

(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
2011 年 9 月 15 日(15.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/111472 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01N 21/27 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/052993
- (22) 国際出願日: 2011 年 2 月 14 日(14.02.2011)
- (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 2010-050328 2010 年 3 月 8 日(08.03.2010) 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): 松尾 正貴 (MATHUO 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センター株式会社内 Tokyo (JP). 二宮 英隆(NINOMIYA Hidetaka) [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センター株式会社内 Tokyo (JP). 石田 賢治(ISHIDA Kenji) [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センター株式会社内 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 (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).

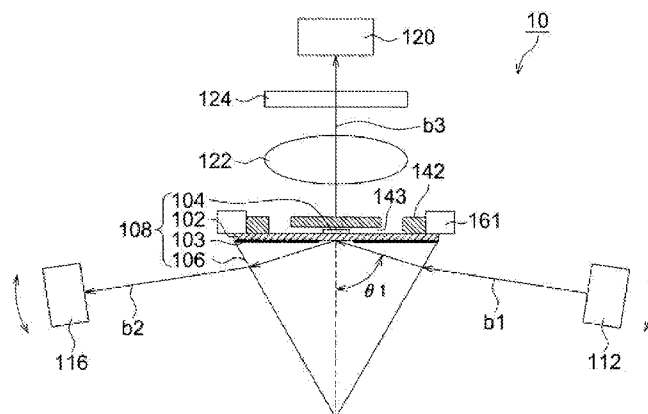
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: SURFACE-PLASMON-ENHANCED FLUORESCENCE MEASUREMENT DEVICE AND CHIP STRUCTURE

(54) 発明の名称: 表面プラズモン増強蛍光測定装置及びチップ構造体

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a surface-plasmon-enhanced fluorescence measurement device, in which one surface of a metal thin film (102) that is arranged on a chip structure (108) is irradiated with excited light to enhance the electric field on the metal thin film (102), thereby exciting a fluorescent substance in a reaction field that is formed on the other surface of the metal thin film (102), and the enhanced fluorescence is detected by means of a light detection means. In the device, a light-blocking part (103) capable of blocking light having the same wavelength as that of the fluorescence excited from the fluorescent substance is arranged on one surface or other surface of the metal thin film (102) in the chip structure (108). In this manner, noises caused by scattered light or intrinsic fluorescence can be reduced, and therefore an S/N ratio can be improved.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2011/111472 A1



チップ構造体 108 に設けられた金属薄膜 102 の一方の面に励起光を照射し、金属薄膜上 102 の電場を増強させることにより、金属薄膜 102 の他方の面に形成された反応場の蛍光物質を励起させ、これにより増強された蛍光を光検出手段にて検出するようにした表面プラズモン増強蛍光測定装置であって、チップ構造体 108 には、金属薄膜 102 の一方若しくは他方の面側に、蛍光物質から励起された蛍光と同じ波長の光を遮光する遮光部 103 が設けられている。これにより散乱光や自家蛍光によるノイズを低減させることにより S/N 比を向上させることが可能となる。

明 細 書

発明の名称：表面プラズモン増強蛍光測定装置及びチップ構造体 技術分野

[0001] 本発明は、表面プラズモン励起増強蛍光分光法（S P F S；Surface Plasm on-field enhanced Fluorescence Spectroscopy）の原理に基づいた表面プラズモン増強蛍光測定装置及びチップ構造体に関する。

背景技術

[0002] 従来より、表面プラズモン励起増強蛍光分光法（S P F S）の原理に基づき、例えば生体内の極微少なアナライトの検出が行われている。表面プラズモン励起増強蛍光分光法（S P F S）は、光源より照射したレーザ光（励起光）が金属薄膜表面で全反射減衰（A T R；attenuated total reflectance）する条件において、金属薄膜表面に粗密波（表面プラズモン）を発生させることによって、光源より照射したレーザ光（励起光）が有する光子量を数十倍～数百倍に増やし（表面プラズモンの電場増強効果）、これにより金属薄膜近傍の蛍光物質を効率良く励起させることによって、極微量および／または極低濃度のアナライトを検出する方法である。

[0003] 近年、このような表面プラズモン励起増強蛍光分光法（S P F S）の原理に基づいた表面プラズモン増強蛍光測定装置の開発が進められており、例えば特許文献 1 にその技術開示がなされている。

[0004] また、特許文献 2 では、これによってダイナミックレンジの大きいプラズモン共振角カーブを得る目的で、最初は比較的広い反射角範囲で反射光強度を C C D により検出し、その後 C C D の直前に設けた遮光板により C C D の受光面積を狭くするとともに光源の光量を増加させて C C D に入射する光量を増加させている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献 1：特開 2 0 0 6 - 2 0 8 0 6 9 号公報

特許文献2：特開平 10-170430号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 表面プラズモン増強蛍光測定装置による測定では、励起光を照射させた際に金属薄膜を形成したチップ構造体を通過する励起光がチップ構造体内で散乱したりチップ構造体の材料からの自家蛍光を発生させたりする。アナライトの検出は、分析対象に付与した蛍光標識から発生する蛍光を測定することにより行うが、前述の散乱光や自家蛍光は、本来的に分析対象に起因する蛍光と分離しづらくS/N比が悪化してしまうという問題がある。また前述の散乱光や自家蛍光が、蛍光標識を光らせてしまい、このような現象によってもS/N比が悪化する。

[0007] 本願発明は、上記問題のように散乱光や自家蛍光によるノイズを低減させることによりS/N比を向上させることが可能な表面プラズモン増強蛍光測定装置、及びチップ構造体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

[0008] 上記の目的は、下記に記載する発明により達成される。

[0009] 1. チップ構造体に設けられた金属薄膜の一方の面に励起光を照射し、前記金属薄膜上の電場を増強させることにより、前記金属薄膜の他方の面に形成された反応場の蛍光物質を励起させ、これにより増強された蛍光を光検出手段にて検出するようにした表面プラズモン増強蛍光測定装置であって、

前記チップ構造体には、前記金属薄膜の前記一方若しくは前記他方の面側に、前記蛍光物質から励起された蛍光と同じ波長の光を遮光する遮光部が設けられていることを特徴とする表面プラズモン増強蛍光測定装置。

[0010] 2. 前記遮光部は、前記光検出手段で蛍光を検出する検出領域の周囲に設けられていることを特徴とする前記1に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

