

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6565934号  
(P6565934)

(45) 発行日 令和1年8月28日(2019.8.28)

(24) 登録日 令和1年8月9日(2019.8.9)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 21/64 (2006.01)** GO 1 N 21/64 G

請求項の数 8 (全 24 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2016-564769 (P2016-564769)                  (86) (22) 出願日 平成27年12月1日 (2015.12.1)                  (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/083763                  (87) 国際公開番号 W02016/098581                  (87) 国際公開日 平成28年6月23日 (2016.6.23)                  審査請求日 平成30年6月14日 (2018.6.14)                  (31) 優先権主張番号 特願2014-253193 (P2014-253193)                  (32) 優先日 平成26年12月15日 (2014.12.15)                  (33) 優先権主張国・地域又は機関                  日本国 (JP)</p>	<p>(73) 特許権者 000001270                  コニカミノルタ株式会社                  東京都千代田区丸の内二丁目7番2号                  (74) 代理人 100105050                  弁理士 鷺田 公一                  (74) 代理人 100155620                  弁理士 木曾 孝                  (72) 発明者 中村 幸登                  東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ                  ニカミノルタ株式会社内                  (72) 発明者 永江 剛典                  東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ                  ニカミノルタ株式会社内</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン増強蛍光測定装置および表面プラズモン増強蛍光測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

回折格子を形成された金属膜と、前記回折格子に固定化され、蛍光物質で標識される被検出物質を捕捉するための捕捉体とを有するチップを装着され、励起光を前記回折格子に照射することで、被検出物質の存在またはその量を検出する表面プラズモン増強蛍光測定装置であって、

増強された電場により前記蛍光物質を励起して蛍光を放出させるために、直線偏光の励起光を前記回折格子に照射する光源と、

平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の光軸の方向を変化させるか、または前記回折格子に対する前記励起光の偏光方向を変化させる回転部と、

前記蛍光物質から放出された蛍光から直線偏光の光を取り出す偏光子と、

前記偏光子により取り出された前記直線偏光の光を検出する光検出部と、

前記光検出部により得られた検出値を処理する処理部と、

を有し、

前記偏光子は、

前記金属膜上に前記蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、前記蛍光物質から放出された蛍光から、前記金属膜の表面に対する法線と前記励起光の光軸とを含む平面に対する電界の振動方向の角度が  $0 \pm 30^\circ$  の範囲内の第1の光と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90 \pm 30^\circ$  の範囲内の第2の光とをそれぞれ取り出し、

前記捕捉体に前記蛍光物質で標識されている前記被検出物質が捕捉されている状態のと

きに、前記蛍光物質から放出された蛍光から、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0 \pm 30^\circ$  の範囲内の第3の光と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90 \pm 30^\circ$  の範囲内の第4の光とをそれぞれ取り出し、

前記光検出部は、

前記金属膜上に前記蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、前記第1の光および前記第2の光を検出し、

前記捕捉体に前記蛍光物質で標識されている前記被検出物質が捕捉されている状態のときに、前記第3の光および前記第4の光を検出し、

前記処理部は、

前記金属膜上に前記蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、前記第1の光の検出値と前記第2の光の検出値との差分値を算出し、

前記捕捉体に前記蛍光物質で標識されている前記被検出物質が捕捉されている状態のときに、前記第3の光の検出値と前記第4の光の検出値との差分値を算出し、

前記回転部は、前記光検出部が前記第3の光および前記第4の光を検出する前に、前記処理部により算出される前記第1の光の検出値と前記第2の光の検出値との差分値が0になるように、前記励起光の光軸と前記回折格子とを相対的に回転させるか、または前記励起光の偏光方向と前記回折格子とを相対的に回転させる、

表面プラズモン増強蛍光測定装置。

【請求項2】

前記第1の光および前記第3の光は、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光であり、

前記第2の光および前記第4の光は、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光である、

請求項1に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

【請求項3】

前記回転部は、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の光軸の方向を変化させる、請求項1または請求項2に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

【請求項4】

前記回転部は、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の偏光方向を変化させる、請求項1または請求項2に記載の表面プラズモン増強蛍光測定装置。

【請求項5】

被検出物質を標識する蛍光物質が、表面プラズモン共鳴に基づく電場により励起されて発した蛍光を検出して、被検出物質の存在またはその量を検出する表面プラズモン増強蛍光測定方法であって、

回折格子を形成された金属膜と、前記回折格子に固定化され、蛍光物質で標識される被検出物質を捕捉するための捕捉体とを有するチップを準備する第1工程と、

前記金属膜上に前記蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、前記回折格子において表面プラズモン共鳴が発生するように、前記回折格子に直線偏光の励起光を照射し、前記蛍光物質から放出された蛍光に含まれる、前記金属膜の表面に対する法線と前記励起光の光軸とを含む平面に対する電界の振動方向の角度が  $0 \pm 30^\circ$  の範囲内の直線偏光の第1の光と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90 \pm 30^\circ$  の範囲内の直線偏光の第2の光とをそれぞれ検出し、前記第1の光の検出値と前記第2の光の検出値との差分値が0となるように、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の光軸の方向を変化させるか、または前記回折格子に対する前記励起光の偏光方向を変化させる第2工程と、

前記金属膜に固定された前記捕捉体に、前記蛍光物質で標識された被検出物質を接触させるか、前記金属膜に固定された前記捕捉体に捕捉された被検出物質を前記蛍光物質で標識する第3工程と、

前記第2工程および前記第3工程の後、前記回折格子において表面プラズモン共鳴が発生するように、前記回折格子に直線偏光の励起光を照射し、前記蛍光物質から放出された

10

20

30

40

50

蛍光に含まれる、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0 \pm 30^\circ$  の範囲内の直線偏光の第3の光と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90 \pm 30^\circ$  の範囲内の直線偏光の第4の光とをそれぞれ検出する第4工程と、

前記第3の光の検出値と前記第4の光の検出値の差分値を算出する第5工程と、  
を含む、表面プラズモン増強蛍光測定方法。

【請求項6】

前記第1の光および前記第3の光は、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光であり、

前記第2の光および前記第4の光は、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光である、

請求項5に記載の表面プラズモン増強蛍光測定方法。

【請求項7】

前記第2工程では、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の光軸の方向を変化させる、請求項5または請求項6に記載の表面プラズモン増強蛍光測定方法。

【請求項8】

前記第2工程では、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の偏光方向を変化させる、請求項5または請求項6に記載の表面プラズモン増強蛍光測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面プラズモン共鳴を利用して検体に含まれる被検出物質の存在またはその量を検出する表面プラズモン増強蛍光測定装置および表面プラズモン増強蛍光測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床検査などにおいて、タンパク質やDNAなどの微量の被検出物質を高感度かつ定量的に検出することができれば、患者の状態を迅速に把握して治療を行うことが可能となる。このため、微量の被検出物質を高感度かつ定量的に検出できる方法が求められている。

【0003】

被検出物質を高感度に検出できる方法として、表面プラズモン励起増強蛍光分光法 (Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy) : 以下「SPFS」と略記する) が知られている。SPFSでは、所定の条件で金属膜に光を照射すると、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : 以下「SPR」と略記する) が生じることを利用する。被検出物質に特異的に結合できる捕捉体 (例えば1次抗体) を金属膜上に固定化して、被検出物質を特異的に捕捉するための反応場を形成する。この反応場に被検出物質を含む検体を提供すると、被検出物質は反応場に結合する。次いで、蛍光物質で標識された別の捕捉体 (例えば2次抗体) を反応場に提供すると、反応場に結合した被検出物質は蛍光物質で標識される。この状態で金属膜に励起光を照射すると、被検出物質を標識する蛍光物質は、SPRにより増強された電場により励起され、蛍光を放出する。したがって、蛍光を検出することで、被検出物質の存在またはその量を検出することができる。SPFSでは、SPRにより増強された電場により蛍光物質を励起するため、高感度で被検出物質を検出することができる。

【0004】

SPFSは、励起光と表面プラズモンとを結合 (カップリング) させる手段により、プリズムカップリング (PC) - SPFSと、格子カップリング (GC) - SPFSとに大別される。PC - SPFSでは、1つの面に金属膜を形成されたプリズムを利用する。この方法では、プリズムと金属膜の界面において励起光を全反射させることで、励起光と表面プラズモンとを結合させる。PC - SPFSは、現在主流となっている方法であるが、プリズムを使用すること、および金属膜に対する励起光の入射角が大きいことから、PC - SPFSは、測定装置の小型化の点で課題を有している。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

これに対し、GC - SPFSは、回折格子を利用して励起光と表面プラズモンとを結合させる（特許文献1および非特許文献1参照）。GC - SPFSは、プリズムを使用せず、かつ回折格子に対する励起光の入射角が小さいため、PC - SPFSに比べて測定装置を小型化することができる。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 1 1 - 1 5 8 3 6 9 号 公 報

## 【 非特許文献 】

10

## 【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Keiko Tawa, Hironobu Hori, Kenji Kintaka, Kazuyuki Kiyosue, Yoshiro Tatsu, and Junji Nishii, "Optical microscopic observation of fluorescence enhanced by grating-coupled surface plasmon resonance", Optics Express, Vol. 16, p. 9781-9790.

