

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3886161号
(P3886161)

(45) 発行日 平成19年2月28日(2007.2.28)

(24) 登録日 平成18年12月1日(2006.12.1)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 9 5

GO 1 N 33/532 (2006.01)

GO 1 N 33/532 A

請求項の数 23 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平10-539874
 (86) (22) 出願日 平成10年3月13日(1998.3.13)
 (65) 公表番号 特表2001-524208(P2001-524208A)
 (43) 公表日 平成13年11月27日(2001.11.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/005025
 (87) 国際公開番号 W01998/040726
 (87) 国際公開日 平成10年9月17日(1998.9.17)
 審査請求日 平成17年3月14日(2005.3.14)
 (31) 優先権主張番号 08/818,199
 (32) 優先日 平成9年3月14日(1997.3.14)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 トラスティーズ・オブ・タフツ・カレッジ
 アメリカ合衆国02155マサチューセツ
 ツ州メッドフォード、バルー・ホール、タ
 フツ・ユニバーシティ
 (74) 代理人
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人
 弁理士 柴田 康夫
 (72) 発明者
 ウォルト, デイビッド・アール
 アメリカ合衆国02178マサチューセツ
 ツ州レキシントン、キャンドルウィック・
 クローズ4番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コード化微小球による光ファイバーセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

光ファイバーアレイ中の複数の光ファイバー、及び微小球の母集団含んでなる化学的分析システムであって、該光ファイバーアレイの一方の末端にウェルが形成され、複数のウェルが該微小球の少なくとも1個を含んでいる、システム。

【請求項2】

a) 別々の亜母集団を含む微小球の母集団、及び

b) 光ファイバーアレイ

を含んでなる化学的分析システムであって、各亜母集団は、

i) 標的アナライトと相互作用する化学的官能基、及び

i i) 該化学的官能基を同定するのに使用できるコード化用光学的特性

を有し、該微小球は、該光ファイバーアレイの一方の末端のウェル内に配置されている、化学的分析システム。

【請求項3】

該コード化用光学的特性は、少なくとも1つの蛍光染料からなる請求項2に記載の化学的分析システム。

【請求項4】

該コード化用光学的特性は、少なくとも2つの蛍光染料間の比率からなる請求項2又は3に記載の化学的分析システム。

【請求項5】

10

20

該化学的官能基は、抗体および酵素からなる群から選択される請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の化学的分析システム。

【請求項 6】

該化学的官能基は、蛍光物質、発色団、リン光体、pH指示薬、金属イオン指示薬、酸素指示薬および二酸化炭素指示薬からなる群から選択される請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載の化学的分析システム。

【請求項 7】

さらに、標的アナライトの存在または不存在を同定するのに使用できる、各亜母集団用の検出用光学的特性を含む、請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載の化学的分析システム。

【請求項 8】

該検出用光学的特性が、蛍光物質、発色団およびリン光体からなる群から選択される少なくとも 1 種の染料である請求項 7 に記載の化学的分析システム。

【請求項 9】

さらに光源を含む請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の化学的分析システム。

【請求項 10】

さらに検出器を含む請求項 9 に記載の化学的分析システム。

【請求項 11】

試料中の標的アナライトの存在を決定する方法であって、

a) 該試料を、下記化学的分析システム：

i) 別々の亜母集団を含む微小球の母集団、及び

ii) 光ファイバーアレイ

を含んでなり、各亜母集団は、

1) 標的アナライトと相互作用するための化学的官能基、及び

2) 該化学的官能基を同定するのに使用できるコード化用光学的特性

を有し、該微小球は、該光ファイバーアレイの一方の末端のウェル内に配置されている化学的分析システム

と接触させ、

b) 標的アナライトの存在または不存在を決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項 12】

さらに、該末端上の各微小球亜母集団の位置を同定することを含む請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

該コード化用光学的特性は、少なくとも 1 つの蛍光染料からなる請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

該コード化用光学的特性は、少なくとも 2 つの蛍光染料間の比率からなる請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

該化学的官能基は、抗体および酵素からなる群から選択される請求項 12 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

該化学的官能基は、蛍光物質、発色団、リン光体、pH指示薬、金属イオン指示薬、酸素指示薬および二酸化炭素指示薬からなる群から選択される請求項 12 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

さらに、標的アナライトの存在または不存在を同定するのに使用できる、各亜母集団用の検出用光学的特性を供給することを含む、請求項 12 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

該検出用光学的特性が、蛍光物質、発色団およびリン光体からなる群から選択される少な

10

20

30

40

50

くとも１種の染料である請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

a) 光ファイバーアレイの末端にウェルを形成し、

b) 該ウェルに微小球を配置する

ことを含んでなる、化学分析システムの製造方法であって、該微小球は、別々の亜母集団を含み、各亜母集団は、

i) 標的アナライトと相互作用するための化学的官能基、及び

ii) 該化学的官能基を同定するのに使用できるコード化用光学的特性を有する、製造方法。

【請求項２０】

該ウェルの形成は、該アレイの個々の光ファイバーのコアを異方性エッチングすることからなる請求項１９に記載の製造方法。

【請求項２１】

該微小球の配置は、亜母集団をウェルに連続的に添加することを含む請求項１９または２０に記載の製造方法。

【請求項２２】

さらに、標的アナライトの存在または不存在を同定するのに使用できる、各亜母集団用の検出用光学的特性を供給することを含む請求項１９～２１のいずれかに記載の製造方法。

【請求項２３】

該検出用光学的特性の供給が、蛍光物質、発色団およびリン光体からなる群から選択される少なくとも１種の染料を各亜母集団に分配することを含む請求項２２に記載の製造方法。

。

【発明の詳細な説明】

従来の技術

光ファイバーおよび光ファイバーストランドを、光吸収性染料と組み合わせて、化学分析の測定に用いることは、特にこの十年の間、急速な開発の対象となっている。このような目的および技術に光ファイバーを用いることは、次のような文献に記載されている：Milanovichら, "Novel Optical Fiber Techniques For Medical Application", Proceedings of the SPIE 28th Annual International Technical Symposium On Optics and Electro-Optics, 494巻, 1980; Seitz, W.R., "Chemical Sensors Based On Immobilized Indicators and Fiber Optics", C.R.C. Critical Reviews In Analytical Chemistry 19巻, 1988, 135-173頁; Wolfbeis, O.S., "Fiber Optical Fluorosensors In Analytical Chemistry", Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications (S.G. Schulman, 編者), Wiley & Sons, New York (1988); Angel, S.M., Spectroscopy 2(4):38 (1987); Waltら, "Chemical Sensors and Microinstrumentation", ACS Symposium Series, 403巻, 1989, 252頁, および Wolfbeis, O.S., Fiber Optic Chemical Sensors, 編者 CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 第2巻。

光ファイバーは、インピトロ/インピボセンサーとして使用する場合、１またはそれ以上の光吸収性染料を、光ファイバーの末梢端付近に配置している。代表的には、適切な光源からの光を、光ファイバーの基部端から伝送して染料に照射する。光は、光ファイバーの全長に沿って伝送され、伝送された光は、その一部が光ファイバー末梢端から出射され、染料によって吸収される。光吸収性染料は、固定または非固定状態であってもよく、また光ファイバー自体に直接または間接的に取り付けられた状態であってもよく、さらに、１またはそれ以上の分析対象としてのアナライトを含んでいる流体サンプル中に懸濁または非懸濁状態であってもよく、加えて、第２の光学測定でのその後の使用のために保存または非保存状態であってもよい。

