

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012 年 1 月 19 日(19.01.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/008258 A1

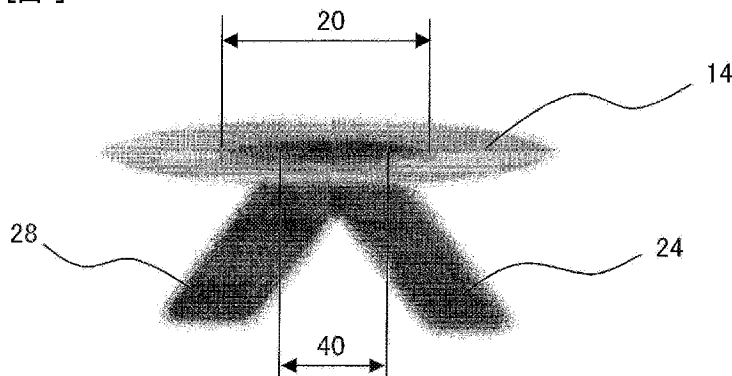
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01N 21/27 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/063687
- (22) 国際出願日: 2011 年 6 月 15 日(15.06.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-159575 2010 年 7 月 14 日(14.07.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): コニカミノルタホールディングス株式会社(KONICA MINOLTA HOLDINGS, INC.) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 青木 洋一(AOKI, Youichi) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町 1 番地 コニカミノルタテクノロジーズセンター株式会社内 Tokyo (JP). 松尾 正
- 貴(MATSUO, Masataka) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町 1 番地 コニカミノルタテクノロジーズセンター株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目 1 3 番 6 号 五反田山崎ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: FLUORESCENCE DETECTION DEVICE, AND FLUORESCENCE DETECTION METHOD USING THE DEVICE

(54) 発明の名称: 蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法

[図2]



(57) Abstract: [Problem] To provide a fluorescence detection device which can produce measurement results having reduced fluctuations and can achieve the detection of an analyte with high accuracy and a fluorescence detection method using the device. [Solution] A fluorescence detection device in which excited light is ejected from a light source to release an evanescent wave from a reflection surface, thereby exciting a fluorescence substance that labels an analyte immobilized on the reflection surface, and the excited fluorescence is detected by a light detection means, and a fluorescence detection method using the device. The fluorescence detection device and the fluorescence detection method using the device are so adapted that a chip structure comprising a reflection surface and a reaction layer formed on the reflection surface is attached to or removed from a main body of the device upon use or is fixed on the main body of the device upon use, wherein the reaction layer comprises a flow path and a reaction area which is formed in the flow path and has a ligand for capturing the analyte, and wherein the relationship between the size of the reaction area formed in the flow path and the size of an excitation area which is an area to be irradiated with the excited light for exciting the fluorescent substance that has labeled the analyte captured in the reaction area are so defined as to fulfill the following relationship: the reaction area > the excitation area.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2012/008258 A1



(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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[課題] 測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度にアナライトの検出を行うことのできる蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法を提供すること。 [解決手段] 光源より励起光を照射して反射面からエバネッセント波を放出させ、前記反射面上に固定化されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させ、この励起された蛍光を光検出手段で検出するようにした蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法であって、前記蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法は、反射面とその反射面上に形成された反応層とを有するチップ構造体を、装置本体に対して着脱して使用する、または装置本体に対して固定して使用するよう構成されており、前記反応層は、流路と、前記流路内に前記アナライトを捕捉するためのリガンドが形成された反応エリアと、を備え、前記流路内に形成された前記反応エリアと、前記反応エリアで捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させるための励起光を照射する範囲である励起エリアと、の関係が、反応エリア>励起エリアの関係を満たすように各エリアの大きさが規定されている。

明 細 書

発明の名称： 蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、光源より励起光を照射することで反射面より生じたエバネッセント波を用いて、アナライトを標識した蛍光物質を励起させ、この励起された蛍光を検出することで高精度なアナライト検出を可能とする蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法に関する。

背景技術

[0002] 従来より、全反射条件下で反射する反射面に光源より励起光を照射することで、この反射面からエバネッセント波が生ずるという原理に基づき、例えば生体内の極微量なアナライトの検出を行うようにした蛍光検出装置が用いられている。

[0003] このような蛍光検出装置としては、例えば表面プラズモン増強蛍光センサ 100 が挙げられ、その基本的な構造は図 7 に示したように、まず誘電体部材 102 と、誘電体部材 102 の主面上に形成された金属薄膜 104 と、金属薄膜 104 の上面に形成され、流路 108 上の所定位置にリガンドが固定化された反応エリア 110 を備えた反応層 106 と、を有するチップ構造体 112 を備えている。本図における反応エリア 110 は、流路 108 の形成された範囲よりも小さい範囲であり、さらに金属薄膜 104 に励起光が照射される領域である励起エリアよりも小さい範囲である（図 8 参照）。

[0004] そして、チップ構造体 112 の誘電体部材 102 側には、誘電体部材 102 内に入射され、金属薄膜 104 に向かって全反射条件で励起光 114 を照射する光源 116 を備え、さらに光源 116 から照射され金属薄膜 104 で反射した反射光 118 を受光する受光手段 120 が備えられている。

[0005] 一方、チップ構造体 112 の反応層 106 側には、反応層 106 の反応エリア 110 で固定化されたアナライトを標識した蛍光物質が発する蛍光 122 を受光する光検出手段 124 が設けられている。

- [0006] なお、反応層１０６の反応エリア１１０と光検出手段１２４との間には、蛍光１２２を効率良く集光するための集光部材１２６と、蛍光１２２以外に含まれる光を除去し、必要な蛍光１２２のみを選択する波長選択機能部材１２８が設けられている。
- [0007] そして、表面プラズモン増強蛍光センサ１００の使用においては、反応層１０６の反応エリア１１０内に、流路１０８を介してアナライトを有する試料溶液を流入させ、その後、このアナライトを標識する蛍光物質を、同様に流路１０８を介して流入させることで、反応エリア１１０に蛍光物質で標識されたアナライトが固定化された状態とする。
- [0008] そして、この状態で光源１１６より誘電体部材１０２を介して金属薄膜１０４に全反射条件で励起光１１４を照射することで、金属薄膜１０４の表面からエバネッセント波を放出させ、このエバネッセント波により反応エリア１１０の全面にわたって、固定化されたアナライトを標識する蛍光１２２を励起させる。
- [0009] このとき、図８に示したように反応エリア１１０の全面にわたって、固定化されたアナライトを標識する蛍光１２２が励起されるように、光源１１６から金属薄膜１０４に照射される励起光１１４の励起エリア１３０は、反応エリア１１０の全範囲またはそれ以上の範囲の大きさに設定されている。
- [0010] なお励起エリア１３０を金属薄膜１０４の形成されたエリアよりも内側の範囲に設定している理由としては、励起エリア１３０を金属薄膜１０４の形成されたエリアよりも大きく設定した場合、誘電体部材１０２などからの自家蛍光の影響を受け、感度が下がるためであり、これを防止するためである。
- [0011] そして、エバネッセント波によって励起された反応エリア１１０全面の蛍光１２２を光検出手段１２４で検出することで、極微量および／または極低濃度のアナライトを検出することができるようになっている。
- [0012] このような表面プラズモン増強蛍光センサ１００に代表される蛍光検出装置は、特に生体分子間などの微細な分子活動を観察するのに好適である。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] ところで、上述したような従来の表面プラズモン増強蛍光センサ１００では、流路１０８を介して反応層１０６の反応エリア１１０にアナライトを有する試料溶液を流入させた際、流路１０８が一方向送液系（Onepass, 循環送液系）であると、流路上流側に位置する反応エリア１１０の端部に反応量が偏ってしまう場合があった。また、流路１０８が双方向の往復送液系であると、流路上流側と下流側に位置する反応エリア１１０の両端部に反応量が偏ってしまう場合があった。
- [0014] これは、送液される試料溶液が、例えば流路の高さ又は流路の幅が数１０μm程度のマイクロ流路内では層流となるため、反応エリア１１０の上流から下流に進むにしたがって、反応エリア１１０の表面近傍と表面から離れた位置とでアナライトの濃度差が生じ、反応エリア１１０の上流に比べて下流の反応量が低くなるためである。
- [0015] このように流路１０８を介して試料溶液を反応エリア１１０に供給するようにしたフローアッセイ系の表面プラズモン増強蛍光センサ１００では、反応量が反応エリア１１０の端部に偏った状態で、反応エリア１１０の全面に励起光１１４を照射して反応エリア１１０の蛍光１２２を励起させ、励起された蛍光１２２を光検出手段１２４で検出している。
- [0016] このことは、図９および図１０に示した一方向の循環送液系と双方向の往復送液系との反応エリアにおける反応量の分布状況のグラフからも明らかであり、反応エリア１１０の端部に反応量が偏って反応量分布のバラツキが大きくなってしまうと、励起エリア１３０に対して蛍光標識物質が存在する「量」及び蛍光標識物質が存在する「流路中の位置」がバラツキ、測定結果が安定しないという問題があった。なお、図９および図１０の符号１３２は、反応量が偏った箇所を示したものである。
- [0017] このような問題は、極微少なアナライトの検出を目的とする表面プラズモン増強蛍光センサのような蛍光検出装置にとって、非常に重大な問題となる

