

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-281831  
(P2009-281831A)

(43) 公開日 平成21年12月3日(2009.12.3)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
**GO 1 N 21/64 (2006.01)** GO 1 N 21/64 B 2 GO 4 3  
 GO 1 N 21/64 F

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2008-133562 (P2008-133562)	(71) 出願人	000236436 浜松ホトニクス株式会社 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1
(22) 出願日	平成20年5月21日 (2008.5.21)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
		(74) 代理人	100092657 弁理士 寺崎 史朗
		(74) 代理人	100124291 弁理士 石田 悟
		(72) 発明者	高本 尚宜 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内
		(72) 発明者	長谷川 寛 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内

最終頁に続く

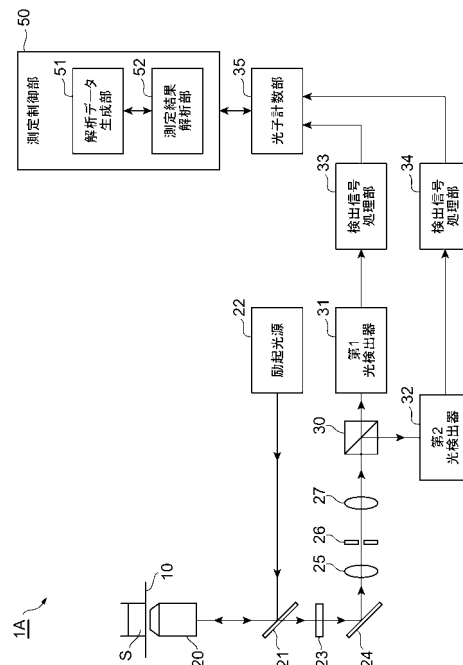
(54) 【発明の名称】 蛍光解析装置及び解析方法

(57) 【要約】

【課題】 試料の蛍光解析を好適に実行可能な蛍光解析装置及び解析方法を提供する。

【解決手段】 試料Sの測定領域に励起光を照射する励起光源22と、測定領域内の蛍光プローブからの蛍光を分岐するビームスプリッタ30と、分岐された蛍光成分をそれぞれ検出する第1、第2光検出器31、32と、光検出器31、32でそれぞれ検出された光子数を時系列的に計数して、第1、第2測定データ $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$ を取得する光子計数部35と、解析データ生成部51及び測定結果解析部52を含む測定制御部50とによって解析装置1Aを構成する。生成部51は、 $F_A \cdot F_B = 0$ の場合に $n_{AB} = 0$ となり、 $F_A \cdot F_B > 0$ の場合に所定の関数 $f$ で $n_{AB} = f(F_A, F_B)$ となる光子数解析データ $n_{AB}(t)$ を生成し、解析部52は、解析データに対して蛍光解析を行う。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

測定試料に対して設定された測定領域に励起光を照射する励起光照射手段と、  
 前記励起光照射手段によって前記励起光が照射された前記測定試料の前記測定領域内に  
 ある蛍光プローブから発生する蛍光を 2 つの蛍光成分に分岐する光分岐手段と、  
 分岐された一方の第 1 蛍光成分を検出する第 1 蛍光検出手段と、  
 分岐された他方の第 2 蛍光成分を検出する第 2 蛍光検出手段と、  
 前記第 1 蛍光検出手段及び前記第 2 蛍光検出手段でそれぞれ検出された光子数を所定の  
 計数時間幅で時系列的に計数して、第 1 光子数測定データ  $F_A(t)$  及び第 2 光子数測定  
 データ  $F_B(t)$  を取得する光子計数手段と、  
 前記第 1 光子数測定データ  $F_A(t)$  及び前記第 2 光子数測定データ  $F_B(t)$  に基づ  
 いて、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の少なくとも一方が 0 の場合に

$$n_{AB}(t) = 0$$

となり、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が 0 でない場合に所定の関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = f(F_A(t), F_B(t))$$

となる光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成する解析データ生成手段と、

前記解析データ生成手段で生成された前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  に対し、前記  
 蛍光プローブを含む前記測定試料の測定結果についての蛍光解析を行う測定結果解析手段  
 と

を備えることを特徴とする蛍光解析装置。

## 【請求項 2】

前記解析データ生成手段は、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が 0 でない場合  
 に、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の相乗平均となる関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = (F_A(t) \cdot F_B(t))$$

によって前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成することを特徴とする請求項 1 記載の  
 蛍光解析装置。

## 【請求項 3】

前記解析データ生成手段は、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が 0 でない場合  
 に、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の調和平均となる関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = 2 / \{ 1 / F_A(t) + 1 / F_B(t) \}$$

によって前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成することを特徴とする請求項 1 記載の  
 蛍光解析装置。

## 【請求項 4】

前記測定結果解析手段は、前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  に対し、前記蛍光解析と  
 して、自己相関解析またはフォトンパースト解析の少なくとも一方を行うことを特徴とす  
 る請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の蛍光解析装置。

## 【請求項 5】

前記測定結果解析手段は、前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を所定のビン時間幅でビ  
 ニングし、ビンングされた解析データに対して前記蛍光解析を行うことを特徴とする請  
 求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の蛍光解析装置。

## 【請求項 6】

前記励起光は単一波長領域の励起光であり、前記第 1 蛍光成分及び前記第 2 蛍光成分は  
 同一波長領域の蛍光成分であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の蛍  
 光解析装置。

## 【請求項 7】

測定試料に対して設定された測定領域に励起光を照射する励起光照射ステップと、  
 前記励起光照射ステップで前記励起光が照射された前記測定試料の前記測定領域内に  
 ある蛍光プローブから発生する蛍光を 2 つの蛍光成分に分岐する光分岐ステップと、  
 分岐された一方の第 1 蛍光成分を検出する第 1 蛍光検出ステップと、  
 分岐された他方の第 2 蛍光成分を検出する第 2 蛍光検出ステップと、

前記第1蛍光検出ステップ及び前記第2蛍光検出ステップでそれぞれ検出された光子数を所定の計数時間幅で時系列的に計数して、第1光子数測定データ  $F_A(t)$  及び第2光子数測定データ  $F_B(t)$  を取得する光子計数ステップと、

前記第1光子数測定データ  $F_A(t)$  及び前記第2光子数測定データ  $F_B(t)$  に基づいて、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の少なくとも一方が0の場合に

$$n_{AB}(t) = 0$$

となり、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が0でない場合に所定の関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = f(F_A(t), F_B(t))$$

となる光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成する解析データ生成ステップと、

前記解析データ生成ステップで生成された前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  に対し、前記蛍光プローブを含む前記測定試料の測定結果についての蛍光解析を行う測定結果解析ステップと

を備えることを特徴とする蛍光解析方法。

#### 【請求項8】

前記解析データ生成ステップにおいて、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が0でない場合に、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の相乗平均となる関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = (F_A(t) \cdot F_B(t))$$

によって前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成することを特徴とする請求項7記載の蛍光解析方法。

#### 【請求項9】

前記解析データ生成ステップにおいて、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が0でない場合に、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の調和平均となる関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = 2 / \{ 1 / F_A(t) + 1 / F_B(t) \}$$

によって前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成することを特徴とする請求項7記載の蛍光解析方法。

#### 【請求項10】

前記測定結果解析ステップにおいて、前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  に対し、前記蛍光解析として、自己相関解析またはフォトンバースト解析の少なくとも一方を行うことを特徴とする請求項7～9のいずれか一項記載の蛍光解析方法。

#### 【請求項11】

前記測定結果解析ステップにおいて、前記光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を所定のピン時間幅でビンングし、ビンングされた解析データに対して前記蛍光解析を行うことを特徴とする請求項7～10のいずれか一項記載の蛍光解析方法。

#### 【請求項12】

前記励起光は単一波長領域の励起光であり、前記第1蛍光成分及び前記第2蛍光成分は同一波長領域の蛍光成分であることを特徴とする請求項7～11のいずれか一項記載の蛍光解析方法。

#### 【請求項13】

前記測定試料に加える前記蛍光プローブとして1種類の蛍光プローブのみを用いるとともに、前記測定試料に含まれる標的分子に2個以上の同一種類の前記蛍光プローブが結合する場合の前記蛍光解析に適用されることを特徴とする請求項7～12のいずれか一項記載の蛍光解析方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、測定試料中の蛍光プローブから発生する蛍光を検出して、測定試料についての解析を行う蛍光解析装置、及び蛍光解析方法に関するものである。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

蛍光相関分光法 ( FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy ) は、極低濃度の

10

20

30

40

50

蛍光物質が存在する測定試料溶液中の微小領域に励起光を照射して測定領域とし、測定領域内で発生した蛍光の強度を時系列的に測定して自己相関関数を求めることで、試料中の蛍光物質の並進拡散運動等の情報を得るものである（例えば特許文献1～3参照）。このような蛍光解析法は、例えば臨床診断における免疫分析に適用可能である。

【特許文献1】特開2007-20565号公報

【特許文献2】特開2007-316017号公報

【特許文献3】特開2006-17628号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上記した蛍光解析では、蛍光物質によって標識された分子プローブ（蛍光プローブ）を測定試料に加え、測定領域内にある蛍光プローブからの蛍光を検出するとともに、その自己相関関数から並進拡散運動等についての情報を取得する。これにより、分析対象となる試料中の標的分子と、蛍光プローブとの反応量を知ることができ、測定試料についての情報を取得することができる。このような試料解析方法は、ホモジニアス・アッセイにおける非分離型の計測方法であるため、ELISA法などのヘテロジニアス・アッセイに比べて、消耗品類の消費を少なくしてランニングコストを低減することが可能である。また、解析装置の小型化、低価格化も可能である。