光は、染料に吸収されると、種々の波長および光度を有するある種の光は、同じ光ファイバーまたは回収用光ファイバーのいずれかを通して伝送され、検出機器に戻り、ここで、観察、測定される。光ファイバーによって伝送された光と、光吸収性染料の特性との間の相互作用によって、定性的測定および定量的測定の両者についての光学的基础データが得

10

20

30

40

50

られる。

従来から、種々の分析目的のために光ファイバーストランドおよび光ファイバー繊維束と一緒に使用される多種類の光吸収性染料のうち、ごく一般的な組成物として、光の吸収後に発光する蛍光物質（フルオロホアール）と呼ばれるものや、光の吸収後、発光するのではなく、吸収した光を内部で熱に変換する発色団と呼ばれるものがある。

蛍光は、ある種の分子が特定波長の光（光子）を吸収し、その後、より長い波長の光を低エネルギーで発光する特性に基づく、物理的現象である。蛍光物質は、共通する種々の特性を有する：ある波長（ λ_{ab} ）で光エネルギーを吸収し、励起エネルギー状態に達し、その後、別の波長（ λ_{em} ）で発光する特性。吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルは、各発光物質について特異的で、しばしばグラフ上で2つの別々の曲線を示し、これらの曲線は、わずかに重複しているにすぎない。一般に、励起光の波長に拘わらず、同じ蛍光発光スペクトルが観察され、したがって、励起光の波長およびエネルギーは、所定の範囲で変えることができる。しかし、蛍光物質が発する光は、常に同じ発光スペクトルを形成する。最後に、蛍光シグナルの強度は、発光した光の量子収量として測定することができる。蛍光量子収量は、（発光した光子の数）対（蛍光物質が当初に吸収した光子の数）の比率である。これらの特性について、より重要な技術情報は、次のような文献が推奨される：Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, 1983; Freifelder, D., Physical Biochemistry, 第2版, W.H. Freeman and Company, New York, 1982; "Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications: Part 1" (S.G. Schulman, 編著), Chemical Analysis, 77巻, Wiley & Sons, Inc., 1985; The Theory of Luminescence, Stepanov and Gribkovskii, Iliffe Books, Ltd., London, 1968.

これに対し、光を吸収しても蛍光を発しない物質は、通常、吸収した光を熱や運動エネルギーに変換する。吸収した光を内部変換する能力によって、そのような染料は発光団として認識される。発光団として光エネルギーを吸収する染料は、各波長のエネルギーをそのように吸収し、その波長における特有のモル吸光係数によって特徴付けられる。光ファイバーストランドおよび吸収分光分析法を採用し、可視光線および紫外線波長を吸光係数と組み合わせて用いる化学分析法によれば、スペクトルの測定によって、分析対象となる特定のアナライトの濃度を測定することができる。光ファイバーによる吸光度測定では、ごく一般的には、濃度は、ベールの法則に従い算出、決定する。すなわち、単一の吸光度波長では、所定波長の光エネルギーを吸収する組成の量が多くなればなるほど、試料の光学密度はより大きくなる。このように、吸収された光の全量は、試料中の組成の量と直接的に相関関係がある。

定量分析および定性分析測定の両者に関する、光ファイバーセンサーを用いる近年の改善の多くは、光ファイバー末梢端に種々の吸光染料を付着および/または固定化させることの要求に関する。この方法に関し、種々の光ファイバー化学センサーおよび方法が、pH測定、酸素検出、二酸化炭素分析などの特定の分析測定および用途について報告されている。このような開発は、次のような文献によって例示される：Freemanら, Anal. Chem. 53:98 (1983); Lippitschら, Anal. Chem. Acta. 205:1, (1988); Wolfbeisら, Anal. Chem. 60:2028 (1988); Jordanら, Anal. Chem. 59:437 (1987); Lubbersら, Sens. Actuators 1983; Munkholmら, Talanta 35:109 (1988); Munkholmら, Anal. Chem. 58:1427 (1986); Seitz, W.R., Anal. Chem. 56:16A-34A (1984); Petersonら, Anal. Chem. 52:864 (1980); Saariら, Anal. Chem. 54:821 (1982); Saariら, Anal. Chem. 55:667 (1983); Zhujunら, Anal. Chem. Acta. 160:47 (1984); Schwabら, Anal. Chem. 56:2199 (1984); Wolfbeis, O.S., "Fiber Optic Chemical Sensors", 編著CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 第2巻; およびPantano, P., Walt, D.R., Anal. Chem., 481A-487A, 67巻, (1995)。

近年、光ファイバーセンサーは、多数の染料を、各光ファイバーからなる単一繊維束と共に使用しうるように、構成されている。米国特許番号5,244,636および5,250,264 (Waltら) は、異なる多数の染料を繊維束の末梢端に付着させるシステムを開示しているが、これら特許の各開示をもって本明細書の記載とする。開示された形態によれば、繊維束の光フ

10

20

30

40

50

ファイバーは、各々、各染料に光学的にアクセスすることができる。これは、各染料から戻
る光の別々のシグナルをデコンボルピング (deconvolving) する問題を回避する。これは
、2またはそれ以上の染料からのシグナルを合する場合に起こり、各染料は、異なるアナ
ライトに対し感受性を示すが、各染料の発光スペクトルが実質的に重複するからである。

発明の概要

上記2つの特許の改善点は、多数の化学的官能基を、単一の光ファイバー繊維束センサー
の端部に配置することであった。この形態では、代表的には小さい繊維束によって遠隔モ
ニターしうる分析化学センサーが得られる。しかしながら、その欠点として、化学的官能
基に関する種々の化学物質を、センサー端部に適用することが困難である。すなわち、化
学的官能基は、センサー端部に連続形態で形成されるが、これは、ゆっくりとしたプロセ
スで、実際には10個の化学的官能基しか適用できない。

10

本発明は、2つの相乗的知見に基づく：(1) ビーズベース分析化学システムの開発、光
学的相互伝送可能なコード化法を用いて、各ビーズを同定する能力を保持しつつ、異なる
化学的官能基を担持するビーズ(微小球とも言う)と一緒に混合できること、および(2)
) 光ファイバー繊維束センサーの開発、別々のビーズまたは微小球(マイクロスフェア
、microsphere)を所望により、繊維束内の各光ファイバーまたは一群の光ファイバーに
連結することができること。各知見は、別々に適用できるが、一緒に実施した場合には、
数千またはそれ以上の、多数の別々の化学的官能基を支持でき、かつ製造および使用が比
較的容易である光ファイバーを得ることができる。

一般に、本発明の一つの要旨によれば、本発明は、ビーズまたは微小球の母集団を含んで
なる分析化学システムを提供する。募集団内において、別々の亜母集団が存在し、各亜母
集団は、標的アナライトの存在下にビーズの光学的特性を変化させる化学的官能基を担持
する。この光学的特性の変化は、多数の異なるメカニズムによって起こすことができる。
例えば、染料-標的アナライトをビーズに結合させたり、染料種をビーズ上またはその付
近に形成したり、存在する染料種を破壊したり、アナライトとビーズ上染料とを相互に反
応させて光学的シグナルを変化させることなどが挙げられ、光学的に相互伝送可能なメカ
ニズムであれば、他のいずれであってもよい。各亜母集団は、相互に、ランダムに混合で
きるが、各ビーズ上の化学的官能基は、化学的官能基の記述(内容または特徴)によって
コード化される光学的特性によって測定される。その結果、特定のビーズの光学的特性が
変化しているか否かを観察し、次いでビーズの化学的官能基の光学的特性を解釈し、これ
により、化学的官能基が標的としているアナライトの存在または不存在を決定することが
できる。

