

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5241274号
(P5241274)

(45) 発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)

(24) 登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51) Int.Cl. F1
GO1N 21/64 (2006.01)
 GO1N 21/64 G
 GO1N 21/64 F

請求項の数 10 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2008-47538 (P2008-47538) (22) 出願日 平成20年2月28日 (2008.2.28) (65) 公開番号 特開2009-204476 (P2009-204476A) (43) 公開日 平成21年9月10日 (2009.9.10) 審査請求日 平成22年7月1日 (2010.7.1)	(73) 特許権者 306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号 (74) 代理人 100080159 弁理士 渡辺 望稔 (74) 代理人 100090217 弁理士 三和 晴子 (72) 発明者 木村 俊仁 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 審査官 上田 泰
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検出物質の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検出面に光を所定の入射角で入射させることで発生する増強場を利用して試料内の被検出物質を検出する方法であって、

前記試料が供給される金属膜が一面上に配置されるプリズムと前記金属膜との境界面で全反射する角度で、前記プリズムに、前記試料によらず前記金属膜に増強場を発生させる所定の波長域におけるスペクトルの最大強度が最低強度の1.1倍以下のスペクトル分布を有する光を入射させて、前記金属膜近傍で発生した光を検出する被検出物質の検出方法。

【請求項2】

前記所定の波長域は、波長幅が15nm以上である請求項1に記載の被検出物質の検出方法。

【請求項3】

前記プリズムに入射するスペクトル分布を有する光は、光源から射出された光を、スペクトル調整手段を用いて生成する請求項1または2に記載の被検出物質の検出方法。

【請求項4】

前記光源は、白色光を射出する光源である請求項3に記載の被検出物質の検出方法。

【請求項5】

前記スペクトル調整手段は、波長毎に透過率の異なるフィルタである請求項3または4に記載の被検出物質の検出方法。

【請求項 6】

前記プリズムに入射するスペクトル分布を有する光は、光源から射出され、

前記光源から射出された光を、前記光源から射出された光を集光する集光レンズ及び前記光源から射出された光を P 偏光方向に偏光する偏光フィルタを用いて、前記プリズムと前記金属膜との境界面で全反射する角度で前記プリズムに入射させる請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の被検出物質の検出方法。

【請求項 7】

前記光源は、互いに異なる波長の光を射出する複数の個別光源を有し、前記個別光源から射出される光を合波し、所定の波長域におけるスペクトルの最大強度が最低強度の 1 . 1 倍以下となるスペクトル分布の光を射出する請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の被検出物質の検出方法。

10

【請求項 8】

前記光検出の検出結果に基づいて、前記試料内の前記被検出物質の濃度を算出する算出手段を有する請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の被検出物質の検出方法。

【請求項 9】

前記被検出物質は、蛍光性を有する物質、または、蛍光性を有する物質で標識された物質である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の被検出物質の検出方法。

【請求項 10】

前記スペクトル分布を有する光の所定の波長域におけるスペクトルの最大強度が最低強度の 1 . 03 倍以下である請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の被検出物質の検出方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検出面に光を所定の入射角で入射させることで発生する増強場を利用して被検出物質を検出する被検出物質の検出方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

バイオ測定（生体分子反応の測定）等において被検出物質を高感度かつ容易に検出（または測定）する方法としては、特定波長の光により励起され蛍光を発する蛍光物質（つまり、蛍光性を有する物質）からの蛍光を検出することで、被検出物質を検出（または測定）する蛍光法がある。

30

この蛍光法は、例えば、被検出物質が蛍光物質の場合は、被検出物質を含むと考えられる検査対象試料に特定波長の励起光を照射し、そのときの蛍光を検出することによって被検出物質の存在を確認する方法である。

また、蛍光法は、被検出物質が蛍光物質ではない場合も、被検出物質と特異的に結合する特異的結合物質を蛍光物質で標識し、この特異的結合物質を被検出物質に結合させ、その後上記と同様にして、蛍光（具体的には、被検出物質と結合した特異的結合物質を標識する蛍光物質の蛍光）を検出することにより、被検出物質の存在を確認することができる。

【0003】

40

また、蛍光法を用い被検出物質をさらに高感度に検出する方法としては、蛍光物質を励起させるために金属膜の表面プラズモン共鳴による増強電場を利用する方法が提案されている（例えば、特許文献 1、特許文献 2 及び特許文献 3）。

【0004】

特許文献 1、特許文献 2 及び特許文献 3 に記載された方法は、いずれも、蛍光物質により標識された被検出物質を金属膜の近傍に配置した状態で、金属薄膜とプリズム（半円柱プリズム、三角形ガラスプリズム）との境界面に、プラズモン共鳴条件を満たす角度（プラズモン共鳴角）で光を入射させて金属薄膜に増強された電場を発生させ、金属薄膜近傍にある物質を強く励起し、蛍光を増幅させるというものであり、表面プラズモン増強蛍光（以下「SPF」ともいう。）を利用した蛍光検出法である。

50

【 0 0 0 5 】

ここで、特許文献 2 に記載されているように、表面プラズモンの電場は、金属表面に強く局在し、かつ、金属表面からの距離に応じて指数関数的に減衰するため、金属表面に吸着固定されている蛍光標識抗体（つまり蛍光物質）のみを選択的かつ高確率で励起することができる。これにより、特許文献 2 に記載されているように、SPF を利用した蛍光検出法を用いることで、界面から離れた位置にある妨害物質の影響を最小限に抑制することができ、高精度に被検出物質を検出することも可能になる。

【 0 0 0 6 】

また、特許文献 2 及び特許文献 3 は、金属膜が載置されたプリズムの角度を調整する回転機構を設け、この回転機構によりプリズムの角度を調整することで、光源から射出された光を最適なプラズモン共鳴角でプリズムに入射させることが記載されている。

10

【 0 0 0 7 】

また、表面プラズモン増強効果を利用して、被検出物質を検出する方法としては、表面プラズモンにより励起された蛍光を検出する方法以外にも散乱光を検出する方法がある。

特許文献 4 には、プリズムの表面に金属膜と、金属膜の表面に配置された抗原・抗体反応により被検出物質をトラップする機能薄膜と、この機能薄膜に触れる状態で試料液を供給するフローセルとを有する表面プラズモンセンサが記載されている。

