

(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
2010年11月25日(25.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/134592 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/27 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058617
- (22) 国際出願日: 2010年5月21日(21.05.2010)
- (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 2009-124124 2009年5月22日(22.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): コニカミノルタホールディングス株式会社(KONICA MINOLTA HOLDINGS, INC.) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 彼谷 高敏(KAYA, Takatoshi) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内 Tokyo (JP). 二宮 英

隆(NINOMIYA, Hidetaka) [JP/JP]; 〒1918511 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 Tokyo (JP).

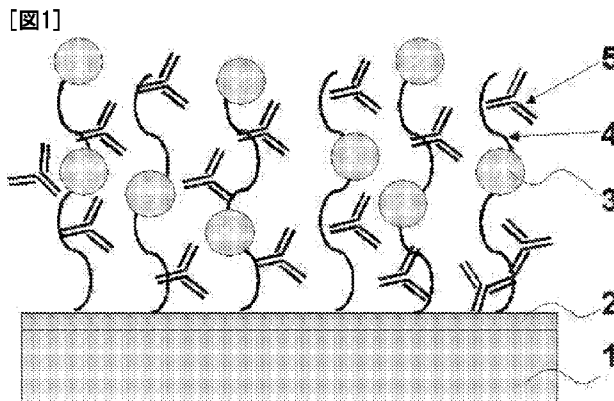
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

[続葉有]

(54) Title: PLASMON EXCITATION SENSOR FOR USE IN ASSAY METHOD BASED ON SPFS-LPFS SYSTEM, AND ASSAY METHOD

(54) 発明の名称: SPFS-LPFS系による測定方法に供するプラズモン励起センサおよびアッセイ法



(57) Abstract: Provided is a high-sensitivity high-precision plasmon excitation sensor with which fluorescent signals generated in SPFS can be improved, an assay method using the sensor, an analyzer for SPFS, and a kit for the assay. The plasmon excitation sensor is characterized by comprising a transparent planar substrate, a thin metallic film formed on one surface of the substrate, a layer constituted of a polymer affixed to the surface of the thin metallic film which is not in contact with the substrate and including a colloidal metal as base points, and a ligand affixed to the polymer, and by being subjected to a novel assay method based on an SPFS-LPFS system.

(57) 要約: [課題] 本発明は、SPFSによる蛍光シグナルを向上させることができる高感度かつ高精度なプラズモン励起センサ、該センサを用いるアッセイ法、SPFS用分析装置および該アッセイ用キットを提供することを目的とする。[解決手段] 透明平面基板と; 該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と; 該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に固定化された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層と; 該ポリマーに固定化されたりガンドを含み、SPFS-LPFS系による新規測定方法に供することを特徴とするプラズモン励起センサ。



WO 2010/134592 A1



(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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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：

S P F S－L P F S系による測定方法に供するプラズモン励起センサおよびアッセイ法

技術分野

[0001] 本発明は、S P F S－L P F S系による測定方法に供するプラズモン励起センサおよびアッセイ法に関する。より詳細には、本発明は、金属薄膜による電場増強効果に、さらに金属コロイドによる電場増強効果および電場増強エリア拡大効果を加えることにより超高感度化したプラズモン励起センサ、および該センサを用いるアッセイ法に関する。

背景技術

[0002] S P R〔表面プラズモン共鳴〕とは、照射したレーザ光が金薄膜表面で全反射減衰〔A T R〕する条件において、誘電体に接触した金属薄膜表面に発生させた粗密波（表面プラズモン）と、誘電率（または屈折率）の差異による影響を受け易いエバネッセント波との波数が一致したとき両者が共鳴して反射光が減衰する現象であって、センサ表面においてリガンドとアナライトとが相互作用することによって誘電体の誘電率（または屈折率）に差異が生じ、その結果、表面プラズモン共鳴が変化することによって、リガンドとアナライトとの相互作用を定量することができる。

[0003] このようなS P Rを利用したバイオセンサとして、例えば、特許文献1には、S P R〔表面プラズモン共鳴〕分析に用いるセンサ・ユニットが開示されており、図2に示すように、該センサ・ユニットとは、ガラス、プラスチックその他の透明な材料で作った透明プレート11と、このプレートの片面にスパッタリング等で形成した金属フィルム12と、この金属フィルムに取り付けられた誘電体フィルムとを有する。この誘電体フィルムは、リガンドが結合したデキストラン層14であって、該リガンドは、抗デキストランからなる1つの活性部分と検出しようとしている抗体に対する抗原からなる別

の部分とを有する二官能価あるいは多官能価分子 15 であってもよいことが記載されている。

[0004] しかしながら、このようなセンサ・ユニットは、センサ表面の平均的な屈折率変化を基本とするため、低分子に対する応答が弱く、感度が低いことから改良の余地が認められる。

[0005] また、非特許文献 1 には、SPR 分析に用いる SPR センサチップが開示されており、図 3 に示すように、該 SPR センサチップとは、カバーガラス 6 と、このカバーガラス 6 の片面にスパッタリングで形成した金フィルム 7 と、この金フィルム 7 の表面で重合して得られた分子インプリントポリマーからなるゲル 8 と、このゲル 8 中に埋め込まれた金ナノパーティクル 10 とから構成されている。分子インプリントポリマーからなるゲル 8 は、低分子を認識する結合サイト 9 を有することが記載されており、比較的低分子を対象にした測定においても、SPR 測定により検出が可能であることが記載されている。

[0006] しかしながら、このようなセンサ・ユニットにおいても、センサ表面の平均的な屈折率変化を基本とするため、感度の点において改良の余地が認められる。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献 1：特許第 3 2 9 4 6 0 5 号

非特許文献

[0008] 非特許文献 1：Jun Matsui, Kensuke Akamatsu, Noriaki Hara, Daisuke Miyoshi, Hidemi Nawafune, Katsuyuki Tamaki, Naoki Sugimoto; SPR sensor chip for detection of small molecules using molecularly imprinted polymer with embedded gold nanoparticles, Anal. Chem., 2005 年, 77 巻, p. 4282-4285

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、SPFSによる蛍光シグナルを向上させることができる高感度かつ高精度なプラズモン励起センサ、該センサを用いるアッセイ法、SPFS用分析装置および該アッセイ用キットを提供することを目的とする。
- [0010] なお、SPFS〔表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕とは、照射したレーザー光が金薄膜表面で全反射減衰〔ATR〕する条件において、誘電体に接触した金属薄膜表面に粗密波（表面プラズモン）を発生させることによって、照射したレーザー光が有するフォトン量を数十倍～数百倍に増やし（表面プラズモンの電場増強効果）、これにより金薄膜近傍の蛍光色素を効率良く励起させることによって、極微量および／または極低濃度のアナライトを検出することができる蛍光測定法である。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、上記の問題を解決すべく鋭意研究した結果、SPFSを用いたアッセイ系において、金属コロイドを分散浮遊状態に近い状態で金属基板上に固定化し蛍光測定を行うと、表面プラズモン励起による電場増強効果に加えて、金属コロイドによる局所電場増強効果も同時に得られることにより、蛍光色素が発する蛍光シグナルの強度が増大することを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0012] すなわち、本発明のプラズモン励起センサは、透明平面基板と；該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と；該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層と；該高分子に固定化されたりガンドとを含み、SPFS〔表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕－LPFS〔局在表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕系による新規測定方法に供することを特徴とする。
- [0013] 本発明のプラズモン励起センサは、上記金属薄膜と上記金属コロイドを基点とする高分子層との間にSAM〔自己組織化単分子膜〕を有することが好ましい。
- [0014] 上記金属コロイドは、金、銀、白金およびそれらの合金からなる群から選

択される少なくとも１種の金属からなるコロイドであることが好ましく、特に金コロイドが好ましい。

[0015] 上記金属コロイドの粒径は、 $0.1\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{ m}$ であることが好ましい。

[0016] 上記高分子は、タンパク質、核酸、多糖類、天然ゴム、合成樹脂、シリコン樹脂、合成繊維および合成ゴムからなる群から選択される少なくとも１種の高分子であり、かつ水に可溶性であることが好ましい。

[0017] また、本発明のアッセイ法は、少なくとも下記工程（a）～（d）を含むことを特徴とする。

[0018] 工程（a）：本発明のプラズモン励起センサに検体を接触させる工程、

工程（b）：上記工程（a）を経て得られたプラズモン励起センサに、第２のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲートを反応させる工程、

工程（c）：上記工程（b）を経て得られたプラズモン励起センサが有する透明平面基板の、上記金属薄膜が形成されている表面の反対側の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射し、励起された上記蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、および

工程（d）：上記工程（c）で得られた測定結果から、上記検体中に含まれるアナライトの量を算出する工程。

[0019] 本発明のSPFS用分析装置は、少なくとも、本発明のプラズモン励起センサを含み、本発明のアッセイ法に用いられることを特徴とする。

[0020] また、本発明のキットは、透明平面基板と；該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と；該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層とからなり、本発明のプラズモン励起センサに用いられるプラズモン励起センサ用基板を、少なくとも含むことを特徴とする。

発明の効果

[0021] 本発明は、SPFS〔表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕－LPFS〔局在表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕系による電場増強効果および電場

増強エリア拡大効果を有する、すなわち、表面プラズモン励起と局在プラズモン励起とによる電場増強を同時に誘起することによって、さらなる蛍光シグナルの増幅を図ることができる効果、およびSPFS系およびSPFS-LPFS系において、通常センサ極表面に限定されてしまう電場増強エリアを3次元的に拡大することができることから、蛍光シグナルの安定性を向上する効果を有する、極めて高感度かつ高精度のアッセイ法に用いるプラズモン励起センサを提供することができる。