20

30

特定の具体例によれば、ビーズは、ビーズ内に好適には捕捉された染料を用いてコード化
され、化学的官能基はビーズ表面上に付加される。染料は、発色団またはリン光体であっ
てよいが、好適には蛍光染料であり、これは、その強力なシグナルによって、解釈に関し
、シグナル/ノイズの良好な比率が得られる。コード化は、少なくとも2つの染料の比率
によって達成できるが、例えば、より大きいコード化サイズを所定寸法のビーズに付加す
ることができる。

本発明の別の要旨によれば、本発明は、分析化学用光ファイバー繊維束センサーを提供す
る。このセンサーは、繊維束またはその付近において化学的官能基を担持するビーズの母
集団を有する。個々のビーズまたは多数のビーズに関連した光学的特性の変化をモニター
する能力は、これらの光学的特性の変化を、繊維束の各光ファイバーまたは一群の光ファ
イバーに接続して、その基部端に伝送し、ここで、使用者による手作業で分析を行うかま
たは画像処理技術により自動的に分析を行うことによって得られる。

40

本発明の好適な具体例によれば、各ビーズは、光ファイバー繊維束の終端に形成した別々
のウェル内に配置される。このようなマイクロウェルは、クラッドに関し、光ファイバー
のコアを異方性エッチングすることによって形成される。

また好適な具体例では、ビーズの母集団は、代表的には繊維束を横断する配列でランダム
に分布させた別々の亜母集団を含み、各亜母集団は、異なる化学的官能基、および化学的
官能基を記述した光学的相互伝送可能なコードを担持する。

50

各センサーは、ビーズ亜母集団のウェル内分布が異なっている点で、相異なっているが、プラスの光学的応答変化または特性変化を示すビーズのみを解読する必要がある。したがって、センサーの製造よりも分析に負担がかかる。加えて、ビーズおよび光ファイバーアレイは、単分散とできるため、シグナル発生に起因する蛍光区域は、非常に均一であり、このため市販の顕微鏡分析ソフトウェアの使用によって自動的に分析することができる。かかる画像処理ソフトウェアは、異なるスペクトル区域を自動的に決定でき、また各区域内のセグメントの数を数秒でカウントすることができる。

次に、添付の図面を参照しながら、構造上の新規な詳細事項、各パーツの組み合わせおよび他の利点を含め、本発明の前記した特徴および他の特徴を、さらに詳しく説明し、以下の請求の範囲に記載した。本発明を具体化した特定の方法および装置は、説明のために示したもので、本発明を制限するものではないものと、理解すべきである。本発明の原理および特徴は、本発明の範囲を逸脱しない限り、種々の具体例において採用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

添付の図面において、異なる図面を通じて同じ部分に同じ番号を付した。図面は、必ずしも同じ尺度ではなく、本発明の原理の説明部分は、強調して図示した。各図面は、次のとおりである。

図1は、本発明に従い微小球をコード化および化学的官能化する光学的特性を説明する模式図、

図2は、本発明の微小球の製造、コード化および化学的官能化を説明するプロセス図、

20

図3は、異なる化学的官能基および化学的官能基のコード化した記述を有する微小球を含んでなる、微小球系の模式図、

図4は、本発明の光ファイバーセンサー、および関連装置および制御システムを示す模式図、

図5Aおよび5Bは、各々、微小球を光ファイバー繊維束の末梢端に付着または取り付けるための方法を示す顕微鏡写真、

図6は、光ファイバー繊維束の形成および微小球のウェル内への取り付けを詳しく説明するプロセス図、

図7Aおよび図7Bは、各々、微小球のウェルへの静電気結合を証明する、物理的撹拌、タッピングおよび空気脈動の前後における微小球のウェル内アレイを示す顕微鏡写真、

30

図8A、図8Bおよび図8Cは、各々、フルオレセイン発光波長、DiICのコード化波長およびTRCのコード化波長において、ニリン酸フルオレセインにさらした場合のアルカリ性リン酸分解酵素微小球の顕微鏡写真、

図9Aおよび図9Bは、各々、フルオレセイン発光波長およびDiICのコード化波長において、フルオレセイン -ガラクトピラノシドにさらした場合の -ガラクトトシダーゼ微小球からの光学的シグナルを示す顕微鏡写真、および

図10Aおよび図10Bは、各々、フルオレセインラベル化抗原への暴露の前後における、x-ウサギ抗体微小球からの光学応答を示す顕微鏡写真である。

好適な具体例の詳細な記載

1. 微小球

40

図1は、本発明の原理に従うビーズまたは微小球10の構造を示す。先行技術では一般に、微小球10は、化学的官能基12を有し、これは、代表的には微小球表面に適用される。化学的官能基は、標的とされるアナライトの存在下に、微小球（化学的官能基を囲む領域を恐らくは含む）の光学的特性を変化させるように設計されている。

ビーズまたは微小球は、球体である必要はなく、不規則形態のビーズも使用することができる。ビーズは、代表的にはプラスチックまたはセラミックから構成され、ナノメートルオーダー、例えば500nm～ミリメートルオーダー、例えば1mm範囲のビーズ粒粒を使用することができる。さらに、種々のビーズ化学物質を使用することができる。メチルスチレン、ポリスチレン、アクリル系ポリマー、ラテックス、常磁性物質、トリアゾル、カーボン、グラファイトおよび酸化チタンを含んでなるビーズまたは微小球など、種々のものが可

50

能である。

"Microsphere Detection Guide", Bangs laboratories, Fishers INが参考となる。

本発明の微小球は、化学的官能基の記述によってコード化される光学的特性を有する。好適な具体例によれば、レポーター染料14を微小球10に添加すると、コード化は、2またはそれ以上の染料の比率で生じる。レポーター染料14は、発色団タイプのものであってよい。しかしながら、蛍光染料が好適である。なぜなら、蛍光シグナルの強度によって、解読の際に良好なシグナル／ノイズ比率が得られるからである。加えて、2またはそれ以上の染料の比率によるコード化は、レポーター染料光学的特性および検出器感度を相互に伝送するのに使用される光度に対し、非感受性を示すため、単一の染料濃度の場合よりも好適である。

図2は、微小球の製造法を示すプロセス図である。工程50において、微小球素材のアリコート真空ろ過して、ドライケーキを生成する。一具体例によれば、メチルスチレン（87%）およびジビニルベンゼン（13%）の微小球を用い、これは、 $3.1\mu\text{m}$ の直径を有する。微小球は、所望の化学的官能基を予め備えた状態で手に入れることができる。このような予め調製した微小球は、現在、多数の会社から市販されており、自由に選択できる。これとは別の態様として、「ブランク」微小球を用いることができ、これは、使用者が所望の化学的官能基を容易に取り付けうる表面化学物質を有する。ブランク微小球の、このような表面化学物質の例は、以下の表1に掲げた。

次いで、ドライケーキをばらばらに碎き、これに、染料溶液を工程52で添加して、微小球の光学的特性を、意図した表面化学的官能基に関する情報によってコード化する。染料は、微小球表面に共有結合することができるが、これは、化学的官能基のために望ましくは蓄えるべき表面結合部位を消費してしまう。好適には、微小球は、この微小球を膨潤させる有機溶媒（例えばジメチルホルムアミド（DMF））中に溶解した2またはそれ以上の蛍光レポーター染料を所定の比率で含んでなる染料溶液中に入れる。微小球の染料溶液中への浸漬時間は、その強度および比率の範囲を決定する。浸漬時間が長ければ、強度はより高く、比率範囲は、より広くなる。

