

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3559525号
(P3559525)

(45) 発行日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(24) 登録日 平成16年5月28日(2004.5.28)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 21/64

F I

GO 1 N 21/64

Z

GO 1 N 21/64

B

GO 1 N 21/64

F

請求項の数 20 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2000-615574 (P2000-615574)	(73) 特許権者	500125755
(86) (22) 出願日	平成12年4月29日 (2000.4.29)		エボテック オーアーイー アクチェンゲ
(65) 公表番号	特表2002-543414 (P2002-543414A)		ゼルシャフト
(43) 公表日	平成14年12月17日 (2002.12.17)		ドイツ連邦国、ハンブルグ D-2252
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/003890		5、シュナッケンブルガリー 114
(87) 国際公開番号	W02000/066985	(74) 代理人	100092635
(87) 国際公開日	平成12年11月9日 (2000.11.9)		弁理士 塩澤 寿夫
審査請求日	平成13年9月11日 (2001.9.11)	(74) 代理人	100096219
(31) 優先権主張番号	60/131,657		弁理士 今村 正純
(32) 優先日	平成11年4月29日 (1999.4.29)	(74) 代理人	100095843
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 釜田 淳爾
(31) 優先権主張番号	09/338,439	(72) 発明者	パロ カウコ
(32) 優先日	平成11年6月23日 (1999.6.23)		エストニア、イーイー74001 ハーブ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ネーメ、オウナ テー 2、ピーケイ 4
			44エイ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生成関数を用いて蛍光分子又は他の粒子を特徴付ける方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の蛍光分子又は他の粒子を特徴付けるための方法であって、

a) 一つ以上の光子検出器による最初の時間間隔における光子カウント数の測定により、不均一な空間明度プロファイルの少なくとも一つの測定体積における上記の分子又は他の粒子によって放射された蛍光の強度の変動を観察すること、

b) 測定された光子カウント数から、光子カウント数の少なくとも一つの分布

【外1】

$$\hat{P}(n)$$

10

を決定すること、

c) 実験によって決定された光子カウント数の分布

【外2】

$$\hat{P}(n)$$

を補正することにより、前記粒子に特有な物理量を決定すること、
の段階を含み、補正法が、

【数 1】

$$G(\vec{\xi}) = \sum_{\mathbf{n}} \vec{\xi}^{\mathbf{n}} P(\mathbf{n})$$

と定義される、その生成関数による光子カウント数 $P(\mathbf{n})$ の理論上の分布関数の計算を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

最初の時間間隔が同じ幅の連続した間隔である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

段階 b) において、分布

10

【外 3】

$$\hat{P}(\mathbf{n})$$

の決定に供される光子カウント数 $\{n_i\}$ が、所定のルールに従い最初の時間間隔からの光子カウント数を足し合わせることにより、最初の時間間隔 $\{N_j\}$ における光子カウント数から導かれる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

段階 b) において、分布

【外 4】

20

$$\hat{P}(\mathbf{n})$$

の決定に供される光子カウント数 $\{n_i\}$ が、

【数 2】

$$n_i = \sum_{k=1}^M N_{Mi+k}$$

(式中、M は、 $\{n_i\}$ が決定される時間間隔が最初の時間間隔より何倍長いかを表す整数である。) というルールに従い最初の時間間隔 $\{N_j\}$ における光子カウント数から算出される請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 5】

段階 b) において、光子カウント数 $\{n_i\}$ が、最初の時間間隔が時間遅延によって分離されるというルールに従い所定の最初の時間間隔から算出される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

段階 b) において、分布

【外 5】

$$\hat{P}(\mathbf{n})$$

40

の決定に供される光子カウント数 $\{n_i\}$ が、所定のルール

【数 3】

$$n_i = \sum_{k=1}^M (N_{Mi+k} + N_{M(i+L)+k})$$

(式中、M 及び L は正の整数である。) に従い最初の時間間隔 $\{N_j\}$ における光子カウント数から算出される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

段階 b) において、一連の分布

50

【外 6】

 $\hat{P}(\mathbf{n})$

が、一連の異なるルールに従って決定され、前記一連の分布は段階 c) において同時に補正される請求項 3～6 の 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

段階 c) において、異なる値の M 及び／又は L を有する一連の分布が同時に補正される請求項 6 及び 7 に記載の方法。

【請求項 9】

段階 c) の少なくとも一つの物理量が粒子の濃度である請求項 1～8 の 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

段階 c) において、少なくとも一つの物理量が粒子の比明度である請求項 1～9 の 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

段階 c) において、少なくとも一つの物理量が拡散係数である請求項 1～10 の 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

生成関数が式

【数 4】

$$G(\xi) = \exp\left[\int dq c(q) \int d^3 \mathbf{r} (e^{(\xi-1)qTB(\mathbf{r})} - 1)\right]$$

(式中、 $c(q)$ は比明度 q を有する粒子の密度であり、 T はカウント間隔の長さであり、かつ $B(r)$ は座標の関数としての空間明度プロファイルである。) を用いて算出される請求項 1～11 の 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

生成関数の独立変数が $\zeta = e^{-i\phi}$ の形で選択され、その生成関数からの光子カウント数の理論上の分布の計算において、高速フーリエ変換アルゴリズムが用いられる請求項 1～12 の 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

段階 c) において、理論上の分布 $P(n)$ を算出する場合に、体積と空間明度の間の数学的な関係によって空間明度プロファイルがモデル化される請求項 1～13 の 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

段階 c) において、理論上の分布 $P(n)$ を算出する場合に、以下の式：

【数 5】

$$\frac{dV}{dx} = A_0 x (1 + a_1 x + a_2 x^2)$$

(式中、 dV は体積成分を表し、 χ は相対空間明度の対数を表し、 A_0 は体積の単位を選択する定数であり、かつ a_1 及び a_2 は経験上評価されたパラメータである。) によって空間明度プロファイルがモデル化される請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

段階 c) において、理論上の分布 $P(n)$ を算出する場合に、以下の式：

【数 6】

$$\frac{dV}{dx} = A_0 x^{a_3} (1 + a_1 x + a_2 x^2)$$

(式中、 dV は体積成分を表し、 χ は相対空間明度の対数を表し、 A_0 は体積の単位を選択する定数であり、かつ a_1 、 a_2 、及び a_3 は経験上評価されたパラメーターである。)によって空間明度プロファイルをモデル化する請求項14に記載の方法。

【請求項17】

段階a)において、蛍光強度を観察するために、共焦点光学装置が使用される請求項1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

前記蛍光分子又は他の分子が均質な蛍光分析を適用して特徴付けされる請求項1～17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】

診断、高処理量薬剤スクリーニング、分子の性質の最適化及び特異的細胞又は懸濁可能な(suspendable)担体の集合の同定において使用するための請求項1～18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】

励起光(14)を与えるための放射線源(12)、
測定体積内に励起光(14)の焦点を合わせるための対物レンズ(22)、
測定体積(26)から発生する励起光(30)を検出するための検出器(42)、
測定体積(26)から発生する放射光(30)の検出のための検出器(42)、及び
放射光(30)又は励起光(14)の中央部を消去するための、放射光(30)又は励起光(14)の経路(32)に位置する光を通さない手段(44)
を含む、請求項1～19のいずれかに記載の方法を行うための共焦点装置の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、蛍光分光法の分野、より詳しくは、試料中に存在する蛍光分子又は他の粒子に特有な物理量を測定するための方法に関する。

米国特許第4,198,571号には、少なくとも一つの焦点に合わせる(focusing)手段が、環状型である、共焦点的に配列された第一及び第二の焦点に合わせる手段、一つの焦点に合わせる手段からの放射線を受け取るために配置された可干渉性(coherent)放射線検出手段、及び焦点板中の対象を走査するための走査手段を含む走査顕微鏡が開示されている。

米国特許第5,866,911には、スポット中の蛍光種又は他の励起し得る種を励起させるために、標本中のスポットに光のビームの焦点を合わせる共焦点レーザー顕微鏡のような走査(scanned)光学系において、励起し得る種の励起光(excitation)を消光させるために適合させた波長の光のビームを与えること、この第二ビームを中央の強度が最小なパターンにすること、及びこの中央の最小値を焦点を合わせられたスポットの中央の強度の最大値と重ねることにより、効果的な大きさの励起光が、スポットの大きさよりも小さくされるので、スポット内で消光する光の強度がスポットの中央からの距離と共に増加し、それにより、スポットの周囲の部分における優先的に(preferentially)消光する励起光が減少するので、系の分解能が向上することが開示されている。

【0002】

蛍光相関分光計(fluorescence correlation spectroscopy)(FCS、先行技術)における実験の主要なデータは、微視的な測定体積(volume)から検出される光子カウント(photon counts)のシーケンス(sequence)である。蛍光相関分析の本質的な属性(attribute)は、光子検出の二次(second order)自己相関関数の計算である。これは、(光子カウントの)確率論的(stochastic)関数を、試料のいくつかのパラメーターを評価するための手段として用いられる所望の(expected)形を有する統計学的関数に変換する方法である。しかし、光子カウントのシーケンスから試料に関する情報を得るための方法は、自己相関関数の計算だけではない。更なるアプローチは、所

10

20

30

40

50

定の時間間隔 (time interval) 当たりの光子カウント数の分布のモーメントアナリシス (moment analysis) 及び直接的な分析に基づく (キアン (Qian) 及びエルソン (Elson)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87: 5479 - 483、1990; キアン (Qian) 及びエルソン (Elson)、Biophys. J. 57: 375 - 380、1990)。

【0003】

試料中の粒子から検出される蛍光強度は、一定ではないが、光学システムの焦点に関する粒子の座標に依存する。従って、測定の信頼できる解釈により、照らされた (illuminated) 測定体積の形状 (geometry) が説明されるべきである。鐘型 (bell-shaped) プロファイルの方が、長方形のものよりも光子カウント数の理論上の分布の計算が複雑であっても、光子カウント数の分布は、蛍光種の濃度及び比明度 (specific brightness) の値に依存するので、測定された光子カウント数の分布は、試料分析に用いることができる。“比明度”という用語は、試料のある場所、通常、空間 (spatial) 明度プロファイル関数が恒等 (unity) である場所に位置する所定の種類の粒子によって放射された光からの検出器の平均カウント率 (mean count rate) を示す。

10

【0004】

この種の分析の最初の実施 (realization) は、光子カウント数の分布のモーメントに基づいて示された (キアン (Qian) 及びエルソン (Elson)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87: 5479 - 483、1990) 光子カウント数の分布 $P(n)$ の κ 次 (κ -th) 階乗モーメントは、

20

【数7】

$$F_k = \sum_n \frac{n!}{(n-k)!} P(n) \quad (1)$$

と定義される。

【0005】

また、階乗モーメントは、階乗キュムラント (cumulants) と密接に関係する。

【数8】

$$F_k = \sum_{l=0}^{k-1} C_l^{k-1} K_{k-l} F_l \quad (2)$$

30

又は

【数9】

$$K_k = F_k - \sum_{l=1}^{k-1} C_l^{k-1} K_{k-l} F_l \quad (3)$$

(

【数10】

$$C_l^k$$

40

は、二項からなる係数であり、 K_k は、キュムラントである。) 理想的な解法 (ideal solutions) のために導かれたモーメントアナリシスで用いられる基本的な式 (expression) は、 κ 次数キュムラントと濃度 (C_i) 及び比明度値 (q_i) との関連を示す。

【0006】

【数11】

$$K_k = \chi_k \sum_i c_i (q_i T)^k \quad (4)$$

ここで、 χ_k は、相対空間明度プロファイル (relative spatial brightness profile) $B(r)$ の k 次モーメントである：

【0007】

【数12】

$$\chi_k = \int_{(V)} B^k(\mathbf{r}) dV \quad (5)$$

10

【0008】

FCSでは通常、体積の単位及び B の単位は、 $\chi_1 = \chi_2 = 1$ が得られる場合に選ばれる。この取り決め (convention) を選ぶと、この等式における濃度は無次元であり、測定体積当たりの平均粒子数を表し、かつ数値 $B(0)$ で割った焦点に位置する場合、いずれの種の比明度も粒子からの平均カウント率に匹敵する。定数 $B(0)$ の値は、光学装置の特徴である。それは、空間強度プロファイルの評価されたパラメーターから計算することができる (下記参照)。

【0009】

キアン (Qian) 及びエルソン (Elson) は、試料の未知のパラメーターを測定するために、最初の3つのキュムラントの実験値を用いた。高い信頼性をもって実験から測定され得るキュムラントの数は、通常3～4である。これは、モーメントアナリシスの適用可能性の限界を定める。

20

【0010】

国際特許出願 PCT/EP 97/05619 (国際公開番号 WO 98/16814) に詳細に記載された、いわゆる蛍光強度分布分析の背景にある (behind) 概念は、細胞選別における理想的な場合と同様に、測定体積が均一に照らされる場合及び同時に照らされる粒子がほとんど一つも存在しない場合という理想的なケースを想像することにより、よく理解することができる。この環境下で、粒子が測定体積に入るそれぞれの場合、蛍光強度は所定のタイプの粒子の明度に対応する値に跳ね上がる。本来、この強度が任意の時間に起こる可能性は、所定の種類の濃度と測定体積の大きさの積 (product) に等しい。試料溶液中に存在し得る別の蛍光種は、この他の種に特徴的な別の値に跳ね上がる強度をもたらす。要約すると、光の強度の分布は、試料溶液中の各蛍光種の濃度及び比明度の値から、直接的な方法で測定される。

30

【0011】

上述の理想的なケースでのみ、粒子の座標の関数として粒子から検出器に到達する光の強度が測定体積全体に亘って一定であり、かつゼロを超えることが予想され得る。最初の推定では、蛍光粒子の拡散が測定間隔 T の間無視できることも予想される。この2つの仮定の下、単一の蛍光種によって放射された光子カウント数の分布は、ダブルポアソニアン (double Poissonian) として分析的に表すことができる。即ち、この体積内の所定の種類の粒子数の分布はポアソニアンであるのに対し、所定の数の粒子を予想する光子数の条件付の (conditional) 確率分布 (probability distribution) もまたポアソニアンである。ダブルポアソン分布は、2つのパラメーター、即ち、測定体積中の平均粒子数 c とドエル時間 (dwell time) 当たりに単一の粒子によって放射される平均光子数 qT を持つ。単一の種類に対応する光子カウント数 n の分布は、

40

【数13】

$$P(n; c, q) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{c^m}{m!} e^{-c} \frac{(mqT)^n}{n!} e^{-mqT} \quad (6)$$

として表される。式中、 m は測定体積中の分子数より多い。 $P_i(n)$ が i 種からの光子

50

カウント数の分布を表す場合、結果として得られる分布 $P(n)$ は、

【数 1 4】

$$P(n) = \sum_{\{n_i\}} \prod_i P_i(n_i) \delta(n, \sum_i n_i) \quad (7)$$

として表される。

これは、 $P(n)$ が一連の分布 $P_i(n)$ のたたみ込み (convolution) として算出され得ることを意味する。

【0012】

FCS の場合のように、長方形試料プロファイルは、実験に殆ど適応し得ない理論上のモデルである。しかし、測定体積を多数の体積成分に分割することもでき、それらのそれぞれにおいて、分子の強度が一定であることを予想することもできる。従って、光子カウント数分布への体積成分からの寄与は、パラメーター cdV 及び $qTB(r)$ によるダブルポアソニアンである (ここで、 q は $B=1$ である選択された標準位置における分子からのカウント率を表し、 $B(r)$ は、座標の空間明度プロファイル関数である)。光子カウント数全体の分布は、ダブルポアソニアンにおけるたたみ込み積分 (convolution integral) として表すことができる。積分の結果はお互いに体積成分の実際の位置には依存しないので、積分は、ここでは三次元よりもむしろ一次元の問題である。比喩的に言えば (figuratively)、例えば、 B 値の次元が減少する場合、体積成分の三次元配列を一次元配列に配列し直すこともできる。

【0013】

(WO 98/16814 として公開された) 国際特許出願 PCT/EP 97/05619 に記載の最初の (first) 実験のいくつかにおいて、光子カウント数分布は、たたみ込み技術を用いて実際に補正された (fitted)。試料モデルは 20 箇所の空間部からなり、それぞれを、その体積 V_j 及び明度 B_j によって特徴付けた。しかし、この国際特許出願に記載の技術は、診断又は薬剤開発の場合、又は 1 つより多い独立変数 (argument) を含む分布関数を分析する場合のように、分析されるべき多数の試料を含む場合、時間がかかり、かつ面倒である。

【0014】

そこで、本発明の目的は、蛍光強度変化の分析のための、使いやすく、かつより一層早い技術を提供することである。

【0015】

本発明によれば、試料中の蛍光分子及び他の粒子を特徴付ける方法であって、以下の段階を含む方法が提供される：

a) 一つ以上の光子検出器によって最初の時間間隔における光子カウント数を測定することにより、空間明度プロファイルが不均一な、少なくとも 1 つの測定体積において、上記の分子又は他の粒子によって放射された蛍光の強度変化を観察すること、

b) 測定された光子カウント数から、少なくとも 1 つの光子カウント数の分布、

【外 7】

$$\hat{P}(n)$$

を決定すること、

c) 光子カウント数の分布

【外 8】

$$\hat{P}(n)$$

を補正することにより、前記粒子を特徴付ける物理量を測定すること、ここで、補正の手順は、

10

20

30

40

50

【数 1 5】

$$G(\vec{\xi}) = \sum_{\mathbf{n}} \vec{\xi}^{\mathbf{n}} P(\mathbf{n})$$

と定義されるその生成関数 (generating function) による光子カウント数の分布

【外 9】

$$\hat{P}(\mathbf{n})$$

10

の計算を含む。

【0 0 1 6】

以下で、“ヒストグラム”という語は、“実験的に決定された分布関数 (experimentally determined distribution function)”又は“実験的に決定された分布”の代わりにしばしば用いられるであろう。

【0 0 1 7】

分布 $P(\mathbf{n})$ の生成関数の正式な (formal) 定義は以下の通りである：

【数 1 6】

$$G(\xi) = \sum_{n=0}^{\infty} \xi^n P(n) \quad (8) \quad 20$$

【0 0 1 8】

カウント数分布分析において生成関数を興味深く (attractive) するものは、その対数の非加算性 (additivity) である。異なる体積成分並びに異なる種のように、独立した供給源 (sources) の光子カウント数分布の生成関数の対数は、関数 (transformation) (8) が、分布のたたみ込みを対応する生成関数にマッピングする (maps) ので、組み合わせられた分布の生成関数の計算のために単に加えられる。

【0 0 1 9】

30

詳細に開発された本発明に特有な四つの例を以下に記載する：

1. 光子カウント数の単一の分布変化を補正し、特徴的な物理量として蛍光分子又は他の粒子の比明度を得る一次元蛍光強度分布分析 (FIDA又は1D-FIDAと表される) ；

2. 光子カウント数の同時分布の変化を補正し、特徴的な物理量として蛍光分子又は他の粒子の二つの比明度値を得る二次元蛍光強度分布分析 (2D-FIDA)。2D-FIDAは、以下に詳細に説明するように、偏光 (polarization) モード又はスペクトルモードに適用することができる；

3. 異なる幅のカウント (counting) 時間間隔における光子カウント数の一連の分布変化を補正し、特徴的な物理量として比明度及び並進拡散時間 (translational diffusion time) を得る蛍光強度多重 (multiple) 分布分析 (FIMDA) ；及び 40

4. それぞれが同じカウント時間間隔に相当する光子カウント数の一連の分布変化を補正する蛍光自己たたみ込み (autoconvoluted) 強度分布分析 (FACID)。但し、二箇所のカウント時間間隔の間で異なる遅延時間を用いる。FACIDからも、特徴的な物理量として比明度及び並進拡散時間が得られる。

【0 0 2 0】

特に好ましい態様において、同じ幅の連続した最初の時間間隔における蛍光強度の変化を観察することもできる。上述の例、1D-FIDA、2D-FIDA、FIMDA及びFACIDは、利用可能な情報が最適に用いられる、この都合のよい態様を利用する。しか 50

し、不連続な最初の時間間隔及び／又は異なる幅の最初の時間間隔を用いることもできる。典型的な最初の時間間隔は、マイクロ秒又は数十マイクロ秒オーダーの幅を有する。全てのデータを収集する時間は、通常数十分の一秒から数十秒までである。

【0021】

更に好ましい態様において、段階b) においてヒストグラム

【外10】

$$\hat{P}(n)$$

が決定される光子カウント数 $\{n_i\}$ は、所定のルールに従い最初の時間間隔からの光子 10
カウント数を加えることにより、最初の時間間隔 $\{N_j\}$ における光子カウント数から得られる。1D-FIDA、2D-FIDA、FIMDA及びFACIDもまた、この態様を利用することができる。

【0022】

例えば、ルール

【数17】

$$n_i = \sum_{k=1}^M N_{Mi+k}$$

(ここで、Mは $\{n_i\}$ が測定される時間間隔が最初の時間間隔より何倍長いかを表す整 20
数である) に従い、最初の時間間隔 $\{N_j\}$ における光子カウント数から算出されるヒストグラム

【外11】

$$\hat{P}(n)$$

が決定される光子カウント数 $\{n_i\}$ の選択が興味深いこともある。1D-FIDA、2D-FIDA及びFIMDAは、この態様を利用することが好ましい。

【0023】

更なる態様において、光子カウント数 $\{n_i\}$ は、最初の時間間隔が時間遅延 (time 30
delay) によって分離されるというルールに従い、所定の最初の時間間隔から得られる。特に、以下のルールを適用することができる：

【数18】

$$n_i = \sum_{k=1}^M (N_{Mi+k} + N_{M(i+L)+k})$$

ここで、M及びLは、正の整数であり、 $\{n_i\}$ はヒストグラム

【外12】

$$\hat{P}(n)$$

40

が決定される光子カウント数であり、 $\{N_j\}$ は、最初の時間間隔における光子カウント数である。この式において、2Mは (n_i が測定される) カウント時間間隔当たりの最初の時間間隔の数であり、Lは、二箇所のカウント時間間隔の間の遅延を引き起こす失われた (missed) 最初の時間間隔の数である。FACIDは、この態様を利用することが好ましい。

【0024】

段階b) において単一のヒストグラム

【外13】

$\hat{P}(\mathbf{n})$

を決定するだけでなく、むしろ一組のヒストグラム
【外 1 4】

$\hat{P}(\mathbf{n})$

を決定することが好ましい場合もある。これらは、一組の異なるルールに従って決定することができ、前記の一組のヒストグラムは、段階 c) において同時に補正される。例えば、異なる値の M 及び／又は L を含む一組のヒストグラムを同時に補正することもできる。F I M D A 及び F A C I D は、この態様を利用する。 10

【0 0 2 5】

本発明による段階 c) において測定される典型的な物理量は、分子又は他の粒子の濃度、比明度及び／又は拡散係数である。

【0 0 2 6】

更に好ましい態様において、生成関数は、式

【数 1 9】

$$G(\xi) = \exp\left[\int dq c(q) \int d^3 \mathbf{r} (e^{(\xi-1)qTB(\mathbf{r})} - 1)\right] \quad 20$$

(ここで、c (q) は、比明度 q の粒子密度であり、T は測定間隔の長さであり、B (r) は座標の関数としての空間明度プロファイルである。)

【0 0 2 7】

$c \rightarrow c dV$ 、 $q \rightarrow q B(\mathbf{r})$ として定義 (8) を式 (6) に適用すると、粒子の種類及び選択された体積分 dV への寄与を

【数 2 0】

$$G_i(\xi; dV) = \exp[c_i dV (e^{(\xi-1)q_i TB(\mathbf{r})} - 1)] \quad (9)$$

30

と書くことができる。

【0 0 2 8】

従って、全光子カウント数分布の生成関数は、クローズド・フォーム (closed form) で表すことができる。

【数 2 1】

$$G(\xi) = \exp\left[\sum_i c_i \int (e^{(\xi-1)q_i TB(\mathbf{r})} - 1) dV\right] \quad (10)$$

【0 0 2 9】

高速フーリエ変換がその後行われる式 (9) による数値積分 (Numeric integration) は、所定の試料 (即ち、蛍光種の所定の濃度及び比明度値) に対応する理論上の分布 $P(\mathbf{n})$ を算出する最も有効な手段である。仮に、 40

【数 2 2】

$$\xi = e^{i\phi}$$

を選択すると、分布 $P(\mathbf{n})$ 及びその生成関数 $G(\phi)$ は、フーリエ変換によって関連する。従って、その生成関数から光子カウント数の理論上の分布を計算する場合に、

