは、マルチチャンネルPMTと比較して小型であるため、全体的な装置規模を縮小することが可能である。

【 0 0 1 8 】

また、2次元イメージセンサは、マルチチャンネルPMTと比較して、検出部が多いため、波長分解能が細かく、解像度の高い蛍光スペクトラム情報を取得することが可能である。そのため、光学フィルタ特性の再現性を高めることが可能となる。

【 0 0 1 9 】

さらに、2次元イメージセンサを用いることで、任意の波長幅で画素値を加算することが可能となるため、マルチチャンネル分析を行なう際のチャンネル数の増減やチャンネル幅の変更、バーチャルフィルタ機能を使用する場合のフィルタ数の増減や各フィルタの中心波長/波長幅の変更など、製品化後の設計変更が容易になるというメリットも備える。

【 0 0 2 0 】

2. 第1の実施形態

まず、第1の実施形態に係る光学測定装置及び光学測定システムについて、図面を参照して詳細に説明する。本実施形態では、シングルスポット型のフローサイトメータについて例を挙げるが、本開示に係るフローサイトメータは、シングルスポット型に限定されず、マルチスポット型など、種々のフローサイトメータであってよい。なお、シングルスポット型とは、レーザー光(励起光)の照射スポットが1つであることを意味し、マルチスポット型とは、照射スポットが複数であることを意味する。また、フローサイトメータは、検査後の検体を分取する機能を備えるか否かで、セルアナライザ型とセルソータ型とに分類されるが、本実施形態に係るフローサイトメータは、そのどちらであってもよい。

【 0 0 2 1 】

2.1 フローサイトメータの概略構成例

図1は、第1の実施形態に係る光学測定装置又は光学測定システムとしてのフローサイトメータの概略構成例を示す模式図である。図2は、図1における分光光学系の一例を示す模式図である。

【 0 0 2 2 】

図1に示すように、フローサイトメータ11は、フローセル31と、励起光源32と、フォトダイオード33と、分光光学系37と、個体撮像素子(以下、イメージセンサという)34と、集光レンズ35及び36とを備える。

【 0 0 2 3 】

図中の上方には、円筒状のフローセル31が設けられており、その中であって、かつ、ほぼ同軸上にサンプルチューブ51が内挿されている。フローセル31は、検体53が流れる流路であって、サンプル流52が図中の下方向に流れ下る構造とされ、さらに、サンプルチューブ51から細胞等からなる検体53が放出される。検体53は、フローセル31内のサンプル流52に乗って、一列に並んで流れ下る。

【 0 0 2 4 】

励起光源32は、例えば、単一波長の励起光71を出射するレーザー光源であり、励起光71を検体53が通過する位置に設定された照射スポット72に照射する。励起光71は

10

20

30

40

50

、連続光であってもよいし、ある程度長い時間幅を持つパルス光であってもよい。

【 0 0 2 5 】

励起光 7 1 が照射スポット 7 2 で検体 5 3 に照射されると、検体 5 3 による励起光 7 1 の散乱や、検体 5 3 やこれに付された蛍光マーカ等の励起が発生する。

【 0 0 2 6 】

本説明において、検体 5 3 で散乱した散乱光のうち、照射スポット 7 2 を挟んで励起光源 3 2 と反対方向へ向かう成分を前方散乱光 7 3 という。なお、散乱光には、励起光源 3 2 と照射スポット 7 2 とを結ぶ直線から外れた方向へ向かう成分や、照射スポット 7 2 から励起光源 3 2 へ向かう成分も含まれる。本説明では、散乱光のうち、励起光源 3 2 と照射スポット 7 2 とを結ぶ直線から外れた所定の方向（以下、側方という）へ向かう成分を側方散乱光と称し、照射スポット 7 2 から励起光源 3 2 へ向かう成分を後方散乱光と称する。

10

【 0 0 2 7 】

また、励起した検体 5 3 や蛍光マーカ等からは、これらが脱励起する際に、それらを構成する原子や分子に固有の波長を持つ蛍光が放射される。この蛍光は、検体 5 3 や蛍光マーカ等から全方位へ向けて放射されるが、図 1 に示す構成では、それらのうち、照射スポット 7 2 から特定の方向（側方）へ放射された成分を分析対象の蛍光 7 4 としている。また、照射スポット 7 2 から側方へ出射する光には、蛍光の他に側方散乱光等も含まれるが、以下では、説明の簡略化のため、蛍光 7 4 以外の光成分等を適宜省略する。

【 0 0 2 8 】

照射スポット 7 2 を通過した前方散乱光 7 3 は、集光レンズ 3 5 により平行光に変換された後、照射スポット 7 2 を挟んで励起光源 3 2 と反対側に光軸から少しずれた角度に配置されたフォトダイオード 3 3 に入射する。一方、蛍光 7 4 は、集光レンズ 3 6 により平行光に変換された後、分光光学系 3 7 に入射する。なお、集光レンズ 3 5 及び 3 6 それぞれは、特定の波長を吸収するフィルタや光の進行方向を変更するプリズムなどの他の光学素子を含んでもよい。例えば、集光レンズ 3 6 は、入射した側方散乱光及び蛍光 7 4 のうち、側方散乱光を低減する光学フィルタを含んでもよい。

20

【 0 0 2 9 】

分光光学系 3 7 は、図 2 に示すように、例えば、プリズムや回折格子などの 1 つ以上の光学素子 3 7 1 を含んで構成され、入射した蛍光 7 4 を、波長ごとに異なる角度へ向けて出射する分散光 7 5 に分光する。なお、本説明では、分散光 7 5 の広がり方向 H 1、すなわち、分光光学系 3 7 による分光方向を、後述するイメージセンサ 3 4 の画素アレイ部 9 1 における行方向とする。

30

【 0 0 3 0 】

分光光学系 3 7 から出射した分散光 7 5 は、イメージセンサ 3 4 に入射する。したがって、イメージセンサ 3 4 には、方向 H 1 における位置に応じて異なる波長の分散光 7 5 が入射する。

【 0 0 3 1 】

ここで、前方散乱光 7 3 が光量の大きい光である一方、側方散乱光や蛍光 7 4 は、検体 5 3 が照射スポット 7 2 を通過した際に発生する微弱なパルス光である。そこで本実施形態では、前方散乱光 7 3 をフォトダイオード 3 3 で観察することで、検体 5 3 が照射スポット 7 2 を通過したタイミングを検出する。

40

【 0 0 3 2 】

例えば、フォトダイオード 3 3 は、常時、照射スポット 7 2 から出射した前方散乱光 7 3 を観察している。その状態で、検体 5 3 の通過により検出されている光量が前方散乱光 7 3 により増加すると、フォトダイオード 3 3 は、光量が増加したタイミングで、検体 5 3 の通過を示すトリガ信号を生成し、このトリガ信号をイメージセンサ 3 4 に入力する。

【 0 0 3 3 】

イメージセンサ 3 4 は、例えば、同一の半導体チップ内に A D (Analog to Digital) 変換器を内蔵した複数画素よりなる撮像素子である。各画素は光電変換素子と増幅素子と

50

を有し、光電変換された電荷は画素内部に蓄積される。蓄積電荷量を反映した信号（画素信号。画素値ともいう）は、所望のタイミングで増幅素子を介して増幅されて出力され、内蔵されたA/D変換器によってデジタル信号に変換される。

【0034】

なお、本説明では、検体53から放射した蛍光74を波長で分光する、いわゆるスペクトル型のフローサイトメータ11を例示したが、これに限定されず、例えば、蛍光74を分光しない構成とすることも可能である。その場合、分光光学系37が省略されてよい。

【0035】

また、本説明では、トリガ信号の生成に前方散乱光73を使用した場合を例示したが、これに限定されるものではなく、例えば、側方散乱光や後方散乱光や蛍光等を使用してトリガ信号を生成してもよい。

10

【0036】

2.2 イメージセンサの構成例

次に、第1の実施形態に係るイメージセンサ34について説明する。図3は、第1の実施形態に係るCMOS(Complementary Metal-Oxide-Semiconductor)型のイメージセンサの概略構成例を示すブロック図である。図4は、図3における画素アレイ部と検出回路アレイとの位置関係の一例を示す図である。図5は、図3における画素と検出回路との接続関係の一例を示す図である。

