

(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4月5日(05.04.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/042882 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/005490
- (22) 国際出願日: 2011年9月29日(29.09.2011)
- (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 2010-222937 2010年9月30日(30.09.2010) JP
特願 2011-115474 2011年5月24日(24.05.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30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): 木村 俊仁 (KIMURA, Toshihito) [JP/JP]; 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 柳田 征史, 外(YANAGIDA, Masashi et al.); 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜3

ー18-3 新横浜KSビル 7階 柳田国際特許事務所 Kanagawa (JP).

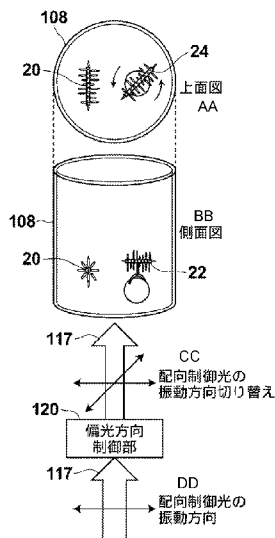
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, 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).

[続葉有]

(54) Title: BIOMOLECULE DETECTION DEVICE AND BIOMOLECULE DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: 生体分子検出装置および生体分子検出方法

[図7B]



120 Polarization-direction control unit
AA Top view
BB Side view
CC Switching oscillation direction of orientation-controlling light
DD Oscillation direction of orientation-controlling light

(57) Abstract: [Problem] To provide a biomolecule detection device capable of high-sensitivity measurement. [Solution] By switching the oscillation direction of orientation-controlling light, the orientation directions of free molecules and binding molecules in a solution can be switched, thereby switching the per-molecule amount of light emitted by the free molecules (20) and binding molecules (22). Since the free molecules (20) and the binding molecules (22) require different amounts of time to switch alignment when the illumination direction of the orientation-controlling light (117) switches, the amounts of light emitted by said molecules increase at different times. Thus, even if all the fluorescent molecules in the solution fluoresce, it is possible to compute the respective fluorescence contributions associated with the free molecules and the binding molecules, making it possible to accurately measure the concentration of a target substance using a simple configuration.

(57) 要約: 【課題】高感度な測定が可能な生体分子検出装置を提供する。【解決手段】配向制御光の振動方向の切り替えにより、溶液中のフリー分子およびバインディング分子の配向方向を切り替え、フリー分子(20)およびバインディング分子(22)の1分子あたりの発光量を切り替えることが可能な構成とした。また、フリー分子(20)およびバインディング分子(22)は、配向制御光(117)の照射方向の切り替えに伴う配向方向の切り替えに要する時間に差が生じるため、それぞれの分子の発光量が増加するタイミングが異なる。従って、溶液中の全ての蛍光分子が蛍光を発生しても、フリー分子およびバインディング分子それぞれに付随した蛍光の寄与分を算出することができ、簡便な構成で検出対象物質の濃度を正確に測定することができる。



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称 : 生体分子検出装置および生体分子検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、溶液中の検出対象物質を検出する技術に係り、特に、検体内の生体分子、ウイルス、核酸、蛋白質および細菌等を検出可能な生体分子検出装置および生体分子検出方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、医師や技師等が診療の現場で生体分子検出を行い、その場で測定結果を得て診断や治療に役立てる生体分子検出法が注目されている。生体分子検出法は、抗原抗体反応等の特異的な反応を利用した高い選択性により、血液、尿、汗といった複数成分を有する体液の中から、検出対象物質だけを選択的に検出する方法である。特に、このような生体分子検出法は、ウイルス、核酸、蛋白質および細菌等の生体分子の微量検出、検査、定量および分析などに広く用いられている。

[0003] 生体分子検出法として、ラジオイムノアッセイが実用化されている。ラジオイムノアッセイは、アイソトープで標識された抗原または抗体を用い、その抗原または抗体と特異的に結合する抗体または抗原の有無を検出するものである。ラジオイムノアッセイは、アイソトープの放射線量を測定することにより抗体または抗原等の検出対象物質を定量するもので、高感度な測定が可能である。

[0004] 放射性物質を用いない生体分子検出法として蛍光イムノアッセイがある。蛍光イムノアッセイとしては、予め反応層に抗体を固定しておき（これを固相という）、当該反応層に、測定対象溶液および蛍光分子で標識された抗体を流し、反応層近傍の蛍光を測定することにより、抗体に特異的に結合した抗原の濃度を測定する装置が知られている（例えば特許文献1参照）。

[0005] しかしながら、固相を利用した蛍光イムノアッセイは、固相を作成するのにコストがかかるという問題があった。固相を用いず液体中で生体分子検出

を行う（抗体等を固定せず液体中で生体分子検出を行うことを液相という）方法として、蛍光偏光法を利用して抗原抗体反応を確認する方法がある。蛍光偏光法は、蛍光標識した分子に別の分子が結合し分子の大きさが変化することにより生じる、ブラウン運動の変化に基づく蛍光偏光度の値の変化を検出する方法である。蛍光偏光法を利用した生体分子検出法は、検体中の検出対象物質の簡便かつ迅速な検知法として知られている（例えば特許文献2参照）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平7－120397号公報

特許文献2：特開2008－298743号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、蛍光偏光法は、ランダムな運動であるブラウン運動の変化を利用しているため、測定感度に限界があるという問題がある。また、特許文献2の方法では、ブラウン運動の変化による影響を受ける程度に蛍光寿命が長い必要がある。しかし、蛍光寿命は検体内の成分によって影響を受けるため、特許文献2の方法による測定結果にばらつきが生じることがある。

[0008] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、高感度測定が可能な生体分子検出装置および生体分子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

[0009] 上記目的を達成するために、本発明に係る生体分子検出方法は、

溶液中に存在する蛍光分子を励起するための、特定方向に直線偏光成分を有する励起光を照射するステップと、

検出対象物質に特異的に結合する物質と配向用標識とこの配向用標識の周囲に結合した複数の蛍光分子とを有する第1の複合体から発生する第1の蛍光を検出するステップと、 第1の複合体と検出対象物質とが結合した第2

の複合体から発生する第2の蛍光を検出するステップと、

第1の複合体および第2の複合体を少なくとも2つの方向に切り換えて配向させるステップと、

検出された第1の蛍光および第2の蛍光に基づいて検出対象物質の検出または定量を行うステップとを具備する。

[0010] また、本発明に係る生体分子検出装置は、

上記の生体分子検出方法で使用される生体分子検出装置であって、

特定方向に直線偏光成分を有し蛍光分子を励起する励起光を照射する光源と、

蛍光分子から発せられた蛍光を検出する受光部と、

溶液中で第1の複合体および第2の複合体を少なくとも2つの方向に切り換えて配向させる配向制御手段と、

第1の複合体および第2の複合体の配向方向の切り替えに伴って蛍光分子から発生する蛍光の強度の時間変化から、第2の蛍光の強度を算出して検出対象物質の検出または定量を行う演算部とを具備する。

[0011] また、本発明に係る生体分子検出装置において、配向制御手段は、配向用標識の長手方向が特定方向と平行となる第1の方向、および、配向用標識の長手方向が上記特定方向と垂直となる第2の方向に、第1の複合体および第2の複合体に切り換えて配向させるものであることが好ましい。

[0012] また、本発明に係る生体分子検出装置において、配向制御手段は、第1の複合体および第2の複合体を所定の時間間隔で複数回切り替えて配向させるものであり、

演算部は、第1の複合体および第2の複合体が所定の時間間隔で複数回切り替えて配向したことによって得られた複数の第2の蛍光の強度の加算平均を行い、加算平均により得られた蛍光の強度に基づいて検出対象物質の検出または定量を行うものであることが好ましい。

[0013] また、本発明に係る生体分子検出装置において、上記所定の時間間隔は、検出対象物質、この検出対象物質と特異的に結合する物質、配向用標識およ

び蛍光分子の質量または体積と、配向制御手段による配向制御の強度とに基づいて決定されることが好ましい。

[0014] また、本発明に係る生体分子検出装置において、配向制御手段は、直線偏光した光を照射する配向制御光源を備え、この配向制御光源から溶液に対して直線偏光した光を照射することにより、第1の複合体および第2の複合体を配向させるものであることが好ましい。

[0015] また、本発明に係る生体分子検出装置において、配向制御手段は、直線偏光した光の振動方向を切り替える波長板を有し、波長板を用いて直線偏光した光の振動方向を切り替えることにより、第1の複合体および第2の複合体を切り換えて配向させるものであることが好ましい。

[0016] また、本発明に係る生体分子検出装置において、配向制御光源は、溶液に対し直線偏光した光を複数の位置から照射するものであることが好ましい。

[0017] また、本発明に係る生体分子検出装置において、溶液は、少なくとも一部に平面を有する溶液保持部に保持されたものであることが好ましい。

[0018] また、本発明に係る生体分子検出装置において、配向制御光源は、溶液を通して溶液保持部の平面から出射する方向に、直線偏光した光を照射し、かつ、溶液と上記平面との界面において、直線偏光した光に焦点を結ばせるものであることが好ましい。

[0019] また、本発明に係る生体分子検出装置において、演算部は、前記第1の複合体および前記第2の複合体が一方の配向方向から他方の配向方向に切り替わる間における、前記第1の複合体から発生する蛍光の強度の時間変化と、前記第2の複合体から発生する蛍光の強度の時間変化とに差があることを利用して、前記第2の蛍光の強度を算出するものであることが好ましい。

[0020] また、本発明に係る生体分子検出装置において、受光部は、光を分光する分光手段を備えることが好ましい。

[0021] また、本発明に係る生体分子検出装置において、分光手段は、特性の異なる複数のフィルタであり、

受光部は、蛍光分子から発生する蛍光の波長に応じて複数のフィルタを切

り替えるものであることが好ましい。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、高感度な生体分子検出を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1A]実施の形態1に係る生体分子検出装置の抗原抗体反応の概要を説明するための模式図である。

[図1B]実施の形態1に係る生体分子検出装置の抗原抗体反応の概要を説明するための模式図である。

[図2A]フリー分子（抗原が結合していない抗体および蛍光分子）の模式図である。

[図2B]バインディング分子（抗原が結合した抗体および蛍光分子）の模式図である。

[図3A]励起光の振動方向と蛍光分子の遷移モーメントとが互いに平行の場合を表す図である。

[図3B]励起光の振動方向と蛍光分子の遷移モーメントとが互いに垂直の場合を表す図である。

[図4A]励起光の振動方向と配向用標識の長手方向とが互いに平行となる場合を示す図である。

[図4B]励起光の振動方向と配向用標識の長手方向とが互いに垂直となる場合を示す図である。

[図5A]実施の形態1に係る生体分子検出装置の外観斜視図である。

[図5B]実施の形態1に係る生体分子検出装置の開閉部を開けたときの外観斜視図である。

[図6]生体分子検出装置の主要な構成を示すブロック図である。

[図7A]配向制御光の振動方向とフリー分子およびバインディング分子の配向方向との関係を描いた図である。

[図7B]配向制御光の振動方向を切り替えた場合におけるフリー分子およびバインディング分子の動作を描いた図である。

[図7C]配向制御光の振動方向を切り替えフリー分子およびバインディング分子の配向が完了した場合を描いた図である。

[図8A]配向したフリー分子およびバインディング分子と励起光の振動方向との関係を描いた図である。

[図8B]別の方向に配向したフリー分子およびバインディング分子と励起光の振動方向との関係を描いた図である。

[図9]実施の形態1に係る生体分子検出装置における受光部の詳細な構成を表した模式図である。

[図10]検体の準備から廃棄までの流れを模式的に表した図である。

[図11]実施の形態1に係る生体分子検出装置における1周期の配向制御信号、サンプリングクロック、PD出力およびA/D変換部出力を表したグラフである。

[図12]実施の形態1に係る生体分子検出装置における配向制御信号を複数周期に亘って示したグラフである。

[図13A]実施の形態2に係る生体分子検出装置の抗原抗体反応の概要を説明するための模式図である。

[図13B]実施の形態2に係る生体分子検出装置の抗原抗体反応の概要を説明するための模式図である。

[図14]実施の形態2に係る生体分子検出装置の主要な構成を示すブロック図である。

[図15]実施の形態2に係る生体分子検出装置における受光部の詳細な構成を表した模式図である。

[図16A]実施の形態2に係る生体分子検出装置を用いて一方の検出対象物質を検出する場合におけるA/D変換部出力を表したグラフである。

[図16B]実施の形態2に係る生体分子検出装置を用いて他方の検出対象物質を検出する場合におけるA/D変換部出力を表したグラフである。

[図17A]一方からレーザーを照射した場合における、蛍光分子の遷移モーメントの方向とランダム偏光した励起光の振動方向との関係を表す概念図である。

。

[図17B]他方からレーザーを照射した場合における、蛍光分子の遷移モーメントの方向とランダム偏光した励起光の振動方向との関係を表す概念図である。

。

[図18A]一方からレーザーを照射した場合における、蛍光分子の遷移モーメントの方向と2方向に直線偏光した励起光の振動方向との関係を表す概念図である。

[図18B]他方からレーザーを照射した場合における、蛍光分子の遷移モーメントの方向と2方向に直線偏光した励起光の振動方向との関係を表す概念図である。

[図19]蛍光分子の遷移モーメントの方向の変化に伴うフォトダイオード出力の変化を表したグラフである。

[図20A]レーザーの偏光軸の変化に伴うバインディング分子の配向の変化を説明するための概念図である。

[図20B]レーザーの偏光軸の変化に伴うバインディング分子の配向の変化を説明するための概念図である。

[図20C]レーザーの偏光軸の変化に伴うバインディング分子の配向の変化を説明するための概念図である。

[図21]試薬カップの多点に直線偏光したレーザーを底面から入射させる場合を示す概念図である。

[図22]直線偏光したレーザーを所定の方向から多点に入射させるための配向制御用光源部の構造を示す概念図である。

[図23]直線偏光したレーザーを所定の方向から多点に入射させるための光学系の一例を示す概念図である。

[図24]直線偏光したレーザーを所定の方向から多点に入射させるための光学系の別の例を示す概念図である。

[図25]マイクロレンズアレイを示す概念図である。

[図26]試薬カップの形状の一例を示す概念図である。

[図27]集光されたレーザーの焦点と試薬カップとの位置関係の一例を示す概念図である。

[図28]配向制御光の試薬カップに対する照射方向を切り替えることにより蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御するための光学系を示す概念図である。

発明を実施するための形態

[0024] 以下、添付図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。生体分子検出には様々な特異的な反応が利用されるが、各実施の形態では、抗原および抗体の特異的な反応を利用し、当該抗体に結合する配向用標識に対して標識された蛍光分子から発生する蛍光を基に、抗体と反応した抗原を検出する装置を例にとって説明する。

[0025] (実施の形態1)

図1 Aおよび図1 Bは、本発明の実施の形態1に係る生体分子検出装置における抗原抗体反応の概要を示した模式図である。図1 Aおよび1 Bを用いて、液中での抗原抗体反応について説明する。実施の形態1では、1種類の抗体を使用し、均一溶液中で1種類の抗原を検出する。ここでは、円筒形の試薬カップ10の中に乾燥した抗体12が入れている場合を考える。抗体12は、円柱状の形状を有する配向用標識8に結合されている。

配向用標識8の周囲には、複数の蛍光分子14が固定されている。

[0026] 本実施の形態においては、検体は全血から分離した血漿16である。試薬カップ10に血漿16を分注して攪拌すると、血漿16中に抗体12と特異的に結合する抗原18が存在する場合は、抗体12と抗原18との間で抗原抗体反応が起こり、図1 Bに示すように抗原12および抗体18が特異的に結合する。抗体12は抗原18に対して十分に多い量が入れているため、一部の抗体12は抗原抗体反応をしないまま血漿16中に残る。

以下、抗原抗体反応で結合した抗体12および抗原18ならびに配向用標識8および蛍光分子14が結合した複合体をバインディング分子、抗原18と結合していない抗体12、配向用標識8および蛍光分子14が結合した複合

体をフリー分子と呼ぶ。バインディング分子およびフリー分子は、血漿溶液中に混在している。なお、血漿中には抗原 18 以外の成分も存在するが、説明を簡単にするため、図 1 A および 1 B では抗原 18 以外の成分は省略して描いてある。

[0027] 本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置は、液相であることによりフリー分子およびバインディング分子が混在している溶液に対し、励起光を照射し、フリー分子およびバインディング分子に付随する蛍光分子 14 から発生する蛍光を受光して、抗原 18 の検出および定量を行う。従って、抗原 18 を含むバインディング分子から発生する蛍光のみを検出することが望ましいが、フリー分子およびバインディング分子は溶液中に混在しているため、溶液に励起光を照射するとフリー分子に付随する蛍光分子 14 から蛍光が発生して不要成分となる。そこで、本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置は、フリー分子およびバインディング分子の配向を光により切り替えつつ蛍光を検出し、配向の切り替えに伴う蛍光強度の変化に基づいて、全蛍光データの中からバインディング分子に付随する蛍光分子から発生する蛍光の寄与分を算出する。

[0028] 本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置において、バインディング分子から発生する蛍光の寄与分とフリー分子から発生する蛍光の寄与分とを算出する原理を説明するために、実施の形態 1 に係る生体分子検出装置に用いるフリー分子およびバインディング分子の構造について図 2 A および 2 B を用いて説明する。図 2 A はフリー分子 20 の模式図を表す。フリー分子 20 は、抗体 12、配向用標識 8 および蛍光分子 14 を有する。一方、図 2 B はバインディング分子 22 の模式図を表す。バインディング分子 22 は、抗体 12、配向用標識 8 および蛍光分子 14、並びに、抗体 12 に結合した抗原 18 を有する。

[0029] 配向用標識 8 は、抗体 12 および蛍光分子 14 と結合し、抗体 12 および蛍光分子 14 を配向させるための標識である。配向用標識 8 は、細長い棒状の形状を有しており、光という外力を受けて特定の方向に配向する性質を有

する。抗体 1 2 および蛍光分子 1 4 は、光により外力を受けて特定の方向に配向しようとするが、分子量が小さいと配向しない場合がある。そこで、本実施の形態では、抗体 1 2 および蛍光分子 1 4 に更に配向用標識 8 を結合させ、この配向用標識 8 を配向させることで、抗体 1 2 および蛍光分子 1 4 を配向させる。配向用標識 8 は、例えば、長手方向の長さが約 3 0 0 n m の I 型コラーゲンを用いることができる。配向用標識 8 は、抗体 1 2 および蛍光分子 1 4 より十分大きい。なお、図 2 A および 2 B では、説明を分かりやすくするために配向用標識 8 を円柱状の形状で示した。コラーゲンと、抗体 1 2 または蛍光分子 1 4 との結合は、公知の任意の方法を用いることができる。

[0030] 蛍光分子 1 4 は、励起光を受けて蛍光を発する分子である。蛍光分子 1 4 は、配向用標識 8 の両端面ならびに配向用標識 8 の側面に満遍なく放射状に結合されている。

[0031] 抗体 1 2 は、抗原 1 8 と特異的に結合する物質であり、配向用標識 8 に結合されている。抗体 1 2 は、ユーザーが検出したい検出対象物質と特異的に結合するものを使用する。

[0032] 本実施の形態では、検体に全血を用い、検出対象物質である抗原 1 8 として P S A (P r o s t a t e S p e c i f i c A n t i g e n) を検出する場合を考え、検出対象物質と特異的に結合する物質である抗体 1 2 として抗 P S A 抗体を用いた場合について示す。蛍光分子 1 4 としては、A l e x a F l u o r 5 6 8 (M o l e c u l a r P r o b e s 社の商品名) を用いた。A l e x a F l u o r 5 6 8 は、波長 6 1 0 n m 程度にピークを持ち、5 5 0 n m - 7 0 0 n m 程度の波長を持った蛍光を発する。

[0033] 蛍光分子 1 4 (A l e x a F l u o r 5 6 8) のサイズは約 1 n m である。従って、蛍光分子 1 4 は配向用標識 8 に比べて十分に小さいため、配向用標識 8 の周囲に複数結合させることができる。なお、図 2 A および 2 B では、説明を分かりやすくするために蛍光分子 1 4 のサイズを大きく描いてある。

[0034] 蛍光分子 14 は、光エネルギーを吸収すると励起状態に遷移し、基底状態に戻る過程で蛍光を発する。一般に、直線偏光した励起光で蛍光分子 14 が励起された場合、蛍光分子 14 は励起光の振動方向と同じ方向に偏光した蛍光を発する。蛍光分子 14 から発生する蛍光の偏光度は、蛍光分子 14 の回転速度に依存する。蛍光分子 14 が回転運動していなければ、蛍光分子 14 は励起光の振動方向と同じ方向に偏光した蛍光を発し、蛍光分子 14 が速い回転運動をしているほど、蛍光分子 14 は偏光していない蛍光を発する。なお本明細書において、光の「振動方向」とは電場の振動方向を意味し、光が偏光している場合にはその偏光方向と同義である。

[0035] 蛍光分子 14 が励起光により励起される場合、蛍光分子 14 の分子構造によって決まる遷移モーメントという蛍光分子 14 内のベクトルが励起光と相互作用する。遷移モーメントは、ある固有の方向を蛍光分子 14 内で持っており、遷移モーメントの方向と励起光の振動方向との関係が蛍光分子 14 の励起効率を決定する。具体的には、蛍光分子 14 は、遷移モーメントと平行な方向に振動する光を選択的に吸収する。従って、図 3 A および 3 B に示すように、励起光 19 が紙面左右に振動しながら紙面下から上に進行して蛍光分子 14 に当たる場合、直線偏光した励起光 19 の振動方向が蛍光分子 14 の遷移モーメントと平行な場合（図 3 A）に最も励起効率が高くなり、直線偏光した励起光 19 の振動方向と蛍光分子 14 の遷移モーメントとのなす角が大きくなるほど励起効率は下がり、直線偏光した励起光 19 の振動方向が蛍光分子 14 の遷移モーメントと直交する場合（図 3 B）に励起効率が 0 となる。遷移モーメントの向きは、蛍光分子 14 の向きによって変わるため、溶液中における蛍光分子 14 の向きは、蛍光分子 14 の励起効率に影響を与える。なお、ここでは説明を分かりやすくするために、蛍光分子 14 の長手方向と蛍光分子 14 の遷移モーメントの方向とが平行となっている場合を例にとって図示したが、蛍光分子の形状と遷移モーメントとの関係は必ずしも平行となる場合ばかりではない。

[0036] このように、蛍光分子 14 の遷移モーメントと励起光 19 の振動方向との

関係は、蛍光分子 14 の励起効率に影響を与えるが、このことは、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 に結合している蛍光分子 14 の遷移モーメントと励起光 19 の振動方向との関係にも当てはまる。フリー分子 20 およびバインディング分子 22 が直線偏光（光の振動方向が同一平面内にある偏光）した励起光によって励起された場合の励起効率について図 4 A および 4 B を用いて説明する。

[0037] 図 4 A および 4 B に示されるように本実施形態では、配向用標識 8 の側面に、配向用標識 8 の中心軸に対して放射状に蛍光分子 14 が結合されている。したがって、これらの配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子 14 の遷移モーメントの方向も配向用標識 8 の中心軸に対して放射状となっている。また、図 4 A および 4 B では、配向用標識 8 の両端面に結合している蛍光分子の遷移モーメントは、配向用標識 8 の長手方向と平行となっている。

[0038] 図 4 A は、励起光 19 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに平行となる場合を示す図である。この場合、バインディング分子 22 が有する複数の蛍光分子 14 の中で、励起される蛍光分子は、主に配向用標識 8 の両端面に結合した蛍光分子（破線で示す領域 24 a および領域 24 b に含まれる蛍光分子）である。配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子は、遷移モーメントが励起光の振動方向と垂直となるため励起されない。

[0039] 図 4 B は、励起光 19 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに垂直となる場合を示す図である。この場合、バインディング分子 22 が有する複数の蛍光分子 14 の中で、励起される蛍光分子は、配向用標識 8 の側面に放射状に結合した蛍光分子のうち、主に遷移モーメントが励起光 19 の振動方向と垂直の関係になっていない蛍光分子（破線で示す領域 26 a および領域 26 b に含まれる蛍光分子）である。配向用標識 8 の両端面に結合した蛍光分子は、遷移モーメントが励起光の振動方向と垂直となるため励起されない。

