

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年8月11日(11.08.2016)



(10) 国際公開番号

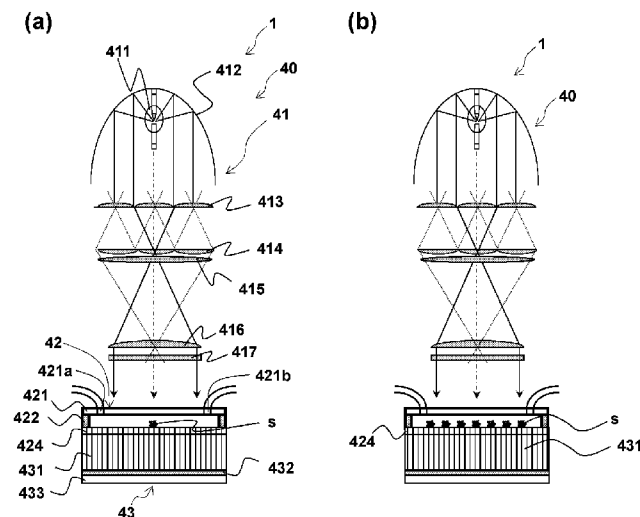
WO 2016/125236 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/052852
- (22) 国際出願日: 2015年2月2日(02.02.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社日立ハイテクノロジーズ(HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 加藤 宏一(KATO, Hirokazu); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 庄司 智広(SHOJI, Tomohiro); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 高橋 智(TAKAHASHI, Satoshi); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 前川 彰(MAEKAWA, Akira); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人ウィルフォート国際特許事務所(WILLFORT INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒1030016 東京都中央区日本橋小網町1-9-7 日本橋TCビル 1階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

[続葉有]

(54) Title: MULTICOLOR FLUORESCENCE ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称: 多色蛍光分析装置



(57) Abstract: A multicolor fluorescence analysis device 1 according to the present invention is provided with: an irradiation unit 41 for irradiating excitation light having a plurality of excitation wavelength bands onto a sample s; a first fiberoptic plate 424 for guiding light including fluorescence emitted from the sample s as a result of the irradiation of the excitation light and emitting the same from a first emission part 425b; a second fiberoptic plate 431 for receiving light emitted from the first emission part 425b at a second incidence part 434a, guiding the same, and emitting the same from a second emission part 434b; a single multilayer dielectric interference film filter 432 that is provided on an end surface of the second emission part 434b, transmits at least a portion of the fluorescence, and transmits light of a plurality of transmission wavelength bands that do not include the excitation wavelength bands; and a two-dimensional detection unit 433 that is disposed so as to be adhered to the multilayer dielectric interference film filter 432 and detect light having passed through the multilayer dielectric interference film filter 432.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/125236 A1



PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明の多色蛍光分析装置 1 は、複数の励起波長帯を有する励起光を試料 s に照射する照射部 4 1 と、励起光の照射により試料 s から発せられた蛍光を含む光を導光すると共に、第 1 の出射部 4 2 5 b から出射する第 1 のファイバオプティックプレート 4 2 4 と、第 1 の出射部 4 2 5 b から出射した光を第 2 の入射部 4 3 4 a から受け入れて導光すると共に、第 2 の出射部 4 3 4 b から上記光を出射する第 2 のファイバオプティックプレート 4 3 1 と、第 2 の出射部 4 3 4 b の端面上に設けられ、上記蛍光の少なくとも一部を透過しかつ上記励起波長帯を含まない複数の透過波長帯の光を透過する単一の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2 と、誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2 に密着するように設けられ、誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2 を透過した光を検出する二次元検出部 4 3 3 とを備えている。

明 細 書

発明の名称：多色蛍光分析装置

技術分野

[0001] 本発明は、多色蛍光分析装置に関する。

背景技術

[0002] 例えば生物学的試験において、蛍光色素でラベルされた多数の微小な試料に一括して励起光を照射し、上記蛍光色素が発した蛍光を検出して各試料を特定する分析装置が知られている（例えば、特許文献1参照）。

[0003] 上記分析装置では、励起光を分離して特定の波長の蛍光のみを取り出すための交換式の干渉フィルタを備えており、この干渉フィルタを透過した蛍光を上記各試料に対応するよう配設された多数の光ファイバで導光し、これら光ファイバの他端に取り付けられた画像センサを用いて分析を行う。

[0004] このような分析装置では、蛍光を導光する手段として多数の光ファイバが束ねられたファイバオプティックプレートが用いられており、束ねられた光ファイバにより伝送される蛍光を画像センサで二次元画像として一括処理して蛍光の有無を判別するため、同時に多数の試料について蛍光分析を行うことが可能である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平11-241947号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、例えばSequence by synthesis（以下、「SBS」ともいう）法を用いたDNAの塩基配列分析に代表されるような異なる蛍光波長を有する複数の蛍光色素を含む試料を分析する場合、上述したような従来の分析装置では、分析対象とする蛍光色素ごとに干渉フィルタを交換しなければならず、繰り返し行われる塩基伸長反応のたびに干渉

フィルタを交換するとなれば分析に膨大な時間を要してしまい、分析迅速化の要求を満足することができない。

[0007] 本発明は、以上のような事情に基づいてなされたものであり、その目的は、試料に含まれる複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を一括して正確に検出することができる多色蛍光分析装置を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、

(1) 励起光の照射により試料が含む異なる蛍光波長を有する複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を検出する多色蛍光分析装置であって、

互いに異なる複数の励起波長帯を有する励起光を前記試料に照射する照射部と、

前記試料の少なくとも一部が当接し、前記励起光の照射により前記試料から発せられた蛍光を含む光を第1の入射部から受け入れて導光すると共に、前記第1の入射部と反対側の第1の出射部から前記光を出射する第1のファイバオプティックプレートと、

前記第1の出射部から出射した光を第2の入射部から受け入れて導光すると共に、前記第2の入射部と反対側の第2の出射部から前記光を出射する第2のファイバオプティックプレートと、

前記第2の出射部の端面上に設けられ、前記蛍光の少なくとも一部を透過しかつ前記励起波長帯を含まない複数の透過波長帯の光を透過する単一の誘電体多層膜干渉フィルタと、

前記誘電体多層膜干渉フィルタに密着するように設けられ、前記誘電体多層膜干渉フィルタを透過した光を検出する二次元検出部とを備えていることを特徴とする多色蛍光分析装置、

(2) 前記(1)に記載の誘電体多層膜干渉フィルタが第1の誘電体多層膜干渉フィルタであり、照射部が光源と前記光源から発せられた光の中から所定の励起波長帯を有する励起光を選択的に透過させる第2の誘電体多層膜干渉フィルタとを有している前記(1)に記載の多色蛍光分析装置、

(3) 第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過波長帯における光の透過率 (α_1) が所定値 (α) よりも小さい関係を満たす立ち上がり波長 (λ_{1i}) と、第2の誘電体多層膜干渉フィルタの透過波長帯における光の透過率 (α_2) が前記所定値 (α) よりも小さい関係を満たす立ち下がり波長 (λ_{2j}) とが、下記式 (1) で表される関係を満たす前記 (2) に記載の多色蛍光分析装置、

[数1]

$$\lambda_{2j} \leq \lambda_{1i} \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta_{\max}}{n_{\text{eff}}} \right)^2} \quad (1)$$

(式 (1) 中、 i および k は、それぞれ 1 以上の整数である。 $\theta_{\max}$ は、第1の誘電体多層膜干渉フィルタに入射する光の最大入射角である。 n_{eff} は、第1の誘電体多層膜干渉フィルタの実効屈折率である。)

(4) 所定値 (α) が 0.1 % である前記 (3) に記載の多色蛍光分析装置、

(5) 第1の誘電体多層膜干渉フィルタの実効屈折率 (n_{eff}) が 1.5 以上 2.2 以下である前記 (3) または (4) に記載の多色蛍光分析装置、

(6) 第1の誘電体多層膜干渉フィルタに入射する光の最大入射角 ($\theta_{\max}$) が 30° である前記 (3) から (5) のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置、

(7) 第2のファイバオプティックプレートを構成する光ファイバの外径が第1のファイバオプティックプレートを構成する光ファイバの外径より小さい前記 (1) から (6) のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置、

(8) 各励起波長帯の励起光が順次照射される前記 (3) から (7) のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置、

(9) 少なくとも 2 つの励起波長帯を有する励起光が同時に照射される前記 (3) から (7) のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置、

(10) 試料が蛍光色素を含む DNA 断片であり、前記 DNA 断片の塩基配列の分析に用いられる前記 (1) から (7) のいずれか 1 項に記載の多色蛍

光分析装置、

(11) 蛍光色素が Alexa 405、FAM、Texas Red および Cy5.5 である前記(10)に記載の多色蛍光分析装置、

(12) 第2の誘電体多層膜干渉フィルタが第1フィルタ、第2フィルタ、第3フィルタおよび第4フィルタを有し、

第1フィルタの透過率が、380～396 nmの波長帯において85%以上、かつ380～396 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、

第2フィルタの透過率が、474～497 nmの波長帯において85%以上、かつ474～497 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、

第3フィルタの透過率が、561～575 nmの波長帯において85%以上、かつ561～575 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、

第4フィルタの透過率が、641～657 nmの波長帯において85%以上、かつ641～657 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、

前記第1フィルタ、第2フィルタ、第3フィルタおよび第4フィルタが切り替えて用いられる前記(11)に記載の多色蛍光分析装置、

(13) 第2の誘電体多層膜干渉フィルタが単一のフィルタであり、前記第2の誘電体多層膜干渉フィルタの透過率が380～396 nm、474～497 nm、561～575 nmおよび641～657 nmの波長帯において85%以上、かつ前記波長帯以外の波長帯において0.1%未満である前記(11)に記載の多色蛍光分析装置、

(14) 第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過率が、436～462 nm、536～548 nm、620～632 nmおよび713～800 nmの波長帯において85%以上、かつ前記波長帯以外の波長帯において0.1%未満である前記(12)または(13)に記載の多色蛍光分析装置、並びに

(15) 第1のファイバオプティックプレートの試料が当接する側の面において、光ファイバのコア部端面にアミノシラン処理が施され、前記光ファイバの前記コア部端面以外の面にHMD S処理が施されている前記(10)から(14)のいずれか1項に記載の多色蛍光分析装置に関する。

[0009] なお、本明細書において、ファイバオプティックプレート (Fiber Optic Plate、以下「FOP」ともいう) とは、多数の光ファイバが一体的に束ねられて当該光ファイバの軸方向の両端部が平面形状をなすものであり、上記光ファイバの一端から入射した光を上記光ファイバの他端に導光可能なデバイスを意味する。このファイバオプティックプレートは、ファイバオプティックテーパ (Fiber Optic Taper、以下「FOT」ともいう) を含む概念である。

発明の効果

[0010] 本発明は、試料に含まれる複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を一括して正確に検出することができる多色蛍光分析装置を提供することができる。したがって、当該多色蛍光分析装置は、例えば、複数の蛍光色素を同時に用いるようなSBS法を用いたDNAの塩基配列分析などに好適に使用することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の多色蛍光分析装置の一実施形態を示す概略図である。

[図2]図1の多色蛍光分析装置における蛍光検出手段を示す概略図であって、(a)は試料が1個の状態、(b)は試料が複数の状態をそれぞれ示す。

[図3]図2のフローチップの概略斜視図であって、(a)は分解した状態、(b)は組み立てた状態をそれぞれ示す。

[図4]図2の蛍光検出手段を示す概略図であって、(a)はフローチップを装着する前の状態、(b)はフローチップを装着した状態をそれぞれ示す。

[図5]図2の蛍光検出手段における蛍光の伝搬状態を示す概略図であって、(a)は第1および第2のファイバオプティックプレート内の伝搬状態、(b)

）は第1および第2の光ファイバ内の伝搬状態をそれぞれ示す。

[図6]図2の蛍光検出手段において第1のファイバオプティックプレートへの蛍光の入射角をパラメータとした蛍光と励起光との関係を示す概略図であって、（a）は入射角が 0° の状態、（b）は入射角が変化したときの状態、（c）は入射角が 30° の状態、（d）は入射角が 0° かつ短波長シフトを考慮した状態をそれぞれ示す。

[図7]図2の蛍光検出手段における照射部の一形態を具体化して示す概略図である。

[図8]図7の蛍光検出手段の照射部における各フィルタの概略透過特性図であって、（a）は第1フィルタの透過率、（b）は第2フィルタの透過率、（c）は第3フィルタの透過率、（d）は第4フィルタの透過率、（e）は第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過率をそれぞれ示す。

[図9]図2の蛍光検出手段における二次元検出部の一形態を説明するための概略図である。

[図10]図9の蛍光検出手段における概略分光特性図であって、（a）は第1および第2の誘電体多層膜干渉フィルタにおいて短波長シフトを考慮していない特性、（b）は第1および第2の誘電体多層膜干渉フィルタにおいて短波長シフトを考慮した特性、（c）は各蛍光色素の蛍光スペクトルをそれぞれ示す。

[図11]図2の蛍光検出手段における二次元検出部の概略特性図であって、（a）は第1の誘電体多層膜干渉フィルタを透過する蛍光スペクトル、（b）は二次元検出部における各センサの波長特性をそれぞれ示す。

[図12]図2の蛍光検出手段における二次元検出部の他の形態を示す概略図である。

[図13]図12の蛍光検出手段における二次元検出部の概略特性図であって、（a）は第1の誘電体多層膜干渉フィルタを透過する蛍光スペクトル、（b）は二次元検出部における各センサの波長特性をそれぞれ示す。

[図14]図2の蛍光検出手段における第2のファイバオプティックプレートと

してファイバオプティックテーパを採用したものの概略図である。

[図15]図2の蛍光検出手段における照射部の光源としてLEDを用いた一形態を示す概略図である。

[図16]図16の蛍光検出手段の照射部としてライトパイプを用いた一形態を示す概略図である。

[図17]図15の蛍光検出手段の照射部として複数セットの照射部を用いた一形態を示す概略図であって、(a)は正面図、(b)は平面図をそれぞれ示す。

[図18]図15の蛍光検出手段の照射部を斜光照明とした一形態を示す概略図である。

[図19]図2の蛍光検出手段における第1および第2のファイバオプティックプレートの他の形態を示す概略図であって、(a)は第1および第2のファイバオプティックプレートの断面図、(b)は第1および第2の光ファイバの切断斜視図をそれぞれ示す。

[図20]図2の蛍光検出手段における第1の誘電体多層膜干渉フィルタと二次元光センサとの間に光隔壁を設けた形態を示す概略図である。

[図21]対物レンズを用いた多色蛍光分析装置における蛍光検出手段の一形態を示す概略図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の多色蛍光分析装置は、励起光の照射により試料が含む異なる蛍光波長を有する複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を検出する多色蛍光分析装置であって、

互いに異なる複数の励起波長帯を有する励起光を前記試料に照射する照射部と、

前記試料の少なくとも一部が当接し、前記励起光の照射により前記試料から発せられた蛍光を含む光を第1の入射部から受け入れて導光すると共に、前記第1の入射部と反対側の第1の出射部から前記光を出射する第1のファイバオプティックプレートと、

前記第 1 の出射部から出射した光を第 2 の入射部から受け入れて導光すると共に、前記第 2 の入射部と反対側の第 2 の出射部から前記光を出射する第 2 のファイバオプティックプレートと、

前記第 2 の出射部の端面上に設けられ、前記蛍光の少なくとも一部を透過しかつ前記励起波長帯を含まない複数の透過波長帯の光を透過する単一の誘電体多層膜干渉フィルタと、

前記誘電体多層膜干渉フィルタに密着するように設けられ、前記誘電体多層膜干渉フィルタを透過した光を検出する二次元検出部とを備えていることを特徴とする。

[0013] このように、当該多色蛍光分析装置は、上記照射部と、第 1 および第 2 のファイバオプティックプレートと、誘電体多層膜干渉フィルタと、二次元検出部とを備えているので、試料に含まれる複数の蛍光色素から発せられた蛍光を一括して正確に検出することができる。これは、後述するように、励起光の波長帯と検出に用いる蛍光の波長帯とが重なるのを抑制することができる、その結果、蛍光のみを分光して分析精度を向上することができるためであると推察される。

[0014] 本発明の多色蛍光分析装置は、上述したように試料が含む異なる蛍光波長を有する複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を検出する分析装置として用いられ、その分析対象となる試料は上記要件を満たす限り特に限定されないが、好適には、試料が蛍光色素を含む DNA 断片であり、上記 DNA 断片の塩基配列の分析に用いられる。これにより、蛍光色素でラベルされた 4 種のヌクレオチド（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）を迅速かつ正確に識別することができ、DNA の塩基配列を効率よく解読することができる。

