

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(10) 国際公開番号  
WO 2012/053355 A1

(43) 国際公開日

2012年4月26日 (26.04.2012)

- (51) 国際特許分類 : G01N 21/64 (2006.01) G02B 21/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP201 1/072939
- (22) 国際出願日 : 2011年10月5日 (05.10.2011)
- (25) 国際出願の言語 : 日本語
- (26) 国際公開の言語 : 日本語
- (30) 優先権データ : 特願 2010-234769 2010年10月19日 (19.10.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について) : オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者 ;および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのタ) : 山口光城 (YAMAGUCHI, Mitsushiro) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号オリンパス株式会社内 Tokyo (JP). 田邊哲也 (TANABE, Tet-suya) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人 : 明石 昌毅 , 外 (AKASHI, Masaki et al); 〒1040033 東京都中央区新川2丁目6番8号 Y H ビル 5 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: OPTICAL ANALYSIS DEVICE FOR OBSERVING POLARISATION CHARACTERISTICS OF SINGLE LIGHT-EMITTING PARTICLE, OPTICAL ANALYSIS METHOD AND OPTICAL ANALYSIS COMPUTER PROGRAM THERE FOR

(54) 発明の名称 : 単一発光粒子の偏光特性を観測する光分析装置、光分析方法及びそのための光分析用コンピュータプログラム

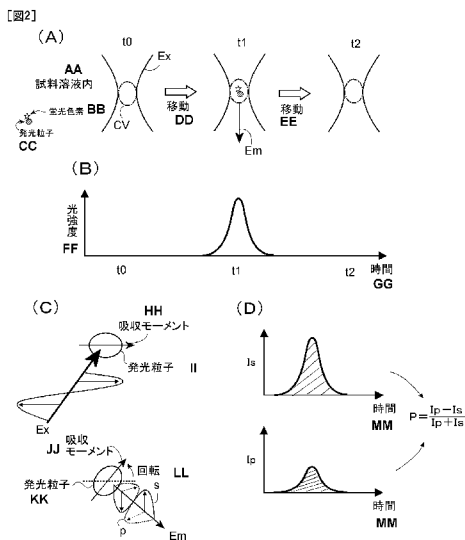


FIG. 2:  
 AA Within the sample solution  
 BB Fluorochrome  
 CC Light-emitting particle  
 DD Movement  
 EE Movement  
 FF Optical intensity  
 GG Time  
 HH Absorption moment  
 II Light-emitting particle  
 JJ Absorption moment  
 KK Light-emitting particle  
 LL Rotation  
 MM Time

(57) Abstract: Provided is optical analysis technology for observing the polarisation characteristics of a light-emitting particle by using a scanning molecular counting method employing optical measurement performed with a confocal microscope or a multi-photon microscope. In the optical analysis technology for observing the polarisation characteristics of a light-emitting particle according to the present invention, excitation light comprising predetermined polarisation components is irradiated in an optical detection region of an optical system while the position of the optical detection region is moved within a sample solution due to the optical path of the optical system of a microscope being altered, and also the intensity of at least one polarisation component of light from the optical detection region is detected. Signals of light-emitting particles are individually detected in the intensity of the at least one polarisation component of the detected light, and polarisation characteristic values of the light-emitting particles are thereby calculated based on the intensity of the at least one polarisation component of the detected signals of the light-emitting particles. It is therefore possible to observe the polarisation characteristics of a light-emitting particle having a low concentration or numerical density in a sample solution.

(57) 要約:

[続葉有]

2012/053355 A1



口ツバ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡による光計測を用いた走査分子計数法を用いて、発光粒子の偏光特性を測定する分析技術が提供される。本発明の発光粒子の偏光特性を観測する光分析技術では、顕微鏡の光学系の光路を変更することにより試料溶液内に於いて光学系の光検出領域の位置を移動しながら、光検出領域に予め定められた偏光成分から成る励起光を照射すると共に、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出し、検出された光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて発光粒子の各々の信号を個別に検出して、検出された発光粒子の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて発光粒子の偏光特性値を算定する。これにより、試料溶液中での濃度又は数密度が低い発光粒子の偏光特性の観測が可能となる。

## 明 細 書

発明の名称 :

単一発光粒子の偏光特性を観測する光分析装置、光分析方法及びそのための光分析用コンピュータプログラム

### 技術分野

[0001] 本発明は、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系などの溶液中の微小領域からの光が検出可能な光学系を用いて、溶液中に分散又は溶解した原子、分子又はこれらの凝集体（以下、これらを「粒子」と称する。）、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖鎖、アミノ酸若しくはこれらの凝集体などの生体分子、ウイルス、細胞などの粒子状の対象物、或いは、非生物学的な粒子からの光を検出して、それらの状態（相互作用、結合・解離状態など）の分析又は解析に於いて有用な情報を取得することが可能な光分析装置、光分析方法及び光分析用コンピュータプログラムに係り、より詳細には、上記の如き光学系を用いて単一の発光する粒子からの光を個別に検出して種々の光分析を可能にする技術に係る。なお、本明細書に於いて、光を発する粒子（以下、「発光粒子」と称する。）は、それ自身が光を発する粒子、又は、任意の発光標識若しくは発光プローブが付加された粒子のいずれであってもよく、発光粒子から発せられる光は、励起光の照射により発せられる蛍光、りん光等であってよい。

### 背景技術

[0002] 近年の光計測技術の発展により、共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング（1光子検出）も可能な超高感度の光検出技術とを用いて、一光子又は蛍光一分子レベルの微弱光の検出・測定が可能となっている。そこで、そのような微弱光の計測技術を用いて、生体分子等の特性、分子間相互作用又は結合・解離反応の検出を行う装置又は方法が種々提案されている。例えば、蛍光相関分光分析（Fluorescence Correlation Spectroscopy : F C U）。例えば、特許文献 1 \_ 3、非特許文献 1 \_ 3 参照）に於いては、レーザー

共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術を用いて、試料溶液中の微小領域（顕微鏡のレーザー光が集光された焦点領域—コンフォーカル・ボリュームと称される。）内に入出入りする蛍光分子又は蛍光標識された分子（蛍光分子等）からの蛍光強度の測定が為され、その測定された蛍光強度の自己相関関数の値から決定される微小領域内に於ける蛍光分子等の平均の滞留時間（並進拡散時間）及び滞留する分子の数の平均値に基づいて、蛍光分子等の運動の速さ又は大きさ、濃度といった情報の取得、或いは、分子の構造又は大きさの変化や分子の結合・解離反応又は分散・凝集といった種々の現象の検出が為される。また、蛍光強度分布分析（Fluorescence-Intensity Distribution Analysis : FIDA。例えば、特許文献4、非特許文献4）やフォトンカウンティングヒストグラム（Photon Counting Histogram : PCH。例えば、特許文献5）では、FCSと同様に計測されるコンフォーカル・ボリューム内に入出入りする蛍光分子等の蛍光強度のヒストグラムが生成され、そのヒストグラムの分布に対して統計的なモデル式をフィッティングすることにより、蛍光分子等の固有の明るさの平均値とコンフォーカル・ボリューム内に滞留する分子の数の平均値が算定され、これらの情報に基づいて、分子の構造又は大きさの変化、結合・解離状態、分散・凝集状態などが推定されることとなる。更に、FIDAにおいては、検出される蛍光を偏光成分で分けて2チャンネルで解析することにより、対象となる分子の偏光特性を求めることも可能になってくる（Fluorescence Intensity Distribution Analysis- Polarization : FIDA - P0）（非特許文献5）。FIDA - P0に於いては、蛍光のp偏光成分（水平偏光成分）とs偏光成分（垂直偏光成分）の強度のヒストグラムがそれぞれ生成され、それらのヒストグラムの分布に対して統計的なモデル式をフィッティングすることにより算出される蛍光分子等の各偏光成分の強度の平均値から蛍光分子等の偏光度が算定される。またその他に、特許文献6、7に於いては、共焦点顕微鏡の光学系を用いて計測される試料溶液の蛍光信号の時間経過に基づいて蛍光性物質を検出する方法が提案されている。特許文献8は、フローサイトメータに於いて流

通させられた蛍光微粒子又は基板上に固定された蛍光微粒子からの微弱光をフォトンカウンティング技術を用いて計測してフロー中又は基板上の蛍光微粒子の存在を検出するための信号演算処理技術を提案している。

[0003] 特に、FCS、FIDA等の共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術とを用いた微小領域の蛍光測定技術を用いた方法によれば、測定に必要な試料は、従前に比して極めて低濃度且微量でよく（一回の測定で使用される量は、たかだか数十 $\mu$ L程度）、測定時間も大幅に短縮される（一回の測定で秒オーダーの時間の計測が数回繰り返される。）。従って、これらの技術は、特に、医学・生物学の研究開発の分野でしばしば使用される希少な或いは高価な試料についての分析を行う場合や、病気の臨床診断や生理活性物質のスクリーニングなど、検体数が多い場合に、従前の生化学的方法に比して、低廉に、或いは、迅速に実験又は検査が実行できる強力なツールとなることが期待されている。

#### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0004] 特許文献1 :特開2005—098876  
特許文献2 :特開2008—292371  
特許文献3 :特開2009—281831  
特許文献4 :特許第4023523号  
特許文献5 :国際公開2008-080417  
特許文献6 :特開2007—20565  
特許文献7 :特開2008—116440  
特許文献8 :特開平4—337446号公報

#### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1 :金城政孝、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 44、No. 9、1431—1438頁 1999年  
非特許文献2 :エフ・ジエイ・メイヤー・アルムス (F. J. Meyer-Alms)、フルオレセンス・コリレーション・スペクトロスコピー (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

tion Spectroscopy)、アール・リグラー編 (R. Rigler)、スプリンガー (Springer)、ベルリン、2000年、204—224頁

非特許文献3 :加藤則子外4名、遺伝子医学、Vol. 6、No. 2、271-277頁

非特許文献4 :カスク他3名、米国科学アカデミー紀要 1999年、96巻、13756 - 13761頁 (P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, K. Gall PNAS 96, 13756-13761 (1999))

非特許文献5 :カスク他6名、バイオフィジカルジャーナル 2000年、78巻、1703頁 (P. Kask, K. Palo, N. Fay, L. Brand, U. Mets, D. Ullmann, and J. Jungmann : Biophys. J. 78, 1703(2000))

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 上記のFCS、FIDA等の共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術を用いた光分析技術では、計測される光は、蛍光一分子又は数分子から発せられた光であるが、その光の解析に於いて、時系列に測定された蛍光強度データの自己相関関数の演算又はヒストグラムに対するフィッティングといった蛍光強度のゆらぎの算出等の統計的処理が実行され、個々の蛍光分子等からの光の信号を個別に参照又は分析するわけではない。即ち、これらの光分析技術に於いては、複数の蛍光分子等からの光の信号が統計的に処理され、蛍光分子等について統計平均的な特性が検出されることとなる。従って、これらの光分析技術に於いて統計的に有意な結果を得るためには、試料溶液中の観測対象となる蛍光分子等の濃度又は数密度は、平衡状態に於いて、一回の秒オーダーの長さの計測時間のうちに統計的処理が可能な数の蛍光分子等が微小領域内を入出するレベル、好適には、微小領域内に常に一個程度の蛍光分子等が存在しているレベルである必要がある。実際、コンフォーカル・ボリュームの体積は、 $1\text{ fL}$ 程度となるので、上記の光分析技術に於いて使用される試料溶液中の蛍光分子等の濃度は、典型的には、 $1\text{ nM}$ 程度若しくはそれ以上であり、 $1\text{ nM}$ を大幅に下回るときには、蛍光分子等が

コンフォーカル・ボリューム内に存在しない時間が生じて統計的に有意な分析結果が得られないこととなる。一方、特許文献6～8に記載の蛍光分子等の検出方法では、蛍光強度のゆらぎの統計的演算処理が含まれておらず、試料溶液中の蛍光分子等が1 nM未満であっても蛍光分子等の検出が可能であるが、溶液中でランダムに運動している蛍光分子等の濃度又は数密度を定量的に算出するといったことは達成されていない。

