

(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11月22日(22.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/157403 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060814
- (22) 国際出願日: 2012年4月23日(23.04.2012)
- (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 2011-112365 2011年5月19日(19.05.2011) 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): 彼谷 高敏 (KAYA, Takatoshi) [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).
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反

田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階
Tokyo (JP).

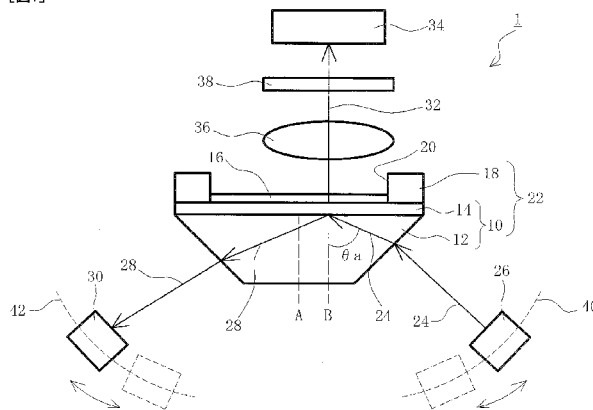
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

(54) 発明の名称: 表面プラズモン励起増強蛍光測定装置およびこれを用いた蛍光検出方法

[図1]



(57) Abstract: [Problem] To provide a surface plasmon-field enhanced fluorescence measurement device capable of accurately detecting a specific substance even when a well member is used and achieving a simpler structure and a lower manufacturing cost, and a fluorescence detection method using the same. [Solution] A surface plasmon-field enhanced fluorescence measurement device is provided with: a sensor structure configured from a sensor member provided with a dielectric member, a metallic thin film formed on the dielectric member, and a ligand immobilized region formed on the metallic thin film, and a well member affixed onto the sensor member and having a through-hole at a position corresponding to the ligand immobilized region; and a device body comprising at least a light source for applying excitation light to the metallic thin film of the sensor structure, and a light detection means for exciting a fluorescent substance held in the ligand immobilized region on the metallic thin film by applying the excitation light to the metallic thin film from the light source to enhance an electric field on the metallic thin film, and detecting fluorescence thus excited, and the sensor structure is configured so as to be used attachably to and detachably from the device body or so as to be used while affixed to the device body. The application position of the excitation

[続葉有]



WO 2012/157403 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

light is set such that the center of the optical axis of the excitation light is located at a position a predetermined distance away from the position of the center of gravity of a bottom surface region defined by the through-hole of the well member of the sensor structure.

(57) 要約: [課題] ウェル部材を用いても特定物質を精度良く検出することができ、構造を簡素化して製造コストを抑えることのできる表面プラズモン励起増強蛍光測定装置およびこれを用いた蛍光検出方法を提供すること。 [解決手段] 誘電体部材と、前記誘電体部材上に形成された金属薄膜と、前記金属薄膜上に形成されたリガンド固定領域と、を備えたセンサ部材と、前記センサ部材上に固定され前記リガンド固定領域と対応する位置に貫通穴を有するウェル部材と、から成るセンサ構造体と、前記センサ構造体の金属薄膜に向かって励起光を照射する光源と、前記光源より前記金属薄膜に励起光を照射し、前記金属薄膜上の電場を増強させて前記金属薄膜上の前記リガンド固定領域に保持された蛍光物質を励起させ、これにより励起された蛍光を検出する光検出手段と、を少なくとも有する装置本体と、を備え、前記センサ構造体が、前記装置本体に対して着脱されて使用される、または前記装置本体に対して固定されて使用されるよう構成された表面プラズモン励起増強蛍光測定装置であって、前記センサ構造体のウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から所定距離離れた位置に、前記励起光の光軸中心が位置するよう前記励起光の照射位置が設定されている。

明 細 書

発明の名称：

表面プラズモン励起増強蛍光測定装置およびこれを用いた蛍光検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS；Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy）の原理に基づいた表面プラズモン励起増強蛍光測定装置およびこの表面プラズモン励起増強蛍光測定装置を用いた蛍光検出方法に関する。

背景技術

[0002] 従来から、ナノメートルレベルなどの微細領域中で電子と光とが共鳴することにより、高い光出力を得る現象（表面プラズモン共鳴（SPR；Surface Plasmon Resonance）現象）を応用し、例えば生体内の極微少なアナライトの検出を行うようにした表面プラズモン共鳴装置（以下SPR装置ともいう）が用いられている。

[0003] このようなSPR装置100は、図12に示したように、誘電体部材102の上面に金属薄膜104が形成されており、この金属薄膜104上にリガンド固定領域106を有するリガンド含有層108が配設されて成るセンサ構造体110を備えている。

[0004] さらに、センサ構造体110の誘電体部材102側には、金属薄膜104に向かって励起光112を照射する光源114を備え、さらに光源114から照射され、金属薄膜104で反射した反射光116を受光する受光手段118が備えられている。

[0005] そして、SPR装置100の使用において、まず金属薄膜104上のリガンド固定領域106にリガンドを固定しておき、ここに特定のアナライトを含んだ試料溶液を供給する。

[0006] さらにこの状態で、誘電体部材102の下方より金属薄膜104に向かって励起光112を共鳴角 θ_1 で照射し、金属薄膜104に反射した反射光1

16を受光手段118で受光する。

[0007] 金属薄膜104に向かって共鳴角 θ 1で励起光112を照射すると、金属薄膜104上に粗密波（表面プラズモン）が生じ、励起光112と金属薄膜104中の電子振動とがカップリングして、反射光116の光量減少が生ずる。

[0008] この現象は、アナライトの有無によって共鳴角 θ 1が変わるため、アナライトを含まない試料溶液をリガンド固定領域106に供給したときの共鳴角 θ 1を予め調べておくことで、この時の共鳴角 θ 1と異なった場合に所定のアナライトを有すると判断することができる。

[0009] これにより、所定のアナライトが試料溶液中に含有されているか否かを知ることができる。

一方、このような表面プラズモン共鳴（SPR）現象を応用した表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS）の原理に基づき、SPR装置100よりもさらに高精度にアナライトの検出を行えるようにした表面プラズモン励起増強蛍光測定装置（以下、SPFS装置ともいう）も開発されている。

[0010] このようなSPFS装置200は、図13に示したように、まず誘電体部材202の上面に金属薄膜204が形成されており、さらにこの金属薄膜204上にリガンド固定領域206を有するリガンド含有層208が配設されて成るセンサ構造体210を備えている。

[0011] そして、センサ構造体210の誘電体部材202側には、金属薄膜204に向かって励起光212を照射する光源214と、光源214から照射され金属薄膜204で反射した反射光216を受光する受光手段218が設けられている。

[0012] 一方、センサ構造体210のリガンド含有層208側には、リガンド固定領域206で捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質が発する蛍光220を受光する光検出手段222が設けられている。

[0013] なお、リガンド含有層208と光検出手段222との間には、蛍光220を効率よく集めるための集光部材224と、蛍光220以外に含まれる光を

除去し、必要な蛍光 220 のみを選択する波長選択機能部材 226 が設けられている。

[0014] そして、SPFS装置 200の使用においては、まず金属薄膜 204 上のリガンド固定領域 206 にリガンドを固定しておき、このリガンドに蛍光物質で標識されたアナライトが捕捉された状態とする。

[0015] そしてこの状態で、光源 214 より誘電体部材 202 内に励起光 212 を照射し、この励起光 212 が共鳴角 $\theta 2$ で金属薄膜 204 に入射することで、金属薄膜 204 上に粗密波（表面プラズモン）を生じさせる。

[0016] なお、金属薄膜 204 上に粗密波（表面プラズモン）が生ずる際には、励起光 212 と金属薄膜 204 中の電子振動とがカップリングし、反射光 216 の光量減少が生ずるため、受光手段 218 で受光される反射光 216 のシグナルが変化（光量が減少）する地点を見つければ、粗密波（表面プラズモン）が生ずる共鳴角 $\theta 2$ を得ることができる。

[0017] この粗密波（表面プラズモン）を生ずる現象により、金属薄膜 204 上のリガンド固定領域 206 の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 220 の光量が増大することとなる。

[0018] この増大した蛍光 220 を、集光部材 224 および波長選択機能部材 226 を介して光検出手段 222 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。

[0019] 近年、SPR装置 100 や SPFS装置 200 では、更なる精度向上に向けた技術開発が盛んに行われている。

ところで、SPR装置 100 のリガンド固定領域 106 や SPFS装置 200 のリガンド固定領域 206 へ試料溶液を供給する方法としては、例えば流路を用いて送液する供給方法が知られている。

[0020] 図 14 に示したセンサ構造体 300 は、金属薄膜 304 上のリガンド固定領域 306 が横形流路 308 の途中に配置されており、横形流路 308 内のリガンド固定領域 306 にリガンドを固定した後、横形流路 308 内に特定物質（アナライト）を含有した試料溶液 310 を送液することで、リガンド

固定領域 306 にアナライトが捕捉されるようになっている。なお、図中の符号 302 は誘電体部材である。

[0021] このような横形流路 308 を備えたセンサ構造体 300 では、試料溶液 310 を、一方向送液ポンプを用いて循環させたり、往復送液ポンプを用いて往復送液させたりすることにより、リガンド固定領域 306 のいずれの箇所においても特定物質の反応が生じるように工夫されている。

[0022] 一方、SPR装置 100 においてリガンド固定領域 106 へ試料溶液を供給する別の方法としては、試料溶液を貯める方法も知られている。

特許文献 1 に開示されたセンサ構造体 400 では、図 15 に示したように金属薄膜 404 上のリガンド固定領域 406 の上に、複数の貫通穴 410 を有するウェル部材 408 を配設し、各貫通穴 410 内に試料溶液 412 を供給して貯留させることで、貫通穴 410 内のリガンド固定領域 406 にアナライトが捕捉されるようにしている。

[0023] この方法は、流路を用いて送液を行う方法のように送液ポンプを用意する必要がないため、流路を用いた場合よりも構造を簡素化できる利点がある。

先行技術文献

特許文献

[0024] 特許文献 1：特許第 3743541 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0025] ところで、上記したようなウェル部材を備えたセンサ構造体を SPFS 装置でも使い、試料溶液を貯めて蛍光測定を行うようにすれば、SPR 装置と同様に構造を簡素化でき、製造コストを抑えることができると考えられる。

[0026] しかしながら、ウェル部材を用いて試料溶液を貯める方法では、試料溶液の流れがウェル部材の貫通穴内で生じ難く、検出対象となる特定物質が極微量の場合、特定物質が確実にリガンド固定領域のリガンドに捕捉されない場合があった。

[0027] 特にこのことはSPR装置よりもさらに高精度が要求されるSPFS装置にとって致命的な問題であり、この問題がSPFS装置においてウェル部材を備えたセンサ構造体の使用を困難にさせている要因の一つとなっている。

[0028] 本発明は、このような現状に鑑み、ウェル部材を備えたセンサ構造体を用いても特定物質を精度良く検出することができ、流路を用いた送液方法よりも構造を簡素化して製造コストを抑えることのできる表面プラズモン励起増強蛍光測定装置およびこれを用いた蛍光検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0029] 本発明は、前述したような従来技術における課題及び目的を達成するために発明されたものであって、

