

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5878690号
(P5878690)

(45) 発行日 平成28年3月8日 (2016.3.8)

(24) 登録日 平成28年2月5日 (2016.2.5)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 21/552 (2014.01) GO 1 N 21/552

請求項の数 5 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2010-541117 (P2010-541117)	(73) 特許権者	590000248
(86) (22) 出願日	平成20年12月18日 (2008.12.18)		コーニンクレッカ フィリップス エヌ ヴェ
(65) 公表番号	特表2011-508887 (P2011-508887A)		KONINKLIJKE PHILIPS N. V.
(43) 公表日	平成23年3月17日 (2011.3.17)		オランダ国 5656 アーエー アイン ドーフエン ハイテック キャンパス 5
(86) 国際出願番号	PCT/IB2008/055406		High Tech Campus 5, NL-5656 AE Eindhoven
(87) 国際公開番号	W02009/083879		
(87) 国際公開日	平成21年7月9日 (2009.7.9)	(74) 代理人	100087789
審査請求日	平成23年12月14日 (2011.12.14)		弁理士 津軽 進
審査番号	不服2014-8976 (P2014-8976/J1)	(74) 代理人	100122769
審査請求日	平成26年5月14日 (2014.5.14)		弁理士 笛田 秀仙
(31) 優先権主張番号	08100068.9		
(32) 優先日	平成20年1月3日 (2008.1.3)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサにおけるエバネセント場変調

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の波長の光を発する第 1 の光源と、前記第 1 の波長とは異なる第 2 の波長の光を発する第 2 の光源と、サンプルが隣接して配置されるセンサ面であって、前記センサ面が前記第 1 及び第 2 の光源により照射され、全反射の条件を満たし、前記センサ面上で減衰長を持つエバネセント場を生成する、前記センサ面と、前記センサ面において反射された光を検出する検出器と、前記第 1 の光源及び第 2 の光源を逆位相でオン及びオフに切り換えることにより前記エバネセント場の減衰長を変調する手段と、前記検出器により検出された信号を復調する手段と、前記復調された信号から前記第 1 の波長の光の反射と前記第 2 の波長の光の反射との間の差分信号を生成する手段とを有する F T I R システム。

10

【請求項 2】

前記第 1 及び第 2 の光源の一方に対する検出器電圧が、他方の光源に対する制御信号として使用される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記センサ面と前記第 1 及び第 2 の光源の光ビームとの間の角度を変化させる手段を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

F T I R バイオセンサ信号を検出する方法において、前記方法が、
a) 第 1 の波長の光を発する第 1 の光源及び前記第 1 の波長とは異なる第 2 の波長の光を発する第 2 の光源により、サンプルが隣接して配置されるセンサ面を照射するステップで

20

あって、全反射の条件が満たされ、減衰長を持つエバネセント場が前記センサ面上に生成される、前記照射するステップと、

b) 前記センサ面において反射された光を検出するステップと、

c) 前記ステップ a) 及び b) を実行している間に前記第 1 の波長の光及び前記第 2 の波長の光を逆位相で切り替えることにより前記エバネセント場の減衰長を変調するステップと、

d) 前記検出された信号を復調するステップと、

e) 前記復調された信号から前記第 1 の波長の光の反射と前記第 2 の波長の光の反射との間の差分信号を生成するステップと、

を有する、方法。

10

【請求項 5】

前記照射の入射角を変化させるステップを有する、請求項 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、漏れ全反射 (FTIR、frustrated total internal reflection) バイオセンサシステム及び FTIR バイオセンサ信号を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願人は、バイオセンサ又はバイオセンサシステムに関する幾つかの同時継続出願を出願している。バイオセンサは、通常、検体又は流体サンプル内の所定の特異的分子の検出を可能にし、前記分子の量は、典型的には、小さい。したがって、検出されるべき分子が検体又は流体サンプル内に存在する場合に、特異的結合部位又はスポットにのみ結合する標的粒子、例えば超常磁性ラベルビーズが使用される。代替的には、阻害アッセイ (inhibition assay) において、これらの分子は、センサ面に対するこれらの粒子又はビーズの結合を阻害することができる。前記結合スポット又は結合面に結合されたこれらのラベル粒子を検出する 1 つの既知の技術は、FTIR である。ここで、光は、全反射が生じることができる角度で前記サンプル又はサンプル体積内に結合される。前記サンプル表面の近くに粒子が存在しない場合、前記光は完全に反射される。しかしながら、前記ラベル粒子が前記面に結合される場合、全反射の条件が破られ、前記光の一部は、前記サンプル内に散乱され、したがって、前記表面により反射された光の量は減少される。光検出器を用いて前記反射された光の強度を測定することにより、前記面に結合された粒子又はビーズの量を推定することが可能である。

