(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
2023年10月5日(05.10.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/189169 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 15/02 (2006.01)　*G01N 21/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2023/007791

(22) 国際出願日：　2023年3月2日(02.03.2023)

(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 2022-058172　2022年3月31日(31.03.2022)　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：立脇　康弘 (**TATEWAKI, Yasuhiro**)；〒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).

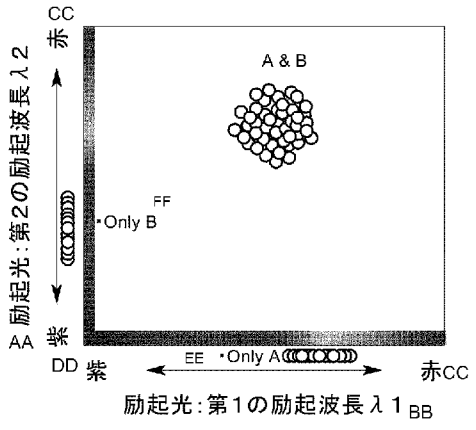
(74) 代理人：西村　竜平，外(**NISHIMURA, Ryuhei** et al.)；〒6008441 京都府京都市下京区四条町３４７番地１ ＣＵＢＥ西烏丸９階 Kyoto (JP).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

(54) **Title:** PARTICLE ANALYZING DEVICE, PARTICLE ANALYSIS METHOD, AND PARTICLE ANALYSIS PROGRAM

(54) 発明の名称：　粒子分析装置、粒子分析方法、及び粒子分析用プログラム



AA Exciting light: Second excitation wavelength λ2
BB Exciting light: First excitation wavelength λ1
CC Red
DD Violet
EE Only A
FF Only B

(57) **Abstract:** In particle analysis employing a PTA method, in order to enable each particle to be analyzed by type while limiting an increase in device size and cost, even if excitation wavelengths of fluorescent markers or particles having autofluorescent properties overlap one another, this particle analyzing device is configured to comprise: a light emitting unit (2) for emitting exciting light onto a sample that emits fluorescence in a plurality of colors; one or a plurality of filters (5) that transmit the fluorescence in the plurality of colors while cutting the exciting light; an imaging unit (3) having a color discrimination capability, for imaging the fluorescence transmitted through the filters (5); and an analyzing unit (43) for analyzing a physical property of the particles contained in the sample by obtaining a diffusion speed, by Brownian motion, of the particles from fluorescence image data obtained by means of the imaging unit (3).

WO 2023/189169 A1

［続葉有］

ZM, ZW), ユーラシア (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, ME, 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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：ＰＴＡ法による粒子の分析において、仮に蛍光マーカ又は自家蛍光の性質を持つ粒子の励起波長が重なっている場合であっても、装置の大型化及び高コスト化を抑えつつ、粒子それぞれを種別ごとに分析できるようにするべく、複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射する光照射部（２）と、励起光をカットしつつ、複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタ（５）と、フィルタ（５）を通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有した撮像部（３）と、撮像部（３）により得られる蛍光の画像データから、サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する分析部（４３）と、を備えるようにした。

明　細　書

発明の名称 ：

粒子分析装置、粒子分析方法、及び粒子分析用プログラム

技術分野

[0001]　本発明は、粒子分析装置、粒子分析方法、及び粒子分析用プログラムに関するものである。

背景技術

[0002]　従来の粒子分析装置としては、粒子軌跡解析法（ＰＴＡ法）と称される測定法を用いたものがある。

[0003]　具体的にこの測定法は、セル内の粒子をＣＣＤカメラ等により撮像し、これにより得られる撮像データに基づいて、粒子のブラウン運動による拡散速度を算出することで粒子径分布等の物性を分析するものである。

[0004]　この種の粒子分析装置において、特許文献１には、複数種類の蛍光マーカを添加したサンプルに対して、それぞれの蛍光マーカに対応した励起波長の励起光を照射するように構成されたものがある。

[0005]　そして、この粒子分析装置は、ＣＣＤカメラの手前に励起光をカットしつつ、蛍光を透過させるフィルタを設けることで、それぞれの蛍光を色ごとに観察できるようにして、各蛍光マーカが添加された粒子それぞれを種別ごとに分析できるようにすることを目的としている。

[0006]　ところで、分析対象の粒子によって添加することのできる蛍光マーカの選択肢には限りがあり、複数種類の粒子を例えば多重染色により分析しようとする際に、異なる種類の蛍光マーカの励起波長が重なってしまうことがある。

[0007]　そうすると、その励起波長の励起光をサンプルに照射した際に、異なる種類の粒子に添加した別々の蛍光マーカそれぞれが蛍光を発することになる。

[0008]　その結果、別々の蛍光マーカからの蛍光それぞれがＣＣＤカメラの白黒画像に現れることになり、それぞれの蛍光がどちらの蛍光マーカに起因するも

のかを判別することができず、結局のところ粒子を種別ごとに分析することができないといった問題が生じる。

[0009] それでも、異なる種類の粒子を種別ごとに分析するための手法としては、別々の蛍光マーカからの蛍光波長それぞれを通すフィルタを複数枚用意するとともに、これらのフィルタを励起波長に合わせて切り替えながら測定する方法もある。

[0010] この方法であれば、異なる種類の蛍光マーカの励起波長が重なっていたとしても、蛍光波長が十分離れていれば、それぞれの蛍光波長を対応するフィルタに通すことで、蛍光マーカを区別することができる。

ところが、この方法は、蛍光マーカに対応するフィルタを用いる蛍光マーカの種類の分だけ準備したうえで、カメラのフレームレートに同期してフィルタを切り替える必要が生じ、光学設計も複雑化してしまう。

[0011] また、これまでは異なる種類の蛍光マーカの励起波長が重なっている場合の問題点を述べてきたが、それぞれの励起波長が重なっていない場合であっても、以下のような問題がある。

[0012] 例えば、互いに異なる励起波長のレーザ光を射出する２つのレーザ光源を用いる場合を考える。

[0013] この場合、サンプルに添加する蛍光マーカとしては、１つ目のレーザ光源からのレーザ光で励起する蛍光マーカＡと、２つ目のレーザ光源からのレーザ光で励起する蛍光マーカＢとが使用可能である。そうすると、種別ごとに分析可能な粒子としては、「蛍光マーカＡのみが添加されている粒子」、「蛍光マーカＢのみが添加されている粒子」、「蛍光マーカＡとＢとの両方が添加されている粒子」、及び「蛍光マーカＡもＢも添加されていない粒子」の４種類となる。

[0014] すなわち、分析可能な粒子の種類の数は、励起用光源の数に応じて限られてしまい、より多くの種類の粒子を分析するためには、それだけ多くのレーザ光源を用いる必要があり、装置の大型化や高コスト化を招く。

[0015] なお、上述した問題は、粒子に蛍光マーカを添加して分析する場合に限ら

ず、自家蛍光の性質を持つ粒子を分析する場合においても共通して生じ得るものである。

先行技術文献

特許文献

[0016] 特許文献1：特開２０２０－２０４６０４号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] そこで、本発明は、上述した問題を一挙に解決するものであり、ＰＴＡ法による粒子の分析において、仮に蛍光マーカ又は自家蛍光の性質を持つ粒子の励起波長が重なっている場合であっても、装置の大型化及び高コスト化を抑えつつ、粒子それぞれを種別ごとに分析できるようにすることを課題するものである。

課題を解決するための手段

[0018] すなわち本発明に係る粒子分析装置は、複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射する光照射部と、前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタと、前記フィルタを通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有した撮像部と、前記撮像部により得られる蛍光の画像データから、前記サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する分析部と、を備えることを特徴とするものである。

[0019] このように構成された粒子分析装置であれば、励起光をカットしつつ、複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタと、このフィルタを通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有する撮像部とを用いているので、仮に複数の色の蛍光の励起波長が重なっていたとしても、それぞれの色を識別することができ、装置の大型化及び高コスト化を抑えつつ、粒子それぞれを種別ごとに分析することが可能となる。

[0020] ここで、蛍光マーカ又は自家蛍光の性質を持つ粒子の励起波長が重なって

いる場合であっても異なる粒子を種別ごとに分析する手法としては、例えば遠心分離などにより粒子を予め種別ごとに分離する方法を挙げることができる。

しかしながら、この方法では、前処理が必要となり、手間や時間がかかるうえ、その処理過程でサンプルとしての性状が変化してしまう可能性すらある。

これに対して、上述した本発明に係る粒子分析装置であれば、仮に複数の色の蛍光の励起波長が重なっていたとしても、それぞれの色を識別することができるので、粒子を種別ごとに分離する前処理を行わずとも、粒子それぞれを種別ごとに分析することが可能となる。

