

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 2 月 24 日 (24.02.2005)

PCT

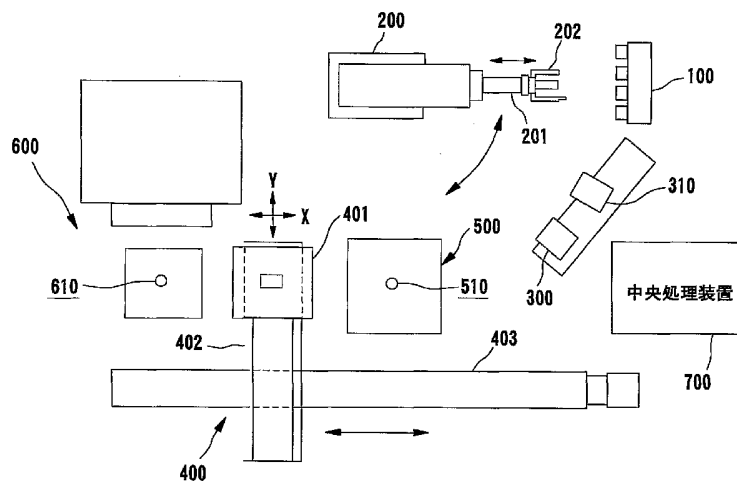
(10) 国際公開番号
WO 2005/017513 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 23/207 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012142 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 貴久 (SATO, Takahisa) [JP/JP]; 〒196-8666 東京都 昭島市 松原町 3 丁目 9 番地 1 2 号 株式会社リガク内 Tokyo (JP). 山野 昭人 (YAMANO, Akihito) [JP/JP]; 〒196-8666 東京都 昭島市 松原町 3 丁目 9 番地 1 2 号 株式会社リガク内 Tokyo (JP). 安川 昇一 (YASUKAWA, Shoichi) [JP/JP]; 〒196-8666 東京都 昭島市 松原町 3 丁目 9 番地 1 2 号 株式会社リガク内 Tokyo (JP). 吉田 博喜 (YOSHIDA, Hiroki) [JP/JP]; 〒196-8666 東京都 昭島市 松原町 3 丁目 9 番地 1 2 号 株式会社リガク内 Tokyo (JP). 濱田 賢作 (HAMADA, Kensaku) [JP/JP]; 〒671-2221 兵庫県 姫路市 青山北 2-3 4-2 5 Hyogo (JP).
(22) 国際出願日: 2004 年 8 月 18 日 (18.08.2004)
(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2003-207771 2003 年 8 月 18 日 (18.08.2003) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社リガク (RIGAKU CORPORATION) [JP/JP]; 〒196-8666 東京都 昭島市 松原町 3 丁目 9 番地 1 2 号 Tokyo (JP). 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).

[続葉有]

(54) Title: SPECIFIC MACROMOLECULE CRYSTAL EVALUATOR

(54) 発明の名称: 特定高分子結晶の評価装置



700... CENTRAL PROCESSING UNIT

(57) Abstract: A specific macromolecule crystal evaluator comprising a sample detection stage (500) for detecting a protein crystal in a sample container (10), an X-ray measurement stage (600) disposed away from the sample detection stage (500) and adapted to X-ray diffraction measurement of a protein crystal, a transfer unit (400) for transferring the sample container (10) from the sample detection stage (500) to the X-ray measurement stage (600), and a central processing unit (700) for identifying the position of the protein crystal on the basis of the information obtained by the sample detection stage (500), controlling the transfer unit (400) according to the position information, and positioning the protein crystal on a sample mount portion (610) of the X-ray measurement stage (600).

(57) 要約: 本発明に係る特定高分子結晶の評価装置は、試料容器(10)内の蛋白質結晶を検出するための試料検出ステージ(500)と、試料検出ステージ(500)とは離間した位置にあって、蛋白質結晶のX線回折測定を行うX線測定

[続葉有]



WO 2005/017513 A1



(74) 代理人: 山本 寿武 (YAMAMOTO, Toshitake); 〒164-0011 東京都 中野区 中央五丁目 3 8 番 1 3 号 S S 1 0 ビル A 8 0 1 号 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (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

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。

ステージ(600)と、試料検出ステージ(500)からX線測定ステージ(600)へ試料容器(10)を搬送する搬送ユニット(400)と、試料検出ステージ(500)で得られた情報に基づき、蛋白質結晶の位置を認識するとともに、該位置情報に基づき搬送ユニット(400)を制御して蛋白質結晶をX線測定ステージ(600)の試料配置部(610)へ位置決めする中央処理装置(700)と、を備えている。

明 細 書

特定高分子結晶の評価装置

技術分野

この発明は、特定高分子結晶をX線の回折現象を利用して評価するための特定高分子結晶の評価装置に関し、特に蛋白質結晶等の生体高分子結晶の評価に好適な装置に関する。

背景技術

DNAの二重らせん構造が発見されて以来、ゲノム計画の展開と相まって、蛋白質結晶の構造解析が世界的に注目を集めている。蛋白質結晶の構造解析には、NMR（核磁気共鳴装置）を用いた手法、電子顕微鏡を用いた手法、X線の回折現象を利用した手法等が開発されており、特に、X線の回折現象を利用したX線結晶構造解析は、イメージングプレート等の二次元X線検出器や二次元データからの解析ソフトウェア等の開発に伴い飛躍的な進展をみせている。

従来、X線の回折現象を利用した蛋白質結晶の構造解析は、まず溶液中で蛋白質を結晶化させて得られた蛋白質の結晶粒をキャピラリーと称するガラス製の細管に注入し、この状態でX線回折装置に装填して行われていた。

さて、蛋白質結晶のX線構造解析を行うためには、X線照射位置にターゲットである蛋白質結晶を正確に位置決めする作業が必要となる。このため、従来は、蛋白質結晶を検出するための顕微鏡をX線回折装置に付設しておき、該顕微鏡を利用して作業者が目視観察により人手をもって蛋白質結晶の位置決め操作を行っていた。このような目視観察と手作業による位置決め操作は煩雑で時間がかかる。しかも、従来は一回の測定が終了する都度、X線回折装置での位置決め操作を行っており、多くの蛋白質結晶を迅速に評価することができなかった。

例えば、人体を構成する蛋白質は5万～10万種類にも及ぶとされており、それら多くの蛋白質結晶の構造を短期間で解明することが、近年の構造生物学における緊急の課題となっている。

本発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、X線の回折現象を利用した特定高分子結晶の構造解析を自動化して、処理の迅速化を図ることを目的とする。

発明の開示

上記目的を達成するために、本発明は、X線、紫外線および可視光線を透過する試料容器を用い、該試料容器内に存在する特定高分子結晶を評価する装置であって、
試料容器内の特定高分子結晶を検出するための試料検出ステージと、
試料検出ステージとは離間した位置にあって、特定高分子結晶のX線回折測定を行うX線測定ステージと、

試料検出ステージからX線測定ステージへ試料容器を搬送する搬送手段と、

試料検出ステージで得られた情報に基づき、特定高分子結晶の位置を認識するとともに、該位置情報に基づき搬送手段を制御して該特定高分子結晶をX線測定ステージの試料配置部へ位置決めする制御手段と、を備えたことを特徴とする。

このように、試料検出ステージで試料容器内の特定高分子結晶を検出し、そこで得られた情報に基づき搬送手段を制御することで、特定高分子結晶をX線測定ステージの試料配置部へ位置決めするようにしたので、特定高分子結晶の検出から試料配置部への位置決めまでの作業を自動化することができ、評価処理の迅速化を図ることが可能となる。

特に、蛋白質結晶の評価に際しては、蛋白質結晶を生成するための多数の凹部が形成された結晶化プレートを試料容器として用い、該結晶化プレートの各凹部で蛋白質結晶を生成させ、それら各蛋白質結晶を試料検出ステージで検出しておき、その後、該結晶化プレートをX線測定ステージへ搬送させて、逐次、各凹部内の蛋白質結晶を試料配置部へ位置決めしてX線回折測定を実施していけば、多数の蛋白質

結晶を連続的に評価することができ、作業時間の大幅な短縮を図ることができる。

ここで、試料検出ステージは、試料容器に紫外線を照射し、該試料容器内の試料が発する蛍光像を検出する特定高分子検出手段と、試料容器内に存在する試料の可視光像から該試料の外形を検出する結晶検出手段と、を備えた構成とすることができる。