この表面プラズモンセンサは、金属膜上に表面プラズモン増強効果を利用して励起された表面プラズモンの電場が、機能薄膜に存在している被検出物質により乱されることで生じる散乱光を検出することで、被検出物質を検出している。このように、蛍光ではなく、散乱光を検出する方法でも、被検出物質を検出することができる。

20

【 0 0 0 8 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 2 - 6 2 2 5 5 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 1 - 2 1 5 6 5 号公報

【特許文献 3】特開 2 0 0 2 - 2 5 7 7 3 1 号公報

【特許文献 4】特開平 1 0 - 7 8 3 9 0 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

ここで、表面プラズモンのプラズモン共鳴条件は、照明光の波長、金属膜への入射角、プリズムの屈折率や凹凸、金属膜の誘電率、厚みや粗密度、金属膜上に配置される試料の種類、状態、等により変化する。しかしながら、最大の増強度で再現性よく検出をするために、特許文献 2 及び 3 に記載されているような、回転機構を設け、基板及びプリズムを回転させ、最適角度を検出する方法では、装置コストが高くなり、また、最適角度を検出している感に、金属膜上の蛍光物質の蛍光量が減少していくという問題があった。

30

また、光の入射角度を調整する機構を設ける代わりに、上記の物理定数や位置関係を保障（一定状態に維持）するための温度調整と、各部材の形状を同一にすることも考えられるが、装置や、チップの製造設備が高価となり、特に低コスト化の要求が厳しい血液診断用途では受け入れられない。

こういった問題が、プラズモンを用いたセンシング装置の実用化の実現を阻む要因だった。

40

【 0 0 1 0 】

これに対して、特許文献 1 ~ 3 に記載したような SPF を利用した蛍光検出法及び特許文献 4 に記載した被検出物質が表面プラズモンを乱すことで生じる散乱光を検出する検出法では、特許文献 1 に記載されているように、光源から射出された光をレンズ等で集光し所定の角度幅の光にして、金属膜に入射させることで、一定の角度幅の光を金属膜に入射させる。このように、一定角度幅の光を入射させ、その収束角度内での角度調整を不要とすることでコストダウンを図っている。

【 0 0 1 1 】

しかしながら、光源から射出される光は、光束の位置（例えば、光束中心からの距離）

50

によって光の強度が変化する（つまり、強度分布がある）ため、表面プラズモン共鳴が発生する角度が変化することで、表面プラズモンがつくる電場の強度が変化してしまうという問題がある。

また、蛍光物質による蛍光は、同一の蛍光物質であっても表面プラズモンがつくる電場の強度によって変化するため、表面プラズモンがつくる電場の強度が変化してしまうと、同一、同量の蛍光物質であっても蛍光の光量に変化し検出値が変化してしまうため、検出の精度が下がり、再現性が低下するという問題がある。

また、表面プラズモンがつくる電場を利用して被検出物質を検出する場合に限らず、検出面に光を所定の入射角で入射させることで発生する増強場を利用して被検出物質を検出する場合にも、同様の問題がある。

10

【0012】

本発明の目的は、上記従来技術に基づく問題点を解消し、試料中の被検出物質を高精度かつ再現性高く検出することができる被検出物質の検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記課題を解決するために、本発明は、検出面に光を所定の入射角で入射させることで発生する増強場を利用して試料内の被検出物質を検出する方法であって、前記試料が供給される金属膜が一面に配置されるプリズムと前記金属膜との境界面で全反射する角度で、前記プリズムに、前記試料によらず前記金属膜に増強場を発生させる所定の波長域におけるスペクトルの最大強度が最低強度の1.1倍以下のスペクトル分布を有する光を入射させて、前記金属膜近傍で発生した光を検出する被検出物質の検出方法を提供するものである。

20

【0014】

ここで、前記プリズムに入射するスペクトル分布を有する光は、光源から射出された光を、スペクトル調整手段を用いて生成するのが好ましい。

また、前記所定の波長域は、波長幅が15nm以上であることが好ましい。

また、前記光源は、白色光を射出する光源であることも好ましい。

前記スペクトル調整手段は、波長毎に透過率の異なるフィルタであることが好ましい。

【0015】

さらに、前記プリズムに入射するスペクトル分布を有する光は、光源から射出され、前記光源から射出された光を、前記光源から射出された光を集光する集光レンズ及び前記光源から射出された光をP偏光方向に偏光する偏光フィルタを用いて、前記プリズムと前記金属膜との境界面で全反射する角度で前記プリズムに入射させるのが好ましい。

30

【0016】

ここで、前記光源は、互いに異なる波長の光を射出する複数の個別光源を有し、前記個別光源から射出される光を合波し、所定の波長域におけるスペクトルの最大強度が最低強度の1.1倍以下となるスペクトル分布の光を射出することが好ましい。

【0017】

また、前記光検出の検出結果に基づいて、前記試料内の前記被検出物質の濃度を算出する算出手段を有することが好ましい。

40

また、前記被検出物質は、蛍光性を有する物質、または、蛍光性を有する物質で標識された物質であることが好ましい。

さらに、前記スペクトル分布を有する光の所定の波長域におけるスペクトルの最大強度が最低強度の1.03倍以下であるのが好ましい。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、光源から所定波長幅の光を射出させ、スペクトル調整手段によりプリズムに入射する光を所定波長幅において最高強度と最低強度との差が小さい光とすることで、任意の波長において表面プラズモン増強効果が発生するプラズモン共鳴角が測定毎に

50

変化した場合も、つまり、所定のプラズモン共鳴角となる波長が測定毎に変化した場合も、表面プラズモンに起因して発生する増強電場の強度を均一にすることができる。このように表面プラズモンに起因して発生する増強電場の強度を均一にできることで、高い再現性でかつ高精度に試料中の被検出物質を検出することができる。

また、任意の波長において表面プラズモン増強効果が発生するプラズモン共鳴角が測定毎に変化した場合、つまり、所定のプラズモン共鳴角となる波長が変化した場合も、再現性の高い検出ができることで、設計誤差の許容範囲を大きくすることができ、装置コストを安価にすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明に係る被検出物質の検出方法について、添付の図面に示す実施形態を基に詳細に説明する。

【0020】

図1は、本発明の被検出物質の検出方法を実施するセンシング装置の一実施形態であるセンシング装置10の概略構成を示すブロック図であり、図2(A)は、図1に示したセンシング装置10の光源12、入射光光学系14、サンプルユニット16の概略構成を示す上面図であり、図2(B)は、図2(A)のB-B線断面図である。

