

(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
2017年5月18日(18.05.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/082069 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 35/10 (2006.01) G01N 35/00 (2006.01)
G01N 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/081891
- (22) 国際出願日: 2016年10月27日(27.10.2016)
- (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 2015-223436 2015年11月13日(13.11.2015) JP
- (71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 野田 哲也(NODA, Tetsuya). 松尾 正貴(MATSUO, Masataka). 青木 洋一(AOKI, Youichi).
- (74) 代理人: 鷲田 公一(WASHIDA, Kimihito); 〒1600023 東京都新宿区西新宿1-2-3-7 新宿ファーストウェスト8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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, 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).

[続葉有]

(54) Title: REACTION METHOD

(54) 発明の名称: 反応方法

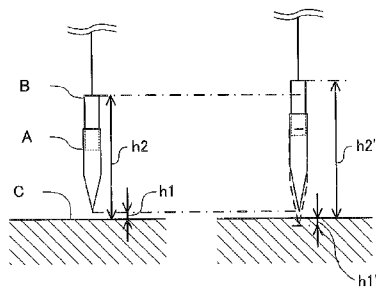


図2A

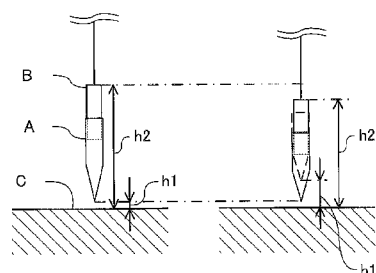


図2B

(57) Abstract: Provided is a reaction method comprising a reaction step of supplying a liquid to a reaction site and removing the liquid from the reaction site multiple times using a pipette tip, for suction or discharge of the liquid, which is attached to a pipette nozzle, to cause two or more materials to react, the reaction method further comprises: a first step of, before the reaction step, measuring the tip height of the pipette tip and setting a reference height of the pipette nozzle on the basis of the tip height of the pipette tip; and a second step of, in the course of the reaction step, correcting the height of the pipette nozzle from the reference height so as to cancel a change in the tip height of the pipette tip caused by a change in the temperature of the pipette tip.

(57) 要約: 反応方法は、ピペットノズルに装着された、液体を吸引または排出するためのピペットチップを用いて、反応場に液体の供給および反応場からの液体の除去を複数回行うことで2以上の物質を反応させる反応工程を含む反応方法であって、反応工程の前に、ピペットチップの先端高さを検出し、ピペットチップの先端高さに基づいて、ピペットノズルの基準高さを設定する第1工程と、反応工程の途中に、ピペットチップの温度が変化することによるピペットチップの先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズルの高さを基準高さから補正する第2工程とを有する。

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 反応方法

技術分野

[0001] 本発明は、ピペットノズルに装着された、液体を吸入または排出するためのピペットチップを用いて、2以上の物質を反応させる反応工程を含む反応方法に関する。

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および装置が求められている。被検出物質を高感度に検出する方法として、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（例えば、特許文献1参照）。

[0003] 特許文献1に記載の表面プラズモン励起増強蛍光分析法は、金属薄膜が形成されたプリズムに対して金属薄膜で全反射するように励起光を照射し、金属薄膜で励起光が全反射されることにより金属薄膜の表面に生じるプラズモン散乱光を測定する工程と、測定されたプラズモン散乱光の強度が最大となる入射角（増強角）を励起光の金属薄膜に対する入射角に決定する工程と、被検出物質に特異的に結合できる第1捕捉体（例えば1次抗体）が固定された金属薄膜上に、被検出物質および蛍光物質で標識された第2捕捉体（例えば2次抗体）を提供する反応工程と、決定した増強角で励起光を照射し、金属薄膜上の被検出物質を標識した蛍光物質から放出された蛍光の蛍光強度を測定する検出工程と、を含む。

[0004] 特許文献1に記載の表面プラズモン励起増強蛍光分析法では、金属薄膜上に被検出物質を含む液状の検体を提供すると、第1捕捉体に被検出物質が結合する。次いで、被検出物質が結合した金属薄膜上に蛍光物質で標識された

第2捕捉体を含む標識液を提供すると、被検出物質が蛍光物質で標識される。この状態で金属薄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、表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance：以下「SPR」と略記する）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、蛍光物質から放出された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。

[0005] このように、微量の被検出物質を高感度かつ定量的に検出するためには、検体や標識液を精度よく供給および除去する必要がある。一般的に、検体や標識液の供給および除去には、ピペットチップが使用される。また、ピペットチップは、射出成型などで一体形成されるため、それぞれ長さが異なる。そこで、ピペットチップの長さがそれぞれ異なることを考慮して検体や標識液を供給および除去する方法が知られている（例えば、特許文献2参照）。

[0006] 特許文献2に記載の液体を供給および除去する方法では、ピペットノズルに装着された樹脂製のピペットチップの先端位置をフォトセンサで検出している。そして、ピペットチップの先端位置の情報に基づいて、ピペットノズルの位置を調整して、液体を精度よく供給および除去している。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2011／152064号

特許文献2：特開2006－275820号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 前述したような微量の被検出物質を捕捉体などに捕捉させるための反応は、反応温度により大きく反応性が異なる。このため、装置は、装置の設置環境温度に関わらず、装置内の反応部を反応に最適な一定温度に管理している。これに対して、装置に供給されるピペットチップは、あらかじめ装置内に設置されている場合を除いて、室温など装置内の反応部とは異なる温度環境

下に置かれている。このため、測定時にピペットチップを装置に供給した際、ピペットチップの全長は、供給時および除去時の環境温度によって変化してしまう。

[0009] 特許文献2に記載の液体を送液する方法では、供給時および除去時の環境温度を考慮していないため、経時的にピペットチップの先端高さが変化してしまい、精度よく液体を供給および除去できない場合があった。特に、反応工程を厳密に制御したい場合には、ピペットチップの先端高さを精度よく制御できないため、液体を除去した後の残液量を精度よく管理できず、また、ピペットチップの先端が流路の底面に接触してしまうという問題があった。

[0010] そこで、本発明の目的は、ピペットチップが温度の影響を受けた場合であっても、反応場に対するピペットチップの先端高さを精度よく制御して、反応場において2以上の物質を適切に反応させることができる反応方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するため、本発明の一実施の形態に係る反応方法は、ピペットノズルに装着された、液体を吸引または排出するためのピペットチップを用いて、反応場に液体の供給および前記反応場からの液体の除去を複数回行うことで2以上の物質を反応させる反応工程を含む反応方法であって、前記反応工程の前に、前記ピペットチップの先端高さを検出し、前記ピペットチップの先端高さに基づいて、前記ピペットノズルの基準高さを設定する第1工程と、前記反応工程の途中に、前記ピペットチップの温度が変化することによる前記ピペットチップの先端高さの変動を打ち消すように、前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する第2工程とを有する。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、ピペットチップの温度が変化することによりピペットチップが伸縮しても、ピペットチップの先端高さを精度よく制御することができる。これにより、反応場において液体の量を高精度に制御することができる。たとえば、本発明によれば、被検出物質の存在または量を高い精度で検

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に係る反応方法の第1工程を説明するための図である。

[図2]図2A、Bは、実施の形態1に係る反応方法の第2工程を説明するための図である。

[図3]図3は、ピペットチップの温度および反応工程の経過時間との関係を示すグラフである。

[図4]図4は、SPFS装置の構成を示す模式図である。

[図5]図5A～Cは、検出チップの構成を示す図である。

[図6]図6は、検出チップの他の形態の断面模式図である。

[図7]図7は、実施の形態1に係るSPFS装置の動作を示すフローチャートである。

[図8]図8は、ピペットチップの先端高さを検出する工程の内容を示すフローチャートである。

[図9]図9は、SPFS装置のピペットチップ周りの構成を示す図である。

[図10]図10Aは、第2温度測定手段の配置を説明するための側面図であり、図10Bは、断面図であり、図10Cは、第2温度測定手段の配置および温調機構の配置を説明するための側面図であり、図10Dは、断面図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の一実施の形態について、添付した図面を参照して詳細に説明する。本発明の一実施の形態に係る反応方法は、ピペットノズルに装着された、液体を吸引または排出するためのピペットチップを用いて、反応場への液体の供給および反応場からの液体の除去を複数回行い、2以上の物質を反応させる反応工程を含む。

[0015] [実施の形態1]

図1および図2は、本発明の実施の形態1に係る反応方法を説明するため

の図である。図 1 は、ピペットチップ A の先端高さを検出する工程（第 1 工程）を示す図である。図 2 は、ピペットノズル B の基準高さを設定する工程（第 2 工程）を示す図である。図 2 A は、ピペットチップ A をピペットノズル B に装着するときの温度が反応工程を行うときの温度より低い場合について説明するための図であり、図 2 B は、ピペットチップ A をピペットノズル B に装着するときの温度が反応工程を行うときの温度より高い場合について説明するための図である。

[0016] 実施の形態 1 に係る反応方法は、ピペットチップ A の温度を測定することなく行う方法である。反応方法は、反応工程の前に、ピペットノズル B の基準高さを設定する第 1 工程と、反応工程の途中に、ピペットノズル B の高さを基準高さから補正する第 2 工程とを有する。ここで、「反応工程」とは、反応場に液体を供給する動作と、反応場から液体を除去する動作とを含む工程を意味しており、反応場に検体を供給して 2 以上の物質を反応させた後に検体を除去する工程、反応場に洗浄液を供給して反応場から洗浄液を除去する工程などを含む。ここで、「液体」には、検体、洗浄液、緩衝液などが含まれる。本実施の形態に係る反応方法は、ピペットノズル B にピペットチップ A を装着する第 1 工程でのピペットチップの温度（第 1 温度）と、2 以上の物質を反応させる反応工程でのピペットチップの温度（第 2 温度）とが異なる場合に適用される。なお、第 1 温度は、第 2 温度より高くてもよいし、第 2 温度より低くてもよい。ここでは、第 1 温度が第 2 温度より低い場合について説明する。第 1 温度が第 2 温度より低い場合とは、例えば、装置が 20℃（常温）の温度環境に設置され、この装置の反応工程を行う部分の温度は 37℃に管理されている場合がある。この装置に対して、20℃（常温）の温度環境で保存されたピペットチップ A を装置のハッチ（図示せず）を開けて架設する場合がある。

[0017] ピペットチップ A をピペットノズル B に装着し、ピペットチップ A の先端高さを検出する工程（第 1 工程）では、ピペットチップ A を装置内に架設してから経過時間が短い。よって、ピペットチップ A の温度はあまり上昇し

ておらず、例えばまだ約20℃であり、その後、所定の時間が経過することで、ピペットチップAの温度はピペットチップA周辺の庫内温度の影響を受けて徐々に温度が上昇する。そして、反応工程でのピペットチップAの温度は、第1工程における温度（約20℃）以上であって、最大37℃にまで上昇する場合がある。

[0018] ここでは、ピペットチップAの温度が変化する例として、反応工程を行う庫内温度が37℃に保持されている。また、装置およびピペットチップAは、庫内温度より低い温度環境に設置されており、庫内温度より低い初期温度のピペットチップAが装置内に持ち込まれる例を記載した。このとき、装置のハッチを開閉することで、外気が装置内に流れ込み、ピペットチップA設置時点（その後の第1工程時点）では、ピペットノズルB周辺の庫内温度が、一時的に外気温に近づく方向に変化している場合もある。

[0019] また、別の例としては、ピペットチップAをピペットノズルBに装着する空間と、反応工程を行う空間が装置内で別空間になっており、反応を行う空間のみ37℃で管理されており、装着する空間は温度管理されていない（例えば、ほぼ装置を設置している外気温に近い温度な）場合も相当する。

[0020] 図2に示されるように、第1工程では、反応工程の前に、ピペットチップAの先端高さを検出し、ピペットチップAの先端高さに基づいて、ピペットノズルBの基準高さを設定する。ピペットチップAの先端高さを検出する方法は、特に限定されない。ピペットチップAの先端高さを検出する方法の例には、ピペットチップA内の空気圧を利用する方法が含まれる。ピペットチップAの先端と、ピペットチップAの先端の基準の高さとなる基準部（本実施の形態では、反応場）Cとの間隔を変えて、ピペットチップAの先端から気体を吸引または排出したときのピペットチップA内の空気圧の変化を測定する方法がある。より具体的には、まず、ピペットチップAの先端と基準部（反応場）Cとを離れた状態で、ピペットチップAの先端から気体を吸引または排出したときのピペットチップA内の第1圧力を測定する。そして、第1圧力の測定時よりもピペットチップAの先端と基準部Cとを近づけた状態