また、制御手段は、特定高分子検出手段により蛍光像が検出され、かつ結晶検出手段により結晶を示す外形が検出された試料を特定高分子結晶と判定するとともに、該特定高分子結晶の位置を認識する構成とすることができる（請求項２）。

高分子結晶、特に生体高分子の多くは、紫外線を照射したとき蛍光を発する。本明細書では、このように紫外線を照射したとき蛍光を発する特性を有した高分子結晶を「特定高分子結晶」と称する。例えば、蛋白質結晶がこの特定高分子結晶に該当する。

本発明は、かかる特定高分子結晶の特性に着目して、試料容器に紫外線を照射し、該試料容器内の試料が発する蛍光像を検出することにより試料容器内の特定高分子を検出するようにしている。

しかし、検出された特定高分子が、結晶を形成するものか否かは、蛍光像だけでは判別できない場合がある。例えば、特定高分子の凝集が試料容器内に存在した場合、かかる凝集も蛍光を発するため、結晶の蛍光像と凝集の蛍光像とが混在して検出されてしまう。

そこで、本発明は、試料容器内に存在する試料の可視光像から該試料の外形を検出することで、その外形から結晶とそれ以外のものとを区別し、上記蛍光像の検出結果と相俟って「特定高分子」の「結晶」を判定するとともに、該特定高分子結晶の位置を認識する構成とした。

また、X線測定ステージは、試料配置部に配置された試料容器内の特定高分子結晶に対し、上方又は下方からX線を照射するX線照射手段と、

試料容器を介してX線照射手段と対向配置され、試料容器を透過してきた特定高

分子結晶からの回折X線を検出するX線検出手段と、

X線照射手段およびX線検出手段を支持する回転アームと、

回転アームをほぼ水平な軸中心に任意の角度回転させる回転駆動機構と、を備えた構成とすることができる。

この構成によれば、試料容器を回転させることなく、特定高分子結晶に対する回折X線の積分強度を求めることができる。回折X線の積分強度は、結晶に対するX線の照射角度を変えて、様々な角度からX線を照射したときの回折X線強度を検出し、それらの強度データを積分して求められる。従来は、結晶試料を封入したキャピラリーを回転させることで、回折X線の積分強度が求められていた。

蛋白質結晶等の特定高分子結晶の構造を解析するには、結晶で回折してきたX線の積分強度を求める必要がある。すなわち、回折を生じる可能性のある結晶からの反射X線は、逆格子空間（回折空間）において球状に分布している。したがって、結晶に対し固定された位置で検出される回折X線のピーク強度（回折斑点）は、この球状に分布する反射X線の一断面のみを観察して得られたものであり、結晶の構造解析（すなわち、分子構造の決定）に必要なピーク強度のわずか数百分の一乃至数千分の一に過ぎない。

本発明によれば、試料ホルダに対しX線照射手段及びX線検出手段を回転させることにより、球状に分布する結晶からの反射X線に対して複数の断面からピーク強度（回折斑点）を検出して、その積分強度を求めることができる。その結果、検出された回折X線の積分強度に基づいて、高い信頼性をもった結晶構造の解析・評価を実現することができる。

特に、結晶化プレートを試料容器として利用した場合、結晶化プレートの凹部には溶液が充填されており、蛋白質結晶等の特定高分子結晶はこの溶液中に浮遊した状態で存在する。したがって、結晶化プレートを回転させると溶液が零れ出たり、溶液中の結晶が移動したりするため、これを回転させることはできないが、本発明装置によれば上記のとおり結晶化プレートを回転させることなく回折X線の積分強

度を求めることができる。

また、搬送手段は、試料容器を載置する試料台と、試料台を搭載するとともに該試料台を水平面上で直交するX、Y方向および高さ方向に移動させるXYZテーブルと、このXYZテーブルを試料検出ステージからX線測定ステージへ搬送するスライダと、を含む構成とすることができる（請求項4）。

これらXYZテーブルとスライダの駆動制御をもって、試料容器内に存在する特定高分子結晶を、X線測定ステージに設けた試料配置部へ自動的に位置決めすることが可能となり、作業性が格段に向上する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施形態に係る特定高分子結晶評価装置の全体構成を示す平面模式図である。

図2は、同じく正面模式図である。

図3Aは、試料容器の構成例を示す斜視図である。

図3Bは、同試料容器の一部を拡大して示す正面断面図である。

図4Aは、試料台の構成を示す平面図である。

図4Bは、試料台の構成を示す正面断面図である。

図5は、試料検出ステージの概要を示す模式図である。

図6は、中央処理装置により実行される蛋白質結晶の検出方法を示すフローチャートである。

図7は、図6のステップS4にかかるサブルーチンを示すフローチャートである。

図8は、図7に示すステップS11のエッジ検出処理を説明するための図である。

図9A、図9Bは、蛋白質結晶と自家蛍光を発しない物質の結晶とが混在して含まれる試料溶液を観察したときの顕微鏡画像のスケッチである。

図10A、図10Bは、蛋白質の凝集が含まれる試料溶液を観察したときの顕微

鏡画像のスケッチである。

図 1 1 は、X線測定ステージの構成を示す側面構成図である。

図 1 2 は、X線測定ステージにおける蛋白質結晶の測定原理を模式的に示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、蛋白質結晶を評価対象（特定高分子結晶）とした、本発明に係る好ましい実施の形態について図面を参照しながら説明する。

〔装置の全体構成〕

図 1 は本実施形態に係る特定高分子結晶評価装置の全体構成を示す平面模式図、図 2 は同じく正面模式図である。

図 1 に示すように、特定高分子結晶評価装置は、試料容器収納部 1 0 0、供給ロボット 2 0 0、試料容器識別部 3 0 0、搬送ユニット 4 0 0（搬送手段）、試料検出ステージ 5 0 0、X線測定ステージ 6 0 0、および中央処理装置 7 0 0（制御手段）を備えている。

試料容器収納部 1 0 0 は、複数の試料容器 1 0 を並べて収納できる仕切棚によって形成されており、該試料容器収納部 1 0 0 に蛋白質結晶を収容する試料容器 1 0 が並べて載置されている。

試料容器 1 0 は、紫外線、可視光線およびX線を透過するポリイミド等の材料で形成された結晶化プレートを用いることが好ましい。結晶化プレートを利用した試料容器 1 0 には、図 3 A に示すように、多数の凹部 1 1 が形成されており、この凹部 1 1 内で蛋白質の結晶 S を生成することができる。結晶化プレートを用いた蛋白質の結晶生成方法は、蒸気拡散法をはじめとして種々の方法が知られている。図 3 B は、蒸気拡散法により蛋白質結晶 S が生成された状態を模式的に示す図であり、カバープレート 1 2 の下面においた試料溶液 L の滴中に蛋白質結晶 S が生成されている。試料容器 1 0 に形成された多数の凹部 1 1 には、それぞれ生成条件を違えた

り、異なる種類の蛋白質結晶Sを別個に生成することができる。

供給ロボット200は、軸方向に伸縮自在で、高さ方向に移動自在、かつ水平面上を旋回可能なロボットアーム201を備えており、このロボットアーム201の先端に開閉チャック202が設けられている。試料容器収納部100に収納されている試料容器10は、開閉チャック202により把持されて同収納部100から引き出され、まず試料容器識別部300に移送される。

試料容器識別部300には、あらかじめ試料容器10に付された識別情報を読み取る情報読取装置が設置されており、該情報読取装置が識別情報を読み取ることのできる位置（情報読取位置）に試料容器10が配置される。ここで、識別情報としてバーコードを用いた場合は、バーコードリーダにより情報読取装置が構成される。

なお、本実施形態では、試料容器収納部100から引き出した試料容器10を、開閉チャック202で確実に把持して移送する目的から、試料容器収納部100の近傍位置に容器持ち換え部310が設けてある。試料容器収納部100から引き出され試料容器10は、いったんこの容器持ち換え部310に置かれ、再び開閉チャック202が正確に把持して試料容器識別部300へ移送される。

搬送ユニット400は、試料容器10を載置する試料台401と、この試料台401を搭載するXYZテーブル402と、このXYZテーブル402を試料台401と一体に搬送するスライダ403とで構成されている。

試料台401には、図4Aに示すように、上面に位置合わせブロック404と押圧用のアクチュエータ405が設けてあり、上面に載置された試料容器10の角部をアクチュエータ405により押圧して、対角線上にある角部を位置合わせブロック404に当接させることにより、試料容器10を常に試料台401の一定位置に載置するようになっている。