【0037】

ここで、CMOS型のイメージセンサとは、CMOSプロセスを応用して、または、部分的に使用して作成された固体撮像素子（固体撮像装置ともいう）である。第1の実施形態に係るイメージセンサ34は、入射面が半導体基板における素子形成面とは反対側の面（以下、裏面という）側である、いわゆる裏面照射型であってもよいし、表面側である、いわゆる表面照射型であってもよい。なお、以下の説明において例示するサイズ、個数、行数、列数等は、単なる例であって、種々変更することが可能である。

20

【0038】

図3に示すように、イメージセンサ34は、画素アレイ部91と、接続部92と、検出回路93と、画素駆動回路94と、ロジック回路95と、出力回路96とを備える。

【0039】

画素アレイ部91は、例えば、行方向H1に320画素、列方向V1に36画素の行列状（以下、320×36画素という）に配列した複数の画素101を備える。各画素101の配列面におけるサイズは、例えば、15μm（マイクロメートル）×15μmであってよい。その場合、画素アレイ部91の開口は、4.8mm（ミリメートル）×0.54mmとなる。

30

【0040】

画素駆動回路94は、各画素101を駆動することで、各画素101に画素信号を生成させる。ロジック回路95は、画素駆動回路94の他、検出回路93や出力回路96の駆動タイミングを制御する。また、ロジック回路95及び/又は画素駆動回路94は、検体53による照射スポット72の通過に合わせて画素アレイ部91に対する画素信号の読出しを制御する制御部としても機能する。

40

【0041】

なお、イメージセンサ34は、A/D変換前の画素信号を増幅するオペアンプ等の増幅回路をさらに備えていてもよい。

【0042】

照射スポット72から側方へ出射した蛍光74は、それぞれ、集光レンズ36でコレリートされた後、分光光学系37により分散光75に変換される。そして、分散光75は、画素アレイ部91の画素101が配列する受光面における異なる領域に入射する。

【0043】

画素アレイ部91の各画素101には、分散光75のうち、画素アレイ部91における行方向H1の位置によって定まる波長成分が入力される。例えば、図2に例示する位置関

50

係では、図2のイメージセンサ34中、右側に位置する画素101ほど波長の短い光が入射し、左側に位置する画素101ほど波長の長い光が入射する。

【0044】

各画素101は、照射された光量に応じた画素信号を生成する。生成された画素信号は、例えば、画素101に対して一対一に設けられた検出回路93により読み出される。各検出回路93は、AD変換器を含み、読み出したアナログの画素信号をデジタルの画素信号に変換する。

【0045】

ここで、図4及び図5に示すように、複数の検出回路93は、例えば、画素アレイ部91に対して2つのグループ(検出回路アレイ93A及び93B)に分かれて配列している。一方の検出回路アレイ93Aは、例えば、画素アレイ部91の列方向上側に配置され、他方の検出回路アレイ93Bは、例えば、画素アレイ部91の列方向下側に配置される。各検出回路アレイ93A及び93Bでは、複数の検出回路93が行方向に沿って1行又は複数行に配列している。

10

【0046】

例えば、画素アレイ部91の列方向上側に配置された検出回路アレイ93Aの各検出回路93は、画素アレイ部91の列方向における上半分の画素101に接続され、列方向下側に配置された検出回路アレイ93Bの各検出回路93は、画素アレイ部91の列方向における下半分の画素101に接続されてもよい。ただし、これに限定されず、例えば、検出回路アレイ93Aの各検出回路93を偶数列の画素101に接続し、検出回路アレイ93Bの各検出回路93を奇数列の画素101に接続するなど、種々変形成されてよい。また、たとえば、複数の検出回路93が画素アレイ部91の一方の側(例えば、列方向上側)に1行又は複数行に配列していてもよい。

20

【0047】

画素アレイ部91において、画素101は列方向V1に36個配列している。したがって、画素1列に対しては、36個の検出回路93を配置する必要がある。そこで、上述したように、検出回路93を2つの検出回路アレイ93A及び93Bにグループ分けし、それぞれの行数を1行とした場合、1列に並ぶ36個の画素101に対しては、各検出回路アレイ93A及び93Bにおいて18個ずつの検出回路93を配置すればよい。

【0048】

説明を図3に戻す。各画素101から検出回路93によって読み出された画素信号は、各検出回路93のAD変換器によってデジタルの画素信号に変換される。そして、デジタルの画素信号は、蛍光74の波長ごとの情報を示す蛍光情報(蛍光スペクトラム情報に相当。以下、スペクトル画像という)として、出力回路96を介して外部の信号取得システム1へ出力される。

30

【0049】

信号取得システム(信号取得部ともいう)1は、例えば、イメージセンサ34から入力されたスペクトル画像を評価し、その結果としての評価値を解析システム2に入力する。例えば、信号取得システム1は、スペクトル画像を行方向H1に沿って配列する複数の領域(後述するチャンネル領域に相当)に分割し、それぞれの領域に含まれる画素の画素値を合算することで、スペクトル画像の評価値を算出する(後述するマルチチャンネル分析に相当)。また、信号取得システム1は、予め設定された、もしくは、ユーザが任意に設定した、1つ以上の領域(後述するパーチャルフィルタに相当)それぞれに含まれる画素の画素値を合算してスペクトル画像の評価値を算出する、いわゆるパーチャルフィルタ機能を備えていてもよい。

40

【0050】

このような信号取得システム1は、イメージセンサ34と同一チップ内又は外部に設けられたDSP(Digital Signal Processor)やFPGA(Field-Programmable Gate Array)等であってもよいし、イメージセンサ34にバスやネットワークを介して接続されたパーソナルコンピュータなどの情報処理装置等であってもよい。

50

【 0 0 5 1 】

解析システム（解析部ともいう）2は、信号取得システム1から入力された評価値に基づいて、種々の解析処理を実行する。例えば、解析システム2は、評価値に基づいて検体53の種類、大きさ、構造などの情報を取得する。また、解析システム2は、スペクトル画像や評価値をユーザに表示するとともに、解析ツールとなるUI（ユーザインタフェース）を提供してもよい。このような解析システム2は、例えば、信号取得システム1にバスやネットワークを介して接続されたパーソナルコンピュータなどの情報処理装置等であってよい。

【 0 0 5 2 】

2.3 画素の回路構成例

次に、図6を参照して、第1の実施形態に係る画素101の回路構成例について説明する。図6は、第1の実施形態に係る画素の回路構成例を示す回路図である。

【 0 0 5 3 】

図6に示すように、画素101は、フォトダイオード（光電変換素子ともいう）111と、蓄積ノード112と、転送トランジスタ113と、増幅トランジスタ114と、リセットトランジスタ116と、浮遊拡散層（Floating Diffusion：FD）117とを備える。転送トランジスタ113、増幅トランジスタ114及びリセットトランジスタ116には、例えば、N型のMOS（Metal-Oxide-Semiconductor）トランジスタが用いられる。

【 0 0 5 4 】

フォトダイオード111、転送トランジスタ113、増幅トランジスタ114、リセットトランジスタ116及び浮遊拡散層117で構成された回路は、画素回路とも称される。また、画素回路のうち、フォトダイオード111を除く構成は、読出し回路とも称される。

【 0 0 5 5 】

フォトダイオード111は、光子を光電変換により電荷に変換する。このフォトダイオード111は、蓄積ノード112を介して転送トランジスタ113に接続される。フォトダイオード111は、自身が形成された半導体基板に入射した光子から、電子とホールペアを発生させ、そのうちの電子をカソードに相当する蓄積ノード112に蓄積する。フォトダイオード111は、リセットによる電荷排出時に、蓄積ノード112が完全空乏化される、いわゆる埋込み型であってもよい。

【 0 0 5 6 】

転送トランジスタ113は、行駆動回路121の制御に従って、蓄積ノード112から浮遊拡散層117へ電荷を転送する。浮遊拡散層117は、転送トランジスタ113からの電荷を蓄積して、その蓄積した電荷の量に応じた電圧値の電圧を生成する。この電圧は、増幅トランジスタ114のゲートに印加される。