[0007] そこで、本願出願人は、特願2010—044714及びPCT/JP2011/53481に於いて、観測対象となる発光粒子の濃度又は数密度が、FCS、FIDA等の統計的処理を含む光分析技術で取り扱われるレベルよりも低い試料溶液中の発光粒子の状態又は特性を定量的に観測することを可能にする新規な原理に基づく光分析技術を提案した。かかる新規な光分析技術に於いては、端的に述べれば、FCS、FIDA等と同様に共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系などの溶液中の微小領域からの光が検出可能な光学系を用いるところ、試料溶液内に於いて光の検出領域である微小領域（以下、「光検出領域」と称する。）の位置を移動させながら、即ち、光検出領域により試料溶液内を走査しながら、光検出領域が試料溶液中に分散してランダムに運動する発光粒子を包含したときに、その発光粒子から発せられる光を検出し、これにより、試料溶液中の発光粒子の一つ一つを個別に検出して、発光粒子のカウンティングや試料溶液中の発光粒子の濃度又は数密度に関する情報の取得を可能にする。この新規な光分析技術（以下、「走査分子計数法」と称する。）によれば、測定に必要な試料がFCS、FIDA等の光分析技術と同様に微量（例えば、数十 $\mu$ L程度）であってもよく、また、測定時間が短く、しかも、FCS、FIDA等の光分析技術の場合に比して、より低い濃度又は数密度の発光粒子の存在を検出し、その濃度、数密度又はその他の特性を定量的に検出することが可能となる。

[0008] 本発明の主な課題は、上記の特願2010-044714及びPCT/JP2011/53481にて提案された新規な光分析技術を更に発展させるべく、特に、かかる新規な光分析技術を用いて、発光粒子からの光の測定の

際に光の特定の偏光成分を測定し、発光粒子の偏光特性を粒子毎に分析することが可能な光分析装置、光分析方法及びそのための光分析用コンピュータプログラムを提案することである。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明によれば、上記の課題は、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出する光分析装置であって、顕微鏡の光学系の光路を変更することにより試料溶液内に於いて光学系の光検出領域の位置を移動する光検出領域移動部と、予め定められた偏光成分から成る励起光を光検出領域に照射する光照射部と、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する光検出部と、試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動させながら光検出部にて検出した光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて発光粒子の各々からの信号を個別に検出し、かかる検出された発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて発光粒子の偏光特性値を算定する信号処理部とを含むことを特徴とする装置によって達成される。かかる構成に於いて、「試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子」とは、試料溶液中に分散又は溶解した原子、分子又はそれらの凝集体などの、光を発する粒子であって、基板などに固定されず、溶液中を自由にブラウン運動している粒子であれば任意の粒子であってよい。かかる発光粒子は、典型的には、蛍光性粒子であるが、励起光の照射により発光するその他の粒子（りん光性粒子など）であってもよい。共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系の「光検出領域」とは、それらの顕微鏡に於いて光が検出される微小領域であり、対物レンズから励起光が与えられる場合には、その励起光が集光された領域に相当する（共焦点顕微鏡に於いては、特に対物レンズとピンホールとの位置関係により確定される。）。また、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の抽出は、偏光ビームスプリッタ、偏光板等を用いて為されてよい。

「偏光特性値」とは、発光粒子の偏光特性を表す任意の指標値であってよく、典型的には、偏光度であるが、その他の任意の少なくとも一つの偏光成分



の強度に基づいて得られる任意の値、例えば、s 偏光成分又は p 偏光成分の強度、それらの強度比、蛍光又はりん光の異方性などであってもよい。予め定められた偏光成分から成る励起光」は、典型的には、実質的に一つの方向に偏光した光であるが、実験条件、観測対象となる発光粒子の特性に依存して複数の方向の偏光成分を含む光、無偏光の光、円偏光、楕円偏光が選択されてもよい。なお、本明細書に於いて、「信号」という場合には、特に断らない限り、発光粒子からの光を表す信号を指すものとする。

[001 0] 上記の本発明の装置に於いては、走査分子計数法と同様に、基本的な構成に於いて、試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動しながら、即ち、試料溶液内を光検出領域により走査しながら、逐次的に、励起光の照射及び光検出領域からの光の検出が行われる。そうすると、移動する光検出領域が、ランダムに運動している発光粒子を包含したときには、発光粒子からの光が検出され、これにより、一つの発光粒子の存在が検出される。かかる構成に於いて、本発明では、励起光として予め定められた偏光成分から成る励起光が光検出領域へ照射されると共に、光検出領域からの光のうち少なくとも一つの偏光成分の強度が測定され、かかる測定された少なくとも一つの偏光成分の強度から発光粒子の偏光特性値が算出される。かかる構成によれば、光検出領域の経路に発光粒子が進入すれば、その偏光特性を個別に観測できるので、FIDA-PO等の光分析技術に於ける蛍光強度のゆらぎの算出のための統計的処理は必要なく、試料溶液中の発光粒子濃度がFIDA-PO等で良好な測定結果を得るに必要なレベルよりも低い場合でも、発光粒子の偏光特性が観測される点で有利である。

[001 1] 実施の形態に於いて、上記の装置により検出される発光粒子の光の少なくとも一つの偏光成分としては、典型的には、光検出領域から到来してくる光を偏光ビームスプリッタなどにより分割して得られるs 偏光成分とp 偏光成分であってよく、偏光特性値は、別々に測定された(発光粒子の光の信号の)s 偏光成分の強度とp 偏光成分の強度とに基づいて算定されてよい。特に、偏光特性値の算定の際に用いられる信号の強度は、発光粒子の光の信号の

少なくとも一つの偏光成分の強度のピーク値、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間積算値、或いは、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間変化に対してフィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値などであってよい。なお、光検出領域から到来してくる光のs偏光成分とp偏光成分を別々に検出する場合、光学系内の各素子の透過率又は反射率が偏光方向によって異なること及び/又は光を検出する装置(光検出器)の感度が偏光方向によって異なることに起因して、s偏光成分の検出感度とP偏光成分の検出感度とが異なっている場合がある。そこで、上記の本発明の装置は、一つの態様に於いて、光検出部が光検出領域からの光に於けるs偏光成分の強度とp偏光成分の強度とを別々に測定する場合には、信号処理部が、s偏光成分の強度の検出感度とp偏光成分の強度の検出感度とのずれを補正する補正值を用いて、発光粒子の光の信号のs偏光成分の強度の検出値とP偏光成分の強度の検出値とに基づいて偏光特性値を算定するよう構成されてよい。かかる態様によれば、装置内に於けるs偏光成分の強度の検出感度とP偏光成分の強度の検出感度とのずれが補正された偏光特性値が得られることとなる。

[001 2] 上記の本発明の構成に於ける光検出領域の位置の移動に関して、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子の特性又は試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて適宜変更されてよい。当業者に於いて理解される如く、発光粒子から検出される光の態様は、その特性又は試料溶液中の数密度又は濃度によって変化し得る。特に、光検出領域の移動速度が速くなると、1つの発光粒子から得られる光量は低減することとなるので、1つの発光粒子からの光が精度よく又は感度よく計測できるように、光検出領域の移動速度は、適宜変更されることが好ましい。

[001 3] 更に、上記の光検出領域の位置の移動に関して、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、好適には、発光粒子の拡散移動速度(ブラウン運動による粒子の平均の移動速度)よりも高く設定される。上記に説明されている如く、本発明の装置では、光検出領域が包含した1つの発光粒子から発せ

られる光を検出して、発光粒子を個別に検出する。しかしながら、発光粒子が溶液中でブラウン運動することによりランダムに移動して、複数回、光検出領域を出入りする場合には、1つの発光粒子から複数回、(その存在を表す)信号が検出されてしまう可能性があり、検出された信号と1つの発光粒子の存在とを対応させることが困難となる。そこで、上記の如く、光検出領域の移動速度を発光粒子の拡散移動速度よりも高く設定し、これにより、1つの発光粒子を、1つの信号に対応させることが可能となる。なお、拡散移動速度は、発光粒子によって変わるので、上記の如く、発光粒子の特性に応じて、光検出領域の移動速度は適宜変更されることが好ましい。

[00 14] 光検出領域の位置の移動のための光学系の光路の変更は、任意の方式で為されてよい。例えば、レーザー走査型光学顕微鏡に於いて採用されているガルバノミラーを用いて光路を変更して光検出領域の位置が変更されるようになっていてよい。光検出領域の位置の移動経路は、任意に設定されてよく、例えば、円形、楕円形、矩形、直線及び曲線のうちから選択可能であってよし。なお、本発明に於いては、光学系の光路を変更して光検出領域の位置を移動するよう構成されていることにより、光検出領域の移動は、速やかであり、且つ、試料溶液に於いて機械的振動や流体力学的な作用が実質的に発生しないので、試料溶液中の発光粒子が力学的な作用の影響を受けることなく(アーティファクトの無い状態で)安定した状態にて、光の計測が可能である(例えば、試料に流れを発生させる場合には常に一樣な流速を与えることは困難であると共に、装置構成が複雑となり、また、必要な試料量が大幅に増大すると共に、流れによる流体力学的作用によって溶液中の発光粒子又はその他の物質が変質又は変性してしまう可能性がある)。そして、試料溶液を流通させるといった構成が必要ではないので、FCS等の場合と同様に微量(1~数十 $\mu\text{L}$ 程度)の試料溶液にて計測及び分析が可能である。

[00 15] また、実施の形態に於いて、本発明による光分析装置は、信号処理部が個別に検出された発光粒子の信号の数を計数して光検出領域の位置の移動中に検出された発光粒子の数を計数するようになっていてよい。これにより、偏

光特性値と共に、発光粒子の数密度又は濃度についての情報を取得することが可能となる。

[001 6] 上記の本発明の装置に於いて試料溶液内に於ける光検出領域の位置を移動させながら個々の発光粒子の光の検出を行い、発光粒子の偏光特性値を算定するという特徴的な光分析技術の処理は、汎用のコンピュータによっても実現可能である。従って、本発明のもう一つの態様によれば、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散シランダムに運動する発光粒子からの光を検出するための光分析用コンピュータプログラムであつて、試料溶液内に於いて顕微鏡の光学系の光検出領域の位置を移動するべく光学系の光路を変更する手順と、予め定められた偏光成分から成る励起光を光検出領域に照射する手順と、試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動させながら光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する手順と、検出された光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて発光粒子の各々からの信号を個別に検出し、検出された発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて発光粒子の偏光特性値を算定する手順とをコンピュータに実行させることを特徴とするコンピュータプログラムが提供される。

[001 7] かかるコンピュータプログラムに於いても、偏光特性値は、発光粒子の偏光特性を表す任意の指標値、例えば、偏光度、s 偏光成分又は p 偏光成分の強度、それらの強度比、蛍光又はりん光の異方性などであってもよい。また、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する手順に於いて、光検出領域からの光に於ける s 偏光成分と p 偏光成分の強度が別々に測定されてよく、発光粒子の偏光特性値を算定する手順に於いて、偏光特性値が発光粒子の光の信号の s 偏光成分の強度と p 偏光成分の強度とに基づいて算定されてよい。偏光特性値の算定の際に用いられる信号の強度は、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度のピーク値、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間積算値、或いは、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間変化に対してフィ

ッティングされた釣鐘型関数の時間積分値などであってよく、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する手順に於いて光検出領域からの光に於けるs偏光成分の強度とp偏光成分の強度とが別々に測定される場合には、発光粒子の偏光特性値を算定する手順に於いて、偏光特性値が、s偏光成分の強度の検出感度とp偏光成分の強度の検出感度とのずれを補正する補正值を用いて、発光粒子の光の信号のs偏光成分の強度の検出値とp偏光成分の強度の検出値とに基づいて算定されてよい。更に、上記のコンピュータプログラムに於いて、個別に検出された発光粒子からの光信号の数を計数して光検出領域の位置の移動中に検出された発光粒子の数を計数する手順及び/又は検出された発光粒子の数に基づいて、試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定する手順が含まれていてよい。また、光検出領域の位置を移動するべく光学系の光路を変更する手順に於いて、光検出領域の位置が所定の速度にて或いは発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されるようになっていてよく、光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子の特性又は試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて設定されるようになっていてよい。

[0018] 更に、上記の本発明の装置又はコンピュータプログラムによれば、試料溶液内に於ける光検出領域の位置を移動させながら個々の発光粒子の光の検出を行い、発光粒子の偏光特性値を算定する新規な光分析方法が実現される。従って、本発明によれば、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散シランダムに運動する発光粒子からの光を検出する光分析方法であって、顕微鏡の光学系の光路を変更することにより試料溶液内に於いて光学系の光検出領域の位置を移動する過程と、予め定められた偏光成分から成る励起光を光検出領域に照射する過程と、試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動させながら光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する過程と、検出された光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて発光粒子の各々からの信号を個別に検出し、検出された発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて発光粒子の偏光

