

(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2004-354348

(P2004-354348A)

(43) 公開日 平成16年12月16日(2004.12.16)

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

GO1N 21/64

F I

GO1N 21/64

E

テーマコード(参考)

2GO43

GO1N 21/64

B

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2003-155635 (P2003-155635)  
 (22) 出願日 平成15年5月30日(2003.5.30)

(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43番2号  
 (74) 代理人 100058479  
 弁理士 鈴江 武彦  
 (74) 代理人 100091351  
 弁理士 河野 哲  
 (74) 代理人 100084618  
 弁理士 村松 貞男  
 (74) 代理人 100100952  
 弁理士 風間 鉄也  
 (72) 発明者 石橋 養親  
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業株式会社内

最終頁に続く

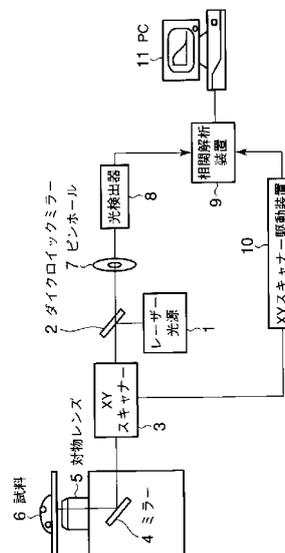
(54) 【発明の名称】 分光分析装置

(57) 【要約】

【課題】 共通に設けられた光学系により複数の測定地点間の相互相関解析を行うことが可能で、小型で價格的にも安価な分光分析装置を提供する。

【解決手段】 励起光としてのレーザー光を発生するレーザー光源1からのレーザー光を対物レンズ5を介して試料6上に集光させるとともに、XYスキャナー3によりレーザー光を試料6上で2次元走査し、レーザー光により発生する蛍光強度を光検出器8で測定するようになっていて、XYスキャナー3によるレーザー光の走査にともなう試料6上での少なくとも2つの測定地点での光検出器8からの蛍光強度信号をXYスキャナー3の走査位置情報と関連づけて相関解析装置9により測定地点間の相互相関演算を行う。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

光源と、  
 前記光源からの光を試料上に集光させる集光手段、  
 前記光を前記試料上で走査する光走査手段と、  
 前記光により発生する光強度を検出する光検出手段と、  
 前記光走査手段による前記光の走査にともなう前記試料上での少なくとも2つの測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を前記光走査手段の走査位置情報と関連づけて前記測定地点間の相互相関演算を行う相互相関演算手段と  
 を具備したことを特徴とする分光分析装置。

10

## 【請求項 2】

前記光走査手段は、2つの測定地点を繰返し走査し、  
 前記相互相関演算手段は、前記2つの測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を前記光走査手段の走査位置情報と関連づけて前記測定地点間の相互相関演算を行うことを特徴とする請求項1記載の分光分析装置。

## 【請求項 3】

前記光走査手段は、閉じたループ状で繰返し走査を行ない、  
 前記相互相関演算手段は、前記ループの一周を複数の領域に分割し、これら分割した領域の少なくとも2つの領域内のそれぞれの測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を前記光走査手段の走査位置情報と関連づけて前記領域間の相互相関演算を行うことを特徴とする請求項1記載の分光分析装置。

20

## 【請求項 4】

前記相互相関演算手段は、前記測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を単一または複数の統計値に一旦変換し、これらの統計値を用いて相互相関演算を行うことを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の分光分析装置。

## 【請求項 5】

前記光走査手段は、前記試料の画像取得の走査系を兼ねることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の分光分析装置。

## 【請求項 6】

前記光走査手段は、測定点の数に応じて走査パターンを変更することを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載の分光分析装置。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、生物試料内の蛍光分子の揺らぎを解析することにより、蛍光分子の状態を解析する蛍光相関分光分析法が用いられ、特に、異なる測定地点間で蛍光強度の相関を解析する分光分析装置に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

蛍光相関分光分析法（FCS法）は、顕微鏡視野の微小観測領域内で蛍光分子のブラウン運動が作り出す光の揺らぎを解析することにより、蛍光強度の自己相関関数を求め、分子毎の拡散時間や平均分子数を解析する手法であり、例えば、非特許文献1に詳述されている。ここでは、蛍光強度を  $I(t)$  とすると、自己相関関数は、式1の形で表される。

40

## 【0003】

## 【数1】

$$g(\tau) = \frac{\frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t+\tau) dt}{\left[ \frac{1}{T} \int_0^T I(t) dt \right]^2} \dots(1)$$

## 【0004】

図13は、このようなFCS法による測定に用いられる光学系の一例を示している。この場合、励起光源としてレーザー光源100が用いられ、レーザー光源100からのレーザー光をダイクロイックミラー101で反射した後、対物レンズ102に入射する。対物レンズ102の焦点位置には蛍光色素で標識された試料103が置かれている。対物レンズ102により焦点部分に集光されたレーザー光は蛍光色素を励起し蛍光を誘起する。試料103の蛍光色素から発した蛍光は、再び対物レンズ102で補足されダイクロイックミラー101に達する。ここでのダイクロイックミラー101には、励起光は反射するが蛍光を透過する光学特性を有するものが用いられている。これにより試料103からの蛍光はダイクロイックミラー101を通過し、集光レンズ104を経て集光される。この集光レンズ104の焦点位置にはピンホール105が配置されており、対物レンズ102の焦点位置以外からの蛍光を遮断することにより高い空間分解能を与えている。ピンホール105を通過した蛍光は光検出器106に入射し、蛍光強度の揺らぎが計測される。