本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、

誘電体部材と、前記誘電体部材上に形成された金属薄膜と、前記金属薄膜上に形成されたりガンド固定領域と、を備えたセンサ部材と、前記センサ部材上に固定され前記リガンド固定領域と対応する位置に貫通穴を有するウェル部材と、から成るセンサ構造体と、

前記センサ構造体の金属薄膜に向かって励起光を照射する光源と、前記光源より前記金属薄膜に励起光を照射し、前記金属薄膜上の電場を増強させて前記金属薄膜上の前記リガンド固定領域に保持された蛍光物質を励起させ、これにより励起された蛍光を検出する光検出手段と、を少なくとも有する装置本体と、

を備え、

前記センサ構造体が、前記装置本体に対して着脱されて使用される、または前記装置本体に対して固定されて使用されるよう構成された表面プラズモン励起増強蛍光測定装置であって、

前記センサ構造体のウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から所定距離離間した位置に、前記励起光の光軸中心が位置するよう前記励起光の照射位置が設定されていることを特徴とする。

[0030] このように励起光の照射位置を変えれば特定物質を精度良く検出することができる。しかもウェル部材を備えたセンサ構造体は、流路やポンプなどの送液手段を必要としないので、装置にかかる製造コストを抑えることができる。

[0031] さらに本発明の蛍光検出方法は、

誘電体部材と、前記誘電体部材上に形成された金属薄膜と、前記金属薄膜上に形成されたりガンド固定領域と、を備えたセンサ部材と、前記センサ部材上に固定され、前記リガンド固定領域と対応する位置に貫通穴を有するウェル部材と、から成るセンサ構造体の前記リガンド固定領域に固定されたりガンドにアナライトを捕捉させ、さらに前記アナライトを蛍光物質で標識する工程と、

前記アナライトを蛍光物質で標識した状態で、前記センサ構造体の金属薄膜に前記誘電体部材側から励起光を照射して、前記蛍光物質を励起させる工程と、

励起された蛍光を光検出手段にて測定する工程と、

を少なくとも有する蛍光検出方法であって、

前記蛍光物質を励起させる工程において、

前記センサ構造体のウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から所定距離離間した位置に、前記励起光の光軸中心が位置するよう前記励起光が照射されることを特徴とする。

このような蛍光検出方法であれば、特定物質を精度良く検出することができる。

[0032] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、

前記励起光の照射位置が、

前記ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から前記貫通穴の外形端までの最短距離を100%とした場合、前記重心位置から1～75%の範囲で離間した位置であることを特徴とする。

[0033] さらに本発明の蛍光検出方法は、

前記蛍光物質を励起させる工程において、

前記励起光の照射位置が、

前記ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から前記貫通穴の外形端までの最短距離を100%とした場合、前記重心位置から1～75%の範囲で離間した位置であることを特徴とする。

このような範囲に励起光の照射位置を規定すれば、精度良く特定物質を検出することができる。

[0034] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、
前記センサ構造体は、攪拌されて使用されることを特徴とする。

[0035] さらに本発明の蛍光検出方法は、
前記アナライトを蛍光物質で標識する工程において、
前記センサ構造体は、攪拌されることを特徴とする。

[0036] このように攪拌がなされれば、貫通穴内に試料溶液を供給した際に、アナライトを確実にリガンド固定領域のリガンドに捕捉させることができる。したがって、精度良く特定物質を検出することができる。

[0037] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、
前記ウェル部材の前記貫通穴には、前記貫通穴の底に向かって次第に径が小さくなる逆テーパが付されていることを特徴とする。

このように貫通穴が構成されていれば、蛍光検出の際に放射状に生ずる蛍光を確実に集光することができる。したがって、精度良く特定物質を検出することができる。

[0038] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、
前記ウェル部材の前記貫通穴の形状が、点対称な形状であることを特徴とする。

[0039] このような形状であれば、貫通穴内に試料溶液を貯めた際に貫通穴内で試料溶液の流れを生じ易くすることができ、アナライトを確実にリガンド固定領域のリガンドに捕捉させることができる。したがって、精度良く特定物質を検出することができる。

[0040] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、前記リガンド固定領域に固定されるリガンドが1種類であることを特徴とする。

このように構成すれば、1種類のアナライトを検出することができる。

[0041] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、前記リガンド固定領域に固定されるリガンドが複数種類であることを特徴とする。

このように構成すれば、同一条件での検査や多項目検査、さらにはリファレンスなどを1つのセンサ構造体で行うことができる。

[0042] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、前記ウェル部材には、前記貫通穴が1つ設けられていることを特徴とする。

このように貫通穴が1つであれば、加工が容易であり、リガンド固定領域の高い位置決め精度も要求されないのでセンサ構造体の製造を容易に行うことができる。

[0043] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、前記ウェル部材には、前記貫通穴が複数設けられていることを特徴とする。

このように貫通穴が複数有れば、同一条件での検査や多項目検査、さらにはリファレンスなどを1つのセンサ構造体で行うことができる。

[0044] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、前記センサ構造体と前記光源とを、相対的に移動させて調整する位置調整手段を有することを特徴とする。

[0045] このように構成すれば、ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置に対して離間した位置に励起光を照射する際に、正確な位置調整を容易に行うことができる。

[0046] さらに貫通穴を複数有するセンサ構造体や複数種類のリガンドが固定されたセンサ構造体を用いた場合には、同一条件での検査や多項目検査、さらに

はりファレンスなどを効率良く進めることができる。

[0047] また、本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置は、
前記ウェル部材の前記貫通穴の内壁面に、非特異吸着防止用の表面処理が施されていることを特徴とする。

[0048] このように構成されていれば、貫通穴内に試料溶液を供給した際に、貫通穴の内壁面に試料溶液中の検体（アナライト）が吸着し難くなるため、試料溶液中の特定物質が貫通穴底面に位置するリガンド固定領域で捕捉される条件が高まり、結果として検出精度を向上させることができる。

発明の効果

[0049] 本発明によれば、ウェル部材を備えたセンサ構造体を用いても、特定物質を精度良く検出することができ、しかも構造が簡単であるため、製造コストを抑えることのできる表面プラズモン励起増強蛍光測定装置およびこれを用いた蛍光検出方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0050] [図1]図1は、本発明のSPFS装置の概略図である。

[図2]図2は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体の斜視図である。

[図3]図3は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、励起光の照射位置を説明するための概略図である。

[図4]図4は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、励起光の照射位置を説明するための上面図である。

[図5]図5は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、ウェル部材の貫通穴内に位置するリガンド含有層の反応量の分布を示したグラフである。

[図6]図6は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、ウェル部材の貫通穴に付された逆テーパーについて説明するための概略図である。

[図7]図7は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、ウ

エル部材の貫通穴の形状を説明するための上面図である。

[図8]図8は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、複数種類のリガンドを1つの貫通穴内に位置するリガンド固定領域に固定した状態を説明するための上面図である。

[図9]図9は、本発明のSPFS装置で用いられるセンサ構造体において、複数の貫通穴内のそれぞれの貫通穴内に位置するリガンド固定領域に、それぞれ異なる種類のリガンドを固定した状態を説明するための上面図である。

[図10]図10は、本発明のSPFS装置で用いられる別の実施例におけるセンサ構造体の概略図である。

[図11]図11は、実施例1～3のセンサ構造体において、ウェル部材の貫通穴内に位置するリガンド含有層の反応量の分布を示したグラフである。

[図12]図12は、従来のSPR装置の概略図である。

[図13]図13は、従来のSPFS装置の概略図である。

[図14]図14は、従来のセンサ構造体において、リガンド固定領域へ試料溶液を供給する方法として流路を用いた供給方法について説明するための概略図である。

[図15]図15は、従来のセンサ構造体において、リガンド固定領域へ試料溶液を供給する方法としてウェル部材を用いた供給方法について説明するための概略図である。

発明を実施するための形態

[0051] 以下、本発明の実施の形態について、図面に基づいてより詳細に説明する。

本発明の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置（SPFS装置）は、リガンド固定領域に固定されたりガンドに捕捉されたアナライトを標識した蛍光物質を、確実に励起させて高感度に蛍光検出を行うものである。

[0052] また、本明細書中でいう「表面プラズモン」とは、広義の意味で用いられるものであって、「局在プラズモン」も含まれるものである。

さらに「ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域」とは、貫通穴

の金属薄膜側の開口端で区画された領域のことである。

[0053] 本発明のSPFS装置1は、図1に示したように、まず誘電体部材12と、誘電体部材12の上面に形成された金属薄膜14と、金属薄膜14上面に検出対象となるアナライトと特異的に吸着するリガンドを固定するためのリガンド固定領域16と、を備えたセンサ部材10を有し、このセンサ部材10の上に、リガンド固定領域16と対応する位置に貫通穴20を有するウェル部材18が固定されたセンサ構造体22が備えられている。

[0054] このようなセンサ構造体22は、例えば誘電体部材12の上面に金属薄膜14を成膜した後、金属薄膜14の全面にリガンドを固定しておき、この状態で金属薄膜14上にウェル部材18を固定することで製造できる。

[0055] この製造方法はウェル部材18を固定する前に、既にリガンドを金属薄膜14上のリガンド固定領域16に固定化しているので、ウェル部材18の貫通穴20の内壁面にリガンドが付かず、検出効率を高める上で好ましい。また金属薄膜14の全面にリガンドを固定するので、リガンドを固定化する際に、リガンドの固定をリガンド固定領域16のみに制限するための別部材を用いる必要がなく簡易な製造ができる。

[0056] なお、リガンドを必ずしも金属薄膜14上の全面に固定する必要がないことは勿論であり、リガンド固定領域16と同一の領域、或いはリガンド固定領域16を含み、それよりも僅かに広い領域に固定することもできる。この場合には、ウェル部材18と異なる枠部材を用いてリガンドを金属薄膜14上に固定化することが好ましい。

[0057] このようにウェル部材18の貫通穴20で規定される底面領域の全域にわたりリガンドを固定することが、非特異吸着を防止してノイズを低減する上では好ましい。

また別の製造方法として、誘電体部材12の上面に金属薄膜14を成膜した後、金属薄膜14上に、予め貫通穴20の内壁面に非特異吸着防止用の表面処理を施したウェル部材18を配設し、貫通穴20内にリガンドを含有した溶液を注入することで、貫通穴20の底面に位置する金属薄膜14の上に

のみリガンドを固定化させるようにしても良い。

[0058] なお貫通穴20の内壁面に施された表面処理については、公知の処理方法を用いることができ、例えばBSAやカゼインなどのタンパク質を含有した溶液やリン脂質類似合成ポリマー（日油株式会社）を含んだ溶液を用いれば、非特異吸着を効果的に防止することができる。

[0059] またセンサ構造体22は、図2に示したように誘電体部材12が断面略台形形状の六面体（截頭四角錐形状）であり、ウェル部材18が誘電体部材12の形状に合わせて方形に構成されている。

[0060] なお、誘電体部材12の形状は図2に示した形態に限定されるものではなく、例えば四角錐，円錐，三角錐，多角錐などの角錐形状、または截頭角錐形状などであっても良いものである。