【0021】

図1、図2(A)及び(B)に示すようにセンシング装置10は、基本的に、所定波長幅の光を射出する光源12と、光源12から射出された光(以下「励起光」ともいう。)を導光し集光する入射光光学系14と、光源12から射出された光のスペクトルを調整するスペクトル調整手段15と、被検出物質84を含有する試料(つまり測定対象)82を保持し、入射光光学系14により集光された光が入射されるサンプルユニット16と、サンプルユニット16の測定位置から射出される光を検出する光検出手段18と、光検出手段18の検出結果に基づいて被検出物質を検出する(つまり、光検出手段18で検出した信号をデジタル化し被検出物質の有無、濃度を判断する)算出手段20とを有し、試料82に含有されている被検出物質84を検出(及び測定)する。

また、センシング装置10は、さらに、励起光を変調するファンクションジェネレータ(以下「FG」ともいう。)24と、FG24で発生された電圧に比例した電流を光源12に流す光源ドライバ26とを有する。

ここで、FG24は、High、Lowの電圧の繰り返しクロックを発生する信号発生器である。FG24が信号を光源ドライバ26に流し、光源ドライバ26がその電圧に比例した電流を光源12に流すことで、光源12は、クロックに応じて変調された光を発光する。また、FG24のクロックは、ロックインアンプ64に接続されており、ロックインアンプ64は、FG24から流されるクロックと同期した信号のみを光検出手段18の出力から取り出す。

また、図示は省略したが、センシング装置10の各部は互いの位置関係を固定するために支持機構により支持されている。

【0022】

光源12は、所定の波長幅の光を射出する光射出装置であり、本実施形態では、ピークが660nmとなる強度分布の光を射出するLED(スタンレー社製EBR3368S)を用いている。

【0023】

入射光光学系14は、コリメータレンズ30と、シリンドリカルレンズ32と、偏光フィルタ34とを有し、励起光の光路において、光源12側からコリメータレンズ30、シリンドリカルレンズ32、偏光フィルタ34の順で配置されている。したがって、光源12から射出された光は、コリメータレンズ30、シリンドリカルレンズ32、偏光フィルタ34をこの順で透過し、その後、サンプルユニット16に入射する。

【0024】

コリメータレンズ30は、光源12から射出され、所定角度で放射状に拡散する光を平

10

20

30

40

50

行光に変換する。

シリンダリカルレンズ32は、図2(A)及び(B)に示すように、後述するサンプルユニットの流路の長手方向に平行な方向が軸方向となる柱状レンズであり、コリメータレンズ30により平行光とされた光を柱状の軸に垂直な面(図2(B)に示す面と平行な面)のみに集光させる。

偏光フィルタ34は、透過した光を後述するサンプルユニット16の反射面に対してp偏光となる方向に偏光するフィルタである。

【0025】

次に、スペクトル調整手段15は、波長域毎に透過率が異なるフィルタであり、入射光光学系14のシリンダリカルレンズ32と偏光フィルタ34との間の励起光の光路上に配置されている。スペクトル調整手段15は、光源12から射出された光のスペクトル分布を調整する。

10

ここで、図3(A)は、スペクトル調整手段15の透過率と、光源から射出される光との関係を示すグラフであり、図3(B)は、スペクトル調整手段15を通過した光のスペクトル分布と、光源から射出された光のスペクトル分布を示すグラフである。ここで、図3(A)は、横軸を波長[nm]とし、縦軸を相対強度と透過率とした。また、図3(B)は、横軸を波長[nm]とし、縦軸を相対強度とした。

【0026】

スペクトル調整手段15は、図3(A)に示すように、波長毎に透過率が異なり、光源から射出される光のスペクトル分布(強度分布)に反比例した透過率分布を有するフィルタである。つまり、スペクトル調整手段15は、光源12から射出される光の強度が強い波長域は、透過率が低く、光源12から射出される光の強度が低い波長域となるにしている。透過率が高くなる分布である。

20

スペクトル調整手段15は、上述のような透過率分布であり、図3(B)に点線で示すような波長毎に強度が異なるスペクトル分布を有する光である光源から射出された光を、波長毎に異なる透過率で透過させることで、図3(B)に実線で示すような一定波長域の強度が実質的に均一な光とする。

【0027】

次に、サンプルユニット16は、プリズム38と、金属膜40と、基板42と、透明カバー44を有し、プリズム38の一面に形成された金属膜40上に被検出物質84を含有する試料82が載置される。

30

【0028】

プリズム38は、断面が二等辺三角形となる略三角柱形状(正確には、二等辺三角形の各頂点部分を二等辺三角形の底面に垂直または平行に切断した六角柱形状)のプリズムであり、光源12から射出され入射光光学系14で集光される光の光路上に配置されている。

プリズム38は、入射光光学系14で集光された光が、3つの側面のうち二等辺三角形の2つの斜辺のうちの1つの辺で構成される面から入射する向きで配置されている。

プリズム38は、公知の透明樹脂や光学ガラスで形成することができ、例えば、日本ゼオン株式会社製Z E O N E X(登録商標)330R(屈折率1.50)を材料として形成することができる。また、プリズム38は、コストをより低くすることができるため、光学ガラスよりも樹脂で形成することが好ましく、例えば、ポリメチルメタクリレート(P M M A)、ポリカーボネイト(P C)、シクロオレフィンを含む非晶性ポリオレフィン(A P O)等の樹脂で形成することが好ましい。

40

プリズム38は、このような構成であり、入射光光学系14で集光された光を、二等辺三角形の2つの斜辺のうちの1つの辺で構成される面から入射させ、二等辺三角形の底面で構成される面で反射し、二等辺三角形の2つの斜辺のうちの他方の辺で構成される面から射出する。

【0029】

金属膜40は、プリズム38の二等辺三角形の底辺で構成される面の一部(具体的には

50

、プリズム 38 に入射した光が照射される領域を含む領域) に形成された金属の薄膜である。

ここで、金属膜 40 に用いる材料としては、Au、Ag、Cu、Pt、Ni、Al 等の金属を用いることができる。なお、試料として液体を用いる場合は、液体との反応を抑制するために Au、Pt を用いること好ましい。