20

30

【0003】

しかしながら、FTIR の 1 つの欠点は、FTIR システムが、開始信号、すなわち、粒子が前記センサ面の近くに存在しない場合の信号が高くなるように動作することである。前記面に対するビーズの結合は、この場合、最初は高い光信号を減少させる。したがって、関心のある信号 x 、すなわち、前記面に近いビーズの量は、 $(1 - x)$ のように、すなわち、最初は高い又は大きい信号の (小さな) 変化として測定される。信号 x の変化が、全体の測定された光信号、すなわち、 $(1 - x)$ と比べてかなり小さい場合、これは、前記開始信号が関心のある信号に対して大きいので、いわゆる "ゲイン問題" を引き起こし得る。したがって、信号 x を増幅するのは、背景信号 $(1 - x)$ も同様に増幅され、これが、例えば、増幅器、ADC 等の非線形性又は飽和さえ引き起こし得るので、難しい。更に、これは、ゲイン変化及びノイズ、例えば電子ノイズの影響を非常に受けやすい信号を生じる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、FTIR バイオセンサシステムにおいて背景を制限又は少なくとも減少し、このようなバイオセンサの表面に結合されたビーズの量を直接的に測定することができ

50

ることが望ましい。したがって、本発明の目的は、上述の問題を克服する改良された F T I R バイオセンサシステムを提供することである。更に、本発明の目的は、F T I R バイオセンサ測定又はアッセイを実行する改良された方法を提供することである。これらの目的は、請求項のフィーチャを用いて達成される。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、F T I R により生成されたエバネセント場の減衰長を変調し、これに応じて反射信号を復調するというアイデアに基づく。したがって、一度粒子がセンサ面の近くに存在しないと消える"直接的な"信号が生成される。

【0006】

したがって、本発明は、第1の波長の光を発する第1の光源と、隣接するセンサ面を持つサンプル体積と、前記センサ面において反射された光を検出する検出器とを有する F T I R システムを提供する。前記センサ面は、前記第1の光源により照射され、全反射の条件を満たし、前記サンプル体積内で減衰長を持つエバネセント場を生成する。前記システムは、更に、前記エバネセント場の減衰長を変更する手段と、前記検出された信号を前記エバネセント場の減衰量の変化と相関させる手段とを有する。

【0007】

前記エバネセント場の減衰長を変更する幾つかの方法が考えられる。例えば、前記センサ面が照射される入射角度は、前記エバネセント場の減衰長を変更するために変化されることができる。しかしながら、前記エバネセント場の減衰長を変更する手段が、前記第1の光源の前記第1の波長を変化させるように構成されることが好ましい。

【0008】

本発明の好適な実施例によると、前記 F T I R システムは、前記第1の波長とは異なる第2の波長の光を発する第2の光源を更に有し、前記第1及び第2の光源で前記センサ面を照射することを可能にする光学素子を更に有する。例えば、2つの光源のビーム、例えば青色及び赤色レーザは、二色性鏡を使用して重複させられることができる。これは、赤色光及び青色光を平行に前記サンプル体積内に結合することを可能にする。

【0009】

前記システムが、前記第1及び第2の光源を逆位相でオン及びオフに切り換える手段を更に有することが好ましい。赤色及び青色レーザの場合、この手段は、好ましくは、数百 M H z の高周波数で両方のレーザを変調し、更に、約 10 ないし 100 k H z の中程度の周波数で前記波長を変調するように構成される。前記センサ面を照射する光は、前記面において反射され、前記検出器により検出されるので、これらの強度及び波長変調は、検出される。前記検出された信号は、この場合、復調する手段により復調される。前記波長変調の変調周波数が、十分に高い周波数に選択された場合、低周波数に存在する 1 / f ノイズは、除去されることができる。有利には、このシステムは、更に、前記第1及び第2の光源の強度を互いに対して制御する手段を有する。

