

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3761898号
(P3761898)

(45) 発行日 平成18年3月29日(2006.3.29)

(24) 登録日 平成18年1月20日(2006.1.20)

(51) Int.C1.

F 1

GO1N 33/543 (2006.01)
GO1N 21/78 (2006.01)GO1N 33/543 575
GO1N 21/78 C

請求項の数 10 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-525237
(86) (22) 出願日	平成9年11月18日(1997.11.18)
(65) 公表番号	特表2001-506750(P2001-506750A)
(43) 公表日	平成13年5月22日(2001.5.22)
(86) 國際出願番号	PCT/FI1997/000704
(87) 國際公開番号	W01998/025143
(87) 國際公開日	平成10年6月11日(1998.6.11)
審査請求日	平成15年11月6日(2003.11.6)
(31) 優先権主張番号	964826
(32) 優先日	平成8年12月3日(1996.12.3)
(33) 優先権主張国	フィンランド(FI)
(31) 優先権主張番号	971626
(32) 優先日	平成9年4月17日(1997.4.17)
(33) 優先権主張国	フィンランド(FI)

(73) 特許権者	ソイニ, エルッキ フィンランド国, エフィーエン—2161 O キルヤラ, クリビンギンティエ 20
(74) 代理人	弁理士 石田 敏
(74) 代理人	弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人	弁理士 福本 積
(74) 代理人	弁理士 西山 雅也
(74) 代理人	弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生体特異性二光子励起蛍光検出方法およびそのための装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1の生体特異性試薬が結合されている生体親和性結合固体相としての微粒子、蛍光ラベルで標識付けされている第2の生体特異性試薬、および二光子蛍光励起に基づく蛍光検出システムを用い、上記微粒子と分析物および上記第2の標識試薬とを反応体積中で同時に接触させ、前記構成成分の反応生成物の形成を開始させ、上記微粒子を蛍光検出の期間にわたってトラップすることが可能な二光子励起レーザー光線を反応懸濁駆中に集束させ、そして上記微粒子が上記レーザー光線の焦点体積を通ってランダムに浮遊する際に個々の微粒子からの蛍光発光を測定する、生物学的流体または懸濁液における生体親和性反応の終点の測定方法およびそのリアルタイム動力学の監視方法であって、

機械式走査装置または光学式走査装置により、試料懸濁液中で上記レーザー光線の焦点を動かすこと、および

上記微粒子を二次元トラップにトラップし、上記走査装置の走査速度を個々の微粒子からの蛍光発光を測定する期間にわたって減じ、光の散乱または反射を測定する検出器から得られる信号によって上記走査装置の動きを制御すること、

を特徴とする方法。

【請求項 2】

散乱または反射を測定するための光学的装備が共焦点型のものであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

- 上記反応が平衡に近付く前の上記反応の初期の間に、特定の時間 $t_1 + t$ における信号強度 I の成長速度 dI/dt を分析物濃度 p の関数として表示するパラメーター $g = G(p)$ を、ある時点で、または多くの時点で、またはある期間内記録すること、および
- 上記標識付けされている反応生成物の信号応答 $R = R(t_2, p)$ (t_2 は特定の反応時間であり、p は分析物濃度である) を上記反応の終点において測定すること、および
- 上記分析物 P の濃度 p が上記第 1 の試薬の濃度よりも低いまたは高い場合に、それぞれ、標準曲線 $p = R'(R)$ または $p = G'(g)$ に基づいて上記分析物の濃度を測定すること、

を特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

10

時間の関数として測定される信号強度の曲線に多項関数をフィッティングすることによって信号強度の成長速度を測定し、前記多項関数の係数から上記分析物の濃度 p を測定することを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

上記フィッティングに使用される関数が一次であり、前記関数の勾配から上記分析物の濃度を測定することを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

上記生体特異性試薬の蛍光ラベルが蛍光微小粒子であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

20

第 1 の生体特異性試薬が結合されている生体親和性結合固体相としての微粒子、蛍光ラベルで標識付けされている第 2 の生体特異性試薬、および二光子蛍光励起に基づく蛍光検出システムを用い、上記微粒子がレーザー光線の焦点体積を通ってランダムに浮遊する際に個々の微粒子からの蛍光発光を測定するために反応懸濁液中に集束させることができる二光子励起レーザー光線を発生させるための手段を用い、上記微粒子のための光学トラップを行うことができるレーザーを用いる、生物学的流体または懸濁液における生体親和性反応の終点の測定およびそのリアルタイム動力学の監視のための装置であって、

上記レーザーの出力および対物レンズ開口数が、上記二光子励起レーザー光線の焦点体積内で光学トラップを行うのに最適化されていること、

上記微粒子を含有している試料を上記レーザー光線の焦点に関して動かすための機械式走査装置または光学式走査装置が組み込まれていること、および

上記走査装置の走査速度を個々の微粒子からの蛍光発光を測定する期間にわたって減ずるための制御系が組み込まれ、上記走査装置の動きが光散乱検出器から得られるトリガー信号によって制御されること、

を特徴とする装置。

【請求項 8】

30

上記装置に、上記レーザー光線と共に焦点の光散乱検出器が組み込まれていることを特徴とする、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 9】

40

上記装置に、反応成分がその上に計量分配される平らな薄い基材が組み込まれていること、および上記基材の材料が、上記液体の表面張力により反応体積が液滴の形を表面上で保つことができる疎水性材料から選ばれたものであること、を特徴とする、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 10】

上記基材がプラスチック箔製のテープであることを特徴とする、請求項 9 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

本発明の背景

免疫学的検定は確立された生体特異性検定方法であり、日常の診断および研究所において幅広く使用されている。生体特異性検定のもう 1 つの群は DNA - RNA ハイブリダイゼーション検定である。生体特異性検定においては、2 つの生体特異性プローブ、第 1 プロ

50

ープおよび第 2 プローブ（すなわち抗体、DNA または RNA プローブ）が通常使用される。それらは両方共、分析物分子の特定のデターミナントに結合され、3 分子の錯体（サンドイッチ構造）を形成する。普通は、これら 2 つの試薬の一方に標識付けを行う。現今では、一般に使用されるラベルは、放射性同位体、酵素、発光ラベルおよび蛍光ラベルである。検定を受けるもっとも一般的な試料材料は血清である。

本発明に係る方法は、固体マトリックスとして役立つ微粒子に生体特異性試薬が取り付けられている生体特異性蛍光検定に関する。当該成分が取り付けられている固体マトリックスは後に固体相と呼ばれる。第 2 の生体特異性試薬は蛍光ラベルで標識付けされており、後に単純にラベルと呼ばれる。それらの機能的な原理に関連して、検定は 2 つの主要な群、1) 過剰の試薬が固体相に結合されている検定（免疫学的には免疫測定(immunometric) 検定と呼ばれる）、および 2) 限られた量の試薬が固体相に結合されている検定（これらは競合的検定と呼ばれる）、に分けることができる。10

第 1 のタイプは、少なくとも 2 つの特異性デターミナントを提供することができる分析物 Ag に適用可能である。このタイプの検定においては、固体相に結合されている生体特異性試薬 Ab の初期濃度は分析物 Ag の量を超えており、当該反応におけるもう一方の試薬は標識付けされた試薬 Ab* である。錯体 Ab-Ag-Ab* は当該固体相に結合され、当該検定の信号応答は線形である。DNA 検定および RNA 検定もまた同じ原理に従って行われる。第 2 のタイプは、少量の分析物分子 Ag に適用可能である。この検定においては、固体相 A に結合されている生体特異性試薬 Ab は当該分析物に関して限られた濃度である。当該反応におけるもう一方の試薬は標識付けされた分析物分子 Ag* である。すなわち、当該標識分析物分子が試薬として使用される。成分 Ag および Ag* は、それらの相対濃度に比例して固体相の試薬 Ab に結合する。この反応は競合的結合反応として知られており、このタイプの検定の信号応答は非線形である。20

