

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6225798号
(P6225798)

(45) 発行日 平成29年11月8日(2017.11.8)

(24) 登録日 平成29年10月20日(2017.10.20)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 21/55 (2014.01)
GO 1 N 33/543 (2006.01)GO 1 N 21/55
GO 1 N 33/543 5 O 1 A

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2014-72552 (P2014-72552)
 (22) 出願日 平成26年3月31日 (2014.3.31)
 (65) 公開番号 特開2015-194405 (P2015-194405A)
 (43) 公開日 平成27年11月5日 (2015.11.5)
 審査請求日 平成28年4月25日 (2016.4.25)

(出願人による申告) 平成24年度 独立行政法人科学技術振興機構 研究成果展開事業(先端計測分析技術・機器開発プログラム) 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 308036402
 株式会社 J V C ケンウッド
 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12
 番地
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (74) 代理人 100101247
 弁理士 高橋 俊一
 (72) 発明者 小野 雅之
 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12
 番地
 (72) 発明者 柳生 慎悟
 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12
 番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析装置及び分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板の表面に検出対象が固定され、前記検出対象に前記検出対象を標識する粒子が結合している基板を、前記粒子の直径よりも長い波長を有するレーザ光を用いて光学的に走査する光走査部と、

前記光走査部が前記基板を走査することにより前記光走査部から取得される検出信号に含まれるパルス波及び前記パルス波のパルス幅を検出するパルス検出部と、

前記パルス検出部において第1基準値未満のパルス幅をそれぞれ有する2つのパルス波が2回連続して検出され、前記2つのパルス波の間隔が所定の間隔未満であるとき、1個の前記検出対象に2個の前記粒子が結合している状態であると判断して、前記検出対象の数を1として計数する計数部と、

を備えることを特徴とする分析装置。

【請求項 2】

前記計数部は、前記パルス検出部において前記第1基準値以上かつ第2基準値未満のパルス幅を有するパルス波が検出されたとき、1個の前記検出対象に1個の前記粒子が結合している状態であると判断して、前記検出対象の数を1として計数することを特徴とする請求項1に記載の分析装置。

【請求項 3】

前記計数部は、前記パルス検出部において、前記第1基準値未満のパルス幅を有する第1パルス波が検出され、前記第1パルス波に続けて第2パルス波が検出され、前記第1パ

ルス波と前記第2パルス波との間隔が前記所定の間隔以上であるとき、前記第1及び第2のパルス波を前記検出対象の数として計数しないことを特徴とする請求項1または2に記載の分析装置。

【請求項4】

前記計数部は、前記パルス検出部において、前記第1基準値未満のパルス幅を有する第1パルス波が検出され、前記第1パルス波に続けて前記第1基準値以上前記第2基準値未満のパルス幅を有するパルス波が検出されたとき、前記第1パルス波を前記検出対象の数として計数しないことを特徴とする請求項2に記載の分析装置。

【請求項5】

前記計数部は、前記パルス検出部において前記第2基準値以上のパルス幅を有するパルス波が検出されたとき、前記第2基準値以上のパルス幅を有するパルス波を前記検出対象の数として計数しないことを特徴とする請求項2または4に記載の分析装置。 10

【請求項6】

前記第1基準値は、前記光走査部が1個の前記検出対象に2個の前記粒子が結合している状態の2個の前記粒子を走査したときに、前記パルス検出部において検出されるパルス波が有する第1パルス幅に所定値を加算したパルス幅であることを特徴とする請求項1~5のいずれか1項に記載の分析装置。

【請求項7】

前記第2基準値は、前記光走査部が1個の前記検出対象に1個の前記粒子が結合している状態の前記粒子を走査したときに、前記パルス検出部において検出されるパルス波が有する第2パルス幅に所定値を加算したパルス幅であることを特徴とする請求項2、4、5のいずれか1項に記載の分析装置。 20

【請求項8】

光走査部が、基板の表面に検出対象が固定され、前記検出対象に前記検出対象を標識する粒子が結合している基板を、前記粒子の直径よりも長い波長を有するレーザ光を用いて光学的に走査し、

パルス検出部が、前記光走査部が前記基板を走査することにより前記光走査部から取得される検出信号に含まれるパルス波及び前記パルス波のパルス幅を検出し、

前記パルス検出部において第1基準値未満のパルス幅をそれぞれ有する2つのパルス波が2回連続して検出され、前記2つのパルス波の間隔が所定の間隔未満であるとき、計数部が、1個の前記検出対象に2個の前記粒子が結合している状態であると判断して、前記検出対象の数を1として計数する 30

ことを特徴とする分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体、抗原等の生体物質を分析するための分析装置及び分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

疾病に関連付けられた特定の抗原または抗体をバイオマーカーとして検出することで、疾病の発見や治療の効果等を定量的に分析する免疫検定法(immunoassay)が知られている。酵素により標識された抗原または抗体を検出するELISA法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)は、免疫検定法の一つであり、コスト等のメリットから広く普及している。ELISA法は、前処理、抗原抗体反応、B/F(bond/free)分離、酵素反応等を合計した時間が、数時間から1日程度であり、長時間を要する。 40

【0003】

これに対して、光ディスクに固定された抗体と試料中の抗原を結合させ、抗原と抗体を有する粒子とを結合させ、光ヘッドで走査することにより、ディスク上に捕捉された粒子を短時間に計数する技術が提案されている(特許文献1)。また、光ディスクのトラッキング構造が形成される面に生体試料や粒子を付着させ、光ピックアップで信号の変化を検 50

出する技術が提案されている（特許文献2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平5-5741号公報

【特許文献2】特表2002-530786号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、特許文献1及び2に記載の技術は、粒子の種類及び配置等により、粒子に対応した検出信号が得られず、粒子の計数結果が不正確となる可能性がある。さらに、例えば粒子が、複数の抗原を有するエキソソーム等の検出対象を標識する場合等には、基板に固定された検出対象と粒子との数が対応しない場合がある。このように、従来技術では検出対象に対する定量性が悪化するおそれがある。 10

上記問題点を鑑み、本発明は、検出対象に対する定量性を向上できる分析装置及び分析方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の第1の態様は、基板の表面に検出対象が固定され、前記検出対象に前記検出対象を標識する粒子が結合している基板を、前記粒子の直径よりも長い波長を有するレーザ光を用いて光学的に走査する光走査部と、前記光走査部が前記基板を走査することにより前記光走査部から取得される検出信号に含まれるパルス波及び前記パルス波のパルス幅を検出するパルス検出部と、前記パルス検出部において第1基準値未満のパルス幅をそれぞれ有する2つのパルス波が2回連続して検出され、前記2つのパルス波の間隔が所定の間隔未満であるとき、1個の前記検出対象に2個の前記粒子が結合している状態であると判断して、前記検出対象の数を1として計数する計数部とを備えることを特徴とする分析装置である。 20