[0022] 本発明において、蛍光シグナルが飛躍的に増幅する要因として、(i) 表面プラズモン光と局在表面プラズモン光との共鳴に伴う電場増強、(ii) 得られた電場増強を効率的に蛍光シグナル増幅に繋げるための蛍光色素と金属コロイドとの近接、(iii) 金属コロイド同士を適切な間隔に配置し、金属基板からの距離を調整することによる高さ方向へのアッセイエリア拡大、が挙げられる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1] 図1は、本発明のプラズモン励起センサの一態様を模式的に示した断面図である。

[図2] 図2は、特許文献1に記載のセンサ・ユニットの一態様を模式的に示した断面図である。

[図3] 図3は、非特許文献1に記載のSPRセンサチップを模式的に示した断面図である。

発明を実施するための形態

[0024] 以下、本発明のプラズモン励起センサについて具体的に説明する。

[0025] <プラズモン励起センサ>

本発明のプラズモン励起センサは、透明平面基板と；該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と；該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層と；該高分子に固定化されたりガンドとを含み、SPFS〔Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spe

ctroscopy ; 表面プラズモン励起増強蛍光分光法] —LPFS [Localized Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy ; 局在表面プラズモン励起増強蛍光分光法] 系による測定方法に供することを特徴とするものである。

[0026] なお、本発明のプラズモン励起センサは、金属薄膜の、透明平面基板とは接していないもう一方の表面にSAM [Self-Assembled Monolayer ; 自己組織化単分子膜] を形成し、金属コロイドを基点とする高分子を該SAMに固定化することが好ましい。

[0027] また、金属薄膜による蛍光色素の金属消光を防止することを目的として、誘電体からなるスペーサ層を適宜形成してもよい。このスペーサ層は、金属薄膜の、透明平面基板と接していないもう一方の表面に形成されることが好ましい。

[0028] (透明平面基板)

本発明において、プラズモン励起センサの構造を支持する平面基板として透明平面基板が用いられる。本発明において、平面基板として透明平面基板を用いるのは、後述する金属薄膜への光照射をこの平面基板を通じて行うからである。

[0029] 本発明で用いられる透明平面基板について、本発明の目的が達せられる限り、材質に特に制限はない。例えば、この透明平面基板が、ガラス製であってもよく、また、ポリカーボネート [PC] , シクロオレフィンポリマー [COP] などのプラスチック製であってもよい。

[0030] また、d線 (588nm) における屈折率 [n_d] が好ましくは1.40~2.20であり、厚さが好ましくは0.01~10mm、より好ましくは0.5~5mmであれば、大きさ (縦×横) は特に限定されない。

[0031] なお、ガラス製の透明平面基板は、市販品として、ショット日本 (株) 製の「BK7」 (屈折率 [n_d] 1.52) および「LaSFN9」 (屈折率 [n_d] 1.85) , (株) 住田光学ガラス製の「K-PSFn3」 (屈折率 [n_d]

n_d] 1.84), 「K-L a S F n 1 7」(屈折率 [n_d] 1.88) および「K-L a S F n 2 2」(屈折率 [n_d] 1.90), ならびに(株)オハラ製の「S-L A L 1 0」(屈折率 [n_d] 1.72) などが、光学的特性と洗浄性との観点から好ましい。

[0032] 透明平面基板は、その表面に金属薄膜を形成する前に、その表面を酸および/またはプラズマにより洗浄することが好ましい。

[0033] 酸による洗浄処理としては、0.001~1Nの塩酸中に、1~3時間浸漬することが好ましい。

[0034] プラズマによる洗浄処理としては、例えば、プラズマドライクリーナー(ヤマト科学(株)製の「PDC200」)中に、0.1~30分間浸漬させる方法が挙げられる。

[0035] (金属薄膜)

本発明に係るプラズモン励起センサでは、上記透明平面基板の一方の表面に金属薄膜を形成する。この金属薄膜は、光源からの照射光により表面プラズモン励起を生じ、電場を発生させ、蛍光色素の発光をもたらす役割を有する。また、この電場は、金属薄膜と金属コロイドとの間の局在電場を強化させる基となり、かつ金属コロイドと金属コロイドとの間の局在電場の基ともなり、増強電場内の蛍光色素からの発光をさらに増強させる。

[0036] 上記透明平面基板の一方の表面に形成された金属薄膜としては、金、銀、アルミニウム、銅、および白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属からなることが好ましく、金からなることがより好ましい。これらの金属は、その合金の形態であってもよい。このような金属種は、酸化に対して安定であり、かつ表面プラズモンによる電場増強が大きくなることから好適である。

[0037] なお、透明平面基板としてガラス製平面基板を用いる場合には、ガラスと上記金属薄膜とをより強固に接着するため、予めクロム、ニッケルクロム合金またはチタンの薄膜を形成することが好ましい。

[0038] 透明平面基板上に金属薄膜を形成する方法としては、例えば、スパッタリ

ング法、蒸着法（抵抗加熱蒸着法、電子線蒸着法等）、電解メッキ、無電解メッキ法などが挙げられる。薄膜形成条件の調整が容易なことから、スパッタリング法または蒸着法によりクロムの薄膜および／または金属薄膜を形成することが好ましい。

[0039] 金属薄膜の厚さとしては、金：5～500nm、銀：5～500nm、アルミニウム：5～500nm、銅：5～500nm、白金：5～500nm、およびそれらの合金：5～500nmが好ましく、クロムの薄膜の厚さとしては、1～20nmが好ましい。

[0040] 電場増強効果の観点から、金：20～70nm、銀：20～70nm、アルミニウム：10～50nm、銅：20～70nm、白金：20～70nm、およびそれらの合金：10～70nmがより好ましく、クロムの薄膜の厚さとしては、1～3nmがより好ましい。

[0041] 金属薄膜の厚さが上記範囲内であると、表面プラズモンが発生し易いので好適である。また、このような厚さを有する金属薄膜であれば、大きさ（縦×横）は特に限定されない。

[0042] （誘電体からなるスペーサ層）

誘電体からなるスペーサ層の形成に用いられる誘電体としては、光学的に透明な各種無機物、天然または合成ポリマーを用いることもできる。その中で、化学的安定性、製造安定性および光学的透明性に優れていることから、二酸化ケイ素〔SiO₂〕または二酸化チタン〔TiO₂〕を含むことが好ましい。

[0043] 誘電体からなるスペーサ層の厚さは、通常10nm～1mmであり、共鳴角安定性の観点からは、好ましくは30nm以下、より好ましくは10～20nmである。一方、電場増強の観点から、好ましくは200nm～1mmであり、さらに電場増強の効果の安定性から、400nm～1,600nmがより好ましい。本発明のアッセイ法では、測定時にプラズモン励起センサと金属コロイドとの間に生じる電場をより効果的に増強させる目的から、スペーサ層の厚さが10～100nmであることが望ましい。

[0044] 誘電体からなるスペーサ層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、電子線蒸着法、熱蒸着法、ポリシラザン等の材料を用いた化学反応による形成方法、またはスピコートによる塗布などが挙げられる。

[0045] (SAM)

SAM [Self-Assembled Monolayer; 自己組織化単分子膜] は、金属薄膜の透明平面基板と接していない面に形成されることが好ましく、本発明のプラズモン励起センサでは、アナライトおよび蛍光色素を、リガンドを介して金属薄膜に捕捉した状態で蛍光を測定するが、このとき、金属コロイドを基点とする高分子を、SAMを介して金属薄膜に固定する。すなわち、SAMは、金属コロイドを基点とする高分子を金属薄膜に固定する際の土台としての役割を有する。

[0046] またSAMは、金属薄膜の透明平面基板と接していない面に「誘電体からなるスペーサ層」が形成されている場合、該スペーサ層の金属薄膜と接していない面に形成されることが好ましい。

[0047] SAMを金属薄膜表面に直接形成する場合、SAMが含む単分子としては、通常、炭素原子数4～20程度のカルボキシアルカンチオール（例えば、（株）同仁化学研究所、シグマ アルドリッチ ジャパン（株）などから入手可能）、アミノアルカンチオール、特に好ましくは10-カルボキシ-1-デカンチオール、10-アミノ-1-デカンチオール（以下、単に「カルボキシデカンチオール」、「アミノデカンチオール」ともいう。）が用いられる。炭素原子数4～20のカルボキシアルカンチオール、アミノアルカンチオールは、それを用いて形成されたSAMの光学的な影響が少ない、すなわち透明性が高く、屈折率が低く、膜厚が薄いなどの性質を有していることから好適である。

[0048] このようなSAMの形成方法としては、特に限定されず、従来公知の方法を用いることができる。具体例として、金属薄膜がその表面に形成されたガラス製透明平面基板を、10-カルボキシ-1-デカンチオール（（株）同仁化学研究所製）を含むエタノール溶液に浸漬する方法などが挙げられる。

このように、10-カルボキシー1-デカンチオールが有するチオール基が、金属と結合し固定化され、金薄膜の表面上で自己組織化し、SAMを形成する。

[0049] また、SAMを誘電体からなるスペーサ層表面に形成する場合、SAMが含む単分子としては、シランカップリング剤が用いられる。

[0050] シランカップリング剤は、反応性基を有するシランカップリング剤が好ましく、このようなシランカップリング剤としては、例えば、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、8-アミノオクタルトリエトキシシラン、6-アミノヘキシルトリエトキシシラン、7-カルボキシーヘプタルトリエトキシシラン、5-カルボキシーペンタルトリエトキシシランなどが挙げられる。

[0051] このようなシランカップリング剤は、例えば、金属コロイドと結合することができるカルボキシ基またはアミノ基を含有するアルカンチオール類とアミンカップリングにより結合することもできる。

[0052] シランカップリング剤からなるSAMの形成方法としては、特に限定されず、従来公知の方法を用いることができる。

[0053] (金属コロイド)