【 0 0 5 7 】

リセットトランジスタ116は、蓄積ノード112や浮遊拡散層117に蓄積された電荷を電源118に放出して初期化する。このリセットトランジスタ116のゲートは行駆動回路121に接続され、ドレインは電源118に接続され、ソースは浮遊拡散層117に接続される。

【 0 0 5 8 】

行駆動回路121は、例えば、リセットトランジスタ116と転送トランジスタ113とをオン状態に制御することで、蓄積ノード112に蓄積された電子を電源118に引き抜き、画素101を蓄積前の暗状態、すなわち、光が未入射の状態に初期化する。また、行駆動回路121は、リセットトランジスタ116のみをオン状態に制御することで、浮遊拡散層117に蓄積された電荷を電源118に引き抜き、その電荷量を初期化する。

【 0 0 5 9 】

増幅トランジスタ114は、ゲートに印加された電圧を増幅してドレインに出現させる。この増幅トランジスタ114のゲートは浮遊拡散層117に接続され、ソースは電源に

10

20

30

40

50

接続され、ドレインは垂直信号線 1 2 4 に接続される。

【 0 0 6 0 】

増幅トランジスタ 1 1 4 と定電流回路 1 2 2 とは、ソースフォロワ回路を形成している。増幅トランジスタ 1 1 4 は、浮遊拡散層 1 1 7 の電圧を 1 弱のゲインで増幅して垂直信号線 1 2 4 に出現させる。垂直信号線 1 2 4 に出現した電圧は、画素信号として、A D 変換回路を含む検出回路 9 3 により読み出される。

【 0 0 6 1 】

以上のような構成を備える画素 1 0 1 は、フォトダイオード 1 1 1 のリセットが実行されてから画素信号の読出しが実行されるまでの期間、光電変換により発生した電荷を内部に蓄積する。そして、画素信号の読出しが実行された際には、蓄積電荷に応じた画素信号を垂直信号線 1 2 4 に出現させる。

10

【 0 0 6 2 】

なお、図 6 における行駆動回路 1 2 1 は、例えば、図 3 における画素駆動回路 9 4 の一部であり、検出回路 9 3 及び定電流回路 1 2 2 は、例えば、図 3 における検出回路 9 3 の一部であってよい。

【 0 0 6 3 】

2 . 4 画素の動作例

次に、図 7 のタイミングチャートを参照して、第 1 の実施形態に係る画素 1 0 1 の動作例について説明する。図 7 は、第 1 の実施形態に係る画素の動作例を示すタイミングチャートである。

20

【 0 0 6 4 】

図 7 に示すように、タイミング t_{11} ~ t_{12} において、行駆動回路 1 2 1 は、蓄積期間直前となるタイミングで、転送トランジスタ 1 1 3 のゲートに印加する転送制御信号 T R G 及びリセットトランジスタ 1 1 6 のゲートに印加するリセット制御信号 R S T をハイレベルに立ち上げる。これにより、転送トランジスタ 1 1 3 及びリセットトランジスタ 1 1 6 がともにオン状態となり、フォトダイオード 1 1 1 と転送トランジスタ 1 1 3 との間の蓄積ノード 1 1 2 に蓄積された電荷が電源 1 1 8 へ排出される。以降において、この制御を「P D リセット」と称する。

【 0 0 6 5 】

また、リセットトランジスタ 1 1 6 をオン状態とした場合、浮遊拡散層 1 1 7 もリセットトランジスタ 1 1 6 を介して電源 1 1 8 に接続されるため、浮遊拡散層 1 1 7 に蓄積された電荷も電源 1 1 8 へ排出される。

30

【 0 0 6 6 】

タイミング t_{12} では、行駆動回路 1 2 1 は、転送制御信号 T R G 及びリセット制御信号 R S T をローレベルに立ち下げることによって、転送トランジスタ 1 1 3 及びリセットトランジスタ 1 1 6 をオフ状態に制御する。この制御により、蓄積ノード 1 1 2 は浮遊状態となって、新たな蓄積期間が開始される。

【 0 0 6 7 】

次に、タイミング t_{13} ~ t_{14} において、行駆動回路 1 2 1 は、転送制御信号 T R G をハイレベルに立ち上げる。これにより、転送トランジスタ 1 1 3 がオン状態となり、フォトダイオード 1 1 1 と転送トランジスタ 1 1 3 との間の蓄積ノード 1 1 2 に蓄積された電荷が浮遊拡散層 1 1 7 へ転送される。以降において、この制御を「電荷転送」と称する。

40

【 0 0 6 8 】

このように、フォトダイオード 1 1 1 に発生した電荷を浮遊拡散層 1 1 7 へ転送すると、垂直信号線 1 2 4 には、浮遊拡散層 1 1 7 に蓄積されている電荷の電荷量に応じた電圧値の電圧が増幅トランジスタ 1 1 4 により増幅されて出現する。本説明では、フォトダイオード 1 1 1 に発生した電荷が浮遊拡散層 1 1 7 に蓄積されている状態で垂直信号線 1 2 4 に出現する電位を蓄積信号という。

【 0 0 6 9 】

検出回路 9 3 は、転送制御信号 T R G がローレベルに立ち下げられたタイミング t_{14}

50

からタイミング t_{15} の期間、垂直信号線 124 に出現した蓄積信号の信号読出し（以下、サンプリングという）を行う。このサンプリングでは、垂直信号線 124 に出現した蓄積信号が、フォトダイオード 111 への露光量に応じた電圧値の画素信号として、検出回路 93 により読み出されて、デジタル信号に変換される。この蓄積信号の多重サンプリングは、後述する CDS（相関二重サンプリング）における 1 回目の読出しとして扱われる。

【0070】

次に、タイミング $t_{15} \sim t_{16}$ において、行駆動回路 121 は、リセット制御信号 RST をハイレベルに立ち上げる。これにより、リセットトランジスタ 116 がオン状態となり、浮遊拡散層 117 に蓄積されていた電荷がリセットトランジスタ 116 を介して電源線 VDD へ放出される。以降において、この制御を「FDリセット」と称する。

10

【0071】

このように、浮遊拡散層 117 をリセットすると、垂直信号線 124 には、リセット状態にある浮遊拡散層 117 の電圧が増幅トランジスタ 114 により増幅されて出現する。本説明では、浮遊拡散層 117 がリセット状態にある際に垂直信号線 124 に出現する電位をリセットレベルという。

【0072】

検出回路 93 は、蓄積信号のサンプリングと同様に、リセット制御信号 RST がローレベルに立ち下げられたタイミング t_{16} からタイミング t_{17} の期間、垂直信号線 124 に出現したリセットレベルの画素信号のサンプリングを行う。このサンプリングでは、垂直信号線 124 に出現したリセットレベルが、浮遊拡散層 117 がリセット状態にある際の電圧値（リセットレベル）の画素信号として、検出回路 93 により読み出されて、デジタル信号に変換される。このリセットレベルの多重サンプリングは、後述する CDS（相関二重サンプリング）における 2 回目の読出しとして扱われる。

20

【0073】

検出回路 93 は、サンプリングした蓄積信号とリセット信号とを比較して、その比較結果に基づいて入射光子量を判定する。

【0074】

なお、検出回路 93 は、蓄積信号のサンプリングを複数回実行し、その全て加算し、必要に応じて、それらの平均値を算出してもよい。同様に、検出回路 93 は、リセット信号のサンプリングを複数回実行し、その全て加算し、必要に応じて、それらの平均値を算出してもよい。

30

【0075】

そして、検出回路 93 は、蓄積信号（またはその平均値）と、リセット信号（またはその平均値）との差分を算出する CDS を実行する。この CDS により、FDリセットの際に生じる kTC ノイズが相殺されて、蛍光 74 の光量に基づいた正味の画素信号が求められる。

【0076】

各画素（画素回路）101 の蓄積期間は、上述の PDリセット動作と蓄積信号の読出し動作との間の期間であり、正確には、PDリセット時に転送制御信号 TRG を立ち下げたから、電荷転送時に再度、転送制御信号 TRG を立ち下げるまでの期間である。この蓄積期間にフォトダイオード 111 に光子が入射し電荷が発生すると、それはリセット信号及び蓄積信号の間の差分となり、上記の正味の画素信号として検出回路 93 により取得される。

