

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-36765

(P2013-36765A)

(43) 公開日 平成25年2月21日(2013.2.21)

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01) GO 1 N 21/64 E 2 GO 4 3
 GO 1 N 21/64 B

審査請求 未請求 請求項の数 30 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2011-170738 (P2011-170738)
 (22) 出願日 平成23年8月4日(2011.8.4)

(71) 出願人 000000376
 オリンパス株式会社
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
 (74) 代理人 100071216
 弁理士 明石 昌毅
 (74) 代理人 100130395
 弁理士 明石 憲一郎
 (72) 発明者 田邊 哲也
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス株式会社内
 Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 BA17 CA04 CA06
 EA01 EA02 EA06 EA14 FA02
 FA03 GA01 GB19 HA01 HA02
 HA05 HA07 HA09 JA02 KA09
 LA01 NA01

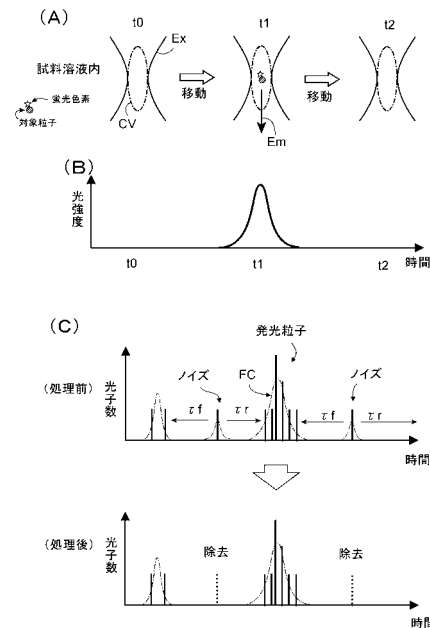
(54) 【発明の名称】 単一発光粒子検出を用いた光分析装置、光分析方法及び光分析用コンピュータプログラム

(57) 【要約】

【課題】 共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡による光計測を用いた走査分子計数法に於いて、発光粒子の信号とノイズの信号との判別に於ける誤判別ができるだけ抑えられるようにする新規な信号処理構成を提供すること。

【解決手段】 本発明による試料溶液中の発光粒子の光を検出する光分析技術は、試料溶液内に於いて顕微鏡の光検出領域の位置を移動させながら検出された光検出領域からの光の時系列光強度データを生成し、そのデータに於いて、所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去してから、発光粒子の信号を個別に検出することを特徴とする。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出する光分析装置であって、

前記試料溶液内に於ける前記光学系の光検出領域の位置を移動する光検出領域移動部と

、前記光検出領域からの光を検出する光検出部と、

前記試料溶液内に於いて前記光検出領域の位置を移動させながら前記光検出部にて検出された前記光検出領域からの光の時系列の光強度データを生成し、前記時系列の光強度データに於いて前記発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する信号処理部とを含み、

前記信号処理部が、前記時系列の光強度データに於いて所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の前記所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去して得られる修正時系列光強度データに於いて前記発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出することを特徴とする装置。

【請求項 2】

請求項 1 の装置であって、前記信号処理部が、前記個別に検出された発光粒子からの光を表す信号の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記発光粒子の数を計数することを特徴とする装置。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 の装置であって、前記光検出領域移動部が前記発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて前記光検出領域の位置を移動することを特徴とする装置。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかの装置であって、前記光検出領域移動部が前記光学系の光路を変更することにより前記試料溶液内に於いて前記光学系の光検出領域の位置を移動することを特徴とする装置。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれかの装置であって、前記光検出部が所定のピンタイム毎に到来する光子数を計数するフォトンカウンティングにより前記光検出領域からの光を検出し、前記時系列の光強度データが時系列のフォトンカウントデータであり、前記修正時系列光強度データが時系列のフォトンカウントデータに於いて所定の光子数以下のデータ点にして前後の前記所定の光子数以上のデータ点までの時間間隔が前記所定時間間隔を超えているデータ点の光子数を無視して得られる修正時系列フォトンカウントデータであることを特徴とする装置。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれかの装置であって、前記信号処理部が、所定の閾値より大きい強度を有する光を表す信号が検出されたときに 1 つの発光粒子が前記光検出領域に入ったことを検出することを特徴とする装置。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 のいずれかの装置であって、前記信号処理部が前記修正時系列光強度データを平滑化し、前記平滑化された修正時系列光強度データに於いて前記所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号を単一の前記発光粒子からの光を表す信号として検出することを特徴とする装置。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれかの装置であって、前記信号処理部が前記検出された発光粒子の数に基づいて、前記試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定することを特徴とする装置。

【請求項 9】

請求項 1 の装置であって、前記所定時間間隔が 0 . 1 μ 秒 ~ 5 m 秒の間であることを特徴とする装置。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

請求項 9 の装置であって、前記所定時間間隔が $0.1 \mu\text{秒} \sim 200 \mu\text{秒}$ の間であることを特徴とする装置。

【請求項 11】

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出する光分析方法であって、

前記試料溶液内に於ける前記光学系の光検出領域の位置を移動する過程と、

前記試料溶液内に於ける前記光検出領域の位置を移動させながら前記光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する過程と、

前記時系列の光強度データに於いて所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去して修正時系列光強度データを生成する過程と、

前記修正時系列光強度データに於ける個々の発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する過程と

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 11 の方法であって、更に、前記個別に検出された発光粒子からの光を表す信号の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記発光粒子の数を計数する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 11 又は 12 の方法であって、前記光検出領域の位置を移動する過程に於いて、前記光検出領域の位置が前記発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 11 乃至 13 のいずれかの方法であって、前記光検出領域の位置を移動する過程に於いて、前記光学系の光路を変更することにより前記試料溶液内に於いて前記光学系の光検出領域の位置を移動することを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 11 乃至 14 のいずれかの方法であって、前記光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する前記過程に於いて、所定のピントタイム毎に到来する光子数を計数するフォトンカウンティングにより前記光検出領域からの光が検出され、前記時系列の光強度データが時系列のフォトンカウントデータであり、前記修正時系列光強度データが時系列のフォトンカウントデータに於いて所定の光子数以下のデータ点にして前後の前記所定の光子数以上のデータ点までの時間間隔が前記所定時間間隔を超えているデータ点の光子数を無視して得られる修正時系列フォトンカウントデータであることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 11 乃至 15 のいずれかの方法であって、前記個々の発光粒子からの光を表す信号を個別に検出する過程に於いて、所定の閾値より大きい強度を有する光を表す信号が検出されたときに 1 つの発光粒子が前記光検出領域に入ったことを検出することを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 11 乃至 16 のいずれかの方法であって、前記個々の発光粒子からの光を表す信号を個別に検出する過程に於いて、前記修正時系列光強度データが平滑化され、前記平滑化された修正時系列光強度データに於いて前記所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号が単一の前記発光粒子からの光を表す信号として検出されることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 11 乃至 17 のいずれかの方法であって、更に、前記検出された発光粒子の数に基づいて、前記試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定する過程を含むことを特徴

10

20

30

40

50

とする方法。

【請求項 19】

請求項 11 の方法であって、前記所定時間間隔が $0.1 \mu\text{秒} \sim 5 \text{m秒}$ の間であることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 11 の方法であって、前記所定時間間隔が $0.1 \mu\text{秒} \sim 200 \mu\text{秒}$ の間であることを特徴とする方法。

【請求項 21】

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散シランダムに運動する発光粒子からの光を検出するための光分析用コンピュータプログラムであって、

前記試料溶液内に於ける前記光学系の光検出領域の位置を移動する手順と、
前記試料溶液内に於ける前記光検出領域の位置の移動中に前記光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する手順と、

前記時系列の光強度データに於いて所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去して修正時系列光強度データを生成する手順と、

前記修正時系列光強度データに於ける個々の発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する手順と

をコンピュータに実行させることを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 22】

請求項 21 のコンピュータプログラムであって、更に、前記個別に検出された発光粒子からの光を表す信号の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記発光粒子の数を計数する手順をコンピュータに実行させることを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 23】

請求項 21 又は 22 のコンピュータプログラムであって、前記光検出領域の位置を移動する手順に於いて、前記光検出領域の位置が前記発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されることを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 24】

請求項 21 乃至 23 いずれかのコンピュータプログラムであって、前記光検出領域の位置を移動する手順に於いて、前記光学系の光路を変更することにより前記試料溶液内に於いて前記光学系の光検出領域の位置を移動することを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 25】

請求項 21 乃至 24 のいずれかのコンピュータプログラムであって、前記光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する前記手順に於いて、所定のビンタイム毎に到来する光子数を計数するフォトンカウンティングにより前記光検出領域からの光が検出され、前記時系列の光強度データが時系列のフォトンカウントデータであり、前記修正時系列光強度データが時系列のフォトンカウントデータに於いて所定の光子数以下のデータ点にして前後の前記所定の光子数以上のデータ点までの時間間隔が前記所定時間間隔を超えているデータ点の光子数を無視して得られる修正時系列フォトンカウントデータであることを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 26】

請求項 21 乃至 25 のいずれかのコンピュータプログラムであって、前記個々の発光粒子からの光を表す信号を個別に検出する前記手順に於いて、所定の閾値より大きい強度を有する光を表す信号が検出されたときに 1 つの発光粒子が前記光検出領域に入ったことを検出することを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 27】

請求項 21 乃至 26 のいずれかのコンピュータプログラムであって、前記個々の発光粒子からの光を表す信号を個別に検出する前記手順に於いて、前記修正時系列光強度データ

10

20

30

40

50

が平滑化され、前記平滑化された修正時系列光強度データに於いて前記所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号が単一の前記発光粒子からの光を表す信号として検出されることを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 28】

請求項 21 乃至 27 のいずれかのコンピュータプログラムであって、更に、前記検出された発光粒子の数に基づいて、前記試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定する手順をコンピュータに実行させることを特徴とするコンピュータプログラム。

【請求項 29】

請求項 21 のコンピュータプログラムであって、前記所定時間間隔が $0.1 \mu\text{秒} \sim 5 \text{秒}$ の間であることを特徴とするコンピュータプログラム。

10

【請求項 30】

請求項 21 のコンピュータプログラムであって、前記所定時間間隔が $0.1 \mu\text{秒} \sim 200 \mu\text{秒}$ の間であることを特徴とするコンピュータプログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系などの溶液中の微小領域からの光が検出可能な光学系を用いて、溶液中に分散又は溶解した原子、分子又はこれらの凝集体（以下、これらを「粒子」と称する。）、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖鎖、アミノ酸若しくはこれらの凝集体などの生体分子、ウイルス、細胞などの粒子状の対象物、或いは、非生物学的な粒子からの光を検出して、それらの状態（相互作用、結合・解離状態など）の分析又は解析に於いて有用な情報を取得することが可能な光分析技術に係り、より詳細には、上記の如き光学系を用いて単一の発光する粒子からの光を個別に検出して種々の光分析を可能にする光分析装置、光分析方法並びに光分析用コンピュータプログラムに係る。なお、本明細書に於いて、光を発する粒子（以下、「発光粒子」と称する。）は、それ自身が光を発する粒子、又は、任意の発光標識若しくは発光プローブが付加された粒子のいずれであってもよく、発光粒子から発せられる光は、蛍光、りん光、化学発光、生物発光、散乱光等であってよい。

20

【背景技術】

【0002】

近年の光計測技術の発展により、共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング（1光子検出）も可能な超高感度の光検出技術とを用いて、一光子又は蛍光一分子レベルの微弱光の検出・測定が可能となっている。そこで、そのような微弱光の計測技術を用いて、生体分子等の特性、分子間相互作用又は結合・解離反応の検出を行う装置又は方法が種々提案されている。例えば、蛍光相関分光分析（Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS。例えば、特許文献 1 - 3、非特許文献 1 - 3 参照）に於いては、レーザー共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術を用いて、試料溶液中の微小領域（顕微鏡のレーザー光が集光された焦点領域 - コンフォーカル・ボリュームと称される。）内に入り出す蛍光分子又は蛍光標識された分子（蛍光分子等）からの蛍光強度の測定が為され、その測定された蛍光強度の自己相関関数の値から決定される微小領域内に於ける蛍光分子等の平均の滞留時間（並進拡散時間）及び滞留する分子の数の平均値に基づいて、蛍光分子等の運動の速さ又は大きさ、濃度といった情報の取得、或いは、分子の構造又は大きさの変化や分子の結合・解離反応又は分散・凝集といった種々の現象の検出が為される。また、蛍光強度分布分析（Fluorescence-Intensity Distribution Analysis: FIDA。例えば、特許文献 4、非特許文献 4）やフォトンカウンティングヒストグラム（Photon Counting Histogram: PCH。例えば、特許文献 5）では、FCSと同様に計測されるコンフォーカル・ボリューム内に入り出す蛍光分子等の蛍光強度のヒストグラムが生成され、そのヒストグラムの分布に対して統計的なモデル式をフィッティングすることにより、蛍光分子等の固有の明るさの平均値とコンフォーカル・ボリューム内に滞留する分子の数の平均値が算定され、これらの情報に基づいて、分子の構造又は大きさの変化、

