

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年7月2日(02.07.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/099116 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 15/12 (2006.01) *G01N 15/02* (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/084488
- (22) 国際出願日: 2014年12月26日(26.12.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-273574 2013年12月27日(27.12.2013) JP
- (71) 出願人: 株式会社堀場製作所 (HORIBA, LTD.)
[JP/JP]; 〒6018510 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 石塚 勝敏 (ISHIZUKA, Katsutoshi); 〒6018510 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内 Kyoto (JP). 松林 寛子 (MATSUBAYASHI, Hiroko); 〒6018510 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場

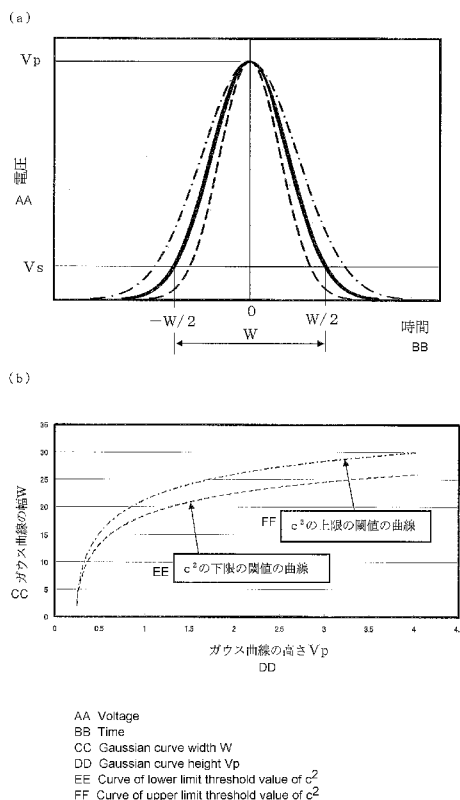
製作所内 Kyoto (JP). 西森 正志 (NISHIMORI, Masashi); 〒6018510 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内 Kyoto (JP).

- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

[続葉有]

(54) Title: PARTICLE COUNTING METHOD AND PARTICLE COUNTING APPARATUS

(54) 発明の名称: 粒子計数方法および粒子計数装置



(57) Abstract: Provided are a particle counting method and device, for obtaining a pulse waveform of particles in a sample liquid, in accordance with an electrical resistance method or an optical procedure, and counting the particles on the basis of the waveform. A pulse waveform to be determined is associated with a Gaussian curve approximating the waveform, and if the variance of the Gaussian curve is within the range of upper limit and lower limit threshold values predetermined in accordance with the height of the Gaussian curve, it is determined to be possible to adopt that pulse voltage waveform for the purpose of counting. According to the present invention, improper waveforms can be appropriately eliminated from measured pulse waveforms.

(57) 要約: 電気抵抗法または光学的手法に従って試料液中の各粒子のパルス波形を得、その波形に基いて粒子を計数する粒子計数方法と装置である。判定すべきパルス波形を、それに近似するガウス曲線に対応付け、そのガウス曲線の分散値が、そのガウス曲線の高さに対応して予め定められた上限と下限の閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス電圧の波形を計数に採用可能であると判定する。本発明によって、測定されたパルス波形から不正波形が適切に排除される。



ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 粒子計数方法および粒子計数装置

技術分野

[0001] 本発明は、血液細胞などの粒子を電気抵抗法または光学的手法に基いて計数する方法とそのための計数装置に関するものであり、とりわけ、該電気抵抗法または光学的手法に基いて得られた個々の粒子のパルス波形が、計数に採用可能なものであるかどうかを判定する技術に関するものである。

背景技術

[0002] 試料液中の粒子（例えば、赤血球、白血球、血小板などの血液細胞）を計数するための粒子計数装置として、試料液の流路にアパーチャと電極対とを設け、電気抵抗法（インピーダンス法とも呼ばれる）に従って電極間の電圧を計測し、各粒子の大きさに対応したパルス状の電気信号（通常、パルス電圧）を得るよう構成された装置が知られている。

電気抵抗法は、図 1 1（a）に示すように、試料液（例えば、所定の検体血液を希釈液中に分散させたもの）を流路 1 0 0 に導入し、該流路 1 0 0 の途中に、オリフィスのごとく流路の断面積が小さくなったアパーチャ（小孔） 2 0 0 を設け、該アパーチャ 2 0 0 の上流側と下流側にそれぞれ電極 3 0 0、3 1 0 を設けることによって、該アパーチャ 2 0 0 を通過する粒子（血球）の容積を、電極間の電気的な特性の変化に基いて測定する手法である。

[0003] 試料液中の 1 つの粒子 X 1 0 がアパーチャ 2 0 0 を通過するとき、電極間の電気抵抗またはインピーダンスはパルス状に変化する。よって、一対の電極 3 0 0、3 1 0 に定電流電源 4 0 0 から電圧を印加しておくと、前記のようなインピーダンスの変化に応じて該電圧も図 1 1（b）に示すようにパルス電圧（パルス状の電気信号）として変化する。このパルス状の電気信号の数を、例えば定電流電源に接続した演算部 5 0 0 などによって計数することによって、粒子の数を知ることができる。

[0004] 電気抵抗法において粒子がアパーチャを通過するときのパルス状の電気信

号のパルス波形のピークの高さ（通常、パルス電圧の最大電圧値） V_p は、その粒子の大きさに比例するので、その高さによって粒子の容積の大小を判定することができる。また、流速が一定の場合には、その粒子の大きさに比例してパルス波形の幅 W も大きくなることから、該パルス波形の幅によっても粒子の容積の大小をある程度判定することができる。

よって、電気抵抗法による粒子の計数では、単に粒子の数を知るだけではなく、得られるパルス波形に基いて、試料液中に何程の容積の血液細胞が何程の度数で存在しているかについての容積度数分布を得ることもできる。

例えば、貧血などの病理診断の指標の1つとして、平均赤血球容積(Mean Corpuscular Volume)が用いられている。該平均赤血球容積は、電気抵抗法によって測定された個々の赤血球のパルス波形の高さの情報（容積情報）から度数分布を作成し、求められる赤血球容積の平均値である。

[0005] 電気抵抗法に基いて血液細胞の計数を行なうための流路、アパーチャ、電極配置等の装置の構成については、例えば特許文献1～3などに詳細に記載されている。尚、特許文献2の装置では、独自の構成によってアパーチャの下流側の流路が2つに分岐し、また、特許文献3の装置では、独自の構成によってアパーチャの下流側に一对の電極が設けられているが、いずれも、血液細胞の大きさを判定する電気抵抗法の基本的な原理は上記と同様である。

[0006] 一方、図12に示すように、光学的手法に基づいた粒子計数装置も知られている。このような装置では、図12(a)に示すように、粒子X10が1つずつ通過し得る細い管路201に、光軸が直交するように光電センサー（図の例では、投光素子E1と受光素子E2のペア）が配置される。該管路201を流れる試料液中の各粒子X10が光L1を横切ると受光量が変化するので（100%の受光量からの減少～遮断～100%の受光量への復帰）、図12(b)に示すように、各粒子の大きさに応じたパルス状の電気信号が得られる。図12(b)は出力信号の一例であって、受光量の変化に応じて出力電圧が変化するように構成されている。 V_p はパルスの高さである。例えば、粒子が大きい場合、該粒子が光L1を横切るのに要する時間が長くなる

ので、得られる信号のパルスの幅 W が大きくなる。

よって、このような光学的手法の場合にも、上記した電気抵抗法と同様、得られるパルス波形に基いて、試料液中に何程の容積の血液細胞が何程の度数で存在しているかについての容積度数分布を得ることができる。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2004-257768号公報

特許文献2：特開2011-180117号公報

特許文献3：特開2005-062137号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 図11(b)にパルス電圧として模式的に示したパルス波形は、1つの粒子がアパーチャの中央を等速直線的に通過するといった理想的な通過状態での波形である（以下、「正常波形」と呼ぶ）。

しかし、実際の血球計数では、前記のような理想的な通過状態のみならず、図13(a)のように、血球がアパーチャの中心からずれて内壁に接近した経路をたどる通過状態や、図13(b)のように、複数の血球が互いに接近した状態のままでアパーチャを通過するといったような種々の通過状態や外乱が存在し、そのような場合のパルス電圧の波形は正常波形から大きく変形した波形（以下、「不正波形」と呼ぶ）となる。

例えば、図13(a)の左側の図に一点鎖線の円で模式的に示唆するように、アパーチャの入口と出口における開口周囲のエッジ付近は、電極間に形成される電界が局所的に強く分布することから、検出感度が中心部分よりも高くなっている。よって、図13(a)の左側の図に示した通過状態のように、血球が中心から偏って開口周囲のエッジに接近した経路を進む場合には、図13(a)の右側のグラフのように、電圧波形は2つの突起したピークを持った不正波形となる傾向にある。このような変則的な突起部の高さは、

その血球の本来の正常波形のピークの高さよりも高い値となるので、その血球の真の大きさよりも大きい血球が通過したものとして計数される。

また、図 1 3 (b) の左側の図に示した通過状態のように、2つの血球が互いに接近した状態でアパーチャを連続的に通過する場合には、図 1 3 (b) の右側のグラフのように、2つのパルス電圧が1つの波形のように重なり合い、2つのピークを持った波形や、斜面にコブを持った幅の広い波形として現れる場合がある。このような波形のデータもまた、個々の血球の真の大きさよりも大きい1つの血球が通過したものとして計数される。

[0009] 上記のような不正波形が生じる現象は、電気抵抗法のみならず図 1 2 に示した光学的手法においても生じる。例えば、2つの血球が互いに接近した状態で光軸を連続的に通過する場合には、2つのパルス波形が1つの波形のように重なり合い、図 1 3 (b) と同様に、2つのピークを持った波形や、斜面にコブを持った幅の広い波形として出力されることになり、それぞれの血球の真の大きさよりも大きい1つの血球が通過したものとして計数される。

[0010] 不正波形を計数に含んだ容積一度数分布グラフは、正常波形のみを計数した場合のグラフに比べて、容積の大きい側に度数が加わった分布グラフとなり、正しい診断の妨げとなる。このような問題は、血液細胞のみならず、電気抵抗法や光学的手法を用いた一般的な粒子計数においても同様に存在する問題である。

[0011] 本発明の課題は、電気抵抗法や光学的手法によって得られるパルス波形から不正波形を排除し、正常波形であるパルス波形だけを計数に採用するための新たな方法を提供し、かつ、該方法を実施し得るよう構成された粒子計数装置を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は、次の特徴を有するものである。

〔1〕 下記 (A) または下記 (B) の粒子計数法に従って、試料液中の各粒子に対応するパルス波形を得、そのパルス波形に基いて粒子を計数する粒子計数方法であって、

各粒子のパルス波形が計数に採用可能か否かを判定する第1の判定ステップを少なくとも有し、

該第1の判定ステップでは、判定すべきパルス波形を、それに近似する下記式(1)のガウス関数 $V(t)$ で規定されるガウス曲線に対応付け、

$$V(t) = V_p * \exp(-t^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式(1)}$$

(上式(1)中、 t は時間の変数、 V_p は判定すべきパルス波形の最大値、 c^2 はそのガウス曲線に対応付けられたパルス波形のパルス幅 W と等しい幅を持つように決定される分散値である。)

前記ガウス曲線の分散値 c^2 が、そのガウス曲線の高さに対応して予め定められた上限と下限の閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定する、
前記粒子計数方法。

(A) アパーチャと電極対とを用いる電気抵抗法に従って、試料液中の各粒子がアパーチャを通過する際の電極間のインピーダンスの変化をパルス状の電気信号として得、該パルス状の電気信号のパルス波形に基いて粒子を計数する粒子計数法。