[0011] 3. 前記遮光部は、励起光の波長の光も遮光可能であり、励起光照射領域の少なくとも一部を遮光する位置に設けられていることを特徴とする前記1

又は2に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

[0012] 4. 前記遮光部は、前記金属薄膜の前記一方の表面若しくは他方の表面に設けられていることを特徴とする前記1から3のいずれか一項に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

[0013] 5. 前記反応場へ検体液及び蛍光物質が含まれる試薬液を送液する流路を有し、

前記遮光部は、前記流路の壁面であって、前記金属薄膜に対向する面に設けられていることを特徴とする前記1から3のいずれか一項に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

[0014] 6. 表面プラズモン増強蛍光測定装置に用いられるチップ構造体であって、

前記チップ構造体は少なくとも、
一方の面に励起光が照射される金属薄膜と、
前記金属薄膜の他方の面に形成された反応場と、
前記金属薄膜の前記一方若しくは前記他方の面側に設けられた遮光部と、
を有することを特徴とするチップ構造体。

[0015] 7. 前記遮光部は、前記金属薄膜の前記一方の表面若しくは他方の表面に設けられていることを特徴とする前記6に記載のチップ構造体。

[0016] 8. 前記反応場へ検体液及び蛍光物質が含まれる試薬液を送液する流路を有し、

前記遮光部は、前記流路の壁面であって、前記金属薄膜に対向する面に設けられていることを特徴とする前記6に記載のチップ構造体。

[0017] 9. 前記遮光部は、前記反応場の蛍光物質から励起された蛍光と同じ波長の光を遮光することを特徴とする前記6から8のいずれか一項に記載のチップ構造体。

[0018] 10. 前記遮光部は、励起光の波長の光も遮光可能であり、励起光照射領域の少なくとも一部を遮光する位置に設けられていることを特徴とする前記6から9のいずれか一項に記載のチップ構造体。

発明の効果

- [0019] 本願発明によれば、金属薄膜の近傍であって該金属薄膜が形成されている層と平行な面に、反応場以外の少なくとも一部の領域を遮光する遮光部を設けることにより、散乱光や自家蛍光によるノイズを低減させることによりS/N比を向上させることが可能な表面プラズモン増強蛍光測定装置、及びチップ構造体を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0020] [図1]実施形態に係るマイクロチップ送液システムを用いた表面プラズモン増強蛍光測定装置の概略図である。
- [図2]チップ構造体108の反応場104周辺の拡大図である。
- [図3]第1の変形例における反応場104周辺の拡大図である。
- [図4]第2の変形例における反応場104周辺の拡大図である。
- [図5]第3の変形例における反応場104周辺の拡大図である。
- [図6]第4の変形例における反応場104周辺の拡大図である。
- [図7]X方向の位置に対する光量の出力変化を示したグラフである。
- [図8]第5の変形例における反応場104周辺の拡大図である。
- [図9]第6、第7の変形例における反応場104周辺の拡大図である。

発明を実施するための形態

- [0021] 本発明を実施の形態に基づいて説明するが、本発明は該実施の形態に限られない。
- [0022] 図1、図2は、実施形態に係るマイクロチップ送液システムを用いた表面プラズモン増強蛍光測定装置の概略図である。
- [0023] 表面プラズモン増強蛍光測定装置は、励起光を金属薄膜に照射して粗密波（表面プラズモン）を生じさせて励起された蛍光物質が生ずる蛍光を正確に検出し、検出感度を上げて超高精度に蛍光検出を行うことを可能とするものである。
- [0024] 本稿において「反応場」とは、金属薄膜102に1次抗体を付着させている領域であり、当該1次抗体にアナライトを反応させることにより、アナラ

イト及び当該アナライトに付与した蛍光標識が捕捉される領域である。

[0025] 「励起光照射領域」とは、金属薄膜 102 の面において、励起光が照射された領域のことである。特に断りがなければ、金属薄膜 102 への励起光の照射角度は特定の入射角度（共鳴角 θ_1 ）である。

[0026] 「電場増強領域」とは電場増強を生じさせる領域である。つまり金属薄膜 102 上であって励起光が照射された領域である。但し（後述する）遮光部 103 が金属薄膜 102 の一方若しくは他方の面上に設けられている場合には、電場増強は生じないので当該金属薄膜 102 の遮光部 103 に対応する領域は電場増強領域とはならない。

[0027] 「検出領域」とは、電場増強領域であって、且つ、反応場の全部又は一部である。電場増強領域内にある反応場に捕捉されている蛍光標識（蛍光物質）から生じる蛍光を検出する。なお本稿においては反応場 104 と検出領域とは一致しているので、特に断りがなければ両者は同一のものとして説明する。

[0028] [表面プラズモン増強蛍光測定装置 10]

本発明の表面プラズモン増強蛍光測定装置 10 は、図 1 に示すように、まず金属薄膜 102 と、金属薄膜 102 の一方の面に形成された反応場 104 と、他方の面側に形成された誘電体部材 106 と、を有するチップ構造体 108 を備えている。金属薄膜 102 の近傍には遮光部 103 が設けられている。遮光部 103 は少なくとも蛍光物質から励起された蛍光と同じ波長の光を遮光する。これにより、蛍光物質から励起される蛍光と同じ波長の誘電体部材 106 等から生じる自家蛍光を、遮光することが可能となっている。また遮光部 103 は金属薄膜 102（及び反応場 104）と平行な面で（光検出部 120 の受光面から検出領域を見た際に）反応場 104（検出領域）の回りを覆うようにその周囲に設けられている。

[0029] そしてチップ構造体 108 の誘電体部材 106 側には、誘電体部材 106 内に入射され、金属薄膜 102 に向かって励起光 b_1 を照射する「発光部」として機能する光源 112 を備え、さらに光源 112 から照射され金属薄膜

102に反射した反射光b2を受光する受光手段116を備えている。

[0030] ここで光源112から照射される励起光b1としてはレーザ光が好ましく、波長200～1000nmのガスレーザまたは固体レーザ、波長385～800nmの半導体レーザが好適である。

[0031] 一方、チップ構造体108の反応場104側には、反応場104で生じた蛍光b3を受光する光検出手段として機能する光検出部120が設けられている。

[0032] 光検出部120としては、超高感度の光電子増倍管、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。

[0033] なお、チップ構造体108の反応場104と光検出部120との間には、光を効率よく集光するための集光部材122と、光の内で蛍光b3とは異なる波長の光の透過を低減して蛍光b3を選択的に透過するように形成されたフィルタ124が設けられている。

