

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

誘電体プレートと、該プレートの一面に設けられた少なくとも金属層からなるセンサ部とからなるセンサチップを用意し、

前記センサ部に液体試料を接触させることにより、該センサ部上に、該液体試料中の被検出物質の量に応じた量の蛍光標識結合物質を結合させ、

前記センサ部に励起光を照射することにより、該センサ部上に増強した光電場を生じさせ、該増強した光電場内において前記蛍光標識結合物質の蛍光標識を励起し、該蛍光標識の励起に起因して生じる光の量に基づいて、前記被検出物質の量を検出する検出方法において、

10

前記蛍光標識として、複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、前記液体試料中において該液体試料の pH に応じて荷電状態が変化する蛍光物質を用い、

前記センサ部に前記蛍光標識結合物質を結合させた状態で、前記液体試料の pH を調整して、前記蛍光物質の荷電状態を中性化することにより、該蛍光物質を前記センサ部表面に引き寄せ、

該蛍光物質を引き寄せた状態で、前記被検出物質の量を検出することを特徴とする検出方法。

【請求項 2】

前記蛍光物質の粒径が 30 nm 以上であることを特徴とする請求項 1 記載の検出方法。

20

【請求項 3】

前記蛍光物質として、前記液体試料の pH に応じて荷電状態が変化する官能基が表面修飾された蛍光物質を用い、

前記該センサ部に、前記蛍光標識結合物質を結合させる際、前記液体試料を前記官能基がイオン化する pH とし、

前記蛍光標識結合物質を結合させた後、前記液体試料を前記官能基が中性化する pH に調整することにより、前記蛍光物質を前記センサ部表面に引き寄せることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

前記励起光の照射により前記金属層にプラズモンを励起し、該プラズモンにより前記増強した光電場を生じさせ、

30

前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光を検出することにより前記被検出物質の量を検出することを特徴とする請求項 1 から 3 いずれか 1 項記載の検出方法。

【請求項 5】

前記励起光の照射により前記金属層にプラズモンを励起し、該プラズモンにより前記増強した光電場を生じさせ、

前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光が前記金属層に新たにプラズモンを誘起することにより、前記誘電体プレートの前記他面から放射される放射光を検出することにより前記被検出物質の量を検出することを特徴とする請求項 1 から 3 いずれか 1 項記載の検出方法。

40

【請求項 6】

前記センサチップとして、前記金属層上に光導波層を備えたものを用い、

前記励起光の照射により前記光導波層に光導波モードを励起し、該光導波モードにより前記増強した光電場を生じさせ、

前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光を検出することにより前記被検出物質の量を検出することを特徴とする請求項 1 から 3 いずれか 1 項記載の検出方法。

【請求項 7】

前記センサチップとして、前記金属層上に光導波層を備えたものを用い、

50

前記励起光の照射により前記光導波層に光導波モードを励起し、該光導波モードにより前記増強した光電場を生じさせ、

前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光が前記金属層に新たにプラズモンを誘起することにより、前記誘電体プレートの前記他面から放射される放射光を検出することにより前記被検出物質の量を検出することを特徴とする請求項 1 から 3 いずれか 1 項記載の検出方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 いずれか 1 項に記載の検出方法に用いられる検出装置であって、

前記センサチップを収容する収容部と、

前記センサ部に前記励起光を照射する励起光照射光学系と、

10

該励起光の照射により該センサ部上に生じた前記増強した光電場における、前記蛍光標識の励起に起因して生じる光を検出する光検出手段と、

前記センサチップに、pH 調整液を注入して前記液体試料の pH を調整する pH 調整手段とを備えたことを特徴とする検出装置。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 いずれか 1 項に記載の検出方法において使用される検出用試料セルであって、

液体試料が流下される流路を有する基台と、

前記流路の上流側に設けられた該流路に前記液体試料を注入するための注入口と、

20

前記流路の下流側に設けられた、前記注入口から注入された前記液体試料を該下流側に流すための空気孔と、

前記流路の、前記注入口と前記空気孔との間に設けられたセンサチップ部であって、前記流路の内壁面の少なくとも一部に設けられた誘電体プレートと、該プレートの試料接触面に設けられた少なくとも金属層を含むセンサ部とからなるセンサチップ部とを備えてなることを特徴とする検出用試料セル。

【請求項 10】

前記センサ部に、前記蛍光標識結合物質と結合する固定層を備えていることを特徴とする請求項 9 記載の検出用試料セル。

【請求項 11】

複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、前記液体試料中において該液体試料の pH に応じて荷電状態が変化する蛍光物質を、前記蛍光標識として含む前記蛍光標識結合物質が、前記流路内の、前記センサ部より上流側に固定されていることを特徴とする請求 10 記載の検出用試料セル。

30

【請求項 12】

前記センサ部において、前記金属層上に光導波層が備えられていることを特徴とする請求項 9 から 11 いずれか 1 項記載の検出用試料セル。

【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の検出方法に使用される検出用キットであって、

液体試料が流下される流路を有する基台と、前記流路の上流側に設けられた該流路に前記液体試料を注入するための注入口と、前記流路の下流側に設けられた、前記注入口から注入された前記液体試料を該下流側に流すための空気孔と、前記流路の、前記注入口と前記空気孔との間に設けられたセンサチップ部であって、前記流路の内壁面の少なくとも一部に設けられた誘電体プレートと、該プレートの試料接触面に設けられた少なくとも金属層を含むセンサ部とからなるセンサチップ部と、該センサ部上に固定された、前記蛍光標識結合物質と結合する固定層とを備えた試料セル、および

40

前記液体試料と同時にしくは前記液体試料の流下後に、前記流路内に流下される、複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、前記液体試料中において該液体試料の pH に応じて荷電状態が変化する蛍光物質を、前記蛍光標識として含む前記蛍光標識結合物質を含んだ標識用溶液を備えてなることを特徴とする検出用キット。

50

【請求項 14】

前記センサ部において、前記金属層上に光導波層が備えられていることを特徴とする請求項 12 記載の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の被検出物質を検出する検出方法、検出用試料セルおよび検出用キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

10

従来、バイオ測定等において、高感度かつ容易な測定法として蛍光検出法が広く用いられている。この蛍光検出法は、特定波長の光により励起されて蛍光を発する被検出物質を含むと考えられる試料に上記特定波長の励起光を照射し、そのとき蛍光を検出することによって被検出物質の存在を確認する方法である。また、被検出物質が蛍光体ではない場合、蛍光色素で標識されて被検出物質と特異的に結合する物質を試料に接触させ、その後上記と同様にして蛍光を検出することにより、この結合すなわち被検出物質の存在を確認することも広くなされている。

【0003】

バイオ測定においては、例えば、試料に含まれる被検出物質である抗原を検出するため、基板上に被検出物質と特異的に結合する 1 次抗体を固定しておき、基板上に試料を供給することにより、1 次抗体に被検出物質を特異的に結合させ、次いで、被検出物質と特異的に結合する、蛍光標識が付与された 2 次抗体を添加し、被検出物質と結合させることにより、1 次抗体—被検出物質—2 次抗体の、所謂サンドイッチを形成し、2 次抗体に付与されている蛍光標識からの蛍光を検出するサンドイッチ法や、被検出物質と競合して 1 次抗体と特異的に結合する、蛍光標識された競合 2 次抗体を被検出物質と競合的に 1 次抗体と結合させ、1 次抗体と結合した競合 2 次抗体からの蛍光を検出する競合法などのアッセイがなされる。

20

【0004】

この際、基板上に固定された 1 次抗体と被検出物質を介して結合した 2 次抗体、あるいは直接結合した競合 2 次抗体のみからの蛍光を検出するために、エバネッセント光により蛍光を励起するエバネッセント蛍光法が提案されている。エバネッセント蛍光法は、基板表面で全反射する励起光を基板裏面から入射し、基板表面に染み出すエバネッセント波により蛍光を励起してその蛍光を検出するものである。

30

【0005】

特許文献 1 には、基板上に 1 次抗体を固定することなく、液相中にて、1 次反応体—被検出物質—2 次反応体結合物を形成させ、これを、エバネッセント波が染み出す領域に局在化させて蛍光を検出するエバネッセント蛍光法が提案されている。具体的には、1 次抗体および磁性体からなる第 1 反応体と、蛍光物質および 2 次抗体からなる第 2 反応体とを被検出物質と結合させ、その結合物を、第 1 反応体の磁性体を磁石で引き寄せることにより局在化する方法が開示されている。

40

【0006】

一方、エバネッセント蛍光法において、感度を向上させるため、プラズモン共鳴による電場増強の効果を利用する方法が特許文献 2、非特許文献 1 などに提案されている。表面プラズモン増強蛍光法は、プラズモン共鳴を生じさせるため、基板上に金属層を設け、基板と金属層との界面に対して基板裏面から、全反射角以上の角度で励起光を入射し、この励起光の照射により金属層に表面プラズモンを生じさせ、その電場増強作用によって、蛍光信号を増大させて S/N を向上させるものである。

【0007】

同様に、エバネッセント蛍光法において、センサ部の電場を増強する効果を有するものとして、導波モードによる電場増強効果を利用する方法が非特許文献 2 に提案されている

50

。この光導波モード増強蛍光分光法 (OWF: Optical waveguide mode enhanced fluorescence spectroscopy) は、基板上に金属層と、誘電体などからなる光導波層とを順次形成し、基板裏面から全反射角以上の角度で励起光を入射し、この励起光の照射により光導波層に光導波モードを生じさせ、その電場増強効果によって、蛍光信号を増強させるものである。

【 0 0 0 8 】

また、特許文献 3 および非特許文献 3 には、表面プラズモンによる増強された電場において励起された蛍光標識からの蛍光を検出するのではなく、その蛍光が金属層に新たに表面プラズモンを誘起して生じる放射光 (SPCE: Surface Plasmon-Coupled Emission) をプリズム側から取り出す方法が提案されている。

10

【 0 0 0 9 】

このように、バイオ測定等においては、被測定物質を検出するための方法として、励起光の照射により、プラズモン共鳴や光導波モードを生じさせ、これらによって増強された電場で蛍光標識を励起させ、その蛍光を直接、あるいは間接的に検出する種々の方法が提案されている。

【 0 0 1 0 】

また、表面プラズモン共鳴測定装置においては、センサ部上のエバネッセント波滲み出し領域における被検出物質の濃度を高めるために、試料に対して電圧を印加させて、被検出物質をセンサ部に引き寄せて測定を行う方法が特許文献 4 や 5 などに提案されている。このような方法においては、緩衝液の pH を調整することにより、蛋白質や核酸などの被検出物質の荷電状態を調整し、被検出物質を正もしくは負に帯電させた状態で、電圧を印加することにより、センサ部に引き寄せている。

20

【特許文献 1】特開 2 0 0 5 - 7 7 3 3 8 号公報

【特許文献 2】特開平 1 0 - 3 0 7 1 4 1 号公報

【特許文献 3】米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 5 3 9 7 4 号明細書

【特許文献 4】特開平 9 - 2 5 7 7 0 2 号公報

【特許文献 5】特開 2 0 0 7 - 8 5 7 7 0 号公報

【非特許文献 1】W.Knoll 他、Analytical Chemistry 77(2005), p.2426-2431

【非特許文献 2】2007 年春季 応用物理学会 予稿集 No. 3, P.1378

【非特許文献 3】Thorsten Liebermann Wolfgang Knoll, "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy" Colloids and Surfaces A 171(2000)115-130

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

電圧印加による被検出物質の局在化方法は、ある程度の効果を得ることができる。表面プラズモン共鳴測定装置においては、エバネッセント波の滲み出し領域となる 1 0 0 n m 程度まで引き寄せれば信号のばらつきが小さくなると特許文献 4 には述べられている。

【 0 0 1 2 】

しかしながら、被検出物質の大きさおよび荷電はいずれも小さいことから、電圧印加による引き寄せ効果が、被検出物質のブラウン運動に負けてしまい、被検出物質を効率的にセンサ部表面に引き寄せることは困難である。また、電圧を印加するためには、試料液に電圧を印加するための手段を備える必要があり、装置が複雑になるという問題点もある。

40

【 0 0 1 3 】

さらに、表面プラズモン共鳴や光導波モードによる電場増強の効果は、金属層や光導波層表面から離れるに従って急激に減衰するため、表面から蛍光標識までの距離が僅かに変化するだけで、信号に差が生じ、信号のばらつきが生じてしまうため、表面から 5 0 n m 程度以下に蛍光標識を引き寄せる必要がある。

【 0 0 1 4 】

例えば、表面プラズモン共鳴による電場増強効果による蛍光を検出する装置のセンサ部近傍の模式図を図 2 0 に示す。プリズム (基板) 1 0 1 の表面に金膜 1 0 2 が設けられて

50

おり、この金膜 102 上に 1 次抗体 B_1 が固定されている。サンドイッチアッセイを行う場合、1 次抗体 B_1 に対して抗原 A を介して結合する、蛍光標識（ここでは、蛍光色素分子 f）が付与された標識 2 次抗体 B_2 の蛍光標識からの蛍光を検出する。プリズム 101 と金膜 102 との界面に全反射角度以上の角度で励起光を入射することにより、金膜表面に表面プラズモンを励起して金膜表面の電場を増強する。蛍光標識 f は増強された電場において励起され、蛍光を発する。図 20 中のグラフは、電場強度のセンサ部表面（金膜表面）からの距離依存性を示している。グラフに示すように、電場強度は表面から離れるにつれ急激に減少する。

【0015】

このとき、センサ部表面から標識 2 次抗体の蛍光標識 f までの距離は最大で 50 nm 程度も離れており、センサ部表面から 50 nm 程度離れると、蛍光強度は 30 % 以上減衰してしまう。また、1 次抗体 B_1 は常にセンサ部表面に直立に固定されるものではなく、液の流れや立体障害等により表面に沿って倒れる場合もあり、これに応じて蛍光標識 f の表面からの距離にばらつきが生じ、このばらつきが信号強度のばらつきに繋がる。