。

[0018] 本発明はこのような現状に鑑みなされたものであって、測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度にアナライトの検出を行うことのできる蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0019] 本発明は、前述したような従来技術における問題点を解決するために発明されたものであって、

本発明の蛍光検出装置は、

光源より励起光を照射して反射面からエバネッセント波を放出させ、前記反射面上に固定化されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させ、この励起された蛍光を光検出手段で検出するようにした蛍光検出装置であって、

前記蛍光検出装置は、

反射面とその反射面上に形成された反応層とを有するチップ構造体を、装置本体に対して着脱して使用する、または装置本体に対して固定して使用するよう構成されており、

前記反応層は、流路と、前記流路内に前記アナライトを捕捉するためのリガンドが形成された反応エリアと、を備え、

前記流路内に形成された前記反応エリアと、前記反応エリアで捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させるための励起光を照射する範囲である励起エリアと、の関係が、

反応エリア>励起エリア

の関係を満たすように各エリアの大きさが規定されていることを特徴とする。

[0020] さらに、本発明の蛍光検出方法は、

反射面とその反射面の一方側に形成された反応層とを有し、前記反応層が、流路と、前記流路内に前記アナライトを捕捉するためのリガンドが形成された反応エリアと、を備えたチップ構造体の前記反応エリアでアナライトを捕捉し、前記アナライトを蛍光物質で標識する工程と、

前記チップ構造体の前記反射面の他方側から励起光を照射して、前記反応エリアの前記蛍光物質を励起させる工程と、

励起された蛍光を光検出手段にて測定する工程と、

を少なくとも有する蛍光検出方法であって、

前記反応エリアの前記蛍光物質を励起させる工程において、

前記反応エリアと、前記反応エリアで捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させるための前記励起光を照射する範囲である励起エリアと、の関係が、

反応エリア>励起エリア

の関係を満たすように前記励起光を照射することを特徴とする。

[0021] このように反応エリアと励起エリアを規定すれば、例えば反応エリア端部の反応量の分布が大きい箇所（反応量の差が大きい箇所）を除いた箇所を励起エリアとすることで、測定結果のバラツキを飛躍的に抑え、高精度にアナライトの検出を行うことができる。

[0022] また、本発明の蛍光検出装置は、

前記励起エリアが、前記反応エリアの流路上流側に位置する端部および流路下流側に位置する端部の両端部を除いたエリアであることを特徴とする。

[0023] さらに、本発明の蛍光検出方法は、

前記励起エリアが、前記反応エリアの流路上流側に位置する端部および流路下流側に位置する端部の両端部を除いたエリアであることを特徴とする。

[0024] このようにすれば、流路が一方向の送液系（Onepass, 循環送液系）であっても双方向の往復送液系であっても、反応エリア端部の反応量の分布が大きい箇所が除かれるため、測定結果のバラツキを飛躍的に抑え、高精度にアナライトの検出を行うことができる。

[0025] また、本発明の蛍光検出装置は、

前記反応層の流路が、往復送液系であることを特徴とする。

[0026] 特に双方向の往復送液系であれば、一方向の送液系（Onepass, 循環送液系）よりも反応量の分布が少なく（反応エリアの端部と反応エリアの中央部と

の反応量の差が出難くなり）、一方向の送液系（Onepass, 循環送液系）と比べてさらに測定結果のバラツキを飛躍的に抑え、高精度にアナライトの検出を行うことができる。

[0027] また、本発明の蛍光検出装置は、

前記光源より照射される励起光が、レーザ光であることを特徴とする。

[0028] このようにレーザ光であれば、励起エリアの位置および大きさの設定が容易であるため、測定結果のバラツキを飛躍的に抑え、高精度にアナライトの検出を行うことができる。

[0029] また、本発明の蛍光検出装置は、

前記反射面が、誘電体部材上に形成された金属薄膜により形成されてなることを特徴とする。

[0030] このような反射面であれば、金属薄膜によって生じたエバネッセント波で反応エリアの蛍光を励起することができ、高精度にアナライトの検出を行うことができる。

[0031] また、本発明の蛍光検出装置は、

表面プラズモン増強蛍光センサまたは全反射蛍光センサのいずれかであることを特徴とする。

[0032] このように表面プラズモン増強蛍光センサまたは全反射蛍光センサであれば、高精度に極微量および／または極低濃度のアナライトの検出を行うことができる。

発明の効果

[0033] 本発明によれば、反応エリアに対する励起エリアの大きさを規定し、反応エリアに対して励起エリアを小さくしたので、例えば反応量の分布の少ない範囲のみ、すなわち反応エリア端部の反応量の分布が大きい箇所を除いた箇所を励起エリアとして測定するなど、測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度にアナライトの検出を行うことのできる蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]図 1 は、本発明の蛍光検出装置の一実施例である表面プラズモン増強蛍光センサの概略図である。

[図2]図 2 は、本発明の蛍光検出装置の一実施例である表面プラズモン増強蛍光センサにおける反応エリアと励起エリアを示した概略図である。

[図3]図 3 は、図 2 に示した反応エリアと励起エリアにおいて、循環送液系の場合における反応量の分布と反応エリア端部からの位置についての関係を示したグラフである。

[図4]図 4 は、本発明の蛍光検出装置の一実施例である表面プラズモン増強蛍光センサにおける反応エリアと励起エリアを示した概略図である。

[図5]図 5 は、図 4 に示した反応エリアと励起エリアにおいて、循環送液系の場合における反応量の分布と反応エリア端部からの位置についての関係を示したグラフである。

[図6]図 6 は、図 2 に示した反応エリアと励起エリアにおいて、往復送液系の場合における反応量の分布と反応エリア端部からの位置についての関係を示したグラフである。

[図7]図 7 は、従来の表面プラズモン増強蛍光センサの概略図である。

[図8]図 8 は、従来の表面プラズモン増強蛍光センサにおける反応エリアと励起エリアを示した概略図である。

[図9]図 9 は、図 8 に示した反応エリアと励起エリアにおいて、循環送液系の場合における反応量の分布と反応エリア端部からの位置についての関係を示したグラフである。

[図10]図 10 は、図 8 に示した反応エリアと励起エリアにおいて、往復送液系の場合における反応量の分布と反応エリア端部からの位置についての関係を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0035] 以下、本発明の実施の形態について、図面に基づいてより詳細に説明する。

[0036] 本発明の蛍光検出装置および蛍光検出方法は、光源より励起光を照射する

ことで反射面より生じたエバネッセント波を用いてアナライトを標識した蛍光物質を励起させ、この励起された蛍光を検出することで高精度にアナライトを検出するものである。

[0037] なお、本発明の実施の形態については、本発明の蛍光検出装置の一実施例である表面プラズモン増強蛍光センサを例にして説明を行う。

[0038] また、本明細書中でいう「表面プラズモン」とは、広義の意味で用いられるものであって、「局在プラズモン」についても含まれるものである。

[0039] <表面プラズモン増強蛍光センサ 10>

図 1 に示した本発明の一実施例である表面プラズモン増強蛍光センサ 10 は、基本的な構造について、先に図 7 を用いて説明した従来の表面プラズモン増強蛍光センサ 100 と同じである。