(B) 管路とそれに直交して配置された光電センサーとを用い、管路を流れる試料液中の各粒子が光電センサーの光軸を横切ることによって得られる受光量の変化をパルス状の電気信号として得、該パルス状の電気信号のパルス波形に基いて粒子を計数する粒子計数法。

〔2〕第2の判定ステップをさらに有し、該第2の判定ステップは、第1の判定ステップの前後にまたは並行して位置し、

該第2の判定ステップは、判定すべきパルス波形の幅 W の中央の時間 T_m と、該パルス波形の最大値 V_p における時間 T_p との間の差を演算し、その差が予め定められた閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定するステップであって、

同じパルス波形に対して、第1の判定ステップと第2の判定ステップが、両方共に、計数に採用可能であると判定したときのみ、そのパルス波形を計

数に採用するように構成されている、

上記〔１〕記載の粒子計数方法。

〔３〕パルス波形をパルス幅 W について予め選別する第１の予備選別ステップをさらに有し、

該第１の予備選別ステップは、全ての判定ステップの前に位置し、予め定められた許容範囲外のパルス幅 W を持ったパルス波形を排除するステップである、上記〔１〕または〔２〕記載の粒子計数方法。

〔４〕パルス波形を最大値 V_p について予め選別する第２の予備選別ステップをさらに有し、

該第２の予備選別ステップは、全ての判定ステップの前に位置し、かつ、第１の予備選別ステップの後に位置し、予め定められた下限値以上の最大値 V_p を持ったパルス波形を上記判定ステップへ送るステップであって、

前記下限値未満の最大値 V_p を持ったパルス波形を計数に採用するように構成されている、

上記〔３〕記載の粒子計数方法。

〔５〕下記（Ａ）または下記（Ｂ）の粒子計数法に従って、試料液中の各粒子に対応するパルス波形を得、そのパルス波形に基いて粒子を計数するように構成された粒子計数装置であって、

当該粒子計数装置は、粒子の計数を行うための演算部を有し、

該演算部は、各粒子のパルス波形が計数に採用可能か否かを判定する第１の判定部を少なくとも有し、

該第１の判定部は、判定すべき粒子のパルス波形を、それに近似する下記式（１）のガウス関数 $V(t)$ で規定されるガウス曲線に対応付け、

$$V(t) = V_p * \exp(-t^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式（１）}$$

（上式（１）中、 t は時間の変数、 V_p は判定すべきパルス波形の最大値、 c^2 はそのガウス曲線に対応付けられたパルス波形のパルス幅 W と等しい幅を持つように決定される分散値である。）

前記ガウス曲線の分散値 c^2 が、そのガウス曲線の高さに対応して予め定め

られた上限と下限の閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定するように構成されている、
前記粒子計数装置。

〔６〕演算部が、第２の判定部をさらに有し、

該第２の判定部は、第１の判定部の前後にまたは並行して位置し、

判定すべきパルス波形の幅 W の中央の時間 T_m と、該パルス波形の最大値 V_p における時間 T_p との間の差を演算し、その差が予め定められた閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定するように構成され、

前記演算部は、同じパルス波形に対して、第１の判定部と第２の判定部が、両方共に計数に採用可能であると判定したときのみ、そのパルス波形を計数に採用するように構成されている、

上記〔５〕記載の粒子計数装置。

〔７〕演算部が、パルス波形をパルス幅 W について予め選別する第１の予備選別部をさらに有し、

該第１の予備選別部は、全ての判定部よりも先にデータ処理を行うように位置し、予め定められた許容範囲外のパルス幅 W を持ったパルス波形を排除するように構成されている、上記〔５〕または〔６〕記載の粒子計数装置。

〔８〕演算部が、パルス波形を最大値 V_p について予め選別する第２の予備選別部をさらに有し、

該第２の予備選別部は、全ての判定部よりも先に選別の処理を行うように位置し、かつ、第１の予備選別部によって排除されなかったパルス波形を選別するように位置し、予め定められた下限値以上の最大値 V_p を持ったパルス波形を上記判定部へ送るように構成されており、

前記演算部は、該下限値未満の最大値 V_p を持ったパルス波形を計数に採用するように構成されている、

上記〔７〕記載の粒子計数装置。

発明の効果

[0013] 本発明では、電気抵抗法または光学的手法によって得られる個々の粒子に対応したパルス波形を、それに近似したガウス曲線に対応付けるという新たな発想に基づき、各粒子のパルス波形が計数に採用可能か否かというパルス波形に対する判定を、ガウス曲線に対する判定に置き換えることに成功している。

即ち、本発明では、ガウス曲線に対する判定において、ガウス曲線の幅を決定付ける分散値に、判定用の閾値として上限と下限を設定し、各粒子のパルス波形に対応付けられたガウス曲線の分散値が、その上限と下限の閾値の範囲以内に入っているかどうかを判定する。ガウス曲線の分散値に上限と下限とを設定することで、正常波形に対応するガウス曲線と、不正波形に対応するガウス曲線とを、より明確に判別することができる。

[0014] 従来においてもパルス波形の良否を判定しようとする試みはあった。しかし、従来の判定の手法では、パルス波形の高さ（パルス高さ）とパルス波形の幅（パルス幅）にそれぞれ上限と下限の閾値を固定的に定めておき、その固定された上限、下限の閾値の範囲内にあるか否かで、パルス波形の良否を判定するというだけのものであった。

また、従来では、（i）電圧波形の対称度を調べることによって不正波形を判別する方法や、（ii）1つの波形の最大ピーク値の半値における時間（ t_1 、 t_2 ）の中間時点における電圧値をその波形のピーク値（中心振幅）として採用する方法なども提案されていた。

しかし、上記（i）の様な方法には、たとえ不正波形であっても左右対称であれば排除できないという欠点があり、上記（ii）の様な方法には、2つの粒子が通過する場合、誤ったピーク値を算出してしまう可能性があるという欠点がある。

[0015] これに対して、本発明では、個々の粒子について得られたパルス波形を、そのパルス高さとパルス幅に基いてガウス曲線に変換しており、各パルス幅の上限と下限の閾値は、各波形のパルス高さに応じて変動する。即ち、本発明では、波形判定の閾値は固定された値ではない。ガウス曲線のパルス高さ

の変化に応じて、ガウス曲線のパルス幅の上限と下限の閾値が変動する様子は、図 1（b）のグラフに示されたとおりである。

本発明は、パルス波形の判定をガウス曲線の判定に置き換え、コンピュータや F P G A（Field Programmable Gate Array）等のデジタル演算装置の高い処理能力を利用することで、判定条件として入力したパルス高さとパルス幅の二次元の閾値（即ち、パルス高さの変化に応じて変動するパルス幅の上限と下限の閾値）の範囲内に入るか否かを判定するものである。

よって、本発明の判定法は、従来にはなかった新たな技術的思想に基づいた判定法であり、誤判定を抑制しながらも、処理速度を低下させることなく、不正波形を排除することが可能な方法である。また、本発明は、上記した従来法（i）、（ii）の欠点を解消することも可能な方法である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図 1 は、本発明の方法における第 1 の判定ステップ（または本発明の装置における第 1 の判定部）における判定の原理を説明するグラフ図である。図 1（a）は、判定すべきパルス波形（パルス電圧）に対応付けられたガウス曲線（太い実線）と、上限の分散値を持ったガウス曲線（一点鎖線）と、下限の分散値を持ったガウス曲線（破線）とを重ね合わせたグラフ図である。横軸は時間 t 、縦軸は一例として電圧の値を示している。図 1（b）は、パルス波形の最大値に対応付けられたガウス曲線の高さ V_p に対応して、該ガウス曲線の幅 W の閾値がそれぞれどのように変化するかを示すグラフ図である。

[図2]図 2 は、本発明の方法における第 1 の判定ステップ（または本発明の装置における第 1 の判定部）に従って、実際に測定された各粒子のパルス波形をガウス曲線に対応付け、プロットしたグラフ図である。該グラフは、縦軸にパルス幅を取り、横軸にパルス高さを取っている。

[図3]図 3 は、本発明の方法における第 2 の判定ステップ（または本発明の装置における第 2 の判定部）における判定の原理を説明するグラフ図である。横軸は時間、縦軸は一例として電圧の値を示している。

[図4]図4は、本発明の方法の好ましい一例を示すフローチャートであって、パルス波形を取得するステップs 1から計数処理を行うステップs 7までの、流れの一例を示している。

[図5]図5は、本発明の装置の構成の一例を模式的に示したブロック図である。

[図6]図6は、本発明の実施例において、実際に測定された各粒子のパルス波形（パルス電圧）の最大値（最大電圧値） V_p とパルス幅 W との関係を示したスキャッターグラムである。

[図7]図7は、本発明の実施例において、第2の判定ステップで計数に採用可能であると判定されたパルス波形（パルス電圧）の最大値（最大電圧値） V_p とパルス幅 W との関係を示したスキャッターグラムである。

[図8]図8は、本発明の実施例において、第1の判定ステップと第2の判定ステップで共に計数に採用可能であると判定されたパルス波形（パルス電圧）の最大値（最大電圧値） V_p とパルス幅 W との関係を示したスキャッターグラムである。

[図9]図9は、本発明の実施例において、測定されたままのパルス波形（パルス電圧）のデータセットと、計数に採用可能であると判定されたパルス波形（パルス電圧）のデータセットの、それぞれの容積度数分布を示すグラフ図である。

[図10]図10は、本発明の方法における判定性能を示すグラフ図である。

[図11]図11は、電気抵抗法の基本的な原理と装置構成を説明する図である。図11（a）はアパーチャと電極の配置例を示しており、図11（b）は粒子である血液細胞がアパーチャを通過する際に現れる電極間の電圧の変動を模式的に示している。

[図12]図12は、光学的手法に基づいた粒子係数の基本的な原理と装置構成を説明する図である。図12（a）は流路と光電センサーの配置例を示しており、図12（b）は粒子である血液細胞がセンサーの光軸を横切る際に得られるパルス状の信号（図の例ではパルス電圧）を模式的に示している。

[図13]図 1 3 は、電気抵抗法による電圧測定において現れる不正波形とその原因を例示する図である。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明の粒子計数方法と粒子計数装置を詳細に説明する。

本発明の粒子計数方法は、電気抵抗法または光学的手法に従って試料液中の各粒子に対応するパルス波形を得、その波形に基いて粒子を計数する方法である。以下の説明では、パルス波形を得るための計測手法として電気抵抗法を例として、パルス波形をパルス電圧として得る場合を例としているが、パルス波形を得るための計測手法を光学的手法に適宜置き換えてもよく、得られるパルス電圧は、パルス状に変化する信号であればよい。

本発明の方法では、パルス波形の判定、予備的な選別、その後の計数などの種々の処理は、後述の演算装置が自動的に行う。

当該方法の重要な特徴は、各粒子のパルス波形が計数に採用可能か否かを判定する第 1 の判定ステップを有する点にある。

該第 1 の判定ステップでは、判定すべきパルス波形を、それに近似する下記式 (1) のガウス関数 $V(t)$ で規定されるガウス曲線に対応付けている。

$$V(t) = V_p * \exp(-t^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式 (1)}$$

上式 (1) において、 t は時間の変数、 V_p は判定すべきパルス波形 (パルス電圧) の最大値 (最大電圧値)、 c^2 は、分散値であって、ガウス曲線の裾野の広がりの度合いを決定付けるパラメータである。該 c^2 は、上式 (1) のガウス曲線が、もとの信号のパルス波形のパルス幅 W に対応した幅を持つように決定されている。

また、上式 (1) において、「 $*$ 」は乗算を意味する演算子、「 $/$ 」は除算を意味する演算子、「 $\exp()$ 」は自然対数の底 e の指数関数 $e^{(\quad)}$ を意味する演算子である。