これら 2 つの主要な群の他に、本発明の方法は、異なる生体分子 Ab と Ab* との間での反応動力学の研究、すなわち反応生成物の形成の時間の関数としての監視に適用可能である。これらの研究においては、標識分子 Ab* が固体相の分子 Ab に如何に結合するかを単純に監視する。

本明細書において前に使用した記号 Ab、Ag、Ab* は、一般的な生体特異性分子を指しており、免疫学的な抗体および抗原に限定されるものではない。

従来の検定および調査方法に伴う問題はそれらの複雑さにある。例えば、蛍光免疫測定検定法による血液からのホルモンの測定は、血清からの細胞の分離、当該血清試料の計量分配および希釈、固体相との定温放置、洗浄による遊離分の分離、ラベルとの定温放置、洗浄による遊離分の分離、測定溶液の添加、並びに信号の測定という多くの工程を必要とすることが多い。30

従来の蛍光検定においてはヘモグロビンの強い光吸収が測定に影響を及ぼすため、血清からの細胞の分離が必要である。上記において言及した第 1 のタイプの検定においては、2 つの別個の階段において試薬を添加し、これらの工程の間に結合分から遊離分を分離しなければならず、さもなくば、分析物濃度が固体相の結合容量を超える場合には、当該検定の応答（すなわち生成物 Ab-Ag-Ab* の濃度）が減少する。この有害な現象は、すべての検定成分が同時に添加された場合にのみ発生し、文献において「フック効果(hook effect)」と呼ばれている。遊離のラベルもまた分離されなければならず、さもなくば、当該遊離のラベルに起因する高いバックグラウンド信号のために、結合したラベルからの信号を測定することができない。40

日常の診断において、より単純で、より原価効率の高い分析への要求が常に存在する。蛍光ラベルを使用する本発明の新しい生体特異性検定法はただ 1 つの工程しか必要とせず、当該ラベルの分離を必要とせず、そして全血または他の生物学的懸濁液における検定に特に好適である。さらに、本発明により、生体親和性反動力学のリアルタイム測定を行うことが可能となる。

二光子励起

二光子励起は、強力な光源を集束させることによって、単位体積あたりおよび単位時間あ50

たりの光子の密度が、2個の光子が同一の発色団中に吸収されるのに十分高くなる場合に起る。この場合、吸収されるエネルギーは当該2個の光子のエネルギーの合計である。確率概念によれば、染料への单一の光子の吸収は独立事象であり、複数の光子の吸収は单一の独立事象の連続である。单一の光子の吸収の確率は、励起されるべきエネルギー状態が飽和していない限り、線形関数として説明することができる。2個の光子の吸収は非線型過程である。二光子励起においては、染料分子は両方の光子が同時に吸収された場合にのみ励起される。2個の光子の吸収の確率は、単一の光子の吸収の確率分布の積に等しい。従って、2個の光子の発光は二次過程である。

蛍光励起に使用される光学系の性質は、点状光源に対する当該系の応答によって説明することができる。点状光源は、回折のために、当該光学系に特徴的な焦点面における強度分布を形成する（点像分布関数）。正規化すると、この点像分布関数は、光源からの光子が焦点領域に如何に到達するかという確率分布である。二光子励起においては、励起の確率分布は、当該2個の光子の強度分布の正規化された積に等しい。このようにして導かれた確率分布は三次元的であり、特に鉛直方向においては、単一の光子よりも制限されているのは明らかである。従って、二光子励起においては、焦点の明確に限られた三次元的近傍において形成される蛍光のみが励起される。10

染料が二光子励起される場合には、焦点近傍における光および工学部品からの光の散乱は、通常の励起と比較して著しく減じられる。そのうえ、二光子励起は、当該焦点の外の、試料の周囲における、および工学部品におけるバックグラウンドの蛍光を減ずる。励起光線はできるだけ小さな点に集束されなければならないので、二光子励起は、小さな試料の体積および構造の観察にもっとも好適であり、本発明に係る方法においても同様である。20
二光子励起の利点は、例えば、紫外または青の領域における励起に、可視光または近赤外（NIR）光を使用することができるという事実にも基づいている。同様に、可視領域における励起をNIR光によって達成することもできる。光源の波長が染料の発光波長よりも相当長いため、ローパスフィルター（少なくとも10桁の減衰）を使用して、光源の波長における散乱および起こりうる自己蛍光が検出器に達するのを防ぐことによって、それらを有効に減衰させることができる。

二光子励起において、2個の光子を同一の発色団中に吸収させるためには、単位体積あたりおよび単位時間あたりの光子の密度が非常に高くなければならないので、繰返し数を多くショートパルスを発生するレーザーを使用するのが有用である。30
三光子励起のための実用的なレーザーは例えばパルス幅が1nsの受動QスイッチNd:YAGレーザーである。
本発明の目的および要約

本発明の目的は、固体相として微粒子を用いる改良された生体特異性検定法および装置に関する。本発明のもう1つの目的は、本発明者によって国際公開第96/22531号パンフレットに記載されているマルチパラメトリック法および装置を改良することである。本発明に係る方法においては、生体特異性試薬を蛍光ラベルで標識付けする。当該蛍光励起は二光子励起に基づいている。二光子励起は回折限界焦点体積に制限されるので、一度に1個の微粒子だけが二光子励起される焦点体積に存在し、当該焦点体積の外の遊離のラベルは有意なバックグラウンド信号はまったく寄与しない。

上記において言及され、国際公開第96/22531号パンフレットに記載されている方法および装置により、非常に小さな試料体積についての分離不要な検定が可能となるけれども、示されている形の検定システムの方法論的および機器的な構成は、複雑な微小流体工学システムを必要とする。本発明の目的は、前記方法および装置をさらに改良することである。当該方法および装置をさらにより単純でより原価効率の高いものとするために、本発明の改良は以下の設計上の要求条件に関連している。40

- 1) 血清の遠心分離を回避することへの关心の高まりのために、細胞を分離することなく全血または他の細胞懸濁液中において行われる検定はより潜在能力のあるものになる。
- 2) 液体の取り扱いシステムを単純化することにより当該システムのコストを強力に削減する。
- 3) 特定の分析物の診断濃度が非常に大きなダイナミックレンジに及ぶ。さらに、マルチ

パラメトリック検定システムにより、異なる分析物（臨床標準濃度（clinical reference concentration）が下端にある1つの分析物と、臨床標準濃度が上端にあるもう1つの分析物）の同時測定を可能とすべきである。結果として、必要とされる全ダイナミックレンジは数桁である。

4) 検定は速くなければならない。これは、微粒子が高速で測定され、各々の粒子から得られる信号が十分に強くなければならないことを意味する。

本発明の方法の非常に重要な点は、レーザー光線を反応懸濁液に直接集束させることによって単純に検定を行うことができ、複雑な液体取り扱いシステムおよび液体流動システムを必要とすることなく微粒子の表面上での錯体の形成を監視することができるということである。本発明は、著しい方法論的な単純化につながるのみならず、上記に規定されている検定の要求条件を満たす他の多くの有用な特徴（本明細書において後に考察する）をも可能にする。10

