

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3640964号

(P3640964)

(45) 発行日 平成17年4月20日(2005.4.20)

(24) 登録日 平成17年1月28日(2005.1.28)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

G01N 21/64

F I

G01N 21/64

E

G01N 21/64

Z

請求項の数 24 (全 16 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-525167  (86) (22) 出願日 平成7年3月10日(1995.3.10)  (65) 公表番号 特表平10-500479  (43) 公表日 平成10年1月13日(1998.1.13)  (86) 国際出願番号 PCT/US1995/002682  (87) 国際公開番号 W01995/026498  (87) 国際公開日 平成7年10月5日(1995.10.5)  審査請求日 平成14年2月26日(2002.2.26)  (31) 優先権主張番号 217,883  (32) 優先日 平成6年3月25日(1994.3.25)  (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者  ブルーカー、ゲイリー  アメリカ合衆国 20854 メリーランド州 ポトマック ベントリッジ アヴェニュー 9212</p> <p>(74) 代理人  弁理士 三好 秀和</p> <p>(72) 発明者  ブルーカー、ゲイリー  アメリカ合衆国 20854 メリーランド州 ポトマック ベントリッジ アヴェニュー 9212</p> <p>審査官 横井 亜矢子</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 定量ルミネセンス比率顕微鏡法における高速多重波長照明源

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(A) 第1光源を用いて、第1波長、第1強度、または第1波長および第1強度の両方を有する光でサンプルを照射するステップと、

(B) 第2光源を用いて、第2波長、第2強度、または第2波長および第2強度の両方を有する光で、前記照射ステップ(A)の1ナノ秒(1ns)から1秒(1s)の時間期間内で、前記サンプルを照射するステップと、

を含み、

前記第1光源および第2光源の少なくとも1つが、パイロット・アークおよび運転アークを具備する多重アーク・ランプである、サンプルを照射する方法。

## 【請求項2】

前記パイロット・アークおよび運転アークが電氣的に互いに接続される請求項1に記載される方法。

## 【請求項3】

前記多重アーク・ランプにより生成される光のビームに光学軸があり、前記運転アークが前記光学軸と一列となり、前記パイロット・アークが前記光学軸と一列にならない請求項2に記載される方法。

## 【請求項4】

前記照射ステップ(A)が第1値を持つ電流に第1光源を通過させることを含み、前記照射ステップ(B)が第2値を持つ電流に第2光源を通過させることを含む請求項1乃至3

10

20

のいずれかに記載される方法。

【請求項 5】

前記照射ステップ (A) が、さらに、第 3 の値を持つ電流に前記第 2 光源を通過させることを含み、前記第 3 値が前記第 2 値より少なく、  
前記照射ステップ (B) が、第 4 の値を持つ電流に前記第 1 光源を通過させることを含み、前記第 4 値が前記第 1 値より少ない請求項 4 に記載される方法。

【請求項 6】

さらに、前記照射ステップ (A) の後で、前記照射ステップ (B) の前に、  
(A') 前記第 1 光源内の電流の前記第 1 値を前記第 4 値まで減少させることと、  
(A'') 前記第 2 光源内の電流の前記第 3 値を前記第 2 値まで増加させることと、  
を含む請求項 5 に記載される方法。

10

【請求項 7】

前記照射ステップ (B) の後に 1ns から 1s の時間期間内で前記照射ステップ (A) を反復することを含み請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載される方法。

【請求項 8】

(A) 第 1 波長、第 1 強度、または第 1 波長および第 1 強度の両方を持つ第 1 光ビームを生成する第 1 光源と、  
(B) 第 2 波長、第 2 強度、または第 2 波長および第 2 強度の両方を持つ第 2 光ビームを生成する第 2 光源であって、前記第 2 波長が前記第 1 波長と異なるか、前記第 2 強度が前記第 1 強度と異なるか、あるいは前記第 2 波長および前記第 2 強度が前記第 1 波長及び前記第 1 強度と異なる第 2 光源と、  
(C) 前記第 1 光源および第 2 光源のそれぞれに対する電流を制御するための制御手段であって、前記第 1 光源および第 2 光源に電氣的に接続されている制御手段と、  
を具備し、

20

前記第 1 光源および第 2 光源の少なくとも 1 つが、パイロット・アークおよび運転アークを具備する多重アーク・ランプである、  
2 つまたはそれ以上の波長、強度または光の波長および強度でサンプルを連続して照射するための装置。

【請求項 9】

前記パイロット・アークおよび運転アークが電氣的に互いに接続される請求項 8 に記載される装置。

30

【請求項 10】

前記多重アーク・ランプにより生成される光のビームに光学軸があり、前記運転アークが前記光学軸と一列となり、前記パイロット・アークが前記光学軸と一列にならない請求項 9 に記載される装置。

【請求項 11】

さらに、  
(D) 前記第 1 光ビームを妨害する光のバンドを選択するための第 1 手段と、  
(E) 前記第 2 光ビームを妨害する光のバンドを選択するための第 2 手段と、  
を具備する請求項 8 乃至 11 のいずれかに記載される装置。

40

【請求項 12】

前記装置が 2 つまたはそれ以上の光の波長でサンプルを連続して照射し、前記第 1 波長が波長の第 1 バンドの中間波長または平均波長であり、前記第 2 波長が波長の第 2 バンドの中間波長または平均波長であり、波長の前記第 1 バンドおよび前記第 2 バンドのそれぞれが (a) 40nm またはそれ以下の帯域幅を持つか、  
(b) 希望の波長または事前に選択された波長より大きいか、希望の波長または事前に選択された波長に等しい請求項 11 に記載される装置。

【請求項 13】

さらに、ビーム結合装置を具備する請求項 8 乃至 10 のいずれかに記載される装置。

【請求項 14】

50

(a) サンプル内で少なくとも1つの発光化合物を電子的に励起するのに十分なエネルギーを持つ第2光ビームを生成する第1光源と、

(b) 前記サンプル内で少なくとも1つの発光化合物を電子的に励起するのに十分なエネルギーを持つ第1光ビームを生成する第2光源と、

(c) 前記第1光源と第2光源のそれぞれに対する電流を制御するための制御手段であって、前記第1光源と第2光源のそれぞれに電氣的に接続される制御手段と、

(d) 光の波長を選択するための第1手段であって、前記第1光ビームに第1波長を提供するために前記第1光ビームの経路内に配置される第1手段と、

(e) 光の波長を選択するための第2手段であって、前記第2光ビームに第2波長を提供するために前記第2光ビームの経路内に配置され、前記第2波長が前記第1波長と異なる第2手段と、

