



(74) 代理人: 特許業務法人 ユニウス国際特許事務所 (UNIUS PATENT ATTORNEYS OFFICE); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目13-9 新大阪MTビル1号館 Osaka (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, BN, 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, IR, IS, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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： 検査方法

技術分野

[0001] 本発明は検査方法に関し、より詳細には、生体組織切片を含む試験片の検査方法であって、生体組織由来の発光スペクトルを高感度で分析できる検査方法に関する。

背景技術

[0002] 光を用いた生体分子イメージングを医療応用する方法としては、蛍光色素で染色し、目的とする細胞や生体組織切片に特異的に蓄積した色素からの蛍光を測定する方法が行われている。

[0003] また、蛍光ではなく、細胞や生体組織切片のラマン分光を、スペクトルの波長を選択して各部位ごとに測定しマッピングすれば、蛍光色素で染色する必要もなく、且つ、組織を切り取らなくても、細胞の状態を直接評価することが可能になる。

[0004] ラマン分光を高感度で測定する方法としてTERS (Tip-Enhanced Raman Scattering) 法、誘導ラマン分光法、共鳴ラマン法などの方法が知られている（例えば非特許文献1 参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：藤田 他、「プラズモニクスで映し出す細胞内の分子」、OPTRONICS、オプトロニクス社、平成20年5月、第341号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 生体組織の検査は、当該部位に何らかの異常が存在しているか否かを判断する際に利用されることが多い。例えば、手術中において、対象となる部位を取り出して検査できる程度の大きさにスライスした後、蛍光色素で染色をした上で励起光を照射して、色素からの発光状態を病理医が観察する。この

とき、当該部位に異常が存在するかどうか等の検査は、経験豊富で判定に習熟した病理医による組織診断が必要であり、検査可能な数が限られていた。それゆえスペクトルを利用した、より迅速で簡便であり且つ正確な診断方法が求められていた。

[0007] 通常の非共鳴ラマン分光を用いた測定では、感度が低いため信号が弱く、画像を得るための必要十分な信号を得るには長い測定時間を要する。従って、限られた測定時間内に二次元画像を求める場合には、測定対象となるエリアを狭める必要がある。すなわち、検査を行う者が、予め測定対象エリアを狭い範囲内に特定した上で、当該領域に対して励起光の照射と、ラマンスペクトルの検出を行うことになる。このため、特定した測定対象エリア外に病変箇所が存在する場合には、かかる病変状態を見落とす可能性が高くなってしまう。

[0008] ラマン分光を高感度で測定する方法として、上記のTERS法が存在するが、この方法では、測定対象エリアが極めて狭くなってしまうので、前記の課題が発生してしまう。また、誘導ラマン分光法や共鳴ラマン法によれば、検査に必要な装置が大型化する上、高価な装置が必要となる。また特定のスペクトルのみが増幅されるなどの方法上の制約がある。

[0009] 誘導ラマン分光法、共鳴ラマン法、及びTERS法では、いずれも広範囲を測定するには信号が微弱であるため、測定対象エリアを極めて狭く設定する必要がある上、その限られた領域（ $\square 1\text{ mm}$ 以下）を測定するにも、場合によっては数時間程度の長い時間を要する。組織診断には数 cm 以上の領域を観察する必要があるので、この方法によれば、実用に耐えないほど非常に時間がかかってしまう。誘導ラマン分光などの非線形ラマン分光法では、効率的な誘導ラマン散乱を誘起するためにパルスレーザや高NAレンズを必要とするため装置が大型化し、また一度に取得できる測定領域の制限が問題となる。そのため、ラマン分光スペクトルを高感度で且つ広いエリアを迅速に測定できる方法が望まれていた。

[0010] また、上記の方法とは別に、従来、局在表面プラズモン効果を用いて最表

面のラマンスペクトルや蛍光スペクトルを測定する方法が存在する。この方法は、局在表面プラズモン効果を実現させるための素子を準備し、この素子上に検査対象となる試験片を載置した状態で光を照射し、試験片からの発光をスペクトル分析する方法である。局在表面プラズモン効果により、試験片からの発光が増強される。

[0011] しかし、この方法によれば、局在表面プラズモン効果を実現させるための素子は、表面に銀微粒子などが塗布されている。従って、生体物質を検査対象とする場合、この生体物質を素子上に載置すると、生体物質に含まれるハロゲン化物イオンと銀微粒子などが化学反応して変質し、銀微粒子の脱離や溶解などが生じて、光増強効果が得られなくなるという問題がある。つまり、従来は局在表面プラズモン効果を利用して、生体物質の検査は行えないと考えられていた。

[0012] 本発明は、上記の課題に鑑み、簡易な装置によって、生体組織切片の検査が可能な検査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

[0013] 本発明の検査方法は、生体組織切片を含む試験片の検査方法であって、
基板と、前記基板の表面上に互いに独立して多数の金属微粒子が分散配置された増強電磁場形成層と、前記基板及び前記増強電磁場形成層の上層に形成された保護層とを有する光増強素子を準備する工程（a）、
前記保護層の上面に検査対象となる前記試験片を載置する工程（b）、
前記光増強素子に対して、上面から又は裏面から励起光を照射する工程（c）、
及び、前記試験片からの発光を受光して発光スペクトルを測定する工程（d）を有することを特徴とする。

[0014] 本発明の方法では、基板の表面上に互いに独立して多数の金属微粒子が分散配置された増強電磁場形成層を備える構成であるため、局在表面プラズモン効果を利用することができる。このため、エバネッセント波を利用した表面プラズモン効果とは異なり、基板に対する光の入射角度に関する厳しい制

限がなく、自由度が担保される。

[0015] また、本発明の方法では、増強電磁場形成層の上層に形成された保護層の上面に検査対象となる試験片が載置される。このため、試験片として生体組織切片のような生体物質を含む場合においても、この試験片は保護層に直接接触するのみであり、金属微粒子が直接試験片と長時間接触し続けるということがない。このため、金属微粒子がハロゲン化物イオンに直接長時間晒され続けることにより、ハロゲン化物イオンと金属微粒子などが化学反応して変質するということがない。この結果、金属微粒子として光の増強効果の高いA gを用いることが可能となる。なお、本発明の構成においては、金属微粒子としてA gを用いるのが好適であるが、他の金属材料（例えばA u）を用いても構わない。

[0016] 本発明のように局在表面プラズモン効果を利用する場合、増強電磁場形成層を構成する多数の金属微粒子の近傍箇所にも、その光の増強効果が作用する。試験片は、増強電磁場形成層の上層に形成された保護層の上面に載置されるが、増強電磁場形成層の上層に形成された保護層を介してその表面まで強い増強効果が及ぶため、金属微粒子から遠く離れた保護層の上面に載置された試験片に対して光増強作用を及ぼすことができる。よって、試験片としての生体組織由来の強い発光を得ることができる。

[0017] これにより、ラマン散乱光を利用したスペクトル分析が行えるため、ラマンスペクトルから生体組織の診断が可能になる。つまり、本方法によれば、異常が存在している場合のスペクトルデータと異常が存在していない場合のスペクトルデータを予め準備しておき、測定されたスペクトルデータとこれらを比較することで、生体組織の診断ができるため、経験豊富で判定に習熟した病理医でなくても、組織診断が行える。

[0018] また、本発明の手法は、試験片からのラマン散乱光だけでなく、蛍光のスペクトル分析にも利用できる。

[0019] この場合、局在表面プラズモン効果を利用できるため、発光増強効果が極めて高い。この結果、従来、通常状態では光らず、蛍光物質とは認識されて

いなかった物質の蛍光増強効果が利用できるのもので、蛍光物質の導入を行うことなく生体組織の蛍光スペクトル分析が可能になる。

[0020] また、本発明の検査方法は、

前記工程（c）が、所定方向に走査しながら前記励起光を前記光増強素子に対して照射する工程であり、

前記工程（d）によって得られた発光スペクトルの強度分布を二次元マッピングする工程（e）を有することを特徴とする。

[0021] この方法によれば、発光増強効果が極めて高いため、短時間で発光スペクトルの検出が可能である。この結果、生体切片試料の観察において、顕微ラマン計測装置を用いて広範囲の二次元マッピングを低倍率の対物レンズを用いて高速に行うことができる。また、従来よりも広いエリアのマッピングが可能になる。つまり、感度が高いため信号が強く、広い観測領域の画像を得るために必要十分な信号を得るには短い測定時間ですむからである。従って、限られた測定時間内に二次元画像を求める場合でも測定エリアを広くできる。

[0022] よって、異常が存在している場合のマッピング像と異常が存在していない場合のマッピング像を予め準備しておき、測定されたスペクトルデータに基づくマッピング像とこれらを比較することで、生体組織の診断ができるため、経験豊富で判定に習熟した病理医でなくても、組織診断が行える。

[0023] なお、前記保護層は、前記多数の金属微粒子に関連して配向性を有する無機物質、又は配向性を有する有機物の重合体で構成されているものとしても構わない。

[0024] この構成により、増強電磁場形成層における局在表面プラズモン効果に起因した増強電磁場を、高効率で保護層の表面に伝達させることが可能となり、保護層の表面に載置された試験片を高効率で発光させることができる。

[0025] また、前記保護層は、ハロゲン元素を含有するものとしても構わない。

[0026] この構成により、増強電磁場形成層における局在表面プラズモン効果に起因した増強電磁場を、更に高効率で保護層の表面に伝達させることが可能と

なる。なお、この構成は、保護層を有しない構成において露出した金属微粒子にハロゲン化物イオンを直接接触させる場合とは異なり、保護層としてハロゲン元素を含有した材料を用いるというものである。上記の構成と同様に、ハロゲン化物イオンによる金属微粒子へのダメージを防御する機能は担保される。

発明の効果

[0027] 本発明によれば、簡易な装置によって、生体組織切片の検査が実現できる。特に、短時間で広範囲にわたるイメージングが可能になると共に、習熟した病理医でなくても生体組織切片の診断が可能になる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]本発明のセンサの構造を模式的に示す図面である。