また、試料台401には、図4Bに示すように、試料容器10が載置される部位に透孔401aが穿設してある。この透孔401aは、後述する試料検出ステージ500で試料容器10に照射される紫外線と可視光線、およびX線測定ステージ6

00で試料容器10内の蛋白質結晶Sに照射されるX線を透過するためのものである。

XYZテーブル402は、試料台401を水平面上で直交するX方向およびY方向に移動させるとともに試料台401を高さ方向（Z方向）に移動させる機構である。このXYZテーブル402は、スライダ403に搭載されている。

スライダ403は、試料検出ステージ500とX線測定ステージ600とを結ぶ搬送経路を形成しており、XYZテーブル402に搭載された試料台401を、試料検出ステージ500とX線測定ステージ600との間で直線的に搬送する機能を有している。

試料検出ステージ500は、試料容器10内の蛋白質結晶Sを検出し、その重心位置を認識するためのステージである。また、X線測定ステージ600は、試料検出ステージ500で検出された試料容器10内の蛋白質結晶SをX線回折測定するためのステージである。これら各ステージについては、追って詳細に説明する。

中央処理装置700は汎用コンピュータで構成され、上述した装置各部の駆動制御を実行する。また、中央処理装置700は、試料検出ステージ500における蛋白質結晶Sの判別と重心位置の認識を実行するとともに、X線測定ステージ600におけるX線測定処理を実行する。特に、この中央処理装置700は、試料検出ステージ500で得られた情報により認識した蛋白質結晶Sの位置情報（重心位置の情報）に基づき、XYZテーブル402とスライダ403を制御して、該蛋白質結晶SをX線測定ステージ600の試料配置部610へ位置決めする機能を有している。

ここで、スライダ403は、始動時から一定期間は徐々に加速していき、その後、一定の速度でスライダ403を駆動し、次いで徐々に減速して試料配置部610に停止させるように駆動制御される。これにより慣性力を抑え試料台401に載置された試料容器10内での蛋白質結晶Sの移動を防止できる。

〔試料検出ステージ〕

次に、試料検出ステージ５００について更に詳細に説明する。

図５は試料検出ステージの概要を示す模式図である。

試料検出ステージ５００には、試料容器１０が配置される試料検出部５１０を基準として、その下方に可視光照射ユニット５２０および紫外線照射ユニット５２１が設置してある。これら可視光照射ユニット５２０および紫外線照射ユニット５２１は、試料検出部５１０に配置された試料容器１０に対し、可視光又は紫外線を照射する光源である。

可視光照射ユニット５２０および紫外線照射ユニット５２１は、横方向にスライドしていずれか一方のユニットが試料容器１０と対向配置される。なお、試料容器１０と可視光照射ユニット５２０および紫外線照射ユニット５２１の間に反射ミラーを配置して、可視光照射ユニット５２０から発射される可視光線または紫外線照射ユニット５２１から発射される紫外線を試料容器１０に導く構成とすれば、これら各照射ユニット５２０、５２１は、試料容器１０と対向配置する必要はない。

試料容器１０は、既述したように試料台４０１に載置されており、XYZテーブル４０２とスライダ４０３の移動により、試料検出部５１０に配置される。

試料検出部５１０の上方には、顕微鏡５３０と２次元撮像ユニット５４０が配設されている。顕微鏡５３０は、紫外線又は可視光の照射により試料容器１０を透過して得られる画像を拡大して２次元撮像ユニット５４０へ導く。なお、顕微鏡５３０は上下方向に焦点位置を変更して、試料容器１０内の蛋白質結晶Ｓを探索することができるように構成されている。

２次元撮像ユニット５４０としては、例えば、ＣＣＤを用いることができる。２次元撮像ユニット５４０は、顕微鏡５３０を介して入射した拡大画像を電気信号（画像データ）に変換し、中央処理装置７００へ出力する。中央処理装置７００は、２次元撮像ユニット５４０から入力された画像データを処理して、試料容器１０内の蛋白質結晶Ｓを検出するとともに、その位置を認識する。

図６および図７は中央処理装置により実行される蛋白質結晶の検出方法を示すフ

ローチャートである。

まず、光源を紫外線照射ユニット 5 2 1 に設定し、該紫外線照射ユニット 5 2 1 から発射される紫外線を試料容器 1 0 に照射する。

このとき、試料容器 1 0 を透して得られる画像は、顕微鏡 5 3 0 により拡大されて 2 次元撮像ユニット 5 4 0 へ入射する。中央処理装置 7 0 0 は、2 次元撮像ユニット 5 4 0 から送られてくる画像データを入力し（ステップ S 1）、該画像データから蛍光像を検出する（ステップ S 2）。すなわち、試料溶液 L 中に生成された蛋白質結晶 S は、紫外線が照射されたとき蛍光を発するため、その蛍光像が 2 次元撮像ユニット 5 4 0 に入射する。そこで、中央処理装置 7 0 0 は、2 次元撮像ユニット 5 4 0 から入力した画像データを分析して蛍光像を検出し、蛍光像すなわち蛋白質の位置を把握する。

なお、ここで把握される蛋白質の位置は、水平面（x y 座標）上の位置であり、高さ方向（z 座標）の位置は、顕微鏡 5 3 0 の焦点位置により把握される。

次いで、光源を紫外線照射ユニット 5 2 1 から可視光照射ユニット 5 2 0 に切り替え、該可視光照射ユニット 5 2 0 から発射される可視光線を試料容器 1 0 に照射する。このとき、試料容器 1 0 を透して得られる可視光像は、顕微鏡 5 3 0 により拡大されて 2 次元撮像ユニット 5 4 0 へ入射する。中央処理装置 7 0 0 は、2 次元撮像ユニット 5 4 0 から送られてくる画像データを入力し（ステップ S 3）、該画像データを処理して試料溶液 L 中の結晶を検出するとともに、その重心位置を認識する（ステップ S 4）。

このステップ S 4（結晶検出ステップ）は、図 7 に示すサブルーチンに沿って処理される。すなわち、2 次元撮像ユニット 5 4 0 から入力した画像データを、所定のしきい値を基準に 2 値化処理して、x y 座標上の各画素を「1」「0」の 2 値データに変換する（ステップ S 10）。

次いで、2 値化処理された画像データから、試料溶液 L 中に存在する試料のエッジに該当する画素を検出する（ステップ S 11）。ここでは、例えば、図 8 に示す

ように判別対象である注目画素が黒（データ「1」）であるか否かを判別し、黒であったときは、その周囲の画素（画素1～8）について、同様に黒（データ「1」）か白（データ「0」）かを判別していく。

そして、周囲の画素（画素1～8）がすべて白（データ「0」）であったときは、注目画素が孤立点であると結論付ける。また、周囲の画素（画素1～8）がすべて黒（データ「1」）であったときは、注目画素が画像の内部点であると結論付ける。このようにして、孤立点と内部点に相当する画素はすべて除外し、周囲の画素（画素1～8）の一部が白（データ「0」）である注目画素を試料のエッジと認識し、そのx y座標を記憶する。

上述した処理を、x y座標系のすべての画素について実行し、試料のエッジに該当する画素をすべて抽出する。

続いて、抽出した試料のエッジに該当する画素に着目し、隣接する画素を連結していき、試料の輪郭線を検出する（ステップS 1 2）。この輪郭線の始点と終点が一致すれば、該輪郭線は閉じた輪郭線と判定される。そして、閉じた輪郭線をもつ試料が、一定の面積を有する結晶と判別される。一方、輪郭線が閉じていない試料は、凝集など結晶化されていないものとして除外される。

次に、閉じた輪郭線をもつ試料（すなわち結晶）の内部領域を認識し、該内部領域の重心位置を、公知の演算法を用いて算出する（ステップS 1 3）。

平面画像の重心位置を求める手法としては、例えば、結晶として認識された連結図形Sのモーメント量を求め、このモーメント量から計算することができる。すなわち、連結図形Sの各画素の重みを均等に1とした場合、モーメントM (m, n) は次式で定義される。

$$M(m, n) = \sum_{(x, y) \in S} (x^m \times y^n)$$

$M(0, 0)$ は、連結図形 S の面積

$M(1, 0)$ は、 x 軸に対するモーメント

$M(0, 1)$ は、 y 軸に対するモーメント

そして、上記のモーメント量を用いて重心座標 (p, q) は、次式で計算できる。

$$p = M(1, 0) / M(0, 0)$$

$$q = M(0, 1) / M(0, 0)$$

中央処理装置 700 は、検出された結晶の重心位置を算出した後、再び図 6 に示すメインルーチンに戻り、蛍光像に基づき検出された蛋白質の位置と、可視光像に基づき検出された結晶の位置を重ね合わせて、蛋白質結晶 S を認識する。そして、該蛋白質結晶 S に対し図 7 のステップ S13 で得られた重心位置を記憶する（ステップ S5）。以上により、試料容器 10 内に存在する蛋白質結晶 S の重心位置を自動的に検出することができる。

