

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6100658号
(P6100658)

(45) 発行日 平成29年3月22日(2017.3.22)

(24) 登録日 平成29年3月3日(2017.3.3)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/49	(2006.01)	GO 1 N 33/49	K
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 9 7
GO 1 N 21/05	(2006.01)	GO 1 N 21/05	
GO 1 N 21/49	(2006.01)	GO 1 N 21/49	Z
GO 1 N 15/14	(2006.01)	GO 1 N 15/14	C

請求項の数 16 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-200600 (P2013-200600)	(73) 特許権者	390014960 シスメックス株式会社
(22) 出願日	平成25年9月26日(2013.9.26)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(65) 公開番号	特開2014-209081 (P2014-209081A)		
(43) 公開日	平成26年11月6日(2014.11.6)	(74) 代理人	100111383 弁理士 芝野 正雅
審査請求日	平成28年3月11日(2016.3.11)		
(31) 優先権主張番号	特願2013-72997 (P2013-72997)	(72) 発明者	小西 雄介 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(32) 優先日	平成25年3月29日(2013.3.29)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	河島 康之 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	山田 和宏 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血球分析装置および血球分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血球を含む測定試料を流すためのフローセルと、
400nm以上435nm以下の第1の波長を有する光を出射する第1光源と、
610nm以上750nm以下の第2の波長を有する光を出射する第2光源と、
 前記フローセルを通過する血球に前記第1光源からの光を照射することにより得られる
前方散乱光を受光して第1検出信号を出力する第1受光部と、
 前記フローセルを通過する血球に前記第2光源からの光を照射することにより得られる
前方散乱光を受光して第2検出信号を出力する第2受光部と、
 前記フローセルを通過する血球に前記第2光源からの光を照射することにより得られる
側方散乱光を受光して第3検出信号を出力する第3受光部と、を備え、
 前記第1検出信号および前記第2検出信号に基づいて、測定試料に含まれる血球から白
 血球を弁別し、
 前記第2検出信号および第3検出信号に基づいて、弁別した前記白血球をさらにリンパ
 球、単球および顆粒球に分類する、
 ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項2】

請求項1に記載の血球分析装置において、
前記フローセルを通過する前記測定試料に含まれる血球に前記第1光源からの光を照射
することにより得られる自家蛍光を受光して第4検出信号を出力する第4受光部をさらに

10

20

備え、

前記第 1 検出信号および前記第 4 検出信号に基づいて、分類された前記顆粒球から好酸球を分類する、

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の血球分析装置において、

血球を含む血液検体から、赤血球を溶血せずに測定試料を調製する試料調製部を備える、

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 に記載の血球分析装置において、

前記試料調製部は、白血球を染色せずに測定試料を調製する、

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載の血球分析装置において、

ヘモグロビンの吸収係数が、前記第 1 の波長と前記第 2 の波長で異なる、

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 6】

請求項 1 ないし 5 の何れか一項に記載の血球分析装置において、

前記フローセルを流れる血球毎に、前記第 1 検出信号の強度と前記第 2 検出信号の強度とを取得し、取得した前記第 1 検出信号の強度および前記第 2 検出信号の強度と所定の強度範囲とを比較することにより、測定試料に含まれる血球から白血球を弁別する、

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の血球分析装置において、

画像を表示可能な表示部を備え、

前記フローセルを流れる血球毎に取得した前記第 1 検出信号の強度および前記第 2 検出信号の強度に基づいて、前記第 1 検出信号の強度および前記第 2 検出信号の強度を 2 軸とするスクアッタグラムを作成し、作成した前記スクアッタグラムを前記表示部に表示する

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の血球分析装置において、

同一の測定試料を用いて、白血球の弁別と白血球の分類とを行う、

ことを特徴とする血球分析装置。

【請求項 9】

血球を含む測定試料をフローセルに流し、

前記フローセルを通過する血球に 400 nm 以上 435 nm 以下の第 1 の波長の光を照射することにより得られる前方散乱光の第 1 検出信号を取得し、

前記フローセルを通過する血球に 610 nm 以上 750 nm 以下の第 2 の波長の光を照射することにより得られる前方散乱光の第 2 検出信号を取得し、

前記フローセルを通過する血球に前記第 2 波長の光を照射することにより得られる側方散乱光の第 3 検出信号を取得し、

前記第 1 検出信号および前記第 2 検出信号に基づいて、測定試料に含まれる血球から、白血球を弁別し、

前記第 2 検出信号および第 3 検出信号に基づいて、弁別した前記白血球をさらにリンパ球、単球および顆粒球に分類する、

ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の血球分析方法において、

10

20

30

40

50

前記フローセルを通過する前記血球に前記第 1 の波長の光を照射することにより得られる自家蛍光の第 4 検出信号をさらに取得し、

前記第 1 検出信号および前記第 4 検出信号に基づいて、分類された前記顆粒球から好酸球を分類する、

ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 1 1】

請求項 9 または 1 0 に記載の血球分析方法において、
血球を含む血液検体から、赤血球を溶血せずに測定試料を調製する、
ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 1 2】

請求項 9 ないし 1 1 の何れか一項に記載の血球分析方法において、
血球を含む血液検体から、白血球を染色せずに測定試料を調製する、
ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 1 3】

請求項 9 ないし 1 2 の何れか一項に記載の血球分析方法において、
ヘモグロビンの吸収係数が、前記第 1 の波長と前記第 2 の波長で異なる、
ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 1 4】

請求項 9 ないし 1 3 の何れか一項に記載の血球分析方法において、
前記フローセルを流れる血球毎に、前記第 1 検出信号の強度と前記第 2 検出信号の強度
とを取得し、

取得した前記第 1 検出信号の強度および前記第 2 検出信号の強度と所定の強度範囲とを
比較することにより、前記測定試料に含まれる血球から、白血球を弁別する、
ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 1 5】

請求項 9 ないし 1 4 の何れか一項に記載の血球分析方法において、
前記フローセルを流れる血球毎に取得した前記第 1 検出信号および前記第 2 検出信号に
基づいて、前記第 1 検出信号の強度および前記第 2 検出信号の強度を 2 軸とするスキャ
ッタグラムを作成し、

作成した前記スキャッタグラムを表示する、
ことを特徴とする血球分析方法。

【請求項 1 6】

請求項 9 ないし 1 5 の何れか一項に記載の血球分析方法において、
同一の測定試料を用いて、白血球の弁別と白血球の分類とを行う、
ことを特徴とする血球分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血球を含む試料の流れに光を照射して、血球の分析を行う血球分析装置およ
び血球分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献 1 には、予め赤血球を溶血させた血液検体中の血球に対しレーザ光を照射し、
低角前方散乱光と高角前方散乱光という散乱角が異なる 2 つの前方散乱光を取得すること
で、白血球の分類および計数を行う手法が記載されている。この手法によれば、染色剤を
用いることなく、白血球の分類を行うことが可能となる。

【0003】

また、特許文献 2 には、血液検体中の赤血球を溶血させ、白血球を染色することにより
白血球をリンパ球、単球、好中球 + 好塩基球、好酸球の 4 つの集団に分類し計数する技術
が記載されている。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平8 - 50089号公報

【特許文献2】特開2003 - 106984号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、上記特許文献1および特許文献2に記載の手法を用いて血液検体中の血球の分類を行った場合、染色剤または溶血剤等の試薬が用いられているため、測定試料の調製のために複数の分注工程が必要となる。このため、より少ない工程で簡易に、血球を分類および計数できる手法が求められている。

10

【0006】

このような課題に鑑み、本発明は、簡易な工程で高精度に、血液検体中の血球から白血球を弁別することが可能な血球分析装置および血球分析方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第1の態様は、血球分析装置に関する。この態様に係る血球分析装置は、血球を含む測定試料を流すためのフローセルと、400nm以上435nm以下の第1の波長を有する光を出射する第1光源と、610nm以上750nm以下の第2の波長を有する光を出射する第2光源と、前記フローセルを通過する血球に前記第1光源からの光を照射することにより得られる前方散乱光を受光して第1検出信号を出力する第1受光部と、前記フローセルを通過する血球に前記第2光源からの光を照射することにより得られる前方散乱光を受光して第2検出信号を出力する第2受光部と、前記フローセルを通過する血球に前記第2光源からの光を照射することにより得られる側方散乱光を受光して第3検出信号を出力する第3受光部と、を備える。そして、前記第1検出信号および前記第2検出信号に基づいて、測定試料に含まれる血球から白血球を弁別し、前記第2検出信号および第3検出信号に基づいて、弁別した前記白血球をさらにリンパ球、単球および顆粒球に分類する。

20

30

【0008】

本態様に係る血球分析装置によれば、第1検出信号および第2検出信号に基づいて、簡易な工程で高精度に、測定試料中の血球から白血球を弁別でき、さらに、第2検出信号および第3検出信号に基づいて、弁別した白血球をさらに、リンパ球、単球および顆粒球に分類できる。

【0009】

本態様に係る血球分析装置は、血球を含む血液検体から、赤血球を溶血せずに測定試料を調製する試料調製部を備える構成とされ得る。こうすると、赤血球を溶血するための試薬が必要ないため、コストの削減を図ることができる。さらに、試薬の消費を削減でき、且つ、試薬を含む測定試料が廃棄されることを抑制できるため、環境に配慮した分析手法を実現することができる。

40

【0010】

さらに、前記試料調製部は、白血球を染色せずに測定試料を調製するよう構成され得る。こうすると、白血球を染色するための試薬が必要ないため、コストの削減を図ることができる。さらに、試薬の消費を削減でき、且つ、試薬を含む測定試料が廃棄されることを抑制できるため、環境に配慮した分析手法を実現することができる。

【0011】

本態様に係る検体処理装置は、前記フローセルを通過する前記測定試料に含まれる血球に前記第1光源からの光を照射することにより得られる自家蛍光を受光して第4検出信号を出力する第4受光部をさらに備え、前記第1検出信号および前記第4検出信号に基づい

50

て、分類された前記顆粒球から好酸球を分類するよう構成され得る。こうすると、分類された顆粒球からさらに好酸球を分類できる。

【0012】

また、本態様に係る血球分析装置において、ヘモグロビンの吸収係数が、前記第1の波長と前記第2の波長で異なるよう構成され得る。こうすると、ヘモグロビンを含む赤血球の散乱光と、ヘモグロビンを含まない他の血球の散乱光とが、互いに異なるものとなるため、赤血球と他の血球とで、信号の状態に差が生じ易くなる。

【0016】

また、本態様に係る血球分析装置は、前記フローセルを流れる血球毎に、前記第1検出信号の強度と前記第2検出信号の強度とを取得し、取得した前記第1検出信号の強度および記第2検出信号の強度と所定の強度範囲とを比較することにより、測定試料に含まれる血球から白血球を弁別するよう構成され得る。

10

【0017】

この場合、血球分析装置は、画像を表示可能な表示部を備え、前記フローセルを流れる血球毎に取得した前記第1検出信号の強度および前記第2検出信号の強度に基づいて、前記第1検出信号の強度および前記第2検出信号の強度を2軸とするスキャッタグラムを作成し、作成した前記スキャッタグラムを前記表示部に表示するよう構成され得る。こうすると、ユーザは、各血球の分布状態を把握することができる。

【0021】

また、本態様に係る血球分析装置は、同一の測定試料を用いて、白血球の弁別と白血球の分類とを行うよう構成され得る。こうすると、白血球の弁別と、白血球の分類とを行うために、個別に測定試料の調製を行う必要がなくなる。

20

【0024】

本発明の第2の態様は、血球分析方法に関する。この態様に係る血球分析方法は、血球を含む測定試料をフローセルに流し、前記フローセルを通過する血球に400nm以上435nm以下の第1の波長の光を照射することにより得られる前方散乱光の第1検出信号を取得し、前記フローセルを通過する血球に610nm以上750nm以下の第2の波長の光を照射することにより得られる前方散乱光の第2検出信号を取得し、前記フローセルを通過する血球に前記第2波長の光を照射することにより得られる側方散乱光の第3検出信号を取得し、前記第1検出信号および前記第2検出信号に基づいて、測定試料に含まれる血球から、白血球を弁別し、前記第2検出信号および第3検出信号に基づいて、弁別した前記白血球をさらにリンパ球、単球および顆粒球に分類する。

30

【0025】

本態様に係る血球分析方法によれば、第1の態様と同様の効果が奏され得る。すなわち、第1検出信号と第2検出信号に基づいて、簡易な工程で高精度に、測定試料中の血球から白血球を弁別でき、さらに、第2検出信号および第3検出信号に基づいて、弁別した白血球をさらに、リンパ球、単球および顆粒球に分類できる。

【発明の効果】

【0030】

以上のとおり、本発明によれば、簡易な工程で高精度に、血液検体中の血球から白血球を弁別することが可能な血球分析装置および血球分析方法を提供することができる。

40

【0031】

本発明の効果ないし意義は、以下に示す実施の形態の説明により更に明らかとなる。ただし、以下に示す実施の形態は、あくまでも、本発明を実施化する際の一つの例示であって、本発明は、以下の実施の形態により何ら制限されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】実施の形態に係る血球分析装置の外観を示す斜視図である。

【図2】実施の形態に係る測定ユニットの構成を模式的に示す図である。

【図3】実施の形態に係る光学検出器の構成を模式的に示す図である。

50

【図 4】実施の形態に係るフローセル、ビームストッパ、ピンホールおよびフォトダイオードの構成を示す図である。

【図 5】実施の形態に係る測定ユニットの構成を示す図である。

【図 6】実施の形態に係る情報処理ユニットの構成を示す図である。

【図 7】解析例 1 に係る同一血球から取得された各波長のデータを対応付ける方法を説明する図である。

【図 8】解析例 1 に係る赤血球に含まれるヘモグロビンの吸収特性を示す図、解析例 1 と比較例における粒子分析のシミュレーション結果を示す図、および、前方散乱光に基づくスキャッタグラムを示す図である。

【図 9】解析例 1 に係る血球分析装置による解析処理を示すフローチャートである。

10

【図 10】解析例 2 に係る被検者から採取された血液検体に基づいて作成されたスキャッタグラムを示す図、および、被検者から採取された血液検体に基づいて行われた白血球の分類結果を示す図である。

【図 11】解析例 2 に係る血球分析装置による解析処理を示すフローチャートである。

【図 12】解析例 3 に係る血球分析装置による解析処理を示すフローチャートである。

【図 13】解析例 4 に係る白血球の分布状態を示すスキャッタグラム、解析例 4 に係るリンパ球の分布状態を示すスキャッタグラム、および、解析例 4 に係るリンパ球の分布状態を示すヒストグラムである。

【図 14】解析例 4 に係る血球分析装置による解析処理を示すフローチャートである。

【図 15】解析例 4 の変更例に係る血球分析装置による解析処理を示すフローチャート、当該変更例に係る白血球の分布状態を示すスキャッタグラム、および、当該変更例に係るリンパ球、単球、顆粒球の分布状態を示すスキャッタグラムである。

20

【図 16】解析例 5 に係る光学検出器の構成を示す図である。

【図 17】解析例 5 に係る血球分析装置による解析処理を示すフローチャート、および、解析例 5 に係るリンパ球の分布状態を示すスキャッタグラムである。

【図 18】解析例 5 の変更例に係る光学検出器の構成を示す図である。

【図 19】変更例に係る血球分析装置による解析処理の選択を示すフローチャートおよび解析対象から除くための領域の設定を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

30

本実施の形態は、血液に関する検査および分析を行うための血球分析装置とその光照射光学系に本発明を適用したものである。以下、本実施の形態に係る血球分析装置について、図面を参照して説明する。

【0034】

図 1 は、本実施の形態に係る血球分析装置 1 の外観を示す斜視図である。

【0035】

血球分析装置 1 は、血液検体に含まれる白血球、赤血球、血小板等を検出し、各血球を計数する多項目血球分析装置である。血球分析装置 1 は、測定ユニット 2 と、測定ユニット 2 の前面側に配置された搬送ユニット 3 と、情報処理ユニット 4 とを備えている。患者から採取された末梢血である血液検体は、検体容器（採血管）T に收容される。複数の検体容器 T がサンプルラック L に支持され、このサンプルラック L が搬送ユニット 3 により搬送されて、血液検体が測定ユニット 2 へ供給される。

40

【0036】

情報処理ユニット 4 は、表示部 4 1 と入力部 4 2 を備えており、測定ユニット 2 と、搬送ユニット 3 と、ホストコンピュータ 5（図 2 参照）に対して、通信可能に接続されている。情報処理ユニット 4 は、測定ユニット 2 と搬送ユニット 3 の動作を制御し、測定ユニット 2 で行われた測定結果に基づいて解析を行い、解析結果をホストコンピュータ 5（図 2 参照）に送信する。情報処理ユニット 4 は、パーソナルコンピュータからなっている。

【0037】

図 2 は、測定ユニット 2 の構成を模式的に示す図である。

50

【 0 0 3 8 】

測定ユニット2は、ハンド部21と、検体容器セット部22と、バーコードユニット23と、検体吸引部24と、試料調製部25と、検出部26とを備えている。検体吸引部24は、ピアサ24aを備えており、検体容器Tから検体を吸引する。試料調製部25は、混合チャンバMCとヒータHを備えており、検体に試薬または希釈液を混和することにより測定に用いられる測定試料を調製する。検出部26は、光学検出器Dを備えており、測定試料から血球を検出する。測定ユニット2の各部は、情報処理ユニット4からの指示に基づいて制御される。

【 0 0 3 9 】

搬送ユニット3により位置P1に位置付けられた検体容器Tは、ハンド部21により把持され、サンプルラックLから上方向に抜き出される。そして、ハンド部21が揺動されることにより、検体容器T内の検体が攪拌される。攪拌が終了した検体容器Tは、ハンド部21により、位置P1に位置付けられた検体容器セット部22にセットされる。しかる後、この検体容器Tは、検体容器セット部22により位置P2まで搬送される。