40

【0077】

なお、検出回路 93 において、AD変換器を通したデジタル値同士で CDS を実施することで、AD変換過程に伴って混入したノイズも相殺することができる。

【0078】

2.4.1 画素動作の変形例

ところで、図 7 を用いて動作例では、単位蓄積が完了して次の蓄積が開始される間、特に、蓄積信号のサンプリング期間において、蓄積が実施されない不感期間が発生している

50

。そこで、特に、高速なサンプリングに対応するため、このような不感期間を除去するようにしてもよい。

【 0 0 7 9 】

図 8 は、変形例に係る画素の動作例を示すタイミングチャートである。図 8 の例では、図 7 で実施したタイミング $t_{15} \sim t_{16}$ における F D リセットが省略され、P D リセット後のタイミング $t_{12} \sim t_{13}$ の蓄積期間中に、リセット信号のサンプリングが実行されている。

【 0 0 8 0 】

その場合、フォトダイオード 1 1 1 の次の蓄積期間は、電荷転送が完了した直後、すなわち、転送制御信号 T R G を立ち下げたときからスタートすることになる。これによって画素 1 0 1 に入射した光子が検知されない不感期間はほぼゼロになる。

【 0 0 8 1 】

なお、図 7 及び図 8 のいずれの動作例においても、単位蓄積の最短サイクルはリセット信号のサンプリングと蓄積信号のサンプリングとの合計所要時間によって規定され得る。

【 0 0 8 2 】

2.5 パルス光検出のオペレーション例

次に、図 9 のタイミングチャートを参照して、第 1 の実施形態に係るフローサイトメータ 1 1 におけるパルス光検出のオペレーション例について説明する。図 9 は、第 1 の実施形態に係るフローサイトメータにおけるパルス光検出のオペレーション例を説明するためのタイミングチャートである。

【 0 0 8 3 】

蛍光 7 4 の光強度は、照射スポット 7 2 への検体 5 3 の通過に伴って、図 9 の最上段で示されるようなパルス波形 P L 1 として描かれ、各パルス波形 P L 1 が検体 5 3 の 1 個分の通過に対応する波形となる。この時、図 9 の中段で示される、フォトダイオード 3 3 で検出された前方散乱光 7 3 の光強度は、図 9 の上段におけるパルス波形 P L 1 とタイミングが類似して、かつ、強度増加率の大きいパルス波形 P L 2 のように描かれる。

【 0 0 8 4 】

タイミング T 6 1 において、フォトダイオード 3 3 は、前方散乱光のパルス波形 P L 2 の強度と、閾値 T h 1 との比較から、検体 5 3 の通過タイミングを取得して、イベント信号 S 1 1 を発生する。

【 0 0 8 5 】

ここで、イメージセンサ 3 4 における蓄積期間の終了と信号読出しとは、検体 5 3 が通過したことを示すイベント信号 S 1 1 に同期して実施される。読出しのアクセスシーケンスは、図 9 に準じ、不感期間の殆ど無いグローバルシャッタとする。

【 0 0 8 6 】

すなわち、蓄積期間の開始と終了とは、全画素同時一斉に行われる。この時、検体 5 3 の通過を示すイベント信号 S 1 1 に同期して電荷の画素内転送が行われ、蓄積期間が全画素一斉に終了する。そして、画素信号の読出しが開始される。さらに、このとき次の蓄積期間が全画素一斉にスタートする。

【 0 0 8 7 】

タイミング T 6 2 において、イメージセンサ 3 4 は、画素における蓄積期間を終了し、画素信号の読出しを開始し、さらには、次の蓄積期間を開始する。ここで、タイミング T 6 2 は、イベント信号 S 1 1 を取得したタイミング T 6 1 から、検体 5 3 の流速と大きさを考慮した一定の遅延時間 t_1 が経過した後のタイミングである。

【 0 0 8 8 】

画素信号の読出しでは、蓄積信号の A D 変換値と、既に取得済みであるリセット信号との A D 変換値との差分取得を伴って実施され、これによって k T C ノイズ等を相殺した正味の画素信号が導出される。さらに、これに引き続いて、次のサイクルにおけるリセット信号の取得と A D 変換が実施され、それが完了した時点で次の蓄積期間の終了と読出しとが可能になる。すなわち、イベント処理の最短サイクルは単位蓄積期間の最短サイクルに

10

20

30

40

50

等しく、それは蓄積信号とリセット信号との各々の取得とA/D変換に要する時間により決定される。

【0089】

各イベント処理において複数の画素101から出力される正味の画素信号の総計値は、パルスごとに光検出器が受光した光子の総量に相当する。これによって検体53ごとの蛍光74の強度が導出される。すなわち、本実施形態においては、画素101が光電変換された電荷を内部に蓄積することにより、画素101内で入射光の積分が行われている。したがって、各画素101からの出力に対するA/D変換は一回でよく、時系列的に複数回のA/D変換を実施する必要はない。

【0090】

例えば、リセット信号のA/D変換と蓄積信号のA/D変換とそのCDSとに、合計で10 μ sの時間を要したとすると、対応できるイベントの最小間隔は約10 μ sとなり、1秒間に最大100,000個のイベント、すなわち、照射スポット72への検体53の通過を評価できることになる。

【0091】

なお、各画素101から画素信号を読み出す時間以外に、出力回路96を介して読み出した画素信号を出力する時間も要することとなるが、例えば、検出回路93にレジスタを設けて画素信号を一時保存しておくことで、リセット信号及び蓄積信号のA/D変換と画素信号の出力とをパイプライン方式で並列に実行することが可能であるため、画素信号の出力に要する時間が蓄積サイクルを制約することはない。

【0092】

また、この例では、検体53が通過したことを示すイベント信号S11を、パルス波形PL2が閾値L1を下回ったダウンエッジのタイミングT61で発生させているが、これに限定されず、パルス波形PL2が閾値L1を上回ったアップエッジのタイミングT63で発生させてもよい。イベント信号S11をアップエッジのタイミングT63で発生させる場合、検体53の大きさや流量の変動に対応することが容易となる。

【0093】

また、イベント信号S11は、側方散乱光や蛍光74（分散光75）の検出結果を用いて発生させてもよい。その場合、イベント検出用の光と検体解析用の光とを分光し、イベント検出用の光をフォトダイオード33に入射させてもよい。

【0094】

さらに、フォトダイオード33に代えて、イメージセンサ34内にイベント発生用の受光素子を別途搭載してもよい。

【0095】

さらにまた、イベント信号S11からの遅延時間 t_1 をここでは一定としたが、一般に前方散乱光73によるパルス波形PL2の強度減衰量は検体53が大きいほど大きい。従って、パルス波形PL2の強度を、例えば、パルスの冒頭部分で評価し、それに応じて遅延時間 t_1 の長さを設定してもよい。この場合、大きな検体53に対しては長めの遅延時間 t_1 が設定されてよい。

【0096】

さらにまた、本説明では、画素アレイ部91の全画素に対して一斉に読出しを開始する、いわゆるグローバルシャッタ方式を例示したが、これに限定されるものではない。例えば、1つの検出回路93を同一列の複数の画素101に接続した場合には、同一の検出回路93に接続された画素101から順に画素信号を読み出す、いわゆるローリングシャッタ方式を採用することも可能である。なお、ローリングシャッタ方式を採用する場合、各画素101の画素回路における増幅トランジスタ114のドレインと垂直信号線124には、行駆動回路121からの選択信号に従って増幅トランジスタ114のドレインと垂直信号線124との接続を制御する選択トランジスタが追加される。

【0097】

2.6 画素アレイ部上の位置と分散光の波長との関係例

10

20

30

40

50

図10は、第1の実施形態に係る画素アレイ部上の位置と分散光の波長との関係の一例を示す図である。上述したように、分光光学系37は、蛍光74を行方向H1に分光して、行方向H1に広がった分散光75を出射する。図10に示す例では、分光光学系37は、行方向H1において最も左側に位置する画素101に波長500nmの光が入射し、最も右側に位置する画素101に波長800nmの光が入射するように、蛍光74を分光する。ここで、上述したように、画素アレイ部91における行方向H1の画素数を320画素とすると、各画素101には、行方向H1の位置に応じて、約0.9~1nmの波長幅の光が入射することとなる。