該第 1 の判定ステップでは、前記ガウス曲線の分散値 c^2 が、そのガウス曲線の高さに対応して予め定められた分散値の上限と下限の閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス電圧の波形を計数に採用可能であると判定する。即

ち、図 1 (a) に示すように、判定すべきガウス曲線（太い実線のグラフ）が、上限の分散を持ったガウス曲線（一点鎖線）と、下限の分散を持ったガウス曲線（破線）との間にあれば、そのガウス曲線に対応するもとのパルス波形を計数に採用可能であると判定する。

[0018] ここで、図 3 に示すように、電気抵抗法によって得られる実際のパルス電圧の 0 V 付近にはノイズ等による波形の変動が存在する。よって、そのような下方の変動部分を排除するためには、各粒子のパルス波形およびガウス曲線に対して閾値電圧 V_s を設定し、該閾値電圧 V_s 以上の部分だけを取り扱うことが好ましい。

そして、パルス波形およびそれに対応付けられるガウス曲線のそれぞれの幅を、図 1 (a) のグラフに示すように、閾値電圧 V_s における幅 W であると規定することで、幅の値が明らかになり、より正確な演算処理を行うことができるようになる。

以下の説明では、パルス波形およびガウス曲線のそれぞれの幅は、閾値電圧 V_s における幅 W である。

[0019] 上式 (1) で規定されるガウス曲線は、図 1 (a) に示すように、判定すべき粒子に対応するパルス波形の最大値（最大電圧値） V_p と同じ高さ V_p を持っている。パルス波形の最大値 V_p とは、例えば、パルス電圧の場合、外乱などによる不規則な突起部の電圧値をも含んだ、そのパルス全体の最大値である。一方、ガウス曲線の高さ V_p は、中央のピークの高さである。また、上式 (1) で規定されるガウス曲線は、判定すべき粒子のパルス電圧のパルス幅 W に対応した幅（例えば、同じ幅） W を持っている。

[0020] ここで、ガウス関数と分散値 c^2 について説明する。

x を変数とするガウス関数は、一般的に下式 (a) のように表される。

$$f(x) = a * \exp(-(x - b)^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式 (a)}$$

上式 (a) において、 a は波形の高さを決定する係数、 b はピークの位置（時間）である。

本発明では、粒子がアパーチャを通過するときに現れるパルス電圧の波形

(光学的手法では、粒子が光軸を横切るときに得られるパルス状の信号の波形)が、ガウス関数によって近似的に表現できると仮定し、該パルス波形の高さ(電圧値)の変化を下式(b)で表している。

$$V(t) = V_p * \exp(-(t - b)^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式 (b)}$$

上式(b)において、tは時間を表す変数である。V_pは、ガウス関数の最大値(ピークの高さ)を決定する値であって、各粒子のパルス波形の最大値(パルス電圧の最大電圧値)を表している。

上式(b)においてt = 0のときにV_pとなるように(即ち、V(0) = V_pとなるように)、b = 0とすると、上式(b)は、上式(1)で表される。

[0021] 閾値電圧V_sにおけるガウス曲線の幅をWとすると、ガウス関数V(t)は、V(-W/2) = V(W/2) = V_sと表され、V(t) = V_sのときの上式(1)は次式のように表すことができる。

$$V(W/2) = V_s = V_p * \exp(-(W/2)^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式 (c)}$$

上式(c)は次のように変形される。

$$V_s / V_p = \exp(W^2 / 8 c^2)$$

該式を、分散値c²を表す式へと変形すると、次式(d)が得られる。

$$c^2 = W^2 / (-8 * \ln(V_s / V_p)) \quad \text{式 (d)}$$

上式中「ln()」は自然対数を意味する演算子である。

上式(d)から明らかなとおり、各粒子のパルス波形に対応付けられたガウス関数の分散値c²は、パルス波形の最大値(パルス電圧の最大電圧値)V_p、パルス幅W、閾値電圧V_sによって決定付けられている。

[0022] 上式(1)のガウス関数において、それぞれの高さV_pに対して分散値c²が取り得る全範囲(不正波形をも含んだ範囲)は、粒子の種類や試料液の流速、対応させようとするガウス関数のグラフのスケールによっても異なるが、一般的な電気抵抗法や光学的手法によって得られるパルス波形をガウス関数に対応付ける場合には、分散値c²の値は20～60程度であり、この全範囲のなかで、対象とする粒子の平均径、電気抵抗法での電極間電圧、光学的手法でのビーム径、それぞれの流速などに応じて、上式(d)から分散値c²の

上限の閾値と下限の閾値とを、単一粒径を持ったビーズを用いた実測値などに基いて決定すればよい。

一例として、赤血球の計数では、分散値 c^2 として設定すべき上限の閾値から下限の閾値まで範囲は、30～50程度である。

[0023] 図1(b)は、第1の判定ステップにおける判定の原理をより分かり易く示したグラフ図である。分散値の上限の閾値の変化を示す上限曲線（一点鎖線で示す）と、分散値の下限の閾値の変化を示す下限曲線（破線で示す）との間にある領域以内に、判定すべきガウス曲線の分散値 c^2 が入っていれば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定し得る。

図2は、実際に測定された各粒子のパルス波形をガウス曲線に対応付け、各ガウス曲線の（分散値、高さ）をプロットしたグラフ図である。図2のグラフ図にも、図1(b)と同様に、上限曲線と下限曲線を重ねて示している。図2に示すように、不正波形は、上限の曲線よりも上側に逸脱する。その主たる理由は、電気抵抗法の場合、一定の流速下では、パルス幅は粒子がアパーチャを通過する時間によって決まるが、粒子のサイズよりもアパーチャの厚さ（電界強度）が支配的となるからである。

[0024] 本発明が判定の対象とすべき粒子は、特に限定はされないが、赤血球、白血球、血小板などの血液細胞の計数（血球計数）に対して本発明は有用である。とりわけ、赤血球は、他の血球に比べて濃度が高く、計数時に二重通過が起き易いので、赤血球の計数において本発明の有用性はより顕著になる。また、平均赤血球容積（MCV）は臨床上、重要である点からも、赤血球は、本発明にとって判定の対象とすべき重要な粒子である。

[0025] 電気抵抗法を実施するためのアパーチャの開口形状や、光学的手法をを実施するための流路の断面形状は、特に限定はされないが、通常、円形が好ましい形状である。その場合の口径は、計数すべき粒子によっても異なるが、赤血球に対しては、0.01mm～1mm程度の範囲から適宜選択すればよい。

アパーチャの流路方向の長さや、一对の電極の材料、電極の位置、試料液

の調整法、試料液の流速、電源、印加電圧などは、電気抵抗法を実施するための従来公知の粒子計数技術を適宜参照すればよい。

[0026] 電気抵抗法に基いてパルス電圧を得る場合、パルス波形の最大値（最大電圧値） V_p は、測定する粒子の容積や、それに応じたアパーチャの断面積、電極間に印加する電圧、粒子の通過経路などによって異なる。従来公知の一般的な血球計数装置では、赤血球のパルス電圧の波形の最大電圧値 V_p は、不正波形を含めると0.1～10V程度である。

[0027] 閾値電圧 V_s は、電圧0V付近のノイズだけを効果的に排除できるように、パルス波形の最大値（最大電圧値） V_p などに応じて適宜決定すればよく、例えば、0.1～1V程度である。

一般的な血球計数装置による赤血球の計数では、閾値電圧 V_s によって決定される赤血球のパルス幅 W は、流速によって大きく異なるが、例えば、不正波形を含めて5～30 μ sec程度である。

その場合、例えば、分散値 c^2 の上限の閾値を40とし、分散値の下限の閾値を30とすることによって、図1（b）に示す2つの曲線が得られる。

[0028] 本発明では、第1の判定ステップに加えて、次に説明する第2の判定ステップを設けてもよい。該第2の判定ステップは、第1の判定ステップの前後にあってもよいし、並行に位置していてもよい。

第2の判定ステップでは、図3のグラフ図に示すように、判定すべきパルス波形の幅 W の中央の時間（一点鎖線で示した中心線の位置） T_m と、パルス波形の最大値 V_p における時間 T_p との間の差 ΔT （即ち、幅の中心位置からの、最大値における位置のずれ）を演算する。そして、その差 ΔT が予め定められた閾値の範囲以内にあるならば、その粒子のパルス波形を計数に採用可能であると判定する。

差 ΔT は、1つのパルス幅に対する相対値であり、正負の符号を持った値でもよく、閾値の範囲や演算法は、それらに応じて決定すればよい。

上述の一般的な血球計数装置による赤血球の計数では、 ΔT の閾値の範囲は、各パルス幅の $\pm 50\%$ 程度が挙げられる。

[0029] 本発明の方法の好ましい態様では、同じ1つの粒子のパルス波形に対して、第1の判定ステップにおける判定結果と、第2の判定ステップにおける判定結果が、両方共に、計数に採用可能である場合のみ、その粒子のパルス波形を計数に採用する。図4のフローチャートに示す好ましい態様例では、第2の判定ステップs4は、第1の判定ステップs5の前に位置し、第2の判定ステップs4が計数に採用可能であると判定した波形のみを、第1の判定ステップs5で判定している。

図4のフローチャートの例では、測定によって得られたパルス波形データ（パルス電圧データなど）の集合（データセット）の選別や判定の処理を、直列的に順番に行っているが、データセット中の各データに識別番号を設け、別個に並行して処理を行い、各データに対して最後に総合的な判定を行うといった手順であってもよい。

[0030] 本発明の方法の好ましい態様では、全ての判定ステップ（第1、第2の判定ステップ）に先立って、次に説明する第1、第2の予備選別ステップがさらに設けられる。

測定で得られたパルス波形には、判定する必要の無い、明らかに規定外の高さや幅を持った不正波形が含まれている場合がある。そのような不正波形は、予め、第1、第2の予備選別ステップにおいて、単純にフィルターをかけて選別し、無駄な判定処理や誤った判定処理を行わないようにすることが好ましい。第1、第2の予備選別ステップは、いずれか一方だけを設けてもよい。

[0031] 〔第1の予備選別ステップ：パルス幅についての予備選別〕

図4のフローチャートに例示するように、第1の予備選別ステップs2は、第1、第2の判定ステップの前に位置し、予め定められた許容範囲外のパルス幅を持ったパルス波形を簡単なフィルターで排除するステップである。

第1の予備選別ステップにおいて設定されるパルス幅に関する許容範囲は、従来公知の血球計数法を参照し、各血球計数装置に応じた適切な値を設定すればよい。

好ましい態様では、図4のフローチャートに例示するように、第1の予備選別ステップs2においてパルス幅が許容範囲以内にあったパルス波形データは、第2の予備選別ステップs3に送られる。

[0032] 〔第2の予備選別ステップ：パルス波形の最大値についての予備選別〕

第2の予備選別ステップもまた、第1、第2の判定ステップの前に位置する。好ましい態様では、図4のフローチャートに例示するように、第2の予備選別ステップs3は、第1の予備選別ステップs2の後に設けられる。

第2の予備選別ステップでは、パルス波形の最大値に関する下限値が設定されており、この下限値以上の最大値 V_p を持ったパルス波形は、第1、第2の判定ステップへと単純に送られる。

一方、本発明の方法の好ましい態様では、この下限値未満の最大値 V_p を持ったパルス波形を、排除するのではなく計数に採用する（図4のフローチャートの例では、最終的に採用を判定するステップs6に送る）。その理由は、例えば、熱傷などを負った患者の検体中に存在する破砕赤血球のように、下限値未満の小さいパルス波形を持った粒子であっても、計数すべき場合があるからである。下限値未満の小さいパルス波形は、高さに対して幅の広い台形のような形状など、ガウス曲線とは大きく異なる形状であるので、第一の判定ステップでは排除されてしまう場合がある。このような計数すべき不正波形は、予備選別ステップの結果に応じて、適宜計数に採用することが好ましい。