[0040] このような表面プラズモン増強蛍光センサ 10 は、まず誘電体部材 12 と、誘電体部材 12 上に形成された金属薄膜 14 と、金属薄膜 14 上に形成され、流路 18 上の所定位置にリガンドが固定化された反応エリア 20 を備えた反応層 16 と、を有するチップ構造体 22 を備えている。

[0041] なお、チップ構造体 22 は、必ずしも表面プラズモン増強蛍光センサ 10（蛍光検出装置）に予め備えられている必要はなく、チップ構造体 22 を、表面プラズモン増強蛍光センサ 10（蛍光検出装置）に設けた装填部（図示せず）に着脱可能な構成とし、例えば蛍光検出を行う度に新たなチップ構造体 22 を装填部（図示せず）に装填した後、測定対象のサンプルをチップ構造体 22 に供給して蛍光検出するような態様であっても良く、勿論本発明はそのような態様も包含するものである。

[0042] 本実施の形態における反応エリア 20 は、流路 18 の形成された範囲と同じ範囲としている。しかしながら反応エリアの範囲は特に限定されるものではなく、例えば金属薄膜 14 の全面に形成されたり、流路の途中に区画形成されるなど自由に位置や範囲を決めることが可能である。

[0043] そして、チップ構造体 22 の誘電体部材 12 側には、誘電体部材 12 内に入射され、金属薄膜 14 に向かって全反射条件で励起光 24 を照射する光源

26を備え、さらに光源26から照射され金属薄膜14で反射した反射光28を受光する受光手段30が備えられている。

[0044] 光源26から照射される励起光24としてはレーザ光が好ましく、波長200～900nm、0.001～1,000mWのLDレーザ、または波長230～800nm、0.01～100mWの半導体レーザが好適である。特にレーザ光は、光の照射位置や照射面積の設定が容易であるため本発明に好適である。

[0045] 一方、チップ構造体22の反応層16側には、反応層16の反応エリア20で固定化されたアナライトを標識した蛍光物質が発する蛍光32を受光する光検出手段34が設けられている。

[0046] 光検出手段34としては、超高精度の光電子増倍管、または多点計測が可能なCCDイメージセンサを用いることが好ましい。

[0047] なお、反応層16の反応エリア20と光検出手段34との間には、蛍光32を効率良く集光するための集光部材36と、蛍光32以外に含まれる光を除去し、必要な蛍光32のみを選択する波長選択機能部材38が設けられている。

[0048] 集光部材36としては、光検出手段34に蛍光シグナルを効率よく集光することを目的とするものであれば、任意の集光系で良い。簡易な集光系としては、顕微鏡などで使用されている市販の対物レンズを転用してもよい。対物レンズの倍率としては、10～100倍が好ましい。

[0049] 一方、波長選択機能部材38としては、光学フィルタ、カットフィルタなどを用いることができる。

[0050] 光学フィルタとしては、減光（ND）フィルタ、ダイアフラムレンズなどが挙げられる。

[0051] さらにカットフィルタとしては、外光（装置外の照明光）、励起光（励起光の透過成分）、迷光（各所での励起光の散乱成分）、プラズモンの散乱光（励起光を起源とし、チップ構造体上に位置する構造物または付着物などの影響で発生する散乱光）、酵素蛍光基質の自家蛍光などの各種ノイズ光を除

去するフィルタであって、例えば干渉フィルタ、色フィルタなどが挙げられる。

[0052] なお、図 1 に示した表面プラズモン増強蛍光センサ 10 は、チップ構造体 22 を表面プラズモン増強蛍光センサ 10 の構成の一部として説明したが、このような形態に限定されるものではなく、上述の光源 26 及び光検出手段 34 を少なくとも含み、さらに例えば集光部材 36 や波長選択機能部材 38 を表面プラズモン増強蛍光センサ 10 の装置本体に備え、その装置本体に対してチップ構造体 22 を着脱して使用する形態としても良く、チップ構造体 22 を装置本体に対して固定して使用する形態であっても良いものである。

[0053] そして、表面プラズモン増強蛍光センサ 10 の使用においては、反応層 16 の反応エリア 20 内に流路 18 を介してアナライトを有する試料溶液を流入させ、その後、同様にこのアナライトを標識する蛍光物質を、流路 18 を介して流入させることで、反応エリア 20 に蛍光物質で標識されたアナライトが固定化された状態とする。

[0054] そして、この状態で光源 26 より誘電体部材 12 を介して、反射面を形成する金属薄膜 14 に全反射条件で励起光 24 を反応エリア 20 内の一部に照射することで、金属薄膜 14 の表面からエバネッセント波を放出させ、このエバネッセント波により励起エリア 40 に対応する位置に固定化されたアナライトを標識する蛍光 32 を励起させる。

[0055] そして、反応エリア 20 内一部において、エバネッセント波によって励起された蛍光 32 を光検出手段 34 で検出することで、極微量および／または極低濃度のアナライトを検出することができるようになっている。

[0056] なお、金属薄膜 14 の材質としては、好ましくは金、銀、アルミニウム、銅、および白金からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属からなり、より好ましくは金からなり、さらにこれら金属の合金から成ることである。

[0057] このような金属は、酸化に対して安定であり、かつ粗密波（表面プラズモン）による電場増強が大きくなることから金属薄膜 14 の材質として好適である。

- [0058] また、金属薄膜 14 の形成方法としては、例えばスパッタリング法、蒸着法（抵抗加熱蒸着法、電子線蒸着法など）、電解メッキ、無電解メッキ法などが挙げられる。中でもスパッタリング法、蒸着法は、薄膜形成条件の調整が容易であるため好ましい。
- [0059] さらに金属薄膜 14 の厚さとしては、金：5～500 nm、銀：5～500 nm、アルミニウム：5～500 nm、銅：5～500 nm、白金：5～500 nm、およびそれらの合金：5～500 nm の範囲内であることが好ましい。
- [0060] 電場増強効果の観点からは、金：20～70 nm、銀：20～70 nm、アルミニウム：10～50 nm、銅：20～70 nm、白金：20～70 nm、およびそれらの合金：10～70 nm の範囲内であることがより好ましい。
- [0061] 金属薄膜 14 の厚さが上記範囲内であれば、粗密波（表面プラズモン）が発生し易く好適である。また、このような厚さを有する金属薄膜 14 であれば、大きさ（縦×横）は特に限定されないものである。
- [0062] さらに、アナライト検出時に用いられる検体としては、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液、唾液、便、体腔液（髄液、腹水、胸水等）などが挙げられる。
- [0063] また、検体中に含有されるアナライトは、例えば、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよい DNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）、タンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む。）、糖質（オリゴ糖、多糖類、糖鎖等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などが挙げられ、具体的には、AFP（ α フェトプロテイン）等のがん胎児性抗原や腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモンなどであってもよく、特に限定されない。
- [0064] さらに蛍光物質としては、所定の励起光 24 を照射するか、または電界効果を利用することで励起し、蛍光 32 を発する物質であれば特に限定されな

いものである。なお本明細書でいう蛍光 32 とは、燐光など各種の発光も含まれるものである。

[0065] また、誘電体部材 12 としては、光学的に透明な各種の無機物、天然ポリマー、合成ポリマーを用いることができ、化学的安定性、製造安定性および光学的透明性の観点から、二酸化ケイ素 (SiO_2) または二酸化チタン (TiO_2) を含むことが好ましい。

[0066] さらに、このような表面プラズモン増強蛍光センサ 10 は、光源 26 から金属薄膜 14 に照射される励起光 24 による表面プラズモン共鳴の共鳴角を調整するため、角度可変部 (図示せず) や、光検出手段 34 に入力された情報を処理するためのコンピュータ (図示せず) などを有しても良いものである。

[0067] ここで、角度可変部 (図示せず) は、サーボモータで全反射減衰 (ATR) 条件を求めるために受光手段 30 と光源 26 とを同期し、 $45 \sim 85^\circ$ の角度変更を可能とし、分解能が 0.01° 以上であることが好ましい。

[0068] 上記した構成を有する本実施の形態の表面プラズモン増強蛍光センサ 10 は、特に反応エリア 20 で固定化されたアナライトを標識した蛍光物質が発する蛍光 32 を励起する励起エリア 40 が、反応エリア 20 よりも小さく設定されている点において特徴的である。

