

(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2019-528450

(P2019-528450A)

(43) 公表日 令和1年10月10日(2019.10.10)

(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 B	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 2 9
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2019-511387 (P2019-511387)	(71) 出願人	500554782
(86) (22) 出願日	平成29年9月6日 (2017.9.6)		ラジオメーター・メディカル・アー・パー
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月25日 (2019.2.25)		・エス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/072290		デンマーク王国デーコーー 2 7 0 0 プラ
(87) 国際公開番号	W02018/050501		ンスホイ, オーカンデウエイ 2 1
(87) 国際公開日	平成30年3月22日 (2018.3.22)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	PA201600533		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成28年9月14日 (2016.9.14)	(74) 代理人	100118902
(33) 優先権主張国・地域又は機関	デンマーク (DK)		弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
		(74) 代理人	100119781
			弁理士 中村 彰吾

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステム及び方法

(57) 【要約】

時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステム (100) が開示される。このシステム (100) は、内部に試料 (99) を受け入れるように適合された試料容積を備える容器 (110) と、パルス励起光 (200) を放出するように適合された光源 (120) と、光源 (120) からパルス励起光 (200) を集光し、該パルス励起光 (200) を容器 (110) 内の試料容積に送出するように適合された照明光学系 (130) と、少なくとも検出スペクトル範囲内の蛍光放射をゲート検出するように適合された検出デバイス (140) と、少なくとも検出スペクトル範囲内で蛍光放射 (210) を容器 (110) から集光し、検出デバイス (140) に該蛍光放射 (210) を送出するように適合された検出光学系 (150) と、励起光 (200) と検出光 (210) とを分離するように構成された光学フィルタ装置 (160) と、を含む。光源 (120) は、355 nm未満の波長でピーク強度放射を有する発光ダイオードである。このシステム (100) は、検出サイクルのタイミングを少なくとも制御するように構成された制御ユニット (

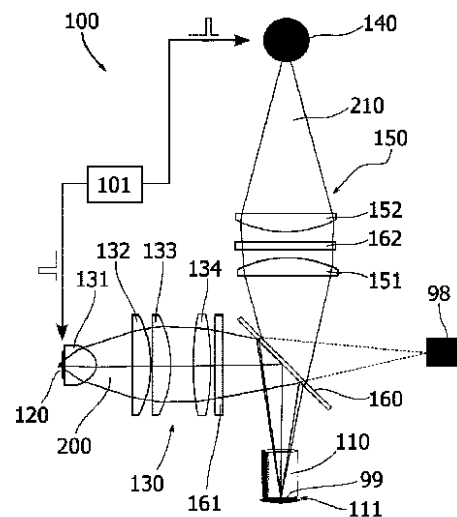


Fig. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

時間分解蛍光イムノアッセイ検出のために適合されたシステムであって、前記システムは、

- 内部に試料を受け入れるように適合された試料容積を備える容器（１１０）と、
 - パルス励起光を放射するように適合された光源（１２０）と、
 - 前記光源から前記パルス励起光を集光し、前記パルス励起光を前記容器内の前記試料容積に送出するように適合された照明光学系（１３０）と、
 - 少なくとも検出スペクトル範囲内の蛍光放射をゲート検出するように適合された検出デバイス（１４０）と、
 - 少なくとも前記検出スペクトル範囲内で蛍光放射を前記容器から集光し、前記検出デバイスに前記蛍光放射を送出するように適合された検出光学系（１５０）と、
 - 励起光と検出光とを分離するように構成された光学フィルタ装置（１６０）と、を有する、システムにおいて、
 - 前記光源（１１０）は、３５５ｎｍ未満の波長でピーク強度放射を有する発光ダイオードであり、
 - 前記システムは、検出サイクルのタイミングを少なくとも制御するように構成された制御ユニット（１０１）を更に備え、
- 前記検出サイクルは、前記発光ダイオードによって放出された励起パルスと、それに続く前記検出デバイスによる蛍光放射の検出のための検出期間とを含み、
- 前記検出期間は、検出遅延によって前記励起パルスから分離されており、
- 前記励起パルスのパルス持続時間は少なくとも１０μｓである、ことを特徴とする、システム。

10

20

【請求項 2】

前記励起パルスの前記パルス持続時間は、少なくとも５０μｓである、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記励起パルスの前記パルス持続時間は、最大５００μｓである、請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記検出遅延は、２００μｓ～６００μｓ、又は好ましくは３００μｓ～５００μｓである、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項 5】

前記検出期間は、１００μｓ～５００μｓである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 6】

前記発光ダイオードは、３５０ｎｍ未満、好ましくは３４５ｎｍ未満の波長でピーク強度放射を有する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 7】

前記発光ダイオードは、少なくとも３２０ｎｍ、又は少なくとも３３０ｎｍの波長でピーク強度放射を有する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のシステム。

40

【請求項 8】

前記容器（１１０）は、マイクロプレート上のウェルである、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 9】

前記照明光学系（１３０）は、前記発光ダイオード（１２０）の画像を前記試料容積の画像面（１１１）上に投影する結像光学系である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 10】

前記画像面（１１１）は、前記容器／ウェル（１１０）の底部面と一致する、請求項 9

50

に記載のシステム。

【請求項 1 1】

時間分解蛍光イムノアッセイ検出のための方法であって、前記方法は、

- ランタニドキレート系蛍光体により試料 (9 9) を免疫染色する工程と、
- 前記試料を励起パルス (1 0 1 0) により照明する工程と、
- 前記励起パルスの終了後に検出遅延 (1 0 2 0) を待機する工程と、
- 検出期間 (1 0 3 0) の間に励起光パルスに応答して、前記試料から放出された蛍光放射を検出する工程と、を含む、方法において、
- 前記励起パルスは、355nm未満の波長でピーク強度放射を有する発光ダイオード (1 2 0) から提供され、
- 前記励起パルスは、少なくとも10μsのパルス持続時間を有する、ことを特徴とする、方法。

10

【請求項 1 2】

前記励起パルスは、少なくとも50μsのパルス持続時間を有する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記検出遅延は、200μs～600μs、又は好ましくは300μs～500μsである、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記検出期間は、100μs～500μsである、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

前記蛍光体は、ユーロピウム系キレートである、請求項 1 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記試料を照明する工程は、免疫染色された試料 (9 9) を乾燥状態で試料面に提供する工程と、照明光学系 (1 3 0) によって、前記発光ダイオードの画像 (1 1 1) を前記試料面に生成する工程と、を含む、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記発光ダイオードは、350nm未満、好ましくは345nm未満の波長でピーク強度放射を有する、請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

前記発光ダイオードは、少なくとも320nm、又は少なくとも330nmの波長でピーク強度放射を有する、請求項 1 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は1つの態様において、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のために適合されたシステムに関する。このシステムは、内部に試料を受け入れるように適合された試料容積を備える容器と、パルス励起光を放射するように適合された光源と、光源からパルス励起光を集光し、該パルス励起光を容器内の試料容積に送出するように適合された照明光学系と、少なくとも検出スペクトル範囲内の蛍光放射をゲート検出するように適合された検出デバイスと、容器から少なくとも検出スペクトル範囲内で蛍光放射を集光し、該蛍光放射を検出デバイスに送出するように適合された検出光学系と、

40

励起光と検出光とを分離するように構成された光学フィルタ装置と、を有する。

【0002】

更なる態様によれば、本発明は、時間分解蛍光イムノアッセイ検出方法に関する。この方法は、ランタニドキレート系蛍光体により試料を免疫染色する工程と、試料を励起パルスにより照明する工程と、励起パルスの終了後に検出遅延を待機する工程と、

検出期間の間に励起光パルスに応答して、試料から放出された蛍光放射を検出する工程

50

と、を含む。

【背景技術】

【0003】

蛍光イムノアッセイは、診断分析において極めて有用で信頼性の高いツールである。単なる例として、トロポニンなどの心臓マーカの濃度を検出し、信頼性をもって測定することは、急性心臓疾患を同定するのに極めて有用である。したがって、このような測定を、高度に特化された精巧な実験室環境で利用できるようにするだけでなく、試料採取から短い所要時間で、診療現場において有用な測定結果を提供する技術が所望される。このような診療現場での装置は、典型的には、誤った測定結果を提供せず、容易に動作可能で信頼性の高いデバイスを必要とする。更に、このような分析のための装置は、専用の実験室に存在するのか、又は診療現場に存在するのかにかかわらず、試料採取、取り扱い、および調製のための標準化された、または少なくとも一般的に使用される実験器具と互換性があることが好ましい。試料採取、試料取り扱い、及び試料調製用の実験器具のための業界標準又は少なくともデファクトスタンダードとの互換性は、装置自体においてもまた重要である。これは、自動化装置内で蛍光イムノアッセイに基づいた測定値を統合するのに適するようにするためである。このことは、自動化機器が複数のパラメータを測定するように適合されている場合にはなおさらである。

10

【0004】

蛍光イムノアッセイは、例えば生物学的試料において関連する（非常に低い）濃度で所定のターゲット物質の存在を検出するのに必要な感度に関して非常に魅力的である。時間分解蛍光は、免疫分析の検出に使用すれば、短寿命のバックグラウンド蛍光を抑制し、高感度を可能にする強力なツールである。これは、長い蛍光寿命を有する高蛍光蛍光体と、これら蛍光体の蛍光寿命よりも著しく短い励起パルスを放射する光源とを用いることによる。短い励起パルスを基準にして数マイクロ秒だけ遅延された時間ゲート蛍光検出は、定常的な測定と比較して信号対雑音比（S/N）の改善を示す。これは、ナノ秒の範囲にある典型的な蛍光寿命のバックグラウンドを低減するからである。長い蛍光寿命を有する多くの蛍光体は、ランタニド系に属する。ユーロピウムはランタノイドイオンであり、そのストークスシフトが大きく、蛍光寿命がマイクロ秒（ μs ）～ミリ秒（ ms ）の期間と長いいため、時間分解蛍光法の装置においてマーカとして使用されている。時間分解検出技術のためのランタニド系蛍光体の励起は、パルスUV光源を必要とする。例えば、ユーロピウムはUV-A領域で励起され、616nmの発光ピークで蛍光を放射する。

20

30

【0005】

しかしながら、上述のように、蛍光イムノアッセイは、有用な診断ツールを提供するために、関連する濃度で所定のターゲット物質の存在を検出するのに必要な感度に関して非常に魅力的である。結果として、検出すべき光信号のスペクトル範囲内で、ノイズとバックグラウンド放射の両方が競合するレベルにおいて極めて低い光信号の検出が要求され、ターゲット蛍光体の効率的な励起も必要である。したがって、キセノンフラッシュランプが、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のための励起源として一般的に使用される。ナノ秒期間におけるそれらの短いパルスの放射が強力だからであり、更に、例えば、光学的バンドパスフィルタを使用して所定の蛍光体に合わせて調整することができる比較的広い帯域発光から得られるそれらのスペクトルが汎用的だからである。しかし、フラッシュランプを使用する場合の主な問題点は、パルス後の数百マイクロ秒に及ぶ長い残光の長い立下りであり、これはバックグラウンド放射の一因となり、S/Nを低減する。代替的な励起光源として窒素レーザーが使用されてきたが、それらは嵩張り、高価であり、低い反復周波数で動作する。最近では、UV LEDが、蛍光マーカの時間分解励起のための光源として登場した。しかしながら、このようなUV LEDは低電力の評価に悩まされ、比較的濃度の高い蛍光体マーカが存在する用途においてのみ成功しており、したがって、例えば、蛍光体の蛍光寿命の顕微鏡画像又は直接的測定に関連して、豊富な信号が利用可能である用途においてのみ成功している。