10

【 0 0 4 0 】

検体容器Tが位置P2に位置付けられると、位置P2の近傍に設置されたバーコードユニット23により、検体容器Tに貼付されたバーコードラベルから検体番号が読み取られる。しかる後、この検体容器Tは、検体容器セット部22により位置P3まで搬送される。検体容器Tが位置P3に位置付けられると、検体吸引部24によりピアサ24aを介して検体容器Tから所定量の検体が吸引される。検体の吸引が終了すると、この検体容器Tは、検体容器セット部22により前方に搬送され、ハンド部21により元のサンプルラックLの支持位置に戻される。ピアサ24aを介して吸引された検体は、ピアサ24aが混合チャンバMCの位置へ移送された後、検体吸引部24により混合チャンバMCに所定量だけ吐出される。

20

【 0 0 4 1 】

試料調製部25は、第1試薬を収容する容器251と、第2試薬を収容する容器252と、希釈液を収容する容器253に、チューブを介して接続されている。また、試料調製部25はコンプレッサ(図示せず)に接続されており、このコンプレッサにより発生される圧力により容器251~253から、それぞれ、第1試薬と、第2試薬と、希釈液を分取することが可能となっている。第1試薬と第2試薬を用いる場合、試料調製部25は、混合チャンバMC内で、血液検体と試薬とを混合し、この混合液を所定時間だけヒータHにより加温して、測定試料を調製する。第1試薬と第2試薬を用いない場合、試料調製部25は、混合チャンバMC内で、血液検体と希釈液とを混合して、測定試料を調製する。なお、第1試薬と第2試薬を用いない場合でも、適宜、混合液を加温しても良い。試料調製部25で調製された測定試料は、検出部26の光学検出器Dに供給される。

30

【 0 0 4 2 】

なお、第1試薬は、核酸を染色可能な蛍光色素を含有し、第2試薬で処理された血液試料中の有核細胞の核酸を蛍光染色するための試薬である。第2試薬は、赤血球を溶血させ、白血球の細胞膜に上記の蛍光色素が透過できる程度の損傷を与えるための試薬である。

【 0 0 4 3 】

検出部26は、シース液を収容する容器261に、チューブを介して接続されている。また、検出部26はコンプレッサ(図示せず)に接続されており、このコンプレッサにより発生される圧力により容器261からシース液を分取することが可能となっている。

40

【 0 0 4 4 】

図3(a)、(b)は、光学検出器Dの光学系の構成を模式的に示す図である。便宜上、図3(a)には、互いに直交するXYZ座標軸が示されている。X軸方向は、紙面上下方向、Z軸方向は紙面左右方向である。図3(a)は、光学検出器Dの光学系をY軸負方向に見た図、図3(b)は、光学検出器Dの光学系をX軸正方向に見た図である。

【 0 0 4 5 】

また、図4(a)は、フローセルD1の構成を模式的に示す図、図4(b)は、ビーム

50

ストッパ203の構成を模式的に示す図、図4(c)は、ピンホール204の構成を模式的に示す図、図4(d)は、フォトダイオード205の構成を模式的に示す図である。

【0046】

図3(a)を参照して、光学検出器Dは、フローセルD1と、シースフロー系D2と、光照射光学系D3と、前方散乱光受光光学系D4と、側方散乱光受光光学系D5と、蛍光受光光学系D6を有している。

【0047】

シースフロー系D2は、フローセルD1内に測定試料をシース液に包まれた状態で送り込み、フローセルD1中に液流を発生させるように構成されている。図3(b)に示すように、フローセルD1は、測定試料を細孔部D13に向かって上方へ噴射する試料ノズルD11と、シース液供給口D12と、廃液口D14を備える。細孔部D13内に、測定試料が流れる流路D15が形成される。

10

【0048】

光照射光学系D3は、半導体レーザ101、103と、コリメータレンズ102、104と、ダイクロイックミラー105と、シリンドリカルレンズ106と、コンデンサレンズ107を備えている。

【0049】

半導体レーザ101は、発光部(図示せず)の半導体層の積層方向がX軸方向に一致するように配置される。したがって、半導体レーザ101から出射されるレーザ光の広がり角は、X軸方向において最大となり、Y軸方向において最小となる。半導体レーザ101は、所定波長のレーザ光(以下、「赤レーザ光RL」という)をZ軸正方向に出射する。半導体レーザ101の出射波長は、610~750nmの範囲に含まれるよう設定される。半導体レーザ101の出射光軸は、光照射光学系D3の光軸Oに一致している。

20

【0050】

コリメータレンズ102は、半導体レーザ101から出射された赤レーザ光RLを平行光に変換する。

【0051】

半導体レーザ103は、発光部(図示せず)の半導体層の積層方向がZ軸方向に一致するように配置される。したがって、半導体レーザ103から出射されるレーザ光の広がり角は、Z軸方向において最大となり、Y軸方向において最小となる。半導体レーザ103は、所定波長のレーザ光(以下、「青レーザ光BL」という)をX軸負方向に出射する。半導体レーザ103の出射波長は、400~435nmの範囲に含まれるよう設定される。半導体レーザ103の出射光軸は、光照射光学系D3の光軸Oに交差する。

30

【0052】

コリメータレンズ104は、半導体レーザ103から出射された青レーザ光BLを平行光に変換する。

【0053】

ダイクロイックミラー105は、コリメータレンズ102を透過した赤レーザ光RLを透過し、コリメータレンズ104を透過した青レーザ光BLを反射する。ダイクロイックミラー105は、ダイクロイックミラー105によって反射された青レーザ光BLの進行方向が、図3(b)に示すように、Z軸方向からややY軸方向に傾くように、配置されている。

40

【0054】

シリンドリカルレンズ106は、ダイクロイックミラー105を経由した赤レーザ光RLと青レーザ光BLをX軸方向にのみ収束させる。コンデンサレンズ107は、シリンドリカルレンズ106を透過した赤レーザ光RLと青レーザ光BLを集光する。コンデンサレンズ107は、赤レーザ光RLと青レーザ光BLをY軸方向に収束させてフローセルD1の流路D15(図4(a)参照)の位置に合焦させ、また、赤レーザ光RLと青レーザ光BLをX軸方向に収束させて流路D15の手前(Z軸負側)の位置に合焦させる。したがって、コンデンサレンズ107によってX軸方向に収束された光は、合焦位置から流路

50

D 1 5 の位置に達するまでに、やや広がる。よって、流路 D 1 5 には、図 4 (a) に示すように、X 軸方向に細長いビーム形状で、赤レーザー光 R L と青レーザー光 B L が照射される。

【 0 0 5 5 】

図 3 (b) に示すように、ダイクロイックミラー 1 0 5 によって反射された青レーザー光 B L は、Z 軸方向から Y 方向にやや傾いた方向に進むため、流路 D 1 5 に対する青レーザー光 B L の照射位置 E P 1 は、赤レーザー光 R L の照射位置 E P 2 よりも Y 軸正方向にずれている。赤レーザー光 R L の照射位置 E P 2 は、光軸 O 上にある。

【 0 0 5 6 】

前方散乱光受光光学系 D 4 は、前方集光レンズ 2 0 1 と、絞り 2 0 2 と、ビームストップ 2 0 3 と、ピンホール 2 0 4 と、フォトダイオード 2 0 5 を備える。フローセル D 1 から前方 (Z 軸正方向) へと向かう赤レーザー光 R L および青レーザー光 B L の散乱光 (前方散乱光) は、それぞれ、前方集光レンズ 2 0 1 によってピンホール 2 0 4 の位置に集光され、その後、ピンホール 2 0 4 を通って、フォトダイオード 2 0 5 により受光される。フォトダイオード 2 0 5 は、受光した前方散乱光のピーク値に基づいて前方散乱光信号を出力する。

10

【 0 0 5 7 】

前方集光レンズ 2 0 1 は、その光軸が、光照射光学系 D 3 の光軸 O から Y 軸正方向にずれるように配置されている。したがって、赤レーザー光 R L の前方散乱光 (以下、「赤散乱光 R S 」という) の中心を通る光線は、前方集光レンズ 2 0 1 を透過した後、Z 軸正方向からやや Y 軸負方向に傾く方向に進む。また、青レーザー光 B L の前方散乱光 (以下、「青散乱光 B S 」という) の中心を通る光線は、前方集光レンズ 2 0 1 を透過した後、Z 軸正方向からやや Y 軸正方向に傾く方向に進む。

20

【 0 0 5 8 】

図 4 (c) に示すように、ピンホール 2 0 4 には、Y 軸方向に並ぶ 2 つの孔 2 0 4 a、2 0 4 b が形成されている。孔 2 0 4 a、2 0 4 b の径 W 2 は、それぞれ、青散乱光 B S、赤散乱光 R S の収束スポットの径よりもやや大きく設定されている。赤散乱光 R S は、Y 軸正側の孔 2 0 4 b の位置に集光され、孔 2 0 4 b を通り抜ける。また、青散乱光 B S は、Y 軸負側の孔 2 0 4 a の位置に集光され、孔 2 0 4 b を通り抜ける。

【 0 0 5 9 】

図 4 (d) に示すように、フォトダイオード 2 0 5 には、Y 軸方向に並ぶ 2 つの受光面 2 0 5 a、2 0 5 b が配置されている。受光面 2 0 5 a、2 0 5 b は、Z 軸方向において同じ位置にあり、それぞれ、X - Y 平面に平行である。フォトダイオード 2 0 5 上において、受光面 2 0 5 a、2 0 5 b は、同一平面上に配置されている。ピンホール 2 0 4 の孔 2 0 4 a を通り抜けた青散乱光 B S は、受光面 2 0 5 a に照射され、孔 2 0 4 b を通り抜けた赤散乱光 R S は、受光面 2 0 5 b に照射される。

30

【 0 0 6 0 】

なお、前方散乱光受光光学系 D 4 の倍率は、受光面 2 0 5 a、2 0 5 b に照射される際の青散乱光 B S と赤散乱光 R S の間隔が、受光面 2 0 5 a の中心と受光面 2 0 5 b の中心との間隔に一致するように設定される。これにより、青散乱光 B S と赤散乱光 R S は、図 4 (d) に示すように、それぞれ、受光面 2 0 5 a、2 0 5 b の中央に照射される。

40

【 0 0 6 1 】

図 3 (a)、(b) に戻り、フローセル D 1 に照射された赤レーザー光 R L、青レーザー光 B L のうち、粒子 (血球、等) に照射されずにフローセル D 1 を透過したレーザー光 (以下、「直接光」という) は、前方集光レンズ 2 0 1 によってビームストップ 2 0 3 上に集光される。ビームストップ 2 0 3 は、光を透過しない薄板状の部材によって構成されている。図 4 (b) に示すように、ビームストップ 2 0 3 は、半円状の開口 2 0 3 a、2 0 3 b と、これら開口 2 0 3 a、2 0 3 b 間に形成された遮光部 2 0 3 c とを備える。遮光部 2 0 3 c の X 軸方向の幅 W 1 は一定である。この遮光部 2 0 3 c 上に、直接光が集光される。上記のように、コンデンサレンズ 1 0 7 は、X 軸方向におけるレーザー光の焦点位置が Y

50

軸方向におけるレーザ光の焦点位置よりも手前（Z軸負側）となるようにレーザ光を収束させる。このため、直接光は、X軸方向の焦点位置がY軸方向の焦点位置よりも手前（Z軸負側）となるように、前方集光レンズ201によって集光される。ビームストッパ203は、入射面が、直接光のX軸方向の焦点位置に位置付けられるように配置される。したがって、直接光は、図4（b）に示すように、Y軸方向に長いビーム形状で、遮光部203c上に照射される。

【0062】

フローセルD1からの赤散乱光RSと青散乱光BSは、大部分が、ビームストッパ203の開口203a、203bを通過し、一部が、遮光部203cによって遮光される。遮光部203cによる前方散乱光の遮光量は、遮光部203cの幅W1によって決まる。このため、遮光部203cの幅W1は、なるべく小さいことが望ましい。しかしながら、遮光部203cの幅W1は、直接光を確実に遮光できるよう、直接光のX軸方向の幅の10倍程度に設定される。

10

【0063】

側方散乱光受光光学系D5は、コリメータレンズD51と、ダイクロイックミラーD52と、側方集光レンズD53と、フォトダイオードD54を備える。フローセルD1から側方（X軸正方向）へと向かう散乱光（側方散乱光）は、コリメータレンズD51にて平行光に変換される。上記のように、フローセルD1には、赤レーザ光RLと青レーザ光BLが照射されるため、各レーザ光に基づく2つの側方散乱光が生じる。コリメータレンズD51は、これら2つの側方散乱光をそれぞれ平行光に変換する。平行光に変換された2つの側方散乱光は、ダイクロイックミラーD52で反射され、さらに、側方集光レンズD53により集光されて、フォトダイオードD54により受光される。

20

【0064】

フォトダイオードD54は、フォトダイオード205と同様、各波長の側方散乱光をそれぞれ受光する2つの受光面D54a、D54bを有する。受光面D54a、D54bはY軸方向に並び、Z軸方向において同じ位置にある。フォトダイオードD54上において、受光面D54a、D54bは、同一平面上に配置されている。フォトダイオードD54は、受光した各波長の側方散乱光のピーク値に基づいて側方散乱光信号を出力する。

【0065】

なお、側方散乱光受光光学系D5の倍率は、受光面D54a、D54bに照射される際の青レーザ光BLの散乱光と赤レーザ光RLの散乱光との間隔が、受光面D54aの中心と受光面D54bの中心との間隔に一致するように設定される。これにより、これら散乱光は、それぞれ、受光面D54a、D54bの中央に照射される。

30

【0066】

蛍光受光光学系D6は、分光フィルタD61と、蛍光集光レンズD62と、アバランシェフォトダイオードD63と、コリメータレンズD64と、ミラーD65を備える。フローセルD1からX軸正方向へと向かう蛍光は、コリメータレンズD51にて平行光に変換され、ダイクロイックミラーD52を透過し、さらに分光フィルタD61に通されて、蛍光集光レンズD62により集光される。また、フローセルD1からX軸負方向へと向かう蛍光は、コリメータレンズD64にて平行光に変換され、ミラーD65によって反射される。ミラーD65によって反射された蛍光は、再び、コリメータレンズD64とフローセルD1を通してコリメータレンズD51に入射する。その後、この蛍光は、ダイクロイックミラーD52を透過し、さらに分光フィルタD61に通されて、蛍光集光レンズD62により集光される。こうして、蛍光集光レンズD62により集光された蛍光は、アバランシェフォトダイオードD63に受光される。アバランシェフォトダイオードD63は、受光した蛍光のピーク値に基づいて蛍光信号(SFL)を出力する。蛍光信号の取得の際には、通常、半導体レーザ101、103の何れか一方が駆動される。

40

【0067】

なお、図3（a）、（b）に示す光学系において、前方集光レンズ201は、アクロマティックレンズからなっており、赤散乱光RSと青散乱光BSの2つの波長に対して色収

50

差を補正する機能を備えている。このため、赤散乱光RSと青散乱光BSは、同一平面上に配置された受光面205a、205b上に適正に照射される。同様に、側方集光レンズD53も、アクロマティックレンズからなっており、赤レーザー光RLと青レーザー光BLに基づく2つの側方散乱光の波長に対して色収差を補正する機能を備えている。このため、これら2つの側方散乱光は、同一平面上に配置された受光面D54a、D54b上に適正に照射される。

【0068】

図2に戻り、光学検出器Dにより取得された前方散乱光信号と、側方散乱光信号と、蛍光信号は、情報処理ユニット4に送信される。情報処理ユニット4は、受信したこれら信号に基づいて解析を実行する。

10

【0069】

図5は、測定ユニット2の構成を示す図である。

【0070】

測定ユニット2は、図2に示す検体吸引部24、試料調製部25および検出部26の他、センサ部27と、駆動部28と、制御部29を備える。センサ部27は、検体容器TおよびサンプルラックLの位置を検出するためのセンサ等を含み、駆動部28は、検体の測定を行うための機構を含む。図2に示すバーコードユニット23は、センサ部27に含まれる。

【0071】

制御部29は、CPU291と、メモリ292と、通信インターフェース293と、I/Oインターフェース294を含んでいる。

20

【0072】

CPU291は、メモリ292に記憶されているコンピュータプログラムを実行する。メモリ292は、ROM、RAM、ハードディスク等からなる。また、CPU291は、通信インターフェース293を介して、情報処理ユニット4との間でデータの送受信を行う。また、CPU291は、I/Oインターフェース294を介して、測定ユニット2内の各部を制御すると共に、各部から出力された信号を受信して処理する。検出部26により得られた血液検体の測定データは、CPU291により処理され、メモリ292に格納される。血液検体に対する測定が終了すると、メモリ292に格納された測定データが、通信インターフェース293を介して、情報処理ユニット4に送信され、情報処理ユニット4において解析処理が行われる。

30

【0073】

図6は、情報処理ユニット4の構成を示す図である。

【0074】

情報処理ユニット4は、パーソナルコンピュータからなり、本体40と、表示部41と、入力部42から構成されている。本体40は、CPU401と、ROM402と、RAM403と、ハードディスク404と、読出装置405と、画像出力インターフェース406と、入出力インターフェース407と、通信インターフェース408を有する。

【0075】

CPU401は、ROM402に記憶されているコンピュータプログラムおよびRAM403にロードされたコンピュータプログラムを実行する。RAM403は、ROM402およびハードディスク404に記録されているコンピュータプログラムの読み出しに用いられる。また、RAM403は、これらのコンピュータプログラムを実行するときに、CPU401の作業領域としても利用される。

40

【0076】

ハードディスク404には、オペレーティングシステム、CPU401に実行させるためのコンピュータプログラム、およびコンピュータプログラムの実行に用いるデータが記憶されている。また、ハードディスク404には、後述の解析処理を実行させるためのプログラム404aが記憶されている。読出装置405は、CDドライブまたはDVDドライブ等によって構成されており、記録媒体405aに記録されたコンピュータプログラム

50

およびデータを読み出すことができる。なお、上記プログラム 404 a が記録媒体 405 a に記録されている場合には、読出装置 405 により記録媒体 405 a から読み出されたプログラム 404 a が、ハードディスク 404 に記憶される。

【0077】

画像出力インターフェース 406 は、画像データに応じた映像信号を表示部 41 に出力し、表示部 41 は、画像出力インターフェース 406 から出力された映像信号に基づいて画像を表示する。ユーザは入力部 42 を介して指示を入力し、入出力インターフェース 407 は、入力部 42 を介して入力された信号を受け付ける。通信インターフェース 408 は、測定ユニット 2 と、搬送ユニット 3 と、ホストコンピュータ 5 に接続されており、CPU 401 は、通信インターフェース 408 を介して、これら装置との間で指示信号およびデータの送受信を行う。