[0069] 以下、このように反応エリア 20 と励起エリア 40 とを設定してなる表面プラズモン増強蛍光センサ 10 について説明する。

[0070] <反応エリア 20 と励起エリア 40 との関係>

本発明の蛍光検出装置の一実施例である表面プラズモン増強蛍光センサ 10 は、図 2 に示したように、反応エリア 20 に対して、光源 26 より照射される励起光 24 による励起エリア 40 が小さく設定されている。

[0071] 反応エリア 20 の全面における反応量の分布は、図 3 に示したように、一方向の循環送液系の場合、流路上流に位置する反応エリア端部 (図 3 では左側端部) において反応量が偏った状態となる。なお、図 3 において、横軸の「反応エリア端部からの相対位置」は、反応エリア 20 の流路方向における

全長を 1 として、一端を「0」、他端を「1」として表したものであり、縦軸の「分布（バラツキ具合）」は、反応エリア 20 全体における全反応量を単位領域で平均した反応量の平均値を 1 として、その平均値に対する各単位領域の反応量の比率を表したものである。この単位領域は、反応エリア 20 を流路方向全長の $1/100$ 毎に区分けした領域である。

[0072] したがって、この反応エリア 20 の内、反応量の偏っていない箇所、すなわち図 3 に示したグラフ縦軸の分布（バラツキ具合）の幅が僅かとなるエリアを励起エリア 40 に設定することにより、測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度なアナライトの検出が可能である。

[0073] なお、図 2 に示した反応エリア 20 と励起エリア 40 との関係では、励起エリア 40 が、反応エリア 20 の流路上流側に位置する端部および流路下流側に位置する端部の両端部を除いたエリアに設定されているが、循環送液系は、流路 18 の上流側に位置する反応エリア 20 端部において反応量が偏り（反応量が局部的に多くなること）、流路 18 の下流側では反応量の偏りは生じないため、図 4 および図 5 に示したように、励起エリア 40 を反応エリア 20 の上流側の端部のみを除いたエリアとしても良いものである。

[0074] 一方、双方向の往復送液系の場合には図 6 に示したように、反応エリア 20 の流路 18 の上流側の端部と流路 18 の下流側の端部において反応量が偏った状態となる。

[0075] このため往復送液系の場合には、反応エリア 20 の流路 18 の上流側の端部と流路 18 の下流側の端部とを除いたエリアを励起エリア 40 とすることで、測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度にアナライトの検出を行うことができる。

[0076] 循環送液系と往復送液系とを比べると、往復送液系の方が反応量の分布（バラツキ具合）が少ないため、表面プラズモン増強蛍光センサ 10 に用いる送液系としては往復送液系の方が好適である。

[0077] なお、往復送液系については、従来より公知の技術を用いることができ、例えば流路 18 の上流側に往復送液ポンプ（図示せず）を設置するとともに

、流路１８の下流側に試料溶液の混合部（図示せず）を設置し、往復送液ポンプ（図示せず）の駆動により、反応エリア２０内に試料溶液を流して流路１８の下流側の混合部（図示せず）へ試料溶液を移動させ、次いで再度往復送液ポンプ（図示せず）を駆動させて今度は混合部（図示せず）内の試料溶液を往復送液ポンプ（図示せず）側へ移動させることを複数回繰り返すことで、反応エリア２０に蛍光物質で標識されたアナライトが固定化されることとなる。

[0078] また、本発明においては、金属薄膜１４の上面に形成された反応層１６において、金属薄膜１４が形成されたエリアよりも内側に反応エリア２０が形成されているが、このような構成に限定されるものではなく、金属薄膜１４の形成されたエリアの全面上に反応エリア２０を設けても良く、これらのエリアの関係は如何なるものであっても良いものである。

[0079] なお、上記説明では本発明の蛍光検出装置の一実施例として表面プラズモン増強蛍光センサ１０を用いて説明したが、表面プラズモン増強蛍光センサ１０と同様の原理を用いた全反射蛍光センサ（図示せず）であっても、反応エリア２０よりも励起エリア４０を小さくすれば、測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度にアナライトの検出を行うことができる。なお、励起エリア４０は反応エリア２０内に位置するよう設定することは勿論である。

[0080] 表面プラズモン増強蛍光センサ１０と全反射蛍光センサ（図示せず）の構成の違いとして、表面プラズモン増強蛍光センサ１０は誘電体部材１２の上面に金属薄膜１４が形成され、この上に反応層１６が形成されるのに対し、全反射蛍光センサ（図示せず）は誘電体部材の上面に直接反応層が形成される点が挙げられる。全反射蛍光センサ（図示せず）の場合には、誘電体部材と反応層との界面においてエバネッセント波が生ずるものであること以外、表面プラズモン増強蛍光センサと基本的な構成は同じであるため、その詳細な説明について本明細書では省略する。

[0081] 上記したように本発明の蛍光検出装置およびこれを用いた蛍光検出方法は

、反応エリアに対する励起エリアの大きさを規定し、反応量の分布の少ない範囲のみ、すなわち反応エリア端部の反応量の分布が大きい箇所を除いた箇所のみを励起エリアとして測定するように各エリアの大きさを規定したので、測定結果のバラツキを抑えることができ、高精度にアナライトの検出を行うことができるものであって、本発明の目的を逸脱しない範囲で種々の変更が可能なものである。

符号の説明

[0082] 10・・・表面プラズモン増強蛍光センサ

12・・・誘電体部材

14・・・金属薄膜

16・・・反応層

18・・・流路

20・・・反応エリア

22・・・チップ構造体

24・・・励起光

26・・・光源

28・・・反射光

30・・・受光手段

32・・・蛍光

34・・・光検出手段

36・・・集光部材

38・・・波長選択機能部材

40・・・励起エリア

42・・・反応量が偏った箇所

100・・・表面プラズモン増強蛍光センサ

102・・・誘電体部材

104・・・金属薄膜

106・・・反応層

- 1 0 8 . . . 流路
- 1 1 0 . . . 反応エリア
- 1 1 2 . . . チップ構造体
- 1 1 4 . . . 励起光
- 1 1 6 . . . 光源
- 1 1 8 . . . 反射光
- 1 2 0 . . . 受光手段
- 1 2 2 . . . 蛍光
- 1 2 4 . . . 光検出手段
- 1 2 6 . . . 集光部材
- 1 2 8 . . . 波長選択機能部材
- 1 3 0 . . . 励起エリア
- 1 3 2 . . . 反応量が偏った箇所

請求の範囲

- [請求項1] 光源より励起光を照射して反射面からエバネッセント波を放出させ、前記反射面上に固定化されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させ、この励起された蛍光を光検出手段で検出するようにした蛍光検出装置であって、
- 前記蛍光検出装置は、
- 反射面とその反射面上に形成された反応層とを有するチップ構造体を、装置本体に対して着脱して使用する、または装置本体に対して固定して使用するよう構成されており、
- 前記反応層は、流路と、前記流路内に前記アナライトを捕捉するためのリガンドが形成された反応エリアと、を備え、
- 前記流路内に形成された前記反応エリアと、前記反応エリアで捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させるための励起光を照射する範囲である励起エリアと、の関係が、
- 反応エリア>励起エリア
- の関係を満たすように各エリアの大きさが規定されていることを特徴とする蛍光検出装置。
- [請求項2] 前記励起エリアが、前記反応エリアの流路上流側に位置する端部および流路下流側に位置する端部の両端部を除いたエリアである請求項1に記載の蛍光検出装置。
- [請求項3] 前記反応層の流路が、往復送液系である請求項1または2に記載の蛍光検出装置。
- [請求項4] 前記光源より照射される励起光が、レーザ光である請求項1から3のいずれか記載の蛍光検出装置。
- [請求項5] 前記反射面が、誘電体部材上に形成された金属薄膜により形成されてなる請求項1から4のいずれかに記載の蛍光検出装置。
- [請求項6] 前記蛍光検出装置が、
- 表面プラズモン増強蛍光センサまたは全反射蛍光センサのいずれか

である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の蛍光検出装置。

[請求項7]

反射面とその反射面の一方側に形成された反応層とを有し、前記反応層が、流路と、前記流路内に前記アナライトを捕捉するためのリガンドが形成された反応エリアと、を備えたチップ構造体の前記反応エリアでアナライトを捕捉し、前記アナライトを蛍光物質で標識する工程と、