本発明の本質的特徴は請求項において示されている。

本発明の方法は、生物学的流体または懸濁液における生体親和性反応の終点の測定およびそのリアルタイム動力学の監視に関する。当該方法は、第1の生体特異性試薬が結合されている生体親和性結合固体相としての微粒子、蛍光分子または蛍光微小粒子で標識付けされている第2の生体特異性試薬、および二光子蛍光励起に基づく蛍光検出システムを用いる。当該微粒子と分析物および当該第2標識試薬とを反応体積中で同時に接触させ、前記構成成分の反応生成物の形成を開始させる。分析物濃度に関連する信号を得るために、当該反応懸濁液中に二光子励起レーザー光線を集束させ、そして当該微粒子が当該レーザー光線の焦点体積を通ってランダムに浮遊する際に個々の微粒子からの蛍光発光を測定する。20

本発明の方法を実施するのに必要とされる装置は、生体親和性反応の終点の測定およびリアルタイム動力学の監視を行う。当該装置には、二光子励起レーザー光線を発生させるための手段が組み込まれており、微粒子が当該レーザー光線の焦点体積を通ってランダムに浮遊する際に個々の微粒子からの蛍光発光を測定するために、反応懸濁液中に二光子励起レーザー光線を集束させることができる。

本発明の詳細な説明

好ましい態様

好ましくは二光子蛍光励起に使用されるのと同じレーザー光線を用いて行われる光学トラップにより微粒子を蛍光検出の間トラップすることを意味する能動トラッピング技法によって上記測定の効率を改良することができる。微粒子を含有している試料をレーザー光線の焦点に関して動かす機械式走査装置または光学式走査装置によってトラッピングの衝撃係数を改良することができ、微粒子からの光の散乱または反射を測定している共焦点検出器から得られる信号によって当該走査装置の動きを制御することができ、蛍光発光測定の間、走査速度を減ずる。30

本発明の方法は以下の工程を行うことによって当該検定のダイナミックレンジを改良することに関する。

- 反応が平衡に近付く前の反応の初期の間に、信号の成長速度を示すパラメーター g を、ある時点で、または多くの時点で、またはある期間内記録し、そして40

- 反応の終点において、標識付けされている反応生成物の信号応答 R を測定し、そして

- 分析物 P の濃度 p が第1試薬の濃度よりも低いまたは高い場合に、それぞれ、標準曲線 $p = R' (R)$ または $p = G' (g)$ に基づいて分析物の濃度を測定する。ここで、 $p = R' (R)$ および $p = G' (g)$ は、それぞれ、後述する第2の標準曲線 $R = R(p)$ および第1の標準曲線 $g = G(p)$ の逆関数である。

時間の関数として測定された信号強度の曲線に多項関数をフィッティングすることによって信号強度の成長速度を測定し、前記多項関数の係数から当該分析物の濃度 p を測定する。フィッティングされた関数が一次である場合は、前記関数の勾配から分析物の濃度を測定する。

好ましい態様によれば、上記装置は、対物レンズおよび微粒子のための光学トラップを行50

うために前記対物レンズを通して反応体積中に集束させることができるレーザーを具備しており、当該レーザーの出力および当該対物レンズの開口数は二光子励起焦点体積内で光学トラップを行うのに最適化されたものである。当該装置には、微粒子を含有している試料をレーザー光線の焦点に関して動かすための、光散乱検出器から得られるトリガー信号によって制御される、機械式走査装置または光学式走査装置、並びに蛍光検出の間、走査速度を減ずるための制御系を組み込むことができる。当該光散乱検出器は上記レーザー光線と共に焦点となっている。当該装置には、反応成分がその上に計量分配される平らな薄い基材（例えばプラスチック箔）を組み込むことができ、当該基材の材料は、液体の表面張力により反応体積を液滴の形で表面上に保つことができる疎水性材料から選択することができる。

10

上記方法は、例えば、以下のように実施することができる。

測定されるべき分析物を含む試料および生体特異性標識試薬を、生体特異性試薬でコーティングされた微粒子と同時に接触させる。生体親和性のために、上記分析物および標識付けされた生体異性試薬からなる錯体が上記微粒子の表面上の固体相に結合される。当該反応懸濁液の構成成分を薄い透明な基材の表面上に計量分配し、上記基材を通して近赤外（NIR）パルスレーザーからの光線を上記反応懸濁液中に集束することができるようとする。上記反応懸濁液の体積は、当該反応体積を当該平らな表面上または浅い液溜め中に液滴として保つのに十分小さい（例えば、1 μL）。

上記レーザー光線の焦点体積は回折によって制限されるので、当該光線は一度に单一の微粒子にのみ集束される。上記懸濁液の動きのために、上記微粒子がランダムに動いて当該焦点体積に入ったり出たりする。浮遊して当該焦点体積中に入る各々の微粒子の表面上のラベルは二光子吸収によって励起され、その蛍光発光は光子検出器で測定される。当該検出器から得られる光子計数率に比例する信号は反応速度および分析物の濃度に依存している。信号の成長を追跡することによって、反応が平衡に達してしまう前の動力学的反応パラメーターおよび分析物濃度についての情報を得ることが可能である。

20

反応体積中の錯体形成の直接測定

この生体特異性検定における固体相として単分散微粒子を使用することにより、迅速な生体親和性反応が確保される。微粒子の表面上で起こる反応においては、反応成分間の平均距離が非常に小さいので、急速に反応平衡に達する。0.01～100 μmの直径を有する単分散球状微粒子は、水懸濁液に良好に適するように適當なポリマー、ガラス、および他の光学的に透明な材料から製造することができる。物理吸着並びに共有結合によって、高分子の結合に好適な表面特性を提供することができる。

30

生体特異性反応の固体相として機能する微粒子は、試料および試薬を含む懸濁液中で、連続的にランダムに動いている。この動き（拡散と呼ばれる）は熱振動力によって生ずる。当該拡散の進路としては、粒子は二光子励起焦点体積を通ってランダムに浮遊し、微粒子の表面上の蛍光ラベルの量に比例している信号が記録される。当該蛍光信号の持続時間は通過時間(transit time)、すなわち焦点体積中に微粒子が留まっている時間に依存する。3 μmの粒子についての通過時間の長さは、拡散理論に基づいて計算すると、1ミリ秒のオーダーであると予想される。

しかしながら、微粒子を自由拡散によって焦点体積中にランダムに浮遊させる場合には、3 μmの粒子についての通過時間が300msのオーダーとなる場合があることが認められた。このことは、二光子励起に必要とされる強いレーザー光線が、レーザーの出力および対物レンズの開口数に応じて二次元的光学トラップまたは三次元的光学トラップのいずれかとして機能することの発見につながった。当該三次元的トラップにより、当該トラップから粒子が放出されるまでのトラッピング時間を長くすることができる。このことは、例えばレーザーを短時間消すことによって達成することができる。

40

上記光学的トラッピング効果は、レーザー照射によって引き起こされる放射圧および斥力に基づくものである。トラッピング力の方向および強さは、粒子の大きさ、形状、および屈折率に依存する。さらに、輻射線の波長並びに粒子の光の吸収度および反射率も重要な役割を演ずる。非常に狭い焦点を有するレーザー光線は軸方向および横方向の両方のト

50

ッピング力を生ずるであろう。より小さな集束角を有するレーザー光線（集束レンズの開口数が小さい）は、横方向にはトラッピング力を、軸方向には推進力を生ずるであろう。この後者の場合、微粒子が浮遊して焦点体積の近傍に入ると、この焦点体積内の二次元のポテンシャル井戸の中に落ち、推進力によって当該焦点体積から押し出されるまでは、そこに留まるであろう。光学トラップの理論および用途については文献に記載されている(Ashkin A., Phys. Rev. Lett. 24(4):156, 1970 ja Ashkin, A., Dziedzic, J.M., Bjorkholm, J.E., and Chu, S. Opt. Lett. 11(5):288, 1986)。