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 8 】

上記のように、GC - SPFSは、PC - SPFSに比べて測定装置を小型化できるという利点を有するが、GC - SPFSについての研究は、PC - SPFSについての研究に比べて進んでいない。したがって、GC - SPFSを利用する測定装置および測定方法には、検出感度に改善の余地がある。

20

## 【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、GC - SPFSを利用する測定装置および測定方法であって、被検出物質をより高感度に検出することができる測定装置および測定方法を提供することである。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

上記課題を解決するため、本発明の一実施の形態に係る表面プラズモン増強蛍光測定装置は、回折格子を形成された金属膜と、前記回折格子に固定化され、蛍光物質で標識される被検出物質を捕捉するための捕捉体とを有するチップを装着され、励起光を前記回折格子に照射することで、被検出物質の存在またはその量を検出する表面プラズモン増強蛍光測定装置であって、増強された電場により前記蛍光物質を励起して蛍光を放出させるために、直線偏光の励起光を前記回折格子に照射する光源と、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の光軸の方向を変化させるか、または前記回折格子に対する前記励起光の偏光方向を変化させる回転部と、前記蛍光物質から放出された蛍光から直線偏光の光を取り出す偏光子と、前記偏光子により取り出された前記直線偏光の光を検出する光検出部と、を有する。

30

## 【 0 0 1 1 】

また、上記課題を解決するため、本発明の一実施の形態に係る表面プラズモン増強蛍光測定方法は、被検出物質を標識する蛍光物質が、表面プラズモン共鳴に基づく電場により励起されて発した蛍光を検出して、被検出物質の存在またはその量を検出する表面プラズモン増強蛍光測定方法であって、回折格子を形成された金属膜と、前記回折格子に固定化され、蛍光物質で標識される被検出物質を捕捉するための捕捉体とを有するチップを準備する第1工程と、前記金属膜上に前記蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、前記回折格子において表面プラズモン共鳴が発生するように、前記回折格子に直線偏光の励起光を照射し、前記蛍光物質から放出された蛍光に含まれる、前記金属膜の表面に対する法線と前記励起光の光軸とを含む平面に対する電界の振動方向の角度が $0 \pm 30^\circ$ の範囲内の直線偏光の第1の光と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90 \pm 30^\circ$ の範囲内の直線偏光の第2の光とをそれぞれ検出し、前記第1の光の検出値と前記第2の光の検

40

50

出値との差分値が0となるように、平面視したときにおける前記回折格子に対する前記励起光の光軸の方向を変化させるか、または前記回折格子に対する前記励起光の偏光方向を変化させる第2工程と、前記金属膜に固定された前記捕捉体に、前記蛍光物質で標識された被検出物質を接触させるか、前記金属膜に固定された前記捕捉体に捕捉された被検出物質を前記蛍光物質で標識する第3工程と、前記第2工程および前記第3工程の後、前記回折格子において表面プラズモン共鳴が発生するように、前記回折格子に直線偏光の励起光を照射し、前記蛍光物質から放出された蛍光に含まれる、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0 \pm 30^\circ$ の範囲内の直線偏光の第3の光と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90 \pm 30^\circ$ の範囲内の直線偏光の第4の光とをそれぞれ検出する第4工程と、前記第3の光の検出値と前記第4の光の検出値の差分値を算出する第5工程と、を含む。

10

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、GC-SPPSを利用する測定装置および測定方法において、被検出物質をより高感度に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、実施の形態1に係る表面プラズモン増強蛍光測定装置（以下「SPPS装置」という）の構成を示す模式図である。

【図2】図2A、Bは、回折格子の斜視図である。

20

【図3】図3Aは、実施の形態1に係るチップの第1の態様を模式的に示す図であり、図3Bは、実施の形態1に係るチップの第2の態様を模式的に示す図である。

【図4】図4A、Bは、入射角度を説明するための模式図である。

【図5】図5は、実施の形態1に係るSPPS装置の動作を示すフローチャートである。

【図6】図6A、Bは、蛍光強度の測定手順を示す模式図である。

【図7】図7Aは、蛍光強度の測定手順を示す模式図であり、図7Bは、測定原理を説明するための図である。

【図8】図8は、実施の形態2に係るSPPS装置の構成を示す模式図である。

【図9】図9は、実施の形態2に係るSPPS装置の動作を示すフローチャートである。

【図10】図10は、実施の形態1、2に係るSPPS装置の他の例の構成を示す模式図である。

30

【図11】図11A、Bは、参考実験の手順を示す模式図である。

【図12】図12A、Bは、参考実験の測定結果を示すグラフである。

【図13】図13A、Bは、参考実験の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明の実施の形態について、図面を参照して詳細に説明する。

【0015】

[実施の形態1]

図1は、本発明の実施の形態1に係る表面プラズモン増強蛍光測定装置（SPPS装置）100の構成を示す模式図である。

40

【0016】

図1に示されるように、SPPS装置100は、励起光照射ユニット110、回転部120、蛍光検出ユニット130および制御部140を有する。SPPS装置100は、回転部120のチップホルダー122にチップ200を装着した状態で使用される。そこで、チップ200について先に説明し、その後にSPPS装置100について説明する。

【0017】

（チップおよびSPPS装置の構成）

チップ200は、基板210と、基板210の上に形成された金属膜220とを有する。金属膜220には、回折格子230が形成されている。回折格子230には捕捉体（例

50

えば1次抗体)が固定化されており、回折格子230の表面は、捕捉体と被検出物質とが結合するための反応場としても機能する。なお、図1では、捕捉体および被検出物質を省略している。

#### 【0018】

基板210は、金属膜220の支持部材である。基板210の材料は、金属膜220を支持できる機械的強度を有するものであれば特に限定されない。基板210の材料の例には、ガラスや石英、シリコンなどの無機材料、ポリメタクリル酸メチルやポリカーボネート、ポリスチレン、ポリオレフィンなどの樹脂が含まれる。

#### 【0019】

金属膜220は、基板210上に配置されている。前述のとおり、金属膜220には、回折格子230が形成されている。金属膜220に光を照射すると、金属膜220中に生じる表面プラズモンと、回折格子230により生じるエバネッセント波とが結合して、表面プラズモン共鳴が生じる。金属膜220の材料は、表面プラズモンを生じさせる金属であれば特に限定されない。金属膜220の材料の例には、金、銀、銅、アルミ、これらの合金が含まれる。また、金属膜220の形成方法は、特に限定されない。金属膜220の形成方法の例には、スパッタリング、蒸着、メッキが含まれる。金属膜220の厚みは、特に限定されない。さらに、金属膜220の厚みは、例えば30~500nmであり、好ましくは100~300nmである。

#### 【0020】

回折格子230は、金属膜220に光を照射された時に、エバネッセント波を生じさせる。回折格子230の形状は、エバネッセント波を生じさせることができれば特に限定されない。たとえば、回折格子230は、図2Aに示されるように1次元回折格子であってもよいし、図2Bに示されるように2次元回折格子であってもよい。図2Aに示される1次元回折格子では、金属膜220の表面に、互いに平行な複数の凸条(金属膜220の表面方向に延びた突出部)が所定の間隔で形成されている。図2Bに示される2次元回折格子では、金属膜220の表面に、所定形状の凸部が周期的に配置されている。凸部の配列の例には、正方格子、三角(六方)格子などが含まれる。回折格子230の断面形状の例には、矩形波形状、正弦波形状、鋸歯形状などが含まれる。

#### 【0021】

回折格子230の形成方法は、特に限定されない。たとえば、平板状の基板210の上に金属膜220を形成した後、金属膜220に凹凸形状を付与してもよい。また、予め凹凸形状を付与された基板210の上に、金属膜220を形成してもよい。いずれの方法であっても、回折格子230を含む金属膜220を形成することができる。

#### 【0022】

回折格子230(反応場)には、被検出物質を捕捉するための捕捉体が固定化されている。捕捉体は、被検出物質に特異的に結合する。本実施の形態では、回折格子230の表面に、捕捉体が略均一に固定化されている。捕捉体の種類は、被検出物質を捕捉することができるれば特に限定されない。たとえば、捕捉体は、被検出物質に特異的な抗体(1次抗体)またはその断片、被検出物質に特異的に結合可能な酵素などである。

#### 【0023】

捕捉体の固定化方法は、特に限定されない。たとえば、回折格子230の上に、捕捉体を結合させた自己組織化単分子膜(以下、「SAM」という)または高分子膜を形成すればよい。SAMの例には、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SH}$ などの置換脂肪族チオールで形成された膜が含まれる。高分子膜を構成する材料の例には、ポリエチレングリコールおよびMPCポリマーが含まれる。また、捕捉体に結合可能な反応性基(または反応性基に変換可能な官能基)を有する高分子を回折格子230に固定化し、この高分子に捕捉体を結合させてもよい。

#### 【0024】

図1に示されるように、励起光は、所定の入射角度 $\theta_1$ で金属膜220(回折格子230)に照射される。照射領域では、金属膜220で生じた表面プラズモンと、回折格子