【数 2 3】

$$\xi = e^{-i\varphi}$$

の形の生成関数の独立変数を選択すること、及び高速フーリエ変換アルゴリズムを使用することが特に好ましい。1 D-F I D A、2 D-F I D A、F I M D A 及び F A C I D は、この態様を利用することが好ましい。

【0030】

本発明による段階c)における理論上の分布P(n)を算出する場合、空間明度プロファイルは、体積と空間明度との間の数学上の関係によってモデル化され得る。特に、以下の式によって空間明度プロファイルをモデル化することもできる：

10

【数24】

$$\frac{dV}{dx} = A_0 x (1 + a_1 x + a_2 x^2)$$

ここで、dVは体積成分を表し、 χ は相対空間明度の対数を表し、 A_0 は体積の単位を選択する定数であり、 a_1 及び a_2 は空間明度関数の形の経験上評価されたパラメーターである。更に好ましい態様において、空間明度プロファイルを以下の式：

【数25】

$$\frac{dV}{dx} = A_0 x^{a_3} (1 + a_1 x + a_2 x^2)$$

20

によってモデル化することもできる。

【0031】

いくつかの蛍光種は、非常に幅広い比明度の分布を有することもある。例えば、非常に幅広い大きさの分布及び任意の数のレセプターを有すると考えられる小囊は、任意の数のラベルされたリガンド分子を取り込むこともできる。そのような種類の種を含む試料に対するカウント数ヒストグラムを補正するためには、以下の方法において式(10)を変更することが有効である。種内の粒子qの明度分布は以下のように数学的に表されるという仮定がなされる：

【数26】

30

$$\rho(q) \propto q^{a-1} e^{-bq} \quad (11)$$

【0032】

この式は、便宜上選択され、この分布の全てのモーメントは、以下の式を用いて分析的に算出され得る：

【数27】

$$\int_0^\infty x^a e^{-bx} dx = \frac{\Gamma(a+1)}{b^{a+1}} \quad (12)$$

40

【0033】

光子カウント数分布の修正された生成関数が直接得られる。式(9)は、以下のように書き直すことができる：

【数28】

$$G(\xi) = \exp \left[\sum_i c_i \int dV \int_0^\infty dq \rho(q; a_i, b_i) (e^{(\xi-1)qTB(r)} - 1) \right] \quad (13)$$

ここで、

50

【数 2 9】

$$\rho(q; a, b) = \frac{b^a}{\Gamma(a)} q^{a-1} e^{-bq} \quad (14)$$

【0 0 3 4】

qでの積分は、分析的に行うことができる：

【数 3 0】

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i c_i \int dV \left[\left(\frac{b_i}{b_i - (\xi - 1)TB(x)} \right)^{a_i} - 1 \right] \right\} \quad (15)$$

10

【0 0 3 5】

パラメーター a_i 及び b_i は、平均明度

【数 3 1】

$$\bar{q}_i$$

及び明度分布

【数 3 2】

$$\sigma_i^2$$

20

と、

【数 3 3】

$$a_i = \frac{\bar{q}_i^2}{\sigma_i^2}, \quad b_i = \frac{\bar{q}_i}{\sigma_i^2} \quad (16)$$

によって相関する。

【0 0 3 6】

得られたカウント数の範囲において、特定のカウント数が得られる確率は、通常著しく (by many orders of magnitude) 変化する。例えば、図 1 の分布を参照。その結果、所定のカウント数でのイベント数 (the number of events) の変化 (variance) は、カウント数に強く依存する。最小二乗補正 (least squares fitting) のための重量の測定のために、全ての

カウント間隔における光強度は独立していると推定することができる。この推定の下では、異なるカウント数 n の選択における M イベントの分布の問題があり、それぞれの特定の結果は、所定の実施の確率 $P(n)$ を有する。分布の共分散マトリックス成分は、以下のよう

30

【数 3 4】

$$\langle \Delta P(n) \Delta P(m) \rangle = \frac{P(n) \delta(n, m) - P(n) P(m)}{M}, \quad (17)$$

40

ここで、 M は実験当たりのカウント間隔数である。

【0 0 3 7】

式 17 の共分散マトリックスは特異である (singular)。我々が、重量マトリックスとして、以下のように表される、その“ウィーク・インバース (weak inverse)” 対角線マトリックスを用いることが容認される：

【数 3 5】

$$W_n = \frac{M}{P(n)} \quad (18)$$

50

【0038】

分散マトリックス（17）は、ヒストグラムの統計学上の実施の多項分布に相当する。カウント間隔数の合計が補正されるという制約を受けるポアソン分布は、多項分布になるであろう。これは、式（18）に示すように、ポアソニアン重量の使用の論理的根拠（rationale）である。

【0039】

n_k を k 光子のカウントのイベント数の期待値（expectation value）とし、かつ

【数36】

$$N = \sum_k n_k \quad 10$$

をそれらの合計とする。 m_k を、

【数37】

$$M = \sum_k m_k$$

により統計学上実施させる。実施 m_0 、 m_1 、・・・は、ポアソンの統計学、

【数38】

$$P(m_0, m_1, \dots) = \frac{[n_0, n_1, \dots]^{[m_0, m_1, \dots]}}{[m_0, m_1, \dots]!} e^{-N} \quad (19) \quad 20$$

に従うと仮定する。ここで、我々は

【数39】

$$n_0^{m_0} n_1^{m_1} \dots \equiv [n_0, n_1, \dots]^{[m_0, m_1, \dots]}$$

及び

【数40】

$$m_0! m_1! \dots \equiv [m_0, m_1, \dots]! \quad 30$$

という表記法を導入した。 M イベントを有する確率は、

【数41】

$$P(M) = \frac{N^M}{M!} e^{-N} \quad (20)$$

である。

【0040】

合計 M イベントある場合に、 m_0 、 m_1 、・・・イベントを有する条件付きの確率は、

【数42】

$$P(m_0, m_1, \dots | M) \equiv \frac{P(m_0, m_1, \dots)}{P(M)} = \frac{M! [n_0, n_1, \dots]^{[m_0, m_1, \dots]}}{N^M [m_0, m_1, \dots]!}$$

又は、

【数43】

$$P(m_0, m_1, \dots | M) \equiv C_{m_0, m_1, \dots}^M [p_0, p_1, \dots]^{[m_0, m_1, \dots]} \quad (21)$$

である。

【0041】

これは、我々が

【数44】

$$p_k \equiv \frac{n_k}{M}$$

10

を導入した多項分布であり、

【数45】

$$C_{m_0, m_1, \dots}^M$$

は、多項係数である。

【0042】

一般に、重量が有意義に (meaningfully) 規定された場合、線形又は線形化 (linearized) 最小二乗補正は、評価されるパラメーターの値だけでなく、それらの共分散マトリックスももたらす (returns)。いくつかの簡単な場合に (例えば、長方形試料のプロファイル及び単一種に対して)、分析的に評価されるパラメーターの統計学上のエラーを表すことが可能であることが明らかになることもあるが、適用において、少なくとも二成分分析が通常興味深い。従って、統計学上のエラーの数の計算が満足されることもある。非相関測定 (式 (17)) の仮定による“理論上の”エラーに加え、いくつかの場合には、理論上のエラーが経験上得られ、個々の条件における一連の約 100 回の FIDA 実験が行われた。一般に、経験上のエラーは理論上のものよりも 3 ~ 4 倍高い。走査実験 (scanning experiments) では、経験上のエラーは、理論上のものに近いようである。それ故、我々は理論上のエラーが実際よりも少ない主な理由は、非相関測定であると確信している。表 1 は、本発明により光子カウント数ヒストグラム (FIDA) を補正することにより得られたパラメーターの理論上のエラーとモーメントアナリシスによって得られたものの比較である。エラー値は、一連のシミュレーションされたヒストグラムを処理することにより決定される。評価されるパラメーターの数が 3 より多い場合、本発明は、モーメントアナリシスよりも圧倒的に良好である。

20

30

【0043】

【表1】

データ 収集時間 (s)	カウント 時間間隔 (μ s)	種の数	評価された パラメータ数	パラメータ 表記	値 (qs(kHz))	FIDA のエラー 百分率 (本発明)	モーメント アナリシス のエラー率
10.0	40.0	1	2	c q	0.5 60.0	0.59 0.56	0.54 0.51
10.0	40.0	2	3	c ₁ q ₁ c ₂ q ₂	0.05 150.0 3.0 5.0 (補正)	2.00 1.54 0.53	2.71 1.89 0.62
10.0	40.0	2	4	c ₁ q ₁ c ₂ q ₂	0.05 150.0 3.0 5.0	2.26 1.63 3.18 3.35	4.99 2.53 17.8 14.9

【0044】

更に好ましい態様において、本発明による方法は、光子カウント数の同時分布の補正に適用される。2D-FIDAは、この態様の例である。実験において、分子数が変化する微視的な体積からの蛍光は、2つの検出器を有する光学装置（例えば共焦点顕微鏡）を用いて観察される。2つの検出器は、異なる偏光又はスペクトル応答を有することもある。ある態様において、各種当たり二つの比強度値を有する蛍光種の濃度が測定される。偏光キューブ（polarization cube）と共に使用される場合の二次元蛍光強度分布分析（2D-FIDA）は、異なる比偏光率を有する蛍光種を区別できるツール（tool）である。これは、単一の分子又は他の粒子の二つの物理的特徴の同時分析の典型例であり、単一の物理的特徴に注目する方法と比較して信頼性の大幅な向上をもたらす。

【0045】

以下に、2D-FIDAをより詳細に説明する。

10

20

30

40

50

予想される光子カウント数の二次元分布を表すためには、以下の仮定を用いることが有利である：

(A) 粒子の座標は任意であり、それぞれ独立である。

(B) 粒子からの蛍光強度の寄与は、粒子の比明度と光学機器に特有の空間明度プロファイル関数との積として表すことができる。

(C) 蛍光粒子の明度が拡散によって大幅に変化しない間、短いカウント時間間隔 T が選択される。

【0046】

最初に、単一の蛍光種及び単一の小型開放体積成分 (small open volume element) からのカウント数の同時分布 dV を表す。体積成分は、座標 r 及び空間明度 $B(r)$ によって特徴付けられ、蛍光種は、その比明度値 q_1 及び q_2 によって特徴付けられる。 q_1 及び q_2 により、 $B(r) = 1$ の場所に位置する粒子からの検出器による平均カウント率が示される。式 $\chi_1 = \chi_2$

(ここで、

【数46】

$$\chi_k = \int B^k(r) d^3r$$

により、通常と同様に FCS において B の単位を選択することが都合がよい。体積成分が m 粒子を偶然含んでいる場合、体積成分からの時間間隔 T 当たりの予想される光子カウント数は、 $mq_1TB(r)$ 及び $mq_2TB(r)$ であり、一方 m 粒子からの光子カウント数の分布 $P(n_1, n_2 | m)$ は、両方の検出器に対してそれぞれポアソニアンである：

【数47】

$$P(n_1, n_2 | m) = \frac{(mq_1TB(x))^{n_1}}{n_1!} e^{-mq_1TB(x)} \frac{(mq_2TB(x))^{n_2}}{n_2!} e^{-mq_2TB(x)} \quad (22)$$

【0047】

一方、仮定 (A) の下、体積成分における所定の種の粒子数の分布は、平均 $c dV$ を有するポアソニアンである。ここで、 c は濃度を表す：

【数48】

$$P_{dv}(m) = \frac{(cdV)^m}{m!} e^{-cdV} \quad (23)$$

【0048】

体積成分からの光子カウント数の全体の分布は、式 22 及び 23 を用いて表すことができる：

【数49】

$$\begin{aligned} P_{dv}(n_1, n_2) &= \sum_m P_{dv}(m) P(n_1, n_2 | m) \\ &= \sum_m \frac{(cdV)^m}{m!} e^{-cdV} \frac{(mq_1TB(r))^{n_1}}{n_1!} e^{-mq_1TB(r)} \frac{(mq_2TB(r))^{n_2}}{n_2!} e^{-mq_2TB(r)} \end{aligned} \quad (24)$$

【0049】

上記の一次元の場合のように、光子カウント数の分布 $P(n_1, n_2)$ を表すには、

【数50】

$$G(\xi_1, \xi_2) = \sum_{n_1=0}^{\infty} \sum_{n_2=0}^{\infty} \xi_1^{n_1} \xi_2^{n_2} P(n_1, n_2) \quad (25)$$

10

20

30

40

50

で表される、その生成関数が有用である。

【0050】

式24によって表される分布の生成関数は、

【数51】

$$\begin{aligned} G_{dV}(\xi_1, \xi_2) &= e^{-cdV} \sum_m \frac{(cdV)^m}{m!} e^{-mq_1 BT} e^{-mq_2 BT} \sum_{n_1} \frac{(m\xi_1 q_1 BT)^{n_1}}{n_1!} \sum_{n_2} \frac{(m\xi_2 q_2 BT)^{n_2}}{n_2!} \\ &= e^{-cdV} \sum_m \frac{\{cdV \exp[(\xi_1 - 1)q_1 BT] \exp[(\xi_2 - 1)q_2 BT]\}^m}{m!} \\ &= \exp[cdV(e^{(\xi_1 - 1)q_1 BT} e^{(\xi_2 - 1)q_2 BT} - 1)] \end{aligned} \quad (26)$$

10

と表記することができる。

【0051】

特に、 $\zeta_k = \exp(i\phi_k)$ を選ぶと、分布 $P(n_1, n_2)$ 及びその生成関数 $G(\phi_1, \phi_2)$ は、二次元フーリエ変換によって相関する。異なる体積成分並びに異なる種のような、独立した供給源の光子カウント数分布の生成関数の対数は、組み合わされた分布の計算のために単に加えられる。それ故、光子カウント数の全体の分布は、閉じた形 (closed form) で表すことができる：

【数52】

$$G(\xi_1, \xi_2) = \exp[(\xi_1 - 1)\lambda_1 T + (\xi_2 - 1)\lambda_2 T + \sum_i c_i \int (e^{(\xi_1 - 1)q_{1i} TB(r)} e^{(\xi_2 - 1)q_{2i} TB(r)} - 1) d^3 r] \quad (27)$$

20

【0052】

この式において、バックグラウンド (background) カウント率、検出器1による λ_1 及び検出器2による λ_2 からの寄与、並びに下付き文字 i によって表される蛍光種からの寄与を積分した。その後高速フーリエ変換が行われる式27による数値積分は、所定の試料 (即ち、所定の濃度及び比明度値の蛍光種) に対応する理論上の分布 $P(n_1, n_2)$ の計算のために非常に有効な手段である。

【0053】

空間明度関数は、式27の右辺における空間積分 (spatial integration) によって説明される。三次元座標 r を、一次元変数、即ち空間明度の単調な (monotonic) 関数 $B(r)$ と置換することにより、三次元積分を一次元のものに変形することができる。変数は、 $\chi = \ln[B(0)/B(r)]$ を選択することが都合がよい。空間明度プロファイルの十分に柔軟な (flexible) モデルは、以下の式によって表される：

【数53】

$$\frac{dV}{dx} \propto x^{a_3} (1 + a_1 x + a_2 x^2) \quad (28)$$

40

【0054】

得られたカウント数の間隔において、カウント数の特定の一对が得られる確率は、通常著しく変化する。その結果、ヒストグラムのデータ点の変化も、カウント数に強く依存する。最小二乗補正のための重量の測定のために、簡略化のため、全てのカウント間隔における粒子の座標が任意に選択されると仮定する。(これは、連続したカウント間隔における座標の相関を無視することを意味する。) この仮定の下では、カウント数 n_1 、 n_2 の異なる一对の選択におけるMイベントの分布の問題があり、それぞれ特定の結果は、所定の実施確率 $P(n_1, n_2)$ を有する。ヒストグラムの共分散マトリックス成分は、以下のように表すことができる：

【数54】

50

$$\langle \Delta P(n_1, n_2) \Delta P(n'_1, n'_2) \rangle = \frac{P(n_1, n_2) \delta(n_1, n'_1) \delta(n_2, n'_2) - P(n_1, n_2) P(n'_1, n'_2)}{M} \quad (29)$$

ここで、Mは実験当たりのカウント間隔数である。

【0055】

式29の共分散マトリックスは特異である。我々が、重量マトリックスとして、以下のよう表される、その“ウィーク・インバース”対角線マトリックスを用いることが容認される：

【数55】

$$W(n_1, n_2) = \frac{M}{P(n_1, n_2)} \quad (30)$$

10

【0056】

一般に、重量が有意義に規定された場合、線形化最小二乗補正アルゴリズムは、評価されるパラメーターだけでなく、それらの共分散マトリックスももたらす。非相関測定の仮定（式(30)）に対応する“理論上の”エラーに加え、統計学上のエラーが経験的に測定されることもあり、同一条件において一連の約100回の2D-FIDA実験が行われる。一般に、経験上のエラーは理論上のものよりも3～4倍高い。理論上のエラーが実際より少ない主な理由は、間違いなく非相関測定の仮定であろう。

【0057】

20

非相関測定の仮定により実際より少ない（underestimated）エラー値が得られるとしても、それは、異なる実験条件並びに異なる分析方法の下での分析精度を比較できる、非常に有用な理論上の推定である。また、この推定は、一般に有用なツールであるデータシミュレーションの容易な方法をもたらす。データシミュレーションの単純かつ非常に迅速な方法は、光子カウント数の関数としての予想されるイベント数の計算及び各イベント数それぞれに対するランダムポアソンノイズ（random Poisson noise）の加算（addition）である。

【0058】

表2に、2つの蛍光種の2つの選択された場合における、本発明による一次元及び二次元蛍光強度分析の理論上のエラーを示す。いずれの場合にも、2つの種の比明度値の比率は3である。2D-FIDAの場合は、2つの検出器のスペクトル感度は、異なる種に合わせる。いずれの場合にも、データ収集時間を10秒、時間窓（time window）を40μs、及びバックグラウンドカウント率を1kHzとする。但し、評価されるパラメーターの統計学上のエラーは、2D-FIDAでは大幅に低い。

30

【0059】

【表2】

方法	パラメーター表記	(選択された) パラメーター値	エラー 百分率
(本発明による)1D-FIDA	c_1V	0.5	6.6
	c_2V	0.5	4.9
	q_1	60 kHz	2.2
	q_2	20 kHz	10.2
(本発明による)2D-FIDA	c_1V	0.5	1.1
	c_2V	0.5	1.1
	q_{A1}	60 kHz	0.77
	q_{A2}	20 kHz	1.2
	q_{B1}	20 kHz	1.2
	q_{B2}	60 kHz	0.77

10

20

30

【0060】

本発明による二次元蛍光強度分布分析は、以下において、従来技術のモーメントアナリシスの二次元一般化 (generalization) と比較される。

【0061】

分布 $P(n_1, n_2)$ の階乗モーメントは、

【数56】

$$F_{kl} = \sum_{n_1, n_2} \frac{n_1! n_2!}{(n_1 - k)! (n_2 - l)!} P(n_1, n_2) \quad (31)$$

40

と表される。

【0062】

階乗モーメントは、階乗キュムラント K_{k-1} と関連付けられる。

【数57】

$$K_{kl} = F_{kl} - \sum_{\substack{i,j \\ i+j>0}} C_i^{k-1} C_j^l K_{k-i, l-j} F_{ij} \quad (32)$$

50

【0063】

Cは、二項からなるカウントを表す。キュムラントは、簡単な関係によって、濃度及び比明度値によって表すことができる。

【数58】

$$K_{kl} = \chi_{k+l} T^{k+l} \sum_i c_i q_{1i}^k q_{2i}^l \quad (33)$$

【0064】

式 $\chi_1 = \chi_2$ によってBの単位が選択される場合、 χ_1 はVによって表される試料体積を意味し、式33は以下のように表記することができる。

10

【数59】

$$\gamma_{k+l} K_{kl} = \sum_i (c_i V) (q_{1i} T)^k (q_{2i} T)^l \quad (34)$$

ここで、 γ は、明度プロファイルを特徴付ける一連の定数を表す：

【数60】

$$\gamma_m = \frac{\chi_1}{\chi_m} \quad (35)$$

【0065】

20

モーメントアナリシスの原理は、実験からのいくつかのキュムラントの値を決定すること及び未知の濃度及び明度値に対して式33の系を解くことである。

【0066】

表3では、一連の30個の任意のヒストグラムのカウント数を得ることによって決定し、同一の“試料”に対してシミュレーションした2D-FIDA（本発明）及び2D-MAFID（蛍光強度分布分析の一次元モーメントアナリシスが記載されている従来技術の一般化）の統計学上のエラーを表し、その後2D-FIDA及び2D-MAFIDを適用し、そして両方の場合に評価されたパラメーターの変化を測定する。但し、2D-MAFIDと比較した2D-FIDAの利点は、評価されるべきパラメーター数と共に増加する傾向がある。

30

【0067】

【表3】

データ 収集時間(s)	種の数	評価される パラメーター数	MAFID で使用される キウムラントの表記	パラメター の表記	実際の値	FIDA の エラー百分率	MAFID の エラー百分率
2	1	3	K_{01} K_{10} K_{11}	cV	0.5	1.1	1.3
				q_A	60 kHz	1.2	1.5
				q_B	40 kHz	1.3	1.6
10	2	4	K_{01} K_{10} K_{02} K_{20}	cV	0.5	1.1	2.5
				c_2V	0.5	1.0	4.2
				q_{A1}	60 kHz	0.70	1.2
				q_{A2}	20 kHz	(補正)	(補正)
				q_{B1}	40 kHz	1.3	5.7
				q_{B2}	80 kHz	(補正)	(補正)
10	3	5	K_{01} K_{10} K_{02} K_{11} K_{20}	c_1V	0.2	2.0	2.4
				c_2V	0.2	1.2	1.2
				c_3V	0.2	1.6	1.9
				q_{A1}	40 kHz	1.4	1.8
				q_{A2}	20 kHz	(補正)	(補正)
				q_{A3}	60 kHz	(補正)	(補正)
				q_{B1}	10 kHz	3.6	9.0
				q_{B2}	60 kHz	(補正)	(補正)
				q_{B3}	70 kHz	(補正)	(補正)
10	2	6	K_{01} K_{10} K_{02} K_{11} K_{20} K_{21}	c_1V	0.5	1.1	4.3
				c_2V	0.5	1.0	5.0
				q_{A1}	60 kHz	0.70	1.4
				q_{A2}	20 kHz	1.3	4.5
				q_{B1}	40 kHz	0.90	2.9
				q_{B2}	80 kHz	0.55	1.5

エラー値は、一連のシミュレーションされたデータに適用された分析のそれぞれの (s c a t t e r e d) 結果から算出する。

【0068】

表4に、2D-FIDA (本発明) 及び2D-MAFID (従来技術の標準化) の評価されたパラメーターの平均値 (即ち、偏り (b i a s)) の相対偏差 (r e l a t i v e

10

20

30

40

50

d e v i a t i o n) を示す。それぞれの場合、偏りは、カウント数の一連の 30 個のシミュレーションされた任意のヒストグラムの分析から決定される。3つのケースを分析した。最初のケースでは、データシミュレーション及びデータ分析で同じモデルを使用した。2番目のケースでは、2番目の種の粒子は等価ではないが、20パーセントの相対半値幅 (r e l a t i v e h a l f - w i d t h) においてそれらの個々の明度によって分類されると仮定して、カウント数のヒストグラムをシミュレーションさせる。但し、分析において、この現象を意図的に (i n t e n t i o n a l l y) 無視した。もちろん、分析にはあまり適当でないモデルを適用することにより、評価されるパラメーターの偏りが生じる。3番目のケースは、2番目の種の個々の明度分布の相対半値幅が、小囊の調製での通常値である 50 パーセントである以外は、2番目のものと同様である。ケース 2 及び 3 において 2 D - F I D A の加重誤差 (w e i g h t e d r e s i d u a l s) をマッピングする場合、方法論的な (m e t h o d o l o g i c a l) 偏差が顕著であるが、2 D - F I D A はやはり意味のある結果をもたらすことに注目する価値がある。これは、一般的な性質である：元のデータを直接補正する 2 D - F I D A は、元のデータの数学的な変換を補正する方法である 2 D - F I D A より完全なモデル (e x a c t m o d e l) の必要性は少ない。