【0004】

一方、FCSなどの手法を用いた蛍光解析において、その測定感度や効率等のさらなる向上が求められている。そのような方法の1つとして、標的分子に対して複数個の蛍光プローブを凝集するように結合させ、それらの蛍光プローブからの蛍光を検出する蛍光解析方法が提案されている（例えば特許文献1、2参照）。しかしながら、このような方法では、複数個の蛍光プローブが結合した標的分子からの蛍光検出イベントと、それ以外のノイズイベントとの識別が難しいという問題がある。

【0005】

本発明は、以上の問題点を解決するためになされたものであり、測定領域内にある蛍光プローブからの蛍光を測定することによる測定試料の蛍光解析を好適に実行することが可能な蛍光解析装置、及び蛍光解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】

【0006】

このような目的を達成するために、本発明による蛍光解析装置は、(1)測定試料に対して設定された測定領域に励起光を照射する励起光照射手段と、(2)励起光照射手段によって励起光が照射された測定試料の測定領域内にある蛍光プローブから発生する蛍光を2つの蛍光成分に分岐する光分岐手段と、(3)分岐された一方の第1蛍光成分を検出する第1蛍光検出手段と、(4)分岐された他方の第2蛍光成分を検出する第2蛍光検出手段と、(5)第1蛍光検出手段及び第2蛍光検出手段でそれぞれ検出された光子数を所定の計数時間幅で時系列的に計数して、第1光子数測定データ $F_A(t)$ 及び第2光子数測定データ $F_B(t)$ を取得する光子計数手段と、(6)第1光子数測定データ $F_A(t)$ 及び第2光子数測定データ $F_B(t)$ に基づいて、測定データ $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$ の少なくとも一方が0の場合に

$$n_{AB}(t) = 0$$

となり、測定データ $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$ の両者が0でない場合に所定の関数 $f$ で

$$n_{AB}(t) = f(F_A(t), F_B(t))$$

となる光子数解析データ $n_{AB}(t)$ を生成する解析データ生成手段と、(7)解析データ生成手段によって生成された光子数解析データ $n_{AB}(t)$ に対し、蛍光プローブを含む測定試料の測定結果についての蛍光解析を行う測定結果解析手段とを備えることを特徴とする。

【0007】

また、本発明による蛍光解析方法は、(1)測定試料に対して設定された測定領域に励

10

20

30

40

50

起光を照射する励起光照射ステップと、(2) 励起光照射ステップで励起光が照射された測定試料の測定領域内にある蛍光プローブから発生する蛍光を2つの蛍光成分に分岐する光分岐ステップと、(3) 分岐された一方の第1蛍光成分を検出する第1蛍光検出ステップと、(4) 分岐された他方の第2蛍光成分を検出する第2蛍光検出ステップと、(5) 第1蛍光検出ステップ及び第2蛍光検出ステップでそれぞれ検出された光子数を所定の計数時間幅で時系列的に計数して、第1光子数測定データ  $F_A(t)$  及び第2光子数測定データ  $F_B(t)$  を取得する光子計数ステップと、(6) 第1光子数測定データ  $F_A(t)$  及び第2光子数測定データ  $F_B(t)$  に基づいて、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の少なくとも一方が0の場合に

$$n_{A,B}(t) = 0$$

となり、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が0でない場合に所定の関数  $f$  で

$$n_{A,B}(t) = f(F_A(t), F_B(t))$$

となる光子数解析データ  $n_{A,B}(t)$  を生成する解析データ生成ステップと、(7) 解析データ生成ステップにおいて生成された光子数解析データ  $n_{A,B}(t)$  に対し、蛍光プローブを含む測定試料の測定結果についての蛍光解析を行う測定結果解析ステップとを備えることを特徴とする。

#### 【0008】

上記した蛍光解析装置、及び蛍光解析方法においては、励起光照射系及び蛍光検出系によって測定試料中に微小な測定領域を設定する。また、測定領域内の蛍光プローブで発生する蛍光に対して光分岐手段を設けるとともに、蛍光検出系として第1、第2蛍光検出手段を設置して第1、第2光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  を取得する。そして、それらの測定データを直接に蛍光解析に用いるのではなく、 $F_A(t) \cdot F_B(t) = 0$  のときに0となる解析データ  $n_{A,B}(t)$  を生成して蛍光解析を行っている。

#### 【0009】

このような構成では、光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  に代えて光子数解析データ  $n_{A,B}(t)$  を用いることにより、第1、第2蛍光検出手段での蛍光検出の同時性を考慮した形で蛍光解析を実行することができる。これにより、例えば、複数個の蛍光プローブが結合した標的分子からの蛍光検出イベントと、それ以外のノイズイベントとの識別精度を向上するなど、測定試料の蛍光解析の精度を向上することが可能となる。

#### 【0010】

ここで、測定試料に対する蛍光解析に用いられる励起光、蛍光については、励起光は単一波長領域の励起光であり、第1蛍光成分及び第2蛍光成分は同一波長領域の蛍光成分である構成を用いることが可能である。このような構成は、測定試料に加える蛍光プローブとして1種類の蛍光プローブのみを用いるとともに、試料に含まれる標的分子に2個以上の同一種類の蛍光プローブが結合する場合の蛍光解析に好適に適用することができる。

#### 【0011】

光子数測定データから解析データへのデータ変換については、具体的には例えば、解析データ生成において、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が0でない場合に、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の相乗平均となる関数  $f$  で

$$n_{A,B}(t) = (F_A(t) \cdot F_B(t))$$

によって光子数解析データ  $n_{A,B}(t)$  を生成することが好ましい。このように相乗平均を用いて解析データを求めることにより、蛍光検出の同時性が考慮された蛍光解析を好適に実行することができる。また、この方法では、測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  の少なくとも一方が0の場合においても、相乗平均の上記関数  $(F_A \cdot F_B)$  で  $n_{A,B} = 0$  となる。

#### 【0012】

あるいは、解析データ生成において、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の両者が0でない場合に、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の調和平均となる関数  $f$  で

$$n_{A,B}(t) = 2 / \{ 1 / F_A(t) + 1 / F_B(t) \}$$

によって光子数解析データ  $n_{A,B}(t)$  を生成する構成を用いても良い。このように調和平均を用いて解析データを求めることにより、相乗平均の場合と同様に、蛍光検出の同時

10

20

30

40

50

性が考慮された蛍光解析を好適に実行することができる。

【0013】

光子数解析データを用いた蛍光解析については、具体的には、測定結果解析において、光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  に対し、蛍光解析として、自己相関解析またはフォトンバースト解析の少なくとも一方を行うことが好ましい。このように、自己相関解析法、フォトンバースト解析法、あるいはそれらを組み合わせた解析法を用いることにより、測定試料の蛍光解析を精度良く実行することができる。

【0014】

また、測定結果解析において、光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を所定のビン時間幅でビンニングし、ビンニングされた解析データに対して蛍光解析を行う構成としても良い。この場合、具体的な測定条件等に応じて解析データのビン時間幅を設定することにより、蛍光解析の精度を向上することができる。

10

【発明の効果】

【0015】

本発明の蛍光解析装置及び解析方法によれば、試料中に設定された測定領域内にある蛍光プローブからの蛍光に対して光分岐手段を設けるとともに、第1、第2蛍光検出手段を設置して第1、第2光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  を取得し、それらの測定データから少なくとも一方が0の場合に  $n_{AB} = 0$  となる解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成して蛍光解析を行うことにより、2つの検出手段での蛍光検出の同時性を考慮した形で蛍光解析を実行して、測定試料の蛍光解析の精度を向上することが可能となる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、図面とともに本発明による蛍光解析装置、及び蛍光解析方法の好適な実施形態について詳細に説明する。なお、図面の説明においては同一要素には同一符号を付し、重複する説明を省略する。また、図面の寸法比率は、説明のものと必ずしも一致していない。

【0017】

図1は、本発明による蛍光解析装置の一実施形態の構成を概略的に示す図である。本実施形態による蛍光解析装置1Aは、測定試料Sに対して設定された測定領域内にある蛍光プローブから発生する蛍光を検出して時系列の光子数測定データを取得し、得られた測定データに対して所定の蛍光解析を行うことで測定試料Sについての情報を取得するものである。以下においては、試料S中において測定対象となる蛍光物質（蛍光物質によって標識された分子等を含む）を「蛍光プローブ」とする。

30

【0018】

本蛍光解析装置1Aによる解析対象の一例としては、図2に示す標的分子（ターゲット物質）T、及び蛍光プローブP1、P2を含むものが挙げられる。図2の模式図は、生体分子などの標的分子Tに対する蛍光プローブPの特異的結合を利用して標的分子Tについての情報を取得するホモジニアス・アッセイの一例を示すものである。

【0019】

具体的には、図2においては、3個所の認識部位  $t_1 \sim t_3$  を有する標的分子Tを含む試料（図2(a)）に対し、認識部位  $t_1$  に特異的に結合する認識部位を有する蛍光標識された分子プローブP1、及び認識部位  $t_2$  に特異的に結合する認識部位を有する蛍光標識された分子プローブP2（図2(b)）を蛍光プローブとして混合し、図2(c)に示すようにそれらを反応させて、蛍光解析の対象となる溶液状の測定試料Sとする。

40

【0020】

このような試料Sにおいて、蛍光プローブP1、P2が同一種類の分子プローブである場合、または蛍光プローブP1、P2の蛍光物質が同一種類の物質である場合、試料Sで発生する蛍光は単一波長領域の蛍光となる。以下においては、標的分子Tに対して複数の同一種類の蛍光プローブが結合する場合を主な蛍光解析の対象として想定する。以下、本実施形態による解析装置1Aの構成について、蛍光解析方法とともに説明する。