30

40

50

結合・解離状態、分散・凝集状態などが推定されることとなる。またその他に、特許文献 6、7 に於いては、共焦点顕微鏡の光学系を用いて計測される試料溶液の蛍光信号の時間経過に基づいて蛍光性物質を検出する方法が提案されている。特許文献 8 は、フローサイトメータに於いて流通させられた蛍光微粒子又は基板上に固定された蛍光微粒子からの微弱光をフォトンカウンティング技術を用いて計測してフロー中又は基板上の蛍光微粒子の存在を検出するための信号演算処理技術を提案している。

【0003】

特に、FCS、FIDA等の共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術とを用いた微小領域の蛍光測定技術を用いた方法によれば、測定に必要な試料は、従前に比して極めて低濃度且微量でよく（一回の測定で使用される量は、たかだか数十 μ L程度）、測定時間も大幅に短縮される（一回の測定で秒オーダーの時間の計測が数回繰り返される。）。従って、これらの技術は、特に、医学・生物学の研究開発の分野でしばしば使用される希少な或いは高価な試料についての分析を行う場合や、病気の臨床診断や生理活性物質のスクリーニングなど、検体数が多い場合に、従前の生化学的方法に比して、低廉に、或いは、迅速に実験又は検査が実行できる強力なツールとなることが期待されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2005-098876

【特許文献2】特開2008-292371

【特許文献3】特開2009-281831

【特許文献4】特許第4023523号

【特許文献5】国際公開2008-080417

【特許文献6】特開2007-20565

【特許文献7】特開2008-116440

【特許文献8】特開平4-337446号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】金城政孝、蛋白質 核酸 酵素 Vol.44、No.9、1431-1438頁 1999年

【非特許文献2】エフ・ジェイ・メイヤー・アルムス（F.J.Meyer-Alms）、フルオレセンス・コリレーション・スペクトロスコピー（Fluorescence Correlation Spectroscopy）、アール・リグラー編（R.Rigler）、スプリングー（Springer）、ベルリン、2000年、204-224頁

【非特許文献3】加藤則子外4名、遺伝子医学、Vol.6、No.2、271-277頁

【非特許文献4】カスク他3名、米国科学アカデミー紀要 1999年、96巻、13756-13761頁（P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, K. Gall PNAS 96, 13756-13761 (1999)）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記のFCS、FIDA等の共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術を用いた光分析技術では、計測される光は、蛍光一分子又は数分子から発せられた光であるが、その光の解析に於いて、時系列に測定された蛍光強度データの自己相関関数の演算又はヒストグラムに対するフィッティングといった蛍光強度のゆらぎの算出等の統計的処理が実行され、個々の蛍光分子等からの光の信号を個別に参照又は分析するわけではない。即ち、これらの光分析技術に於いては、複数の蛍光分子等からの光の信号が統計的に処理され、蛍光分子等について統計平均的な特性が検出されることとなる。従って、これらの光分析技術に於いて統計的に有意な結果を得るためには、試料溶液中の観測対象となる蛍光分子等の濃度又は数密度は、平衡状態に於いて、一回の秒オーダーの長さの計測時間のう

10

20

30

40

50

ちに統計的処理が可能な数の蛍光分子等が微小領域内を入出するレベル、好適には、微小領域内に常に一個程度の蛍光分子等が存在しているレベルである必要がある。実際、コンフォーカル・ボリュームの体積は、1 f L程度となるので、上記の光分析技術に於いて使用される試料溶液中の蛍光分子等の濃度は、典型的には、1 n M程度若しくはそれ以上であり、1 n Mを大幅に下回るときには、蛍光分子等がコンフォーカル・ボリューム内に存在しない時間が生じて統計的に有意な分析結果が得られないこととなる。一方、特許文献6～8に記載の蛍光分子等の検出方法では、蛍光強度のゆらぎの統計的演算処理が含まれておらず、試料溶液中の蛍光分子等が1 n M未満であっても蛍光分子等の検出が可能であるが、溶液中でランダムに運動している蛍光分子等の濃度又は数密度を定量的に算出するといったことは達成されていない。

10

【0007】

そこで、本願出願人は、特願2010-044714及びPCT/JP2011/53481に於いて、観測対象となる発光粒子の濃度又は数密度が、FCS、FIDA等の統計的処理を含む光分析技術で取り扱われるレベルよりも低い試料溶液中の発光粒子の状態又は特性を定量的に観測することを可能にする新規な原理に基づく光分析技術を提案した。かかる新規な光分析技術に於いては、端的に述べれば、FCS、FIDA等と同様に共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系などの溶液中の微小領域からの光が検出可能な光学系を用いるところ、試料溶液内に於いて光の検出領域である微小領域（以下、「光検出領域」と称する。）の位置を移動させながら、即ち、光検出領域により試料溶液内を走査しながら、光検出領域が試料溶液中に分散してランダムに運動する発光粒子を包含したときに、その発光粒子から発せられる光を検出し、これにより、試料溶液中の発光粒子の一つ一つを個別に検出して、発光粒子のカウンティングや試料溶液中の発光粒子の濃度又は数密度に関する情報の取得を可能にする。この新規な光分析技術（以下、「走査分子計数法」と称する。）によれば、測定に必要な試料がFCS、FIDA等の光分析技術と同様に微量（例えば、数十 μ L程度）であってもよく、また、測定時間が短く、しかも、FCS、FIDA等の光分析技術の場合に比して、より低い濃度又は数密度の発光粒子の存在を検出し、その濃度、数密度又はその他の特性を定量的に検出することが可能となる。

20

【0008】

上記の走査分子計数法では、より具体的には、試料溶液内に於ける光検出領域の位置の移動と共に、逐次的に計測された光強度値（若しくはフォトンカウント値）が時系列の光強度データとして記録され、そのデータ上に於いて、発光粒子から発せられる光を表す光強度値の増大（発光粒子の光を表す信号）が検出される。その際、実際の時系列光強度データ上には、迷光や散乱光などの背景光や光検出器の熱ノイズ等の発光粒子の光以外に起因する強度値の増大（ノイズ）が含まれるので、かかる時系列光強度データから発光粒子の光を表す信号の検出の処理に於いては、例えば、時系列光強度データに於いて強度値の増大の存在する領域が検出され、その領域の時間幅及び強度値の大きさ（プロファイル）が発光粒子の光を表す信号に於いて想定される範囲にあるとき、その領域の強度値の増大が発光粒子の光を表す信号であると判別され、強度値のプロファイルが発光粒子の光を表す信号に於いて想定されるものではないときには、ノイズの信号として判別される。

30

【0009】

上記の如く、発光粒子の信号とノイズの信号とを光強度値のプロファイルにより判別する場合、誤判別、即ち、ノイズの信号を発光粒子の信号として判別すること（或いは発光粒子の信号をノイズの信号として判別すること）は、回避されるべきである。従って、本発明の主な目的は、上記の走査分子計数法に於いて、発光粒子の信号とノイズの信号との判別に於ける誤判別ができるだけ抑えられるようにする新規な信号処理構成を提供することである。

40

【0010】

この点に関し、本発明の発明者は、時系列光強度データ上に於いて、ノイズの信号の多くは、発光粒子の信号に比較して、一つの信号幅が短く、また、出現する間隔が長い傾向にあることが見出された。特に、光測定をフォトンカウンティングにより実行する際には

50

、発光粒子の信号の場合には、光子の（光検出器に）到来する時間間隔が短く且つ連続しているのに対して、ノイズの信号の多くは、光子の到来する時間間隔が長く、連続することが殆どない傾向にあることが観察された。本発明に於いては、かかる知見を利用して、時系列光強度データ上からノイズを除去し、しかる後に、発光粒子の信号の検出の処理を実行して、発光粒子の信号の検出精度の向上、或いは、S/N比の改善が図られる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の一つの態様によれば、上記の課題は、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出する光分析装置であって、試料溶液内に於ける顕微鏡の光学系の光検出領域の位置を移動する光検出領域移動部と、光検出領域からの光を検出する光検出部と、試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動させながら光検出部にて検出された光検出領域からの光の時系列の光強度データを生成し、時系列の光強度データに於いて発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する信号処理部とを含み、信号処理部が、時系列の光強度データに於いて所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去して得られる修正時系列光強度データに於いて発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出することを特徴とする装置によって達成される。

10

【0012】

かかる構成に於いて、「試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子」とは、試料溶液中に分散又は溶解した原子、分子又はそれらの凝集体などの、光を発する粒子であって、基板などに固定されず、溶液中を自由にブラウン運動している粒子であれば任意の粒子であってよい。かかる発光粒子は、典型的には、蛍光性粒子であるが、りん光、化学発光、生物発光、光散乱等により光を発する粒子であってもよい。共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系の「光検出領域」とは、それらの顕微鏡に於いて光が検出される微小領域であり、対物レンズから照明光が与えられる場合には、その照明光が集光された領域に相当する（共焦点顕微鏡に於いては、特に対物レンズとピンホールとの位置関係により確定される。発光粒子が照明光なしで発光する場合、例えば、化学発光又は生物発光により発光する粒子の場合には、顕微鏡に於いて照明光は要しない。）。なお、本明細書に於いて、「発光粒子の信号」という場合には、特に断らない限り、発光粒子からの光を表す信号を指すものとする。

20

30

【0013】

上記から理解される如く、本発明の基本的な構成である走査分子計数法に於いては、まず、試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動しながら、即ち、試料溶液内を光検出領域により走査しながら、逐次的に、光の検出が行われる。そうすると、試料溶液内にて移動する光検出領域が、ランダムに運動している発光粒子を包含したときには、発光粒子からの光が検出され、これにより、一つの発光粒子の存在が検出されることが期待される。従って、逐次的に検出された光に於いて発光粒子からの光の信号を個別に検出して、これにより、粒子の存在を一つずつ個別に逐次的に検出し、粒子の溶液内での状態に関する種々の情報が取得されることとなる。その際、既に述べた如く、ノイズ信号の多くは、発光粒子の信号と比較して、一つの信号幅が短く、出現する間隔が長く、また、最高強度も発光粒子の信号に比して小さい傾向にある。そこで、本発明に於いては、逐次的に検出された光の強度データ、即ち、時系列光強度データに於いて発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する処理に先だって、ノイズ信号に相当する所定強度値より小さい「強度値の増大」にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている「強度値の増大」を時系列光強度データから除去し、かくして、ノイズ信号に相当する「強度値の増大」が除去された修正時系列光強度データに於いて発光粒子の各々からの光を表す信号の検出が為される。かかる構成によれば、後に説明される実施例に於いて示されている如く、修正時系列光強度データに於いて、全てのノイズの信号が除去されているわけではないが、発光粒子の信号の判別に於ける誤判別が低減でき、発光粒子

40

50

の信号の検出精度の向上、或いは、S/N比の改善が図られることが確認されている。なお、上記の所定強度値、所定時間間隔は、それぞれ、実験的に適宜決定可能である。

【0014】

上記の本発明の装置に於いて、典型的には、光検出部は、所定のビンタイム毎に到来する光子数を計数するフォトンカウンティングにより光検出領域からの光を検出し、その場合、時系列の光強度データが時系列のフォトンカウントデータとなる。上記の如きフォトンカウンティングの場合、発光粒子の信号に比して、ノイズ信号の各ビンタイムに於ける光子数、即ち、各データ点の光強度に相当する光子数が小さく、光子の到来する間隔が長い傾向にある。従って、本発明に於いては、上記の修正時系列光強度データとして、時系列のフォトンカウントデータに於いて所定の光子数以下のデータ点にして前後の所定の光子数以上のデータ点までの時間間隔が所定時間間隔を超えているデータ点の光子数を無視して修正時系列フォトンカウントデータを生成し、或る程度のノイズの信号の除去が為され、かかる修正時系列フォトンカウントデータに於いて、発光粒子の信号の検出が為されてよい。なお、本発明の発明者による実験によれば、所定時間間隔は、典型的には、0.1 μ秒 ~ 5 m秒の間であり、好適には、0.1 μ秒 ~ 200 μ秒の間であってよい。

