

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3837165号

(P3837165)

(45) 発行日 平成18年10月25日(2006.10.25)

(24) 登録日 平成18年8月4日(2006.8.4)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 21/64 (2006.01)

F I

G O 1 N 21/64

E

G O 1 N 21/64

Z

請求項の数 20 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願平10-510125
 (86) (22) 出願日 平成9年8月12日(1997.8.12)
 (65) 公表番号 特表2001-505654(P2001-505654A)
 (43) 公表日 平成13年4月24日(2001.4.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/015269
 (87) 国際公開番号 W01998/007022
 (87) 国際公開日 平成10年2月19日(1998.2.19)
 審査請求日 平成16年8月9日(2004.8.9)
 (31) 優先権主張番号 60/024,043
 (32) 優先日 平成8年8月16日(1996.8.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 アマーシャム バイオサイエンス ナイ
 アガラ, インク.
 カナダ オンタリオ エル・ツー・エス
 スリー・エイ・ワン, セント キャサリン
 ズ, グレンリッジ アベニュー 500
 ブロック大学内
 (74) 代理人
 弁理士 松本 研一
 (74) 代理人
 弁理士 小倉 博
 (74) 代理人
 弁理士 伊藤 信和
 (74) 代理人
 弁理士 黒川 俊久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウェルプレート、ゲル及びプロットにおける検査用のデジタルイメージングシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レンズサブアッセンブリと、該レンズサブアッセンブリの近傍に配置された標本のイメージを形成すべくレンズサブアッセンブリよりも前記標本から遠い位置に配置されたイメージングサブアッセンブリとを有する方式の標本検査用のデジタルイメージングシステムにおいて、

前記レンズサブアッセンブリは、

第1のレンズ要素を有し、光軸をもつレンズと、

前記レンズサブアッセンブリ内の前記第1のレンズ要素よりも前記標本から遠い位置に配置され、前記第1のレンズ要素へ光を導き、前記レンズから出射すべくなしてある内部光源と、

を備え、

前記デジタルイメージングシステムは更に、

前記レンズサブアッセンブリとは反対側の前記標本の近傍に配置された透過光プレートと、照明光源からの光を前記内部光源及び前記透過光プレートに供給する光結合器と、

を備えていることを特徴とするシステム。

【請求項2】

前記内部光源は、第1端で前記照明光源に連結され、前記レンズ内の前記第1のレンズ要素よりも前記標本から遠い位置に配置された第2端を有する複数のオプティカルファイバーを備え、この第2端は、そこから放出される光が前記軸に対して実質的に平行に、また

10

20

前記第 1 のレンズ要素へ向かうように配置されている、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記レンズサブアセンブリは、ダイクロイックミラーを含んでいない請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記レンズサブアセンブリは、複数のレンズ要素を備え、これらの大半は前記内部光源よりも前記標本から遠い位置に配置されている請求項 1 乃至 3 の何れかに記載のシステム。

【請求項 5】

前記第 1 のレンズ要素のみが前記内部光源よりも前記標本から近い位置に配置されている請求項 4 に記載のシステム。 10

【請求項 6】

前記レンズサブアセンブリは、複数のレンズ要素を備えており、前記第 1 のレンズ要素と前記複数のレンズ要素の最も前記標本から遠い位置に配置されたものとの間の位置で少なくとも 1 つの放出光フィルタを保持する手段を更に備え、前記レンズサブアセンブリは、前記標本から導かれた光線が前記保持手段の位置で前記軸に対して実質的に平行となるべく組み立てられている請求項 1 乃至 5 の何れかに記載のシステム。

【請求項 7】

前記レンズサブアセンブリは、前記標本までの距離よりも大きい距離で前記内部光源からの照明をフォーカスすべく組み立てられている請求項 1 乃至 6 の何れかに記載のシステム。 20

【請求項 8】

前記レンズサブアセンブリは、サイトのアレイを含む標本の全部を捉えるように前記レンズサブアセンブリのための十分に大きな視野をもつべく組み立てられている請求項 1 乃至 7 の何れかに記載のシステム。

【請求項 9】

前記レンズサブアセンブリは、少なくとも直径 1 c m の視野を有する請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 10】

レンズサブアセンブリの近傍に配置された標本のイメージを形成すべく前記レンズサブアセンブリよりも前記標本から遠い位置に配置されたイメージングサブアセンブリとを有する方式の標本査用のデジタルイメージングシステムに用いられるレンズサブアセンブリにおいて、 30

前記レンズサブアセンブリは、

第 1 のレンズ要素を有し、光軸をもつテレセントリックマクロレンズと、

該レンズ内の前記第 1 のレンズ要素よりも前記標本から遠い位置に配置され、前記第 1 のレンズ要素へ光を導き、前記レンズから出射すべくなしてある内部光源と、を備え、

前記内部光源に供給される光は、前記レンズサブアセンブリとは反対側の前記標本の近傍に配置された透過光プレートに照明光源からの光を供給する光結合器により供給される前記照明光源からの光である 40

ことを特徴とするレンズサブアセンブリ。

【請求項 11】

前記内部光源は、第 1 端で前記照明光源に連結され、前記レンズ内の前記第 1 のレンズ要素よりも前記標本から遠い位置に配置された第 2 端を有する複数のオプティカルファイバーを備え、この第 2 端は、そこから放出される光が前記軸に対して実質的に平行に、また前記第 1 のレンズ要素へ向かうように配置されている請求項 10 に記載のレンズサブアセンブリ。

【請求項 12】

前記レンズは、ダイクロイックミラーを含んでいない請求項 10 又は 11 に記載のレンズサブアセンブリ。 50

【請求項 13】

前記レンズは、複数のレンズ要素を備え、これらの大半は前記光源よりも前記標本から遠い位置に配置されている請求項 10 乃至 12 の何れかに記載のレンズサブアセンブリ。

【請求項 14】

前記第 1 のレンズ要素のみが前記光源よりも前記標本から近い位置に配置されている請求項 10 に記載のレンズサブアセンブリ。

【請求項 15】

前記レンズは、複数のレンズ要素を備えており、前記第 1 のレンズ要素と前記複数のレンズ要素の最も前記標本から遠い位置にあるものとの間の位置で少なくとも 1 つの放出光フィルタを保持する手段を更に備え、前記レンズは、前記標本から導かれた光線が前記保持手段の位置で前記軸に対して実質的に平行となるべく組み立てられている請求項 10 乃至 14 の何れかに記載のレンズサブアセンブリ。

10

【請求項 16】

前記レンズは、前記標本までの距離よりも大きい距離で前記内部光源からの照明をフォーカスべく組み立てられている請求項 10 乃至 15 の何れかに記載のレンズサブアセンブリ。

【請求項 17】

前記レンズは、サイトのアレイを含む標本の全部を捉えるように前記レンズのための十分に大きな視野をもつべく組み立てられている請求項 10 乃至 16 の何れかに記載のレンズサブアセンブリ。

20

【請求項 18】

前記レンズは、少なくとも直径 1 cm の視野を有する請求項 10 乃至 17 の何れかに記載のレンズサブアセンブリ。

【請求項 19】

レンズサブアセンブリと、該レンズサブアセンブリよりも前記標本から遠い位置に配置されたイメージングサブアセンブリと、照明サブアセンブリとを有する標本検査用のデジタルイメージングシステムにおいて、

前記標本に近接して配置された平面拡散プレートと、

前記レンズサブアセンブリ内に配置された内部光源と、

複数のオプティカルファイバーであって、前記複数のオプティカルファイバーの各々は、照明光源からの光を受ける第 1 端と、前記拡散プレートよりも前記標本に遠い位置に配置され、そこから放出される光が前記拡散プレートの面に対して実質的に直角となるように向けられた第 2 端とを有し、前記オプティカルファイバーは、これらの間の間隔が前記拡散プレートの周囲よりも中央で大きくなるように配置されている、前記複数のオプティカルファイバーと、

30

前記照明光源からの光を前記内部光源と前記複数のオプティカルファイバーの第 1 端に供給する光結合器と、

を備えていることを特徴とするシステム。

【請求項 20】

前記レンズサブアセンブリは、ダイクロイックミラーを含んでいない請求項 19 に記載のシステム。

40

【発明の詳細な説明】

本発明の技術分野

本発明は、一般的に検査解析システムに関し、特にランダム配置された標本（例えばゲル内のビード、ペトリ皿内のコロニー）又は整列配置された標本（例えばプラスチックプレートにおけるウェル、膜上についたドット）のデジタルイメージを生成するシステム及び方法に関する。本発明は、非常に低いレベルの蛍光、化学発光、又は生物発光を生じる標本のデジタルイメージを生成し、その自動解析を実行することが可能である。さらには、本発明は、ウェルプレート及びゲルメディア内での、及び膜、ガラス、微小製作（microfabricated）装置、又はその他の支持上での検査で起こる輝度解析を行なうようにな

50

されている。

発明の背景

検査の種類

多くの化学的及び分子的生物検査は、光の吸収、透過、又は放出の変化が標本内での反応に対応するようになされている。従って、これらの検査を定量化するために用いられる機器では輝度変化を検出することが必須となっている。

ウェル。幾つかの検査は、その他の検査が整列配置された多数のウェルを有すべくなされたプラスチックプレート内で行われるのに対して、個別のフラスコ又はアンプル内で行われる。「ウェルプレート」検査は、処理能力が高く、個別の容器における同様の検査よりも低コストである。通常のウェルプレートは、 $8 \times 12 \text{ cm}$ の領域に96個のウェルを有している。最近の傾向としては同じサイズのプレート内により多くのウェルを有している。今日市販されている最高密度のものではウェルが384個のものがある。小型のウェルであって非常に高密度なアレイ（マイクロウェル、例えば $1 \mu\text{l}$ ／ウェルよりも小さい占有体積内に1プレート当り数千のウェルがあるもの）は開発中にあり、マイクロウェルの充填及び検出技術が成熟すれば市場に出回ることになる。

ドットプロット。小型のドットのグリッド（リアクティブサイト）は、処理ガラスの平坦な支持膜又はスリップ上に配置されている。高密度グリッドは、何千もの個別のドットを含むことが可能である。グリッド検査は、特定の配列を有する遺伝子を探すべく、又は特別な遺伝子が活動する程度を見極めるべく、人工オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを通常伴っている。適用範囲は、ライブラリ選別、ハイブリダイゼーションによる配列、ハイブリダイゼーションによる診断、及び遺伝子発現の学習を含む。高密度グリッドは、グリッドの解析が簡易で信頼性が高ければ、低コストで非常に高い処理能力を提供することになる。従って、無視できない程の市場の注目が、ゲノム配列の高密度アレイを生成、検出、及び解析するための技術を開発している企業に向けられている。

組み合わせ検査。幾つかの検査は、リアクティブサイトとして作用する小粒子（典型的には化合物に覆われたビード）を伴っている。何千ものビードが存在し、各ビードは組み合わせライブラリとは異なる化合物（例えば酵素の分子変異体）に覆われている。これらのビードは、ウェル内又はゲルマトリクス内の対象となる物質（例えばクローン受容体）に晒される。ターゲット物質と相互作用するビードは、各ビード周囲の領域における蛍光発光又は吸収によって識別される。相互作用するビードは、輝度が変化したぼんやりした領域に囲まれている。前記ターゲットと相互作用するビード周囲のこの微妙な輝度変化を識別するためには、非常に高感度な検出器が必要である。

電気泳動分離。可溶性サンプルがマトリクスに与えられ、該マトリクスの全域に電位が印加される。異なるアミノ酸又はヌクレオチドの配列をもつ蛋白質又は核酸の夫々が特性的な静電荷及び分子サイズを有しているので、前記サンプル内の成分は、前記電荷に応じた動作速度の偏差により分離される。分離された成分は、同位体、蛍光、又は発光ラベルを用いて可視化される。多くの場合（例えば化学発光）では標本の光が非常に暗い。

整列配置されたアクティブサイト（ウェル、グリッド内のドットプロット）のアレイで発生する検査は、固定型検査と称される。ゲル又はプロットマトリクス内に不規則に分配された標本を伴う検査は、自由型検査と称される。

固定型検査は、イメージング（イメージ化）することなしに通常行われる。これに対して、自由型検査は、イメージのどの位置においても反応を検出又は定量化することができるイメージ解析システムの利用を要する。

固定型検査用になされた機器は、一般的にイメージング機能を欠いており、自由型に適用されることがなかった。同様に、自由型用になされたイメージング機器のうちの非常に僅かなものがウェル及びその他の固定型対象に適用されてきたに過ぎない。

非イメージング計数システム

非イメージング計数システム（液体シンチレーション、輝度計、蛍光分極機器等）は実質的には光計である。これらは、ウェル内の光の透過又は放出の変化を検出する光電子倍增管（PMT）又は光検出ダイオードを用いる。光計の如く、これらのシステムは、各ウェ

10

20

30

40

50

ルからの光出力を単のデータ点に集束する。これらは、空間的変動に関する情報は一つ提供しないばかりか、アクティブサイトの凝縮密度又は位置決めにおける変動を許容しないようになっている。

各PMTは一度に1つのウェルを読み取り、限られた個数のPMTしか計数システム内へ設置することができない（既存の計数システムにおいては最大12個）。限られた個数のPMTということは、一度にたった数個のウェルしか読み取れないということであり、ウェルのアレイはPMT検出器アセンブリを多くの回数移動することによって解析され得る。

非イメージング形成システムの最大の長所は、これらが「押しボタン式」の技術（利用が簡単）であり、該技術が成熟しているということにある。従って、多くのこのような機器は市販されており、これらの性能は良く特徴付けられている。

10

計数システムの最大の短所は：

a. 限られた自由度—僅かな機器のみが384個のウェルに対応でき、より高密度な蛍光又は発光標本のアレイは問題にもならない。

b. 固定型のみ—ウェル又はアンプル読み取り用であって、自由型では標本を読めない。

c. 薄暗い検査には遅い—光が十分にあるときには、一度に幾つかのウェルをスキャンすることは非常に高速であるが、薄暗い検査では各位置でのスキャンに対してより長い計数時間を必要とする。スキャンすべき位置が多数あるので、これは処理能力の低下となる。つまり、非イメージング計数システムは、自由度が小さく、幾つかの標本では処理能力が低下する。

20

スキャニングイメージャ

平坦な標本では、非イメージング計数に代わるものとしてスキャニングイメージャがある。モレキュラ・ダイナミクス（MD：Molecular Dynamics）社のストーム（Storm）、MD社のフローイメージャ（FluorImager）、又は日立のFMBIOの如きスキャニングイメージャは、蛍光又は反射率を点対点又は線対線の態様に励起すべく、標本にレーザ又はその他の光ビームを通過させる。共焦光学機器は、速度及び感度を犠牲にし、焦点ずれの蛍光を最小限とすべく用いられる（例えばバオメディカル・フォトメトリクス（Biomedical Photometrics）社のマクロスコープ（MACROscope））。これら全ての装置を用い、点又は線をシリアルに蓄積することによって時系列的にイメージが形成される。

スキャニングイメージャは、便利な操作性を提供するのでゲル及びプロットに通常適用される。標本が挿入され、そして、最小のユーザの介入により（焦点合わせ、照度の調整等が不要）、スキャンが進行し、イメージが作成される。非イメージング計数システムの如く、スキャニングイメージャは押しボタン式の技術である。この使い易さ及び比較的良好な性能は、ゲル及びプロットの解析においてスキャニングイメージャの受容を増大させることに繋がってきた。

30

スキャニングイメージャは4つの大きな短所をもっている。

a. 遅いスキャニング。ビーム及び検出器アセンブリは、スキャンの各点でのデータを読み取るために標本全体に亘っていなければならない。小さな標本をスキャンするのに5～10分はかかる。大きな標本ではスキャンに1/2時間かかる。この遅いスキャンは処理能力を制限し、スキャン処理の間に変化する検査の定量化を煩雑にする。