[0015] 以下に、本発明の多色蛍光分析装置を図面に基づいて説明するが、本発明は、当該図面に記載の実施態様のみに限定されるものではない。なお、以下の実施形態では、試料が蛍光色素を含む DNA 断片であり、SBS 反応方式を用いた DNA 断片の塩基配列の分析に用いられる多色蛍光分析装置（以下

、「DNAシーケンサ」ともいう)を例示して説明する。また、以下の実施形態では、第1のファイバオプティックプレートがフローチップの基板として用いられている。また、以下に示す実施形態では、第2の出射部の端面上に設けられている単一の誘電体多層膜干渉フィルタを第1の誘電体多層膜干渉フィルタと称する。

[0016] 図1は、本発明の多色蛍光分析装置の一実施形態を示す概略図である。当該多色蛍光分析装置1は、図1に示すように、概略的に、試薬保管手段10と、送液手段20と、廃液保管手段30と、蛍光検出手段40とにより構成されている。

[0017] 試薬保管手段10は、DNAシーケンサに用いられる試薬等を保管する手段である。試薬保管手段10は試薬カートリッジ101を備え、試薬カートリッジ101内にはプライマ試薬、ポリメラーゼ酵素、4種の蛍光色素を有するヌクレオチドを含んだ伸長試薬、保護基切断試薬、洗浄試薬、イメージング試薬等を各別に収納する複数の試薬保管容器102が格納されている。

[0018] 送液手段20は、試薬等を後述する後述するフローチップ42内に供給すると共にフローチップ42から排出された試薬等を後述する廃液保管手段30に送液する手段である。送液手段20は複数の試薬保管容器102の中からフローチップ42へ供給する試薬等を選択的に切り替える切り替えバルブ201と、試薬等をフローチップ42に送液する流路202と、フローチップ42から排出された試薬等を廃液保管手段30に送液する流路203とを備えている。また、流路203にはシリンジ204と2個の二方弁205、206が設けられ、これらを用いてフローチップ42への試薬等の供給とフローチップ42からの試薬等の排出とを行う。

[0019] 廃液保管手段30は、フローチップ42から排出された試薬等の廃液を保管する手段である。具体的には、廃液保管手段30は、送液手段20の流路203端部から排出された廃液を受け入れる廃液タンク301と、廃液が廃液タンク301から漏れた場合の受け皿となる液受けトレイ302と、廃液の蒸散を防止する蓋303と、廃液タンク301の有無を監視するマイクロ

フォトセンサ304とにより構成されている。

[0020] 蛍光検出手段40は、照射部41と、フローチップ42と、蛍光検出部43とを備えている。

[0021] 照射部41は、互いに異なる複数の励起波長帯を有する励起光を試料sに照射する。照射部41は、図2(a)に示すように、光源411と、放物面鏡412と、第1フライアイレンズ413と、第2フライアイレンズ414と、畳重レンズ415と、フィールドレンズ416と、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417とを有している。

[0022] 光源411は、励起用の光源である。この光源411は、励起光を生成するのに用いられる光を発する。光源411としては、通常キセノンショートアークランプが採用される。このキセノンショートアークランプはキセノンガス中での放電によって可視光領域に良好な連続スペクトルを有するので、複数の励起波長帯の光を発生させるための光源として好適な放電灯である。

[0023] 放物面鏡412は、光源411から発せられた光を反射して平行光に変換する。第1フライアイレンズ413、第2フライアイレンズ414、畳重レンズ415およびフィールドレンズ416は、協働して放物面鏡412で変換された平行光を均一性を持つ平行光に変換する。ここで、畳重レンズ415は、第1フライアイレンズ413の各レンズセルの像をフィールドレンズ416上で重なり合わせ、第1フライアイレンズ413の各レンズセルの照度分布を重ね合わせるにより照度の均一化を実現している。

[0024] 第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417は、光源411から発せられた光の中から所定の励起波長帯を有する励起光を選択的に透過させる。第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417は、具体的には、可視光に対して透明なガラス基板（不図示）と、このガラス基板上に形成された誘電体多層膜（不図示）とにより構成されている。

[0025] 上記誘電体多層膜を構成する材料としては、例えば、 SiO_2 、 TiO_2 、 Ta_2O_5 、 Nb_2O_5 等が挙げられる。当該誘電体多層膜は、上記材料の中から高屈折率材料と低屈折率材料とを選択し、これらを交互に10～40層程

度積層することで形成されている。各層の膜厚等は、当該誘電体多層膜干渉フィルタ417を透過させる所望の波長帯に基づき適宜決定される。上記誘電体多層膜の全厚さは、通常10 μ m程度である。上記誘電体多層膜の形成方法としては、真空蒸着法、イオンアシスト法、イオンプレーティング法、スパッタ法およびイオンアシステッド・イオンビームスパッタリング法が好ましく、真空蒸着法がより好ましい。上記形成方法とすることで、温度や湿度に対する良好な安定性、急峻な立ち上がり特性などの優れた光学特性を付与することができる。

[0026] このように、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を有していることで、例えば、従来から用いられている色素フィルタに比べて励起波長帯の波長範囲を峻別することができ、後述する第1の誘電体多層膜干渉フィルタにより励起光を確実に遮断して二次元検出部での蛍光検出精度を向上させることができる。

[0027] 当該多色蛍光分析装置1では、上述した第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を用い、各励起波長帯の励起光が順次試料sに照射される。具体的には、図7に示すように、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417は、第1フィルタ417a、第2フィルタ417b、第3フィルタ417cおよび第4フィルタ417dを有し、これら第1～第4フィルタ417a～417dが順次切り替えて用いられ、所定の励起波長帯の光を選択的に透過することで、透過した光を励起光として試料sに照射することができる。第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を構成する第1～第4フィルタ417a～417dはフィルタホイール418に取り付けられており、このフィルタホイール418が図示していない駆動装置を用いてが高速（例えば、50ms以内に異なるフィルタに移動可能な程度の高速）に回転する。このように、各励起波長帯の励起光が順次照射されることで、各蛍光色素から発せられる蛍光を確実に識別することができる。

[0028] 本実施形態の塩基配列の分析において好適に用いられる蛍光色素は、Alexa405、FAM、Texas RedおよびCy5.5の4種である

。A l e x a 4 0 5 は d C T P、F A M は d A T P、T e x a s R e d は d G T P、C y 5 . 5 は d T T P にそれぞれ結合する。そのため、上記蛍光色素を励起可能な励起光を照射することで、当該蛍光色素が結合したヌクレオチド（以下、「蛍光ヌクレオチド」ともいう）から対応する蛍光が発せられ、この蛍光を検出することで塩基が解読される。このように、蛍光色素が上記色素であることで、4種のヌクレオチドを確実に識別することができ、これに対応するDNA断片中の塩基を正確に特定することができる。

[0029] 上記4種の蛍光色素を励起させるため、第1フィルタ417aの透過率は、380～396nmの波長帯において85%以上、かつ380～396nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、第2フィルタ417bの透過率は、474～497nmの波長帯において85%以上、かつ474～497nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、第3フィルタ417cの透過率は、561～575nmの波長帯において85%以上、かつ561～575nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、第4フィルタ417dの透過率は、641～657nmの波長帯において85%以上、かつ641～657nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満である。その結果、第1～第4フィルタ417a～417dの中から適当なフィルタを選択することで、380～396nm（主としてA l e x a 4 0 5 を励起）、474～497nm（主としてF A M を励起）、561～575nm（主としてT e x a s R e d を励起）および641～657nm（主としてC y 5 . 5 を励起）の各励起波長帯の励起光を適宜得ることができる。なお、図8（a）～（d）において、符号601～604は、それぞれ第1～第4フィルタ417a～417dの透過波長帯を示している。また、図8（e）は、上記第1～第4フィルタ417a～417dを用いる場合の第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432（後述）の透過波長帯605を示している。このように、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417が第1～第4フィルタ417a～417dを有し、各フィルタの透過率が上記要件を満たしていることで、上記4種の蛍光色素を効率よく励起および検出

することができる。

[0030] なお、少なくとも2つの励起波長帯を有する励起光が同時に照射されることも好ましい。これにより、上記励起波長帯に対応する複数の蛍光色素を同時に効率よく励起させることができ、蛍光分析を迅速に行うことができる。具体的には、用いる蛍光色素がAlexa405、FAM、Texas RedおよびCy5.5である場合、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417が単一のフィルタであり、図10(a)、(b)の符号701で示すように、この第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417の透過率が380~396nm、474~497nm、561~575nmおよび641~657nmの波長帯において85%以上、かつ上記波長帯以外の波長帯において0.1%未満であることが好ましい。このように、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417が単一のフィルタであり、かつ第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417が上記複数の波長帯を透過させることで、上記4種の蛍光色素を同時に効率よく励起させることができ、蛍光分析をより迅速に行うことができる。

[0031] 図3は、図2のフローチップの概略斜視図である。フローチップ42は、図3に示すように、カバーガラス421と、スペーサ422と、基板423とを備えている。

[0032] カバーガラス421は、光透過性を有し、特に400nm以上800nm以下の波長の可視光を透過する。カバーガラス421の材質としては、例えば、ガラス、石英、サファイヤ等が挙げられる。カバーガラス421は、フローチップ42内の流路に試薬等の液体を注入する注入口421aおよび使用済みの液体を排出する排出口421bを有している。

[0033] スペーサ422は、額縁状の周縁部を残して打ち抜き穴422aが形成されている。このスペーサ422は、カバーガラス421と後述する基板423との間に挟み込まれ、これらと共に上記液体を試料sに供給する流路を形成する。スペーサ422は、通常ポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて形成されている。スペーサ422の厚さは、試薬等の液体を円滑に流通

させる観点から、通常30～100 μm であり、好ましくは40～60 μm であり、より好ましくは45～55 μm である。

[0034] 基板423は、試料sとなるDNA断片を固定する。基板423は、第1のファイバオプティックプレート424により構成されている。この第1のファイバオプティックプレート424は、図5(a)に示すように、試料sの少なくとも一部が当接し、励起光の照射により試料sから発せられた蛍光を含む光を第1の入射部425aから受け入れて導光すると共に、第1の入射部425aと反対側の第1の出射部425bから上記光を出射する。

[0035] 第1のファイバオプティックプレート424は、光を導光する格子状に配設された多数の光ファイバ（以下、「第1の光ファイバ425」ともいう）と、これらの第1の光ファイバ425を覆い当該第1の光ファイバ425から漏れる光を吸収する吸収体ガラス（不図示）とから構成されている。第1の光ファイバ425は、図5(b)に示すように、コア部426とこのコア部426を被覆するクラッド部427とから構成されている。これらコア部426およびクラッド部427は、それぞれコアガラスおよびクラッドガラスで形成されており、これら両ガラスは屈折率が異なっている。そのため、コア部426およびクラッド部427を構成するガラスの屈折率を適宜選択することで、両者の界面において全反射を生じさせることができ、第1の入射部425aから受け入れた光を第1の光ファイバ425の光軸方向に導光させて第1の出射部425bに導びくことができる（図5(a)参照）。

[0036] また、各光ファイバ425は、第1のファイバオプティックプレート424の試料sが当接する側の面において、第1の光ファイバ425のコア部426端面にアミノシラン処理が施され、第1の光ファイバ425のコア部426端面以外の面にHMDS処理（ヘキサメチルジシラザン処理）が施されている。このようにアミノシラン処理およびHMDS処理を施されていることで、第1の光ファイバ425のコア部426端面に形成されたアミノシランからなる膜（以下、アミノシランからなる膜が形成された領域を「スポット部」ともいう）上にDNA断片を強固に吸着させると共に、第1の光ファ

イバ4 2 5のコア部4 2 6端面以外の面に形成された1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサメチルジシラザンからなる膜上へのDNA断片の吸着を抑制することができ、DNA断片をコア部4 2 6端面上に選択的に固定することができる。この結果、DNA断片から発せられた蛍光をコア部4 2 6端面を介して確実に取り込むことができる。なお、上記スポット部およびスポット部以外の領域の形成方法としては、例えば、米国特許出願公開第2 0 0 9 / 0 2 7 0 2 7 3号明細書に記載の方法を適用することができる。

[0037] 本実施形態においては、第1の光ファイバ4 2 5の直径（クラッド部4 2 7の外径）は約1. 4 μm であり、上記スポット部の直径が約0. 3 μm である。このため試料sとなるDNA断片を適当な大きさとすることで、1本の第1の光ファイバ4 2 5のコア部4 2 6端面に1個のDNA断片を配置することができ、1個のDNA断片（試料s）と1本の第1の光ファイバ4 2 5とを対応させることができる。

[0038] 本実施形態で用いられるコアガラスおよびクラッドガラスの屈折率は、それぞれ1. 8 0、1. 6 7である。そのため、一般にシングルファイバの集光能力の指標となる開口数（Numerical Aperture）は、下記式（2）を用いて0. 6 7と算出することができる。

[0039] [数2]

$$NA = \sqrt{(n_2^2 - n_3^2)} \quad (2)$$

[0040] 上記式（2）中、NAは、開口数である。 n_2 および n_3 は、それぞれコアガラスおよびクラッドガラスの屈折率である。

[0041] ここで、本実施形態で用いられる試薬等の水溶液の屈折率（ n_1 ）は1. 3 3である。そのため下記式（3）を用いて第1の入射部4 2 5 aにおける光の最大入射角が3 0°と算出される。なお、下記式（3）中、 θ_{max} は、最大入射角である。NAは、上記式（2）と同義である。

[0042] [数3]

$$\theta_{\text{max}} = \text{Arc sin}(NA / n_1) \quad (3)$$

[0043] そこで、本実施形態では、第1の光ファイバ4 2 5内に入射した光を全反

射させながら導光して第1の出射部425bに到達させるためには、第1の入射部425aにおける入射角(θ_1) (図5(b)参照)が $\theta_1 \leq 30^\circ$ の要件を満たす必要がある。他方、第1の入射部425aにおける入射角(θ_1)が $\theta_1 > 30^\circ$ の光線は、最大入射角(θ_{max})である 30° を超えているためにコア部426とクラッド部427との界面で全反射をすることができず、クラッド部427を通過して吸収体ガラスに吸収されてしまい、第1の出射部425bに到達することができない。

[0044] 蛍光検出部43は、図2(a)に示すように、第2のファイバオプティックプレート431と、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432と、二次元検出部433とを備えている。

[0045] 第2のファイバオプティックプレート431は、第1の出射部425bから出射した光を第2の入射部434aから受け入れて導光すると共に、第2の入射部434aと反対側の第2の出射部434bから上記光を出射する(図5(a)参照)。この第2のファイバオプティックプレート431は、第1のファイバオプティックプレート424と同様に、コア部435およびクラッド部436からなる光ファイバ(以下、「第2の光ファイバ434」ともいう)と、吸収体ガラス(不図示)とにより構成されている。また、図5(a)に示すように、第1および第2の光ファイバ425、434の外径は同一であり、これら第1および第2の光ファイバ425、434どうしの光軸が一致し、かつ第1の出射部425bと第2の入射部434aとが当接または近接するように配置されている。ここで、近接とは、第1の出射部425bから出射した光が漏光せずに第2の入射部434aに受け入れられる範囲内で、第1の出射部425bと第2の入射部434aとが離間している状態を意味する。なお、第2のファイバオプティックプレート431は、フローチップ42を載置するための台座となっている。

[0046] なお、本実施形態では、上述したように、第1および第2の光ファイバ425、434の外径が同一であるが、第2のファイバオプティックプレート431を構成する光ファイバ(第2の光ファイバ434)の外径が、第1の

ファイバオプティックプレート424を構成する光ファイバ（第1の光ファイバ425）の外径より小さいことも好ましい。これにより、隣接した複数の第1の光ファイバ425から出射される光が単一の第2の光ファイバ434に入射するのを抑制することができ、蛍光検出における空間分解能を向上させることができる。

[0047] また、図19（b）に示すように、第1の光ファイバ425のコア部426の直径は、第2の光ファイバ434のコア部435の直径よりも小さいことが好ましい。これにより、第1の出射部425aにおける第1の光ファイバ425のコア部426から出射された光を第2の入射部434aにおける第2の光ファイバ434のコア部435内に確実に伝達することができ、蛍光検出をより正確に行うことができる。

