

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3929057号
(P3929057)

(45) 発行日 平成19年6月13日(2007.6.13)

(24) 登録日 平成19年3月16日(2007.3.16)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 21/64 (2006.01) GO 1 N 21/64 Z

請求項の数 7 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2004-104943 (P2004-104943)	(73) 特許権者	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成16年3月31日(2004.3.31)	(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
(65) 公開番号	特開2005-291821 (P2005-291821A)	(74) 代理人	100106297 弁理士 伊藤 克博
(43) 公開日	平成17年10月20日(2005.10.20)	(74) 代理人	100106138 弁理士 石橋 政幸
審査請求日	平成17年11月25日(2005.11.25)	(72) 発明者	山道 淳太 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
		審査官	横井 亜矢子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発光強度解析方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多数の発光部と非発光部とが混在する試料の一部を切り出した測定画像を得る手段と、前記測定画像の2次元の位置に対応する輝度を記録する輝度記録手段と、該輝度記録手段に記憶した輝度をn階調にデジタル処理化するデジタル化手段と、前記デジタル処理化された輝度を2次元の位置情報とともに記憶装置に記憶する第1の記憶手段と、

前記記憶装置に記憶された輝度情報を読み出し輝度ヒストグラムを形成する第1の演算手段と、第2の記憶手段に記憶された前記輝度ヒストグラムの閾値となる階調値(Gr_th)により発光部と非発光部とを分割し、発光部から解析値を演算する第2の演算手段と、第3の記憶手段に記憶された検量線と前記解析値とから濃度を演算する第3の演算手段とを有し、

前記閾値となる階調値(Gr_th)が、前記検量線を求めるための少なくとも3以上の既知の試料の濃度の各々の輝度ヒストグラムをn個のすべての階調値(Gr_{n=1, n})を用いて、第2の演算手段により階調値毎に演算した解析値と、前記既知の濃度と、の関係を第3の演算手段により相関係数として求めたもののうち、該相関係数がもっとも1に近い階調値であり、

前記閾値となる階調値(Gr_th)での解析値と前記既知の濃度との検量線を第3の記憶手段に記憶させたことを特徴とする発光強度解析装置。

【請求項2】

10

20

前記解析値が、前記多数の発光部の積分値、合計値、であることを特徴とする請求項 1 に記載の発光強度解析装置。

【請求項 3】

前記多数の発光部と非発光部とが混在する試料の一部を切り出した測定画像を得る手段が顕微鏡であることを特徴とする請求項 1 に記載の発光強度解析装置。

【請求項 4】

前記顕微鏡が共焦点型の顕微鏡であることを特徴とする請求項 3 に記載の発光強度解析装置。

【請求項 5】

前記多数の発光部からの発光が、蛍光、燐光、化学発光または生物発光であることを特徴とする請求項 1 に記載の発光強度解析装置。 10

【請求項 6】

前記試料は、基材上に担持された発光物質を含む化合物質であることを特徴とする請求項 1 に記載の発光強度解析装置。

【請求項 7】

多数の発光部と非発光部とが混在する試料の一部を切り出して測定画像を得るステップと、

前記測定画像の 2 次元の位置に対応する輝度を記録するステップと、

前記記録された輝度をデジタル値に変換するステップと、

該デジタル値に変換された輝度を 2 次元の位置情報とともに記憶装置に記憶するステップと、 20

前記記憶装置に記憶された前記輝度情報を読み出すステップと、

前記輝度情報を輝度ヒストグラムに加工するステップと、

前記輝度ヒストグラムを予め決められた閾値となる階調値 (G r t h) により発光部と非発光部とに分割するステップと、

前記発光部から解析値を求めるステップと、

予め求めておいた検量線と前記解析値とから濃度を求めるステップとを有し、

前記閾値となる階調値 (G r t h) を、前記検量線を求めるための少なくとも 3 以上の既知の試料の濃度の各々の輝度ヒストグラムを n 個のすべての階調値 (G r_{n=1, n}) を用いて、階調値毎に演算した解析値と、前記既知の濃度と、の関係を相関係数として求めたもののうち、該相関係数がもっとも 1 に近い階調値とし、前記階調値 (G r t h) での解析値と濃度との関係を示す前記検量線を作成することを特徴とする発光強度解析方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化学物質定量に於ける発光強度解析方法及び装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