本発明において、金属コロイドは、光源からの光照射によって表面プラズモン励起した金属薄膜からもたらされる電場を受け、この電場により表面プラズモン励起を生じるとともに、金属薄膜との間および金属コロイド間に強い局所電場を生じさせることにより、上記プラズモン励起センサに捕捉された蛍光色素の発光を増強する役割を果たす。このとき、表面プラズモンによる電場増強効果、ならびに金属コロイドと金属薄膜との間および金属コロイド同士間に生じる局在電場による電場増強効果は、金属コロイドが存在しない場合と比べてそれぞれ15倍程度および70倍程度に上る。また、原因は不明であるものの、金属コロイドが存在しない場合には、SPFSによる蛍光測定の際の蛍光色素からの発光強度が経時的に消光する傾向にあるが、金属コロイドが存在する場合には、蛍光色素からの発光強度における経時的な

消光の度合いが少なくなる効果が再現性よく現れる。

[0054] 本発明で用いられる金属コロイドを構成する金属種には、特に制限はないものの、試料等に対する化学的安定性が高く、可視光によりプラズモン共鳴が効率的に発生することから、金、銀、白金等の貴金属およびこれらの合金からなる群から選択される少なくとも1種の金属が好ましく、その中で、金が特に好ましい。また、この金属コロイドを構成する金属は、金属薄膜を構成する金属と同じでもよく、あるいは異なってもよい。

[0055] 金属コロイドの粒径については、コロイド溶液中でコロイドとして分散状態を維持でき、かつ本発明の作用・効果を発揮できる程度に局在表面プラズモン共鳴を十分に誘起することができる限り特に制限はない。しかし、一般的に、金属コロイドの最大吸光波長は、構成金属種により変わるほか、構成金属種が同じであっても、金属コロイドの粒径が大きくなるほど大きくなる傾向にある。そのため、金属コロイドの粒径は、蛍光色素の最大蛍光波長との関係で、蛍光色素からの蛍光が金属コロイドによる吸光により消光されないような粒径であることが望ましい。具体的には、電子顕微鏡を用いて粒径の平均値を測定した結果、その粒径が0.1 nm~10 μmの範囲内にあることが好ましく、1 nm~100 nmであるとより好ましい。

[0056] 金属コロイドの形状については、任意の形状のものであってもよく、例えば、球状、楕円状、円柱状などの形状を有するものが挙げられる。

[0057] このような金属コロイドは、様々な粒径を有する金属コロイドのコロイド溶液の形態で市販品として入手可能である。あるいは、このような金属コロイドを、従来公知の方法、例えば、 HAuCl_4 、 H_2PtCl_4 、硝酸銀などの金属化合物の溶液を還元することによって得ることもできる。

[0058] また、コロイド溶液中での金属コロイドの分散性を向上させ、また、非特異吸着を防止するため、金属コロイドの表面にポリエチレングリコール〔PEG〕修飾等の表面処理を施すことが望ましい。PEG修飾金属コロイド粒子は、例えば、特開2001-200050号公報および特開2005-328809号公報等に記載されているように、メルカプト基またはポリアミ

ンを有するPEGを金属微粒子と混合することによる調製することができる。あるいは、 HAuCl_4 、 H_2PtCl_4 、硝酸銀などの金属化合物の溶液を還元する際に、このような官能基を有するPEGを共存させることにより調製してもよい。

[0059] 本発明で用いる金属コロイドとして市販されているものも用いることができ、市販品として、例えば、田中貴金属工業（株）製、（株）ワインレッドケミカル製などが好適である。

[0060] （高分子）

本発明において、高分子は、金コロイドを分散浮遊状態に近い状態で捕捉し固定化するために用いるものであって、リガンドおよびアナライトに対して不活性であり、かつ水に可溶性である。

[0061] このような高分子として、上述した（i）表面プラズモン光と局在表面プラズモン光との共鳴に伴う電場増強、（ii）得られた電場増強を効率的に蛍光シグナル増幅に繋げるための蛍光色素と金属コロイドとの近接、（iii）金属コロイド同士を適切な間隔に配置し、金属基板からの距離を調整することによる高さ方向へのアッセイエリア拡大の観点から、以下の条件（I）～（III）を満たすものが好ましい。

[0062] 条件（I）：繊維状に伸びる直線構造、球状構造体の連なった構造、XY平面（金属薄膜の表面を指す。なお、該表面に垂直な方向をZ方向とする。）の広がり限定された構造を形成するもの。

[0063] ただし、金属コロイドと金属基板との間に多く存在すると増強電場を遮蔽または減衰させることから、例えば、架橋により頑強な網目構造を形成するゲルや、高密度な成形品や塗膜などの層構造を形成する高分子を除く。

[0064] なお、ゲルや層構造を形成する高分子であっても、金属薄膜の表面へのパターンニングによっては、用いることができるものもある。

[0065] 条件（II）：金属コロイドおよびリガンドを固定化するための反応点を多数有するもの。このような高分子は、リガンドを金属コロイドの近傍に配置することできるため好適である。

[0066] 条件 (I I I) : ヒドロキシル基やカルボキシ基などの水和性の官能基を多数有するもの。本発明のプラズモン励起センサを用いるアッセイは水溶液中で実施されるため、疎水性の官能基を多数有する高分子を用いると該センサ表面に局在しやすく、また非特異吸着を起す場合がある。なお、疎水性の官能基を多数有する高分子であっても、親水性加工を施すことによって、本発明に係る高分子として用いることができるものもある。

[0067] このような高分子として、具体的には、タンパク質、核酸、多糖類、天然ゴム、合成樹脂、シリコン樹脂、合成繊維、合成ゴムなどが挙げられる。

[0068] これらのうち、核酸 (DNA および RNA) ; グルコース、グリコーゲン、デンプン、セルロース、デキストラン、デキストリン、グルカン、フルクトース等の多糖類; 多糖類との重合体、ポリエチレンオキサイド構造含有物、アクリル酸誘導体、メタアクリル酸誘導体、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリイミン等の線状またはポリマーブラシ状の構造を取り得る合成樹脂; 水溶性シリコン樹脂; 水溶性モノマーとして、アクリル酸、メタクリル酸、ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド、アクリレートまたはメタクリレート (エチレンオキサイド構造を含んでいてもよい。) , マレイン酸、2-メチルプロパンスルホン酸等を用いてなるホモポリマーまたはコポリマーなどが好ましい。

[0069] 特に、多糖類としてデキストランが、合成樹脂としてポリアクリル酸が好ましい。これらの高分子は、非特異吸着低減に対する効果が高い官能基として、水酸基 [-OH] およびカルボキシル基 [-COOH] を有し、水素結合による水分子の内包により非特異タンパク質の吸着を防ぐことができるため好適である。

[0070] これら高分子は、1種単独でも2種以上併用してもよい。

[0071] (金属コロイドを基点とする高分子からなる層)

金属コロイドを基点とする高分子は、上記高分子1分子が有する2個の末端のうち、いずれか一方の末端は上記金属コロイドと結合しており、もう一

方の末端は上記金属薄膜（好ましくは上記SAM）または該金属コロイドと結合しているか、もしくは遊離している態様（このような態様は、その一方の末端が必ず金属コロイドと結合していることから、“金属コロイドを基点とする”を意味している。）であってもよく、または該高分子の側鎖に該金属コロイドを結合する態様であってもよい。

[0072] 金属コロイドを基点とする高分子の作製方法として、例えば、上記高分子が有するカルボキシル基を、水溶性カルボジイミド〔WSC〕（例えば、1-エチルー3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩〔EDC〕など）とN-ヒドロキシコハク酸イミド〔NHS〕とにより活性エステル化し、このように活性エステル化したカルボキシル基と、アミノデカンチオールなどが有するアミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて脱水反応させ固定化させた後に、上記金属コロイドを含むコロイド溶液と反応させることによって、アミノデカンチオールを介して金属コロイドをカルボキシメチルデキストランに固定化する方法などが挙げられる。

[0073] なお、該コロイド溶液に含まれる金属コロイドの濃度は、0.0000001%～0.1%が好ましく、0.0000001%～0.01%がより好ましい。金属コロイドの濃度が上記範囲内であると、効果的に金属コロイドによる局所電場増強効果を得られるため好適である。また、このコロイド溶液として、市販されているコロイド溶液を用いる場合、このコロイド溶液中の金属コロイドの濃度は、製造会社によってそれぞれ異なり、通常0.03%程度であるので、それ以上の濃度とすることは困難である。

[0074] 上述の「金属コロイドを基点とする高分子の作製方法」として例示した方法のうち、アミノデカンチオールを介して金属コロイドをカルボキシメチルデキストランに固定化する工程について、より具体的に説明する。なお、本発明において、該工程は、下記工程（I）または（II）を適宜選択することができる。

[0075] 〔工程（I）〕

まず、透明平面基板と；該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と；該

薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面（縦：2 mm，横：14 mm）に形成された、重量平均分子量が好ましくは1万～100万のカルボキシメチルデキストランとを含むプラズモン励起センサ用基板を流路（高さ0.5 mm，容積1 mL）に固定する。

[0076] 次に、その流路に、アミノデカンチオールを好ましくは0.001～100 mMの濃度に調製した溶液10 mLを、好ましくは0.5～2.0時間循環送液する。金属コロイドを好ましくは0.0000001%～0.1%の濃度で含むコロイド溶液10 mLを、好ましくは1～60分間循環送液する（より好ましくは、該コロイド溶液を1～60分間循環送液後、1 Mの濃度のアミノエタノールを含むリン酸緩衝溶液を30～60分間循環送液する）ことによって、アミノデカンチオールを介して金属コロイドをカルボキシメチルデキストランに固定化することができる。

[0077] [工程（I I）]

予め、金属コロイドを好ましくは0.0000001%～0.1%の濃度で含むコロイド溶液に、その濃度が好ましくは0.001～100 mMとなるようにアミノデカンチオールを混合し、室温の場合、好ましくは24時間以上反応させることによって、金属コロイド表面にアミノデカンチオールを結合させる。