前記チップ構造体の前記反射面の他方側から励起光を照射して、前記反応エリアの前記蛍光物質を励起させる工程と、

励起された蛍光を光検出手段にて測定する工程と、

を少なくとも有する蛍光検出方法であって、

前記反応エリアの前記蛍光物質を励起させる工程において、

前記反応エリアと、前記反応エリアで捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質を励起させるための前記励起光を照射する範囲である励起エリアと、の関係が、

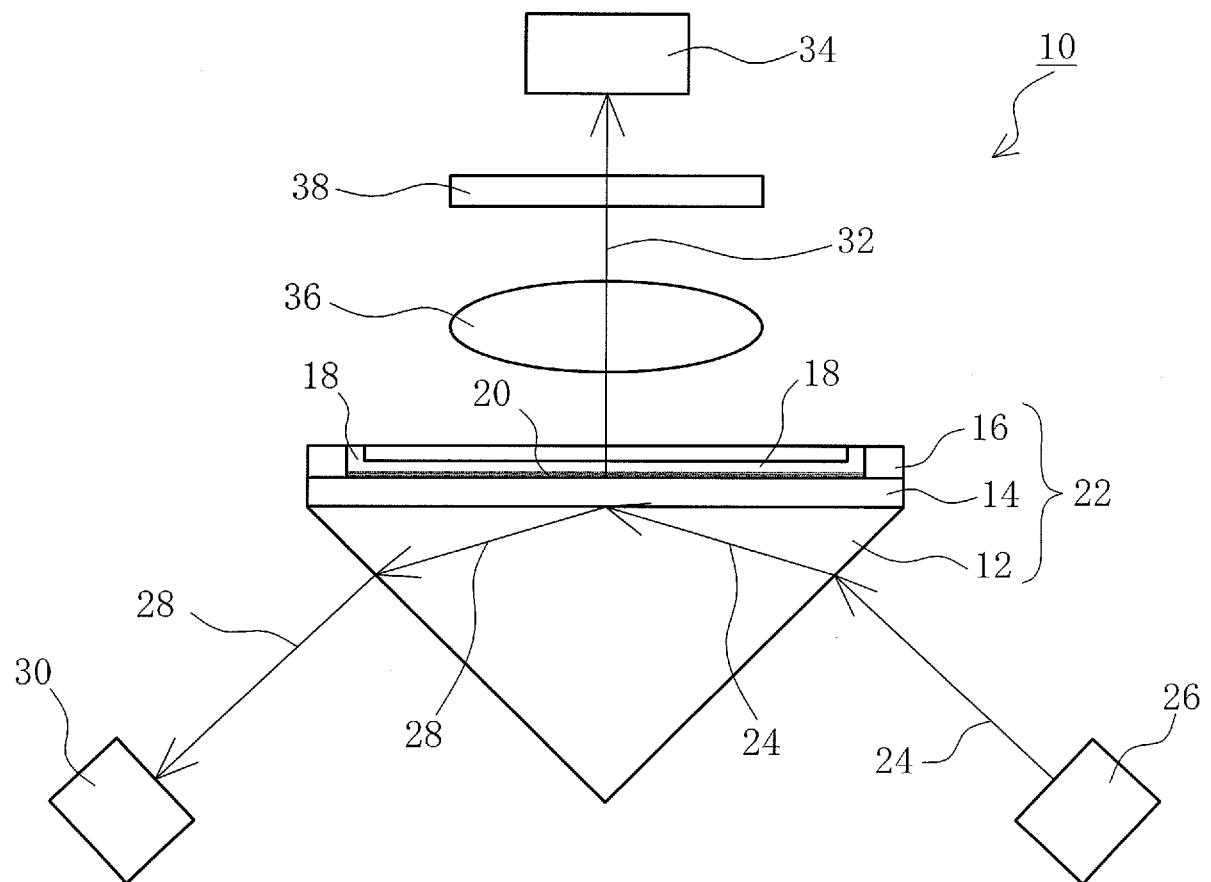
反応エリア>励起エリア

の関係を満たすように前記励起光を照射することを特徴とする蛍光検出方法。

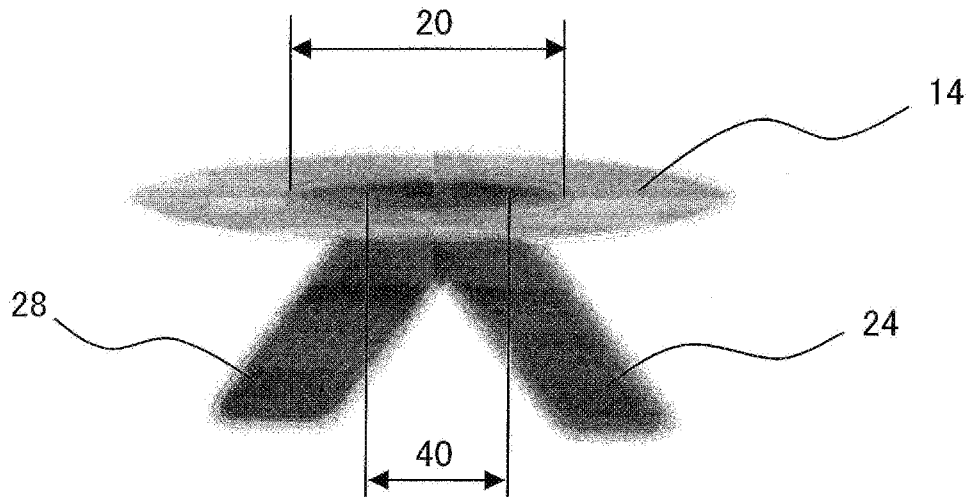
[請求項8]

前記励起エリアが、前記反応エリアの流路上流側に位置する端部および流路下流側に位置する端部の両端部を除いたエリアである請求項 7 に記載の蛍光検出方法。

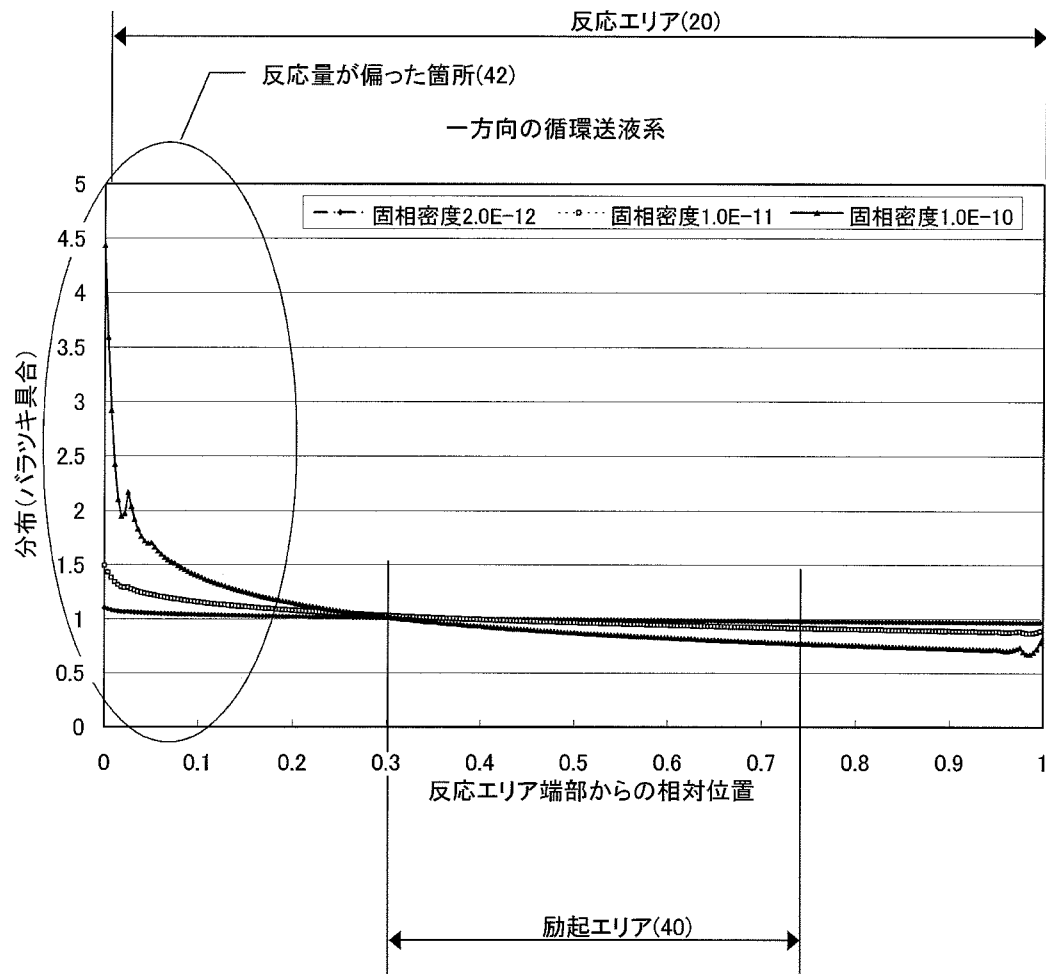
[図1]