(f) 前記サンプル用の取付けプラットフォームであって、前記発光化合物が発光放出を作り出すように、前記第1光ビームおよび第2光ビームが前記サンプルに当たるように配置される取付けプラットフォームと、

(g) 前記発光放出を受け取るために配置される検出器と、  
を具備し、

前記第1光源および第2光源の少なくとも1つが、パイロット・アークおよび運転アークを具備する多重アーク・ランプである、  
ルミネセンス放出測光法用の装置。

【請求項15】

前記パイロット・アークおよび運転アークが電氣的に互いに接続される請求項14に記載される装置。

【請求項16】

前記多重アーク・ランプにより生成される光のビームに光学軸があり、前記運転アークが前記光学軸と一列となり、前記パイロット・アークが前記光学軸と一列にならない請求項15に記載される装置。

【請求項17】

さらに、

(h) 前記第1光ビームおよび第2光ビームのそれぞれを、前記サンプルが位置する可能性がある前記取付けプラットフォーム上のロケーションに反射するために、前記第1光ビームおよび第2光ビームのそれぞれの経路内に配置される二色性ミラーとを具備する請求項14乃至16のいずれかに記載される装置。

【請求項18】

前記検出器が約2nsから1分の時間期間内に少なくとも2回前記検出器の感度を調整するための電子切り替え手段を備える請求項14乃至16のいずれかに記載される装置。

【請求項19】

さらにビーム結合装置を具備する請求項14乃至16のいずれかに記載される装置。

【請求項20】

前記検出器が前記第1光ビームによる励起に応じて、前記サンプルからの放出を検出し、前記装置が、さらに、前記第2光ビームによる励起に応じて前記サンプルからの放出を検出する第2検出器を具備する請求項14乃至16のいずれかに記載される装置。

【請求項21】

(A) 第1波長を持ち、サンプルに第1発光放出を放出させるのに十分なエネルギーを持つ光で、1nsから1sの時間期間内に前記サンプルを照射するステップと、

(B) 第2波長を持ち、前記サンプルに第2発光放出を放出させるのに十分なエネルギーを持つ光で、前記サンプルを照射するステップと、

(C) 前記第1発光放出および第2発光放出のそれぞれの強度を測定するステップと、

(D) 前記第1発光放出強度および第2発光放出強度の一方の前記第1発光放出強度および第2発光放出強度の残りの一方に対する比率を決定するステップと、

(E) 前記比率を前記サンプル内の前記ルミネセンスに影響を及ぼす化学種の濃度に

10

20

30

40

50

相関付けるステップと、  
を含み、

前記第1光源および第2光源の少なくとも1つが、パイロット・アークおよび運転アークを具備する多重アーク・ランプである、

発光放射を放出することができるサンプル内で、ルミネセンスに影響を及ぼす化学種の濃度を決定する方法。

【請求項22】

前記パイロット・アークおよび運転アークが電氣的に互いに接続される請求項21に記載される方法。

【請求項23】

前記多重アーク・ランプにより生成される光のビームに光学軸があり、前記運転アークが前記光学軸と一列となり、前記パイロット・アークが前記光学軸と一列にならない請求項22に記載される方法。

【請求項24】

前記ルミネセンスが蛍光性である請求項21乃至23のいずれかに記載される方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、高速多重波長照明源、照明源を具備する装置、照明源および装置を使用する定量比率ルミネセンス顕微鏡法 (quantitative ratio luminescence microscopy) の発光サンプルを照射する方法に関する。

発明の背景

定量蛍光顕微鏡法で拡大しつつある分野が、2つ以上の光の波長で検体の同じフィールドを連続的に照らし出し、各イメージを捕捉してから、2つの結果として生じるイメージ (あるいはイメージ内での関心のある領域) の強度を分割し、2つのイメージの強度率を求めることを必要とする比率イメージングである。典型的なケースでは、検体は蛍光染料により分類され、その蛍光率は染料の定量特性または蛍光染料の蛍光性に影響を及ぼす別の物質との相互作用と関係付けられる。多重放出率測光法および多重放出比率イメージング用の方法および装置の一例は、1992年8月26日に提出された米国出願番号07/935,873、現在は1994年7月26日に発行された米国特許第5,332,905号に記述され、その全内容は参照により本明細書中に取り入れられている。

定量蛍光比率イメージングまたは (「定量比率イメージング」または「定量比率測光法」としても既知の) 蛍光比率測光法において、蛍光化合物または種を含有する検体は、2つの異なる波長の光 ( $\lambda_1$  および  $\lambda_2$ ) により照らし出される。その結果生じる各蛍光強度 ( $I_1$  および  $I_2$ ) が、測光器により蛍光検体上の関心のある事前に決定された任意の数の領域で測定される。代わりに、蛍光強度  $I_1$  および  $I_2$  は、蛍光検体のイメージの作成または観察、あるいはその両方を行うことができるように、イメージング検出器により1列のピクセルとして検出することもできる。

2つのそれぞれの励起波長  $\lambda_1$  および  $\lambda_2$  のそれぞれでの蛍光放出強度の比率 ( $I_1/I_2$ ) の関係性は、蛍光染料と関連または相互作用する物質の濃度の関数である。蛍光性に影響を及ぼす物質 ([物質]) は、以下に示す等式 (1) により定義される。

$$[\text{物質}] = \frac{[I_1 @ \lambda_1] [\text{染料}]}{[I_2 @ \lambda_2] [\text{染料}]} \quad (1)$$

強度は、サンプルの同じロケーション (複数の場合がある) で測定される。したがって、蛍光化合物の濃度 ([染料]) は、両方の励起波長で同じとなる。このようにして、等式 (1) に従った測定での唯一の相違点とは、励起の波長である。ゆえに、染料濃度の項は、等式 (1) から相殺し合い、等式は以下に変形する。

10

20

30

40

$$[\text{物質}] = \int \frac{[I_1 @ \lambda_1]}{[I_2 @ \lambda_2]} \quad (2)$$

現在の慣行では、サンプルの比率イメージを求めることができる速度は、検体を励起波長のそれぞれにより交互に照らし出すことができる周波数により制限されている。波長の変化は、すべてのケースでなんらかの機械的な装置（例えば、フィルター・ホイール）により制御され、照射の波長を交番する。励起の波長を交番するもっとも典型的な方法は、（光の幅広いスペクトルを実現する）アーク・ランプ11でサンプルを照らし、図1に図示されるように検体13にだけ光の希望の波長を通すフィルター・ホイール12上でフィルターを切り換えることにより照明の波長を変更する方法である。

