

血液細胞生物学・光学・関連技術

Philippe Nérin, Didier Lefèvre

本稿では光と細胞との相互作用についての基礎を紹介し、ますます複雑化する血液分析に、弾性散乱及び蛍光発光がどのように用いられるかを説明する。光学構成の仕様、特にビーム整形を取上げる。最後に、細胞の光学反応とそのマトリクス表示についての実験データを紹介する。これは、HORIBA ABXの新世代を担う血液分析装置のために新しい展望を切り開くものである。

はじめに

人間の血液細胞は図1に示すように、次の3種類に大別される。血小板、赤血球及び白血球である。白血球は更に顆粒細胞質(顆粒球)とそれ以外(単球及びリンパ球)に分けられる。また顆粒球は、メチレンブルーエオシン塩(methylene blue eosinate)などのような、一般的な生体染色液への反応の仕方で更に分類される。顆粒球の分類は好酸球(細胞顆粒を赤色に染色)、好中球(細胞顆粒を薄く染色)及び好塩基球(細胞顆粒を紫色に染色)である。この他にも一般に発生する異常白血球には多くの種類がある。また稀に見る種類の白血球もあるが、これについてはここでは言及しない。

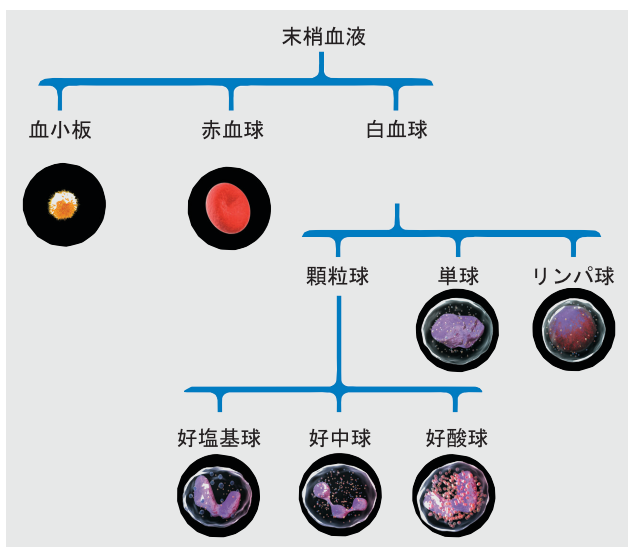


図1 末梢血液細胞の種類

光と物質の相互作用

光と物質との相互作用を説明するための概略図を図2に示す。一般的に生体細胞に対して光子は、散乱または吸収という2つの基本的な作用を起こす。散乱には弾性散乱と非弾性散乱とがあるが、後者の場合、散乱光は新たな光周波数を持つ。物質による光の吸収ではその他の現象、例えば、音響信号や血球温度の変化なども発生する^[1]。光子が吸収されるため、細胞診断において光ルミネッセンスは広く用いられてきた物理プロセスである^{[2][4]}。細胞のフォトルミネッセンスは蛍光プローブ^[5]の組み込みによって内在的(自己蛍光^[6])となる場合と外来的となる場合がある。ルミネッセンス現象は他のエネルギー源(電気励起、あるいは熱励起など)を含む、より一般的な一連の物理プロセスである。これらすべての物理プロセスは細胞特性を知るために用いられてきたが、本稿では弾性散乱と蛍光に焦点を当てる。これらは十分な成果を上げており、商業技術を統合的に発展させてきている。

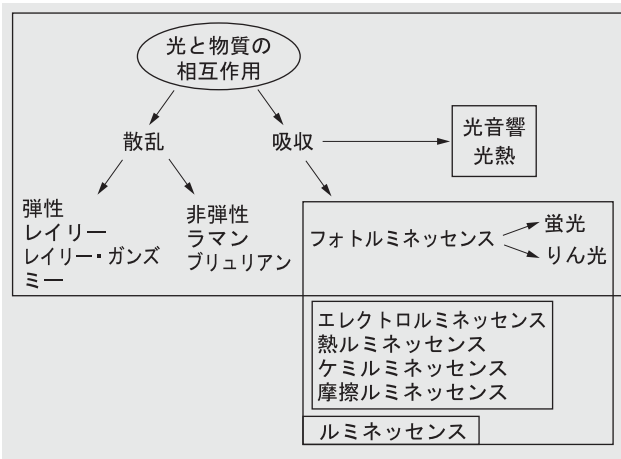


図2 光と物質の相互作用を含むプロセス概略図

細胞生物学における分析ツールとしての弾性散乱

微視レベルでは、血球はその膜や核の複雑な構造によって不規則な形状を有している。このような構造と光との相互作用を数学的に表現するには、その複雑性からいくつかの近似や仮定が必要となる。基本的な実験観察(主に赤血球)を強調するため、レイリー・ガンズ(Rayleigh-Gans)近似^[7]において膜厚を無視し、散乱プロセスを均質な球体の散乱として扱うことを基本仮定とする。この理論では位相物体に作用する平面波がわずかに乱れると仮定しているため、界面の内外で電界が乱れる可能性がある^[8]。入射平面波で三面体XYZの原点Oに置かれた細胞を捕えてみる(図3)。偏光は垂直方向(E_v)と水平方向(E_h)の電界の振動成分として表される。