【0007】

本発明の第2の態様は、光走査部が、基板の表面に検出対象が固定され、前記検出対象に前記検出対象を標識する粒子が結合している基板を、前記粒子の直径よりも長い波長を有するレーザ光を用いて光学的に走査し、パルス検出部が、前記光走査部が前記基板を走査することにより前記光走査部から取得される検出信号に含まれるパルス波及び前記パルス波のパルス幅を検出し、前記パルス検出部において第1基準値未満のパルス幅をそれぞれ有する2つのパルス波が2回連続して検出され、前記2つのパルス波の間隔が所定の間隔未満であるとき、計数部が、1個の前記検出対象に2個の前記粒子が結合している状態であると判断して、前記検出対象の数を1として計数することを特徴とする分析方法である。 30

【発明の効果】

【0008】

本発明の分析装置及び分析方法によれば、検出信号のパルス幅に応じて、加算する数を変更することにより、検出対象に対する定量性を向上できる。 40

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の実施の形態に係る分析装置の基本的な構成を説明する模式的なブロック図である。

【図2】(a)～(f)は、本発明の実施の形態に係る分析装置の基板に抗体、抗原、ビーズを固定する方法の一例を説明する模式的な基板の拡大断面図である。

【図3】基板において、1個のエキソソームに2個のビーズ66が結合する様子を示す模式的な図である。

【図4】基板を走査するときのスポット位置と信号強度との特性を隣接するビーズの数毎

50

に示すシミュレーション結果である。

【図5】本発明の実施の形態に係る分析装置の基板を走査する際のスポット位置と信号強度との特性を隣接するビーズの数毎に示す図である。

【図6】本発明の実施の形態に係る分析装置の記憶部が記憶する基準値の決定方法を説明する図である。

【図7】本発明の実施の形態に係る分析装置の記憶部が記憶する基準値の決定方法を説明する図である。

【図8】本発明の実施の形態に係る分析装置の動作を示すフローチャートである。

【図9】本発明の実施の形態に係る分析装置の動作を説明する図である。

【図10】本発明の実施の形態に係る分析装置の動作を説明する図である。 10

【図11】本発明の実施の形態に係る分析装置におけるバイオマーカー濃度とビーズ計数結果との特性を従来装置と比較する図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

次に、図面を参照して、本発明の実施の形態を説明する。以下の図面の記載において、同一または類似の部分には同一または類似の符号を付し、重複する説明を省略している。

【0011】

(分析装置)

本発明の実施の形態の分析装置は、図1に示すように、基板100と、基板100を回転させるモータ2と、基板100を光学的に走査する光走査部3と、モータ2及び光走査部3を制御する制御部5とを備える。 20

【0012】

基板100は、例えば、コンパクトディスク(CD)、デジタルバーサタイルディスク(DVD)、ブルーレイディスク(BD)等の光ディスクと同等の寸法を有する円盤状である。基板100は、表面に光走査部3が走査可能なトラック構造を有する。トラック構造は、グルーブ、ランド、ピット等からなり、内周側から外周側にスパイラル状に形成される。基板100は、例えば、一般的の光ディスクに用いられるポリカーボネート樹脂やシリコオレフィンポリマー等の疎水性を有する樹脂材料からなる。また、基板100表面には必要に応じて、薄膜形成やシランカップリング剤などによる表面処理を施すこともできる。 30

【0013】

基板100は、図2に示すように、検出対象の生体物質である抗原62と特異的に結合する抗体61が表面に固定される。抗原62が、表面に抗原62と特異的に結合する抗体65が固定されたビーズ(粒子)66によって標識されることにより、抗原62及びビーズ66は、基板100の表面に対して相対的に固定される。抗原62は、抗体61及び抗体65と特異的に結合することにより、疾病等の指標となるバイオマーカーとして用いられる。

【0014】

図2(a)に示すように、基板100は、予め、表面に抗体61が固定される。抗体61は、疎水結合や共有結合により基板100の表面に結合される。抗体61は、アビジン等の物質を介して基板100の表面に固定されてもよい。次に、図2(b)に示すように、抗原62を含む試料液63が基板100の表面に滴下される。抗原62は、ブラウン運動により試料液63中を移動することにより抗体61と接触し、抗原抗体反応により、抗体61と特異的に結合する。図2(c)に示すように、基板100に滴下された試料液63を、純水等を用いてスピinn洗浄することにより、抗体61と結合しない余剰の抗原62を含む試料液63が除去される。 40

【0015】

図2(d)に示すように、ビーズ66を含む緩衝液64が基板100の表面に滴下される。緩衝液64は、試料液63が残存するまま基板100に滴下されてもよい。ビーズ66の表面に固定された抗体65は、抗原抗体反応により、抗原62と特異的に結合する。 50

次に、ビーズ 6 6 は、抗原 6 2 と結合することにより、抗原 6 2 を標識する。

【 0 0 1 6 】

ビーズ 6 6 は、例えば、フェライト等の磁性材料を内包するポリスチレン等の合成樹脂により略球形に形成される。ビーズ 6 6 の直径は、数十 nm ~ 数百 nm 程度であり、例えば直径 200 nm である。ビーズ 6 6 は、緩衝液 6 4 が滴下される際に基板 100 の反対側に磁石が配置されることにより、迅速に基板 100 の表面に集合され、抗原 6 2 との反応を促進することができる。また、抗原 6 2 とビーズ 6 6 とが同時に投入されることにより、基板 100 に固定された抗原 6 2 を標識するまでの時間を数分程度に短縮することができる。

【 0 0 1 7 】

抗体 6 1 及び抗体 6 5 とは、抗原 6 2 と特異的に結合する特異性生体物質であればよく、それぞれが別の部位と結合する組み合わせを選択する。例えば、複数種類の抗原 6 2 が表面に発現しているエキソソーム等の膜小胞を検出対象とする場合は、抗体 6 1 及び抗体 6 5 は異なる種類とすることにより、2種類の抗原 6 2 を有する生体試料を検出することができる。これに限らず、エキソソーム等は通常の抗原とは異なり、表面に同種のたんぱく質である抗原が複数存在していることから、抗体 6 1 及び抗体 6 5 は、同じ種類とされてもよい。