10

20

## 【0005】

また、図14は、2つの測定地点で同時に計測できるようにした光学系の例を示している。この場合も、励起光源としてレーザー光源200が用いられ、レーザー光源200からの励起光であるレーザー光は、ビームスプリッター201で2つの光束に分割され互いに僅かに光軸が傾けられた後、それぞれミラー202、203を介して再びビームスプリッター204で合成される。合成光束はダイクロイックミラー205で反射した後、対物レンズ206に入り、試料207上の僅かに離れた2点で、それぞれ焦点を結ぶ。そして、試料207上のそれぞれの焦点領域から発した蛍光は、再び対物レンズ206で補足され、ダイクロイックミラー205を通過し、集光レンズ208を経て、それぞれ対応する2点で焦点を結ぶ。そして、この焦点位置からは、それぞれ光ファイバー209a、209bを経て光検出器210a、210bに入射し、それぞれの蛍光強度の揺らぎが計測される。この例ではピンホールは用いていないが光ファイバー209a、209bのコア径がピンホールとして機能している。

30

## 【0006】

一方、このような蛍光相関分光分析法(FCS法)を拡張した解析法として、蛍光相互相関分光分析法(FCCS法)が考えられている。この蛍光相互相関分光分析法(FCCS法)は、異なる蛍光信号間の相互相関関数を求めることにより、両者の関連性を解析する手法である。蛍光相互相関分光分析(FCCS法)は、同一の測定地点に於いて2色の蛍光色素間について関連性を求める場合や、2つの測定地点間において関連性を求める場合があるが、これらの相互相関関数は式2の形で表される。ここで $I_A(t)$ 、 $I_B(t)$ は、それぞれの蛍光強度信号を表している。

40

## 【0007】

## 【数2】

$$g(\tau) = \frac{\frac{1}{T} \int_0^T I_A(t)I_B(t+\tau) dt}{\frac{1}{T} \int_0^T I_A(t) dt \cdot \frac{1}{T} \int_0^T I_B(t) dt} \dots(2)$$

50

## 【0008】

同一の測定地点に於いて2色の蛍光色素間の相互相関分析は、非特許文献2に詳述されているが、2色の蛍光色素で標識した分子間の相互作用の解析等に用いられる。異なる地点間での相関を解析する方法は、非特許文献3に記載があり、流体の流れの速度と方向を測定する方法が紹介されている。

## 【0009】

これら蛍光相関分光分析法(FCS法)や蛍光相互相関分光分析法(FCCS法)は、測定が非侵襲に行える利点が注目され、近年では細胞系などの不均質な試料にも用いられるようになってきている。吸着等の特異現象が発生しやすい容器界面の近傍を避けると、溶液系では基本的に全ての場所が均一であるため、溶液中の1点を測定すれば系全体の様子を把握することができる。しかし、細胞のように不均質な系では、個々の場所で起っている事象が異なり、測定結果は測定場所に大きく依存する。また、このような系、特に細胞系では、異なる地点間の事象が互いに関連をもっており、ある地点のある事象が別の地点の別の事象を引き起すと言った時間的空間的な関連を持っている場合も多い。このような系を的確に把握しようとする、異なる地点間で同時に測定を行うことが不可欠であり、近年研究者の間でこの要望が高まってきている。

10

## 【0010】

複数の測定地点間で同時に蛍光測定を行うため光学系としては、例えば、特許文献1に開示されているように、複数の励起光源と複数の検出器を用いる方法が提案されている。

## 【0011】

また別の方法としては、特許文献2に開示されているように一つの励起光源をビームスプリッターで分割し、この分割した励起光源を複数の測定点に供給する光学系を用いる方法が提案されている。

20

## 【0012】

## 【特許文献1】

米国特許第6320196号明細書

## 【0013】

## 【特許文献2】

特開平9-113448号公報

## 【0014】

## 【非特許文献1】

「蛍光相関分光法による1分子検出」金城著、蛋白質核酸酵素, 1999, vol. 44 NO9 1431-1438

30

## 【0015】

## 【非特許文献2】

Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Multicomponent Diffusional Analysis in Solution, P. Schwi11e et al, Biophysica1 Journal 1997, 72, 1878-1886

40

## 【0016】

## 【非特許文献3】

"Two-Beam Cross-Correlation: A method To Characterize Transport Phenomena in Micrometer Sized Structures" M. Brinkmeier et al. Anal. Chem. 1999, 71, 609-616

## 【0017】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特許文献1に開示される方法では、励起光源と検出器を有する光学系を複数配置するため装置が複雑化するという欠点がある。また、検出器間の間隔により測定地

50

点の距離が制限を受け、非常に近接した測定点を計測することは困難である。

【0018】

特許文献2に開示される方法では、検出器は測定地点毎に独立して用いるようにしているため、検出光学系の複雑化は避けられない。

【0019】

蛍光相関分光分析で用いられる光学系は、レーザと単光子計測が可能な超高感度の光検出器とを組合わせて用いられるが、一般にこれらの光学部品は非常に高価である。このため、これらの測定系を複数設置することは装置が極めて高価になるとともに、大型化するとういう問題を生じる。さらに、複数の測定地点を単一の細胞に設定する場合、測定点の間隔は非常に近接し、また、常に一定ではないく、測定対象の細胞によっても異なってくることもあり、従来の方法では、これらの要求への対応が困難であるという問題もあった。

