

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4756948号
(P4756948)

(45) 発行日 平成23年8月24日(2011.8.24)

(24) 登録日 平成23年6月10日(2011.6.10)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 15/14 (2006.01)

GO 1 N 15/14

D

GO 1 N 15/14

C

請求項の数 16 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2005-229536 (P2005-229536)
 (22) 出願日 平成17年8月8日(2005.8.8)
 (65) 公開番号 特開2007-46947 (P2007-46947A)
 (43) 公開日 平成19年2月22日(2007.2.22)
 審査請求日 平成20年1月11日(2008.1.11)

(73) 特許権者 502437702
 ベイバイオサイエンス株式会社
 兵庫県神戸市中央区港島南町5丁目2番5号
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (72) 発明者 神田 昌彦
 兵庫県神戸市中央区港島南町5丁目5-2
 ベイバイオサイエンス株式会社内
 審査官 河野 隆一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

互いに異なる波長を有する複数の励起光を、所定の周期および互いに異なる位相で照射する複数の光源と、

前記複数の励起光を同一の入射光路上に導光し、フローセル内に流れる染色された粒子に集光する導光部材と、

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子を励起して生じた蛍光を検出し、蛍光信号を出力する複数の蛍光検出器と、

前記蛍光信号を前記励起光の位相のそれぞれに同期して検出される複数の光信号要素に分離する同期分離回路と、

検出された複数の光信号要素に基づいて、細胞に標識されて蛍光色素の蛍光強度を特徴付ける蛍光強度要素として蛍光ピーク強度や幅や面積を計算する演算回路部とを備えたことを特徴とするフローサイトメータ。

【請求項 2】

前記蛍光検出器が光電子増倍管からなり、

前記蛍光検出器の光電子増倍電圧を前記光信号要素の前記位相のそれぞれに呼応して変化させることを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

【請求項 3】

前記蛍光信号を電氣的に増幅する増幅回路を備え、

前記増幅回路の増幅電圧を前記光信号要素の前記位相のそれぞれに呼応して変化させる

ことを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

【請求項 4】

前記フローセルと前記複数の蛍光検出器のそれぞれとの間の出射光路上に配設され、所定の波長帯を有する前記蛍光を選択的に透過させる複数のバンドパスフィルタとを備えたことを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

【請求項 5】

前記複数の励起光のそれぞれが粒子で散乱して生じた散乱光を検出し、散乱光信号を出力する散乱光検出器を備え、

前記蛍光検出器のそれぞれは、前記散乱光信号が所定の閾値を超えた時点から所定の期間において前記蛍光を検出することを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

10

【請求項 6】

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子で散乱して生じた散乱光を検出し、散乱光信号を出力する散乱光検出器を備え、

前記複数の蛍光検出器は、少なくとも 1 つのトリガ蛍光検出器を含み、

前記蛍光検出器および前記散乱光検出器は、前記トリガ蛍光検出器で検出された前記蛍光信号が所定の閾値を超えた時点から所定の期間においてそれぞれ前記蛍光および前記散乱光を検出することを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

【請求項 7】

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子で散乱して生じた前方散乱光を検出し、前方散乱光信号を出力する前方散乱光検出器と、

20

前記フローセルと前記前方散乱光検出器との間の出射光路上に配設され、所定の波長帯を有する前記前方散乱光を選択的に透過させる前方散乱光バンドパスフィルタと、

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子で散乱して生じた側方散乱光を検出し、側方散乱光信号を出力する側方散乱光検出器と、

前記フローセルと前記側方散乱光検出器との間の出射光路上に配設され、所定の波長帯を有する前記側方散乱光を選択的に透過させる側方散乱光バンドパスフィルタとを備えたことを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

【請求項 8】

前記複数の光源は、前記複数の励起光を所定の周期および互いに異なる位相でパルス発振することを特徴とする請求項 1 に記載のフローサイトメータ。

30

【請求項 9】

互いに異なる波長を有する複数の励起光を、所定の周期および互いに異なる位相で照射するステップと、

前記複数の励起光を同一の入射光路上に導光し、フローセル内に流れる染色された粒子に集光するステップと、

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子を励起して生じた蛍光を検出し、蛍光信号を出力するステップと、

前記蛍光信号を前記励起光の前記位相のそれぞれに同期して検出される複数の光信号要素に分離するステップと、

検出された複数の光信号要素に基づいて、細胞に標識されて蛍光色素の蛍光強度を特徴付ける蛍光強度要素として蛍光ピーク強度や幅や面積を計算するステップとを有することを特徴とするフローサイトメトリ方法。

40

【請求項 10】

前記蛍光を検出するステップは、光電子増倍管を用いて行われ、

前記光電子増倍管の光電子増倍電圧を前記励起光の前記位相のそれぞれに呼応して変化させるステップを有することを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

【請求項 11】

増幅回路を用いて、前記蛍光信号を電氣的に増幅するステップと、

前記増幅回路の増幅電圧を前記励起光の前記位相のそれぞれに呼応して変化させるステップとを有することを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

50

【請求項 1 2】

前記蛍光を検出するステップは、所定の波長帯を有する前記蛍光を選択的に検出するステップを有することを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

【請求項 1 3】

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子で散乱して生じた散乱光を検出し、散乱光信号を出力するステップを有し、

蛍光を検出するステップは、前記散乱光信号が所定の閾値を超えた時点から所定の期間において行われることを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

【請求項 1 4】

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子で散乱して生じた散乱光を検出し、散乱光信号を出力するステップを有し、

前記蛍光を検出するステップは、少なくとも 1 つのトリガ蛍光検出器を用いて蛍光を検出するステップを含み、

前記散乱光信号を出力するステップおよび前記蛍光を検出するステップは、前記トリガ蛍光検出器で検出された前記蛍光信号が所定の閾値を超えた時点から所定の期間において行われることを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

【請求項 1 5】

前記複数の励起光のそれぞれが前記粒子で散乱して生じた前方散乱光のうち、所与の波長帯を有する前方散乱光を選択的に検出し、前方散乱光信号を出力するステップと、

前記複数の励起光のそれぞれが粒子で散乱して生じた側方散乱光のうち、所与の波長帯を有する側方散乱光を選択的に検出し、側方散乱光信号を出力するステップとを有することを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

【請求項 1 6】

前記励起光を照射するステップは、前記複数の励起光を所定の周期および互いに異なる位相でパルス発振するステップを有することを特徴とする請求項 9 に記載のフローサイトメトリ方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、フローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

バイオテクノロジーの急速な発展に伴い、医学や生物学を含むさまざまな分野で多数の細胞などを自動的に分析・分別するフローサイトメータおよびセルソータの需要がますます増大しつつある。フローサイトメータは、概略、生体（血液など）から採取された数多くの細胞粒子を蛍光標識試薬などで染色し、これらの細胞粒子をシースフロー内で一列に配列し、細胞粒子のそれぞれにレーザ光を照射して、細胞粒子から生じる散乱光（前方散乱光および側方散乱光）と蛍光色素に依存するさまざまな多色蛍光を測定することにより、細胞を同定するものである。また、同定するために収集された散乱光と蛍光に関する情報を電気的信号に変換し、サンプルから採取された大量の細胞粒子を統計的に評価することにより、生体の病変などの状態を診断することができる。さらにセルソータは、散乱光と蛍光に関する電気的信号を用いて、分取したい各細胞粒子を含む液滴を選択的に荷電し、この液滴が落下する経路上に直流電場を形成することにより、特定の細胞粒子を選択的に収集することができる。

【0003】

以下、図 7 および図 8 を参照しながら、従来式のフローサイトメータを具体的に説明する。図 7 に示す従来式のフローサイトメータ 101 は、概略、蛍光標識試薬などで染色された細胞粒子をシースフロー内で一列に配列するための流体力学的要素と、各細胞粒子に波長の異なる複数のレーザ光を照射し、散乱光および蛍光を受光するための光学的要素とを備える。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