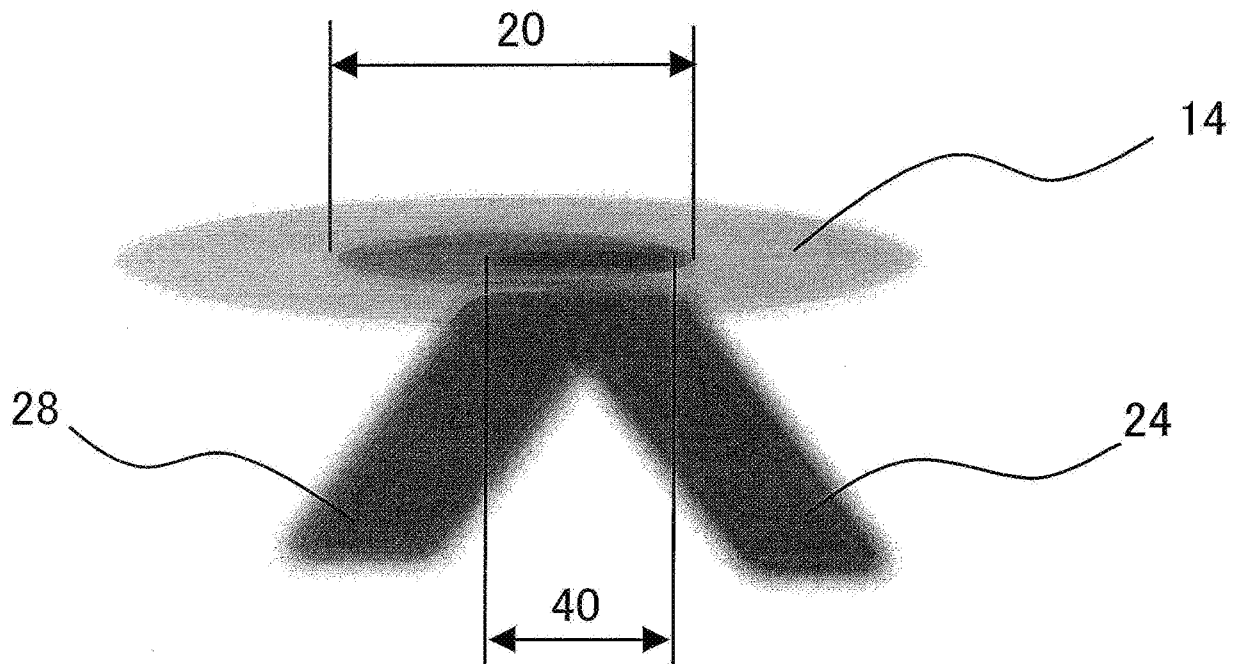
[図2]



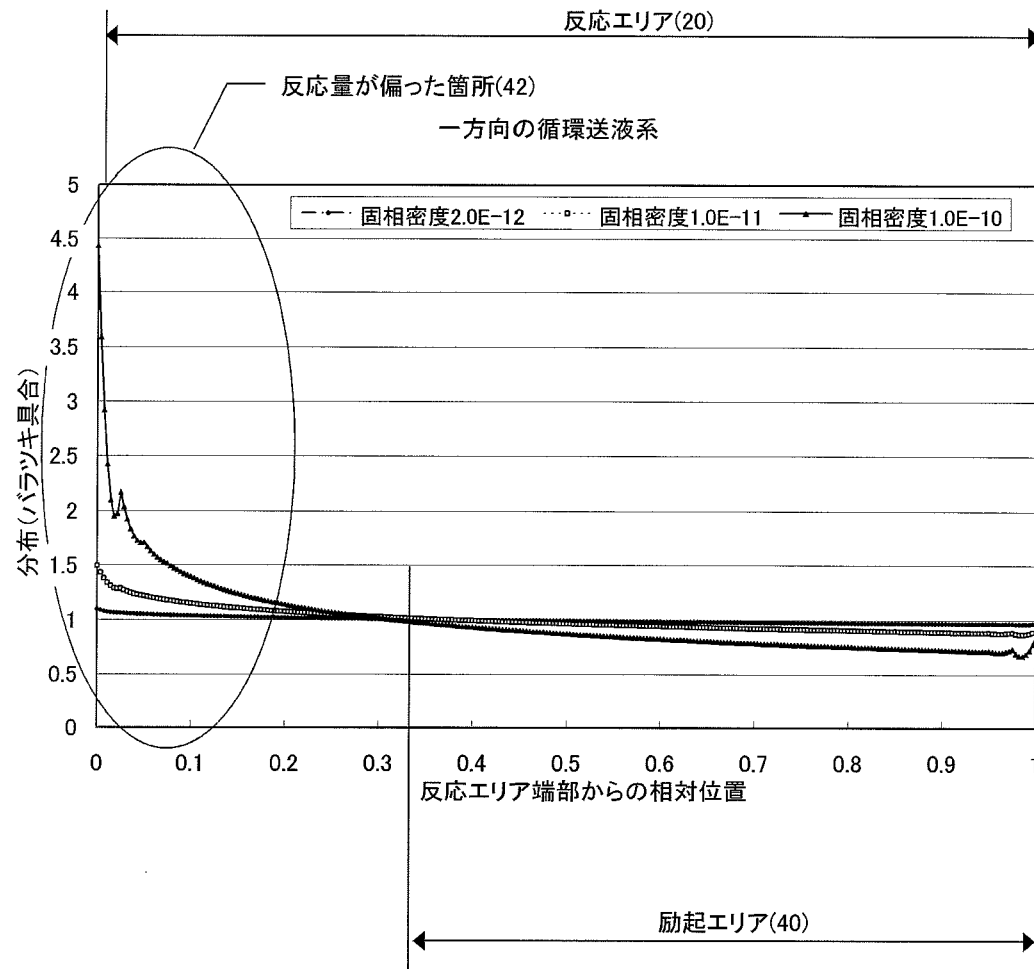
[図3]