10

【0015】

また、上記の本発明の装置の信号処理部の処理に於いて、逐次的な光検出部からの検出値の信号から1つの発光粒子が光検出領域に入ったか否かの判定は、光検出部にて検出された時系列の光を表す信号の形状に基づいて為されてよい。実施の形態に於いて、典型的には、所定の閾値より大きい強度を有する信号が検出されたときに、1つの発光粒子が光検出領域に入ったと検出されるようになっていてよい。より具体的には、後の実施形態の欄にて説明される如く、通常、発光粒子からの光を表す信号は、光検出部の時系列の検出値、即ち、光強度データに於いて、或る程度以上の強度を有する釣鐘型のパルス状の信号として現れ、ノイズは、釣鐘型のパルス状ではないか、強度の小さい信号として現れる。そこで、本発明の装置の信号処理部は、修正時系列光強度データ上に於いて、所定閾値を超える強度を有するパルス状信号を単一の発光粒子からの光を表す信号として検出するよう構成されていてよい。「所定閾値」は、実験的に適当な値に設定することが可能である。

20

【0016】

更に、本発明の装置の検出対象は、単一の発光粒子からの光であるため、光強度は、非常に微弱であり、一つの発光粒子が、蛍光一分子又は数分子などである場合、発光粒子の発する光は確率的に放出されるものであり、微小な時間に於いて信号の値の欠落が生じる可能性がある。そして、そのような欠落が生ずると、一つの発光粒子の存在に対応する信号の特定が困難となる。そこで、信号処理部は、時系列の光強度データ（修正時系列光強度データ）を平滑化し、微小な時間に於ける信号値の欠落を無視できるようにデータを加工した後、平滑化された修正時系列光強度データに於いて所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号を単一の発光粒子からの光を表す信号として検出するよう構成されていてよい。

30

【0017】

上記の本発明の装置に於ける試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子の特性又は試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて適宜変更可能となっていてよい。当業者に於いて理解される如く、発光粒子から検出される光の態様は、発光粒子の特性又は試料溶液中の数密度又は濃度によって変化し得る。特に、光検出領域の移動速度が速くなると、一つの発光粒子から得られる光量は低減することとなるので、一つの発光粒子からの光が精度よく又は感度よく計測できるように、光検出領域の移動速度は、適宜変更可能となっていることが好ましい。

40

【0018】

また、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、好適には、検出対象となる発光粒子の拡散移動速度（ブラウン運動による粒子の平均の移動速度）よりも高く設定される。上記に説明されている如く、本発明の装置は、光検出領域が発光粒子の存在位置を通過

50

したときにその発光粒子から発せられる光を検出して、発光粒子を個別に検出する。しかしながら、発光粒子が溶液中でブラウン運動することによりランダムに移動して、複数回、光検出領域を出入りする場合には、1つの発光粒子から複数回、(発光粒子の存在を表す)信号が検出されてしまい、検出された信号と1つの発光粒子の存在とを対応させることが困難となる。そこで、上記の如く、光検出領域の移動速度を発光粒子の拡散移動速度よりも高く設定し、これにより、1つの発光粒子を一つの(発光粒子の存在を表す)信号に対応させることが可能となる。なお、拡散移動速度は、発光粒子によって変わるので、上記の如く、発光粒子の特性(特に、拡散定数)に応じて、本発明の装置は、光検出領域の移動速度が適宜変更可能であるよう構成されていることが好ましい。

【0019】

試料溶液内での光検出領域の位置の移動は、任意の方式で為されてよい。例えば、レーザー走査型光学顕微鏡に於いて採用されているガルバノミラーを用いるなどして、顕微鏡の光学系の光路を変更して光検出領域の位置が変更されるようになっていく、或いは、光検出領域を固定して、試料溶液の位置を(例えば、顕微鏡のステージを移動するなどして)動かして、光検出領域の試料溶液内に於ける位置を移動するようになっていく。光検出領域の位置の移動軌跡は、任意に設定されてよく、例えば、円形、楕円形、矩形、直線及び曲線のうちから選択可能であってよい。特に、顕微鏡の光学系の光路を変更して光検出領域の位置が変更される場合、光検出領域の移動は、速やかであり、且つ、試料溶液に於いて機械的振動や流体力学的な作用が実質的に発生しないので、検出対象となる発光粒子が力学的な作用の影響を受けることなく安定した状態にて、光の計測が可能である点で有利である。

【0020】

上記の本発明の実施の態様の一つに於いては、信号の数を計数して光検出領域に含まれた発光粒子の数を計数するようになっていく(粒子のカウンティング)。その場合、検出された発光粒子の数と光検出領域の位置の移動量と組み合わせることにより、試料溶液中の同定された発光粒子の数密度又は濃度に関する情報が得られることとなる。具体的には、例えば、複数の試料溶液の数密度若しくは濃度の比、或いは、濃度若しくは数密度の基準となる標準試料溶液に対する相対的な数密度若しくは濃度の比が算出されるか、又は、濃度若しくは数密度の基準となる標準試料溶液に対する相対的な数密度若しくは濃度の比を用いて、絶対的な数密度値又は濃度値が決定されていく。或いは、任意の手法により、例えば、所定の速度にて光検出領域の位置を移動するなどして、光検出領域の位置の移動軌跡の全体積を特定すれば、発光粒子の数密度又は濃度が具体的に算定できることとなる。

【0021】

上記の本発明の装置に於いて試料溶液内に於ける光検出領域の位置を移動させながら光検出を行い、個々の発光粒子からの信号を個別に検出する光分析技術であって、発光粒子の信号の検出に先だって光強度データからノイズの信号を除去して検出精度の向上或いはS/N比の改善が図られる光分析技術の処理は、汎用のコンピュータによっても実現可能である。従って、本発明のもう一つの態様によれば、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散しランダムに運動する発光粒子からの光を検出するための光分析用コンピュータプログラムであって、試料溶液内に於ける顕微鏡の光学系の光検出領域の位置を移動する手順と、試料溶液内に於ける光検出領域の位置の移動中に光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する手順と、時系列の光強度データに於いて所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去して修正時系列光強度データを生成する手順と、時系列の光強度データに於ける個々の発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する手順とをコンピュータに実行させることを特徴とするコンピュータプログラムが提供される。

【0022】

かかる構成に於いて、典型的には、光検出領域からの光を検出して時系列の光強度デー

10

20

30

40

50

タを生成する手順に於いて、所定のピンタイム毎に到来する光子数を計数するフォトンカウンティングにより光検出領域からの光が検出され、その場合、時系列の光強度データが時系列のフォトンカウントデータであり、修正時系列光強度データが時系列のフォトンカウントデータに於いて所定の光子数以下のデータ点にして前後の所定の光子数以上のデータ点までの時間間隔が所定時間間隔を超えているデータ点の光子数を無視して得られる修正時系列フォトンカウントデータであってよい。所定時間間隔は、典型的には、 0.1μ 秒 ~ 5 m秒の間であり、好適には、 0.1μ 秒 $\sim 200 \mu$ 秒の間であってよい。

【0023】

また、上記のコンピュータプログラムに於いても、発光粒子の各々からの光を表す信号の個別の検出は、時系列の信号の形状に基づいて為されてよい。実施の形態に於いて、典型的には、所定の閾値より大きい強度を有する信号が検出されたときに、1つの発光粒子が光検出領域に入ったと検出されるようになっていてよい。具体的には、光強度データ上に於いて所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号が単一の発光粒子からの光を表す信号として検出されてよく、好適には、修正時系列光強度データが平滑化され、平滑化された修正時系列光強度データに於いて所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号が単一の発光粒子からの光を表す信号として検出されてよい。

10

【0024】

更に、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子の特性、試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて適宜変更可能となっていてよく、好適には、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、検出対象となる発光粒子の拡散移動速度よりも高く設定される。試料溶液内での光検出領域の位置の移動は、任意の方式で為されてよく、好適には、顕微鏡の光学系の光路を変更して或いは試料溶液の位置を動かして光検出領域の位置が変更されるようになっていてよい。光検出領域の位置の移動軌跡は、任意に設定されてよく、例えば、円形、楕円形、矩形、直線及び曲線のうちから選択可能であってよい。

20

【0025】

更に、上記のコンピュータプログラムに於いても、個別に検出された発光粒子からの信号の数を計数して光検出領域の位置の移動中に検出された発光粒子の数を計数する手順及び/又は検出された発光粒子の数に基づいて、試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定する手順が含まれていてよい。

【0026】

上記の本発明の装置又はコンピュータプログラムによれば、試料溶液内に於ける光検出領域の位置を移動させながら、個々の発光粒子の光の検出を行う光分析方法であって、発光粒子の信号の検出に先だって光強度データからノイズの信号を除去して検出精度の向上或いはS/N比の改善が図られる新規な方法が実現される。かくして、本発明によれば、更に、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて試料溶液中にて分散シランダムに運動する発光粒子からの光を検出する光分析方法であって、試料溶液内に於ける顕微鏡の光学系の光検出領域の位置を移動する過程と、試料溶液内に於ける光検出領域の位置を移動させながら光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する過程と、時系列の光強度データに於いて所定強度値より小さい強度値の増大にして前後の所定強度値より大きい強度値の増大との時間間隔が所定時間間隔を超えている強度値の増大を除去して修正時系列光強度データを生成する過程と、修正時系列光強度データに於ける個々の発光粒子の各々からの光を表す信号を個別に検出する過程とを含むことを特徴とする方法が提供される。かかる方法に於いても、典型的には、光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する手順に於いて、所定のピンタイム毎に到来する光子数を計数するフォトンカウンティングにより光検出領域からの光が検出され、その場合、時系列の光強度データが時系列のフォトンカウントデータであり、修正時系列光強度データが時系列のフォトンカウントデータに於いて所定の光子数以下のデータ点にして前後の所定の光子数以上のデータ点までの時間間隔が所定時間間隔を超えているデータ点の光子数を無視して得られる修正時系列フォトンカウントデータであってよい。所定時間間隔は、典型的には、 0.1μ 秒 ~ 5 m秒の間であり、好適には、 0.1μ 秒 $\sim 200 \mu$ 秒の間であってよ

30

40

50

い。

【0027】

更に、上記の方法に於いても、発光粒子の各々からの光を表す信号の個別の検出は、時系列の信号の形状に基づいて為されてよい。実施の形態に於いて、典型的には、所定の閾値より大きい強度を有する信号が検出されたときに、1つの発光粒子が光検出領域に入ったと検出されるようになってよい。具体的には、光強度データ上に於いて所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号が単一の発光粒子からの光を表す信号として検出されてよく、好適には、修正時系列光強度データが平滑化され、平滑化された修正時系列光強度データに於いて所定閾値を超える強度を有する釣鐘型のパルス状信号が単一の発光粒子からの光を表す信号として検出されてよい。

10

【0028】

また、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、発光粒子の特性、試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて適宜変更可能となっていてよく、好適には、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、検出対象となる発光粒子の拡散移動速度よりも高く設定される。試料溶液内での光検出領域の位置の移動は、任意の方式で為されてよく、好適には、顕微鏡の光学系の光路を変更して或いは試料溶液の位置を動かして光検出領域の位置が変更されるようになってよい。光検出領域の位置の移動軌跡は、任意に設定されてよく、例えば、円形、楕円形、矩形、直線及び曲線のうちから選択可能であってよい。

【0029】

更に、上記の方法に於いても、個別に検出された発光粒子からの信号の数を計数して光検出領域の位置の移動中に検出された発光粒子の数を計数する過程及び/又は検出された発光粒子の数に基づいて、試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度を決定する過程が含まれていてよい。

20

【0030】

上記の本発明の光分析技術は、典型的には、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖鎖、アミノ酸若しくはこれらの凝集体などの生体分子、ウイルス、細胞などの粒子状の生物学的な対象物の溶液中の状態の分析又は解析の用途に用いられるが、非生物学的な粒子(例えば、原子、分子、ミセル、金属コロイドなど)の溶液中の状態の分析又は解析に用いられてもよく、そのような場合も本発明の範囲に属することは理解されるべきである。