【 0 0 1 8 】

図 2 (e) に示すように、基板 100 に滴下された緩衝液 6 4 を、純水等を用いて洗浄することにより、抗原 6 2 と結合しない余剰のビーズ 6 6 を含む緩衝液 6 4 が除去される。図 2 (f) に示すように、基板 100 が光走査部 3 により光学的に走査され、ビーズ 6 6 が検出されることにより、ビーズ 6 6 に標識された抗原 6 2 を分析することができる。

【 0 0 1 9 】

光走査部 3 は、図 1 に示すように、レーザ発振器 3 1 と、コリメータレンズ 3 2 と、ビームスプリッタ 3 3 と、アクチュエータ 3 4 と、対物レンズ 3 5 と、集光レンズ 3 6 と、光検出部 3 7 とを備える。光走査部 3 は、基板 100 を光学的に走査する光ピックアップである。

【 0 0 2 0 】

レーザ発振器 3 1 は、制御部 5 の制御に応じて、コリメータレンズ 3 2 に向けてレーザ光を射出する。レーザ発振器 3 1 は、例えば、波長が BD の再生用と同一の 405 nm であり、出力が 1 mW 程度のレーザ光を射出する半導体レーザ発振器である。コリメータレンズ 3 2 は、レーザ発振器 3 1 から射出されたレーザ光を平行にする。ビームスプリッタ 3 3 は、コリメータレンズ 3 2 により平行にされたレーザ光を対物レンズ 3 5 に向けて反射する。

【 0 0 2 1 】

対物レンズ 3 5 は、制御部 5 の制御に応じたアクチュエータ 3 4 の駆動により、ビームスプリッタ 3 3 を経由したレーザ光を、抗体 6 1 が固定された基板 100 の表面に集光してスポット S を結像する。対物レンズ 3 5 は、例えば開口数が 0.85 である。対物レンズ 3 5 に集光されたレーザ光は、基板 100 において反射し、ビームスプリッタ 3 3 に入射する。入射したレーザ光は、ビームスプリッタ 3 3 を透過し、集光レンズ 3 6 を介して光検出部 3 7 に入射する。集光レンズ 3 6 は、基板 100 において反射したレーザ光を光検出部 3 7 に集光させる。光検出部 3 7 は、例えばフォトダイオードからなり、基板 100 から反射したレーザ光の光量に対応する検出信号を制御部 5 に出力する。

【 0 0 2 2 】

制御部 5 は、回転制御部 2 1 を介して、モータ 2 の駆動を制御する。モータ 2 は、制御部 5 の制御により、線速度一定 (CLV) 方式で基板 100 を回転させる。線速度は、例えば 4.92 m / s である。

【 0 0 2 3 】

制御部 5 は、光学系制御部 4 を介して、レーザ発振器 3 1 及びアクチュエータ 3 4 の駆動を制御する。アクチュエータ 3 4 は、制御部 5 の制御により、回転する基板 100 の表

面をスパイラル状に走査するように、光走査部3を基板100の半径方向に移動させる。その他、制御部5は、光検出部37から出力された検出信号から、フォーカスエラー(FE)やトラッキングエラー(TE)を等のエラーを検出する。制御部5は、検出したエラーに応じて、基板100の表面を適正に走査するようにアクチュエータ34等を制御する。

【0024】

制御部5は、パルス検出部51と、記憶部52と、計数部50とを備える。パルス検出部51には、光検出部37により出力された検出信号が入力される。パルス検出部51は、光走査部3から取得される検出信号に含まれるパルス波及びパルス波のパルス幅を検出する。パルス検出部51は、デジタルシグナルプロセッサ(DSP)等の信号処理装置から構成される。記憶部52は、半導体メモリ等の記憶装置から構成される。記憶部52は、パルス検出部51が検出するパルス波及びパルス幅に対する基準値等を記憶する。

10

【0025】

計数部50は、パルス検出部51により検出されたパルス波と、記憶部52が記憶する基準値に基づいて、基板100の表面に固定された検出対象の個数を計数する。計数部50は、中央演算処理装置(CPU)等から構成される。計数部50は、第1カウンタ501と、第2カウンタ502と、対象カウンタ503とを論理構造として有する。

【0026】

第1カウンタ501は、パルス検出部51により検出されたパルス波のパルス幅Taを測定する。第2カウンタ502は、パルス検出部51により検出されたパルス波のパルス幅Taに応じて、次に検出されるパルス波との間のパルス間隔Tbを測定する。対象カウンタ503は、第1カウンタ501及び第2カウンタ502の測定結果と、記憶部52に記憶される基準値とに基づいて、ビーズ66の個数を計数することにより、検出対象の個数を計数する。

20

【0027】

仮に、図2(d)に示す例において、ビーズ66が複数の抗原62を表面に有するエキソソーム等の生体物質を標識するとする。一般に、癌の早期発見等、微量のエキソソーム検出を想定する場合、液中のビーズ66の量は、エキソソームの量と比較して過剰に投入される。エキソソームは、一般に50nm~150nm程度の様々な直径を有する。一方、ビーズ66の直径は200nm程度である。

30

【0028】

よって、例えば図3に示すように、表面の抗原62の1つが基板100上の抗体61に結合した1個のエキソソーム620に、2個のビーズ66が結合することがある。すなわち、ビーズ66を光学的に検出することによりエキソソーム620を検出する場合、互いに隣接する2個のビーズ66に対応する2つのパルス波は、2個のビーズ66の各抗体65にそれぞれ標識された2つの抗原62を有する1個のエキソソーム620である確率が極めて高い。なお図3は、基板100の上面に貫通孔を有するウェル11が配置され、ウェル11の貫通孔と基板100とが、液体が滴下される容器を構成する例を示している。

【0029】

本発明の実施の形態に係る分析装置は、検出信号及び記憶部52に記憶される基準値等に基づいて、検出されたパルス波が、互いに隣接する2個のビーズ66によるものか否かを判断する。そして、互いに隣接する2個のビーズ66によるものと判断されたパルス波のパターンが検出された場合、対応する走査範囲に存在するエキソソーム620の個数を1として計数することにより、検出対象であるエキソソーム620の定量性が向上される。

40

【0030】

- 基準値 -

図4に示す3つの検出信号DS1~DS3は、基板100上のビーズ1個を想定した凸ピット1個、ビーズ2個を想定した隣接した凸ピット2個、隣接ビーズ3個を想定した隣接した凸ピット3個をそれぞれ走査する際の検出信号をシミュレーションした結果である