蛍光物質などの発光強度を特徴にして、薄膜や平板に捕捉された発光物質の定量を行うことは、広く行われている。得られた画像の発光強度の面内分布が一様である場合、前記発光面の発光強度を以って、定量に用いることが可能であるが、発光状態が一様でない場合、定量性を向上するために発光部と非発光部を分離する必要があるが生じる。廣辻等 (特許第 2947305 号) や野上 (特許第 3270722 号) は、発光強度画像を取得後、微生物内の蛍光物質濃度を測定するにあたり、得られた画像を予め定めたしきい値により 2 値化し、計測対象物の切り出しを行い、該当部位の蛍光強度を積分する手法を用いている。また、大戸等 (特許第 3129631 号) は、発光酵素で菌を染色し、総発光量と測定対象物である菌数の検量線を作成し、菌数を求めるあるいは菌 1 個あたりの平均発光量で総発光量を割り算して菌数とする方法を用いている。 40

【特許文献 1】特許第 2947305 号

【特許文献 2】特許第 3270722 号

【特許文献3】特許第3129631号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、上記の測定方法では、基本的に計測対象部位の切り出しが必要であり、測定系に適した任意の処理基準を設定しなければならない。また、光学的な解像度を超えた画像を処理する場合、切り出しによる形態学的な意義は薄れてしまう。

【0004】

本発明に係る目的は、発光強度読み取り装置において、測定画像として信号部とバックグラウンド部が混在するような画像を処理するにあたり、画像を輝度分布にデジタル化し、任意の輝度を境界値（しきい値）にして、信号成分とバックグラウンド成分を分割し、信号成分部分の統計的な解析値を出力する機構を提供し、発光物質標準液の一連の濃度系列から作られた画像系列を用いて最適な前記境界値を算出し、検量線を作成する機構と、前記検量線および前記境界値を用いて、未知試料中の発光物質濃度の算出を可能にすることにある。前記手法及び装置は、計測対象を選ばず適用可能である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記目的を達成するため、本発明に係る第1の発明は、発光強度読み取り装置において、測定画像として信号部とバックグラウンド部が混在するような画像を処理するにあたり、画像を2次元（xy平面）の輝度分布にデジタル化する機構と、任意の輝度を境界値（しきい値）にして、信号成分とバックグラウンド成分を分割し、信号成分部分の統計的な解析値を出力する機構を有する発光強度読み取り方法と装置を提供することにある。本発明に係る第2の発明は、前記手法及び装置を用いて、発光物質標準液の一連の濃度系列から作られた画像系列を用いて最適な前記境界値を算出し、検量線を作成する機構と、前記検量線および前記境界値を用いて、未知試料中の発光物質濃度を算出する機構を有する発光強度読み取り方法と装置を提供することにある。

【発明の効果】

【0006】

以上、説明したように、本発明よれば、測定画像として信号部とバックグラウンド部が混在するような画像を処理し、最適化された検量線を作成し、未知試料中の発光物質の信号強度の算出と発光物質の定量が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明の発光強度解析装置は、化学物質の発光を測定することで化学物質の定量解析に用いるものである。本発明の第1の実施形態は、多数の発光部と非発光部とが混在する試料の一部を切り出した測定画像を得る手段と、測定画像の2次元の位置に対応する輝度を記録する輝度記録手段と、該輝度記録手段に記憶した輝度をn階調にデジタル処理化するデジタル化手段と、デジタル処理化された輝度を2次元の位置情報とともに記憶装置に記憶する第1の記憶手段と、記憶装置に記憶された輝度情報を読み出し輝度ヒストグラムを形成する第1の演算手段と、第2の記憶手段に記憶された輝度ヒストグラムの閾値となる階調値（G r t h）により発光部と非発光部とを分割し、発光部から解析値を演算する第2の演算手段と、第3の記憶手段に記憶された検量線と解析値とから濃度を演算する第3の演算手段とを有することを特徴とする発光強度解析装置である。第2の記憶手段に記憶された前記閾値となる階調値（G r t h）が、検量線用の少なくとも3以上の既知の試料の濃度の各々の輝度ヒストグラムをn個のすべての階調値（G r_{n=1, n}）を用いて発光部と非発光部とに分解し、第2の演算装置で階調値毎の解析値を演算し、n個の階調値（G r_{n=1, n}）毎の解析値と既知の濃度との相関係数を演算する第3の演算装置と、第3の演算装置で演算された前記相関係数のうちもっとも1に近い階調値を前記閾値となる階調値（G r t h）とし、閾値となる階調値（G r t h）による解析値と既知の濃度との検量線とすることが好ましい。解析値は、発光部の積分値、合計値等を用いることができる。