表1

表面化学物質	名称
NH_2	アミン
COOH	カルボン酸
CHO	アルデヒド
$\text{CH}_2\text{-NH}_2$	脂肪族アミン
CO NH_2	アミド
$\text{CH}_2\text{-Cl}$	クロロメチル
CONH-NH_2	ヒドラジド
OH	ヒドロキシル
SO_4	スルフェート
SO_3	スルホネート
Ar NH_2	芳香族アミン

代表的な二染料系として、テキサスレッドカダベリン（Texas Red Cadaverine, TRC）（これは、 $\lambda_{ab} = 580\text{nm}$ で励起、 $\lambda_{em} = 630\text{nm}$ で発光）を、インドジカルボシアニン（DiIC）（ $\lambda_{ab} / \lambda_{em} = 610 / 670$ ）と組み合わせて用いた。一般に、染料は、分析に使用される化学物質に適合性を示し、スペクトル上適合性を示すように、選択すべきである。染料の発光波長は、化学的官能基が微小球の光学的特性変化を誘発する光学的スペクトル領域と、重複すべきではない。これにより、重複発光スペクトル領域に寄与しうるコード化染料比率およびアナライトの両者の存在を起因とし、シグナル寄与測定の際に伴うデコンボリューション（deconvolution）の問題が回避される。

使用しうる他の染料の例は、オキサジン（662 / 705）、IR-144（745 / 825）、IR-140（74

6 / 882)、IR-125 (786 / 800) (Exiton) およびBodipy (665 / 676) (Molecular Probes)、およびナフトフルオレセイン (605 / 675) (Molecular Probes) である。Lanthideも使用できる。近赤外領域以外で発光する蛍光染料も使用することができる。発色団染料も、例えば、ラマン散乱系染料または極性化染料を用いるより魅力的な組成物として、光学的相互伝送可能な特性を形成する別の代用物に相当する。

異なる化学的官能基のためにコード化する特定の染料対の識別能力は、比率計測定法の感度限界に依存する。控えめに言えば、いずれの染料対も、少なくとも20の異なる比率を識別しうる能力を有すべきである。特定の染料セットでなされる、2つの染料についての特定の組み合わせの数は、次の表2に示す。

表2

1セット中の染料の数	可能な組合せ
3	3
4	6
5	10
6	15

10

すなわち、6個の染料および各染料対について20個の識別比率を用いれば、300個の別々の化学的官能基を所定の母集団の微小球にコード化することができる。2以上の染料を組み合わせると、コード化の組み合わせにおいて、付加的な多様性が得られる。

工程54では、微小球を真空ろ過して過剰の染料を除去する。次いで、微小球を水または、微小球非潤滑性の他の液体で洗浄するが、ここでは、染料は、未だに可溶性である。このため、微小球から染料を洗い流すことなく、残留染料を洗い落とすことができる。

20

工程56では、化学的官能基を微小球表面化学物質に取り付ける（存在しない場合）。なお、表面化学物質は、微小球本体全体に存在してもよく、物理的な円周表面に限定されるものではないことに、注意すべきである。

先行技術によれば、化学的官能基の大きいスペクトルは、微小球について現れ、標的アナライトの存在下に光学的相互伝送可能な変化を形成する。このような化学的官能基には、4つの広範な分類上の微小球センサーが包含される：（1）基本的なインジケータ化学センサー、（2）酵素系センサー、（3）免疫系センサー、および（4）ゲノセンサー。

多数の基本的なインジケータ微小球センサーは、以前からその有用性が証明されている。例えば、以下の表3を参照のこと。

30

表 3

標的アナライト	化学的官能基	注($\lambda_{ab}/\lambda_{em}$)
pH センサー系:	セミナフトフルオレsein	例えば、カルボキシ-SNAFL
	セミナフトロダフルオルス	例えば、カルボキシ-SNARF
	8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸フルオレsein	
CO ₂ センサー系:	セミナフトフルオレsein	例えば、カルボキシ-SNAFL
	セミナフトロダフルオルス	例えば、カルボキシ-SNARF
	8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸	
金属イオンセンサー系:	デスフェリオザミン B	例えば、Fe
	シクレン誘導体	例えば、Cu, Zn
	誘導化ペプチド	例えば、FITC-Gly-Gly-His, および FITC-Gly His, Cu, Zn
	フルオレキソン(カルシン)	例えば、Ca, Mg, Cu, Pb, Ba
	カルシンブルー	例えば、Ca, Mg, Cu
	メチルカルシンブルー	例えば、Ca, Mg, Cu
	オルトジアニジジン四酢酸 (ODTA)	例えば、Zn
	ビスサリシリジンエチレンジアミン (SED)	例えば、Al
	N-(6-メトキシ-8-キノリル-p-トルエンスルホンアミン (TSQ)	例えば、Zn
	イント-1	例えば、Mn, Ni
	フラ-2	例えば、Mn, Ni
	マグネシウムグリーン	例えば、Mg, Cd, Tb
O ₂	Si フェニルイソベンゾフラ	409/476
	メトキシピニルピレン	352/401
ニトライト	ジアミノナフタリン	340/377
NO	ルミノール	355/411
	ジヒドロロダミン	289/なし
Ca ²⁺	ビスフラ	340/380
	カルシウムグリーン	可視光/530
	フラ-2	340/380
	イント-1	405/485
	フルオ-3	可視光/525
	ロダ-2	可視光/570
Mg ²⁺	マグネシウム-フラ-2	340/380
	マグネシウム-フラ-5	340/380
	マグネシウム-イント-1	405/485
	マグネシウムグリーン	475/530
	マグネシウムオレンジ	可視光/545
Zn ²⁺	Newport Green	506/535
TSQ	メトキシキノビル	334/385
Cu ²⁺	フェンクグリーン	492/517
Na ⁺	SBFI	339/565

10

20

30

40

	SBFO	354/575
	リソウムク [®] リン	506/535
K ⁺	PBFI	336/557
Cl ⁻	SPQ	344/443
	MQAE	350/460

表3に掲げた化学物質の各々は、標的アナライトの存在下に光学的相互伝送可能なシグナルまたは光学的特性を直接形成する。

酵素系微小球センサーは、その性能が証明されており、微小球について明示することができる。例えば、以下の表4に示す。

表4

センサー標的	化学的官能基
グルコースセンサー	グルコースオキシダーゼ (酵素) +O ₂ -感受性染料 (表1参照)
ペニシリンセンサー	ペニシリナーゼ (酵素) +pH-感受性染料 (表1参照)
尿素センサー	ウレアーゼ (酵素) +pH-感受性染料 (表1参照)
アセチルコリンセンサー	アセチルコリンエステラーゼ (酵素) +pH-感受性染料 (表1参照)

一般に、酵素感受性化学物質アナライトの存在により誘発される、光学的特性の変化は、この種の化学的官能基では間接的に起こる。微小球結合酵素、例えばグルコースオキシダーゼは、標的アナライト、例えばグルコースを分解し、共基質、例えば酵素を消費するか、またはある種の副生成物、例えば過酸化水素を生成する。次いで、酸素感受性染料の使用によって、特性変化を開始する。

酵素の微小球への固定化法は、従来技術として知られている。一例によれば、NH₂表面化学物質微小球を用いる。表面の活性化は、リン酸塩緩衝生理食塩水中2.5%グルタルアルデヒド (10mM、pH 6.9) (NaCl: 138mM、KCl: 2.7mM) で達成される。これは、攪拌床により、室温で約2時間攪拌する。次いで、微小球を超純水+0.01%~0.02%ツイーン20 (界面活性剤) で洗浄し、再度、pH 7.7のPBS+0.01%ツイーン20で洗浄する。最後に、酵素を、好適には0.45μm超微粒子マイクロピュアーフィルターで予めろ過した後に、溶液に添加する。

