

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3577317号
(P3577317)

(45) 発行日 平成16年10月13日(2004.10.13)

(24) 登録日 平成16年7月16日(2004.7.16)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 21/64

F I

GO 1 N 21/64

Z

請求項の数 15 (全 21 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平8-509582 (86) (22) 出願日 平成7年8月31日(1995.8.31) (65) 公表番号 特表平10-507828 (43) 公表日 平成10年7月28日(1998.7.28) (86) 国際出願番号 PCT/US1995/011074 (87) 国際公開番号 W01996/007888 (87) 国際公開日 平成8年3月14日(1996.3.14) 審査請求日 平成14年8月26日(2002.8.26) (31) 優先権主張番号 08/300,160 (32) 優先日 平成6年9月2日(1994.9.2) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 ビー・ディー・バイオサイエンス・システムズ・アンド・リエイジェンツ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、95131 カリフォルニア州、サン・ノゼ、クム・ドライブ、2350 (74) 代理人 弁理士 深見 久郎 (74) 代理人 弁理士 森田 俊雄 (74) 代理人 弁理士 伊藤 英彦 (74) 代理人 弁理士 堀井 豊</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学式スキャナの校正方法と装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光分光計の2つのチャンネルを校正する方法であって、
 第1のチャンネルおよび第2のチャンネルを有する蛍光分光計を用意するステップと、
 校正基準を励起して蛍光校正光線を発生させるステップと、
 前記蛍光校正光線を第1の分割光線と第2の分割光線とに分離するステップと、
 前記第1の分割光線を前記第1のチャンネルで検出して第1の強度値を発生させるステップと、
 前記第2の分割光線を前記第2のチャンネルで検出して第2の強度値を発生させるステップとを含み、現在の割合は、前記第1の強度値および前記第2の強度値から決められ、校正係数は、前記現在の割合を予め定められた割合に対して比較することにより決められる、方法。

10

【請求項2】

前記校正基準を励起して前記蛍光校正光線を発生させる前記ステップは、ルビーを励起するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ルビーの温度を計るステップと、
 前記校正基準の温度により引起された前記校正光線の強さの変化に対して前記第2の強度値および前記第1の強度値を補償するステップとをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

20

前記校正係数の関数として前記第 1 のチャンネルを調節するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記校正係数の関数として前記第 2 のチャンネルを調節するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記校正係数を予め定められた値と比較するステップと、
前記校正係数と前記予め定められた値との間の前記比較について使用者に知らせるステップとをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

複数のチャンネルを有する蛍光分光計を校正するための方法であって、
長波長チャンネルおよび短波長チャンネルを有する蛍光分光計を用意するステップと、
校正基準を励起して第 1 の校正光線を発生させるステップと、
前記第 1 の校正光線を、第 1 の分割長波長校正光線と第 1 の分割短波長校正光線とに分離するステップと、
前記第 1 の分割長波長校正光線を前記長波長チャンネルによって検出して第 1 の長波長強度値を発生させるステップと、
前記第 1 の分割短波長校正光線を前記短波長チャンネルによって検出して第 1 の短波長強度値を発生させるステップと、
前記長波長校正強度値と前記短波長校正強度値との間の第 1 の割合を発生させるステップと、
引続き、前記校正基準を励起して第 2 の校正光線を発生させるステップと、
前記第 2 の校正光線を、第 2 の分割長波長校正光線と第 2 の分割短波長校正光線とに分離するステップと、
前記第 2 の分割長波長校正光線を前記長波長チャンネルで検出して第 2 の長波長強度値を発生させるステップと、
前記第 2 の分割短波長校正光線を前記短波長チャンネルで検出して第 2 の短波長強度値を発生させるステップと、
前記第 2 の長波長強度値と前記第 2 の短波長強度値との間の第 2 の割合を発生させるステップと、
前記第 2 の割合と前記第 1 の割合との間の校正係数を発生させるステップとを含み、蛍光分光計により発生されたデータは前記校正係数によって校正され得る、方法。

【請求項 8】

第 1 の蛍光染料の傾斜を決めるステップと、
第 2 の蛍光染料の傾斜を決めるステップと、
前記第 1 の染料の傾斜を前記校正係数によって調節するステップと、
前記第 2 の染料の傾斜を前記校正係数によって調節するステップとをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

複数のチャンネルを有する蛍光分光計を校正するための方法であって、
長波長チャンネルおよび短波長チャンネルを有する蛍光分光計を用意するステップと、
ルビーを励起して第 1 の校正光線を発生させるステップと、
前記第 1 の校正光線を、第 1 の分割長波長校正光線と前記第 1 の分割短波長校正光線とに分離するステップと、
前記第 1 の分割長波長校正光線を前記長波長チャンネルによって検出して第 1 の長波長強度値を発生させるステップと、
前記第 1 の分割短波長校正光線を前記短波長チャンネルによって検出して第 1 の短波長強度値を発生させるステップと、
前記長波長校正強度値と前記短波長校正強度値との間の第 1 のルビー割合を発生させるステップと、

引続き、前記ルビーを励起して第2の校正光線を発生させるステップと、
 前記第2の校正光線を、第2の分割長波長校正光線と第2の分割短波長校正光線とに分離するステップと、
 前記第2の分割長波長校正光線を前記長波長チャンネルで検出して第2の長波長強度値を発生させるステップと、
 前記第2の分割短波長校正光線を前記短波長チャンネルで検出して第2の短波長強度値を発生させるステップと、
 前記第2の長波長強度値と前記第2の短波長強度値との間の第2のルビー割合を発生させるステップと、
 前記第2のルビー割合を前記第1のルビー割合で割って校正係数を発生させるステップと
 を含み、前記蛍光分光計により発生されたデータは前記校正係数により校正され得る、方法。

10

【請求項10】

第1のチャンネルおよび第2のチャンネルを有する蛍光分光計を校正するための装置であって、
 蛍光分光計からの光線が衝突すると蛍光校正光線を発生させるように構成された校正基準と、
 前記蛍光校正光線を第2の分割光線と第1の分割光線とに分離するよう構成された光線分割器とを含み、前記第2の分割光線は前記蛍光分光計の第2のチャンネルで検出されて第2の強度値を発生させ、前記第1の分割光線は前記蛍光分光計の第1のチャンネルで検出
 されて第1の強度値を発生させ、前記装置はさらに、
 前記第1の強度値および前記第2の強度値から現在の割合を決めるための手段と、
 前記現在の割合と予め定められた割合との割合としての校正係数を決めるための手段とを含む、装置。

20

【請求項11】

前記校正基準はイオンを添加したガラスである、請求項10に記載の装置。

【請求項12】

前記校正基準は結晶である、請求項10に記載の装置。

【請求項13】

前記結晶はルビーである、請求項12に記載の装置。

30

【請求項14】

前記ルビーは或る長さ寸法および或る幅寸法を有するよう構成され、前記長さ寸法は前記幅寸法に等しくない、請求項13に記載の装置。

【請求項15】

校正係数を決めるための前記手段は、前記校正基準の温度を決めるための温度センサーを含む、請求項10に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

この発明は、一般に蛍光分光計、以後光学式スキャナ又は液中粒子の蛍光を検出するスキャナとも呼ばれるものを校正する方法と装置、特に走査用光学式イメージャを校正する方
 法と装置における改良に関する。

40

光学式走査技法を使用して、例えば人の血液サンプル等、色々のサンプルを分析することは多くの場合有利である。或るその種の技法では、蛍光染料で札付けされた抗体等の物質を含んだサンプルがレーザー光等の励起エネルギーによって励起されると発生される蛍光を分析する。もし光学式スキャナが適正に感度良く且つ正しく校正されていれば、サンプルは、札付き抗体が取り付いている抗原を多く含んだ細胞等、高くなった光濃度の部位の存在や実にその強さまでも分析する。

走査用蛍光イメージャを利用するそのような用途では、抗体のタイプに特有な蛍光染料で札付けされた異なったタイプの過剰な抗体と血液サンプルが混合されている。抗体は、血液サンプルで身受けられる特定タイプの細胞の或る目標プロテイン特性に対して特定の有

50

縁性を有している。サンプルは、公知容積の毛細管内に置かれ、次に染料を蛍光発光させる励起放射線で走査される。毛細管全体の内容物が、蛍光された蛍光を検出して計量できる走査システムを使用して一度に一小点域ずつ走査される。点域の各々からの蛍光強度は、次いでデジタル処理されて毛細管の全体の蛍光映像を形成する。抗体が取り付いている抗原が或るタイプの細胞内又はその上に比較的高い濃度で発見されるので、そのタイプの細胞内又はその上に比較的高い濃度で蛍光の札付き抗体が群がっているのが分かる。比較的高い濃度の蛍光は、かくしてそのタイプの細胞と識別する働きをする。

蛍光分光計を使用した一つのシステムとしてフローサイトメトリ（流動血球計算）がある。蛍光強度を検出できるもう一つ別のものは、トーマス M.ベアー、ルイス J.ダイエット、ロバート S.ダブロー、ポウル G.ハイター、ミカエル ホジェス、バラ S.マニアン、ロバート J.シャートルによって発明され、この出願人と同じ譲受人によって所有され、ここに参考に載げられている『容積式毛細管血球計算の装置と方法』の名称で願番08/236、342号の同時継続米国特許出願に開示されている。そのシステムによって実行されるような毛細管の走査を解説したデータ集積と分析の方法と装置については、ニング L.シッツとルイス J.ダイエットによって発明され、またこの出願と同じ譲受人によって所有され且つここに参考に載げられている『細胞算出と細胞分類の方法と装置』の名称で願番08/236、645号の同時継続米国特許出願に説明されている。

そのような光学式スキャナの設計者や製造者が遭遇する大きな問題は、異なった光学式スキャナは、同じサンプルに対して同じ蛍光強度の値をコンスタントに報告できない点である。検出された蛍光強度は、サンプルと混合された染料量が適当なのかを判断したり、機器が続けて正しく機能しているかを監視するのに役立つ。