[0048] また、上述した第1および第2のファイバオプティックプレートとして、それぞれファイバオプティックテーパ（FOT）を採用することもできる。図14は、図2の蛍光検出手段における第2のファイバオプティックプレートとしてファイバオプティックテーパを採用したものの概略図である。FOT437は、図14に示すように、第2の入射部と第2の射出部との大きさが異なる第2の光ファイバを束ねたものであり、第2の入射部の像を拡大または縮小することができる。上記像の拡大率は、単純に1本の第2の光ファイバの両端面の直径の比となる。この比は、通常最大5倍程度である。なお、FOTは、第2の入射部と第2の射出部の大きさが異なるものの、第2の光ファイバの本数は同じである。

[0049] FOTは、例えば、円柱状のFOPの中央部を加熱し、このFOPの両末端に反対方向の力を加えること当該FOPの中央部を圧延する。次いで、圧延したFOPの中央部を切断した後、切断面を研磨してFOTの片面とすることで、二つの面の大きさが異なるFOTを製造することができる。なお、FOTの光ファイバの形状は、上記圧延を制御することで、例えば円形から円形、円形から正方形、正方形から正方形、正方形から長方形など、自在に変更することができる。

[0050] このように、FOTは、第2の入射部と第2の射出部の大きさが異なるので、例えばイメージインテンシファイア（光増幅光学装置）など大口径を持つ撮像面を小さい撮像面を持つCMOSイメージセンサの各素子に直接カップリングするときに用いられる。これにより、結像解像力を落とさずに明るい像を撮像素子に伝達することができる。また、第2の光ファイバの断面積が第2の射出部に向かって漸次大きくなる（図14参照）場合、光の全反射の繰り返しに応じて第1の誘電体多層膜干渉フィルタへの入射角が小さくなる。これにより、第1の誘電体多層膜干渉フィルタへの入射角に伴う透過分光特性の短波長側へのシフト（以下、「短波長シフト」ともいう）を小さくすることができ、第2の入射部と第2の射出部とが同じ断面積である場合に比べて第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過波長帯を拡げることができる。

[0051] 第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432は、第2の射出部434bの端面上に設けられ、蛍光の少なくとも一部を透過しかつ励起波長帯を含まない複数の透過波長帯の光を透過する単一のフィルタである。第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432は、上述した第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417と同様に、可視光に対して透明なガラス基板（不図示）と、このガラス基板上に形成された誘電体多層膜（不図示）とにより構成されている。但し、上記誘電体多層膜を構成する各層の膜厚や層数は、励起光を遮断しかつ所望の波長帯の光（蛍光の一部または全部）を透過できるように適宜決定される。これにより、励起光由来のノイズを抑制して蛍光検出をより正確に行うことができる。

[0052] なお、第1および第2の誘電体多層膜干渉フィルタ432、417における各波長帯の透過性能を十分に発揮させるため、上記各フィルタへの入射角は、通常フィルタ面に対して $0 \pm 5^\circ$ であることが仕様として求められている。これは、上記フィルタへの入射角が増大すると、当該フィルタを透過する波長帯が短波長側にシフトするためである。この現象は下記式（4）で表される数式で表現することができる。

[0053] [数4]

$$\lambda(\theta)/\lambda_0 = \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta}{n_{\text{eff}}}\right)^2} \quad (4)$$

[0054] 上記式(4)中、 θ は、入射角である。 n_{eff} は、実効的屈折率であり、それぞれのフィルタに特有の値である。 λ_0 は、光線が入射角 0° で入射するときの波長である。 $\lambda(\theta)/\lambda_0$ は、フィルタに入射する光線の入射角が θ であるときに発生する短波長シフトの割合である。

[0055] 上記式(4)において、フィルタの実効屈折率 n_{eff} を1.5とすると、例えば入射角が 30° ($\theta = 30^\circ$)である場合、短波長シフトの割合($\lambda(\theta)/\lambda_0$)は0.94程度となる。これは、誘電体多層膜干渉フィルタを透過する波長帯が、入射角 0° ($\theta = 0^\circ$)である場合に比べて0.06波長($0.06\lambda_0$)分、短波長側にシフトすることを意味する。

[0056] 図6は、図2の蛍光検出手段において第1のファイバオプティックプレートへの蛍光の入射角をパラメータとした蛍光と励起光との関係を示す概略図である。この図は、蛍光色素としてCy3を用いる場合の関係を示している。なお、符号503で表される特性はCy3の蛍光スペクトルを示している。

[0057] 本実施形態では、第1の光ファイバ425内に入射した光をコア部426、435内で全反射して伝搬させるため、最大 30° の入射角をもって第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432に入射させる必要がある。この場合、図6(b)に示すように、透過波長帯は入射角 0° の光に比べて短波長側にシフトする(例えば、入射角 0° での透過波長帯502が、入射角 30° では透過波長帯504に、入射角 40° では透過波長帯505にそれぞれシフトする)。そのため、例えば、上記入射角 0° での透過波長帯502を有する第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432を用いる場合、図6(c)に示すように、上述した短波長シフトにより第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417の透過波長帯501と最大入射角が 30° である第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432の透過波長帯504とが重なってしまい、第1の誘電体多層膜

干渉フィルタ 4 3 2 での励起光の一部透過により微弱な蛍光が強大な励起光に埋もれて上記蛍光を検出できなくなる虞がある。

[0058] そこで、あらかじめ上記短波長シフトを考慮して第 1 および第 2 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2、4 1 7 の透過波長帯を決定することが好ましい。上記両誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2、4 1 7 の関係としては、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2 の透過波長帯における光の透過率 (α_1) が所定値 (α) よりも小さい関係を満たす立ち上がり波長 (λ_{1i}) と、第 2 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 1 7 の透過波長帯における光の透過率 (α_2) が上記所定値 (α) よりも小さい関係を満たす立ち下がり波長 (λ_{2j}) とが、上記式 (1) で表される関係を満たすことが好ましい。

[0059] 上記式 (1) 中、 i および k は、それぞれ 1 以上の整数である。 θ_{max} は、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタに入射する光の最大入射角である。 n_{eff} は、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタの実効屈折率である。

[0060] このように、第 1 および第 2 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2、4 1 7 の透過波長帯が上記関係を満たすことで、短波長シフトが発生したとしても両透過波長帯が重なり合うのを防止することができ、蛍光と励起光とを確実に区別することができる。

[0061] ここで、所定値 (α) は、0.1% であることが好ましい。このように所定値 (α) を設定することで、透過光が短波長側にシフトしたとしても両透過波長帯が重なり合うのを効果的に防止することができ、蛍光と励起光とをより確実に区別することができる。

[0062] 上記所定値 (α) が 0.1% であり、かつ上記式 (1) の関係を満たす一例としては、例えば図 6 (d) に示すように、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2 の入射角 0° での透過波長帯の立ち上がり波長が 600 nm (符号 506 参照) であり、かつ第 2 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 1 7 における励起光の透過波長帯の立ち下がり波長が 560 nm であるものが挙げられる。

[0063] 上記一例では、入射光が入射角 0° で第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4

32に入射する場合、透過波長帯の立ち上がりは600nmであるが、入射光が入射角 30° である場合、上記立ち上がり波長は、上記式(1)の右辺から564nmと算出される($n_{eff}=1.5$ で計算)。ここで、励起光の透過波長帯の立ち下がり波長(λ_{2j})を560nmに設定した場合、上記立ち上がり波長は、上記式(1)の関係を満たすので、短波長シフトが発生した場合であっても、第1および第2の誘電体多層膜干渉フィルタ432、417の透過波長帯は重ならず、励起光の遮断によりOD(光学濃度: Optical Density)が6以上を維持して確実に微弱な蛍光を検出することができる。

[0064] なお、本実施形態では第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432の実効屈折率(n_{eff})が1.5である例について説明したが、本発明の多色蛍光分析装置では、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432の実効屈折率(n_{eff})が1.5以上2.2以下であることが好ましい。このように、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432の実効屈折率(n_{eff})を上記範囲とすることで、短波長シフトが発生したとしても第1および第2の誘電体多層膜干渉フィルタ432、417の透過波長帯が重なり合うのを効果的に防止することができ、蛍光と励起光とをさらに確実に区別することができる。上記実効屈折率としては、短波長シフトを低減する観点から、1.7以上2.2以下がより好ましく、2.0以上2.2以下がさらに好ましい。

[0065] また、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432に入射する光の最大入射角(θ_{max})は 30° であることが好ましい。このように、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432における最大入射角を上記値とすることで、第1および第2の光ファイバ425、434で導光される光の損失を抑制することができ、蛍光をより確実に検出することができる。なお、最大入射角を上記値とすることは、導光される光の損失抑制の観点から、本実施形態のDNA断片の塩基配列の分析のように、第1の入射部425aが水溶液や純水等の水を含む液体に接するような分析により有効である。上記最大入射角としては、 20° がより好ましく、 10° がさらに好ましい。

[0066] また、蛍光分析に用いられる蛍光色素がAlexa405、FAM、Texas RedおよびCy5.5であり、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417の透過率が380～396nm、474～497nm、561～575nmおよび641～657nmの波長において85%以上、かつ上記波長以外の波長において0.1%未満である場合、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432の透過率は、図10(b)に示すように、436～462nm、536～548nm、620～632nmおよび713～800nmの波長帯において85%以上、かつ上記波長帯以外の波長帯において0.1%未満であることが好ましい。

[0067] このような好適な構成は、上記Alexa405、FAM、Texas RedおよびCy5.5の最大吸収波長および最大蛍光波長が、それぞれAlexa405について401nm、421nm、FAMについて494nm、518nm、Texas Redについて596nm、615nm、Cy5.5について675nm、694nmである（蛍光波長については、図10(c)の符号704～707参照）こと、並びに第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432への最大入射角が30°である場合を考慮し、図10(a)に示す第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過波長帯702の立ち上がり波長を長波長側に0.06波長（0.06 λ_0 ）分移動（符号703参照）させたことに基づくものである。

[0068] このように、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432の透過率を上記波長帯とすることで、上記蛍光色素および第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を用いた場合、例えば、入射光が最大30°の入射角をもって第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432に入射する場合（短波長シフトが発生する場合）であっても、OD6の光学濃度で励起光を確実に遮断することができ、各蛍光色素をより確実に識別することができる。

[0069] その結果、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432を透過する蛍光スペクトルは、図11(a)に示すように、励起光がカットされたものとなる。なお、この図に示された蛍光スペクトルは、任意のDNA断片が上記4種の蛍

光色素うちの特定種の蛍光色素を取り込む確率が25%であって各DNA断片に含まれる蛍光色素の数（蛍光分子数）を同数とし、かつ吸光係数、量子収率等を加味したものである。

[0070] 二次元検出部433は、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432に密着するように設けられ、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432を透過した光（蛍光）を検出する。二次元検出部433としては、例えば、入射する光（蛍光）を検出可能な二次元光センサにより構成され、上記光（蛍光）を二次元画像として検出する。上記二次元光センサとしては、当該二次元光センサの受光面方向の同一位置での色分離ができる点から、光軸方向に波長分解能を持つ複層方式のCMOSイメージセンサが好ましい。このCMOSイメージセンサは、低価格化および小型化の観点からも好ましい。本実施形態では、空間分解能を最大限に高める目的で、CMOSイメージセンサの画素の大きさと光ファイバの大きさ（外径）が同一となるように形成されている。なお、上記二次元光センサは、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432に接着剤で接合されている。

[0071] 上記二次元光センサとしては、図9に示すように、例えば3層のセンサ（第1層センサ433a、第2層センサ433bおよび第3層センサ433c）を備えている。これら各層のセンサは、検出する蛍光の波長に対応した検出感度のものが用いられる。例えば、本実施形態のような上記4種の蛍光色素を用いる場合、上記第1～第3層センサ433a～433cとしては、図11（b）に示すように、検出感度がそれぞれ500nm、585nmおよび675nmにピークを有するものを採用することができる。

[0072] これら第1～第3層センサ433a～433cを用いて上述の図11（a）に示す蛍光スペクトルを有する蛍光を検出した場合、各センサで検出される信号は表1に示す強度比となる。表1からも明らかなように、各信号の強度比として、例えば、第1層センサ433aが83%である場合はAlexa405、第1層センサ433aおよび第2層センサ433bがそれぞれ43%、49%である場合はFAM、第2層センサ433bおよび第3層セン

サ 4 3 3 c がそれぞれ 4 6 %、4 6 %である場合は T e x a s R e d、第 2 層センサ 4 3 3 b および第 3 層センサ 4 3 3 c がそれぞれ 1 4 %、6 6 %である場合は C y 5. 5 と判定することができる。

[0073] [表1]

蛍光色素	第1層センサ	第2層センサ	第3層センサ
Alexa405	0.83	0.10	0.07
FAM	0.43	0.49	0.07
Texas Red	0.08	0.46	0.46
Cy5. 5	0.20	0.14	0.66

[0074] また、上記二次元光センサとしては、図 1 2 に示すように、例えば、4 層のセンサ（第 1 層センサ 4 3 3 a'、第 2 層センサ 4 3 3 b'、第 3 層センサ 4 3 3 c' および第 4 層センサ 4 3 3 d'）を備え、第 1～第 4 層センサ 4 3 3 a'～4 3 3 d' の検出感度が、図 1 3（b）に示すように、それぞれ 4 5 0 n m、5 5 0 n m、6 2 5 n m および 7 2 5 n m にピークを有するものを採用することもできる。

[0075] これら第 1～第 4 層センサ 4 3 3 a'～4 3 3 d' を用いて図 1 3（a）に示す蛍光スペクトル（図 1 1（a）に示す蛍光スペクトルと同様の蛍光スペクトル）の蛍光を検出した場合、各センサで検出される信号は表 2 に示す強度比となる。表 2 から明らかなように、各信号の強度比として、例えば、第 1 層センサ 4 3 3 a' が 9 8 %である場合は A l e x a 4 0 5、第 2 層センサ 4 3 3 b' が 8 3 %である場合は F A M、第 3 層センサ 4 3 3 c' が 7 8 %である場合は T e x a s R e d、第 4 層センサ 4 3 3 d' が 9 8 %である場合は C y 5. 5 と判定することができる。

[0076] [表2]

蛍光色素	第1層センサ	第2層センサ	第3層センサ	第4層センサ
Alexa405	0.98	0.02	0.00	0.00
FAM	0.04	0.83	0.13	0.00
Texas Red	0.00	0.11	0.78	0.11
Cy5. 5	0.00	0.00	0.02	0.98

[0077] なお、蛍光検出部 4 3 は、図 2 0 に示すように、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタ 4 3 2 と二次元検出部 4 3 3 との間における隣接する画素どうしの境界部に、光を反射する光隔壁 4 3 8 を設けてもよい。これにより、二次元検出部 4 3 3 において、隣接する他の画素への光の回り込みを防止すること

ができると共に集光効率を向上させることができ、結果として信号検出のS／N向上、DNAシーケンスの色分離能の向上、画素間のコンタミ低減に起因した1回の反応で検出可能な試料数の低下抑制を図ることができる。

[0078] 光隔壁438としては、高反射率が得られる観点から、アルミニウム、銀、金、銅およびタングステン、並びにこれらの合金からなる薄膜が好ましく、信頼性および加工性向上の観点から、アルミニウム薄膜がより好ましい。光隔壁438の寸法としては、作製容易性向上の観点から、高さが500nm以上1,000nm以下であり、幅が200nm以上500nm以下であることが好ましい。このような光隔壁438は、例えば、CVD法、スパッタ法等を用いて第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432上に上記材料を蒸着することで形成することができる。

[0079] 次に、蛍光色素の種類を判定する方法について説明する。蛍光色素の種類を判定するには、まずクロストーク除去を行う。クロストーク除去は、例えば、上記表2に示すTexas Redの場合、第1層～第4層センサ433a'～433d'で検出される信号量は、それぞれ0.00、0.11、0.78、0.11となる。これは、Texas Red単色蛍光の主な成分は基本的に第3層センサ433c'で検出できるものの、第1層センサ433a'、第2層センサ433b'、第4層センサ433d'でもTexas Redの蛍光がクロストークとして検出されてしまうということを意味している。これらの4種の蛍光色素の蛍光強度と4層のセンサ433a'～433d'が検出する信号量の関係は下記式(5)で表される行列式のようになる。

[0080] [数5]

$$\begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} w_{11} & w_{12} & w_{13} & w_{14} \\ w_{21} & w_{22} & w_{23} & w_{24} \\ w_{31} & w_{32} & w_{33} & w_{34} \\ w_{41} & w_{42} & w_{43} & w_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Dye_1 \\ Dye_2 \\ Dye_3 \\ Dye_4 \end{bmatrix} = W \begin{bmatrix} Dye_1 \\ Dye_2 \\ Dye_3 \\ Dye_4 \end{bmatrix} \quad (5)$$