図1は、二元の場合の焦点の周りでの二重煙突の形状のレーザー強度プロフィール（点像分布関数）についての輪郭モデルを示している。鉛直軸はレーザー光線の方向である。輪郭は相対強度分布を示している。当該モデルは、Richards & Wolfによって1959年に示された理論（例えば、Stamnes, J.J. (1986), Waves in focal regions: Propagation, Diffraction and Focusing of Light, Sound and Water Waves, pp. 461-. Bristol, England: Adam Hilger Imprint by IOP Publishing Limitedにおいて見出すことができる）に基づいて計算されたものである。1目盛り単位の寸法は4 μmである。このモデルにおける対物レンズの開口数は0.65である。粒子が曝される放射圧により、当該粒子が橢円形状の二光子励起体積中に吸い込まれ、次に鉛直軸の方向に押し出される。図1は、3 μmの粒子が二光子励起下で上記煙突の中を移動し、焦点の中心を通って動き、比較的長い時間留まる様子を示している。二元トラップの使用により、如何なる場合においても、粒子が横向きの拡散にのみ影響される場合よりも、はるかに長い平均通過時間となる。結果として、通過時間における光子の合計カウント数はトラッピング効果が無い場合よりも大きい。

本発明者の実験においては、同じレーザーが、蛍光染料の二光子励起および微粒子の二元光学トラッピングの両方のための手段として機能した。この実験においては、1064nmの波長において30mWを生ずる受動QスイッチNd:YAGレーザーおよび開口数が0.65~0.8の対物レンズを使用した。

本発明の関連において、トラッピング効果は、検出される光子の合計カウントを増加させるので、非常に重要であるということが見出された。微粒子は焦点体積中により長く留まり、ランダムに動いている粒子のより多くの部分が焦点の中心を通って浮遊するので、種々の粒子から得られるカウントの変動がより小さい。

全血および他の細胞懸濁液の検定

二光子励起を使用することによって、散乱および自己蛍光によって引き起こされるバックグラウンド信号を排除することができることは既知である（国際公開第96/22531号パンフレット）。驚くべきことに、例えば波長が1064nmの励起光はヘモグロビン（プロトポルフィリンIX）の蛍光を誘発すること無く、ゆえに微粒子懸濁液が著しい量の赤血球を含有している場合でさえ、赤血球によって引き起こされるバックグラウンド蛍光は大きくはないことが発見された。赤血球、特にヘモグロビンによるNIR領域における光吸收が非常に小さいことは明らかであるけれども、より興味深いことに、ポルフィリンの二光子励起エネルギー移動機構は单一光子励起のそれとはまったく異なるらしく、驚くべきことに、懸濁液中の赤血球の自己蛍光は結果としてバックグラウンド信号に少しまだは極僅かしか寄与しない。

ポルフィリンの单一光子蛍光励起と二光子蛍光励起との間の違いに関する観察は、細胞を分離する必要を排除し、自己蛍光によって引き起こされる大きい干渉を伴わずに、細胞懸濁液中で検定を直接行う可能性につながった。

液体取り扱いシステムの単純化

本発明の概念によって提供されるもう1つの可能性は、液体取り扱いシステムの単純化である。これは、単に、反応キュベットまたは基材の透明な窓を通して反応体積中に二光子励起レーザー光線を集束させることによって達成することができる。従って、蛍光信号は、微粒子がランダムに浮遊して、拡散または液体の動きのいずれかのために焦点体積に出入りする際に得られる。

上記反応基材は、非常に小さい体積の試料を多数担持するために作られる。二光子励起に基づく検出システムにより、性能を損なうことなく反応体積を非常に小さくすることが可

10

20

30

40

50

能となり、結果として、実用上の最小反応体積は、検出によるよりも、計量分配技法および試料の蒸発によって制限される。さまざまな見地から、 $1 \mu L$ のオーダーの反応体積が実用的であることは明白である。このような小さい体積は平らな基材にある浅い液溜めに計量分配することができ、この基材には、このような液溜めを多数組み込むことができる。あるいは、当該体積を平らな表面、円板、プレートまたは箔の上に計量分配することもできる。基材の材料が疎水性材料から選択されたものである場合には、液体の表面張力により、反応体積が表面上で液滴の形に保たれる。開口数が大きい対物レンズを用いて、二光子蛍光励起のためのレーザー光線が反応体積に集束されるであろう。このようなレンズは、例えば 0.3mm よりも短い作動距離を有する。ゆえに、懸濁液中で光線を集束させることができるためには、基材は薄い窓、好ましくは 0.2mm よりも薄い窓を提供しなければならない。好適なプラスチック箔（例えば、過フルオロエチレンプロピレン、DuPont 製の FEP 箔）から作られるテープは、薄く、例えば 0.05mm にすることができ、安価であり、このようなテープを大量に当該システムに装填することができるので特に実用的である。上記表面力により、重力に関する基材の状態に関係なく、表面上の定位置に液滴が保たれる。対物レンズは、当該薄い基材を通してまたは直接に液滴中に焦点を合わせることができる。

微小体積の計量分配は、例えば、圧電アクチュエーターの使用に基づく液滴発生器を使用して行うことができる。現在市販されている典型的な液滴発生器は、 $1 \sim 2\text{ kHz}$ の周波数で $0.1 \sim 1\text{ nL}$ の液滴を作ることができる。

反応速度の動力学的監視

レーザー光線を懸濁液中に集束させる場合、粒子が二光子励起に付される際に蛍光信号が得られる。当該蛍光信号の振幅は微粒子上に結合しているラベルの量に正比例しているので、この概念は、平衡までは反応動力学のリアルタイム監視として機能する。微粒子から得られる信号の振幅は、浮遊している微粒子が如何にランダムに焦点体積と交差するかということにも依存する。それにもかかわらず、統計学的に十分な数の微粒子を短時間のうちに測定することができる場合には、当該蛍光強度の監視によって十分正確に生体親和性反応の動力学を追跡することが可能である。

粒子率の増加

生体特異性検定の多くの用途は多数の試料を必要とする。高い試料処理量並びに動力学的反応速度の監視には、高い信号発生量および良好な統計学的精度が短時間のうちに必要とされる。本発明の方法に適用する場合には、これらの要求条件は、高い粒子率および短い計数時間となる。

本発明に係る検定システムにおいては、微粒子は、例えば、拡散のためにランダムに浮遊して、レーザー光線の焦点体積の中に入る。浮遊して当該焦点体積の中に入る微粒子の割合は微粒子の濃度に依存する。当該測定を加速するために、当該懸濁液を動かしてもよく、または当該懸濁液を含んでいるキュベットもしくは何らかの容器を所望の速度で攪拌するか、もしくは回転させてもよい。当該動きが速いほど、ランダムに浮遊して当該焦点体積を通る粒子の割合が高くなる。

上記粒子率（秒あたりに焦点体積を浮遊して通る粒子の数）は、粒子の濃度に比例している。検定における粒子の大きさおよび濃度には、検定の性能パラメーターに依存する最適値があり、小さい粒子および比較的低い濃度を使用するのが好ましい。例えば、 $2 \mu m$ の粒子を使用する場合には、最高性能のために最適な粒子の濃度は 10^7 粒子 / mL未満であり、これは、自由拡散によってほどよい粒子率を得るために必要とされる濃度よりも少なくとも 1 衍は低い。蛍光発光は粒子が焦点体積を横切って動き、二光子励起下にある間にのみ起こる。小さい粒子は大きい粒子よりも速く動き、はるかに短い時間しか焦点体積中に留まらない。このことは、全励起時間と全経過時間との間の比である励起衝撃係数の定義につながる。上記に示した例においては、当該衝撃係数は 10^{-2} のオーダーであり、非常に低い。このような低い衝撃係数は、経過時間の非常に少ない部分についてのみ計数が有効であり、結果として光子のカウント数が少ないままとなり、要求される統計学的精度に必要な全計数時間が長いことを意味する。