40

b. 限られた数の波長。限られた数の蛍光励起波長が光学機器により与えられる。従って、限られた数の検査方法のみを利用することができることになる。

c. 低い感度。殆どのスキャニングイメージャはアートエリアイメージャ（art area imager）の状態よりも低い感度を示す。

d. 発光に適さない。スキャニングイメージャは、標本に対する光ビームの適用に起因する明るい信号を要する。従って、内因性のほのかな光を発する（例えばルシファラーゼ又はルミノールを含む反応）標本をイメージ化することができる。

e. ウェルに適さない。平坦な標本のみがイメージ化され得る。限られた数の共焦機器のみが、光学的区画化を行い、区画を濃い焦点化イメージに再生することができる。

エリアイメージング

50

エリアイメージングシステムでは一度に標本全体を検出器面に載置する。カメラが標本全体を多数の小さな検出器要素（通常はCCD）上へ平行に映し出すので、PMTを移動したり、レーザをスキャンする必要が全くない。この平行取得段階の後に、検出器からイメージ全体が読み出される。読み出しはシリアル処理であるが、数千～数百万画素／秒の割合と比較的高速である。

エリアイメージングシステムは幾つかの非常に魅力的な可能性を秘めている。

- a. 標本全体が一度にイメージ化されるので、検出処理を非常に高速化できる。
- b. 適正な照明システムの採用により、任意の励起波長を適用することができる。
- c. フラッシュ型及びグロー型の生物発光又は化学発光の両方を含む発光反応（光照射を伴わない発光）をイメージ化することができる。
- d. 自由型又は固定型の標本をイメージ化することができる。

10

発光イメージングは、照明を必要としないので更に簡単に実行することができる。しかし、殆どの発光反応はかなり薄暗く、これが、既存のエリアイメージング技術の究極の課題である。標準的な考え方では、これらのタイプの標本用に、高感度で、工学品質の冷却CCDカメラを用いる。しかし、本発明なしには、集積カメラでは多くの発光標本のイメージ化に失敗することになる。従って、本発明は他のシステムではイメージ化できないような標本のイメージ化を可能としてある。

典型的な従来のシステムでは、エリアイメージングを平坦な膜上の発光検査及びウェル内の発光検査に適用している。標準的なカメラレンズが常に用いられる。ウェルのイメージ化結果は、視誤差の補正がなされず、欠陥がある。

20

蛍光におけるエリアイメージングの利用に関して更に広い範囲の従来技術がある。蛍光顕微鏡法（ブルッカー（Brooker）ら、米国特許No. 5, 332, 905参照）及びルーチン・ゲル／プロット・イメージングは最も一般的な応用である。顕微鏡法における従来技術は、大きな標本領域をイメージングするための対応が全くなされていないという点においては、殆ど関連がない。

マクロ標本に関連した既存技術は、ルーチン・ゲル／プロット蛍光のための低コストな市販のシステムによって支配されている。これらのシステムは、標準的な集積CCDカメラを用いて大きく、明るい領域をイメージ化することができる。しかし、これらは大きな欠点を有している。

- a. 放電灯によって発せられる波長に限定される。典型的には、UVA、UVB、UVC、及び／又は白熱灯のうちの幾つかの組み合わせが用いられる。その他の波長は得られない。
- b. 波長は検査の途中で変更することができない。もしも照明を（例えばfura-2を伴うカルシウム測定のような）検査の途中で変更する必要がある場合には、この装置は適用できない。

30

c. 蛍光の小さな変化には低感度である。透過光は標本の直下から検出光学機器に至る。従って、非常に良いフィルタであっても、その直射光の全てを取り除くことには失敗し、これは非特定照明の高いバックグラウンドを生じる。蛍光における小さな変化（多くの検査の典型である）は、前記非特定バックグラウンド内に消えてしまう。

d. 非効率的なカメラ及びレンズ。非常に少数のシステムで高性能カメラが使用されている。これらの少数のシステムでさえも、明るい標本への適用に限定される標準的なCCTV又は写真レンズを使用している。

40

e. 視誤差は正確なウェルイメージングを阻害する。高速の、テレセントリックレンズは利用不可なため、これらのシステムはウェルをイメージ化する際に視誤差を伴う。

本発明の新規な特徴は、公知のマクロ蛍光システムの短所を最小化する。これらの新規な特徴は以下を含む。

- a. 照明波長は放電灯又はレーザのピークに関係なく選択される。
- b. コンピュータ制御フィルタホイール又はその他の装置を用いて、照明を検査の途中で変更することができる。
- c. 蛍光放出における小さな変化が検出され得る。蛍光照明がエピイルミネーション（ep

50

i-illumination) を介して、並びに背後又は横の光源から照射されるため、直接の励起照明は光学機器に入らない。これは、非特定バックグラウンドを可及的に低くすべくなる。

d. 非常に効率の良いカメラ及びレンズ系は、薄暗い標本を伴う使用を許容する。

e. 独特のテレセントリックレンズは、非常に高速であるとともに、ウェルプレート検査が正確となるように視誤差を取り除く。

本発明の第1の長所は、ウェルプレート全体を一度にイメージ化することができ、効率の良いエピイルミネーションを透明又は不透明な標本に与えることができるその高速なテレセントリックレンズにある。標本に対するファイバーオプティックカップリングをレンズカップリングの代わりに用いることができる。例えば、ファイバーオプティックレンズは、固定型又は自由型におけるデータ解析用のフォトン計数モードにおいて動作されるイメージ倍増化CCDカメラとともに用いられてきた。このアプローチでは、良好な感度を得ることができるが、次のような短所がある。

a. このシステムは蛍光標本に使用可能であると推奨しているが、エピイルミネーション機構を挿入するスペースがどこにもないために、光透過性のある標本に制限される。従って、ファイバーレンズ系は感度を低下させる虞があり、不透明な標本に用いることができない。多くの標本は不透明（例えば多くのウェルプレート、ナイロン膜）である。

b. ウェルプレートは8×12cmである。このサイズのイメージ形成ファイバーオプティクスは製造が非常に困難で高価である。従って、標本は多数の小さなイメージとして得られる必要があり、これらの小さなイメージは標本全体を示すべく再度組み合わせられる。

この多段取得は、時系列的に変化する検査に対する装置の使用を阻害することになる。

エリアイメージング解析システム(LUANA)は、ディー・ネリ(D.Neri)ら(「多目的高感度輝度アナライザ」、バイオテクニクス(Biotechniques) 20:708-713,1996)によって開示されており、このシステムは、冷却CCD、横付け型のファイバーオプティック照明器、及び本発明に類似した幾つかの機能(波長の選択、エリアイメージング)を達成すべく励起フィルタホイールを用いている。しかし、LUANAは、研究所育ちのシステムで広く用いられている横付け型のファイバーオプティックを用いており、本発明により解決される問題を生じている。具体的には、横付け型のファイバーオプティックは特にウェルに用いる際に非常に不均一な照明を与える。本発明のエピ及び透過型のイルミネーション(照明)システムは、平坦な標本及びウェルの両方に対して均一な照明を与える。さらに、LUANAにおいては、視差がウェルにおける検査のイメージングを阻害する。

いま一つのシステム(ミシガン州アナーバにあるノベルテック社(NovelTech Inc.)製の蛍光イメージングプレートリーダーFLIPR)は、96個のウェル内の蛍光を検出すべくエリアCCDを用いている。この装置は、非イメージング計数システムであって、複数のPMTの代わりにエリアCCDを用いている。納得できる感度を達成するには、これを96個のウェルフォーマットで実行し、各ウェル内の全画素を単一値にまとめる。この装置は、輝度イメージング、自由型イメージング、又はより高密度のウェル製剤には適用不可であり、非常に高価につく。

微小製作装置(例えば「ゲノセンサ(genosensor)」)内に組み込まれた検査を検出するためのイメージングの利用に関して更に広い範囲の従来技術がある。幾つかのゲノセンサはスキャニングイメージャを用いており、スキャニング光電子倍増管によって発光を検出する。その他は、CCD上に、又は該CCD上に配置され得るカバースリップ上に直接的に製作された検査サイトでの変化を検出するエリアCCDを用いている。ゲノセンサは、固定ターゲットが明確化される際に、大きな可能性をもっている。例えば、ゲノム情報の特定の配列を探索するようにチップが製作され、このチップが多数の血液サンプルをスクリーニングするために用いられる。その意図された配列には高効率であるとともに、もしも様々な配列のスクリーニングに有用であるならば、チップは多数のアクティブサイトを含む必要がある。何千ものサイトを伴ったチップの製作は、高価であり、困難である。従って、ゲノセンサの第1世代は、ヌクレオチドの非常に特定の配列のためのスクリーニングに適用されるだろう。

微小製作装置の自由度の小ささは、検査基質の微小製作を必要としない本発明とは対象的である。代わりに、本発明は検査がウェル、膜、珪化スライド、又はその他の環境において行なえるようにしてある。殆どどの様な反応も定量化される。つまり、本発明は微小製作に対する代替技術として用いられ得る。本発明は自由度が大きく、殆どどの様な化学検査をも可能であり、検査進展の全ての段階で用いることができる。これらは試作及び量産スクリーニングを含んでいる。本発明は、従って、微小製作が適当でないか又はコストエフェクティブでない場合に、微小製作の代替品を提供するものである。

上述した従来技術の参照の各々は、イメージング検査の幾つかの観点を包括する。しかし、従来技術は、低い光のレベルで大きな標本をイメージ化することにおける大きな問題点の全てに言及しているわけではない。低い光における大きな問題点、マクロイメージング

10

- a. 非常に高い検出器感度が必要であり、
- b. 自由度が大きく、広域の単色照明が必要であり、
- c. 視誤差が回避されるべきであり、そして、
- d. ターゲットを探索及び定量化するために、より信頼性の高い手順が必要である。

発明の要約

広義には、本発明の目的は、従来技術のシステムの欠点を解消する、検査のためのイメージングシステムを提供することにある。ウェル内での及び膜上での検査のエリアイメージのための完全なシステムを提供することを特に意図している。本発明は、化学発光、蛍光、化学蛍光、生物発光、又は高密度ドットプロットアレイを含むその他の非同位ハイブリ

20

ダイゼーション検査のエリアイメージングのための完全なシステムを提供することを特に意図している。

本発明のいま一つの目的は、化学発光、蛍光、化学蛍光、生物発光、又は自由型における組み合わせ検査を含むその他の非同位検査を自由な形でイメージ化することにある。本発明の目的は、蛍光イメージデータのデジタル畳み込みのためのソフトウェアを提供することにある。このソフトウェアの適用によりフレア及び焦点ずれの情報を減少させる。

本発明の目的は、特に低いレベルの発光を伴う使用上の、自由度が大きく、信頼性が高く、効率が高い、検査をイメージ化する方法及びシステムを提供することにもある。

本発明は、検出器と、レンズと、イメージングシステムと、非イメージングカウンタ及び

30

スキニングイメージャによって事前に得られた標本の種類のイメージ化を可能にさせる照明技術との相乗的な組み合わせを提供する。特に、本発明は、固定型又は自由型、及びウェル又は平坦な標本に利用可能である。本発明は、蛍光、発光、又は光透過を検出することができる。

本発明の特徴は、規則的に配置されたターゲットの大きなアレイを検出及び定量化すること、規則的なアレイに配置されていないターゲットを検出及び定量化すること、規則的に配置された、少数の大きなウェルから多数の非常に小さなウェル又はドットプロットまでの任意個数の標本の自動解析を実行することを含んでいる。

本発明のいま一つの特徴は、励起波長を選択すべく、標準的及び低コストな干渉フィルタを用いて、単位相の単色励起をウェルプレート又は同様のサイズの標本に与え、また、

40

コンピュータ制御により、単位相の単色励起の様々な波長をウェルプレート又は同様のサイズの標本に与えるエリア照明システムを提供することにある。

本発明を実施するシステムは、ウェルプレート型における検査用に特別になされたレンズを提供する。このレンズは、標本からCCDアレイ（高速である）へフォトンを送る場合に、非常に効率的であり、好ましくはエピイルミネーションシステムを備え、非常に薄暗い標本に利用が可能である。このレンズは、テレセントリックでもある。テレセントリックレンズは、ウェルプレート内における全ての点を直接的に捉えるという特性を備え、標準的なレンズの性質である視誤差を示さない。

好ましいシステムは、要求があれば、エピイルミネーションの均一な場を生成するテレセントリックで高速なレンズを提供する。このレンズは、ダイクロイックミラーを必要とし

50

ない内蔵ファイバーオプティック照明システムを装備している。好ましくは、このレンズは、バリアフィルタとして用いられる内蔵干渉フィルタを受け入れるべく製作される。このレンズを透過する光線は、フィルタがその特定の波長及び波長帯の許容範囲で動作するように、バリアフィルタに当たる際に殆ど平行となる。

本発明の特徴は、高速なテレセントリックレンズを用いているか又は標準的な写真レンズを用いているか否かで高い光集束効率を提供する。

好ましいシステムは、殆どの標本が倍増でなく集積によって検出され得るように、高量子化効率（約80%）、及び高感度（16ビット精度）を有したCCDエリアアレイカメラを提供する。好ましくは、システムが集積、冷却CCDカメラを有し、該CCDカメラはそれにオプションとしてのイメージ倍増器を連結されてある。極度に低い光のレベルを意図した実施例においては、標本からの入射光が前記倍増器によって増幅され、倍増された光は、集積期間に亘って集積カメラ上に蓄積される。前記集積期間の終わりの時点で、前記カメラは光イメージを再生成する専用のコントローラ又はイメージング装置に読み出される。多露光が前記カメラのダイナミックレンジを増大させるべく用いられ得る。標本を入れるライトタイト（light-tight）標本チャンバが設けられ、これに全ての照明及び検出要素が取り付けられ得る。

本発明に係るシステムは、ライトタイトチャンバ内に収納され、大きな標本（例えば22×22cmの膜）を光学系を通過移動すべく用いられる並進ステージ（オプション）を伴い得る。本発明は、前記並進ステージで取得した複数の「タイル」から単一の合成イメージを生成するソフトウェアを介してステージの動作を制御する。

好ましくは、本発明は、カメラ及びレンズ系が本来備えるシェーディング、幾何学的歪、焦点ずれ、及びノイズ誤差を補正し、異なる励起フィルタで生成された複数のイメージを用いて非特定の蛍光を可及的に取り除くソフトウェア制御を提供する。

特に、本発明は、前記レンズ及び検出器系から前に測定された光学特性を用いて、単一の焦点面からイメージを解析するソフトウェアを提供する。多焦点面からのデータが解析されることは評価できるものである。

本発明の好ましい実施例は、高精度の、冷却CCDカメラを用いているが、もしもコストが大きな要因であれば、本発明は低コストの集積カメラを用いて製作することもできる。この場合には、イメージ品質の低下と最大の感度とを伴うが、より短い集積期間が得られることになる。

【図面の簡単な説明】

本発明の更なる目的、特徴及び長所は、添付の参照図面とともに、現時点で好ましく、しかしそれにも拘らず図説の実施例の次の如き詳細な説明により、更に完全に理解され得る。

第1図は、本発明の第1の好ましい実施例（直立）に対応したシステムの模式図、

第2図は、高速な、テレセントリックレンズの側面からの模式図、

第3図は、前記レンズとエミッション（放出）フィルタホルダとの光学的及び機械的構成要素の詳細図、

第4図は、前記レンズ及びCCDカメラの間に取り付けられた倍増器を備え、極度に低い光への適用に用いる本発明に対応したシステムの第2実施例を示す模式図、

第5図は、前記倍増器の模式図、

第6図は、どの様にメインバンドルからの個別のファイバーバンドルが矩形のファイバーホルダ内の位置に移されるかを示す拡散照明プレートの側面からの模式図、

第7図は、どの様にメインバンドルからの個別のファイバーバンドルが前記ファイバーホルダ内のチャンネルのアレイに移されるかを示す前記拡散照明プレートの上面からの模式図、

第8図は、前記CCDカメラの模式図、

第9図は、本発明に対応したイメージの取得及び解析に利用される方法を示すフローチャート、及び

第10図は、第9図の手順におけるターゲットの位置特定に利用される方法を示すフロー

10

20

30

40

50

チャートである。

好ましい実施例の説明

図面の詳細に移行する。第1図は、本発明に対応したイメージングシステム1の好ましい実施例を示す模式図である。システム1は、広義には、照明サブシステム10、ハウジング14内に設けられたイメージングサブシステム12、及び制御サブシステム16を備えている。イメージングサブシステム12は、ハウジング14のカメラチャンバ20内に収納されたCCDカメラサブシステム18と、カメラチャンバ20及び標本チャンバ24の間に延設されたレンズサブアッセンブリ22とを備えている。運転に際しては、照明サブシステム10がチャンバ24内の標本に与える必要な光エネルギーを供給する。標本から放出される光エネルギーは、レンズサブシステム22を介してカメラ18へ伝えられ、ここでイメージが形成され、処理のために制御サブシステム16に伝えられる。制御サブシステム16は、本発明に対応する独自の制御及び処理を達成すべく、特別なカメラ18と、制御ユニット26にプログラムされ、カメラ18からデータを受け付けるコンピュータ28とに合わせた従来のユニットであるカメラ制御ユニット26を備えている。