免疫系微小球センサーは、農薬、除草剤、PCB、PAHなどの環境汚染物質の検出についてその性能が証明されている。加えて、このセンサーは、次のような用途に使用されている：診断剤、例えば細菌 (例えば、癩病、コレラ、リンパ炎 (lyme) およびターブルクロシス (tuberculosis))、ウイルス (例えば、HIV、単純ヘルペス、サイトメガロウイルス)、真菌 (例えば、アスペルギルス症、カンジダ症、クリプトコックス症)、マイコプラズマ (例えば肺炎マイコプラズマ)、原虫類 (例えば、アメーバー症、トキソプラズマ症)、リケッチア (例えばロッキー山紅斑点熱) および妊娠試験。

微小球ゲノセンサーも、その性能が証明されている。これは、代表的には、プローブ配列を微小球表面化学物質に、一般にNH₂基によって取り付けることで、構成される。蛍光染料分子、例えばフルオレセインを、溶液中の標的配列に取り付ける。その光学的相互伝送可能な特性変化は、標的配列の微小球への結合によって起こる。これにより、溶液全体よりも微小球周囲の染料濃度がより高くなる。性能が証明された数種のプローブおよび標的配列 (Ferguson, J.A.ら, Nature Biotechnology, 14巻, Dec. 1996参照) を、以下の表5に示す。

10

20

30

40

表 5

プローブ配列	標的配列
B-glo(+) (ヒト B-グロブリンのセグメント)5'-NH ₂ -(CH ₂) ₈ -TT TTT TTT TCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC-3'	B-glo(+)-CF 5'-フルオレセイン-TC AAC GTG GAT GAA GTT C-3'
IFNG (インターフェロン γ)5'-NH ₂ -(CH ₂) ₈ -T ₁₂ -TGG CTT CTC TTG GCT GTT ACT-3'	IFNG-CF 5'-フルオレセイン-AG TAA CAG CCA AGA GAA CCC AAA-3'
IL2 (インターロイキン-2)5'-NH ₂ -(CH ₂) ₈ -T ₁₂ -TA ACC GAA TCC CAA ACT CAC CAG-3'	IL2-CF 5'-フルオレセイン-CT GGT GAG TTT GGG ATT CTT GTA-3'
IL4 (インターロイキン-4)5'-NH ₂ -(CH ₂) ₈ -T ₁₂ -CC AAC TGC TTC CCC CTC TGT-3'	IL4-CF 5'-フルオレセイン-AC AGA GGG GGA AGC AGT TGG-3'
IL6 (インターロイキン-6)5'-NH ₂ -(CH ₂) ₈ -T ₁₂ -GT TGG GTC AGG GGT GGT TAT T-3'	IL6-CF 5'-フルオレセイン-AA TAA CCA CCC CTG ACC CAA C-3'

図3は、異なる化学的官能基を有する微小球による分析化学システム100の構成を説明する。亜母集団微小球は、10a、10b、10cとして示され、各々、プローブ配列60a、60bおよび60cを官能基の例示として担持する。これら亜母集団は、製造されると、相互に合され、混合される。合して得られた母集団は、ランダムに分布した各化学的官能基を有する微小球を含む。

一般には、異なる官能基を有する微小球を混合すると、対応する標的配列の各々の選択性に関し、情報が喪失する。プローブ配列60a、60bおよび60cの各々を有する微小球の溶液において、蛍光マーカー染料64の濃度を、微小球10について観察すると、少なくとも1つの標的配列62a、62bおよび62cの存在を測定することができる。しかしながら、プローブ配列60a、60bおよび60cが活性を発生していることは、測定する方法がない。なぜなら、亜母集団を混合した際に、この微小球がこのプローブ配列を含んでいることに関する情報が喪失されているからである。

これとは対照的に、本発明によれば、各亜母集団において、各微小球は、共通の光学的特性によってコード化されている。図示した例では、微小球10aで示される亜母集団は、10：1の2つのレポーター染料間についての比率を有し、微小球10bの亜母集団は、同じレポーター染料の比率1：1を有し、微小球10cの亜母集団は、同じレポーター染料の比率1：10を有する。

したがって、ランダムに混合した亜母集団の微小球は、担持した化学的官能基60a～60c各々をベースとする別々の分析化学システムとして有用である。系100は、ある種の化学的官能基が相互作用しうる、分析対象となるアナライトに添加される。いずれの相互作用も、例えば蛍光染料64の微小球への結合によって、対応する微小球の光学的応答を変化させる。コード化した染料の組み合わせを用い、光学的特性が変化した微小球の化学的官能基を同定することによって、アナライトの化学的同一性および濃度に関する情報を、プローブ中に含まれる各官能基との相互作用または非相互作用に基いて、得ることができる。光学的特性の変化または活性を示す微小球は、顕微鏡による各微小球の手動的観察法の利用によって同定することができる。解読は、用いた特定のレポーター染料に応じて、手動で行うことができる。フィルターのような光学的器具を用いて、レポーター染料の発光波長の微小球からの光を観察することも有用である。この方法が可能な場合、好適な具体例では、分析化学微小球系は、本発明の光ファイバーセンサーとして使用される。

2. 光ファイバーセンサー

図4は、本発明の光ファイバーセンサー200および関連する制御システム210を示す模式的ブロック図である。光ファイバーセンサー200は、光ファイバー繊維束202を含んでなり、

10

20

30

40

50

これは、光が光ファイバー間で混合しないように別々のクラッド光ファイバーから構成される。微小球系100は、繊維束の末梢端212に取り付け、基部端214には、z-変換ステージ216およびx-yマイクロポジショナー218が接続されている。これら2つの構成要素は、適切に配置した繊維束202基部端214と共に、顕微鏡対物レンズ220に対し作用する。対物レンズ220で集光した光は、3つの指針形キューブスライダー222を備える反射光蛍光付属装置に伝送する。付属装置222によって、光は、75Wキセノンランプ224から、繊維束202内に連結される対物レンズ220内に入ることができる。電源224からの光は、集光レンズ226で集光し、次いでフィルターおよびシャッターホイール228で過および/またはシャッター処理し、その後NDフィルタースライド230内を通過する。

繊維束202の末梢端212から戻ってきた光は、付属装置222を通過して、倍率変換器232に達する。この倍率変換器232は、光ファイバー基部端または末梢端の画像寸法を調節することができる。倍率変換器232を通過した光は、第二ホイール234でシャッター処理および通過する。次いで、光は、電荷結合素子(CCD)カメラ236で映像化する。コンピュータ238は、画像処理ソフトウェアを実行し、CCDカメラ236からの情報を処理し、要すれば第一および第二シャッターおよびフィルターホイール228,234を制御する。光ファイバーセンサー200専用の装置、即ち繊維束202の基部端から左手に記載の装置は、次の文献を参照されたし：Bronkら, Anal. Chem. 1995, 67巻, 17号, 2750-2752頁。

微小球系100は、光ファイバー繊維束の末梢端に、種々の好適な方法で取り付けることができる。重要なこととして、微小球は、繊維束の端部に接近して配置する。これにより、各光ファイバーに戻ってくる光は、主として、単一の微小球のみから入ることが保証される。この特徴は、個々の微小球の光学的特性が相互に伝送可能になって、微小球官能基に伴う反応を同定し、また、これら微小球中に含まれる染料比率を解読するのに必要である。しかしながら、接着または付着技術では、微小球をアナライトから化学的絶縁する必要がある。