[図2]本発明の検査方法を説明するための概念図である。

[図3]本発明のセンサの性能を検証するための測定装置の概念図である。

[図4]センサに対してローダミン 6 G 色素を担持させたときの、保護層の厚みと光増強度の関係をプロットした結果を示すグラフである。

[図5]センサに対してフクシン色素を担持させたときの、保護層の厚みと光増強度の関係をプロットした結果を示すグラフである。

[図6]実施例 2 と比較例 1 の受光部で受光された光のスペクトル分布を比較したグラフである。

[図7]実施例 3 と比較例 2 の各センサチップに励起光を照射した際に受光部で受光された光のスペクトル分布を比較したグラフである。

[図8]実施例 4 と比較例 3 の各センサチップに励起光を照射した際に受光部で受光された光のスペクトル分布を比較したグラフである。

[図9]実施例 5 と実施例 1 の各センサに励起光を照射した際に受光部で受光されたラマンスペクトルを示すグラフである。

[図10]試験片としてのラット心臓組織切片の顕微鏡像である。

[図11]実施例 6 及び比較例 4 において、受光部で受光されたラマンスペクトルを示すグラフである。

[図12]実施例6において得られたラマンマッピング像である。

[図13]試験片としての食道の迷走神経切片の顕微鏡像である。

[図14]実施例7において得られた蛍光マッピング像である。

[図15]実施例8と実施例9の各センサチップに励起光を照射した際に受光部で受光されたラマンスペクトルを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0029] [第1実施形態]

本発明の第1実施形態につき、図面を参照して説明する。なお、各図において図面の寸法比と実際の寸法比は必ずしも一致しない。

[0030] 〈センサ構造〉

図1は、本発明の検査方法に利用されるセンサの構造を模式的に示す図面である。センサ1は、基板7、増強電磁場形成層9及び保護層11を備えて光増強素子を構成している。そして、検査対象となる試験片5を保護層11の上面に載置して、検査を行う。

[0031] 基板7の材質は特に限定されるものではなく、例えば、ガラス、セラミックス、樹脂などを用いることができる。なお、後述するように、センサ1の作製工程において加熱処理（例えば100℃以上の加熱）が行われる場合には、例えばガラス、ポリイミド樹脂などの耐熱性を有するものであることが好ましい。

[0032] 増強電磁場形成層9は、基板7の表面上に互いに独立して多数の金属微粒子10が分散配置されて構成されている。基板7の表面上における金属微粒子10の配列方法については、二次元的にランダムに配列された構成であっても、規則的に配列された構成であっても構わない。

[0033] 増強電磁場形成層9を構成する金属微粒子10としては、例えばAgを好適に用いることができるが、励起光の照射により励起されて局在表面プラズモン効果を実現し得るものであれば、Au、Al、Cuなどの他の材料を利用することもできる。また、この金属微粒子10の形状としては、例えば扁平な半球形状、平板状の形状など、形状異方性を有するものを好適に用いる

ことができる。なお、多数の金属微粒子 10 は、いずれも均一の大きさ及び形状を備えていることが望ましいが、大きさや形状に多少のばらつきがあっても構わない。

[0034] また、金属微粒子 10 の粒径としては、励起光の波長以下の大きさであることが好ましい。ここで、本明細書において「粒径」とは、顕微鏡法による投影面積円相当径をいう。具体的には、次のようにして求められる。センサ 1 の表面における任意に選ばれる領域について、長さ $2\ \mu\text{m}$ の線分が長さ $6\ \text{cm}$ に拡大（倍率 30000 倍）されるよう観察される走査型電子顕微鏡の視野領域（例えば $1.5\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ ）を撮像領域として、センサ 1 における当該領域の二次電子像を得る。このとき、明るさの指標（ 256 段階）が 100 程度以上の金属微粒子の各々について、金属微粒子 10 の面積と同一面積の真円の直径が当該金属微粒子 10 の粒径として得られる。

[0035] なお、金属微粒子 10 の粒径は、例えば $5 \sim 300\ \text{nm}$ の範囲内であり、厚みは例えば $5 \sim 70\ \text{nm}$ の範囲内である。また、増強電磁場形成層 9 を構成する金属微粒子 10 の密度は、例えば $10^8 \sim 10^{11}$ 個/ cm^2 程度とすることができる。

[0036] このような増強電磁場形成層 9 の形成方法の一例としては、基板 7 の表面に金属微粒子 10 の前駆体が適宜の溶媒に分散された分散液をスピンコート法により塗布して加熱する方法を用いることができる。また、別の方法としては、基板 7 の表面に金属微粒子 10 の前駆体をディッピングして加熱する方法、基板 7 の表面に金属微粒子 10 を真空蒸着する方法、基板 7 の表面に金属微粒子 10 をスパッタ蒸着する方法などを用いることができる。

[0037] そして、センサ 1 において、隣接する金属微粒子 10 間において露出される基板 7 の表面を含む増強電磁場形成層 9 の上層には保護層 11 が形成されている。保護層 11 を構成する材料としては、例えば酸化ケイ素、酸化チタン、酸化セリウム、酸化ボロン、酸化リン、酸化マグネシウム、酸化カルシウム、酸化アルミニウム、酸化ガリウム、酸化ゲルマニウム、酸化亜鉛などを用いることができる。

[0038] 保護層 11 の平均厚さは、例えば 50～250 nm であることが好ましい。特に、保護層 11 の厚さが 85 nm 以上であることにより、試験片 5 が生体物質のようなハロゲン化物イオン（例えば Cl^- ）を含有する場合であっても、金属微粒子 10 に対する十分な耐性（保護機能）が得られる。

[0039] このようなセンサ 1 は、例えば以下の方法により作製される。まず、基板 7 の表面上に金属ナノ粒子膜を形成し、これを加熱処理することにより粒状性を変化させ、これにより、粒径が所定範囲内にある金属微粒子 10 による増強電磁場形成層 9 を形成する。このとき、形成すべき金属微粒子 10 の粒径は、加熱処理条件を適宜変更することにより調整できる。

[0040] 次に、隣接する金属微粒子 10 間において露出される基板 7 の表面部分を含む増強電磁場形成層 9 の表面上に、蒸着法により、金属微粒子 10 を起点として保護層を厚さ方向に成長させることにより柱状組織構造を有する保護層 11 を形成する。保護層 11 の厚さは、成長条件、時間を適宜変更することにより調整できる。また、保護層 11 の形成方法としては、高周波（RF）スパッタ蒸着法、電子線蒸着法、又は電子サイクロトロン共鳴（ECR）スパッタ蒸着法などの方法を適宜選択して利用できる。

[0041] <センサ 1 の使用方法>

次に、本実施形態のセンサ 1 を用いて試験片 5 の検査を行う方法について説明する。図 2 は、検査方法を説明するための概念図である。なお、ここでは、試験片 5 が載置されたセンサ 1 に対して励起光を照射し、試験片 5 から放射されるラマン散乱光を受光してスペクトル分析を行う方法について説明する。

[0042] 本実施形態では、検査に際し、センサ 1 の上方、すなわち試験片 5 が載置された側から励起光を照射するための光源部 41 及び、試験片 5 からの発光を受光するための受光部 43 を利用する。光源部 41 は、励起光源 50、フィルタ 51、ミラー 61 を備える。受光部 43 は、フィルタ 53、分光器 55 及び光検出器 56 を備える。また、図 2 においては、光源部 41 からの光を透過し、試験片 5 からの発光を反射するハーフミラー 62 を備える構成と

している。また、集光レンズ52は、光源部41からの励起光の集光や試験片5からの発光を集光する目的で設置されている。図2に示す装置構成は、あくまで一例であって、この構成に限定されるものではない。

[0043] 試験片5を保護層11上に載置した状態で、光源部41から励起光をセンサ1に向けて入射させる。入射された光により、センサ1の増強電磁場形成層9において生成したプラズモン電場が、保護層11の上面に載置された試験片5に伝搬する。これにより、試験片5に対して強い励起光が及ぼされ、試験片5から高い出力のラマン散乱光が放射される。このラマン散乱光は、ハーフミラー62で反射されて受光部43にて受光される。受光部43の分光器55によって波長分解されて、光検出器56によって受光された光のスペクトル分布が得られる。

[0044] 試験片5として生体組織切片を含む生体物質を想定する。増強電磁場形成層9によって形成された増強電磁場は、電磁場伝搬性を有する保護層11を介して、試験片5、すなわち生体組織の分子種を選択的に励起し、これにより生体組織由来のラマン信号が選択的に得られる。このようにして生じる増強ラマン散乱光は増強電磁場形成層9と光学的に強く結合しているため、増強電磁場形成層9はこの散乱光を受光部43に効率よく導き、もってこれらの相乗効果により強いラマン信号を与える。

[0045] <センサ1の性能についての説明>

以下、センサ1が備える増強電磁場形成層9によって、光増強効果が実現できる点につき、実施例を参照しながら説明する。

[0046] (実施例1)

まず、実施例1のセンサ1の作製方法につき説明する。基板7として数cm角の大きさのスライドガラスを用い、このスライドガラスの表面上に、Agを10nm程度の厚みで蒸着させて金属微粒子10を形成するためのAg膜を形成した。その後、約100℃のホットプレート上で、Ag膜が形成された基板7を数分間加熱処理することにより、Ag膜の粒状性を変化させて増強電磁場形成層9としての多数の金属(Ag)微粒子10によるAg微粒

子単層膜を形成した。得られたA g 微粒子単層膜における金属微粒子10の粒径は、50～150 nmの範囲内にあり、厚さは平均で約20 nmであり、金属微粒子10の密度はおおよそ 5×10^9 個/cm²であった。

[0047] その後、RFスパッタ装置「RFS-200型」（U l v a c社製）を用いて、酸化ケイ素（SiO₂）をターゲットとして下記条件でスパッタを行うことにより、隣接する金属微粒子10間において露出される基板7の表面部分を含む増強電磁場形成層9の表面上に保護層11を形成することでセンサ1を作製した。なお、保護層11の厚さは、スパッタ時間を適宜に変更することにより調整した。