[0034] 集光部材122としては、光検出部120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。

[0035] 一方、フィルタ124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。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。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、プラズモン励起センサ表面上の構造体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。

[0036] そして、このような表面プラズモン増強蛍光測定装置10を用いたアナライト検出方法では、反応場104に接する側の金属薄膜102表面上には1次抗体を結合させたSAM膜（Self-Assembled Monolayer：「自己組織化単

分子膜」ともいう)あるいは高分子材料膜が設けられている。1次抗体はSAM膜あるいは高分子材料膜の一方の面に結合されており、SAM膜あるいは高分子材料膜の他方の面は、直接若しくは間接に金属薄膜102表面に固定されている。SAM膜としては例えば $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SH}$ などの置換脂肪族チオールで形成された膜、高分子材料としては例えばポリエチレングリコール (polyethylene glycol) やMPCポリマー等が挙げられる。これは使用時に調製しても、予めこれらを結合させた基板を用いてもよい。また、1次抗体に対する反応性基(または反応性基に変換可能な官能基)を備えたポリマーを直接基板上に固定化し、その上に1次抗体を固定化してもよい。各種反応性基を利用して抗体やポリマーを結合させる際には、スクシンイミジル化を経たアミド化縮合反応や、マレイミド化を経た付加反応等が一般的である。

[0037] このようにして構成した反応場104に標的物質としてのアナライト(検体ともいう)の抗原を含む溶液(以下、検体液ともいう)と、2次抗体を含む試薬液の送液を行う。固定化した1次抗体によって抗原を捕捉することが可能である。これに対しさらに蛍光物質で標識した2次抗体を含む試薬液を作用させることで捕捉された抗原を標識している。なお予め抗原と2次抗体とを反応させておいてから1次抗体に作用させてもよい。

[0038] 蛍光物質で標識されたアナライトの検出は、アナライトが捕捉された反応場104に光源112より誘電体部材106に励起光b1を照射し、この励起光b1が金属薄膜102に対して特定の入射角度(共鳴角 θ_1)で金属薄膜102に入射することで、金属薄膜102上に粗密波(表面プラズモン)を生ずるようになる。

[0039] なお、金属薄膜102上に粗密波(表面プラズモン)が生ずる際には、励起光b1と金属薄膜102中の電子振動とがカップリングし、反射光b2のシグナルが変化(光量が減少)することとなるため、励起光b1の金属薄膜102に対する入射角度(共鳴角 θ_1)を設定するためには、受光手段116で受光される反射光b2のシグナルが変化(光量が減少)する地点を見つ

ければ良い。

[0040] そして、この粗密波（表面プラズモン）により、金属薄膜 102 上の反応場 104 で生じた蛍光物質が効率良く励起され、これにより蛍光物質が発する蛍光 b3 の光量が増大し、この蛍光 b3 を集光部材 122 およびフィルタ 124 を介して光検出部 120 で受光することで、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。

[0041] なお、チップ構造体 108 の金属薄膜 102 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。

[0042] 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 102 に好適である。

[0043] また、金属薄膜 102 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。

[0044] さらに少なくとも反応場 104 及びその周辺における金属薄膜 102 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。

[0045] 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。

[0046] 金属薄膜 102 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 102 であれば、面の大きさ（縦×横）は特に限定されないものである。

[0047] 遮光部 103 は、金属薄膜 102 に対して他の材料の遮光膜を塗布するこ

とにより形成してもよい。または、金属薄膜 102 と同じ材料を使用して一体として 2 段の厚みの金属膜を形成し、反応場 104 に対応する領域のみを薄肉の金属膜で形成することにより金属薄膜 102 として機能させ、それ以外を厚肉の金属膜で形成することにより遮光部 103 として機能させてもよい。

[0048] 前者の遮光膜について説明する。遮光膜により光を吸収（吸収型遮光膜）させるか、または光を反射（反射型遮光膜）させることで、望ましくない光の金属薄膜 102 への入射光量を抑えることができる。一般的に、吸収型の遮光膜の方が効率は高いが、吸収と反射ではそれぞれ特性と課題が異なるので必要に応じて両者を組み合わせることも可能である。課題としては、いかに薄い膜厚で遮光効率を上げるかが大きい。その他の課題としては、例えば吸収型では、強い光が当たると、温度上昇で測定系に悪影響を与えたり、チップ構造体の劣化を引き起こしたりする可能性がある。反射型では反射光が迷光、散乱光として測定系に悪影響を及ぼす恐れがある。遮光膜は可視光領域全般を遮光するものと波長選択性を有するものがあるが、必要に応じて選択可能とすることができる。

[0049] 遮光膜の形成は、一般的にはマスク材で遮光部分と非遮光部分とを区別して蒸着、メッキ、塗布等で遮光被膜を形成した後、マスク材を除去することで容易に形成できる。別法として、全面に遮光被膜を形成しておいて、被膜形成後、逆マスクを施した後、化学的または物理的にエッチングを行って不要部分を取り除く方法も利用できる。最近では、インクジェットのように複雑なパターンをマスクなしで直接描画できる装置も知られており、本発明でも特に塗布型の遮光被膜の形成は有効な形成方法である。

[0050] （１）吸収型遮光膜の例

光透過性の低い金属被膜、例えばクロム、チタン、モリブデン、スズ、酸化鉄、酸化カドミウム、硫化カドミウム等が挙げられる。金属膜の黒化処理を行ったもの、例えば黒化アルミニウム、黒化銅、黒化亜鉛が挙げられる。その他窒化アルミニウム、シリコン膜、更にモリブデンシリサイドのような

金属シリサイドも知られている。ガラス、ポリマー等の誘電体に光吸収剤を分散させた遮光膜は成型性が良好なことから光学部材以外にも広く使われている。誘電体がポリマーの場合は、塗布で遮光膜を形成可能なため、樹脂チップの場合特に加熱することなく容易に成膜可能で好ましい。光吸収性の材料としては、有機物としてはカーボンブラック、無機物としてはチタンブラックが代表的である。波長選択性のある各種染料、顔料も利用可能であるが、新たな蛍光の発生源になる可能性も有るので選択するに際しては注意が必要である。干渉フィルタは誘電体多層膜と金属膜をコーティングし、光の干渉作用を利用することで任意の波長を取り出すことのできる分光素子であり、遮光膜としても利用可能である。但し、被膜形成が容易ではなくコストアップになりやすい課題がある。

