

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7610732号
(P7610732)

(45)発行日 令和7年1月8日(2025.1.8)

(24)登録日 令和6年12月24日(2024.12.24)

(51)国際特許分類

F I

G O 1 N 15/0205(2024.01)

G O 1 N 15/0205

請求項の数 15 (全29頁)

(21)出願番号	特願2023-575020(P2023-575020)	(73)特許権者	501387839
(86)(22)出願日	令和4年1月24日(2022.1.24)		株式会社日立ハイテク
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/002363		東京都港区虎ノ門一丁目17番1号
(87)国際公開番号	WO2023/139777	(74)代理人	110002572
(87)国際公開日	令和5年7月27日(2023.7.27)		弁理士法人平木国際特許事務所
審査請求日	令和6年3月19日(2024.3.19)	(72)発明者	峯邑 浩行
			東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
			株式会社日立製作所内
		(72)発明者	安齋 由美子
			東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
			株式会社日立製作所内
		(72)発明者	大澤 賢太郎
			東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 株
			式会社日立ハイテク内
		審査官	野田 華代

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 粒子計測装置、粒子計測方法、サンプル容器

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

溶媒と粒子を含むサンプル内において浮遊する前記粒子のサイズを計測する粒子計測装置であって、

光を出射する光源、
前記光を前記サンプルに対して照射する対物レンズ、
前記光の光軸方向に沿って前記サンプルの位置または前記対物レンズの位置のうち少なくともいずれかを走査する走査部、
前記サンプルから反射された前記光の強度を検出する検出部、
前記強度と前記溶媒の屈折率に基づいて前記粒子のサイズを算出する演算部、
を備え、

前記光源は、光透過窓と接した前記サンプルに対して前記光透過窓を介して前記光を照射し、

前記演算部は、前記走査部が前記サンプルの位置または前記対物レンズの位置を走査する過程において前記強度のピークを特定することにより、前記光透過窓と前記サンプルとの間の前記光軸方向に沿った境界位置を特定し、

前記演算部は、
前記光透過窓と前記サンプルとの間の前記光軸方向に沿った境界位置を前記対物レンズの焦点として前記光を照射することにより反射された前記光の第1強度、

前記光透過窓と既知の屈折率を有する既知サンプルとの間の前記光軸方向に沿った境

界位置を前記対物レンズの焦点として前記光を照射することにより反射された前記光の第2強度、

前記溶媒の屈折率、

前記既知サンプルの屈折率、

前記光透過窓の屈折率、

の間の関係にしたがって、前記溶媒の屈折率を計算する

ことを特徴とする粒子計測装置。

【請求項2】

前記走査部は、前記演算部が前記溶媒の屈折率を取得した後において、前記光の焦点を前記サンプル内に移動させ、

前記演算部は、前記溶媒の屈折率と前記粒子のサイズと前記第1強度との間の関係を記述したデータを取得し、

前記演算部は、前記溶媒の屈折率と、前記光の焦点が前記サンプル内にあるときにおける前記第1強度とを用いて前記データを参照することにより、前記粒子のサイズを計算することを特徴とする請求項1記載の粒子計測装置。

【請求項3】

前記演算部は、前記走査部が前記サンプルの位置または前記対物レンズの位置を走査する過程において前記強度のピークを特定することを繰り返すことにより、前記境界位置の候補を計算し、

前記演算部は、前記繰り返しの過程において計算した前記候補とその前回値との間の差分を計算し、

前記演算部は、前記差分が閾値未満に達した時点における前記候補を、前記境界位置として採用する

ことを特徴とする請求項1記載の粒子計測装置。

【請求項4】

前記粒子計測装置はさらに、

前記光源が出射する前記光を測定光と参照光へ分岐する光分岐部、

前記測定光を前記サンプルに対して集光して照射する光照射部、

前記参照光の光路長を調整する光路長調整部、

前記測定光が前記サンプルから反射することにより生じた信号光を前記参照光と合波することにより干渉光を生成する干渉光学系、

前記干渉光を検出する光検出部、

を備え、

前記演算部は、前記光路長調整部を制御することにより、前記光の焦点位置ごとに前記干渉光が最大強度となるように前記光路長を調整し、

前記演算部は、前記最大強度が得られる前記光路長を用いて、前記粒子のサイズを計算する

ことを特徴とする請求項1記載の粒子計測装置。

【請求項5】

前記走査部が、前記光軸方向に沿って、前記光照射部に向かって前記サンプルの位置を dz 移動させ、または、前記サンプルへ向かって前記対物レンズの位置を dz 移動させたとき、

前記光路長調整部は、前記参照光の光路長を dr 増加させ、

$dr = \alpha (n^2 - 1) dz$ 、

n は前記サンプルの屈折率、

α は 0.8 から 1.2 の定数、

である

ことを特徴とする請求項4記載の粒子計測装置。

【請求項6】

前記演算部は、

前記光検出部が検出した前記干渉光の信号値、
前記粒子のサイズ、
前記測定光の電場振幅、
前記参照光の電場振幅、
前記溶媒の屈折率、
前記光のコヒーレンス長、
前記信号光と前記参照光との間の光路長差、
を用いて、前記粒子の屈折率を計算する
ことを特徴とする請求項 4 記載の粒子計測装置。

【請求項 7】

前記演算部は、互いに異なる屈折率を有する前記溶媒それぞれについて、
前記光検出部が検出した前記干渉光の信号値、
前記測定光の電場振幅、
前記参照光の電場振幅、
前記溶媒の屈折率、
前記光のコヒーレンス長、
前記信号光と前記参照光との間の光路長差、
の組み合わせを取得し、
前記演算部は、各前記組み合わせを用いて、前記粒子のサイズと前記粒子の屈折率を計算する
ことを特徴とする請求項 4 記載の粒子計測装置。

【請求項 8】

前記粒子計測装置はさらに、サンプル容器を備え、
前記サンプル容器は、前記サンプルを収容するウェルを備え、
前記サンプル容器はさらに、前記ウェルの側壁から前記ウェルの外側へ向かって突出した狭窄部を有し、
前記サンプル容器の高さ方向に対して垂直な平面上における前記狭窄部の断面積は、前記平面上における前記ウェルの断面積よりも小さい
ことを特徴とする請求項 1 記載の粒子計測装置。

【請求項 9】

溶媒と粒子を含むサンプル内において浮遊する前記粒子のサイズを計測する粒子計測方法であって、
光透過窓と接した前記サンプルに対して、前記光透過窓を介して、光源から出射された光を対物レンズによって照射するステップ、
前記光の光軸方向に沿って前記サンプルの位置または前記対物レンズの位置のうち少なくともいずれかを走査するステップ、
前記サンプルから反射された前記光の強度を検出するステップ、
前記強度と前記溶媒の屈折率に基づいて前記粒子のサイズを算出するステップ、
を有し、
前記粒子のサイズを算出するステップにおいては、前記走査するステップによって前記サンプルの位置または前記対物レンズの位置を走査する過程において前記強度のピークを特定することにより、前記光透過窓と前記サンプルとの間の前記光軸方向に沿った境界位置を特定し、
前記粒子のサイズを算出するステップにおいては、
前記光透過窓と前記サンプルとの間の前記光軸方向に沿った境界位置を前記対物レンズの焦点として前記光を照射することにより反射された前記光の第 1 強度、
前記光透過窓と既知の屈折率を有する既知サンプルとの間の前記光軸方向に沿った境界位置を前記対物レンズの焦点として前記光を照射することにより反射された前記光の第 2 強度、
前記溶媒の屈折率、

前記既知サンプルの屈折率、
前記光透過窓の屈折率、
の間の関係にしたがって、前記溶媒の屈折率を計算する
ことを特徴とする粒子計測方法。

【請求項 10】

前記サンプルは、前記サンプルを収容するウェルを備えたサンプル容器内に保持されており、

前記サンプル容器はさらに、前記ウェルの側壁から前記ウェルの外側へ向かって突出した狭窄部を有し、

前記サンプル容器の高さ方向に対して垂直な平面上における前記狭窄部の断面積は、前記平面上における前記ウェルの断面積よりも小さい

ことを特徴とする請求項 9 記載の粒子計測方法。

【請求項 11】

前記ウェルの内径は、3.5 mm～4.0 mmの範囲である

ことを特徴とする請求項 10 記載の粒子計測方法。

【請求項 12】

前記光透過窓は、前記サンプルを収容するサンプル容器の一部としてまたは前記サンプル容器に対して取り付けることができる部材によって構成されており、

前記光透過窓の最大厚さと最小厚さとの間の差分は70 μm以下である

ことを特徴とする請求項 9 記載の粒子計測方法。

【請求項 13】

前記サンプルは、前記サンプルを収容するウェルを備えたサンプル容器内に保持されており、

前記サンプル容器は、前記光透過窓を形成したフレームを介して金属製のベースプレートと接触するように構成されており、

前記ベースプレートは、前記光透過窓と対向する穴を有し、

前記穴の開口サイズは、前記光透過窓の開口サイズよりも大きい

ことを特徴とする請求項 9 記載の粒子計測方法。

【請求項 14】

前記粒子計測方法はさらに、前記サンプルとは別に設けられた屈折率が既知の基準サンプルを用いて、前記溶媒の屈折率を計測する

請求項 9 記載の粒子計測方法。

【請求項 15】

溶媒と粒子を含むサンプルに光を照射して、前記溶媒中に浮遊する前記粒子のサイズを計測するサイズ計測装置に設けられたフレームと金属製のベースプレートにより形成されたサンプルホルダーに脱着可能で、前記サンプルを内部に形成されたウェル内に保持するサンプル容器であって、

前記フレームに挿入することにより、前記光の光軸と直行する2方向の位置決めを行い、前記ベースプレートに接触することにより前記光の光軸方向の位置決めを行う位置決め機能を提供する形状特徴と、

前記ベースプレートに設けられた穴と、前記サンプル容器の底部に配置された透明部材により、前記光を前記サンプルに照射することが可能な光透過窓を形成する機能を提供する形状特徴と、

前記ウェルの内径を3.5 mm～4.0 mmの範囲にすることにより、前記サンプルの使用量を20 μL程度にして、サンプルの消費量を少なく抑える機能を提供する形状特徴と、

前記ウェルを4個以上形成することにより、分注時や脱着時のハンドリングを容易にする機能を提供する形状特徴と、

前記ウェルは、側壁から外側へ向かって突出した狭窄部を2個以上4個以下有し、前記光の光軸と直行する平面内で前記狭窄部の断面積は、前記ウェルの断面積よりも小さいことにより、前記サンプル内に発生した気泡の影響を低減する機能を提供する形状特徴と、

10

20

30

40

50

前記透明部材の厚さの最大値と最小値の差分を70 μm 以下の範囲にすることにより、前記サイズ計測装置によって、前記溶媒の屈折率を測定可能にする機能を提供する形状特徴と、

を備えること特徴とするサンプル容器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、溶媒と粒子を含むサンプル内において浮遊する粒子のサイズ分布を計測する技術に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、医薬品の開発対象は低分子薬からバイオ医薬品へシフトしつつある。バイオ医薬品は高分子であるがゆえに凝集しやすく、凝集すると毒性を生じる場合がある。例えばアメリカ食品医薬品局等は、凝集体の濃度管理規制を強めようとしている。そこで0.1～1 μm のサブミクロン領域における凝集体について、所望密度のサイズ分布を定量的に計測する技術が必要とされている。タンパク質の凝集体は溶媒中に浮遊し、ブラウン運動によって位置が時間とともに変化している。以下本発明では、タンパク質の凝集体およびポリスチレンビーズ等の標準粒子のサイズと密度の計測技術について記述する。これらの被検物を総称して『粒子』に統一して記述する。

【0003】

特許文献1は、光計測を用いて粒子を検出する技術について記載している。同文献は、『光を集光して光スポットを生成し、前記光スポットのサイズの略3倍以下の被検物を計測する光計測方法であって、少なくとも前記光の焦点位置を光軸方向に動かしながら前記被検物に対して照射することにより前記被検物から反射される反射光を検出する信号取得ステップ、前記反射光の強度と前記被検物のサイズとの間の対応関係を記述した対応関係データを取得するステップ、前記反射光の強度を用いて前記対応関係データを照会することにより前記被検物のサイズを取得するサイズ算出ステップ、を有することを特徴とする光計測方法。』について開示している（請求項1）。同文献記載の技術は、反射光と参照光を干渉させて信号増強することにより、前処理が不要で、高分解能な計測を実現することができる。