40

【0006】

50

このため、自動化された分析装置における実現と互換性があるように時間分解蛍光イムノアッセイ検出を改善する必要がある。

【 0 0 0 7 】

したがって、本発明の目的は、上述の欠点の少なくとも一部を克服する、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のための改善された又は少なくとも代替のシステム及び方法を提供することである。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本願発明の一実施例は、例えば、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステム及び方法に関する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明の第 1 の態様は、時間分解蛍光イムノアッセイ検出に適合されたシステムに関する。このシステムは、

- 内部に試料を受け入れるように適合された試料容積を備える容器と、
- パルス励起光を放射するように適合された光源と、
- 光源からパルス励起光を集光し、該パルス励起光を容器内の試料容積に送出するように適合された照明光学系と、
- 少なくとも検出スペクトル範囲内の蛍光放射をゲート検出するように適合された検出デバイスと、

- 少なくとも検出スペクトル範囲内の蛍光放射を容器から集光し、検出デバイスに該蛍光放射を送出するように適合された検出光学系と、

- 励起光と検出光とを分離するように構成された光学フィルタ装置と、を有し、

- 光源は、355 nm 未満の波長でピーク強度放射を有する発光ダイオードであり、

- システムは、検出サイクルのタイミングを少なくとも制御するように構成された制御ユニットを更に備え、

検出サイクルは、発光ダイオードによって放出された励起パルスと、これに続く検出デバイスによる蛍光放射の検出のための検出期間とを含み、

検出期間は、検出遅延によって励起パルスから分離されており、

- 励起パルスのパルス持続時間は少なくとも 50 μ s である。

【 0 0 1 0 】

これまで、本発明者らが知る限りでは、UV LED をパルス励起源として使用した時間分解蛍光イムノアッセイ検出の成功実現例は報告されていない。これは、UV 放射帯域用の発光ダイオードが、例えばフラッシュランプと比較して周知のように低いピーク出力を有するからである。このような低い出力は、十分な総パルスエネルギー、すなわちフラッシュランプによって提供されるものと少なくとも同等の総パルスエネルギーを達成するために、非常に長いパルスを必要とする。一方、非常に長い励起パルスは励起効率に強く影響を与える。本発明の驚くべき洞察は、励起パルスエネルギーの合計と励起効率とのこのような均衡を、そのような LED によって放射される非常に低いピーク出力にもかかわらず、355 nm 未満のピーク強度放射波長を有する LED を使用して、実際に打撃できることである。更なるステップで驚くことには、蛍光体の蛍光寿命と同等のミリ秒期間のパルス持続時間が、時間分解蛍光イムノアッセイ検出システムにおいて信頼性のある励起を達成できることが発見された。そして、時間分解蛍光イムノアッセイ検出システムに基づくフラッシュランプと比較して、信号対雑音比の改善さえも達成することができる。更に驚くべきことに、ランタニド系蛍光体、特にユーロピウム系 (Eu-III) 蛍光体を使用すれば、355 nm 未満の波長でピーク強度放射を有する LED を、少なくとも 10 μ s、好ましくは少なくとも 50 μ s のパルス持続時間、好ましくは 500 μ s 未満のパルス持続時間で用いることにより、時間分解蛍光イムノアッセイ検出システムは、非常に良好な結果が達成されることが発見された。これは、このような波長期間の UV LED

は、前に述べたように低出力であることが周知であるため、特に驚くものである。パルス持続時間の下限は、十分な総パルスエネルギーを達成することを考慮することによって規定されるが、パルス持続時間の上限は、十分な励起効率を達成することを考慮することによって規定される。更に好ましくは、355nm未満の波長でピーク強度放射を有するUV LEDのパルス持続時間を100μs~400μsの間で選択することにより、総パルスエネルギーと励起効率の均衡が更に最適化される。

【0011】

最も好ましくは、LED励起パルスのそれぞれは、容器に送出される最小パルスエネルギーを有し、この最小パルスエネルギーは、少なくとも2μJ、少なくとも5μJ、又は更には少なくとも10μJである。試料に適時に送出されるこのような最小パルスエネルギーは、蛍光イムノアッセイ検出の非常に低い信号レベルに対して有用な信号対雑音比を達成するための十分な励起を達成するための必要条件である。

10

【0012】

上述したように、いくつかの実施形態による時間分解蛍光イムノアッセイ検出システムは、容器、光源、照明光学系、検出デバイス、検出光学系、光学フィルタ装置、及び制御ユニットを含む。容器は、免疫染色された試料を受け入れるためのものであり、免疫染色はランタニド系キレート蛍光体として使用して行われる。好ましくは、蛍光体はユーロピウム系である。動作中、光源は、パルス励起光を発生し、この励起光は照明光学系によって集光され、内容積または空洞内の試料容積あるいは容器の底部に調製され配置された染色試料に送出される。励起光パルスによるパルス励起にตอบสนองして、免疫染色された試料中の蛍光マーカ分子は、励起波長(ストークスシフト)よりも波長の長い特徴的なスペクトル放射特性を有する蛍光放射を放出し、励起光と蛍光放射とをスペクトル的に区別することができる。したがって励起光および蛍光放射は、光学フィルタ装置、例えばダイクロイックフィルタセットを使用して互いに分離される。検出光学系は、容器内の試料により放出された少なくとも検出スペクトル範囲内の蛍光放射を集光し、該蛍光放射を、検出スペクトル範囲内の蛍光放射を検出するように適合された検出デバイスに送出する。

20

【0013】

パルス励起した後、蛍光放射の放出は、特徴的寿命時間により減衰する。多くのバックグラウンド放射の特徴的寿命時間は、ランタニド系キレート蛍光体、特に、ユーロピウム系キレート蛍光体からの放射よりもはるかに速い速度で減衰する。これによりバックグラウンド蛍光と免疫染色された試料から由来する所望の信号蛍光放射とを、ゲート検出によって適時に分離することができる。したがって、検出のタイミングは、検出サイクルに従って制御ユニットにより管理される。制御ユニットは、励起フェーズと、これに続く検出期間を含む検出サイクルのタイミングを制御するように構成されている。この検出期間は、励起フェーズから検出遅延だけ離れている。励起フェーズは、励起光源、ここではLEDが励起光を放射し始める時(すなわち、励起フェーズの立ち上がり縁)に開始し、制御ユニットによって制御されるパルス持続時間後に終了する。検出遅延は、励振フェーズの終了時に開始し、蛍光放射のゲート検出の開始時に終了する。蛍光放射のゲート検出の開始は、測定窓の開始をマークする。この測定窓は、ゲート検出の終了によって決定される検出期間の満了後に閉じる。このようにして測定は、予め決められた反復周波数で典型的に提供される励起パルスのパルス列から周期的に取得される。検出後遅延は、検出期間の終了(すなわち、測定窓の閉鎖)と新たな後続の励起パルスの開始との間の時間間隔を特定することができる。したがって検出サイクル全体の長さは、後続の検出サイクルにおける対応のポイント間の時間的距離によって定義される。例えば、第1の励起パルスの立ち上がりエッジから第2の後続のパルスの立ち上がりエッジまでに経過する時間である。典型的には、励起パルスは、パルス持続時間、検出遅延、検出期間、及び検出後遅延の和によって決定される所定の周波数で周期的に送出される。

30

40

【0014】

有利には、検出サイクルは、数ミリ秒のオーダであり、例えば、少なくとも1ms、好ましくは少なくとも2ms、又は少なくとも3ms、又は少なくとも4ms、又は少なく

50

とも 6 ms 、又は更には少なくとも 8 ms である。したがって励起パルスは、 $10\text{ Hz} \sim 1\text{ kHz}$ の間、または $50\text{ Hz} \sim 500\text{ Hz}$ の間、または 100 Hz と 400 Hz の間の範囲の所定の周波数で発射してもよい。所与の検出遅延及び検出期間に対して、検出サイクルがより長いことは、より長い検出後遅延を意味する。より長い検出後遅延は、後続の励起パルスが発射される前に長寿命のバックグランド蛍光が十分に減衰することができるという利点を有し、これにより信号対雑音比を更に向上させる。適切なタイミングを達成するために、制御ユニットは、励起パルスに関連して、検出サイクルのために選択された遅延に従ってゲート検出をトリガ/同期する。

【0015】

検出サイクルの長さに対する上限、ひいては検出後遅延の長さに対する上限は、所定の時間内に可及的に多くの信頼できる測定が蓄積されるものであることが望ましいことを述べておく。すなわち、所定の時間内で可及的に多くの可能な検出サイクルを実行できるものであることが望ましい。このような所定の時間は、例えば、信頼できる結果がシステムによって提供される前に指定された総測定時間によって決定することができる。

【0016】

蛍光イムノアッセイ検出を伴う測定の大多数は、信号対雑音比により決定された検出感度限界で実行されるが、例えば特定の病理学的状態の患者からの試料においては生物学的マーカの濃度が非常に高いため、非常に高い信号レベルが稀に発生することがある。検出感度限界に近接する極端に小さな蛍光放射信号を収集することができるようにするため、検出装置は非常に高い感度に合わせて用意されるので、マーカのそのような高濃度は検出装置を飽和させる信号レベルにつながり、又は少なくとも検出出力の非線形挙動につながる場合がある。フラッシュランプベースの励起システムをLEDベースの励起システムと置き換える本システムは、これにより励起パルスエネルギーの調整を容易に行うことができるので、ここでは特に有利である。結果として、試料中の蛍光マーカの濃度が特に上昇している稀な場合、検出デバイスを線形状態に維持するために、LED励起パルスのパルスエネルギーを容易に低減することができる。したがってLEDベースの励起を使用するシステムは、信号レベルのダイナミックレンジの向上を達成し、この信号レベルは、フラッシュランプベースのシステムと比較して所与のシステムにより取り扱うことができる。

【0017】

有利には、システムは、データプロセッサを更に含むことができる。このデータプロセッサは、検出ユニットによって検出された蛍光放射を表す、検出ユニットから受信された出力信号を収集し、処理するように適合されている。

【0018】

有利には、いくつかの実施形態によれば、発光ダイオードのピーク放射強度は $320\text{ nm} \sim 355\text{ nm}$ の間、更に有利には $330\text{ nm} \sim 350\text{ nm}$ の間である。更に有利には、いくつかの実施形態によれば、発光ダイオードは、半値全幅 (FWHM) が $10\text{ nm} \sim 20\text{ nm}$ であるスペクトル放射を有する。これによりランタニド系キレート蛍光体、特にユーロピウム系キレート蛍光体との良好なスペクトルの重なり合いが実現される。

【0019】

更に、システムの一実施形態によれば、励起パルスのパルス持続時間は、最大 $500\text{ }\mu\text{s}$ である。更に、システムの一実施形態によれば、励起パルスのパルス持続時間は、最大 $400\text{ }\mu\text{s}$ である。更に有利には、いくつかの実施形態によれば、励起パルスのパルス持続時間は、少なくとも $100\text{ }\mu\text{s}$ であり、最大で $300\text{ }\mu\text{s}$ である。このパルス持続時間の選択により、上記ランタニド系キレート系蛍光体の蛍光寿命と励起パルス持続時間とを両立させて励起効率を最適化し、驚くほど良好な信号対雑音比が達成される。上記のように、最も好ましくは、LED励起パルスのそれぞれは、容器に送出される最小パルスエネルギーを有し、この最小パルスエネルギーは、少なくとも $3\text{ }\mu\text{J}$ 、少なくとも $5\text{ }\mu\text{J}$ 、又は更には少なくとも $10\text{ }\mu\text{J}$ である。試料に適時に送出されるこのような最小パルスエネルギーは、蛍光イムノアッセイ検出の非常に低い信号レベルに対して有用な信号対雑音比を達成するための十分な励起を達成するための必要条件である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