[0051] (2) 反射型遮光膜の例

反射率の高い膜材料としては銀、アルミニウム、ロジウム、及びそれらの合金が良く知られている。ニッケル、銅、金等も特定の波長しか反射しないが利用することも可能である。銀、アルミニウム、銅、金はプラズモンを発生する金属として知られており、遮光膜として用いるには金属薄膜102と異なる金属を用いたり、異なる厚さにしたりして同一条件（金属薄膜102でプラズモンが発生する条件）では遮光膜にプラズモンが発生しないようにする必要がある。上記観点からロジウムあるいはその銀-ロジウム、アルミ-ロジウム合金等を蒸着、メッキで遮光膜を形成するのが好ましい。多層膜反射ミラーは異なる屈折率の材料を組み合わせた反射膜であり例えば、Mo/Si多層膜のような金属材料のほか、誘電体多層膜から構成されることが知られている。

[0052] 次に遮光部を金属薄膜102と同じ材料の厚肉の金属膜により形成する後者の例について説明する。遮光部103の金属膜の厚みとしては、励起光b1の照射によっても電場増強効果が発生しない厚みにする必要があり、反応場104での金属薄膜102の厚み5~500nmよりも十分厚くする必要がある。例えば遮光部103として機能する金属膜の厚みを1000nm以

上とすることが好ましい。また、このような薄肉部と厚肉部からなる金属膜を形成するにあたってはエッチング法により形成することが好ましい。

[0053] また、誘電体部材 106 としては、高屈折率材料の角度 60 度等のプリズムを用いることができる。高屈折率の材料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)、二酸化チタン (TiO_2)、ポリカーボネート (PC)、シクロオレフィンポリマー (COP)、光学用ポリエステル (OKP: 大阪ガスケミカル (株) 製) 等を用いることができる。

[0054] さらに、このような表面プラズモン増強蛍光測定装置 10 は、光源 112 から金属薄膜 102 に照射される励起光 b1 による表面プラズモン共鳴の最適角 (共鳴角 θ_1) を調整するため、角度可変部 (図示せず) を有している。

[0055] ここで、角度可変部は制御部 (いずれも不図示) により制御され、「共鳴角スキャン工程」においては角度可変部の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 116 と光源 112 とを同期して、照射領域を中心として回転し、 $45 \sim 85^\circ$ の範囲で角度変更を可能としている。また分解能は 0.01° よりも高いことが好ましい。

[0056] 図 2 はチップ構造体 108 の反応場 104 周辺の拡大図であり図 2 (a)、図 2 (c) はチップ構造体 108 の断面図であり、図 2 (b) はその一部の上面図である。図 2 (a) は図 2 (b) に示す A-A 断面図であり、図 2 (c) は同 B-B 断面図である。

[0057] 図 2 (a) では、金属薄膜 102 及び遮光部 103 を設けた誘電体部材 106 に樹脂基板 142 を取り付けられている。樹脂基板 142 はその周囲を固定具 161 により支持されており誘電体部材 106 と隙間なく固定されている。樹脂基板 142 は、反応場 104 の周辺で発生する蛍光 b3 を透過する。樹脂基板 142 には微細加工により微細流路 143 及びその両端に開口 144a、144b が設けられており、開口 144a、144b の一方は挿入口

となり他方は排出口となる。微細流路 143 ではアナライトを溶媒に溶かした検体液及び蛍光物質を溶媒に溶かした試薬液を送液する。なお同図においては開口 144 a、144 b に接続する接続機構及び送液を行うポンプの記載は省略している。微細流路 143 の経路中には、前述の反応場 104 が設けられている。微細流路 143 の幅（B-B 断面図方向の長さ）は 1 mm ～ 3 mm、高さは 50 μ m ～ 500 μ m、反応場 104 の幅は微細流路 143 の幅と同等であり、長さ（A-A 断面方向の長さ）は 1 mm ～ 3 mm としている。但し必ずしもこの長さに限定されるものではない。

[0058] また、図 2 に示す例では、固定具 161 により樹脂基板 142 の固定を行っているが、その他の固定方法として、接合による固定や接着剤による固定であってもよい。

[0059] 同図に示すように、反応場 104 を上面（光検出部 120 の受光面側）から見た場合には、反応場 104（検出領域）以外の周辺の領域を遮光部 103 により覆うように、遮光部 103 の位置関係が設定されている。図 2（a）に示すように励起光 b1 の金属薄膜 102（及び遮光部 103）表面での励起光照射領域の直径は D b である。

[0060] なお図 2 に示す例では、遮光部 103 を金属薄膜 102 の表面であって励起光 b1 の照射面側（一方の面側）に設けた例である。反応部 104 の周囲に遮光部 104 を設けており、かつ、遮光部 103 で覆われていない開口の大きさと反応場 104 の大きさとは一一致させている。このようにすることにより、たとえ励起光 b1 のビーム径が大きく、その励起光照射領域が反応場 104（検出領域）よりも大きい場合であっても、遮光部 103 が励起光照射領域の一部を遮光するので、反応場 104 以外（厳密には反応場 104 に対応する金属薄膜 102 の領域以外）には励起光 b1 は照射されないことになる。なお遮光部 103 は励起光の波長の光も遮光可能である。このようなことから反応場 104 以外に照射された励起光 b1 の影響を考えなくてよく、励起光 b1 の反応場 104 以外への照射を考慮せずにビーム径を大きくして、ビーム品質を向上させることが可能となる。

[0061] 本実施形態のように遮光部 103 を金属薄膜 102 の表面であって励起光 b1 の照射面側（一方の面側）に設けることにより、反応場 104 以外の領域に照射する励起光 b1 を遮光することになり、金膜面での不要な散乱の発生を最小限に抑え、かつ誘電体内の励起光光路上から発生する散乱光や誘電体の自家蛍光を遮光することが可能となり、アナライトに付与した蛍光標識により発生した蛍光のみを受光することができるので、S/N 比を向上させることが可能な表面プラズモン増強蛍光測定装置、及びチップ構造体を得ることが可能となる。特に、チップ構造体 108 の外側であって光検出部 120 との間に遮光部やフィルタを設けた構成においては、前記蛍光標識から発生する蛍光もロスしてしまう場合があることに比べて、本実施形態ではそのようなロスが生じない。

[0062] [チップ構造体 108 の変形例]

図 3 から図 6 に基づいて変形例について説明する。図 3 から図 6 はチップ構造体 108 の反応場 104 周辺の拡大図であり、図 2 (a) に対応する。他の構成に関しては図 1 と共通するので説明は省略する。