特性値を算定する過程とを含むことを特徴とする方法が提供される。

[0019] 上記の方法に於いても、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の抽出は、偏光ビームスプリッタを用いて達成されてよく、偏光特性値は、発光粒子の偏光特性を表す任意の指標値、例えば、偏光度、s偏光成分又はP偏光成分の強度、それらの強度比、蛍光又はりん光の異方性などであってもよい。また、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する過程に於いて、光検出領域からの光に於けるs偏光成分とp偏光成分の強度が別々に測定され、発光粒子の偏光特性値を算定する過程に於いて、偏光特性値が発光粒子の光の信号のs偏光成分の強度とp偏光成分の強度とに基づいて算定されてよい。偏光特性値の算定の際に用いられる信号の強度は、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度のピーク値、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間積算値、或いは、発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間変化に対してフィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値などであってもよく、また、光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する過程に於いて、光検出領域からの光に於けるs偏光成分の強度とp偏光成分の強度とが別々に測定される場合には、発光粒子の偏光特性値を算定する過程に於いて、偏光特性値が、s偏光成分の強度の検出感度とp偏光成分の強度の検出感度とのずれを補正する補正值を用いて、発光粒子の光の信号のs偏光成分の強度の検出値とP偏光成分の強度の検出値とに基づいて算定されてよい。更に、上記の方法に於いても、個別に検出された発光粒子からの光信号の数を計数して光検出領域の位置の移動中に検出された発光粒子の数を計数する過程及び/又は検出された発光粒子の数に基づいて、試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定する過程が含まれていてよい。また更に、光検出領域の位置を移動するべく光学系の光路を変更する過程に於いて、光検出領域の位置が所定の速度にて或いは発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されるようになっていてよく、光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子の特性又は試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて設定されるようになつ

ていてよい。

[0020] 本発明による発光粒子の偏光特性を観測するための光分析技術は、典型的には、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖鎖、アミノ酸若しくはこれらの凝集体などの生体分子、ウイルス、細胞などの粒子状の生物学的な対象物の溶液中の状態の分析又は解析の用途に用いられるが、非生物学的な粒子（例えば、原子、分子、ミセル、金属コロイドなど）の溶液中の状態の分析又は解析に用いられてもよく、そのような場合も本発明の範囲に属することは理解されるべきである。

### 発明の効果

[0021] 総じて、本発明によれば、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡に於いて、その光検出領域により試料溶液中を走査することにより、発光粒子の存在を個別に検出すると共に、その発光粒子の偏光特性が観測できることとなる。そして、発光粒子の偏光特性は、粒子の構造、大きさ及び形状を反映した値であるので、本発明による観測によって、粒子の同定、粒子の構造、大きさ、形状、及び、それらの変化の検出、或いは、粒子の結合・解離反応又は分散・凝集といった種々の現象の検出及び分析が可能となる。

[0022] 上記の本発明に於ける偏光特性の観測は、新規な原理によるものであり、FIDA-POとは異なる特徴を有している。FIDA-POでは、試料溶液中にて分散ランダムに運動する複数の発光粒子の光を偏光成分毎に計測して、強度のヒストグラムを生成し、そのヒストグラムに理論式をフィッティングして偏光成分毎の強度の平均値が算出され、しかる後に、偏光特性値が算出される。従って、試料溶液中に種類の異なる発光粒子が存在している場合、演算処理が複雑となるので、例えば、観測対象となる粒子に発光プローブを付加して、かかる粒子について、FIDA-POによる測定をする場合には、観測対象粒子に結合していない発光プローブを除去するための精製処理が必要となり得る。また、既に述べた如く、FIDA-POで良好な精度にて蛍光強度の平均値を演算するには、試料溶液中の発光粒子濃度が、測定時間中、常に1つ以上の発光粒子が存在するレベルである必要がある。こ

れに対し、本発明によれば、発光粒子の偏光成分を個別に検出して、偏光特性値を算出することが可能である。従って、測定を良好な精度にて実行可能な試料溶液中の発光粒子濃度は、FIDA—POの場合よりも大幅に低くてもよく、また、信号の特性等によって発光粒子の種類が見分けられる場合には、試料溶液中に種類の異なる発光粒子が存在しているか否かは、偏光特性値の算出の難易度にあまり影響しないので、発光プローブが付加された粒子について測定する場合にも、発光プローブの除去は必須ではなくなるといった利点を得られる。また、本発明では、発光粒子を個別に検出できるようになっていることから、試料溶液中で相対的に濃度が低い発光粒子であって、その光が従前の方法ではその他の発光粒子からの光に埋没してしまう発光粒子であっても、検出可能であり、その偏光特性が観測可能となる。

[0023] 本発明のその他の目的及び利点は、以下の本発明の好ましい実施形態の説明により明らかになるであろう。

### 図面の簡単な説明

[0024] [図1] 図1 (A) は、本発明を実現する光分析装置の内部構造の模式図である。図1 (B) は、コンフォーカル・ポリウム (共焦点顕微鏡の観察領域) の模式図である。図1 (C) は、ミラー7の向きを変更して試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動する機構の模式図である。

[図2] 図2 (A)、(B) は、それぞれ、本発明の一部を構成する走査分子計数法に於ける光検出の原理を説明する模式図及び計測される光強度の時間変化の模式図である。図2 (C) は、発光粒子から放出される偏光成分を模式的に表すモデル図であり、図2 (D) は、各偏光成分の光強度の時間変化の模式図である。

[図3] 図3 は、本発明に従って実行される拡散係数測定の手順をフローチャートの形式で表した図である。

[図4] 図4 (A)、(B) は、それぞれ、発光粒子がブラウン運動をしながら光検出領域を横切る場合及び試料溶液内の光検出領域の位置を発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動することにより発光粒子が光検出領域を



横切る場合の粒子の運動の態様を表すモデル図であり、図4 (C) は、光検出領域の移動速度が図4 (B) の如く設定された場合の、一つの発光粒子からの光を表す信号 (フォトンカウント) の時間変化の例を示している。

[図5] 図5 (A) は、走査分子計数法に従って、計測された時系列光強度データ (フォトンカウントの時間変化) から発光粒子の存在を検出するための処理手順に於ける検出信号の信号処理過程の例を説明する図である。図5 (B) は、計測されたフォトンカウントデータの実測例 (棒グラフ) と、データをスムージングして得られる曲線 (点線) と、パルス存在領域にてフィッティングされたガウス関数 (実線) を示している。図中、「ノイズ」と付された信号は、ノイズ又は異物による信号であるとして無視される。

[図6] 図6 は、本発明に従って検出された個々の発光粒子についての s 偏光成分強度  $I_s$  に対して対応する発光粒子の p 偏光成分強度  $I_p$  をプロットした図である。(A) は、発光粒子として TAMRA を用いた場合であり、(B) は、発光粒子として SYTOX Orange で染色されたプラスミドを用いた場合である。

[図7] 図7 は、従来の蛍光強度のゆらぎを算出する光分析技術に於いて得られるフォトンカウント (光強度) の時間変化の例であり、(A) は、試料内の粒子の濃度が、十分な計測精度が与えられる程度である場合であり、(B) は、(A) の場合よりも大幅に試料内の粒子の濃度が低い場合である。

## 符号の説明

- [0025] 1…光分析装置 (共焦点顕微鏡)
- 2…光源
- 3…シングルモードオプティカルファイバー
- 4…コリメータレンズ
- 4 a…励起光偏光素子
- 5…ダイクロイックミラー
- 6、7、11…反射ミラー
- 8…対物レンズ

- 9…マイクロプレート
- 10…ウエル (試料溶液容器)
- 12…コンデンサーレンズ
- 13…ピンホール
- 14 a…偏光ビームスプリッタ
- 14 s、p…バリアフィルター
- 15…マルチモードオプティカルファイバー
- 16 s、p…光検出器
- 17…ミラー偏向器
- 17 a…ステージ位置変更装置
- 18…コンピュータ

### 発明を実施するための形態

[0026] 以下、本発明の好ましい実施形態について詳細に説明する。

#### [0027] 光分析装置の構成

本発明による光分析技術は、基本的な構成に於いて、図1(A)に模式的に例示されている如き、FIDA—POが実行可能な共焦点顕微鏡の光学系と光検出器とを組み合わせる光分析装置により実現可能である。図1(A)を参照して、光分析装置1は、光学系2~17と、光学系の各部の作動を制御すると共にデータを取得し解析するためのコンピュータ18とから構成される。光分析装置1の光学系は、通常の共焦点顕微鏡の光学系と同様であってよく、そこに於いて、光源2から放射されシングルモードファイバー3内を伝播したレーザー光(Ex)が、ファイバーの出射端に於いて固有のNAにて決まった角度にて発散する光となって放射され、コリメーター4によって平行光となり、偏光素子4aに於いて、予め定められた偏光方向の光となるよう調整された後(ここに於いて、典型的には、p偏光又はs偏光のいずれか一方が透過する。)、ダイクロイツクミラー5、反射ミラー6、7にて反射され、対物レンズ8へ入射される。対物レンズ8の上方には、典型的には、1~数十 $\mu$ Lの試料溶液が分注される試料容器又はウエル10が配

列されたマイクロプレート9が配置されており、対物レンズ8から出射したレーザー光は、試料容器又はウエル10内の試料溶液中で焦点を結び、光強度の強い領域(励起領域)が形成される。試料溶液中には、観測対象物である発光粒子、典型的には、蛍光色素等の発光標識が付加された分子が分散又は溶解されており、発光粒子が励起領域に進入すると、その間、発光粒子が励起され光が放出される。放出された光(E<sub>m</sub>)は、対物レンズ8、ダイクロミックミラー5を通過し、ミラー11にて反射してコンデンサーレンズ12にて集光され、ピンホール13を通過する。なお、当業者に於いて知られている如く、ピンホール13は、対物レンズ8の焦点位置と共役の位置に配置されており、これにより、図1(B)に模式的に示されている如きレーザー光の焦点領域、即ち、励起領域内から発せられた光のみがピンホール13を通過し、焦点面以外からの光は遮断される。図1(B)に例示されたレーザー光の焦点領域は、通常、1~10fL程度の実効体積を有する本光分析装置に於ける光検出領域であり、コンフォーカル・ボリュームと称される。コンフォーカル・ボリュームに於いては、典型的には、光強度が領域の中心を頂点とするガウス型分布又はローレンツ型分布となり、その実効体積は、光強度が $1/e^2$ となる面を境界とする略楕円球体の体積である。かくして、ピンホール13を通過した光は、偏光ビームスプリッター14aに於いて、s偏光成分とP偏光成分とに分割され、それぞれ、バリアフィルター14s、14pを透過して(ここで、特定の波長帯域の光成分のみが選択される。)、マルチモードファイバー15に導入され、対応する光検出器16s、16Pに到達する。光検出器16s、16pでは、それぞれ、逐次的に到来する光が時系列の電気信号に変換されて、コンピュータ18へ入力され、後に説明される態様にて光分析のための処理が為される。光検出器16s、16pとしては、好適には、フォトンカウンティングに使用可能な超高感度の光検出器が用いられ、これにより、1つの発光粒子からの光、例えば、一個又は数個の蛍光色素分子からの微弱光が検出可能となる。かくして、上記の構成により、偏光方向別に発光粒子からの光の強度が計測されることとなる。

[0028] また、上記の光分析装置の光学系に於いて、更に、光学系の光路を変更して試料溶液内を光検出領域により走査する、即ち、試料溶液内に於いて焦点領域（即ち、光検出領域）の位置を移動するための機構が設けられる。かかる光検出領域の位置を移動するための機構としては、例えば、図1（C）に模式的に例示されている如く、反射ミラー7の向きを変更するミラー偏向器17が採用されてよい。かかるミラー偏向器17は、通常のレーザー走査型顕微鏡に装備されているガルバノミラー装置と同様であってよい。また、所望の光検出領域の位置の移動パターンを達成するべく、ミラー偏向器17は、コンピュータ18の制御の下、光検出器16s、pによる光検出と協調して駆動される。光検出領域の位置の移動経路は、円形、楕円形、矩形、直線、曲線又はこれらの組み合わせから任意に選択されてよい（コンピュータ18に於けるプログラムに於いて、種々の移動パターンが選択できるようになってよい。）。なお、図示していないが、対物レンズ8を上下に移動することにより、光検出領域の位置が上下方向に移動されるようになっていてもよい。上記の如く、試料溶液を移動するのではなく、光学系の光路を変更して光検出領域の位置を移動する構成によれば、試料溶液内に機械的な振動や流体力学的な作用が実質的に発生することがなくなり、観測対象物に対する力学的な作用の影響を排除することが可能となり、安定的な計測が達成される。