[0033] 次に、本発明による粒子計数装置について説明する。

図5は、当該装置の構成の一例を模式的に示す図である。同図では、説明のために電気抵抗法を実施するための装置構成を示しているが、光学的手法に置き換えてもよい。同図に例示するように、当該装置1は、本発明による粒子計数方法を実施するよう構成されており、概しては、測定構造部2と、制御部3とを有している。

[0034] 測定構造部2は、試料液を流すための流路20と、該流路に設けられたアパーチャ21と、該アパーチャの両側（上流側、下流側）に配置された一対

の電極 2 2、2 3 とを備え、電気抵抗法に従って粒子のパルス電圧（パルス波形）を取得し得るように構成されている。タンク、ポンプ、流路の細部の形態など、測定構造部 2 の詳細な構造や付帯的な装置は、従来技術を参照してもよい。

[0035] 制御部 3 は、測定構造部 2 に電気抵抗法（または、光学的手法による測定）を実施させるための制御装置であって、試料液の流れを制御し、電極対への電圧印加を制御し（光学的手法の場合には、光電センサーの駆動制御）、各粒子のパルス波形の測定データを得、該データを処理し、計数するように構成されている。

制御部 3 は、定電流電源部 4 と演算部 5 とを少なくとも有する。

定電流電源部は、電極対 2 2、2 3 に電圧を印加し、各粒子がアパーチャを通過したときのパルス電圧の波形データを演算部 5 に出力するよう構成されている。

[0036] 演算部 5 は、上記した本発明の方法を実行し、計数に採用可能であると最終的に判定されたパルス波形を計数するよう構成された演算装置である。該演算装置としては、本発明の方法を実施するように作成されたプログラムを実行するコンピュータが挙げられるが、全ての演算処理をプログラムで行うだけではなく、上記 F P G A など、演算処理を電子回路によって行えるように構築されたデジタル演算素子を部分的に利用する態様が、処理の高速化や、データの確認後、回路の調整が容易である点で好ましい。コンピュータとデジタル演算素子とのデータ通信の技術自体は、従来技術を参照すればよい。また、図 5 の態様において、得られたパルス波形をデジタルデータに変換する構成などは、定電流電源部 4 と演算部 5 のどちらに含まれていてもよい。

[0037] 演算部 5 は、上記した本発明の方法における第 1 の判定ステップを実行するように構成された第 1 の判定部 6 を少なくとも有する。第 1 の判定部における判定原理やそのための設定値、詳細な処理内容は上記したとおりである。

[0038] また、好ましい態様では、演算部 5 は、上記した本発明の方法における第

2の判定ステップを実行するように構成された第2の判定部7をさらに有する。第2の判定部における判定原理やそのための設定値、詳細な処理内容は上記したとおりである。

この場合、演算部は、同じ1つのパルス波形に対して、第1の判定部6と第2の判定部7が、両方共に計数に採用可能であると判定したときのみ、そのパルス波形を計数に採用するように構成される。

[0039] また、好ましい態様では、演算部5は、上記した本発明の方法における第1の予備選別ステップを実行するように構成された第1の予備選別部をさらに有する（図5には示さず）。該第1の予備選別部は、第1、第2の判定部よりも先にデータ処理を行うように位置する。第1の予備選別部における選別内容やそのための設定値、詳細な処理内容は上記したとおりである。

[0040] また、好ましい態様では、演算部5は、本発明の方法における第2の予備選別ステップを実行するように構成された第2の予備選別部をさらに有する（図5には示さず）。該第2の予備選別部は、第1、第2の判定部よりも先にデータ処理を行うように位置し、かつ、第1の予備選別部によって排除されなかったパルス波形を選別するように位置する。

第2の予備選別部における選別内容やそのための設定値、詳細な処理内容は上記したとおりである。また、好ましい態様では、演算部5は、第2の予備選別部において、下限値未満の最大値（最大電圧値） V_p を持っていると判定されたパルス波形を計数に採用するように構成されている。その理由は、上記したとおりである。

[0041] 好ましい態様では、演算部5の主要装置であるコンピュータは、図4のフローチャートに示されたステップs1のパルス波形の取得から、ステップs7の計数処理ステップまでを、全て外付けのデジタル演算素子（特にFPGA）に処理させるように構成される。これにより、ガウス波形を処理するという複雑な演算であっても、負担にはなることなく、小型の装置でありながら、高速に処理することが可能になる。

実施例

[0042] 本実施例では、血液を試料液として用い、本発明の粒子計数装置を用いて、本発明の粒子計数方法を実際に行い、電気抵抗法に従って粒子のパルス波形（パルス電圧の波形）を取得し、本発明の粒子計数方法を実施した（図6～図10）。

本発明の粒子計数装置における制御部3の本体はコンピュータである。

アパーチャは断面円形であって、口径は50 μm である。

図6は、試料液として血液を用い、測定によって得られた個々の粒子のパルス電圧の最大値 V_p とパルス幅 W との関係を示したスキャッターグラム（分散図）である。また、図7～10も、試料液として血液を用いた場合の測定結果を示すスキャッターグラムまたはグラフである。

[0043] また、分散閾値の妥当性を確認するために、3種類の平均粒子径を持ったポリスチレンビーズを含んだ実験用の試料液を用い、スキャッターグラムを判定した。該実験用の試料液には、生理食塩水に、3種類（平均粒子径が5 μm 、6 μm 、7 μm ）のポリスチレン単分散粒子をほぼ同じ比率にて混在させた液を用い、実際の血液に対する判定の性能を検証した。

その結果、上下の閾値の間にビーズの分布が入ったことから、該閾値が妥当であると判断した。

[0044] 〔第2の判定ステップ〕

電気抵抗法に従って得られたパルス波形のデータセットに対し、コンピュータによって、本発明の方法における第2の判定ステップでの判定処理を行った。これにより、最大値 V_p の位置 T_p とパルス幅の中心 T_m との差異 ΔT が、所定の閾値範囲を超えているパルス波形が排除された。このときの差異 ΔT の閾値範囲は、パルス波形の幅の $\pm 30\%$ とした。

図7は、第2の判定ステップで計数に採用可能であると判定されたパルス波形の最大値 V_p とパルス幅 W との関係を示したスキャッターグラムである。図6と比べると、パルス幅が異常に広いパルス波形が好ましく排除されていることがわかる。

[0045] 〔第1の判定ステップ〕

上記第2の判定ステップで計数に採用可能であると判定されたパルス波形のデータセットに対し、コンピュータによって、第1の判定ステップでの判定処理を行った。これにより、分散値 c^2 が、所定の閾値範囲を超えているパルス波形が排除された。

このときの分散値 c^2 の閾値の上限と下限は、血液やポリスチレン単分散粒子をサンプルとした際のパルスの形状から、上限を30、下限を43とした。

図8は、第1の判定ステップで計数に採用可能であると判定されたパルス電圧の最大電圧値 V_p とパルス幅 W との関係を示したスキャッターグラムである。

図6、図7と比べると、パルス幅が広いパルス波形が効果的に排除され、正常波形のパルス波形だけが残っていることがわかる。

[0046] 上記第1の判定ステップで計数に採用可能であると判定されたパルス波形のデータセットに対してコンピュータで計数処理を行い、粒子の容積と度数との関係を演算し、容積度数分布を作成した(図9)。また、図9には、処理前の最初のデータセットの容積度数分布をも重ねて示している。

図9のグラフから明らかなとおり、第2の判定ステップ～第1の判定ステップでの判定処理によって、体積が大きい側の度数だけが効果的に削り取られていることがわかる。

[0047] [判定性能の評価]

上記の実験を2回繰り返し、それぞれの容積度数分布の結果から、それぞれの実験に用いた試料液に含まれた粒子のヘマトクリット値を計算によって求めた。

ヘマトクリット値は、試料液全体の容積に対する、その試料液に含まれた粒子全体の容積の比率である。

一方、それぞれの実験に用いた各試料液のヘマトクリット値をマイクロヘマトクリット法によって実際に測定した。粒子を遠沈させるための遠心器での処理は12000rpmで5分間とした。

本発明による判定法が正しければ、上記各実験によって得られた各試料液のヘマトクリット値と、計算で得られた各試料液のヘマトクリット値とは、強い相関関係を持つはずである。

図10は、上記各実験で得られた各試料液のヘマトクリット値を横軸とし、それぞれの試料液の計算で得られたヘマトクリット値を縦軸として、プロットしたグラフである。

同図からも明らかなとおり、両者の相関の度合いを表す決定計数 R^2 の値は0.97であり、強い相関関係を持っており、本発明による判定法が正しいことがわかった。

尚、各実験で得られた各試料液の実際のヘマトクリット値が、計算で得られた各試料液のヘマトクリット値よりも全て高い値となっているのは、ヘマトクリット値に各粒子同士の間微量な隙間が含まれているからであると推定される。

産業上の利用可能性

[0048] 本発明によって、電気抵抗法や光学的手法によって得られるパルス波形から不正波形を効果的に排除し、正常波形のパルス波形だけを計数に採用することが可能になった。これにより、血球計数では、不正波形を計数に含まない容積度数分布グラフが得られ、より正しい診断を行うことが可能になる。

[0049] 本出願は、日本で出願された特願2013-273574（出願日：2013年12月27日）を基礎としている。

請求の範囲

[請求項1]

下記（A）または下記（B）の粒子計数法に従って、試料液中の各粒子に対応するパルス波形を得、そのパルス波形に基いて粒子を計数する粒子計数方法であって、

各粒子のパルス波形が計数に採用可能か否かを判定する第1の判定ステップを少なくとも有し、

該第1の判定ステップでは、判定すべきパルス波形を、それに近似する下記式（1）のガウス関数 $V(t)$ で規定されるガウス曲線に対応付け、

$$V(t) = V_p * \exp(-t^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式（1）}$$

（上式（1）中、 t は時間の変数、 V_p は判定すべきパルス波形の最大値、 c^2 はそのガウス曲線に対応付けられたパルス波形のパルス幅 W と等しい幅を持つように決定される分散値である。）

前記ガウス曲線の分散値 c^2 が、そのガウス曲線の高さに対応して予め定められた上限と下限の閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定する、
前記粒子計数方法。

（A）アパーチャと電極対とを用いる電気抵抗法に従って、試料液中の各粒子がアパーチャを通過する際の電極間のインピーダンスの変化をパルス状の電気信号として得、該パルス状の電気信号のパルス波形に基いて粒子を計数する粒子計数法。

（B）管路とそれに直交して配置された光電センサーとを用い、管路を流れる試料液中の各粒子が光電センサーの光軸を横切ることによって得られる受光量の変化をパルス状の電気信号として得、該パルス状の電気信号のパルス波形に基いて粒子を計数する粒子計数法。

[請求項2]

第2の判定ステップをさらに有し、該第2の判定ステップは、第1の判定ステップの前後にまたは並行して位置し、

該第2の判定ステップは、判定すべきパルス波形の幅 W の中央の時

間 T_m と、該パルス波形の最大値 V_p における時間 T_p との間の差を演算し、その差が予め定められた閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定するステップであって、

同じパルス波形に対して、第 1 の判定ステップと第 2 の判定ステップが、両方共に、計数に採用可能であると判定したときのみ、そのパルス波形を計数に採用するように構成されている、

請求項 1 記載の粒子計数方法。

[請求項3] パルス波形をパルス幅 W について予め選別する第 1 の予備選別ステップをさらに有し、

該第 1 の予備選別ステップは、全ての判定ステップの前に位置し、予め定められた許容範囲外のパルス幅 W を持ったパルス波形を排除するステップである、請求項 1 または 2 記載の粒子計数方法。