流体力学的要素は、図 7 に示すように、サンプル懸濁液を貯蔵するためのサンプル懸濁液供給部 1 1 0 と、シース液を貯蔵・供給するためのシース液供給部 1 1 2 と、フローチャンバ 1 1 4 と、フローチャンバ 1 1 4 の下流に連結されたフローセル 1 1 6 とを有する。

【 0 0 0 5 】

フローチャンバ 1 1 4 は略円筒形状を有し、その中心軸に沿って懸濁液供給管 1 1 8 が配設されている。サンプル懸濁液供給部 1 1 0 およびシース液供給部 1 1 2 に貯蔵されたサンプル懸濁液およびシース液は、それぞれのエアポンプ 1 1 1 , 1 1 3 の圧力により、サンプル管 1 2 0 およびシース管 1 2 2 を介して懸濁液供給管 1 1 8 およびフローチャンバ 1 1 4 内に供給される。これにより、シース液がサンプル懸濁液を円筒状に包み込む鞘状のシースフロー（層流）が形成され、サンプル懸濁液に含まれる細胞粒子 1 0 5 をフローセル 1 1 6 内で一列に整列させることができる。

10

【 0 0 0 6 】

一方、光学的要素は、異なる波長を有する複数のレーザビーム（励起光）を連続的に照射する第 1、第 2 および第 3 の光源 1 3 0 , 1 3 2 , 1 3 4 を備える。第 1 の光源 1 3 0 は、例えば、青色レーザビーム（ピーク波長：4 8 8 n m , 出力：2 0 m W）を照射する D P S S レーザ（Diode Pumped Solid State Laser：半導体レーザ励起固体レーザ）である。また、第 2 の光源 1 3 2 は、赤色レーザビーム（ピーク波長：6 3 5 n m , 出力：2 0 m W）を照射するダイオードレーザで、第 3 の光源 1 3 4 は、紫外レーザビーム（ピーク波長：3 7 5 n m , 出力：8 m W）を照射するダイオードレーザである。

20

【 0 0 0 7 】

従来技術によるフローサイトメータによれば、第 1、第 2 および第 3 の光源 1 3 0 , 1 3 2 , 1 3 4 からのレーザビームは、集光レンズ 1 3 6 などからなる導光部材を用いて、フローセル 1 1 6 の互いに異なる第 1、第 2 および第 3 の集光位置 F 1 , F 2 , F 3 に集光され、これらの集光位置は、集光位置 F 1 , F 2 の間隔および集光位置 F 2 , F 3 の間隔がシースフローの方向（Z 方向）において所定の距離 d となるように設計されている。

【 0 0 0 8 】

さらに、光学的要素は、図 8 に示すように、第 1 のレーザビーム 1 3 0 が細胞粒子 1 0 5 で散乱して生じた前方散乱光（F S C : Forward Scattering Light）を検出する前方散乱光検出装置 1 5 0 と、各レーザビームが細胞粒子 1 0 5 で散乱して生じた側方散乱光（S S C : Side Scattering Light）および青色レーザビームが細胞粒子 1 0 5 を励起して生じたさまざまな波長を有する複数の蛍光（F L : fluorescent light）を検出する第 1 の側方散乱光 / 蛍光検出装置 1 4 0 と、赤色レーザビームおよび紫外レーザビームが細胞粒子 1 0 5 を励起して生じたさまざまな波長を有する複数の蛍光を検出する第 2 および第 3 の蛍光検出装置 1 4 2 , 1 4 4 とを備える。

30

【 0 0 0 9 】

前方散乱光検出装置 1 5 0 は、図 8 に示すように、第 1 のレーザビーム 1 3 0 の前方散乱光を検出する光検出器 1 5 2 を有する。また、第 1 の側方散乱光 / 蛍光検出装置 1 4 0 は、複数のハーフミラー 1 5 4、バンドパスフィルタ 1 5 6、および光電子増倍管 1 5 8 を有する。同様に、第 2 および第 3 の蛍光検出装置 1 4 2 , 1 4 4 は、1 つのハーフミラー 1 5 4 と、2 つのバンドパスフィルタ 1 5 6 および光電子増倍管 1 5 8 を有する。なお、従来技術による第 1 の側方散乱光 / 蛍光検出装置 1 4 0 は、第 1 の光源（青色レーザ）1 3 0 による側方散乱光および蛍光を検出し、同様に、第 2 および第 3 の蛍光検出装置 1 4 2 , 1 4 4 は、それぞれ第 2 の光源（赤色レーザ）1 3 2 および第 3 の光源（紫外レーザ）1 3 4 による蛍光を検出する。

40

このように、これまでのフローサイトメータによれば、連続発振する複数のレーザビームが間隔 d を隔てた異なる集光位置に集光され、それぞれの集光位置で生じた散乱光および蛍光を独立して検出し、図示しない信号処理装置に出力する。

【 0 0 1 0 】

50

信号処理装置は、前方散乱光検出装置 150、第 1 の側方散乱光 / 蛍光検出装置 140、さらに第 2 および第 3 の蛍光検出装置 142, 144 から出力されたアナログ信号を処理する。

上述のように、第 1、第 2 および第 3 のレーザビームはフローセル 116 の間隔 d を隔てた異なる集光位置に連続的に照射されるので、信号処理装置は、第 1 のレーザビームにより励起された蛍光を検出した時点から第 3 のレーザビームにより励起された蛍光を検出するまでの第 1 の遅延時間、および第 2 のレーザビームにより励起された蛍光を検出した時点から第 3 のレーザビームにより励起された蛍光を検出するまでの第 2 の遅延時間を算出し、第 1 および第 2 のレーザビームによる蛍光に関する信号を、それぞれ第 1 および第 2 の遅延時間だけ FIFO メモリに格納した後に出力することにより、同一の細胞粒子を第 1、第 2 および第 3 のレーザビームで励起して生じた蛍光に関する信号を同時に出力する。こうして、信号処理装置は 1 つの細胞粒子から生じる複数の蛍光および散乱光に関する信号を処理して、この細胞粒子 105 を同定する。

10

【0011】

以上説明した従来式のフローサイトメータが 3 つの光源を備えるのに対し、特許文献 1 に記載のフローサイトメータが 2 つの光源を有する点を除き、基本的構成は同等であり、特許文献 1 に記載された内容は、参考にここに一体のものとして統合される。

【特許文献 1】特開 2004 - 184217 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0012】

しかしながら、上記遅延時間は、シースフローの流速（すなわち、サンプル懸濁液およびシース液に対するエアポンプの圧力）、環境温度または大気圧などに依存して変動するため、オペレータがこれを適正に設定・維持することは不可能であり、検出およびソートの精度を低下させていた。

【0013】

また、複数の光源からフローセルの異なる集光位置に導光するための複数の導光部材が必要となり、光軸を調整することが極めて煩わしいものであった。

【0014】

そこで本発明は、このような問題に鑑みてなされたものであり、その 1 つの態様は、遅延時間を設定することなく、複数の蛍光色素により標識された細胞粒子が複数のレーザ光源により励起されて生じた複数の蛍光を検出できるフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法を提供することを目的とする。

30

【0015】

また、本発明の別の態様は、シースフロー中に流送される細胞粒子に至る光軸を単一化して、光軸の調整を簡素化できるフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の 1 つの態様によれば、互いに異なる波長を有する複数の励起光を、所定の周期および互いに異なる位相で照射する複数の光源と、複数の励起光を同一の入射光路上に導光し、染色された粒子に集光する導光部材とを備えたフローサイトメータが提供される。

40

【0017】

本発明の別の態様によれば、互いに異なる波長を有する複数の励起光を、所定の周期および互いに異なる位相で照射するステップと、複数の励起光を同一の入射光路上に導光し、染色された粒子に集光するステップとを有するフローサイトメトリ方法が提供される。

