

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年12月31日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/001402 A1(51) 国際特許分類⁷: G01N 21/64

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007894

(22) 国際出願日: 2003年6月20日 (20.06.2003)

(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2002-181928 2002年6月21日 (21.06.2002) JP
特願2002-361158 2002年12月12日 (12.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリンパス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO.,

LTD.) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

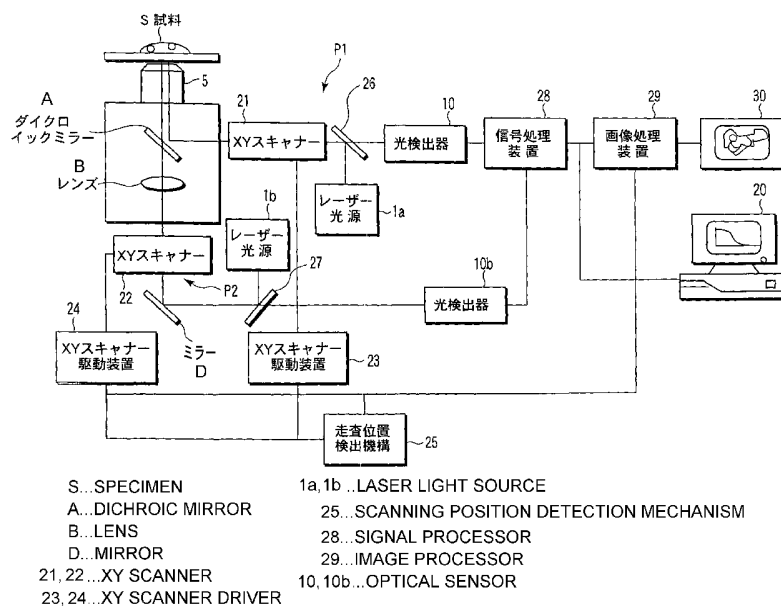
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 南波 昭宏 (NAMBA, Akihiro) [JP/JP]; 〒152-0012 東京都目黒区洗足2-11-5 Tokyo (JP). 石橋 養親 (ISHIBASHI, Kiyochika) [JP/JP]; 〒192-0363 東京都八王子市別所1-54-4-1304 Tokyo (JP). 堀川 嘉明 (HORIKAWA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒193-0832 東京都八王子市散田町3-9-15-804 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 鈴江 武彦, 外 (SUZUYE, Takehiko et al.); 〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目7番2号 鈴榮特許綜合法律事務所内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: BIOMOLECULE ANALYZER

(54) 発明の名称: 生体分子解析装置



(57) Abstract: An instrument for analyzing a dynamic behavior of a biomolecule, comprising image acquiring means for acquiring an image of at least an observation area of a biological specimen containing a biomolecule held measurably, specifying means for specifying an arbitrary point on the image acquired by the image acquiring means, locating means for locating a measurement point in a position on the specimen corresponding to the point specified by the specifying means continuously, measuring means for measuring a signal originated from dynamic information on a substance to be measured from the measurement point located by the locating means, and analyzing means for analyzing the results of the measurement by the measuring means.

(57) 要約: 本発明の生体分子解析装置は、生体分子の動的挙動を解析する生体分子解析装置であって、測定可能な状態に保持された生体分子を含む生物学的試料の少なくとも一つの観察領域に対応する画像を取得する画像取得手段と、この画像取得手段で取得した画像上の任意の点を指定する指定手段と、この指定手段で指定された点に対応する試料上の点位置に測定点を継続

[続葉有]



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

生体分子解析装置

技術分野

本発明は、試料内の複数の特定部位の統計的な性質や各部位間の相互作用などを求める生体分子解析装置に関する。

背景技術

共焦点走査型光学顕微鏡に関しては、例えば文献 "Confocal Microscopy" T.Wilson(ed.) Academic press (London)に解説がある。また、主に生物試料を対象とした解説として、文献 "Handbook of Biological confocal Microscopy" J.B.Pawley(ed.) Plenum Press (New York)などがある。蛍光相関分光法に関しては、例えば文献 "Fluorescence correlation spectroscopy" R.Rigler, E.S.Elson (eds.) Springer (Berlin) などの解説がある。

1990年代に入り、蛍光を用いた単一分子の検出・イメージングに関する研究が急増している。例えば単一分子の検出法として、文献 P.M.Goodwin etc. ACC.Chem.Res. (1996), Vol.29, p607-613、また蛍光相関分光法 (FCS) などが挙げられる。蛍光相関分光法では、共焦点レーザー顕微鏡の視野の中で蛍光標識したタンパク質や担体粒子を溶液中に浮遊させ、これらの微粒子のブラウン運動に基づく蛍光強度のゆらぎを解析して自己相関関数を求め、対象とする微粒子の数や大きさなどを推測する。この技術については、例えば、特表平11-502608号や金城政孝「蛋白質 核酸 酵素」(1999) Vol.44, No.9, p1431-1437に論じられている。

一方、上記の共焦点走査型顕微鏡および蛍光相関分光法に関して、いくつか特許出願がなされている。例えば、特開 2001-194303 号公報では、レーザー光をシリンドリカル・レンズに導き、これによりスポット光ではないライン状に連続した励起用の光ビームを形成して試料に照射する。このライン状の光ビームは、ガルバノ・ミラーによる光走査によってシリンドリカル・レンズの垂直方向に移動して、試料の撮像領域内全体を 2 次元的に励起する。試料からの蛍光信号は CCD のような 2 次元光検出器で画像化する。この方法では、シリンドリカル・レンズの走査速度より遅い並進拡散速度を有するような分子のみが励起されて画像上に蛍光が表示される。

また、特開平 08-43739 号公報、特開 2000-98245 号公報では、走査型光学顕微鏡において、多重染色された試料からの蛍光をそれぞれグレーティング、プリズムにより分光し、複数の光検出器により成分波長毎に検出を行なう。

特開平 08-068694 号公報では、光ファイバーを、液体試料を収容する反応容器中に侵入させることにより、空間的に離れた部位から蛍光相関解析を行なう。マルチプレクス処理により 1 本の光ビームを複数に分離することにより、複数の反応容器から別々の蛍光強度を検出することが開示されている。

特開平 09-113448 号公報では、複数の反応容器をライン状に並べて、全ての反応容器を通過するように 1 本のレーザー光を照射し、各反応容器内の手前に集光レンズを配置することで全ての容器に 1 個の焦点を生じさせて、各反応容器内

の試料について同時に蛍光相関解析を行なう。

特開平 10-206742 号公報では、レーザー走査型共焦点光学顕微鏡において、2つの独立した走査光学系によって、異なる時間の観察画像を取得し、画像を重ねたときの位置移動に基づいて標本の動的特性を求める。

従来行なわれている蛍光相関分光法では、視野内に存在する蛍光分子からの蛍光強度のゆらぎを観測し、これに基づいて時系列信号を得て、自己相関関数を求める。この場合、視野内に存在する蛍光分子が1種類のみであれば、得られた蛍光強度のゆらぎをそのまま解析することにより、蛍光分子の並進拡散速度などの情報を得ることができる。また、これら蛍光分子が移動したり、運動速度を変えたりしても、これらの変化を統計的に捉えることができる。発光波長の異なる2種類以上の蛍光分子が試料内に存在する場合は、波長分離を行なうことにより、それぞれの蛍光分子の自己相関や相互相関を求めることができる。しかし、同一視野内に限定されてしまう。

実際の生体細胞などを観測しようとする場合、細胞内外、細胞核内外での所望の分子の挙動をリアルタイムで観察することや、細胞内のシグナル伝達や物質輸送、細胞分裂などの事象について経時的な変化や局在情報を得ることが必要とされる。従来の蛍光相関分光法では、分子の集団としての状態変化や、挙動については捉えることができるが、細胞内外の所望の部位の状態変化などについて、ダイナミックに測定することは不可能であった。

本発明の目的は、対象となる試料の多様な動きや変化を捉えることができる生体分子解析装置を提供することにある。

発明の開示

(1) 本発明の生体分子解析装置は、生体分子の動的挙動を解析する生体分子解析装置であって、測定可能な状態に保持された生体分子を含む生物学的試料の少なくとも一つの観察領域に対応する画像を取得する画像取得手段と、この画像取得手段で取得した画像上の任意の点を指定する指定手段と、この指定手段で指定された点に対応する試料上の点位置に測定点を継続的に一致するように配置する配置手段と、この配置手段で配置された測定点から被測定物質の動的情報に由来する信号を測定する測定手段と、この測定手段で測定した結果を解析する解析手段と、を具備している。

(2) 本発明の生体分子解析装置は上記(1)に記載の装置であり、かつ前記画像取得手段で取得する画像は3次元領域を含む画像であり、

前記配置手段は、測定点を3次元上の任意の位置に配置する。

(3) 本発明の生体分子解析装置は上記(1)に記載の装置であり、かつ前記測定手段は、同一の測定点から時間の異なる複数の信号を取得し、前記解析手段は、前記測定点間の出力を比較し演算する。

(4) 本発明の生体分子解析装置は上記(1)に記載の装置であり、かつ前記測定手段は、光学的信号の強度を測定する。

(5) 本発明の生体分子解析装置は上記(1)または(2)に記載の装置であり、かつ前記解析手段は、指定された点が属する試料上の成分に応じて適切な動的情報に関する演算式を用いて演算する。

(6) 本発明の生体分子解析装置は上記(1)乃至(5)のいずれかに記載の装置であり、かつ前記指定手段は、任意の2以上の点を指定可能に構成され、前記配置手段及び前記測定手段は、指定された2以上の点のそれぞれにおいて独立して機能し、前記解析手段は、前記2以上の点のそれぞれから得られた測定結果を比較可能に出力する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の第1の実施の形態に係る生体分子解析装置の基本構成を示す図。

図2は、本発明の第1の実施の形態に係る生体分子解析装置の走査光学系の基本構成を示す図。

図3は、本発明の第1の実施の形態に係る生体分子解析装置の走査光学系の具体的な構成を示す図。

図4は、本発明の第1の実施の形態に係る生体分子解析装置の具体的な構成を示す図。

図5は、本発明の第1の実施の形態に係る多数のレーザー光源と多数の光検出器を用いた走査光学系の構成を示す図。

図6は、本発明の第2の実施の形態に係る生体分子解析装置の構成を示す図。

図7は、本発明の第3の実施の形態に係る生体分子解析装置の構成を示す図。

図 8 A, B は、本発明の第 4 の実施の形態に係る標準チャートの例を示す図。

図 9 は、本発明の第 4 の実施の形態に係る入力電圧に対する走査角の動的特性と静的特性を示す図。

図 10 は、本発明の第 4 の実施の形態に係る画像メモリ中に記録される画像を表す図。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を図面を参照して説明する。