10

20

30

40

50

230により生じたエバネッセント波が結合し、SPRが生じる。照射領域に蛍光物質が存在する場合は、SPRにより形成された増強電場により、蛍光物質が励起され、蛍光が放出される。GC-SPFSでは、PC-SPFSと異なり、蛍光は特定の方向に指向性を持って出射される。たとえば、蛍光の出射角度 $\theta_2$ は、 $2\theta_1$ で近似される。なお、励起光の反射光は、ほとんど生じない。

#### 【0025】

回折格子230は、使用時には、反応や洗浄などの操作のために緩衝液などの液体に接触する。したがって、通常は、回折格子230は、液体を収容可能な空間に配置される。たとえば、回折格子230は、図3Aに示されるように、液体を収容するウェルの内表面（例えば底面）に配置されてもよいし、図3Bに示されるように、液体を連続して供給される流路（フローセル）の内表面（例えば底面）に配置されてもよい。図3Aに示されるチップ200は、例えば、一般的な被検出物質の測定（非リアルタイム測定）に加えて、バルクと金属膜220表面との間の物質移動解析（リアルタイム測定）や、増強電場空間スケール（z軸方向）の測定などにも好適である。図3Bに示されるチップ200は、例えば、一般的な被検出物質の測定（非リアルタイム測定）に加えて、金属膜220表面に固定化された分子（捕捉体）に対する、別の分子（被検出物質）の反応定数解析（リアルタイム測定）などにも好適である。なお、回折格子230のピッチとしては、例えば400nm程度であることが好ましい。

10

#### 【0026】

次に、SPFS装置100の各構成要素について説明する。前述したように、SPFS装置100は、励起光照射ユニット110、回転部120、蛍光検出ユニット130および制御部140を有する。

20

#### 【0027】

励起光照射ユニット110は、波長および光量が一定である直線偏光の励起光を、チップ200の金属膜220（回折格子230）に照射する。このとき、励起光照射ユニット110は、金属膜220中の表面プラズモンと結合できる回折光が回折格子230で生じるように、直線偏光の励起光を金属膜220（回折格子230）に照射する。本実施の形態では、励起光の光軸は、チップ200を側面視したとき、金属膜220の法線Nに対して傾斜している（図4A参照）。また、励起光の光軸は、チップ200を平面視したとき、回折格子230における周期的構造の配列方向に沿う直線Lに対して平行であるか傾斜している（図4B参照）。

30

#### 【0028】

励起光照射ユニット110は、少なくとも光源112および第1偏光子114を有する。励起光照射ユニット110は、さらにコリメートレンズや励起光フィルターなどを有していてもよい。

#### 【0029】

光源112は、チップ200の回折格子230に向けて励起光を出射する。本実施の形態では、光源112は、レーザーダイオードである。なお、光源112の種類は、特に限定されず、レーザーダイオードでなくてもよい。光源112の例には、発光ダイオード、水銀灯、その他のレーザー光源が含まれる。

40

#### 【0030】

第1偏光子114は、光源112と回折格子230との間に配置され、光源112から出射された励起光から直線偏光の励起光を取り出す。第1偏光子114の種類は、所定の偏光方向の直線偏光の励起光を取り出すことができれば特に限定されない。第1偏光子114の例には、偏光プリズム、液晶フィルター、その他の偏光フィルターが含まれる。本実施の形態では、第1偏光子114は、偏光板である。第1偏光子114は、光源112から出射された励起光から、金属膜220の表面に対する法線Nと励起光の光軸とを含む平面（以下、「前記平面」という）に対する電界の振動方向の角度が $0 \pm 30^\circ$ の範囲内の直線偏光の励起光を取り出す。

#### 【0031】

50

励起光フィルター（図示省略）は、光源 112 とチップ 200 との間に配置され、光源 112 から出射された励起光を整波する。励起光フィルターは、例えば、バンドパスフィルターを含む。レーザーダイオード（光源 112）からの励起光は、若干の波長分布幅を有しているため、バンドパスフィルターは、レーザーダイオードからの励起光を中心波長のみの狭帯域光にする。

【0032】

コリメートレンズ（図示省略）は、光源 112 とチップ 200 との間に配置され、光源 112 から出射された励起光をコリメートする。レーザーダイオード（光源 112）から出射される励起光は、コリメートされてもその輪郭形状が扁平である。このため、金属膜 220 表面における照射スポットの形状が略円形となるように、レーザーダイオードは所定の姿勢で保持される。照射スポットのサイズとしては、例えば 1 mm 程度であることが好ましい。

10

【0033】

金属膜 220 に対する励起光の入射角度  $\theta_1$  は、チップ 200 を側面視したときにおける励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  と、チップ 200 を平面視したときにおける励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  とにより表すことができる。

【0034】

図 4 は、励起光の入射角度  $\theta_1$  ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ ) を説明するための模式図である。図 4 A は、チップ 200 を側面視したときにおける励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  を説明するための模式図であり、図 4 B は、チップ 200 を平面視したときにおける励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  を説明するための模式図である。なお、以下の説明では、回折格子 230 における周期的構造の配列方向を x 軸方向とし、x 軸に垂直かつ金属膜 220 の表面に平行な軸を y 軸とし、x 軸に垂直かつ金属膜 220 の表面に垂直な軸を z 軸とする。

20

【0035】

図 4 A に示されるように、チップ 200 を側面視したとき、励起光の光軸は、金属膜 220 の表面の法線 N に対して所定の角度傾斜している。チップ 200 を側面視したとき、励起光の光軸と金属膜 220 の表面の法線 N とのなす角度のうち小さい角度  $\theta_{1a}$ （以下、「励起光の入射角度  $\theta_{1a}$ 」ともいう）は、蛍光（増強電場）が最も強くなる角度である。励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  は、回折格子 230 のピッチや励起光の波長、金属膜 220 を構成する金属の種類などに応じて適切に選択される。チップ 200 を側面視したときの励起光の最適な入射角度  $\theta_{1a}$  は、各種条件の変更により変わるため、SPFS 装置 100 は、励起光の光軸と前記金属膜 220（回折格子 230）との交点を通り、かつ金属膜 220 の表面に位置する直線を中心軸として励起光の光軸とチップ 200 とを相対的に回転させることで入射角度  $\theta_{1a}$  を調整する第 1 角度調整部（図示省略）を有することが好ましい。たとえば、第 1 角度調整部は、励起光の光軸と金属膜 220 との交点を通り、かつ金属膜 220 の表面上の直線を中心軸として、励起光照射ユニット 110 またはチップ 200 を相互に回転させればよい。

30

【0036】

また、図 4 B に示されるように、チップ 200 を平面視したとき、励起光の光軸は、回折格子 230 における周期的構造の配列方向（x 軸方向）に沿う直線 L に対して平行であるか傾斜している。チップ 200 を平面視したとき、励起光の光軸と回折格子 230 における周期的構造の配列方向に沿う直線 L とのなす角度のうち小さい角度  $\theta_{1b}$ （以下、「励起光の入射角度  $\theta_{1b}$ 」ともいう）は、後述する金属膜 220 上に蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、第 1 の光（例えば、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$ ）の検出値と、第 2 の光（例えば、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$ ）の検出値との差分値が 0 となる角度である。チップ 200 を平面視したときの励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  の調整方法は、特に限定されない。本実施の形態では、チップ 200 を平面視したときの励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  は、回転部 120 によって調整している。なお、蛍光（増強電場）が最も強くなるためには、チップ 200 を平面視したときの最適な入射角度  $\theta_1$  は、励起光の光軸が、回折格子 230 における周期的構造の配列

40

50

方向（図2A、Bにおけるx軸方向）に沿うことが必要となる。しかし、本実施の形態では、より高精度に被検出物質を測定するために、回折格子230における周期的構造の配列方向に沿う直線Lに対する励起光の光軸の角度を設定している。

【0037】

回転部120は、平面視したときにおける回折格子230に対する励起光の光軸の方向（角度）を変化させる。本実施の形態では、回転部120は、励起光の光軸と金属膜220との交点を通る金属膜220の表面に対する法線Nを中心軸として、回折格子230（チップ200）を回転させる。

【0038】

回転部120の構成は、平面視したときにおける回折格子230に対する励起光の光軸の方向を変化させることができれば特に限定されない。たとえば、回転部120は、チップホルダー122およびモーター124を有する。チップホルダー122の構造は、チップ200を保持することができれば特に限定されない。本実施の形態では、チップホルダー122は、上面が開放された箱状に形成されており、内部にチップ200を収容できるようになっている。モーター124は、前記法線Nを中心軸としてチップホルダー122を回転させる。モーター124がチップホルダー122に接続されており、モーター124を回転させることによりチップ200が所定の角度だけ回転する。

【0039】

蛍光検出ユニット130は、励起光照射ユニット110に対して、励起光の光軸と金属膜220との交点を通り、かつ金属膜220の表面に対する法線Nを挟むように配置されている。蛍光検出ユニット130は、金属膜220で反射した励起光の反射光および回折格子230（反応場）上の蛍光物質から放出される蛍光を検出する。

【0040】

蛍光検出ユニット130は、少なくとも第2偏光子132および光検出部134を有する。蛍光検出ユニット130は、さらに集光レンズ群や開口絞り、蛍光フィルターなどを有していてもよい。