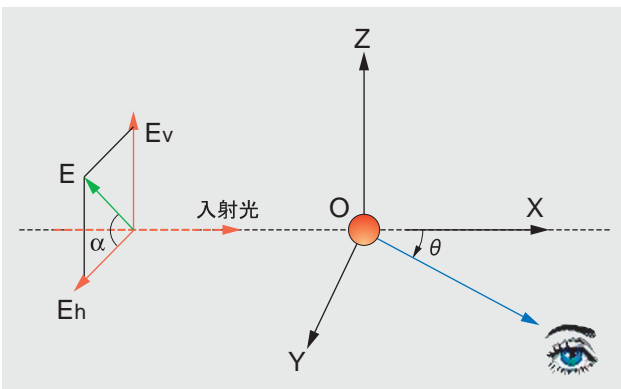


図3 光と赤血球の相互作用 光学パラメータの指定

我々の近似では、散乱パターンはX軸について対称となっている。結果として散乱現象は、観測方向を示すXY面内の単一変数 θ によって記述される。

入射光が直線的に偏光する時、振動面をX軸を含む面と定義し、電界をEとする。図3に示す通り、振動面とXOY面との間の角度は α とする。

入射波の偏光が異なる状態には、以下のようなものがある。

直線偏光: 入射波は2つの要素に分けられる。

$$E_y = E \cos \alpha \text{ 及び } E_z = E \sin \alpha$$

楕円偏光: E_y と E_z 要素間に位相シフト ϕ がある。

$E_y = E_z$ 及び $\phi = \pm \pi/2$ の時、偏光は円偏光となる。

非偏光: $E_y = E_z$ で 2つの要素間に位相関係が成り立たず、散乱強度パターンは付加的なものとなる。

上述の分析により、偏光のどのような状態も2種類の直交する直線偏光波の解析に還元できることがわかる。図3に示す視野方向に沿って散乱光の偏光率を予想するため、偏光プリズムを用いて水平・垂直軸に沿った強度を計測する。それぞれの強度を I_h 及び I_v とする。偏光率は下記のように表される。

$$\rho = \frac{I_v}{I_h}$$

同種の球体については、 I_h 及び I_v の強度(W/sr)は次式で得ることができる^[8]。

$$I_v = \frac{V^2 \cdot \pi^2}{\lambda^4} \cdot (n^2 - 1)^2 \left[\frac{\sin u - u \cos u}{\frac{1}{3}u^3} \right]^2 E_v$$

$$I_h = \frac{V^2 \cdot \pi^2}{\lambda^4} \cdot (n^2 - 1)^2 \left[\frac{\sin u - u \cos u}{\frac{1}{3}u^3} \right]^2 \cos^2 \theta E_h$$

ここで、

$$u = \frac{4\pi \cdot R \cdot \sin(\theta/2)}{\lambda}$$

E_v と E_h はそれぞれ垂直と水平の偏光に対応する入射光の強度を表している。他のパラメータは次のように定義される。

$V = 4\pi R^3/3$ は細胞の容積を表し、 n は周囲の媒質との比屈折率を、 λ は入射光の波長を表している。

図4はパラメータ θ に対する角度スペクトルのプロットを表している。この曲線は $\lambda = 488 \text{ nm}$ $n = 1.03$ の条件で、3種類の直径を持つ球体に対して描いたものである。局所的な最小値は、関数 $\tan u = u$ のゼロ点に関連した逆位相干渉の影響を示している^[8]。これらの曲線から、光散乱計測は非常に感度が良いということがいえる。直径における $2 \mu\text{m}$ の変化によって散乱光の強度パターンに著しい変化が発生するからである。 $1 \mu\text{m}$ 程度の直径の変化が散乱光信号では5倍の変化となる。

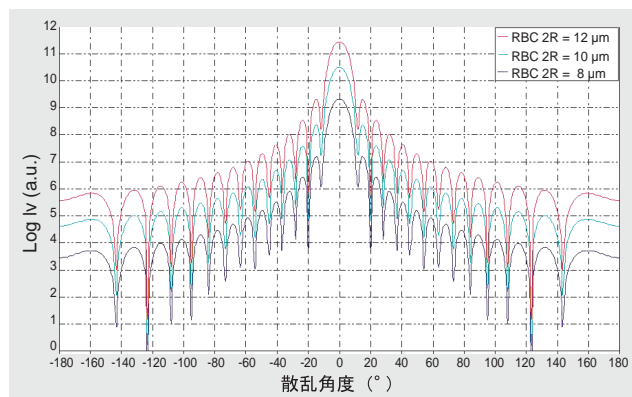


図4 3種類の球体の角度スペクトル
上から $12 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $8 \mu\text{m}$ の曲線を示す。

このような基本的な考察が、細胞の診断において広範囲に用いられてきた。例えば赤血球では、容積分布とヘモグロビン量を決定するため、実験データに基本的な数学モデルを適用している^{[9][10]}。赤血球では、膨張の影響を考慮に入れて補正を行わなくてはならない^[11]。

偏光率は例えば顆粒球^[12]や異常な母集団の検出^[13]など、細胞の母集団を差別化する目的で用いることも可能である。偏光分離した散乱実験のその他のアプリケーションには、変形体の検出^[14]が挙げられる。

これまで前方散乱は側方散乱より良く理解されてきた。そこで、側方散乱でより多くの知見^[15]を得るために、側方散乱の最新モデルを開発した。先駆的な研究によって、側方散乱が核部分及び核の丸みに対して1次的な関係を有していることが、実験を通じて明らかになっている。多くの粒子を内部に持つ細胞も、顆粒球と同様に、側方散乱による信号を発生させる。

蛍光による識別

蛍光検出に基づく分析技術は、高感度で選択性があり、更に空間的・時間的分解能にも優れていることから、非常によく知られている。蛍光測定の実理は分子による光の吸収と再放射に基づくものである。ある分子が光子の吸収によって励起されると、入射光子のエネルギーよりも低いエネルギーを持つ新しい光子を放出することで基底状態に戻ることができる。励起状態から脱するには他の方法もある。内部変換(すなわち、蛍光発光なしに直接基底状態に戻る)や系間交差(蛍光が発生する機会が多い)及び分子内の電荷移動と構造変化である。蛍光は物理化学、生化学、生物学系の調査研究に用いることができる。本稿では挿入色素(intercalant dye)特にチアゾールオレンジ(TO)(図5)について言及することにする。