図5Aおよび図5Bは、繊維束202末梢端212の微小球の顕微鏡写真であり、微小球10の繊維束202への取り付けのための好適な技術を示す。ウェル250は、繊維束202の各光ファイバー252の中央において形成される。図5Bに示すように、ウェル250の寸法は、微小球10のウェル250内への配置が可能になるように、微小球10の寸法に調整する。すなわち、繊維束202の各光ファイバー252は、光を、ウェル内に含まれる単一の微小球10から伝送する。その結果、繊維束202端部をCCDアレイ236に対し映像化することによって、微小球10の光学的特性は、個別的に相互に伝送することができる。

図6は、マイクロウェル250の形成法、および微小球10のウェル内への配置法を説明する。

1mmの六角形充填画像化光ファイバーは、約20,600本の別々の光ファイバー(横断寸法約 $3.7\mu\text{m}$ のコアを有する)を含む(Part No. ET26, Galileo Fibers)。代表的には、各光ファイバーのコアは、ガラスの硬度および光ファイバー製造時の延伸の結果として六角形に形成される。しかしながら場合により、その形態は円形であってもよい。

工程270では、繊維束202の基部端および末梢端の両端212,214は、 $12\mu\text{m}$ 、 $9\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ および $0.3\mu\text{m}$ のラッピングフィルム上で連続的に研磨される。その後、両端は、アトミックホース(atomic force)顕微鏡で傷について検査することができる。工程272では、繊維束202末梢端212のエッチングを行う。蒸留水 $600\mu\text{l}$ およびHF(フッ化水素酸) $100\mu\text{l}$ (50%保存液)含有 $0.2\text{gNH}_4\text{F}$ (フッ化アンモニウム)溶液を用いることができる。末梢端212は、この溶液で所定の時間、好適には約80秒間エッチングする。

この溶液から取り出して、繊維束端部を直ちに脱イオン水中に入れ、いずれの付加的なエッチングを停止する(274)。光ファイバーを次いで水道水で洗浄した。この段階で、好適には超音波処理を数分行っていずれの塩生成物を反応から除去する。光ファイバーを次いで風乾する。

以上の方法に従い、繊維束202の各光ファイバー用のクラッド256に関し、光ファイバーコア254を好適に異方性エッチングすることによってウェルを形成する。ウェルは、ほぼコア254の直径 $3.7\mu\text{m}$ を有する。この直径は、一例では、用いる微小球の直径 $3.1\mu\text{m}$ よりもわずかに大きくなるように選択される。優先的なエッチングが起こる。なぜなら、純シリ

10

20

30

40

50

カのコア254は、フッ化水素酸の存在下に、ゲルマニウムドーブシリカクラッド256よりもエッチングされるからである。

微小球は、次いでウェル250内に、工程276において種々の方法で配置される。微小球の配置は、ランダムに混合した所望の亜母集団微小球含有溶液の末梢端212への滴下、繊維束の超音波処理による微小球のウェル内への沈降および微小球溶媒の蒸発によって達成することができる。これとは別の態様として、亜母集団は、繊維束端部に連続的に添加することができる。微小球は、次いでウェル250内に、スルホン化ナフィオンNafion希釈液の端部への滴下によって固定することができる。溶媒蒸発によって、薄膜のナフィオンは、微小球を覆うように形成し、微小球を所定の場所に保持する。この方法は、FITC官能基を担持するpH指示用の微小球の固定に適している。固定微小球の得られたアレイは、スルホン化ナフィオンの水素イオン浸透性によってpH感受性を保持する。しかしながら、この方法は、一般に採用できない。なぜなら、ナフィオンは殆どの水溶性種に対し不浸透性を示すからである。同様な方法を異なるポリマー用いて採用することができる。例えば、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、またはポリヒドロキシメチルメタクリレート（ポリHEMA）の溶液も、水性種に対し必要な浸透性を示す限り、ナフィオンに代えて使用することができる。

10

別の固定化法では、微小球膨潤を用いて、各微小球10を対応するマイクロウェル250内に捕捉する。この方法によれば、微小球は、まずマイクロウェル250内に、末梢端212上のマイクロウェルアレイの存在下に非膨潤性溶液中に懸濁化した微小球の超音波処理によって分布する。マイクロウェル内への配置の後、微小球は、その後膨潤性の水性緩衝液に暴露すると、膨潤することによって、マフィン（muffin）をマフィンスズで洗浄する場合と同様に、物理的に捕捉される。

20

ごく一般的な微小球組成の1つは、テンタゲル（tentagel）、スチレン-ポリエチレングリコールコポリマーである。この微小球は、ヘキサンのような無極性溶媒中で膨潤しないが、極性がより高い溶媒または水性溶媒への暴露によって約20～40容量%で膨潤する。この方法は、微小球自体の分散特性または浸透性を実質的に損なうことがないため、非常に望ましい。

図7Aおよび図7Bは、初期配置後並びにタッピングおよび空気脈動後のウェル250中のポリマー被覆微小球12を示す。図7Aおよび図7Bは、特別な固定技術を施さなくとも、機械的攪拌によってウェルから微小球が実質的に喪失していないことを示す。この効果は、恐らく微小球と光ファイバーとの間の静電気力によるものであろう。この静電気力は、微小球をウェル内に結合させる傾向を示す。すなわち、殆どの環境において、微小球の化学的または物理的固定を用いることが不要である。

30

別の具体例では、微小球寸法のような付加的なコード化パラメーターを付加することができる。必要なセンサーの数が数百を越える場合、異なる寸法の微小球を用いて、微小球のコード化サイズを拡大することができる。光ファイバーアレイは、異なる光ファイバー直径を有するピクセル（pixel）を含むように製造することができる。異なる寸法を用いれば、最も大きいウェルに、最も大きい微小球を充填でき、ついで移動させて漸進的により小さい微小球をより小さいウェルに充填し、全ての寸法のウェルに充填することができる。この方法では、同じ染料比率を用いて、異なる寸法の微小球をコード化でき、これにより、アレイに存在する、数種の異なるオリゴヌクレオチド配列または化学的官能基を拡大することができる。

40

実験結果

1. 酵素系センサー

亜母集団A

化学的官能基：アルカリ性リン酸分解酵素（フォスファターゼ）

標的基質：ニリン酸フルオレセイン（FDP）

レポーター染料比：DiIC：TRC＝比率1：1〔DiICは、ヨウ化1,1',3,3,3',3',-ヘキサメチル-インドジカルボシアニン、TRCは、テキサスレッドカダベリン（cadaverine）〕

光度の比率の範囲は、2つの染料の量子収量に基づき、亜母集団の染料比率について代表

50

的な光学的特性となるように選択した。この亜母集団の光学的特性は次のとおりである。
 $(\text{DiIC 光度} - \text{DiIC平均バックグラウンド}) / (\text{TRC 光度} - \text{TRC平均バックグラウンド}) = 0.847 \pm 0.23$

亜母集団B

化学的官能基：B-ガラクトシダーゼ

標的基質：フルオレセインジ-B-ガラクトピラノシド (FDG)

レポーター染料比：DiIC：TRC = 比率10：1、これは、次のような光学的特性に変換される。

$(\text{DiIC 光度} - \text{DiIC平均バックグラウンド}) / (\text{TRC 光度} - \text{TRC平均バックグラウンド}) = 4.456 \pm 1.27$

10

亜母集団C

化学的官能基：B-グルクロニダーゼ

標的基質：フルオレセインジ-B-D-グルクロニド (FDGicu)

レポーター染料比：DiIC：TRC = 比率1：10、これは、次のような光学的特性に変換される。

$(\text{DiIC 光度} - \text{DiIC平均バックグラウンド}) / (\text{TRC 光度} - \text{TRC平均バックグラウンド}) = 0.2136 \pm 0.03$