[0021] 励起光をカットしつつ、複数の色の蛍光を透過させるフィルタを１枚のフィルタで実現しようとすると、フィルタの製作コストが高くなる懸念があり、装置が高価なものになる可能性がある。

そこで、装置のコストを安価に抑えるためには、複数枚の前記フィルタにより、前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させることが好ましい。

[0022] 上述したように、本発明に係る粒子分析装置では、撮像部が蛍光の色を識別可能に撮像するので、フィルタに対しては、透過させる蛍光の波長選択性を求める必要はない。

それにもかかわらず、フィルタを透過する蛍光の波長領域が狭いと、蛍光の蛍光波長に応じて、その蛍光を透過させるフィルタに取り換える必要が生じる。

そこで、前記光照射部が、前記サンプルに対して互いに異なる励起波長の励起光を照射するものであり、前記１又は複数枚のフィルタが、最も短い前記励起波長よりも長波長領域において、カットする波長領域よりも透過させる波長領域の方が広くなるように構成されていることが好ましい。

このような構成であれば、１又は複数枚のフィルタを種々の色の蛍光が透過するので、種々の色の蛍光に対して同じフィルタを用いることができ、部

品点数の削減や低コスト化を図れる。

[0023] 色の識別能力を有する撮像部としては、例えば、ある色の蛍光を透過させるフィルタとＣＣＤカメラとの組み合わせを複数組設ける構成も考えられるが、光学設計をよりシンプルにするためには、前記撮像部が、カラーＣＣＤを有することが好ましい。

[0024] 前記光照射部が、前記複数の色の蛍光を発生させるための励起波長の前記励起光を順番に切り替えて前記サンプルに照射することが好ましい。

これならば、蛍光マーカが添加された粒子それぞれを種別ごとに精度良く分析することができる。

[0025] 前記撮像部により得られる蛍光の前記画像データから、蛍光を発している粒子を特定する粒子特定部と、前記粒子特定部により特定された粒子が発する蛍光に関する蛍光情報を特定する蛍光特定部と、を備え、前記分析部が、前記蛍光特定部により特定された前記蛍光情報ごとに粒子の物性を分析することが好ましい。

これならば、蛍光情報ごとに、すなわち粒子の種別ごとに物性を分析することができる。

[0026] 前記蛍光特定部の具体的な実施態様としては、前記撮像部からの出力値を変換した色相を前記蛍光情報として特定するものを挙げることができる。

[0027] 一方の軸が前記蛍光情報に設定され、他方の軸が粒子の物性に設定されたグラフを表示するとともに、当該グラフに粒子それぞれを示すプロットを表示する表示部を備えることが好ましい。

これならば、ある蛍光マーカが添加されている粒子のサイズ等の物性のばらつきを一見して把握することができる。

[0028] 一方の軸が前記サンプルに第１の励起波長の励起光を照射して得られる前記蛍光情報に設定され、他方の軸が前記サンプルに第２の励起波長の励起光を照射して得られる前記蛍光情報に設定されたグラフを表示するとともに、当該グラフに粒子それぞれを示すプロットを表示する表示部を備えることが好ましい。

これならば、サンプルに含まれる種々の粒子それぞれの蛍光情報を視認性良く表示させることができる。

[0029] 前記表示部が、前記プロットそれぞれを選択可能に表示するとともに、１又は複数の前記プロットが選択された場合に、それらのプロットが示す粒子に対する前記分析部の分析結果を表示することが好ましい。

これならば、確認したい粒子の分析結果を簡単に表示させることができ、操作性の向上を図れる。

[0030] 前記表示部が、１又は複数の前記プロットが選択された場合に、それらのプロットが示す粒子を前記画像データの中から切り取った拡大画像を表示することが好ましい。

これならば、拡大画像を確認することにより、そこに写る粒子の大きさや蛍光の色などが例えば想定される範囲内であるか否かなどを確認することができる。

[0031] 前記蛍光特定部の具体的な実施態様としては、前記画像データに含まれる１つの粒子を表す複数の画素の色情報を平均化したものを、当該粒子に添加されている蛍光マーカの前記蛍光情報として算出する態様を挙げることができる。

[0032] 上述した実施態様において、観察される蛍光が明るい場合など、画像データに含まれる１つの粒子を表す画素のうち中心部は白飛びする場合がある。

そこで、より正確な蛍光情報を取得できるようにするためには、平均化される色情報が、前記１つの粒子を表す複数の画素のうち少なくとも中心部に位置する画素を除く画素のものであることが好ましい。

[0033] 前記サンプルに含まれる粒子の少なくとも１種類は、複数種類の蛍光マーカが添加されるものであることが好ましい。

これならば、本発明に係る粒子分析装置が多重染色法に資するものとなる。

[0034] また、本発明に係る粒子分析方法は、複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射し、１又は複数枚のフィルタを用いて、前記励起光をカ

ットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させ、色の識別能力を有した撮像部により、前記フィルタを通過した蛍光を撮像し、前記撮像部により得られる蛍光の画像データから、前記サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する方法である。

[0035] さらに、本発明に係る粒子分析用プログラムは、複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射する光照射部と、前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタと、前記フィルタを通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有した撮像部と、を備える粒子分析装置に用いられるプログラムであり、前記撮像部により得られる蛍光の画像データから、前記サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する分析部としての機能をコンピュータに発揮させることを特徴とするものである。

[0036] このような粒子分析方法及び粒子分析用プログラムによれば、上述した粒子分析装置と同様の作用効果を奏し得る。

発明の効果

[0037] 以上に述べた本発明によれば、ＰＴＡ法による粒子の分析において、粒子を種別ごとに分離する前処理を必要とすることなく、なおかつ、装置の大型化及び高コスト化を抑えつつ、粒子それぞれを種別ごとに分析することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0038] [図1]本発明の一実施形態に係る粒子分析装置を示す模式図。

[図2]同実施形態に用いられる蛍光マーカの一例を示す表。

[図3]同実施形態におけるフィルタ群の透過率を示すグラフ。

[図4]同実施形態の情報処理装置の機能を示す機能ブロック図。

[図5]同実施形態の蛍光マーカが添加されている粒子を説明するための模式図。

[図6]同実施形態の蛍光マーカが添加されている粒子を説明するための模式図。

[図7]同実施形態の表示部により表示される内容の一例を示す模式図。

[図8]同実施形態の表示部により表示される内容の一例を示す模式図。

[図9]その他の実施形態の分析情報格納部に格納されている情報の一例を示す表。

発明を実施するための形態

[0039] 以下、本発明に係る粒子分析装置の一実施形態について、図面を参照しながら説明する。

[0040] ＜装置構成＞

本実施形態の粒子分析装置１００は、図１に示すように、セル１内のサンプルに含まれる粒子の物性を分析するものであり、例えば血液や尿等の体液試料に含まれるエクソソーム、又は、ワクチンに関するウイルス様粒子、リポソーム、或いはタンパク質などを分析するものである。

[0041] この粒子分析装置１００は、粒子に複数種類の蛍光マーカを添加してなるサンプルに光を照射し、それらの蛍光マーカが添加されている粒子からの蛍光を検出して、粒子の物性を分析するものであり、多重染色法とともに用いられるものである。

[0042] ただし、本粒子分析装置１００を用いた分析において、例えばサンプルに含まれる粒子が自家蛍光を性質に持つものなど、粒子自身が蛍光発光する場合であれば、必ずしも蛍光マーカを用いる必要はない。かかる粒子としては、例えば蛍光ビーズなどの無機材料を挙げることができる。

[0043] 本実施形態では、図２に示すように、３種類の蛍光マーカを用いており、具体的には、同図２における第２の蛍光マーカ及び第３の蛍光マーカのように、励起波長が重なっている異なる種類の蛍光マーカを用いる場合を想定している。ただし、用いる蛍光マーカそれぞれの励起波長が重なり合わない場合であっても、本粒子分析装置１００による分析が可能であることはいうまでもない。

[0044] なお、図２においては、説明の便宜上、蛍光マーカが蛍光を発している状態を「10」と表しており、第２の蛍光マーカ及び第３の蛍光マーカの両方が

添加されている場合は、それぞれの蛍光マーカが発する蛍光（図２における赤色の蛍光）が足し合わされた状態を「20」と表している。

[0045] さらに付言しておくと、第２の蛍光マーカが発する蛍光は緑と赤が足し合わされた黄色であり、第３の蛍光マーカが発する蛍光は赤色であり、第２の蛍光マーカ及び第３の蛍光マーカの両方が添加されていると、その粒子は黄色と赤色とが混ざり合った橙色の蛍光を発する。

[0046] 具体的にこの粒子分析装置１００は、図１に示すように、複数種類の蛍光マーカそれぞれを励起させる励起光を照射する光照射部２と、複数種類の蛍光マーカそれぞれからの蛍光を検出することで粒子を撮像する撮像部３と、撮像部３により得られた撮像データを用いて粒子の物性を分析する情報処理装置４とを備える。