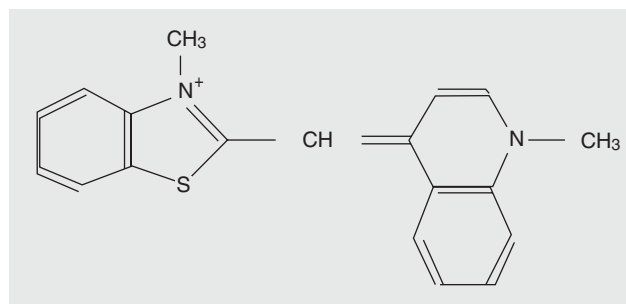


図5 血球の光学識別に用いられるチアゾールオレンジ分子

TOは、2種類の芳香族環系が結合して共役系を構成する、非対称のシアニンである。この色素の水溶液中での蛍光強度は無視できる程度であるが、核酸と結合した時には極めて強い蛍光を出す。芳香族間の化学結合周りの回転が停止して、無輻射の基底への遷移が排除されるために、蛍光強度の増加が起こると考えられる。直線2色性やNMR(核磁気共鳴)測定^[16]によって示されるように、この結合は相互的に作用すると考えられる。TOから核酸への混成が起こると量子収率が増大し、DNA信号やRNA信号を高感度に検出することが可能となる。細胞生物学では、TOの挿入特性を用いて幼若赤血球の識別や赤血球内変形体の検出^{[17][18]}など、多くのアプリケーションがある。

測定原理と光学配置

HORIBA ABX血液分析装置は、自動化されたフローサイトメータである。標準のサイトメータでは血液試料の準備を手動で行う必要があるのに対し、希釈、溶解試薬の添加、試料温度管理などの作業がすべてHORIBA ABXの分析計にて自動で行われる。HORIBA ABXにおける最近の開発による測定原理をいくつか紹介する。図6に動作原理の概略を示す。血球は液流により光学部へと導かれ、そこでレーザービームと相互作用する。

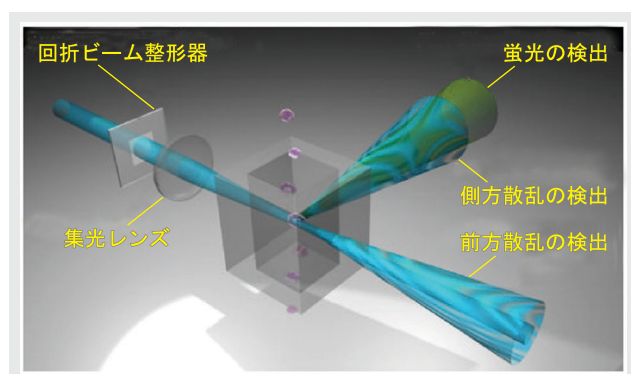


図6 細胞の光学反応を決定する動作原理

検出部の主要部分は図6に示しているが、下記のもので構成されている。

- 光源
- ビーム整形器
- 集光レンズ
- 散乱光を電気信号に変換する光学検出器
- 光学フィルタ
- 細胞が1つずつレーザービームを通過するための液流集束器

細胞の水力学的な集束化の原理は、他のところでも見出すことができる^[19]。測定は、流れる血球が集光されたレーザービームで照射される点で行う。散乱角度の高低や蛍光などのパラメータ検出により、次に記載するように、数多くの血球タイプに分類することができる。

光源

DPSS (Diode Pumped Solid State: ダイオード励起固体) レーザは、生物医学計測の分野で注目を浴びている。アルゴンやクリプトンイオンレーザなどのガスレーザ技術に比べ、DPSSレーザには下記のような卓越した優位性がある。

- 小型
- 小消費電力
- 高信頼性
- 少ない光ノイズ
- 動作の静寂性
- 波長の選択性

DPSSレーザの動作原理は、非線形光学プロセスの高調波発生に基づいている。図7に示すように、DPSSレーザ技術では一般的に2つの部分、ポンプ部と第2高調波発生部に分かれる。ポンプ部で、特定波長のメインビームが発生する。ポンプ部の波長は、波長セクタ (Bragg Grating) と温度管理されたチャンバによって通常安定化される。波長の安定はレーザ動作の際に満たさなくてはならない位相整合条件として重要なものである。増幅素子は、光学増幅を起こすもので、半導体技術に基づいている。メインビームは第2高調波発生部を交差して非線形の相互作用を起こし、これにより入射波の周波数が2倍となる。この光学変換により、我々の目的に必要な488 nm という波長を発生させる。これは細胞内核酸の染色に用いる血液学特有の色素の波長に一致するものである。

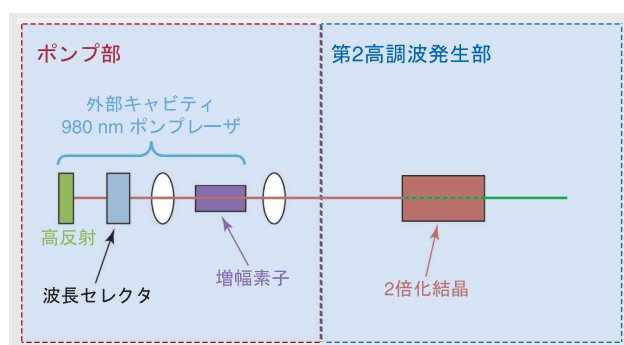


図7 DPSSレーザ原理(照射: 488 nm)