【0021】

50

図 1 に示す蛍光解析装置 1 A は、試料ホルダ 1 0 と、対物レンズ 2 0 と、ダイクロイックミラー 2 1 と、励起光源 2 2 と、光フィルタ 2 3 と、反射ミラー 2 4 と、結像レンズ 2 5 と、ピンホール 2 6 と、コリメートレンズ 2 7 と、ビームスプリッタ 3 0 と、光検出器 3 1、3 2 とを備えており、これらの各要素が本蛍光解析装置 1 A における蛍光顕微鏡部を構成している。また、この蛍光顕微鏡部の各要素に加えて、本蛍光解析装置 1 A は、検出信号処理部 3 3、3 4 と、光子計数部 3 5 と、測定制御部 5 0 とを備えている。

#### 【 0 0 2 2 】

試料ホルダ 1 0 は、蛍光測定及び解析の対象となる蛍光プローブを含む測定試料 S を保持する試料保持手段であり、その底面がスライドガラスとして機能する容器によって構成されている。また、この試料ホルダ 1 0 に対し、所定位置に対物レンズ 2 0 が設置されている。対物レンズ 2 0 としては、例えば水浸（液浸）系の対物レンズを好適に用いることができる。また、このような対物レンズ 2 0 に対し、試料ホルダ 1 0 は、その形状が対物レンズ 2 0 の作動距離に対応するように構成されている。

10

#### 【 0 0 2 3 】

図 1 に示す構成では、対物レンズ 2 0、ダイクロイックミラー 2 1、及び励起光源 2 2 によって、測定試料 S の測定領域に励起光を照射する励起光照射手段が構成されている。励起光源 2 2 としては、例えばレーザ光源を好適に用いることができる。励起光源 2 2 から供給された励起レーザ光は、ダイクロイックミラー 2 1 によって反射され、対物レンズ 2 0 を介して集光されつつ、試料ホルダ 1 0 内の測定試料 S へとビームスポットとして照射される（励起光照射ステップ）。励起光源 2 2 の例としては、波長 4 7 3 n m、5 3 2 n m、または 6 3 5 n m のレーザ光を供給するレーザ光源を用いることができる。

20

#### 【 0 0 2 4 】

また、図 1 に示す構成では、対物レンズ 2 0、光フィルタ 2 3、反射ミラー 2 4、結像レンズ 2 5、ピンホール 2 6、コリメートレンズ 2 7、ビームスプリッタ 3 0、第 1 光検出器 3 1、及び第 2 光検出器 3 2 によって蛍光検出手段が構成されている。測定試料 S の蛍光プローブからの蛍光は対物レンズ 2 0 によって収集され、ダイクロイックミラー 2 1 を透過し、さらに光フィルタ 2 3 を通過した後、反射ミラー 2 4 によってビームスプリッタ 3 0 に向けて反射される。光フィルタ 2 3 としては、例えば、試料 S からの散乱光、迷光等の余分な光成分を除去するための、測定対象の蛍光プローブの蛍光スペクトルに合わせて選択されたバンドパスフィルタを用いることができる。

30

#### 【 0 0 2 5 】

反射ミラー 2 4 によって光路が変更された蛍光は、結像レンズ 2 5 及びピンホール 2 6 を順に通過し、コリメートレンズ 2 7 によって平行光束とされた後に、ビームスプリッタ 3 0 へと入射する。ピンホール 2 6 は、結像レンズ 2 5 によって集光される蛍光に対して共焦点となる位置に設置されており、焦点外れの光を除去して、試料 S 中に形成されたビームスポットの測定領域からの蛍光のみを通過させる構成となっている。

#### 【 0 0 2 6 】

ビームスプリッタ 3 0 は、蛍光を分岐する光分岐手段であり、励起光が照射された測定試料 S の測定領域内にある蛍光プローブからの蛍光を 2 つの蛍光成分に分岐する（光分岐ステップ）。すなわち、ビームスプリッタ 3 0 は、試料 S からの蛍光の個々の光子を第 1 光検出器 3 1 への光路または第 2 光検出器 3 2 への光路のいずれか一方へと導くことで、蛍光を 2 つの蛍光成分に分岐する。このようなビームスプリッタ 3 0 としては、例えば蛍光を 5 0 : 5 0 の分岐比で 2 つの蛍光成分に等分割するものが用いられる。

40

#### 【 0 0 2 7 】

ビームスプリッタ 3 0 で分岐された一方の第 1 蛍光成分（ビームスプリッタ 3 0 を透過した光子）は第 1 蛍光検出手段を構成する光検出器 3 1 によって検出され、検出信号が出力される（第 1 蛍光検出ステップ）。また、ビームスプリッタ 3 0 で分岐された他方の第 2 蛍光成分（ビームスプリッタ 3 0 で反射された光子）は第 2 蛍光検出手段を構成する光検出器 3 2 によって検出され、検出信号が出力される（第 2 蛍光検出ステップ）。光検出器の具体例としては、光電子増倍管を用いることができる。また、光フィルタ 2 3 からレ

50

ンズ 27 までの各光学要素は、第 1、第 2 蛍光検出手段で共用されている。

【0028】

以上の励起光照射手段及び蛍光検出手段により、試料 S において微小な測定領域を設定し、励起光を照射するとともに、測定領域からの蛍光を検出する共焦点光学系による蛍光顕微鏡が構成されている。また、本実施形態の蛍光顕微鏡は、試料 S からの蛍光に対し、光分岐手段、及びそれに対応する 2 つの蛍光検出手段を含んで構成されている。

【0029】

ここで、上記構成の蛍光顕微鏡によって測定試料 S 中に設定される測定領域は、例えば 1 f l (フェムトリットル) 程度の極微小領域である。また、試料 S に含まれる蛍光プローブの分子濃度の一例を 1 n M とすると、測定領域内の蛍光プローブの平均分子数は、 $6 \cdot 10^{23} \times 1 \cdot 10^{-9} \times 1 \cdot 10^{-15} = 0.6$  個である。また、図 2 に例示したホモジニアス・アッセイでは、標的分子の濃度は例えば 1 p M 程度である。ただし、これらの数値は測定領域等の設定の一例であり、具体的な設定は個々の場合で異なる。

【0030】

第 1、第 2 光検出器 31、32 から出力された検出信号は、それぞれ第 1、第 2 検出信号処理部 33、34 へと入力される。検出信号処理部 33、34 は、例えばプリアンプなどの信号増幅回路及び波高弁別器などの信号処理回路によって構成され、光検出器 31、32 からの検出信号に対して所定の信号処理を行って、光検出器 31、32 のそれぞれでの単一光子検出イベントを示す検出パルス信号列を生成し出力する。

【0031】

信号処理部 33、34 からの検出パルス信号列は光子計数部 35 へと入力される。光子計数部 35 は、蛍光解析に用いる測定データを取得する計数手段であり、光検出器 31、32 からの検出信号 (処理部 33、34 からの信号列) に基づいて、検出光子数を所定の計数時間幅で計数して、時系列の第 1、第 2 光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  を生成する (光子計数ステップ)。これにより、試料 S に対する単一光子計数による蛍光測定が可能となる。ここで、以下において、第 1 光検出器での検出結果に関する量を添え字「A」で示し、第 2 光検出器での検出結果に関する量を添え字「B」で示す。

【0032】

本解析装置 1A においては、光子計数部 35 での計数時間幅が蛍光解析のピン幅の初期条件 (最小ピン幅) となる。また、光子計数部 35 としては、具体的には例えば、マルチチャンネルスケラ (MCS) を用いることができる。また、光子計数部 35 での計数時間幅となる MCS の時間分解能は、例えば 200 nsec (ナノ秒) 以下である。

【0033】

光子計数部 35 において生成された時系列の光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  は測定制御部 50 に入力され、この測定制御部 50 において、測定データに対して蛍光解析が行われる。本実施形態による測定制御部 50 は、解析データ生成部 51 と、測定結果解析部 52 とを有している。このような測定制御部 50 は、例えば、蛍光解析用のソフトウェアが動作する制御用コンピュータによって構成することができる。

【0034】

解析データ生成部 51 は、光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  から、蛍光解析に用いる光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成する (解析データ生成ステップ)。具体的には、生成部 51 は、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  に基づいて、測定データの少なくとも一方が 0 の場合 ( $F_A \cdot F_B = 0$ ) に

$$n_{AB}(t) = 0$$

となり、測定データの両者が 0 でない場合 ( $F_A \cdot F_B > 0$ ) に所定の関数  $f$  で

$$n_{AB}(t) = f(F_A(t), F_B(t))$$

となる光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成する。

【0035】

具体的な光子数解析データとしては、好ましくは、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  の相乗平均を用い、下記の式 (1)

10

20

30

40

50



【数 1】

$$n_{AB}(t) = \sqrt{F_A(t) \cdot F_B(t)} \quad \dots (1)$$

によって解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成する方法を用いることができる。なお、相乗平均の場合、その定義式で測定データの少なくとも一方が 0 の場合に  $n_{AB} = 0$  となる条件が満たされるため、その場合も含めて上記式 (1) で解析データが定義される。

【0036】

測定結果解析部 52 は、必要な蛍光解析を行う解析手段であり、生成部 51 で生成された解析データ  $n_{AB}(t)$  に対し、蛍光プローブを含む測定試料 S の測定結果についての蛍光解析を行う (測定結果解析ステップ)。これにより、例えば試料 S 中にある標的分子の情報など、測定試料 S についての必要な情報を取得することができる。

10

【0037】

上記実施形態による蛍光解析装置、及び蛍光解析方法の効果について説明する。

【0038】

図 1 に示した蛍光解析装置 1A、及び蛍光解析方法においては、対物レンズ 20、励起光源 22、及び光検出器 31、32 等を含む励起光照射系及び蛍光検出系によって試料 S 中に微小な測定領域を設定する。また、測定領域内の蛍光プローブで発生する蛍光に対してビームスプリッタ 30 を設けるとともに蛍光検出系として第 1、第 2 蛍光検出手段を設置して、第 1 光子数測定データ  $F_A(t)$  及び第 2 光子数測定データ  $F_B(t)$  を取得する。そして、測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  から  $F_A(t) \cdot F_B(t) = 0$  のときに  $n_{AB}(t) = 0$  となる解析データ  $n_{AB}(t)$  を生成して蛍光解析を行っている。