で、ピペットチップAの先端から気体を吸引または排出したときのピペットチップA内の第2圧力を測定する。最後に、第1圧力と第2圧力との差に基づいて、基準部に対するピペットチップAの先端高さを検出する。

[0021] 次いで、ピペットチップAの先端高さに基づいて、ピペットノズルAの基準高さ（ h_2 ）を設定する。図2Aの左図に示されるように、本実施の形態では、検出したピペットチップAの先端高さを、反応場から液体を除去するときの高さ（例えば $100\mu\text{m}$ ） h_1 に補正する。そして、補正した後のピペットノズルBの高さがピペットノズルBの基準高さ（ h_2 ）である。

[0022] 図2Aの右図に示されるように、第2工程では、反応工程の途中に、ピペットチップAの温度が変化することによるピペットチップAの先端位置の変動を打ち消すように、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正する。

[0023] 第1工程後の経過時間に伴い、ピペットチップAの先端高さは、反応場に近づくように変動する。本実施の形態では、ピペットチップAは、先端高さが h_1 から h_1' に変動する。これは、ピペットチップA周辺の庫内温度が、ピペットチップAを装置内に設置した時点の温度よりも高いため、ピペットチップAの温度が庫内温度に依存して徐々に上昇し、ピペットチップAの全長が長くなることによる。このまま反応工程を進めた場合、ピペットチップAの先端が反応場に接触してしまい、反応場から適切に液体を除去できなくなってしまう。

[0024] そこで、ピペットチップAの先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズルBの高さを基準高さ h_2 から h_2' に補正する。すなわち、反応場に対するピペットチップAの先端が所定の高さ（ h_1 ）となるように、ピペットノズルBの高さを反応場に対して高くなるように補正する。

[0025] なお、ピペットチップA周辺の庫内温度が、ピペットチップAを装置内に設置した時点の温度よりも低い場合には、ピペットチップAの全長は、庫内温度に依存して徐々にピペットチップAの温度が低下することによって短くなる。この場合、図2Bに示されるように、ピペットチップAは、先端高さ h_1 から h_1' に変動する。このまま反応工程を進めた場合、反応場に対し

てピペットチップAの先端が高くなりすぎてしまい、反応場から液体を除去した場合に、反応場に規定量以上の液体が残留してしまう。よって、次の液体を反応場に供給すると、反応場に残留した液体により、新たに供給した液体が希釈されてしまい、精度よく反応させることができない。そこで、ピペットチップAの先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズルBの高さを基準高さ h_2 から h_2' に補正する。すなわち、反応場に対するピペットチップAの先端が所定の高さ(h_1)となるように、ピペットノズルBの高さを反応場に対して低くなるように補正する。

[0026] なお、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正する時期は、反応場に液体を供給する直前、あるいは、反応場に液体を供給した後、反応場からこの液体を除去する前まで（特に、除去する直前）に行うことが好ましい。このような時期にピペットノズルBの高さを基準高さから補正することにより、反応場およびピペットチップAの先端の位置関係を精度よく制御することができる。反応場に液体を供給する直前に補正することにより、ピペットチップAの全長が伸びた際、ピペットチップAの先端が反応場に接触することや、接触により先端が曲がってしまうことを防止できる。また、ピペットノズルBの高さを反応場から液体を除去する直前に補正することにより、反応場内に残留する液体の量を精度よく制御することができる。

[0027] なお、ピペットノズルBの高さは、反応工程の経過時間に応じて補正することが好ましい。ピペットチップAは、反応工程中においてピペットチップA周辺の庫内温度の影響を受ける。そして、ピペットノズルBの先端高さは、反応工程の経過時間に応じて徐々に変動する。よって、ピペットノズルBの高さを反応工程の経過時間に応じて補正することで、ピペットチップAの全長を測定することなく、簡単にかつ迅速にピペットチップAの先端の変動を打ち消すことができる。また、特別な装置を必要としないため、安価で、かつ少ないスペースで行うことができる。

[0028] また、ピペットノズルBの高さは、ピペットチップAにおける先端とピペットノズルBとの嵌合部との間の長さ、ピペットチップAの線膨張係数と

、ピペットチップAの温度の経時的な変動と、反応工程の経過時間と、に基づいて補正させることが好ましい。ピペットノズルBの高さは、前述した要素に加え、反応工程における、ピペットチップAの温度の最大変化量に基づいて補正させることが好ましい。

[0029] 例えば、ピペットチップAにおける先端からピペットノズルBとの嵌合部までの長さは、任意の測定装置で予め測定される。

[0030] ピペットチップAの線膨張係数は、ピペットチップAの材料毎に決まる。ピペットチップAは、容易にかつ安価に製造できる観点から、樹脂製であることが好ましい。ポリプロピレンを用いた場合のピペットチップAの線膨張係数は、 $5.8 \times 10^{-5} \sim 12 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ 程度であり、ポリスチレンを用いた場合のピペットチップAの線膨張係数は、 $6.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ 程度である。また、ポリエチレンを用いた場合のピペットチップAの線膨張係数は、 $11 \times 10^{-5} \sim 15 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ 程度であり、低密度ポリエチレンを用いた場合のピペットチップAの線膨張係数は、 $16 \times 10^{-5} \sim 20 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ 程度である。さらに、フッ素樹脂を用いた場合のピペットチップAの線膨張係数は、 $10 \times 10^{-5} \sim 12 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ 程度である。

[0031] 次いで、ピペットチップAの温度の経時的な変動について、図3を参照しながら詳細に説明する。図3は、ピペットチップAの温度および第1工程後の反応工程の経過時間との関係を示すグラフである。図3の横軸は、第1工程後の反応工程における経過時間であり、縦軸は、ピペットチップAの温度($^\circ\text{C}$)である。この説明では、ピペットチップAをピペットノズルBに装着するときのピペットチップAの温度は $10 \sim 30$ 度の範囲内である。さらに、反応工程を行う空間の庫内温度を 37°C とし、当該空間内におけるピペットチップAの最大到達温度を 35°C とした。また、図3に示されるF10は、ピペットチップAをピペットノズルBに装着するときのピペットチップAの温度が 10°C の場合における経過時間とピペットチップAの温度との関係を示す関数であり、F20は、ピペットチップAをピペットノズルBに装着するときのピペットチップAの温度が 20°C の場合における経過時間とピペ

ットチップAの温度との関係を示す関数であり、F30は、ピペットチップAをピペットノズルBに装着するときのピペットチップAの温度が30℃の場合における経過時間とピペットチップAの温度との関係を示す関数である。

[0032] 図3に示されるように、反応工程の経過時間およびピペットチップAの温度の関係は、ピペットチップAをピペットノズルBに装着するときのピペットチップAの温度によって異なるため、反応空間における反応工程の経過時間およびピペットチップAの温度の関係を求めておく。ピペットチップAの温度を測定しない場合、第1工程におけるピペットチップAの温度は、10～30℃の範囲内のいずれの温度であるか不明となる。この場合、ピペットチップAの先端高さを検出した後であって、反応工程の開始後、t1秒後におけるピペットチップAの温度の取りうる温度範囲は、図3に示される「A」の範囲内であり、t2秒後におけるピペットチップAの温度の取りうる温度範囲は、図3に示される「B」の範囲内となる。

[0033] また、t1秒後におけるピペットチップAの温度の変化量の最大値は、図3に示される「C」であり、 $F10(t1) - F10(t0)$ で表すことができる。また、t1秒後におけるピペットチップAの温度の変化量の最小値は、図3に示される「D」であり、 $F30(t1) - F30(t0)$ で表すことができる。図3に示されるように、ピペットチップAの温度の変化量は、第1工程時点（あるいは反応開始直後）のピペットチップAの温度が低いほど、最大到達温度との温度差が大きくなるため、t秒後におけるピペットチップAの温度の変化量が大きくなる。図3に示される例では、ピペットチップAの最大温度変化量は、 $35^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C} = 25^{\circ}\text{C}$ である。

[0034] ピペットチップAの温度の経時的な変動（以下、「ピペットチップAの温度の時間変化関数」ともいう）は、ピペットチップAの第1工程における温度（初期温度）と、反応工程を実施する庫内温度とに依存する。以下に、想定されるケースについて説明する。

[0035] （ケース1）

ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）が既知の場合には、ピペットチップAの温度の時間変化関数により t 秒後のピペットチップAの温度が推定できるため、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正した後のピペットノズルBの高さ（補正量）を精度よく決めることができる。

[0036] （ケース2）

ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）が未知の場合には、ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）が最低の 10°C と最大の 30°C の時の時間変化関数 $F10$ と $F30$ を用いて、 t 秒後のピペットチップAの温度を、 $F10(t) \sim F30(t)$ の間と推定することで、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正した後のピペットノズルBの高さ（補正量）を概算することができる。

[0037] （ケース3）

さらに、ピペットチップAの温度の経時的な変動自体が不明な場合には、反応時間によるピペットチップAの先端の変動が不明であるため、ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）と最大到達温度を 35°C とから算出されるピペットチップAの最大温度変化量の範囲内とでピペットノズルBの高さを基準高さから補正する。この最大温度変化量を考慮して補正した場合、反応場とピペットチップAの先端位置とが離れてしまうが、少なくともピペットチップAの先端が反応場に衝突することを防止できる。

[0038] 具体的には、前述したピペットチップの温度の経時的な変動と、反応工程の経過時間とから、ピペットノズルを基準高さから補正するときにおける、ピペットチップAの温度が第1工程の直後から変動した温度差がわかる。次いで、当該変動した温度差と、ピペットチップAの線膨張係数とから当該変動した温度差におけるピペットチップAの変化率がわかる。次いで、当該変化率と、ピペットチップAにおける先端とピペットノズルBとの嵌合部との間の長さから、ピペットチップAの先端の変動量が推定できる。そして、当該変動に基づいてピペットノズルBの補正量を推定する。このように、ピペットチップAにおける先端とピペットノズルBとの嵌合部との間の長さ

、ピペットチップAの線膨張係数と、ピペットチップAの温度の経時的な変動と、反応工程の経過時間とに基づいてピペットノズルBの高さの補正量を推定することで、ピペットチップAの温度を測定することなく、反応工程において所定の時間が経過したときのピペットノズルBの高さを精度よく位置決めすることができる。

[0039] また、図3に示されるように、ピペットチップAの温度の時間変化関数は、その傾き（変化率）が経過時間とともに、小さくなることが好ましい。反応工程を行う空間の庫内温度が反応工程を行っている間一定であれば、ピペットチップAの温度の時間変化関数は、その傾き（変化率）が経過時間とともに、小さくなる。以下に、想定されるケースについて説明する。

[0040] （ケース1）

ピペットチップAをピペットノズルBに装着したときの庫内温度を、第1温度測定手段により測定することで、ピペットチップAの温度を推定してもよい。この場合、第1工程での周辺環境温度がわかれば（例えば、20℃）、その温度がほぼ投入された直後のピペットチップAの初期温度に近いと推定できるため、温度の時間変化関数としてF20を選択し、t1秒後のピペットチップAの温度の最大変化量は、 $F20(t1) - F20(t0)$ で表せることができる。これは、第1工程でのピペットチップAの温度が未知の場合における、t1秒後のピペットチップAの温度の最大変化量（ $F10(t1) - F10(t0)$ ）より小さいため、精度よくピペットノズルBの高さを補正できる。

[0041] （ケース2）

ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）が未知の場合には、ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）が最低の10℃と最大の30℃の時の時間変化関数F10とF30を用いて、t秒後のピペットチップAの温度を、 $F10(t) \sim F30(t)$ の間の温度と推定することで、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正した後のピペットノズルBの高さ（補正量）を概算することができる。このとき、ピペットチップAの温度の

最大変化量は、 $F10(t1) - F10(t0)$ 、最小変化量は、 $F30(t1) - F30(t0)$ であるため、ピペットチップAの温度変化量を $F30(t1) - F30(t0)$ 以上、 $F10(t1) - F10(t0)$ 以下として、補正量を算出し、ピペットノズルBの高さを補正できる。ピペットチップ先端の衝突を回避する観点から、最大変化量 $F10(t1) - F10(t0)$ から算出される最大補正量にて、ピペットノズルBの高さを補正するのがより望ましい。

[0042] (ケース3)