[0081] 上記式(5)中、 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 は、それぞれ第1層センサ、第2層センサ、第3層センサおよび第4層センサが検出する信号量である。また、 Dye_1 、 Dye_2 、 Dye_3 および Dye_4 は、それぞれAlexa405、

FAM、Texas RedおよびCy 5. 5が発する蛍光強度である。Wは、 w_{ij} ($i = 1, 2, 3, 4, j = 1, 2, 3, 4$) を要素にもつ行列であり、上記蛍光強度と信号量とを関連づける行列である。

[0082] ここで、上述したクロストークを除去した蛍光強度は、Wの逆行列である W^{-1} を左から掛け合わせることで、下記式(6)のように求められる。

[0083] [数6]

$$\begin{bmatrix} Dye_1 \\ Dye_2 \\ Dye_3 \\ Dye_4 \end{bmatrix} = W^{-1} \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \end{bmatrix} \quad (6)$$

[0084] 上記式(6)中、 $Dye_1 \sim Dye_4$ および $S_1 \sim S_4$ は、上記式(5)と同義である。 W^{-1} は、Wの逆行列である。

[0085] 次に得られた蛍光強度をノーマライズし、蛍光色素毎に異なる蛍光強度が等しくなるように変換する。以上のようにクロストーク除去等を行うことで、試料中に取り込まれた蛍光色素を効率よく識別することができる。

[0086] 次に、当該多色蛍光分析装置1(DNAシーケンサ)を用いてDNAシーケンスを行う方法について説明する。なお、ここで説明する多色蛍光分析装置1は、二次元光センサが41メガの画素数を有するCMOSイメージセンサであり、このCMOSイメージセンサが光軸方向に波長分解能を有する4層のセンサ433a'~433d'を有しているものとする。また、基板423における1本の第1の光ファイバ425に対して試料sとなるDNA断片が1個のみ吸着し、かつ1本の第1の光ファイバ425と1本の第2の光ファイバ434とにより1つの光導波路が形成されていると共に、この光導波路1つに対してCMOSイメージセンサの1個の画素(図14に示すような二次元光センサでは1つの画素群)が対応しているものとする。

[0087] まず、試料sとなるDNA断片の塩基配列を解析するためにSBS反応を基板423上で行う。上記反応に必要な試薬は、プライマ試薬、ポリメラーゼ酵素、4種の蛍光色素を有するヌクレオチドを含んだ伸長試薬、保護基切断試薬、洗浄試薬、イメージング試薬である。これらの試薬は、試薬カート

リッジ１０１内の試薬保管容器１０２に格納されている。また、試薬カートリッジ１０１は、試薬ラック１０３に設置され、４℃に冷却されている。

[0088] 冷却方法としては、例えば、ペルチェ素子１０４を用いてヒートブロック１０５およびヒートシンク１０６を冷却し、これらヒートシンク１０６等により冷却された空気をファン１０７で試薬ラック１０３内に送風して試薬を４℃に冷却する。なお、ペルチェ素子１０４からの排熱は、ファン１０８を用いて行う。

[0089] 次いで、試薬ラック１０３内で４℃に冷却された試薬を流路２０２に導入する。このとき、切り替えバルブ２０１により切り替えることで、任意の試薬を流路２０２に導入することができる。流路２０２に導入された試薬は、フローチップ４２よりも下流側の流路２０３に配置されたシリンジ２０４を駆動させることで送液される。具体的には、流路２０３には２個の二方弁２０５、２０６が設置されており、シリンジ２０４に試薬等を吸引（フローチップ４２への試薬等の供給およびフローチップ４２からの使用済みの試薬等の排出）するときは、二方弁２０５を開かつ二方弁２０６を閉の状態ではシリンジ２０４を駆動させる。

[0090] 一方、シリンジ２０４内の試薬等（廃液）を廃液タンク３０１に排出するときは、二方弁２０５を閉かつ二方弁２０６を開の状態ではシリンジ２０４を駆動させる。これにより、一つのシリンジ２０４で試薬の吸引および排出が可能となる。廃液となった試薬等は、廃液タンク３０１へ送液されて貯蔵される。この廃液タンク３０１は、廃液こぼれにより生じる感電、装置の錆、異臭の発生などを防止するために設けられている。廃液タンク３０１の有無はマイクロフォトセンサ３０４で監視される。

[0091] ここで、試薬等が供給されたフローチップ４２において行われるＳＢＳ反応について説明する。この反応方式では、フローチップ４２内に伸長試薬を送液する。この伸長試薬は、蛍光色素でラベルされた４種類のヌクレオチドおよびポリメラーゼを含んでいる。上記４種類の蛍光ヌクレオチドは、A l e x a 4 0 5 - d C T P、F A M - d A T P、T e x a s R e d - d G T

PおよびCy 5. 5-d T T Pであり、各蛍光ヌクレオチドが上記伸長試薬中それぞれ200 nMの濃度で含まれている。この伸長試薬は、伸長反応が効率よく行なわれるように、塩濃度、マグネシウム濃度およびpHが最適化されている。また、伸長試薬に含まれるポリメラーゼの作用により、DNA断片内のプライマがハイブリダイズした箇所に、分析対象となる塩基に相補的な蛍光ヌクレオチドが1塩基分だけ取り込まれる。なお、一度に2塩基分の蛍光ヌクレオチドが伸長しないのは、1塩基目の蛍光色素中に2塩基目の蛍光ヌクレオチドの伸長を阻害する部位が含まれているからである。

[0092] 次いで、フローチップ42内に洗浄試薬を送液する。この洗浄試薬を送液することで、フローチップ42内に浮遊する反応に寄与しない蛍光ヌクレオチドが除去される。次いで、フローチップ42内にメージング試薬を送液し、上記洗浄試薬を置換した後、蛍光検出を行う。蛍光検出後は、フローチップ42内に保護基切断試薬を送液する。この保護基切断試薬を送液することで、蛍光ヌクレオチドから蛍光色素が切断され、次の伸長反応（2塩基目の蛍光ヌクレオチドの伸長反応）が可能となる。以降、上述した操作を繰り返すことで、DNAシーケンスを行うことができ、1個のDNA断片から500塩基を超える塩基配列を解析することができる。

[0093] ここで、上記蛍光検出について、図2（a）を参照して説明する。当該多色蛍光分析装置1の蛍光検出手段において、光源から発せられた白色光は放物面鏡412で反射して平行光に変換される。平行光に変換された光は第1フライアイレンズ413により第2フライアイレンズ414上に光源像を結像させ、畳重レンズ415およびフィールドレンズ416を経て均一な平行光となる。この平行光は第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を用いて互いに異なる複数の励起波長帯を有する励起光に変換され（図10（b）の実線の特性参照）、試料sとなるDNA断片に取り込まれた4種類の蛍光ヌクレオチドをそれぞれ独立に励起する。その際、DNA断片の塩基に相補的な蛍光ヌクレオチドが取り込まれるため、各蛍光ヌクレオチドに含まれる蛍光色素の種類に対応した蛍光が発せられる（図10（c）参照）。なお、DN

A断片から発せられる光には、上記蛍光の他に上記DNA断片等で反射した励起光が含まれている。

[0094] この蛍光を含む光は上述した光導波路内を全反射しながら進行して第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432に到達する。この光が第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432を通過する際、当該第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432を透過可能な波長帯の光のみが透過するため励起光は遮断され、蛍光のみが二次元検出部433に到達する。この二次元検出部433に到達した蛍光は、二次元光センサに設けられた4層のセンサ433a'～433d'により蛍光検出される。その際、蛍光色素の種類に応じて発せられる蛍光の波長が異なるため、第1～第4層センサ433a'～433d'で検出される光の強度比の違いにより蛍光ヌクレオチドの種類を同定することができ、その結果、DNA断片の塩基を決定することができる。

[0095] なお、上記方法を用いてDNAシーケンスを行う場合、二次元光センサの各画素に1個のDNA断片を対応させるため、例えば、1個のDNA断片が500塩基を有し、これを41M画素のCMOSイメージセンサを用いて分析すると、結果として総読取塩基数は20Gb a s eとなる。また、1塩基あたりの取り込みに要するSBSケミストリ時間を3分／b a s e、イメージング時間を3秒とすると、500塩基分の伸長反応を約1日で完了することができる。

[0096] なお、本発明は、上述した実施形態の構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲と均等の意味および範囲内での全ての変更が含まれることが意図される。

[0097] 例えば、上述の実施形態では、多色蛍光分析装置1として、試薬保管手段10と、送液手段20と、廃液保管手段30と、蛍光検出手段40とにより構成されているDNAシーケンサを例示して説明したが、当該多色蛍光分析装置1はDNAシーケンサ用に限定されず、例えば、試薬保管手段10、送液手段20および廃液保管手段30を有していない多色蛍光分析装置も本発明が意図する範囲内である。

[0098] また、上述した実施形態では、励起光を得るために第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を用いたが、本発明の効果を損なわない限り、色素フィルタなどの他の手段を採用してもよい。

[0099] また、上述した実施形態では、蛍光色素がAlexa405、FAM、Texas RedおよびCy5.5の4種であるものについて説明したが、用いる蛍光色素の種類やその数は、試料に応じて適宜決定することができる。なお、互いに異なる蛍光色素が吸収するピーク波長どうしは、50nm以上離れていることが好ましく、80nm以上離れていることがより好ましく、120nm以上離れていることがさらに好ましい。また、互いに異なる蛍光色素が発する蛍光のピーク波長どうしは、50nm以上離れていることが好ましく、80nm以上離れていることがより好ましく、120nm以上離れていることがさらに好ましい。

[0100] また、上述した第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417では、主として380～396nm、474～497nm、561～575nmおよび641～657nmの波長帯の光を透過するものについて説明したが、分析対象となる全ての蛍光色素を励起可能な励起光を発することができ、かつ第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432で上記励起光を遮断することができるようなものであれば、上記波長帯に限定されるものではない。なお、第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417を透過する互いに異なる波長帯は、それらの帯域が50nm以上離れていることが好ましく、80nm以上離れていることがより好ましく、120nm以上離れていることがさらに好ましい。

[0101] また、上述した第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432では、その透過率が436～462nm、536～548nm、620～632nmおよび713～800nmの波長帯において85%以上、かつ上記波長帯以外の波長帯において0.1%未満であるものを好適なフィルタとして説明したが、励起光を遮断することができれば、上記波長帯に限定されるものではない。なお、第1の誘電体多層膜干渉フィルタ432を透過する互いに異なる波長帯は、それらの帯域が50nm以上離れていることが好ましく、80nm以上

離れていることがより好ましく、120nm以上離れていることがさらに好ましい。

[0102] また、上述した実施形態では、二次元検出部433として、複数の層からなる二次元光センサについて説明したが、単一の層からなる二次元光センサを採用することもできる。このような二次元光センサとしては、例えば図14に示すように、第2の光ファイバ434の1本に対して2×2画素の正方形配列（例えば、ベイヤ配列など）した1つの画素群439が対応するように配置されたもの等が挙げられる。この場合、上記1つの画素群439を構成する4つの画素439a～439dは、例えば、それぞれ図13（b）に示される第1～第4層センサ433a'～433d'の波長特性と同様の波長特性を有する素子を用いることができる。上記二次元光センサとしては、例えば、公知の単板方式のカラーCMOSイメージセンサ等が採用される。

[0103] また、上述した実施形態においては、光源411としてキセノンショートアークランプを用いた多色蛍光分析装置1について説明したが、高輝度LED等のLEDを光源として用いてもよい。上記キセノンショートアークランプの寿命が500～1,000時間であるのに対し、上記LEDの寿命は20,000時間超であり、多色蛍光分析装置1の生涯稼働時間を超えるので寿命に伴う光源の取り替えが不要となる。また、機械的なシャッタの不要化および低消費電力化を図ることができる。なお、このようなLEDを用いる場合、キセノンショートアークランプが点光源であるのに対し、このLEDは面光源であるため、図15に示すように、平行光を得る目的で非球面レンズ4191が採用される。

[0104] また、光源411としてLEDを用いる場合、図16に示すように、図15で図示した非球面レンズ4191等の代替としてライトパイプ4192および非球面レンズ4193、4194を用いてもよい。ライトパイプ4192は、当該ライトパイプ4192の端面から入射した光を内部で全反射させることにより光を均一化する作用を有する。具体的には、例えば、ライトパイプ4192の光が入射する側の端面と上記LEDの発光面との間隔が1m

m以内となるように近接させ、ライトパイプ4192の上記LEDと反対側に第1および第2の非球面レンズ4193、4194を配設する。これにより、LEDから発せられる光を効率良く集光し、かつ平行光に変換して第2の誘電体多層膜干渉フィルタ417に光を導光することができる。

[0105] また、上述した実施形態においては、1セットの照射部41を備えている多色蛍光分析装置1について説明したが、複数セットの照射部を備えている多色蛍光分析装置であってもよい。具体的には、図17(a)、(b)に示すように、例えば、光源となるLED411aを半球面状に9個配設され、上記各LED411aを有する9セットの照射部41aが設けられ、これらの照射部41aにより試料sに対して励起光を照射可能な多色蛍光分析装置1aが挙げられる。これにより、試料sに照射される励起光の強度を増加させることができ、この励起光に対応した大きな強度の蛍光を得ることができる（この例では強度が9倍に増加）。なお、図21に示すような対物レンズを用いた蛍光分析装置2では、対物レンズ21とフローチップ22とを0.5mm～5mm程度に接近させる必要があるため、上述のように複数セットの照射部を配設することが困難であった。

[0106] また、上述した実施形態においては、照射部41がフローチップ42の基板423の板面に対して垂直方向に位置する多色蛍光分析装置1について説明したが、上記基板423に対して励起光を斜めに照射できるように、1セットまたは複数セットの照射部が配設されている多色蛍光分析装置であってもよい。具体的には、図18(a)、(b)に示すように、例えば、輪帯状にLED411bを8個配設し、上記各LED411bを含む8セットの照射部41bを設け、これらの照射部41bにより基板423に対して励起光が所定の角度 θ_3 で入射するように照射可能な多色蛍光分析装置1bが挙げられる。

[0107] 本実施形態のように多色蛍光分析装置1をDNAシーケンサとして用いる場合、第1のファイバオプティックプレート424を構成する第1の光ファイバ425に入射する光線の入射角 θ_1 が $\theta_1 \leq 30^\circ$ を満たす必要がある。

そこで、励起光がフローチップ42に入射する角度 θ_3 を $\theta_3 > 30^\circ$ に限定することで、第1の光ファイバ425に入射する励起光が第1および第2の光ファイバ425、434内で全反射するのを抑制することができ、蛍光を確実に検出することができる。

[0108] このような照明を斜光照明という。この斜光照明は特に1分子蛍光測定などに代表される微弱な蛍光の計測に有効である。ちなみに1分子の蛍光色素が発する総光子数は $10^4 \sim 10^5$ 個である。一方、二次元光センサとして公知の高感度カメラを用いれば、バックグラウンドが十分低ければ光子を100個受光できれば上記1分子を検出することができる。したがって、上記高感度カメラを用いることで1分子蛍光測定に必要な光子数は既に十分な数が確保されており、必要なのはバックグラウンド（背景光）の低減であることがわかる。本発明においては、励起光が背景光となる。そこで、上記多色蛍光分析装置1bとすることで、背景光となる励起光を除去することができ、蛍光を確実に検出することができる。

産業上の利用可能性

[0109] 本発明は、試料に含まれる複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を一括して正確に検出することができる多色蛍光分析装置を提供することができる。したがって、当該多色蛍光分析装置は、例えば、複数の蛍光色素を同時に用いるようなSBS法を用いたDNAの塩基配列分析などに好適に使用することができる。

符号の説明

- [0110] s 試料
- 1、1a、1b 多色蛍光分析装置
- 10 試薬保管手段
- 20 送液手段
- 30 廃液保管手段
- 40 蛍光検出手段
- 41 照射部

