

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5337676号
(P5337676)

(45) 発行日 平成25年11月6日(2013.11.6)

(24) 登録日 平成25年8月9日(2013.8.9)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 21/64 (2006.01) GO 1 N 21/64 F

請求項の数 36 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2009-269404 (P2009-269404)	(73) 特許権者	501387839 株式会社日立ハイテクノロジーズ 東京都港区西新橋一丁目24番14号
(22) 出願日	平成21年11月27日(2009.11.27)	(74) 代理人	100100310 弁理士 井上 学
(65) 公開番号	特開2011-27706 (P2011-27706A)	(74) 代理人	100098660 弁理士 戸田 裕二
(43) 公開日	平成23年2月10日(2011.2.10)	(72) 発明者	高橋 智 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社 日立ハイ テクノロジーズ 那珂事業所内
審査請求日	平成24年2月13日(2012.2.13)	(72) 発明者	芳賀 孝信 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社 日立製作 所 中央研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2009-150445 (P2009-150445)		
(32) 優先日	平成21年6月25日(2009.6.25)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光分析装置および蛍光検出装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉されうる領域が複数設けられ、それらが格子構造の格子点位置に配置される基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

集光した光を指定の波長範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で分割する分離部と、

分割された光を検出器に結像する結像光学系と、

分割され結像された光を各々検出するための複数の検出画素を備えた検出器と、

検出器で検出されたそれぞれの光の光強度の比から蛍光体種を判定するデータ処理部を具備し、

前記指定の波長範囲は、個々の蛍光体の波長帯を含む、蛍光検出装置。

【請求項2】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

10

20

分子が捕捉されうる領域が複数設けられ、それらが格子構造の格子点位置に配置される基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

複数の蛍光体からの蛍光強度を、各々指定の波長帯ごとに異なる比率に分割する分離部と

分割された光強度をそれぞれ検出する画素を有する検出器と、

それぞれの光強度の比を計算するデータ処理部

を有する蛍光検出装置。

【請求項 3】

10

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉されうる領域が複数設けられた基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

複数の蛍光体からの蛍光強度を、各々指定の波長帯ごとに異なる比率に分割する分離部と

分割された光強度をそれぞれ検出する画素を有する検出器と、

それぞれの光強度の比を計算するデータ処理部

を有する蛍光検出装置。

20

【請求項 4】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉されうる基板、または、分子が捕捉された基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

集光した光を指定の波長範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で分割する分離部と、

分割された光強度をそれぞれ検出する画素を有する検出器と、

それぞれの光強度の比を計算するデータ処理部

を有する蛍光検出装置。

30

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか記載の蛍光分析装置において、
光強度の比から 3 種以上の蛍光体種を判定するデータ処理部を有することを特徴とする
蛍光検出装置。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいずれか記載の蛍光分析装置において、
光強度の比から 4 種以上の蛍光体種を判定するデータ処理部を有することを特徴とする
蛍光検出装置。

40

【請求項 7】

請求項 1 から 4 のいずれか記載の蛍光分析装置において、
指定の波長範囲が約 400 から約 900 nm の範囲以内であることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 8】

請求項 1 から 4 のいずれか記載の蛍光分析装置において、
指定の波長範囲が約 100 nm 以上の領域を有することを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれか記載の蛍光分析装置において、

50

最短波長側の蛍光体の蛍光極大波長から、最長波長側の蛍光体の蛍光極大波長までの範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で2分割することを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項10】

請求項1から4のいずれか記載の蛍光分析装置において、
指定の波長範囲において異なる比率で分割する手段が、透過率または反射率が、実質的にほぼ0からほぼ100%までのほぼ線形的な特性を有する2色性ミラーであることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項11】

請求項1から4のいずれか記載の蛍光分析装置において、
基板上に複数の蛍光体が存在し、蛍光体は各々異なる蛍光を発生し、その強度を複数の検出画素を有する1個または2個の検出器で検出し、第1の蛍光体からの蛍光強度比率が、ほかの蛍光体からの蛍光強度比と異なることを特徴とする蛍光検出装置。

10

【請求項12】

請求項1または2記載の蛍光分析装置において、
該格子構造が、2次元の長方形格子構造、または、三角格子構造であることを特徴とする蛍光分析装置。

【請求項13】

請求項1または2記載の蛍光分析装置において、
該格子構造の格子点位置に微小な金属構造物を設けたことを特徴とする蛍光分析装置。

20

【請求項14】

請求項13記載の蛍光分析装置において、
金属の微小な構造物は、金、クロム、銀、アルミ、白金、チタンなどの金属微粒子または金属膜、または一部に微細な突起を有する構造体などの、励起光の波長以下の大きさをなす金属構造体であることを特徴とする蛍光分析装置。

【請求項15】

請求項1または2記載の蛍光分析装置において、
該格子構造の格子点位置に微小開口を有し、光学的に不透明な材質の薄膜で構成された基板を使用することを特徴とする蛍光分析装置。

【請求項16】

請求項13から15のいずれか記載の蛍光分析装置において、
該基板は、オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が金属構造体表面、または開口部底部に捕捉された基板であることを特徴とする蛍光分析装置。

30

【請求項17】

請求項1から4のいずれか記載の蛍光分析装置において、
基板にプリズムが光学的に接触するか、または、基板の底面の一部がプリズム形状であり、そのプリズムを介して蛍光励起用の光を照射し、基板表面で全反射させ、エバネッセント場を形成し、蛍光分光測定することを特徴とする蛍光分析装置。

【請求項18】

請求項1から4のいずれか記載の蛍光分析装置において、
基板とプリズムとの間に光学的に透明で、弾性のある材料を挟み、光学的に接着し、基板表面で全反射させ、エバネッセント場を形成し、蛍光分光測定することを特徴とする蛍光分析装置。

40

【請求項19】

請求項1から2のいずれか記載の蛍光分析装置において、
隣接する最短の格子点の間隔が、200nmから10000nmであることを特徴とする蛍光分析装置。

【請求項20】

請求項1から2のいずれか記載の蛍光分析装置において、
オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される領域の大きさは100nm径以下で

50

あることを特徴とする蛍光分析装置。

【請求項 2 1】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉されうる領域が複数設けられた基板、または分子が捕捉された基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

集光した光を指定の波長範囲において、波長ごとに実質的に異なる比率で検出する複数の検出画素を有する $N(> 1)$ 個の検出器を具備し、

各検出器で検出されたそれぞれの光の光強度の比から $K(> N)$ 種の蛍光体を識別するデータ処理部を有することを特徴とする蛍光検出装置。

10

【請求項 2 2】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉されうる領域が複数設けられた基板、または分子が捕捉された基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

4種以上の複数の蛍光体からの蛍光強度を、各々の蛍光極大波長帯ごとに異なる比率に分割する分離部と

分割された光強度をそれぞれ検出する画素を有する検出器と、

それぞれの光強度の比を計算するデータ処理部

を有する蛍光検出装置。

20

【請求項 2 3】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉されうる領域が複数設けられた基板、または分子が捕捉された基板と、

光励起用の光源と、

照射光学系と蛍光集光系と、

4種以上の複数の蛍光体からの蛍光強度を、各々の蛍光極大波長帯ごとに異なる比率に分割する分離部と

分割された光強度をそれぞれ検出する画素を有する単一の検出器と、

それぞれの光強度の比を計算するデータ処理部

を有する蛍光検出装置。

30

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の蛍光分析装置であって、

基板が実質的に透明な基板であり、照射光学系が全反射照明であることを特徴とする蛍光分析装置。

40

【請求項 2 5】

請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の蛍光検出装置であって、

基板が実質的に透明な基板であり、照射光学系が全反射照明であることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 4 および 2 1 から 2 3 のいずれかに記載の蛍光分析装置において、

前記分離手段は、透過率又は反射率が、波長に対して非線形的な特性を持つ2色性ミラーであることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の蛍光分析装置において、前記分離手段は、透過率又は反射率が、波

50

長に対して階段状又は変化率の異なる傾斜状を有する特性を持つ2色性ミラーであることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項28】

請求項1から4および26のいずれか記載の蛍光分析装置において、

前記分離手段は、蛍光体の吸収極大波長が最も近い励起光の波長と上記蛍光体の吸収極大波長の差が1番大きい蛍光体種と2番目に大きい蛍光体種の蛍光極大波長において、透過率をほぼ0%とほぼ100%またはほぼ100%とほぼ0%とする特性を有することを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項29】

請求項1から4および21から23のいずれかの記載の蛍光分析装置において、

前記蛍光は、複数の蛍光体から発せられ、前記複数の蛍光体の1つは励起光源によって励起されるドナー、その他の蛍光体は前記ドナーからのエネルギー移動によって励起されるアクセプタ蛍光体であることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項30】

請求項29記載の蛍光分析装置において、

前記ドナーの蛍光を、前記アクセプタの蛍光と実質的に異なる光路に分離する第2の2色性ミラーをさらに有し、

前記アクセプタの蛍光は、前記分離部により、異なる各々の蛍光極大波長帯ごとに異なる比率に分割されることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項31】

請求項30記載の蛍光分析装置において、

前記検出器は、3つの光路の光を検出する画素を有することを特徴とする蛍光検出装置

【請求項32】

請求項29記載の蛍光検出装置において、

前記ドナーの蛍光体の蛍光強度を、前記アクセプタの蛍光の蛍光強度の0.5倍から5倍にする透過率特性を有するフィルタを有する蛍光検出装置。

【請求項33】

請求項29記載の蛍光検出装置において、

前記ドナーの蛍光体の蛍光極大波長の透過率をほぼ0%または100%とする特性を有する分離部を有する蛍光検出装置。

【請求項34】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、蛍光検出する装置であって、

集光した光を指定の波長範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で分割する分離部と、

分割された光を各々検出するための検出器と、

検出器で検出されたそれぞれの光の光強度の比から蛍光体種を判定するデータ処理部を具備し、

前記指定の波長範囲は、個々の蛍光体の波長帯を含む、
蛍光検出装置。

【請求項35】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、

分子が捕捉される個々の領域からの蛍光、または捕捉した個々の蛍光分子からの蛍光を、指定の波長範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で分割し、

分割した光を、各々、輝点あたり25画素数以内の大きさで検出し、

検出器で検出されたそれぞれの光の光強度の比から蛍光体種を判定し、

前記指定の波長範囲は、個々の蛍光体の波長帯を含む、

10

20

30

40

50

することを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 36】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉された基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であつて、

分子が捕捉される個々の領域からの蛍光、または捕捉した個々の蛍光分子からの蛍光を、指定の波長範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で分割し、

分割した光を、各々、輝点あたり9画素数以内の大きさに結像して検出し、

検出器で検出されたそれぞれの光の光強度の比から蛍光体種を判定し、

前記指定の波長範囲は、個々の蛍光体の波長帯を含む、

10

することを特徴とする蛍光検出装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光分析装置に関し、例えば、DNA、RNA、又はタンパク質、細胞等の生体関連物質に光を照射して光分析する光計測・分析装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来から、基板の表面に配置された物体に対して励起光を照射して物体の形状を観察する方法が提案されている。例えば、特許文献1には、励起光源から出力された励起光を透明な基板に照射し、その内部で励起光を全反射させることにより、基板表面にエバネセント波を生成し、基板上の試料によるエバネセント波の散乱光を検出する装置が記載されている。ただし、特許文献1に記載の装置では散乱光を分光していない。

20

【0003】

また、例えば、特許文献2には、エバネセント波で励起された試料成分からの蛍光及び散乱光を分光する装置が記載されている。ただし、特許文献2に記載の装置では試料成分が流路境界面に捕捉されていない。

【0004】

一方、基板表面に複数の生体分子を捕捉し、特許文献1と同様に基板表面の一定範囲にエバネセント波を生成し、そのエバネセント波によって励起された生体分子の発光を画像化する装置がある。基板上に非蛍光性の生体分子を捕捉し、蛍光性の分子を含む反応液を基板上に流入させ、生体分子捕捉位置からの蛍光を観測するものである。これにより、生体分子と反応液中の分子との結合反応を観察することができる。例えば、始めに基板に非修飾一本鎖のDNAを捕捉し、塩基種ごとに異なる蛍光体で修飾された蛍光修飾塩基を含む反応液を導入し、一本鎖DNAに対して相補な塩基を結合させながら、分子捕捉位置からの蛍光を分光すれば、捕捉されたDNAの配列を解読することが可能である。

30

【0005】

近年、非特許文献2にあるように、基板にDNAなどを捕捉してその塩基配列を決定することが提案されている。基板表面にランダムに分析すべき試料DNA断片を1分子ずつ捕捉し、ほぼ1塩基ずつ伸長させて、その結果を蛍光計測より検出することにより塩基配列を決定するものである。具体的には、DNAポリメラーゼの基質として鋳型DNAに取り込まれてDNA鎖伸長反応を保護基の存在により停止することができ、かつ検出される標識を持つ4種のdNTPの誘導體(MdNTP)を用いてDNAポリメラーゼ反応を行わせる工程、次いで取り込まれたMdNTPを蛍光等で検出する工程、及びMdNTPを伸長可能な状態に戻す工程を1サイクルとし、それを繰り返すことにより試料DNAの塩基配列を決定する。本技術では、DNA断片を1分子ずつ配列決定することができるため、同時に数多くの断片を解析することができ、解析スループットを大きくすることができる。また、本方式では、単一DNA分子毎に塩基配列が決定できる可能性があるため、従来技術の問題であったクローニングやPCR等での試料DNAを精製、増幅が不要にできる可能性があり、ゲノム解析や遺伝子診断の迅速化が期待できる。なお、本方法では、

40

50

分析すべき試料DNA断片分子が基板面にランダムに捕捉されるため、捕捉されたDNA断片分子数に対して数100倍の画素数を有する高価なカメラが必要となる。つまり、DNA断片分子同士の間隔が平均1マイクロメートルになるように調整した場合、より大きな間隔同士の分子もあれば、より近接した間隔の分子同士も存在し、これらを互いに分離して検出するには、基板面に換算して、より細かな間隔で蛍光像を検出する必要がある。通常、数10分の1の間隔で計測する必要がある。

【0006】

また、一方、非特許文献3および特許文献3では、全反射エバネッセント照射検出方式よりも励起光照射体積の一層の低減が可能となるナノ開口エバネッセント照射検出方式によって、蛍光検出の感度を更に向上させている。2枚のガラス基板、ガラス基板Aとガラス基板Bを平行に配置し、ガラス基板Aのガラス基板Bと対面する側の表面に、径50nmのナノ開口を有する膜厚約100nmの平面状のアルミニウム薄膜を積層する。アルミニウム薄膜は遮光性能を有している必要がある。2枚のガラス基板の間に反応槽を構成し、反応槽に溶液を充填することによって、2枚のガラス基板の間に溶液層を形成する。反応槽には溶液の注入口と排出口があり、注入口から溶液を注入し、排出口から溶液を排出させることで、溶液をガラス基板およびアルミニウム薄膜と平行方向にフローさせることができる。これにより、溶液層の溶液を任意の組成に交換することが可能である。Aryonレーザから発振した波長488nmの励起光を、ガラス基板Bと反対方向より、ガラス基板Aに対して垂直に、対物レンズで絞って照射すると、ナノ開口内部の底平面近傍の溶液層に励起光のエバネッセント場が形成され、それ以上先の溶液層内部に励起光が伝播することはない。一方、蛍光発光は、前記対物レンズを用いて2次元CCD上に結像することによって検出される。エバネッセント場では、励起光強度がナノ開口底平面から離れるに従って指数関数的に減衰し、ナノ開口底平面から30nm程度の距離で励起光強度が1/10となる。更に、ナノ開口エバネッセント照射検出方式では、全反射エバネッセント照射検出法と異なり、ガラス基板と平行方向の励起光照射幅が開口径すなわち50nmに限定されるため、励起光照射体積が一層低減される。このため、遊離の蛍光体の蛍光発光や水のラマン散乱を始めとする背景光を飛躍的に低減することが可能となる。その結果、より高濃度の遊離の蛍光体存在下で、対象とする生体分子に標識された蛍光体だけを選択的に検出することが可能となり、非常に高感度な蛍光検出を実現できる。本文献では、以上の蛍光検出方式をDNA分子の伸長反応によるdNTPの取り込み計測に応用している。

【0007】

以降では、試料成分捕捉面のように、エバネッセント場が開始される平面をエバネッセント場境界平面と呼ぶ。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開平9-257813号公報

【特許文献2】特開2005-70031号公報

【特許文献3】米国特許第6917726号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Nature Vol. 374, 555-559 (1995).