【発明の効果】

30

【0031】

総じて、本発明の光分析技術では、走査分子計数法に於いて、発光粒子の信号の検出処理に先だって、時系列光強度データ上に於いて発光粒子の信号の誤判別の原因となるノイズの信号が、全てではないが、或る程度除去され、これにより、発光粒子の信号の検出精度の向上、或いは、S/N比の改善が図られる。後述の実施形態の説明の欄にて詳細に例示される如く、予備的な実験によりノイズの信号を判別するための所定時間を適当に選択することにより、時系列光強度データから検出されるノイズ信号の数に対する発光粒子の信号の数の比が改善され、より精度の良い検出結果が得られることとなる。また、或る程度のノイズの信号に相当する光強度データの部分が発光粒子の信号の検出処理前に時系列光強度データから除去されることにより、発光粒子の信号の検出処理に於ける信号処理の負荷が低減される。

40

【0032】

本発明のその他の目的及び利点は、以下の本発明の好ましい実施形態の説明により明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1(A)は、本発明による走査分子計数法を実行する光分析装置の内部構造の模式図である。図1(B)は、コンフォーカル・ボリューム(共焦点顕微鏡の観察領域)の模式図である。図1(C)は、ミラー7の向きを変更して試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動する機構の模式図である。図1(D)は、マイクロプレートの水平方向位

50

置を移動して試料溶液内に於ける光検出領域の位置を移動する機構の模式図である。

【図2】図2(A)、(B)は、それぞれ、本発明が適用される走査分子計数法に於ける光検出の原理を説明する模式図及び計測される光強度の時間変化の模式図である。図2(C)は、時系列光強度データからノイズ信号を除去する原理を説明する図である。

【図3】図3は、本発明に従って実行される走査分子計数法の処理手順をフローチャートの形式で表した図である。

【図4】図4(A)、(B)は、それぞれ、発光粒子がブラウン運動をしながら光検出領域を横切る場合及び試料溶液内の光検出領域の位置を発光粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動することにより発光粒子が光検出領域を横切る場合の粒子の運動の態様を表すモデル図である。図4(C)は、走査分子計数法に従って、計測された時系列光強度データ(フォトンカウントの時間変化)から発光粒子の存在を検出するための処理手順に於ける検出信号の信号処理過程の例を説明する図である。

【図5】図5は、計測されたフォトンカウントデータの実測例(棒グラフ)と、データをスムージングして得られる曲線(点線)と、パルス存在領域にてフィッティングされたガウス関数(実線)を示している。図中、「ノイズ」と付された信号は、ノイズ又は異物による信号であるとして無視される。

【図6】図6(A)の上段は、発光粒子を含まない緩衝液のみを試料溶液として光検出部により得られる光強度(フォトンカウント)の時系列データの例であり、下段は、上段のデータからノイズ信号の除去処理(所定時間間隔は3 μ 秒に設定)を施して得られた修正時系列フォトンカウントデータである。図中、棒グラフがフォトンカウント(Raw)であり、曲線は、平滑化後のデータ(Smoothing)と発光粒子の信号と判別されたデータ領域に対するガウス関数のフィッティング曲線(Fit)である。

【図7】図7(A)の上段は、発光粒子として1 pM ATTO 647Nを含む試料溶液を用いて光検出部により得られる光強度(フォトンカウント)の時系列データの例であり、下段は、上段のデータからノイズ信号の除去処理(所定時間間隔は3 μ 秒に設定)を施して得られた修正時系列フォトンカウントデータである。図中、棒グラフがフォトンカウント(Raw)であり、曲線は、平滑化後のデータ(Smoothing)と発光粒子の信号と判別されたデータ領域に対するガウス関数のフィッティング曲線(Fit)である。

【図8】図8は、ピンタイムを1 μ 秒に設定したフォトンカウンティングにより取得された時系列フォトンカウントデータに対して種々の所定時間間隔を設定してノイズ信号の除去処理を施して得られた修正時系列フォトンカウントデータに於いて検出された発光粒子の信号に相当する基準を満たすパルスの数を示している。図中、発光粒子を含まない緩衝液のみを試料溶液とした場合の検出パルス数(緩衝液)及び1 pM ATTO 647Nを含む試料溶液の場合の検出パルス数(色素)がそれぞれ棒グラフで示され、それらの差分(単位はパルス数)が折れ線グラフにて示されている。

【図9】図9は、ピンタイムを0.5 μ 秒に設定したフォトンカウンティングにより取得された時系列フォトンカウントデータに対して種々の所定時間間隔を設定してノイズ信号の除去処理を施して得られた修正時系列フォトンカウントデータに於いて検出された発光粒子の信号に相当する基準を満たすパルスの数を示している。図中、発光粒子を含まない緩衝液のみを試料溶液とした場合の検出パルス数(緩衝液)及び1 pM ATTO 647Nを含む試料溶液の場合の検出パルス数(色素)がそれぞれ棒グラフで示され、それらの差分(単位は処理なしの場合の差分に対するパーセント)が折れ線グラフにて示されている。

【図10】図10は、ピンタイムを1 μ 秒に設定し且つ励起光と検出光の偏光方向が互いに垂直となるよう設定してフォトンカウンティングにより取得された時系列フォトンカウントデータに対して種々の所定時間間隔を設定してノイズ信号の除去処理を施して得られた修正時系列フォトンカウントデータに於いて検出された発光粒子の信号に相当する基準を満たすパルスの数を示している。図中、発光粒子を含まない緩衝液のみを試料溶液とした場合の検出パルス数(緩衝液)及び1 pM ATTO 647Nを含む試料溶液の場合の検出パルス数(色素)がそれぞれ棒グラフで示され、それらの差分(単位はパルス数)が

10

20

30

40

50

折れ線グラフにて示されている。

【図 1 1】図 1 1 は、従来の蛍光強度のゆらぎを算出する光分析技術に於いて得られるフォトンカウント（光強度）の時間変化の例であり、（A）は、試料内の粒子の濃度が、十分な計測精度が与えられる程度である場合であり、（B）は、（A）の場合よりも大幅に試料内の粒子の濃度が低い場合である。

【符号の説明】

【 0 0 3 4 】

1 ... 光分析装置（共焦点顕微鏡）

2 ... 光源

3 ... シングルモードオプティカルファイバー

4 ... コリメータレンズ

5 ... ダイクロイックミラー

6、7、11 ... 反射ミラー

8 ... 対物レンズ

9 ... マイクロプレート

10 ... ウェル（試料溶液容器）

12 ... コンデンサーレンズ

13 ... ピンホール

14 ... バリアフィルター

14 a ... ダイクロイックミラー又は偏光ビームスプリッタ

15 ... マルチモードオプティカルファイバー

16 ... 光検出器

17 ... ミラー偏向器

17 a ... ステージ位置変更装置

18 ... コンピュータ

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

以下、本発明の好ましい実施形態について詳細に説明する。

【 0 0 3 6 】

光分析装置の構成

本発明による光分析技術を実現する光分析装置は、基本的な構成に於いて、図 1（A）に模式的に例示されている如き、FCS、FIDA等が実行可能な共焦点顕微鏡の光学系と光検出器とを組み合わせる装置であってよい。同図を参照して、光分析装置 1 は、光学系 2 ~ 17 と、光学系の各部の作動を制御すると共にデータを取得し解析するためのコンピュータ 18 とから構成される。光分析装置 1 の光学系は、通常の共焦点顕微鏡の光学系と同様であってよく、そこに於いて、光源 2 から放射されシングルモードファイバー 3 内を伝播したレーザー光（Ex）が、ファイバーの射出端に於いて固有のNAにて決まった角度にて発散する光となって放射され、コリメータ 4 によって平行光となり、ダイクロイックミラー 5、反射ミラー 6、7 にて反射され、対物レンズ 8 へ入射される。対物レンズ 8 の上方には、典型的には、1 ~ 数十 μ L の試料溶液が分注される試料容器又はウェル 10 が配列されたマイクロプレート 9 が配置されており、対物レンズ 8 から射出したレーザー光は、試料容器又はウェル 10 内の試料溶液中で焦点を結び、光強度の強い領域（励起領域）が形成される。試料溶液中には、観測対象物である発光粒子、典型的には、蛍光性粒子又は蛍光色素等の発光標識が付加された粒子が分散又は溶解されており、かかる発光粒子が励起領域に進入すると、その間、発光粒子が励起され光が放出される。放出された光（Em）は、対物レンズ 8、ダイクロイックミラー 5 を通過し、ミラー 11 にて反射してコンデンサーレンズ 12 にて集光され、ピンホール 13 を通過し、バリアフィルター 14 を透過して（ここで、特定の波長帯域の光成分のみが選択される。）、マルチモードファイバー 15 に導入されて、光検出器 16 に到達し、時系列の電気信号に変換された後、コンピュータ 18 へ入力され、後に説明される態様にて光分析のための処理が為さ

10

20

30

40

50

れる。なお、当業者に於いて知られている如く、上記の構成に於いて、ピンホール13は、対物レンズ8の焦点位置と共役の位置に配置されており、これにより、図1(B)に模式的に示されている如きレーザー光の焦点領域、即ち、励起領域内から発せられた光のみがピンホール13を通過し、励起領域以外からの光は遮断される。図1(B)に例示されたレーザー光の焦点領域は、通常、 $1 \sim 10fL$ 程度の実効体積を有する本光分析装置に於ける光検出領域であり(典型的には、光強度が領域の中心を頂点とするガウス様分布となる。実効体積は、光強度が $1/e^2$ となる面を境界とする略楕円球体の体積である。) 、コンフォーカル・ボリュームと称される。また、本発明では、1つの発光粒子からの光、例えば、一つの蛍光色素分子からの微弱光が検出されるので、光検出器16としては、好適には、フォトンカウンティングに使用可能な超高感度の光検出器が用いられる。光の検出がフォトンカウンティングによる場合、光強度の測定は、所定時間に亘って、逐次的に、所定の単位時間毎(BIN TIME)に、光検出器に到来するフォトンの数を計測する態様にて実行される。従って、この場合、時系列の光強度のデータは、時系列のフォトンカウントデータである。また、顕微鏡のステージ(図示せず)には、観察すべきウェル10を変更するべく、マイクロプレート9の水平方向位置を移動するためのステージ位置変更装置17aが設けられていてよい。ステージ位置変更装置17aの作動は、コンピュータ18により制御されてよい。かかる構成により、検体が複数在る場合にも、迅速な計測が達成可能となる。

10

【0037】

更に、上記の光分析装置の光学系に於いては、試料溶液内を光検出領域により走査する、即ち、試料溶液内に於いて焦点領域、即ち、光検出領域の位置を移動するための機構が設けられる。かかる光検出領域の位置を移動するための機構としては、例えば、図1(C)に模式的に例示されている如く、反射ミラー7の向きを変更するミラー偏向器17が採用されてよい(光検出領域の絶対的な位置を移動する方式)。かかるミラー偏向器17は、通常のレーザー走査型顕微鏡に装備されているガルバノミラー装置と同様であってよい。或いは、別の態様として、図1(D)に例示されている如く、試料溶液が注入されている容器10(マイクロプレート9)の水平方向の位置を移動し、試料溶液内に於ける光検出領域の相対的な位置を移動するべくステージ位置変更装置17aが作動されてもよい(試料溶液の絶対的な位置を移動する方式)。いずれの方式による場合も、所望の光検出領域の位置の移動パターンを達成するべく、ミラー偏向器17又はステージ位置変更装置17aは、コンピュータ18の制御の下、光検出器16による光検出と協調して駆動される。光検出領域の位置の移動軌跡は、円形、楕円形、矩形、直線、曲線又はこれらの組み合わせから任意に選択されてよい(コンピュータ18に於けるプログラムに於いて、種々の移動パターンが選択できるようになっていてよい。)。なお、図示していないが、対物レンズ8又はステージを上下に移動することにより、光検出領域の位置が上下方向に移動されるようになっていてもよい。

