

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号
特開2005-291831
(P2005-291831A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005. 10. 20)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 15/14	GO 1 N 15/14	2 GO 4 3
GO 1 N 21/64	GO 1 N 15/14	
	GO 1 N 21/64	
	GO 1 N 21/64	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2004-105332 (P2004-105332)	(71) 出願人	390014960
(22) 出願日	平成16年3月31日 (2004. 3. 31)		シスメックス株式会社
			神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
(出願人による申告) 産業再生法第 30 条の適用を受ける特許出願 (タンパク質機能解析・活用プロジェクト：ヒトの完全長 c DNA 等を利用したタンパク質機能解析)		(74) 代理人	100065248
			弁理士 野河 信太郎
		(72) 発明者	石坂 正樹
			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
		F ターム (参考)	2G043 AA03 BA16 CA04 DA02 DA05
			EA01 FA01 FA02 GA08 GB01
			HA01 HA02 HA09 JA02 KA02
			KA03 KA05 KA08 KA09 LA03
			NA01

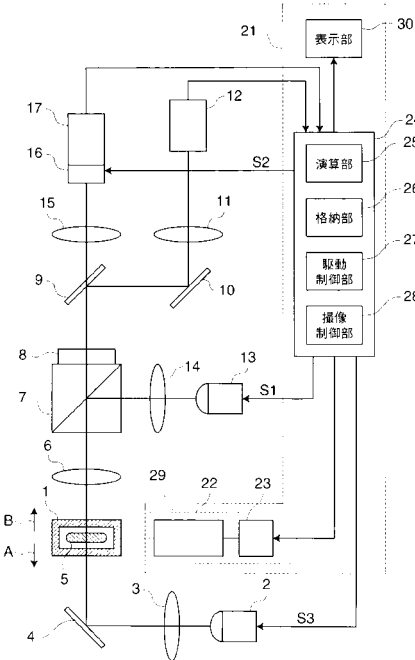
(54) 【発明の名称】 イメージングフローサイトメータ

(57) 【要約】

【課題】細胞の透過光画像をコントラスト良く撮像すること。

【解決手段】粒子含有液をシース液で包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流を照明する光源と、試料流中の粒子の透過光画像を撮像する第 1 撮像部と、試料流中の粒子の蛍光画像を撮像する第 2 撮像部とを備え、第 1 撮像部が後ピン透過光画像を撮像する。

【選択図】図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

粒子含有液をシース液で包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流を照明する光源と、試料流中の粒子の透過光画像を撮像する第 1 撮像部と、試料流中の粒子の蛍光画像を撮像する第 2 撮像部とを備え、第 1 撮像部が後ピンの透過光画像を撮像するイメージングフローサイトメータ。

【請求項 2】

粒子含有液をシース液で包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流を照明する光源と、試料流中の粒子の透過光画像を撮像する第 1 撮像部と、試料流中の粒子の像を第 1 撮像部の第 1 撮像面に投影するための第 1 光学系と、試料流中の粒子の蛍光画像を撮像する第 2 撮像部と、試料流中の粒子の像を第 2 撮像部の第 2 撮像面に投影するための第 2 光学系とを備え、第 1 光学系の焦点が第 1 撮像面よりも遠い位置にあるイメージングフローサイトメータ。

10

【請求項 3】

第 2 光学系の焦点が第 2 撮像面にある請求項 2 記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項 4】

粒子が細胞であり、細胞核が蛍光色素で染色され、蛍光画像が細胞核から得られる請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項 5】

光源が白色光を出射する第 1 光源と、レーザ光を出射する第 2 光源からなり、第 1 および第 2 撮像部は、それぞれ第 1 および第 2 光源により照明された粒子を撮像する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のイメージングフローサイトメータ

20

【請求項 6】

第 1 光源は第 1 撮像部が透過照明によって粒子を撮像するように配置され、第 2 光源は第 2 撮像部が落射照明によって粒子を撮像するように配置された請求項 5 記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項 7】

光源がパルス光源からなる請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載のイメージングフローサイトメータ。

30

【請求項 8】

第 1 撮像部によって得られる粒子画像の画像濃度に基づいてシースフローセルの位置を第 1 撮像部の光軸に沿って変位させる制御部をさらに備える請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項 9】

制御部が、シースフローセルを第 1 撮像部の光軸方向に変位させる変位部と、第 1 撮像部による粒子画像の平均画像濃度を算出する演算部と、算出した平均画像濃度が所定値になるように変位部を駆動する駆動制御部を備える請求項 8 記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項 10】