【0010】

本発明は、F T I R バイオセンサ信号を検出する方法にも関する。前記方法は、第1の波長の光でサンプル体積に隣接したセンサ面を照射するステップを有し、ここで全反射の条件が満たされ、減衰長を持つエバネセント場が、前記サンプル体積内で生成される。前記方法は、更に、前記センサ面において反射された光を検出するステップと、照射及び検出中に前記エバネセント場の減衰長を変更するステップとを有する。

【0011】

ここで、前記エバネセント場の前記減衰長は、照射光ビームの入射角度を変化させるか、又は前記第1の波長を変化させるかのいずれかにより変更されることができる。

【0012】

オプションとして、前記方法は、更に、第2の波長の光で前記センサ面を照射するステップを有する。この場合、前記センサ面が、前記第1及び第2の波長の光により交互に照射されることが好ましい。前記方法は、前記検出された信号を復調するステップをも有し

10

20

30

40

50

うる。

【 0 0 1 3 】

本発明のこれら及び他の態様は、以下に記載される実施例を参照して説明され、明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】従来技術の F T I R システムの検出器信号を概略的に示す。

【図 2 a】波長に対するエバネセント場の減衰長の依存性を概略的に示す。

【図 2 b】波長に対するエバネセント場の減衰長の依存性を概略的に示す。

【図 3】本発明による F T I R システムの好適な実施例を概略的に描く。

【図 4】本発明によってどのように光源が制御されるかをブロック図で示す。

【図 5】本発明による 2 つの光源の変調スキームを示す。

【図 6 a】本発明によってどのように 2 つの光源を制御するかの他のブロック図を示す。

【図 6 b】本発明による F T I R システムの検出器信号を概略的に示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

図 1 は、従来技術の F T I R システムの典型的な信号を持つ図を示す。黒い曲線は、前記 F T I R システムのセンサ面において反射される光の強度を表す。強度及び時間の単位は任意である。測定の開始、すなわち $t = 0$ において、測定される強度は、約 0 . 3 5 の値で開始し、これは、前記測定の背景を表す。これは、ビーズ又は粒子が前記センサ面の近くに存在しない場合に前記センサ面において反射される光の量である。幾らかの時間の後、すなわち $t = 0 . 4 5$ において、前記粒子は、前記センサ面に向かって沈殿し、又は力を受け、例えば磁氣的に引き付けられ、結果的に、前記反射される光の強度は減少される。前記信号は、前記曲線が飽和又は安定化する約 0 . 2 7 の平坦域まで減少する。この場合の前記信号の振動は、この特定のタイプのアッセイにおいて使用される磁気ビーズ作動プロトコルによる。

【 0 0 1 6 】

関心の信号 x は、この平坦域と 0 . 3 5 の背景との間の差（矢印により示される）である。したがって、関心のある実際の情報は、信号の約 2 1 % の相対的变化になる。現実のアッセイにおいて、測定される信号変化は、0 . 1 % のように小さいことが可能である。これは、一般に、粗悪な信号対雑音比を生じるかもしれない、特に、いわゆるゲイン問題を引き起こし得る。例えば、かなり小さい信号 x を増幅するのは、背景信号がこの場合に同様に増幅され、結果として増幅器の飽和を生じうるので、難しい。本発明は、したがって、この背景を減少又は除去することを目的とする。

【 0 0 1 7 】

本発明は、前記エバネセント場の減衰長が、前記センサ面に垂直な方向において指数関数的に減衰するという事実を用いる。したがって、実際に、粒子を検出する感度が高い前記センサ面上の非常に小さな層のみが存在する。本発明は、特に、前記エバネセント場の減衰長を実際に変更する又は変化させる、特に変調するというアイデアに基づく。前記エバネセント場の減衰長は、以下のように計算されることができる。

$$z_{\text{decay}} = \frac{1}{k} \ln \left(\frac{2}{(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)} \right)$$