【0004】

特許文献2は、対物レンズを物理的に走査するとともに、信号光と干渉光の干渉を位相条件の異なる4つの検出器で受光することにより、タイムドメインOCT（Optical Coherence Tomography）におけるミラーの走査による参照光の位相調整を不要とする技術を開示している。さらに特許文献2は、特許文献1の技術に基づいて、液中でブラウン運動する粒子の運動の影響を受けないように、光スポットの走査を高速化する技術を開示している。

【0005】

特許文献3は、半導体レーザを光源とする生体断層像の計測において、駆動電流に高周波を重ねることにより、コヒーレンス長を所定の範囲に制御し、これにより取得断層像に含まれるノイズの影響を低減する技術を開示している。

【0006】

特許文献4は、特殊な容器と光学系を用いて、溶媒の屈折率を測定する技術を開示している。

【0007】

非特許文献1は、バイオ医薬品の分析に利用される容器として代表的なマイクロプレートの機能・形状に関する規格情報を開示している。この規格については後述のサンプル容器の実施形態において言及する。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【0008】

【文献】特開2017-102032号公報

【文献】WO2020/144754

【文献】特開2015-049204号公報

【文献】特開平7-055700号公報

【非特許文献】

【0009】

【文献】URL：<https://www.slas.org/education/ansi-slas-microplate-standard>
s/（2022年1月18日取得）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

特許文献1または2が記載している技術を用いて、タンパク質凝集体などの粒子のサイズと密度を計測することを考える。同文献記載の技術を用いて検出される反射光は、粒子のサイズとともに、その屈折率に応じて変化する。同文献記載の技術は、光の干渉を利用して反射光の電場振幅を電圧に変換することにより、検出信号を得ることができる。この検出信号の大きさは、粒子のサイズだけでなく、粒子の屈折率および溶媒の屈折率に応じて変化する。一方、バイオ医薬ではタンパク質ができるだけ凝集しないように例えばpH、塩、糖、界面活性剤などを適切な量で添加する。したがって、溶媒の屈折率は添加剤の条件によって変化する。

【0011】

溶媒との間における屈折率差が小さいタンパク質凝集体の場合、溶媒の屈折率の変化に対して、検出信号の大きさの変化が大きい。したがって、特許文献1および特許文献2に記載の技術でタンパク質凝集体のサイズと密度を計測する場合、ユーザはタンパク質凝集体および溶媒の屈折率を測定装置に対して高精度で入力することが必要であった。

【0012】

ユーザが屈折率を入力することに代えて、特許文献4のような屈折率を計測する装置を用いることも考えられる。しかし同文献記載の方法を含む市販の屈折率測定装置においては、使用する光源の波長が離散的な値になることが多い。したがって、波長の違いおよび添加物条件の差異に応じて溶媒と粒子それぞれの屈折率を正確に求めることは、ユーザの利便性の観点から困難である。

【0013】

本発明は、上記の課題を解決するためになされたものであり、光照射によって粒子のサイズや密度などを計測する場合において、ユーザが粒子の屈折率や溶媒の屈折率を計測装置に対して入力する負担を軽減するとともに、屈折率に依存した測定精度を向上することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明に係る粒子計測装置は、光透過窓とサンプルとの間の光軸方向に沿った境界位置を特定し、その境界位置における既知サンプルの屈折率と前記光透過窓の屈折率を用いて、前記サンプルの屈折率を計算する。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、光を用いて媒質中の粒子のサイズと密度を計測する際の利便性と計測精度を向上することができる。上記した以外の課題、構成、効果などについては、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】特許文献1記載の技術において、焦点ずれと検出信号および粒子のサイズの関係を示す模式図である。

10

20

30

40

50

【図 2】粒子の直径と信号強度との間の関係を示すシミュレーション結果である。

【図 3】式 1 に基づいて計算した溶媒の屈折率と検出信号の大きさとの間の関係を示す計算結果である。

【図 4】測定対象の粒子を含む溶媒を入れた容器と、測定するレーザ光との間の関係を示す模式図である。

【図 5 A】サンプルを Z 方向に移動して焦点位置を変化させたときの検出信号を示す実験結果である。

【図 5 B】焦点位置を Z 0 として固定し、参照光ミラーの位置を変化させたときの検出信号の変化を示す実験結果である。

【図 6】実施形態 1 における計測の流れを示すフローチャートである。

10

【図 7】実施形態 1 における計測の流れを示す別フローチャートである。

【図 8】ショ糖水溶液を溶媒として用いて測定した溶媒の屈折率の測定結果である。

【図 9 A】レーザ光の焦点が透明窓と溶媒との間の境界にある場合における光路を示す模式図である。

【図 9 B】レーザ光の焦点をサンプル内に移動する場合における移動量について示した模式図である。

【図 10】サンプル内の焦点位置 Z と検出信号の関係を示す計算結果である。

【図 11】特許文献 3 記載の高周波重畳技術によって、光源の半導体レーザのコヒーレンス長 L を $210\text{ }\mu\text{m}$ とした場合のサンプル内の焦点位置 Z と検出信号との間の関係を示す計算結果である。

20

【図 12】本発明による溶媒の屈折率の測定を高精度に実現するための透明窓の厚さバラツキの仕様について示す計算結果である。

【図 13】特許文献 2 に記載のサンプル容器の断面構造を示す模式図である。

【図 14 A】本発明において好適なサンプル容器の平面図を示す。

【図 14 B】図 14 A の A A ' 断面図である。

【図 15 A】特許文献 2 に記載のサンプル容器を用いて、サンプルの分注時に測定領域に気泡の影響が発生せず正常に測定が実施された比率を示す実験結果を示す。

【図 15 B】特許文献 2 に記載のサンプル容器を用いて、サンプルの分注時に測定領域に気泡の影響が発生せず正常に測定が実施された比率を示す実験結果を示す。

【図 16 A】実施形態 3 のサンプル容器によって、サンプルの分注時に測定領域に気泡の影響が発生せず正常に測定が実施された比率を示す実験結果である。

30

【図 16 B】実施形態 3 のサンプル容器によって、サンプルの分注時に測定領域に気泡の影響が発生せず正常に測定が実施された比率を示す実験結果である。

【図 17 A】実施形態 3 のサンプル容器とフレームおよびベースプレートの構成を示す図である。

【図 17 B】実施形態 3 の容器とベースプレートとの間の関係を示す模式図である。

【図 18 A】溶媒の屈折率の測定の基準として好適な容器の構成を示す模式図である。

【図 18 B】実施形態 1 と同様に対象となるサンプルの溶媒の測定の様子を示す模式図である。

【図 19】実施形態 4 に係る粒子計測装置の構成図の 1 例である。

40

【図 20 A】サンプル容器を Z 方向に移動させながら検出信号を取得する本発明の粒子サイズ分布測定方法を模式的に示す。

【図 20 B】サンプル容器を Z 方向に移動させながら検出信号を取得する本発明の粒子サイズ分布測定方法を模式的に示す。

【図 21 A】対物レンズを Z 方向に移動させながら検出信号を取得する本発明の粒子サイズ分布測定方法を模式的に示す。

【図 21 B】対物レンズを Z 方向に移動させながら検出信号を取得する本発明の粒子サイズ分布測定方法を模式的に示す。

【図 22 A】本発明のサンプル容器を本発明の粒子計測装置に取り付け・取り外しする場合を模式的に示す。

50

【図 2 2 B】本発明のサンプル容器を粒子計測装置に取り付けた場合の断面図を模式的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

＜実施の形態 1：従来技術の課題＞

図 1 は、特許文献 1 記載の技術において、焦点ずれと検出信号および粒子のサイズの関係を示す模式図である。図 1 左上は、相対的に小さな粒子に対して焦点ずれがある場合の光学系を幾何的に示すものである。粒子の z 位置（光軸に沿った座標）における幾何的なスポットサイズは、対物レンズの開口数と焦点ずれ量によって幾何的に定まる。幾何的ビームの面積内における粒子の投影面積の比率に応じて、検出信号が減衰する。この投影面積の比は光の反射の反応断面積に相当するものである。図 1 右上は、相対的に大きな粒子に対して焦点ずれがある場合を示す模式図である。図 1 左上に比較して、粒子サイズが大きいので反応断面積が大きく、反射する光量も大きくなる。したがって、粒子サイズの差異を反射光量の差異（検出信号量の差異）として検出することが可能である。図 1 下は、焦点位置の検出信号量と粒子サイズとの間の関係を示す実験結果である。

【0018】

図 2 は、粒子の直径と信号強度との間の関係を示すシミュレーション結果である。シミュレーション方法は、特許文献 1 記載の『波動的光線追跡法』を用い、光源の波長を 785 nm、対物レンズの開口数を 0.45 とした。図に見られるように、粒子の大きさに依存して検出信号の大きさが変化することがわかる。これらの対応関係データをあらかじめ記憶しておくことによって、検出信号の大きさから粒子サイズを計測することが可能である。

【0019】

一方、検出される反射光は、粒子サイズに応じて変化するとともに、粒子の屈折率に応じて変化する。特許文献 1 および特許文献 2 に記載の技術では、光の干渉を利用して反射光の電場振幅を電圧に変換することにより、検出信号を得ることができる。このとき、検出信号の大きさ $|E_{sig}|$ は、粒子の屈折率 n_p 、および溶媒の屈折率 n_m を用いて、Fresnel の法則から、光源のコヒーレンス長が十分に長い場合、次式によって表すことができる。S はサンプルに照射する光の電場振幅、R は参照光の電場振幅、 σ は粒子サイズに応じて変化する係数、 η は反射光と参照光の干渉効率および光検出器の高電変換の効率を示す定数、である。

【0020】

【数 1】

$$|E_{sig}| = \eta \sigma |S| |R| \frac{|n_p - n_m|}{|n_p + n_m|} \quad (\text{式 1})$$

【0021】

式 1 に見られるように、検出信号の大きさは、粒子のサイズだけでなく、粒子の屈折率 n_p 、および溶媒の屈折率 n_m に応じて変化する。一方、バイオ医薬においては、タンパク質ができるだけ凝集しないように例えば pH、塩、糖、界面活性剤などを適切な量で添加する。したがって、溶媒の屈折率は添加剤の条件によって変化する。

【0022】

図 3 は、式 1 に基づいて計算した溶媒の屈折率と検出信号の大きさとの間の関係を示す計算結果である。ここでは、ポリスチレンの屈折率を 1.58、タンパク質凝集体の屈折率を 1.40 とした。図に見られるように、溶媒との間の屈折率差が小さいタンパク質凝集体の場合、溶媒の屈折率に変化に対して、検出信号の大きさの変化が大きいことがわかる。

【0023】

このような関係があるので、特許文献 1 および特許文献 2 に記載の技術によってタンパ

ク質凝集体のサイズと密度を計測する場合、ユーザはタンパク質凝集体および溶媒の屈折率を測定装置に高精度で入力することが必要であった。この入力がユーザにとって計測時の負担となる場合がある。本発明の実施形態 1 では、このような屈折率の入力にともなうユーザ負担を軽減する手法を説明する。

【0024】

以下の記載においては、図 1 に記載したように、光軸方向を z 軸にとる座標系に統一して説明を進める。また、測定対象とする粒子のサイズは、体積が等しい球の直径として扱う。