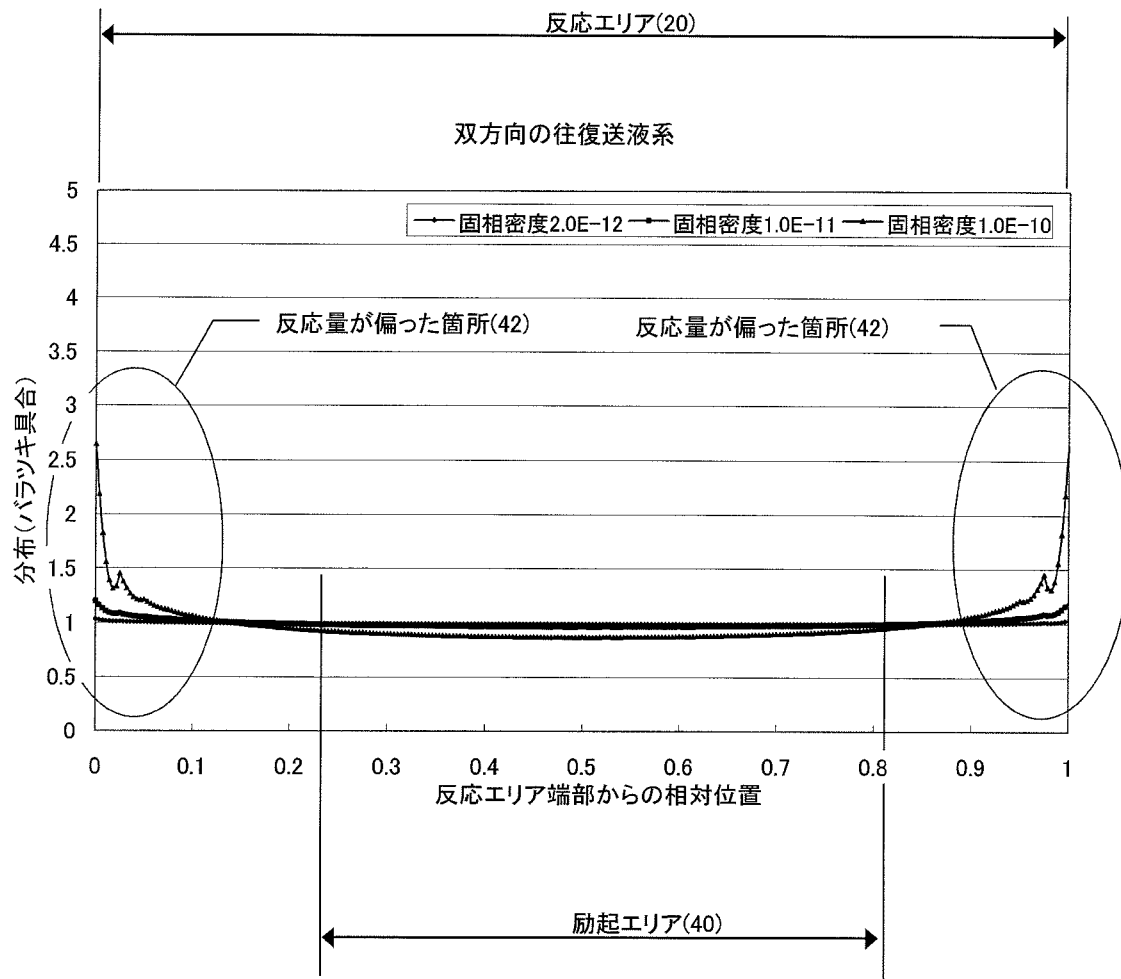
[図4]



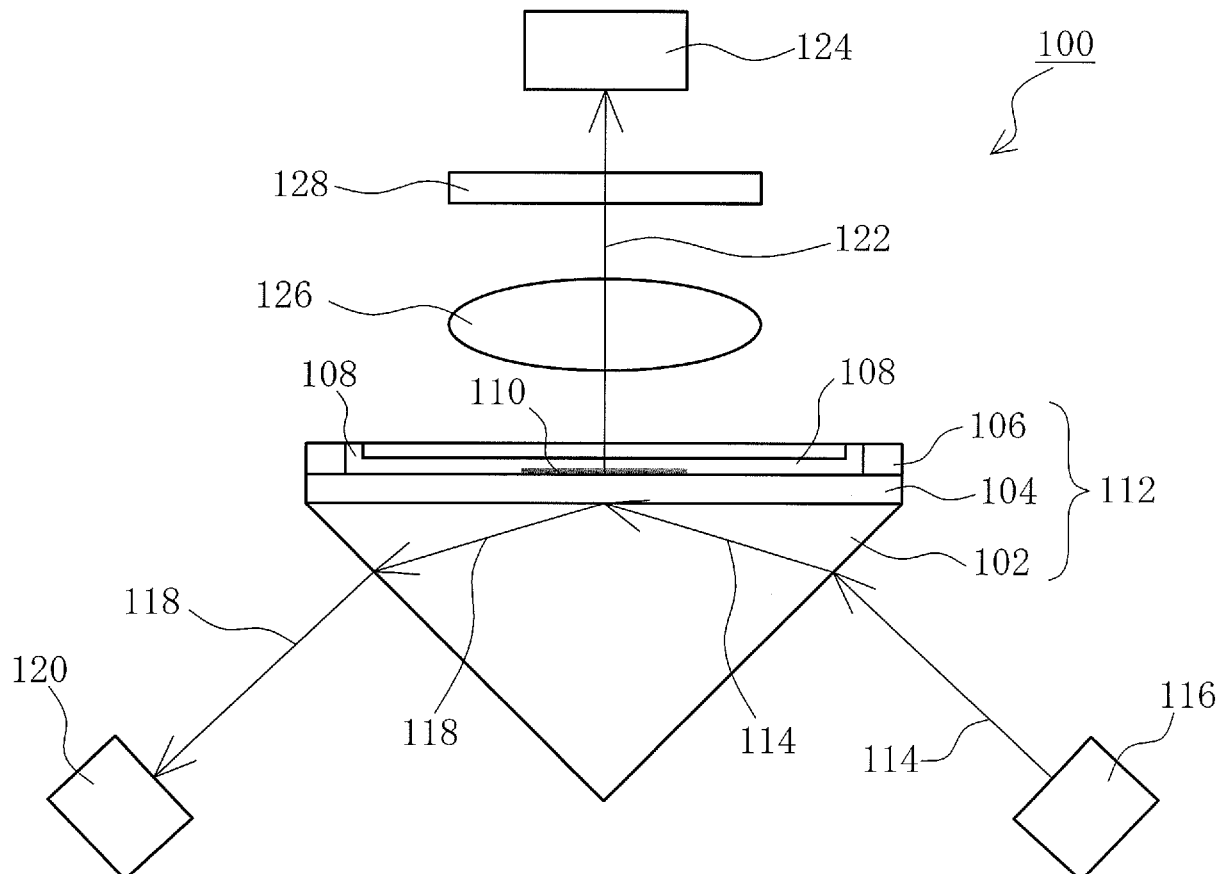
[図5]



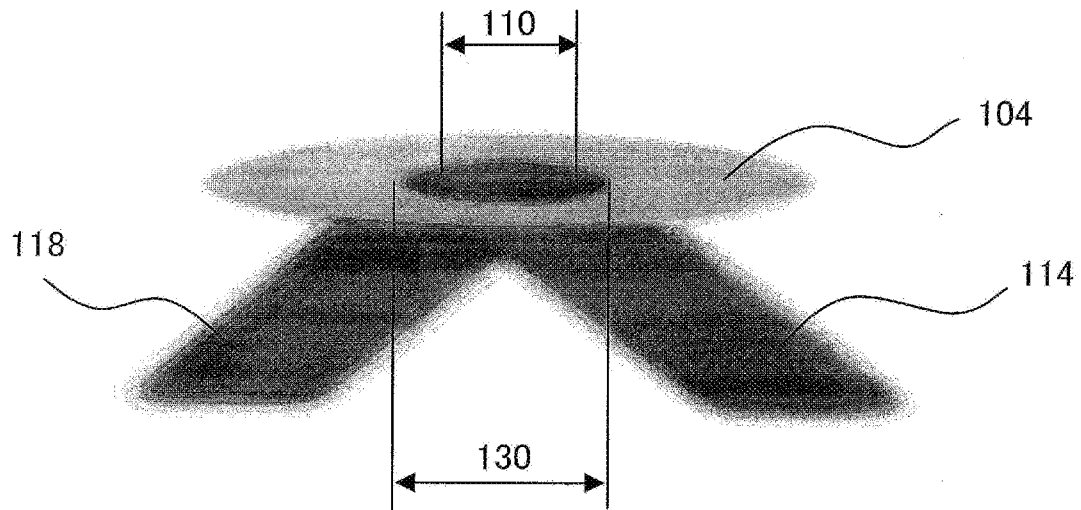
[図6]