図 1 は、本発明の第 1 の実施の形態に係る生体分子解析装置の基本構成を示す図である。本発明では、従来から用いられているレーザー走査型共焦点光学顕微鏡をベースにしている。本第 1 の実施の形態では、微小な測定領域をレーザー共焦点光学系により実現する。微小な共焦点領域の形成のために、NA（開口数）1.0 程度の大きさの開口数の対物レンズを用いる。これにより得られる共焦点領域は、直径 0.6 μm 程度、長さ 2 μm 程度の大きさの略円筒状となる。

図 1 では、二つの照明系 S 1 a, S 2 a、二つの走査系 S 1 b, S 2 b、及び二つの検出系 S 1 c, S 2 c を備えている。照明系 S 1 a, S 2 a は、それぞれレーザー光源 1 a, 1 b、及び第 1 レンズ 2 a, 2 b からなる。走査系 S 1 b, S 2 b は、それぞれサーボ方式のガルバノスキャナー（ガルバノミラー）6 a, 6 b からなる。ガルバノスキャナー 6 a, 6 b は、互いに走査方向が垂直方向になるように配置され、各々がレーザー光を X 軸、Y 軸走査する X 軸走査スキャナと Y 軸走査スキャナからなる。検出系 S 1 c, S 2 c は、それ

ぞれ受光用レンズ 9 a , 9 b 、受光用ピンホール 8 a , 8 b 、及び光検出器 10 a , 10 b からなる。

まず、ステージ S T 上に測定可能な状態で保持された生物学的試料（細胞）S の画像を取得するために、第 1 の照明系 S 1 a 、第 1 の走査系 S 1 b 、及び第 1 の検出系 S 1 c を用いる。レーザー光源 1 a から照射されたレーザー光は、第 1 レンズ 2 a 、ダイクロイックミラー 7 a 、及びミラー 101 を介して、ガルバノスキャナー 6 a に達する。レーザー光は、ガルバノスキャナー 6 a で X Y 走査され、ダイクロイックミラー 100 を透過し、対物レンズ 5 を介してステージ S T 上の試料 S を照明する。

試料 S からの反射光および蛍光は、対物レンズ 5 を介してダイクロイックミラー 100 を透過し、ガルバノスキャナー 6 a 、ミラー 101 、ダイクロイックミラー 7 a 、ミラー 91 a 、受光用レンズ 9 a 、及び受光用ピンホール 8 a を介して光検出器 10 a で受光される。光検出器 10 a は、光学的信号の強度を測定する。光学的信号は、画像処理装置にてコントラスト向上、輪郭強調などの画像処理が行なわれた後、コンピューターに導かれ、T V モニター上で 2 次元画像となる。

次に、試料 S 内の蛍光分子の自己相関関数を取得するために、第 2 の照明系 S 2 a 、第 2 の走査系 S 2 b 、及び第 2 の検出系 S 2 c を用いる。レーザー光源 1 b から照射されたレーザー光は、第 1 レンズ 2 b 及びダイクロイックミラー 7 b を介して、ガルバノスキャナー 6 b に達する。レーザー光は、

ガルバノスキャナー 6 b で X Y 走査され、ダイクロイックミラー 1 0 0 で反射され、対物レンズ 5 を介してステージ S T 上の試料 S を照明する。これにより、レーザー光が微小な測定領域に存在する試料 S 内の蛍光分子を励起し、蛍光信号（フォトンパルス）が得られる。

得られた蛍光信号、すなわち蛍光分子からの蛍光の強度ゆらぎは、対物レンズ 5 を介してダイクロイックミラー 1 0 0 で反射し、ガルバノスキャナー 6 b、ダイクロイックミラー 7 b、ミラー 9 1 b、受光用レンズ 9 b、及び受光用ピンホール 8 b を介して光検出器 1 0 b で受光される。蛍光信号は、光検出器 1 0 b で光電流パルスに変換され、信号処理装置に導かれて波形整形、2 値化処理などが行なわれ、コンピューター（相関解析装置）により蛍光相関分光法（F C S）で自己相関関数、相互相関関数などが求められる。ここで得られた自己相関関数から、蛍光分子の並進拡散運動の速度などの統計的な性質が求められる。なお、レーザー光を X Y 走査するために、ガルバノスキャナーに限らず、A O モジューレーター（A O D）やポリゴン鏡などを用いてもよい。

図 2 は、図 1 に示した生体分子解析装置の照明光学系、走査光学系、及び検出光学系の基本構成を示す図である。図 2 において図 1 と同一な部分には同符号を付してある。

レーザー光源 1 b から出射したレーザー光は、第 1 レンズ 2 b により合焦（フォーカス）される。合焦位置には、照明光用ピンホール 3 b が配置されている。また、第 2 レンズ 4 のフォーカス位置に照明光用ピンホール 3 b の位置を合わせ

ている。第 2 レンズ 4 は、対物レンズ 5 までコリメート光（平行光）を導く。また、対物レンズ 5 の焦点位置に試料面を合わせている。

レーザー光源 1 b から照射されたレーザー光は、第 1 レンズ 2 b と照明光用ピンホール 3 b を介してダイクロイックミラー 7 b を透過し、第 2 レンズ 4 を介して、X 軸走査スキャナ 6 1 と Y 軸走査スキャナ 6 2 に達する。X 軸走査スキャナ 6 1 と Y 軸走査スキャナ 6 2 は、互いに走査方向が直交している。レーザー光は、X 軸走査スキャナ 6 1 と Y 軸走査スキャナ 6 2 により、それぞれ X 軸走査及び Y 軸走査され、試料 S 面内で 2 次元走査される。

試料 S 内の蛍光分子からの蛍光信号は、照射されたレーザー光と同じ光路を通して、第 2 レンズ 4 と照明光用ピンホール 3 b の間に配置されたダイクロイックミラー 7 b で反射される。この反射光は、第 2 レンズ 4 の焦点位置に配置された受光用ピンホール 8 b を通過して、受光用レンズ 9 b に導かれる。ダイクロイックミラー 7 b は、照射されたレーザー光（励起光）を透過し、蛍光分子から発せられた蛍光を反射させるスペクトル特性を持っている。受光用レンズ 9 b の焦点位置に受光用ピンホール 8 b が位置している。蛍光は、受光用レンズ 9 b を通って光検出器（受光器）10 b に到達する。光検出器 10 b としては、画像取得用の CCD カメラなどの 2 次元光検出器を用いる。蛍光の強度ゆらぎの測定には、APD（アバランシェフォトダイオード）、あるいは光電子増倍管などを用いる。

図 3 は、図 1 に示した生体分子解析装置の走査光学系の具体的な構成を示す図である。図 3 において図 2 と同一な部分には同符号を付してある。以下、レーザー光の 3 次元走査について図 3 を基に説明する。

図 3 の光学系は、光軸方向（Z 軸方向）のフォーカス移動を実施できるよう構築されている。図 3 では、図 2 における照明光用ピンホール 3 b とダイクロイックミラー 7 b との間に可動レンズ 1 1 が配置されている。この可動レンズ 1 1 を光軸方向に適量移動させることにより、レーザー光源 1 b の試料面でのフォーカス位置を光軸方向（Z 軸方向）に変化させることができる。例えば、可動レンズ 1 1 を a の方向へ移動させると、試料面でのフォーカス位置は a' となる。逆に可動レンズを c の方向へ移動させると、試料面でのフォーカス位置は c' となる。

このように可動レンズ 1 1 を移動させることにより、可動レンズ 1 1 を通過した光束が可動レンズ 1 1 の移動量に応じた拡がり角を持つようになる。これにより、対物レンズ 5 を通過した照射レーザー光のフォーカス位置を光軸方向に適量移動させることができる。さらに、3 次元走査を行なうことができると共に、試料内の 3 次元的位置に対して、照射レーザー光のフォーカスを試料の深さ方向に合わせられ、深さ方向に分布した所望の蛍光分子を励起することができる。

なお、光軸方向（Z 軸方向）のフォーカス移動は、対物レンズ 5 を光軸方向に移動させることでも実施できる。

図 4 は、本発明の第 1 の実施の形態に係る生体分子解析装

置の具体的な構成を示す図である。以下、生体分子解析装置の動作について図 4 を基に説明する。この装置では、レーザー走査型共焦点光学顕微鏡により試料の 2 次元、あるいは 3 次元画像を TV モニター上に得る。2 次元画像を得るための XY スキャナー 21 として、例えばガルバノスキャナーを用いて XY 走査を行なう。これを、例えば第一走査系 P1 とする。もう一方の XY スキャナー 22 として第一走査系 P1 と同じガルバノスキャナーを用い、これを例えば第二走査系 P2 とする。

顕微鏡による観察画像を取得する場合、例えば第一走査系 P1 の XY 走査により、細胞内にレーザー光を照射し、反射光、蛍光を光検出器 10a で受光し、光強度信号を電気信号に変換し、信号処理装置 28 で波形整形した後、画像処理装置 29 で 2 次元画像を生成し、TV モニター 30 上に出力させる。また、上述した可動レンズまたは対物レンズ 5 を光軸方向に移動させることにより、レーザー光のフォーカス位置を光軸方向に沿って上下させることができる。これにより、3 次元画像を TV モニター 30 上に生成させることができる。

2 つの XY スキャナー 21, 22 は、互いに直交する方向に走査されるように配置されており、コンピューター 20 によって制御される XY スキャナー駆動装置 23, 24 により、走査運動が精確に制御される。XY スキャナー駆動装置 23, 24 には走査位置検出機構 25 が装備されており、走査位置がリアルタイムで精度良く検知され、コンピューター 20 にフィードバック制御される。これにより、試料 S 内をランダ

ムにスキャンして、試料 S 内の所望の位置に存在する蛍光分子からの蛍光信号を 2 つ同時に測定することができる。なお、コンピューター 20 が X Y スキャナー駆動装置 23, 24 を制御することにより、試料 S 内の同一の位置から時間の異なる複数の蛍光信号を取得することもできる。