[0063] 図 3 は「第 1 の変形例」で、遮光部 103 を金属薄膜 102 の表面であって励起光 b1 の照射面とは反対側（他方の面側）に設けた例である。同図に示す例では金属薄膜 102 の誘電体部材 106 とは反対側の面に遮光部 103 を設けることができるので、誘電体部材 106 に金属薄膜 102 を形成しその上面に遮光部 103 を塗布するような場合に好適な形態である。

[0064] このような実施形態によれば、図 2 に実施形態と同様の効果を得ることが可能となる。特に第 1 の変形例では遮光部 103 を金属薄膜 102 の他方の面側に設けることにより、遮光部 103 に接する金属薄膜 102 では電場増強せず金膜上での散乱が発生せず、また励起光光路上から発生する散乱光や誘電体自家蛍光を遮光することができるので、S/N 比を向上させることが可能な表面プラズモン増強蛍光測定装置、及びチップ構造体を得ることが可能となる。

[0065] 図 4 は「第 2 の変形例」で、金属薄膜 102 が形成される面と同じ面に遮

光部 103 を設けた例であり、金属薄膜 102 は反応場 104 に対応する領域のみ形成しており、それ以外の周辺に遮光部 103 を設けた例である。例えば遮光部 103 も金属薄膜 102 と同じ材料で一体して設け、エッチング法により反応場 104 に対応する金属薄膜 102 の部分を薄肉の金属で形成し、その周辺を厚肉の金属で形成するような場合に好適な例である。第 2 の実施形態においても、図 2 に示す実施形態と同様の効果を得ることが可能となる。

[0066] 図 5 は「第 3 の変形例」である。第 3 の変形例では、樹脂基板 142 側に遮光部 103 を設け（図 5 (a) 参照）、樹脂基板 142 の遮光部 103 と、金属薄膜 102 に形成された反応場 104 とを位置合わせすることによりチップ構造体 108 を形成する例である（図 5 (b) 参照）。

[0067] 図 6 は「第 4 の変形例」である。第 4 の変形例では、反応場 104 の長さ L_c よりも遮光部 103 の開口の長さ L_a が大きく、境界が一致せずに隙間が形成された例である。同図においては、反応場 104 の中心と遮光部 103 の開口の中心とは一致しており、両側にそれぞれ長さ L_b の隙間が形成されている。同図に示す例では遮光部 103 の形成位置は、図 2 の実施形態に対応させたものであるが、図 3 から図 5 の示したそれぞれの変形例に適用してもよい。第 4 の実施形態に基づいて隙間の影響について説明する。

[0068] 図 7 は X 方向の位置に対する光量の出力変化を示したグラフである。図 1、図 2 に示した表面プラズモン増強蛍光測定装置の構成で、遮光部 103 を設けない場合での反応場 104 の中心をゼロとして、X 方向に光検出部を移動させた時の出力変化を示したものである。X 軸のプラスは励起光 b_1 の照射側、マイナスは反射側（図 1 の左：受光手段 116 側）を示す。縦軸は、X 軸がゼロの際の蛍光標識に由来する蛍光と、バックグラウンドの光の出力を 1 としてその比率を示している。

[0069] 同図に示すようにノイズとなるバックグラウンドの光成分は、X 軸の数値が大きく、照射側に行くほど強くなっていることがわかる。

[0070]

[表1]

隙間 L b (mm)	バックグラウンド	蛍光シグナル	S/N比	
遮光無し	100	100	1.00	比較例
1.0	95	100	1.05	実施例
0.5	71	100	1.41	実施例
0.0	40	100	2.50	実施例

[0071] 表1は、図6に示すチップ構造体108で遮光部103の開口の大きさLaを異ならせることにより隙間Lbを変更した際のバックグラウンドのシグナルと蛍光シグナル、及びこれらの値によるS/N比を示している。励起光b1の照射面におけるX方向の直径Dbは3.0mmであり、反応場104の長さLcは1.0mmである。また比較例として遮光部103を設けない場合のデータも合わせて表示している。

[0072] 隙間Lbがゼロ（つまり図2と同じ構成）の場合がS/N比が最も高いが、隙間Lbがあっても、バックグラウンドのシグナルを低減できるので比較例にくらべるとS/N比低減の効果が得られていることがわかる。

[0073] 図8は、「第5の変形例」である。第5の変形例は、図6に示す第4の変形例に対して反射側に遮光部103を設けずに、照射側にのみ遮光部103を設けた例である。図7に示したようにノイズとなるバックグラウンドのシグナルは照射側の方が大きく、片側に設けるのであれば反射側に設けるよりも照射側に設ける方がノイズの低減への効果は高い。

[0074] [表2]

隙間 L b (mm)	バックグラウンド	蛍光シグナル	S/N比	
遮光無し	100	100	1.00	比較例
1.0	95	100	1.05	実施例
0.5	80	100	1.25	実施例
0.0	63	100	1.59	実施例

[0075] 表2は、図8に示すチップ構造体108で遮光部103の反応場104の中心からの距離を異ならせることにより隙間Lbを変更した際のバックグラウンドのシグナルと蛍光シグナル、及びこれらの値によるS/N比を示してい

る。表 1 の条件と同様に励起光 b 1 の照射面における X 方向の直径 D b は 3 . 0 mm であり、反応場 1 0 4 の長さ L c は 1 . 0 mm である。

[0076] 表 1 と比較では、S / N 比は低下しているが、照射側の片側にのみ遮光部 1 0 3 を設けた場合であっても S / N 比低減の効果が得られていることがわかる。

[0077] 図 9 は、「第 6、第 7 の変形例」である。第 6、第 7 の変形例はそれぞれ第 4、第 5 の変形例に対応するものである。遮光部 1 0 3 を金属薄膜 1 0 2 の近傍であって、反応場 1 0 4 が設けられている微細流路 1 4 3 の反応場 1 0 4（金属薄膜 1 0 2）に対向する壁面（1 4 3 h）に設けている点で、第 4、第 5 の変形例とは異なっている。なお、図 9 に示す例では隙間 L b を設けていないが、表 1、表 2 に示すような適切な範囲内であれば隙間 L b を設けた構成としてもよい。