【0041】

第2偏光子132は、回折格子230と光検出部134との間に配置され、蛍光物質から放出された蛍光から直線偏光の光を取り出す。第2偏光子132の種類は、所定の偏光方向の直線偏光の光を取り出すことができれば特に限定されない。第2偏光子132の例には、偏光プリズム、液晶フィルター、その他の偏光フィルターが含まれる。本実施の形態では、第2偏光子132は、偏光板である。第2偏光子132は、金属膜220から光検出部134に向かう蛍光の進行方向に垂直な平面内で回転できるように保持されている。

【0042】

第2偏光子132は、チップ200を平面視したときの励起光の入射角度 $\theta_{1b}$ の決定時および被検出物質の検出時において、2種類の光をそれぞれ取り出す。励起光の入射角度 $\theta_{1b}$ の決定時には、第2偏光子132は、金属膜220上に蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに、蛍光物質から放出された蛍光から、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0 \pm 30^\circ$ の範囲内の第1の光、および前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90 \pm 30^\circ$ の範囲内の第2の光を取り出す。好ましくは、第2偏光子132は、蛍光から、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光を第1の光として取り出し、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光を第2の光として取り出す。

【0043】

また、被検出物質の検出時には、第2偏光子132は、捕捉体に蛍光物質で標識されている被検出物質が捕捉されている状態のときに、蛍光物質からそれぞれ放出された蛍光から、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0 \pm 30^\circ$ の範囲内の第3の光、および前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90 \pm 30^\circ$ の範囲内の第4の光を取り出す。好ましくは、第2偏光子132は、蛍光から、前記平面に対する電界の振動方向の角度

10

20

30

40

50

が  $0^\circ$  の光を第 3 の光として取り出し、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光を第 4 の光として取り出す。

【 0 0 4 4 】

本実施の形態では、第 2 偏光子（偏光板）1 3 2 を回転させることで、第 1 の光または第 2 の光を取り出す。また、第 2 偏光子（偏光板）1 3 2 を回転させることで、第 3 の光または第 4 の光を取り出す。

【 0 0 4 5 】

光検出部 1 3 4 は、第 2 偏光子 1 3 2 により取り出された直線偏光の光を検出して、金属膜 2 2 0 上の蛍光像を検出する。第 2 偏光子 1 3 2 が、蛍光 から第 1 の光または第 2 の光を取り出した場合は、光検出部 1 3 4 は、第 1 の光または第 2 の光を検出する。また、第 2 偏光子 1 3 2 が、蛍光 から第 3 の光または第 4 の光を取り出した場合は、光検出部 1 3 4 は、第 3 の光または第 4 の光を検出する。たとえば、光検出部 1 3 4 は、感度および S/N 比が高い光電子増倍管である。光検出部 1 3 4 は、アバランシェ・フォトダイオード（APD）やフォトダイオード（PD）、CCD イメージセンサなどであってもよい。

10

【 0 0 4 6 】

集光レンズ群（図示省略）は、チップ 2 0 0 と光検出部 1 3 4 との間に配置され、迷光の影響を受けにくい共役光学系を構成する。集光レンズ群は、金属膜 2 2 0 上の蛍光像を光検出部 1 3 4 の受光面上に結像させる。

【 0 0 4 7 】

蛍光フィルター（図示省略）は、チップ 2 0 0 と光検出部 1 3 4 との間に配置される。蛍光フィルターは、例えば、カットフィルターおよび減光（ND）フィルターを含み、光検出部 1 3 4 に到達する光から蛍光 以外のノイズ成分（例えば、励起光 や外光など）を除去したり、光検出部 1 3 4 に到達する光の光量を調整したりする。

20

【 0 0 4 8 】

前述のとおり、GC-SPFS では、蛍光 は、回折格子 2 3 0（反応場）から特定の方向に指向性を持って出射される。したがって、金属膜 2 2 0 表面の法線 N に対する蛍光検出ユニット 1 3 0 の光軸の角度は、蛍光 の強度が最大となる角度（蛍光ピーク角）であることが好ましい。したがって、SPFS 装置 1 0 0 は、蛍光検出ユニット 1 3 0 の光軸とチップ 2 0 0 とを相対的に回転させることで蛍光検出ユニット 1 3 0 の光軸の角度を調整する第 2 角度調整部（図示省略）を有することが好ましい。たとえば、第 2 角度調整部は、蛍光検出ユニット 1 3 0 の光軸と金属膜 2 2 0 との交点を通り、かつ金属膜 2 2 0 の表面上の直線を中心軸として、蛍光検出ユニット 1 3 0 またはチップ 2 0 0 を相互に回転させればよい。

30

【 0 0 4 9 】

制御部 1 4 0 は、励起光照射ユニット 1 1 0（光源 1 1 2、第 1 偏光子 1 1 4 および第 1 角度調整部）、回転部 1 2 0（モーター 1 2 4）および蛍光検出ユニット 1 3 0（第 2 偏光子 1 3 2、光検出部 1 3 4 および第 2 角度調整部）の動作を制御する。また、制御部 1 4 0 は、光検出部 1 3 4 からの出力信号（検出結果）を処理する処理部としても機能する。制御部 1 4 0 は、例えば、ソフトウェアを実行するコンピュータである。

40

【 0 0 5 0 】

（表面プラズモン増強蛍光測定方法）

次に、SPFS 装置 1 0 0 の検出動作に（表面プラズモン増強蛍光測定方法）について説明する。図 5 は、SPFS 装置 1 0 0 の動作手順の一例を示すフローチャートである。図 6 A、B、図 7 A は、蛍光強度の測定手順を示す模式図である。図 7 B は、測定原理を説明するための図である。この例では、捕捉体として 1 次抗体が金属膜 2 2 0 上に固定化されている。また、蛍光標識に使用する捕捉体として、蛍光物質で標識された 2 次抗体を使用している。

【 0 0 5 1 】

まず、測定の準備をする（工程 S 1 0）。具体的には、チップ 2 0 0 を準備して、チッ

50

プホルダー 122 にチップ 200 を設置する。また、チップ 200 の金属膜 220 上に保湿剤が存在する場合は、1次抗体が適切に被検出物質を捕捉できるように、金属膜 220 上を洗浄して保湿剤を除去する。

#### 【0052】

次いで、制御部 140 は、チップ 200 を側面視したときの励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  を決定する（工程 S20）。具体的には、図 6A に示されるように、制御部 140 は、励起光を金属膜 220 の所定の位置に照射させながら、第 1 角度調整部により金属膜 220 に対する励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  を走査させる。また、制御部 140 は、光検出部 134 が金属膜 220 上からの反射光を検出するように、第 2 角度調整部を制御する。金属膜 220 で反射した励起光の反射光は、光検出部 134 に到達する。これにより、制御部 140 は、励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  と励起光の反射光の光量との関係を含むデータを得る。そして、制御部 140 は、データを解析して、励起光の反射光の光量が最小となる入射角度  $\theta_{1a}$  を決定する。このとき、励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  は、 $0^\circ$  である。なお、第 1 偏光子 114 および第 2 偏光子 132 は、それぞれ励起光の光路上および反射光の光路上に配置されていなくてもよい。

10

#### 【0053】

このように、決定したチップ 200 を側面視したときの励起光の入射角度  $\theta_{1a}$  は、励起光の反射光の光量が最小となる角度である。したがって、チップ 200 を平面視したときの励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  が  $0^\circ$  の場合、励起光の入射角度  $\theta_1$  ( $\theta_{1a}$ 、 $\theta_{1b}$ ) は、共鳴角となる。また、GC-SPPS では、励起光の反射光の光量が最小となる共鳴角と、増強電場の強度が最も強くなる増強角の値とは、ほとんど同じ値である。すなわち、励起光の入射角度  $\theta_{1b}$  が  $0^\circ$  の場合、励起光の反射光の光量が最小となる励起光の入射角度  $\theta_1$  ( $\theta_{1a}$ 、 $\theta_{1b}$ ) を求めることで、共鳴角および増強角を求めることができる。決定した入射角度  $\theta_{1a}$  は、被検出物質の測定に用いられる。

20

#### 【0054】

次いで、第 1 の光の蛍光強度を測定する（工程 S30）。具体的には、まず、蛍光物質で標識された 2 次抗体を含む蛍光標識液を提供する。このように、第 1 の光の蛍光強度の測定は、金属膜 220 上に蛍光物質を含む液体が存在する状態のときに行われる。次いで、図 6B に示されるように、制御部 140 は、光源 112 に励起光を金属膜 220 の所定の位置に照射させながら、回転部 120 のモーター 124 を駆動して、金属膜 220 の回折格子 230 の周期方向に対する励起光の光軸の方向（入射角度  $\theta_{1b}$ ）を走査させる（チップ 200 を水平方向に回転させる）。このとき、入射角度  $\theta_{1a}$  は、工程 S20 で決定した反射光の光量が最小となる角度である。また、制御部 140 は、蛍光に含まれる第 1 の光（例えば、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$ ）のみが透過できるように、第 2 偏光子 132 の回転角度を調整する。光検出部 134 は、測定結果（出力  $O_1$ ）を制御部（処理部）140 に出力する。出力  $O_1$  は、金属膜 220 上に浮遊している蛍光物質から放出される蛍光（ノイズ成分）のうち、第 1 の光の蛍光強度である。