更に、システムの一実施形態によれば、検出遅延は、 $200\mu s \sim 600\mu s$ 、又は好ましくは $300\mu s \sim 500\mu s$ である。検出遅延をこのように選択することにより、特に検出期間の長さに対する上方及び下方の特定された範囲との組み合わせで驚くほど良好なS N Rが達成される。これらの範囲から選択される検出遅延は、免疫染色蛍光体の寿命に応じた減衰を考慮して短寿命のバックグランド蛍光と、長寿命のバックグランド蛍光との間のS N Rを最適化する。したがって遅延は、適切な信号レベルを維持するために、短寿命のバックグランドは減衰するが、それでも蛍光体の寿命が許容する範囲を超えないように十分に長く選択される。

【 0 0 2 1 】

更に、システムの一実施形態によれば、検出期間は $100\mu s \sim 500\mu s$ である。検出期間の長さをこのように選択することにより信号を蓄積することができるが、この検出期間は、S N Rに影響を与える長寿命のバックグランド蛍光からの関与を回避するために過度に長くはならない。これは、長寿命のバックグランド蛍光と比較したランタニド系蛍光体の信号減衰のためである。

【 0 0 2 2 】

更に、システムの一実施形態によれば、容器はウェルである。ウェルは、マイクロプレートから知られるウェルのタイプと同様である。

【 0 0 2 3 】

有利には、受器は、いわゆるマイクロプレート内のウェルである。更に有利には、マイクロプレートは、規格ANSI / SLAS 1 - 2004からANSI / SLAS 4 - 2004を次のように満たす。ANSI / SLAS 1 - 2004：マイクロプレート - フットプリント寸法；ANSI / SLAS 2 - 2004：マイクロプレート - 高さ寸法；ANSI / SLAS 3 - 2004：マイクロプレート - 底部外側フランジ寸法；及び/またはANSI / SLAS 4 - 2004：マイクロプレート - ウェル位置。更に有利には、マイクロプレートは、規格ANSI / SLAS 6 - 2012：マイクロプレート - ウェル底部高さを満たす。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用される用語「マイクロプレート」とは、小試験管として用いられる複数の「ウェル」を備える平板を指す。蛍光イムノアッセイ検出のための容器としてマイクロプレートウェルを使用することの利点は、マイクロプレート（「マイクロタイタープレート」、「マイクロウェルプレート」、又は「マルチウェルプレート」としても知られる）は、分析研究及び臨床診断試験、例えば、試料採取、取り扱い、及び調製に広く使用されているツールであることである。したがってマイクロプレートのウェルを容器として使用するように構成された蛍光イムノアッセイ検出システムは、実験室用機器の共通の自動化デザインと両立するので、これにより自動化された分析装置での組み込み / 実現が促進される。

【 0 0 2 5 】

しかしながら、マイクロプレートウェルに対する蛍光イムノアッセイのこのような適応は、例えば、規格又は類似の適合性制約によって規定されるウェル自体の幾何学的形状によって光学的アクセスが制限されるという事実により、光学的構成に更なる課題を持ち込む。更に、例えば、容器にアクセスする装置の他の構成要素の空間的要件により、更なる課題が生じ得る。

【 0 0 2 6 】

更に、システムの一実施形態によれば、照明光学系は、試料容積内の画像面上に発光ダイオードの画像を投影する結像光学系である。したがって、照明光学系は、照明源の像を試料と重なる画像面に投影するように構成されている。これにより、上記の課題を光学的構成に合わせることができ、既存の分析装置、特に自動分析装置と蛍光イムノアッセイ検出システムとの統合及び/又は互換性を促進することができる。

【 0 0 2 7 】

更に、本システムの一実施形態によれば、画像面は、容器／ウェルの底面と一致する。この構成は、容器／ウェルの底部に位置する乾燥した蛍光免疫染色試料に関連して特に有用である。乾燥した蛍光免疫染色試料は、例えば、液体試料に発生し得る蛍光体に対する非蛍光減衰経路を回避するために調製され、これにより蛍光体の量子効率を高めることができる。

【0028】

有利には、システムの一実施形態によれば、励起結像光学系は、50mm超の画像側焦点距離、及び0.4未満の画像側開口数、あるいは択一的に60mm超の画像側焦点距離、及び0.3未満の画像側開口数を有する。これにより、励起光学系と所与の試料面との間の最小間隔が機械的に制約されても、試料容積における試料の遠隔励起を可能にする光学的設計が達成される。

10

【0029】

更に有利には、照明光学系は、発光ダイオードから容器に、すなわち試料に送出される総エネルギーを最大にするために、所定の画像側開口数の機械的制約の下で、集光効率に対して倍率を均衡させることによって最適化される。これらの考察及び発光ダイオードは平面ランバート放射体として記述できるという想定に基づいて、市販の光線追跡ソフトウェアを最適化の実行のために使用することができる。

【0030】

本発明の第2の態様は、時間分解蛍光イムノアッセイ検出方法に関する。この方法は、
- ランタニドキレート系蛍光体により試料を免疫染色する工程と、
- 試料を励起パルスにより照明する工程と、
- 励起パルスの終了後に検出遅延を待機する工程と、
- 検出期間の間に励起光パルスに応答して、試料から放出された蛍光放射を検出する工程とを備え、

20

励起パルスは、355nm未満の波長でピーク強度放射を有する発光ダイオードから提供され、励起パルスは少なくとも50μsのパルス持続時間を有する。

【0031】

更に、本方法の一実施形態によれば、蛍光体は、ユーロピウム系キレートである。ユーロピウム系キレート蛍光体の寿命は、励起パルス、検出遅延、検出期間、検出後遅延および／または検出サイクルに対して上に特定された所定範囲による時間分解蛍光イムノアッセイ検出に特に良く適合されている。更に、ユーロピウム系キレート蛍光体は、UV-A帯域での励起、特に320nm～最大355nmまでのUV-A帯域の範囲で満足のいく蛍光応答を提供する。

30

【0032】

更に本方法の一実施形態によれば、試料を照明する工程は、免疫染色された試料を乾燥状態で試料面に提供する工程と、照明光学系によって、試料面に発光ダイオードの画像を生成する工程と、を含む。

【0033】

有利には、いくつかの実施形態によれば、励起パルスは、少なくとも100μs、及び／又は最大400μs、又は更には最大500μsの持続時間を有する。

40

【0034】

有利には、いくつかの実施形態によれば、発光ダイオードは、少なくとも350nm、又は少なくとも345nmの波長でピーク強度放射を有する。

【0035】

有利には、いくつかの実施形態によれば、発光ダイオードは、少なくとも320nm、又は少なくとも330nmの波長でピーク強度放射を有する。

【0036】

有利には、一実施形態によれば、蛍光放射を検出する工程は、検出光学系によって、励起光パルスに応答して試料から放出された蛍光放射を集光する工程と、集光した蛍光放射を検出装置に送出する工程とを含む。

50

【 0 0 3 7 】

時間分解蛍光イムノアッセイ検出のための方法の上記の実施形態により、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステムに関して上述した実施形態によって達成されるのと同じ又は類似の利点が達成される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 8 】

本発明の好ましい実施形態を、概略的に示された添付図面に関連してより詳細に説明する。

【 図 1 】 本発明の一実施形態による、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステムを示す図である。

【 図 2 】 図 1 の実施形態による照明光学系を示す図である。

【 図 3 (a) 】 照明光学系の画像面に形成された励起光源の画像を示す図である。

【 図 3 (b) 】 x 方向及び y 方向に沿った対応する断面正規化強度分布を示す図であり、シミュレートされた L E D (図 3) 、実験的 L E D (図 4) 、及び実験的キセノン閃光ランプアーケ (図 5) である。

【 図 4 (a) 】 照明光学系の画像面に形成された励起光源の画像を示す図である。

【 図 4 (b) 】 x 方向及び y 方向に沿った対応する断面正規化強度分布を示す図であり、シミュレートされた L E D (図 3) 、実験的 L E D (図 4) 、及び実験的キセノン閃光ランプアーケ (図 5) である。

【 図 5 (a) 】 照明光学系の画像面に形成された励起光源の画像を示す図である。

【 図 5 (b) 】 x 方向及び y 方向に沿った対応する断面正規化強度分布を示す図であり、シミュレートされた L E D (図 3) 、実験的 L E D (図 4) 、及び実験的キセノン閃光ランプアーケ (図 5) である。

【 図 6 】 ユーロピウム系キレート蛍光体 (キレート) 、発光ダイオード (L E D) 、及びバンドパスフィルタリングされたフラッシュランプ (D U G 1 1) のスペクトル特性の線図である。

【 図 7 】 L E D 電流の関数として、図 6 の L E D によって放出されたパルスエネルギーの線図である。

【 図 8 】 フィールドプログラマブルゲートアレイ (F P G A) からのトリガパルス、F P G A によって制御されるパルス発生器 (P G) からのトリガパルス、L E D 回路 (I) に生じる電流、及び L E D 出力電力パルス (O) を表す信号を上から下に、時間の関数として示す複合線図である。

【 図 9 】 キセノンフラッシュランプの出力を時間に依存して示す線図である。

【 図 1 0 】 2 つの異なる励起パルスに関して、励起された蛍光体分子の数について算出された曲線を備える検出サイクルの線図である。

【 図 1 1 】 2 つの異なる励起パルスに関して、励起パルスの終了直後に励起された蛍光体分子の算出された数の線図である。

【 図 1 2 】 バックグランドカウントへの異なる寄与度の反復測定の線図である。

【 図 1 3 】 3 つの異なる励起モードに関して、バックグランドカウントへの 4 つの異なる寄与を分解した線図である。

【 図 1 4 】 目標濃度が既知の溶液から誘導された試料を含む 1 5 回の反復試験と、ブランク容器の 1 5 回の反復試験に対する蛍光応答を示す線図である。

【 図 1 5 】 励起パルスエネルギー (L E D 電流) の関数としての信号対雑音比の線図である。

【 図 1 6 】 ブランク容器及び空容器からの、L E D 電流の関数としてのバックグランドカウントの線図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 9 】

以下では、340nm にピーク放射を有する発光ダイオードを使用した時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステム 100 の一実施形態について詳細に論じる。このシス

10

20

30

40

50

テム 100 は、光学系と容器 110 との間の最小距離に対して機械的制約を有する自動化機械において標準マイクロプレート容器 110 と共に使用するのに適している。以下では、用語「容器」110 及び「試験カップ」、又は単に「カップ」という用語は、互換的に使用される。更に、本発明の一実施形態に係る 340 nm 発光ダイオードによる励起に基づくシステムと、キセノンフラッシュランプを用いたシステムとを比較する比較研究のデータが提示される。キセノンフラッシュランプは、従来技術で一般的に使用される形式のものである。励起光学系は、ランベルト放射特性を備える $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 正方形の放出面の LED チップにより放出される光の 80 % までを集光するように設計されている。容器（カップ）内に形成された LED 画像は、 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ の大きさであり、これは比較に使用されるキセノンフラッシュランプの画像よりも 3 倍大きい。LED は、200 μs のパルス幅により 370 mA で作動され、これらの動作パラメータにおいて、LED はキセノンフラッシュランプと同じエネルギーを送出する。ユーロビウム系キレートの LED 励起の時間的、スペクトルの及び空間的特性が調査され、以下に考察する。

10

【0040】

図 1 および図 2 を参照して、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のためのシステム 100 の光学系を説明する。光学系は、反射型蛍光システムであり、照明光学系 130 によって提供される励起光路及び検出光学系 150 によって提供される検出光路を有する 2 つのサブシステムを含み、二色性ビームスプリッタ 160 が、励起光路と検出光路とを分離する。