10

もう一つの方法は、サンプル上に焦点が合った2つの光源の単色光の間で交番する方法である。これは、現在では、図2に示されるように、2つの光源22と23および検体24の間に配置される機械的手段21により達成される。機械的手段21は、一般的には、シャッターを交互に開閉するか、チョッパー・ホイールを回転させることのどちらかにより、光の1つのビームを選択式で遮る。光ビームは、機械的手段21を通過した後、検体24を照射する前にフィルター25または26を通過する。

フィルター・ホイール、シャッターまたはチョッパー・ブレードを利用するアプローチは、フィルター、シャッター、チョッパー・ブレードを変更するのに必要となる機械的な運動の速度により制限を受ける。対照的に、新しい測定を行ったり新しい測定を処理するために検出器を交番する速度は、測定装置を制御する電子回路によってのみ制限される。一般的に、電子インパルスは、フィルター・ホイール、シャッター、またはチョッパー・ブレードのような機械的装置よりかなり高速な速度で変化できる。したがって、測光技術においては、機械的な運動の速度ではなく、電子回路の速度で異なる波長の光源を（繰り返し）変更するまたは異なる波長の光源間で切り換えるための手段の実現が望ましい目標となる。

20

さらに、機械的に切り替わるフィルター、シャッター、またはチョッパー・ブレードは、測定装置の振動も引き起こす。このような振動は、（特に検体が顕微鏡の下で見られている場合に）測定中のサンプルの位置の変化につながり、それにより測定から求められるデータの信頼性を破壊する可能性がある。

30

現在利用できる最高速度のフィルター・ホイールは、異なる励起波長間の切り替えを約2.5 - 5ミリ秒（ms）からの時間期間で行う機能を提供する。しかしながら、このようなフィルター・ホイールは動作中一定運動を行う。一定運動は、サンプルを照射できる期間を制限するだけでなく、励起光をフィルターする上で非均一な干渉パターンを生じさせる。

#### 発明の開示

したがって、本発明の第1の目的は、光の2つの波長の間で変更するための電子手段を具備する新規の照明源を提供することである。

本発明のさらなる目的は、照明源を具備する発光サンプルを照射するための新規装置を提供することである。

40

本発明のさらなる目的は、照明源および装置を使用する発光放射比率測光法および多重放出比率イメージングの新規の方法を提供することである。

本発明のさらなる目的とは、フィルター・ホイール、フィルター・アーム、チョッパー・ホイール、および照射の波長あるいは励起光の波長を変更するためのそれ以外の過去の装置に固有な振動というリスクが生じるのを回避する放出比率イメージングおよび放出比率測光法を実施するための新規の方法および装置を提供することである。

本発明のさらなる目的とは、異なった波長、または機械的な切替装置により制限されない速度での光の強度、あるいはその両方の中での切り替えを可能にする、サンプルを照射するための新規の方法および装置を提供することである。

50

本発明のさらなる目的とは、ミリ秒およびミリ秒以下の規模で発光物質と発光性に影響を及ぼす物質（を含む運動現象）の間の相互作用の変化をモニターすることができる発光放出比率測光およびイメージングを実施するための新規の方法および装置を提供することである。

本発明のさらなる目的とは、ミリ秒およびミリ秒以下の規模で蛍光物質とルミネセンスに影響を及ぼす物質を含む運動現象をモニターすることができる、蛍光放出比率測光法およびイメージングを実施するための新規の方法および装置を提供することである。

本発明のそれ以外のさまざまな目的、特徴および付随する優位点は、類似する参照文字がいくつかの図面全体で類似する部分または対応する部分を指定し、実施例の次に示す詳細な記述が、前記の問題を克服する本発明により提供されている、付随の図面に関連して考慮される場合に、以下の詳細な記述から同発明がさらによく理解されるに従い、より完全に認識される。

10

#### 【図面の簡単な説明】

本発明および付随するその優位点のより完全な理解は、同発明が、付随する図面に関連して考慮される場合に以下の詳細な説明を参照することによりさらによく理解されるに従い、容易に得られるであろう。

図1は、フィルター・ホイールを使用することにより照射の波長を変更する従来の方法を図解する。

図2は、シャッターまたは回転するチョッパー・ホイールを使用して照射の波長を変更する従来の方法を図解する。

20

図3は、2つの独立した光源を電子的に制御することにより励起エネルギーの波長を変更する方法を図解する。

図4は、放出比率測光法または放出比率イメージングあるいはその両方を実施するための装置の概要図である。

図5は、多重アーク切り替え源の性能特性を図解する。

図6Aおよび図6Bは、電子制御および切り替えの結果として、2つの独立した光源のそれぞれのアーク電流および光出力の変化をグラフで描画する。

図7は、アーク電流と光強度の間の一般的な関係性を図解する。

図8は、ビーム結合装置と組み合わせた本発明の照明源の代替実施例を図解する。

図9は、パイロット・アークおよび運転アークを利用する多重アーク・ランプを具備する本発明の照明源の代替実施例を図解する。

30

発明を実施するための最良の形態

類似する参照数字が、複数の図面で同一部分または対応する部分を示す図面、さらに特定するとその図3を参照すると、本発明の方法の光の2つの異なる波長でサンプルを連続して照射する方法および方法に適した装置の第1ステップが、静的に図解されている。図3では、電子電流制御手段31は、第1光源32に対し比較的高い電流を提供する。第1光源32は、第1波長特殊フィルター34を通過する励起光を提供し、それから発光（蛍光性であることが望ましい）物質を含有する検体36に当たる（または照射する）第1波長 $\lambda_1$ の光を生成する。と同時に、相対的に低い電流が、第2光源33に対し電子電流制御手段31により提供される。電流の第2光源33に対する相対的な割合は、第1波長 $\lambda_1$ の励起光での照射により引き起こされ、第1光源32および第1波長特殊フィルター34により生成される、検体36の発光放出（複数の場合がある）に干渉しない、あるいは検体36の発光放出（複数の場合がある）に影響を及ぼさないほど十分に低い。

40

技術において理解されているように、光のエネルギーはその波長に反比例する。用語「エネルギー」および「波長」は、光に関しては取り換えて使用できる。さらに用語「発光」および「ルミネセンス」は、両方とも蛍光性の現象および燐光性の現象を指す。

励起光の波長を変更するためには、電子電流制御手段31は、それぞれの光源（例えば、アーク・ランプ32および33）を流れる電流の相対量を交互に変更する。その結果、電子電流制御手段31は、第1光源32および第2光源33の強度も交互に変更する。図3に示される第1ステップから、第2光源33を流れる電流を増大させ、第1光源32を流れる