【0098】

2.7 イメージセンサをマルチチャンネル化する場合

10

図11は、第1の実施形態に係るイメージセンサをマルチチャンネル化する場合の例を示す図である。すなわち、本説明では、イメージセンサ34をマルチチャンネルPMTとして使用する場合が例示される。なお、図11は、イメージセンサ34を32チャンネルに分割する場合を示している。

【0099】

図11に示すように、イメージセンサ34を32チャンネルのマルチチャンネル化する場合、画素アレイ部91は、行方向H1の画素数が10画素ずつの計32個の領域に分割される。具体的には、信号取得システム1は、画素アレイ部91から取得したスペクトル画像G1を、行方向H1の画素数が10画素ずつの計32個のチャンネル領域CH1~CH32に分割する。その場合、各チャンネル領域CH1~CH32に含まれる光の波長幅は、約9~10nmとなる。

20

【0100】

なお、マルチチャンネル化において実現するチャンネル数、すなわち、画素アレイ部91又はスペクトル画像G1の行方向H1の分割数は、32個に限定されず、種々変形することが可能である。例えば、画素アレイ部91における行方向H1の画素数を320画素とした場合には、最小で1チャンネル、最大で320チャンネルのチャンネル領域に分割することが可能である。

【0101】

また、光検出部としてイメージセンサ34を用いる本実施形態では、例えば、チャンネル領域それぞれの行方向H1の幅(画素数)を、チャンネル領域ごとに別々に設定することが可能である。

30

【0102】

例えば、分光光学系37にプリズムを用いる場合には、長い波長の光の方が、短い波長の光に比べて、行方向H1への広がりが広がる。そのような場合、例えば、図11に示す例において、長い波長の光が入射するチャンネル領域CH31、CH32等の行方向H1の画素数を、短い波長の光が入射するチャンネル領域CH1、CH2等の行方向H1の画素数よりも大きくしてもよい。すなわち、分光光学系37が蛍光74を所定方向(例えば、行方向H1に対応する方向)に分光するプリズムを含んでいる場合、蛍光74のうちの第1波長成分が入射する第1領域(例えばチャンネル領域CH1)の行方向H1の幅(画素数)は、第1波長成分よりも長い第2波長成分が入射する第2領域(例えば、チャンネル領域CH32)の行方向H1の幅(画素数)よりも狭くてもよい。

40

【0103】

このように、本実施形態では、蛍光74に対してマルチチャンネル分析を行なう場合に、チャンネル数、各チャンネルのチャンネル幅(波長幅)、各チャンネルの中心波長等を自由に設計することが可能である。

【0104】

2.8 イメージセンサでバーチャルフィルタ機能を実現する場合

また、本実施形態に係るイメージセンサ34を用いて、バーチャルフィルタ機能を実現することも可能である。図12は、波長488nmの励起光で励起されたFITC、PE、PerCP-Cy5.5及びPE-Cy7の4種類の蛍光色素から放射された蛍光のス

50

ペクトルを示す図である。図 1 3 は、図 1 2 に示す蛍光に対して実現される第 1 の実施形態に係るバーチャルフィルタの一例を示す図である。なお、図 1 3 では、画素アレイ部 9 1 における左端の画素列を画素列 # 1 とし、右端の画素列を画素列 # 3 2 0 としている。

【 0 1 0 5 】

図 1 2 に示すように、4 8 8 nm の励起光 L 0 を F I T C、P E、P e r C P - C y 5 . 5 及び P E - C y 7 の 4 種類の蛍光色素に照射した場合、F I T C からは中心波長が 5 3 0 nm 程度の蛍光 L 1 が放射され、P E からは中心波長が 5 8 5 程度の蛍光 L 2 が放射され、P e r C P - C y 5 . 5 からは中心波長が 6 9 5 nm 程度の蛍光 L 3 が放射され、P E - C y 7 からは中心波長が 7 8 0 nm 程度の蛍光 L 4 が放射される。

【 0 1 0 6 】

そこで信号取得システム 1 は、図 1 3 に示すように、F I T C からの蛍光 L 1 に対しては、行方向 H 1 の中心を波長 5 3 0 nm に相当する画素列 # 3 3 とし、行方向 H 1 の幅を波長 3 0 nm に相当する 3 3 画素としたバーチャルフィルタ (フィルタ領域ともいう) F 1 をスペクトル画像 G 1 に設定する。P E からの蛍光 L 2 に対しては、行方向 H 1 の中心を波長 5 8 5 nm に相当する画素列 # 9 1 とし、行方向 H 1 の幅を波長 4 2 nm に相当する 4 6 画素としたバーチャルフィルタ F 2 をスペクトル画像 G 1 に設定する。P e r C P - C y 5 . 5 からの蛍光 L 3 に対しては、行方向 H 1 の中心を波長 6 9 5 nm に相当する画素列 # 2 0 8 とし、行方向 H 1 の幅を波長 4 0 nm に相当する 4 4 画素としたバーチャルフィルタ F 3 をスペクトル画像 G 1 に設定する。P E - C y 7 からの蛍光 L 4 に対しては、行方向 H 1 の中心を波長 7 8 0 nm に相当する画素列 # 2 9 9 とし、行方向 H 1 の幅を波長 4 0 nm に相当する 4 4 画素としたバーチャルフィルタ F 4 をスペクトル画像 G 1 に設定する。

【 0 1 0 7 】

なお、それぞれのバーチャルフィルタ F 1 ~ F 4 では、列方向 V 1 の画素数は、例えば、画素アレイ部 9 1 の列方向 V 1 の画素数と同じ、3 6 画素であってよい。

【 0 1 0 8 】

以上のようなバーチャルフィルタ F 1 ~ F 4 をスペクトル画像 G 1 に設定した場合、信号取得システム 1 からは、例えば、バーチャルフィルタ F 1 を構成する 3 3 x 3 6 画素の各画素 1 0 1 から出力された画素信号の合算値と、バーチャルフィルタ F 2 を構成する 4 6 x 3 6 画素の各画素 1 0 1 から出力された画素信号の合算値と、バーチャルフィルタ F 3 を構成する 4 4 x 3 6 画素の各画素 1 0 1 から出力された画素信号の合算値と、バーチャルフィルタ F 4 を構成する 4 4 x 3 6 画素の各画素 1 0 1 から出力された画素信号の合算値とが、評価値として出力される。

【 0 1 0 9 】

このように、本実施形態では、光検出器としてイメージセンサ 3 4 を用いることで、波長分解能が細かく、解像度の高い蛍光スペクトラム情報を取得することが可能であるため、光学フィルタ特性の再現性を高めることや、各蛍光色素から放出された蛍光に対して最適なバーチャルフィルタを設定することなどが可能となる。

【 0 1 1 0 】

なお、設定するバーチャルフィルタの数、各バーチャルフィルタの中心波長及び / 又は波長幅等は、使用する励起光 7 1 の波長や検体 5 3 及び / 又は蛍光マーカの種類等に応じて自由に設計することが可能である。例えば、図 1 2 に例示した 4 つの蛍光色素に対して別の蛍光色素を追加した場合には、追加した分のバーチャルフィルタをスペクトル画像 G 1 に設定することが可能である。その際、異なる蛍光のスペクトルが近接する領域では、各バーチャルフィルタの中心波長及び / 又は波長幅が調整されてよい。

【 0 1 1 1 】

また、マルチスポット型のフローサイトメータとした場合には、それぞれの励起光 7 1 によって検体 5 3 及び / 又は蛍光マーカから放射される蛍光に応じて、最適なバーチャルフィルタを設定することも可能である。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

2.9 作用・効果

以上のように、第1の実施形態によれば、スペクトル型のフローサイトメータ11において、アレイ型光検出器に2次元のイメージセンサ34が用いられる。これにより、アレイ型光検出器にマルチチャンネルPMTを使用した場合と比較して、装置規模を小型化することが可能となる。その結果、全体的な装置規模を縮小することが可能である。

【0113】

また、イメージセンサ34は、マルチチャンネルPMTと比較して、波長分解能が細かく、解像度の高い蛍光スペクトラム情報を取得することが可能であるため、光学フィルタ特性を忠実に再現したバーチャルフィルタを実現することが可能となる。