10

【0016】

本発明は上記の事情に鑑みてなされたものであり、装置構成を複雑化することなく、信号強度のばらつきを抑え、かつ増強された電場を効率よく利用することができる、蛍光を直接、あるいは間接的に検出する検出方法および装置を提供することを目的とする。

【0017】

また、本発明は検出方法に用いられる試料セルおよび検出用キットを提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明の検出方法は、誘電体プレートと、該誘電体プレートの一面に設けられた少なくとも金属層からなるセンサ部とからなるセンサチップを用意し、

前記センサ部に液体試料を接触させることにより、該センサ部上に、該液体試料中の被検出物質の量に応じた量の蛍光標識結合物質を結合させ、

前記センサ部に励起光を照射することにより、該センサ部上に増強した光電場を生じさせ、該増強した光電場内において前記蛍光標識結合物質の蛍光標識を励起し、該蛍光標識の励起に起因して生じる光の量に基づいて、前記被検出物質の量を検出する検出方法において、

30

前記蛍光標識として、複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、前記液体試料中において該液体試料の pH に応じて荷電状態が変化する蛍光物質を用い、

前記センサ部に前記蛍光標識結合物質を結合させた状態で、前記液体試料の pH を調整して、前記蛍光物質の荷電状態を中性化することにより、該蛍光物質を前記センサ部表面に引き寄せ、

該蛍光物質を引き寄せた状態で、前記被検出物質の量を検出することを特徴とする。

【0019】

前記蛍光物質の粒径は、30 nm 以上、さらには 70 nm 以上であることが好ましい。

40

本明細書において、蛍光物質の粒径は、略球状の粒子の場合にはその直径であり、球状でない粒子の場合にはその最大幅と最小幅との平均の長さで定義するものとする。

【0020】

なお、ここで「蛍光標識結合物質」は被検出物質の量に応じた量だけセンサ部上に結合する蛍光標識された結合物質であり、例えば、サンドイッチ法によるアッセイを行う場合には、被検出物質と特異的に結合する結合物質と蛍光標識とから構成され、競合法によるアッセイを行う場合には、被検出物質と競合する結合物質と蛍光標識とから構成される。

【0021】

「被検出物質の量を検出する」とは被検出物質の存在の有無を含み、定量的な量のみな

50

らず、定性的な量を含むものとする。

【0022】

本発明の検出方法においては、前記蛍光物質として、前記液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する官能基が表面修飾された蛍光物質を用い、前記該センサ部に、前記蛍光標識結合物質を結合させる際、前記液体試料を前記官能基がイオン化するpHとし、前記蛍光標識結合物質を結合させた後、前記液体試料を前記官能基が中性化するpHに調整することにより、前記蛍光物質を前記センサ部表面に引き寄せることが望ましい。

【0023】

ここで「光電場」とは、励起光の照射により生じるエバネッセント光もしくは近接場光に起因する電場をいうものとする。

また、「増強した光電場を生じさせる」とは、光電場を増強させることによって、増強した光電場を形成することを意味するものであり、光電場を増強させる方法は、プラズモン共鳴によるものであってもよいし、光導波モードの励起によるものであってもよい。

【0024】

また、「前記蛍光標識結合物質の蛍光標識の励起に起因して生じる光の量に基づいて、前記被検出物質の量を検出する」方法としては、蛍光標識からの蛍光を直接検出するものであってもよいし、間接的に検出するものであってもよい。

【0025】

具体的には、以下の態様(1)～(4)が挙げられる。

(1) 前記励起光の照射により前記金属層にプラズモンを励起し、該プラズモンにより前記増強した光電場を生じさせ、前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光を検出することにより前記被検出物質の量を検出する。

【0026】

(2) 前記励起光の照射により前記金属層にプラズモンを励起し、該プラズモンにより前記増強した光電場を生じさせ、前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光が前記金属層に新たにプラズモンを誘起することにより、前記誘電体プレートの前記他面から放射される放射光を検出することにより前記被検出物質の量を検出する。

【0027】

(3) 前記センサチップとして、前記金属層上に光導波層を備えたものを用い、前記励起光の照射により前記光導波層に光導波モードを励起し、該光導波モードにより前記増強した光電場を生じさせ、前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光を検出することにより前記被検出物質の量を検出する。

【0028】

(4) 前記センサチップとして、前記金属層上に光導波層を備えたものを用い、前記励起光の照射により前記光導波層に光導波モードを励起し、該光導波モードにより前記増強した光電場を生じさせ、前記蛍光標識の励起に起因して生じる前記光として、該励起によって該蛍光標識から生じる蛍光が前記金属層に新たにプラズモンを誘起することにより、前記誘電体プレートの前記他面から放射される放射光を検出することにより前記被検出物質の量を検出する。

【0029】

(1) および(2)においては、前記金属層を金属膜とし、金属膜と基板との界面に基板裏面から全反射角度以上の角度で励起光を入射させ、金属膜表面に表面プラズモンを励起するものであってもよいし、前記金属層を、励起光の波長よりも小さい周期の凹凸を表面に有する金属微細構造体あるいは、励起光の波長よりも小さいサイズの複数の金属ナノロッドにより構成し、励起光の照射により、金属微細構造体あるいは金属ナノロッドに局在プラズモンを励起するものであってもよい。

【0030】

本発明の検出装置は、上述の本発明の検出方法に用いられる検出装置であって、

10

20

30

40

50

前記センサチップを収容する収容部と、
前記センサ部に前記励起光を照射する励起光照射光学系と、
該励起光の照射により該センサ部上に生じた前記増強した光電場における、前記蛍光標識の励起に起因して生じる光を検出する光検出手段と、
前記センサチップに、pH調整液を注入して前記液体試料のpHを調整するpH調整手段とを備えたことを特徴とするものである。

【0031】

本発明の検出用試料セルは、上述の本発明の検出方法に使用される検出用試料セルであって、

液体試料が流下される流路を有する基台と、

前記流路の上流側に設けられた該流路に前記液体試料を注入するための注入口と、

前記流路の下流側に設けられた、前記注入口から注入された前記液体試料を該下流側に流すための空気孔と、

前記流路の、前記注入口と前記空気孔との間に設けられたセンサチップ部であって、前記流路の内壁面の少なくとも一部として設けられた誘電体プレートと、該プレートの試料接触面に設けられた少なくとも金属層を含むセンサ部とからなるセンサチップ部とを備えてなることを特徴とするものである。

【0032】

検出用試料セルにおいては、前記センサ部に、前記蛍光標識結合物質と結合する固定層を備えていることが望ましい。

【0033】

さらに、複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、前記液体試料中において該液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する蛍光物質を、前記蛍光標識として含む前記蛍光標識結合物質が、前記流路内の、前記センサ部より上流側に固定されていることが望ましい。

【0034】

本発明の試料セルは、前記固定層が、前記被検出物質と特異的に結合する第1の結合物質が固定されてなる層であり、前記蛍光標識結合物質が、前記被検出物質と特異的に結合する第2の結合物質を含み、前記被検出物質を介して前記第1の結合物質と結合するものであれば、サンドイッチ法によるアッセイを行うのに好適なものとなる。

【0035】

また、本発明の試料セルは、前記固定層が、前記被検出物質と特異的に結合する第1の結合物質が固定されてなる層であり、前記蛍光標識結合物質は、前記第1の結合物質と特異的に結合する第3の結合物質を含み、前記被検出物質と競合して前記第1の結合物質と結合するものであれば、競合法によるアッセイを行うのに好適なものとなる。

【0036】

さらに、前記センサ部において、前記金属層上に光導波層が備えられていてもよい。

【0037】

本発明の検出用キットは、上述の本発明の検出方法に使用される検出用キットであって、

液体試料が流下される流路を有する基台と、前記流路の上流側に設けられた該流路に前記液体試料を注入するための注入口と、前記流路の下流側に設けられた、前記注入口から注入された前記液体試料を該下流側に流すための空気孔と、前記流路の、前記注入口と前記空気孔との間に設けられたセンサチップ部であって、前記流路の内壁面の少なくとも一部として設けられた誘電体プレートと、該プレートの試料接触面に設けられた少なくとも金属層を含むセンサ部とからなるセンサチップ部と、該センサ部上に固定された、前記蛍光標識結合物質と結合する固定層とを備えた試料セル、および

前記液体試料と同時にしくは前記液体試料の流下後に、前記流路内に流下される、複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、前記液体試料中において該液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する蛍光物質を、前記蛍光

10

20

30

40

50

標識として含む前記蛍光標識結合物質を含んだ標識用溶液を備えてなることを特徴とするものである。

【0038】

さらに、前記試料セルは、前記センサ部において、前記金属層上に光導波層が備えられていてもよい。

【0039】

本発明の検出用キットは、前記試料セルの前記固定層が、前記被検出物質と特異的に結合する第1の結合物質が固定されてなる層であり、前記標識用溶液が、前記蛍光標識結合物質として、前記被検出物質と特異的に結合する第2の結合物質を含む、前記被検出物質を介して前記第1の結合物質と結合するものを備えている場合には、サンドイッチ法によるアッセイを行うのに好適なものとなる。また、前記試料セルの前記固定層が、前記被検出物質と特異的に結合する第1の結合物質が固定されてなる層であり、前記標識用溶液が、前記蛍光標識結合物質として、前記第1の結合物質と特異的に結合する第3の結合物質を含む、前記被検出物質と競合して前記第1の結合物質と結合するものを備えている場合には、競合法によるアッセイを行うのに好適なものとなる。

10

【0040】

なお、前記金属層の材料としては、Au、Ag、Cu、Al、Pt、Ni、Ti、およびこれらの合金からなる群より選択される少なくとも1種の金属を主成分とすることが望ましい。なおここで、「主成分」は、含量90質量%以上の成分と定義する。

20

【発明の効果】

【0041】

本発明の検出方法および装置によれば、センサ部上に、試料に含有される被検出物質の量に応じて結合される蛍光標識結合物質の蛍光標識として、複数の蛍光色素分子を、該蛍光色素分子からの蛍光を透過する材料により包含してなる、液体試料中において該液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する蛍光物質を用い、センサ部に蛍光標識結合物質を結合させた状態で、液体試料のpHを調整することにより、光電場増強効果の高いセンサ部表面に蛍光物質を引き寄せ、その引き寄せた状態で、その蛍光標識結合物質の蛍光標識の励起に起因して生じる光の量を検出するので、センサ部表面の増強度の大きい光電場を効率よく利用することができ、かつ蛍光標識の表面からの距離を一様にするため、信号強度のばらつきを抑制することができる。液体試料のpHを調整するのみで、センサ部への蛍光物質の引き寄せ効果を得ることができ、装置の複雑化を要することなく、S/Nのよい安定した信号を検出することができ、被検出物質の有無および/または量を精度よく検出することができる。

30

【0042】

本発明の検出用試料セルあるいは検出用キットを用いれば、本発明の検出方法を容易に実施することができ、増強された光電場を有効に利用し、かつ信号強度のばらつきを抑制し、被検出物質の有無および/または量を精度よく検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

以下、図面を参照して本発明の実施形態について説明する。なお、各図において説明の便宜上、各部の寸法は実際のものとは異ならせている。

40

「検出方法および装置」

本発明の検出方法は、例えば図1に示すように、誘電体プレート11と、該プレート11の一面に設けられた少なくとも金属層12を含むセンサ部14とからなるセンサチップ10を用い、センサ部14に試料を接触させることにより、該センサ部14上に、該試料に含有される被検出物質Aの量に応じた量の蛍光標識結合物質B_Fを結合させ、センサ部14に励起光L₀を照射することにより、センサ部14上に増強した光電場Dを生じさせ、該増強した光電場D内において、蛍光標識結合物質B_Fの蛍光標識Fの励起し、該蛍光標識の励起に起因して生じる光の量に基づいて、被検出物質Aの量を検出する検出方法であって、蛍光標識として、複数の蛍光色素分子fを、該蛍光色素分子fからの蛍光を透過

50

する材料により包含してなる、液体試料中において該液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する蛍光物質Fを用い、センサ部14に蛍光標識結合物質B_Fを結合させた状態で、液体試料のpHを調整して、蛍光物質の荷電状態を中性化することにより、該蛍光物質をセンサ部表面に引き寄せ、該蛍光物質Fを引き寄せた状態で被検出物質Aの量を検出することを特徴とする。

【0044】

液体試料中において該液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する蛍光物質としては、例えば、液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する官能基が表面修飾された蛍光物質を用いればよい。このとき、センサ部に、蛍光標識結合物質を結合させる際、液体試料を官能基がイオン化するpHとし、蛍光標識結合物質を結合させた後、液体試料を官能基が中性化するpHに調整することにより、蛍光物質をセンサ部表面に引き寄せることができる。

10

【0045】

なお、ここで、センサ部に結合するとは、センサ部に対して特異的に結合することを意味し、具体的には、蛍光標識結合物質が特異的に結合する物質が固定層としてセンサ部に設けられており、この固定層に結合する形態が挙げられる。

【0046】

本発明の検出装置は、上記検出方法を実施するためのものであって、センサチップ10を収容する収容部19と、センサ部14に励起光L₀を照射する励起光照射光学系20と、励起光L₀の照射により生じる、被検出物質Aに応じた量の光を検出する光検出手段30と、センサチップにpH調整液を注入して液体試料のpHを調整するpH調整手段35とを備えている。図中において、pH調整手段35は、pH調整液を注入するためのノズル部分のみを図示している。