【 0 0 1 8 】

ここで、 λ は前記光の波長であり、 θ は前記センサ面の法線に対する入射光の角度であり、 n_1 及び n_2 はそれぞれ前記基板及び前記サンプル流体の屈折率である。この式によると、前記入射光の波長の変調は、プロービング光場 (probing optical field) のエバネセント減衰長の変調を引き起こす。これは、結果として標準的な復調技術を使用して検出されることができる変調された信号を生じる。

【 0 0 1 9 】

図 2 は、前記エバネセント場の減衰長に対する前記波長の影響を概略的に描く。図 2 a において、センサ面 1 は、赤色光で照射され、大きな減衰長を持つエバネセント場 2 を生

10

20

30

40

50

成する。沈殿又は結合された粒子 3 は、この場合にエバネセント場 2 内に完全に沈められる。青色光（すなわち、より小さな波長）が図 2 b のように赤色光の代わりに使用される場合、エバネセント場 2 の減衰長は、大幅に小さく、粒子 3 は、前記エバネセント場を部分的にしか経験しない。したがって、赤色光と青色光との間の切り替えは、前記センサ面において反射される異なる信号をもたらす。

【 0 0 2 0 】

図 3 は、本発明の好適な実施例による F T I R バイオセンサシステムの概略図を示す。青色レーザ 4 及び赤色レーザ 5 は、青色光ビーム 1 1 及び赤色光ビーム 1 2 をそれぞれ生成する。赤色光 1 2 は、鏡 6 において反射され、二色性鏡 7 内に結合される。二色性鏡 7 は、ビーム 1 1 及び 1 2 の重複を作成するのに使用される。第 2 の二色性鏡 8 は、前記光ビームの中心ビームから外れた部分を結合するのに使用される。前記光は、カラーフィルタ 9 a 及び 9 b を通って、それぞれ青色光及び赤色光に対する検出器 1 0 a 及び 1 0 b にガイドされる。前記中心ビームは、前記サンプル体積の前記センサ面を照射するのに使用される。

【 0 0 2 1 】

本発明によると、2つのレーザ源 4 及び 5 は、高い周波数 f において逆位相でオン及びオフに切り換えられる。両方のレーザビーム 1 1 及び 1 2 の強度は、ビーズ又は粒子が前記センサ面に存在しない場合に、前記センサ面において反射された光を検出する検出器が、両方のレーザに対して同一の応答を示すように制御されるべきである。これは、例えば、図 4 に示されるように、マスタ - スレーブフィードバック制御回路により達成されることができる。設定値電圧 V_s は、赤色レーザ 5 を駆動する赤色レーザ電流源に供給される（図 3 を参照）。前記赤色光は、検出器電圧 V_{red} を出力する赤色検出器 1 0 b により検出される。前記検出器電圧 V_{red} は、修正されなければならない、例えば補正パラメータ、すなわち検出波長感度 $S_{det}()$ により乗算されなければならない。このパラメータは、両方の波長に対する前記検出器の感度を考慮して適切に設定される。前記制御信号は、青色レーザ 4 を駆動する青色レーザ電流源に供給される。前記青色光の強度は、前記青色レーザ電流源にフィードバックされる検出器電圧 V_{blue} を出力する青色検出器 1 0 a において検出される。図 4 に見られるように、青色システムは、赤色マスタのスレーブである。赤色信号 V_{red} は、第 1 のマスタ制御ループに対する入力として使用されることができ、前記赤色レーザの光出力を一定値に保とうと試みる。同時に、青色レーザ V_{blue} に対する実際の測定される検出器電圧は、第 2 のスレーブ制御ループに入力され、前記青色レーザの強度を前記赤色レーザの強度に等しくする。この目的で、波長の関数としての検出器感度 S_{det} は、既知であるべきである。一般に、この感度は、周知であるか、又は測定されることができる。