粒子含有液をシース液に包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流中の粒子の透過光画像および蛍光画像をそれぞれ撮像する第 1 および第 2 撮像部とを備え、第 1 撮像部によって得られる粒子画像の画像濃度に基づいてシースフローセルの位置を第 1 撮像部の光軸に沿って変位させる制御部を備えるイメージングフローサイトメータ。

40

【請求項 11】

粒子含有液をシース液に包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流中の粒子の画像を撮像する撮像部と、撮像部によって得られる粒子画像の画像濃度に基づいてシースフローセルの位置を撮像部の光軸に沿って変位させる制御部を備えるイメージングフローサイトメータ。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

この発明はイメージングフローサイトメータに関し、特に、フローセル中を流れる粒子を撮像する機能を備えたフローサイトメータに関する。

【背景技術】

【0002】

この発明の背景技術としては、被検粒子を含む液体をフローセルに流してサンプル流を形成し、サンプル流をレーザ光で照明して、照明された粒子の蛍光像と透過光像をそれぞれ2つの撮像部（イメージセンサ）で撮像するようにしたものが知られている（例えば、特許文献1参照）。

10

【特許文献1】特開平5-346390号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、このような従来の装置においては、被検粒子が周りの媒質より高い屈折率をもつ細胞のような透明物体の場合には、透過光像がほとんど消失し、コントラストの良い透過光画像を得ることが難しかった。

この発明はこのような事情を考慮してなされたもので、透過光画像の撮像系の焦点を、正確な焦点から適度にずらして設定することにより、コントラストの良好な透過光画像を得ることが可能なイメージングフローサイトメータを提供するものである。

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

この発明は、粒子含有液をシース液で包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流を照明する光源と、試料流中の粒子の透過光画像を撮像する第1撮像部と、試料流中の粒子の蛍光画像を撮像する第2撮像部とを備え、第1撮像部が後ピンの透過光画像を撮像するイメージングフローサイトメータを提供するものである。

【発明の効果】

【0005】

この発明によれば、第1撮像部が試料流中の粒子に対して後ピンの透過光画像を撮像するので、粒子が細胞のような透明な粒子であれば、その画像は黒いベッケ線に包まれて現れる。従って、第1撮像部によりコントラストの良好な透明粒子の透過光画像を得ることができる。また、第2撮像部は、ピンを試料流中の粒子に合わすことにより、粒子の蛍光画像をコントラスト良く撮像できる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

この発明のイメージングフローサイトメータは、粒子含有液をシース液で包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流を照明する光源と、試料流中の粒子の透過光画像を撮像する第1撮像部と、試料流中の粒子の蛍光画像を撮像する第2撮像部とを備え、第1撮像部が後ピンの透過光画像を撮像されていることを特徴とする。

【0007】

40

この発明は、別の観点から、粒子含有液をシース液で包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流を照明する光源と、試料流中の粒子の透過光画像を撮像する第1撮像部と、試料流中の粒子の像を第1撮像部の第1撮像面に投影するための第1光学系と、試料流中の粒子の蛍光画像を撮像する第2撮像部と、試料流中の粒子の像を第2撮像部の第2撮像面に投影するための第2光学系とを備え、第1光学系の焦点が第1撮像面よりも遠い位置にあるイメージングフローサイトメータを提供するものである。

【0008】

このイメージングフローサイトメータの被検粒子としては、細胞のようなその一部の染色可能な透明粒子が好適であるが、これに限定されない。シースフローセルには流路の断面が偏平型のものが好ましいが、流路の断面が円形や方形のものも用いることができ

50

る。

光源には、白色ランプ、レーザ、ストロボフラッシュランプ、パルスレーザなどを用いることができる。

第1および第2撮像部にはCCDカメラ、ビデオカメラなどが好適であるが、とくに蛍光画像を撮像する第2撮像部には、光増幅素子、例えばイメージンテンシファイヤを付設することが好ましい。なお、この発明において「後ピン」とは、被写体の後にピントの合った状態をいう。

【0009】

試料流中の粒子の像を第2撮像部の第2撮像面に投影するための第2光学系においては、第2光学系の焦点が第2撮像面にあるとが好ましい。

10

粒子が細胞であり、細胞核が蛍光色素で染色され、蛍光画像が細胞核から得られるようにしてもよい。

光源が、白色光を出射する第1光源と、レーザ光を出射する第2光源からなり、第1および第2撮像部は、それぞれ第1および第2光源により照明された粒子を撮像するようにしてもよい。