10

20

30

40

50

懸濁液または反応室を焦点に関して動かすことによって粒子率を増やすことができる。当該動きの速度を上げることによって粒子率を増大させる。100 μm / s以下の走査では3 μmの粒子は二次元トラップ内に保たれるけれども、走査速度を増大させると、粒子が焦点トラップから放出される。走査速度を増大させると、光学トラッピング力が粘性摩擦力に耐えることができないため、光学トラップのトラッピング力はトラップ中に粒子を保つには小さすぎる。ゆえに、速度を増大させると、同じ割合で通過時間がより短くなり、衝撃係数は同じ低いレベルのままである。

しかしながら、能動トラッピング技法によって上記衝撃係数を改良することができる事が見出された。これは、微粒子懸濁液を焦点に関して動かすか、またはその逆のための電子制御の機械的または光学的走査システムを使用することによって達成される。当該動きは、拡散よりもはるかに急速に新しい粒子を焦点体積中に入れるのに十分速くなければならない。微粒子によって発生する信号が検出されると、検出器から走査システムへのフィードバックにより、走査速度が直ちに下げられる。走査速度は短時間の間だけ下げられる。二次元トラッピングを使用している場合には、焦点の煙突における微粒子のトラッピング時間に等しい時間にわたって走査速度が下げられる。この短い時間の後、新しい粒子を見出すために走査速度が再び回復される。

反応キュベットのための機械式ステージ走査装置を使用して半径0.5mmの円形走査運動を行うことによって、上記衝撃係数を大幅に改良することができる事が見出された。レーザー出力および対物レンズの開口数を最適化することにより、通過時間をより短くし、粒子率をより高くすることができる。

電気機械式、検流計式、または圧電式のアクチュエーターによって上記機械式トラッピング走査装置を操作することができる。トラッピング走査装置の制御に必要とされる信号はレーザーの波長における散乱検出器からもっとも良好に得ることができる。ラテックスまたは高い屈折率を有する他の光学的に透明な材料で作られた微粒子を使用する場合、散乱信号は強い。走査速度を下げ、トラッピング効果を発揮させるためには、二光子励起焦点体積に微粒子が近づいた際に、十分早くに散乱信号が必要とされる。散乱検出器の前に適当なピンホールを有する共焦点散乱検出システムを使用することによって、空間散乱応答関数の大きさを最適化することが可能である。

蛍光信号強度

二光子蛍光励起は、単一光子励起の信号レベルと比較して非常に低い信号レベルの原因となる場合が多い。しかしながら、バックグラウンド信号もまた非常に低いので、單一分子レベルに匹敵するほどの高い感度を得ることができる。この高い感度にもかかわらず、信号発生量が低いと計数時間が長くなる場合がある。処理量を高くするには、および特に動力学の監視には、秒あたりに検出される光子で表される信号強度を最大化することが重要である。市販の蛍光ラテックス微小粒子が生体特性試薬の標識付けに非常に有用であることが見出された。1つの抗体または少数の抗体を共有結合的または受動的に(passively)このような微小粒子に標識付けすることができる。直径が10~100nmの微小粒子には多数の蛍光染料分子を取り込むことができる。20nmの微小粒子には例えば1000個の蛍光分子を取り込むことができ、当該信号強度は單一分子の信号強度よりも1000倍大きい。さらに、微粒子の内部の染料分子は、溶液中の遊離分子よりも、溶媒消光、自己消光に付されることがより少なく、発光帯域もより狭く、それらは、同じレベルの励起において、より高い蛍光収量およびより良好な分光分解能に寄与する。

大きいダイナミックレンジ

検定信号応答Rとは、分析物濃度pの関数としてラベルから得られる信号強度Iの値を指す。信号強度Iとは、特定の時間tにラベルから得られる信号の強度を指す。信号応答のピーク値とは、検定の信号応答、すなわち標準曲線が、その最高値(図6における点H)に達する点を指す。

従来の検定法に伴う問題は、それらの複雑さ、および動力学が試薬の濃度未満の値に制限されるということにある。普通、試薬は2つの別個の工程で反応キュベット中に添加されなければならず、当該キュベットはこれらの工程の間に洗浄されなければならない。

10

20

30

40

50

2つの工程の使用および洗浄の目的は、固体相の結合容量に応じて検定応答を制限することである。これは、単一工程検定においては、分析物濃度 p が第1試薬の結合容量を超えると信号応答 R が減少するので必要である。分析物 A_g の濃度が試薬の結合容量を超えるとすぐに、反応生成物が、錯体 $A_b A_b^*$ の他に、固体相、 A_b 、および分析物 A_g の濃度の相対的な割合で形成される錯体 $A_g A_b^*$ を含むようになる。第1試薬 A_b の結合容量に関して過剰の分析物 A_g の量が多くなるにほど、検定信号応答 R は弱くなる。この有害な現象は、すべての検定成分を同時に計量分配した場合にのみ発生し、文献においては「フック効果」と呼ばれている。当該フック効果のために、検定応答が不明瞭となり、ゆえに、システムのダイナミックレンジは、通常は、第1試薬 A_b の容量に応じて制限される。そのうえ、従来の手順で起こりうる誤った結果を防ぐためには、分析物 A_g が第1試薬 A_b と反応した後に、好適な方法を使用して、反応溶液中の潜在過剰材料が反応溶液から分離される。試薬の一方が、例えば、キュベットの表面上の固体相に結合する場合、もっとも一般的な分離方法はキュベットの洗浄である。

日常の診断において、より単純で、より原価効率の高い分析への要求が常に存在するけれども、上記フック効果に起因する誤った結果の危険性のために、単一工程検定を広範囲に使用することは制限されてきた。本発明の当該特徴は、従来の多工程検定によるよりも大きいダイナミックレンジを有する単一工程検定を可能とし、上記フック効果に起因する誤った結果の危険性を排除する。

本発明の当該態様の特色は、本明細書に示されている測定システムが錯体 $A_b A_g A_b^*$ から発せられた信号と遊離の標識試薬から発せられた信号とを光学的に区別することができることである。さらに、本発明の当該態様の特色は、試料、第1試薬、および第2試薬を同時に添加し、反応生成物の信号強度を、反応の開始から時間の関数として監視することである。以降これを動力学的測定と呼ぶ。動力学的測定により、反応が平衡に達するずつと前の分析物の濃度についての情報が得られる。信号強度の成長速度 dI/dt は初期分析物濃度 p に比例しており、この情報を反応の早い段階において使用して、およその分析物濃度、より具体的には、分析物濃度が第1試薬 A_b の結合容量よりも高いかどうかを見積もることができる。従って、当該動力学的測定により、標準曲線におけるピーク値 H (図6) の右側または左側のいずれで反応が平衡に達するかが特定される。当該反応動力学に基づいて、固体相の結合容量を超える分析物濃度が観察されるので、誤った結果の危険性を伴わずに、従来の検定法と比較して、より高い分析物濃度での測定が可能となる。このようにして、システムのダイナミックレンジをかなり広げることができる。例えば、普通の3桁のダイナミックレンジを本発明の方法を用いて5~6桁に増大させることができる。