10

【0069】

【表4】

パラメーター 表記	(選択された) 実際の値	2D-FIDA の偏り (パーセント)			2D-MAFID の偏り (パーセント)		
		ケース1	ケース2	ケース3	ケース1	ケース2	ケース3
c_1V	1.0	$+0.1 \pm 0.2$	-0.35	-2.0	$+0.1 \pm 0.2$	-6.5	-28
c_2V	0.05	$+0.6 \pm 0.4$	-2.0	-10.6	$+1.8 \pm 0.6$	-15.6	-69
q_{A1}	20 kHz	-0.1 ± 0.2	+0.8	+5.0	-0.3 ± 0.3	+10.0	+58
q_{A2}	100 kHz	-0.3 ± 0.4	-0.7	-11.2	-0.9 ± 0.3	+5.5	+41
q_{B1}	1 kHz	-1.2 ± 0.5	+2.6	+20.6	-6.7 ± 3.0	+75	+563
q_{B2}	200 kHz	-0.3 ± 0.4	+1.2	+1.3	-0.9 ± 0.3	+11.6	+99

【0070】

本発明によれば、共焦点技術は、蛍光強度の変化の観察に特に適している。それらは、生体臨床医学、診断、高処理量薬剤スクリーニング (high throughput drug screening)、ビーズ、小囊、細菌、ウイルス等のような粒子の選別等の選別法 (sorting processes) のような、幅広い利用分野に適用することができる。結合 (conjugate) 焦点 (共焦点) 技術は、試料上の回折限界点 (diffraction-limited spot) に鋭く焦点を合わせられた光の点光源 (point source) の使用に基づいている。放射光は、照射点 (ill

10

20

30

40

50

uminating spot) と正確に同じ場所に位置する観察範囲 (viewing area) を隔てる空間フィルター (ピンホール) を通して観察される。従って、照射及び検出アパーチャー (aperture) は、お互いに光学的につながれる。対物レンズの光以外の焦点板から生じる光は跳ね返され、これにより、非常に小さな深さの場 (field) が効果的にもたらされる。それ故、本発明の特に好ましい態様において、段階 a) では、蛍光強度の観察のために共焦点顕微鏡が使用される。高いシグナル・ノイズ比 (signal-to-noise ratio) を達成するためには、励起光 (excitation radiation) (14) を与えるための放射線 (radiation) 源 (12)、測定体積 (26) 内に励起光 (14) の焦点を合わせるための対物レンズ (22)、測定体積から発生する (stems) 放射光 (excitation radiation) (30) を検出するための検出器 (42)、放射光 (30) 又は励起光 (14) の中央部を消去するための、放射光 (30) 又は励起光 (14) の経路 (32) に位置する光を通さない手段 (opaque means) (44) を含む装置を用いて蛍光強度を観察することが有用である。図 9 に詳細に記載された光学装置を使用することが特に好ましいこともある。

【0071】

図面の詳細な説明

図 1

テトラメチルローダミン色素の溶液から得られるカウント数ヒストグラム (a)、及び式 (36)、(37) 及び (38) によって得られた最良の補正 (best fit) に対応する 3 つの誤差曲線 (b) を示す図 1 をここで説明する。最初の時間間隔は 40 μ 秒であった。データ収集時間は、60 秒であった。この 1D-FIDA 実験は、明度プロファイルの十分に柔軟なモデルを用いることの重要性を表す。これは、2D-FIDA、FIMDA 及び FACID でも同様に重要である。

【0072】

FCS において最も幅広く使用されている空間プロファイルモデルは、単一のパラメータの形、縦及び放射方向における軸次元率 (axial dimension rate) を用いる三次元ガウス (Gaussian) プロファイルである。白丸を用いた誤差曲線は、ガウスプロファイルから得られ得る補正量を表す。誤差には、大きな系統偏差 (systematic deviations) がある。FCS データを補正するための十分に柔軟なモデルは、FIDA の場合はむしろ柔軟でなく、適当でないモデルであることがわかった。

【0073】

ヒストグラム

【外 15】

$$\hat{P}(n)$$

をより良好に補正する試料プロファイルのモデルは、ガウス・ローレンツ (Gaussian-Lorentzian) (白抜きの四角) であるが、このモデルはやはり柔軟性に欠ける。式 (8) により、空間明度 B のある関数が体積に対して積分される。換言すれば、それは FIDA における所定の空間明度プロファイルを特徴付ける B と V との間の関係である。例えば、ガウスプロファイルにより

【数 61】

$$\frac{dV}{dx} \propto \sqrt{x} \quad (36)$$

$$(\chi = -\ln B)$$

10

20

30

40

という関係が得られる。ガウス-ローレンツプロファイルにより、

【数 6 2】

$$\frac{dV}{dx} \propto e^{x/4} \sqrt{\sinh \frac{x}{2}} \quad (37)$$

という関係が得られる。

いずれの関係も、かなり柔軟性に欠ける。即ち、測定されたデータを補正するために理論上計算された分布を調整するための空間形状パラメーターを何らもたらさない。

【0074】

10

実験データを補正するに足る柔軟性を有するモデルを調べる場合、以下の関係を適用することが有用なこともある：

【数 6 3】

$$\frac{dV}{dx} \propto x(1 + a_1x + a_2x^2) \quad (38)$$

式(38)の背景にある物理的モデル以外に正式な(formal)モデルがある。式(38)によって得られ得る補正量は、塗りつぶした四角の曲線によって表される。

【0075】

図 2

20

ここで図 2 に、ラベルされたリガンドの小囊への結合反応をモデル化する場合のカウント数のシミュレーションされたヒストグラムを示す。最初の時間間隔は 40 μ 秒であり、式(38)の空間パラメーターの値は、 $a_1 = -0.4$ ； $a_2 = 0.08$ 、バックグラウンドカウント率 $b = 1.0$ kHz、データ収集時間 4 秒であった。“リガンド”の曲線は、 $c = 6.0$ ； $q = 6.0$ /粒子； $\sigma_q = 0$ の種に相当する。“小囊”の曲線は、 $c = 0.05$ ；

【数 6 4】

$$\bar{q} = 300.0 \text{ kHz/粒子} ;$$

$\sigma_q = 150.0$ の種に相当する。“混合物”の曲線は、それらの混合物に相当する。濃度及び比明度の値は、薬剤スクリーニングにおいて特徴的な状態をモデル化するために選択された。1D-FIDAを適用すると、曲線(c)の補正により、13パーセントである小囊の σ_q のエラーを除き、ほぼ3.5～6の間である統計学上のエラーにより所定の“試料”を特徴化する5つのパラメーターの値が得られる。しかし、仮に小囊の σ_q が補正されると、全ての統計学上のエラーは4パーセントより低くなる。

30

【0076】

最も迅速なデータシミュレーションアルゴリズムでは、予想される分布を計算し、nのそれぞれの値に対するイベントの任意のポアソン数を得ることができる。任意のポアソン数は以下のように得る：所定の予想されるイベントの値Eに対し、シミュレーションされたイベント数Sを、不等式

40

【数 6 5】

$$\sum_{i=0}^{S-1} \text{Poisson}(i; E) < R \leq \sum_{i=0}^S \text{Poisson}(i; E)$$

によって0.0～1.0の間のごく普通に(routinely)得られた数Rから決定する。

【0077】

体系的な(cosmetic)エラーとして、全イベント数

【数 6 6】

$$\sum_n S(n)$$

は、予め与えられた数Mからわずかに外れることがある。時間がかかるが直接的なデータシミュレーションアルゴリズムから、蛍光に寄与する体積成分中の粒子の任意の形状が得られ、所定の粒子形状に対応する古典的な光強度が計算され、かつシミュレーションされた光子カウント数として、この強度に対応する任意のポアソン数が得られる。この過程がM回繰り返され、シミュレーションされたカウント数ヒストグラムが得られる。

【0078】

図3～8

10

図3～8は、1D-FIDAの理論上のエラーを表す。

図3

qの値に依存する、単一種の溶液の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す図3をここで説明する。以下の実験パラメーターの値を選択した：c = 1.0；T = 20 μ秒；a₁ = -0.4；a₂ = 0.08；b = 1.0 kHz；データ収集時間2秒。

【0079】

図4

図4は、cの値に依存する、単一種の溶液の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。以下の実験パラメーターの値を選択した：q = 60 kHz/粒子；T = 20 μ秒；a₁ = -0.4；a₂ = 0.08；b = 1.0 kHz；データ収集時間2秒。

20

【0080】

図5

ここで図5に、Tの値に依存する、単一種の溶液の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを示す。以下の実験パラメーターの値を選択する：c = 1.0；q = 30.0 kHz/粒子（上のグラフ）；q = 60.0 kHz/粒子（下のグラフ）；a₁ = -0.4；a₂ = 0.08；b = 1.0 kHz；データ収集時間2秒。

【0081】

図6

30

図6は、Tの値に依存する、2種の混合物の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。以下の実験パラメーターの値を選択する；c₁ = 0.1；c₂ = 2.0；q₁ = 200.0 kHz/粒子；q₂ = 10.0 kHz/粒子；a₁ = -0.4；a₂ = 0.08；b = 1.0 kHz；データ収集時間10秒。但し、明るい方の種のパラメーターの決定のためのTの最適値は暗い方の種のものよりも低い。

【0082】

図7

q₁のq₂に対する比率に依存する、2種の混合物の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す図7をここで説明する。以下の実験パラメーターの値を選択する；q₁ = 50.0 kHz/粒子；c₁ = c₂ = 0.5；a₁ = -0.4；a₂ = 0.08；b = 1.0 kHz；データ収集時間40秒。

40

【0083】

図8

図8は、濃度に依存する、2種の混合物の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。c₁ = c₂で濃度を同時に変化させた。以下の実験パラメーターの値を選択した；q₁ = 75.0 kHz/粒子；q₂ = 25.0 kHz/粒子；a₁ = -0.4；a₂ = 0.08；b = 1.0 kHz；データ収集時間60秒。但し、最適濃度は試料体積当たり約1つの粒子である。これは、3つ未満のパラメーターが決定されるべき場合を除き、一般に当てはまる。

【0084】

50

図 9

本発明による方法を行う場合の使用に適合させた装置の1つの態様を示す図9をここで示す。装置10は、干渉光の束によって試料を照らすための光源として働くレーザー12、単色励起光14を含む。励起光14は、レンズ16によって平行化され、二色鏡20に到達する。光学軸18と二色鏡の間の角度は45°であることが好ましい。二色鏡20は、試料体積26内にその焦点24を有する対物レンズ22の方向に励起光14を反射する。試料体積26及び対物レンズ22は、透明なカバーガラス28によって、例えば、試料を収容する市販のマイクロタイタプレート(micro-titer plate)の底部によって、お互いに分離されることが好ましい。試料は好ましくは蛍光ラベルされた分子又は他の粒子を含む。適切な励起光14による励起により、試料中の分子又は他の粒子が放射線30を放射する。放射光30は、対物レンズ22を通り、放射線30を透過する二色鏡20に到達する。その後、放射光は、光学軸32上でフィルター34及びコリメーター(collimator)レンズ36を通る。ピンホール38は、コリメーターレンズ36の焦点に位置する。ピンホール38をとおり放射光30は、更なるレンズ40に到達し、その後、写真検出器(photo-detector)42によって検出される。放射光30の経路内に、特に二色鏡20と写真検出器42との間に、それにより放射光30の中央部が通ることができなくなる光を通さない手段44が備えられる。この放射光30の中央部は、励起光14の焦点の前又は後ろの光学軸32上の領域から発生する。焦点24又はその直接の近傍から発生する放射光30のみがピンホール38を通り、写真検出器42に到達する。光を通さない手段44を放射光30の経路内へ配置する代わりに、励起光14の経路に光を通さない手段44に配置することもまた適当である。特に、光を通さない手段44を、レーザー12と二色鏡20との間に配置することができる。ここで詳細に記載したように光を通さない手段44を用いることにより、シグナル・ノイズ比が改善される。

【0085】

図 10

図10Aにおいて、同じ平均カウント率、

【数67】

$$\bar{n} = 1.0$$

の5つの場合で計算された光子カウント数分布、 $P(n)$ が示される。白抜きの記号は、単一種の溶液であるが、粒子当たりの平均カウント数 q_T の値が異なる溶液に相当する。実線は、一方は $q_T = 0.5$ であり他方は $q_T = 8.0$ である2つの種の混合物に対して計算される。明らかに、曲線はお互いに著しく異なっている。重要なポイントは、本発明による1D-FIDAは、個々の種の寄与を明確に分離できることである。

【0086】

2つの異なる色素、0.5 nMのローダミン6G(Rh6G)及び1.5 nMのテトラメチルローダミン(TMR)、並びに2つ(0.8 nMのTMR、0.1 nMのRh6G)の混合物の純粋な溶液の光子カウント数の分布を表す図10Bをここで示す。主な装置は、蛍光相関研究のためにごく普通に用いられる共焦点顕微鏡(コンフォコール(ConfoCor)(登録商標);エボテックバイオシステムズ・アンド・カールツァイス(EVOTEC BioSystems and Carl Zeiss)、ドイツ)である。波長514.5 nmのアルゴン・イオンレーザーからの(約800 μ Wまで)弱められた(attenuated)ビームは、通常のFCS実験のスポットの2倍の大きさである、約0.5 μ mのスポットへ集められ、その結果、ローダミン6Gの場合、拡散時間は約200 μ 秒となった。励起強度は、一般に、自己相関関数の三重項(triplet term)の約15パーセント振幅を特徴とする値以下に保たれる。蛍光放射は、アバランシェフォトダイオード検出器SPCM-AQ 131(EG&G)を用いて顕微鏡の焦点板上のピンホールによって検出される。光子カウント数のヒストグラムは、 $T = 40 \mu$ 秒のドエル時間で測定された。データ収集時間は50秒であった。これらのヒストグラムは、

1 D - F I D A のための入力データとして用いられる。多成分補正 (f i t) 分析の結果を以下の表 5 に示す。 χ^2 値は

【数 6 8】

$$\chi^2 = \frac{\sum W_n [\hat{P}(n) - P(n)]^2}{n_p - n_{fit}} \quad (39)$$

によって計算した。ここで、 n_p は、測定されたヒストグラム

【外 1 6】

$\hat{P}(n)$

10

の長さであり、 n_{fit} は補正 (f i t) パラメーターの数である。前記の多成分分析において、一定の数の蛍光種を仮定し、光子カウント数の測定されたヒストグラムを補正し、未知の濃度及び比明度の値を評価する。

【0 0 8 7】

【表 5】

試料	a_2	a_3	C	q (kHz)	χ^2
Rh6G	-0.380 ± 0.009	0.077 ± 0.003	0.461 ± 0.003	107.2 ± 0.8	0.97
TMR	-0.427 ± 0.032	0.084 ± 0.014	1.517 ± 0.012	36.56 ± 0.29	0.81
混合物	-0.380 (補正)	0.077 (補正)	0.103 ± 0.012 0.738 ± 0.011	109.1 ± 4.0 37.4 ± 1.0	0.77

【0088】

すべての場合において、脱イオン水を用いて測定される場合、バックグラウンドカウント率を1.05 kHzに補正した。 a_1 が1.0に補正される場合、 a_2 及び a_3 は予め標準化された値である。表5における理論上の統計学的なエラーは、理論上の重量：

【数69】

$$W_n = \frac{N}{P(n) + \frac{1}{N}} \quad (40)$$

と一致する。

【0089】

この式は、光子カウントの数のN個の独立した測定 of 単純な仮定の下で導かれる。現実には、連続した測定は相関しているため、補正アルゴリズムによって得られた評価されるパラメーターのエラーは、実際の統計学的なエラーを低く見積もる。我々は、一連の30～200回の別々の測定から、これらの統計学的なエラーは理論上のエラーの約3倍大きいことを経験的に決定した。

【0090】

Rh6Gの典型的な誤差を図10Cに示す。

1D-FIDAを非常に頻繁に用いて、蛍光種の所定数を仮定し、この仮定の下で測定された分布と理論上の分布との間の最も良好な補正を見出す。しかし、1D-FIDAは、蛍光粒子の比明度の連続した分布を仮定して適用することもできる。この方法は、補正 (regularizations) を用いる反比例関数 (ITR) として一般に知られている。1D-FIDAにおけるITR分析の結果を、それらの比明度の関数として粒子数の分布を表す図10Dに示す。このようなITR分析は、線形補正及び濃度を負でない値にすることにより行われる。ITRは、特に、試料組成からの事前の (priori) 情報が与えられないか、試料組成が不均一である試料のために有益なツールである。点線は、単一の色素 (Rh6G及びTMR) の溶液に、実線はそれらの混合物に対応する。縦座標により、共焦点体積成分 (左: 単一色素、右: 混合物) 内の平均粒子数が得られる。装置の詳細については、図10Bの説明を参照。理想的な結果は、単一種の溶液の場合は単一のδ-ピークであり、混合物の場合は2つのδ-ピークである。実際は、ITR出力スペクトルピークの幅は、比明度値の分布の実際の幅からだけでなく、入力データの精度及び線形補正の特別な実施からも測定される: 即ち、幅広いスペクトルが実験値並びに狭いものを補正するならば、ITRには幅広いものが好ましい。

【0091】

図11

更なる例として、ラベル化又は非ラベル化相補性オリゴヌクレオチド及び制限エンドヌクレアーゼHind III及びKpn IによるDNAハイブリッドのその後の対称な切断による5'-(6-カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA)) でラベルされた40mer類のハイブリダイゼーションの研究に、本発明による1D-FIDAが適用された。この研究で用いられた特定のオリゴヌクレオチドは、

TAMRA-AAGAAGGGGTACCTTTGGATATAAAGAGGAAGCTTTTCCCGT (5'-TAMRA-オリゴA) 及び
TAMRA-ACGGGAAGAGCTTCTCTTTTATCCAAAGGTACCCCTTCTT (5'-TAMRA-オリゴB)

であった。

【0092】

それらのHPLC純度のものを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) (ワイテルスタット (Weiterstadt)、ドイツ) から購入した。約300 μWに弱めた4mWのヘリウム/ネオンレーザー (ユニフェーズ (Uniphase)) を用いて543/580 nmの励起/放射波長で上記のFCS読み取り機において、全ての測定が行われた。水のバックグラウンドは、800 Hz以下であった。測定のために、試料のアリコート (aliquots) を1 nMに希釈し、20 μlを、室温で8つのウェルを有する (8-well chambered) カバーガラス (ナルゲ・ヌンク (Nalge Nunc)) において分析した。70%ホルムアミド含有10 mM トリス/HCl バッファー (pH 8.0)、1 mM の EDTA、0.2 mM の N

a C l 及び 0.5 μ M のオリゴヌクレオチド濃度でハイブリダイゼーション反応を行った。95℃で2分間変性を行い、融点 T_m より 10–15 度低い最適温度 T_x (ヒーティングブロック (Heating block)、テシュネ (Teschne)) に従って 55–60℃で40分間、次のハイブリダイゼーションを行った。 T_m は、以下のように算出される： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 600/N$ ($N = 40$; $\%G + C = 42.5$)。制限酵素 *Hind* III 及び *Kpn* I によってハイブリッドDNAの制限消化分析を行った。異なる大きさのフラグメントを得るために、制限部位を選択した。37℃、1時間、33mMのトリス/酢酸 (pH 7.9)、1mMの酢酸マグネシウム、6.6mMの酢酸カリウム及び 0.1mg/ml のウシ血清アルブミンにおいて切断反応を行った。反応経過は、一桁の大きさの範囲内の分子当たりの蛍光強度の大幅なシフトを特徴とする (図 11A–E)。得られた2つの生成物ピークは、ハイブリダイズされていない種が検出され得る1つの単一ハイブリダイゼーション種に相当することに注目することが重要である。これは、二重ラベルされたハイブリッドと比較して異なる明度を有する信号が得られたラベル化/非ラベル化オリゴヌクレオチドの組み合わせを用いるハイブリダイゼーション/切断実験において容易に示すことができた (図 12A、B)。そのような2つのピーク構造の1つの例は、2つの構造的な状態 (conformational states) の間の転位 (transition) の結果である構造的な変化であろう。この挙動は、ラベルの極性、非極性、及び消光 (quenching) 環境による構造的な動力学の3つの状態のモデルを用いて説明される (エゲリング (Eggeling) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1556 – 1561)。このデータから、構造的な変化は、DNAの長さ及びラベル数に大きく依存するという結論を得ることができる。ワンラベル (one-label) ハイブリッドを研究する場合、小さな消化された DNA フラグメントは、単一の明度を示し、抽出物 (educt) の2つのピークの濃度比は1つの成分の方へシフトする。更なる結果として、小さなフラグメントは、低分子明度を示し、大きなフラグメントは高明度値に相当する。

【外 17】

$$(Q_2 \approx Q_3, Q_1 \approx Q_4)$$

【0093】

図 12

両酵素に対する対称な切断部位に基づき、同じ大きさ及び更に非常に類似した分子明度の DNA フラグメントが予想され得る。図 12A 及び B により、そのような結果が観察され、理論的な関係 $Q_1 + Q_2 = Q_3 + Q_4$ が実験的に立証されたことが明確に示される。制限酵素 *Hind* III 及び *Kpn* I を単独又は組み合わせることにより、ハイブリッドDNAの制限消化分析を行った。制限部位により対称に切断されたフラグメントが得られる (2×12mers、二重消化 (double digest) に対し 1×16mer)。[●] はラベルされたDNAに相当する。 $Q_{0.1-0.3}$: DNA ハイブリッドの強度、 Q_i : 切断生成物の強度。単一または二重にラベルされたDNA構造を用いる切断生成物の全ての測定のパルクにより、単一の測定において個々の構造によって観察された強度全てを分類することが可能になる。これは本発明の方法の特徴であり、他の既知の分析方法を何ら用いることができない。

【0094】

図 13 及び 14

ここで図 13 及び 14 を説明する。2D-FIDA のための装置の中央光学部として、FCS 分光計の場合のように、共焦点顕微鏡を使用する (コッペル (Koppel) ら、Biophys. J. 16: 1315 – 1329、1976)。蛍光の励起のため、Ar からのビーム又は緑色 He-Ne レーザーを中性のフィルターによって弱め、ビーム伸張器に通し、二色鏡によって顕微鏡の対物レンズに当てる。粒子をゆっくり拡散させるいくつかの実験において、レーザー走査顕微鏡で知られたツールとして、試料走査と組み

10

20

30

40

50

合わせたビーム走査を用いる。二色鏡によって同じ対物レンズにより蛍光を集め、焦点外の光を遮断するために用いる共焦点ピンホールに焦点を合わせる。顕微鏡の蛍光収集経路においてアパーチャーの約4分の1を閉じる同心の光を通さないスポットを用いることにより、縦方向の分解能は更に改善される。ピンホールを通る光は、2つの検出器による検出のためのビームスプリッター (beam splitter) によって分けられる。一般のタイプの2D-FIDA実験によれば、ビームスプリッターは偏光キューブ又は二色鏡のいずれかである。最初の場合は、一般的なスペクトルバンドパスフィルター (spectral band-pass filter) が用いられるのに対し、二色FIDAの場合は、各検出器はその前に異なるバンドパスフィルターを有する。光子カウント検出器は、カナダのEG&Gオプトエレクトロニクス (EG&G Optoelectronics) のケイ素アバランシェフォトダイオードモジュールSPCM-AQ-131である。検出器からのTTLパルスは、コンピューターの差込式カードとしてのエボテックバイオシステムズAG (EVO TEC Biosystems AG) (ハンブルグ、ドイツ) 製2チャンネルカウンタによってカウントされる。カウント数分布は、32MBオンボード (on board) バッファからのデータを読み取る間に計算される。それ自身はオンライン法である。FCS測定は、検出器の出力を相関計へ送り込むことにより、FIDA実験と並行して行うことができる。

【0095】

両検出器に対するバックグラウンドカウント率の値は、2回蒸留した水における別々の実験によって決定される。バックグラウンド光の強度が変動しないことの主な要因は、水からのラマン拡散である。

【0096】

観察される試料体積の半径は、元のレーザービームの適当な拡大倍率を選択することにより調整することができる。約 $0.6\text{ }\mu\text{m}$ の焦点ビーム半径を用いると、単純な有機色素分子 (例えばTAMRA) の場合、拡散時間は、カウンタの $40\text{ }\mu\text{s}$ のドエル時間と比較して長いと考えられる約 $260\text{ }\mu\text{s}$ になるので、カウント間隔の間の一定の分子明度の推定は妥当である。励起強度は、分子当たりの高カウント率と三重項 (triplet state) の低い集合 (population) との間の妥協点 (compromise) に調整される。三重項集合は、約15パーセントに保たれる。更に高い三重項集合値は、明らかな空間明度プロファイルを大きくゆがめることもある。一連の実験の準備 (set-up) の間に相関計 (ALV-5000、ALV、ランゲン (Langen)、ドイツ) によって三重項の集合を測定した。