第1光源は第1撮像部が透過照明によって粒子を撮像するように配置され、第1光源は第2撮像部が落射照明によって粒子を撮像するように配置されてもよい。

【0010】

光源がパルス光源からなってもよい。

この発明のイメージングフローサイトメータは、第1撮像部によって得られる粒子画像の画像濃度に基づいてシースフローセルの位置を第1撮像部の光軸方向に変位させる制御部をさらに備えてもよい。

20

制御部がシースフローセルを第1撮像部の光軸方向に変位させる変位部と、第1撮像部による粒子画像の平均画像濃度を算出する演算部と、算出した平均画像濃度が所定値になるように変位部を駆動する駆動制御部を備えてもよい。

【0011】

この発明は、別の観点から、粒子含有液をシース液に包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流中の粒子の透過光画像および蛍光画像をそれぞれ撮像する第1および第2撮像部とを備え、第1撮像部によって得られる粒子画像の平均画像濃度に基づいてシースフローセルの位置を第1撮像部の光軸に沿って変位させる制御部を備えるイメージングフローサイトメータを提供するものである。

30

【0012】

この発明は、さらに別の観点から、粒子含有液をシース液に包んで試料流を形成するシースフローセルと、試料流中の粒子の画像を撮像する撮像部と、撮像部によって得られる粒子画像の画像濃度に基づいてシースフローセルの位置を第1撮像部の光軸に沿って変位させる制御部を備えるイメージングフローサイトメータを提供するものである。

【0013】

実施例

以下、図面に示す実施例に基づいて、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。

40

第1実施例

図1はこの発明の第1実施例を示す構成説明図である。同図に示すようにシースフローセル（以下、フローセルという）1は、細長い長方形の断面を有する筒状のセルであり、ガラスやプラスチックのような透明材料で形成される。フローセル1には、試料液とシース液が導入され、試料液はシース液に包まれて約 $1\mu\text{m} \times 2000\mu\text{m}$ の扁平な試料流5に変換される。

【0014】

この実施例においては、K562又はHL-60細胞について、1サンプルあたり、2000個/ μL の細胞が浮遊する試料液200 μL 準備し、その試料液を2~5cm/secの流速でフローセル1に流すようにしている。なお、細胞は細胞核がHoechst

50

3 3 3 4 2 によって予め蛍光染色されている。

【0015】

透過画像の撮像系は、試料流 5 中の細胞を照明するための第 1 照明光学系と試料流 5 中の細胞からの光像を受光するための第 1 受光光学系（第 1 光学系）からなる。第 1 照明光学系は、第 1 光源 2、コンデンサレンズ 3 および反射ミラー 4 から構成される。第 1 受光光学系（第 1 光学系）は、対物レンズ 6、ダイクロイックミラー 7、蛍光フィルタ 8、ハーフミラー 9、反射ミラー 10、結像レンズ 11、および第 1 撮像部 12 から構成される。

一方、蛍光画像の撮像系は、試料流 5 の細胞を照明するための第 2 照明光学系と試料流 5 の細胞からの光像を受光するため第 2 受光光学系（第 2 光学系）からなる。第 2 照明光学系は、第 2 光源 13、コンデンサレンズ 14、ダイクロイックミラー 7 および対物レンズ 6 から構成される。第 2 受光光学系（第 2 光学系）は、対物レンズ 6、ダイクロイックミラー 7、蛍光フィルタ 8、ハーフミラー 9、結像レンズ 15、ゲート付きイメージン

10

【0016】

ここで、第 1 光源 2 は、コンデンサレンズ 3 を介してケラー照明を行うように設定されたパルス光源であり、これには白色光（波長 500 nm ~ 650 nm）を出射するストロボフラッシュランプが用いられる。第 2 光源 17 は、コンデンサレンズ 14 を介してクリティカル照明を行うように設定されたパルス光源であり、これには中心波長 365 nm の紫外光を出射する UV パルスレーザが用いられる。ダイクロイックミラー 7 には 400 nm 以上の波長の光を透過させ、400 nm より短い波長の光を反射するものが用いられる。蛍光フィルタ 8 は、波長 450 nm $\pm$ 50 nm の波長の光のみを透過させる。また、ハーフミラー 9 には入射光の 1/2 の光量を透過させ、残りを反射するものが用いられる。第 1 および第 2 撮像部 12, 17 は CCD カメラ（ビデオカメラ）で構成される。

