

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 6 部門第 1 区分  
 【発行日】平成20年2月28日 (2008.2.28)

【公開番号】特開2007-46947(P2007-46947A)  
 【公開日】平成19年2月22日 (2007.2.22)  
 【年通号数】公開・登録公報2007-007  
 【出願番号】特願2005-229536(P2005-229536)  
 【国際特許分類】

G 0 1 N 15/14 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 15/14 D

G 0 1 N 15/14 C

G 0 1 N 21/64 F

【手続補正書】  
 【提出日】平成20年1月11日 (2008.1.11)  
 【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。

## 【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、

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。

## 【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を有することを特徴とするフローサイトメトリ方法。

## 【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。

## 【請求項 12】

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 13】

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 14】

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 15】

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 16】

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。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

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130，132，134を備える。第1の光源130は、例えば、青色レーザビーム（ピーク波長：488nm，出力：20mW）を照射するDPS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132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、第3の光源134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る。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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  $\phi_1$ ， $\phi_2$ ， $\phi_3$  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 以上に設定したとき、各レーザビームのパルス幅は0.01μ秒以下となる。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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

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。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

さらに、ハーフミラー HM4 で透過した蛍光はハーフミラー HM5 に入射し、ハーフミラー HM5 は、波長が 505 nm 未満の波長を透過し、波長が 505 nm 以上の蛍光を反射する。ハーフミラー HM5 で反射した蛍光は、530 nm  $\pm$  30 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 BPF5 で分光され、光電子増倍管 PMT5 は、図 2 (h) に示すように、第 1、第 2 および第 3 の位相  $\phi_1$ ,  $\phi_2$ ,  $\phi_3$  において、530 nm  $\pm$  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 PMT4 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 PMT5 の光信号要素  $S_{52}$  は自家発光の蛍光による信号を示す。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

さらに、光信号要素  $S_{51}$  は、青色レーザー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 FITC から生じる青色蛍光 (FL1) に相当し、光信号要素  $S_{63}$  は、紫外レーザー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 Ho-Blue から生じる青色蛍光 (FL7) を検出する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

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。