【0008】

多数の発光部と非発光部とが混在する試料の一部を切り出した測定画像を得る手段は顕微鏡であることが好ましく、共焦点型の顕微鏡であることがより好ましい。また、多数の発光部からの発光は、蛍光、燐光、化学発光または生物発光であっても良く、試料は、基材上に担持された発光物質を含む化合物質であっても良い。基材は、平板形状であっても、3次元的な立体形状をしていても良いが、3次元的な立体形状としては、基板に形成された貫通孔であることが好ましい。

【0009】

更に、本発明は、多数の発光部と非発光部とが混在する試料の一部を切り出して測定画像を得るステップと、測定画像の2次元の位置に対応する輝度を記録するステップと、記録された輝度をデジタル値に変換するステップと、該デジタル値に変換された輝度を2次元の位置情報とともに記憶装置に記憶するステップと、記憶装置に記憶された輝度情報を読み出すステップと、輝度情報を輝度ヒストグラムに加工するステップと、輝度ヒストグラムを予め決められた閾値となる階調値 (G_{rth}) により発光部と非発光部とに分割するステップと、発光部から解析値を求めるステップと、予め求めておいた検量線と解析値とから濃度を求めるステップとを有することを特徴とする発光強度解析方法である。検量線と閾値となる階調値 (G_{rth}) とは、少なくとも3以上の既知の試料の濃度の各々の輝度ヒストグラムから、該複数の輝度ヒストグラムを n 個のすべての階調値 ($G_{r_{n=1, n}}$) で発光部と非発光部とに分解するステップと、各階調値の発光部の解析値を求めるステップと、各階調値の解析値と既知の濃度との相関係数を求めるステップと、 n 個の各階調値 ($G_{r_{n=1, n}}$) の相関係数からもっとも相関性が高い階調値を記憶するステップと、該階調値での解析値と濃度との関係を示す検量線を作成するステップで得ることができる。解析値を求めるステップは、発光部の積分値、合計値等を求めるステップであることが好ましい。

【0010】

本発明の第1の実施の形態をより詳細に説明する。本実施の形態による発光強度解析装置は、化学物質を光学的な手法で、測定対象となる化学物質の一部を切り出し、受光素子に電荷を蓄積し電荷の量により受光した光の強度 (輝度) を測定する。受光素子としては、電荷結合素子 (以下、CCDと称す場合がある)、C-MOSセンサや受光ダイオードが一般的に使われている。CCDやC-MOSセンサは、素子中に画素となる受光部がマトリックス状に形成されているので、平面状の試料からの発光を測定するのに適している。

【0011】

受光素子の画素に蓄積された電荷は、アナログ-デジタルコンバータ (以下、ADCあるいはADコンバータと略す) により、蓄積された電荷量をデジタル値に変換することができる。8bitのADCを用いた場合、 2^8 (256) 階調に区分することができる。CCDやC-MOSセンサに蓄積された輝度情報は、記憶装置に記憶させるときに画素の位置情報と輝度情報とを同時に記憶させることが容易である。

【0012】

例えば、 n 行 m 列の画素からなっているCCDの場合、図7(b)に示すように、一定の時間で各画素6-1に蓄積された電荷は、一端垂直シフトレジスタ13に転送され、次に、1列目が2列目に以下順に転送され n 列目の素子が水平レジスタに転送される。次に、水平レジスタに転送された電荷は、 m 、 $m-1$ 、 $m-2 \cdots 3$ 、 2 、 1 の順に素子外に順番に転送される。垂直レジスタ内での転送と水平レジスタ内での転送はCCDに供給されるクロック信号により行われる。CCDの外へ転送される際に電荷は一端電圧に変換される。ADCはこのアナログ値の電圧をデジタル値に変換するものである。CCDから外部へ転送される情報は、CCDの画素の位置により決まった順番で転送されるので、予め記憶装置16にCCDと同じ記憶領域を設けておけば、CCDの垂直及び水平シフトレジスタの転送信号と同期させることで、デジタルカメラで画像データを記憶させる方法と同じ方法で記憶させることができる。