【0025】

<実施の形態 1：溶媒および対象粒子の屈折率の測定方法について>

図 4 は、測定対象の粒子を含む溶媒を入れた容器と、測定するレーザ光との間の関係を示す模式図である。図において、108 は対物レンズ、300 はレーザ光、204 はサンプル、203 は容器、202 は容器の底面に設けられた透明窓、である。本実施形態は、溶媒の屈折率を測定するために、溶媒と透明窓 202 との間の境界の反射率が、溶媒の屈折率に依存することを利用する。図示しないサンプルステージを Z 方向に移動しながら、検出信号が最大となる条件を定めることにより、対物レンズ 108 の焦点はサンプル 204 と透明窓 202 との間の境界に位置決めすることができる。このとき、Fresnel の式から、検出信号の大きさ E_{sig} は、溶媒の屈折率 n_m 、透明窓の屈折率 n_g を用いて、下記式によって表される。S はサンプルに照射する光の電場振幅、R は図示しない参照光の電場振幅、 η は反射光と参照光の干渉効率および光検出器の高電変換の効率を示す定数、である。

【0026】

【数 2】

$$|E_{sig}| = \eta |S| |R| \frac{|n_g - n_m|}{|n_g + n_m|} \quad (\text{式 2})$$

【0027】

本実施形態において、透明窓 202 の材質を選択することにより、その屈折率は規定の値として用いることができる。同様に、サンプル 204 に対して照射する光の電場振幅 S、および参照光の電場振幅 R は、図示しない半導体レーザの出射パワー条件を一定とすることにより、定数値として扱うことができる。さらに、あらかじめクリーンルーム用純水などの既知の屈折率 n_o の液体をサンプルとして用いた場合の検出信号の大きさを計測しておき、その値を $|E_{0sig}|$ とする。 $|E_{0sig}|$ は下記式によって表される。

【0028】

【数 3】

$$|E_{0sig}| = \eta |S| |R| \frac{|n_g - n_o|}{|n_g + n_o|} \quad (\text{式 3})$$

【0029】

式 2 と式 3 より、下記式が成り立つ。

【数 4】

$$\frac{|E_{sig}|}{|E_{0sig}|} = \frac{|n_g - n_m|}{|n_g - n_o|} \quad (\text{式 4})$$

【0030】

式 4 において、溶媒の屈折率 n_m 以外は、既知の値もしくは計測値である。したがって、式 4 を用いて、測定するサンプルに対して溶媒の屈折率 n_m を直接定量化することが可

能となる。このとき、光源の波長は測定波長そのものであるから、前述のような波長に依存して変化する値を測定波長に相当する値へ換算するなどの処理も不要である。

【0031】

図5Aは、サンプルをZ方向に移動して焦点位置を変化させたときの検出信号を示す実験結果である。焦点位置約200 μm に見られるピークは透明窓と空気の界面からの反射光を表しており、焦点位置約375 μm に見られるピークは透明窓とサンプル（溶媒）の界面からの反射光を表している。両者の間隔は透明窓の厚さを示す。このように、透明窓と空気との間の界面、および透明窓と溶媒との間の界面を含むように、焦点位置を走査しながら検出信号を取得することによって、図における左から2番目のピーク位置を求めれば、透明窓と溶媒との間の境界の焦点位置Z0を位置決めすることができる。

10

【0032】

図5Bは、焦点位置をZ0として固定し、参照光ミラーの位置を変化させたときの検出信号の変化を示す実験結果である。図にみられるように、参照光ミラーの位置が約300 μm において、反射光が検出器に到達するまでの光路長と、参照光が同じ検出器に到達するまでの光路長が等しくなり、検出信号は最大となる。このときの検出信号の最大値が式4における E_{sig} である。参照光については説明を割愛したが、光学系の詳細については後述する。

【0033】

図6は、本実施形態における計測の流れを示すフローチャートである。ステップS600において、焦点位置Z0および参照光ミラー位置R0を予め定められた初期値Z00、R00に初期化する。ステップS601およびS602において、焦点位置Z0を走査しながら、検出信号を取得し、透明窓と溶媒との間の境界に焦点を結ぶようにZ0を更新する。ステップS603およびS604において、検出信号の光路長と参照光の光路長が一致する参照光ミラー位置R0を更新する。ステップS605において、式4を用いて溶媒の屈折率 n_m を求める。ステップS606において、焦点位置をサンプル内に移動して、屈折率 n_m を用いて、サンプルに含まれる粒子のサイズと密度を測定する。粒子のサイズと密度の測定に関しては、焦点位置を所定の範囲でX、Y、Z方向に移動しながら粒子からの反射光を検出信号として電気信号に変換して計測し、粒子ごとに焦点位置の検出信号の最大値を求め、媒質の屈折率 n_m を利用して、粒子ごとのサイズと密度を測定してユーザに視認できる形式で提示する。このとき、検出信号の最大値から粒子のサイズを求める変換においては、溶媒の屈折率 n_m に応じて補正した図2の関係を用いる。

20

30

【0034】

図7は、本実施形態における計測の流れを示す別フローチャートである。本発明においては、ユーザの利便性とサイズ分布計測精度の向上を図るために、サンプル容器は使い捨てタイプにすることが可能である。このとき、サンプル容器の形状の個体差やユーザがサンプル容器を装置へ設置する際に発生する位置ずれなどにより、透明窓と溶媒との間の境界に焦点を結ぶ条件が、あらかじめ定められた初期値から大きく（例：10 μm 程度以上）ずれることがある。図7は、このような場合において好適な本実施形態のフローチャートである。レーザ光のスポット位置と参照光ミラーの位置の前回値からの変化が所定の閾値 Δ 以下になるまで、Z0とR0の更新を繰り返すことにより、これを実現することができる。

40

【0035】

ステップS700において、焦点位置Z0および参照光ミラー位置R0を、あらかじめ定められた初期値Z00、R00に初期化する。ステップS701～S704は、S601～S604と同様である。ステップS705において、Z0の現在値と前回値との間の差分、および、R0の現在値と前回値との間の差分が、いずれも閾値 Δ よりも小さいか否かを判定する。これが満たされない場合には、Z0とR0それぞれの前回値を現在値によって更新した後、S701に戻って試行を繰り返す。S705の条件を満たす場合は、ステップS706～S707を実施する。これらはステップS605～S606と同様である。Z0に関する閾値 Δ とR0に関する閾値 Δ は、互いに同じ値であってもよいし異なる

50

値であってもよい。

【0036】

発明者らの実験的検討を通じて、光源として波長785nmの半導体レーザを用い、対物レンズとして開口数0.45の顕微鏡レンズ、透明窓として厚さ175 μ mのホウケイ酸ガラス（屈折率実測値=1.520）を用いた場合、閾値 Δ は、Z方向に対して約1 μ m、R方向に対して約5 μ mが好適であることが分かっている。また、サイズ分布測定における焦点位置の移動範囲に関しては、Z方向に50～100 μ m、X、Y方向に300～500 μ m程度が好適であることが分かっている。また、溶媒内で乱雑にブラウン運動する粒子の位置の変化に対応して、粒子のサイズを計測するためには、XまたはY方向の焦点走査のいずれか1つについて、走査型レーザ顕微鏡などに広く用いられている共振型ガルバノミラーを用いることが好ましい。ここに述べた数値については、波長、ビーム直径、対物レンズの仕様などに応じて、一般の干渉計測に通じた技術者ならば、適宜定めることができる。

【0037】

図8は、ショ糖水溶液を溶媒として用いて測定した溶媒の屈折率の測定結果である。よく知られているように、ショ糖水溶液は濃度に応じて屈折率が線形に変化する。図中の参照データは、カルニュー精密屈折計を用いてC線（656.27nm）で測定されたショ糖水溶液の屈折率の公開データ（<http://www.shimadzu.co.jp/products/opt/products/ref/ref-app05.html>）を示している。前述のように、一般の屈折率測定方法は、平行光を用いて、離散的な波長に対して実施されるので、例えば波長785nmの半導体レーザを光源として用いるときの波長に直接対応することが困難である。一般に、誘電体の屈折率は波長が長くなるほど低下する傾向があることが知られており、これらが温度に依存することも既知である。本実施形態を利用して測定した屈折率は、サイズ分布を測定する光源をそのまま用い、かつ対物レンズで集光されたレーザ光に対する屈折率であって、かつサンプルの温度条件等はサイズ測定を実施するものと同じであるから、前述のようにユーザがこれらの要因を換算して屈折率を入力する必要がなくなり、利便性の向上を図ることができる。

【0038】

<実施の形態2：サンプル内への焦点位置の移動量と参照光ミラーの移動量について>

本発明は、溶媒内に浮遊する粒子からの微弱な反射光をホモダイン位相ダイバーシティ法によって増幅して検出する。ホモダイン位相ダイバーシティ法を構成する光学系の詳細については後述するが、これが所定の増幅を実現するためには、反射光と参照光が光検出器上で光路長が一致することが求められる。本発明の実施形態2では、光路長を一致させるための具体的手法について説明する。

【0039】

図9Aは、レーザ光の焦点が透明窓と溶媒との間の境界にある場合における光路を示す模式図である。図示しないZステージにより保持されたサンプルの位置をZ0、図示しないRステージに保持された参照光ミラーの位置をR0とする。光源である半導体レーザから照射された光の一部は、信号光としてサンプルに向かって進行し反射されて検出光学系に導かれる。同時に半導体レーザから照射された光の別の一部は、参照光として参照光ミラーに向かって進行し反射されて検出光学系に導かれる。Z0とR0において、半導体レーザから検出光学系までの信号光と参照光それぞれの光路長は、波長オーダで一致する。

【0040】

図9Bは、レーザ光の焦点をサンプル内に移動する場合における移動量について示した模式図である。図に見られるように、レーザ光の焦点をサンプル内に移動するためには、サンプルを保持するZステージをdzだけ移動し、参照光ミラーを保持するRステージをdrだけ移動すればよい。本発明が測定対象とする粒子は媒質中を乱雑にブラウン運動しており、位置が定まらないので、前述のようにZとRを走査しながら光路長が一致するように定めるのは困難である。仮にこれを実施すると、参照光ミラー位置を5 μ m程度の間隔で数十回変化させながら、上に示した粒子サイズ分布の測定を実施し、検出された複数

の粒子からの検出信号の平均値が最大となる条件として参照光ミラーの位置を定めることになる。しかしこのような手順は、測定に余計な時間がかかりユーザの利便性が大きく損なわれることになる。そこで本実施形態においては、光学的観点から dz と dr の関係を以下のように定める。

【0041】

サンプル位置を dz だけ対物レンズの方向に移動した場合における焦点位置の変化 dFP は溶媒の屈折率 n_m に依存し、スネルの法則もしくは光学における近軸理論によって下記式により近似することができる。

【0042】

【数5】

$$dFP = dz n_m \quad (\text{式5})$$

10

【0043】

焦点からの反射光が検出光学系に達するまでの光路長の変化 dL は、空気中の光路長が dz だけ小さくなり、媒質中の光路長が dFP だけ大きくなるので、次式で表すことができる。

【0044】

【数6】

$$dL = 2(n_m^2 - 1)dz \quad (\text{式6})$$

20

【0045】

したがって、信号光と光路長を一致させるための参照光ミラーの移動量 dr は、上の近似の補正項を α として、次式で表すことができる。

【0046】

【数7】

$$dr = \alpha(n_m^2 - 1)dz \quad (\text{式7})$$

30

【0047】

補正項 α は、対物レンズの球面収差の変化の影響を主体とするものであり、対物レンズの構造が既知の場合には光線追跡法により求めることが可能である。発明者らの実験的検討を通じて、光源として波長 785 nm の半導体レーザーを用い、対物レンズとして開口数 0.45 の顕微鏡レンズ、透明窓として厚さ $175 \mu\text{m}$ のホウケイ酸ガラス（屈折率実測値 $=1.520$ ）を用いた場合、 dz の範囲が $100 \sim 900 \mu\text{m}$ の範囲において、 $\alpha = 1.029$ で良好に補正が可能なが分かっている。光源の波長や対物レンズを変更する場合には、上に述べたように光線追跡による計算や実験的検討により α の値を適宜定めればよい。 α の値は光学系の選択によって変化するがその範囲は $0.8 \sim 1.2$ である。

【0048】

式5と式7を用いれば、サンプルの移動量に対する焦点の位置、および参照光ミラーの移動量を、前述のような参照光ミラー位置の網羅的走査をしなくても一意に定めることが可能となり、測定時間の伸長を抑えて測定精度の担保とユーザの利便性の向上を同時に実現することが可能である。