50

。横軸はある区間における先頭のビーズ 6 6 に対するスポット S の位置、縦軸は検出信号をビーズ 6 6 が存在しないときの検出信号で正規化した信号強度である。検出信号 D S 1 ~ D S 3 は、孤立する 1 個のビーズ 6 6 から、2 個、3 個とビーズ 6 6 の個数が増加する従い、パルス幅が大きくなると考えられた。

【0031】

しかしながら、実際には、図 5 に示すように、互いに隣接する 2 個のビーズ 6 6 を走査する際の実際の検出信号 D 2 は、パルス幅が、孤立するビーズ 6 6 を走査する際の検出信号 D 1 よりもそれ小さく、互いに同程度の 2 つのパルス波を含む。なお、3 個のビーズ 6 6 が互いに隣接する場合の検出信号も同様に、検出信号 D 2 のパルス幅とほぼ等しく、検出信号 D 2 よりパルス間隔が大きい 2 つのパルス波を含む。

10

【0032】

このように、ビーズ 6 6 の直径が走査するレーザ光の波長の 1 / 2 程度であり、隣接する複数のビーズ 6 6 が存在する場合、ビーズ 6 6 の計数結果が不正確になる可能性がある。発明者は、以上のような、一般的の光ディスクのピットと異なる、光の波長以下の大きさの構造体(粒子)に対する光の作用を、有限差分時間領域(FDTD)法によりマクスウェル方程式を時間と空間変数に関して解くことにより明らかにした。

【0033】

さらに、互いに隣接する 2 個のビーズ 6 6 が基板 100 上に存在する場合、2 個のビーズ 6 6 は、1 個のエキソーム 620 を標識している可能性が高い。本発明の実施の形態に係る分析装置によれば、後述するように、ビーズ 6 6 の配置に応じた検出信号のパルス幅 T a、パルス間隔 T b、及び記憶部 52 に記憶される基準値に基づいて、エキソーム 620 の個数を高精度に計数することができる。

20

【0034】

記憶部 52 は、図 6 に示すように、光走査部 3 が互いに隣接する 2 個のビーズ 6 6 を走査する場合の検出信号 D 2 の 2 つのパルス波の第 1 パルス幅 T 1 と、第 1 パルス幅 T 1 に応じて決定される第 1 基準値 T 2 とを予め記憶する。第 1 基準値 T 2 は、例えば、第 1 パルス幅 T 1 と所定値の和である。第 1 パルス幅 T 1 に加算される所定値は、検出信号が有するジッタ値とすればよい。第 1 パルス幅 T 1 に加算される所定値は、ジッタ値の 100 % ~ 130 % 程度としてもよい。その他、第 1 基準値 T 2 は、第 1 パルス幅 T 1 の所定の比率としてもよい。第 1 基準値 T 2 の比率は、例えば第 1 パルス幅 T 1 の 100 % ~ 130 % 程度である。

30

【0035】

記憶部 52 は、図 7 に示すように、光走査部 3 が他のビーズ 6 6 から孤立するビーズ 6 6 を走査する場合の検出信号 D 1 の第 2 パルス幅 T 3 と、第 2 パルス幅 T 3 に応じて決定される第 2 基準値 T 4 とを予め記憶する。第 2 基準値 T 4 は、例えば、第 2 パルス幅 T 3 と所定値の和である。第 2 パルス幅 T 3 に加算される所定値は、検出信号が有するジッタ値とすればよい。第 2 パルス幅 T 3 に加算される所定値は、ジッタ値の 100 % ~ 130 % 程度としてもよい。その他、第 2 基準値 T 4 は、第 2 パルス幅 T 3 の所定の比率としてもよい。第 2 基準値 T 4 の比率は、例えば第 2 パルス幅 T 3 の 100 % ~ 130 % 程度である。

40

【0036】

さらに、記憶部 52 は、図 6 に示すように、光走査部 3 が互いに隣接する 2 個のビーズ 6 6 を走査する場合の検出信号 D 2 に含まれる 2 つのパルス波のパルス間隔 T 5 と、パルス間隔 T 5 に応じて決定される第 3 基準値 T 6 とを予め記憶する。第 3 基準値 T 6 は、例えば、パルス間隔 T 5 と所定値の和である。パルス間隔 T 5 に加算される所定値は、検出信号が有するジッタ値とすればよい。パルス間隔 T 5 に加算される所定値は、ジッタ値の 100 % ~ 130 % 程度としてもよい。その他、第 3 基準値 T 6 は、パルス間隔 T 5 の所定の比率としてもよい。第 3 基準値 T 6 の比率は、例えば第 1 パルス間隔 T 5 の 100 % ~ 130 % 程度である。

【0037】

50

(分析方法)

図8のフローチャートを用いて、本発明の実施の形態に係る分析装置において、光走査部3が基板100を光学的に走査し、計数部50が基板100に固定されたエキソソーム620を検出対象として計数することにより分析する方法を説明する。

【0038】

まず、オペレータの操作により、制御部5の制御に応じた回転制御部21及び光学系制御部4が、モータ2及び光走査部3の駆動をそれぞれ開始する。抗原抗体反応等により抗原62及びビーズ66が表面に固定された基板100は、モータ2により線速度一定に回転され、光走査部3により光学的に走査される。光走査部3は、レーザ発振器31から射出され基板100の表面において反射したレーザ光を、光検出部37において検出する。
光検出部37は、検出したレーザ光の光量に応じた検出信号をパルス検出部51に出力する。

10

【0039】

ステップS1において、パルス検出部51は、光検出部37から出力された検出信号を取得し、取得した検出信号の立ち下がりを検出する。パルス検出部51は、ビーズ66が走査される際の検出信号のピーク値の1/2程度の強度に設定された閾値を予め保持し、検出信号が閾値を下回る時点を検出信号の立ち下がりとして検出する。

【0040】

次に、ステップS2において、第1カウンタ501は、図9に示すように、ステップS1において立ち下がりが検出された時点から、時間Taの測定を開始する。

20

【0041】

次に、ステップS3において、パルス検出部51は、光検出部37から取得した検出信号の立ち上がりを検出する。パルス検出部51は、ビーズ66が走査される際の検出信号のピーク値の1/2程度の強度に設定された閾値を予め保持し、検出信号が閾値を上回る時点を検出信号の立ち上がりとして検出する。