更に、染料分子を取り付けた細胞等の各種の高蛍光部位に対する絶対強度の値は、診断目的に対して役立つ情報を提供する。テスト間での（多分光式スキャナとなるが）蛍光強度の比較を行うには、絶対蛍光強度について或る基準を必要とする。しかし、異なった光学式スキャナの光学構成要素の特性は、違ってきて、それ故に同じサンプルを走査しても異なった機器は異なった結果を報告する。異なった光学式スキャナが校正される上での対象となる或る根本的な参照基準（以後『ゴールド基準』と言う）無しでは、そのような比較に対して何ら蛍光単位の役立つ基準は存在しない。

更に、個々の光学式スキャナの要素は、時間がたったり、温度が変わると変化したりドリフトを起こす。更に、光学式スキャナの一つ又は複数の要素が修理や取り替えを必要とすれば、新しい又は修理された要素も元の要素から変わって来、その光学式スキャナは同じ入力に対して同じ値をもはや報告しなくなる。

現在使用されている幾つかの光学式スキャナは、同じ染料からの幾つかの蛍光が二つ以上のチャンネルで同時に検出される異なった検出器（チャンネル）で同時に蛍光を検出できるようになっている。そのような多チャンネル光学式スキャナは、付加校正を必要とする。それらは各チャンネルで基準蛍光単位を報告するばかりでなく、各チャンネルの感度を他に対して確立するように校正されなければならない。

検出される各タイプの蛍光染料は、特徴的な蛍光スペクトルを有している。各チャンネルで検出された蛍光の割合は、それ故に特定の染料を識別するのに使用されよう。しかし、もし検出器が各地のものに対して感度を変えれば、その割合は変わって出現するであろう。染料の正しくない識別や染料の識別不能が結果的に生じる。

上述のように複数のチャンネルを備えた光学式スキャナは、異なっているがオーバーラップした発光スペクトルを有した二つ以上の染料から同時に蛍光を検出するために時々使用される。そのような場合、少なくとも一つのチャンネルは、二つ以上の染料からの発光を検出する。どの染料がその発光に対して責任があったのかどうかを判断するのが、各チャンネルで検出された蛍光割合を分析することによって可能である。しかし、検出器の感度がもし互いに変化すれば、このことはもはや不可能である。

蛍光発光強度を計測する上でまたチャンネル光学式スキャナの感度のドリフトを調節する上で首尾一貫した単位が欠けていると言った問題と取り組むために、光学式スキャナの校正が必要となる。校正は、装置を基準（スタンダード）に対して相互に関係付けることを

10

20

30

40

50

意味している。蛍光分光計は、染料を血液サンプル内の細胞か又は多分ポリスチレンビードのいずれかに取り付けて、光学式スキャナの校正基準としてサンプル内で検出されるようにした染料を歴史的に採用して来た。しかし、そのような染料は、校正基準としては大きな欠点を有している。例えば、染料はしばしば不安定で、また有効寿命が限定器である。更に使用者は、基準が正確であると確約するには染料製造者のなずかままの状態である。もし、それが同じ各時刻で正確に調合されなければ、一染料ロットから次のロットにかけて蛍光反応で変化することになる。染料は、濃度や染料の保持容器の形、素材及び他の詳目や、また染料のPHや温度の影響を受け、たとえ高い信頼の下で製造されたとしても染料の蛍光特性は一樣でなく、また使用者によっても予想不可能に変化しよう。かくして、そのような染料を使用して絶対蛍光単位を校正する上での信頼の高い反復基準を造ることは非常に困難である。事実、その種の染料に対して異なったチャンネルによって検出された蛍光割合を決めることは可能で、作業がしにくく、高価で総体的にむずかしかったが、これらの染料を使用して絶対強さの一樣な単位、即ち基準蛍光単位を確立するのは一般には可能ではなかった。

10

たとえ正確であったとしても、基準としてその種の染料を使用することは、広範囲で複雑で周到的な用意と、熱心な訓練を要し且つ時間がかかり、費用を大幅に高めたり、手順にエラーを増すような取扱いを多くの場合必要とする。これらの理由に対して、取扱いが容易で且つ蛍光反応が予見できる比較的安定した基準は大きな前進となる。

かくして、蛍光分光計の改良と用途に係わった人々は、異なったテストや異なった蛍光分光計からのデータで多チャンネル検出器のチャンネル間の相対感度を決定するために使用されるデータを有意義に比較するために使用される一樣な蛍光単位を確立する上で、また蛍光分光計で校正を行う際に高レベルの熟練と訓練と熟達の必要性と重大なオペレータ入力とを回避する安定した恒久的な校正基準のために改良された方法と装置が必要であることを長い間認識してきた。本発明は、これらのニーズを全て満足するものである。

20

発明の概要

簡潔に且つ一般用語で言うと、本発明は、均質でソリッドステートな基準、即ち分子レベルで均一に蛍光発光粒子を分散させた状態のソリッドステートな基準を参照にして蛍光分光計を校正する改良された方法と装置を提供する。基本的に、このことは、基準を励起して蛍光発光させ、蛍光発光を光線として収集し、その光線を検出器に導き、検出器は次いで結晶の蛍光反応を表示するように調節されることで、本発明に依って達成されよう。その調節は、検出器の物理的調節であったり、検出器によって報告されるデータに加えらる数学的調節であったりする。

30

励起時の基準の温度変化は、蛍光発光の強さに影響する。本発明に依ると、温度センサーが基準の近傍に設置されて温度が励起時に記録される。温度差に依る蛍光発光の変化は、前もって決められ、自動照合表から入手出来るようになる。

ゴールド基準に対して光学式スキャナを校正する一方法は、ここで校正基準と称される中間基準を使用している。例によって、また必ずしも限定するものではないが、本発明の校正基準は、ゴールド基準に対して評価される。これに関して、両基準は、励起されて互いに同じ量の励起エネルギーだけ蛍光発光し、蛍光の強さは同じ検出器によって計測される。修正係数は、次いで校正基準の放射の同じ強さの値が、ゴールド基準のものと同じ値として表現されるように決定される。その後、校正基準によって校正される光学式スキャナでは、その光学式スキャナによって検出される蛍光発光強さが、同じゴールド基準に対して校正されていた校正基準によって校正される他の全ての光学スキャナに対して有意義で比較される蛍光発光単位を光学スキャナが報告するように修正係数によって調節される。本発明に依ると、2つ以上のチャンネルを備えた光学式スキャナは、それらの異なったチャンネルを単一の基準を参照にして同時に校正している。もし基準の蛍光スペクトルが光線分割器によって幾つかの分割光線に分割される波長範囲をカバーすれば、このことは可能である。各分割光線は、異なった検出器へ導かれる。各チャンネルによって報告された蛍光発光強さは、次に上述のように校正される。

40

本発明に依ると、2つ以上のチャンネルを備えた光学式スキャナは、チャンネル間の相対

50

感度におけるドリフトを補償するために各チャンネルで検出される光の割合を調節するべく単一の校正基準によって校正される。発明のより具体的特長として、或る有用な蛍光染料を検出するのに役立つ同じ光学式構成要素が本発明の校正を確立するために使用されるように、それら染料を検出する上で適切な波長を含んだスペクトル範囲をカバーする蛍光を発光させる校正基準が用意されている。

結晶が基準として使用される場合、蛍光発光強さと基準の発光光線の偏光化を制御するために励起源に関連して結晶の内部結晶構造の方位について、本発明は更に用意できている。このことは、例えば直方体として結晶を成形することで達成される。次いで結晶は、固定された長方形の凹み内にぴったりと嵌入される。長方形の凹みが前の走査におけるのと同じ方位に励起光線に対して配置されると、結晶の内部結晶構造も同じ方位に整列される。

10

本発明の具体的な応用では、ルビーの発光スペクトルが、生物学的サンプルと関連して有用な幾つかの染料の発光スペクトルとオーバーラップし且つルビーの励起スペクトルが、可視領域に大部分のレーザー光を含んだ広範囲の波長の光によってルビーを励起するようになるので、ルビーは特に役立つ結晶であるとみなされる。この領域の励起エネルギーは、上記染料を励起する上で適切な励起エネルギーを有している。かくして、そのような染料からの蛍光発光を励起して検出する光学式スキャナは、ルビーの使用によって都合良く校正される。

合成ルビーは、特に幾つかの光学式スキャナに使用する上で有利である。ルビーは、結晶中のクロムイオンの濃度に左右される強度レベルで蛍光発光し、合成ルビーのクロムイオン濃度は、意図した用途に対して適切な濃度を有したルビーを得るために製造中に制御される。

20

ルビーは、非常に耐久性があり、都合良く取り扱われ、且つ出荷されている。又ルビーは、非常に安定しており、時間と共に劣化しない。それは、基準として以前から使用されていた他の蛍光発光材における変わりやすいと言う問題発生源であったPHの変化や溶液中の周りの分子との化学的干渉や、濃度変化等の影響を受けない。それは確実に再生され、適切な蛍光発光強さを有するように合成調合もされる。ルビーは、繰り返し使用や通常の自動使用のために光学式スキャナ内に恒久的に組込まれる。

本発明の新しい改良された方法と装置は、多チャンネルの蛍光分光計のチャンネル間での蛍光に対する感度バランスを校正するために蛍光発光強さの基準単位を用意すべく蛍光分光計を校正し、また機器に対する簡単で自動的で度々使う安価な校正を提供するために蛍光分光計の一部として構成される安定した市販の恒久的校正基準によって校正する使い勝手の良い信頼性の高い安価な校正方法を提供する。

30

本発明のこれらや他の目的及び長所は、本発明の特長を例によって図解している添付図面と関連付けられた次の詳細な説明から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明と共に使用する光学式スキャナのシステム線図である。