10

【0078】

ところで、図 3 (a)、(b) に示す光学検出器 D は、血液検体に試薬が混和された測定試料がフローセル D1 に流される場合の他、試薬が混和されない測定試料がフローセル D1 に流される場合にも、血球分析のための信号を取得するために用いられる。試薬が混和されない測定試料がフローセル D1 に流される場合、半導体レーザ 101、103 が駆動され、青レーザ光 B L と赤レーザ光 R L が、それぞれ、照射位置 E P 1、E P 2 に照射される。そして、照射位置 E P 1、E P 2 から生じた青散乱光 B S と赤散乱光 R S が、それぞれ、フォトダイオード 205 の受光面 205 a、205 b により受光され、フォトダイオード 205 から、青散乱光 B S と赤散乱光 R S に基づく前方散乱光信号が出力される。

20

【0079】

以下、これら 2 種類の前方散乱光信号に基づく血球の分類および計数の処理について説明する。なお、以下の解析処理では、青散乱光 B S と赤散乱光 R S に基づく前方散乱光信号が用いられているが、青レーザ光 B L と赤レーザ光 R L からそれぞれ生じる 2 種類の側方散乱光に基づく側方散乱光信号を、同様の解析に用いることも可能である。

【0080】

< 解析例 1 >

本解析例は、赤散乱光 R S と青散乱光 B S を用いて、赤血球と他の血球とを分類する処理に関するものである。なお、本解析例では、測定試料の調製において、検体容器 T から吸引された検体には希釈液のみが混和され、染色剤や溶血剤等の試薬は混和されない。

30

【0081】

図 3 (b) に示すように、青レーザ光 B L の照射位置 E P 1 と赤レーザ光 R L の照射位置 E P 2 は、互いに、Y 軸方向にずれている。また、測定試料は、流路 D15 を Y 軸正方向に流れる。したがって、流路 D15 を流れる血球に赤レーザ光 R L が照射されてから、この血球に青レーザ光 B L が照射されるまでには、所定のタイムラグがある。このため、青レーザ光 B L と赤レーザ光 R L からそれぞれ生じる 2 種類の前方散乱光に基づく前方散乱光信号を解析に用いる場合には、同一の血球から生じた 2 種類の前方散乱光信号から取得された 2 種類のデータ（以下、「前方散乱光データ」という）を互いに対応付ける必要がある。

40

【0082】

図 7 (a)、(b) は、2 種類の前方散乱光データを対応付ける方法を説明する図である。図 7 (a) は、粒子濃度が低い場合に赤散乱光 R S と青散乱光 B S が検出されるタイミングを示すタイミングチャート、図 7 (b) は、粒子濃度が高い場合（通常濃度の血液試料を用いた場合）に赤散乱光 R S と青散乱光 B S が検出されるタイミングを示すタイミングチャートである。

【0083】

図 7 (a) を参照して、測定試料の濃度が低い場合、赤散乱光 R S の検出タイミングと青散乱光 B S の検出タイミングは離散的になる。この場合、通常、一つの血球に対する赤

50

散乱光 R S の検出タイミングと青散乱光 B S の検出タイミングとの間の期間に、次の血球に対する赤散乱光 R S の検出タイミングが入ることはない。したがって、赤散乱光 R S の検出タイミングの次に到来する青散乱光 B S の検出タイミングが、同一血球に対する検出タイミングとして対応づけられる。図 7 (a) の例では、検出タイミング T 2 1 ~ T 2 5 が、それぞれ、検出タイミング T 1 1 ~ T 1 5 に対応づけられる。同一血球に対する検出タイミングの時間差は、何れの血球の場合も略同じである。したがって、たとえば、互いに対応付けられた 2 つの検出タイミングの時間差の平均値 t を、各血球に対する赤散乱光 R S と青散乱光 B S の検出タイミングの時間差として用いることができる。

【 0 0 8 4 】

図 7 (b) を参照して、粒子濃度が高い場合 (通常濃度の血液試料を用いる場合) には、赤散乱光 R S の検出タイミングと青散乱光 B S の検出タイミングが混在し合うことになる。この場合、同一の血球に対する赤散乱光 R S の検出タイミングと青散乱光 B S の検出タイミングとを対応付けることが難しい。しかしながら、フローセル D 1 を流れる測定試料の速度は、粒子濃度が高い場合と粒子濃度が低い場合とで殆ど変わらない。よって、粒子濃度が低い場合に取得された時間差 t を、粒子濃度が高い場合の同一血球に対する赤散乱光 R S の検出タイミングと青散乱光 B S の検出タイミングの時間差として用いることができる。図 7 (b) の例では、時間差 t を用いることにより、検出タイミング T 2 n 、 T 2 m が、それぞれ、検出タイミング T 1 n 、 T 1 m に対応づけられる。

【 0 0 8 5 】

本解析例では、青散乱光 B S と赤散乱光 R S を用いた血球分析が行われる前に、粒子濃度の低い試料がフローセル D 1 に流され、時間差 t が取得される。そして、こうして取得された時間差 t が、青散乱光 B S と赤散乱光 R S を用いた血球分析が行われる場合に用いられ、青散乱光 B S に基づいて取得された前方散乱光データと赤散乱光 R S に基づいて取得された前方散乱光データが互いに対応づけられる。この対応付けは、図 5 に示す測定ユニット 2 の制御部 2 9 において行われる。制御部 2 9 の CPU 2 9 1 は、検出部 2 6 (光学検出器 D) から受信した赤散乱光 R S および青散乱光 B S に基づく 2 種類の前方散乱光データを、順次、時間差 t を用いて対応づけて、メモリ 2 9 2 に格納する。

【 0 0 8 6 】

なお、時間差 t の取得方法は、上述の方法に限られるものではない。たとえば、フローセル D 1 を流れる測定試料の速度は、測定試料の温度によって変化する。したがって、フローセル D 1 を流れる測定試料の温度を測るための検出器をフローセル D 1 中に配置しておき、検出された温度に基づいて時間差 t のデフォルト値を調整して、時間差 t を取得するようにしても良い。

【 0 0 8 7 】

次に、赤血球により生じる前方散乱光と、赤血球以外の血球 (血小板や白血球) により生じる前方散乱光との違いについて説明する。

【 0 0 8 8 】

光が照射されることにより粒子から生じる散乱光は、その粒子の粒径と屈折率とにより定まる (M i e 散乱理論) 。ここで、屈折率は、実数部と虚数部とからなる複素数により表すことができる。すなわち、複素屈折率を m 、屈折率を n_r 、吸収を n_i とすると、複素屈折率 m は、以下の式により算出することができる。

【 0 0 8 9 】

$$m = n_r + i n_i$$

【 0 0 9 0 】

上記式によれば、複素屈折率 m は吸収 n_i に応じて変化するため、光に対する粒子の吸収度合いが異なれば、屈折率も異なることになる。よって、異なる種類の粒子が互いに異なる吸収度合いを有する場合、これら粒子に対して光を照射すると、生じる散乱光も互いに異なったものとなる。

【 0 0 9 1 】

図 8 (a) は、赤血球に含まれるヘモグロビンの吸収特性を示す図である。横軸は、ヘ

10

20

30

40

50

モグロビンに照射される光の波長を示し、縦軸は、吸収係数（任意単位）を示している。

【 0 0 9 2 】

図 8 (a) には、酸素化ヘモグロビン (HbO_2) と脱酸素化ヘモグロビン (Hb) の吸収係数がそれぞれ示されている。赤血球中のヘモグロビンは、酸素化ヘモグロビンと、脱酸素化ヘモグロビンとが混在した状態にあり、一般的には、静脈血のヘモグロビン酸素飽和度は約 75%、すなわち、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの存在比率が 3 対 1 となっている。このため、血液検体に含まれる赤血球では、酸素化ヘモグロビンの性質が支配的となる。

【 0 0 9 3 】

図 8 (a) に示すように、波長が 400 ~ 435 nm の範囲では、酸素化ヘモグロビン (HbO_2) の吸収係数は、他の波長帯に比べて数段大きくなっている。一方、波長が 610 ~ 750 nm の範囲では、酸素化ヘモグロビン (HbO_2) の吸収係数は、他の波長帯に比べて数段小さくなっている。すなわち、青レーザー光 B L に対する赤血球の吸収度合いと、赤レーザー光 R L に対する赤血球の吸収度合いとの差は、大きいものとなる。他方、赤血球以外の血球 (血小板や白血球) はヘモグロビンを含んでいないため、青レーザー光 B L に対する赤血球以外の血球の吸収度合いと、赤レーザー光 R L に対する赤血球以外の血球の吸収度合いとの差は、小さいものとなる。

【 0 0 9 4 】

以上のことから、赤血球と、赤血球以外の血球 (血小板や白血球) とでは、青レーザー光 B L に対する吸収度合いと、赤レーザー光 R L に対する吸収度合いとの差が顕著に異なるため、青レーザー光 B L が照射される場合に生じる青散乱光 B S の強度と、赤レーザー光 R L が照射される場合に生じる赤散乱光 R S の強度との差も異なるものとなる。具体的には、赤血球では、青散乱光 B S の強度は、赤散乱光 R S の強度よりも小さくなり易く、赤血球以外の他の血球では、青散乱光 B S の強度と赤散乱光 R S の強度は、同程度になり易い。

【 0 0 9 5 】

図 8 (b)、(c) は、それぞれ、本解析例と比較例における粒子分析のシミュレーション結果を示す図である。

【 0 0 9 6 】

本シミュレーションは、上記光学検出器 D において、前方散乱光受光光学系 D 4 の NA を 0.22 に、ビームストッパ 203 の遮光部 203 c の幅 W 1 を 0.3 mm に、フローセル D 1 とビームストッパ 203 との間を 6 mm に、フローセル D 1 に照射されるビームの Y 軸方向の幅を 10 μ m として行われた。また、本シミュレーションでは、赤血球と同様の性質を有する粒子と、血小板と同様の性質を有する粒子とが設定され、これら粒子に対して所定波長のレーザー光を照射することにより生じる前方散乱光の強度がシミュレーションにより算出された。

【 0 0 9 7 】

本解析例のシミュレーションでは、赤血球と血小板に相当する粒子に、波長 640 nm の赤レーザー光 R L と波長 405 nm の青レーザー光 B L を照射し、各粒子により生じる 640 nm と 405 nm の前方散乱光信号が、図 8 (b) に示すようにスキヤッタグラム上にプロットされている。比較例のシミュレーションでは、赤血球と血小板に相当する粒子に、約 632 nm の波長のレーザー光を照射し、各粒子により生じる低角 (2 ~ 3 度) と高角 (8 ~ 20 度) の前方散乱光信号が、図 8 (c) に示すようにスキヤッタグラム上にプロットされている。

【 0 0 9 8 】

図 8 (b)、(c) に示すスキヤッタグラムには、それぞれ、赤血球に相当する粒子が分布するマップ M 1、M 2 が示されている。マップ M 1、M 2 は、体積の値が V 30 ~ V 150 であり、ヘモグロビン濃度の値が H C 22 ~ H C 46 である 81 個の粒子に基づいて作成されており、各粒子は、マップ M 1、M 2 の格子の交点にプロットされている。なお、健康者の赤血球では、概ね、体積が V 60 ~ V 120 であり、ヘモグロビン濃度が H C 31 ~ H C 37 である。また、図 8 (b)、(c) に示すスキヤッタグラムには、それ

10

20

30

40

50

ぞれ、血小板に相当する粒子が分布する分布線 C 1 1、C 1 2 が示されている。分布線 C 1 1、C 1 2 は、体積の値が V 0 . 5 ~ V 3 3 である 4 つの粒子に基づいて作成されている。

【 0 0 9 9 】

図 8 (b)、(c) に示すように、赤血球と血小板に相当する粒子に対して行ったシミュレーション結果から、被検者から採取される赤血球も、マップ M 1、M 2 内に分布すると考えられ、被検者から採取される血小板も、分布線 C 1 1、C 1 2 上に分布すると考えられる。

【 0 1 0 0 】

本解析例において、赤血球の分布を示すマップ M 1 は、血小板の分布を示す分布線 C 1 1 よりも、左上に位置しており、マップ M 1 と分布線 C 1 1 とが重なり合わない。これは、図 8 (a) を参照して説明したように、赤血球に含まれるヘモグロビンにより青レーザ光 B L が吸収され、青散乱光 B S の強度が赤散乱光 R S に比べて小さくなっているためと考えられる。一方、比較例において、赤血球の分布を示すマップ M 2 は、血小板の分布を示す分布線 C 1 2 と、左右方向において同様の位置にあり、マップ M 2 に分布線 C 1 2 が重なっている。

10

【 0 1 0 1 】

本解析例の場合、被検者から採取される血小板の体積が大きいと、この血小板は、分布線 C 1 1 の延長線 C 1 1 a に位置付けられることになる。しかしながら、延長線 C 1 1 a はマップ M 1 と交わらないため、この血小板はマップ M 1 と重なることはない。このため、本解析例では、血小板の体積が大きい場合でも、赤血球と血小板を弁別する精度が高められる。一方、比較例の場合、被検者から採取される血小板の体積が大きいと、この血小板は、分布線 C 1 2 の延長線 C 1 2 a に位置付けられることになる。この場合、延長線 C 1 2 a はマップ M 2 と交わるため、この血小板はマップ M 2 と重なる惧れがある。このため、比較例では、血小板の体積が大きい場合、赤血球と血小板を弁別する精度が悪くなる惧れがある。

20

【 0 1 0 2 】

なお、血小板と白血球は、概ね同様の屈折率を有していると考えられ、ヘモグロビンを有しないという点でも同様の性質を有している。このため、白血球から生じる前方散乱光信号も、概ね分布線 C 1 1、C 1 2 上に位置すると考えられる。なお、白血球は血小板に比べて大きいため、白血球は血小板よりも、赤散乱光 R S と青散乱光 B S の値が大きい領域に位置付けられる。本解析例では、白血球がマップ M 1 と重なりにくいいため、赤血球と白血球を弁別する精度が高められる。一方、比較例では、白血球がマップ M 2 と重なりやすいため、赤血球と白血球を弁別する精度が悪くなる惧れがある。

30

【 0 1 0 3 】

よって、本解析例のように青レーザ光 B L と赤レーザ光 R L を用いると、図 8 (b) に示すように、赤血球と、赤血球以外の血球 (血小板や白血球) とを精度良く弁別することが可能になる。

【 0 1 0 4 】

図 8 (d) は、本解析例において、実際の測定試料から得られる赤散乱光 R S と青散乱光 B S に基づくスカッタグラムを示す図である。縦軸と横軸は、それぞれ、フォトダイオード 2 0 5 から出力される赤散乱光 R S と青散乱光 B S の信号を示しており、各血球から得られた赤散乱光 R S と青散乱光 B S の信号をパラメータとして、各血球がスカッタグラム上にプロットされている。

40

【 0 1 0 5 】

この場合、赤血球を示す点は領域 A 1 近傍に分布しており、血小板を示す点は、領域 A 2 近傍に分布しており、白血球を示す点は領域 A 3 近傍に分布している。また、赤血球が分布する領域 A 1 は、分布曲線 C 1 上に位置しており、血小板が分布する領域 A 2 と白血球が分布する領域 A 3 は、分布曲線 C 2 上に位置している。また、分布曲線 C 2 は、図 8 (b) に示す分布線 C 1 1 と延長線 C 1 1 a に対応するものであり、分布曲線 C 1 と分布

50

曲線 C 2 とは、互いに異なる角度で伸びているため、交わることがない。図 8 (d) のように分布曲線 C 1 と分布曲線 C 2 とが互いに離れるのは、上記のように、赤血球がヘモグロビンを有しており、ヘモグロビンの吸収係数が波長によって大きく変わるためであると考えられる。

【 0 1 0 6 】

このように、実測値において、分布曲線 C 1 上に位置する赤血球が分布する領域 A 1 と、分布曲線 C 2 上に位置する赤血球以外の血球が分布する領域 A 2、A 3 が重なりにくいことが分かる。なお、赤散乱光 R S の信号を示す閾値 V 1 は、後述するようにノイズを含む信号を除くために用いられる。

【 0 1 0 7 】

図 9 は、本解析例の血球分析装置 1 による解析処理を示すフローチャートである。

【 0 1 0 8 】

血球分析装置 1 が起動されると、まず、図 7 (a)、(b) を参照して説明したように、赤散乱光 R S の検出タイミングと青散乱光 B S の検出タイミングの時間差に基づいて、時間差 t が取得される (S 1 1)。そして、取得された時間差 t は、測定ユニット 2 のメモリ 2 9 2 に記憶される。なお、時間差 t は、たとえば、フローセル D 1 に粒子濃度が低い精度管理用試料を流すことにより取得されても良く、あるいは、フローセル D 1 中に配置された温度を測るための検出器が検出する温度に基づいてデフォルト値を修正することにより取得されても良い。

【 0 1 0 9 】

解析処理が開始されると、上述したように検体容器 T が測定ユニット 2 に取り込まれ、位置 P 3 に位置付けられる。そして、測定ユニット 2 の CPU 2 9 1 は、ピアサ 2 4 a により検体容器 T から検体を吸引し、試料調製部 2 5 により吸引した検体から測定試料を調製する (S 1 2)。この場合の測定試料の調製は、赤血球を溶血する試薬や、白血球を染色する試薬等が混和されることなく行われる。

【 0 1 1 0 】

次に、CPU 2 9 1 は、赤レーザ光 R L と青レーザ光 B L をフローセル D 1 に照射し、測定試料をフローセル D 1 に流す (S 1 3)。これにより、同一の血球から生じた 2 種類の前方散乱光 (赤散乱光 R S と青散乱光 B S) が生じ、これら前方散乱光がフォトダイオード 2 0 5 により受光される。CPU 2 9 1 は、フォトダイオード 2 0 5 から出力される 2 種類の前方散乱光信号に基づく前方散乱光データを取得する。そして、CPU 2 9 1 は、経過時間のカウントを開始する (S 1 4)。