[0078] 図 9（a）に示す第 6 の変形例は、第 4 の変形例に比較して、遮光部 1 0 3 の位置は、金属薄膜 1 0 2 の近傍ではあるが、金属薄膜の形成面とは離間している面に設けることで、本来的に発生する蛍光シグナルをロスすることになる点で劣るが、遮光部を設けない比較例に比べると S / N 比は向上する点で効果がある。

[0079] 図 9（b）に示す第 7 の変形例では、照射側（図示の右側）にのみ遮光部 1 0 3 を設けることにより、第 6 の変形例に比べて蛍光シグナルのロスを抑えることができるので、S / N 比の向上効果が期待できる。

符号の説明

[0080] 1 0 表面プラズモン増強蛍光測定装置

b 1 励起光

b 2 反射光

b 3 蛍光

1 0 2 金属薄膜

1 0 3 遮光部

1 0 4 反応場

- 1 0 6 誘電体部材
- 1 0 8 チップ構造体
- 1 1 2 光源
- 1 1 6 受光手段
- 1 2 0 光検出部
- 1 2 2 集光部材
- 1 2 4 フィルタ
- 1 4 2 樹脂基板
- 1 4 3 微細流路
- 1 6 1 固定具

請求の範囲

- [請求項1] チップ構造体に設けられた金属薄膜の一方の面に励起光を照射し、前記金属薄膜上の電場を増強させることにより、前記金属薄膜の他方の面に形成された反応場の蛍光物質を励起させ、これにより増強された蛍光を光検出手段にて検出するようにした表面プラズモン増強蛍光測定装置であって、
- 前記チップ構造体には、前記金属薄膜の前記一方若しくは前記他方の面側に、前記蛍光物質から励起された蛍光と同じ波長の光を遮光する遮光部が設けられていることを特徴とする表面プラズモン増強蛍光測定装置。
- [請求項2] 前記遮光部は、前記光検出手段で蛍光を検出する検出領域の周囲に設けられていることを特徴とする請求項1に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。
- [請求項3] 前記遮光部は、励起光の波長の光も遮光可能であり、励起光照射領域の少なくとも一部を遮光する位置に設けられていることを特徴とする請求項1又は2に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。
- [請求項4] 前記遮光部は、前記金属薄膜の前記一方の表面若しくは他方の表面に設けられていることを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。
- [請求項5] 前記反応場へ検体液及び蛍光物質が含まれる試薬液を送液する流路を有し、
- 前記遮光部は、前記流路の壁面であって、前記金属薄膜に対向する面に設けられていることを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。
- [請求項6] 表面プラズモン増強蛍光測定装置に用いられるチップ構造体であって、
- 前記チップ構造体は少なくとも、
- 一方の面に励起光が照射される金属薄膜と、

前記金属薄膜の他方の面に形成された反応場と、

前記金属薄膜の前記一方若しくは前記他方の面側に設けられた遮光部と、

を有することを特徴とするチップ構造体。

[請求項7] 前記遮光部は、前記金属薄膜の前記一方の表面若しくは他方の表面に設けられていることを特徴とする請求項6に記載のチップ構造体。

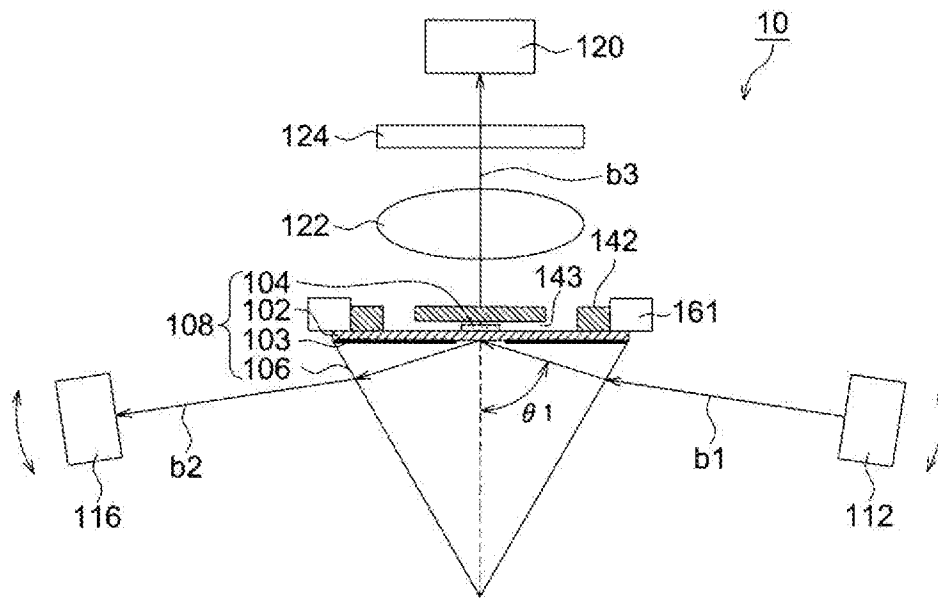
[請求項8] 前記反応場へ検体液及び蛍光物質が含まれる試薬液を送液する流路を有し、

前記遮光部は、前記流路の壁面であって、前記金属薄膜に対向する面に設けられていることを特徴とする請求項6に記載のチップ構造体。

[請求項9] 前記遮光部は、前記反応場の蛍光物質から励起された蛍光と同じ波長の光を遮光することを特徴とする請求項6から8のいずれか一項に記載のチップ構造体。

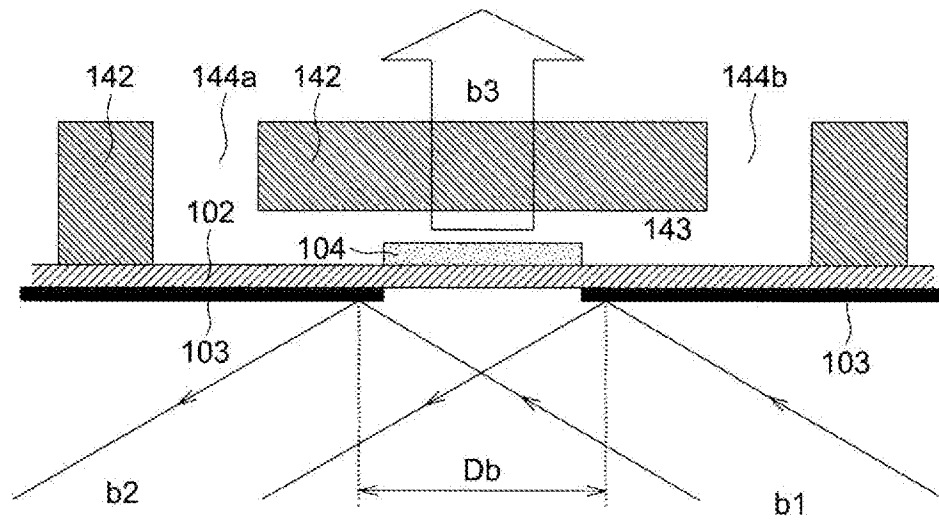
[請求項10] 前記遮光部は、励起光の波長の光も遮光可能であり、励起光照射領域の少なくとも一部を遮光する位置に設けられていることを特徴とする請求項6から9のいずれか一項に記載のチップ構造体。