10

照明サブシステム10のための光源は、好ましくはアーク灯30である。灯30からの光は、液体光ガイド32を介して光結合器又はフィルタホイール34へ伝えられる。液体光ガイド32は、UV帯を伝搬する点で、またファイバーオプティックよりも入力照明を拡散するように作用する点で有利である。

光結合器34は、標準的な、直径1インチの干渉フィルタである従来のフィルタホルダ（図示せず）を備えている。好ましい構成においては、コンピュータ制御フィルタが前記光結合器に代えて用いられる。前記フィルタホイールは、コンピュータの指示下で急速に変更可能な多数のフィルタを備えることができる。

20

ファイバーオプティックバンドル36は、光結合器又はフィルタホイール34からの光をライトタイトな標本チャンバ24内へ運ぶ。バンドル36は、前記標本ホルダの焦点合わせの間における上下動自在に隔壁38を貫通している。レンズ22内のエピイルミネーションリングライトからのファイバーオプティックバンドル40を光結合器34に連結するようにしてもよい。

照明システムの3つの形態は、各々が個別のファイバーバンドルによって供給されるように記述されている。これらは、透過光プレート（42）、前記レンズ（図示せず）の外部のリングライト、及びエピイルミネーションを行なうレンズ（22）の内部のリングライト44である。

30

前記透過光プレートは、矩形のチャンバ50（第6図及び第7図参照）であって、この内部において、バンドル51からの個別のファイバー52が分離され、標本に対して横向きになるように90°回転されるようになっている。ファイバー52は、これらが照明パターン内でのシェーディングを最小化するように、前記チャンバ内に設けられている。この目的のため、その中央部に配置されているよりも更に多数のファイバーが外方周囲部分に配置されている。

矩形のチャンバ50は、拡散スクリーン54、及びクォーツガラス拡散プレート56を備えている。これらの拡散要素は、ファイバー52からの光の個別点をその入力とし、プレート56の表面に亘る単相照明を生成する。チャンバ50は、光が標本に側方から入射することを許容すべく、暗視野ストップを備えていてもよい。

40

外部のリングライトは、前記レンズの軸に配され、レンズ22を囲むのに十分な大きさの孔を中央に有したオプティカルファイバーのリングから構成されている。前記リングライトの作動距離はレンズ22の焦点距離に一致してある。

内部のリングライト44は、テレセントリックレンズ22の本体内にこれと軸を一致させ、その前側レンズ要素の後ろに取り付けられたオプティカルファイバーのリングから構成されている。拡散器、偏光子、又はその他の円形の要素がファイバーリング44の前に配置され得る。

標本ウェルプレートは、ファイバーオプティックチャンバ50に取り付けられたホルダ58（第6図）内に保持されている。ホルダ58は、前記ウェルプレートをその縁端部で把

50

持している。ホルダ58の底は、前記ウェルの視界を妨げないように空としてある。ホルダ58は、ジャックに取り付けられ、これを上下の次元で移動するようになっている。ジャック60を調整することによって、ホルダ58がレンズ22に対して移動し、標本に焦点が合う。

レンズ22は、高速な、テレセントリックレンズである。該レンズは、蛍光イメージングのための直径3インチの干渉フィルタを受け入れるエミッションフィルタスロット62を備えている。これは、前記前側レンズ要素の後ろに配置された内部のファイバーオプティックリングライト44を備えている。レンズ22は、その中途にあるフランジ64（第2図参照）により前記カメラチャンバに取り付けられている。前記レンズの後側は、カメラチャンバ20内に投影され、標本を阻害することなくエミッションフィルタスロット62への容易なアクセスを提供している。前記レンズの前側は、標本チャンバ24へ投影される。冷却CCDカメラ18は、前記レンズへ直接取り付けられている。前記カメラは自体のチャンバ20を有しているので、前記チャンバを前記カメラ制御ユニットへ出る冷却、電源及びデータケーブル周りの光もれを考える必要がない。

全ての制御、イメージング、及び解析機能は、コンピュータ28に内在するものである。
照明サブシステム

単相エリア照明のための標準的な技術は、放出ピークでの表面が約 5000 uW/cm^2 を供給可能な（通常は水銀）放電照明器（例えばUVライトボックス）を用いるものである。灯は、特定のピークでの放出に制限するフィルタで覆われている。かなり明るい放電灯は、該灯内の励起ガスによって前記ピークの波長に限定される。

放電灯以外では、非常に少ないエリア照明の記述が存在している。大きい問題は、波長の選択であり、照明ビームの収集光学機器への入射が感度を低下させることに繋がることである。これを回避すべく、光が上方から、側方から、並びに暗視野又は前記標本への屈折を介して与えられ得る。これら全ての技術は重大な制限を有する。横付けされたファイバーオプティック照明器は不均一である。これらは、光が標本に対して角度をもって入射され、深いターゲットへの貫通に失敗するので、ウェル又はその他の非平坦標本に不向きでもある。屈折又は暗視野照明器は、ウェルプレートにおいて特別な光学要素を必要とし、不透明な標本には利用することができない。

より自由度が大きいエリア照明システムでは、広帯域照明源を用い、高精度フィルタ（通常は干渉フィルタ）により単色照明の任意の波長の選定が許容される。可変のモノクロメータ又は低コストの可調整レーザは、大きな領域に拡散される際に十分な光出力に欠けるので、フィルタが好ましい。水銀又はキセノンアーク灯は、フィルタによる単色励起用として多く選択される。アーク灯の長所は、その出力を、標本の全面に亘って拡散される前に、小さい市販の干渉フィルタを通過することができる細いビームにすることができることである。レンズ又はファイバーオプティックの何れかは、前記フィルタから前記標本へ単色光を伝えることに用いられ得る。

本発明は、以前のどの装置よりもずっと自由度が大きい。これは、標本の全面への、拡散透過光（標本を介して）、背側照明（リングライト又はその他の光源を介して）、又はエピイルミネーション（前記レンズを介して）に適用される。実社会においては、より低いバックグラウンド、より広いダイナミックレンジ、及びよりリニアな蛍光反応が得られるため、エピイルミネーションが好ましい。広いエリア単色エピイルミネーションを供給する能力は、本発明を従来技術と切り離す上での1つの決定的な要因である。

本発明は照明供給において3つの主問題に言及している。

a. フィルタの手に入れ易さ—小許容範囲フィルタ（例えば 10 nm 帯域幅フィルタ）は、小型のものが市販されているが、大領域の照明用はない。この問題は標準的なフィルタを用いることによって解消される。

b. 照明供給— $8 \times 12\text{ cm}$ の領域への均一で、単色で、選択可能な照明は本発明の特徴である。光結合器又はコンピュータ制御フィルタホイールは、標準的な干渉フィルタを受け入れ、波長を選択するのに用いられる。前記光結合器又はホイールは、特別に設計された透過光用のファイバーオプティックプレートに、又は背側照明用のファイバーオプティ

10

20

30

40

50

ックリング又はパネルライトに、並びに前記レンズ内のエピイルミネーション用のファイバーオプティック照明アセンブリに取り付けられる。

c. 強度－励起照明は、大領域（典型的には 96 cm^2 ）に亘って拡散される。強度は照明領域の2乗に応じて減少するので、結果としての励起強度は非常に低いものになる。多くの場合においては、放出された蛍光は、標準的な、工学品質の冷却CCDカメラでは検出されない。本発明の非常に高感度な検出器は、大きな標本から放出された低いレベルの蛍光をイメージ化する能力を有している。殆どの極度に低い光の状態のために、本発明は前記レンズ及びCCDカメラの間に挿入され得るオプションとしての光倍増システムを組み込んでいる（下記参照）。

レンズサブアセンブリ

10

第2図は、テレセントリックレンズ22内の照明及びフィルタ構成要素の一般的な配置を示している。前記レンズ内に、ファイバーオプティックリングライト44が取り付けられ、前記前側レンズ要素を介して標本（第2図における左方）上へ単色照明を投影する。前記リングライトの焦点面は、Bにあり、レンズ全体の焦点面はその点の前、Aにある。前記リングライトの焦点を標本を越えた点に配置することは、前記表面からの強面反射を最小化している。

エミッションフィルタスロット62は、入射光線から励起照明を取り除き、標本から放出された蛍光のみを残す干渉フィルタの挿入を許容する。

第3図は、テレセントリックなマクロレンズ22の光学要素を最も良く示している。前記レンズは、39個の面を有し、次の如き特性を備えている。

20

有効焦点距離 164.436 mm

開口数 0.443

倍率 0.25

光線はエミッションフィルタスロット62で殆ど平行であることに注意されたい。これは、前記フィルタがその特定の波長及び帯域幅で作動することを許容する。

本発明ではどの様なレンズでも用いることができるが、最大感度はその特別に設計されたレンズによって与えられる。このレンズは、高速で、テレセントリックであり、大標本用に適した前記エピイルミネーションを組み込んでいる。

エピイルミネーションは、小さな領域を照らす蛍光顕微鏡法において標準的な技術である。小さな領域を照らす最も効果的な方法は、対象の後ろにダイクロイックビームスプリッタを配することである。ダイクロイックビームスプリッタ又はミラーは、1つの波長帯を反射する部分反射面であり、他の波長帯の通過を許容する。

30

顕微鏡では、照明が側方から前記ダイクロイックミラーへ入る。該ミラーは、励起光を前記対象を介して標本に下方へ反射すべく角度付けされている。（励起から波長を増加された）標本から放出された蛍光は、前記対象に集められ、前記ダイクロイックミラーへ上方に通される。該ダイクロイックミラーは、放出波長には透過性があるので、光はダイクロイックを介して検出器面に進む。異なるダイクロイックが各励起／放出波長に必要である。

標準的な形式のダイクロイックによるエピイルミネーションシステムをマクロイメージングに適用するには大きな困難がある。

40

a. 前記ダイクロイックミラーは、それが充填する対象と少なくとも同じ大きさでなければならない。カメラレンズは、顕微鏡対象よりもずっと大きく、これに応じた大きなダイクロイックミラーを必要とする。この大きさのダイクロイックミラーは市販されていない。

b. 高速マクロレンズにおいては、後側レンズ要素が前記CCDに可及的に近く取り付けられることが重要となる。最後方のレンズ及びCCDの間の距離のどの様な延長も、作動f値及び集光効率を著しく低下させる。従って、前記レンズの後ろにダイクロイックを取り付けるスペースなどない。

c. 通常のエピイルミネーションシステムにおいては、前記ダイクロイックは、レンズ全体を介して励起を反射する。このような理由から、励起照明の伝達は前記レンズに用いら

50

れるガラスの光学特性に多く支配される。非常に高価なしかも操作が困難なクォーツガラスの光学機器は、UVのエピイルミネーションを必要とする。これらのUV透過性の光学機器は、顕微鏡対象に必要な小型に製作され得るが、本発明用に記述された大きなサイズでは天文学的に高額となってしまう。

d. ダイクロイックビームスプリッタは光を吸収する。典型的には、これらは80～90%の効率である。

本発明の独特な特性は、ダイクロイックが不要であるということである。前記テレセントリックレンズは大きいので、その本体内に照明フッセンブリを組み込むスペースがある。照明器は、それが前記前側レンズ要素を直接的に後ろから照らすように取り付けられる。これは、反射性のダイクロイックミラーの必要なしに、標本を照らす。前記レンズを介して反射し戻されたどの様な迷い励起照明をも、照明光源に対して後部へ配置されたエミッションバリアフィルタによって取り除かれる。

さらに、前記レンズは15個の内部レンズ要素の1つだけが内部照明の前に存在するように設計される。これは、内部フレア及び反射が最小限とされるという長所がある。同じ重要性をもって、前側レンズのみがUV透過性を有していればよい。単一のUV透過性レンズは、高価であるが、使えない程ではない。

前記レンズの前側要素は、標本の面を越えて照明源に焦点が合うように計算される。標本面での前記照明源の焦点ずれは反射を最小化する。可及的に多数のウェルプレートが研磨されたプラスチックから製作され、鏡面反射を生成するようになされ、これが重要な特徴となる。

前記レンズは高効率である。前記レンズの集光 $F/\#$ は4.5である。これは、 0.03891 sr の集光固定角度、及び $0.03891/4\text{ p}=0.3096\%$ の集光効率を意味する。予想透過値は $0.85\sim0.90$ であり、これによって $0.263\sim0.279\%$ の全体としての集光効率を与えることになる。 $F/1.2$ の写真レンズとの比較では、本発明のレンズによる予想向上率は約340%である。

本発明のレンズはテレセントリックである。テレセントリックレンズは視誤差がない。標準的なレンズにより作られた深く狭いターゲットのイメージは視誤差を示す。前記イメージの中央部での円形のターゲットは真円に見える。しかし、前記レンズは、角度をもって横方向のターゲットを捉えることになる。従って、これら横方向のターゲットは、半月形（又は三日月形）に見える。多くの場合においては、ウェルの底を全く見る事ができないようになっている。テレセントリックレンズは、ウェルプレートの全体領域に亘る平行光線を集める。つまり、どのウェル内へも角度をもって見ることはなく、視誤差がない。本発明のレンズの決定的な特徴は、内部ビームがバリアフィルタの挿入に適した位置で視準することである。つまり、前記レンズは、光線がレンズバレルの中途の点で略平行となるように計算されている。前記レンズは、この点で干渉フィルタを受け入れるようになっている。前記フィルタは、励起照明及びその他の非特定光を取り除くように作用する。干渉フィルタが入射光に対して直角に取り付けられるので、この点での視準ビームは重要である。もしも前記入射光が角度付けされているならば、前記フィルタはそれが通過する際に波長の変化を示す。本発明においては、光線はこれらが前記フィルタに当たる際に略平行となり、可及的に最高の性能が得られる。

前記テレセントリックレンズは固定視野（この場合、直径約14.5cm）を有しているが、もしもより大きな標本がイメージ化されるのであれば、モータ駆動並進テーブルが前記ライトタイトチャンバ内に取り付けられ得る。前記並進テーブルは、コンピュータ制御下で標本を前記レンズに対して移動する。各動作の後で、単一の「タイル」が得られる。標本全体がイメージ化された際に、全てのタイルが、テレセントリック性、視誤差の回避、その全面に亘る高解像度を維持しつつ、単一の大きなイメージに（前記ソフトウェアにより）合成される。

極度低光用の改良

第4図は、極度低光イメージングに有用な代替システムを提供する光学倍増器70を加えた第1図のシステムの改良を示している。本システムは、その他の点においては第1図と

10

20

30

40

50

実質的に同一である。倍増器 70 は、テレセントリックレンズ 22 及び CCD カメラ 18 の間に取り付けられている。

第 5 図は、光電陰極 72、マイクロチャネルプレート (MCP) 74、燐光 (蛍光) スクリーン 76、及び真空密閉体又は封入体 78 を備えた GEN3 型としての倍増器 70 を最も良く示している。まず、テレセントリックレンズ 22 (第 2、第 3 図) は、このアセンブリ 70 の前に配置されている。その出力側で、前記レンズは、標本のイメージを伝えるべく陰極 72 の入力窓に焦点を合わせてある。光電陰極 72 は、それに当てられる光の強度に比例した電子を放出すべく選択されてある。MCP 74 は、陰極 72 及び燐光スクリーン 76 の間の真空密閉体 78 内に配置され、各端部にて陰極 72 に連結されている。MCP 74 には、小径の MCP チャンネルのアレイが設けられており、これらの夫々が砒化ガリウムでコーティングされている。陰極 72 から放出された電子は、前記 MCP チャンネルに沿って燐光スクリーン 76 へ加速される。前記陰極からの電子は、小径チャンネルに沿って加速されながら、コーティングされたチャンネル壁に衝突して追加電子を生成する。倍増化された電子は、前記 MCP チャンネルから離れながら、燐光スクリーン 76 に衝突し、出力窓上に標本の倍増イメージを生成する。このイメージは、レンズ 80 により前記カメラ内の CCD 84 要素に連結される。