[0047] 光照射部２は、複数種類の蛍光マーカを励起させる励起波長の光を照射する複数の光源２１、２２、２３を有している。光源２１、２２、２３は、例えばレーザ光源である。本実施形態は、３種類の蛍光マーカを用いていることから、３つの光源２１、２２、２３を有している。なお、１つの光源において、３つの励起波長を含む光を照射するものであっても良い。また、光源の数は、使用している蛍光マーカの種類の数に応じて適宜変更して構わない。

[0048] 第１の光源２１は、第１の蛍光マーカの励起波長λ１の励起光（例えば、青色の光）を照射するものであり、第２の光源２２は、第２の蛍光マーカの励起波長λ２の励起光（例えば、緑色の光）を照射するものであり、第３の光源２３は、第３の蛍光マーカの励起波長λ３の励起光（例えば、赤色の光）を照射するものである。ここで、励起波長λ１、λ２、λ３は、３種類の蛍光マーカがそれぞれ発する蛍光の蛍光波長λ１’、λ２’、λ３’とは異なる。また、これら各光源２１、２２、２３から射出された光は、反射ミラ２４１、２４２、ハーフミラ２４３、２４４、集光レンズ２４５等の照射光学系２４を介して、セル１に導光される。

[0049] これらの光源２１、２２、２３は、図示しない制御部によって、各蛍光マ

ーカに対応する励起波長λ１、λ２、λ３の光を順番に照射するように制御されている。なお、これらの光源２１、２２、２３は、同時に光を照射するように制御することもできる。

[0050] 撮像部３は、蛍光マーカが発する蛍光を検出することで、その蛍光マーカが添加されている粒子を撮像するものであり、撮像データとして例えば画像データを出力する。この撮像部３は、色の識別能力を有するものであり、この実施形態ではカラーＣＣＤを有する撮像カメラである。なお、図１では、光照射部２の光照射方向と撮像部３の撮像方向とが互いに直交して設けられているが、これに限られない。

[0051] ここで、セル１内の粒子に励起光を照射すると、その励起光が粒子により散乱して、その散乱光が撮像部３により検出されてしまうと、上述した蛍光の検出を阻害してしまう。

[0052] そこで、励起光の散乱光が撮像部３で検出されないようにするべく、粒子分析装置１００は、図１及び３に示すように、各光源２１、２２、２３からの励起光それぞれをカットしつつ、上述した複数種類の蛍光マーカが発する複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタ５を備えている。

[0053] 本実施形態では、複数枚のフィルタが重ねられてなるフィルタ群５（以下、バンドストップフィルタ５という）が、セル１と撮像部３との間に設けられている。これにより、撮像部３は、励起光が検出されない状態において、バンドストップフィルタ５を通過した蛍光を検出する。

[0054] バンドストップフィルタ５は、図３に示すように、複数の光源２１、２２、２３からの励起光のうち最も短い励起波長λ１よりも長波長領域において、カットする波長領域よりも透過させる波長領域の方が広くなるように構成されている。なお、ここでは、励起光のうち最も短い励起波長λ１よりも短波長領域の光は全てカットされるが、この短波長領域における透過率は適宜変更して構わない。

[0055] 具体的にバンドストップフィルタ５は、少なくとも複数枚のノッチフィルタを重ね合わせたものであり、最も短い励起波長λ１よりも長波長領域を透

過させる第１フィルタと、次に短い励起波長λ２をカットする第２フィルタと、最も長い励起波長λ３をカットする第３フィルタとを重ねてなるものである。

[0056] これにより、バンドストップフィルタ５は、図３に示すように、少なくとも励起波長λ１、λ２、λ３をカットしつつ、種々の波長（種々の色）の蛍光を透過させるものとなる。

[0057] 情報処理装置４は、ＣＰＵ、メモリ、ディスプレイ、各種入出力機器等を備えたコンピュータであり、撮像部３と有線又は無線でつながれている。

[0058] この情報処理装置４は、前記メモリに格納されている粒子分析用プログラムが実行されることにより、図４に示すように、粒子特定部４１、蛍光特定部４２、分析部４３、及び表示部４４としての機能を備えている。

[0059] 以下、本実施形態の粒子分析装置１００の動作の説明を兼ねて、情報処理装置４の各部の機能を説明する。

[0060] まず、セル１内のサンプルに複数種類の蛍光マーカを添加することにより、サンプルに含まれる測定対象たる粒子を多重染色する。なお、蛍光マーカを添加する前にサンプルを撹拌する工程を設けても良い。

[0061] 次に、光照射部２からセル１内のサンプルに、複数種類の蛍光マーカそれぞれに対応する励起波長λ１、λ２、λ３の励起光を照射するとともに、これにより生じる蛍光を撮像部３により撮像する。

[0062] 本実施形態では、上述したように、励起波長λ１、λ２、λ３の励起光を順番に照射する。そして、この励起光の切替タイミングと撮像部３のフレーム長さとを適宜設定することにより、ここでは図５に示すように、撮像部３により得られる画像データのうち、１フレーム目を第１の励起波長λ１の励起光を照射して得られるもの、２フレーム目を第２の励起波長λ２の励起光を照射して得られるもの、３フレーム目を第３の励起波長λ３の励起光を照射して得られるものとなるようにしてある。

[0063] 言い換えれば、３×（Ｎ－１）＋１フレーム目を第１の励起波長λ１の励起光を照射して得られるもの、３×（Ｎ－１）＋２フレーム目を第２の励起

波長λ２の励起光を照射して得られるもの、３×（Ｎ－１）＋３フレーム目を第３の励起波長λ３の励起光を照射して得られるものとなるようにしてある。なお、Ｎは自然数である。

[0064] ただし、励起光の切替タイミングや撮像部３のフレームの長さは上述した態様に限定されるものではなく、例えば複数フレームからなる第１群の画像データが、第１の励起波長λ１の励起光を照射して得られるもの、それに続く複数フレームからなる第２群の画像データが、第２の励起波長λ２の励起光を照射して得られるもの、それにさらに続く複数フレームからなる第３群の画像データが、第３の励起波長λ３の励起光を照射して得られるものとなるようにしても良い。

[0065] 以下では説明の便宜上、図５に示すように、連続する３フレームの画像データには、第１の蛍光マーカＡのみが添加された粒子、第２の蛍光マーカＢのみが添加された粒子、及び第１の蛍光マーカＡと第２の蛍光マーカＢとが添加された粒子が、写され得る状態を取り上げる。

[0066] なお、図５において、粒子が各フレーム間で静止しているかのように記載されているが、実際のところは、第１の励起波長λ１の励起光、第２の励起波長λ２の励起光、及び第３の励起波長λ３の励起光それぞれを照射する時間は、撮像部３が１フレームの画像データを取得する時間であり、ごく僅かな時間であることから、この間における粒子の動きも僅かである。

[0067] また、同図５においては、第１の蛍光マーカＡは、第１の励起波長の励起光が照射されることにより蛍光を発し、第２の蛍光マーカＢは、第２の励起波長の励起光が照射されることにより蛍光を発するものとする。

[0068] 上述したように、サンプルに励起波長λ１、λ２、λ３の励起光が順番に照射されると、粒子特定部４１が、撮像部３により得られる蛍光の画像データから、蛍光を発している粒子、言い換えれば、蛍光マーカが添加されている粒子を特定する。

[0069] この粒子特定部４１は、複数フレームの画像データを用いて、それらの画像データに写されている粒子の位置、大きさ、又は範囲を特定するものであ

る。具体的に粒子特定部４１は、画像データを画像処理することにより、蛍光を発している蛍光マーカが添加されている粒子と、それ以外の領域とを区別して、粒子の位置等を特定する。

[0070] 図５においては、粒子特定部４１が、１フレーム目の画像データから第１の蛍光マーカＡが添加されている粒子を特定し、２フレーム目の画像データから第２の蛍光マーカＢが添加されている粒子を特定する。一方、３フレーム目の画像データには、蛍光を発している蛍光マーカが撮像されておらず、粒子特定部４１により特定される粒子は無い。

[0071] ここで、一見すると図５に示す３フレームの画像データを見比べれば、第１の蛍光マーカＡのみが添加された粒子、第２の蛍光マーカＢのみが添加された粒子、及び第１の蛍光マーカＡと第２の蛍光マーカＢとが添加された粒子それぞれを種別できると考えられる。

[0072] しかしながら、第１の蛍光マーカＡ及び第２の蛍光マーカＢの種類によっては、必ずしも図５に示す発光状態になるとは限らず、例えば蛍光マーカＡの励起波長と、蛍光マーカＢの励起波長とが重なっている場合には、図６に示すように、同じフレームに別々の蛍光マーカからの蛍光が写される発光状態も有り得る。この場合、画像データが仮にモノクロであると、粒子それぞれを種別することができない。