本発明の実施上の態様は以下の工程によって特徴づけられる。

- 既知の標準試料を使用することによって、較正目的の2つの標準曲線を測定する。第1の標準曲線 $g = G(p)$ は、特定の時間 $t_1 + t$ における信号強度 I の成長速度 dI/dt を分析物濃度 p の関数として表示している。第2の標準曲線 $R(t_2, p)$ は、特定の反応時間 t_2 後の信号応答の値を分析物濃度 p の関数として表示している。

- 未知の試料を測定する際には、信号強度 I を時間の関数として記録し、パラメーター g (信号強度 I の成長速度を特徴づける) を測定する。特定の反応時間の後に、信号応答 R もまた測定する。

- 反応が平衡近くまで進んだら、標準曲線 $g = G(p)$ の逆関数 $p = G'(g)$ を使用して上記未知試料の濃度 p が固体相の濃度 q 未満か、およそそれに等しいか、またはそれより多いかを測定する。

$p < q$ の場合には、標準曲線 $p = R'(R)$ から試料濃度 p を読み取る。

$p > q$ の場合には、標準曲線 $p = G'(g)$ から試料濃度 p を読み取る。そして

$p = q$ の場合には、いずれかの曲線から試料濃度 p を読み取る。

例

適用例を使用して上述の方法をより詳細に説明することができる。図2~7に示されている反応チャート、反応方程式、標準曲線、および信号強度曲線は、数学的モデルを使用し

て作られたものである。

本発明の実例として、固体相に結合された生体特異性試薬を使用する検定を示す。図2は当該検定の反応スキームを示している。当該反応の初期成分は、固体相に結合された生体特異性試薬Ab、分析物Ag、および標識試薬Ab*を含んでいる。成分Ab、AgおよびAb*を反応溶液中に同時に添加する。図3に示されている反応方程式(式1~4)は、ありうる反応および生成物のすべてを包含している。文字kは反応の会合および解離の速度を指す。反応速度は本来大きく異なる。固体相と関連する反応がより遅いのに対して、液体相中で起こっている反応は迅速である。この例において、選ばれた反応定数の値はこれらのタイプの検定に典型的なものである。生体特異性試薬AbおよびAb*の任意の平衡値(親和性)は $K = 1 \times 10^{10} \text{ L/mol}$ である。

10

種々の反応の選ばれた会合速度は以下の通りである。

$$k_1 = 1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_3 = 1 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_5 = 1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_7 = 1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$k_{diss} = k_{ass} / K$ であるので、選ばれた解離定数は以下の通りである。

$$k_2 = 1 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_4 = 1 \times 10^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_6 = 1 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_8 = 1 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

20

さらに、固体相Aに結合されている試薬Abの濃度は $q = 1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ であり、標識試薬Ab*の濃度は $q^* = 1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ であると仮定する。

単純化のために、これらの反応方程式を溶液中の反応に対応させ、上記会合速度定数はすべての拡散計数を含んでいると仮定する。固体相は微粒子の形をしており、次に、懸濁液中に均一に拡げられ、ゆえに、平均拡散距離は非常に小さいので、このモデルの最終結果における、拡散に起因する濃度勾配の影響は最小である。固体相との反応の会合速度および解離速度は溶液中の対応する速度よりも1桁または2桁遅いと単純に仮定する。この仮定は、固体相と起こる反応における拡散によって引き起こされる慣性(inertia)を包含している。

図3は上記反応方程式から導かれる微分方程式(方程式5~10)を示している。それらの解は反応動力学を説明する。変数 x_i の値は方程式11と記されている方程式に、各項の単位は方程式12と記されている方程式に示されている。これらの微分方程式の数値的な解のみが可能であり、それらを解くのにMathcad 6.0+数学ソフトウェア(Matsoft Inc., Cambridge, Mass, USA)を使用した。この数学的モデルにより、反応動力学並びに(反応速度定数および試薬濃度および反応に影響を及ぼし得る他の予想される初期値を含む)種々の初期条件下での種々の反応成分の消費および形成をシミュレートすることが可能となる。

30

図4および5は、検定反応動力学、すなわち時間の関数としての信号強度の値を描写している。このモデルにおいて使用された親和性定数は例であるので、当該時間軸も相対的なものと解されるべきである。信号強度は反応において形成される生成物Ab Ag Ab*の濃度に正比例している。図4は、時間tの関数としての過渡的な信号強度を示している。図5は、時間tの関数としての時間0~tの間の積分信号強度を示している。積分の使用により、当該測定の信号ノイズ比が改良される。図4および5は、種々の分析物濃度：1) 10^{-11} mol/L 、2) 10^{-10} mol/L 、3) 10^{-9} mol/L 、4) 10^{-8} mol/L 、および5) 10^{-7} mol/L における信号強度曲線を示している。図6は、信号応答曲線、すなわち反応において形成される生成物Ab Ag Ab*の濃度Rを分析物Agの濃度pの関数として表す検定標準曲線を示している。当該検定における応答曲線のピーク値は図6中にHとして記されている。

40

図4は、信号強度成長速度が分析物Agの濃度pに正比例していること、すなわち分析物濃度が高いほど特定の時間における信号強度も高くなることを示している。反応が平衡に近付くにつれて、信号強度曲線は平衡値に向かって漸近的に傾く(曲線a、b、およびc)

50

）。分析物濃度 p が固体相の結合容量 q （すなわち、この例においては 10^{-9} mol/L の濃度）を超えるとすぐに、信号強度が最初は急速に上昇するけれども（曲線 d および e）、まもなく、より低い分析物濃度における信号強度に等しい平衡に向かって傾く。図 5 における曲線群は、さまざまな分析物濃度における時間の関数としての時間範囲 0 ~ t における全積分信号強度を示している。この場合、曲線 a、b、c、d、および e の勾配は、より緩やかである。

図 4 および 5 に示されている曲線は、分析物濃度が固体相の結合容量を超えると、信号強度が低濃度の場合の信号レベルよりも低い特定のレベルに留まるという上述のフック効果を示している。そのうえ、はるかにより速く反応平衡に達する。

異なる時間 t における信号強度の成長速度 dI/dt を記録することによって、信号強度の成長および潜在的フック効果を予測することができる。反応が平衡に達すると、信号強度の成長速度が低下して零になる。分析物濃度が固体相の結合容量を超えると、分析物濃度が結合容量よりも低い場合よりも早く反応平衡に達する。線形多項関数もしくはより高次の関数、またはいずれかの他の関数を特定の時間における反応曲線にフィッティングすることによって、調整されたフィッティングパラメーターを使用して、分析物の濃度範囲を測定することができる。信号強度の成長速度の監視は単純でノイズに強い。本来、上記曲線の適応は、等分目盛または対数目盛のいずれかにおいて行うことができる。等分目盛においては、信号強度の成長速度 dI/dt から分析物濃度を直接測定することができる。

例として、 $t = 0 \sim 300$ s の時間範囲で対数目盛において一次関数、すなわち直線を使用することによって、図 4 および 5 における曲線 a および d にフィッティングを施す。これらの直線はそれぞれ「a a」および「d d」と記されている。これらの回帰線は数学的には $\log[R(t)] = g \log(t) + c$ と表すことができ、式中、 $R(t)$ は時間依存信号応答であり、 g は反応速度を示す回帰線の勾配であり、そして c は $t = 1$ s の点における信号応答の値を示す定数である。定数 c は分析物の濃度をも表している。