また、金属膜 40 の形成方法としては、種々の方法を用いることができ、例えば、スパッタ、蒸着、めっき、貼り付け等によりプリズム 38 上に形成することができる。

ここで、図 4 は、図 2 (A) 及び (B) に示すサンプルユニット 16 の金属膜 40 の一部を拡大して示す拡大模式図である。

図 4 に示すように、金属膜 40 の表面には、被検出物質 84 と特定の結合する特異的結合物質である 1 次抗体 80 が固定されている。

【0030】

基板 42 は、プリズム 38 の二等辺三角形の底辺で構成される面に配置された板状部材であり、金属膜 40 に試料 82 を供給する流路 45 が形成されている。

流路 45 は、金属膜 40 を横断して形成された直線状の線状部 46 と、線状部 46 の一方の端部に形成され、測定時に試料 82 が供給される液溜りとなる始端部 47 と、線状部 46 の他方の端部に形成され、始端部 47 に供給され線状部 46 を通過した試料 82 が到着する液溜りとなる終端部 48 とで構成される。

また、金属膜 40 よりも始端部 47 側の線状部 46 には、蛍光物質 86 によって標識された二次抗体 88 が載置された二次抗体載置領域 49 が設けられている。

ここで、二次抗体 88 とは、被検出物質 84 と特定の結合する特異的結合物質である。

なお、本実施形態のように、光源 12 として 660 nm がピークとなる強度分布の光を射出する LED を用いる場合は、蛍光物質 86 として、励起波長が 660 nm、蛍光波長が 690 nm、粒径が ≈ 210 nm、かつ、COOH 基を有する蛍光ビーズ (Bangs Laboratories 社製、FC02F/7040)、または、最大励起波長が 650 nm、かつ、蛍光波長が 668 nm である蛍光素子 (Molecular Probes 社製、Alexa647) を用いることが好ましい。

【0031】

透明カバー 44 は、基板 42 のプリズム 38 と接している面とは反対側の面に接合された透明な板状の部材である。透明カバー 44 は、基板 42 のプリズム 38 と接している面とは反対側の面を塞ぐことで、基板 42 に形成された流路 45 を密閉している。

また、透明カバー 44 は、流路 45 の始端部 47 に対応する部分及び流路 45 の終端部 48 に対応する部分に開口が形成されている。また、透明カバー 44 は、始端部 47 (さらには終端部 48) に対応する位置に形成した開口に開閉可能な蓋を設けてもよい。

なお、サンプルユニット 16 は、基本的に以上のような構成である。ここで、プリズム 38 と、金属膜 40 と基板 42 とは、一体で形成することが好ましい。

【0032】

ここで、光源 12 と入射光光学系 14 とサンプルユニット 16 とは、入射光光学系 14 からプリズム 38 に入射した光をプリズム 38 と金属膜 40 との境界面で全反射させてプリズムの他方の面から射出させる位置関係で配置されている。

【0033】

光検出手段 18 は、検出光光学系 50 と、フォトダイオード (以下「PD」という。) 52 と、フォトダイオードアンプ (以下「PDアンプ」という。) 54 とを有し、サンプルユニット 16 の金属膜 40 上の光 (つまり、金属膜 40 上にある試料 82 から射出される光) を検出する。

【0034】

検出光光学系 50 は、第 1 レンズ 56 と、カットフィルタ 58 と、第 2 レンズ 60 と、これらを支持する支持部 62 とを有し、金属膜 40 上 (より正確には金属膜 40 の近傍) から射出されている光を集光し、PD 52 に入射させる。また、検出光光学系 50 は、金

10

20

30

40

50

属膜 40 で発光された光の光路上において、金属膜 40 側から順に第 1 レンズ 56、カットフィルタ 58、第 2 レンズ 60 の順に互いに所定間隔離間して配置されている。

【0035】

第 1 レンズ 56 は、コリメータレンズであり、金属膜 40 に対向して配置されており、金属膜 40 上で発光し、第 1 レンズ 56 に到達した光を平行光にする。

カットフィルタ 58 は、励起光と同一波長の光を選択的にカットし、励起光と異なる波長の光（例えば、蛍光物質 86 に起因する蛍光等）を通過させる特性を有するフィルタであり、第 1 レンズ 56 で平行光とされた光のうち、励起光と異なる波長の光のみを通過させる。

第 2 レンズ 60 は、集光レンズであり、カットフィルタ 58 を透過した光を集光し、P D 52 に入射入射させる。

支持部 62 は、第 1 レンズ 56 と、カットフィルタ 58 と、第 2 レンズ 60 と互いに所定間隔離間させて一体的に保持する保持部材である。

【0036】

P D 52 は、受光した光を電気信号に変換する光検出器であり、第 2 レンズ 60 で集光され、入射した光を電気信号に変換する。また P D 52 は、変換した電気信号を検出信号として P D アンプ 54 に送る。

P D アンプ 54 は、検出信号を増幅する増幅器であり、P D 52 から送られた検出信号を増幅し、算出手段 20 に送る。

【0037】

算出手段 20 は、ロックインアンプ 64 と P C（つまり演算部）66 とを有し、検出信号から被検出対象の質量、濃度等を算出する。

【0038】

ロックインアンプ 64 は、検出信号のうち参照信号と等しい周波数成分を増幅する増幅器であり、P D アンプ 54 により増幅された検出信号のうち、F G 24 から送られた参照信号と同期する信号成分を増幅する。ロックインアンプ 64 で増幅された検出信号は、P C 66 に流される（出力される）。

【0039】

P C 66 は、ロックインアンプ 64 から供給された検出信号をデジタル信号に変換し、変換した信号に基づいて、試料中の被検出物質の濃度を検出する。ここで、試料中の被検出物質の濃度は、被検出物質の個数と液量との関係から算出することができる。また、被検出物質の個数は、個数既知の被検出物質を用いて検出信号の強度と被検出物質の個数との関係を算出し検量線を作成しておくことで算出することができる。なお、サンプルユニット 16 の基板 42 の流路 45 に供給する試料の液量を一定量とすること（または、一定量となるように設計すること）で、簡単かつ正確に濃度を算出することができる。

センシング装置 10 は、基本的に以上のような構成である。

【0040】

以下、センシング装置 10 の作用について説明することで本発明をより詳細に説明する。図 5 (A) ~ (C) は、それぞれ、サンプルユニット 16 での試料 82 の流れを示す説明図であり、図 6 は、試料 82 が到達した金属膜 40 の一部を拡大して示す拡大模式図である。