10

20

30

40

50

【0013】

輝度情報を演算し、輝度ヒストグラムを作成する。作成した輝度ヒストグラムの発光部と非発光部とを分離する閾値となる階調値は、後述の手順で決められる。

【0014】

閾値となる階調値により輝度ヒストグラムから発光部を分離し、発光部を解析し解析値を得る。得られた解析値と既知の検量線とから濃度が未知の試料の濃度を決定できる。

【0015】

定量対象発光物質の既知の複数の濃度の試料を作成する。この時、濃度は少なくとも3種類以上の濃度の試料を作成することが好ましい。

【0016】

作成した複数の濃度の試料ごとに、画像データを採取し、輝度ヒストグラムを作成する。次に、該輝度ヒストグラムから発光部の解析値（積分値、合計値等）求めるが、発光部と非発光部とを区分する階調値を階調のすべてについて行う。8 bitのADCを用いた場合は256階調であるので256の解析値が各濃度の試料に対して得られる。次に、濃度と、階調値毎の解析値との相関係数を求める。発光部と非発光部との区分が正確にできていれば発光強度を示す解析値と濃度との相関は高いので、最も相関が高い（相関係数が1に近い）階調値が、発光部と非発光部とを分ける閾値となる階調値となる。濃度と解析値との相関を示す検量線も同時に得られる。得られた検量線と閾値となる階調値を用いて濃度が未知の試料の濃度を求めることができる。

【0017】

本発明の発光強度解析方法を用いた化学物質定量は、図1の示されるような顕微鏡1に接続されたCCDカメラ5などにより撮影された化学物質の発光輝度分布画像を処理することで得られるものである。図1の発光強度解析装置は、顕微鏡1、顕微鏡1からの画像情報を受ける、CCDカメラ5及びCCDカメラ6を構成するCCD6を制御するCCDコントローラ7及び画像処理コンピュータ10から成り立っている。画像処理コンピュータ10はCCD6からの画像情報を演算し、CCDを制御する信号をCCDコントローラ7に送信する演算装置8および演算された画像情報に基づいて画像を表示する画像表示装置9から成り立っている。顕微鏡1は、試料2と試料からの発光を受ける対物レンズ3と対物レンズ3により集光した光を目視確認用の光とCCDカメラ用の光とに分光するハーフミラー（目視による確認とCCDカメラによる観察とを同時に行う必要がないときは単なるハーフミラーではなく反射鏡を用いることもできる）とハーフミラーにより分光された光を受ける接眼レンズ4とから成り立っている。

【0018】

本実施の形態では、CCDカメラを用いたので、受光素子としてCCDが用いられているが、CCD以外にもC-MOSセンサや受光ダイオードをマトリクス状に形成したものであっても良いが、現状ではもっとも高感度であるので冷却CCDが発光強度解析には良く使われている。

【0019】

発光輝度分布画像は、蛍光、燐光、化学発光、生物発光を利用できる。また、化学物質からの直接の発光以外の、発光物質により標識された化学物質（例えば、ポリマー、核酸、タンパク質など）からの発光も利用できる。この結果、本発明の発行輝度分布画像を用いた解析は、発光物質そのもの発光以外にも、物理的吸着、化学反応、抗原抗体反応や核酸のハイブリダイゼーション反応等における反応の検出に利用することができる。

【0020】

蛍光等の発光画像を処理するので、顕微鏡1は、共焦点型の蛍光顕微鏡を用いることが好ましい。共焦点型の光学系を用いることで、焦点面以外の蛍光が見えないようにすることが可能となり、更に、厚い試料中の特定の面に焦点を合わせることが可能となる。また、CCDカメラ5は、微弱光の検出を目的とするのでCCD6を冷却する冷却CCDカメラが好ましい。

