

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-515065

(P2006-515065A)

(43) 公表日 平成18年5月18日(2006.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	2GO43
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 21/64 E	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
	GO 1 N 33/574 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-502064 (P2005-502064)	(71) 出願人 505058908
(86) (22) 出願日 平成15年8月18日 (2003.8.18)	ディンジョン バイオマーカーズ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日 平成17年3月9日 (2005.3.9)	アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/025702	1760, ネイティック, ヒューロン ド
(87) 国際公開番号 W02004/017374	ライブ 6
(87) 国際公開日 平成16年2月26日 (2004.2.26)	(74) 代理人 100079108
(31) 優先権主張番号 60/404, 237	弁理士 稲葉 良幸
(32) 優先日 平成14年8月16日 (2002.8.16)	(74) 代理人 100080953
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 田中 克郎
(31) 優先権主張番号 60/430, 299	(74) 代理人 100093861
(32) 優先日 平成14年12月2日 (2002.12.2)	弁理士 大賀 真司
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 60/476, 512	
(32) 優先日 平成15年6月6日 (2003.6.6)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光配列の読み取り

(57) 【要約】

臨床設定中の蛍光配列 (103) の読み取りは、配列の暗視野照明を用いて構成した読み取り器 (110) と、蛍光配列寸法 (D_o) と同級の大きさの撮像寸法 (D_i)、好ましくは縮減された画像を用いたソリッドステートセンサ配列 (146) 上への配列画像の写像とを用いて可能となる。高輝度照明を用い、その非一様性は配列の撮像期間中に検出される配列自体の輝度較正特徴 (164) を用いた正規化により補償する。好ましくは交通信号灯に用いるような高輝度発光ダイオード (122, 132, 402, 404) を配列の励起に用い、好ましくはこの励起は固体内部反射均質化器 (130) を介して配列に導入する。中程度の被写界深度収集及び撮像光学系が、0.30 ~ 0.60 の範囲、好ましくは 0.4 ~ 0.55 の範囲の NA でもって実質的な集光を可能にする。得られる比較的大きな被写界深度は一部の好都合なケースでは、撮像対象スポットを越えて進行しがちで或いはノイズ蛍光を生成しかねない光を吸収することで補償され、例えば基板 (302)、好ましくは配列が横たわる極薄基板とより肉厚のガラス又は他の剛性支持体 (306) との間に介挿した不透明金属酸化物被覆 (304) により吸収を生ずる。臨床目的に合わせ、配列は蛋白質に適した 1000 スポット未満からなり、一例では、500 スポット未満の配列とする。比較的大きなスポット寸法を用い、例えば少なくとも 80 又は 100 ミクロン台の直径、或いは好ましくはそれを上回り、150 又は 300 ミクロンのスポットを用いる。ソリッドステート検出器上の少なくとも 50 画素に対するこの種のスポットの解像度によって適切なピニングと高精度成果に通ずる他の操作が可能になる。癌診断等の分析及び診断の新規方法は、疾患、例えば卵巣癌に関連するマーカ群の検出に読み取り器

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

平坦な基板(302)上にある特徴の二次元配列(103)を読み取る臨床目的に適し、前記特徴は感光マーカを担持し、該マーカが励起時に発光可能である、配列読み取り器(110)であって、

前記基板上に二次元配列で分布する複数の感光マーカを同時に励起する照明システム(120)と、

前記基板上の前記特徴からの発光に対する視野を有する画像収集記録システム(140)と、を備え、

前記照明システム(120)は、前記基板の前記平面に対して約20°乃至50°の間の角度()で配設した照明路(P)に沿って、励起波長の光で二次元配列(103)を覆い尽くすよう配置した光源を備え、

前記画像収集記録システム(140)は、前記配列を担持する前記基板(102)の平面に実質的に直角の画像取得軸(141)を有し、感光素子のソリッドステート配列(図4の203)、例えば、電荷結合素子(CCD)或いはCMOS配列を用いており、前記画像収集記録システムは、前記配列の大きさD_oと同級の、例えば、約25%までの拡大或いは75%までの縮減した大きさ(D_c)のソリッドステート配列に特徴配列の画像を適用するよう構成し配置している二次元センサ(146)を有しており、前記画像収集記録システム(140)は、臨床精度を持ちかつ前記配列の転移を伴うことなく前記励起された二次元配列から前記蛍光画像の記録を可能にする中程度の開口数NAを有する、配列読み取り器。

10

20

【請求項 2】

前記画像収集及び記録システム(140)は、前記基板(102)又はその支持体から少なくとも5mm、好ましくは少なくとも10mm(寸法h)離間してその最近接部品を有し、前記部品は前記基板上の前記二次元配列への前記照明路(P)用の前記部品の下側に空間をもたらすよう構成し配置した、請求項1記載の配列読み取り器。

【請求項 3】

前記画像収集記録システムは、NA=0.3~NA=0.60の間の有効開口を有し、好適な前記NA値は、約4.0~5.5の間にある、請求項1または2に記載の配列読み取り器。

30

【請求項 4】

前記画像収集記録システム(140)は、約50mm²~300mm²の間の領域の基板上に視野(図1と図7BのV)を有する、請求項1ないし3のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項 5】

前記照明システムは、1以上の発光ダイオード(122)を備える、請求項1ないし4のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項 6】

30mW/cm²を超える電流密度の基板(102)上の二次元配列(103)上に、励起照明をもたらすよう構成し配置した、請求項5に記載の照明システム。

40

【請求項 7】

前記画像収集記録システム(140)は、前記照明システムに協働的に関連付けられて前記二次元配列全体に約15mJ/cm²を上回って前記基板に一定のフルエンスの励起放射を生成するに十分な露光をもたらすタイマを備える、請求項6または7に記載の配列読み取り器。

【請求項 8】

前記配列読み取り器の前記視野(V)は、10mm以上の直径(D_o)を有する、請求項1ないし7のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項 9】

前記特徴配列のスポット(166, 202)は、前記ソリッドステート配列(203)

50

の少なくとも50画素素子、例えば、CCD或いはCMOS素子上へ結像させる、請求項1ないし8のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項10】

前記ソリッドステートセンサ配列(203)に対し、拡大をしていない視野像を給送するよう構成し配置した、請求項1ないし9のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項11】

前記ソリッドステートセンサ配列(203)に対し、約30%~50%の間に縮減した視野像を給送するよう構成し配置した、請求項1ないし10のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項12】

各直径が、少なくとも約80ミクロンで、好ましくは少なくとも約100ミクロンの直径の少なくとも100スポット(202)の二次元配列(103)を撮像するよう構成し配置した、請求項1ないし11のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項13】

一回の撮像間隔中に、各300ミクロンの直径の少なくとも100スポット又は各150ミクロンの直径の少なくとも400スポットの配列の画像を生成するよう構成し配置した、請求項1ないし12のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項14】

支持本体(306)が担持する基板層(302)を備える配列用の担体(102)を組み合わせて、前記画像収集記録システム(140)を前記特徴配列と同じ側に前記基板に常駐させ、前記照明の前記路(P)が前記支持本体(306)に達する前に前記配列(103)に達するようにし、前記担体は前記層を越えて透過する励起放射線を吸収する、請求項1ないし13のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項15】

前記支持本体(306)は、透明な、例えば、ガラスであり、前記基板層(302)と前記透明本体(306)の間には前記透明本体に進入しがちな励起放射線を実質的に遮断することができる実質的な不透明な付着層(304)を常駐させた、請求項14記載の配列読み取り器。

【請求項16】

前記実質的な不透明層(304)は、金属酸化物層を含む、請求項15記載の配列読み取り器。

【請求項17】

前記基板(302)は、透明本体(306)が担持する透明層の形をなし、前記画像収集記録システム(140)は、前記透明本体と前記配列の同一側に前記透明本体を越えて横たわる、請求項1に記載の配列読み取り器。

【請求項18】

支持本体上の極薄基板層(302)、すなわち厚さ約5ミクロン未満、好ましくは約3ミクロン未満である基板を備える、前記配列(103)用の担体(102)と組み合わせた、請求項1ないし17のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項19】

前記配列(103)は、ニトロセルロースまたはポリスチレンの透明層を含む基板(302)上に配設する、請求項1ないし18のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項20】

前記基板(302)は、少なくともその外部領域まで多孔質のニトロセルロース膜である、請求項1ないし18のうちいずれか1項に記載の配列読み取り器。

【請求項21】

前記二次元配列の特徴全体に分布する励起エネルギー基準特徴(166)を担持する基板(302)と組み合わせて、前記画像収集記録システム(140)は、前記個別基準特徴からの検出放射量に基づき個別基準特徴の近傍で検出したデータを正規化する正規化構成(図10参照)を備える、請求項1ないし20のうちいずれか1項に記載の配列読み取り

10

20

30

40

50

器。

【請求項 2 2】

前記照明システム (1 2 0) は、それぞれ実質的に異なる波長の少なくとも二つの異なる光源サブシステム (図 7 A の 4 0 2 , 4 1 2 , 4 0 6 , 4 0 4 , 4 1 4 , 4 0 8) で、それぞれが光路沿いに光を給送する個別光学系と関連し、前記基板への前記サブシステムの光路がそれぞれ異なる軸に沿って横たわる前記サブシステムを備え、前記軸は前記基板周りに離間させた、請求項 1 ないし 2 1 のうちいずれか 1 項に記載の配列読み取り器。

【請求項 2 3】

二つの前記異なる光源サブシステムを備え、その信号路を前記基板 (図 7 A) 周りに直径両端に配設した、請求項 2 2 に記載の配列読み取り器。

10

【請求項 2 4】

前記照明システムは、それぞれ C y 3 と C y 5 を励起するよう選択された光源 (例えば、ダイオード 4 0 2 , 4 0 4) を備え、前記画像収集記録システム (1 4 0) は、それぞれ C y 3 及び C y 5 からの放射路を可能にするに適した可変帯域通過フィルタ (図 7 A の 4 2 4 , 4 2 4 ')、または C y 3 , C y 5 の両方の帯域通過放射等の複数の帯域通過放射を可能にするのに適した単一の帯域通過フィルタ (4 2 4) を備える、請求項 1 ないし 2 3 のうちいずれか 1 項に記載の配列読み取り器。

【請求項 2 5】

前記画像収集記録システム (1 4 0) は、少なくとも二つの設定間で調整可能であり、前記第 1 および第 2 の設定は、6 . 5 mm × 9 . 0 mm (図 8 の 5 0 4) の寸法の配列形式、または 4 . 5 × 1 3 . 5 mm の矩形 (図 8 の 5 0 2) 内に配置された、それぞれ寸法が 4 . 5 mm × 4 . 5 mm の二つの個別小窓を備える配列形式の単一画像を形成するよう個別に構成配置した、請求項 1 ないし 2 4 のうちいずれか 1 項に記載の配列読み取り器。

20

【請求項 2 6】

前記照明システムは、ダイオード光源 (1 3 2) と、照明場全体の光束密度のばらつきを低減するのに有効な均質化器 (図 2 B の 1 3 0) と、を備える、請求項 1 ないし 2 5 のうちいずれか 1 項に記載の配列読み取り器。

【請求項 2 7】

前記均質化器 (1 3 0) は、細長い透明な内部反射ロッドを備え、これが直線又は湾曲しており、丸形、正方形または長方形の断面を有し、擦るか擦らないかした、請求項 2 6

30

【請求項 2 8】

前記画像収集記録システム (1 4 0) は、約 1 0 ミクロンまでの解像度の前記ソリッドステート配列 (図 4 の 2 0 3) 上で前記画像を解像するよう構成し配置した、請求項 1 ないし 2 7 のうちいずれか 1 項に記載の配列読み取り器。