10

【0020】

本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、共通に設けられた光学系により複数の測定地点間の相互相関解析を行うことが可能で、小型で價格的にも安価な分光分析装置を提供することを目的とする。

【0021】

【課題を解決するための手段】

請求項1記載の発明は、光源と、前記光源からの光を試料上に集光させる集光手段、前記光を前記試料上で走査する光走査手段と、前記光により発生する光強度を検出する光検出手段と、前記光走査手段による前記光の走査にともなう前記試料上での少なくとも2つの測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を前記光走査手段の走査位置情報と関連づけて前記測定地点間の相互相関演算を行う相互相関演算手段とを具備したことを特徴としている。

20

【0022】

請求項2記載の発明は、請求項1記載の発明において、前記光走査手段は、2つの測定地点を繰返し走査し、前記相互相関演算手段は、前記2つの測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を前記光走査手段の走査位置情報と関連づけて前記測定地点間の相互相関演算を行うことを特徴としている。

【0023】

請求項3記載の発明は、請求項1記載の発明において、前記光走査手段は、閉じたループ状で繰返し走査を行ない、前記相互相関演算手段は、前記ループの一周を複数の領域に分割し、これら分割した領域の少なくとも2つの領域内のそれぞれの測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を前記光走査手段の走査位置情報と関連づけて前記領域間の相互相関演算を行うことを特徴としている。

30

【0024】

請求項4記載の発明は、請求項1乃至3のいずれかに記載の発明において、前記相互相関演算手段は、前記測定地点での前記光検出手段からの光強度情報を単一または複数の統計値に一旦変換し、これらの統計値を用いて相互相関演算を行うことを特徴としている。

【0025】

請求項5記載の発明は、請求項1乃至4のいずれかに記載の発明において、前記光走査手段は、前記試料の画像取得の走査系を兼ねることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の分光分析装置。

40

【0026】

請求項6記載の発明は、請求項1乃至5のいずれかに記載の発明において、光走査手段は、測定点の数に応じて走査パターンを変更することを特徴としている。

【0027】

この結果、本発明によれば、共通に設けられた光学系の光走査手段により複数の測定点の蛍光強度情報を測定できるので、これら測定点間における相互相関解析を簡単な構成で実現できる。

50

## 【 0 0 2 8 】

また、本発明によれば、光走査手段を用いることにより、複数の測定点を近接して配置することが可能となり、細胞を対象とした測定に最適な効果を発揮できる。

## 【 0 0 2 9 】

さらに、本発明によれば、光走査手段の走査をループ状で繰り返し行い、複数の領域間の相互相関関数を求めることで、各領域間の相互相関の対称性の比較、解析などを行なうことができる。

## 【 0 0 3 0 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下、本発明の実施の形態を図面に従い説明する。

10

## 【 0 0 3 1 】

図 1 は、本発明が適用される分光分析装置の一実施の形態の概略構成を示すものである。図において、1 は励起光源としてのレーザ光源で、このレーザ光源 1 からのレーザ光の光路には、ダイクロイックミラー 2 が配置されている。このダイクロイックミラー 2 には、励起光を反射し、励起光と比べ波長の長い蛍光を透過するような光学特性を有するものが用いられている。

## 【 0 0 3 2 】

ダイクロイックミラー 2 の反射光路には、光走査手段としての X Y スキャナー 3 が配置されている。X Y スキャナー 3 は、直交する 2 方向に光を偏向するための不図示の 2 枚のガルバノミラーを有し、これらのガルバノミラーによりダイクロイックミラー 2 で反射されるレーザ光を 2 次元方向に偏向するようになっている。つまり、X Y スキャナー 3 は、入射光を任意の角度だけ X 軸、Y 軸方向にそれぞれ偏向可能にしたもので、ここでは、後述する対物レンズ 5 の視野内をラスタースキャンすることもできるし、任意の一つまたは複数の測定点を順次走査したり停止させることもできるようになっている。

20

## 【 0 0 3 3 】

このような X Y スキャナー 3 の各種の動きは、X Y スキャナー駆動装置 10 により制御されるようになっている。

## 【 0 0 3 4 】

X Y スキャナー 3 の反射光路には、ミラー 4 を介して対物レンズ 5 が配置されている。対物レンズ 5 の焦点位置には、蛍光色素で標識された試料 6 が配置されている。

30

## 【 0 0 3 5 】

一方、ダイクロイックミラー 2 の蛍光の透過光路には、ピンホール 7 を介して光検出手段としての光検出器 8 が配置されている。ピンホール 7 は、対物レンズ 5 の焦点位置以外からの蛍光を遮断して高い空間分解能を与えるためのものである。光検出器 8 は、ピンホール 7 を通過した蛍光の強度を検出するもので、ここでは、A P D (アバランシェフォトダイオード)、P M T (フォトマルチプライア) などが用いられている。

## 【 0 0 3 6 】

光検出器 8 には、相互相関演算手段としての相関解析装置 9 が接続されている。また、相関解析装置 9 には、X Y スキャナー駆動装置 10 が接続されている。相関解析装置 9 は、光検出器 8 からの蛍光の強度信号と X Y スキャナー駆動装置 10 からの試料 6 上の測定地点の位置情報とを対応づけて相関演算を実行し、各測定点の間の相互相関関数を求めるようになっている。