[0078] そして、上記工程（I）と同様にしてプラズモン励起センサ用基板を流路に固定する。

[0079] 次に、その流路に、予め調製したその表面にアミノデカンチオールが結合した金属コロイド溶液（未反応の金属コロイドおよびアミノデカンチオールを除いた。）10 mLを、好ましくは24時間以上循環させる。このようにしても、アミノデカンチオールを介して金属コロイドをカルボキシメチルデキストランに固定化することができる。

[0080] このような作製方法によって得られた金属コロイドを基点とする高分子は、例えば、図1に示すように、金薄膜2に結合しており、金コロイド3を介してデキストラン4同士が直鎖状に連結する態様であってもよい。

[0081] このような金属コロイドを基点とする高分子は、金属薄膜（好ましくはSAM）に、好ましくは $10^3 \sim 10^{15}$ 個/mm²という密度で、より好ましくは $10^5 \sim 10^9$ 個/mm²という密度で結合する。金属コロイドを基点とする高分子の密度が上記範囲内であると、粗密のバランスが良好である、すなわち、流路中のアナライトと高分子に固定化されているリガンドとが十分に接触できるほど密であり、かつ流路中のアナライト以外の物質を滞留させないほど粗であることから好適である。

[0082] また、金属コロイドを基点とする高分子からなる層の厚さ（すなわち、金属コロイドを基点とする高分子の平均の長さ）は、 $10 \sim 1,000$ nmが好ましく、 $10 \sim 500$ nmがより好ましい。このような層の厚さが上記範囲内であると、効果的に金属コロイドによる局所電場増強効果および検出エリアの三次元的広がり効果を得られることから好適である。

[0083] （リガンド）

本発明では、上記高分子にリガンドを結合させる。このリガンドは、プラズモン励起センサに、検体中のアナライトを固定させる目的で用いられるものである。なお、本発明において、工程（a）で用いられるリガンドを「第1のリガンド」と称するのは、後述する工程（b）で用いられるリガンド（「第2のリガンド」）と区別するためである。

[0084] 本発明において、「リガンド」とは、検体中に含有されるアナライトを特異的に認識し（または、認識され）結合し得る分子または分子断片をいう。このような「分子」または「分子断片」としては、例えば、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）、タンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む。）、糖質（オリゴ糖、多糖類、糖鎖等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0085] 「タンパク質」としては、例えば、抗体などが挙げられ、具体的には、抗

α フェトプロテイン〔AFP〕モノクローナル抗体（（株）日本医学臨床検査研究所などから入手可能）、抗ガン胎児性抗原〔CEA〕モノクローナル抗体、抗CA19-9モノクローナル抗体、抗PSAモノクローナル抗体などが挙げられる。

[0086] なお、本発明において、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、遺伝子組換えにより得られる抗体、および抗体断片を包含する。

[0087] このリガンドの固定化方法としては、例えば、上記SAMを形成するシランカップリング剤などが有するカルボキシル基を、水溶性カルボジイミド〔WSC〕（例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩〔EDC〕など）とN-ヒドロキシコハク酸イミド〔NHS〕とにより活性エステル化し、このように活性エステル化したカルボキシル基と、上記リガンドが有するアミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて脱水反応させ固定化させる方法などが挙げられる。

[0088] なお、後述する検体等がプラズモン励起センサに非特異的に吸着することを防止するため、上記リガンドを固定化させた後に、プラズモン励起センサの表面を牛血清アルブミン〔BSA〕やアミノエタノール等のブロッキング剤により処理することが好ましい。

[0089] （SPFS-LPFS系による測定方法）

本発明において、金属コロイドを利用した「SPFS-LPFS系による測定方法」は、新規であり、表面プラズモン励起による金属薄膜の電場増強効果と、金属コロイドの局所電場増強効果が同時に得られる。なお、本発明は、SPFS-LPFS系による測定方法のみならず、SPFS系による測定方法に供することも可能である。

[0090] 「SPFS-LPFS系による測定方法」とは、プラズモン励起センサが有する上記透明平面基板の、上記金属薄膜が形成されている表面の反対側の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射することによって、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する方法である。

[0091] <アッセイ法>

本発明のアッセイ法は、少なくとも下記工程（a）～（d）を含むことを特徴とするものであり、適宜洗浄工程を含むことが好ましい。

[0092] 工程（a）：本発明のプラズモン励起センサに検体を接触させる工程、

工程（b）：上記工程（a）を経て得られたプラズモン励起センサに、第2のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲートを反応させる工程、

工程（c）：上記工程（b）を経て得られたプラズモン励起センサが有する透明平面基板の、上記金属薄膜が形成されている表面の反対側の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射し、励起された上記蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、および

工程（d）：上記工程（c）で得られた測定結果から、上記検体中に含まれるアナライトの量を算出する工程。

[0093] 洗浄工程：上記工程（a）を経て得られたプラズモン励起センサの表面、および上記工程（b）を経て得られるプラズモン励起センサの表面のうち少なくともいずれか一方を洗浄する工程。

[0094] [工程（a）]

工程（a）とは、本発明のプラズモン励起センサ、すなわち、「透明平面基板」と；該基板の一方の表面に形成された「金属薄膜」と；該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に固定化された「金属コロイドを基点とする高分子」と；該高分子に固定化された「第1のリガンド」とからなるプラズモン励起センサに検体を接触させる工程である。

[0095] なお、「透明平面基板」、「金属薄膜」および「金属コロイドを基点とする高分子」については、上述した通りである。

[0096] （第1のリガンド）

本発明において、工程（a）で用いられるリガンドを「第1のリガンド」と称するのは、下記工程（b）で用いられるリガンド（「第2のリガンド」と区別するためである。

[0097] 第1のリガンドは、上述した「リガンド」と同様である。

[0098] (検体)

本発明において、「検体」とは、本発明のアッセイ法による測定対象となる種々の試料をいう。

[0099] 「検体」としては、例えば、血液（血清・血漿）、尿、鼻孔液、唾液、便、体腔液（髄液、腹水、胸水等）などが挙げられ、所望の溶媒、緩衝液等に適宜希釈して用いてもよい。これら検体のうち、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液および唾液が好ましい。これらは1種単独で用いてもよく、また、2種以上を併用してもよい。

[0100] (接触)

本発明において、「接触」とは、プラズモン励起センサのリガンド等が固定化されている面が送液中に浸漬されている状態で、この送液中に含まれる対象物をこのプラズモン励起センサと接触させることをいう。工程（a）では、上記検体とプラズモン励起センサとの「接触」は、流路中に循環する送液に検体が含まれ、プラズモン励起センサのリガンドが固定化されている片面のみが該送液中に浸漬されている状態において、プラズモン励起センサと検体とを接触させる態様が好ましい。

[0101] 上記「流路」とは、微量な薬液の送達を効率的に行うことができ、反応促進を行うために送液速度を変化させたり、循環させたりすることができる直方体または管状のものである。また、この流路の形状として、プラズモン励起センサを設置する個所近傍は直方体構造を有することが好ましく、薬液を送達する個所近傍は管状を有することが好ましい。

[0102] その材料としては、プラズモン励起センサ部ではメチルメタクリレート、スチレン等を原料として含有するホモポリマーまたは共重合体；ポリエチレン等のポリオレフィンなどの光透過性の材質からなり、薬液送達部ではシリコーンゴム、テフロン（登録商標）、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリマーを用いる。

[0103] ただし、プラズモン励起センサ部については、蛍光測定時に流路が一定の形状に保たれ、かつプラズモン励起により発生した蛍光の検出が妨げられな

い限り、必ずしもその流路造のすべてを光透過性の材質のみから構成する必要はない。すなわち、プラズモン励起センサ部の流路のうち、プラズモン励起により発生した蛍光を透過させて検出部に導くために必要な部分、具体的には蛍光の集光に必要な透光窓を含む部分については、光透過性の材質で構成する必要があるが、その他の部分については、その一部または全部を光透過性の材質以外の化学的に安定な材質で構成してもよい。プラズモン励起センサ部の流路が直方体構造を有する場合、金属薄膜（または、好ましくはSAM）が表面に存在するプラズモン励起センサの面を底面としたときに、例えば、この底面と対向する位置にある天井面を光透過性の材質で構成し、側面を光透過性の材質以外の化学的に安定な材質で構成してもよい。

[0104] ここで、上記その他の部分、例えば側面は、蛍光測定時に一定の形状が保たれる限り、必ずしも剛体である必要はなく、シール性を確保するために適度な弾性を有していてもよい。例えば、プラズモン励起センサ部の流路について、天井面をポリメチルメタクリレート〔PMMA〕で構成し、側面をシリコーンゴムで構成してもよい。

[0105] プラズモン励起センサ部においては、検体との接触効率を高め、拡散距離を短くする観点から、プラズモン励起センサ部の流路の断面として、縦×横がそれぞれ独立に100nm～1mm程度が好ましい。

[0106] 流路において、薬物送達部からプラズモン励起センサ部に送液を導入する送液導入口、およびその送液をプラズモン励起センサ部から排出する送液排出口の位置は、いずれも、蛍光測定の妨げとならない限り特に限定されない。例えば、プラズモン励起センサ部の流路が直方体構造を有する場合、前記送液導入口及び送液排出口とも天井面に設けるのが流路の作製上簡便であるが、この送液導入口と送液排出口とのうちいずれか一方、あるいはその両方を側面に設けてもよい。