20

【0017】

次に、制御部 21 は、信号処理部 24、表示部 30 および変位部 29 から構成される。変位部 29 は、ステッピングモータ 23 と直線移動機構 22 を備える。直線移動機構 22 は、ステッピングモータ 23 の回転出力を減速し直線運動に変換してフローセル 1 を撮像系の光軸方向（矢印 A 又は B 方向）に変位させる。つまり、ステッピングモータ 23 に 1 ステップ分の駆動パルスが印加されると、フローセル 1 は 0.05 μ m だけ変位するよう

30

【0018】

信号処理部 24 は、演算部 25、格納部 26、駆動制御部 27 および撮像制御部 28 を備え、マイクロコンピュータによって一体的に構成される。演算部 25 は、第 1 および第 2 撮像部 12, 17 から得られる画像データを処理して分析に必要な演算を行う。格納部 26 は、演算部 25 で処理された画像データや演算された演算結果を格納する。駆動制御部 27 は、演算部 25 の演算結果に基づいてステッピングモータ 23 に駆動パルスを印加し、変位部 29 を駆動制御する。撮像制御部 28 は、第 1 および第 2 光源 2, 13 の発光動作、インテンシファイヤ 16 のゲートの開閉動作、そして第 1 および第 2 撮像部 12, 17 の撮像動作などを制御する。

40

【0019】

第 1 受光光学系の焦点は、第 1 撮像部 12 の撮像面よりも遠い位置に合わされ、黒いベッケ線に包まれた透過光画像が得られるように結像レンズ 11 と撮像部 12 の間の光路長が設定される。また、第 2 受光光学系の焦点は、第 2 撮像部 17 の撮像面に合うように結像レンズ 15 と第 2 撮像部 17 との光路長が設定され、コントラストの良い蛍光画像が得られる。ここで、対物レンズ 6 の焦点は、試料流 5 の中心軸に合うように設定されている。

【0020】

このような構成における動作について次に説明する。

図 2 は、制御部 1 の撮像制御部 28 から出力される信号、つまり第 2 光源 13 および第

50

1 光源 2 をそれぞれ点灯させるパルス信号 S_1 , S_3 と、イメージインテンシファイヤ 16 のゲートを開くパルス信号 S_3 のタイミングチャートである。

まず、フローセル 1 に試料流 5 が形成されると、撮像制御部 28 から出力されるパルス信号 S_1 によって第 2 光源 13 が 365 nm の波長の光を発光する。第 2 光源 13 の出射光はコンデンサレンズ 14 を通ってダイクロイックミラー 7 で対物レンズ 6 の方へ反射され、対物レンズ 6 を介して試料流 5 内の細胞を落射照明する。それによって、細胞内の蛍光染色された核から 400 ~ 500 nm の波長の蛍光が励起され、結像レンズ 6 , ダイクロイックミラー 7 , 蛍光フィルタ 8 , ハーフミラー 9 , および結像レンズ 15 を介してイメージインテンシファイヤ 16 へ到達する。この時、イメージインテンシファイヤ 16 のゲートは、撮像制御部 28 から出力されるパルス信号 S_2 により、図 2 に示すように開いているので、核の蛍光画像がイメージインテンシファイヤ 16 の光電面に結像し、増幅される。増幅された蛍光画像は第 2 撮像部 17 によって撮像され、蛍光画像データとして制御部 21 の信号処理部 24 へ送られる。

10

【0021】

図 2 に示すように、イメージインテンシファイヤ 16 のゲートを開くパルス信号 S_2 がオフになり、そのゲートが閉じると、次に、撮像制御部 28 からパルス信号 S_3 が出力され、第 1 光源 2 が白色光を発光する。第 1 光源 2 の出射光はコンデンサレンズ 3 および反射ミラー 4 を介して試料流 5 内の細胞を照明する。そして、細胞を透過した透過光は、ダイクロイックミラー 7 , 蛍光フィルタ 8 , ハーフミラー 9 , 反射ミラー 10 および結像レンズ 11 を介して第 1 撮像部 12 へ入射し、細胞の透過光画像として第 1 撮像部 12 により撮像され、透過光画像データとして制御部 21 の信号処理部 24 へ送られる。このような第 1 および第 2 撮像部 12 , 17 による各撮像動作が 1 秒間に 30 回くり返される。これによって、1 秒間に各 30 フレームの透過光画像と蛍光画像が得られる。つまり、1 秒間に 30 組の透過光画像と蛍光画像が得られる。なお、各組の画像において同じ細胞の透過光画像と蛍光画像の位置ずれが大きくならないように、図 2 に示すパルス信号 S_1 と S_3 との時間差 T は $20 \mu\text{sec}$ 以下に設定される。