40

## 【 0 0 3 7 】

相関解析装置 9 には、コンピュータ ( P C ) 1 1 が接続されている。P C 1 1 は、相関解析装置 9 での解析結果を処理し、モニタ表示などをするようになっている。

## 【 0 0 3 8 】

このような構成において、まず、装置全体の動作を簡単に説明する。

## 【 0 0 3 9 】

レーザ光源 1 より励起光としてのレーザ光が発せられると、レーザ光は、ダイクロイックミラー 2 で反射して、X Y スキャナー 3 に入射する。X Y スキャナー 3 で偏向されたレー

50

ザ光は、対物レンズ 5 により集光され、X Y スキャナー 3 の X Y 偏向に対応した試料 6 上の位置に焦点を結ぶ。

【 0 0 4 0 】

この状態で、試料 6 中の蛍光色素が励起され、蛍光を発する。蛍光色素から発した蛍光は、対物レンズ 5 で補足され、逆の光路を通りダイクロイックミラー 2 に導かれ、ダイクロイックミラー 2 を透過してピンホール 7 に入射される。

【 0 0 4 1 】

ピンホール 7 では、対物レンズ 5 の焦点位置以外からの蛍光を遮断し、ピンホール 7 を通過した蛍光のみが光検出器 8 に入射する。

【 0 0 4 2 】

光検出器 8 で光電変換された蛍光の強度信号は、相関解析装置 9 に入力される。相関解析装置 9 は、光検出器 8 からの蛍光の強度信号と X Y スキャナー駆動装置 10 からの試料 6 上の測定点の位置情報とを対応づけた相関演算を実行し、測定点の間の相互相関関数を求める。

【 0 0 4 3 】

次に、相関解析装置 9 での相互相関演算を説明する。ここでは、試料 6 上の 2 つの測定地点を繰返し走査して、それぞれの測定地点での蛍光強度を検出する場合について説明を行う。

【 0 0 4 4 】

この場合、X Y スキャナー 3 は、図 2 に示すように、一方の測定地点 A で一定時間 (  $t_w$  )、例えば 1 m s 停止し、その後、次の測定地点 B に移動して、この測定地点 B で一定時間 (  $t_w$  )、例えば 1 m s 停止し、その後、測定地点 A に戻るようになっており、このような動作を繰返し走査するようになっている。

【 0 0 4 5 】

このときの時間と位置の関係を模式的に表したものが図 3 であり、時間  $t$  とともに、測定地点が測定地点 A と B を交互に移動しながら、それぞれの測定地点 A、B での蛍光強度が測定される。このため、光検出器 8 から出力される信号は、図 4 に示すように測定地点 A で測定される蛍光強度信号 A S と測定地点 B で測定される蛍光強度信号 B S の他に、測定地点 A から測定地点 B に移動するまでの間の無効信号 C が混じったものになる。

【 0 0 4 6 】

相関解析装置 9 には、これら測定地点 A の蛍光強度信号 A S と測定地点 B の蛍光強度信号 B S の他、無効信号 C が混入したものが入力信号とし与えられる。そして、蛍光強度信号 A S、B S と測定地点 A、B の位置情報 ( X Y スキャナー駆動装置 10 による X Y スキャナー 3 の測定地点 A、B での位置情報 ) とを対応づけた相関演算を行うことにより、2 点間相互相関関数を求めることになる。

【 0 0 4 7 】

この場合、2 点間相互相関関数を求める方法として、第 1 の方法を図 5 に従い説明する。

【 0 0 4 8 】

この第 1 の方法では、測定地点 A の蛍光強度信号 A S から だけ時間が経過した所に測定地点 B からの蛍光強度信号 B S が存在することから、この時間 を経過した範囲について、部分的に集積演算することによって 2 点間相互相関関数を求めるようにしている。この場合、測定地点 A、B での測定時間を  $t_w$ 、測定地点 A から測定地点 B に移動するまでの無効信号 C を有する無効時間を  $t_v$ 、測定周期を  $t_c$  で表すと、時間 の最小値は、無効時間  $t_v$  で、測定地点 A の蛍光強度信号 A S の最後データと測定地点 B の蛍光強度信号 B S の最初データの間で得られる。それより大きな時間 の値は、 $2 t_w + t_v$  まで、連続的に求まる ( 式 3 参照 ) 。

【 0 0 4 9 】

さらに、それより大きな時間 は、次に測定地点 B の蛍光強度信号 B S が現れるまで存在しない。このようにして時間 は、不連続な形で得られるようになり、これを式 3 を含めて一般化すると式 4 で表される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

【 数 3 】

$$t_v \leq \tau \leq 2t_w + t_v \quad \dots(3)$$

$$jt_c + t_v \leq \tau \leq jt_c + 2t_w + t_v \quad \dots(4)$$

但し、  
j : 0, 1, 2, 3, ...