また、配向用標識 8 の側面に放射状に結合した蛍光分子のうち、遷移モーメントが励起光 19 の振動方向と垂直となる蛍光分子（例えば、蛍光分子 14

a および蛍光分子 1 4 b) は励起されない。

[0040] 配向用標識 8 は細長い円柱状の形状を有しており、配向用標識 8 の側面の面積は配向用標識 8 の両端面の面積より大きいので、配向用標識 8 の側面には配向用標識 8 の両端面と比べて多くの蛍光分子が結合している。従って、励起光 1 9 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに垂直の位置関係にある場合の方が、励起光 1 9 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに平行の位置関係にある場合と比べて、より多くの蛍光分子を励起することができる。つまり、励起光 1 9 の振動方向を一定としながら配向用標識 8 の配向方向（配向用標識 8 の長手方向）を変化させると、バインディング分子 2 2 から発生する蛍光の総量も変化する。

[0041] なお、厳密には、励起光 1 9 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに平行となる場合においても、配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子 1 4 が斜めに結合していれば、遷移モーメントが励起光 1 9 の振動方向と完全に垂直とはならず、配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子 1 4 が励起される場合がある。しかし、配向用標識 8 の側面に結合し、遷移モーメントが励起光 1 9 の振動方向と垂直とならない蛍光分子の個数は全体から見るとわずかな量しかない。したがって、バインディング分子 2 2 全体として見ると、このレアケースのバインディング分子 2 2 は、励起光 1 9 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに垂直となる場合ほどの蛍光を発することはない。同様に、励起光 1 9 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが互いに垂直となる場合においても、配向用標識 8 の両端面に結合した蛍光分子のうち励起されるものが現れる場合があるが、バインディング分子 2 2 全体として見るとそれらの割合は無視できるほどに少ない。

[0042] なお、図 4 A および 4 B では、バインディング分子 2 2 を図示して説明したが、フリー分子 2 0 の場合においても、励起光 1 9 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向との関係に応じてバインディング分子 2 2 の場合と同じ位置にある蛍光分子が励起される。

[0043] 溶液中における蛍光分子 1 4 の向きを考えるため、溶液中におけるフリー

分子 20 および バインディング分子 22 の運動について説明する。フリー分子 20 および バインディング分子 22 は、溶液中で不規則に運動（ブラウン運動）しており、溶液中の移動および回転運動を行っている。溶液中での分子のブラウン運動は、絶対温度、分子の体積、溶媒の粘度等の影響を受けることが知られている。バインディング分子 22 は、抗原 18 の分だけフリー分子 20 より体積が大きく、溶液中でブラウン運動しにくい。溶液中でフリー分子 20 および バインディング分子 22 のブラウン運動のしやすさが互いに異なることを利用して、ブラウン運動の変化からバインディング分子 22 の検出を行う方法が知られているが、ブラウン運動というランダムな運動を利用しているため検出感度に限界がある。

[0044] そこで、本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置は、レーザーを利用して溶液中のフリー分子およびバインディング分子の配向を制御する。溶液中のフリー分子およびバインディング分子にレーザーを照射すると、主に配向用標識 8 が外力を受け、溶液中でランダムな運動をしていたフリー分子およびバインディング分子は、特定の一方方向を向く（以下、このように外力の付加を受けて分子が特定の一方方向を向いた状態を、分子の配向が完了した状態という）。フリー分子およびバインディング分子は、体積または質量の違いにより溶液中での移動および回転運動のしやすさが異なる。レーザーで溶液中の分子の配向を制御した場合においても、フリー分子とバインディング分子とでは、レーザーを照射されてからこれらの分子の配向が完了するまでに要する時間に差が生じる。本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置は、フリー分子およびバインディング分子のそれぞれの配向が完了するまでに要する時間の差を利用して、フリー分子およびバインディング分子それぞれに付随した蛍光分子 14 の励起効率に差を生じさせ、バインディング分子から発生する蛍光の寄与分の算出を行う。

[0045] 続いて、本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置 100 の構成について説明する。図 5 A は、生体分子検出装置 100 の外観斜視図である。生体分子検出装置 100 の側面には、表示部 102、ユーザー入力部 104 お

よび開閉部１０６がある。表示部１０２は、測定結果等を表示する。ユーザー入力部１０４は、モードの設定および検体情報の入力等を行う。開閉部１０６は、上蓋の開閉が可能な構成となっており、検体のセット時には上蓋が開けられ、測定時には上蓋が閉じられる。この構成により、外部の光が測定に影響を与えることを防いでいる。

[0046] 図５Ｂは、開閉部１０６を開いた場合における生体分子検出装置１００の外観斜視図である。開閉部１０６を開くと、中には試薬カップ１０８および保持台１１０がある。試薬カップ１０８は、保持台１１０に保持されており、保持台１１０から着脱可能となっている。試薬カップ１０８は、溶液を入れる円柱状の容器である。ユーザーは、試薬カップ１０８に検体を分注し、上蓋を閉じて測定を行う。図示しないが、生体分子検出装置１００内には試薬タンクおよび分注部があり、測定が開始されると、分注部は試薬タンク内から試薬を吸い上げて試薬カップ１０８内に分注する。

[0047] 図６は、生体分子検出装置１００の主要な構成を説明するための機能ブロック図である。生体分子検出装置１００は、表示部１０２、ユーザー入力部１０４、試薬カップ１０８、試薬タンク１１２、分注部１１４、配向制御用光源部１１６、励起光源部１１８、偏光方向制御部１２０、ファンクションジェネレータ（ＦＧ）１２２、受光部１２４、増幅部１２６、Ａ／Ｄ変換部１２８、サンプリングクロック発生部１３０およびＣＰＵ１３２を有する。

[0048] 試薬カップ１０８は、試薬タンク１１２に保存してある試薬と患者等から採取した検体とを反応させる容器である。試薬カップ１０８は、生体分子検出装置１００から着脱可能となっている。試薬カップ１０８の容量は、例えば約１２０μＬである。

[0049] 試薬タンク１１２は、複数種類の試薬を貯めておくタンクである。フリー分子２０は試薬タンク１１２中試薬として保存されている。

[0050] 分注部１１４は、着脱可能なピペットや吸引器によって構成される。分注部１１４は、ＣＰＵ１３２からの命令に従い、測定に使用する試薬を試薬タンク１１２からピペットで吸い上げ、試薬カップ１０８へ分注する。

- [0051] 配向制御用光源部 116 は、試薬カップ 108 の下部に設けられ、内部に備えた偏光子により直線偏光した配向制御光 117 を偏光方向制御部 120 に向けて照射し、試薬カップ 108 内の溶液中にあるフリー分子 20 およびバインディング分子 22 に外力を加えてこれらの分子の配向を制御する。配向制御光 117 としては、例えば波長 $1.3 \mu\text{m}$ 、出力 700 mW のレーザーを用いる。配向制御光 117 は、試薬カップ 108 の溶液全体を照らす程度の幅を有している。
- [0052] 励起光源部 118 は、試薬カップ 108 の下部に設けられ、内部に備えた偏光子により直線偏光した励起光 119 を試薬カップ 108 の下部から上部に向けて照射して蛍光分子 14 を励起する。励起光としては、例えば波長 532 nm 、出力 10 mW の光を用いる。
- [0053] 偏光方向制御部 120 は、配向制御光 117 の偏光方向（振動方向）を切り替えることで、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向を切り替える。なお、本明細書において、フリー分子およびバインディング分子に関して「配向方向」とは、配向が完了した状態における配向用標識 8 の長手方向を意味するものとする。偏光方向制御部 120 は、 $\lambda/2$ 波長板を有する。 $\lambda/2$ 波長板は、垂直な方向に振動する偏光の光路差を $1/2$ 波長変化させる機能を有する位相板であり、光の偏光面を回転操作するために用いられる。 $\lambda/2$ 波長板の光学軸方向と平行な方向に直線偏光した光は $\lambda/2$ 波長板を素通りするが、 $\lambda/2$ 波長板の光学軸方向と 45 度の角度をなす方向に直線偏光した光は振動方向が 90 度変化する。つまり、直線偏光した光に対する $\lambda/2$ 波長板の角度を切り替えることで、光を素通りさせる場合と、光の振動方向を 90 度変化させる場合とを切り替えることができる。偏光方向制御部 120 は、FG122 からの信号を受けて $\lambda/2$ 波長板を回転し、配向制御光 117 の振動方向を 90 度切り替える。換言すれば、配向制御光 117 の振動方向は、FG122 が発生する電圧信号によって決まる。
- [0054] FG122 は、様々な周波数と波形をもった電圧信号を発生させることの

できる装置で、CPU 132からの命令を受けて、偏光方向制御部120およびサンプリングクロック発生部130へそれぞれ異なる電圧信号を出力する。以下、FG 122から偏光方向制御部120へ出力される電圧信号を配向制御信号という。

[0055] CPU 132は、生体分子検出装置100の各動作を統括的に制御し、測定結果の演算等を行う。CPU 132は、FG 122が出力する配向制御信号を指定することで、偏光方向制御部120が配向制御光117の振動方向を切り替えるタイミングを制御する。

[0056] 受光部124は、試薬カップ108の下部に設けられ、試薬カップ108内の蛍光分子14から発生する蛍光123を試薬カップ108の下部で受光し、受光した光の信号をアナログ電気信号（アナログ蛍光データ）に変換して増幅部126へ出力する。

[0057] 増幅部126は、受光部124から出力されたアナログ蛍光データを増幅してA/D変換部128へ出力する。

[0058] サンプリングクロック発生部130は、FG 122から入力された電圧信号に基づいて、A/D変換部128がアナログ蛍光データをサンプリングするタイミングを指定するサンプリングクロックをA/D変換部128へ出力する。

[0059] A/D変換部128は、サンプリングクロック発生部130から出力されたサンプリングクロックに基づいて、増幅部126から出力されたアナログ蛍光データのサンプリングを行い、サンプリングしたアナログ蛍光データをデジタルデータに変換してCPU 132へ出力する。

[0060] CPU 132は、A/D変換部128から出力されたデジタルデータの演算を行い、その結果を表示部102へ出力する。また、CPU 132は、ユーザー入力部104から入力を受けて、配向制御用光源部116、励起光源部118、分注部114およびFG 122の動作の指示命令を行う。具体的には、CPU 132は、配向制御用光源部116および励起光源部118に対してはそのON/OFF命令を行い、分注部114に対しては使用する試

薬を指定する命令および分注動作開始命令を行い、F G 1 2 2 に対しては出力する電圧信号の波形の指示命令および出力命令を行う。

[0061] 図 7 (A) ~ (C) に示す模式図を用いて、配向制御用光源部 1 1 6 から照射される配向制御光 1 1 7 の振動方向の切り替えに伴うフリー分子 2 0 およびバイディング分子 2 2 の動作を説明する。

[0062] 配向制御用光源部 1 1 6 から照射された配向制御光 1 1 7 は、偏光方向制御部 1 2 0 を通って試薬カップ 1 0 8 へ照射される。偏光方向制御部 1 2 0 は、配向制御用光源部 1 1 6 から照射された配向制御光 1 1 7 の振動方向を 2 方向に切り替える。具体的には、偏光方向制御部 1 2 0 は、F G 1 2 2 から 0 V の配向制御信号を受信した場合には配向制御光 1 1 7 を素通りさせ、F G 1 2 2 から 5 V の配向制御信号を受信した場合には配向制御光 1 1 7 の振動方向を 9 0 度切り替える。本実施形態では、偏光方向制御部 1 2 0 が配向制御光 1 1 7 を素通りさせた場合に試薬カップ 1 0 8 に入射する配向制御光 1 1 7 の振動方向は、励起光 1 1 9 の振動方向と平行となる。したがって、偏光方向制御部 1 2 0 が配向制御光 1 1 7 の振動方向を 9 0 度切り替えた場合に試薬カップ 1 0 8 に入射する配向制御光 1 1 7 の振動方向は、励起光 1 1 9 の振動方向と垂直となる。

[0063] 配向制御光 1 1 7 は、フリー分子 2 0 およびバイディング分子 2 2 に外力を加えることでこれらの分子を配向させる。配向制御光 1 1 7 による外力は、配向制御光 1 1 7 がフリー分子 2 0 およびバイディング分子 2 2 に当たって散乱する反作用として生じるものである。したがって、配向制御光 1 1 7 が振動する方向とフリー分子 2 0 およびバイディング分子 2 2 の向きとの関係によって、配向制御光 1 1 7 が力を及ぼす方向が決まる。

フリー分子 2 0 およびバイディング分子 2 2 は、溶液中でランダムな方向を向いて分散しているが、配向制御光 1 1 7 を照射されると配向制御光 1 1 7 によって少し回転するような方向（回転方向）の力を受ける。そして、配向制御光 1 1 7 による作用を受けたフリー分子 2 0 およびバイディング分子 2 2 は、配向制御光 1 1 7 が及ぼす様々な方向への回転方向の力が釣り合

う方向を向いて安定する。この場合、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 が、配向制御光 117 が及ぼす回転方向の力が釣り合う方向を向くとは、配向用標識の長手方向が配向制御光 117 の振動方向と平行になることをいう。従って、配向制御光 117 の振動方向を変化させれば、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 が配向する方向を変化させることができる。

[0064] 図 7 A は、偏光方向制御部 120 が配向制御光 117 を素通りさせた場合におけるフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向を示す図である。紙面左右方向に振動している配向制御光 117 が試薬カップ 108 に入射すると、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 は、配向用標識 8 の長手方向が配向制御光 117 の振動方向と平行となるように配向する。

[0065] 図 7 B は、配向制御光 117 の振動方向を 90 度切り替えて配向制御光 117 が紙面に垂直な方向に振動するようにした初期段階におけるフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の動作を示す図である。FG 122 から 5 V の配向制御信号が出力されると、偏光方向制御部 120 は、配向制御光 117 の振動方向を紙面に垂直な方向に切り替える。

紙面に垂直な方向に振動する配向制御光 117 が試薬カップ 108 に入射すると、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 は、配向用標識 8 の長手方向が配向制御光 117 の振動方向と平行となるように回転運動を行う。この場合、バインディング分子 22 に比べて体積および質量が小さいフリー分子 20 の方が速く回転運動し、その配向が完了するまでに要する時間が短い。バインディング分子 22 の配向はフリー分子 20 より遅れて完了する。

[0066] 図 7 C は、配向制御光 117 の紙面に垂直な方向に振動している場合における、それぞれ配向が完了したフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向を示す図である。配向制御光 117 の振動方向が紙面に垂直な方向である場合、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 は、配向用標識 8 の長手方向が紙面に垂直となる向きに配向する。

- [0067] 生体分子検出装置 100 は、FG 122 からの配向制御信号の入力により偏光方向制御部 120 が有する $\lambda/2$ 波長板の向きを切り替えることで、配向制御光 117 の振動方向、並びに、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向を角度が 90 度互いに異なる 2 つの方向にそれぞれ切り替えることができる。
- [0068] フリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向と励起光 119 との関係について図 8 A および 8 B を用いて説明する。
- [0069] 図 8 A は、FG 122 から偏光方向制御部 120 への配向制御信号の出力が 0 V の場合における励起光 119 の振動方向とフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向との関係を示した模式図である。
- [0070] FG 122 から偏光方向制御部 120 への配向制御信号の出力が 0 V の場合、励起光 119 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが平行となる。この場合、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 が有する複数の蛍光分子 14 の中で、主に配向用標識 8 の両端面に結合した蛍光分子 14 が励起される。これは、配向用標識 8 の両端面に結合した蛍光分子の遷移モーメントが、励起光 119 の振動方向と垂直とならないためである。配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子 14 は、遷移モーメントが励起光 119 の遷移モーメントと垂直となるため励起されない。
- [0071] 図 8 B は、FG 122 から偏光方向制御部 120 への配向制御信号の出力が 5 V の場合における励起光 119 の振動方向とフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向との関係を示した模式図である。
- [0072] FG 122 から偏光方向制御部 120 への配向制御信号の出力が 5 V の場合、励起光 119 の振動方向と配向用標識 8 の長手方向とが垂直となる。この場合、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 が有する複数の蛍光分子 14 の中で、主に配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子 14 が励起される。これは、配向用標識 8 の側面に結合した蛍光分子 14 の遷移モーメントが、原則励起光 119 の振動方向と垂直とならないためである。
- 配向用標識 8 の両端面に結合した蛍光分子 14、ならびに、配向用標識 8 の

側面に結合しかつ励起光 1 1 9 の振動方向と垂直な遷移モーメントを有する一部の蛍光分子 1 4 は、遷移モーメントが励起光 1 1 9 の遷移モーメントと垂直となるため励起されない。

[0073] 配向用標識 8 の側面には配向用標識 8 の両端面と比べて多くの蛍光分子 1 4 が結合しているため、F G 1 2 2 から偏光方向制御部 1 2 0 への配向制御信号の出力が 5 V の場合の方が 0 V の場合と比べ、フリー分子 2 0 またはバインディング分子 2 2 の 1 分子あたりの発光量が多い。そのため、F G 1 2 2 から偏光方向制御部 1 2 0 への配向制御信号の出力が 5 V の場合の方が、試薬カップ 1 0 8 内の溶液中から発生する蛍光の総量も多い。

[0074] このように、偏光方向制御部 1 2 0 による配向制御光 1 1 7 の振動方向の切り替えは、フリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 の 1 分子あたりの発光量を切り替えることになる。一方、フリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 は体積および質量が異なるため、配向制御光 1 1 7 の振動方向の切り替えに応じて配向が切り替わる速度は、これらの分子では互いに異なる。

[0075] フリー分子 2 0 は、バインディング分子 2 2 に比べて体積および質量が小さいため、配向制御光 1 1 7 の振動方向の切り替えに応じて、バインディング分子 2 2 より早く配向を変化させる。つまり、バインディング分子 2 2 より早くその配向が完了することで、1 分子あたりの発光量が増加するタイミングがバインディング分子 2 2 より早い。生体分子検出装置 1 0 0 は、配向制御光 1 1 7 の振動方向の切り替えに伴ってフリー分子 2 0 とバインディング分子 2 2 との発光量が切り替わるタイミングが異なることを利用して、総発光量に対するフリー分子 2 0 の寄与分とバインディング分子 2 2 の寄与分との分離を行う。

[0076] 続いて図 9 を用いて受光部 1 2 4 の詳細な構成について説明する。図 9 は、受光部 1 2 4 の詳細な構成を表した模式図である。受光部 1 2 4 は、レンズ 1 4 2、フィルタ 1 4 4、偏光子 1 4 6、レンズ 1 4 8 および P D（フォトダイオード）1 5 0 を含む。

[0077] 受光部 124 は、試薬カップ 108 の底面側から蛍光を受光する。試薬カップ 108 内のフリー分子 20 またはバインディング分子 22 から発生して受光部 124 の紙面左側部分に入射する蛍光 147 および受光部 124 の紙面右側部分に入射する蛍光 149 は、レンズ 142 によって集光および平行化され、フィルタ 144 を通って偏光子 146 へ入射する。なお、図示しないが蛍光 147 と蛍光 149 との間にも蛍光が存在し、それらの挙動は当業者であれば予測可能であるので説明を省略する。

[0078] フィルタ 144 は、蛍光分子 14 から発生する蛍光以外の光をカットするバンドパスフィルタであり、励起光等の蛍光以外の光が PD 150 へ入射することを防いでいる。

[0079] 偏光子 146 は、励起光 119 の振動方向と同じ方向に偏光した光のみを透過させる。

配向が完了した蛍光分子、すなわちブラウン運動などの運動をしていない蛍光分子 14 を直線偏光した励起光 119 で励起すると、蛍光分子 14 から発生する蛍光も励起光の振動方向と同じ方向に直線偏光した光となる。そのため、配向が完了したフリー分子 20 またはバインディング分子 22 から発生した蛍光は、偏光子 146 を透過することができる。

試薬カップ 108 内で散乱された励起光 119 や、配向方向を切り替えている途中のフリー分子 20 またはバインディング分子 22 に付随する蛍光分子 14 から発生した蛍光は、振動方向が元々の励起光 119 の振動方向と異なっているため偏光子 146 を透過できない。このように、偏光子 146 は、配向が完了したフリー分子 20 およびバインディング分子 22 に付随する蛍光分子 14 から発生する蛍光のみを透過させる。

[0080] PD 150 は、レンズ 148 によって集光された蛍光を受光し、受光した蛍光の強度に応じた電荷を発生させて増幅部 126 へ出力する。このようにして受光部 124 は、配向が完了した蛍光分子 14 から発生した蛍光を電荷に変換する。

[0081] 続いて生体分子検出装置 100 の測定時における動作について説明する。

図 10 は、検体の準備から廃棄までの流れを模式的に表した図である。

[0082] 測定の準備にあたり、まず患者から 50 μ L 採集した全血 156 を遠心分離し、血漿 16 を分離する。分離して取り出した血漿 16 を、生体分子検出装置 100 の検体セット部 152 にセットする。ここまでの作業はユーザーが行う。

[0083] 生体分子検出装置 100 は、検体セット部 152 にセットされた血漿 16 を、試薬カップストック部 160 にストックしてある未使用の試薬カップ 108 の中に分注する。続いて、生体分子検出装置 100 は、試薬タンク 112 の中にあるフリー分子 20 をピペット 158 で吸い上げ、試薬カップ 108 の中に分注する。試薬カップ 108 内に血漿 16 およびフリー分子 20 を注入後、生体分子検出装置 100 は、試薬カップ 108 を 37℃ で温調しながら、内蔵したボルテックスミキサーによって振動させて抗原抗体反応を起こさせる。その後、生体分子検出装置 100 は、励起光の照射および蛍光の検出を行い、蛍光の検出終了後に試薬カップ 108 を内蔵のごみ箱 154 へ廃棄する。

[0084] 測定の際に FG 122 が出力する配向制御信号、サンプリングクロック発生部 130 が出力するサンプリングクロック、PD 150 が出力する PD 出力および A/D 変換部 128 が出力する A/D 変換部出力について、図 11 を用いて説明する。図 11 は、縦軸がそれぞれ生体分子検出装置 100 における配向制御信号の電圧、サンプリングクロックの電圧、PD 出力および A/D 変換部出力を表し、横軸が時間 t を表したグラフである。なお、ここでは説明を容易にするため、PD 出力および A/D 変換部出力については、グラフを模式的に示してある。

[0085] FG 122 から出力される配向制御信号は、測定前は 0 V となっている。測定前においては、配向制御光 117 を溶液中に照射してフリー分子 20 およびバイnding 分子 22 を配向させておく。配向制御信号が 0 V の場合、サンプリングクロックも 0 V となりサンプリングは行われない。サンプリングクロックが入力されないため、A/D 変換部出力も 0 となる。配向制御

信号が0 Vの場合、励起光を試薬カップ108に向けて照射すると、PD出力は、初めフリー分子20およびバインディング分子22が有する配向用標識8の両端面に結合した蛍光分子14が発光したことによる出力と装置に起因するノイズとを加算した i_z の値となる。

[0086] 続いて、生体分子検出装置100は、配向制御信号を5 Vにする。配向制御信号を5 Vとすると、サンプリングクロック発生部130は、サンプリングタイミングを表すサンプリングクロックとして5 Vの信号を定期的に出力する。そして、A/D変換部128はサンプリングクロックの5 Vの信号を受信したタイミングでアナログ蛍光データのサンプリングをしてA/D変換を行う。

[0087] また、配向制御信号を5 Vとすると、偏光方向制御部120が配向制御光117の振動方向を90度切り替える。配向制御光117の振動方向の切り替えに伴い、試薬カップ108内のフリー分子20およびバインディング分子22の配向方向が90度切り替わる。

この場合、バインディング分子22に比べて体積および質量の小さいフリー分子20の方が配向方向の切り替えが速い。配向が切り替わる途中のフリー分子20およびバインディング分子22に付随する蛍光分子14から発生した蛍光は、大半が偏光していないため偏光子146によって遮断される。

[0088] 配向が完了したフリー分子20は、配向が切り替わる前に比べて多くの蛍光を発する。

配向が完了したフリー分子20に付随する蛍光分子から発生した蛍光は、励起光と同じ方向に偏光しているため、偏光子146によって遮断されずPD150に到達する。配向が完了したフリー分子20が増加することに伴い、PD出力も i_z から増加していく。時刻T1で全てのフリー分子20の配向が完了すると、PD出力は値 i_f で一旦飽和する。