【0097】

方法論的なテスト実験のために、2つの異なる色素、カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) 及びローダミンレッドX (RRX) を選択した。レーザー波長 543.5 nm において、これらの色素は、異なる放射スペクトル並びに異なる消光係数を有する。これらの実験では、検出器の前に広帯域 (wideband) $40/60$ ビームスプリッターを用いる。“赤”チャンネルのスペクトルフィルターは、中央波長が 605 nm でありFWHMが 50 nm であるのに対し、“黄色-緑”チャンネルに対する対応する数値は、 575 nm 及び 30 nm である。観察体積中の平均分子数が、 $0.23\sim 0.92\text{ nM}$ の濃度に対応する $0.5\sim 2.0$ の範囲になるように、蒸留水中で色素を希釈した。

【0098】

それぞれの実験に対して、水を浸した (water immersion) 対物レンズ (ツァイスC-アポクロマト (Zeiss C-Apochromat) $40\times 1.2\text{ W Korr}$) から試料を分離するカバーガラス上に約 $20\text{ }\mu\text{l}$ の試料溶液を滴下した。60秒間で各ヒストグラムを得た。それぞれの色素を別々に測定したが、異なる濃度比の色素の混合物も測定した。TAMRAにおける実験から、空間明度プロファイルを示すパラメーターを測定し、 $a_1 = -0.405$ 及び $a_2 = 0.0772$ の値での他の試料のその後の分析において補正した。その方法によって得られた2種の特定のパラメーターの値がどれほど良好であったかを見るために、混合物を測定して分析した。

【0099】

例として、図13は、純粋なTAMRA溶液の場合に測定されたカウント数ヒストグラムを視覚化する。Z軸に対応する値は、所定の一对のカウント数 n_1 及び n_2 に対するイベント数である。分布を補正することにより、平均粒子数 $cV = 1.139 \pm 0.005$ 、“赤”チャンネルの場合の比明度 $q_1 = 79.4 \pm 0.5$ kHz、及び“黄色-緑色”の場合の $q_2 = 50.9 \pm 0.3$ kHzが得られる。テスト実験の分析の結果を表6に示す。色素分子のガラス表面への吸着が実際の濃度に大きく影響するので、調製物の希釈率から計算される濃度値による試料の特定は行わなかった。同様の理由により、試料毎に良好に再現されなかった；実施毎の濃度値のシフトもしばしば観察され得る。しかし、比明度値は良好に再現される。示された統計学的なエラーの値は、非相関測定の仮定に対応する理論上の値の3倍である。3は、経験上の因子である。統計的なエラーに加え、適度な大きさの試料毎の偏差も顕著である。

【0100】

【表6】

試料	実施数	試料体積当たりの平均分子数、 cV	“赤”の比明度、 q_1 、kHz	“黄色-緑”の比明度、 q_2 、kHz
TAMRA	1	1.128 ± 0.005	79.6 ± 0.4	51.3 ± 0.3
	2	1.139	79.4	50.9
	3	1.160	79.4	50.8
	4	1.171	79.0	50.6
RRX	1	1.892 ± 0.009	48.0 ± 0.3	15.63 ± 0.09
	2	1.859	48.0	15.63
	3	1.850	47.3	15.44
	4	1.811	47.9	15.58
TAMRA 及び RRX	1	0.99 ± 0.05	78.0 ± 1.0	51.8 ± 1.1
	2	1.14 ± 0.05	49.1 ± 1.1	15.0 ± 0.9
	3	1.01	76.8	51.1
	4	1.08	49.5	15.1
TAMRA 及び RRX、新しい試料	1	0.99	77.9	51.8
	2	1.03	49.3	15.1
	3	0.97	76.9	51.7
	4	1.03	50.0	15.5
TAMRA 及び RRX、新しい試料	1	0.93 ± 0.07	74.6 ± 1.3	49.6 ± 1.5
	2	2.51 ± 0.07	47.6 ± 0.8	14.7 ± 0.5
	3	0.98	75.2	49.2
	4	2.38	46.8	14.2
TAMRA 及び RRX、新しい試料	1	0.96	75.0	49.4
	2	2.25	48.0	14.7
	3	0.94	76.1	49.9
	4	2.16	47.6	14.8

【0101】

混合物を用いて測定したヒストグラムが純粋な色素の場合に測定したものと質的に異なっ

ていることは注目に値する。図14は、TAMRAとRRXとの混合物を用いて測定した分布の補正の加重誤差を視覚化する。上のグラフは、2種の存在を仮定した場合の適当な分析に相当する；極めて任意かつ均一に誤差がばらついている。下のグラフは、単一種のみが存在するとの仮定に相当する；この場合、測定された分布と算出された分布との間には大きな違いがある。 n_1 は、“赤”検出器によって得られたカウント数であり、 n_2 は、“黄色－緑”検出器によって得られたカウント数である。

【0102】

図15及び16

伝統的な蛍光偏光の研究において、蛍光の2つの偏光成分の平均強度は、直接測定される。強度の変動は、ここで直接の興味の対象ではなく、むしろ統計学的なエラーの原因として考えられている。蛍光的にラベルされた結合対を含む試料の蛍光偏光値の変化は、分子体積の変化を引き起こし、これにより、平衡結合 (equilibrium binding) の直接的な情報がもたらされる。蛍光偏光測定は、リアルタイムで行うこともでき、結合及び解離反応の運動学上の分析が行われる。最も幅広く用いられている蛍光偏光適用の一つは、治療効果のある、及び法的に認められていない (illicit) 薬剤の検出のために使用される競合イムノアッセイ (competitive immunoassay) である。蛍光偏光の方法は、10年以上の間、臨床的イムノアッセイのために用いられていた。同種の (homogeneous) FPIA (イムノアッセイにおける蛍光偏光) は、RIA又はELISAのような通常の異種のイムノアッセイにおいて広く一般に認められている (well-accepted) 利点を有する。しかし、個々の偏光種の分離は不可能であるので、それは、多結合段階反応が研究されるべき場合は達成できない。それ故、リガンド結合曲線のみが、偏光の全体的な減少を示す。このことは、力学的な (mechanistic) 結合定数が決定できないことを意味する。試料体積並びに質量制限 (mass restrictions) において、更なる限界が見られる。

【0103】

本発明による二次元蛍光強度分布分析により、通常蛍光異方性に隠れている情報の全ての内容を利用することができ、それにより、上記の限界が克服される。2D-FIDAは、1つの測定において各蛍光種当たりの2つの特異的な量：分子当たりの蛍光強度及び所定のモデルの異方性を直接決定する。この追加の情報に基づき、全ての関与している種の図解 (delineation)、更に結合挙動の定量化が可能である。2D-FIDA異方性は、多数の結合段階、凝集及びマルチメリゼーション (multimerization) 現象を示す系の定量的な説明のための理想的なツールである。

【0104】

以下に、その偏光モードにおける2D-FIDAの適用を説明する。ここでは、テオフィリン (theophylline) 抗原とアンチテオフィリン抗体との間の相互作用を研究した。

【0105】

テオフィリン治療は、数年間喘息治療の基礎であったので、血清中のテオフィリン値の分析及び調整が強く要求されている。本発明の可能性を示すため、ポリクローナルアンチテオフィリン血清からのテオフィリン抗原のアンチテオフィリン抗体への結合が研究されている。組み込まれたスパーサーを有する、又は有さない5'-カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) によって抗原をラベルした。古典的なFP分析において、抗体との相互作用において、これらの結合体 (conjugates) は、低い異方性値 (それぞれ0.037及び0.055) を示した。従って、それらは、本発明の感度を表すための重大な (critical) 基礎を形成する。

【0106】

結合実験のために、抗体の貯蔵液及び抗原を0.05%ツイーン20 (Tween 20) 含有PBSバッファー中で希釈した。化合物を混合した後、混合物を室温で30分間インキュベートした。結合体の空間特性を釣り合わせ、He/Neレーザー (ユニフェーズ (Uniphase)) の543nm線において系を励起した。2つの例として、抗体希

10

20

30

40

50

積値は異なるがリガンド濃度が $[L] = 2 \text{ nM}$ と一定の場合の、光子カウント数の測定されたジョイントヒストグラム (joint histograms) 及び試料に適用された 2D-FIDA の結果を、図 15 及び 16 に示す。抗体濃度は、効果的な希釈を示す任意の単位中のものである。各検出チャンネルにおける水のバックグラウンドは、 1 kHz 以下であった。

【0107】

図 17-19

本発明による二色蛍光強度分布分析において、2つの検出器をスペクトル的に調整して異なる色の2つのラベルからの蛍光を観察する。下記の分析タイプでは、リガンド分子は“緑色”にラベルされる。各小囊が多数のレセプターを運ぶので、結合度の低い試料中の小囊を、大幅に高い“緑色”の比明度によって結合度の高い試料中の小囊と区別することができる。小囊は、更に“赤色”に染色される。“赤色”の小囊の比明度は、リガンド分子の結合によっては変わらないが、“赤色”の染色は、“赤色”では殆ど見えない結合していない (free) リガンド分子と (非常に低い結合の場合に、結合していないリガンド分子とほぼ同じ“緑色”の明度である) 小囊との間の定数を増加させる手段である。単一の試料の2つの蛍光種からの光子カウント数の測定された二次元分布への寄与は、この分析タイプにおいて実際に大きく異なっているので、分析は非常に信頼できる。

【0108】

本発明による二次元蛍光強度分布の利点を示すために、TAMRAでラベルされたソマトスタチン (somatostatin) -14 (SMS14-5 TAMRA) のヒト2型高アフィニティーソマトスタチンレセプター STR-2 への結合 (P. Schoeffter) ら、Eur. J. Pharm.、289、163-173、1995) が、生物学的システムとして選択された。レセプターを、CCL39 hss t2細胞と表した。この細胞系から小囊を調製し、親油性トレーサー DiC_{18} (5) によって染色した。プロテアーゼ阻害剤存在下で、 10 mM の HEPES ($\text{pH } 7.6$)、 5 mM の MgCl_2 、 0.01% (w/v) の蛍光活性剤 (fluorosurfactant) FC-135、 1.33% の DMSO 中で結合反応を行った。分析原理の概略図を図 17 に示す。

【0109】

2つのスペクトル的に異なるラベルの蛍光の励起のため、 $250 \mu\text{W}$ に減じられたネオジウム：ヤグ (Yag) レーザーの 532 nm 線及び $25 \mu\text{W}$ に減じられた He-Ne レーザーの 632 nm 線を同時に使用した。2のレーザービームの調整不良 (misalignment) を最小化するため、それら両方を、顕微鏡によって焦点に集める前に単一の光ファイバーに通した。また、集めた蛍光ビームを、2つの検出器に分ける前に、単一のピンホールに通した。中央の波長が 590 nm 、FWHM が 60 nm である光学的バンドパスフィルター及び中央の波長が 690 nm 、FWHM が 40 nm であるもう一つのものを、2つの検出器の前で使用し、2つのラベルから別々に観察した。小囊はゆっくりと拡散する粒子であるので、この実験では、1つの方向で周波数 25 Hz 、振幅 $100 \mu\text{m}$ のシヌソイドの (sinusoidal) ビーム走査、その他の方向で8秒間のデータ収集時間当たり $500 \mu\text{m}$ の試料走査を用いて、各試料の 0.05 mm^2 の範囲を走査した。

【0110】

図 18 において、高結合度及び低結合度に相当する2つの典型的なカウント数ヒストグラムの例を比較する。図 18 A では、大過剰の非蛍光コンペティター (competitor) (SRIF-14、SIGMA; コンペティター $1 \mu\text{M}$ 、全リガンド 3 nM) を加えることにより、リガンドに結合する小囊 (SMS14-5 TAMRA) を競合させる。コンペティターなしで得られるヒストグラム (図 18 B) は、 n_2 方向において、コンペティターが存在する場合よりも広がっていることがはっきり見られる。 n_2 方向は、ラベルされたリガンドの緑色蛍光を表すので、リガンド結合のための測定である。

【0111】

本発明による 2D-FIDA を、それぞれの測定されたヒストグラムに適用した。二色補

10

20

30

40

50

正アルゴリズムを用いて、結合していないリガンド及び小囊に結合したリガンドの濃度（共焦点体積中の粒子数）及び蛍光明度値を得た。コンペティターが存在する場合（低い結合）であっても、小囊は結合していないリガンドから良好に分離された。コンペティターの添加により、小囊の緑色蛍光の減少及び結合していないリガンドの濃度の増加が引き起こされる。リガンドが小囊から完全には解離しないという事実は、分析において用いられる小囊の量に依存する非特異的結合によるものである。

【0112】

次に、投与量応答（dose-response）曲線の記録及びEC₅₀値の決定のために、10 pM ～ 1 μM未満（各10回の測定）でコンペティターを滴定した。図19に示すように、2D-FIDA分析により、標準偏差が極めて低い典型的なS字型競合曲線が得られる。測定されたEC₅₀値は、0.87 nMであり、他の評価方法（データは示さず）を用いて得られたEC₅₀値と良好に一致する。それ故、高結合と低結合とを区別することが可能なだけでなく、本発明による2D-FIDA分析によって、結合度の小さな変化を決定することもできる。これは、高処理量スクリーニングにおける分析阻害剤（“hits”）の同定をしようとする場合に特に重要である。要約すると、2D-FIDA分析は、小囊に基づく結合分析に適合した、信頼できる方法であり、高処理量スクリーニングに既に良好に（successfully）適用されている。

10

【0113】

図20

ここで、図20を説明する。好ましい態様によれば、段階b)においてヒストグラム

20

【外18】

$$\hat{P}(n)$$

が決定される光子カウント数 {n_i} は、所定のルールに従い最初の時間間隔からの光子カウント数を加えることにより、最初の時間間隔における光子カウント数 {N_j} から得られる。例えば、ルール

【数70】

$$n_i = \sum_{k=1}^M N_{Mi+k}$$

30

（ここで、Mは、{n_i} が測定される時間間隔が最初の時間間隔より何倍長いかを表す整数である）

に従い、最初の時間間隔における光子カウント数 {N_j} から計算される分布関数

【外19】

$$\hat{P}(n)$$

が決定される光子カウント数 {n_i} の選択が興味深いこともある。行Nは、最初の時間間隔窓を示す。行n_i は、ルールに従ってn_i を算出するために選択された最初の時間窓を表す。このルールは、FIMDAの場合のカウント時間間隔の長さが異なる一連のヒストグラムを作るために適用される。

40

【0114】

図21

図21は、最初の時間間隔を時間遅延によって分けるというルールに従い、所定の最初の時間間隔から光子カウント数 {n_i} が得られる更なる態様を示す。特に、以下のルールを適用することができる：

【数71】

$$n_i = \sum_{k=1}^M (N_{Mi+k} + N_{M(i+L)+k})$$

ここで、M及びLは正の整数であり、 $\{n_i\}$ はヒストグラム
【外 20】

$\hat{P}(n)$

が決定される光子カウント数であり、かつ $\{N_j\}$ は最初の時間間隔における光子カウント数である。このルールは、FACIDの場合の異なるヒストグラムの決定に適用される
10

【0115】

図 22-27

ここで、図 22-27 を説明する。

細胞表面レセプターの機能及び活性の研究は、現代生物学及び薬理学の全研究分野の主流をなす。膜レセプターは、血漿膜を横切る細胞外信号を細胞内で変換するので、多細胞生物内の伝達 (communication) において重要な役割を果たす。膜レセプターの2つの重要な種類は、成長因子レセプター及びG蛋白質結合 (G protein-coupled) レセプター (GPCR) である。成長因子レセプターは、細胞の分化及び成長において重要な役割を果たすレセプターチロシンキナーゼの群に属する。この種類に
20
属するレセプターは、表皮成長因子レセプター群、ニューロトロフィン (neurotrophin) レセプター群及びインシュリンレセプター類を含む (Mc Innes C. & Sykes B. D. Biopolymers, 43, 339 - 366, 1997; Riese D. J. & Stern D. F. Bioessays 20, 41 - 48, 1998; Persson H. & Ibanez C. F. Curr. Opin. Neurol. Neurosurg. 6, 11 - 18, 1993)。G蛋白質結合レセプターは、神経伝達物質及びホルモンのような細胞外因子の結合により様々な工程のトランスメンブレン信号変換 (transmembrane signal transduction) を媒介する7つの α -ヘリカルトランスメンブレンドメインを含む
30
不可欠な (integral) 細胞蛋白質の上科である (ジー (Ji) ら、J. Biol. Chem.、273、17299 - 17302、1998; ゲザー (Gethe) ら、J. Biol. Chem. 273、17979 - 17982、1998; ウェスJ. (Wess J.)、FASEB J. 11、346 - 354、1997)。

【0116】

殆どの場合、レセプターは、放射性リガンド (radioligand) 結合分析を用いて生化学的及び薬理的に研究される。これらの実験では、結合した、又は結合していないリガンドの分離をしばしば含む、放射線でラベルされたリガンドの膜画分又は細胞全体への結合を観察する。本発明による方法を用いると、蛍光ラベルされた分子又は粒子の、
40
単一分子値でのそれらの分子明度及び濃度に関する特徴化が可能である。リガンドとレセプターとの相互作用の研究に、この方法がどのように適用され得るかを以下に記載する。レセプターを担持した (receptor-bearing) 小囊上への蛍光リガンド分子の積み重なりにより、結合されたリガンドを未結合リガンドと区別することができ、その結果、単一の蛍光リガンド分子と比べて粒子明度が増加する。本発明による蛍光強度分布分析 (FIDA) により、分子明度におけるこれらの違いを定量することができ、かつ結合していない、及び結合しているリガンドの完全な濃度が、分離の必要なしに1つの測定で測定される。FIDAは、高度に焦点に集められたレーザービームを利用するので、検出体積は約1フェムトリッターの大きさである。液体のハンドリングの現在の (currently) 実用上の限界である1 μ lに試料体積を減らすことができるので、貴重な生物学的材料及び化学的化合物が大幅に節約される。FIDAは研究及び高処理量薬学的
50

スクリーニングに対する本質的な利益をもたらす、レセプターリガンド研究のための理想的な方法であることがこれらの結果から示された：それは、幅広く適用することができ、危険かつ効果な放射性プローブの使用を回避し、洗浄段階の必要性をなくし（即ち、本発明は、均質な（homogeneous）分析方法を提供する）、かつ試薬の消費の大幅な減少を可能にする。

【0117】

上記のレセプターの両方の種類は、癌、神経変性疾患（neurodegenerative diseases）、心臓血管異常（cardiovascular disorders）及びAIDSのような多数の疾患において重要な役割を果たすので、重要な薬剤のターゲットである。EGFレセプター（EGFR/Erbb1）、170kDのレセプターチロシンキナーゼ及び β 2-アドレナリン作用性レセプター、我々のモデル系としてのG蛋白質結合レセプター。

10

【0118】

以下の実験プロトコルを用いた：

材料．テトラメチルローダミンでラベルされた表皮成長因子（TMR-EGF）、非ラベル化表皮成長因子（EGF）及びボディピィ（Bodipy）FL-CGP 12177（ボディピィFL：4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ（bora）-3a,4a-ジアザ-s-インダセン（indacene）-3-プロピオン酸；CGP 12177：4-（3-（（1,1-ジメチルエチル）アミノ（-2-ヒドロキシプロピル（-1,3-ジヒドロ-2H-ベンズイミダゾール-2-オン ヒドロクロライド）を、モレキュラープローブズ（Molecular Probes）（ライデン（Leiden）、オランダ）から購入した。アメリカ型組織培養収集（American Type Tissue Culture Collection）から、ヒトの表皮上の癌腫（A431）細胞及びヒトの結腸癌腫腫瘍（colon carcinoma tumor）（HCT）細胞を得た。R&Dシステムズ（R & D Systems）からベータセルリン（Betacellulin）及びヘパリン結合EGF（HB-EGF）を、RBI（ナチック（Natick）、米国）からCGP 12177Aを購入した。

20

【0119】

方法．細胞系及び膜調製．野生型ヒト β 2アドレナリン作用性レセプターcDNAをプラスミドpcDNA3内でクローン化した。プラスミドは、HEK293細胞にトランスフェクトされ、かつ安定なクローンを記載されたように選択した（ガビロンドA. M.（Gabilondo A. M.）、ヘグラーJ.（Hegler J.）、クラセルC.（Krasel C.）、ボイビン-ジャーンスV.（Boivin-Jahns V.）、ヘインL.（Hein L.）、ローセM. J.（Lohse）、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、94、12285 - 12290、1997）。膜調製のために、氷冷溶解バッファー（10mMのトリス-HCl pH 7.4、1mMのMgSO₄、プロテアーゼ阻害剤カクテル（コンプリートTMミニEDTAフリー（CompleteTM Mini EDTA-free）、ロシェ・モレキュラー・バイオケミオカルズ（Roche Molecular Biochemicals））を含有する0.5mMのEDTA）2mlの中で、約 2×10^8 個の細胞を再懸濁させた。氷上でドウンス（Dounce）均質化によって細胞をばらばらにし、900×gで10分間、遠心分離で破壊されていない細胞及び核を取り除いた。上清を貯留し、100,000×gで20分間（4℃）で遠心分離した。0.5mlの結合分析バッファー中で膜ペレットを再懸濁し、ブラッドフォードプロテインアッセイ（Bradford protein assay）（バイオラド（Biorad））を用いて蛋白質濃度を測定した。液体中で、膜をアリコート中で凍結させ、-80℃で貯蔵した。

30

40

【0120】

結合研究．典型的な実験は、50～500 μ g/mlの膜蛋白質、最終体積が40 μ lの異なる濃度の蛍光リガンド及びコンペティターを含んでいた（詳細は図の説明（Figure legends）を参照）。20mMのHepes pH 7.4、140mMのN

50

aCl、5mMのKCl、1.2mMのMgCl₂、1.8mMのCaCl₂、0.1%のBSA及び0.1%のCHAPS中で、EGFレセプター（EGFR）結合研究を行った。β2アドレナリン作用性レセプターのための結合分析バッファーは、75mMのTris-HCl pH 7.4、10mMのMgCl₂、2mMのEDTA、0.05%のBSA及び0.1%のCHAPSを含んでいた。8ウェルガラスチャンバー（Nunc）中で測定を行った。1μlの試料体積を用いる実験に対し、ウェル当たりの総容量1.5μlで、専有液体分配単位（proprietary liquid dispensing units）及び高密度試料キャリアー（ナノキャリアー（Nanocarrier））を用いた（エボテックバイオシステムズAG（EVO TEC BioSystem s AG））。

10

【0121】

データ分析. カスクP.（Kask P.）、パロK.（Palo K.）、Ullmann D. & Gall K.（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、96、13756－13761、1999；この内容は、本明細書に開示として援用される）に記載の光学装置と共に、共焦点顕微鏡（コンフォーカル（Confoc or）、エボテックバイオシステムズ（EVO TEC BioSystem s AG）及びカールツァイス（Carl Zeiss）、ジェナ（Jena）ドイツ）を用いた。ウェル当たり40μ秒のドエル時間及び4－8秒のデータ収集時間で光子カウント数を測定した。約300μWに減じられたヘリウム／ネオンレーザーを用いて励起／放射波長が543／580nmでTMR-EGFによって測定を行った。約2mWに減じられたアルゴン⁺レーザーを用いて励起／放射波長が488／520でボディピィFL-CGF 12177によって測定を行った。本発明による方法は、FCSのように、共焦点体積に出入りする蛍光粒子の任意の拡散に頼っている（カスクP.（Kask P.）、パロK.（Palo K.）、Ullmann D. & Gall K.、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、96、13756－13761、1999；リーグラーR.（Rigler R.）、J. Biotechnol. 41、177－186、1995）。蛋白質のような単一の粒子と比べて膜粒子の拡散時間が非常に長いので（平均拡散時間τ＝10－100ms対約200μs－単一分子に対して1ms）、十分多数の膜質状小嚢を検出し得るように、二次元走査アプローチを利用する。これは、レーザービーム発振器及び可動性試料ステージを用いて達成される。