反応時間によるピペットチップAの先端の変動が不明な場合、ピペットチップAの第1工程での温度（初期温度）と最大到達温度である35℃とから算出されるピペットチップAの最大温度変化量の範囲内でピペットノズルBの高さを基準高さから補正する。さらに初期温度も不明な場合は、想定されるピペットチップAの第1工程での最低温度（例えば10℃）と、最大到達温度である35℃との差が最大温度変化量となる。この最大温度変化量を用いて、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正した後のピペットノズルBの高さ（補正量）を概算し、補正することができる。この最大温度変化量で補正した場合には、反応場とピペットチップAの先端位置とが離れてしまうが、少なくともピペットチップAの先端が反応場に衝突することを防止できる。

[0043] (効果)

以上のように、実施の形態1に係る反応方法では、ピペットチップAの先端高さに基づいてピペットノズルBの基準高さを設定し、ピペットチップAの先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズルBの高さを基準高さから補正しているため、反応場とピペットチップAの先端との位置関係（距離）を精度よく制御できる。これにより、反応工程を精度よく制御することができるため、高感度に、かつ定量的に結果を得ることができる。

[0044] [実施の形態2]

実施の形態2に係る反応方法は、ピペットチップAの温度を測定している

点において実施の形態 1 に係る反応方法と異なる。実施の形態 2 に係る反応方法は、反応工程の前に、ピペットノズル B の基準高さを設定する第 1 工程と、反応工程の途中に、ピペットノズル B の高さを基準高さから補正する第 2 工程とを有する。また、第 1 工程では、第 2 温度測定手段によってピペットチップ A の温度をさらに測定する。第 1 工程において、ピペットチップ A の温度を測定する時期は、ピペットノズル B にピペットチップ A を装着した後であって、反応工程に移行する直前までに行うことが好ましく、より好ましくは第 1 工程とほぼ同じ時期である。

[0045] 第 2 工程では、第 2 温度測定手段によってピペットチップ A の温度をさらに測定するとともに、第 1 工程において第 2 温度測定手段によって測定された、ピペットチップ A の先端高さを検出したときのピペットチップ A の温度と、反応工程における第 2 温度測定手段によって測定されたピペットチップ A の温度との差に応じて、ピペットノズル B の高さを基準高さから補正する。第 2 工程では、ピペットチップ A の温度を常時測定してもよい。

[0046] また、第 2 工程では、ピペットチップ A における先端とピペットノズル B との嵌合部との間の長さ、ピペットチップ A の線膨張係数と、ピペットチップ A の先端高さを検出したときのピペットチップ A の温度（第 1 温度）と、反応工程におけるピペットチップ A の温度（第 2 温度）との差に基づいて、ピペットノズル B の高さを基準高さから補正することが好ましい。この場合、ピペットチップ A の温度を測定することにより正確にピペットチップ A の高さの変動を把握することができるため、ピペットノズル A を精度よく制御することができる。

[0047] 具体的には、ピペットチップ A はポリプロピレン製とし、ピペットチップ A の線膨張係数は $1.0 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ とする。また、ピペットチップ A の先端からピペットノズル B との嵌合部までの長さを 70 mm とする。また、ピペットチップ A をピペットノズル B に取り付け、ピペットチップ A の先端高さを検出した時の温度を 10°C とする。そして、反応空間内において、ピペットチップ A の温度が 35°C まで上昇するとする。すなわち、ピペットチップ

Bの温度は、10℃から35℃まで変化したとする。この場合、ピペットチップAは、175 μ m伸びる。例えば、反応場から液体を除去する動作において、反応場における液体の液量を少なくするため、反応場とピペットチップAの先端との距離を100 μ m以下に制御したい場合がある。このように、反応場とピペットチップAの先端との距離を高精度に制御したい場合、ピペットチップAの先端が反応場に接触してしまう。このため、ピペットチップAが伸びた分だけ、ピペットノズルBの基準高さを補正する。この場合では、175 μ m上方に移動させる。

[0048] (効果)

以上のように、実施の形態2に係る反応方法では、ピペットチップAの温度を測定するため、実施の形態1に係る反応方法と比較して、さらに精度よく、ピペットノズルAの高さを基準高さから補正することができる。これにより、反応場とピペットチップAの先端との位置関係（距離）をさらに精度よく制御できる。また、反応工程を精度よく制御することができるため、さらに高感度に、かつ定量的に結果を得ることができる。

[0049] なお、実施の形態1および実施の形態2においてピペットチップAは、温調機構により温度が制御されていてもよい。この場合、ピペットチップAの温度を一定に維持することができるとともに、吸引後の液体の温度も維持することができるため、さらに、精度よく反応を行うことができる。特に、ポンプ吸排を複数回繰り返し、反応液が反応場とピペットチップ内を複数回往復送液される場合には、ピペットチップ内での温度に維持により効果的である。また、反応空間において、反応場および液体の貯留部が離れているときや、液体貯留部が温調されていない場合には、ピペット内で予備温調することができ有効である。

[0050] なお、実施の形態2では、第2温度測定手段によってピペットチップAの温度を第1工程と、第2工程との2回測定し、その温度差により補正量を算出しているが、ピペットチップAの温度の測定を第1工程のみとし、得られた第1工程でのピペットチップAの温度（初期温度）（例えば30℃）と、

その温度での時間変化関数として F_{30} とを用いることで、 t_1 秒後のピペットチップ A の温度の最大変化量は、 $F_{30}(t_1) - F_{30}(t_0)$ で表せることができる。これは、第 1 工程でのピペットチップ A の温度が未知の場合における、 t_1 秒後のピペットチップ A の温度の最大変化量 ($F_{10}(t_1) - F_{10}(t_0)$) より小さいため、精度よくピペットノズル B の高さを補正できる。実施の形態 2 の第 2 工程でもピペットチップ A の温度を測定する場合と比較して、補正精度は下がるが、何らかの理由で、第 2 工程でピペットチップ A の温度が正確に測定できない場合に有効な手段である。このような場合として、例えば、近くに配置されたピペットチップ A の温調（ヒーター）の影響により、ピペットチップ A の温度測定に誤差が出る際に有効である。また、第 1 工程時点では、ピペットチップ A の温調を OFF にして、ピペットチップ A の温度を測定し、その後の反応工程ではピペットチップ A の温調を ON にして安定した温度で反応させる場合に利用できる。

[0051] [SPFS 装置]

次いで、前述した実施の形態 1、2 に係る反応方法を実施するための装置の一例として、検体に含まれる被検出物質の存在または量を検出するための表面プラズモン励起増強蛍光分析装置（SPFS 装置）について説明する。

[0052] (SPFS 装置の構成 1)

図 4 は、実施の形態 1 に係る反応方法を行うことができる表面プラズモン励起増強蛍光分析装置（SPFS 装置）100 の構成を示す模式図である。

[0053] 図 4 に示されるように、SPFS 装置 100 は、ピペット 111 およびピペット移動部 112 を含む送液部 110 と、チップホルダー 121 を含む搬送部 120 と、位置情報取得部 130 と、光照射部 140 と、光検出部 150 と、制御部 160 とを有する。SPFS 装置 100 は、チップホルダー 121 に検出チップ 10 を装着した状態で使用される。そこで、検出チップ 10 について先に説明し、その後に SPFS 装置 100 の各構成部材について説明する。

[0054] (検出チップの構成)

図5は、検出チップ10の構成を示す図である。図5Aは、検出チップ10の平面図であり、図5Bは、図5Aに示されるA-A線の断面図であり、図5Cは、図5Aに示されるB-B線の断面図である。図6は、検出チップ10の他の形態を示す断面模式図である。

[0055] 図5A～Cに示されるように、検出チップ10は、入射面21、成膜面22および出射面23を含むプリズム20と、金属膜30と、反応領域41および試薬貯留領域42を含む流路蓋40とを有する。金属膜30および流路蓋40は、プリズム20の成膜面22上に配置されている。プリズム20、金属膜30および流路蓋40により、液体が流れる流路60が形成される。流路60は、プリズム20の成膜面22上に直接または金属膜30を介して配置されている。検出チップ10は、再利用可能なチップであってもよいし、使い捨てのチップであってもよい。本実施の形態では、検出チップ10は、使い捨てのチップである。また、流路60を流れる液体の例には、被検出物質を含む検体（例えば、血液や血清、血漿、尿、鼻孔液、唾液、精液など）や、蛍光物質で標識された捕捉体を含む標識液、洗浄液などが含まれる。

[0056] プリズム20は、励起光 α に対して透明な絶縁体からなる。プリズム20の入射面21は、光照射部140からの励起光 α をプリズム20の内部に入射させる。成膜面22上には、金属膜30が配置されている。本実施の形態では、プリズム20の内部に入射した励起光 α は、被検出物質が捕捉される金属膜30に照射される。励起光 α は、金属膜30の裏面で反射して反射光 β となる。より具体的には、励起光 α は、プリズム20と金属膜30との界面（成膜面22）で反射して反射光 β となる。出射面23は、反射光 β をプリズム20の外部に出射させる。

[0057] プリズム20の形状は、特に限定されない。本実施の形態では、プリズム20の形状は、底面が台形の柱体である。台形の一方の底辺に対応する面が成膜面22であり、一方の脚に対応する面が入射面21であり、他方の脚に対応する面が出射面23である。底面となる台形は、等脚台形であることが好ましい。これにより、入射面21と出射面23とが対称になり、励起光 α

のS波成分がプリズム20内に滞留しにくくなる。

[0058] 入射面21は、励起光 α が光照射部140に戻らないように形成される。励起光 α の光源がレーザーダイオード（以下「LD」ともいう）である場合、励起光 α がLDに戻ると、LDの励起状態が乱れてしまい、励起光 α の波長や出力が変動してしまう。そこで、増強角を中心とする走査範囲において、励起光 α が入射面21に垂直に入射しないように、入射面21の角度が設定される。ここで「増強角」とは、金属膜30に対する励起光 α の入射角を走査した場合に、検出チップ10の上方に放出される励起光 α と同一波長の散乱光（以下「プラズモン散乱光」という） γ の光量が最大となる時の入射角を意味する。本実施の形態では、入射面21と成膜面22との角度および成膜面22と出射面23とのなす角度は、いずれも約80°である。

[0059] なお、検出チップ10の設計により、増強角が概ね決まる。設計要素は、プリズム20の屈折率や、金属膜30の屈折率、金属膜30の膜厚、金属膜30の消衰係数、励起光 α の波長などである。金属膜30上に捕捉された被検出物質によって増強角がシフトするが、その量は数度未満である。

[0060] 一方で、プリズム20は、複屈折特性を少なからず有する。プリズム20の材料の例には、絶縁性の樹脂およびガラスが含まれる。プリズム20の材料は、好ましくは、屈折率が1.4～1.6であり、かつ複屈折が小さい樹脂である。

[0061] 金属膜30は、プリズム20の成膜面22上の流路60の少なくとも一部に露出するように配置されている。金属膜30により、成膜面22に全反射条件で入射した励起光 α の光子と、金属膜30中の自由電子との間で相互作用（SPR）が生じ、金属膜30の表面上に局在場光（一般に「エバネッセント光」または「近接場光」とも呼ばれる）を生じさせることができる。

[0062] 金属膜30の材料は、SPRを生じさせることができる金属であれば特に限定されない。金属膜30の材料の例には、金、銀、銅、アルミ、これらの合金が含まれる。本実施の形態では、金属膜30は、金薄膜である。金属膜30の形成方法は、特に限定されない。金属膜30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30の厚みは、特に限定されないが、30～70nmの範囲内であることが好ましい。

[0063] また、特に図示しないが、金属膜30の表面には、被検出物質を捕捉するための捕捉体が固定されている。金属膜30に捕捉体を固定することで、被検出物質を選択的に検出することができる。本実施の形態では、金属膜30上の所定の領域に、捕捉体が均一に固定されている。捕捉体が固定されている領域は、後述する1次反応および2次反応が起こる反応場となる。金属膜30に固定されている捕捉体は、流路60内に露出している。捕捉体の種類は、被検出物質を捕捉することができれば特に限定されない。本実施の形態では、捕捉体は、被検出物質に特異的に結合可能な抗体またはその断片である。