20

【0047】

蛍光標識は、図1の一部に拡大して示すように、複数の蛍光色素分子fを、該複数の蛍光色素分子fから生じる蛍光を透過する材料16により包含してなる蛍光物質を用いることが好ましい。複数の蛍光色素分子fを含む蛍光物質Fを用いれば、蛍光量を増加させることができるからである。また、蛍光L_fを透過する材料16により蛍光色素分子fが内包されていることにより、金属層と所定以上の距離を保つことができ、蛍光色素分子fが金属層12に近接した場合に生じる金属消光を防止することができる。

30

【0048】

蛍光色素分子が金属層に接近しすぎた場合に生じる消光は、金属へのエネルギー移動に伴うものであり、このエネルギー移動の程度は、金属が半無限の厚さを持つ平面なら距離の3乗に反比例して、金属が無限に薄い平板なら距離の4乗に反比例して、また、金属が微粒子なら距離の6乗に反比例して小さくなる。従って、金属層12と蛍光色素分子fとの間の距離は少なくとも数nm以上、より好ましくは10nm以上確保しておくことが望ましい。

従来金属消光を防止する方法としては、金属層12上に自己組織化膜(SAM)を形成し、さらにカルボキシメチルデキストラン(CMD)膜を作製して金属膜と蛍光色素分子との距離を離す方法が知られている。しかしながら、金属膜上にこれらの金属消光を防止するための膜を設けるのは、センサチップ作製工程を複雑なものとし、非常に手間がかかる。一方、蛍光物質Fを用いれば、上述のような金属消光防止のための膜を設けることなく、非常に簡便な方法で効果的に金属消光を防止することができる。

40

【0049】

材料16としては、具体的には、ポリスチレンやSiO₂などが挙げられるが、蛍光色素分子fを内包でき、かつ、該蛍光色素分子fからの蛍光を透過させて外部に放出できるものであれば特に制限されない。

【0050】

なお、蛍光物質は、蛍光物質の電荷が中性化されて親水性が低下した場合に、蛍光標識結合物質の液体試料中におけるブラウン運動よりも、蛍光物質の親水性の低下による壁へ

50

の凝集効果が大きくなるサイズであることが望ましい。被検出物質となりうるタンパク、生体分子のうちでサイズが大きいものとしては、抗体（ $\sim 15 \text{ nm}$ ）、アルブミン（ $\sim 20 \text{ nm}$ ）などがあるが、被検出物質を帯電させるだけでは引き寄せ効果は不十分である。したがって、蛍光物質としては、粒径が 30 nm 程度以上の大きさであることが好ましい。粒径が 30 nm 未満であると、物質のブラウン運動により、十分な引き寄せ効果が得られない場合が生じる恐れがある。なお、蛍光物質の粒径が 70 nm 以上、さらには、 100 nm 以上であれば、より効果的な引き寄せが期待できる。

【0051】

また、拡散時間の点から粒径が 5300 nm 以下のものが好ましい。また、蛍光量およびセンサ部上への最密充填密度の観点および、表面プラズモンの擾乱の観点から $70 \text{ nm} \sim 900 \text{ nm}$ のものがさらに好ましく、 $130 \text{ nm} \sim 500 \text{ nm}$ のものが特に好ましい。

10

【0052】

蛍光物質Fは、例えば、以下のようにして作製することができる。

まず、ポリスチレン粒子（Estapor社、 $\phi 500 \text{ nm}$ 、 $10\% \text{ solid}$ 、カルボキシル基、製品番号K1—050）を調液して $0.1\% \text{ solid in phosphate}$ （ポリスチレン溶液： $\text{pH } 7.0$ ）を作製する。

次に、蛍光色素（林原生物化学研究所 NK-2014（励起 $\sim 780 \text{ nm}$ ）） 0.3 mg の酢酸エチル溶液（ 1 mL ）を作製する。

上記ポリスチレン溶液と蛍光色素溶液を混合し、エバポレートしながら含浸を行った後、遠心分離（ 15000 rpm 、 4 、 20 分を2回）を行い、上清を除去する。以上の工程により、ポリスチレンにより蛍光色素を内包してなる蛍光物質Fを得ることができる。このような手順で、ポリスチレン粒子に蛍光色素を含浸させて作製された蛍光物質Fの粒径はポリスチレン粒子の粒径と同一（上記例では $\phi 500 \text{ nm}$ ）となる。なお、上記において用いるポリスチレン粒子は表面に pH に応じて荷電状態が変化する官能基であるカルボキシル基が修飾されており、蛍光物質Fは表面にカルボキシル基が修飾された、蛍光 pH に応じて荷電状態が変化する蛍光物質である。

20

【0053】

蛍光標識結合物質 B_F は、被検出物質Aの量に応じた量だけセンサ部14上に結合する蛍光標識された結合物質であり、図1で示すように、サンドイッチ法によるアッセイを行う場合には、被検出物質と特異的に結合する結合物質と上述の蛍光物質Fとから構成されるものであり、後記する競合法によるアッセイを行う場合には、被検出物質と競合する結合物質と蛍光物質Fとから構成されるものである。より具体的には、センサチップ10として、センサ部14に被検出物質Aと特異的に結合する第1の結合物質 B_1 が固定層として固定されたものを用いた場合、サンドイッチ法では、蛍光標識結合物質 B_F として、被検出物質Aと特異的に結合する第2の結合物質 B_2 と、この結合物質 B_2 が修飾された蛍光物質Fとからなるものを用い、競合法では、蛍光標識結合物質として、被検出物質Aと競合して第1の結合物質と特異的に結合する第3の結合物質と、この結合物質が修飾された蛍光物質Fとからなるものを用いる。被検出物質Aが抗原である場合、第1の結合物質 B_1 として所謂1次抗体を用い、蛍光標識結合物質として所謂標識2次抗体を用いればよい。

30

40

【0054】

蛍光物質に表面修飾される、液体試料中において該液体試料の pH に応じて荷電状態が変化する官能基としては、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基、アミノ基、4級アンモニウム基、イミダゾール基、及びグアニジニウム基などを用いることができる。例えば、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）は、血清、血漿などの液体試料中、もしくはリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline, PBS）中など $\text{pH } 7.4$ 近傍において、 COO^- にイオン化した状態となり、 pH を5程度まで下げる（具体的には、酢酸バッファ溶液を用いる）ことにより COO^- がプロトン化して COOH となり電氣的に中性化する。また、アミノ基（ $-\text{NH}_2$ ）は、血清、血漿などの液体試料中、もしくはPBS中など $\text{pH } 7.4$ 近傍において、 NH_3^+ にイオン化した状態となり、 pH を9付近まで上げる（具体

50

的には、ボレートバッファ溶液を用いる) ことにより、 NH_3^+ が脱プロトン化して NH_2 となり電氣的に中性化する。

【0055】

図2に液体試料のpHを調整した際の蛍光物質の表面電荷と液体試料中における分散性についての模式図を示す。ここでは、官能基としてCOOHが蛍光物質に表面修飾されている例を示す。pH7近傍で官能基は COO^- にイオン化しており、蛍光物質同士は同じ電荷に帯電しているためお互いに反発し、また、イオン化しているために親水性が高く、液体試料中における分散性が高い。他方、pHを4.5まで下げて官能基を中性化させると、蛍光物質の親水性が低下して疎水的となり、液体試料中における分散性が低くなり、蛍光物質が壁側に寄る現象が生じる。すなわち、蛍光標識結合物質がセンサ部に結合している状態で、官能基が中性化した場合、最も近い壁側となるセンサ部表面に蛍光物質は引き寄せられることとなる。

10

【0056】

既述の図20の例では、蛍光標識が十分に金属層上に引き寄せられず、また、結合体の直立、横臥により蛍光標識のセンサ面からの距離にばらつきが生じていたが、液体試料のpHに応じて荷電状態が変化する蛍光物質を用いることにより、液体試料のpHを制御するのみで、蛍光物質を効率的に、かつ一様にセンサ部表面に引き寄せることができる。これにより、S/Nよく安定した信号を検出することが可能となる。

【0057】

本発明は、励起光の照射によりセンサ部上に増強した光電場を生じさせ、その増強した光電場において蛍光標識が励起されることによって生じる光を検出するものであるが、光電場を増強させる方法は、表面プラズモン共鳴あるいは局在プラズモン共鳴によるものであってもよいし、光導波モードの励起によるものであってもよい。また、蛍光標識から生じる蛍光を直接検出してもよいし、間接的に検出してもよい。具体的な態様については、以下の各実施形態で説明する。

20

【0058】

< 第1の実施形態 >

第1実施形態の検出方法および装置について図1を参照して説明する。図1は第1の実施形態の検出装置の概略構成を示す全体図である。本実施形態の検出方法および装置は、表面プラズモン共鳴により光電場を増強させ、増強された光電場において励起された蛍光を検出する蛍光検出方法および装置である。

30

【0059】

本実施形態の本蛍光検出方法では、誘電体プレート11およびその一面の所定領域に少なくとも金属層12として金属膜が設けられてなるセンサ部14を備えたセンサチップ10を用い、このセンサチップ10上に液体試料Sを保持する試料保持部13が備えられ、センサチップ10と液体試料を保持可能な試料保持部13による箱状の試料セルを用いている。

金属膜12は、所定領域に開口を有するマスクをプレート11の一表面に形成し、既知の蒸着法で成膜形成することができる。金属膜12の厚みは、金属膜12の材料と、励起光の波長により表面プラズモンが強く励起されるように適宜定めることが望ましい。例えば、励起光として780nmに中心波長を有するレーザ光を用い、金属膜として金(Au)膜を用いる場合、金属膜の厚みは50nm±20nmが好適である。さらに好ましくは、47nm±10nmである。なお、金属膜は、Au、Ag、Cu、Al、Pt、Ni、Ti、およびこれらの合金からなる群より選択される少なくとも1種の金属を主成分とするものが好ましい。

40

【0060】

本蛍光検出装置1は、センサチップ10を収容する収容部19と、収容部19に収容されたセンサチップ10の誘電体プレート11と金属膜12との界面に励起光Loを全反射角以上の入射角度で、センサチップ10の金属膜形成面とは反対の他面側から入射させる励起光照射光学系20と、励起光の照射により生じる蛍光Lfを検出する光検出器30と

50

、収容部 19 にセンサチップ 10 が収容された際に、センサチップに pH 調整液を注入して液体試料の pH を調整する pH 調整手段 35 とを備えている。

【0061】

励起光照射光学系 20 は、励起光 L_o を出力する半導体レーザ (LD) 等からなる光源 21 と、誘電体プレート 11 に一面が接触するように配置されたプリズム 22 とを備えている。プリズム 22 は、誘電体プレート 11 と金属膜 12 との界面で励起光 L_o が全反射するように誘電体プレート 11 内に励起光 L_o を導光するものである。なお、プリズム 22 と誘電体プレート 11 とは、屈折率マッチングオイルを介して接触されている。光源 21 は、プリズム 22 の他の一面からセンサチップ 10 の試料接触面 10a で励起光 L_o が全反射角以上で、かつ金属膜で表面プラズモン共鳴する特定の角度で入射するように配置されている。さらに、光源 21 とプリズム 22 との間に必要に応じて導光部材を配置してもよい。なお、励起光 L_o は、表面プラズモンを誘起するように p 偏光で界面に対して入射させる。

【0062】

光検出器 30 としては、CCD、PD (フォトダイオード)、フォトマルチプライア、c-MOS 等を適宜用いることができる。

【0063】

収容部 19 は、センサチップ 10 を収容する際に、センサチップのセンサ部 14 がプリズム 22 上に配置され、光検出器 30 で蛍光が検出できるよう構成されている。収容部 19 に対しセル (センサチップ 10) を、図中矢印 X 方向に出し入れすることができる。

【0064】

pH 調整手段 35 は、図 1 中においては、pH 調整液を注入するためのノズル部分のみ示しているが、pH 調整液を貯留する貯留室を備え、必要に応じて pH 調整液をノズルから滴下できるよう構成されている。なお、本実施形態では、pH 調整手段は、センサチップを収容部に収容した状態で、pH 調整液をセンサチップに注入する構成としたが、pH 調整は、収容部にセンサチップを収容する前の工程で行ってもよく、pH 調整手段がそのように構成されていてもよい。

【0065】

蛍光検出装置 1 を用いた本実施形態の蛍光検出方法について説明する。

ここでは、一例として、試料 S に含まれる被測定物質として抗原 A を検出する場合について説明する。

【0066】

センサチップ 10 として、センサチップ 10 の金属膜 12 上に、抗原 A と特異的に結合する第 1 の結合物質として 1 次抗体 B_1 が固定層として修飾されているものを用意する。

まず、試料保持部 13 中に検査対象である液体試料 S を流し、センサチップ 10 の金属膜 12 上に試料 S を接触させる。次いで同様に抗原 A と特異的に結合する第 2 の結合物質である 2 次抗体 B_2 と蛍光標識 F とからなる蛍光標識結合物質 (標識 2 次抗体) B_F を含む溶液を流す。この場合、金属膜 12 に表面修飾される 1 次抗体 B_1 と蛍光標識結合物質 B_F の 2 次抗体 B_2 として、被検出物質である抗原 A に対して互いに別の部位に結合するものを用いる。なお、ここでは、蛍光標識として、蛍光色素分子 f を内包する、カルボキシル基 (-COOH) が表面に修飾されてなる蛍光物質 F を用いている。カルボキシル基は生理食塩水等の pH 7.4 近傍の液体試料中において COO^- にイオン化し、pH を下げるとプロトン化して COOH となり電氣的に中性化する。

【0067】

試料 S 中に抗原 A が存在すれば、1 次抗体 B_1 に抗原 A が特異的に結合し、さらに抗原 A に蛍光標識結合物質 B_F の 2 次抗体 B_2 が結合して、1 次抗体 B_1 - 抗原 A - 2 次抗体 B_2 結合体 (以下、サンドイッチ結合体という。) が形成される。