[0061] 図2に示したような截頭四角錐形状の誘電体部材12を用いた場合には、センサ構造体22の高さを低く抑えることができ、SPFS装置1の小型化に寄与することができる。

そして、センサ構造体22の誘電体部材12側には、誘電体部材12内に入射され、金属薄膜14に向かって励起光24を照射する光源26を備え、さらに光源26から照射され金属薄膜14に反射した反射光28を受光する受光手段30が備えられている。

[0062] ここで光源26および受光手段30には、照射位置や受光位置を調整するための位置調整手段40，42が設けられている。

光源26から照射される励起光24としてはレーザ光が好ましく、波長200～900nm、0.001～1,000mWのLDレーザ、または波長230～800nm、0.01～100mWの半導体レーザが好適である。

[0063] 一方、センサ構造体22のウェル部材18側には、リガンド固定領域16で生じた蛍光32を受光するための光検出手段34が設けられている。

光検出手段34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。

[0064] また、センサ構造体22のリガンド固定領域16と光検出手段34との間

には、光を効率よく集光するための集光部材 36 と、光の内で蛍光 32 のみを選択するように形成された波長選択機能部材 38 が設けられており、これにて装置本体を構成している。

[0065] なお、図 1 に示した S P F S 装置 1 は、センサ構造体 22 が装置本体に対して着脱されて使用されるような形態を意図しているが、このような形態に限定されるものではなく、センサ構造体 22 が装置本体に対して固定されて使用されるような形態であっても良いものである。

[0066] ここで集光部材 36 としては、蛍光シグナルを効率よく集光するものであれば、任意の集光系を用いることができる。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することができる。対物レンズの倍率としては、10～100倍が好ましい。

[0067] 一方、波長選択機能部材 38 としては、光学フィルタ、カットフィルタなどを用いることができる。

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。

[0068] 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、センサ構造体 22 の面に付着した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。

[0069] このようにして構成される S P F S 装置 1 を用いて蛍光を検出する方法としては、まずセンサ構造体 22 の金属薄膜 14 上のリガンド固定領域 16 に検出対象となるアナライトと特異的に吸着するリガンドを固定した状態で検出対象となるアナライトを含んだ試料溶液を貫通穴 20 内に供給し、センサ構造体 22 を攪拌する。

[0070] ここでリガンド固定領域 16 へのリガンドの固定は、蛍光検出を行う前から予め行っておくことが蛍光検出に要する時間を少なくする上で好ましいが、特にこれに限定されるものではなく、蛍光検出の直前に行っても良いもの

である。

- [0071] さらに貫通穴 20 内を洗浄した後、検体（アナライト）に捕捉される蛍光物質を含んだ溶液を貫通穴 20 内に供給し攪拌した後、再度貫通穴 20 内を洗浄する。これにより蛍光物質で標識されたアナライトがリガンドに捕捉された状態となる。
- [0072] この状態で、光源 26 より金属薄膜 14 に励起光 24 を照射し、この励起光 24 が特定の角度（共鳴角（電場増強時に励起光 24 と金属薄膜 14 の垂線とから成る角度） θa ）で金属薄膜 14 に入射することで、金属薄膜 14 上に粗密波（表面プラズモン）を生ずるようになる。
- [0073] なお、金属薄膜 14 上に粗密波（表面プラズモン）が生ずる際には、励起光 24 と金属薄膜 14 中の電子振動とがカップリングし、反射光 28 のシグナルが変化（光量が減少）することとなるため、受光手段 30 で受光される反射光 28 のシグナルが変化（光量が減少）する地点を見つければ、粗密波（表面プラズモン）が生ずる共鳴角 θa を得ることができる。
- [0074] そして、この粗密波（表面プラズモン）により、金属薄膜 14 上のリガンド固定領域 16 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 32 の光量が増大し、この蛍光 32 を集光部材 36 および波長選択機能部材 38 を介して光検出手段 34 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。
- [0075] なお、センサ構造体 22 の金属薄膜 14 の材質としては、好ましくは金、銀、アルミニウム、銅、および白金からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属からなり、より好ましくは金からなり、さらにこれら金属の合金から成ることである。このような金属は、酸化に対して安定であり、かつ粗密波（表面プラズモン）による電場増強が大きくなることから金属薄膜 14 に好適である。
- [0076] また、金属薄膜 14 の形成方法としては、例えばスパッタリング法、蒸着法（抵抗加熱蒸着法、電子線蒸着法など）、電解メッキ、無電解メッキ法などが挙げられる。中でもスパッタリング法、蒸着法は、薄膜形成条件の調整

が容易であるため好ましい。

[0077] さらに金属薄膜14の厚さとしては、金：5～500nm、銀：5～500nm、アルミニウム：5～500nm、銅：5～500nm、白金：5～500nm、およびそれらの合金：5～500nmの範囲内であることが好ましい。電場増強効果の観点からは、金：20～70nm、銀：20～70nm、アルミニウム：10～50nm、銅：20～70nm、白金：20～70nm、およびそれらの合金：10～70nmの範囲内であることがより好ましい。

[0078] 金属薄膜14の厚さが上記範囲内であれば、粗密波（表面プラズモン）が発生し易く好適である。また、このような厚さを有する金属薄膜14であれば、大きさ（縦×横）は特に限定されないものである。

[0079] さらに、アナライト検出時に用いられる検体としては、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液、唾液、便、体腔液（髄液、腹水、胸水等）などが挙げられる。

また、検体中に含有されるアナライトは、例えば、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）、タンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む。）、糖質（オリゴ糖、多糖類、糖鎖等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などが挙げられ、具体的には、AFP（ α フェトプロテイン）等のがん胎児性抗原や腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモンなどであってもよく、特に限定されない。

[0080] さらに蛍光物質としては、所定の励起光24を照射するか、または電界効果を利用することで励起し、蛍光32を発する物質であれば特に限定されないものである。なお本明細書でいう蛍光32とは、燐光など各種の発光も含まれるものである。

[0081] また、誘電体部材12としては、光学的に透明な各種の無機物、天然ポリマー、合成ポリマーを用いることができ、化学的安定性、製造安定性および

光学的透明性の観点から、二酸化ケイ素 (SiO_2) または二酸化チタン (TiO_2) を含むことが好ましい。

[0082] さらにウェル部材 18 としては、合成樹脂、金属、セラミックスなど種々の材料を用いることができ、例えば機械加工で貫通穴 20 を設けることができる。

また、センサ部材 10 上にウェル部材 18 を固定する際には、誘電体部材 12 と同じ光屈折率を有する接着剤、マッチングオイル、透明粘着シートなどを用いることが好ましい。

[0083] さらにウェル部材 18 の貫通穴 20 の大きさとしては、例えば $80 \sim 100 \mu\text{m}$ の容量となるように設定することが好ましい。

また、このような SPFS 装置 1 は、光源 26 から金属薄膜 14 に照射される励起光 24 による表面プラズモン共鳴の最適角 (共鳴角 θ_a) を調整するため、角度可変部 (図示せず) や、光検出手段 34 に入力された情報を処理するためのコンピュータ (図示せず) などを有しても良いものである。

[0084] ここで、角度可変部 (図示せず) は、サーボモータで全反射減衰 (ATR) 条件を求めるために受光手段 30 と光源 26 とを同期し、 $45 \sim 85^\circ$ の角度変更を可能とし、分解能が 0.01° 以上であることが好ましい。

[0085] このような構成を有する本発明の SPFS 装置 1 では、図 3 および図 4 に示したように、リガンド固定領域 16 で生ずる蛍光 32 を励起させる際において、光源 26 から金属薄膜 14 に照射される励起光 24 の照射位置 B を、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A から所定距離 H だけ離間した位置に、励起光 24 の光軸中心が位置するよう、励起光 24 の照射位置が設定されている。なお、図中符号 r は貫通穴 20 の底面領域の重心位置 A から貫通穴 20 の外形端までの最短距離である。

[0086] ここで励起光 24 の照射位置を移動させる際には、先に説明した位置調整手段 40 を用いて光源 26 を移動させることが好ましいが、センサ構造体 22 自体を移動させるよう構成しても良く、光源 26 とセンサ構造体 22 とを相対的に移動させることができれば特に限定されないものである。

[0087] 上記した本発明のSPFS装置1では、リガンド固定領域16で固定されたリガンドに検体（アナライト）が確実に捕捉されるよう、ウェル部材18の貫通穴20内に検体を含んだ試料溶液を供給した後、センサ構造体22を攪拌するようにしている。

[0088] ここでの攪拌方法は円運動による攪拌が好ましく、例えば専用の攪拌装置（図示せず）を用いて行うことができる。

なおセンサ構造体22を円運動で攪拌すると、ウェル部材18の貫通穴20内で試料溶液が円を描くように移動される。この時、リガンド固定領域16におけるリガンドとアナライトとの反応量がどのように分布するか、攪拌後のリガンド固定領域16に金コロイドで染色して調べたところ、ウェル部材18の貫通穴20によって規定された底面領域の重心位置Aを起点にして、ドーナツ状に反応量の高い箇所が分布していることが確認された。

[0089] この反応量の分布をグラフ化すると、図5に示したようにウェル部材18の貫通穴20によって規定された底面領域の重心位置Aから所定距離移動した位置Bで最も反応量の値が高くなっていることが分かる。

[0090] したがって本発明者は、励起光24の照射位置Bを、反応量の値が最も高くなった位置に合わせて設定すれば、蛍光32の検出効率を効果的に高めることができることを見出した。

[0091] また貫通穴20の大きさやリガンドの種類などの測定条件が異なれば反応量の分布も異なると考えられるが、本発明者は貫通穴20の底面領域の重心位置Aから貫通穴20の外形端までの最短距離 r を100%とした際、重心位置Aから1～75%の範囲の位置であれば、概ね反応量の値が高くなることを見出した。

[0092] このため、予めこの範囲内に励起光24の照射位置を設定するようにすれば、蛍光32の検出効率を効果的に高めることができる。ただし、励起光24の照射位置の移動範囲は、励起光24の光軸の直径が、貫通穴20内に収まる範囲内である。

[0093] このように本発明のSPFS装置1では、センサ構造体22の攪拌後の反

応量の分布を調べておき、反応量の値が最も高くなった位置に励起光 24 の照射位置を設定することで、蛍光 32 の検出効率を効果的に高めることができる。

[0094] さらに本発明の S P F S 装置 1 で用いられるセンサ構造体 22 はウェル部材 18 を用いたものであるため、図 14 に示したような流路型のセンサ構造体 300 のようにポンプなどの送液手段を用意する必要がなく、装置を簡素化して製造コストを抑えることができる。

[0095] なお、上記説明した S P F S 装置 1 におけるセンサ構造体 22 では、ウェル部材 18 の貫通穴 20 はストレートであるが、図 6 に示したように貫通穴 20 の底に向かって次第に径が小さくなる逆テーパ 44 が付されていても良いものである。