[0064] 流路蓋40は、成膜面22上に配置されている。前述したように、流路蓋40は、反応領域41および試薬貯留領域42を有する。反応領域41は、後述する1次反応や2次反応を行うための領域である。また、試薬貯留領域42は、2次反応に使用する標識液や、各反応後の洗浄に使用される洗浄液などが貯留される領域である。流路蓋40における反応領域41の裏面には、流路60となる流路溝43が形成されている。また、反応領域41の表面と裏面とには、注入部70となる第1貫通孔44と、貯留部80となる第2貫通孔45とがそれぞれ開口している。流路溝43の両端は、第1貫通孔44および第2貫通孔45にそれぞれ接続されている。試薬貯留領域42には、表面に開口した凹部46が形成されている。凹部46の数は、特に限定されない。本実施の形態では、凹部46の数は、2個である。凹部46には、2次反応に使用する標識液や、洗浄液などが貯留されている。流路溝43、第1貫通孔44および第2貫通孔45は、プリズム20、金属膜30および流路蓋40をこの順に積層することでそれぞれ流路60、注入部70および貯留部80となる。

[0065] 流路蓋40は、金属膜30上から放出される蛍光 δ およびプラズモン散乱光 γ に対して透明な材料からなることが好ましい。流路蓋40の材料の例に

は、樹脂が含まれる。流路蓋 40 は、蛍光 δ およびプラズモン散乱光 γ を外部に取り出す部分が蛍光 δ およびプラズモン散乱光 γ に対して透明であれば、他の部分は不透明な材料で形成されていてもよい。流路蓋 40 は、例えば、両面テープや接着剤などによる接着や、レーザー溶着、超音波溶着、クランプ部材を用いた圧着などによりプリズム 20 または金属膜 30 に接合されている。

[0066] なお、図 6 に示されるように、検出チップ 10' は、流路 60 に代えてウェル 60' を有していてもよい。この検出チップ 10' では、ウェル 60' の開口から液体を注入したり、除去したりする。このとき、反応場は、ウェルの底部やウェルの壁面に予め捕捉体が固定される形で形成され、溶液中の被検出物質と反応する場合でもよく、また、そのような捕捉体は固定されておらず、ウェル内の溶液中で液-液反応する場合でも良い。

[0067] 図 4 に示されるように、励起光 α は、入射面 21 でプリズム 20 内に入射する。プリズム 20 内に入射した励起光 α は、金属膜 30 に全反射角度（SPR が生じる角度）で照射される。このように金属膜 30 に対して励起光 α を SPR が生じる角度で照射することで、金属膜 30 上に局在場光を発生させることができる。この局在場光により、金属膜 30 上に存在する被検出物質を標識する蛍光物質が励起され、蛍光 δ が放出される。SPFS 装置 100 は、蛍光物質から放出された蛍光 δ の光量を測定することで、被検出物質の存在または量を検出する。

[0068] （SPFS 装置の構成）

次に、本実施の形態に係る SPFS 装置 100 の各構成部材について説明する。前述したように、SPFS 装置 100 は、送液部 110、搬送部 120、位置情報取得部 130、光照射部 140、光検出部 150 および制御部 160 を有する。検出チップ 10 は、搬送部 120 のチップホルダー 121 に保持されうる。

[0069] 送液部 110 は、送液ポンプ 111、ピペットノズル 116、ピペットノズル駆動機構 112 および送液ポンプ駆動機構 113 を有する。送液部 11

0は、チップホルダー121に保持された検出チップ10の流路60内に検体を注入したり、検出チップ10の試薬貯留領域42に貯留された標識液や洗浄液などの液体を反応領域41の流路60内に移動させたりする。また、送液部110は、流路60から液体を排出したり、流路60内の液体を攪拌したりもする。送液部110は、ピペットノズル116にピペットチップ170を装着した状態で使用される。なお、不純物の混入などを防止する観点から、ピペットチップ170は、交換可能であることが好ましい。

[0070] 送液ポンプ111は、流路60に液体を供給したり、流路60から液体を除去したりする際に液体を吸引する。送液ポンプ111は、シリンジ114と、シリンジ114内を往復動作可能なプランジャー115と、シリンジ114からなり、シリンジ114にはピペットノズル116が接続されている。また、送液ポンプ111は、プランジャー115の往復運動によって、液体の吸引および排出を定量的に行うことができる。これにより送液ポンプ111は、流路60に液体を供給したり、流路60から液体を除去したりできる。また、送液ポンプ111は、液体の吸引および排出を繰り返すことで、流路60内の液体を攪拌できる。

[0071] ピペットノズル駆動機構112は、注入部70を介した流路60内への液体の供給、注入部70を介した流路60内からの液体の除去のために、ピペットノズル116を移動させる。また、ピペットノズル駆動機構112は、前述のピペットノズル116の高さを基準高さから補正するために、ピペットノズル116を移動させる。ピペットノズル駆動機構112は、例えば、ピペットノズル116をピペットノズル116の軸方向（例えば垂直方向）に自在に動かす。ピペットノズル駆動機構112は、例えば、ソレノイドアクチュエーターおよびステッピングモーターを含む。

[0072] 送液ポンプ駆動機構113は、プランジャー115を移動させて、外部の液体をピペットチップ170内に吸入させたり、ピペットチップ170内の液体を外部に排出させたりする。送液ポンプ駆動機構113は、ステッピングモーターなどのプランジャー115を往復運動させるための装置を含む。

ステップモーターは、送液ポンプ 111 の送液量や送液速度を管理できるため、検出チップ 10 の残液量を管理する観点から好ましい。

[0073] 前述したように、送液部 110 は、凹部 46 より各種液体を吸引し、検出チップ 10 の流路 60 内に供給する。このとき、ピペットチップ 170 の先端が流路 60 内において流路 60 の底面と近接した状態で、シリンジ 114 に対するプランジャー 115 の往復動作を繰り返すことで、検出チップ 10 中の流路 60 内を液体が往復し、流路 60 内の液体が攪拌される。これにより、液体の濃度の均一化や、流路 60 内における反応（例えば、1 次反応および 2 次反応）の促進などを実現することができる。

[0074] 流路 60 内の液体は、再び送液ポンプ 111 で吸引され、図外の廃液タンクなどに排出される。これらの動作の繰り返しにより、各種液体による反応や洗浄などを実施し、流路 60 内の反応場に、蛍光物質で標識された被検出物質を配置することができる。なお、流路 60 内から液体を除去するときには、前述したように、ピペットチップ 170 の先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズル 116 の高さを基準高さから補正する。

[0075] 搬送部 120 は、検出チップ 10 を装着位置、検出位置または送液位置に搬送するとともに、検出チップ 10 を保持する。ここで「装着位置」とは、ピペットノズル 116 にピペットチップ 170 を装着する位置である。また、「検出位置」とは、光照射部 140 が検出チップ 10 に励起光 α を照射し、それに伴い発生する蛍光 δ またはプラズモン散乱光 γ を光検出部 150 が検出する位置である。また、「送液位置」とは、送液部 110 が検出チップ 10 の流路 60 内に液体を注入するか、または検出チップ 10 の流路 60 内の液体を除去する位置である。搬送部 120 は、チップホルダー 121 および搬送ステージ 122 を含む。「装着位置」と「検出位置」とは、同じ位置であってもよい。

[0076] チップホルダー 121 は、搬送ステージ 122 に固定されており、検出チップ 10 を着脱可能に保持する。チップホルダー 121 の形状は、検出チップ 10 を保持することが可能であり、かつ励起光 α 、蛍光 δ およびプラズモ

ン散乱光 γ の光路を妨げなけ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１２１の形状は、流路蓋４０を挟み込んで検出チップ１０を保持できるように構成されている。

[0077] 搬送ステージ１２２は、チップホルダー１２１を一方向およびその逆方向（図１の紙面における左右方向）に移動させる。搬送ステージ１２２も、励起光 α 、蛍光 δ およびプラズモン散乱光 γ の光路を妨げない形状である。搬送ステージ１２２は、例えば、ステッピングモーターなどで駆動される。

[0078] 位置情報取得部１３０は、ピペットチップ１７０の先端高さを取得する。位置情報取得部１３０は、ピペットチップ１７０の先端高さに関する情報を取得できれば特に限定されない。本実施の形態では、位置情報取得部１３０には、空気圧センサー１３１が含まれる。空気圧センサー１３１は、ピペットノズル１１６とシリンジ１１４との間に接続されている。空気圧センサー１３１の種類は、ピペットチップ１７０内の空気圧（圧力）を測定することができれば特に限定されない。空気圧センサー１３１の種類の例には、ブルドン管を用いた機械式のセンサーや、半導体などを用いた電子式のセンサーなどが含まれる。

[0079] 本実施の形態では、ピペットチップ１７０の先端高さは、ピペットチップ１７０の先端と基準部１８０との間隔を変えて、ピペットチップ１７０の先端から気体を吸引または排出したときのピペットチップ１７０内の空気圧の変化を空気圧センサー１３１により測定することで取得される。基準部１８０は、固体であってもよいし、液体であってもよく、その高さが高精度に特定されていれば特に限定されない。固体の基準部１８０の例には、検出チップ１０における流路蓋４０やシール５０、プリズム２０（流路６０の底面）などが含まれる。また、SPFS装置１００における基準部１８０の例には、搬送ステージ１２２や、チップホルダー１２１、搬送部１２０において搬送ステージ１２２を配置する配置面（ピペットノズル１１６の下方に位置する部分）などであってもよい。また、液体の基準部１８０の例には、検出チップ１０における凹部４６に貯留されている液体の液面、流路６０内の液体

の液面などが含まれる。反応場とピペットチップ170の先端位置とを高精度に管理するためには、より直接的に反応場の位置を基準部180とすることが望ましく、例えば、プリズム20（流路60の底面）を基準部180とすることがより望ましい。

[0080] ピペットチップ170の先端高さを検出する動作において、ピペットチップ170の先端における気体の吸引または排出は、連続的に行われてもよいし、間欠的に行われてもよい。例えば、気体を排出する場合では、送液ポンプ111を用いてピペットチップ170の先端より気体を排出させながら、ピペットチップ170の先端位置と上記基準部180との距離を変化させつつ、空気圧センサー131の出力を検出し、出力値が閾値以上に大きくなった時、ピペットチップ170の先端が基準部180に近接したとして、ピペットチップ170の先端位置を検出する。判定に用いる閾値は、基準部180に応じて適宜調整することが好ましい。基準部180が固体の場合には、基準部180が液体の場合と比較して閾値を高圧にすることができる。なお、第1工程にてピペットチップ170の先端高さを検出するセンサーは、空気圧センサーだけでなく、接触式の圧力センサー、ロードセル、非接触の画像センサーなど、先端高さを精度よく検出さえできれば、さまざまなセンサーを使用できる。第1工程では、まだピペットチップ170には液が吸引されていないため、装置が汚染されるなどの心配もなく、非接触式だけでなく接触式のセンサーも使用できる。

[0081] 光照射部140は、チップホルダー121に保持された検出チップ10の入射面21に向かって励起光 α を照射する。蛍光 δ またはプラズモン散乱光 γ の測定時には、光照射部140は、金属膜30に対する入射角がSPRを生じさせる角度となるように、金属膜30に対するP波のみを入射面21に向けて出射する。ここで「励起光」とは、蛍光物質を直接または間接的に励起させる光である。たとえば、励起光 α は、プリズム20を介して金属膜30にSPRが生じる角度で照射されたときに、蛍光物質を励起させる局在場光を金属膜30の表面上に生じさせる光である。光照射部140は、光源ユ

ニット 141、角度調整機構 142 および光源制御部 143 を含む。

[0082] 光源ユニット 141 は、コリメートされ、かつ波長および光量が一定の励起光 α を、金属膜 30 の裏面における照射スポットの形状が略円形となるように出射する。光源ユニット 141 は、例えば、励起光 α の光源、ビーム整形光学系、APC 機構および温度調整機構（いずれも不図示）を含む。

[0083] 光源の種類は、特に限定されず、例えばレーザーダイオード（LD）である。光源の他の例には、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。光源から出射される光がビームでない場合は、光源から出射される光は、レンズや鏡、スリットなどによりビームに変換される。また、光源から出射される光が単色光でない場合は、光源から出射される光は、回折格子などにより単色光に変換される。さらに、光源から出射される光が直線偏光でない場合は、光源から出射される光は、偏光子などにより直線偏光の光に変換される。