[0048] スパッタ条件は以下のとおりである。

- ・ターゲットから増強電磁場形成層9の表面までの離間距離：45 mm
- ・雰囲気：Ar 3.0 Pa（放電時）
- ・放電出力：100 W
- ・RF周波数：13.6 MHz
- ・保護層11の成長速度：8.5 nm/分

[0049] 次に、実施例1として作製されたセンサ1に対する性能検証方法について説明する。ここでは、センサ1が光増強効果を有することを示す目的で、蛍光の増強効果の検証を行う。すなわち、センサ1に対し、保護層11の表面上にローダミン6G色素（Rh6G：発光量子収率およそ1）の希薄エタノール溶液を3000回転でスピコートすることにより、色素分子を保護層11の表面上に担持させた。センサ1の表面に担持される色素分子の密度とスピコートに用いた溶液の色素濃度との関係は、ローダミン6G色素の濃度が1 μMである場合に、色素分子の担持量が 3×10^{11} 個/cm²である。

[0050] なお、発光量子収率Φとは、分子に吸収された光子数と蛍光により放出された光子数の比で定義される（数1参照）。ここで k_f が電子励起状態にある分子の蛍光遷移速度定数であり、 k_{nr} が無輻射遷移速度定数（単位時間当たり消光を起こす速さ）である。

（数1）

$$\Phi = k_f / (k_f + k_{nr})$$

[0051] 励起された分子のすべてが蛍光によって基底状態に戻れば、発光量子収率は1となり、この値に近い発光量子収率を持つ物質を「発光量子収率の高い物質」と呼ぶ。しかし、実際には、無輻射遷移によって1とはならない。無輻射遷移とは、蛍光を発しないで基底状態に戻る遷移である。発光量子収率が低い色素とは $k_f < k_{nr}$ である色素のことである。なお、 $k_f \ll k_{nr}$ の条件ではほとんど発光せず、このような条件を満たす色素を非発光性色素と呼ぶ。

[0052] センサ1に対して励起光を照射して試料（色素分子）から発せられる光の強度を図3に示す測定装置により測定した。図3は、センサ1の性能を検証するための測定装置の概念図である。励起光源50としてのダイオードレーザ及びフィルタ51によって光源部41を構成し、光源部41からセンサ1に対して光を入射させ、保護層11の表面上に担持させた色素分子からの光を受光部43によって受光する。受光部43は、集光レンズ52、フィルタ53、受光ヘッド54及び光検出器55（電子冷却型ダイオードアレイ検出器）によって構成した。

[0053] より詳細には、励起光源50としては、出力1 mW未満の緑色ダイオードレーザ（波長532 nm）を用い、この励起光源50からの射出光を、フィルタ51を介して非集光（エネルギー密度約30 mW/cm²）又は反集光（エネルギー密度約10 mW/cm²以下）励起光としてセンサ1に対して、約45°の角度で入射させる。そして、センサ1に担持された色素分子による90°の角度方向に散乱される光を、集光レンズ52によって、光検出器55の受光ヘッド54にフィルタ53を介して集光した。

[0054] 図3に示す測定装置による測定結果を図4に示す。図4において、縦軸は発光の増強度（単位：倍）を示しており、増強効果がないガラス基板上に担持された同じ量の色素について同じ方法で測定された発光強度に対する相対比率に対応する。

[0055] また、試料としてローダミン6G色素に代えて非発光性のフクシン色素（

発光量子収率 $\ll 0.01$)を用い、保護層11の表面上に 3×10^{12} 個/ cm^2 の密度で担持させ、上記と同様の方法により発光強度を測定した。この測定結果を図5に示す。

[0056] 図4及び図5によれば、色素自体の発光量子収率とは関係なく、保護層11の膜厚を200nm以上としても高い発光増強率が維持されていることが分かる。特に、発光量子収率が0.01未満、すなわち非発光性の色素に対しては、数千倍以上の光増強率が確保されていることが分かる。これにより、金属微粒子10の上層に、所定の膜厚の保護層11を形成しても、その上面にまで発光増強効果を伝搬できることが分かる。

[0057] すなわち、本発明のセンサ1によれば、分子発光双極子と双極子型表面プラズモン（局在表面プラズモン）の相互作用により、結果的に色素の輻射遷移速度 k_f （上記数1参照）が大きくなる。これにより、 $k_f \gg k_{nr}$ となるため、上式の発光量子収率が大きくなり、もともとは発光量子収率が0.01以下の非発光性物質（ $k_f \ll k_{nr}$ ）である色素でも光を強く発するようになることが分かる。

[0058] なお、別の検証として、励起光源50として、ダイオードレーザに代えて出力1mW未満のHe-Neレーザ（波長632.8nm）を用いた他は、図3と同じ配置でローダミン6G色素のラマン散乱強度を保護層11の厚さの関数として測定した。この結果、保護層11の膜厚が200nmを超えても、色素分子が直接に金属微粒子10に表面に吸着した場合に得られた信号と変わらない大きさの増強ラマン信号（増強度は約 10^5 倍）が得られた。

[0059] このように増強効果が保護層11の膜厚程度分を伝搬する理由の一つとしては、以下の点が考えられる。蒸着により配向性を持った誘電体で形成された柱状の保護層11中では、プラズモン電場が乱されず、損失を受けずに保護層11の表面にまで達する。従って、保護層11の厚さをある程度大きくした場合であっても、金属微粒子10に生ずる電磁場（局在表面プラズモン）が保護層11の表面に伝達される。

[0060] つまり、図2に示すように、保護層11の表面に生体物質からなる試験片

5を載置して励起光を照射することで、試験片5に対して増強電磁場の影響が及び、これにより、試験片5を構成する物質、すなわち生体組織由来のスペクトルを強く含む光が放射される。受光部43でこの発光を受光してスペクトル分布を得ることで、生体組織の分析が行える。

[0061] (実施例2)

実施例1と同様の方法により作製されたセンサ1に対し、フクシン色素で標識した抗体1gGの水溶液を滴下した。より詳細には、保護層11の上面にフクシン色素で標識した抗体1gGの水溶液を滴下した。

[0062] (比較例1)

基板7に対し、実施例2と同様にフクシン色素で標識した抗体1gGの水溶液を滴下した。

[0063] そして、実施例2及び比較例1のそれぞれの素子に対し、図3に示す測定装置によって励起光を入射させて、受光部43で得られた光のスペクトル分布を調べた結果を図6に示す。なお、図6において、横軸は光の波長、縦軸は発光強度を表している。

[0064] 図6を参照すると、実施例2の構成によれば、非発光性の標識物質であるフクシン色素は、増強電磁場形成層9によって生じる局在プラズモンとの保護層11を介した相互作用で発光量子収率が向上し、それに伴ってフクシン色素が発する光の光量が著しく増加していることが分かる。これに対し、比較例1の構成によれば、発光の増強効果はない。これにより、本発明のセンサ1が極めて高い発光増強効果を有していることが分かる。

[0065] (実施例3)

実施例1と同様の方法により作製されたセンサ1の保護層11の上面に、低発光量子収率を有する自家発光性の生体高分子コラーゲンの水溶液をスピコートした。

[0066] (比較例2)

基板7に対し、実施例3と同様に、低発光量子収率を有する自家発光性の生体高分子コラーゲンの水溶液をスピコートした。

[0067] (実施例 4)

実施例 1 と同様の方法により作製されたセンサ 1 の保護層 11 の上面に、低発光量子収率を有する自家発光性のリボフラビンの水溶液をスピンコートした。

[0068] (比較例 3)

基板 7 に対し、実施例 4 と同様に、低発光量子収率を有する自家発光性のリボフラビンの水溶液をスピンコートした。

[0069] 実施例 3 及び比較例 2 のそれぞれの素子に対し、図 3 に示す測定装置によって励起光を入射させて、受光部 43 で得られた光のスペクトル分布を調べた結果を図 7 に示す。同様に、実施例 4 及び比較例 3 のそれぞれの素子に対し、図 3 に示す測定装置によって励起光を入射させて、受光部 43 で得られた光のスペクトル分布を調べた結果を図 8 に示す。なお、図 7 及び図 8 において、横軸は光の波長、縦軸は発光強度を表している。

[0070] 図 7 を参照すると、実施例 3 の構成によれば、低発光量子収率を有する自家発光性の生体高分子コラーゲンは、増強電磁場形成層 9 によって生じる局在プラズモンとの保護層 11 を介した相互作用で発光量子収率が向上し、それに伴って生体高分子コラーゲンが発する光の光量が著しく増加していることが分かる。これに対し、比較例 2 の構成によれば、発光の増強効果はなく、自家発光性の生体高分子コラーゲンからの発光を受光することによる分析が困難であることが示唆される。

[0071] 同様に、図 8 を参照すると、実施例 4 の構成によれば、低発光量子収率を有する自家発光性のリボフラビンは、増強電磁場形成層 9 によって生じる局在プラズモンとの保護層 11 を介した相互作用で発光量子収率が向上し、それに伴ってリボフラビンが発する光の光量が著しく増加していることが分かる。これに対し、比較例 3 の構成によれば、発光の増強効果はなく、自家発光性のリボフラビンからの発光を受光することによる分析が困難であることが示唆される。

[0072] <別構成のセンサ 1 の性能についての説明>

センサ１が有する保護層１１に予めハロゲン元素を含有させても構わない。保護層１１に対してハロゲン元素を含有させる方法としては、保護層１１が形成されたセンサ１に対してハロゲン化物塩の水溶液に浸漬する方法を用いることができる。例えば、ハロゲン化物塩水溶液の濃度が $0.1 \sim 0.3 \text{ mol/L}$ の場合には、 $5 \sim 30$ 分間程度の室温浸漬により最大の効果を得ることができるが、水溶液の濃度がそれより高い場合、あるいは逆に低い場合には、その濃度に応じて浸漬時間を調整することにより同等の効果を得ることができる。なお、保護層１１におけるハロゲン元素の含有割合は、 $0.002 \text{ 質量}\% \sim 0.05 \text{ 質量}\%$ であることが好ましい。