【0018】

好適には、粒子は、入射光路と交差するシースフロー中を流れる。

【0019】

また、このフローサイトメータは、複数の励起光のそれぞれが粒子を励起して生じた蛍

50

光を検出し、蛍光信号を出力する複数の蛍光検出器と、蛍光信号を励起光の位相のそれぞれに同期して検出される複数の光信号要素に分離する同期分離回路とを備える。

【0020】

好適には、蛍光検出器が光電子増倍管からなり、蛍光検出器の光電子増倍電圧を励起光の位相のそれぞれに呼応して変化させる。

【0021】

択一的には、蛍光信号を電氣的に増幅する増幅回路を備え、増幅回路の増幅電圧を励起光の位相のそれぞれに呼応して変化させる。

【0022】

好適には、フローセルと複数の蛍光検出器のそれぞれとの間の出射光路上に配設され、所定の波長帯を有する蛍光を選択的に透過させる複数のバンドパスフィルタとを備える。

10

【0023】

また、このフローサイトメータは、複数の励起光のそれぞれが粒子で散乱して生じた散乱光を検出し、散乱光信号を出力する散乱光検出器を備え、蛍光検出器のそれぞれは、散乱光信号が所定の閾値を超えた時点から所定の期間において蛍光を検出する。

【0024】

択一的には、このフローサイトメータは、複数の励起光のそれぞれが粒子で散乱して生じた散乱光を検出し、散乱光信号を出力する散乱光検出器を備え、複数の蛍光検出器は、少なくとも1つのトリガ蛍光検出器を含み、蛍光検出器および散乱光検出器は、トリガ蛍光検出器で検出された蛍光信号が所定の閾値を超えた時点から所定の期間においてそれぞれ蛍光および散乱光を検出する。

20

【0025】

さらに、このフローサイトメータは、複数の励起光のそれぞれが粒子で散乱して生じた前方散乱光を検出し、前方散乱光信号を出力する前方散乱光検出器と、フローセルと前方散乱光検出器との間の出射光路上に配設され、所定の波長帯を有する前方散乱光を選択的に透過させる前方散乱光バンドパスフィルタと、複数の励起光のそれぞれが粒子で散乱して生じた側方散乱光を検出し、側方散乱光信号を出力する側方散乱光検出器と、フローセルと側方散乱光検出器との間の出射光路上に配設され、所定の波長帯を有する側方散乱光を選択的に透過させる側方散乱光バンドパスフィルタとを備える。

【0026】

好適には、複数の光源は、複数の励起光を所定の周期および互いに異なる位相でパルス発振する。

30

【発明の効果】

【0027】

本発明の1つの態様に係るフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法によれば、遅延時間を設定することなく、複数の蛍光色素により標識された細胞粒子を複数のレーザ光源により励起して得られた複数の蛍光を検出することができる。

【0028】

また、本発明の別の態様に係るフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法によれば、光軸の調整を格段に簡素化することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

以下、添付図面を参照して本発明に係るフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法の実施形態を説明する。この説明において、理解を容易にするために方向を表す用語（例えば、「X方向」、「Y方向」および「Z方向」など）を適宜用いるが、これは説明のためのものであって、これらの用語は本発明を限定するものでない。

【0030】

図1～図6を参照しながら、本発明に係るフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法の実施形態について以下に説明する。図1に示すフローサイトメータ1は、概略、蛍光標識試薬などで染色された細胞粒子をシースフロー内で一列に配列するための流体力

50

学的フロー機構 2 と、各細胞粒子に波長の異なる複数のレーザ光を照射し、散乱光および蛍光を受光するための光学的機構 3 と、光学的機構 3 から出力された散乱光および蛍光に関する電気信号を制御・処理するための信号処理装置 4 とを備える。

【0031】

まず、流体力学的フロー機構 2 について説明する。

流体力学的フロー機構 2 は、図 1 に示すように、分析すべき細胞粒子 5 を含むサンプル懸濁液を貯蔵・供給するためのサンプル懸濁液供給部 10 と、シース液を貯蔵・供給するためのシース液供給部 12 と、フローチャンバ 14 と、フローチャンバ 14 の下流に連結されたフローセル 16 とを有する。分析すべき細胞粒子 5 は、例えば、蛍光染料や蛍光ラベルモノクロナール抗体などの蛍光標識試薬で蛍光標識されている。

10

なお本実施形態では、フローセルを採用したフローサイトメータを用いて以下説明するが、択一的には、詳細図示しないが、本発明は、ジェット・イン・エア方式のフローサイトメータにも等しく適用される。

【0032】

蛍光標識試薬は、これに限定するものではないが、例えば、青色励起光で励起されて黄緑色蛍光を発する F I T C (Fluorescein)、同様に青色励起光で励起されて黄緑色の蛍光を発光する P E (R-phycoerythrin) およびそのタンデム蛍光試薬である P E - C y 5 (赤色蛍光)、P E - C y 7 (赤外蛍光)、橙色励起光で励起されて赤色の蛍光を発する A P C (Allophycocyanin) およびそのタンデム蛍光試薬である A P C - C y 5 (赤外蛍光)、紫外励起光で励起されて蛍光発光する H o (Hoechst 33342) - Blue (青色蛍光) および H o - Red (赤色蛍光) などが一般的に用いられている。

20

【0033】

フローチャンバ 14 は略円筒形状を有し、その中心軸に沿って懸濁液供給管 18 が配設されている。サンプル懸濁液供給部 10 およびシース液供給部 12 に貯蔵されたサンプル懸濁液およびシース液は、それぞれのエアポンプ 11、13 の圧力により、サンプル管 20 およびシース管 22 を介して懸濁液供給管 18 およびフローチャンバ 14 内に供給される。これにより、シース液がサンプル懸濁液を円筒状に包み込む鞘状のシースフロー（層流）が形成される。このとき、サンプル懸濁液供給部 10 の圧力をシース液供給部 12 の圧力より若干低く設定することにより、流体力学的な絞り込みが生じ、シース液に包まれたサンプル懸濁液の流径が非常に細くなり、サンプル懸濁液に含まれる細胞粒子 5 をフローセル 16 内で一列に整列させることができる（1つ1つの細胞粒子 5 をフローセル 16 内で実質的に等間隔に配列することができる）。

30

【0034】

フローセル 16 は最下部にオリフィス 24 を有し、フローセル 16 を通過した細胞粒子 5 を含むシースフローがオリフィス 24 からジェット噴射される。噴射されたシースフローは、図示しないピエゾ圧電素子などの振動装置からの振動を加えられると、それぞれの細胞粒子 5 を収容する液滴 26 が形成される。

【0035】

また、特定の細胞粒子 5 を含む液滴 26 を分取するとき（セルソータに適用する場合）、液滴 26 が形成されるブレイク・オフ・ポイントの直前で、分取したい細胞粒子 5 を含むシースフローを荷電する荷電部（図示せず）が配設される。さらに、所定電圧（例えば、6000V の直流電圧）が印加された一对の偏向板 28a、28b が設けられ、荷電された液滴 26 は、これらの偏向板 28a、28b の間を通過するときに直流電場から力を受けて偏向し、分取される。

40

【0036】

次に、光学的機構 3 について説明する。

図 1 に示す光学的機構 3 は、フローセル 16 内で整列した細胞粒子 5 に異なる波長の複数のレーザビーム（励起光）を照射する第 1、第 2 および第 3 の光源 30、32、34 を有する。第 1、第 2 および第 3 の光源 30、32、34 は、任意の光源であって、本発明を限定するものではないが、レーザビームなどのコヒーレント光を生成することが好まし

50

い。一例として、第1の光源30は、青色レーザビーム（ピーク波長：488nm，出力：20mW）を照射するDPSSLレーザ（Diode Pumped Solid State Laser：半導体レーザ励起固体レーザ）であってもよい。第2の光源32は、赤色レーザビーム（ピーク波長：635nm，出力：20mW）を照射するダイオードレーザで、同様に、第3の光源34は、紫外レーザビーム（ピーク波長：375nm，出力：8mW）を照射するダイオードレーザであってもよい。