- 4 2 フローチップ
- 4 3 蛍光検出部
- 4 1 1 光源
- 4 1 7 第2の誘電体多層膜干渉フィルタ
- 4 1 7 a 第1フィルタ
- 4 1 7 b 第2フィルタ
- 4 1 7 c 第3フィルタ
- 4 1 7 d 第4フィルタ
- 4 2 3 基板
- 4 2 4 第1のファイバオプティックプレート
- 4 2 5 第1の光ファイバ
- 4 2 5 a 第1の入射部
- 4 2 5 b 第1の出射部
- 4 2 6 コア部
- 4 2 7 クラッド部
- 4 3 1 第2のファイバオプティックプレート
- 4 3 2 誘電体多層膜干渉フィルタ（第1の誘電体多層膜干渉フィルタ）
- 4 3 3 二次元検出部
- 4 3 4 第2の光ファイバ
- 4 3 4 a 第2の入射部
- 4 3 4 b 第2の出射部
- 4 3 5 コア部
- 4 3 6 クラッド部

請求の範囲

- [請求項1] 励起光の照射により試料が含む異なる蛍光波長を有する複数種の蛍光色素から発せられた蛍光を検出する多色蛍光分析装置であって、
- 互いに異なる複数の励起波長帯を有する励起光を前記試料に照射する照射部と、
- 前記試料の少なくとも一部が当接し、前記励起光の照射により前記試料から発せられた蛍光を含む光を第1の入射部から受け入れて導光すると共に、前記第1の入射部と反対側の第1の出射部から前記光を出射する第1のファイバオプティックプレートと、
- 前記第1の出射部から出射した光を第2の入射部から受け入れて導光すると共に、前記第2の入射部と反対側の第2の出射部から前記光を出射する第2のファイバオプティックプレートと、
- 前記第2の出射部の端面上に設けられ、前記蛍光の少なくとも一部を透過しかつ前記励起波長帯を含まない複数の透過波長帯の光を透過する単一の誘電体多層膜干渉フィルタと、
- 前記誘電体多層膜干渉フィルタに密着するように設けられ、前記誘電体多層膜干渉フィルタを透過した光を検出する二次元検出部とを備えていることを特徴とする多色蛍光分析装置。
- [請求項2] 請求項1に記載の誘電体多層膜干渉フィルタが第1の誘電体多層膜干渉フィルタであり、照射部が光源と前記光源から発せられた光の中から所定の励起波長帯を有する励起光を選択的に透過させる第2の誘電体多層膜干渉フィルタとを有している請求項1に記載の多色蛍光分析装置。
- [請求項3] 第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過波長帯における光の透過率 (α_1) が所定値 (α) よりも小さい関係を満たす立ち上がり波長 (λ_{1i}) と、第2の誘電体多層膜干渉フィルタの透過波長帯における光の透過率 (α_2) が前記所定値 (α) よりも小さい関係を満たす立ち下がり波長 (λ_{2j}) とが、下記式(1)で表される関係を満たす

請求項 2 に記載の多色蛍光分析装置。

[数1]

$$\lambda_{2j} \leq \lambda_{1i} \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta_{\max}}{n_{\text{eff}}} \right)^2} \quad (1)$$

(式 (1) 中、 i および k は、それぞれ 1 以上の整数である。 $\theta_{\max}$ は、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタに入射する光の最大入射角である。 n_{eff} は、第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタの実効屈折率である。)

[請求項4] 所定値 (α) が 0.1 % である請求項 3 に記載の多色蛍光分析装置。

[請求項5] 第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタの実効屈折率 (n_{eff}) が 1.5 以上 2.2 以下である請求項 3 または請求項 4 に記載の多色蛍光分析装置。

[請求項6] 第 1 の誘電体多層膜干渉フィルタに入射する光の最大入射角 ($\theta_{\max}$) が 30° である請求項 3 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置。

[請求項7] 第 2 のファイバオプティックプレートを構成する光ファイバの外径が第 1 のファイバオプティックプレートを構成する光ファイバの外径より小さい請求項 1 から請求項 6 のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置。

[請求項8] 各励起波長帯の励起光が順次照射される請求項 3 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置。

[請求項9] 少なくとも 2 つの励起波長帯を有する励起光が同時に照射される請求項 3 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置。

[請求項10] 試料が蛍光色素を含む DNA 断片であり、前記 DNA 断片の塩基配列の分析に用いられる請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の多色蛍光分析装置。

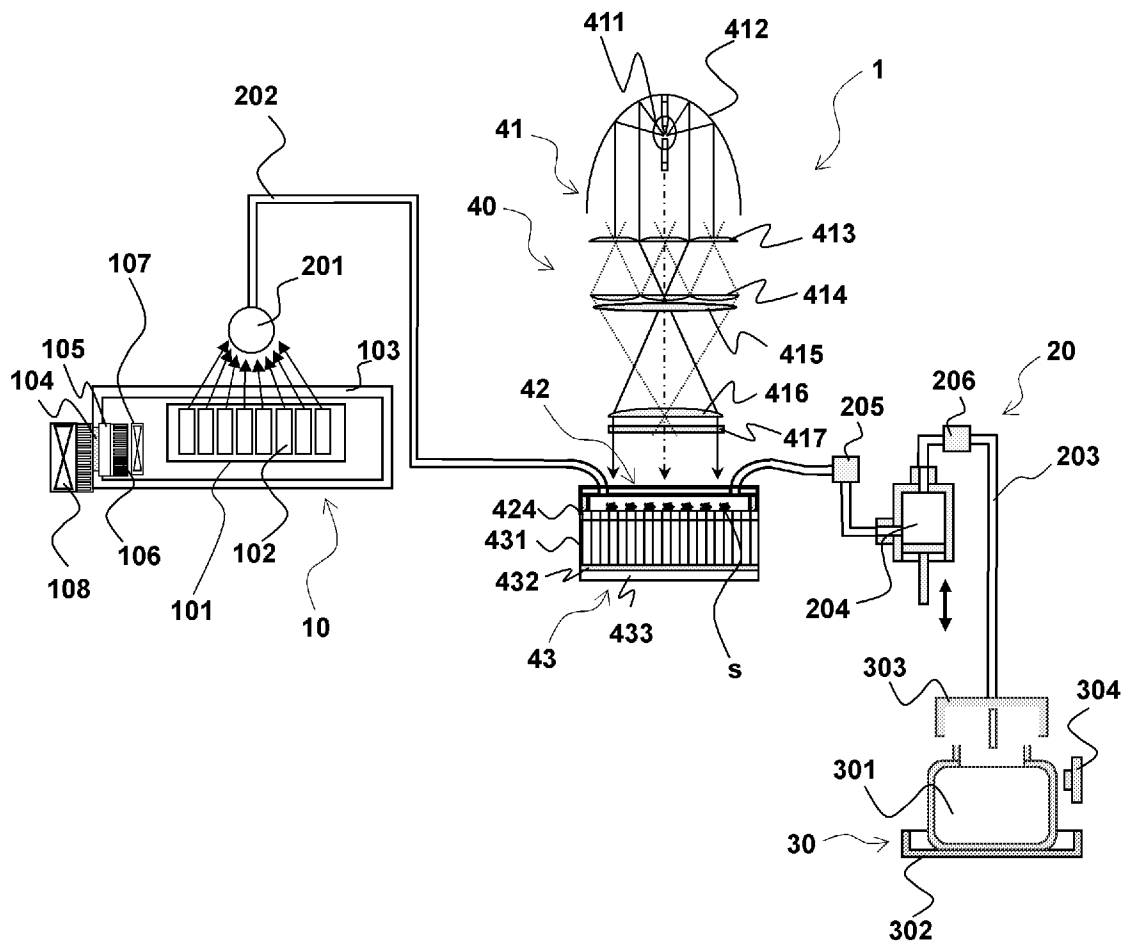
[請求項11] 蛍光色素が Alexa 405、FAM、Texas Red および

C y 5. 5である請求項10に記載の多色蛍光分析装置。

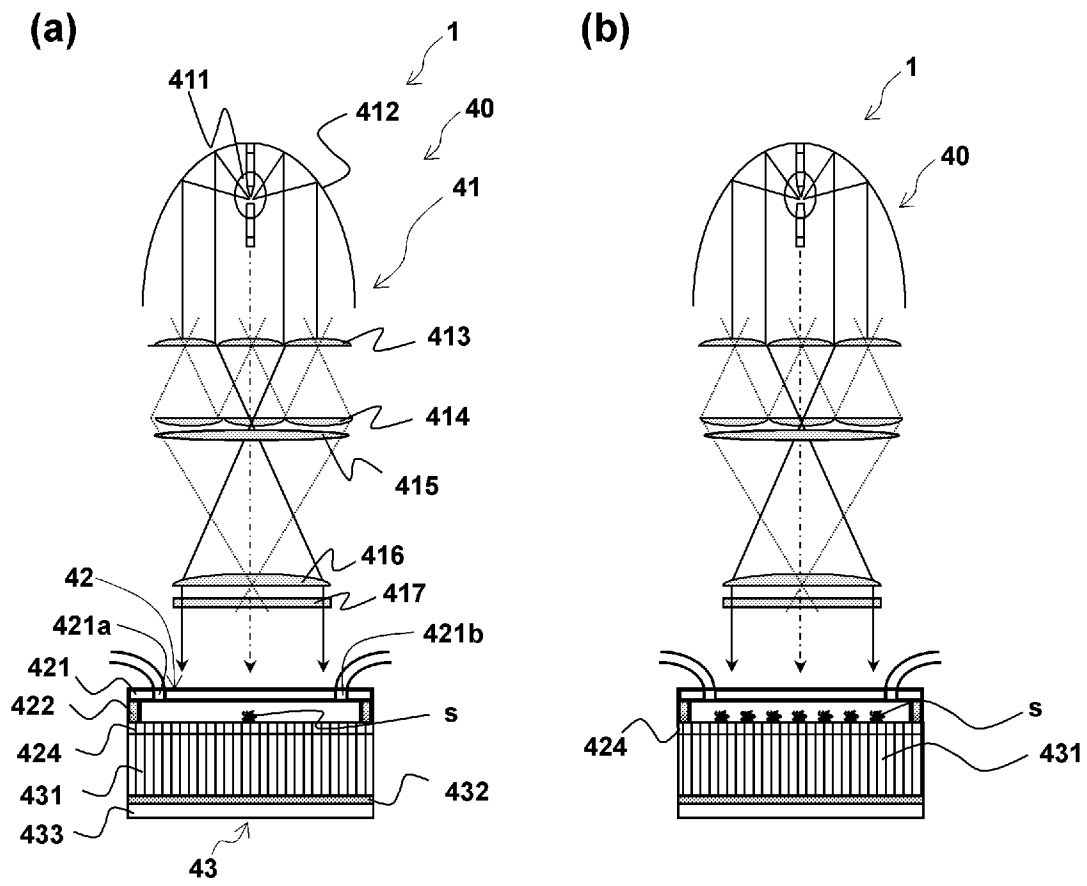
- [請求項12] 第2の誘電体多層膜干渉フィルタが第1フィルタ、第2フィルタ、第3フィルタおよび第4フィルタを有し、
- 第1フィルタの透過率が、380～396 nmの波長帯において85%以上、かつ380～396 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、
- 第2フィルタの透過率が、474～497 nmの波長帯において85%以上、かつ474～497 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、
- 第3フィルタの透過率が、561～575 nmの波長帯において85%以上、かつ561～575 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、
- 第4フィルタの透過率が、641～657 nmの波長帯において85%以上、かつ641～657 nmの波長帯以外の波長帯において0.1%未満であり、
- 前記第1フィルタ、第2フィルタ、第3フィルタおよび第4フィルタが切り替えて用いられる請求項11に記載の多色蛍光分析装置。
- [請求項13] 第2の誘電体多層膜干渉フィルタが単一のフィルタであり、前記第2の誘電体多層膜干渉フィルタの透過率が380～396 nm、474～497 nm、561～575 nmおよび641～657 nmの波長帯において85%以上、かつ前記波長帯以外の波長帯において0.1%未満である請求項11に記載の多色蛍光分析装置。
- [請求項14] 第1の誘電体多層膜干渉フィルタの透過率が、436～462 nm、536～548 nm、620～632 nmおよび713～800 nmの波長帯において85%以上、かつ前記波長帯以外の波長帯において0.1%未満である請求項12または請求項13に記載の多色蛍光分析装置。
- [請求項15] 第1のファイバオプティックプレートの試料が当接する側の面にお

いて、光ファイバのコア部端面にアミノシラン処理が施され、前記光ファイバの前記コア部端面以外の面にHMD S処理が施されている請求項10から請求項14のいずれか1項に記載の多色蛍光分析装置。

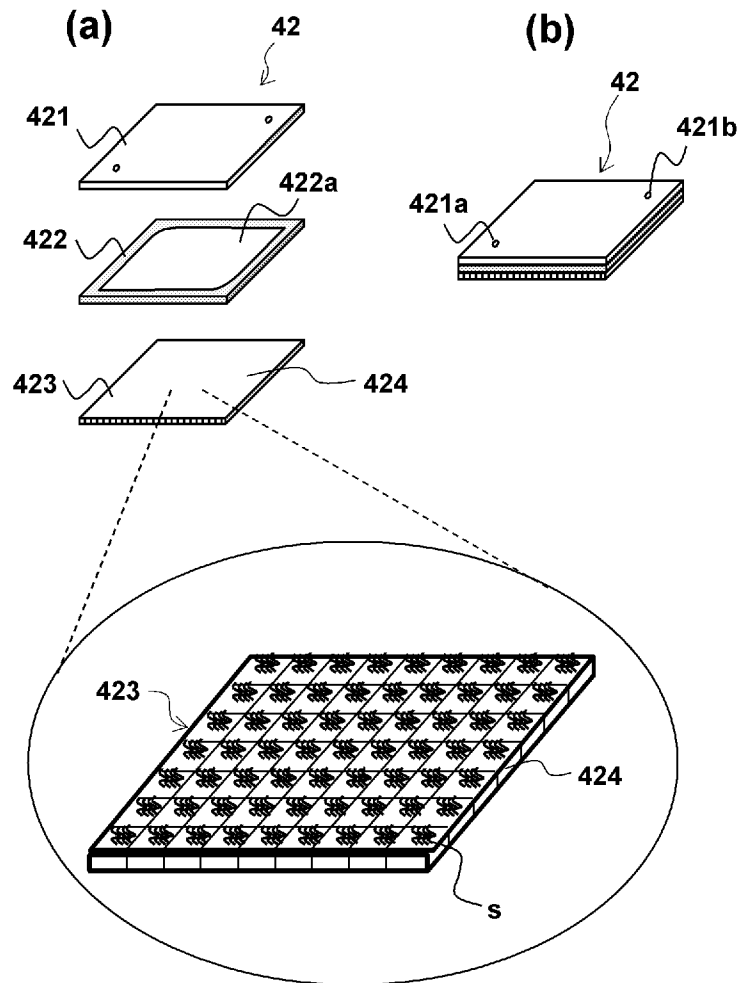
[図1]