20

【0022】

次に、制御部 21 の制御処理動作を図 3 のフローチャートを用いて説明する。

第 1 および第 2 撮像部 12 , 17 において各 1 フレームの撮像が終了すると (ステップ S_1)、まず、透過光画像中の細胞の輪郭を追跡する処理が行われ、細胞画像が切り出される (ステップ S_2)。切り出された細胞画像の平均輝度 I_a が算出されて格納部 26 へ保存され (ステップ S_3)、細胞画像の面積 S と周囲長 L が算出される (ステップ S_4)。また、面積 S と周囲長 L から細胞の大きさ (円相当径) や細胞の丸さ (円形度) が算出される。

30

【0023】

次に、蛍光画像中の細胞画像が切り出され、上記 S , L と共に格納部 26 へ保存される (ステップ S_5)。また、面積 S と周囲長 L から細胞核の大きさ (円相当径) や細胞核の丸さ (円形度) が算出される。

次に、細胞の透過光画像の平均輝度 I_a と所定値 I_s とを比較するために、 $P = K(I_s - I_a)$ が演算される (ステップ S_6)。ここで、 K は定数である。

40

【0024】

そして、 P が所定範囲 ε 内にあるか否か、つまり $|P| \leq \varepsilon$ であるか否かが判別される (ステップ S_7)。 $|P| \leq \varepsilon$ であれば、ステップ S_1 から 1 / 30 秒の時間が経過すると (ステップ S_{11})、次のフレームの撮像が行われる。

ステップ S_7 において $|P| > \varepsilon$ でない場合、 $P > \varepsilon$ である場合には (ステップ S_8)、図 1 の駆動制御部 27 からステッピングモータ 23 に 1 ステップ分の正回転駆動パルスが出力され、フローセル 1 が対物レンズ 6 から遠ざかるように矢印 A 方向へ移動する。

また、ステップ S_8 において $P < -\varepsilon$ でない場合、つまり $P < -\varepsilon$ である場合には、駆動制御部 27 からステッピングモータ 23 に 1 ステップ分の逆回転駆動パルスが出力され、フローセル 1 が対物レンズ 6 へ近づくように矢印 B 方向へ移動する。

50

【0025】

このように、第1受光光学系の焦点を第1撮像部12の撮像面よりも遠い位置に合わせようとしたので、黒いベッケ線に包まれた透過光画像であるコントラストの大きい細胞画像が得られる。このコントラストの大きい細胞画像を用いることにより、細胞画像の輪郭抽出が容易となり、単純な画像処理で、細胞画像の大きさや丸さを高速に算出できる。

また、細胞の蛍光画像から得られる細胞核の大きさを用いることにより、抗がん剤などの薬剤による細胞核の大きさの変化をとらえ、薬剤の効果を確認できる。

この実施例では前述のように蛍光画像撮像系の焦点は試料流5の中心軸に合うように設定され、透過光撮像系の焦点は細胞の透過光画像が黒いベッケ線でつまれるように蛍光画像撮像系の焦点よりも遠くに設定されている。しかし、試料流5の中を流れる細胞列が何らかの原因により試料流5の中心軸からずれると、透過光画像撮像系および蛍光画像撮像系の焦点に対する撮像対象の位置がずれるため、所望の画像がコントラスト良く得られない。

そこで、この発明では上記のように透過光画像の細胞の平均輝度（細胞画像の濃淡）から細胞列の位置ずれを検出し、それに対応してフローセル1を移動させ、撮像対象が常に正規の位置の方向へ補正されるようにしている。

このようにして、1サンプル分の撮像が終了すると、格納部26に格納されている各種データは必要に応じて表示部30に表示される。

【0026】

第2実施例

図4はこの発明の第2実施例を示す構成説明図である。同図において、第1実施例（図1）と同じ要素には同じ参照番号を付している。

図4において、透過画像の撮像系は、試料流5中の細胞を照明するための第1照明光学系と試料流5中の細胞からの光像を受光するための第1受光光学系（第1光学系）からなる。第1照明光学系は、第1光源2、コンデンサレンズ3および反射ミラー4から構成される。第1受光光学系（第1光学系）は、対物レンズ6、ダイクロイックミラー7a、結像レンズ11、および第1撮像部12から構成される。

一方、蛍光画像の撮像系は、試料流5の細胞を照明するための第2照明光学系と試料流5の細胞からの光像を受光するため第2受光光学系（第2光学系）からなる。第2照明光学系は、第2光源13、ビームイクスパンダ18、ダイクロイックミラー7、7a、および対物レンズ6から構成される。第2受光光学系（第2光学系）は、対物レンズ6、ダイクロイックミラー7a、7、蛍光フィルタ8、ハーフミラー9、結像レンズ15、ゲート付きイメージンテンシファイヤ16、および第2撮像部17から構成される。ここで、ダイクロイックミラー7aは、500nm以下の波長の光を反射し、500nmより大きい波長の光を透過させる。