20

30

試料内に2つの異なる蛍光種、即ち蛍光リガンド及びそれらの表面に積み重なった蛍光リガンドを有する小嚢の存在を仮定すると、これらの2成分の分子明度及び完全な濃度を測定するために、光子カウント数ヒストグラムは、カスクP.（Kask P.）、パロK.（Palo K.）、Ullmann D. & Gall K.（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、96、13756－13761、1999；この内容は、本明細書に開示として援用される）による多成分補正によって補正される。結合した、又は結合していないリガンドの濃度は、そのデータから推定される。小嚢へ結合したリガンド量は、濃度において（nM、結合したリガンド）、又は部分的な（fractional）結合として（リガンドの合計で割った結合したリガンド）得られる。最大値の半分の置換（一方の結合モデルに対する非線形最小二乗曲線補正IC₅₀）をもたらす濃度から、チェンY.（Cheng Y.）及びプルソフW. H.（Prusoff W. H.）（Biochem. Pharmacol. 22、3099－3108、1973）による $KI = IC_{50} / (1 + (ligand\ concentration / K_D))$ の関係をj用いて、見かけの（Apparent）アフィニティー（K_I）を算出した。プリズム（Prism）3.0（グラフパッドプリズム（Graph Pad Prism）、サンディエゴ、米国）を用いて実験データを分析した。

40

【0122】

蛍光強度分布分析（FIDA）により、結合において粒子明度の変化が起こる場合の蛍光分子の分子相互作用が研究される。試料中の各蛍光種の分子明度及びそれらのそれぞれの完全な濃度が測定されるので、分子相互作用を説明する定量データが得られる。図22は

50

、本発明による方法によって観察された蛍光ラベルされた分子のレセプター担持小囊への結合の概略図を示す。中央の黒い四角によって共焦点体積を表す。A：膜がない場合に、共焦点体積は結合していない蛍光リガンド分子のみを含有する。蛍光リガンドの分子明度は、フルオロフォア (fluorophore) の固有の性質であり、分子に結合する。B：結合していないリガンドに対する典型的な分子明度 7 kHz で A に示された試料の場合に得られた明度分布。C：小囊の添加後、リガンド結合が起こり、共焦点体積は小囊に結合した、及び結合していないリガンドで占められている。D：C に示す試料の明度分布。非結合リガンドの分子明度は、7 KHz のままである。この場合、小囊の分子明度は 9 8 kHz であった (結合していないリガンドの 14 倍、小囊当たり 14 のリガンド分子の結合に相当)。これは、レセプター発現値に依存している。典型的には、小囊当たり 10 - 500 個のリガンド分子を見つけることができる。注：大きさは測定していない。従って、結合において全ての蛍光が変化しないとしても、結合のモル濃度並びに非結合リガンドのモル濃度は、何ら分離を必要とせずに、単一の測定によって定量的に測定される。

【0123】

本発明による方法は、TMRでラベルされたEGFとそのレセプター、EGFレセプター (EGFR/Erbb1) との相互作用を特徴付けるために用いられた。供給源として、EGFRを過剰発現する (overexpress) ことが知られているA431細胞を使用した (Mcクロック (Mc Culloch) ら、Int. J. Biochem. Cell Biol. 30、1265-1278、1998)。図23は、A431細胞から調製された膜へのTMR-EGFのリガンド結合特性を示す。0.25-18 nMのリガンド濃度を、全体積40 µl中で、最終濃度50 µg/mlで未精製の膜画分と共にインキュベートした。室温での20分のインキュベート期間の後、測定を行い、結合していない、及び結合したリガンド濃度を測定した。TMRでラベルされたEGFの膜への結合は、飽和され得て、かつ過剰の非ラベル化EGFによって競合され得る。1 µMのEGFの存在下、非特異的結合を測定した。示した結果は、典型的な実験からのものであり、標準偏差 (SD) を、エラーバーとして示す。測定された解離定数 (K_D) 3.1 ± 0.2 nMは、放射性リガンド結合分析におけるコンペティターとして蛍光ラベルされたEGFを使用した初期の報告と一致する (キャラウェイ (Carraway) ら、J. Biol. Chem. 266、8899-8906、1991)。細胞当たり約 6×10^6 の結合部位に相当する60 pmol/mgの発現値 (B_{max}) が観察され、これにより、A431におけるEGFRの発現値は、初期の報告によって立証されたように、大幅に上に調整される (upregulated) ことが示された。

【0124】

本発明による方法が、大幅に低く、より生理学的な発現値を示す生物学的システムにも適用可能であることを示すために、ヒトの結腸癌腫瘍 (HCT) 細胞を使用した。図24は、HCT細胞から調製された膜へのTMR-EGF結合を示す。HCT細胞から調製された量が増えた未精製膜は、非ラベル化EGFの存在下及び欠乏下で2 nMのTMR-EGFと共にインキュベートされた。本発明の方法により、全体の非特異的結合を測定した。リガンド結合は、部分的な結合として表される (リガンドの合計で割ったリガンド結合)。HCT細胞から調製した膜は、TMR-EGFに結合し、そこでは、特異的結合は全結合の70-80%であった。図23においてA431に対して示したように、アフィニティー及び発現の値は、飽和曲線 (saturation curve) において測定された。 K_D は3 nMであった。これは、A431細胞中のEGFレセプターのアフィニティーと非常に類似している (図23参照)。 B_{max} は、400 fmol/mgの膜蛋白質であった。これは、約10,000-20,000個の結合部位/細胞に相当し、要するに、A431細胞の場合より100倍より更に低い。この実験は、レセプター過剰発現細胞系だけでなく、それらの自然な環境にあるものと同等のレセプター密度を用いてもFIDAを使用することができることを示す。

【0125】

EGFレセプターは異なる成長因子 (EGFR/Erbb-1、Erbb-2、Erbb-

B3及びErbbB-4；リーゼ(Riese)ら、Bioessays 20、41-48、1998)に結合する関連するレセプターチロシンキナーゼの群の一部であるので、TMR-EGFのHCT膜との相互作用を、更に特徴付けた。EGFとの顕著な配列の一致を示す哺乳類ポリペプチド成長因子の数は、近年劇的に増加し、かつベータセルリン及びヘパリン結合EGF(HB-EGF)を含む。図25は、EGFレセプターの薬理学的プロファイルを表す。非ラベル化EGF、ベータセルリン及びヘパリン結合表皮成長因子(HB-EGF)は、TMR-EGF及び示された濃度のコンペティターと共にHCT膜をインキュベートする競合アッセイによって測定された。本発明による方法によって結合を測定し、コンペティターが存在しない場合のものに標準化した。得られたアフィニティーは、EGFの場合は 0.35 ± 0.12 nM、ベータセルリンの場合は 0.23 ± 0.02 nM及びHB-EGFの場合は 1.4 ± 0.3 nMであった。 10

【0126】

更なる系として、 $\beta 2$ アドレナリン作用性レセプターを用いた。何故なら、G蛋白質結合レセプターの大きな群に対する周知のモデルシステムであるからである(コビルカ(Kobilka)、Annu. Rev. Neurosci. 1587-114、1992)。蛍光ラベルされたCGP 12177、 $\beta 2$ アドレナリン作用性レセプター拮抗剤をリガンドとして選択した(ハイザー(Heithier)ら、Biochemistry 33、9126-9134、1994)。図26は、ボディピィFL-CGP 12177のリガンド結合特性を表す。濃度の増加したボディピィFL-CGP 12177を、ヒト $\beta 2$ アドレナリン作用性レセプターを発現するHEK細胞から得られた未精製膜画分と共にインキュベートした。最終的な膜濃度は、全体積 $40 \mu\text{l}$ において $130 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。 $1 \mu\text{M}$ のプロプラノロール(propranolol)の存在下で非特異的結合を測定し、全結合から引いた。示した結果は、典型的な実験からのものであり、標準偏差(SD)を、エラーバーとして示す。ボディピィFL-CGP 12177は、結合部位の外見上(apparently)均質な集合に結合した。リガンドの結合は、単一部位モデルを用いた統計学的な最良の補正であり、平均アフィニティーは 0.7 nMで、標準フィルター結合分析を用いる場合に得られる結果と同様であり(ハイザー(Heithier)ら、Biochemistry 33、9126-9134、1994)、かつ B_{max} は $4 \text{ pmol}/\text{mg}$ であった。非ラベル化CGP 12177との競合実験により、 0.8 nMの K_I が得られ、これは、蛍光ラベルの結合がレセプターに対するアフィニティーに大きく影響しないことを示す。 30

【0127】

図27は、 $40 \mu\text{l}$ 及び $1 \mu\text{l}$ の分析体積におけるボディピィFL-CGP 12177結合の阻害を表す。非ラベル化リガンド(CGP 12177A)を、示した濃度でのコンペティターとして使用した。最大の結合において、結合を100%に標準化した。 $40 \mu\text{l}$ 及び $1 \mu\text{l}$ の試料体積中で結合分析を行った。 $1 \mu\text{l}$ の試料体積を含む実験の場合、専有液体分配単位及び試料キャリアーを用いた(エボテックバイオシステムズAG(EVOTEC BioSystems AG))。CGP 12177の場合に得られたアフィニティーは、分析体積 $40 \mu\text{l}$ 中 0.7 ± 0.1 nMであり、 $1 \mu\text{l}$ 中 0.9 ± 0.1 であった。この実験により、FIDAの特有の感度を強調され、かつ試料体積の、及びそれによる高処理量薬剤スクリーニングのために要求される生物学的材料の大幅な減少の大きな機会が主張される。 40

【0128】

リガンド-レセプター相互作用の研究は、膜レセプター機能の生物学的及び薬理学的特徴化のために重要なツールである。特に、市場の全ての薬剤の約30-50%が、GPCRに作用すると評価されているので、G蛋白質結合レセプターは、薬学的薬剤開発プログラムのために非常に重要である(グダーマン(Gudermann)ら、J. Mol. Med. 73、51-63、1995)。伝統的に、レセプター研究の大多数は、放射性ラベル化リガンドを用いて行われ、そこでは、非ラベル化リガンドからの結合は、濾過又は遠心分離のいずれかによって分離される。近年、シンチレーション接近分析(scin 50

til l a t i o n p r o x i m i t y a s s a y s) は、レセプター-リガンド結合研究のための広範な使用が見出された。ここで、結合イベントは、シンチラント含有 (s c i n t i l l a n t c o n t a i n i n g) ビーズ上に固定された膜への放射性リガンドの接近によって検出されるので、分離の必要がなくなる (ハート (H a r t)、M o l. I m m u n o l. 1 6、2 6 5 - 2 6 7, 1 9 7 9)。しかし、これらの方法の欠点は、潜在的に危険な、放射性化合物に曝されている状態、ラベル化リガンドの制限された貯蔵 (s h e l f) 半減期、及び試薬のハンドリング及び処分のための特別な要求である。従って、全蛍光の検出 (ハイザー (H e i t h i e r) ら、B i o c h e m i s t r y 3 3、9 1 2 6 - 9 1 3 4、1 9 9 4; イングレーゼ (I n g l e s e) ら、B i o c h e m i s t r y 3 7、2 3 7 2 - 2 3 7 7、1 9 9 8)、蛍光消光/スペクトルシフト (タイリ (T a i r i) ら、B i o c h e m i s t r y 3 7、1 5 8 5 0 - 1 5 8 6 4、1 9 9 8)、蛍光偏光 (タイリ (T a i r i) ら、B i o c h e m i s t r y 3 7、1 5 8 5 0 - 1 5 8 6 4、1 9 9 8) 又はレーザー走査イメージ化 (ズック (Z u c k) ら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、1 1 1 2 2 - 1 1 2 7、1 9 9 9) の使用に基づく、いくつかの蛍光系検出法が、近年のレセプター-リガンド研究に適用されている。

【0129】

本発明による方法に基づき、リガンドのそれらの同種の (c o g n a t e) レセプターとの相互作用を定量的に特徴付けるために、蛍光強度分布分析を用いることができる。F I D A は、単一分子感度 (s i n g l e m o l e c u l a r s e n s i t i v i t y) によって相互作用の研究を可能にするので、上記の方法に大きな利点をもたらす。モデルシステムとして E G F 及び β 2 アドレナリン作用性レセプターを使用すると、上記の例において、アフィニティー及びレセプター発現値を単純な方法で定量できることが示された。それらの結果は、F I D A を用いて得られた薬理学的プロファイルは、古典的な放射性リガンド結合分析によって得られたものと一致することを示す。レセプターの低い値を示す細胞を用いてリガンド-レセプター相互作用を研究するためにも、F I D A を用いることができることも示された。これは、G P C R 類のために特に重要である。なぜなら、それらは典型的に初期細胞中で低密度で見られ、かつ機能的レセプターの過剰発現を達成することがしばしば困難だからである。F I D A は、多数の蛍光分子の小囊への結合における粒子明度の増加を定量することができるので、蛍光消光又はスペクトルシフトのような蛍光パラメーターの変化が起こることは必要ではなく、このアプローチの幅広い適用を可能にする。F I D A では、結合していない、及び結合したリガンドの両者のモル濃度は、1 つの測定において測定され、それにより、各試料中で全リガンドがどの程度多く存在するかに応じて内部制御をもたらす。共焦点装置を用いる F I D A の大きな利点は、検出の体積がほぼ細菌細胞の大きさで、小さいことである。分析体積の小型化は、現代の薬学的薬剤スクリーニングにおいて重要な戦略である。なぜなら、化学的化合物の増加数は、生物学的ターゲット、生物学的試薬の消費、及び化学的又は天然の化合物の数の増加数に対してスクリーニングしなければならないので、主な問題となるからである。従って、シグナル-ノイズ比を弱めることなく、現在の液体のハンドリングの限界である $1 \mu\text{l}$ に試料体積を減少させることができ、それにより特有の感度を示すので、本発明に基づく F I D A 及び関連する好ましい共焦点法は、これらの目的に理想的に適合する。

【0130】

我々の研究室において、F I D A は、いくつかの異なるタイプの G 蛋白質結合レセプターの研究に良好に適用された。これらは、ケモキン (c h e m o k i n e) レセプター、ドーパミンレセプター及びいくつかのペプチドレセプターを含む。これらの分析システムは、小さなラベル化分子 (作用薬又はこの研究において記載したような拮抗剤)、ペプチド及び蛋白質 (データは示さず) の使用を含む。また、その技術は、 $1 \mu\text{l}$ フォーマット (f o r m a t) 中の生存細胞への分子の結合の測定に良好に適用することができる。これは、高処理量スクリーニングにおける初期組織の直接的な使用のエキサイティングな機会を開く。要するに、F I D A は、リガンド-レセプター研究のために理想的な方法である

；それは、放射性同位体の使用及び分離段階を回避し、幅広く適用可能であり、かつ試薬の消費を大幅に減少させるので、研究、高処理量スクリーニングに対し、及び薬理的プロファイリングに対し、大きな利点をもたらす。

【0131】

図28-30

更なる例は、様々な幅のカウント時間間隔で同時に記録した一組の光子カウント数ヒストグラムの全体的な分析に基づく。図20に記載の方法により、カウント時間間隔を測定することができる。この蛍光強度多分散分析（FIMDA）は、比分子明度及び並進拡散時間の両者に基づき、蛍光種を区別する。単一の測定から得られた、組み合わせられた情報は、1つの次元により読み出しを効果的に増加させ、それによりFCS及びFIDAの個々の限界を打ち破る。その方法は、生命科学にいずれも大きく関連する、レセプター及びリガンド又は抗体及び抗原を含む分子相互作用を観察するために幅広く適用することができる。

10

【0132】

以下に、我々の実験の目的に適当な推定である、FIDA理論の修正を示す。FIDAでは、光子カウント数分布 $P(n)$ の便宜的な表現は、

【数72】

$$R_{P(n)}(\xi) = \sum_n \xi^n P(n) \quad (41)$$

20

と規定される、その生成関数である。

【0133】

FIDA理論は、(i) カウント時間間隔中、分子は動かない、及び(ii) 分子からの光束は、空間明度関数 $B(r)$ （これは、装置を特徴付ける分子の空間座標の関数である）と（ある分子種を特徴付ける）比明度 q との積として表すことができる。これらの2つの仮定の下、体積成分 dV から分子によって放射された光子カウント数の分布は、ダブルポアソニアンであり、対応する生成関数は、

【数73】

$$R_{P(n)}(\xi) = \exp[c dV (e^{(\xi-1)qB(r)T} - 1)] \quad (42)$$

30

を読み取る。ここで、 ζ は生成関数の複合独立変数（complex argument）であり、 c は分子の濃度であり、 T はカウント時間間隔の幅である。例えば、異なる体積成分又は種のような、独立した原因からの寄与が、寄与する生成関数の掛け合わせ（multiplication）によって組み合わせられるので、この表現は都合がよい。単一種に対する生成関数 $P(n)$ は、

【数74】

$$R_{P(n)}(\xi) = \exp[c \int (e^{(\xi-1)qB(r)T} - 1) dV] \quad (43)$$

40

であり、一方、多数の種に対する計算により、簡単に

【数75】

$$R_{P(n)}(\xi) = \exp[\sum_i c_i \int (e^{(\xi-1)q_i B(r)T} - 1) dV] \quad (44)$$

が得られる。

【0134】

式44の右辺の積分は、数学的に計算されるが、空間座標上の三次元積分の代わりに、一次元積分座標 $\chi = \ln [B_0 / B(r)]$ が導入される。従って、明度 B と座標 χ との関係は、 $B(\chi) = B_0 e^{-\chi}$ である。FIDAでは、式

50

【数 7 6】

$$\frac{dV}{dx} = A_0(x + a_1x^2 + a_2x^3) \quad (45)$$

によって、一次元的な表現で明度プロファイルを説明する関数 $dV/d\chi$ を表すのに適していることが見出された。

ここで、 a_1 及び a_2 は、測定されたヒストグラムの補正に高精度で十分な柔軟性を与える経験上の調整パラメーターである。係数 A_0 及び B_0 の選択は、 V 及び B の単位を選択にほかならない。通常、それらは

【数 7 7】

$$\int B dV = 1 \quad (46)$$

10

【数 7 8】

$$\int B^2 dV = 1 \quad (47)$$

の条件から測定される。

【0 1 3 5】

今まで、F I D A 理論の簡単なバージョンを説明した。F I M D A の目的のためには、カ 20
ウント間隔中分子が動かないという仮定をやめなければならない。驚くべきことに、式 4
2 並びに以下の等式は捨て去られないであろうが、いくつかの変数の意味は変わるであろ
う。 χ は、やはり空間明度プロファイルに関する関数であるが、ここでは、その位置より
むしろ分子の経路を特徴付ける。 B は、分子の固定された位置において測定されるより
むしろ経路に亘って平均化された空間明度である。 V は、空間中の体積ではないが、 d
 $V/d\chi$ は、やはり分子が所定の χ の値を有する確率を表す。 c 及び q が本来の意味のま
まである場合、 A_0 、 a_1 及び a_2 がカウント時間間隔 T にどの程度依存するかを予想す
る理論が展開されなければならないであろう。しかし、別のアプローチが選択された。標
準化条件はそのままであった（式 4 6 及び 4 7）。一組の異なる時間窓に対し、 A_0 、 a 30
 a_1 及び a_2 の値の一つの選択を適用することさえも可能である。この選択の結論は、式 4
2 - 4 4 において c が見掛けの濃度 (c_{app}) であり、 q が見掛けの明度 (q_{app})
であり、いずれもカウント時間間隔 T に依存するということである。

【0 1 3 6】

以下に、 c_{app} 及び q_{app} がどの程度 T に依存するかを予想する理論を示す。単一種
の場合を研究し、式 4 3 に対応する分布の第一及び第二階乗キュムラントを計算する。階
乗キュムラントは、

【数 7 9】

$$K_n = \left(\frac{\partial}{\partial \xi} \right)^n \ln(R(\xi)) \Big|_{\xi=1} \quad (48)$$

40

と定義され、

【数 8 0】

$$K_1 = \langle n \rangle = c_{app} q_{app} T \quad (49)$$

【数 8 1】

$$K_2 = \langle n(n-1) \rangle - \langle n \rangle^2 = c_{app}^2 q_{app}^2 T^2 \quad (50)$$

50

が得られる。ここで、式 4 6 及び 4 7 によって得られる標準化条件を用いた（注、式 4 9 及び 5 0 は、仮定 i 及び i i）の下で得られたキアン（Q i a n）及びエルソン（E l s o n）の式（B i o p h y s. J. 5 7 : 3 7 5 - 3 8 0, 1 9 9 0）と完全に一致する）。式 4 9 から、

【数 8 2】

$$c_{app}(T)q_{app}(T) = \langle I \rangle \quad (51)$$

と結論付けることができる。ここで、 $\langle I \rangle \equiv \langle n \rangle_T / T$ は、T の選択には依存しない平均カウント率である。我々は、カウント数分布 $P(n; T)$ の第二キュムラントと蛍光強度の自己相関関数 $G(t) = \langle I(0)I(t) \rangle - \langle I \rangle^2$ との間の以下の関係

【数 8 3】

$$\langle n(n-1) \rangle_T - \langle n \rangle_T^2 = \int_0^T dt_1 \int_0^T dt_2 G(t_2 - t_1)$$

を用い続けるであろう。

【0 1 3 7】

【数 8 4】

$$\Gamma(T) = \frac{1}{cq^2T^2} \int_0^T dt_1 \int_0^T dt_2 G(t_2 - t_1) \quad (53)$$

という表記を導入し、式 5 2 及び 5 0 から

【数 8 5】

$$c_{app}(T)q_{app}^2(T) = cq^2\Gamma(T) \quad (54)$$

が導かれる。

【0 1 3 8】

式 5 1 及び 5 4 から、

【数 8 6】

$$q_{app}(T) = q\Gamma(T) \quad (55)$$

【数 8 7】

$$c_{app}(T) = \frac{c}{\Gamma(T)} \quad (56)$$

を得る。

【0 1 3 9】

最後の段階として、FCSからの $G(t)$ の式を式 4 3 に代入した。ガウスの明度関数を適用し、かつ三重項トラッピング (triplet trapping) を無視すると（アラゴン (Aragon) 及びペコラ (Pecora)、J. Chem. Phys. 64 : 1791 - 1803, 1976）、

【数 8 8】

$$G_{diff}(t) = cq^2 \left(1 + \frac{D|t|}{\sigma_r^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{D|t|}{\sigma_z^2}\right)^{-1/2} \quad (57)$$

放射方向の場合を σ_r 及び縦方向の場合を σ_z と表す。ここで、ガウスのプロファイルは

10

20

30

40

50

$e^{1/2}$ 倍減少した。式 5 3 の積分から

【数 8 9】

$$\Gamma_{diff}(t) = \frac{4}{t^2 \beta \sqrt{1-\beta}} \left[\beta(1+t) \operatorname{artanh} \left(\frac{\sqrt{1-\beta}(\sqrt{1+\beta t}-1)}{\beta + \sqrt{1+\beta t}-1} \right) - \sqrt{1-\beta}(\sqrt{1+\beta t}-1) \right] \quad (58)$$

が得られる。ここで、 $t = DT \sigma_r^2 / \sigma_z^2$ 及び $\beta = \sigma_r^2 / \sigma_z^2$ である。下記に説明した理由により、式 5 8 において最初のオーダーの項を計算することが有用である：

【数 9 0】

$$\Gamma_{diff}(T) = \left[1 + \frac{DT}{6} \left(\frac{2}{\sigma_r^2} + \frac{1}{\sigma_z^2} \right) \right]^{-1} + O(D^2) \quad (59)$$

【0 1 4 0】

しかし、理論的な考察並びに測定から、ガウス又は他のガウスローレンツのような簡単な物理的モデルは、実際の明度プロファイルを正確に表さないことがわかる（カスク（Kask）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、96、13746-13761、1999）。従って、式 5 9 を修正し、補正パラメーター a を導入した。これは、式 5 9 の最初のオーダーの項を保っている：

【数 9 1】

$$\Gamma_{diff}(T) \approx \left[1 + \frac{DT}{6a} \left(\frac{2}{\sigma_r^2} + \frac{1}{\sigma_z^2} \right) \right]^{-a} \quad (60)$$

【0 1 4 1】

ガウスの明度プロファイルは、2 番目のオーダーの項を適合させることにより、 $a = 2/3$ と一致するであろう。しかし、むしろ a は、経験上のパラメーターに選ばれ、補正法（fitting procedure）によって決定される。

【0 1 4 2】

関連する別の現象は、三重項励起状態への分子のトラッピングによる強度変動のものである（ウィーデングレン（Widengren）ら、J. Phys. Chem、99：13368-13379、1995）。特に三重項寿命（典型的には 2μ 秒）と比較可能な T の値において、良好な補正を得るために、 $G(t)$ に更なる因子を導入する：

【数 9 2】

$$G_{trip}(t) = \frac{1 + \kappa \tau \exp \left(-\frac{(1 + \kappa \tau)t}{\tau} \right)}{(1 + \kappa \tau)^2} \quad (51)$$