【請求項 2 9】

前記解像度は、約 1 2 ないし 1 5 ミクロンの間にある、請求項 2 8 に記載の配列読み取り器。

【請求項 3 0】

前記画像収集記録システム (1 4 0) は、干渉フィルタ (図 7 A の 4 2 4) を備え、前記フィルタよりも前段にある前記システムの集光光学系 (4 2 2) が前段フィルタと平行に集光光線を案内し、前記撮像光学系 (4 2 2 ') は、前記ソリッドステートセンサ (4 2 0) 上の前記フィルタを離れる平行光を撮像する構成とした、請求項 1 ないし 2 9 のうちいずれか 1 項に記載の配列読み取り器。

40

【請求項 3 1】

2 以上の配列を保持する配列支持体と共に用い、前記読み取り器が各配列を独立配列として読み取り処理するよう構成し配置した、請求項 1 ないし 3 0 のうちいずれか 1 項に記載の読み取り器。

【請求項 3 2】

基板上に二次元スポット配列したアミノ酸あるいは核酸の特徴を調製するステップで、

50

好ましくは液体試料をその上にスポット形成し、前記配列全体の特徴が光反応マーカを担持する前記ステップと、前記配列を読み取るように、請求項 1 ないし 3 1 のうちいずれか 1 項に記載の読み取り器を用いるステップとを含む、分析を実行する方法。

【請求項 3 3】

前記分析は、血液由来の蛋白質に基づく、診断免疫分析である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記免疫分析は、固定化抗体を用いる、抗体捕捉構成からなる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

悪性癌を検出または監視するよう設けた、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

初期診断での卵巣癌の検出又は患者の再発危険の監視に適用する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記基板は、封止された使い捨て可能な生体カセット（図 7 B の 4）内に配設され、撮像は前記基板に視覚的にアクセスする透明窓を介して実行する、または透明本体が前記生体カセットの側面を形成して前記基板を担持しており、前記基板は極薄ニトロセルロースやポリスチレン層の如く透明であり、前記配列は前記透明本体を介するとともに前記基板を介して前記配列読み取り器が視覚的にアクセスする、請求項 3 2 ないし 3 6 のうちいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 3 8】

前記配列は、操作可能な照明輝度全体にそれらの照明に対する発光輝度に略比例する蛍光特性の輝度較正特徴（1 6 4）を含む基板上の配列を読み取り、配列読み取り器を用いて前記配列の画像の形成と、近傍輝度較正特徴から得られるデータ量に基づき記録配列データ（例えば図 4 C のスポット 1 6 6）を正規化することを含む、請求項 1 ないし 3 1 のうちいずれか 1 項に記載した配列読み取り器を用いる、または請求項 3 2 ないし 3 7 のうちいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

血液あるいは他の人体構成要素内の既知の蛋白質生体マーカ集合が存在する疾患について蛍光読み取り器を利用した診断方法であって、（1）基板上に異なる試薬の二次元配列（1 0 3）を配設し、該試薬を前記疾患の診断が可能な前記生体マーカ群の要素を束ねるべく個別特化したステップと、（2）個体の血液或いは人体構成要素内に存在する場合に生体マーカを含む個体の蛍光体標識化血液あるいは人体構成要素抽出体に対し前記配列を露光させるステップと、（3）前記配列を静止させたまま、暗視野照明を用いて蛍光励起波長の光により（たとえば、図 1 の 1 2 0 により）前記二次元配列全体を同時照明することで前記配列を励起するステップと、（4）ソリッドステート配列からなる撮像器の単一フレーム上に前記二次元励起配列全体の蛍光画像を（たとえば、図 1 の 1 4 0 により）捕捉するステップと、（5）（たとえば、図 1 のコンピュータ 1 0 4 により）疾患の存在について前記蛍光画像を分析するステップとを含む、方法。

30

40

【請求項 4 0】

前記二次元配列全体の同時照明ステップは、ダイオード（1 2 2, 1 3 2, 4 0 2, 4 0 4）またはダイオード群からの励起放射を案内し、少なくとも $30 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の電力密度で前記蛍光体を励起するよう選択した波長の照明を生成することで実施する、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

蛍光輝度基準特徴（1 6 4）は、前記配列を介して分配され、前記生体マーカからの検出放射は、前記照明に対する前記基準の応答に基づいて前記読み取り器が正規化する、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

50

少なくとも50画素のソリッドステートセンサが、前記配列特徴の画像を表わす、請求項32ないし41のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

前記生物マーカは、抗体に取り付けた、請求項39ないし42のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項44】

前記配列は、卵巣癌の存在を診断するよう選択したタンパク質生物マーカを固定化するように形成した、請求項39ないし43のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

蛍光体を含む特徴を有する基板上の配列を読み取る方法であって、

前記配列は操作可能な照明輝度全体にそれらの照明に対する発光輝度に略比例する蛍光特性の輝度較正特徴を含み、配列読み取り器を用いた前記配列の画像の形成と、前記配列内の近傍輝度較正特徴からの前記配列の読み取り期間中の記録配列データの正規化と、を含む、方法。

10

【請求項46】

血液あるいは他の人体構成要素内の既知の蛋白質生体マーカ集合が存在する疾患について診断を実行するよう適用され、(1)基板上に異なる試薬の二次元配列を配設し、該試薬を前記疾患の診断が可能な前記生体マーカ群の要素を束ねるべく個別特化したステップで、前記配列に前記輝度較正機能を含ませる前記ステップと、(2)個体の血液あるいは人体構成要素内に存在する場合に生体マーカを含む個体の蛍光体標識化血液あるいは人体構成要素抽出体に対し前記配列を露光させるステップと、(3)前記配列を静止させたまま、暗視野照明を用いて蛍光励起波長の光により二次元配列全体を同時照明することで前記配列を励起するステップと、(4)ソリッドステート配列からなる撮像器の単一フレーム上で前記二次元励起配列全体の蛍光画像を捕捉するステップと、(5)前記配列内の前記較正特徴に基づき前記記録配列データを正規化するステップと、(6)疾患の存在について前記蛍光画像を分析するステップと、を含む、請求項45記載の方法。

20

【請求項47】

前記二次元配列全体を照明し、一つのダイオード或いはダイオード群からの励起放射を案内することで少なくとも30mW/cm²の電力密度で前記蛍光体を励起するよう選択した波長での照明を生成して前記画像を形成する、請求項45または46記載の方法。

30

【請求項48】

少なくとも50画素のソリッドステートセンサが、前記配列特徴の画像を表わす、請求項45ないし47のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

前記配列特徴が、抗体を含む診断を実行するのに用いる、請求項32ないし48のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

前記配列特徴は、卵巣癌の存在を診断するよう選択される、請求項49記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本開示が関する分野は、臨床微細配列技術、たとえば、臨床調査や臨床診断である。

【背景技術】

【0002】

微細配列技術は、過去十年以上に互い発展してきた。それは、生体分子、特に核酸やアミノ酸材料の調査に用いられている。有効利用は、ゲノム解明と薬物発見の技術でなされてきた。技術が究極的に発展し、臨床、例えば臨床調査や臨床診断用に現実的用途を可能にすると予測されてきたが、その見通しは程遠いように思われていた。これが単に長期的な希望とされていた理由は、必要な機器の非常な高コストや分析実行に必要な時間や高レベルの経験と手腕が要求されていたからである。

50

【0003】

周知の如く、しかるべき成分が存在する場合、微細配列はタグ付け或いはマーカ付けした特徴場或いは異なる分析物スポットを作り出すことで用いられる。マーカ付けは、しばしば放射性同位元素タグによっていたが、材料を処理することができて安全性配慮の不要な簡便さを含む幾つかの理由で蛍光タグが幅広く使用されるようになってきた。一般に、配列の全体画像または関連配列の小集合により分析を表わすことが望ましい。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

蛍光マイクロ配列読み取り器は、配列使用に対する鍵となるものである。読み取り器は、光励起への露光に応答して配列内に精密配置された各特徴における蛍光の存在及び程度を記録する。読み取り器設計に関する様々な構成を熟慮した後に、二三の奏功する技術が受け入れ先を見出した。これらは、多彩な光学系やソフトウェアだけでなく精密でコストのかかる機械的な展開を遍く必要としてきた。一つのケースでは、高速発振走査アームが一つの座標で一度に1画素を読み取る小型レンズを共焦点構成にて移動し、その一方で他方の座標中の配列の画像を、顕微鏡ステージを用いた精密な段階的前進により展開する。(このステージは、ミクロン又はサブミクロン精度の精密な動きを生み出す装置であり、他の構成要素に加え製造に費用がかかる)。この手法では、ソフトウェアを用いて広範な配列の集結画素から画像を収集する。別の技法は、配列の小部分の一連の拡大画像それぞれの採取の間の精密段の移動と、続く小視野画像フレームを併せ電子的に合併すなわち「縫合」して全配列の画像を電子的に生成することで、配列全体の一部の大幅な拡大図を撮像してきた。一つの採取で配列全体を画像処理するソリッドステートアレイセンサを用いる先の提案あるいは考察は、問題点の全体集合の実用的な解決策、すなわち妥当なコストでの高精度かつ高速の動作の同時達成をもたらすことはなかった。時が経つにつれ、また読み取り器の生産量が増えるにつれ、簡潔な設計により奏功するこれらの画像処理システムのコストは数十万もの現米ドルから、一部事例では十萬ドルに若干満たないコストまで低減されてきた。しかしながら、量産が読み取り器価格をして臨床使用に魅力的な、たとえば、2万5000米ドル以下の価格とし得る価格へ近づくことを可能にするであろう時までは、見通しは程遠いように思われていた。

【課題を解決するための手段】

【0005】

通例、実際の臨床的用途、すなわち、臨床研究や臨床診断や監視が可能な読み取り器が、幾つかの制約を見ながらも特定の組み合わせでもって可能であることが分かっており、他分野で見出された一般に利用可能な構成要素を用いて実装することができる。実施形態は、臨床読み取り器に対する厳しい低コスト要求を相当の高速性と操作の簡単さに対する必要性と共に満足することができ、その一方で、医療用途に必要な高レベルの精度が達成される。

【0006】

基本的な読み取り器の構造は、暗視野照明、たとえば、20～50度の鋭角で二次元配列に届く光を利用すべきであり、この照明は、CCDセンサやCMOS配列等のソリッドステート検出配列上の二次元撮像に対し、その配列上の写像が生物学的特徴の配列と同級の大きさの尺度となるようにした状態で一致させねばならないことが判っている。撮像は、生体配列平面に対し直角になされ、中程度の開口数(NA)、好ましくは、 $NA = 0.3 \sim 0.6$ 、ここでは、好ましくは、 $NA = 0.4 \sim 0.55$ の範囲を有する光学的集光撮像システムを用いて達成される。これらの制約内の実施形態は、配列の構成要素を移動したり縫合したりすることなく、単一フレーム内の配列全体を撮像することができる。好ましくは、説明対象であるさらなる新規改善付き機器内の特徴の協働が、この種の構成、すなわち、その比較的大きな被写界深度の固有の限界を補うことができ、高輝度ダイオード等の好適な比較的廉価な照明を使用したときにその非一様照明を補うことができることが判ろう。得られる装置は、その単純さと精密可動部あるいは高価な光学系の欠如が故

に、システムならびに技術を実用的なものとするコストでもって、臨床医に対し利用可能にできる。こうして、実用的な高速臨床撮像は現在でさえ可能になっており、このことから医療や患者介護に対する大きな便益を得ることができる。