【0042】

次に、ステップS4において、第1カウンタ501は、ステップS1において立ち下がりが検出された時点からステップS3において立ち上がりが検出された時間までの時間Taを確定し、リセットする。対象カウンタ503は、第1カウンタ501により確定された時間Taを取得し、ステップS1～S3において検出されたパルス波のパルス幅（半値幅）Taとして保持する。

30

【0043】

次に、ステップS5において、対象カウンタ503は、記憶部52から第1基準値T2を読み出し、ステップS4において保持したパルス幅Taが第1基準値T2未満であるか否かを判定する。対象カウンタ503は、パルス幅Taが第1基準値T2未満である場合、ステップS6に処理を進め、パルス幅Taが第1基準値T2以上である場合、ステップS11に処理を進める。

【0044】

ステップS5においてパルス幅Taが第1基準値T2未満である場合、ステップS6において、対象カウンタ503は、隣接フラグがハイ(High : 1)であるか否かを判定する。隣接フラグは、対象カウンタ503において、第2カウンタ502に連動して設定されるフラグである。対象カウンタ503は、ステップS6において隣接フラグがハイである場合、ステップS7に処理を進め、隣接フラグがロー(Low : 0)である場合、ステップS14に処理を進める。

40

【0045】

仮に、図9に示す例において、検出信号D2がパルス検出部51に入力され、1回目のパルス波の立ち上がりをステップS3においてパルス検出部51が検出したとする。この場合、ステップS6において隣接フラグはローであり、計数部50は、ステップS14に処理を進める。

【0046】

50

ステップ S 14において、第 2 カウンタ 502 は、ステップ S 3において立ち上がりが検出された時点から、時間 T b の測定を開始する。対象カウンタ 503 は、第 2 カウンタ 502 に連動して、ステップ S 3において立ち上がりが検出された時点から隣接フラグをハイに設定し、ステップ S 10 に処理を進める。

【0047】

ステップ S 10において、制御部 5 は、予め設定された基板 100 のトラック範囲の光走査部 3 による走査が終了したか否かを判定する。制御部 5 は、走査が終了している場合、処理を終了し、未だ走査が終了していない場合、ステップ S 1 に処理を戻す。

【0048】

仮に、図 9 に示す例において、検出信号 D 2 がパルス検出部 51 に入力され、2 回目のパルス波の立ち上がりをステップ S 3 においてパルス検出部 51 が検出したとする。この場合、ステップ S 6 において隣接フラグはハイであり、計数部 50 は、ステップ S 7 に処理を進める。

【0049】

ステップ S 7 において、第 2 カウンタ 502 は、ステップ S 3 において 1 回目の立ち上がりが検出された時点から次のステップ S 3 において 2 回目の立ち上がりが検出された時間までの時間 T b を確定した後、リセットする。対象カウンタ 503 は、第 2 カウンタ 502 により確定された時間 T b を取得し、2 回のステップ S 1 ~ S 3 において検出された 2 つのパルス波のパルス間隔 T b として保持し、隣接フラグをローに設定する。

【0050】

次に、ステップ S 8 において、対象カウンタ 503 は、記憶部 52 から第 3 基準値 T 6 を読み出し、ステップ S 7 において保持したパルス間隔 T b が第 3 基準値 T 6 未満であるか否かを判定する。対象カウンタ 503 は、パルス間隔 T b が第 3 基準値 T 6 未満である場合、ステップ S 9 に処理を進め、パルス間隔 T b が第 3 基準値 T 6 以上である場合、ステップ S 15 に処理を進める。

【0051】

ステップ S 8 においてパルス間隔 T b が第 3 基準値 T 6 未満である場合、ステップ S 9 において、対象カウンタ 503 は、光走査部 3 が互いに隣接する 2 個のビーズ 66 を走査したと判断し、エキソソーム 620 の個数を 1 として計数し、ステップ S 10 に処理を進める。すなわち、図 9 に示す例において、検出信号 D 2 がパルス検出部 51 に入力された場合、ビーズ 66 の個数は 2 となるが、互いに隣接する 2 個のビーズ 66 は 1 個のエキソソーム 620 と結合している可能性が極めて高いことから、エキソソーム 620 の個数を 1 として計数する。このように、対象カウンタ 503 は、第 3 基準値 T 6 未満のパルス間隔 T b を有する 2 つのパルス波が 2 回連続して検出されると、検出対象であるエキソソーム 620 の個数を 1 として計数する。

【0052】

ステップ S 8 においてパルス間隔 T b が第 3 基準値 T 6 以上である場合、ステップ S 15 において、対象カウンタ 503 は、第 3 基準値 T 6 以上のパルス幅を有するパルス波を、異物、凝集塊等に起因するノイズであると判断し、計数に際して無視する。すなわち、互いに隣接する 3 個以上のビーズ 66 は、基板 100 上において、すべて複数のエキソソーム 620 と結合する必要があり、出現の可能性が極めて低い。よって、ノイズである可能性が極めて高い第 3 基準値 T 6 以上のパルス幅を有するパルス波を、計数に際して無視する。

【0053】

ステップ S 5 においてパルス幅 T a が第 1 基準値 T 2 以上である場合、ステップ S 11 において、対象カウンタ 503 は、記憶部 52 から第 2 基準値 T 4 を読み出し、ステップ S 4 において保持したパルス幅 T a が第 2 基準値 T 4 未満か否かを判定する。対象カウンタ 503 は、パルス幅 T a が第 2 基準値 T 4 未満である場合、ステップ S 12 に処理を進め、パルス幅 T a が第 2 基準値 T 4 以上である場合、ステップ S 13 に処理を進める。

【0054】

10

20

30

40

50

仮に、図10に示すように、検出信号D1がパルス検出部51に入力され、パルス波の立ち上がりをステップS3においてパルス検出部51が検出したとする。この場合、ステップS5においてパルス幅Taが第1基準値T2以上、ステップS9においてパルス幅Taが第2基準値T4未満であり、計数部50は、ステップS12に処理を進める。

【0055】

ステップS12において、対象カウンタ503は、光走査部3が他のビーズ66から孤立する1個のビーズ66を走査したと判断し、エキソソーム620の個数を1として計数する。孤立する1個のビーズ66は、基板100上において、1個のエキソソーム620と結合している可能性が高い。このように、対象カウンタ503は、第1基準値T2以上第2基準値T4未満のパルス幅Taをパルス波が検出されると、エキソソーム620の個数を1として計数する。また、対象カウンタ503は、隣接フラグをローに設定し、ステップS10に処理を進める。10