図 9 A、図 9 B は蛋白質結晶と自家蛍光を発しない物質の結晶とが混在して含まれる試料溶液を観察したときの顕微鏡画像のスケッチであり、図 9 A は同試料溶液に可視光線を照射して得られた可視光像、図 9 B は同試料溶液に紫外線を照射して得られた蛍光像である。

図 9 A に示すように、試料溶液に可視光線を照射したときは、蛋白質結晶の可視光像 A とその他の結晶の可視光像 B が観察された。この画像では、いずれの可視光像が蛋白質結晶であるか判別がつかない。

しかし、図 9 B に示すように、試料溶液に紫外線を照射したとき、蛋白質結晶の蛍光像 C のみが観察され、その他の結晶は検出されない。よって、可視構造 A と蛍光像 C を重ね合わせることで、蛋白質結晶の位置を認識することができる。

図 10 A、図 10 B は蛋白質の凝集が含まれる試料溶液を観察したときの顕微鏡画像のスケッチであり、図 10 A は同試料溶液に紫外線を照射して得られた蛍光像、図 10 B は同試料溶液に可視光線を照射して得られた可視光像である。

図 10 A に示すように、試料溶液に紫外線を照射したときは、蛋白質の凝集から

発せられる蛍光像Dが観察された。この蛍光像Dでは、蛋白質の凝集か結晶かの判断はつかない。

しかし、図10Bに示すように、試料溶液に可視光線を照射したとき、蛋白質の凝集に特徴的な針状の外形をもつ可視光像Eが観察され、よって該観察対象が蛋白質の凝集であると判定することができる。

このように、試料溶液に紫外線を照射したとき得られる蛍光像と、試料溶液に可視光線を照射したとき得られる可視光像とを総合することで、蛋白質以外の結晶や蛋白質の凝集を除外して、蛋白質結晶の位置を認識することが可能となる。

〔X線測定ステージ〕

次に、X線測定ステージについて更に詳細に説明する。

図11はX線測定ステージの構成を示す側面構成図、図12はX線測定ステージにおける蛋白質結晶の測定原理を模式的に示す図である。

図11に示すように、X線測定ステージ600には、試料配置部610を基準として、その下方にX線照射ユニット620（X線照射手段）、上方にX線検出器630（X線検出手段）が配設されている。

試料配置部610には、既述したように試料台401上に載置された試料容器10が、XYZテーブル402とスライダ403の移動をもって位置決め配置される。

X線照射ユニット620は、X線源621とX線光学系622を含んでいる。X線源621には、電子銃とターゲットを内蔵したラボ用のX線発生器が用いられる。この種のX線発生器は、放射光を発生させる大規模X線発生設備と異なり、寸法および重量が格段に小さい。そのため、後述するように回転アーム640に搭載して回転駆動することが可能である。

X線光学系622は、X線源621から取り出されたX線のうち、特定波長のX線のみを選別したり（単色化）、試料配置部610へX線を収束する等の機能を有し、コンフォーカルミラーやコリメータ等の光学機器の組合せをもって構成されている。

X線検出器630には、二次元X線検出器が用いられる。特に、本実施形態では、X線検出器630としてCCDを用いており、平面上に検出される回折X線の強度を電気信号に変換して、中央処理装置700へ出力するように構成されている。

上述したX線照射ユニット620およびX線検出器630は、回転アーム640にそれぞれ搭載されている。なお、回転アーム640の形状は任意であり、例えば、板状であっても棒状であってもよい。この回転アーム640の一端部にX線照射ユニット620が搭載され、他端部にX線検出器630が対向するように搭載されている。

回転アーム640の中心部は、回転駆動機構641の回転軸641aに装着されており、回転駆動機構641により回転軸641a中心に任意の角度回転可能となっている。回転駆動機構641の回転軸641aの中心線Oは、ほぼ水平に配置しており、X線照射ユニット620から放射されるX線の光軸は、この回転軸641aの中心線Oと交わるように調整されている。この回転駆動機構641は、例えば、ステッピングモータ等の高精度に回転角度を制御可能な駆動モータとその回転を回転軸641aに伝達する歯車機構で構成されており、駆動モータは中央処理装置700によって回転角度が制御されている。回転角度は、正逆両方向へ45°程度の範囲で任意に制御できるようにすることが好ましい。

本実施形態では、回転アーム640に搭載されたX線照射ユニット620を試料配置部610の下方に配置するとともに、X線検出器630を試料配置部610の上方に配置してあり、試料配置部610上の試料容器10内に生成された蛋白質結晶Sに対して下方からX線を照射し、蛋白質結晶Sで反射してきた回折X線を、試料容器10の上方でX線検出器630により検出する構成となっている。なお、X線照射ユニット620とX線検出器630の配置を上下逆転して、X線照射ユニット620を試料配置部610の上方に配置するとともに、X線検出器630をその下方に配置することもできる。

また、X線検出器630には、検出位置調整機構650が付設されている。この

検出位置調整機構 650 は、X線検出器 630 を回転半径方向（図示 a 方向）に移動させるとともに、試料配置部 610 に配置される試料容器 10 と平行な一方向（図示 b 方向）に移動させる機構である。図 11 に示す構成例では、検出位置調整機構 650 を、回転アーム 640 に設置された第 1 の案内レール 651 と、この第 1 の案内レール 651 に沿って移動可能な第 1 の移動台 652 と、この移動台 652 から図示 b 方向に延出する第 2 の案内レール 653 と、この第 2 の案内レール 653 に沿って移動可能な第 2 の移動台（図示せず）と、これら各移動台を駆動する駆動モータ（図示せず）とで構成しており、第 2 の移動台に X線検出器 630 が固定されている。

次に、X線測定ステージ 600 における蛋白質結晶の測定方法を説明する。

XYZ テーブル 402 およびスライダ 403 の移動により試料配置部 610 に試料容器 10 内の蛋白質結晶 S が自動的に位置決め配置される。

ここで、必要に応じて蛋白質結晶 S と X線検出器 630 との間の距離を調整する。すなわち、蛋白質結晶 S に X線検出器 630 を近づけるほど、蛋白質結晶 S から放射状に反射してくる X線の回折斑点を広い角度範囲で検出することができる。しかし、蛋白質結晶 S の逆格子密度が高い場合、蛋白質結晶 S に X線検出器 630 を近づけると、蛋白質結晶 S から放射状に反射してくる X線の回折斑点が重なり合って検出されてしまうおそれがある。そこで、検出位置調整機構 650 をもって X線検出器 630 を図 11 の a 方向に移動調整することで、蛋白質結晶 S と X線検出器 630 との間の距離を適宜調整し好適な検出データを得ることが可能となる。

さらに、検出位置調整機構 650 をもって X線検出器 630 を図 11 の b 方向に移動調整することで、蛋白質結晶 S から放射状に反射してくる回折 X線の検出範囲を変更することもできる。

次いで、X線照射ユニット 620 から X線を放射して X線回折測定を実行する。図 12 に示すように、X線照射ユニット 620 から放射された X線は、試料容器 10 内の蛋白質結晶 S に下方から入射する。そして、蛋白質結晶 S からは放射状に X

線が回折して、この回折X線がX線検出器630で検出される。中央処理装置700は、検出された回折X線の強度データに基づき結晶評価や結晶構造解析を実行する。

また、蛋白質結晶Sに対して様々な角度からX線を照射して回折X線の強度を検出する場合には、回転駆動機構641により回転アーム640を回転駆動して、蛋白質結晶Sの格子面に対するX線照射ユニット620およびX線検出器630の角度を調整し、上記X線回折測定を繰り返す。この操作をもって、試料容器10を回転させることなく、蛋白質結晶Sに対する回折X線の積分強度を求めることができ、さらに、積分強度に基づき高い信頼性をもった結晶構造解析を実現することができる。