【 0 1 1 1 】

続いて、CPU 2 9 1 は、赤散乱光 R S の信号が図 8 (d) に示す閾値 V 1 以下であるかを判定する (S 1 5)。なお、閾値 V 1 は微小な値に設定されており、ノイズを含む信号を除くために用いられる。赤散乱光 R S の信号が閾値 V 1 より大きいと (S 1 5 : N O)、CPU 2 9 1 は、上記時間差 t に基づいて、同一の血球から生じた 2 種類の前方散乱光データを互に対応付けて、メモリ 2 9 2 に記憶する (S 1 6)。他方、赤散乱光 R S の信号が閾値 V 1 以下であると (S 1 5 : Y E S)、CPU 2 9 1 は、この場合の血球についての 2 種類の前方散乱光データを記憶せず、処理を S 1 7 に進める。

【 0 1 1 2 】

こうして、所定時間が経過するまで、血球ごとに S 1 5、S 1 6 の処理が繰り返し行われる (S 1 7)。所定時間が経過することにより測定が終了すると (S 1 7 : Y E S)、CPU 2 9 1 は、メモリ 2 9 2 に記憶した前方散乱光データを、情報処理ユニット 4 に送信する (S 1 8)。

【 0 1 1 3 】

一方、情報処理ユニット 4 の CPU 4 0 1 は、測定ユニット 2 から前方散乱光データを受信すると (S 2 1 : Y E S)、図 8 (d) に示すようなスキッタグラムを作成し、表示部 4 1 に表示する (S 2 2)。続いて、CPU 4 0 1 は、作成したスキッタグラム上に領域 A 1 を設定する (S 2 3)。こうして、CPU 4 0 1 は、スキッタグラム上の領

10

20

30

40

50

域 A 1 に含まれる点を測定試料に含まれる赤血球として区分し、領域 A 1 に含まれる点に基づいて赤血球の解析処理を行い (S 2 4)、解析結果を表示部 4 1 に表示する (S 2 5)。

【 0 1 1 4 】

なお、S 2 3 で設定される領域 A 1 は、あらかじめ決められた固定領域であっても良く、固定領域に基づいて微調整された領域であっても良い。ここで、領域 A 1 の境界は、たとえば、直線や曲線の数式により定義される。

【 0 1 1 5 】

また、ここでは、説明の便宜上、作成したスカッタグラム上に領域 A 1 が設定され、このスカッタグラム上の領域 A 1 に含まれる点が赤血球に対応する点として区分されたが、スカッタグラムは、必ずしも図形またはグラフとして作成される必要はなく、領域 A 1 の設定と領域 A 1 に含まれる点の区分は、データ処理によって行われるようにしても良い。

【 0 1 1 6 】

以上、本解析例によれば、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、血球を、赤血球とその他の血球に良好に分類することができる。上記のように、赤血球は、波長により吸収係数が大きく変化するヘモグロビンを含むため、赤血球と他の血球では、赤散乱光 R S の強度と青散乱光 B S の強度が、大きく異なる。このため、図 8 (d) のスカッタグラムに示すように、赤血球が分布する領域 A 1 と、血小板および白血球が分布する領域 A 2 、 A 3 とが大きく離れるようになる。赤血球は、図 8 (d) のスカッタグラム上に模式的に示した分布曲線 C 1 に沿うように分布し、血小板と白血球は、分布曲線 C 2 に沿うように分布する。上記のように、分布曲線 C 1 と分布曲線 C 2 との間には、大きな開きが生じ、且つ、分布曲線 C 1 と分布曲線 C 2 とが交差することもない。よって、横軸を青散乱光 B S の強度とし、縦軸を赤散乱光 R S の強度とするスカッタグラムでは、図 8 (d) に示すように、赤血球が分布する領域 A 1 と、血小板および白血球が分布する領域 A 2 、 A 3 とが大きく離れるようになる。したがって、本解析例によれば、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、血球を、赤血球とその他の血球に、良好に分類することができる。

【 0 1 1 7 】

このように、本解析例によれば、実施の形態に記載の血球分析装置 1 を用いることにより、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、簡易な工程により、良好に、測定試料に含まれる血球から、赤血球を弁別し計数することができる。また、測定試料に含まれる血球から、赤血球と血小板を分類することができる。さらに、測定試料に含まれる血球から、血小板を弁別し計数することもできる。

【 0 1 1 8 】

なお、本解析例によれば、図 8 (d) に示すように、赤血球の他、血小板と白血球を弁別することが可能である。しかしながら、白血球の血球数は、赤血球と血小板の血球数に比べてかなり少ないため、本解析例により白血球を弁別して精度の高い解析結果を得ようとする場合には、測定時間を長くして、測定結果に含まれる白血球の数を高める必要がある。しかし、測定時間を長くすると、赤血球と血小板の血球数が多くなり過ぎ、赤血球と血小板の弁別が非効率となる。よって、本解析例は、測定時間を制限しながら、赤血球と血小板を効率的に弁別・分類する際に用いて好適なものである。白血球については、追って示す解析例 2 を用いることにより、効率的に、弁別・分類することが可能である。

【 0 1 1 9 】

また、本解析例によれば、染色剤や溶血剤等の試薬を用いる必要がないため、血液検体に試薬を混和する工程を省略することができる。よって、簡易な工程で良好に、血球を区分することができる。

【 0 1 2 0 】

また、本解析例によれば、染色剤や溶血剤等の試薬を用いる必要がないため、コストの削減を図ることができる。さらに、試薬の消費を削減でき、且つ、試薬を含む測定試料が

10

20

30

40

50

廃棄されることを抑制できるため、環境に配慮した分析手法を実現することができる。

【0121】

また、本解析例によれば、図7(a)、(b)を参照して説明したように、同一血球から取得された赤散乱光RSおよび青散乱光BSに基づくデータが互いに対応づけられるため、血球の濃度が高く、各散乱光に基づくデータが混在する場合にも、解析処理を適正に行うことができる。

【0122】

また、本実施の形態に係る光学検出器Dでは、図3(b)に示すように、青レーザ光BLの照射位置EP1と赤レーザ光RLの照射位置EP2が流路D15に平行な方向にずれているため、別途、青散乱光BSと赤散乱光RSとを分離する素子を配さなくとも、前方散乱光受光光学系D4の倍率を調整することにより、青散乱光BSと赤散乱光RSを、それぞれ、フォトダイオード205の受光面205a、205bに集光させることができる。同様に、側方散乱光受光光学系D5の倍率を調整することにより、青レーザ光BLに基づく散乱光と赤レーザ光RLに基づく散乱光を、それぞれ、フォトダイオードD54の受光面D54a、D54bに集光させることができる。

10

【0123】

また、本実施の形態に係る光学検出器Dによれば、一つのフォトダイオード205に受光面205a、205bが配置されているため、光学検出器Dの構成を簡素にすることができる。同様に、一つのフォトダイオードD54に受光面D54a、D54bが配置されているため、光学検出器Dの構成を簡素にすることができる。

20

【0124】

また、本実施の形態に係る光学検出器Dによれば、受光面205a、205bが同一平面上に配置されるため、フォトダイオード205の構成を簡素にすることができる。同様に、受光面D54a、D54bが同一平面上に配置されるため、フォトダイオードD54の構成を簡素にすることができる。

【0125】

また、本実施の形態に係る光学検出器Dによれば、前方集光レンズ201が、赤散乱光RSと青散乱光BSの2つの波長に対して色収差を補正する機能を備えているため、赤散乱光RSと青散乱光BSを、受光面205a、205b上に適正に照射することができる。同様に、側方集光レンズD53も、赤レーザ光RLと青レーザ光BLに基づく2つの側方散乱光の波長に対して色収差を補正する機能を備えているため、これら2つの側方散乱光を、受光面D54a、D54b上に適正に照射することができる。

30

【0126】

<解析例2>

上記解析例1では、赤散乱光RSと青散乱光BSを用いて、測定試料に含まれる血球から赤血球を弁別する処理について説明した。本解析例では、赤散乱光RSと青散乱光BSを用いて、測定試料に含まれる血球から白血球を弁別し、白血球を3つの分類に区分する処理について説明する。なお、本解析例でも、上記解析例1と同様、測定試料の調製において、検体容器Tから吸引された検体には希釈液のみが混和され、染色剤や溶血剤等の試薬は混和されない。

40

【0127】

上記のように、白血球はヘモグロピンを持たないため、白血球に対する赤散乱光RSと青散乱光BSの強度変化に寄与するパラメータは、粒径が支配的となる。すなわち、粒径が異なれば、図8(d)のスクアッタグラムに模式的に示された分布曲線C2上における血球の分布位置が異なることとなる。本解析例では、かかる分布位置の差異に基づいて、白血球が、リンパ球、単球および顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球)に区分される。

【0128】

また、上記解析例1において説明したとおり、赤血球が分布する領域A1(分布曲線C1)は、白血球を含む他の血球が分布する領域A2、A3(分布曲線C2)から大きく離れている。このため、白血球を分類および計数する際に、赤血球が分布する領域A1に含

50

まれるデータを処理対象から除外することが可能である。本解析例では、フォトダイオード205から出力される前方散乱光信号のうち、赤血球が分布する領域A1に対応する前方散乱光信号については、前方散乱光データの取得が禁止され、これにより、処理負荷の軽減が図られる。

【0129】

図10(a)~(c)は、本解析例において、異なる被検者から採取された3つの血液検体に基づいて作成されたスキャッタグラムを示す図である。縦軸と横軸は、それぞれ、フォトダイオード205から出力される赤散乱光RSと青散乱光BSの信号を示している。なお、この場合の測定試料の調製では、赤血球の解析と同様の希釈液による希釈が行われ、この場合の測定試料の測定では、赤血球の解析を行う場合と同様の測定時間で測定が行われている。

10

【0130】

本解析例では、青散乱光BSの信号が所定の閾値V2以下である血球は、解析処理に用いられない。具体的には、フォトダイオード205から出力される青散乱光BSの信号が閾値V2以下であると、この血球から取得された2種類の前方散乱光信号はメモリ292には記憶されない。これにより、図10(a)~(c)に示すように、各検体に基づいて作成されるスキャッタグラムには、青散乱光BSの信号が閾値V2以下である領域A10に、血球がプロットされなくなる。なお、閾値V2は、領域A10に、大部分の赤血球が含まれる値に設定される。これにより、領域A10以外の領域に、大部分の白血球が含まれることになる。こうして、図10(a)~(c)に示すように、領域A10に含まれる血球が除かれることにより、赤血球が分布する領域A1も大きく除かれることになる。

20

【0131】

図10(d)~(f)は、異なる被検者から採取された8つの血液検体に基づいて行われた白血球の分類結果を示す図である。図10(d)~(f)の縦軸と横軸は、それぞれ、本解析例に基づく処理によって得られた結果と、染色剤や溶血剤等の試薬を用いて測定試料を調製する解析手法(比較手法)によって得られた結果を示している。

【0132】

本解析例では、図10(a)~(c)と同様に、閾値V2以下の血球が解析の対象から除外される。そして、領域A31~A33内の血球数を、それぞれ、3つの分類(リンパ球、単球および顆粒球)の血球数として取得し、全体の血球数に占める各分類の血球数の比率を求める。図10(d)~(f)の縦軸には、それぞれ、本解析例におけるリンパ球と、単球と、顆粒球とが全体の血球数に占める比率(%)が示されている。一方、比較手法においても、この手法に従って白血球を3つの種類に分類し、全体の血球数に占める各分類の血球数の比率を求める。図10(d)~(f)の横軸には、それぞれ、この装置におけるリンパ球と、単球と、顆粒球とが全体の血球数に占める比率(%)が示されている。こうして、図10(d)~(f)には、本解析例による比率と比較手法による比率とをパラメータとして、それぞれ、8つの検体に対応する比率を示す点がプロットされる。

30

【0133】

また、図10(d)~(f)には、それぞれ、8つの検体の比率を示す点の近似直線L1~L3と、x(横軸の値)とy(縦軸の値)からなる近似直線L1~L3の式が示されている。また、図10(d)~(f)には、本解析例による結果と、比較手法による結果との相関係数 R^2 の値が示されている。近似直線の傾きと相関係数の値は、何れも1に近づくほど、本解析例による結果と比較手法による結果との相関性が高くなる。

40

【0134】

図10(d)~(f)に示すように、近似直線L1~L3の傾きは、それぞれ、1.1735、0.9436、1.183であり、相関係数 R^2 の値は、それぞれ、0.9397、0.4948、0.9149であるため、リンパ球と顆粒球では、本解析例の結果と比較手法の結果との相関性は、比較的高いことが分かる。このことから、本解析例によれば、リンパ球と顆粒球の結果は、染色剤や溶血剤等の試薬を用いて測定試料を調製する比較手法と、同程度の精度を有することが分かる。

50

【 0 1 3 5 】

なお、単球では、近似直線 L 2 に対する各点の収束度合いがやや低いため、本解析例の結果と比較手法の結果との相関性は、やや低いことが分かる。しかしながら、本解析例の解析処理は、赤血球の解析手法（赤血球用の希釈と測定時間）に基づいて行われているため、本解析例の解析処理が、白血球の解析手法（白血球用の希釈と測定時間）に基づいて行われれば、本解析例と比較手法との相関性は高められる可能性がある。

【 0 1 3 6 】

図 1 1 は、本解析例の血球分析装置 1 による解析処理を示すフローチャートである。図 1 1 に示すフローチャートは、図 9 に示す上記解析例 1 のフローチャートにおいて、S 1 5 の代わりに S 1 0 1 が追加され、S 2 3 の代わりに S 2 0 1 が追加されている。

10

【 0 1 3 7 】

測定ユニット 2 の CPU 2 9 1 は、上記解析例 1 と同様にして、S 1 1 ~ S 1 4 の処理を行う。続いて、CPU 2 9 1 は、青散乱光 BS の信号が図 1 0 (a) ~ (c) に示す閾値 V 2 以下であるかを判定する (S 1 0 1)。青散乱光 BS の信号が閾値 V 2 より大きいと (S 1 0 1 : N O)、CPU 2 9 1 は、上記時間差 t に基づいて、同一の血球から生じた 2 種類の前方散乱光データを互いに対応付けて、メモリ 2 9 2 に記憶する (S 1 6)。他方、青散乱光 BS の信号が閾値 V 2 以下であると (S 1 0 1 : Y E S)、CPU 2 9 1 は、この血球についての 2 種類の前方散乱光データを記憶せず、処理を S 1 7 に進める。

【 0 1 3 8 】

こうして、所定時間が経過するまで、血球ごとに S 1 0 1、S 1 6 の処理が繰り返し行われる (S 1 7)。なお、この場合の所定時間は、赤血球よりも数段個数の少ない白血球をより多く検出するために、上記解析例 1 の S 1 7 (図 9 参照) で設定される所定時間よりも長く設定される。所定時間が経過することにより測定が終了すると (S 1 7 : Y E S)、CPU 2 9 1 は、メモリ 2 9 2 に記憶した前方散乱光データを、情報処理ユニット 4 に送信する (S 1 8)。

20

【 0 1 3 9 】

一方、情報処理ユニット 4 の CPU 4 0 1 は、測定ユニット 2 から前方散乱光データを受信すると (S 2 1 : Y E S)、図 1 0 (a) ~ (c) に示すようなスキッタグラムを作成し、表示部 4 1 に表示する (S 2 2)。続いて、CPU 4 0 1 は、作成したスキッタグラム上に領域 A 3 1 ~ A 3 3 (領域 A 3) を設定する (S 2 0 1)。こうして、CPU 4 0 1 は、領域 A 3 1 ~ A 3 3 に含まれる点を測定試料に含まれるリンパ球、単球および顆粒球 (好中球、好酸球、好塩基球) として区分し、領域 A 3 1 ~ A 3 3 に含まれる点に基づいて白血球の解析処理を行い (S 2 4)、解析結果を表示部 4 1 に表示する (S 2 5)。

30

【 0 1 4 0 】

なお、S 2 0 1 で設定される領域 A 3 1 ~ A 3 3 は、あらかじめ決められた固定領域であっても良く、固定領域に基づいて微調整された領域であっても良い。ここで、領域 A 3 1 ~ A 3 3 の境界は、たとえば、直線や曲線の数式により定義される。領域 A 3 1 ~ A 3 3 は、特許請求の範囲の「所定の強度範囲」に相当する。

40

【 0 1 4 1 】

また、ここでは、説明の便宜上、作成したスキッタグラム上に領域 A 3 1 ~ A 3 3 が設定され、このスキッタグラム上の領域 A 3 1 ~ A 3 3 に含まれる点が、それぞれ、リンパ球、単球および顆粒球に対応する点として区分されたが、スキッタグラムは、必ずしも図形またはグラフとして作成される必要はなく、領域 A 3 1 ~ A 3 3 の設定と領域 A 3 1 ~ A 3 3 に含まれる点の区分は、データ処理によって行われるようにしても良い。

【 0 1 4 2 】

以上、本解析例によれば、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、白血球を、リンパ球、単球および顆粒球 (好中球、好酸球、好塩基球) に区分し計数することができる。また、図 3 (a)、(b) に示す構成の光学検出器 D を用いることにより、染色剤や溶血

50

剤等の試薬を用いることなく、簡易な工程により、良好に、測定試料に含まれる血球から、白血球を弁別し、白血球を3つの分類に区分し計数することができる。

【0143】

また、本解析例によれば、青散乱光BSの信号が閾値V2以下であると、この血球の前方散乱光データはメモリ292に記憶されない。これにより、白血球の解析処理に不要な前方散乱光データが記憶されないため、解析処理の負荷軽減を図りながら、効率的に、測定試料に含まれる血球から、白血球を弁別し計数することができる。

【0144】

なお、本解析例2では、図10(a)~(c)のように領域A31~A33を設定することにより、白血球が、リンパ球と、単球と、顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球)に分類されたが、さらに、好酸球から生じる自家蛍光を蛍光受光光学系D6のアバランシェフォトダイオードD63(図3(a)、(b)参照)で検出することにより、顆粒球から好酸球を分類することができる。好酸球は、好中球や好塩基球と異なり、短波長のレーザー光が照射されると、自家蛍光が生じる。すなわち、好酸球からは、測定試料の調製において検体に染色剤(試薬)を混和せずとも、短波長のレーザー光を照射することにより、所定波長の蛍光が生じる。好中球や好塩基球には、このような自家蛍光の現象は略生じない。