【0041】

まず、図 5 (A) に示すように、サンプルユニット 16 の基板 42 の流路 45 の始端部 47 に、被検出物質 84 を含有する試料 82 を滴下する。

始端部 47 に滴下された試料 82 は、毛細管形状により、線状部 46 及びガラスカバー 44 で形成された管の中を終端部 48 に向けて移動する。

【0042】

始端部 47 から終端部 48 に向けて線状部 46 を移動する試料 82 は、図 5 (B) に示すように、線状部 46 の二次抗体載置領域 49 に到達する。試料 82 が二次抗体載置領域 49 に到達すると、試料 82 に含有されている被検出物質 84 と二次抗体載置領域 49 に

10

20

30

40

50

載置されている二次抗体 88 との間で抗原抗体反応がおき、被検出物質 84 と二次抗体 88 とが結合する。また、この二次抗体 88 は、蛍光物質 86 により標識されているため、二次抗体 88 と結合した被検出物質 84 は、蛍光物質 86 により標識された状態となる。

【 0043 】

二次抗体載置領域 49 を通過した試料 82 は、線状部をさらに終端部 48 側に移動し、金属膜 40 に到達する。試料 82 が金属膜 40 に到達すると、図 6 に示すように、試料 82 に含有されている被検出物質 84 と金属膜 40 上に固定されている一次抗体 80 との間で抗原抗体反応がおき、被検出物質 84 が一次抗体 80 に捕捉される。ここで、一次抗体 80 に捕捉された被検出物質 84 は、二次抗体載置領域 49 で蛍光物質 86 により標識された状態であるため、被検出物質 84 を捕捉した一次抗体 80 は、蛍光物質 86 で標識された状態となる。つまり、被検出物質 84 は、一次抗体 80 と二次抗体 88 とでサンドイッチされた状態となる。

10

【 0044 】

金属膜 40 を通過した試料 82 は、終端部 48 まで移動する。また、一次抗体 80 により捕捉されなかった被検出物質 84、被検出物質 84 に結合されなかった二次抗体 88 及び蛍光物質 86 も試料 82 とともに終端部 48 まで移動する。

これにより、図 5 (C) に示すように、金属膜 40 上に二次抗体 88 と結合し、蛍光物質 86 により標識され、かつ一次抗体 80 に捕捉された被検出物質 84 が残った状態となる。

【 0045 】

20

このように、金属膜 40 上に蛍光物質 86 により標識された二次抗体 88 と被検出物質 84 と固定化された一次抗体 80 のみが残った状態となったら、金属膜 40 に励起光を照射する。

具体的には、FG24 で決定された強度変調信号に基づいて光源ドライバ 26 から流れる電流に基づいて、光源 12 から励起光を射出させる。励起光は、光源 12 から射出された後、入射光光学系 14 及びスペクトル調整手段 15 を透過する。具体的には、励起光は、コリメータレンズ 30 により平行光とされ、その後、シリンドリカルレンズ 32 により一方向のみ集光され、スペクトル調整手段 15 により一定波長幅の強度が実質的に均一にされ、偏光フィルタ 34 により偏光される。

入射光光学系 14 及びスペクトル調整手段 15 を通過した光は、プリズム 38 に入射され、所定の角度幅の光としてプリズム 38 と金属膜 40 との境界面に到達し、プリズム 38 と金属膜 40 との境界面で全反射され、プリズム 38 から射出される。なお、シリンドリカルレンズ 32 は、プリズム 38 と金属膜 40 との境界面を一定距離越えた位置が焦点となるように集光する。

30

また、コリメータレンズ 30 により生成された平行光を、シリンドリカルレンズ 32 により一方向のみに集光することで、プリズム 38 と金属膜 40 との境界面の線状部 46 の延在方向に平行な方向には、同一角度の光を入射することができる。

【 0046 】

励起光がプリズム 38 と金属膜 40 との境界面で全反射されることで、金属膜 40 の流路 45 側の面 (プリズム 38 側とは反対側の面) に、エバネッセント波が滲み出し、このエバネッセント波により、金属膜 40 中に表面プラズモンが励起される。この表面プラズモンにより金属膜 40 の表面に電界分布が生じ、電場増強領域が形成される。

40

このとき、所定の角度幅で入射された励起光のうち、プリズム 38 と金属膜 40 との境界面に所定角度 (具体的には、プラズモン共鳴条件を満たす角度) した入射した励起光により発生した、エバネッセント波と表面プラズモンとが共鳴し、表面プラズモン共鳴 (プラズモン増強効果) が発生する。このように、表面プラズモン共鳴 (プラズモン増強効果) が発生した領域では、より強い電場増強が形成される。ここで、プラズモン共鳴条件とは、入射された光により発生したエバネッセント波の波数ベクトルと、表面プラズモンの端数とが等しくなり、波数整合が成立する条件であり、上述したように、試料の種類、試料の状態、金属膜の厚み、密度、励起光の波長、入射角度等種々の条件に基づいて決まる

50

。なお、本発明において、プラズモン共鳴角及び励起光の入射角は、金属面に垂直な線とのなす角である。

【0047】

このとき、エバネッセント波の滲み出している領域において蛍光物質86がある場合、励起されて蛍光を発生させる。また、エバネッセント波が染み出している領域とほぼ同等の領域に存在する表面プラズモンによる電場増強の効果、特に、表面プラズモン共鳴により増強された電場増強の効果により、この蛍光が増強される。

なお、エバネッセント波の滲み出し領域外の蛍光物質は励起されないため、蛍光を発生させない。

このようにして、金属膜40上に固定された被検出物質84を標識する蛍光物質86の蛍光は、励起され、増強される。

蛍光物質86から射出された光は、光検出手段18の第1レンズ56に入射し、カットフィルタ58を透過し、第2レンズ60で集光され、PD52に入射され電気信号に変換される。また、第1レンズ56に入射した光のうち励起光を同一波長の光は、カットフィルタ58を透過できないため、励起光成分は、PD52まで到達しない。

【0048】

PD52で生成された電気信号は、検出信号として、PDアンプ54で増幅され、ロックインアンプ64で、参照信号と同期する信号成分を増幅する。これにより、励起光に起因して発生した光を増幅することができるため、その他のノイズ成分(例えば、部屋の蛍光灯、装置内のセンサーの光など、検出光光学系50以外からPD52に入射した光や、PDで発生する暗電流)と蛍光物質86から射出された光とを確実に識別することができる。