ビーム整形器

ビーム整形は、光学的放射ビームから光を再配分するプロセスである。多くの標準的な光学設計は、球面レンズとシリンドリカルレンズの組み合わせで構成されている。そのため測定点における光強度分布は、図8に示す通り楕円形及びガウス形となる。結果として、ビーム中央から血球の流れが外れていれば、入射光の強度に大きな変化が生まれることになる。更に、たとえ流れが完全に中央に集束されていたとしても、流れの中の細胞位置について水力学的な変動をなくすることは困難である。図8(a)に示すように、この変動は散乱光の振幅及び検出信号に影響する。この光学的影響により測定誤差が発生し、測定再現精度が悪くなる。従来、フローサイトメータを用いた時の光の変動を抑えるため、集束ビームの幅が広げられ、また細胞がレーザービームの中央近くを交差するような流れに設定されている。この方法の難点は、光の大半が光学系内で消失してしまい、全体的な効率性が低いことである。

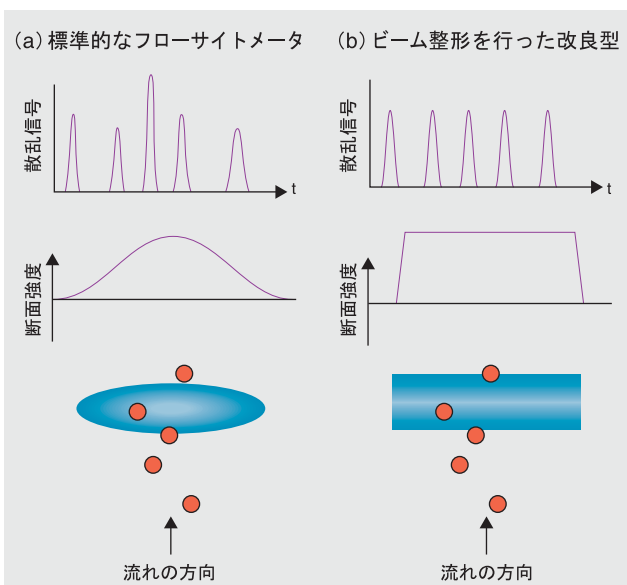


図8 フローサイトメータにおける散乱反応の比較

このような難点は次のようなビーム整形“円形断面” “長方形断面”及び“ガウス形強度プロファイル” “頂上平坦形強度プロファイル”の2つの変換を行うことで回避できる。このような変換を行う光学表面を合成することは、フーリエ光学理論を用いることで解決できる逆問題である^[20]。解析的に計算でき、計算された非球面の表面で所要の変換が行われることを示すことができる^[21]。

$$z(x, y) = \frac{\beta_x}{k(n-1)} f(\xi_x) + \frac{\beta_y}{k(n-1)} f(\xi_y)$$

次のように記号を定義している。

$$\beta_x = \frac{2\sqrt{2\pi} \alpha_x w}{\lambda f} \quad \beta_y = \frac{2\sqrt{2\pi} \alpha_y w}{\lambda f}$$

$$\xi_x = \frac{x\sqrt{2}}{w} \quad \xi_y = \frac{y\sqrt{2}}{w}$$

$$f(\xi) = \xi \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{Erf}(\xi) + \frac{1}{2} \exp[-\xi^2] - \frac{1}{2}$$

この式では、 w は放射レーザーのビームウエストを表す。一般に $k = 2\pi/\lambda$ で n は屈折率、 f は結像レンズの焦点距離とする。パラメータを図9に示す。

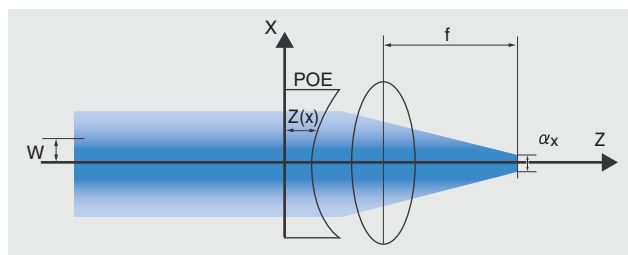


図9 X-Z面の位相光学素子(POE:Phase Optical Element)の定義 (Y-Z面では光学ウィンドウのサイズは α_y で表す)

我々の仮定が十分に正しいものであるかどうかを評価するため、Zemaxソフトウェアを用いて光学的シミュレーションを行った。このシミュレーションを実施するにあたり、データをこのソフトウェアと互換性のあるフォーマットに変換する必要があった。例えば光学面は多項式を用いてモデル化される。

光学面は下記のように展開される。

$$z(x, y) = z_x(x) + z_y(y)$$

これを多項式で示すと下記の形式となる。

$$z_x(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + \dots + a_{10}x^{10}$$

$$z_y(y) = b_0 + b_1y + b_2y^2 + \dots + b_{10}y^{10}$$

Matlabを用いて最小二乗近似した非球面データを表1に報告する。

表1 非球面データ

パラメータ: $\alpha_x = 30 \mu\text{m}$, $\alpha_y = 100 \mu\text{m}$, $w = 700 \mu\text{m}$, $\lambda = 488 \text{ nm}$, $f = 30 \text{ mm}$

ここに示す係数は、瞳孔径を3 mmとして規格化されている。

a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	a_{10}
0.0000	0.0000	0.0115	-0.0000	-0.0222	0.0000	0.0347	-0.0000	-0.0288	0.0000	0.0095
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_6	b_7	b_8	b_9	b_{10}
0.0000	0.0000	0.0043	-0.0000	-0.0083	0.0000	0.0130	-0.0000	-0.0108	0.0000	0.0036

図10に、解析的な式と多項式近似を用いて計算した $z(x)$ と $z(y)$ のプロファイルを示す。図10により異なるプロット間で有意な差異がみられなかったため、補間は正しいと言える。