【 0 0 2 2 】

図 5 は、光学式記憶技術から容易に入手可能である赤色レーザ及び青色レーザを使用する変調スキームを示す。両方のレーザを数百 MHz の範囲の高い周波数 f_{laser} で変調することにより、レーザ出力は、安定化され、光学的フィードバックに対して無反応にされる。更に、入射ビームの波長は、赤色レーザと青色レーザとの間で切り換えることにより変調される（図示されない）。波長変調周波数 f として、約 10 ないし 100 kHz の範囲の周波数が選択される。前記センサ面の近くに配置されたビーズ又は粒子から生じる信号は、この場合、変調周波数 f において直接的に復調するか、又は側波帯周波数 $f_{laser} \pm f$ において復調するかのいずれかにより検出されることができる。

【 0 0 2 3 】

f が十分に高い周波数に選択される場合、低周波数に存在する $1/f$ ノイズは除去される。更に、両方のレーザパワーが上述の制御ループを使用して適切に較正される場合、この検出器信号において f 又は $f_{laser} \pm f$ の周波数成分は存在しない。したがって、ビーズ又は粒子が存在しない場合に、信号が測定されない。ここで、両方の周波数 f_{laser} 及び f が、制御ループフィルタ帯域幅 f_{LF} を優に上回ると仮定する。制御ループフィルタの帯域幅は、低周波数信号変化、例えば温度変化によるドリフトが、測定手順中に

10

20

30

40

50

除去されることができるよう選択される。

【0024】

粒子が前記センサ面に結合されるとすぐに、周波数 f を持つ信号が生成される。前記信号の強度は、前記粒子の量に線形に依存する。前記信号は、一般に、波長に線形に依存しない。しかしながら、使用される波長は、固定及び周知であり、これは、測定中に一定である機器校正係数を生じる。

【0025】

上記の実施例において、前記信号は、復調により取り出される。

【0026】

本発明の他の好適な実施例によると、実DCフリー (real DC-free) 測定が、以下のよう
10
に得られることができる。両方のレーザは、既に上述したように周波数 f で逆位相でパルス送信される。前記2つのレーザの出力パワーを安定化する制御ループは、前記センサ面において反射された光を検出するメイン検出器により制御されることもできる。この目的で、前記メイン検出器は、レーザ変調スキームと同調してサンプリングされるべきである。例えば、偶数パルスは、赤色光の反射を測定することができるのに対し、奇数パルスは、青色光の反射を測定することができる。代替的には、2つのカラーフィルタと組み合わせることで2つの別個の検出器を使用することができる。

【0027】

前記センサ面に存在する粒子又はビーズに関する情報を含む信号は、ここで、赤色光の反射と青色光の反射との間の差分信号として規定される。実際の測定の開始の前に全ての
20
オフセットを取り除くために、前記青色レーザの出力を管理する第2の制御ループは、この差分信号を制御信号として使用する。したがって、前記青色レーザの強度は、全てのオフセットが自動的にゼロまで減少されるように制御される。前記サンプル流体が前記サンプル体積内に導入され、実際の測定が開始するとすぐに、前記第2の制御ループは、中断され、最新のサンプリングされた制御信号が、保留され、前記青色レーザ電流源に対する静的制御として使用される。粒子がエバネセント波に浸透し始めるとすぐに、前記赤色レーザは、前記青色レーザと比較して強い散乱を示すので、赤色反射と青色反射との間の差分信号は、ゼロから外れる。この場合、実ゼロ信号ベースラインが測定されることができ
る。

【0028】

図6は、この実施例に対するそれぞれの制御ループを示す。図6bは、この実施例に対する典型的な検出器出力を描く。測定の開始時において、前記信号が最小化されるまで較正
30
ステップが上記のように行われる。一度このゼロ信号ベースラインが確立されると、粒子は、前記センサ面に向かって力を受けることができ、実又は直接信号の増大をもたらす。

【0029】

他の実施例によると、前記エバネセント場の減衰長の変調は、前記センサ面の法線に対する照射光ビームの入射角度を変調することにより達成される。一般に、前記センサ面の法線に対するより大きな入射角は、より小さなエバネセント減衰長を生じる。したがって、前記入射角度を変化させ、前記センサ面において反射される信号を復調することは、前
40
記センサ面の近くの粒子の量にのみ依存する"直接"信号をもたらす。