[0029] なお、追加的な構成として、顕微鏡のステージ（図示せず）には、観察するウエル10を変更するべく、マイクロプレート9の水平方向位置を移動するためのステージ位置変更装置17aが設けられていてよい。ステージ位置変更装置17aの作動は、コンピュータ18により制御されてよい。

[0030] 発光粒子が多光子吸収により発光する場合には、上記の光学系は、多光子顕微鏡として使用される。その場合には、励起光の焦点領域（光検出領域）のみで光の放出があるので、ピンホール13は、除去されてよい。発光粒子がりん光により発光する場合には、上記の共焦点顕微鏡の光学系がそのまま用いられる。更に、光分析装置1に於いては、図示の如く、複数の励起光源

2 が設けられていてよく、発光粒子を励起する光の波長によって適宜、励起光の波長が選択できるようになってよい。

[0031] 本発明の原理

「発明の概要」の欄に記載されている如く、本発明の光分析技術によれば、端的に述べれば、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光検出領域の位置を試料溶液内にて移動しながら、試料溶液中にて分散する発光粒子が光検出領域内に包含される際に放出する光を検出して発光粒子の存在を個別に検知する「走査分子計数法」に於いて、発光粒子の光の少なくとも一つの偏光成分を計測し、発光粒子の偏光特性が決定される。かかる構成によれば、試料溶液中の発光粒子の各々を個別に検出し、その偏光特性が観測されることになるので、試料溶液中の発光粒子濃度が、蛍光ゆらぎの大きさの算出のための統計的処理を要する F I D A — P O で良好に測定可能な濃度よりも低い場合でも、発光粒子の偏光特性の測定が可能となる。以下、本発明による偏光特性の測定の原理について説明する。

[0032] 1. 走査分子計数法の原理

F I D A 等の分光分析技術は、従前の生化学的な分析技術に比して、必要な試料量が極めて少なく、且つ、迅速に検査が実行できる点で優れている。しかしながら、F I D A 等の分光分析技術では、原理的に、発光粒子の特性は、蛍光強度のゆらぎに基づいて算定されるので、精度のよい測定結果を得るためには、試料溶液中の発光粒子の濃度又は数密度が、図 7 (A) に模式的に描かれているように、蛍光強度の計測中に常に一個程度の発光粒子が光検出領域 C V 内に存在するレベルであり、同図の右側に示されている如く、計測時間中に常に有意な光強度 (フォトンカウント) が検出されることが要求される。もし発光粒子の濃度又は数密度がそれよりも低い場合、例えば、図 7 (B) に描かれているように、発光粒子がたまにしか光検出領域 C V 内へ進入しないレベルである場合には、同図の右側に例示されている如く、有意な光強度の信号 (フォトンカウント) が、計測時間の一部にしか現れないこととなり、精度のよい光強度のゆらぎの算定が困難となる。また、計測中

に常に一個程度の発光粒子が光検出領域内に存在するレベルよりも発光粒子の濃度が大幅に低い場合には、光強度のゆらぎの演算に於いて、バックグラウンドの影響を受けやすくなると共に、演算に十分な量の有意な光強度データを得るために計測時間が長くなる。

[0033] そこで、本願出願人は、特願 2010—044714 及び PCT/JP2011/53481 に於いて、発光粒子の濃度が、上記の如き FCS、FIDA 等の分光分析技術にて要求されるレベルよりも低い場合でも、発光粒子の特性の検出を可能にする新規な原理に基づく「走査分子計数法」を提案した。

[0034] 走査分子計数法に於いて実行される処理としては、端的に述べれば、光検出領域の位置を移動するための機構（ミラー偏向器 17）を駆動して光路を変更し、図 1（C）にて模式的に描かれているように、試料溶液内に於いて光検出領域 CV の位置を移動しながら、即ち、光検出領域 CV により試料溶液内を走査しながら、光検出が実行される。そうすると、例えば、図 2（A）の如く、光検出領域 CV が移動する間（図中、時間  $t_0 \sim t_2$ ）に於いて 1 つの発光粒子の存在する領域を通過する際（ $t_1$ ）には、発光粒子から光が放出され、図 2（B）に描かれている如き時系列の光強度データ上に有意な光強度（ $E_m$ ）のパルス状の信号が出現することとなる。かくして、上記の光検出領域 CV の位置の移動と光検出を実行し、その間に出現する図 2（B）に例示されている如きパルス状の信号（有意な光強度）を一つずつ検出することによって、発光粒子が個別に検出され、発光粒子の特性に関する情報が取得できることとなる。かかる走査分子計数法の原理に於いては、蛍光強度のゆらぎの算出の如き統計的な演算処理は行われず、発光粒子が一つずつ検出されるので、FCS、FIDA 等では十分な精度にて分析ができないほど、観測されるべき粒子の濃度が低い試料溶液でも、粒子の特性に関する情報が取得可能である。

[0035] 2. 本発明による発光粒子の偏光特性の原理

本発明では、特に、上記の走査分子計数法に於いて、図 1 に関連して説明

した如く、発光粒子からの光を偏光成分に分割し、かかる偏光成分の強度を別々に測定することにより、発光粒子の偏光特性の検出が為される。かかる偏光特性の検出に於いては、典型的には、図2(C)に模式的に描かれている如く、或る方向に偏光した光が励起光 $E_x$ として発光粒子に対して与えられ、その発光粒子から放出される光のs偏光成分及びp偏光成分のそれぞれが別々に検出される。そして、検出された各偏光成分の強度、例えば、信号の積分値(図2(D)に於ける斜線領域の面積値)又はピーク強度(信号の最大値)を用いて、偏光特性を表す指標値、例えば、偏光度Pが算出される。励起光 $E_x$ を吸収した発光粒子から放出される光 $E_m$ は、種々の要因にて、例えば、回転ブラウン運動による粒子の自転、励起エネルギー移動などにより、その偏光方向が励起光 $E_x$ とは異なるので、かかる偏光特性を表す指標値によって、発光粒子の回転ブラウン運動の速さ、励起エネルギー移動の有無等の情報が取得され、更に、それらの情報から粒子の大きさや構造、分子間相互作用(結合・解離)等の情報が得られることとなる。特に、理解されるべきことは、走査分子計数法に於いては、光検出領域を通過する単一の発光粒子からの光が測定されるので、偏光特性値も単一の発光粒子の値が個別に算出可能であるという点である。従って、FIDA-POにて良好な統計的な演算結果を得るのに必要な濃度よりも低い発光粒子濃度の試料溶液を用いても、偏光特性値が取得可能となり、粒子の大きさや構造、分子間相互作用等の情報が得られることになる。

[0036] なお、励起光としてどのような偏光成分を含む光を与え、また、検出光としてどのような偏光成分を検出するかは任意に決定されてよい。上記の図1(A)の装置或いは図2(C)に関連した説明の例は、励起光として、一方に偏光した成分、例えば、P偏光成分が光検出領域へ照射され、光検出領域からの光をp偏光成分とs偏光成分とに分けて検出する構成されている。しかしながら、例えば、励起光として偏光の無い光が与えられ、s偏光又はp偏光のいずれか一方のみを検出するか又はs偏光又はp偏光の双方を別々に検出するようになっていてもよい(発光粒子の回転ブラウン運動が比較的遅く

、一つの発光粒子の信号において、発光粒子の向きに殆ど変化がない場合又は変化が検出可能である場合には、上記の構成にて発光粒子の向きや回転ブラウン運動の速さを観測することが可能となる。)。その他、種々の態様にて、励起光の偏光設定、検出光の偏光設定が選択されてよく、そのような場合も本発明の範囲に属することは理解されるべきである。

[0037] 処理操作過程

図 1 (A) に例示の光分析装置 1 を用いた本発明による発光粒子の偏光特性の観測方法の実施形態に於いては、具体的には、(1) 発光粒子を含む試料溶液の調製過程、(2) 試料溶液の光強度の測定処理過程、及び(3) 測定された光強度の分析処理過程が実行される。図 3 は、フローチャートの形式にて表した本実施形態に於ける処理過程を示している。

[0038] (1) 試料溶液の調製

本発明に於いて観測対象となる粒子は、溶解された分子等の、試料溶液中にて分散し溶液中にてランダムに運動する粒子であれば、任意のものであつてよく、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖鎖、アミノ酸若しくはこれらの凝集体などの生体分子、ウイルス、細胞、或いは、金属コロイド、その他の非生物学的粒子などであつてよい(試料溶液は、典型的には水溶液であるが、これに限定されず、有機溶媒その他の任意の液体であつてよい。)。また、観測対象となる粒子は、それ自体が発光する粒子であつてもよく、或いは、発光標識(蛍光分子、りん光分子)が任意の態様にて付加された粒子であつてよい。

[0039] (2) 試料溶液の光強度の測定

本実施形態の走査分子計数法による光強度の測定処理過程では、ミラー偏向器 17 を駆動して、試料溶液内での光検出領域の位置の移動(試料溶液内の走査)を行いながら、光強度の測定が為される(図 3 \_ ステップ 100)。操作処理に於いて、典型的には、マイクロプレート 9 のウェル 10 に試料溶液を注入して顕微鏡のステージ上に載置した後、使用者がコンピュータ 18 に対して、測定の開始の指示を入力すると、コンピュータ 18 は、記憶装



置（図示せず）に記憶されたプログラム（試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動するべく光路を変更する手順、励起光を光検出領域に照射する手順及び光検出領域の位置の移動中に光検出領域からの光を検出する手順）に従って、試料溶液内の光検出領域に於ける励起光の照射及び光強度の計測が開始される。計測が開始されると、まず、コンピュータ 18 のプログラムに従った処理動作の制御下、光源 2 から、試料溶液中の発光粒子の励起波長の光が出射されると共に、ミラー偏向器 17 がミラー 7（ガルバノミラー）を駆動して、ウエル 10 内に於いて光検出領域の位置の移動を実行し、これと同時に光検出器 16 s、p は、それぞれ、逐次的に検出された光を電気信号に変換してコンピュータ 18 へ送信し、コンピュータ 18 は、任意の態様にて、送信された信号から時系列の光強度データを生成して保存する。典型的には、光検出器 16 s、p は、一光子の到来を検出できる超高感度光検出器であるので、光の検出は、所定時間に亘って、逐次的に、所定の単位時間毎（BIN TIME）に、例えば、10 μ秒毎に光検出器に到来するフォトン数を計測する態様にて実行されるフォトンカウンティングであり、時系列の光強度のデータは、時系列のフォトンカウントデータであってよい。

[0040] 光検出領域の位置の移動速度に関して、走査分子計数法に於いて、計測された時系列の光強度データからの発光粒子の個別の検出を、定量的に精度よく実行するために、好適には、光強度の計測中の光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子のランダムな運動、即ち、ブラウン運動による移動速度よりも速い値に設定される。光検出領域の位置の移動速度が粒子のブラウン運動による移動に比して遅い場合には、図 4（A）に模式的に描かれている如く、粒子が領域内をランダムに移動し、これにより、光強度がランダムに変化し（光検出領域の励起光強度は、領域の中心を頂点として外方に向かって低減する。）、個々の発光粒子に対応する有意な光強度の変化（発光粒子からの光を表す信号）を特定することが困難となる。そこで、好適には、図 4（B）に描かれている如く、粒子が光検出領域 CV を略直線に横切り、これにより、時系列の光強度データに於いて、個々の粒子に対応する光強度の変化

のプロファイルが、図4 (C) に例示されている如く励起光強度分布と略同様の略釣鐘状となって、個々の発光粒子と光強度との対応が容易に特定できるように、光検出領域の位置の移動速度は、粒子のブラウン運動による平均の移動速度 (拡散移動速度) よりも速く設定される。