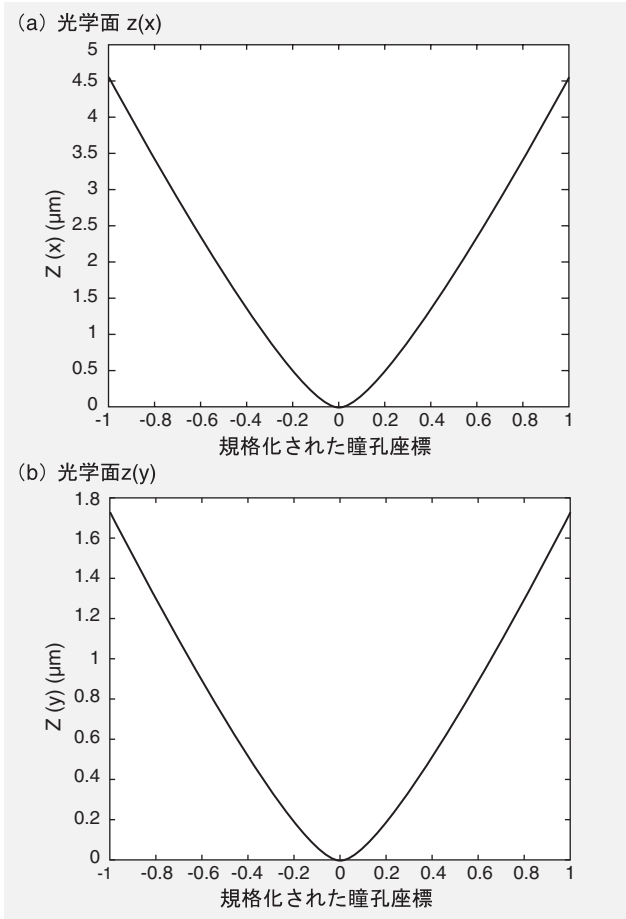


図10 光学面 $z(x)$ と $z(y)$ の解析的及び多項式プロットの比較

補間が検証されたため、合成光学素子を通したガウスビームの伝播をシミュレートした。このシミュレーションは Zemaxソフトウェアで利用可能な“Physical Optics Propagation”パッケージを用いて実施した。

図11に示した結果は、POEが測定ウィンドウ内の光の均一性を増加させることを表している。生物細胞への結合光はPOEを用いることでより良いものとなるが、これは流れの断面に対する損失率(破線で示す部分)が改善されるためである。

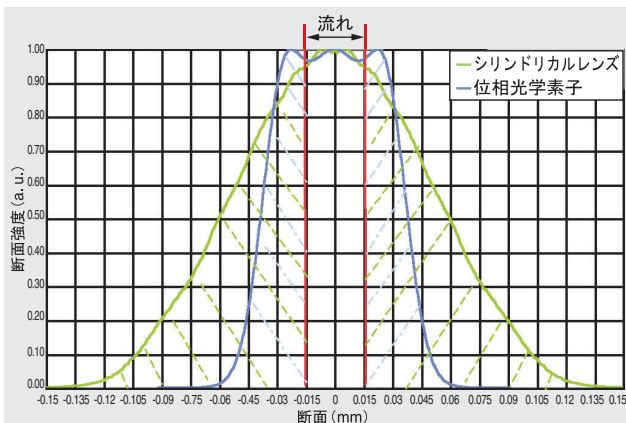


図11 シリンドリカルレンズ(緑色線)と計算された位相光学素子(青色線)を用いたビーム整形の比較

この他に、POEプロファイルは数ナノメートル内の誤差で正確であることを示すシミュレーションがいくつかある。プロファイルの精度がこの許容範囲外である場合、光学測定ウィンドウ内に大きな強度変動がみられる。このレベルの精度を得るには、ナノ計測の分解能を得る加工技術が要求される。我々は電子ビームマイクロリソグラフィを用いてビーム整形素子を製造してきたが、これは加工技術の中でも精度が高いものである。実際は、この加工プロファイルは最初 2π の範囲に折りたたまれているので、次にいくつかの離散レベルにデジタル化される^[22]。回折素子はDOE(Diffractive Optical Element)として知られるが、これはアナログプロファイルがうまく離散化されることを示している。設計値からのずれによる不正確さは、回折グレーティングの場合と同様にゴーストイメージを発生することに注意を要する。

今回ビーム整形に用いたトポグラフィ(3Dイメージ)は、位相シフト顕微干涉計を用いて計測された(図12)。図はDOEの不連続な構造を示すため、素子の半分を表している。

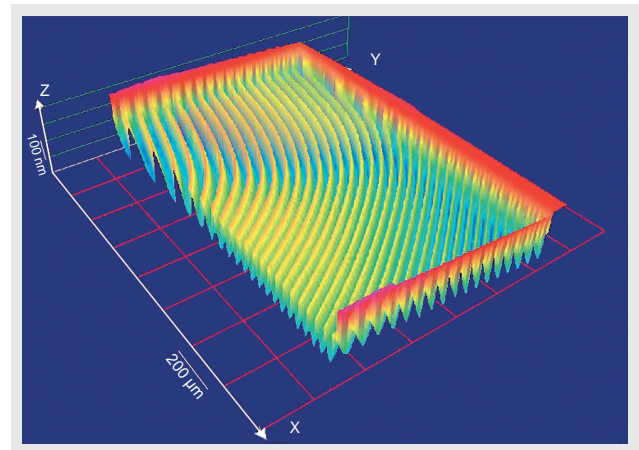


図12 位相光学素子
30 × 100 μm^2 の長方形測定ウィンドウ内に、レーザービームをビーム整形する。

試料準備とデータ取り

細胞をサイトメータで観察する前に、“分析可能な”成分溶液を得るために最低限の準備が必要である。HORIBA ABX特許のFR0102489では核細胞を計数し分離する方法が記載されている。これは、インピーダンスにより細胞の容積を計測し、前方散乱光によりサイズ計測を行い、直交散乱光により構造を計測し、蛍光発光法により核酸量を計測する方法である。