【0007】

本発明の一の態様によれば、平坦な基板上の特徴の二次元配列(103)を読み取る臨床目的に適し、前記特徴が感光マーカを担持し、該マーカが励起時に発光可能である配列読み取り器であって、前記基板上に二次元配列で分散する複数の感光マーカを同時に励起する照明システムと、前記基板上の前記特徴からの発光に対する視野を有する画像収集記録システムとを備え、前記照明システムが前記基板の前記平面に対し、約20°~50°の間の角度で配設した照明路に沿って励起波長の光で二次元配列を覆い尽くすよう配置した光源を備え、前記画像収集記録システムは、前記配列を担持する基板の平面に実質的に直角の画像取得軸を有し、感光素子のソリッドステート配列、たとえば、電荷結合素子(CCD)またはCMOS配列を用いており、前記画像収集記録システムは、前記配列の大きさと同級、たとえば、約25%まで拡大または75%まで縮減した大きさのソリッドステート配列に特徴配列の画像を適用するよう構成し配置してあり、前記画像収集記録システムは、臨床精度をもちかつ前記配列の移動を伴うことなく前記励起された二次元配列から前記蛍光画像の記録を可能にする中程度の開口数NAを有する。

10

【0008】

本発明の本態様の好適な実施形態は、1以上の下記の特徴を有する。

【0009】

配列読み取り画像収集記録システムは、基板又はその支持体から少なくとも5mm、好ましくは少なくとも10mmだけ離間した位置に、その最接近部品を有しており、その部品は、基板上の二次元配列への照明路向けの部品の下側に空間を提供するよう構成し配置する。

20

【0010】

画像収集記録システムは、 $NA = 0.3 \sim NA = 0.60$ の間の有効開口を有し、NAの値は、好ましくは、約4.0~5.5の間にある。

【0011】

画像収集記録システムは、 $50\text{mm}^2 \sim 300\text{mm}^2$ の間の面積の基板上に視野を有する。

30

【0012】

照明システムは、1以上の発光ダイオードを備える。

【0013】

照明システムと特にダイオードを利用するシステムは、 $30\text{mW}/\text{cm}^2$ を超える電力密度の基板上に二次元配列に対し励起照明をもたらすよう構成し配置してあり、好ましくは、画像収集記録システムは、基板に二次元配列全体で約 $15\text{mJ}/\text{cm}^2$ を超す励起放射フルエンスを生成するのに十分な露光をもたらすよう照明システムに協働的に関連付けたタイマを含む。

【0014】

配列読み取り器は、10mm以上の直径の視野を有する。

40

【0015】

注目配列の各特徴は、最低50画素素子のソリッドステート配列、たとえば、CCDまたはCMOS素子上に結像する。(本願明細書に示す好適なケースでは、ソリッドステート配列の画素(すなわち、検出素子)は9ミクロンの寸法に選択してあるが、より大きな視野を撮像する場合は、同じ構成を用い、約4.5ミクロンまで小さくした画素を選択し、画像のより大きな縮減を用いる)。

【0016】

配列読み取り器は、ソリッドステートセンサに対し拡大していない視野の画像を給送するよう構成し配置してあり、好ましくは、読み取り器は約30%~50%の間で縮減した視野の画像をソリッドステートセンサ配列へ給送するよう構成し配置する。

50

【 0 0 1 7 】

配列読み取り器は、各直径が少なくとも約 80 ミクロン、好ましくは、少なくとも 100 ミクロンの直径のスポットを撮像する構成としてある。

【 0 0 1 8 】

配列読み取り器は、一回の撮像期間中に、それぞれ 300 ミクロンの直径の少なくとも 100 個のスポットまたはそれぞれ 150 ミクロンの直径の少なくとも 400 個のスポットの配列の画像を生成するよう構成し配置する。

【 0 0 1 9 】

この配列読み取り器は、支持本体が担持する基板層を備える配列用の担体を組み合わせて、画像収集記録システムを特徴配列と同じ側に基板上に常駐させ、照明路が支持本体に達する前に配列に達するようにし、担体は層を越えて透過する励起放射を吸収し、好ましくは、支持本体は透明な、たとえば、ガラスであり、基板層と透明本体の間には透明本体に進入しがちな励起放射をほぼ遮断することのできるほぼ不透明な付着層が常駐させてあり、ほぼ不透明な層は金属酸化物層からなる。

10

【 0 0 2 0 】

配列読み取り器には、透明本体が担持する透明層の形をした配列用の担体が組み合わされてあり、画像収集記録システムは、透明本体と同一の配列側に透明本体を越えて横たわっている。

【 0 0 2 1 】

配列読み取り器は、支持本体上の極薄基板層を備える配列用担体が組み合わせてあり、すなわち、基板は 5 ミクロン未満、好ましくは、約 3 ミクロン未満の肉厚を有する。

20

【 0 0 2 2 】

配列読み取り器には、ニトロセルロース或いはポリスチレンの透明層からなる基板上に配列を配設した担体が組み合わせてある。

【 0 0 2 3 】

配列読み取り器には担体が組み合わせてあり、ここでは、基板は少なくともその外側領域で多孔質のニトロセルロース膜としてある。

【 0 0 2 4 】

配列読み取り器には、特徴の二次元配列全体に分布する励起エネルギー基準特徴を担持する基板が組み合わせてあり、画像収集記録システムは、個別基準特徴からの検出放射量に基づき個別基準特徴の近傍で検出したデータを正規化する正規化構成を含む。

30

【 0 0 2 5 】

配列読み取り器は、それぞれ実質的に異なる波長の少なくとも二つの異なる光源サブシステムを備える照明システムを有し、サブシステムそれぞれが光路沿いに光を給送する個別光学系と関連し、基板へのサブシステムの光路がそれぞれ異なる軸に沿って横たわっており、軸は基板周りに離間させてあり、幾つかの好適な実施形態には、光路を基板の直径両端に配設した二つの異なる光源サブシステムが存在する。

【 0 0 2 6 】

配列読み取り器は、それぞれ Cy 3 と Cy 5 を励起するよう選択された光源、画像収集記録システムは、それぞれ Cy 3 及び Cy 5 からの放射路を可能にするに適した可変帯域通過フィルタとする、または Cy 3 , Cy 5 の両方の帯域通過放射等の複数の帯域通過放射を可能にするのに適した単一の帯域通過フィルタを備える照明システムを有する。

40

【 0 0 2 7 】

配列読み取り器の画像収集記録システムは、少なくとも二つの設定間で調整可能であり、第 1 と第 2 の設定は、6.5 mm x 9.0 mm の寸法の配列形式と、4.5 x 13.5 mm の矩形内に配置したそれぞれ寸法 4.5 mm x 4.5 mm の二つの個別小窓を備える配列形式の単一画像を形成するよう個別に構成し配置する。

【 0 0 2 8 】

配列読み取り器照明システムは、ダイオード光源と、照明場を横切るフラックス密度のばらつきを低減するのに有効な均質化器とを含み、幾つかの実施形態では、均質化器は細

50

長い透明な内部反射ロッドを備え、これが直線又は湾曲しており、丸形又は正方形又は長方形の断面を有し、擦るか擦らないかしてある。

【0029】

配列読み取り器は、約10ミクロンまでの解像度でソリッドステートセンサ配列上の画像を解像するよう構成し配置した画像収集記録システムを有し、幾つかの実施形態では、解像度は約12～15ミクロンの間にある。

【0030】

配列読み取り器は、画像収集記録システムを有し、これが干渉フィルタを含み、フィルタよりも前段にあるシステムの集光光学系がフィルタと平行に集光光線を案内し、撮像光学系がソリッドステートセンサ上のフィルタを離れる平行光を撮像する構成としてある。

10

【0031】

配列読み取り器は、1以上の配列を保持する配列支持体と共に用いるように構成し、読み取り器は各配列を独立した配列として読み取って処理するよう構成し配置した。

【0032】

また、本発明は、好ましくは、液体試料をその上にスポット化することによる基板上へのアミノ酸または核酸特徴の二次元スポット化配列の調製を含み、配列内の特徴が蛍光マーカを担持し、配列の読み取りに先の説明のいずれかの読み取り器を用いて分析を行う方法を含む。

【0033】

本発明の本態様の好ましい実施形態は、以下の1以上の技術的特徴を有する。

20

【0034】

この分析は、血液から採取した蛋白質に基づく診断免疫分析であり、幾つかの実施形態では好ましくは、免疫分析は抗体捕捉構成であり、たとえば、悪性癌を検出または監視する固定化抗体により適応させ、たとえば、初期診断で卵巣癌を検出したり、再発の危険性について患者を監視したりする。

【0035】

基板は封止した使い捨て可能な生体カセット内に配設してあり、撮像は、基板に視覚的にアクセスする透明窓又は生体カセットの側面を形成する透明本体を介して行ない、基板は透明であり、配列は透明本体を介すると共に基板を介して配列読み取り器により視覚的にアクセスする。

30

【0036】

基板上の配列を読み取る説明済み或いは前述のいずれかの方法用の任意の配列読み取り器実施形態について、幾つかの好適な実施形態では、配列は操作可能な照明輝度範囲全体の励起レベルに対する発光輝度に略比例する蛍光特性の輝度較正マーカを含み、システムまたは方法が配列読み取り器を用いる配列の画像の形成と近傍輝度較正マーカから取得した定量データに基づく記録配列データの正規化とを含む。

【0037】

本発明の他の態様は、血液或いは他の人体構成要素内に既知の蛋白質生体マーカ群が存在する疾患について蛍光読み取り器を利用する診断方法であって、(1)基板上に異なる試薬の二次元配列を供給し、試薬を疾患の診断が可能な生体マーカ群の要素を束ねるべく個別特化したステップと、(2)個々の血液あるいは人体構成要素内に存在する場合に生体マーカを含む個体の蛍光体標識化血液あるいは人体構成要素抽出体に対し配列を露光させるステップと、(3)配列を静止させたまま、暗視野照明を用いて蛍光励起波長の光により二次元配列全体を同時照明することで配列を励起するステップと、(4)ソリッドステート配列からなる撮像器の単一フレーム上の二次元励起配列全体の蛍光画像を捕捉するステップと、(5)(たとえば、コンピュータにより)疾患の存在について蛍光画像を分析するステップとを含む方法である。

40

【0038】

本発明の本態様の好ましい実施形態は、1以上の以下の特徴を有する。

【0039】

50

本方法は、二次元配列全体を照明するステップは、一つのダイオード或いはダイオード群からの励起放射を案内し、少なくとも $30 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の電力密度で蛍光体を励起するよう選択した波長での照明を生成することで実施することを実行する。

【0040】

本方法は、蛍光輝度基準特徴配列を介して分布させ、生体マーカからの検出放射を前記照明に対する前記基準の応答に基づき、読み取り器により正規化する仕方で実施する。

【0041】

本方法は、少なくとも50画素のソリッドステートセンサが配列の特徴の画像を表わす仕方で実施する。

【0042】

本方法は、生体マーカを抗体に取り付けて実施する。

【0043】

本方法は、配列が卵巣癌の存在を診断すべく選択した蛋白質生体マーカを固定化するよう形成する仕方で実施する。

【0044】

本発明の別の特徴は、蛍光体を含む特徴を有する基板上的配列を読み取る方法であって、配列は操作可能な照明輝度範囲全体にそれらの照明に対する発光輝度において概ね比例する蛍光特性の輝度較正特徴を含み、配列読み取り器を用いる配列の画像の形成と配列内の近傍輝度較正特徴からの配列の読み取り期間中に取得される定量データに基づく記録配列データの正規化とを含む。