【0027】

第1受光光学系の焦点は、第1撮像部12の撮像面よりも遠い位置に合わせられ、黒いベッケ線に包まれた透過光画像が得られるように結像レンズ11と撮像部12の間の光路長が設定される。また、第2受光光学系の焦点は、第2撮像部17の撮像面に合うように結像レンズ15と第2撮像部17との光路長が設定され、コントラストの良い蛍光画像が得られる。ここで、対物レンズ6の焦点は、試料流5の中心軸に合うように設定されている。

【0028】

このような構成における動作について次に説明する。

図2は、撮像制御部21から出力される信号、つまり第2光源13および第1光源2をそれぞれ点灯させるパルス信号S1、S3と、イメージンテンシファイヤ16のゲートを開くパルス信号S3のタイミングチャートである。

まず、フローセル1に試料流5が形成されると、制御部21から出力されるパルス信号S1によって第2光源13が365nmの波長の光を発光する。第2光源13の出射光はビームイクスパンダ18を通してダイクロイックミラー7でダイクロイックミラー7aの

10

20

30

40

50

方へ反射され、さらにダイクロイックミラー 7 a で反射されて対物レンズ 6 を介して試料流 5 内の細胞を落射照明する。それによって、細胞内の蛍光染色された核から 400 ~ 500 nm の波長の蛍光が励起され、結像レンズ 6 , ダイクロイックミラー 7 a , ダイクロイックミラー 7 , 蛍光フィルタ 8 , および結像レンズ 15 を介してイメージインテンシファイア 16 へ到達する。この時、イメージインテンシファイア 16 のゲートは、撮像制御部 21 から出力されるパルス信号 S2 により、図 2 に示すように開いているので、核の蛍光画像がイメージインテンシファイア 16 の光電面に結像し、増幅される。増幅された蛍光画像は第 2 撮像部 17 によって撮像され、蛍光画像データとして制御部 21 へ送られる。

【0029】

10

図 2 に示すように、イメージインテンシファイア 16 のゲートを開くパルス信号 S2 がオフになり、そのゲートが閉じると、次に、制御部 21 からパルス信号 S3 が出力され、第 1 光源 2 が発光する。第 1 光源 2 の出射光はコンデンサレンズ 3 および反射ミラー 4 を介して試料流 5 内の細胞を照明する。そして、細胞を透過した透過光は、対物レンズ 6 , ダイクロイックミラー 7 a , および結像レンズ 11 を介して第 1 撮像部 12 へ入射する。それによって、細胞の透過光画像が第 1 撮像部 12 により撮像され、透過光画像データとして制御部 21 へ送られる。このような第 1 および第 2 撮像部 12 , 17 による各撮像動作が 1 秒間に 30 回くり返される。これによって、1 秒間に各 30 フレームの透過光画像と蛍光画像が得られる。つまり、1 秒間に 30 組の透過光画像と蛍光画像が得られる。

得られた蛍光画像データおよび透過光画像データは、第 1 実施例と同様に制御部 21 において、図 3 に示すように処理され、フローセル 1 の位置も同様に駆動制御される。

20

【0030】

第 3 実施例

図 5 はこの発明の第 3 実施例を示す構成説明図である。同図において、第 1 実施例（図 1）と同じ要素には同じ参照番号を付している。なお、第 3 実施例では、第 1 実施例における第 1 光源 2 が省略されている。

透過画像の撮像系は、試料流 5 中の細胞を照明するための第 1 照明光学系と試料流 5 中の細胞からの光像を受光するための第 1 受光光学系（第 1 光学系）からなる。第 1 照明光学系は、第 2 光源 13、コンデンサレンズ 14 および反射ミラー 4 から構成される。第 1 受光光学系（第 1 光学系）は、対物レンズ 6、ダイクロイックミラー 7、蛍光フィルタ 8、反射ミラー 10、結像レンズ 11、および第 1 撮像部 12 から構成される。

30

一方、蛍光画像の撮像系は、試料流 5 の細胞を照明するための第 1 照明光学系と試料流 5 の細胞からの光像を受光するため第 2 受光光学系（第 2 光学系）からなる。第 1 照明光学系は、第 2 光源 13、コンデンサレンズ 14 および反射ミラー 4 から構成される。第 2 受光光学系（第 2 光学系）は、対物レンズ 6、ダイクロイックミラー 7、蛍光フィルタ 8、結像レンズ 15、ゲート付きイメージインテンシファイア 16、および第 2 撮像部 17 から構成される。