[請求項4] パルス波形を最大値 V_p について予め選別する第 2 の予備選別ステップをさらに有し、

該第 2 の予備選別ステップは、全ての判定ステップの前に位置し、かつ、第 1 の予備選別ステップの後に位置し、予め定められた下限値以上の最大値 V_p を持ったパルス波形を上記判定ステップへ送るステップであって、

前記下限値未満の最大値 V_p を持ったパルス波形を計数に採用するように構成されてい

る、

請求項 3 記載の粒子計数方法。

[請求項5] 下記 (A) または下記 (B) の粒子計数法に従って、試料液中の各粒子に対応するパルス波形を得、そのパルス波形に基いて粒子を計数するよう構成された粒子計数装置であって、

当該粒子計数装置は、粒子の計数を行うための演算部を有し、

該演算部は、各粒子のパルス波形が計数に採用可能か否かを判定する第 1 の判定部を少なくとも有し、

該第1の判定部は、判定すべき粒子のパルス波形を、それに近似する下記式(1)のガウス関数 $V(t)$ で規定されるガウス曲線に対応付け、

$$V(t) = V_p * \exp(-t^2 / (2 * c^2)) \quad \text{式(1)}$$

(上式(1)中、 t は時間の変数、 V_p は判定すべきパルス波形の最大値、 c^2 はそのガウス曲線に対応付けられたパルス波形のパルス幅 W と等しい幅を持つように決定される分散値である。)

前記ガウス曲線の分散値 c^2 が、そのガウス曲線の高さに対応して予め定められた上限と下限の閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定するように構成されている、前記粒子計数装置。

[請求項6]

演算部が、第2の判定部をさらに有し、

該第2の判定部は、第1の判定部の前後にまたは並行して位置し、判定すべきパルス波形の幅 W の中央の時間 T_m と、該パルス波形の最大値 V_p における時間 T_p との間の差を演算し、その差が予め定められた閾値の範囲以内にあるならば、そのパルス波形を計数に採用可能であると判定するよう構成され、

前記演算部は、同じパルス波形に対して、第1の判定部と第2の判定部が、両方共に計数に採用可能であると判定したときのみ、そのパルス波形を計数に採用するように構成されている、請求項5記載の粒子計数装置。

[請求項7]

演算部が、パルス波形をパルス幅 W について予め選別する第1の予備選別部をさらに有し、

該第1の予備選別部は、全ての判定部よりも先にデータ処理を行うように位置し、予め定められた許容範囲外のパルス幅 W を持ったパルス波形を排除するように構成されている、請求項5または6に記載の粒子計数装置。

[請求項8]

演算部が、パルス波形を最大値 V_p について予め選別する第2の予

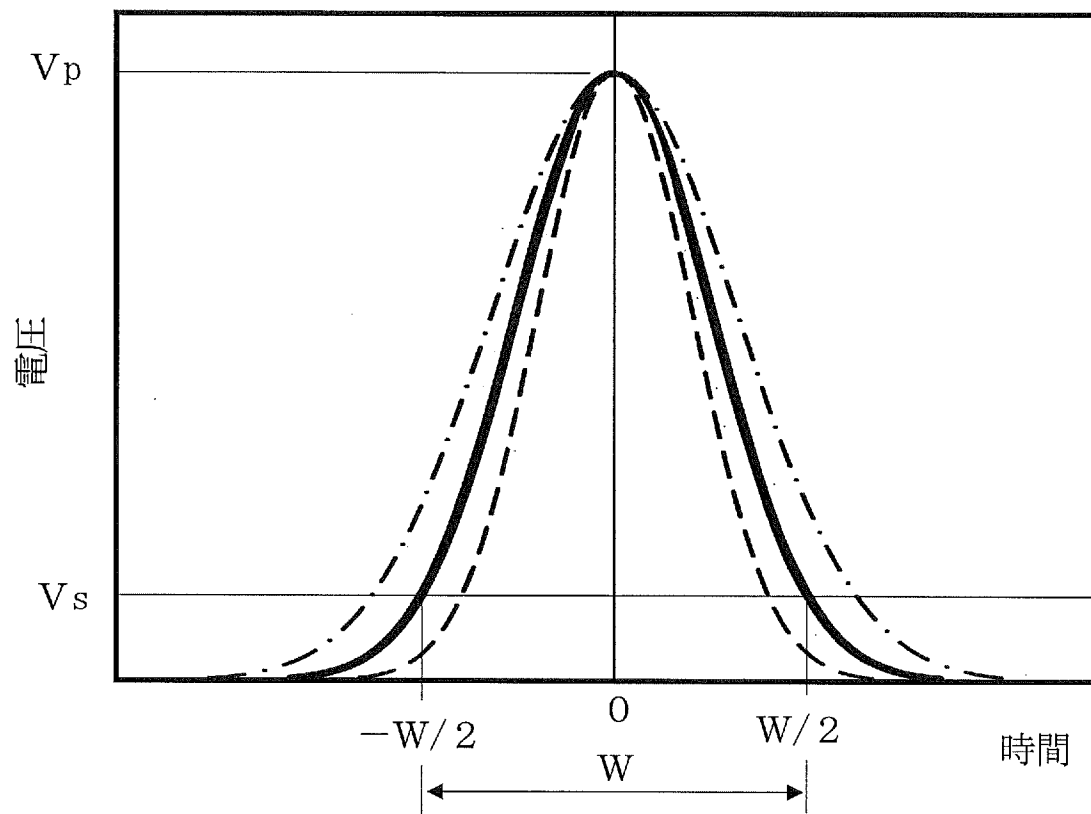
備選別部をさらに有し、

該第2の予備選別部は、全ての判定部よりも先に選別の処理を行うように位置し、かつ、第1の予備選別部によって排除されなかったパルス波形を選別するように位置し、予め定められた下限値以上の最大値 V_p を持ったパルス波形を上記判定部へ送るように構成されており、

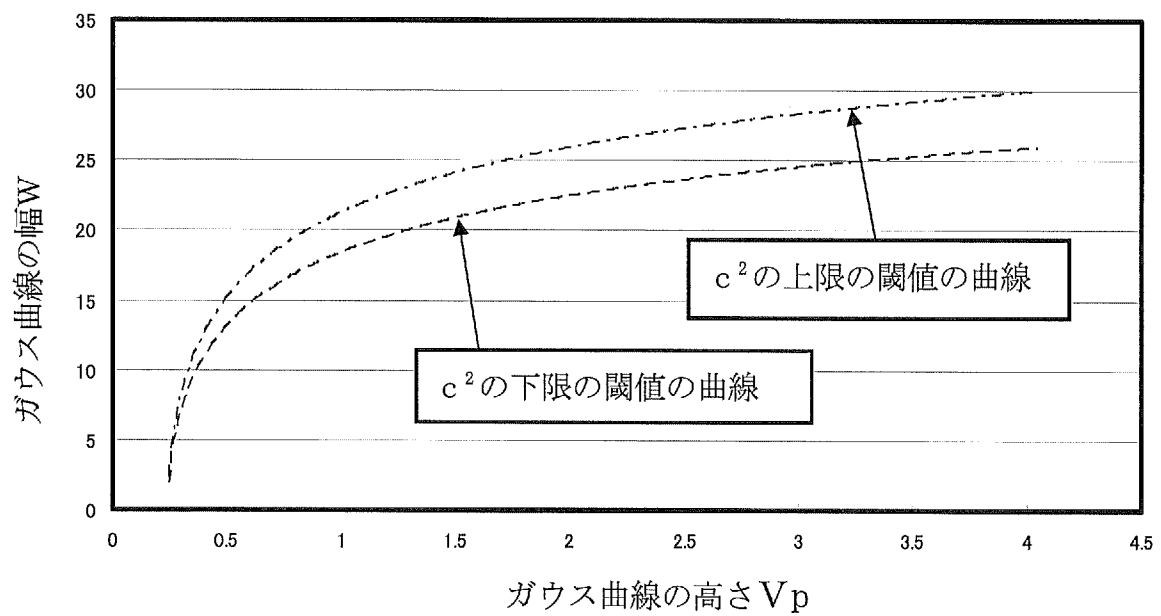
前記演算部は、該下限値未満の最大値 V_p を持ったパルス波形を計数に採用するように構成されている、
請求項7記載の粒子計数装置。

[図1]

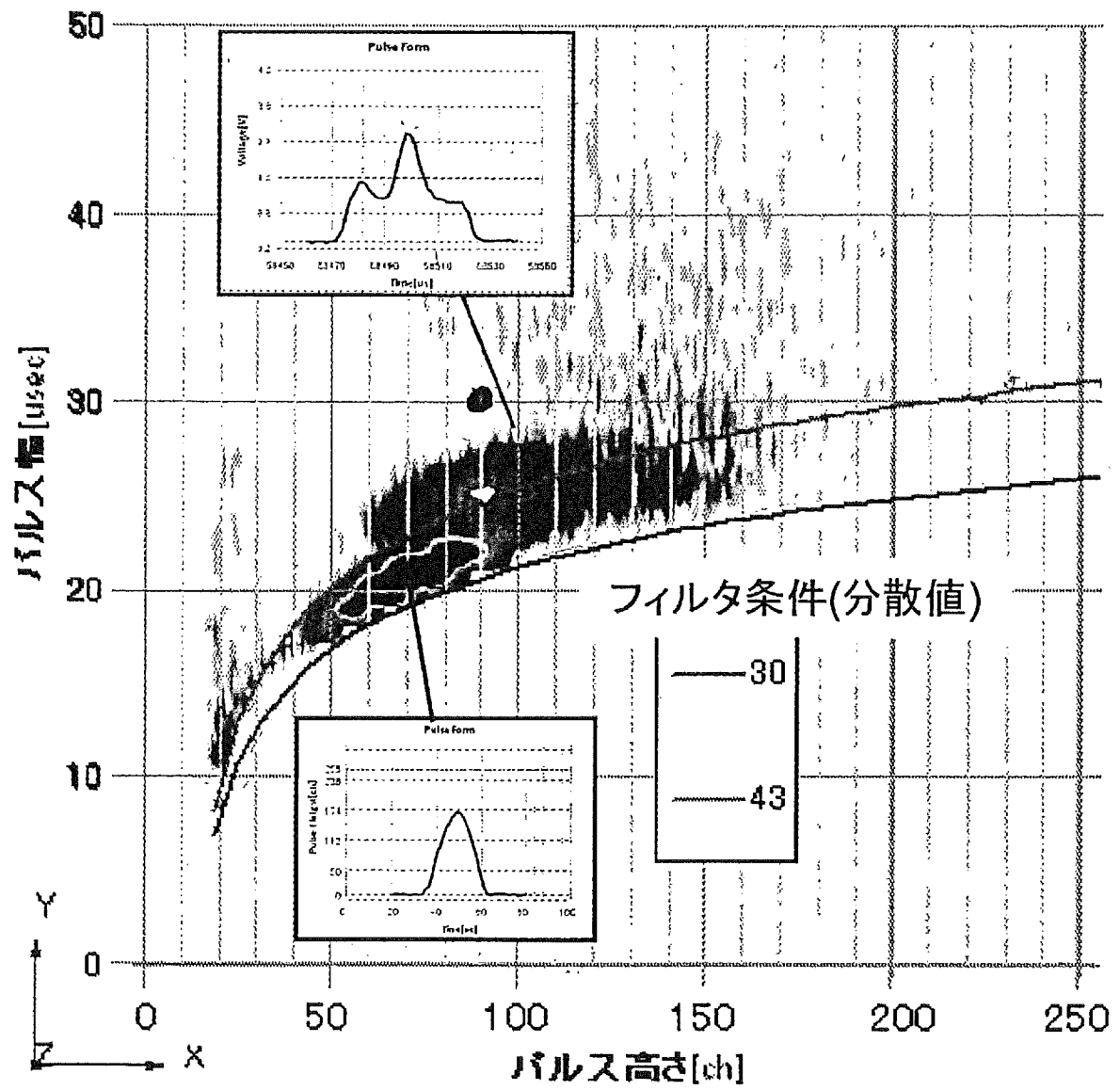
(a)