【0045】

本発明の本態様の好適な実施形態は、1以上の以下の特徴を有する。

【0046】

本方法は、血液あるいは他の人体構成要素内の既知の蛋白質生体マーカ集合が存在する疾患について診断を実行するよう適用され、(1)基板上に異なる試薬の二次元配列を供給し、試薬を疾患の診断が可能な生体マーカ群の要素を束ねるべく個別特化したステップで、配列に輝度較正機能を含ませる前記ステップと、(2)個体の血液あるいは人体構成要素内に存在する場合に生体マーカを含む個体の蛍光体標識化血液あるいは人体構成要素摘出体に対し配列を露光させるステップと、(3)配列を静止させたまま、暗視野照明を用いて蛍光励起波長の光により二次元配列全体を同時照明することで配列を励起するステップと、(4)ソリッドステート配列からなる撮像器の単一フレーム上で二次元励起配列全体の蛍光画像を捕捉するステップと、(5)配列内の較正特徴に基づき記録配列データを正規化するステップと、(6)疾患の存在について蛍光画像を分析するステップとを含む。

【0047】

本方法は、前記二次元配列全体を照明し、一つのダイオードまたはダイオード群からの励起放射を案内して少なくとも $30 \text{ mW} / \text{cm}^2$ の電力密度で蛍光体を励起するよう選択した波長での照明を生成することで画像を形成することで実施する。

【0048】

本方法は、少なくとも50画素のソリッドステートセンサが配列の特徴の画像を表わす状態で実施する。

【0049】

本方法は、配列の特徴が抗体を含む診断を実行するのに用い、一つの重要なケースでは、配列の特徴は卵巣癌の存在を診断するよう選択する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0050】

様々な図面中の同様の参照符号は、同様の要素を指すものとする。図1を参照するに、配列読み取りシステム100は、配列読み取り器110と、その幾つかが分析に応じて蛍光材料を担持する特徴103(たとえば、アミノ酸や核酸等の生体材料スポット)の二次元配列を担う基板102と、配列読み取り器110を用いて記録した画像を処理するコン

10

20

30

40

50

コンピュータ 104 と、を備える。配列読み取り器 110 は、照明システム 120 と画像収集記録システム 140 を含む。

【0051】

操作期間中、基板 102 は、ポジショナ 105 を用いて画像収集記録システム 140 の下側に位置決めするが、両者間の距離 h は、照明システム 120 からの光が二次元配列 103 を覆い尽くすに十分な程度に大きく、好ましくは、 h は少なくとも 5 mm、一般に好ましくは少なくとも 10 mm の値を有する。照明光の好適な光源は約 $30 \text{ mW} / \text{cm}^2$ 以上の間に出力を有し、好ましくは発光ダイオード (LED) やこの種のダイオードの配列である。基板上の特徴は、照明システム 120 からの選択された波長の光での励起時に幅狭の蛍光スペクトル内で発光することのできる材料を含む。利用可能な蛍光色素を用いることができ、ここでは Cy3, Cy5 が一般的な選択肢である。

10

【0052】

画像収集記録システム 140 は蛍光を集光し、特徴すなわちスポットの生成画像を記録し、光学システムは平坦な視野を生成するよう選択してある。画像取得軸 141 は、基板 102 の平面に対しほぼ直角をなす。照明系 120 は暗視野照明を用い、照明システム 120 からの光を基板 102 の平面に対し約 $20^\circ \sim 50^\circ$ の間の角度を有する光路に沿って案内し、基板 102 で反射された照明光が、画像収集記録システム 140 へ入射しないようにする。スポットが発する蛍光は、視野と集光光量を増大させるべく、中程度の開口数、たとえば、 $NA = 0.30 \sim 0.60$ の間、ここでは好適な実施形態では、 $NA = 0.40 \sim 0.55$ の間 (全て空中) の範囲の撮像光学システム 142 により集光する。撮像光学システム 142 は、センサ 146 から成る二次元配列ソリッドステート検出素子上に配列 103 の画像 144 を投射する。このソリッドステート配列は、生物材料スポット配列の寸法と同じ大きさの等級の寸法を有する。撮像光学システム 142 は、配列 103 全体がセンサ 146 上へ写像されるようにする大きな視野を持つよう設計してある。一般に、二つの配列は相対的な寸法としてあり、生体マーカのスポットを少なくとも 50 画素上で、好ましくは 100 画素台の 100 ミクロン台のスポット寸法で、或いは 300 画素台の 300 ミクロンのスポット寸法で解像する。

20

【0053】

かかる構成を用いることで、画像 144 の物理的な大きさ D_i は縮減へ向けてバイアスさせた配列 103 の物理的寸法 D_o とほぼ同じであり、すなわち、好ましくは、約 25% を超えては拡大せず、また約 75% を超えては縮減しない。現在、相当に低コストの利用可能な部品を用いることで、配列は肥大化せず、好ましくは、30% ~ 50% の範囲内で縮減される。これにより、画像を取得したり複数の小部分の画像を併せ縫合したりして配列 103 の単一画像を形成する上で読み取り器 110 に対する精密段により配列 103 を転移させる必要のないという非常に重要な特徴がもたらされる。

30

【0054】

図 2A を参照するに、好適な実施形態では、照明システム 120 はスポット内の材料 (たとえば、Cy3) の蛍光スペクトルを励起するよう設計された励起帯域内の光 (たとえば、緑) を発する高輝度 LED 122 を含む。励起フィルタ 124 は、励起波長帯域をさらに制限するのに用いる。光の空間分布は一对のレンズ 126, 128 等の光学系を用いて形作られ、基板 102 上に二次元配列 103 のほぼ一様な照明をもたらす。より高輝度の照明を提供するには、基板 102 の平面に対し約 $20^\circ \sim 50^\circ$ の間の角度を有する光路沿いに光を放出するようにも配置した、2 以上の LED を配列 103 周りに分布させることもできる。

40

【0055】

図 2B を参照するに、別の好適な実施形態では、照明システム 120' は材料の蛍光スペクトルをスポットにて励起するよう設計した励起帯域内で発光する高輝度 LED 132 を含む。励起フィルタ 134 は、励起波長帯域をさらに制限すべく用いる。その端部 (図示せず) に一体化した適当なレンズ付きの均質化器 130 が、基板 102 上に位置する二次元配列 103 上への照明場全体の光束密度のばらつきを低減する。それは、100% の

50

内部反射を有するよう適当に設計され、所望の均質化効果をもたらすよう選択した直径対長さをもち、照明分布をより一様に機能させる固体透明ロッドすなわちクラッドである。均質化器 130 は、約 45 度の受容角度まで光を受け入れる。均質化器 130 の端部は、基板 102 の平面に対し約 20° ~ 50° の間の角度を有する光路に沿って光を発光する構成としてある。

【0056】

読み取り器と丁寧に組み合わせて読み取り器の性能を向上させ、様々な重要な文脈において実用的とすることのできる改善が存在する。

【0057】

少なくとも一つ、好ましくは、各配列内のエネルギー較正スポットの分布を用い、配列のスポットに関する検出輝度は画像処理期間中にそばに横たわる較正スポットから受け取る放射検出値に対し正規化し、かくして低コスト照明システムで生ずることのある放射内の非一様性公差を可能にすることができる。また、技術は、読み取り器の下側の配列の不正確な位置を補償するのにも有効とし得る。図 3 は、中心軸からの角度の関数としての相対輝度をプロットした一般的な高輝度 LED が生成する非一様照明パターンを示す。較正スポットに対応する画像内の所定位置にてソリッドステートセンサ配列が記録する蛍光の輝度は、局部照明輝度の推定に用いられ、この輝度がセンサ配列上の隣接スポットにて記録した信号レベルを正規化するのに用いられる。一般に、未知の輝度のスポットの異なる集合に対し、それぞれ局部的である異なる較正スポットが用いられる。

10

【0058】

較正点は、好ましくは正確な相対配置用の生体的スポットの配列と共に基板上に配置する。図 4 A は、ピン 161 を浸漬して基板 102、たとえば、揮発性溶剤中に溶解させたポリイミド高分子 (Kapton (商標)) にスポット化する組成を受け入れる蛍光較正組成を含む微細井戸プレートの井戸を表わす。図 4 B は、図 4 A の組成を生成する蛍光較正スポット 164 のパターンがその間にある生体的スポット 166 のスポット化配列 103 を概略示すものである。図 4 C は、生体的スポット 166 に加え、蛍光輝度較正スポット 164 を含む基板 102 の一部の拡大図である。図 4 D は、較正スポット 164 の相対的配置を示す生体的スポット 166 の配列 103 を寸法拡大した概略平面図である。この装置は、配列全体 103 上での輝度のばらつきを正規化を可能にする。同じ輝度較正スポットが配列を配置する空間的基準として用いることもでき、あるいは配置の全体的外形を用いてそれを制御システムへ配置するのに用いることもできる。

20

30

【0059】

大寸法のスポット、すなわち、ソリッドステート配列上のそれらの妥当な寸法の画像を利用することで、拡大は一切ないが、別の改善策は不規則ノイズを平均化するのに役立つソリッドステート配列画像内の画素のビニングである。このように供給される、従来の CCD のオンボードビニング能力を用い、読み取り精度を高める。図 5 は、ほぼ 291 画素の配列内の特徴の解像を可能にすることに対応するスポット 202 の画像境界近傍の CCD の一部を示す。

【0060】

他の重要な改善には、自動蛍光捕捉 (すなわち、配列の特徴内の蛍光材料以外の光源から集光した蛍光) を低減する基板とその支持体の特別な特徴および特性を用意する必要がある。図 6 は、好適な基板 102 の重要な態様を示す。材料の極薄層 302 (たとえば、約 5 ミクロンよりも薄く、好ましくは、3 ミクロン未満) は、たとえば、ニトロセルロースまたはポリスチレンから成る。フィルムとしてそれは透明であり、ただし、他の場合は極薄多孔質ニトロセルロース膜を用いることもできる。基板が、特徴の配列 103 を支持する。その存在が極薄であるため、それは基板層 302 自体が発する蛍光量を制限する。

40

【0061】

スパッタリングした金属酸化物等の不透明層 304 は照明光 300 が内部へ浸透するのを阻止し、下側 (たとえば、ガラス製顕微鏡スライドからなる基板) の剛性支持体 306 内で蛍光を刺激するのに役立つ。このことが、大開口数光学系を使用しないことに起因す

50

る大きな焦点深度が引き起こす支持体層 306 からの潜在的な自動蛍光捕捉に対抗するのに役立つ。

【0062】

配列読み取り器 110 は、蛍光タグ付きや蛍光タグあるいは発光タグ付きの他の生体材料付きの標識化蛋白質の撮像等の他の潜在的な広範な用途だけでなく、蛍光標識付き蛋白質の配列の撮像も可能である。配列読み取り器 110 は、ウイルスやペプチドや抗体や受容体や他の蛋白質と共に、また植物や動物や人間や菌類やバクテリア細胞を含む他の広範な標識付き生体材料と共に、また標識付き化学製品とも共に効果的に用いることができる。配列読み取り器 110 は、一般には、1000 スポット未満で臨床医向けの大きさの寸法の免疫分析配列の迅速な撮像用に設計する。