【0021】

図4は、図1に示した発光強度解析装置により得られた発光輝度分布画像である。

【0022】

次に、図4の発光輝度分布画像を用いた発光輝度解析方法を、図面を用いて詳細に説明する。

(1) 画像データの採取。

【0023】

試料から採取された画像情報は、CCDの画素に蓄積された電荷量が生のデータである。採取する発光の強度によりCCDコントローラにより蓄積時間を変更することができる。測定試料の濃度範囲に応じてCCDの画素への蓄積時間を設定する。CCDの画素に蓄積された電荷量は、CCDの列・行に対応する位置情報とともに演算装置に送信され、演算装置の記憶領域に記憶される。

10

(2) 輝度ヒストグラムの作成

採取された画像データは、図5に示すような、CCDの画素を単位として各画素の電荷量に基づく輝度ヒストグラムを作成する。輝度は、CCDの画素に蓄積された電荷をアナログ-デジタルコンバータ(以下、ADCと略す)によりデジタル変換することで得られ、8bitのADCを用いた場合は最大で256階調の輝度に分類することができる。複数の画素、例えば、2×2の4画素を1単位として輝度ヒストグラムを作成しても良い。

【0024】

複数の画素を1単位として輝度ヒストグラムを作成する場合は、複数画素の電荷量の解析値(積分値、合計値等)を用いることができる。

20

(3) 閾値による信号部の確定

後述の検量線を作成した際の、階調を閾値として、信号とバックグラウンドを分離し、信号部を確定する。

(4) 信号部の解析値の算定

信号部からの解析値(積分値、合計値等)を求める。

(5) 解析値と検量線とから濃度の算定

検量線と得られた信号部の解析値とから、試料の濃度を求める。

【0025】

この際の解析値は、検量線を作成した際に用いた解析値と同じ手法を用いることは言うまでもない。

30

(6) 検量線の作成

6-1 標準試料の作成

定量対象発光物質標準液の一連の濃度系列を調製し、各濃度の試料を作成する。

6-2 標準試料の画像データの採取

各濃度の試料のCCDカメラ5による画像データを採取する。

6-3 輝度ヒストグラムの作成

採取した各標準試料の輝度ヒストグラムを作成する。

6-4 階調毎の信号部の確定

全ての階調を閾値として信号とバックグラウンドを分離し、階調毎の信号部を確定する。

40

6-5 階調毎の信号部の解析値の算定

階調毎の信号部のデータから解析値(積分値、合計値等)を求める。

6-6 濃度と解析値の相関関係の算定

得られた各階調の解析値と試料の濃度とを比較し、検量線の相関を調べ、閾値とした階調と試料の濃度との相関係数との関係を求める(図6参照)。最も濃度との相関が高い階調を閾値とする。

【0026】

この際、解析値を得る方法も種々変えて最も相関の高い解析方法と閾値となる階調を得ることもできる。

6-7 検量線の選定

50

もっとも濃度と相関の高い階調値の解析値から検量線を選定する。

【0027】

図7を用いて、本実施例の発光強度解析装置の構成と動作とをより詳細に説明する。

【0028】

試料からの発光は、 $n \times m$ の画素を持つCCD6に入射する。入射光は、対応する画素に入射光の強度に比例した電荷が蓄積される。各画素に蓄積された電荷は、垂直シフトレジスタ13により水平シフトレジスタ14に逐次転送される。水平シフトレジスタ14に転送された電荷は、水平シフトレジスタ14によりCCD6からADコンバータ15に転送される。ADコンバータ15に転送された電荷は、ADコンバータ15によりアナログ値からデジタル値に変換される。8ビットのADコンバータの場合256階調のデジタル値に変換される。デジタル値に変換された画素の輝度データは、記憶装置16にCCDの位置情報とともに記憶される。

10

【0029】

記憶装置16は、ダイナミックメモリ(以下、DRAMと略す)、ハードディスクデバイス(以下、HDDと略す)等の記憶装置を使うことができるが、大量のデータになるのでHDDが好ましい。上記の説明は、試料全体を一回で測定できることを想定して説明したが、 $N \times M$ に分割して測定する場合は、上記の手順を $N \times M$ 回行えばよいのでこの後の説明も試料全体を1回で測定できる場合を想定して説明する。