50

流れる電流を減少させることにより、サンプル36に当たる光の波長が変化する。

このようにして電流を変更すると、各光源の光強度の瞬間的な変化が引き起こされる。2つの源を使用するシステムのケースでは、電流が(  $I_1$  を制御する ) 第1ランプ32で増加し、電流が(  $I_2$  を制御する ) 第2ランプ33で減少すると、その結果生じる効果は、 $I_1$  光で検体36を照明することである。それから電流が(  $I_2$  を制御する ) 第2ランプ33で上昇し、電流が(  $I_1$  を制御する ) 第1ランプ32で減少すると、その結果として生じる効果は、 $I_2$  光で検体36を照明することである。その結果、光のこれらの2つの波長で検体を交互に照らし出すために、電子電流制御手段31が提供することができる周波数でサイクルを繰り返すことができる。

また、光の異なる波長を変更したり、光の異なる波長の間で切り替えるための前記の同じ方法で、第1光源および第2光源により生成される光の異なる強度を変更したり、第1光源および第2光源により生成される光の異なる強度の間で切り替える、あるいはその両方を行うこともできる。したがって、光の異なる強度を変更したり、光の異なる強度間で切り替えたり、あるいはその両方を行う場合には、第1光源および第2光源、ならびにそれと関連するあらゆる波長選択手段により提供される第1光ビームおよび第2光ビームは、同じである場合(  $I_1 = I_2$  ) もあれば、異なる場合(  $I_1 \neq I_2$  ) もある。

したがって、本発明のある面は、

( A ) 第1波長、第1強度、または第1波長と第1強度の両方を有する光で前記サンプルを照射するステップと、

( B ) 第2波長、第2強度、または第2波長と第2強度の両方を有する光で、前記照射ステップ( A ) の1ナノ秒( 1ns ) から1秒( 1s ) の時間期間内で前記サンプルを照射するステップと、

から構成される、サンプルを照射する方法に関する。

便宜上、以下の説明( 複数の場合がある ) では、同じ技法は、光の異なる強度へ変更したり、光の異なる強度の間で交互に切り替えたりすることにも適用できるが、光の異なる波長を変更したり、光の異なる波長の間で交互に切り替えたりするための方法および装置に集中する。

本発明のサンプルを照射する方法の照射ステップ( A ) は、第1値を有する電流に第1光源を通過させることを含むのが望ましく、照射ステップ( B ) は、第2値を有する電流に第2光源を通過させることを含むのが望ましい。照射ステップ( A ) は、第3値が電流の第2値を下回る、第3値を有する電流に第2光源を通過させることも含み、照射ステップ( B ) が、第4値が電流の第1値を下回る、第4値を有する電流に第1光源を通過させることも含むのが更に望ましい。

本発明の別の面では、サンプルを照射する方法は、照射ステップ( A ) の後で、照射ステップ( B ) の前に、

( A' ) 第1光源の電流の第1値を電流の第4値まで減少させるステップと、

( A'' ) 第2光源の電流の第3値を電流の第2値まで増大させるステップと、

をさらに具備する。

本発明のさらに別の面では、サンプルを照射する方法の高速かつ正確な反復性が優位に利用されている。したがって、方法は、さらに、照射ステップ( B ) の後の1nsから1sの時間期間内で、照射ステップ( A ) を反復することを含む。

本発明のさらに別の面は、

( A ) 第1波長、第1強度、または第1波長と第1強度の両方を有する第1光ビームを生成する第1光源と、

( B ) 第2波長、第2強度、または第2波長と第2強度の両方を有する第2光ビームを生成する第2光源であって、前記第2波長が前記第1波長と異なるか、前記第2強度が前記第1強度と異なるか、あるいは前記第2波長および前記第2強度が前記第1波長および第1強度と異なる第2光源と、

( C ) 前記第1光源および前記第2光源のそれぞれに対する電流を制御するための制御手段であって、前記制御手段が第1光源および第2光源に電氣的に接続されている制御手段

10

20

30

40

50

と、

を具備する、2つまたはそれ以上の波長、強度、あるいは光の波長と強度でサンプルを連続して照射するための装置に関する。

光の第1波長および第2波長のそれぞれは、光の波長のバンドまたは範囲の中間波長あるいは平均波長（例えば、300nmから340nmあるいは380nmから400nm）を表すか、あるいは選択されたまたは希望の波長より大きなバンドまたは範囲〔例えば、500nmまたはそれ以上の波長を持つ光が通過できるようにする長パス・フィルターのよう「長パス・フィルター」〕を表す場合がある。したがって、本発明の装置は、さらに、光のバンドを選択するための第1手段および第2手段も具備し、その場合、手段は、フィルター、回折格子モノクロメーター、あるいは光の波長の選択されたバンドを実現するそれ以外の同等な装置である可能性がある。本発明の光のバンドを選択するための手段は、光源により生成された後で、サンプルに当たるまたはサンプルを照射する前に、各光ビームを遮る。

任意のバンド幅を持つ光のバンドを選択できるが、波長の第1バンドおよび第2バンドのそれぞれが40nmまたはそれ以下の帯域幅となるか、あるいは希望の波長または選択された波長より大きいか、希望の波長または選択された波長に等しくなることが望ましい。このような光の波長のバンドは、それぞれが第1光源および第2光源により生成される光の経路内に配置される第1フィルターおよび第2フィルターにより実現される。このようなフィルターは、任意の数の適切な従来の波長選択物質からできている可能性があり、一般的に技術で既知である。代わりに、希望の励起波長を提供する従来の回折格子モノクロメーターが、第1フィルターおよび第2フィルターのどちらかまたは両方の代わりに使用される場合がある。このようにして、優位な実施例においては、本発明の装置が、光の2つまたは3つ以上の波長でサンプルを照射する。第1波長は、波長の第1バンドの中間波長または平均波長であり、第2波長は、波長の第2バンドの中間波長または平均波長であり、波長の第1バンドおよび第2バンドのそれぞれは、(a) 40nmまたはそれ以下の帯域幅となるか、(b) 希望の波長または事前に選択された波長を上回るか、希望の波長または事前に選択された波長と等しくなる。

本発明の別の面では、サンプルを光の2つまたは3つ以上の波長で連続して照射するための装置での第1光源(A)は第1アークであり、第2光源(B)は第2アークである。装置の1つの実施例では、第1アークは第1アーク・ランプであり、第2アークは第2アーク・ランプである。