[0073] そこで、蛍光特定部４２が、上述した撮像部３の色の識別能力を利用して、粒子特定部４１により特定された粒子に添加されている蛍光マーカの蛍光に関する情報である蛍光情報を特定する。なお、この蛍光情報は、蛍光の色に関する色情報であっても良いし、その色情報に基づき特定される情報（例えば、蛍光マーカの種類）などであっても良い。また、粒子に添加されている蛍光マーカの量の情報を得るべく、蛍光情報に蛍光の強度が含まれていても良い。

[0074] 本実施形態の蛍光特定部４２は、撮像部３のカラーＣＣＤからの出力値を取得するとともに、画像データに写されている蛍光の色（色相）を、例えばＲＧＢやＨＳＶを用いて所定の算出式等に基づいて数値化し、その数値を蛍

光マーカの蛍光情報として得る。なお、数値化された色相としては、例えば色空間などにより表される色相角度などを挙げることができる。また、蛍光情報としては、蛍光の明度又は彩度を数値化したものが含まれていても良い。

[0075] 粒子特定部４１により特定された粒子の１つに着目すると、蛍光特定部４２は、画像データに含まれる前記１つの粒子を表す複数の画素の色情報を平均化したものを、当該粒子に添加されている蛍光マーカの蛍光情報とする。

[0076] より具体的に説明すると、蛍光特定部４２は、１つの粒子を表す複数の画素それぞれの色相を数値化したものを合計して、その合計値を画素数で割ることにより、その１つの粒子の蛍光情報を算出するものであっても良い。

[0077] また、別の態様として、蛍光特定部４２は、１つの粒子を表す複数の画素それぞれに対応するカラーＣＣＤの出力値を合計して、その合計値を画素数で割ることにより、その出力値の平均値を算出し、その平均値により数値化される色相を蛍光情報として算出するものであっても良い。

[0078] ところで、撮像部３により撮像される蛍光が明るい場合など、画像データに含まれる１つの粒子を表す画素のうち中心部が白飛びする場合がある。この場合、中心部の画素の色情報を用いて蛍光情報を算出すると、蛍光情報の信頼性の低下が懸念される。

[0079] そこで、蛍光特定部４２としては、蛍光情報をより信頼性の高い情報にするべく、１つの粒子を表す複数の画素のうち少なくとも中心部に位置する画素を除く画素の色情報を平均化して蛍光情報を取得するように構成されていても良い。

[0080] ここで、本実施形態の情報処理装置４としては、蛍光マーカの発する蛍光の色相と、その蛍光マーカの種類とを結び付けたマーカデータを格納するマーカデータ格納部をさらに備えていても良い。

[0081] かかる構成において、蛍光特定部４２は、画像データから得られた蛍光の色相と、マーカデータ格納部に格納されているマーカデータとに基づいて、粒子特定部４１により特定された粒子に添加されている蛍光マーカの種類を

蛍光情報として特定するように構成されていても良い。

[0082] このように蛍光情報を特定することにより、仮に互いに異なる蛍光マーカの励起波長が重なっており、同じフレームに別々の蛍光マーカからの蛍光が写されるとしても、それぞれの蛍光の蛍光情報、すなわちそれぞれの蛍光マーカが発する蛍光の色相、又は、それぞれの蛍光マーカの種類を判別することができる。

[0083] 分析部４３は、撮像部３から撮像データを取得するとともに、この撮像データに基づいて粒子の物性を分析するものであり、具体的には、蛍光特定部４２により特定された蛍光情報ごとに、その蛍光情報の蛍光マーカが添加されている粒子の物性を分析する。すなわち、分析部４３は、サンプルに含まれる粒子の物性を、粒子の種類ごとに切り分けて分析するものである。

[0084] ここでの分析部４３は、ＰＴＡ法により粒子径分布を算出するものであり、より具体的には、撮像データに基づいて、粒子のブラウン運動による拡散速度を算出することにより粒子径分布を算出するものである。なお、分析部４３としては、必ずしも粒子径分布を算出する必要はなく、例えば粒子の粒子径を物性として算出するものであっても良い。

[0085] 表示部４４は、分析部４３の分析結果をディスプレイＤ等に表示するものであり、具体的には粒子の粒子径分布又は粒子径などを、例えば蛍光マーカの蛍光情報ごとに識別可能に表示する。

[0086] 表示部４４の具体的な実施態様としては、図７に示すように、一方の軸が蛍光情報に設定され、他方の軸が粒子の物性に設定されたグラフを表示し、そのグラフに粒子それぞれを示すプロットを表示する態様を挙げることができる。

[0087] この実施態様では、一方の軸が、蛍光情報たる蛍光の色情報をカラースケールによる色のグラデーションで表現したものであり、他方の軸が、粒子のサイズ（粒子径）を示すものである。なお、他方の軸は、粒子数であっても良い。

[0088] ここでは、複数種類の蛍光マーカを用いており、それぞれの蛍光マーカに

対応する励起波長λ１、λ２、λ３の励起光ごとに粒子の物性を分析することができるので、本実施形態の表示部４４は、第１の励起波長λ１を照射して得られる第１の分析結果を示すグラフと、第２の励起波長λ２を照射して得られる第２の分析結果を示すグラフと、第３の励起波長λ３を照射して得られる第３の分析結果を示すグラフとを、例えば比較可能に同一画面に表示する。なお、表示部４４としては、それぞれの分析結果を示すグラフを切替可能に表示しても良い。

[0089] また、表示部４４の別の実施態様としては、図８に示すように、一方の軸がサンプルにある励起波長の励起光を照射して得られる蛍光情報に設定され、他方の軸がサンプルに別の励起波長の励起光を照射して得られる蛍光情報に設定されたグラフを表示し、そのグラフに粒子それぞれを示すプロットを表示する態様を挙げることができる。

[0090] この実施態様では、一方の軸及び他方の軸が、蛍光情報たる蛍光の色情報をカラースケールによる色のグラデーションで表現したものである。

[0091] この表示部４４は、それぞれの蛍光マーカに対応する励起波長の中から選択された２種類の励起波長の組み合わせに対応したグラフを表示するものであり、本実施形態では３種類の励起波長λ１、λ２、λ３の中から２種類を組み合わせてなる３つの組み合わせそれぞれに対応した３つのグラフを、例えば比較可能に同一画面に表示する。なお、表示部４４としては、それぞれの分析結果を示すグラフを切替可能に表示しても良いし、３つの軸を用いた三次元的なグラフに粒子それぞれを示すプロットを表示しても良い。なお、３つの軸を用いたグラフとしては、第１軸、第２軸、及び第３軸が、それぞれ色相、粒子数、粒子径などの種々のパラメータの中から適宜組み合わせて構わない。

[0092] さらに表示部４４としては、例えば図７に示すように、上述したプロットそれぞれを選択可能に表示しても良い。

[0093] この場合、ユーザが例えばマウスやタッチパネルなどの入力手段を介して１又は複数のプロットが選択すると、表示部４４は、それらのプロットが示

す粒子に対して得られた粒子径分布などの分析結果を、上述したグラフと同一の又は別の画面に表示するように構成されていても良い。

[0094] さらに加えて、表示部４４としては、１又は複数のプロットが選択された場合に、選択された１又は複数のプロットが示す粒子を画像データの中から切り取った拡大画像を、上述したグラフと同一の又は別の画面に表示するように構成されていても良い。

[0095] ＜本実施形態の効果＞

このように構成された本実施形態の粒子分析装置１００によれば、バンドストップフィルタ５を用いて、励起光それぞれをカットしつつ、複数の色の蛍光を透過させるとともに、このバンドストップフィルタ５を通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有する撮像部３により撮像するので、仮に別々の蛍光マーカの励起波長が重なっており、図６に示すように、同じフレームに複数の色の蛍光が写されていたとしても、それぞれの色を識別することができる。

これにより、粒子を種別ごとに分離する前処理を必要とすることなく、なおかつ、装置の大型化及び高コスト化を抑えつつ、粒子それぞれを種別ごとに分析することが可能となり、特に多重染色法に資する。

[0096] また、バンドストップフィルタ５が複数枚のノッチフィルタを重ねてなるものであり、製造コストを安価に抑えることができる。

[0097] さらに、バンドストップフィルタ５が、最も短い励起波長λ１よりも長波長領域において、カットする波長領域よりも透過させる波長領域の方が広くなるように構成されているので、種々の色の蛍光を透過させることができる。これにより、種々の蛍光マーカに対して同じバンドストップフィルタ５を用いることが可能となり、部品点数の削減や低コスト化を図れる。