【0056】

ステップS11においてパルス幅Taが第2基準値T4以上である場合、ステップS13において、対象カウンタ503は、第2基準値T4以上のパルス幅を有するパルス波を、異物、凝集塊等に起因するノイズであると判断し、計数に際して無視する。また、対象カウンタ503は、隣接フラグをローに設定し、ステップS10に処理を進める。

【0057】

また、1回目のステップS1～S3において第1基準値T2未満のパルス幅Taを有するパルス波が検出された後に、2回目のステップS1～S3において第1基準値T2以上第2基準値T4未満のパルス幅Taを有するパルス波が検出されたとする。この場合、対象カウンタ503は、先に検出されたパルス波を異物等に起因するノイズであると判断し、計数に際して無視する。20

【0058】

以上のように、対象カウンタ503は、検出信号に第1基準値T2未満のパルス幅Taを有するパルス波が2回連続して検出されると、1を加算していくことにより、エキソソーム620の個数を計数する。また、対象カウンタ503は、検出信号に第1基準値T2以上第2基準値T4未満のパルス幅Taをパルス波が検出されると1を加算していくことにより、ビーズ66の個数を計数する。

【0059】

(比較例)

図11を用いて、本発明の実施の形態に係る分析装置によるビーズ66の計数結果と、従来方法による計数結果との比較例を説明する。横軸は、検出対象となるバイオマーカー(エキソソーム620)の濃度であり、縦軸はビーズ66の計数結果である。本発明の実施の形態に係る分析装置による計数結果を曲線P1に、従来方法による計数結果を曲線P2に示す。30

【0060】

曲線P1に対して、曲線P2はバイオマーカーの濃度に関わらず計数結果が少なくなっている。曲線P1及び曲線P2に沿う破線のように、理想的にはバイオマーカー含有量が0であれば計数結果も0となるべきである。しかしながら、抗原抗体反応を用いた検出方法では、基板100上に、抗原抗体反応による結合の他に非特異吸着が生じる。このため、バイオマーカーの濃度が0であっても、非特異吸着により基板100の表面に固定されたビーズ66が計数されてしまう。40

【0061】

曲線P1、P2において、曲線P1、P2のバイオマーカー濃度がそれぞれ0(図11における最左端のプロット)の誤差上限Q1、Q2をバックグラウンドノイズという。このバックグラウンドノイズと各プロットにおける誤差下限との接点(交点)をそれぞれ最小検出感度R1、R2という。従来方法による計数結果は、ビーズ66のカウント数そのものであり、実験(分析)を行うたびに異なるため、ばらつきも大きくなる。本発明の実施の形態に係る分析装置による計数結果は、ビーズカウント数 = エキソソーム数であるた50

め、実験（分析）を繰り返してもばらつきは小さくなる。その結果、本発明の実施の形態に係る分析装置の最小検出感度R1は、従来方法の最小検出感度R2に比べて向上しており、バイオマーカー検出の感度が向上していることが分かる。よって、本発明の実施の形態に係る分析装置によれば、疾病等の検出感度を向上することができる。

【0062】

従来方法では、2個のビーズ66に標識された1個のエキソソーム620を2個として計数してしまうため、真値とのばらつきが大きな計数結果となるおそれがあった。例えば、ノイズレベルQを基準と考える場合、従来方法は、濃度が基準に達していない検体に対して誤診断を行う危険性を有する。

【0063】

例えば、1万個のエキソソーム620について、1個のビーズ66と結合するエキソソーム620が8千個、2個のビーズ66と結合するエキソソーム620が2千個あったとすると、エキソソーム620の計数結果は、本発明の実施の形態の方法では1万個、従来方法による方法では1万2千個となる。また、1個のビーズ66と結合するエキソソーム620が5千個、2個のビーズ66と結合するエキソソーム620が5千個あったとすると、エキソソーム620の計数結果は、本発明の実施の形態の方法では1万個、従来方法による方法では1万5千個となる。さらに、1個のビーズ66と結合するエキソソーム620が2千個、2個のビーズ66と結合するエキソソーム620が8千個あったとすると、エキソソーム620の計数結果は、本発明の実施の形態の方法では1万個、従来方法による方法では1万8千個となる。このように、1個のビーズ66と結合するエキソソーム620の個数と、2個のビーズ66と結合するエキソソーム620の個数の割合は、分析を行うたびに異なる。

10

【0064】

本発明の実施の形態に係る分析装置は、基板100上にビーズ66が隣接して固定される場合であっても、検出信号のパルス幅に応じて、ビーズ66の配置を考慮してエキソソーム620の個数を計数する。よって、本発明の実施の形態に係る分析装置によれば、ビーズ66の配置により検出信号に不規則なパルス波が検出された場合であっても、エキソソーム620の個数を高精度に計数することが可能となり、検出対象に対する定量性を向上することができる。

20

【0065】

また、本発明の実施の形態に係る分析装置によれば、第1基準値T2、第2基準値T4及び第3基準値T6が、検出信号のジッタ値を考慮されて決定されることにより、パルス幅Taの類別に際してジッタの影響を低減することができ、エキソソーム620の個数をさらに高精度に計数することができる。

30

【0066】

（その他の実施の形態）

上記のように、本発明を実施の形態によって記載したが、この開示の一部をなす論述及び図面は本発明を限定するものであると理解すべきではない。この開示から当業者には様々な代替実施の形態、実施例及び運用技術が明らかとなろう。

【0067】

40

例えば、既に述べた実施の形態において、検出対象である生体物質と、検出対象と特異的に結合する特異性生体物質との組み合わせは、エキソソーム620の抗原62と、抗体61及びビーズ66に固定された抗体65との組み合わせに限るものでない。特異的に結合する組み合わせは、例えば、リガンドと受容体（酵素タンパク質、レクチン、ホルモン等）との組み合わせ、互いに相補的な塩基配列を有する核酸の組み合わせ等であってもよい。

【0068】

さらに、基板100表面にシリコーンゴム等で作製された井戸型のウェルを設置し、そのウェル内の領域において、対象の抗体61、抗原62、ビーズ66などの反応、未反応物の洗浄を行うことで、スピン洗浄、乾燥などのプロセスを簡略化でき、基板100

50

の面積が許す範囲で複数のウェルを同一半径上に設置することにより、複数検体の同時計測も可能である。

【 0 0 6 9 】

また、本発明は、既に述べた実施の形態に係る通知装置の機能をコンピュータに実行させるためのプログラムを含む。プログラムは、記録媒体から読み取られコンピュータに取り込まれてもよく、電気通信回線を介して伝送されてコンピュータに取り込まれてもよい。