20

【0039】

このような構成では、光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  に代えて光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を用いることにより、第 1、第 2 光検出器 31、32 での蛍光検出の同時性を考慮した形で蛍光解析を実行することができる。これにより、例えば、複数個の蛍光プローブが結合した標的分子からの蛍光検出イベントと、それ以外のノイズイベントとの識別精度を向上するなど、試料 S の蛍光解析の精度を向上することが可能となる。

【0040】

蛍光解析の励起光、蛍光については、励起光は単一波長領域の励起光であり、第 1、第 2 蛍光成分は同一波長領域の蛍光成分である構成を用いることが可能である。このような構成は、図 2 に関して上述したように、測定試料 S に加える蛍光プローブとして 1 種類の蛍光プローブのみを用いるとともに、試料 S に含まれる標的分子に 2 個以上の同一種類の蛍光プローブが結合する場合の蛍光解析に好適に適用することができる。また、図 1 の解析装置 1A では、このような解析対象に対応して、単一の励起光源 22 を用いている。

30

【0041】

ここで、蛍光プローブとして 2 種類以上の蛍光プローブを用いる方法では、複数種類の蛍光プローブが均等に反応する必要があり、プローブの選定が難しい。また、例えば各種類の蛍光プローブに対する測定領域の不一致などの問題を生じる場合もある (特許文献 3 参照)。これに対して、1 種類の蛍光プローブを用いる蛍光解析法では、これらの問題点がなく測定が容易であり、蛍光解析の精度を向上することも可能である。

40

【0042】

光子数解析データを用いた蛍光解析の具体的な内容については、解析部 52 において、光子数解析データ  $n_{AB}$  に対し、自己相関解析またはフォトンバースト解析の少なくとも一方を行うことが好ましい。このように、自己相関解析法、フォトンバースト解析法、あるいはそれらを組み合わせた解析法を用いることにより、試料 S の蛍光解析を精度良く実行することができる。また、解析部 52 において、解析データ  $n_{AB}$  を所定のピン時間幅でビンニングし、ビンニングされた解析データに対して蛍光解析を行う構成としても良い。この場合、具体的な測定条件等に応じて解析データのピン時間幅を設定することにより、蛍

50

光解析の精度を向上することができる。

【 0 0 4 3 】

図 1 に示した蛍光解析装置 1 A、及び解析装置 1 A において実行される蛍光解析方法について、さらに具体的に説明する。

【 0 0 4 4 】

まず、光子数測定データ  $F_A(t)$ 、 $F_B(t)$  を用いた一般的な蛍光解析について説明する。試料 S に 1 種類の蛍光プローブを加えて測定した場合、光検出器 3 1、3 2 での測定結果による自己相関関数  $G(\tau)$  は、光子数測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  に対して、それぞれ下記の式 (2)、式 (3)

【数 2】

$$G_A(\tau) = \frac{\langle F_A(t)F_A(t+\tau) \rangle}{\langle F_A \rangle^2} - 1 \quad \dots (2)$$

10

【数 3】

$$G_B(\tau) = \frac{\langle F_B(t)F_B(t+\tau) \rangle}{\langle F_B \rangle^2} - 1 \quad \dots (3)$$

20

によって求めることができる。

【 0 0 4 5 】

また、光検出器 3 1、3 2 間の相互相関関数は、下記の式 (4)、式 (5)

【数 4】

$$G_{AB}(\tau) = \frac{\langle F_A(t)F_B(t+\tau) \rangle}{\langle F_A \rangle \langle F_B \rangle} - 1 \quad \dots (4)$$

30

【数 5】

$$G_{BA}(\tau) = \frac{\langle F_B(t)F_A(t+\tau) \rangle}{\langle F_A \rangle \langle F_B \rangle} - 1 \quad \dots (5)$$

によって求められる。ここで、これらの相関関数  $G_{AB}(\tau)$ 、 $G_{BA}(\tau)$  の対称性

【数 6】

$$G_{AB}(\tau) = G_{BA}(\tau) \quad \dots (6)$$

40

を考慮すると、下記の式 (7) で定義される関数  $G_C(\tau) = G_{CROSS}(\tau)$

【数 7】

$$G_{CROSS}(\tau) = \frac{\{G_{AB}(\tau) + G_{BA}(\tau)\}}{2} \quad \dots (7)$$

を光検出器 3 1、3 2 間の相互相関関数として用いることができる。

【 0 0 4 6 】

一般に、蛍光相関分光法における 1 成分系の波形解析では、自己相関、相互相関ともに相関関数  $G(\tau)$  は、下記の式 (8)

50

## 【数 8】

$$G(\tau) = \left[ 1 + \frac{T}{1-T} e^{-\lambda\tau} \right] \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + \left( \frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad \dots (8)$$

によって求められる。ここで、 $\langle N \rangle$  は試料 S で共焦点光学系によって構築される測定領域内に滞在する蛍光プローブの平均分子数を示し、また、 $\tau_D$  は拡散時定数、 $r_0$ 、 $z_0$  は構造パラメータ（ストラクチャパラメータ）、 $T$  は三重項状態へと遷移する割合、 $\lambda$  は三重項遷移の時定数をそれぞれ示している。これらのパラメータは、取得された相関関数に対してフィッティング計算による波形解析を行うことで求めることができる。

## 【0047】

式(7)、式(8)を用いる解析法は従来法であるが、測定データを直接用いずに解析データ  $n_{AB}$  を用いる図1に示した解析装置 1A においても、このような解析法によって平均分子数、並進拡散時定数、三重項に関するパラメータ等を解析することは、蛍光プローブの初期状態を把握する上で好適である。また、式(8)において三重項状態への遷移確率を  $T = 0$  とすると、時間遅れ  $\tau = 0$  のときに、 $G(\tau = 0)$  の  $y$  切片について

$$G(\tau = 0) = 1 / \langle N \rangle$$

の関係が得られる。すなわち、相関関数  $G(\tau)$  の  $y$  切片により、試料 S 中での蛍光プローブの濃度に対応する測定領域内の平均分子数  $\langle N \rangle$  が求められる。

## 【0048】

ここで、式(7)に示した相互相関関数  $G_c(\tau)$  は、1種類の蛍光プローブを用いて求められたものであるため、上記の式(8)で波形解析することができる。このような蛍光解析法では、相互相関によって光検出器のノイズをキャンセルすることができる利点がある。ただし、このように2つの光検出器を用いた相互相関では、1つの光検出器の場合に比べて SN 比が 1/2 倍に低下する。

## 【0049】

次に、光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  を用いた蛍光解析について説明する。ここで、図1の解析装置 1A において、試料 S の測定領域内に1個の蛍光プローブのみが存在している場合には、光検出器 31、32 で同時に蛍光が検出されることはなく、光検出器 31、32 で同時に蛍光が検出された場合には、必ず複数個の蛍光プローブが測定領域内に存在するものとする。

## 【0050】

この場合、上記の式(1)に示した相乗平均による解析データ  $n_{AB}(t)$

$$n_{AB}(t) = (F_A(t) \cdot F_B(t))$$

を用いることにより、光子検出の同時性の観点から1個の蛍光プローブによる検出イベントを排除することができる。また、この解析データでは、同時性の評価のため、測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  の一方または両方が 0 で  $n_{AB} = 0$  となる場合も除外せずに解析データを求める。また、相乗平均による上記の解析データは、光分岐手段として分岐比 1:1 のビームスプリッタを用いた場合の蛍光解析において、特に好適に適用することができる。

## 【0051】

この解析データ  $n_{AB}$  を時系列の光子数データとして、蛍光検出の同時性が加味された自己相関関数  $G_{new}(\tau)$  を求めると、下記の式(9)

## 【数 9】

$$G_{new}(\tau) = \frac{\langle n_{AB}(t)n_{AB}(t+\tau) \rangle}{\langle n_{AB} \rangle^2} - 1 \quad \dots (9)$$

となる。なお、相乗平均による解析データは実数データであるため、この式(9)の相関関数を求める演算も実数演算となる。このような演算を含む蛍光解析は、測定制御部50でソフトウェア的に解析演算を行う構成において好適に実現することができる。

【0052】

式(9)の自己相関関数では、光子数データのビン時間幅が例えば1 μsecと小さい場合には  $n_{AB} = 0$  である確率が高いため、相関波形を求めることができない。これに対して、解析データ  $n_{AB}$  のビン時間幅をビニングで大きくしていくと、 $n_{AB} = 0$  の確率が次第に減少して相関波形が現れてくる。すなわち、上記の相関波形  $G_{new}()$  は、2つの光検出器31、32で取得される光子数データに対して任意のビン時間幅を設定したときに、そのビン幅内で光子が同時に検出される程度を示すものである。

10

【0053】

また、自己相関関数  $G()$  では、上記したように、その  $y$  切片が蛍光プローブの平均分子数の逆数  $1 / \langle N \rangle$  に対応している。したがって、試料  $S$  の測定領域内に蛍光プローブが多い場合には、それらが同時に観測される確率が高くなって相関波形の  $y$  切片が小さくなる。一方、蛍光プローブが少ない場合には、同時に観測される確率が低くなって  $y$  切片が大きくなる。蛍光検出の同時性を考慮した上記の相関関数  $G_{new}()$  は、一般的な相関関数  $G_c()$  に対して、上記特性によって変動することとなる。

【0054】

なお、蛍光プローブの並進拡散運動等については、いずれの相関関数でも同じ運動を観測している。このため、式(9)の相関関数  $G_{new}()$  の波形解析においても、相互相関関数  $G_c()$  について求められた拡散時定数  $\tau_D$ 、遷移割合  $T$ 、及び時定数  $\tau$  の各パラメータを、同じパラメータ値で適用することが可能である。