20

【0041】

照明光学系 130 の第 1 のサブシステムでは、発光ダイオード 120 (LED) からの光を集光する。この発光ダイオードは、焦点距離 8 mm と 0.63 の開口数 (NA) を備える非球面レンズ 131 により面積 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ のランバート放射体と見なされる。焦点距離 60 mm の次の 2 つの平凸レンズ 132、133 及び焦点距離 67 mm の両凸レンズ 134 が、画像を 65 m 遠方に形成する。照明光学系 130 のすべてのレンズ 131、132、133、134 は、UV グレードの溶融シリカから作製され、UV 領域で高い透過率を保証し、レンズ材料の自家蛍光を最小化する。照明光学系サブシステム 130 の倍率は 5 であり、物体及び画像側の開口数によって制限される。画像が試験カップ 110 の底部に形成され、試験カップはポリスチレンから作製され、UV 吸収である。カップ底部は直径 6.7 mm であり、カップ 110 の周壁は 10.6 mm の高さであり、したがって、中心点に対する画像側開口数 (NA) を 0.3 の値又は 17.5 度に制限する。照明光学系サブシステム 130 は、最大集光効率が 80 % に達するように設計されている。システム倍率を低減するために、第 1 のレンズ 131 は、より大きな焦点距離、したがってより小さい物体側の NA を有する必要があるか、又は最後のレンズ 134 は、より短い焦点距離を有する必要がある、したがってより大きい画像側の NA を有する必要がある。第 1 の選択肢は、集光効率を低下させる。試験カップの許容角度が小さいこと、及びビームスプリッター 160 と試験カップ 110 との間の最小距離の機械的要件は、第 2 の選択肢を実行不可能にする。したがって、倍率および集光効率との間にトレードオフがある。励起光 200 が、照明光学系 130 によって容器 110 内に位置する蛍光染色された試料 99 に送出されると、これは、励起に応答して蛍光体からの蛍光放射 210 の放出を引き起こす。二色性ビームスプリッタ 160 は、励起光路 200 と検出光路 210 とを分離する。放出された蛍光光 210 は、1:1 の倍率の配置された 2 つの非球面 PMMA レンズ 151、152 によって集光され、光電子増倍管 140 (PMT) のフォトカソードに集束される。 $8 \times 24 \text{ mm}^2$ のフォトカソード有効面積を備える PMT が光子計数モードにおいて使用される。励起サブシステム及び検出サブシステム 130、150 内にそれぞれ配置された 2 つのバンドパスフィルタ 161、162 は、放出された蛍光光 210 のみが検出器 140 に到達することを確実にする。基準フォトダイオード 98 は励起光 200 の強度をモニタするために使用される。

30

40

【0042】

図 3 ~ 5 を参照すると、照明光学系の画像面内に形成された励起光源の画像が特徴付け

50

られている。図 3 a は、 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ の寸法を有する平坦な正方形 L E D のシミュレートされた画像を示す。光源 (L E D) の画像は、市販の光線追跡ソフトウェアを使用して得られた。画像は、面積 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ 内にパワーの 90 % が取り囲まれた正方形の形状である。図 4 a は、 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ の寸法を有する平坦な正方形の L E D の実験的画像を示す。この実験的画像は、容器の底部に生成され、カメラを用いて得られた。L E D の実験的画像は、 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ の寸法を有する正方形であり、カメラのダイナミックレンジが制限されているため、低強度減衰エッジが見えない。図 5 a は、キセノンフラッシュランプアーキの実験的画像を容器の底部に示す。この画像は、同じカメラを用いて得られた。図 3 b、4 b、及び 5 b は、それぞれ、図 3 a、4 a、および 5 a の画像から取り込まれた画像面における x 方向および y 方向に沿った対応する断面正規化強度分布を示す。フラッシュランプアーキの画像は $2 \times 4 \text{ mm}^2$ であり、したがって、カップ底部面積の 71 % を覆う 4 重対称 L E D 画像の 1 / 3 である照明面積を覆う。照明光学系の画像面は、容器の試料容積内に配置されている。平面試料の場合、画像面は、好ましくは、平面試料が位置する容器内の試料面と一致するように、例えば、容器 110 の底部にある乾燥試料に対して配置されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

図 6 ~ 11 を参照すると、免疫染色された試料におけるランタニド系蛍光体の励起が詳細に記述される。時間分解蛍光分光法に基づく検出システムでは、試料は励起パルスの形態の励起光により照射される。励起パルスの光は試料中の蛍光体分子によって吸収され、これにより複数の蛍光体分子が励起状態にもたらされる。この励起状態から蛍光体分子は、蛍光放射を放出することによって、蛍光体の特性により決定される寿命で緩和することができる。放出された蛍光放射は、照明励起光からスペクトル的に分離され、集光され、検出器に送出され、そこで測定される。ランタニド系キレートは、数百マイクロ秒 (μs) ~ 数ミリ秒 (ms) まで範囲の典型的な寿命を有する。

【 0 0 4 4 】

励起システムのスペクトル特性を図 6 に示す。「キレート」と標識された曲線は、ランタニド系キレート蛍光体の励起スペクトル 610 の例を提供する。本明細書に示される特定の蛍光体は、トロポニン - I 心臓マーカのための Radiometer Turku 社、Finland のユーロピウム系キレート「a - Gal TEKES」であり、以下、「TnIキレート」とも呼ぶ。TnIキレートの励起スペクトル 610 は、325 nm にピークを有し、64 nm の半値全幅 (FWHM) を備える。励起スペクトル 610 は、その最大値に正規化されている。異なるキレートは、ピーク波長が変化する僅かに異なる励起スペクトルを有することがあることに注意されたい。したがって、アッセイの性能は、L E D などの狭帯域光源を使用する場合に変化する。「L E D」と標識された曲線は、発光ダイオードの放射スペクトル 620 の例を提供する。放射スペクトル 620 も、その最大値に正規化されている。L E D 放射スペクトル 620 は、10 nm の FWHM で 343 nm を中心とする。パルスモードで L E D 電流を 100 mA ~ 1 A に増大しても、ピーク波長の視覚的シフトは観察されなかった。ここで使用される特定の L E D 放射スペクトル 620 の分析は、正規化された L E D 放射照度が対数スケールで、372 nm と 404 nm においてはピーク放射の 1 % と 0.1 % にそれぞれ低下することを示す。「UG11 1 mm」と標識された曲線は、キセノンフラッシュランプベースの照明システムとの組み合わせで共通に使用されるバンドパス光学フィルタの透過スペクトル特性、特に、Schott 社の 1 mm 厚の DUG11 フィルタの透過スペクトルを提供する (Schott 社オンラインライブラリ) (実際には、我々は厚さ 2 mm のフィルタを使用するが、これはおそらく重要ではなく、これについて何かを行うには遅すぎる)。Schott 社の DUG11 フィルタは、フラッシュランプスペクトルの 110 nm 窓をフィルタリング除去する。したがって、「UG11 1 mm」と標識された曲線は、広帯域キセノンフラッシュランプベースの照明システムの放射スペクトル 630 を示す。L E D 放射スペクトル 620 は、パルスエネルギーが一定であると仮定すれば、フラッシュランプ照明スペクトル 630 よりもキレート励起スペクトル 610 と 19 % 大きく重なっている。

【 0 0 4 5 】

図 7 は、容器に送出することのできるパルスエネルギーを示す線図である。720 (LED) と標識されたデータセットは、励起パルスエネルギーを LED 電流の関数として示す。この LED 電流は、パルス持続時間が $200 \mu s$ 、デューティ比が 0.05 の励起パルスを使用する場合に、LED により容器に送出される。キセノンフラッシュランプベースの照明システムは、実線 730 によって示されるように、パルス毎に $5 \mu J$ を試料に送出する。370 mA の電流において、LED から送出される励起パルスエネルギーは、キセノンフラッシュランプベースのく照明システムと同等である。オーバードライブすることにより LED は、1.5 A の電流で最大 $15 \mu J$ を送出することができる。これは、データシートに指定された 500 mA の最大注入電流の 3 倍である。

10

【 0 0 4 6 】

図 8 と図 9 は、LED 及びキセノンフラッシュランプによりそれぞれ発生されたパルスの時間特性を示す。図 8 は、フィールドプログラマブルゲートアレイ (FPGA) からのトリガパルス 810、FPGA によって制御されるパルス発生器 (PG) からのトリガパルス 820、LED 回路 (I) に生じる LED 電流パルス 830、LED 出力パルス 840 (O) を表す信号を時間の関数として (上から下に) 示す複合線図である。LED 出力は、例えば図 1 に示すようにフォトダイオード 98 を用いてセットアップにおいて監視することができる。LED 出力 840 は、LED 電流 830 によって決定される。LED 出力パルス 840 は、立ち上がりエッジ 841、出力が実質的に一定のプラトー領域 842、及び立ち下がりエッジ 843 を有する箱形の形状である。第 1 の立ち上がりエッジ 841 と最後の立ち下がりエッジ 843 との間の持続時間は、パルス持続時間と呼ばれる。LED は、検出計数システムに同期した LED ドライバによって制御される。Thorlabs 社から市販のドライバを使用した。FPGA は、励起及び検出システムの両方をトリガパルストレインにより制御する。トリガパルストレインは、パルス発生器 (PG) を通して LED ドライバに至り、LED がスイッチオンされる。LED パルスの持続時間は $200 \mu s$ であり、これは、フラッシュランプのパルス持続時間 $200 ns$ よりも 3 桁長い大きさである。図 9 および下記参照。LED パルスの持続時間は蛍光体寿命より短くなければならず、同時に十分な数の蛍光体分子を励起状態にもたらし、検出可能な光信号を発生させるために、十分な励起エネルギーを送出する。ここで使用されるドライバ回路は、最小パルス幅が約 $5 \mu s$ である。しかしながら、必要ならば、特殊なドライバ回路を用いて、より短いパルス持続時間を達成することができる。トリガパルス 810 と LED 電流 830 との間に $8 \mu s$ の遅延が観測された。LED パルスの立ち下がり時間は、 $3 \mu s$ 未満である。図 9 は、キセノンフラッシュランプの照明システムの出力を時間に依存して示す線図である。フラッシュランプは、 $200 ns$ のパルス持続時間及び $400 ns$ の降下時間 (90% ~ 10%) を有する。

20

30

【 0 0 4 7 】

図 10 と図 11 を参照して、励起された蛍光体分子の数に対するパルス持続時間および蛍光寿命の作用を論議する。上述のように、励起のタイミングと検出サイクルに対して有用な範囲を特定するためには、特に LED 励起パルスのパルス持続時間に対する有用な範囲を決定するためには、この関係の関連性を理解することが重要である。上述したように、非常に長い LED パルス持続時間は、キレートの励起効率に影響を与える。LED パルス持続時間は、ランタニド系キレート蛍光体の蛍光寿命と同等であり、これは数百マイクロ秒の範囲にある。一方、フラッシュランプパルスは数百ナノ秒の範囲である。第 1 のケースにおいて、以下に詳細に述べるように、励起分子の数は小さい。励起分子 N の数は、以下のレート式に従う。

40

【 0 0 4 8 】

【数 1】

$$\frac{dN}{dt} = \alpha \cdot P(t) - k \cdot N \quad , \quad (1)$$

式中、 $P(t)$ は励起パルスのピーク出力； k は、蛍光体の速度定数（蛍光寿命 τ に反比例する）である。励起パルスがスイッチオフされた場合の分子数 N_0 は、

【0049】

【数 2】

10

$$N_0 = \alpha \cdot \frac{P(t)}{k} \{1 - \exp(-k \cdot \tau_p)\} \quad , \quad (2)$$

である。

【0050】

励起分子の減衰は以下の通りである。

【0051】

【数 3】

20

$$N(t) = \alpha \cdot P(t) \cdot \tau \{1 - \exp(-\frac{\tau_p}{\tau})\} \cdot \exp(-\frac{t}{\tau}) \quad , \quad (3)$$