[0096] 理由としては、蛍光物質から生ずる蛍光 32 が放射状に拡散され、拡散された蛍光 32 を光検出手段 34 で効率良く集光するためである。

逆テーパ 44 の傾斜角度 θ b としては、集光効率を高める上で 0° より大きく 45° 以下の範囲内であることが好ましい。

[0097] また、貫通穴 20 の形状としては本実施例のように円形に限定されるものではなく、楕円形や三角形などであっても良いものであるが、図 7 (a) に示した四角形、図 7 (b) に示した六角形のように点対称な形状であれば、攪拌を行った際に反応分布が顕著に現れるので好ましい。

[0098] このような円形以外の形状を有する貫通穴 20 の場合にも、貫通穴 20 の底面領域の重心位置 A から貫通穴 20 の外形端までの最短距離 r を 100% として励起光 24 の照射位置を規定するようにすれば良い。

[0099] さらに、図 8 に示したように、リガンド固定領域 16 に固定されるリガンド 16 a ~ 16 d の種類は一箇所の貫通穴 20 に対して、複数であっても良い。

また、図 9 に示したように、複数の貫通穴 20 を有するウェル部材 18 を用いても良く、この場合には貫通穴 20 毎に異なるリガンド 16 e ~ 16 h を固定化するようにしても良いものである。

- [0100] なお、1つの貫通穴20に対して複数種類のリガンドを固定した場合や、複数の貫通穴20を有するウェル部材18を用いた場合には、例えば光源26に対してセンサ構造体22が回転移動するような移動手段（図示せず）を別途設けておけば、蛍光検出をスムーズに行うことができる。
- [0101] さらに、上記したセンサ構造体22では、金属薄膜14上にウェル部材18が固定されているが、図10に示したように、センサ構造体22上にパターンニングなどの方法で部分的に金属薄膜14を成膜しておき、さらに金属薄膜14上にリガンド固定領域16を形成し、リガンド固定領域16および金属薄膜14を囲うようにウェル部材18を誘電体部材12上に設置した形態でも構わないものである。
- [0102] 以上、本発明のSPFS装置1およびこれを用いた蛍光検出方法について説明したが、本発明は上記の形態に限定されるものではなく、例えば上記実施形態で説明した装置本体の構成を更に簡略化することも可能であり、本発明の目的を逸脱しない範囲で種々の変更が可能なものである。

実施例

[0103] [実施例1]

誘電体部材12の上面に金属薄膜14を成膜した後、金属薄膜14上に検出対象となるアナライトと特異的に吸着するリガンドを固定してリガンド固定領域16を形成した。

- [0104] 直径φ5mmの円形の貫通穴20を有するウェル部材18を用意し、これを金属薄膜14上にマッチングオイルを介して固定し、センサ構造体22とした。

次いでセンサ構造体22の貫通穴20内に検体（アナライト）を含有した試料溶液を注入し、これを円運動で攪拌する攪拌装置にセットして攪拌させた。

- [0105] 攪拌させたセンサ構造体22から試料溶液を抜取って洗浄した後、リガンド固定領域16の検体（アナライト）を金コロイドで染色し、染色状況をCCDカメラで確認したところ、ウェル部材18の貫通穴20によって規定さ

れた底面領域の重心位置 A を起点としてドーナツ状に反応分布が生じていることが確認できた。

[0106] この反応分布を図 11 に示したようにグラフ化した。グラフの X 軸は、ウェル部材 18 の貫通穴 20 の底面領域の重心位置 A から貫通穴 20 の外形端までの最短距離 r を 100% とした場合、貫通穴 20 の底面領域の重心位置 A からの移動距離を示しており、Y 軸は反応量であり、反応量の最大値を 100% とした時の割合を表したものである。

[0107] グラフから明らかのように、貫通穴 20 の底面領域の重心位置 A から貫通穴 20 の外形端までの最短距離 r を 100% とした際に、貫通穴 20 の底面領域の重心位置 A から 8% 離間した位置で、反応量が最大値を示すことが確認された。

[0108] [実施例 2]

直径 $\phi 6.5$ mm の円形の貫通穴 20 を有するウェル部材 18 を用いたこと以外は実施例 1 と同様にしてセンサ構造体 22 を製造し、これを円運動で攪拌する攪拌装置にセットして攪拌させた。

[0109] 攪拌させたセンサ構造体 22 から試料溶液を抜取って洗浄した後、リガンド固定領域 16 の検体を金コロイドで染色し、染色状況を CCD カメラで確認したところ、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A を起点としてドーナツ状に反応分布が生じていることが確認できた。

[0110] この反応分布を図 11 に示したようにグラフ化したところ、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A から 15% 離間した位置で、反応量が最大値を示すことが確認された。

[0111] [実施例 3]

直径 $\phi 12$ mm の円形の貫通穴 20 を有するウェル部材 18 を用いたこと以外は実施例 1 と同様にしてセンサ構造体 22 を製造し、これを円運動で攪拌する攪拌装置にセットして攪拌させた。

[0112] 攪拌させたセンサ構造体 22 から試料溶液を抜取って洗浄した後、リガン

ド固定領域 16 の検体を金コロイドで染色し、染色状況を CCD カメラで確認したところ、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A を起点としてドーナツ状に反応分布が生じていることが確認できた。

[0113] この反応分布を図 11 に示したようにグラフ化したところ、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A から 50% 離間した位置で、反応量が最大値を示すことが確認された。

[0114] [実施例 4]

直径 ϕ 18 mm の円形の貫通穴 20 を有するウェル部材 18 を用いたこと以外は実施例 1 と同様にしてセンサ構造体 22 を製造し、これを円運動で攪拌する攪拌装置にセットして攪拌させた。

[0115] 攪拌させたセンサ構造体 22 から試料溶液を抜取って洗浄した後、リガンド固定領域 16 の検体を金コロイドで染色し、染色状況を CCD カメラで確認したところ、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A を起点としてドーナツ状に反応分布が生じていることが確認できた。

[0116] この反応分布を図 11 に示したようにグラフ化したところ、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A から 61% 離間した位置で、反応量が最大値を示すことが確認された。

[0117] なお、実施例 1～4 の貫通穴 20 の大きさは、概ね市販されているウェル部材 18 の貫通穴 20 の最小サイズから最大サイズである。したがって実施例 1～4 の結果から、ウェル部材 18 の貫通穴 20 の大きさが変わっても、ウェル部材 18 の貫通穴 20 によって規定された底面領域の重心位置 A からの移動距離が 1～75% の範囲内の位置に励起光 24 の照射位置を設定すれば、概ね良好な反応が生ずることが確認できた。

符号の説明

[0118] 1・・・表面プラズモン励起増強蛍光測定装置（SPFS 装置）
10・・・センサ部材

- 1 2 . . . 誘電体部材
 - 1 4 . . . 金属薄膜
 - 1 6 . . . リガンド固定領域
 - 1 6 a ~ 1 6 h . . . リガンド
 - 1 8 . . . ウェル部材
 - 2 0 . . . 貫通穴
 - 2 0 a ~ 2 0 d . . . 貫通穴
 - 2 2 . . . センサ構造体
 - 2 4 . . . 励起光
 - 2 6 . . . 光源
 - 2 8 . . . 反射光
 - 3 0 . . . 受光手段
 - 3 2 . . . 蛍光
 - 3 4 . . . 光検出手段
 - 3 6 . . . 集光部材
 - 3 8 . . . 波長選択機能部材
 - 4 0 . . . 位置調整手段
 - 4 2 . . . 位置調整手段
 - 4 4 . . . 逆テーパー
 - θa . . . 共鳴角
 - θb . . . 逆テーパーの傾斜角度
 - A . . . ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置
 - B . . . 光源から金属薄膜に照射される励起光の照射位置
 - H . . . 離間距離（所定距離）
 - r . . . 貫通穴の底面領域の重心位置から貫通穴の外形端までの最短距離
- 離
- 1 0 0 . . . 表面プラズモン共鳴装置（S P R 装置）
 - 1 0 2 . . . 誘電体部材

- 104 . . . 金属薄膜
- 106 . . . リガンド固定領域
- 108 . . . リガンド含有層
- 110 . . . センサ構造体
- 112 . . . 励起光
- 114 . . . 光源
- 116 . . . 反射光
- 118 . . . 受光手段
 - $\theta 1$. . . 共鳴角
 - $\theta 2$. . . 共鳴角
- 200 . . . 表面プラズモン励起増強蛍光測定装置 (SPFS装置)
- 202 . . . 誘電体部材
- 204 . . . 金属薄膜
- 206 . . . リガンド固定領域
- 208 . . . リガンド含有層
- 210 . . . センサ構造体
- 212 . . . 励起光
- 214 . . . 光源
- 216 . . . 反射光
- 218 . . . 受光手段
- 220 . . . 蛍光
- 222 . . . 光検出手段
- 224 . . . 集光部材
- 226 . . . 波長選択機能部材
- 300 . . . センサ構造体
- 302 . . . 誘電体部材
- 304 . . . 金属薄膜
- 306 . . . リガンド固定領域

- 308 . . . 横形流路
- 310 . . . 試料溶液
- 400 . . . センサ構造体
- 402 . . . 誘電体部材
- 404 . . . 金属薄膜
- 406 . . . リガンド固定領域
- 408 . . . ウェル部材
- 410 . . . 貫通穴
- 412 . . . 試料溶液

請求の範囲

[請求項1]

誘電体部材と、前記誘電体部材上に形成された金属薄膜と、前記金属薄膜上に形成されたりガンド固定領域と、を備えたセンサ部材と、前記センサ部材上に固定され前記リガンド固定領域と対応する位置に貫通穴を有するウェル部材と、から成るセンサ構造体と、

前記センサ構造体の金属薄膜に向かって励起光を照射する光源と、前記光源より前記金属薄膜に励起光を照射し、前記金属薄膜上の電場を増強させて前記金属薄膜上の前記リガンド固定領域に保持された蛍光物質を励起させ、これにより励起された蛍光を検出する光検出手段と、を少なくとも有する装置本体と、

を備え、

前記センサ構造体が、前記装置本体に対して着脱されて使用される、または前記装置本体に対して固定されて使用されるよう構成された表面プラズモン励起増強蛍光測定装置であって、

前記センサ構造体のウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から所定距離離間した位置に、前記励起光の光軸中心が位置するよう前記励起光の照射位置が設定されていることを特徴とする表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。

[請求項2]

前記励起光の照射位置が、

前記ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から前記貫通穴の外形端までの最短距離を100%とした場合、前記重心位置から1～75%の範囲で離間した位置であることを特徴とする請求項1に記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。

[請求項3]

前記センサ構造体は、攪拌されて使用されることを特徴とする請求項1または2に記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。

[請求項4]

前記ウェル部材の前記貫通穴には、前記貫通穴の底に向かって次第に径が小さくなる逆テーパが付されていることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。