励起光としてのレーザーには、波長 488nm のアルゴンレーザー、633nm の He・Ne レーザーを用いる。試料 S の細胞内の所望の箇所を標識する蛍光色素は、ローダミン・グリーン(RhG)、サイファイヴ(Cy5)を用いる。ローダミン・グリーン(RhG)は、レーザー光源 1 a からの波長 488nm のアルゴンレーザーで励起する。サイファイヴ(Cy5)は、レーザー光源 1 b からの波長 633nm の He・Ne レーザーで励起する。所望の箇所の蛍光色素分子からの蛍光は励起光と同じ光路を通り、それぞれの色素の発光波長に合わせて光学的に調整されたダイクロイックミラー 26, 27 により、入射光路から分離されて光検出器 10 a, 10 b で受光される。

光検出器 10 a, 10 b に入射した光強度信号は電気信号に変換され、信号処理装置 28 で波形整形され、on-off の 2 値化パルスに変換されて、コンピューター 20 に導かれる。コンピューター 20 では、入力された 2 値化パルス信号に対して相関演算が行なわれ、自己相関関数が求められる。さらに、得られた自己相関関数から、蛍光分子の並進拡散速度や測定領域中の蛍光分子の数の変化などが求められる。光検出器 10 a, 10 b に入射する光強度信号が比較的大きい場合は、光検出器 10 a, 10 b から出力される電気信号は時系

列信号となる。この場合は、その時系列信号を信号処理装置 28 で A/D 変換し、デジタル信号に変換した後、波形整形を行ない、先と同様に 2 値化パルス信号に変換する。この 2 値化パルス信号をコンピューター 20 に導くことによって相関演算が行なわれ、自己相関関数が求められる。あるいは、デジタル化された時系列信号をそのままコンピューター 20 に導いて相関演算を行なってもよい。

観察画像上でのスキヤニングポイントの指定は、以下のように行なう。観察者は、TV モニター 30 上の観察画像を見ながら所望のポイントの蛍光分子からの発光を見出し、この点で XY スキャナー 21, 22 の走査ミラーのスキヤンを停止するように、コンピューター 20 に付属の指定手段、例えば、キーボードやマウスポインタ等によって画像上のポイントを指定して走査ミラー駆動機構 25 に位置情報を伝えることによって、光軸が調整される。これにより、試料 S の 3 次元上の任意の位置に測定点が配置される。このときの走査ミラーの角度は走査位置検出機構 25 によって精度よく求められる。

図 5 は、多数の照明光学系と多数の検出光学系を用いた構成を示す図である。以下、多数のレーザー光源と多数の光検出器を用いた測定について図 5 を基に説明する。図 5 の構成は、基本的に 1 走査光学系、1 検出光学系の場合と同様である。図 5 に示すように、三つのレーザー光源 1a, 1b, 1c と四つの光検出器 10a, 10b, 10c, 10d を備えている。

レーザー光源 1 a は波長 488nm のアルゴンレーザー、レーザー光源 1 b は波長 514.5nm のアルゴンレーザー、レーザー光源 1 c は波長 632.8nm のヘリウムネオンレーザーからなる。試料 S への蛍光色素としては、ローダミンググリーン (RhG)、テトラメチルローダミン (TMR)、サイファイヴ (Cy5) を用いる。波長 488nm のアルゴンレーザーによりローダミンググリーン (RhG) を励起する。波長 514.5nm のアルゴンレーザーによりテトラメチルローダミン (TMR) を励起する。波長 632.8nm のヘリウムネオンレーザーによりサイファイヴ (Cy5) を励起する。各蛍光色素は細胞内の所望の目的分子、例えば DNA を構成する塩基やコレステロールを標識する。これにより細胞内に取り込まれたときのコレステロールの凝集などの構造変化に関する情報を得る。

レーザー光源 1 a から照射されたレーザー光は、ダイクロイックミラー 3 1 a を透過し、ダイクロイックミラー 2 6 で反射され、X Y スキャナー 2 1 と X Y スキャナー 2 2 に達する。レーザー光源 1 b から照射されたレーザー光は、ダイクロイックミラー 3 1 b で反射され、ダイクロイックミラー 3 1 a で反射され、ダイクロイックミラー 2 6 で反射され、X Y スキャナー 2 2 と X Y スキャナー 2 1 に達する。レーザー光源 1 c から照射されたレーザー光は、ダイクロイックミラー 3 1 c で反射され、ダイクロイックミラー 3 1 b を透過し、ダイクロイックミラー 3 1 a で反射され、ダイクロイックミラー 2 6 で反射され、X Y スキャナー 2 1 と X Y スキャナー 2 2 に達する。レーザー光は、X Y スキャナー 2 1 と X Y ス

キャナー 22 により、対物レンズ 5 を介して試料 S 面内で走査される。

試料 S からの反射光および蛍光は、対物レンズ 5、XY スキャナー 21 と XY スキャナー 22 を介してダイクロイックミラー 26 を透過し、ミラー 32 で反射され、ミラー 33 で反射される。ミラー 33 で反射されダイクロイックミラー 34a で反射された前記反射光および蛍光は、レンズ 35a、受光用ピンホール 8a、及び受光用レンズ 9a を介して、光検出器 10a に受光される。同様に、ダイクロイックミラー 34a を透過し、ダイクロイックミラー 34b, 34c, 34d で反射された前記反射光および蛍光は、それぞれレンズ 35b, 35c, 35d、受光用ピンホール 8b, 8c, 8d、及び受光用レンズ 9b, 9c, 9d を介して、光検出器 10b, 10c, 10d に受光される。

図 5 では、レーザー光源のひとつを走査光学系、観察光学系として共有している。これはさらにレーザー光源を 1 個増やして 4 本として、そのうち 1 本を観察光学系として試料画像の取得に用い、他の 3 本を蛍光励起用に用いても良い。またレーザー光源はこれに限ることなく、5 本以上としても良い。

このように、2 個の XY スキャナー 21, 22 を用いて、それぞれ互いに直交する方向に走査を行なう。本第 1 の実施の形態では XY スキャナー 2 個を各レーザー光源 1a, 1b, 1c で共有して、同じ方向にレーザー光を走査する構成になっているが、これに限ることなく、XY スキャナーを 4 個、

あるいは6個用いて、それぞれのレーザー光について、別々な方向に走査しても良い。

また、走査位置検出機構によりXYスキャナーの角度を検知し、その位置でXYスキャナーを固定して、試料の目的分子の位置にレーザー光を照射し、目的分子からの蛍光信号を検出する。蛍光分子から発せられる蛍光信号をそれぞれ別々の光検出器10a, 10b, 10c, 10dで受光する。得られた時系列パルス信号を信号処理装置で波形整形、2値化処理を行なって、コンピュータに導き、相関演算を行なって、それぞれ自己相関関数を求める。

本第1の実施の形態により、同一細胞内の異なる蛋白質などの目的分子の挙動を同時にリアルタイムで捉えることができる。また、異なる目的分子の相互相関についても情報を得ることができる。

図6は、本発明の第2の実施の形態に係る生体分子解析装置の構成を示す図である。図6において図1と同一な部分には同符号を付してある。

図6では、四つの照明系S11a, S12a, S22a, S32a、三つの走査系S11b, S12b, S13b、及び四つの検出系S11c, S12c, S22c, S32cを備えている。照明系S11a, S12a, S22a, S32aは、それぞれレーザー光源11a, 11b, 21b, 31b及び第1レンズ12a, 12b, 22b, 32bからなる。走査系S11b, S12b, S13bは、それぞれサーボ方式のガルバノスキャナー（ガルバノミラー）16a, 16b、

1 6 c からなる。ガルバノスキャナー 1 6 a , 1 6 b 、 1 6 c は、各々が X 軸走査スキャナと Y 軸走査スキャナからなる。検出系 S 1 1 c , S 1 2 c 、 S 2 2 c 、 S 3 2 c は、それぞれ受光用レンズ 1 9 a , 1 9 b 、 2 9 b 、 3 9 b 、受光用ピンホール 1 8 a , 1 8 b 、 2 8 b 、 3 8 b 及び光検出器 1 1 0 a , 1 1 0 b 、 2 1 0 b 、 3 1 0 b からなる。

まず、ステージ S T 上に測定可能な状態で保持された生物学的試料（細胞） S の画像を取得するために、第 1 の照明系 S 1 1 a 、第 1 の走査系 S 1 1 b 、及び第 1 の検出系 S 1 1 c を用いる。レーザー光源 1 1 a から照射されたレーザー光は、第 1 レンズ 1 2 a 及びダイクロイックミラー 1 7 a を介して、ガルバノスキャナー 1 6 a に達する。レーザー光は、ガルバノスキャナー 1 6 a で X Y 走査され、ダイクロイックミラー 1 0 2 で反射し、ダイクロイックミラー 1 0 3 を透過して、対物レンズ 5 を介してステージ S T 上の試料 S を照明する。

試料 S からの反射光および蛍光は、対物レンズ 5 を介してダイクロイックミラー 1 0 3 を透過し、ダイクロイックミラー 1 0 2 で反射して、ガルバノスキャナー 1 6 b 、ダイクロイックミラー 1 7 a 、ミラー 1 9 1 a 、受光用レンズ 1 9 a 、及び受光用ピンホール 1 8 a を介して光検出器 1 1 0 a で受光される。光検出器 1 1 0 a は、光学的信号の強度を測定する。光学的信号は、画像処理装置にてコントラスト向上、輪郭強調などの画像処理が行なわれた後、コンピュータに導かれ、T V モニター上で 2 次元画像となる。

次に、試料 S 内の蛍光分子の自己相関関数を取得するために、例えば第 2 の照明系 S 1 2 a、第 2 の走査系 S 1 2 b、及び第 2 の検出系 S 1 2 c を用いる。レーザー光源 1 1 b から照射されたレーザー光は、第 1 レンズ 1 2 b、ダイクロイックミラー 1 7 b、及びミラー 1 0 4 を介して、ガルバノスキャナー 1 6 b に達する。レーザー光は、ガルバノスキャナー 1 6 b で X Y 走査され、ダイクロイックミラー 1 0 3 で反射され、対物レンズ 5 を介してステージ S T 上の試料 S を照明する。これにより、第 1 の実施の形態と同様にレーザー光が微小な測定領域に存在する試料 S 内の蛍光分子を励起し、蛍光信号（フォトンパルス）が得られる。