40

【0049】

ここでは、サンプル位置を対物レンズの方向に移動する移動量と参照光ミラーの移動量との間の関係を示したが、サンプル位置を固定して対物レンズを移動することも同様に可能である。この場合、対物レンズ位置をサンプルの方向に同じ dz だけ移動すると、式5～式7の関係をそのまま使って、参照光ミラーの移動量 dr を定めることが可能である。具体的な実施の形態については後述する。

50

【0050】

次に本発明の粒子サイズ分布測定において好適なサンプルの移動量 dz の好適な値について述べる。本発明では、溶媒内に浮遊する粒子からの微弱な反射光をホモダイン位相ダイバーシティ法によって増幅して電気信号に変換して検出する。式1に対して、光源である半導体レーザのコヒーレンス長の影響を考慮すると、レーザ光の焦点にある粒子から検出信号の大きさ $|E_{sig}|$ は反射光の電場 E_s の大きさと参照光の電場 E_r の大きさに比例し、コヒーレンス長を L 、信号光と参照光の光路長の差を ΔL として、以下で表される。

【0051】

【数8】

$$|E_{sig}| = \eta \sigma |S| |R| \frac{|n_p - n_m|}{|n_p + n_m|} \cdot \exp \left\{ -2 \log(2) \frac{\Delta L^2}{L^2} \right\} \quad (\text{式8})$$

10

【0052】

コヒーレンス長は、検出信号の2乗 $|E_{sig}|^2$ が最大値の $1/2$ となる光路長差の FWHM 範囲である。その他の項については、式1の説明と重複するので、ここでは説明を割愛する。

【0053】

本発明では、ホモダイン位相ダイバーシティ法によって、対象の粒子からの反射光を検出するが、他の光学測定法と同様に、透明窓と溶媒との間の境界からの反射光も検出光学系によって受光される。透明窓と溶媒からの反射光は対象の粒子からの反射光に比較して10倍～100倍程度大きく、粒子サイズ分布の計測時に不要なノイズとして振る舞うので、この影響について次に述べる。

20

【0054】

レーザ光の焦点がサンプル内にあるとき、透明窓と溶媒の境界からの反射光は、焦点からずれた面からの反射光としてデフォーカス収差を伴って検出される。この場合の検出信号検出信号の大きさ $|E_{sig_boundary}|$ は以下の式で表される。

【0055】

【数9】

$$|E_{sig_boundary}| = \eta |S| |R| \frac{|n_g - n_m|}{|n_g + n_m|} \cdot \left| \text{sinc} \left(\pi \cdot \frac{Z}{\lambda} \cdot NA^2 \right) \right| \cdot \exp \left\{ -2 \log(2) \frac{\Delta L^2}{L^2} \right\} \quad (\text{式9})$$

30

【0056】

式9において、デフォーカス収差の影響は sinc 関数の項であり、 Z はサンプル内の焦点位置（デフォーカス量に相当）であり、 λ は光源の波長、 NA は対物レンズの開口数を表している。

40

【0057】

図10は、サンプル内の焦点位置 Z と検出信号の関係を示す計算結果である。ここでは、レーザ光のコヒーレンス長が十分に大きいとして、式8と式9を用いて、対象粒子から得られる検出信号、および透明窓と溶媒の境界から得られるノイズを計算した。図において、 $Z=0$ は透明窓と溶媒の境界位置である。ここでは、溶媒の屈折率を1.333、粒子の屈折率を1.400、サイズを $0.1 \mu\text{m}$ 、位置を $Z=500 \mu\text{m}$ とした。図に見られるように、透明窓と溶媒の境界からの得られる信号は、 Z の増加に従って減衰し、対象粒子の位置が $500 \mu\text{m}$ であれば、粒子からの検出信号が、境界からのノイズに比較して約10倍大きくなるのがわかる。両者の大きさが同じになる条件は、図より $Z > \text{約} 50 \mu\text{m}$ である。この結果から、本発明のサイズ分布計測では、サンプル内のレーザ光の焦点

50

位置は、透明窓から少なくとも $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上離すことが好ましいことがわかる。

【0058】

図11は、特許文献3記載の高周波重畳技術によって、光源の半導体レーザのコヒーレンス長 L を $210\text{ }\mu\text{m}$ とした場合のサンプル内の焦点位置 Z と検出信号との間の関係を示す計算結果である。発明者らの実験的検討を通じて、光源として波長 785 nm の半導体レーザを用い、対物レンズとして開口数 0.45 の顕微鏡レンズを用いた場合、高周波重畳の周波数を約 300 MHz としてコヒーレンス長を約 $210\text{ }\mu\text{m}$ とすることにより、レーザノイズの観点、および透明窓と溶媒の境界からのノイズの観点などから、これが本発明に好適な高周波重畳の条件であることが分かっている。計算結果はこれに基づくものである。

10

【0059】

図に見られるように、高周波重畳によって光源である半導体レーザのコヒーレンス長を制御することにより、対象粒子の位置が $500\text{ }\mu\text{m}$ の場合、粒子からの検出信号が、境界からのノイズに比較して約 100 倍大きくなり、高周波重畳の効果によって、ノイズの影響が約 $1/10$ に改善することがわかる。図より、高周波重畳を用いることにより、 S/N 比を 10 以上として計測を実施するためには、サンプル内の焦点位置を透明窓の境界から $130\text{ }\mu\text{m}$ 以上離せばよいことがわかる。一般には S/N 比が 3 程度あれば、計測の実施が可能と考えて良いので、本実施形態の効果は透明窓の境界から $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上離してサンプルを計測することによって得られるといえる。

20

【0060】

高周波重畳によるコヒーレンス長の制御については、使用する回路形式やインピーダンス整合条件などにより好適な条件が変化する。レーザノイズの観点で発光パワーの時間変化と発振波長の広がりを見ながら、式9による測定へのノイズ影響を考慮して、対象の粒子に対して、検出信号の S/N 比が最大となるようにすることによって、他の光学システムでも本実施形態の技術を適用することができる。これは、当該技術分野に係る一般の技術者にとっては容易なことである。

【0061】

サンプルの液面の上端と空気の境界からの反射光も同様に測定に対してノイズとして影響する。図に見られるように、測定焦点位置を透明窓から $500\text{ }\mu\text{m}$ 程度離せば、十分にノイズの影響を小さくすることができるので、サンプルの液面の上端は、透明窓の境界から $500\text{ }\mu\text{m}$ の 2 倍である 1 mm 以上であることが、本実施形態の効果を良好に実現するために求められる。

30

【0062】

次に対象粒子の屈折率の測定方法について述べる。本実施形態によりあらかじめ溶媒の屈折率を測定した後、式5～式7にしたがって、サンプル内にレーザ光の焦点位置を移動して対象粒子からの検出信号を測定することにより、溶媒と対象粒子それぞれの屈折率に応じた検出信号を計測することができる。ポリスチレン標準粒子のように、対象粒子のサイズが既知の場合は、得られた検出信号と式8を用いて対象粒子の屈折率 n_p を算出することが可能である。一方で、特定の条件で形成されたタンパク質凝集体のように、サイズが未知の対象の場合には、図8に示したショ糖水溶液などのように屈折率が既知の媒質を用いればよい。少なくとも 2 つ以上の濃度のショ糖水溶液でサンプルを希釈したものを測定することによって、溶媒の屈折率とサイズ分布に応じた検出信号の平均値（サイズ分布があるので、平均値を用いるのがよい）を 2 つ取得すれば、式8を用いてサイズ分布に係る量 σ と対象粒子の屈折率 n_p を 2 つの未知数として連立することにより、両者を算出することが可能である。

40

【0063】

<実施の形態3：サンプル容器>

実施形態1～2によって、粒子サイズ分布を高精度に計測するためには、測定光学系の一部である透明窓を含むサンプル容器が所定の仕様を満足する必要がある。上に述べたように、液面高さ 1 mm 以上がその条件の 1 つである。本発明の実施形態3では、これらの

50

仕様を満足するサンプル容器の具体例について説明する。計測手法については実施形態 1～2 と同様である。

【0064】

図 12 は、本発明による溶媒の屈折率の測定を高精度に実現するための透明窓の厚さバラツキの仕様について示す計算結果である。よく知られているように、透明窓の厚さが所定の値からずれた場合、光学的には球面収差が発生する。式 1～式 2 に示した検出信号への影響は、波面収差に基づく S t r e h l 強度の低下として扱うことができる。図 12 は透明窓の厚さのズレによる検出信号 (S t r e h l 強度) の低下の様子を示す計算結果である。ここでは、光源として波長 785 nm の半導体レーザーを用い、対物レンズとして開口数 0.45 の顕微鏡レンズ、透明窓として厚さ 175 μm のホウケイ酸ガラス (屈折率実測値=1.520) を用いた場合の結果を示している。図に見られるように、検出信号の低下量を 0.2 % 以下とするためには、透明窓の厚さのバラツキ (最も厚い箇所と最も薄い箇所との間の厚さ差分) は 70 μm 以下が求められることがわかる。

【0065】

実施形態 1 で示したように、溶媒の屈折率と粒子サイズ分布を計測するためには、サンプル容器を Z 方向に移動させながら、反射光を検出信号に変換して取得することが好ましい。原理的には、サンプル容器の位置を固定して、光学系全体を移動させながら計測を実施しても同様であるが、サンプル容器に比較して、光学系全体の重量と体積は非常に大きいので、消費電力や装置の小型化の観点で好ましいとは言えない。上述のように、サンプル容器を電動ステージにより Z 方向に移動させる場合、その加減速の影響によって、サンプル内に液面の振動が生じることは避けられない。この液面振動をブラウン運動の量に対して、十分に小さなものとするためには、容器の壁面に狭窄部などを形成することによって、粘性抵抗を高めることなどが求められる。

【0066】

図 13 は、特許文献 2 に記載のサンプル容器の断面構造を示す模式図である。ここでは、上述のように電動ステージによりサンプル容器が Z 方向に移動した影響によって液面が振動する様子を模式的に示している。図に見られるように、特許文献 2 に記載のサンプル容器は、測定部に気泡の混入を防ぐために気泡流路を介して気泡を逃がすことができるように 2 つの領域が接続された構造をもつ。これにより、Z 方向の移動の影響として、2 つの領域の液面高さが上下に振動するモードが発生しやすい。これは、測定中の粒子のブラウン運動よりも大きくなりやすく、測定精度の低下につながりやすい。

【0067】

図 14 A は、本発明において好適なサンプル容器の平面図を示す。図中、1401 は容器、1402 はウェル外周部に形成した狭窄部、1403 はウェルに注入されたサンプル、1404 はウェル、である。図に見られるように、本実施形態においては、サンプルを注入するウェル 1404 をアレイ状に一体成型して配列している。特徴は、ウェル 1404 の外周に狭窄部 1402 を形成したことにある。狭窄部 1402 は、ウェル 1404 の側壁からウェル 1404 の外側に向かって突出するように形成されている。図 14 A の平面上における狭窄部 1402 の断面積は、ウェル 1404 の断面積よりも小さい。

【0068】

図 14 B は、図 14 A の A A ' 断面図である。1405 は透明窓を示す。容器 1401 は、Z 方向の容器の移動による液面の振動を低減させるために、特許文献 2 のような気泡流路を用いず、代わりに狭窄部 1402 を有する。狭窄部 1402 は、気泡を逃がすのではなく、ウェル 1404 の外周部に気泡をトラップして測定への影響を抑止する機能を有する。さらに、狭窄部 1402 を形成することによって、毛細管現象を利用して実効的に液と壁面との間の流れ抵抗を増加させて、液面の振動の低減を図っている。

【0069】

本実施形態の容器 1401 により、上に述べた液面振動の課題を解決して、安定した粒子サイズ分布計測の実現が可能になった。また、貴重なバイオ医薬品サンプルの使用量を少なくするために、20 μL のサンプルで、液面高さが 1 mm 以上となるように、ウェル

1404の直径は4.0mm以下とした。透明窓1405の材質としては、厚さ175 μ mのホウケイ酸ガラス（屈折率実測値=1.520）を用いた。厚さ精度は上の仕様（バラツキ $\leq$ 70 μ m）を満たすように、 $\pm$ 15 μ mの精度で管理して作成した。容器1401の外形は、透明窓1405の傾きなどが発生しないように管理して黒色のポリプロピレン樹脂の成型で作成した。