[0098] 撮像部３としては、ある色の蛍光を透過させるフィルタとＣＣＤカメラとの組み合わせを複数組設ける構成も考えられるが、本実施形態の撮像部３は、カラーＣＣＤを有するものであり、光学設計をよりシンプルにすることができる。

[0099] 光照射部２が、複数種類の蛍光マーカそれぞれに対応した励起波長の励起光を順番に切り替えてサンプルに照射するので、蛍光マーカが添加された粒子それぞれを種別ごとに精度良く分析することができる。

[0100] 分析部４３が、蛍光特定部４２により特定された蛍光マーカの蛍光情報ごとに、その蛍光マーカが添加されている粒子の物性を分析するので、サンプルに含まれる粒子の物性を、粒子の種類ごとに切り分けて分析することができる。

[0101] 表示部４４が、一方の軸が蛍光情報に設定され、他方の軸が粒子の物性に設定されたグラフを表示するとともに、当該グラフに粒子それぞれを示すプロットを表示するので、ある蛍光マーカが添加されている粒子のサイズ等の物性のばらつきを一見して把握することができる。

[0102] また、表示部４４が、一方の軸がサンプルにある励起波長の励起光を照射して得られる蛍光情報に設定され、他方の軸がサンプルに別の励起波長の励起光を照射して得られる蛍光情報に設定されたグラフを表示するとともに、当該グラフに粒子それぞれを示すプロットを表示するので、サンプルに含まれる種々の粒子それぞれの蛍光情報を視認性良く表示させることができる。

[0103] さらに、表示部４４が、プロットそれぞれを選択可能に表示するとともに、１又は複数のプロットが選択された場合に、それらのプロットが示す粒子に対する分析部４３の分析結果を表示するので、確認したい粒子の分析結果を簡単に表示させることができ、操作性の向上を図れる。

[0104] 加えて、表示部４４が、１又は複数のプロットが選択された場合に、それらのプロットが示す粒子を画像データの中から切り取った拡大画像を表示するので、拡大画像を確認することにより、そこに写る粒子の大きさや蛍光の色などが例えば想定される範囲内であるか否かなどを確認することができる。

[0105] ＜その他の実施形態＞

なお、本発明は前記実施形態に限られるものではない。

[0106] 例えば、撮像部３としては、色の識別能力を有していれば良く、例えば、

ある色の蛍光を透過させるフィルタとＣＣＤカメラとの組み合わせを複数組備える構成であっても良い。

[0107] また、分析部４３としては、粒子径分布又は粒子径を測定するものに限らず、例えば粒子の個数濃度や、自己相関関数からゲルの平均格子間隔などのゲル特性など、粒子の種々の特性を分析するものとして構わない。

[0108] さらに、前記実施形態では、複数枚のフィルタによって、励起光それぞれをカットしつつ、複数種類の蛍光マーカが発する複数の色の蛍光を透過させていたが、１枚のフィルタによって、励起光それぞれをカットしつつ、複数種類の蛍光マーカが発する複数の色の蛍光を透過させても良い。

[0109] 表示部４４としては、前記実施形態で述べたそれぞれのグラフを表示する機能、選択されたプロットが示す粒子に対する分析結果を表示する機能、及び、選択されたプロットが示す粒子の拡大画像を表示する機能の全てを備えている必要はなく、どの機能を発揮させるかは適宜変更して構わない。

[0110] 前記実施形態では、励起光をカットしつつ、撮像部３で蛍光を検出する態様を説明したが、撮像部３で蛍光を検出しつつ、粒子に当たって散乱する散乱光をも検出するようにしても良い。具体的には、例えば１又は複数枚のフィルタを透過する第４の波長λ４の光をサンプルに照射するための第４の光源を用いる態様を挙げることができる。そして、分析部４３としては、撮像部３により得られる散乱光の画像データから、サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて、当該粒子の物性を分析するように構成されていても良い。

これならば、蛍光と散乱光との双方を用いて粒子の物性を分析することができるので、より多様な物性や、より多種の粒子（例えば、蛍光マーカが添加されていない粒子など）を分析することが可能となる。

[0111] 具体的な一態様としては、励起波長λ１、λ２、λ３の励起光と第４の波長λ４の光とを順番に照射することで、撮像部３により得られる画像データのうち、１フレーム目を第１の励起波長λ１の励起光を照射して得られるもの、２フレーム目を第２の励起波長λ２の励起光を照射して得られるもの、

３フレーム目を第３の励起波長λ３の励起光を照射して得られるもの、４フレーム目を第４の波長λ４の光を照射して得られるものとすることができる。

[0112] 言い換えれば、４×（Ｎ－１）＋１フレーム目を第１の励起波長λ１の励起光を照射して得られるもの、４×（Ｎ－１）＋２フレーム目を第２の励起波長λ２の励起光を照射して得られるもの、４×（Ｎ－１）＋３フレーム目を第３の励起波長λ３の励起光を照射して得られるもの、４×（Ｎ－１）＋４フレーム目を第４の波長λ４の光を照射して得られるものとなるようにすることができる。なお、Ｎは自然数である。

[0113] なお、上述した第４の光源を用いずに散乱光を検出する別の態様としては、サンプルに励起光を照射している状態において、セル１と撮像部３との間からバンドストップフィルタ５を取り除く態様を挙げれることができる。

[0114] さらに、光照射部２としては、前記実施形態では複数の光源２１、２２、２３を有していたが、図６を参照して述べた通り、複数の色の蛍光の励起波長が重なっている場合であれば、所定の励起波長の励起光を射出する１つの光源を用いて複数の色の蛍光を観察しても良い。

[0115] また、情報処理装置４としては、メモリの所定領域に設定された分析情報格納部としての機能を備えており、この分析情報格納部に分析に関わる種々の情報が格納されていても良い。

[0116] 具体的に分析情報格納部に格納されている情報は、粒子特定部４１により特定された粒子に関する情報であり、その一例としては、図９に示すものを挙げることができる。すなわち、この分析情報格納部は、粒子特定部４１により特定された粒子を示す識別番号に紐づけて、その粒子の径、それぞれの励起波長λ１、λ２、λ３の励起光を入射した際にカラーＣＣＤから出力されるＲＧＢの出力値、それらの出力値を用いて算出された色相情報（ここでは、色相角度）、その粒子が画像データに最初に写った重心位置のＸ座標及びＹ座標などを挙げることができる。もちろん、この全てを格納している必要はなく、適宜取捨選択して構わない。

また、分析情報格納部が、上述した識別番号に紐づけて、その粒子が写されている例えば最初の画像データを格納しても良い。

[0117] その他、本発明は前記実施形態に限られず、その趣旨を逸脱しない範囲で種々の変形が可能であるのは言うまでもない。

産業上の利用可能性

[0118] 本発明によれば、ＰＴＡ法による粒子の分析において、仮に蛍光マーカ又は自家蛍光の性質を持つ粒子の励起波長が重なっている場合であっても、装置の大型化及び高コスト化を抑えつつ、粒子それぞれを種別ごとに分析することができる。

符号の説明

[0119] １００・・・粒子分析装置
１　・・・セル
２　・・・光照射部
３　・・・撮像部
４　・・・情報処理装置
４１　・・・粒子特定部
４２　・・・蛍光特定部
４３　・・・分析部
４４　・・・表示部
５　・・・バンドストップフィルタ

請求の範囲

[請求項1] 複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射する光照射部と、

前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタと、

前記フィルタを通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有した撮像部と、

前記撮像部により得られる蛍光の画像データから、前記サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する分析部と、を備える、粒子分析装置。

[請求項2] 複数枚の前記フィルタにより、前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させる、請求項１記載の粒子分析装置。

[請求項3] 前記光照射部が、前記サンプルに対して互いに異なる励起波長の励起光を照射するものであり、

前記１又は複数枚のフィルタが、

最も短い前記励起波長よりも長波長領域において、カットする波長領域よりも透過させる波長領域の方が広くなるように構成されている、請求項１又は２記載の粒子分析装置。

[請求項4] 前記撮像部が、カラーＣＣＤを有する、請求項１乃至３のうち何れか一項に記載の粒子分析装置。

[請求項5] 前記光照射部が、前記複数の色の蛍光を発生させるための励起波長の前記励起光を順番に切り替えて前記サンプルに照射する、請求項１乃至４のうち何れか一項に記載の粒子分析装置。

[請求項6] 前記撮像部により得られる蛍光の前記画像データから、蛍光を発している粒子を特定する粒子特定部と、

前記粒子特定部により特定された粒子が発する蛍光に関する蛍光情報を特定する蛍光特定部と、を備え、

前記分析部が、前記蛍光特定部により特定された前記蛍光情報ごと

に粒子の物性を分析する、請求項１乃至５のうち何れか一項に記載の粒子分析装置。

[請求項7] 前記蛍光特定部が、前記撮像部からの出力値を変換した色相を前記蛍光情報として特定する、請求項６記載の粒子分析装置。

[請求項8] 一方の軸が前記蛍光情報に設定され、他方の軸が粒子の物性に設定されたグラフを表示するとともに、当該グラフに粒子それぞれを示すプロットを表示する表示部を備える、請求項６又は７記載の粒子分析装置。