【0030】

もちろん、使用される入射角度が常に全反射の条件を満たすことを確認しなければならない。

【0031】

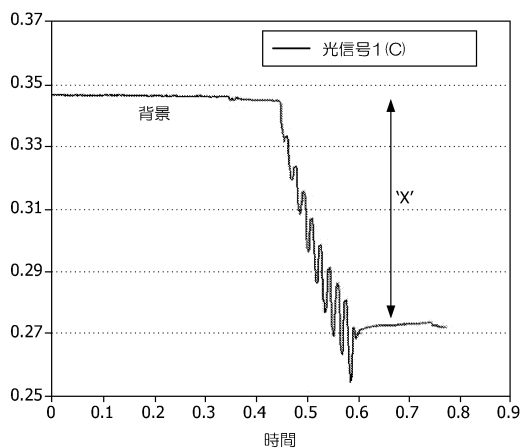
前記入射角度の変化は、例えば、反射光が常に前記検出器の上で集束されることを確認するために前記光源及び前記検出器を完全な逆位相で移動することにより達成されることが
50
できる。

【0032】

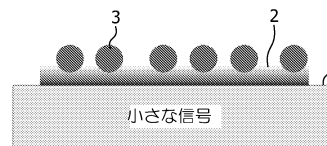
本発明は、図面及び先行する記載において詳細に図示及び説明されているが、このよう
50

な図示及び説明は、例示的又は典型的であると思なされるべきであり、限定的であると思なされるべきでなく、本発明は、開示された実施例に限定されない。開示された実施例に対する他の変形例は、図面、開示及び添付の請求項の検討から、請求された発明を実施する当業者により理解及び達成されることができ。請求項において、単語"有する"は、他の要素又はステップを除外せず、不定冠詞"1つの"("a"又は"an")は複数形を除外しない。単一のプロセッサ又は他のユニットが、請求項に列挙された複数のアイテムの機能を満たしてもよい。特定の方策が相互に異なる従属請求項に記載されているという単なる事実は、これらの方策の組み合わせが有利に使用されることができないことを示さない。請求項内の参照符号は、範囲を限定すると解釈されるべきでない。