10

【0063】

また、配列読み取り器 110 は、複数の生体マーカ（例えば、卵巣癌）の免疫分析を同時に実施することもできる。血液あるいは他の人体構成要素内の既知の蛋白質生体マーカ群を用い、疾患はかくしてより簡単に診断することができる。基板上に二次元スポット配列試薬を供給した後、蛍光体標識付き血液或いは疾患を患っている疑いのある個体から採取した他の人体構成要素に試薬スポットをさらす。得られるスポット配列を、そこで配列読み取り器 110 により読み取る。

【0064】

図 7A を参照するに、ここでの好適な実施形態では、元々は交通信号灯用に設計された光源を用い、二つの発光サブシステムを配列位置周りの直径両端に配設する。配列読み取り器 400 は、Cy3 励起用の緑色ピーク波長をもったルミレッド (LumiLed) 高輝度 LED 402 (カリフォルニア州サンノゼ市米国ルミレッド・ライティング社 (Lumileds Lighting U.S., LLC) から入手可能な Luxeon 緑色 535 nm、5 ワット LED、品番 # LXHL-LM5C) や、Cy5 励起用のピーク波長をもった第 2 のルミレッド高輝度 LED 404 (Luxeon 赤橙色 617 nm、1 ワット LED、品番 # LXH-MH1B) を含む。両 LED は、ほぼ 0.04 nm/ の低温度係数と、Cy5 については 8 nm、Cy3 については 30 nm の狭帯域ピーク波長公差を有する。これらの LED は、10% ~ 20% の変換効率と、低デューティサイクルでの第 2 用に 50% ピークを持たせ、約 150 mW をもたらすことのできる通常仕様の 110 mW 連続波でもって利用可能であり、ほぼ全てが Cy3 の励起フィルタ 406 の通過帯域内にあり (バーモント州ロッキングラム市のクロマ・テクノロジーズ (Chroma Technologies) から入手可能なクロマフィルタ品番 # HQ535/50) と、Cy5 励起フィルタ 408 (クロマフィルタ品番 # HQ620/60) である。f/1 円錐 (図 3 に示した照明パターン中の 30° の線 150 で表記) は、21.5% の光、すなわち 64.5 mW を含む (より大きい捕捉が図 2B の均質化器の受容角度 45 度でもって可能である)。しかしながら、f/1 円錐内の全ての光がより高い角度でのフレネル反射が故に f/1 レンズを介して転送はしない。適当な濾波と口径食を用いることで、赤色 LED 404 用の 20% の空間輝度に満たない直径 10 mm の丸型ビーム 10 内に 50 mW (ほぼ 33% の転送効率) を予想するのが安全である。ビームを 45° 傾斜させることで、所望の 6.5 x 9.5 mm² の面積を囲む楕円全体に光を拡散させ、これにより電力密度は約 45 mW/cm² となる。0.5 秒で、それは 22.5 mJ/cm² のフルエンスをもたらす。比較するに、レーザ共焦点顕微鏡の励起エネルギーはほぼ 7.5 マイクロ秒に互り 10 ミクロンの直径ごとに約 5 mW であり、48 mJ/cm² のフルエンスをもたらす。同様の性能が、Cy3 に対し、ピーク吸収を有する緑色 LED 402 について得られる。高電力とコスト効率に加え、LED は長寿命を有しており、多色蛍光体の簡単な実装が可能である。緑色 LED 402 は一対のケーラーレンズ 412 を用い、赤橙色 LED 404 は一対のケーラーレンズ 414 を用い、これにより両 LED は配列 103 の視野 6.5 x 9.5 mm² に互りほぼ一樣なビームを給送する。LED は、それらの供給元から入手可能なヒートシンク上に載置する。

20

30

40

【0065】

50

読み取り器の視野軸に対する基板102の位置決めは、ポジシヨナ105、たとえば、約0.1~0.2mmの位置決め精度を有する0.1または0.2mmの空間解像度をもった、たとえば、ゼネバ歯車によってなされる。ポジシヨナ105は、同一のあるいは異なる基板のいずれにも一つの配列撮像から別の配列撮像へ自動的に遷移させるのに用いることができるが、無論のこと顕微鏡ステージの精度やコストではなく、配列画像の構成要素の生成には一切役割を果さない。同じ基板は互いに配列を正確に位置決めする必要なく多くの配列を担持することができ、ポジシヨナ105は、撮像用の位置へ次から次へ移動するよう機能する。好ましくは、基板は、位置合わせマーク、すなわち、たとえば、矩形配列の角部を指定する目立つマーク群を位置決めするのに役立つ「起点」を有する。

【0066】

配列103は、一对の商用CCDレンズ組立体422, 422' (ニューヨーク州ペンフィールド市のウェステック光学社 (Westech Optical Corporation) から入手可能なウェステック (Westech) CCDレンズ組立体品番#2105と#2131) によりCCDセンサ420上へ結像し、レンズ422はその元々の設計目的に対し特異な方法で使用される。二つのレンズの中間に位置する帯域通過フィルタ424 (Cy5用クロマテクノロジー部品#68030、Cy3用クロマ部品#57030) が、励起蛍光スペクトル内の光だけを選択的に送光する。一つの視野 $6.5 \times 9.5 \text{ mm}^2$ の画像 (図8の502参照) が、0.707倍に縮減されたCCDセンサ420上に投射されるが、矩形 $4.50 \times 13.5 \text{ mm}$ 内に横たわる二つの分離された小配列の画像は0.5倍に縮減される。

【0067】

レンズは、被写体側 (配列103に対向) の0.42NAでもって動作するよう組み立ててある。配列103は、0.52と同程度の大きさのNAをもって動作するよう組み立てたレンズ組立体422付きのCCDセンサ420上に結像させることができる。

【0068】

CCDセンサ420は、暗電流ノイズを減らすべくペルティエ冷却器426 (カリフォルニア州サンタバーバラ市のサンタバーバラ計器グループ社 (Santa Barbara Instrument Group, Inc.) からのCCDを利用するカメラ型番ST-7xME) を用いて冷却する。冷却器426は、必要に応じて環境よりも420~50度低くCCDセンサを冷却する能力を有する。有利な冷却にも拘わらず、画素内に蓄積された電荷の電圧への変換時に生成した読み取りノイズは優勢なノイズ源であり、その影響が除外されない限り、読み取りノイズは、検出することのできる最低光輝度を決定する。このノイズはランダムであり、スポットからの蛍光はそうではないため、その大半の影響は、「オンボードビニング」や暗視野減算や時間およびフレーム積算やソフトウェア分析や各スポットを撮像する多数の画素の使用により低減させることができる。

【0069】

図7Bを参照するに、暗視野モード内での撮像は、図示の角度での直接照明と基板から距離 h だけ離間させた集光光学系27を介して配列平面に直角の軸Aに沿う配列を視認するよう配置したCCDセンサ24とを用いて達成することもできる。この場合、基板層は一部あるいはその深さ全体に微細多孔質とする、または固体フィルムもしくは修正固体フィルムとすることができ、好ましくは、これらのいずれの場合も、5ミクロンの肉厚未満の極薄被覆又は薄膜とすることができ、図示の如く、直接照明光が配列平面に対し鋭角で照明軸A'に沿って入射する。角度が、約 $20^\circ \sim 50^\circ$ の範囲、ここでは 45° で図示した状態で、距離 h は、この種の照明を可能にするよう選択しなければならない。配列の蛍光体タグを励起するよう選択した波長の光源112a, 112b, または112cに由来する光Lは、ダイクロミックミラー156b, 156cを介して角度で軸A'に沿って照明を導く側に位置するミラー116へ、極薄基板20又は20'上に在る蛍光体タグ付きスポット配列上へ向かう。スポットの配列は、支持本体上に極薄基板層を有する担体か、透明本体が担持する透明層の形をなす担体を使用することができ、画像収集記録システムは、透明本体と配列と同じ側に透明本体を越えて横たわっている。蛍光発光

10

20

30

40

50

は、選択されたフィルタ 28A, 28B, または 28C を介してレンズ 27 により集光され、そこで、コンピュータ 32 の制御下でレンズ 26 を介して CCD カメラ 24 へ入射する。これまでの如く、背景減算技法を本システムと共に用いる。励起ソースと図 7A のそれとの違いは、臨床の最もコスト要求の厳しい状況に逆行する相当のコストに至るが、図 7B の照明システムの構造と異なる能力が他の説明済み便益を享受する利点を有することができる。

【0070】

有利な設計では、免疫分析配列は 400 個の微細分析スポットに限定される。配列形式が、そこでは重要な設計課題となる。CCD チップの画素の寸法と数および商用スポット化配列の構成が、読み取り器と配列の設計では互いに調和させるべき重要な制約となる。配列寸法は、CCD パラメータに整合させねばならない。他方、スポット形成ピンやチップ構成がスポット形成あるいは印刷ヘッドをソース材料へロードする貯槽の選択を制限し、また可能な配列構成もまた制限する。96 個のまたは 384 個の使い捨て型のマイクロタイタ板が、使用する一般的な貯槽である。これらの制約は、図 8 に図式的に示した二つの形式が満足するものである。

【0071】

幾何学的公差を考慮することで、第 1 形式 502 の視野が一つの $6.5 \times 9.5 \text{ mm}^2$ の配列を覆い、第 2 形式 504 の視野が、二つの $4.5 \times 4.5 \text{ mm}^2$ の配列を覆っている。300 ミクロン直径のスポット、中央では 500 ミクロン、スポット占有率が 36% を想定するに、各スポットが約 291 個の画素と接合されよう。150 ミクロン直径のスポット、中央では 333 ミクロン、を想定するに、各スポットは約 91 個の画素と接合されよう。スポットごとの大量の数の画素により、CCD センサにとって利用可能なオンボード 3×3 ビニング選択肢がもたらされ、信号対ノイズ比が増大する。中間の背景は同一の平均化にさらされ、高感度で信頼に足る蛍光信号レベルをもたらす。配列は、二つのスポット寸法のいずれかを用いて各形式をもって形成することができる。これらの配列は、ソース材料装荷貯槽として 96 個か 384 個のいずれかのマイクロタイタ板から始め、アフィメトリックス・ピン (Affymetrix Pin) やリング・アレイヤー (Ring Arrayer) 等のあらゆる商用配列器 / プリンタを用いて印刷することができる。

【0072】

他の方法は、信号対ノイズ比を改善して画像の品質を最良に規定するのに役立つ。より長い積分時間すなわち静止配列の複数取得和は、CCD の飽和を回避するのに役立つ。信号対ノイズ比は、積分時間比の平方根あるいはフレーム数として改善される。0.5 秒対 5 秒の読み取り時間が、信号対ノイズ比をほぼ 3.16 倍改善する。

【0073】

信号対ノイズ比は LED の数を、たとえば、2 波長のそれぞれについて 4 程度へ増やし、電力レベルを $160 \text{ mW} / \text{cm}^2$ へ高めることでも増大させることができる。併せ適用することにより、これらの選択肢はフルエンスを約 $1,120 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ へ高めることで 13 倍ほどに信号対ノイズ比を増大させる。写真退色、すなわち、起き得る結果は、色素等に応じて特定の環境内でのこの手法を制限することがある。

【0074】

代替実施形態は、他種の基板を用いることができる。たとえば、基板は、ガラス製スライドとすることもでき、また基板内の透明窓を介して撮像を行なう封止された使い捨て可能な生体カセットとすることもできる。

【0075】

図 9 を参照するに、複数生体マーカ分析方法は、基板上のアミノ酸或いは核酸の特徴の二次元スポット化配列を配設するステップ 600 を含み、配列全体の特徴は光感応マーカを担持している。第 2 のステップ 602 では、配列読み取り器の照明光源が基板平面に対しほぼ $20^\circ \sim 50^\circ$ の間の角度で照明路に沿って配列を照明する。第 3 のステップ 603 では、画像収集記録システムはそこで基板に対しほぼ直角をなす画像取得軸に沿って