[0107] 流路にプラズモン励起センサを固定する方法は、流路が一定の形状に保たれ、かつ蛍光測定が妨げられない限り特に限定されない。

[0108] このような固定方法の例としては、小規模ロット（実験室レベル）では、

まず、プラズモン励起センサの金属薄膜が形成されている表面上に、一定の厚さを有するシリコンゴム製シートまたはリングを載せることによって流路の側面構造を形成し、次いで、その上に送液導入口及び送液排出口を設けてある光透過性の天板（例えば、PMMA基板）を配置することによって流路の天井面を形成し、その後、これらを圧着して適当な留め具により固定する方法などが挙げられる。このとき、側面構造を構成する材料として、その中央部に任意の形状および大きさを有する穴を開けてある、適当な厚さを有するシリコンゴム製シートを用いると、この穴の内周がプラズモン励起センサ部の流路の側面構造となることから、所要の形状および大きさを有する流路を容易に形成することができるので好ましい。例えば、まず、該プラズモン励起センサの金属薄膜が形成されている表面に、流路高さ0.5mmを有する穴あきポリジメチルシロキサン〔PDMS〕製シートを該プラズモン励起センサの金属薄膜が形成されている部位を囲むようにして配置し、次いで、このポリジメチルシロキサン〔PDMS〕製シートの上に、予め送液導入口および送液排出口を設けてあるPMMA基板を配置し、その後、該PMMA基板と該ポリジメチルシロキサン〔PDMS〕製シートと該プラズモン励起センサとを圧着し、ビス等の留め具により固定する方法が好ましい。また、プラズモン励起センサに、シリコンゴム製シートまたはリングと光透過性の天板とを圧着し、固定するにあたっては、必要に応じて、シリコンゴムまたはステンレスなどの材質でできた適当なスペーサを併用してもよい。

- [0109] また、工業的に製造される大ロット（工場レベル）では、流路にプラズモン励起センサを固定する方法としては、プラスチックの一体成形品に直接金基板を形成するかあるいは別途作製した金基板を固定し、金表面に（好ましくはSAM）金コロイドを基点とする高分子からなる層の形成およびリガンドの固定化を行った後、流路の天板に相当するプラスチックの一体成形品により蓋をすることで製造できる。必要に応じてプリズムを流路に一体化することもできる。

[0110] このような「送液」としては、検体を希釈した溶媒または緩衝液と同じものが好ましく、例えば、リン酸緩衝生理食塩水〔PBS〕、トリス緩衝生理食塩水〔TBS〕などが挙げられるが、特に限定されるものではない。

[0111] 送液を循環させる温度および時間としては、検体の種類などにより異なり、特に限定されるものではないが、通常 $20\sim40^{\circ}\text{C}\times1\sim60$ 分間、好ましくは $37^{\circ}\text{C}\times5\sim15$ 分間である。

[0112] 送液中の検体中に含有されるアナライトの初期濃度は、 $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim0.0001\text{pg}/\text{mL}$ であってもよい。

[0113] 送液の総量、すなわち流路の容積としては、通常 $0.0001\sim20\text{mL}$ 、好ましくは $0.01\sim1\text{mL}$ である。

[0114] 送液の流速は、通常 $1\sim2,000\mu\text{L}/\text{min}$ 、好ましくは $5\sim500\mu\text{L}/\text{min}$ である。

[0115] 〔洗浄工程〕

洗浄工程とは、工程（a）を経て得られたプラズモン励起センサの表面、および後述する工程（b）を経て得られるプラズモン励起センサの表面のうち少なくともいずれか一方を洗浄する工程である。この洗浄工程は、工程（b）の前後のうち少なくともいずれか一方に含まれることが好ましい。

[0116] 洗浄工程に使用される洗浄液としては、例えば、Tween 20, Triton X 100などの界面活性剤を、工程（a）および（b）の反応で用いたものと同じ溶媒または緩衝液に溶解させ、好ましくは $0.00001\sim1$ 重量%含有するものが望ましい。

[0117] 洗浄液を循環させる温度および流速は、上記工程（a）の「送液を循環させる温度および流速」と同じであることが好ましい。

[0118] 洗浄液を循環させる時間は、通常 $0.5\sim180$ 分間、好ましくは $5\sim60$ 分間である。

[0119] 〔工程（b）〕

工程（b）とは、上記工程（a）を経て得られたプラズモン励起センサに、第2のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲートを反応させる工程である。

[0120] (蛍光色素)

「蛍光色素」とは、本発明において、所定の励起光を照射する、または電界効果を利用して励起することによって蛍光を発光する物質の総称であり、該「蛍光」は、燐光など各種の発光も含む。

[0121] 本発明で用いられる蛍光色素は、後述する金属コロイドによる吸光に起因する消光を受けない限りにおいて、その種類に特に制限はなく、公知の蛍光色素のいずれであってもよい。一般に、単色比色計〔monochromometer〕よりむしろフィルタを備えた蛍光計の使用をも可能にし、かつ検出の効率を高める大きなストークス・シフトを有する蛍光色素が好ましい。

[0122] このような蛍光色素としては、例えば、フルオレセイン・ファミリーの蛍光色素（Integrated DNA Technologies社製）、ポリハロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素（アプライドバイオシステムズジャパン（株）製）、ヘキサクロロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素（アプライドバイオシステムズジャパン（株）製）、クマリン・ファミリーの蛍光色素（インビトロジェン（株）製）、ローダミン・ファミリーの蛍光色素（GEヘルスケア バイオサイエンス（株）製）、シアニン・ファミリーの蛍光色素、インドカルボシアニン・ファミリーの蛍光色素、オキサジン・ファミリーの蛍光色素、チアジン・ファミリーの蛍光色素、スクアライン・ファミリーの蛍光色素、キレート化ランタニド・ファミリーの蛍光色素、BODIPY（登録商標）・ファミリーの蛍光色素（インビトロジェン（株）製）、ナフタレンスルホン酸・ファミリーの蛍光色素、ピレン・ファミリーの蛍光色素、トリフェニルメタン・ファミリーの蛍光色素、Alexa Fluor（登録商標）色素シリーズ（インビトロジェン（株）製）などが挙げられ、さらに米国特許番号第6,406,297号、同第6,221,604号、同第5,994,063号、同第5,808,044号、同第5,880,287号、同第5,556,959号および同第5,135,717号に記載の蛍光色素も本発明で用いることができる。

[0123] これらファミリーに含まれる代表的な蛍光色素の吸収波長（nm）および発光波長（nm）を表1に示す。

[0124] [表1]

表1

蛍光色素	ファミリー	吸収波長 (nm)	発光波長 (nm)
Aminomethylcoumarin; AMCA	クマリン	350	450
Cy2(登録商標)	シアニン	492	510
Fluorescein Isothiocyanate; FITC	フルオレセイン	492	520
Cy3(登録商標)	インドカルボシアニン	550	570
Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate; TRITC	ローダミン	550	570
Rhodamine Red-X; RRX		570	590
Texas Red; TR		596	620
Cy5(登録商標)	シアニン	650	670
Alexa Fluor(登録商標) 647	シアニン	650	665

[0125] また、蛍光色素は、上記有機蛍光色素に限られない。例えば、Eu、Tb等の希土類錯体系の蛍光色素も、本発明に用いられる蛍光色素となりうる。希土類錯体は、一般的に励起波長（310～340nm程度）と発光波長（Eu錯体で615nm付近、Tb錯体で545nm付近）との波長差が大きく、蛍光寿命が数百マイクロ秒以上と長い特徴がある。市販されている希土類錯体系の蛍光色素の一例としては、ATBTA-Eu³⁺が挙げられる。さらに、青色蛍光タンパク質〔BFP〕、シアン蛍光タンパク質〔CFP〕、緑色蛍光タンパク質〔GFP〕、黄色蛍光タンパク質〔YFP〕、赤色蛍光タンパク質〔DsRed〕またはAllophycocyanin〔APC〕（Lyoflogen（登録商標））などに代表される蛍光タンパク質、ラテックスやシリカなどの蛍光微粒子なども、本発明に用いられる蛍光色素となりうる。

[0126] 本発明においては、後述する蛍光測定を行う際に、金属コロイドに含まれる金属による吸光の少ない波長領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用い

ることが望ましい。例えば、金属コロイドとして金を用いる場合には、金コロイドによる吸光による影響を最小限に抑えるため、最大蛍光波長が600nm以上である蛍光色素を使用することが望ましい。したがって、この場合には、Cy5, Alexa Fluor（登録商標）647等近赤外領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることが特に望ましい。このような近赤外領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることは、血液中の血球成分由来の鉄による吸光の影響を最小限に抑えることができる点で、検体として血液を用いる場合においても有用である。一方、金属コロイドとして銀を用いる場合には、最大蛍光波長が400nm以上である蛍光色素を使用することが望ましい。

[0127] これら蛍光色素は1種単独でも、2種以上併用してもよい。

[0128] （第2のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲート）

「第2のリガンドと蛍光色素からなるコンジュゲート」は、リガンドとして2次抗体を用いる場合、検体中に含有されるアナライト（標的抗原）を認識し結合し得る抗体であることが好ましい。

[0129] 本発明のアッセイ法において、第2のリガンドは、アナライトに蛍光色素による標識化を行う目的で用いられるリガンドであり、上記第1のリガンドと同じでもよいし、異なってもよい。ただし、第1のリガンドとして用いる1次抗体がポリクローナル抗体である場合、第2のリガンドとして用いる2次抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、該1次抗体がモノクローナル抗体である場合、2次抗体は、該1次抗体が認識しないエピトープを認識するモノクローナル抗体であるか、またはポリクローナル抗体であることが望ましい。

[0130] さらに、検体中に含有されるアナライト（標的抗原）と競合する第2のアナライト（競合抗原；ただし、標的抗原とは異なるものである。）と2次抗体とが予め結合した複合体を用いる態様も好ましい。このような態様は、蛍光信号（蛍光シグナル）量と標的抗原量とを比例させることができるため好適である。