[図1]

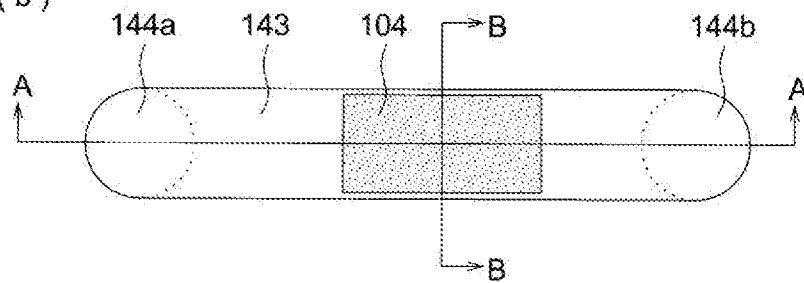


[図2]

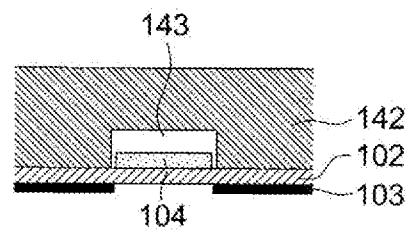
(a) A-A断面図



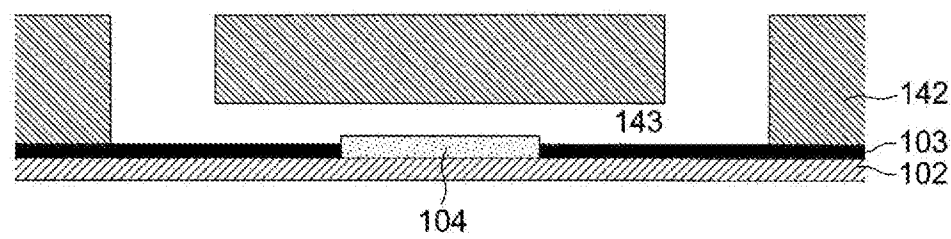
(b)



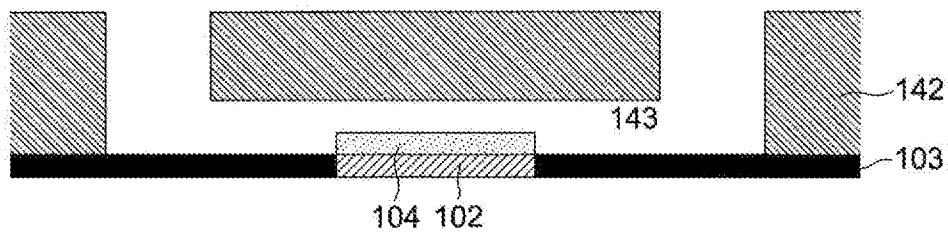
(c) B-B断面図



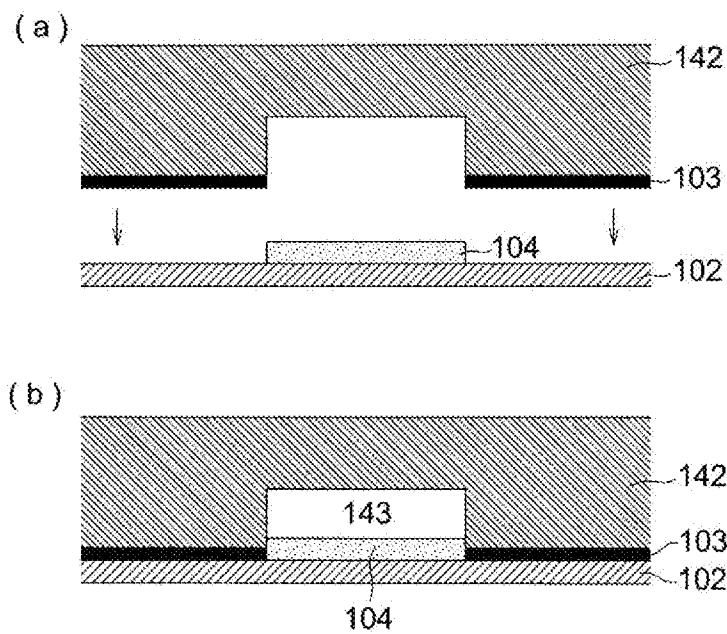
[図3]



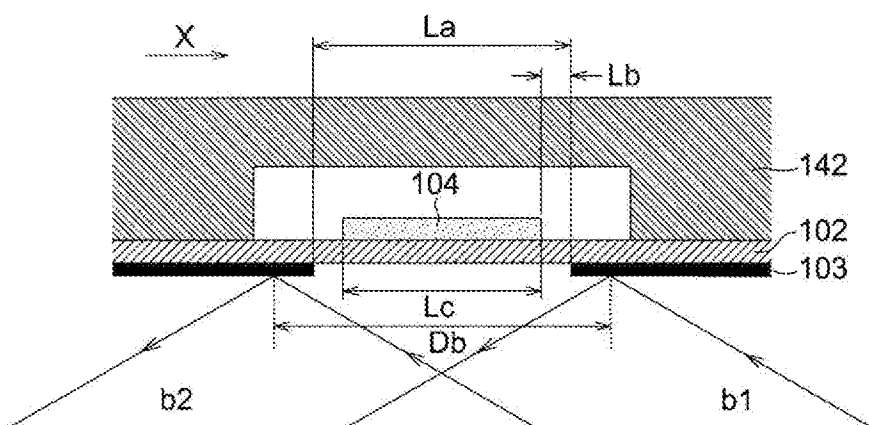
[図4]