10

20

30

40

50

励起蛍光を集光し、これにCCDセンサのソリッド配列上の生体材料スポットの配列の画像の記録ステップ604が続き、これに輝度校正マーカを用いて記録画像内の画素の輝度レベルを正規化するステップ606が続く。

【0076】

この校正が各配列の撮像における統合機能として発生することに、留意されたい。機器全体の事前読み取り校正を通常ではあるが、全体的に効果的な手続きではないと識別すべきである。

【0077】

図10を参照するに、記録された画像内の画素の輝度レベルを正規化する方法は、配列1002の角部に配置された位置校正スポットからの蛍光を検出する画素を判定するステップ1004を含む。得られた位置情報は、そこで、二次元画像全体に複数「データ群」に対応する画素を配置するのに用いる。各データ群は、生体スポットに対応する画素を含み、画素は輝度校正スポットに対応する。「データ群n」を含む各データ群にとって、本方法は、輝度校正スポットnを表わす画素により記録された輝度を検出するステップ1006と、データ集合n内の各生体スポットを表わす画素により記録された輝度を検出するステップ1008と、輝度校正スポットの輝度を用い各生体スポットごとに輝度データを正規化するステップ1010と、を含む。最終ステップ1012において各データ群について輝度データを正規化した後、画像全体を全データ集合に対する正規化データに従って表わす。

10

【0078】

図11を参照するに、血液あるいは他の人体構成要素内の既知の蛋白質生体マーカ群が存在する疾患用の蛍光読み取り器を利用する診断方法は、基板上に異なる試薬の二次元配列を配設するステップ1102を含む。試薬は、疾患を診断することのできる一組の生体マーカからなる部材を束ねるのにそれぞれ特有のものである。本方法はそこで、個体の血液又は人体構成要素内に存在する場合に生体マーカを含む個体の蛍光体標識化血液あるいは人体構成要素の抽出物に対し配列を露光させる第2のステップ1104を含む。配列を静止させたまま、第3のステップ1106において読み取り器は蛍光体励起波長の光により二次元配列全体を同時に照明することで配列を励起し、暗視野照明を使用する。第4のステップ1108では、読み取り器は、そこでソリッドステート配列からなる撮像器の単一フレーム上の二次元励起配列全体の蛍光画像を捕捉する。本方法は、そこで疾患の存在

20

30

【0079】

好適な実施形態では、分析は血液から採取した蛋白質に基づく診断免疫分析であり、卵巣癌等の悪性癌を検出或いは監視し、初期診断したり、あるいは再発の危険のある患者を監視することができる。最近十年では、単独でのあるいはCa125との組み合わせでの生体マーカに対する探索が、多数の候補を生み出す卵巣癌用の予後の試験を改善することが有り得る。しかしながら、1995年に、ベレク(Berek)とバスト(Bast)が17個の異なるマーカ(CA125を含む)上のデータを見直し、早期段階の卵巣癌の設定にどれも有効でないと結論付けた(1)。しかしながら、他の腫瘍マーカがCA125を補完することができ、一部の環境で役立つことは示されてきた(2)。

40

【0080】

近年では、ゲノム技術は予後の卵巣癌生体マーカの探索における進歩を劇的に加速してきた。卵巣癌細胞線の差分DNA転写プロファイリングを使用した研究と卵巣上皮からの研究が、数百の候補生体マーカを集合的に特定した(たとえば、3, 4, 5)。これらの新規な候補蛋白質生体マーカは、調査試行において評価されてきた。研究された候補生体マーカ蛋白質には、HE4(6)とオステオポンチン(osteopontin)(7)、プロスタシン(prostasin)(4, 5)、メソテリン(mesothelin)/巨大核細胞強化因子(8)が含まれる。最近の報告も、カリクレインセリンプロテアーゼ系の要素、特に、カリクレイン10が血液中の卵巣癌生体マーカとしても役立つことがあることを示唆している(9, 10, 11)。調査研究からの成果は、これらの蛋白質

50

を、単独でまたはCA125等の他のマーカと組み合わせ卵巣癌の予後インジケータとして役立たせることができることを助長し示唆している。

【0081】

血液中の多数の生体マーカのパターンが早期段階の卵巣癌のシグナルを供給する直接的な証拠が存在する。質量分光(SELDI-TOF)により卵巣癌患者と健常個体の血清から生成されて反復探索アルゴリズムにより分析した蛋白質スペクトルは、未だ特定されていない5個の蛋白質プロファイルを特定し、この蛋白質が卵巣癌患者の血清を完全に識別した(12)。目隠し試料の試験では、特殊パターンが初期段階の患者から36%を含む卵巣癌試料の100%を正確に特定し、95%の特性(偽陽性率)を示した(12)。

【0082】

蛋白質パターン技術の陽性予測値が母集団を母体とする治験でサポートされている場合、これらの識別蛋白質は高感度の診断プローブ(13)を発展させる秀逸な機会をもたらし、このプローブは所与の適切な技術プラットフォームを与えられたときに、早期段階の卵巣癌の発見に向けた常套的試験に最終的に活かされる。

【0083】

引用した参考文献は、以下の通りである。

1. Berek, JS, RC Bast 著、1995年、「卵巣癌のスクリーニング 早期発見に向け感度と特性を改善した連続相補型腫瘍マーカの使用方法」、Cancer 76: 2092-06000
2. Woolas, RP, DH Oran, AR Jeyarajah, RC Bast, JJ Jacobs 著、1999年、「骨盤撮像ではなく血清マーカを用いたスクリーニングを介して識別される卵巣癌」、1999. Int. J. Gynecol 9: 497-501
3. Schummer, M, WV Ng, RE Baumgarner, PS Nelson, B Schummer, DW Bednarski, L Hassell, BY Baldwin, L. Hood 著、1999年、「卵巣癌に過剰発現する遺伝子の発見に向けた21,500個の卵巣のcDNAsの配列の比較混成形成」、Gene 238: 375-385
4. Kwong-Kwok, W, RS Cheng, SC Mok 著、2001年、「MICROMAXTM cDNA 微細配列システムによる卵巣癌細胞から差分的に発現させた遺伝子の識別」、2001. Biotechniques 30(3): 670-674
5. Mok, S, J Chao, S Skates, K-K Wong, GK Yu, MG Muto, RS Berkowitz, DW Cramer 著、2001年、「プロスタシン、卵巣癌に関する潜在的血清マーカ: マイクロ配列技術を介する識別」、JNCI 93(19): 1458-1464
6. Hellstrom, I, J. Raycraft, M Hayden-Ledbetter, J A Ledbetter, M Schummer, M McIntosh, C Drescher, N Urban, KE Hellstrom 著、2003年、「HE4(WFDC2)蛋白質は卵巣癌に関する生体マーカである」、癌研究 63; 3695-3700
7. Kim, JH, SJ Skates, T Ude, KK Wong, JO Schorge, CM Feltmate, RS Berkowitz, DW Cramer, SC Mok 著、2002年、「卵巣癌の潜在的診断用生体マーカとしてのオステオポンチン」、JAMA 287(13): 1671-9
8. Scholler N, N Fu, Y Yang, Z Ye, GE Goodman, KE Hellstrom, I Hellstrom 著、1999年、「メソテリン/巨大核細胞強化因子の一又は複数の可溶性材が卵巣癌患者からの血清中に検出可能である」、PNAS USA 96(20): 11531-6 (L. Hoodのスクリーニング研究で発見)
9. Shvartsman, HS, KH Lu, J Lillie, MT Deave

10

20

30

40

50

- rs, S Clifford, JI Wolf, GB Mills, RC Bast, D M Gershenson, R Schmandt 著、2003年、「上皮卵巢癌腫のカリクレイン10発現について」、Gynecol Oncol 90: 44 - 50
10. Luo, LY, D Katsaros, A Sorilas, S Fracchiolo, R Riccinno, IA Rigault de la Longris, DJC Howarth, EP Diamandis 著、2001年、「上皮卵巢癌のヒト・カリクレイン10発現の予後的価値」、Clin Can Res 7: 2317 - 2379
11. Luo, LY, D Katsaros, A Scorialas, S Fracchioli, R Bellino, M van Gramberen, H de Bruijn, A Henrik, UH Stenman, M Massobrio, AG van der Zee, I Vergote, EP Diamandis 著、2003年、「血清予後」、Cancer Res 63: 807 - 11
12. Petricoin, EF, AM Ardekani, BA Hitt, PJ Levine, VA Fusaro, MA Steinberg, GB Mills, C Simone, DA Fishman, EC Kohn, LA Liotta 著、2002年、「卵巢癌を識別する血清における蛋白パターンの使用」、Lancet 16: 359 (9306); 572 - 77
13. Wulfkuhle, JD, LA Liotta, EF Petricoin 著、2003年、「癌の早期発見へ向けたプロテオミク応用」、Nature Reviews Cancer 3: 267 - 75

【0084】

主題(1)暗視野照明内での極薄基板層の特性の使用、一般に、特にニトロセルロースとポリスチレンとそれらの製造方法および用途におけるスポット配列の大きさの等級の大きさのセンサのソリッドステート配列上での撮像、(2)操作を改善したり臨床蛍光読み取り器を実用的とするのに役立つ励起光を吸収する基板下側の金属酸化物と他の吸収層と、(3)特に高輝度発光ダイオード或いは照明を励起するダイオード配列を用いるものにおける蛍光読み取り器の操作を改善するのに役立つ微細配列内での輝度較正マークの形成及び活用に関するさらなる開示については、2003年6月6日出願の米国仮特許出願第60/476,512号から同様に優先権を主張する本願と同時出願されたさらなるPCT出願を参照されたい。

【0085】

本発明の他の特徴及び効果は、前記及び請求項から理解されるが、本発明の趣旨ならびに範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】配列読み取りシステムの線図である。