【0037】

本発明に係る実施形態によれば、光源30，32，34は変調器（図示せず）を内蔵し、この変調器は、後述のクロックパルス発生回路62（図5参照）から出力されるクロックパルス信号に基づいて、図2（a）～（c）に示すように、所定の発振周波数（例えば、 $f = 100\text{MHz}$ ）で各レーザビームをパルス発振（パルス変調）させることができる。このとき、各光源30，32，34から出力される各レーザビームの出力パルス波形は、互いに重なり合わないよう制御される。すなわち、第1、第2および第3の光源30，32，34は、同一の周期で異なる第1、第2および第3の位相 ϕ_1 ， ϕ_2 ， ϕ_3 を有するようにレーザビーム（励起光）をパルス発振させることができる。なお、発振周波数を、例えば100MHz以上を設定したとき、各レーザビームのパルス幅は0.01μs以下となる。

【0038】

さらに、光源30，32，34に内蔵される変調器は、任意のものを用いることができ、例えば、DPSSLレーザ光源30に関しては、アメリカ合衆国メリーランド州のボルチモア市にあるブリムローズ株式会社（Brimrose Corporation）から市販されている音響光学的変調器（型番TEM-85-10）などが好適に用いられ、赤色および紫外レーザ光源32，34のダイオードレーザに対しては、汎用半導体変調器を用いて、各レーザビームをパルス駆動することができる。

なお、モード同期型レーザ光源を用いてレーザパルスを形成すると、レーザビームのピーク強度を実質的に増大させることができ、検出感度を向上させることができる。

【0039】

第1、第2および第3の光源30，32，34からパルス発振させたレーザビームは、図1および図3に示すように、導光部材36を用いて同一光路上に導光し、フローセル16上の同一の照射位置に照射される。導光部材36を構成する部品は、例えば、光ファイバ37、ビームエキスパンダ38、ハーフミラー39、および集光レンズ40などを含み、導光部材36のこれらの構成部品の全体または一部をX、YおよびZ方向に移動させて、光源30，32，34からのレーザビームを正確に同一光路上に導光させることができる。

【0040】

また光学的機構3は、図1および図3に示すように、好適な実施形態では、青色レーザビームが細胞粒子5で散乱して生じた前方散乱光（FSC：Forward Scattering Light）を検出する前方散乱光検出装置42と、各レーザビームが細胞粒子5で散乱して生じた側方散乱光（SSC：Side Scattering Light）および各レーザビームが細胞粒子5を励起して生じたさまざまな波長を有する複数の蛍光（FL：fluorescent light）を検出する側方散乱光／蛍光検出装置50とを備える。

前方散乱光検出装置42は、青色レーザビームを選択的に透過させるバンドパスフィルタ（図示せず、例えば、 $488 \pm 5\text{nm}$ の選択波長）を有し、青色レーザビームが細胞粒子5で散乱して生じた前方散乱光を検出するものである。一方、側方散乱光／蛍光検出装置50は、レーザビームの波長と同じ3つの波長を有する側方散乱光と、各光源からのレーザビームの波長とは異なるさまざまな波長を有する蛍光を検出するものである。

【0041】

ここで図2～図6を参照しながら、前方散乱光検出装置42、側方散乱光／蛍光検出装置50、および信号処理装置4についてさらに詳細に説明する。

【0042】

10

20

30

40

50

前方散乱光検出装置 42 は、集光レンズ 44 を介してフローセル 16 からの前方散乱光 (FSC) を検出する光検出器 PD を有し (図 3)、上述のように、青色レーザビームを選択的に透過させるバンドパスフィルタ (図示せず) を介して、青色レーザビームが細胞粒子 5 で散乱して生じた青色前方散乱光だけを検出する。こうして、前方散乱光検出装置 42 は、青色前方散乱パルス光の強度に応じて電圧が変化する電氣的な前方散乱光パルス信号を信号処理装置 4 に出力する。

【0043】

このとき、光検出器 PD は、フローセル 16 中を Z 方向に移動する単一の細胞粒子 5 が青色レーザビームを散乱して生じる前方散乱光を検出するため、光検出器 PD から出力される前方散乱光パルス信号の強度は、図 4 に示すように時間的に増減する。そして、前方散乱光パルス信号が検出される期間 T、すなわち細胞粒子 5 が青色レーザビームにより照射されている期間 T は、フローセル 16 中を移動する細胞粒子 5 の大きさおよびシースフローの流速 (エアポンプ 11 の圧力) に依存する。例えば、エアポンプ 11 の圧力が約 30 psi で、フローセルの断面積が約 $20000 \mu\text{m}^2$ であるとき、期間 T は約 10 μ 秒であることが知られている。したがって、各光源 30, 32, 34 が 100 MHz の発振周波数でレーザビームを実質的に間断なくパルス発振するとき、1つのパルス発振レーザビームの幅 w が 0.01 μ 秒となり、期間 T 内に約 1000 パルスのレーザビームが 3つの光源から交互に細胞粒子 5 に照射され、青色レーザビームの前方散乱光パルス信号は約 333 パルス検出されることになる。ただし、図 4 においては、図面をわかりやすくするために、レーザビームの幅 w を十分大きくして図示した。

【0044】

換言すると、前方散乱光パルス信号が検出されている間、例えば、前方散乱光パルス信号の出力値 V が所定の閾値電圧 V_{th} を超えている間 ($V > V_{th}$)、細胞粒子 5 がフローセル 16 中の照射位置を通過していると判断することができる。したがって、後述するが、信号処理装置 4 は、前方散乱光パルス信号の出力値 V が所定の閾値電圧 V_{th} を超えた時点から所定期間 T において、前方散乱光パルス信号、側方散乱光パルス信号および蛍光パルス信号をデータとして取り込む。

【0045】

次に、側方散乱光 / 蛍光検出装置 50 について説明する。

図 3 において、青色、赤色および紫外レーザビームをフローセル 16 内で一列に配列された細胞粒子 5 に照射すると、側方散乱光および異なる波長帯を有する複数の蛍光は、光ファイバ 52 および光をコリメートするためのロッドレンズ 54 を介して、側方散乱光 / 蛍光検出装置 50 に入射される。

【0046】

本実施形態において、光源 30, 32, 34 は、上述のように、それぞれ青色レーザビーム (ピーク波長: 488 nm)、赤色レーザビーム (ピーク波長: 635 nm)、および紫外レーザビーム (ピーク波長: 375 nm) を照射し、細胞粒子 5 は、FITC、PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy5、Ho-Blue および Ho-Red からなる蛍光標識試薬を用いて蛍光標識されている。

【0047】

側方散乱光 / 蛍光検出装置 50 は、概略、微弱な光を電氣的に増幅して検出する複数の光電子増倍管 (Photo Multiplier Tube) PMT1 ~ PMT6 と、ハーフミラー (Half Mirror) HM1 ~ HM6 と、所定の波長帯の光だけを透過するバンドパスフィルタ (Band Pass Filter) BPF1 ~ BPF6 とを有する。

【0048】

ロッドレンズ 54 を介して入射された側方散乱光 / 蛍光は、ハーフミラー HM1 に入射し、その一部がバンドパスフィルタ BPF1 に向かって反射する。バンドパスフィルタ BPF1 は、例えば、第 1 の光源 30 と実質的に同じ波長帯 ($488 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$) を有する青色側方散乱光だけを透過し、光電子増倍管 PMT1 は、図 2 (d) に示すように、青色側方散乱光の光パルス信号を信号処理装置 4 に出力する。

【 0 0 4 9 】

ハーフミラー H M 1 を透過した光は、概略、図 3 に示す数多くのハーフミラー H M 2 ~ H M 5 で反射、またはこれらを透過して光電子増倍管 P M T 2 ~ P M T 6 に入射する。すなわち、光電子増倍管 P M T 2 ~ P M T 6 のそれぞれは、青色、赤色、および紫外レーザービームの発振周波数とそれぞれの位相において、波長の異なる複数の蛍光を組み合わせた複合的な蛍光を検出する。