【0030】

記憶装置16に記憶された $n \times m$ の輝度データは、演算装置17により各階調のデータの分布が演算される。演算の手順(プログラム)も記憶領域16に記憶され、演算装置17の記憶領域に転送され、演算装置は該プログラムの手順に従って輝度データの階調の分布を演算する。演算した階調の分布は、表示装置18に表示することができる。図5に演算した階調の分布(輝度ヒストグラム)を示す。

20

【0031】

図5の1階調が閾値の場合、1階調以上が信号部となる。この場合、図5(b)の領域が信号部となり、該信号部を積分した値を解析値とする。解析値は、積分値に限られるものではなく、合計値、平均値等を用いることができる。

【0032】

検量線を求める場合は、各濃度の標準試料の輝度データ毎に、閾値となる階調を0~255階調すべての階調値について解析値を求め、濃度、閾値となる階調値及び解析値を記憶装置16に記憶させる。その後、各濃度の試料の、閾値となる階調値が同じ場合の解析値と濃度との相関係数を求める。各階調値毎の相関係数は図6に示すような結果が得られた。相関係数が1にもっとも近い階調値を閾値とする。閾値となる階調値と濃度と解析値との関係は記憶装置16に記憶される。濃度と解析値との関係は、例えば、 y :濃度、 x :解析値とした場合、検量線は、 $y = f(x)$ として記憶することもできる。

30

【0033】

未知の濃度の試料の濃度を求める場合は、同様の手順で、輝度ヒストグラムを求め、閾値となる階調値から信号部からの解析値を検量線に当てはめることで濃度を算出することができる。

40

【実施例】

【0034】

以下、図面を参照して、本発明を実施例により更に具体的に説明する。なお、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

(第1の実施例)

本実施例では、顕微鏡として、共焦点型の蛍光顕微鏡を用いた。また、発光物質を固定化する基材として、ポリカーボネート製の多孔性のメンブレンフィルター(例えば、Whatman社Nuclepore Membrane)を利用した。発光物質としてローダミン溶液を、フィルターホルダー(例えば、東洋濾紙株式会社KS-13)に装着した前記フィルターを通過させた。ローダミンはポリカーボネートフィルター表面に物理吸着

50

した。ポリカーボネートフィルターは、15 μm 程度の膜厚を持っており、ローダミンは膜内に3次元的に吸着した。共焦点顕微鏡で観察すると、ポリカーボネートフィルターをスライスしながら、蛍光画像を取得することができる。

【0035】

最初に、検量線を作成した。孔径を0.8 μm 、厚さ10 μm のメンブレンフィルターを用い、ローダミンの濃度系列を調製し、それぞれの別個のポリカーボネートフィルターを通過させた。余分なローダミン溶液を除去するために洗浄しても良い。ローダミンが吸着したフィルターは、順次、共焦点顕微鏡により、図4に示す蛍光画像を測定した。得られた画像は、図5に示すように256階調程度の輝度のヒストグラムに変換した。閾値となる階調を求めるために、全ての階調を境界値として、信号成分とバックグラウンド成分に分解し、輝度の積分値を計算した。各試料の濃度と積分値との相関係数を、各階調毎に算出し、各階調と相関係数とから最適な閾値となる階調を求めた(図6参照)。本実施例では、222の階調を閾値としたときに濃度との相関がもっとも高かった。閾値となる階調を基準に検量線を作成した。本実施例では、検量線は1次直線として得られ、解析値と濃度との関係式として用いた。

10

【0036】

該検量線を用いて、未知濃度のローダミンの定量を行った。

【0037】

上記の説明は、ポリカーボネートメンブレンのような3次元的な立体構造を持った基材の場合、同じ測定深度での画像データを用いた場合の説明である。

20

【0038】

測定厚みも考慮すると、本実施例の厚さ10 μm のメンブレンフィルターの場合、各濃度試料画像の採取を、メンブレンフィルターの上面、底面及び中間部の3箇所で行った輝度分布の画像データをCCDの画素に対応する位置毎に加算して求めることで測定精度を上げることができる。また、厚み方向に測定したそれぞれの画像について、解析値を求め相関を解析することで、より最適な厚み方向の位置と測定する厚さ及び閾値が得られ、測定精度を上げることができる。

(第2の実施例)