【 0 0 7 0 】

その他、上述の構成を相互に応用した構成等、本発明はここでは記載していない様々な実施の形態等を含むことは勿論である。したがって、本発明の技術的範囲は上記の説明から妥当な特許請求の範囲に係る発明特定事項によってのみ定められるものである。

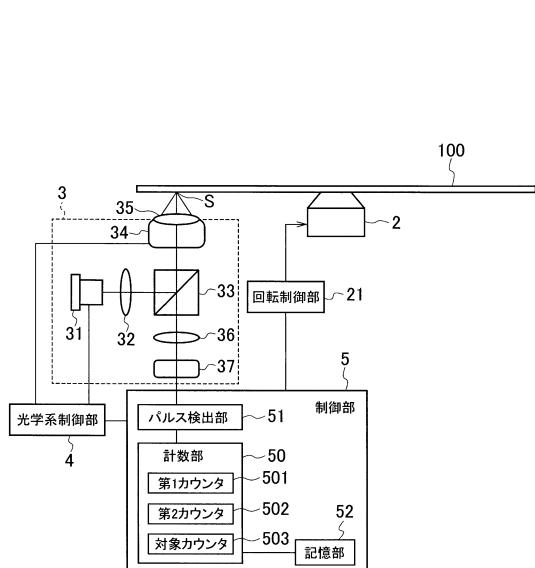
10

【 符号の説明 】

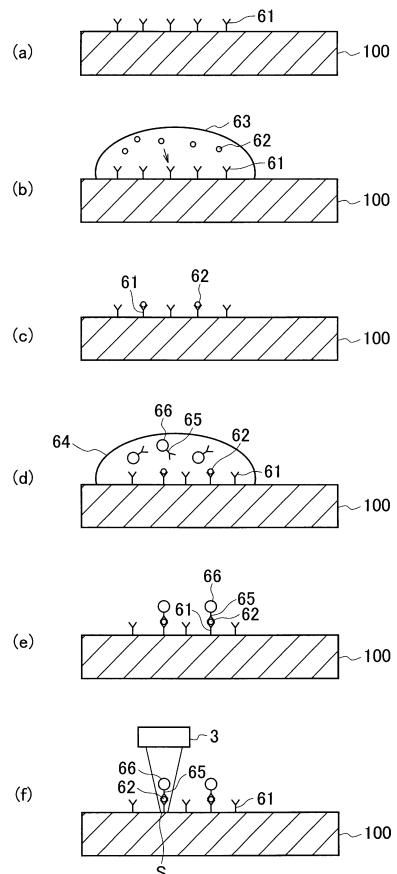
【 0 0 7 1 】

- | | | |
|-------|--------------|----|
| 2 | モータ | |
| 3 | 光走査部 | |
| 4 | 光学系制御部 | |
| 5 | 制御部 | |
| 2 1 | 回転制御部 | |
| 3 1 | レーザ発振器 | |
| 3 2 | コリメータレンズ | 20 |
| 3 3 | ビームスプリッタ | |
| 3 4 | アクチュエータ | |
| 3 5 | 対物レンズ | |
| 3 6 | 集光レンズ | |
| 3 7 | 光検出部 | |
| 5 0 | 計数部 | |
| 5 1 | パルス検出部 | |
| 5 2 | 記憶部 | |
| 6 1 | 抗体 | |
| 6 2 | 抗原 | 30 |
| 6 3 | 試料液 | |
| 6 4 | 緩衝液 | |
| 6 5 | 抗体 | |
| 6 6 | ビーズ(粒子) | |
| 1 0 0 | 基板 | |
| 5 0 1 | 第1カウンタ | |
| 5 0 2 | 第2カウンタ | |
| 5 0 3 | 対象カウンタ | |
| 6 2 0 | エキソソーム(検出対象) | |