この手法は全血あるいは他の生物学的液体を分取し、一定量の特別な単一試薬と混合するもので、次に示す内容をおよそ同時に行うことができる。

すべての赤血球を、核細胞のみ残して溶解残った核細胞(主に白血球を含む)の固定細胞内の核酸を、細胞浸透を促進する抗生物質と色素自身の両方を用いて染色。色素はDNAやRNAなどすべての核酸と結合する非対称シアニンを用いる

保温が完了すると(数秒で完了)細胞溶液は輸送されフロー・トランスデューサに注入されて、細胞1つずつを基本として次のような測定が行われる。インピーダンスによる容積測定(RES)、前方散乱光及び直交散乱光(FSC & SSC)特定色素の波長による蛍光(FL1)などである。

各パラメータ検出器で得られた信号は次に増幅され、フィルタリングされてピーク検出器回路へ送られ、12ビットあるいは16ビットのADコンバータによって数値信号へ変換される。結果の情報を統合し関連付けることで、細胞固有の特性に基づいて固体群に分けることができる。

ソフトウェアアルゴリズムにより、各細胞に対して同時に得られる4次元データの処理ができ、全く同じパラメータの組み合わせについても、手動で行うよりも正確で精度の高い成分分離が可能である。人間の脳では4次元像を形成することは不可能だが、ソフトウェアには可能である。細胞の分離についてより良く理解するため、一般的なヒト血液試料にさまざまなパラメータを用いて得られた2Dの描画プロットを以下に簡単に紹介する。

赤血球及び網赤血球の光学

赤血球は適切な低張性溶剤にさらされ、ヘモグロビンが流出して血球の形状が両凹形から球形へと変化する(図13)。この赤血球は本質的に、非常に薄い膜で覆われた、内部が空洞の球形である。

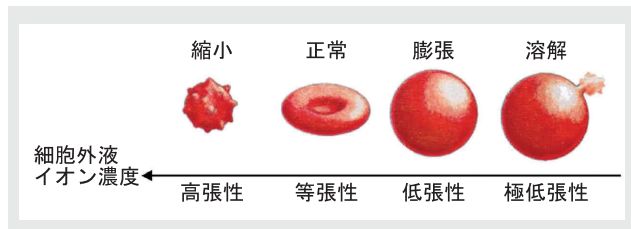


図13 赤血球が異なる細胞外液イオン濃度に対して示す反応

網赤血球の赤血球との主な違いは、核の痕跡がまだ細胞内で浮遊していることである。これらのRNA粒子は、血液への出現から2~3日でリボヌクレアーゼによって完全に消化される。このように、網赤血球の相対的な細胞年齢はそのRNA含有量を測定することで見積もることができる。赤血球が120日間生存することを考えると、毎日、骨髄は赤血球の約1%(1日あたり約200 × 10⁹個)

の新しい赤血球を生産しなくてはならないことになる。分析前にチアゾールオレンジ蛍光プローブを用いて、これらの痕跡は細胞内で染色される^[23]。

図14は蛍光に対する前方散乱光を示している。左側には赤血球に対応する大きな固体群がある。R2の長方形内には明白な蛍光、すなわち網赤血球の成分が含まれている。白血球は赤血球と比較して非常に高い蛍光反応を持つため、右側の飽和チャンネルに限定して現れている。

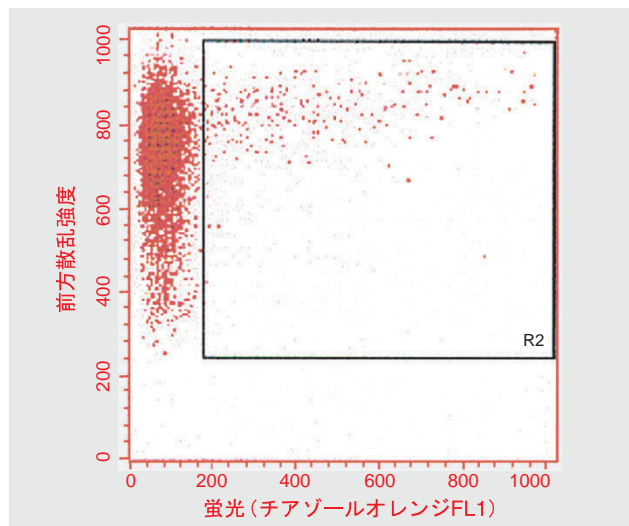


図14 赤血球と網赤血球の分類(前方散乱光/蛍光)

網赤血球の平均細胞年齢を決定するため、IRF(Immature Reticulocyte Fraction: 幼若網赤血球片)指数が設けられた^[24]。網赤血球の蛍光軸はまず3つに等分され、2つのより高い部分の合計を総数で割った。こうして得られた相対指数は、多くの種類の装置間で比較可能であると考えられる。図15はPentra120 RETにて得られた代表的なマトリクスを、X軸にインピーダンス(容積)を、Y軸に蛍光量をプロットして示している。