【非特許文献2】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, pp3960, 2003

【非特許文献3】SCIENCE 2003, Vol.299, pp. 682-686.

【非特許文献4】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.102, pp5932, 2005

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

基板表面上に捕捉された生体分子の蛍光を画像化することにより生体分子を分析する装

10

20

30

40

50

置においては、一般に基板上の個々の捕捉された領域（スポット）ごとに異なる種類の生体分子を捕捉し、各スポットからの蛍光を画像化によって分離して検出する。できる限り短時間で多数種の生体分子を分析し、また、消費される試薬量を低減するには、スポットは光学的に分解可能な範囲でできる限り基板上に高密度に生体分子を捕捉するのが好ましい。また、1スポットあたりの試薬消費量を低減するためには、1スポット内に捕捉する生体分子数は少ないほど好都合であり、1分子が理想的である。非特許文献1に記載されているように、蛍光検出法は1分子をも検出する感度を有しているけれども、少数分子からの蛍光を分光検出して良好なS/Nを得るには、損失の少ない分光イメージング法が好ましい。したがって、プリズムや回折格子などの分散素子による分散分光イメージング法、もしくはダイクロイックミラーで分光して複数のイメージセンサで画像を取得する方法（ダイクロ/マルチセンサ分光イメージング法）が好ましい。また、蛍光体からの発光が同時に行われぬか、または同時に測光する必要がない場合は、非特許文献2に記載されているように、蛍光体専用の透過フィルタを使い、逐次的にフィルタを交換、測光を繰り返してもよい。

10

【0011】

上記複数のスポットは光学的に分解可能な範囲でできる限り基板上に高密度に配置するのが好ましいが、ダイクロ/マルチセンサ分光イメージング法では、使用する蛍光標識物の種類の数だけイメージセンサが必要になるため、検出装置のコストが高くなるという問題がある。また、蛍光像を通常のダイクロイックミラーなどで分割するため、S/Nが必ずしも大きくならない場合も多い。分光フィルタを逐次的に変更して測光する場合は、イメージセンサが1個で済むが、フィルタを変更する機構部が必要で、機械的な故障の可能性が大きくなるとともに、装置コスト高につながる。また、フィルタの変更に要する時間が比較的長い場合、早い反応に基づく蛍光変化に対応できず、同時測定が1波長帯であるため同時に異なる蛍光波長の光を検出することができないという課題がある。分散分光イメージング法にすれば、最小限の（たとえば1個）のイメージセンサで検出できるというメリットがあるが、スポット同士の間隔が狭くなると、スポットから発する蛍光を波長分散させたときの蛍光像が近接する別のスポットの蛍光像と重なってしまい、蛍光識別精度が低下する。そのため蛍光検出精度を向上させるには、基板上に生体分子を捕捉したスポット同士の間隔を広くしなければならなくなり、高密度化しにくいという問題があった。

20

【0012】

また従来の光学系においては、生体分子が基板上にランダムに捕捉された場合、基板上のスポット数に対して、数100倍以上の画素数が必要であり、検出速度が低下すると共に、高価な2次元センサが必要になるという問題点があった。さらに、また、より高解像度で蛍光像を検出しなければならないため、開口数NAの大きな集光レンズを使う必要があり、高価な系になるという問題点があった。

30

【0013】

本発明の目的は、少ない画素数で、複数の蛍光体からの強度を識別して計測する装置に関する。また、例えば基板上に捕捉するDNA断片の分子からの蛍光像を2次元センサにて蛍光検出する際、安価に、または操作性の良い検出方法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

40

【0014】

オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する装置であって、生体関連分子が捕捉される領域が複数設けられた基板と、該分子は、複数種の蛍光体または色素等により検出可能なように個別または同時に標識され、光励起用の光源と、照射光学系と蛍光集光系と、集光した光を指定の波長範囲において、特定の波長ごとに実質的に異なる比率で分割する分割部と、分割された光を複数の検出画素を有する検出器で検出し、分割された対応する画像位置の強度の比率を算定し、該比率から複数種の蛍光体を識別するデータ処理手段とを具備するものである。

【発明の効果】

50

【 0 0 1 5 】

本発明により、試料基板からの蛍光像測定で、複数の蛍光体の強度を算出するのに、従来同じ数の検出器を要していたものが、蛍光体の種類よりも少ない検出器で可能になり、効率よく検出することができる。特に、1個の検出器で3種類、4種類、それ以上の蛍光体を識別し、蛍光強度を測定することができ、総合的に安価にシステムを構築することが可能になる。

【 0 0 1 6 】

また、プリズム、回折格子などを使った分散方式の場合、分散させた蛍光を多数の検出画素にて検出する必要があり、また近接する他の部分の蛍光像と重ならないようにするため、ひとつの捕捉領域からの蛍光を検出するのに、十分大きな画素数を検出器内に確保する必要はあるが、本発明では、分散させる必要がなく、近接するほかの部分との重なりの影響が少なくなる。そのため、オリゴヌクレオチド等の捕捉された領域の間隔を狭くすることができ、より多くの試料からの蛍光を同時に解析することが可能になる。高密度に配置された基板が使用でき、試料解析の高スループット化とシステムの簡便化を同時に実現できる。

10

【 0 0 1 7 】

また、例えば、測定すべきオリゴヌクレオチドが捕捉された領域数が同じ場合、少ない画素数で、効率よく検出でき、2次元センサの価格を安価することができるようになる。また、光学分解能をオリゴヌクレオチドが捕捉される領域同士の間隔程度にすることができるため、大きな開口数の集光レンズを使う必要がなくなり、安価なレンズを使用することができ、液浸レンズも使う必要が無いので、操作性が向上できる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 本発明の第 1 の実施例の蛍光分析方法を使った蛍光検出装置の構成図。

【 図 2 】 第 1 の実施例での基板の構造図。

【 図 3 】 第 1 の実施例でのフィルタ、ミラーの特性図。

【 図 4 】 第 1 の実施例での各蛍光体からの蛍光検出の説明図。

【 図 5 】 第 1 の実施例での蛍光体ごとの蛍光強度比算定結果の説明図。

【 図 6 】 第 1 の実施例での別のダイクロイックミラーの別の例（模式図）。

【 図 7 】 本発明の第 2 の実施例の蛍光検出装置の構成図。

30

【 図 8 】 本発明の第 4 の実施例の蛍光検出装置の構成図（蛍光分離部）。

【 図 9 】 本発明の第 4 の実施例で使用するダイクロイックミラーの特性図（模式図）。

【 図 1 0 】 本発明の第 5 の実施例の基板とエバネッセント照明のためのプリズムとの接合部の構造図。

【 図 1 1 】 本発明の第 5 の実施例の基板とエバネッセント照明のためのプリズムとの接合部の構造図。

【 図 1 2 】 本発明の第 5 の実施例の基板とエバネッセント照明のためのプリズムとの接合部の構造図。

【 図 1 3 】 本発明の第 6 の実施例の基板の構造図。

【 図 1 4 】 本発明の第 7 の実施例の蛍光検出装置の構成図。

40

【 図 1 5 】 本発明の第 7 の実施例の蛍光体の特性とダイクロイックミラーの特性図。

【 図 1 6 】 本発明の第 7 の実施例の蛍光検出装置の画像取得の説明模式図。

【 図 1 7 】 本発明の第 7 の実施例の各輝点の蛍光強度比算定結果の一例。

【 図 1 8 】 本発明の第 8 の実施例の別の画像分割検出方式の説明模式図。

【 図 1 9 】 本発明の第 9 の実施例の各輝点の蛍光強度測定・配列決定の模式図。

【 図 2 0 】 本発明の第 1 1 の実施例の（ A ）励起用レーザの波長と蛍光体の励起スペクトルおよび（ B ）蛍光スペクトル特性図。

【 図 2 1 】 本発明の第 1 1 の実施例で使用するダイクロイックミラーの特性図（模式図）。

。

【 図 2 2 】 本発明の第 1 1 の実施例の（ A ）ダイクロイックミラー透過および反射後の蛍

50

光体の蛍光スペクトルと (B) 蛍光体の蛍光強度比算定結果の説明図。

【図 2 3】本発明の第 1 2 の実施例の F R E T 効率と各蛍光体の強度比の関係の算定結果の説明図。

【図 2 4】本発明の第 1 2 の実施例の (A) 蛍光検出装置の構成図と (B) 使用するダイクロイックミラーの特性図 (模式図) 。

【図 2 5】本発明の第 1 2 の図 2 4 の構成とダイクロイックミラーを用いたときに予想される F R E T 効率と各蛍光体の強度比の関係の算定結果説明図。

【図 2 6】本発明の第 1 3 の実施例で使用するダイクロイックミラーの特性図 (模式図) と (B) 予想される F R E T 効率と各蛍光体の強度比の関係の算定結果説明図と (C) F R E T 効率 5 0 % における強度比算定結果の説明図。

10

【図 2 7】本発明の第 1 4 の実施例の蛍光検出装置の構成図。

【図 2 8】本発明の第 1 5 の実施例の (A) 蛍光体の蛍光スペクトルとロングパスフィルタの特性図 (模式図) と (B) 予想される F R E T 効率と各蛍光体の強度比の関係の算定結果説明図。

【図 2 9】(A) (B) 本発明の第 1 5 の実施例のロングパスフィルタの別の例と蛍光スペクトルの特性図 (模式図) 。

【図 3 0】本発明の第 1 5 の実施例のダイクロイックミラーの別の例と蛍光スペクトルの特性図 (模式図) 。

【図 3 1】(A) (B) (C) 本発明の第 1 5 の実施例の別の蛍光体の例の蛍光スペクトルの特性図とロングパスフィルタとダイクロイックミラーの特性図 (模式図) 。

20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 9 】

以下、本発明を実施の形態例により説明するが、本発明は本例に限定されるものではない。

【実施例 1】

【 0 0 2 0 】

基板表面に分析すべき試料 D N A 断片を 1 分子ずつ均等間隔で捕捉し、ほぼ 1 塩基ずつ伸長させて、取り込まれた蛍光標識を 1 分子ごと検出して塩基配列を決定する装置、方法について説明する。具体的には、D N A ポリメラーゼの基質として鋳型 D N A に取り込まれて D N A 鎖伸長反応を保護基の存在により停止することができかつ検出され得る標識を持つ 4 種の d N T P の誘導体を用いて D N A ポリメラーゼ反応を行わせる工程、次いで取り込まれた d N T P 誘導体を蛍光検出等で検出する工程、及び d N T P 誘導体を伸長可能な状態に戻す工程を 1 サイクルとし、それを繰り返すことにより試料 D N A の塩基配列を決定する。なお、本操作は単分子蛍光検出を行うため、測定は H E P A フィルタなどを介したクリーンルーム様の環境にて行うのが望ましい。

30

【 0 0 2 1 】

(装置構成)

図 1 は、本発明の蛍光分析方法を使った D N A 検査装置の構成図である。装置は顕微鏡に類似する装置の構成であり、基板 8 に捕捉する D N A 分子の伸長状態を蛍光検出にて測定する。

40

【 0 0 2 2 】

基板 8 は、図 2 に示すような構造をしている。基板 8 は少なくともその一部が透明材質でできており、材質としては合成石英などが使用できる。基板 8 には反応領域 8 a があり、この部分は透明材質であり、この部分に試薬などが接触する。反応領域 8 a 内に D N A が捕捉される領域 8 i j が複数形成されている。領域 8 i j の個々の大きさは直径 1 0 0 n m 以下である。この領域には D N A を捕捉するための表面処理を施す。その表面処理は、例えば、ストレプトアビジンを結合させておき、ピオチン化 D N A 断片を反応させることで、捕捉する。また、ポリ T のオリゴヌクレオチドを捕捉しておき、D N A 断片の一端をポリ A 化処理して、ハイブリダイゼーション反応にて捕捉することもできる。この際、D N A 断片濃度を適当に調製することで、個々の領域 8 i j に単一分子の D N A のみが入

50

ることができる。なお、領域 8 i j をより小さくしていくことで、領域内に捕捉できる分子が 1 個になるようにすることができる。以後このような状態の基板を計測する。このような基板では、すべての領域 8 i j に単一分子の DNA が捕捉されている場合、領域 8 i j の一部のみ DNA が捕捉されている場合がある。一部のみ DNA が捕捉されている場合は、残りの領域 8 i j には捕捉されておらず、空きの状態となる。なお、領域 8 i j 同士の間隔 d x は 2 マイクロメートル、間隔 d y は 2 マイクロメートルとする。領域 8 i j はこのように、格子構造 (2 次元の格子構造) を形成し、その格子点の位置に領域 8 i j が配置される。このような、均等間隔の基板の作成法は、例えば、特開 2 0 0 2 - 2 1 4 1 4 2 号公報に記載の手法などで、作成する。なお、d x , d y は領域 8 i j の個々の大きさより大きく、0.2 ~ 10 マイクロメートル以下、さらには 0.5 ~ 6 マイクロメートル程度が好ましい。なお、格子構造は正方格子構造、長方格子構造、三角格子構造などにしてもよい。基板の反応領域 8 a は 1 mm x 1 mm の大きさとする。反応領域 8 a の大きさは、それより大きくても可であるし、0.5 mm x 0.5 mm の大きさのものを一定間隔で、1 次元または 2 次元に複数個並べたようなものでもよいし、長方形、丸型、三角形、六角形の形状などでもよい。なお、領域 8 i j には金属構造体を配置してもよい。金属構造体は半導体プロセスにて作成することもできる。電子線描画、光リソグラフィ、ドライエッチング、ウェットエッチングなどの手法にて作製できる。金属構造体は、金、銀、アルミ、クロム、チタン、タンゲステン、白金等で、励起光の波長以下の大きさを有する形状であり、直方体、円錐、円柱、三角柱、一部が突起状のものを有する構造、あるいは、これらを 2 個または複数個近接して並べた構造など、また金属微粒子なども使用可能である。たとえば、直径 10 nm から 100 nm 程度の大きさの金の膜状のドットを上記 d x , d y の間隔、たとえば、1 x 1 , 1 x 2 , 1 x 3 , 2 x 3 , 2 x 4 , 3 x 5 , 3 x 6 (マイクロメートル x マイクロメートル) などの間隔の格子状に構築できる。直径 20 nm 程度のドットに、大きさ 20 nm 程度の蛋白や蛍光物質、リンカーをその上部に捕捉すれば、確率的にその大きさからドットあたり 1 分子を捕捉し、格子状に単一分子を配置することが可能になる。また、周知の手法でドットに選択的なリンカーを結合させ、それにオリゴヌクレオチド、たんぱく質などを捕捉することで、ドットに目的の分子を捕捉することが可能であり、これを使うことができる。