[0131] 「第2のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲート」の作製方法としては、第2のリガンドとして2次抗体を用いる場合、例えば、まず蛍光色素にカルボキシル基を付与し、該カルボキシル基を、水溶性カルボジイミド〔WSC〕（例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩〔EDC〕など）とN-ヒドロキシコハク酸イミド〔NHS〕とにより活性エステル化し、次いで活性エステル化したカルボキシル基と2次抗体が有するアミノ基とを水溶性カルボジイミドを用いて脱水反応させ固定化させる方法；イソチオシアネートおよびアミノ基をそれぞれ有する2次抗体および蛍光色素を反応させ固定化する方法；スルホニルハライドおよびアミノ基をそれぞれ有する2次抗体および蛍光色素を反応させ固定化する方法；ヨードアセトアミドおよびチオール基をそれぞれ有する2次抗体および蛍光色素を反応させ固定化する方法；ビオチン化された蛍光色素とストレプトアビジン化された2次抗体（あるいは、ストレプトアビジン化された蛍光色素とビオチン化された2次抗体）とを反応させ固定化する方法などが挙げられる。

[0132] このように作製された「第2のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲート」の送液中の濃度は、 $0.001 \sim 10,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましく、 $1 \sim 1,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ がより好ましい。

[0133] 送液を循環させる温度、時間および流速は、それぞれ上記工程（a）の場合と同様である。

[0134] 〔工程（c）〕

工程（c）とは、上記工程（b）を経て得られたプラズモン励起センサが有する透明平面基板の、上記金属薄膜が形成されている表面の反対側の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射し、励起された上記蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程である。

[0135] （光学系）

本発明のアッセイ法で用いる光源は、金属薄膜および金属コロイド粒子にプラズモン励起を生じさせることができるものであれば、特に制限がないも

の、波長分布の単一性および光エネルギーの強さの点で、レーザ光を光源として用いることが好ましい。レーザ光は、光学フィルタを通して、プリズムに入射する直前のエネルギーおよび光子量を調節することが望ましい。

[0136] レーザ光の照射により、全反射減衰条件〔ATR〕において、金属薄膜の表面に表面プラズモンが発生する。表面プラズモンの電場増強効果により、照射した光子量の数十～数百倍に増えた光子により蛍光色素を励起する。なお、該電場増強効果による光子増加量は、透明平面基板の屈折率、金属薄膜の金属種および膜厚に依存するが、通常、金では約10～20倍の増加量となる。本発明のアッセイ法では、金属薄膜における表面プラズモン発生に加えて、金属コロイドにおける表面プラズモン発生、および金属薄膜と金属コロイドとの間に生じる局在電場の増強も生じることから、さらに電場増強が誘起され、さらに光子が増加し、蛍光色素をさらに強く励起する。

[0137] 蛍光色素は、光吸収により分子内の電子が励起され、短時間のうちに第一電子励起状態に移動し、この状態（準位）から基底状態に戻る際、そのエネルギー差に相当する波長の蛍光を発する。

[0138] 「レーザ光」としては、例えば、波長200～900nm、0.001～1,000mWのLD、波長230～800nm（金属薄膜に用いる金属種によって共鳴波長が決まる。）、0.01～100mWの半導体レーザなどが挙げられる。

[0139] 「プリズム」は、各種フィルタを介したレーザ光が、プラズモン励起センサに効率よく入射することを目的としており、屈折率が透明平面基板と同じであることが好ましい。本発明は、全反射条件を設定できる各種プリズムを適宜選択することができることから、角度、形状に特に制限はなく、例えば、60度分散プリズムなどであってもよい。このようなプリズムの市販品としては、上述した「ガラス製の透明平面基板」の市販品と同様のものが挙げられる。

- [0140] 「光学フィルタ」としては、例えば、減光〔ND〕フィルタ、ダイアフラムレンズなどが挙げられる。「減光〔ND〕フィルタ」（または、中性濃度フィルタ）は、入射レーザ光量を調節することを目的とするものである。特に、ダイナミックレンジの狭い検出器を使用するときには精度の高い測定を実施する上で用いることが好ましい。
- [0141] 「偏光フィルタ」は、レーザ光を、表面プラズモンを効率よく発生させるP偏光とするために用いられるものである。
- [0142] 「カットフィルタ」は、外光（SPFS用分析装置外の照明光）、励起光（励起光の透過成分）、迷光（各所での励起光の散乱成分）、プラズモンの散乱光（励起光を起源とし、プラズモン励起センサ表面上の構造体または付着物などの影響で発生する散乱光）、酵素蛍光基質の自家蛍光などの各種ノイズ光を除去するフィルタであって、例えば、干渉フィルタ、色フィルタなどが挙げられる。
- [0143] 「集光レンズ」は、検出器に蛍光シグナルを効率よく集光することを目的とするものであり、任意の集光系でよい。簡易な集光系として、顕微鏡などで使用されている、市販の対物レンズ（例えば、（株）ニコン製またはオリンパス（株）製等）を転用してもよい。対物レンズの倍率としては、10～100倍が好ましい。
- [0144] 「SPFS検出部」としては、超高感度の観点からは光電子増倍管（浜松ホトニクス（株）製のフォトマルチプライヤー）が好ましい。また、これらに比べると感度は下がるが、画像として見ることができ、かつノイズ光の除去が容易なことから、多点計測が可能なCCDイメージセンサも好適である。
- [0145] 〔工程（d）〕
- 工程（d）とは、上記工程（c）で得られた測定結果から、上記検体中に含まれるアナライトの量を算出する工程である。
- [0146] より具体的には、既知濃度の標的抗原もしくは標的抗体での測定を実施することで検量線を作成し、作成された検量線に基づいて被測定検体中の標的

抗原量もしくは標的抗体量を測定シグナルから算出する工程である。

[0147] (アナライト)

アナライトとしては、上記高分子に固定化された第1のリガンドを特異的に認識され（または、認識し）結合し得る分子または分子断片であって、このような「分子」または「分子断片」としては、例えば、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）、タンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む。）、糖質（オリゴ糖、多糖類、糖鎖等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体などが挙げられ、具体的には、AFP〔 α フェトプロテイン〕等のがん胎児性抗原や腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモンなどであってもよく、特に限定されない。

[0148] (アッセイS/N比)

さらに、工程(d)は、上記工程(c)の前に測定した“ブランク蛍光シグナル”、上記工程(c)で得られた“アッセイ蛍光シグナル”、および何も修飾していない金基板を流路に固定し、超純水を流しながらSPFSを測定して得られたシグナルを“初期ノイズ”としたとき、下記式(1a)で表されるアッセイS/N比を算出することができる：

$$\text{アッセイS/N比} = |I_a / I_o| / I_n \quad \cdots (1a)$$

(上記式(1a)において、 I_a はアッセイ蛍光シグナル、 I_o はブランク蛍光シグナル、 I_n は初期ノイズである)。

[0149] ただし、アッセイS/N比を算出するにあたっては、実用上、上記式(1a)に代えて、検体中に含まれるアナライトの濃度が0の場合における“アッセイノイズシグナル”を基準として、下記式(1b)にしたがって算出してもよい：

$$\text{アッセイS/N比} = |I_a| / |I_{an}| \quad \cdots (1b)$$

(上記式(1b)において、 I_{an} はアッセイノイズシグナル、 I_a は上記式(1a)の場合と同様にアッセイ蛍光シグナルである)。

[0150] <SPFS用分析装置>

本発明のSPFS用分析装置は、少なくとも、本発明のプラズモン励起センサを含み、本発明のアッセイ法に用いられることを特徴とするものであり、SPR系による測定にも転用することができる。

[0151] このような「SPFS用分析装置」としては、例えば、光源、各種光学フィルタ、プリズム、カットフィルタ、集光レンズ、表面プラズモン励起増強蛍光検出部なども含むことができる。なお、検体液、洗浄液、標識抗体液などを取り扱う際に、プラズモン励起センサと組み合った送液系を有することが好ましい。送液系としては、本発明の目的が達せられる限り、その種類を問わない。例えば、液ポンプと連結したマイクロ流路デバイスなどでもよい。

[0152] また、表面プラズモン共鳴〔SPR〕検出部、すなわちSPR専用の受光センサとしてのフォトダイオード、SPRおよびSPFSの最適角度を調製するための角度可変部（サーボモータで全反射減衰〔ATR〕条件を求めるためにフォトダイオードと光源とを同期して、 $45 \sim 85^\circ$ の角度変更を可能とする。分解能は 0.01° 以上が好ましい。）、表面プラズモン励起増強蛍光検出部に入力された情報を処理するためのコンピュータなども含んでもよい。

[0153] 「送液ポンプ」としては、例えば、送液が微量な場合に好適なマイクロポンプ、送り精度が高く脈動が少なく好ましいが循環することができないシリンジポンプ、簡易で取り扱い性に優れるが微量送液が困難な場合があるチューブポンプなどが挙げられる。

[0154] <アッセイ用キット>

本発明のアッセイ用キットは、透明平面基板と；該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と；該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層とからなり、本発明のプラズモン励起センサに用いられるプラズモン励起センサ用基板を、少なくとも含むことを特徴とするものである。

[0155] このような「アッセイ用キット」は、本発明のアッセイ法を実施するにあたり、第1のリガンドと第2のリガンドと検体とを除き必要とされるすべてのもの、例えば、1次抗体、抗原などのリガンド（すなわち、検体中に含まれるアナライトは、抗原とは限らず、抗体であってもよい。）と検体と2次抗体とを除き必要とされるすべてのものを含むことが好ましい。

[0156] 例えば、本発明のアッセイ用キットと、検体として血液または血清と、特定の腫瘍マーカーに対する抗体とを用いることによって、特定の腫瘍マーカーの含有量を、高感度かつ高精度で検出することができる。この結果から、触診などによって検出することができない前臨床期の非浸潤癌（上皮内癌）の存在も高精度で予測することができる。

[0157] このような「アッセイ用キット」としては、具体的に、プラズモン励起センサ用基板；SAMを形成するための炭素原子数4～20程度のカルボキシアルカンチオール；蛍光色素；検体を溶解または希釈するための溶解液または希釈液；プラズモン励起センサと検体とを反応させるための各種反応試薬および洗浄試薬が挙げられ、本発明のアッセイ法を実施するために必要とされる各種器材または資材や上記「SPFS用分析装置」を含めることもできる。