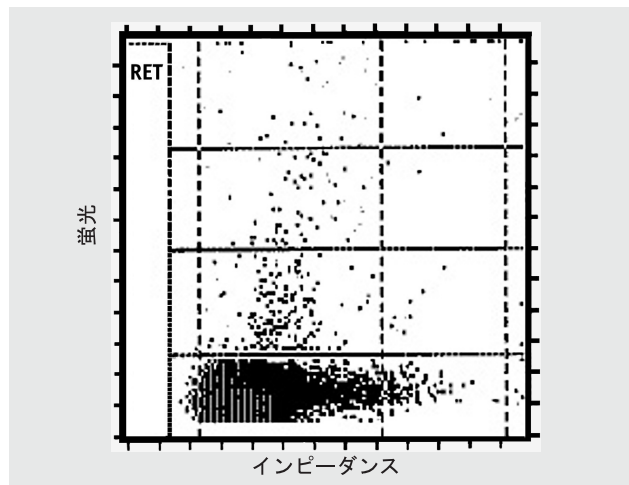


図15 容積インピーダンス測定と蛍光測定を用いた赤血球と網赤血球の分類

白血球の光学

図16を参照し、マトリクスを構成する2つの要素として、前方散乱(FSC)と側方散乱(SSC)の情報を使うことで、成分をその光学サイズと外観構造に従って分類することが可能である。このように、リンパ球はその微小さ(5 μm 径まで)や中身の均質さ(顆粒がなく、核と細胞質の比率が1に近い)から、各軸の下方部分に位置する(図16 ボックスL)。単球などの大きな細胞は、マトリクスの右側に見られるが(図16 ボックスM)、その透明性及び細胞質のない性質から、低い構造反応となっている。好中球や好酸球など、内部に複雑な構成や核小葉を持つ多形核細胞は、構造軸(縦軸)に対してより強い反応を示す(図16のボックスN及びE)。血小板や赤血球膜ゴーストのように、小さく、分離できない成分は、マトリクス上で左下隅にバックグラウンドノイズとして現れる(図16のボックスBN)。

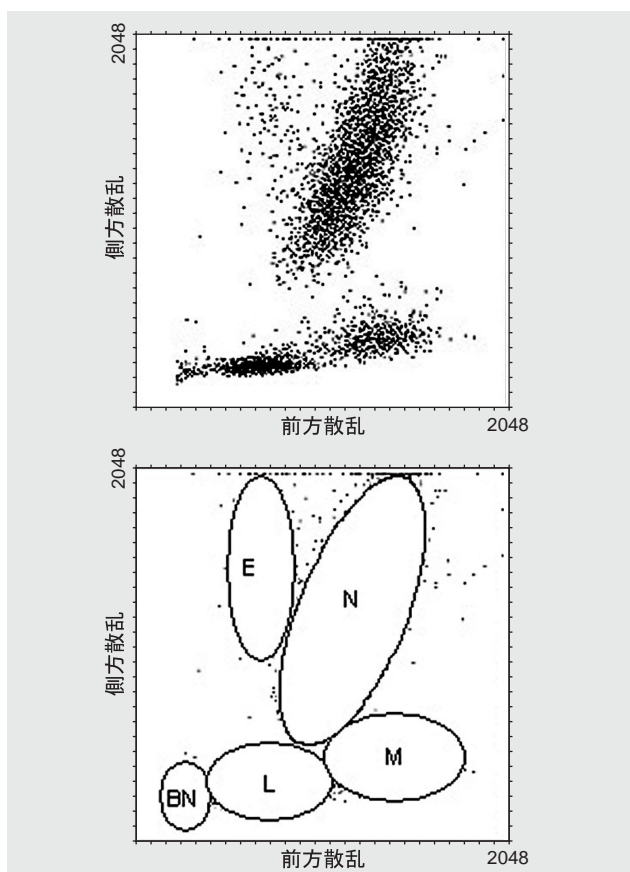


図16 白血球の光学反応(側方散乱光/前方散乱光)
BN:バックグラウンドノイズ L:リンパ球 M:単球,
N:好中球 E:好酸球

前方散乱対インピーダンスマトリクス

細胞特定におけるもう一つの重要な鍵は容積である。各細胞容積の正確な計測はインピーダンス検出を用いて行うことができる^[25]。また細胞が球形で滑らかであればすぐに、前方散乱光によって特に容積について信頼のおける数値を出すことが可能である。この2つの軸でマトリクスを作成して、2種類のサイズ計測で反応の不一致となる形状や表面変形などの異形から細胞の分離を明確に行うことができる(図17)。この手法を用いて、少なくとも好酸球(図17、ボックスE)などの細胞を、その顆粒の数の多さによって容易に識別することができる。顆粒は、自然な容積よりも高い角度で光を散乱させる、不均一な表面性状を生成するといわれている。同様に、芽球は光のサイズにおいて、インピーダンス計測より微弱な反応(図17、ボックスBL)を示す。

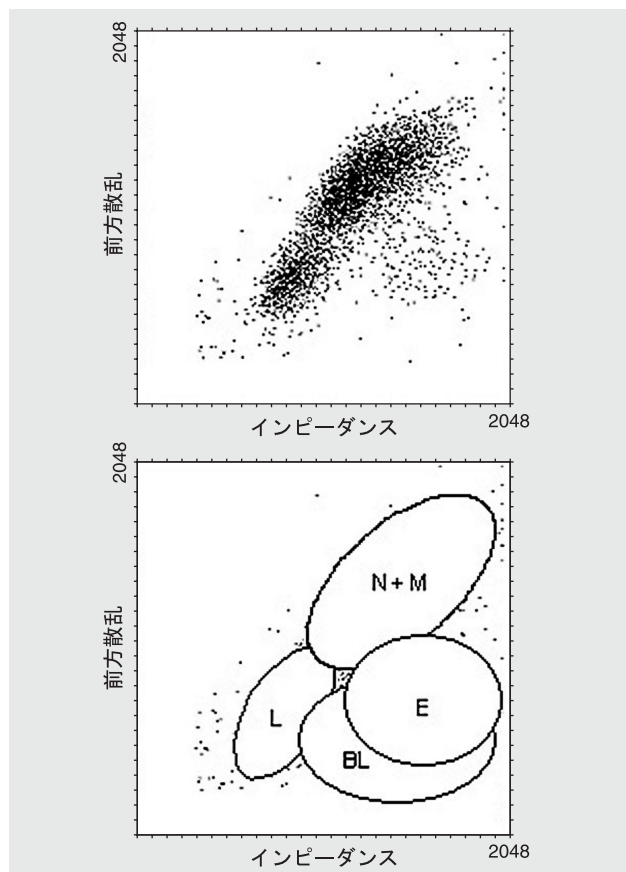


図17 光学及びインピーダンスによる白血球分類
(前方散乱光/インピーダンス)