【 0 0 2 3 】

d N T P の蛍光標識として種々の蛍光体を使うことができる。たとえば、B o d i p y - F L - 5 1 0 , R 6 G , R O X , B o d i p y - 6 5 0 を使用し、これらそれぞれ異なる 4 種の蛍光体で標識された 3 末端がアリル基で修飾された 4 種の d N T P (3 - O - a l l y l - d G T P - P C - B o d i p y - F L - 5 1 0 , 3 - O - a l l y l - d T T P - P C - R 6 G , 3 - O - a l l y l - d A T P - P C - R O X , 3 - O - a l l y l - d C T P - P C - B o d i p y - 6 5 0) を使用する。これ以外の蛍光体で修飾した d N T P を使用することもできる。

【 0 0 2 4 】

蛍光励起用のレーザー装置 1 0 1 a (A r レーザ、488 nm : B o d i p y - F L - 5 1 0 , R 6 G 励起用) からのレーザー光を / 4 波長板 1 0 2 a を通して円偏光とする。蛍光励起用のレーザー装置 1 0 1 b (H e - N e レーザ、594.1 nm : R O X , B o d i p y - 6 5 0 励起用) からのレーザー光を / 4 波長板 1 0 2 b を通して円偏光とする。両レーザー光をミラー 1 0 4 b とダイクロイックミラー 1 0 4 a (5 2 0 nm 以下を反射) で重ね合わせ、ミラー 5 を介して全反射照明用の石英製プリズム 7 に図のように入射面に垂直に入射し、DNA 分子を捕捉する基板 8 の裏側から照射する。石英製プリズム 7 と基板 8 はマッチングオイル (無蛍光グリセリン等) を介して接触させており、レーザー光はその界面で反射することなく、基板 8 に導入される。基板 8 表面は反応液 (水) で覆われており、その界面にてレーザー光は全反射し、エバネッセント照明となる。これにより、高い S / N で蛍光測定が可能になる。

【 0 0 2 5 】

なお、基板の近傍には、温調器が配置されているが、図では省略した。また、通常観察

のため、プリズム下部よりハロゲン照明，LED照明ができる構造としているが、図ではこれを省略している。

【0026】

また、レーザ装置101a，101bとは別にレーザ装置100（YAGレーザ、355nm）を配置し、ダイクロイックミラー103（400nm以下を反射）でレーザ装置101a，101bのレーザ光と重ね合わせ同軸にして照射できるようにする。本レーザは、取り込まれたdNTP誘導体の蛍光検出後、dNTP誘導体を伸長可能な状態に戻す工程に使用するものである。

【0027】

基板8の上部には、試薬などを流し、反応させるためのフローチャンバ9が構成されている。チャンバには試薬導入口12があり、分注ノズル26を有する分注ユニット25，試薬保管ユニット27，チップボックス28により、目的の試薬液の注入などを行う。試薬保管ユニット27には、試料液容器27a，dNTP誘導体溶液容器27b，27c，27d，27e（27c，d，eは予備）及び洗浄液容器27f等が用意される。チップボックス28内の分注チップを分注ノズル26に取り付け、適当な試薬液を吸引し、チャンバ導入口から基板の反応領域に導入し、反応させる。廃液は廃液チューブ10を介して廃液容器11に排出される。これらは制御PC21により自動的に行われる。

【0028】

フローチャンバは光軸方向に透明材で形成され、蛍光検出される。蛍光13は、自動ピント合わせ装置29で制御される集光レンズ（対物レンズ）14で集められ、フィルタユニット15で必要な波長の蛍光を取り出し、不必要な波長の光を除去するフィルタユニット15を透過する蛍光はダイクロイックミラー32により、波長ごとに異なる比率で分割された光束に分離される。分離された光束をそれぞれ、補助フィルタ17a，17bを通し、その像を結像レンズ18a，18bで、2次元センサカメラ19a，19b（高感度冷却2次元CCDカメラ）に結像させ、検出する。カメラの露光時間の設定、蛍光画像の取り込みタイミングなどの制御は、2次元センサカメラコントローラ20a，20bを介して制御PC21が行う。なお、フィルタユニット15には、レーザ光除去用のノッチフィルタ2種（488nm，594.1nm）、検出する波長帯を透過させるバンドパス干渉フィルタ（透過帯域：510 - 700nm）を組み合わせる。レーザ光除去用のノッチフィルタの概略特性を図3（A）に、バンドパス干渉フィルタ（及び補助フィルタ17a，17b）を図3（B）に、ダイクロイックミラー32を図3（C）に示す。

【0029】

なお、装置は、調整などのため、透過光観察用鏡筒16とTVカメラ23とモニタ24を備えており、ハロゲン照明などで基板8の状態をリアルタイムで観察できるようになっている。

【0030】

図2にあるように、基板8には位置きめマーカ30，31が刻印されている。マーカ30，31は領域8ijの並びと平行に配置され、その間隔が規定されている。そこで、透過照明での観測でマーカを検出することで、領域8ijの位置を計算することができる。

【0031】

本実施例で使用する2次元センサカメラとして、CCDエリアセンサを使用する。種々の画素サイズ、画素数のCCDエリアセンサを使うことができる。たとえば、画素サイズが7.4×7.4マイクロメータで、画素数2048×2048画素の冷却CCDカメラを使用する。なお、2次元センサカメラとしては、CCDエリアセンサの他、C-MOSエリアセンサなどの撮像カメラなどを一般に使うことができる。CCDエリアセンサにも、構造によって、背面照射型、正面照射型があり、どちらも使用できる。また、素子内部に信号の増倍機能を有する電子増倍型CCDカメラなども高感度化を図る上で有効である。また、センサは冷却型が望ましく、-20℃程度以下にすることで、センサの持つダークノイズを低減でき、測定の精度を高めることができる。

【0032】

10

20

30

40

50

反応領域 8 a からの蛍光像を一度に検出してもいいし、分割することもできる。この場合、基板の位置を移動させるための X - Y 移動機構部をステージ下部に配置し、制御 PC で照射位置への移動、光照射、蛍光像検出を制御する。本例では X - Y 移動機構部は図示していない。

【 0 0 3 3 】

(反応の工程)

段階的伸長反応の工程を以下に示す。反応工程は非特許文献 2 および非特許文献 4 を参考に行った。ストレプトアビジンを加えたバッファを導入口 1 2 よりチャンバに導入し、ストレプトアビジンを金属構造体に捕捉されているピオチンに結合させ、ピオチン - アビジン複合体を形成させる。ターゲットであるピオチン修飾一本鎖鋳型 DNA にプライマをハイブリさせ、前記鋳型 DNA - プライマ複合体と大過剰のピオチンを加えたバッファをチャンバへ導入し、ピオチン - アビジン結合を介して、単分子の前記鋳型 DNA - プライマ複合体を格子点に配置された金属構造体に捕捉する。捕捉反応後に、余剰な鋳型 DNA - プライマ複合体およびピオチンを洗浄用バッファにてチャンバより洗い流す。次に、それぞれ異なる 4 種の蛍光体で標識された 3' 末端がアリル基で修飾された 4 種の d N T P (3' - O - a l l y l - d G T P - P C - B o d i p y - F L - 5 1 0 , 3' - O - a l l y l - d T T P - P C - R 6 G , 3' - O - a l l y l - d A T P - P C - R O X , 3' - O - a l l y l - d C T P - P C - B o d i p y - 6 5 0) および Thermo Sequenase ポリメラーゼを加えた Thermo Sequenase Reaction バッファを導入口 1 2 よりチャンバへ導入し、伸長反応を行う。鋳型 DNA - プライマ複合体に取込まれた d N T P は、3' 末端はアリル基で修飾されているため、前記鋳型 DNA - プライマ複合体に 1 塩基以上取込まれることはない。伸長反応後、未反応の各種 d N T P およびポリメラーゼを洗浄用バッファで洗い流し、Ar レーザ光源 1 0 1 a , He - Ne レーザ光源 1 0 1 b のそれぞれの光源から発振するレーザー光を同時にチップに照射する。レーザー照射により鋳型 DNA - プライマ複合体に取込まれた d N T P に標識された蛍光体を励起し、そこから発する蛍光を検出する。鋳型 DNA - プライマ複合体に取込まれた d N T P に標識された蛍光体の蛍光波長を特定することにより、前記 d N T P の塩基種を特定できる。なお、エバネッセント照射であり、反応領域表面近傍のみが励起光照射領域となるため、前記表面以外の領域に存在する蛍光体を励起することは無く、背景光の少ない測定ができる。そのため、上記では、伸長反応後洗浄しているが、蛍光標識 d N T P 濃度が小さい場合、洗浄不要で測定が可能になる場合もある。

【 0 0 3 4 】

次に、YAG レーザ光源 1 0 0 より発振するレーザー光をチップへ照射し、前記複合体に取込まれた d N T P に標識された蛍光体を光切断により取除く。次いで、パラジウムを含んだ溶液を流路内に導入し、パラジウム触媒反応により、前記複合体に取込まれた d N T P の 3' 末端のアリル基を水酸基に変える。前記 3' 末端のアリル基を水酸基に変えることにより、前記鋳型 DNA - プライマ複合体の伸長反応が再開可能となる。前記触媒反応後に、洗浄用バッファにてチャンバを洗浄する。これを繰り返すことにより、捕捉された一本鎖鋳型 DNA の配列を決定する。

【 0 0 3 5 】

本システムでは、反応領域 8 a の複数の領域 8 i j からの発光を同時計測できるため、領域 8 i j にそれぞれ異なる鋳型 DNA を捕捉する場合、前記複数の異なる鋳型 DNA - プライマ複合体に取込まれた d N T P の塩基種を、つまり複数の鋳型 DNA の配列を同時に決定できる。

【 0 0 3 6 】

(蛍光検出と蛍光体識別)

基板上に捕捉された上記蛍光体の蛍光を検出して蛍光体の種類つまりは塩基の種類を識別して強度を測定する方式について説明する。

【 0 0 3 7 】

図 1 では、CCD カメラ 1 9 a , 1 9 b への結像倍率を 1 4 . 8 倍とし、DNA が捕捉

されるべき複数の領域 $8ij$ (格子点) を蛍光計測する。この場合、 $d_x = 2$ マイクロメートルの距離を 4 分割して CCD 画素で検出する。

【0038】

例えば、分散素子を使って波長分散させる場合、格子点の最も近接する間隔は 2 マイクロメートルであり、蛍光発光波長範囲である 500 - 700 nm を、その範囲に分散させると、1 画素あたり 50 nm となる。4 種の蛍光体の各蛍光極大波長は約 510 nm, 約 550 nm, 約 610 nm, 約 650 nm であるため、上記画素では蛍光が重なってしまい、区別して識別することは困難である。さらに、実際の結像画像では、個々の領域 $8ij$ は 1 画素に収まらず、数画素にわたって結像され、重なりがより大きくなるので、識別がさらに困難になる。

10

【0039】

本実施例では、蛍光体分子が捕捉されたドットの像、蛍光体分子個々に存在する位置からの発光像、個々の蛍光発光点の像を分散させることなく結像させるので、そのような制約はなくなる。図 4 に各蛍光体からの蛍光検出の概要を図示する。図 4 (A) は、各蛍光体の蛍光発光スペクトルを、図 4 (B) は、本実施例のフィルタユニット 15, ダイクロイックミラー 32, 補助フィルタ 17a, 17b の通過後の、2 次元 CCD カメラ 19a, 19b に到達する各蛍光体の蛍光スペクトル成分である。図のように、各蛍光体の蛍光成分が、2 次元 CCD カメラ 19a, 19b にそれぞれ異なる比率で到達することになる。2 次元 CCD カメラでは波長方向の情報はなく、輝点の輝度情報のみが得られる。具体的には図 4 (B) に示すスペクトルの積分値が検出光強度として算出される。その結果、図 5 に示すような 2 次元 CCD カメラ 19a, 19b で検出される光強度となり、蛍光体ごとにその比率が異なる。この比率から蛍光体の種類が識別でき、蛍光体の強度つまり蛍光体捕捉されたドットからの蛍光強度は両 CCD カメラの相当する輝点の強度の合計値として算出される。このように、波長ごとに異なる比率で分割するダイクロイックミラーを使用し、ひとつの輝点の蛍光強度を分割し、それらを異なる画素にて検出することで、4 種の蛍光体を識別し、蛍光検出することができる。制御 PC 21 では、各 CCD カメラの画像から、領域 $8ij$ からの蛍光輝点を抽出し、その強度の比を算定し、蛍光輝点ごとの蛍光体の蛍光なのかを判定することで、塩基の種類が識別でき、配列解析ができる。

20

【0040】

なお、使用できる蛍光体は本実施例に示すものに限らず、所定の励起光をつかい、異なる蛍光特性を有する蛍光体の組み合わせであれば同様に使用できる。一般には、蛍光極大波長が各々異なる種類の組み合わせであればよい。

30

【0041】

また、2 次元 CCD カメラは 2 つである必要はなく、1 個でもよい。この場合は分割された像を同じ 2 次元 CCD カメラに結像させる際、画像を横にずらすなどして位置が異なるようにすればよい。

【0042】

本例では、4 種の蛍光体であるが、3 種でも、また 5 種, 6 種以上の組み合わせも可能である。

【0043】

本例では、ダイクロイックミラー 32 として、指定の波長範囲において、透過率が、実質的にほぼ 0 からほぼ 100% までのほぼ線形的な特性を有する 2 色性ミラーを使用するが、ほぼ 10 からほぼ 80% までのほぼ線形的な特性であってもよい。また使用する複数の蛍光体の各蛍光極大波長ごとに透過率・反射率が異なる特性の分割ミラーであってもよい。たとえば、蛍光極大波長ごとに階段状に変化する特性のミラー (図 6 に模式的に図示) でも同様に可能である。対象とする複数の蛍光体の蛍光極大波長または最大ピークを示す波長ごとに異なる比率に分割できる効能を有していればよい。

40

【0044】

なお、蛍光測定では、背景光が存在するが、上記では、背景光成分を差し引いた信号成分での説明である。

50

【0045】

また、石英製プリズム7に対してレーザー光をその入射面に垂直つまり入射角度0度で入射している。これにより、基板とプリズムを一体化して移動させても、対物レンズ観察視野からレーザー照射位置がずれないため、基板とプリズムを一体化することができ、プリズムと基板とのカップリング方式を種々選ぶことが可能になる。オイルカップリングのほか、光学接着も可能になり、装置構成を容易に選ぶことができる。

【0046】

なお、本実施例では、基板の各々の反応領域に結合している蛍光分子が1分子であり、複数の異なる蛍光分子が同じ位置にいないため、本発明のような装置及び方法で効率よく蛍光体種つまりは塩基種が識別でき、しかも高密度な基板に対応できる。

10

【0047】

本実施例によれば、複数の測定対象物を精密配置し、複数の検出画素を備えた複数の検出器の特定画素に各測定対象物をそれぞれ結像させ、検出器ごとの強度比を測定することで、より多い種類の蛍光体を識別し、その蛍光強度を算定することができる。特に検出器である2次元CCDカメラを1台または2台で、標識物である蛍光体3種、または4種以上を識別検出することができる。これにより、装置コストを抑えることができる。1分子ごとに検出することもできる。