得られた蛍光信号、すなわち蛍光分子からの蛍光の強度ゆらぎは、対物レンズ 5 を介してダイクロイックミラー 1 0 3 で反射し、ガルバノスキャナー 1 6 b、ミラー 1 0 4、ダイクロイックミラー 1 7 b、ミラー 1 9 1 b、受光用レンズ 1 9 b、及び受光用ピンホール 1 8 b を介して光検出器 1 1 0 b で受光される。蛍光信号は、光検出器 1 1 0 b で光電流パルスに変換され、信号処理装置に導かれて波形整形、2 値化処理などが行なわれ、コンピューター（相関解析装置）により蛍光相関分光法（FCS）で自己相関関数、相互相関関数などが求められる。ここで得られた自己相関関数から、蛍光分子の並進拡散運動の速度などの統計的な性質が求められる。

上記の例では、蛍光分子の相関関数を取得するために、第 2 の照明系 S 1 2 a、第 2 の走査系 S 1 2 b、及び第 2 の検出系 S 1 2 c の組み合わせを用いたが、その他、第 3 の照明

系 S 2 2 a、第 2 の走査系 S 1 2 b、及び第 3 の検出系 S 2 2 c の組み合わせと、第 4 の照明系 S 3 2 a、第 3 の走査系 S 1 3 b、及び第 4 の検出系 S 3 2 c の組み合わせを用いることができる。すなわち、各光学系により個別に、試料内の所望の異なる部位に存在する蛍光分子からの自己相関関数または相互相関関数の取得を行なうことができる。各ガルバノスキャナー 1 6 a、1 6 b、1 6 c は互いに独立して動作し、試料内の異なる複数部位にレーザー光スポットを集光させる。あるいは、各ガルバノスキャナー 1 6 a、1 6 b、1 6 c を互いに連動させて、試料内の所望の一部位に同時にレーザー光スポットを集光させることもできる。

本第 2 の実施の形態では、蛍光色素を 1 種類としている。例えばローダミンググリーン(RhG)を用い、レーザーはアルゴンレーザー（波長 488nm）を用いる。アルゴンレーザーの出力光強度は例えば 1 0 m W とする。レーザーの出力光強度は大きければ大きいほど、強く蛍光色素を励起することができ、強い蛍光を受光することができる。しかし、レーザーの出力光強度が大きすぎると、バックグラウンドノイズが増大すると共に、蛍光色素を褪色させてしまうこともある。したがって、装置構成などにもよるが、1 0 m W 程度の出力光強度が適当である。

本第 2 の実施の形態によれば、試料内の所望の異なる部位に存在する蛍光分子からの蛍光の強度ゆらぎを光検出器で受光し、相関解析装置に導く。これにより得られる自己相関関数または相互相関関数から、蛍光色素が付けられた細胞など

の状態や大きさなどを知ることができる。

図 7 は、本発明の第 3 の実施の形態に係る生体分子解析装置の構成を示す図である。図 7 において図 6 と同一な部分には同符号を付してある。

図 7 では、四つの走査系 S 1 1 b、S 1 2 b、S 1 3 b、S 1 4 b を備えている。ステージ S T 上に測定可能な状態で保持された生物学的試料（細胞）S の画像を取得する動作手順は、第 2 の実施の形態と同様である。また、試料 S 内の蛍光分子の自己相関関数を取得するために、第 2 の照明系 S 1 2 a、第 2 の走査系 S 1 2 b、及び第 2 の検出系 S 1 2 c を用いた場合の動作手順も、第 2 の実施の形態と同様である。

試料 S 内の蛍光分子の自己相関関数を取得するために、例えば第 3 の照明系 S 2 2 a、第 4 の走査系 S 1 4 b、及び第 3 の検出系 S 2 2 c を用いる。レーザー光源 2 1 b から照射されたレーザー光は、第 1 レンズ 2 2 b 及びダイクロイックミラー 2 7 b を介して、ガルバノスキャナー 1 6 d に達する。レーザー光は、ガルバノスキャナー 1 6 d で X Y 走査され、ダイクロイックミラー 1 0 5 で反射され、ダイクロイックミラー 1 0 2、ダイクロイックミラー 1 0 3、及び対物レンズ 5 を介してステージ S T 上の試料 S を照明する。これにより、第 1、第 2 の実施の形態と同様にレーザー光が微小な測定領域に存在する試料 S 内の蛍光分子を励起し、蛍光信号（フォトンパルス）が得られる。

得られた蛍光信号、すなわち蛍光分子からの蛍光の強度ゆらぎは、対物レンズ 5、ダイクロイックミラー 1 0 3、及び

ダイクロイックミラー 102 を介してダイクロイックミラー 105 で反射し、ガルバノスキャナー 16d、ダイクロイックミラー 27b、ミラー 291b、受光用レンズ 29b、及び受光用ピンホール 28b を介して光検出器 210b で受光される。また、第 4 の照明系 S32a、第 3 の走査系 S13b、及び第 4 の検出系 S32c を用いた場合、レーザー光は、ガルバノスキャナー 16c で X Y 走査される。

本第 3 の実施の形態では、レーザー光源、第 1 レンズ、ダイクロイックミラー、ミラー、受光用レンズ、受光用ピンホール、及び光検出器の組み合わせからなる各光学系に対して、それぞれ一組のガルバノスキャナーを用いた構成をなしている。これら各光学系では、レーザーの発振波長が異なり、またダイクロイックミラーの波長特性も異なる。

このような構成にすることで、各光学系により、ほぼ同一の集光位置に波長の異なるレーザー光を同時に集光させることができ、異なる蛍光色素からの蛍光を検出することができる。また、各光学系により、同一の対物レンズを介して試料内の異なる部位にレーザー光を照射することができる。このように、各光学系にて、独立して動作するガルバノスキャナーで走査をするため、各光学系により異なる位置にレーザー光が照射される。したがって、試料内の複数の離散的な部位にレーザー光スポットを同時に、またはタイミングをずらして集光させることができる。

なお、レーザー光源、第 1 レンズ、ダイクロイックミラー、ミラー、受光用レンズ、受光用ピンホール、及び光検出器の

組み合わせからなる一つの光学系に対して、ガルバノスキャナーで構成される走査系を2組以上用いてもよい。

本第3の実施の形態によれば、試料内の所望の異なる部位に、同時にまたはタイミングをずらして、単一または複数の異なる波長からなるレーザー光をまたは複数の異なる波長のレーザー光を複数本照射し、蛍光分子からの蛍光を取得し、画像として記録、観察すると共に、蛍光の強度ゆらぎから、演算により自己相関関数または相互相関関数などを取得することができる。

以下、第1～3の実施の形態に示した生体分子解析装置において動的特性と静的特性を補正する方法について説明する。

レーザー顕微鏡で得た画像に表示される任意の点を選択して蛍光相関分光法（FCS）により一分子の蛍光分析を行なう場合、レーザー顕微鏡で得られる画像は走査手段を高速で駆動しながら描画されている。このため、走査手段は同じ制御信号を入力して静止させても、一般に異なる位置に停止する。特に、ガルバノスキャナーのような機械的な走査手段では、その影響は顕著である。よって、レーザー顕微鏡で得た画像に表示される目標に対して正しくレーザー光を静止させるには、何らかの補正手段が必要である。

1) 標準チャートを用いる方法

図8A、Bは、標準チャートの例を示す図であり、図8Aは格子模様、図8Bはランダム模様である。この方法では、標準チャートを用意し、動的特性が静的特性と同じになるくらい低速で走査を行ない画像データを取得し、通常の高速走

査で得た画像データと比較して補正データを得る。

この方法を実現する構成要素は、通常の高速走査で得た画像を記録する第1のメモリ、低速走査で得た画像を記録する第2のメモリ、第1のメモリと第2のメモリに記録された二つの画像を比較する演算装置、演算装置での比較結果（補正データ）を記録する第3のメモリ、レーザー顕微鏡で得た画像上で指定された位置を補正データを用いて制御データに変換する補正装置からなる。なお、通常これらメモリ、演算装置、補正装置は全てコンピュータで実現する。

以下、標準チャートを用いる方法の手順を説明する。標準チャートを構成する標準画像データは、図8A、Bに示すような格子データ、ランダムデータなどが考えられる。

まず、通常の高速走査で画像を取得して第1のメモリに記録する。そして、低速走査で画像を取得して第2のメモリに記録する。次に演算装置で、高速走査で得た画像と低速走査で得た画像との位置のずれ或いは歪みを比較し、その比較結果を第3のメモリに記録する。通常この比較には相関演算が用いられる。次に演算装置で、高速走査で得た画像の制御信号に対する低速走査で得た画像の制御信号の補正データを作成する。通常、この補正データは走査の角度を制御する電圧値である。なお、この補正データは、高速走査のスピード毎、走査角度毎に作成する。

図9は、入力電圧に対する走査角の動的特性と静的特性を示す図である。以下、図9を用いて上記の方法をより具体的

に説明する。レーザー顕微鏡で高速走査を行なっている場合、電圧がいくつのときに走査角（画像上での位置）がどこか特定するのは難しい。実際には、電圧を軸として画像上での座標が決まる。

そこで、まず低速走査で得た画像の中で、図 9 に示すように観測点 c を選択して電圧 b を求める。次に、高速走査で得た画像の中からこの観測点 c（電圧 a）を見出し、低速走査で得た画像との位置の違いを求める。この差が静的特性と動的特性との差である。標準チャートを用いて画像全域に渡りこの補正データを設定しておくことにより、任意の位置で補正ができる。

実際に画像中で観測点を指定する場合、高速走査で得た画像上で観測点を指定し、レーザー光を観測点に停止させる場合は補正データを用いて電圧 b を入力する。このようにして、レーザー顕微鏡で得た画像上で指定した任意の位置に、レーザー光を正確に固定でき FCS 測定を行なうことができる。この方法により、光学系の歪など全ての誤差を補正できる。

2) 蛍光試料を用いる方法

蛍光色素を均一に塗布した試料に対して、走査手段を静止させてレーザー光を照射し退色させる。退色の仕方は、格子点状でもその他の模様でも良い。次に、通常の高速走査によりレーザー顕微鏡で得た蛍光画像を観察する。すると、退色した模様が画像上に現れている。この時の画像のずれから、動的特性と静的特性の差が明らかになる。