【0114】

さらに、イメージセンサ34を用いることで、任意の波長幅で画素値を加算することが可能となるため、マルチチャンネル分析を行なう際のチャンネル数の増減やチャンネル幅の変更、バーチャルフィルタ機能を使用する場合のフィルタ数の増減や各フィルタの中心波長/波長幅の変更など、製品化後の設計変更が容易になるというメリットも備える。

【0115】

3. 第2の実施形態

上述した第1の実施形態では、スペクトル型フローサイトメータを例示したが、本開示に係る技術は、フローサイトメータに限定されず、例えば、デジタルパソロジーイメージング(DPI)などの医療機器にも適用することが可能となる。

【0116】

デジタルパソロジーイメージング(DPI)では、検体53は、ステージ上に載置され、ステージ上に載置された検体53が励起光源32からの励起光71によって走査される。ステージ上に載置された検体53の励起光71による走査は、ステージと励起光源32との位置関係を制御する走査制御部によって制御される。

【0117】

また、デジタルパソロジーイメージング(DPI)では、イメージセンサ34として、画素101が直線状に配列したラインセンサが用いられる。ラインセンサは、励起光71がステージ上の検体53を走査した際に、検体53から放射された蛍光74を受光することで、検体53全体に対する2次元又は3次元の画像データ(スペクトル画像)を生成する。

【0118】

生成されたスペクトル画像は、第1の実施形態と同様に、信号取得システム1に入力されて評価され、その評価値が解析システム2に入力されて解析される。

【0119】

図14は、第2の実施形態に係る光学測定装置(システム)の概略構成例を示すブロック図である。

【0120】

図14に示すように、本実施形態の光学測定装置200は、観察ユニット201を備える。観察ユニット201は、異軸平行に配置された波長の異なる複数のライン照明を病理標本(病理サンプル)に照射する励起部210と、病理標本を支持するサンプルステージ220と、ライン状に励起された病理標本の蛍光スペクトル(分光データ)を取得する分光イメージング部230とを有する。

【0121】

光学測定装置200は、第1の実施形態における信号取得システム1及び解析システム2に相当する処理ユニット202をさらに備える。処理ユニット202は、観察ユニット201によって取得された病理標本(以下、サンプルSともいう)の蛍光スペクトルに基づいて、典型的には、病理標本の画像(スペクトル画像に相当)を形成し、あるいは蛍光スペクトルの分布を出力する。ここでいう画像とは、そのスペクトルを構成する色素やサンプル由来の自家蛍光などの構成比率、波形からRGB(赤緑青)カラーに変換されたもの、特定の波長帯の輝度分布などをいう。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

サンプルステージ 2 2 0 に対して、対物レンズなどの観察光学系 2 4 0 を介して、励起部 2 1 0 と分光イメージング部 2 3 0 が接続されている。観察光学系 2 4 0 はフォーカス機構 2 6 0 によって最適な焦点に追従する機能を持っている。観察光学系 2 4 0 には、暗視野観察、明視野観察などの非蛍光観察部 2 7 0 が接続されてもよい。フォーカス機構 2 6 0、非蛍光観察部 2 7 0 などは記憶、制御、計算処理を行う制御部（P C (Personal Computer) など）に接続されている。

【 0 1 2 3 】

励起部 2 1 0 は、波長の異なる複数の励起光を出力することができる複数の光源を備える。複数の光源は、典型的には、発光ダイオード（L E D）、レーザダイオード（L D）、水銀ランプなどで構成され、それぞれがライン照明化され、サンプルステージ 2 2 0 のサンプル S に照射される。

10

【 0 1 2 4 】

サンプル S は、典型的には、組織切片等の観察対象を含むスライドで構成されるが、勿論それ以外であってもよい。サンプル S は、複数の蛍光色素によって染色されている。観察ユニット 2 0 1 は、サンプル S を所望の倍率に拡大して観察する。ライン照明が複数配置されており、それぞれの照明エリアに重なるように分光イメージング部 2 3 0 の複数の撮影エリアが配置される。2 つのライン照明はそれぞれ平行に離間して配置される。各ライン照明の長手方向を X 軸方向とし、配列方向を Y 軸方向とする。

【 0 1 2 5 】

1 つめのライン照明を構成する波長と、2 つめのライン照明を構成する波長は相互に異なっている。これらライン照明により励起されるライン状の蛍光は、観察光学系 2 4 0 を介して分光イメージング部 2 3 0 において観測される。

20

【 0 1 2 6 】

分光イメージング部 2 3 0 は、複数のライン照明によって励起された蛍光がそれぞれ通過可能な複数のスリット部を有する観測スリットと、観測スリットを通過した蛍光を個々に受光可能な少なくとも 1 つの撮像素子（イメージセンサ 3 4 に相当）とを有する。撮像素子には、C C D (Charge Coupled Device)、C M O S (Complementary Metal Oxide Semiconductor) などの 2 次元イメージャが採用される。観測スリットを光路上に配置することで、それぞれのラインで励起された蛍光スペクトルを重なりなく検出することができる。

30

【 0 1 2 7 】

分光イメージング部 2 3 0 は、それぞれのライン照明から、撮像素子の 1 方向（例えば垂直方向）の画素アレイを波長のチャンネルとして利用した蛍光の分光データ（ x 、 y ）を取得する。得られた分光データ（ x 、 y ）は、それぞれの励起波長から励起された分光データであるかが紐づけられた状態で処理ユニット 2 0 2 に記録される。

【 0 1 2 8 】

処理ユニット 2 0 2 は、C P U (Central Processing Unit)、R A M (Random Access Memory)、R O M (Read Only Memory) 等のコンピュータに用いられるハードウェア要素および必要なソフトウェアにより実現され得る。C P U に代えて、またはこれに加えて、F P G A (Field Programmable Gate Array) 等の P L D (Programmable Logic Device)、あるいは、D S P (Digital Signal Processor)、その他 A S I C (Application Specific Integrated Circuit) 等が用いられてもよい。

40

【 0 1 2 9 】

処理ユニット 2 0 2 は、複数のライン照明の波長と撮像素子で受光された蛍光との相関を表す分光データを記憶する記憶部 2 2 1 を有する。記憶部 2 2 1 には、不揮発性半導体メモリ、ハードディスクドライブ等の記憶装置が用いられ、サンプル S に関する自家蛍光の標準スペクトル、サンプル S を染色する色素単体の標準スペクトルがあらかじめ格納されている。撮像素子で受光した分光データ（ x 、 y ）は、例えば、記憶部 2 2 1 に記憶される。

50

【0130】

観察ユニット201はさらに、サンプルステージ220に対して複数のライン照明をY軸方向、つまり、各ライン照明の配列方向に走査する走査機構250を備える。走査機構250を用いることで、サンプルS上において空間的にyだけ離れた、それぞれ異なる励起波長で励起された色素スペクトル(蛍光スペクトル)をY軸方向に連続的に記録することができる。この場合、例えば、撮影領域がX軸方向に複数に分割され、Y軸方向にサンプルSをスキャンし、その後、X軸方向に移動し、さらにY軸方向へのスキャンを行うといった動作が繰り返される。1回のスキャンで数種の励起波長によって励起されたサンプル由来の分光スペクトルイメージを撮影することができる。

【0131】

走査機構250は、典型的には、サンプルステージ220がY軸方向に走査されるが、光学系の途中に配置されたガルバノミラーによって複数のライン照明がY軸方向に走査されてもよい。最終的に、(X、Y、)の3次元データが複数のライン照明についてそれぞれ取得される。各ライン照明由来の3次元データはY軸についてyだけ座標がシフトしたデータになるので、あらかじめ記録されたy、または撮像素子34の出力から計算されるyの値に基づいて、補正され出力される。

【0132】

ここまでの例では励起光としてのライン照明は2本で構成されたが、これに限定されず、3本、4本あるいは5本以上であってもよい。またそれぞれのライン照明は、色分離性能がなるべく劣化しないように選択された複数の励起波長を含んでもよい。またライン照明が1本であっても、複数の励起波長から構成される励起光源で、かつそれぞれの励起波長と、撮像素子で所得されるロウデータとを紐づけて記録すれば、異軸平行ほどの分離能は得られないが、多色スペクトルを得ることができる。