【0145】

したがって、上記のように領域A33に基づいて分類された顆粒球に対し、さらに、自家蛍光のパラメータを適用することにより、顆粒球から好酸球を分類することができる。

【0146】

この場合、自家蛍光の検出には、短波長の青レーザー光BLが用いられる。青レーザー光BLが好酸球に照射されると、500~550nm程度の自家蛍光が生じる。したがって、図3(a)、(b)に示すダイクロイックミラーD52と分光フィルタD61は、当該自家蛍光の波長帯の光を透過可能なように、透過波長帯域が設定される。また、図11のS16においては、前方散乱光データとともに、蛍光信号(SFL)に基づく蛍光データがメモリ292に記憶され、S18においては、前方散乱光データとともに蛍光データが、情報処理ユニット4に送信される。

【0147】

さらに、S24においては、上記解析例2における処理とともに、蛍光強度(SFL)のパラメータを用いて、顆粒球から好酸球を分類し計数する解析処理が行われる。ここでは、たとえば、領域A33に基づいて分類された顆粒球に対し、青散乱光BSの強度(BFSC)と蛍光強度(SFL)を2軸とするスキャッタグラムが生成される。そして、生成されたスキャッタグラムに対して、好酸球に対応する領域が設定され、この領域に含まれる点が、測定試料に含まれる好酸球として区分される。

【0148】

なお、この場合も、スキャッタグラムは、必ずしも図形またはグラフとして作成される必要はなく、好酸球に対応する領域の設定と当該領域に含まれる点の区分は、データ処理によって行われるようにしても良い。

【0149】

このように、蛍光データをさらに取得することにより、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、さらに、好酸球の分類および解析を行うことができる。

【0150】

<解析例3>

上記解析例2では、赤散乱光RSと青散乱光BSを用いて、測定試料に含まれる血球から白血球を弁別し、白血球を3つの分類に区分する処理について説明した。本解析例では、赤散乱光RSと青散乱光BSを用いて測定試料に含まれる血球から、赤血球を弁別する処理と、白血球を弁別し、白血球を3つの分類に区分する処理を、一つの測定試料を用いて同時に行う処理について説明する。なお、本解析例でも、上記解析例1、2と同様、測定試料の調製において、検体容器Tから吸引された検体には希釈液のみが混和され、染色剤や溶血剤等の試薬は混和されない。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 1 】

図 1 2 は、本解析例の血球分析装置 1 による解析処理を示すフローチャートである。図 1 2 に示すフローチャートは、図 1 1 に示す上記解析例 2 のフローチャートにおいて、S 1 4、S 1 0 1 の間に S 1 1 1 ~ S 1 1 3 が追加され、S 2 2、S 2 0 1 の代わりに S 2 1 1 ~ S 2 1 4 が追加されている。

【 0 1 5 2 】

測定ユニット 2 の CPU 2 9 1 は、上記解析例 1、2 と同様にして、S 1 1 ~ S 1 4 の処理を行う。続いて、CPU 2 9 1 は、図 9 の S 1 5 と同様、赤散乱光 RS の信号が図 8 (d) に示す閾値 V 1 以下であるかを判定する (S 1 1 1)。赤散乱光 RS の信号が閾値 V 1 より大きいと (S 1 1 1 : N O)、CPU 2 9 1 は、図 9 の S 1 6 と同様、上記時間差 t に基づいて、同一の血球から生じた 2 種類の前分散乱光データを互いに対応付けて、メモリ 2 9 2 に記憶する (S 1 1 2)。他方、赤散乱光 RS の信号が閾値 V 1 以下であると (S 1 1 1 : Y E S)、CPU 2 9 1 は、この場合の血球についての 2 種類の前分散乱光データを記憶せず、処理を S 1 0 4 に進める。

10

【 0 1 5 3 】

こうして、所定時間が経過するまで、血球ごとに S 1 1 1、S 1 1 2 の処理が繰り返し行われる (S 1 1 3)。所定の時間が経過すると (S 1 1 3 : Y E S)、処理が S 1 0 1 へ進められる。なお、フローセル D 1 への測定試料の供給は継続される。

【 0 1 5 4 】

次に、CPU 2 9 1 は、上記解析例 2 と同様、青散乱光 BS の信号が閾値 V 2 以下であるかを判定する (S 1 0 1)。青散乱光 BS の信号が閾値 V 2 より大きいと (S 1 0 1 : N O)、前方散乱光データをメモリ 2 9 2 に記憶し (S 1 6)、青散乱光 BS の信号が閾値 V 2 以下であると (S 1 0 1 : Y E S)、この血球についての 2 種類の前分散乱光データを記憶しない。所定時間が経過することにより測定が終了すると (S 1 7 : Y E S)、CPU 2 9 1 は、S 1 1 2 においてメモリ 2 9 2 に記憶した前方散乱光データと、S 1 6 においてメモリ 2 9 2 に記憶した前方散乱光データとを、情報処理ユニット 4 に送信する (S 1 8)。

20

【 0 1 5 5 】

一方、情報処理ユニット 4 の CPU 4 0 1 は、測定ユニット 2 から前方散乱光データを受信すると (S 2 1 : Y E S)、S 1 1 2 で取得された前方散乱光データに基づいて、図 8 (d) に示すようなスキャッタグラムを作成し、表示部 4 1 に表示する (S 2 1 1)。そして、CPU 4 0 1 は、S 2 1 1 で作成したスキャッタグラム上に領域 A 1 を設定する (S 2 1 2)。続いて、CPU 4 0 1 は、S 1 6 で取得された前方散乱光データに基づいて、図 1 0 (a) ~ (c) に示すようなスキャッタグラムを作成し、表示部 4 1 に表示する (S 2 1 3)。そして、CPU 4 0 1 は、S 2 1 3 で作成したスキャッタグラム上に領域 A 3 1 ~ A 3 3 (領域 A 3) を設定する (S 2 1 4)。

30

【 0 1 5 6 】

次に、CPU 4 0 1 は、S 2 1 1 で作成したスキャッタグラムと S 2 1 2 で設定した領域 A 1 に基づいて、上記解析例 1 と同様にして、赤血球の解析処理を行い、S 2 1 3 で作成したスキャッタグラムと S 2 1 4 で設定した領域 A 3 1 ~ A 3 3 に基づいて、上記解析例 2 と同様にして、白血球の解析処理を行う (S 2 4)。そして、CPU 4 0 1 は、解析結果を表示部 4 1 に表示する (S 2 5)。

40

【 0 1 5 7 】

以上、本解析例によれば、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、測定試料に含まれる血球から、赤血球を弁別することができ、且つ、白血球を弁別し、白血球を、リンパ球、単球および顆粒球 (好中球、好酸球、好塩基球) に区分し計数することができる。

【 0 1 5 8 】

また、本解析例によれば、1 回の測定工程において、白血球の弁別に必要な前方散乱光データと、赤血球の弁別に必要な前方散乱光データの両方を取得することができる。これにより、同一の測定試料を用いて、白血球の弁別と、白血球以外の他の血球 (赤血球) の

50

弁別とを行うことができるため、白血球の弁別と、白血球以外の他の血球の弁別とを行うために、個別に測定試料の調製を行う必要がなくなる。

【 0 1 5 9 】

< 解析例 4 >

上記解析例 2 では、赤散乱光 R S と青散乱光 B S を用いて、測定試料に含まれる血球から白血球を弁別し、さらに、白血球をリンパ球、単球および顆粒球に区分する処理について説明した。本解析例では、赤散乱光 R S と青散乱光 B S とともに蛍光信号を用いて、白血球の細胞表面抗原（以下、「表面抗原」という）に対する分析が行われる。

【 0 1 6 0 】

本解析例では、上記解析例 2 と異なり、測定試料の調製において、検体容器 T から吸引された検体に、A P C 標識 C D 4 抗体を含む試薬が混和される。ただし、本解析例においても、上記解析例 1 と同様、赤血球を溶血するための試薬（溶血剤）は検体に混和されず、赤血球を溶血する処理工程は実行されない。本解析例では、図 2 の試料調製部 2 5 に、A P C 標識 C D 4 抗体を含む試薬を収容する容器がさらに接続される。

10

【 0 1 6 1 】

本解析例では、蛍光標識抗体により励起される蛍光が、図 3 (a) のアバランシェフォトダイオード D 6 3 によって受光される。したがって、ダイクロイックミラー D 5 2 と分光フィルタ D 6 1 は、当該蛍光の波長帯の光を透過可能なように、透過波長帯域が設定される。上記のように、本解析例では、蛍光標識抗体として、表面抗原 C D 4 (ヘルパー T 細胞) と特異的に結合し、赤色の光によって蛍光が励起される A P C が用いられる。励起された A P C の蛍光放射極大波長 (Em Max) は、6 6 0 n m である。本解析例では、赤色の光によって蛍光が励起される蛍光標識抗体が用いられるため、蛍光の検出のために、赤レーザー光 R L が用いられる。なお、青色の光によって蛍光が励起される蛍光標識抗体が用いられる場合には、蛍光の検出のために、青レーザー光 B L が用いられる。また、赤レーザー光 R L および青レーザー光 B L とは別の波長のレーザー光（たとえば、赤外のレーザー光）をフローセル D 1 に照射する構成が光学検出器 D にさらに設けられる場合には、当該別の波長のレーザー光によって蛍光が励起される蛍光標識抗体を含む試薬が検体に混和されても良い。

20

【 0 1 6 2 】

本解析例では、上記のように蛍光標識抗体が混和され調製された測定試料に対して、上記解析例 2 と同様、図 1 3 (a) に示す赤散乱光 R S と青散乱光 B S を 2 軸とするスキャッタグラムが生成され、このスキャッタグラムに領域 A 3 1 が設定される。これにより、白血球からリンパ球が区分される。そして、区分されたリンパ球に対して、図 1 3 (b) に示すスキャッタグラムが生成され、このスキャッタグラムに領域 A 4 1、A 4 2 が設定される。

30

【 0 1 6 3 】

図 1 3 (b) のスキャッタグラムは、横軸が、図 3 (a) のアバランシェフォトダイオード D 6 3 によって検出される蛍光信号の強度（ピーク値）であり、縦軸は、赤散乱光 R S の強度である。

【 0 1 6 4 】

表面抗原 C D 4 を有するリンパ球は、A P C 標識 C D 4 抗体と結合するため、赤レーザー光 R L によって蛍光が励起される。このため、表面抗原 C D 4 を有するリンパ球は、図 1 3 (b) のスキャッタグラムにおいて、蛍光強度が高い領域に分布する。これに対し、表面抗原 C D 4 を有さないリンパ球は、A P C 標識 C D 4 抗体と結合しないため、赤レーザー光 R L によって蛍光が励起されない。このため、表面抗原 C D 4 を有さないリンパ球は、図 1 3 (b) のスキャッタグラムにおいて、蛍光強度が弱い領域に分布する。

40

【 0 1 6 5 】

したがって、図 1 3 (b) のスキャッタグラムに、表面抗原 C D 4 を有するリンパ球が分布する領域 A 4 1 と、表面抗原 C D 4 を有さないリンパ球が分布する領域 A 4 2 とを設定することにより、これら 2 種類のリンパ球を区分することができる。こうして、リンパ

50

球を区分することにより、CD4の分類について、白血球の表面抗原分析を行うことができる。なお、表面抗原CD4を有さないリンパ球は、蛍光が略励起されないため、本来的には、アバランシェフォトダイオードD63から出力される蛍光信号は、略ゼロとなる。しかしながら、アバランシェフォトダイオードD63およびこれを含む検出回路系のバックグラウンドノイズによって、表面抗原CD4を有さないリンパ球についても、所定の値の蛍光信号が取得される。領域A42は、このようなバックグラウンドノイズの影響を考慮して設定される。

【0166】

本解析例では、蛍光標識抗体が検体に混和されるため、蛍光標識抗体が図13(a)のスクアッタグラムに影響を及ぼすことが懸念される。しかしながら、蛍光標識抗体は、白血球に対して微小であり、また、ヘモグロビンのような特異な光吸収特性を有さないため、蛍光標識抗体が、図8(a)~(d)で説明した検出原理に影響を及ぼすことはない。したがって、蛍光標識抗体が検体に混和された場合にも、上記解析例2と同様、図13(a)に示すスクアッタグラム上において、白血球の分布領域(領域A3)が他の種類の血球から分離され、さらに、白血球の分布領域が、リンパ球、単球および顆粒球の分布領域(領域A31~A33)に分離され得る。よって、上記解析例2と同様の手法により、白血球と、リンパ球、単球および顆粒球の解析を行うことができる。

【0167】

なお、図13(a)、(b)は、患者から採取した検体に対して、上記手法により実際に測定を行ったときの測定結果を示している。この測定では、測定試料が以下の方法により調製された。

(1) 血液サンプル100 μ LとAPC標識CD4抗体を含む規定量の試薬とを反応容器に加え、反応容器内の反応液を攪拌する。

(2) 反応液を遮光し、室温にて10分静置して抗原抗体反応を進行させる。

(3) 再び反応液を攪拌した後、反応液を5 μ L分取し、分取した反応液を希釈液995 μ Lとともに測定容器に分注し測定試料を作製する。

【0168】

図13(a)を参照して分かるとおり、当該測定例においても、領域A3により、白血球を他の血球から区分することができ、また、領域A31~A33により、白血球を、リンパ球、単球および顆粒球に区分することができている。領域A41、A42に含まれる血球の計数値と割合は、下表のとおりである。下表において、“+”は、領域A41に対する血球の計数結果(表面抗原CD4を有するリンパ球の計数結果)を示し、“-”は、領域A42に対する血球の計数結果(表面抗原CD4を有さないリンパ球の計数結果)を示している。

【0169】

【表1】

CD4	検出血球数	比率(%)
+	115	62.8
-	68	37.2

【0170】

同一検体に対して、従来解析手法により、リンパ球の細分類および計数を行ったところ、CD4+の比率は63.1%、CD4-の比率は37.2%であった。ここで、従来解析手法では、CD4の蛍光標識抗体とともに白血球を検出するためのCD45の蛍光標識抗体が検体に混和され、さらに溶血剤により赤血球を溶血して、測定試料が調製されている。また、白血球の分類は、蛍光標識CD45抗体により発せられる蛍光に基づいて行われ、CD4+の分類は、蛍光標識CD4抗体により発せられた蛍光に基づいて行われている。表1の解析結果は、従来解析手法による解析結果に略一致している。したが

って、本解析例 4 における解析手法によっても、CD4+ の表面抗原に対する解析を精度良く行うことができることが検証され得る。

【0171】

図 1 4 は、本解析例の血球分析装置 1 による解析処理を示すフローチャートである。図 1 4 に示すフローチャートは、図 1 1 に示す上記解析例 2 のフローチャートにおいて、S12、S16、S18、S24 が、それぞれ、S121、S122、S123、S221 に置き換えられている。

【0172】

測定ユニット 2 の CPU291 は、上記解析例 2 と同様にして、S11、S13、S14 の処理を行う。ただし、S121 では、規定量の APC 標識 CD4 抗体を含む試薬が検体に混和される。続いて、CPU291 は、青散乱光 BS の信号が図 10 (a) ~ (c) に示す閾値 V2 以下であるか否かを判定する (S101)。青散乱光 BS の信号が閾値 V2 より大きいと (S101: NO)、CPU291 は、同一の血球から生じた 2 種類の前方散乱光データとともに、当該血球から生じた蛍光データを互いに対応付けて、メモリ 292 に記憶する (S122)。他方、青散乱光 BS の信号が閾値 V2 以下であると (S101: YES)、CPU291 は、この血球についてデータを記憶せず、処理を S17 に進める。

10

【0173】

こうして、所定時間が経過するまで、血球ごとに S101、S122 の処理が繰り返される (S17)。所定時間が経過することにより測定が終了すると (S17: YES)、CPU291 は、メモリ 292 に記憶した前方散乱光データおよび蛍光データを、情報処理ユニット 4 に送信する (S123)。

20

【0174】

一方、情報処理ユニット 4 の CPU401 は、測定ユニット 2 から前方散乱光データと蛍光データを受信すると (S21: YES)、図 13 (a) に示すようなスキャッタグラムを作成し、表示部 41 に表示する (S22)。続いて、CPU401 は、作成したスキャッタグラム上に領域 A31 ~ A33 を設定する (S201)。こうして、CPU401 は、領域 A31 ~ A33 に含まれる点を、測定試料に含まれるリンパ球、単球および顆粒球 (好中球、好酸球、好塩基球) として区分し、領域 A31 ~ A33 に含まれる点に基づいて白血球の解析処理を行う (S221)。

30

【0175】

S221 の解析処理には、上述の表面抗原 CD4 に対する解析が含まれる。すなわち、図 13 (a) に示すスキャッタグラムにおいて、領域 A31 により区分されたリンパ球に対し、図 13 (b) に示すスキャッタグラムが生成される。そして、このスキャッタグラムに領域 A41、A42 が設定され、表面抗原 CD4 を有するリンパ球と、表面抗原 CD4 を有さないリンパ球とが区分される。領域 A41、A42 に含まれる点の数が計数され、上記表 1 に示すように、計数値と比率が取得される。こうして解析処理を行った後、CPU401 は、解析結果を表示部 41 に表示する (S25)。ここでは、表示される解析結果に、たとえば、上記表 1 に示すような情報が含まれる。

【0176】

なお、S221 で設定される領域 A41、A42 は、あらかじめ決められた固定領域であっても良く、固定領域に基づいて微調整された領域であっても良い。また、ここでは、説明の便宜上、作成したスキャッタグラム上に領域 A41、A42 が設定され、このスキャッタグラム上の領域 A41、A42 に含まれる点が、それぞれ、表面抗原 CD4 を有するリンパ球および表面抗原 CD4 を有さないリンパ球に対応する点として区分されたが、スキャッタグラムは、必ずしも図形またはグラフとして作成される必要はなく、領域 A41、A42 の設定と領域 A41、A42 に含まれる点の区分は、データ処理によって行われるようにしても良い。