ここで、 κ は一重項から三重項への遷移率であり、 τ は三重項の寿命である。式 5 1 により、

【数 9 3】

$$\Gamma_{trip}(T) = \frac{\left\{ 2 \frac{\tau}{T} \kappa \tau \left[1 + \kappa \tau - \frac{\tau}{T} \left(1 - e^{-\frac{T}{\tau}(1 + \kappa \tau)} \right) \right] + (1 + \kappa \tau)^2 \right\}}{(1 + \kappa \tau)^4} \quad (52)$$

が得られる。

【0 1 4 3】

光子カウント数の大きい方のキュムラントのみに影響する拡散と異なり、三重項補正もまた、1番目のキュムラントが $1/(1+\kappa\tau)$ 倍シフトする。

【数 9 4】

$$q_{app}^{(trip)}(T) = q\Gamma_{trip}(T)(1+\kappa\tau) \quad (53)$$

【数 9 5】

$$c_{app}^{(trip)}(T) = \frac{c}{\Gamma_{trip}(T)(1+\kappa\tau)^2} \quad (54)$$

10

【0 1 4 4】

c_{app} 及び q_{app} (三重項因子を含む) の場合のこれらの式を導いた後、データシミュレーション及び実験は、それらの妥当性を立証すべきである。

【0 1 4 5】

以下の実験プロトコルを用いた。

実験装置. FIMDAの中央の光学部は、蛍光相関分光法で用いられるような共焦点顕微鏡である(コッペル(Koppel)ら、Biophys. J. 16:1315-1329、1976;リグラー(Rigler)ら、Eur. Biophys. J. 22:169-175、1993a)。蛍光の励起のために、連続波レーザーからのビームを、帯電していない密度フィルターによって800 μ Wまで減じさせ、ビーム伸張器に通し、そして二色鏡によって顕微鏡の対物レンズに向ける。二色鏡、スペクトルバンドパスフィルターを通して同じ対物レンズによって蛍光を集め、焦点を外れた光を遮断するために働く共焦点ピンホールに焦点を合わせる。ピンホールを通る光を、ケイ素光子カウントモジュール(SPCM-AQ-131、EG&Gオプトエレクトロニクス(EG&G Optoelectronics)、ボードロイル(Vaudreuil)、カナダ)によって検出する。コンピューター差込式カードとしてエボテック(EVOTEC)において作成された電子カウンターは、検出器からの TTL パルスを連続的に集め、32 MB オンボードバッファから、予め選択された幅の時間窓全てに対するカウント数ヒストグラムをリアルタイムで計算する(40、60、120、200、400、600、800、1200、1600、2000 μ 秒)。検出器の出力を相関計へ送り込むことにより、FIMDA実験と並行してFCS測定を行うことができる。

20

30

【0 1 4 6】

この研究において用いられる様々なフルオロフォアのスペクトルの必要性を満足するために、異なるレーザー及びスペクトルバンドパスフィルターを用いた。生体分子に結合したCy5(アマシャム・ファルマシア・バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech)、バックス(Bucks)、英国)に対し、赤色レーザーダイオード(クリスタル社(Crystal GmbH)、ベルリン、ドイツ;635nm)及び中央の波長が670nmであるバンドパスフィルター(670DF40、オメガオプティカル(Omega Optical)、ブラットレボロ(Brattleboro)、Vt)の配列を用いた。TAMRA(5-カルボキシテトラメチルローダミン)にラベルされた分子の場合、これは、周波数を2倍にしたNd-YAGレーザー(μ グリーン4601;ユニフェーズ(Uniphase)、サンジョゼ(San Jose)、CA;532nm)及び590DF60フィルターの配列である。

40

【0 1 4 7】

元のレーザービームの適当な拡大倍率(factor)を選択することにより、共焦点ビーム半径を0.75 μ mまで調整した結果、結合していない色素Cy5に対し、平均並進拡散時間は360 μ 秒であった。時間窓を40 μ sから2msに増やすと、この拡散をはっきり観察することができる。図28で見ることができるよう、0.8nMのCy5溶液の選択されたカウント数ヒストグラムは著しく異なっている。しかし、分布の形の間の主な違いは、カウント時間間隔の長さによって平均カウント数が変化することによるもの

50

である。蛍光分子の拡散は、小さいだけであるが、依然として顕著な各分布の形の変化を引き起こす。

【0148】

バックグラウンドカウント率の値は、2回蒸留された(bidistilled)水における別々の実験において一般に測定され、通常0.5kHzになる。バックグラウンド光強度がこのように変化しないことの主な要因は、水からのラマン拡散である。

【0149】

データシミュレーション. 慎重に選択されたパラメーター(明度値及び拡散係数)を表す分子の混合物を含む実際の試料を調製する代わりに、シミュレーションされたデータを用いて、新しい方法のいくつかの評価を行った。FIMDA、FIDA及びFCSに対する相関関数に対するいくつかのヒストグラム組を、以下のアルゴリズムに従ってシミュレーションした。閉じた長方形の容器中で、所定の数 of 分子を、大きな(典型的には $360 \times 360 \times 720$)分離した空間グリッド点上に最初に任意に分布させる。各分子は、必然的な(consequent)拡散シミュレーションに付され、そして所定の拡散係数に相当する周波数で、x-、y-又はz-方向のいずれかで1つのグリッド単位によって任意にジャンプする。“焦点”は、容器の中央に配置され、かつ明度分布は三次元全てにおいてガウシアン(Gaussian)であると推定される。所定の時間間隔組に亘って分子から明度の積分を計算する場合、分子は任意に捕集され、並びに三重項励起状態(暗い部分)から放出される。ここで、混合物の進化(evolution)を説明する、所定幅の基本的な時間間隔(例えば $5 \mu s$)に亘る明度の積分の配列(array)を計算することができる。その後、明度の積分は光子カウント数に変換され、次いでFIMDA、FIDA並びにFCSに対する相関関数に対するヒストグラムの計算に用いられた。

【0150】

シミュレーション容器の限定された大きさにより、相関関数のいくつかのひずみ(distortions)(即ち、式57からの偏差)を予想することができる。ひずみは、統計学的なノイズ値より実際は低い。従って、シミュレーションは、得られたパラメーターの統計学的なエラーを評価するのに適当なツールであると考えられた。この目的のために、所定の分子パラメーター組による実験の30個の実施を典型的にシミュレーションし、それから標準偏差及び標準偏差の平均値に対する比として変動係数(CV)を算出した。

【0151】

生物学的システム. The Grb2(SH2)-ホスホペプチド(phosphopeptide)相互作用. 最近の抗腫瘍研究は、チロシンキナーゼ成長因子レセプターに集中している(レビツキ(Levitzyki)、Eur. J. Biochem. 226:1-13, 1994; アレサンドロ(Alessandro)ら、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 213:167-188, 1996; フレット(Furet)ら、J. Med. Chem. 41:3442-3449, 1998)。このレセプターのシグナル変換経路における重大な関連は、そのホスホチロシン(phosphotyrosine)残基(pTyr)のアダプター蛋白質Grb2(成長因子レセプター結合蛋白質2)のSrc-相同2(SH2)ドメインとの相互作用である。認識のために、レセプターの最小のペプチド配列(pTyr-Val-Asn)は十分である(ミュラー(Mueller)ら、J. Biol. Chem. 271:16500-16505, 1996; Gram et al., Eur. J. Biochem. 246:633-637, 1997; フレット(Furet)ら、J. Med. Chem. 41:3442-3449, 1998)。このペプチドモチーフ(motif)の結合パートナー、Grb2のSH2ドメインは、近傍の配列から独立した機能的蛋白質モジュールに折り重なることができる(ブッカー(Booker)ら、Nature 358:684-687, 1992; オベルドイン(Overduin)ら、Cell 70:697-704, 1992)。従って、我々は、モデルシステムとして、蛍光ラベルされたホスホペプチド(pTyr-Val-Asn-Val-Lys(Cy5))(1387 Da)と相互作用させるため、担持された(bare)SH2ドメイ

ン (14.3 kDa) を選択した。

【0152】

Grb2のSH2ドメインは、他に記載されているように調製した (ローエンスタイン (Lowenstein) ら、Cell 70:431-442、1992; バウマン (Baumann) ら、Eur. J. Immunol. 24:1799-1807、1994; ミュラー (Müller) ら、J. Biol. Chem. 271:16500-16505、1996)。マニュアルFmoc固相化学 (manual Fmoc solid chemistry) を用いてホスホペプチドを合成し、リシン残基によってCy5-NHSを用いてラベルした。主な認識モチーフpTyrとの色素の可能な相互作用を最小化するために、追加のバリンを導入した。最終化合物、pTyr-Val-Asn-Val-Lys (Cy5) は、質量スペクトル計 (LC/MSおよびMALDI/TOF)、UV/VIS、及び蛍光分光法によって特徴付けられた。

10

【0153】

以下の結果が得られた。

データシミュレーション及びテスト実験. 最初に、1 nMのTAMRA溶液において一連の測定を行い、FIMDA並びにFCSと並行してデータを収集した。この一連の実験は、それぞれ2秒続き、類似の分子パラメーターを用いてシミュレーションにおいて繰り返された。これらの実験の目的は、シミュレーションは実際の実験の合理的なモデルであるか、特に、データシミュレーションが評価されるパラメーターの統計的なエラーを予想する合理的な手段であるかを立証することである。シミュレーションされたデータから得られたパラメーターの変動係数は、表7において見るように、実際の実験の結果と確かに一致する。

20

【0154】

【表7】

FIMDAにより、一連の実験の、及びシミュレーションされたヒストグラムから
評価されたパラメーターの変動係数及びFCSによる相関関数

パラメーター	平均値	CV(%)			
		FIMDA		FCS	
		実験データ	シミュレーション された値	実験データ	シミュレーション された値
明度 q(kHz)	52	1.8	1.6	1.7	2.0
濃度 c(共焦点体積 当たりの分子)	0.7	1.6	1.8	1.7	2.4
拡散時間 τ (μ s)	64	3.5	3.4	4.1	3.9

【0155】

FIMDAとFCSの能力を比較することを目的として、極めて短い時間範囲で別の一連のテスト実験を繰り返し、三重項成分のパラメーターを評価した。この目的のために、2、4、8、16、32、64、128、256、512、及び1024 μ sの一連のカウント時間間隔を選択した。これらの実験を16秒継続した。表8に示した結果は、FIMDAによって評価された三重項パラメーターに対する値は、FCSの結果と同様に励起強度に依存することを示す。

【0156】

【表8】

10

20

30

40

2つの異なる励起強度において1nMのTAMRA溶液における一連の実験から、FCS及びFIMDAによって評価した三重項パラメーター。励起波長532nm、継続時間16秒、時間窓2、4、8、16、32、64、128、256、512、及び1024 μ s

ピーク 励起強度 (kW/cm ²)	FCS					
	三重項 寿命 (μ s)	CV(%)	三重項 母集団	CV(%)	三重項 寿命 (μ s)	CV(%)
118	1.98	3.9	0.182	2.7	3.12	7.6
187	1.75	3.7	0.235	1.6	2.59	3.8
					0.183	2.0

10

20

30

【0157】

短い方の時間窓（2 μ s）は三重項寿命と等しいので、FIMDAにおける三重項パラメーターの評価は、間接的であるため、FIMDAの結果は、わずかに片寄っており、FCSと比べて高いCV値を有する。しかし、モデルにおける三重項の補正の主な目的は、三重項パラメーターを測定することではなく、補正の質を向上させ、かつ明度及び拡散パラメーターにおけるゆがみ（bias）の原因を取り除くことである。

40

【0158】

三成分分析の場合のFIMDAに対するヒストグラムもシミュレーションした。2つの成分は同じ明度値（120kHz）を有しており、別の一对は同じ拡散時間（192 μ s）を有していた。多数のフリーのパラメーターにより、実験のシミュレーションの継続時間は60秒に増加したので、補正されたパラメーターの変動には、合理的な限界があった。この実験では、全てのパラメーターが補正された。x-y座標として明度及び拡散時間を

50

取り、強度の寄与を表す縦座標を取った面内の垂直なバーとして、即ち、濃度と明度との積として、図29に結果を示す。異なる成分に対応する個々のバーの位置のばらつきは、グループ間の距離よりもはるかに小さいので、3成分ははっきり区別される。注、FIDAのみでは、同じ明度を有する成分は区別できず、一方FCSのみでは、同じ拡散時間を有する成分は区別されないままである。

【0159】

生物学的システム。新しい方法の実験的利用は、前述で導入されたGrb2(SH2)－ホスホペプチド相互作用の結合定数の測定によってここで示されるであろう。この目的のために、pTyr－Val－Asn－Val－Lys(Cy5)濃度を0.4nMで一定に保って滴定実験を行い、同時にSH2を滴定に付した(0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100、及び130 μ M)。全ての実験は、同一条件下で、即ち、同じバッファー(滅菌濾過された水、50mMのリン酸Naバッファー pH 7.8、50mMのNaCl及び0.05%のプルロニック(Pluronic)；T=20℃)、及び測定当たり30秒のデータ獲得時間で行われ、試料当たり30回繰り返された。それぞれの単一の測定において、同じ一組の10個の異なる時間窓を用いた(40、60、120、200、400、600、800、1200、1600、2000 μ s)。その結果、全体的に補正された10個の異なる光子カウント数ヒストグラムが得られた。

【0160】

最初の段階として、純粋な結合体溶液に適用された単一成分分析から、拡散時間 $\tau_1 = 407 \pm 6 \mu$ s及び分子明度 $q_1 = 31.7 \pm 0.3$ kHzが測定された。余分のSH2(130 μ M)を0.4nMの結合体(conjugate)に添加した結果、SH2に結合した多数の結合体を含む試料が得られた。複合体(complex)は、フリーの結合体と比べて長い拡散時間及び高い分子明度の両方を特徴としていた。方法により補正された τ_1 及び/又は q_1 を含む2成分補正を用いて、この混合物を3つの方法全て(FIDA、FIDA及びFCS)によってその後分析した。分析のこの段階の結果を表9に示す。全ての方法によって類似のパラメーターの値が得られることが示され得る。2つの独立した方法によって、即ち、一連の30回の測定の結果の統計学的分析から、及びシミュレーションから、対応するCV値を再度測定した。成分の明度値の違いが小さい(30%)ことによる困難性を有するFIDAを除き、統計学的エラーの2つの評価は合理的に良好に一致しており、異なる方法に対応するCV値は類似している。その他の成分がこの試料中の大部分を占めているので、混合物の評価された濃度の相対エラーは高い。

【0161】

【表9】

高いレセプター濃度(130 μ M)における評価されたパラメーター及びそれらの変動係数の比較。
 継続時間 30 秒の一連の 30 個の実験は、それぞれ FIMDA、FIDA 及び FCS によって評価した。
 この分析において、3 つの結合体の(FIMDA 及び FIDA における)明度及び (FIMDA 及び FCS における)
 拡散係数をそれぞれ独立に測定し、31.7kHz 及び 407 μ s にそれぞれ補正した。

パラメーター	方法	実験からの平均値	CV (%)	シミュレーションからの CV (%)
C _{結合体} (共焦点体積当たりの分子)	FIMDA	0.132	>20	>20
	FIDA	0.196	>20	>20
	FCS	0.052	>20	>20
C _{複合体} (共焦点体積当たりの分子)	FIMDA	0.618	9.6	8.0
	FIDA	0.555	26.7	14.9
	FCS	0.710	7.9	12.6
q _{複合体} (kHz)	FIMDA	39.5	2.2	2.3
	FIDA	38.4	5.5	3.9
	FCS	36.4	3.7	3.4
$\tau_{\text{複合体}}$ (ms)	FIMDA	0.913	6.9	4.6
	FCS	0.898	5.4	7.2

【0162】

研究の次の段階として、3 μ M の SH2 を含む試料を分析した。複合体とフリーの結合体とのほぼ同じ割合での混合物を得るために、この特定の濃度を選択した。拡散係数の 2 倍の違いのみによって、及び比明度のより小さな違いによっても、成分を区別することはかなり困難であるので、ここでは複合体の拡散時間及び明度を表 9 の値に補正した。補正した分子パラメーターによって、全ての方法によって濃度を高い信頼性をもって区別した。分析のこの段階の結果を表 10 にまとめる。

【0163】

【表 10】

10

20

30

中間的な(intermediate)レセプター濃度($3\mu\text{M}$)における評価されたパラメーターの比較。
フリーの結合体の明度及び拡散時間に加えて、ここでは複合体の明度及び／又は拡散時間も
表9に示す値に補正した。

パラメーター	方法	実験からの平均値	CV (%)	シミュレーション からの CV (%)
C _{結合体} (共焦点体積あたりの分子)	FIMDA	0.328	11.7	4.9
	FIDA	0.311	16.1	4.9
	FCS	0.303	8.4	8.0
C _{複合体} (共焦点体積あたりの分子)	FIMDA	0.437	8.2	3.4
	FIDA	0.455	10.0	3.7
	FCS	0.467	7.8	8.8

10

【0164】

同様の方法で、一連のSH2濃度全部を補正した。図30は、FIMDAの場合に算出された部分結合(fraction bound) (C_{複合体} / (C_{複合体} + C_{結合体}))を
実線で表す。双曲線補正(hyperbolic fit)の結果、SH2-ホスホペプチド相互作用に対する結合定数 $K_D = 1.68 \pm 0.27 \mu\text{M}$ が得られた。FCS及びFIDAによって、比較可能な結合曲線も得られ(データは示さず)、 K_D 値はそれぞれ
 $2.26 \pm 0.28 \mu\text{M}$ 及び $1.70 \pm 0.29 \mu\text{M}$ であった。

20

【0165】

図30のデータは、FIMDAが分子複合体の形成の観察に適した方法であることを示す。
FCS及びFIDA実験により、この特定のSH2-ホスホペプチド相互作用に対して同様の K_D が得られた。文献には、アフィニティーがペプチド配列により著しく変化すると報告されている(ミュラー(Mueller)ら、J. Biol. Chem. 271:16500-16505、1996; グラム(Gram)ら、Eur. J. Biochem. 246:633-637、1997; フレット(Furet)ら、J. Med. Chem. 41:3442-3449、1998)。高アフィニティーは、 $K_D = 10-100 \text{ nM}$ の範囲である。しかし、ホスホペプチドの+4位(pThrを0位とし、“+”はC末端上で、及び“-”はN末端上で続いている)のリシン(及びそれに結合したCy5)により、アフィニティーはマイクロモルの範囲に低下する。この結果は、SH2ドメインへの結合定数を増加させる、C末端上の‘適当な’位置に結合した親油基の重要性と良好に一致する(フレット(Furet)ら、J. Med. Chem. 41:3442-3449、1998)。例えば、(pTyr+3位の)Valは、SH2ドメインにおいて大きな疎水性範囲とファンデルワールス結合(van der Waals contact)を作っている。

30

40

【0166】

この研究の驚くべき結果の一つは、各実験において、FIMDAによって評価された拡散時間の統計学的な精度は、FCSによって評価されたものと同様に良好であり、又は更に良好であることである。これは、反直感的な(counter intuitive)結果である。なぜなら、FCSは拡散依存性相関関数 $G(t)$ の補正に直接向けられるのに対し、FIMDAでは拡散時間は間接的にのみ評価されるためであり、即ち、時間窓の幅における見掛けの明度の依存性によるものであるからである。

【0167】

この点での更なる観察は、拡散時間に対するCV値は明度値に対するものより一般に高いことである。これは、理論上のシミュレーションにも当てはまるので、測定原理に基づく

50

効果をもたらす。この現象は、これらの量を測定する異なる方法によって定量的に説明することができる。簡略化のため、内部の一定の明度プロファイル $B(r)$ によって観察体積を推測することができる。この場合は、その比明度を測定するために、体積に入る分子の平均カウント率を測定することのみを要する。これは、所定時間間隔当たり多くの光子の検出を必要とするが、原則として単一の過程 (passage) から達成することができる。一方、拡散時間を評価するためには、各時間で多数の光子が検出され得るとしても、多数のイベントを平均化することを必然的に要求する、拡散が行われる過程の平均経過時間を決定しなければならない。従って、補正された経過時間の実験において、分子の比明度は、原則としてその拡散時間よりも高い精度をもって測定され得る。

【0168】

従来技術の FCS に対する FIMDA 及び FIDA の利点は、いずれの方法でも、FCS において二乗される (squared) 濃度と明度との積の代わりに、試料中の成分の真の (genuine) 濃度が得られる。上記の例で行われたように、少なくとも 1 つの 2 分子明度値の独立した測定のみが、FCS において 2 つの成分を明確に区別することを可能にする。しかし、FCS の未熟な使用者は、2 つの成分が区別されると、同じ分子明度であると、しばしば黙って (silently) 考える。この仮定は、大きく偏った結果を引き起こし得る。本発明によれば、FIDA 及び FIMDA は、この問題を分析の焦点とする。

【0169】

示した態様の他の利点は、その万能性 (versatility) である。FCS 及び FIDA が生化学的反応において特定の読み出しを検出できないとしても、FIMDA は達成可能であろう。生化学的反応は、2 成分の結合に必ずしも限定されないが、何らかの目的の化学反応であり得る。単一の測定において 2 つの物性を記録するために一つの検出器のみを用いることにより、FIMDA は貴重な分析進行時間を短縮する、極めて効率的な方法となる。

【0170】

図 31-33

更なる実験において、本発明による方法を、ハイブリドーマ細胞表面上に直接位置するモノクローナル抗体の迅速かつ定量的なスクリーニングに適用した。臨床的診断において、かつ治療薬としてのモノクローナル抗体の拡大している市場は、抗原特異的ハイブリドーマの検出及び単離のための、より迅速で、かつより定量的な方法の必要性を生じさせている。現在は、ハイブリドーマ細胞融合 (fusions) の効率的なスクリーニングは、分泌されたモノクローナル抗体の特異性及びアフィニティーが時間及び労働集約的な方法において測定されるという事実によって制限される。

【0171】

共焦点蛍光に基づくアプローチを以下に説明する。ここでは、これらのパラメーターは、培養培地中にまだ放出されていないが生成ハイブリドーマ細胞の表面と未だに物理的に結合している抗体分子の均質な結合分析において測定される。この直接的な細胞結合分析を蛍光強度分布分析 (FIDA) と組合せると、テオフィリンー及び β -アミロイド特異的モノクローナル K 抗体の解離定数 (K_D) は、対応するハイブリドーマ細胞の表面において直接測定することができた。この感度が高い共焦点スクリーニングアプローチは、異種のハイブリドーマ細胞の集合の間で抗原特異的クローンの単離を促進するための強力な技術をもたらす。

【0172】

ハイブリドーマ細胞系を生成する一般的な技術が良好に確立されているが、所定の抗原に対する合理的なアフィニティーを有する単一特異性クローンのスクリーニング及び選択に関する多くの時間と努力がやはり存在する。マウスの免疫法及びスプレノサイト (splenocytes) 及びネズミ (murine) 骨髄腫細胞系の融合に続く、主な制限段階は、殆ど機能しないハイブリドーマ細胞の異種の集団の間の個々のハイブリドーマクローンの検出及び単離である。一般に、目的の抗体を生成する細胞は、単一クローン性 (mo

10

20

30

40

50

noclonality)を確保するために、柔らかい寒天中で、又はマルチウェルプレートにおける限定的な希釈によってクローン化される。ハイブリドーマクローンの培養液の上清は、その後、所望の抗体の存在に関して、酵素関連免疫吸着剤分析(enzyme-linked immunosorbent assays)(ELISAs)によって特徴付けられる。これらの確立された抗体生成方法を用いると、大きな細胞集団の効果的なスクリーニングは、2つの主要な方法に制限される。まず、適用された異種検出分析は、非常に長い多段階工程であり、生成された抗体のアフィニティー(K_D)の正確なデータを与えない。第二に、これらの分析は、かなり感度が低く、かつ単一のハイブリドーマ細胞によって生成することができない培養液上清中で、抗体分子の濃度が相対的に高いことを要する。従って、抗原特異的ハイブリドーマクローンの検出及び単離のためには、融合された細胞系の多くの時間を要する培養が必要であり、スクリーニングは数百個のクローンに制限される。