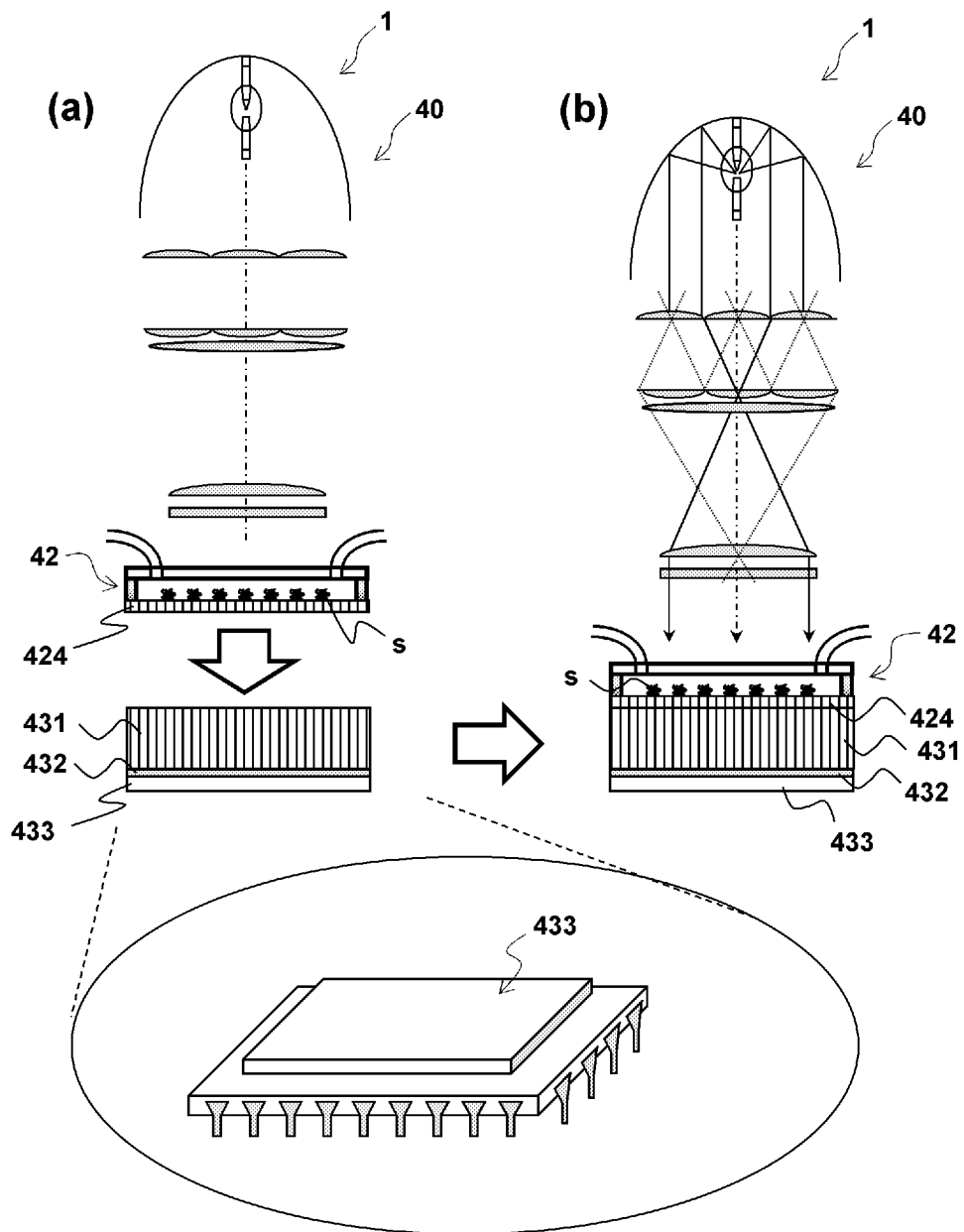
[図2]



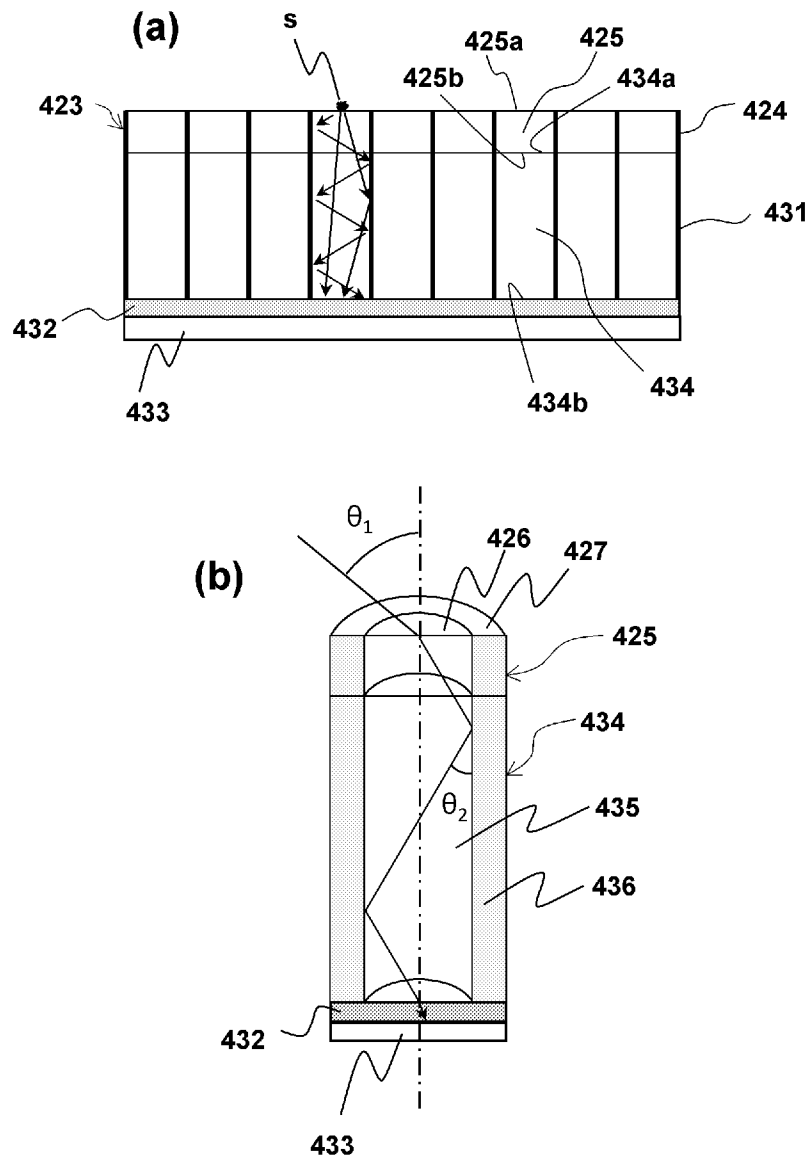
[図3]



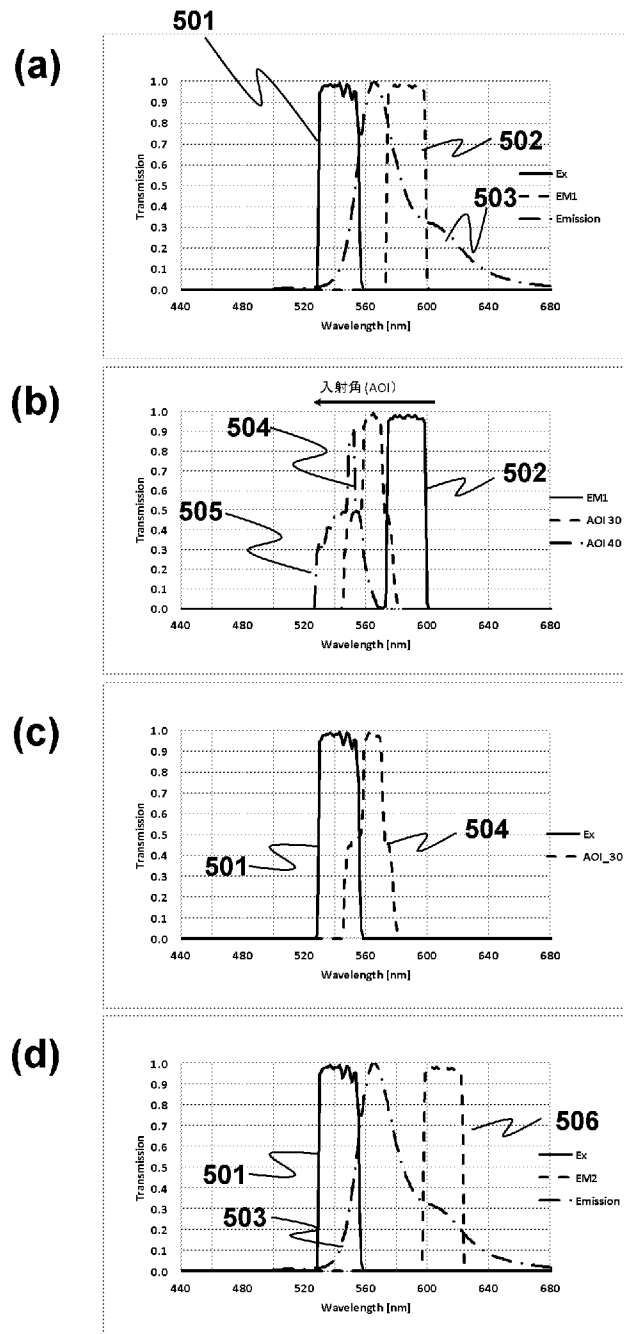
[図4]



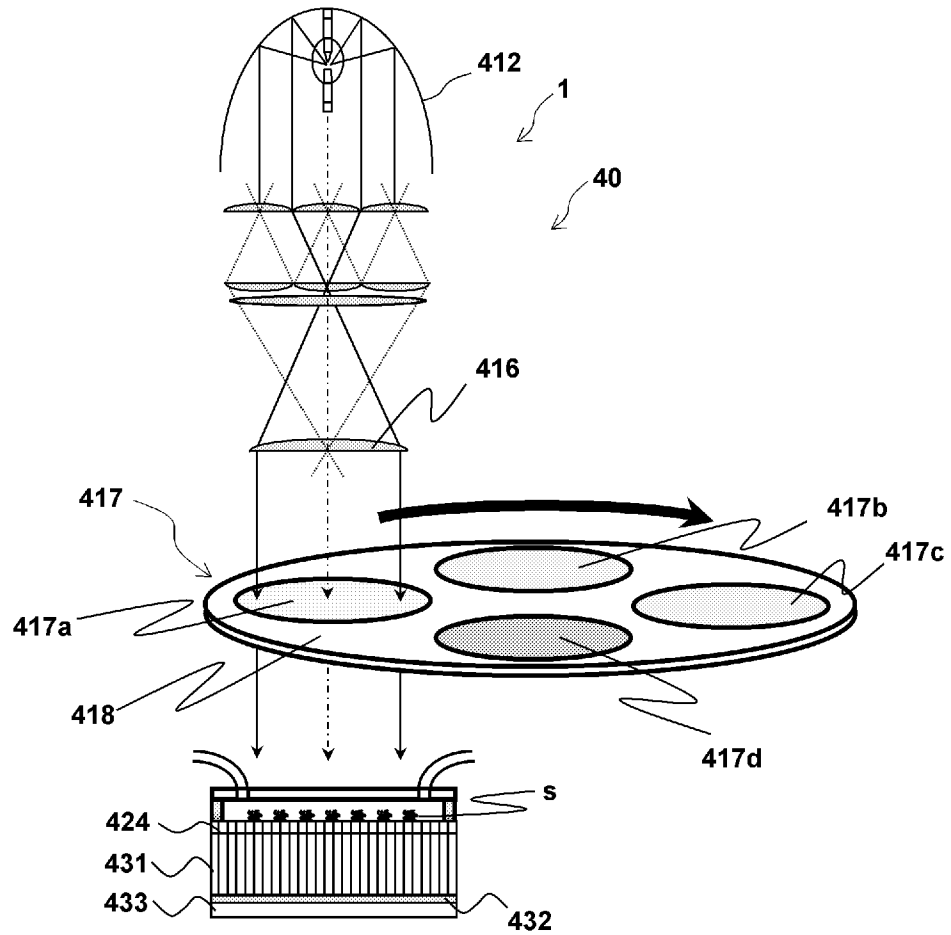
[図5]



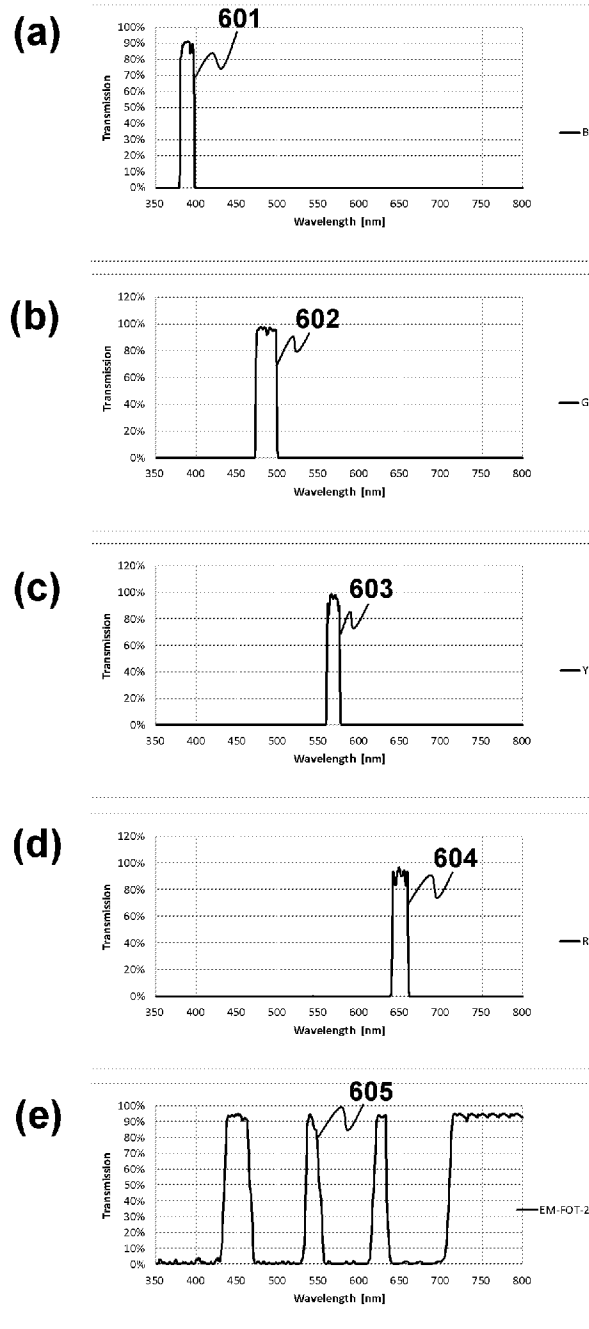
[図6]



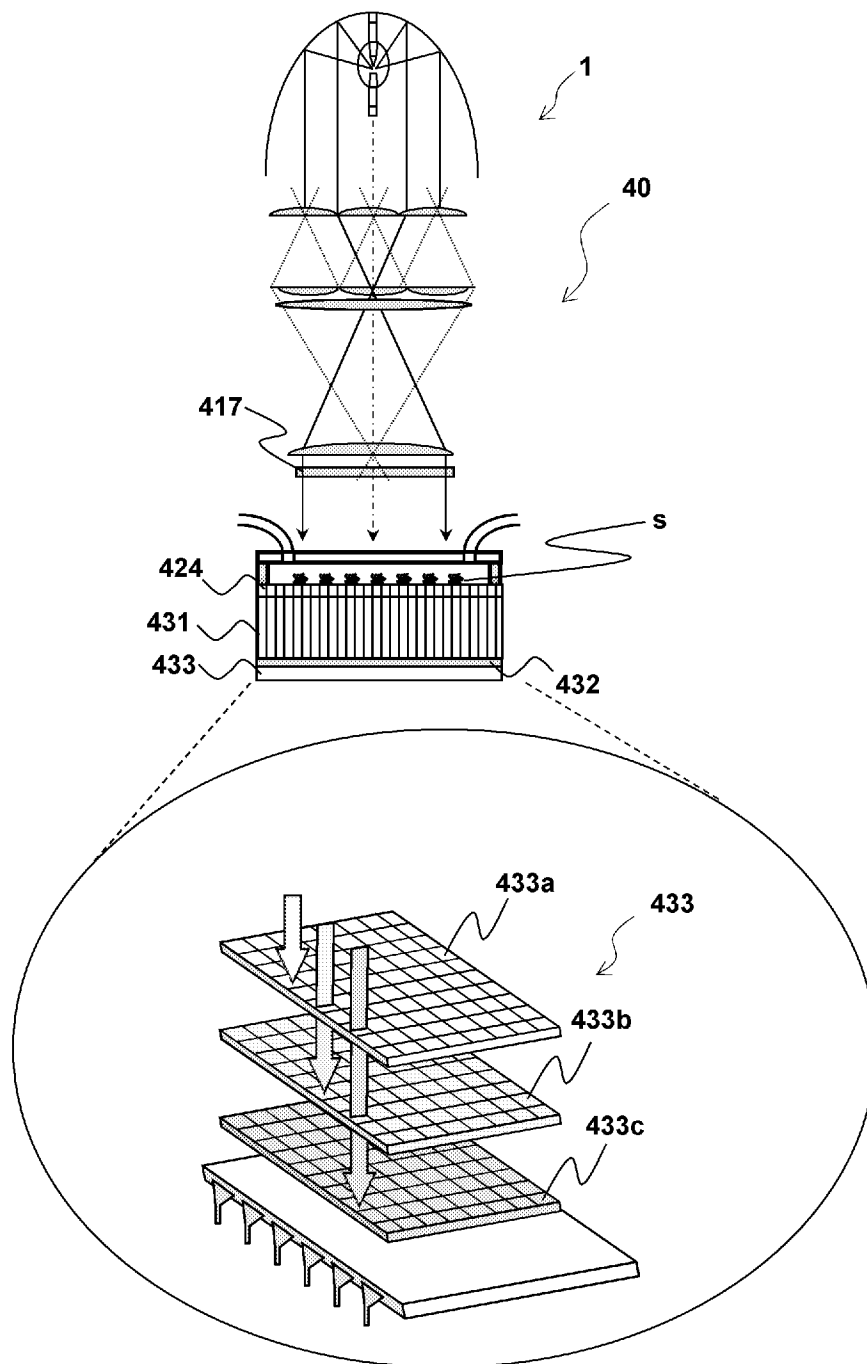
[図7]