20

30

【0038】

観測対象物となる発光粒子が多光子吸収により発光する場合には、上記の光学系は、多光子顕微鏡として使用される。その場合には、励起光の焦点領域(光検出領域)のみで光の放出があるので、ピンホール13は、除去されてよい。また、観測対象物となる発光粒子が化学発光や生物発光現象により励起光によらず発光する場合には、励起光を生成するための光学系2~5が省略されてよい。発光粒子がりん光又は散乱により発光する場合には、上記の共焦点顕微鏡の光学系がそのまま用いられる。更に、光分析装置1に於いては、図示の如く、複数の励起光源2が設けられていてよく、発光粒子の励起波長によって適宜、励起光の波長が選択できるようになっていてよい。同様に、光検出器16も複数個備えられていてよく、試料中に波長の異なる複数種の発光粒子が含まれている場合に、それらから光をその波長によって別々に検出できるようになっていてよい。更にまた、光の検出に関して、励起光として所定の方向に偏光した光が用いられ、検出光として励起光の偏光方向と垂直な方向の成分が選択されてよい。その場合、励起光光路には、ポーラライザ(図示せず)が挿入され、検出光光路に偏光ビームスプリッター14aが挿入される。かか

40

50

る構成によれば、検出光に於ける背景光を大幅に低減することが可能となる（実施例 3 参照）。

【 0 0 3 9 】

本発明の光分析技術の原理

「発明の概要」の欄に記載されている如く、本発明の光分析技術に於いては、端的に述べれば、走査分子計数法に於いて、時系列光強度データ上にて明らかにノイズであると考えられるデータの除去（ノイズ信号除去処理）が為され、しかる後に、ノイズ信号除去処理が施された時系列光強度データ（修正時系列光強度データ）に於いて発光粒子の信号の検出が為される。以下、本発明の走査分子計数法及び時系列光強度データのノイズ信号除去処理の原理について説明する。

10

1. 走査分子計数法の原理

FCS、FIDA等の分光分析技術は、従前の生化学的な分析技術に比して、必要な試料量が極めて少なく、且つ、迅速に検査が実行できる点で優れている。しかしながら、FCS、FIDA等の分光分析技術では、原理的に、発光粒子の濃度や特性は、蛍光強度のゆらぎに基づいて算定されるので、精度のよい測定結果を得るためには、試料溶液中の発光粒子の濃度又は数密度が、図 1 1 (A) に模式的に描かれているように、蛍光強度の計測中に常に一個程度の発光粒子が光検出領域 CV 内に存在するレベルであり、同図の右側に示されている如く、計測時間中に常に有意な光強度（フォトンカウント）が検出されることが要求される。もし発光粒子の濃度又は数密度がそれよりも低い場合、例えば、図 1 1 (B) に描かれているように、発光粒子がたまにしか光検出領域 CV 内へ進入しないレベルである場合には、同図の右側に例示されている如く、有意な光強度の信号（フォトンカウント）が、計測時間の一部にしか現れないこととなり、精度のよい光強度のゆらぎの算定が困難となる。また、計測中に常に一個程度の発光粒子が光検出領域内に存在するレベルよりも発光粒子の濃度が大幅に低い場合には、光強度のゆらぎの演算に於いて、バックグラウンドの影響を受けやすく、演算に十分な量の有意な光強度データを得るために計測時間が長くなる。

20

【 0 0 4 0 】

そこで、本願出願人は、特願 2 0 1 0 - 0 4 4 7 1 4 及び PCT / JP 2 0 1 1 / 5 3 4 8 1 に於いて、発光粒子の濃度が、上記の如き FCS、FIDA等の分光分析技術にて要求されるレベルよりも低い場合でも、発光粒子の数密度又は濃度等の特性の検出を可能にする新規な原理に基づく「走査分子計数法」を提案した。

30

【 0 0 4 1 】

走査分子計数法に於いて実行される処理としては、端的に述べれば、光検出領域の位置を移動するための機構（ミラー偏向器 1 7）を駆動して光路を変更し、或いは、試料溶液が注入されている容器 1 0（マイクロプレート 9）の水平方向の位置を移動して、図 2 (A) にて模式的に描かれているように、試料溶液内に於いて光検出領域 CV の位置を移動しながら、即ち、光検出領域 CV により試料溶液内を走査しながら、光検出が実行される。そうすると、例えば、光検出領域 CV が移動する間（図中、時間 $t_0 \sim t_2$ ）に於いて 1 つの発光粒子の存在する領域を通過する際（ t_1 ）には、発光粒子から光が放出され、図 2 (B) に描かれている如き時系列の光強度データ上に有意な光強度（ E_m ）のパルス状の信号が出現することとなる。かくして、上記の光検出領域 CV の位置の移動と光検出を実行し、その間に出現する図 2 (B) に例示されている如きパルス状の信号（有意な光強度）を一つずつ検出することによって、発光粒子が個別に検出され、その数をカウントすることにより、計測された領域内に存在する発光粒子の数、或いは、濃度若しくは数密度に関する情報が取得できることとなる。かかる走査分子計数法の原理に於いては、蛍光強度のゆらぎの算出の如き統計的な演算処理は行われず、発光粒子が一つずつ検出されるので、FCS、FIDA等では十分な精度にて分析ができないほど、観測されるべき粒子の濃度が低い試料溶液でも、粒子の濃度若しくは数密度に関する情報が取得可能である。

40

【 0 0 4 2 】

2. 時系列光強度データのノイズ信号除去処理の原理

50

上記の走査分子計数法により光検出器 16 により経時的に取得された光強度のデータ（時系列光強度データ）に於いては、発光粒子からの光によるパルス状の信号の他に、光検出器の熱ノイズや背景光等に起因にするノイズが混入する。そこで、時系列光強度データから発光粒子の信号を検出する際には、典型的には、時系列光強度データに於いて見出されるパルス状の信号の形状的特徴、例えば、ピーク強度、幅、ガウス関数等の釣鐘型関数（図 2（C）中の FC）の形状に対する近似の程度（ガウス関数フィッティングに於ける相関係数）が参照される。そして、発光粒子によるパルス信号に於いて想定される範囲の形状的特徴を有するパルス信号を発光粒子の信号として判別し、それ以外のパルス信号は、ノイズ信号として判別する。

【0043】

しかしながら、かかる発光粒子の信号とノイズ信号との判別に於いては、誤判別が含まれ、かかる誤判別が多くなると、発光粒子の信号の検出精度が低下することとなる。また、時系列光強度データに於いて、ノイズ信号が多数存在すると、誤判別が多くなる傾向にあることが観察される。この点に関し、本発明の発明者による観察によれば、時系列光強度データに於いて、発光粒子の信号とノイズ信号とを比較すると、ノイズ信号は、発光粒子の信号に比して、強度が低く、信号の発生する間隔が長い傾向にあることが見出された。例えば、時系列フォトンカウントデータを参照すると、図 2（C）の上段に示されている如く、発光粒子の信号の場合は、光子の到来が密であり、強度（一時に到来する光子数）が高くなるのに対し、ノイズ信号の場合は、発光粒子の信号の場合に比して、光子の到来が相対的に疎であり、強度（一時に到来する光子数）も低くなる。[所定のビンタイム毎の光子数を計数するフォトンカウントデータの場合、一時に到来する光子数が大きいということは、光子の到来が密であるということと等価である。]

【0044】

かくして、本発明に於いては、時系列光強度データからの発光粒子の信号の検出処理に先だって、ノイズ信号を除去する処理を実行し、発光粒子の信号とノイズ信号との判別に於ける誤判別の低減が試みられる。具体的には、上記の如く、ノイズ信号は発光粒子の信号に比して光子の到来が疎であるので、図 2（C）の上段に示されている如く、光強度（光子数）が所定値以下であり且つ前後の所定値以上の光強度の増大（光子の到来）までの時間間隔 f 、 r が所定の時間間隔よりも長いデータ点がノイズ信号であると判定し、かかるデータ点の光強度（光子数）が、図 2（C）の下段に示されている如く、無視又は除去される（強度値（光子数）を 0 にする）。そして、上記の如くノイズ信号の除去が為された時系列光強度データ（修正時系列光強度データ）に於いて、発光粒子の信号の検出処理が実行される。かかる構成によれば、後の説明する実施例の如く、ノイズ信号除去処理で或る程度の量のノイズ信号が予め除去され、発光粒子の信号の検出精度の改善が為されることが確認された。なお、ノイズ信号の判別のための基準となる上記の所定値と所定の時間間隔とは、発光粒子を含まない試料溶液を用いた計測と発光粒子を含む試料溶液を用いた計測の結果を比較するなどして、実験的に設定可能である。

【0045】

走査分子計数法の処理操作過程

図 1（A）に例示の光分析装置 1 を用いた本発明に従った走査分子計数法の実施形態に於いては、具体的には、（1）発光粒子を含む試料溶液の調製、（2）試料溶液の光強度の測定処理、及び（3）測定された光強度の分析処理が実行される。図 3 は、フローチャートの形式にて表した本実施形態に於ける処理を示している。

【0046】

（1）試料溶液の調製

本発明の光分析技術の観測対象物となる粒子は、溶解された分子等の、試料溶液中にて分散し溶液中にてランダムに運動する粒子であれば、任意のものであってよく、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、糖鎖、アミノ酸若しくはこれらの凝集体などの生体分子、ウイルス、細胞、或いは、金属コロイド、その他の非生物学的分子などであってよい。観測対象物となる粒子が光を発する粒子でない場合には、発光標識（蛍光分子、りん

10

20

30

40

50

光分子、化学・生物発光分子)が観測対象物となる粒子に任意の態様にて付加されたものが用いられる。試料溶液は、典型的には水溶液であるが、これに限定されず、有機溶媒その他の任意の液体であってよい。

【0047】

(2) 試料溶液の光強度の測定(図3-ステップ100)

本実施形態の走査分子計数法による光分析に於ける光強度の測定は、測定中にミラー偏向器17又はステージ位置変更装置17aを駆動して、試料溶液内の光検出領域の位置の移動(試料溶液内の走査)を行う他は、FCS又はFIDAに於ける光強度の測定過程と同様の態様にて実行されてよい。操作処理に於いて、典型的には、マイクロプレート9のウェル10に試料溶液を注入して顕微鏡のステージ上に載置した後、使用者がコンピュータ18に対して、測定の開始の指示を入力すると、コンピュータ18は、記憶装置(図示せず)に記憶されたプログラム(試料溶液内に於いて光検出領域の位置を移動する手順と、光検出領域の位置の移動中に光検出領域からの光を検出して時系列の光強度データを生成する手順)に従って、試料溶液内の光検出領域に於ける励起光の照射及び光強度の計測が開始される。かかる計測中、コンピュータ18のプログラムに従った処理動作の制御下、ミラー偏向器17又はステージ位置変更装置17aは、ミラー7(ガルバノミラー)又は顕微鏡のステージ上のマイクロプレート9を駆動して、ウェル10内に於いて光検出領域の位置の移動を実行し、これと同時に光検出器16は、逐次的に検出された光を電気信号に変換してコンピュータ18へ送信し、コンピュータ18では、任意の態様にて、送信された信号から時系列の光強度データを生成して保存する。なお、典型的には、光検出器16は、一光子の到来を検出できる超高感度光検出器であるので、光の検出が、フォトンカウンティングによる場合、時系列光強度データは、時系列のフォトンカウントデータであってよい。

10

20

【0048】

光強度の計測中の光検出領域の位置の移動速度は、任意に、例えば、実験的に又は分析の目的に適合するよう設定された所定の速度であってよい。検出された発光粒子の数に基づいて、その数密度又は濃度に関する情報を取得する場合には、光検出領域の通過した領域の大きさ又は体積が必要となるので、移動距離が把握される態様にて光検出領域の位置の移動が実行される。なお、計測中の経過時間と光検出領域の位置の移動距離とが比例関係にある方が測定結果の解釈が容易となるので、移動速度は、基本的に、一定速度であることが好ましいが、これに限定されない。