[0089] その後、時刻T2でバインディング分子22の配向が完了し始めることに伴い、PD出力は再び増加していく。配向が切り替わる途中のバインディング分子22に付随する蛍光分子14から発生した蛍光は、大半が偏光してい

ないため偏光子 1 4 6 によって遮断される。時刻 T 3 で全てのバインディング分子 2 2 の配向が完了すると、PD 出力は値 i_t で飽和する。

[0090] A/D変換部出力は、PD出力と同様に初め D_z の値を出力し、徐々に増加して値 D_f で一旦飽和する。PD出力が i_f から増加することに伴い、A/D変換部出力も徐々に増加して D_t で飽和する。このように、配向制御信号を 0 V としておき、その後配向制御信号を 5 V とすれば、フリー分子 2 0 に付随する蛍光分子から発生した蛍光による寄与分と、バインディング分子 2 2 に付随する蛍光分子から発生した蛍光による寄与分とが時間差を伴って A/D変換部出力に表れる。

[0091] 配向制御信号は、5 V の出力が T 秒間続いた後 0 V となる。この T 秒は、少なくとも PD 出力が i_t で 2 度目の飽和をする以上の期間を取る。配向制御信号が 5 V から 0 V に切り替わることに伴い、サンプリングクロックは 0 V となる。配向制御信号が 5 V から 0 V に切り替わると、PD 出力は、しばらく i_t の値を出力した後 i_z の値まで減少する。PD 出力が i_z となる理由は、配向制御信号が 0 V に切り替わったことに伴い、励起光 1 1 9 の振動方向とフリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 が有する配向用標識 8 の長手方向とが平行となり、フリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 の 1 分子あたりの発光量が減少するためである。PD 出力がしばらく i_t の値を出力する理由は、フリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 の配向方向の切り替えが、配向制御信号の切り替えに対して少し遅れるためである。

[0092] ここで、配向制御信号を 0 V とする期間は、配向制御信号を 5 V としていた期間と同じ T 秒とした。これは、配向制御光 1 1 7 の出力が一定という条件下では、溶液中のフリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 の配向が完了するまでに要する時間は、配向制御信号を 0 V から 5 V にした場合と配向制御信号を 5 V から 0 V にした場合とで、ほぼ同じだからである。配向制御信号が 0 V から 5 V に変わって時間 T だけ経過し、配向制御信号が 0 V に戻って時間 T だけ経過するまでが、生体分子検出装置 1 0 0 における測定の

1 周期である。すなわち、生体分子検出装置 1 0 0 における 1 周期の測定時間は 2 T である。

[0093] 図 1 2 は、生体分子検出装置 1 0 0 における配向制御信号を複数周期に亘って示したグラフである。生体分子検出装置 1 0 0 は、図 1 2 に示すように、配向制御信号を所定の間隔で切り替えて上記 1 周期の測定を複数回行い、得られた複数の D_t 、 D_f および D_z の値についてそれぞれ加算平均を行って、 D_t 、 D_f および D_z の値の平均値を求める。本実施の形態では、上記 1 周期の測定を 1 0 回行い、 D_t 、 D_f および D_z の値の平均値を求める。これにより、様々な要因により発生する測定結果のばらつきを平均化している。

[0094] CPU 1 3 2 は、得られた D_t 、 D_f 、 D_z の平均値から、バインディング分子 2 2 の濃度を算出する。具体的には、初めに測定値 S を、次式 (1) によって求める。

$$S = (D_t - D_f) / (D_t - D_z) \cdots (1)$$

[0095] 式 (1) において、 $(D_t - D_f)$ は、バインディング分子 2 2 が配向方向を切り替えたことに伴い増加した蛍光の強度を表している。 $(D_t - D_z)$ は、得られたデータの最大値から当初のデータを減ずることで、フリー分子 2 0 およびバインディング分子 2 2 が配向方向を切り替えたことに伴い増加した蛍光の強度を表している。 $(D_t - D_f)$ を $(D_t - D_z)$ で除算することで、光学系変動等の測定結果の再現性を悪化させる要因をキャンセルしている。

[0096] CPU 1 3 2 は、ここで求めた測定値 S から、診断値 C (検出対象物質の濃度) を求める。診断値 C は、次式によって求める。

$$C = f(S) \cdots (2)$$

[0097] ここで、 $f(S)$ は、検量線関数である。生体分子検出装置 1 0 0 は、あらかじめ測定項目ごとに異なる検量線関数を持っておき、測定値 S を診断値 C に変換する。CPU 1 3 2 は、得られた診断値 C を表示部 1 0 2 へ出力する。

[0098] 以上説明したように、本発明の実施の形態 1 に係る生体分子検出装置 100 によれば、配向制御光 117 の振動方向の切り替えにより、溶液中のフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向方向を切り替えることが可能な構成とした。配向制御光 117 により切り替えるフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向の状態としては、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 が有する配向用標識 8 の長手方向が励起光 119 の振動方向に対して平行になる状態及び垂直になる状態の 2 つの状態がある。すなわち生体分子検出装置 100 は、配向制御光 117 の振動方向の切り替えにより、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 の 1 分子あたりの発光量を切り替える。また、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 に関して、配向制御光 117 の照射方向の切り替え後これらの分子の配向がそれぞれ完了するまでに要する時間に差が生じるため、それぞれの分子の発光量が増加するタイミングが互いに異なる。従って生体分子検出装置 100 は、溶液中の全ての蛍光分子から蛍光が発生しても、フリー分子およびバインディング分子それぞれに付随する蛍光の寄与分を算出することができ、簡便な構成で検出対象物質の濃度を正確に測定することができる。

[0099] また、以上の構成において、生体分子検出装置 100 は、配向制御光 117 による外力によって、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向を全て同じ方向に切り替えるため、ブラウン運動というランダムな運動を利用して測定する場合に比べて、高感度な測定をすることができる。

[0100] また、フリー分子 20 およびバインディング分子 22 に配向用標識 8 を設けたため、配向制御光 117 により配向を変化させることができないほど抗体 12 の分子量が小さい場合においても、配向制御光 117 によりフリー分子 20 およびバインディング分子 22 の配向を切り替えることができ、高感度な測定を行うことができる。また、抗原の分子量が十分に大きい場合においても、配向用標識 8 を用いることで S/N を向上させることができる。

[0101] なお、本実施の形態では、抗原抗体反応を利用する場合を例にとって説明したが、検出対象物質と検出対象物質に特異的に結合する物質との組み合わせ

せは、ここで説明した場合に限られない。例えば本願発明は、抗原を用いて抗体を検出する場合や、特定の核酸を用いて当該核酸とハイブリダイゼーションをする核酸を検出する場合、核酸を用いて核酸結合性たんぱく質を結合する場合、リガンドを用いてレセプターを検出する場合、糖を用いてレクチンを検出する場合、プロテアーゼ検出を利用する場合、高次構造変化を用いる場合等にも適用することができる。

[0102] また、本実施の形態では、測定結果から検出対象物質の濃度の算出までの説明を容易にするため、測定結果のグラフを模式的な図とした場合における検出対象物質の算出の説明を行ったが、必ずしもこのように算出する必要はない。例えば、グラフ中の変曲点に基づいて、フリー分子による蛍光とバインディング分子による蛍光との境目の点を決めて算出を行っても良い。

[0103] また、配向制御信号を5 Vまたは0 Vとする期間は、フリー分子およびバインディング分子の体積や、溶媒の粘度、溶液の温度等に基づいて変化させることが望ましい。フリー分子およびバインディング分子に対する配向制御光の振動方向が切り替わった時からこれらの分子の配向が完了するまでに要する時間は、フリー分子およびバインディング分子の体積や、溶媒の粘度、溶液の温度等によって決まる溶液中におけるフリー分子およびバインディング分子の回転しやすさによって決まる。フリー分子およびバインディング分子が溶液中で回転しにくい場合には、フリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間が長くなるため、配向制御信号を5 Vまたは0 Vとする期間を、配向が完了する程度まで長くすることが望ましい。

[0104] また、本実施の形態では、配向制御光117として波長1.3 μm 、出力700 mWのレーザーを用いたが、配向制御光117として用いるレーザーはこれに限られない。レーザーの波長および出力は、フリー分子およびバインディング分子の体積、質量等起因する溶液中での回転しやすさに基づいて決定することが望ましく、特に、フリー分子とバインディング分子との間に、それぞれの配向の完了までに要する時間に差が表れる程度の出力のレーザーを用いることが望ましい。

[0105] また、本実施の形態では、励起光 119 として波長 532 nm、出力 10 mW の光を用いたが、励起光 119 として用いる光はこれに限られない。

[0106] なお、本実施の形態では、繰り返し測定を行って測定結果の加算平均を求めたが、加算平均は必ずしも行う必要はなく、ユーザーが何を重視するかによって決定すれば良い。例えば、ユーザーが素早く測定を行いたい場合には、測定を 1 周期のみ行って結果を表示しても良いし、ユーザーがより高精度な測定を行いたい場合には、1 周期の測定を何度も繰り返すことによって測定精度を向上させることもできる。

[0107] (実施の形態 2)

図 13A および 13B は、本発明の実施の形態 2 に係る生体分子検出装置の抗原抗体反応の概要を示した模式図である。実施の形態 2 では、2 種類の抗体を使用し、均一溶液中で 2 種類の抗原を検出する。試薬カップ 30 の中に、抗体 32 および抗体 34 が入れられている場合を考える。抗体 32 は、配向用標識 36 および蛍光分子 40 と結合してフリー分子を形成している（以下、フリー分子 A という）。抗体 34 は、配向用標識 38 および蛍光分子 42 と結合してフリー分子を形成している（以下、フリー分子 B という）。

[0108] 試薬カップ 30 の中に検体 48 を入れて攪拌すると、抗体 32 と特異的に結合する抗原 44 が検体 48 中に存在する場合には、フリー分子 A と抗原 44 との間で抗原抗体反応が起こり、抗体 32 および抗原 44 が特異的に結合する。同様に抗体 34 と特異的に結合する抗原 46 が検体 48 中に存在する場合には、フリー分子 B と抗原 46 との間で抗原抗体反応が起こり、抗体 34 および抗原 46 が特異的に結合する。実施の形態 1 で説明した場合と同様に、一部の抗体は、抗原抗体反応をしないまま溶液中に存在する。以下、抗原抗体反応をしたフリー分子 A および抗原 44 をバインディング分子 A、抗原抗体反応をしたフリー分子 B および抗原 46 をバインディング分子 B と呼ぶ。本実施の形態では、検出対象物質である抗原 44 は PSA、抗原 46 は SCC (Squamous Cell Carcinoma) 抗原とする。また、抗体 32 として PSA と特異的に結合する抗 PSA 抗体を用い、抗体

34としてSCC抗原と特異的に結合するSCC抗体を用いる。蛍光分子40として、Alexa Fluor 568 (Molecular Probes社の商品名)を用い、蛍光分子42として、Alexa Fluor 555 (Molecular Probes社の商品名)を用いた。Alexa Fluor 555は、540-700nm程度の波長を持った蛍光を発し、570nm程度の波長の蛍光を最も強く発する。

[0109] 本発明の実施の形態2に係る生体分子検出装置は、2種類のフリー分子および2種類のバインディング分子が混在する溶液に励起光を照射し、目的のバインディング分子の検出または定量を行う。

[0110] 図14は、本発明の実施の形態2に係る生体分子検出装置200の主要な構成を示すブロック図である。なお、実施の形態1で示した生体分子検出装置100と同一の構成要素には同一の符号を付し、その説明を省略する。

[0111] 生体分子検出装置200は、実施の形態1で示した生体分子検出装置100の構成に対して、受光部202、分注部204、試薬タンク206およびCPU208が主に異なる。

[0112] 分注部204は、複数の抗体がそれぞれ別の容器に入った試薬タンク206から2種類の抗体を吸い上げ、試薬カップ108内へ分注する。

[0113] 受光部202は、試薬カップ108内の蛍光分子から発生した蛍光を検出するが、CPU208からの命令(S1)を受けて、蛍光分子40および蛍光分子42の蛍光を互いに分離して受光できるように構成されている。

[0114] CPU208は、A/D変換部128から出力されたデジタルデータの演算を行い、その結果を表示部102へ出力する。また、CPU208は、ユーザー入力部104から入力を受けて、配向制御用光源部116、励起光源部118、分注部204、FG122および受光部202の動作の指示命令を行う。具体的には、CPU208は、配向制御用光源部116および励起光源部118に対してはそのON/OFF命令を行い、分注部204に対しては使用する試薬を指定する命令および分注動作開始命令を行い、FG122に対しては出力する電圧信号の波形の指示命令および出力命令を行い、受

光部 202 に対してはフィルタの切り替え命令を行う。

[0115] 受光部 202 の構成について、図 15 を用いて具体的に説明する。図 15 は、実施の形態 2 に係る生体分子検出装置 200 における受光部 202 の詳細な構成を表した模式図である。受光部 202 内のフィルタ切替部 210 は、フィルタ 212 およびフィルタ 214 の 2 種類のフィルタを備えている。2 種類のフィルタは、可動式となっており、レンズ 142 によって集光された光が通るフィルタを切り替えることができる。フィルタ切替部 210 は、CPU 208 からの命令を受けて、使用するフィルタを切り替える。例えば、Alexa Fluor 568 から発生する蛍光を検出する場合は、フィルタ 212 を使用し、Alexa Fluor 555 から発生する蛍光を検出する場合はフィルタ 214 を使用する。これにより、不要な蛍光がフォトダイオード 150 に到達することを防いでいる。本実施の形態では、フィルタ 212 として SpRed-A フィルタ (Semrock 社の商品名) セットの受光側フィルタを用いる。SpRed-A フィルタセットの受光側フィルタは、605 nm-650 nm 程度の波長の光を透過するバンドパスフィルタである。フィルタ 214 として SpOr-A フィルタ (Semrock 社の商品名) セットの受光側フィルタを用いる。SpOr-A フィルタセットの受光側フィルタは、575-600 nm 程度の波長の光を透過させるバンドパスフィルタである。なお、本実施の形態では 2 種類のフィルタにより光を分光して不要な蛍光等がフォトダイオード 150 に到達することを防いだが、必ずしもフィルタを用いて光を分光する必要はない。例えば、回折格子やプリズムを用いて光を分光して、特定の波長を有する光のみを受光してもよい。

[0116] 続いて生体分子検出装置 200 の測定動作について説明する。生体分子検出装置 200 の測定動作は基本的には、実施の形態 1 で説明した生体分子検出装置 100 の測定動作と同じであるが、細かな点で異なる。フリー分子とバインディング分子を分離して検出できる理由については実施の形態 1 で説明したため、ここでは 2 種類のバインディング分子を分離して検出する方法

を説明する。

[0117] 生体分子検出装置200は、初めに2種類のバインディング分子のどちらを先に検出するか決定する。これは、ユーザーが、ユーザー入力部104を通して入力する等して任意に決定することができる。ここでは、Alexa Fluor 568を蛍光分子として持つバインディング分子Aから先に測定を行う。CPU208は、受光部202内のフィルタ切替部210に、フィルタ212の使用を指示する命令を出す。フィルタ切替部210は、CPU208からの命令を受け、レンズ142で集光された光が通る位置にフィルタ212を移動させる。配向制御信号が5Vに変わり、試薬カップ108に向けて励起光が照射されると、溶液内の蛍光分子40および蛍光分子42のそれぞれから蛍光が発生する。蛍光分子40および蛍光分子42のそれぞれから発生した蛍光は、レンズ142によって集光され、フィルタ212へ入射する。フィルタ212は605nm-650nm程度の波長の光のみを通すため、蛍光分子40から発生した蛍光は当該フィルタを透過し、蛍光分子42から発生した蛍光は当該フィルタによりほぼ全て遮断される。このようにして、蛍光分子40から発生した蛍光のみを検出することができる。

[0118] 実施の形態1と同様に、生体分子検出装置200によって1周期の測定を行い、蛍光分子40から発生した蛍光の検出を行った結果のA/D変換部出力を、図16Aに示す。なお、ここでは説明を容易にするためグラフを模式的に示してある。

[0119] A/D変換部出力は、測定開始段階ではフリー分子Aおよびバインディング分子Aが有する配向用標識8の両端面に結合した蛍光分子40から発生した蛍光による出力および装置ノイズに起因する出力が加算された出力値D1zであり、徐々に増加して時刻T11で値D1fとなって一旦飽和する。続いてA/D変換部出力は、時刻T12で再び増加し、時刻T13で値D1tとなって再び飽和する。

[0120] 生体分子検出装置200は、配向制御信号を所定の間隔で切り替えて上記1周期の測定を複数回行い、得られた複数のD1t、D1fおよびD1zの

値についてそれぞれ加算平均を行って、 $D1t$ 、 $D1f$ および $D1z$ の値の平均値を求める。

[0121] 続いて、CPU208は、得られた $D1t$ 、 $D1f$ 、 $D1z$ の平均値から、バインディング分子Aの濃度を算出する。具体的には、実施の形態1で測定値Sを求めた場合と同じ演算を行い、測定値S1を求める。そして、検量線関数 $f1(S)$ を用いて、測定値S1から濃度C1に変換する。CPU208は、得られた濃度C1を表示部102へ出力する。

[0122] 次に、生体分子検出装置200は、バインディング分子Bの測定を行う。CPU208は、受光部202内のフィルタ切替部210に、フィルタ214の使用を指示する命令を出す。フィルタ切替部210は、CPU208からの命令を受け、レンズ142で集光された光が通る位置にフィルタ214を移動させる。フィルタ214は575nm-600nm程度の波長の光のみを通すため、蛍光分子40から発生した蛍光は当該フィルタにより遮断され、蛍光分子42から発生した蛍光は当該フィルタを透過する。このようにして、蛍光分子42から発生した蛍光のみを検出することができる。

[0123] 生体分子検出装置200によって1周期の測定を行い、蛍光分子42から発生した蛍光の検出を行った結果のA/D変換部出力を、図16Bに示す。なお、図16Bにおいては、説明を容易にするためグラフを模式的に示してある。

[0124] A/D変換部出力は、測定開始段階ではフリー分子Bおよびバインディング分子Bが有する配向用標識8の両端面に結合した蛍光分子42から発生した蛍光による出力および装置ノイズに起因する出力が加算された出力値 $D2z$ であり、徐々に増加して時刻T21で値 $D2f$ となって一旦飽和する。続いてA/D変換部出力は、時刻T22で再び増加し、時刻T23で値 $D2t$ となって再び飽和する。

[0125] 生体分子検出装置200は、配向制御信号を所定の間隔で切り替えて上記1周期の測定を複数回行い、得られた複数の $D2t$ 、 $D2f$ および $D2z$ の値についてそれぞれ加算平均を行って、 $D2t$ 、 $D2f$ および $D2z$ の値の

平均値を求める。

[0126] バインディング分子Bを測定する場合の配向制御信号の切り替えタイミングは、バインディング分子Aを測定する場合のものと異なる。これは、バインディング分子A、フリー分子A、バインディング分子Bおよびフリー分子Bそれぞれの体積および質量が異なるため、それぞれの分子の配向が完了するまでに要する時間が互いに異なるためである。

[0127] 図16Aおよび16Bに示したように、バインディング分子Aを測定する場合と、バインディング分子Bを測定する場合とでは、PD出力が増加したり飽和したりするタイミングは異なる。これは、バインディング分子Aとバインディング分子Bとの、体積の違いによる溶液中での運動しやすさに起因する。

[0128] 続いて、CPU208は、得られたD2t、D2f、D2zの平均値から、バインディング分子Bの濃度を算出する。具体的には、実施の形態1で測定値Sを求めた場合と同じ演算を行い、測定値S2を求める。そして、検量線関数f2(S)を用いて、測定値S2から濃度C2に変換する。CPU208は、得られた濃度C2を、表示部102へ出力する。

[0129] 以上説明したように、本発明の実施の形態2に係る生体分子検出装置200によれば、実施の形態1で説明した生体分子検出装置100の構成に加え、検出対象物質と特異的に結合する物質として2種類の抗体および蛍光分子を用い、フィルタ切替部210を2種類のフィルタの切り替えが可能な構成とした。そのため、検出対象物質を含むバインディング分子に付随した蛍光分子に対応したフィルタを使用することで、検出対象物質を含むバインディング分子に付随した蛍光分子から発生する蛍光のみを検出することができる。すなわち、一の検体に含まれる複数の検出対象物質のそれぞれの濃度を正確に測定することができる。

[0130] また、一の検体から同時に複数の検出対象物質を測定できることは、診断の精度を上げる上で重要である。

[0131] なお、本実施の形態では、蛍光分子をAlexa Fluor 568およ

びAlexa Fluor 555としたが、蛍光分子はこれに限られない。複数の検出対象物質のそれぞれとそれぞれ特異的に結合する複数の物質を、フィルタで分離できる程度に互いの蛍光波長が離れている複数の蛍光分子でそれぞれ標識すれば良い。

[0132] なお、本実施の形態では、抗原抗体反応を利用する場合を例にとって説明したが、検出対象物質と検出対象物質に特異的に結合する物質との組み合わせは、これに限られない。

例えば本願発明は、抗原を用いて抗体を検出する場合や、特定の核酸と当該核酸とハイブリダイゼーションをする核酸、核酸と核酸結合性たんぱく質、リガンドとレセプター、糖とレクチン、プロテアーゼ検出、高次構造変化等にも適用することができる。

[0133] また、本実施の形態では検出対象物質が2種類の場合について説明したが、検出対象物質の種類は、それより多くても良い。その場合においても、複数の検出対象物質のそれぞれとそれぞれ特異的に結合する複数の物質を用い、それぞれ異なった複数の蛍光分子で標識し、それぞれの蛍光分子から発生する蛍光を、それぞれの蛍光に対応したフィルタで分離して検出することで、それぞれの検出対象物質を互いに分離して検出することができる。

[0134] なお、検出対象物質の種類が増えるほど蛍光分子の種類も増え、複数の蛍光分子から発生する複数の蛍光が混在することになるため、フィルタのみで蛍光を分離することが困難となる場合がある。その場合は、励起光の種類を増やすことで蛍光の分離を容易にすることができる。蛍光分子の吸光度は励起光の波長に依存し、蛍光分子の種類ごとに吸収しやすい波長帯がある。そのため、励起光の波長を変えることで、一部の蛍光分子のみが蛍光を発生するようになり、フィルタでの蛍光の分離が容易となる。また、より狭い通過帯域を持つバンドパスフィルタを用いることで、目的の蛍光分子から発生する蛍光を検出しやすくすることができる。

[0135] (実施の形態1および実施の形態2の設計変更)

なお、以上説明した本発明に係る各実施の形態は、本発明の一例を示すも

のであり、本発明の構成を限定するものではない。本発明に係る生体分子検出装置は、上記各実施の形態に限定されず、本発明の目的を逸脱しない範囲で種々変更して実施することが可能である。

[0136] 例えば、溶液中の分子の配向を切り替える方法は、レーザーによるものに限られず、フリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間に差が生じる程度の外力を加えるものであれば、磁気的な方法や電気的な方法としても良い。

[0137] また、本発明に係る各実施の形態では、互いに直交する2つの方向、つまり直線偏光した励起光の振動方向と平行となる方向、および、直線偏光した励起光の振動方向と垂直となる方向の間で、配向制御光の振動方向を切り替えたが、必ずしも互いに直交する2つの方向の間で切り替える必要はない。フリー分子およびバインディング分子は、配向する方向が異なればそれぞれが有する蛍光分子の励起効率が異なるため、フリー分子またはバインディング分子の1分子あたりの発光量が異なる。従って、フリー分子およびバインディング分子の配向方向を直交する2つの方向としなくとも、フリー分子およびバインディング分子を分離して算出することができる。配向制御光を振動させる2つの方向が直交していれば、フリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間の差が最大となって最もS/Nが良くなる。一方で、例えば配向制御光のそれぞれの振動方向の成す角度が60度であれば、直交する2つの方向に配向制御光の振動方向を切り替える場合と比べ、フリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間が短くなり、測定に要する時間も短くなる。このように配向制御光が振動する2つの方向の成す角度が90度より小さいほど、フリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間が短くなり測定時間も短くなる。