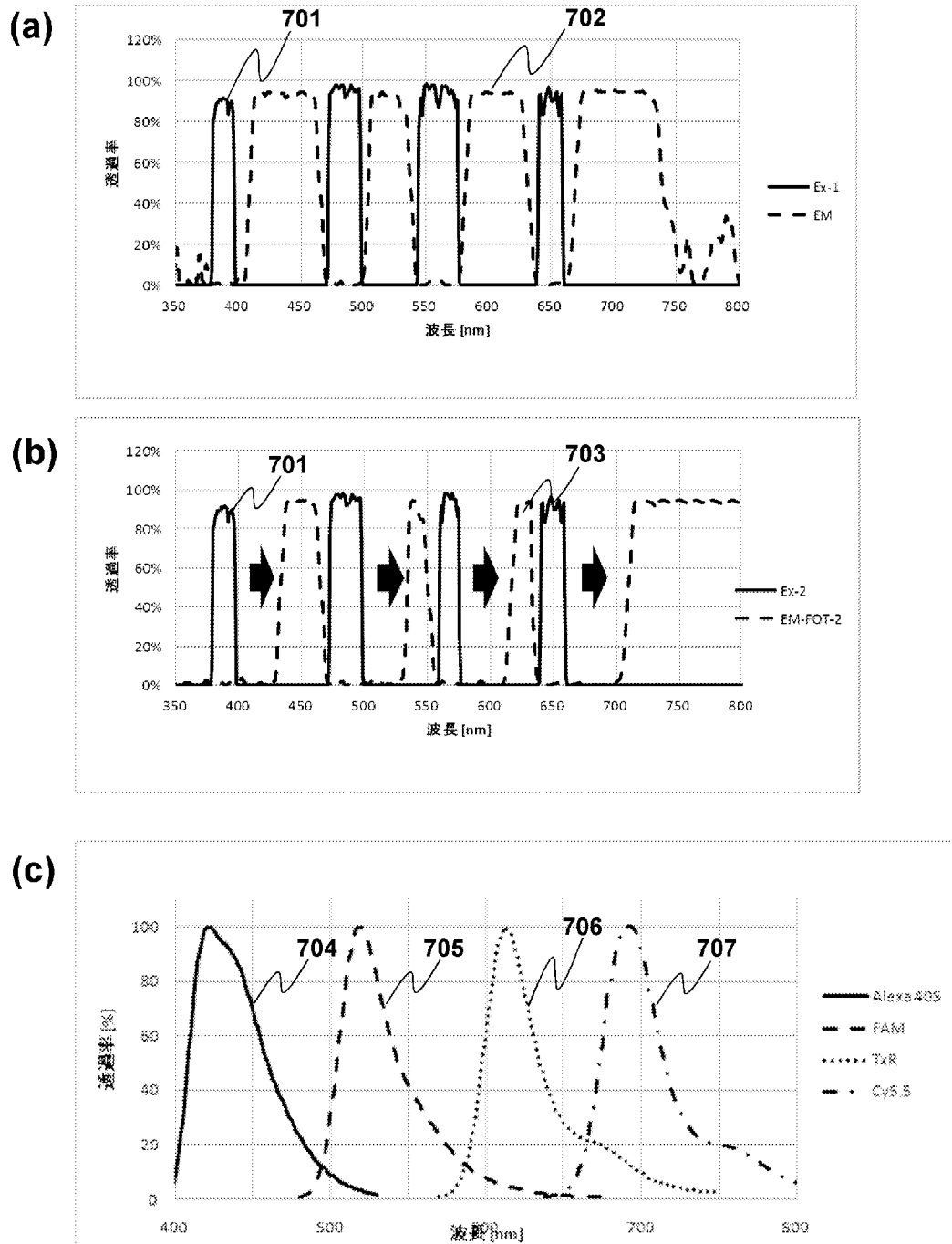
[図8]



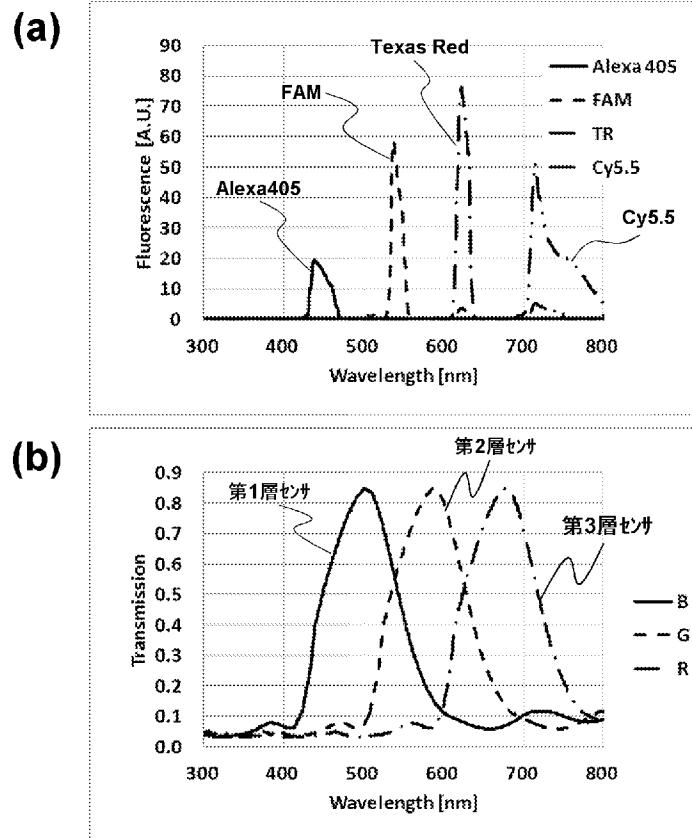
[図9]



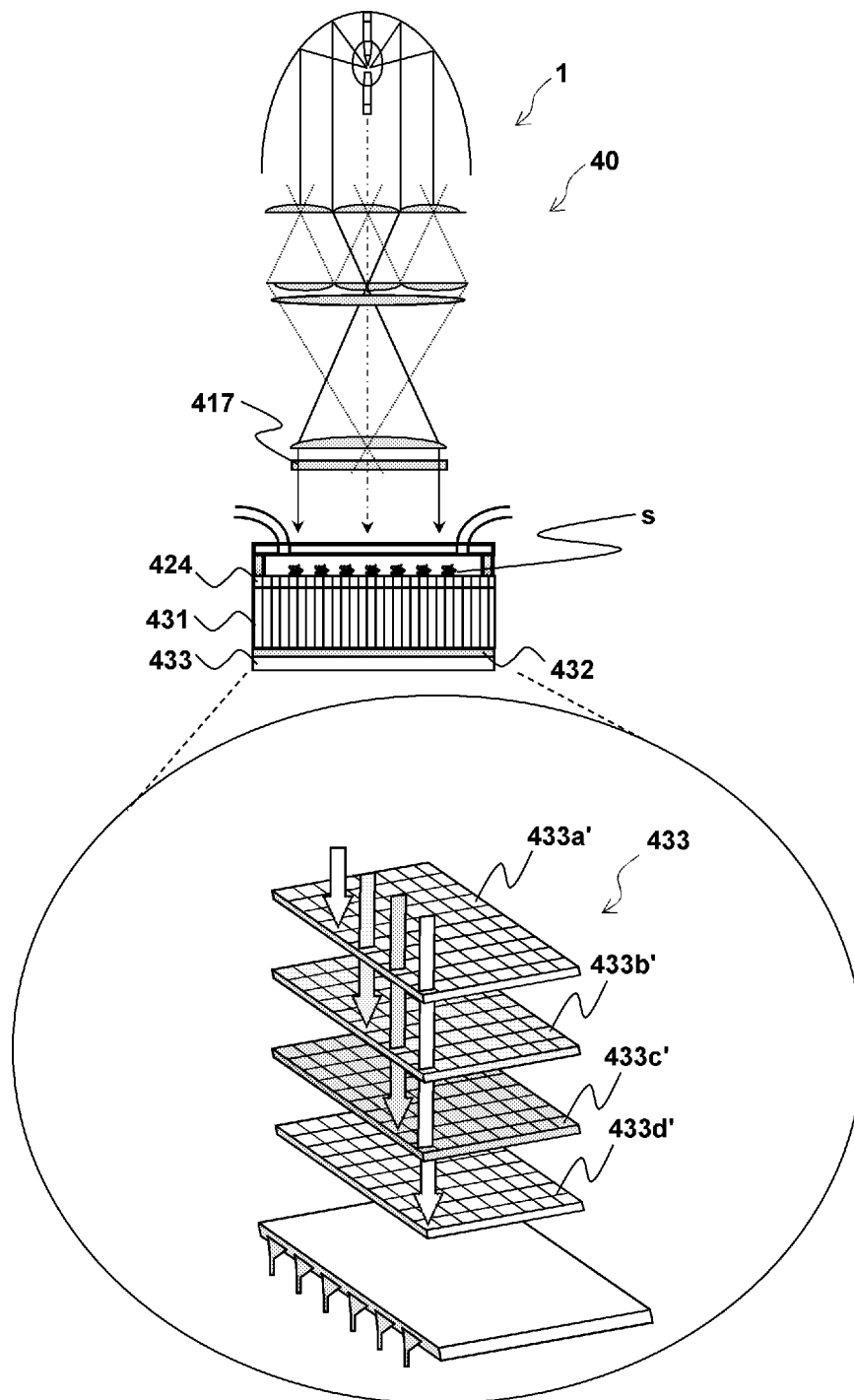
[図10]



[図11]

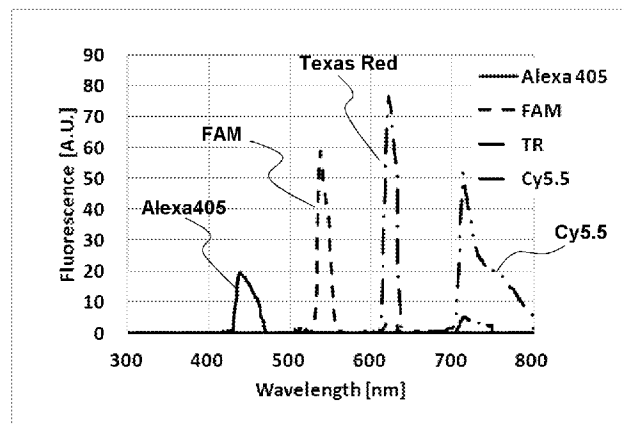


[図12]

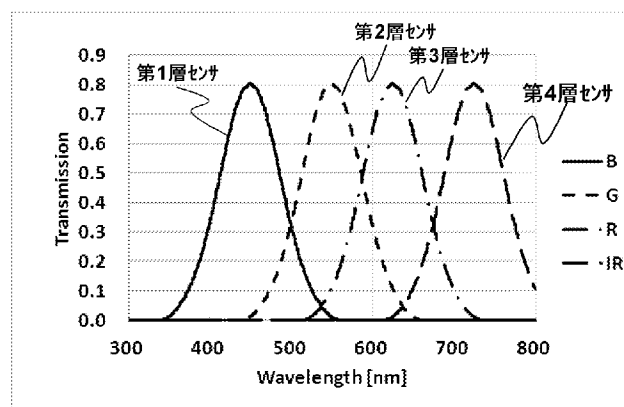


[図13]

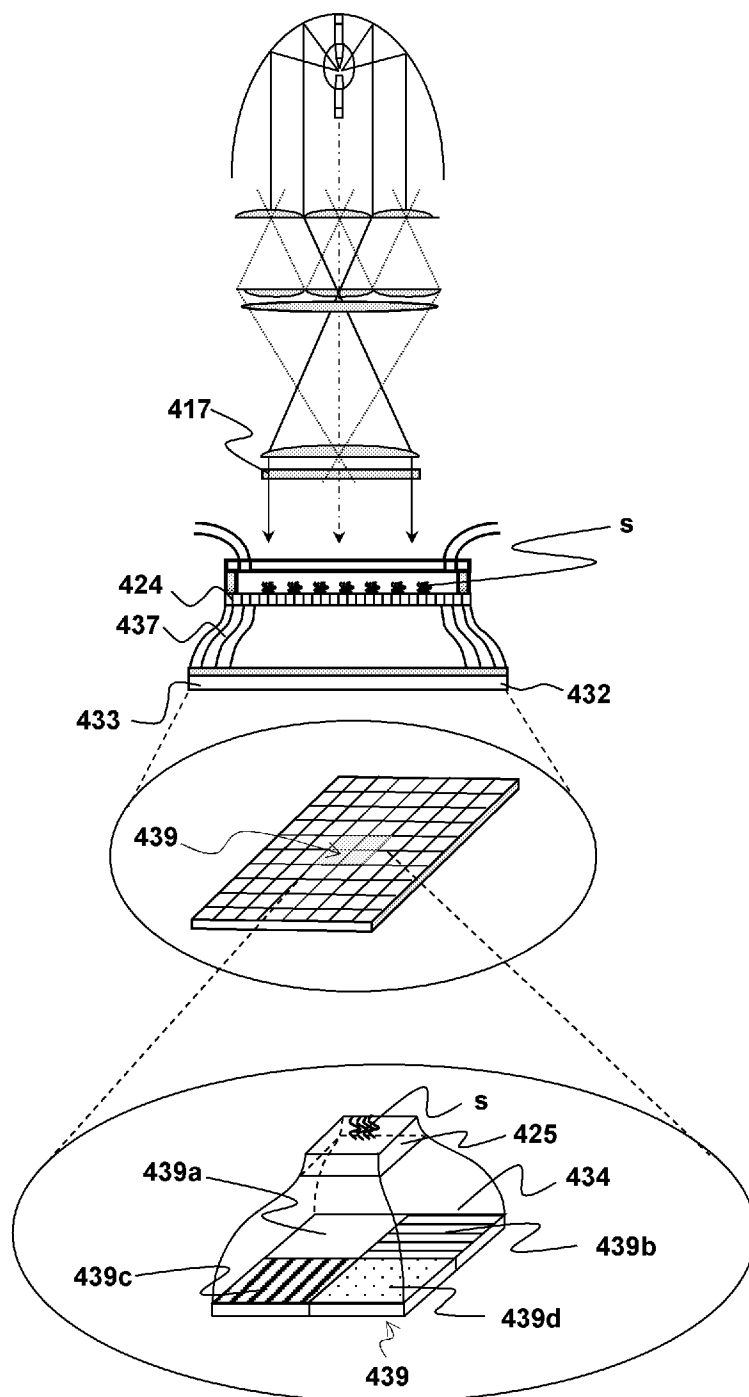
(a)



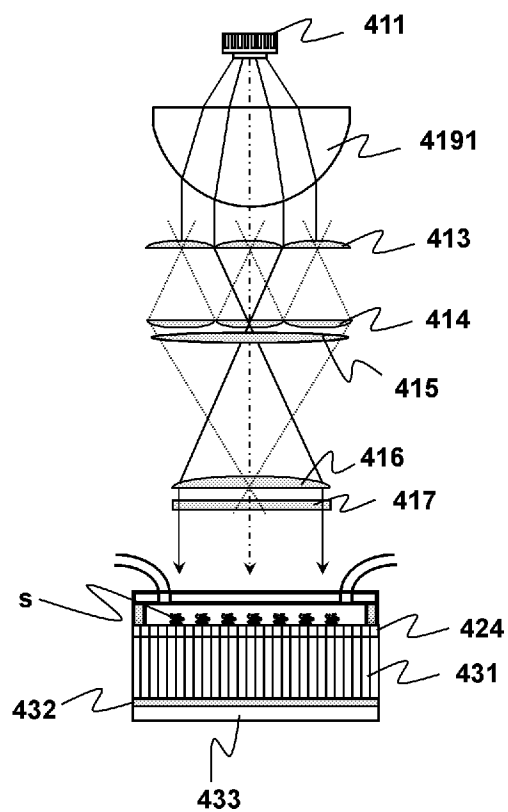
(b)