10

【 0 0 5 1 】

さらに、式 4 の範囲の時間  $\tau$  であっても、測定地点 A の蛍光強度信号 A S から  $\tau$  だけ時間が経過した所に測定点 B の蛍光強度信号 B S が存在する組合せは全体の一部であるので、これを満たす組み合わせの範囲のみを部分集積すれば、該当する時間  $\tau$  に対する相互相関値を求めることができる。この部分集積についての例を式 5 に表す。なお、式 3 ~ 式 5 は、図 5 に対応した場合の例であり、部分的な集積の演算は、必ずしも同じ形態を取るとは限らない。

【 0 0 5 2 】

【 数 4 】

$$g(\tau) = \frac{(J+1)(2t_w + t_v - \tau') \sum_{j=0}^J \int_0^{2t_w + t_v - \tau'} I_A(Jt_c + t) I_B(Jt_c + t + k t_c + t + \tau') dt}{\sum_{j=0}^J \int_0^{2t_w + t_v - \tau'} I_A(Jt_c + t) dt \sum_{j=0}^J \int_0^{2t_w + t_v - \tau'} I_B(Jt_c + t) dt} \quad \dots(5)$$

20

但し、  
j : 0, 1, 2, 3, ...  
 $t_v \leq \tau \leq 2t_w + t_v$   
 $\tau = k t_c + \tau'$   
k : 0, 1, 2, 3, ...

30

【 0 0 5 3 】

なお、測定地点 B から測定地点 A に向う方向の場合は、負の値とし表す。以上の方法は、時間  $\tau$  が無効時間  $t_v$  より大きな範囲でしか求めることができないが、測定事象に比べて無効時間  $t_v$  が十分に小さければ、事実上  $\tau = 0$  と見なすことができる。

【 0 0 5 4 】

次に、2点間相互相関関数を求める第 2 の方法について説明する。この第 2 の方法では、測定地点 A、B において、それぞれ時間  $t_w$  内で取得される蛍光強度信号 A S、B S (蛍光強度値) を単一または複数の統計値に一旦変換し、これらの統計値を用いて相関関数を演算するようにしている。この場合の統計値としては、図 6 に示すように各時間  $t_w$  内で取得される各測定地点 A、B の蛍光強度信号 A S、B S の平均値が用いられている。また、演算例としては、式 6 で表わされる。

40

【 0 0 5 5 】

【 数 5 】

$$g(\tau) = \frac{\sum_{j=0}^J S_A(j) S_B(j+k)}{\sum_{j=0}^J S_A(j) \sum_{j=0}^J S_B(j)} \quad \dots(6)$$

但し、  
 $\tau = kt_c + t_w/2$   
 $k : 1, 3, 5, 7, \dots$

10

ここでの時間 の最小値は  $t_c$  となり、以後、この整数倍で離散的に与えられる。

【0056】

このような第2の方法は、第1の方法に比べると最小の値が大きくなるが、 $t_c$ が測定事象に比べ十分に小さい場合には、事実上  $= 0$  と見なすことができる。また、この第2の方法は、集積演算数が少なく演算の高速化に適している。また、蛍光強度信号  $A_S$ 、 $B_S$  を取得する時間  $t_w$  の間だけ、不図示のゲートを開けて、光検出器からの出力をカウントし、その値を直接相関演算に用いればよいため、装置の構成を簡単にできるという利点

20

【0057】

上述では、統計値として平均値を用いたが、平均値に限らない。例えば、蛍光強度の積分値またはフォトンカウントの総和を用いてもよい。さらに時間に対して重みづけをした平均を用いたり、あるいは、しきい値を越えた値のみ選別して使用するなどの統計処理を行なうことにより、 $S/N$  比を向上することが可能である。

【0058】

従って、このようにすれば、XYスキャナー3により複数の測定地点A、Bを交互に移動しながら、それぞれの測定地点A、Bでの蛍光強度信号  $A_S$ 、 $B_S$  を光検出器8により測定し、これらの蛍光強度信号  $A_S$ 、 $B_S$  をXYスキャナー3の測定地点A、Bでの位置情報と関連づけて測定地点A、B間の相互相関演算を行うようにしたので、共通に設けられた光学系、ここでは、一つの光学系により複数の測定点間に於ける相互相関解析を行うことができる。これにより、装置の構成の単純化を実現でき、装置の小型化とともに、価格的にも安価な装置を実現できる。

30

【0059】

また、XYスキャナー3によるXY方向の走査により試料6上の測定点を設定しているので、複数の測定点を近接して配置することも可能となり、このことは、特に試料6として細胞を対象とした測定には、生きたまま迅速に結果が得られたり、走査長が所望の地点間距離に応じた長さに設定されるので、無駄なデータが最小限になって、解析の精度が向上するなど、生体分子の解析にとって最適な効果を発揮できる。

40

【0060】

なお、上述した実施の形態では、測定地点が2点(1次元)の場合について述べたが、測定地点の数は3点でも、またそれ以上の場合(2次元または3次元)であっても構わない。なお、測定地点が3点以上の場合には、全ての点を最短で通過し終える経路に設定するようにプログラムを設計するのが好ましい。

【0061】

また、上述した実施の形態では、各測定値点でXYスキャナー3の走査を一時停止して蛍光強度信号を測定するようにしたが、常に動かしながら(走査しながら)、蛍光強度信号を測定し、特定の位置に対してのみ相関演算を行なうようにしてもよい。

【0062】

50

さらに、XYスキャナー3の停止時にリングングが大きいような場合は、目的位置に停止後、リングングが収まってから蛍光強度信号を測定するようにしてもよい。

【0063】

(変形例1)