[0084] ビーム整形光学系は、例えば、コリメーターやバンドパスフィルター、直線偏光フィルター、半波長板、スリット、ズーム手段などを含む。ビーム整形光学系は、これらのすべてを含んでいてもよいし、一部を含んでいてもよい。コリメーターは、光源から出射された励起光 α をコリメートする。バンドパスフィルターは、光源から出射された励起光 α を中心波長のみの狭帯域光にする。光源からの励起光 α は、若干の波長分布幅を有しているためである。直線偏光フィルターは、光源から出射された励起光 α を完全な直線偏光の光にする。半波長板は、金属膜 30 に P 波成分が入射するように励起光 α の偏光方向を調整する。スリットおよびズーム手段は、金属膜 30 の裏面における照射スポットの形状が所定サイズの円形となるように、励起光 α のビーム径や輪郭形状などを調整する。APC 機構は、光源の出力が一定となるように光源を制御する。より具体的には、APC 機構は、励起光 α から分岐させた光の光量を不図示のフォトダイオードなどで検出する。そして、APC 機構は、帰回路で投入エネルギーを制御することで、光源の出力を一定に制御する。

- [0085] 角度調整機構 142 は、金属膜 30（プリズム 20 と金属膜 30 との界面（成膜面 22））に対する励起光 α の入射角を調整する。角度調整機構 142 は、プリズム 20 を介して金属膜 30 の所定の位置に向けて所定の入射角で励起光 α を照射するために、励起光 α の光軸とチップホルダー 121 とを相対的に回転させる。
- [0086] たとえば、角度調整機構 142 は、光源ユニット 141 を励起光 α の光軸と直交する軸（図 4 の紙面に対して垂直な軸）を中心として回転させる。このとき、入射角を走査しても金属膜 30 上での照射スポットの位置がほとんど変化しないように、回転軸の位置を設定する。回転中心の位置を、入射角の走査範囲の両端における 2 つの励起光 α の光軸の交点近傍（成膜面 22 上の照射位置と入射面 21 との間）に設定することで、照射位置のズレを極小化できる。
- [0087] 前述したように、金属膜 30 に対する励起光 α の入射角のうち、プラズモン散乱光 γ の光量が最大となる角度が増強角である。励起光 α の入射角を増強角またはその近傍の角度に設定することで、高強度の蛍光 δ を測定することが可能となる。検出チップ 10 のプリズム 20 の材料および形状、金属膜 30 の膜厚、流路 60 内の液体の屈折率などにより、励起光 α の基本的な入射条件が決まるが、流路 60 内の蛍光物質の種類および量、プリズム 20 の形状誤差などにより、最適な入射条件はわずかに変動する。このため、測定ごとに最適な増強角を求めることが好ましい。
- [0088] 光源制御部 143 は、光源ユニット 141 に含まれる各種機器を制御して、光源ユニット 141 からの励起光 α の出射を制御する。光源制御部 143 は、例えば、演算装置、制御装置、記憶装置、入力装置および出力装置を含む公知のコンピュータやマイコンなどによって構成される。
- [0089] 光検出部 150 は、光照射部 140 が検出チップ 10 の金属膜 30 に励起光 α を照射したときに、金属膜 30 の流路 60 側の面の近傍から放出される蛍光 δ の光量を検出する。また、必要に応じて、光検出部 150 は、金属膜 30 への励起光 α の照射によって生じたプラズモン散乱光 γ も検出する。光

検出部 150 は、受光ユニット 151、位置切り替え機構 152 およびセンサー制御部 153 を含む。

[0090] 受光ユニット 151 は、検出チップ 10 の金属膜 30 の表面に対する法線方向に配置される。受光ユニット 151 は、第 1 レンズ 154、光学フィルター 155、第 2 レンズ 156 および受光センサー 157 を含む。

[0091] 第 1 レンズ 154 は、例えば、集光レンズであり、金属膜 30 上から出射される光を集光する。第 2 レンズ 156 は、例えば、結像レンズであり、第 1 レンズ 154 で集光された光を受光センサー 157 の受光面に結像させる。第 1 レンズ 154 および第 2 レンズ 156 の間の光路は、略平行になっている。

[0092] 光学フィルター 155 は、第 1 レンズ 154 および第 2 レンズ 156 の間に配置されている。光学フィルター 155 は、蛍光成分のみを受光センサー 157 に導き、高い S/N 比で蛍光 δ を検出するために、励起光成分（プラズモン散乱光 γ ）を除去する。光学フィルター 155 の例には、励起光反射フィルター、短波長カットフィルターおよびバンドパスフィルターが含まれる。光学フィルター 155 は、例えば、所定の光成分を反射する多層膜を含むフィルター、または所定の光成分を吸収する色ガラスフィルターである。

[0093] 受光センサー 157 は、蛍光 δ およびプラズモン散乱光 γ を検出する。受光センサー 157 は、微量の被検出物質からの微弱な蛍光 δ を検出することが可能な高い感度を有する。受光センサー 157 は、例えば、光電子増倍管（PMT）やアバランシェフォトダイオード（APD）、シリコンフォトダイオード（SiPD）などである。

[0094] 位置切り替え機構 152 は、光学フィルター 155 の位置を、受光ユニット 151 における光路上または光路外に切り替える。具体的には、受光センサー 157 が蛍光 δ を検出する時には、光学フィルター 155 を受光ユニット 151 の光路上に配置し、受光センサー 157 がプラズモン散乱光 γ を検出する時には、光学フィルター 155 を受光ユニット 151 の光路外に配置する。

[0095] センサー制御部153は、受光センサー157の出力値の検出や、検出した出力値による受光センサー157の感度の管理、適切な出力値を得るための受光センサー157の感度の変更、などを制御する。センサー制御部153は、例えば、演算装置、制御装置、記憶装置、入力装置および出力装置を含む公知のコンピュータやマイコンなどによって構成される。

[0096] 制御部160は、送液ポンプ駆動機構113、搬送ステージ122、角度調整機構142、光源制御部143、位置切り替え機構152、およびセンサー制御部153を制御する。制御部160は、例えば、演算装置、制御装置、記憶装置、入力装置および出力装置を含む公知のコンピュータやマイコンなどによって構成される。なお、前述したピペットチップ170における先端とピペットノズル116との嵌合部との間の長さ、ピペットチップ170の線膨張係数と、反応工程における、ピペットチップ170の温度の最大変化量と、ピペットチップ170の温度の経時的な変動とは、予め記憶装置に記憶されている。また、制御部160は、第1工程におけるピペットチップ170の先端高さに基づいて、ピペットノズル116の基準高さを設定する。また、制御部160は、第2工程におけるピペットノズル116の高さを基準高さから補正する補正量を求める。

[0097] (SPFS装置の検出動作)

次に、SPFS装置100の被検出物質の検出動作について説明する。図7は、SPFS装置100の動作手順の一例を示すフローチャートである。図8は、ピペットチップ170の先端高さを検出する工程（図7における工程S120）の内容を示すフローチャートである。この例では、捕捉体として1次抗体が金属膜30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。さらに、基準部180は、流路60の底面（金属膜30）とした。

[0098] まず、測定の準備をする（工程S110）。具体的には、検出チップ10を準備して、検出チップ10のセット位置においてチップホルダー121に検出チップ10を設置する。また、装着位置において、ピペットノズル11

6の先端部にピペットチップ170を装着する。

[0099] 次いで、ピペットチップ170の先端高さを検出する（工程S120）。まず、ピペットチップ170内の第1圧力を測定する（工程S121）。具体的には、制御部160は、ピペットノズル駆動機構112を駆動して、ピペットチップ170の先端を流路60の底面（基準部）の直上に移動させる。そして、制御部160は、送液ポンプ駆動機構113を駆動して、プランジャー115をシリンジ114に対して進行させて、ピペットチップ170の先端から空気を連続してはき出しながら、空気圧センサー131によってピペットチップ170内の第1圧力を測定する。

[0100] 次いで、ピペットチップ170内の第2圧力を測定する（工程S122）。具体的には、制御部160は、ピペットノズル駆動機構112を駆動して、第1圧力を測定した工程（工程S121）よりもピペットチップ170の先端を流路60の底面（基準部180）側に移動させる。そして、制御部160は、送液ポンプ駆動機構113を駆動して、プランジャー115をシリンジ114に対して進行させて、ピペットチップ170の先端から空気を連続してはき出しながら、空気圧センサー131によってピペットチップ170内の第2圧力を測定する。

[0101] 次いで、第1圧力と第2圧力との差を求める（工程S123）。具体的には、制御部160は、第1圧力（第2圧力）から第2圧力（第1圧力）を差し引くことで第1圧力と第2圧力との差を求める。このとき、第1圧力と第2圧力との差が所定の閾値以上になるまで、ピペットノズル駆動機構112を駆動して、ピペットチップ170の先端を流路60の底面（基準部180）側に移動させ、空気圧センサー131によってピペットチップ170内の第2圧力を測定する工程を繰り返す。そして、制御部160は、第1圧力と第2圧力との差が生じたことにより、ピペットチップ170の先端が基準部180に近接したと判定して、基準部180に対するピペットチップ170の先端高さを検出する。すなわち、制御部160は、空気圧センサー131が空気圧を検出することで、基準部180に対するピペットチップ170の

先端高さを検出する。

[0102] なお、ピペットチップ170の先端高さを検出する工程（工程S120）では、ピペットチップ170の先端から空気を連続してまたは間欠的にはき出しながら、かつピペットチップ170の先端を基準部180に近づけながら空気圧センサー131によりピペットチップ170内の空気圧を測定してもよい。この場合、ピペットチップ170を移動する前の空気圧が第1圧力となる。また、ピペットチップ170の先端を基準部180に近づけながら空気圧センサー131により測定したピペットチップ170内の空気圧が第2圧力となる。この場合であってもピペットチップ170の先端高さを高精度に検出できる。

[0103] 次いで、ピペットノズル116の基準高さを設定する（工程S130）。具体的には、制御部160は、ピペットノズル駆動機構112を駆動して、工程S120でピペットチップ170の先端を検出したときにおけるピペットノズル116の高さ（位置）から、流路60内から液体を除去するときの、ピペットチップ170の先端が流路60の底面から所定の高さとなるように、ピペットノズル116を移動する。そして、制御部は、ピペットチップ170の先端が所定の高さ（例えば100 μ m）のときのピペットノズル116の高さをピペットノズル116の基準高さに設定する。

[0104] 次に、検出チップ10に測定液を注入する（工程S140）。具体的には、制御部160は、搬送ステージ122、ピペットノズル駆動機構112、送液ポンプ駆動機構113を操作して、測定液が貯留されているウェルから、ピペットチップ170を介して、検出チップ10の流路60内に測定液を注入する。この工程では、ピペットノズルの基準高さを設定した直後なので、ピペットノズル基準高さの補正は特に不要である。このとき、検出チップの金属膜30上の反応場が保存試薬により保護されている場合には、ピペットチップ170の先端の位置を固定した状態で、プランジャー115を往復動作させ、ピペットチップ170で測定液（洗浄液）の吸入および排出を繰り返すことで、流路60内で測定液を往復させ、保存試薬を洗浄除去しても

よい。この場合は、洗浄に用いた測定液をピペットチップ170にて吸引除去し、新しい測定液を再度検出チップ10の流路60内に注入する。

[0105] 次いで、励起光 α の入射角を決定する（工程S150）。制御部160は、搬送ステージ122を操作して、検出チップ10を検出位置に移動させる。そして、制御部160は、角度調整機構142を駆動して励起光 α の入射角を走査しながら、センサー制御部153を駆動して受光センサー157によりプラズモン散乱光 γ を検出する。そして、プラズモン散乱光 γ の光量が最大となる角度を励起光 α の入射角（増強角）とする。次いで、ピペットチップ170内に測定液を吸入することで流路60内から測定液を除去する。

[0106] 次に、流路60内より測定液を吸引除去する（工程S160）。この際、制御部160は、前述したいずれかの手段により、ピペットチップ170の先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズル116の高さを基準高さからの補正量を求める。そして、制御部160は、ピペットノズル駆動機構112を介して、ピペットノズル116の高さを補正後の基準高さに移動させる。制御部160は、送液ポンプ駆動機構113を操作して、流路60内の測定液をピペットチップ170内に吸引除去する。ピペットノズル基準高さを補正し、ピペットチップ170の先端位置を高精度に管理することで、流路60内の測定液の残液量を低減し、かつ一定量に管理することが可能となり、次の1次反応工程において、残液により検体が希釈されてしまう割合を低減かつ一定の希釈率に管理することができる。

[0107] 次いで、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；工程S170）。制御部160は、搬送ステージ122、ピペットノズル駆動機構112、送液ポンプ駆動機構113を操作して、1次反応液（検体または検体希釈液）が貯留されているウェルから、ピペットチップ170を介して、検出チップ10の流路60内に1次反応液を注入し、プランジャー115を往復動作させることで、一定時間往復送液する。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。1次反応後、1次反応液を、ピペットチップ170内に吸入することで流路60か