40

【0177】

本解析例によれば、上記解析例 2 と同様、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、

50

白血球を、リンパ球、単球および顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）に区分し計数することができる。また、赤血球を溶血することなく、APC標識CD4抗体を用いることにより、表面抗原CD4を有するリンパ球と表面抗原CD4を有さないリンパ球をさらに区分することができる。

【0178】

なお、本解析例では、APC標識CD4抗体（染料）が用いられるが、これは、表面抗原解析のために用いられるものであって、白血球の区分や、リンパ球、単球および顆粒球の区分のために用いられるものではない。白血球の区分、およびリンパ球、単球、顆粒球の区分は、上記解析例2と同様、APC標識CD4抗体（染料）により発せられた蛍光を用いることなく行われる。また、本解析例では、赤血球を溶血する工程が省略されるため、測定開始から解析終了までの時間を、顕著に短縮することができる。

10

【0179】

また、本解析例では、白血球の区分のために用いられる赤レーザー光RLが、蛍光標識抗体の励起用に共用されるため、赤レーザー光RLと青レーザー光BL以外の波長のレーザー光（たとえば、赤外のレーザー光）を蛍光標識抗体の励起用に用いる場合に比べて、光学検出器D1の構成を簡素にすることができる。

【0180】

なお、本解析例においても、上記解析例2と同様、好酸球において生じる自家蛍光を利用して、好酸球をさらに区分するようにしても良い。この場合、たとえば、図3(a)の光学系において、フローセルD1からX軸負方向に向かう自家蛍光を検出するために、ミラーD65が省略され、代わりに、自家蛍光を検出するための分光フィルタと、蛍光集光レンズと、アバランシェフォトダイオードが配置される。

20

【0181】

また、本解析例では、図13(b)に示すスキャッタグラムに領域A41、A42を設定することによって、表面抗原CD4を有するリンパ球と表面抗原CD4を有さないリンパ球をさらに区分するようにしたが、図13(a)に示す領域A31に含まれる血球について、図13(c)に示すヒストグラムを生成し、このヒストグラムに、範囲R1、R2を設定して、表面抗原CD4を有するリンパ球と表面抗原CD4を有さないリンパ球をさらに区分するようにしても良い。図13(c)において、横軸は、図3(a)のアバランシェフォトダイオードD63によって検出される蛍光信号の強度（ピーク値）であり、縦軸は、血球数である。また、範囲R1は、表面抗原CD4を有するリンパ球の分布範囲であり、範囲R2は、表面抗原CD4を有さないリンパ球の分布範囲である。

30

【0182】

また、本解析例では、上記解析例2と同様、図13(a)に示すスキャッタグラムに領域A31～A33を設定してリンパ球、単球および顆粒球を区分するようにしたが、これに代えて、たとえば、図15(b)に示すように、青散乱光BSと赤散乱光RSを2軸とするスキャッタグラムに領域A5を設定して白血球を区分し、さらに、区分された白血球を、図15(c)に示すスキャッタグラムに展開して、リンパ球、単球および顆粒球を区分するようにすることもできる。

【0183】

図15(c)において、横軸は、赤レーザー光RLの側方散乱光の強度（ログ表示）であり、縦軸は、赤散乱光RS（赤レーザー光RLの前方散乱光）の強度である。また、領域A51～A53は、それぞれ、リンパ球、単球および顆粒球の分布領域である。

40

【0184】

図15(a)は、図15(b)、(c)の処理を用いる場合の解析処理を示すフローチャートである。図15(a)に示すフローチャートでは、図14に示すフローチャートにおいて、S122、S123、S201、S221が、それぞれ、S131、S132、S231、S232に置き換えられている。また、図17(a)のフローチャートでは、図14に示すフローチャートのS11～S14のステップの図示が省略されている。

【0185】

50

図15(a)のフローチャートにおいて、S131では、同一の血球から生じた上記2種類の前方散乱光データと、蛍光標識抗体によって励起された蛍光に基づく蛍光データとともに、赤レーザ光RLに基づく側方散乱光の強度(ピーク値)を示す赤側方散乱光データが、互いに対応付けられて、メモリ292に記憶される。また、S132では、メモリ292に記憶された前方散乱光データ、蛍光データおよび赤側方散乱光データが、情報処理ユニット4に送信される。

【0186】

一方、情報処理ユニット4側では、S231において、図15(b)に示すスキャッタグラム上に領域A5が設定され、白血球が区分される。また、S232では、区分された白血球が、図15(c)に示すスキャッタグラムに展開され、領域A51~A53に含まれる点が、測定試料に含まれるリンパ球、単球および顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球)として区分される。こうして、領域A51~A53に含まれる点に基づいて白血球の解析処理が行われる。

【0187】

図15(a)のS232の解析処理には、図14のS221と同様、上述の表面抗原CD4に対する解析が含まれる。すなわち、図15(c)のスキャッタグラムにおいて、領域A51により区分されたリンパ球に対し、図13(b)に示すスキャッタグラムが生成される。そして、このスキャッタグラムに領域A41、A42が設定され、表面抗原CD4を有する血球と、表面抗原CD4を有さない血球とが区分される。

【0188】

なお、図15(b)のスキャッタグラムに設定される領域A5と、図15(c)のスキャッタグラム上に設定される領域A51~A53は、あらかじめ決められた固定領域であっても良く、固定領域に基づいて微調整された領域であっても良い。また、ここでは、説明の便宜上、作成したスキャッタグラム上に領域A5または領域A51~A53が設定されるとしたが、スキャッタグラムは、必ずしも図形またはグラフとして作成される必要はなく、領域A5および領域A51~A53の設定とこれら領域に含まれる点の区分は、データ処理によって行われるようにしても良い。

【0189】

<解析例5>

上記解析例4では、1種類の表面抗原を解析するために1種類の蛍光標識抗体が検体に混和された。しかしながら、解析対象とされる表面抗原は1種類に限らず、複数種類の表面抗原が解析対象とされても良い。この場合、解析対象とされる表面抗原の種類と数に応じて、検体に混和される蛍光標識抗体が調整される。本解析例では、表面抗原CD4に加えて、表面抗原CD8(キラーT細胞)が解析対象とされる。したがって、検体には、蛍光標識抗体として、APCに加えて、キラーT細胞表面抗原CD8と特異的に結合するAPC-Cy7標識CD8抗体が混和される。APC-Cy7は、赤色の光によって、蛍光放射極大波長(Em Max)が785nmの蛍光が励起される。周知のとおり、同一のリンパ球に対して、APCとAPC-Cy7が同時に結合することはない。本解析例では、図2の試料調製部25に、APC-Cy7標識CD8抗体を含む試薬を収容する容器がさらに接続される。

【0190】

図16は、本解析例において用いられる光学検出器Dの光学系の構成を示す図である。この光学系には、図3(a)の光学系に対し、ダイクロイックミラーD66と、分光フィルタD67と、蛍光集光レンズD68と、アバランシェフォトダイオードD69が追加されている。

【0191】

ダイクロイックミラーD52は、コリメータレンズD51側から入射する光のうち、赤レーザ光RLの側方散乱光のみを反射し、その他の光を透過する。したがって、フォトダイオードD54は、赤レーザ光RLの側方散乱光のみを受光する。ダイクロイックミラーD66は、APC-Cy7標識CD8抗体によって励起される蛍光(Em Max:78

10

20

30

40

50

5 nm)を透過し、APC標識CD4抗体によって励起される蛍光(Em Max: 660 nm)を反射する。分光フィルタD61は、APC-Cy7標識CD8抗体によって励起される蛍光の波長帯域以外の波長の光をカットする。また、分光フィルタD67は、APC標識CD4抗体によって励起される蛍光の波長帯域以外の波長の光をカットする。したがって、APC標識CD4抗体にて励起される蛍光は、アバランシェフォトダイオードD69によって受光され、APC-Cy7標識CD8抗体にて励起される蛍光は、アバランシェフォトダイオードD63によって受光される。

【0192】

図17(b)は、APC標識CD4抗体とAPC-Cy7標識CD8抗体を検体に混和して調製された測定試料からリンパ球を区分し、さらに区分したリンパ球を、2つの蛍光強度を2軸とするスキャッタグラムに展開した場合の測定結果を示す図である。図17(b)において、横軸は、APC標識CD4抗体にて励起される蛍光を受光するアバランシェフォトダイオードの検出信号(横軸:ログ表示)であり、縦軸は、APC-Cy7標識CD8抗体にて励起される蛍光を受光するアバランシェフォトダイオードの検出信号(縦軸:ログ表示)である。

10

【0193】

なお、図17(b)の測定結果は、赤血球の溶血処理を含む従来の解析手法による汎用装置により測定を行って得られたものである。ただし、上記解析例4で検証したとおり、赤血球の溶血を行わずに、青散乱光BSの強度と赤散乱光の強度とに基づいて、白血球(リンパ球、単球、顆粒球)の区分が行われた場合にも、従来の解析手法に略一致する表面抗原の解析結果が得られている(表1参照)。したがって、APC標識CD4抗体とAPC-Cy7標識CD8抗体を検体に混和して調製された測定試料に対して、青散乱光BSの強度と赤散乱光の強度とに基づく白血球(リンパ球、単球、顆粒球)の区分が行われた場合にも、図17(b)と同様の分布のスキャッタグラムが得られることが想定され得る。

20

【0194】

表面抗原CD4を有するリンパ球は、APC標識CD4抗体と結合するため、赤レーザー光RLによって、660 nm(Em Max)の蛍光が励起される。このため、表面抗原CD4を有するリンパ球は、図17(b)のスキャッタグラムにおいて、横軸の蛍光強度が高い領域に分布する。また、CD8の表面抗原を有するリンパ球は、APC-Cy7標識CD8抗体と結合するため、赤レーザー光RLによって、785 nm(Em Max)の蛍光が励起される。このため、CD8の表面抗原を有するリンパ球は、図17(b)のスキャッタグラムにおいて、縦軸の蛍光強度が高い領域に分布する。これに対し、表面抗原CD4およびCD8の表面抗原の何れをも有さないリンパ球は、APC標識CD4抗体、APC-Cy7の何れとも結合しないため、赤レーザー光RLによって蛍光が励起されない。このため、CD4、CD8の何れの表面抗原も有さないリンパ球は、図17(b)のスキャッタグラムにおいて、縦軸、横軸の両方において蛍光強度が低い領域に分布する。

30

【0195】

したがって、図17(b)のスキャッタグラムに、表面抗原CD4を有するリンパ球が分布する領域A61と、CD8の表面抗原を有するリンパ球が分布する領域A62と、CD4、CD8の何れの表面抗原をも有さないリンパ球が分布する領域A63とを設定することにより、これら3種類のリンパ球を区分することができる。こうして、リンパ球を区分することにより、CD4およびCD8の分類について、白血球の表面抗原分析を行うことができる。

40

【0196】

図17(a)は、本解析例の解析処理を示すフローチャートである。図17(a)に示すフローチャートでは、図14に示すフローチャートにおいて、S121、S122、S123、S221が、それぞれ、S141、S142、S143、S241に置き換えられている。また、図17(a)のフローチャートでは、図14に示すフローチャートのS11のステップの図示が省略されている。

50

【 0 1 9 7 】

図 1 7 (a) のフローチャートにおいて、S 1 4 1 では、規定量の A P C 標識 C D 4 抗体を含む試薬と、規定量の A P C - C y 7 標識 C D 8 抗体を含む試薬が検体に混和される。S 1 4 2 では、同一の血球から生じた上記 2 種類の前方散乱光データと、A P C 標識 C D 4 抗体および A P C - C y 7 標識 C D 8 抗体にてそれぞれ励起された蛍光に基づく 2 種類の蛍光データが、互いに対応付けられて、メモリ 2 9 2 に記憶される。また、S 1 4 3 では、メモリ 2 9 2 に記憶された前方散乱光データ、蛍光データが、情報処理ユニット 4 に送信される。

【 0 1 9 8 】

一方、情報処理ユニット 4 側では、S 2 4 1 において、上記解析例 4 と同様、青散乱光 B S の強度と赤散乱光 R S の強度に基づき、白血球が区分され、さらに、リンパ球、単球、顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）が区分される。さらに、区分されたリンパ球が、図 1 7 (b) に示すスキャッタグラムに展開され、C D 4 および C D 8 の分類について、白血球の表面抗原分析が行われる。すなわち、図 1 7 (b) に示すスキャッタグラムに領域 A 6 1 ~ A 6 3 が設定され、表面抗原 C D 4 を有するリンパ球と、C D 8 の表面抗原を有するリンパ球と、C D 4、C D 8 の何れの表面抗原も有さないリンパ球とが区分される。その後、S 2 5 において、解析結果が表示される。ここでは、上記表 1 と同様の計数値および比率を示す情報が、C D 4 と C D 8 について、それぞれ表示される。

【 0 1 9 9 】

なお、図 1 7 (b) のスキャッタグラムに設定される領域 A 6 1 ~ A 6 3 は、あらかじめ決められた固定領域であっても良く、固定領域に基づいて微調整された領域であっても良い。また、ここでは、説明の便宜上、作成したスキャッタグラム上に領域 A 6 1 ~ A 6 3 が設定されるとしたが、スキャッタグラムは、必ずしも図形またはグラフとして作成される必要はなく、領域 A 6 1 ~ A 6 3 の設定とこれら領域に含まれる点の区分は、データ処理によって行われるようにしても良い。

【 0 2 0 0 】

本解析例によれば、上記解析例 4 と同様、染色剤や溶血剤等の試薬を用いることなく、白血球を、リンパ球、単球および顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）に区分し計数することができる。また、赤血球を溶血することなく、A P C 標識 C D 4 抗体、A P C - C y 7 標識 C D 8 抗体を用いることにより、表面抗原 C D 4 を有するリンパ球と、C D 8 の表面抗原を有するリンパ球と、C D 4、C D 8 の何れの表面抗原も有さないリンパ球とをさらに区分することができる。

【 0 2 0 1 】

なお、図 1 7 (a) のフローチャートでは、S 2 2 において作成されたスキャッタグラムに領域 A 3 1 ~ A 3 3 を設定して、リンパ球、単球および顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）を区分したが、これに代えて、図 1 5 (a) のように、S 2 2 において作成されたスキャッタグラムに領域 A 5 を設定して白血球を区分し、区分した白血球を図 1 5 (c) のスキャッタグラムに展開して、リンパ球、単球および顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）を区分しても良い。

【 0 2 0 2 】

また、本解析例においても、上記解析例 2、4 と同様、好酸球において生じる自家蛍光を利用して、好酸球をさらに区分するようにしても良い。

【 0 2 0 3 】

図 1 8 は、この場合の光学検出器 D の光学系の構成例を示す図である。この構成例では、図 1 6 に示す光学系において、ミラー D 6 5 が省略され、代わりに、自家蛍光を検出するための分光フィルタ D 7 0 と、蛍光集光レンズ D 7 1 と、アバランシェフォトダイオード D 7 2 が配置される。このように、好酸球から励起される自家蛍光の受光系を、C D 4 および C D 8 のリンパ球から励起される蛍光の受光系から分離することにより、各蛍光を適正に且つ効率良く検出することができる。

【 0 2 0 4 】

10

20

30

40

50

なお、図18の光学系では、図16の光学系と同様、赤レーザー光RLに基づく側方散乱光のみがフォトダイオードD54によって受光され、青レーザー光BLに基づく側方散乱光を検出するための系が設けられていない。さらに青レーザー光BLに基づく側方散乱光を検出する場合には、図18の光学系において、たとえば、コリメータレンズD64と分光フィルタD70との間に、好酸球において生じる自家蛍光を透過し、青レーザー光BLに基づく側方散乱光を反射するダイクロイックミラーを配置し、ダイクロイックミラーによって反射された側方散乱光を、側方集光レンズによって、フォトダイオードに集光するようにすれば良い。

【0205】

また、本解析例では、解析対象とされる表面抗原の種類が2つであったが、3種類以上の表面抗原が解析対象とされても良い。この場合、解析対象とされる表面抗原の種類数に応じて、検体に混和される蛍光標識抗体が調整される。たとえば、解析対象とされる表面抗原の種類数が3つであれば、3種類の蛍光標識抗体が検体に混和される。また、解析対象とされる表面抗原の種類数に応じて、光学検出器Dの光学系が調整される。たとえば、解析対象とされる表面抗原の種類数が3つであれば、3種類の蛍光標識抗体により励起される蛍光を検出可能なように、光学系が調整される。この場合、たとえば、図18の光学系において、コリメータレンズD64と分光フィルタD70との間に、好酸球において生じる自家蛍光を透過し、追加された3番目の蛍光標識抗体により励起される蛍光を反射するダイクロイックミラーを配置し、ダイクロイックミラーによって反射された蛍光を、分光フィルタ、蛍光集光レンズおよびアバランシェフォトダイオードにより構成される受光系によって受光するようにすれば良い。このように、適宜、ダイクロイックミラーによって蛍光を分岐させることにより、3種類以上の蛍光標識抗体により励起される蛍光を検出可能な光学系を構成することができる。

【0206】

また、赤レーザー光RLによって蛍光が励起される蛍光標識抗体と青レーザー光BLによって蛍光が励起される蛍光標識抗体が、それぞれ、検体に混和されて測定試料が調製されても良い。この場合、それぞれの蛍光を受光可能なように、適宜、光学検出器Dの光学系が変更される。

【0207】

<変更例>

以上、本発明の実施の形態および解析例について説明したが、本発明の実施形態はこれらに限定されるものではない。

【0208】

たとえば、上記解析例2では、青散乱光BSの信号が閾値V2以下である場合、この血球は解析の対象から除外された。しかしながら、上記解析例2において、上記解析例1と同様にして、全ての血球の前方散乱光データに基づいて、図8(d)に示すようなスキャッタグラムを表示し、このスキャッタグラム上に、図10(a)~(c)に示す領域A31~A33を設定することにより、白血球(リンパ球、単球および顆粒球)が3つに分類されるようにしても良い。この場合、全ての血球の前方散乱光データをメモリ292に記憶し、全ての血球をスキャッタグラム上に表示するため、CPU291、401の処理に負荷がかかることになるものの、上記解析例2と同様、白血球の分類を行うことができる。