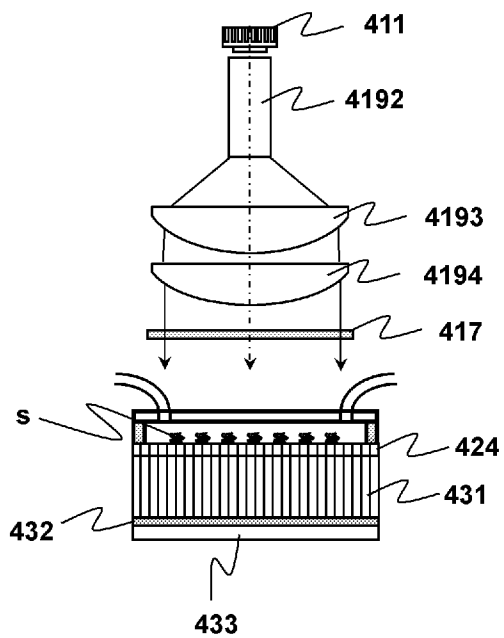
[図14]



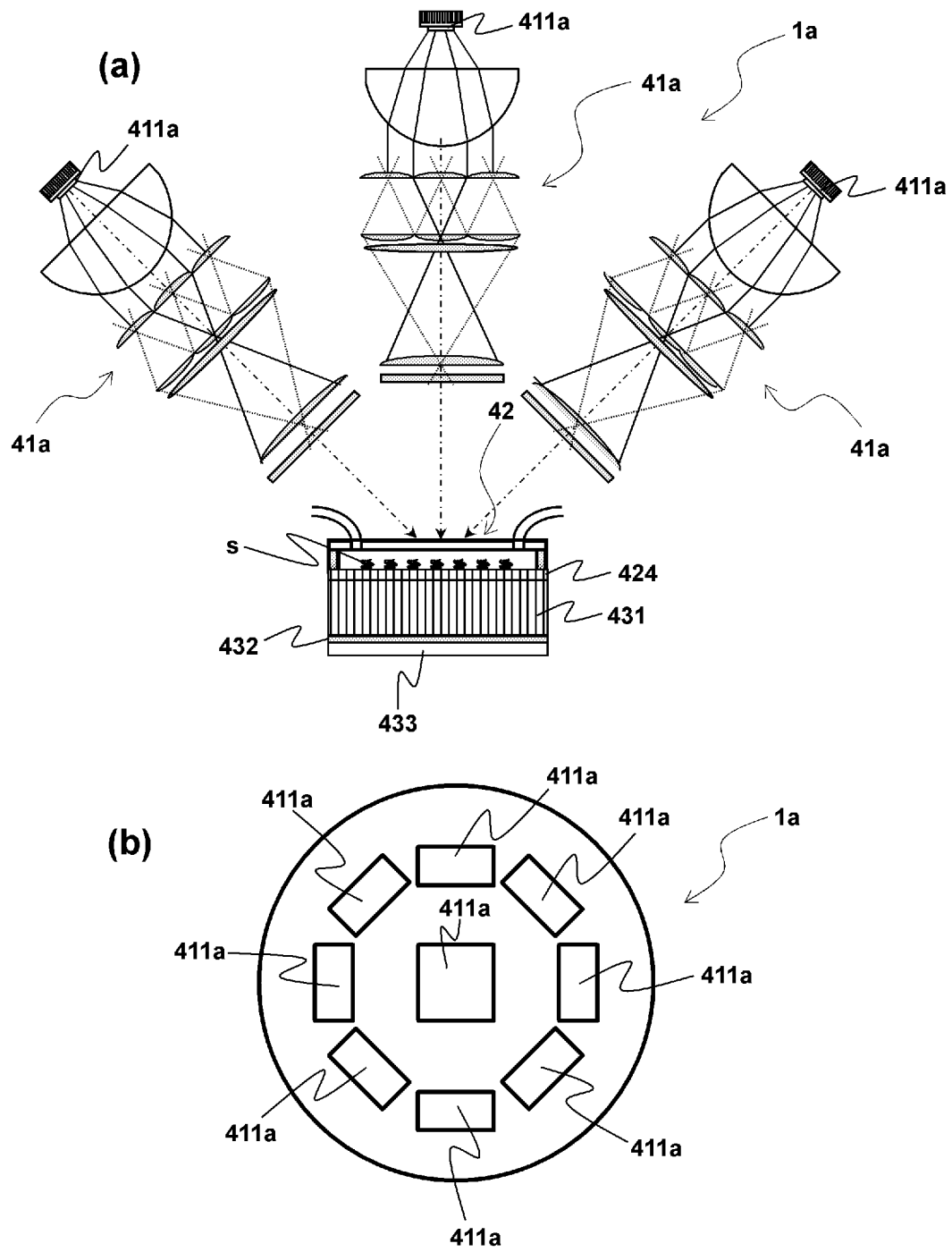
[図15]



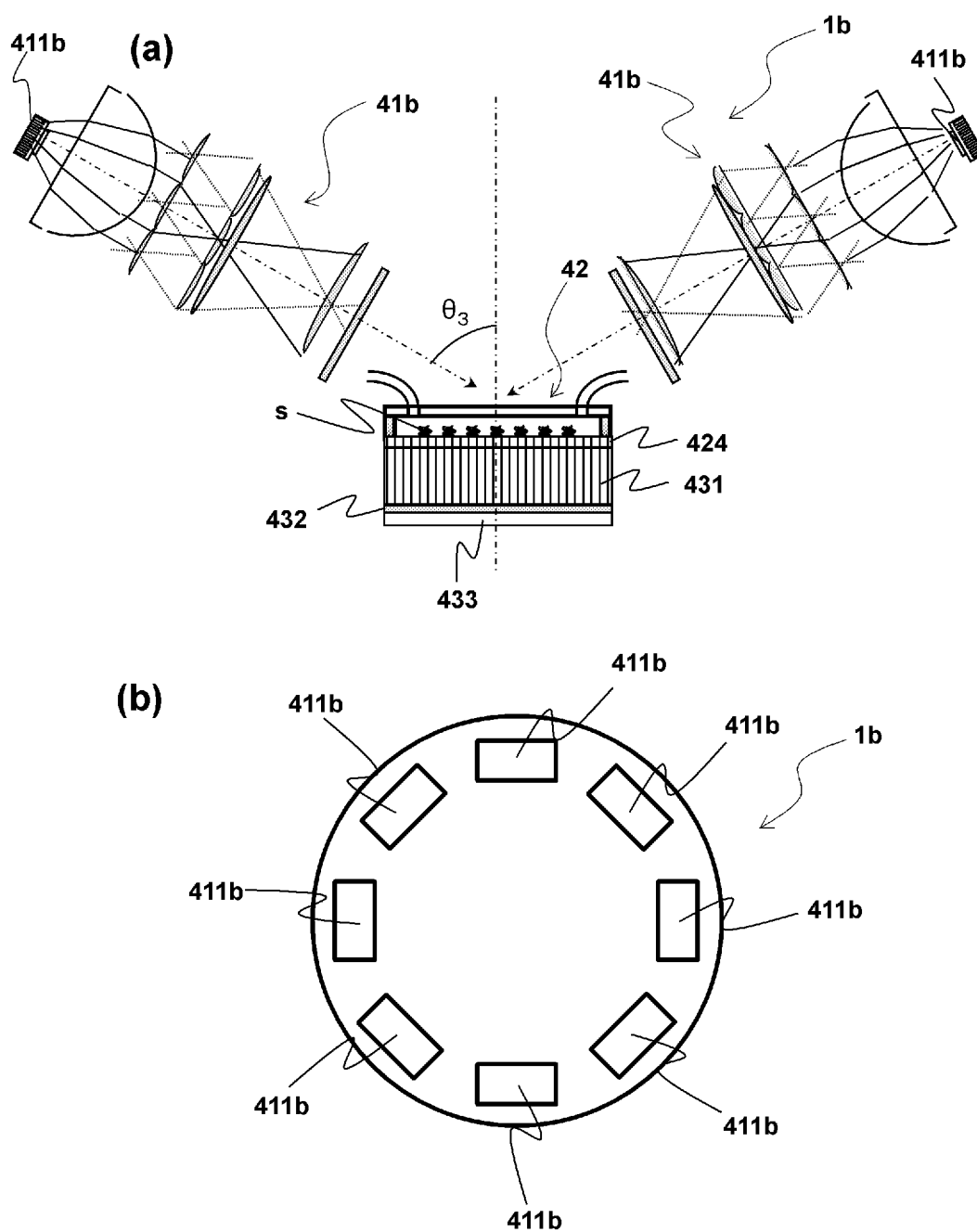
[図16]



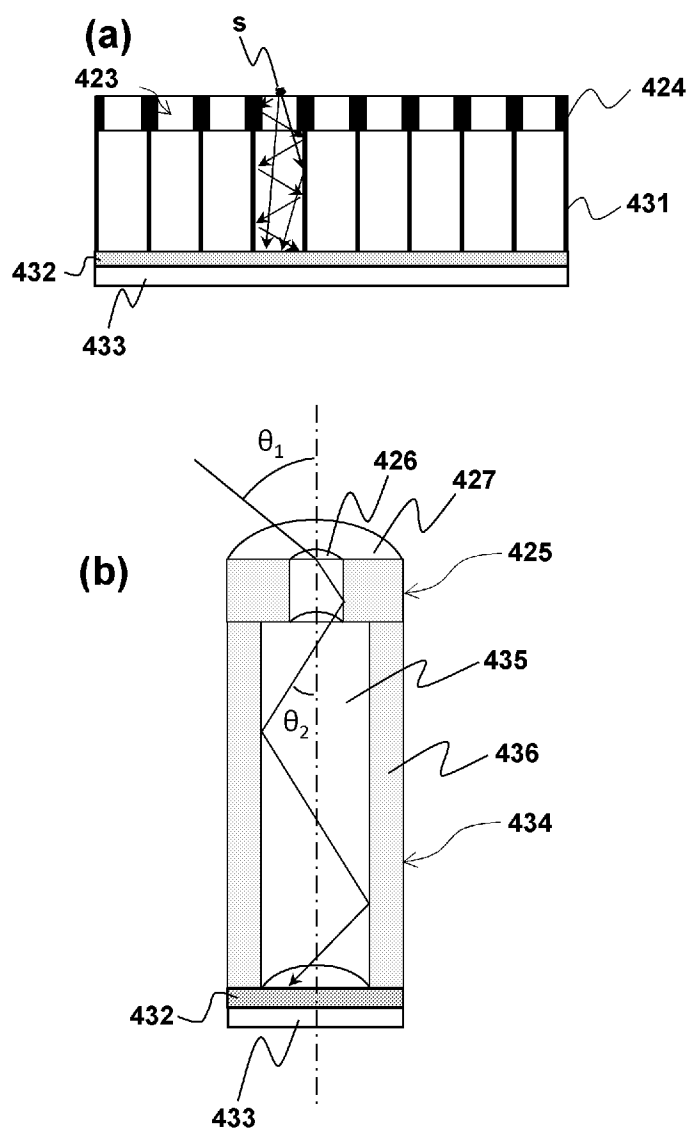
[図17]



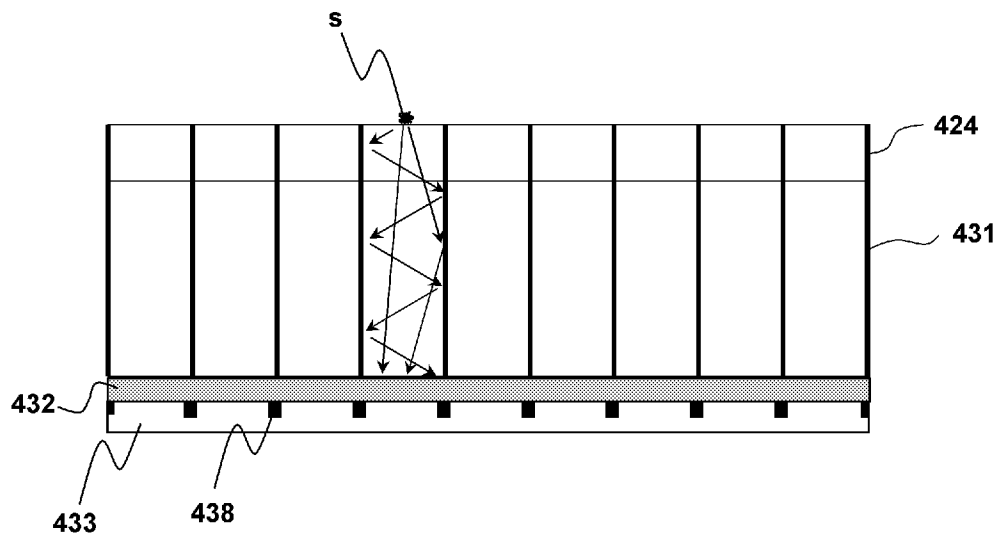
[図18]



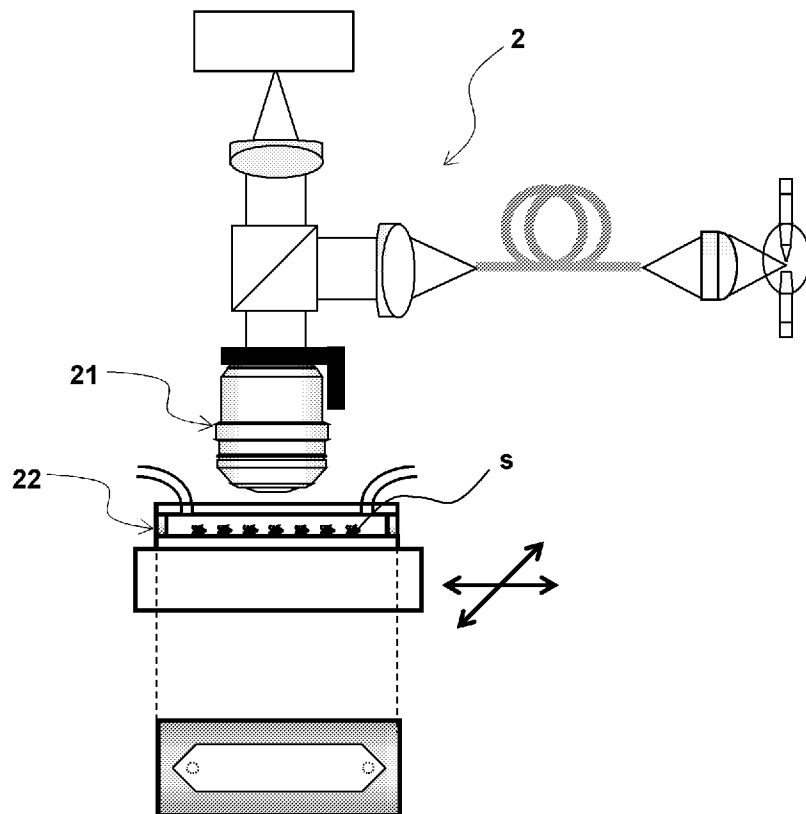
[図19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/052852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/00-21/83, G01J3/00-3/52

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-77260 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 24 March 2005 (24.03.2005), entire text; all drawings (Family: none)	1-15
A	JP 10-513553 A (MURRAY, Anthony, J.), 22 December 1998 (22.12.1998), entire text; all drawings & WO 1996/023213 A1 & EP 805974 A	1-15
A	JP 7-78469 B2 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 23 August 1995 (23.08.1995), entire text; all drawings (Family: none)	1-15

☒ 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
06 April 2015 (06.04.15)

Date of mailing of the international search report
21 April 2015 (21.04.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/052852

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2809422 B2 (Hitachi, Ltd.), 08 October 1998 (08.10.1998), entire text; all drawings & US 5062942 A & DE 4011730 A1	1-15
A	JP 2006-177955 A (Palo Alto Research Center Inc.), 06 July 2006 (06.07.2006), entire text; all drawings & US 2006/0132878 A1 & EP 1672355 A2	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/00-21/83, G01J3/00-3/52

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2005-77260 A（富士写真フイルム株式会社）2005.03.24, 全文、全図（ファミリーなし）	1-15
A	JP 10-513553 A（マーレイ, アンソニー・ジェイ）1998.12.22, 全文、全図 & WO 1996/023213 A1 & EP 805974 A	1-15
A	JP 7-78469 B2（日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社）1995.08.23, 全文、全図（ファミリーなし）	1-15

☒ 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

0 6 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

田中 洋介

2 W

3 0 0 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 0

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2809422 B2 (株式会社日立製作所) 1998. 10. 08, 全文、全図 & US 5062942 A & DE 4011730 A1	1-15
A	JP 2006-177955 A (パロ・アルト・リサーチ・センター・インコーポレーテッド) 2006. 07. 06, 全文、全図 & US 2006/0132878 A1 & EP 1672355 A2	1-15