ただし、細胞粒子 5 を同定するためには、各光電子増倍管 P M T 2 ~ P M T 6 は、波長の異なる複数の蛍光を検出することが好ましいので、側方散乱光 / 蛍光検出装置 5 0 は、波長選択可能なハーフミラー H M 2 ~ H M 6 およびバンドパスフィルタ B P F 2 ~ B P F 6 を用いて、特定の波長帯を有する蛍光を選択的に検出するように構成されている。

10

【 0 0 5 0 】

具体的には、図 3 に示す側方散乱光 / 蛍光検出装置 5 0 において、ハーフミラー H M 1 を透過した光は、ハーフミラー H M 2 に入射し、ハーフミラー H M 2 は、波長が 7 3 0 n m 未満の波長を有する光を反射し、波長が 7 3 0 n m 以上の光を透過する。ハーフミラー H M 2 を透過した光は、波長が 7 4 9 n m 以上の光だけを透過するバンドパスフィルタ B P F 2 に入射する。したがって、光電子増倍管 P M T 2 は、図 2 (e) に示すように、第 1、第 2 および第 3 のレーザーが照射される第 1、第 2 および第 3 の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 において、7 4 9 n m 以上の波長を有する蛍光を検出する。

ここで本願において、光電子増倍管 P M T 2 が検出する一連の光パルス信号を構成する、第 1、第 2 および第 3 の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 において検出される光パルス信号のそれぞれを光信号要素 S_{21}, S_{22}, S_{23} と定義する。すなわち、光信号要素 S_{21}, S_{22}, S_{23} は、各光源 3 0, 3 2, 3 4 により励起された 7 4 9 n m の波長を有する蛍光に対応し、光電子増倍管 P M T 2 は、3 つの光信号要素 S_{21}, S_{22}, S_{23} からなる一連の光パルス信号を検出する。

20

【 0 0 5 1 】

図 3 に戻って、ハーフミラー H M 2 で反射した光はハーフミラー H M 3 に入射し、ハーフミラー H M 3 は、波長が 6 0 0 n m 未満の波長を反射し、波長が 6 0 0 n m 以上の光を透過する。ハーフミラー H M 3 を透過した光は、6 8 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する光だけを透過するバンドパスフィルタ B P F 3 で分光され、光電子増倍管 P M T 3 は、図 2 (f) に示すように、第 1、第 2 および第 3 の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 において、6 8 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する蛍光を検出して、光信号要素 S_{31}, S_{32}, S_{33} からなる一連の光パルス信号を出力する。同様に、光信号要素 S_{31}, S_{32}, S_{33} は、各光源 3 0, 3 2, 3 4 により励起された 6 8 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する蛍光に対応する。

30

【 0 0 5 2 】

続いて、ハーフミラー H M 3 で反射した蛍光はハーフミラー H M 4 に入射し、ハーフミラー H M 4 は、波長が 5 5 0 n m 未満の波長を透過し、波長が 5 5 0 n m 以上の光を反射する。ハーフミラー H M 4 で反射した蛍光は、5 8 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する蛍光だけを透過するバンドパスフィルタ B P F 4 で分光され、光電子増倍管 P M T 4 は、図 2 (g) に示すように、第 1、第 2 および第 3 の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 において、5 8 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する蛍光を検出して、光信号要素 S_{41}, S_{42}, S_{43} からなる光パルス信号を出力する。ただし、赤色レーザービームの励起光により、5 8 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する蛍光が生じることはないので、光信号要素 S_{42} は、蛍光試薬によらない自家発光の蛍光による信号を示す。

40

【 0 0 5 3 】

さらに、ハーフミラー H M 4 で透過した蛍光はハーフミラー H M 5 に入射し、ハーフミラー H M 5 は、波長が 5 0 5 n m 未満の波長を透過し、波長が 5 0 5 n m 以上の蛍光を反射する。ハーフミラー H M 5 で反射した蛍光は、5 3 0 n m \pm 3 0 n m の波長帯を有する蛍光だけを透過するバンドパスフィルタ B P F 5 で分光され、光電子増倍管 P M T 5 は、図 2 (h) に示すように、第 1、第 2 および第 3 の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 において、5 3

50

0 nm ± 30 nm の波長帯を有する蛍光を検出して、光信号要素 S_{51} , S_{52} , S_{53} からなる光パルス信号を出力する。ただし、光電子増倍管 PMT 4 と同様、赤色レーザービームの励起光により、励起光より短い波長を有する蛍光は生じないので、光電子増倍管 PMT 5 の光信号要素 S_{52} は自家発光の蛍光による信号を示す。

【0054】

また、ハーフミラー HM 5 を透過した蛍光は、424 nm ± 44 nm の波長帯を有する蛍光だけを透過するバンドパスフィルタ BPF 6 で分光され、光電子増倍管 PMT 6 は、図 2 (i) に示すように、第 1、第 2 および第 3 の位相 ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3 において、424 nm ± 44 nm の波長帯を有する蛍光を検出して、光信号要素 S_{61} , S_{62} , S_{63} からなる光パルス信号を出力する。ただし、光電子増倍管 PMT 4 および 5 と同様、青色および赤色レーザービームの励起光より短い波長を有する蛍光は生じないので、光電子増倍管 PMT 6 の光信号要素 S_{61} および S_{62} は自家発光の蛍光による信号を示す。

【0055】

一方、信号処理装置 4 は、図 5 に示すように、クロックパルス発生回路 62 と、これに接続されたレーザー駆動回路 64 を有し、上述のように、第 1 ~ 第 3 の光源 30 , 32 , 34 を一定の周波数および異なる位相 (ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3) でパルス駆動する。

また、信号処理装置 4 は、同期回路 66 を有し、これはレーザー駆動回路 64、光電子増倍管 PMT 1 ~ PMT 6、増幅回路 (AMP) 70、および分離回路 68 に接続されている。

【0056】

信号処理装置 4 は、同期回路 66 において、光検出器 PD および光電子増倍管 PMT 1 ~ PMT 6 からの各光パルス信号を第 1 ~ 第 3 のレーザー光源 30 , 32 , 34 の位相 ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3 に同期させ、分離回路 68 において、光電子増倍管 PMT 1 ~ PMT 6 で検出された各光パルス信号を表 1 に示すような光信号要素 S に分離する。

【表 1】

	第1レーザー	第2レーザー	第3レーザー
PMT1 $\lambda = 488 \pm 5 \text{ nm}$	$S_{11}(\text{SSC})$	S_{12}	S_{13}
PMT2 $\lambda > 749 \text{ nm}$	$S_{21}(\text{FL4})$	$S_{22}(\text{FL6})$	S_{23}
PMT3 $\lambda = 680 \pm 30 \text{ nm}$	$S_{31}(\text{FL3})$	$S_{32}(\text{FL5})$	S_{33}
PMT4 $\lambda = 580 \pm 30 \text{ nm}$	$S_{41}(\text{FL2})$	S_{42}	$S_{43}(\text{FL8})$
PMT5 $\lambda = 530 \pm 30 \text{ nm}$	$S_{51}(\text{FL1})$	S_{52}	S_{53}
PMT6 $\lambda = 424 \pm 44 \text{ nm}$	S_{61}	S_{62}	$S_{63}(\text{FL7})$

【0057】

このとき、光信号要素 S_{11} は、第 1 のレーザー光源 30 と同じ波長帯 ($\lambda = 488 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$) を有するので、側方散乱光 (SSC) として検出される。

同様に、光信号要素 S_{21} は、青色レーザビームで励起されて生じた赤外蛍光 ($\lambda > 749 \text{ nm}$) の強度を示すものであって、蛍光標識試薬 P E - C y 7 で染色された細胞粒子 5 からの赤外蛍光 (F L 4) に関する光パルス信号に他ならない。また光信号要素 S_{22} は、蛍光標識試薬 A P C - C y 7 が赤色レーザビームで励起されて生じた赤外蛍光 (F L 6) の強度を示す。