図 10 は、画像メモリ中に記録される画像を表す図である。

画像中の各画素は、サンプリングされたときの走査手段の角度或いは制御電圧（制御入力）を軸に記録されていると考えることができる。まず、走査手段を停止させて蛍光色素を退色させる。その時の走査手段への制御入力を（ a ， b ）とする。次に、通常のレーザー顕微鏡で得た蛍光画像を観察し、退色を確認した座標を（ c ， d ）とする。この（ a ， b ）と（ c ， d ）の差が静的特性と動的特性との差である。

この差を求める手法として、一般に相関演算がある。画像全面に渡ってある間隔でこのような作業を行えば、補正データを得ることができる。各画素毎の細かい補正は、実験で得た補正データを内挿することにより実施できる。実際の位置指定は、通常のレーザー顕微鏡で得た画像上で観察位置を指定（例えば（ c ， d ））し、補正データを用いて（ a ， b ）に変換すれば、正確な制御ができる。以上の方法により、顕微鏡画像から観察点を正確に設定できる。

本発明では、蛍光色素分子の励起用光源として、複数の連続発振レーザーあるいはパルスレーザーを測定点に応じて選択して（レーザーの波長を選択して）用い、細胞内領域で複数の所望の点を励起し、その蛍光強度のゆらぎを測定して、複数の種類の蛍光分子の並進拡散運動を解析することができる。この方法では、細胞核内外、細胞質内外で複数の目的分子をターゲットとして捉えることができ、細胞内のシグナル伝達や物質輸送、細胞分裂といった動的な変化を3次元的にリアルタイムで観察、記録しながら、解析を行なうことができる。また、細胞核内外における転写制御反応や情報伝達シ

システムが明らかにされ得るので、ゲノム創薬研究において有益な情報を提供することができる。これらは従来の蛍光相関分光測定法では実現できなかったことである。

また、細胞内の所望の２種類の分子に対して、相互相関を測定したい場合、それぞれを異なる蛍光色素で標識し、蛍光信号を並列に同時に検出して、蛍光強度ゆらぎの時系列信号（分子の動的情報に由来する信号）の解析を行なう。これにより、両者の相関が明確になると共に、遊離している分子の数、結合している分子の数などの情報も得ることができる。また、異なる２以上の離散的な位置同士で、１以上の刺激による応答性を同時に経過測定するのに適している。

同じ細胞内でも、核付近の深部と外界に近い細胞膜の近傍では、PH、イオン濃度勾配、酸素濃度の違いや蛋白質の分布の偏在など、さまざまな違いが予想される。特に核内では、転写因子などの蛋白質の流入や流出、転写複合体の形成や解離などが起こり、時々刻々ダイナミックに変化している。このような細胞内の離散的な複数箇所の変化を、本発明によりリアルタイムに画像化するだけでなく、その挙動をそれぞれ統計的に解析し、動きの変化を解明することができる。また、互いの相関性についての情報も得ることができる。

以上のように本実施の形態によれば、共焦点走査型光学顕微鏡をベースにし、視野内の特定の部位が蛍光標識された生物学的試料にレーザー光を照射し、試料画像を観察、記録しながら、試料内の複数の特定部位からの蛍光の強度ゆらぎを相関解析し、該部位の統計的な性質や各部位間の相互作用な

どを求める。

すなわち、試料中に離散的に存在する所望の蛍光分子を認識し、視野内の2次元あるいは3次元画像を観察、記録すると共に、試料画像上での位置を検知しながら、蛍光分子からの蛍光強度のゆらぎを同時あるいは別々に検出する。そして、各々の蛍光分子の強度ゆらぎ（系列信号）の自己相関関数を解析するとともに、所望の異なる蛍光分子間の相互相関解析を行ない、測定点間の時間的、空間的な関連性を解析することができる。

このように、同一の細胞内の複数の部位について、これを同定して観察、記録しながら、それぞれの部位からの蛍光信号を個々に受光して相関解析を行ない、各部位の統計的な性質（拡散速度、粒子密度など）や異なる部位間の相関などを求める。これにより、従来解析できなかった、同一細胞内に存在する複数の所望の部位からのダイナミックな挙動や統計的性質の変化を求めることができる。

また、同時に複数の部位での相関解析を実行できるので、同一細胞内の異なる成分同士についての機能の比較検討をリアルタイムに解析できる。同様にして、組織上の別々の細胞についての同時比較も行なえる。さらに、細胞内または細胞間の異なる部位における経時的な変化についても、同時の比較検討によって解析することができる。なお、癌等の異変を細胞毎に生きたまま調べる場合にも、所望の対象部位について高精度に、且つ迅速に解析できるので、細胞診断の信頼性を向上するとともに、病理ないし再生医療に大きく貢献する。

本発明によれば、以下の生体分子解析装置を構成する。

(1) . 生体分子の動的挙動を解析する生体分子解析装置であって、

測定可能な状態に保持された生体分子を含む生物学的試料の少なくとも一つの観察領域に対応する画像を取得する画像取得手段と、

この画像取得手段で取得した画像上の任意の点を指定する指定手段と、

この指定手段で指定された点に対応する試料上の位置に測定点を配置する配置手段と、

この配置手段で配置された測定点から被測定物質の動的情報に由来する信号を測定する測定手段と、

この測定手段で測定した結果を解析する解析手段と、
を具備したことを特徴とする生体分子解析装置。

(2) . 前記画像取得手段で取得する画像は3次元領域を含む画像であり、

前記配置手段は、測定点を3次元上の任意の位置に配置することを特徴とする上記(1)に記載の生体分子解析装置。

(3) . 前記測定手段は、同一の測定点から時間の異なる複数の信号を取得し、前記解析手段は、前記測定点間の出力を比較し演算することを特徴とする上記(1)に記載の生体分子解析装置。

(4) . 前記測定手段は、光学的信号の強度を測定することを特徴とする上記(1)に記載の生体分子解析装置。

(5) . 前記解析手段は、蛍光強度のゆらぎを測定すること

を特徴とする上記（１）に記載の生体分子解析装置。

（６）．前記解析手段は、蛍光相関分光法で前記蛍光強度のゆらぎを測定することを特徴とする上記（５）に記載の生体分子解析装置。

（７）．前記画像取得手段は、レーザー走査型共焦点方式からなることを特徴とする上記（１）に記載の生体分子解析装置。

（８）．前記画像取得手段は、ガルバノスキャナーを用いて前記試料を走査することを特徴とする上記（５）に記載の生体分子解析装置。

（９）．前記測定手段は共焦点光学系からなることを特徴とする上記（１）に記載の生体分子解析装置。

（１０）．前記画像取得手段は、試料上の測定点に応じて波長を選択可能であることを特徴とする上記（１）に記載の生体分子解析装置。

（１１）．前記解析手段は、異なる前記被測定物質を自己相関と相互相関により相関解析することを特徴とする上記（１）に記載の生体分子解析装置。

（１２）．前記相関解析に用いる走査光学系は、前記画像取得手段の走査光学系と同じであることを特徴とする上記（１１）に記載の生体分子解析装置。

（１３）．前記相関解析に用いる走査光学系は、前記画像取得手段の走査光学系と異なることを特徴とする上記（１１）に記載の生体分子解析装置。

（１４）．前記走査光学系を少なくとも二つ設け、そのうち

少なくとも一つを画像取得に用い、その他を前記相関解析に用いることを特徴とする上記（１１）に記載の生体分子解析装置。

なお、本発明は上記実施の形態のみに限定されず、要旨を変更しない範囲で適宜変形して実施できる。

例えば、測定点から光強度以外にも明度ないし輝度に関する測定データを得るようにして、生体分子の活性度を解析するようにしてもよい。また、単一分子を検出する原理として、光学的偏光度や共鳴エネルギーの変化を測定するようにしてもよい。また、測定点として指定された試料上の部位における成分特性に応じて、異なる演算式の中から適切な式を選択して解析を行なうように解析手段を改良することによって、細胞内部や多種類の由来が異なる生体試料のような多様な物理学的環境にも対応して正確な解析結果を得るようにしてもよい。この場合、画像上で指定可能な点が属する試料表面及び／または内部の成分毎に適切な演算式を予めメモリに記憶しておいて、実際に指定された点に応じて最適な演算式を読み出して解析を行なうようにするとよい。

また例えば、上述した実施の形態では、蛍光相関分光法を用いた測定を例に説明したが、本発明はこれに限定されない。すなわち本発明は、測定対象としての試料の特定部位または特定領域に限定して種々の光学特性（偏光、散乱、電気化学発光、共鳴エネルギー転移、プラズモン共鳴等）を測定する任意の微小光学測定に適用可能である。また、試料について取得する２次元乃至３次元画像は、１枚の静止画像に限らず、

リアルタイムに逐次更新される複数の静止画像またはビデオ画像でもよい。こうすることで、更新された最新の試料画像に基づいて、所望のタイミングで測定用のポイントを任意の個数指定することができる。指定した個数が、同時に測定できる個数より多い場合には、所望の組合わせで測定ポイントをグループ化するような指定を行うことによって、グループ単位で複数のポイント毎に同時測定をすることも可能である。例えば、同時に比較したい異なる箇所同士のポイントを同じグループに分類するのが望ましい。また、本発明では、微小光学測定の種類によっては、画像取得のための照射光量と検出のための照射光量とを最適化するように設計するのが望ましい。例えば、上述した蛍光相関分光法では、光強度揺らぎを計測するために一定時間継続してレーザを照射するので、画像取得のための瞬間的な走査レーザに比べて弱いレーザ出力に設定するのが望ましい。また、独立した走査系で測定用ポイントを設定し得る例では、複数の測定ポイントにおいて測定する部位の光学特性や測定項目に応じて、最適な測定結果が得られるように任意のタイミングおよび照射時間に設定したり、レーザ光源からの出力を測定ポイント毎に異ならせることも可能である。また、光信号を得るための指標物質として、蛍光色素を用いたが、蛍光を発生し得る融合蛋白質（緑色蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質等）や、化学発光物質、磁性物質等であってもよい。また、試料の保持手段も、細胞その他の任意な材料について自然の状態を保つ条件で適宜の容量を保持できれば、いかなる種類のものでも構わない。

産業上の利用可能性

本発明によれば、対象となる試料の多様な動きや変化を捉えることができる生体分子解析装置を提供できる。

すなわち本発明によれば、細胞内の離散的に存在する複数の微小領域の目的分子を顕微鏡観察、記録しながら、生体分子の動的挙動、数などについての情報や、所望の異なる分子間の相関を得ることができる。これにより、細胞内のシグナル伝達や物質移送、細胞分裂などの多彩な生命活動をリアルタイムで捉え、解析することができる。