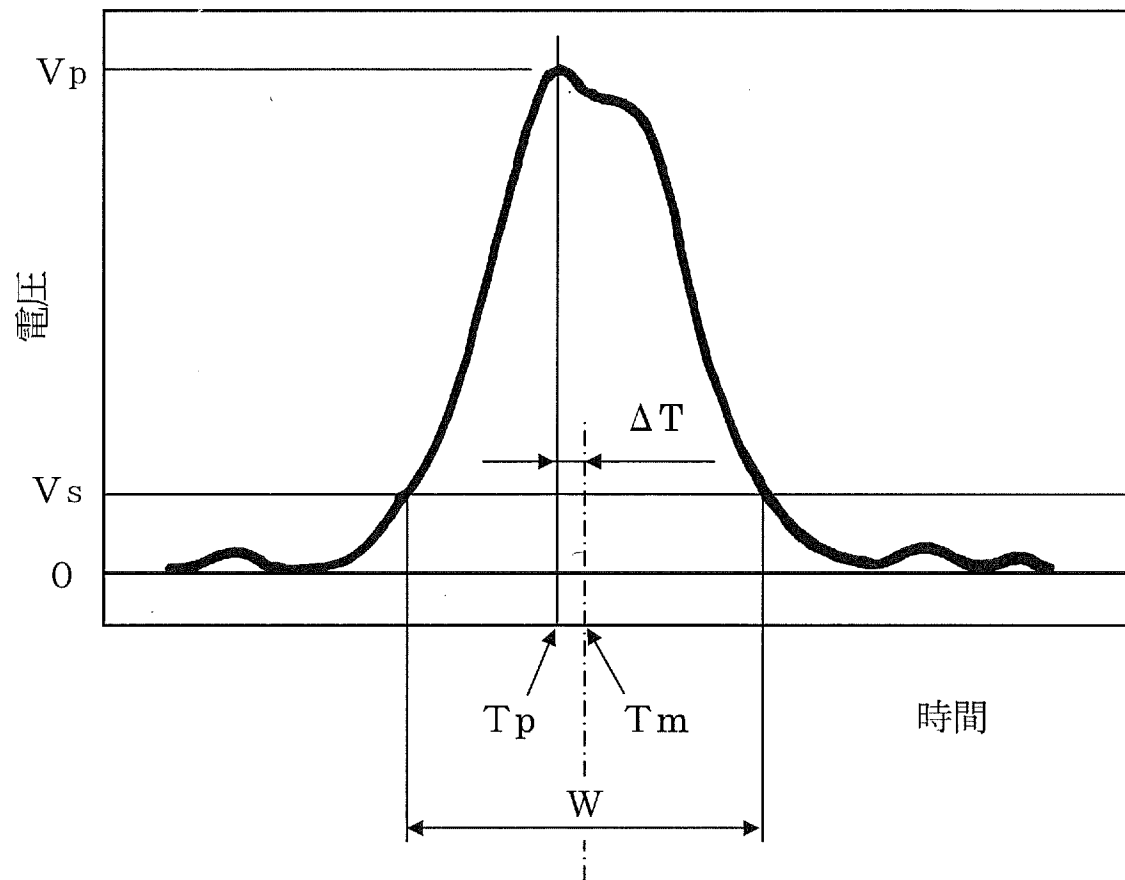
(b)



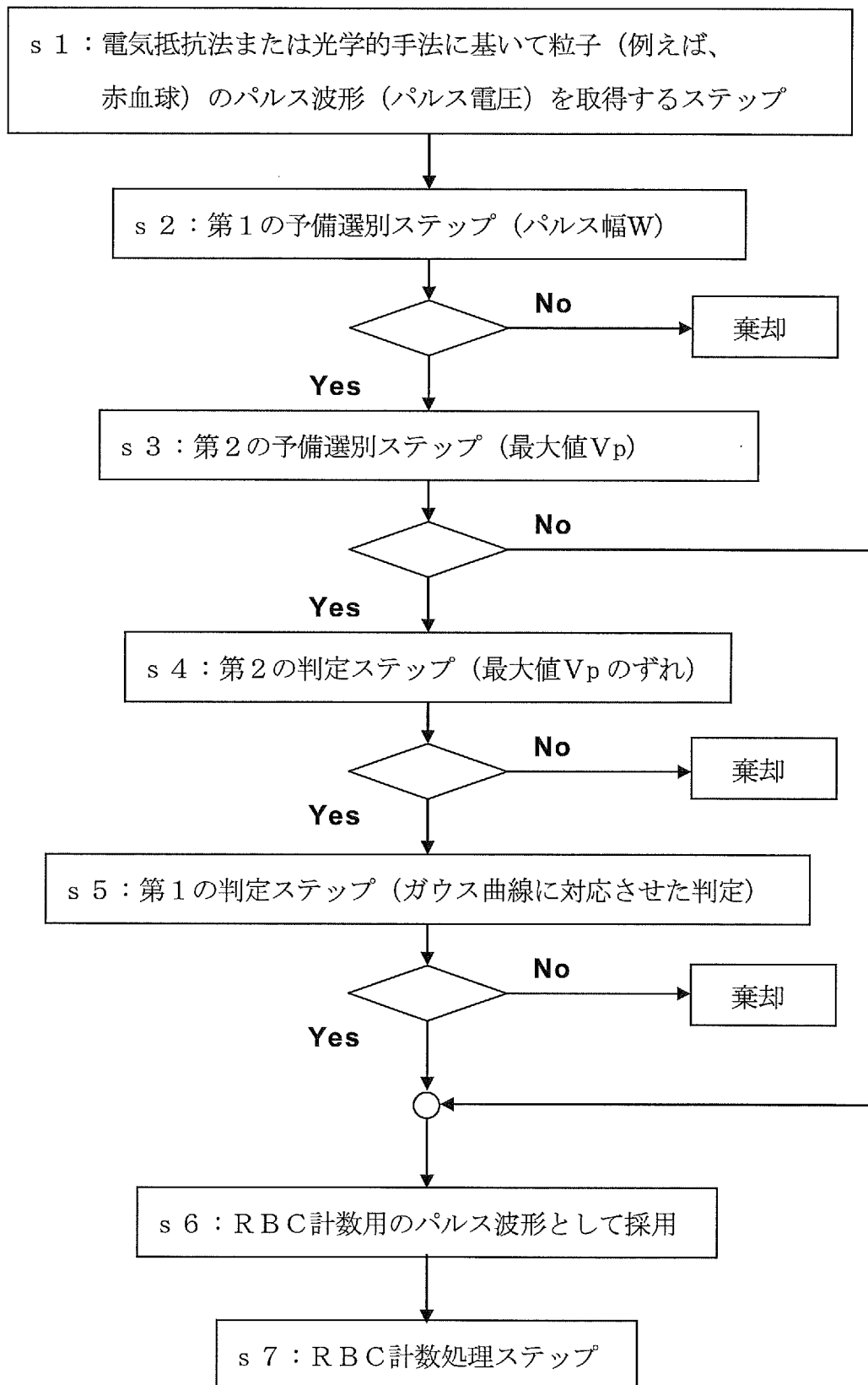
[図2]



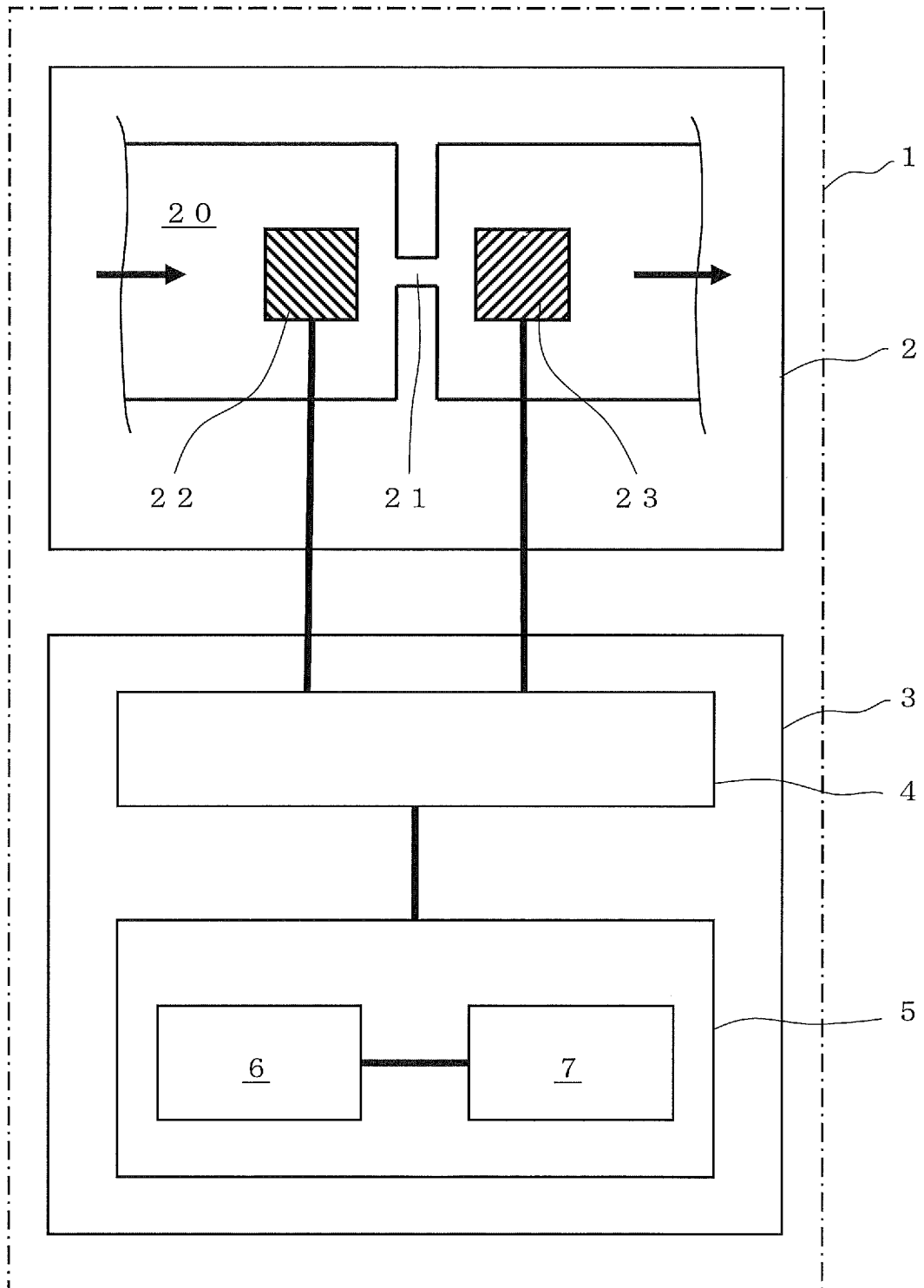
[図3]