10

【0173】

代わりの戦略が説明された。ここでは、通常の蛍光活性化細胞選別(fluorescence-activated cell sorter)(FACS)技術が、表面Ig発現(surface Ig expression)に基づくハイブリドーマ細胞の選択的なクローニングのための手段として適用された。免疫グロブリンの量は、蛍光標識化抗原を用いて、ハイブリドーマ表面上で直接測定されるか(マードーP.(Marder P.)ら、サイトメトリー(Cytometry) 11:498-505、1990; メイルホックE.(Meilhoc E.)ら、J. of Immunol. Methods 121:167-174、1989)、又は分泌された抗体が人為的に細胞に拘束された(arrested)(マンツR.(Manz R.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 92:1921-1925、1994; ウエーバーJ. C.(Weaver J. C.)ら、Nature Medicine 3:583-585、1997)。いくつかの研究において、細胞結合Igは、モノクローナル抗体を細胞培養培地内に分泌するハイブリドーマの能力と相関し得た(センS.(Sen S.)ら、Enzyme Microb. Technol. 12:571-576、1990)。主な障害(draw-back)としては、これらのアプローチは、生成されたモノクローナル抗体の結合アフィニティーに関する情報を何ら与えない異種の分析を使用していた。

20

30

【0174】

本発明によれば、均質な免疫アッセイに基づく直接的な戦略が示される。ここでは、ハイブリドーマ細胞表面上に直接位置する蛍光ラベルされた抗原のそれらの相補的モノクローナル抗体との相互作用を観察するために、共焦点蛍光顕微鏡を適用した。大容量の培養培地内に分泌される可溶性抗体分子と比較する場合、表面に拘束された(surface-arrested)抗体画分は、更に短い時間内にハイブリドーマ細胞上ではるかに高い局所的濃度をもたらす。単一の分子及び粒子のように、異なる蛍光種の濃度及び明度の値を同時に測定することができる。ハイブリドーマ細胞表面上に表れた蛍光ラベルされた抗原と抗体との結合において、複合体の明度は結合した抗原数と共に増加する。その後、複合体はフリーの抗原によって正確に区別することができ、かつフリーの、及び結合した分子の濃度を定量的に測定することができる。モデルハイブリドーマ細胞系、小さなハプテン(hapten)であるテオフィリンに向けられた生成モノクローナル抗体に対し、表面に結合した抗体の K_D 値を測定した。並行して行われる蛍光相関分光(FCS)測定によって、蛋白質Gアフィニティークロマトグラフィーによって精製された、対応する抗体の比較可能な K_D 値を測定した。

40

【0175】

材料及び方法. テオフィリン特異的モノクローナル抗体のその同種の抗原テオフィリン(1, 3-ジメチルキサントシン(dimethylxanthine))との結合反応を測定するために、共焦点蛍光顕微鏡(例えば、市販の蛍光相関分光計コンフォコール(Confocor)、ツァイス・アンド・エボテック(Zeiss and EVO TEC、ド

50

イツ)並びに蛍光相関分光法(FCS)及び蛍光強度分布分析(FIDA)検出技術を使用した。

【0176】

ハイブリドーマ細胞系：記載した実験に使用したハイブリドーマ細胞系は、テオフィリンに特異的に結合するモノクローナル抗体を安定的に生成することが示された(ATCC登録番号：HB-8152)。

【0177】

テオフィリン-TAMRA結合体の合成：テオフィリンとテトラメチルローダミン誘導体(TAMRA)の共有結合は、以下のプロトコルを用いることによって固相上で行われた：標準PyBOP活性化(standard PyBOP activation) (26 mgのベンゾトリアゾール-1-yl-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、5.5 µlのN-メチルモルフォリンを含む250 µlのジメチルホルムアミド)を用いて、11.0 mgのN-α-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-γ-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ジアラミノ酪酸(Fmoc-Dab(Boc)-OH)を、10 mgの4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂(導入：0.5 mmol/g)と結合させた。Fmoc基の切断後(250 µlの20%ピペリジン含有ジメチルホルムアミド、20分間)、PyBOP活性化(26 mgのベンゾトリアゾール-1-yl-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、5.5 µlのN-メチルモルフォリンを含む125 µlのジメチルホルムアミド/125 µlのN-メチルピロリドン)を用いることにより、6.7 mgの8-(3-カルボキシプロピル)-テオフィリンを、樹脂結合ジアラミノ酪酸と結合させた。300 µlの50%のトリフルオロ酢酸含有ジクロロメタンによって15分間2回処理した結果、Bocが切断された。0.5 mlの10%のN-エチルジイソプロピルアミン含有ジメチルホルムアミドで10分間洗浄及び中和(neutralisation)した後、13.2 mgの5-カルボキシテトラメチルローダミンスクシンイミジルエステル(5-TAMRA、SE)を含む500 µlのジメチルホルムアミドを添加し、反応を一晩進行させた。反応混合物を濾過し、100 mlのジクロロメタンで5回樹脂を洗浄した。250 µlの10%のトリフルオロメタンスルホン酸を含むトリフルオロ酢酸による2.5時間の処理により、得られたモルフォリン結合体を樹脂から切断した。減圧下の濾過によって樹脂を除去した。未精製の精製物を沈殿させるために、8-10倍量の冷たいtert-ブチルメチルエーテルを加えて濾過した。最後に、蛍光テオフィリン-TAMRA結合体を、逆相HPLCによって精製した。

【0178】

蛍光相関分光法(FCS)－先行技術：FCSは、小さな分子に対する大きな分子の並進拡散の違いを利用し、分子相互作用における分子量の大きな変化を検出し、それによりリガンドの結合画分と非結合画分を識別する。照らされた共焦点の焦点を通して拡散する各分子は、その一連の行程(journey)全体において蛍光量のバースト(bursts)を生じさせ、全体に亘る蛍光シグナルの特徴的な変動を生じさせる。各光子バーストの長さは、分子が共焦点の焦点に留まる時間に対応する。放射された光子は、高感度単一光子検出装置によって、時間を分割する方法(time-resolved manner)で記録される。この検出方法により、単一分子感度が得られるが、拡散が任意の方法であるという事実は、分子の最小の集合に対する拡散イベントが、統計学的に信頼性の高い情報を得るために平均化されることを要する。拡散イベントの検出は、溶液中で異なる蛍光種を、例えばフリーのリガンド結合したリガンドを区別するパラメーターとして働く拡散係数を測定可能にする。

【0179】

蛍光強度分布分析(FIDA)－本発明の一態様：溶液中の粒子の混合物の蛍光明度の分析のための方法であるFIDAは、FCS分析に用いられる、同様の光学的かつ電子的構成(configuration)に基づいているが、分析のための異なるアルゴリズムを利用する。(本発明の一態様を表す)この方法は、光子カウント数のヒストグラムを測

10

20

30

40

50

定し、かつ所定の粒子当たりの平均カウント率として表される比明度の関数として蛍光粒子の濃度を決定する。それは、異種の試料における様々な蛍光種の濃度の測定に適用でき、非常に特殊な適用、例えば薬剤開発及び診断に対する基本的な研究から、様々な分野において有益なツールである。一例として、それにより、フリーの、又は多価レセプター、例えば二価抗体分子に結合する蛍光ラベルされた抗原間を区別することができる。この結合反応は、溶液中の単一の抗体分子に対して、並びにハイブリドーマ細胞の表面上に固定される抗体分子に対して測定することができる。

【0180】

テオフィリン-TAMRAの特異的ハイブリドーマ細胞系HB-8152の細胞表面上に拘束された抗体への結合反応は、FIDAによって測定された。対照として、無関係な(unrelated) β_1-40 アミロイド特異的ハイブリドーマ細胞系PS1-8A1-C6-D6をテオフィリン-TAMRA結合体と共にインキュベートした場合に、細胞関連蛍光シグナルは何ら検出されなかった(図31)。融合した(confluent) ハイブリドーマ培養液の細胞数は1ml当たり 1.6×10^6 個と測定され、各単一実験に対して100 μ l中に約 0.5×10^6 個のハイブリドーマ細胞を有するアリコートが使用された。100 μ lのリン酸緩衝食塩水(PBS)バッファー中で5分間細胞を洗浄し、分析物から可溶性抗体を除去した。続いて、テオフィリン-TAMRA結合体を異なる濃度0、0.4、2、8、16、40、200、800 nMで含む100 μ lのPBS中で30分間、細胞をインキュベートした。各測定に対して、各細胞懸濁液50 μ lをチャンバースライド(Nunc)中でピペティングし、FIDA(波長：励起：543 nm及び放射：572 nm)を用いて、コンフォコール(ConfoCor)中で分析した。4つの別々の測定において、それぞれの単一実験の場合のハイブリドーマ細胞の蛍光ラベル度を測定した。HB-8152抗体の解離定数(K_D)は、 $33.1 \text{ nM} + / - 7.6 \text{ nM}$ と算出された。対照として、ハイブリドーマクローンPS1-8A1-C6-D6の場合は、特異的蛍光シグナルは何ら測定されなかった。

【0181】

競合実験において、ハイブリドーマHB-8152細胞に対するテオフィリン-TAMRA結合の特異性は、非変性(non-modified)テオフィリンの濃度の上昇によって競合的に(competitively)阻害された。ハイブリドーマ細胞系HB-8152に対するテオフィリン-TAMRA結合の阻害は、同じ分析プロトコル及び図31に記載したFIDA分析を用いることによって測定された。唯一の例外は、テオフィリン-TAMRA(80 nM)の濃度を一定にして、非ラベル化テオフィリンコンペティターと異なる濃度：1、10、100、300、600、1000、2000、5000 nMで混合して用いることにより、ハイブリドーマ細胞をラベルしたことである。IC50値は、 $250.1 \text{ nM} + / - 25.5 \text{ nM}$ と算出された。対照として、テオフィリン-TAMRA結合体のアミロイド特異的ハイブリドーマクローンPS1-8A1-C6-D6との結合は何ら測定されなかった(図32)。

【0182】

参考として、ハイブリドーマHB-8152培養培地から精製された分泌された抗体分子を用いる独立したFCS測定において、テオフィリン特異的抗体の測定された解離定数(K_D)を確認した(図33)。従って、分泌されたモノクローナルIgG抗体分子は、蛋白質Gアフィニティークロマトグラフィーを用いてハイブリドーマHB-8152培養培地から精製され、かつ精製された抗体溶液の濃度は分光器を用いて(spectroscopically)測定された。蛍光テオフィリン-TAMRA結合体を含む(1 nM) 100 μ lのPBSバッファー中で、精製された抗体を以下の濃度：0、1、5、10、50、100、200、500 nMに希釈した。混合物を30分間インキュベートすることにより、抗体：テオフィリン-TAMRA複合体が形成された。30 μ lのアリコートをチャンバースライド(Nunc)に移し、FCSを用いてコンフォコール(ConfoCor)中で分析した。可溶性抗体分子に対する解離定数(K_D)は、 $24.6 \text{ nM} + / - 11.5 \text{ nM}$ と算出された。これは、細胞のFIDA測定で得られた結果と比較され

得る。

【0183】

免疫グロブリン、サイトカイン、成長因子、又はホルモンのような分泌された生体分子の定量的測定は、診断又は薬理学のような分野において有益なツールである。一般に、これらの分子の濃度及び薬理活性は、細胞から細胞外培地へ実際に放出された分子について測定される。ここで、細胞結合抗体の画分が、共焦点顕微鏡及びFIDAによって測定される代わりの方法を示す。通常のFACSと比べると、本発明によるこの技術は本質的な利点を有する：

【0184】

第一に、共焦点顕微鏡は、単一分子の検出を可能にすることにより、はるかに高い感度をもたらす。それに対して、FACSは、共焦点的でない(non-confocal)レンズのため、かなり感度が低く、その適用は、染色された細胞の検出に限定される。 10

【0185】

第二に、均質な結合分析を用いることができ、それによりアフィニティーの低いIgG又はIgMを生成する、好ましくないハイブリドーマクローンの親和力によって行われる選択(avidity-driven selection)が妨げられる。また、溶液系分析は、間違った正の(positive)クローンの選択を引き起こす異種の固相分析において観察される非特異的相互作用を減少させる。

【0186】

第三に、飽和濃度下で蛍光抗原によってハイブリドーマ細胞がラベルされる場合、細胞の絶対(absolute)明度により、生成された抗体分子の量が示される。それ故、ハイブリドーマが必ずしも均質な培養液とは限らないので、効率的な抗体生成が維持されていることは、“良好な”生産者(producers)の連続的な選択を表すであろう。 20

【0187】

四番目の、恐らく最も重要であることは、生成された抗体の結合アフィニティーに従って、一価の蛍光抗原がハイブリドーマに結合することである。抗原濃度を増加させた場合の蛍光ラベルされたハイブリドーマの異なる明度から、抗体の K_D 値を算出することができる。前述のIg生成能力と比べ、このパラメーターは、ハイブリッド細胞のクローン集団内でしばしば観察される統計学的な変動による影響を受けない。それ故、単一の細胞から検出されたシグナルは、異なるアフィニティーで抗体を生成するハイブリッドクローンを区別するのに十分な情報を既に与えている。 30

【0188】

示された技術により、ここでは、高アフィニティー抗体を生成する稀少な(rare)細胞がはるかに早い時間の点(time point)において検出され、それにより生成を行わない(non-producing)クローンによる過剰成長(overgrowth)が妨げられるであろう。その結果、この技術は、ハイブリドーマから得られる全体的に利用可能な抗体のレパートリー(repertoire)を増やし、かつ新たに(freshly)融合された細胞系からの単一特異性ハイブリッドクローンの選択的な単離を促進するであろう。更なる重要な治療又は診断の適用は、幹細胞又は癌細胞のような稀少なイベントの単離である。 40

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、テトラメチルローダミン(a)の色素溶液から得られたカウント数ヒストグラム及び異なる補正法に対応する誤差曲線(residual curves)を示す。

【図2】図2は、ラベルされたりガンドの小囊への結合反応をモデル化する場合のカウント数のシュミレーションされたヒストグラムを示す。

【図3】図3は、q値に依存する、単一種の溶液の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。

【図4】図4は、c値に依存する、単一種の溶液の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。 50

【図5】図5は、T値に依存する、単一種の溶液の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。

【図6】図6は、T値に依存する、2種の混合物の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。

【図7】図7は、 q_2 の q_1 に対する比に依存する、2種の混合物の評価されたパラメーターc及びqの理論上のエラーを表す。

【図8】図8は、濃度に依存する、2種の混合物の評価されたパラメーターの理論上のエラーを表す。

【図9】図9は、本発明による方法を行う場合の使用に適合された装置を表す。

【図10】図10Aにおいて、同じ平均カウント数

10

【数96】

$\bar{n}$

を有するが、試料組成が異なる場合に計算された光子カウント数分布、 $P(n)$ をプロットする。図10Bは、ローダミン6G (Rh6G) 及びテトラメチルローダミン (TMR) 、並びにこれら2つの色素の混合物の純粋な溶液の光子カウント数のヒストグラムのグラフである。

【図11】Rh6Gの場合の典型的な誤差を図10Cに示す。図10Dは、図10Bの曲線に適用したITR分析 (線形補正 (linear regularization) 及び濃度を負でない値 (non-negative values) にすることによる反比例関数 (inverse transformation)) の結果を示す。

20

【図12】図11は、ハイブリダイズされた (A-C) 、及び制限酵素で切断された (D, E) ラベルされたオリゴヌクレオチドのITR分析を示す。お互いの間で10%未満の変動を示す、20個体のセットの10秒間の測定から曲線を得る。

【図13】図12は、異なる組み合わせのラベル及び非ラベル化オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション及び制限酵素切断を表す。

【図14】図13は、TAMRA溶液において測定した光子カウント数のジョイントヒストグラムのグラフによる表示 (graphical presentation) である。

【図15】図14は、TAMRA (5'-(6'-カルボキシテトラメチルローダミン) とRRX (ローダミンレッドX) との混合物から得られたカウント数のジョイントヒストグラムの加重された誤差のグラフによる表示である。

30

【図16】図15は、テオフィリン濃度は2nMと等しいが、抗体濃度が異なる場合に測定した蛍光の“平行”及び“垂直”偏光成分の光子カウント数のジョイントヒストグラムを表す。

【図17】図16は、テオフィリン濃度は等しいが抗体濃度が異なる試料からのデータに適用した2D-FIDAの結果を表す。

【図18】図17は、小囊当たりの多数の結合部位による二色2D-FIDAの原理を表す。

【図19】図18は、SMS-14 (ソマトスタチン) のSSTR-2 (ヒト2型高アフィニティーソマトスタチンレセプター (human type-2 high-affinity somatostatin receptor) への結合度が低い (A) 及び高い (B) 条件において測定した“緑”及び“赤”の光子カウント数のジョイントヒストグラムを表す。

40

【図20】図19は、SMS-14のSSTR-2への結合反応の競合曲線 (competition curve) を示す。

【図21】図20は、段階b) においてヒストグラム

【外21】

$\hat{P}(n)$

が決定される光子カウント数 $\{n_i\}$ が、所定のルールに従う最初の時間間隔からの光子カウント数を足し合わせるにより、最初の時間間隔 $\{N_j\}$ における光子カウント数から得られる態様を表す。

【図 2 2】図 2 1 は、光子カウント数 $\{n_i\}$ が、最初の時間間隔が時間遅延によって分離されるというルールに従って所定の最初の時間間隔から得られる更なる態様を表す。

【図 2 3】図 2 2 は、蛍光ラベルされた分子の、本発明を用いて観察されたレセプター担持 (receptor-bearing) 小囊への結合の概略図である。

10

【図 2 4】図 2 3 は、TMR-EGF の A 4 3 1 細胞から調製された膜へのリガンド結合特性を表す。

【図 2 5】図 2 4 は、TMR-EGF の、HCT 細胞から調製された膜への結合を示す。

【図 2 6】図 2 5 は、EGF レセプターの薬理学プロファイルを表す。

【図 2 7】図 2 6 は、ボディピィ (Bodipy) FL-CGP 12177 のリガンド結合特性を表す。

【図 2 8】図 2 7 は、40 μ l 及び 1 μ l の分析体積におけるボディピィ (Bodipy) FL-CGP 12177 結合の阻害を示す。

【図 2 9】図 2 8 は、異なるタイムウィンドウ T で記録された 0.8 nM の Cy 5 溶液のカウント数ヒストグラムを表す。

20

【図 3 0】図 2 9 は、3 成分の混合物のシュミレーションされたデータの補正結果を示す。それら成分のシュミレーションされた明度 (kHz) 及び散乱時間 (μ s) の値は、(30 kHz, 192 μ s); (120 kHz, 192 μ s); (120 kHz, 64 μ s) である。全強度への寄与は、それぞれ 10.8、20.4 及び 14.4 である。グラフは、20 個の独立したシュミレーションの実施からの FIMDA の結果を表す。それぞれのシュミレーションは、60 秒継続する実験に相当する。

【図 3 1】図 3 0 は、pTyr-Val-Asn-Val-Lys (Cy 5) の SH 2 への結合を表す。実線は双曲線補正から得られ、 $K_D = 1.68 \pm 0.27 \mu$ M の結合定数が得られる。

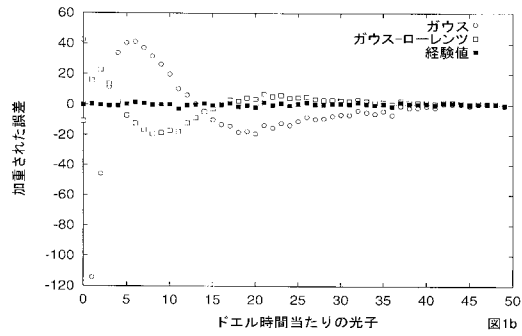
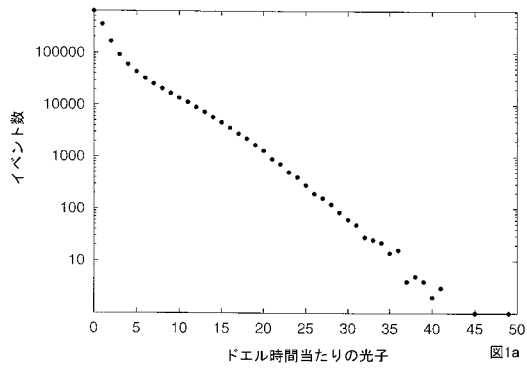
【図 3 2】図 3 1 は、テオフィリンに特異的なハイブリドーマ細胞系 HB-8152 の表面上に暴露された (exposed) モノクローナル抗体の結合定数 (K_D) の測定を表す。

30

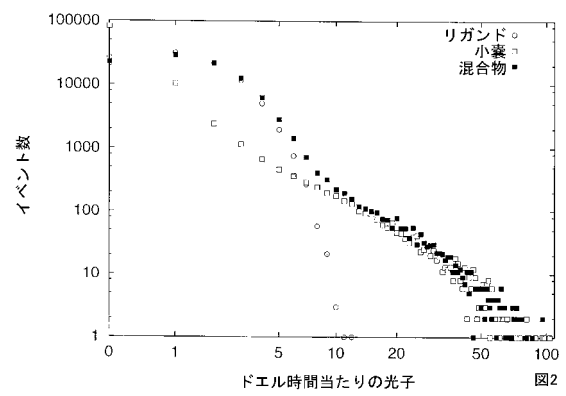
【図 3 3】図 3 2 は、ハイブリドーマ細胞系 HB-8152 の表面上に暴露されたモノクローナル抗体へのテオフィリン-TAMRA の特異的結合の IC_{50} 測定を表す。

【図 3 4】図 3 3 は、テオフィリンに特異的なハイブリドーマ細胞系 HB-8152 の培養培地から精製された可溶性モノクローナル抗体のアフィニティ定数の測定を表す。

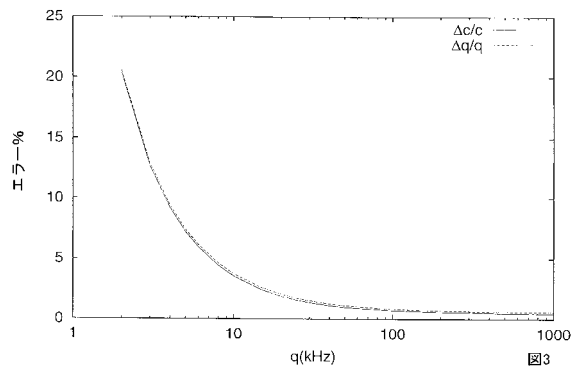
【図 1】



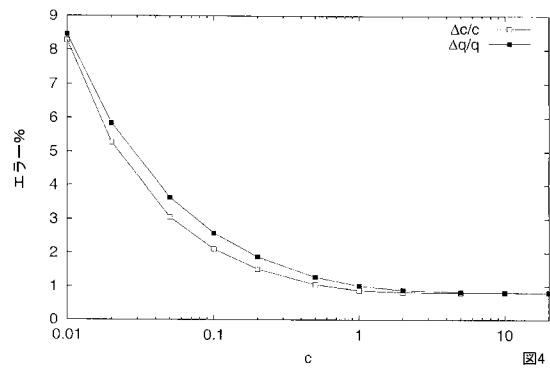
【図 2】



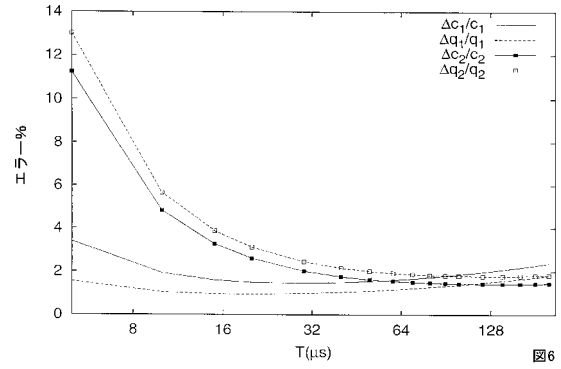
【図 3】



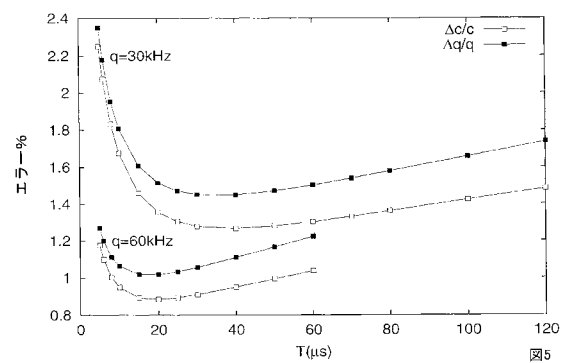
【図 4】



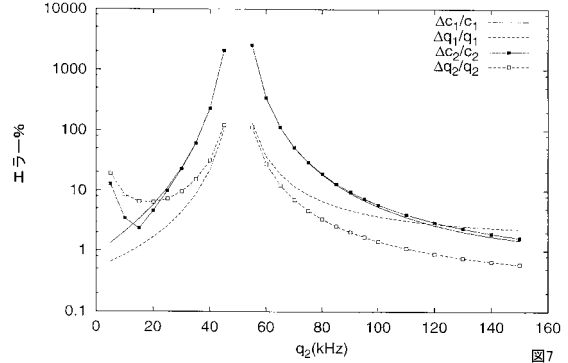
【図 6】



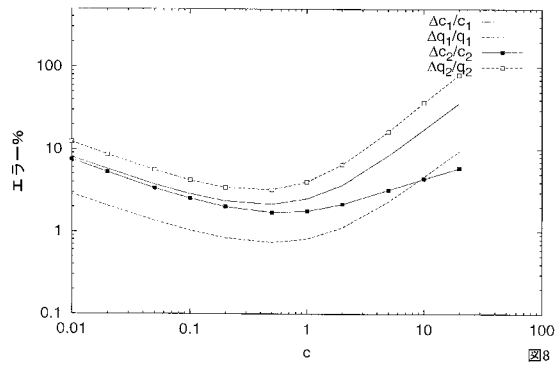
【図 5】



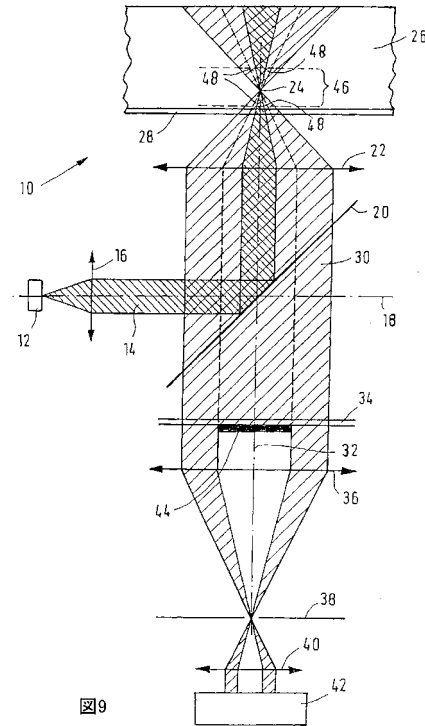
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】