[0041] 具体的には、拡散係数  $D$  を有する発光粒子がブラウン運動によって半径  $r$  の光検出領域 (コンフォーカルボリューム) を通過するときを要する時間  $\Delta \tau$  は、平均二乗変位の関係式

$$(2r)^2 = 6D \cdot \Delta \tau \quad \dots (1)$$

から、

$$\Delta \tau = (2r)^2 / 6D \quad \dots (2)$$

となるので、発光粒子がブラウン運動により移動する速度 (拡散移動速度)  $V_{dif}$  は、概ね、

$$V_{dif} = 2r / \Delta \tau = 3D / r \quad \dots (3)$$

となる。そこで、光検出領域の位置の移動速度は、かかる  $V_{dif}$  を参照して、それよりも十分に早い値に設定されてよい。例えば、発光粒子の拡散係数が、 $D = 2.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  程度であると予想される場合には、「 $r$ 」が、 $0.62 \mu\text{m}$  程度だとすると、 $V_{dif}$  は、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ m/s}$  となるので、光検出領域の位置の移動速度は、その10倍以上の  $15 \text{ mm/s}$  と設定されてよい。なお、発光粒子の拡散係数が未知の場合には、光検出領域の位置の移動速度を種々設定して光強度の変化のプロファイルが、予想されるプロファイル (典型的には、励起光強度分布と略同様) となる条件を見つけるための予備実験を繰り返し実行して、好適な光検出領域の位置の移動速度が決定されてよい。

[0042] (3) 光強度の分析

上記の処理により試料溶液中の発光粒子の時系列の光強度データが得られると、コンピュータ18に於いて、記憶装置に記憶されたプログラムに従った処理により、光強度データ上に於ける発光粒子からの光に対応する信号の検出、偏光特性値の算出が実行される。

## [0043] (i) 発光粒子に対応する信号の検出

時系列の光強度データに於いて、一つの発光粒子の光検出領域を通過する際の軌跡が、図4 (B) に示されている如く略直線状である場合、その粒子に対応する信号に於ける光強度の変化は、(光学系により決定される) 光検出領域内の光強度分布を反映した略釣鐘状のプロファイルを有する (図4 (C) 参照)。従って、走査分子計数法では、基本的には、適宜設定される閾値を超える光強度が継続する時間幅が所定の範囲にあるとき、その光強度のプロファイルを有する信号が一つの粒子が光検出領域を通過したことに対応すると判定され、一つの発光粒子の検出が為されるようになってよい。そして、閾値を超える光強度が継続する時間幅が所定の範囲にない信号は、ノイズ又は異物の信号として判定される。また、光検出領域の光強度分布が、ガウス分布：

$$I = A \cdot \exp(-2t^2/a^2) \quad \dots (4)$$

であると仮定できるときには、有意な光強度のプロファイル (バックグラウンドでないと明らかに判断できるプロファイル) に対して式 (4) をフィッティングして算出された強度A及び幅aが所定の範囲内にあるとき、その光強度のプロファイルが一つの粒子が光検出領域を通過したことに対応すると判定され、一つの発光粒子の検出が為されてよい。(強度A及び幅aが所定の範囲外にある信号は、ノイズ又は異物の信号として判定され、その後の分析等に於いて無視されてよい。)

[0044] 時系列光強度データからの発光粒子の一括的な検出を行う処理方法の一つの例としては、まず、時系列光強度データ (図5 (A)、最上段「検出結果 (未処理)」) に対して、スムージング (平滑化) 処理が為される (図3 - ステップ110、図5 (A) 中上段「スムージング」)。発光粒子の発する光は確率的に放出されるものであり、微小な時間に於いてデータ値の欠落が生じ得るため、かかるスムージング処理によって、前記の如きデータ値の欠落を無視できることとなる。スムージング処理は、例えば、移動平均法等により為されてよい。なお、スムージング処理を実行する際のパラメータ、例

例えば、移動平均法に於いて一度に平均するデータ点数や移動平均の回数などは、光強度データ取得時の光検出領域の位置の移動速度（走査速度）、BIN TIME に応じて適宜設定されてよい。

[0045] 次いで、スムージング処理後の時系列光強度データに於いて、有意なパルス状の信号（以下、「パルス信号」と称する。）が存在する時間領域（パルス存在領域）を検出するために、スムージング処理後の時系列光強度データの時間についての一次微分値が演算される（ステップ120）。時系列光強度データの時間微分値は、図5（A）中下段「時間微分」に例示されている如く、信号値の変化時点に於ける値の変化が大きくなるので、かかる時間微分値を参照することによって、有意な信号の始点と終点を有利に決定することができる。

[0046] しかる後、時系列光強度データ上に於いて、逐次的に、有意なパルス信号を検出し、検出された信号が発光粒子に対応する信号であるか否かが判定される。具体的には、まず、時系列光強度データの時系列の時間微分値データ上にて、逐次的に時間微分値を参照して、一つのパルス信号の始点と終点とが探索され決定され、パルス存在領域が特定される（ステップ130）。一つのパルス存在領域が特定されると、そのパルス存在領域に於けるスムージングされた時系列光強度データに対して、釣鐘型関数のフィッティングが行われ（図5（A）下段「釣鐘型関数フィッティング」）、釣鐘型関数のパルスのピーク（最大値）の強度  $I_{\text{pea}}$  にパルス幅（半値全幅）  $W_{\text{pea}}$  にフィッティングに於ける（最小二乗法の）相関係数等のパラメータが算出される（ステップ140）。なお、フィッティングされる釣鐘型関数は、典型的には、ガウス関数であるが、ローレンツ型関数であってもよい。そして、算出された釣鐘型関数のパラメータが、一つが発光粒子が光検出領域を通過したときに検出されるパルス信号が描く釣鐘型のプロファイルのパラメータについて想定される範囲内にあるか否か、即ち、パルスのピーク強度、パルス幅、相関係数が、それぞれ、所定範囲内にあるか否か等が判定される（ステップ150）。かくして、図5（B）左に示されている如く、算出された釣鐘型

関数のパラメータが一つの発光粒子に対応する信号に於いて想定される範囲内にあると判定された信号は、一つの発光粒子に対応する信号であると判定され、これにより、一つの発光粒子が検出されたこととなる。一方、図5 (B) 右に示されている如く、算出された釣鐘型関数のパラメータが想定される範囲内になかったパルス信号は、ノイズとして無視される。

[0047] 上記のステップ130～150の処理に於けるパルス信号の探索及び判定は、s偏光成分及びp偏光成分の各々の時系列光強度データの全域に渡って繰り返し実行されてよい(ステップ160)。また、本実施形態の場合、一つの発光粒子の光は、s偏光成分及びp偏光成分の時系列光強度データの両方に出現することが期待される。従って、各発光粒子の信号は、s偏光成分及びP偏光成分の時系列光強度データに於いて一つずつ特定される。s偏光成分の時系列光強度データ上の信号とP偏光成分の時系列光強度データ上の信号との対応付けは、パルス存在領域の時間値を参照して為されてよい。なお、時系列光強度データから発光粒子の信号を個別に検出する処理は、上記の手順に限らず、任意の手法により実行されてよい。

[0048] (ii) 発光粒子の偏光特性値の算出 (図3\_ステップ170)

かくして、s偏光成分及びp偏光成分の各々の時系列光強度データに於いて、発光粒子の信号が検出されると、発光粒子毎に、s偏光成分及びp偏光成分の光強度を用いて、偏光特性値が算出される。s偏光成分及びp偏光成分の光強度 $I_s$ 、 $I_p$ としては、例えば、ステップ130～160に於いて検出された発光粒子の信号のピーク強度、フォトンカウンタの積算値、或いは、フィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値(図2(D)の斜線領域の面積)が採用されてよい。また、偏光特性値としては、典型的には、偏光度P、即ち、

$$P = (I_p - I_s) / (I_p + I_s) \quad \dots (5)$$

が用いられてよい。なお、その他の偏光特性を表す指標値、例えば、s偏光成分又はP偏光成分或いは或る特定の方向の偏光成分の光強度値自体、s偏光成分及びP偏光成分の光強度比、 $I_p / I_s$ 、蛍光(又はりん光)の異方

性などであってもよい。また、偏光特性値は、検出された発光粒子の s 偏光成分の光強度  $I_s$  の平均値と p 偏光成分の光強度  $I_p$  の平均値とを用いて算出されてもよい。

[0049] ところで、図 1 (A) の装置に於ける s 偏光成分及び p 偏光成分の光の測定に於いて、s 偏光成分の検出感度と p 偏光成分の検出感度とが異なっている場合がある。例えば、光学系内の各素子の透過率又は反射率は、偏光方向によって異なる場合があり、また、光検出器 16 s、p の感度も異なる場合があるので、各偏光方向に於いて同じ強度の光が発光粒子から放出されても、s 偏光成分の強度の検出値と p 偏光成分の強度の検出値が異なってしまうことが有り得る。そこで、好適には、偏光特性値を算出する場合に、s 偏光成分の検出感度と P 偏光成分の検出感度のずれを補正する処理が施されてよし。かかる補正処理を行う場合、例えば、上記の偏光度 P は、下記の式により算出されてよい。

[数 1]

$$P = \frac{\left(\frac{I_p}{I_s}\right)^{C-1}}{\left(\frac{I_p}{I_s}\right)^{C+1}} \quad \dots (6)$$

ここに於いて、C は、補正值であり、発光粒子からの光の p 偏光成分と s 偏光成分の強度が等しいときの強度検出値  $I_{so}$  と強度検出値  $I_{po}$  との比、 $I_{so} / I_{po}$ 、である (p 偏光成分の検出感度に対する s 偏光成分の検出感度の比に相当する。)。式 (6) 中の  $(I_p / I_s)$  の値に単一の発光粒子についての値を代入すれば、その発光粒子の偏光度が算出され、複数の発光粒子の、例えば、検出された全ての発光粒子の強度の総和若しくは平均値を代入すれば、それらの平均の偏光度が算出される。

[0050] 補正值 C は、例えば、偏光度が既知の蛍光色素について、上記の光の測定及び発光粒子の信号の検出 (ステップ 100 ~ 160) を実行して、個々の発光粒子の P 偏光成分強度  $I_p$  及び s 偏光成分強度  $I_s$  を算定した後、それらの強度比  $(I_p / I_s)$  の平均値  $(I_p / I_s)_{av}$  と、既知の偏光度  $P_k$  と

を用いて、

[数2]

$$C = \frac{I_p}{I_s} \frac{P_k}{(1-pk)} \quad \dots \text{ ( け )}$$

により算出可能である。また、補正值Cは、励起光として無偏光の光を用いて計測される強度検出値  $I_{so}$  と強度検出値  $I_{po}$  との比を用いて決定されてもよい。

[0051] かくして、上記の本発明の光分析技術によれば、光検出領域により試料溶液中にて走査して発光粒子を個別に検出する走査分子計数法に於いて、発光粒子の偏光特性を観測することが可能となる。既に述べた如く、偏光特性は、粒子の大きさや形状を反映した物理量であるので、本発明によれば、任意の観測したい粒子に発光標識を付与することによって発光粒子とし、かかる発光粒子の偏光特性を観測することによって、観測したい粒子の大きさ、構造又はそれらの変化、或いは、種々の分子間相互作用に関する情報を得ることが可能となる。特に、本発明に於いては、単一の発光粒子の偏光特性が個別に検出されることとなるので、試料溶液中に於いて数密度の少ない発光粒子の偏光特性が観測可能となることが期待される。

[0052] 上記に説明した本発明の有効性を検証するために、以下の如き実験を行った。なお、以下の実施例は、本発明の有効性を例示するものであって、本発明の範囲を限定するものではないことは理解されるべきである。

#### 実施例 1

[0053] 本発明により発光粒子の偏光特性が観測されることを検証した。

[0054] 発光粒子として、蛍光色素であるTAMRAと、インタカレータ蛍光色素であるSYTOX Orangeにて染色されたプラスミドとを用いて、これらの発光粒子の偏光特性を観測した。試料溶液として、TAMRAを10 pMにて含む溶液 (TAMRA溶液) と、SYTOX Orange (インビトロジェン社、Cat. No. S-1 1368) を10 nMにて含むリン酸緩衝液 (0 .