【0070】

図15AとBは、特許文献2に記載のサンプル容器を用いて、サンプルの分注時に測定領域に気泡の影響が発生せず正常に測定が実施された比率を示す実験結果を示す。図15Aは容器の断面構造である。ここでは上の仕様にしたがって、サンプル量20 μ Lで液面高さが1mm以上となる条件の範囲としてウェルの内径を2~3mmの範囲で変化させた容器を作成した。図15Bは、50回の分注試験を実施して、正常にサイズ分布計測が実施できた比率をテーブルにまとめた実験結果である。図に見られるように、ウェルの内径が3mmの場合は気泡の混入が発生せずサイズ分布計測が実施できた。しかしながら、液面の振動の影響がブラウン運動よりも小さくなるための測定待ち時間が1分必要であった。これはサイズ分布測定時間20秒に比較して長いことが分かった。

【0071】

図16AとBは、本実施形態のサンプル容器によって、サンプルの分注時に測定領域に気泡の影響が発生せず正常に測定が実施された比率を示す実験結果である。図16Aに見られるように、ここでは狭窄部の形成個数を0~4個の範囲、ウェルの内径を2~4mmの範囲、で変化させた容器を作成した。図16Bは、50回の分注試験を実施して、正常にサイズ分布計測が実施できた比率をテーブルにまとめた実験結果である。図に見られるように、狭窄部の個数が0個の場合は、全数の正常計測が実現できる条件がないことがわかる。一方、本実施形態に係る容器のように狭窄部を形成した場合、狭窄部が2個以上または1個かつウェルの内径が3.5mm~4.0mmの範囲であれば、全数の正常計測が実現できる条件があることがわかる。この時、液面の振動の影響がブラウン運動よりも小さくなるための測定待ち時間は約5秒であった。

【0072】

以上のように、本実施形態のサンプル容器を用いることによって、特許文献1に記載の容器と同等の気泡の影響抑止性能を得るとともに、サンプル容器のZ方向の移動にともなう待ち時間を削減し、短時間での計測が完了するというユーザ利便性の向上を図ることができた。

【0073】

図17Aは、本実施形態のサンプル容器とフレームおよびベースプレートの構成を示す図である。図17Aにおいて、1701はベースプレート、1702はフレーム、1703はサンプル容器を示す。ベースプレート1701の上にフレーム1702に沿ってサンプル容器1703が位置決めされてセットされる。この時、サンプル容器の底面である透明窓とベースプレートは接する構成とした。ベースプレート1701の材質としては熱伝導率の高い金属材料を用いることが望ましい。ここでは熱伝導率が高く加工精度に優れたグラファイト基アルミニウム複合材ACM-i_oを用いた。このような構造によって、サンプル容器は測定ごとに使い捨てにすることができ、容器の洗浄や測定への付着物の影響を避けて、ユーザの利便性を向上することが可能である。

【0074】

本実施形態においては、ユーザのハンドリング性を考慮して、サンプル容器がウェル4個の組を有する場合について示したが、サンプル容器が有するウェルの個数は任意である。例えばウェル32個を1組とした容器も作成可能であり、容器のコストや歩留まりなどを考慮して適宜、組数を選択することが可能である。

【0075】

図17Bは、本実施形態の容器とベースプレートとの間の関係を示す模式図である。図において、1701はベースプレート、1703はサンプル容器、1704は透明窓、1705はサンプル、1706はサンプルの蒸発を抑止するためのシール、1710は射出

10

20

30

40

50

成型による容器の形状精度を向上するための空隙、１７１１は温度安定化のためのサンプルからベースプレートへの熱流をそれぞれ示す。

【００７６】

本構造によって、透明窓１７０４はベースプレート１７０１に対して直接接触することができる。ベースプレート１７０１には透明窓１７０４に対応する穴を設けており、その直径はウェルの直径よりも大きくしている。本発明の粒子サイズ測定方法においては、サンプルの温度と測定装置の温度に差異があると対流による粒子の流れが生じて、測定精度が低下する。本実施形態では、透明窓１７０４として、プラスチック素材に対して熱伝導率の高いガラス素材を使い、さらに透明窓１７０４と金属製で熱伝導率の高いベースプレート１７０１を接触させる構成によって、サンプルの温度を短時間で装置内の温度と同じにすることができ、温度安定化の待ち時間を短縮してユーザの利便性を向上することができる。発明者らが実験的に確かめた温度安定化のための待ち時間は、特許文献２に記載のサンプル容器に比較して、３０分から１０分に短縮することができた。また、本実施形態では１回の操作で９６個のサンプルの測定を連続して実施することができる。各サンプルに対して上の標準測定を１０回繰り返す条件で９６個のサンプルの測定を完了するまでに要した時間は約４．８時間であった。

【００７７】

実施形態１で述べたように、本発明では光学系の一部としてサンプル容器の透明窓を用いて溶媒の屈折率を測定する。前述の実施形態では基準となる信号を装置の出荷時にあらかじめ記憶しておく方法について開示した。一方で、光源である半導体レーザは長期間の使用により量子効率が低下することが知られており、また発光波長分布が温度により変化することも既知である。さらに、対物レンズの表面にホコリなどが付着することによって透過率が低下し、検出信号の大きさが小さくなる場合もある。このような場合、装置の出荷時にあらかじめ記憶していた信号レベルを基準値として用いると、屈折率の測定誤差が大きくなってしまう。

【００７８】

図１８Ａは、溶媒の屈折率の測定の基準として好適な容器の構成を示す模式図である。図１８Ａは、サンプルの代わりにクリーンルーム用の純水もしくは屈折率が既知の紫外線や熱硬化樹脂（基準サンプル）を封止したサンプル容器を用いた基準信号の測定方法を示す。透明窓と純水もしくは紫外線硬化樹脂や熱硬化樹脂との界面にレーザ光の焦点を位置決めし、参照光ミラーの位置を光路長が等しくなるように調整した後、基準信号を取得することにより、式２～式４において必要な基準信号を得ることができる。

【００７９】

図１８Ｂは、実施形態１と同様に対象となるサンプルの溶媒の測定の様子を示す模式図である。本実施形態のように既知の屈折率の物質を封止したサンプル容器を用いることによって、式４を用いて前述の半導体レーザの量子効率の変化や対物レンズに付着したホコリなどの影響を共通項として排除することが可能になり、本発明による溶媒の屈折率の測定精度を高精度に保つことが可能となる。こうした容器は、ユーザが必要なときに、前述のフレームに設置してもよいし、あらかじめ装置内の特定の箇所に固定しておいてもよい。封止する材料として、純水の場合には、ユーザが必要に応じて準備することが容易というメリットがある。またＵＶ硬化樹脂や熱硬化樹脂を封止する場合には、液量や蒸発などの影響がなく取り扱いが容易でユーザの利便性が向上するというメリットがある。

【００８０】

<実施の形態４：粒子計測装置>

図１９は、本発明の実施形態４に係る粒子計測装置の構成図の１例である。高周波重畳や出射パワーを制御するレーザドライバ１０１により発光状態を制御された光源１００から出射したレーザ光はコリメートレンズ１０２によって平行光に変換され、光学軸が水平方向に対して約２．５度に設定されたλ／２板１０３によって偏光方位を調整された後、偏光ビームスプリッタ１０４によって信号光と参照光とに分離される。

【００８１】

参照光は、 $\lambda/4$ 板105によって円偏光状態に変換された後、参照光ミラー106によって反射され、 $\lambda/4$ 板105によって往路とは偏光が90度回転した偏光状態となり、偏光ビームスプリッタ104で反射される。信号光は、XY方向の複合偏向素子107により進行方向が偏向されたのち、内蔵された $\lambda/4$ 板の作用により円偏光状態に変換され、対物レンズ108によってサンプル204内で焦点を結ぶ。サンプルをZ軸方向に移動する駆動機構109は、信号光の焦点位置をZ軸方向（光軸方向）に沿って走査する機能を有する。サンプル204から反射した信号光の成分は、XY方向の複合偏向素子107によって、往路と同じ方向に偏向されるとともに、内蔵された $\lambda/4$ 板の作用により円偏光状態となり、偏光ビームスプリッタ104を透過する。ここで、サンプル容器200はウェル内にサンプル204を保持するとともに、透明窓202を介して信号光をサンプル内に導く。203はサンプル容器のウェルを形成する樹脂部材である。ベースプレート201は透明窓202と接触して、機械的にサンプル容器200を保持するとともに、サンプルの温度の安定化を担う。

【0082】

信号光と参照光は、偏光ビームスプリッタ104によって合波され、検出光学系112に導かれ、ピンホール111を介してハーフビームスプリッタ113によって透過光と反射光に分岐される。

【0083】

反射光は、光学軸が水平方向に対して約45度に設定された $\lambda/4$ 板114を通過した後、集光レンズ115によって集光されるとともに偏光ビームスプリッタ116によって2分岐され、それぞれ光検出器150、151で光電変換され、電流差動アンプ152により差動増幅され検出信号123となる。

【0084】

透過光は、光学軸が水平方向に対して約22.5度に設定された $\lambda/2$ 板118を透過した後、集光レンズ119によって集光されるとともに偏光ビームスプリッタ120によって2分岐され、それぞれ光検出器153、154で光電変換され、電流差動アンプ155によって差動増幅され検出信号122となる。

【0085】

ここに示した検出光学系112はホモダイン位相ダイバーシティ法を構成しており、検出信号122、および123は（式8）（式9）で示す検出信号のそれぞれ実数部と虚数部である。検出信号の大きさは、これらから絶対値を算出したものとして、信号処理部124で処理される。表示部125は、信号処理部124による算出結果を表示してユーザに提示する。信号処理部124は、以上の実施形態において説明した手法（例えば図6～図7のフローチャート）を実施することにより、溶媒の屈折率、粒子の屈折率、粒子サイズ、などを計算する。信号処理部124はその他、粒子計測装置が備える各部を制御する。

【0086】

本装置を用いて、図17Aに示した複数のサンプル容器のアレイに対して連続自動測定を実施することは、駆動機構109の機能としてZ方向だけでなく、X、Y方向のサンプル移動機能を付加することにより容易に実現可能である。

【0087】

<実施の形態5：サイズ分布測定における焦点位置の移動方法>

実施形態1に示したように、本発明によって、粒子サイズ分布を測定するためには、サンプル内でZ方向に焦点位置を移動しながら検出信号を取得する必要がある。このとき、サンプル容器をZ方向に移動させながら検出信号を取得することが、光学系の光路長条件を一定に保つという意味で好ましい。他方で、サンプル容器の位置を固定して、光学系全体を移動させながら計測を実施したとしても、光学系の光路長条件を一定に保つという効果は同様であるが、サンプル容器に比較して、光学系全体の重量と体積は非常に大きいので、消費電力や装置の小型化の観点で好ましいとは言えない。しかし、対物レンズを透過する光のパワー変動などが一定の基準内であれば、光学系全体ではなく、対物レンズだけをサンプルの方向に移動して粒子サイズ分布を測定することが可能である。本発明の実施

10

20

30

40

50

形態5では、その具体例を説明する。サンプル容器に代えて対物レンズを移動する点以外は以上の実施形態と同様である。

【0088】

図20AとBは、サンプル容器をZ方向に移動させながら検出信号を取得する本発明の粒子サイズ分布測定方法を模式的に示す。図20Aは焦点位置が開始点にある場合を示す模式図である。図20Bは焦点位置が終了点にある場合を示す模式図である。図において Δz は両者のサンプル容器の位置の差異を示している。前述のように、 Δz は50～100 μm が好ましいことがわかっている。サンプル容器の移動は図示しないZステージによって制御される。