【0048】

なお、本実施例では、検出する波長帯域が500 - 700 nmであるが、これに制限されることはない。使用する蛍光体の波長帯域に応じて、波長範囲400 - 600 nm, 400 - 700 nm, 600 - 850 nmなどの範囲など任意に対応できる。たとえばAlexa Fluor 635, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750の蛍光体を使用する場合は、蛍光発光波長範囲が630 - 820 nmであり、ダイクロイックミラーの指定波長域を650 - 780 nmとする。通常、指定波長域の範囲は、400 - 900 nmである。なお、ダイクロイックミラーの特性は、使用する蛍光体種の中で、一番短い蛍光極大波長を有する蛍光体種の蛍光極大波長付近から、一番長い蛍光極大波長を有する蛍光体種の蛍光極大波長付近までの範囲で調整すればよい。厳密に蛍光極大波長間とする必要はない。蛍光体種ごとの蛍光極大波長付近でそれぞれ異なる比率に分割できればよい。また、特定の蛍光体を受光するときの蛍光強度比が、ほかの蛍光体の蛍光強度比と異なることで、複数の蛍光体を識別することができる。

20

30

【0049】

実施例では、オリゴヌクレオチド等の生体関連分子が捕捉される基板に蛍光測定用の光を照射し、生じる蛍光を集光し、2次元検出器に結像させ、2次元検出器にて蛍光検出する。基板は実質的に透明な基板であり、分子が捕捉されうる領域が複数設けられ、それらが格子構造の格子点位置に配置されている。該基板上で必要な試薬や試料などを反応させ、全反射照明のための光励起用の光源と、照射光学系により該基板上の蛍光体を励起し、発する蛍光を蛍光集光系で集光し、その光束を指定の波長範囲において実質的に各々の波長で異なる比率で分割する分光部により分割し、結像光学系で各々検出器に結像し、複数の検出画素を備えた検出器により検出する。さらにデータ処理部では、分割された蛍光像の相対する輝点の強度を算定し、その強度比から蛍光体種を判定する。これにより、簡便に多種の蛍光体種を識別検出することができる。

40

【0050】

実施例では、基板に金属構造物を形成している。この場合、構造物の光ルミネセンス、光散乱を検出することで、構造物の空間位置を検出することができ、位置の基準マーカとして活用でき、効果的である。

【0051】

格子点位置の領域(スポット, 格子点の領域)の大きさは100 nm径以下にする。少なくとも、隣接する最短の格子点の間隔の1/3以下が好ましい。これにより、光学的に解像しやすくなり、識別が容易になる。格子点位置の捕捉のための領域を10 nm ~ 30 nm程度にすれば、単一分子の捕捉に有効である。

50

【 0 0 5 2 】

また、本例では、一定間隔の格子状に捕捉領域を配置する基板を使用する。格子状に配置することで、透過像と反射像内の相対応する輝点の識別が容易になる。格子状に捕捉領域を配置する基板を使わない場合にも対応する。分子をランダムに分散させて捕捉する場合など、捕捉位置が、ランダムに分散する場合は、両方の画像を比較し、パターン解析し、または基準マーカを参照して、相対応する輝点を判定すればよい、これによっても同様の効果が得られる。

【 0 0 5 3 】

また、本例では、一定間隔の格子状に配置した捕捉領域間隔を4画素×4画素で結像している。発光点の大きさは3画素×3画素以内に結像され、強度を算定できる。つまり、各領域からの蛍光をダイクロイックミラーによる反射光像と透過光像に分け、それぞれ3×3画素以内にて結像しており、3×3×2=18画素以内にて個々の領域にある蛍光体種を判定することができる。分子をランダムに分散させて捕捉する場合も、個々の分子を18画素以下にて識別することができる。これにより、高密度に捕捉した分子を高効率で検出識別することができる。発光点を4画素×4画素で強度算定してもよい。

【 0 0 5 4 】

また、上記はCCDの画素数を1発光輝点あたり4×4画素としているが、5×5画素、5×4画素、4×3、3×3画素などに調整することが可能である。これらの画素数で検出しても高密度に捕捉した分子を高効率で検出識別することができる。

【 実施例 2 】

【 0 0 5 5 】

図7は本発明の第2の実施例の構成を示す。本実施例では、4種の蛍光体を用いた段階的伸長反応によるDNAシーケンシングを行う。全体の構成等は図1と同等である。

【 0 0 5 6 】

dNTPの蛍光標識としてAlexa Fluor 488, Cy3, Cy5, Cy5.5を用いる。蛍光体は、ほかの種々の蛍光体を使用することも可能である。また、1蛍光体で標識された4種のdNTPを使うことも可能である。蛍光励起用のレーザ装置101c(固体レーザ、505nm: Alexa Fluor 488, Cy3励起用)からのレーザ光を/4波長板102cを通して円偏光とする。蛍光励起用のレーザ装置101d(半導体レーザ、635nm: Cy5, Cy5.5励起用)からのレーザ光を/4波長板102dを通して円偏光とする。両レーザ光をミラー104dとダイクロイックミラー104c(520nm以下を反射)で重ね合わせ、ミラー5を介して全反射照明用の石英製プリズム7に図のように入射面に垂直に入射し、DNA分子を捕捉する基板8の裏側から照射する。石英製プリズム7と基板8はマッチングオイル(無蛍光グリセリン等)を介して接触させており、レーザ光はその界面で反射することなく、基板8に導入される。基板8表面は反応液(水)で覆われており、その界面にてレーザ光は全反射し、エバネッセント照明となる。これにより、高いS/Nで蛍光測定が可能になる。

【 0 0 5 7 】

本実施例では、フィルタユニット15に、レーザ光除去用のノッチフィルタ2種(505nm, 635-642nm)、検出する波長体を透過させるバンドパス干渉フィルタ(透過帯域: 510-700nm)を用いる以外は図1と同じものを使用する。

【 0 0 5 8 】

実際の計測手順に従って配列決定法を説明する。モデル試料としてM13-DNA断片を使用する。末端を定法に従い、M13-DNA断片の末端をピオチン化する。ピオチン化DNA溶液を図7の試料液容器27aに、Alexa Fluor 488で標識されたケージドdATP, Cy3で標識されたケージドdCTP, Cy5で標識されたケージドdGTP, Cy5.5で標識されたケージドdTTP溶液(ポリメラーゼ含む)を混合して容器27bに保持する。なお、標識されたケージドdNTPはヌクレオチドに2-ニトロベンジル基が結合するケージド化合物であり、ポリメラーゼにより、相補鎖として取り込まれるが、相補鎖合成反応で連続的に取り込まれる活性が抑えられている。そのため、

1塩基分伸長して反応がとまる。しかし、ついで、360nm以下の紫外線を照射すると、ケージド物質(2-ニトロベンジル基)が遊離し、ヌクレオチド本来の活性が生じ、次のdNTPの合成を起こすことができる。

【0059】

分注ユニット25により、フローチャンバ内にテンプレートとなるビオチン化DNAを導入し、基板と反応させる。洗浄後、オリゴプライマを導入してビオチン化DNAにプライマをハイブリさせる。これにより相補鎖伸長反応を行う。まず洗浄後、標識ケージドdNTP溶液を導入する。プライマ結合位置の次のテンプレートの塩基によって、取り込まれる塩基が決定される。レーザー光101c(505nm), 101d(635nm)を照射し、2次元センサカメラにて、蛍光測定を行う。実施例1と同様に蛍光の有無, 蛍光波長の違いにより、取り込まれた塩基が判断できる。ついで、レーザー光100(355nm)を照射し、dATPの活性を戻す。この手順を、複数サイクル行うことで、塩基配列が決定できる。

10

【0060】

DNAポリメラーゼの基質として鋳型DNAに取り込まれてDNA鎖伸長反応を保護基の存在により停止することができかつ検出され得る標識を持つ4種のdNTPの誘導体であり、なんらかの手段により該dNTP誘導体を伸長可能な状態に戻すことのできる試薬として本例では、蛍光標識ケージドdNTPを使用するが、蛍光体とヌクレオチドをジスルフィド結合により結合するdNTPの誘導体などでも同様に実施可能である。この場合、蛍光体の存在で、伸長が停止し、Tris[2-carboxyethyl]phosphine試薬などでジスルフィド結合を化学的に解離させて伸長可能な状態に戻すことが可能である。

20

【0061】

本実施例でも実施例1とほぼ同様の効果がある。

【実施例3】

【0062】

蛍光体として別の組み合わせの例を示す。

【0063】

蛍光体として、Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647の5種を使うことで、実施例1と同様の操作、図3(C)と同じダイクロイックミラーを使用することで、蛍光強度の比率から蛍光体種を5種識別することが容易にできる。

30

【実施例4】

【0064】

センサ3個を使った場合の装置を示す。適用例を示す。

【0065】

図8に集光した蛍光を分離する部分の装置構成を示す。ダイクロイックミラー300, 301を2個使用し、それぞれ図のように配置して蛍光を所定の比率で分割し、分割蛍光束を結像レンズ18c, 18d, 18eで結像させ、その像を2次元センサカメラ19c, 19d, 19e(高感度冷却2次元CCDカメラ)で各々検出する。制御方式は実施例1と同様である。

40

【0066】

図9は、この場合のダイクロイックミラー300, 301の透過(反射)特性図である。このように、3種のカメラに対して、各波長ごとに異なる比率の組み合わせとすることで、500nmから700nmの範囲に蛍光極大波長を有する蛍光体を識別して検出することができる。本例では、実施例3での組み合わせの蛍光体を識別できる。

【0067】

なお、本例では、蛍光波長帯域が500-700nmの場合であるが、これに制限されることはない。実施例1, 2を含めて、400-600nmの範囲, 400-700nmの範囲, 600-850nmの範囲など任意に対応できる。例えば、Alexa Flu

50

or 350などの蛍光波長が400 - 500 nmになる蛍光体をつかい、ダイクロイックミラーの指定波長域を400 - 700 nmとすることで、より広い範囲の蛍光体を同様に使うことができる。Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750の蛍光体をつかう場合は、蛍光波長帯域が630 - 820 nmであり、ダイクロイックミラーの指定波長域を650 - 780 nmとする。通常、指定波長域の範囲は、400 - 900 nmである。

【実施例5】

【0068】

図10は基板とエバネッセント照明のためのプリズムとの接合部の別の構造を示す。図1と同じく、石英製プリズム7に基板8をカップリングする。カップリング材として透明な弾性体、たとえば、PDMS樹脂201（屈折率=1.42、内部透過率=0.966/厚み2mm材）を介して接合する。PDMS樹脂の屈折率はガラスに近く、また透明であるため、基板とプリズムで挟み押し付けることで光学的に接着する。測定中、基板内の測定視野の移動は、プリズム込みでXYステージにて行うことができる。

10

【0069】

図11、図12は、基板とエバネッセント照明のためのプリズムとの接合部の別の構造を示す。

【0070】

測定基板200は専用のホルダ203に埋め込まれて保持される。この下部（反応表面側、格子構造形成側）にフローチャンバ204が構成される。フローチャンバ204はPDMSで形成し、ホルダ203および測定基板200と接着され、測定基板200の反応領域に試薬、洗浄液などをフローできるようにしている。これをXYステージ209（図12に図示）に保持された基板保持具205に接触させる。フローチャンバ204の流路208と貫通孔206の位置をそろえて配置する。貫通孔206は外部のフローシステムと連結される。また、基板保持具205は、その中央に大きな開口部207を有しており、集光レンズ14と測定基板200とが近接でき、蛍光を高効率で集光できる。

20

【0071】

測定基板200の裏面（図では上側）のホルダ203内の窪み202にマッチングオイルを保持し、プリズム7を配置する。窪み202にマッチングオイルに替えてPDMS樹脂を埋めることでマッチングすることでもよい。

30

【0072】

プリズム7はプリズムホルダ210に捕捉されており、基板との着脱機能を有しており、エバネッセント照明する場合に基板と接着する。

【0073】

なお、プリズムをアクリルなどで作成し、それと基板とが一体化した状態のものを使うこともできる。

【0074】

また図の構造を、上下反転した形状でも同様に実施できる。

【実施例6】

【0075】

反応基板の別の実施例を示す。本実施例での基板60の構造を示す。基板60は、反応領域60aを有し、その内部にDNAや蛋白などを捕捉する領域60ijがピッチdsで複数形成されており、さらに複数の60ijの周りを光学的に不透明なマスク60bで覆う構造とする。マスク材料としては、アルミニウム、クロムなどの金属、炭化シリコンなどが適用でき、蒸着などで、薄膜化する。領域60ijの個々の大きさは直径100nm以下である。この開口をマスク60bのなかに作成する方法としては、プロジェクション法での蒸着（蒸着源と基板との間に適当なマスクを配置して蒸着する）、電子ビームリソグラフィ、フォトリソグラフィによる直接描画によって作成できる。ドライエッチング、ウェットエッチングを用いても良い。

40

【0076】

50

微小開口を有する金属薄膜の基板の場合は、生体分子は開口中に捕捉する。この場合、生体分子周囲の試料液のラマン散乱光と生体分子近傍の金属構造物の光ルミネセンス・光散乱を検出することで、構造物の空間位置を検出することができ、位置の基準マーカとして活用できる。

【0077】

開口中に金属構造体を作成してもよい。実施例1と同様に位置マーカ61, 62, 63を配置することもでき、実施例1と同様の効果が期待できる。

【0078】

本例によっても、前記実施例1等と同様の効果が得られる。また、反応領域60ij以外はマスクされているため、不要な迷光、蛍光が低減でき、より高感度に測定することができるようになる。

10

【実施例7】

【0079】

6種類の蛍光体をラベルとして使用する場合について説明する。反応に関する機構部は前記実施例と同等であるため、主に光学測定系について説明する。

【0080】

図14は、本発明の蛍光分析方法を使った装置の構成図である。反応部、レーザ照射機構部対物レンズなどは実施例1、図1と同様である。

【0081】

基板のドットの構成も同様に本例では、領域8ij同士の間隔dxを2マイクロメートル、間隔dyは2マイクロメートル、領域8ijのドット径は20nmとし、ドットに単一分子状態の測定試料を捕捉する。

20

【0082】

標識用の蛍光体としてQdot525, Qdot565, Qdot605, Qdot625, Qdot655, Qdot705の6種類を使用する。これらが個々に標識された抗体を用意し、反応させることで、格子上に配置されたドット部に個々の蛍光体を捕捉する。

【0083】

蛍光励起用のレーザ装置101e(半導体レーザ、405nm)からのレーザ光を4波長板102eを通して円偏光とする。ミラー104e, 5を介して全反射照明用の石英製プリズム7に図のように入射面に垂直に入射し、蛍光体が捕捉された基板8の裏側から照射する。

30

【0084】

石英製プリズム7と基板8は接着剤にて光学接着しており、レーザ光はその界面で反射することなく、基板8部に導入される。基板8表面は反応液(水)で覆われており、その界面にてレーザ光は全反射し、エバネッセント場照明となる。これにより、基板8表面に捕捉される蛍光体を高いS/Nで測定することが可能になる。なお、基板8の端面がプリズム形状に加工されている基板を使用すれば、石英製プリズム7を使う必要がなく、構成がより簡便になる。

【0085】

40

基板8の上部には、試薬などを含む反応液などをフローまたは保持するためのフローチャンバ9が配置されているが、フローチャンバは光軸方向に透明材で形成されており、基板表面から発する蛍光13は、チャンバ9を通して集光レンズ(対物レンズ)14で集められ、フィルタユニット406を通して、分割結像光学系に導入される。フィルタユニット406は、レーザ装置101eからのレーザ光を遮断するための短波長カットフィルタ(450nm以下の波長帯の光をカット。透過率0.000001以下。480nm以上の波長帯域の透過率90%以上)と、検出する蛍光波長帯を設定し、透過させるバンドパス干渉フィルタ(透過帯域: 500-700nm、透過率90%以上)を組み合わせから構成される。短波長カットフィルタに替えて、405nmをカットするノッチフィルタ(ブロッキング波長450nm±4nm、透過率0.000001以下)でもよい。