[0073] なお、上記ハロゲン化物塩の具体例としては、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カリウム (KCl)、臭化ナトリウム (NaBr)、ヨウ化カリウム (KI) などのアルカリ金属塩や、塩化カルシウム (CaCl_2) などのアルカリ土類金属塩などが挙げられる。

[0074] このように予めハロゲン化物塩水溶液にセンサ１を浸漬させた場合においても、多数の金属微粒子１０はその周囲及び上方を保護層１１で覆われているため、ハロゲン化物イオンが直接金属微粒子１０に接触して、金属微粒子１０がハロゲン化物イオンと反応して基板７から離脱してしまうということがない。そして、このように保護層１１に予めハロゲン元素を含有させることで、後述の実施例に示すように、光増強効果を更に高めることができる。

[0075] (実施例５)

実施例１と同様の方法を用い、RFスパッタ装置による処理時間を調整して、厚さが 100 nm の保護層１１を有するセンサ１を作製した。その後、塩化物イオンの濃度が $0.2 \sim 0.3 \text{ mol/L}$ である塩化ナトリウム水溶液中に、増強電磁場形成層９及び保護層１１が形成された基板７を約 30 分間浸漬させ、その後、純水で洗浄して乾燥することにより、保護層１１中にハロゲン化物イオンを含有させて、本実施例のセンサ１とした。この方法で得られた光増強素子における保護層に含有されたハロゲン元素の含有割合は正確には決定することが難しいが、およそ $0.01 \text{ 質量}\%$ のオーダーと推定

される。そして、このセンサ1の保護層11の上面に、ローダミン6G色素の希薄エタノール溶液を3000回転でスピコートすることにより、色素分子を保護層11の表面上に 3×10^{11} 個/cm²の密度で担持させた。

[0076] なお、比較のために、塩化ナトリウム水溶液に浸漬させなかった以外は同様の方法でセンサ1についても作製した。なお、このセンサ1は実施例1の素子に対応する。

[0077] そして、実施例5及び実施例1のセンサ1に対し、励起光を照射して試料（色素分子）から発せられるラマン散乱光の強度を、ダイオードレーザ50に代えて出力1mW未満のHe-Neレーザ（波長632.8nm）を励起光源として用いた他は、図3と同じ測定装置により測定した。この結果を図9に示す。なお、図9のグラフでは、縦軸はラマン散乱強度（cps）を示し、横軸はラマンシフト（cm⁻¹）を示す。

[0078] 図9では、実施例5と実施例1のそれぞれのセンサ1に対して、ラマン散乱光の強度を比較した。これは、ラマン散乱光自体の強度が蛍光の強度よりも小さいため、両者の光増強効果を比較する上での比較のしやすさを考慮して行われたものである。ハロゲン化物イオンを浸漬した実施例5の方が、ハロゲン化物イオンを浸漬しなかった実施例1よりも顕著なラマン信号が観測されており、光の増強効果が更に高いことが示唆される。

[0079] 図9における、ハロゲン化物イオンを浸漬しなかった実施例1のセンサ1においても、図4及び図5を参照して上述したように、発光強度を極めて高くする効果は得られている。またハロゲン化物イオンを浸漬した実施例5では、実施例1よりも更に発光増強効果が高くなっていることが示唆される。

[0080] なお、実施例5では、塩化物イオンの濃度が0.2~0.3mol/Lである塩化ナトリウム水溶液を浸漬させたが、これに代えて、塩化物イオンの濃度が0.2mol/Lである塩化カリウム水溶液を浸漬させて形成した素子、臭化物イオンの濃度が0.2mol/Lである臭化ナトリウム水溶液を浸漬させて形成した素子、ヨウ化物イオンの濃度が0.2mol/Lであるヨウ化カリウム水溶液を浸漬させて形成した素子、塩化物イオンの濃度が0

・ 2 m o l / L である塩化カルシウム水溶液を浸漬させて形成した素子についても、同様の測定を行った結果、実施例 5 と同様に高いラマン散乱光を受光できた。一方、塩化ナトリウム水溶液の代わりに硫酸イオンの濃度が 0.2 m o l / L である硫酸ナトリウム水溶液を浸漬させて形成した素子について同様の測定を行ったところ、受光したラマン散乱光の強度は低いものであった。このことから、保護層 1 1 にハロゲン元素を添加した場合に、光増強効果を更に高められることが分かる。

[0081] 〈センサ 1 を用いた検査例〉

以下、上述したセンサ 1 の使用方法に基づいて行った試験片 5 の検査結果について説明する。

[0082] (実施例 6)

本発明のセンサ 1 を用い、この保護層 1 1 の上面に試験片 5 としてのラット心臓組織 (8 週齢、雌、組織切片厚 5 μ m) を載置し、図 2 と同様の方法によって、光源部 4 1 より励起光を照射して試験片 5 からのラマンスペクトルを測定した。より詳細には、ラット心臓組織を OCT-compound により凍結固定した組織切片を試験片 5 とし、センサ 1 の保護層 1 1 の上面に載置した。なお、図 1 0 は、試験片 5 としてのラット心臓組織切片の顕微鏡像である。

[0083] 計測条件は以下のとおりである。

- ・ 計測装置 : R a m a n - 1 1 (ナノフォトン社製)
- ・ 励起光 : 波長 5 3 2 n m 、出力 9 1 . 1 m W / m m ² (7 3 m W / L i n e)
- ・ 励起光照射領域 : 図 1 0 内の測定領域 3 0 (走査範囲は約 7 4 0 μ m × 3 7 0 μ m)
- ・ 対物レンズ : X 1 0 、 N A 0 . 3 (オリンパス社製)

[0084] なお、光源部 4 1 から照射される励起光は、シリンドリカルレンズと対物レンズによってライン状とし、試験片 5 の面上に焦点を合わせて照射した。直線形状に照射された試験片 5 からのラマン散乱光は、同じ対物レンズを介

して集光され、一次元のラマン像を二次元のCCDイメージセンサ（Pixel size 400BR、電子冷却−70℃、1340×400ピクセル；Princeton Instruments社，Trenton，NJ，US）により取得した。二次元のラマン散乱像は、直線形状にした励起光を走査することにより取得した。一つの一次元像は、幅約740μm、スリット幅は70μmであり、1秒の計測時間を要し、200本走査することにより約740μm×370μmの範囲におけるラマンスペクトル像（二次元マッピング像）を得た。

[0085] なお、ライン照射型ラマン散乱分光顕微鏡の構造は、例えばHarada, Y. et al., 2008, Proc. SPIE, vol. 6853, 685308に記載がある。

[0086] （比較例4）

基板7の上面に試験片5としてのラット心臓組織（8週齢、雌、組織切片厚5μm）を載置し、実施例6と同様に、光源部41より励起光を照射してラマンスペクトルを得た。

[0087] 実施例6及び比較例4におけるスペクトル結果を、図11に示す。図11によれば、基板7の上面に直接試験片5を載置した比較例4に比べて、光増強素子を含むセンサ1の上面に試験片5を載置した実施例6の方が、明瞭なラマンスペクトルが計測できていることが分かる。このように、センサ1を用いることで、通常のラマン分光スペクトルよりも明瞭なスペクトルが得られるため、短時間の測定が可能になる。

[0088] なお、図11中に矢印で示したピークは、心筋細胞のミトコンドリアに含まれるチトクロームCに帰属されるピークである。754cm⁻¹のピーク強度によってコントラスト差をつけ、センサ1上の心筋細胞のラマンマッピングを行った結果を図12に示す。図10の光学顕微鏡像との比較から、図12のラマンマッピング像が組織の形を反映していることが分かる。

[0089] すなわち、本方法によれば、明瞭なラマンスペクトルが計測されることから、励起光を走査して得られたラマンマッピング像にも、明瞭なコントラストが得られるので、このラマンマッピング像に基づいて、試験片5としての生体組織の診断が可能になる。また、上述したような極めて短時間での励起

光照射によってラマンスペクトルの検出が可能となるため、短時間で広範囲のラマンマッピング像が得られる。これにより、限られた測定時間内に二次元画像を求める場合でも測定対象領域を広くできる。

[0090] (実施例 7)

本発明のセンサ 1 を用い、この保護層 11 の上面に試験片 5 としての食道の迷走神経（有髄線維：組織切片厚 $5\ \mu\text{m}$ ）を載置し、実施例 4 と同様の方法及び装置によって、光源部 41 より励起光を照射して、試験片 5 からの蛍光スペクトル及び二次元の蛍光マッピング像を測定した。なお、図 13 は、試験片 5 としての食道の迷走神経切片の顕微鏡像である。

[0091] 計測条件は以下のとおりである。

- ・計測装置：R a m a n - 11（ナノフォトン社製）
- ・励起光：波長 $532\ \text{nm}$ 、出力 $300\ \text{mW}/\text{mm}^2$ ($50\ \text{mW}/\text{Line}$)
- ・励起光照射領域：図 13 内の測定領域 32（走査範囲は約 $1000\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ ）
- ・対物レンズ：X10、NA0.3（オリンパス社製）

[0092] 二次元の蛍光像はライン状にした励起光を走査することにより取得した。一つの一次元像は、幅約 $740\ \mu\text{m}$ 、スリット幅は約 $70\ \mu\text{m}$ であり、10 秒の計測時間を要し、100 本走査することにより約 $740\ \mu\text{m} \times 460\ \mu\text{m}$ の範囲における蛍光スペクトル像（二次元マッピング像）を得た。より詳細には、図 13 内の測定領域 32 内において、励起光を走査し、波長が $560 \sim 630\ \text{nm}$ の蛍光スペクトルを積分し、強度によりコントラスト差をつけて二次元マッピングを行った。この結果得られた蛍光マッピング像を図 14 に示す。図 13 の光学顕微鏡像との比較から、図 14 の蛍光マッピング像が組織の形を反映していることが分かる。