【0068】

その後、サンドイッチ結合体と、未反応の蛍光標識結合物質 B_F を分離するため、緩衝

液を流し、未反応の蛍光標識結合物質を排除する。

【0069】

被検出物質（抗原 A）への標識のタイミングは特に制限されず、被検出物質（抗原 A）を第 1 の結合物質（1 次抗体 B_1 ）に結合させる前に、予め試料に蛍光標識を添加しておいてもよい。

【0070】

その後、センサチップ 10 を収容部 19 にセットした状態で、pH 調整手段 35 により、試料セル中に pH 調整液を分注して液体試料の pH を調整する。具体的には、酢酸バッファ溶液を注入することにより、pH を 5 付近まで、好ましくは pH 4.5 程度まで下げる。これにより、センサ部上に結合している蛍光標識結合物質 B_F の蛍光物質 F 表面の COO^- がプロトン化して $COOH$ となり、電氣的に中性化して、蛍光物質 F がセンサ部 14 に引き寄せられる。このように、蛍光物質 F をセンサ部 14 に引き寄せた状態で、センサチップ 10 の誘電体プレート 11 の所定領域に向けて励起光照射光学系 20 により励起光 L_o を照射する。励起光照射光学系 20 により励起光 L_o が誘電体プレート 11 と金属膜 12 との界面に対して全反射角以上の特定の入射角度で入射されることにより、金属膜上 12 の試料 S 中にエバネッセント波が滲み出し、このエバネッセント波によって金属膜 12 中に表面プラズモンが励起される。励起光の入射により金属層上に生じている光電場（エバネッセント波に起因する電場）が、この表面プラズモンにより増強され、金属層上に光電場増強領域 D が形成される。電場増強領域の金属膜表面には、蛍光物質 F が引き寄せられており、蛍光物質 F が励起されて（実質的にはその蛍光物質中の蛍光色素分子 f が励起されて）蛍光 L_f が発生する。表面プラズモンによる光電場増強の効果により蛍光は増強されたものとなる。光検出器 30 によりこの蛍光 L_f を検出することにより、蛍光標識結合物質と結合した被検出物質の有無および / または量を検出することができる。

10

20

【0071】

このように、液体試料の pH を調整して、蛍光物質の荷電状態（蛍光物質に表面修飾されている官能基の荷電状態）を中性化することにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で蛍光を検出することにより、安定した S / N よい信号を得ることができ、検査の信頼性を向上させることができる。

【0072】

< 第 1 の実施形態の設計変更例 >

30

上述の各実施形態においては励起光 L_o として、界面に所定の角度 θ で入射する平行光を入射するものとしたが、励起光としては、図 3 に模式的に示すような、角度 θ を中心に角度幅 $\Delta\theta$ を持つファンビーム（集束光）を用いてもよい。ファンビームの場合、プリズム 122 とプリズム上の金属膜 112 との界面に対して、角度 $\theta - \Delta\theta / 2 \sim \theta + \Delta\theta / 2$ の範囲の入射角度で入射することになり、この角度範囲内に共鳴角があれば、金属膜 112 に表面プラズモンを励起することができる。金属膜上への試料供給の前後において、金属膜上の媒質の屈折率が変化し、そのために表面プラズモンが生じる共鳴角が変化する。上述の実施形態のように平行光を励起光として用いる場合、共鳴角が変化するたびに平行光の入射角度を調整する必要がある。しかし、図 3 に示すような、界面に入射する入射角度に幅を持たせたファンビームを用いることにより、入射角度の調整をすることなく、共鳴角の変化に対応することができる。なお、ファンビームは入射角度による強度変化が少ないフラットな分布を持つものであることがより好ましい。

40

【0073】

< 第 2 の実施形態 >

第 2 の実施形態である検出方法および装置について図 4 を参照して説明する。図 4 は第 2 の実施形態の検出装置の概略構成を示す全体図である。本実施形態の検出方法および装置は、局在プラズモン共鳴により光電場を増強させ、増強された光電場において励起された蛍光を検出する蛍光検出方法および装置である。なお、以下においては、第 1 実施形態と同じ構成要素には同じ参照符号を付してある。

【0074】

50

図 4 に示す蛍光検出装置 2 は、用いられるセンサチップ 10' と、励起光照射光学系 20' とが上述の第 1 の実施形態の蛍光検出装置 1 とは異なる。

【0075】

センサチップ 10' は誘電体プレート 11 上に設けられる金属層 12' として、励起光の照射を受けて、所謂局在プラズモンを生じる、表面に励起光 L_o の波長よりも小さい凹凸構造を有する金属微細構造体、あるいは、励起光の波長よりも小さいサイズの複数の金属ナノロッドを備えている。このような局在プラズモンを生じさせる金属層 12' を備えた場合には、励起光を金属層 12' と誘電体プレート 11 との界面に全反射するように入射させる必要はなく、ここでは、励起光照射光学系 20' は、誘電体プレート上方から励起光 L_o を照射するよう構成されている。

10

【0076】

励起光照射光学系 20' は、励起光 L_o を出力する半導体レーザ (LD) 等からなる光源 21 と、励起光 L_o を反射してセンサチップ 10' へ導光するハーフミラー 23 とを備えている。ハーフミラー 23 は、励起光 L_o を反射し、蛍光 L_f を透過するものである。

【0077】

センサチップ 10' の具体例を図 5 A ~ 図 5 C に斜視図で示し説明する。

図 5 A に示すセンサチップ 10 A は、誘電体プレート 11 と、該プレート 11 の所定領域上にアレイ状に固着された複数の金属粒子 73 a からなる金属微細構造体 73 で構成されている。金属粒子 73 a の配列パターンは適宜設計できるが、略規則的であることが好ましい。かかる構成では、金属粒子 73 a の平均的な径及びピッチが励起光 L_o の波長よりも小さく設計される。

20

【0078】

図 5 B に示すセンサチップ 10 B は、誘電体プレート 11 と、該プレートの上の所定領域に設けられた、金属細線 74 a が格子状にパターン形成された金属パターン層からなる金属微細構造体 74 で構成されている。金属パターン層のパターンは適宜設計でき、略規則的であることが好ましい。かかる構成では、金属細線 74 a の平均的な線幅及びピッチが励起光 L_o の波長よりも小さく設計される。

【0079】

図 5 C に示すセンサチップ 10 C は特開 2007-171003 号公報に記載のような、Al などの金属 76 の陽極酸化の過程で形成される金属酸化物体 77 の複数の微細孔 77 a 内に成長させた複数のマッシュルーム状の金属 75 a からなる金属微細構造体 75 により構成されている。ここでは金属酸化物体 77 が誘電体プレートに相当する。この金属微細構造体 75 は、金属体 (Al 等) の一部を陽極酸化して金属酸化物体 (Al_2O_3 等) とし、陽極酸化の過程で形成される金属酸化物体 77 の複数の微細孔 77 a 内に各々金属 75 a をメッキ等により成長させて得ることができる。

30

図 5 C に示す例では、マッシュルーム状の金属 75 a の頭部が粒子状であり、サンプルプレート表面から見れば、金属微粒子が配列されたような構造になっている。かかる構成では、マッシュルーム状の金属 75 a の頭部が凸部であり、その平均的な径およびピッチが測定光 L の波長よりも小さく設計される。

【0080】

40

なお、励起光の照射を受けて局在プラズモンを生じる金属層 12' としては、その他、特開 2006-322067 号公報、特開 2006-250924 号公報などに記載の金属体を陽極酸化して得られる微細構造体を利用した種々の形態の金属微細構造体を用いることができる。

【0081】

さらには、局在プラズモンを生じさせる金属層は、表面が粗面化された金属膜により構成されていてもよい。粗面化方法としては、酸化還元等を利用した電気化学的な方法等が挙げられる。また、金属層を、サンプルプレート上に配置された複数の金属ナノロッドにより構成してもよい。金属ナノロッドのサイズは、短軸長さが 3 nm ~ 50 nm 程度、長軸長さが 25 nm ~ 1000 nm 程度であり、長軸長さを励起光の波長よりも小さいサイ

50

ズとする。金属ナノロッドについては、例えば特開 2 0 0 7 - 1 3 9 6 1 2 号公報に記載されている。

【 0 0 8 2 】

なお、金属層 1 2 ' として用いられる、金属微細構造体あるいは金属ナノロッドとしては、A u、A g、C u、A l、P t、N i、T i、およびこれらの合金からなる群より選択される少なくとも 1 種の金属を主成分とするものが好ましい。

【 0 0 8 3 】

蛍光検出装置 2 を用いた本実施形態の蛍光検出方法について説明する。

センサチップを用意し、抗原—抗体反応をさせ、蛍光物質をセンサ部上に引き寄せる工程は、第 1 の実施形態と同様であるため、説明を省略する。以下の実施形態において同様とする。

蛍光物質 F をセンサ部 1 4 に引き寄せた状態で、センサチップ 1 0 の誘電体プレート 1 1 の所定領域に向けて励起光照射光学系 2 0 ' により励起光 L o を照射する。光源 2 1 から出射された励起光 L o はハーフミラー 2 3 により反射されてセンサチップ 1 0 ' の試料接触面上に入射される。この励起光 L o の照射により、金属層 1 2 ' の表面で局在プラズモンが励起される。励起光の入射により金属層上に生じている光電場（近接場光に起因する電場）が、この局在プラズモンにより増強され、金属層上に光電場増強領域 D が形成される。光電場増強領域の金属膜表面には、蛍光物質 F が引き寄せられており、蛍光物質 F が励起されて（実質的にはその蛍光物質中の蛍光色素分子 f が励起されて）蛍光 L f が発生する。局在プラズモンによる光電場増強の効果により蛍光は増強されたものとなる。この蛍光 L f を光検出器 3 0 により検出することにより、蛍光標識結合物質と結合した被検出物質の有無および / または量を検出することができる。

【 0 0 8 4 】

本実施形態においても、液体試料の p H を調整して、蛍光物質の荷電状態（蛍光物質に表面修飾されている官能基の荷電状態）を中性化することにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で蛍光を検出するので、第 1 の実施形態と同様の効果を得ることができる。

【 0 0 8 5 】

< 第 3 の実施形態 >

第 3 の実施形態の検出方法および装置について図 6 を参照して説明する。図 6 は第 3 の実施形態の検出装置の概略構成を示す全体図である。本実施形態の検出方法および装置は、表面プラズモン共鳴により電場を増強させ、増強された電場において励起された蛍光が金属層に新たにプラズモンを誘起することにより、誘電体プレートの金属層形成面と反対の面側から放射される、新たに誘起されたプラズモンからの放射光を検出する放射光検出方法および装置である。

【 0 0 8 6 】

図 6 に示す放射光検出装置 3 は、第 1 の実施形態の蛍光検出装置と光検出器の配置が異なる。本放射光検出装置 3 においては、光検出器 3 0 が、蛍光が金属層に新たに表面プラズモンを誘起することによって誘電体プレートの金属層形成面と反対の面側から放射される、新たに誘起されたプラズモンからの放射光 L p を検出するように配置されている。

【 0 0 8 7 】

放射光検出装置 3 を用いた本実施形態の放射光検出方法について説明する。

蛍光物質 F をセンサ部 1 4 に引き寄せた状態で、第 1 の実施形態と同様に、励起光照射光学系 2 0 により励起光 L o を照射する。励起光照射光学系 2 0 により励起光 L o が誘電体プレート 1 1 と金属膜 1 2 との界面に対して全反射角以上の特定の入射角度で入射されることにより、金属膜上 1 2 の試料 S 中にエバネッセント波が滲み出し、このエバネッセント波によって金属膜 1 2 中に表面プラズモンが励起される。励起光の入射により金属層上に生じている光電場（エバネッセント波に起因する電場）が、この表面プラズモンにより増強され、金属層上に光電場増強領域 D が形成される。光電場増強領域の金属膜表面には、蛍光物質 F が引き寄せられており、蛍光物質 F が励起されて（実質的にはその蛍光物

質中の蛍光色素分子 f が励起されて) 蛍光 L_f が発生する。このとき、表面プラズモンによる光電場増強の効果により蛍光は増強されたものとなる。金属膜 12 上で生じたこの蛍光 L_f が、金属膜 12 に表面プラズモンを新たに誘起し、この表面プラズモンによりセンサチップ 10 の金属膜形成面と反対側から特定の角度で放射光 L_p が射出される。光検出器 30 によって、この放射光 L_p を検出することにより、蛍光標識結合物質と結合した被検出物質の有無および / または量を検出することができる。

【0088】

放射光 L_p は蛍光が金属膜の特定の波数の表面プラズモンと結合する際に生じるものであり、蛍光の波長に応じてその結合する波数は定まり、その波数に応じて放射光の射出角度が定まる。通常励起光 L_o の波長と蛍光の波長とは異なることから、蛍光により励起される表面プラズモンは、励起光 L_o により生じた表面プラズモンとは異なる波数のものとなり、励起光 L_o の入射角度とは異なる角度で放射光 L_p は放射される。

10

【0089】

本実施形態においても、液体試料の pH を調整して、蛍光物質の荷電状態 (蛍光物質に表面修飾されている官能基の荷電状態) を中性化することにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で蛍光を生じさせ、この増強された蛍光に起因する放射光を検出するので、第 1 の実施形態と同様の効果を得ることができる。

【0090】

さらに、本実施形態では、センサ表面で生じる蛍光に起因する光をセンサ裏面側から検出するので、蛍光 L_f が光吸収の大きい溶媒を通過する距離を数十 nm 程度と削減することができる。したがって、例えば血液における光吸収をほぼ無視することができ、血液を遠心分離し赤血球などの着色成分を除去したり、血球フィルタを通して血清あるいは血漿状態にしたりするという前処理を行うことなく測定が可能となる。