10

エクステンデッドブルー (Extended Blue) GEN3 型のイメージ倍増器の利用は、前記出力窓上に与えられたイメージがよりシャープで、シェーディング誤差が少なく、また GEN1 及び GEN2 型の倍増器によるものよりもノイズが少ないという点でその他の型の倍増器よりも優れていることが分かった。但し、より優れた倍増器技術が開発されており、これらを本発明のシステムに取り入れててもよい。

20

集積カメラ 18 は、出力窓 78 上に生成される高増幅イメージが中間レンズ 80 によって CCD 要素 84 上へ焦点を合わせるように構成される。低光標本をイメージ化すべく、カメラ 18 の CCD 要素 84 は所定期間集積を行なう。集積期間中に、前記出力窓から CCD 要素 84 へ入射する光子は、負電荷 (信号) として CCD 要素 84 の無数の個別領域に記憶される。CCD 要素 84 の各個別領域における電荷量は、次の如く蓄積される。
信号 = 入射光 × 量子化効率 × 集積時間

倍増器 70 からくる入射光の相対強度が大きければ大きいほど、CCD 要素 84 の対応する領域に記憶された前記信号は大きくなる。

殆どの極度低光状態におけるシンチレーション近接検査では、本発明は光増幅器を前記レンズ及び CCD カメラの間に挿入することを許容している。好ましい構成においてはこの光増幅器がイメージ倍増器である。倍増は、例えばサイモネット (Simonet) の米国特許 No. 5, 204, 533 に開示されており、CCD カメラへのイメージ倍増器の連結を含んでいる。前記イメージ倍増器は、典型的には、光電陰極と、燐光スクリーンと、前記光電陰極及び燐光スクリーンの間に連結されたマイクロチャネルプレート (MCP) とを備えている。約 90, 000 までの光増幅係数がこの種類の装置で対応可能である。

30

光学的チェインへ前記倍増器が挿入されることにより、本発明はイメージ倍増 CCD (ICCD) カメラとなる。ICCD カメラにおいては、イメージは 3 つ又は 4 つの面で生成される。これらの面の夫々で、量子化効率が幾らか失われる。従って、前記イメージ倍増器は、前記光学的チェイン内の信号損失を上回る高いゲインで作動される。非常に高いゲイン係数では、前記 MCP を介したノイズ及びイオンフィードバックが非常に厳しくなり、このため、感度の更なる向上が不可能となる。最大ゲインで実行する際であっても、従来のイメージ倍増 CCD カメラは最も薄暗い標本をイメージかするのに十分な感度をもっていない。

40

典型的な非常に薄暗い標本に対して、殆どの ICCD カメラはイメージを生成することに失敗するか、又はターゲットがバックグラウンドから識別することが困難となるような、またターゲット強度の本当の範囲が表現されないような非常に貧弱なイメージを生成する。最悪の状態には前記ターゲットがバックグラウンドから識別できなくなる。

従来のイメージ倍増 CCD カメラは、単一のテレビジョンフレームと等しい集積期間を用いている。短い集積期間は、前記倍増器を標準的な例えばテレビジョンの製造分野で用い

50

られている低コストビデオカメラとともに用いることを許容する。その他の場合には、前記倍増器は、非常に短い集積期間（例えば1 m s e c）を用いるべくゲート制御される。ゲート制御の利用は、前記倍増器をフォトンの計数モードに用いることを許容する。本発明は、倍増光が用いられる2つの方法を提案している。好ましい方法は、冷却C C Dカメラ上への前記倍増器の出力の連続した集積を含んでいる。この方法は、高速で効率が高いが、ダイナミックレンジが制限されている。前記倍増器の冷却、又は異なる時間での多露光は、前記ダイナミックレンジを向上することに用いられ得る。第2の方法は、倍増器出力及びフォトン計数をより短い期間で観察することを含んでいる。この方法は、ずっと遅いが、広いダイナミックレンジをもっている。本発明では、標本に応じて正当化すべく何れかの方法の選択も許容する。

10

従来技術は、ウェルプレート検査のイメージ化における倍増化C C Dカメラの利用するためのものである。マーチン（Martin）及びブロンシュタイン（Bronstein）（1994）と、ロダ（Roda）ら（1996）とは、化学発光標本のイメージ化用の倍増化C C Dカメラの利用について議論している。明るい標本のみが見られ得る。視誤差なしに深いウェルをイメージ化すること、また標本に単色励起を適用することについては言及がない。

ラッシュブルーク（Rushbrooke）らの米国特許N o . 4, 922, 092（1990）では、特別なファイバーオプティックレンズに連結されたイメージ倍増化C C Dカメラの利用が開示されている。該ファイバーオプティックレンズは、ウェルのアレイと前記倍増器の入力との間に光を伝えるバンドルを備えている。この発明はラッシュブルークによって視差がないと開示されており、標準的な96個又は384個のウェルプレートには適しているが、本発明によって言及されている非常に高密度のウェルアレイをイメージ化する能力はない。さらに、ラッシュブルークによって開示された発明は照明能力に欠けている。また、入力バンドルの間にスペースがあり、これについては言及されていないので、自由型における標本をイメージ化する能力もない。レンズの入力を用いることにより、ファイバーオプティックに対して、本発明は自由型のイメージ化を許容する。

20

総じて、本発明のこの実施例は、殆どの非常に低い光の標本を検出すべく、前記レンズの後ろに配置された光学倍増器の利用を許容している。倍増に際して、前記装置は連続的な集積又はフォトンの計数モードを実行することができるようになっている。

第4及び第5図に示されたシステムでは、C C Dセンサのみが冷却されている。これは殆どの目的において十分である。増幅器光電陰極72もまた冷却されている方がもっと良く、これによって前記倍増器のS/N比が向上される。同様に、光電装置（倍増器+C C D）全体が冷却され得る。しかし、前記光電装置全体を冷却することは、前記ファイバーオプティック出力窓上の燐光体の効率を低下させるという欠点がある。

30

高品質、工學品質のC C Dカメラは前記C C Dに入射される約50個の光電子を検出することができる（どの様に検出の信頼性を設定するかによる）が、これは発光標本をイメージ化することにおける性能の正確な指標ではない。実社会での性能は、前記光学的チェイン全体の放出及び集束特性によって、また前記C C Dカメラの性能によって複雑化される。従って、前記検出器のQ E（量子化効率）を越える必要があり、またシステム全体の伝達効率を調査する必要がある。

3つの要因が前記検出器システムの伝達効率（光電子生成／フォトン放出）を支配している。これらは、前記レンズの集光率、前記C C D検出器の量子化効率、及びレンズの透過率である。生成された光電子の数は次の如く計算することができる。

40

$$N_{p e} = \tau \times \phi_{\text{detector}} \times c . e . \times N_{\text{photons}}$$

ここで、

τ は、レンズの透過率、我々のレンズでは約85～90%、

ϕ は、前記C C D検出器の量子化効率、典型的には約35～40%、我々の場合には最高80%まで、また、

$c . e .$ は、レンズの集光率、高速な写真レンズでは0.1%以下、我々の場合には約1.2%である。

市販されている最高速の写真レンズ（f 1.2）を光品質の冷却検出器とともに用いた典

50

型的な工學品質のCCDカメラシステムにおいては、前記CCDは、サンプル内の点源から生成された約5,000~10,000個のフォトンに対して1個の光電子を生成する。

本発明のレンズは、約0.271%の集光率を提供している。前記CCD検出器の効率は、その他のCCDのその約2倍である。これは、本発明が前記サンプル内の点源から生成された約500~1000個のフォトンに対して1個の光電子を生成する能力を理論的に有している結果となる。この非常に高い伝達効率は、従来技術のシステムではイメージ化できないような標本の検出を許容する。

第4及び第5図に示された本発明の他の実施例において、本システムはエクステンデッドブルー型のGEN3イメージ増倍器を伴っている。その他の型の増倍器はあまり好ましくないが、使用は可能である。増倍器の3つの大きな型（GEN1、GEN2及びGEN3）では、これらの構成要素の構成及び該構成要素が製作される材質が異なっている。GEN1型の増倍器においては、光電陰極へ入射される照明が入射信号の強度に比例した割合で放出されることになる。前記光電陰極から放出された電子は、高電位の電界を介して加速され、静電又は近接焦点合わせを用いた燐光スクリーン上へ焦点を合わせられる。該燐光スクリーンは、（珪化増倍ターゲットカメラにおけるような）ビデオカメラへの入力窓であることができ、又は直接的に見られ得る。GEN1型の増倍器は、面倒な変形を被り、比較的低い量子化効率（約10%）を有している。

GEN2型の増倍器は、GEN3型のように、前記陰極及び陽極の間のイメージ管内にMCPを伴っている。GEN2型の増倍器は、小型で、ノイズが少なく、GEN1型の増倍器よりも高いゲインを有している。しかし、これらの量子化効率は、比較的低く（典型的には20%未満）、貧弱なコントラスト伝達特性をもつ傾向がある。これとは対称的に、GEN3型の増倍器管は、約30%以上の量子化効率（より小さなゲインを要する）、及び非常に高い真性コントラスト伝達を有している。GEN3型の最近のバージョンでは、ゲインレベルがGEN2型のそれと略等しくなっている（可能な最大のゲインレベルは約90,000）。従って、GEN3型の増倍器は、GEN2型よりも良好なイメージを得る傾向にある。コスト又は特定の設計的特徴の理由から必要であれば、その他の形態の増倍器を用いることができる。同様に（電子がボンバードされた後側照明型のCCDセンサの如き）高真性ゲインを伴う同様の装置がイメージ増倍器の代わりに用いられ得る。

本発明のCCDカメラ18は、前記イメージ増倍器内のゲート制御電源に固定された集積期間を用いることができ、非常に短い間隔で読み出すことができる結果となる。前記ゲート制御及び高速な読み出しの特徴を用いることにより、最大ゲインで実行される前記増倍器又は多ステージ増倍器とともに、本発明は従来のフォトン計数カメラのように動作される。つまり、本発明のシステムは、ぼやけた標本の直接イメージ化用に、また集積からゲート制御へ動作モードを変更することによってフォトン計数カメラとしての両方に有利に用いられ得る。

CCDカメラシステム

第8図は、CCDカメラ18の模式的な代表例である。カメラ18は、カメラ開口の後ろに配置されたCCD要素84を備えている。前記CCD内の電子によって生じるダークノイズを軽減すべく、CCD要素84はヒートシンク88に取り付けられており、ヒートシンク88は、ペルチエ（Peltier）冷却要素と、高度な熱分散を提供するための液体循環システムとに熱力学的に連結されている。前記レンズは、CCD要素84上にイメージの焦点を合わせるべく前記開口に亘って配置されている。高速なテレセントリックレンズ22（第2及び第3図）は、写真レンズマウントを取り除いた後で、ネジによりカメラ本体に直接的に取り付けられている。同様に、イメージ増倍器70（ある場合）が前記カメラ本体に直接的に取り付けられている。

エリアイメージングシステムは、イメージを形成するのにCCDアレイを用いている。少ない個数の入って来るフォトンを検出するCCDアレイの能力に影響する要因には、量子化効率、読み出しノイズ、ダークノイズ、及び殆どのイメージングアレイの小さなサイズ（例えば2.25cm²）が含まれている。

10

20

30

40

50

量子化効率（QE）は、入射フォトンの前記CCD内の電子孔対内へ変換する光検出器の能力を示している。一般品質のCCDでは、典型的には約12～15%のQEを示す。標準的な工学品質の冷却CCDカメラでは、約40%のQEを示す。非常に限られた数の薄型の後側照明付きCCDでは、ピーク検出波長で80%程度のQEを達成することができる。

読み出しノイズは、一又は複数のCCD要素の電荷内容が伝達されてくる度に生じる電圧の小さな変化を測定する前記CCDの出力前置増幅器内から発生する。読み出しノイズは、読み出し率に直接的に関係しており、遅い読み出しとすることにより軽減される。

ダークノイズは、前記CCD内の熱力学的に生成された電荷によって生じる。バックグラウンドレベルを増大することにより、ダークノイズはダイナミックレンジを低下させる。ダークノイズの定常的なレベルはイメージから減算することができるが、ダークノイズは、減算することができないランダムなノイズをもまた有している。この成分は前記検出器のノイズレベルに加えられる。ダークノイズは前記CCDを冷却することにより低減される。

前記CCD要素のサイズは、光電子を格納するその能力（ウェルキャパシティとして知られる）に、つまり、そのダイナミックレンジに関係している。前記アレイ内の各CCD要素が大きくなればなるほど、その要素の最大のウェルキャパシティ及びダイナミックレンジが大きくなる。広いダイナミックレンジは検出器を飽和することなくより長い露光時間に用いることを許容し、これが非常に小さい信号の検出を向上させる。さらに、より大きな要素のS/N性能は、より小さな要素のそれよりも本質的に大きい。殆どのエリアイメージングシステムは、比較的小さいCCDを用いている。これは、個別のCCD要素が大きい装置の解像度を限定し、個別のCCD要素が小さい装置のダイナミックレンジを限定する結果となる。ダイナミックレンジが限定された装置では16ビット精度を達成することができず、比較的明るい標本（例えば蛍光顕微鏡法、UVゲル、非常に明るい化学発光）に用いられなければならない。

本発明は、上述した問題の全てを最小化すべく設計されたCCDシステムを伴っている。CCDアレイは、通常は大きく（6.25cm²）、効率が良い（約80%の量子化効率）である。これは、広いダイナミックレンジ（真16ビット）を伴った非常に高い検出器感度という結果となる。好ましい補助電子機器としては、最小の読み出しノイズをもつ高精度ディジタイザがある。好ましくは、前記カメラがダークノイズを最小化すべく冷却されているのがよい。

電気機械式のシャッター機構が、前記CCD要素上へのイメージの露光を限定べく、前記カメラ内に追加的に設けられている。好ましくは、前記カメラは、非同期リセット機能及び高量子化効率をもつ、薄型で後側照明付きの1024×1024画素の白黒カメラであるのがよい。該カメラは、前記カメラ制御ユニット内に取り付けられたディジタル化回路（ADC）と、前記コンピュータ内に取り付けられたインタフェースカードとを介して16ビットのディジタル信号出力を提供する。前記CCDからのデータは、前記カメラ制御ユニットによって200,000画素/秒の割合でディジタル化され、前記コンピュータのメモリに直接的に伝送される。

前記集積期間に続いて、前記CCDカメラは、前記電気機械式のシャッターの閉鎖を開始すべく、前記コンピュータからのトリガ信号を受け付ける。前記シャッターが閉鎖されるとともに、イメージが前記CCDから前記コンピュータの内部フレームバッファへ伝送される。

このカメラは、前記CCD要素を冷却することなく利用され得るが、集積冷却要素付きのCCDカメラを用いることにより、集積期間の延長を達成することができる。集積の効果は冷却の程度により限定される。非冷凍液体冷却装置を用いて、約-50°（周囲の温度より低い）のセンサ温度が達成できる。この温度で、ダークノイズは約7～10電子/秒の割合で蓄積する。この種類の冷却は、低コストで導入が容易であるという長所を有している。

もしも冷凍液体又は低温冷却が用いられれば、より長い集積期間が可能である。

制御サブシステム

制御サブシステム 16 は、制御ユニット 26 及びコンピュータ 28 を備えている。カメラ制御ユニットは、前記カメラを制御すべくカメラ 18 の製造元により提供されたコンピュータ制御可能なユニットである。コンピュータ 28 は、好ましくはウィンドウズ（登録商標）環境で動作する従来のコンピュータであり、本発明に応じたイメージ取得及び解析を達成すべくプログラムされている。

カメラ利用のイメージングシステムは、計数又はスキャニングシステムの典型である押しボタン式の操作性に欠けている。カメラの焦点を合わせること、露光時間を調整すること等は、全て不便となり得る。

実際、イメージングは、ウェル内の単一ターゲットを計数することよりも本来複雑である。非イメージング計数システムは比較的簡単な作業である。これらは、スキャニング処理を制御すること、内部較正を制御すること、及び各ウェルに対応したデータ点の小さなアレイを生成することのみを必要としている。その各ステップの流れは次の如きものになる。

- a. 内部標準に対して検出器を較正する。
- b. 1つのウェルに照明を当てる。
- c. 照らされたウェルに亘って P M T を配置する。
- d. ウェルを読み取る。
- e. スプレッドシートにデータを伝送する。
- f. 次のウェルに照明を当て、繰り返す。