0.5% Tween 20を含む)中にプラスミド (pBR322、タカラバイオ株式会社、Cat. No. 3035) を、その濃度が10 pMとなるように溶解した溶液 (プラスミド溶液) を調製した。なお、SYTOX Orangeは、DNA (プラスミド) に結合すると、蛍光強度が約500倍増大する蛍光色素である。光の測定に於いては、光分析装置として、共焦点蛍光顕微鏡の光学系とフォトンカウンティングシステムを備えた1分子蛍光測定装置MF20 (オリンパス株式会社) を用い、上記の「(2) 試料溶液の光強度の測定」にて説明した態様に従って、上記の試料溶液について、s偏光成分及びp偏光成分の時系列光強度データ (フォトンカウントデータ) を同時に且つ別々に取得した。その際、TAMRA溶液及びプラスミド溶液の両方について、励起光は、543 nmのレーザー光を用い、バンドパスフィルターを用いて、560 - 620 nmの波長帯域の光を検出した。また、励起光の偏光方向は、検出光のP偏光成分と同じ方向となるよう設定した。試料溶液中に於ける光検出領域の移動速度は、15 mm/秒と設定し、BIN TIMEを10  $\mu$ 秒とし、測定時間は、2秒間とした。光強度の測定後、上記の「(3) (i) 発光粒子に対応する信号の検出」に記載された処理手順に従って、各試料溶液の各偏光成分について取得された時系列光強度データにスムージング処理を施し、スムージングされたデータに於いて、パルス信号の始点及び終点を決定した後、各パルス信号にガウス関数を最小二乗法によりフィッティングして、(ガウス関数に於ける) ピーク強度、パルス幅 (半値全幅)、相関係数を決定した。そして、下記の条件:

$$20 \mu\text{秒} < \text{パルス幅} < 400 \mu\text{秒}$$

$$\text{ピーク強度} > 1.0 [\text{pc} / 10 \mu\text{S}] \quad \dots (A)$$

$$\text{相関係数} > 0.95$$

を満たすパルス信号のみを発光粒子に対応する信号であると判定する一方、上記の条件を満たさないパルス信号はノイズとして無視した。

[0055] 図6 (A) 及び (B) は、それぞれ、TAMRA溶液及びプラスミド溶液について検出された個々の発光粒子の信号のs偏光成分強度  $I_s$  に対して対



応する信号のP偏光成分強度  $I_p$  をプロットした図を示している (強度  $I_s$ 、 $I_p$  は、それぞれ、発光粒子の信号のフィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値とした。)。同図を参照して、s偏光成分強度  $I_s$  に対するp偏光成分強度  $I_p$  のプロットは、概ね、直線上に分布し、TAMRA溶液に於いて、s偏光成分強度  $I_s$  に対するp偏光成分強度  $I_p$  の比  $I_p / I_s$  の平均値  $(I_p / I_s)_{av}$  [s偏光成分強度  $I_s$  に対するp偏光成分強度  $I_p$  のプロットの傾き] は、1.314であり、プラスミド溶液に於いて、 $(I_p / I_s)_{av}$  は、2.902であった。このことは、本発明に従って検出された偏光成分の強度比 (偏光特性値の一つの例) は、粒子に固有の値であり、発光粒子の偏光特性を表していることを示唆している。

[0056] 更に、蛍光色素TAMRAの偏光度Pは、0.034であることが分かっている。かかる偏光度Pと、上記のTAMRA溶液についての測定結果から算定された  $(I_p / I_s)_{av}$  (= 1.314) とを用いて、式(8)により、式(7)中の補正值Cは、 $C = 0.815$  と算定された。この補正值Cを用いて、プラスミド溶液についての測定結果から算定された  $(I_p / I_s)_{av}$  (= 2.902) から式(7)により算定されるプラスミドの偏光度Pは、0.406であった。

[0057] かくして、上記の実施例の結果から理解される如く、上記の本発明の光分析技術によれば、走査分子計数法に於いて発光粒子の偏光特性が観測となる。特に、本発明の光分析技術は、単一の発光粒子の偏光成分を個別に検出して偏光特性値を算定するよう構成されているので、本発明によれば、試料溶液中の発光粒子濃度が、FCS、FIDA—PO等の光分析技術で要求される濃度域よりも低くても、発光粒子の偏光特性の観測が可能であり、かかる特徴は、医学・生物学の研究開発の分野でしばしば使用される希少な或いは高価な試料についての分析を行う場合に有利であろう。

## 請求の範囲

### [請求項1]

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出し分析する光分析装置であって、

前記光学系の光路を変更することにより前記試料溶液内に於いて前記光学系の光検出領域の位置を移動する光検出領域移動部と、

予め定められた偏光成分から成る励起光を前記光検出領域に照射する光照射部と、

前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する光検出部と、

前記試料溶液内に於いて前記光検出領域の位置を移動させながら前記光検出部にて検出された光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて前記発光粒子の各々からの光の信号を個別に検出し、前記検出された発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて前記発光粒子の偏光特性値を算定する信号処理部とを含むことを特徴とする装置。

### [請求項2]

請求項1の装置であって、前記光検出部が前記光検出領域からの光に於けるs偏光成分とp偏光成分の強度を別々に測定し、前記偏光特性値が、前記発光粒子の光の信号の前記s偏光成分の強度と前記p偏光成分の強度とに基づいて算定されることを特徴とする装置。

### [請求項3]

請求項1の装置であって、前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分が偏光ビームスプリッタを用いて前記光検出領域からの光から抽出されることを特徴とする装置。

### [請求項4]

請求項1の装置であって、前記偏光特性値が偏光度であることを特徴とする装置。

### [請求項5]

請求項1の装置であって、前記光検出部が前記光検出領域からの光に於けるs偏光成分の強度とp偏光成分の強度とを別々に測定し、前記信号処理部が、前記s偏光成分の強度の検出感度と前記p偏光成分

の強度の検出感度とのずれを補正する補正值を用いて、前記発光粒子の光の信号の前記 s 偏光成分の強度の検出値と前記 p 偏光成分の強度の検出値とに基づいて前記偏光特性値を算定することを特徴とする装置。

[請求項6] 請求項 1 の装置であって、前記信号処理部が前記発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間変化に対してフィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値を前記発光粒子の偏光特性値の算定に用いることを特徴とする装置。

[請求項7] 請求項 1 の装置であって、前記信号処理部が前記発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間積算値を前記発光粒子の偏光特性値の算定に用いることを特徴とする装置。

[請求項8] 請求項 1 の装置であって、前記信号処理部が、前記個別に検出された発光粒子の光の信号の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記発光粒子の数を計数することを特徴とする装置。

[請求項9] 請求項 1 乃至 8 のいずれかの装置であって、前記光検出領域移動部が前記発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて前記光検出領域の位置を移動することを特徴とする装置。

[請求項10] 共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出し分析する光分析方法であって、

前記光学系の光路を変更することにより前記試料溶液内に於いて前記光学系の光検出領域の位置を移動する過程と、

予め定められた偏光成分から成る励起光を前記光検出領域に照射する過程と、

前記試料溶液内に於いて前記光検出領域の位置を移動させながら前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する過程と、

前記検出された光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて前記

発光粒子の各々からの光の信号を個別に検出し、前記検出された発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて前記発光粒子の偏光特性値を算定する過程とを含むことを特徴とする方法。

[請求項11]

請求項10の方法であって、前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する過程に於いて、前記光検出領域からの光に於けるs偏光成分とp偏光成分の強度が別々に測定され、前記発光粒子の偏光特性値を算定する過程に於いて、前記偏光特性値が前記発光粒子の光の信号の前記s偏光成分の強度と前記p偏光成分の強度とに基づいて算定されることを特徴とする方法。

[請求項12]

請求項10の方法であって、前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分が偏光ビームスプリッタを用いて前記光検出領域からの光から抽出されることを特徴とする方法。

[請求項13]

請求項10の方法であって、前記偏光特性値が偏光度であることを特徴とする方法。

[請求項14]

請求項10の方法であって、前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する過程に於いて、前記光検出領域からの光に於けるs偏光成分の強度とp偏光成分の強度とが別々に測定され、前記発光粒子の偏光特性値を算定する過程に於いて、前記偏光特性値が、前記s偏光成分の強度の検出感度と前記p偏光成分の強度の検出感度とのずれを補正する補正值を用いて、前記発光粒子の光の信号の前記s偏光成分の強度の検出値と前記p偏光成分の強度の検出値とに基づいて算定されることを特徴とする方法。

[請求項15]

請求項10の方法であって、前記発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間変化に対してフィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値が前記発光粒子の偏光特性値の算定に用いられることを特徴とする方法。

[請求項16]

請求項10の方法であって、前記発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間積算値が前記発光粒子の偏光特性値の算

定に用いられることを特徴とする方法。

[請求項 17] 請求項 10 の方法であって、更に、前記個別に検出された発光粒子の光の信号の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記発光粒子の数を計数する過程を含むことを特徴とする方法。

[請求項 18] 請求項 10 乃至 17 のいずれかの方法であって、前記光検出領域の位置を移動する過程に於いて、前記光検出領域の位置が前記発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されることを特徴とする方法。

[請求項 19] 共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出し分析するための光分析用コンピュータプログラムであって、

前記試料溶液内に於いて前記光学系の光検出領域の位置を移動するべく前記光学系の光路を変更する手順と、

予め定められた偏光成分から成る励起光を前記光検出領域に照射する手順と、

前記試料溶液内に於いて前記光検出領域の位置を移動させながら前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する手順と、

前記検出された光の少なくとも一つの偏光成分の強度に於いて前記発光粒子の各々からの信号を個別に検出し、前記検出された発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度に基づいて前記発光粒子の偏光特性値を算定する手順と  
をコンピュータに実行させることを特徴とするコンピュータプログラム。

[請求項 20] 請求項 19 のコンピュータプログラムであって、前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する手順に於いて、前記光検出領域からの光に於ける s 偏光成分と p 偏光成分の強度が別々に測定され、前記発光粒子の偏光特性値を算定する手順に於いて、

前記偏光特性値が前記発光粒子の光の信号の前記 s 偏光成分の強度と前記 P 偏光成分の強度とに基づいて算定されることを特徴とするコンピュータプログラム。

[請求項21] 請求項 19 のコンピュータプログラムであって、前記偏光特性値が偏光度であることを特徴とするコンピュータプログラム。

[請求項22] 請求項 19 のコンピュータプログラムであって、前記光検出領域からの光の少なくとも一つの偏光成分の強度を検出する手順に於いて、前記光検出領域からの光に於ける s 偏光成分の強度と p 偏光成分の強度とが別々に測定され、前記発光粒子の偏光特性値を算定する手順に於いて、前記偏光特性値が、前記 s 偏光成分の強度の検出感度と前記 P 偏光成分の強度の検出感度とのずれを補正する補正值を用いて、前記発光粒子の光の信号の前記 s 偏光成分の強度の検出値と前記 p 偏光成分の強度の検出値とに基づいて算定されることを特徴とするコンピュータプログラム。

[請求項23] 請求項 19 のコンピュータプログラムであって、前記発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間変化に対してフィッティングされた釣鐘型関数の時間積分値が前記発光粒子の偏光特性値の算定に用いられることを特徴とするコンピュータプログラム。

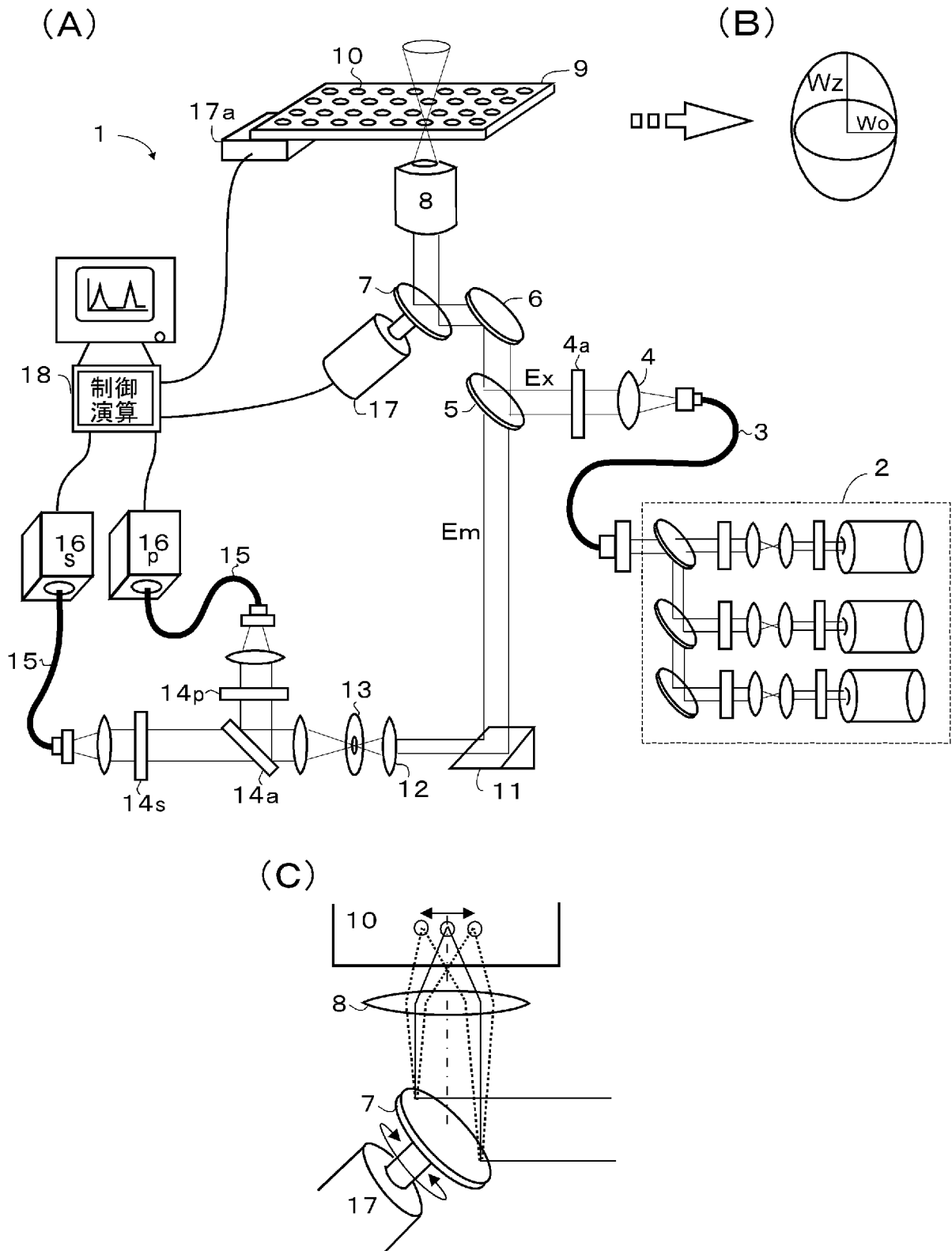
[請求項24] 請求項 19 のコンピュータプログラムであって、前記発光粒子の光の信号の少なくとも一つの偏光成分の強度の時間積算値が前記発光粒子の偏光特性値の算定に用いられることを特徴とするコンピュータプログラム。