図2は、図1の光学式スキャナによって走査される毛細管を図解した概略線図である。

図3は、本発明に係るゴールド基準のルビーを収容したカートリッジの頂部平面図である。

40

図4は、本発明に係るルビーの側部立面図である。

図5は、本発明に係る組込み校正ルビーを示している光学式スキャナに使用する大皿の頂部の平面図である。

図6は、校正ルビーを示している図5の点線円形部の拡大頂部平面図である。

図7Aは、チャンネル-0によって検出された蛍光単位に対してグラフ化されたチャンネル-1によって検出された蛍光単位で図1のスキャナによって検出された蛍光単位を図解したグラフである。

図7Bは、図7Aで図解されているものと同じデータであるが、チャンネル間の相対感度における変化後にスキャナの図7Aと同じ2つのチャンネルによって検出されたものを図解しているグラフである。

50

図8は、2つの異なった染料の発光スペクトルと、染料の発光スペクトルを分割する二色性鏡の透過スペクトルとを図解したグラフである。

図9は、本発明と共に使用する温度自動照合表である。

図10は、ゴールド基準のルビーを参考にして校正ルビーの蛍光発光強さを決定する際にとられる工程を示したブロック線図である。

図11は、光学式スキャナへ電力が入れられた時に蛍光に対する光学式スキャナの感度を自動的に設定する手順のフローチャートである。

図12は、2つのチャンネルの検出器でCy5TMとCy5.5TMとルビーに対するチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合を決定するために取られる工程のブロック線図である。

図13は、相対的なチャンネルの感度におけるドリフトに対して修正するために図12のような光学式スキャナで予じめ検出されたように染料に対する現在のチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合を決定するために取られる工程を示したブロック線図である。

好適な実施例の詳細な説明

本発明の校正方法と装置は、トーマス M.ベアー、ルイス J.ダイエット、ロバート S.ダブロー、ポウル G.ハイター、ミカエル ホジェス、バラ S.マニアン、ロバート J.シャートルによって発明され、この出願人と同じ譲受人によって所有され、ここに参考に載げられている『容積式毛細管血球計算の装置と方法』の名称で願番08/236、342号の同時継続米国特許出願に開示されたタイプの光学式スキャナに使用される。それは、ニング L.シizzoとルイス J.ダイエットによって発明され、またこの出願と同じ譲受人によって所有され且つここに参考に載げられている『細胞算出と細胞分類の方法と装置』の名称の願番08/236、645号の同時継続米国特許出願に開示されているようにデータを訳する方法と装置に関連して使用されるように設計されている。

図1を参照して説明され、本発明と共に使用する光学式スキャナは、ガラス板の衝突するレーザ光80を発生するヘリウムオンレーザ(以後HeNeレーザとする)のようなレーザ10を有している。ガラス板は、レーザの電気出力を計測する電力モニター11にレーザ光80の大部分を反射する。ガラス板12によって反射されるよりもむしろ透過される励起光線81部分は、レーザのラインフィルター13を通して、次いで例えば二色性鏡やプリズムや格子等のスペクトル分散装置14へと導かれる。スペクトル分散装置14は、HeNeレーザの場合に約633ナノメートルの波長を有した励起光線81を反射する。

励起光線81は、次いで鏡15に導かれ、その鏡によって直角プリズム16へ反射される。光線は直角プリズムを通して走査組立体34へと移動する。

走査組立体34は、検流計17と検流計鏡18とレンズ26、27と対物レンズ19とから構成されている。検流計17は、励起光線81が検流計鏡18上に導かれている間に検流計鏡18を振るようになりその鏡と連通している。それによって、励起光線81は、対物レンズ19を通るように導かれ、これによって毛細管20を横断して走査される。毛細管20は、その内部に例えばその蛍光染料で色付けされた生物学的サンプル53を収容している。

図2に最も観察されるように、サンプル走査中、励起光線81は毛細管20の外壁に当り、その壁を横断し、サンプルから蛍光発光を起こさせながらサンプル53に柱状域51を照らす。サンプルからの蛍光発光は、光線32A、32Bによって図2で表されている。かくして発生された蛍光の幾分かは、対物レンズ19上に到達し、後方光線83としてサンプルから収集され且つ後に導かれる。

励起の結果として、サンプルによって放射され且つ対物レンズ19によって収集された蛍光は、走査組立体34を通して後方に導かれる。さて、より具体的に図1を参照にすると、後方光線83は、走査組立体34から直角プリズム16を通して鏡15とスペクトル分散装置14に移動する。後方光線は、励起光線とは異なった波長を含んだスペクトル領域を有しており、従って励起光線を走査組立体34に導く同じ光学要素によって励起光線とはちがって導かれる。例えば、その波長によって、後方光線83はスペクトル分散装置14によって反射されるよりはむしろその装置を透過され、次いで視準レンズ23を通るように導く鏡22へと帯域フィルター21を通される。

例えば、後方光線83に経路に沿うように後方に毛細管20の面によって反射された励起光線

10

20

30

40

50

からの光のように、励起光線81の波長を有した光は、後方光線の経路から離れるように且つレーザ10に向かって後方に二色性鏡14によって反射される。これによって後方光線83から反射励起光が追放される。後方光線83は、走査対象物内の限定域51からの蛍光とは別の光をその後方光線から除去するように作用する空間フィルタ-24のピンホール孔を通して視準レンズ23によって焦点が合わされる。

空間フィルタ-24を通過後に、後方光線83は検出手段35へ導かれる。検出手段35は、後方光線83の蛍光発光信号を受信して、それを増幅し、増幅した結果をデータリーダ50へ報告するPM30のような検出チャンネルから構成されており、リーダ50はその結果をアナログ形からデジタル形へ転換し、蛍光発光強さの単位でそれを記録するものである。この説明のために、それら単位は、アナログからデジタルへのカウント又は『A/Dcts』として命名される。

10

検出手段35は、各々がそれ自身のPMT30、31を有した2つの検出チャンネルを含んでいる。スペクトル分散装置25は、光の波長に基づいて後方光線83を分割し、そして一方の光線84を第一PMT30に、また他方の光線85を他方のPMT31に導くために空間フィルタ-24とPMT30、31との間に配置される。このように、単一の光学式スキャナは、各々が後方光線83の別個の部分を受ける2つのチャンネルを有している。

図5を参照すると、毛細管20はカートリッジ49によって各々担持されており、各カートリッジは2つの毛細管を担持している。カートリッジ46は、対物19の下で回転する回転大皿48上に設けられている。モータ(不図示)は、各毛細管20を対物19の下に位置付けるために大皿48を回転し、且つその毛細管上の走査が完了するまで毛細管が対物の下に在る間停止している。次いでモータは、次の毛細管20が対物の下になるまで再度大皿48を回転し、その毛細管の走査が次いで実施される。

20

さて図5と図6を参照にすると、大皿48は、10個のカートリッジ49を保持するように設計されており、また10個の放射状支持アーム46を有している。ルビー45のような校正結晶が、それらアーム46の一つに搭載されている。校正ルビー45を走査するために、大皿48は回され且つ校正ルビーが対物レンズ19の下になる位置で止められる。ルビー45は、次いでレーザ-10からの励起光線81で励起され、その結果放射された蛍光は、後方光線83として収集され、光学式スキャナのチャンネル30、31に分割されて検出される。実際は、このルビー走査の結果として検出された蛍光強さの平均最大値は、ルビー上の幾つかの点を順次走査し且つ次に校正の目的に使用される平均値を得るために各走査から蛍光強さの最大値を平均して得られる。これで使用される値の信頼性を高める。

30

サンプル53上で走査を実施するのと違って、ルビー45の走査を行う時は、検流計鏡18は静止している。ルビーは、励起後に比較的長い期間蛍光発光をする。光学式スキャナは、ルビー45上に励起光線81を焦点を結ばせるために使われる同じ対物19を通して戻るルビーからの蛍光を検出する。かくして、検出された蛍光は、励起光線81と同じ点からのもので、同じタイミングとなる。励起光線81が毛細管20を横切って走査される時に行うように検流計鏡18がもし振れれば、ルビー45からの計測信号は、ルビー45が蛍光発光の定常状態に到達する前に検出点が動き続けるので大幅に減衰されよう。

複数の検出チャンネルを備えた光学式チャンネルは、異なった染料からの蛍光を識別するのに役立つ。例えば、最も簡単な場合で、サンプルは、2つの染料の蛍光からの光から成る後方光線83がスペクトル分散装置25によって別々のはっきりした光線84、85に分割されるように或る範囲の波長を有したスペクトルで蛍光発光する2つの染料を含むことがあり、各光線84、85は一方のただ一つの染料からの蛍光を表しており且つ各々異なったPMT30、31に導かれる。そのような場合、一つの特定のチャンネルによって検出された全ての蛍光は、一つの特定の染料からの蛍光を表し、また他のチャンネルによって単一の励起光線81を使用して且つ単一の走査を行い、これら2つの異なった染料は、後方光線83を分割してその結果の分割光線84、85を別々のチャンネルに導くことで容易に検出されて識別されよう。

40

しかし、もっと一般的な場合、後方光線83の蛍光は、染料の少なくとも一方の蛍光の一部が2つのチャンネルの両方に導かれるようにオーバーラップする発光スペクトルを有した2

50

つの異なった染料によって放出される蛍光から構成される。そのような状況では、光学式スキャナの2つのチャンネルによって検出される蛍光に対して責任あるのは一方なのか、他方なのか、それらの両方の組み合わせなのかを決めるのが依然可能である。このことは、2つの異なったチャンネルに導かれる全蛍光エネルギーの割合を決める必要がある。このことは、各染料の蛍光の或る割合のどの部分が各チャンネルに導かれるのかを決め且つ各チャンネルによって検出された蛍光発光の相対量を分析して実施されよう。