ら検体を除去する。

[0108] なお、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。

[0109] 次いで、金属膜30上を緩衝液などの洗浄液で洗浄する（工程S180）。制御部160は、搬送ステージ122、ピペットノズル駆動機構112、送液ポンプ駆動機構113を操作して、洗浄液が貯留されているウェルから、ピペットチップ170を介して、検出チップ10の流路60内に洗浄液を注入し、プランジャー115を往復動作させることで、一定時間往復送液する。次いで、流路60内から残留した1次反応液を含む洗浄液を除去する。

[0110] この洗浄液を除去する工程では、測定液を除去する工程（工程S160）と同様に、制御部160は、前述したいずれかの手段により、ピペットチップ170の先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズル116の高さを基準高さからの補正量を求める。そして、制御部160は、ピペットノズル駆動機構112を介して、ピペットノズル116の高さを補正後の基準高さに移動させる。そして、制御部160は、ピペットノズル駆動機構112を介して、ピペットノズル116の高さを補正後の基準高さに移動させ、その補正した位置で残留した1次反応液を含む洗浄液を流路60内から除去する。ピペットノズル116基準高さを補正し、ピペットチップ170の先端位置を高精度に管理することで、流路60内の1次反応液の残液量を低減することが可能となり、以後の工程において、残液として残った1次反応液により、さらに検体が捕捉されてしまうことを防止し、1次反応時間を管理することで、検体の濃度を精度よく検出することが可能となる。

[0111] 次いで、金属膜30上に捕捉されている被検出物質を蛍光物質で標識する（2次反応；工程S190）。具体的には、制御部160は、搬送ステージ122、ピペットノズル駆動機構112、送液ポンプ駆動機構113を操作

して、２次反応液（標識抗体液）が貯留されているウェルから、ピペットチップ１７０を介して、検出チップ１０の流路６０内に２次反応液を注入し、プランジャー１１５を往復動作させることで、一定時間往復送液する。流路６０内では、抗原抗体反応によって、金属膜３０上に捕捉されている被検出物質が蛍光物質で標識される。この２次反応後、２次反応液を、ピペットチップ１７０内に吸入することで流路６０から検体を除去する。

[0112] 次いで、金属膜３０上を緩衝液などの洗浄液で洗浄する（工程Ｓ２００）。制御部１６０は、搬送ステージ１２２、ピペットノズル駆動機構１１２、送液ポンプ駆動機構１１３を操作して、洗浄液が貯留されているウェルから、ピペットチップ１７０を介して、検出チップ１０の流路６０内に洗浄液を注入し、プランジャー１１５を往復動作させることで、一定時間往復送液する。次いで、流路６０内から残留した２次反応液を含む洗浄液を除去する。

[0113] この洗浄液を除去する工程では、測定液を除去する工程（工程Ｓ１６０）および１次反応後の洗浄工程（Ｓ１８０）と同様に、制御部１６０は、前述した本発明のいずれかの手段により、ピペットチップ１７０の先端高さの変動を打ち消すように、ピペットノズル１１６の高さを基準高さからの補正量を求める。そして、制御部１６０は、ピペットノズル駆動機構１１２を介して、ピペットノズル１１６の高さを補正後の基準高さに移動させる。そして、制御部１６０は、ピペットノズル駆動機構１１２を介して、ピペットノズル１１６の高さを補正後の基準高さに移動させ、その補正した位置で残留した２次反応液を含む洗浄液を流路６０内から除去する。ピペットノズル１１６基準高さを補正し、ピペットチップ１７０の先端位置を高精度に管理することで、流路６０内の２次反応液の残液量を低減することが可能となり、以後の被検出物質の検出工程において、残液として残った被検出物質に対して未反応の蛍光物質からの発光を防止し、検体の濃度を精度よく検出することが可能となる。

[0114] なお、１次反応（工程Ｓ１７０）と２次反応（工程Ｓ１９０）との順番は、これに限定されない。たとえば、被検出物質を２次抗体に結合させた後に

、これらの複合体を含む液体を金属膜30上に提供してもよい。また、金属膜30上に検体と標識液を同時に提供してもよい。

[0115] 次いで、被検出物質を検出する（工程S210）。具体的には、制御部160は、搬送ステージ122を操作して、検出チップ10を検出位置に移動させる。そして、光源制御部143を駆動して励起光 α を工程S120で決定した入射角（増強角）で金属膜30の所定の位置に照射させながら、センサー制御部153を駆動して金属膜30（金属膜30表面およびその近傍）上から放出される蛍光 δ の強度を検出するように受光センサー157を制御する。

[0116] なお、制御部160は、入射角の決定（工程S150）の後（1次反応S180の前）にブランク値を測定してもよい。この場合、増強角で励起光 α を金属膜30に照射し、受光センサー157の検出値をブランク値とする。そして、被検出物質を検出する工程（工程S210）では、蛍光 δ の検出値からブランク値を引くことで、検体中の被検出物質の量を示す蛍光 δ の量を算出する。

[0117] なお、ピペットノズル116の高さを基準高さから補正する工程は、流路60内から液体を除去する全ての場合において行わなくてもよい。特に、ピペットノズル160の高さの基準高さからの補正は、測定液の排出工程（工程S160）と、1次反応後の洗浄工程（工程S180）と、2次反応後の洗浄工程（工程S200）とにおいて流路60内から液体を除去する動作時において行えばよい。また、測定液の排出工程（工程S160）と、2次反応後の洗浄工程（工程S200）とにおいて行えばよい。測定液の排出工程（工程S160）において、ピペットノズル116の高さを基準高さから補正する工程を行うのは、流路60内に測定液が余分に残留することによって、1次反応における検体が希釈されてしまうことを防止するためである。また、1次反応後の洗浄工程（工程S180）において、ピペットノズル116の高さを基準高さから補正する工程を行うのは、流路60内に1次反応液が余分に残留することによって、1次反応がその後も継続してしまうのを防

止するためである。２次反応後の洗浄工程（工程Ｓ２００）において、ピペットノズル１１６の高さを基準高さから補正する工程を行うのは、標識液内に浮遊した蛍光物質が流路６０内に残留してしまうと、被検出物質と反応した蛍光物質との区別がつかずノイズとなってしまうためである。

[0118] １次反応後の洗浄工程（工程Ｓ１８０）での残液は比較的影響が小さいので、この工程での基準高さからの補正は省略することも可能である。また、測定液の排出工程（工程Ｓ１６０）は、第１工程にて基準高さを設定してからの経過時間が比較的短く、ピペットチップ１７０の温度変化が比較的小さいため、この工程での基準高さからの補正は省略することも可能である。２次反応後の洗浄工程（工程Ｓ２００）は、ピペットチップ１７０の先端高さを検出してから経過時間が長いため、ピペットチップ１７０の長さの変化量が最も大きいため、基準高さを補正する効果が大きく、最も重要である。

[0119] また、図９に示されるように、ＳＰＦＳ装置は、装着空間の温度を測定するための第１温度測定手段１９０をさらに有していてもよい。第１温度測定手段１９０は、装着したピペットチップ１７０周辺の庫内温度を測定できれば特に限定されない。第１温度測定手段１９０は、温度センサーなどである。第１温度測定手段１９０により、反応工程における、ピペットチップ１７０の最大温度および最小温度の差の推定値をより精度良く推定できるため、ピペットノズル１１６の高さを基準高さから精度よく補正できる。

[0120] （ＳＰＦＳ装置の構成２）

図１０は、実施の形態２に係る反応方法を実施するための装置の一例である表面プラズモン励起増強蛍光分析装置（ＳＰＦＳ装置）のピペットチップ周りの構成を示す模式図である。図１０Ａは、第２温度測定手段１９２の配置を説明するための側面図であり、図１０Ｂは、断面図であり、図１０Ｃは、第２温度測定手段１９２の配置および温調機構１９４の配置を説明するための側面図であり、図１０Ｄは、断面図である。

[0121] 図１０Ａ、Ｂに示されるように、実施の形態２に係る反応方法を行うことができるＳＰＦＳ装置は、第２温度測定手段１９２を有する。

[0122] 第2温度測定手段192は、ピペットチップ170の温度を測定する。第2温度測定手段192は、前述の機能を発揮できれば特に限定されない。第2温度測定手段192の例には、熱電対、サーモバイル、ボロメータなどが含まれる。特に、非接触でピペットチップ170の温度を短時間で測定でき、かつ安価であることから、第2温度測定手段192は、サーモバイルであることが好ましい。

[0123] また、SPFS装置は、ピペットチップ170の温度を調整する温調機構194を有していてもよい。温調機構194は、前述の機能を発揮できれば特に限定されない。温調機構194は、例えば、温調ブロックである。この場合、図10C、Dに示されるように、温調機構194は、検出チップ10'やウェル60にピペットチップ170の先端が入り込む部分を除いた高さに、かつ第2温度測定手段192を除いた位置に配置されている。

[0124] 制御部160は、ピペットチップ170をピペットノズル116に装着し、第1工程を行った後、反応工程が終わるまで、ピペットチップ170の温度を調整するために、温調機構194を起動する。

[0125] 本出願は、2015年11月13日出願の特願2015-223436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

[0126] 本発明に係る反応方法は、例えば被検出物質を高い信頼性で測定することができる。よって、本発明に係る反応方法は、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

- [0127] 10、10' 検出チップ
20 プリズム
21 入射面
22 成膜面
23 出射面

- 3 0 金属膜
- 4 0 流路蓋
- 4 1 反応領域
- 4 2 試薬貯留領域
- 4 3 流路溝
- 4 4 第1貫通孔
- 4 5 第2貫通孔
- 4 6 凹部
- 6 0 流路
- 6 0' ウェル
- 7 0 注入部
- 8 0 貯留部
- 1 0 0 S P F S 装置
- 1 1 0 送液部
- 1 1 1 ピペット
- 1 1 2 ピペット移動部
- 1 1 3 送液ポンプ移動機構
- 1 1 4 シリンジ
- 1 1 5 プランジャー
- 1 1 6 ピペットノズル
- 1 2 0 搬送部
- 1 2 1 チップホルダー
- 1 2 2 搬送ステージ
- 1 3 0 位置情報取得部
- 1 3 1 空気圧センサー
- 1 4 0 光照射部
- 1 4 1 光源ユニット
- 1 4 2 角度調整機構

- 1 4 3 光源制御部
- 1 5 0 光検出部
- 1 5 1 受光ユニット
- 1 5 2 位置切り替え機構
- 1 5 3 センサー制御部
- 1 5 4 第1レンズ
- 1 5 5 光学フィルター
- 1 5 6 第2レンズ
- 1 5 7 受光センサー
- 1 6 0 制御部
- 1 7 0 ピペットチップ
- 1 8 0 基準部
- 1 9 0 第1温度測定手段
- 1 9 2 第2温度測定手段
- 1 9 4 温調機構
- A ピペットチップ
- B ピペットノズル
- C 基準部
- α 励起光
- β 反射光
- γ プラズモン散乱光
- δ 蛍光

請求の範囲

- [請求項1] ピペットノズルに装着された、液体を吸引または排出するためのピペットチップを用いて、反応場に液体の供給および前記反応場からの液体の除去を複数回行うことで2以上の物質を反応させる反応工程を含む反応方法であって、
- 前記反応工程の前に、前記ピペットチップの先端高さを検出し、前記ピペットチップの先端高さに基づいて、前記ピペットノズルの基準高さを設定する第1工程と、
- 前記反応工程の途中に、前記ピペットチップの温度が変化することによる前記ピペットチップの先端高さの変動を打ち消すように、前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する第2工程と
- を有する、反応方法。
- [請求項2] 前記第2工程では、前記ピペットノズルの高さを前記反応場に対して高くなるように前記基準高さから補正する、請求項1に記載の反応方法。
- [請求項3] 前記第2工程では、前記反応工程の経過時間に応じて、前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する、請求項1または請求項2に記載の反応方法。
- [請求項4] 前記第2工程では、
- 前記ピペットチップにおける先端と前記ピペットノズルとの嵌合部との間の長さ、と、
- 前記ピペットチップの線膨張係数と、
- 前記ピペットチップの温度の経時的な変動と、
- 前記反応工程の経過時間と、
- に基づいて前記ピペットチップの先端高さの変動を推定し、推定された前記変動に基づいて前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する、
- 請求項3に記載の反応方法。