30

#### 【0055】

なお、工程 S30 では、蛍光物質のみ含む液体を提供してもよい。この場合、後述する工程 S70 では、まず検体を提供して、検体中の被検出物質と 1 次抗体とを反応させる（1 次反応）。次いで、2 次抗体を提供して、被検出物質と 2 次抗体とを反応させるとともに、2 次抗体と蛍光物質を反応させる（2 次反応）。

40

#### 【0056】

次いで、第 2 の光の蛍光強度を測定する（工程 S40）。具体的には、図 6B に示されるように、制御部 140 は、光源 112 に励起光を金属膜 220 の所定の位置に照射させながら、回転部 120 のモーター 124 を駆動して、金属膜 220 の回折格子 230 の周期方向に対する励起光の光軸の方向（入射角度  $\theta_{1b}$ ）を走査させる。このとき、入射角度  $\theta_{1a}$  は、工程 S30 と同じ角度である。また、制御部 140 は、蛍光に含まれる第 2 の光（例えば、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$ ）のみが透過できるように、第 2 偏光子 132 の回転角度を調整する。光検出部 134 は、測定結果（出力

50

O<sub>2</sub>)を制御部(処理部)140に出力する。出力O<sub>2</sub>は、金属膜220上に浮遊している蛍光物質から放出される蛍光(ノイズ成分)のうち、第2の光の蛍光強度である。

【0057】

なお、第1の光の蛍光強度の測定(工程S30)と第2の光の蛍光強度の測定(工程S40)との順番は、これに限定されない。たとえば、第2の光の蛍光強度を測定した後に、第1の光の蛍光強度を測定してもよい。

【0058】

次いで、制御部140は、入射角度 $\theta_{1b}$ を決定する(工程S50)。具体的には、制御部140は、工程S30および工程S40により得られた測定結果(出力O<sub>1</sub>および出力O<sub>2</sub>)から第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度の差分値が0となる角度を求める。そして、制御部140は、第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度の差分値が0となる角度を入射角度 $\theta_{1b}$ とする。

10

【0059】

前述のとおり、入射角度 $\theta_{1b}$ は、第1の光の蛍光強度(ノイズ成分)および第2の光の蛍光強度(ノイズ成分)の差分値が0となる角度である。このように、第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度の差分値が0となるように、入射角度 $\theta_{1b}$ を設定することで、後述の工程S110において、浮遊している蛍光物質の蛍光強度と、第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度の差分値とをキャンセルすることができる。

【0060】

次いで、制御部140は、チップ200を平面視したときの励起光の入射角度 $\theta_{1b}$ を調整する(工程S60)。具体的には、制御部140は、金属膜220の回折格子230の周期方向に対する励起光の光軸の角度が工程50で得られた入射角度 $\theta_{1b}$ となるように、回折格子230(チップ200)を回転させる。

20

【0061】

次いで、制御部140は、検体中の被検出物質と1次抗体とを反応させるとともに、被検出物質と標識された2次抗体とを反応させる(1次反応、2次反応;工程S70)。具体的には、金属膜220上に検体を提供して、検体と1次抗体とを接触させる。検体中に被検出物質が存在する場合は、被検出物質の少なくとも一部は1次抗体に結合する。また、被検出物質が1次抗体に結合している場合は、被検出物質の少なくとも一部は、すでに存在している2次抗体に結合することで蛍光物質により標識される。検体および被検出物質の種類は、特に限定されない。検体の例には、血液や血清、血漿、尿、鼻孔液、唾液、精液などの体液およびその希釈液が含まれる。また、被検出物質の例には、核酸(DNAやRNAなど)、タンパク質(ポリペプチドやオリゴペプチドなど)、アミノ酸、糖質、脂質およびこれらの修飾分子が含まれる。

30

【0062】

次いで、任意の工程として、金属膜220を洗浄する(工程S80)。具体的には、蛍光物質で標識した後は、金属膜220上を緩衝液などで洗浄し、遊離の2次抗体などを除去することが好ましい。なお、1次反応、2次反応(工程S70)の後に金属膜220上の蛍光標識液を、2次抗体を含まない緩衝液に置換して金属膜220を洗浄した場合であっても、被検出物質に結合した2次抗体の一部は緩衝液中に離脱する。また、1次反応、2次反応(工程S70)の後に洗浄を行わなかった場合は、金属膜220上には蛍光標識液がそのまま存在していることになる。この場合、リアルタイム測定が可能となるほか、洗浄により測定できなくなるアフィニティの低い物質を測定対象にできるメリットがある。また、洗浄工程を省略することで測定時間も短縮できる。

40

【0063】

次いで、第3の光の蛍光強度を測定(被検出物質の測定)する(工程S90)。具体的には、制御部140は、光源112に励起光を出射させる。同時に、制御部140は、光検出部134に金属膜220からの蛍光の強度を検出させる。このとき、励起光の入射角度 $\theta_{1a}$ は、工程S20で決定した角度であり、入射角度 $\theta_{1b}$ は、工程S50で決定した角度である。また、図7Aに示されるように、制御部140は、蛍光に含まれ

50

る第3の光（図では前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光）のみが透過できるように、第2偏光子132の回転角度を調整する。光検出部134は、測定結果（出力Op）を制御部（処理部）140に出力する。出力Opは、シグナル成分および第1の光の蛍光強度の少なくとも一部を含む。

【0064】

GC-SPFSでは、被検出物質を標識する蛍光物質から放出される蛍光（シグナル成分）は、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光、または偏光角度が前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光に近い光であり、第2偏光子132を透過して光検出部134に到達する。また、浮遊している蛍光物質の蛍光に含まれる第1の光も光検出部134に到達する。結果として、この工程の測定結果（出力Op）は、シグナル成分および第1の光の蛍光強度の少なくとも一部を含む。

10

【0065】

次いで、第4の光の蛍光強度を測定（被検出物質の測定）する（工程S100）。具体的には、制御部140は、光源112に励起光を出射させる。同時に、制御部140は、光検出部134に金属膜220からの蛍光の強度を検出させる。このとき、図7Aに示されるように、制御部140は、蛍光に含まれる第4の光（図では前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光）のみが透過できるように、第2偏光子132の回転角度を調整する。光検出部134は、測定結果（出力Os）を制御部（処理部）140に出力する。被検出物質を標識する蛍光物質から放出される蛍光（シグナル成分）は、前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光、または前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光に近い光をほとんど含まないため、出力Osは、主として第2の光の蛍光強度の少なくとも一部からなる。

20

【0066】

なお、第3の光の蛍光強度の測定（工程S90）と第4の光の蛍光強度の測定（工程S100）の順番は、これに限定されない。たとえば、第4の光の強度を測定した後に、第3の光の強度を測定してもよい。

【0067】

最後に、制御部（処理部）140は、光検出部134からの出力信号（出力OpおよびOs）を解析して、被検出物質の存在または被検出物質の量を分析する（工程S110）。具体的には、制御部（処理部）140は、出力Opと出力Osとの差分値を算出してシグナル値を得る。

30

【0068】

次に、図7Bを参照して、表面プラズモン増強蛍光測定方法の測定原理について説明する。なお、図7Bの $I_{p1}$ は被検出物質を標識した蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光の成分を示しており、 $I_{s1}$ は被検出物質を標識した蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光の成分を示しており、 $I_{p2}$ は増強電場が及ばない空間に位置する浮遊の蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光の成分を示しており、 $I_{s2}$ は増強電場が及ばない空間に位置する浮遊の蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光の成分を示しており、 $I_{p3}$ は金属膜220に非特異的に付着した蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光の成分を示しており、 $I_{s3}$ は金属膜220に非特異的に付着した蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光の成分を示している。また、図7Bの白丸は被検出物質を示しており、白抜きのY字様の構造は、捕捉体（1次抗体）を示しており、黒塗りのY字様の構造は2次抗体を示しており、白抜きの星形は蛍光物質を示している。

40

【0069】

図7Bに示されるように、被検出物質の測定時（第3の光の蛍光強度の測定；工程S90）において、蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光の成分 $I_p$ は、以下の式（1）で表すことができる。

50

$$I_p = I_{p1} + I_{p2} + I_{p3} \quad (1)$$

【0070】

また、被検出物質の測定時（第4の光の蛍光強度の測定；工程S100）において、蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の成分 $I_s$ は、以下の式（2）で表すことができる。

$$I_s = I_{s1} + I_{s2} + I_{s3} \quad (2)$$

【0071】

さらに、以下の式（3）に示されるように、式（1）から式（2）を差し引くことで、蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の成分 $I_p$ と、蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の成分 $I_s$ との差分値を求めることができる。

$$I_p - I_s = (I_{p1} - I_{s1}) + (I_{p2} - I_{s2}) + (I_{p3} - I_{s3}) \quad (3)$$