20

【0091】

< 第 4 の実施形態 >

第 4 の実施形態の検出方法および装置について図 7 を参照して説明する。図 7 は第 4 の実施形態の検出装置の概略構成を示す全体図である。本実施形態の検出方法および装置は、金属層上に光導波層を備えたセンサチップを用い、励起光の照射により光導波層に光導波モードを励起し、光導波モードにより光電場を増強させ、増強された光電場において励起された蛍光を検出する蛍光検出方法および装置である。

30

【0092】

図 7 に示す蛍光検出装置 4 の構成は、第 1 の実施形態の蛍光検出装置の構成と同じであるが、用いられるセンサチップが異なり、このセンサチップの違いにより、光電場増強のメカニズムが異なる。

【0093】

センサチップ 10 は金属層 12 a 上に光導波層 12 b を備えている。光導波層 12 b の層厚は、特に制限されることはなく、光導波モードが誘起されるように、励起光 L_o の波長、入射角度および光導波層 12 b の屈折率等を考慮して定めることができる。例えば、上記と同様に励起光 L_o として $780 nm$ に中心波長を有するレーザ光を用い、光導波層 12 b として 1 層のシリコン酸化膜からなるものを用いる場合には、 $500 \sim 600 nm$ 程度が好ましい。なお、光導波層 12 b は、1 層以上の誘電体等の光導波材料からなる内部光導波層を含む積層構造であってもよく、この積層構造は、金属層側から順に内部光導波層および内部金属層の交互積層構造であることが好ましい。

40

【0094】

蛍光検出装置 4 を用いた本実施形態の蛍光検出方法について説明する。

【0095】

蛍光物質 F をセンサ部 14 に引き寄せた状態で、第 1 の実施形態と同様に、励起光照射光学系 20 により励起光 L_o を照射する。励起光照射光学系 20 により励起光 L_o が誘電体プレート 11 と金属層 12 a との界面に対して全反射角以上の特定の入射角度で入射されることにより、金属層 12 a 上にエバネッセント波がしみ出し、このエバネッセント波

50

が光導波層 12b の光導波モードと結合し、光導波モードが励起される。励起光の入射により光導波層上に生じている光電場（エバネッセント波に起因する電場）が、この光導波モードにより増強され、光導波層上に光電場増強領域 D が形成される。光電場増強領域の金属膜表面には、蛍光物質 F が引き寄せられており、蛍光物質 F が励起されて（実質的にはその蛍光物質中の蛍光色素分子 f が励起されて）蛍光 Lf が発生する。このとき、光導波モードによる光電場増強の効果により蛍光は増強されたものとなる。光検出器 30 によって、この蛍光 Lf を検出することにより、蛍光標識結合物質と結合した被検出物質の有無および / または量を検出することができる。

【0096】

本実施形態においても、液体試料の pH を調整して、蛍光物質の荷電状態（蛍光物質に表面修飾されている官能基の荷電状態）を中性化することにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で蛍光を生じさせ、この増強された蛍光に起因する放射光を検出するので、第 1 の実施形態と同様の効果を得ることができる。

【0097】

さらに、光導波モードの励起により生じる光増強電場分布は、表面プラズモンにより生じる光増強電場分布と比較して表面からの距離に伴う電場減衰の程度が緩やかであることから、蛍光標識として、複数の蛍光色素分子を内包する径の大きな蛍光物質を用いた場合、表面プラズモンによる光電場増強を用いるよりも大きな蛍光量増加効果を得ることができる。

【0098】

< 第 5 の実施形態 >

第 5 の実施形態の検出方法および装置について図 8 を参照して説明する。図 8 は第 5 の実施形態の検出装置の概略構成を示す全体図である。本実施形態の検出方法および装置は、金属層上に光導波層を備えたセンサチップを用い、励起光の照射により光導波層に光導波モードを励起し、光導波モードにより光電場を増強させ、増強された光電場において励起された蛍光が金属層に新たにプラズモンを誘起することにより、誘電体プレート上の金属層形成面と反対の面側から放射される、新たに誘起されたプラズモンからの放射光を検出する放射光検出方法および装置である。

【0099】

図 8 に示す本実施形態の放射光検出装置 5 は、第 3 の実施形態の放射光検出装置と同様の構成であり、本実施形態の検出方法において用いられるセンサチップは第 4 の実施形態の蛍光検出方法で用いられるセンサチップと同様である。

【0100】

放射光検出装置 5 を用いた本実施形態の蛍光検出方法について説明する。

【0101】

蛍光物質 F をセンサ部 14 に引き寄せた状態で、第 1 の実施形態と同様に、励起光照射光学系 20 により励起光 Lo を照射する。励起光照射光学系 20 により励起光 Lo が誘電体プレート 11 と金属層 12a との界面に対して全反射角以上の特定の入射角度で入射することにより、金属層 12a 上にエバネッセント波が滲み出し、このエバネッセント波が光導波層 12b の光導波モードと結合し、光導波モードが励起される。励起光の入射により光導波層上に生じている光電場（エバネッセント波に起因する電場）が、この光導波モードにより増強され、光導波層上に光電場増強領域 D が形成される。光電場増強領域の金属膜表面には、蛍光物質 F が引き寄せられており、蛍光物質 F が励起されて（実質的にはその蛍光物質中の蛍光色素分子 f が励起されて）蛍光 Lf が発生する。このとき、このとき、光導波モードによる光電場増強の効果により蛍光は増強されたものとなる。光導波層 12b 上で生じたこの蛍光 Lf が、金属層 12a に表面プラズモンを新たに誘起し、この表面プラズモンによりセンサチップ 10 の金属層形成面と反対側から特定の角度で放射光 Lp が射出される。光検出器 30 によって、この放射光 Lp を検出することにより、蛍光標識 F が標識された被検出物質の有無および / または量を検出することができる。

【0102】

10

20

30

40

50

本実施形態においても、液体試料のpHを調整して、蛍光物質の荷電状態（蛍光物質に表面修飾されている官能基の荷電状態）を中性化することにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で蛍光を生じさせ、この増強された蛍光に起因する放射光を検出するので、第1の実施形態と同様の効果を得ることができる。

【0103】

また、本実施形態では、センサ表面で生じる蛍光に起因する光をセンサ裏面側から検出するので、蛍光Lfが光吸収の大きい溶媒を通過する距離を数十nm程度と削減することができる。第2の実施形態と同様の効果を得ることができる。

【0104】

さらに、光導波モードの励起による電場増強を用いていることから、第4の実施形態と同様に蛍光量増加効果を得ることができる。

【0105】

なお、本発明の方法においては、蛍光標識として、図9に示すように、さらに、材料16の表面に蛍光を透過する厚みの金属被膜19が設けられたものを用いてもよい。金属被膜19は、材料16の全表面を覆うものであってもよいし、全表面を覆うものでなく、一部表面が露出するように設けられたものであってもよい。金属被膜19の材料としては、上述の金属層と同様の金属材料を用いることができる。

【0106】

蛍光物質の表面に金属被膜19を備えた場合、センサチップ10、10'の金属層12、12'に発生した表面プラズモンあるいは局在プラズモンが蛍光物質Fの金属被膜19のウィスパリング・ギャラリー・モードにカップリングし、蛍光物質F内の蛍光色素分子fをさらに高効率に励起できる。なお、ウィスパリング・ギャラリー・モードとは、ここで用いられるφ5300nm以下程度の蛍光物質のような微小球の球表面に局在し、周回する電磁波モードである。

【0107】

蛍光物質への金属被膜方法の一例を挙げる。

まず、前述手順により蛍光物質を作製し、その表面にポリエチレンイミン（PEI）（エポミン、日本触媒社）を修飾する。

次に、粒子表面のPEIに粒径15nmのPdナノ粒子（平均粒径19nm、徳力本社）を吸着させる。

Pdナノ粒子が吸着したポリスチレン粒子を無電解金メッキ液（HAuCl₄、小島化学薬品社）に浸漬させることで、Pdナノ粒子を触媒とする無電界メッキを利用して、ポリスチレン粒子表面に金膜を作製する。

【0108】

「検出用試料セル」

本発明の検出方法のセンサチップとして使用される検出用試料セルについて説明する。

【0109】

< 第1の実施形態の試料セル >

図10Aは、第1の実施形態の試料セル50の構成を示す平面図、図10Bは試料セル50の側断面図である。

検出用試料セル50は、誘電体プレートからなる基台51と、該基台51上に液体試料Sを保持し、液体試料Sの流路52を形成するスペース53と、試料Sを注入する注入口54aおよび流路52を流下した試料を排出する排出口となる空気孔54bを備えたガラス板からなる上板54とから構成され、流路52の注入口54aと空気孔54bとの間の試料接触面となる基台51の所定領域上に設けられた金属層58a、59aからなるセンサ部58、59が備えられている。また、注入口54aから流路52に至る箇所にはメンブレンフィルター55が備えられ、流路52下流の空気孔54bに接続する部分には廃液だめ56が形成されている。

【0110】

本実施形態においては、基台51が誘電体プレートから構成され、センサ部の誘電体ブ

10

20

30

40

50

レート兼ねているが、基台としては、センサ部が構成される部分のみ誘電体プレートで構成されたものを用いてもよい。

【0111】

試料セル50は、上述した第1～第5のいずれの実施形態の検出装置および方法において使用することができる。

【0112】

本検出用試料セル50は、被検出物質に応じて、該被検出物質と特異的に結合する第1の結合物質をセンサ部に適宜固定して使用することができる。

さらに、流路内の、センサ部より上流側に、被検出物質と特異的に結合する第2の結合物質および被検出物質と競合して第1の結合物質と特異的に結合する第3の結合物質のうちのいずれか一方の結合物質とその結合物質および、液体試料中で極性を示す官能基が表面に修飾された蛍光物質とからなる蛍光標識結合物質を適宜固定して使用することができる。

【0113】

<第2実施形態の試料セル>

図11は、サンドイッチ法によるアッセイに適した第2の実施形態の試料セルの側断面を示すものである。本実施形態の試料セル50Aにおいては、基台51上に流路52上流側から、被検出物質である抗原と特異的に結合する2次抗体（第2の結合物質） B_2 と該2次抗体 B_2 および液体試料のpHにより荷電状態が変化する官能基（例えば、 $-COOH$ や $-NH_2$ 等、図示せず。）が表面修飾された蛍光物質Fとからなる蛍光標識結合物質 B_F （以下、「標識2次抗体 B_F 」という。）が物理吸着させてある標識2次抗体吸着エリア57、被検出物質である抗原と特異的に結合する1次抗体（第1の結合物質） B_1 が固定された第1の測定エリア58、被検出物質である抗原Aとは結合せず標識2次抗体 B_F と特異的に結合する1次抗体 B_0 が固定された第2の測定エリア59が順に設けられている。この第1および第2の測定エリア58、59がセンサ部に相当する。本例では、センサ部に2つの測定エリアを設けた例を挙げているが、測定エリアは1つのみであってもよい。

【0114】

基台51上の第1の測定エリア58および第2の測定エリア59にはそれぞれ金属層として、金（Au）膜58aおよび59aが形成されている。第1の測定エリア58のAu膜58a上にはさらに1次抗体 B_1 が固定され、第2の測定エリア59のAu膜59a上にはさらに1次抗体 B_1 とは異なる1次抗体 B_0 が固定されている。互いに異なる1次抗体が設けられている点以外は第1の測定エリア58と第2の測定エリア59は同一の構成である。第2の測定エリア59に固定されている1次抗体 B_0 は抗原Aとは結合せず、2次抗体 B_2 と直接結合するものである。これにより、流路を流れた標識2次抗体の量、活性など反応に関する変動要因と励起光照射光学系20、金（Au）膜58aおよび59a、液体試料Sなど光電場増強度に関する変動要因を検出し、較正に利用することができる。なお、第2の測定エリアには1次抗体 B_0 ではなく、既知量の標識物質が予め固定されていてもよい。標識物質は標識2次抗体 B_F の蛍光物質Fと同種のものであってもよいし、波長、サイズの異なる蛍光物質であってもよい。さらには金属微粒子などであってもよい。この場合、励起光照射光学系20、金膜58a、59a、液体試料Sなど光電場増強度に関する変動要因のみを検出し、較正に利用することができる。第2の測定エリア59に標識2次抗体 B_F 、あるいは標識2次抗体 B_F とは異なる既知量の標識物質のどちらを固定するかは、較正目的および方法によって適宜定めればよい。

【0115】

試料セル50Aは、上述した第1～第5のいずれの実施形態の検出装置および方法においてもセンサチップに代えて同様に使用することができる。試料セル50は、収容部19において、励起光照射光学系20および検出器30に相対的にX方向に移動可能とされており、第1の測定エリア58からの蛍光もしくは放射光の検出測定の後、第2の測定エリア59を検出位置に移動させて第2の測定エリア59からの蛍光もしくは放射光の検出を

行うように構成されている。

【0116】

本発明の検出方法において、本実施形態の検出用試料セル50Aを用い、血液（全血）中に被検出物質である抗原を含むか否について、サンドイッチ法によるアッセイを行う手順について図12を参照して説明する。

【0117】

step 1：注入口54aから検査対象である血液（全血）Soを注入する。ここでは、この血液So中に被検出物質である抗原が含まれている場合について説明する。図12中において全血Soは網掛け領域で示している。

step 2：全血Soはメンブレンフィルター55により濾過され、赤血球、白血球などの大きな分子が残渣となる。

step 3：メンブレンフィルター55で血球分離された血液（血漿）Sが毛細管現象で流路52に染み出す。または反応を早め、検出時間を短縮するために、空気孔54bにポンプを接続し、メンブレンフィルター55で血球分離された血液をポンプの吸引、押し出し操作によって流下させてもよい。図12中において血漿Sは斜線領域で示している。

step 4：流路52に染み出した血漿Sと標識2次抗体B_Fとが混ぜ合わされ、血漿中の抗原Aが標識2次抗体B_Fの2次抗体B₂と結合する。

step 5：血漿Sは流路52に沿って空気孔54b側へと徐々に流れ、2次抗体B₂と結合した抗原Aが、第1の測定エリア58上に固定されている1次抗体B₁と結合し、抗原Aが1次抗体B₁と2次抗体B₂（標識2次抗体B_F）で挟み込まれたいわゆるサンドイッチが形成される。

step 6：抗原Aと結合しなかった標識2次抗体B_Fの一部は第2の測定エリア59上に固定されている1次抗体B₀と結合する。さらに抗原Aまたは1次抗体B₀と結合しなかった標識2次抗体B_Fが測定エリア上に残っている場合があっても、後続の血漿が洗浄の役割を担い、プレート上に浮遊および非特異吸着していた標識2次抗体を洗い流す。