【0052】

励起パルスが長くなると、パルスエネルギーが等しくても励起分子の数が少なくなる。図 10 は、200 ns 及び 200 μ s の励起パルス（それぞれ曲線 1100 と 1000）によって照射されたときの励起分子の数 N を時間に依存して示す。 N は、パルス中に励起ピーク出力に比例する係数により指数関数的に上昇し、パルスがスイッチオフされると、寿命 τ 、ここでは 1 ms で指数関数的に減衰を開始する。この曲線は、励起パルス及び蛍光減衰の畳み込みによっても得ることができる。この場合におけるパルス持続時間の 3 桁の大きさの差は、励起分子の数、したがって蛍光信号の 10% の減少に相当する。パルス持続時間と、励起パルスの終了時の励起分子の数 N_0 の減少との関係を図 11 に示す。0.5 ms と 1 ms の 2 つの異なる蛍光寿命値についての曲線が示されている。図 11 では、パルス持続時間は、総パルスエネルギーを一定に維持するという制約下で変化する。励起パルスが長くなると、励起パルスの終了時における励起分子の数が小さくなる。

30

【0053】

ゲート信号を検出装置に送信し、検出期間中に計数システムを起動することにより、検出遅延 1020 後に測定窓 1030 が開かれる。典型的には、フラッシュランプベースの照明システムを使用する場合、短寿命のバックグランド蛍光の十分な減衰を達成するために、400 μ s の検出遅延が用いられる。したがって、LED 励起を使用する比較測定もまた、400 μ s の検出遅延で実施される。400 μ s の検出遅延が、励起パルス 1010 と、測定窓 1030 をマーキングする検出期間との間にある。驚くべきことに、本発明者らは、LED ベースの照明を使用する場合、400 μ s を基準にして検出遅延を短縮できることを発見した。これは、LED により励起する場合、バックグランドカウントが「許容できる」レベルまで、より急速に減衰すると思われるからである。検出遅延が短いため、測定窓を開いたときに、ランタニド系トレーサ蛍光体からの蛍光信号がさほど減衰しておらず、したがって LED 励起により得られる信号対雑音比が更に向上する。例えば、検出遅延は、300 μ s まで短縮してもよい。

40

【0054】

50

以下、特に図12～16を参照すると、濃度200 ng/Lの心臓マーカ、トロポニンI (TnI)を試料とする蛍光イムノアッセイ検出に対する詳細な例が与えられている。この例は、一方では蛍光イムノアッセイ検出のためのシステムの上記実施形態によるLEDベースの励起と、他方では伝統的なキセノンフラッシュランプベースの励起との比較を含む。システムのバックグラウンドは、PMTダークカウント、光学ユニット自体からの自己蛍光、ポリスチレン及び非特異的結合を含む。ゼロ濃度の溶液で処理されたブランクカップで測定されたバックグラウンドは、LEDにより励起される場合、低下する。これは、フラッシュランプの減衰エッジがなく、励起パルス持続時間が長く、バックグラウンドの蛍光寿命が短く、より広帯域のフラッシュランプスペクトル(100 nm)と比較して狭帯域UV光(10 nm)とバックグラウンド励起スペクトルとのスペクトル整合が悪化するからである。したがって、信号対バックグラウンド比は18%だけ改善される。この特定の構成では、同じ露出エネルギー(すなわち同じ総パルスエネルギー)でも、LEDベースのシステムにより励起された場合、蛍光信号が26%だけ低減されたことを述べておく。LEDベースのシステムの3桁長い励起パルスは、信号を10%だけ減少させる。容器内に蛍光性キレートが空間的に非均一に分布していると、蛍光応答が更に減少される。したがって、システムのSNRは、15%だけ低下した。一般的に、SNRは、励起光のエネルギーを増大することにより改善することができる。励起エネルギーが一定であれば、SNRは、照明面積を低減し、より短い励起パルス幅を使用し、可能であれば、キレート励起スペクトルと更に良好にスペクトル整合することにより改善することができる。信号とブランクカップの標準偏差はフラッシュランプと同じ範囲にある。以下の実施例で更に詳述するように、本発明は、時間分解蛍光イムノアッセイ検出においてフラッシュランプ励起の代わりにLEDベースの励起を使用するための可能な解決策を提供する。

10

20

30

40

【実施例】

【0055】

この実施例では、LEDベースのシステムは、トロポニンI (TnI)心臓マーカの時間分解蛍光イムノアッセイ測定におけるその能力を試験するために使用される。TnIイムノアッセイによる実験のために、15個の試料カップと15個のブランクカップを作製した。TnIカップは、ストレプトアビジンによってコーティングされたポリスチレンで作製され、トレサ抗体の非特異的結合をブロックする。底部における捕捉抗体の層は、トレサと捕捉抗体との間で試料中の抗原を捕捉するために使用される。ユーロピウム蛍光マーカはトレサ抗体に結合され、このトレサ抗体は、側部に近いカップ内に配置される。絶縁層が捕捉およびトレサ抗体間の接触を防止する。試料カップを、200 ng/LのTnI濃度を有する10 µLの参照溶液で処理する。培養中は、36で15分間加熱し、シェークし、反応時間を短縮する。反応後、カップを洗浄し、非結合トレサ抗体を洗い流す。標識されたトレサ抗体は抗原と結合され、その後、UV光源により励起され、616 nmにおけるピーク放射により発光する。ブランクカップは、同じ方法で処理されるが、TnI濃度ゼロの溶液で処理される。ブランクカップで測定されたカウントは、バックグラウンドカウントと呼ばれる。現在使用されているキセノンフラッシュランプに基づく光学ユニットを比較のために使用した。このユニットは異なる励起光学系を有するが、検出光路は同じである。スタンドアロンのフラッシュランプユニットを、実験前に既知の標準に調整し、校正した。LEDベースの光学ユニットのLED電流は、フラッシュランプユニットと同じエネルギーをパルス毎に送出するように調整された。したがって各カップは、フラッシュで測定され、LEDは同じカップホルダー内にあり、回転はしない。

【0056】

文献で使用されるSNRの定義には相違がある。我々はSNRを、平均バックグラウンド値について補正された信号として定義し、信号とバックグラウンド変動の和により除算した。

【0057】

【数 4】

$$SNR = \frac{\overline{S}(200 \text{ ng/L}) - \overline{B}(0 \text{ ng/L})}{\sqrt{\sigma_s(200 \text{ ng/L})^2 + \sigma_B(0 \text{ ng/L})^2}}, \quad (4)$$

式中、

【 0 0 5 8 】

【数 5】

 $\overline{S}$

10

は、N 個のサンプルカップにわたって平均化された信号であり、

【 0 0 5 9 】

【数 6】

 $\overline{B}$

は、N 個のブランクカップにわたって平均化されたバックグラウンドであり、 σ_s 、及び σ_B は、それぞれ信号及びバックグラウンドの標準偏差である。したがって、信号とバックグラウンド変動の両方が考慮されている。PMT のダークカウントは、式中において無視される。次に、我々は、信号対バックグラウンド比を信号平均対平均バックグラウンドの関係として定義する

20

【 0 0 6 0 】

【数 7】

$$S/B = \frac{\overline{S}(200 \text{ ng/L})}{\overline{B}(0 \text{ ng/L})}, \quad (5)$$

30

【 0 0 6 1 】

システムのバックグラウンドは、PMT ダークカウント (10 / 25 未満)、光学ユニット自体 (材料および汚染物質からの自己蛍光) からのバックグラウンド、及びカップ (ポリスチレン、ストレプトアビジンコーティング、非特定結合、汚染物質) からのバックグラウンドを含む。更に、我々は、空カップ (ポリスチレンのみ) からのバックグラウンドとブランクカップ (濃度ゼロ溶液で処理した) からのバックグラウンドを区別する。後者は上記のように底部に抗体を有する化学層を含み、全てのトレーサ抗体は理想的に洗浄される。

【 0 0 6 2 】

図 1 2 及び 1 3 は、LED ベース及びフラッシュランプベースのシステムのバックグラウンドを比較する。図 1 2 は、ブラック POM 閉容積固定具で測定した光学ユニット自体からのバックグラウンド、及び 1 2 5 Hz でのフラッシュランプ励起と LED 励起で測定した空カップからのバックグラウンドの反復測定データを示す。図 1 3 は、LED 1 2 5 Hz、2 5 0 Hz、及びフラッシュランプ励起に対するバックグラウンドを示し、4 つの寄与が区別されている：すなわち、PMT ダークカウント、光学ユニット、空カップ (ポリスチレンのみ) 及び濃度ゼロで処理されたカップである。光学ユニット自体のバックグラウンドは、ブラックポリオキシメチレン (POM) 製の特別な遮光固定具で測定した。この固定具は閉じた容積であり、内部にカップを有していない。1 2 5 Hz で動作する LED ベースの光学ユニットに関して、ブラック POM により測定されたユニット自体からのバックグラウンドは、 26 ± 7 カウント (ダークカウントを含む) であり、空カップにより測定されたのは 51 ± 4 カウントであり、ブランクカップで測定した場合には 62 ± 9 カウント

40

50

である（図 1 2）。図のポイントは、ブラック P O M と空カップに対して 1 つの固定具で実施された反復測定である。図 1 3 では、平均値及び標準偏差は、密閉容積のブラック P O M 及び空カップを用いた 1 0 の反復測定値から計算され、ブランクカップについては 1 5 回の反復が行われる。光学ユニットに基づくフラッシュランプは、ユニット自体からは 51 ± 5 カウントを示し、空カップを含めると 95 ± 21 カウントであり、処理されたカップにより測定すると 119 ± 22 を示す。4 つの寄与の割合は、2 つの光源についてはほぼ同じであるが、L E D ユニットのバックグラウンドは、それぞれ 125 Hz 及び 250 Hz の動作に対して 52% 及び 39% だけ低減される。このバックグラウンドの減少は、フラッシュランプと比較して残光のない L E D によって部分的に説明される。キセノンフラッシュランプは、数百マイクロ秒の残光を示し、バックグラウンドに加え、S N R を低下させる。時間ゲート測定に寄与するバックグラウンドの長寿命部分の強度は、励起パルス幅に依存する。パルス幅が長くなると、望ましくない光を放出する分子の数が減少し、この分子数は、バックグラウンド寿命が蛍光体寿命よりも短い場合にはより速く低下する。更に、L E D 放射スペクトルは、フラッシュランプベースのシステムのスペクトルよりも 1 0 倍狭い。バックグラウンドの励起スペクトルが広帯域である場合、広帯域フラッシュランプ励起とのスペクトル整合がより良好である。

【 0 0 6 3 】

図 1 4 は、 $T n I \quad 200 \text{ ng / L}$ 濃度による 1 5 回の反復蛍光応答を示し、1 5 のブランクカップが濃度ゼロの溶液により処理され、フラッシュランプシステム及び同等の励起エネルギーを使用する L E D システムによって励起された。線図上の各ポイントは、7 7 7 パルスによる 1 つのカップの 1 つの測定値を表す。

【 0 0 6 4 】

濃度 200 ng / L の心臓マーカを備える試料カップが、同じ露出エネルギーを備える両方の光学ユニットにより測定された。上述したように、図 1 4 は、3 0 のカップ（1 5 の試料カップ及び 1 5 のブランクカップ）に関するデータを提示し、表 1 は、光源及び統計データのパラメータを示す。試料は、パルスエネルギーがそれぞれ $5.1 \mu \text{ J}$ で、 250 Hz （ 125 Hz ）の反復周波数の 7 7 7 個のパルスに曝された。これは、 1.27 mW （ 0.64 mW ）の平均パワーに相当する。L E D ベースの光学ユニットを 2 つの反復周波数で試験した。試料平均に対して信頼区間により平均カウントが与えられた。この平均カウントは、スチューデントの t パラメータを

【 0 0 6 5 】

【数 8】

$$\bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

として、

【 0 0 6 6 】

【数 9】

$$\bar{x}$$

を試料平均として、 s を試料の標準偏差として用い、 n はサンプルサイズである。パラメータ t は、 95% の信頼水準に対応する 2.5% の P により計算される。試料の標準偏差 s は、信頼間隔によって与えられた。この信頼間隔は、 X^2 分布を用いて計算された。