[0093] 実施例 7 によれば、ラマン散乱光のみならず、蛍光によるスペクトル分析によっても、短時間で広範囲の二次元マッピング像が得られることが分かる。特に、センサ 1 が有する高い発光増強効果によって、従来蛍光物質と認識

されていなかった物質についても、励起光の照射による蛍光を得ることができるため、標識を行うことなく検査が可能な生体組織の部位が格段に広がる。

[0094] ただし、本発明の方法は、試験片 5 に色素を標識して励起光を照射して蛍光スペクトルを測定する方法に用いることを排除するものではない。この場合においても、発光増強効果が高いため、図 4 及び図 5 を参照して上述したように、非発光性の色素を標識色素として用いることができる。

[0095] [第 2 実施形態]

本発明の第 2 実施形態について図面を参照して説明する。

[0096] 本実施形態は、第 1 実施形態で説明したセンサ 1 が備える保護層 11 を、結晶性（配向性）を有する有機物の重合体で構成した点のみが異なり、他は共通である。

[0097] なお、この有機物の重合体としては、ポリメチルメタクリレートなどのアクリル系重合体、ポリビニルアルコールなどを利用することができる。この場合、保護層 11 の形成方法としては、保護層形成液をスピンコート法、ディップコート法、スプレーコート法、スリットコート法、バーコート法などを用いて基板 7 に滴下又は塗布することで実現できるが、スピンコート法は厚さが最も均一な保護層 11 を形成する方法として好適に用いることができる。

[0098] なお、この保護層 11 にハロゲン元素を含有させる場合、保護層形成液としては、溶媒中に所定の重合体およびハロゲンの金属塩を溶解させることにより、或いは溶媒中に所定の重合体が溶解されてなる重合体溶液と、溶媒中にハロゲンの金属塩が溶解されてなる金属塩溶液とを混合することにより、調製することができる。

[0099] 保護層形成液を調製するための溶媒としては、用いられる重合体および金属塩に応じて適宜選択される。具体的には、用いられる重合体および金属塩を溶解し得るものであればよい。例えば、重合体としてポリビニルアルコール等の水溶性のものを用いる場合には、溶媒として水を用いることができる。

。また、重合体として水に不溶な重合体例えばポリメチルメタクリレートを用いる場合には、重合体溶液を調製するための溶媒として例えばシクロヘキサノンを用いると共に、金属塩溶液を調製するための溶媒として水とアセトンとの混合溶媒を用い、重合体溶液と金属塩溶液とを混合することによって、保護層形成液を調製することができる。

[0100] 保護層形成液中における重合体の含有割合は、上記塗布方法と目的とする保護膜の厚さとの組合せによって決定される。例えばスピコート法（3000 rpm）を用いてポリビニルアルコール膜をその水溶液から形成する場合において、膜厚を100 nmに調整するために必要な重合体の含有割合は約4.5質量%である。保護層形成液中における金属塩の割合は、目的とする保護層11中のハロゲン元素の含有割合や、保護層形成液中の重合体の含有割合に応じて設定される。

[0101] （実施例8）

実施例1と同様の方法で、基板7上に増強電磁場形成層9としての多数の金属（Ag）微粒子10によるAg微粒子単層膜を形成した。

[0102] また、純水中に、5質量%のポリビニルアルコール（和光純薬工業（株）製、重合度約500）、及び0.2 mmol/Lの塩化ナトリウムが溶解されてなる保護層形成液を調製した。その後、スピコート法によって、基板7の表面に、調製した保護層形成液を塗布して約60℃で乾燥すると共に結晶化を促すことにより、基板7の表面部分を含む増強電磁場形成層9の表面上に保護層11を形成することでセンサ1を作製した。なお、保護層11は、結晶度が50%以上で厚さが110 nmであった。

[0103] そして、この保護層11の上面に、ローダミン6G色素の希薄エタノール溶液を3000回転でスピコートすることにより、色素分子を保護層11の表面上に 3×10^{11} 個/cm²の密度で担持させた。

[0104] （実施例9）

保護層形成液を、以下のようにして調製されたものに変更したこと以外は、実施例6と同様にして光増強素子を製造した。すなわち、シクロヘキサノ

ン（和光純薬工業（株）製）中に3質量%のポリメチルメタクリレート（和光純薬工業（株）製）が溶解されてなる重合体溶液を調製した。一方、純水とアセトンとが質量比で1：1の割合で混合されてなる混合溶媒中に、20 mmol/Lの塩化ナトリウムが溶解されてなる金属塩溶液を調製した。そして、重合体溶液と金属塩溶液とを容量比9：1で混合することにより、保護層形成液を調製した。

[0105] そして、図7と同様の方法により、実施例8及び実施例9のセンサ1に対し、励起光を照射して試料（色素分子）から発せられるラマン散乱光の強度を測定した。この結果を図15に示す。図7と同様に、図15のグラフにおいても、縦軸はラマン散乱強度（cps）を示し、横軸はラマンシフト（ cm^{-1} ）を示す。図15のグラフより、保護層11を有機物の重合体で構成した場合であっても、強いラマン散乱信号が確認できており、保護層11の上面に光増強効果が伝搬できていることが分かる。

[0106] つまり、本実施形態のように、センサ1を有機物の重合体で構成した保護層11を有する構成とし、この保護層11の上面に、試験片5としての生体組織を載置して光源部41から励起光を照射して、試験片5からのラマン散乱光又は蛍光のスペクトルを分析することで、第1実施形態と同様に試験片5の診断を行うことが可能である。

[0107] なお、実施例8及び実施例9では、いずれも保護層11にハロゲン元素を含有した構成としたが、保護層11として、ハロゲン元素を含有せずに有機物の重合体で構成しても構わない。

[0108] [別実施形態]

上記の各実施形態において、センサ1を、高反射層および誘電体層を更に具えた多層構造を有する構成としてもよい。このような構造のものにおいては、基板7の表面上に高反射層および誘電体層がこの順で形成され、誘電体層の表面上に増強電磁場形成層9が形成される。

[0109] また、図2を参照して説明したように、上記実施形態では、センサ1の保護層11の上面に試験片5を載置して、この試験片5側から励起光を照射し

たが、センサ 1 の裏面側（基板 7 側）から励起光を照射して、試験片 5 からのラマン散乱光又は蛍光のスペクトルを得るものとしても構わない。

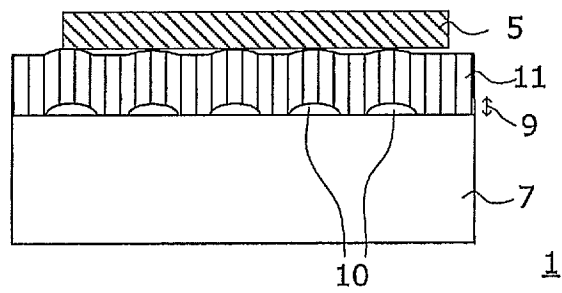
符号の説明

[0110]	1	:	センサ
	5	:	試験片
	7	:	基板
	9	:	増強電磁場形成層
	10	:	金属微粒子
	11	:	保護層
	30	:	励起光照射領域
	31	:	チトクロームCに帰属されるスペクトルピーク
	32	:	励起光照射領域
	41	:	光源部
	43	:	受光部
	50	:	励起光源
	51	:	フィルタ
	52	:	集光レンズ
	53	:	フィルタ
	54	:	受光ヘッド
	55	:	分光器
	56	:	光検出器
	61	:	ミラー
	62	:	ハーフミラー