【0072】

ここで、増強電場により励起された蛍光物質からは前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光および偏光角度が前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光に近い光がほとんど放出されないため、増強電場が及ぶ領域に存在する蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の成分（ $I_{s1}$ ）および（ $I_{s3}$ ）は0と近似することができる。これにより、前述の式（3）は、以下の式（4）となる。

$$I_p - I_s = I_{p1} + (I_{p2} - I_{s2}) + I_{p3} \quad (4)$$

【0073】

次に、右辺の第2項の「 $I_{p2} - I_{s2}$ 」とは、増強電場が及ばない空間に位置する浮遊の蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の成分と、増強電場が及ばない空間に位置する浮遊の蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の成分との差分値であり、本実施の形態では、「 $I_{p2} - I_{s2} = 0$ 」である（工程S30～工程S50参照）。したがって、前述の式（4）は、以下の式（5）となる。

$$I_p - I_s = I_{p1} + I_{p3} \quad (5)$$

【0074】

さらに、金属膜220に非特異的に付着した蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の成分（ $I_{p3}$ ）は、被検出物質を標識した蛍光物質から放出された蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の成分（ $I_{p1}$ ）と比較して極めて小さい値であるため、0と近似することができる。よって、前述の式（5）は、以下の式（6）となる。

$$I_p - I_s = I_{p1} \quad (6)$$

【0075】

このように、本実施の形態に係る表面プラズモン増強蛍光測定方法は、「 $I_{p2} - I_{s2} = 0$ 」としているため、第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度が異なる値であっても、被検出物質を標識する蛍光物質から放出される蛍光の蛍光強度を精度良く検出することができる。

【0076】

以上の手順により、検体中の被検出物質の存在または被検出物質の量を検出することができる。

【0077】

以上のように、本実施の形態のSPFS装置100は、シグナル成分とノイズ成分の偏光特性の違いを利用してシグナル成分のみを検出することができるため、従来のSPFS装置に比べてより高感度に被検出物質を検出することができる。

【0078】

また、本実施の形態のSPFS装置100は、蛍光に含まれるノイズ成分を除去する

10

20

30

40

50

ことができるため、1次反応、2次反応(工程S70)を行った後に遊離の2次抗体を除去(金属膜220の洗浄;工程S80)しなくても被検出物質の検出を行うことができる。

【0079】

なお、前述の実施の形態では、回折格子230(チップ200)を金属膜220の法線Nを回転軸として回転させたが、回折格子230(チップ200)に対して励起光の光軸を回転させてもよい。

【0080】

なお、上記実施の形態では、金属膜220側から励起光をチップ200に照射する例について説明したが、基板210側から励起光をチップ200に照射してもよい。

10

【0081】

[実施の形態2]

実施の形態2に係るSPFS装置300は、回転部320の構成が回転部120と異なる点において実施の形態1に係るSPFS装置100と異なる。そこで、主として回転部320の構成について説明する。また、SPFS装置100と同じ構成については同じ符号を付してその説明を省略する。なお、チップ200は、実施の形態1に係るチップ200と同様であるため、その説明を省略する。

【0082】

(SPFS装置の構成)

図8は、実施の形態2に係るSPFS装置300の構成を示す模式図である。図8に示されるように、実施の形態2に係るSPFS装置300は、励起光照射ユニット110、回転部320、蛍光検出ユニット130および制御部140を有する。

20

【0083】

回転部320は、回折格子230に対する励起光の偏光方向を変化させる。回転部320は、第1偏光子114に接続されており、励起光の光軸を中心軸として、第1偏光子114を回転させる。第1偏光子114を回転させることで、直線偏光の励起光の偏光方向を回転させる。

【0084】

(表面プラズモン増強蛍光測定方法)

次に、SPFS装置300の検出動作に(表面プラズモン増強蛍光測定方法)について説明する。図9は、SPFS装置300の動作手順の一例を示すフローチャートである。なお、実施の形態1におけるSPFS装置100の検出動作と同じ工程については、同じ符号を付してその詳細な説明を省略する。

30

【0085】

まず、測定の準備をする(工程S10)。

【0086】

次いで、励起光の入射角度 $\theta_1$ ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ )を決定する(工程S220)。具体的には、制御部140は、励起光を金属膜220の所定の位置に照射させながら、第1角度調整部により、チップ200を側面視したときの金属膜220の表面に対する法線Nに対する励起光の入射角度 $\theta_{1a}$ を走査させる。また、制御部140は、光検出部134が金属膜220上からの反射光を検出するように、第2角度調整部を制御する。金属膜220で反射した反射光は、光検出部134に到達する。これにより、制御部140は、チップ200を側面視したときの励起光の入射角度 $\theta_{1a}$ と励起光の反射光の光量との関係を含むデータを得る。そして、制御部140は、データを解析して、励起光の反射光の光量が最小となる入射角度 $\theta_{1a}$ を決定する。なお、励起光の入射角度 $\theta_{1a}$ を測定する場合、励起光の入射角度 $\theta_{1b}$ は、0°である。そして、制御部140は、励起光の反射光の光量が最小となる入射角度 $\theta_{1a}$ と、 $\theta_{1b}$ とにより構成される角度を励起光の入射角度 $\theta_1$ ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ )として決定する。

40

【0087】

次いで、第1の光の蛍光強度を測定する(工程S230)。具体的には、制御部140

50

は、蛍光物質で標識された2次抗体を含む蛍光標識液を提供した後、励起光を金属膜220の所定の位置に照射させながら、回転部320を駆動することで、励起光の光軸を中心軸として、第1偏光子114を回転(走査)させる。このとき、入射角度 $\theta_1$ ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ )は、工程S220で得られた角度である。また、制御部140は、蛍光に含まれる第1の光のみが透過できるように、第2偏光子132の回転角度を調整する。光検出部134は、測定結果(出力 $O_1$ )を制御部(処理部)140に出力する。出力 $O_1$ は、金属膜220上に浮遊している蛍光物質から放出される蛍光(ノイズ成分)のうち、第1の光(例えば前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光)の蛍光強度である。

【0088】

次いで、第2の光の蛍光強度を測定する(工程S240)。具体的には、工程S230と同様に、制御部140は、励起光を金属膜220の所定の位置に照射させながら、回転部320を駆動することで、励起光の光軸を中心軸として、第1偏光子114を回転(走査)させる。このとき、入射角度 $\theta_1$ ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ )は、工程S220で得られた角度である。また、制御部140は、蛍光に含まれる第2の光のみが透過できるように、第2偏光子132の回転角度を調整する。光検出部134は、測定結果(出力 $O_2$ )を制御部(処理部)140に出力する。出力 $O_2$ は、金属膜220上に浮遊している蛍光物質から放出される蛍光(ノイズ成分)のうち、第2の光(例えば前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光)の蛍光強度である。

【0089】

次いで、制御部140は、励起光の偏光方向を決定する(工程S250)。具体的には、制御部140は、工程S230および工程S240で得られた測定結果(出力 $O_1$ および出力 $O_2$ )から第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度の差分値が0となるときの、励起光の偏光方向を求める。そして、制御部140は、第1の光の蛍光強度および第2の光の蛍光強度の差分値が0となる方向を励起光の偏光方向として決定する。

【0090】

次いで、制御部140は、直線偏光の励起光の偏光方向を調整する(工程S260)。具体的には、制御部140は、第1偏光子114の偏光方向が工程S250で得られた方向となるように、第1偏光子114を回転させる。

【0091】

次いで、制御部140は、検体中の被検出物質と1次抗体とを反応させるとともに、被検出物質と標識された2次抗体とを反応させる(1次反応、2次反応;工程S70)。

【0092】

次いで、任意の工程として、金属膜220を洗浄する(工程S80)。

【0093】

次いで、第3の光の蛍光強度を測定する(工程S290)。具体的には、制御部140は、光源112に励起光を出射させる。同時に、制御部140は、光検出部134に金属膜220からの蛍光の強度を検出させる。このとき、制御部140は、蛍光に含まれる第3の光(図では前記平面に対する電界の振動方向の角度が $0^\circ$ の光)のみが透過できるように、第2偏光子132の回転角度を調整する。また、このとき、入射角度 $\theta_1$ ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ )は、工程S220で得られた角度であり、第1偏光子114の偏光方向は、工程S260で得られた方向である。光検出部134は、測定結果(出力 $O_p$ )を制御部(処理部)140に出力する。出力 $O_p$ は、シグナル成分および第1の光の蛍光強度の少なくとも一部を含む。

【0094】

次いで、第4の光の蛍光強度を測定する(工程S300)。具体的には、制御部140は、光源112に励起光を出射させる。同時に、制御部140は、光検出部134に金属膜220からの蛍光の強度を検出させる。このとき、制御部140は、蛍光に含まれる第4の光(図では前記平面に対する電界の振動方向の角度が $90^\circ$ の光)のみが透過できるように、第2偏光子132の回転角度を調整する。このとき、入射角度 $\theta_1$ ( $\theta_{1a}$ ,  $\theta_{1b}$ )は、工程S220で得られた角度であり、第1偏光子114の偏光方向は、工程S260で得られた方向である。光検出部134は、測定結果(出力 $O_q$ )を制御部(処理部)140に出力する。出力 $O_q$ は、シグナル成分および第2の光の蛍光強度の少なくとも一部を含む。

10

20

30

40

50

$\theta_{1b}$ )は、工程S220で得られた角度であり、第1偏光子114の偏光方向は、工程S260で得られた方向である。光検出部134は、測定結果(出力Os)を制御部(処理部)140に出力する。出力Osは、主として第2の光の蛍光強度の少なくとも一部である。