[0138] また、溶液中に検出対象物質が存在するか否か、すなわちバインディング分子が存在するかないかを定性的に測定したい場合は、フリー分子およびバインディング分子の間で配向が完了するまでに要する時間に差が生じ

る程度だけ角度を変えた2つの方向で配向制御光の振動方向を切り替えれば良い。フリー分子およびバインディング分子の間で、配向が完了するまでに要する時間に差が生じれば、その差は蛍光データに表れるため、バインディング分子の存在を確認できる。

[0139] また、本発明に係る各実施の形態では、配向制御光の振動方向の切り替えに $\lambda/2$ 波長板を用いたが、必ずしも $\lambda/2$ 波長板を使用する必要はない。例えばミラー等を使ってレーザーの振動方向を変える構成や、配向制御用光源部116を2つ設けてそれぞれ異なる方向に振動した配向制御光を照射する構成等が考えられる。

[0140] また、本発明に係る各実施の形態では、生体分子検出装置内に試薬カップを1つ設ける場合を説明したが、必ずしも試薬カップは1つである必要はなく、装置内に複数の試薬カップを設けて複数の検体をセットできる構成としても良い。その場合は、装置が試薬カップを順に測定位置に移動させて測定を行う構成とすれば、自動で複数の検体を測定することができる。

[0141] なお、本発明に係る各実施の形態では、蛍光分子および配向用標識と結合した抗体を用いた例を説明したが、必ずしも蛍光分子および配向用標識により標識済みの抗体を用いる必要はない。例えば、抗体および抗原の結合と、抗体、配向用標識および蛍光分子の結合とを同時に試薬カップ内で行っても良い。この場合、ユーザーは、抗体、配向用標識および蛍光分子をそれぞれ別の試薬タンクに用意しておく。測定時には、生体分子検出装置が、抗体、蛍光分子、配向用標識および検体をそれぞれ試薬カップへ分注して反応させる。

[0142] また、配向制御用光源部116や励起光源部118は、着脱可能な構成として、検出対象物質および蛍光分子等に応じて適切なものに交換できるような構成としても良い。

[0143] また、フリー分子およびバインディング分子の配向方向を所定の時間間隔で切り替え、得られた複数の蛍光データの加算平均を行って、上記検出対象物質の検出または定量を行うと、1周期の測定毎のノイズの影響を減少させ

ることができ、より高精度な測定が可能となる。

[0144] フリー分子およびバインディング分子の配向方向を切り替える所定の時間間隔は、検出対象物質、検出対象物質と特異的に結合する物質、配向用標識および蛍光分子の質量または体積と、配向制御手段による配向制御のための外力の強度とに基づいて、全てのフリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間を求め、その時間を所定の時間間隔とすることが望ましい。この場合、全ての分子の配向が完了した後も同一方向にレーザーを照射することがなくなり、消費電力を削減することができる。また、不要な時まで測定を続けることがなくなり、測定時間を短くすることができる。

[0145] 全てのフリー分子およびバインディング分子の配向が完了するまでに要する時間は、PD出力やA/D変換部出力に基づいて求めてもよい。例えば、測定を何周期か繰り返せば、それぞれの出力が飽和するまでにどのくらいの時間を要するかおよそ分かるため、それぞれの出力が飽和するまでに要する時間を加算平均等して、算出した時間を所定の時間間隔として決めれば良い。

[0146] レーザーによる分子の配向制御を行う場合には、磁力等によって分子の配向を制御する場合に比べ複雑な機構が必要ない。例えば、磁力を用いて分子の配向を制御するためには、それぞれの分子が磁性を持ったものであるか、磁性を持った分子を用意して配向を制御したい分子に結合させる必要があり、測定にあたって準備が煩雑となる。

[0147] なお、本発明に係る各実施の形態では、配向用標識としてコラーゲンを例にとって説明したが、配向用標識は必ずしもコラーゲンでなくても良い。配向用標識は、抗体および蛍光分子を自身の周囲に結合させることができ、溶液中で光により配向する棒状の物質であれば良く、例えば、アクチンフィラメント、金属ナノロッド（金、銀、銅、酸化鉄等）、プラスチック等を用いることができる。

[0148] また、配向用標識の長手方向の長さは必ずしも300nmでなくても良く

、周囲に複数の蛍光分子を結合させることができればどのような長さでも良い。

[0149] なお、本発明に係る各実施の形態では、説明を容易にするため配向用標識に1つの抗体が結合している場合を例にとって説明したが、配向用標識に結合させる抗体は必ずしも1つである必要はない。

[0150] なお、本発明に係る各実施の形態では、検体として全血を用いる場合を例にとって説明したが、検体は全血に限られず、検出対象物質が溶液中に分散していれば尿や髄液等の体液を検体とすることもできる。

[0151] また、本発明に係る各実施の形態では、固相ではなく抗原、抗体および蛍光分子が液体中に分散している液相で測定ができるため、抗原等を反応層に固定して測定を行う固相での測定に比べ、前処理が簡単であるという利点がある。また、抗原、フリー分子共に溶液中を自由に動き回れるため、固相に比べて反応が早いという利点がある。

[0152] また、本発明に係る各実施の形態は、従来の蛍光偏光法のようにブラウン運動の変化による蛍光の偏光度の変化を調べるものではないため、検体の成分が蛍光分子の蛍光寿命に影響を与えたとしても測定に与える影響は少ない。

[0153] また、本発明に係る各実施の形態では、配向制御用光源部は必ずしも1つの照射方向に対して1つである必要はなく、複数の配向制御用光源部を設けて、同一方向に複数の配向制御光を照射しても良い。

[0154] また、本発明に係る各実施の形態では、一方向に直線偏光した励起光119を溶液に照射する場合、すなわち偏光面が単一の励起光119を溶液に照射する場合を例にとって説明したが、励起光119は必ずしも単一の偏光面を有する直線偏光した光である必要はない。実施の形態1および実施の形態2の効果と同様の効果を奏するためには、励起光119が特定方向の直線偏光成分を少なくとも1つ有していれば良い。ここで、特定方向の直線偏光成分を有する光とは、蛍光分子の配向方向の変化により、蛍光分子の遷移モーメントと励起光の当該直線偏光成分の振動方向との関係が変化して、当該直

線偏光成分による蛍光分子の励起効率に変化が生じる光である。例えば、ランダム偏光した励起光を照射し、受光部の前に検光子を設けて、蛍光分子から発生した蛍光から特定方向の直線偏光成分のみを受光するように構成しても良い。ここでランダム偏光とは、光の振動方向がランダムであり、様々な方向に振動する直線偏光成分が存在することをいう。

[0155] 図17Aは、振動方向222に直線偏光した配向制御光117が照射された際のバインディング分子22の配向方向とランダム偏光した励起光230の振動方向とを表した概念図であり、図17Bは振動方向224に直線偏光した配向制御光117が照射された際のバインディング分子22の配向方向とランダム偏光した励起光230の振動方向とを表した概念図である。なお、図17Aは配向制御信号が0Vの場合の状態を示す図であり、図17Bは配向制御信号が5Vの場合の状態を示す図である。励起光230の振動方向232a～232dは、励起光230の進行方向に対して垂直な平面内における光の振動方向を表す。図17Aおよび図17Bでは、振動方向232a～232dによって励起光230の振動方向が様々な方向であることを表しているが、実際は、図示した成分だけでなく、あらゆる角度方向のより多くの成分が含まれている。一般に、溶液中で静止した蛍光分子を直線偏光した励起光で励起すると、蛍光分子は、励起光の偏光方向と同一の方向に偏光した蛍光を発生することが知られている。ランダム偏光した励起光230によって励起されると、バインディング分子22に付随する蛍光分子14からもランダム偏光した蛍光234が発生する。

[0156] 検光子236は、蛍光分子14から発生したランダム偏光した蛍光234のうち特定の方向に振動する成分を透過させ、それ以外の方向に振動する成分を遮断する。換言すれば、検光子236を透過した光は特定の方向にのみ振動する光となる。検光子236を透過可能な特定の方向に振動する蛍光234の成分とは、励起光230のうち振動方向232aに直線偏光した励起光成分によって励起されて発生した成分である。したがって、検光子236を透過した蛍光234の振動方向は、図17AおよびBにおいて振動方向2

3 2 aのみとなる。これにより、蛍光分子 1 4 から発生した蛍光 2 3 4のうち、励起光 2 3 0のうち振動方向 2 3 2 aに直線偏光した励起光成分によって励起された成分のみをフォトダイオード 2 3 8に到達させることができる。このような構成にすることで、励起光 2 3 0としてランダム偏光した光を用いても、特定の方向に振動する光に対して実施の形態 1と同様の測定を行うことができる。なお、検光子 2 3 6が透過させる特定の方向に振動する蛍光 2 3 4の成分とは、必ずしもここで示した方向に振動する成分に限られず、蛍光分子 1 4の配向方向の変化に伴い蛍光分子 1 4に対する励起効率に差が生じる成分であれば何でも良い。

[0157] また、図 1 7 Aおよび図 1 7 Bでは励起光 2 3 0がいずれの方向に振動する場合においても振幅が一定である例を示したが、必ずしも全ての方向において振幅が一定である必要はない。フォトダイオード 2 3 8が受光する蛍光 2 3 4の成分は、ランダム偏光した蛍光 2 3 4のうち特定方向に振動する成分のみであるので、その他の方向に振動する成分は遮断される。

[0158] 図 1 7 Aに示すように配向制御信号が 0 Vの場合には、配向制御光 1 1 7の振動方向 2 2 2が、検光子 2 3 6を透過可能な光の振動方向と平行になる。このとき、配向用標識 8の長手方向が、検光子 2 3 6を透過可能な光の振動方向に対して平行となる。したがって、振動方向 2 2 2に直線偏光した配向制御光 1 1 7により配向したバインディング分子 2 2に付随する大部分の蛍光分子 1 4（主に配向用標識 8の側面に結合している蛍光分子 1 4）の遷移モーメントと検光子 2 3 6を透過可能な光の振動方向 2 3 2 aとは互いに垂直となる。すなわち、バインディング分子 2 2に付随する大部分の蛍光分子 1 4は、励起光 2 3 0に含まれる振動方向 2 3 2 aに振動する成分によって励起されない。つまり、励起光 2 3 0に含まれる振動方向 2 3 2 aに振動する成分によるバインディング分子 2 2の励起効率は最小となる。バインディング分子 2 2から発生する蛍光 2 3 4のうち検光子 2 3 6を透過する成分は、励起光 2 3 0に含まれる振動方向 2 3 2 aに振動する成分によって励起されて発生するため、蛍光 2 3 4において検光子 2 3 6を透過する成分は最

小となり、フォトダイオード238の出力は最小となる。

[0159] 一方、図17Bに示すように配向制御信号が5Vの場合には、配向制御光117の振動方向224が、検光子236を透過可能な光の振動方向と垂直になる。このとき、配向用標識8の長手方向が、検光子236を透過可能な光の振動方向に対して垂直となる。したがって、振動方向224に直線偏光した配向制御光117により配向したバインディング分子22の側面に結合している多数の蛍光分子14の遷移モーメントと検光子236を透過可能な光の振動方向とは互いに平行となる。この場合、励起光230に含まれる振動方向232aに振動する成分によるバインディング分子22の励起効率は最大となる。つまり、蛍光234において検光子236を透過する成分は最大となり、フォトダイオード238の出力は最大となる。

[0160] このような構成とした場合においても、配向制御信号を0Vから5Vに変化させると、蛍光分子14の配向方向が変化し、バインディング分子22中の多数の蛍光分子14の遷移モーメントの方向と検光子236を透過可能な光の振動方向とが徐々に平行に近づく。

それに伴い、励起光230に含まれる検光子236を透過可能な方向に振動する成分によるバインディング分子22の励起効率が増加し、バインディング分子22に付随する蛍光分子14から発生する蛍光234の成分であって検光子236を透過可能な方向に振動する成分が増加する。すなわち、フォトダイオード238において検出する蛍光強度は、実施の形態1と同様に徐々に増加する。ここではバインディング分子22を用いて説明を行ったが、フリー分子に対してランダム偏光した励起光を照射しても同様のことが言える。

この場合、フリー分子とバインディング分子とでは、配向が完了するまでに要する時間が互いに異なるため、フォトダイオード238が受光する蛍光強度が増加して飽和するタイミングも互いに異なる。そのため、このような構成とした場合においても、配向制御信号を0Vから5Vに変化させた際の、時間に対するフォトダイオード出力のグラフは、図11と同様の形状となる。

。つまり、この場合においてもフォトダイオード出力のグラフについて実施の形態１と同様の計算を行うことにより、検出対象物質の濃度を測定することができる。

[0161] また、図１８Ａおよび図１８Ｂに示す概念図のように、互いに直交する２つの方向にそれぞれ直線偏光した２つの成分のみを有する励起光２４０を用いてもよい。励起光２４０は、進行方向に対して垂直な平面内において振動方向２４２ａ、２４２ｂにそれぞれ直線偏光した２つの成分のみを有する。つまり、振動方向２４２ａと振動方向２４２ｂとは互いに直交している。このような励起光２４０によって励起された蛍光分子１４は、励起光２４０の振動方向と同一方向に振動する成分を有する蛍光２４４を発する。すなわち、蛍光２４４は振動方向２４２ａ、２４２ｂにそれぞれ直線偏光した２つの成分を有する。

[0162] 図１８Ａは、配向制御信号が０Ｖの場合の概念図である。配向制御信号が０Ｖの場合、振動方向２２２に直線偏光した配向制御光１１７が照射される。振動方向２２２に直線偏光した配向制御光１１７により配向されたバインディング分子中の大部分の蛍光分子１４（主に配向用標識８の側面に結合している蛍光分子１４）は、遷移モーメントの方向が振動方向２４２ａと垂直な方向となるように配向する。つまり、配向制御信号が０Ｖの場合、励起光２４０に含まれる振動方向２４２ａに振動する成分によるバインディング分子２２の励起効率は最小となる。一方、励起光２４０に含まれる振動方向２４２ｂに振動する成分によるバインディング分子２２の励起効率は最大となる。

[0163] 偏光ビームスプリッタ２４６は、蛍光２４４のうち振動方向２４２ａに振動する直線偏光成分２４４ａを透過させ、振動方向２４２ｂに振動する直線偏光成分２４４ｂを反射する。偏光ビームスプリッタ２４６を透過した蛍光２４４の直線偏光成分２４４ａは、フォトダイオード２４８に到達する。偏光ビームスプリッタ２４６で反射した蛍光２４４の直線偏光成分２４４ｂは、フォトダイオード２５０に到達する。配向制御信号が０Ｖの場合、励起光

240に含まれる振動方向242aに振動する成分によるバインディング分子22の励起効率は最小となるため、バインディング分子22から発生する蛍光244に含まれる振動方向242aに振動する成分は最小となり、フォトダイオード248の出力は最小となる。一方、フォトダイオード250の出力は最大となる。

[0164] 図18Bは、配向制御信号が5Vの場合の概念図である。配向制御信号が5Vの場合、振動方向224に直線偏光した配向制御光117が照射される。振動方向224に直線偏光した配向制御光117により配向されたバインディング分子中の大部分の蛍光分子14（主に配向用標識8の側面に結合している蛍光分子14）は、遷移モーメントの方向が振動方向242bと垂直な方向となるように配向する。つまり、励起光240に含まれる振動方向242bに振動する成分によるバインディング分子22の励起効率は最小となる。

一方、励起光240に含まれる振動方向242aに振動する成分によるバインディング分子22の励起効率は最大となる。

[0165] 図19は、縦軸がそれぞれ配向制御信号の電圧、フォトダイオード248の出力、フォトダイオード250の出力および正規化したフォトダイオードの出力を表し、横軸が時間tを表したグラフである。なお、ここでは説明を容易にするため、フォトダイオード出力については、グラフを模式的に示してある。

[0166] 図19においては、実施の形態1と同様に測定前の配向制御信号は0Vとなっている。

測定前においては、振動方向222に直線偏光した配向制御光117を試薬カップ内の溶液中に照射して、フリー分子およびバインディング分子を同一方向に配向させておく。測定の開始に伴い、配向制御光117は振動方向222に直線偏光した状態から振動方向224に直線偏光した状態に切り替わる。

[0167] 偏光ビームスプリッタ246を透過した蛍光244の直線偏光成分244

aに着目する。この場合、励起光240の一方の成分の振動方向242aと蛍光分子14の遷移モーメントの方向との関係は実施の形態1の場合の関係と同様になる。そして、フォトダイオード248の出力の時間変化は、実施の形態1において説明した図11に示したグラフと同様のグラフとなる。つまり、時刻T31における配向制御光117の振動方向の切り替えに伴ってまずフリー分子の配向方向が切り替わり始め、フォトダイオード248の出力が当初の値 i_z3 から増加する。フリー分子の配向が完了することによりフォトダイオード248の出力は、時刻T32において値 i_f3 となった後しばらく一定値となる。その後、バインディング分子の配向方向が切り替わり始めることに伴って時刻T33でフォトダイオード248の出力は再び増加する。そして、全てのバインディング分子の配向が完了した時刻T34において、フォトダイオード248の出力は値 i_t3 で最大値となる。配向制御信号は5Vの出力がT秒間続いた後0Vとなる。配向制御信号が5Vから0Vに切り替わると、フォトダイオード248の出力は、しばらく i_t3 の値であるが、その後 i_z3 の値まで減少する。

[0168] 偏光ビームスプリッタ246で反射した蛍光244の直線偏光成分244bに着目する。この場合、励起光240の他方の成分の振動方向242bと蛍光分子14の遷移モーメントの方向とが時刻T31までは互いに平行であるため、励起光240の当該他方の成分による蛍光分子14の励起効率は時刻T31までは最大の状態である。すなわち、蛍光244の直線偏光成分244bの量が時刻T31までは最大であるため、偏光ビームスプリッタ246で反射する蛍光244の直線偏光成分244bを受光するフォトダイオード250の出力も時刻T31までは最大となる。時刻T31における配向制御光117の振動方向の切り替えに伴ってまずフリー分子の配向方向が切り替わり始め、フォトダイオード250の出力が当初の値 i_t4 から減少する。フリー分子の配向が完了することによりフォトダイオード250の出力は、時刻T32において値 i_f4 となった後しばらく一定値となる。その後、バインディング分子の配向方向が切り替わり始めることに伴って時刻T33

でフォトダイオード 250 の出力は再び減少する。そして、全てのバインディング分子の配向が完了した時刻 T_{34} において、フォトダイオード 250 の出力は値 i_{z4} で最小値となる。配向制御信号は 5 V の出力が T 秒間続いた後 0 V となる。配向制御信号が 5 V から 0 V に切り替わると、フォトダイオード 250 の出力は、しばらく i_{z4} の値であるが、その後 i_{t4} の値まで増加する。これは、励起光 240 の当該他方の成分の振動方向 242 b と蛍光分子 14 の遷移モーメントの方向とが互いに平行となる状態に戻るためである。

[0169] そして、実施形態 1 と同様に CPU は、フォトダイオード 248 の出力を P_p 、フォトダイオード 250 の出力を P_v として、これらを次式 (3) に従って正規化する。

$$K = (P_p - P_v) / (P_p + P_v) \cdots (3)$$

[0170] このように、2つのフォトダイオードの出力を正規化することで、フリー分子およびバインディング分子の濃度ばらつきや、光学系の励起パワー変動などの影響を低減させることができる。

[0171] そして、正規化したフォトダイオード出力のグラフからバインディング分子の濃度を算出する。具体的には、測定値 S_3 を次式 (4) によって求める。

$$S_3 = (i_{t5} - i_{f5}) / (i_{t5} - i_{z5}) \cdots (4)$$

[0172] ここで求めた測定値 S_3 から、実施の形態 1 と同様に検量線関数を用いて診断値 C_3 (検出対象物質の濃度) を求めることができる。

[0173] また、本発明に係る各実施の形態のように、一方向に直線偏光した配向制御光の振動方向を制御することにより蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御する場合において、進行方向に垂直な平面での配向制御光の断面形状はどのようなものであっても良い。例えば、図 20A に示すように、偏光軸 352 を有する直線偏光した配向制御光 350 が照射される場合を考える。この場合、配向制御光 350 は、進行方向に垂直な方向の断面形状が略長方形である。このとき、配向制御光 350 の中心に位置するバインディング分子 3

54と配向制御光350の周縁部に位置するバインディング分子356の挙動を考える。

[0174] 図20Bに示すように、配向制御光350を回転させると偏光軸352も回転し、回転軸（偏光軸352の回転中心）上に位置するバインディング分子354は、偏光軸352の回転にすぐに追従して回転する。一方、配向制御光350の周縁部に位置するバインディング分子356は、偏光軸352の回転にすぐには追従できず、偏光軸352から離れることになる。その後しばらくすると、バインディング分子356も、配向制御光350に引き込まれ、偏光軸352の回転に追従して回転を開始する。そして、図20Cのように、配向制御光350の偏光軸352を図20Aの場合における偏光軸352に対して90度回転させた場合、偏光軸352の回転の終了と同時にバインディング分子354の配向は完了し、一方、バインディング分子356が偏光軸352の回転にすぐには追従できないため、バインディング分子356の配向はバインディング分子354の配向の完了後しばらくしてから完了する。つまり、回転軸上に位置するバインディング分子354の動きは、配向制御光350の偏光軸352の回転に同期して自転する挙動となるが、配向制御光350の周縁部に位置するバインディング分子356の動きは、配向制御光350の偏光軸352の回転に同期せずかつ回転軸を中心として公転するような動きとなる。

[0175] このように、配向制御光350の偏光軸352の回転に追従できないバインディング分子が存在すると測定に影響を与えることがある。そこで、このような影響を低減するため、配向制御光を所定の方角から同時に多点に入射させることが好ましい。例えば図21（試薬カップ108の上面図）に示すように、360a～360iの9点にそれぞれ対応した9本の配向制御光を試薬カップ108に入射させるような態様でも良い。このようにすると、配向制御光の偏光軸の中心に位置するバインディング分子の数が増えるため、測定への影響を低減することができる。なお、ここでは9点に配向制御光を入射させる例を示したが、配向制御光を入射させる点は9点に限られず、9点

より多くても少なくても良い。

配向制御光を絞るほど、多くの点に入射させることが望ましい。これにより、複数箇所配向制御光の回転に同期してバインディング分子を回転させることができる。その結果、突発的な蛍光強度の変動を低下させることができ、相対的な散らばりを表す指標である変動係数 (Coefficient of Variation) を改善することができる。

[0176] このように、配向制御光を所定方向から同時に多点に入射させるための配向制御用光源部402の構造について図22に示す。配向制御用光源部402は、 3×3 の2次元レーザーアレイである。配向制御用光源部402は、発光点404a~404iの9点が発光する。発光点の大きさは縦が $1 \mu\text{m}$ で横が $100 \mu\text{m}$ である。発光点の間の距離は約 $100 \mu\text{m}$ である。

[0177] 図22に示される配向制御用光源部402を用いた光学系の一例を図23に示す。なお図23では、配向制御光および励起光の光学系以外の構成要素は省略して描いてある。

[0178] 配向制御用光源部402から出力された直線偏光した配向制御光422は、コリメータレンズ406を通して焦点において平行光線となる。コリメータレンズ406を通った配向制御光422は、ビームエキスパンダ408およびビームエキスパンダ410を通して $\lambda/2$ 波長板412に入射する。ビームエキスパンダ408およびビームエキスパンダ410を通った配向制御光422は、特定の倍率の平行光束に広げられる。 $\lambda/2$ 波長板412は回転ステージ上にあり、回転可能となっている。これにより配向制御光422の振動方向を回転することができる。 $\lambda/2$ 波長板412を透過した配向制御光422は、ダイクロイックミラー418で反射してレンズ420により集光されて試薬カップ108の底面から上方に向かって入射する。

[0179] 光源部414から出力された励起光424は、レンズ426を通してダイクロイックミラー416により反射される。ダイクロイックミラー416により反射された励起光424は、ダイクロイックミラー418を透過してレンズ420により集光されて試薬カップ108の底面から上方に向かって入