【0209】

なお、この場合、図8(d)に示すスキャッタグラム上に、領域A31~A33だけでなく、領域A2、A3を設定することにより、それぞれ、血小板と白血球を分類しても良い。

【0210】

また、上記解析例2では、青散乱光BSの信号が閾値V2以下である場合、この血球についての2種類の前方散乱光データは記憶されないが、これに替えて、上記解析例1と同様、全ての血球についての2種類の前方散乱光データが記憶されるようにしても良い。こ

10

20

30

40

50

の場合、CPU 291は、青散乱光BSの信号が閾値V2以下であると判定すると、この血球についての2種類の前方散乱光データを記憶する際に、たとえば、このデータにフラグを付与しておく。そして、情報処理ユニット4のCPU 401は、受信した前方散乱光データを参照して、血球のデータにフラグが付与されている場合、この血球のデータをスキッタグラムに表示せず、解析しないようにする。

【0211】

また、上記解析例2では、白血球を3分類に区分する場合について説明したが、図11に示すように白血球を3分類に区分して白血球の解析を行う処理と、図9に示すように赤血球を他の血球と区分して赤血球の解析を行う処理とが、ユーザの選択により行われるようにしても良い。たとえば、表示部41に、白血球の解析を開始させるための測定開始ボタンと、赤血球の解析を開始させるための測定開始ボタンが表示され、ユーザは、所望する解析処理に応じて、これら測定開始ボタンを押下するようにしても良い。

10

【0212】

図19(a)は、この場合の血球分析装置1による解析処理の選択を示すフローチャートである。情報処理ユニット41のCPU 401は、白血球の測定開始ボタンが押下されると(S31: YES)、図11に示す白血球の解析処理を開始させ(S32)。他方、CPU 401は、赤血球の測定開始ボタンが押下されると(S33: YES)、図9に示す赤血球の解析処理を開始させる(S34)。このように、図13(a)に示す変更例によれば、白血球の弁別と、赤血球の弁別を選択的に行うことができる。

20

【0213】

また、上記解析例2では、図10(a)~(c)に示すスキッタグラムにおいて、青散乱光BSの信号が閾値V2以下となるよう領域A10が設定されたが、これに限らず、領域A10は、図13(b)に示すように、斜め方向に伸びる直線L4によっても設定されるようにしても良い。この場合、領域A10は、青散乱光BSの信号が閾値V2以下であり、または、直線L4よりも左側に位置する領域として設定される。この場合も、領域A10が解析対象から除かれるため、赤血球が分布する領域A1を考慮することなく、白血球の分類を容易に行うことができる。なお、領域A10は、さらに曲線によって区画されるように設定されても良い。

【0214】

また、上記解析例2において、領域A10は、図13(c)に示すように、青散乱光BSの信号が閾値V2以下であり、且つ、赤散乱光RSの信号が閾値V3以上となるよう設定されても良い。この場合、解析対象となる範囲に、血小板が分布する領域A2を設定することができ、領域A2に基づいて血小板の弁別を行うことができる。

30

【0215】

また、上記解析例3において、赤血球の弁別に用いる前方散乱光データを取得する期間(S111~S113)と、白血球の弁別に用いる前方散乱光データを取得する期間(S101、S16、S17)とは、経過時間によって区分された。しかしながら、これに限らず、S112において記憶した前方散乱光データの数(血球の数)が所定値に達すると、S113の判定がYESとなり、処理がS101に進められるようにしても良い。

【0216】

40

また、測定に用いる光学系も、図3(a)、(b)に記載された構成に限らず、異なる波長の光をフローセルD1に照射でき、各波長の光の散乱光をそれぞれ受光できる構成であれば、他の構成であってもよい。たとえば、図3(a)、(b)の光学系では、一つのフォトダイオード205に2つの受光面205a、205bが配置されたが、前方散乱光受光光学系D4に青散乱光BSと赤散乱光RSの光路を分離させる手段を配置し、光路が分離された青散乱光BSと赤散乱光RSをそれぞれ個別に受光する2つのフォトダイオードが配置されても良い。

【0217】

また、フローセルD1に照射される2つの光の波長も上記に記載された波長に限られず、ヘモグロビンの吸収係数がそれぞれ異なるように波長を適宜選択してもよい。たとえば

50

、青レーザー光 B L と同様に赤血球の吸収度合いの高い黄レーザー光（出射波長 550 ~ 600 nm）を青レーザー光 B L に替えて用いてもよい。さらに、散乱光の特性が血球毎に異なるのであれば、他の波長が用いられても良い。ただし、青レーザー光 B L の波長を上記実施の形態に示された波長に設定することにより、上記のように、各血球の分布をより明確に区分し、各血球を計数することができる。

【0218】

また、解析例 1 では、赤散乱光 R S の強度に対してのみ閾値 V 1 が設定され、前方散乱光データの取得が制限されたが、さらに青散乱光 B S の強度に対しても閾値を設定して前方散乱光データの取得が制限されても良い。また、解析例 2 では、青散乱光 B S の強度に対してのみ閾値 V 2 が設定され、前方散乱光データの取得が制限されたが、さらに赤散乱光 R S の強度に対しても閾値を設定して前方散乱光データの取得が制限されても良い。

10

【0219】

また、上記解析例 1 ~ 5 では、表示部 4 1 にスカッタグラムが表示されたが、スカッタグラムは必ずしも表示されなくても良い。ただし、スカッタグラムが表示された方が、各血球の分離具合を視覚により確認できるため、解析結果の評価を円滑に行うことができる。

【0220】

また、上記解析例 3 では、測定試料をフローセル D 1 に連続的に流しながら、解析例 1 のための測定と解析例 2 のための測定とを時間を区切って行うようにしたが、解析例 1 のための測定と解析例 4 のための測定とを時間を区切って行うようにしてもよく、あるいは、解析例 1 のための測定と解析例 5 のための測定とを時間を区切って行うようにしても良い。この場合、図 1 2 の S 1 2 では、蛍光標識抗体を含む試薬が検体に混和されて測定試料が調製され、S 2 4 では、前方散乱光データとともに蛍光データをも用いた解析処理が行われる。

20

【0221】

また、上記実施の形態では、第 1 試薬と第 2 試薬が混和されない測定試料だけでなく、これら試薬が混和された測定試料に対しても測定可能なように、血球分析装置 1 が構成された。しかしながら、血球分析装置 1 は、必ずしも、第 1 試薬と第 2 試薬が混和された測定試料を処理するための構成を備えずとも良く、たとえば、上記解析例 1 ~ 3 に従って、第 1 試薬と第 2 試薬が混和されない測定試料のみを測定可能なように、血球分析装置 1 が構成されても良い。この場合、図 2 に示す測定ユニット 2 から、第 1 試薬を収容する容器 2 5 1 と、第 2 試薬を収容する容器 2 5 2 が省略される。また、図 3 (a) に示す光学検出器 D から、蛍光受光光学系 D 6 が省略され、ダイクロイックミラー D 5 2 が全反射ミラーに変更される。こうすると、血球分析装置 1 の構成を簡素にすることができる。また、容器 2 5 1、2 5 2 が省略されるため、試料調製部 2 5 に容器 2 5 1、2 5 2 を接続する手間が省略されると共に、コストの削減を図ることができる。ただし、上記解析例 4、5 では、蛍光標識抗体を含む試薬が検体に混和されるため、図 2 に示す測定ユニット 2 から、試薬を収容する容器を省略することはできず、また、図 3 (a) に示す光学検出器 D から、蛍光受光光学系 D 6 を省略することもできない。

30

【0222】

なお、上記解析例 1 ~ 5 では、対応するフローチャートにおいて、スカッタグラムの作成と、領域の設定および各血球の区分、解析が、それぞれ、別のステップで示された。しかしながら、各血球の区分および解析は、必ずしも、一連のステップを順番に実行して行われる必要はなく、たとえば、各血球に対応づけられた複数のデータが所定の条件を満たすか否かによって、各血球に対する分類が決定されても良い。たとえば、解析例 2 では、各血球に対応づけられた青散乱光 B S と赤散乱光 R S に基づく前方散乱光データが、それぞれ、図 1 0 (a) ~ (c) に示す領域 A 3 1 に対応する青散乱光の強度範囲と、当該領域 A 3 1 に対応する赤散乱光の強度範囲に含まれる場合に、当該血球をリンパ球と判定するようにしても良い。また、解析例 4 では、各血球に対応づけられた青散乱光 B S と赤散乱光 R S に基づく前方散乱光データが、それぞれ、図 1 3 (a) に示す領域 A 3 1 に対

40

50

応する青散乱光の強度範囲と、当該領域 A 3 1 に対応する赤散乱光の強度範囲に含まれ、且つ、当該血球に対応づけられた蛍光強度と赤散乱光 R S の強度が、それぞれ、図 1 3 (b) に示す領域 A 4 1 に対応する蛍光の強度範囲と、当該領域 A 4 1 に対応する赤散乱光の強度範囲に含まれる場合に、当該血球を、表面抗原 C D 4 を有するリンパ球と判定するようにしても良い。この場合、各血球は、当該血球に対応づけられた各データが、所定の条件式に適用され、当該条件式に規定された条件節を満たす場合に、当該血球が、当該条件式に結果として規定された分類に割り当てられる。

【 0 2 2 3 】

この他、本発明の実施の形態は、特許請求の範囲に示された技術的思想の範囲内において、適宜、種々の変更が可能である。

10

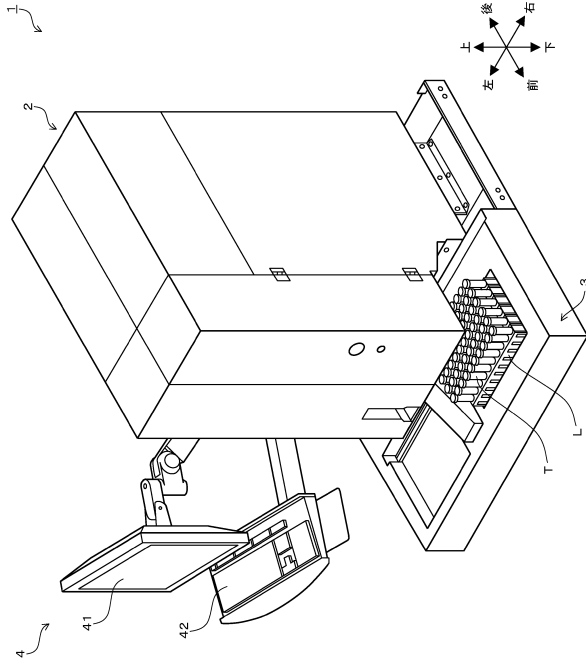
【符号の説明】

【 0 2 2 4 】

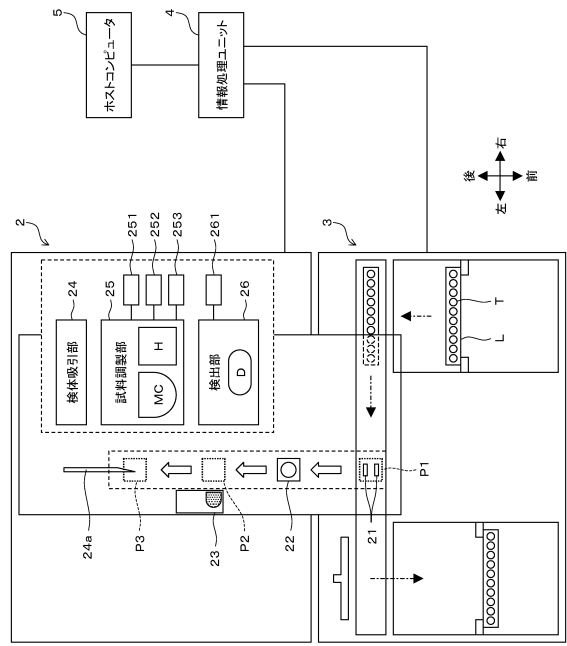
- 1 ... 血球分析装置
- 2 ... 測定ユニット
- 4 ... 情報処理ユニット
- 4 1 ... 表示部
- 2 5 ... 試料調製部
- 2 6 ... 検出部
- D ... 光学検出器
- D 1 ... フローセル
- D 1 5 ... 流路
- D 6 1、D 6 7 ... 分光フィルタ
- D 6 2、D 6 8 ... 蛍光集光レンズ
- D 6 3、D 6 9 ... アバランシェフォトダイオード
- 1 0 1、1 0 3 ... 半導体レーザ
- 2 0 5 ... フォトダイオード
- 2 0 5 a、2 0 5 b ... 受光面