【0118】

このように、血液を注入口から注入し、測定エリア58上に抗原Aが1次抗体B₁と標識2次抗体B_Fで挟まれたサンドイッチが形成されるまでのstep 1からstep 6の後、注入口からpH調整液を注入して試料セル中の溶液を蛍光物質に表面修飾されている官能基が中性化するpHとすることにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せ、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で、第1の測定エリア58からの蛍光もしくは放射光強度（以下、「信号」という。）を検出する。その後、第2の測定エリア59からの信号を検出できるように試料セル50をX方向に移動させ、第2の測定エリア59からの信号を検出する。標識2次抗体B_Fと結合する1次抗体B₀を固定している第2の測定エリア59からの信号は標識2次抗体の流下した量、活性などの反応条件を反映した信号であると考えられ、この信号をリファレンスとして、第1の測定エリアからの信号を補正することにより、より精度の高い検出結果（抗原の有無および/またはその濃度）を得ることができる。また、既述の通り、第2の測定エリア59に既知量の標識物質（蛍光物質、金属微粒子）をあらかじめ固定した場合であっても、同様に、第2の測定エリア59からの信号をリファレンスとして第1の測定エリアからの信号を補正することができる。

【0119】

< 第3実施形態の試料セル >

図13は、競合法によるアッセイに適した第3の実施形態の試料セルの側断面を示すものである。本実施形態の試料セル50Bにおいては、基台51上には流路52上流側から、被検出物質である抗原Aとは結合せず、後述の1次抗体と特異的に結合する2次抗体C₃（第3の結合物質）と該2次抗体C₃および液体試料のpHにより荷電状態が変化する官能基（例えば、-COOHや-NH₂等、図示せず。）が表面修飾された蛍光物質Fとからなる蛍光標識結合物質C_F（以下、「標識2次抗体C_F」という。）を物理吸着させてある標識2次抗体吸着エリア57'、被検出物質である抗原Aおよび2次抗体C₃と特異的に結合する1次抗体C₁（第1の結合物質）が固定された第1の測定エリア58'、

被検出物質である抗原 A とは結合せず標識 2 次抗体 C_F の 2 次抗体 C_3 と特異的に結合する 1 次抗体 C_0 が固定された第 2 の測定エリア 59' が順に設けられている。

【0120】

基台 51 上の第 1 の測定エリア 58 および第 2 の測定エリア 59 にはそれぞれ金属層として、金 (Au) 膜 58a および 59a が形成されている。第 1 の測定エリア 58' の Au 膜 58a 上にさらに 1 次抗体 C_1 が固定され、第 2 の測定エリア 59' の Au 膜 59a 上にさらに 1 次抗体 C_1 とは異なる 1 次抗体 C_0 が固定されている。互いに異なる 1 次抗体が設けられている点以外は第 1 の測定エリア 58' と第 2 の測定エリア 59' は同一の構成である。抗原 A と 2 次抗体 C_3 とは、第 1 の測定エリア 58' に固定されている 1 次抗体 C_1 に競合的に結合するものである。第 2 の測定エリア 59' に固定されている 1 次抗体 C_0 は抗原 A とは結合せず、2 次抗体 C_3 と直接結合するものである。これにより、流路を流れた標識 2 次抗体の量、活性など反応に関する変動要因と励起光照射光学 20、金 (Au) 膜 58a および 59a、液体試料 S など光電場増強度に関する変動要因を検出し、較正に利用することができる。なお、第 2 の測定エリアには 1 次抗体 C_0 ではなく、既知量の標識物質が予め固定されていてもよい。標識物質は標識 2 次抗体 C_F の蛍光物質 F と同種のものであってもよいし、波長、サイズの異なる蛍光物質であってもよい。さらには金属微粒子などであってもよい。この場合、励起光照射光学系 20、金 (Au) 膜 58a および 59a、液体試料 S など光電場増強度に関する変動要因のみを検出し、較正に利用することができる。第 2 の測定エリア 59 に標識 2 次抗体 C_F 、あるいは標識 2 次抗体 C_F とは異なる既知量の標識物質のどちらを固定するかは較正目的および方法によって適宜定めればよい。

【0121】

試料セル 50B は、既述の試料セル 50A と同様に、上述した第 1 ~ 第 5 のいずれの実施形態の検出装置および方法においてセンサチップに代えて同様に使用することができる。

【0122】

本発明の検出方法において、本実施形態の検出用試料セル 50B を用い、血液 (全血) 中に被検出物質である抗原を含むか否について、サンドイッチ法によるアッセイを行う手順について図 14 を参照して説明する。

【0123】

step 1: 注入口 54a から検査対象である血液 (全血) So を注入する。ここでは、この血液 So 中に被検出物質である抗原が含まれている場合について説明する。図 14 中において全血 So は網掛け領域で示している。

step 2: 全血 So はメンブレンフィルター 55 により濾過され、赤血球、白血球などの大きな分子が残渣となる。

step 3: メンブレンフィルター 55 で血球分離された血液 (血漿) S が毛細管現象で流路 52 に染み出す。または反応を早め、検出時間を短縮するために、空気孔 54b にポンプを接続し、メンブレンフィルター 55 で血球分離された血液をポンプの吸引、押し出し操作によって流下させてもよい。図 14 中において血漿 S は斜線領域で示している。

step 4: 流路 52 に染み出した血漿 S と標識 2 次抗体 C_F とが混ぜ合わされる。

step 5: 血漿 S は流路 52 に沿って空気孔 54b 側へと徐々に流れ、抗原 A と標識 2 次抗体 C_F の 2 次抗体 C_3 とが競合して、第 1 の測定エリア 58' 上に固定されている 1 次抗体 C_1 と結合する。

step 6: 第 1 の測定エリア 58' 上の 1 次抗体 C_1 と結合しなかった標識 2 次抗体 C_F の一部は、第 2 の測定エリア 59' 上に固定されている 1 次抗体 C_0 と結合する。さらに 1 次抗体 C_1 または C_0 と結合していない標識 2 次抗体 C_F が測定エリア上に残っている場合があっても、後続の血漿が洗浄の役割を担い、プレート上に浮遊および非特異吸着していた標識 2 次抗体 C_F を洗い流す。

【0124】

このように、血液を注入口から注入し、測定エリア 58' 上の 1 次抗体 C_1 に抗原 A お

よび2次抗体 C_3 が競合結合するまでのstep 1からStep 6の後、注入口からpH調整液を注入して試料セル中の溶液を蛍光物質に表面修飾されている官能基が中性化するpHとすることにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せ、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で、第1の測定エリア58'および第2の測定エリア59'からの蛍光もしくは放射光強度などの信号を検出する。その後、第2の測定エリア59からの信号を検出できるように試料セル50をX方向に移動させ、第2の測定エリア59からの信号を検出し、この信号をリファレンスとして、第1の測定エリアからの信号を補正することにより、より精度の高い検出結果（抗原の有無および/またはその濃度）を得ることができる。

【0125】

競合法においては、被検出物質Aの濃度が高ければ、第1の結合物質 C_1 と結合する第3の結合物質 C_3 の量が少なく、すなわち金属層上の蛍光物質Fの数が少なくなるため蛍光強度が小さくなり、一方、被検出物質Aの濃度が低ければ、第1の結合物質 C_1 と結合する第3の結合物質 C_3 の量が多く、すなわち金属膜上の蛍光物質Fの数が多くなるため蛍光強度が大きくなる。競合法は被検出物質にエピトープが一つあれば測定が可能であることから、低分子量の物質の検出に適している。

【0126】

<第4実施形態の試料セル>

図15は、第4の実施形態の試料セル70の構成を示す平面図である。

検出用試料セル70は、誘電体プレートからなる図示しない基台と、該基台上に液体試料Sを保持し、液体試料Sの流路72および該流路から分岐した枝路80を形成するスペーサと、試料Sを注入する注入口74a、流路72を流下した試料を排出する排出口となる空気孔74b、および枝路80にpH調整液を注入するためのpH調整液注入口79を備えたガラス板からなる上板とから構成され、流路72の注入口74aと空気孔74bとの間の試料接触面となる基台の所定領域上に設けられた金属層からなるセンサ部78が備えられている。また、注入口74aから流路72に至る箇所にはメンブレンフィルターが備えられ、流路72下流の空気孔74bに接続する部分には廃液だめ76が形成されている。また、流路72と枝路80の分岐部分には切り替えバルブ81が設けられており、試料とpH調整液とのセンサ部78に送液する順序を制御可能となっている。また、センサ部下流側にもバルブ82が設けられており、センサ部に蛍光標識結合物質を結合させる（抗原—抗体反応をさせる）際に一旦試料液をセンサ部に溜めるためにバルブを閉じ、センサ部への蛍光標識結合物質の結合反応の後、未反応の蛍光標識結合物質を洗い流す際、及びpH調整液によりセンサ部上に溶液のpHを調整する際などには、バルブを開き、試料液を廃液だめ76へと流下可能に構成されている。

【0127】

このようにpH調整液を注入するための注入口79および枝路80、送液の順序や流量を調整するためのバルブ81、82を備えたセンサチップを用いればセンサ部上の液体試料のpHの調整を簡便に行うことができる。

【0128】

試料セル70は、上述した第1～第5のいずれの実施形態の検出装置および方法においても使用することができる。

【0129】

本検出用試料セル70は、被検出物質に応じて、該被検出物質と特異的に結合する第1の結合物質をセンサ部に適宜固定して使用することができる。

さらに、流路内の、センサ部より上流側に、具体的には、本試料セル70は流路81の、注入口74aからセンサ部78に至る箇所に、標識2次抗体吸着エリア75を備え、被検出物質と特異的に結合する第2の結合物質および被検出物質と競合して第1の結合物質と特異的に結合する第3の結合物質のうちのいずれか一方の結合物質とその結合物質および、液体試料中で極性を示す官能基が表面に修飾された蛍光物質とからなる蛍光標識結合物質を適宜固定して使用することができる。

【0130】

(試料セルの設計変更例)

光導波モードによる光電場増強を利用する検出方法および装置に用いる試料セルの断面図を図 1 6 に示す。図 1 0 A および図 1 0 B に示した第 1 の実施形態の試料セルの構成と略同一であるが、センサ部の金属層 5 8 a、5 9 a 上にさらに光導波層 5 8 b、5 9 b を備えている。

【 0 1 3 1 】

この試料セルも適宜、センサ部に第 1 の結合物質を、センサ部上流側に蛍光標識結合物質を固定し使用することができる。

【 0 1 3 2 】

「検出用キット」

本発明の検出方法に使用される検出用キットについて説明する。

【 0 1 3 3 】

図 1 6 は蛍光検出用キット 6 0 の構成を示す模式図である。

【 0 1 3 4 】

検出用キット 6 0 は、試料セル 6 1 と、蛍光検出測定を行うにあたり、液体試料と同時もしくは液体試料の流下後に、試料セル 6 1 の流路内に流下される、抗原 A と特異的に結合する 2 次抗体 (第 2 の結合物質) B_2 と、該 2 次抗体 B_2 および液体試料の pH により荷電状態が変化する官能基 (例えば、 $-COOH$ や $-NH_2$ 等、図示せず。) が表面修飾された蛍光物質 F とからなる蛍光標識結合物質 B_F (以下、「標識 2 次抗体 B_F 」という。) を含む標識用溶液 6 3 とを備えている。

【 0 1 3 5 】

試料セル 6 1 は、試料セル内に、蛍光標識結合物質 B_F を物理吸着した物理吸着エリアを備えていない点でのみ上述の第 2 の実施形態の試料セル 5 0 A と異なり、その他は試料セル 5 0 A と略同一の構成である。

【 0 1 3 6 】

本発明の検出方法において、本実施形態の検出用キット 6 0 を用い、血液 (全血) 中に被検出物質である抗原を含むか否について、サンドイッチ法によるアッセイを行う手順について図 1 7 を参照して説明する。

【 0 1 3 7 】

s t e p 1 : 注入口 5 4 a から検査対象である血液 (全血) S_0 を注入する。ここでは、この血液 S_0 中に被検出物質である抗原が含まれている場合について説明する。図 1 7 中において全血 S_0 は網掛け領域で示している。

s t e p 2 : 全血 S_0 はメンブレンフィルター 5 5 により濾過され、赤血球、白血球などの大きな分子が残渣となる。引き続き、メンブレンフィルター 5 5 で血球分離された血液 (血漿) S が毛細管現象で流路 5 2 に染み出す。または反応を早め、検出時間を短縮するために、空気孔にポンプを接続し、メンブレンフィルター 5 5 で血球分離された血液をポンプの吸引、押し出し操作によって流下させてもよい。図 1 7 中において血漿 S は斜線領域で示している。

s t e p 3 : 血漿 S は流路 5 2 に沿って空気孔 5 4 b 側へと徐々に流れ、血漿 S 中の抗原 A が、第 1 の測定エリア 5 8 上に固定されている 1 次抗体 B_1 と結合する。

s t e p 4 : 標識 2 次抗体 B_F を含む標識用溶液 6 3 を供給口 5 4 a から注入する。

s t e p 5 : 標識 2 次抗体 B_F が毛細管現象により流路 5 2 に染み出す。または反応を早め、検出時間を短縮するために、空気孔にポンプを接続し、メンブレンフィルター 5 5 で血球分離された血液をポンプの吸引、押し出し操作によって流下させてもよい。

s t e p 6 : 標識 2 次抗体 B_F は徐々に下流側に流れ、該標識 2 次抗体 B_F の 2 次抗体 B_2 が抗原 A と結合し、抗原 A が 1 次抗体 B_1 と 2 次抗体 B_2 で挟み込まれたいわゆるサンドイッチが形成される。抗原 A と結合しなかった 2 次抗体 B_2 の一部は第 2 の測定エリア 5 9 上に固定されている 1 次抗体 B_0 と結合する。さらに抗原 A または 1 次抗体 B_0 と結合しなかった標識 2 次抗体 B_F が測定エリア上に残っている場合があっても、後続の血漿が洗浄の役割を担い、プレート上に浮遊および非特異吸着していた標識 2 次抗体 B_F を洗