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

【数 1 0】

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}} \leq \sigma \leq \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{1-\alpha/2}^2}}, \quad (6)$$

式中、 α は信頼水準である。95%の α 及び15の試料に対して、標準偏差信頼区間は $[0.73 \cdot s; 1.58 \cdot s]$ であり、をテーブル 1 に示されている。なお15カップの試料サイズは、高い統計精度を得るには十分ではないが、これは本調査の目的ではなかったことに注意されたい。95%の信頼水準で標準偏差 $[0.91 \cdot s; 1.08 \cdot s]$ に対する信頼区間を達成するためには、約200回の反復が必要となろう。CVSとCVBは、それぞれ、200 ng/Lの濃度のカップ及びブランクカップに対する変動係数である。そして、その平均に対する試料の標準偏差の関係として計算された。信号対バックグラウンド比は18%だけ改善される。これは、上記のように、LED励起によりバックグラウンドが低減されるためである。試料カップの蛍光応答は、LEDユニットにより励起される場合、26%低くなる。したがって、信号が減少するため、SNRが低下する。光源における3つの相違は、信号レベルの変化に寄与する、すなわち、励起パルス幅の増大、異なる空間およびスペクトル分布に寄与する。上述のように、パルス幅の増大は、10%の信号低下に相当する。他のパラメータが一定の場合、スペクトルの重なり合いはLED励起により19%だけ改善される。照明面積が拡大されると、カップ内のキレート分布が不均一な場合、更なる信号低下を引き起こすことがある。正確なキレート分布に応じて、中心にキレートがより集中する場合、3倍大きい照明面積は不利になる。フラッシュランプ画像が数ミリメートルだけ器具内で位置ずれしていると、フラッシュランプ画像がセンタリングされず、カップのエッジに配置される。これにより信号が、位置合わせされたセットアップと比較して最大30%だけ減少することが観察された。

【0068】

10

20

【表 1】

テーブル 1 : 濃度 200 ng/L とゼロ濃度の試料に対して提示された励起光のパラメータと効率。パルスエネルギーを一定にして、250 Hz と 125 Hz の 2 つの反復周波数で LED を使用した。15 回の反復に対して計算されたデータ

	信号 (TnI 200ng/L)		バックグラウンド (0ng/L)	
	フラッシュランプ	LED	フラッシュランプ	LED
平均電力、mW	1.27	1.27	1.27	1.277
パルスの数	777	777	777	777
周波数、Hz	250	250	250	250
パルスエネルギー、μJ	5.1	5.1	5.1	5.1
平均カウンント (±95%CI)	2114.1±	1574.3±	119.1±	73.3±
試料標準偏差 [95%CI]	28.6	26.8	12.4	7.1
	51.6	48.3	22.4	12.9
	[37.8;	[35.4;	[16.4;	[9.4;
	81.4]	76.2]	35.3]	20.3]
CV _{S(B)}	2.4%	3.1%	18.8%	17.5%
S/B @200ng/L	17.7	21.5		
SNR @200ng/L	35.5	30.0		

10

20

30

40

【0069】

励起エネルギーを一定に維持し、カップ内の照明面積を低減することにより、SNRを

50

改善することができ、より多くの蛍光信号が獲得される。励起パルス幅の減少は、信号を増加させるが、最大でも 10 % の改善にしか達しない。340 nm を中心としたキレート励起スペクトルとの良好なスペクトル重なり合いは、信号を更に改善することになる。S/N R はまた、励起エネルギーの増大により改善することができる。図 15 は、200 ng/L の TnI 濃度に関して、4 つのカップに対して平均化された信号対雑音比と LED 電流（励起パルスエネルギー）とを対比して示す。S/N R は、励起電力と共に二乗で増大する。四角形及びひし形は、フラッシュランプ及び LED ベースのユニットについて、15 回の反復による実験に対する平均値を示す。図 15 は、200 ng/L の TnI 濃度において S/N R を LED 電流の関数として示し、ここで S/N R は、平方根依存（適合された実線曲線）で増大する。S/N R は、4 回の反復に対して算出されており、円として示されている。この挙動は、システム内のポアソン分布信号及びノイズによって説明され、分布の標準偏差はその平均と等しい。15 回の反復による実験により計算された値（テーブル 1）は、フラッシュランプ励起に対しては正方形として、250 Hz の LED ユニットに対してはひし形として、それぞれで示される。より多くの試料数を調査すれば、より高い統計的精度を達成することができる。式 4 でバックグラウンド変化のみが考慮される場合、信号が検出システムのノイズと同等であれば、S/N R は急速に増大し、励起電力に依存しない場合にプラトーに達する。これは、トレーサ分子がカップ壁に結合されると、バックグラウンドの有意な部分が非特異的結合に由来するため起こる。この場合、キレート濃度は極めて低く、バックグラウンド変動は平方根曲線の一部であり、これは直線として近似することができる。バックグラウンドは励起電力と共に線形に増大するため、信号対バックグラ

10

20

【図 1】

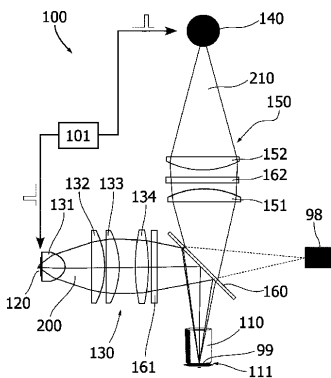


Fig. 1

【図 3 (a)】

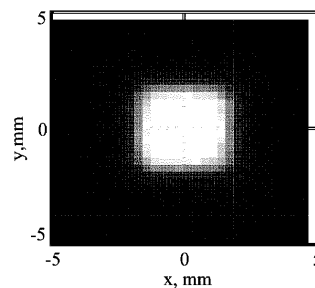


Fig. 3a

【図 2】

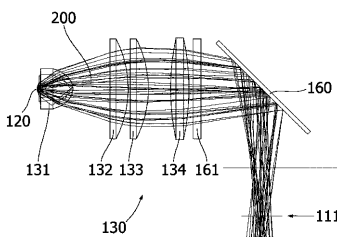
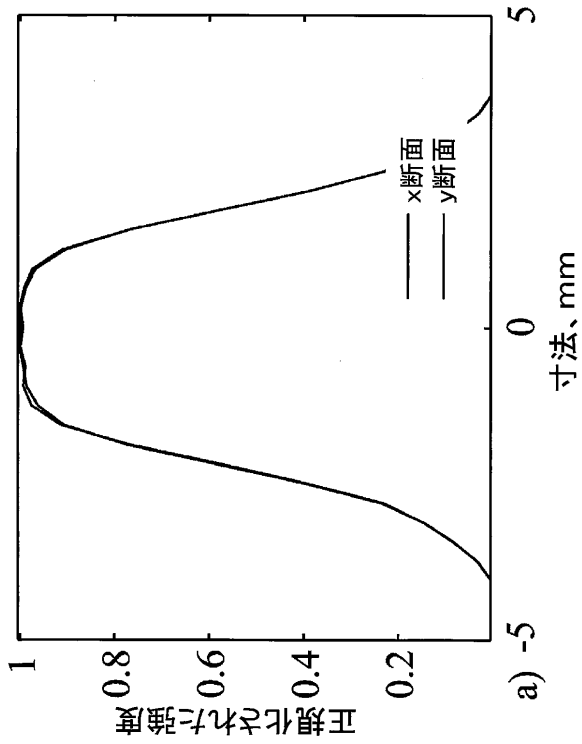


Fig. 2

【図 3 (b)】



【図 4 (a)】

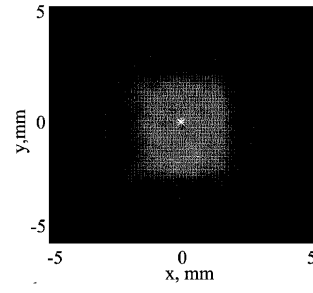
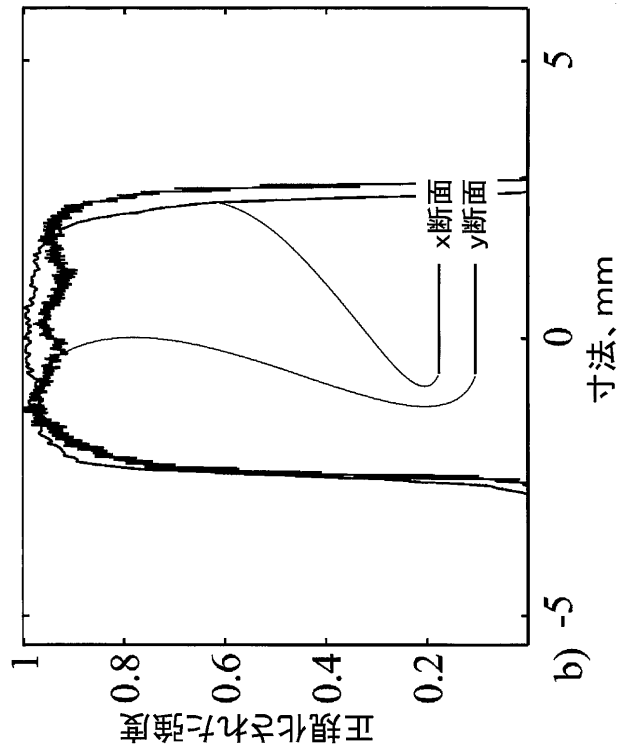


Fig. 4a

【図 4 (b)】



【図 5 (a)】

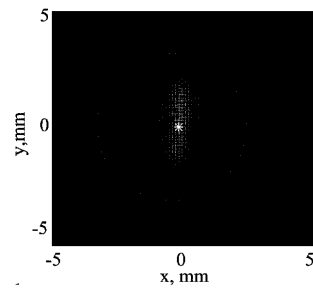
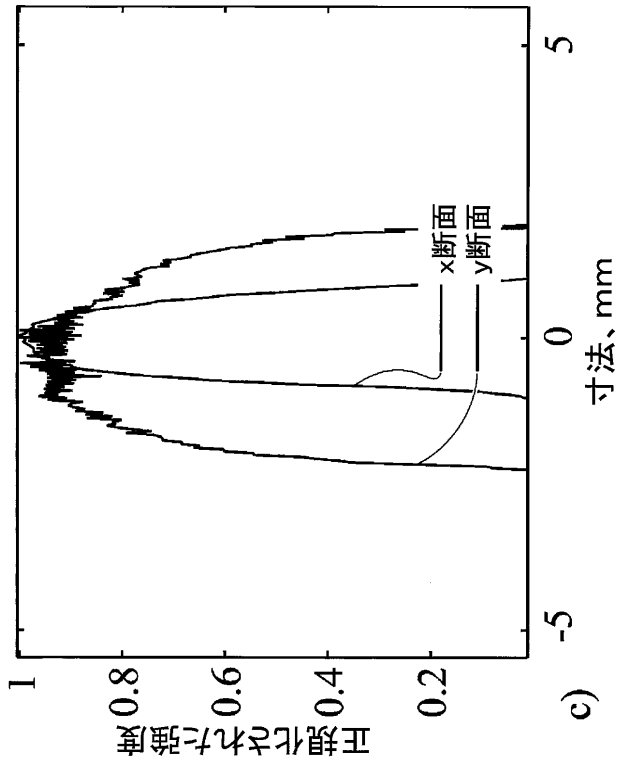
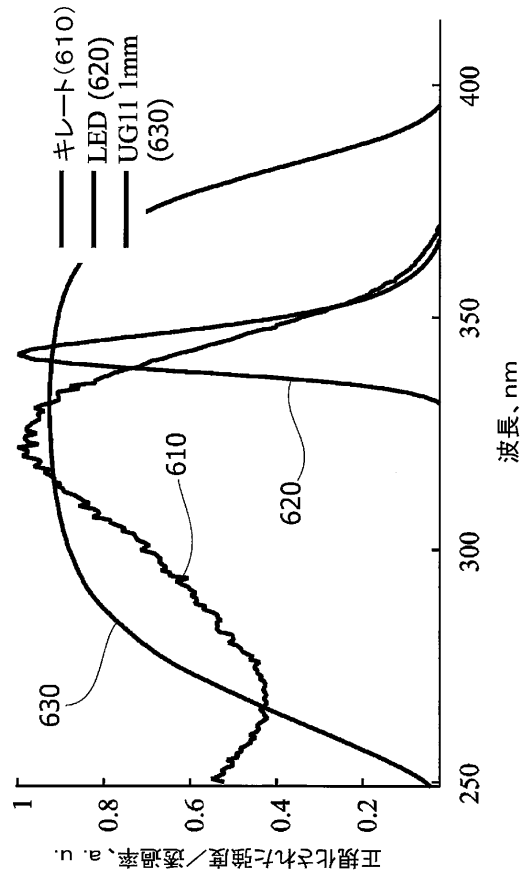