おわりに

本稿では細胞と光波との間の主な相互作用について紹介した。弾性散乱と蛍光に着目し、主な血液細胞群を識別し計数を行うためにどのようにこの物理プロセスが用いられるかを指摘した。ビーム整形がフローサイトメトリアプリケーションにおいていかに重要な働きをしているかを示し、回折光学に基づいた実際的な成果を紹介した。赤血球と白血球の光学反応を実験的な見地から紹介し、考察を試みた。網赤血球をその他の赤血球から分類し、計数する方法を示した。最後に、白血球を複数のパラメータを用いたアプローチで分離する方法について言及し、HORIBA ABX血液分析装置の次世代に用いられるコンセプトとマトリクス表示を紹介した。

注記：本文中、各社保有の登録商標名をそのまま使わせていただいた場合があります。

参考文献

- [1] T. Kitamori, T. Sawada, *Laser Photoacoustic and Photothermal Spectroscopies as Novel Characterization Methods for Microparticles*, *Polymer International* 30, 451-453 (1993)
- [2] W. Hubl, L. Tlustos, A. Erath, S. Andert, P. M. Bayer, Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labeled monoclonal antibodies, *Cytometry* 26, 69-74 (1996)
- [3] Janet K. A. Nicholson, Marjorie Hubbard, Bonnie M. Jones, Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry, *Cytometry* 26, 6-21 (1996)
- [4] Young Ran Kim, Ronny van't Oever, Marilou Landayan, James Bearden, Automated red blood cell differential analysis on a multi-angle light scatter/fluorescence hematology analyzer, *Cytometry Part B* 56, 43-54 (2003)
- [5] B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and applications*, Wiley-VCH (2002)
- [6] D. Barnes, S. Aggarwal, S. Thomsen, M. Fitzmaurice, R. Richards-Kortum, A characterisation of the fluorescent properties of circulating eosinophils, *Photochemistry and Photobiology* 58, 297-303(1993)
- [7] R.A. Meyer, Light scattering from red blood cell ghosts: sensitivity of angular dependent structure to membrane thickness and refractive index, *Applied Optics* 16, 2036-2038 (1977)
- [8] A. Kastler, La diffusion de la lumiere par les milieux troubles, Influence de la grosseur des particules, Hermann, Paris, 21 (1952)
- [9] M. L. Polanyi, Volume and Index Measurement of blood cells with a recording diffractometer, *The Review of Scientific Instruments* 30, 626-632 (1959)
- [10] D.H. Tycko, M. H. Metz, E.A. Eptein and Grinbaum, Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration, *Applied Optics* 24, 1355-1365 (1985)
- [11] Y. M. Petrenko, Y. A. Vladimirov, Change in the size of erythrocytes on swelling in hypo-osmotic media, *Biophysics* 32, 485-492 (1987)
- [12] B.G. de Grooth, L.W.M.M. Terstappen, G.J. Puppels, and J. Greve, Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry, *Cytometry* 8, 539-544 (1987)
- [13] A.N. Korolevich, A. Ya Khairullina, Polarization characteristics of light scattering by erythrocytes under normal and pathological state, *SPIE Vol. 2370 Laser Applications in Life Science*, 375-378 (1994)

- [14] B. Kramer and col., Relative frequency of malaria pigment-carrying monocytes of nonimmune and semi-immune patients from flow cytometric depolarized side scatter, *Cytometry* 45, 133-140 (2001)
- [15] M. Benson and col., The application of perpendicular and forward light scatter to assess nuclear and cellular morphology, *Cytometry* 5, 515-522 (1984)
- [16] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, The interactions between the fluorescent dye Thiazole Orange and DNA, *Biopolymers* 46, 39-51 (1998)
- [17] L. G. Lee, and col., Detection of reticulocytes, RNA or DNA, Patent US 4,883,867
- [18] *Cytometry* 7, 508 (1986)
- [19] Howard M. Shapiro, *Practical Flow cytometry*, ARL, second edition (1988)
- [20] B. Kress, P. Meyrueis, *Digital Diffractive Optics*, Wiley editor (2001)
- [21] P. Nerin, Synthèse d'un élément d'optique diffractive pour la transformation d'un faisceau gaussien, ABX private communication, novembre 2003.
- [22] *Laser beam shaping*, edited by F.M. Dickey and S.C. Holwade (2000)
- [23] O. D. Laerum, R. Bjerknes, *Flow cytometry in hematology*, Academic Press, 95-109 (1992)
- [24] B.H. Davis and col., Immature Reticulocyte Fraction (IRF): By any name, a useful parameter of erythropoietic activity. *Laboratory Hematology*. 2:2-8 1996 ISLH
- [25] V. Kachel, *Electrical Resistance Pulse Sizing: Coulter sizing*, *Flow Cytometry and Sorting*, second edition, 45-80 (1990)



Philippe Nérin, PhD

HORIBA ABX S.A.
R&D Optical Department



Didier Lefèvre

HORIBA ABX S.A.
R&D Department