既知の標準試料で測定装置を標準化することによって、種々の濃度の分析物 A g についての上述の動力学的信号応答を測定することができ、その後、上記回帰線を測定することができる。これにより、一群の直線が得られ、それらの勾配は、分析物濃度 A g の関数として変化する。この線の群の勾配に関数をフィッティングすることができる。図 5 の積分曲線にフィッティングされるこのような関数の例が図 6 に示されている。この曲線は、検定応答範囲（ピーク値の手前）においては、当該勾配は同じ値を有するけれども、分析物 A g の濃度がピーク値を超えるとすぐに、勾配の値 g は急落する。

未知の試料を測定する場合には、反応が前に示された平衡に近付くまで信号応答およびその積分を監視し、その後、回帰線の勾配の値を測定する。図 7 に示されている曲線から対応する試料の濃度を読み取ることによって、当該未知試料の濃度がピーク値における分析物の濃度よりも低いのか、または高いのかを確かめることができる。当該未知試料の濃度が低い場合には、規定の反応期間の後に、図 6 に示されている標準曲線 $p = R'$ (R) から当該未知試料の濃度を読み取る。一方、当該未知試料の濃度がピーク値の範囲内にある場合には、図 7 に示されている曲線 $p = G'$ (g) から未知試料の濃度を読み取る。最後に、当該未知試料の濃度がピーク値を超えている場合には、図 6 および 7 に示されている曲線のいずれから未知試料の濃度を読み取ってよい。

信号強度の成長速度についての先の例においてフィッティングに使用された線形関数は單なる例である。標準曲線 $p = G'$ (g) を測定する際に他の数学的解析法を使用してもよいことは明らかである。例えば、より高次の多項関数を動力学的測定曲線にフィッティングする場合には、多項の係数が反応の進行を特徴づける。当該係数は、より複雑な反応条件からの情報をも含んでいる場合がある。これらの係数を調査することによって、必要な応答信号を測定することができる。

結論

本発明の装置に使用されるマイクロフォトメーター測定システムは、微粒子の表面から発

10

20

30

40

50

せられる蛍光と当該粒子を取り巻いている溶液から発光される蛍光とを光学的に区別することができる。この分解能は、適当に希釈された反応懸濁液においては、一度に1個の微粒子のみが焦点体積に入るという事実に基づいている。微粒子が反応生成物を濃縮し、微粒子の微視的体積におけるmol/Lで表されるラベルの濃度は、懸濁液中の遊離ラベル分子の濃度よりも何桁も大きい。結果として、遊離の標識試薬によって引き起こされるバックグラウンド信号は最小である。光学的分離により、化学的または物理的な分離を伴わずに、遊離分と結合分との十分な分解能が確保される。

上述の本発明の特徴と微粒子に基づく検定システムとを組み合わせることにより、全血のような細胞懸濁液または血清試料のような他の臨床試料の非常に少ない体積の試料についての速くて、単一工程の生体特異性検定を行うための方法および装置が可能となる。当該検定は分離が不要であり、動力学的信号の成長速度からフック効果を予測することができる、高濃度でもフック効果に起因する誤った検定結果を得る危険性が無い。
10

本発明の特色は、レーザー光線を反応体積中に直接集束させることによって、微小流体工学的な液体の取り扱いの必要性が最小化されることである。この概念により、反応動力学のリアルタイム監視が可能となる。さらに、能動光学トラッピングを使用して、および生体特異的な標識付けのための蛍光微小粒子の使用によって、微粒子の割合並びに光子の計数率を高くすることができます。さらに、リアルタイム監視により、検定標準曲線のフック点を超える検定応答の利用が可能となる。

本発明に係る方法および関連する装置は多くの種々の方法において実現することができる。しかしながら、本発明の本質的特徴は、レーザー光線を反応懸濁液中に直接集束させることによって反応の進行を監視することができるということ、および生物学的材料(例えば、特に赤血球)は、これらの細胞が焦点体積の中に見出されるか、または外に見出されるかにかかわらず、微々たるバックグラウンド信号しか生じないということである。能動トラッピング法によって検出衝撃係数を高く保つことができる、統計学的に正確な測定結果を短い時間で得ることができる。蛍光検出器は、二光子励起に使用されるレーザーパルスの持続時間の間だけ活性化される。このことは、励起間隔の間に起こる光子の発光または熱雑音のカウントは測定されないことを意味する。同時に、微粒子が焦点体積に命中した正にその瞬間にのみ、当該光子検出器を活性化させることができる。

焦点体積における微粒子の位置に関する情報は、例えば、レーザー光線の波長における散乱および反射によって得られる。散乱を測定する最善の方法は共焦構成を使用することである。血液細胞の相対的な屈折率は、本発明の方法において使用される微粒子の屈折率よりもはるかに低いので、血液細胞の散乱信号はより小さい。等張溶液に細胞膜の穿孔を行うことによって、細胞によって引き起こされる散乱およびバックグラウンドをさらに減ずることができる。結果として、細胞内液およびヘモグロビンが検定懸濁液中に希釈される。

二光子励起の使用に基づく本発明の方法は、国際公開第96/22531号パンフレットにおいて示されているマルチパラメトリック検定であってもよい。この検定においては、微粒子は多くの異なるカテゴリーに分けられ、種々の分析物を結合するさまざまな第1試薬でコーティングされる。測定機器の製造費用に留意すると、粒子を検出するのに使用される励起光と同じ、赤またはNIR領域のいずれかの波長を使用する同じレーザー光線によって、ラベルの二光子励起を行うことができるということは極めて重要である。
40