測定用の基材が活性基を有する場合、定量対象物質を共有結合させて、測定を行うことができる。活性基による表面修飾メンブレン(例えば、日本ポール株式会社イムノダインABCメンブレン)を利用した場合、該メンブレン表面の活性基は、たんぱく質のアミノ基と反応し共有結合を形成する。定量対象物質として、Fluorescein-4-isothiocyanate(FITC)標識抗体をメンブレンに滴下する。濃度系列を調製し、一定時間反応させた後、ブロッキング試薬(例えば、ウシ血清アルブミン、カゼインなど)にて洗浄し、測定に用いる。該メンブレンは、光透過性ではないので、メンブレン表面からの蛍光発光を測定する。

30

【0039】

実施例1での画像処理と同様に、輝度ヒストグラムを作成し、相関係数を基にして、最適な階調値を求める。次に、閾値として得られた階調値に基づいて検量線を作成し、該検量線を用いて、未知濃度の結合たんぱく質の定量を行う。

40

【0040】

また、前記、FITC標識抗体を任意の抗原に対する非標識抗体とし、該非標識抗体の共有結合による固定化、ブロッキング試薬による洗浄、抗原、FITC標識抗体により順次メンブレンを処理し、サンドイッチイムノアッセイを行い、抗原の定量法に用いることもできる。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】本発明に係る測定装置を示す図

【図2】実施例の解析フロー図

【図3】実施例の検量線を作成するフロー図

50

【図4】実施例における蛍光画像

【図5】実施例における輝度ヒストグラム

【図6】実施例における検量線の相関係数と境界値の関係図

【図7】本発明に係わる測定装置の詳細概略図

【符号の説明】

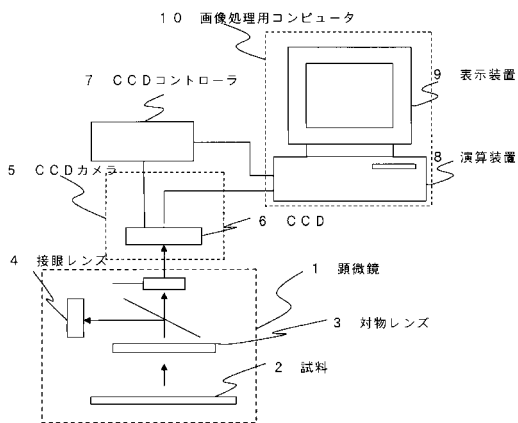
【0042】

- 1 顕微鏡
- 2 試料
- 3 対物レンズ
- 4 接眼レンズ
- 5 CCDカメラ
- 6 CCD
- 7 CCDコントローラ
- 8 演算装置
- 9 表示装置
- 10 画像処理用コンピュータ
- 11 信号部
- 12 バックグラウンド部
- 13 垂直シフトレジスタ
- 14 水平シフトレジスタ
- 15 記憶装置
- 16 演算装置
- 17 表示装置