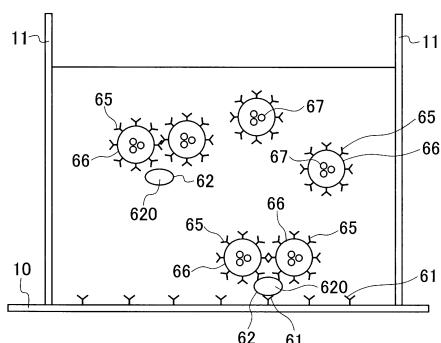
【図1】



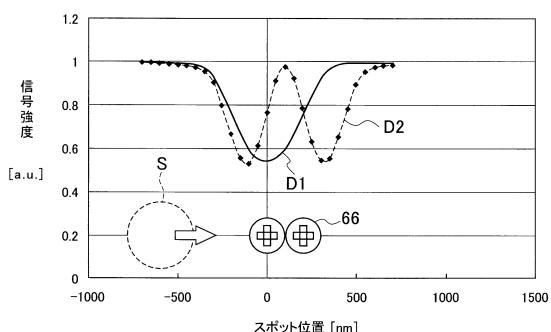
【図2】



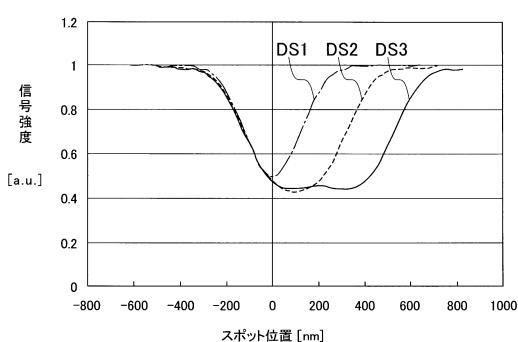
【図3】



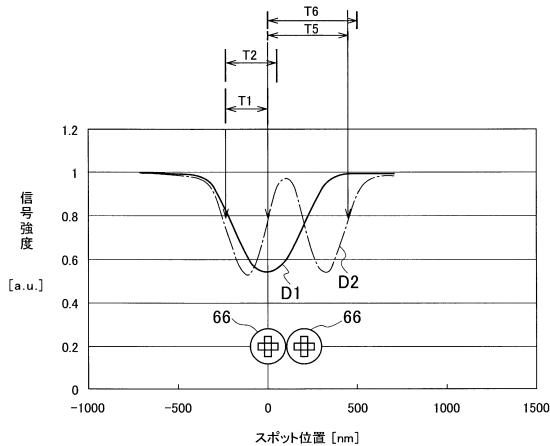
【図5】



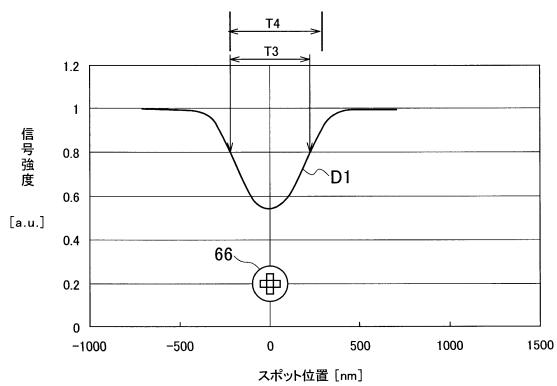
【図4】



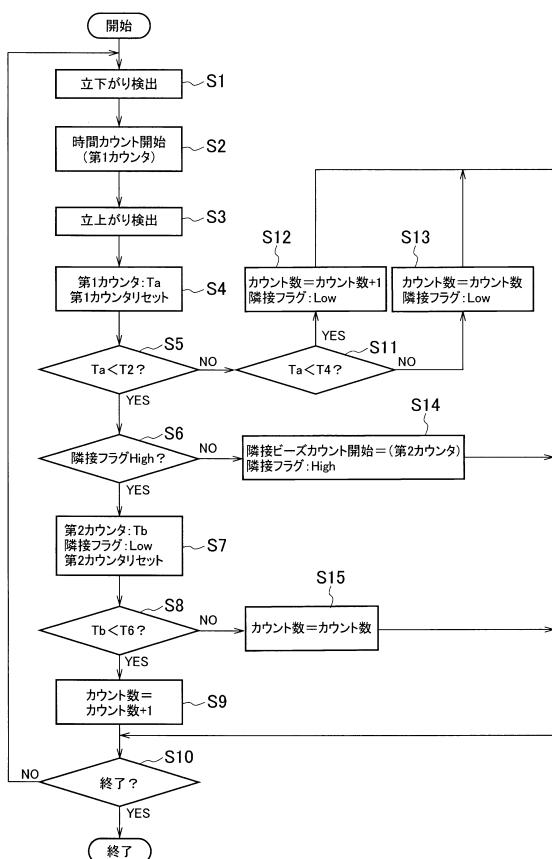
【図6】



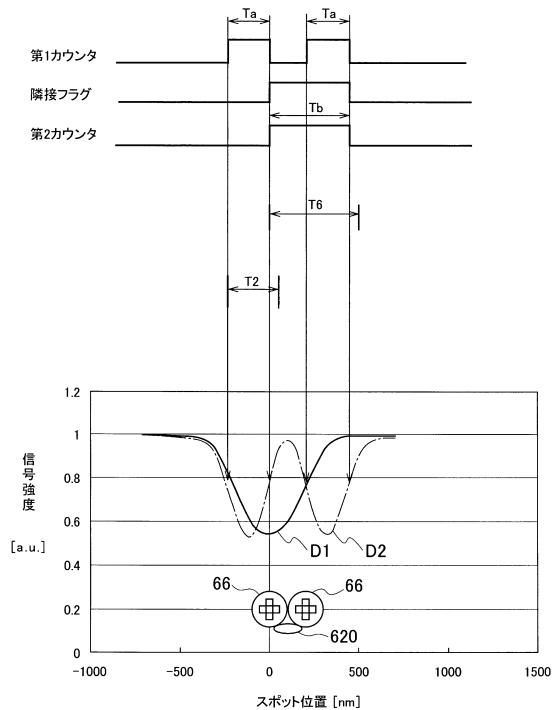
【図7】



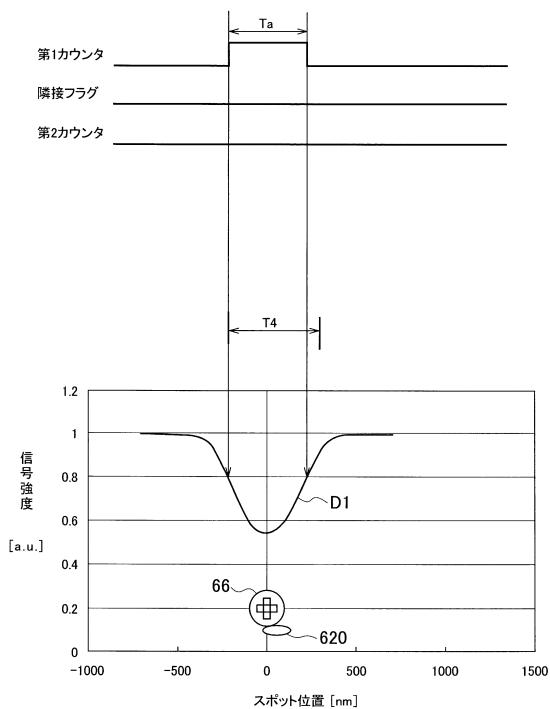
【図8】



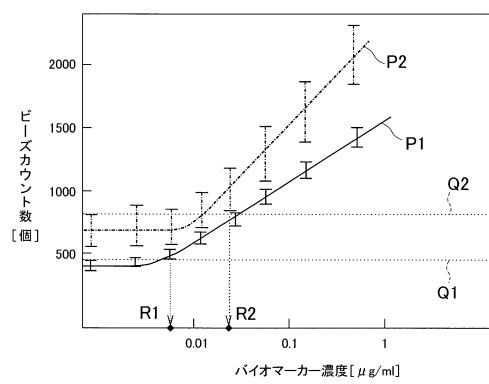
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 糸長 誠
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
(72)発明者 長谷川 祐一
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
(72)発明者 辻田 公二
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地

審査官 横尾 雅一

(56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0035352(US, A1)

特開2012-237711(JP, A)

特開2005-156538(JP, A)

特開2013-064722(JP, A)

特開2004-309288(JP, A)

Koji Tsujita et al., Ultrahigh-Sensitivity Biomarker Sensing System Based on the Combination of Optical Disc Technologie, Japanese Journal of Applied Physics, 2013年, Vol.52, pp.09LB02-1~09LB02-4

小野雅之 他, 光ディスク技術を応用したバイオマーカー高精度検出技術の開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回研究会 講演要旨集, 2013年 5月, Vol.27th, p.23

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/83

G01N 15/00 - 15/14

G01N 33/48 - 33/98

G02B 21/00 - 21/36

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)