射する。

[0180] 図23に示される光学系において、コリメータレンズ406の焦点距離を3.1mm、レンズ420の焦点距離を4mmとすると、倍率は1.29倍となる。そのため、試薬カップ108の底面において、配向制御光422の大きさは約 $1.3\mu\text{m} \times 130\mu\text{m}$ となり、ピッチは約 $129\mu\text{m}$ となる。

[0181] また、配向制御光を所定の方向から同時に多点に入射させるための別の光学系の例について図24を用いて説明する。なお図24においても、配向制御光および励起光の光学系以外は省略して描いてある。また、図23と同一の構成要素には同一の符号を付し、その説明を省略する。

[0182] 図24に示される光学系において、配向制御用光源部116は実施の形態1と同様のものである。配向制御光432は、コリメータレンズ406、ビームエキスパンダ408およびビームエキスパンダ410を通り、マイクロレンズアレイ428へ入射する。マイクロレンズアレイ428は、図25に示されるように、複数のマイクロレンズ428aを格子状に並べたものである。マイクロレンズアレイ428を通った配向制御光432は、複数の光源から照射された光のように、異なる位置で焦点を結ぶ複数の光束となる。配向制御光432は、ピンホールアレイ430によって絞られ、ダイクロイックミラー418で反射し、レンズ420を通して試薬カップ108の底面から上方に向かって入射する。このようにマイクロレンズアレイを用いても、配向制御光を所定の方向から同時に多点に入射させることができる。

[0183] また、 $\lambda/2$ 波長板412を用いて振動方向を変更する例を示したが、電気信号で制御可能な液晶位相変調デバイスを用いて振動方向を変更してもよい。

[0184] また、上記各実施の形態では試薬カップを円柱状の形状としたが、試薬カップは必ずしも円柱状の形状とする必要は無い。例えば、図26に示されるように、四角柱状の形状を有し、内部に四角柱状の溶液保持部を有する試薬カップ432を用いても良い。このような四角柱状の溶液保持部を有する試薬カップ432は、特に、配向制御光の進行方向に働く配向制御光による圧

力を利用してフリー分子およびバインディング分子を試薬カップ432の内部側壁面に押しつける場合に適している。これは、フリー分子およびバインディング分子の質量が軽い場合に起こる現象であり、配向制御光による圧力を受けてフリー分子およびバインディング分子が溶液中を移動することが原因である。この場合、溶液保持部が四角柱であると、フリー分子およびバインディング分子は溶液と試薬カップ432との界面に押しつけられながら配向する。当該界面が平面でありかつ配向制御光による圧力が当該界面に垂直な方向に作用する場合には、フリー分子およびバインディング分子は当該界面に平行な方向に移動して配向制御光の照射範囲の外に出ることがない。

[0185] また、フリー分子およびバインディング分子を試薬カップ432の内部側壁面に押しつける場合には、配向制御光の焦点の位置を工夫することによりこれらの分子をより容易に配向させることができる。図27は、集光された配向制御光の焦点と試薬カップとの位置関係の一例を示す図である。配向制御光434は、レンズ436に入射し、血漿16と試薬カップの側壁部432bとの界面（側壁部432bの内部側壁面）において焦点434aを結ぶ。配向制御光434の焦点434aの位置では、配向制御光434の強度が最も強いため、より強い圧力でフリー分子およびバインディング分子を押しつけることができる。従って、図27のように配向制御光434を入射させると、焦点434aの位置においてフリー分子およびバインディング分子を側壁部432bの内部側壁面に押しつけつつ、より効率的にフリー分子およびバインディング分子を配向させることができる。この場合においても、直線偏光した配向制御光434の振動方向を回転させることで、フリー分子およびバインディング分子の配向方向を焦点434aの位置において変化させることができる。

[0186] なお、溶液保持部は必ずしも四角柱状の形状を有している必要はなく、少なくとも一面に平面を有していれば良い。溶液を通してその平面において焦点を結ぶように配向制御光を照射すれば、フリー分子およびバインディング分子は、当該平面に平行な方向に移動して配向制御光の照射範囲の外に出る

ことがなく平面に押しつけられながら配向する。

[0187] また、本発明に係る各実施の形態では、直線偏光した配向制御光の振動方向を制御してフリー分子およびバインディング分子の配向状態を制御することにより、これらの分子に付随する蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御する場合について説明したが、蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御する方法はこれに限られない。例えば、光を照射された分子の配向状態が光の照射方向に応じて変化することを利用して、配向制御光の試薬カップに対する照射方向を切り替えることにより蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御する方法を用いることもできる。このような場合、配向制御光は偏光していなくてもよい。

[0188] 配向制御光 117 の試薬カップ 108 に対する照射方向を切り替えることにより蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御する方法について、図 28 を用いてより詳細に説明する。図 28 は、配向制御用光源部 116 から照射される配向制御光 117 の試薬カップ 108 に対する照射方向を切り替えるための光学系を試薬カップ 108 の上面側（カップ口側）から見た模式図である。配向制御用光源部 116 から照射された配向制御光 117 は、AOD（Acousto Optic Deflector）121 を通って試薬カップ 108 へ照射される。配向制御光 117 は、試薬カップ 108 の溶液全体を照らす程度の幅を持っている。AOD 121 は、配向制御用光源部 116 から照射された配向制御光 117 の照射方向を 2 方向に切り替える。具体的には、AOD 121 は、FG 122 から 5 V の配向制御信号が入力された場合には、配向制御光 117 を配向制御光 134 の方向へ進ませ、FG 122 から 0 V の配向制御信号が入力された場合には、配向制御光 117 を配向制御光 136 の方向へ進ませる。配向制御光 134 は、試薬カップ 108 の側面に入射する。配向制御光 136 は、ダイクロイックミラー 138 によって反射され、配向制御光 134 の進行方向と垂直な方向に進んで試薬カップ 108 の側面に入射する。上面から見た試薬カップ 108 を時計の文字盤に例えると、配向制御光 134 は 9 時の位置から入射して 3 時の方向へ進行し

、配向制御光 1 3 6 は 6 時の位置から入射して 1 2 時の方向へ進行する。すなわち、配向制御光 1 3 4 の進行方向と配向制御光 1 3 6 の進行方向とは互いに直交する。ダイクロイックミラー 1 3 8 は、配向制御光 1 1 7 に用いた波長の光のみを反射し、その他の波長の光を透過する。励起光源部 1 1 8 から照射された励起光 1 1 9 は、ダイクロイックミラー 1 3 8 を透過し、ダイクロイックミラー 1 3 8 で反射した配向制御光 1 3 6 と同じ方向に進行して試薬カップ 1 0 8 の側面へ入射する。

[0189] このような構成により、生体分子検出装置 1 0 0 は、F G 1 2 2 からの配向制御信号の入力により A O D 1 2 1 を制御することで、配向制御光 1 1 7 が試薬カップ 1 0 8 へ照射される方向を、角度が 9 0 度異なる 2 つの方向に切り替えることができる。A O D 1 2 1 と試薬カップ 1 0 8 との間には遮光板 1 4 0 があり、配向制御光 1 3 4 および配向制御光 1 3 6 が示す方向以外に進行する配向制御光は、試薬カップ 1 0 8 へ照射されないように構成されている。また、配向制御光 1 1 7 は、配向制御光 1 3 4 および配向制御光 1 3 6 のいずれの方向に進行した場合においても、円柱状の試薬カップ 1 0 8 の側面から入射する。試薬カップ 1 0 8 は円柱状であるため、配向制御光の進行方向が切り替わっても、試薬カップ 1 0 8 の配向制御光が入射する側面の形状は同じである。

[0190] また、配向制御光を照射する方向を切り替えることにより蛍光分子の遷移モーメントの方向を制御する光学系においては、配向制御光のビーム径を細長く絞った場合に配向制御光で照射できる範囲が減少してしまうことを回避する観点から、配向制御光をある方向から同時に多点に照射して照射範囲をより広くするために、光学系を複数段用意しても良い。複数段の光学系は、少なくとも試薬カップに配向制御光が入射する前の段階で光路が複数存在していればよい。例えば、光源も含めた同様の光学系を 3 段重ねれば、3 つの配向制御用光源部からそれぞれ配向制御光が照射され、試薬カップへある方向から 3 点に配向制御光を照射することができる。また例えば、光源が 1 つであっても 2 次元レーザーアレイやマイクロレンズアレイ等を用いて配向制

御光を分岐すれば、分岐した分だけの複数の点で配向制御光を照射することができる。このような場合、配向制御光を同時に多点に照射することができる、複数の箇所で蛍光分子の遷移モーメントを回転させることができる。

産業上の利用可能性

[0191] 本発明に係る生体分子検出装置および生体分子検出方法は、例えば、検出対象物質と、その検出対象物質に特異的に結合する物質との相互作用を利用して、検出対象物質の検出又は定量を行う装置に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 溶液中に存在する蛍光分子を励起するための、特定方向に直線偏光成分を有する励起光を照射するステップと、
- 検出対象物質に特異的に結合する物質と配向用標識と該配向用標識の周囲に結合した複数の前記蛍光分子とを有する第1の複合体から発生する第1の蛍光を検出するステップと、
- 前記第1の複合体と前記検出対象物質とが結合した第2の複合体から発生する第2の蛍光を検出するステップと、
- 前記第1の複合体および前記第2の複合体を少なくとも2つの方向に切り換えて配向させるステップと、
- 検出された前記第1の蛍光および前記第2の蛍光に基づいて前記検出対象物質の検出または定量を行うステップとを備えたことを特徴とする生体分子検出方法。
- [請求項2] 請求項1記載の生体分子検出方法で使用される生体分子検出装置であって、
- 特定方向に直線偏光成分を有し前記蛍光分子を励起する励起光を照射する光源と、
- 前記蛍光分子から発せられた蛍光を検出する受光部と、
- 前記溶液中で前記第1の複合体および前記第2の複合体を少なくとも2つの方向に切り換えて配向させる配向制御手段と、
- 前記第1の複合体および前記第2の複合体の配向方向の切り替えに伴って前記蛍光分子から発生する蛍光の強度の時間変化から、前記第2の蛍光の強度を算出して前記検出対象物質の検出または定量を行う演算部とを備えたことを特徴とする生体分子検出装置。
- [請求項3] 前記配向制御手段は、前記配向用標識の長手方向が前記特定方向と平行となる第1の方向、および、前記配向用標識の長手方向が前記特定方向と垂直となる第2の方向に、前記第1の複合体および前記第2の複合体を切り換えて配向させるものであることを特徴とする請求項

2 に記載の生体分子検出装置。

[請求項4] 前記配向制御手段は、前記第 1 の複合体および前記第 2 の複合体を所定の時間間隔で複数回切り替えて配向させるものであり、

前記演算部は、前記第 1 の複合体および前記第 2 の複合体が複数回切り替えて配向したことによって得られた複数の前記第 2 の蛍光の強度の加算平均を行い、加算平均により得られた蛍光の強度に基づいて前記検出対象物質の検出または定量を行うものであることを特徴とする請求項 2 または 3 に記載の生体分子検出装置。

[請求項5] 前記所定の時間間隔は、前記検出対象物質、該検出対象物質と特異的に結合する物質、前記配向用標識および蛍光分子の質量または体積と、前記配向制御手段による配向制御の強度とに基づいて決定されることを特徴とする請求項 4 に記載の生体分子検出装置。

[請求項6] 前記配向制御手段は、直線偏光した光を照射する配向制御光源を備え、該配向制御光源から前記溶液に対して前記直線偏光した光を照射することにより、前記第 1 の複合体および前記第 2 の複合体を配向させるものであることを特徴とする請求項 2 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の生体分子検出装置。

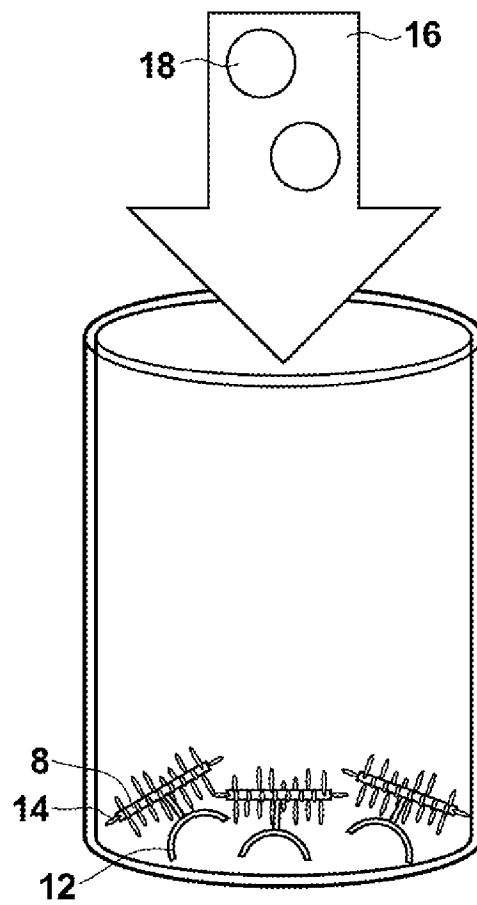
[請求項7] 前記配向制御手段は、前記直線偏光した光の振動方向を切り替える波長板を有し、該波長板を用いて前記直線偏光した光の振動方向を切り替えることにより、前記第 1 の複合体および前記第 2 の複合体を切り換えて配向させるものであることを特徴とする請求項 6 に記載の生体分子検出装置。

[請求項8] 前記配向制御光源は、前記溶液に対し前記直線偏光した光を複数の位置から照射するものであることを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の生体分子検出装置。

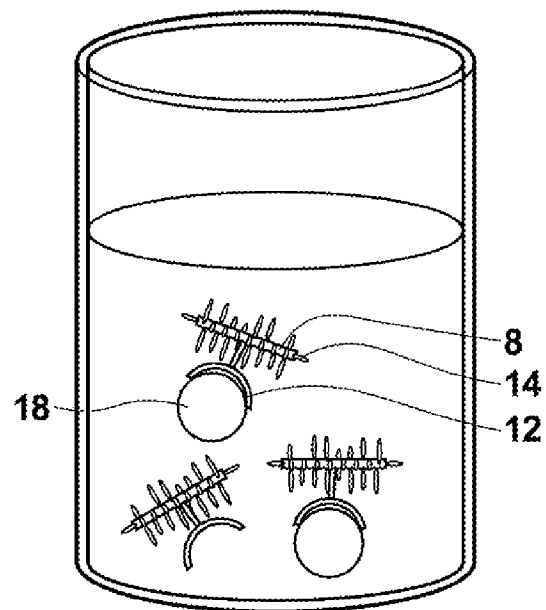
[請求項9] 前記溶液は、少なくとも一部に平面を有する溶液保持部に保持されたものであることを特徴とする請求項 6 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の生体分子検出装置。

- [請求項10] 前記配向制御光源は、前記溶液を通して前記溶液保持部の平面から出射する方向に、前記直線偏光した光を照射し、かつ、前記溶液と前記平面との界面において、前記直線偏光した光に焦点を結ばせるものであることを特徴とする請求項9に記載の生体分子検出装置。
- [請求項11] 前記演算部は、前記第1の複合体および前記第2の複合体が一方の配向方向から他方の配向方向に切り替わる間における、前記第1の複合体から発生する蛍光の強度の時間変化と、前記第2の複合体から発生する蛍光の強度の時間変化とに差があることを利用して、前記第2の蛍光の強度を算出するものであることを特徴とする請求項2乃至10のいずれか1項に記載の生体分子検出装置。
- [請求項12] 前記受光部は、光を分光する分光手段を備えることを特徴とする請求項2乃至11のいずれか1項に記載の生体分子検出装置。
- [請求項13] 前記分光手段は、特性の異なる複数のフィルタであり、
前記受光部は、前記蛍光分子から発生する蛍光の波長に応じて前記複数のフィルタを切り替えるものであることを特徴とする請求項12に記載の生体分子検出装置。

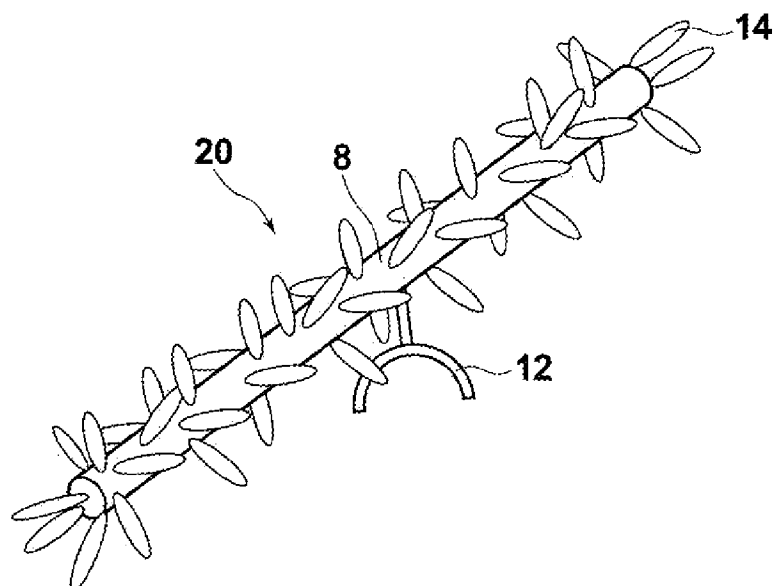
[図1A]



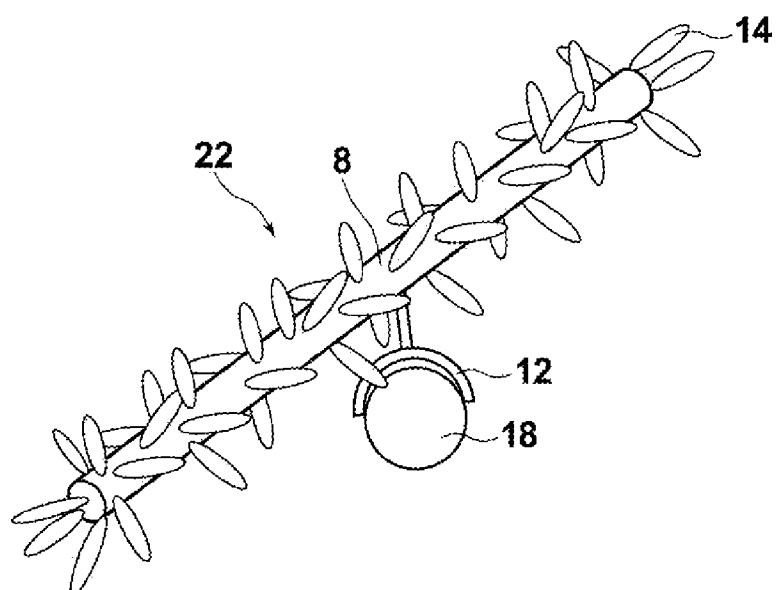
[図1B]



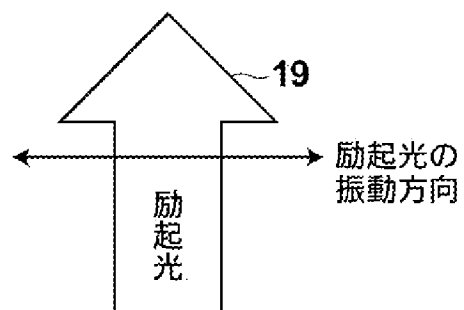
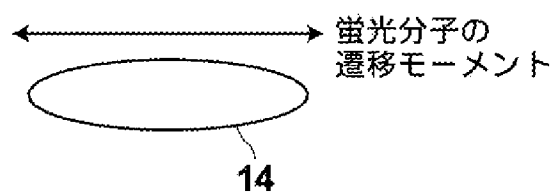
[図2A]



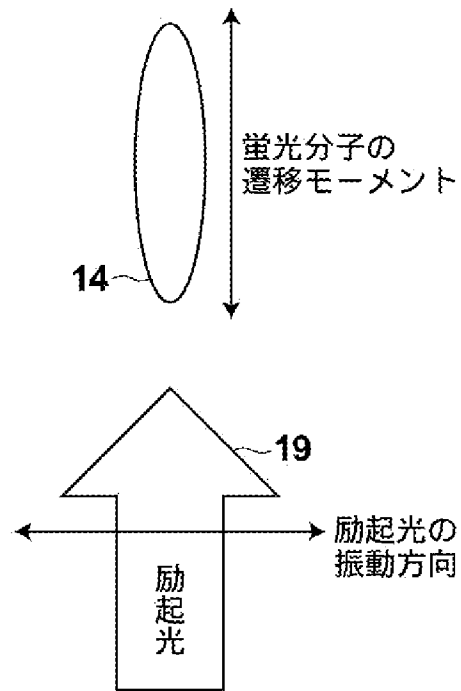
[図2B]



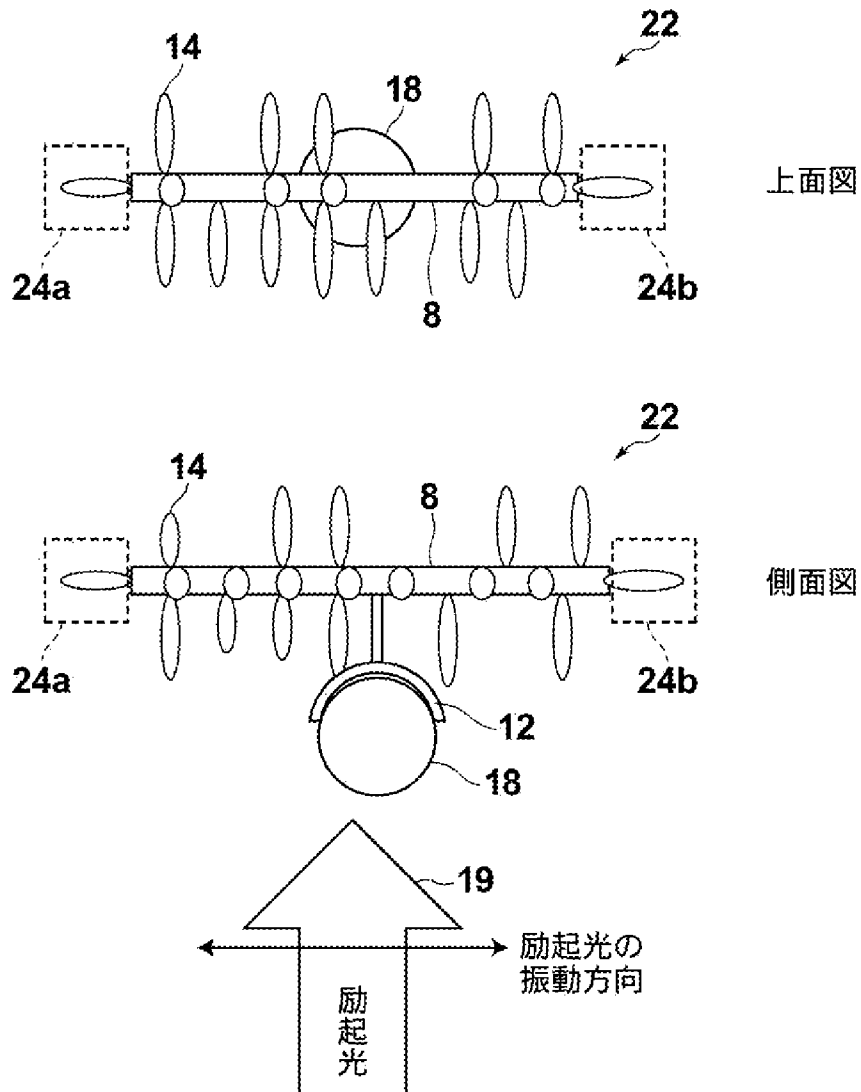
[図3A]