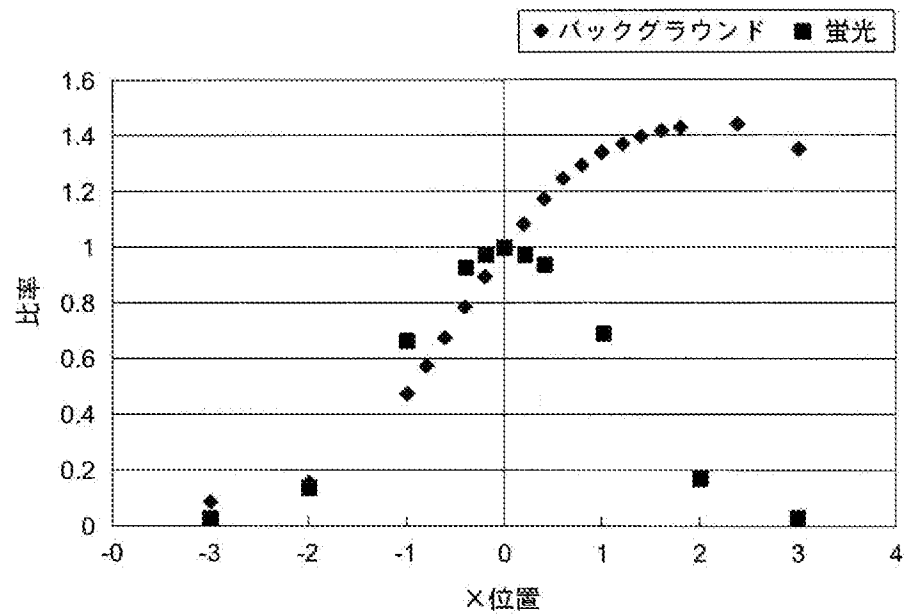
[図5]



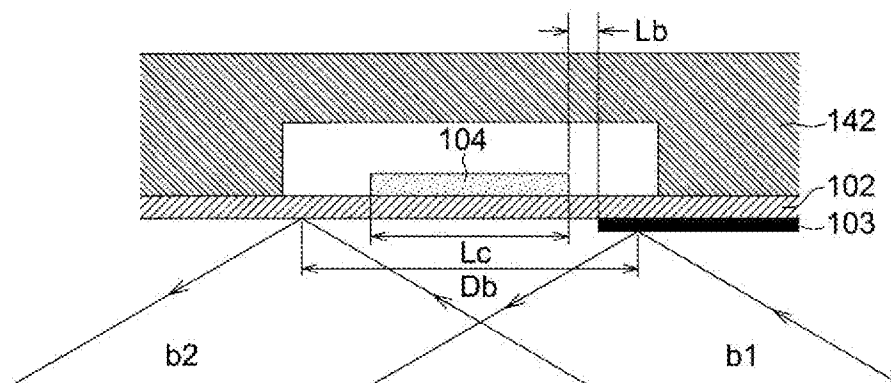
[図6]



[図7]

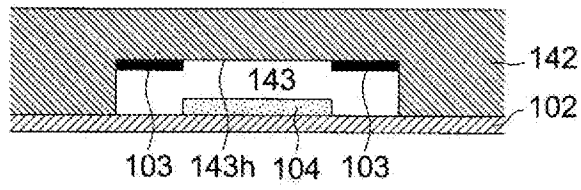


[図8]

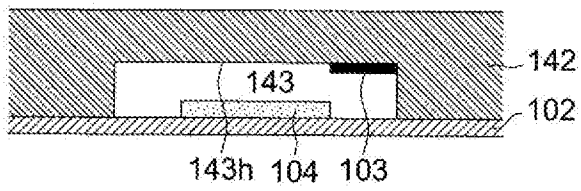


[図9]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/052993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)n

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

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 2009-133717 A (Konica Minolta Holdings, Inc.), 18 June 2009 (18.06.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-10
Y	JP 2005-147891 A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 09 June 2005 (09.06.2005), entire text; all drawings (Family: none)	1-10
Y	WO 2008/029591 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 13 March 2008 (13.03.2008), entire text; all drawings & JP 2008-64574 A	1-10

☒ 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 May, 2011 (02.05.11)Date of mailing of the international search report
17 May, 2011 (17.05.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/052993

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-241549 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 09 October 2008 (09.10.2008), entire text; all drawings & US 2008/0239311 A1	3, 10
Y	WO 2005/095929 A1 (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 13 October 2005 (13.10.2005), entire text; all drawings & US 2008/0165353 A1 & EP 1734358 A1	5, 8
Y	JP 2002-318192 A (Tosoh Corp.), 31 October 2002 (31.10.2002), entire text; all drawings & US 6664113 B2 & US 2002/0155619 A1 & EP 1253419 A2 & DE 60205157 D & DE 60205157 T	5, 8
A	JP 2009-133677 A (Konica Minolta Holdings, Inc.), 18 June 2009 (18.06.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-10
A	JP 2003-156432 A (Toshiba Corp.), 30 May 2003 (30.05.2003), entire text; all drawings & US 2003/0225322 A1	1-10
A	JP 2004-361256 A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 24 December 2004 (24.12.2004), entire text; all drawings (Family: none)	1-10

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, G01N21/78(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)n

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

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 2009-133717 A（コニカミノルタホールディングス株式会社）2009.06.18, 全文、全図（ファミリーなし）	1-10
Y	JP 2005-147891 A（アイシン精機株式会社）2005.06.09, 全文、全図（ファミリーなし）	1-10
Y	WO 2008/029591 A1（独立行政法人産業技術総合研究所）2008.03.13, 全文、全図 & JP 2008-64574 A	1-10

☒ 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 5 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 5 . 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）

田中 洋介

2W

3 0 0 9

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
Y	JP 2008-241549 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2008.10.09, 全文、全図 & US 2008/0239311 A1	3, 10
Y	WO 2005/095929 A1 (浜松ホトニクス株式会社) 2005.10.13, 全文、全図 & US 2008/0165353 A1 & EP 1734358 A1	5, 8
Y	JP 2002-318192 A (東ソー株式会社) 2002.10.31, 全文、全図 & US 6664113 B2 & US 2002/0155619 A1 & EP 1253419 A2 & DE 60205157 D & DE 60205157 T	5, 8
A	JP 2009-133677 A (コニカミノルタホールディングス株式会社) 2009.06.18, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2003-156432 A (株式会社東芝) 2003.05.30, 全文、全図 & US 2003/0225322 A1	1-10
A	JP 2004-361256 A (アイシン精機株式会社) 2004.12.24, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-10