【0089】

図21AとBは、対物レンズをZ方向に移動させながら検出信号を取得する本発明の粒子サイズ分布測定方法を模式的に示す。図21Aは焦点位置が開始点にある場合を示す模式図である。図21Bは焦点位置が終了点にある場合を示す模式図である。図において Δz は両者の対物レンズの位置の差異を示している。対物レンズの移動は対物レンズ駆動部2101（例えばZステージ、対物レンズの位置を走査する『走査部』に相当）によって制御される。本図の構成においては、測定中にサンプル容器の位置が動かないので、慣性力およびステージからの振動の伝搬によるサンプル液面の振動が抑えられるという長所がある。一方で、対物レンズを移動するZステージが追加されるので、装置構成が複雑になるという短所がある。サイズ分布測定時における対物レンズの移動量は50～100 μm 程度であるので、ビーム直径を5mm程度とすれば、ガルバノミラーで焦点位置を走査する方法であっても、対物レンズを透過した光のパワー変動が十分に小さくなるように光学系を構成することは、一般の光学技術者であれば容易である。対物レンズの重量は光学系全体に対して十分に小さいので、この方式の消費電力はサンプル容器を移動する方式と同等である。

【0090】

以上説明したように、本発明の手法は、サンプル容器を移動する方式と対物レンズを移動する方式いずれにおいても適用可能である。

【0091】

<実施の形態6：サンプル容器>

図22Aは、本発明の実施形態6に係るサンプル容器を本発明の粒子計測装置に取り付け・取り外しする場合の様子を表す模式図である。図中、1701はベースプレート、1702はフレーム、1703はサンプル容器である。ここで、ベースプレート1701およびフレーム1702は粒子計測装置に取り付けられて固定され、サンプルホルダーを形成している。こうした構成により、サンプル容器1703はサンプルホルダーに取り付け、取り外しが可能である。ユーザは、サンプルを分注するウェルの洗浄や異物管理をすることなく、サンプル容器を使い捨てにすることが可能で、速やかで安定した計測が可能となる。また、本サンプル容器をサンプルホルダーにすべて取り付けした場合、前述のマイクロプレートの96ウェル規格（127.76mm幅×85.48mm奥行）と同じ寸法となる。同時にウェル間のピッチは同規格（9mm）と同じである。これにより、保管庫の共通利用などのユーザ利便性を提供することができる。

【0092】

図22Bは、本発明のサンプル容器を粒子計測装置に取り付けた場合の様子を示す断面図である。図中、1701はベースプレート、1702はフレーム、1703はサンプル容器、1704は透明窓、1705はサンプル、1708は対物レンズである。本発明においては、透明窓を介して、対物レンズから出射した光がサンプル容器に対して照射される必要がある。このためには、サンプル容器は、フォルダーに収容された状態で、ウェルが計測に支障のないように位置決めされる必要がある。本発明は、これを可能にするように構造上の工夫をしている。図に見られるように、ウェルのXY方向の位置決めは、フレーム1702とサンプル容器1703の外形の寸法精度で実現する。両者の間隙は30～300 μm 程度が好ましい。ウェルのZ方向の位置決めは、透明窓1704とベースプレ

10

20

30

40

50

ト 1 7 0 1 を接触することで実現する。

【 0 0 9 3 】

本実施形態のサンプル容器はウェル 4 個を内蔵する。ウェル 1 個を内蔵するサンプル容器に比較して、容器の X Y 方向の幅を約 1 7 . 5 mm、高さを約 1 1 mm とすることができ、サイズの面でつまみ易く、分注時に自立して転倒しないため、ユーザの作業性を向上することができる。また、本発明の容器の幅は、前述のマイクロプレートの 9 6 ウェル規格のウェルピッチ 9 mm の 2 倍 (1 8 mm) 以下とすることにより、重なることなく 9 6 ウェルを配置することが可能となる。

【 0 0 9 4 】

< 本発明の変形例について >

本発明は、前述した実施形態に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、上記した実施形態は本発明を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備えるものに限定されるものではない。また、ある実施形態の構成の一部を他の実施形態の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実施形態の構成に他の実施形態の構成を加えることも可能である。また、各実施形態の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

【 0 0 9 5 】

以上の実施形態において、透明窓を構成する部材 (例えば 2 0 2 や 1 7 0 4) は、ウェルを形成する部材 (例えば 2 0 3 や 1 7 0 3) の下方に配置されている 1 つの板状の部材として例示したが、透明窓を形成する部材の構造はこれに限られるものではない。少なくともウェル内のサンプルとの間に光を透過する領域が形成されることにより、透明窓として作用することができればよい。さらに、透明窓を構成する部材は、サンプル容器の一部として構成してもよいし、サンプル容器に対して装着することにより透明窓を形成する部材として構成してもよい。

【 符号の説明 】

【 0 0 9 6 】

- 1 0 0 : 光源
- 1 0 1 : レーザドライバ
- 1 0 8 : 対物レンズ
- 1 0 9 : 駆動機構
- 1 1 2 : 検出光学系
- 1 2 4 : 信号処理部
- 2 0 0 : サンプル容器
- 2 0 1 : ベースプレート
- 2 0 2 : 透明窓
- 2 0 3 : ウェルを形成する樹脂部材

10

20

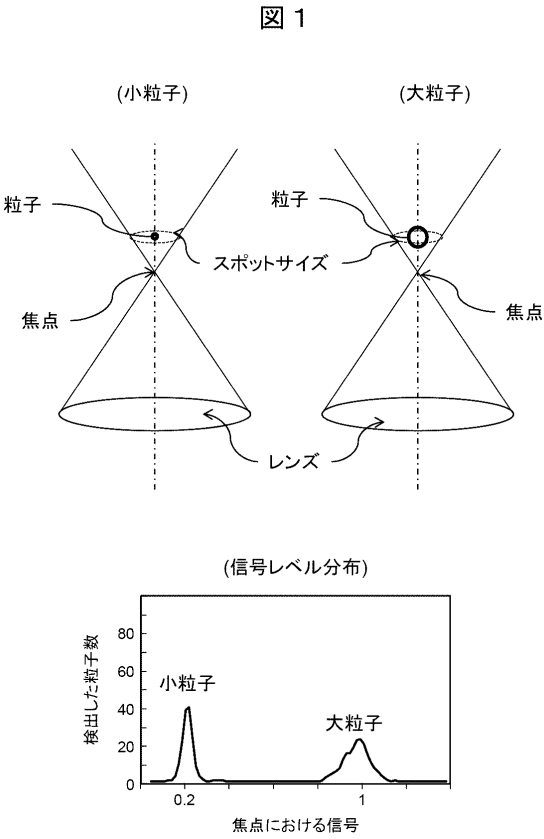
30

40

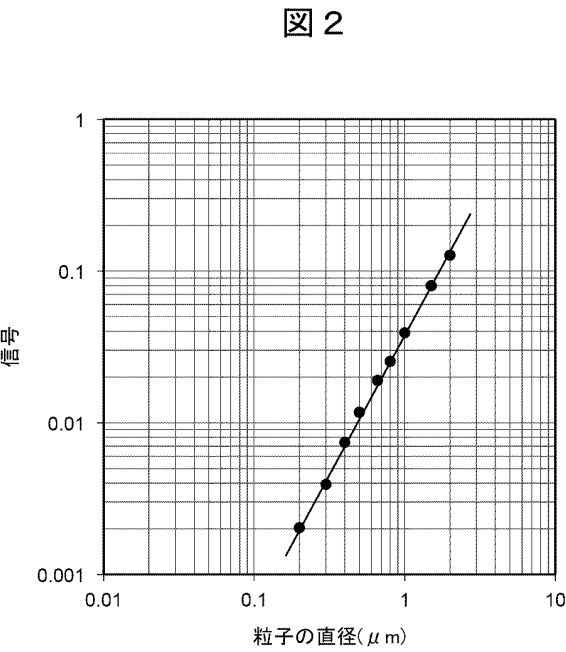
50

【図面】

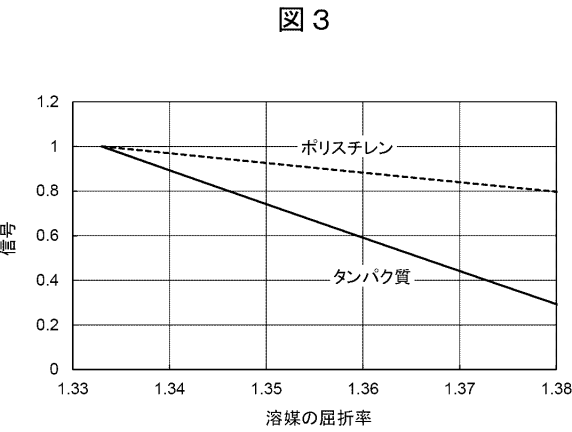
【図 1】



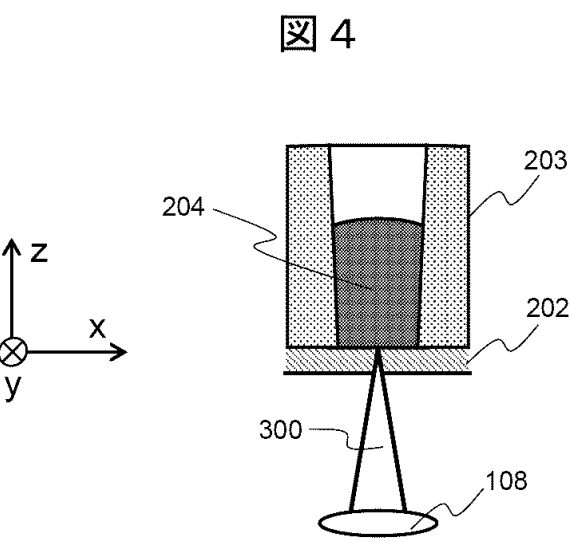
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