ロックインアンプ64で増幅された検出信号は、PC66に送られる。

PC66は、信号をA/D変換し、あらかじめ記憶していた検量線に基づき、被検出物質84の算出結果から、試料82中の被検出物質84の濃度を検出する。

センシング装置10は、以上のようにして、試料82中の被検出物質84の濃度を検出する。

【0049】

センシング装置10によれば、光源12から所定波長幅の光を射出させ、スペクトル調整手段15により所定波長域内における各波長の強度を実質的に均一(つまり、最高強度と最低強度の差が小さいスペクトル分布)にすることで、プラズモン共鳴角がずれた場合でも、強度差の少ない増強電場を発生させることができる。

【0050】

以下、図7を用い波長とプラズモン共鳴角の関係について、より詳細に説明する。ここで、図7は、単波長の励起光の入射角度と境界面での反射率との関係を示すグラフであり、横軸を入射角度[°]とし、縦軸を反射率とした。ここで、反射率とは、プリズム38と金属膜40との境界面に入射した光の強度に対する、プリズム38と金属膜40との境界面で反射された光の強度の割合である。また、プリズム38と金属膜40との境界面で反射されなかった光は、表面プラズモンに変換されている。したがって、反射率が低いほど(境界面で反射される光の量が少ないほど)、より強い表面プラズモンが発生し、より強い増強電場が形成されていることになる。

【0051】

また、図7には、金属膜を厚さ50nmの金で形成し、試料として水を用い、プリズムとして屈折率 $n = 1.60$ のプリズムを用い、励起光として、波長 = 656nmの光を用いた測定例1、金属膜、試料、励起光は、測定例1と同一とし、プリズムとして屈折率 $n = 1.65$ のプリズムを用いた測定例2、さらに、金属膜、試料は、測定例1と同一とし、プリズムとして屈折率 $n = 1.65$ のプリズムを用い、励起光として、波長 = 701nmの光を用いた測定例3の測定結果を示す。

【0052】

測定例1と測定例2に示すように、サンプルユニット(測定例では、プリズムの屈折率

10

20

30

40

50

)が異なると、表面プラズモンへの変換効率が最も高い角度、つまり共鳴角が変化する。そのため、同一角度で同一強度の励起光を入射させた場合でもサンプルユニットにより表面プラズモンの発生量が変化することになる。具体的には、入射角度を63度で光を入射させた場合、測定例1の場合よりも測定例2の場合の方が反射率が10%上がるため、表面プラズモンの強度が下がることになる。

次に、測定例1と測定例3に示すように、サンプルユニットが異なる場合も、励起光の波長を調整することにより、同様の反射率の分布とすることができる。つまり、入射角は変化させずに射出する光の波長を変化させることで、表面プラズモンに起因する増強電場強度を同一にすることができる。

つまり、プラズモン共鳴角は、波長によっても変化するため、異なるサンプルユニットを用い、任意の波長におけるプラズモン共鳴角が変化した場合でも、励起光の波長を変化させることで、同一の入射角で、同じ量だけ、表面プラズモン共鳴に起因する増強電場を発生させることができる。

【0053】

ここで、センシング装置10は、一定幅の波長域の光を実質的に均一な強度で入射させることで、サンプルユニットの任意の波長におけるプラズモン共鳴角が異なる場合でも、一定幅の波長域の中で同一の反射率分布の波長を含むことができる。つまり、センシング装置10は、サンプルユニット毎に、光の入射角がプラズモン共鳴角となる波長が異なる場合でも、所定波長幅の光を入射させているため、表面プラズモン増強効果を発生させることができる。また、所定波長幅の光を入射させることで、表面プラズモン増強効果を効率よく発生させる波長の前後の波長も、サンプルユニット毎に入射することができるため、サンプルユニットによらず、表面プラズモンに起因して発生する増強電場の強度を実質的に同一にすることができる。

【0054】

このように、サンプルユニットによらず(ある波長における表面プラズモンの共鳴角によらず)、金属膜上に発生する表面プラズモンに起因して発生する増強電場の強度を実質的に均一にできることで、蛍光物質の蛍光を増強する増強電場の強度を一定にすることができる。したがって、任意の波長におけるプラズモン共鳴角の角度が異なるサンプルユニットで測定した場合(条件が異なる測定の場合)でも、被検出物質の量、濃度に対する検出信号の強度が一定となる。

これにより、再現性の高い測定をすることができ、被検出物質の量、濃度を正確に検出(もしくは測定)することができる。

また、プラズモン共鳴角を検出する必要がないため、短時間で検出することができる。また、条件設定のために、測定前に蛍光物質を励起することもないため、蛍光物質の蛍光の強度が低下することも防止できる。

【0055】

また、プラズモン共鳴角は、金属膜上に配置される試料や、被検出物質によっても変化するが、本発明のセンシング装置のよれば、一定の波長幅の光を、差のない強度で入射できることで、異なる試料、被検出物質を用いてプラズモン共鳴角が変化した場合も角度調節することなく、同一の装置で検出することができる。

例えば、1つのセンシング装置で、試料として尿を用い尿の中の被検出物質を検出することも、試料として血液を用い、血液の中の被検出物質を検出することもできる。

このように本発明によれば、検出する対象もより多くすることができる。また、プラズモン共鳴角によらず、表面プラズモンに起因して発生する増強電場の強度を一定にすることができるため、検出物質によって、検出精度にバラツキが生じることを防止できる。

【0056】

また、任意の波長におけるプラズモン共鳴角の角度が異なるサンプルユニットで再現性の高い測定を可能となることで、サンプルユニットの許容誤差を大きくすることができるため、サンプルユニットを安価に製造することが可能となる。

【0057】

また、スペクトル調整手段（本実施形態ではフィルタ）を設けるという簡単な構成で、被検出物質の量、濃度を正確に検出（もしくは測定）することが可能となるため、回転機構等を用いるよりも装置を安価にすることができる。

【0058】

ここで、本実施形態では、スペクトル調整手段をシリンドリカルレンズと偏光フィルタとの間に配置したが、スペクトル調整手段の配置位置は、光源とサンプルユニットとの間の励起光の光路上にあれば特に限定されず、コリメータレンズよりも光源側でもよく、また、コリメータレンズとシリンドリカルレンズの間でも、偏光フィルタよりもプリズム側でもよい。