エリアイメージングシステムはずっと難しい作業である。ウェルプレートをイメージ化することは次の要求を含んでいる。

- a. 前記プレート全体に亘って適切な照明を設ける。
- b. 高性能カメラを制御する。
- c. 寸法形状及び密度補正計数を記憶する。
- d. 標本をイメージ化する。
- e. 寸法形状及び密度変数を補正する。
- f. 必要であれば、前記標本内の標準にイメージを較正する。
- g. 各ウェルを配置し、強度を量子化する。
- h. スプレッドシートにデータを伝送する。

これらの作業は、前記イメージングシステムが上記の機能 b～h を行なうソフトウェアを装備している場合に限り行なうことができる。本発明はそのようなソフトウェアを伴っている。

特に、本発明の 1つの観点は、2つのイメージを用いることによって非特定のバックグラウンド蛍光のための補正を行なうソフトウェアであるということにある。第 1のイメージは、非特定の蛍光を励起する間、特定の蛍光を可及的に少なく励起する励起フィルタから作られる。第 2のイメージは、特定の蛍光を可及的に多く励起し、非特定の蛍光を可及的に少なくする励起フィルタから作られる。最高の特定の蛍光イメージは、前記特定のイメージから前記非特定のイメージを減算することによって作られる。

第 9 図は、前記システム 1 を制御し、それからデータを取得する際、コンピュータ 28 によって実行される一次処理を示すフローチャートである。前記処理の開始後に、標本のイメージがカメラ 18 を用いてブロック 200 で取得される。公知の処理が標本のバイアスイメージを取得するために存在する。そのようなバイアスイメージは、イメージが取られる際の、前記システム自体によって生じる全ての重大な歪及び誤差を勘案する。公知の方法の一つを用いて、前記標本のためのバイアスイメージがステップ 202 で取得される。ステップ 204 では、非特定のイメージが取得される。このイメージは、補助基質の如き非特定の構成要素の前記イメージに対する誘因を決定する。このステップは、これが標本のイメージを取得するために標本に照明が当てられなければならないので、この際に幾つかの光もまた非特定の要素から反射するときだけにだけ行われるので、オプションとして示されている。一方、もしも標本が前記イメージのための（化学発光の如き）光源であるならば、前

10

20

30

40

50

記非特定のイメージは取得されない。同様に、ブロック206でのステップもまた、非特定のバイアスイメージを得ることを含むので、オプションとなっている。

ブロック208では、前記標本のバイアスイメージが前記標本イメージから取り除かれるか又は減算され、ブロック210では、前記非特定のバイアスイメージが前記非特定イメージから減算される。これは、バイアス効果が補償された2つのイメージを結果として生じる。ステップ212では、補償された非特定のイメージが、前記標本の前記効果を隔離した実イメージを生成すべく、前記補償された標本のイメージから取り除かれる。この技術に熟練した者にとっては、ステップ204及び206が行われなければ、ステップ210及び212もまた行われたいのが望ましいことである。

バイアス除去に続いて、公知の処理を用い、（例えば前記レンズに起因する寸法形状歪用の）様々な他の補正が設けられている。

ステップ214では、オペレータが呼び「グリッド」間隔及び「プローブテンプレート」をコンピュータに入力する。前記グリッド間隔は、前記基質上の標本サンプルの呼び中心間距離である。前記「プローブテンプレート」は、膜上の1つのドット、プレート内の1つのウェル、又は同様のターゲットに対応した単一ターゲットの呼び定義（例えば形状及び面積の用語において）である。典型的には前記プローブテンプレートは円形の領域であり、前記標本内の各ターゲットに対して1つのプローブテンプレートがある。グリッドは、ターゲットの夫々に対する1つのプローブテンプレートを含んでいるマトリクスから構成されている。

オプションとして、オペレータが「アンカー点」のアレイを定義することもできるようになっている。前記標本は何千もの潜在的なサンプルのアレイをもっている可能性がある。幾つかの例においては、これらの大半が満たされ、その他の例においては、比較的僅かが満たされる。比較的少ないサンプル点が含まれている例においては、前記標本は、前記システムがプローブテンプレートの位置を特定するのを補助すべく所定の「アンカー」点を含む。大半の潜在的なサンプルサイトが含まれている例においては、サンプル自体が、前記プローブテンプレートを配置すべき十分な占有率（population）を提供し、アンカー点は必要がなくなる。

ブロック216では、定められたグリッド間隔をもつ定められたサイズのプロブテンプレートが生成され、実標本イメージに重畳させる。この時点では、オペレータが、プローブテンプレートの重畳されたグリッドを、実際の標本に対してそれらを粗アラインメントすべく、手動調整することをオプションとして提供することができる。オペレータは、例えば、マウスを用いることによって、アレイ全体を移動し、特定のプローブテンプレートを「掴み」、前記標本上の適切なターゲット上にセンタリングすることもできる。オペレータは、例えば、前記標本の適切なターゲット上の前記グリッドの4つのコーナーに、前記プローブテンプレートをセンタリングすることによって、粗アラインメントしてもよい。必須ではないが、この手動調整はコンピュータ28によって行われる処理を高速化及び単純化する。

ブロック218では、潜在的なターゲットの実際の位置に関連したプローブテンプレートのためのより詳細な位置を決定すべく、後述する処理が行われる。この処理の初めに、ブロック218では、前記ターゲット又はアンカー点が適切に特定又は定められたか否かの決定がなされる。もしもターゲットがよく定められていれば、プローブテンプレートのアレイが定められたターゲットにアラインメントされるブロック222へ制御が移行され、もしもターゲットはよく定められていないがアンカーはよく定められている場合は、制御は、プローブテンプレートのアレイが前記アンカーにアラインメントされるブロック220へ移行され、それ以外では、制御は、前記アレイのための所定のグリッド間隔及びプローブテンプレートが用いられるブロック224へ移行される。幾つかの例においては、前記アレイをアンカー上へ、そしてターゲット上へアラインメントすることが望ましい。

前記プローブテンプレート及びターゲットが一度アラインメントされると、個別のプローブテンプレート内の測定値が異なる条件に復号される。例えば、プローブは、 n 個の条件の何れをも仮定することができ、ブロック226の処理は各プローブでのサンプルをこれ

10

20

30

40

50

らの条件の1つに復号することができる。実際の処理は統計的に行われ、バイナリ判断を解くのに関連した単純な例から最もよく理解される。しかし、この技術に熟練した者にとっては、前記処理が多条件処理を解くことに実際に適用され得るのがよい。最も単純な場合には、バイナリ判断が「YES」又は「NO」の判断となって、或る条件の存否に関連させることができる。ブロック226での処理に応じて、前記標本の全てのプローブでの実際のレベルが測定され、平均及び標準偏差がサンプルのセットに対して決定され、そして結果として実統計的分布が得られる。そして、「YES」又は「NO」の復号は、オペレータによって選択されたどの信頼レベルに対しても行われ得る。信頼レベルのオペレータの選択は、（例えば分布曲線の平均からの標準偏差の演算値に位置するレベルに基づいた）閾値レベルの決定に寄与し、該閾値レベルを越える何れの信号をも「YES」と判断され、前記閾値レベルを下回る何れの信号をも「NO」と判断される。

10

ブロック228では、処理は、ブロック226で行われた処理に基づいて、アレイデータの報告の生成を行なう。好ましい形式の報告を用意することにおけるかなりの大きさの自由度をオペレータに提供する何れの形式の報告作成ソフトウェアをも意図している。報告が一度生成されると、本処理は終了となる。

付録Aとして添付したものは、第9図の処理のより詳細な議論である。

第10図は、第9図のブロック222で行われる処理を示すフローチャートである。

本処理の初期化の後、イメージバックグラウンド及びノイズがブロック300で予測される。ブロック302では、ターゲットのアレイに対するグリッドのグループアラインメントが必要であるか否かの判断を行なう。これは、オペレータにより目視で、又は前記システムによってなされ得る。この試験の目的は、前記グリッドがターゲット全体にアラインメントされているか否かを判断するものである。もしも前記システムによってなされるのであれば、形状の2つの一般的な形状パターンのアラインメントを試験するための従来の手順によって行われる。もしも、前記グループの適切なアラインメントが存在すると判断されれば、制御は、ブロック306へ移行する。

20

ブロック304では、グループアラインメントが行われる。この操作の目的は、前記プローブテンプレートグリッドを対応するターゲットに大ざっぱにアラインメントすることにある。該アラインメントは、オペレータによって選択されたグリッドの一部又は全部に基づいて行われ得る。このアラインメントは、IDを最大化するブロック306に対する、前記IDがグリッド全体に亘って最大化されていることを除く、後述の処理によって行われ得る。

30

ブロック306では、ステップ毎の処理が、式(1)によって与えられる前記プローブテンプレート内における最大の集積密度IDを獲得する点を特定すべく、夫々の個別テンプレートの領域内で行われる。

$$ID(x_0, y_0) = \int_{S(x_0, y_0)} D(x, y) W(x - x_0, y - y_0) dx dy \quad \cdots (1)$$

ここで、

(x_0, y_0) は、プローブテンプレートの中心点、

$S(x_0, y_0)$ は、 (x_0, y_0) でのプローブテンプレート領域、

$D(x, y)$ は、 (x, y) での密度値（例えば光沢剤）、そして、

$W(x, y)$ は、重み関数（例えば(0,0)で最大値をもつ2次元のガウス関数）である。これによって、式(1)で最大値を与える位置である各プローブテンプレートの「A位置」が得られる。ブロック306の前でのプローブテンプレートの位置は「G位置」と称される。ブロック308では、各プローブテンプレートの中心の最終位置に到達するために、A位置及びG位置の間で信頼重み付けが行われる。各A位置に対する信頼重み係数は S/N 比の一形態である。つまり、各点でのIDの値は、その点でのIDの値と、その点に対するブロック300での決定値との間の比率に比例している。つまり、重み係数は、その点がどのくらい前記A位置に近いかを決定する重み付けによって、前記A位置及びG位置の間の直線に沿ったプローブの中心の位置を決定するために用いられている。

40

詳細説明は本発明装置の好ましい実施例を記述及び図示しているが、本発明はそれに限定されるものではない。改良及び改変はこの技術に熟練した者には明かである。本発明が参

50

照する定義は添付の請求範囲である。

付録 A

目次

序論	2	
イメージング及びライブラリスクリーニング	3	
遺伝子発現の研究	4	
高密度グリッドソフトウェアの詳細	5	
断片化	5	
手動断片化	6	
自動断片化	6	10
固定サンプリングプローブを用いた断片化	7	
グリッドの生成及びアラインメント	7	
精密整列	8	
アンカー	8	
詳細モード及びスクリーニングモード	8	
詳細モードー遺伝子発現	8	
ライブラリスクリーニングモード	8	
詳細モード及びスクリーニングモードのまとめ	9	
対象目的の選択：統計的断片化	9	
スクリーニング	9	20
詳細モード及び遺伝子発現	10	
まとめ	10	
高速データ通信：基本表示	11	
バックグラウンド変動の効果	11	
まとめ：高密度グリッド研究の種類の特徴	12	
参考文献	13	

序論

分子生物学、化学及びロボット工学における急速なペースの革新は、一般的に生物医学の研究において、また特に薬学の先端発見において大きな影響を及ぼしている。或る企業は革新的な技術を取り入れるのが早く、全ての競争相手のプレッシャーを助長している。皆が、コストを低減し、潜在的な治療対象の発見及び評価のスピードを上げる方法を見出したいと願っている。その結果、薬学の新しい分野ー生物分子スクリーニングの急速な成長をもたらした。生物分子スクリーニングは、潜在的な治療効果のある多数の化合物の急速で効果的な研究所における試験として定義され得る。

スクリーニングの発展は、革新、組み合わせ化学、生物学的変化、分子遺伝学、及びその他の分野における新しい理解の当然の結果である。例えば、組み合わせ化学は、数百数千もの潜在的な関心のある化合物が生成される単一の化合物から始めることができる。これらの化合物の全て又は重要な部分集合は、生物学的活動を試験されなければならない。別の例は、化合物と遺伝子との間の相互作用の発見、検出及び特性付けにある。

組み合わせ化学、分子遺伝学、及びその他の応用の要求がスクリーニング技術、高処理能力スクリーニング（HTS）の特化した特色の発展を促してきた。HTSは、生物分子スクリーニングの一般的な定義と基本的には異なっていない。我々は、これをスクリーニングの「ホットロッド」と考えることができ、これには、化合物を試験する速度を加速するために無視できない程の費用及び努力が費やされている。検査化学、検出システム、自動化／ロボット工学、及び生物情報学における最高技術の全てが、HTSにおける役割をもっている。検査化学が最大効率に最適化することができる1つの方法は、検査フォーマットを最小化することにある。例えば、96個から384個のウェルプレートに移行することは単位面積当りの検査サイトの数を増加させる。ずっと高密度のマイクロウェルフォーマットが直に出現すると考えられる。マイクロウェル検査は、微小製作装置又はスポットロボットが固体支持メディア（例えば、Beattieら, 1995; Eggersら, 1994; Khrapkoら, 19

89, 1991; Lamtureら, 1994; Lipshutzら, 1995; Maskos及びSouthern, 1992; Mason, Rampal及びCoassinら, 1994; Pearson及びTonucci, 1995; Peaseら, 1994; Saiki, Walsh, Levenson及びErlich, 1989; Schena, Shalon, Davis及びBrown, 1995; Southern, Maskos及びElder, 1992) 上にDNAクロンの非常に高密度なアレイを設けることに用いられるような、その他のスクリーニングプロトコルの先例に追従するであろう。

典型的な標本内のターゲットの数は急速に増加している。今日の微小製作装置の試作品には、約1000~20,000個のグリッド要素(簡単な閲覧には、Southern, 1996を参照)が組み込まれている。スポット化された検査では、ずっと高い密度を日常的に達成している。我々の記録では、約20×20cmの膜上にハイブリダイゼーションした50,000個以上の同位体認識されたcDNAのドットプロットを含んだイメージをもっている。我々は、充填密度が同位体からの拡散放出によって限定されないような、非同位体方法を用いて達成されたずっと高い密度を見てきている。マイクロプレート、膜、又はその他のメディアが検査サイトに更に濃く混雑化されてきているので、結果として規則的に離隔されたグリッドパターンでのサイトの高密度を得ている。これは、「高密度グリッド」と通常称される。

ウェルを解析するための伝統的な方法(一般的には光電子倍增管を利用したカウンタ)は、高密度グリッドには通常不適切である。各グリッドに次々に取り掛かることができなければならない計数装置は、小さな検査サイトの大きなアレイを取り扱うことができない。これとは逆に、カメラを利用したイメージングシステムは、高密度グリッド及び自由型(規則的に離隔されたパターンでないもの)における標本の両方によく適している。自由型の標本の例は、皿における組み合わせビード検査、組織培養における細胞単位の検査、及びコロニー検査を含んでいる。

イメージング技術及びスクリーニング技術の間の共通点は、依然として造形的な段階にあり、その手順が丁度実用化されただけである。微小製作における、非加工アレイ(例えば膜、マイクロウェル)における、及び検出技術における革新は、順序付け、診断、及びバインディングにおける新しいスクリーニングの規範のための道具を得るべくイメージ解析と結合する。

イメージング及びライブラリスクリーニング

分子遺伝学、即ちDNA分子レベルにおける遺伝子の研究は、DNA符号化特定遺伝子の分離及び特性付けを含んでいる。最も基本的な目的は、疾患の又は病理学的プロセスにゲノムを関連付けることにある。例えば、殆どの癌は、異常な細胞機能をもたらす後天性の遺伝子の突然変異に起因している。もしも特定の遺伝子が特定の癌に伴って通常変質するのであれば、遺伝子変質は前記癌の試験に利用することができるものである。遺伝子工学の技術は、遺伝子、及びその暗号化蛋白質の機能を研究し、希少蛋白質を大量生産し、遺伝的無秩序の動物モデルを生成することに利用することも可能である。この全ての出発点は、cDNA及びゲノムライブラリのスクリーニングである。我々は、我々のプローブにハイブリダイゼーションするクローンを単純に識別するためにスクリーニングを行ない、また我々は、いくつかの独立した変量(例えば2つの細胞系)に応じて遺伝子発現を変質するクローンを識別するためにスクリーニングを行なう。