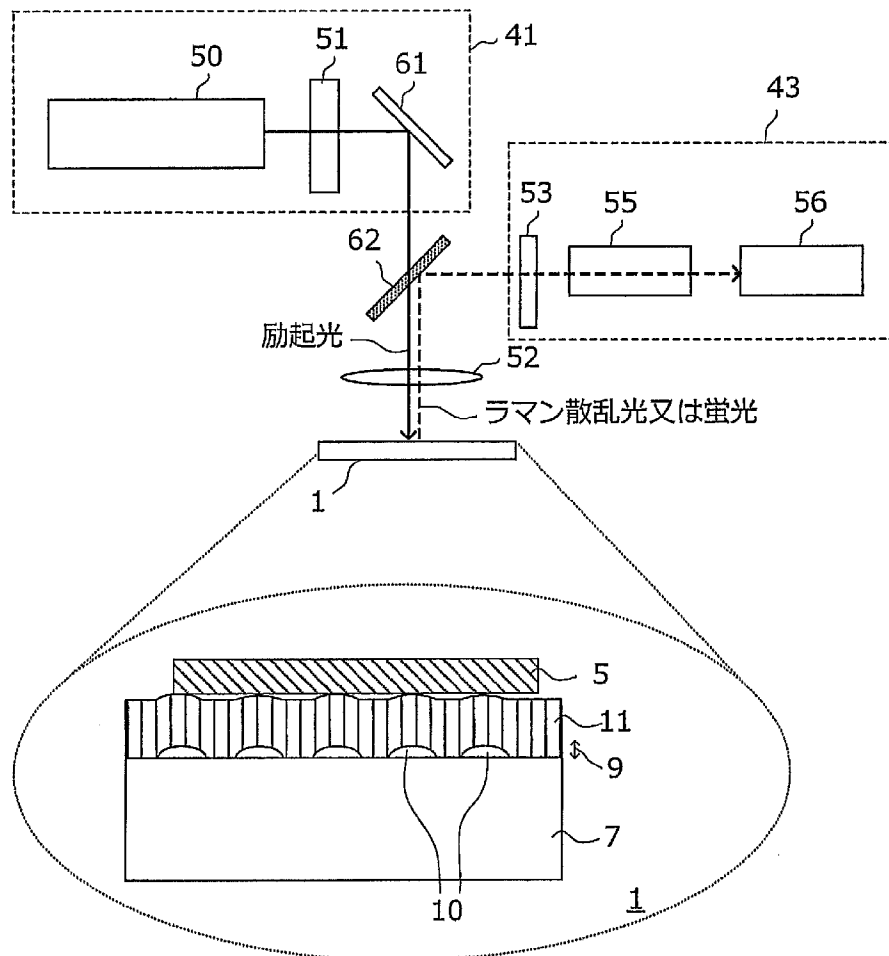
請求の範囲

- [請求項1] 生体組織切片を含む試験片の検査方法であって、
基板と、前記基板の表面上に互いに独立して多数の金属微粒子が分散配置された増強電磁場形成層と、前記基板及び前記増強電磁場形成層の上層に形成された保護層とを有する光増強素子を準備する工程（a）、
前記保護層の上面に検査対象となる前記試験片を載置する工程（b）、
前記光増強素子に対して、上面から又は裏面から励起光を照射する工程（c）、
及び、前記試験片からの発光を受光して発光スペクトルを測定する工程（d）を有することを特徴とする検査方法。
- [請求項2] 前記工程（c）が、所定方向に走査しながら前記励起光を前記光増強素子に対して照射する工程であり、
前記工程（d）によって得られた発光スペクトルの強度分布を二次元マッピングする工程（e）を有することを特徴とする請求項1に記載の検査方法。
- [請求項3] 前記試験片からの発光が、ラマン散乱光又は蛍光であることを特徴とする請求項1又は2に記載の検査方法。
- [請求項4] 前記保護層は、前記多数の金属微粒子に関連して配向性を有する無機物質、又は配向性を有する有機物の重合体で構成されていることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の検査方法。
- [請求項5] 前記保護層は、ハロゲン元素を含有することを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の検査方法。

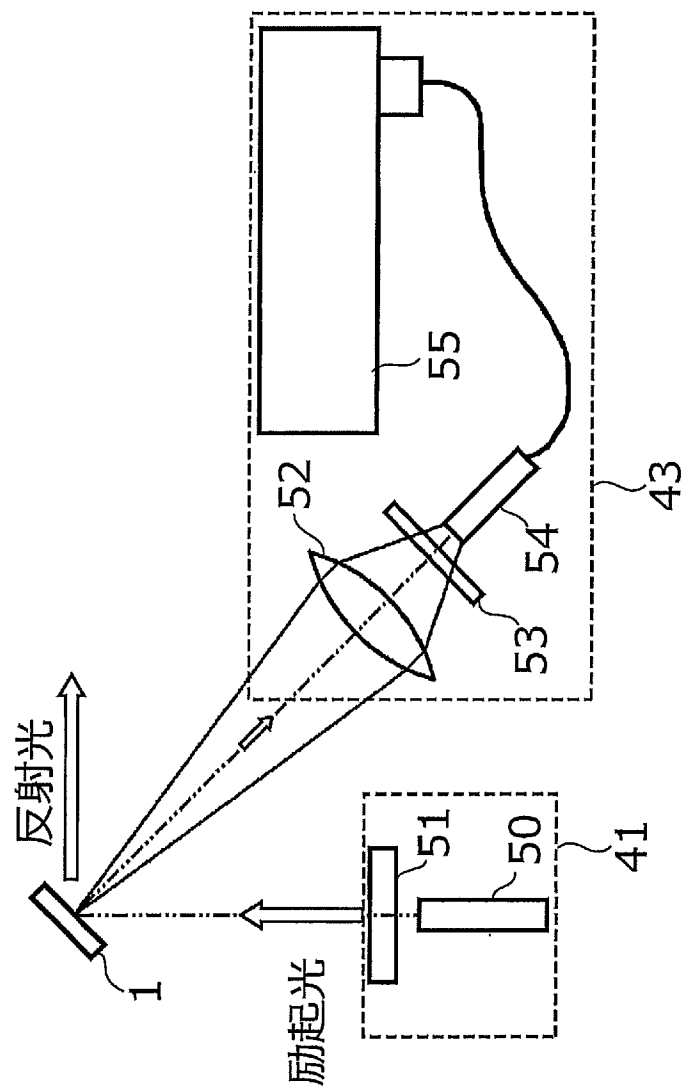
[図1]



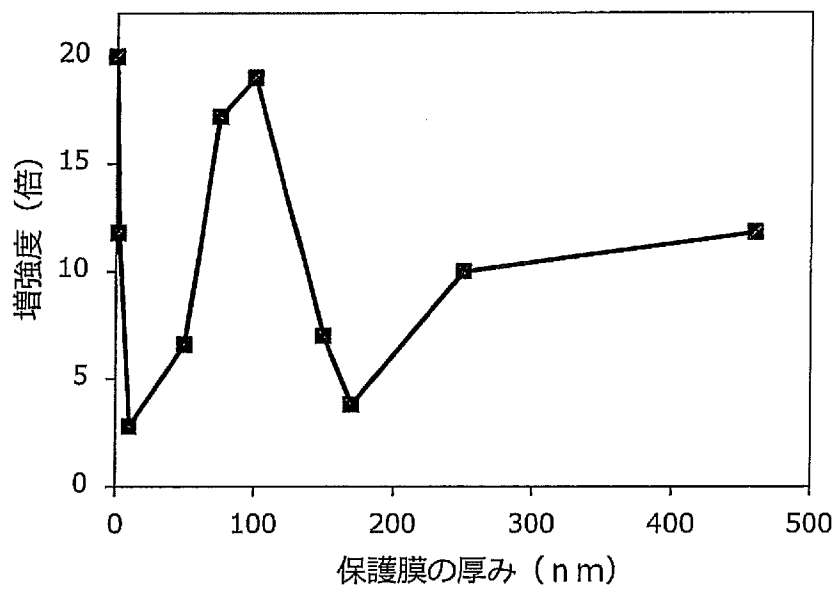
[図2]



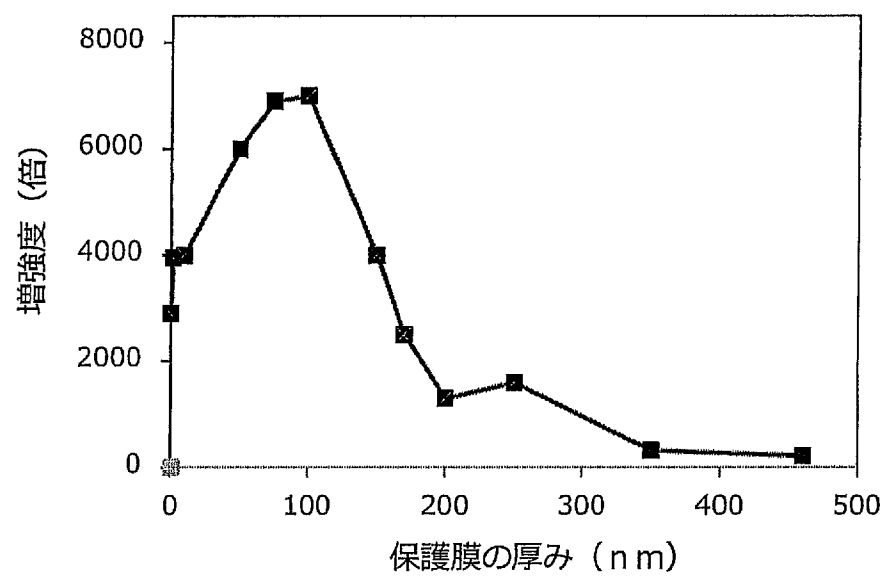
[図3]



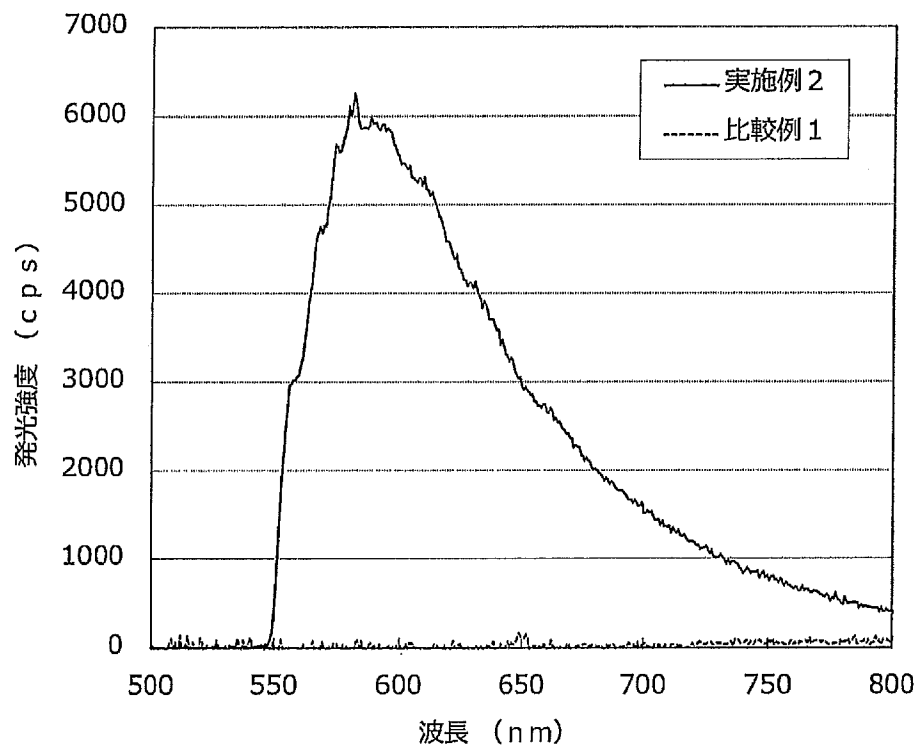
[図4]