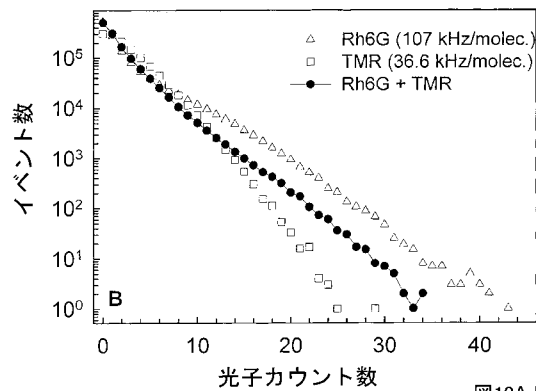
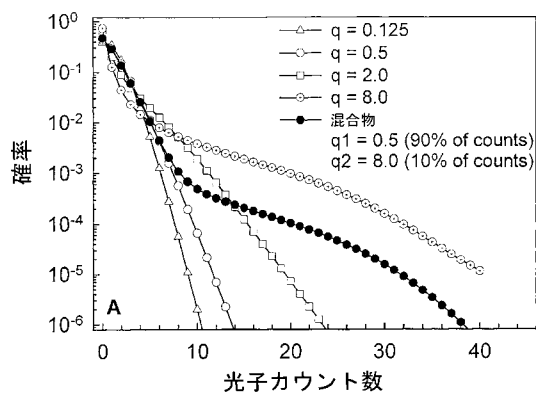


図10A,B

【図 11】

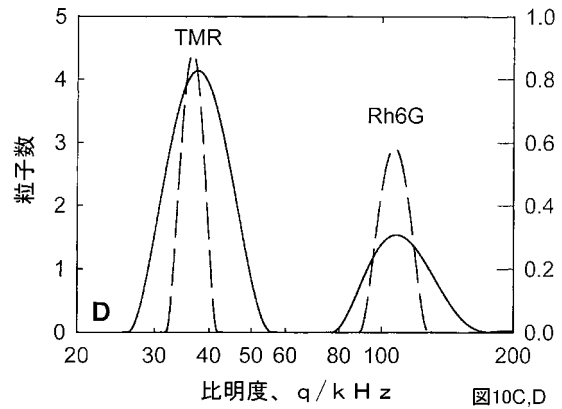
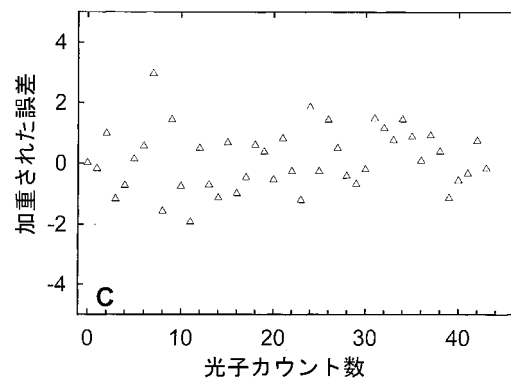


図10C,D

【図 1 2】

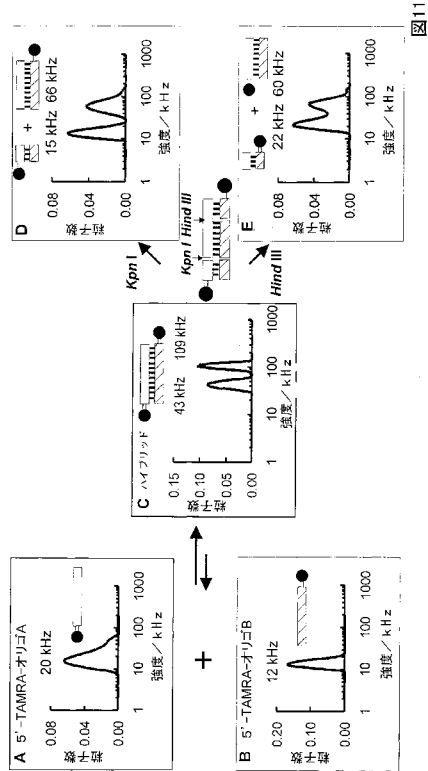


図11

【図 1 3】

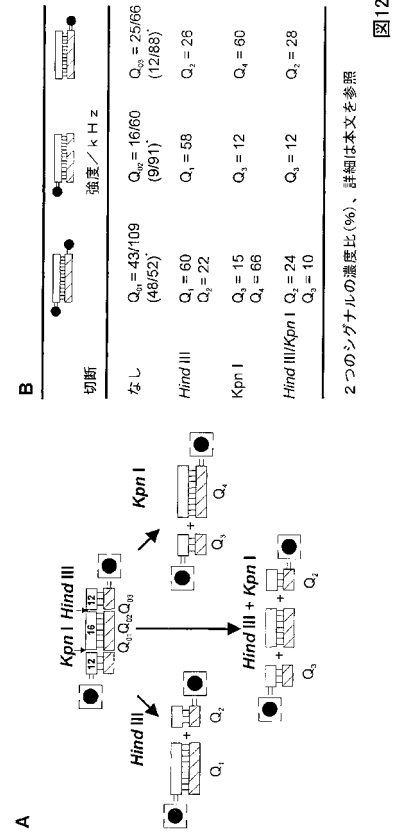


図12

【図 1 4】

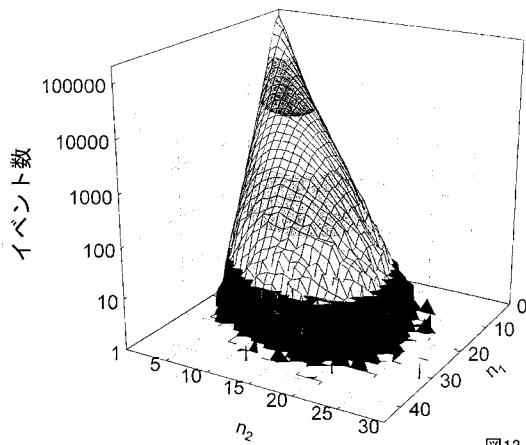


図13

【図 1 5】

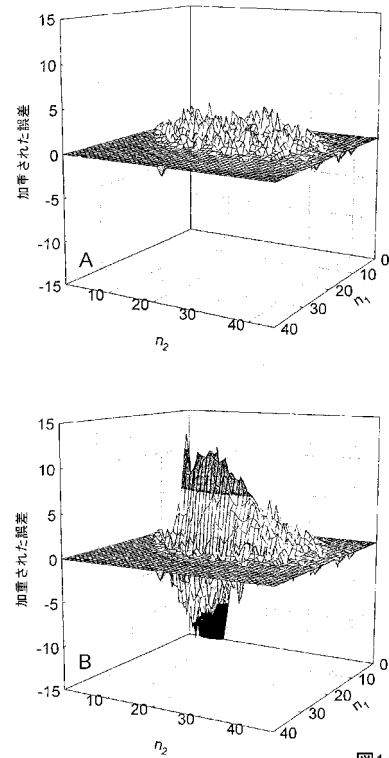


図14

【図 16】

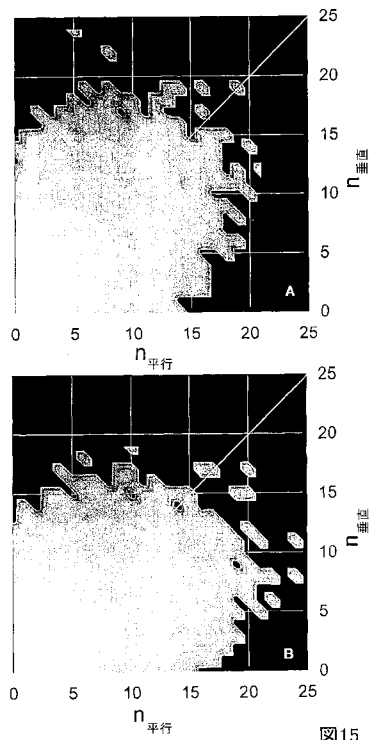


図15

【図 17】

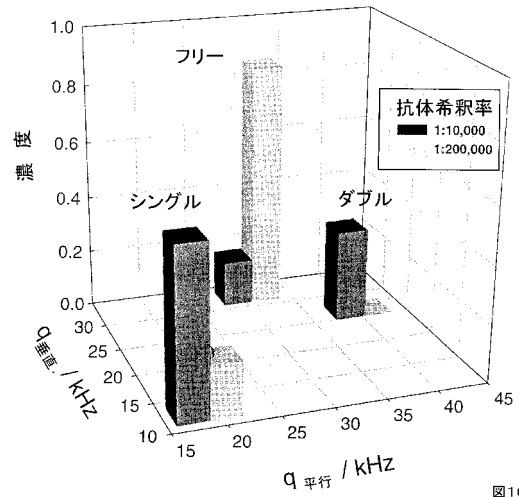


図16

【図 18】

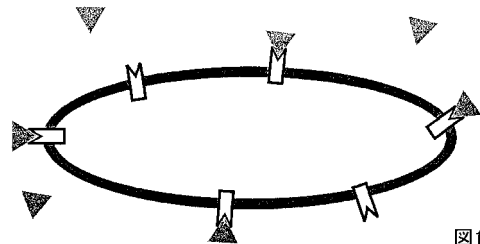


図17

【図 19】

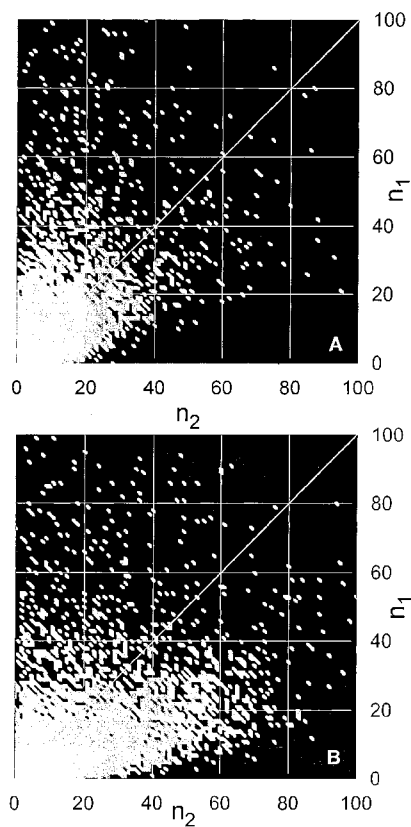


図18

【図 20】

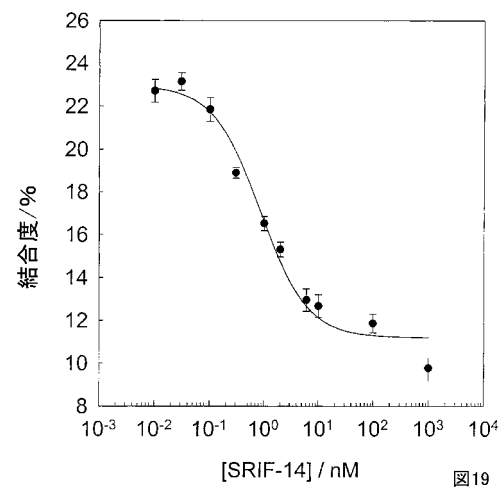
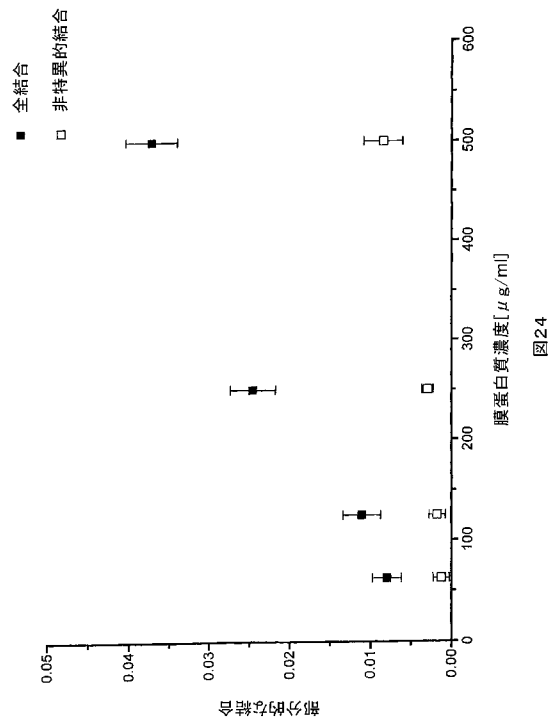
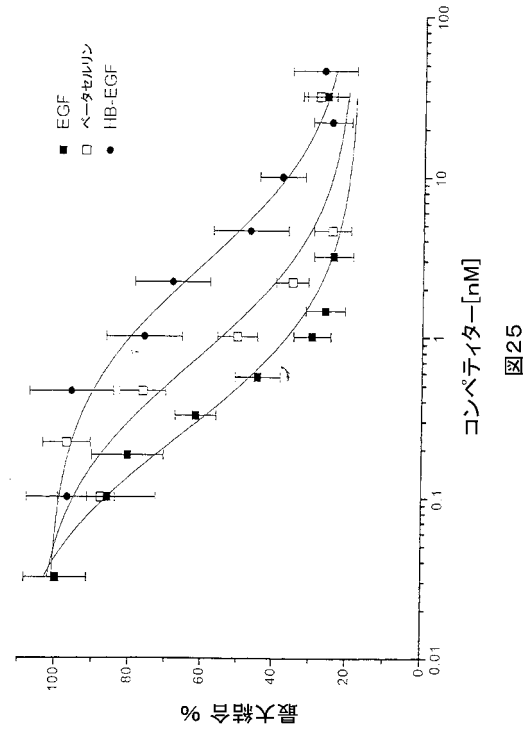


図19

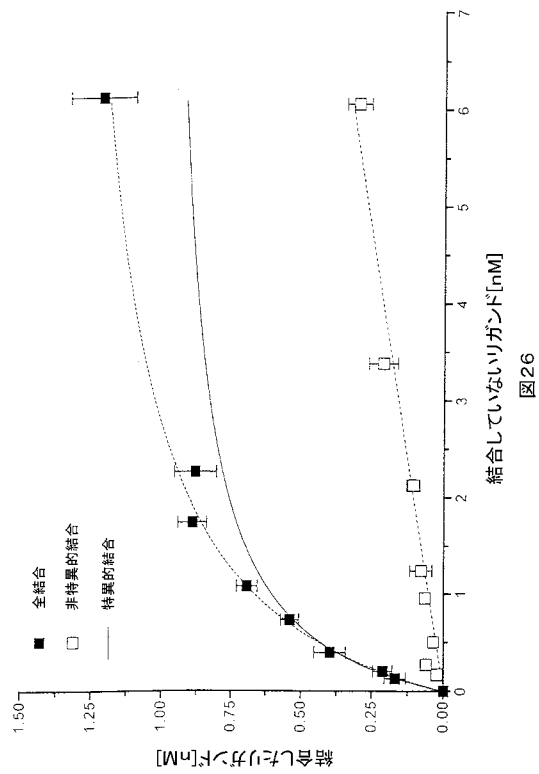
【図 25】



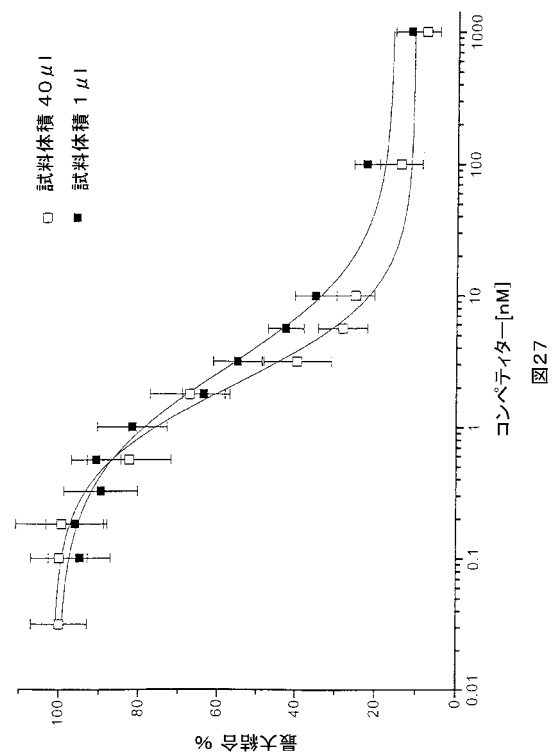
【図 26】



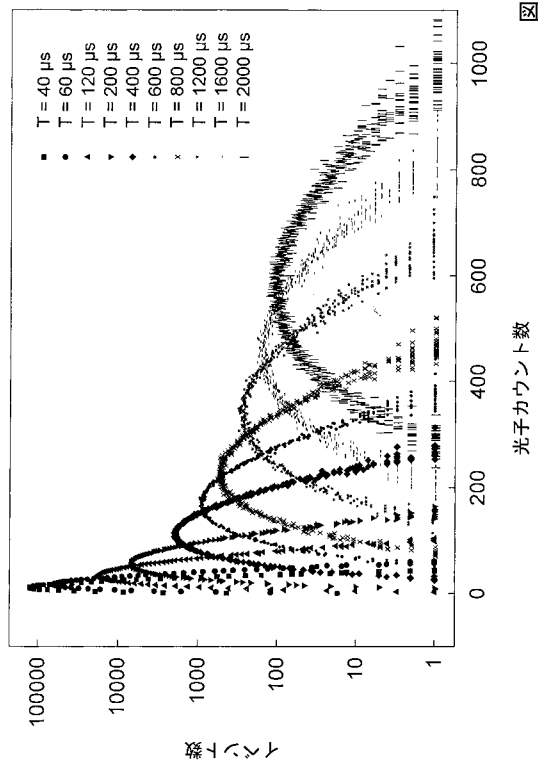
【図 27】



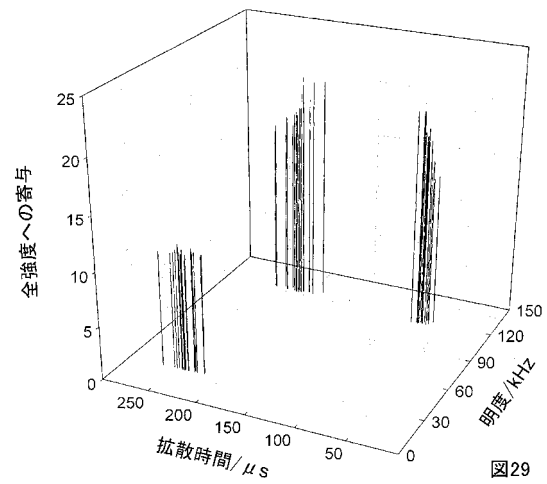
【図 28】



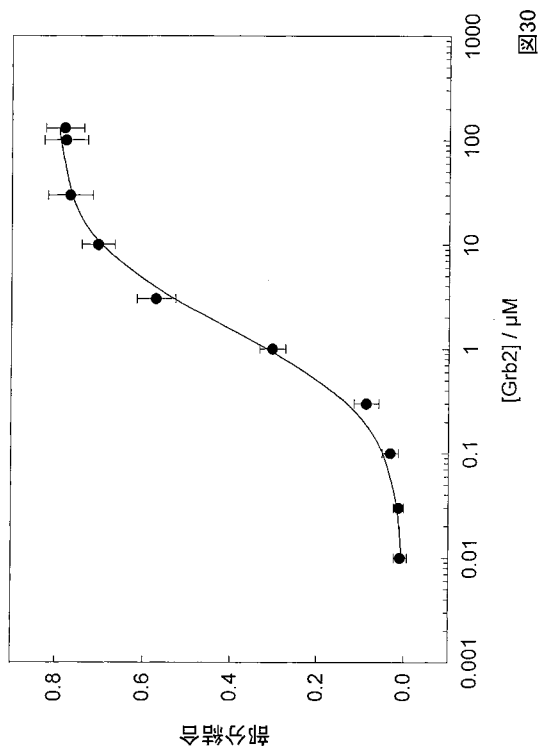
【図 29】



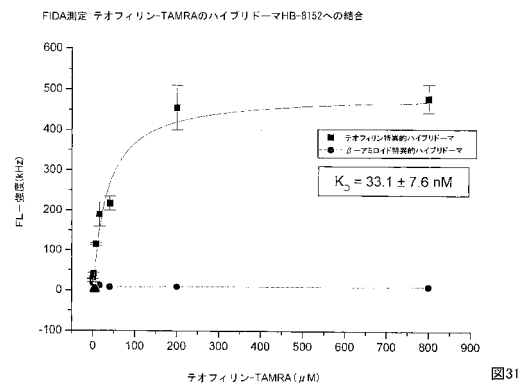
【図 30】



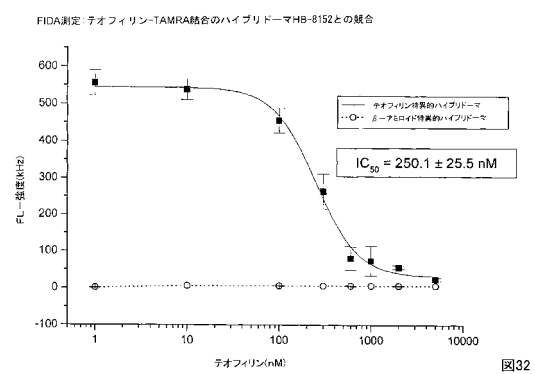
【図 31】



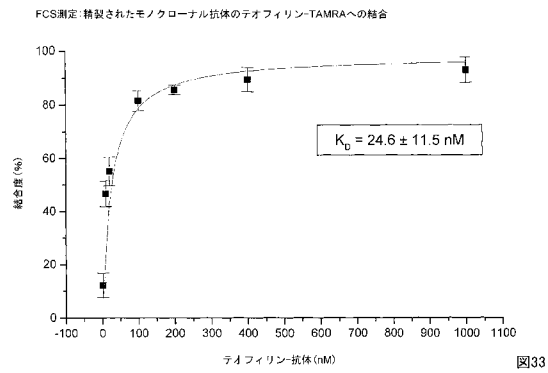
【図 32】



【図 33】



【図 3 4】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 99112104.7
(32)優先日 平成11年6月23日(1999.6.23)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 99125745.2
(32)優先日 平成11年12月23日(1999.12.23)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 60/181,564
(32)優先日 平成12年2月10日(2000.2.10)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 カスク ペテ
エストニア、イーイー 3051 ハルク、ウース 5-3

審査官 横井 亜矢子

- (56)参考文献 特表2002-505742 (JP, A)
特表2001-502062 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 21/62-21/74
JICSTファイル(JOIS)