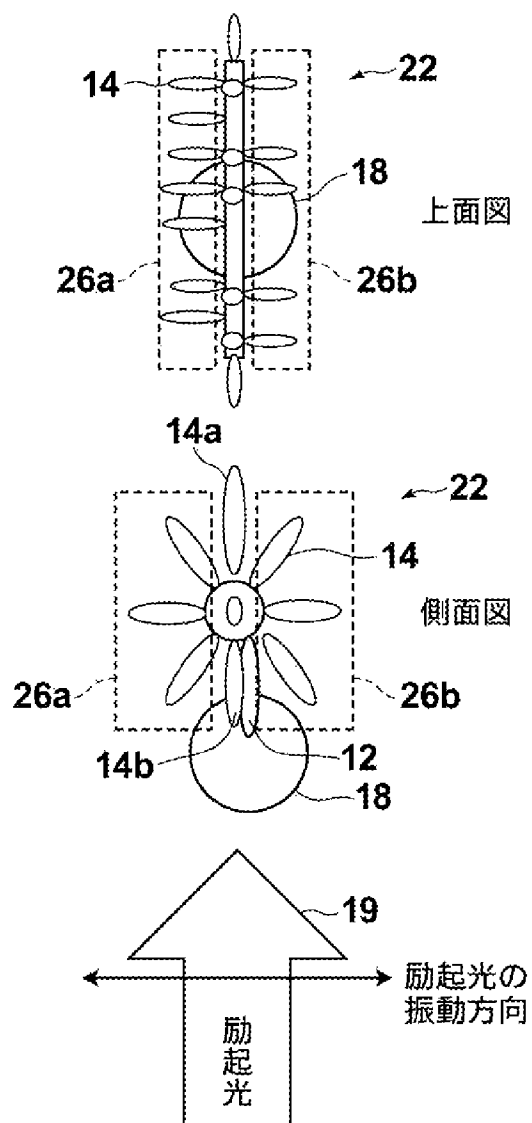
[図3B]



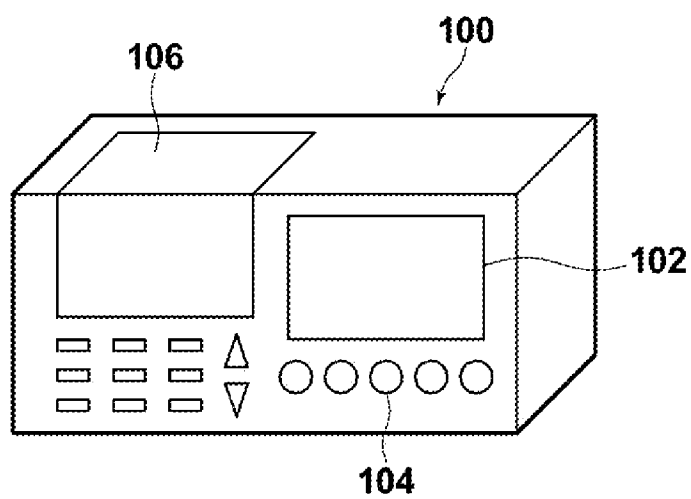
[図4A]



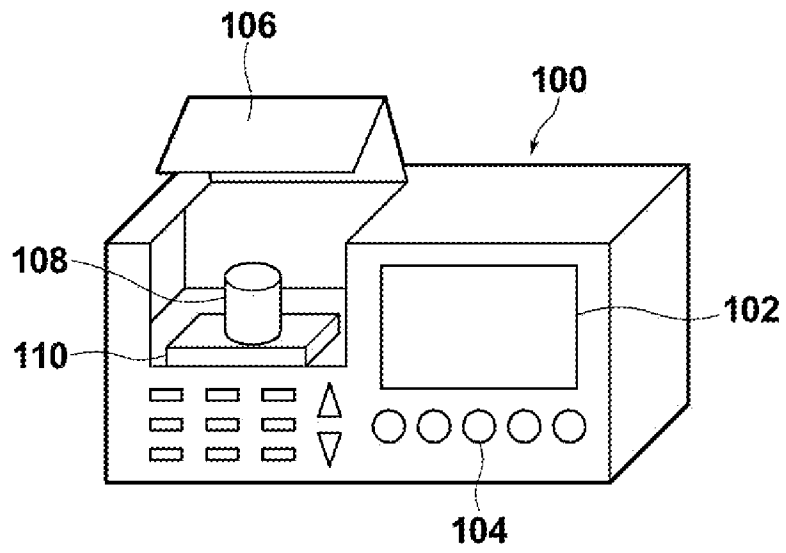
[図4B]



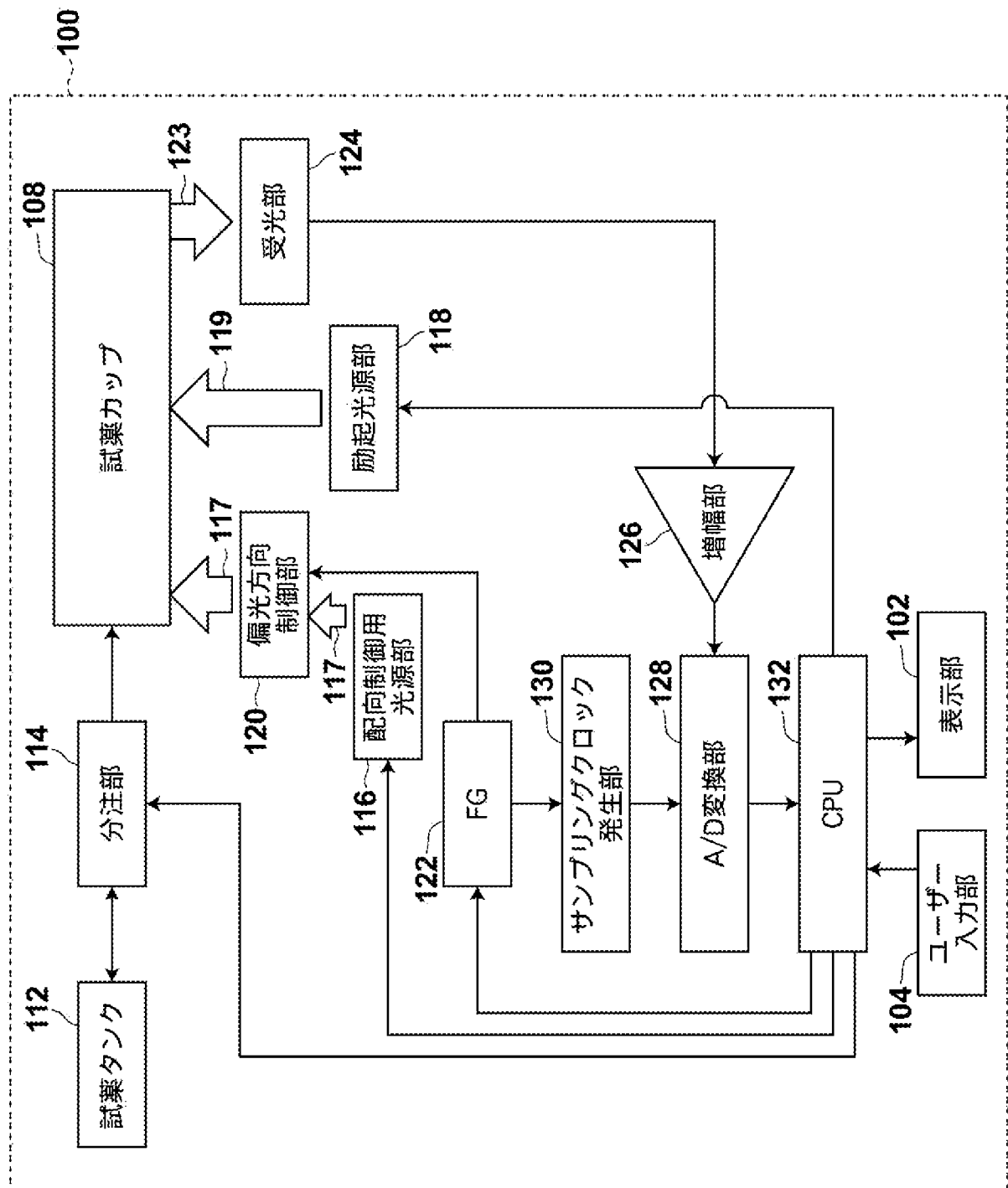
[図5A]



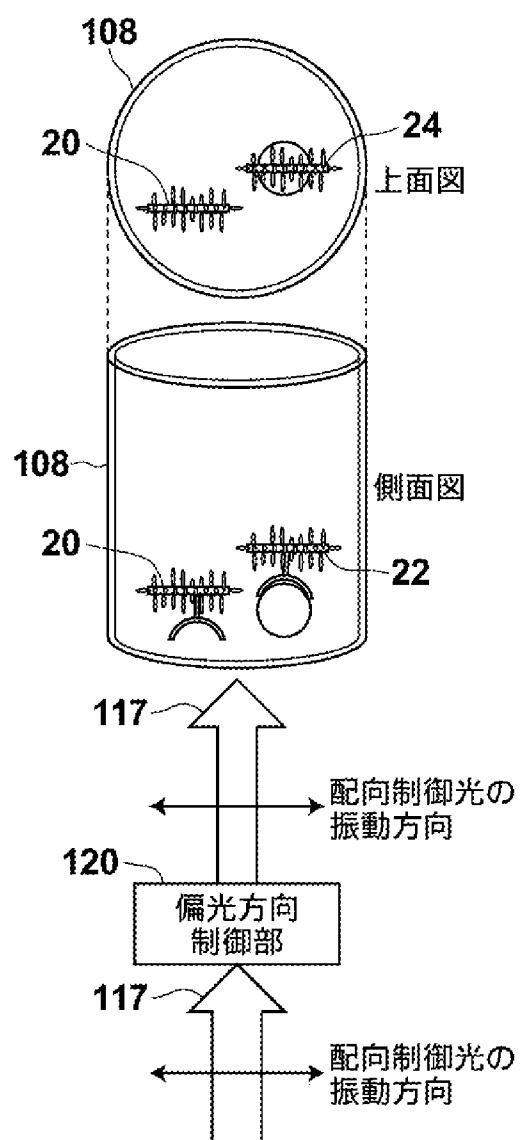
[図5B]



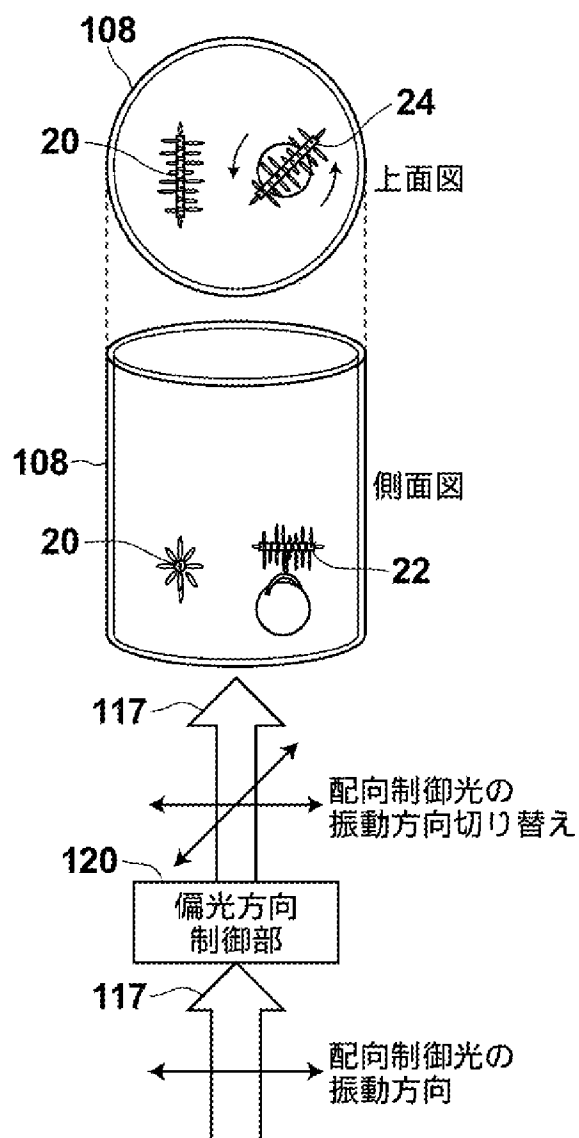
[図6]



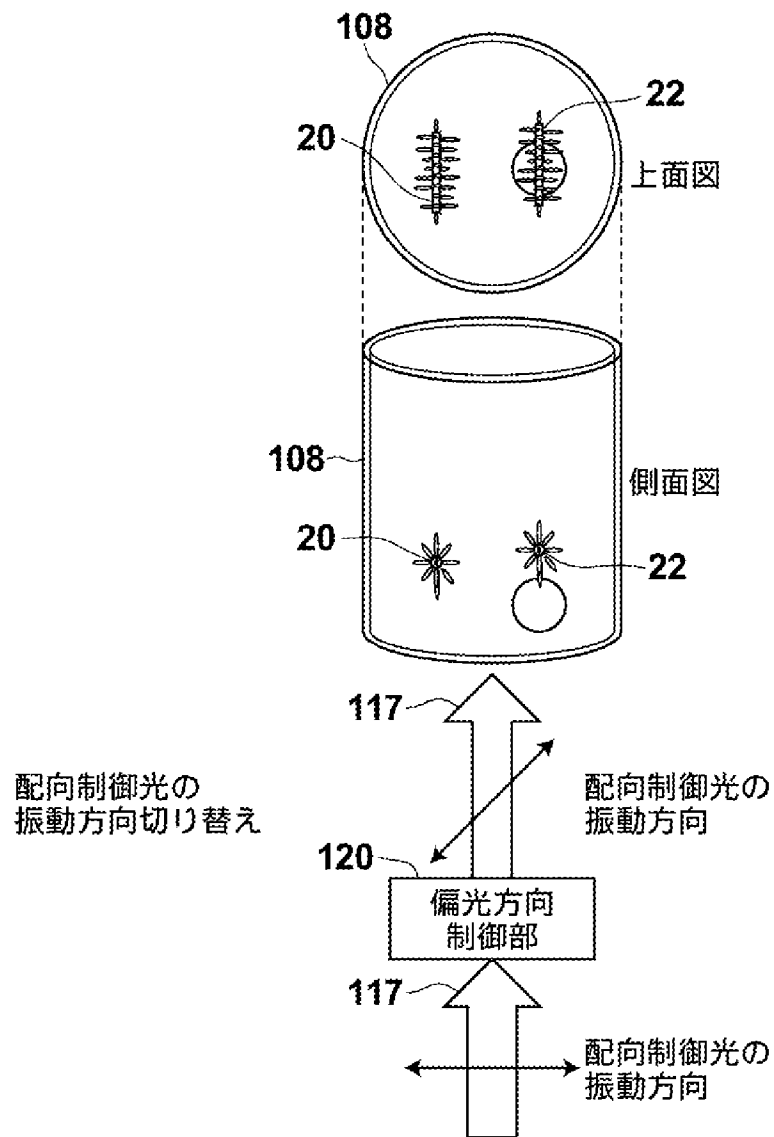
[図7A]



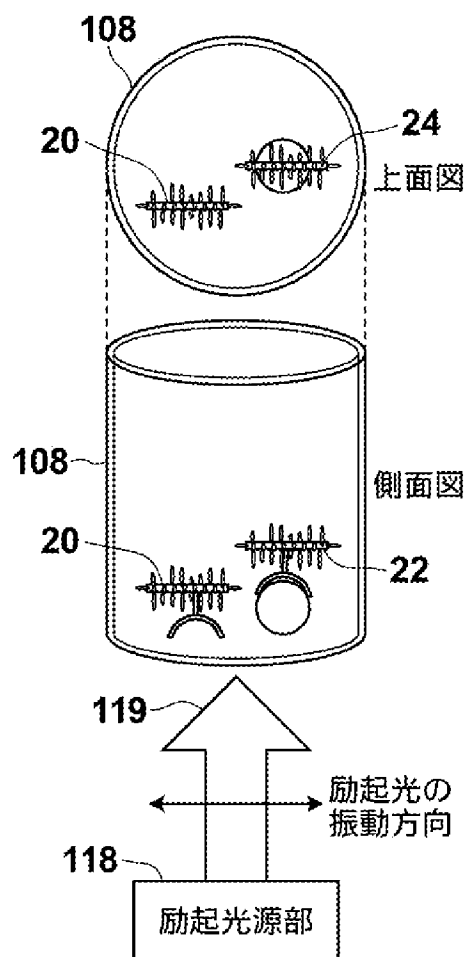
[図7B]



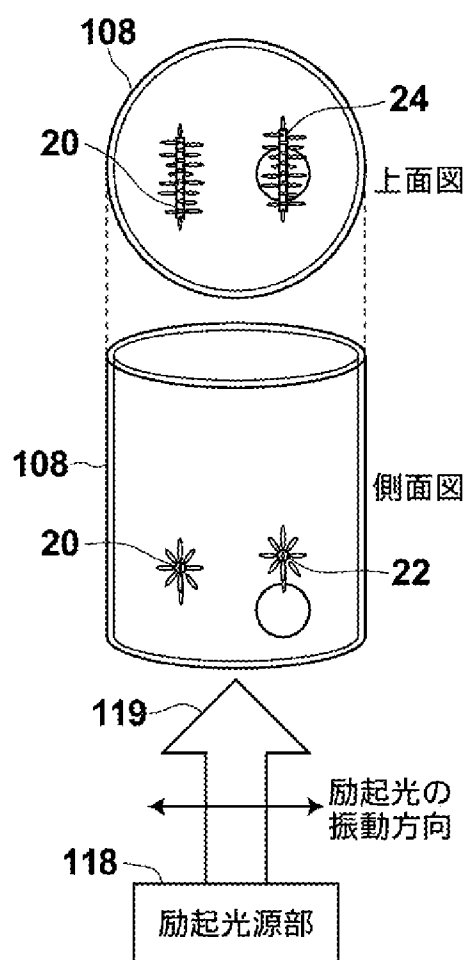
[図7C]



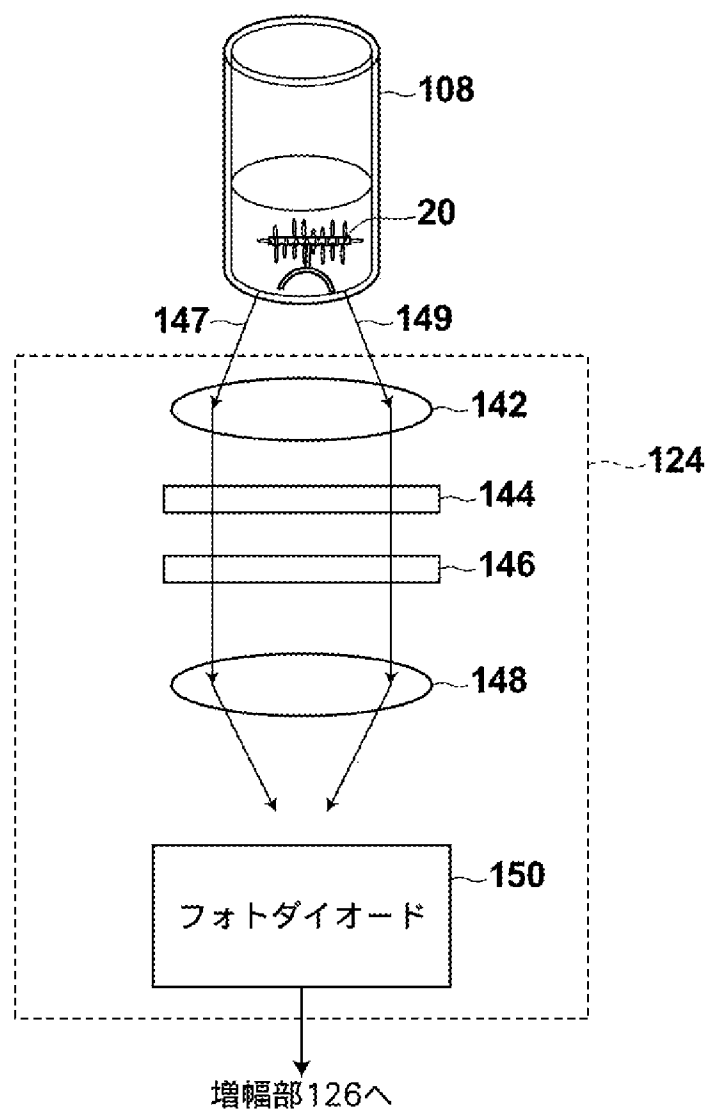
[図8A]



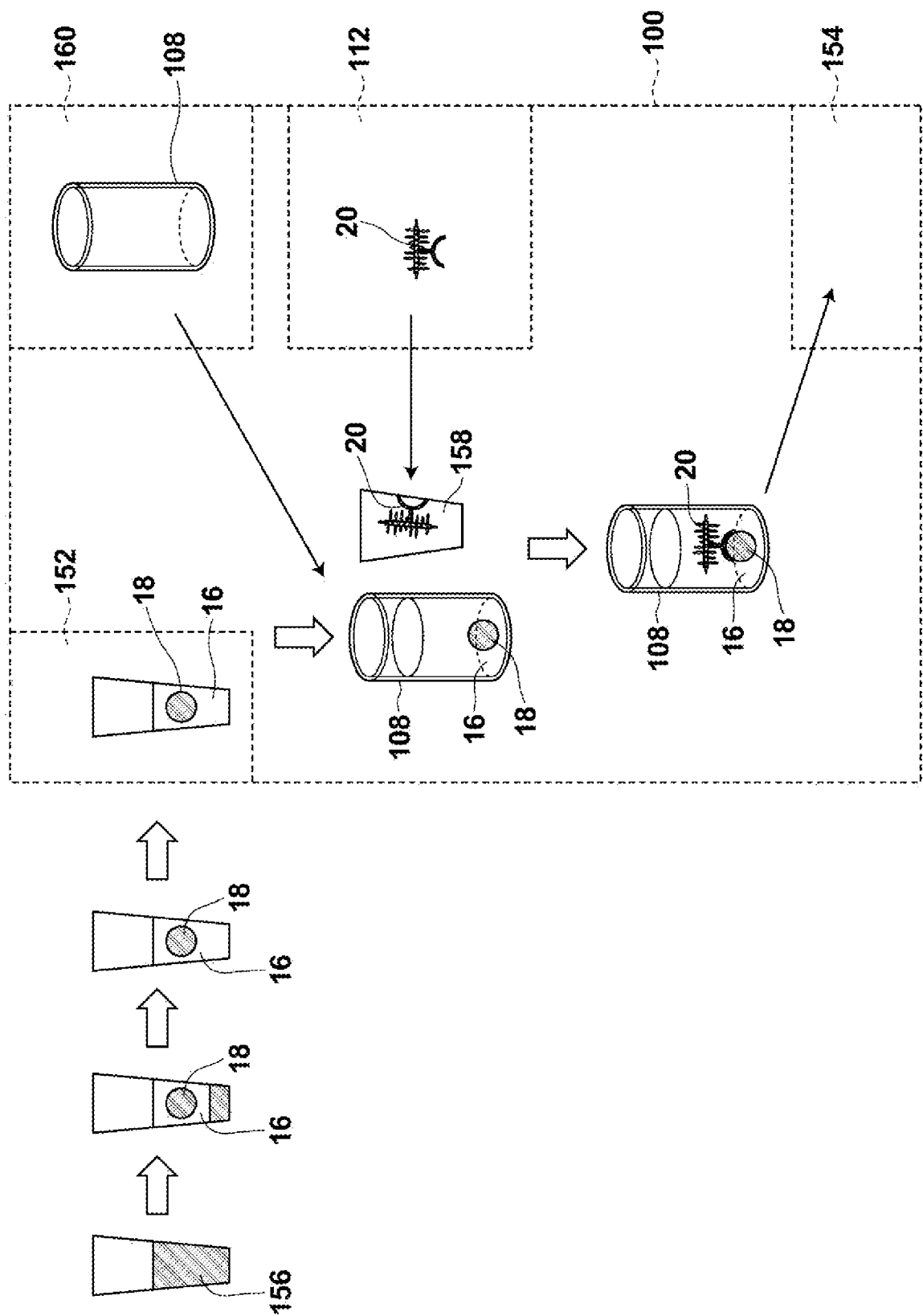
[図8B]