【0031】

第 1 受光光学系の焦点は、第 1 撮像部 12 の撮像面よりも遠い位置に合わされ、黒いベッケ線に包まれた透過光画像が得られるように結像レンズ 11 と撮像部 12 の間の光路長が設定される。また、第 2 受光光学系の焦点は、第 2 撮像部 17 の撮像面に合うように結像レンズ 15 と第 2 撮像部 17 との光路長が設定され、コントラストの良い蛍光画像が得られる。ここで、対物レンズ 6 の焦点は、試料流 5 の中心軸に合うように設定されている。

40

【0032】

このような構成における動作について次に説明する。

まず、フローセル 1 に試料流 5 が形成されると、制御部 21 から出力されるパルス信号によって第 2 光源 13 が 365 nm の波長の光を発光する。第 2 光源 13 の出射光はコンデンサレンズ 14 を通って反射ミラー 4 で反射され、試料流 5 内の細胞を透過照明する。それによって、細胞内の蛍光染色された核から 400 ~ 500 nm の波長の蛍光が励起さ

50

れ、励起された蛍光は、結像レンズ 6 , ダイクロイックミラー 7 , 蛍光フィルタ 8 , および結像レンズ 15 を介してイメージインテンシファイヤ 16 へ到達する。この時、イメージインテンシファイヤ 16 のゲートは、制御部 21 から出力されるパルス信号により開かれて核の蛍光画像がイメージインテンシファイヤ 16 の光電面に結像し、増幅される。増幅された蛍光画像は第 2 撮像部 17 によって撮像され、蛍光画像データとして制御部 21 へ送られる。

【0033】

一方、細胞を透過した透過光は、ダイクロイックミラー 7 によって反射され、反射ミラー 10 および結像レンズ 11 を介して第 1 撮像部 12 へ入射し、細胞の透過光画像が第 1 撮像部 12 により撮像され、透過光画像データとして制御部 21 へ送られる。このような第 1 および第 2 撮像部 12 , 17 による各撮像動作が 1 秒間に 30 回くり返される。これによって、1 秒間に各 30 フレームの透過光画像と蛍光画像が得られる。つまり、1 秒間に 30 組の透過光画像と蛍光画像が得られる。

10

得られた蛍光画像データおよび透過光画像データは、第 1 実施例と同様に制御部 21 において、図 3 に示すように処理され、フローセル 1 の位置も同様に駆動制御される。

【0034】

以上のように、第 1 ~ 3 実施例では第 1 受光光学系 (第 1 光学系) の焦点が第 1 撮像部 12 の撮像面より遠い位置になるように設定したが、本発明はこれに限定されない。例えば、第 1 受光光学系 (第 1 光学系) の焦点は第 1 撮像部 12 の撮像面に設定し、対物レンズ 6 の焦点が、試料流 5 の中心軸よりも遠い位置になるように設定しても良い。この場合には、第 2 受光光学系は、第 1 受光光学系の対物レンズ 6 とは別の第 2 対物レンズを備える構成を有しており、この第 2 対物レンズの焦点は試料流 5 の中心軸にあることが好ましい。

20

【0035】

なお、本出願は産業再生法第 30 条の適用を受ける特許出願である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】この発明の第 1 実施例を示す構成説明図である。

【図 2】この発明の第 1 実施例の信号のタイミングチャートである。

【図 3】この発明の第 1 実施例の動作を示すフローチャートである。

30

【図 4】この発明の第 2 実施例を示す構成説明図である。

【図 5】この発明の第 3 実施例を示す構成説明図である。

【符号の説明】

【0037】

- 1 フローセル
- 2 第 1 光源
- 3 コンデンサレンズ
- 4 反射ミラー
- 5 試料流
- 6 対物レンズ
- 7 ダイクロイックミラー
- 8 蛍光フィルタ
- 9 ハーフミラー
- 10 反射ミラー
- 11 結像レンズ
- 12 第 1 撮像部
- 13 第 2 光源
- 14 コンデンサレンズ
- 15 結像レンズ
- 16 ゲート付きイメージインテンシファイヤ