- [請求項5] 前記ピペットチップの先端高さの変動率は、経時的に減少する、請求項4に記載の反応方法。
- [請求項6] 前記第1工程では、第1温度測定手段によって前記ピペットチップを前記ピペットノズルに装着したときの前記ピペットチップの周囲の温度をさらに測定し、その測定値に基づいて推定される前記ピペットチップ温度の最大変化量に応じて前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する、請求項4または請求項5に記載の反応方法。
- [請求項7] 前記第1工程では、第2温度測定手段によって前記ピペットチップの温度をさらに測定し、その測定値に基づいて推定される前記ピペットチップ温度の最大変化量に応じて前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する、請求項4～6のいずれか一項に記載の反応方法。
- [請求項8] 前記第1工程では第2温度測定手段によって前記ピペットチップの温度をさらに測定し、
前記第2工程では、前記第2温度測定手段によって前記ピペットチップの温度をさらに測定するとともに、前記第1工程において第2温度測定手段によって測定された、前記ピペットチップの先端高さを検出したときの前記ピペットチップの温度と、前記反応工程における前記第2温度測定手段によって測定された前記ピペットチップの温度との差に応じて、前記ピペットノズルの高さを前記基準高さから補正する、請求項1～3のいずれか一項に記載の反応方法。
- [請求項9] 前記第2工程では、
前記ピペットチップにおける先端と前記ピペットノズルとの嵌合部との間の長さ、
前記ピペットチップの線膨張係数と、
前記第2温度測定手段によって前記ピペットチップの温度をさらに測定するとともに、前記第1工程において第2温度測定手段によって測定された、前記ピペットチップの先端高さを検出したときの前記ピ

ペットチップの温度と、前記反応工程における前記第2温度測定手段によって測定された前記ピペットチップの温度との差とに基づいて、前記ピペットノズルの基準高さを補正する、

請求項8に記載の反応方法。

[請求項10]

前記ピペットチップは、樹脂製であり、

前記ピペットチップの線膨張係数は、 $5.8 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$ 以上である、

請求項1～9のいずれか一項に記載の反応方法。

[請求項11]

前記ピペットチップの温度は、温調手段により調整されている、請求項1～10のいずれか一項に記載の反応方法。

[請求項12]

前記第2工程は、前記反応場に液体を供給した後であって、前記反応場から当該液体を除去する前までに行われる、請求項1～11のいずれか一項に記載の反応方法。

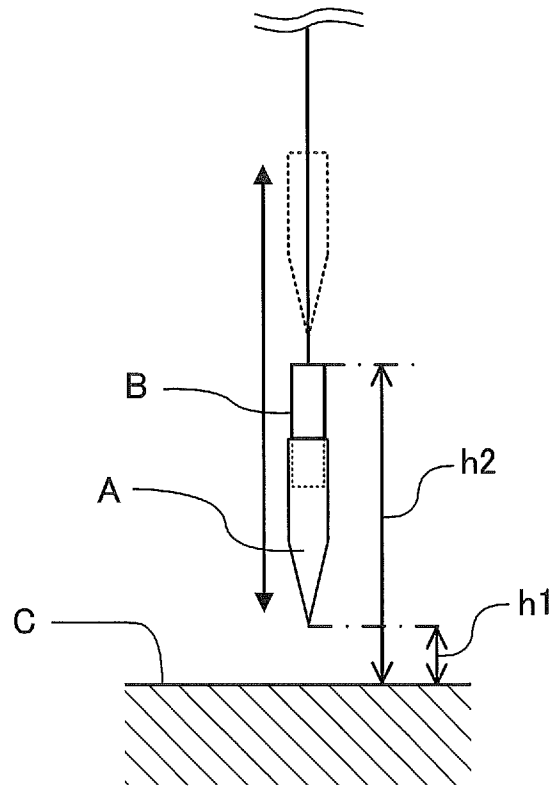
[請求項13]

前記反応場は、液体を貯留可能な流路の底面またはウェルの底部に配置されており、

前記反応工程は、前記反応場上における免疫反応を含む、

請求項1～12のいずれか一項に記載の反応方法。

[図1]



[図2]

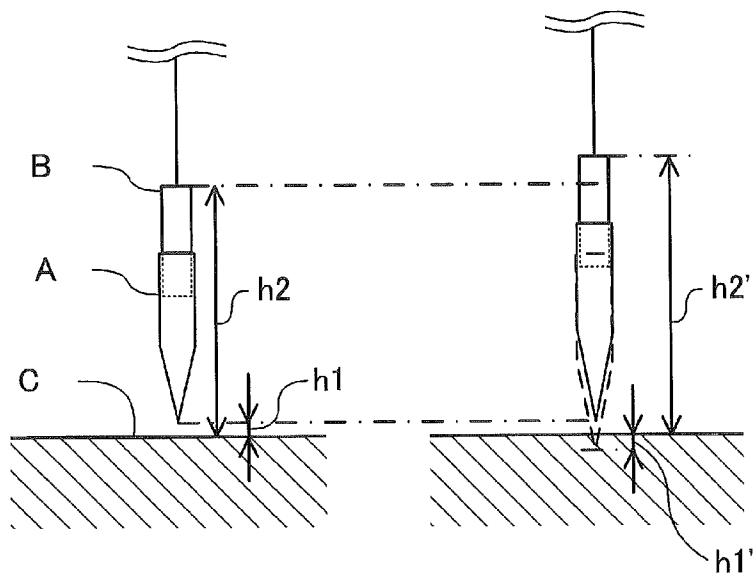


図2A

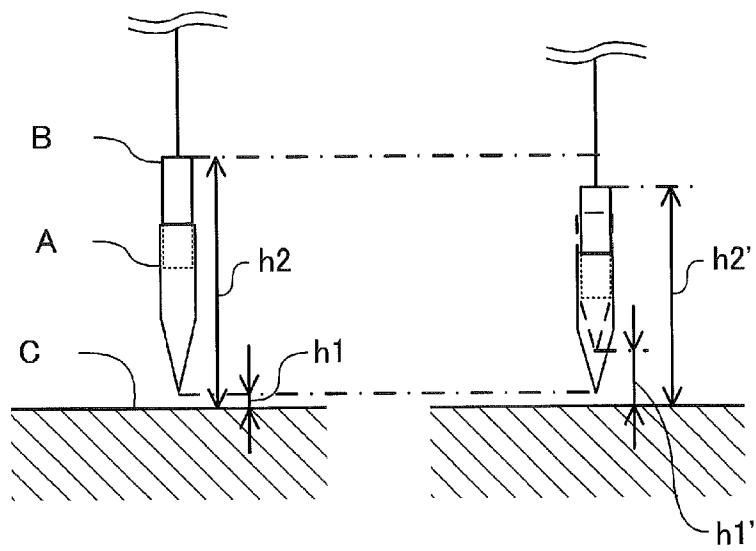
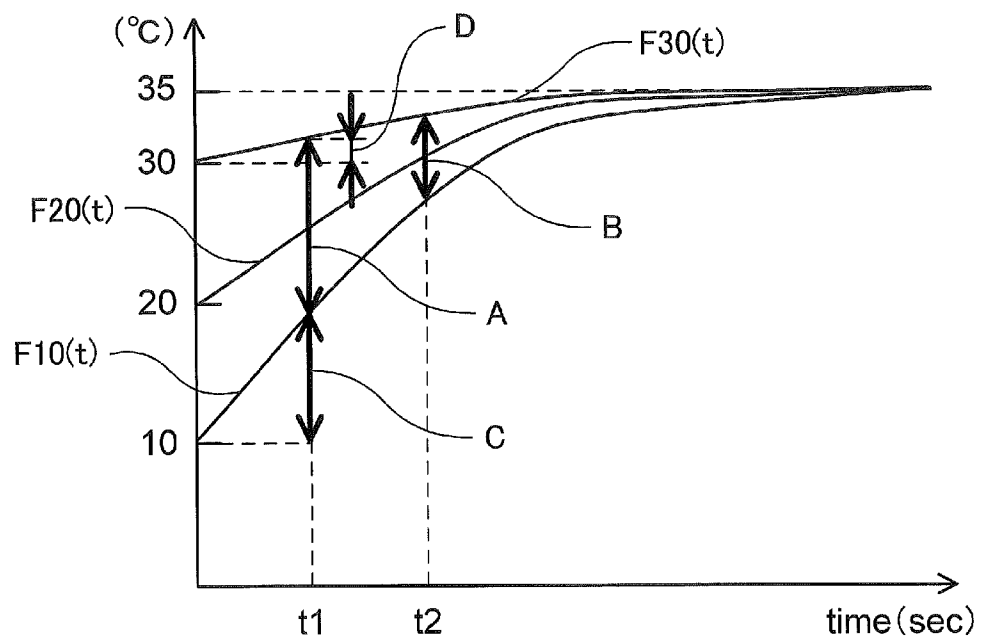


図2B

[図3]



[図5]