[請求項9] 一方の軸が前記サンプルに第１の励起波長の励起光を照射して得られる前記蛍光情報に設定され、他方の軸が前記サンプルに第２の励起波長の励起光を照射して得られる前記蛍光情報に設定されたグラフを表示するとともに、当該グラフに粒子それぞれを示すプロットを表示する表示部を備える、請求項６又は７記載の粒子分析装置。

[請求項10] 前記表示部が、前記プロットそれぞれを選択可能に表示するとともに、１又は複数の前記プロットが選択された場合に、それらのプロットが示す粒子に対する前記分析部の分析結果を表示する、請求項８又は９記載の粒子分析装置。

[請求項11] 前記表示部が、１又は複数の前記プロットが選択された場合に、それらのプロットが示す粒子を前記画像データの中から切り取った拡大画像を表示する、請求項１０記載の粒子分析装置。

[請求項12] 前記蛍光特定部が、前記画像データに含まれる１つの粒子を表す複数の画素の色情報を平均化したものを、当該粒子に添加されている蛍光マーカの蛍光情報として算出する、請求項６乃至１１のうち何れか一項に記載の粒子分析装置。

[請求項13] 平均化される色情報が、前記１つの粒子を表す複数の画素のうち少なくとも中心部に位置する画素を除く画素のものである、請求項１２記載の粒子分析装置。

[請求項14] 前記サンプルに含まれる粒子の少なくとも１種類は、複数種類の蛍

光マーカが添加されるものである、請求項１乃至１３のうち何れか一項に記載の粒子分析装置。

[請求項15] 複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射し、

１又は複数枚のフィルタを用いて、前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させ、

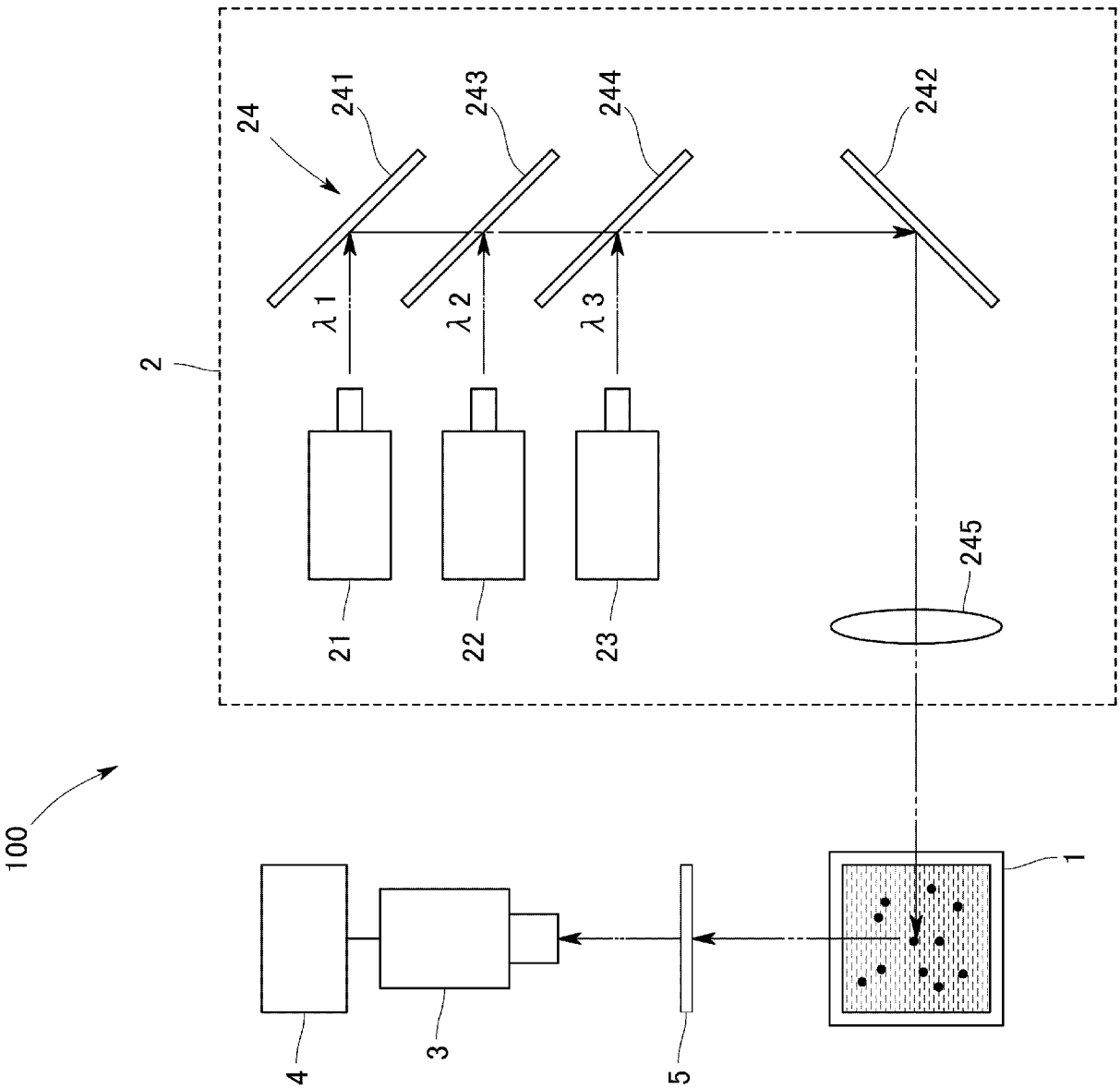
色の識別能力を有した撮像部により、前記フィルタを通過した蛍光を撮像し、

前記撮像部により得られる蛍光の画像データから、前記サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する、粒子分析方法。

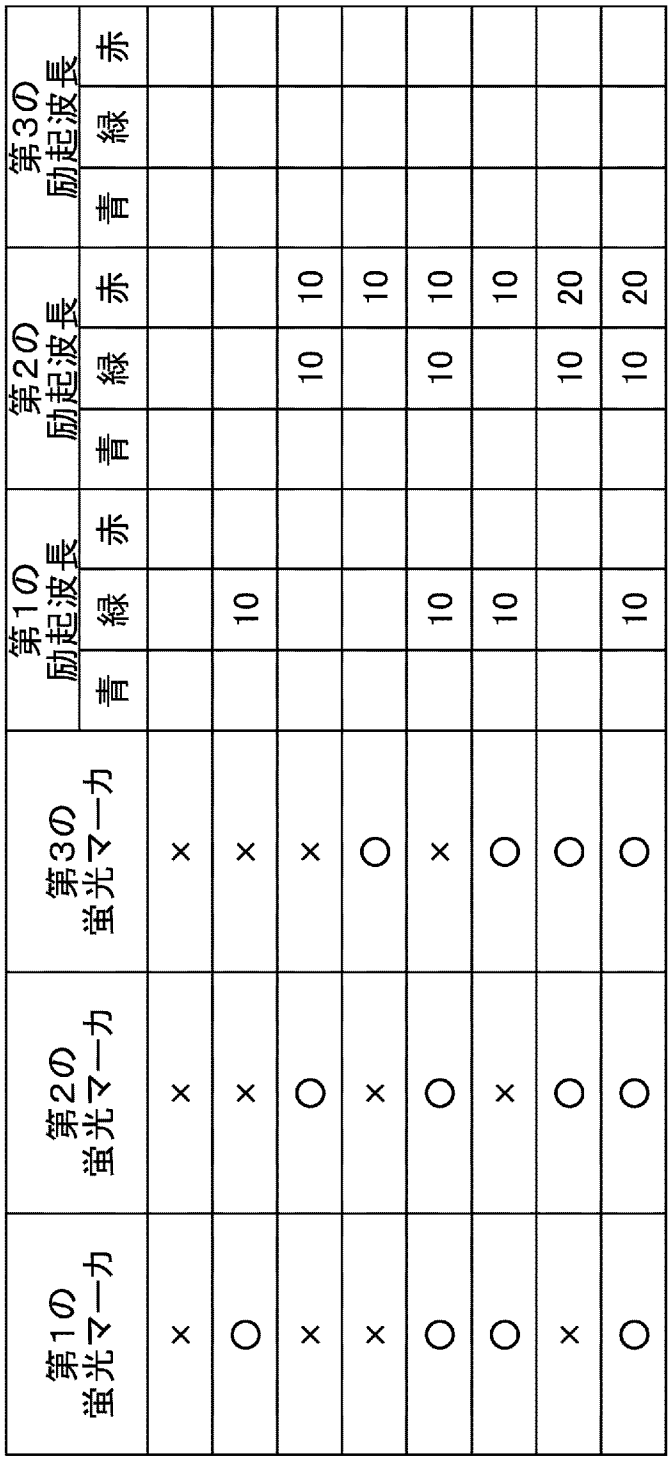
[請求項16] 複数の色の蛍光を発するサンプルに対して励起光を照射する光照射部と、前記励起光をカットしつつ、前記複数の色の蛍光を透過させる１又は複数枚のフィルタと、前記フィルタを通過した蛍光を撮像する色の識別能力を有した撮像部と、を備える粒子分析装置に用いられるプログラムであり、