【0058】

さらに、光信号要素 S_{31} は、青色レーザビームで励起されて生じた赤色蛍光 ($\lambda = 680 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$) の強度を示し、蛍光標識試薬 P E - C y 5 で染色された細胞粒子 5 からの赤色蛍光 (F L 3) に対応する。同様に、光信号要素 S_{32} は、蛍光標識試薬 A P C が赤色レーザビームで励起されて生じた赤色蛍光 (F L 5) の強度を示す。

10

【0059】

加えて、光信号要素 S_{41} は、青色レーザビームで励起されて生じた黄緑色蛍光 ($\lambda = 580 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$) の強度を示し、蛍光標識試薬 P E で染色された細胞粒子 5 からの黄緑色蛍光 (F L 2) に対応する。同様に、光信号要素 S_{43} の強度は、蛍光標識試薬 H o - Red が紫外レーザビームで励起されて生じた黄緑色蛍光 (F L 8) に相当する。

【0060】

さらに、光信号要素 S_{51} は、青色レーザビームで励起されて生じた青色蛍光 ($\lambda = 530 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$) の強度を示し、蛍光標識試薬 F I T C から生じる青色蛍光 (F L 1) に相当し、光信号要素 S_{63} は、紫外レーザビームで励起されて生じた紫色蛍光 ($\lambda = 424 \text{ nm} \pm 44 \text{ nm}$) の強度を示し、蛍光標識試薬 H o - Blue から生じる青色蛍光 (F L 7) を検出する。

20

【0061】

このように、本実施形態によれば、任意の選択波長を有するハーフミラー H M 2 ~ H M 6 およびバンドパスフィルタ B P F 2 ~ B P F 6 をフローセル 1 6 と光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 の間に配設することにより、光源の波長および蛍光標識試薬に依存する蛍光 F L 1 ~ F L 8 を、各光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 で検出された光パルス信号から分離された光信号要素として検出することができる。なお、ハーフミラー H M 2 ~ H M 5 およびバンドパスフィルタ B P F 1 ~ B P F 5 に関して、上述した選択波長は一例に過ぎず、他の適当な波長帯で光を選択した場合であっても本発明を同様に適用することができる。

30

なお、分離回路 6 8 は、上述のように、表 1 のすべての光信号要素 S_{ij} を検出してもよいが、側方散乱光 (S S C) および蛍光 (F L 1 ~ F L 6) に相当する光信号要素 S_{ij} のみを検出するようにロジックを設計しておいてもよい。

【0062】

ところで、光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 が検出する光の強度は、その波長およびハーフミラーやバンドパスフィルタなどの構成、細胞粒子の大きさや性状、染色条件などに大きく依存する。すなわち、表 1 に示す上述の光信号要素 S_{ij} は、光源 3 0 , 3 2 , 3 4 および光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 に応じて、そのスケール (検出値) にばらつきが生じる。そこで、光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 が検出する光信号要素 S_{ij} のばらつきを補正するために、同期回路 6 6 は、光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 のそれぞれの光電子増倍電圧 H V を、第 1 ~ 第 3 のレーザ光源 3 0 , 3 2 , 3 4 の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 に同期させて変化させることができる。例えば、光電子増倍管 P M T 2 の第 1 レーザ 3 0 が照射される位相において、光信号要素 S_{21} を増倍させるための光電子増倍電圧 H V $_{21}$ に設定する。他の光信号要素 S_{ij} に対しても同様に、同期回路 6 6 は、光電子増倍管 P M T 1 ~ P M T 6 の光電子増倍電圧 H V $_{ij}$ (表 2 参照) を、各光源の位相 ϕ_1, ϕ_2, ϕ_3 に応じてスイッチング制御して、各光信号要素 S_{ij} のスケールをより均一化することができる。

40

【表 2】

	第1レーザ	第2レーザ	第3レーザ
PMT1 $\lambda = 488 \pm 5 \text{nm}$	HV_{11}	HV_{12}	HV_{13}
PMT2 $\lambda > 749 \text{nm}$	HV_{21}	HV_{22}	HV_{23}
PMT3 $\lambda = 680 \pm 30 \text{nm}$	HV_{31}	HV_{32}	HV_{33}
PMT4 $\lambda = 580 \pm 30 \text{nm}$	HV_{41}	HV_{42}	HV_{43}
PMT5 $\lambda = 530 \pm 30 \text{nm}$	HV_{51}	HV_{52}	HV_{53}
PMT6 $\lambda = 424 \pm 44 \text{nm}$	HV_{61}	HV_{62}	HV_{63}

10

20

【0063】

択一的には、光電子増倍管PMT1～PMT6が検出する光パルス信号を電氣的に増幅する増幅回路70の増幅電圧 AMP_{ij} を、同期回路66を用いて、表3に示すようにスイッチング制御してもよい。こうして、同期して変化する増幅電圧 AMP_{ij} を用いて、各光信号要素 S_{ij} を電氣的に増幅して、より均一なスケールを有する光信号要素 S_{ij} を得るようにしてもよい。

30

【表 3】

	第1レーザ	第2レーザ	第3レーザ
PMT1 $\lambda = 488 \pm 5 \text{nm}$	AMP ₁₁	AMP ₁₂	AMP ₁₃
PMT2 $\lambda > 749 \text{nm}$	AMP ₂₁	AMP ₂₂	AMP ₂₃
PMT3 $\lambda = 680 \pm 30 \text{nm}$	AMP ₃₁	AMP ₃₂	AMP ₃₃
PMT4 $\lambda = 580 \pm 30 \text{nm}$	AMP ₄₁	AMP ₄₂	AMP ₄₃
PMT5 $\lambda = 530 \pm 30 \text{nm}$	AMP ₅₁	AMP ₅₂	AMP ₅₃
PMT6 $\lambda = 424 \pm 44 \text{nm}$	AMP ₆₁	AMP ₆₂	AMP ₆₃

【0064】

なお、本実施形態のフローサイトメータ1は、多色レーザビームが照射された細胞粒子5を同定するために散乱光および蛍光を検出するものであるから、信号処理装置4は、細胞粒子5がフローセル16中を通過し、各レーザビームが照射されている間に限って光パルス信号（光信号要素S）を検出することが好ましい。さもなければ、信号処理装置4は、細胞粒子5とは関連のないノイズ信号に関する膨大な量のデータを処理しなければならない。

【0065】

そこで、本発明の信号処理装置4は、上述（図4）のように、例えば、前方散乱光パルス信号の出力値Vを常にモニタし、この出力値Vが所定の閾値電圧 V_{th} を超えていることを検出したとき（ $V > V_{th}$ ）、細胞粒子5がフローセル16中の照射位置を通過していると判断し、前方散乱光パルス信号の出力値Vが所定の閾値電圧 V_{th} を超えた時点から所定期間Tにおいて、前方散乱光パルス信号、側方散乱光パルス信号および蛍光パルス信号をデータとして取り込む。すなわち、信号処理装置4は、前方散乱光パルス信号の出力値Vをトリガ信号として、散乱光パルス信号および蛍光パルス信号の検出を開始する。

【0066】

なお、上記（図4）説明では、散乱光パルス信号および蛍光パルス信号の検出を開始するトリガ信号を検出するために、前方散乱光パルス信号の出力値Vをモニタしていたが、側方散乱光パルス信号または任意の少なくとも1つの蛍光パルス信号を常時モニタしてもよい。すなわち、側方散乱光パルス信号の出力値Vが所定の閾値電圧 V_{th} を超えた時点を開始点として、前方散乱光および蛍光パルス信号の検出を開始してもよい。択一的には、複数の光電子増倍管PMT1～PMT6のうちの少なくとも1つの光電子増倍管PMTをトリガ光電子増倍管PMTと設定し、トリガ光電子増倍管PMTで検出された蛍光パルス信号を常時モニタして、その出力値Vが所定の閾値電圧 V_{th} を超えた時点から所定期間Tにおいて前方散乱光パルス信号、側方散乱光パルス信号、および蛍光パルス信号の検出を開始してもよい。