本発明では、サンプルにおいて任意の数の発光放出を作成するために十分な励起光を提供するアーク・ランプが使用されることがある。光源は、例えば10Wから2000Wのワット数のアーク・ランプである場合がある。適切なアーク・ランプの選択は、必要となる照明（励起光）の量、光源により作り出される光の強度、またはそれ以外の関連する要因（複数の場合がある）、あるいはそのすべてに基づいて決定される。本発明による装置および方法の1つの優位点は、利用できる光源の柔軟性にある。例えば、第1源を光の第1強度を提供するアーク・ランプ（例えば、500ワット(W)のアーク・ランプ)とし、第2光源が光の第2の相対的に高い強度または相対的に低い強度（例えば、10Wまたは2000Wのアーク・ランプ）を提供する場合がある。

本発明の方法および装置の別の優位点とは、光の2つの異なる波長でサンプルを同時に照射できるという点である。例えば、第1光源は、発光化合物または染料を励起する照射光の第1波長を実現し、第2光源が技術(Ann.Rev.Biophys.Chem.,第18巻、239頁(1989年))のJ.A.マックレイ(McCray)その他、およびオレゴン州、ジャンクシオン・シティーにある分子プローブ社(Molecular Probe)により配布されるカタログの品目番号4287を参照のことで既知の方法で光活性化可能なケージに入れられた(caged)プローブを「アンケージ(uncage)する」か、起動するために照射光の第2波長を提供することができる。代わりに、第1光源が、光の第1波長でサンプルの連続照射を行い、第2光源がサンプルの間欠照射を行う（例えば「点滅」照射）場合がある。したがって、本発明の方法は、照射ステップの任意の特定の時相シーケンスに制限されない。

本発明は、2つ以上の光源および2つ以上の光の波長を含むように拡張されることもある

10

20

30

40

50

。理論的には、生成される光ビームが照射のためにサンプルに向けることができる限り、光源の数に制限は存在しない。同様に、選択された波長のそれぞれを、サンプルを照射するために作り出し使用できる限り、選択可能な光の波長の数に制限はない。

図4は、放出比率測光法またはイメージングを実施するためのある特定な装置の典型的な図を示す。光源41は、希望の放出現象を生じさせるために、適切な励起エネルギーの光を提供する。本発明では、光源41は、電子電流制御手段31および第1光源32と第2光源33を具備する図3に図示される装置であるのが望ましい。光源41からの光は(図3に図示されるように、第1フィルター34および第2フィルター35を具備することがある)濾過装置42を通過してから、二色性ミラー43によりサンプル取付け領域または取付けプラットホーム44に向かって反射される。それから、励起光は取付けプラットホーム44上に配置または取り付けられたサンプルにより吸収される。サンプルは、発光(蛍光性または燐光性)物質または発光合成物を含有し、合成物は、発光物質および発光性に影響を及ぼす種類を含む。発光物質または合成物は、励起状態になり、その後励起光より低いエネルギーで、長い波長の光を放出する。発光物質から放出される光は、二色性ミラー43を通過し、放出が測定される検出器46に向かって、一連のミラー45(a)、45(b)、および45(c)により反射される。

それから、第2放出を得るために、プロセスが繰り返される。任意の数の追加発光物質または合成物を有するサンプルの場合、プロセスは追加発光物質または合成物ごとにさらに二度繰り返される。放出のそれぞれが、適切に装備された検出器により個別にモニターされる。

本発明に従って、光波長を変更するためのこのような機械的な装置は、本発明の慣行には使用されないという点は除くが、任意の数のランプ源が、シャッターまたはチョッパーを使用して前記の従来の方法(複数の場合がある)でのように検体を照らし出すことができるように配置される。

図5に図解されるように、励起光の第1波長( $\lambda_1$ )から励起光の第2波長( $\lambda_2$ )への変更は、電子電流制御手段51を使用して電子的に達成される。電流を光源に制御する制御手段が、ソリッド・ステートの電子回路により提供されるのが望ましい。

図5により示される静的図解では、電子電流制御手段51は、この静的図解では活性光源である第1光源52に対して相対的に高い電流を提供する。例えば、第1光源に流れる電流の相対パーセンテージは、電子電流制御手段51により第1光源52および第2光源53の両方に供給される総電流の>90%となることがある。不活性光源を通して小さな電流を維持することの方が望まれることを考えると、電流の活性光源に対する最大相対パーセンテージは、すべての光源に対して電子電流制御手段により供給される総電流の95%から99%となるのが望ましい。したがって、図5の静的な図解においては、第1光源52に対して供給される電流の相対パーセンテージは、第1光源52および第2光源53の両方に電子電流制御装置51により供給される総電流の、95-99%となるのが望ましく、第2光源53に供給される電流の相対パーセンテージは1-5%となるのが望ましい。

第1光源52は、第1波長特殊フィルター54を通過する第1光ビームを提供し、それから第1検出器56にあたる第1波長 $\lambda_1$ の光を生成する。同時に、相対的に低い電流が、第2波長特殊フィルター55を通過する第2光ビームを提供し、それから第2検出器57にあたる第2波長 $\lambda_2$ の光を生成する。

励起光の異なる波長の間で切り替えを行うために、電子電流制御手段51は、各光源52および53を通して流れる電流の量を交互に変更することによって、各光源52および53の相対強度を交互に変更する。光源52および53は、例えば、アーク・ランプである。光源53を通して流れる電流を増大させ、第1光源52を通して流れる電流を減少させることによって、第1検出器56および第2検出器57にあたる光の各波長の強度は、互いに対して変化する。代わりに、あるいはさらに、電子電流制御手段51を使用することによって、励起光の異なる強度を切り替え、各光源52および53を通して流れる電流の相対量を交互に変更することができる。

光源(例えば、アーク・ランプ)の強度が減少状態にあるときには、光源で最小の電流を

10

20

30

40

50

維持することが優位である。光源の、およびさらに特定するとアーク・ランプでの「最小電流」とは、小さなアークをサポートするのに十分な電流ではあるが、相対的に大きな電流にそれを通過させる光源からの光での照射から生じる放出の測定との干渉を生じさせない電流のことである。最小電流で動作するアークを「パイロット」状態にあると考えることができる。ランプにかけられる最大電流の最低1%またはそれ以下の電流でアークを活性状態で維持できる。アークが活性状態である限り、増大した電流をかけると瞬間的に新しいレベルの照明になる。パイロット状態にあるアークが消えてしまうと、高速切り替えは可能ではない。アークを確立し直すには、比較的長い時間量（例えば、約1 - 20秒）が必要である。