- [請求項5] 前記ウェル部材の前記貫通穴の形状が、点対称な形状であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項6] 前記リガンド固定領域に固定されるリガンドが1種類であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項7] 前記リガンド固定領域に固定されるリガンドが複数種類であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項8] 前記ウェル部材には、前記貫通穴が1つ設けられていることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項9] 前記ウェル部材には、前記貫通穴が複数設けられていることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項10] 前記センサ構造体と前記光源とを、相対的に移動させて調整する位置調整手段を有することを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項11] 前記ウェル部材の前記貫通穴の内壁面に、非特異吸着防止用の表面処理が施されていることを特徴とする請求項1～10のいずれかに記載の表面プラズモン励起増強蛍光測定装置。
- [請求項12] 誘電体部材と、前記誘電体部材上に形成された金属薄膜と、前記金属薄膜上に形成されたリガンド固定領域と、を備えたセンサ部材と、前記センサ部材上に固定され、前記リガンド固定領域と対応する位置に貫通穴を有するウェル部材と、から成るセンサ構造体の前記リガンド固定領域に固定されたリガンドにアナライトを捕捉させ、さらに前記アナライトを蛍光物質で標識する工程と、
前記アナライトを蛍光物質で標識した状態で、前記センサ構造体の

金属薄膜に前記誘電体部材側から励起光を照射して、前記蛍光物質を励起させる工程と、

励起された蛍光を光検出手段にて測定する工程と、

を少なくとも有する蛍光検出方法であって、

前記蛍光物質を励起させる工程において、

前記センサ構造体のウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から所定距離離間した位置に、前記励起光の光軸中心が位置するよう前記励起光が照射されることを特徴とする蛍光検出方法。

[請求項13] 前記蛍光物質を励起させる工程において、

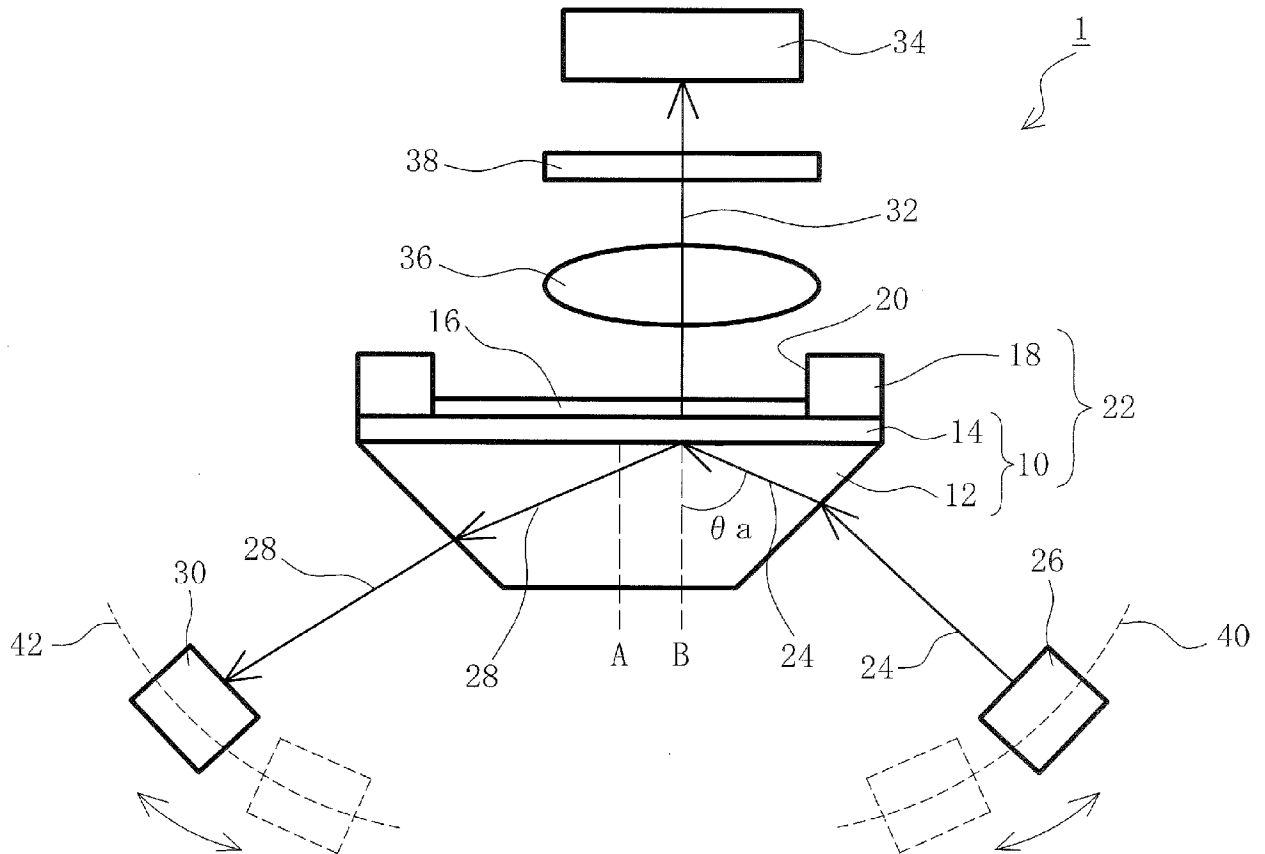
前記励起光の照射位置が、

前記ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置から前記貫通穴の外形端までの最短距離を100%とした場合、前記重心位置から1～75%の範囲で離間した位置であることを特徴とする請求項12に記載の蛍光検出方法。

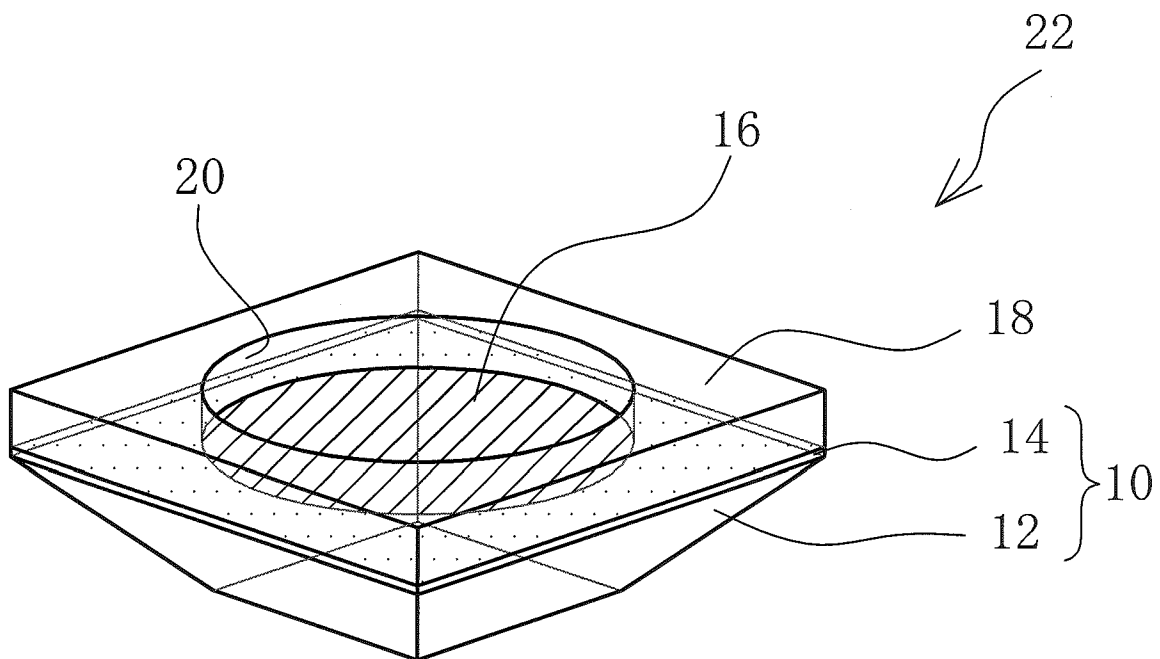
[請求項14] 前記アナライトを蛍光物質で標識する工程において、

前記センサ構造体は、攪拌されることを特徴とする請求項12または13に記載の蛍光検出方法。

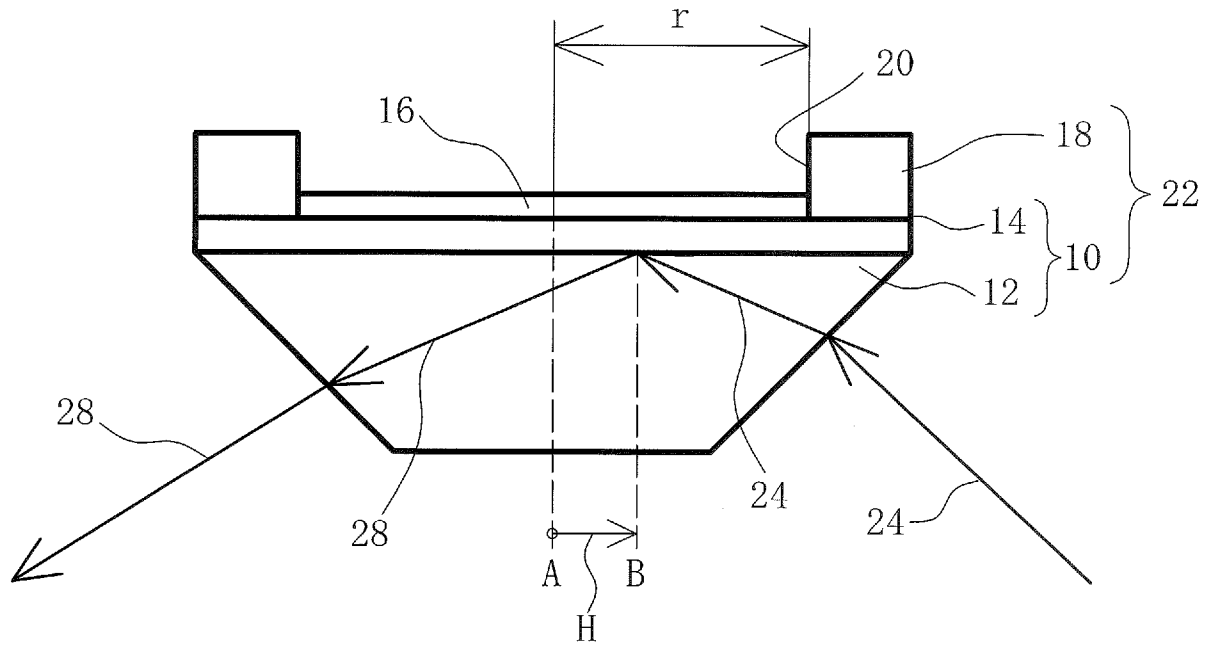
[図1]