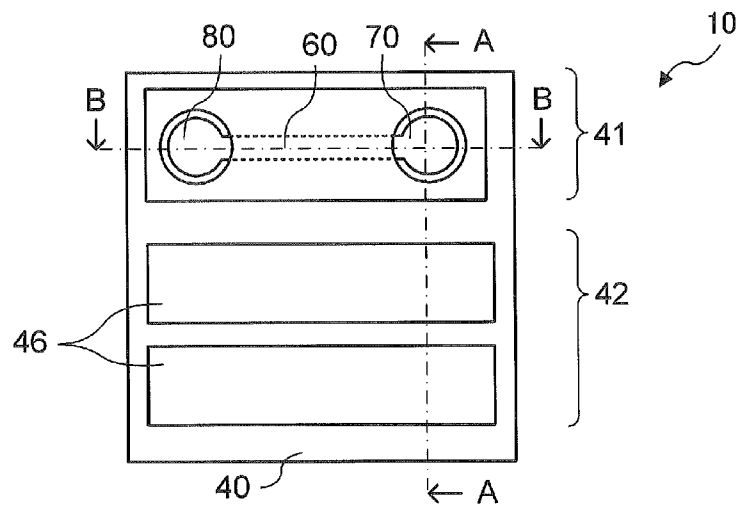


図5A

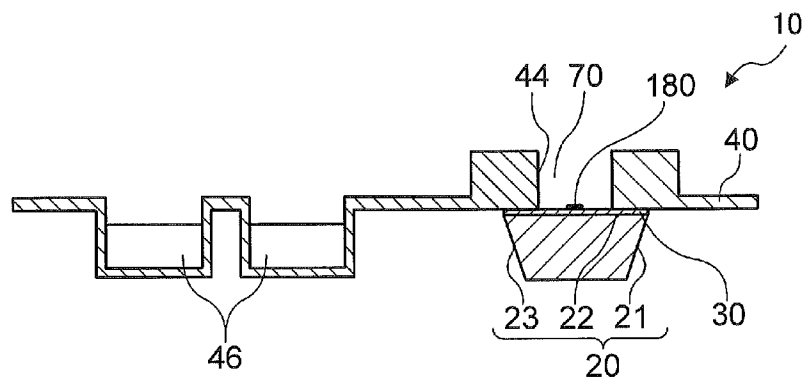


図5B

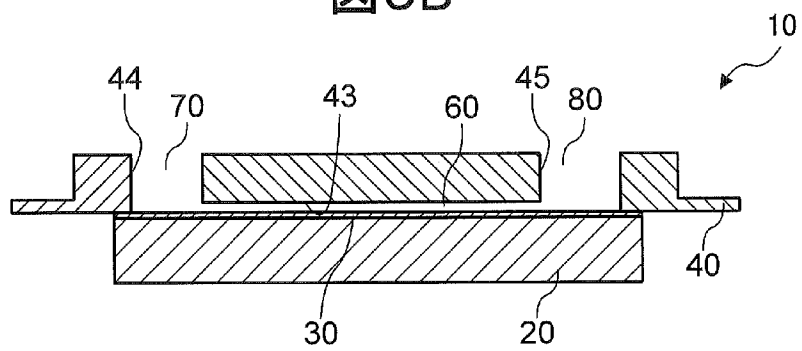
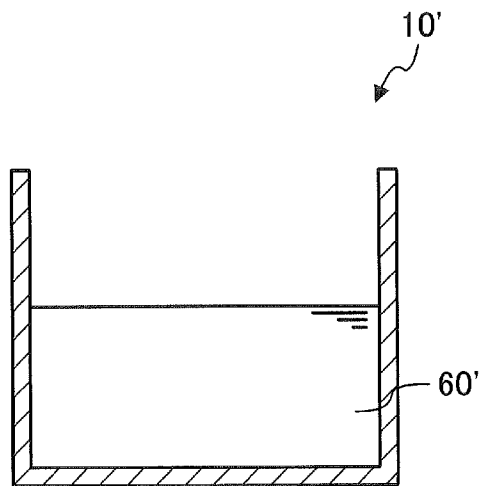
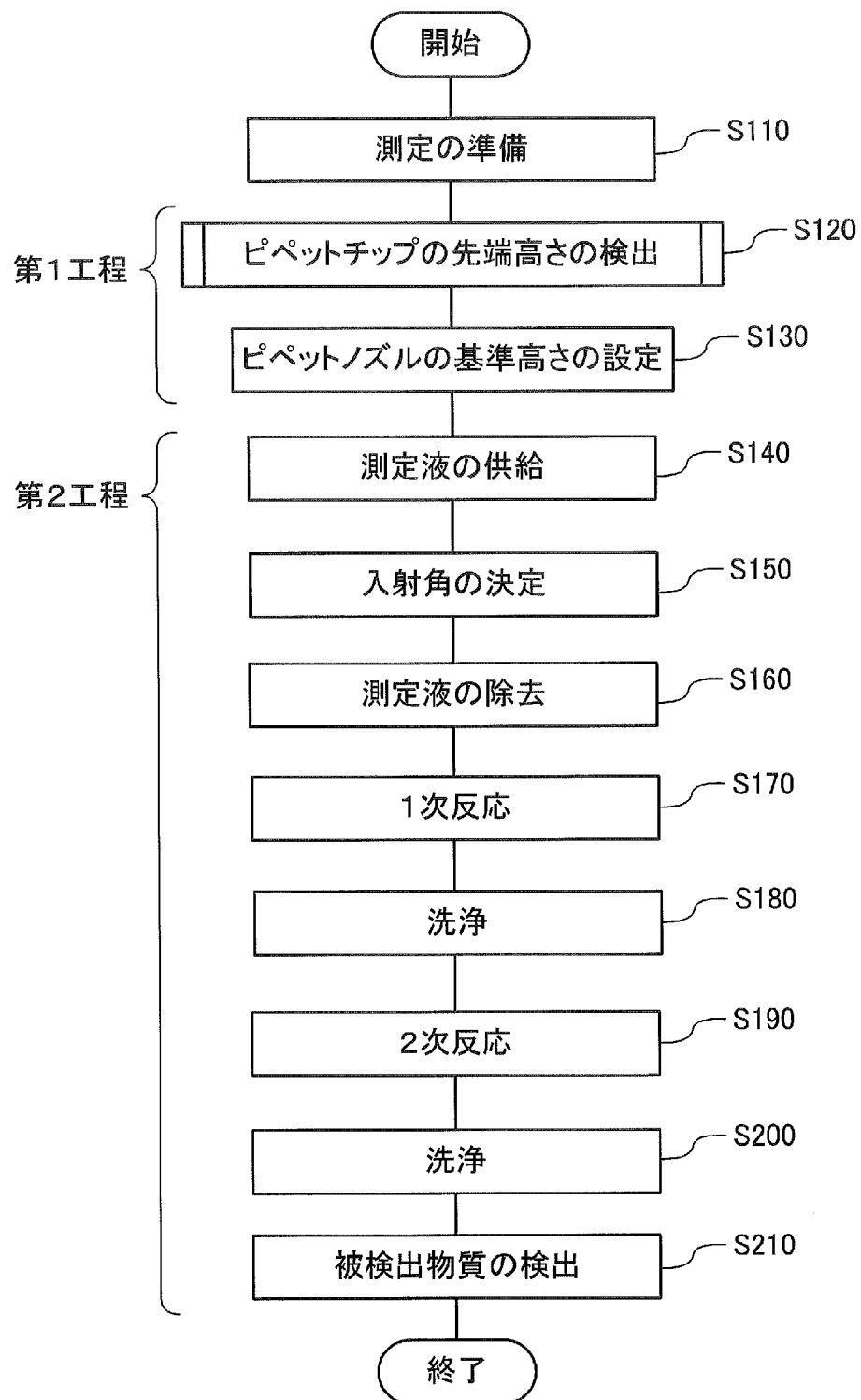


図5C

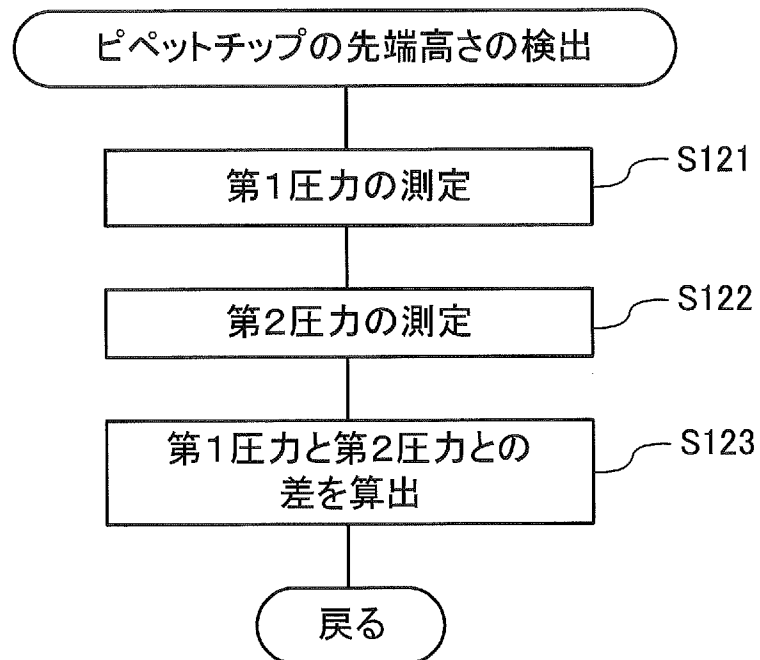
[図6]



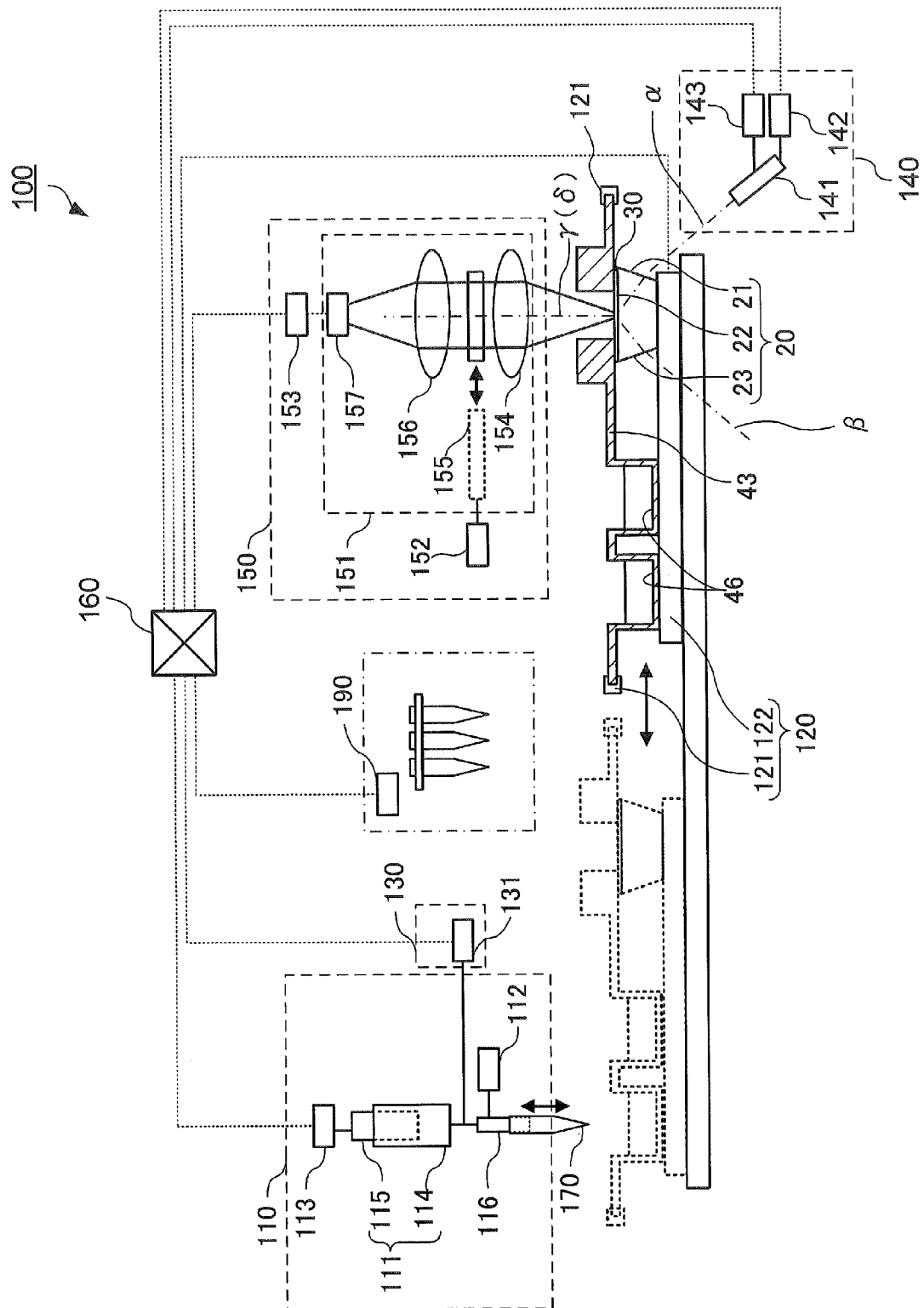
[図7]



[図8]



[図9]



[図10]

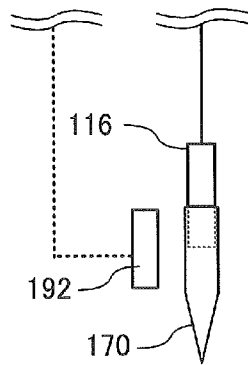


図10A

図10B

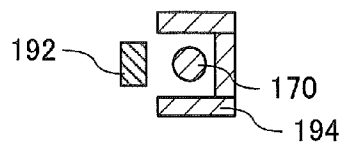
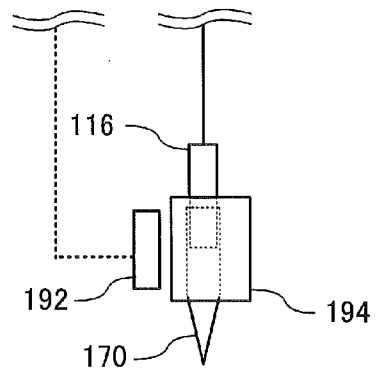


図10C

図10D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/081891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N35/10(2006.01)i, G01N1/00(2006.01)i, G01N35/00(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)

G01N35/00-35/10, G01N1/00, G01N35/00

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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.
A	JP 2013-186019 A (Konica Minolta, Inc.), 19 September 2013 (19.09.2013), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2004-333343 A (Shimadzu Corp.), 25 November 2004 (25.11.2004), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	WO 2014/162921 A1 (Shimadzu Corp.), 09 October 2014 (09.10.2014), entire text; all drawings (Family: none)	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 January 2017 (16.01.17)

Date of mailing of the international search report
24 January 2017 (24.01.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/081891

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-139704 A (Sugino Machine Ltd.), 07 June 2007 (07.06.2007), entire text; all drawings (Family: none)	1-13
A	JP 2004-340624 A (Yasunobu TSUKIOKA), 02 December 2004 (02.12.2004), entire text; all drawings (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. G01N35/10(2006.01)i, G01N1/00(2006.01)i, G01N35/00(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. G01N35/00-35/10, G01N1/00, G01N35/00

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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
A	JP 2013-186019 A（コニカミノルタ株式会社） 2013.09.19 全文、全図 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 2004-333343 A（株式会社島津製作所） 2004.11.25 全文、全図 (ファミリーなし)	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

16.01.2017

国際調査報告の発送日

24.01.2017

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）

山口 剛

2 J

9806

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2014/162921 A1 (株式会社島津製作所) 2014. 10. 09 全文、全図 (ファミリーなし)	1 - 13
A	JP 2007-139704 A (株式会社スギノマシン) 2007. 06. 07 全文、全図 (ファミリーなし)	1 - 13
A	JP 2004-340624 A (月岡 康信) 2004. 12. 02 全文、全図 (ファミリーなし)	1 - 13