[請求項25] 請求項 19 のコンピュータプログラムであって、更に、前記個別に検出された発光粒子の光の信号の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記発光粒子の数を計数する手順を含むことを特徴とするコンピュータプログラム。

[請求項26] 請求項 19 乃至 25 のいずれかのコンピュータプログラムであって、前記光学系の光路を変更する手順に於いて、前記光検出領域の位置

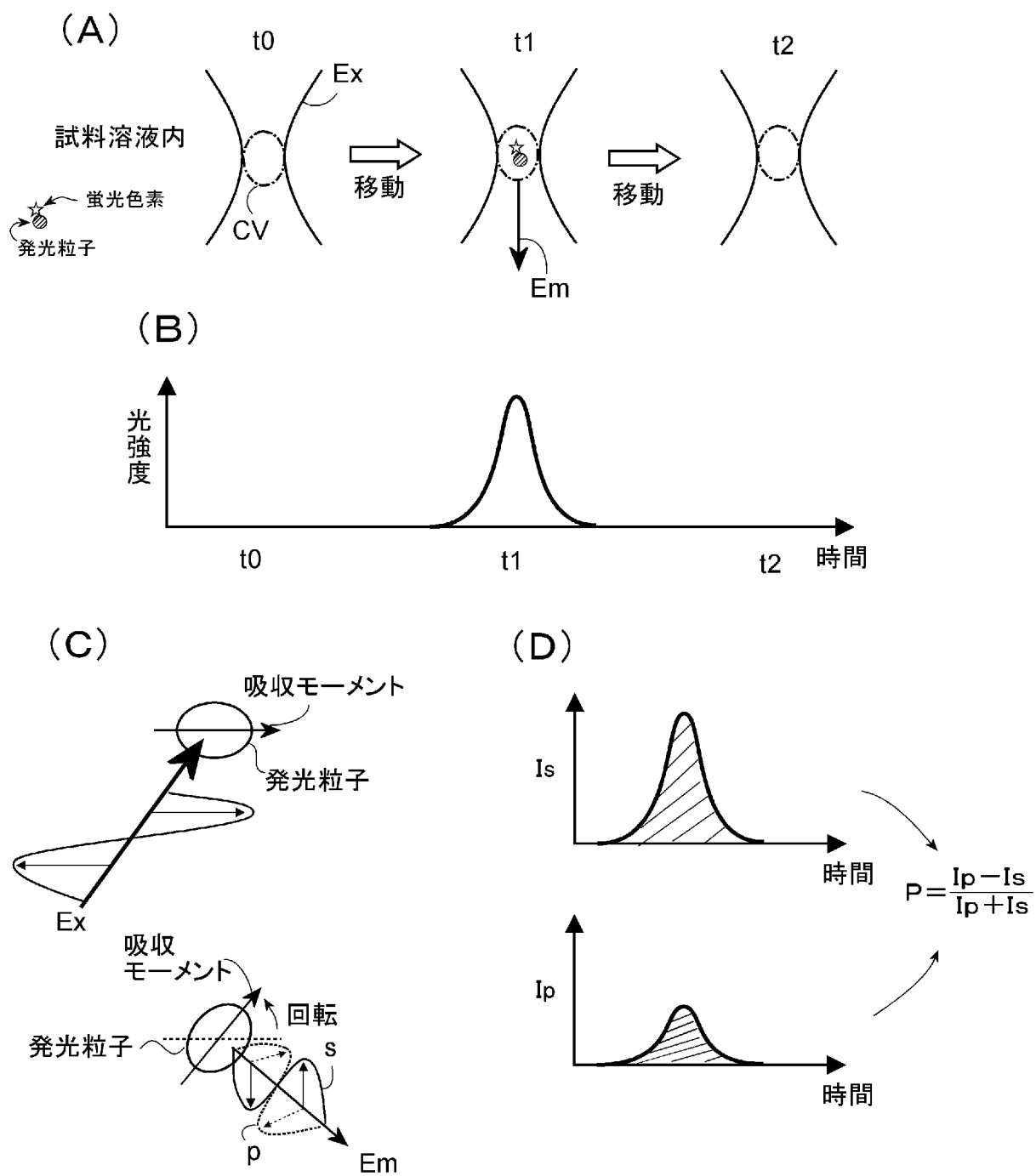
が前記発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されることを特徴とするコンピュータプログラム。

[図1]

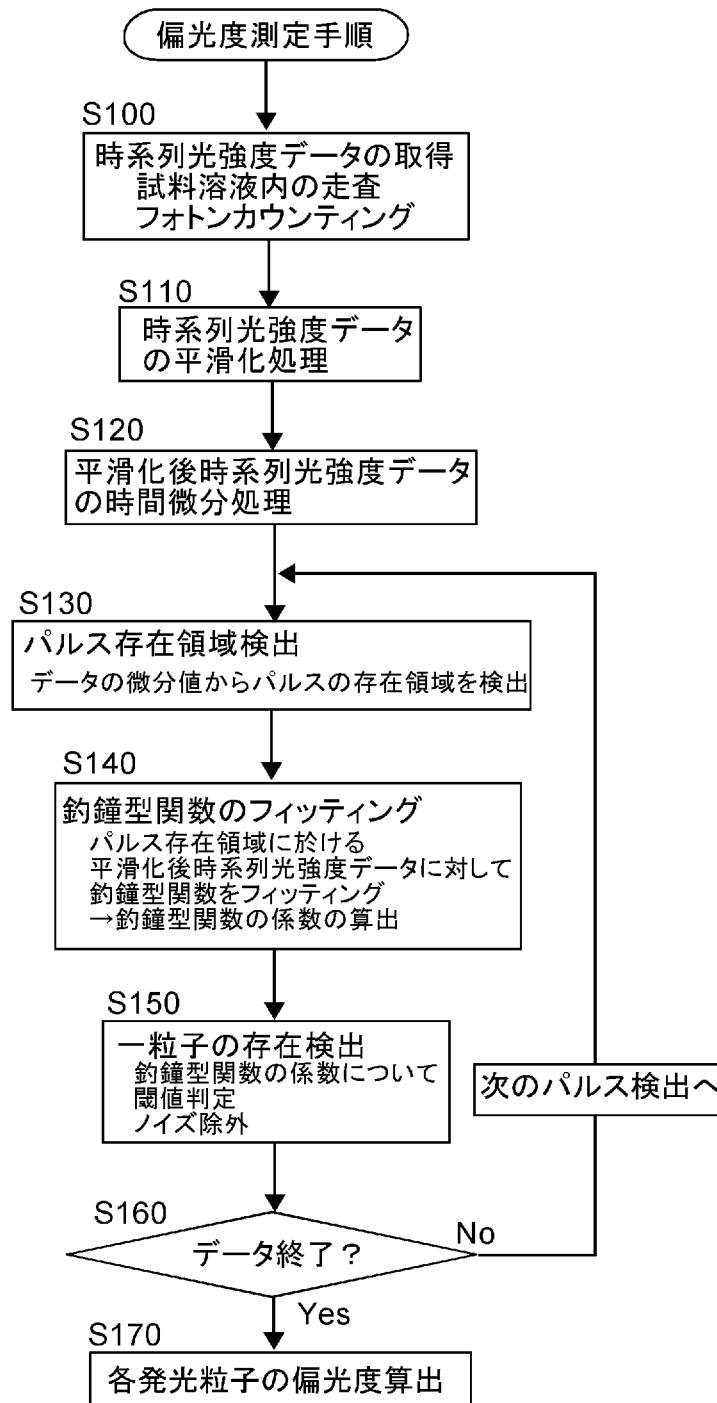




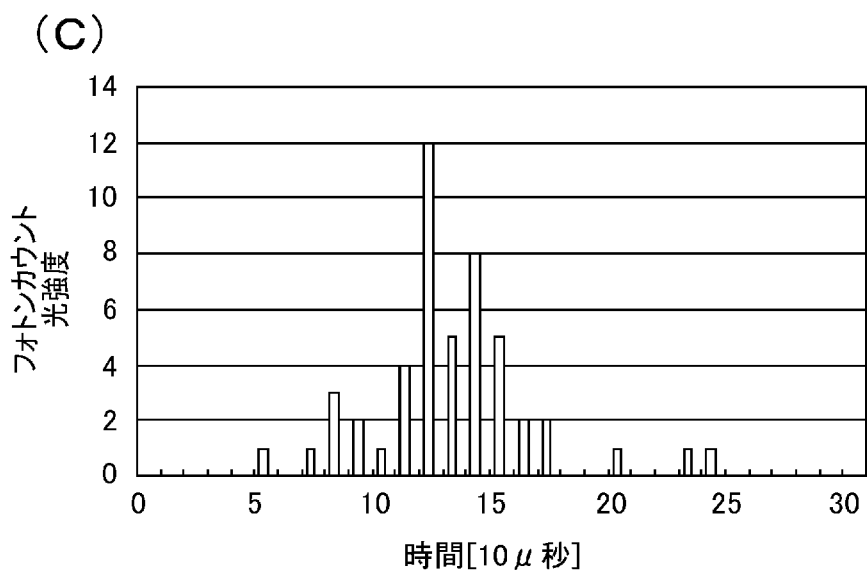
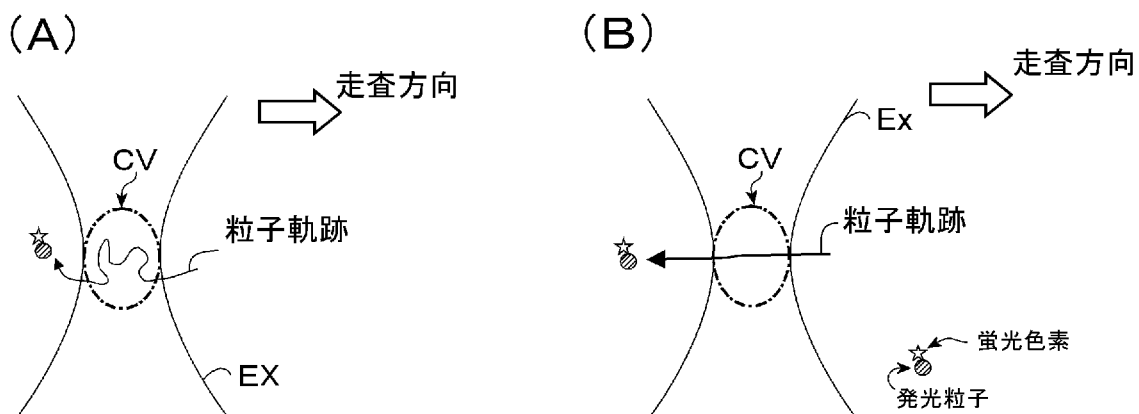
[図2]