50

【 0 0 8 6 】

分割結像光学系では、まず、分割のためのダイクロイックミラー 4 0 0 により、波長ごとに異なる比率で透過光と反射光に分割する。分割された光束をそれぞれ、反射光はミラー 4 0 1 で反射し、結像レンズ 4 0 7 に指定の角度で導く。透過光はミラー 4 0 2 と 4 0 3 で折り曲げ、同じ結像レンズ 4 0 7 に別の指定の角度で導く。両光束は異なる角度で結像レンズに入射することで、2次元センサカメラ 4 0 8 (高感度冷却2次元CCDカメラ)に対して、それぞれの画像をずらして結像させる。補助フィルタ 4 0 4 , 4 0 5 は迷光除去のため、バンドパス干渉フィルタ(透過帯域: 5 0 0 - 7 0 0 nm、透過率90%以上)を使う。場合により、補助フィルタは使わなくてもよい。2次元センサカメラ 4 0 8 の画像は2次元センサカメラコントローラ 4 0 9 を介して制御PC 2 1 で収集し解析を行う。なお、分割透過光と分割反射光の光路の長さは、なるべく同じになっているが、必ずしも同じでなくてもかまわない。図では結像倍率は、両光束で同じであるが、異なるようにしてもよい。同じ輝点の分割透過光像と分割反射光像であることが判断されれば解析可能である。

10

【 0 0 8 7 】

図 1 5 に本例で使用する蛍光体の特性とダイクロイックミラーの特性図を示す。Q d o t 5 2 5 , Q d o t 5 6 5 , Q d o t 6 0 5 , Q d o t 6 2 5 , Q d o t 6 5 5 , Q d o t 7 0 5 の 6 種類の蛍光スペクトル(規格化済)と、ダイクロイックミラーの透過特性を示す。

【 0 0 8 8 】

図 1 6 に本例での画像取得の説明模式図を示す。ダイクロイックミラー 4 0 0 により反射される光の波長成分は図 1 6 (A) 右に記される「分割された反射光束の蛍光スペクトル」図になり、ダイクロイックミラー 4 0 0 を透過する光の波長成分は図 1 6 (A) 左に記される「分割された透過光束の蛍光スペクトル」図になる。実施例 1 の場合と同様、各波長ごとに異なる比率で透過光束と反射光束に分割される。本例では、ダイクロイックミラーの特性は、波長に対してほぼリニアに反射・透過特性が変わる。なお、フィルタユニット 4 0 6 の透過帯域が 5 0 0 - 7 0 0 nm のため、図の表示波長帯域を 5 0 0 - 7 0 0 nm としている。

20

【 0 0 8 9 】

反射光と透過光を異なる角度で結像レンズ 4 0 7 に入射させることで、それぞれの蛍光像を同じ2次元センサカメラ 4 0 8 の異なる位置に結像され、デュアル・ビュー状態で蛍光像を検出することができる。基板上的格子点位置の各領域から生じる蛍光の結像状態を図 1 6 (A) 上図に模式的に示す。図 1 6 (B) には格子点に並んだ各蛍光体の捕捉領域から発する輝点の蛍光像の分割透過光強度像(左図)と分割反射光強度像(右図)の一部を図示する。図の丸枠で示された輝点像が同じ輝点からの分割透過光像と分割反射光像に相当する。蛍光体の捕捉状態によって、格子点に並んだ捕捉領域のすべてから蛍光が観察されるわけではなく、一部輝点がない箇所も存在する。

30

【 0 0 9 0 】

図 1 6 (B) の輝点の蛍光強度比算定結果の一例を図 1 7 に示す。各蛍光体種ごとの代表的な輝点について、分割透過光強度と分割反射光強度の合計に対する分割透過光強度の比と分割反射光強度の比が示されている。それぞれの点は、図に記載の種類の蛍光体種に相当する。各蛍光体が異なる比率で検出され、それらを区別して検出することができる。本例により、1個の2次元センサカメラで6種の蛍光体を識別することが可能であり、多種類の蛍光体を同時に簡便に識別検出することができる。

40

【 0 0 9 1 】

本例によれば、抗原、抗体を測定対象にした蛋白チップ、DNAチップ、抗原検査装置などにも適用できる。同時に6種類のラベルを使うことができるので、6種類の標識抗体などを準備し、同時に反応させ、反応結果を同時に測定でき、比率で識別し、各標識抗体ごとの強度を算定することができる。単一分子の測定だけでなく、定量も可能になる。なお、基板に捕捉する抗体、抗原の位置は格子状でなくても良いので、種々のチップに対応

50

することができる。もちろん標識は6種に限らず、3種類以上、4種類以上で適用できる。

【0092】

また、本例を細胞染色、細胞チップ等に適用することもできる。例えば、細胞表面抗原に特異的に結合する抗体を準備し、それぞれ蛍光体で標識する。6種類の標識抗体を同時に反応させ、同時に蛍光測定することで、6種の抗体の分布、濃度などを測定することもできる。表面抗原だけでなく、細胞質内のマーカ、膜マーカ、DNA、RNAなどを同時に検出することができる。

【実施例8】

【0093】

格子点に並んだ各蛍光体の捕捉領域から発する輝点の蛍光像の分割透過光強度像と分割反射光強度像を図16(B)とは異なる状態で結像し、解析する例について説明する。

【0094】

図18は、画像分割検出方式の説明模式図である。基板上的格子状の捕捉領域の間隔を、 d_x を3マイクロメータ、間隔 d_y を2マイクロメータ、捕捉領域のドット径を20nmとし、ドットに単一分子状態の測定試料を捕捉する場合について説明する。2次元センサカメラ(高感度冷却2次元CCDカメラ)に画素サイズ 6.45×6.45 マイクロメータ、画素数、横(x方向):1392画素、縦(y方向):1040画素を使用する。集光光学系、結像光学系の総合倍率を12.9倍とすることで、捕捉領域の間隔を、 d_x 方向に6画素、 d_y 方向に4画素とする。

【0095】

図14または図16において、分割透過光束と分割反射光束の結像レンズへの入射角度をより浅くすることで、対応する輝点の像を図18(A)のように隣接させることもできる。分割透過光像と分割反射光像を d_x 方向にわずかにずらして結像させる。これにより、輝点の対応がより明確になるため、解析が容易になる。透過光像と反射光像が重なるため、通常は蛍光輝点の計測が困難であるが、本例では、蛍光輝点が格子状に整列しており、重なる画像の輝点をもう一方の輝点間隔の中間部分に結像するように調整することで、測定が可能になる。本例では、基板の捕捉領域の間隔を、 d_x 方向が d_y 方向にくらべて長い長方形状態にし、 d_x 方向に透過像と反射像を格子の約半ピッチ程度ずらすことで、輝点同士の重なりが抑えられ効率よく検出識別することができる。

【0096】

本実施例では、個々の輝点を結像した蛍光像の大きさは、分割透過光像と分割反射光像それぞれ、像のボケなどの影響を含んで3(d_x 方向) \times 3(d_y 方向)画素以内の大きさになる。これにより、個々の輝点を $3 \times 3 \times 2 = 18$ 画素以内にて検出し、蛍光体種を判定することができる。高密度基板を効率よく検出解析することができる。また、個々の輝点を $4 \times 3 \times 2 = 24$ 画素以内にて強度算定してもよい。

【0097】

また、上記例では、 d_y 方向のCCDの画素数を1発光輝点あたり4画素としているが、5画素、3画素などに調整することが可能である。 d_x 方向も6画素に限定されない。これらの画素数でも高密度基板を効率よく検出解析することができる。

【実施例9】

【0098】

実施例1の方式での任意の領域 8_{ij} について、測定の一例を模式図で説明する。工程の概要は、(i)伸長反応 (ii)洗浄 (iii)蛍光測定 (iv)蛍光体除去 + 3 末端回復 (v)洗浄を繰り返す。(iii)蛍光測定と(v)洗浄時の測定の模式図を図19に示す。経過時間は伸長反応、蛍光体除去 + 3 末端回復等の部分を除外しての表示であり、相対値を示す。図19(A)は格子状に並んだ同一捕捉領域からの蛍光の透過光強度と反射光強度の時間変化を示す。図19(B)は透過光強度と(透過光強度と反射光強度の合計値)との比率(分割比率)の時間変化である。蛍光体が捕捉されない場合、比率の算定は意味がないので、比透過光強度と反射光強度の合計値が一定以上の時に

10

20

30

40

50

ついて比率を算定する。比率の大きさが、各工程で捕捉されるそれぞれの蛍光体ごとに異なるので、データ処理部で、タイミング、各検出強度、分割比率、ノイズ幅などを解析することで、図のように配列が決定できる。あらかじめ格子点位置を識別することで、または測定後に輝点位置情報を持って位置を識別することで、反応輝点・分子の全箇所の配列を判定することができる。

【0099】

なお、本例と同様の方式でDNAのリアルタイムシーケンスを行うことも可能である。伸長時に発光する蛍光の透過像強度と反射光強度を同時に連続的に測定できるので、上記と同様にその比率から塩基種を連続的に判定できる。

【実施例10】

【0100】

蛍光体として別の組み合わせの例を示す。

【0101】

共鳴による励起エネルギーの移動（いわゆるFRET）を利用した蛍光測定にも適用できる。例えば、ドナーとして、蛍光波長525nmのQdot525などを使い、アクセプタとしてAlexa Fluor546, Alexa Fluor594, Alexa Fluor633, Alexa Fluor660の4種の蛍光体を使うことも可能である。これら5種の蛍光体も、前記実施例と同様に、その蛍光強度比率でそれぞれ識別弁別することができる。FRETの場合は、実施例1などで記載した反応領域の個々のドット（領域8ijなど）にQdot標識の試料分子を捕捉し、それに対して4種の蛍光体または、蛍光体標識特異的認識分子（抗体、DNAなど）を個々に反応させる。前記実施例に記載の装置により、蛍光強度検出、各々の検出蛍光強度比率を算定することで、蛍光体の種類を識別することができる。個々の領域の状態は、何も捕捉されていないドット、Qdotのみ捕捉されたドット、Qdot+Alexa Fluor546が捕捉されたドット、Qdot+Alexa Fluor594が捕捉されたドット、Qdot+Alexa Fluor633が捕捉されたドット、Qdot+Alexa Fluor660が捕捉されたドット、になる。Qdotが捕捉されたドットからはその蛍光が検出されるが、蛍光強度の比率が異なっており、また、励起エネルギーの移動によりQdotからの蛍光強度が低下することにより、蛍光強度比率により、上記組み合わせの状態を識別することが可能である。

【0102】

本例では、FRET現象を利用した蛍光測定系でも適用可能である。この場合、個々の領域・ドットに存在する蛍光体は1分子でなく、複数分子での計測にも対応可能である。

【実施例11】

【0103】

ダイクロイックミラー32,400の透過率（反射率）特性を検出帯域において非線形に変化させた例を示す。装置構成は、図1同等、用いる蛍光体および蛍光励起用のレーザー装置101c,101dは実施例2と同じである。

【0104】

一般に、ある座標（本実施例であれば、格子点上に配置された金属構造体の座標）の蛍光体の存在を検出するには、上記座標における2次元センサカメラの輝度が所定の閾値よりも大きい必要がある。前記実施例のように、輝点が単一蛍光体の場合は、輝度が上記閾値を超える条件に加えて、一段階消光（リアルタイムシーケンスなら一段階解離）を示すことが単一蛍光体由来輝点の選別条件となる。蛍光体が無いときの2次元センサカメラの輝度（背景輝度）は、ショットノイズや読み出しノイズ等によって空間的かつ時間的にばらつく。そのため、たまたま閾値を超えた背景輝度の輝点が蛍光体として選別されないように、上記閾値は十分大きく設定する。しかし、輝度が閾値を下回る微弱な蛍光体輝点は、見逃されてしまう。特に、蛍光強度をダイクロイックミラーで分割する場合、画素あたりの蛍光強度が小さくなるため、輝度が閾値を下回る微弱な蛍光体輝点が存在する。本発明において、例えば、透過率が極端に大きな蛍光体種は、透過側の画素で蛍光体輝点とし

10

20

30

40

50

て選別されるが、反射側の画素では、輝度が閾値を下回るために蛍光体輝点と選別されない場合がある。このような場合は、透過側の輝点が選別されている画素に対応する反射側の画素の輝度を取得することで、強度比を算出することができる。ここで強度比とは、(透過側の蛍光強度) / (透過側蛍光強度 + 反射側蛍光強度) × 100%で与えられるとする。ところが、例えば、強度比が50%付近の蛍光種の場合、分割後の蛍光強度は半分になるので、微弱な蛍光体種は、どちらの画素でも蛍光体輝点として選別されない可能性がある。微弱な蛍光体種とは、例えば、蛍光体の励起波長が、励起用レーザの波長から離れて励起効率が低いものである。

【0105】

本実施例では、Alexa Fluor 488とCy3励起用に505nmで発振する固体レーザを、Cy5とCy5.5励起用に635nmで発振する半導体レーザを用いている。図20(A)に励起用レーザの波長と各蛍光体の励起スペクトル、図20(B)に蛍光スペクトルを示す。Cy3とCy5.5は、Alexa Fluor 488とCy5に比べて、レーザ励起波長から離れている。そのため、Cy3とCy5.5の励起効率が低くなり、蛍光強度はAlexa Fluor 488とCy5に比べて微弱になる可能性がある。特にCy3またはCy5.5の強度比が50%付近の場合、前述の通り、微弱な蛍光体輝点の中には、分割後のどちらの画素でも輝点として選別されないものが存在し得る。

10

【0106】

そこで本実施例では、図21(A)または(B)に示すような非線形な透過率特性を持ったダイクロイックミラー32を設計する。非線形な透過率特性を持つとは、透過率の波長に対する変化率(図21の透過率曲線の傾き)が異なる波長帯域を含むような特性を持つことをいう。たとえば、(A)のように変化率がほぼ一定な領域を含むように階段状に透過率を変化させても良く、(B)のように変化率が異なる波長帯域を混在させて傾斜状に透過率を変化させても良い。いずれの特性も、Cy3の蛍光極大波長(567nm)を含む発光体帯域で透過率を0%に、Cy5.5の蛍光極大波長(696nm)を含む発光体帯域で透過率を100%にする点に特徴がある。これにより、Cy3やCy5.5のように励起効率が低い蛍光体種を反射または励起側で優先的に検出することができる。

20

【0107】

尚、上記ではダイクロイックミラー32の透過率特性のみを示したが、反射率特性は、 $\text{反射率}(\%) = (100\% - (\text{透過率}(\%)))$ であり、ダイクロイックミラーによる反射光と透過光の強度の和は、ほぼもとの光強度と同じである。上記は、ダイクロイックミラーに関する限り、他の実施例においても同様である。

30

【0108】

本実施例では、フィルタユニット15に、レーザ光除去用のノッチフィルタ2種(505nm、635-642nm)、検出する波長帯を透過させるバンドパス干渉フィルタ(透過帯域: 510-730nm)を用いる。