前記撮像部により得られる蛍光の画像データから、前記サンプルに含まれる粒子のブラウン運動による拡散速度を求めて当該粒子の物性を分析する分析部としての機能をコンピュータに発揮させる、粒子分析用プログラム。

[図1]

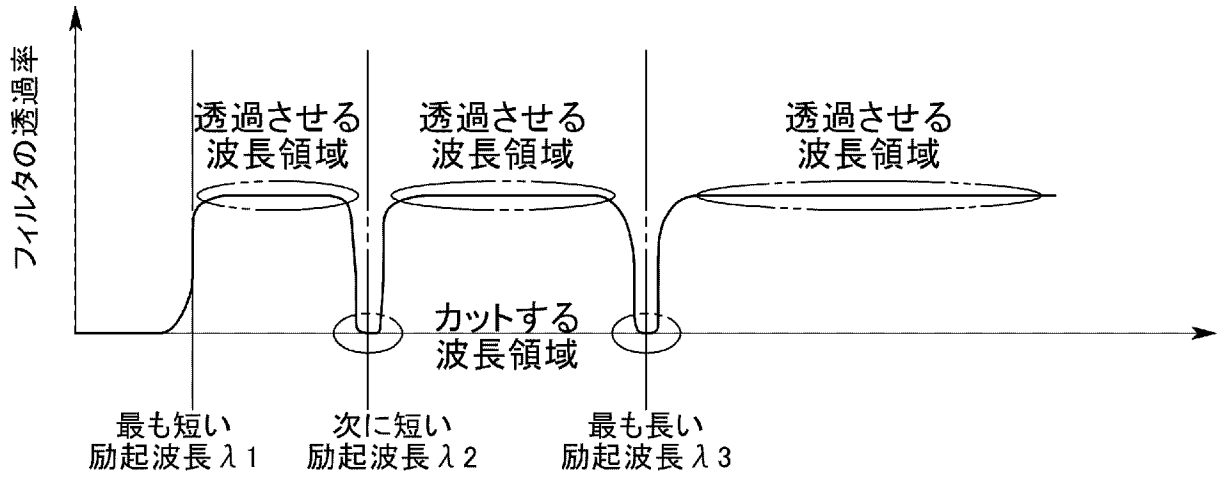


[図2]

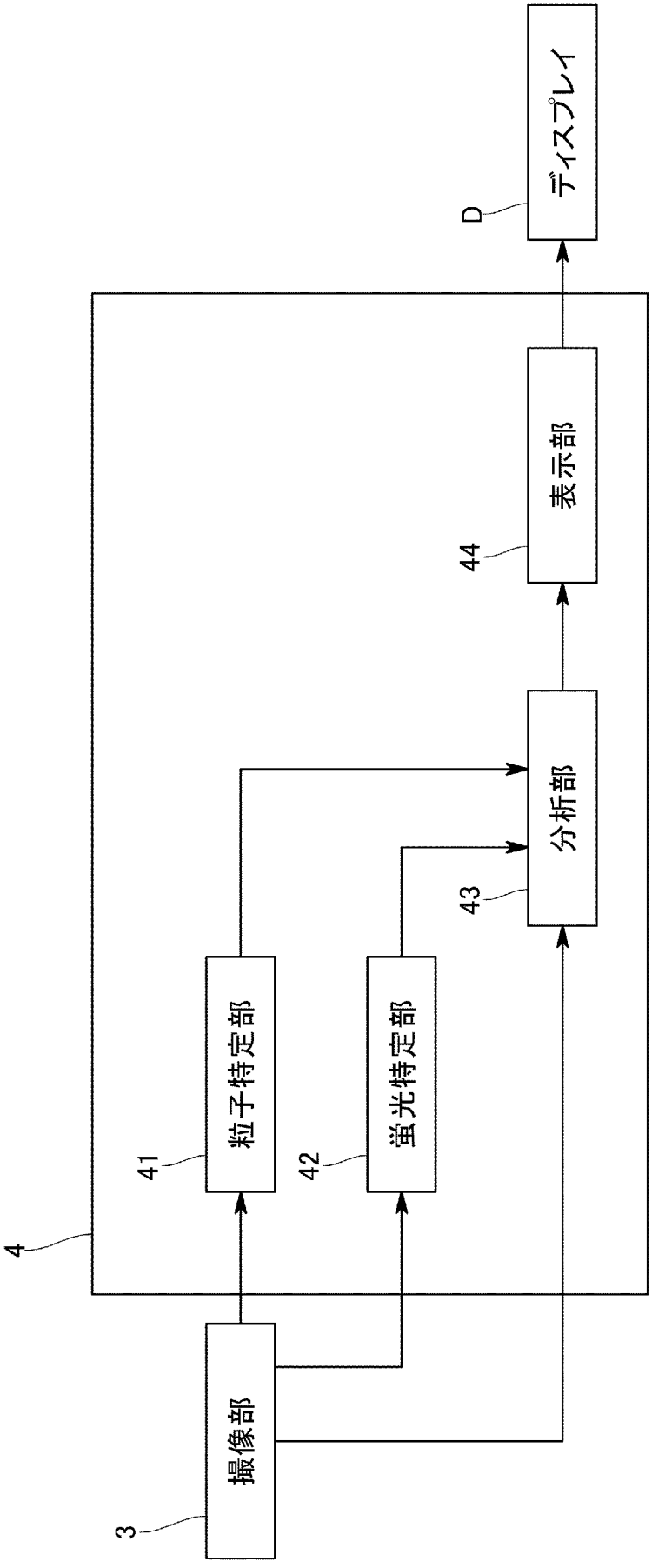


第1の蛍光マーカ力	第2の蛍光マーカ力	第3の蛍光マーカ力	第1の励起波長			第2の励起波長			第3の励起波長		
			青	緑	赤	青	緑	赤	青	緑	赤
×	×	×									
○	×	×		10							
×	○	×					10	10			
×	×	○						10			
○	○	×		10			10	10			
○	×	○		10				10			
×	○	○					10	20			
○	○	○		10			10	20			

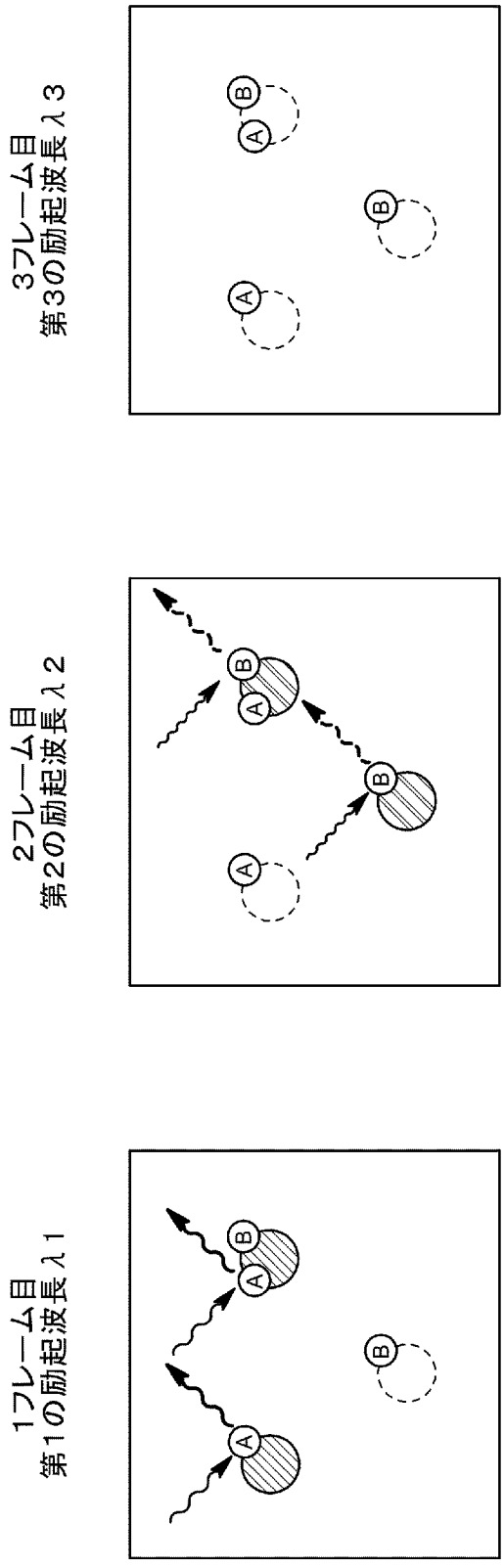
[図3]