#### 【0095】

最後に、制御部(処理部)140は、光検出部134からの出力信号(出力OpおよびOs)を解析して、被検出物質の存在または被検出物質の量を分析する(工程S310)。具体的には、制御部(処理部)140は、出力Opと出力Osとの差分値を算出してシグナル値を得る。

#### 【0096】

実施の形態2における表面プラズモン増強蛍光測定方法でも、実施の形態1に係る表面プラズモン増強蛍光測定方法と同様に、浮遊している蛍光物質からの蛍光のうち第1の光の蛍光強度および浮遊している蛍光物質からの蛍光のうち第2の光の蛍光強度が異なる値であっても、被検出物質を標識する蛍光物質から放出される蛍光の蛍光強度を精度良く検出することができる。

#### 【0097】

以上のように、本実施の形態のSPFS装置300は、実施の形態1のSPFS装置100と同様の効果を有する。

#### 【0098】

なお、図1および図8に示されるSPFS装置100の代わりに、図10に示されるSPFS装置400を用いてもよい。図10に示されるように、SPFS装置400は、ハーフミラー431、第3偏光子432および光検出部434をさらに有する点を除き、SPFS装置100、300と同様に構成されている。

#### 【0099】

ハーフミラー431は、回折格子230と第2偏光子132との間において蛍光の光路上に配置されている。光検出部434は、ハーフミラー431で反射した蛍光の光路(反射光路)上に配置されており、第3偏光子432は、ハーフミラー431と光検出部434との間において反射光路上に配置されている。第2偏光子132の回転角度は、第1の光および第3の光(例えば前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光)を通すように調整(あるいは固定)されており、第3偏光子432の回転角度は、第2の光および第4の光(例えば前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光)を通すように調整(あるいは固定)されている。なお、ハーフミラー431、第2偏光子132および第3偏光子432の代わりに、偏光ビームスプリッターを使用してもよい。

#### 【0100】

以上のように、SPFS装置400は、SPFS装置100、300と同様の効果に加え、ハーフミラー431、第3偏光子432および光検出部434をさらに有しているため、第1の光と第2の光、第3の光と第4の光を同時に測定できる。

#### 【0101】

##### [参考実験]

本実験では、GC-SPFSを利用する測定装置および測定方法において、金属膜上で励起された蛍光物質から放出された蛍光(被検出物質の存在または量を示すシグナル成分)と、液体中に浮遊している蛍光物質から放出された蛍光(ノイズ成分)の偏光特性を調べた結果を示す。

#### 【0102】

本実験では、チップ200を平面視したときの入射角度 $\theta_{1b}$ が10°の場合において、浮遊している蛍光物質から放出される蛍光の指向性の分布について調べた。本実験では、被検出物質を含む検体を提供せず、蛍光物質のみ含む液体を金属膜220上に提供した。本実験では、チップ200を側面視したときの励起光の入射角度 $\theta_{1a}$ は励起光の反射光の光量が最小となる角度とし、励起光の偏光方向(角度)は金属膜220の表面に対する法線Nと励起光の光軸とを含む平面に対して0°とした。この状態で、回折

10

20

30

40

50

格子 230 に所定の波長の励起光を照射し、光検出部 134 の受光角度を変更しながら、浮遊している蛍光物質から放出される蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数および蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光の光子数を測定した。また、比較として、チップ 200 を平面視したときの入射角度  $\theta_{1b}$  が  $0^\circ$  であり、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数を測定した。

【0103】

図 11A は、参考実験の手順を示す模式図である。図 12A は、光検出部 134 の受光角度と、浮遊している蛍光物質から放出される蛍光の光子数との関係を示すグラフである。図 12A の横軸は光検出部 134 の受光角度  $\theta_3$  ( $^\circ$ ) であり、縦軸は蛍光の光子数 (count) である。図 12A の実線は前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光 (入射角度  $\theta_{1b}$  が  $10^\circ$ ) を示しており、破線は前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光を示している。

10

【0104】

図 11A および図 12A の実線に示されるように、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数は、受光角度が  $15^\circ$  近傍で一時的に低下した。また、チップ 200 を平面視したときの入射角度  $\theta_{1b}$  が  $10^\circ$  の場合には、浮遊の蛍光物質由来の前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数と、浮遊の蛍光物質由来の前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光の光子数との差分値が 0 となる受光角度があることが分かった。また、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数が一時的に低下したときの受光角度は、蛍光を検出するために最適な受光角度である。前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数が一時的に低下するのは、当該受光角度では、増強電場の強さが一時的に低下することによるものと考えられた。

20

【0105】

次いで、チップ 200 を平面視したときの入射角度  $\theta_{1b}$  が  $90^\circ$  の場合において、浮遊している蛍光物質から放出される蛍光の指向性の分布について調べた。その他の条件は、前述の実験と同じである。

【0106】

図 11B は、参考実験の手順を示す模式図である。図 12B は、光検出部 134 の受光角度と、蛍光の光子数との関係を示すグラフである。図 12B の横軸は光検出部 134 の受光角度  $\theta_3$  ( $^\circ$ ) であり、縦軸は蛍光の光子数 (count) である。図 12B の実線は前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光を示しており、破線は前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光を示している。

30

【0107】

図 11B と、図 12B の実線および破線とに示されるように、チップ 200 を平面視したときの入射角度  $\theta_{1b}$  が  $90^\circ$  の場合では、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数および前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光の光子数が一時的に低下することがなかった。また、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光の光子数とは、異なることが分かった。

【0108】

次いで、励起光の偏光方向と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の蛍光強度または前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光の蛍光強度との関係について調べた。

40

【0109】

本実験では入射角度  $\theta_{1a}$  を  $10^\circ$  とし、入射角度  $\theta_{1b}$  を  $0^\circ$  とした。この状態で、回折格子 230 に所定の波長の励起光を照射し、励起光の偏光方向を変化させながら、浮遊または固定された蛍光物質から放出された前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $0^\circ$  の光の光子数および前記平面に対する電界の振動方向の角度が  $90^\circ$  の光の光子数を測定した。

【0110】

50

図13Aは、偏光方向と、蛍光物質から放出される蛍光の光子数との関係を示すグラフである。図13Aの横軸は励起光の偏光方向(°)を示しており、縦軸は蛍光の光子数(count)を示している。図13Aの黒丸のシンボルは蛍光のうち、前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の蛍光成分を示しており、白丸のシンボルは蛍光のうち、前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の蛍光成分を示している。

【0111】

図13Aに示されるように、蛍光の前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の光子数は、励起光の反射光の光量が最小となる角度であって、入射角度 $\theta_i$ が0°の励起光(前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光)を照射した場合に最大であった。また、前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の光子数と、前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の光子数との差分値は、偏光方向が±50°付近で0であった。

10

【0112】

次いで、励起光の偏光方向を変化させたときの被検出物質を蛍光標識した蛍光物質から放出された蛍光の光子数について調べた。検体に含まれる被検出物質をAlexa Fluor色素(ライフテクノロジーズ・ジャパン株式会社)で蛍光標識した。この状態で、回折格子230に所定の波長の励起光を照射し、励起光の偏光方向を変化させながら、被検出物質を蛍光標識した蛍光色素から放出された前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の光子数および前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の光子数を測定した。

20

【0113】

図13Bは、偏光方向と、蛍光の光子数との関係を示すグラフである。図13Bの横軸は、励起光の偏光方向(°)を示しており、縦軸は蛍光の光子数(count)を示している。図13Bの黒丸のシンボルは前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光を示しており、白丸のシンボルは前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光を示している。

【0114】

図13Bに示されるように、励起光の偏光方向が±50°付近であっても、蛍光物質が放出した蛍光を測定できた。

【0115】

したがって、シグナル成分以外のノイズ成分が蛍光に含まれる場合であっても、図13に示されるように、前記平面に対する電界の振動方向の角度が0°の光の成分の検出結果から前記平面に対する電界の振動方向の角度が90°の光の成分の検出結果を引くことで、ノイズ成分をほとんど含まないシグナル成分の値を算出することができる。

30

【0116】

本出願は、2014年12月15日出願の特願2014-253193に基づく優先権を主張する。当該出願明細書および図面に記載された内容は、すべて本願明細書に援用される。

【産業上の利用可能性】

【0117】

本発明に係る表面プラズモン増強蛍光測定装置および表面プラズモン増強蛍光測定方法は、被検出物質を高い信頼性で測定することができるため、例えば臨床検査などに有用である。

40

【0118】

また、本発明に係る表面プラズモン増強蛍光測定装置および表面プラズモン増強蛍光測定方法は、蛍光標識液などを提供した後に金属膜表面を洗浄しなくても、被検出物質を高い信頼性で測定することもできる。よって、測定時間の短縮化が図られるだけでなく、非常に簡易な定量免疫測定システムの開発、普及および発展に寄与することも期待される。

【符号の説明】

【0119】

50

100、300、400 表面プラズモン増強蛍光測定装置 (SPFS装置)

110 励起光照射ユニット

112 光源

114 第1偏光子

120、320 回転部

122 チップホルダー

124 モーター

130 蛍光検出ユニット

132 第2偏光子

134、434 光検出部

140 制御部(処理部)