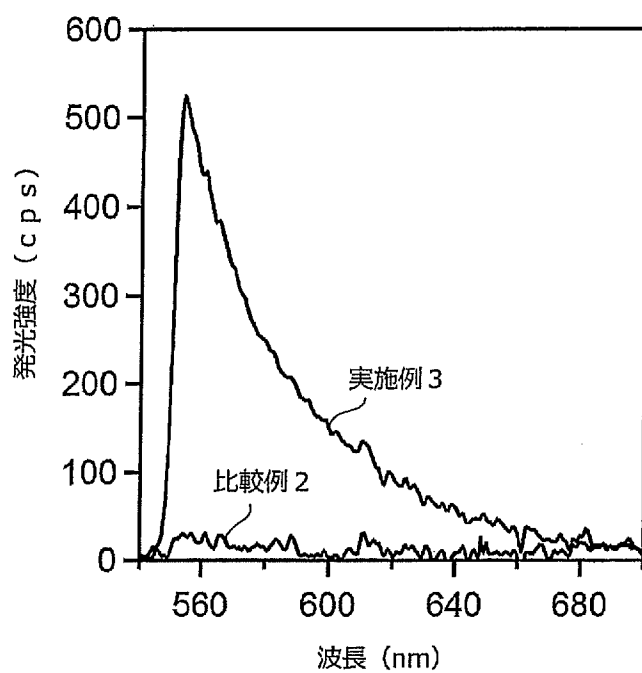
[図5]



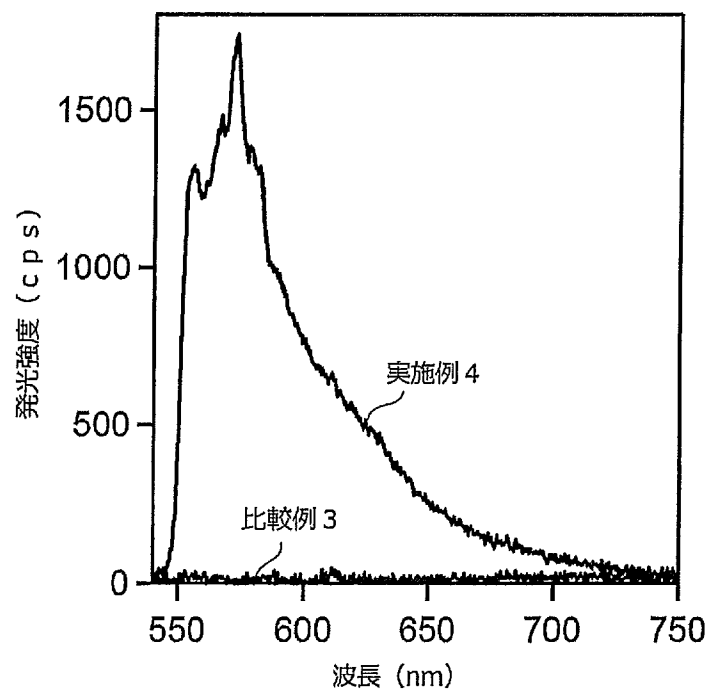
[図6]



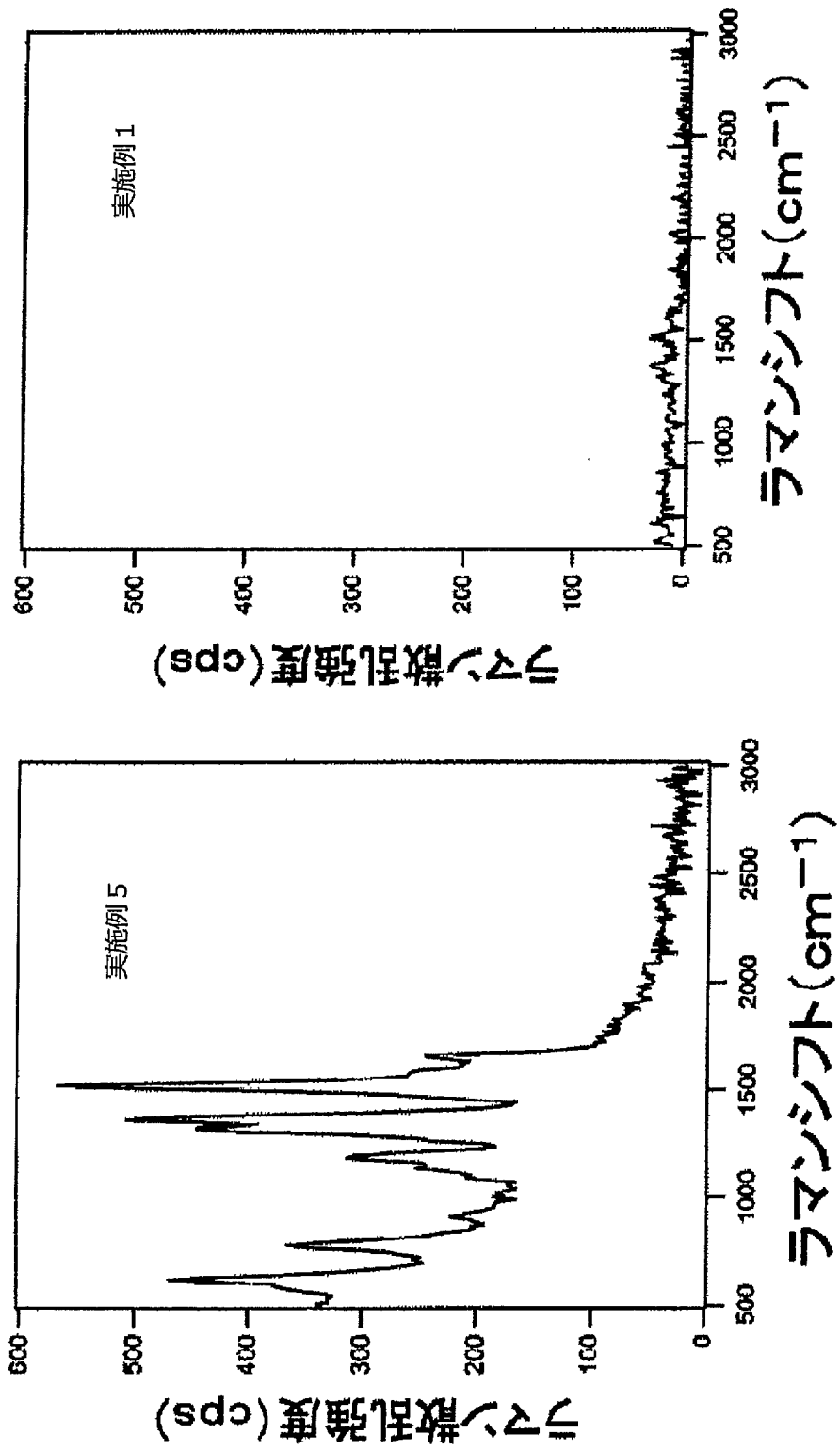
[図7]



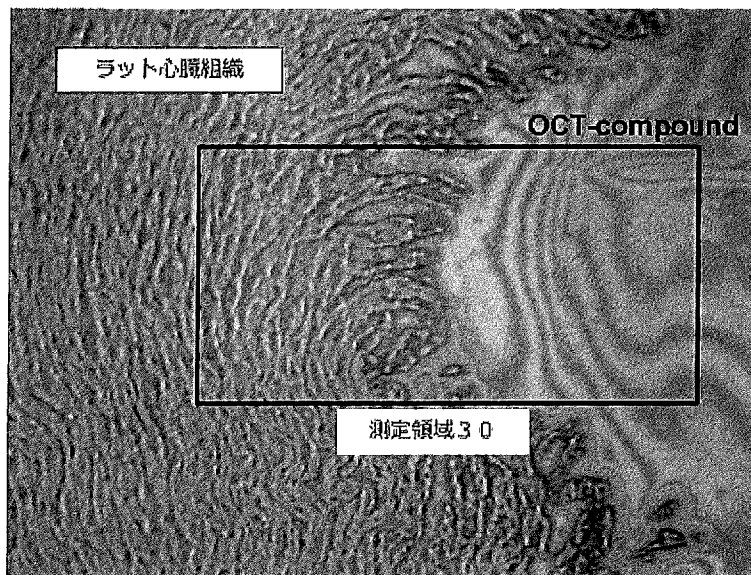
[図8]



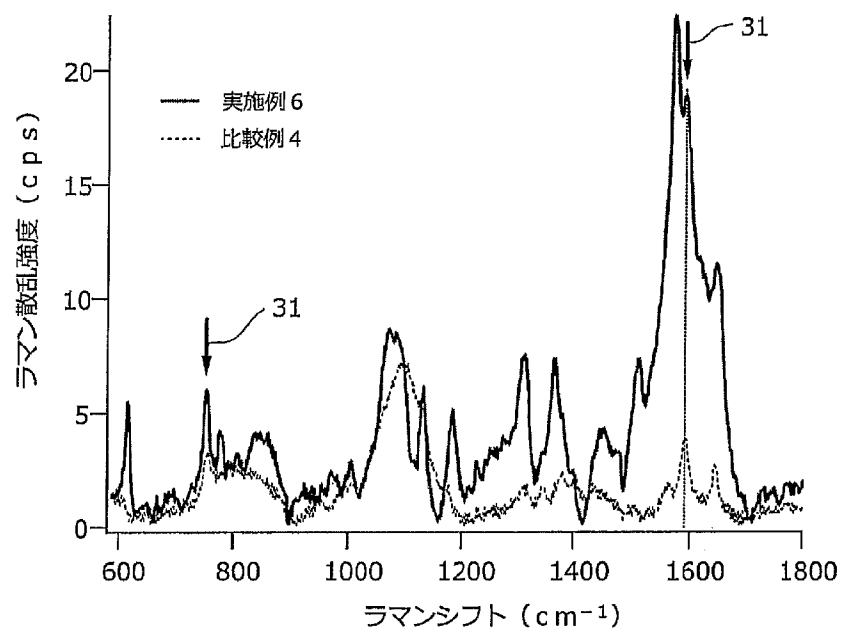
[図9]



[図10]