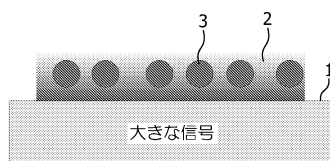
【図 1】



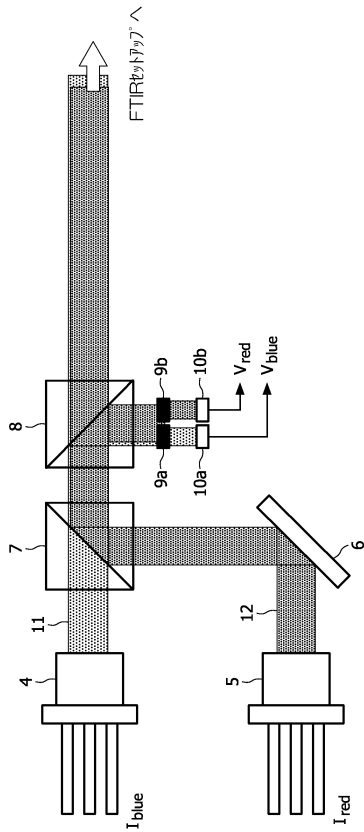
【図 2 b】



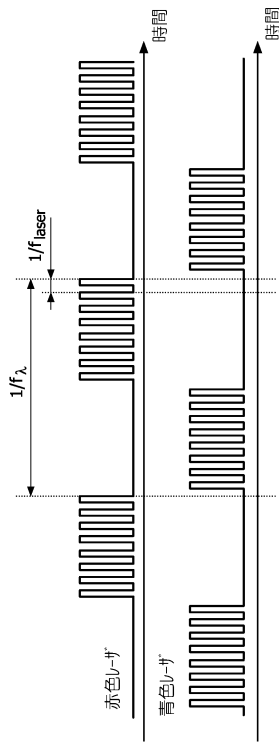
【図 2 a】



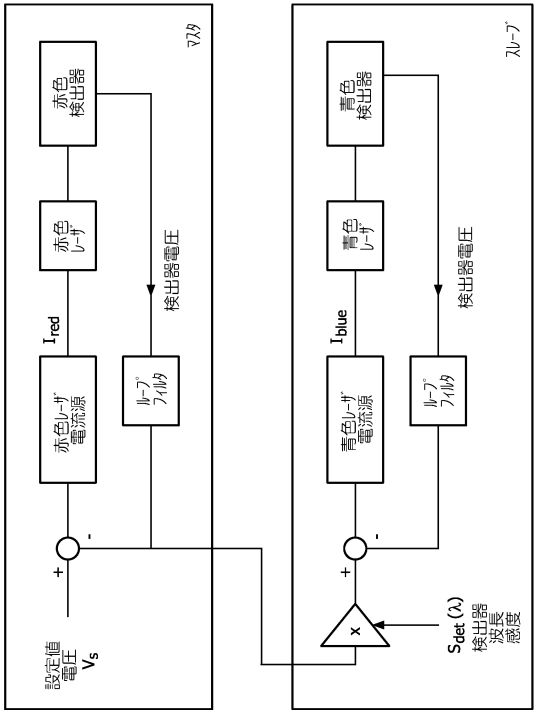
【図 3】



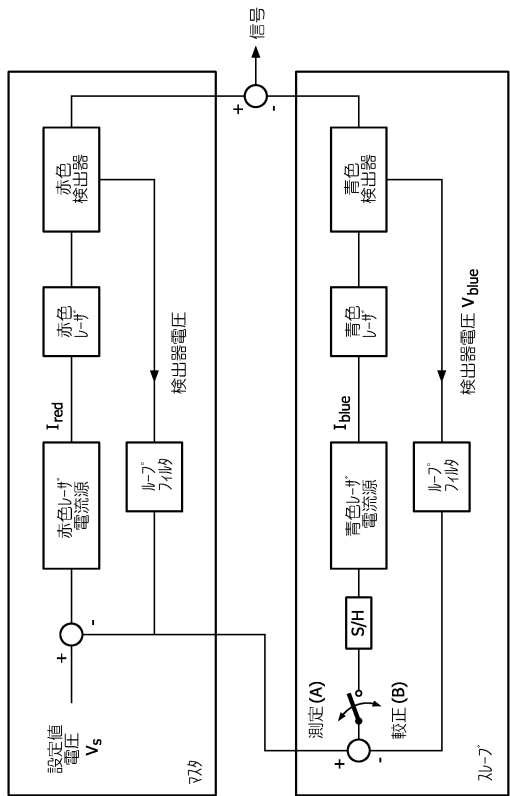
【図 5】



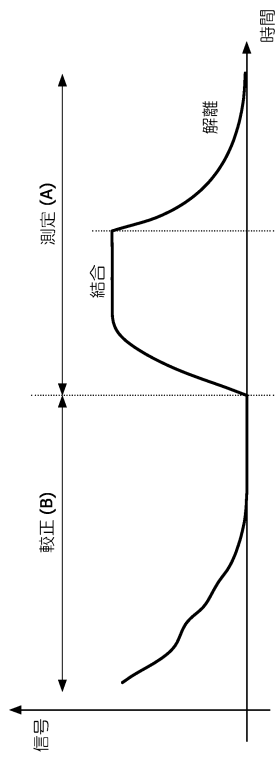
【図 4】



【図 6 a】



【図 6 b】



フロントページの続き

- (72)発明者 スヒレイペン ヨハンネス ジェイ エイチ ビー
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 4 4
- (72)発明者 ブルルス ドミニク エム
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 4 4
- (72)発明者 カールマン ヨセフス エイ エイチ エム
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 4 4

合議体

審判長 三崎 仁

審判官 高 橋 祐介

審判官 松本 隆彦

- (56)参考文献 米国特許第5 9 5 3 1 1 5 (U S , A)
特表2 0 0 4 - 5 3 5 8 1 1 (J P , A)
特開平0 8 - 2 0 1 2 7 8 (J P , A)
特表2 0 0 2 - 5 2 7 1 3 6 (J P , A)
特許第3 2 7 0 4 6 8 (J P , B 2)
特開2 0 0 1 - 2 6 4 2 3 5 (J P , A)
米国特許第6 1 5 9 7 4 8 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 21/00 - 21/61 , G01N 15/00 - 15/14 , G01N 33/48 - 33/98