微小球母集団が、1またはそれ以上の基質の存在下にある場合、微小球上の各酵素は、基質の分解を触媒して、フルオレセイン（蛍光物質、490nmでの励起により530nmで発光）を生成する。次いで、特定のビーズに局在するフルオレセインの生産をモニターする。この方法では、フルオレセインの微小球周囲への局在化は、グリセロール90%および基質10%の基質溶液を用いて増大させる。グリセロールは、発生したフルオレセインの微小球反応部位からの拡散を防止する。

20

実験の間、コード化波長の画像をまずとった。なぜなら、DiICおよびTRCの両者とも、577nmで励起されるからである。微小球の670nmでの発光（DiICの存在を表示）および微小球の610nmでの発光（TRCの存在を表示）を、595nmの二色性物質および習得時間5秒（CCD236）を用いて記録した。

次に、光ファイバー繊維束の末梢端212を緩衝液に入れ、490nmのビームを照射させながら、別の画像を撮った。530nmのフルオレセイン波長の発光を、505nmの二色性物質（ジクロリック）を用いて記録した。この場合、CCD習得時間1秒を用いた。この方法によって、バックグラウンド標準化画像が得られる。緩衝液を除去し、光ファイバーを乾燥して、基質溶液の希釈を避けた。

30

基質溶液を、次いで導入し、CCD画像を30秒～1分毎に、30分間得た。微小球に490nmの光を照射しながら、530nm範囲の発光を集めた。光ファイバーを緩衝液に戻し、別のバックグラウンド画像を得た。フルオレセインの生成を示すシグナルを形成するビーズを、解読した。2つのレポーター染料からの光度の比率に応じて、光学活性ビーズの化学的官能基を、以下の表に従い解読することができる。

0.617-1.08	アルカリ性リン酸分解酵素ビーズ
3.188-5.725	β -ガラクトシダーゼビーズ
0.183-0.243	β -グルクロニダーゼビーズ

40

この方法を、残りの2つの基質について繰り返した。

図8A～図8Cは、ビーズ母集団を二リン酸フルオレセインに暴露した場合にCCD236によって形成した画像である。図8Aは、490nmで励起した場合のアルカリ性リン酸分解酵素微小球からのシグナルを示し、530nmの発光を記録した。この波長での発光は、フルオレセインの生成を示すものである。図8Bは、微小球を577nmで励起した場合にCCDで撮った画像を示し、670nmの発光を記録した。この波長は、微小球上のDiIC濃度を示すコード化波長である。最後に、図8Cは、微小球を577nmの光で励起した場合の画像を示し、微小球のTRC濃度を表示する610nm範囲の発光を記録した。

同様な方法で、図9Aおよび図9Bは、微小球をフルオレセインd- -ガラクトシダーゼに

50

暴露した場合の画像である。図9Aは、フルオレセイン生成を表示する530nmでの発光を示す。図9Bは、DiICの存在を表示する670nm範囲で発した光を示す。

顕微鏡写真、図8A～図8Cおよび図9A～図9Bは、微小球周囲のフルオレセイン生成を示すが、これらの微小球は、この微小球の化学的官能基に伴う反応を示す光学的特性の変化として検出することができる。顕微鏡写真は、光学的特性を解読して、各微小球についてその化学的官能基を決定することができる。

2. ゲノセンサー

3つの別々の亜母集団のビーズを用いた。亜母集団Aでは、x-ウサギ抗体（Ab）を微小球表面に付着した。亜母集団Bでは、x-ヤギ抗体を微小球に付着した。亜母集団Cでは、x-マウス抗体を微小球に付着した。これら3つの別々の亜母集団は、前記実験と同様なDiIC：TRCのコード化比率を用いて同定した。

10

実験の第一工程のため、コード化波長の画像は、577nm励起を用いて得、610nmおよび670nmでの発光を調べた。これを解読した後、光ファイバーを緩衝液に入れ、490nm励起を用いて530nmの画像を撮った。これにより、フルオレセイン発光波長において、バックグラウンド標準化シグナルを得た。次に、光ファイバーを、フルオレセインラベルウサギIgG抗原（Ag）に入れた。次いで、画像を、フルオレセイン530nm発光波長において、数分ごとに得た。図10Aおよび図10Bは、ウサギ抗原への暴露の前後においてCCDで得た画像を示し、これは、母集団内の選択微小球の反応を明確に示す。

注意すべきは、抗原溶液からのフルオレセインバックグラウンドが、抗体-抗原シグナルを調べるのにあまりにも高い場合には、光ファイバー繊維束を緩衝液に入れてもよい。これにより、Ab-Agシグナルのみを放出するバックグラウンド蛍光が除去される。

20

以上、本発明の好適な具体例を参照しながら、本発明を記載し、説明したが、当業者ならば、添付の請求の範囲に規定した本発明の範囲および精神を逸脱することなく、種々の変形例もなすことができるものと、理解すべきである。