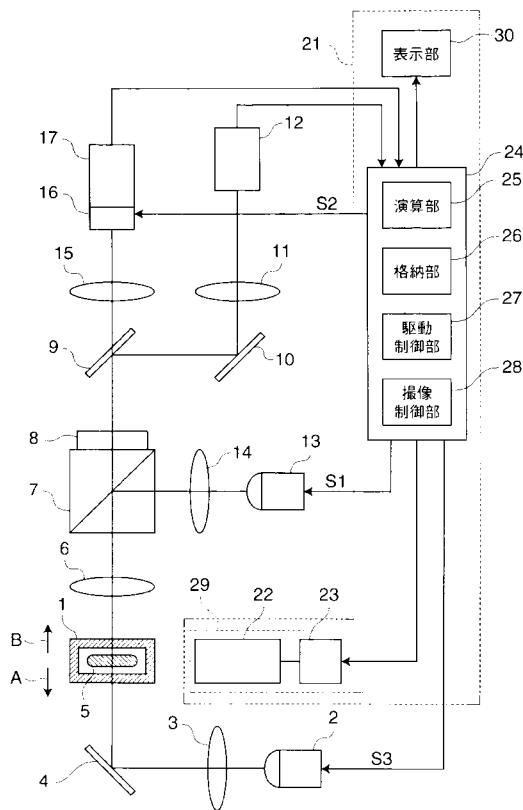
40

50

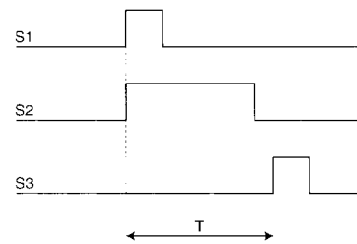
- 1 7 第 2 撮 像 部
- 1 8 ビームイクスパンダ
- 2 1 制 御 部
- 2 2 直線移動機構
- 2 3 ステッピングモータ
- 2 4 信号処理部
- 2 5 演算部
- 2 6 格納部
- 2 7 駆動制御部
- 2 8 撮像制御部
- 2 9 変位部
- 3 0 表示部

10

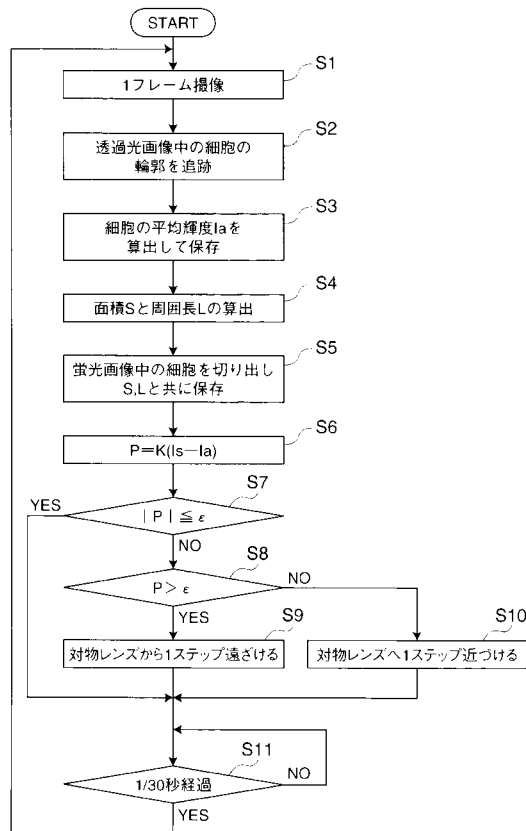
【 図 1 】



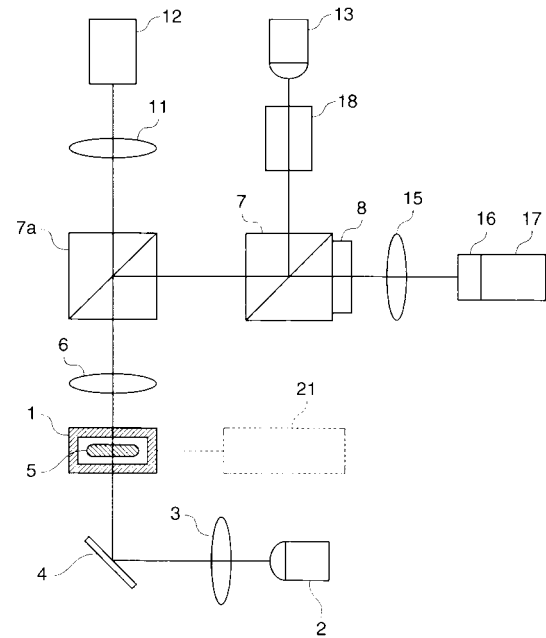
【 図 2 】



【図3】



【図4】



【図5】