【図2A】読み取り器用の照明装置の概略図である。

【図2B】読み取り器用の照明装置の概略図である。

【図3】高輝度LED用中心軸に対しなす角度に対する照明の相対輝度のプロットを示す図である。

【図4A】図4Aは生体材料のスポットすなわち輝度較正スポットの形成に適したスポット形成ピンと貯槽を示す図である。

【図4B】図4Bは較正スポットを生体材料のスポットの配列を介して戦略的に分散させた配列を表わす図である。

【図4C】図4Cは図4Bの拡大図である。

【図4D】図4Dは、図4Bの平面図である。

【図5】センサのソリッドステート検出要素配列上へのスポットの写像を示す図である。

【図6】不透明層と極薄基板と基板上の配列スポットを抱える透明剛性支持本体を備える担体を高倍率尺度で表わす線図で、配列と同じ側からの照明が図示してある。

【図7A】図7Aは好適な臨床配列読み取り器を表わす線図である。

【図7B】図7Bは別の臨床配列読み取り器を示す図である。

【図8】図7Aの配列読み取り器により撮像可能な二つの配列規格を示す図である。

【図9】配列読み取り方法のステップを表わす線図である。

【図10】記録された画像の画素の輝度レベルを正規化する方法のステップを表わす線図である。

【図11】蛍光読み取り器を利用する診断方法のステップを示す線図である。

【図1】

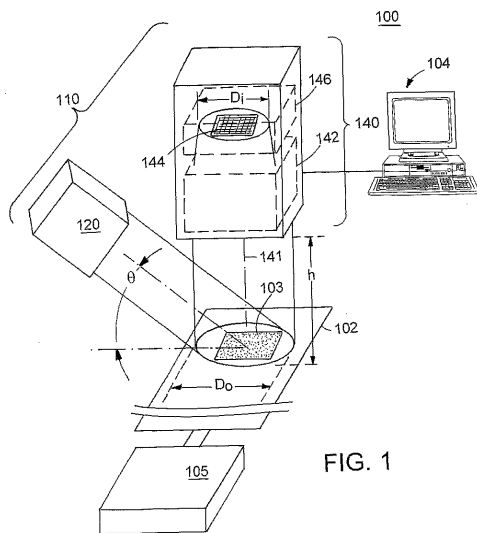


FIG. 1

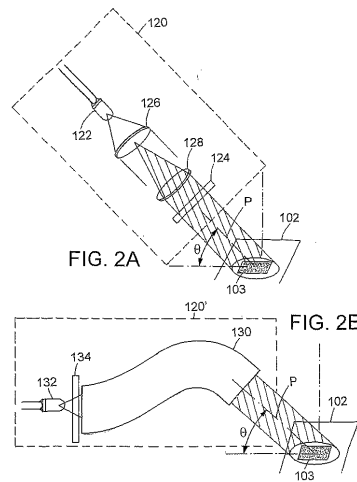


FIG. 2A

FIG. 2B

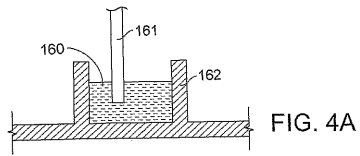


FIG. 4A

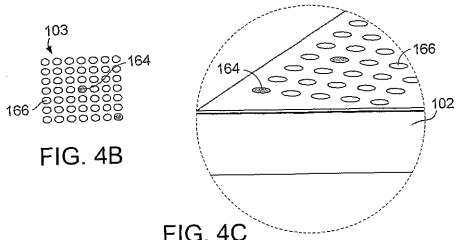


FIG. 4B

FIG. 4C

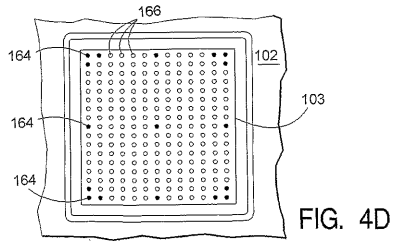


FIG. 4D

【 図 5 】

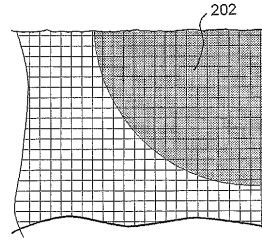


FIG. 5

【 図 6 】

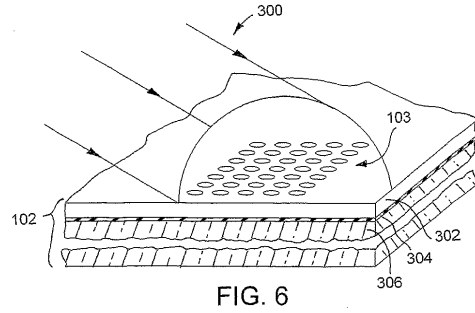


FIG. 6

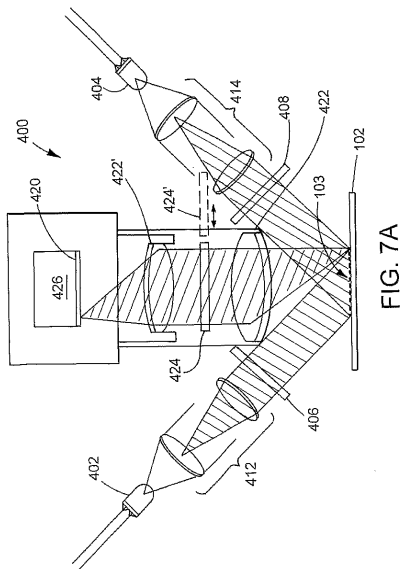


FIG. 7A

【 図 8 】

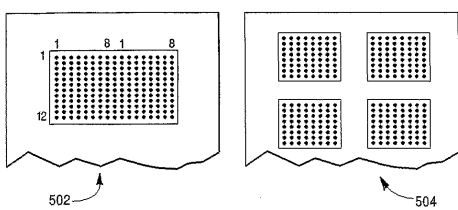
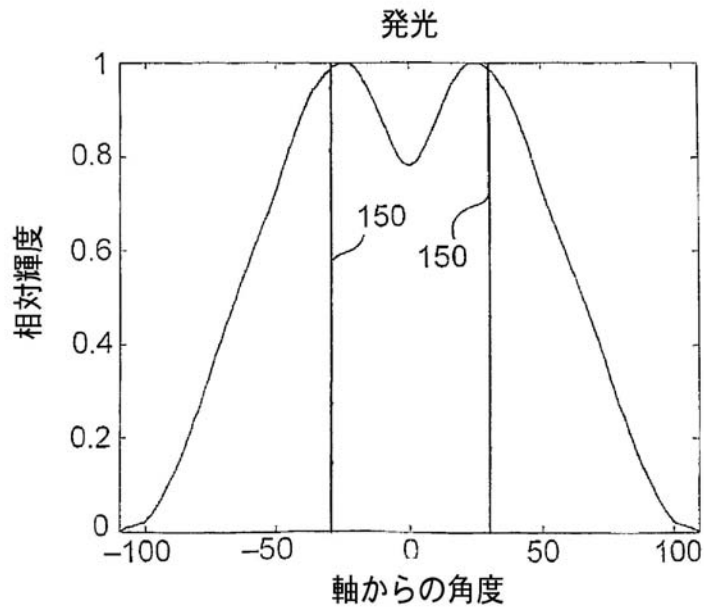
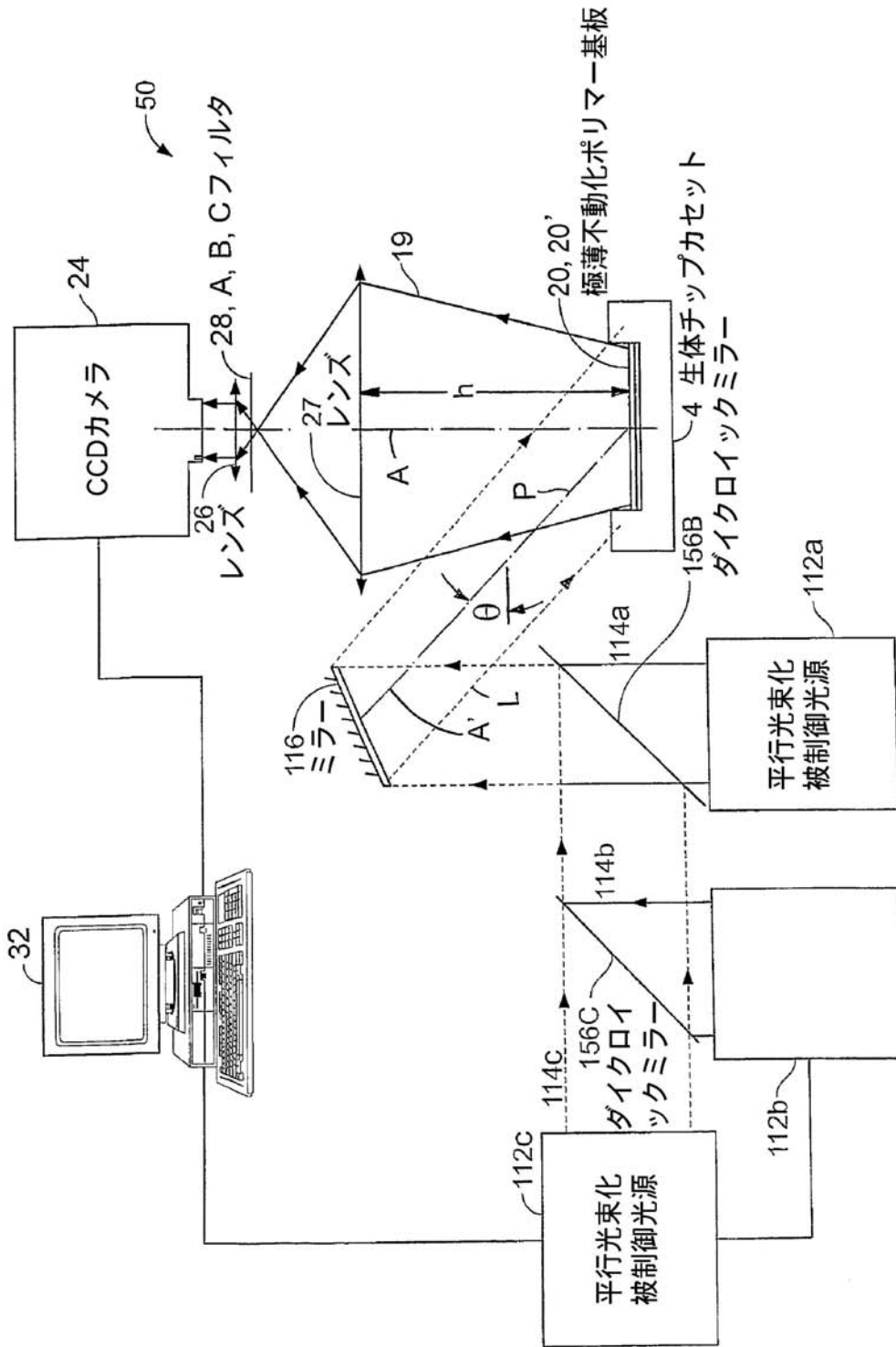