【0059】

また、より正確に被検出物質の検出、測定を行うことができるため、上記実施形態のように、スペクトル調整手段が、所定波長域におけるスペクトル分布が実質的に均一となるように調整することが最も好ましいが、所定波長域において、スペクトルの最大強度が最低強度が1.1倍以下となるスペクトル分布にすることで、表面プラズモンの強度を実質的に均一にすることができる。また、表面プラズモンに起因して発生する増強電場の強度をより均一にすることができるため、スペクトル調整手段は、所定波長域において、スペクトルの最大強度が最低強度が1.03倍以下となるスペクトル分布とすることが好ましい。

【0060】

また、上記実施形態では、光源として、一定波長域の光を射出するLED光源を用いたが、本発明はこれに限定されず、一定長さの波長域の光を射出する光源、より具体的には、試料によらず金属膜にプラズモン増強効果を発生させる所定の波長域を含む波長域の光を射出する光源であればよく、種々の光源を用いることができる。

ここで、試料によらず金属膜にプラズモン増強効果を発生させる所定の波長域とは、想定されるサンプルユニット、試料のいずれの組み合わせとしても、波長域の中にセンシング装置の光の入射角がプラズモン共鳴角となる波長を含むように設定する波長域である。

ここで、所定の波長域は、波長幅を15nm以上とすることが好ましい。波長幅を上記範囲にすることで、プラズモン共鳴角がずれた場合も均一な強度の電場を形成することができる。

また、光源としては、図8に示すようなスペクトル分布の光、つまり、白色光を射出する白色光源（例えば、白色LED）も好適に用いることができる。なお、図8に示す白色光源のスペクトル分布は、25 の場合のスペクトル分布である。

図8に示すように白色光源は、広範囲はスペクトル分布の光であるため、光源として白色光を用い、スペクトル調整手段で、強度を均一にすることで、より多くの種類のサンプルユニット、試料に対応させることができ、また、許容誤差をより広くすることができる。

【0061】

ここで、センシング装置10では、光源として一定波長域の光を射出する光源を用い、かつ、スペクトル調整手段により光源から射出された光のスペクトルの強度を調整したが、本発明はこれに限定されない。

例えば、光源にスペクトル調整手段を組み合わせ、所定の波長域のスペクトルの強度が実質的に均一の光を射出する光源としてもよい。

具体的には、光源として互いに波長の異なる光を射出する複数のLEDを用い、各LEDから射出される光を合波することで、所定の波長域のスペクトルの強度が実質的に均一の光を射出するようにしてもよい。

なお、ハイパスフィルタや、ローパスフィルタ、バンドパスフィルタ等により、各LEDから射出される光の各波長の強度を調整することで、合波させる場合も各波長における強度を調整することができる。

【0062】

ここで、蛍光物質は、波長によって蛍光の励起効率が変化するため、スペクトル調整手

10

20

30

40

50

段は、蛍光物質の励起スペクトル及び励起光率に基づいて、励起光のスペクトルを調整することが好ましい。

また、表面プラズモン共鳴は、励起光の波長によって共鳴角が変化することに加え、電場の増強度も、波長毎に変化する。一般的に励起光が長波長となるに従って増強度は、高くなる。そのため、スペクトル調整手段は、励起光の波長とその波長により発生する表面プラズモン共鳴により発生する電場の最大増強度との関係に基づいて励起光のスペクトルを調整することが好ましい。例えば、励起光の波長が高くなるに従って強度が低くなるようにすることが好ましい。これにより、より高精度に被検出物質を検出することができる。

【0063】

以上、本発明に係る被検出物質の検出方法およびこれを実施するセンシング装置について詳細に説明したが、本発明は、以上の実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、各種の改良や変更を行ってもよい。

【0064】

例えば、上述した実施形態では、いずれも入射光光学系として、コリメータレンズと集光レンズとなるシリンダリカルレンズとを設け、光源から射出された光をコリメータレンズで平行光にした後、シリンダリカルレンズで集光させたが、本発明はこれに限定されず、集光レンズのみを設け、光源から射出された光を平行光にせず集光レンズで集光させる構成としてもよい。

【0065】

また、センシング装置10では、入射光学系にシリンダリカルレンズまたは集光レンズを用い、光源から射出された光を集光したが、これに限定されず、光源から所定の放射角で射出された光を集光させずにプリズムと金属膜との境界面に入射させてもよい。

また、偏光フィルタも必ずしも設ける必要はなく、光源として予め偏光された励起光を射出する光源、例えば、レーザ光源（正確には、光波長域の光を射出するレーザ光源）を用いる場合は、光源から射出される光が偏光された光であるので、偏光フィルムは設けなくてもよい。

【0066】

また、上述した実施形態では、いずれも試料に含まれる被検出物質の個数または濃度を検出したが、本発明はこれに限定されず、試料に被検出物質が含有されるが否か（つまり、試料の中に被検出物質があるか否か）を検出してもよい。

【0067】

また、上述した実施形態では、いずれも蛍光物質に標識された二次抗体に被検出物質を結合させた状態で、表面プラズモンに起因して発生した増強電場により増強された蛍光物質の蛍光を検出し、被検出物質を検出したが、被検出物質を蛍光物質により標識する方法は特に限定されず、例えば、被検出物質自体が蛍光物質である場合は、二次抗体を設ける必要はない。

また、本発明のセンシング装置は、金属膜上に被検出物質に付着（または近傍に配置）されている状態で表面プラズモンを発生させた場合に生じる散乱光（ラマン散乱光）を検出する方式のセンシング装置にも用いることができる。

【0068】

また、上述した実施形態では、いずれも金属膜の表面にエバネッセント波及び表面プラズモンを発生させ、さらに表面プラズモン共鳴を発生させることで、増強された電場を形成させたが本発明はこれに限定されず、増強電場が形成される面への光の入射角度によって増強度が変化する（つまり、所定の入射角で光が入射したときのみ増強場が変化する）種々の方式に用いることができる。例えば、プリズム上に金膜と厚み約1 μmのSiO₂膜とを積層させ、所定角度で入射した光をSiO₂膜内で共振させることで増強された電場を形成する方式にも用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0069】

10

20

30

40

50

【図 1】本発明のセンシング装置の一実施形態の概略構成を示すブロック図である。

【図 2】(A)は、図 1 に示したセンシング装置の光源、入射光光学系、サンプルユニットの概略構成を示す上面図であり、(B)は、(A)の B - B 線断面図である。