【図1】

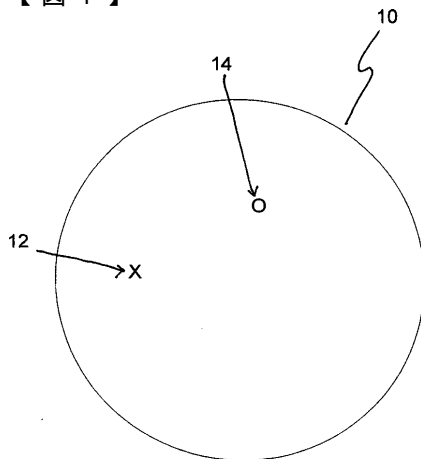


Fig. 1

【図2】

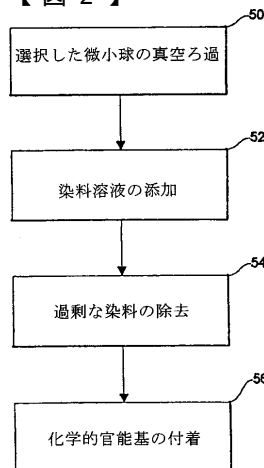


FIG. 2

【図 3】

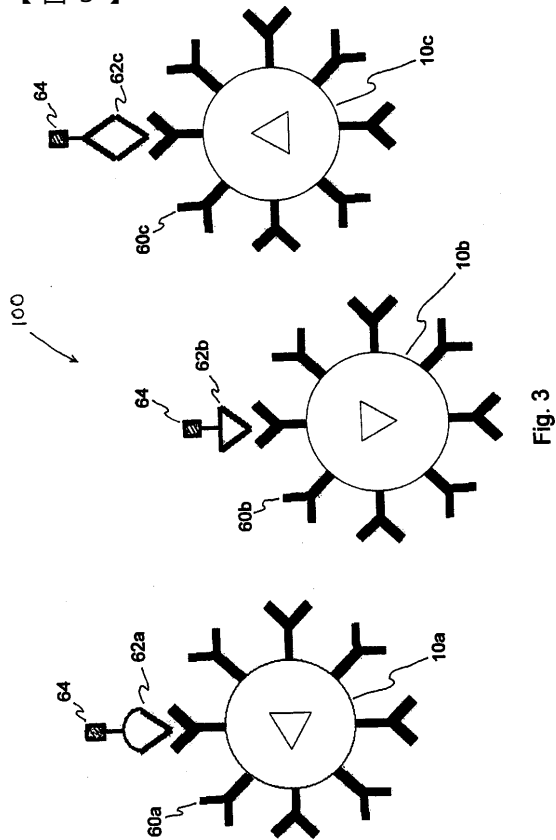


Fig. 3

【図 4】

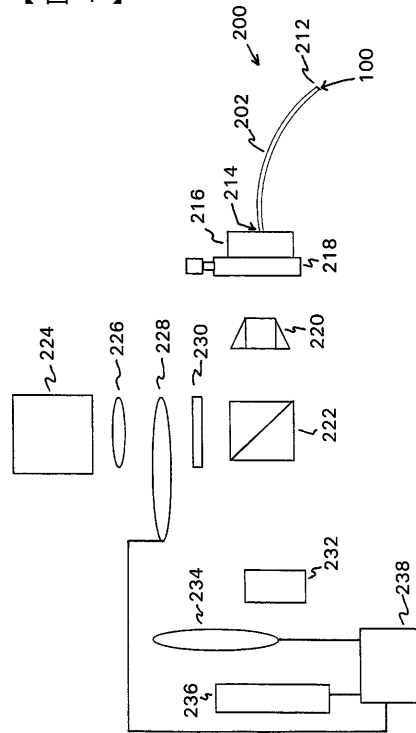


Fig. 4

【図 5 A】

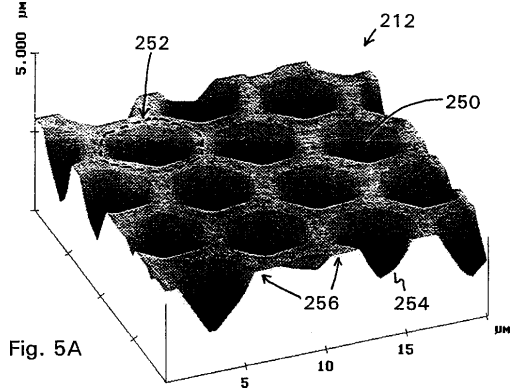


Fig. 5A

【図 5 B】

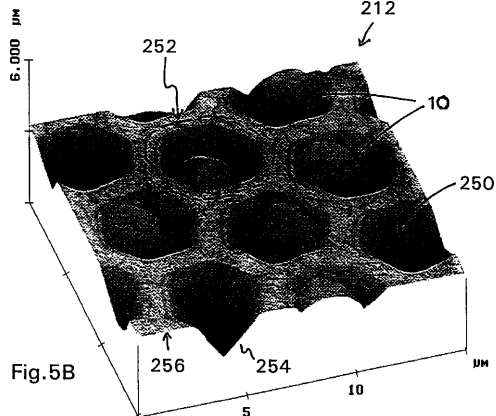


Fig. 5B

【図 6】

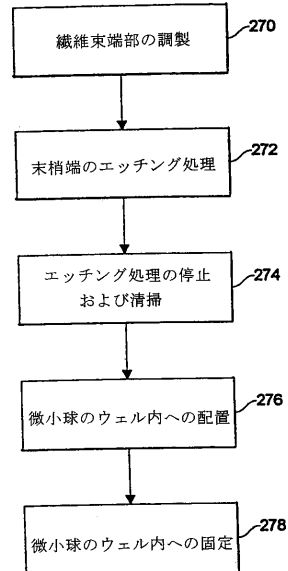


FIG. 6

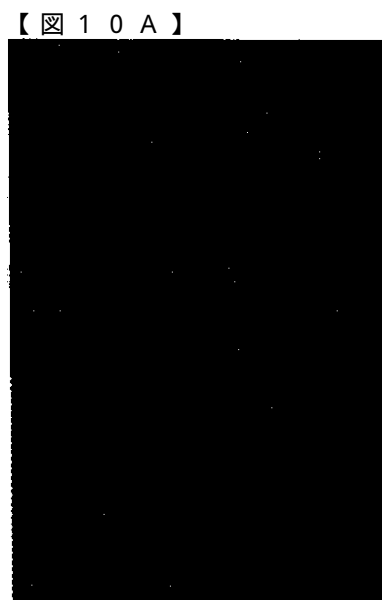
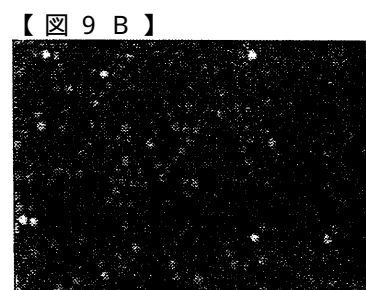
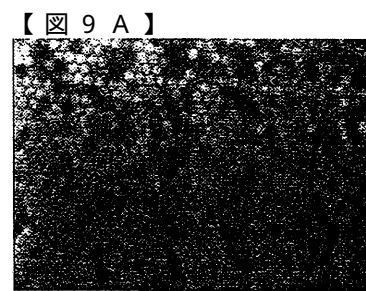
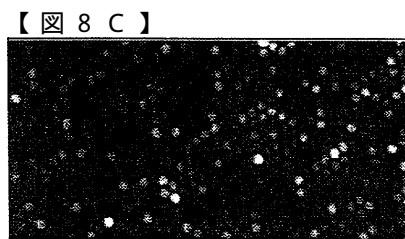
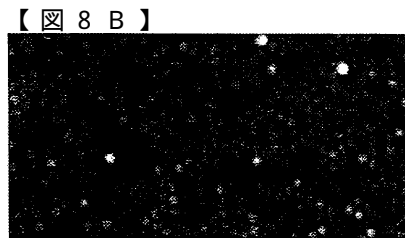
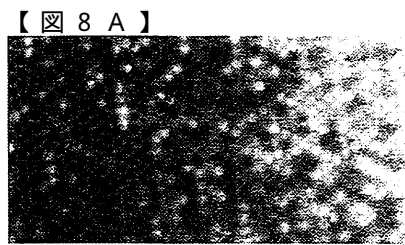
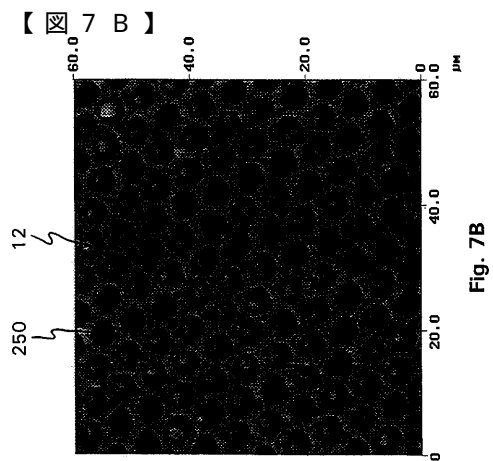
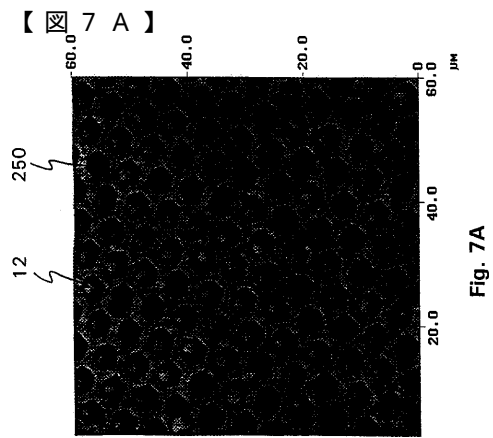




Fig. 10B

フロントページの続き

(72)発明者 マイケル、カリー・シー

アメリカ合衆国 0 2 1 4 5 マサチューセッツ州サマービル、パートリッジ・アベニュー 7 7 番

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開昭 6 4 - 0 3 5 2 6 8 (J P , A)

特開平 0 7 - 2 8 7 1 3 4 (J P , A)

米国特許第 5 3 0 8 7 7 1 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48 - 33/98