【0109】

図22に各蛍光体からの蛍光検出の概要を示す。図22(A)は、図20(B)に示す蛍光スペクトルを有する各蛍光体を、本実施例のフィルタユニット15、ダイクロイックミラー32、補助フィルタ17a、17bに通過させた後の、2次元センサカメラ19a、19bに到達する蛍光スペクトル成分である。図22(B)は、(A)に示すスペクトルの積分値から透過側および反射側の2次元センサカメラの検出蛍光強度を用いて強度比を算出した結果である。Cy3の強度比は0%に近く、Cy5.5の強度比は100%に近い。そのため、微弱な蛍光体分子の見逃し率を低減できる。また、4種の蛍光体とも異なる強度比になるように、ダイクロイックミラー32の特性を設計しているため、強度比の違いによる蛍光体種識別が可能である。ここでは、4種の蛍光体の強度比を0-100%で均等に割り振るため、Alexa Fluor 488の強度比を33%付近に、Cy5の強度比を66%付近にした。強度比を均等に割り振るとは、4色蛍光体であれば、 $100\% / ((4 - 1)\text{種}) = 33\% / \text{種}$ より、どの蛍光体種の強度比もおおよそ33%以上離れる

40

50

ことである。蛍光単分子輝点の強度比はばらつくため、強度比が極端に近い蛍光体種は識別精度が低下する。強度比を均等に割り振ることで、特定の蛍光体種の識別精度低下を抑制する効果がある。上記は、Alexa Fluor 488の強度比を66%付近に、Cy5の強度比を33%付近にしても同様の効果がある。また、Cy3の強度比を100%に近く、Cy5.5の強度比を0%に近く設計しても良い。以下、理想的な強度比の割り振り方法を記す。

【0110】

蛍光体 n 種を 0 - 100% の強度比の間で均等に割り振る場合、対応する励起用レーザーの波長と吸収極大波長の差が $n - 2m$ と $n - 2m - 1$ 番目に小さい蛍光体 F_i の強度比 R_i (%) は、

【0111】

【数1】

$$R_i = \frac{100\%}{n-1} \times (n-m-1) \quad \dots(\text{数1})$$

【0112】

または、

【0113】

【数2】

$$R_i = \frac{100\%}{n-1} \times m \quad \dots(\text{数2})$$

(m は0以上の整数, i は1から n までの整数)

【0114】

となるようにする。ここで、対応する励起用レーザーとは、上記Alexa Fluor 488とCy3の場合は、505nmで発振する固体レーザーであり、Cy5とCy5.5の場合は、635nmで発振する半導体レーザーである。上記(数1)と(数2)の割り振り方法をAlexa Fluor 488, Cy3, Cy5, Cy5.5の例に適用する。Cy3とCy5.5は、4番目と3番目にレーザーから励起波長が近いので、 $n = 4$, $k = 0$ を(数1)と(数2)に代入して、~100%または0%を割り振る。また、2番目と1番目に近いAlexa Fluor 488とCy5は $n = 4$, $k = 1$ を代入して、33%と66%を割り振る。以上より、4種蛍光体に強度比を均等に割り振ることができる。

【0115】

上記強度比を与えるダイクロイックミラーの透過率特性 $D(\quad)$ は、1から n までの全ての i に対して、

【0116】

【数3】

$$\int F_i(\lambda) D(\lambda) \prod_k f_k(\lambda) d\lambda = R_i / 100\% \quad \dots(\text{数3})$$

【0117】

を満たすように設計する。ここで、 $F_i(\quad)$ は蛍光体 F_i の蛍光スペクトル、 $f_k(\quad)$ は、蛍光体からの発光が検出器に到達するまでに透過するフィルタ等光学部品の透過率特性である。実際には、蛍光体の蛍光スペクトルは重なりを持つため、全ての蛍光体 F_i に対して、(数3)をみたす $D(\quad)$ を設計することは困難である。そこで、本例では可能な限り強度比 R_i に近くなるように $D(\quad)$ を設計した。上記、Alexa Fluor 488, Cy3, Cy5, Cy5.5では、フィルタユニット15のレーザー光除去用のノッチフィルタ2種(505nm, 635-642nm)と検出する波長体を透過させるバンドパス干渉フィルタ(透過帯域: 510-730nm)の透過率特性を $f_k(\quad)$ に代

10

20

30

40

50

入して、ダイクロイックミラーの透過率特性 $D(\lambda)$ を (数3) を満たすように近づけて求めた。

【実施例12】

【0118】

一般的に、FRET現象を利用した蛍光測定において、FRET未発生時は、ドナーの発光のみが検出され、FRET発生時は、ドナーおよびアクセプタの蛍光が検出される。FRET発生時、ドナーの蛍光強度は低下し、その蛍光強度の低下量は、(FRET未発生時のドナー蛍光強度) × (FRET効率) となる。そこで、ドナーの蛍光強度の変化からFRET発生の有無を知ること、アクセプタの蛍光の発生を識別することができ、蛍光強度をより正確に検出できるようになる。

10

【0119】

本実施例では、ドナーであるQdotの蛍光強度がアクセプタより数倍大きく、FRET効率が低い場合の強度比を利用した蛍光体識別方法を示す。ドナーとして用いるQdotの蛍光強度が強く、FRET効率が低い場合、FRET発生時でもQdotが大きな蛍光強度を有するため、アクセプタ蛍光体の蛍光はQdotの蛍光に埋もれてしまう。Qdot蛍光の影響が大きくなると、アクセプタの強度比がQdotの強度比に支配されるため、すべてのアクセプタの強度比がQdot強度比に漸近する。

【0120】

例として、ドナーにQdot525を、アクセプタにAlexa Fluor546, Alexa Fluor594, Alexa Fluor633, Alexa Fluor660を用いたときのFRET効率と強度比の関係を図23に示す。Alexa Fluorの蛍光強度は規格化して同一にしており、Qdot525の強度はAlexa Fluorの10倍としている。図14に示す構成を用いて、レーザ装置101eに405nmで発振する半導体レーザを、レーザ装置100には何も使用していない。フィルタユニット406には510-710nmの光を透過させるバンドパスフィルタを、ダイクロイックミラー400には、図15(B)の特性を示すダイクロイックミラーを用いた。図23に示すように、Qdot525の蛍光強度がAlexa Fluorに対して10倍大きい条件下では、FRET効率が低下するに従い全てのAlexa Fluorの強度比がQdot525の強度比~5%に漸近する。低FRET効率領域では、強度比の違いによるAlexa Fluor種の識別は困難である。

20

30

【0121】

図24(A)に本実施例の検出系の構成を示す。ドナーの蛍光強度が大きく、FRET効率が低い場合でも、強度比によるアクセプタ識別を容易にすることができる。フィルタユニット406とダイクロイックミラー400の間に図24(B)に示すような透過率特性を有するダイクロイックミラー501を配置し、Qdot525の蛍光成分のみを分けた。Qdot由来の輝点は結像レンズ502で2次元センサカメラ503上に結像させた。フィルタユニット406には488nm以上の光を透過させるロングパスフィルタを、ダイクロイックミラー400には、図15(B)の特性を示すダイクロイックミラーを用いた。ダイクロイックミラー501でQdot525の発光成分を分離することで、Alexa Fluor蛍光信号へのQdot525蛍光の重なりを防ぐ効果がある。Qdot525の蛍光強度はAlexa Fluorに比べて強いため、2次元センサカメラ503は2次元センサカメラ408よりも感度が低く、安価なもので構わない。Qdot525は、ランダムに固定しても構わないが、実施例1記載のように格子点状に固定することで、図24(A)示す検出画像の模式図のように、同一輝点Aを簡便に見つけることができる。

40

【0122】

図25(A)に図24(A)の構成でFRET観察したときに予想されるFRET効率と強度比の関係を示す。FRET効率0のときは、Alexa Fluorの蛍光強度は0のため、強度比はQdot525と同一になる。0以外のFRET効率では、Alexa FluorのQdotの強度比への漸近はほとんど見られない。また図25(B)に

50

FRET効率0.5における強度比を示す。4種のAlexaで強度比に十分な差があるため、強度比の違いによる蛍光体種識別が可能である。尚、本例では、Qdot525と上記に示す4種のAlexa Fluorを用いたが、異なる蛍光体の組み合わせでも構わない。

【0123】

また、本例では、Qdot525の蛍光強度を単独のカメラにて独立に検出する。ダイクロイックミラー501の特性によっては、2次元センサカメラ408側にQdot525の蛍光の一部が検出される場合があるが、その場合、2次元センサカメラ503のデータをもとに、2次元センサカメラ408への漏れ量を計算し、補正することもできる。それによってより正確な強度比の違いによる蛍光体種識別が可能になる。

10

【実施例13】

【0124】

本例では、実施例12におけるダイクロイックミラー400(図24(A))の透過率特性を実施例11同様に検出帯域で非線形に変化させ、励起効率が低い蛍光体を透過側もしくは反射側で高蛍光強度で検出する。これにより、励起効率が低いために存在する微弱な蛍光体の見逃し率を下げる。特にFRET効率の低い場合、アクセプタの蛍光強度が弱まるため、本実施例による効果が高まる。

【0125】

装置構成は実施例12と同じであるが、FRET観察の蛍光体は、ドナーにQdot525、アクセプタにAlexa Fluor546, Alexa Fluor594, Alexa Fluor635, Alexa Fluor660を用いた。

20

【0126】

図26(A)に実施例11の方法に従って設計したダイクロイックミラー400の透過率特性を示す。励起効率はQdot525の蛍光波長から遠くなるに従い低くなる。すなわち、Alexa Fluor546, Alexa Fluor594, Alexa Fluor635, Alexa Fluor660の順に蛍光強度が低くなると予想される。そこで、上記蛍光強度順番に従い、(数1)と(数2)から各蛍光体の理想的な強度比を算出し、(数3)を可能な限り満たすようにダイクロイックミラー400の透過率特性を設計した。なお、図26(A)では階段状に透過率特性を変化させたが、図21(B)のように傾斜状に透過率を変化させても良い。図26(B)にFRET効率に対する強度比の変化を示した。図26(C)はFRET効率0.5における強度比である。2つの図からわかるように、本実施例のダイクロイックミラーによって、励起効率が低いAlexa Fluor660とAlexa Fluor635をそれぞれ透過側と反射側で効率的に検出することができる。さらに、強度比20%から90%の間で、強度比を4種Alexa Fluorにほぼ均一に割り振っている。

30

【0127】

上記ダイクロイックミラーは、主にFRET効率の低いFRET観察において、微弱な蛍光体輝点の見逃し率を下げ、強度比ばらつきによる蛍光体識別率低下を抑制する効果がある。

【実施例14】

40

【0128】

FRET観察を1台の2次元センサカメラで行う例を図27に示す。実施例12で記したように、ドナーであるQdotの蛍光は、ダイクロイックミラー501で分けられ、アクセプタの蛍光は実施例12と13で示したような透過率特性を有するダイクロイックミラー400で分離する。上記3つの光路に分けられた蛍光は結像レンズ407によって、2次元センサカメラ408に結像する。図27中の検出画像の模式図に示すように、2次元センサカメラ408のチップは3分割され、左からQdotのみの蛍光像、透過側のアクセプタ蛍光像、反射側のアクセプタ蛍光像を与える。実施例12と13同様に、アクセプタの同一輝点からの蛍光像に関して、透過側と反射側の蛍光強度から強度比を算出し、アクセプタ蛍光体の識別を行うことができる。本実施例は、3種類の蛍光像を1台の2次

50

元センサカメラで検出することで、装置コストを削減する効果がある。

【0129】

尚、ミラー401とレンズ407の間に減光フィルタを設けてもよい。Qdotの蛍光強度が大き過ぎる場合、減光フィルタにより強度を小さくして、3種の蛍光像を適正な輝度レベルに合わせることができ、画像計測が容易になる。

【実施例15】

【0130】

本例では、FRET観察において、ドナーおよびアクセプタの蛍光を1つのダイクロイックミラーで分離し、透過側と反射側に分けられた同一の2次元センサカメラで検出する方法を示す。FRET観察の試薬は、実施例13同様、ドナーにQdot525, アクセプタにAlexa Fluor546, Alexa Fluor594, Alexa Fluor635, Alexa Fluor660を用いる。検出系は、図1または図14に示す構成を用いる。ただし、ドナー励起用として、レーザ装置101e, 101bに405nmで発振する半導体レーザを使用する。ダイクロイックミラー32, 400の特性を図15(B)に示す。

【0131】

フィルタユニット406, 15に図28に示すようにQdot525とAlexa Fluor546の蛍光極大波長の間に立ち上がり有するロングパスフィルタ(短波長カットフィルタ)を用い、これによりQdot525の蛍光の一部をカットし、蛍光強度を下げることを特徴とする。これにより、ドナーQdot525の蛍光シグナルが支配的になるのを防ぐ。特に、低いFRET効率でアクセプタ強度比がドナー強度比への漸近するのを抑制することができる。ドナーのQdot525は、Alexa Fluorアクセプタに対して10倍強い蛍光強度を有するとする。この場合、図23に示すように、FRET効率低下に伴い、Alexa Fluorの強度比がQdot525の値に急激に漸近する。一方、図28(A)に示すようにロングパスフィルタでQdot525の蛍光強度を1/10にした場合、図28(B)に示すように、漸近の速度を比較的緩やかできるため、蛍光体識別精度の向上が期待できる。ドナーの蛍光強度変化は、FRET発生を確認するために必要である。そのため、ドナーの蛍光強度およびFRET発生時の蛍光強度低下が十分に検出でき、さらに2次元センサカメラの飽和電荷量を超えないように、アクセプタの蛍光強度の0.5倍から5倍まで低下させるのが適当である。例えば、ドナーの蛍光強度がアクセプタの10倍であれば、ドナーの蛍光強度を1/2から1/20にするようにロングパスフィルタを設計すればよい。ロングパスフィルタの特性は、図28(A)のほか、図29(A)に示すように、ドナーであるQdot525の蛍光波長帯域で一定の透過率であっても良い。この場合、Qdot525の波長シフトに伴う透過蛍光強度の変化を抑制する効果がある。また図29(B)のように緩やかな傾斜でも構わない。この場合、(A)同様の効果のほかに、フィルタの製造が容易になる効果がある。尚、ロングパスフィルタの他に、ノッチフィルタ、バンドパスフィルタを用いても良い。ダイクロイックミラー32, 400の特性は、図15(B)のほかに、実施例11で記述した方法で設計した非線形的に透過率(反射率)が変化するものでも構わない。

【0132】

また、図30に示すように、ダイクロイックミラー32, 400の特性として、ドナー(Qdot525)の蛍光体帯域の透過率をほぼ0%(反射率ほぼ100%)とし、最短波長のアクセプタ蛍光体(Alexa Fluor546)の極大波長から最長波長のアクセプタ蛍光体(Alexa Fluor660)の極大波長までをほぼ線形的に透過率を増加させてもよい。このとき、Qdot525の蛍光成分は、殆ど全て反射側の像として検出されるため、強度比は殆ど0となる。Qdot525の強度比を殆ど0とすることで、4種Alexa Fluorの強度比を0から100%の間でほぼ均等に割り振れるので、アクセプタ蛍光体種の識別精度向上が期待できる。尚、図30に示したダイクロイックミラー32, 400の透過率は、線形的に変化させるほかに、実施例11で示したように非線形的に変化させても良い。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 3 】

また、FRET観察の試薬として、上記の他種々の組合せ、たとえば、ドナーにQdot 565、アクセプタにAlexa Fluor 635、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750が使用できる。図31(A)はこれらの試薬の蛍光スペクトルであり、図31(B)は本試薬の場合のロングパスフィルタ(バンドパスフィルタ)の透過率特性、図31(C)は本試薬の場合のダイクロイックミラーの透過率特性である。本例の場合も、上記と同様に、Qdot 565の強度比が殆ど0になり、4種Alexa Fluor蛍光体の強度比を0から100%の間でほぼ均等に割り振れるので、アクセプタ蛍光体種の識別精度向上が期待できる。