パイロット状態にアークを維持すると、新しく安定した光の強度を瞬間的に確立することが容易になる。新しい強度の安定性および再現性は、発光種または発光性に影響を及ぼす種の未知の濃度分布を含むサンプルの放出強度を照射または測定する前に、適切な基準により校正することにより優位に強化できる。したがって、アーク・ランプ源は、瞬間的な非機械的な振動を免れた電子制御という重要な特徴により、高速切り替えされる光強度の幅広い動的な範囲を実現するために優位に利用できる。

図5に示されるように、電流の相対的に高い割合および相対的に低い割合が、第1光源52と第2光源53の間で交番され、生成される各光ビームの強度は、第1検出器56および第2検出器57でモニターされ、図6Aおよび図6Bに示される光対時間強度が観測される。第1検出器56および第2検出器57は、例えば、高速光ダイオード検出器である。増大した電流を瞬間的にかけると、光強度はただちに増加する。同様にして、電流の即座の減少は、光出力（強度）の即座の比例する損失につながる。図6Aおよび図6Bに示される例では、 $I_1$  または  $I_2$  による1回の照射は、1ナノ秒ほどの短さから理論的には無限に近づく長さまで変化するが、実際上の理由から、図6Aおよび図6Bに示される結果として生じる反復性で2時間から4時間の長さになる場合がある。

図6Aおよび図6Bを参照すると、サンプルが  $I_2$  光で照射される時間期間「a」およびサンプルが  $I_1$  で照射される時間期間「b」は、電子的に制御可能な任意の期間とすることができる。理論的には、サンプルを光の片方の波長または両方の波長で照射可能な時間の長さには上限はない。ただし、実際的な見地から、サンプルは、1nsから24hまで、さらに優位には1nsから1sまで、あるいはさらに優位には1nsから2.5msまでの時間の長さの間光の1つの波長で照射される。

さらに、片方の光源（例えば、アーク・ランプ）からの光出力の強度は、光源にかけられる電流の量に線状に比例する。

図8に示されるように、2つの光源82および83（例えば、アーク・ランプ・ビーム）が、検体を照らし出すために従来のビーム結合装置84内で結合されるように、装置の構成要素を配置することにより、本発明を顕微鏡内の蛍光比率測光法およびイメージングのために構成することもできる。例えば、適切なビーム結合装置は、ドイツ、オベルコチエン（Oberkochen）のCarl Zeiss社製のものである。電子電流制御81は、希望するようにサイクルごとに1nsから24hの周波数で  $I_1$  光源82と  $I_2$  光源83の間で照明を交番する。

本発明による照明源のオプションの実施例では、互いに電氣的に接続されるのが望ましいパイロット・アークおよび運転アークを備える多重アーク・ランプが利用される。このようにして、アーク強度切り替えの代替方法および本発明に従った代替装置は、2つまたは3つ以上のアークが維持される（多重アーク・ランプ）の光源の内少なくとも1つを利用し、その場合、一方のアークはパイロット・アークであり、もう一方のアークが運転アークである。

本発明の多重アーク・ランプでは、各光源の一方のアークは光源内で最小の電流を維持するために「パイロット」状態にある光学軸から外れたままであり、各光源のもう一方のアークは光学軸内に配置される（「運転」アーク）。運転アークは、オンまたはオフに切り替えたり、その強度をそれを通過する電流を電子的に変化させることにより調整させることができる。

10

20

30

40

50

パイロット・アークおよび運転アーク付きの多重アーク・ランプは、図9に図示される。メイン・アーク91(「運転」アーク)は、多重アーク・ランプにより生成される光のビームの光学軸93と一直線になる。相対的に高い事前に選択された電流量または希望の電流量が、電子電流制御手段(図示されていない)により供給され、メイン・アーク91を通過し、サンプルの照射のために光 $\lambda_1$ の第1波長を提供する。電子電流制御手段は、「パイロット」状態を維持するために、パイロット・アーク92に最小電流を提供する。

パイロット・アークが電氣的に運転アークに接続されている場合、パイロット・アークの機能は、光源の光提供手段(多重アーク)を通して最小電流を維持することである。この実施例は、特に、運転アークがオンとオフに交互に切り替えられる方法で優位である。運転アークを通過する電流が、(相対的に低い値からまたはゼロ電流から)相対的に高い値に上昇すると、パイロット・アークは、運転アーク内でアークを瞬間的に確立し直す電流を実現する。本発明の多重アーク・ランプの別の優位点とは、パイロット・アークにより生成される光が光学軸と一列になっていない(実質上または完全に整列状態から外れている)という点である。したがって、多重アーク・ランプは、単独アーク・ランプより「パイロット」状態で維持されるアークから生成する干渉光が少なくなる。

サンプル照射光の波長を $\lambda_1$ から $\lambda_2$ に切り換えるには、電子電流制御手段がメイン・アーク91の電流を最小電流、あるいは望ましくはゼロ電流に減少させる。同時にあるいは連続的に、(図9には図示されていない、単独アーク・ランプまたは多重アーク・ランプのどちらかである)第2光源への電流がサンプルの照射のために励起波長 $\lambda_2$ を提供するのに十分なほど上昇する。パイロット・アーク92に提供される電流は(前記に定義されるように)最小電流で維持され、優位なことに一定電流で維持される。特に優位な実施例では、第2光源が第2多重アーク・ランプであり、サンプル照射光の波長または強度を切り換えることは、波長 $\lambda_2$ のまたは第2強度を持つ光ビームを提供するのに十分なほど第2光多重アーク・ランプの運転アークに対する電流を増大させることを含む。

本発明の照明源および装置は、特に、多重放出比率測光法およびイメージング、ならびに蛍光放出比率測光法およびイメージングを含む、放出比率測光法および放出比率イメージングの方法で有効である。ただし、本発明は、これらの特殊な有用性に制限されていない。

したがって、本発明の別の面は、

(a) サンプル内で少なくとも1つの発光化合物を電子的に励起するために十分なエネルギーを持つ第1光ビームを生成する第1光源と、

(b) 前記サンプル内で少なくとも1つの発光化合物を電子的に励起するために十分なエネルギーを持つ第2光ビームを生成する第2光源と、

(c) 第1光源および第2光源のそれぞれに対する電流を制御するための制御手段であって、第1光源および第2光源のそれぞれに電氣的に接続されている制御手段と、

(d) 第1光ビームに第1波長を提供するために、第1光ビームの経路に配置される光の波長を選択するための第1手段と、

(e) 第2光ビームに第2波長を提供するために第2光ビームの経路に配置される光の波長を選択するための第2手段であって、第2波長が第1波長と異なる第2手段と、

(f) 前記サンプル用の取付けプラットフォームであって、発光化合物が発光放出を作り出すように、第1光ビームおよび第2光ビームのそれぞれがサンプルにあたるように配置される取付けプラットフォームと、