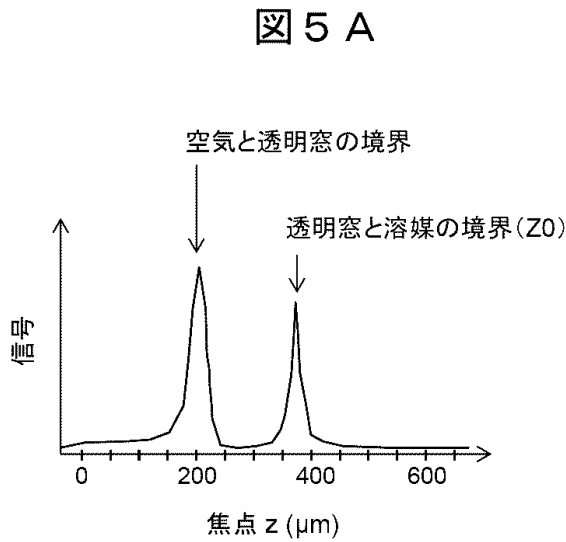
20

30

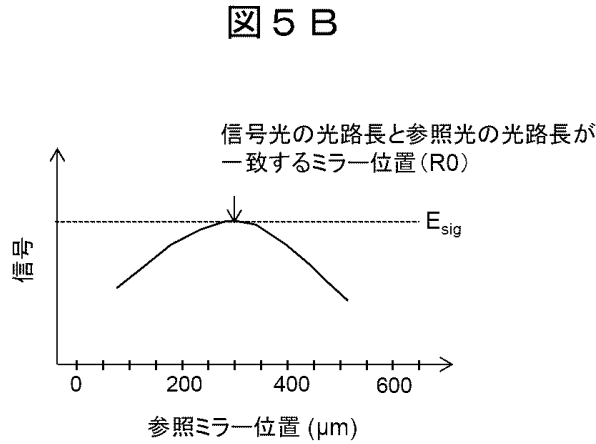
40

50

【図 5 A】

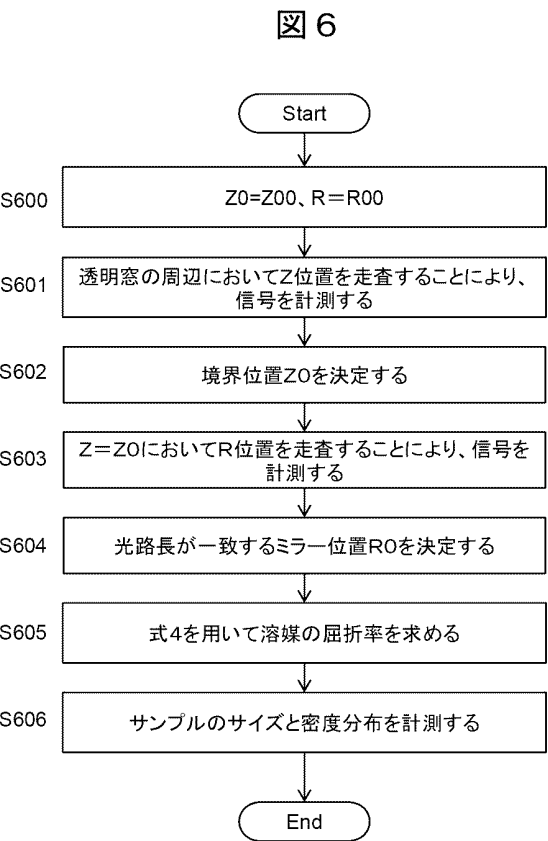


【図 5 B】

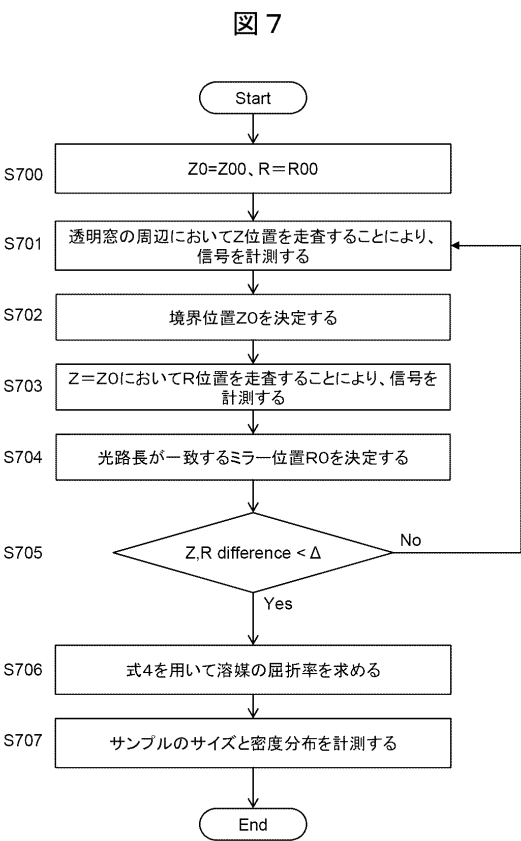


10

【図 6】



【図 7】



20

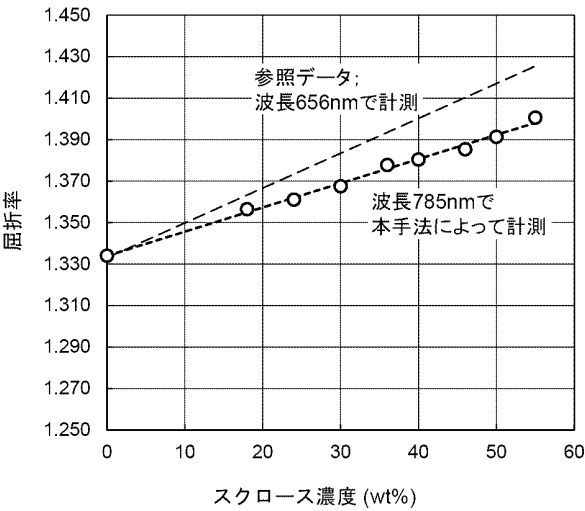
30

40

50

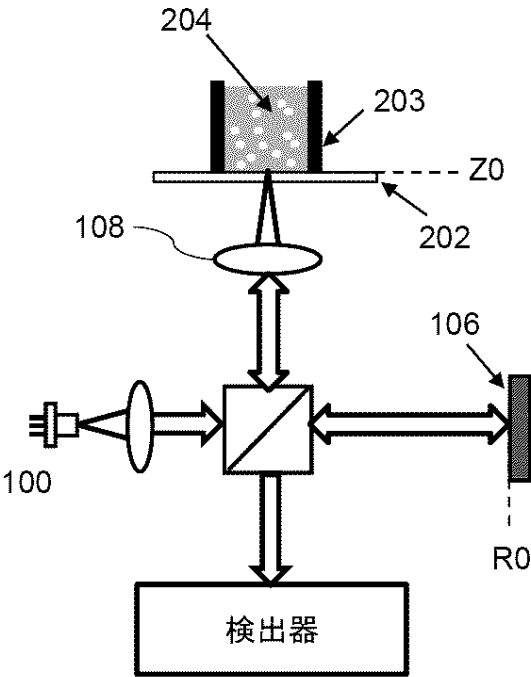
【図 8】

図 8



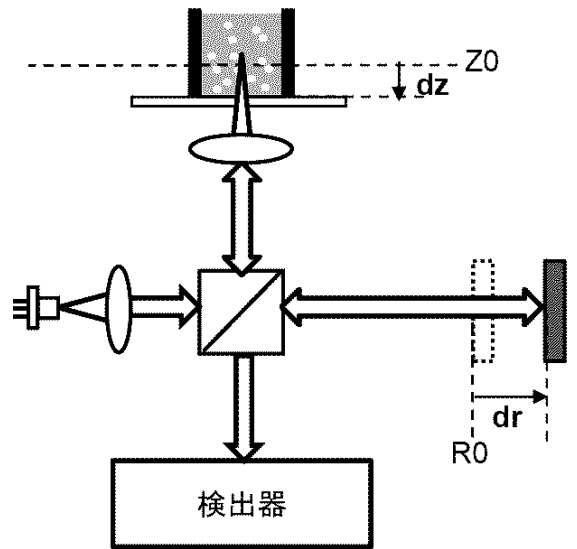
【図 9 A】

図 9 A



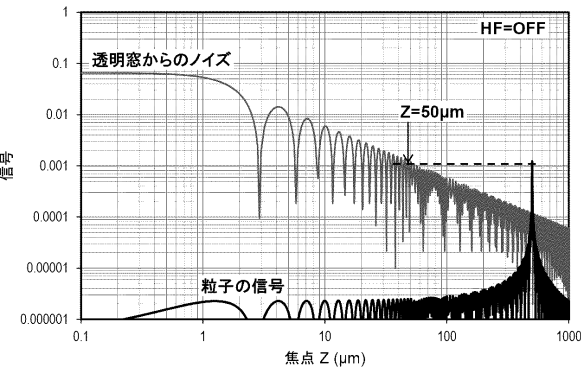
【図 9 B】

図 9 B



【図 1 0】

図 1 0



10

20

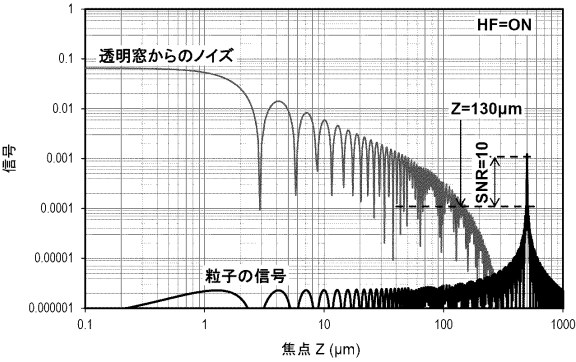
30

40

50

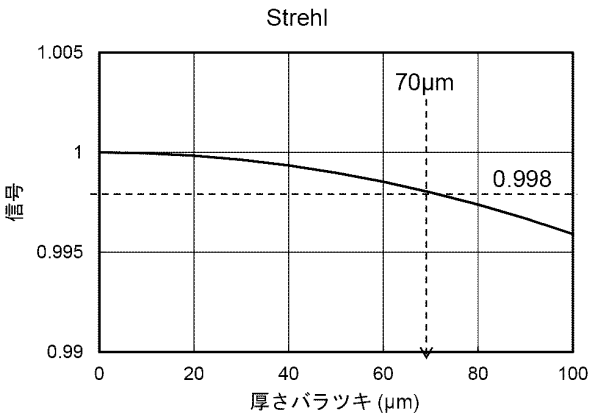
【図 1 1】

図 1 1



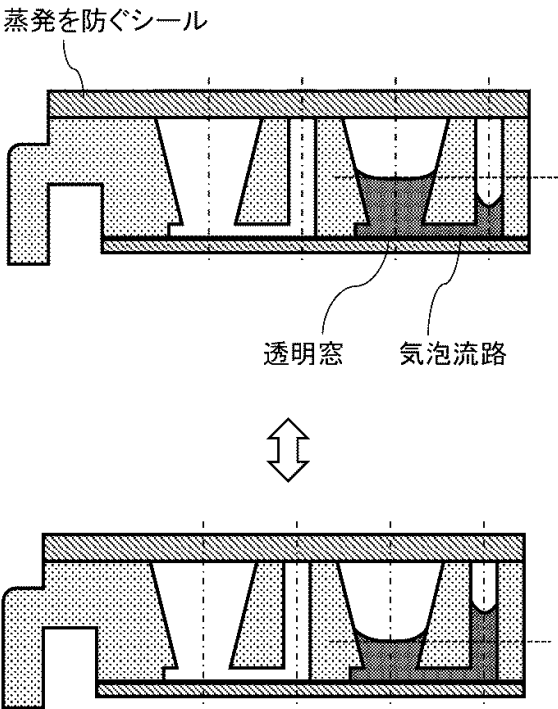
【図 1 2】

図 1 2



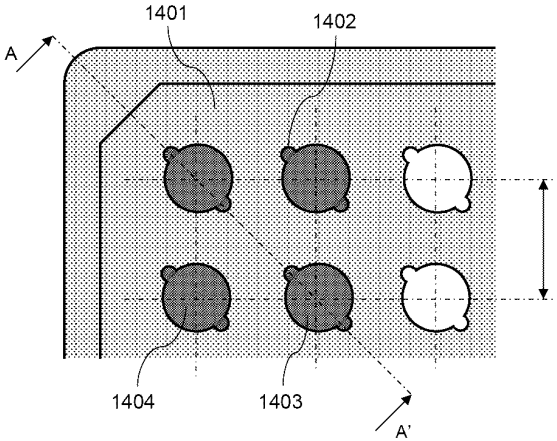
【図 1 3】

図 1 3



【図 1 4 A】

図 1 4 A



10

20

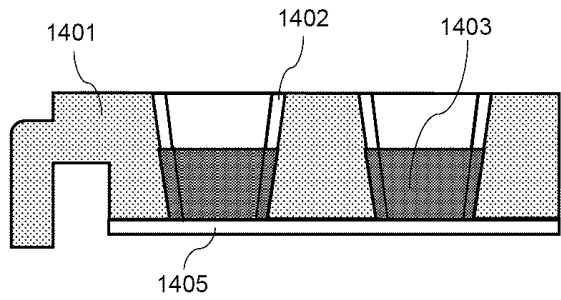
30

40

50

【図 1 4 B】

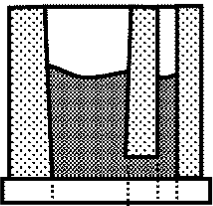
図 1 4 B



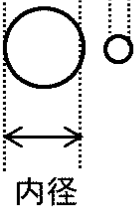
【図 1 5 A】

図 1 5 A

側断面図



平面図



10

20

【図 1 5 B】

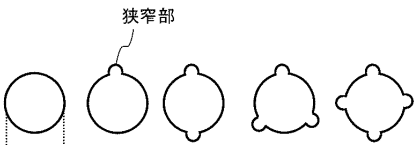
図 1 5 B

内径(mm)	成功率
2	80%
2.5	86%
3	100%

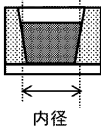
【図 1 6 A】

図 1 6 A

平面図



断面図



30

40

50

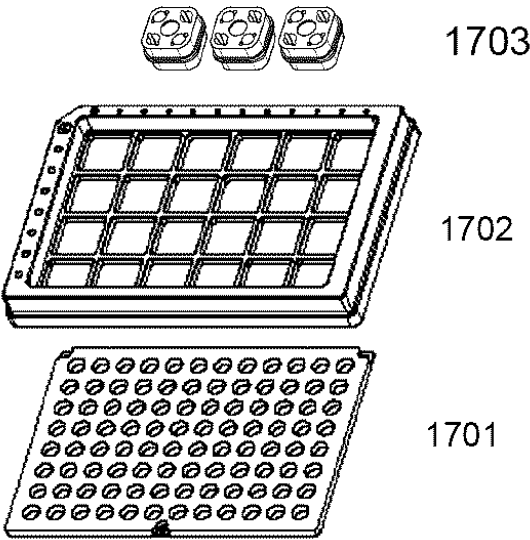
【図 1 6 B】

図 1 6 B

内径 (mm)	狭窄部の数				
	0	1	2	3	4
2	0%	28%	82%	90%	84%
2.5	46%	50%	90%	100%	96%
3	50%	54%	94%	100%	100%
3.5	58%	82%	100%	100%	100%
4.0	60%	94%	100%	100%	100%
4.5	NG (液体レベル不足)				