30

【0049】

ところで、光検出領域の位置の移動速度に関して、計測された時系列の光強度データからの発光粒子の個別の検出、或いは、発光粒子の数のカウンティングを、定量的に精度よく実行するためには、かかる移動速度は、発光粒子のランダムな運動、即ち、ブラウン運動による移動速度よりも速い値に設定されることが好ましい。本発明の光分析技術の観測対象粒子は、溶液中に分散又は溶解されて自由にランダムに運動する粒子であるので、ブラウン運動によって位置が時間と共に移動する。従って、光検出領域の位置の移動速度が粒子のブラウン運動による移動に比して遅い場合には、図4(A)に模式的に描かれている如く、粒子が領域内をランダムに移動し、これにより、光強度がランダムに変化し(既に触れた如く、光検出領域の励起光強度は、領域の中心を頂点として外方に向かって低減する。)、個々の発光粒子に対応する有意な光強度の変化を特定することが困難となる。そこで、好適には、図4(B)に描かれている如く、粒子が光検出領域を略直線に横切り、これにより、時系列の光強度データに於いて、図4(C)の最上段に例示の如く、個々の発光粒子に対応する光強度の変化のプロファイルが略一様となり(発光粒子が略直線的に光検出領域を通過する場合には、光強度の変化のプロファイルは、励起光強度分布と略同様となる。)、個々の発光粒子と光強度との対応が容易に特定できるように、光検出領域の位置の移動速度は、粒子のブラウン運動による平均の移動速度(拡散移動速度)よりも速く設定される。

40

【0050】

50

具体的には、拡散係数 D を有する発光粒子がブラウン運動によって半径 W_0 の光検出領域（コンフォーカルボリューム）を通過するときに要する時間 t は、平均二乗変位の関係式

$$(2W_0)^2 = 6D \cdot t \quad \dots (1)$$

から、

$$t = (2W_0)^2 / 6D \quad \dots (2)$$

となるので、発光粒子がブラウン運動により移動する速度（拡散移動速度） V_{dif} は、概ね、

$$V_{dif} = 2W_0 / t = 3D / W_0 \quad \dots (3)$$

となる。そこで、光検出領域の位置の移動速度は、かかる V_{dif} を参照して、それよりも十分に早い値に設定されてよい。例えば、観測対象粒子の拡散係数が、 $D = 2.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$ 程度であると予想される場合には、 W_0 が、 $0.62 \mu\text{m}$ 程度だとすると、 V_{dif} は、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ m} / \text{s}$ となるので、光検出領域の位置の移動速度は、その10倍以上の $15 \text{ mm} / \text{s}$ などと設定されてよい。なお、観測対象粒子の拡散係数が未知の場合には、光検出領域の位置の移動速度を種々設定して光強度の変化のプロファイルが、予想されるプロファイル（典型的には、励起光強度分布と略同様）となる条件を見つけるための予備実験を繰り返し実行して、好適な光検出領域の位置の移動速度が決定されてよい。

【0051】

(3) 光強度の分析

上記の処理により時系列光強度データが得られると、コンピュータ18に於いて、記憶装置に記憶されたプログラムに従った処理により、発光粒子の信号の検出、発光粒子のカウンティング、濃度算出等の各種分析が実行される。また、既に述べた如く、特に、本発明に於いては、発光粒子の信号の検出の前に時系列光強度データに対してノイズ信号除去処理が実行される。

【0052】

(i) ノイズ信号除去処理（ステップ105）

ノイズ信号除去処理では、図2(C)に示されている如く、時系列光強度（フォトンカウント）データに於いて、所定値以下の光強度値（光子数）のデータ点であって、その前後の所定値以上の光強度値（光子数）のデータ点までの時間 f 、 r が所定時間間隔 t_h を超えるデータ点に於ける光強度値を0に置き換える処理が実行される（修正時系列光強度（フォトンカウント）データの生成）。所定時間間隔 t_h は、装置固有のノイズレベルと観測対象となる溶液に依存する。典型的には、観測対象粒子を含む観測対象となる試料溶液と観測対象粒子及びその他の発光粒子を実質的に含まない溶液（緩衝液）とのそれぞれについて、光計測を行って、時系列光強度（フォトンカウント）データを取得し、種々の時間間隔を用いて、ノイズ信号除去処理を行い、かくして得られた修正時系列光強度（フォトンカウント）データに於いて、後に述べる発光粒子の信号の検出を実行される。そして、試料溶液の場合と緩衝液の場合とに於ける検出されたパルス数の差分の最大値を与える時間間隔を、最適な所定時間間隔 t_h として設定することができる。設計上の所定時間間隔 t_h の範囲は、光検出器の熱ノイズの頻度と光検出器の時間分解能とに依存する。光検出器として使用されるAPD（アバランシェフォトダイオード）の熱ノイズの頻度は、典型的には、 0.2 kHz 程度であり、平均して5m秒毎に1回の割合にてノイズが発生するので、所定時間間隔 t_h は、5m秒以下に設定されるべきである。また、APDを用いたフォトンカウンティングのピンタイムの下限、即ち、時間分解能は、典型的には、 $0.1 \mu\text{s}$ 程度が限界であるので、所定時間間隔 t_h は、 $0.1 \mu\text{s}$ 以上に設定されるべきである。更に、発光粒子を実質的に含まない緩衝液を用いた光計測に於いて、ノイズの頻度は、典型的には、 5 kHz 程度である（ $200 \mu\text{s}$ に一回の割合でノイズが発生する。）ことが経験的に見出されているので、好適には、所定時間間隔 t_h は、 $0.1 \mu\text{s} \sim 200 \mu\text{s}$ の間に設定される。また、ノイズ信号の除去の基準となる上記の所定値は、フォトンカウンティングの場合は、典型的には、1であってよい。既に触

10

20

30

40

50

れたように、フォトンカウンティングに於いては、光子数が2以上のときは、光子が短時間に連続して到来したことに相当するためである。

【0053】

(ii) 発光粒子の信号の個別検出(ステップ110~160)

上記の処理にて修正時系列光強度データが調製されると、かかる光強度データ上にて、発光粒子の信号を個別に検出する処理が実行される。既に触れた如く、一つの発光粒子の光検出領域を通過する際の軌跡が、図4(B)に示されている如く略直線状である場合、その粒子に対応する信号に於ける光強度データ上での光強度の変化は、光学系により決定される光検出領域内の光強度分布を反映した略釣鐘状のプロファイルを有する。従って、走査分子計数法では、基本的には、光強度データ上で、適宜設定される閾値 I_{th} を超える光強度値が継続する時間幅が所定の範囲にあるとき、その光強度のプロファイルを有する信号が一つの粒子が光検出領域を通過したことに対応すると判定され、一つの発光粒子の検出が為されるようになってよい。そして、光強度が閾値 I_{th} を超えないか、時間幅が所定の範囲にない信号は、ノイズ又は異物の信号として判定される。また、光検出領域の光強度分布が、ガウス分布：

$$I = A \cdot \exp(-2t^2/a^2) \quad \dots (4)$$

であると仮定できるときには、有意な光強度のプロファイル(バックグラウンドでないと明らかに判断できるプロファイル)に対して式(4)をフィッティングして算出された強度 A 及び幅 a が所定の範囲内にあるとき、その光強度のプロファイルが一つの粒子が光検出領域を通過したことに対応すると判定され、一つの発光粒子の検出が為されてよい。(強度 A 及び幅 a が所定の範囲外にある信号は、ノイズ又は異物の信号として判定され、その後の分析等に於いて無視されてよい。)

【0054】

光強度データ上の信号の検出の処理の一つの例に於いては、まず、光強度データ(図4(C)、最上段「検出結果(未処理)」)に対して、スムージング(平滑化)処理が為される(図3-ステップ110、図4(C)中上段「スムージング」)。発光粒子の発する光は確率的に放出されるものであり、微小な時間に於いてデータ値の欠落が生じ得るため、かかるスムージング処理によって、前記の如きデータ値の欠落を無視できることとなる。スムージング処理は、例えば、移動平均法により為されてよい。なお、スムージング処理を実行する際のパラメータ、例えば、移動平均法に於いて一度に平均するデータ点数や移動平均の回数など、は、光強度データ取得時の光検出領域の位置の移動速度(走査速度)、BIN TIMEに依じて適宜設定されてよい。

【0055】

次いで、スムージング処理後の光強度データに於いて、有意なパルス状の信号(以下、「パルス信号」と称する。)が存在する時間領域(パルス存在領域)を検出するために、スムージング処理後の光強度データの時間についての一次微分値が演算される(ステップ120)。光強度データの時間微分値は、図4(C)中下段「時間微分」に例示されている如く、信号値の変化時点に於ける値の変化が大きくなるので、かかる時間微分値を参照することによって、有意な信号の始点と終点を有利に決定することができる。

【0056】

しかる後、光強度データ上に於いて、逐次的に、有意なパルス信号が検出される(ステップ130~160)。具体的には、まず、光強度データの時間微分値データ上にて、逐次的に時間微分値を参照して、一つのパルス信号の始点と終点とが探索され決定され、パルス存在領域が特定される(ステップ130)。一つのパルス存在領域が特定されると、そのパルス存在領域に於けるスムージングされた光強度データに対して、釣鐘型関数のフィッティングが行われ(図4(C)下段「釣鐘型関数フィッティング」)、釣鐘型関数のパルスのピーク(最大値)の強度 I_{peak} 、パルス幅(半値全幅) W_{peak} 、フィッティングに於ける(最小二乗法の)相関係数等のパラメータが算出される(ステップ140)。なお、フィッティングされる釣鐘型関数は、典型的には、ガウス関数であるが、ローレンツ型関数であってもよい。そして、算出された釣鐘型関数のパラメータが、一つの発光粒子

が光検出領域を通過したときに検出されるパルス信号が描く釣鐘型のプロファイルのパラメータについて想定される範囲内にあるか否か、即ち、パルスのピーク強度、パルス幅、相関係数が、それぞれ、所定範囲内にあるか否か等が判定される（ステップ150）。かくして、図5左に示されている如く、算出された釣鐘型関数のパラメータが一つの発光粒子に対応する信号に於いて想定される範囲内にあると判定された信号は、一つの発光粒子に対応する信号であると判定され、これにより、一つの発光粒子が検出されたこととなる。一方、図5右に示されている如く、算出された釣鐘型関数のパラメータが想定される範囲内になかったパルス信号は、ノイズとして無視される。なお、発光粒子の信号の検出と同時に信号数のカウンティング、即ち、発光粒子のカウントングが実行されてよい。

【0057】

上記のステップ130～150の処理に於けるパルス信号の探索及び判定は、光強度データの全域に渡って繰り返し実行されてよい（ステップ160）。

【0058】

後の実施例に於いて示される如く、本発明によるノイズ信号除去処理を適当な所定時間間隔 t_h を設定して実行すると、上記の発光粒子信号の検出処理（ステップ110～160）に於いて、発光粒子信号の数に対するノイズ信号の数の割合が低減し、S/N比の改善が為される。なお、光強度データから発光粒子の信号を個別に検出する処理は、上記の手順に限らず、任意の手法により実行されてよい。

【0059】

(iii) 発光粒子濃度の決定

検出された発光粒子の信号の数を計数して、発光粒子の数の決定が為されている場合、任意の手法にて、光検出領域の通過した領域の総体積が算定されれば、その体積値と発光粒子の数とから試料溶液中の発光粒子の数密度又は濃度が決定される（ステップ170）。

【0060】

光検出領域の通過した領域の総体積は、励起光又は検出光の波長、レンズの開口数、光学系の調整状態に基づいて理論的に算定されてもよいが、実験的に、例えば、発光粒子の濃度が既知の溶液（対照溶液）について、検査されるべき試料溶液の測定と同様の条件にて、上記に説明した光強度の測定、発光粒子の検出及びカウンティングを行うことにより検出された発光粒子の数と、対照溶液の発光粒子の濃度とから決定されるようになってよい。具体的には、例えば、発光粒子の濃度 C の対照溶液について、対照溶液の発光粒子の検出数が N であったとすると、光検出領域の通過した領域の総体積 V_t は、

$$V_t = N / C \quad \dots (5)$$

により与えられる。また、対照溶液として、発光粒子の複数の異なる濃度の溶液が準備され、それぞれについて測定が実行されて、算出された V_t の平均値が光検出領域の通過した領域の総体積 V_t として採用されるようになってよい。そして、 V_t が与えられると、発光粒子のカウントング結果が n の試料溶液の発光粒子の濃度 c は、

$$c = n / V_t \quad \dots (6)$$

により与えられる。なお、光検出領域の体積、光検出領域の通過した領域の総体積は、上記の方法によらず、任意の方法にて、例えば、FCS、FIDAを利用するなどして与えられるようになってよい。また、本実施形態の光分析装置に於いては、想定される光検出領域の移動パターンについて、種々の標準的な発光粒子についての濃度 C と発光粒子の数 N との関係（式（6））の情報をコンピュータ18の記憶装置に予め記憶しておき、装置の使用者が光分析を実施する際に適宜記憶された関係の情報を利用できるようになってよい。