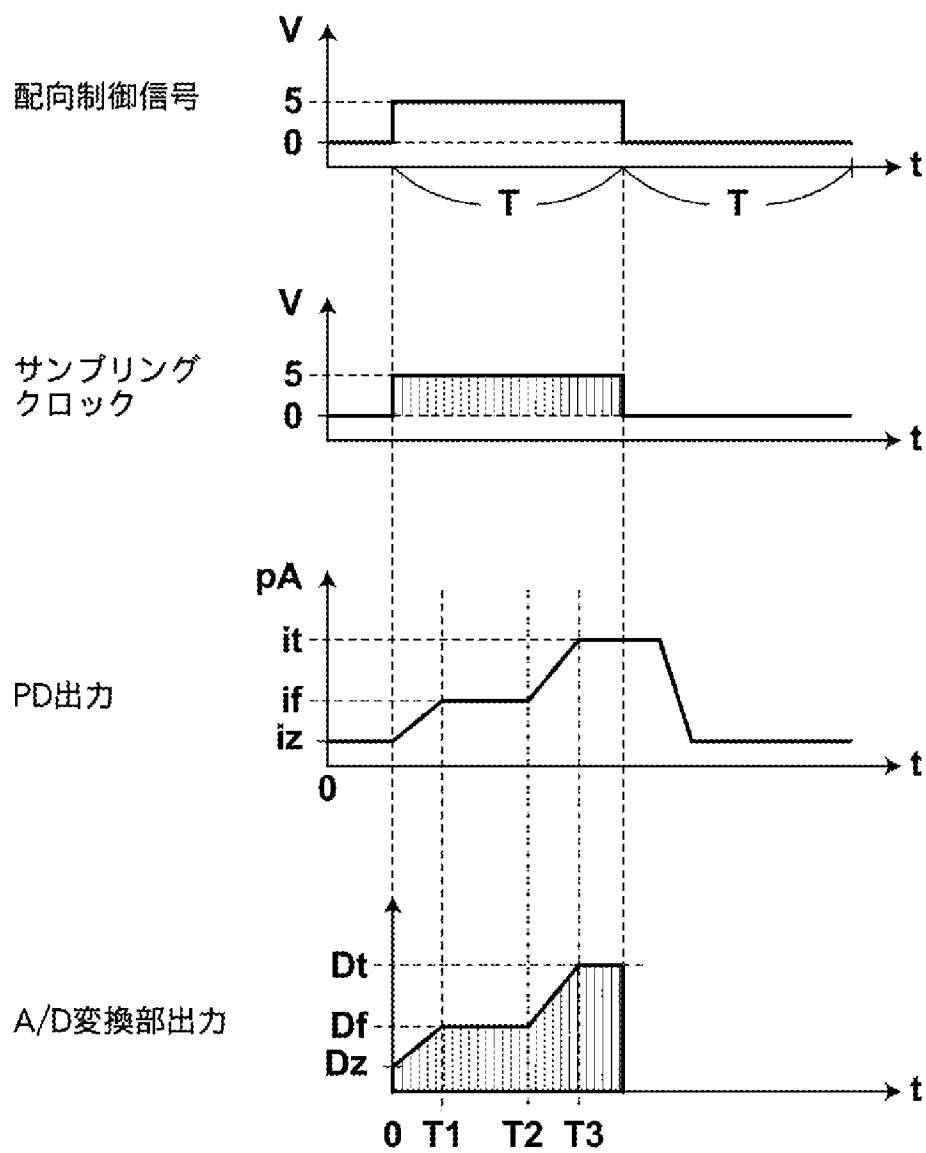
[図9]



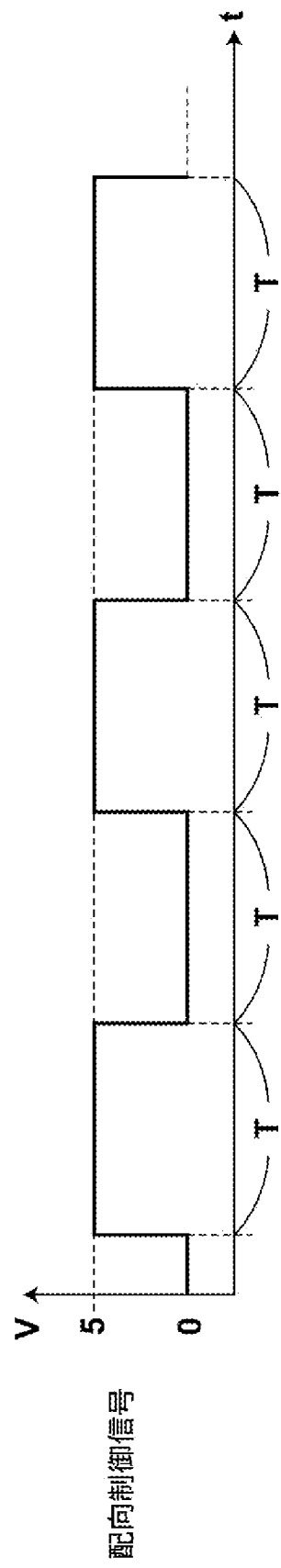
[図10]



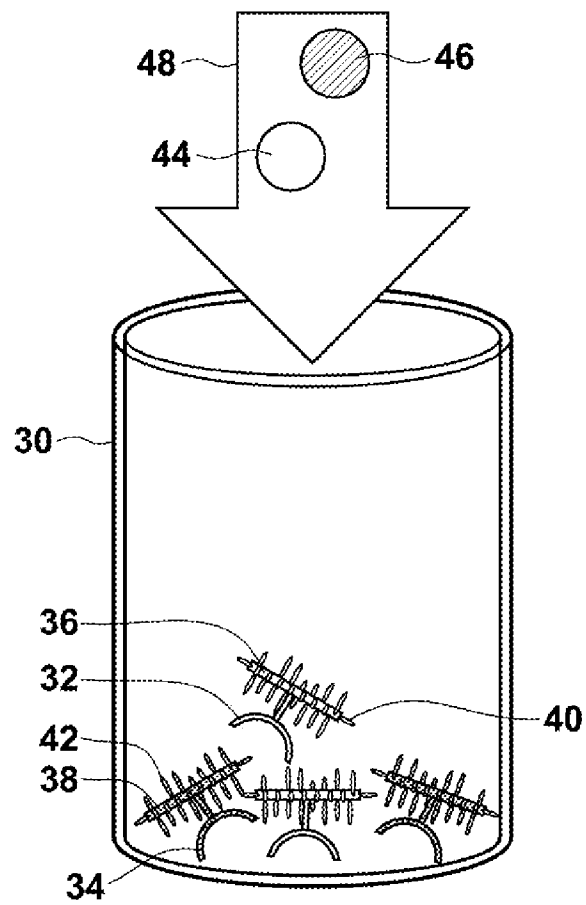
[図11]



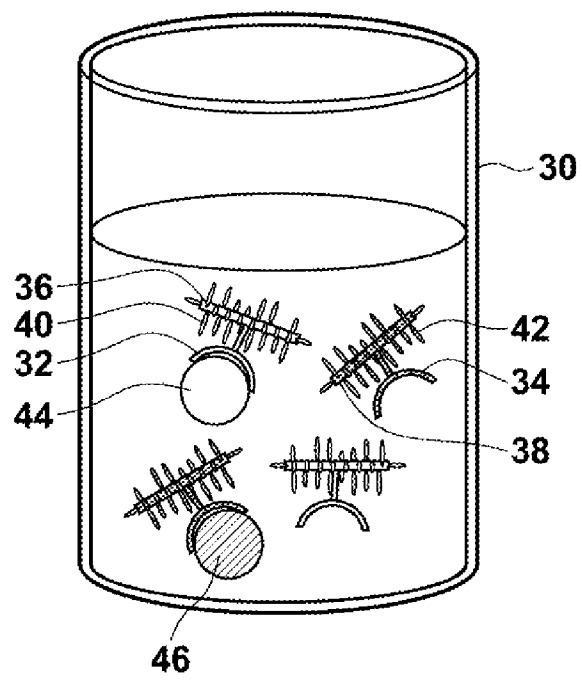
[図12]



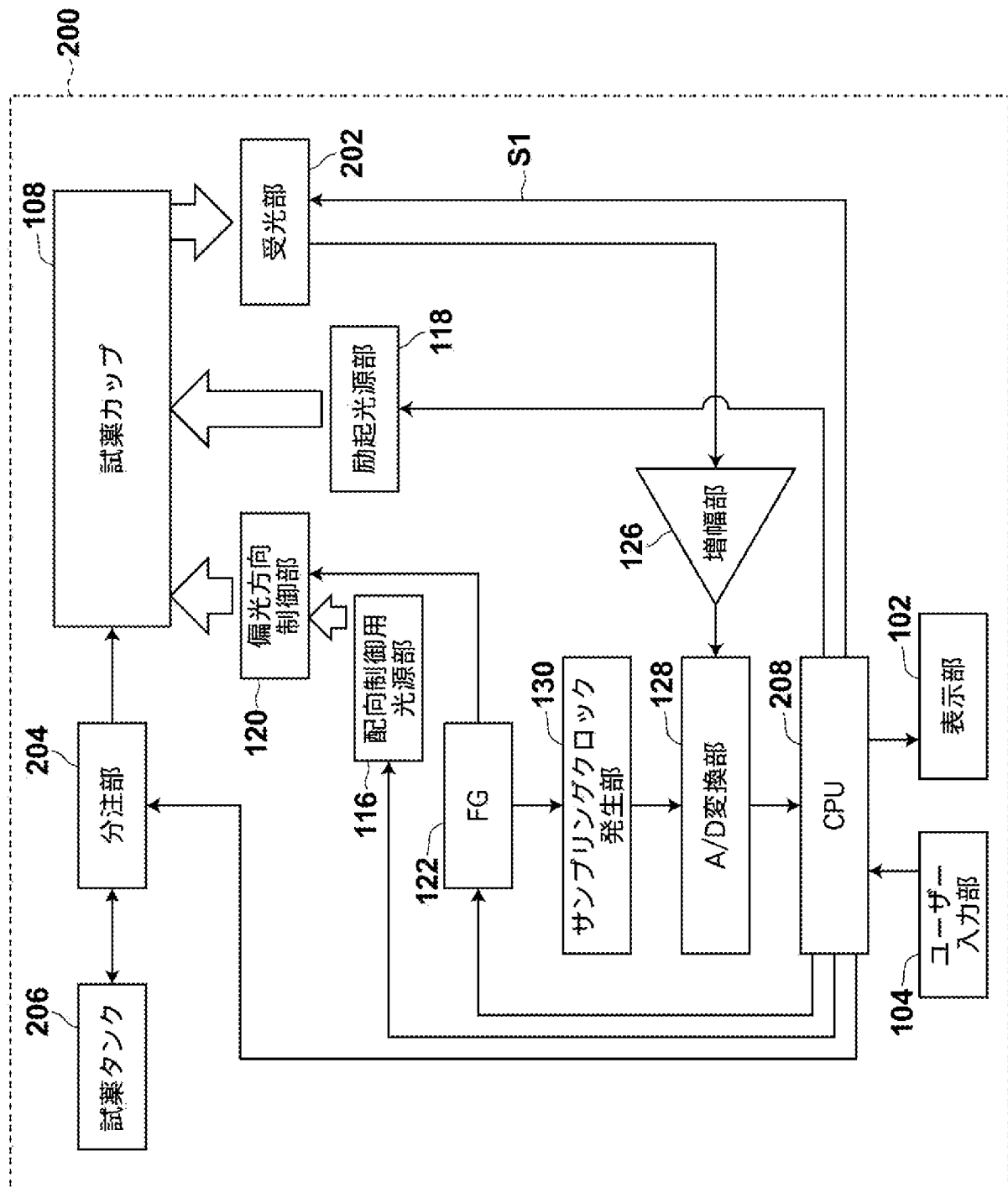
[図13A]



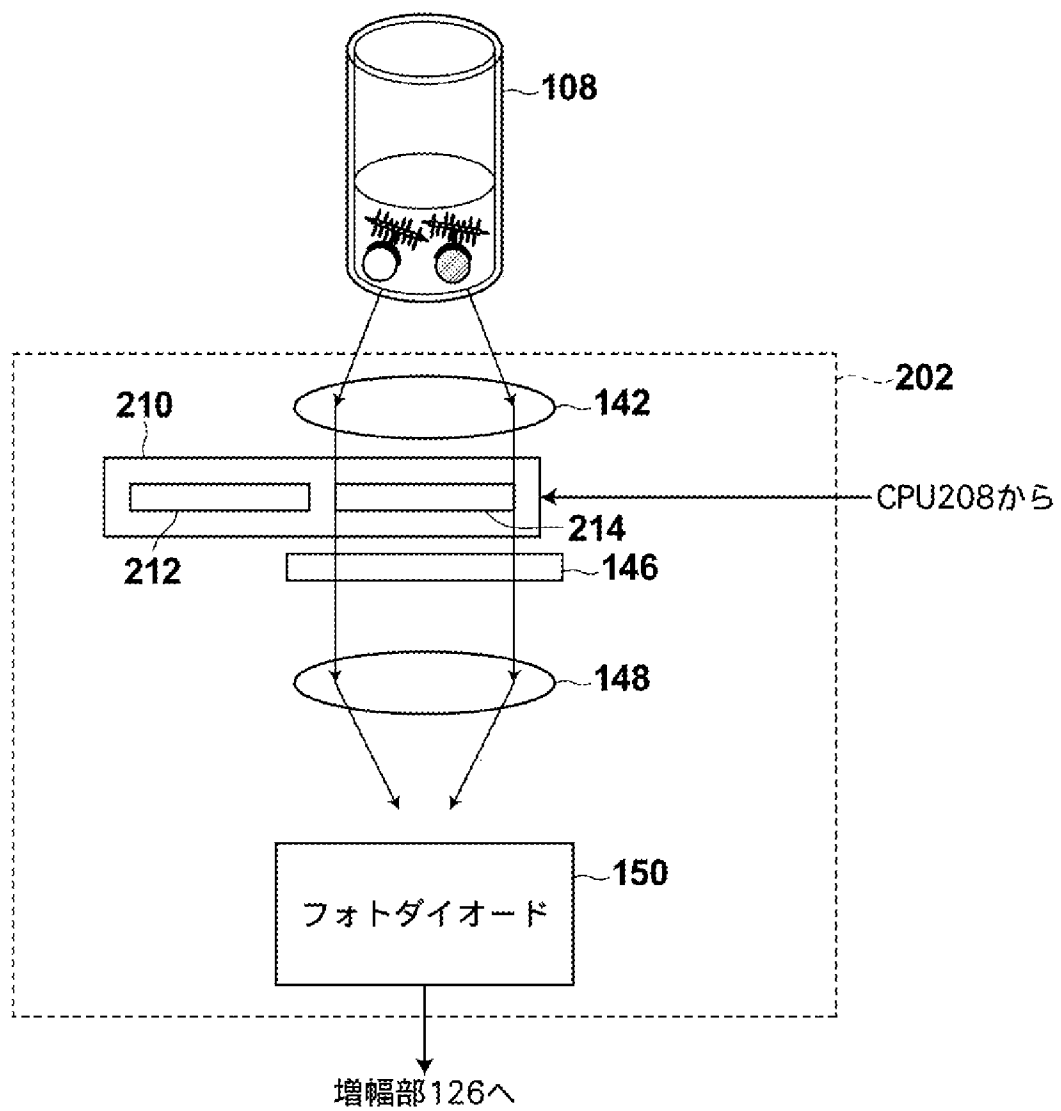
[図13B]



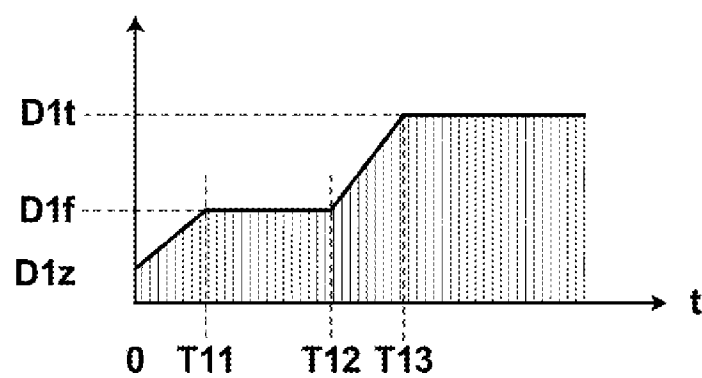
[図14]



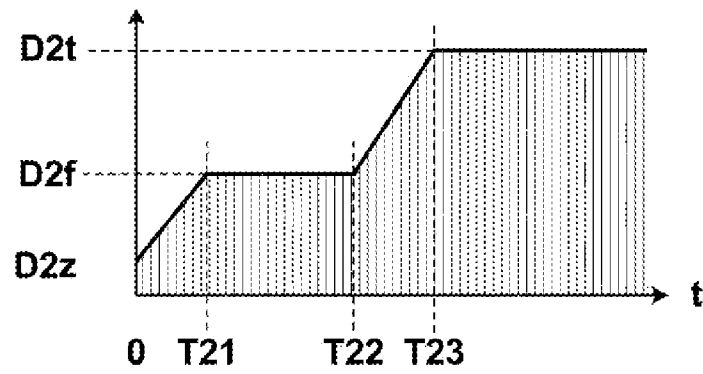
[図15]



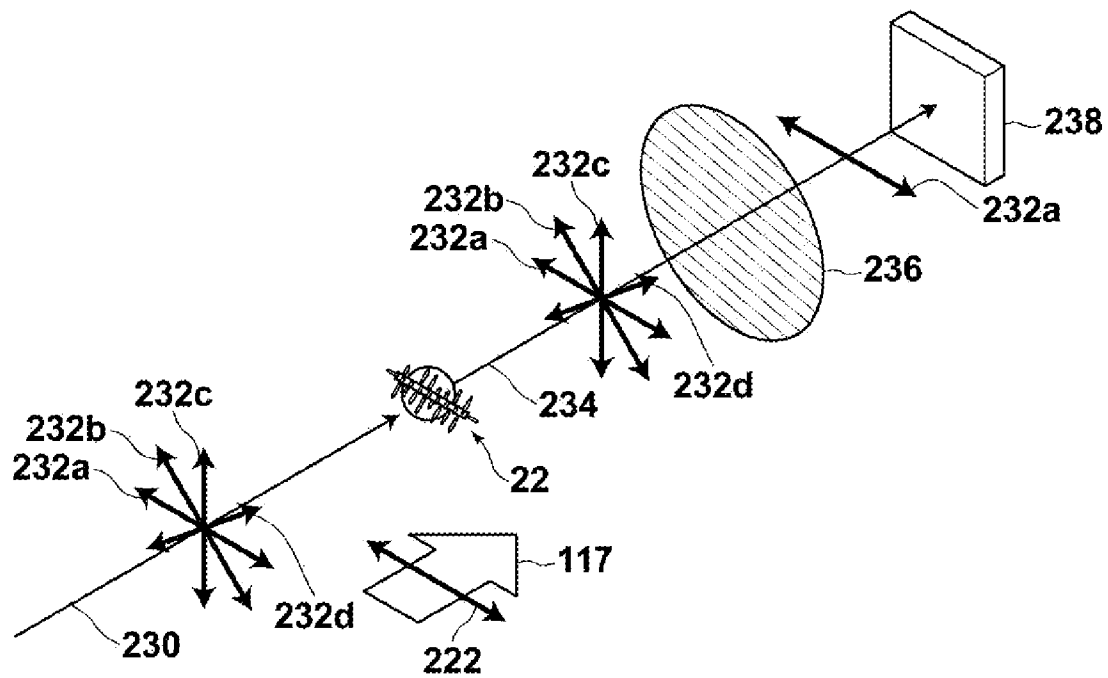
[図16A]



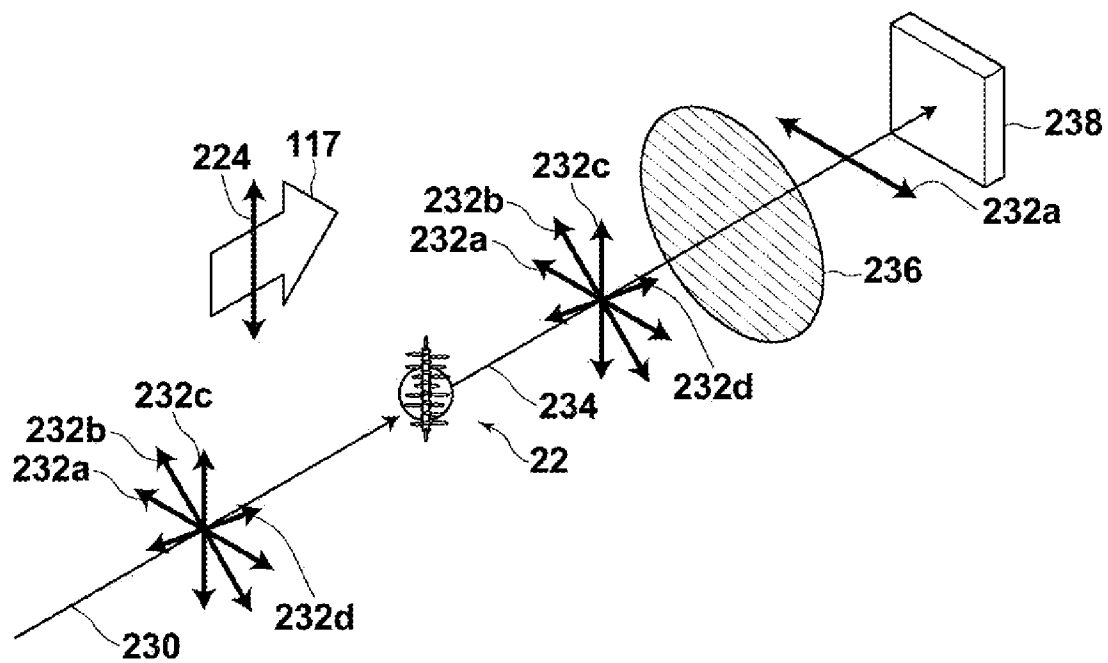
[図16B]



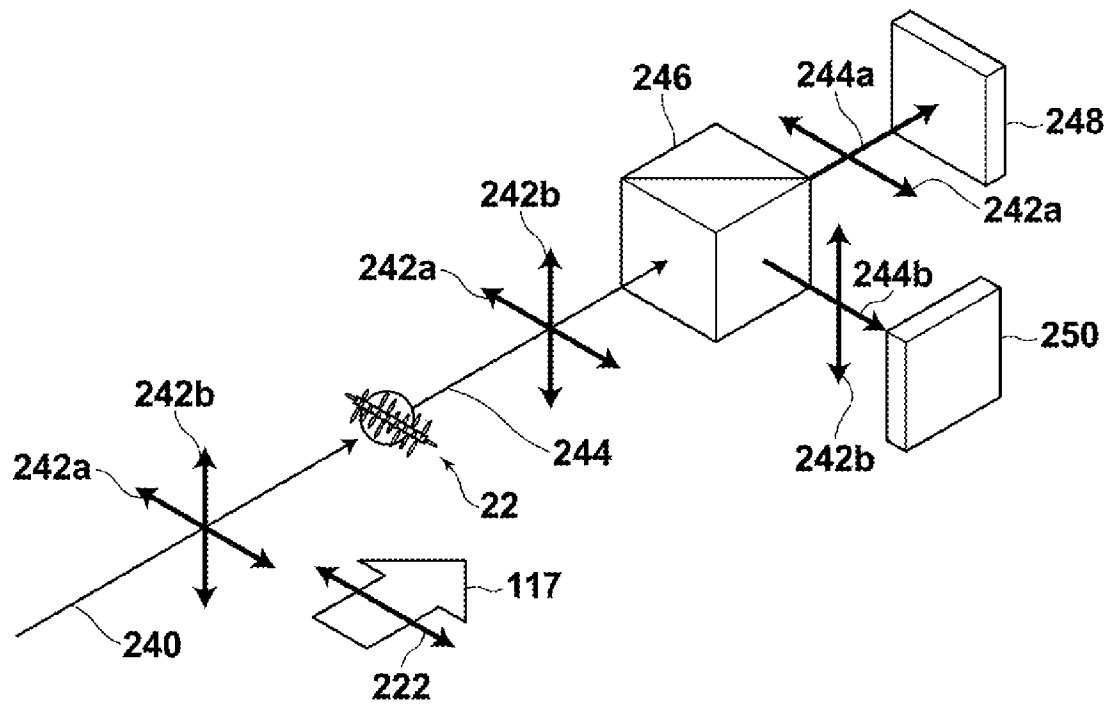
[図17A]