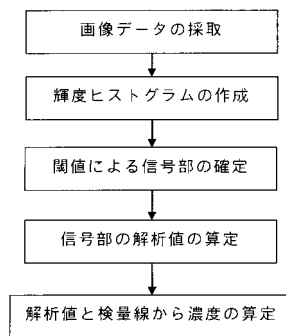
10

20

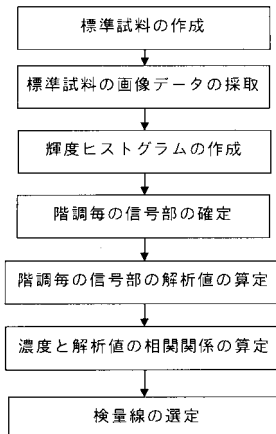
【図1】



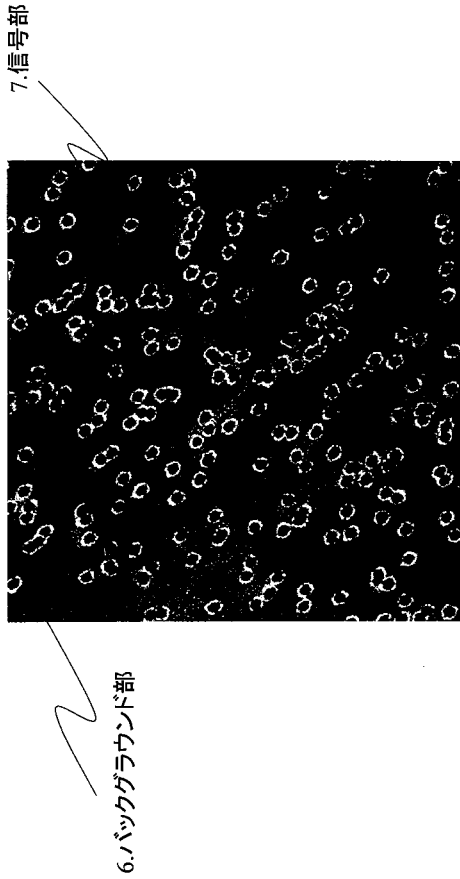
【図2】



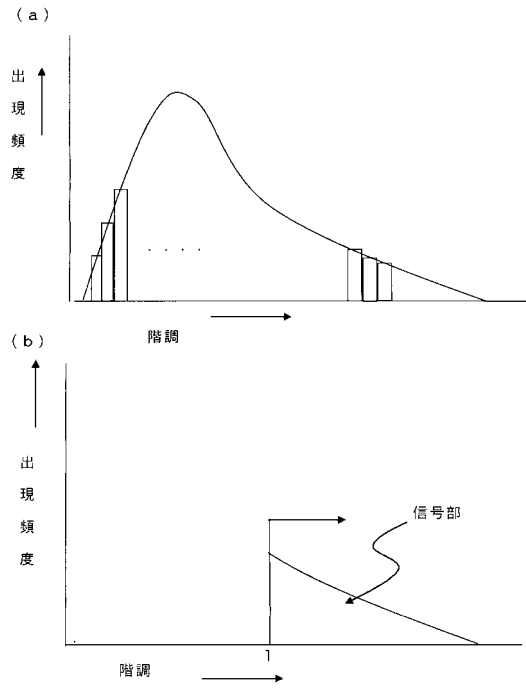
【図3】



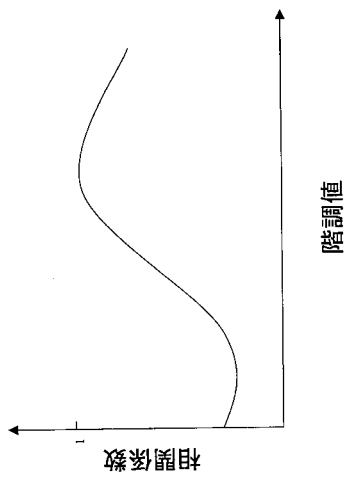
【 図 4 】



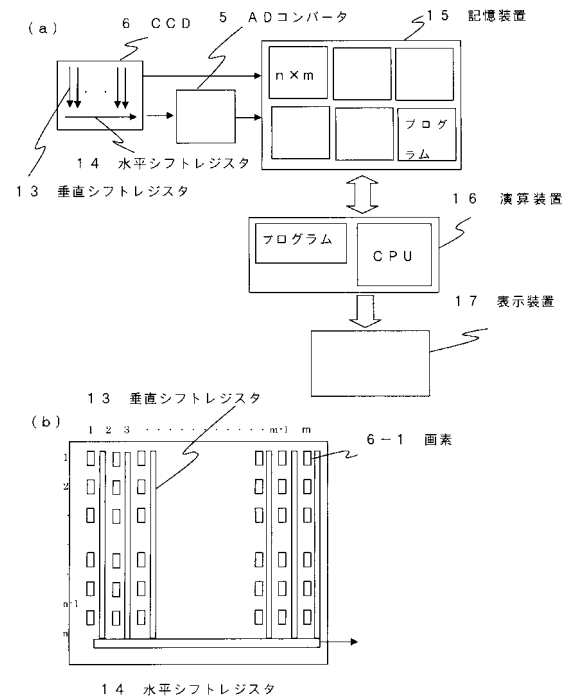
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特許第3270722(JP, B2)
特許第2947305(JP, B2)
特許第3129631(JP, B2)
特開平03-089141(JP, A)
特開平05-240857(JP, A)
国際公開第00/039329(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 21/62 - 21/83
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus(JDream2)