なお、上記実施形態および実施例では蛋白質結晶を検出対象として説明してきたが、本発明方法の対象はこれに限定されるものではなく、紫外線を照射したとき蛍光を発する特性を有した各種の特定高分子結晶を検出対象とすることができる。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明によれば、試料検出ステージで試料容器内の特定高分子結晶を検出し、そこで得られた情報に基づき搬送手段を制御することで、特定高分子結晶をX線測定ステージの試料配置部へ位置決めするようにしたので、特定高分子結晶の検出から試料配置部への位置決めまでの作業を自動化することができ、評価処理の迅速化を図ることが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. X線、紫外線および可視光線を透過する試料容器を用い、該試料容器内に存在する特定高分子結晶を評価する装置であって、

前記試料容器内の特定高分子結晶を検出するための試料検出ステージと、

前記試料検出ステージとは離間した位置にあって、前記特定高分子結晶のX線回折測定を行うX線測定ステージと、

前記試料検出ステージから前記X線測定ステージへ試料容器を搬送する搬送手段と、

前記試料検出ステージで得られた情報に基づき、特定高分子結晶の位置を認識するとともに、該位置情報に基づき前記搬送手段を制御して該特定高分子結晶を前記X線測定ステージの試料配置部へ位置決めする制御手段と、を備えたことを特徴とする特定高分子結晶の評価装置。

2. 前記試料検出ステージは、前記試料容器に紫外線を照射し、該試料容器内の試料が発する蛍光像を検出する特定高分子検出手段と、

前記試料容器内に存在する試料の可視光像から該試料の外形を検出する結晶検出手段と、を備え、

前記制御手段は、前記特定高分子検出手段により蛍光像が検出され、かつ前記結晶検出手段により結晶を示す外形が検出された試料を特定高分子結晶と判定するとともに、該特定高分子結晶の位置を認識する構成であることを特徴とする請求の範囲1に記載した特定高分子結晶の評価装置。

3. 前記X線測定ステージは、試料配置部に配置された試料容器内の特定高分子結晶に対し、上方又は下方からX線を照射するX線照射手段と、

前記試料容器を介して前記X線照射手段と対向配置され、前記試料容器を透過し

てきた前記特定高分子結晶からの回折X線を検出するX線検出手段と、
前記X線照射手段およびX線検出手段を支持する回転アームと、
前記回転アームをほぼ水平な軸中心に任意の角度回転させる回転駆動機構と、を
備えたことを特徴とする請求の範囲1に記載した特定高分子結晶の評価装置。

4. 前記搬送手段は、試料容器を載置する試料台と、前記試料台を搭載するとともに該試料台を水平面上で直交するX、Y方向および高さ方向に移動させるXYZテーブルと、このXYZテーブルを前記試料検出ステージから前記X線測定ステージへ搬送するスライダと、を含むことを特徴とする請求の範囲1に記載した特定高分子結晶の評価装置。

Fig.1

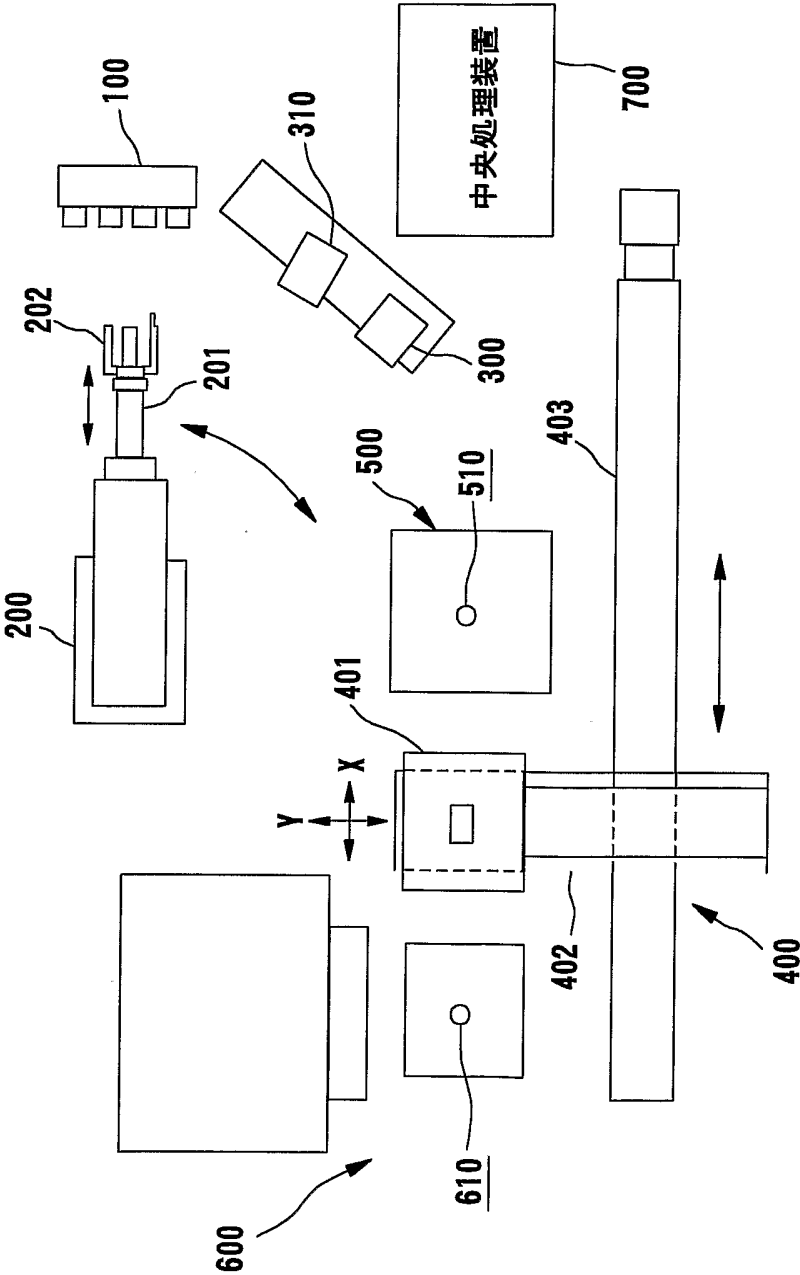
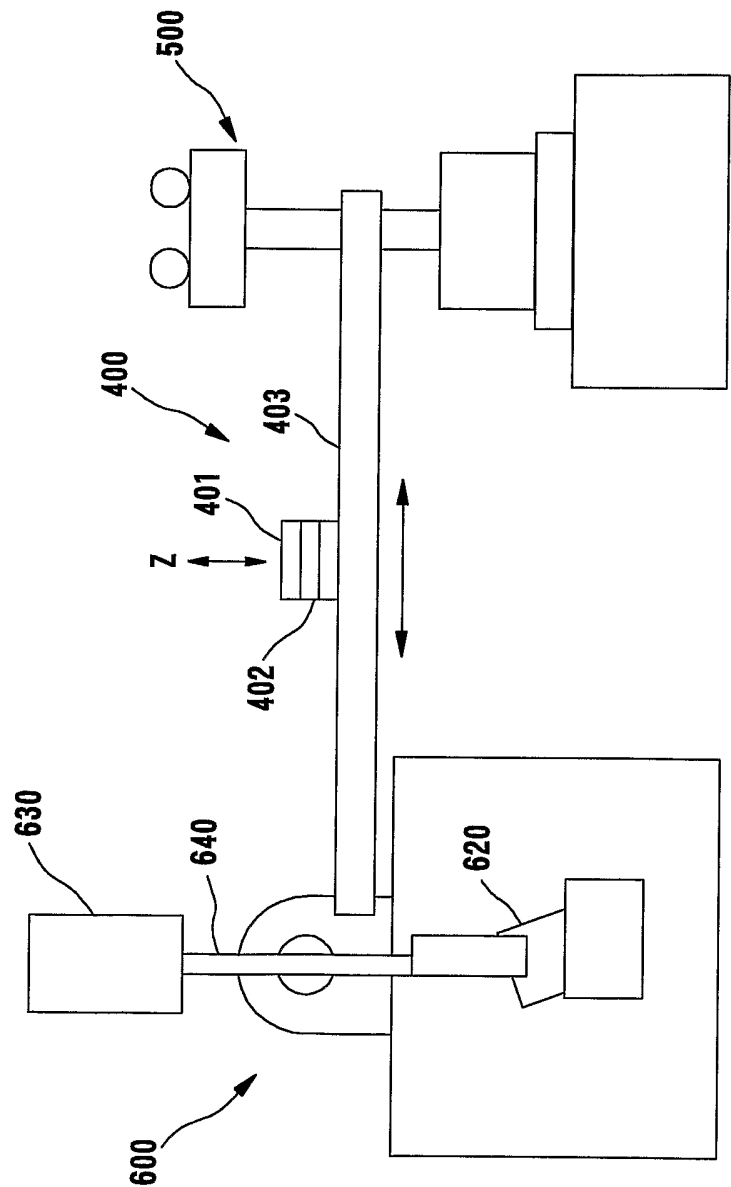