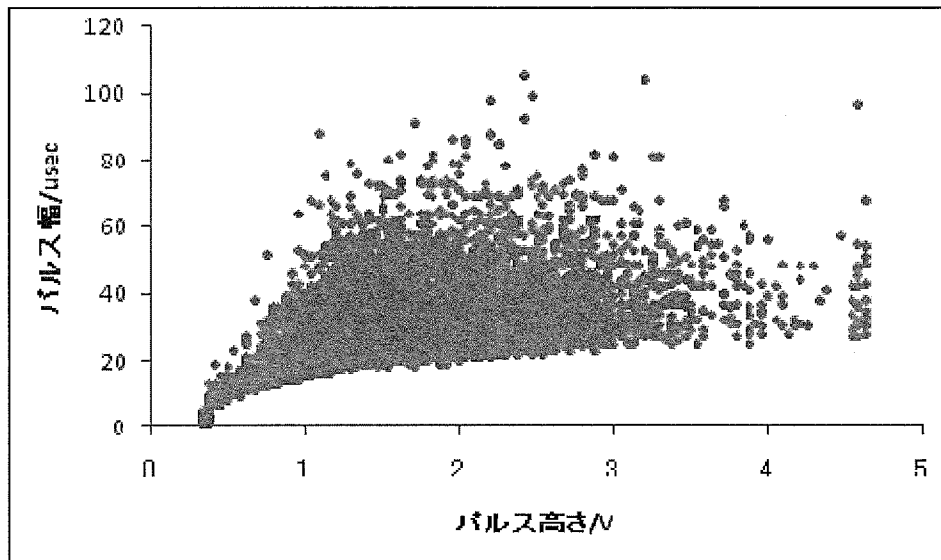
[図4]



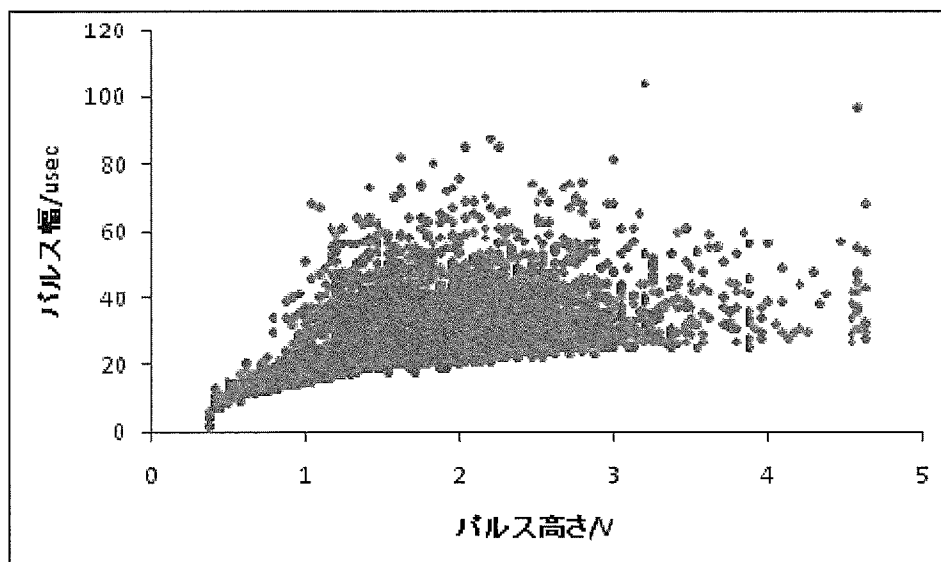
[図5]



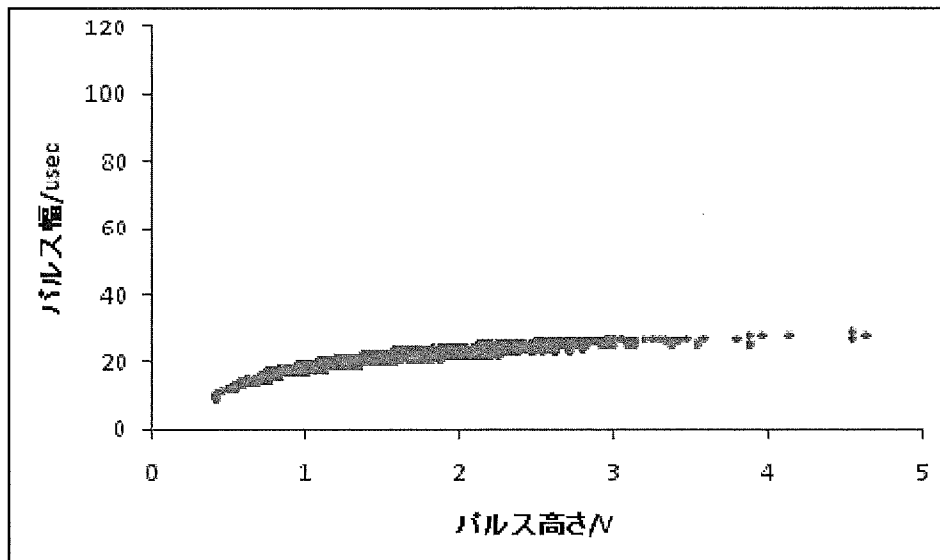
[図6]



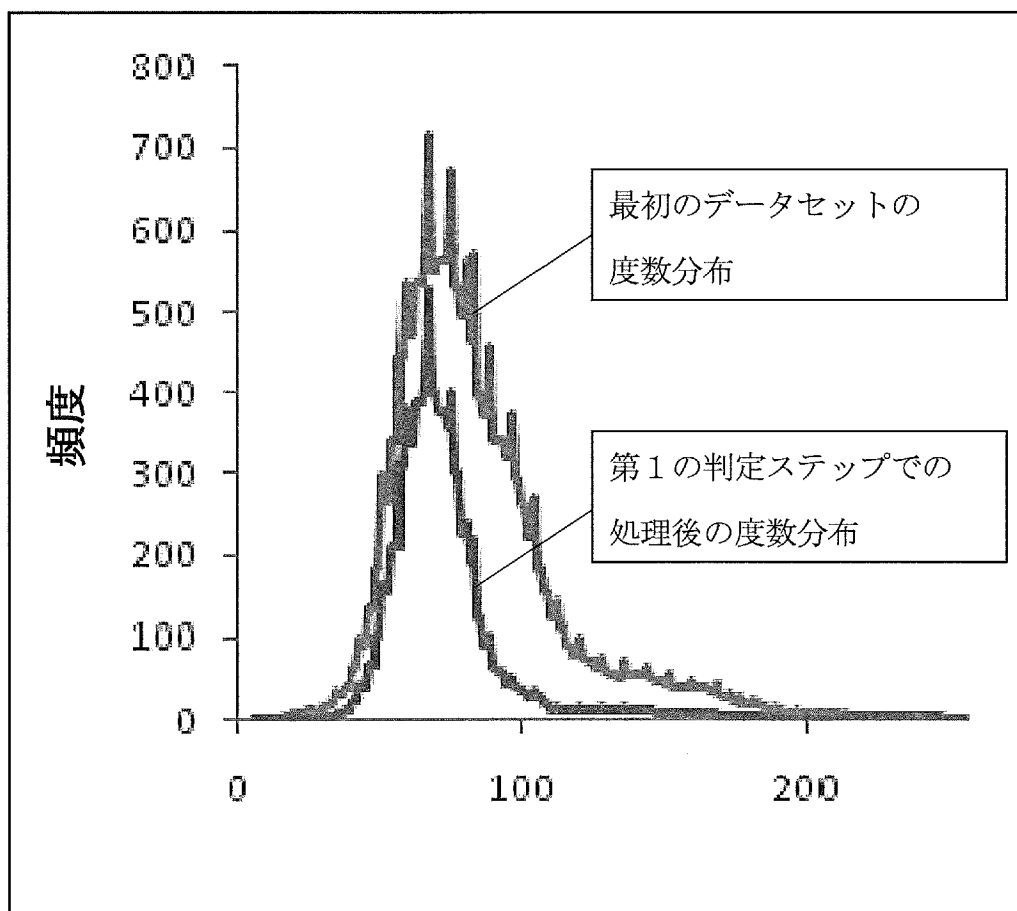
[図7]



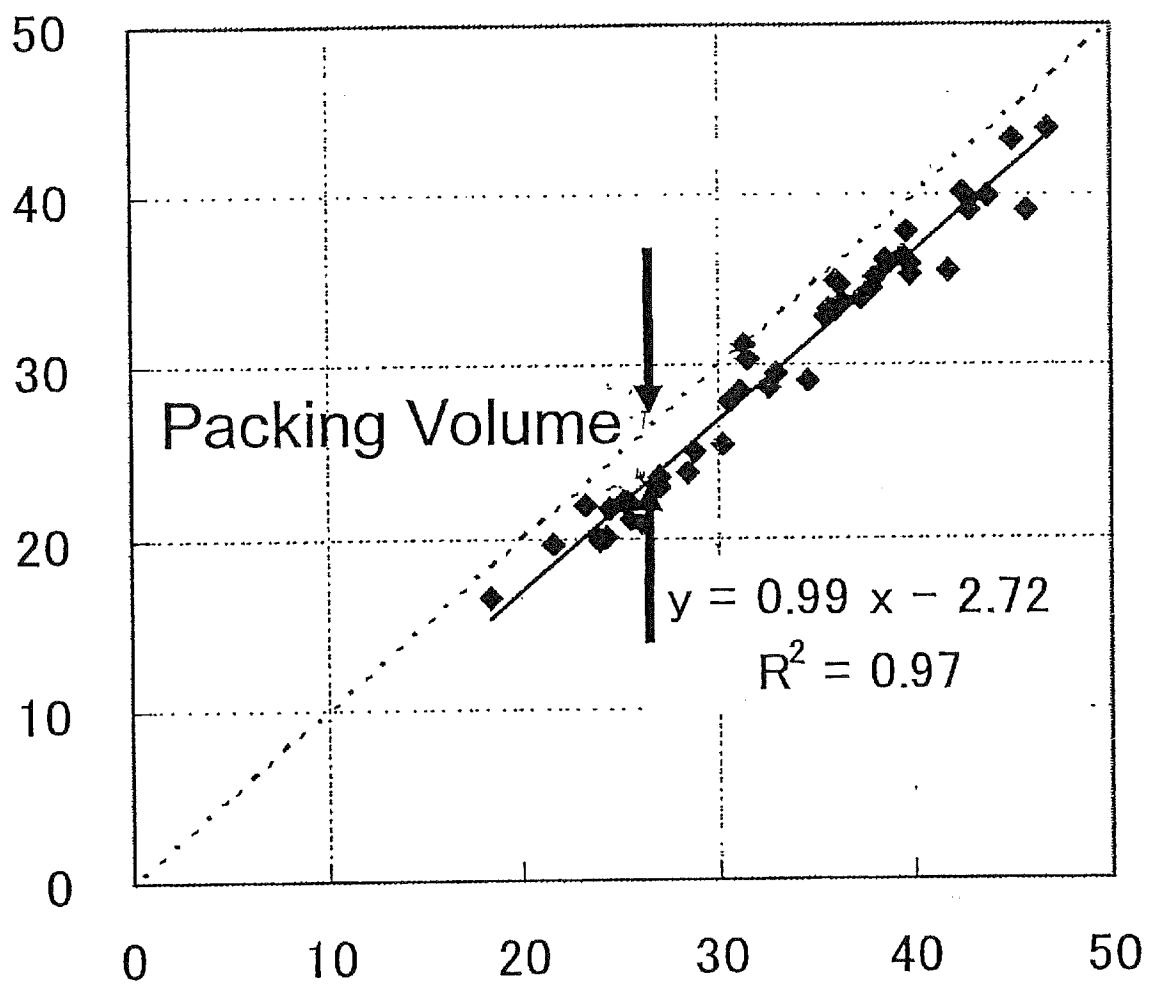
[図8]