そのような状況例としては、Cy5TM染料とCy5.5TM染料の両方の札付き細胞を含んだサンプルがあげられよう。Cy5TMは、1/1000未満の分子量を有したアロフィコシアニド同様の蛍光特性を有した反応性シアニンである。それは、フリーアミノグループを含んだ化合物の札付けに用意された乾燥染料として提供されたスクシニミドの腐食剤であり、ペンシルバニア州のピッツバーグの生物学的検出システム社から入手可能である。それは、図8のライン91によって示されているように65ナノメートルの吸収最大値と、66ナノメートルの放射最大値と、約630から約800ナノメートルの放射スペクトルを有している。

Cy5.5TMは同様な染料であり、同じペンシルバニア州のピッツバーグの生物学的検出システム社から入手可能であり、図8の線93で示されているように約695ナノメートルの放射最大値と約650ナノメートルから約780ナノメートルのスペクトル範囲を有している。もしこれら2つの染料からの蛍光から構成された後方光線が、線95で示されているように、一方が約684ナノメートルより長い波長を有し、他方がそれ未満の2つの光線にその蛍光を分離するスペクトル分散装置に導かれ、その分散光線が異なったチャンネル30、31に導かれれば、各染料の蛍光の一部は、各チャンネルに導かれることになる。

各染料は、その蛍光の特徴的なチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合によって識別されよう。その割合は、上述のように各チャンネルに導かれる蛍光量から成る。その割合は、図7Aに示されているようにグラフ化され、蛍光を発している染料の特性を表しており、チャンネル - 1によって検出された蛍光単位はY軸で、チャンネル - 0で検出された蛍光単位はX軸としている。

各染料に対する特徴的な割合は、線に沿ってグラフ化されているその染料からの全ての蛍光発光に帰結し、その線の傾斜がその割合であり、その線に沿った点が検出された全蛍光エネルギーである。例えば、図7Aを参照すると、線100AはCy5TMからの放射の蛍光単位のようなグラフを示している。その線の傾斜は、チャンネル - 0に対するチャンネル - 1への流入蛍光エネルギーの割合（即ちチャンネル - 1/チャンネル - 0）を表している。もう一つ別のそのような線が、例えば、Cy5.5TMに対する蛍光発光を表している100Aとして図7Aに示されている。各染料に対する割合は、その染料の特徴を表しており、検出された発光は、図示のようにグラフ化されよう。もし、グラフ化された蛍光発光が特定染料に対する特定線に沿って下がれば、それはその染料によって放射されているものとして正しく識別されよう。

しかし、PMTが検出器として使用されたり、鏡やレンズのような他の光学式エレメントが汚れたり、時間と共に変化した場合によく起こるように、もしチャンネル30、31の相対感度が時間と共に変化すれば、各チャンネルに導かれる光の見かけの割合は変化する。そのような変化は図7Aと図7Bを参照にして立証される。図7Aの線100Aは、Cy5TMからの蛍光発光に対して特定の光学式スキャナによって観察されるチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合を表している。図7Bの線100Bは、相対PMT感度における変化の後に同じ光学式スキャナで観察されたその同じ割合を図解している。光学式スキャナは、依然として同じ割合の蛍光を各チャンネルに導くが、しかしチャンネルの感度の相対変化によってその割合は変化を起こしたように現れ、Cy5TMからの発光のグラフ100Bは、次いで以前の場合と異なった傾斜の線を示す。同じ光学式スキャナによって検出され且つグラフ化された他の特徴的放射スペクトルは、Cy5TMに対するチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合を表している図7Aの線101Aと図7Bの線101Bによって示されているように、それらの線の特徴的傾斜において同様の見かけシフトを経験することになる。

ルビーや、クロムイオンのようなイオンを添加したガラスのような結晶も、特徴的な蛍光スペクトルを有しており、また2つのチャンネルの光学式スキャナによって検出されると

10

20

30

40

50

、それらの特徴的なチャンネル - 1/チャンネル - 0 の割合によって、識別されよう。これは、図7Aの線102Aによって図解されているようにグラフ化されよう。検出器の感度が変化すると、ルビー発光に対するチャンネル - 1/チャンネル - 0 の見かけ割合も変化する。それは、同じ光学式スキャナによって検出された他の全ての特徴的発光と同じ程度だけ変化する。従って、ルビーの発光線の傾斜における見かけの変化を参照にして、他の染料の発光に対する線の傾斜は、そのような発光が正しく識別されるように決定されよう。このことは、もしルビーのチャンネル - 1/チャンネル - 0 の線の傾斜におけるシフトが知られていれば、他の全ての発光に対するチャンネル - 1/チャンネル - 0 の線におけるシフトを決めるのに使用されるので、純粋な染料を含んだ校正カートリッジを動かす必要無しに実施される。クロムイオンを添加したサファイアの結晶であるルビーは、上述のようにCy5^{T^M}とCy5.5^{T^M}のような生物学的試料に色をつけるのに役立つ多くの染料を分析する働きの光学式スキャナの同じ光学要素によって励起され、分割され、検出される発光スペクトルを有している。ルビーの発光スペクトルは、692nmと694nmの間の比較的狭いものでCy5^{T^M}とCy5.5^{T^M}の蛍光発光によって発生される後方光線83と同様にスペクトル分散装置14を通過する。Cy5^{T^M}とCy5.5^{T^M}からの後方光線83を分割する好適実施例の同じスペクトル分散装置25は、ルビーの後方光線83を分割する。ルビーの後方光線83を分割する正確な割合は、決定的ではないが、図7Aでの図解を目的として、それは約50/50として示されており、各分割光線84、85は異なったチャンネル30、31に導かれている。ルビーのチャンネル - 1/チャンネル - 0 の蛍光単位のグラフは、図7Aにおける線102Aによって表されている。チャンネル - 1/チャンネル - 0 の相対感度が変わると、線102Aの見かけの傾斜も、図7Aにおける102Aから図7Bにおける102Bへの変化によって図解されている如く変化する。これらの線の傾斜は、Cy5^{T^M}とCy5.5^{T^M}に対する線の傾斜と同じ係数だけ変化する。かくして、校正ルビーのチャンネル - 1/チャンネル - 0 の割合における見かけの変化を参照にすると、同じ光学式スキャナによって検出されるように他の染料に対するチャンネル - 1/チャンネル - 0 の割合における見かけの変化は決定され、また観察されたデータは適切に調節される。

励起に対するルビーの蛍光反応の強さは、ルビー結晶内のクロムイオンの濃度に依存している。もし結晶が余りにも高いクロムイオン濃度を含んでいると、蛍光も余りにも大きな強さとなって光線84、85は検出器30、31を飽和させる。合成ルビーのクロムイオン濃度は、所望の蛍光強さに対するクロムイオンの適切な濃度を有したルビーが得られるように合成ルビーの製造中に制御される。この実施例のルビー40は、例えば100万当り37±12部のような比較的低いクロムイオンで製造される。

組込まれた校正ルビー45は、一般に0.5mm～1.0mmの厚さで比較的薄い。走査中、励起光線81は、10ミクロンの直径で100ミクロンの深さのガウス腰51へ焦点を合わす対物レンズ19を介してルビーに導かれる。励起光線81は、100ミクロン以上の深さとなっているルビーから、別言すれば全ガウス腰がルビー40以内の時はいつでも最大発光を起こすことができる。走査中、最大発光値を決めるためにガウス腰をルビー内に通過移動させながら対物レンズ19はルビー40に向かって徐々に移動される。最大励起は、ガウス腰が完全に結晶内に入った時に達成される。対物の焦点域（即ち、ガウス腰）がルビーの遠方面を越えて移動されるに従って放射された蛍光は減衰し始める。かくして発光を検出するソフトウェアは、検出された発光値が増大し、最大値でしばらく安定し、次いで減少しはじめたことを決定できるものである。かくしてそのソフトウェアは、ルビー走査が続行していてもその最大値は増大しないと言う確信をもってその値として達成された最も高い値を選択する。

励起光線81に対するルビーの結晶構造の配列は、スペクトル分散装置25が放射光線83を分割する蛍光強さは、励起光線81に対するルビーの整合に応じて3の係数のように大きく変化できる。強さの変化はルビーの発光のスペクトル範囲に影響せず、従って、各チャンネル30、31によって検出された放射光の割合に大きくは影響しないが、検出された全般の強さは変わる。観察された絶対強さに係るデータは、設備の連続した正しい機能やサンプル53と混合された染料の適切なレベルをモニターする上で重要であり、且つ有用な診断情報を発生するので、絶対強さは時間と共に校正されるべきである。蛍光発光強さに対する感度について光学式スキャナを校正するために、校正ルビーの結晶構造の配列は、励起光線

10

20

30

40

50

に対してその時その時で同じでなければならない。

励起光線に対する結晶構造の配列も、その時その時で同じ偏りを有した発光を行わせる上で重要である。二色性鏡25がルビーからのスペクトル放射を分割する波長は、鏡に当る光の偏りに応じて変わる。かくして、走査から走査にかけてチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合において一貫性を維持するために、他の全てのファクターが等しければ、発光された蛍光の偏りはその時その時で同じでなければならない。放射光の偏りは、結晶構造の配列に応じて変化する。従って、この理由や蛍光発光の強さのために、結晶構造の配列は、走査から走査にかけて首尾一貫していなければならない。

結晶配列を取り巻いたこれら両方の関心の高い強さと偏りは、ルビーの形状によって解決される。さて、図3を参照にすると、ルビー40は、直方体である。ルビー40の結晶構造は、長方形の平行辺に関連して特定される。例えば、ルビー40は、垂直な研磨面42から60度~65度に結晶の光軸で得られる。図5を参照にすると、ルビー40は矩形に成形され且つ大皿48の支持アーム46の矩形凹み内にしっかりとハマる寸法となっている。ルビー40によって放射された光は、結晶の180°回転毎に一度偏りを回し、それで矩形ルビー40がアーム44の凹みに挿入されるとルビーは2つの起こり得る方位に安定付けされるだけであり、いずれもルビーによって放射されている光と同じ偏りに帰結する。比較的薄いルビーは、大きな面のいずれかを頂面として位置付けて180°回転されよう。このことは更に、正しい偏りをも備えた光を発生させる内部結晶構造の定方位付けとなる。