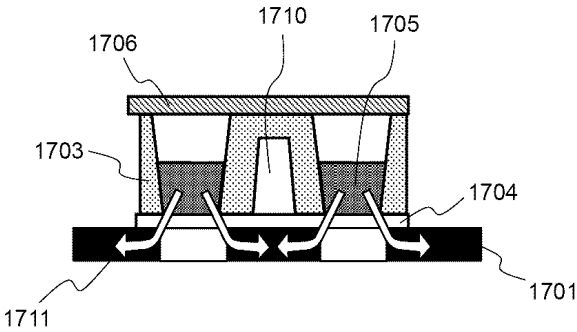
【図 1 7 A】

図 1 7 A



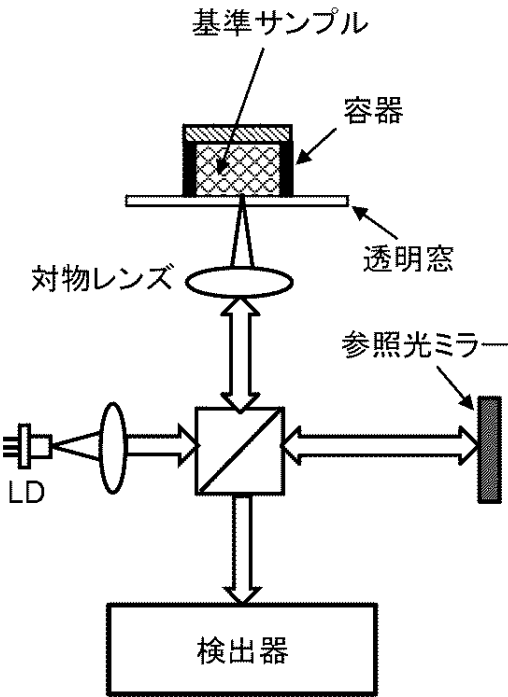
【図 1 7 B】

図 1 7 B



【図 1 8 A】

図 1 8 A



10

20

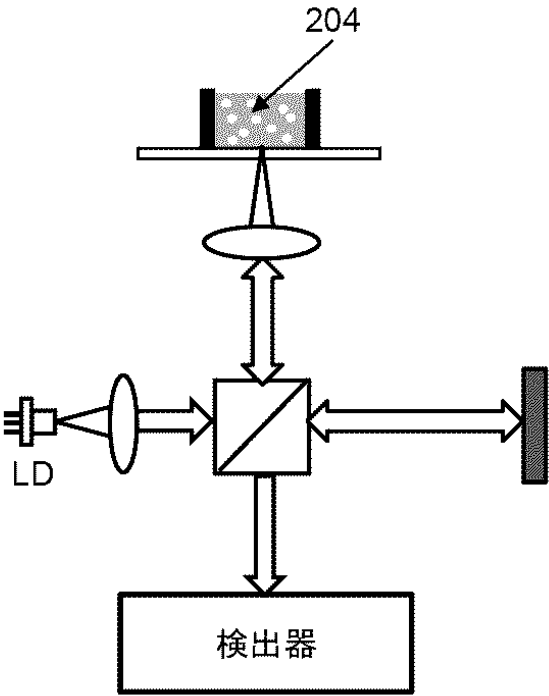
30

40

50

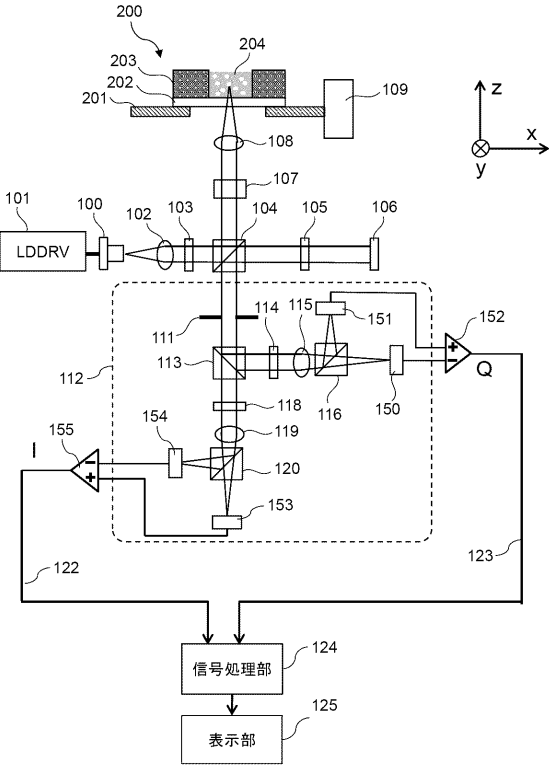
【図 18 B】

図 18 B



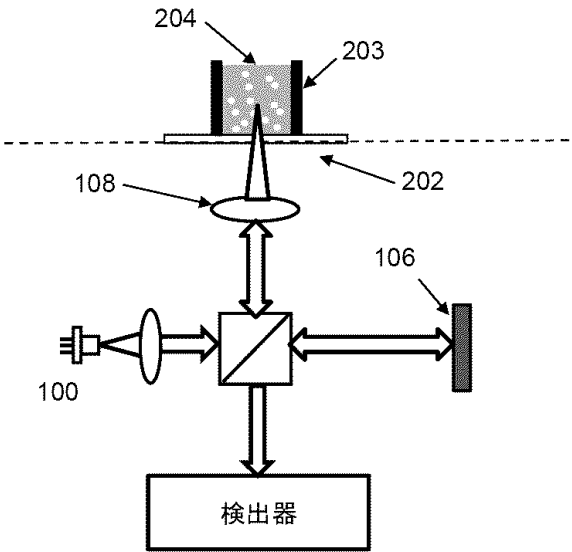
【図 19】

図 19



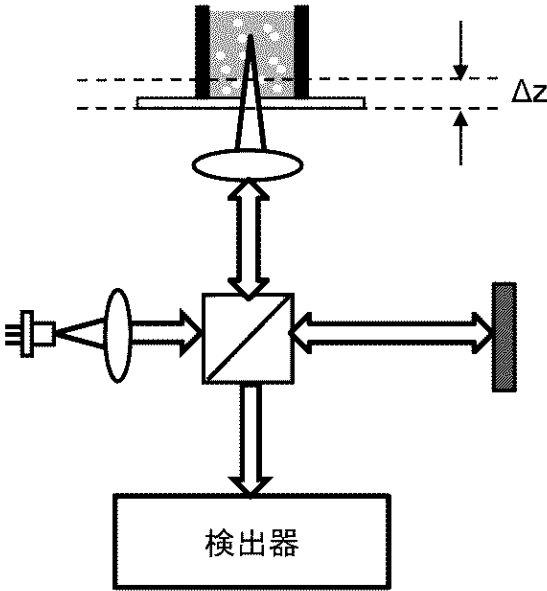
【図 20 A】

図 20 A



【図 20 B】

図 20 B



10

20

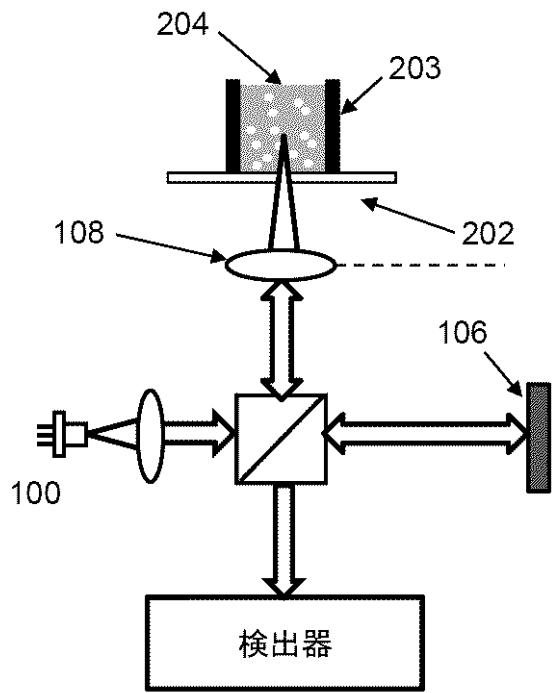
30

40

50

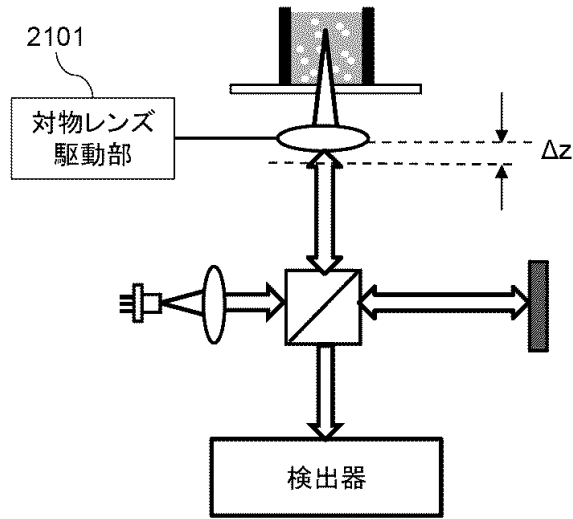
【図 2 1 A】

図 2 1 A



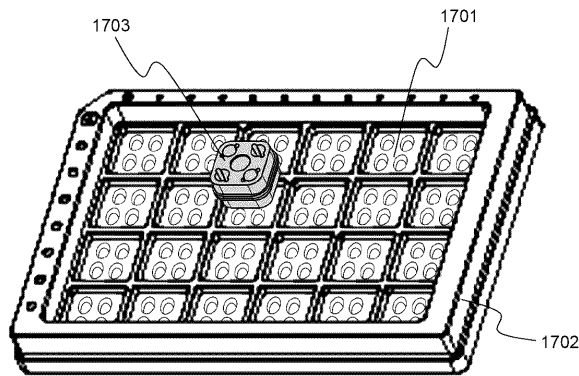
【図 2 1 B】

図 2 1 B



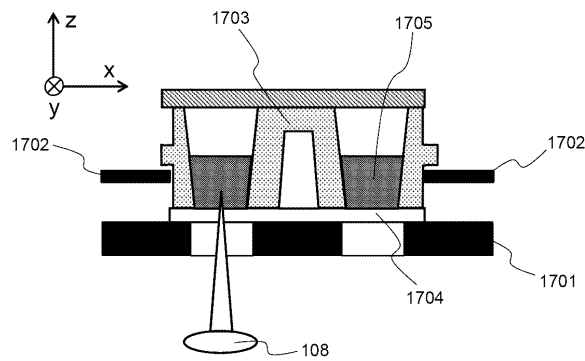
【図 2 2 A】

図 2 2 A



【図 2 2 B】

図 2 2 B



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開 2017-102032 (JP, A)
国際公開第 2020/144754 (WO, A1)
特開 2011-53002 (JP, A)
特開平 10-2855 (JP, A)
特開 2002-323659 (JP, A)
特開平 7-306139 (JP, A)
特開平 2-203247 (JP, A)
米国特許出願公開第 2018/172582 (US, A1)
米国特許出願公開第 2019/195776 (US, A1)
特表 2005-504317 (JP, A)
特開平 11-94730 (JP, A)
米国特許出願公開第 2009/14060 (US, A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G01N 15/00-15/14