測定事象が高速のため走査によって生じる の時間差が問題になる場合は、2つのXYスキャナーを用いるようにすればよい。

【0064】

図7は、このような他のXYスキャナーを用いた変形例の概略構成を示すもので、図1と同一部分には、同符号を付している。

【0065】

この場合、図1で述べた対物レンズ5および試料6を共通にして、その他の構成を2組用意し、第1の光学系21の第1のXYスキャナー22と、第2の光学系31の第2のXYスキャナー32を同期させて走査するようにしている。

【0066】

このようにすると、光学系は多少複雑になるが、第1のXYスキャナー22と第2のXYスキャナー32を同期して走査させ、例えば、図8に示すように第1のXYスキャナー22により測定地点AとCの間を繰返して1次元的に走査し、第2のXYスキャナー32により測定地点BとDの間を繰返して1次元的に走査することにより、 $\rho = 0$ の相互相関値を精度よく得ることができる。

【0067】

測定周期 $t_c$ や測定時間 $t_w$ は、固定値ではなく可変値としてもよい。図9は、測定周期 $t_c$ を時間とともに $max$ から $min$ までの間で可変した場合の例を示している。このようにすれば、 $\rho$ 値の存在しない区間を減少させることも可能となる。

【0068】

(変形例2)

XYスキャナー3の走査を閉じたループ状で繰返して行い、このループ一周を複数の領域に分割し、これら分割した領域間で相関演算を行ってもよい。図10(a)は、走査ループの形状が円形の場合で、このような円形のループの一周をA1、B1の2つの等しい領域に分け、これら領域A1、領域B1内で取得した蛍光強度信号間で相関演算を行うようにしている。この場合の時間と位置の関係を模式的に表したものが図11であり、領域A1とB1を交互に通過しながら、領域A1、B1内のそれぞれの測定地点での蛍光強度が測定される。なお、図11において、 $t_w$ は領域A1、B1での測定時間、 $t_c$ は測定周期である。そして、領域A1、B1間の相互相関関数を求める方法としては、第2の方法を用いるとよいが、第1の方法でもよい。

【0069】

図10(b)は、円形のループ走査を、A1、B1、C1の3つの等しい領域に分割した例、同図(c)は、三角形のループ走査をA1、B1、C1の3つの等しい領域に分割した例である。このようにループ走査の形状は円形でも多角形でも構わない。また、走査パターンは、ループ以外にも一筆書きの軌跡を辿る形状でもよいし、2次元の走査でも、3次元の走査でもよい。

【0070】

勿論、分割数は、4以上でも構わない。各領域を均等に分割すると、環境の差がなければ、各領域間の相互相関関数は対称形となる。また、分割数、地点間距離、走査形状乃至パターンを多様に組み合わせてもよい。従って、相関解析のための地点間走査は、ランダムな走査ということができる。

【0071】

従って、このようにすれば、各領域間の相互相関の対称性を比較、解析することにより、例えば、試料6が細胞やマイクロフローセル等のような測定対象物質を溶液中に含んだ状態の生物学的試料である場合に、細胞やマイクロフローセル内部の対流、拡散、その他信号伝達の方法や速度に関する情報を得ることができる。

10

20

30

40

50

## 【0072】

## (変形例3)

蛍光強度信号の測定系は、顕微鏡画像取得系と組合わせて用いると、その効果が大きく発揮できる。特に、光学系が類似であるため、共焦点レーザー走査型顕微鏡と組合わせると一層効果が大きい。例えば、画像取得の際は、サーボ系のラスタースキャンを網羅的に実行して、画像中の複数の測定点については上述したようなランダムな走査を行なうことにより、ラスタースキャンだけで実行する場合に比べて迅速である。このことは、相関解析における複数の測定点から効率よく多くの測定値を得ることかになるので、高精度の結果につながる。この場合、図1と同一部分には同符号を付した図12に示すように相関解析装置9の他に、画像取得用の画像処理装置12が設けられ、これら相関解析装置9および画像処理装置12に対し光検出器8からの蛍光強度信号を入力するようになる。そして、これら相関解析装置9および画像処理装置12での結果は、PC11に出力される。

## 【0073】

この場合、相関解析装置9および画像処理装置12に対し光検出器8を共通に用いているが、相関解析装置9には、アバランシェフォトダイオード、画像処理装置12には、光電子増倍管のように別々の光検出器を用いてもよい。

## 【0074】

その他、本発明は、上記実施の形態に限定されるものでなく、実施段階では、その要旨を変更しない範囲で種々変形することが可能である。例えば、上述した実施の形態では、走査装置としてガルバノミラーを採用しているが、高速な走査装置であれば、光ファイバを振動させるなどの他の手段であってもよい。また、使用する蛍光色素は、単色でも多色でもよい。さらに測定する光強度は、上述した以外の光信号、例えば、電気化学発光、蛍光共鳴エネルギー転移などによる複数地点間の相互作用についての相関であってもよい。さらに、上述した実施の形態では、光源としてレーザ光源について述べたが、キセノンランプや水銀ランプなどを光源として用いることもできる。

## 【0075】

さらに、上記実施の形態には、種々の段階の発明が含まれており、開示されている複数の構成要件における適宜な組み合わせにより種々の発明が抽出できる。例えば、実施の形態に示されている全構成要件から幾つかの構成要件が削除されても、発明が解決しようとする課題の欄で述べた課題を解決でき、発明の効果の欄で述べられている効果が得られる場合には、この構成要件が削除された構成が発明として抽出できる。