【0061】

かくして、上記の本発明では、走査分子計数法に於いて、時系列光強度データにてノイズ信号除去処理を実行した後の光強度データを用いて発光粒子の信号の検出処理を実行すると、後の実施例に示されている如く、発光粒子の信号の誤判別の低減が図られ、S/N比の改善が見られる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

上記に説明した本発明の有効性を検証するために、以下の如き実験を行った。なお、以下の実施例は、本発明の有効性を例示するものであって、本発明の範囲を限定するものではないことは理解されるべきである。

【 実施例 1 】

【 0 0 6 3 】

走査分子計数法による光測定により得られた時系列光強度データから、上記に述べた手法に従って、ノイズ信号除去処理を実行した後に発光粒子の信号の検出を実行した場合の検出精度、S/N比について評価した。

【 0 0 6 4 】

試料溶液として、リン酸緩衝液(0.05% Tween 20を含む)と、リン酸緩衝液中に発光粒子として蛍光色素 ATTO 647 N (Sigma-Aldrich) を 1 pM にて含む溶液(色素溶液)とを調製した。光の測定に於いては、光分析装置として、共焦点蛍光顕微鏡の光学系とフォトンカウンティングシステムを備えた 1 分子蛍光測定装置 MF 20 (オリンパス株式会社)を用い、上記の「(2) 試料溶液の光強度の測定」にて説明した態様に従って、上記の蛍光色素を含む色素溶液と蛍光色素を含まない緩衝液とについて、それぞれ、時系列光強度データ(フォトンカウントデータ)を取得した。その際、励起光は、642 nm のレーザー光を用い、バンドパスフィルターを用いて、660 - 700 nm の波長帯域の光を測定し、時系列フォトンカウントデータを生成した。励起光のレーザーパワーは、10 mW とした(ノイズ信号の影響を検証するため、通常用いられる出力よりも高く設定した。)。試料溶液中に於ける光検出領域の位置の移動速度は、45 mm / 秒とし、BIN TIME を 1 μ 秒とし、2 秒間の測定を行った。

【 0 0 6 5 】

光計測後のデータ処理に於いては、まず、取得された時系列フォトンカウントデータに対して、上記のノイズ信号除去処理を適用した。ノイズ信号除去処理に於いては、光子数が 1 のデータ点について、それぞれ、前後の光子数が 1 以上のデータ点までの時間間隔が所定時間間隔を超える場合、そのデータ点の光子数を 0 に修正した。また、光子数が 2 以上のデータ点は、そのまま残した。そして、ノイズ信号除去処理が施された修正時系列フォトンカウントデータに於いて、発光粒子の信号の個別検出と信号数のカウンティングを行った。発光粒子の信号の検出は、「(ii) 発光粒子の信号の個別検出」及び図 3 のステップ 110 ~ 160 に記載された要領に従って、修正時系列フォトンカウントデータにスムージング処理を施し、スムージングされたデータに於いて、パルス信号の始点及び終点を決定した後、各パルス信号にガウス関数を最小自乗法によりフィッティングして、(ガウス関数に於ける)ピーク強度、パルス幅(半値全幅)、相関係数を決定した。そして、下記の条件:

$$20 \mu \text{秒} < \text{パルス幅} < 400 \mu \text{秒}$$

$$\text{ピーク強度} > 1 [\text{pc} / 10 \mu \text{s}] \quad \dots (A)$$

$$\text{相関係数} > 0.95$$

を満たすパルス信号のみを発光粒子の信号として抽出し、その信号数を計数した。

【 0 0 6 6 】

図 6 は、色素を含まない緩衝液を用いた光計測により得られた時系列フォトンカウントデータの一部を示しており、図 7 は、色素を含む試料溶液を用いた光計測により得られた時系列フォトンカウントデータ(棒グラフ)の一部を示している。これらの図に於いて、それぞれ、(A) は、取得されたままの時系列フォトンカウントデータであり、(B) は、所定時間間隔 t_h を 3 μ 秒に設定してノイズ信号除去処理を施した修正時系列フォトンカウントデータである。また、図中には、平滑化されたデータ(Smoothing)と、発光粒子の信号として判別されたフィッティングされたガウス関数曲線(Fit)とが示されている。図 6 及び 7 の(A) と(B) とをそれぞれ比較して、ノイズ信号除去処理を実行することにより、値の低いデータ点の多くが消去され、これにより、平滑化されたデータに於ける重複した釣鐘型のパルス状信号の数が低減されたことが観察される。また、値の低

10

20

30

40

50

いデータ点は殆どがノイズ信号であると考えられるところ、そのような信号を発光粒子の信号として判別した数（フィッティングされたガウス関数曲線の数）も低減した。

【0067】

図8は、ノイズ信号除去処理に於ける所定時間間隔 t_h を種々変更して、上記の発光粒子の信号の検出処理を実行した場合の緩衝液及び色素溶液についての発光粒子の信号として判別されたパルス信号の数を、所定時間間隔 t_h に対して棒グラフの形式にて表した図である。また、図中に於いては、色素溶液に於ける検出パルス信号数と緩衝液に於ける検出パルス信号数との差分が折れ線グラフにて示されている。同図を参照して、所定時間間隔 t_h を増大すると、値の除去されるデータ点が低減することから、緩衝液及び色素溶液の双方に於いて、検出パルス信号数が増大した。しかしながら、色素溶液と緩衝液とに於ける検出パルス信号数の差分は、所定時間間隔 t_h が3 μ 秒程度のときに、最大値となった。また、処理をしなかった場合の検出パルス信号数の差分は、2115個であったのに対し、検出パルス信号数の差分が最大値となるときのその差分は、2898個となり、増加した。緩衝液の検出パルス信号数は、全て誤判別によるものであると考えられ、色素溶液と緩衝液とに於ける検出パルス信号数の差分が大きいほど、精度良く発光粒子の信号の判別が為されたと考えることができる。従って、上記の結果は、最適化された所定時間間隔 t_h を用いたノイズ信号除去処理を実行することにより、発光粒子の信号の検出精度或いはS/N比を改善できることを示している。

10

【実施例2】

【0068】

フォトンカウンティングに於けるピンタイムを0.5 μ 秒に変更して、その他は、実施例1と同一の条件にて光計測・データ処理を行い、発光粒子の信号の検出を行った。図9は、ノイズ信号除去処理に於ける所定時間間隔 t_h を種々変更して、上記の発光粒子の信号の検出処理を実行した場合の緩衝液及び色素溶液についての発光粒子の信号として判別されたパルス信号の数を、所定時間間隔 t_h に対して棒グラフの形式にて表した図である。図中に於いては、色素溶液に於ける検出パルス信号数と緩衝液に於ける検出パルス信号数との差分が示されている（ノイズ信号除去処理なしの場合の差分に対する百分率で示されている）。同図を参照して、ピンタイムを0.5 μ 秒にした場合には、所定時間間隔 t_h が4 μ 秒に設定された際に、色素溶液と緩衝液とに於ける検出パルス信号数の差分が最大となった。このことにより、ピンタイムを変更してもノイズ信号除去処理を実行することにより、発光粒子の信号の検出精度或いはS/N比を改善できることが確認された。また、最適な所定時間間隔 t_h がピンタイムに依存することが示唆された。

20

30

【実施例3】

【0069】

光分析装置に於いて、励起光光路にポーライザを挿入して励起光を一方向に偏光し、検出光光路に偏光ビームスプリッタを挿入して、検出光として励起光の偏光方向に垂直な方向の成分を検出し、その他は、実施例1と同様の条件にて光計測・データ処理を行い、発光粒子の信号の検出を行った。なお、レーザーパワーは、8 mWとし、測定時間は、600秒とし、検出光の波長選択のためのバンドパスフィルターは、透過帯域が675 - 700 nmのものを用いた。なお、励起光と検出光の偏光方向を互いに垂直になるよう選択すると、背景光や散乱光に起因するノイズが大幅に低減されることが見出されている（特願2011-153381参照）。

40

【0070】

図10は、ノイズ信号除去処理に於ける所定時間間隔 t_h を種々変更して、上記の発光粒子の信号の検出処理を実行した場合の緩衝液及び色素溶液についての発光粒子の信号として判別されたパルス信号の数を、所定時間間隔 t_h に対して棒グラフの形式にて表した図である。図中に於いては、色素溶液に於ける検出パルス信号数と緩衝液に於ける検出パルス信号数との差分が示されている。図から理解される如く、所定時間間隔 t_h が20 μ 秒のときに、色素溶液と緩衝液とに於ける検出パルス信号数の差分が最大となった。差分が最大となる所定時間間隔 t_h が変化したのは、背景光や散乱光が低下し、時系

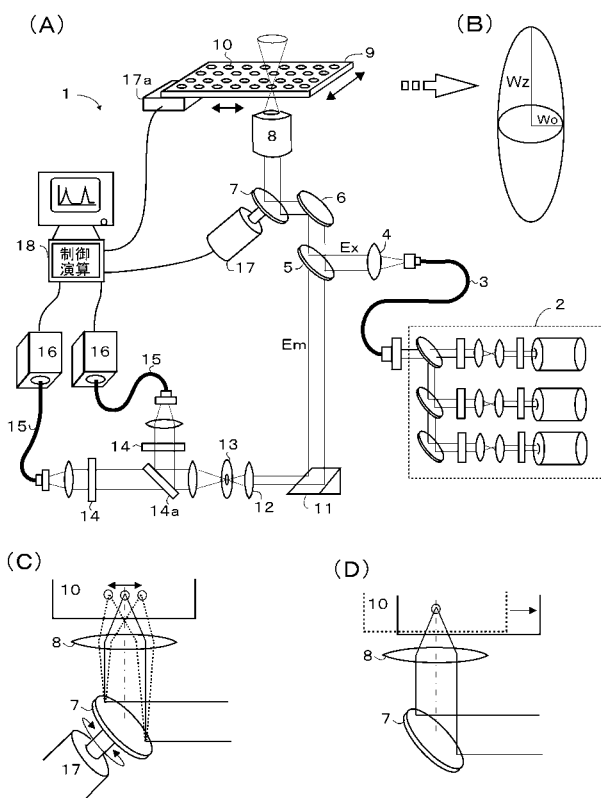
50

列フォトンカウントデータ上に於いてノイズ信号が大幅に低減したためであると考えられる。

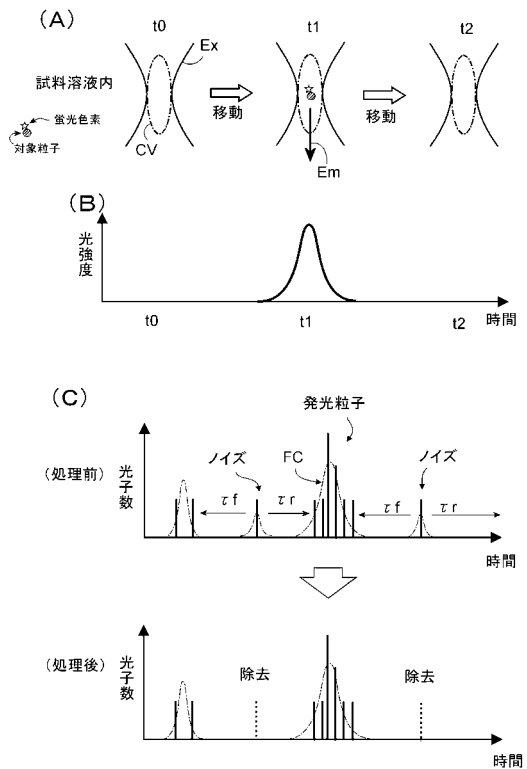
【 0 0 7 1 】

かくして、上記の実施例の結果から理解される如く、本発明の教示に従って、走査分子計数法に於いて取得された時系列光強度データに対してノイズ信号除去処理を実行してノイズ信号を或る程度低減してから、時系列光強度データ上に於ける発光粒子の信号の検出処理を実行することにより、発光粒子の信号の検出精度が向上し、S/N比が改善される。