[0158] さらに、キット要素として、検量線作成用の標準物質、説明書、多数検体の同時処理ができるマイクロタイタープレートなどの必要な器材一式などを含んでもよい。

実施例

[0159] 次に、本発明について実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0160] [作製例1] (Alexa Fluor (登録商標) 647 標識2次抗体の作製)

2次抗体として、抗 α フェトプロテイン〔AFP〕モノクローナル抗体（1D5；2.5mg/mL, (株)日本医学臨床検査研究所製）を、市販のビオチン化キット（(株)同仁化学研究所製）を用いてビオチン化した。手

順は、該キットに添付のプロトコールに従った。

[0161] 次に、得られたビオチン化抗AFPモノクローナル抗体の溶液とストレプトアビジン標識Alexa Fluor（登録商標）647（Molecular Probes社製）溶液とを混合し、4℃で60分間、攪拌混合することで反応させた。

[0162] 最後に、未反応抗体および未反応酵素を、分子量カットフィルタ（日本ミリポア（株）製）を用いて精製することで、Alexa Fluor（登録商標）647標識抗AFPモノクローナル抗体溶液を得た。得られた抗体溶液はタンパク定量後、4℃で保存した。

[0163] [実施例1]（プラズモン励起センサの製造）

屈折率 $[n_d]$ 1.72、厚さ1mmのガラス製の透明平面基板（（株）オハラ製の「S-LAL 10」）をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは1～3nm、金薄膜の厚さは44～52nmであった。

[0164] このようにして得られた基板を、1mMに調製した10-アミノ-1-デカンチオールのエタノール溶液10mLに24時間浸漬し、金薄膜の片面にSAMを形成した。この基板を、該エタノール溶液から取り出し、エタノールおよびイソプロパノールでそれぞれ洗浄した後、エアガンを用いて乾燥させた。

[0165] 続いて、分子量50万のカルボキシメチルデキストランを2mg/mLと、N-ヒドロキシコハク酸イミド[NHS]を50mMと、水溶性カルボジイミド[WSC]を100mMとを含むリン酸緩衝生理食塩水[PBS]にSAMを形成した基板を1時間浸漬し、SAMにカルボキシメチルデキストランを固定化した。

[0166] 次に、このように基板上に形成したSAMの表面に、流路高さ0.5mmを有し、かつ適当な形状および大きさを有する穴のあいたポリジメチルシロキサン[PDMS]製シートを設け、さらに、このPDMS製シートの周囲

にシリコンゴム製スペーサを配置した（このシリコンゴム製スペーサは送液に触れない状態にある。）。このPDMS製シートおよび該シリコンゴム製スペーサの上に、送液導入用の穴及び送液排出用の穴を予めそれぞれ形成してあるPMMA基板を、PDMS製シートで囲まれた領域の内側にこれらの穴が位置するように配置した（このとき、SAM表面が流路の内側となるように、PMMA基板が配置されている）。これらを流路の外側から圧着し、ビスでPMMA基板と流路シート（すなわち、前記PDMS製シート）とプラズモン励起センサ（すなわち、SAMを形成した基板）とを固定した。

[0167] 続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド〔NHS〕を50mMと、水溶性カルボジイミド〔WSC〕を100mMとを含むリン酸緩衝生理食塩水〔PBS〕を5mL送液し、20分間循環送液させた後に、抗 α フェトプロテイン〔AFP〕モノクローナル抗体（1D5；2.5mg/mL、（株）日本医学臨床検査研究所製）溶液2.5mLを30分間循環送液することで、カルボキシメチルデキストランに1次抗体を固相化した。

[0168] さらに、アミノデカンチオールを1mMの濃度に調製した溶液10mLを1時間循環送液した。平均粒径20nmの金コロイドを0.00075%の濃度で含むコロイド溶液10mLを10分循環送液後、12時間放置することによって、アミノデカンチオールを介して金コロイドをカルボキシメチルデキストランに固定化した。

[0169] なお、1重量%牛血清アルブミン〔BSA〕および1Mのアミノエタノールを含むPBSにて30分間循環送液することで、非特異的吸着防止処理を行った。

[0170] 〔比較例1〕（プラズモン励起センサの製造）

実施例1において、SAMを形成する際、10-アミノ-1-デカンチオールの代わりに10-カルボキシー-1-デカンチオールを用い、さらに金コロイドおよびデキストランを用いず、かつN-ヒドロキシコハク酸イミド〔NHS〕を50mMと、水溶性カルボジイミド〔WSC〕を100mMとを

含むリン酸緩衝生理食塩水〔PBS〕を5 mL送液し、20分間循環送液させた後に、抗 α フェトプロテイン〔AFP〕モノクローナル抗体（1 D 5；2. 5 mg/mL，（株）日本医学臨床検査研究所製）溶液2. 5 mLを30分間循環送液することで、SAM上に1次抗体を固相化した以外は実施例1と同様にしてプラズモン励起センサを作製した。

[0171] [比較例2]（プラズモン励起センサの製造）

実施例1において、金コロイドを用いなかった以外は実施例1と同様にしてプラズモン励起センサを作製した。

[0172] 実施例1および比較例1，2のそれぞれで製造したプラズモン励起センサの構成を下表にまとめる。

[0173] [表2]

表2: プラズモン励起センサの構成

		実施例 1	比較例	
			1	2
プラズモン励起センサの構成	透明平面基板	(株)オハラ製のS-LAL 10		
	金属薄膜	金薄膜をスパッタリング法により形成		
	SAM	アミノデカンチオール		カルボキシデカンチオール
	金属コロイドを基点とした高分子	金属コロイド [粒径]	金コロイド [20nm]	—
	リガンド(第1のリガンド)	高分子	カルボキシメチルデキストラン	カルボキシメチルデキストラン

[0174] [実施例2]（アッセイ法の実施）

工程（a）として、まず、実施例1で得られたプラズモン励起センサに標的抗原としてAFPを1 ng/mL含むPBS溶液を0. 5 mL添加し、25分間循環させた。

[0175] 工程（b）として、Tween 20を0. 05重量%含むトリス緩衝生理食塩水〔TBS〕を送液として10分間循環させることによって洗浄した後、作製例2で得られたAlexa Fluor（登録商標）647標識2次抗体（1, 000 ng/mLとなるように調製したPBS溶液）を2. 5 mL添加し、20分間循環させた。

[0176] 工程（c）として、まず、Tween 20を0. 05重量%含むTBSを送

液として10分間循環させることによって洗浄した。プラズモン励起センサに、ガラス製の透明平面基板の、金薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズム（シグマ光機（株）製）を経由してレーザ光（640nm、40μW）を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量をCCDから観察したときのシグナル値を計測し「アッセイシグナル」とした。

[0177] なお、AFPが0ng/mLの場合におけるSPFSシグナルを「アッセイノイズシグナル」とした。

[0178] 工程（d）として、上記工程（c）で得られた測定結果から、アッセイS/N比を以下の式を用いて算出し、各条件での感度に関して、金コロイドを使用しない測定結果（比較例1）を基準とした規格値（LP増強率）により評価した。

[0179]
$$\text{アッセイS/N比} = \left| \frac{\text{アッセイ蛍光シグナル}}{\text{アッセイノイズシグナル}} \right|$$

すなわち、規格値（LP増強率）が大きければアッセイS/N比が向上していることを意味し、イムノアッセイ測定の信頼性が高いことがわかる。

[0180] 得られた結果を表3に示す。

[0181] [実施例3]（アッセイ法の実施）

実施例2の工程（c）において、Tween20を0.05重量%含むTBBSを送液として10分間循環させることによって洗浄した後、0.5mL、0.00075%金コロイド溶液（金コロイド平均粒径20nm）を0.5mL/minで送液することでプラズモン励起センサに金コロイドを接触させた以外は実施例2と同様にしてアッセイS/N比を算出した。

[0182] 得られた結果を表3に示す。

[0183] [比較例3]（アッセイ法の実施）

実施例2において、実施例1で得られたプラズモン励起センサの代わりに比較例1で得られたプラズモン励起センサを用いた以外は実施例2と同様にしてアッセイS/N比を算出した。

[0184] 得られた結果を表3に示す。

[0185] [比較例 4] (アッセイ法の実施)

実施例 2 において、実施例 1 で得られたプラズモン励起センサの代わりに比較例 2 で得られたプラズモン励起センサを用いた以外は実施例 2 と同様にしてアッセイ S/N 比を算出した。

[0186] 得られた結果を表 3 に示す。

[0187] [表 3]

表 3: プラズモン励起センサを用いたアッセイ法の実施

		実施例		比較例	
		2	3	3	4
ア ッ セ イ 法 の 実 施	アッセイ法に用いた プラズモン励起センサ	実施例 1		比較例 1	比較例 2
	送液中の金コロイドの濃度 (%)	—	0.00075	—	
	シグナル増加率 (%) (※比較例 3 のシグナル増加率を 100% としたときの相対値を表す。)	208	188	100	168

[0188] 表 3 から、表面プラズモン増強蛍光を使用したとき (比較例 2, 3) に比べて、金属コロイドを分散状態で使用した系 (実施例 2, 3) では有意に感度が向上していることが明らかである。

[0189] 本発明では、金属コロイドが高分子からなる層中に分散に近い状態で固定化されているため、金属コロイド密度は極めて均質である。そのため、従来報告されているような局在プラズモンを利用した方法と比べて高い再現性が見込まれ、本発明が高感度かつ高精度な測定方法であることがわかる。

産業上の利用可能性

[0190] 本発明のプラズモン励起センサを用いたアッセイ法は、高感度かつ高精度に検出することができる方法であるから、例えば、血液中に含まれる極微量の腫瘍マーカーであっても検出することができ、この結果から、触診などによって検出することができない前臨床期の非浸潤癌 (上皮内癌) の存在も高精度で予測することができる。