予想可能なようルビーの定方位付けの同様な方法は、ゴールド基準のルビー41に採用される。校正ルビー45のような大皿48の支持アーム46に配置された矩形凹みに挿入される代わりに、ゴールド基準のルビー41は、図3に図解されているようにカートリッジ60の矩形凹みにしっかりとハマるように同様に成形され、ルビー41は、毛細管20の一部がサンプルのカートリッジ49上に配置されているカートリッジ上に配置されている。カートリッジ60は、走査用カートリッジ49のように大皿48上に置かれる。

図2を参照にすると、走査がルビー上で行われると、ゴールド基準のルビー41又は校正ルビー45のいずれかの上で、ルビーは対物レンズ19の下方に置かれ且つ励起光線81がルビー上に導かれ、検流計鏡18は静止している。励起光線81は、692nmから694nmの波長に渡るスペクトルでルビーに蛍光発光させる。蛍光は、対物レンズ19によって収集されて後方光線83として検出手段35に向かって後方へ導かれる。それが二色性鏡14に当たると、光線は反射されず、むしろ二色性鏡を透過し、そこから帯域フィルター21を通過して鏡22まで導かれる。それは、視準レンズ23を通して鏡22から反射され、その後空間フィルター24を通過して検出手段35内に導かれる。

検出手段35は、後方光線83の蛍光信号を読み且つデータリーダー50に通じているPMT30のような少なくとも一つの検出チャンネルを校正しており、リーダー50はPMTから報告された信号をアナログからデジタルの形に変換する。図1に図解された検出器では、後方光線83は、それを分解光線84、85に分解するスペクトル分散装置25に導かれ、それら各光線84、85は次いで別々の検出チャンネル30、31に導かれるようになっている。各PMTによって発生された信号は、A/Dカウントと見なされたりまたデータリーダーによってデジタルカウントに転換される検出器からのアナログ形のデータを参照にする蛍光発光強さの単位でデータリーダーによって読み取られる。

光学式スキャナは、基準蛍光単位を報告するためにゴールド基準のルビー41に対して直接校正される。そうすることによって、絶対蛍光発光強さを計測する基準蛍光単位は、ゴールド基準のルビー41に対して校正された全ての光学式スキャナにおいて確立される。実際には、光学式スキャナはゴールド基準のルビー41に対して間接的に校正され、光学式スキャナに組込まれた校正用ルビー45は、ゴールド基準のルビーに対して評価される。光学式スキャナが、引き続き組込み校正ルビー45に対して校正されると、光学式スキャナはゴールド基準のルビー41によって確立されるように基準の蛍光単位を報告するように調節される。

特定の光学式スキャナによって基準の蛍光単位を報告するためのこの校正は、次のように実施される。校正ルビー45は、大皿48の支持アーム46に組込まれている。大皿は、光学式

10

20

30

40

50

スキャナの対物19の真下に配置されるまで回転される。次いで大皿は回転を止め、校正ルビーは対物の下で静止している。レーザー10からの光線は、結果的に蛍光を発生するルビー上に導かれる。校正ルビー45から放射される蛍光は、後方光線83に収集された、検出器に、又は2チャンネルの光学式スキャナの各検出器30、31に導かれる。校正ルビー45の蛍光のピーク値としても知られている最大蛍光値が決定される。

各検出器30、31は、バイアス部に加えられる電圧を調節することによって感度が調節される光電子倍增管(PMT)である。校正ルビーによって放射される蛍光が検出されると、最大検出蛍光に対する感度が例えば約100のA/Dカウンタの所定の範囲内に入るまでバイアス電圧は調節される。2チャンネル検出では、同じ手段が、最初に各チャンネルに対するものとしてバイアスを設定するのに使用される。

その後、図3に図解されているようにカートリッジ上に一般に配置されたゴールド基準のルビー41は、大皿48上に置かれる。大皿は、ゴールド基準のルビー41が対物19の真下に配置されるまで回される。次いで大皿48は、回転を止め、ゴールド基準のルビー41は対物19の下で静止している。レーザー10からの励起光線81は、ゴールド基準のルビー41上に導かれて、それは結果的に蛍光を放射する。ゴールド基準ルビー41によって放射された蛍光は、後方光線83に収集され、校正ルビー45の後方光線のように検出器35に導かれる。ゴールド基準ルビー41の蛍光の最大強さ(ピーク値)は、校正ルビー41のピーク値の蛍光単位をゴールド基準ルビー41のピーク値の蛍光単位に変換する係数を決めることでゴールド基準ルビー41に対して評価される。この調節は、PMT上のバイアス電圧を調節することによって検出器の感度に対して行われたり、又は光学式スキャナから引き出されたデータに算術的修正が加えられる。

ルビーの蛍光発光の強さは、温度の影響を受ける。例えば、15 から35 の範囲に渡って、信号振幅は各チャンネルにおいて30%も変化する。従って、ゴールド基準ルビー41に対して評価する時に、また再び後で差を補償するために光学式スキャナが校正ルビー45に対して校正される時はいつでも校正ルビー45の温度を決める必要がある。特定の温度変化に対する適切な調節が、自動照合表を参照にして行われる。この実施例で述べたルビーに対して、自動照合表は経験的に決められ、25 の温度に対して標準化されており、また強さを標準化する係数は、5 の0.71から4 の1.30に渡ってリストアップされている。自動照合表は図9に示されている。

実際には、もし周囲とほぼ同じ温度をルビーが取れるように十分な時間と露出が行われれば、ルビーの温度をそれ自身直接計測するよりもむしろ一般に光学式スキャナの内部のようにルビー45の直接の周囲温度を計測するのが適切であることがわかっている。校正ルビー45は、走査手順の一部として回転する大皿48上に搭載されており、またゴールド基準ルビー41は、大皿48上に置かれて使用中に同じく回転するカートリッジ60上に在る。回転するために自由でなければならぬルビーの温度を直接計測する必要が無い温度センサー75は、そのような温度を直接計測する温度センサーよりも製造や操作の点でより好都合で、より安価であることがわかっている。

もしスキャナが2つのチャンネルを有していれば、両方共単一の校正ルビー45によって同時に校正される。これによって、ルビー45の励起や後方光線83の発生は、上述のようになっている。

後方光線83は、二色性鏡等のスペクトル分散装置25に導かれ、光線はPMT等の2つの検出器30、31に導かれる分割光線84、85に分割される。これら結果的に生じる分割光線の各々は、次いでそれらのバイアス電圧を調節することでPMT30、31の感度を設定するのに使用される。その後、ゴールド基準のルビー41は走査され、その後方光線83は同様に分割され、分割光線84、85はPMT30、31に導かれ、各々の強さは各チャンネルに対して記録される。各チャンネル30、31の補償係数が、次いで決められ、それによって校正ルビー41の発光はゴールド基準ルビー41に対して校正され、出力が絶対蛍光強さの基準単位を報告するように校正ルビーを評価する値を得る。その後、校正ルビー45が走査されると、両チャンネル30、31とも同時に校正され、ゴールド基準ルビー41を参照にして決められるように基準蛍光単位を報告する。

10

20

30

40

50

図7Aと図7Bを参照すると、Cy5^TMとCy5.5^TMのようなオーバーラップするスペクトルを有した2つの染料が、図1に図解されているような2チャンネル光学式スペクトルで検出される場合、チャンネルの一方又は両方の感度における経時変化は、各々に対する蛍光信号の見かけのチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合の変化をもたらす。ルビー発光のチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合は見かけの変化を経験するが、3つの割合は互いに対して一定となっている。関連した染料（及びそれで上でそれが濃縮されている細胞）の識別は、特徴的なチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合の正確な決定に依存するので、染料の正しい識別及びそれで細胞の識別を確実にを行うためのテスト時にその割合を正確に決める必要がある。これは、校正ルビー45からの蛍光発光を参照にして行われる。もう一つの方法では、もし染料のチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合がチャンネル感度の変化による見かけ

10

の変化を有していれば、ルビー発光は同じ係数によるチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合の見かけの変化を持つことになる。従って、染料に対する正しいチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合は、もしその染料のチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合が校正ルビー45のチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合に対して決められたならば見かけの変化の後に決められる。見かけ変化の後のルビーのチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合は、次いで決定され、ルビーや染料に対するオリジナルのチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合間で経験される見かけの変化は同じになる。

実際は、全ての合成ルビー基準を参照にして光学式スキャナの幾つかの異なった校正が実施される。最初、ゴールド基準ルビー41に対して直接又は間接的に校正される全ての光学式スキャナに対して蛍光単位の一様な基準を提供する蛍光強さに対して感度を設定するた

20

めにゴールド基準ルビー41に対して光学式スキャナは校正される。更に、校正ルビー45には、各光学式スキャナが割り当てられ、ゴールド基準ルビー41に対して校正される。次いでその校正ルビー41は、（例えば光学式スキャナが作動されると）基準蛍光単位を表している蛍光単位を正確に報告するために校正ルビーを参照にして日常的に又は自動的に校正されるように光学式スキャナに組込まれる。もし2チャンネル検出器が用意され且つルビーのスペクトル放出が各々2つの異なったチャンネル30、31に導かれる2つの光線84、85に分割されれば、両チャンネルは単一のルビー結晶を参照にして同時に校正される。たとえば2つのチャンネルの各々の絶対校正が行われても、ルビーのチャンネル - 1/チャンネル - 0の割合が決められ且つ続いて2つのチャンネルの相対感度の変化に対して調節するために物理的に又は数学的に調節が行われる。