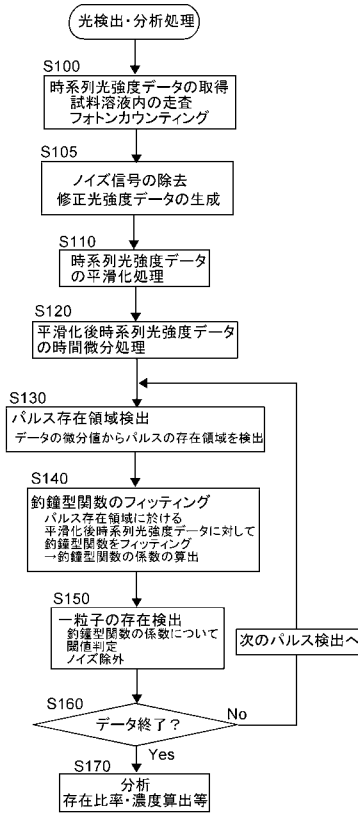
【 図 1 】



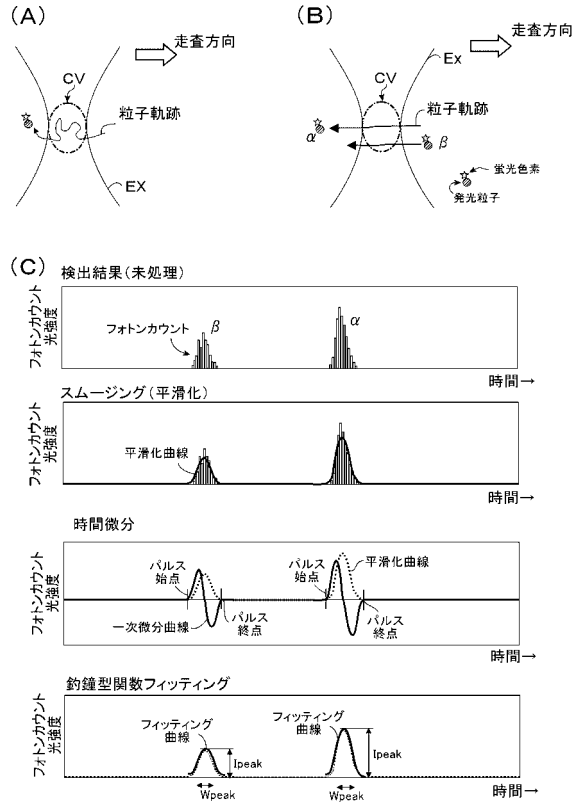
【 図 2 】



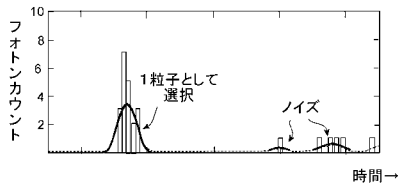
【 図 3 】



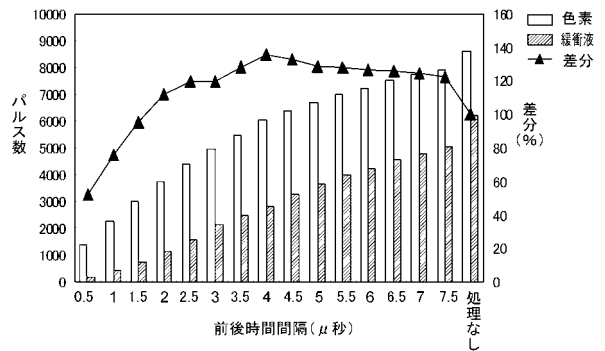
【 図 4 】



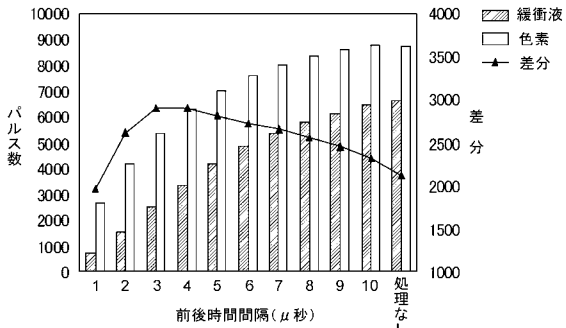
【 図 5 】



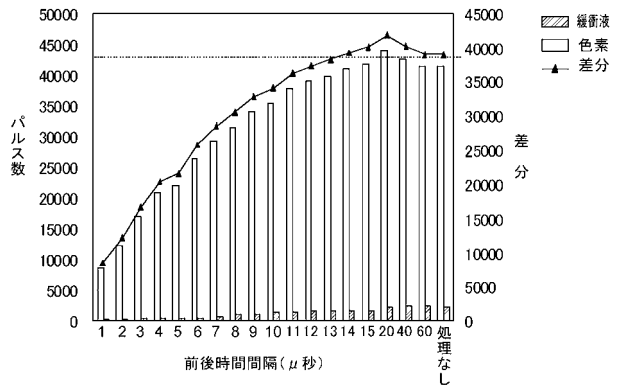
【 図 9 】



【 図 8 】

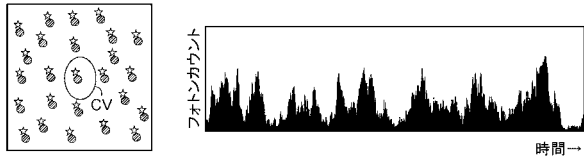


【 図 10 】

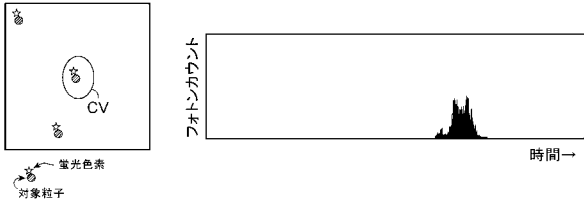


【 図 1 1 】

(A) 高濃度 (e.g. ~1nM)

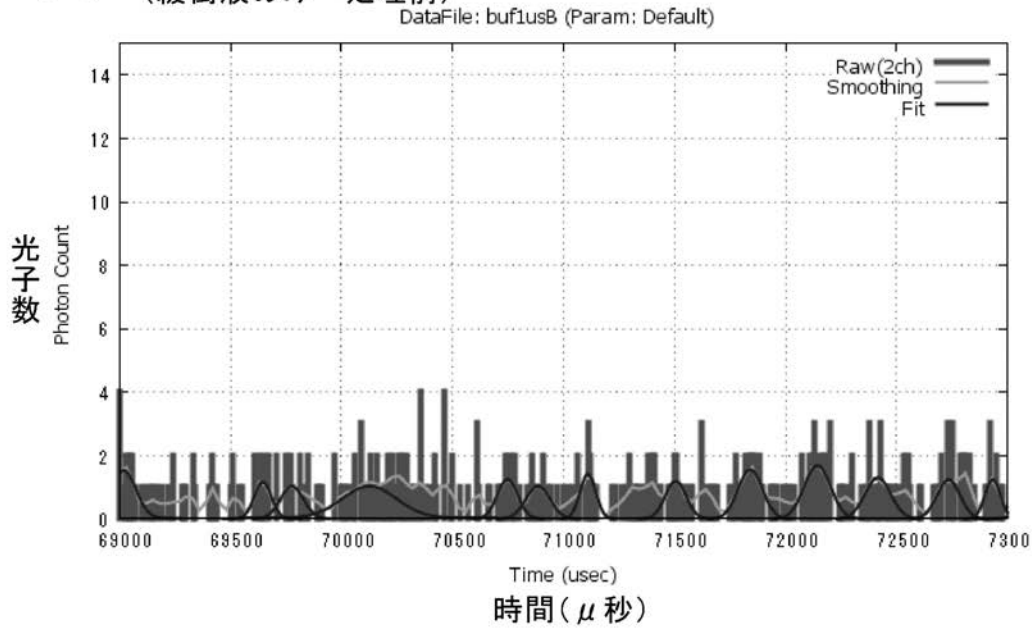


(B) 低濃度 (e.g. ~1pM)

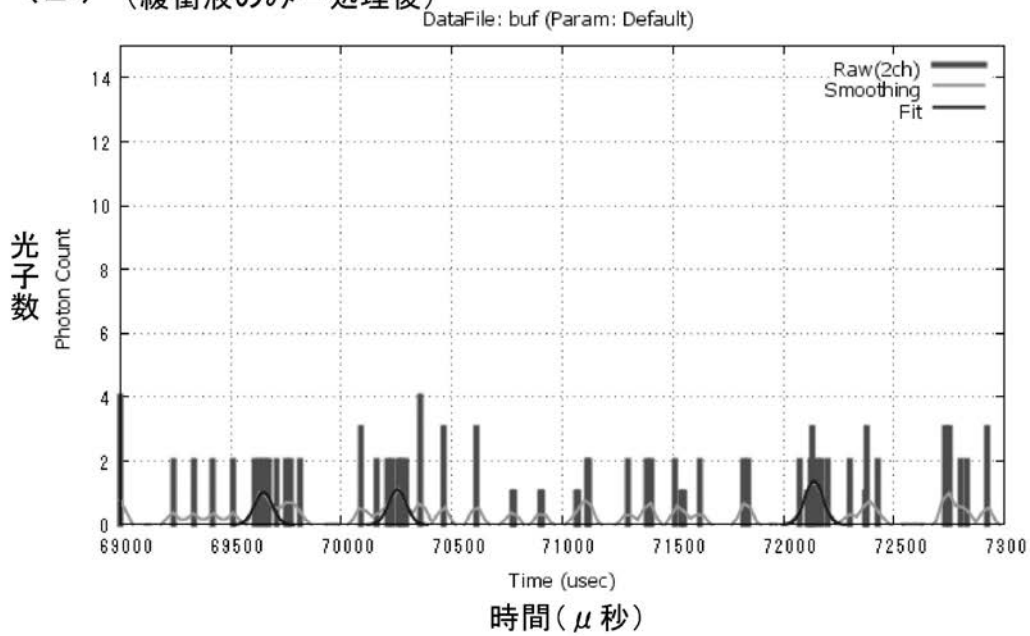


【 図 6 】

(A) (緩衝液のみー処理前)

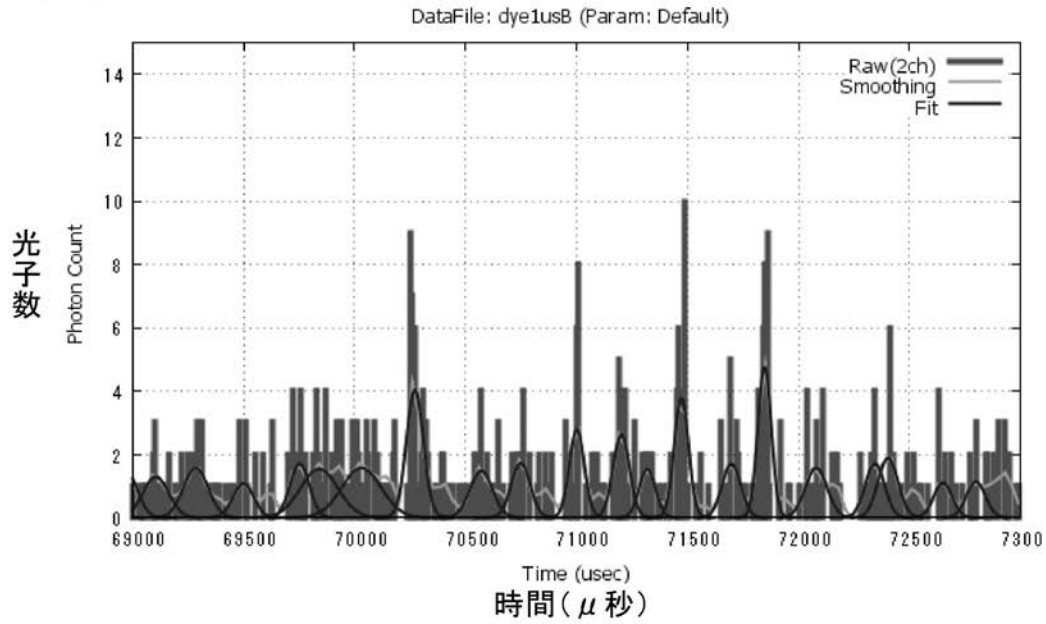


(B) (緩衝液のみー処理後)



【 図 7 】

(A) (1pM ATTO647N—処理前)



(B) (1pM ATTO647N—処理後)