請 求 の 範 囲

1. 生体分子の動的挙動を解析する生体分子解析装置であって、

測定可能な状態に保持された生体分子を含む生物学的試料の少なくとも一つの観察領域に対応する画像を取得する画像取得手段と、

この画像取得手段で取得した画像上の任意の点を指定する指定手段と、

この指定手段で指定された点に対応する試料上の点位置に測定点を継続的に一致するように配置する配置手段と、

この配置手段で配置された測定点から被測定物質の動的情報に由来する信号を測定する測定手段と、

この測定手段で測定した結果を解析する解析手段と、
を具備したことを特徴とする生体分子解析装置。

2. 前記画像取得手段で取得する画像は3次元領域を含む画像であり、

前記配置手段は、測定点を3次元上の任意の位置に配置することを特徴とする請求項1に記載の生体分子解析装置。

3. 前記測定手段は、同一の測定点から時間の異なる複数の信号を取得し、

前記解析手段は、前記測定点間の出力を比較し演算することを特徴とする請求項1に記載の生体分子解析装置。

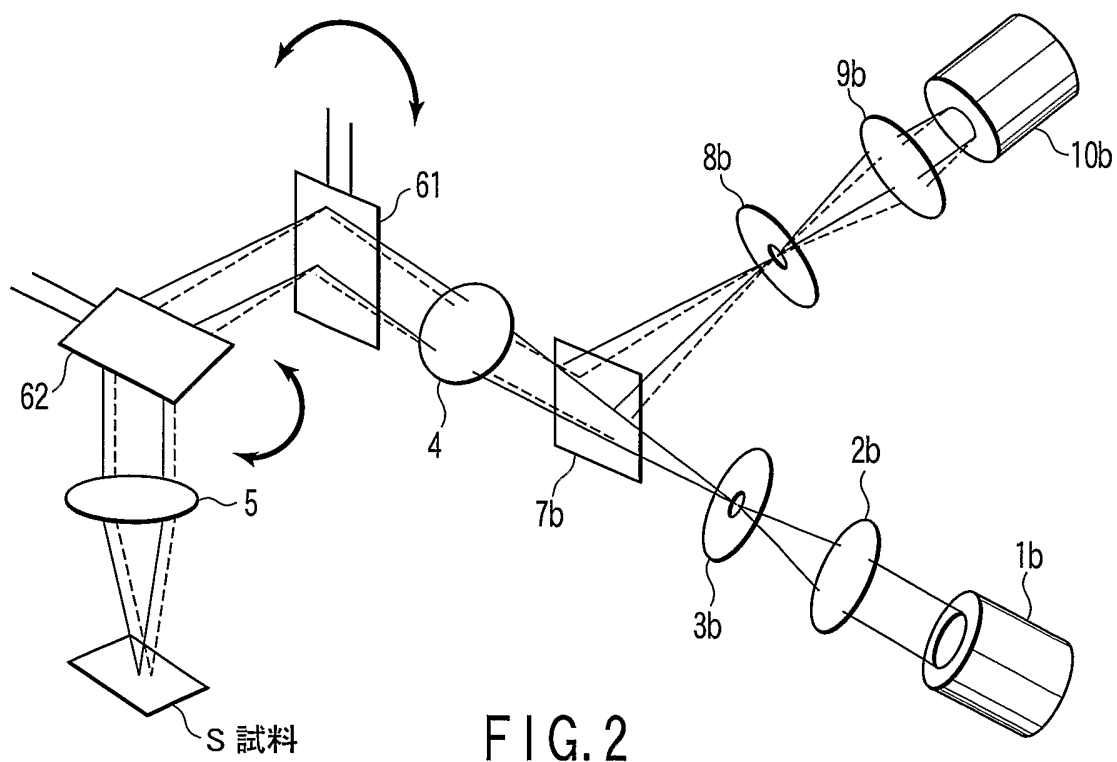
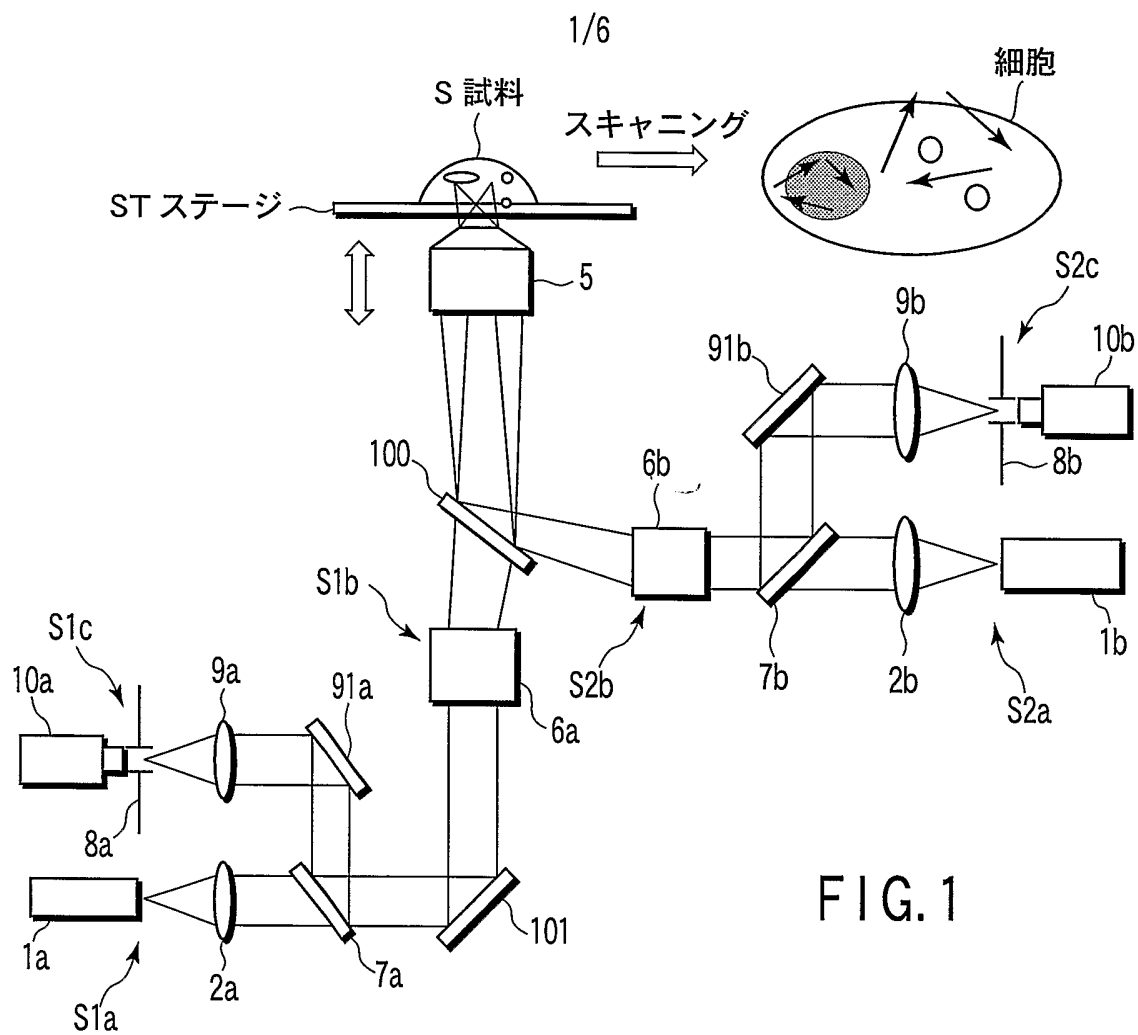
4. 前記測定手段は、光学的信号の強度を測定することを特徴とする請求項1に記載の生体分子解析装置。

5. 前記解析手段は、指定された点が属する試料上の成分

に応じて適切な動的情報に関する演算式を用いて演算することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の生体分子解析装置。

6. 前記指定手段は、任意の 2 以上の点を指定可能に構成され、前記配置手段及び前記測定手段は、指定された 2 以上の点のそれぞれにおいて独立して機能し、

前記解析手段は、前記 2 以上の点のそれぞれから得られた測定結果を比較可能に出力することを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の生体分子解析装置。