[図3]

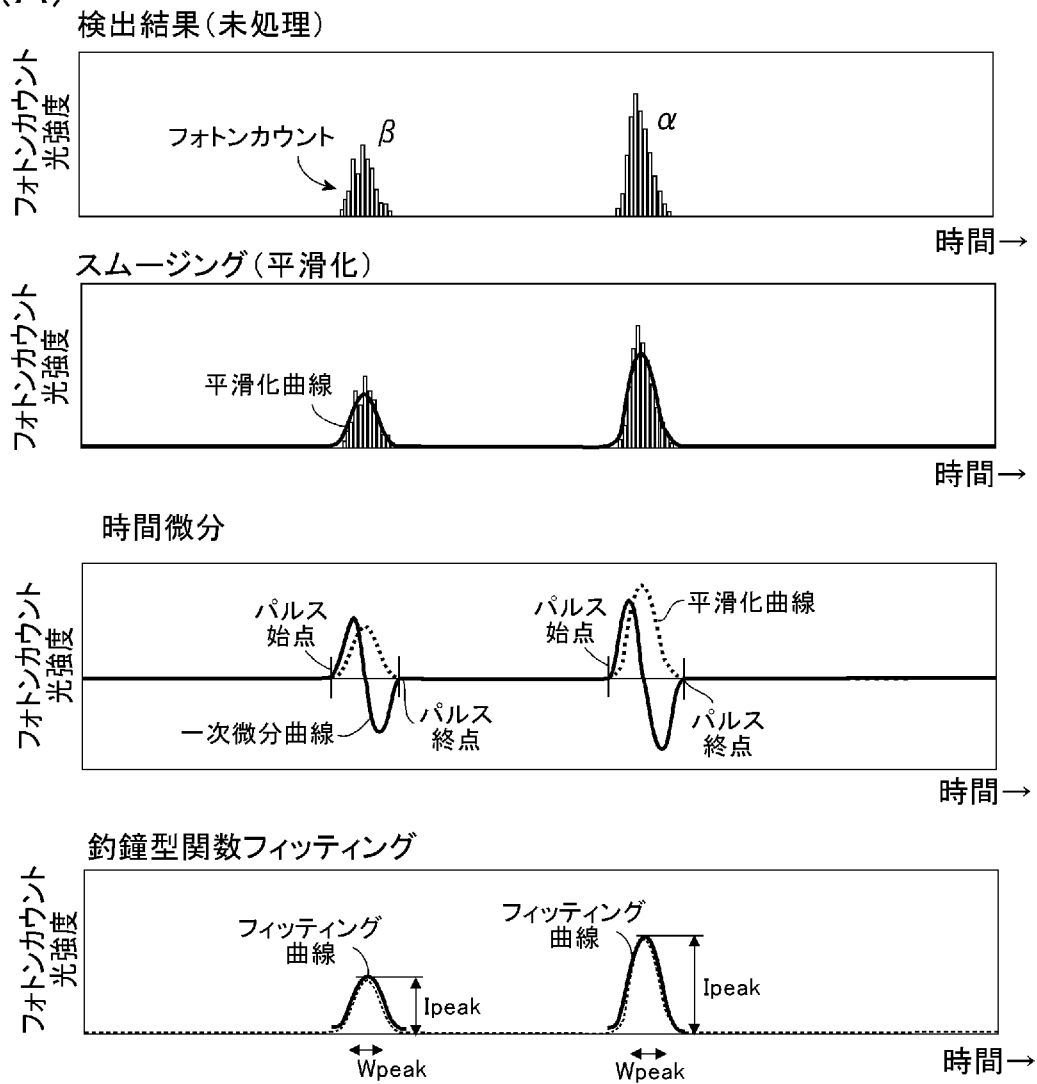


[図4]

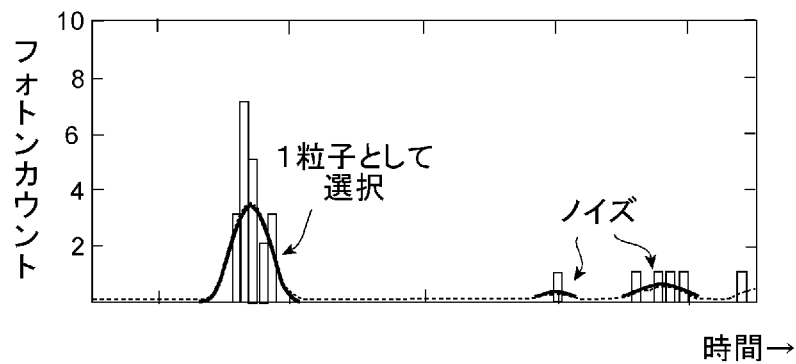


[図5]

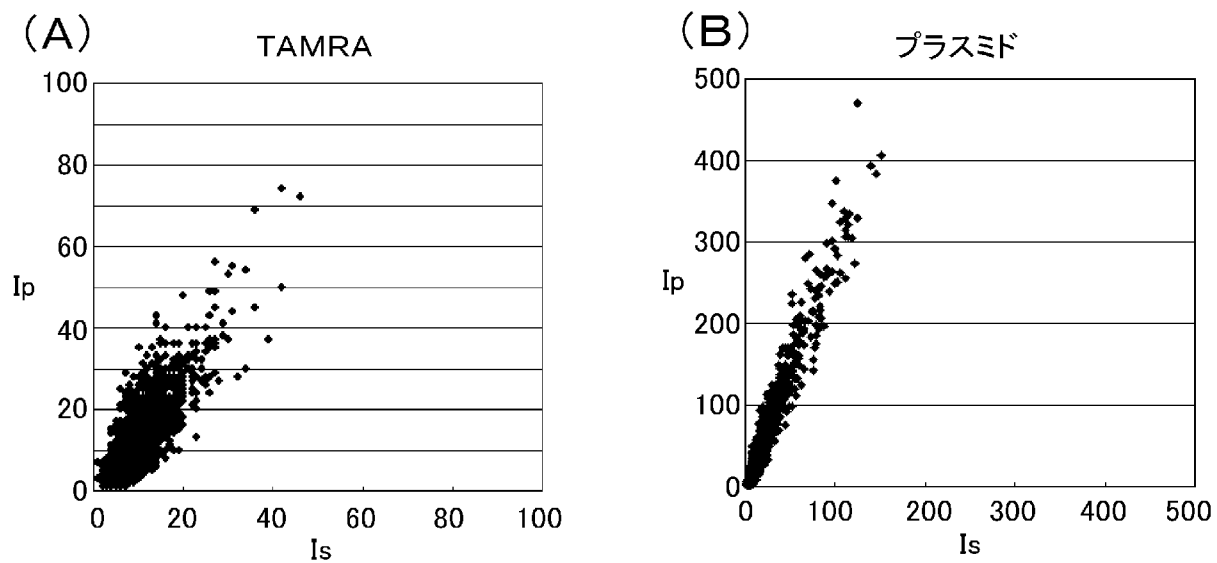
(A)



(B)

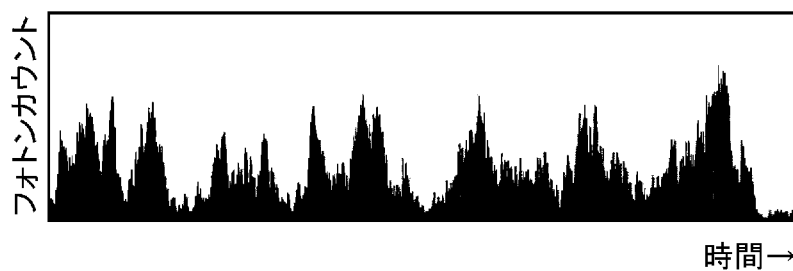
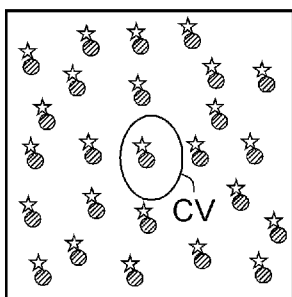


[図6]

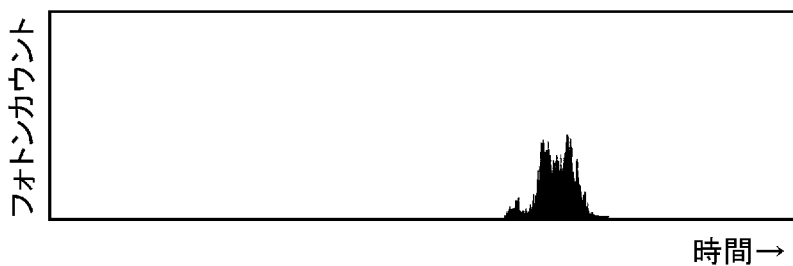
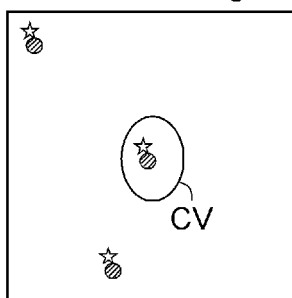


[図7]

(A) 高濃度 (e.g. ~1nM)



(B) 低濃度 (e.g. ~1pM)



蛍光色素  
発光粒子

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072939

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21 / 64 (2006.01) i , G02B21 / 00 (2006.01) i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21 / 62 - 21 / 78 , G02B21 / 00

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

Jitsuyo	Shinan	Koho	1922-1	996	Jitsuyo	Shinan	Toroku	Koho	1996-2011
Kokai	Jitsuyo	Shinan	Koho	1971-2011	Toroku	Jitsuyo	Shinan	Koho	1994-2011

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

JST Plus (JDreaml I)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-288161 A (Olympus Corp.), 10 December 2009 (10.12.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-26
Y	JP 2009-145242 A (Olympus Corp.), 02 July 2009 (02.07.2009), entire text (Family: none)	1-26
Y	JP 2005-99662 A (Olympus Corp.), 14 April 2005 (14.04.2005), claims 1, 7 & US 2004/0150880 A1 & US 2006/0158721 A1	1-26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 November , 2011 (15.11.11)Date of mailing of the international search report  
29 November , 2011 (29.11.11)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072939

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/117033 A2 (SINGULEX, INC.), 24 September 2009 (24.09.2009), claims 28, 37; paragraphs [0067], [0071], [0178] to [0180], [0198], [0214] & JP 2011-508219 A & US 2009/0159812 A1 & EP 2232271 A	1-26
A	JP 2008-116440 A (Shiga-Ken), 22 May 2008 (22.05.2008), paragraphs [0001] to [0006] (Family: none)	1-26
P, A	JP 2011-2415 A (Olympus Corp.), 06 January 2011 (06.01.2011), entire text; all drawings (Family: none)	1-26
P, A	WO 2011/108371 A1 (Olympus Corp.), 09 September 2011 (09.09.2011), entire text; all drawings (Family: none)	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/64 (2006.01) i , G02B21/00 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/62- 21/78 , G02B21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-  
 日本国公開実用新案公報 1971-2  
 日本国実用新案登録公報 1996-  
 日本国登録実用新案公報 1994-2

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

JSTPlus (JDream1)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-288161 A (オリンパス株式会社) 2009. 12. 10, 全文全図 (ファミリーなし)	1 - 26
Y	JP 2009-145242 A (オリンパス株式会社) 2009. 07. 02, 全文 (ファミリーなし)	1 - 26
Y	JP 2005-99662 A (オリンパス株式会社) 2005. 04. 14, 請求項 1,7 & US 2004/0150880 A1 & US 2006/0158721 A1	1 - 26

? c 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- IA 「特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
- IE 「国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- I 「優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- Iθ 「口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- IP 「国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- IT 「国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- IX 「特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- IY 「特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- I& 「同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 11. 2011	国際調査報告の発送日 29. 11. 2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA / JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 裕美 電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2W 9515



C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	wo 2009/117033 A2 (SINGULEX, INC.) 2009. 09. 24, Claira28, 37, [0067] [0071] [0178] - [0180] [0198] [0214] & JP 2011-508219 A & US 2009/0159812 AI & EP 2232271 A	1 - 26
A	JP 2008- 116440 A (滋賀県) 2008. 05. 22, [0001] - [0006] (ファミリーなし)	1 - 26
P, A	JP 2011-2415 A (オリンパス株式会社) 2011. 01. 06, 全文全図 (ファミリーなし)	1 - 26
P, A	Wo 2011/108371 A1 (オリンパス株式会社) 2011. 09. 09, 全文全図 (ファミリーなし)	1 - 26