DNAライブラリスクリーニングの最も一般的な応用は、関心のある特定の遺伝子に応じたクローンの識別及び分離である。特定の遺伝子のクローンを分離するために、その遺伝子用のプローブが不可欠である。そして、DNAライブラリでは、前記プローブによるハイブリダイゼーションする配列を含んだクローンをスクリーニングする。

関心のある遺伝子のクローン化DNAを分離する第1ステップは、ライブラリの個々のクローンを分布様式に並べることである。各位置に配置されたクローンは、例えば我々がコスミド、又はYAC又はBACクローンの指定されたアレイをもっている際には、既知のエンティティである。このアプローチは、遺伝子を同時にクローニングし、染色体位置にそれをマッピングするという利点をもっている。このようなライブラリは遺伝子マップに多く統合されるので、遺伝子の位置を識別することは、染色体と同じ領域にマップされている遺伝的疾患との可能な結び付きを連想させる。換言すれば、前記クローンは、特定の

10

20

30

40

50

ライブラリの非指定のサンプリング（冗長及び重複（複写）を伴う）を構成している。個別のクローンのライブラリは、強固な支持体、典型的には膜フィルタ上に重複されている。精密なスポットロボットを用いて、ライブラリ全体が2、3個の膜上の高密度グリッドとして並べられ得る。ライブラリ内の各クローンは、関心のある遺伝子のほんの一部を含んでいるか、又は特定の遺伝子が前記ライブラリ内にて不十分に代表していることがあるので、ポジティブ（補完的な）クローンを見つける高い確率を得るべく、数万個、いや数10万個の個別のクローンが、スクリーニングされる必要がある。特定の遺伝子用の標識プローブが、数千個の可能性があるターゲットのうちの2、3個のクローンだけと相互作用する結果となる。

ポジティブクローンを識別すべく、我々はドットプロットの高密度グリッドを標識プローブによってハイブリダイゼーションする。典型的には、前記プローブは、小さなDNAの破片又は既知の配列をもつ人工オリゴヌクレオチドである。ハイブリダイゼーションの手順は、強力な配列特殊性及び補完的なヌクレオチドストランドの高相性を利用する。この手順のゴールは、我々の膜上のライブラリが我々のプローブにおける既知の配列に補完的な配列を含んでいるか否かを決めることにある。もしもそうであれば、このハイブリダイゼーション化された配列は、より小さなハイブリダイゼーション化された部分の側面的なゲノムの未知の部分に我々の注目を導くことに成果を納め、また用いられ得る。

クローンが前記プローブにハイブリダイゼーションする程度を可視化することは、前記イメージングシステムの1つの役割である。前記高密度グリッドは、同位体又は非同位体イメージングの何れかによって可視化される。同位体標識プローブにとっては、燐光（蛍光）イメージングプレート技術が最も便利及び正確な信号検出を提供する。非同位体検出は、感度が高いデジタルカメラ、及び化学発光又は蛍光標識を用いて行われる。我々は、この目的に我々のツンドラ（Tundra）超低光イメージングシステムを用いることを推奨する。我々の標識がどうであっても、結果は高密度グリッドのイメージである。典型的なスクリーニングの研究においては、このイメージは何千もの非標識点と2、3個の標識点とを含んでいる。ポジティブヒットを識別すべく前記イメージを解析することは、前記イメージングシステムの第2の大きな機能である。

イメージ解析は、前記ドットの位置特定、ハイブリダイゼーションの強さの定量化、並びにポジティブ及びネガティブヒットへのオペランド解析を含んでいる。最も困難な局面はドットの位置特定である。ライブラリをスクリーニングすることは、前記イメージ内のたった2、3個の可視スポットを通常生成するだけなので、それらの相対的な強さに基づいてポジティブターゲットの位置を定めることが容易に見える。この場合には、我々は前記イメージを「目で見て」、ヒットだけを選択する密度レベル（閾値）をセットする。

密度値に基づいたヒットの選択は、遺伝子発現の研究（下記参照）よりもライブラリスクリーニングの方がより適切であるが、次の如き理由からヒットを選択するのには貧弱な方法であることには変わりがない。

1. バックグラウンドにおける変動及び標識の強さは、ヒットの単一の密度値を定めることにおける何れかの不確かさに通常繋がっている。クローンに対する弱い本物の相関をもつ重要なクローンにハイブリダイゼーションするプローブの場合を考える。このクローンは、ネガティブの殆どよりも幾らか強いだけのぼんやりしたスポットとして現れる。もしもポジティブの選択が単純な密度の切捨てによりなされるのであれば、前記スポットは見逃されてしまう。

2. 密度基準が定量化及び評価の前に対象物を除外する。従って、定量化データを基準とする代わりに、我々は主観的な判定を基準にヒットを検出している（より暗いか明るい）。この種類の手順は、有効化することが難しくバイアスを生じ易い。

これとは対称に、我々のソフトウェアは、ヒットの識別に先立ってグリッド要素の全てを位置特定及び定量化すべく、前記グリッドの規則的な間隔を利用する。このアプローチ（固定サンプリングプローブ方法）は、空間的参照点を提供するために、フィルタ上の特定の「アンカー」スポットを用いている。これらのスポットを用いて、前記ソフトウェアは、グリッド要素の各々及び全てにおけるクローンを識別することができる。前記ソフトウ

10

20

30

40

50

ウェアは、ローカルバックグラウンド変動、照明偏差、及びその他の誤差源の補正も行なう。

バックグラウンドのために位置特定及び補正が行われたグリッド要素を用いて、前記システムは全ての要素からデータを読み取る。グリッド内の全てのターゲットは、測定し、グリッド用のデータベースに入力される。前記データを用いて、客観的な統計的手法がポジティブヒットを識別することに適用され得る。例えば、我々は前記グリッド要素の全ての強さを比較し、全ての平均信号から10標準偏差単位離れている信号の要素を選択する。統計的手法の利用は、全てのポジティブを、視覚的に明確でないようなものでさえも、客観的な基準を用いて確実に識別する。

最後に、前記ソフトウェアは、容易に解釈可能な方法で結果を示す便利なグラフ出力を提供し、あなたのデータ管理ソフトウェアにエクスポートすることができる完全な数値データを提供する。

10

遺伝子発現の研究

遺伝子発現の研究のゴールは、2つ以上の条件に亘り異なって発現された遺伝子を見つけることにある。例えば、我々は疾患をもつ家系からの対照標準細胞内の、及び何らかの薬品に触れさせた同一種類の細胞内の、所定の遺伝子の発現を比較する。遺伝子発現を評価するための伝統的な方法は、個々の遺伝子のRNAレベルを順々に又は一度に幾つかずつ検査することに基づいてなされる。これに対して、高密度グリッドの利用は、数千の遺伝子の発現を同時に研究可能とする。ライブラリスクリーニング及び遺伝子発現の間のキーとなる違いは、我々が特定の既知の配列に対するハイブリダイゼーションを識別する2、3個のヒットを探しているのではないということである。それよりも、我々は多数の遺伝子が発現される程度を評価しているのである。

20

遺伝子発現は、cDNAライブラリに対するプローブの複雑な化合物のハイブリダイゼーションによって調査される。前記ライブラリは、2つ以上の同一の高密度グリッドを生成すべく、反復試験区においてスポットされる。異なるプローブが、研究における各条件から分離されたRNAを用いて、独立して引き出される。各RNAサンプルは、実際には、異なる遺伝子の生成物に応じた、多くの異なるmRNA分子の複雑な化合物である。個々の遺伝子の発現レベルは、mRNA分子の数に反映され、この複雑な化合物に寄与している。発現レベルが高いほど化合物内のmRNA分子の数が多くなる。

(反転転写酵素を用いて) 複雑なプローブが生成される際に、放射性又はビオチニル化 (biotinylated) スクレオチドを伴う。ハイブリダイゼーションに続いて、特定の遺伝子の活動は、前記高密度グリッドの各スポットで検出された信号に対して比例する。

30

2、3個のスポットがハイブリダイゼーションするライブラリスクリーニングの場合とは違い、殆どのスポットが、遺伝子発現を研究するのに使用されるRNAの化合物にハイブリダイゼーションする。従って、グリッドスポットの全ての位置を識別することは難しいことではない。前記イメージングシステムは、サンプリンググリッドにアラインメントするために実際のスポットマトリクスからの情報を用いている。遺伝子発現を研究する上での本当の問題は全くもって大量のデータにある。高密度グリッドは、複数の膜に亘る幾千ものスポットを含むことがあり、各スポットの発現値が保持されなければならない。イメージ解析ソフトウェアは、このような大きなデータセットを取り扱うように、及び条件間でのこれらのデータセットの比較を行なうように設計されることが重要である。我々のソフトウェアはこれらの機能を含んでいる。条件間の発現を比較することは、つまらないことではない。各グリッドは、信号の絶対的な強さにおいてその他のものと異なり、我々は標本間の信号を単に比較することはできない。我々のソフトウェアは、不適切な内部膜の変動が最小化できる多数の方法を推奨している。例えば、我々は各グリッド内の内部標準 (特定の遺伝子、又は全ての遺伝子の平均発現レベル) を定めることができる。内部標準へ値を標準化した後で、強さの値がグリッド間で比較される。別の方法では、局所的なヒットの差の分布を用いて、条件間の差のスコアを比較するようになっている。前記差のスコアは、膜間の一般的な強さの差の影響を受けず、幾つかのその他の有益な統計上の特性を有している。これらと、我々のソフトウェアに含まれるその他の方法とを用いて、我々

40

50

は、遺伝子発現を比較するための最良の方法に辿り着くための、様々な種類の事後データ解析を行なうことができる。

大きな遺伝子発現の研究は甚大なデータセットを構成する結果となる。従って、データ管理機能がこのデータセットを要約及び操作することが重要である。我々の基本表示機能は、複雑な発現の研究結果を要約した容易に理解される図を生成する。我々のデータエクスポート機能は、あなたの会社のデータ構造に直接的にインポートできるマトリクスを生成する。

高密度グリッドソフトウェアの詳細

断片化

高密度グリッドが解析され得る前に、3つの主なる課題を達成しなければならない。

10

1. マトリクス内でのその位置がわかるように、(以後ターゲットと称する)各グリッド要素を識別する。この識別は、グリッドを生成する上での幾つかの変異性を考慮しなければならない。

2. 各ターゲットでの(ハイブリダイゼーションの強さを反映する)密度を定量化する。これは、密度基準、及び/又は何らかの形式のバックグラウンドの補正を必要とすることがある。

3. 関心があるターゲットを選択する。ターゲット密度が一度定量化されると、我々は、複数の標本に亘って遺伝子発現を解析すべく、ターゲットの夫々及び全てを報告できる。これに代えて、我々は、前記大きなアレイから関心のある限定数のターゲット(しばしばヒットと呼ばれる)を単に選択することができる。

20

前記解析の第1ステップは常にターゲットの識別である。バックグラウンドからのターゲットの区別化の処理は、断片化として知られており、手動又は自動で行なうことができる。

手動断片化

断片化の最も単純な形態は、各ターゲットを1つずつ定めるものである。これは、各ターゲット上にマウスで円を配置することによってなされる。マウスの各クリックに応じて、ターゲットの強さ及び位置が示される。

典型的なライブラリスクリンにおいては、ヒットを示すほんの2、3個のよく見えるドットをもつ透明な基質の大きな領域がある。明かなドットをクリックする(これらの位置コードを生成する)ことは、受け入れ可能な検出方法のようである。しかし、手動断片化は、はっきりと見えるヒットに対してさえも実用的ではない。この問題は、ヒットをグリッド内のこれらの正しい位置に割り振ることにある。何れかのドットをその正しい位置へ割り振るには、まず全てのドットを検出し、アラインメントすることを含んでいる。勿論、全てのドットを手動でクリックすることもできるが、これには非常に時間がかかる。1000個のターゲットを識別しようとすることを想像して見て下さい。多くの研究所は近い将来100,000個以上のターゲットを調査することを望んでいることを考えて下さい。

30

自動断片化

自動断片化は、手動の指示なしにターゲットを見つけるものである。あなたのシステムの自動断片化機能の品質はその成功のために重大である。もしも自動断片化が正しく実行されるならば、それは何千ものターゲットを識別して解析する速くて便利な方法を提供することができる。もしも正しく実行されなければ、自動断片化は多くの間違ったポジティブ及び間違ったネガティブを生成し、大規模なスキャン後修正機能を必要とする。最悪の場合、貧弱な自動断片化は偽のデータを得ることであろう。

40

自動断片化の標準的な方法は、ターゲットに特定の密度範囲を割り振ることにある。この処理は閾値化と称する。前記密度範囲内にある画素はターゲットとして分類される。この範囲内にない画素はバックグラウンドと分類される。

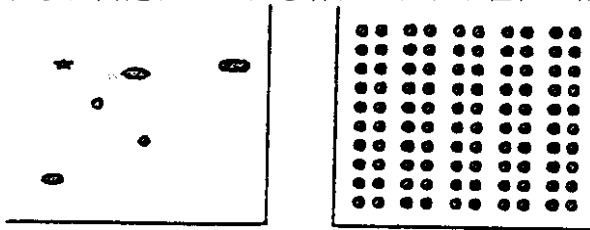
単純な密度閾値は、もしもターゲットが様々なサイズ及び形状のものであり、及び/又はイメージ内の固定位置を占有しないならば、最良の選択となる。例えば、乳剤で覆われ、プローブの本来の位置にある同位体で標識化された組織部分は、前記イメージ内のどこに

50

でもあるターゲット（暗い粒）を含んでいる。我々は、前記粒を最大限に可視化し、密度閾値（例えば50グレイレベル）をセットし、そしてこの閾値よりも暗い何れの画素を粒として検出するように、前記イメージを処理することができる。

これに対して、グリッドを使えば、ターゲットは固定サイズとされ、規則的に配置されている（第1図）。我々は、断片化をより正確及び効率よくするために、この規則的な配置を利用することができる。実際、密度閾値はグリッドイメージングにおいては殆ど十分ではない。これは、ばらつきのある局所的なバックグラウンド（例えば左上と右下で異なる密度）によって、及びターゲットを区別するための強さのレベルを定めることにおける不確かさによって無効になる。我々の経験は、密度閾値が高度に主観的であり、グリッド解析の殆どの形態において難しい作業であるということである。

第1図：空間的に多様なターゲット及びグリッドターゲット。左のイメージにおけるターゲットは、サイズが様々で間隔が不規則である。これらは密度閾値を設定することによって検出される。右のイメージにおけるターゲットは、グリッドとして整理されている。これらは固定プローブを各ターゲット位置に配置することによって検出できる。

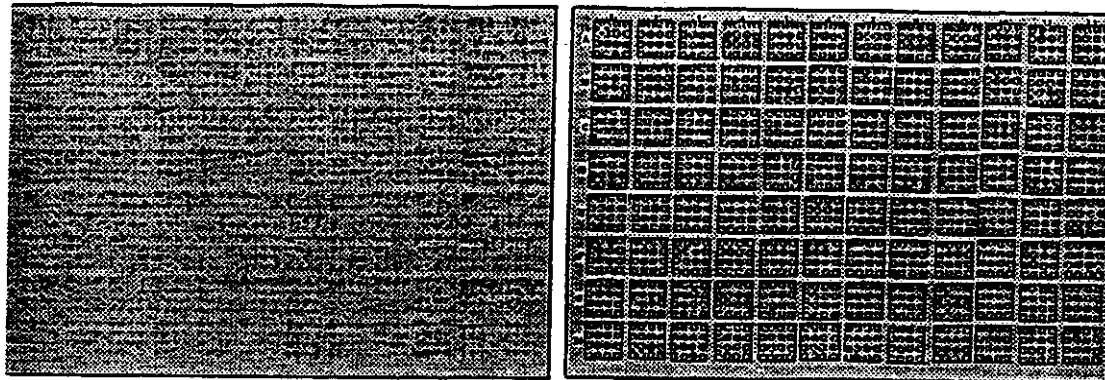


固定サンプリングプローブを用いた断片化

好運にも、グリッドは、かなり客観的に、また不規則なターゲットよりもずっと効率よく解析され得る。我々は、ターゲットの間隔、数、及び直径を知っており、ターゲットの識別における唯一のツールとしての密度差を用いる必要が全くない。代わりに、A I S / M C I Dが固定サンプリングプローブ方向を用いている。