2/6

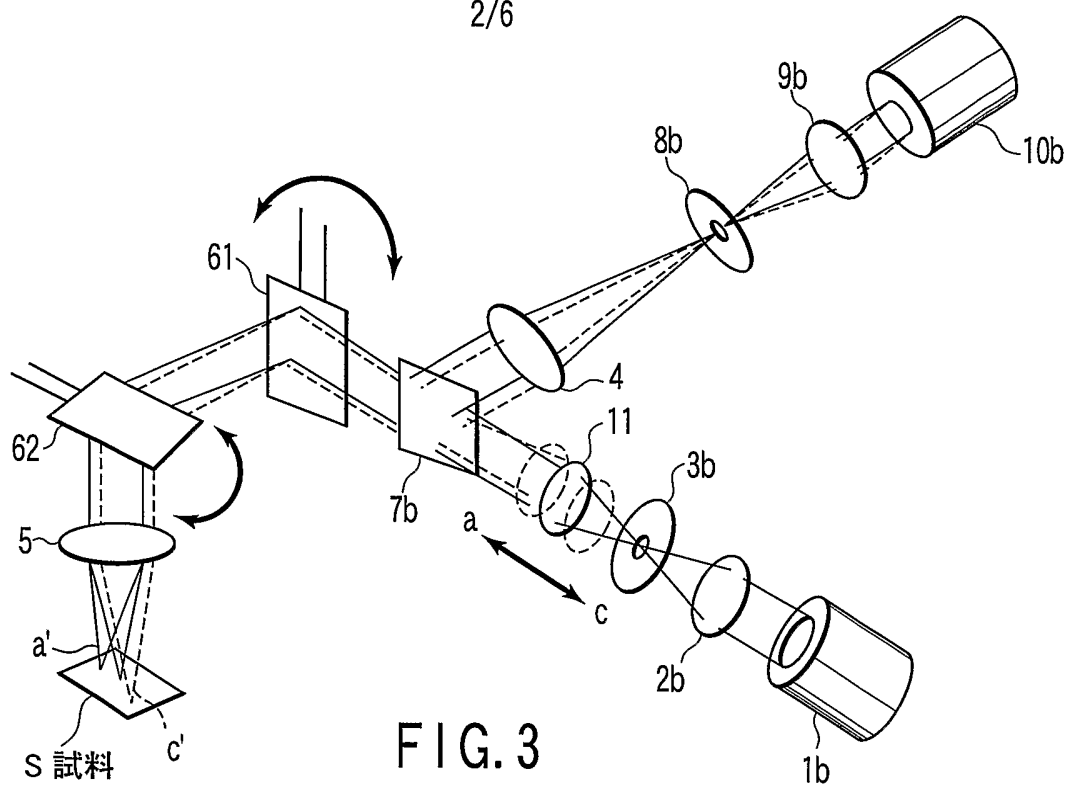


FIG. 3

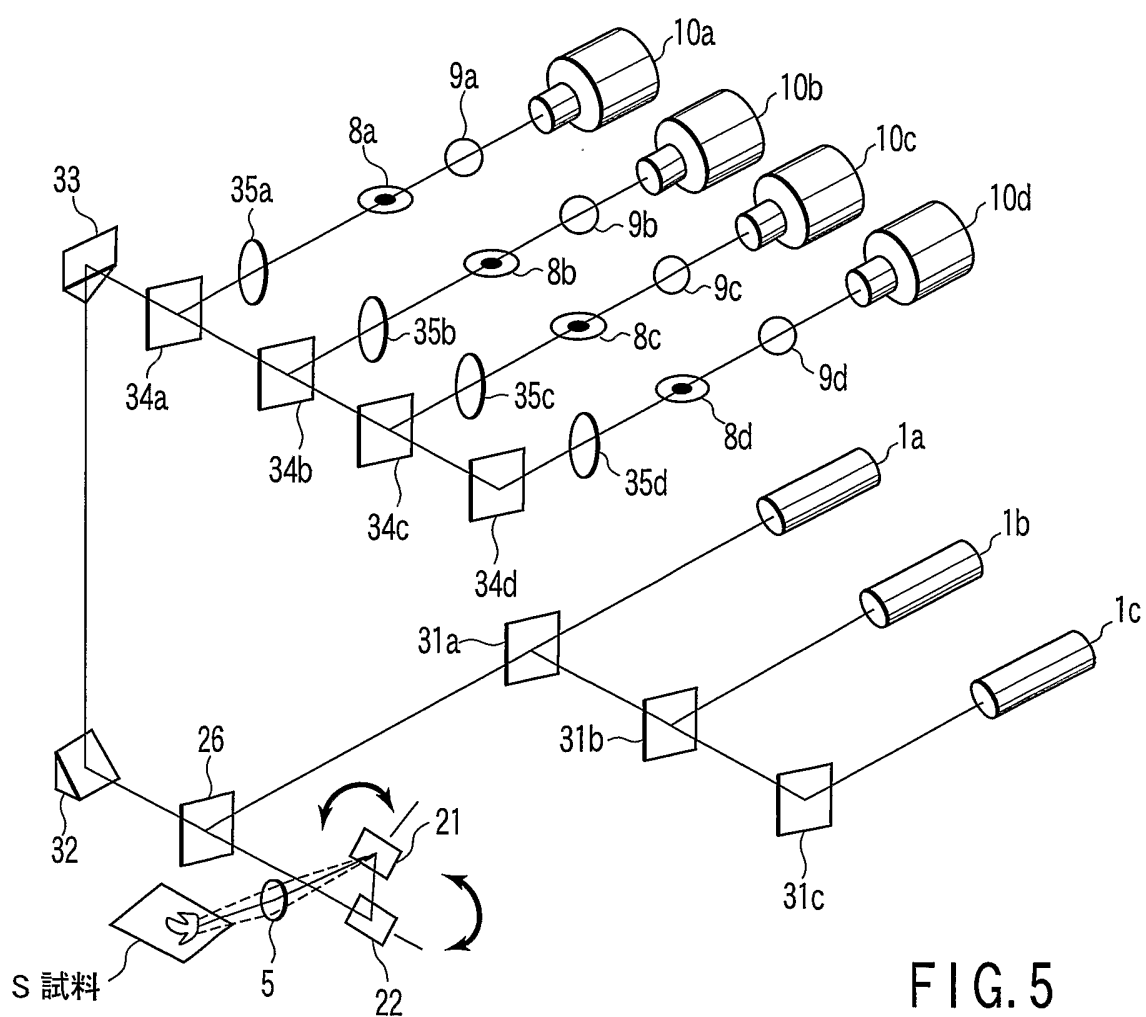


FIG. 5

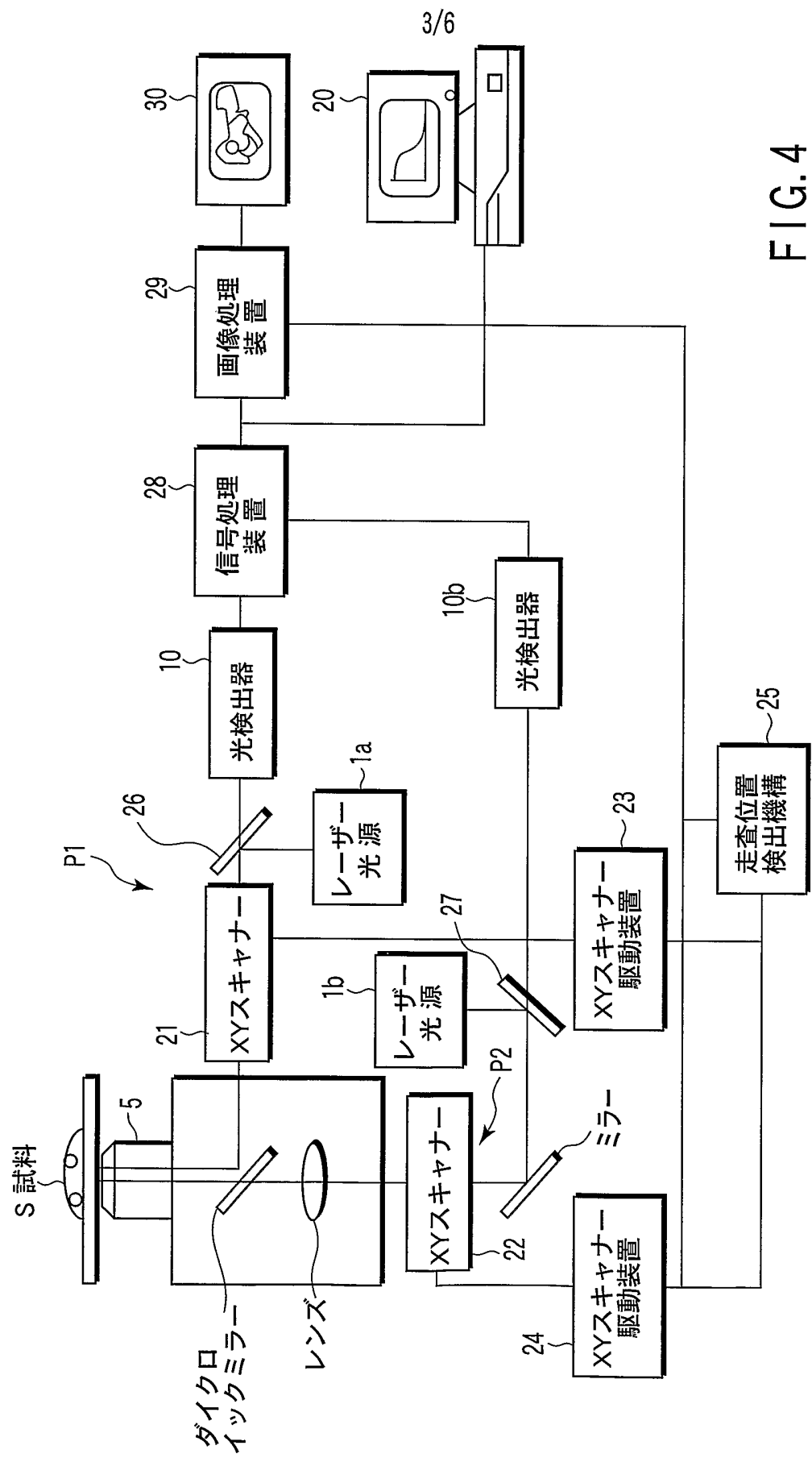


FIG. 4

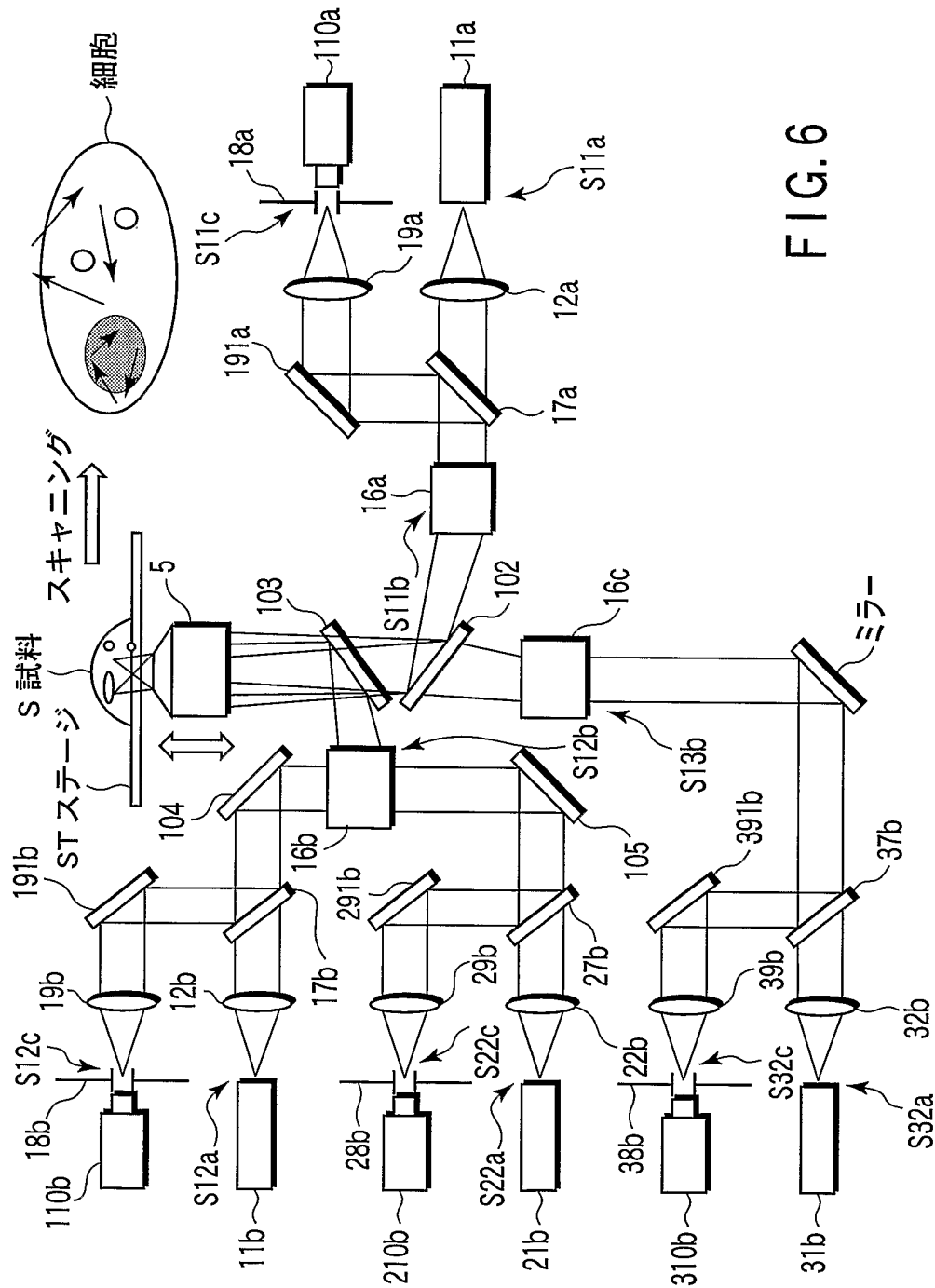


FIG. 6

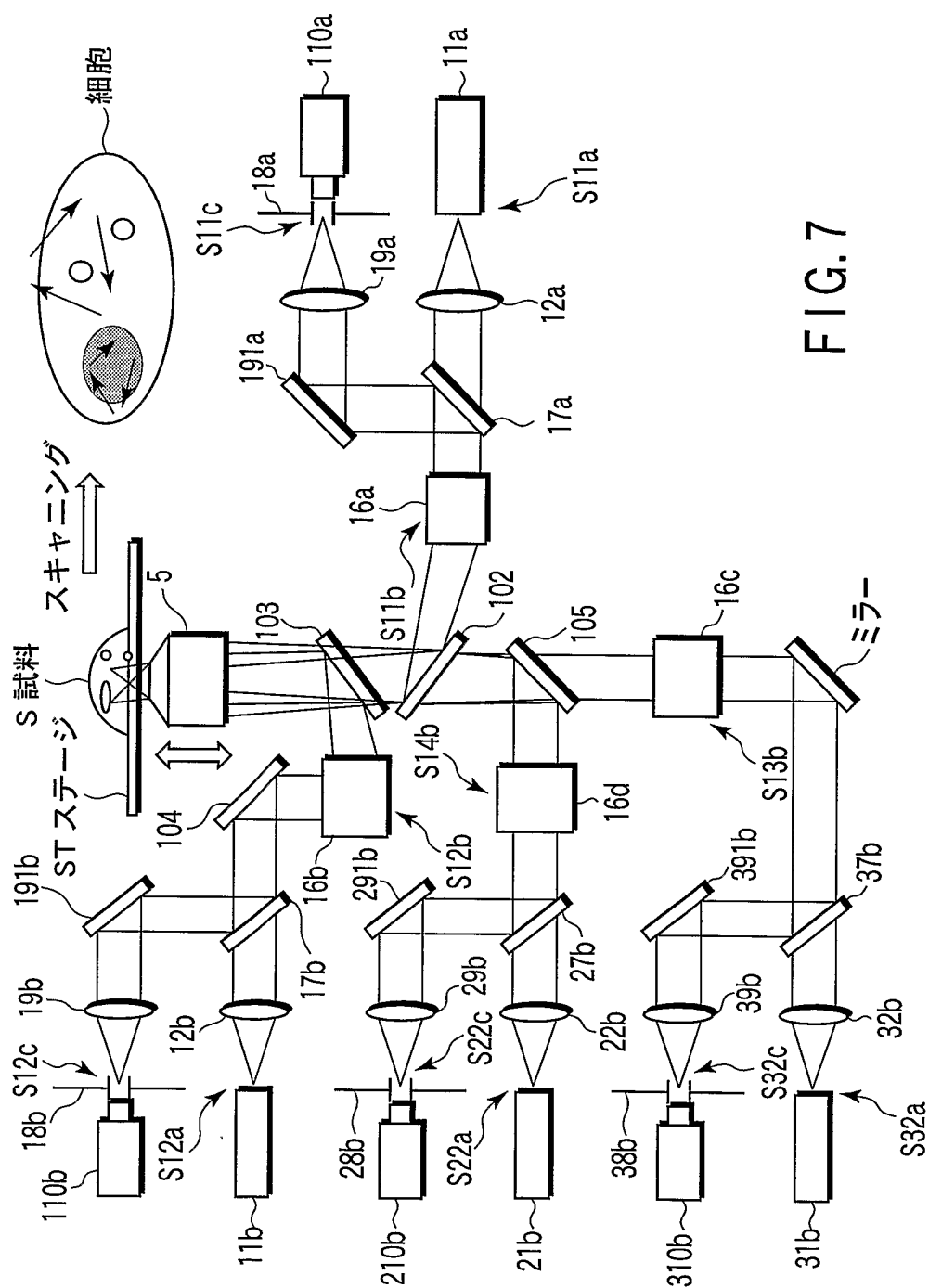


FIG. 7

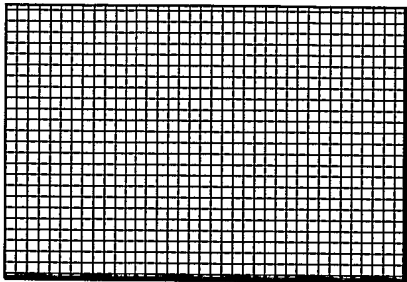


FIG. 8A

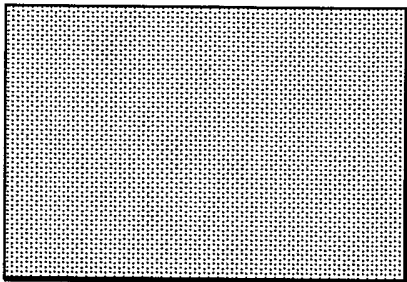


FIG. 8B

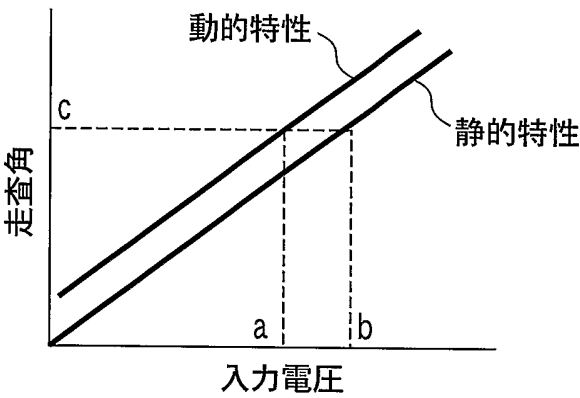


FIG. 9

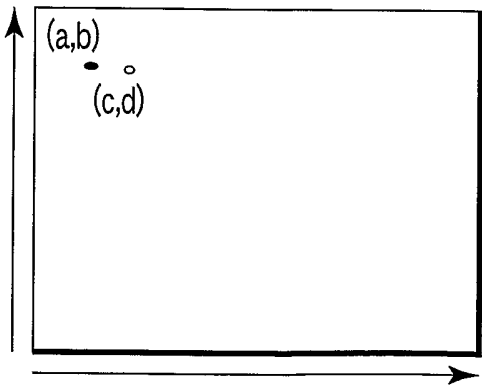


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07894

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N21/64

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)

Int.Cl⁷ G01N21/00-21/74, G02B19/00-21/36

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

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

JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-194305 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 19 July, 2001 (19.07.01), All pages; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-6
Y	JP 7-199079 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 04 August, 1995 (04.08.95), All pages; Figs. 1 to 2 (Family: none)	1-6
Y	JP 3-72244 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 27 March, 1991 (27.03.91), All pages; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
18 September, 2003 (18.09.03)

Date of mailing of the international search report
30 September, 2003 (30.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07894

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-38324 A (Nikon Corp.), 12 February, 1999 (12.02.99), All pages; Figs. 1 to 5 (Family: none)	2
Y	JP 7-333516 A (Nikon Corp.), 22 December, 1995 (22.12.95), All pages; Figs. 1 to 7 (Family: none)	6
A	JP 2000-275529 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 06 October, 2000 (06.10.00), All pages; Figs. 1 to 4 (Family: none)	6