## 【0076】

## 【発明の効果】

以上述べたように本発明によれば、共通に設けられた光学系により複数の測定地点間の相互相関解析を行うことが可能で、小型で價格的にも安価な分光分析装置を提供できる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施の形態の概略構成を示す図。

【図2】第1の実施の形態の走査の様子を平面的な模式図で表した図。

【図3】第1の実施の形態の走査の時間と位置の関係を模式的に表した図。

【図4】第1の実施の形態の光検出器から出力される信号状態を示す図。

【図5】第1の実施の形態の2点間相互相関関数を求める第1の方法を説明する図。

【図6】第1の実施の形態の2点間相互相関関数を求める第2の方法を説明する図。

【図7】第1の実施の形態の変形例1の概略構成を示す図。

【図8】変形例1の走査の様子を平面的な模式図で表した図。

【図9】変形例1の測定周期を可変した場合の例を示す図。

【図10】第1の実施の形態の変形例2のXYスキャナー走査を閉じたループ状で行なう場合の例を示す図。

【図11】変形例2の光検出器から出力される信号状態を示す図。

【図12】第1の実施の形態の変形例3の概略構成を示す図。

【図13】従来のFCS法による測定に用いられる光学系の一例の概略構成を示す図。

10

20

30

40

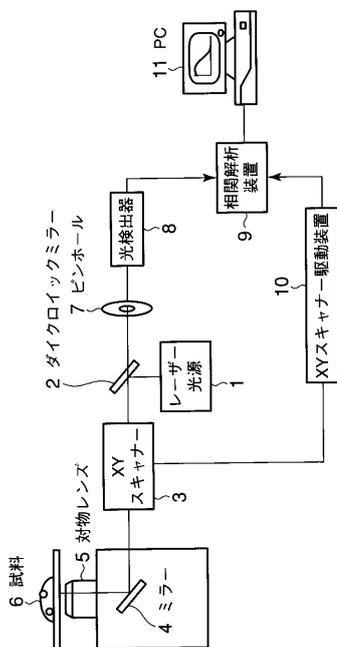
50

【図14】従来のFCS法による測定に用いられる光学系の他例の概略構成を示す図。

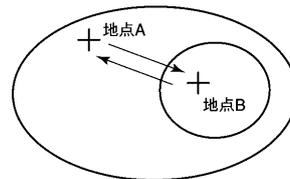
【符号の説明】

- 1 ... レーザ光源
- 2 ... ダイクロイックミラー
- 3 ... XYスキャナー
- 4 ... ミラー
- 5 ... 対物レンズ
- 6 ... 試料
- 7 ... ピンホール
- 8 ... 光検出器
- 9 ... 相関解析装置
- 10 ... XYスキャナー駆動装置
- 11 ... PC
- 12 ... 画像処理装置
- 21 ... 第1の光学系
- 22 ... 第1のXYスキャナー
- 31 ... 第2の光学系
- 32 ... 第2のXYスキャナー