200 チップ

210 基板

220 金属膜

230 回折格子

431 ハーフミラー

432 第3偏光子

励起光

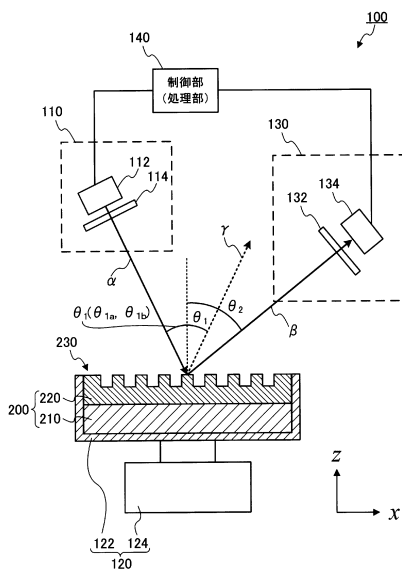
蛍光

反射光

10

20

【図1】



【図2】

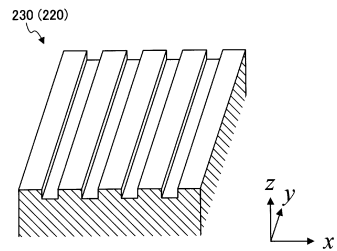


図2A

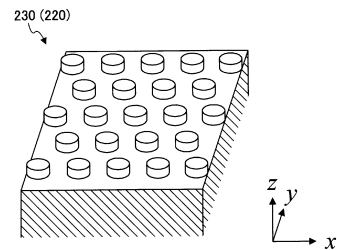


図2B

【 図 3 】

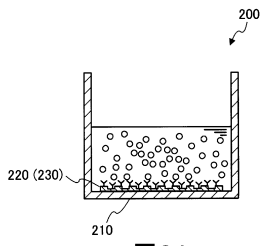


図3A

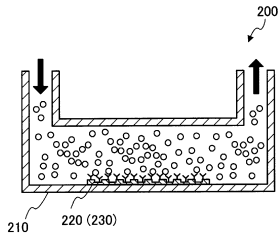


図3B

【 図 4 】

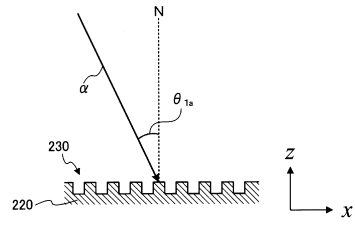


図4A

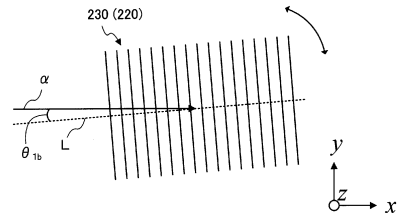
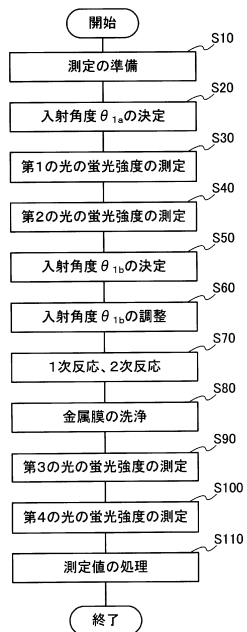


図4B

【 図 5 】



【 図 6 】

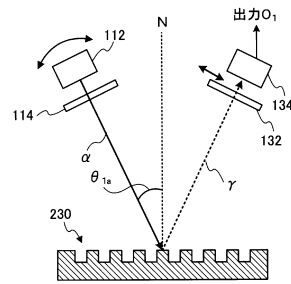


図6A

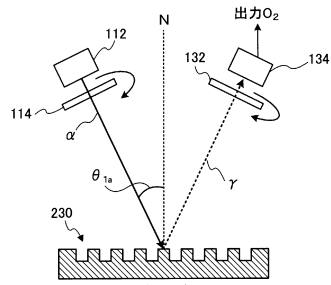


図6B

【 図 7 】

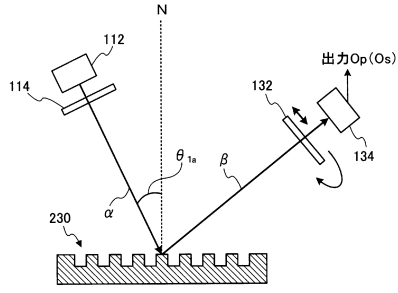


図 7A

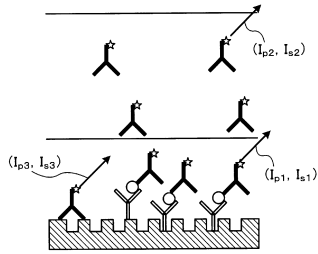
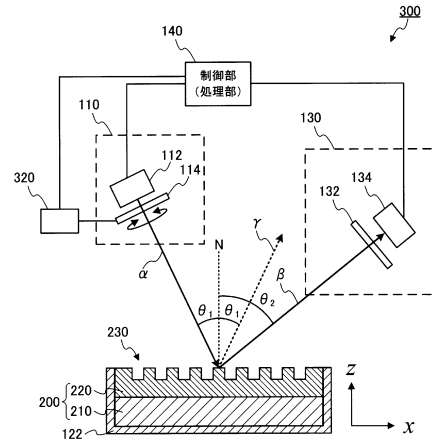
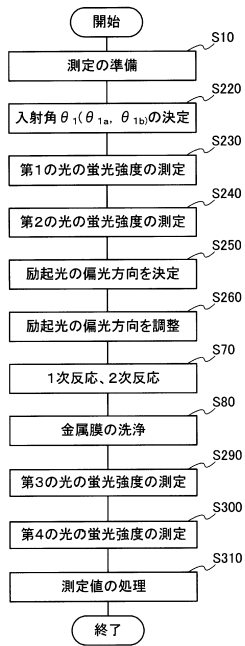


図 7B

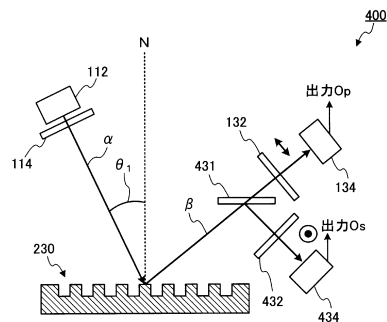
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】

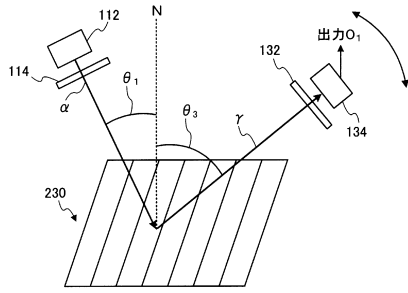


図11A

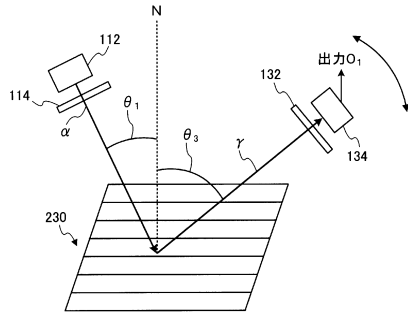


図11B

【 図 1 2 】

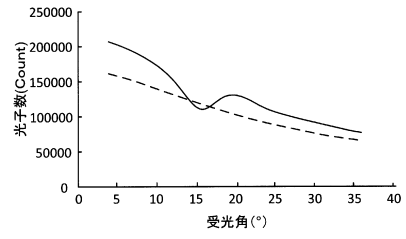


図12A

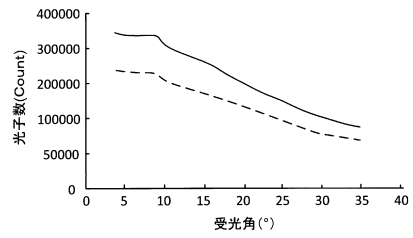


図12B

【 図 1 3 】

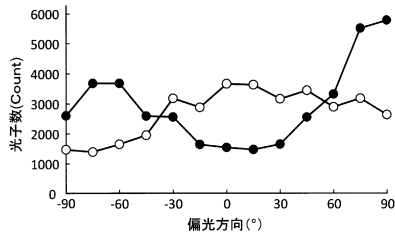


図13A

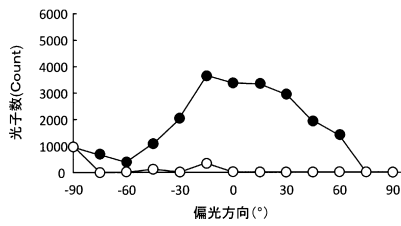


図13B

---

フロントページの続き

(72)発明者 彼谷 高敏

東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内

審査官 横尾 雅一

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0045351(US, A1)

米国特許第07989220(US, B2)

特開2008-286778(JP, A)

特表2000-515966(JP, A)

特開2010-038624(JP, A)

米国特許出願公開第2005/0186565(US, A1)

TAWA K, et al., Optical microscopic observation of fluorescence enhanced by grating-coupled surface plasmon resonance, OPTICS EXPRESS, 2008年 6月18日, Vol. 16, No. 13, p.9781-9790

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/74

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)