符号の説明

[0191] 1 透明平面基板

- 2 金薄膜
- 3 金コロイド
- 4 デキストラン
- 5 抗体
- 6 カバーガラス
- 7 金フィルム
- 8 分子インプリントポリマーからなるゲル
- 9 結合サイト
- 10 金ナノパーティクル
- 11 透明プレート
- 12 金属フィルム
- 14 デキストラン層
- 15 抗デキストランからなる 1 つの活性部分と検出しようとしている抗体に対する抗原からなる別の部分とを有する二官能価あるいは多官能価分子

請求の範囲

- [請求項1] 透明平面基板と；
該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と；
該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層と；
該高分子に固定化されたりガンドと
を含み、SPFS〔表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕－LPFS〔局在表面プラズモン励起増強蛍光分光法〕系による測定方法に供することを特徴とするプラズモン励起センサ。
- [請求項2] 上記金属薄膜と上記金属コロイドを基点とする高分子からなる層との間にSAM〔自己組織化単分子膜〕を有する請求項1に記載のプラズモン励起センサ。
- [請求項3] 上記金属コロイドが、金、銀、白金およびそれらの合金からなる群から選択される少なくとも1種の金属からなるコロイドである請求項1または2に記載のプラズモン励起センサ。
- [請求項4] 上記金属コロイドの粒径が、0.1nm～10μmである請求項1～3のいずれかに記載のプラズモン励起センサ。
- [請求項5] 上記高分子が、タンパク質、核酸、多糖類、天然ゴム、合成樹脂、シリコン樹脂、合成繊維および合成ゴムからなる群から選択される少なくとも1種の高分子であり、かつ水に可溶性である請求項1～4のいずれかに記載のプラズモン励起センサ。
- [請求項6] 少なくとも下記工程（a）～（d）を含むことを特徴とするアッセイ法；
工程（a）：請求項1～5のいずれかに記載のプラズモン励起センサに検体を接触させる工程、
工程（b）：上記工程（a）を経て得られたプラズモン励起センサに、第2のリガンドと蛍光色素とのコンジュゲートを反応させる工程、

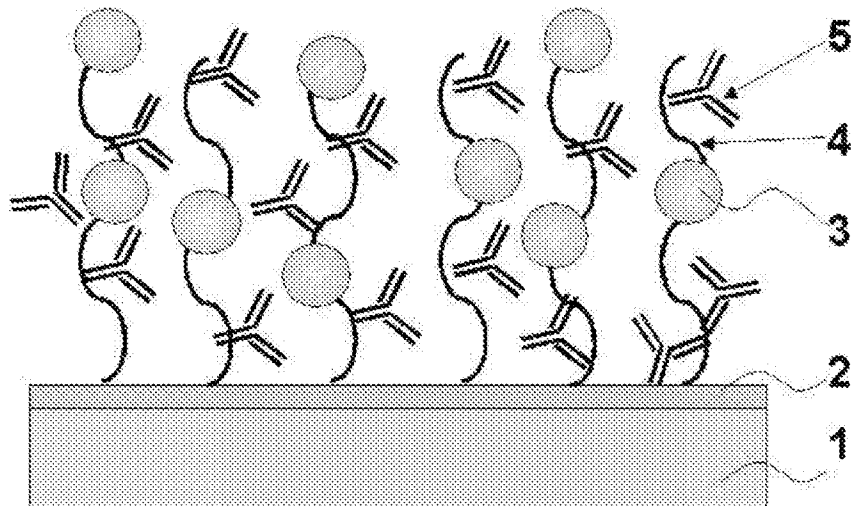
工程（c）：上記工程（b）を経て得られたプラズモン励起センサが有する透明平面基板の、上記金属薄膜が形成されている表面の反対側の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射し、励起された上記蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、および

工程（d）：上記工程（c）で得られた測定結果から、上記検体中に含まれるアナライトの量を算出する工程。

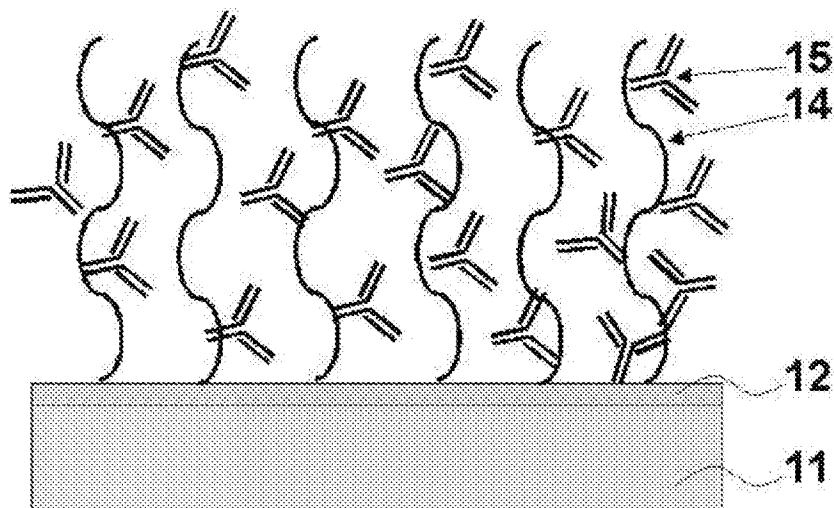
[請求項7] 少なくとも、請求項1～5のいずれかに記載のプラズモン励起センサを含み、請求項6に記載のアッセイ法に用いられることを特徴とするSPFS用分析装置。

[請求項8] 透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と、該薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された、金属コロイドを基点とする高分子からなる層とからなり、請求項1～5のいずれかに記載のプラズモン励起センサに用いられるプラズモン励起センサ用基板を、少なくとも含むことを特徴とするアッセイ用キット。

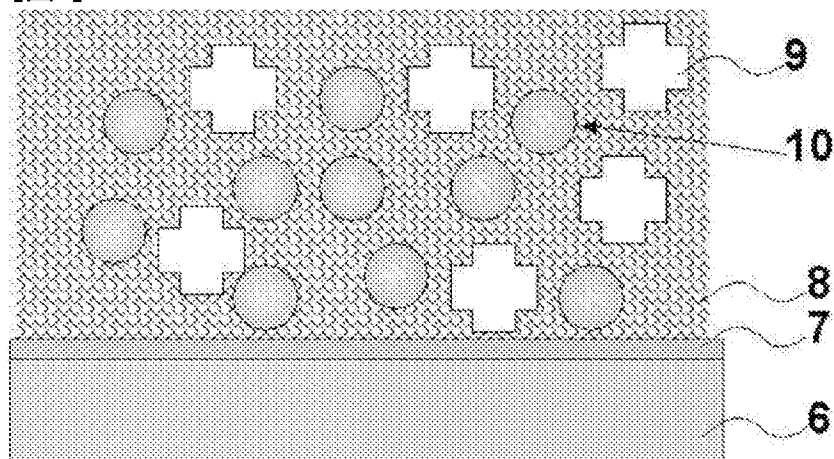
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i,
G01N33/553(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/00-21/74, G01N33/48-33/98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-308321 A (Toyobo Co., Ltd.), 09 November 2006 (09.11.2006), claims 1 to 4; paragraphs [0004], [0022] to [0024], [0028], [0041] to [0043]; fig. 1, 10 to 13 (Family: none)	1-8
Y	JP 2005-180921 A (Japan Science and Technology Agency), 07 July 2005 (07.07.2005), paragraphs [0010], [0022] to [0024], [0035] to [0039], [0051] to [0052]; fig. 1 & US 2005/0106570 A1 & EP 1496363 A1 & WO 2003/083478 A1 & CA 2480770 A & CN 1646912 A	1-8

☒ 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
13 August, 2010 (13.08.10)

Date of mailing of the international search report
24 August, 2010 (24.08.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058617

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 2001-021565 A (Japan Science and Technology Corp.), 26 January 2001 (26.01.2001), entire text; all drawings (Family: none)	1-8
Y	JP 2007-256270 A (Fujifilm Corp.), 04 October 2007 (04.10.2007), paragraphs [0039] to [0041], [0046] & US 2007/0266775 A1 & EP 1826564 A1	2-8
A	JP 2008-216046 A (Fujifilm Corp.), 18 September 2008 (18.09.2008), entire text; all drawings & US 2008/0219893 A1	1-8
A	WO 2008/078579 A1 (Rohm Co., Ltd.), 03 July 2008 (03.07.2008), entire text; all drawings & JP 2008-154493 A & EP 2096179 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/00-21/74, G01N33/48-33/98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-308321 A（東洋紡績株式会社）2006.11.09, 請求項1-4、段落0004、段落0022-0024、段落0028、段落0041-0043、図1、図10-13（ファミリーなし）	1-8
Y	JP 2005-180921 A（独立行政法人科学技術振興機構）2005.07.07, 段落0010、段落0022-0024、段落0035-0039、段落0051-0052、図1 & US 2005/0106570 A1 & EP 1496363 A1 & WO 2003/083478 A1 & CA 2480770 A & CN 1646912 A	1-8

☒ 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 3 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 8 . 2 0 1 0

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）

横尾 雅一

2W

3716

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

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 2001-021565 A (科学技術振興事業団) 2001.01.26, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 2007-256270 A (富士フイルム株式会社) 2007.10.04, 段落 0 0 3 9 - 0 0 4 1、段落 0 0 4 6 & US 2007/0266775 A1 & EP 1826564 A1	2-8
A	JP 2008-216046 A (富士フイルム株式会社) 2008.09.18, 全文、全 図 & US 2008/0219893 A1	1-8
A	WO 2008/078579 A1 (ローム株式会社) 2008.07.03, 全文、全図 & JP 2008-154493 A & EP 2096179 A1	1-8