固定プローブを用いることにおいて、グリッドの輪郭（形状）が断片化処理を管理している。固定サンプリングプローブは、前記グリッド内の各位置に（自動的に）配置される。これに伴う困難は、本当の標本がめったに完全に離隔されないことにある。我々は、スポットロボットがさまよったり、多種多様に変化したりするのを、又は幾つかのその他の要因がグリッド内の変化を引き起こすのを見い出すであろう。従って、固定プローブ方法による断片化は2つのステップを必要とする。まず、グリッドが、グリッドの輪郭からのドットの位置を用いて、その理想的な位置に伝えられる。そして、システムは、実際のターゲットにグリッドを自動的にアラインメントするために、幾つかの若干洗練されたアルゴリズムを応用する（第2図）。

第2図：1536個の個別のドットプロットを含んだ高密度グリッド。左には、サンプリングプローブなしのイメージを示してある。右のイメージは、ドットプロットの夫々の所定位置にサンプリングプローブが配置されているのを示してある。我々は、プローブを配置し、これらをドットに自動的にアラインメントした。



固定サンプリングプローブ法を用いることには、密度閾値を超えるターゲットをスキャンすることに対して、多くの利点がある。

1. 我々は、バックグラウンド又はバックグラウンド近傍のレベルでのデータを備えるものを含む全てのターゲットを検出及び定量化する。
2. 全てのターゲットを検出することは、ヒットを定めるべく、（主観的な密度閾値に代えて）客観的な統計的手順を用いることを許容する。
3. 我々は、ターゲットを明かな方法で活性化しないものを含む任意の数の実験条件に亘って、与えられたターゲットを追うことができる。

グリッドの生成及びアラインメント

グリッドは、キーボードで入力された間隔パラメータ（ドット間距離及びドットのグループ間距離）を用いて生成される。定められた間隔によって、グリッドの基点が示され、そしてグリッド全体が前記基点から拡大する。

10

精密アラインメント

グリッドサンプリングプローブの幾つかがそれらに割り振られたターゲットの真上に直接ないことがある。この問題を解決すべく、自動アラインメントが行われる。この処理の間、ファジー理論のアルゴリズムが各別のグリッド要素を実際のイメージデータに最も当てはまる位置に配置する。もしも更なるアラインメントが必要であれば、任意のグリッド要素又は要素のグループをもマウスを用いて正しい位置へ引っ張って行くことができる。

アンカー

全ての標本が、精密アラインメントに用いられ得る可視ドットを有しているわけではない。ライブラリスクリーニングにおいては、可視ドットを2、3個しかもたない非常に大きなグリッドを有することは普通である。この場合において、精密アラインメントのアルゴリズムは、既知の参照点がグリッド上に配置されている場合を除いて、利用できるデータに欠けている。これらの参照点は、アンカーと称し、明確なターゲットを備え、自動アラインメントを導くことに用いられる。例えば、我々のスポットロボットは6144個の個別のドットを備えたグリッドを生成する。我々は容易に検出された量の標識を4隅のドットの位置及び数カ所のより有効な位置におくことができる。我々が前記グリッドを生成する際に、A I S / M C I Dはアンカー点を参照として用いて自動アラインメントを行なう。

20

詳細モード及びスクリーニングモード

詳細モードー遺伝子発現

詳細モードにおいて、グリッド内のターゲットの夫々及び全てについて値が得られる。詳細モードは、ターゲットの完全な説明を与えるものであり、最高で4個のグリッド間の直接的な比較を許容する。しかし、データテーブルは何千もの数を有しており、これがあなたのシステムの速度を低下させることがある。一般に、5,000個のドットを夫々有する2、3個のアレイを扱うことには全く問題がない。しかし、非常に大きな数のドット（例えば30,000個以上）を管理することは処理能力を制限することになる。グリッドをスキャンすることが大きな問題ではない。むしろ、50,000個の数を有するデータテーブルをただ再演算することに時間が掛かるのである。もしもデータ管理が遅すぎるのであれば、スクリーニングモードを用いることを検討されたい。

30

詳細モードは、遺伝子発現の研究において、またハイブリダイゼーションによるスクリーニングの幾つかの場合において最も有用である。これらの応用のどちらも、明かなヒット及びバックグラウンドの単純な区別以上のものを含んでいる。従って、どのようにグリッド内の全ての点が反応するかの知識をもつことは有用である。

40

ライブラリスクリーニングモード

スクリーニングモードは一度に1つのグリッドを解析し、そのグリッドからのヒットのみを表示する。グリッド要素の小さな割合のみが標識を有している場合は、スクリーニングモードを使って大きなライブラリに対して未知のものをスクリーニングする。

スクリーニングは、詳細モードと同様の理論構造を用いている。即ち、統計的な断片化に先立ってデータの全てがスキャンされ、定量化される。違いは、我々が比較的きれいな標本から2、3個の標識化ヒットを識別したいということにある。非標識化グリッドの位置からのデータは、これらがシステムの反応をただ単に低速化するので、報告される必要は

50

ない。

断片がスクリーニングされた後で、ミスは破棄され、ヒットのみが保持される。該ヒットのみがデータテーブル内に表示されるので、データ管理はずっと高速になる。

詳細及びスクリーニングモードのまとめ

前記詳細モード及びスクリーニングモードの間の差は、前記グリッドが定量化された後で何が起こるかに依っている。詳細モードは、あなたがデータ解析をこの後に探求的行なうことができるように、各ターゲットの値を報告する。これに対して、スクリーニングモードは有効なヒットのみを報告する。それは、更なる注目のための限定された数のヒットを選択すべく、ターゲットの分布における切り捨て点（例えば平均を超える5標準偏差）をセットする。前記切り捨て点を超えたところにあるこれらのターゲットだけがデータリス

10

対象目的の選択：統計的断片化

詳細モード及びスクリーニングモードの両方において、初期断片化ステップは、固定サンプリングプローブ及び自動アラインメントを用い、グリッド内の夫々及び全てのターゲットからデータを生成する。ターゲットが一度断片化され、その密度又は体積が計測された後には、様々な手順が関心のあるターゲットを選択するために用いられる。

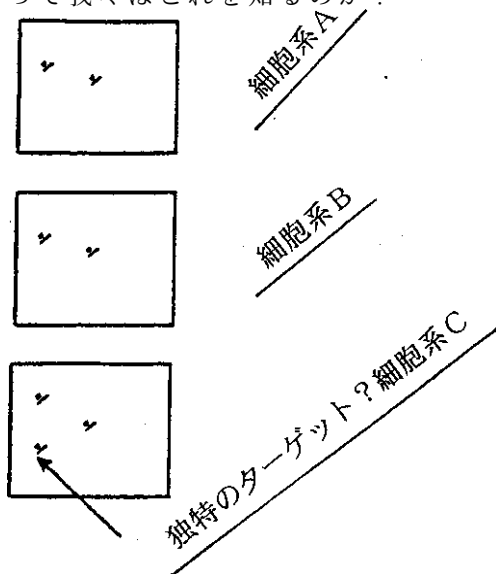
我々は、我々が標本全体から限られた数のヒットを選択する（スクリーニングモード）、又は遺伝子発現における1つの標本の別のものとの最も重要な差を追跡する（詳細モード）処理を記述するために、統計的断片化という用語を用いている。我々は、統計的断片化を統計的理論のターゲットの自動規定化への応用として定義することができる。

20

スクリーニング

我々がプローブを用いてcDNAライブラリを3つの細胞系からスクリーニングするような実験を考えてみる。これらのライブラリは3つの同一の膜（20Kプローブ／膜）上にスポットされ、1つの細胞系が各膜に与えられる。ハイブリダイゼーション手順に続いて、我々は前記3つの膜のオートラジオグラフを調べ、全ての細胞系がライブラリ内に2つのクローンを伴う強いハイブリダイゼーションを示すと判断する。しかし、3つ目の細胞系（系C）も、さらに他のクローンとハイブリダイゼーション（幾らか弱く）することが示される（第3図）。系Cが他の2つとは異なるということは可能であるが、ではどうやって我々はこれを知るのか？

30



40

第3図：空間的に多様なターゲット及びグリッドターゲット。左のイメージ内におけるターゲットは、サイズが様々で間隔が不規則である。これらは密度閾値を設定することによって検出される。右のイメージにおけるターゲットは、グリッドとして整理されている。これらは固定プローブを各ターゲット位置に配置することによって検出できる。

第3図：プローブによるcDNAライブラリの3つの細胞系からのスクリーニング。3つの細胞系の全てはクローンの2つにハイブリダイゼーションする。細胞系Cは、3つ目の

50

クローンにハイブリダイゼーションしている。これが本当の効果であるか否かを決めるために、我々は3つの膜の全てに亘って前記3つ目のクローンでのハイブリダイゼーションの強さを比較する必要がある。

幾つかの要因が系Cにおける前記3つ目のクローンについての我々の決定に影響し得る。

1. 前記3つ目のクローンは、系Cに強くハイブリダイゼーションするが、細胞系A及びBにもそれより弱くハイブリダイゼーションする。

2. 前記3つ目のクローンは、系Cのみに排他的にハイブリダイゼーションするが、ハイブリダイゼーション信号は弱い。

3. 作成には、前記3つ目のクローンの解釈を複雑化する任意の数の紛らわしいスポットを含み得る。 10

これらの場合において、我々は単純な白黒区別を有しないかも知れない。むしろ、我々は前記3つ目のクローンに対する判決を下す必要がある。前記信号がヒットと考慮される十分な強さであるか、ないか？「良いように見える」密度閾値を単に設定することは、むしろ独断である。

あなたの客観的な判断を助けるために、前記システムは全てのターゲットの強さを見つけ、演算する。そのデータは、バックグラウンドの強さのターゲット、バックグラウンドよりも幾らか上であるがぼんやりしているターゲット、及び我々の目に明らかであるより強いプローブクローン相互作用であるターゲットを含んでいる。

我々が完全なデータセットを一度もったならば、夫々の観測された強さがヒットである確率を決めるために、平方偏差基準の統計的手順を適用することができる。平方偏差基準の識別は、単に密度基準でヒットを検出するのではないという点で単純な閾値とは異なっている。むしろ、それは各ターゲットの密度を全てのターゲットの分布特性と比較している。ヒットはその他のものと最も似ていないターゲットである。その理論は、ターゲットが残りのものと非常に異なるターゲットが恐らく調査されるべきものであるというものである。この種類の平方偏差基準の閾値は、（統計を用いて）容易に有効化され、また容易に適用される。 20

詳細モード及び遺伝子発現

統計的断片化は、遺伝子発現を追跡するのに有用である。これらの研究において、我々は多グリッドに亘る与えられたクローン-プローブ相互作用の強さを通常比較する。興味深い相互作用は（例えば潜在的な薬学化合物を適用する）実験的操作によって高められた又は抑制されたものである。統計的断片化によるこの種類の研究を解析するステップは次の如きものである。 30

1. 遺伝子発現のレベルを、多数の標本に亘って全てのターゲットにおける密度を測定することによって定量化する。各標本は実験における異なる条件に対応している。

2. ターゲットの各対の差のスコアを演算する。ここで、我々は前記実験の全ての条件に亘る各ターゲットクローンにおける差の分布をもつことになる。

3. 差のスコアの分布における平均及び標準偏差を演算する。

4. 統計的断片化ステップ。標準偏差の数単位分だけ前記平均の上又は下にある差のスコアを示すターゲットを選択する。これらのターゲットはヒットとして分類される。平方偏差基準の識別である、ヒット選択のこの処理は、全体の密度におけるグリッド間の差に干渉されない。 40

5. 基本表示（下記参照）と呼ばれる図形フォーマットで前記ターゲットを表示する。

まとめ

統計的断片化は統計的な理論のグリッドデータの解析への応用である。その利点は、それがターゲットを区別化する上での客観的な基準を提供し、それが我々に複数の標本に亘るデータの比較を許容することにある。この後者の利点は、平方偏差基準の解析が我々の解析（例えば処理効果、露出時間）への不適切な影響の影響を最小化するために存在している。

要約すれば、統計的断片化は、有効なヒットを大きなグリッドデータから取り出すための 50

客観的な手順である。統計的断片化の大きな利点は、

- a) 我々がヒットを分類するために用いる正確な基準を文書化でき、
- b) 我々が複数のグリッドに亘る比較を単純化するために異質な処理変動の効果を最小化することができることにある。

高速データ通信：基本表示

グリッド解析は多くの数値データ点を生成することができる。これらのデータはあなたが適当と思うどの様な形式においても提供することができる。例えば、データマトリクスをエクセル (Excel) にエクスポートし、ハイブリダイゼーションの強さで並べ替え、並べ替えたデータテーブルをあなたの結果を伝えるために利用する。

別のオプションは基本表示を生成することである。これは、限られた数の関心のあるターゲットにフラグを立てる様々な方法を用いた図形イメージである。スクリーニングの研究において、例えば、6 標準偏差単位以上平均ドット密度の上にある任意のドットにフラグを立てるべく前記基本表示に指示する。該基本表示は、典型的な実行において生成された数千のデータ点のうちから最も意味のあるデータ点に、あなたの注意を引く (第 4 図)。勿論、きれいな膜及びバイナリ標識 (ON 又は OFF) があれば、前記基本表示は必要がないかも知れない。我々はどのドットがヒットであるかを理解するために元のイメージを単に見ることができる。しかし、前記基本表示は、標本がきれいではないか、又はもしも標識の強さに強弱がある場合に、非常に有用となる。これらの場合においては、我々の目が不確かになる傾向があり、コンピュータにカラーコード化及び容易に判断できる形態でヒットを示させる方が簡単である。

前記基本表示は、2 個以上の標本に亘って比較する際の詳細モードにおいて特に有用である。ターゲットの平均強さ、バックグラウンドレベル、及びその他の要因は、グリッド間で変化する傾向がある。従って、複数の標本に亘って特定のグリッド点の相対的な強さについて視覚的な判定を下すことは困難である。これに対して、前記基本表示は複数のグリッドに亘る変化を明確に表示する。統計的断片化の何れの結果も単一の基本表示によって要約することができる (第 5 図)。

バックグラウンド変動の効果

何れの形態の断片化もバックグラウンドに影響される。理想的には、バックグラウンドのレベルは低く一定である。低いバックグラウンドは感度を向上させる。一定のバックグラウンドはターゲットの検出を単純化する。不幸にも、バックグラウンドはめったに低く一定ではない。従って、A I S / M C I D は様々なバックグラウンド補正を備えている。

なし バックグラウンドの補正なし。

選択ドット 或るドット (例えば各プライマリの左上) がバックグラウンドを有していると特定される。

周囲画素 本システムは、各ドットの外側境界を見ており、これら周囲の画素からドットのバックグラウンドを演算する。

ユーザ選択 あなたがバックグラウンドの補正に用いられる標本の 1 以上の領域を定める。

イメージ処理 幾つかのイメージ処理機能はイメージ内の点間で変化するバックグラウンドを取り除くのに非常に効果的である。

上述した全ての補正方法には弱点がある。最良の選択は元の標本内のバックグラウンド変動を最小化することである。

まとめ：高密度グリッド研究の種類の特徴

1. 高速且つ自動的に解析された大きなグリッド

何個のターゲットであってもグリッド内に配することが可能である。どの様な媒体であってもグリッド (例えば膜、ゲル、マイクロ力価) のマトリクスとして用いることができる。

2. 自動拡大、整列、及びバックグラウンド補正

グリッドはユーザによって入力された間隔を用いて自動的に拡大される。拡大に続いて、前記グリッドがイメージ内の最良のデータ位置に自動的にアラインメントされ、バックグ

10

20

30

40

50

ラウンドが取り除かれる。

3. 詳細モード及びスクリーニングモード

全てのスキャンにおいて、グリッド要素の全てが読み取られる。しかし、我々はデータの全てを表示するか、ヒットと定められたデータのみを保持又は表示するかを選択できる。データの全てを保持することは、大規模な事後の解析を許容することになる。ヒットのみを保持することは、時間を節約することになる。

4. 統計的断片化

ヒットが全てのグリッド要素の分布内に配置されることによって自動的に定められる。この手順は客観的であり、容易に文書化できる。

5. 複数の標本に亘ってターゲットを比較する

統計的断片化は処理要因の影響を最小化し、複数の標本に亘る比較を許容する。例えば、我々は、夫々が5, 000個のドットプロットを有する1つの対照標準の膜及び3つの実験膜に亘ってハイブリダイゼーションの強さの増減を探ることができる。