【図 3】(A)は、スペクトル調整手段の透過率と、光源から射出される光との関係を示すグラフであり、(B)は、スペクトル調整手段を通過した光のスペクトル分布と、光源から射出された光のスペクトル分布を示すグラフである。

【図 4】図 2 (A) 及び (B) に示すサンプルユニットの金属膜の一部を拡大して示す拡大模式図である。

【図 5】(A) ~ (C) は、それぞれ、サンプルユニットでの試料の流れを示す説明図である。

10

【図 6】試料が到達した金属膜の一部を拡大して示す拡大模式図である。

【図 7】単波長の励起光の入射角度と境界面での反射率との関係を示すグラフである。

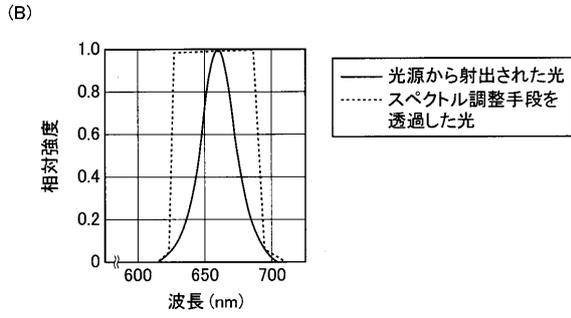
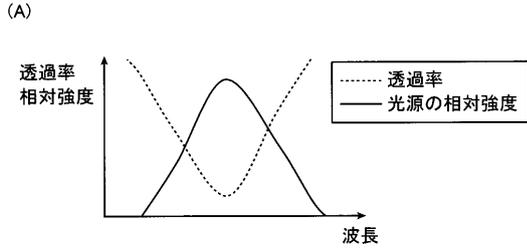
【図 8】本発明のセンシング装置に用いることができる光源の他の一例のスペクトル分布を示すグラフである。

【符号の説明】

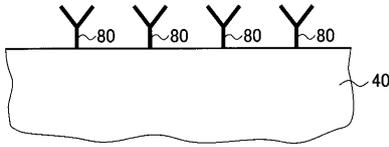
【 0 0 7 0 】

1 0	センシング装置	
1 2	光源	
1 4	入射光光学系	
1 5	スペクトル調整手段	20
1 6	サンプルユニット	
1 8	光検出手段	
2 0	算出手段	
2 4	ファンクションジェネレータ (F G)	
2 6	光源ドライバ	
3 0	コリメータレンズ	
3 2	シリンドリカルレンズ	
3 4	偏光フィルタ	
3 8	プリズム	
4 0	金属膜	30
4 2	基板	
4 4	透明カバー	
4 5	流路	
4 6	線状部	
4 7	始端部	
4 8	終端部	
4 9	二次抗体載置領域	
5 0	検出光光学系	
5 2	フォトダイオード (P D)	
5 4	フォトダイオードアンプ (P D アンプ)	40
5 6	第 1 レンズ	
5 8	カットフィルタ	
6 0	第 2 レンズ	
6 2	支持部	
6 4	ロックインアンプ	
6 6	P C	
8 0	一次抗体	
8 2	試料	
8 4	被検出物質	
8 6	蛍光物質	50

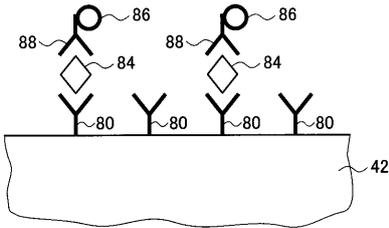
【図3】



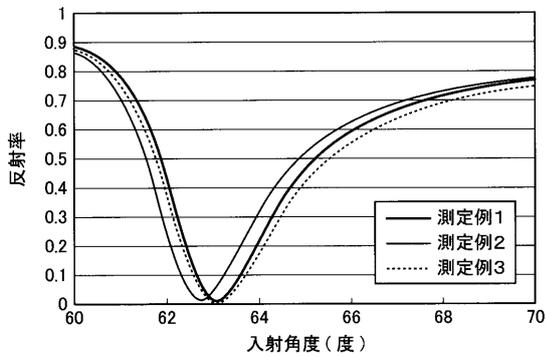
【図4】



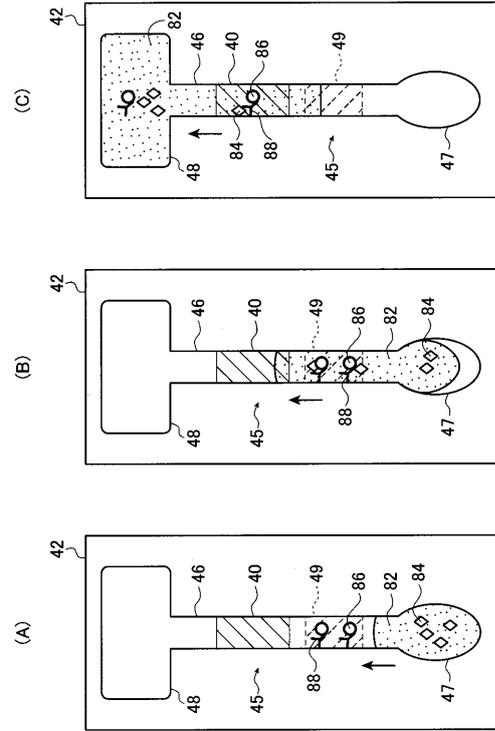
【図6】



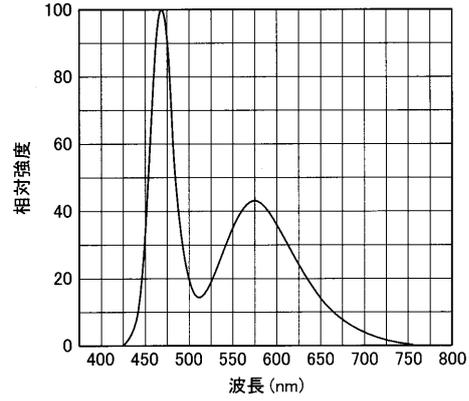
【図7】



【図5】



【図8】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2002-257722(JP,A)
特開平10-281981(JP,A)
特開平10-078390(JP,A)
特開2003-185568(JP,A)
特開2007-263901(JP,A)
特開2007-101242(JP,A)
特開平01-221666(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/17 - 21/74