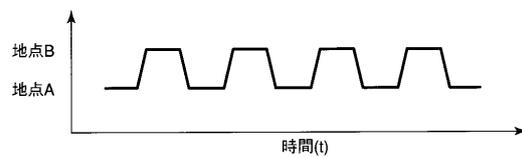
【図1】



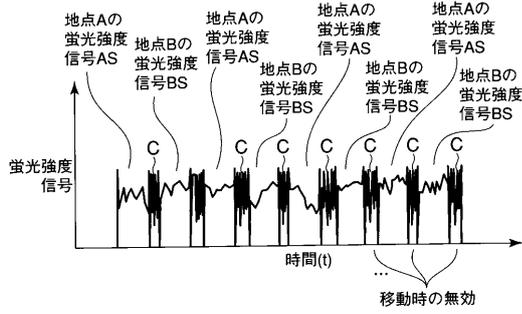
【図2】



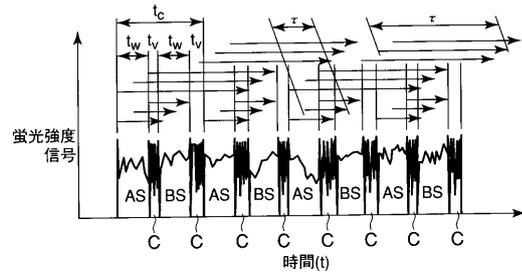
【図3】



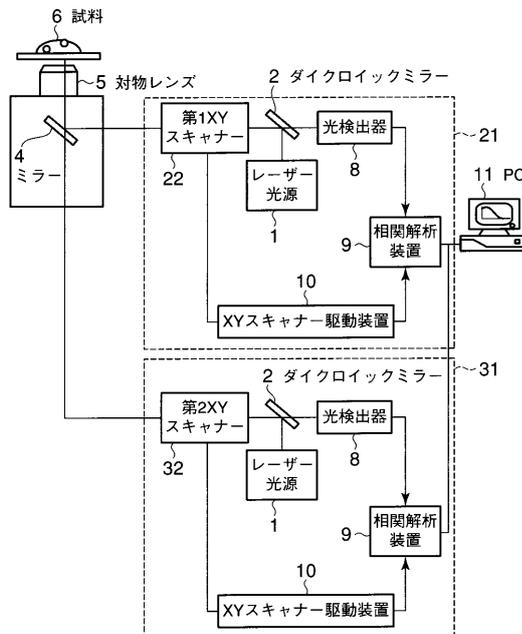
【 図 4 】



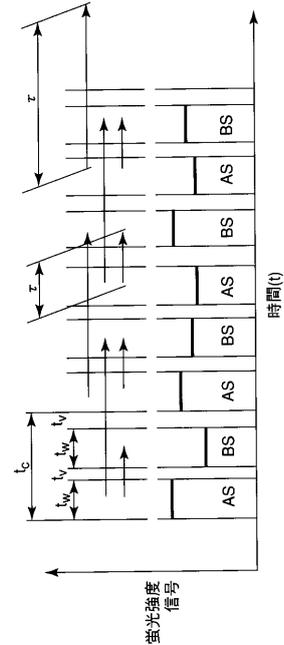
【 図 5 】



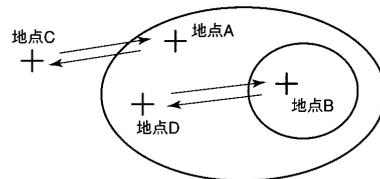
【 図 7 】



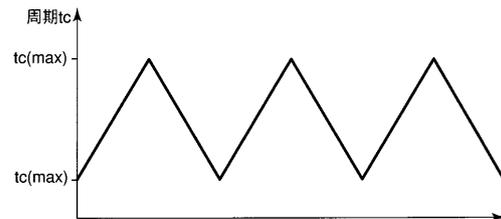
【 図 6 】



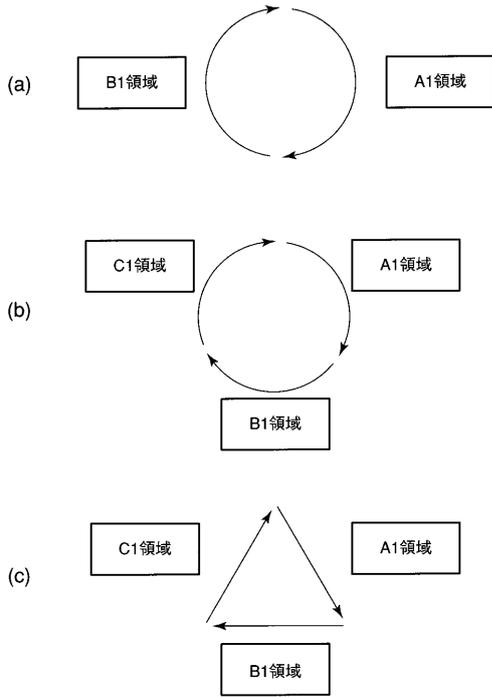
【 図 8 】



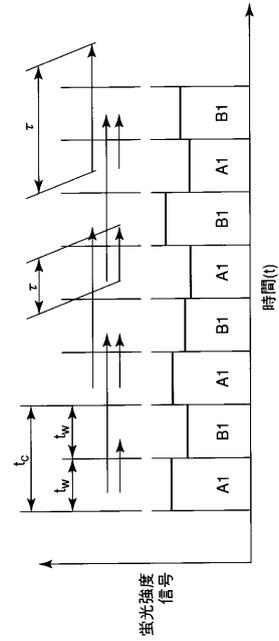
【 図 9 】



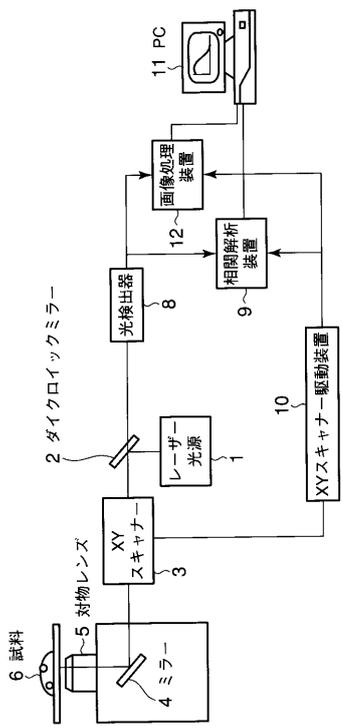
【図 10】



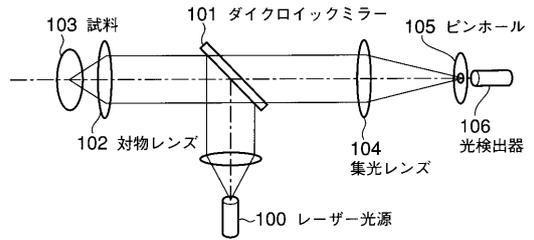
【図 11】



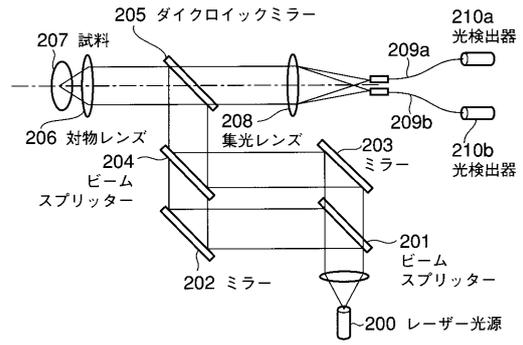
【図 12】



【図 13】



【図 14】



---

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 BA16 EA01 FA01 FA02 FA03 GA01 GB01 GB19 HA01 HA02  
HA05 JA02 KA09 LA02 NA01 NA02