20

【0055】

上記の相関関数  $G_{new}()$  の導出において、解析データ  $n_{AB}$  のビン時間幅を蛍光プローブの濃度に対して適切に設定することにより、蛍光検出の同時性による制限によって測定領域内に滞在する見かけ上の分子数を少なく見積もることができる。これは、測定領域内にある複数個の蛍光プローブからの蛍光を2つの光検出器で同時に検出する頻度が、ビン時間幅の大きさによって異なってくることによる。このビン時間幅については、光子計数部35での計数時間幅を初期ビン幅として取得された光子数データについて、必要に応じてビニングを行ってビン時間幅を設定、変更することが好ましい。

30

【0056】

解析データ  $n_{AB}$  を用いた蛍光解析の上記性質は、標的分子に対して複数個の蛍光プローブが凝集するように結合する場合の蛍光解析に特に有効である。この場合、試料  $S$  に加える蛍光プローブを多くすることにより、複数個の蛍光プローブが結合した標的分子による蛍光検出イベントが増加する。また、複数個の蛍光プローブの標的分子への結合によって並進拡散運動が変化するため、FCSによる蛍光解析において標的分子の検出能力が向上される。また、フリーの蛍光プローブについては、測定領域内に複数個が滞在する場合でも滞在タイミングがずれて同時性が小さくなるため、ビン時間幅の設定によって、フリーの蛍光プローブによるイベントを効果的に除外することが可能である。

40

【0057】

標的分子に複数個の蛍光プローブが結合する場合のFCSによる蛍光解析では、相関関数  $G()$  は下記の式(10)、式(11)

【数10】

$$G(\tau) = \frac{\sum_{i=1}^M \alpha_i^2 \langle N_i \rangle g_i(\tau)}{\left[ \sum_{i=1}^M \alpha_i \langle N_i \rangle \right]^2} \quad \dots (10)$$

50

【数 1 1】

$$g_i(\tau) = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{Di}}}} \quad \dots (11)$$

によって求められる。ここで、式(10)、式(11)において、添え字  $i$  は標的分子に対する蛍光プローブの結合状態が異なる場合の各蛍光成分を示している。また、 $\tau_{Di}$  は蛍光の発光効率に関する係数である。また、式(11)の相関波形成分では、三重項に関する波形部分を省略している。

10

【0058】

蛍光プローブとして1種類の分子プローブのみを用い、図1の解析装置1Aで取得された測定データを式(7)の相互相関関数  $G_c(\tau)$  によって解析する場合、係数  $N_i$  は正の整数の値をとり、それに応じて平均分子数  $\langle N_i \rangle$  がそれぞれ求められる。例えば、標的分子に対して蛍光プローブが最大で2個までしか結合しない場合、式(10)の相関関数  $G_c(\tau)$  は下記の式(12)

【数 1 2】

$$G(\tau) = \frac{1}{[\langle N_1 \rangle + \langle N_2 \rangle + 2\langle N_3 \rangle]^2} [\langle N_1 \rangle g_1(\tau) + \langle N_2 \rangle g_2(\tau) + 4\langle N_3 \rangle g_3(\tau)] \quad \dots (12)$$

20

となる。ここで、添え字  $i = 1$  はフリーの蛍光プローブによる蛍光成分を示し、 $i = 2$  は標的分子に蛍光プローブが1個結合した場合の蛍光成分を示し、 $i = 3$  は標的分子に蛍光プローブが2個結合した場合の蛍光成分を示している。また、この場合の蛍光プローブの総分子数  $\langle N \rangle$  は、下記の式(13)

【数 1 3】

$$\langle N \rangle = \langle N_1 \rangle + \langle N_2 \rangle + 2\langle N_3 \rangle \quad \dots (13)$$

30

によって求められる。

【0059】

これらの式(12)、式(13)を用い、式(7)の相互相関関数  $G_c(\tau)$  について各相関波形成分  $g_i(\tau)$  の係数を求めることによって、試料Sにおける蛍光プローブの状態、及び標的分子の量などについての情報を取得することができる。ただし、このような蛍光解析において、標的分子の量が少なくフリーの蛍光プローブが多い場合には、相関波形は主にフリーの蛍光プローブによる蛍光成分によって表されることとなり、標的分子についての情報を十分な精度で取得することが困難となる。

40

【0060】

このような場合、測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  による相関関数  $G_c(\tau)$  に代えて、解析データ  $n_{AB}$  による相関関数  $G_{new}(\tau)$  を用いることにより、標的分子の情報を好適に取得することができる。すなわち、蛍光検出の同時性が考慮された相関関数  $G_{new}(\tau)$  では、フリーの蛍光プローブ、及び標的分子に1個のみ結合した蛍光プローブの分子数が低く見積もられるため、標的分子に蛍光プローブが2個結合した分子数  $\langle N_3 \rangle$  を精度良く定量することができる。

【0061】

また、式(1)に示した光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  自体については、試料Sの測定領域内に複数個の蛍光プローブが同時に滞在する場合の蛍光ゆらぎに相当している。この

50

ため、蛍光解析については、上記した自己相関解析以外にも、解析データに対してフォトンバースト解析（光子数データでの検出光子数についての解析）を行うことによっても、標的分子の情報等を取得することが可能である。なお、解析データのフォトンバースト解析については、具体的には後述する。

#### 【0062】

ここで、標的分子 T に対する蛍光プローブ P の特異的結合（図 2 参照）を利用するホモジニアス・アッセイでは、具体的には例えば、標的分子を含む試料 S に対し、（1）反応前の蛍光プローブの評価工程、（2）標的分子と蛍光プローブとの反応工程、及び（3）反応後の蛍光の評価工程の 3 つの工程によって蛍光解析が行われる。この場合、反応前の評価工程（1）では、式（7）の相互相関関数  $G_c(\tau)$  を求め、式（8）を適用して波形解析を行って必要なパラメータの値を決定する。さらに、式（1）の解析データ、及び式（9）の相関関数  $G_{new}(\tau)$  による解析を行い、反応前の状態の初期値を求めるとともに、同時性を評価する上で重要となる蛍光解析用のビン時間幅を設定する。

10

#### 【0063】

また、反応後の評価工程（3）では、先に求めた蛍光解析用のビン時間幅を適用して式（1）、式（9）による解析を行い、さらに、相関波形に対して式（10）、式（11）を用いた波形解析を行うことにより、試料 S での標的分子の量を見積もることができる。あるいは、波形解析に代えて、式（1）の解析データに対してフォトンバースト解析を行っても良い。なお、ビン時間幅の設定方法等については、具体的には後述する。

20

#### 【0064】

また、自己相関関数  $G(\tau)$  の算出においては、一定のビン時間幅で演算を行わず、時間遅れ  $\tau$  に応じてビン幅を変えて相関関数を求めるマルチプルタウ方式を用いても良い。すなわち、一般的な自己相関関数は、下記の式（14）

#### 【数14】

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} - 1 \quad \dots (14)$$

によって求められるが、時間遅れ  $\tau$  が例えば  $100 \text{ nsec} \sim 1 \text{ sec}$  の範囲全体で一定のビン幅  $100 \text{ nsec}$  の分解能を適用すると演算量が膨大となり、また、時間遅れ  $\tau$  が大きい領域で求められる波形の SN 比が劣化する場合がある。

30

#### 【0065】

これに対し、時間遅れ  $\tau$  が大きい領域でビン時間幅が大きくなるように、時間遅れ  $\tau$  に応じてビン幅を変えるマルチプルタウ方式によれば、相関波形の演算量を低減するとともに、時間遅れ  $\tau$  が大きい領域での SN 比を改善することができる。具体的には例えば、初期ビン幅が  $100 \text{ ns}$  の時系列の測定データに対して解析演算を行う場合、 $\tau = 1 \mu\text{s}$  では初期ビン幅  $100 \text{ ns}$  のままで演算を行い、 $\tau = 1 \text{ ms}$  ではビン幅が  $1 \mu\text{s}$  となるようにビニングした光子数データを用いて演算を行う方法を用いることができる。

40

#### 【0066】

一般には、相関関数の算出において、時間遅れ  $\tau$  が小さい領域で適用する最小ビン幅を設定し、時間遅れ  $\tau$  が大きい領域では最小ビン幅を整数倍したビン時間幅でビニングして相関関数を算出する方法を用いることができる。このような演算方法は、測定制御部 50 でソフトウェア的に蛍光解析を行う構成において好適に実現することができる。すなわち、ソフトウェア的に解析する構成では、解析演算に対する自由度が大きく、また、蛍光測定後にデータ処理を実行できることから、例えば解析条件を変えて何回も演算を繰り返すなど、様々な蛍光解析を行うことが可能である。

#### 【0067】

次に、解析データ  $n_{AB}$  及び相関関数  $G_{new}(\tau)$  による蛍光解析について、その具体例とともにさらに説明する。以下においては、蛍光解析における測定データ  $F_A$ 、 $F_B$

50

の初期ピン幅となる光子計数部 35 での計数時間幅を 100 ns とする。また、相関関数の算出においては、基本的に上記したマルチプルタウ方式を用いるものとする。

【0068】

図 3 は、光子数測定データに対して得られる相関関数を示すグラフである。図 3 において、グラフ (a) は、光検出器 31 での測定データ  $F_A$  から式 (2) によって算出された自己相関関数  $G_A$  ( ) を示している。また、グラフ (b) は、光検出器 31、32 での測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  から式 (7) によって算出された相互相関関数  $G_C$  ( ) を示している。これらの相関関数は、いずれも最小ピン幅を 100 ns としたマルチプルタウ方式によって算出されている。また、図 3 では、図 1 の解析装置 1A で 3 秒間の蛍光測定を 10 回繰り返して得られた測定データから求められる相関関数を示している。