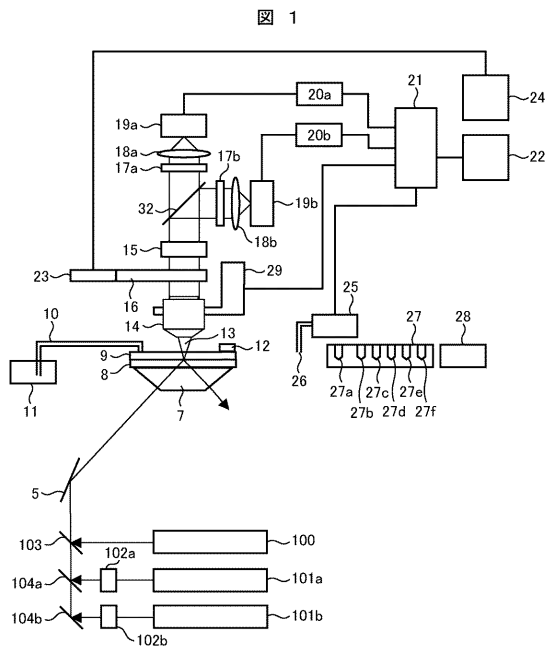
【符号の説明】

【 0 1 3 4 】

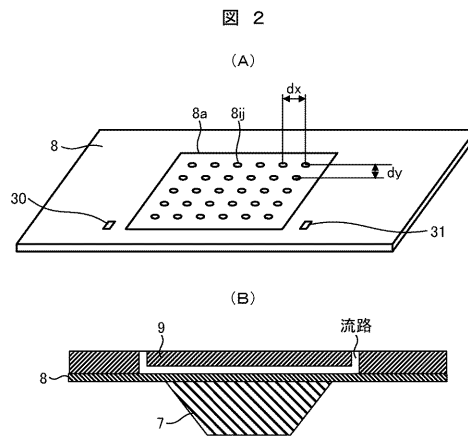
5, 104b, 104e, 401, 402, 403	ミラー	
7	プリズム	
8, 60	基板	
8a, 60a	反応領域	
8ij, 60ij	DNAが捕捉される領域	
9, 204	フローチャンバ	
10	廃液チューブ	
11	廃液容器	
12	試薬導入口	20
13	蛍光	
14	集光レンズ(対物レンズ)	
15, 406	フィルタユニット	
16	透過光観察用鏡筒	
17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 404, 405	補助フィルタ	
18a, 18b, 18c, 18d, 18e, 407, 502	結像レンズ	
19a, 19b, 19c, 19d, 19e, 408, 503	2次元センサカメラ	
20a, 20b, 409	2次元センサカメラコントローラ	
21	制御PC	
22, 24	モニタ	30
23	TVカメラ	
25	分注ユニット	
26	分注ノズル	
27	試薬保管ユニット	
27a	試料液容器	
27b, 27c, 27d, 27e	dNTP誘導体溶液容器	
27f	洗浄液容器	
28	チップボックス	
29	自動ピントあわせ装置	
30, 31, 61, 62, 63	位置きめマーカ	40
32, 103, 104a, 300, 301, 400, 501	ダイクロイックミラー	
60b	マスク	
100, 101a, 101b, 101c, 101d, 101e	レーザー装置	
102a, 102b, 102c, 102d, 102e	/4波長板	
200	測定基板	
201	PDMS樹脂	
202	窪み	
203	ホルダ	
205	基板保持具	
206	貫通孔	50

- 207 開口部
- 208 流路
- 209 X Y ステージ
- 210 プリズムホルダ
- dx, dy 領域 $8ij$ の間隔の寸法

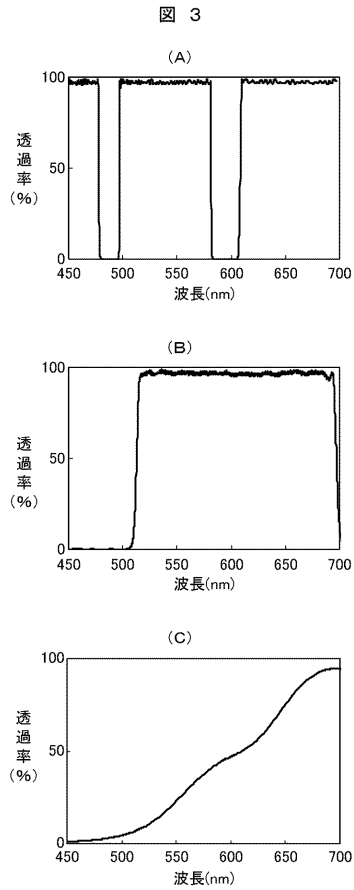
【図1】



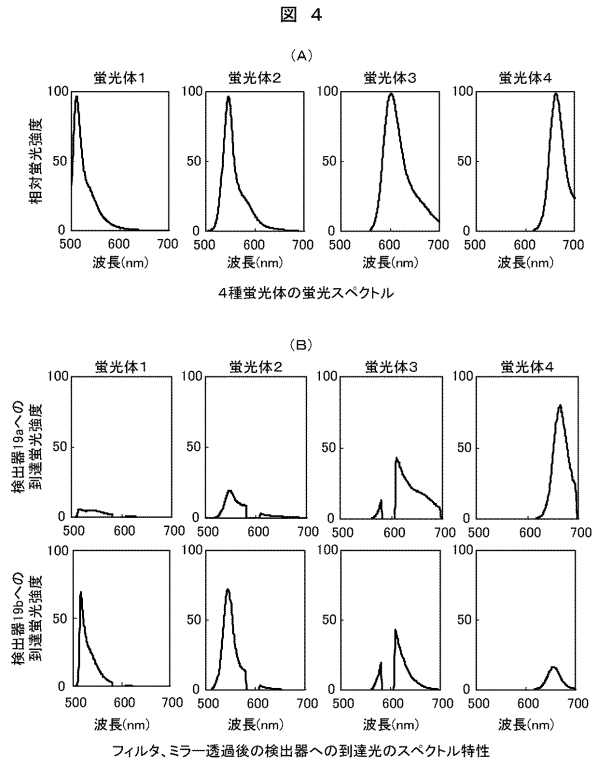
【図2】



【図3】



【図4】

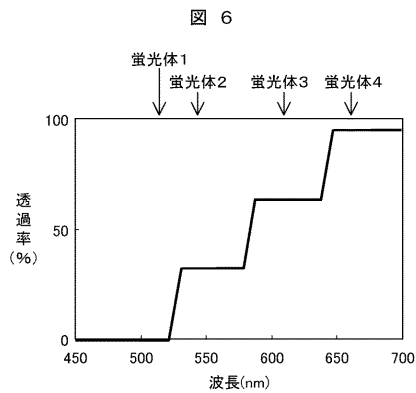


【図5】

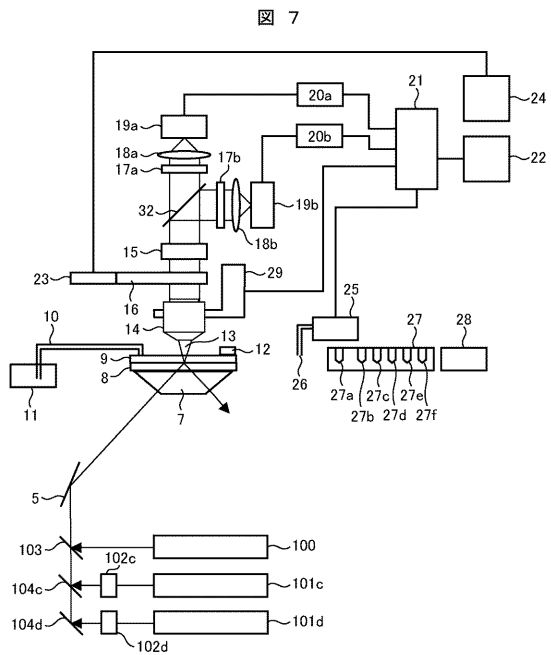
図5

蛍光体種	蛍光体1	蛍光体2	蛍光体3	蛍光体4
該当蛍光体を検出したときの検出光強度	15	25	63	84
検出器19a	85	75	37	16
検出器19b				