Fig.2



3/12

Fig.3A

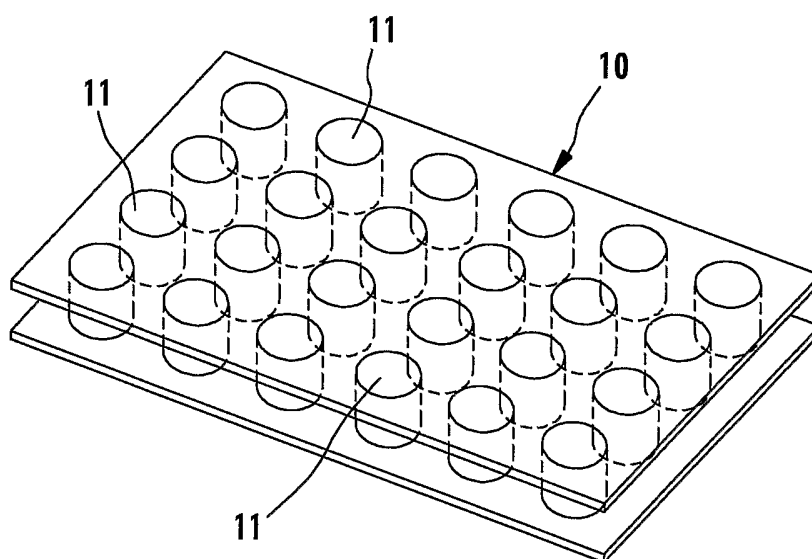
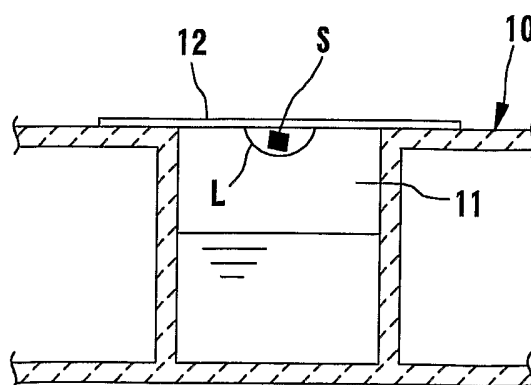


Fig.3B



4/12

Fig.4A

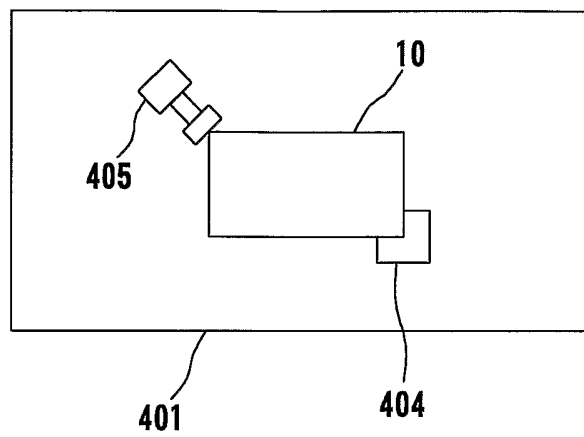
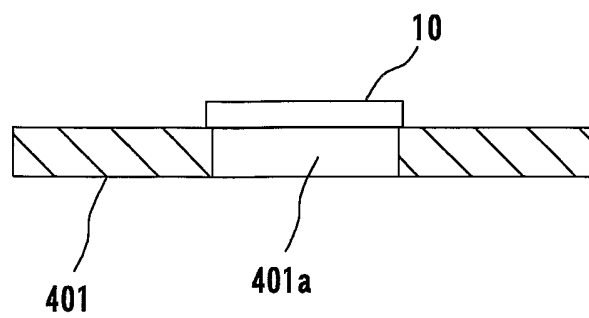