フィルタの透過率
透過させる
波長領域
透過させる
波長領域
透過させる
波長領域
カットする
波長領域
最も短い
励起波長λ1
次に短い
励起波長λ2
最も長い
励起波長λ3

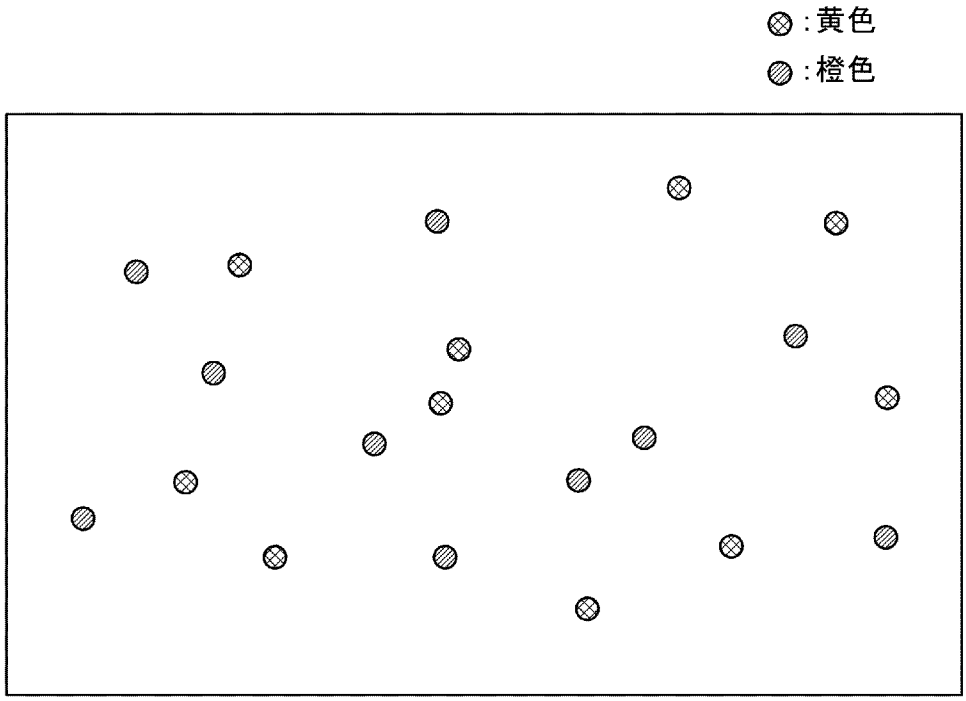
[図4]



[図5]



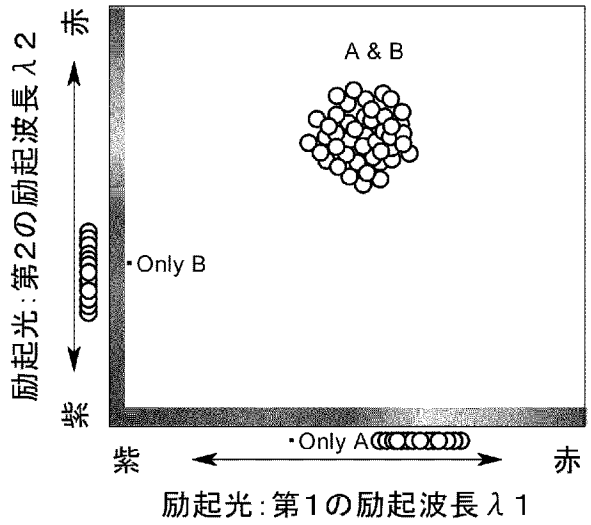
[図6]



[図7]

励起光：第1の励起波長λ1
紫
赤
・Only A
・A & B
・Only B
サイズ
励起光：第2の励起波長λ2
紫
赤
・Only B
・A & B
選択された粒子
サイズ
・Only A
励起光：第3の励起波長λ3
紫
赤
・Only A
・Only B
・A & B
サイズ

[図8]



[図9]

粒子	径 [nm]	励起波長λ1入射				励起波長λ2入射				励起波長λ3入射				最初に写った重心位置(x座標)	最初に写った重心位置(y座標)
		R	G	B	H	R	G	B	H	R	G	B	H		
1	102	0	0	0	無	120	120	0	60	0	0	0	無	10	251
2	110	0	0	0	無	115	125	0	64.1	0	0	0	無	21	128
3	130	30	150	20	−64	0	0	0	無	0	0	0	無	35	120
4	135	15	135	8	−63	0	0	0	無	0	0	0	無	100	15
5	121	0	0	0	無	0	0	0	無	110	118	0	63.5	135	210
6	165	0	0	0	無	0	0	0	無	3	210	10	−58	193	56

H:色相角度

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/007791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 15/02(2006.01)i; ***G01N 21/64***(2006.01)i
FI: G01N15/02 B; G01N21/64 F

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; G01N21/62-21/74; G01N33/48-33/98

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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	JP 2020-204604 A (HORIBA LTD) 24 December 2020 (2020-12-24) paragraphs [0019]-[0045], fig. 1-4	1-7, 14-16
Y	JP 2014-521967 A (NANOSIGHT LIMITED) 28 August 2014 (2014-08-28) paragraphs [0004], [0008]	1-7, 14-16
Y	JP 2012-88304 A (SHIN NIPPON AIR TECHNOL CO LTD) 10 May 2012 (2012-05-10) paragraphs [0079]-[0103]	1-7, 14-16
A	JP 2005-245317 A (MITSUBISHI ELECTRIC CORP) 15 September 2005 (2005-09-15) entire text, all drawings	1-16
A	WO 2019/230636 A1 (HORIBA LTD) 05 December 2019 (2019-12-05) entire text, all drawings	1-16
A	US 2008/0085550 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 10 April 2008 (2008-04-10) entire text, all drawings	1-16

☑ 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	Date of mailing of the international search report
01 May 2023	**16 May 2023**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/007791

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 2022/185592 A1 (HORIBA LTD) 09 September 2022 (2022-09-09) entire text, all drawings	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/007791

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2020-204604 A	24 December 2020	(Family: none)	
JP 2014-521967 A	28 August 2014	US 2014/0152978 A1 paragraphs [0004], [0008] GB 2493391 A WO 2013/021185 A1 CN 103890561 A	
JP 2012-88304 A	10 May 2012	(Family: none)	
JP 2005-245317 A	15 September 2005	(Family: none)	
WO 2019/230636 A1	05 December 2019	(Family: none)	
US 2008/0085550 A1	10 April 2008	WO 2008/057159 A2	
WO 2022/185592 A1	09 September 2022	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/007791

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 15/02(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i
FI: G01N15/02 B; G01N21/64 F

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（ＩＰＣ））

G01N15/00-15-14; G01N21/62-21/74; G01N33/48-33/98

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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	JP 2020-204604 A (株式会社堀場製作所) 24.12.2020 (2020-12-24) 段落００１９－段落００４５，図１－図４	1-7,14-16
Y	JP 2014-521967 A (ナノサイト・リミテッド) 28.08.2014 (2014-08-28) 段落０００４，段落０００８	1-7,14-16
Y	JP 2012-88304 A (新日本空調株式会社) 10.05.2012 (2012-05-10) 段落００７９－段落０１０３	1-7,14-16
A	JP 2005-245317 A (三菱電機株式会社) 15.09.2005 (2005-09-15) 全文，全図	1-16
A	WO 2019/230636 A1 (株式会社堀場製作所) 05.12.2019 (2019-12-05) 全文，全図	1-16
A	US 2008/0085550 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 10.04.2008 (2008-04-10) 全文，全図	1-16
P, A	WO 2022/185592 A1 (株式会社堀場製作所) 09.09.2022 (2022-09-09) 全文，全図	1-16

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
01.05.2023	16.05.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
山口　剛 2J 9806

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/007791

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2020-204604 A	24.12.2020	（ファミリーなし）	
JP 2014-521967 A	28.08.2014	US 2014/0152978 A1 [0004],[0008] GB 2493391 A WO 2013/021185 A1 CN 103890561 A	
JP 2012-88304 A	10.05.2012	（ファミリーなし）	
JP 2005-245317 A	15.09.2005	（ファミリーなし）	
WO 2019/230636 A1	05.12.2019	（ファミリーなし）	
US 2008/0085550 A1	10.04.2008	WO 2008/057159 A2	
WO 2022/185592 A1	09.09.2022	（ファミリーなし）	