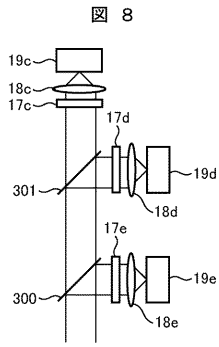
【図6】



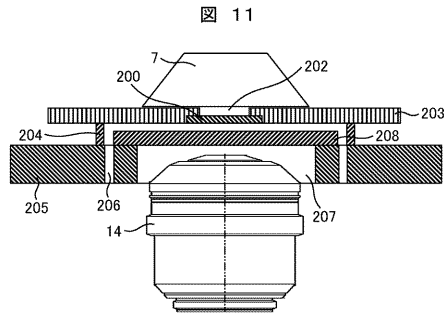
【図7】



【 図 8 】

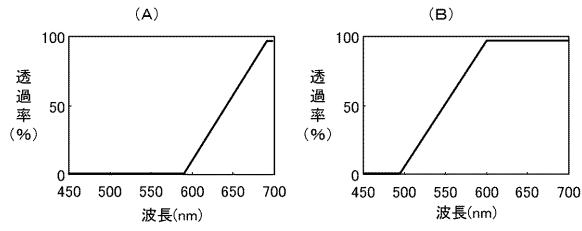


【 図 1 1 】



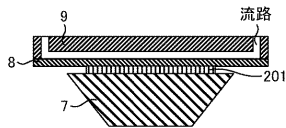
【 図 9 】

図 9



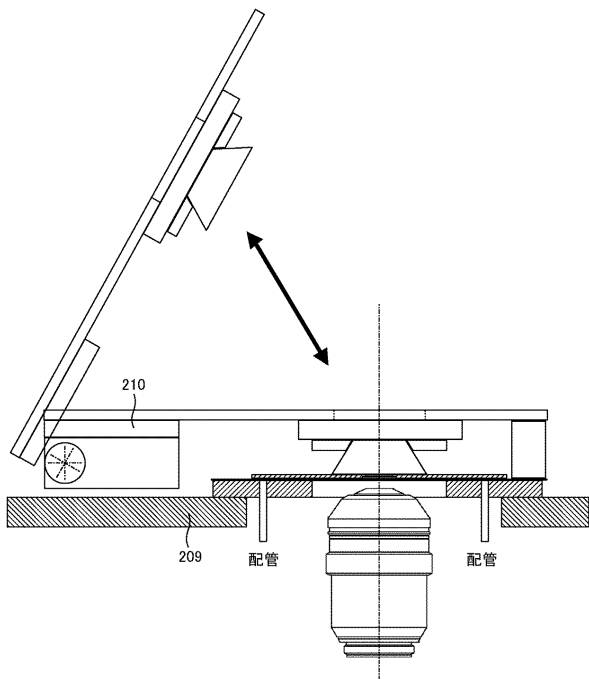
【 図 1 0 】

図 10



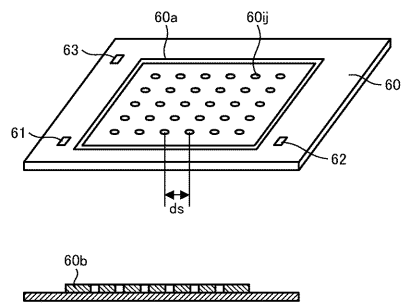
【 図 1 2 】

図 12

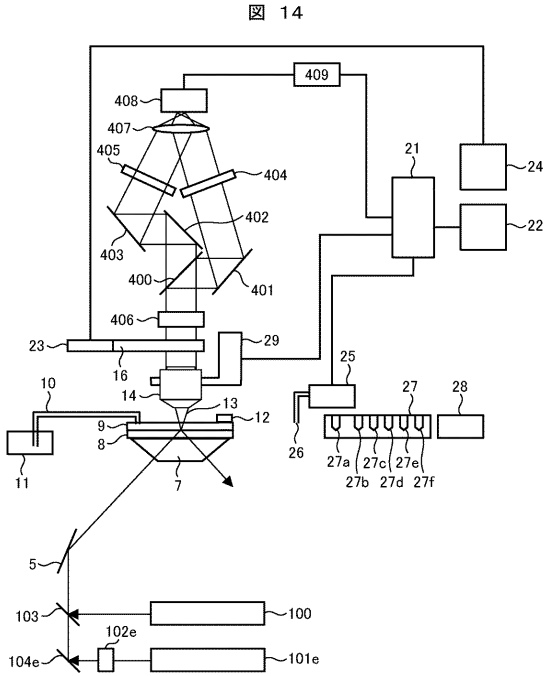


【 図 1 3 】

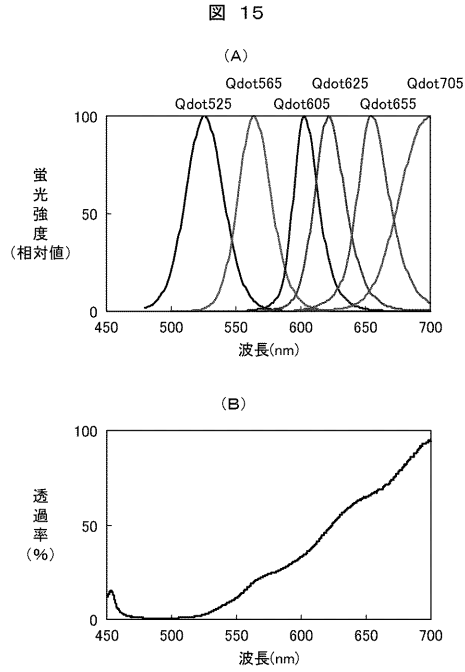
図 13



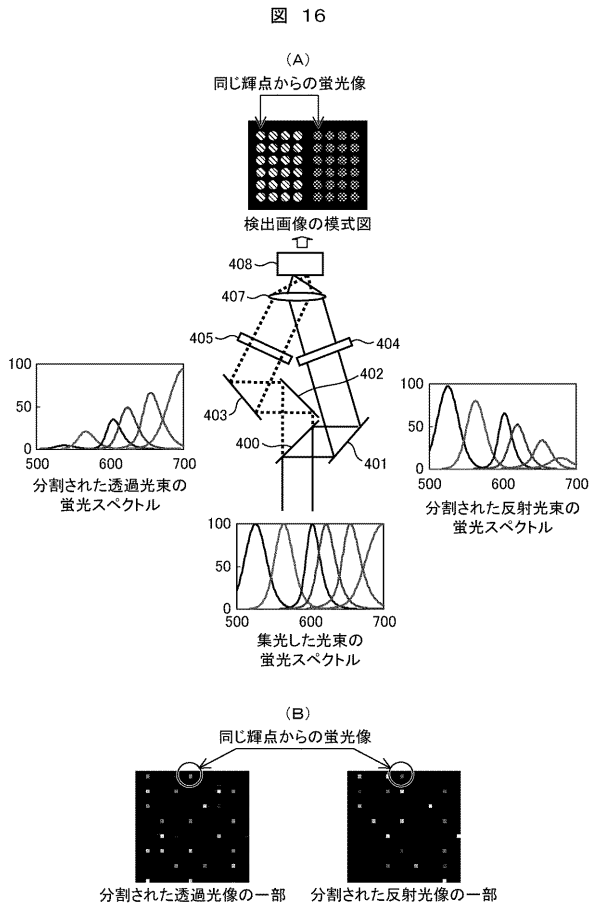
【図14】



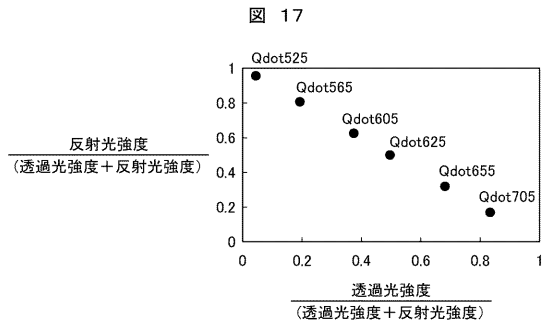
【図15】



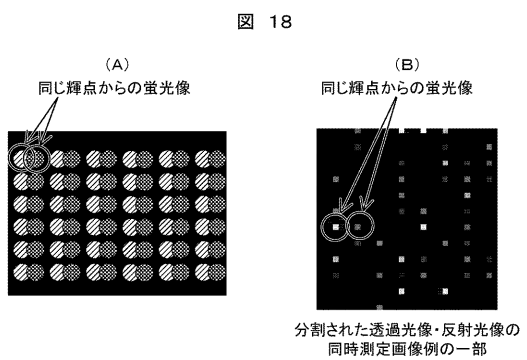
【図16】



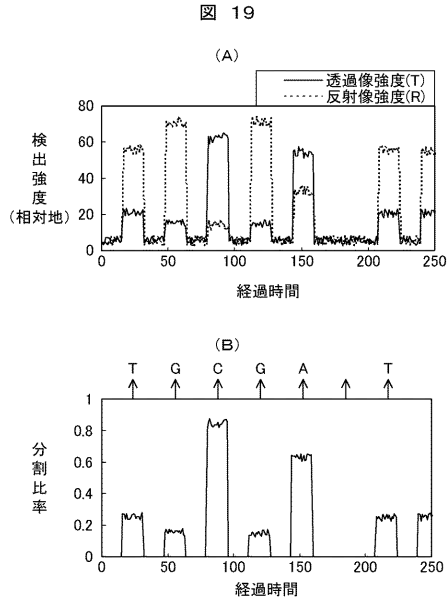
【図17】



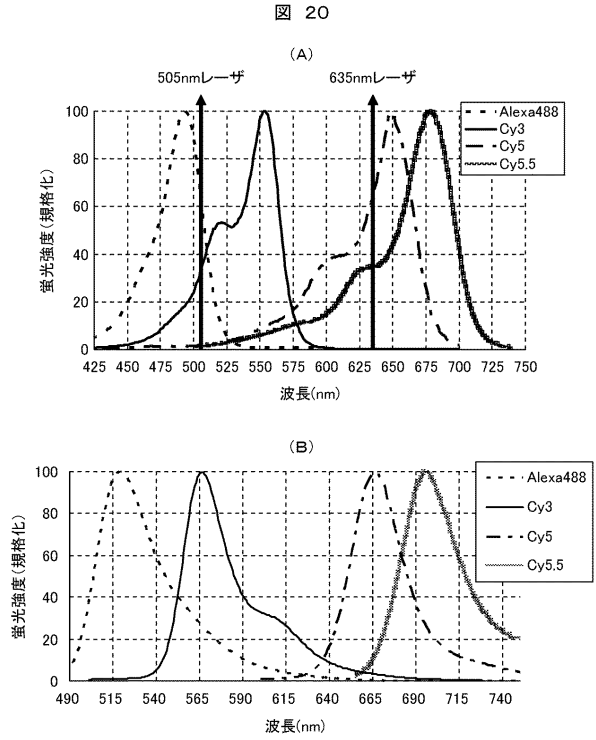
【図18】



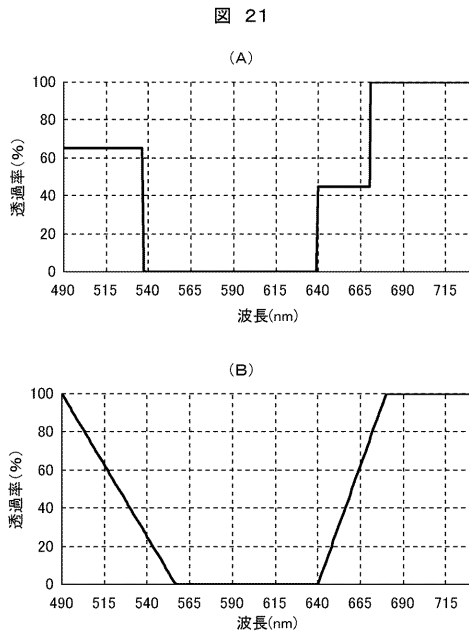
【図19】



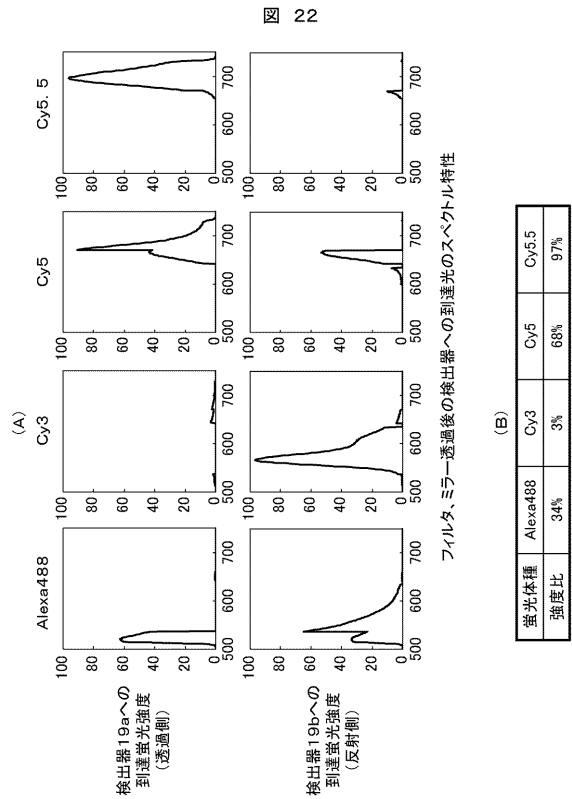
【図20】



【図21】

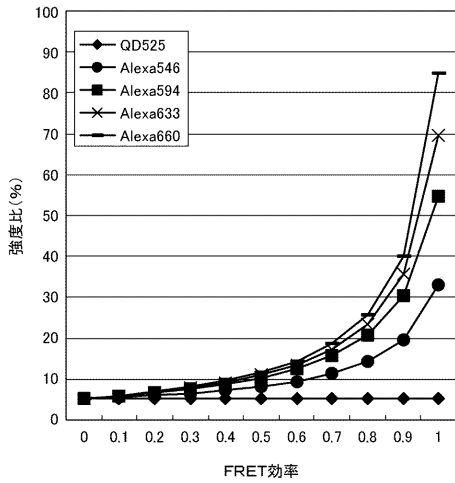


【図22】



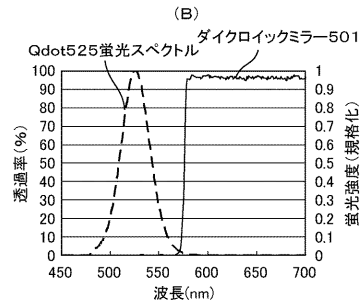
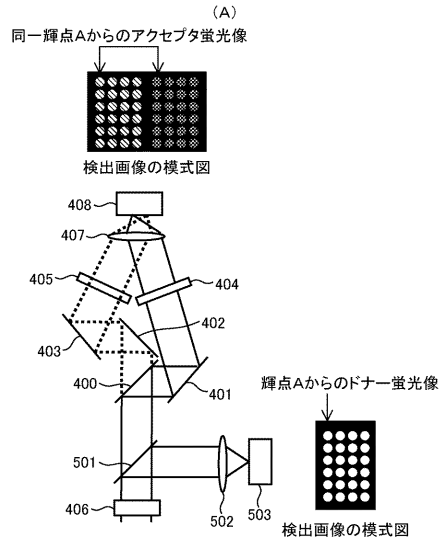
【図 23】

図 23



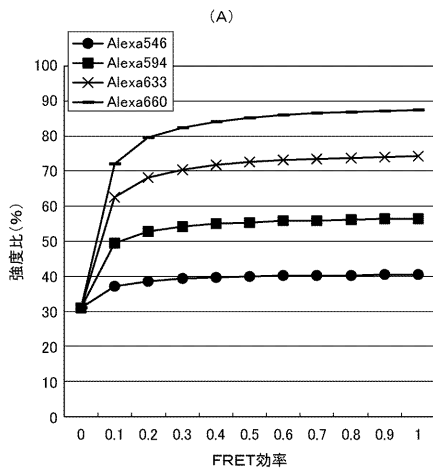
【図 24】

図 24



【図 25】

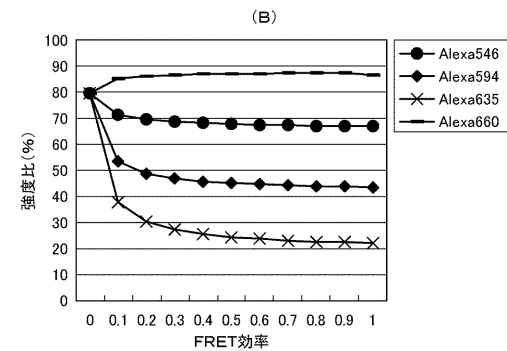
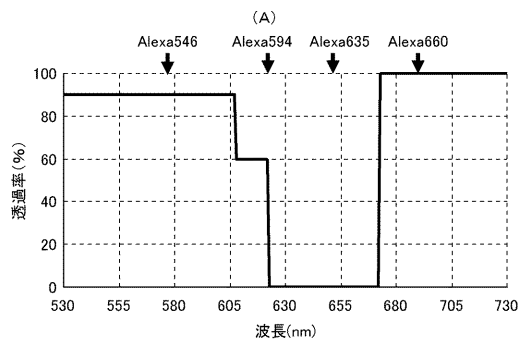
図 25



蛍光体種	Alexa546	Alexa594	Alexa633	Alexa660
強度比	40%	55%	73%	85%

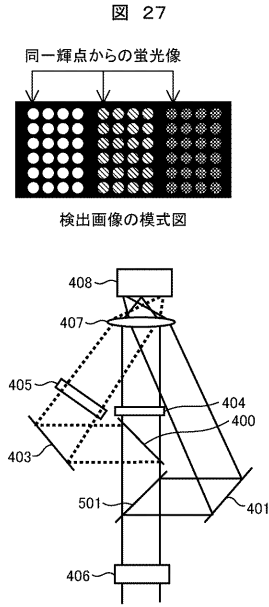
【図 26】

図 26

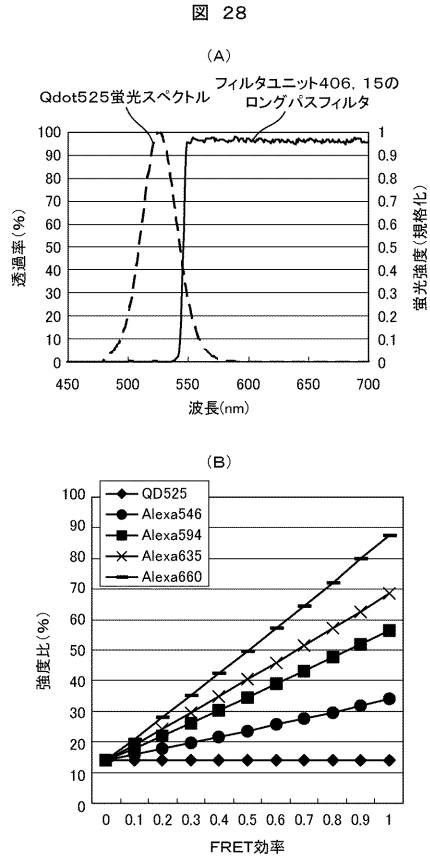


蛍光体種	Alexa546	Alexa594	Alexa635	Alexa660
強度比	68%	45%	24%	87%

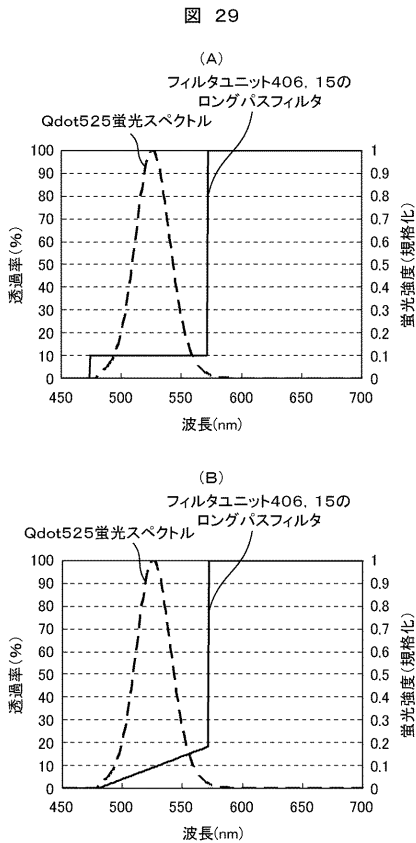
【図 27】



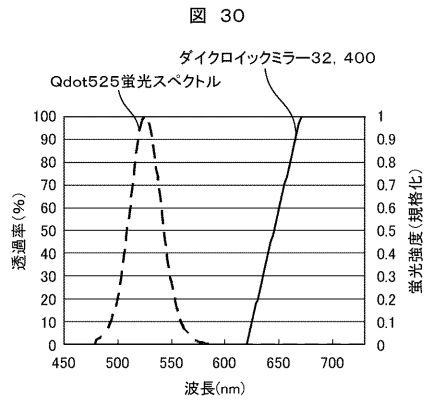
【図 28】



【図 29】

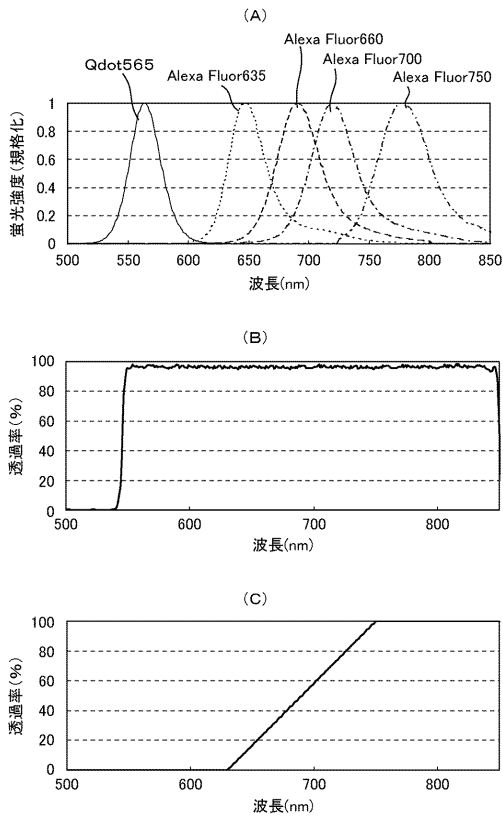


【図 30】



【 図 3 1 】

図 31



フロントページの続き

(72)発明者 曾根原 剛志

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
所内

株式会社 日立製作所 中央研究

審査官 廣田 健介

(56)参考文献 特開2000-098244(JP,A)

特開2009-122203(JP,A)

特開2009-074947(JP,A)

特開2007-322185(JP,A)

特開平04-315119(JP,A)

特開2004-341204(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/83

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)