30

さて図10を参照にすると、ゴールド基準ルビー41に対して光学式スキャナを間接的に校正する方法は、ゴールド基準ルビー41によって放射されたものと校正ルビー45から放射された蛍光を比較し、校正ルビー45に当てられる修正係数を決め、続いて校正ルビー45に対して光学式スキャナを校正し且つ修正係数を参照にして光学式スキャナを調節し、基準蛍光単位の設定を行う。この方法を、2チャンネル検出器を参照にして且つゴールド基準ルビー41からの蛍光発光の計測に先立って校正ルビー45からの蛍光強さの計測を参照にしてここに説明する。

40

しかし、単一チャンネル検出器に使用する校正は同じであることは、当業者によって容易に理解されよう。蛍光の検出オーダは、最初に検出された校正ルビー45からの又は最初に検出されたゴールド基準ルビー41からのいずれかの蛍光に係ることは、通常当業者には容易に思いつくことである。

校正を始めるために光学式スキャナが作動され、その要素、具体的にはレーザ10、PMT30、31、温度センサー75、校正ルビー45がウォームアップされる。これで、校正中に比較的安定した温度が用意される。各チャンネル30、31の検出器は、初期感度に設定される。これからの参考までに、この値は光学式スキャナが最初に作動された時の自動調節中に使用するために記憶される。PMTの場合、感度はバイアス電圧によって調節され、それは後で使うために記録されるこの電圧である。ここで説明するために、チャンネル - 1とチャンネル - 0のバイアス電圧は、各々hv1、hv0とする。レーザが作動され、その出力は組込まれた発光ダイオード11で計測され、次いでレーザ出力は記憶される。ここで説明するために、このレーザー出力値はlaser0とする。

50

次いでレーザ10は、次いで校正ルビー45に導かれる励起光線81を発生し、かくして発生された蛍光は後方光線83として収集されて検出器30、31へと導かれる。各チャンネルの最大信号は次いで記録される。ここで説明するために、この最大検出値は、チャンネル - 1用にref1、チャンネル - 0用にref0とする。

温度センサーによって温度が読まれ、後で使うために記録される。ここで説明するために、これはtem0とする。

プラスチックカートリッジ60の搭載されるゴールド基準ルビー41は、対物19の下に配置され、励起光線81によって励起されて蛍光発光し、発光蛍光は前の文節での校正ルビー45の場合と同様の光学要素によって分割され、各チャンネルの最大信号は次いで記録される。チャンネル - 1とチャンネル - 0で検出された信号のこれら最大値は、ここで説明するために、各々gol1、gol0とする。

次いで校正ルビーは、それからの蛍光に対する報告蛍光単位をゴールド基準ルビー41によって発生された蛍光に対して報告されたように蛍光単位を等しくするべく調節する各チャンネル用修正係数を決めることで評価される。上記のように設定された術語を使い、チャンネル - 1とチャンネル - 0のこれらの修正係数をcorr1とcorr0とし、これらの修正係数の決定は、次のように数式化される。corr1 = gold1/ref1、corr0 = gold0/ref0。この修正係数は、校正ルビー45に適用され、その後ゴールド基準ルビー41に関連して光学式スキャナの感度を調節するために使用される。例えば、たとえレーザ10の出力低下や、光学式スキャナの蛍光検出効率の全体的低下や増大等の光学要素のドリフトが起きても、走査される全てが校正ルビー45と同じ光学的作用を受けるので、修正係数は校正ルビー45に適用される。(このことは、勿論蛍光の強さを参照にし、スペクトル特徴を参照していない。)もし校正ルビー45がゴールド基準ルビー41の2倍の強さの蛍光を発生し、gold1が2000のA/Dカウントであれば、校正ルビー45のch1で検出される蛍光は4000のA/Dカウントとなる。従って、同様に校正された他の光学式スキャナに有意義に比較される蛍光発光単位における基準値は、この図解では(2000A/Dカウント/4000A/Dカウント) × (検出された単位)となるcorr0 × (検出された単位)となる。

さて図11を参照にすると、光学式スキャナが作動されると、校正ルビー45は、検出器30、31の感度を自動設定するために使用される。検出器30、31の感度は、光学式スキャナが作動された前の時に確立されたレベルに最初は設定される。例えば、PMTが検出器として使用されると、PMTの最初のバイアス電圧は、各々ch1とch2に対してhv1とhv0となる。光学式スキャナが作動されると、レーザ10の出力が計測され(ここでの説明にlaser1とする)、校正ルビー45は対物19の下に位置決めされ、校正ルビー45に対してルビー走査が行われ、チャンネル - 130とチャンネル - 031に対する最大信号が各々記録される。ここでの説明のために、これらの値は各々ruby1とruby0とする。

もしruby1とruby0が、laser1、laser0、ref1及びref0の関数である所定の範囲から外れれば、次に光学式スキャナは自動的に、そのチャンネル信号をその所定範囲に入るように戻すべく例えばhv1とhv0を調節することによって各検出器感度を調節する。20分もかかるレーザのウォームアップまでに、laser1はlaser0より小さくなる。ruby1とruby0に対する許容可能な範囲は、次の通りである。

$$\text{ref1} / \sqrt{2} \times (\text{laser1} / \text{laser0}) \leq \text{ruby1} \leq \text{ref1} \quad 40$$

$$(\sqrt{2}) (\text{laser1} / \text{laser0}) \text{ と}$$

$$\text{ref0} / \sqrt{2} \times (\text{laser1} / \text{laser0}) \leq \text{ruby0} \leq \text{ref0}$$

$$(\sqrt{2}) (\text{laser1} / \text{laser0}) \text{。}$$

検出器の感度に対する新しい設定は、光学式スキャナが作動される次の時の初期設定として使用されるように記憶される。例えば、もし検出器がPMTであれば、新たに決められたhv0とhv1は、hv0とhv1の前の値にとって代わる。

この校正は自動的に且つ使用者の介入無しに行われることに注目される。かくして光学式

10

20

30

40

50

スキャナは、都合良く自動的に使用者の介入無しに、光学式スキャナの作動時毎に自ら校正を行うように設計される。もし信頼性の高い校正が行われ得ないようにいずれかの要素が感度変化を起こすと、例えば光学式スキャナのサービスや修理が必要であると使用者に知らされる。

各々がサンプルの特定タイプの染料から放射された蛍光の一部を検出する複数のチャンネルを検出器が有している時、各チャンネルで検出される蛍光割合を参照にして放射蛍光源を識別することが可能となる。しかし、これを行うために、各々のそのような染料の放射蛍光を識別するための特徴的なch1/ch0の割合を得なければならない。もし光学式スキャナのいずれかのチャンネルの感度が他のものに対して変化すれば、ch1/ch0の割合は差を補償するために正しく調節されなければならない。

10

実際には、それは、組込まれた校正ルビー45を基準にして上述した光学式スキャナによって自動的に行われる。さて図12を参照にして、これは次のように説明される。

関係染料に最初適切であった特徴的なch1/ch0の割合は、その染料のみを含んだサンプル上で走査を行って、ch0に比較されたch1で検出された蛍光の割合（即ちch1/ch0）を記録することで決められる。たとえば、ただCy5TMの札付き血液を含んだカートリッジが用意され、そのカートリッジについて走査が行われ、各チャンネルで検出された光学蛍光の量が記録される。説明のために、チャンネル - 1 とチャンネル - 0 に受けられた蛍光に対する値は各々ch1cy5とch0cy5とする。Cy5TMの特徴的なch1/ch0の割合は、従ってch1cy5/ch0cy5であり、この説明にcompCy5とする。（例えば、Cy5.5TMの特徴的な蛍光スペクトルを有した他の染料に対しても同じ手順がとられる。）

20

校正ルビー45は、励起されて蛍光を放射し、各チャンネルでの最大信号が記録される。説明のために、チャンネル - 1 に対してcalib1、チャンネル - 0 に対してcali0とする。この時のルビーのch1/ch0の割合は、従ってcalib1/calib0である。

図13を参照にすると、いずれかの染料のch1/ch0の割合における変化は、その後、校正ルビーを基準にして決められる。これは、Cy5TMを参照にして次のように図解される。例えば、Cy5TMでサンプルを色付けした10個のカートリッジ49を有した大皿48等のいずれかのバッチのサンプルカートリッジを走査する直前に、Cy5TM染料の識別のための正確なch1/ch0の割合がここで述べたように得られる。校正ルビー45が励起されて蛍光を発生し、後方光線83を発生させ、後方光線83は2の分割光線84、85に分割され、それらの分割光線の各チャンネルは、光学式スキャナの各チャンネル30、31で検出される。各チャンネルで受け

30

た光の割合は、（例えば、チャンネル - 1 にnewruby1、チャンネル - 0 にnewruby0のように）決められ、割合が（newruby1/newruby0）と決められ、その割合は、compCy5が（calib1/calib0）と確立された時に決定割合と比較される。それらの割合の相対変化は、compCy5に対する割合の相対変化と同じになる。修正された特徴的なch1/ch0の割合は、この変化に対して（newcompCy5 = compCy5（〔newruby1/newruby0〕 / 〔calib1/calib0〕）と調節することで決められる。

40

更に、ピークと背景の蛍光に対する、即ち蛍光の絶対感度に対する報告値は、温度のどんな変化に対しても標準化される。温度センサーは、バッチテスト時の温度を検出し、光学式スキャナが最初に校正された時の温度とそれとを比較する。温度のその差を調節する為に、報告データを修正する係数を自動照合表から得る。

また、この校正と調節は、使用者からの入力をなんら必要とせずに自動的に行われる。従って、その結果は、都合良く且つ自動的に校正され、使用者の訓練を必要とせずに、又はオペレータ制御の必要無しに温度に対して調節され、これによって手順を大幅に簡略化し、オペレータエラーの潜在性を最小にする。