(g) 発光放出を受け取るために配置される検出器と、  
を具備するルミネセンス放出測光法用の装置に関する。

望ましい実施例においては、ルミネセンス放出測光法用の本発明の装置は、さらに、

(h-1) サンプルが位置する可能性がある取付けプラットフォーム上のロケーションに第1光ビームおよび第2光ビームのそれぞれを反射するために、(それぞれ第1波長および第2波長を有する)第1光ビームおよび第2光ビームのそれぞれの経路内に配置される二色性ミラーと、

(h-2) ビーム結合装置と、

10

20

30

40

50

(h-3) 第2検出器と、  
あるいはそのあらゆる組み合わせと、  
を具備する。

ルミネセンス放出測光法用の本発明の装置の別の面では、検出器(d)(または第2検出器(h-3)あるいはその両方)は、約2nsから1分の時間期間内で少なくとも2回検出器の感度を調整するための電子切換装置を具備する。

望ましい実施例では、検出器は、1992年8月26日に提出され、現在では許可されている米国出願番号07/935,873に記述される検出器のような感光要素を備えるカメラおよび感光要素内で作り出される電気信号を増加させるための手段を具備する。当業者には既知である、従来の増強された電荷結合素子(CCD)が、検出器としての使用に適している。ただし、望ましい感光要素および電気信号を増加させるための手段を具備する望ましいカメラは、ATTOFLUOR(登録商標)デジタル蛍光顕微鏡法システム(商標、Atto計器、ロックビル、メリーランド)を伴うカメラである。

第2検出器を具備する実施例では、第1検出器(前記検出器(g))は、第1光ビームによる励起に応じてサンプルからの放出を検出する。第2検出器は、第2光ビームによる励起に応じてサンプルからの放出を検出する。

オプションで、検出器には、第1カメラおよび第2カメラを取り付けることができる。従来のビーム・スプリッターは、一般的に技術で既知である任意の数の適当な従来の波長選択物質から作られるフィルターによる放出ビームの妨害の前に、構成要素波長範囲の中に反射された放出ビームを分離するために使用できる。ビーム・スプリッター8によりカメラ7(a)に反射される放出ビーム波長範囲は、プリズムまたはミラー11によりフィルター10(a)に向けられる。2台カメラ・システムは、2つの独立した放出を正確に同時モニタするという点で優位点を提供する。ただし、2台カメラ・システムの不利な点とは、信頼できる結果を実現するためには感光装置が正確に位置合わせされなければならないという点である。

本発明の別の面は、

- (A) 第1波長を持ち、サンプルに第1発光放出を、1nsから1分の時間期間内に、放出させるのに十分なエネルギーを持つ光でサンプルを照射するステップと、
- (B) 第2波長を持ち、サンプルに第2発光放出を放出させるのに十分なエネルギーを持つ光でサンプルを照射するステップと、
- (C) 第1発光放出および第2発光放出のそれぞれの強度を測定するステップと、
- (D) 発光放出強度の1つの発光放出強度の残りの一方に対する比率を決定するステップと、
- (E) サンプル中のルミネセンスに影響を及ぼす化学種の濃度に比率を相関付けるステップと、

を含む、発光放射を放出することができるサンプルでルミネセンスに影響を及ぼす化学種の濃度を決定する方法に関する。

本発明の望ましい実施例では、ルミネセンスは蛍光性である。

本発明のその他の特徴は、本発明の図解のために示されるが、それを制限することを意図としていない典型的な実施例に関する以下の記述の過程で明らかになる。

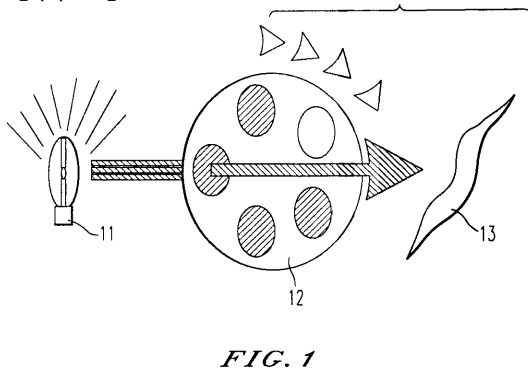
#### 例1

ガラス製のカバースリップ上で育てられた培養星状細胞腫細胞は、5mMのブドウ糖を含有する生理食塩溶液中で20分間5 $\mu$ M Fura-2 AM(オレゴン州、ジャンクション・シティーのモレキュラ・プローブ社が市販している蛍光染料)で分類される。細胞は、媒体から過剰なFura-2 AMを除去するために洗浄される。それから細胞はザイス・アキシオバート(Zeiss Axiovert)135顕微鏡のステージ上に装填され、ザイス・アクロスチグマ40パワー・オイル浸漬対物レンズ(Zeiss Achrostat 40 power oil immersion objective)で観察される。細胞は、(第1アークまたは第1光源および第2アークまたは第2光源を備える)二重励起光源により励起(照射)された。各光源のそれぞれの電流は、図5の概要図に図示される制御手段51により表されるコンピュータにより制御される。

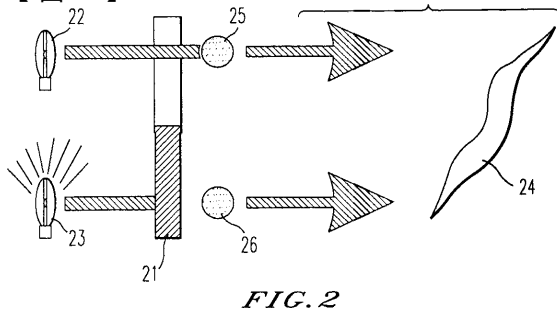
ビームは、図8に図示される(ドイツ、オーバーコチェンのカール・ゼイス(Carl Zeiss)社製の)ビーム結合装置84を使用して結合される。図5を参照すると、第1アーク源52および第2アーク源53は、各100ワットの水銀アーク・ソースであり、干渉フィルター54は、平均波長334nmの光を通過させる10nmのバンドパス(帯域幅)フィルターであり、干渉フィルター55は、平均波長380nmの光を通過させる10nmの帯域フィルターである。395nm以下の光を反射し、この波長以上の光を通過させることにより、放出光から励起光を分離する二色性ミラーは、サンプルからの放出だけでなく二重励起光源により生成される第1光ビームおよび第2光ビームの両方を妨害するために配置される。例えば、図4を参照すると、光源41により生成される(交番する334nmおよび380nmの光のある)励起ビームは、二色性ミラー43に当り、細胞サンプル44上に反射される。Fura-2(またはFura-2 AMあるいはその両方)をロードされた細胞からの蛍光性放出は、500nm光の範囲内にある。蛍光性放出は、二色性ミラー43を通過し、二色性ミラーと光検出器の間の光経路内に配置される495nmの長パス・フィルターを通過した後カメラまたは光検出器46まで反射される。334nmと380nmの間の照明を交番させることにより、細胞は、細胞内のカルシウム・イオンの濃度に比例して交互に蛍光を放出する。