10

20

30

40

50

い流す。

【0138】

このように、血液を注入口から注入し、抗原が1次抗体および2次抗体と結合するまでのstep 1からStep 6の後、検出装置において、注入口からpH調整液を注入して試料セル中の溶液を蛍光物質に表面修飾されている官能基が中性化するpHとすることにより、蛍光物質をセンサ部に引き寄せ、蛍光物質をセンサ部に引き寄せた状態で、第1の測定エリア58からの信号を検出する。その後、第2の測定エリア59からの信号を検出できるように試料セル61をX方向に移動させ、同様に、センサ部上に蛍光標識結合物質を引き寄せ、第2の測定エリア59からの信号を検出する。標識2次抗体 B_F の2次抗体 B_2 と結合する1次抗体 B_0 を固定している第2の測定エリア59からの信号は標識2次抗体の流下した量、活性などの反応条件を反映した信号であると考えられ、この信号をリファレンスとして、第1の測定エリアからの信号を補正することにより、より精度の高い検出結果（抗原の有無および/またはその濃度）を得ることができる。また、第2の測定エリア59に既知量の標識物質（蛍光物質、金属微粒子）をあらかじめ固定しておき、第2の測定エリア59からの蛍光信号をリファレンスとして第1の測定エリアからの信号を補正してもよい。

10

【0139】

蛍光物質への2次抗体修飾方法および標識用溶液の作製方法の一例を説明する。

前述の手順で作製した蛍光物質溶液（蛍光物質の直径500nm、励起波長780nm）に50mM MESバッファおよび、5.0mg/mLの抗hCGモノクローナル抗体（Anti-hCG 5008 SP-5、Medix Biochemica社）溶液を加えて攪拌する。これにより蛍光物質への抗体の修飾がなされる。

20

【0140】

次に、400mg/mLのWSC（品番01-62-0011、和光純薬）水溶液を加え室温で攪拌する。

さらに、2mol/L Glycine水溶液を添加し攪拌した後、遠心分離にて、粒子を沈降させる。

最後に、上清を取り除き、PBS（pH7.4）を加え、超音波洗浄機により、表面修飾された蛍光物質を再分散させる。さらに遠心分離を行い、上清を除いた後、1%BSAのPBS（pH7.4）溶液500 μ L加え、表面修飾された蛍光物質を再分散させて標識用溶液とする。

30

【0141】

（検査用キットの設計変更例）

光導波モードによる光電場増強を利用する検出方法および装置に用いる試料セルとしては、図15に示す、センサ部の金属層58a、59a上にさらに光導波層58b、59bを備え試料セルの光導波層58b、59b上に、それぞれ1次抗体 B_1 、1次抗体 B_1 とは異なる1次抗体 B_0 を固定したものをを用いればよい。

【0142】

また、さらに、競合法によるアッセイを行う場合には、試料セルとして、1次抗体 B_1 、1次抗体 B_2 に代えて、被検出物質である抗原Aおよび2次抗体 C_3 と特異的に結合する1次抗体 C_1 （第1の結合物質）、被検出物質である抗原Aとは結合せず2次抗体 C_3 と特異的に結合する1次抗体 C_0 をセンサ部上に固定したものをを用い、標識用溶液として、被検出物質である抗原Aとは結合せず、後述の1次抗体と特異的に結合する2次抗体 C_3 （第3の結合物質）と該2次抗体 C_3 および液体試料のpHにより荷電状態が変化する官能基が表面修飾された蛍光物質とからなる蛍光標識結合物質 C_F を含むものをを用いればよい。

40

【実施例】

【0143】

生理食塩水（NaCl、150mM（mmol/L）含有、pH7.4）中に、抗hCGモノクローナル抗体からなる2次抗体とカルボキシル基（-COOH）とが表面修飾された蛍光物

50

質からなる標識 2 次抗体、および被検出物質として h C G を含む試料液を用意し、センサ部の金属膜上に抗体が認識する抗原の部位（エピトープ）が 2 次抗体とは異なる抗 h C G モノクローナル抗体からなる 1 次抗体が固定層として固定されてなる試料セルを用意した。

【 0 1 4 4 】

試料セルに試料液を流し、抗原—抗体反応により、固定層にサンドイッチ結合体を形成させ、緩衝液により未反応の標識 2 次抗体を洗い流した。ここまでの工程はすべての試料セルについて共通とした。

【 0 1 4 5 】

その後、p H 調整液を注入して試料セル中の試料液の p H を調整した。具体的には、p H 3.0 に調整するためには、10 m M (m o l / L) のグリシン - 塩酸緩衝液 (10 m M glycine-HCl) を用い、p H 4.5、5.0、5.5 に調整するためには、10 m M 酢酸緩衝液 (10 m M sodium acetate) を用い、p H 8.5 に調整するためには、10 m M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (10 m M disodium tetraborate) を用い、p H 10.0 に調整するためには、1 M 塩化ナトリウム - 50 m M 水酸化ナトリウム緩衝液 (1 M NaCl 50 m M NaOH) を用いた。 10

【 0 1 4 6 】

p H 3 . 5 から p H 1 0 の異なる 1 0 の p H 毎に 6 個の試料セルについて蛍光信号量の測定を行った。測定結果として得られた、信号強度のバッファ p H 依存性を図 1 9 に示す。なお、図 1 9 においては、蛍光信号量は p H 7.4 の値で規格化している。

【 0 1 4 7 】

図 1 9 に示すように、蛍光信号量は、バッファの p H が 4 . 5 のとき、p H 7 . 4 のときの蛍光信号量と比較して 1 . 2 倍以上となり、またエラーバーで示される、信号のバラツキも半分以下と小さくなるという結果が得られた。 20

【 0 1 4 8 】

上述の実施例のものと同様の表面修飾がなされた蛍光物質を含む、上記実施例の測定ポイントとなる各 p H 値の溶液中における、蛍光物質の表面電位（ゼータ（ ζ ）電位）をゼータ電位計（シスメックス株式会社製 ゼータサイザーナノ（商品名））により測定した。図 1 9 のグラフ中に、蛍光信号測定を行った各 p H における蛍光物質の ζ 電位を併せて示した。

【 0 1 4 9 】

図 1 9 に示すように、C O O H が表面修飾された蛍光物質は、バッファ p H が 4 に近づくにつれて電荷が小さくなっており、また、p H が 8 に近づくにつれ電荷が大きくなっていることが確認できた。 30

【 0 1 5 0 】

図 1 9 に示す、蛍光信号量および蛍光物質の表面電位の p H 依存性から、蛍光物質表面の電荷が小さいほど蛍光信号量が大きくなり、信号が大きいほど信号のばらつきも小さくなることが明らかである。このように、p H を調整することにより、蛍光信号の増加および信号ばらつきの抑制効果が得られることが確認できた。

【 0 1 5 1 】

なお、電荷が小さいほど（電氣的に中性であるほど）蛍光物質の親水性が低くなり疎水的になり、よりセンサ表面に蛍光物質が近づく（センサ表面に引き寄せられる）ために蛍光信号が増加し、かつ信号のばらつきが小さくなるものと考えられる。また、バッファの p H が 4 を過ぎると蛍光信号が急激に低下するのは、酸性が強すぎ、抗原—抗体反応の結合力が低下し、結合が解消されてしまっていると考えられる。 40

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 2 】

【図 1】本発明の第 1 実施形態による蛍光検出装置を示す概略構成図

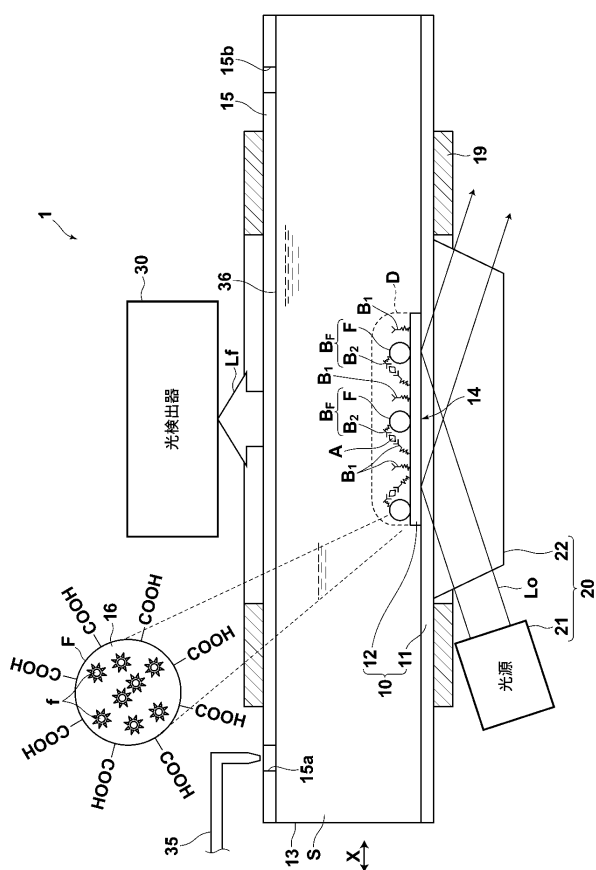
【図 2】液体試料の p H、蛍光物質の表面電荷および液体試料中における蛍光物質の分散性について説明するための模式図

【図 3】励起光照射光学系の設計変更例を示す図 50

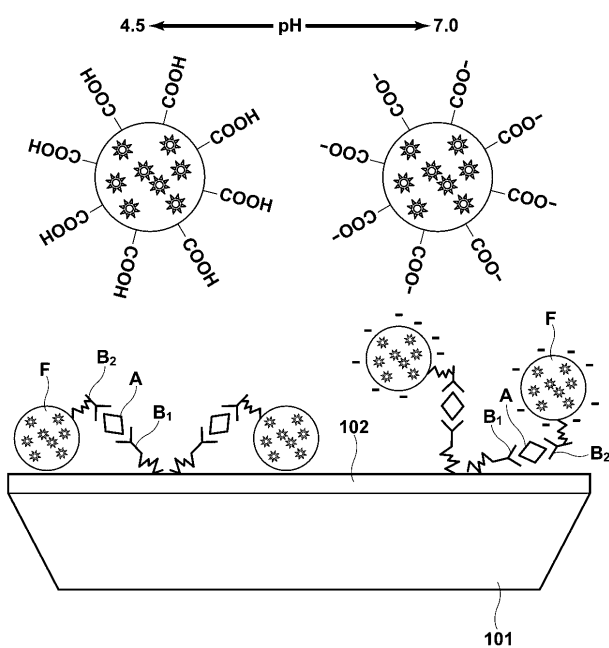
【図 4】本発明の第 2 実施形態による蛍光検出装置を示す概略構成図	
【図 5 A】蛍光検出装置 2 に用いられるセンサチップのセンサ部を示す概略構成図（その 1）	
【図 5 B】蛍光検出装置 2 に用いられるセンサチップのセンサ部を示す概略構成図（その 2）	
【図 5 C】蛍光検出装置 2 に用いられるセンサチップのセンサ部を示す概略構成図（その 3）	
【図 6】本発明の第 3 実施形態による検出装置を示す概略構成図	
【図 7】本発明の第 4 実施形態による検出装置を示す概略構成図	
【図 8】本発明の第 5 実施形態による検出装置を示す概略構成図	10
【図 9】金属被膜を有する蛍光物質を示す模式図	
【図 10 A】本発明の第 1 の実施形態の試料セルを示す平面図	
【図 10 B】本発明の第 1 の実施形態の試料セルを示す側断面図	
【図 11】本発明の第 2 の実施形態の試料セルを示す側断面図	
【図 12】第 2 の実施形態の試料セルを用いたサンドイッチ法によるアッセイ手順を示す図	
【図 13】本発明の第 3 の実施形態の試料セルを示す側断面図	
【図 14】第 3 の実施形態の試料セルを用いた競合法によるアッセイ手順を示す図	
【図 15】第 4 の実施形態の試料セルを示す平面図	
【図 16】試料セルの設計変更例を示す側断面図	20
【図 17】本発明の 1 実施形態の蛍光検出用キットの構成を示す模式図	
【図 18】蛍光検出用キットを用いたサンドイッチ法によるアッセイ手順を示す図	
【図 19】蛍光信号量のバッファ pH 依存性を示すグラフ	
【図 20】従来例を示す図	
【符号の説明】	
【0153】	
1、2、3、4、5	検出装置
10、10'、10''	センサチップ
11	誘電体プレート
12	金属層（金属膜）
12'	金属層（金属微細構造体）
14	センサ部
16	材料
19	金属被膜
20、20'	励起光照射光学系
21	光源
22	プリズム
30	光検出器
35	pH 調整手段
50、50A、50B、61、70	試料セル
51	誘電体プレート
52	流路
53	スペーサ
54	上板
57	標識 2 次抗体吸着エリア
58、59	検出エリア
60	検出用キット
63	検出用標識溶液
A	抗原（被検出物質）
B ₁ 、C ₁	1 次抗体（第 1 の結合物質）