10

【0069】

図 3 の自己相関関数のグラフ (a) では、 $\tau = 1 \mu s$  程度までの速い時間領域では光検出器のアフターパルスノイズが重畳された波形となっており、 $1 \mu s$  以降の相関波形についてのみ、有効に解析することができる。また、相互相関関数のグラフ (b) では、三重項状態への遷移過程が十分に観測されており、この相関波形を解析することで蛍光プローブの状態を正確に知ることができる。蛍光測定における平均光子検出数は、第 1 光検出器 31 で 35.3 kcps、第 2 光検出器 32 で 32.9 kcps であり、ビームスプリッタ 30 による蛍光の分岐比は約 52 : 48 となっている。また、グラフ (b) の相関波形について、式 (8) で波形フィッティングを行った場合、各パラメータの値は

$$\begin{aligned} \langle N \rangle &: 21.4 \\ \tau_D &: 0.256 \text{ ms} \\ T &: 0.123 \\ \tau &: 0.396 \mu s \\ r_0 / z_0 &: 0.2 \end{aligned}$$

20

と求められ、この場合の平均分子数は  $\langle N \rangle = 21.4$  となっている。

【0070】

図 3 と同一の測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  について、式 (1) の解析データ  $n_{AB}$  を求め、さらに式 (9) の同時性を考慮した相関関数  $G_{new}$  ( ) を算出した結果を図 4 に示す。図 4 においては、ビンングによって初期ピン幅 100 ns よりも大きい所定の時間幅を最小ピン幅としてマルチプルタウ方式によって算出された相関関数を示している。また、図 4 において、グラフ A1、A2、A3、A4 は、それぞれ最小ピン幅を 6.4  $\mu s$ 、25.6  $\mu s$ 、102.4  $\mu s$ 、409.6  $\mu s$  としたときの相関関数を示している。ここで、例えばピン幅 6.4  $\mu s$  の光子数データは、初期ピン幅 100 ns の光子数データを 64 個ずつ加算するビンング処理によって得られる。また、初期ピン幅よりも大きい時間幅を最小ピン幅としているのは、最小ピン幅 100 ns では同時性を考慮することでほとんどのピンの計数値が 0 になってしまうためである。

30

【0071】

図 4 のグラフ A1 ~ A4 より、相関関数  $G_{new}$  ( ) を求める際の最小ピン幅を大きくすることにより、 $1 / \langle N \rangle$  に相当する相関関数の y 切片が小さくなり、測定領域内での同時性が考慮された蛍光プローブの平均分子数  $\langle N \rangle$  が増加することがわかる。この図 4 の相関関数に対し、分子数  $\langle N \rangle$  以外のパラメータについて図 3 のグラフ (b) で求めた上記のパラメータ値を適用して波形フィッティングによる解析を行うことにより、グラフ A1 ~ A4 のそれぞれについて各最小ピン幅での平均分子数  $\langle N \rangle$  が求められる。

40

【0072】

図 5 は、相関関数  $G_{new}$  ( ) から求められる分子数のピン幅依存性を示すグラフである。図 5 において、横軸はマルチプルタウ方式による相関関数の算出での最小ピン時間幅 (sec) を示し、縦軸は各最小ピン幅での相関関数の y 切片から求められる平均分子数  $\langle N \rangle$  を示している。ここで、光子数解析データ  $n_{AB}$  では、時系列の測定データにおいて計数値が 0 のピンが存在することを前提として同時性を評価している。このため、ビンング処理によってピン時間幅当たりの蛍光量が増えて計数値が 0 となる頻度が低くなる

50

時間領域、例えば図5においてピン幅が0.3ms以上の領域では、解析データ $n_{AB}$ を求めて同時性を評価する効果が十分に得られていない。

【0073】

一方、例えばピン幅を6.4 $\mu$ sとした場合の相関関数 $G_{new}(\ )$ では、図3のグラフ(b)の相関関数 $G_c(\ )$ で21.4個であった平均分子数 $\langle N \rangle$ が6.1個まで減少している。これは、解析データ $n_{AB}$ で蛍光検出の同時性を考慮することにより、試料Sの測定領域内にある見かけ上の分子数が少なく見積もられたことを示すものである。このような解析条件は、上述したように、標的分子に対して複数個の蛍光プローブが凝集するように結合する場合の蛍光解析において、複数個のフリーの蛍光プローブによるバックグラウンドイベントの影響が低減されるなどの点で特に有効である。

10

【0074】

図6は、光子数測定データに対して得られる相関関数の他の例を示すグラフである。図6のグラフは、図3の場合よりも蛍光プローブの濃度が低い条件で蛍光測定を行って得られた相互相関関数 $G_c(\ )$ を示している。このグラフにおいて、蛍光測定における平均光子検出数は、第1光検出器31で2.3kcps、第2光検出器32で2.2kcpsであり、ビームスプリッタ30による蛍光の分岐比は約51:49となっている。また、図6のグラフの相関波形について、式(8)で波形フィッティングを行った場合、各パラメータの値は

$$\langle N \rangle : 1.66$$

$$D : 0.256 \text{ ms}$$

$$T : 0.247$$

$$: 2.28 \mu\text{s}$$

$$r_0 / z_0 : 0.2$$

と求められ、この場合の平均分子数は $\langle N \rangle = 1.66$ となっている。

20

【0075】

図7は、図6と同一の測定データについて、相関関数 $G_{new}(\ )$ から求められる分子数のピン幅依存性を示すグラフである。このグラフにおいて、例えばピン幅を6.4 $\mu$ sとした場合の相関関数 $G_{new}(\ )$ では、図6の相関関数 $G_c(\ )$ で1.66個であった平均分子数 $\langle N \rangle$ が0.27個まで減少している。これらの図5、図7のグラフからわかるように、蛍光解析において光子数測定データ、解析データをビンニングする場合のピン時間幅については、相関関数から求められる分子数のピン幅依存性を参照してピン時間幅を設定することが好ましい。また、分子数のピン幅依存性は、蛍光プローブの濃度等の条件によって変化するが、条件が同じであれば再現性は高いと考えられる。

30

【0076】

次に、光子数測定データ $F_A$ 、 $F_B$ から解析データ $n_{AB}$ へのデータ変換について説明する。同時性を考慮した解析データは、一般には、 $F_A \cdot F_B = 0$ の場合に

【数15】

$$n_{AB}(t) = 0 \quad \dots (15)$$

40

となり、 $F_A \cdot F_B > 0$ の場合に所定の関数 $f$ で

【数16】

$$n_{AB}(t) = f(F_A(t), F_B(t)) \quad \dots (16)$$

となるように求められる。また、 $F_A \cdot F_B > 0$ の場合の解析データの具体的な算出方法としては、上記に例示した相乗平均による解析データ $n_{AB}$



【数 17】

$$n_{AB}(t) = \sqrt{F_A(t) \cdot F_B(t)} \quad \dots (17)$$

を用いることができる。これにより、蛍光検出の同時性が考慮された蛍光解析を好適に実行することができる。また、この方法では、 $F_A \cdot F_B = 0$  の場合においても、相乗平均の上記関数で  $n_{AB} = 0$  となる。

【0077】

また、 $F_A \cdot F_B > 0$  の場合の解析データの他の算出方法としては、相加平均による解析データ  $n_{AB}$  10

【数 18】

$$n_{AB}(t) = \frac{F_A(t) + F_B(t)}{2} \quad \dots (18)$$

を用いることができる。なお、この方法では、相加平均の上記関数では  $F_A$ 、 $F_B$  の一方のみが 0 の場合に  $n_{AB} = 0$  とならない。このため、 $F_A \cdot F_B = 0$  の場合については、別に  $n_{AB} = 0$  と定義する。

【0078】

あるいは、 $F_A \cdot F_B > 0$  の場合の解析データのさらに他の算出方法としては、調和平均による解析データ  $n_{AB}$  20

【数 19】

$$n_{AB}(t) = \frac{2}{\frac{1}{F_A(t)} + \frac{1}{F_B(t)}} \quad \dots (19)$$

を用いることができる。これにより、相乗平均の場合と同様に、蛍光検出の同時性が考慮された蛍光解析を好適に実行することができる。また、この方法でも、 $F_A \cdot F_B = 0$  の場合については、別に  $n_{AB} = 0$  と定義する。 30

【0079】

あるいは、 $F_A \cdot F_B > 0$  の場合の解析データのさらに他の算出方法としては、測定データの積による解析データ  $n_{AB}$

【数 20】

$$n_{AB}(t) = F_A(t) \cdot F_B(t) \quad \dots (20)$$

を用いても良い。ただし、この積による解析データは、他の相乗平均、相加平均、調和平均による解析データとは性質が異なっている。 40

【0080】

一般には、解析データ  $n_{AB}(t)$  の算出において、 $F_A \cdot F_B > 0$  の場合には、相乗平均、相加平均、調和平均、または積のいずれかとなる関数  $f(F_A, F_B)$  で解析データ  $n_{AB}$  を求めることが好ましく、特に、相乗平均、相加平均、または調和平均のいずれかとなる関数  $f(F_A, F_B)$  で解析データ  $n_{AB}$  を求めることが好ましい。

【0081】

図 8 は、相関関数から求められる分子数のピン幅依存性を示すグラフである。図 8 において、グラフ (a) は図 5 に示した蛍光プローブの濃度が高い場合のグラフに対応し、グラフ (b) は図 7 に示した濃度が低い場合のグラフに対応している。また、グラフ (a) 40

において、グラフ B 1、B 2、B 3、B 4 は、それぞれ解析データの算出に相乗平均、相加平均、調和平均、積を用いた場合の分子数  $\langle N \rangle$  を示している。グラフ (b) におけるグラフ C 1、C 2、C 3、C 4 についても同様である。