Fig.4B



5/12

Fig.5

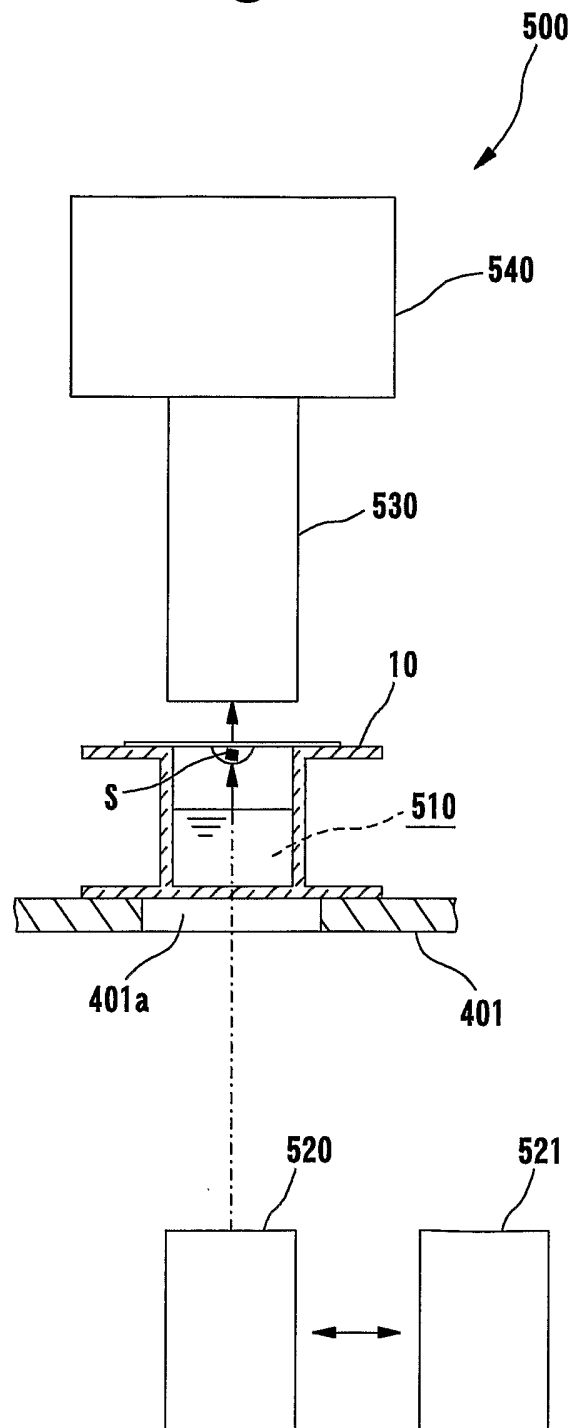


Fig.6

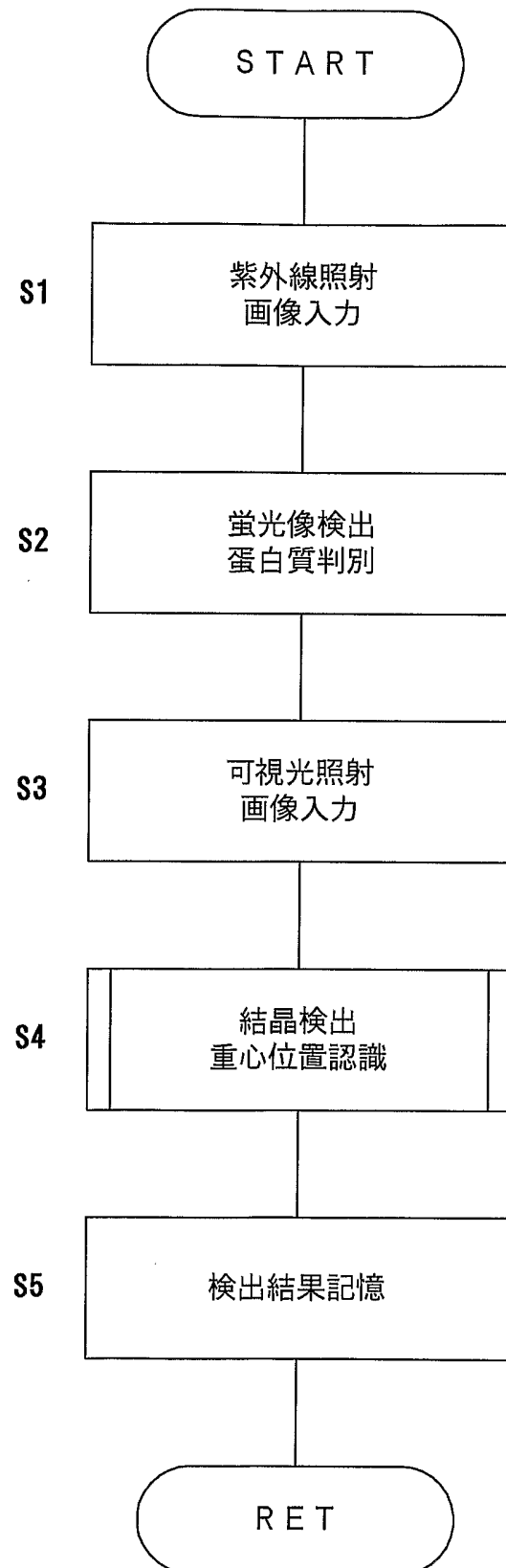
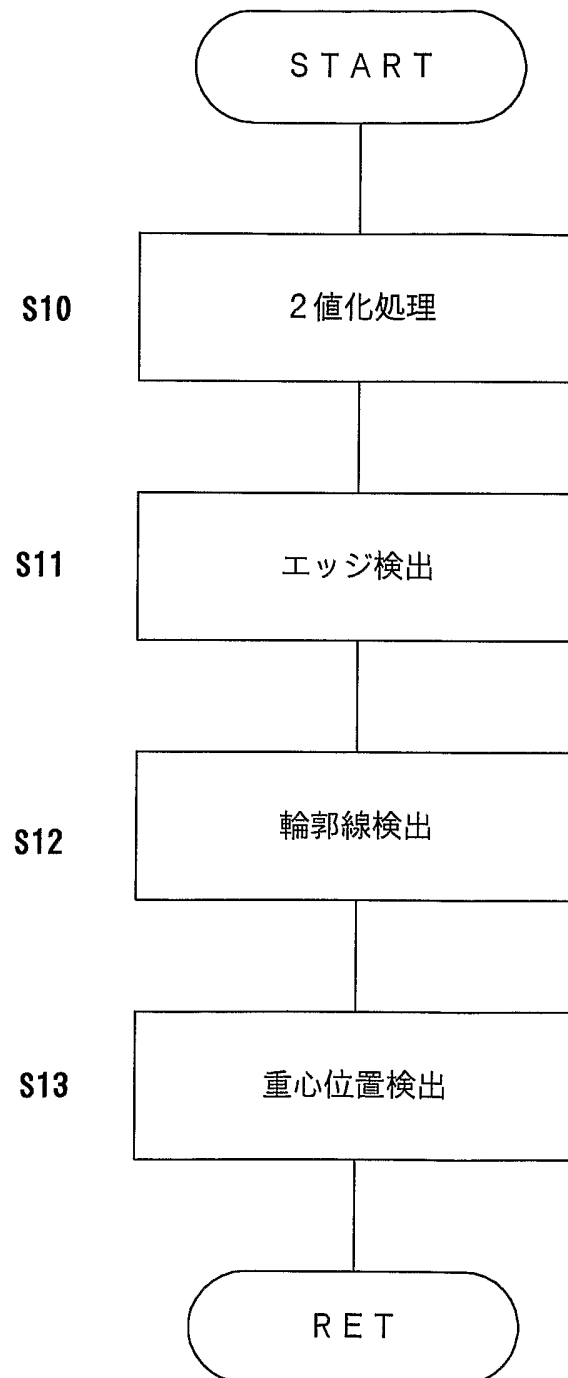


Fig.7



8/12

Fig.8

3	2	1
4	注目画素 (x, y)	8
5	6	7

Fig.9A

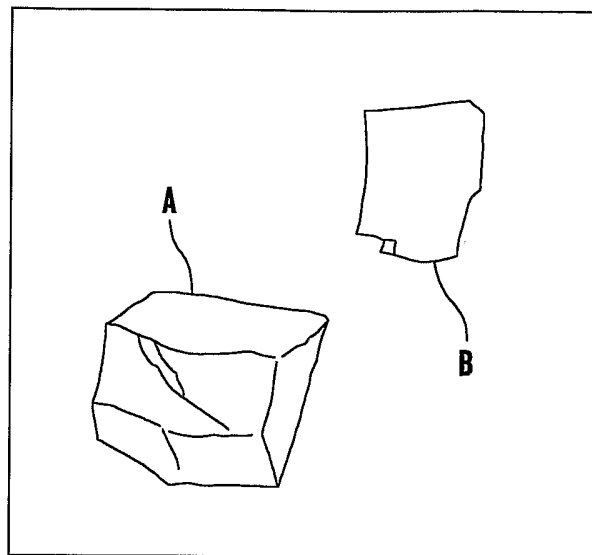
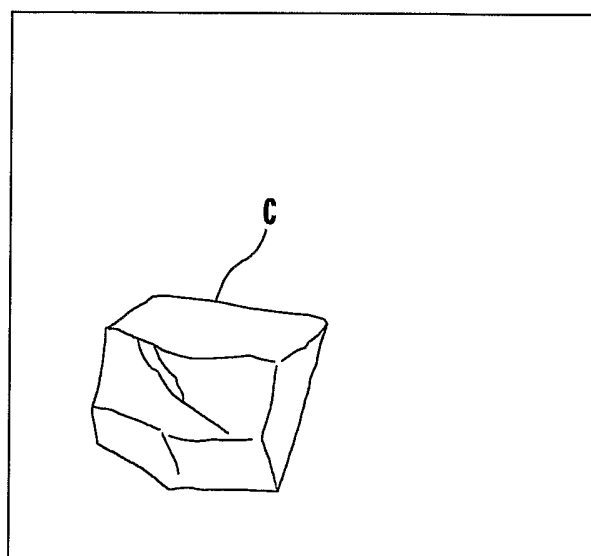