以下に示されている請求項の範囲内で前記発明の種々の用途を多様化してもよいということが当業者に理解される。

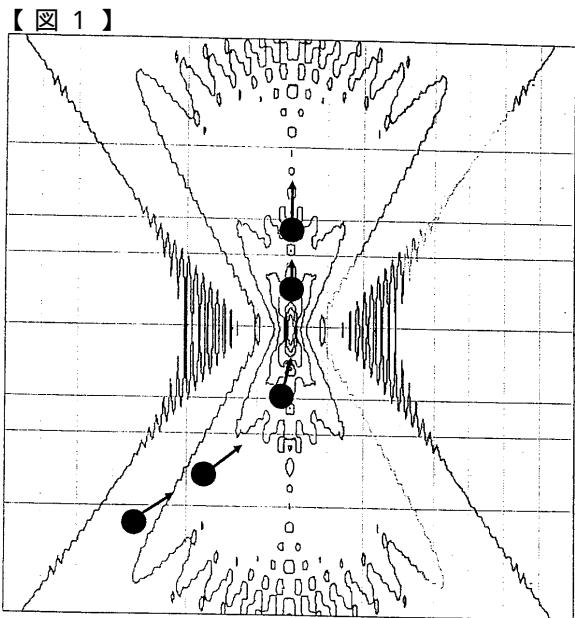


FIG. 1

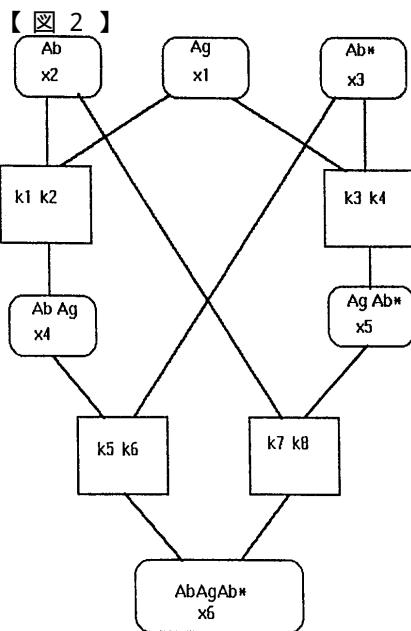


FIG. 2

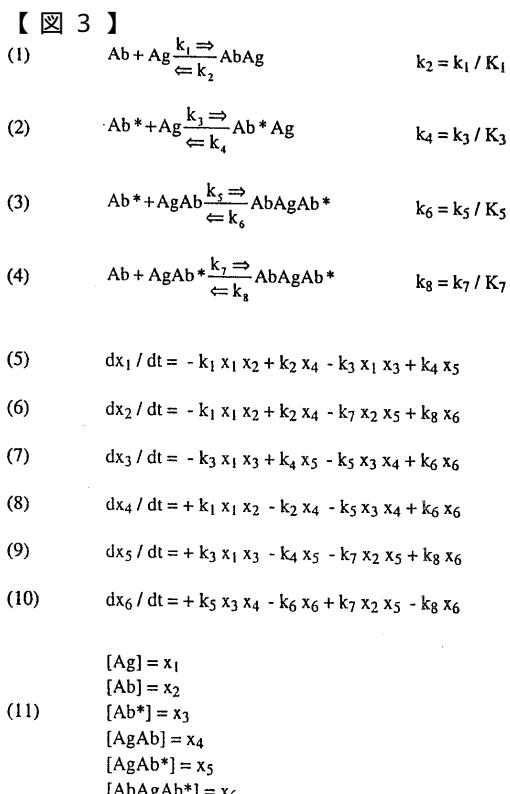


FIG. 3

(12) $[x] = \text{mol L}^{-1}$
 $[dx / dt] =$
 $[k_{1,3,5,7}] = \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $[k_{2,4,6,8}] = \text{s}^{-1}$
 $[K_{1,3,5,7}] = \text{L mol}^{-1}$

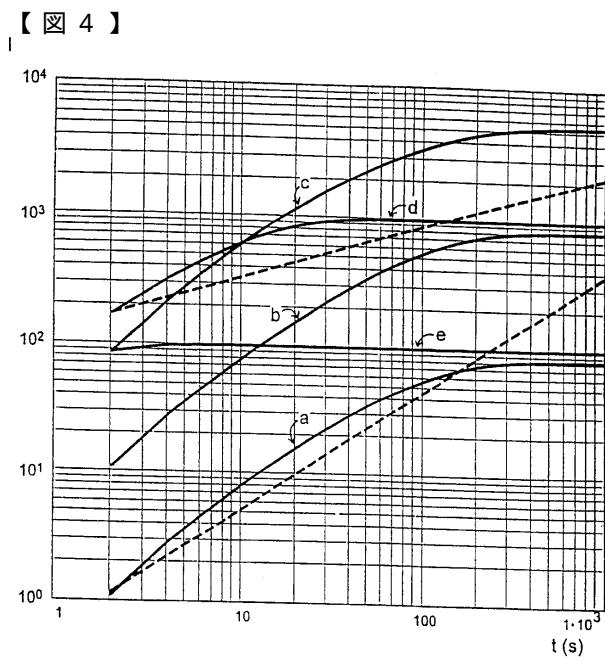


FIG. 4

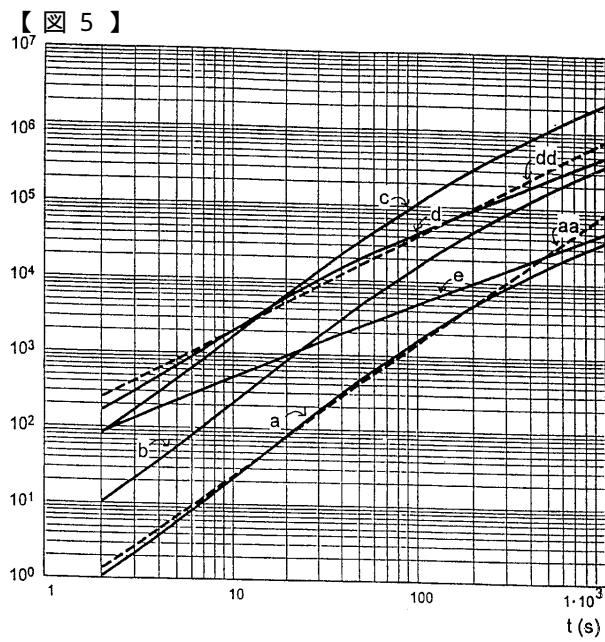


FIG. 5

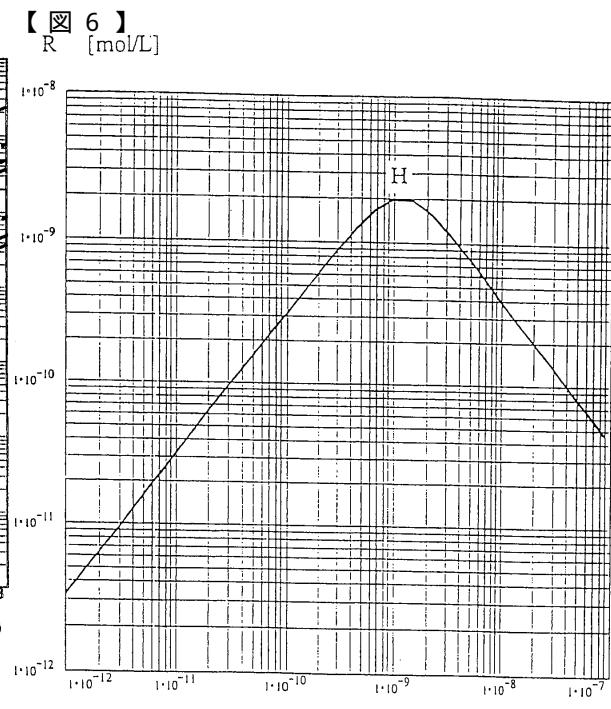
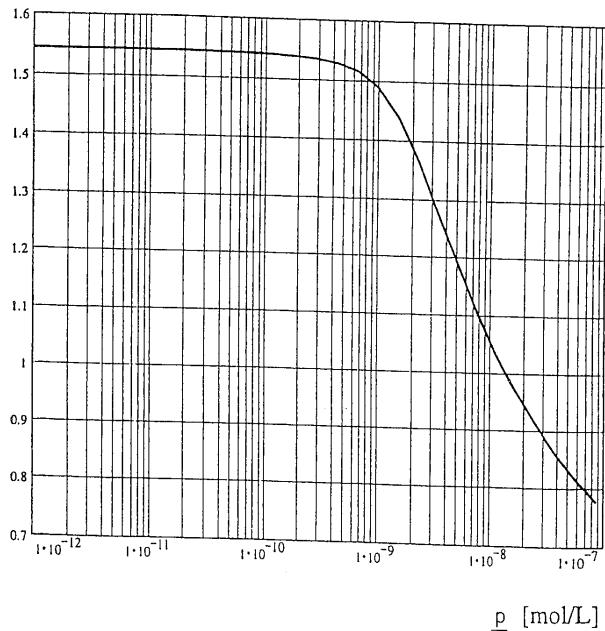


FIG. 6

【図7】
g



p [mol/L]

FIG. 7

フロントページの続き

(72)発明者 ソイニ , エルッキ

フィンランド国 , エフィーエン 21610 キルヤラ , クリピンギンティエ 20

(72)発明者 ハンニネン , ペッカ

フィンランド国 , エフィーエン 20100 トゥルク , コルケアオレンカトウ 2 ベー 2
5

(72)発明者 ソイニ , ユハニ

フィンランド国 , エフィーエン 20700 トゥルク , バルツィオオレンカトウ 5 アーエ
ス . 4

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表平08-501632(JP,A)

特表平11-502608(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 98