20

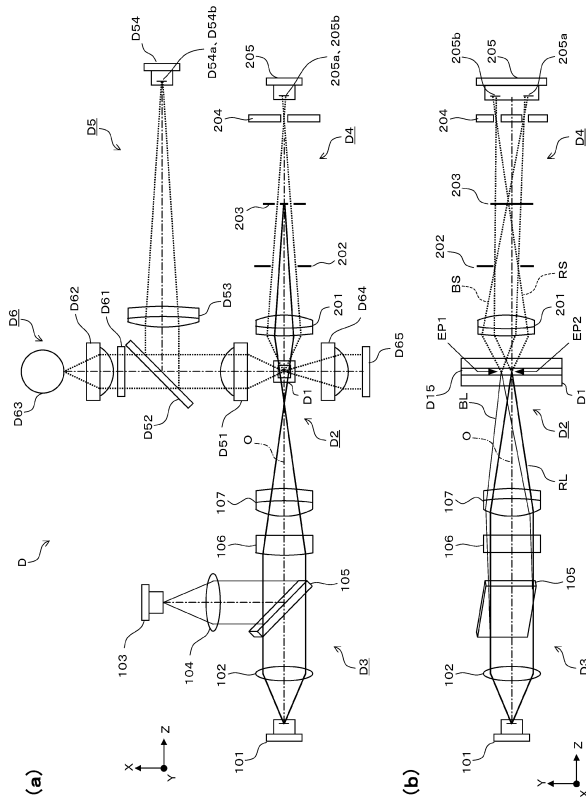
【図1】



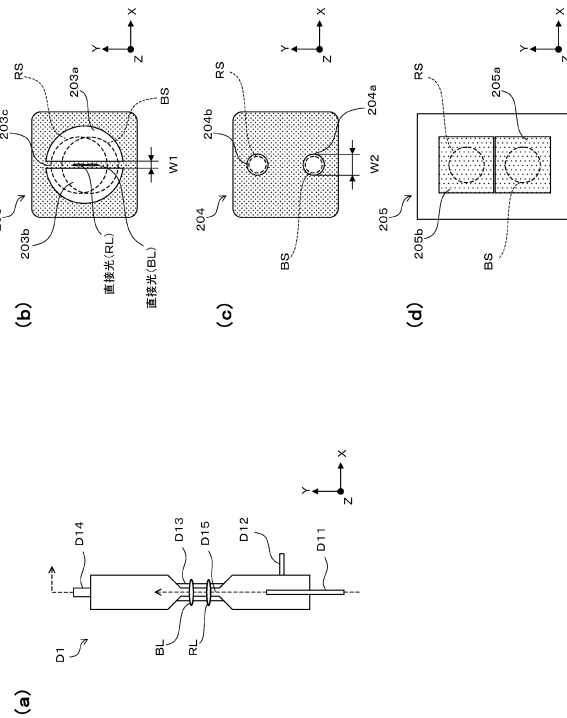
【図2】



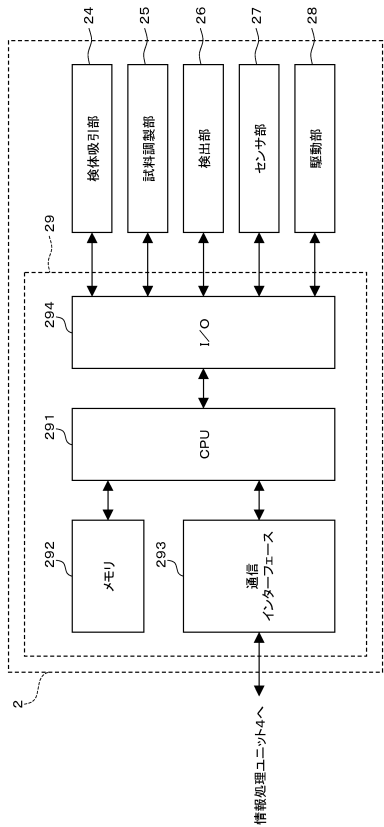
【図3】



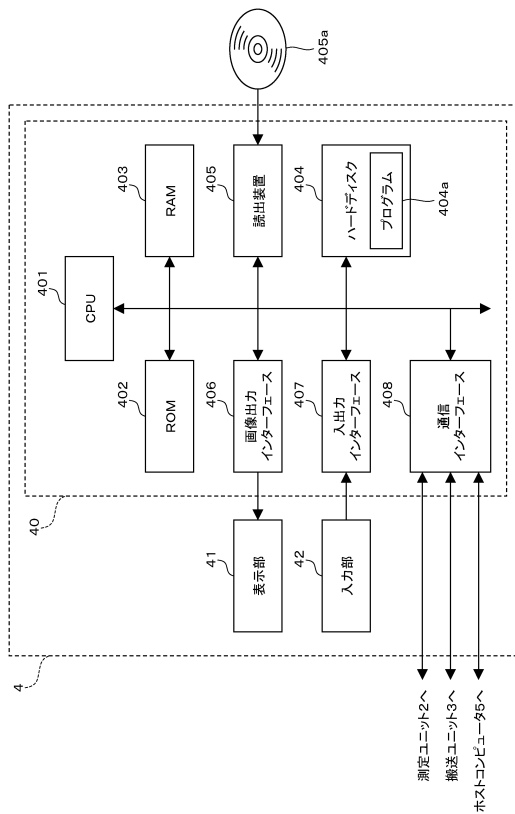
【図4】



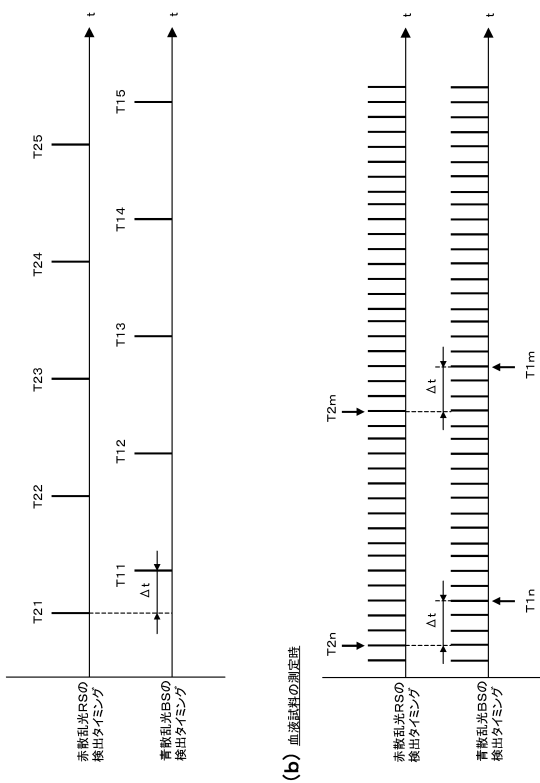
【図5】



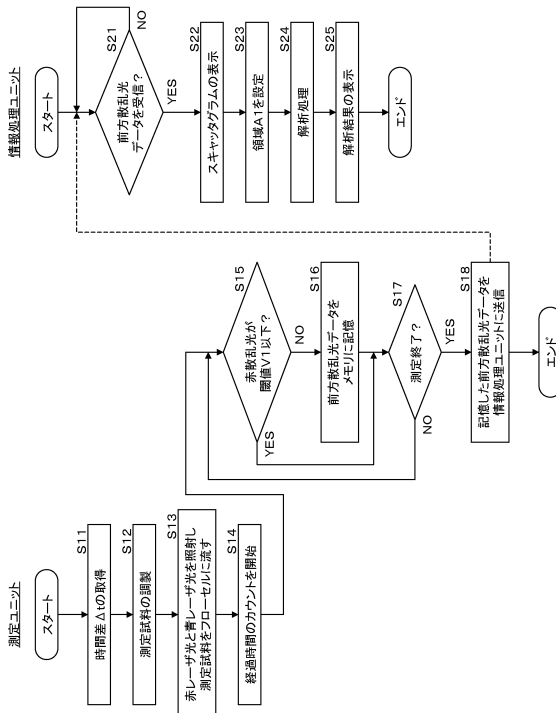
【図6】



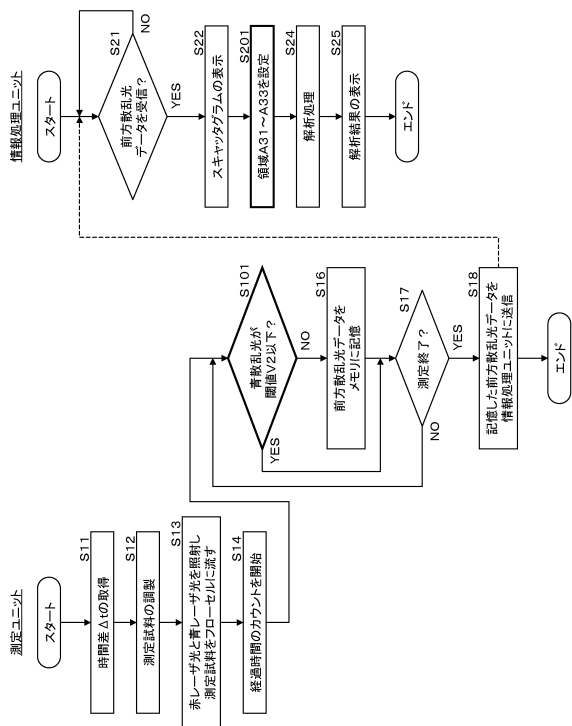
【図7】



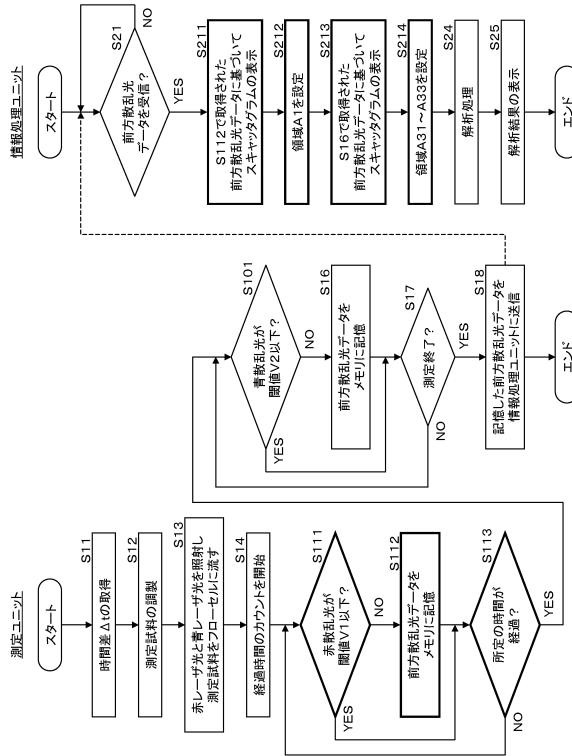
【図9】



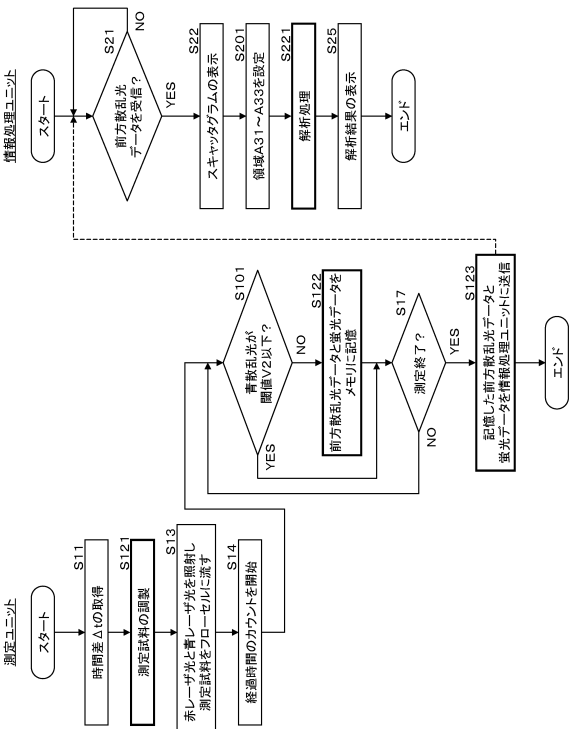
【図11】



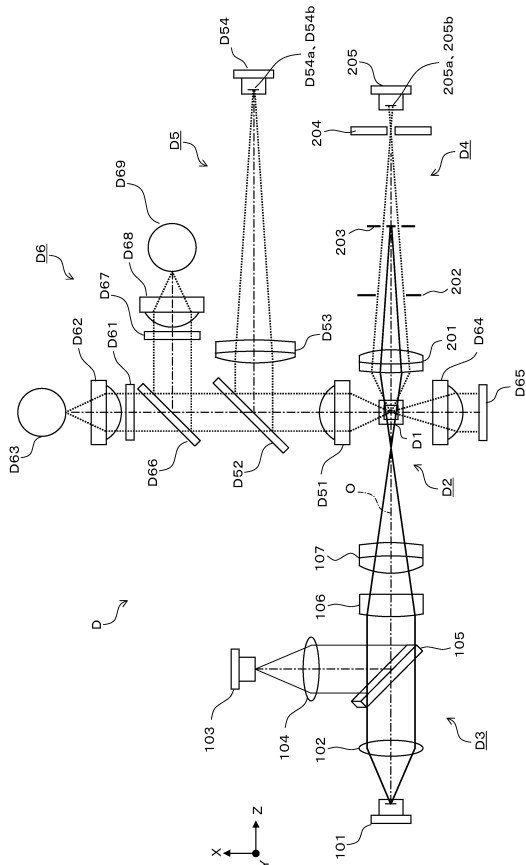
【図12】



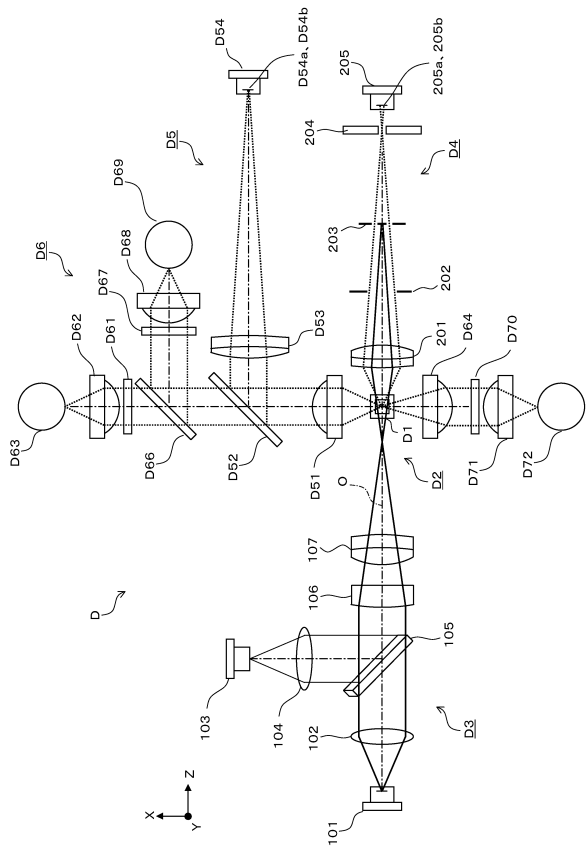
【図14】



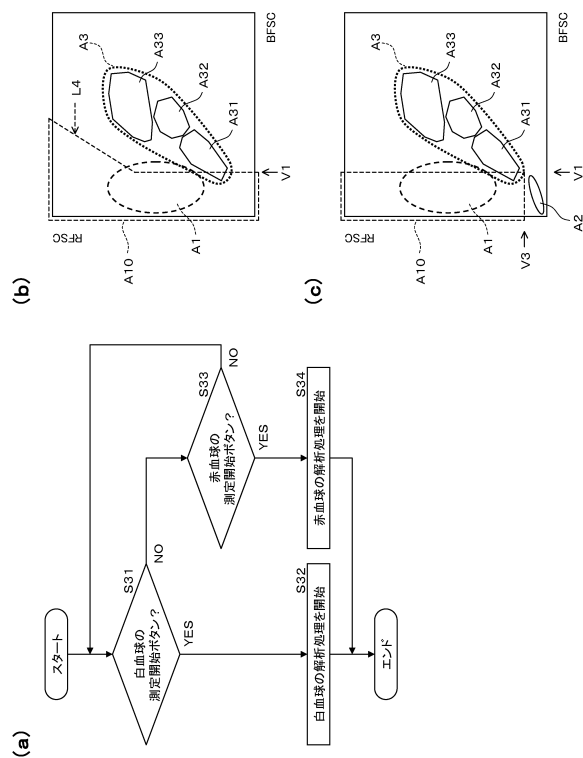
【図16】



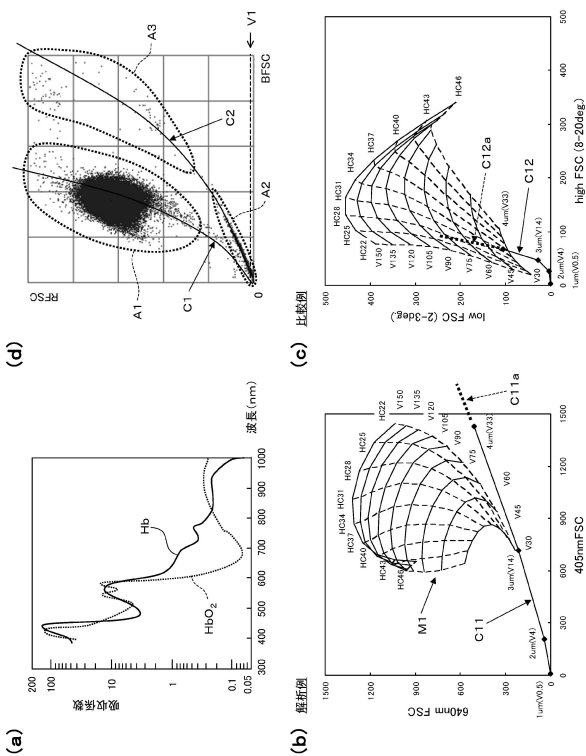
【図18】



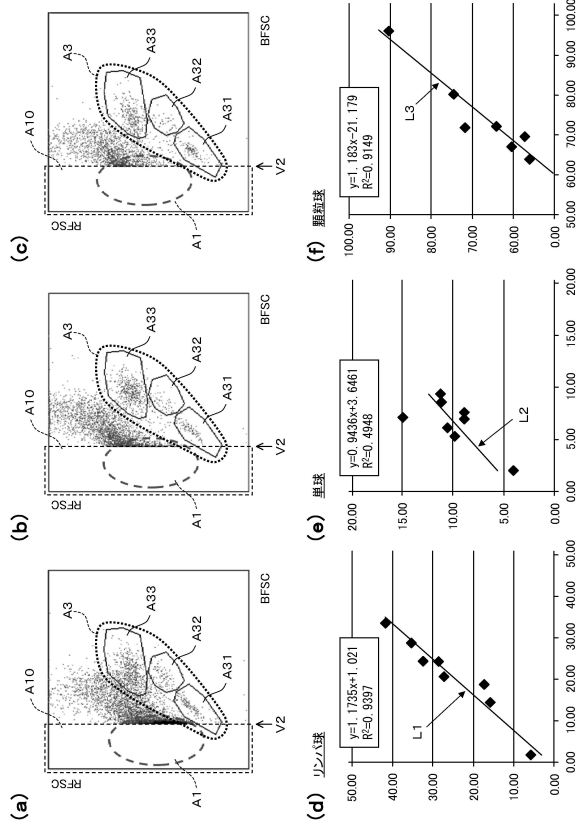
【図19】



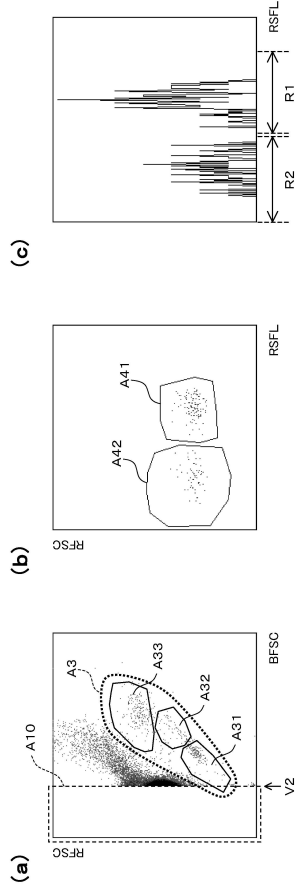
【図8】



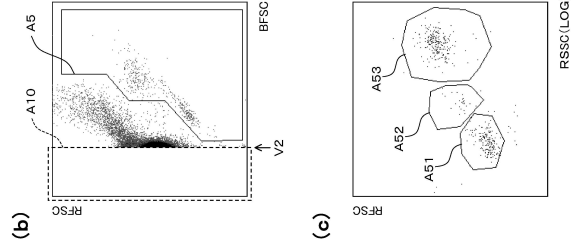
【図10】



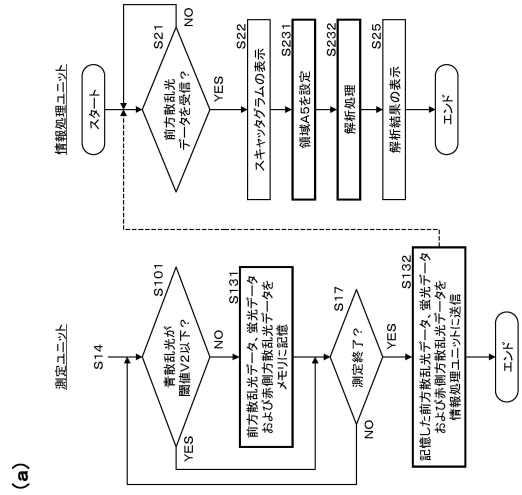
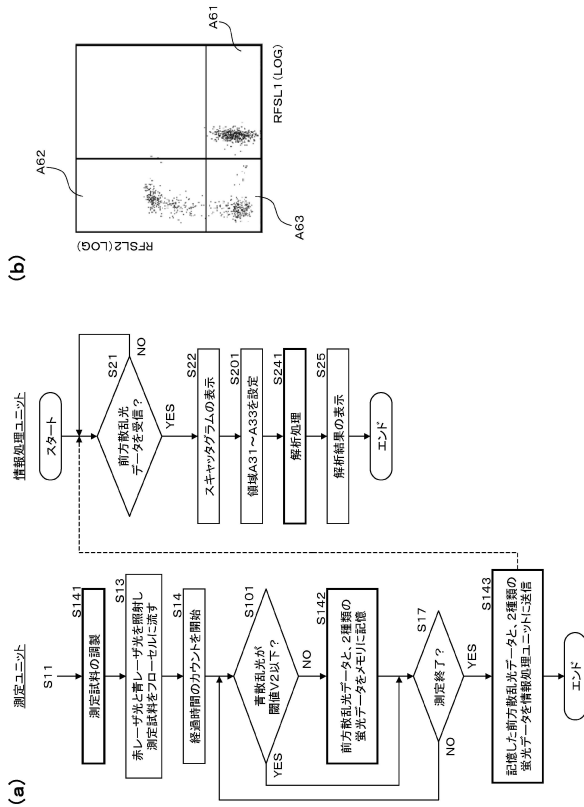
【図13】



【図15】



【図17】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 15/14 K

(72)発明者 吉川 景子
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 特開2012-215593(JP,A)
国際公開第2010/126838(WO,A1)
特開2012-122954(JP,A)
Determination of micro-litre volumes with high accuracy for flow cytometric blood cell counting, Meas Sci Technol, 2010年, Vol.21 No.7 Page.074006,1-9
Microfluidic structures for flow cytometric analysis of hydrodynamically focussed blood cells fabric, Lab on a chip, 2009年, Vol. 9, No. 7, pp. 972-81

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
G 0 1 N 1 5 / 1 4
G 0 1 N 2 1 / 4 9