上述の実施例は、ソリッドステートのルビー結晶とCy5TM及びCy5.5TMで説明した染料検出を参照していた。しかし、ルビーとは別の異なったスペクトル範囲を有した蛍光を発生する他のソリッドステート基準の使用が、Cy5TM及びCy5.5TMのものとは違う発光スペクトルを有して染料を検出するように設計された光学式スキャナで行われることが容易に理解される。例えば、蛍光発生するイオン添加ガラスや他の結晶は、光学式スキャナと使用するのに適した蛍光スペクトルを出す。もし問題のソリッドステート基準が、いずれかの有用な

50

染料の発光スペクトルに適した光学要素を使用して分析され且つ検出される一貫性のある特徴的な蛍光スペクトルを有していれば、次に光学式スキャナは、ここで説明しているように、その種の他の結晶を基準にして校正される。各種の結晶の発光スペクトルは、当業界公知であり、例えば、L.G.デッサツェル等の著の『レーザ結晶』（M.J.ウエパー編集、フィラデルフィア州ボカラートンのCRC出版社、1987年）の第5巻、2.9章のレーザ科学と技法のハンドブックや、A.A.カミンスキー著の『レーザ結晶』（ハイデルベルグ、ベルリン、スプリンガー、1981年）のスプリンガーシリーズ、光学科学、第14巻、2.55章に見受けられるレーザ結晶リスト等の広く利用可能な文献を参照にして得られる。

実際には、ゴールド基準を参照にしてここで述べられたタイプの光学式スキャナは、そのように校正された他の光学式スキャナに対して有意な方法でデータ量を計るのに使用される絶対蛍光基準を提供するように校正される。光学式スキャナが2つの検出チャンネル間に発光蛍光スペクトルを分割する場合、ソリッドステート基準が両チャンネルを同時に校正したり、一方のチャンネルによって他方に関連して検出されるその基準からの蛍光量の割合を決めるのに使用される。この割合は時間と共に変化すれば、そのソリッドステート基準が相対変化の大きさと特徴を決めたり、そのような変化に対する調節を行う為に、染料などの全ての蛍光から観察されるデータを補償するのに使用される。最後に、テスト時の温度が、テスト間の温度変化を補償するために監視される。

ソリッドステート基準は丈夫で安定しているため、それは光学式スキャナに組み込まれ、オペレータ制御や入力を必要としないように、光学式スキャナの通常運転の一部として都合良い自動校正を提供する。基準を取り替えたり、調節したりする必要無しに長期間に渡って安定し且つ再使用出切る基準が提供される。これは、従来基準として使用されていた液体染料等に対する広範囲な改良である。

もし、ここで述べた好適実施例と異なった波長のレーザのような異なった励起手段や、好適実施例と異なった波長の蛍光スペクトルを分割する二色性鏡等の他の光学要素を有した光学式スキャナが設計されれば、そのような光学式スキャナに適した蛍光スペクトルを有したソリッドステート基準が選択される。

ここで述べたような新しい改良された方法と装置は、抵抗分光計の安価で好都合な自動校正を提供する。時間がかかり且つエラーの起こしやすいオペレータ入力には必要が無く、光学式スキャナを確実に校正するのに必要な高レベルの訓練やその技量は低減される。かくして一様で標準的な蛍光単位を維持して、また画して高い信頼性のあるデータの検出と報告を高揚し、科学や医学の調査に対するそのような光学式スキャナの価値は大幅に増大される。

本発明の特定の実施例を説明してきたが、開示された発明の構造や用途に対する各種の変更は、本発明の精神と技術的範囲を逸脱しないように開示技術全体に鑑みて行われることは当業者の認めるところである。従って、添付の請求の範囲によるものは除外して、本発明が限定されることは意図していない。

10

20

30

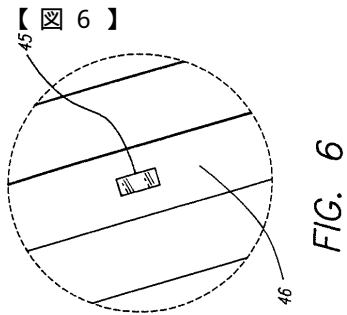
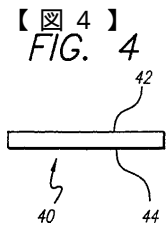


FIG. 6

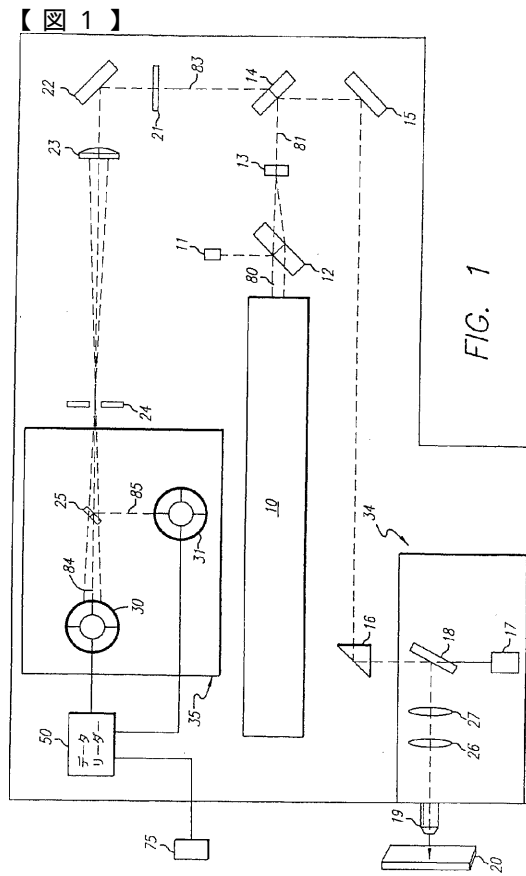


FIG. 1

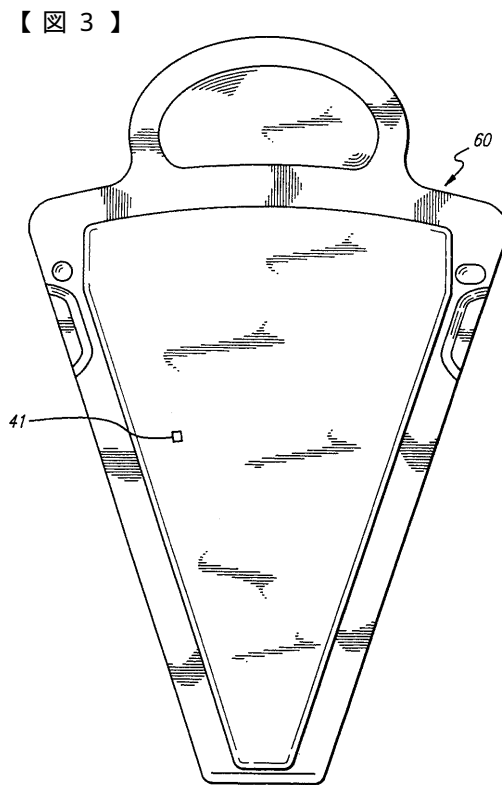
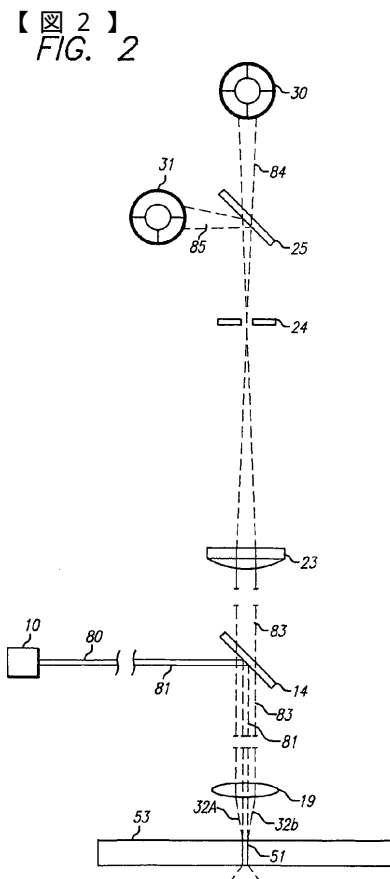