明らかに、前記教示を鑑みると、本発明の多数の改良およびバリエーションが可能である。したがって、本発明を、添付請求項の範囲内で本明細書に明記される以外に実施できることが理解されるべきである。

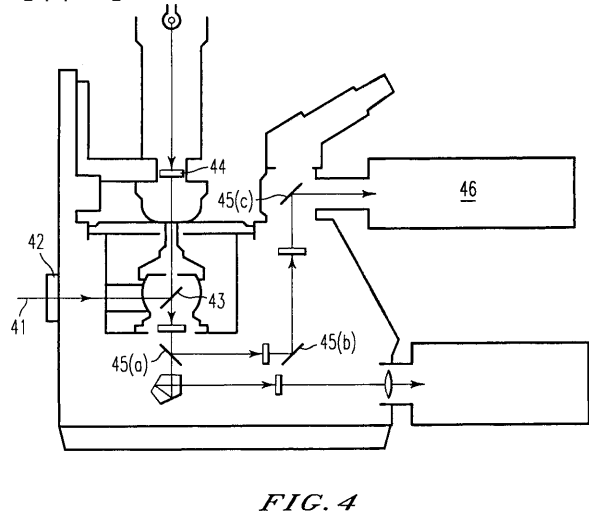
【図1】

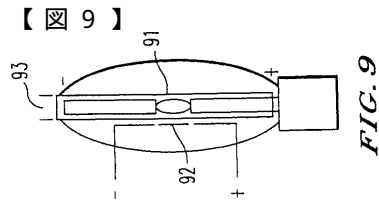
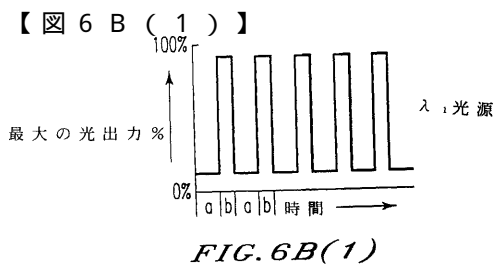
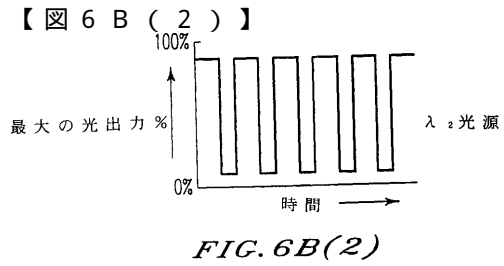
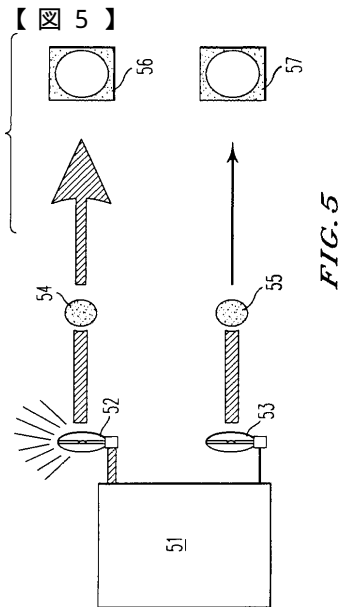
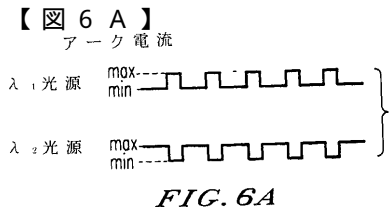
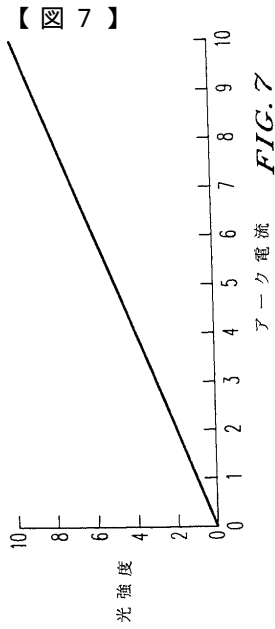
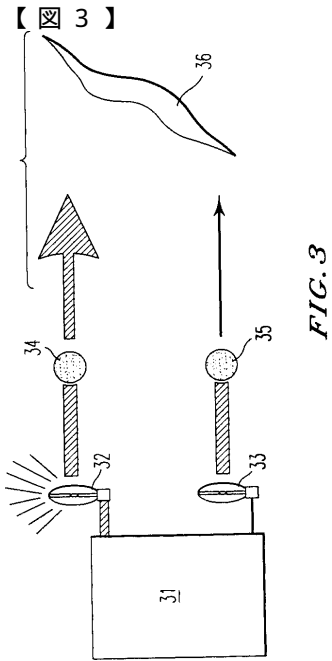


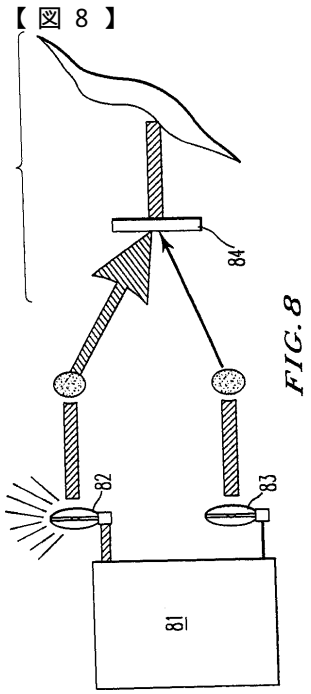
【図2】



【図4】







---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平04 - 215044 (JP, A)  
特開昭63 - 079040 (JP, A)  
特開昭58 - 005631 (JP, A)  
米国特許第05294799 (US, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)  
G01N 21/62 - 21/74