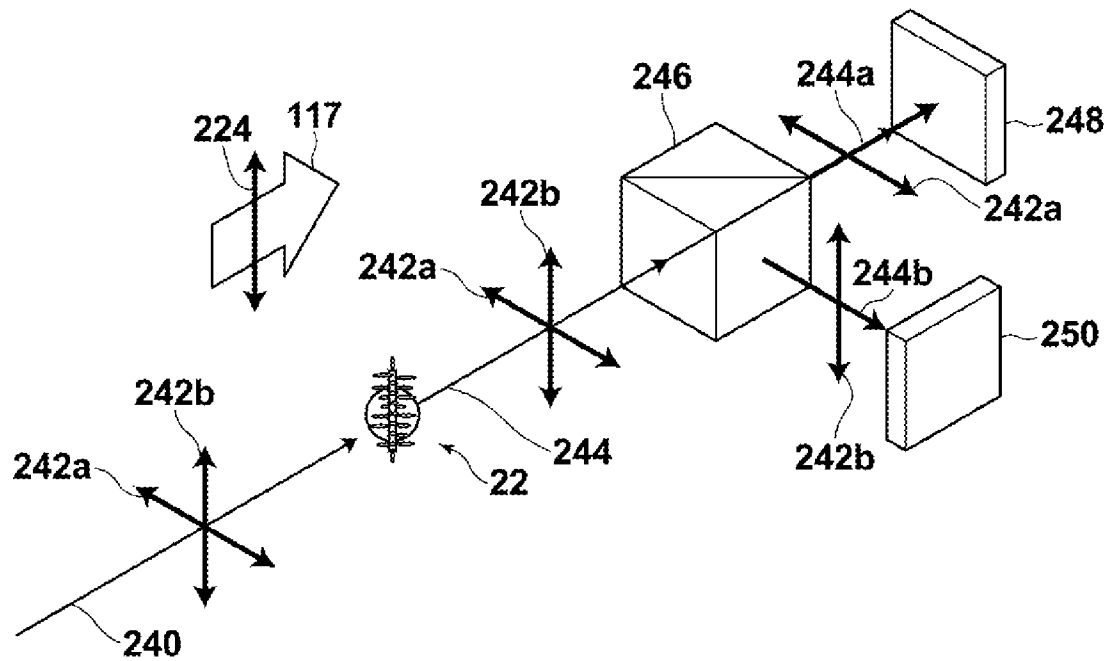
[図17B]



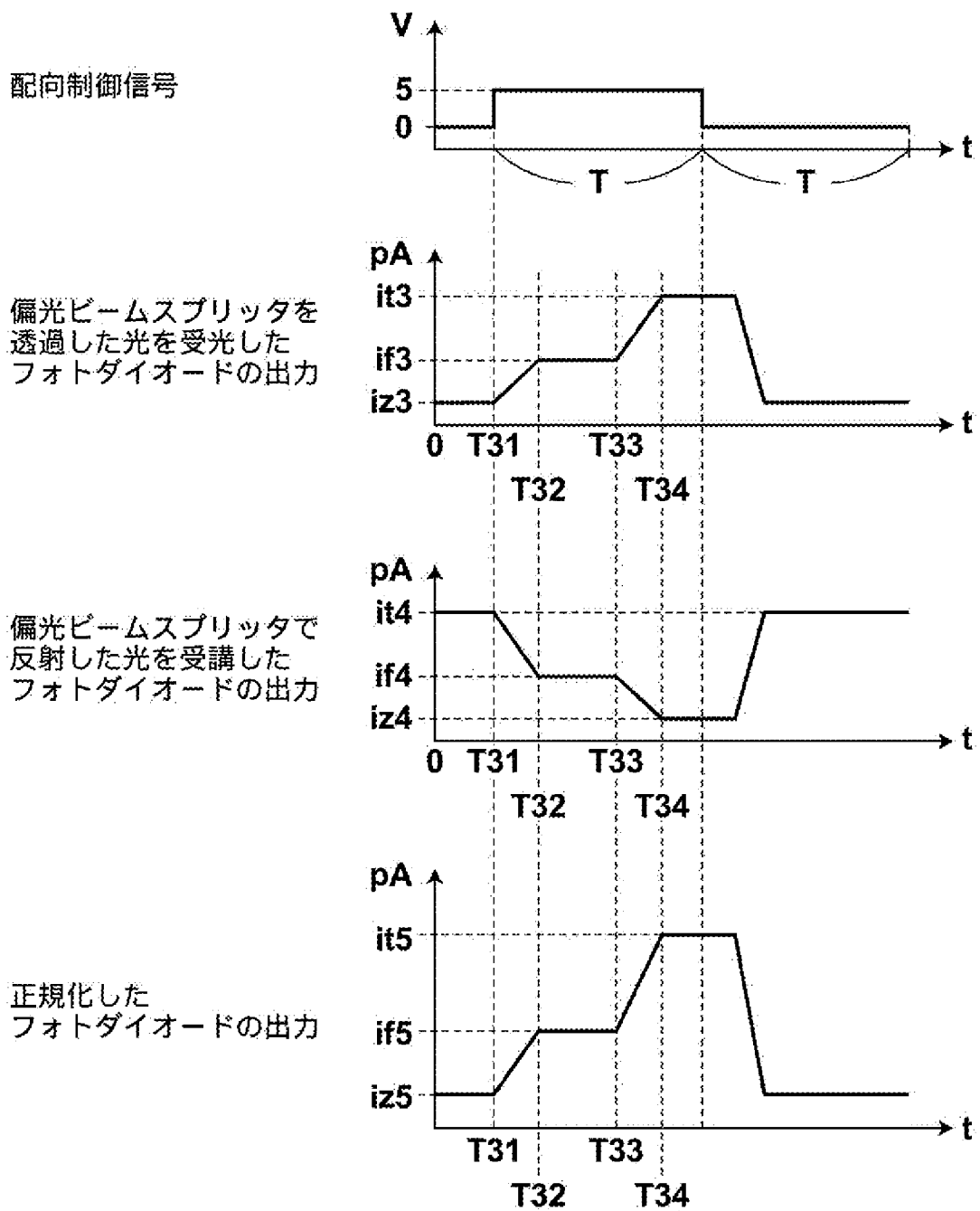
[図18A]



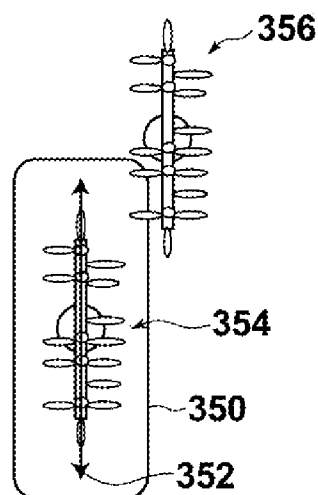
[図18B]



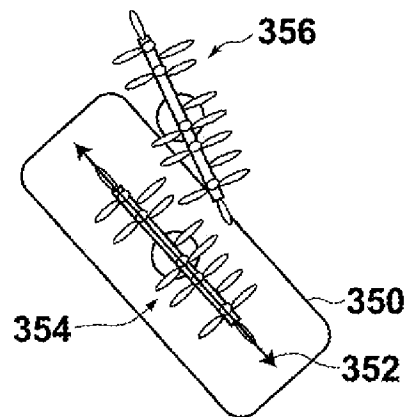
[図19]



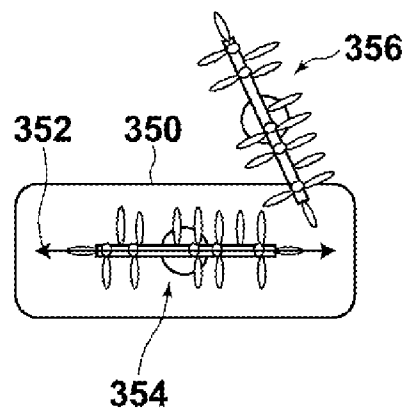
[図20A]



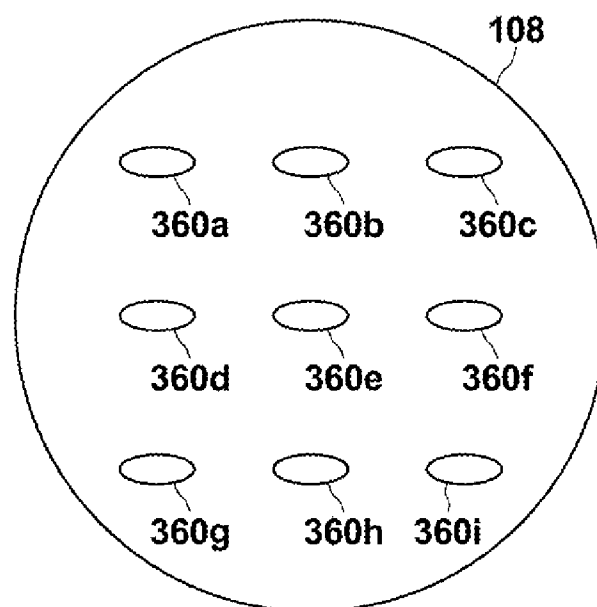
[図20B]



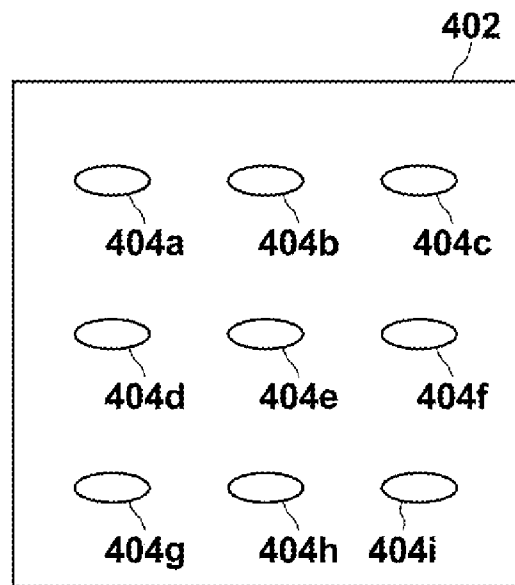
[図20C]



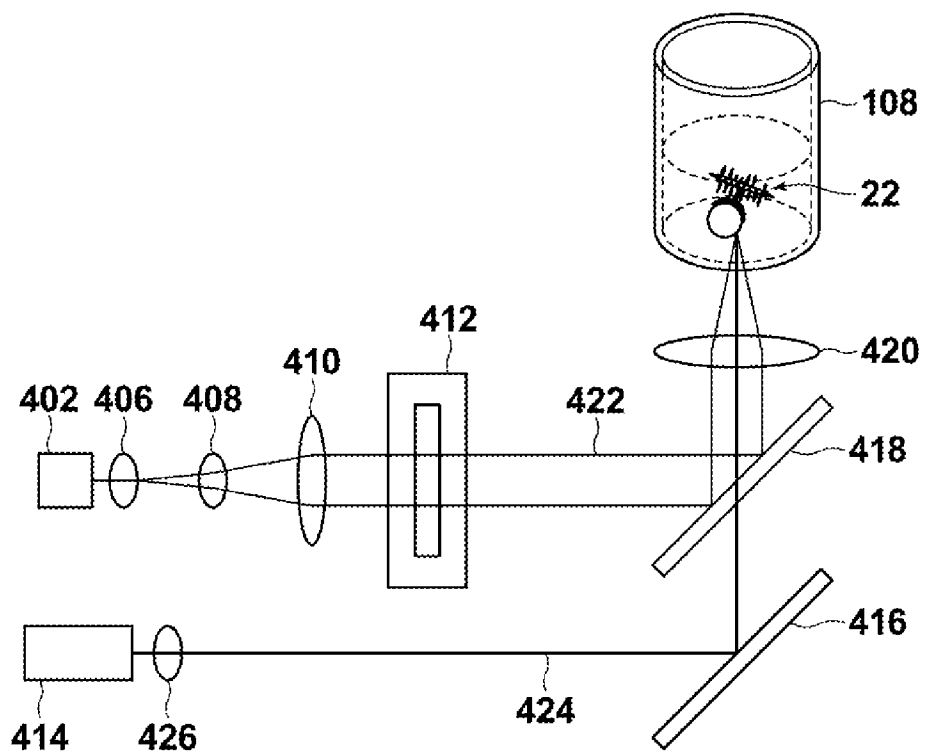
[図21]



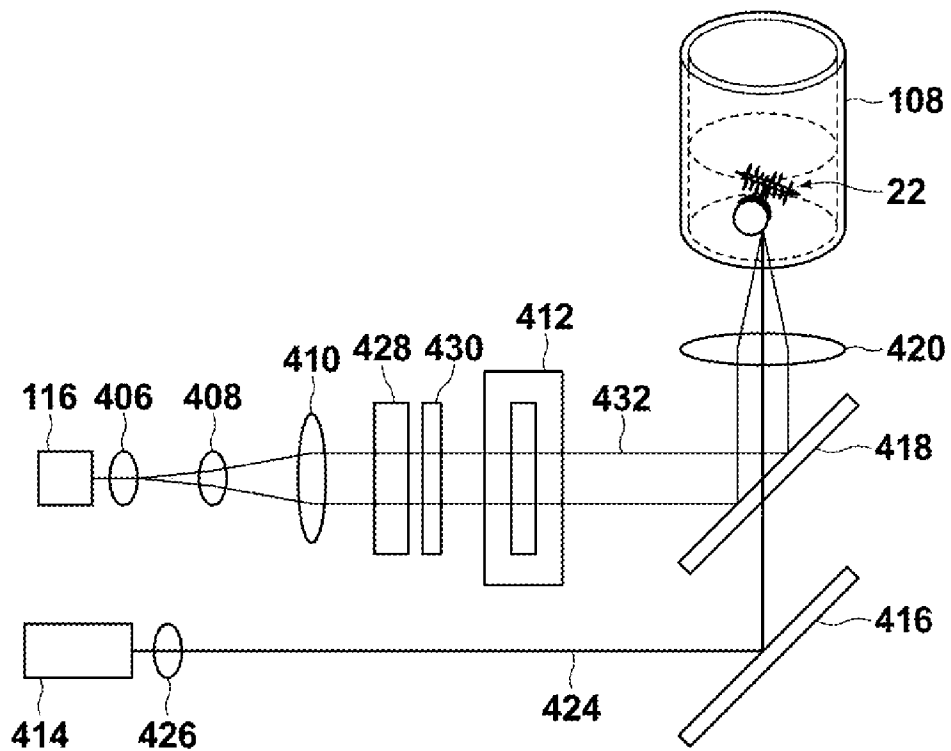
[図22]



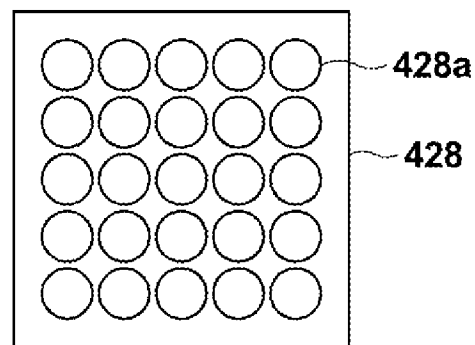
[図23]



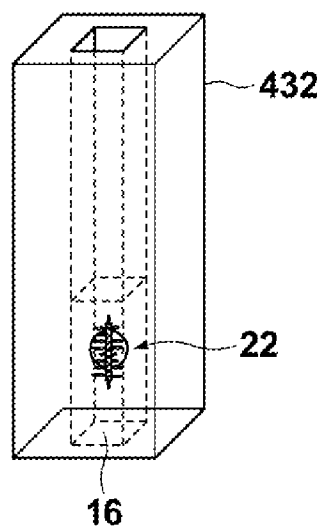
[図24]



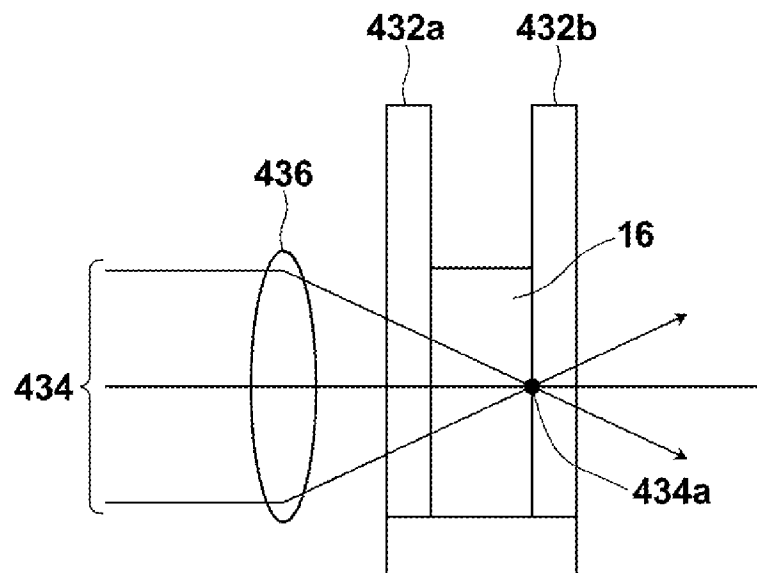
[図25]



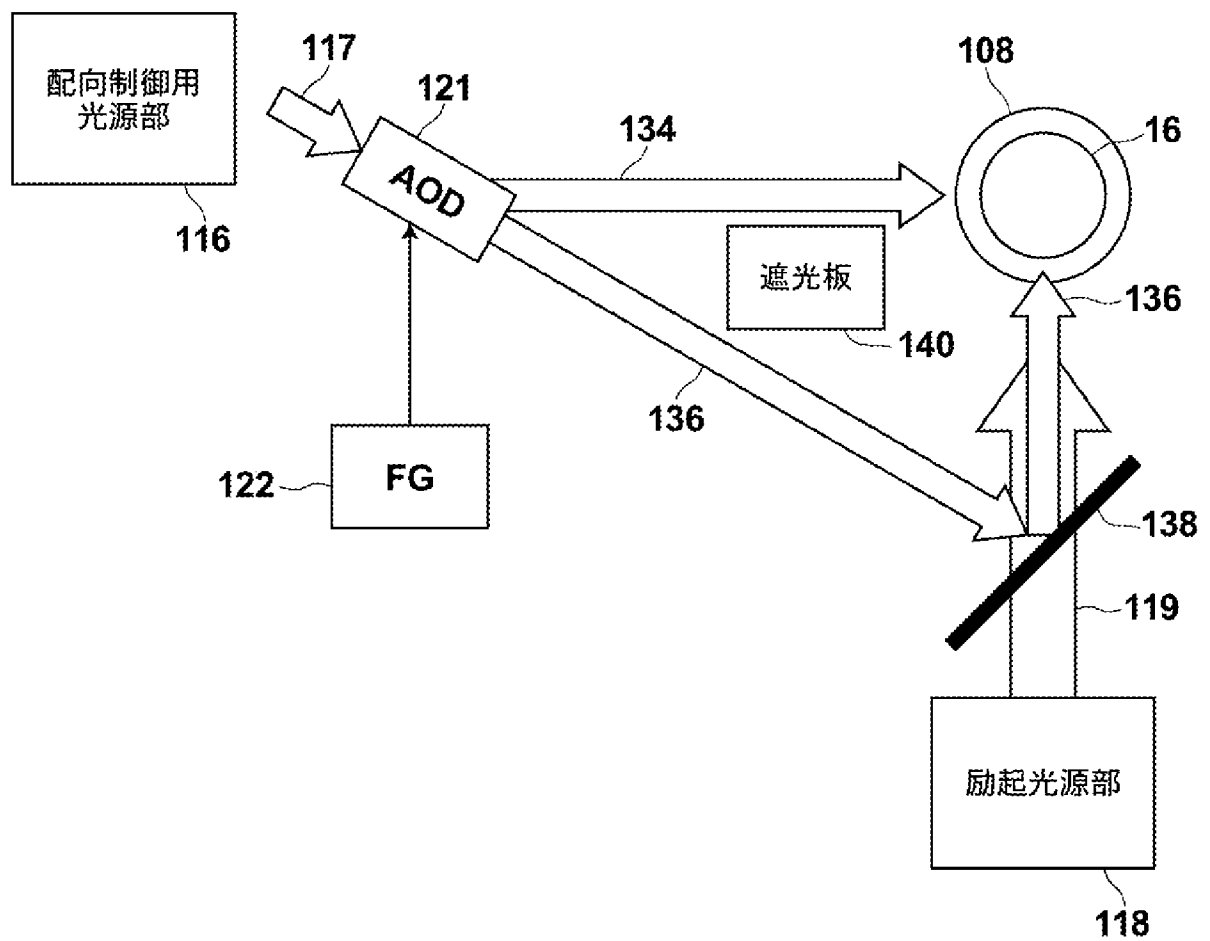
[図26]



[図27]



[図28]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/005490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64 (2006.01) i, G01N33/542 (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, G01N33/48-33/98

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.
A	JP 61-272637 A (Hitachi, Ltd.), 02 December 1986 (02.12.1986), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2003-315258 A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 06 November 2003 (06.11.2003), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2005-017282 A (Olympus Corp.), 20 January 2005 (20.01.2005), entire text; all drawings & US 2006/0109546 A1 & EP 1637871 A1 & WO 2004/106903 A1 & DE 602004031941 D & AT 503177 T	1-13

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

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 December, 2011 (15.12.11)Date of mailing of the international search report
27 December, 2011 (27.12.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/005490

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 62-038346 A (Hitachi, Ltd.), 19 February 1987 (19.02.1987), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2006-501860 A (Platypus Technologies, L.L.C.), 19 January 2006 (19.01.2006), entire text; all drawings & US 2005/0221271 A1 & EP 1549953 A & WO 2004/041061 A2 & CA 2486812 A & AU 2003299522 A	1-13
A	JP 2000-019172 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 21 January 2000 (21.01.2000), entire text; all drawings & US 6448018 B1 & EP 969279 A2 & DE 69912361 D	1-13
A	WO 2003/024586 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 27 March 2003 (27.03.2003), entire text; all drawings & JP 4257422 B & US 2004/0239854 A1 & EP 1426103 A2 & CN 1555290 A	1-13
A	Mann T L, Krull U J, Fluorescence polarization spectroscopy in protein analysis, Analyst, 2003.04, Vol.128, No.4, pp.313-317	1-13
A	Kazuaki NAGAYAMA et al., "Three-dimensional morphological analysis of mechanical response of MC3T3-E1 osteoblast-like cells cultured in collagen gel", Dai 19 Kai Proceedings of the Bioengineering Conference annual meeting of BED/JSME, 06 January 2007 (06.01.2007), pages 110 to 111	1-13

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, G01N33/542(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, G01N33/48-33/98,

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
A	JP 61-272637 A (株式会社日立製作所) 1986. 12. 02, 全文、全図（ファミリーなし）	1-13
A	JP 2003-315258 A (アイシン精機株式会社) 2003. 11. 06, 全文、全図（ファミリーなし）	1-13
A	JP 2005-017282 A (オリンパス株式会社) 2005. 01. 20, 全文、全図 & US 2006/0109546 A1 & EP 1637871 A1 & WO 2004/106903 A1 & DE 602004031941 D & AT 503177 T	1-13

☒ 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

1 5 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 7 . 1 2 . 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）

横尾 雅一

2 W

3 7 1 6

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	JP 62-038346 A (株式会社日立製作所) 1987. 02. 19, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2006-501860 A (プラティパス テクノロジーズ エルエルシー) 2006. 01. 19, 全文、全図 & US 2005/0221271 A1 & EP 1549953 A & WO 2004/041061 A2 & CA 2486812 A & AU 2003299522 A	1-13
A	JP 2000-019172 A (松下電器産業株式会社) 2000. 01. 21, 全文、全図 & US 6448018 B1 & EP 969279 A2 & DE 69912361 D	1-13
A	WO 2003/024586 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003. 03. 27, 全文、全図 & JP 4257422 B & US 2004/0239854 A1 & EP 1426103 A2 & CN 1555290 A	1-13
A	Mann T L , Krull U J, Fluorescence polarization spectroscopy in protein analysis, Analyst, 2003. 04, Vol. 128, No. 4, pp. 313-317	1-13
A	長山和亮、外 2 名, コラーゲンゲル内に培養した骨芽細胞様細胞の力学刺激に対する応答の 3 次元形態解析, 第 1 9 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2007. 01. 06, 第 1 1 0 頁ー第 1 1 1 頁	1-13