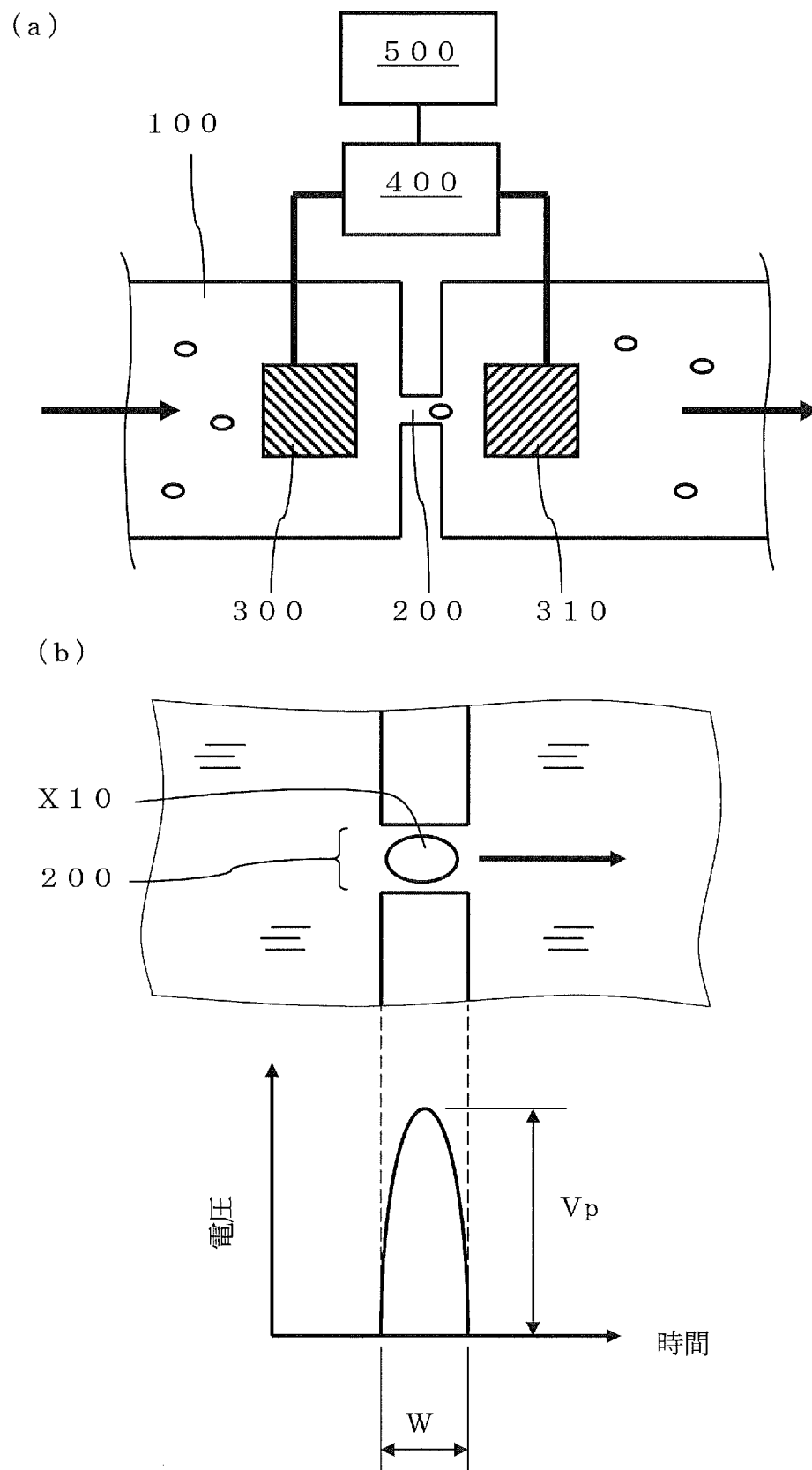
[図9]



[図10]

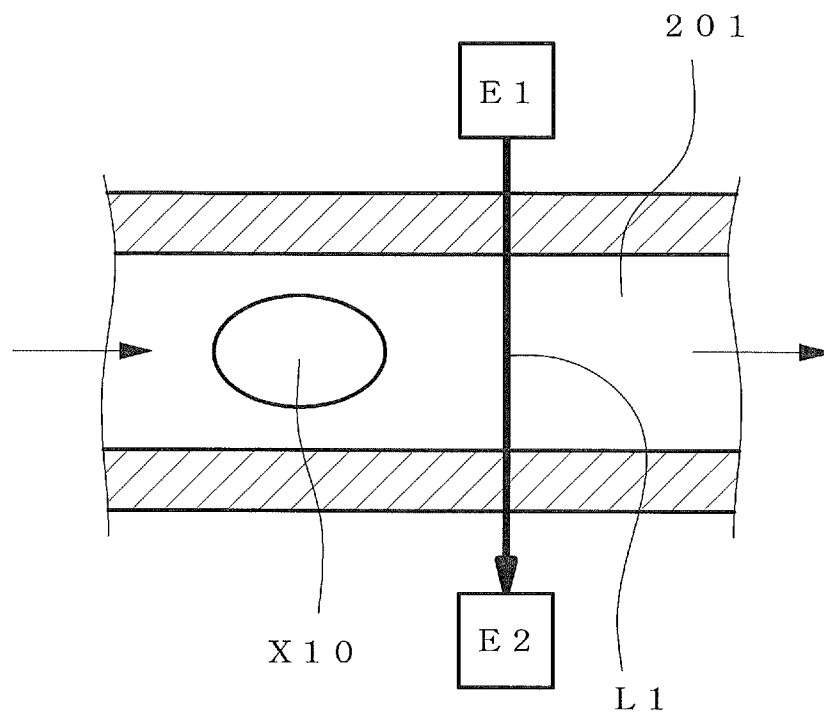


[図11]

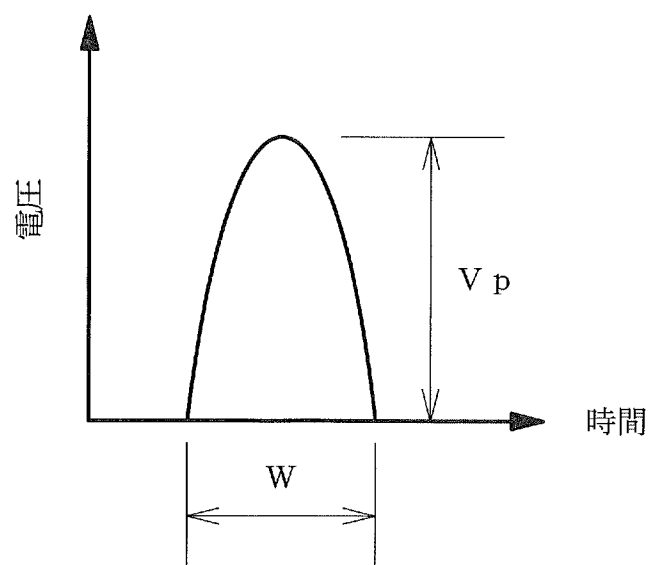


[図12]

(a)

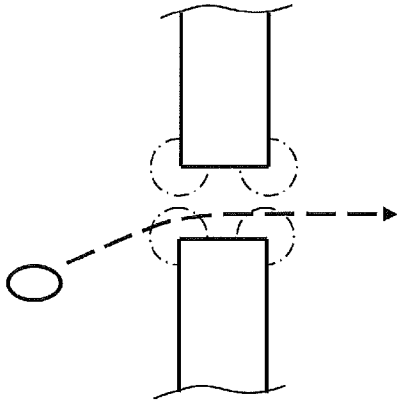


(b)

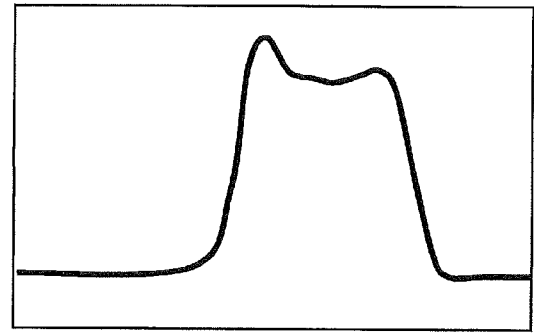


[図13]

(a)

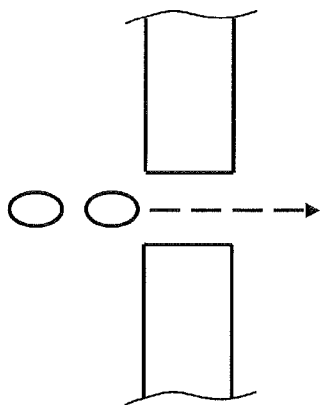


電圧

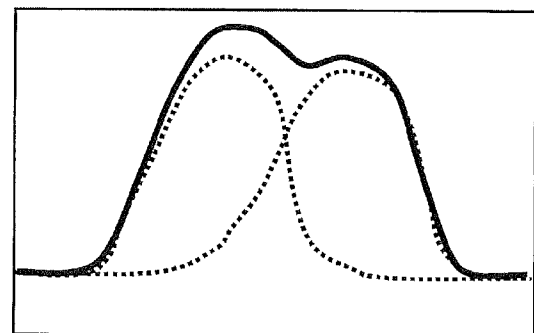


時間

(b)



電圧



時間

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/084488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N15/12(2006.01)i, G01N15/00(2006.01)i, G01N15/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N15/00-15/14, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2008-292448 A (The Furukawa Electric Co., Ltd.), 04 December 2008 (04.12.2008), paragraphs [0004] to [0033]; fig. 1 to 5 (Family: none)	1, 3, 5, 7 2, 4, 6, 8
Y A	WO 2012/032981 A1 (Olympus Corp.), 15 March 2012 (15.03.2012), paragraphs [0052] to [0069] & US 2013/0228705 A1 & EP 2602613 A1 & CN 103097878 A	1, 3, 5, 7 2, 4, 6, 8
A	JP 61-115188 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 02 June 1986 (02.06.1986), entire text; all drawings (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 March 2015 (20.03.15)

Date of mailing of the international search report
31 March 2015 (31.03.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/084488

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 59-171540 A (Fujitsu Ltd.), 28 September 1984 (28.09.1984), entire text; all drawings & US 4545250 A & EP 119844 A2 & DE 3482496 D	1-8
A	US 2008/0079929 A1 (Luo et al.), 03 April 2008 (03.04.2008), entire text; all drawings & CN 101153868 A	1-8
A	US 6542833 B1 (L.Nygaard), 01 April 2003 (01.04.2003), entire text; all drawings & EP 1017989 A & WO 1999/014574 A1 & DE 69839776 D & DK 105397 A & AU 9063098 A & AT 402404 T & ES 2310009 T	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N15/12(2006.01)i, G01N15/00(2006.01)i, G01N15/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N15/00-15/14, G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 2008-292448 A（古河電気工業株式会社）2008.12.04, 段落【0004】－【0033】、第1図－第5図（ファミリーなし）	1, 3, 5, 7 2, 4, 6, 8
Y A	WO 2012/032981 A1（オリンパス株式会社）2012.03.15, 段落【0052】－【0069】 & US 2013/0228705 A1 & EP 2602613 A1 & CN 103097878 A	1, 3, 5, 7 2, 4, 6, 8
A	JP 61-115188 A（東亜医用電子株式会社）1986.06.02, 全文, 全図 （ファミリーなし）	1 - 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 0 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

3 1 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高橋 亨

2 J

4 0 7 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 59-171540 A (富士通株式会社) 1984.09.28, 全文, 全図 & US 4545250 A & EP 119844 A2 & DE 3482496 D	1 - 8
A	US 2008/0079929 A1 (Luo et al.) 2008.04.03, 全文, 全図 & CN 101153868 A	1 - 8
A	US 6542833 B1 (L.Nygaard) 2003.04.01, 全文, 全図 & EP 1017989 A & WO 1999/014574 A1 & DE 69839776 D & DK 105397 A & AU 9063098 A & AT 402404 T & ES 2310009 T	1 - 8