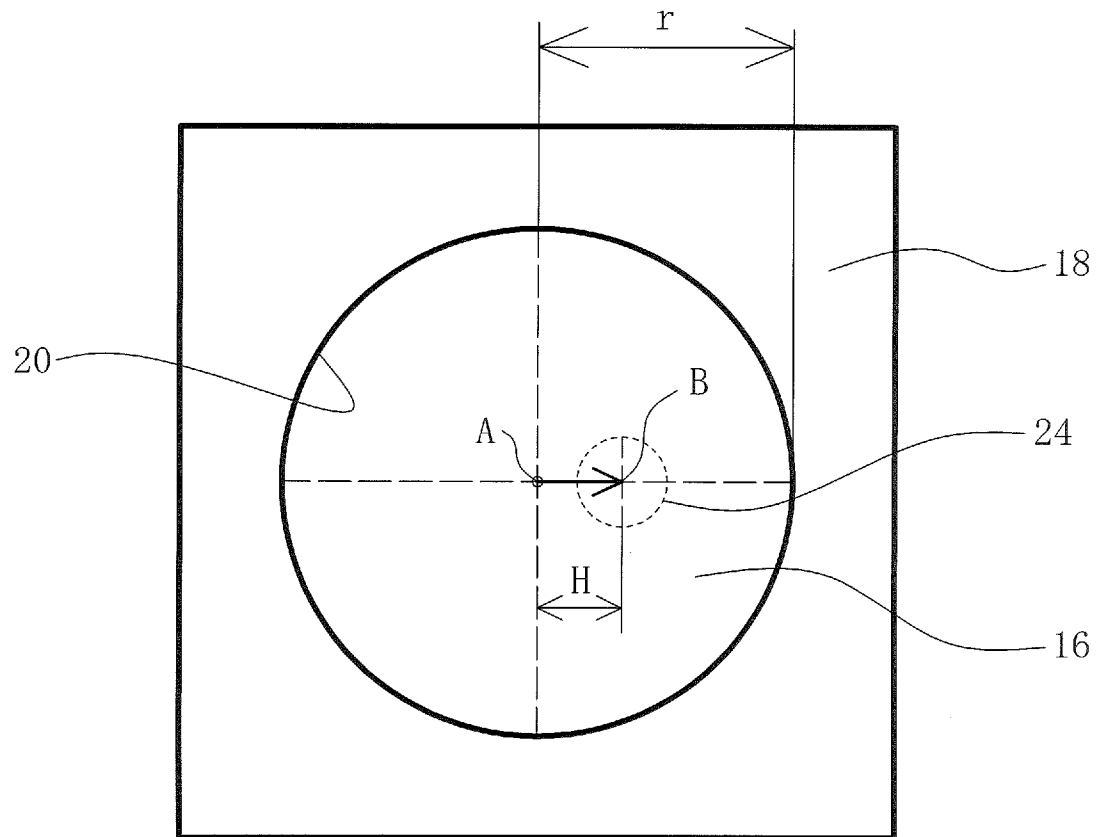
[図2]



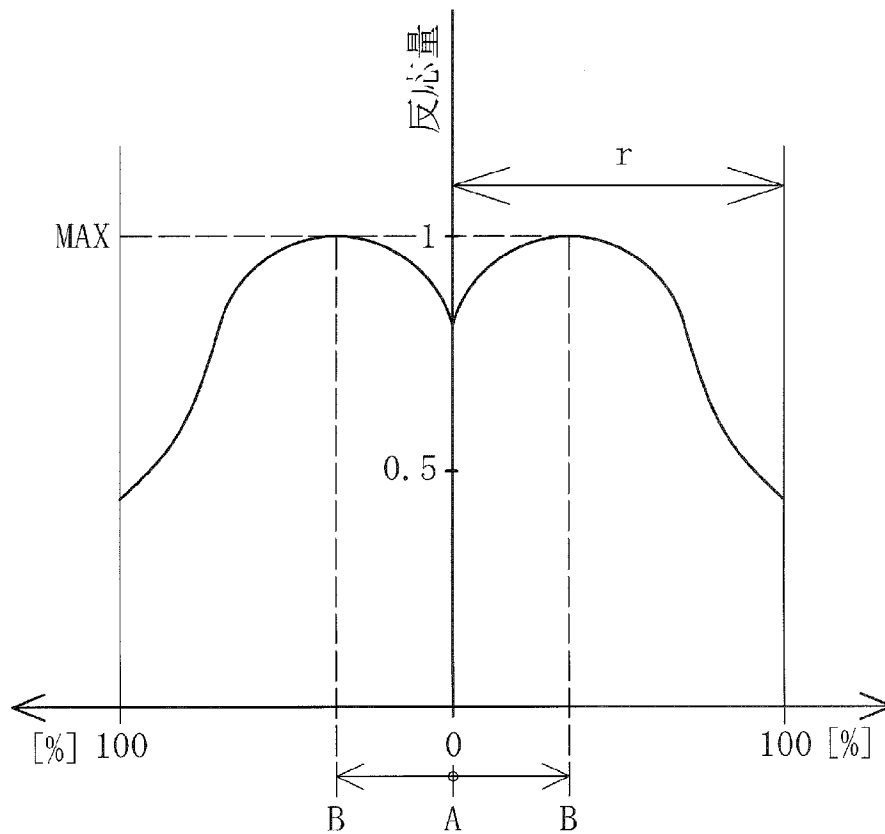
[図3]



[図4]

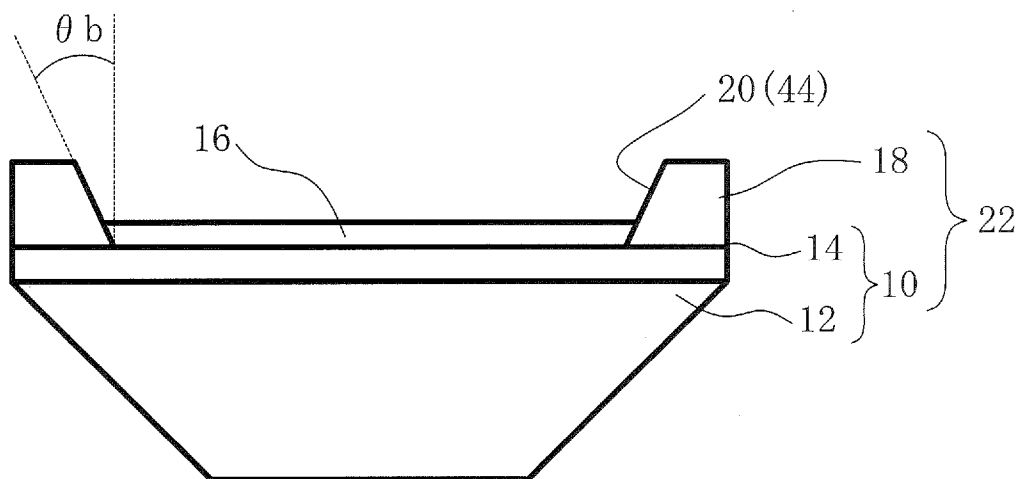


[図5]

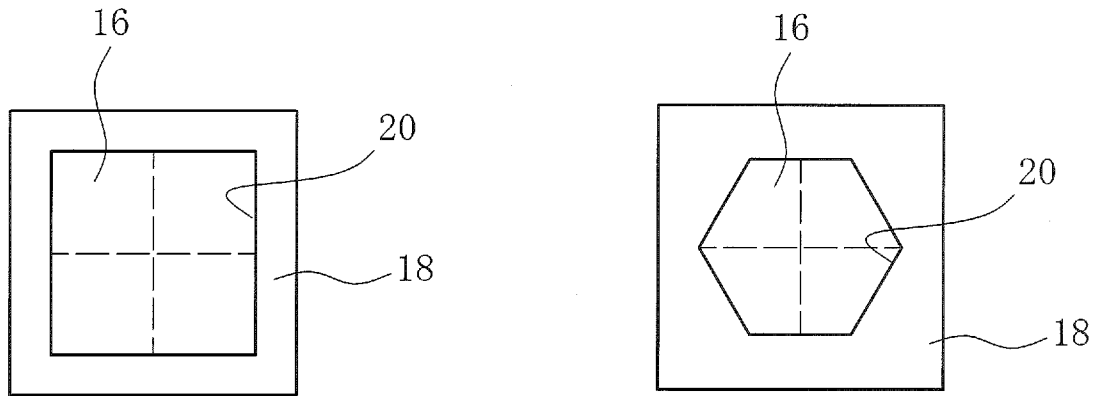


ウェル部材の貫通穴によって規定された底面領域の重心位置からの移動距離

[図6]



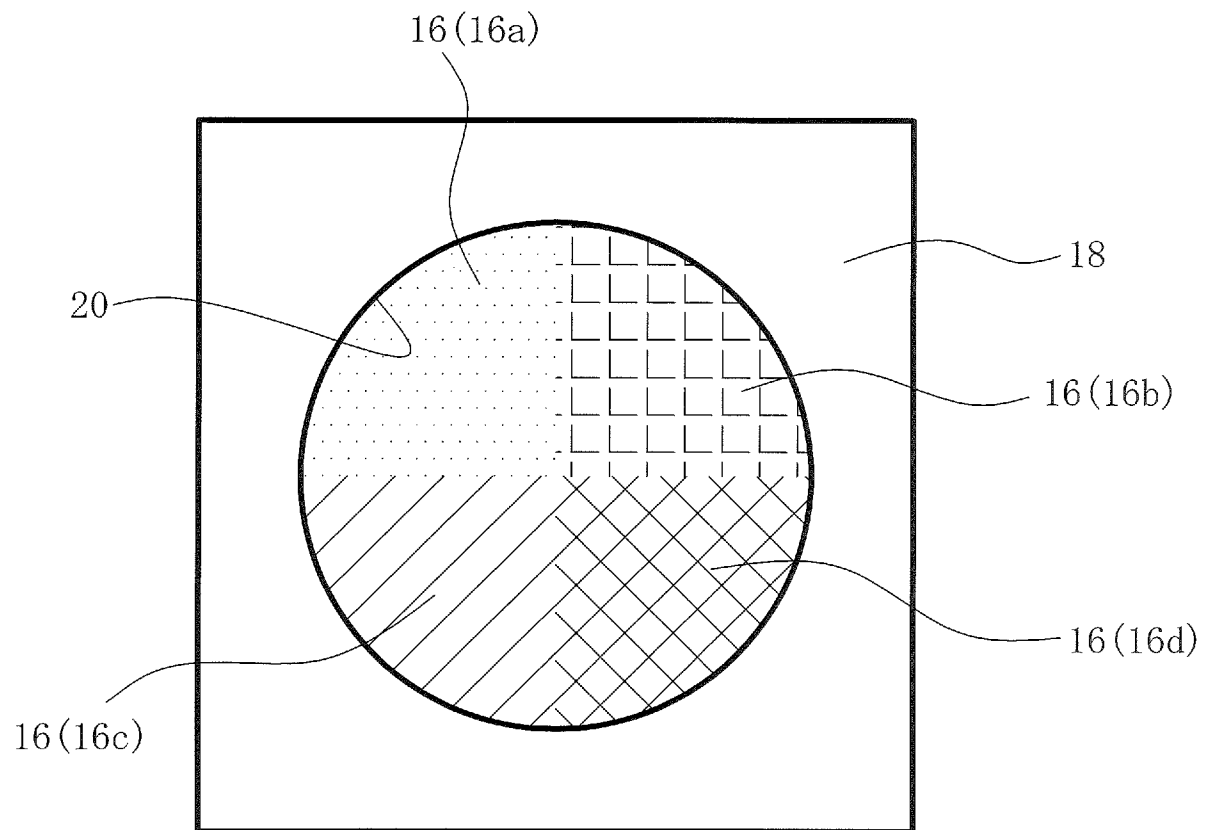
[図7]