6. 基本表示

これらの単純化されたグラフィックディスプレイは、2、3個のカラーコード化されたヒットに減じられた1以上のドットのアレイを示すことができる。

参考文献

イガーズ (Eggers, M.)、ホーガン (Horgan, M.)、レイッヒ (Reich, R.K.)、ラムチャー (Lamture, J.)、アーリッヒ (Ehrlich, D.)、ホルリス (Hollis, M.) ら、発光及び放射同位体レポーターグループを利用した分子の量検出のためのマイクロチップ、バイオテクニクス (Biotechniques) 17:516-525 (1994)。

カラプコ (Khrapko, K.R.)、リソフ (Lysov, Y.P.)、コーリン (Khorlin, A.A.)、イワノフ (Ivanov, I.B.)、イエルショフ (Yershov, G.M.)、バシレンコ (Vasilenko, S.K.)、フロレンチェフ (Florentiev, V.L.) 及び (ミルチェベコフ (Mirzabekhov, A.D.) オリゴヌクレオチドマトリクスとのハイブリダイゼーションによるDNA配列のための方法、DNA配列-DNA配列及びマッピングジャーナル (Journal of DNA Sequencing and Mapping) 1:375-388 (1991)。

ラムチャー (Lamture, J.B.)、ビーティー (Beattie, K.L.)、バーク (Burke, B.E.)、イガーズ (Eggers, M.D.)、アーリッヒ (Ehrlich, D.J.)、フォウラー (Fowler, R.)、ホルリス (Hollis, M.A.)、コシクキ (Kosicki, B.B.)、レイッヒ (Reich, R.K.)、スミス (Smith, S.R.)、バルマ (Varma, R.S.) 及びホーガン (Hogan, M.E.) 荷電結合デバイスの表面への核酸ハイブリダイゼーションの直接検出、核酸リサーチ (Nucleic Acids Research) 22:2121-2125 1994。

リップシュルツ (Lipschutz, R.J.)、モリス (Morris, D.)、チー (Chee, M.)、ハベル (Hubbell, E.)、コザル (Kozal, M.J.)、シャー (Shah, N.)、シェン (Shen, N.)、ヤン (Yang, R.) 及びフォダー (Fodor, S.P.A.) オリゴヌクレオチドプローブアレイを用いた遺伝的変異へのアクセス、バイオテクニクス (BioTechniques) 19:442-447 (1995)。

マスコス (Maskos, U.) 及びサザン (Southern, E.M.) オリゴデオキシリボヌクレオチド (オリゴヌクレオチド) 相互作用の平行解析 I. オリゴヌクレオチドの2重組成に影響する要因の解析、核酸リサーチ (Nucleic Acids Research) 20:1675-1678 (1992)。

メイソン (Mason, R.S.)、ランパル (Rampal, J.B.) 及びコassin (Coassin, P.J.) ポリプロピレンサポートの生体高分子合成 I. オリゴヌクレオチド、解析的生化学 (Analytical Biochemistry) 217:306-310 (1994)。

ピアソン (Pearson, D.H.) 及びトヌッチ (Tonucci, R.J.) ナノチャネルガラスレプリカ膜、サイエンス (Science) 270:68-69 (1995)。

ピアセ (Pease, A.C.)、ソラス (Solas, D.)、サリバン (Sullivan, E.J.)、クロニン (Cronin, M.T.)、ホルメス (Holmes, C.P.) 及びフォダー (Fodor, S.P.A.) 急速DNA配列解析のための光生成オリゴヌクレオチドアレイ、全米科学アカデミー会報 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA) 91:5022-5026 (1994)。

サイキ (Saiki, R.K.)、ウォルシュ (Walsh, P.S.)、レベンソン (Levenson, C.H.) 及び

10

20

30

40

50

アーリッヒ (Erlich, H.A.) 固定化配列志向オリゴヌクレオチドプローブによる増幅DNAの遺伝的解析、全米科学アカデミー会報 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA)、86:6230-6234 (1989)。

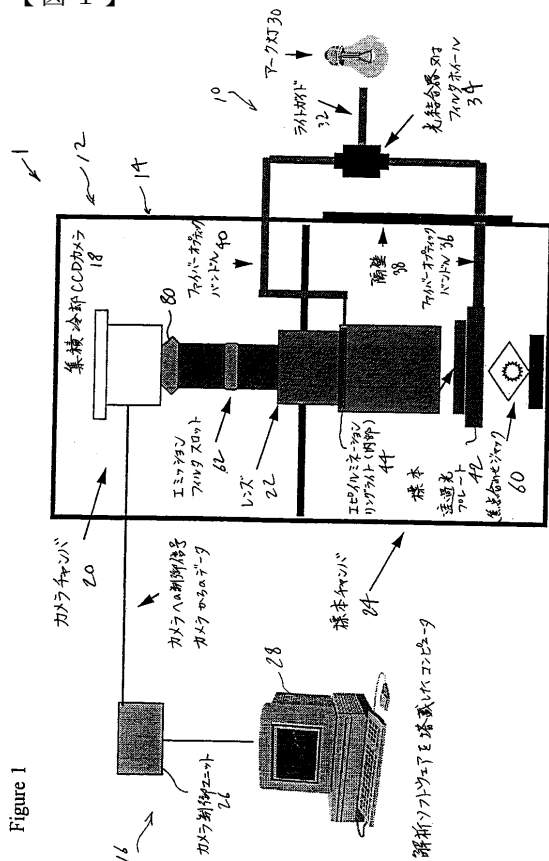
シェナ (Skena, M.)、シャロン (Shalon, D.)、デイビス (Davis, R.W.) 及びブラウン (Brown, P.O.) 補完的DNAマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの量監視、サイエンス (Science) 270:467-470 (1995)。

サザン (Southern, E.M.) DNAチップ：大きなスケールでのオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによる配列の解析、遺伝学のトレンド (Trends in Genetics) 12:110-115 (1996)。

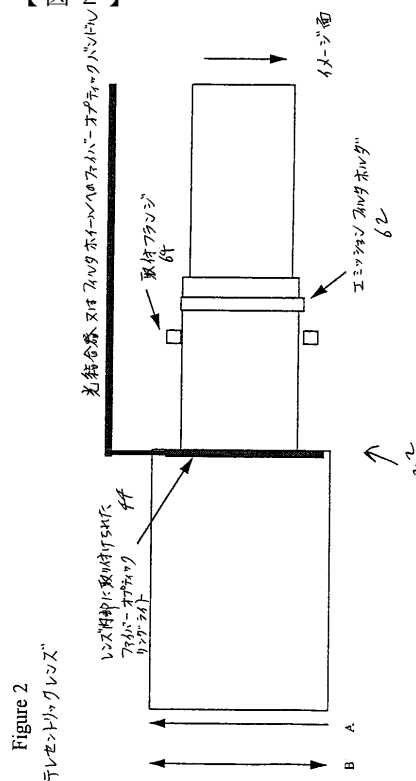
サザン (Southern, E.M.)、マスコス (Maskos, U.) 及びエルダー (Elder, J.K.) オリゴヌクレオチドのアレイへのハイブリダイゼーションによる核酸配列の解析及び比較：実験モデルを用いた評価、ゲノミクス (Genomics) 13:1008-1017 (1992)。

10

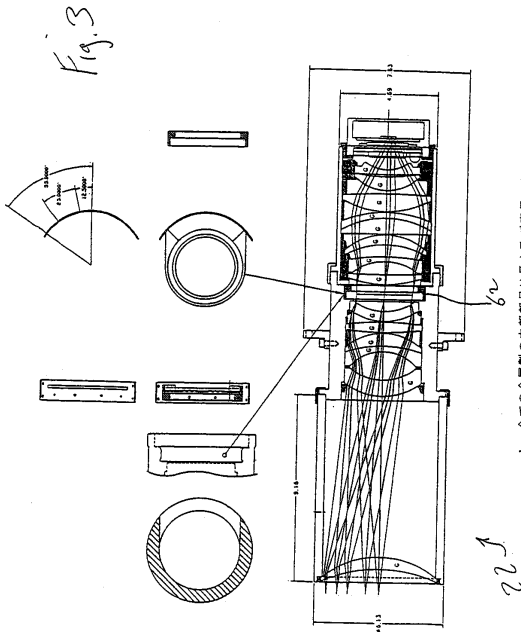
【図1】



【図2】



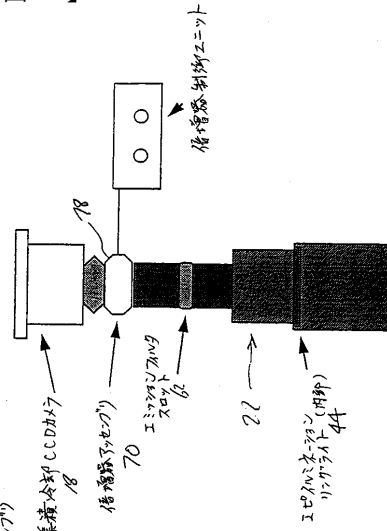
【図 3】



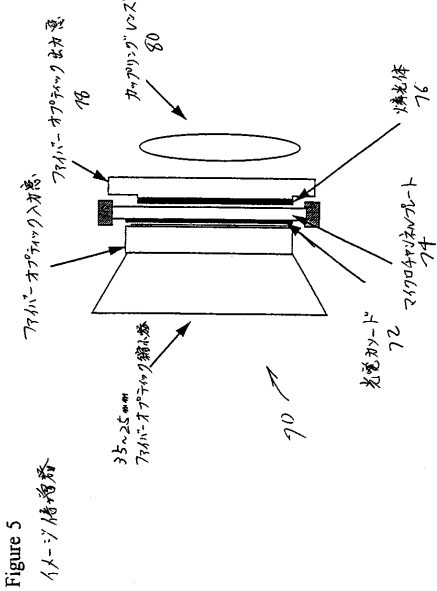
1. 全ての金属の内部部品は長さ及び直径で±0.001インチとする。
2. ハウジング(3)は直径で±0.001、シート部分及び接合面の長さで±0.001インチとする。
3. 全てのネジは3/16インチとする。
4. 寸法は全ての部品を黒メッキした後のものを適用する。
5. 材質：5051-T5アルミニウム。
6. "G" でマークした領域はガラスレンズである。

Figure 4: 以下は CCD カメラの構成要素のリストである

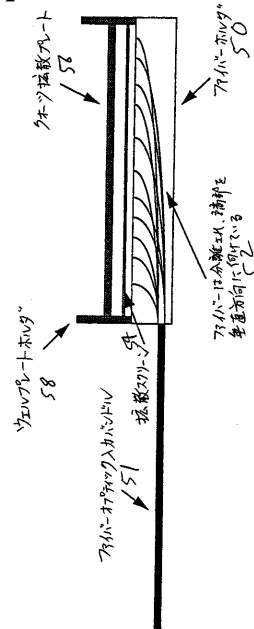
【図 4】



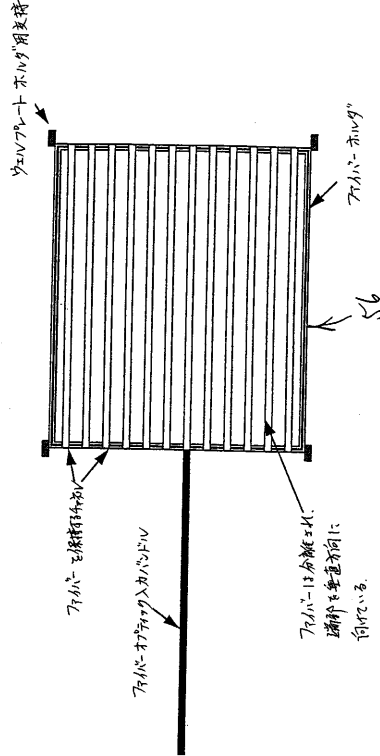
【図 5】



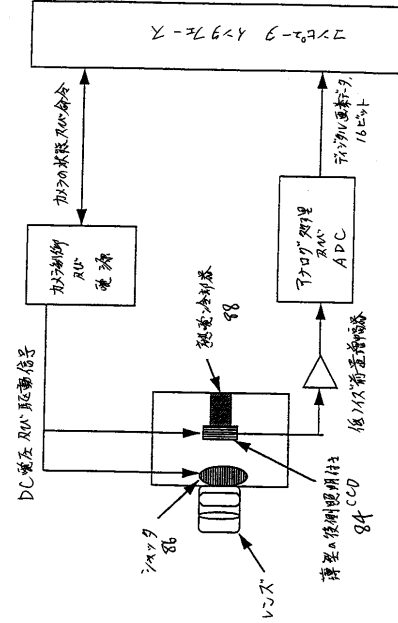
【図 6】

Figure 6
増倍器の断面図

【図 7】

Figure 7
光源照明プレート、上面図

【図 8】

Figure 8
CCDカメラ

【図 9】

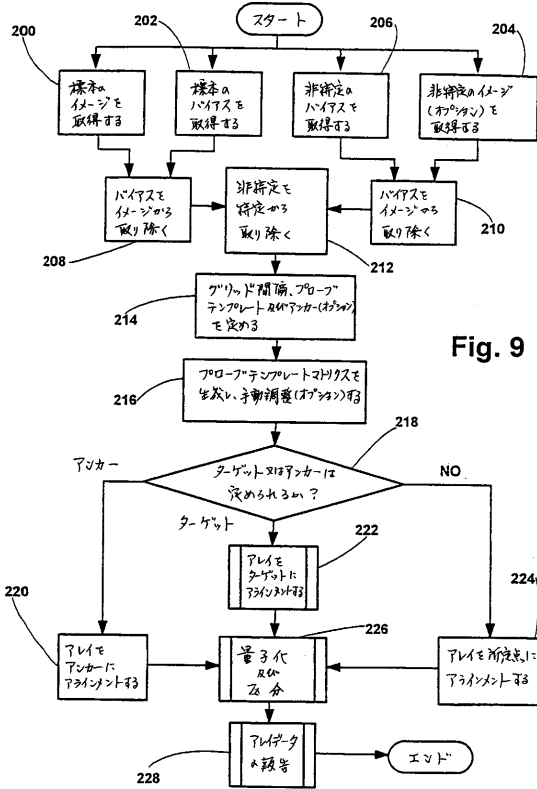


Fig. 9

【図 10】

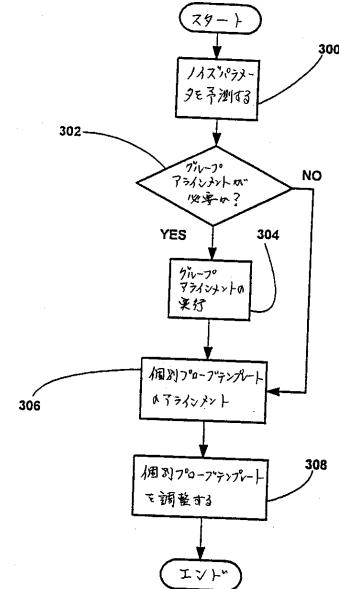


Fig. 10

フロントページの続き

- (72)発明者 ラム, ピーター
カナダ オンタリオ エル・ツー・ティー スリー・エヌ・フォー, セント キャサリンズ, リバ
ービュー ブルバード 290
- (72)発明者 サン, ギャング
カナダ オンタリオ エル・ツー・ティ スリー・エム・ファイブ, セント キャサリンズ, リバ
ービュー ブルバード 146
- (72)発明者 ミューラー, ロルフ
アメリカ合衆国 ニューヨーク 13021 オウバーン, ジョン スミス アベニュー 25
- (72)発明者 オームズビー, ティモシー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 13021 オウバーン, ウェスト レーク ロード 4915
- (72)発明者 キャッスル, ケニース アール.
アメリカ合衆国 アリゾナ 85749 ツーソン, イースト ニタニー ウェイ 9720

審査官 横井 亜矢子

- (56)参考文献 特開平08-201304 (JP, A)
特開平05-011192 (JP, A)
特開平05-341192 (JP, A)
特開平06-102418 (JP, A)
特開平04-027909 (JP, A)
特開平03-188408 (JP, A)
国際公開第96/018205 (WO, A1)
実開昭63-084113 (JP, U)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 21/62 - 21/74
G02B 21/00