A	WO 01/44817 A2 (Pharmacia & Upjohn Co.), 21 June, 2001 (21.06.01), All pages; Fig. 3 & JP 2003-5176009 A All pages; Fig. 3	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ G01N 21/64

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. ⁷ G01N 21/00-21/74, G02B 19/00-21/36

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 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

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)

JICSTファイル (JOIS)

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 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-194305 A (株式会社分子バイオトニクス研究所) 2001. 07. 19, 全頁, 第1-3図 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 7-199079 A (オリンパス光学工業株式会社) 1995. 08. 04, 全頁, 第1-2図 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 3-72244 A (オリンパス光学工業株式会社) 1991. 03. 27, 全頁, 第1-3図 (ファミリーなし)	1-6

☒ 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

「A」 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
 「E」 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
 「L」 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)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 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

「T」 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
 「X」 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
 「Y」 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
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 09. 03

国際調査報告の発送日

30.09. 03

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)

平田 佳規



2W

3009

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

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 請求の範囲の番号
Y	J P 11-38324 A (株式会社ニコン) 1999. 02. 12, 全頁, 第1-5図 (ファミリーなし)	2
Y	J P 7-333516 A (株式会社ニコン) 1995. 12. 22, 全頁, 第1-7図 (ファミリーなし)	6
A	J P 2000-275529 A (オリンパス光学工業株式会社) 2000. 10. 06, 全頁, 第1-4図 (ファミリーなし)	6
A	WO 01/44817 A2 (Pharmacia & Upjohn Company) 2001. 06. 21, 全頁, 第3図 & J P 2003-517609 A, 全頁, 第3図	1-6