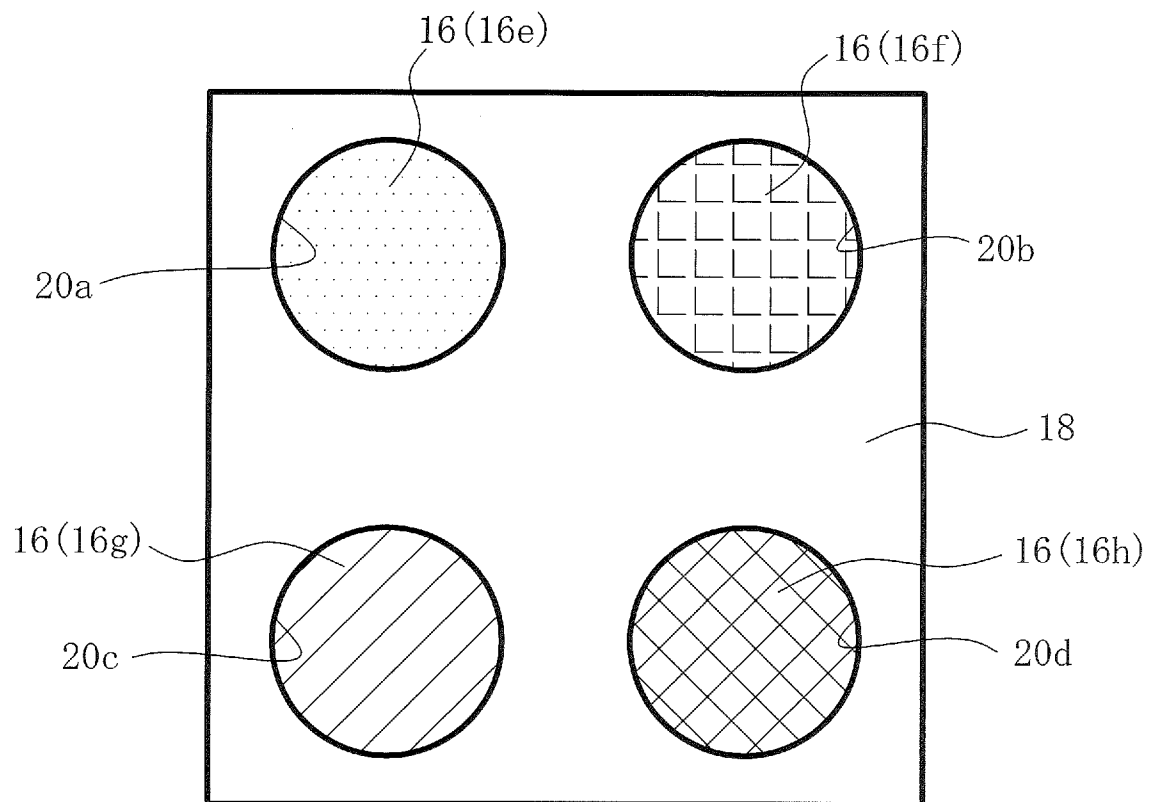
(a)

(b)

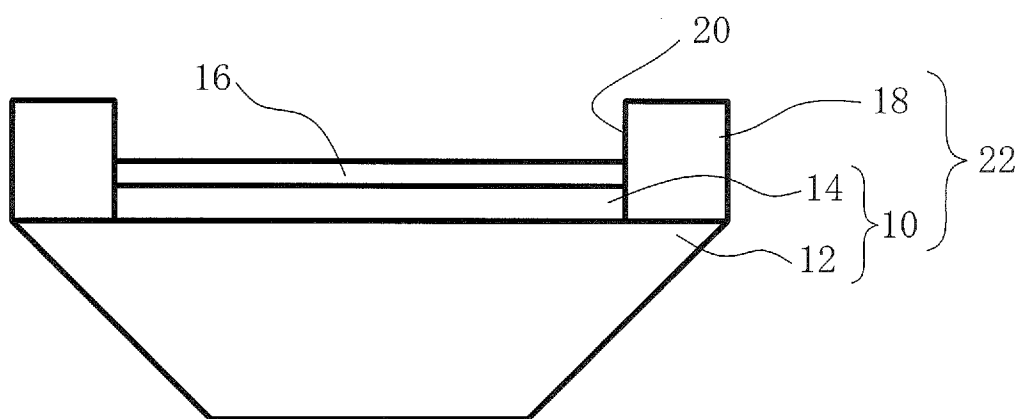
[図8]



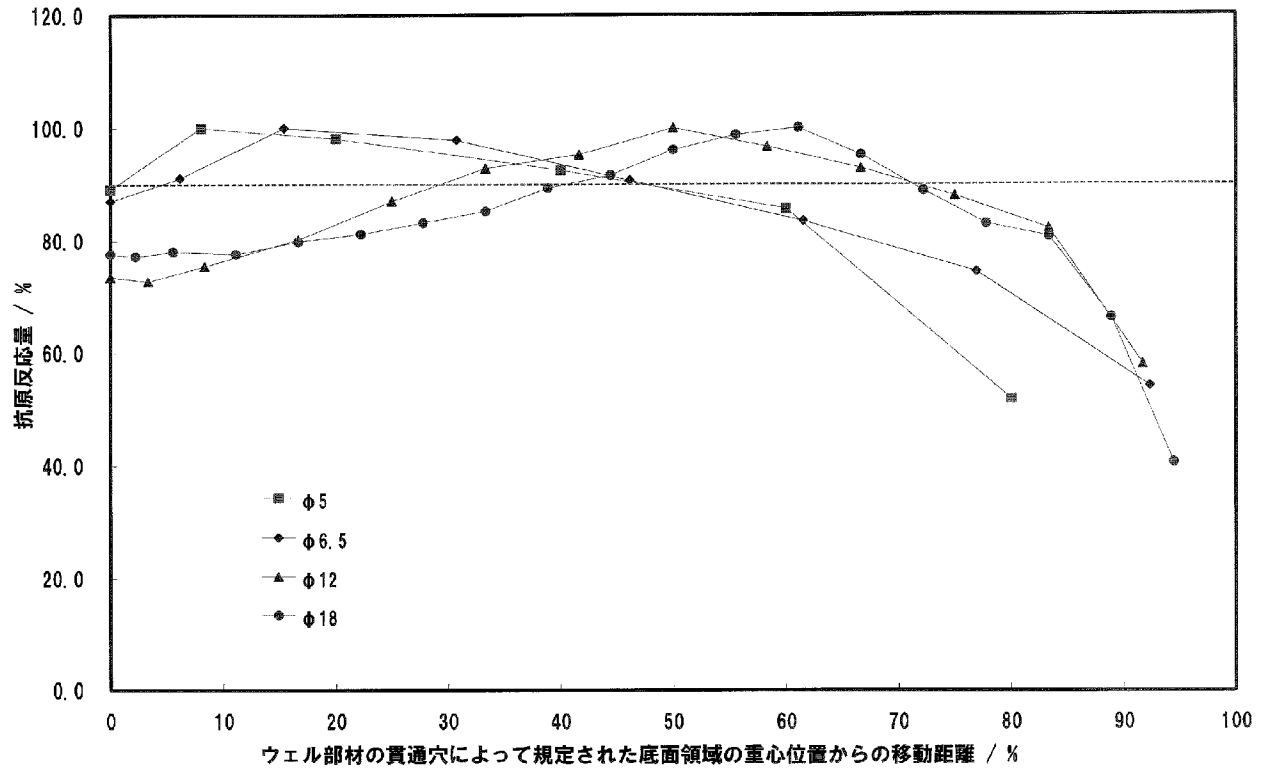
[図9]



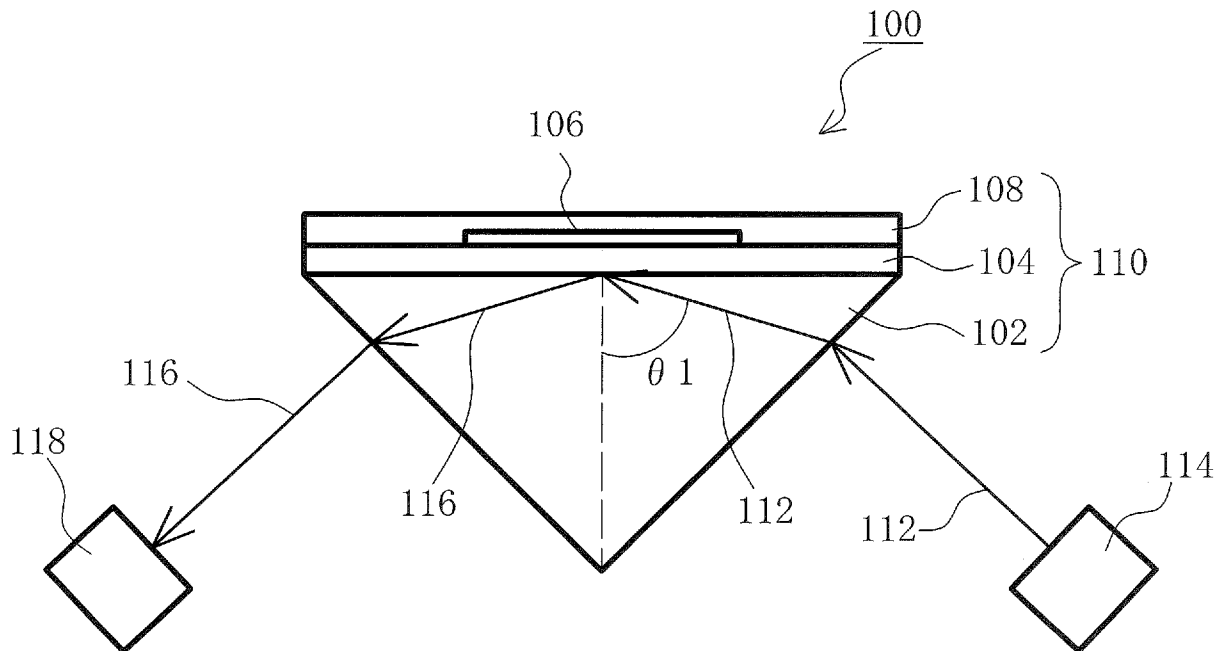
[図10]