FIG. 8

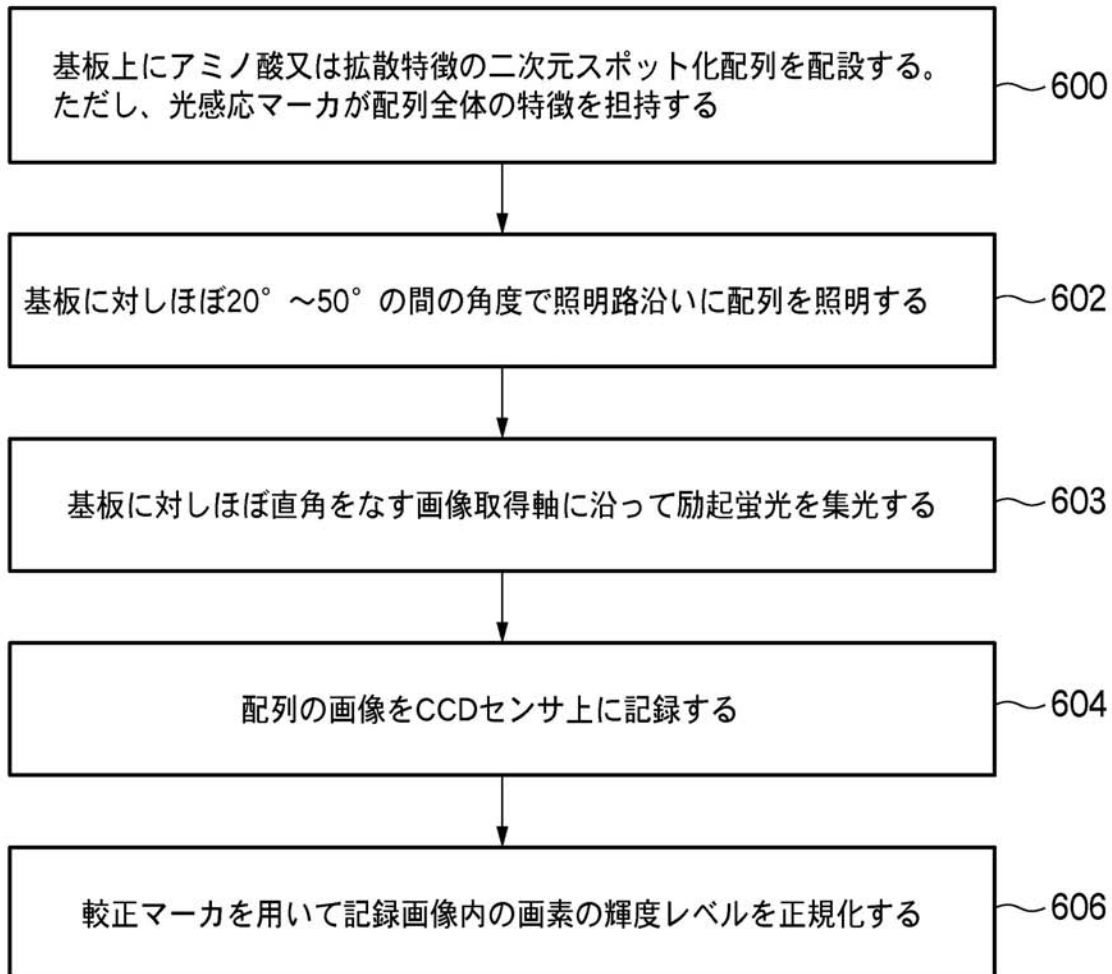
【 図 3 】



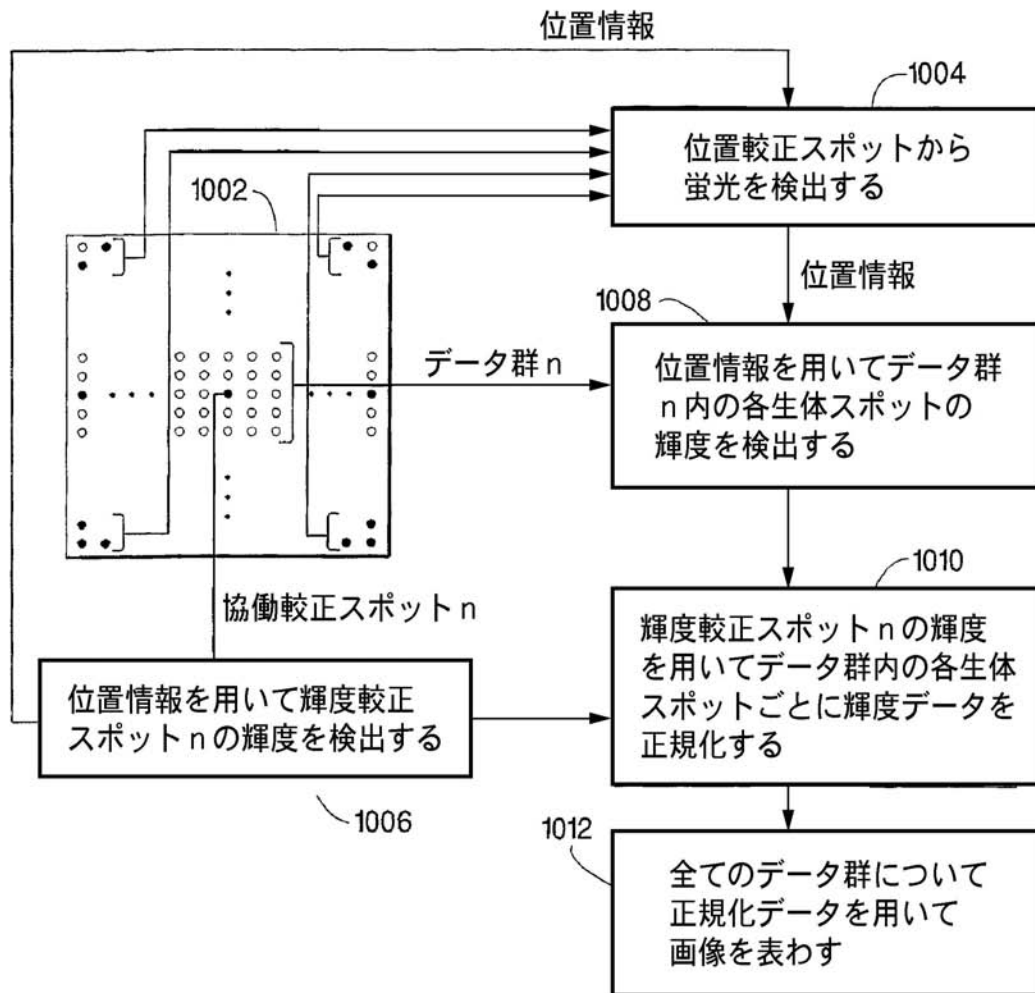
【図7B】



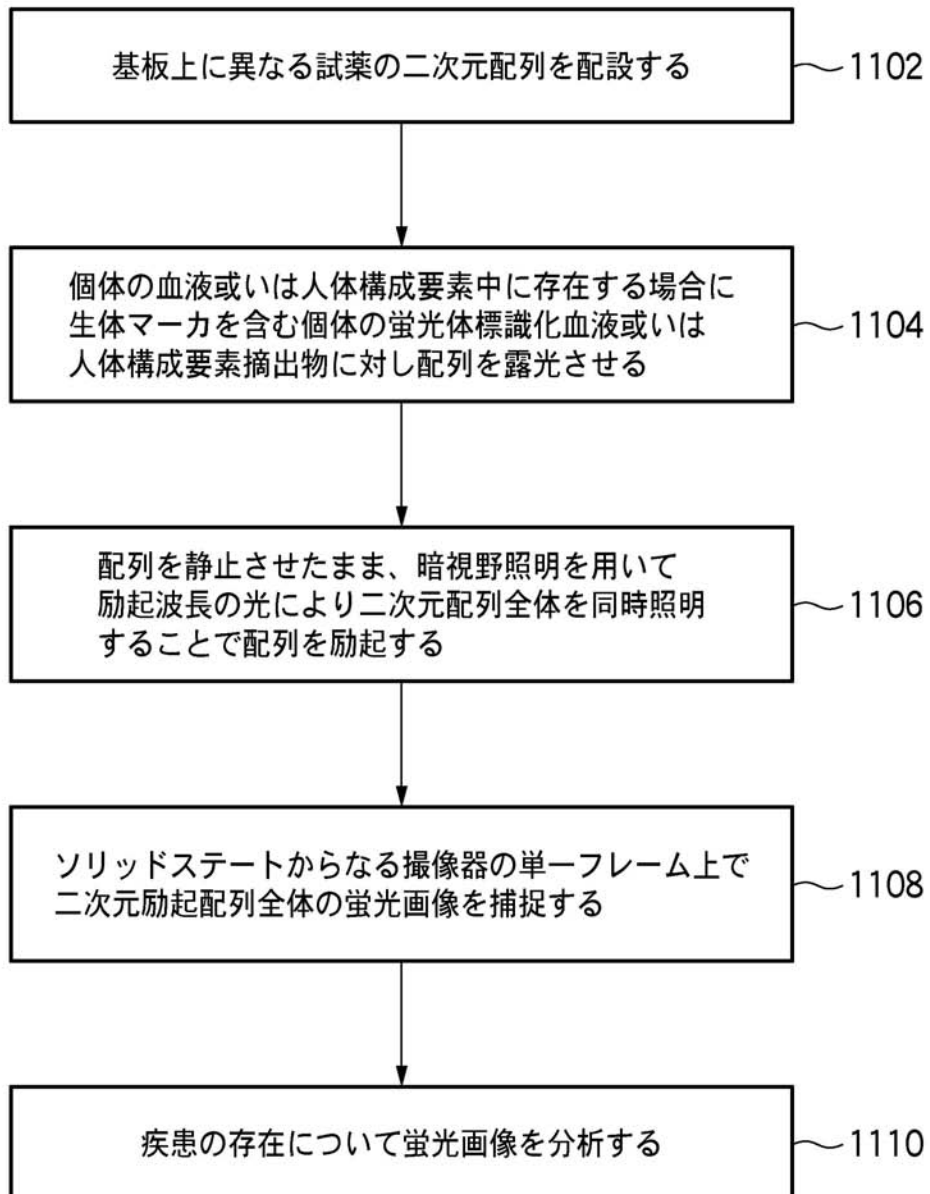
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/25702		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : G01N 33/543 US CL : 436/518 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/518				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EAST				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X ---	US 6,294,136 B1 (SCHWARTZ) 25 September 2001 (25.11.2001), see entire document.	1, 17 -----		
Y		2, 3, 45, 46		
X ---	US 6,294,327 B1 (WALTON et al) 25 September 2001 (25.11.2001), see entire document.	1-2, 17, 45-47, 49 -----		
Y		3, 39-41, 50		
Y	US 6,007,996 A (MCNAMARA et al) 28 December 1999 (28.12.1999), see entire document.	1-3, 17, 39, 45, 46, 49, 50		
Y, E	US 6,573,051 B2 (ALSMADI et al) 03 June 2003 (03.06.2003), see entire document.	45, 46, 49, 50		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 24 February 2004 (24.02.2004)		Date of mailing of the international search report 20 APR 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Nelson Yang <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (703) 308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/25702

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.: 4-16, 18-38, 42-44 and 48
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/25702

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-31, drawn to an array reader.

Group 2, claim(s) 39-50, drawn to a fluorescence reader-based diagnostic method.

The inventions listed as Groups 1-2 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The application contains claims to more than one of the combinations of categories of inventions as set forth by 37 CFR 1.475.

According to 37 CFR 1.475 regarding unity of invention:

(a) An international and a national stage application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept ("requirement of unity of invention"). Where a group of inventions is claimed in an application, the requirement of unity of invention shall be fulfilled only when there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

(b) An international or a national stage application containing claims to different categories of invention will be considered to have unity of invention if the claims are drawn only to one of the following combinations of categories:

- (1) A product and a process specially adapted for the manufacture of said product; or
- (2) A product and a process of use of said product; or
- (3) A product, a process specially adapted for the manufacture of the said product, and a use of the said product; or
- (4) A process and an apparatus or means specifically designed for carrying out the said process; or
- (5) A product, a process specially adapted for the manufacture of the said product, and an apparatus or means specifically designed for carrying out the said process.

If an application contains claims to more or less than one of the combinations of categories of invention set forth in paragraph (b) above, unity of invention might not be present. Furthermore, the determination whether a group of inventions is so linked as to form a single general inventive concept shall be made without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim.

Unity of invention exists only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more special technical features. The term "special technical features" is defined as meaning those technical features that define a contribution which each of the inventions considered as a whole, makes over the prior art. The determination is made based on the contents of the claims as interpreted in light of the description and drawings. In the instant application, Groups 1-2 have differing special technical features:

Group 1 has the special technical feature of an array reader.

Group 2 has the special technical feature reading an array using an array reader.

Furthermore, the special technical feature of the apparatus of group 1 is known in the art as shown by Schwartz [US 6,294,136] for image processing and determining the size of individual nucleic acid molecules. Therefore the inventions do not form a general inventive concept, as they do not share a common special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 1 0 2

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 モンタグ, ジーン, アイ.
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 4 5, ブルックリン, ウォルナット プレイス 7
6

(72)発明者 ウェブ, ロバート, エイチ.
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 7 3, リンカーン, オールド コンコルド ロード
9

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA01 EA01 FA01 FA02 FA06 FA07 GA02
GB03 HA01 HA02 HA05 HA09 JA02 JA03 KA02 KA05 LA03
NA13

【要約の続き】
を用いる。