Fig. 5a

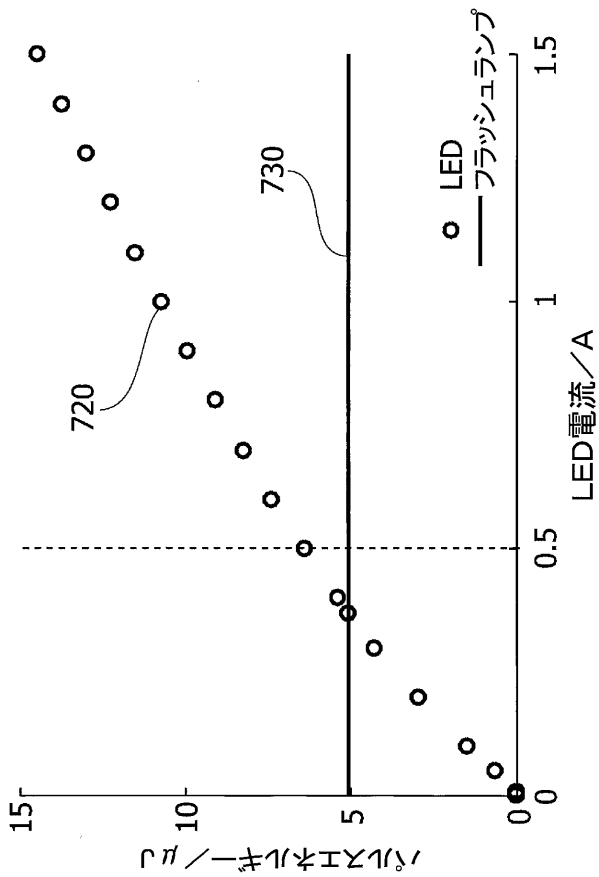
【図 5 (b)】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

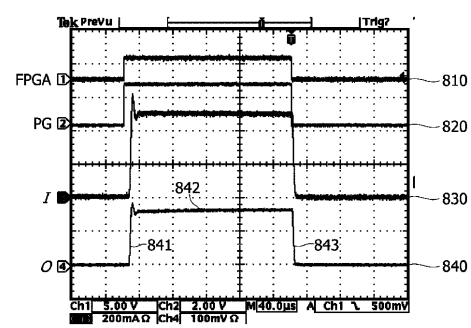


Fig. 8

【図 9】

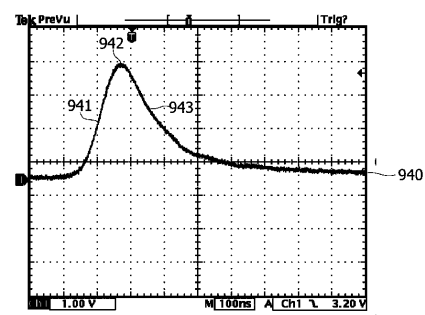
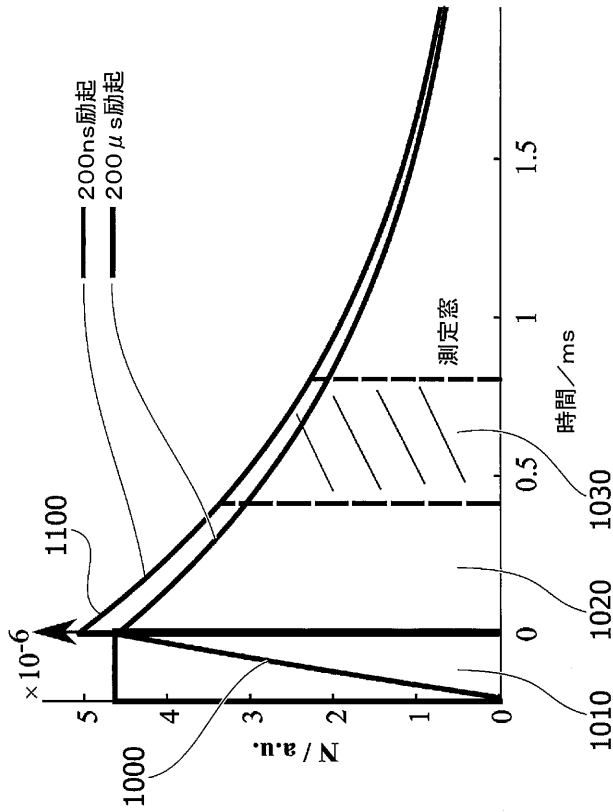
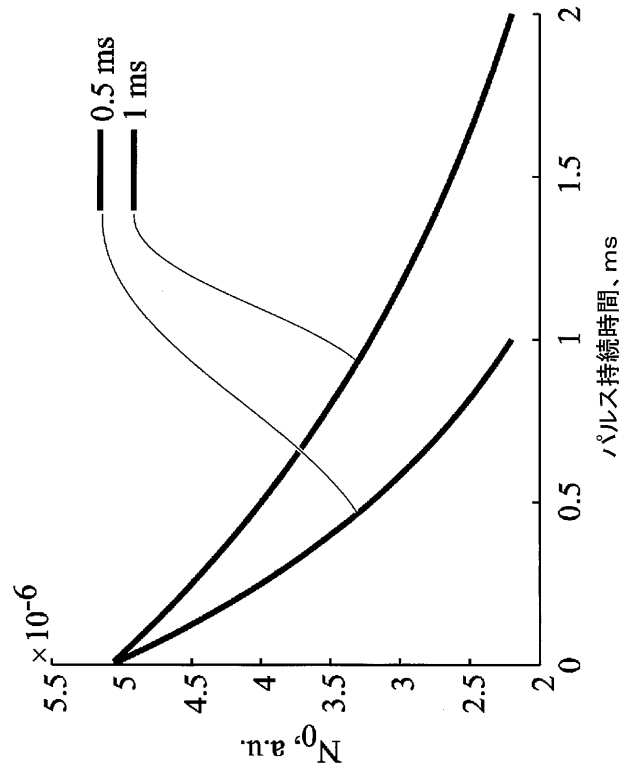