B ₂	2 次 抗 体 (第 2 の 結 合 物 質)
B _F 、C _F	標 識 2 次 抗 体 (蛍 光 標 識 結 合 物 質)
C ₃	2 次 抗 体 (第 3 の 結 合 物 質)
F	蛍 光 物 質
f	蛍 光 色 素 分 子
L _o	励 起 光
L _f	蛍 光
L _p	放 射 光

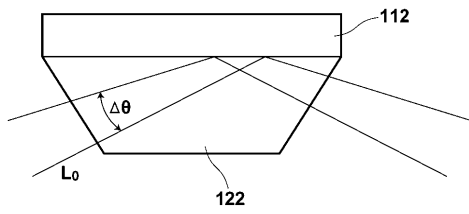
【圖 1】



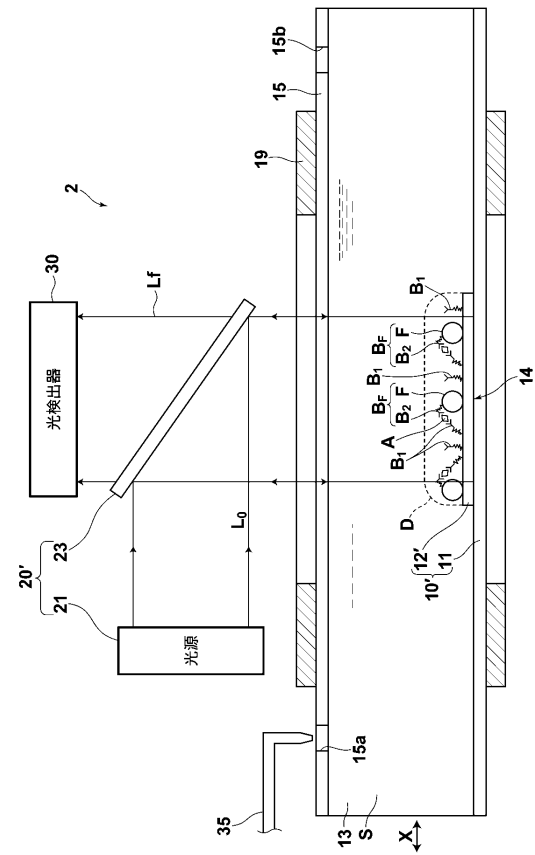
【圖 2】



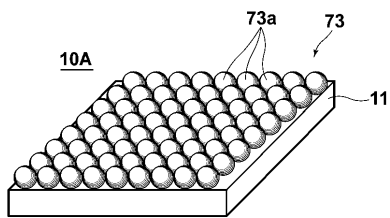
【図 3】



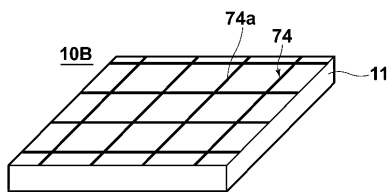
【図 4】



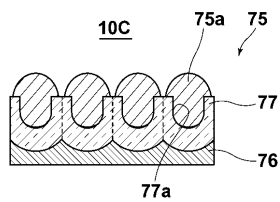
【図 5 A】



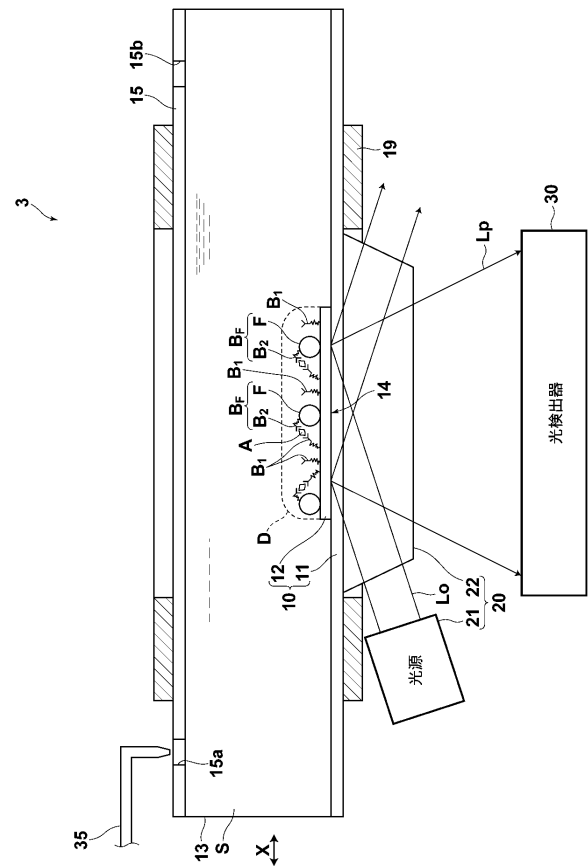
【図 5 B】



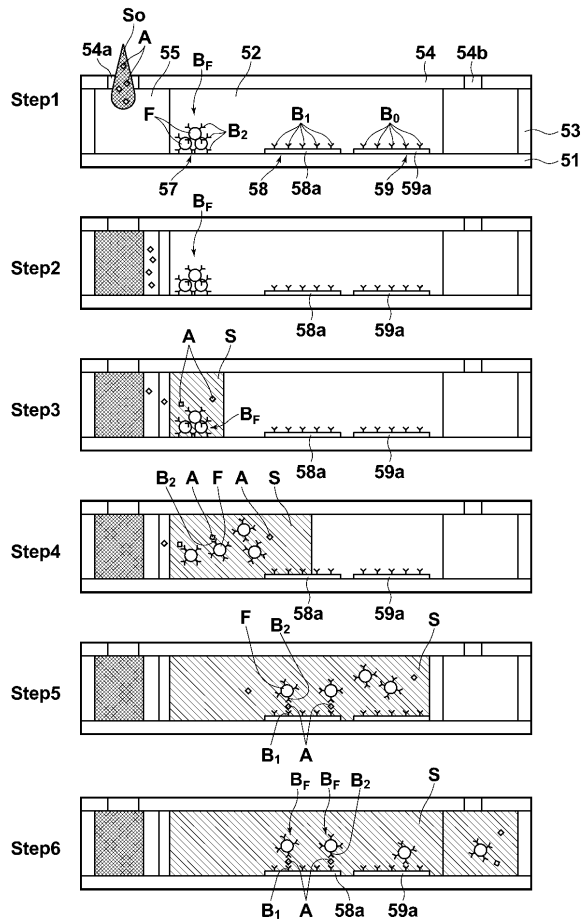
【図 5 C】



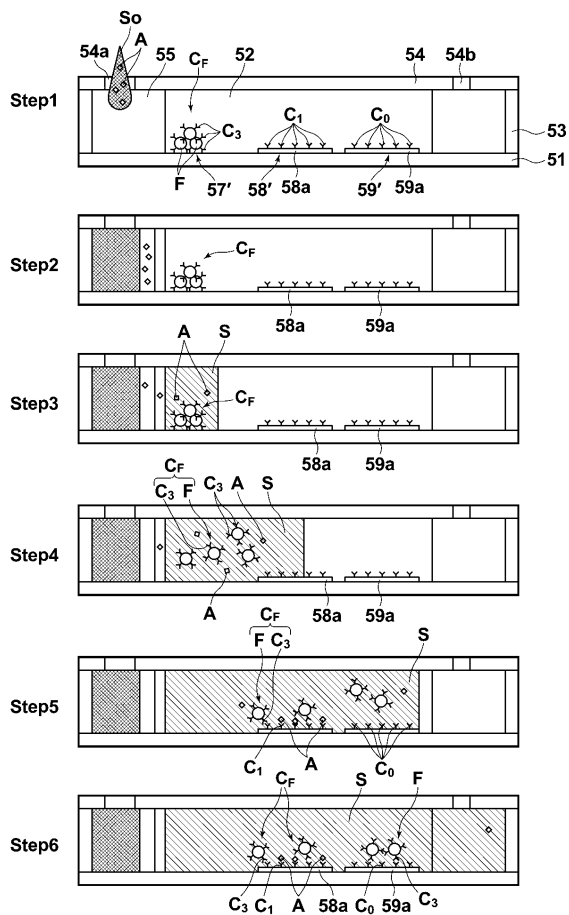
【図 6】



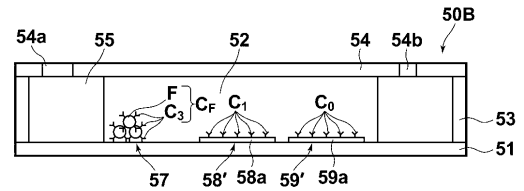
【図 1 2】



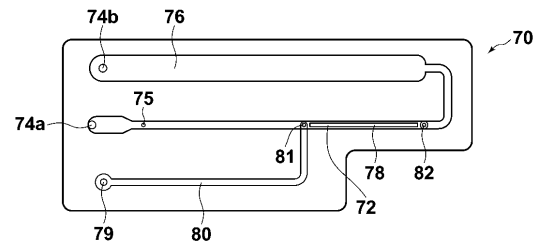
【図 1 4】



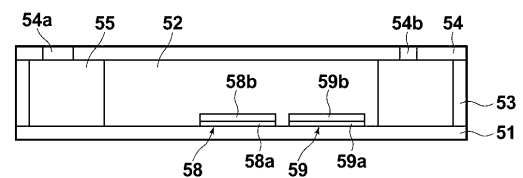
【図 1 3】



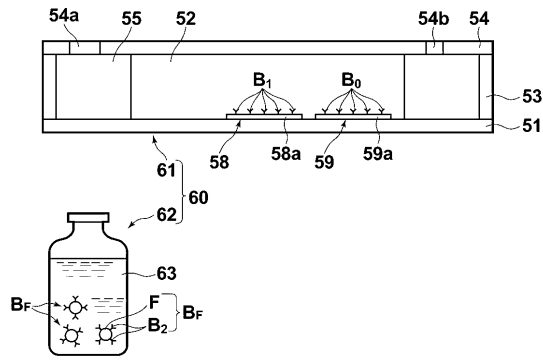
【図 1 5】



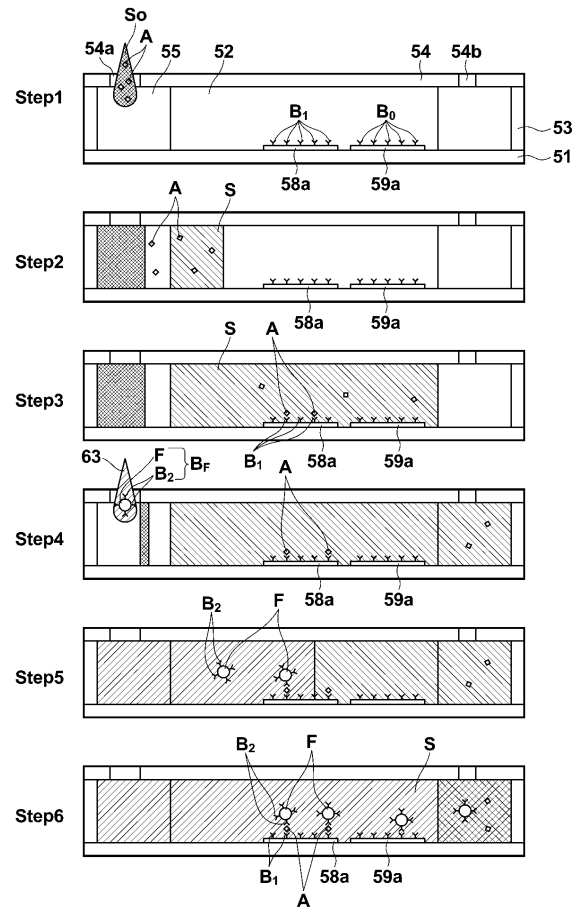
【図 1 6】



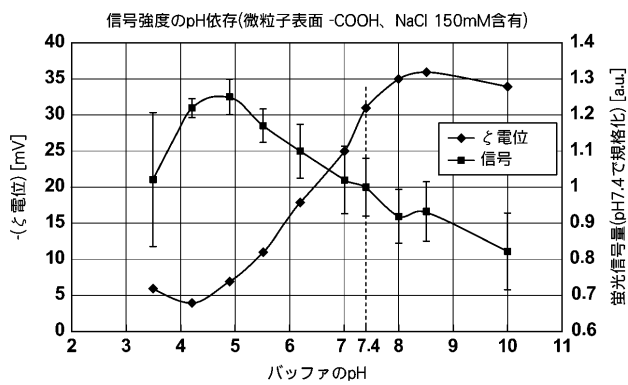
【図 17】



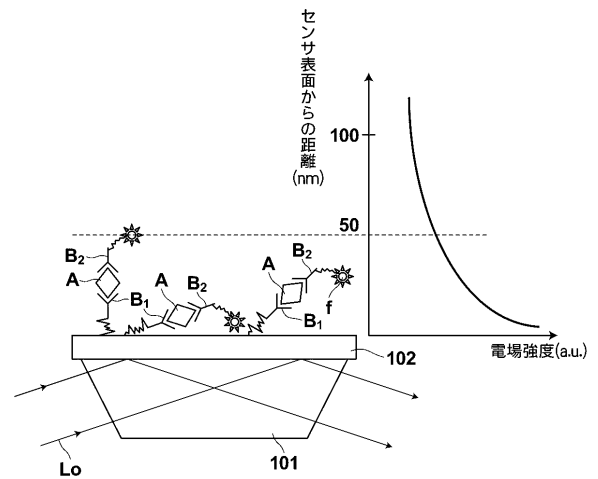
【図 18】



【図 19】



【図 20】



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 35/08

E

F ターム(参考) 2G057 AA04 AB02 AB04 AB07 AC01 BA05 CB01 CB10 GA06
2G058 CC14 CC17 DA07 EA14 GA02