【0082】

また、図 9 は、図 8 のグラフ (a) に示した蛍光プローブの濃度が高い条件における、光子数解析データに対して得られる相関関数を示すグラフである。図 9 において、グラフ (a) は、ピン幅を  $6.4 \mu s$  とした場合の相関関数を示し、グラフ D 1、D 2、D 3、D 4 は、それぞれ解析データの算出に相乗平均、相加平均、調和平均、積を用いた場合の相関関数を示している。また、図 9 のグラフ (b) は、ピン幅を  $102.4 \mu s$  とした場合の相関関数を示し、グラフ E 1、E 2、E 3、E 4 は、それぞれ解析データの算出に相乗平均、相加平均、調和平均、積を用いた場合の相関関数を示している。

10

【0083】

これらのグラフに示すように、相乗平均、相加平均、及び調和平均による解析データを用いた場合は、いずれも分子数  $\langle N \rangle$  のピン幅依存性について同様の傾向を示している。一方、積による解析データを用いた場合は、自己相関演算において平均強度とゆらぎとが同じように変動するため、相関波形の y 切片、及びそれによって求められる分子数  $\langle N \rangle$  は、ほぼ一定値を示す結果となっている。また、上記のいずれの場合でも、相関関数 (図 9 参照) については、分子数  $\langle N \rangle$  以外のパラメータについて、相互相関関数から求めたパラメータ値を適用して波形フィッティングによる解析を行うことが可能である。

20

【0084】

図 8 のグラフ (a) に示す例では、上記したように相乗、相加、調和平均について同様の傾向を示している。これは、この測定例では光検出器 3 1、3 2 での平均光子検出数が  $35.3 \text{ kcps}$ 、 $32.9 \text{ kcps}$  であり、例えば  $6.4 \mu s$  のピン幅では平均計数値が  $0.22$  となる。このため、各ピンでの計数値の多くが 0、1、2 のいずれかとなり、光検出器間の検出の偏りについて、相乗、相加、調和平均で大きな差が無いことによる。これらの相乗、相加、調和平均のうちでは、蛍光ゆらぎを過剰に評価しないことから、相乗平均、及び調和平均が特に解析データの算出に適していると考えられる。

【0085】

次に、光子数解析データ  $n_{AB}(t)$  のフォトンバースト解析について説明する。フォトンバースト解析は、時系列の光子数データに対し、その各ピンでの検出光子数及びその時間変化について解析することで、測定領域内での蛍光プローブの個数等についての情報を得る解析方法である。

30

【0086】

図 10 は、時系列の光子数データでの計数値 (ピン当たりの検出光子数) の分布の一例を示すグラフである。図 10 に示す計数値分布は、図 3 ~ 図 5 に示した蛍光プローブの濃度が高い場合の測定結果によるものである。図 10 のグラフ (a) は、光検出器 3 1、3 2 での測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  を加算した光子数データにおいて、ピンングによってピン幅を  $307.2 \mu s$  としたときの計数値分布を示している。ここで、この図 10 の測定例では、測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  での平均光子検出数を加算すると  $68.2 \text{ kcps}$  となり、分子数が  $\langle N \rangle = 21.4$  であることから、1 分子当たりの蛍光強度は約  $3.2 \text{ kcps}$  である。上記のピン幅は、この蛍光強度を考慮し、蛍光プローブ 1 分子に対応する計数値が約 1 となるように選択している。このため、グラフ (a) において、そのピーク計数値はおおよそ 21 となっている。

40

【0087】

一方、図 10 のグラフ (b) は、ピン幅  $6.4 \mu s$  で相乗平均による解析データ  $n_{AB}$  を求め、さらにピンングによってピン幅を  $307.2 \mu s$  としたときの計数値分布を示している。この場合、測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  の平均という点でいうと、計数値  $0.5$  が蛍光プローブ 1 分子に相当することとなる。このグラフ (b) では、計数値が 5 以上で 2 つ以上のピンをまたいで発光するような現象について、その識別が容易になる。すなわち、図 10 の例では、例えば 10 個程度の蛍光プローブが標的分子に凝集、結合する反応系の場

50

合、測定データのグラフ ( a ) ではフリーの蛍光プローブによるイベントに埋もれてしまい識別が困難であるが、蛍光検出の同時性が考慮された解析データのグラフ ( b ) ではそれらを識別することが可能である。

【 0 0 8 8 】

図 1 1 は、光子数データでの計数値の分布の他の例を示すグラフである。図 1 1 に示す計数値分布は、図 6、図 7 に示した蛍光プローブの濃度が低い場合の測定結果によるものである。図 1 1 のグラフ ( a )、( b ) は、それぞれ図 1 0 のグラフ ( a )、( b ) と同様に求められた計数値分布を示している。ここで、この図 1 1 の測定例では、測定データ  $F_A$ 、 $F_B$  での平均光子検出数を加算すると  $4.5 \text{ kcps}$  となり、分子数が  $\langle N \rangle = 1.66$  であることから、1 分子当たりの蛍光強度は約  $2.6 \text{ kcps}$  である。このとき、上記のピン幅では、蛍光プローブ 1 分子に対応する計数値は約  $0.8$  となっている。

10

【 0 0 8 9 】

図 1 1 のグラフ ( b ) では、計数値 1 の頻度が 1 4 2、計数値 2 の頻度が 1 となっており、その他のイベントは全て計数値が 0 となっている。このような測定結果では、上記した  $307.2 \mu\text{s}$  のピン幅で例えば計数値  $0.4$  を基準としてフォトンバースト解析を行うことが可能である。

【 0 0 9 0 】

標的分子に対して複数個の蛍光プローブが結合する反応系では、解析データ  $n_{AB}$  が 0 よりも大きくなる確率は非常に高い。このため、相乗平均などによる解析データを用いることで、フリーの蛍光プローブなどによるバックグラウンドイベントを低減した形での蛍光解析が可能となる。ただし、フォトンバースト解析は相対的な評価であるため、濃度が既知の測定試料についてあらかじめ測定を行って検量線を作成し、その検量線を参照して解析を行うことが好ましい。また、同時性を考慮した解析データの算出方法については、フォトンバースト解析においても、相乗、相加、調和平均のいずれを用いても大きな差は無かった。また、積については、分散が大きくなる傾向があるため、解析データの算出方法としては相乗平均等が適しているものと考えられる。

20

【 0 0 9 1 】

本発明による蛍光解析装置、及び蛍光解析方法は、上記実施形態及び構成例に限られるものではなく、様々な変形が可能である。例えば、蛍光測定に用いられる蛍光顕微鏡等の装置構成については、図 1 はその一例を示すものであり、具体的には様々な構成を用いて良い。また、上記した蛍光解析法は、測定試料に 1 種類の蛍光プローブのみを加える場合以外にも、様々な条件での蛍光測定に対して適用可能である。また、上記した蛍光解析装置及び解析方法は、フリーの蛍光プローブの影響を抑制できることから、例えば分子間相互作用における結合力が弱い反応系に対する蛍光解析法として有効であると考えられ、これまで E L I S A 法等に適用できなかった抗原抗体反応の組合せについても適用できる可能性がある。

30

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 9 2 】

本発明は、測定領域内にある蛍光プローブからの蛍光を測定することによる測定試料の蛍光解析を好適に実行することが可能な蛍光解析装置、及び蛍光解析方法として利用可能である。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 3 】

【 図 1 】 蛍光解析装置の一実施形態の構成を示す図である。

【 図 2 】 蛍光解析装置による解析対象の一例を示す図である。

【 図 3 】 光子数測定データに対して得られる相関関数を示すグラフである。

【 図 4 】 同時性を考慮した光子数解析データに対して得られる相関関数を示すグラフである。

【 図 5 】 相関関数から求められる分子数のピン幅依存性を示すグラフである。

【 図 6 】 光子数測定データに対して得られる相関関数を示すグラフである。

50

【図7】 相関関数から求められる分子数のピン幅依存性を示すグラフである。  
 【図8】 相関関数から求められる分子数のピン幅依存性を示すグラフである。  
 【図9】 同時性を考慮した光子数解析データに対して得られる相関関数を示すグラフである。

【図10】 光子数データでの計数値の分布を示すグラフである。  
 【図11】 光子数データでの計数値の分布を示すグラフである。

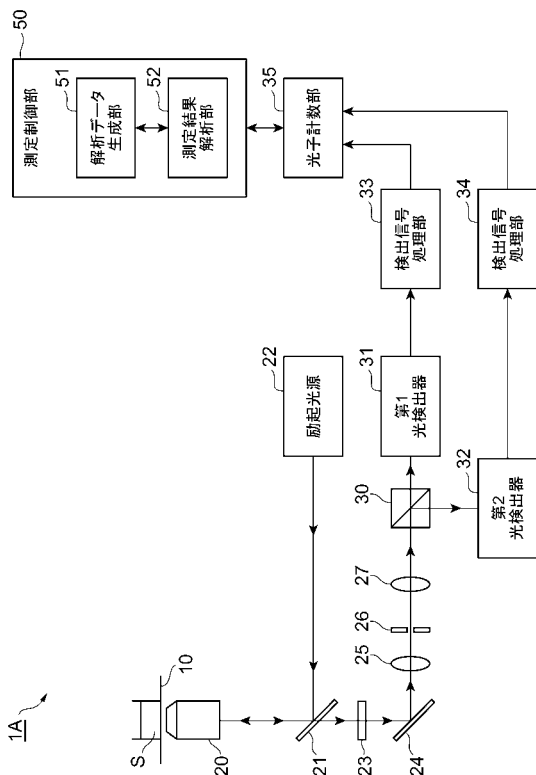
【符号の説明】

【0094】

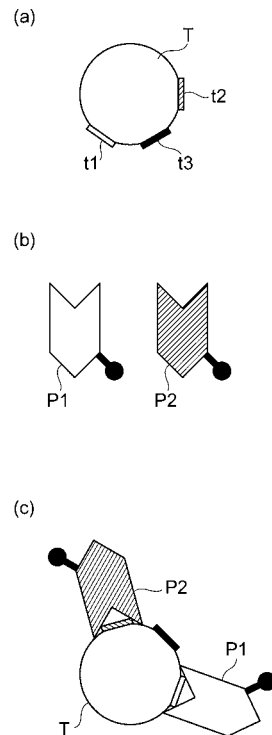
1 A ... 蛍光解析装置、S ... 測定試料、10 ... 試料ホルダ、20 ... 対物レンズ、21 ... ダイクロイックミラー、22 ... 励起光源、23 ... 光フィルタ、24 ... 反射ミラー、25 ... 結像レンズ、26 ... ピンホール、27 ... コリメートレンズ、