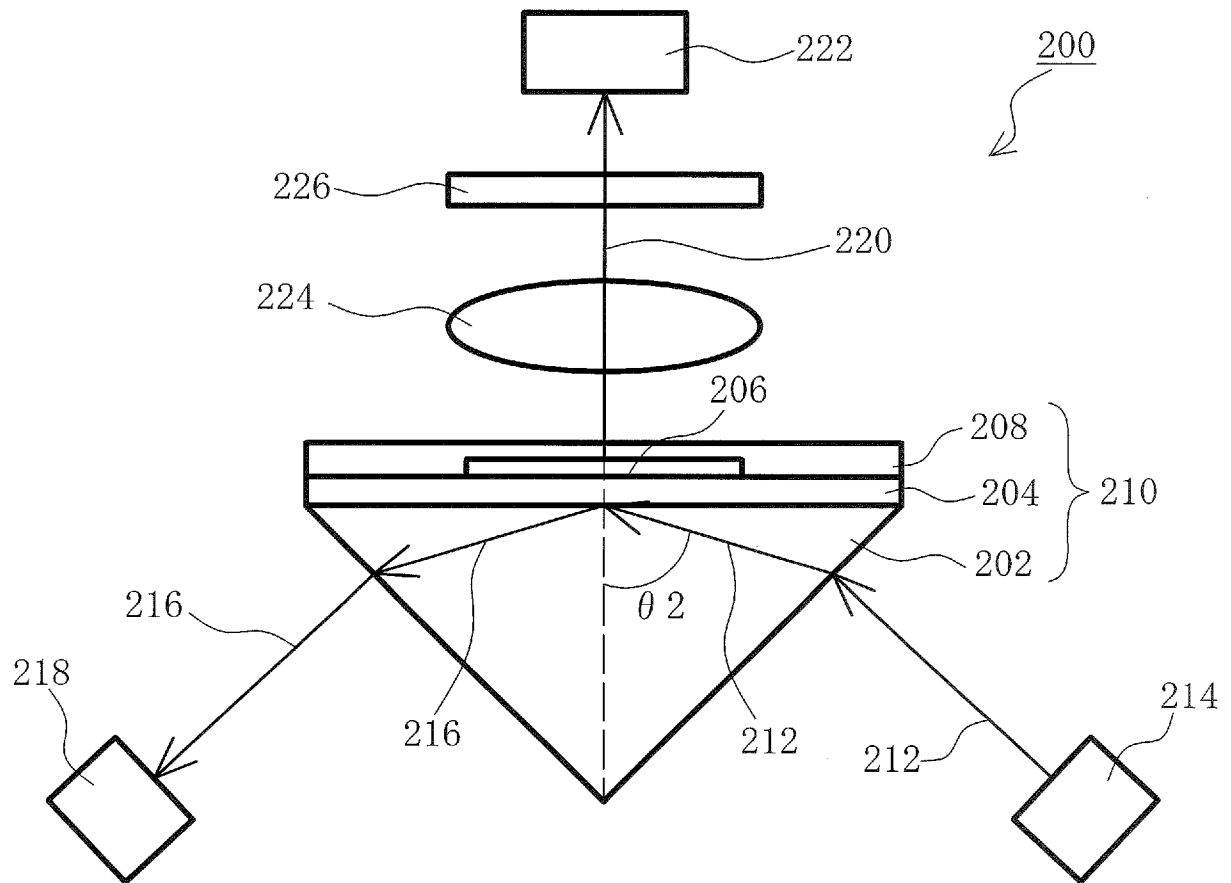
[図11]



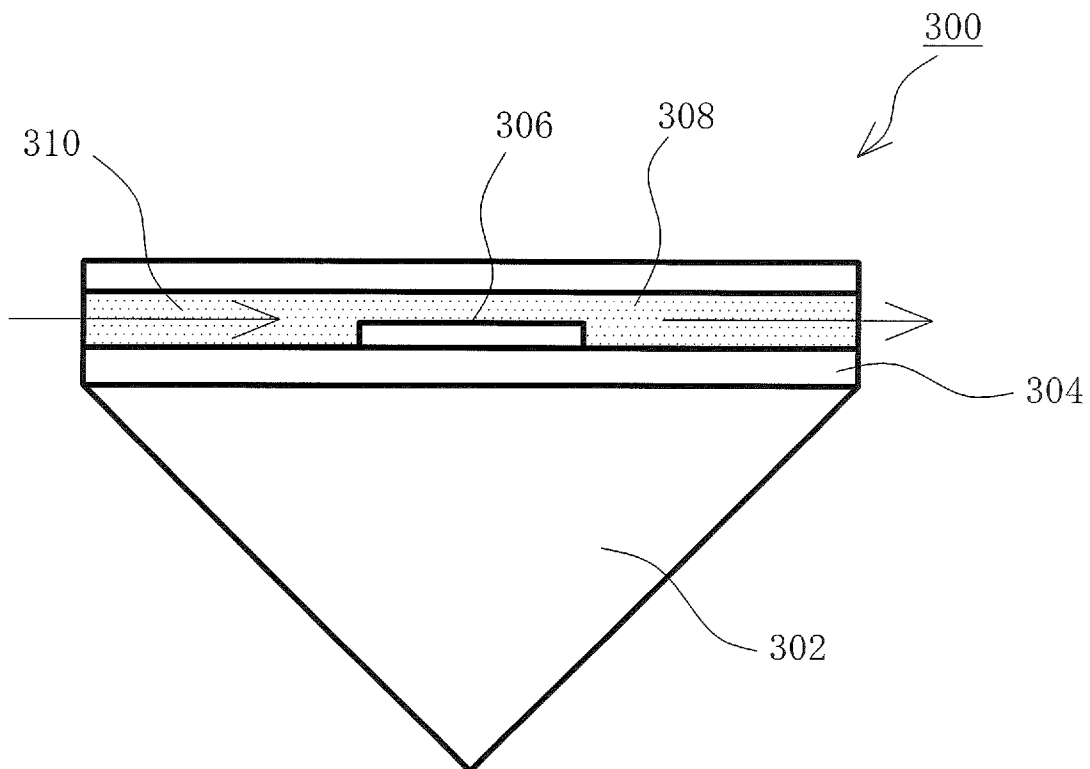
[図12]



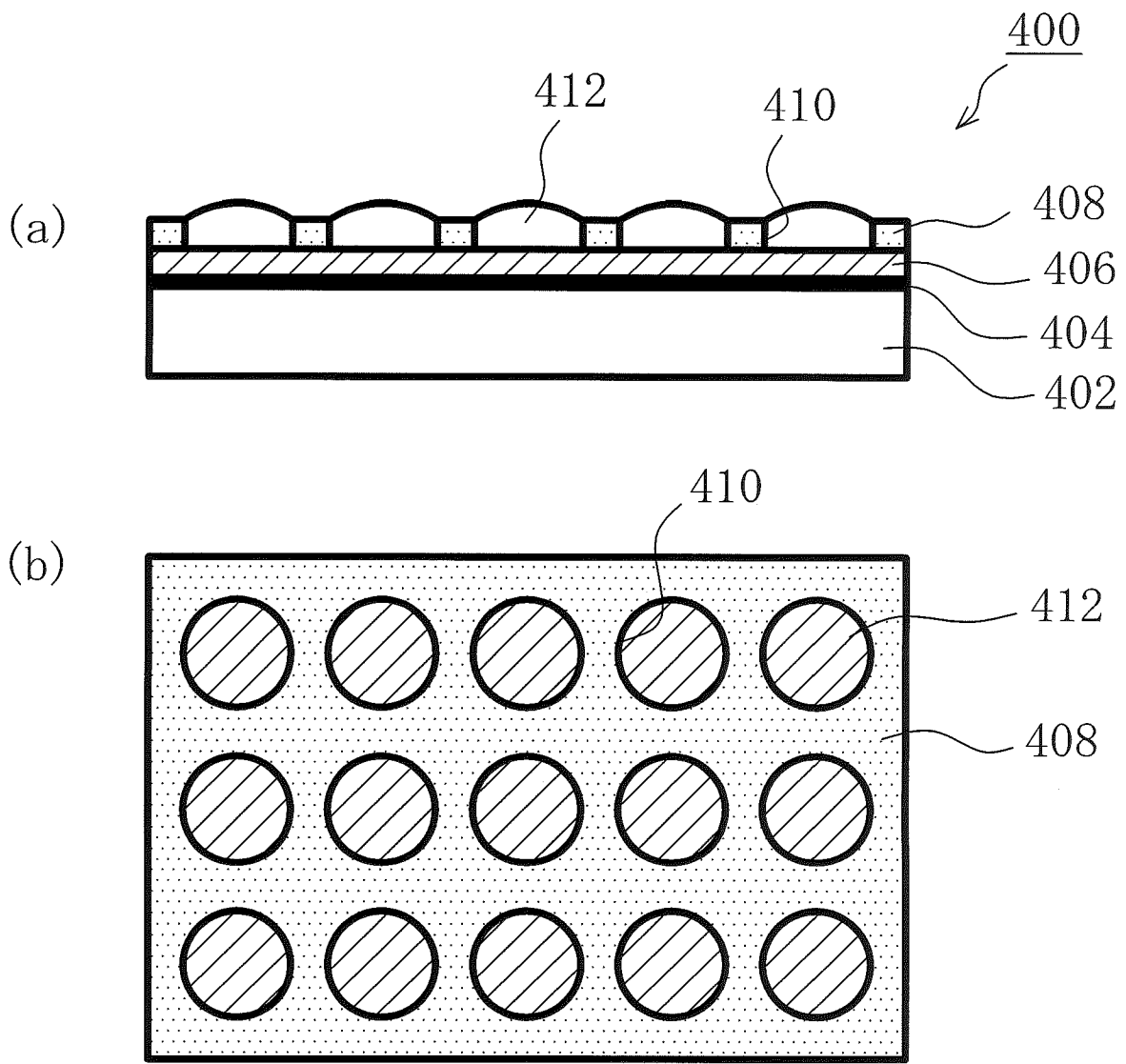
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64 (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)

G01N21/01-21/83

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-208069 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 10 August 2006 (10.08.2006), paragraphs [0026] to [0037]; fig. 1 to 4 (Family: none)	1-14
Y	WO 2011/043202 A1 (Konica Minolta Holdings, Inc.), 14 April 2011 (14.04.2011), paragraphs [0030] to [0050], [0062] to [0067]; fig. 1 to 2, 7 (Family: none)	1-14
Y	JP 2009-222484 A (Fujifilm Corp.), 01 October 2009 (01.10.2009), paragraph [0051] (Family: none)	3, 14

 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
03 July, 2012 (03.07.12)Date of mailing of the international search report
17 July, 2012 (17.07.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060814

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 2003-4629 A (Ricoh Optical Industries Co., Ltd.), 08 January 2003 (08.01.2003), paragraphs [0015] to [0017] (Family: none)	4
Y	JP 2007-3357 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 11 January 2007 (11.01.2007), paragraph [0084] & US 2009/0041630 A1 & EP 1895301 A1 & WO 2006/137311 A1	11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N21/64(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（IPC）） Int.Cl. G01N21/01-21/83		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012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）		
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 2006-208069 A（独立行政法人産業技術総合研究所）2006.08.10, 【0026】-【0037】、図1-図4（ファミリーなし）	1-14
Y	WO 2011/043202 A1（コニカミノルタホールディングス株式会社） 2011.04.14, [0030]-[0050], [0062]-[0067]、図1-図2、図7 （ファミリーなし）	1-14
Y	JP 2009-222484 A（富士フイルム株式会社）2009.10.01, 【005 1】（ファミリーなし）	3,14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 03.07.2012	国際調査報告の発送日 17.07.2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 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） 波多江 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3292	2W 9508

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 2003-4629 A (リコー光学株式会社) 2003.01.08, 【0015】 - 【0017】 (ファミリーなし)	4
Y	JP 2007-3357 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2007.01.11, 【0084】 & US 2009/0041630 A1 & EP 1895301 A1 & WO 2006/137311 A1	11