Fig.9B



10/12

Fig.10A

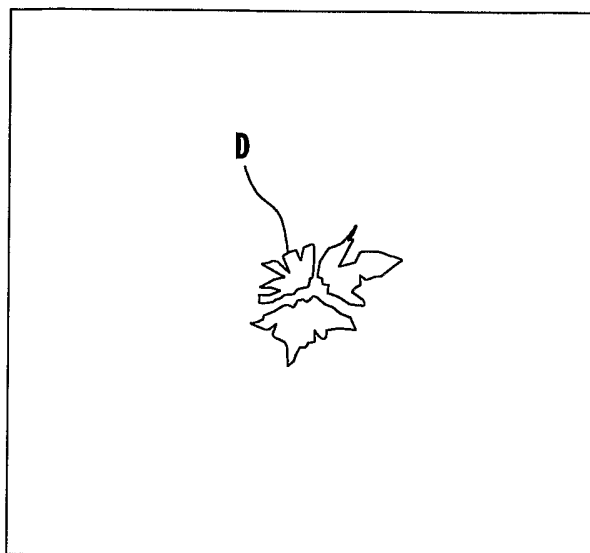
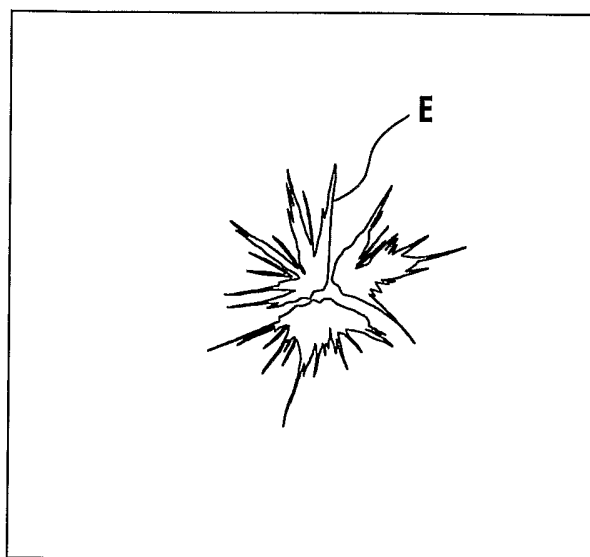
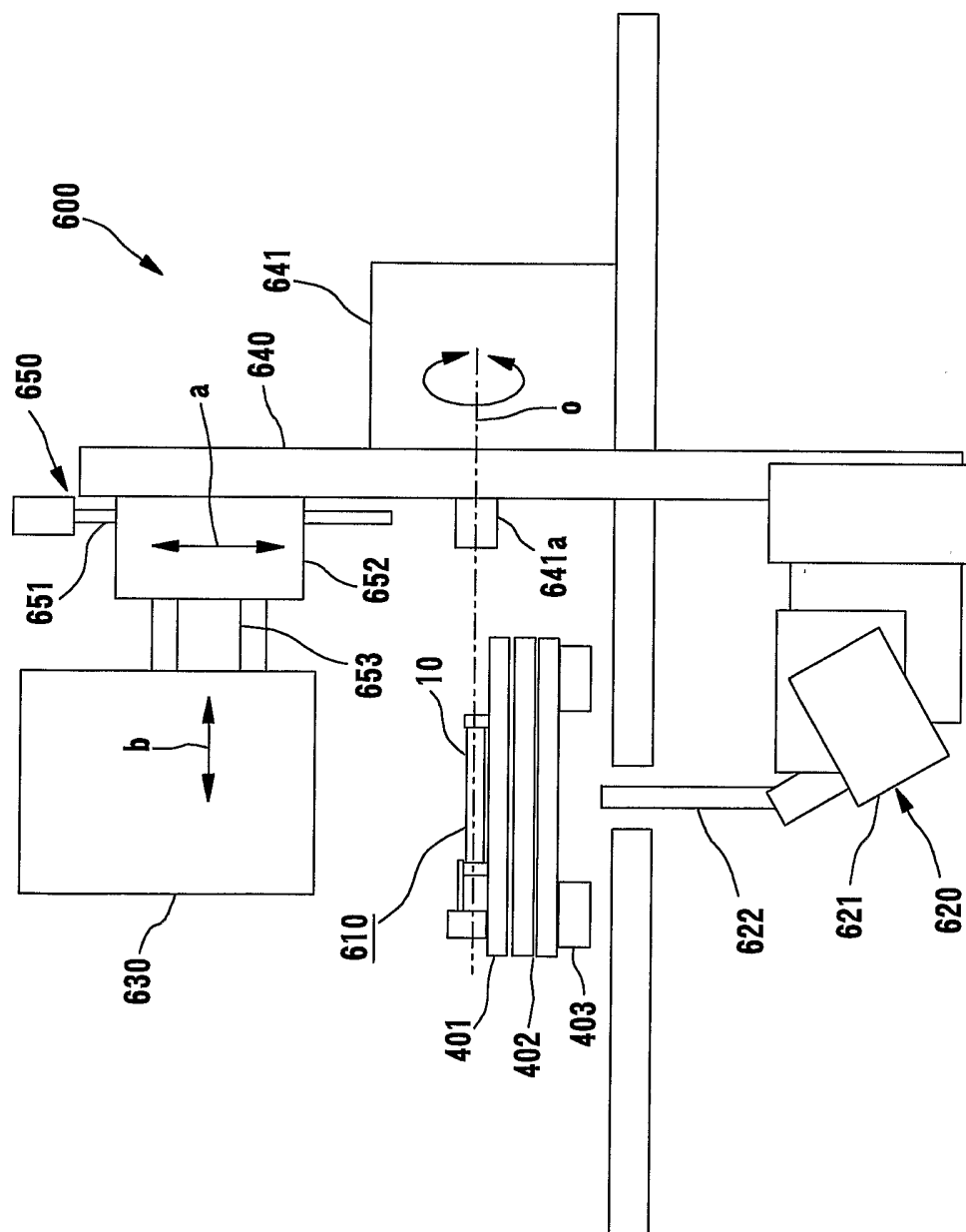


Fig.10B

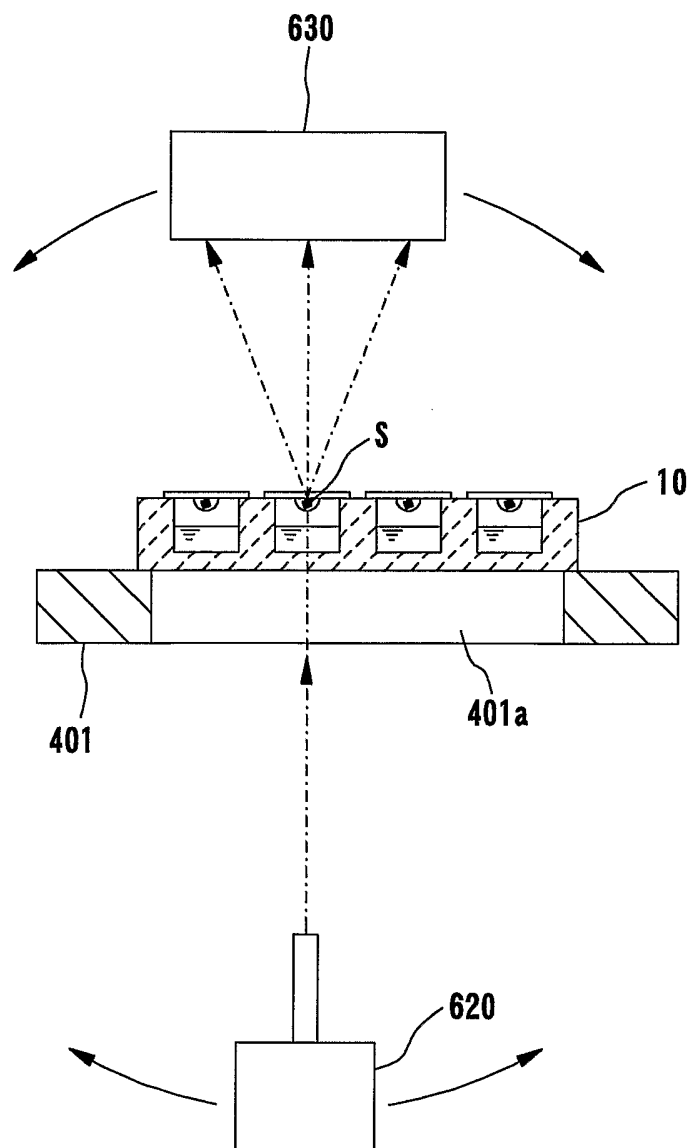


110



12/12

Fig.12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N23/207		
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.Cl ⁷ G01N23/00-23/227, G01N21/00-21/958, G01N33/48-33/98		
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 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004		
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 A	WO 2002/057763 A2 (STRUCTURAL GENOMIX), 25 July, 2002 (25.07.02), Full text; Figs. 1 to 6 & US 2002/0067800 A1 & JP 2004-526949 A & EP 1327012 A	1, 3, 4 2
Y A	JP 7-35687 A (Fujitsu Ltd.), 07 February, 1995 (07.02.95), Full text; Figs. 1 to 6 (Family: none)	1, 3, 4 2
Y A	JP 4-216441 A (Fujitsu Ltd.), 06 August, 1992 (06.08.92), Full text; Figs. 1 to 4 & EP 491558 A2 & US 5214288 A	1, 3, 4 2
☒ 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 November, 2004 (18.11.04)		Date of mailing of the international search report 07 December, 2004 (07.12.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012142

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 2003-194741 A (Seiko Epson Corp.), 09 July, 2003 (09.07.03), Full text; Figs. 1 to 11 (Family: none)	3
P,X	JP 2004-20397 A (Rigaku Denki Co., Ltd.), 22 January, 2004 (22.01.04), Full text; Figs. 1 to 3 & EP 1376108 A2	1,3,4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N23/207

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. Cl⁷ G01N23/00-23/227, G01N21/00-21/958,
G01N33/48-33/98

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	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004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 A	WO 2002/057763 A2 (STRUCTURAL GENOMIX) 2002.07.25, 全文, 第1-6図 & US 2002/0067800 A1 & JP 2004-526949 A & EP 1327012 A	1, 3, 4 2
Y A	JP 7-35687 A (富士通株式会社) 1995.02.07, 全文, 第1-6図 (ファミリーなし)	1, 3, 4 2

☒ 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

18.11.2004

国際調査報告の発送日

07.12.2004

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)

鈴木 俊光

2W

9115

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

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 A	JP 4-216441 A (富士通株式会社) 1992.08.06, 全文, 第1-4図 & EP 491558 A2 & US 5214288 A	1, 3, 4 2
Y	JP 2003-194741 A (セイコーエプソン株式会社) 2003.07.09, 全文, 第1-11図 (ファミリーなし)	3
P, X	JP 2004-20397 A (理学電機株式会社) 2004.01.22, 全文, 第1-3図 & EP 1376108 A2	1, 3, 4