30 ... ビームスプリッタ、31 ... 第1光検出器、32 ... 第2光検出器、33 ... 第1検出信号処理部、34 ... 第2検出信号処理部、35 ... 光子計数部、50 ... 測定制御部、51 ... 解析データ生成部、52 ... 測定結果解析部、53 ... 光子計数部、54 ... 解析データ生成部、55 ... 測定結果解析部。

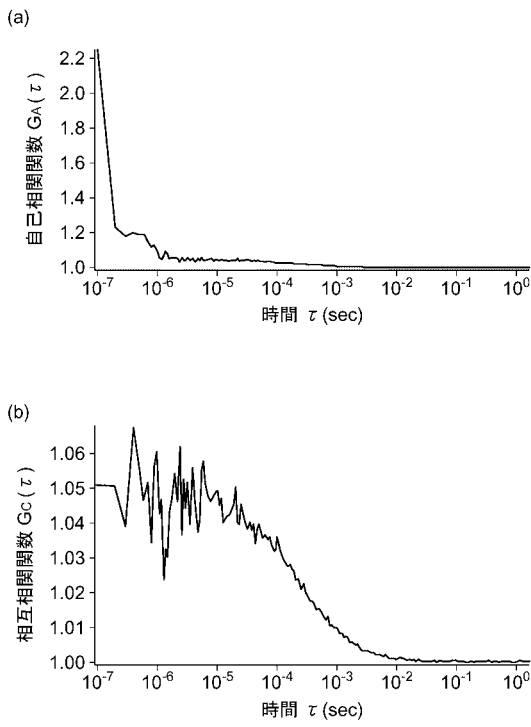
【図1】



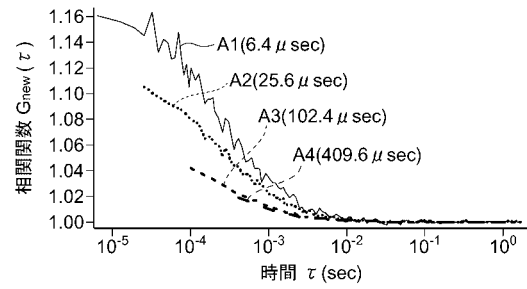
【図2】



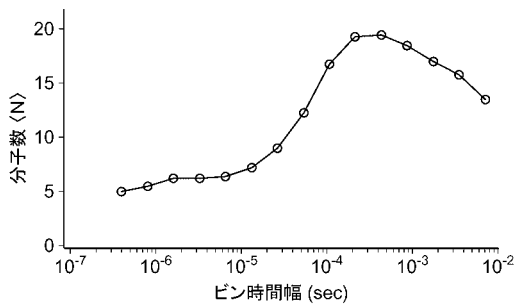
【 図 3 】



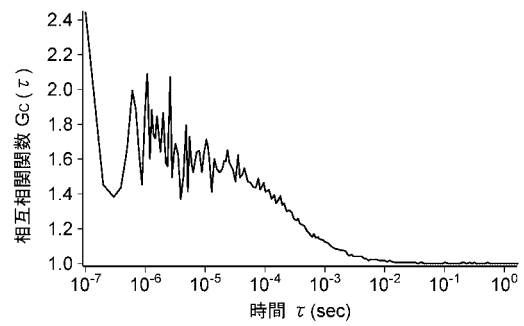
【 図 4 】



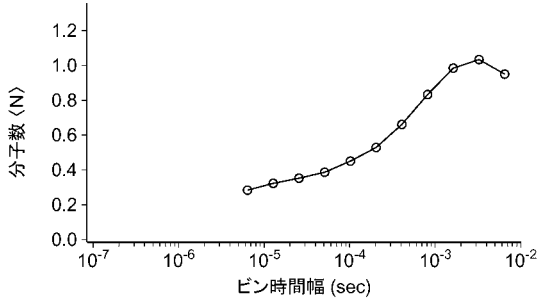
【 図 5 】



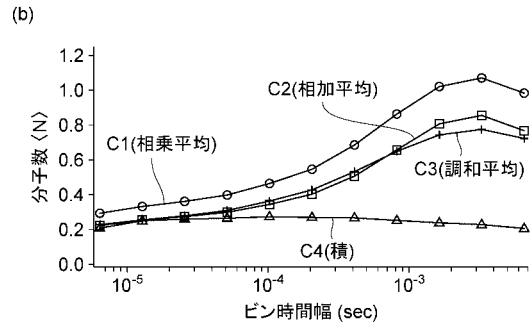
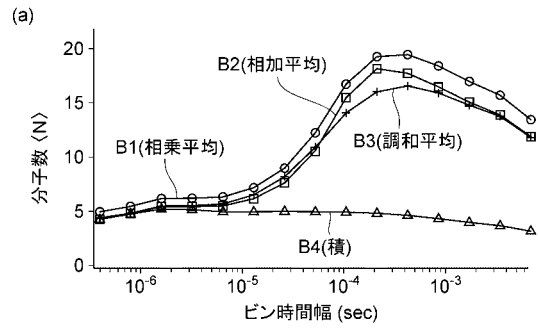
【 図 6 】



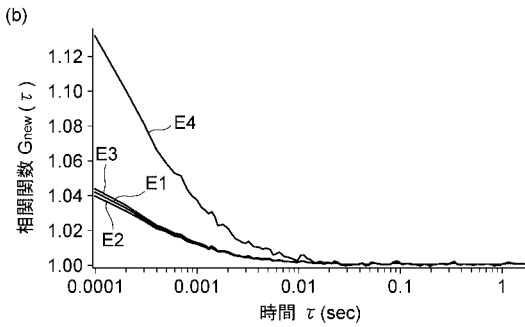
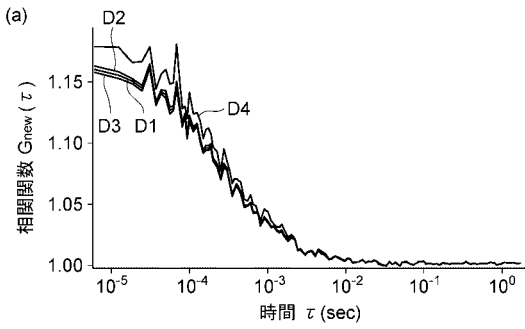
【 図 7 】



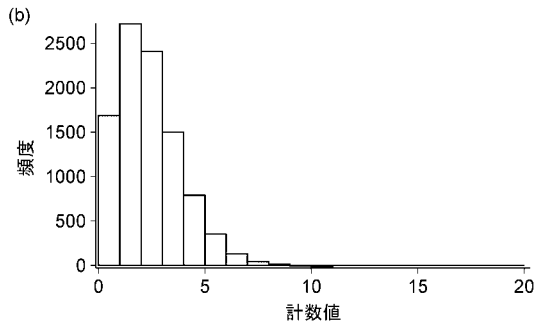
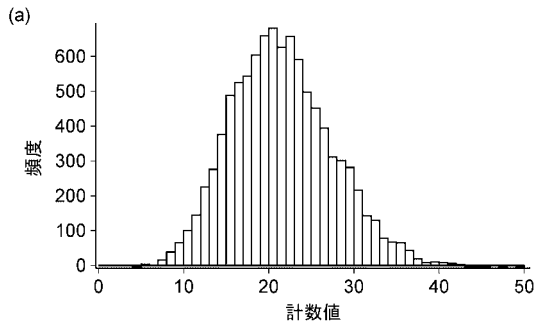
【 図 8 】



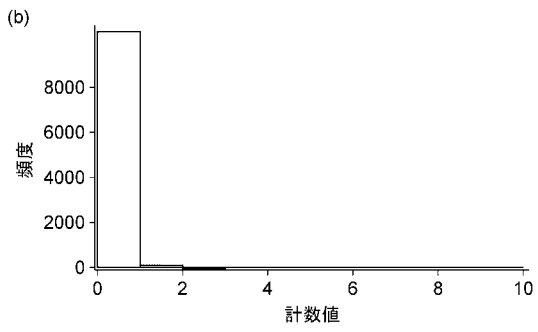
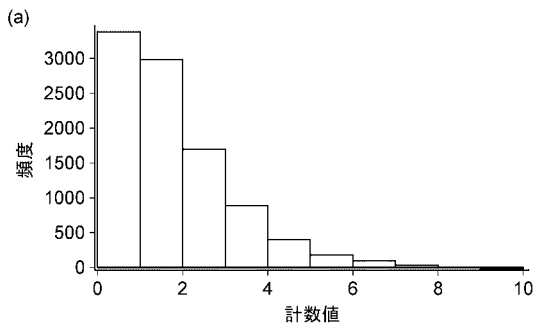
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 杉江 正美

静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内

(72)発明者 加藤 進

静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内

Fターム(参考) 2G043 BA16 CA04 EA01 FA02 FA03 HA01 HA02 HA09 JA02 KA02  
KA05 KA09 LA02 NA01 NA02 NA11