【0067】

こうして信号処理装置 4 は、所定期間 T において、例えば、光電子増倍管 P M T 2 から、図 6 (a) ~ (c) に示すように推移する光信号要素 S_{21} (F L 4) , S_{22} (F L 6) , S_{23} を検出する。

【 0 0 6 8 】

次に、図 5 を参照しながら、信号処理装置 4 を構成する上記以外の各種回路およびその機能について説明する。

信号処理装置 4 は、光検出器 P D で検出された前方散乱光パルス信号、および光電子増倍管 P M T で検出されて、同期回路 6 6 で分離された各光信号要素 S_{ij} をデジタル変換するためのアナログ / デジタル変換回路 (A / D 変換回路) 7 2 を有する。

また、本実施形態の信号処理装置 4 は、面積 / 幅 / 高さ演算回路 (A / W / H 演算回路) 7 4 を有し、これにより、光信号要素 S_{ij} から直接的に、従来式のアナログ波形の光パルス信号の面積、幅、高さなどに相当する細胞粒子 5 を特徴付けるデータを迅速に計算することができる。そしてパラメータセレクト回路 7 6 で処理すべき光信号要素 S_{ij} (F S C , S S C , F L 1 ~ F L 8) を選択し、コンペンセーション回路 7 8 は、同様に、デジタル式の光信号要素 S_{ij} を用いて、異なる波長スペクトルを有する蛍光の間で生じる蛍光の漏れ込みを補償する (蛍光補正を行う) 。そして選択された光信号要素 S_{ij} は、ログ / リニア増幅回路 8 0 により増幅され、コンピュータ 8 2 および / またはセルソータ 8 4 に出力される。

【 0 0 6 9 】

コンピュータ 8 2 は、各細胞粒子 5 に対するデジタルパルス光信号を受けると、さまざまなアプリケーションを用いて、例えば、細胞数頻度分布 (ドットプロットやヒストグラム) を作成するなどの各種分析・評価を行うことができる。また、セルソータ 8 4 は、デジタルパルス光信号から細胞粒子 5 を同定し、特定の細胞粒子 5 を含む液滴を分取することができる。

【 0 0 7 0 】

これまで説明してきたように、本実施形態によれば、複数のレーザビームを同一光路上に導光するので、従来のフローサイトメータおよびフローサイトメトリ方法のように、遅延時間を設定することなく、複数の蛍光色素により標識された細胞粒子からの前方・側方散乱光および蛍光を検出することができる。さらに、光源からフローセルに至る光軸の調整を格段に簡素化することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 1 】

【図 1】本発明に係るフローサイトメータの構成を示す概略図である。

【図 2】図 1 の光源が照射する光パルスおよび光電子増倍管が出力する光パルス信号のタイミングチャートである。

【図 3】図 1 のフローサイトメータのブロック図である。

【図 4】図 3 に示す光検出器が検出する前方散乱光のパルス信号のタイミングチャートである。

【図 5】図 3 に示すデジタル信号処理装置のブロック図である。

【図 6】図 3 に示す 1 つの光電子増倍管が出力する各光源に対応する光信号要素の時間的推移を示すタイミングチャートである。

【図 7】従来技術によるフローサイトメータの構成を示す概略図である。

【図 8】図 6 のフローサイトメータのブロック図である。

【符号の説明】

【 0 0 7 2 】

1 : フローサイトメータ、 2 : 流体力学的フロー機構、 3 : 光学的機構、 4 : デジタル信号処理装置 (D S P)、 5 : 細胞粒子、 1 0 : サンプル懸濁液供給部、 1 1 , 1 3 : エアポンプ、 1 2 : シース液供給部、 1 4 : フローチャンバ、 1 6 : フローセル、 1 8 : 懸濁液供給管、 2 0 : サンプル管、 2 2 : シース管、 2 4 : オリフィス、 2 6 : 液滴、 2 8 a

10

20

30

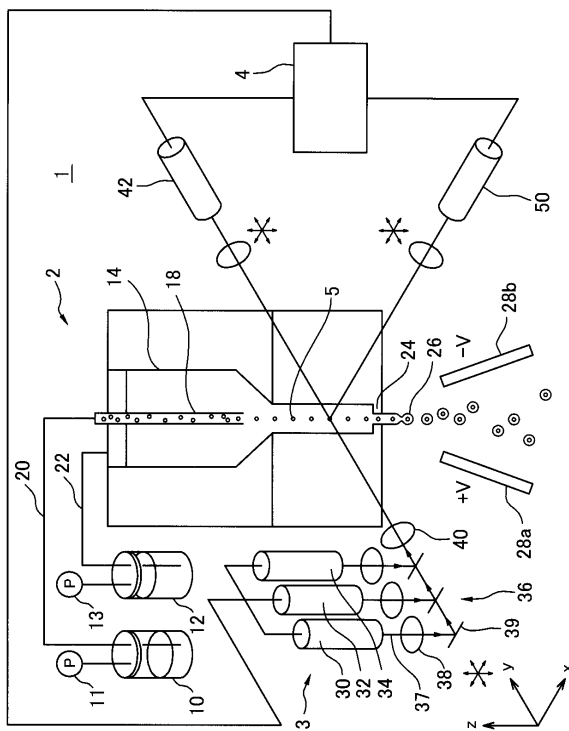
40

50

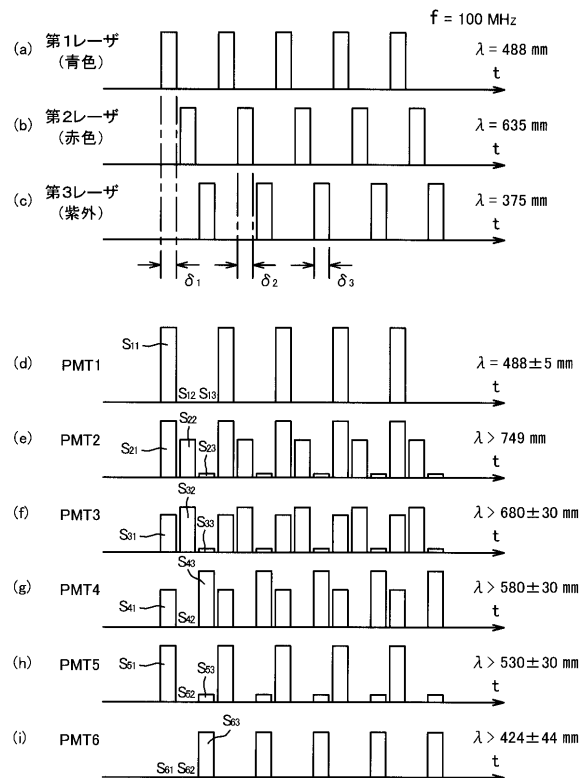
、28b：偏向板、30、32、34：光源、36：導光部材、37：光ファイバ、38：ビームエキスパンダ、39：ハーフミラー、40：集光レンズ、42：検出する前方散乱光検出装置、50：側方散乱光／蛍光検出装置、52：光ファイバ、54：ロッドレンズ、62：クロックパルス発生回路、64：レーザ駆動回路、66：同期回路、68：分離回路、PD：光検出器、70：増幅回路（AMP）、72：デジタル／アナログ変換回路、74：面積／幅／高さ演算回路（A/W/H演算回路）、76：パラメータセレクト回路、78：コンペンセーション回路、80：ログ／リニア増幅回路、82：コンピュータ、84：セルソータ、PMT1～PMT6：光電子増倍管（Photo Multiplier Tube）、HM1～HM6：ハーフミラー（Half Mirror）、BPF1～BPF6：バンドパスフィルタ（Band Pass Filter）。