FIG. 3

【 図 5 】

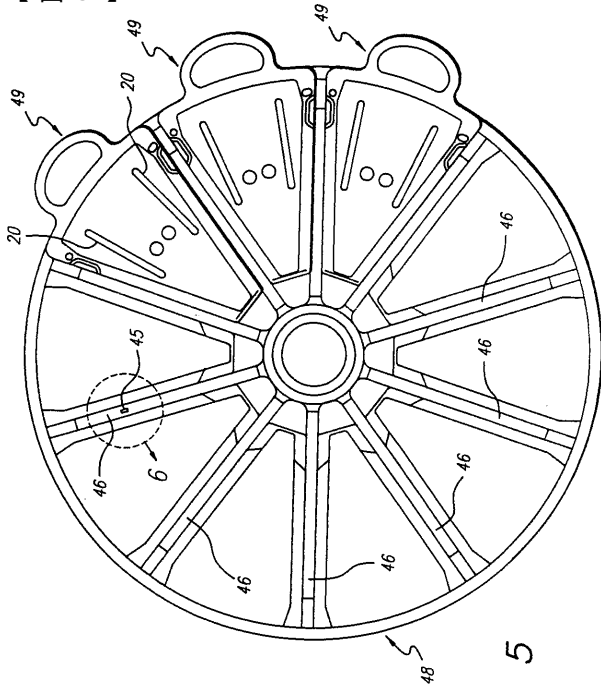


FIG. 5

【 図 7 A 】

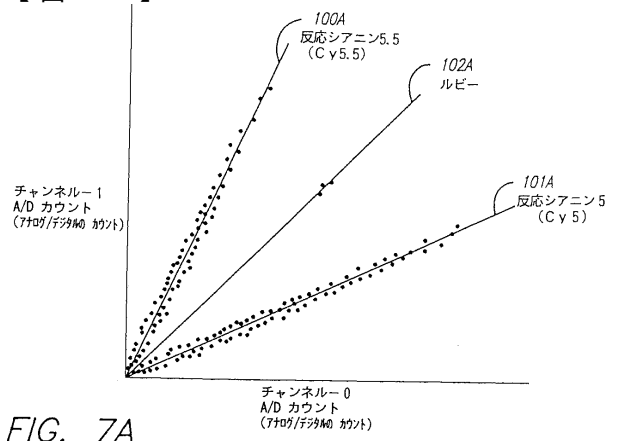


FIG. 7A

【 図 7 B 】

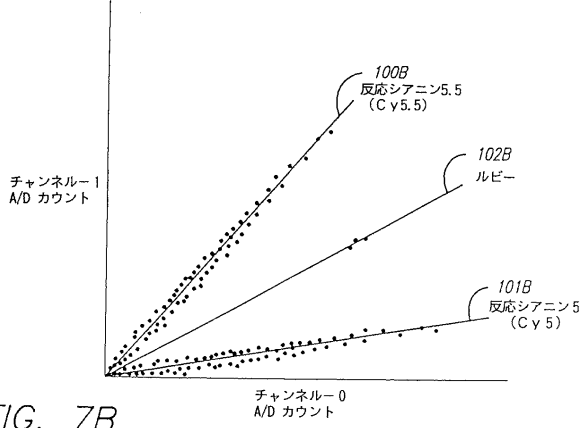


FIG. 7B

【 図 8 】

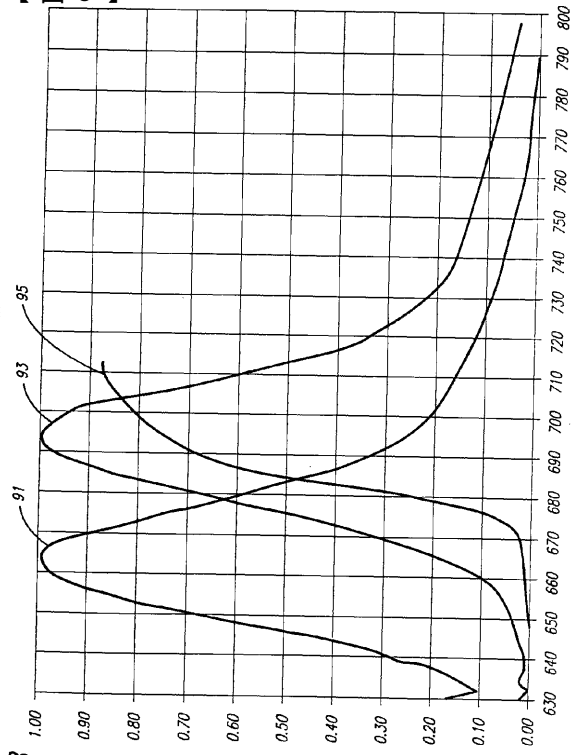
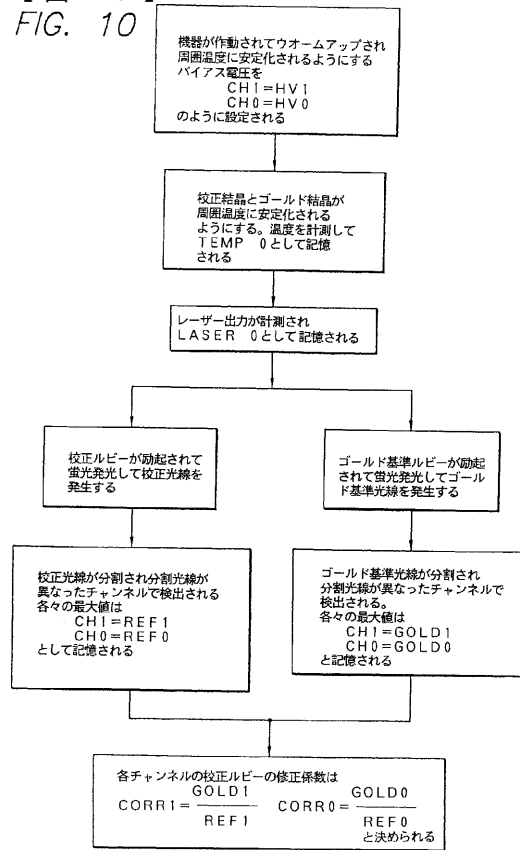


FIG. 8

【図 9】
FIG. 9

温度 (C)	標準化された値
5	0.71
6	0.72
7	0.74
8	0.75
9	0.76
10	0.78
11	0.80
12	0.82
13	0.84
14	0.86
15	0.88
16	0.89
17	0.90
18	0.92
19	0.93
20	0.94
21	0.95
22	0.97
23	0.98
24	0.99
25	1.00
26	1.01
27	1.02
28	1.04
29	1.05
30	1.06
31	1.08
32	1.09
33	1.11
34	1.12
35	1.14
36	1.16
37	1.17
38	1.19
39	1.20
40	1.22
41	1.23
42	1.25
43	1.27
44	1.28
45	1.30

【図 10】
FIG. 10



【図 11】

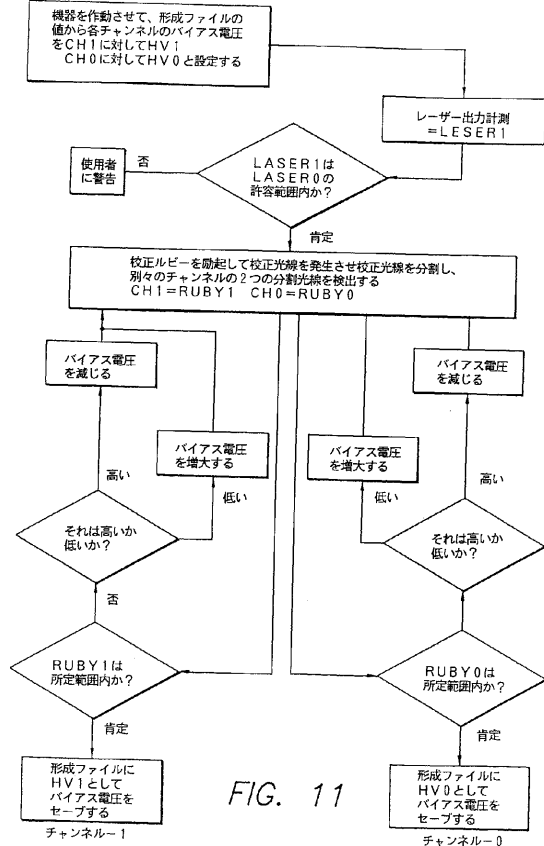
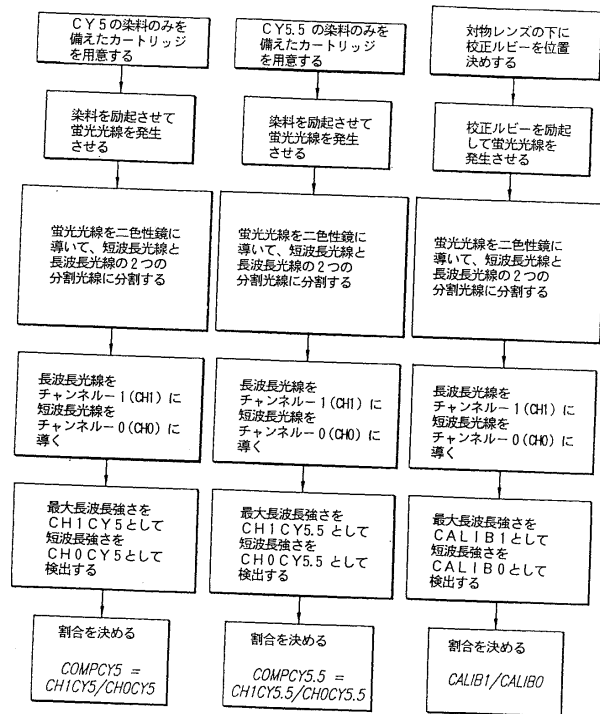
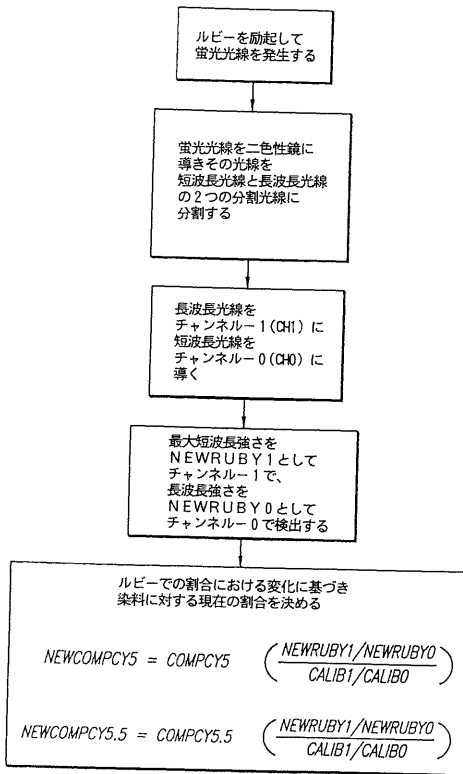


FIG. 11

【図 12】
FIG. 12



【図 13】
FIG. 13



フロントページの続き

- (72)発明者 ディーツ ルイス ジェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94041 マウンテン ヴィュー ヴィラ ストリート
759シー
- (72)発明者 ベア トーマス エム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94040 マウンテン ヴィュー ドルーシラ ドライブ
537

審査官 横井 亜矢子

- (56)参考文献 特開平5 - 133849 (JP, A)
特開昭64 - 86041 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 21/00 - 21/83
JICSTファイル(JOIS)