【0133】

画像形成部223は、記憶部221に記憶された分光データ(あるいはデータ校正部222によって校正された分光データ)と、励起ラインの軸間距離(y)に相当する間隔とに基づいて、サンプルSの蛍光画像を形成する。

【0134】

各ライン照明由来の3次元データは、Y軸についてyだけ座標がシフトしたデータになるので、あらかじめ記録されたy、または撮像素子の出力から計算されるyの値に基づいて補正され、出力される。

【0135】

画像形成部223は、撮影した画像を繋げて1つの大きな画像にするための処理(ステッチング)を実行する。これにより、多重化されたサンプルSに関する病理画像を取得することができる。形成された蛍光画像は、表示部203に出力される。

【0136】

さらに、画像形成部223は、記憶部221にあらかじめ記憶されたサンプルSの自家蛍光及び色素単体の各標準スペクトルを基に、撮影された分光データ(測定スペクトル)からサンプルSの自家蛍光及び色素の成分分布を分離計算する。演算方法としては、最小二乗法、重み付け最小二乗法などが採用可能であり、撮影された分光データが上記標準スペクトルの線形和になるような係数を計算する。算出された係数の分布は、記憶部221に記憶されるとともに、表示部203へ出力されて画像として表示される。

【0137】

以上のように、DPIに対しても、第1の実施形態と同様に、その光検出部をイメージセンサ34とすることが可能である。また、マルチチャンネル分析やバーチャルフィルタ機能についても同様に、DPIに対して適用することが可能である。

【0138】

以上、本開示の実施形態について説明したが、本開示の技術的範囲は、上述の実施形態そのままに限定されるものではなく、本開示の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能である。また、異なる実施形態及び変形例にわたる構成要素を適宜組み合わせても

10

20

30

40

50

よい。

【0139】

また、本明細書に記載された各実施形態における効果はあくまで例示であって限定されるものではなく、他の効果があってもよい。

【0140】

なお、本技術は以下のような構成も取ることができる。

(1)

生体検体から放射した蛍光を分光する分光光学系と、

前記分光光学系で分光された前記蛍光を受光して蛍光情報を生成するイメージセンサと、
を備え、

前記イメージセンサは、それぞれ前記蛍光のうちの異なる波長成分を受光して前記波長成分ごとの蛍光情報を生成する複数の領域に分割されている

光学測定装置。

(2)

前記蛍光情報は、前記イメージセンサの画素ごとの画素値を前記領域ごとに合算した値、又は、前記画素ごとの画素値よりなる画像データである前記(1)に記載の光学測定装置。

(3)

前記イメージセンサで生成された前記蛍光情報を評価する信号取得部をさらに備える前記(1)又は(2)に記載の光学測定装置。

(4)

前記信号取得部は、前記蛍光情報を前記分光光学系によって分光された前記蛍光の分光方向に沿って配列する複数のチャネル領域に分割し、前記複数のチャネル領域それぞれの画素値を合算することで、前記蛍光情報の評価値を算出する前記(3)に記載の光学測定装置。

(5)

前記信号取得部は、前記蛍光情報における1つ以上のフィルタ領域それぞれの画素値を合算することで、前記蛍光情報の評価値を算出する前記(3)に記載の光学測定装置。

(6)

前記分光光学系は、前記蛍光を所定方向に分光するプリズムを含み、

前記複数の領域のうち、前記蛍光のうちの第1波長成分が入射する第1領域の前記所定方向に対応する方向の幅は、前記蛍光のうちの前記第1波長成分よりも長い第2波長成分が入射する第2領域の前記所定方向に対応する方向の幅よりも狭い

前記(1)～(5)の何れか1項に記載の光学測定装置。

(7)

前記信号取得部による前記蛍光情報の評価結果に基づいて前記生体検体を解析する解析部をさらに備える前記(3)に記載の光学測定装置。

(8)

前記イメージセンサは、

行列状に配列する複数の光電変換素子と、

前記光電変換素子それぞれに発生した電荷に基づいて前記蛍光情報を構成する複数の前記画素値を生成する検出回路と、

を備える前記(2)に記載の光学測定装置。

(9)

前記生体検体に所定波長の励起光を照射する励起光源をさらに備える前記(1)～(8)の何れか1項に記載の光学測定装置。

(10)

前記生体検体が流れる流路をさらに備え、

前記励起光源は、前記流路における所定の領域に前記励起光を照射する

前記(9)に記載の光学測定装置。

10

20

30

40

50

(1 1)

所定波長の励起光を出射する励起光源と、
 前記生体検体を載置するステージと、
 前記励起光が前記ステージ上の前記生体検体を走査するように前記ステージと前記励起光源との位置関係を制御する走査機構と、
 をさらに備える前記(1) ~ (1 0) の何れか 1 項に記載の光学測定装置。

(1 2)

生体検体から放射した蛍光を分光する分光光学系と、
 前記分光光学系で分光された前記蛍光を受光して蛍光情報を生成するイメージセンサと、
 前記イメージセンサで生成された前記蛍光情報を評価する信号取得部と、
 前記信号取得部による前記蛍光情報の評価結果に基づいて前記生体検体を解析する解析部と、
 を備え、
 前記イメージセンサは、それぞれ前記蛍光のうちの異なる波長成分を受光して前記波長成分ごとの蛍光情報を生成する複数の領域を備える光学測定システム。

10

【符号の説明】

【 0 1 4 1 】

- 1 信号取得システム
- 2 解析システム
- 1 1 フローサイトメータ 20
- 3 1 フローセル
- 3 2 励起光源
- 3 3 フォトダイオード
- 3 4 イメージセンサ
- 3 5、3 6 集光レンズ
- 3 7 分光光学系
- 3 7 1 光学素子
- 5 1 サンプルチューブ
- 5 2 サンプル流
- 5 3 検体 30
- 7 1 励起光
- 7 2 照射スポット
- 7 3 前方散乱光
- 7 4 蛍光
- 7 5 分散光
- 9 1 画素アレイ部
- 9 2 接続部
- 9 3 検出回路
- 9 3 A、9 3 B 検出回路アレイ
- 9 4 画素駆動回路 40
- 9 5 ロジック回路
- 9 6 出力回路
- 1 0 1 画素
- 1 1 1 フォトダイオード
- 1 1 2 蓄積ノード
- 1 1 3 転送トランジスタ
- 1 1 4 増幅トランジスタ
- 1 1 6 リセットトランジスタ
- 1 1 8 電源
- 1 2 1 行駆動回路 50

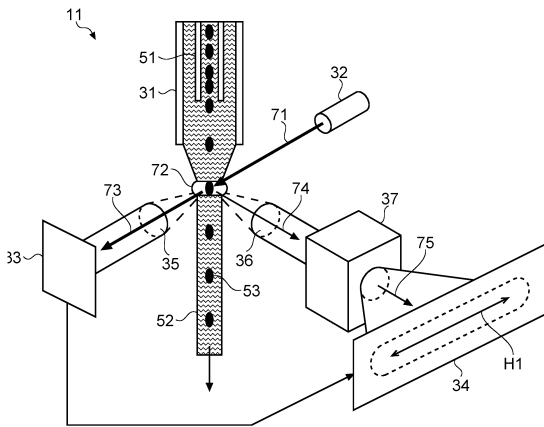
- 1 2 2 定電流回路
- 1 2 4 垂直信号線
- 2 0 0 光学測定装置
- 2 0 1 観察ユニット
- 2 0 2 処理ユニット
- 2 0 3 表示部
- 2 1 0 励起部
- 2 2 0 サンプルステージ
- 2 3 0 分光イメージング部
- 2 4 0 観察光学系
- 2 5 0 走査機構
- 2 6 0 フォーカス機構
- 2 7 0 非蛍光観察部
- 2 2 1 記憶部
- 2 2 2 データ校正部
- 2 2 3 画像形成部
- CH 1 ~ CH 3 2 チャンネル領域
- F 1 ~ F 4 バーチャルフィルタ
- G 1 スペクトル画像
- H 1 行方向
- V 1 列方向