10

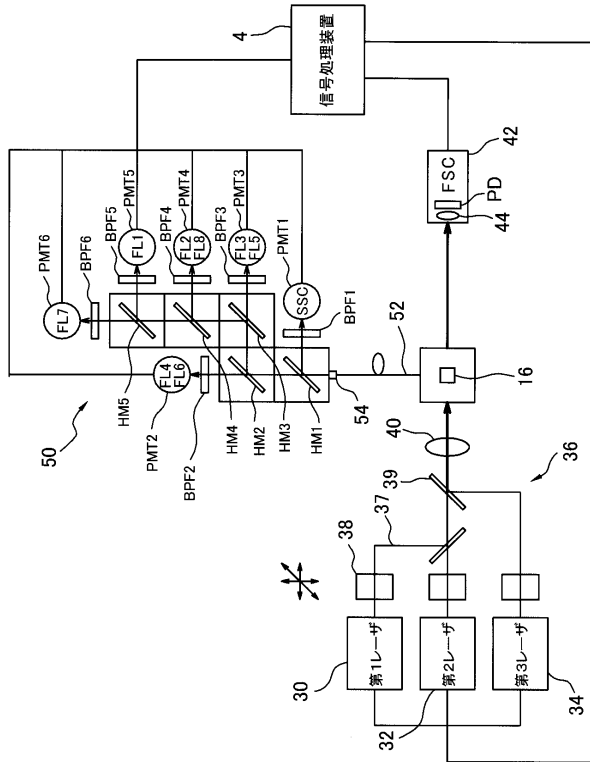
【図1】



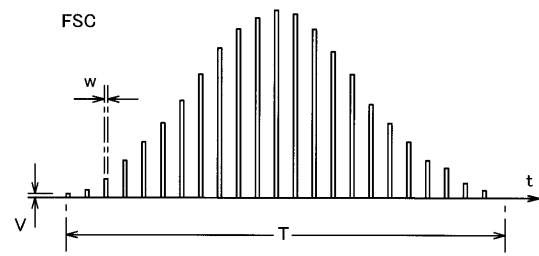
【図2】



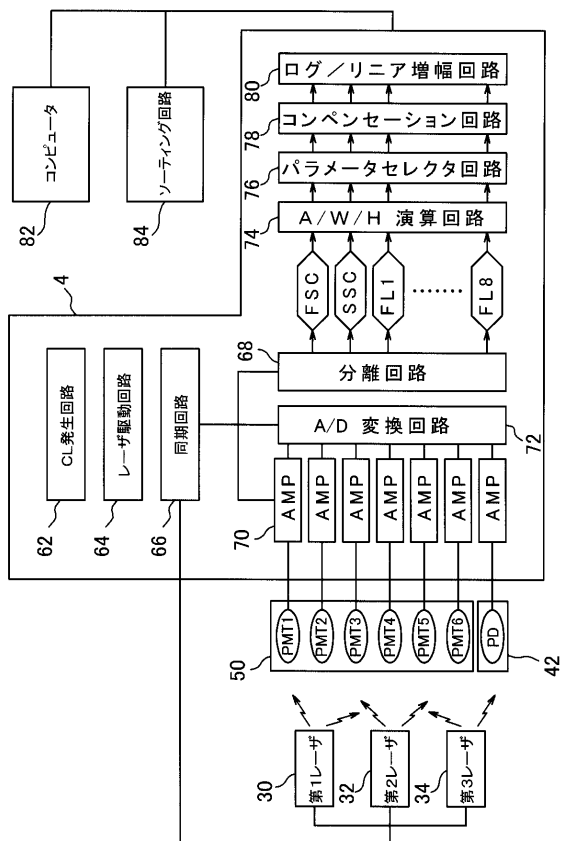
【図 3】



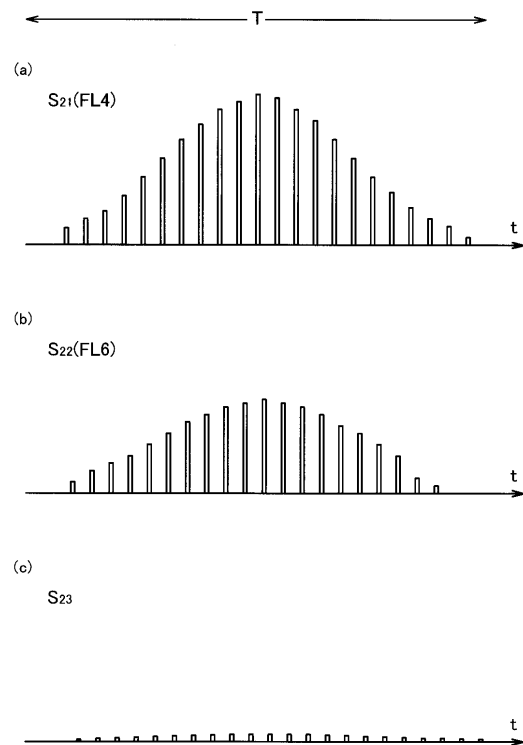
【図 4】



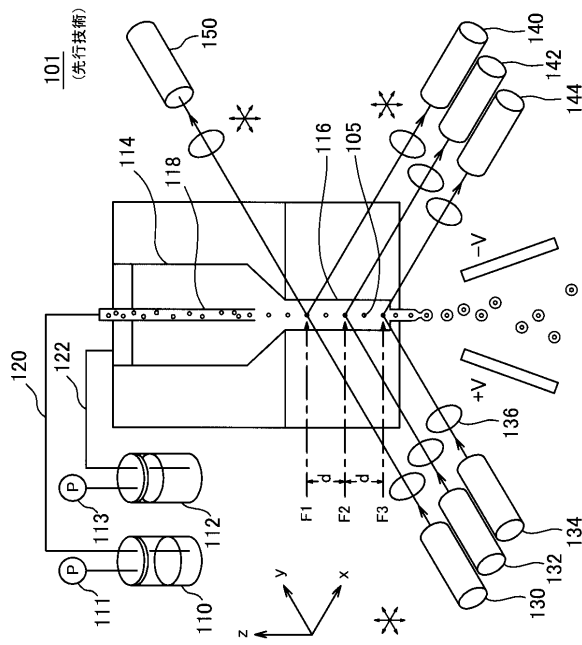
【図 5】



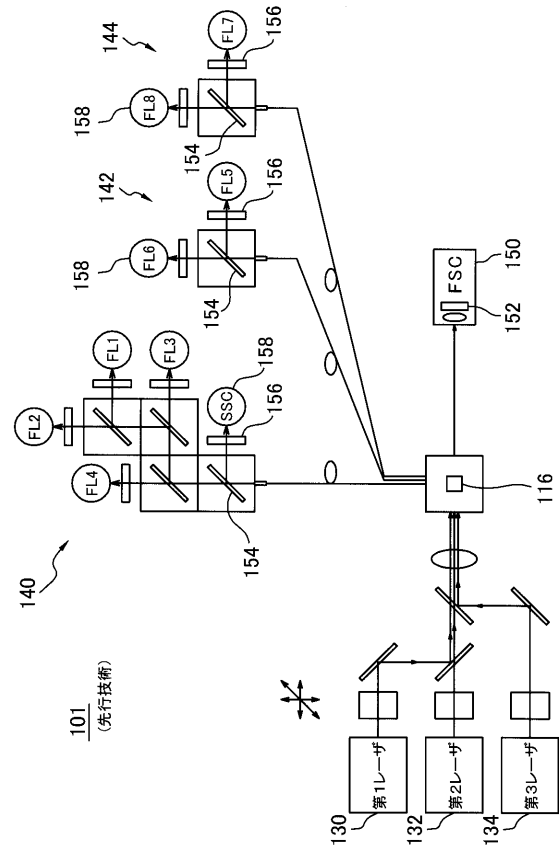
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開昭61-173141(JP,A)
国際公開第03/021212(WO,A1)
特開2003-315248(JP,A)
特開2006-275858(JP,A)
特表2005-524051(JP,A)
国際公開第2005/029046(WO,A1)
特表2004-521334(JP,A)
特開2005-315799(JP,A)
特開2006-292769(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 15/00 - 15/14