Fig. 9

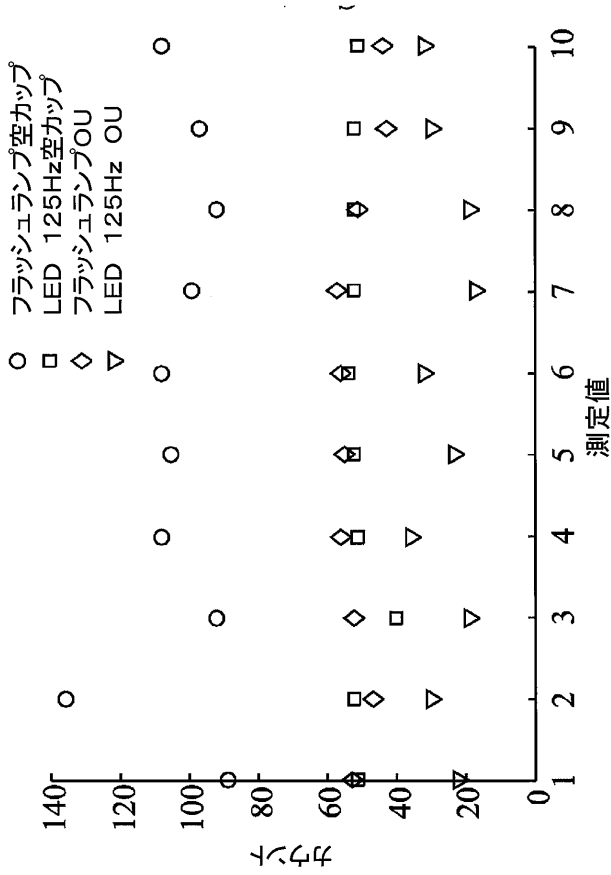
【図 10】



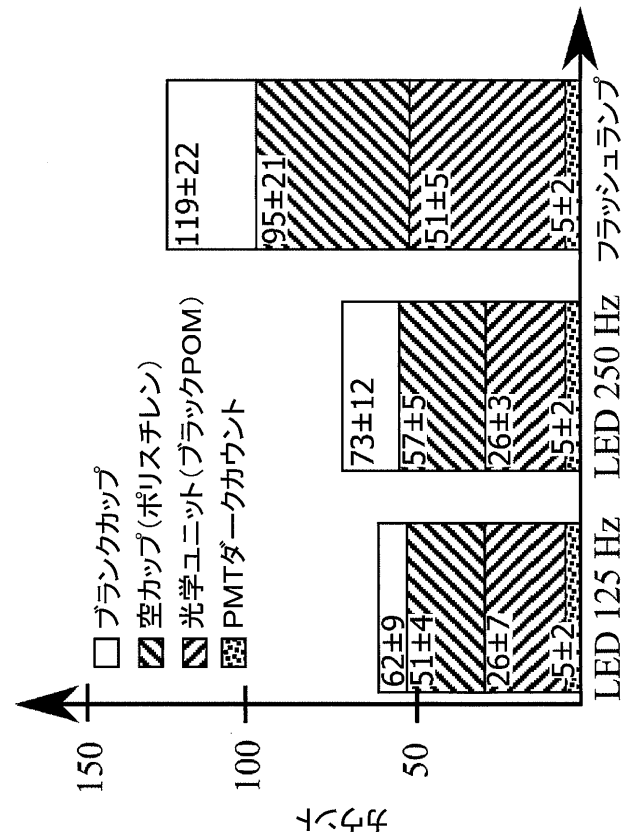
【図 11】



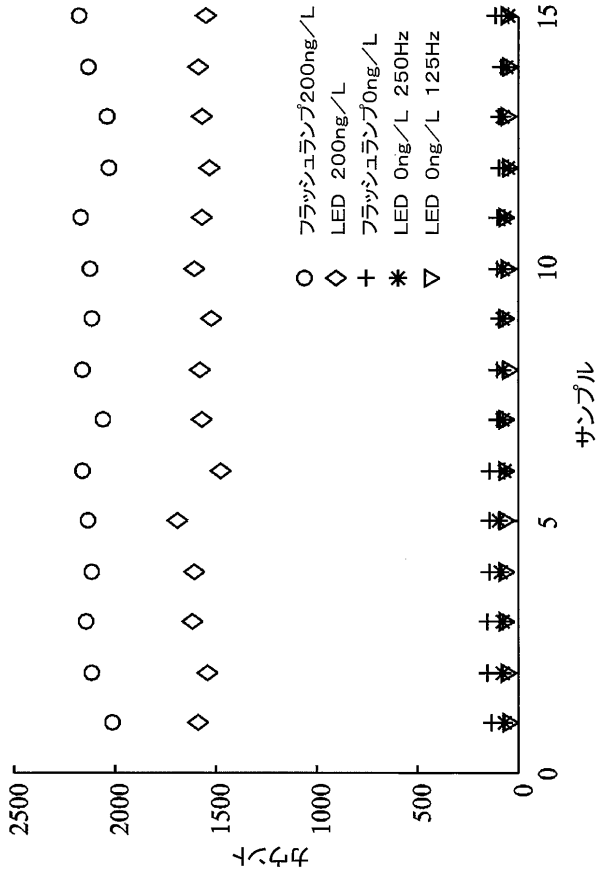
【図 12】



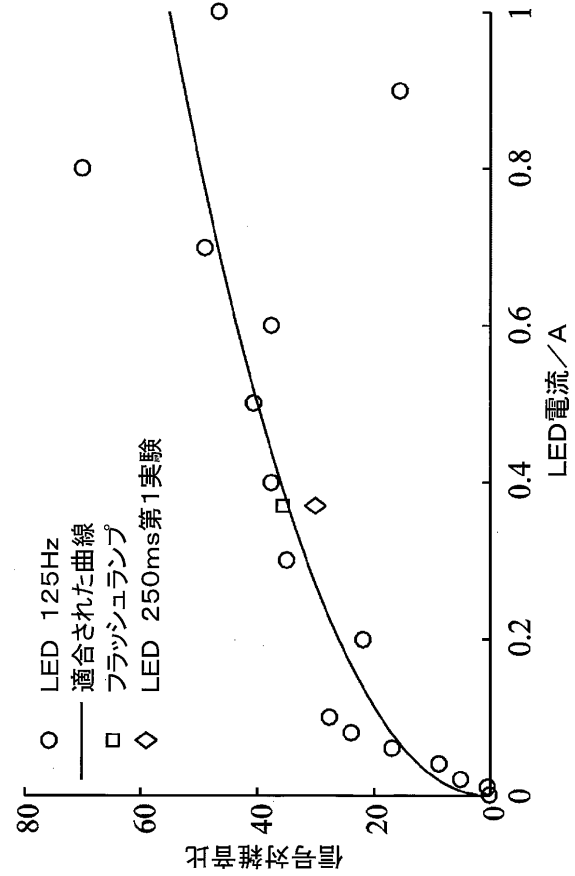
【図 13】



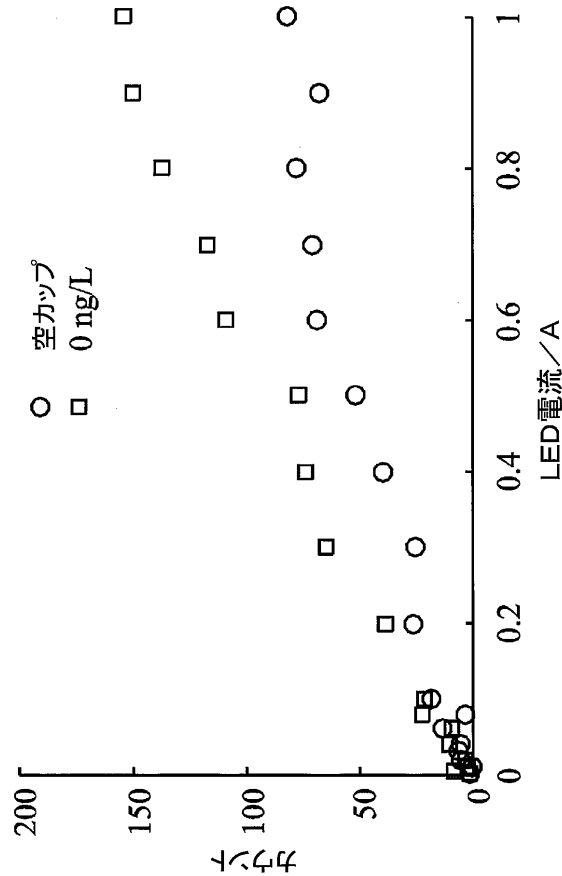
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/072290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N21/64
ADD.

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)

G01N

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)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BINGQIANG REN ET AL: "Design of time-resolved fluorometer based on immunochromatography", PROCEEDINGS OF SPIE: INTERNATIONAL CONFERENCE OF OPTICAL INSTRUMENT AND TECHNOLOGY, 2008, BEIJING, CHINA, vol. 7157, 3 February 2009 (2009-02-03), pages 71570Y-1-71570Y-7, XP055424866, US ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.806776 ISBN: 978-1-5106-1354-6 the whole document ----- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but 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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November 2017

Date of mailing of the international search report

24/11/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sauerer, Christof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/072290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REN BINGQIANG ET AL: "Time-resolved fluorometer based on immunobromatography", YIQI YIBIAO XUEBAO - CHINESE JOURNAL OF SCIENTIFIC INSTRUMENT, ZHONGGUO YIQI YIBIAO XUEHUI, BEIJING, CN, vol. 30, no. 6, 31 May 2009 (2009-05-31), pages 1330-1335, XP009501531, ISSN: 0254-3087 the whole document -----	1-18
X	WO 2006/089342 A1 (UNIV MACQUARIE [AU]; CONNALLY RUSSELL [AU]; PIPER JAMES AUSTIN [AU]) 31 August 2006 (2006-08-31) page 15, line 16 - page 25, line 11 figures 1, 2 -----	1-18
A	Dayong Jin ET AL: "How to Build a Time-Gated Luminescence Microscope : How to Build a Time-Gated Luminescence Microscope" In: "Current Protocols in Cytometry", 2 January 2014 (2014-01-02), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, XP055424733, ISBN: 978-0-471-14295-9 pages 2.22.1-2.22.36, DOI: 10.1002/0471142956.cy0222s67, the whole document -----	1-18
A	LIXIN ZHANG ET AL: "Practical Implementation, Characterization and Applications of a Multi-Colour Time-Gated Luminescence Microscope", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 4, no. 1, 13 October 2014 (2014-10-13), XP055424740, DOI: 10.1038/srep06597 the whole document -----	1-18
A	HAGAN A K ET AL: "Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 400, no. 9, 11 May 2011 (2011-05-11), pages 2847-2864, XP019909258, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-011-5047-7 the whole document ----- -/--	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/072290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BABU S ET AL: "A PMMA microcapillary quantum dot linked immunosorbent assay (QLISA)", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 24, no. 12, 6 May 2009 (2009-05-06), pages 3467-3474, XP026305636, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/J.BIOS.2009.04.043 [retrieved on 2009-05-06] the whole document -----	1-18
A	RUSSELL CONNALLY ET AL: "Solid-state time-gated luminescence microscope with ultraviolet light-emitting diode excitation and electron-multiplying charge-coupled device detection", INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, SPIE, PO BOX 10 BELLINGHAM WA 98227-0010 USA, vol. 13, no. 3, 19 May 2008 (2008-05-19), pages 34022/1-6, XP007911002, ISSN: 1083-3668, DOI: 10.1117/1.2928169 [retrieved on 2008-05-19] the whole document -----	1-18
A	YIQING LU ET AL: "Time-Gated Orthogonal Scanning Automated Microscopy (OSAM) for High-speed Cell Detection and Analysis", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 2, 12 November 2012 (2012-11-12), XP055045836, DOI: 10.1038/srep00837 the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/072290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006089342 A1	31-08-2006	AU 2005327903 A1	31-08-2006
		CA 2584186 A1	31-08-2006
		EP 1817573 A1	15-08-2007
		JP 2008517280 A	22-05-2008
		US 2008265177 A1	30-10-2008
		WO 2006089342 A1	31-08-2006

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 フォズゴー, ヘンレク

デンマーク国 2 5 0 0 ヴァルビュー, スキュゲロンスヴァイ 1 4

(72)発明者 ロデンコ, オルガ

デンマーク国 2 8 2 0 ゲントフテ, コンゲリュスヴァイ 2 5, エムエフ 1

Fターム(参考) 2G043 AA01 AA04 BA16 CA05 DA02 EA01 FA01 FA03 GA06 GA08

GB21 HA01 HA02 HA09 JA02 JA03 KA03 KA05 KA08 LA03

MA01 MA04 MA11 MA12 NA01 NA02 NA04 NA05 NA06 NA13

4B029 AA07 BB15 FA12 GA08 GB10

【要約の続き】

1 0 1) を更に含む。検出サイクルは、発光ダイオード(1 2 0)によって放出された励起パルスと、これに続く、検出デバイス(1 4 0)による蛍光放射(2 1 0)の検出のための検出期間とを含み、検出期間は、検出遅延によって励起パルスから分離されている。励起パルスのパルス持続時間は少なくとも1 0 μsである。更なる態様によれば、時間分解蛍光イムノアッセイ検出のための方法が提供される。

专利名称(译)	时间分辨荧光免疫检测的系统和方法		
公开(公告)号	JP2019528450A	公开(公告)日	2019-10-10
申请号	JP2019511387	申请日	2017-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	雷迪奥米特医学公司		
申请(专利权)人(译)	辐射计医疗阿苯丙氨酸ES		
发明人	フォズゴー,ヘンレク ロデンコ,オルガ		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/543 C12M1/00 C12M1/34		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/6428 G01N21/6452 G01N21/6456 G01N2201/062 G01N33/6887 G01N2021/6439 G01N2021/6471		
FI分类号	G01N21/64.B G01N33/53.Y G01N33/543.575 C12M1/00.A C12M1/34.F		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/AA04 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA03 2G043/GA06 2G043/GA08 2G043/GB21 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA09 2G043/JA02 2G043/JA03 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA08 2G043/LA03 2G043/MA01 2G043/MA04 2G043/MA11 2G043/MA12 2G043/NA01 2G043/NA02 2G043/NA04 2G043/NA05 2G043/NA06 2G043/NA13 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/FA12 4B029/GA08 4B029/GB10		
代理人(译)	山本修 宫前彻 中西 基晴 中村省吾		
优先权	201600533 2016-09-14 DK		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于时间分辨荧光免疫测定检测的系统 (100)。系统 (100) 包括：容器 (110)，其具有适于在其中接收样本 (99) 的样本体积；光源 (120)，适于发射脉冲激发光 (200)，照明光学器件 (130) 适于收集来自光源 (120) 的脉冲激发光 (200)，并将脉冲激发光 (200) 传递至容器 (110) 中的样品体积，并至少进行检测。一种检测装置 (140)，其适于对光谱范围内的荧光发射进行门控，并至少在检测光谱范围内从容器 (110) 收集荧光发射 (210) 并到达检测装置 (140)。适于传递荧光发射 (210) 的检测光学器件 (150) 和被配置为分离激发光 (200) 和检测光 (210) 的光学滤波器装置 (160)。包括。光源 (120) 是在低于355nm的波长处具有峰值强度发射的发光二极管。系统 (100) 还包括配置为至少控制检测周期的定时的控制单元 (101)。该检测周期包括由发光二极管 (120) 发射的激励脉冲，随后是用于由检测装置 (140) 检测荧光发射 (210) 的检测周期，该检测周期取决于检测延迟。与激励脉冲分开。激励脉冲的脉冲持续时间至少为10μs。根据另一方面，提供了一种用于时间分辨荧光免疫测定检测的方法。

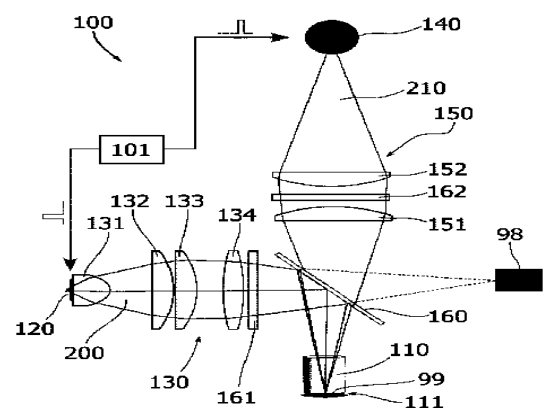


Fig. 1