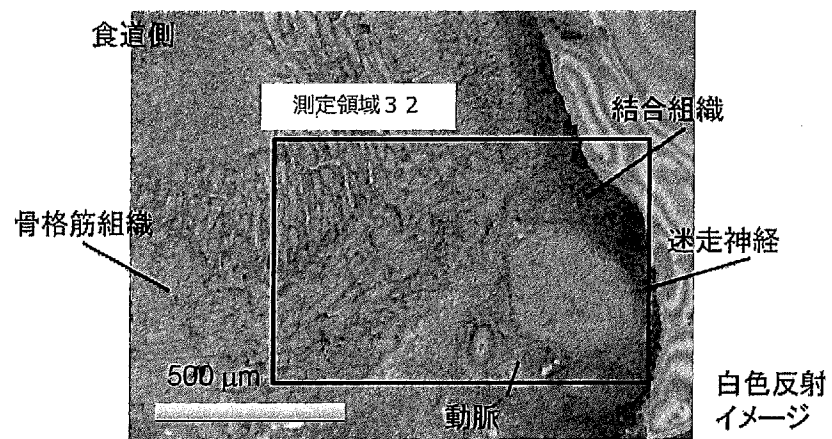
[図11]



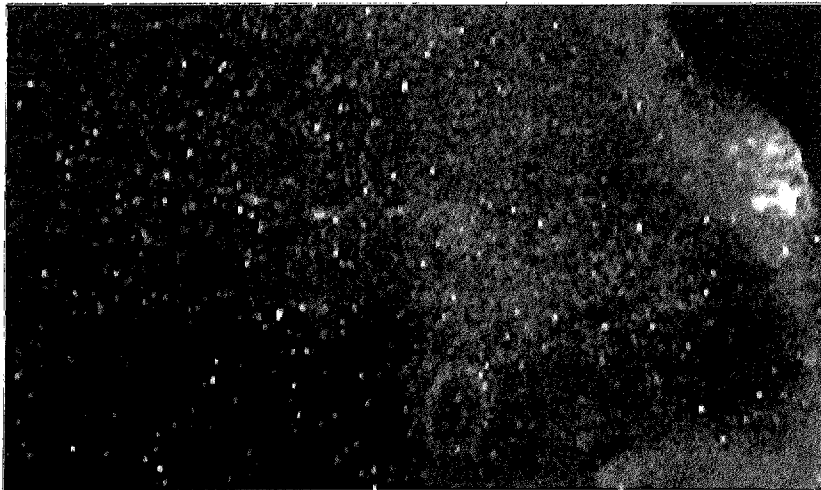
[図12]



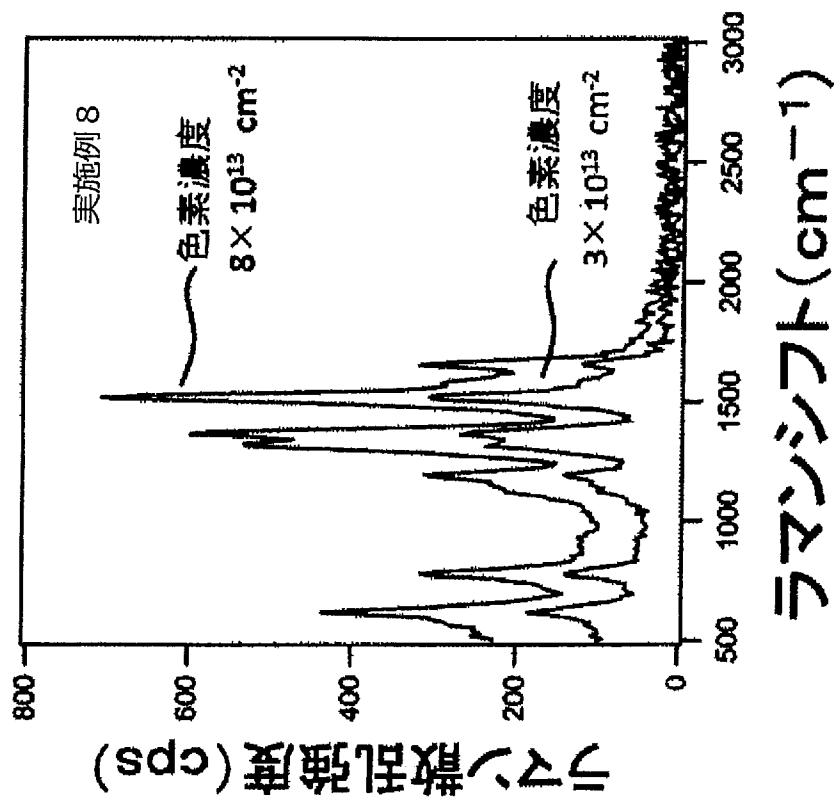
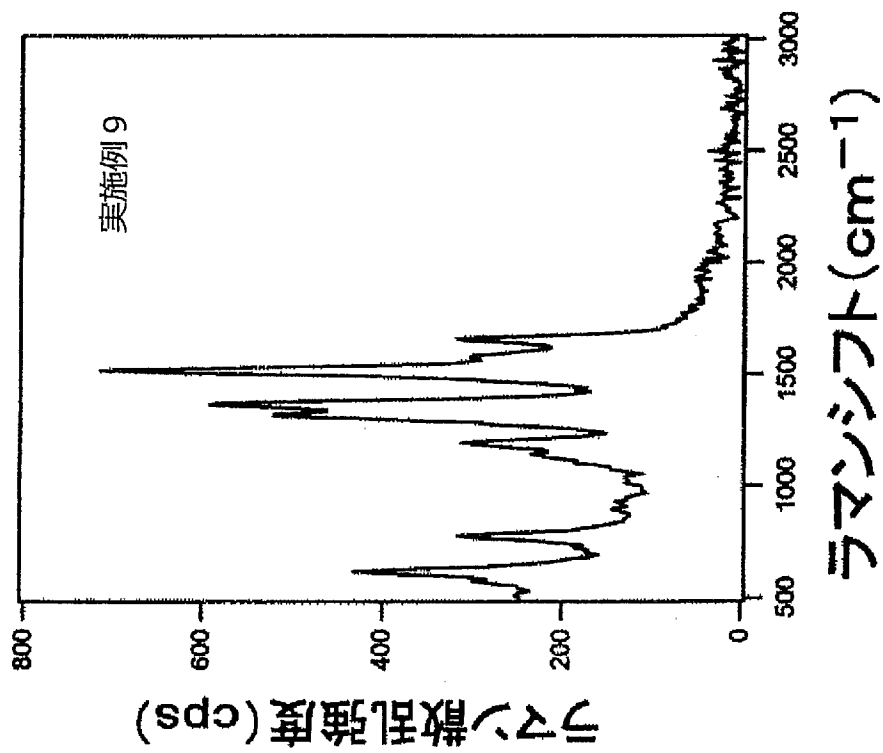
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/081669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/65(2006.01) i, 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)

G01N21/65, G01N21/64, G01N21/41, G01N33/543-33/553

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Joji TAKAYOSHI et al., "Ihosei Silica Hogoso o Yusuru Gin Nanoisland Maku ni yoru Chokkyori Zokyo Hakko Zokyo Raman Sanran", 93rd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan in Spring (2013) Koen Yokoshu II, 08 March 2013 (08.03.2013), page 689(3 PB-133)	1-5
Y	JP 2011-208993 A (Toyo University), 20 October 2011 (20.10.2011), paragraph [0015] (Family: none)	1-5
Y	JP 2006-113021 A (Waseda University), 27 April 2006 (27.04.2006), paragraphs [0001] to [0002] (Family: none)	2-5

☒ 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
10 January, 2014 (10.01.14)

Date of mailing of the international search report
28 January, 2014 (28.01.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/081669

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 4317989 B2 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 19 August 2009 (19.08.2009), paragraphs [0034], [0068] & US 2009/0027668 A1 & WO 2006/080382 A1	4
Y	JP 2007-525662 A (Intel Corp.), 06 September 2007 (06.09.2007), paragraph [0011] & US 2005/0148098 A1 & US 2005/0250159 A1 & EP 1711829 A & WO 2005/065541 A2	5
Y	JP 2006-514309 A (Intel Corp.), 27 April 2006 (27.04.2006), paragraph [0006] & US 2004/0181708 A1 & GB 2414318 A & EP 1606610 A & WO 2004/085988 A2 & WO 2004/081920 A2	5
A	JP 2011-209108 A (Nippon Telegraph and Telephone Corp.), 20 October 2011 (20.10.2011), claims 1 to 3 (Family: none)	1-5
A	WO 2012/086586 A1 (Kyoto University), 28 June 2012 (28.06.2012), claim 1; paragraph [0027] (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/65(2006.01)i, 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（I P C））

Int.Cl. G01N21/65, G01N21/64, G01N21/41, G01N33/543-33/553

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 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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(JDreamIII)

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	高良穰二 他, 異方性シリカ保護層を有する銀ナノアイランド膜による長距離増強発光・増強ラマン散乱, 日本化学会第 93 春季年会 (2013) 講演予稿集 II, 2013. 03. 08, p. 689 (3 PB-133)	1-5
Y	JP 2011-208993 A (学校法人東洋大学) 2011. 10. 20, [0015] (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2006-113021 A (学校法人早稲田大学) 2006. 04. 27, [0001]-[0002] (ファミリーなし)	2-5

☒ 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 0 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 1 . 2 0 1 4

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）

伊藤 裕美

2 W

9 5 1 5

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 4317989 B2 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2009. 08. 19, [0034] [0068] & US 2009/0027668 A1 & WO 2006/080382 A1	4
Y	JP 2007-525662 A (インテル・コーポレーション) 2007. 09. 06, [0011] & US 2005/0148098 A1 & US 2005/0250159 A1 & EP 1711829 A & WO 2005/065541 A2	5
Y	JP 2006-514309 A (インテル・コーポレーション) 2006. 04. 27, [0006] & US 2004/0181708 A1 & GB 2414318 A & EP 1606610 A & WO 2004/085988 A2 & WO 2004/081920 A2	5
A	JP 2011-209108 A (日本電信電話株式会社) 2011. 10. 20, 請求項 1-3 (ファミリーなし)	1-5
A	WO 2012/086586 A1 (国立大学法人京都大学) 2012. 06. 28, 請求項 1, [0027] (ファミリーなし)	1-5