10

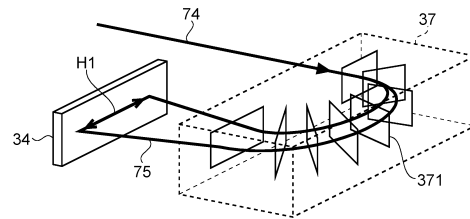
20

【図面】

【図 1】



【図 2】

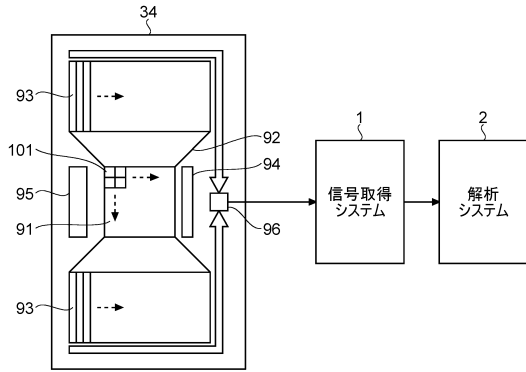


30

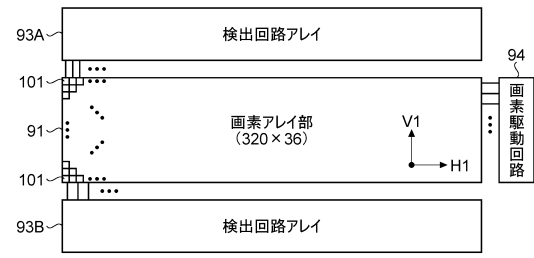
40

50

【図3】

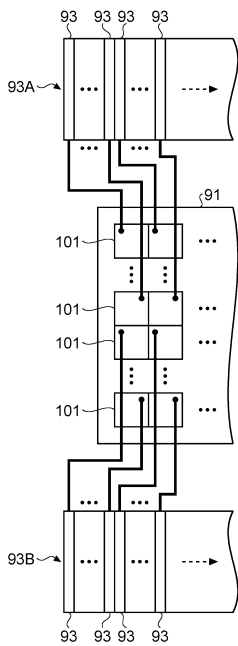


【図4】

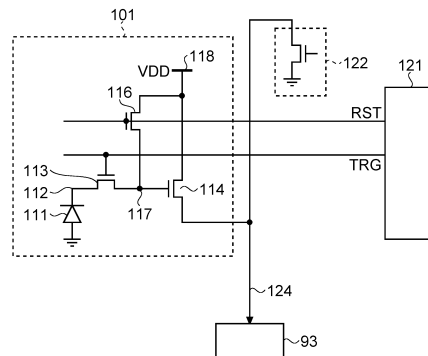


10

【図5】



【図6】



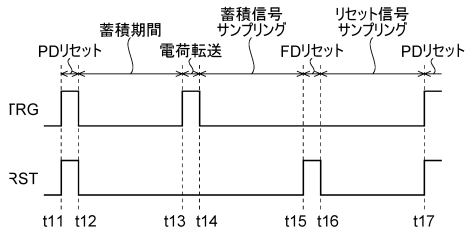
20

30

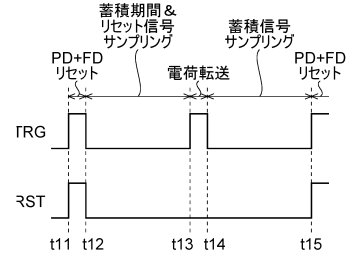
40

50

【 図 7 】

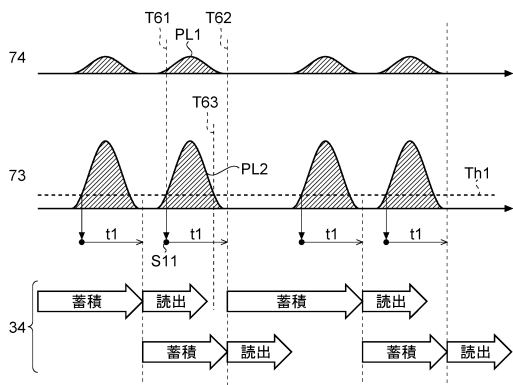


【 図 8 】

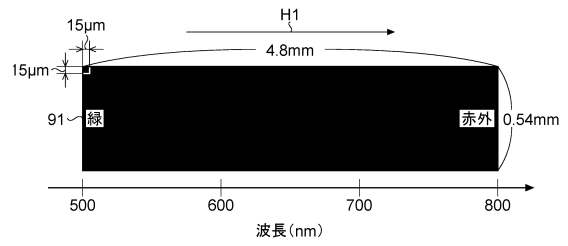


10

【 図 9 】



【 図 10 】



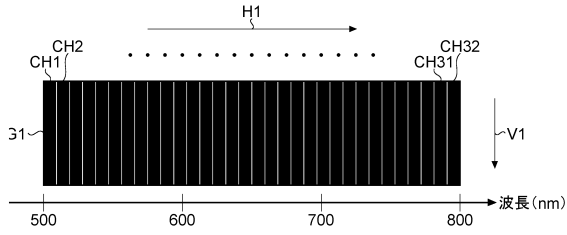
20

30

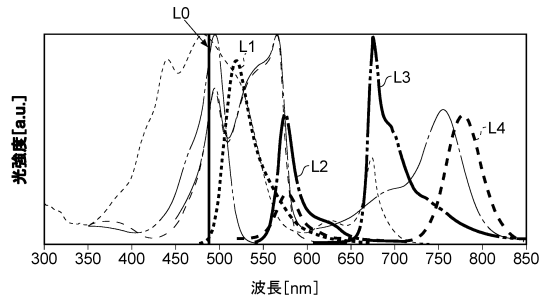
40

50

【図 1 1】

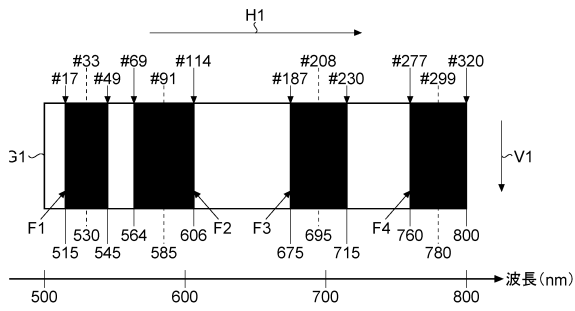


【図 1 2】

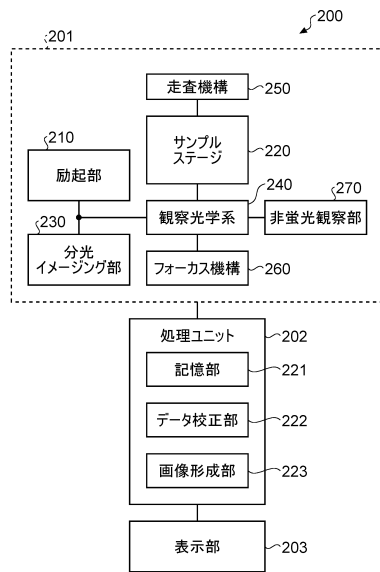


10

【図 1 3】



【図 1 4】



20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第17/145816(WO,A1)
特開2009-230021(JP,A)
特開2007-113979(JP,A)
特開2007-285999(JP,A)
特開2018-013422(JP,A)
特開平05-142137(JP,A)
特表2016-524703(JP,A)
国際公開第17/104438(WO,A1)
国際公開第17/086181(WO,A1)
米国特許出願公開第2017/0328826(US,A1)
米国特許出願公開第2018/0231452(US,A1)
第5章第6節 フローサイトメーターを用いた細胞特性の定量化, iPSC細胞の安全・高品質な作製技術, 日本, 株式会社技術情報協会, 2016年10月31日, 第327-337頁, ISBN:978-4-86104-629-2
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G01N 21/00 - G01N 21/83
G01N 33/00 - G01N 33/98
G01N 35/00 - G01N 35/10
G01N 37/00
G02B 21/00 - G02B 21/36
C12Q 1/00 - C12Q 1/70
C12M 1/00 - C12M 1/42
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
JSTChina(JDreamIII)