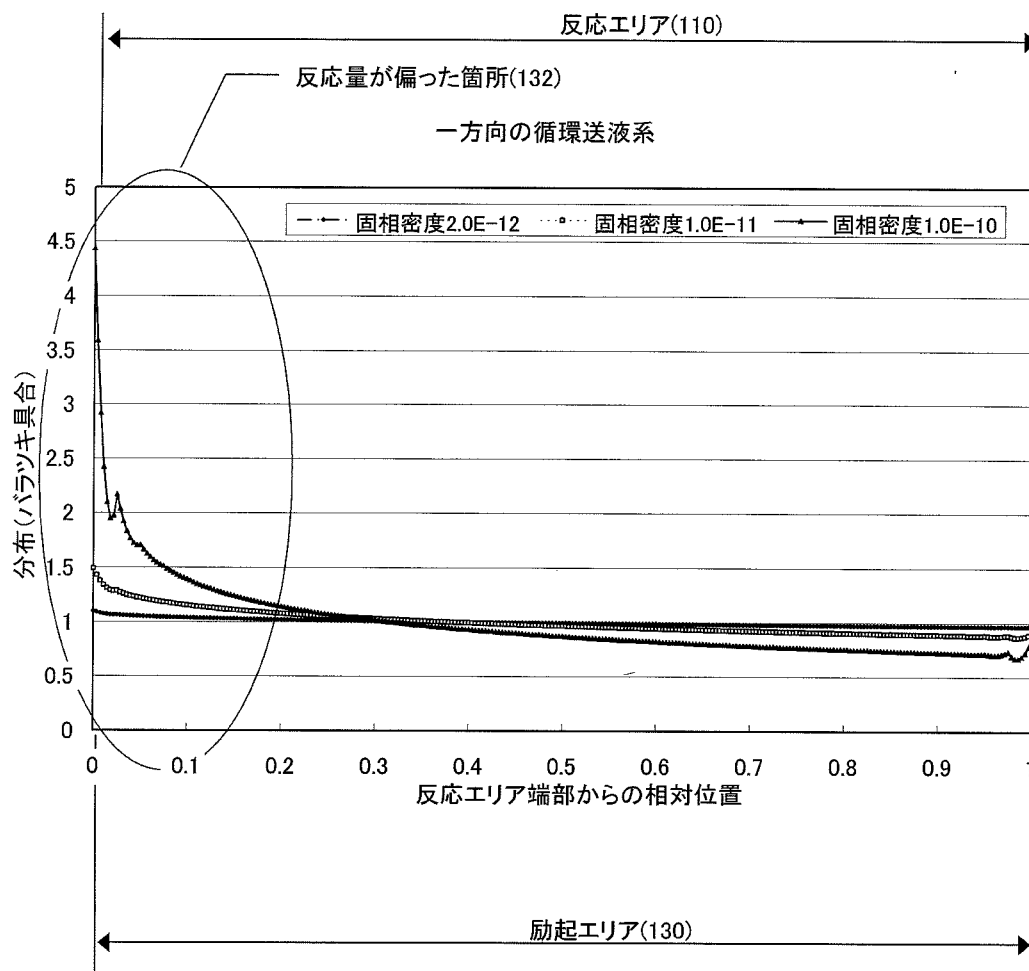
[図7]



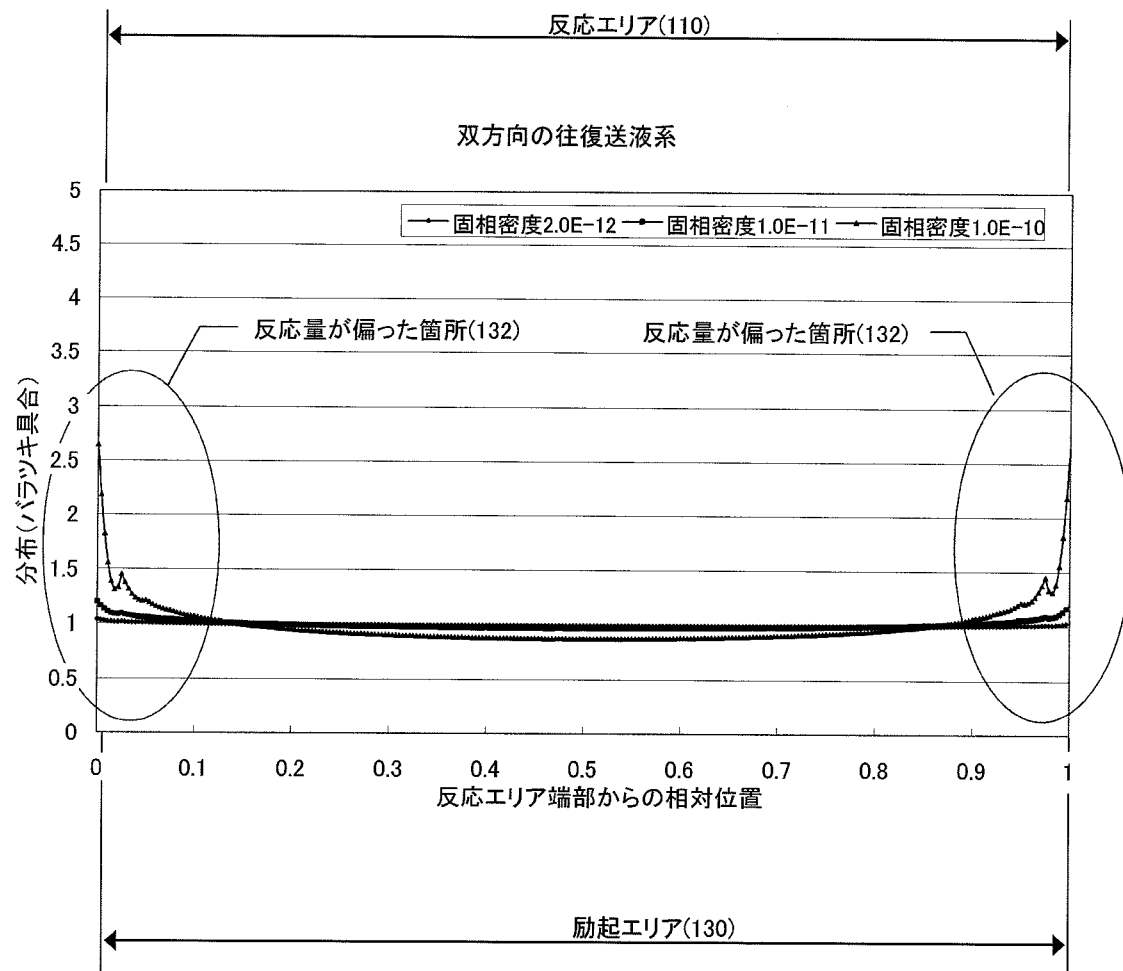
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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)

G01N21/00-21/83, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-091553 A (Konica Minolta Holdings, Inc.), 22 April 2010 (22.04.2010), claims; paragraphs [0070] to [0090]; fig. 1, 2	1-8
Y	JP 2002-062255 A (Nippon Laser Denshi Kabushiki Kaisha), 28 February 2002 (28.02.2002), claims; paragraphs [0011] to [0040]; fig. 1 to 4	1-8
A	JP 2010-008263 A (Fujifilm Corp.), 14 January 2010 (14.01.2010), paragraphs [0065] to [0086]; fig. 4 to 6	1-8

☒ 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
02 September, 2011 (02.09.11)

Date of mailing of the international search report
13 September, 2011 (13.09.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063687

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/073605 A1 (Hitachi High-Technologies Corp.), 01 July 2010 (01.07.2010), entire text; all drawings	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2011/063687

JP 2010-091553 A	2010.04.22	(Family: none)	
JP 2002-062255 A	2002.02.28	(Family: none)	
JP 2010-008263 A	2010.01.14	US 2009/321661 A1	2009.12.31
WO 2010/073605 A1	2010.07.01	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/00-21/83, G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-091553 A (コニカミノルタホールディングス株式会社) 2010.04.22、特許請求の範囲、【0070】 - 【0090】、図1, 2	1 - 8
Y	JP 2002-062255 A (日本レーザ電子株式会社) 2002.02.28、特許請 求の範囲、【0011】 - 【0040】、図1 - 4	1 - 8
A	JP 2010-008263 A (富士フイルム株式会社) 2010.01.14、【0065】 - 【0086】、図4 - 6	1 - 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

廣田 健介

2W

3 8 0 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 9 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	W0 2010/073605 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2010.07.01、 全文、全図	1 - 8

JP 2010-091553 A	2010. 04. 22	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2002-062255 A	2002. 02. 28	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2010-008263 A	2010. 01. 14	US 2009/321661 A1	2009. 12. 31
-----	-----	-----	-----
WO 2010/073605 A1	2010. 07. 01	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----