

(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
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/257725 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 27/28 (2006.01) G01N 27/333 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021045

(22) 国際出願日: 2024年6月10日(10.06.2024)

(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 2023-097172 2023年6月13日(13.06.2023) JP

特願 2024-067014 2024年4月17日(17.04.2024) JP

(71) 出願人: キヤノン株式会社 (CANON KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 前田 晴信 (MAEDA Harunobu); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 山本 毅 (YAMAMOTO Takeshi); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会

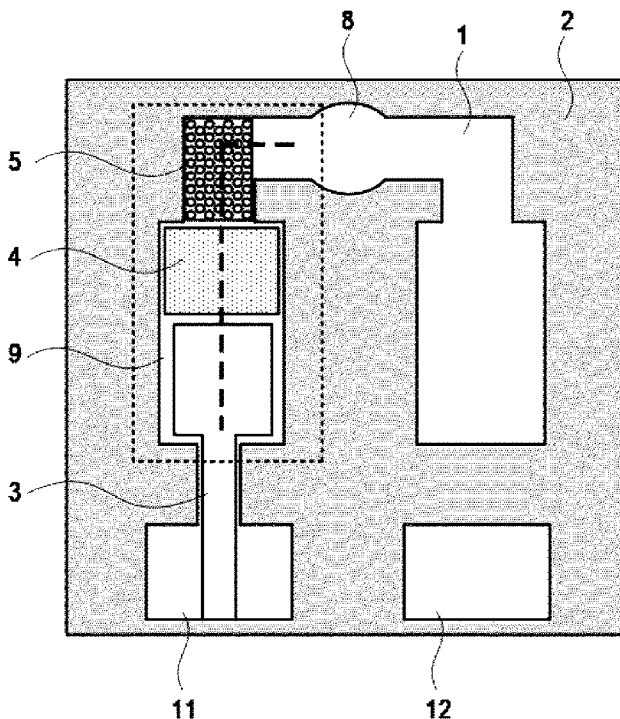
社内 Tokyo (JP). 宮 ▲崎 ▼ 啓司 (MIYAZAKI Keiji); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 深津 慎 (FUKATSU Makoto); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 三浦 淳 (MIURA Jun); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 田中 正典 (TANAKA Masanori); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 榎戸 風花 (ENOKIDO Fuka); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 岡部 譲, 外 (OKABE Yuzuru et al.); 〒1070062 東京都港区南青山1-1-1 新青山ビル東館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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称: 分析デバイス



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an analysis device with which it is possible to carry out analysis which is simple and has a stable measured electric potential. Provided is an analysis device having a flow path region surrounded by flow path walls provided inside of a porous substrate, said analysis device being characterized in that: the flow path region has a first flow path chamber, a second flow path chamber, and a flow path connecting the first flow path chamber and the second flow path chamber; a reference electrode is disposed in the first flow path chamber; a working electrode is disposed in the second flow path chamber; when using the advancing direction of a sample in the flow path region as a reference, a component A is disposed upstream relative to the first flow path chamber or upstream relative to a position which, when an electrolyte is disposed on the surface of the reference electrode, has the electrolyte disposed thereto; and the component A has the effect of changing the three-dimensional structure of a protein in the sample.

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 簡便で測定電位の安定した分析を行うことができる分析デバイスを提供することを目的とする。多孔質基材の内部に設けられた流路壁で囲まれた流路領域を有する分析デバイスであって、前記流路領域は、第一流路室、第二流路室、及び前記第一流路室と前記第二流路室とを繋ぐ流路を有し、前記第一流路室には、参照電極が配置されており、前記第二流路室には、作用電極が配置されており、前記流路領域における検体の進行方向を基準としたとき、前記第一流路室の上流に、又は前記参照電極の表面に電解質が配置されており、前記電解質が配置された位置の上流に、成分Aが配置されており、前記成分Aが、検体中の蛋白質の立体構造を変化させる作用を及ぼす成分であることを特徴とする。

明 細 書

発明の名称： 分析デバイス

技術分野

[0001] 本発明は、多孔質基材の内部に流路領域を形成した分析デバイス、該分析デバイスを用いた電解質濃度測定システム及び電解質濃度測定方法に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、微細流路を利用して1つのチップ内で効率的（微量、迅速、簡便）に化学分析を行うデバイスが、生化学の研究、医療、創薬、ヘルスケア、環境、食品、等の幅広い分野で注目されている。

[0003] 分析デバイスの中でも、紙を基材としたデバイスは『 μ PADs』（micro fluidic paper-based analytical devices）と呼ばれ、紙の毛細管現象を利用して検体や検査液を浸透させることで化学分析を行うことができる。このデバイスのメリットとしては、小型、低コスト、持ち運びが容易、廃棄性が高い（燃やすだけで廃棄完了）、大掛かりな装置がいらない、等が挙げられる。この新しい分析デバイスが実用化されることにより、誰でも、簡単に、低コストで、POC（point of care）による検査診断が可能になると言われている。

[0004] そのほかにも、上述の μ PADsのメリットから、医療設備が十分に整っていない途上国や過疎地、迅速な救急活動が必要な災害現場、感染症の広がりを水際で食い止めなければならない空港等での活用が期待されている。また、日常の健康状態を管理・モニタリングするヘルスケアデバイスや、通常の医療現場における様々な病理診断デバイスとしても注目を集めており、その用途は多岐にわたる。

[0005] 上記病理診断における生化学検査の一つとして電解質検査がある。電解質（Naイオン、Kイオン、Clイオン等）は、体内の水分量やpHを一定に保つことや、神経の伝達や筋肉を正常に働かすこと等、生命維持に必要不可

欠であり、電解質検査は、血中や尿中の電解質イオン濃度を測定し、体内のイオン濃度バランスを確認する検査である。

[0006] 一般的に体内の電解質濃度に変化が生じた場合、腎機能やホルモンのほたらきに異常が発生している可能性が高い。そのため、電解質検査は病気のスクリーニングに不可欠な検査である。またそのほかにも、災害現場等で患者の生理機能（生命維持）を確認する上でも大変重要な検査である。この電解質測定を $\mu PADs$ で行うことを目指す研究が様々な大学や企業で行われている。

[0007] 非特許文献1では、 Na イオン及び K イオンの濃度測定のための分析デバイスが提案されている。この分析デバイスは、検体を分注するための分注部を持ち、分注された検体が分注部から作用電極及び参照電極それぞれの領域へと浸透することによって、両電極を電氣的に接続させて電位差測定を行う。またこの分析デバイスでは、参照電極において安定した電位を得るために KCl のイオン結晶を参照電極上に堆積させており、測定時において KCl が検体へ溶解することで、参照電極領域の Cl イオンを高濃度に保持し、安定した参照電極の電位を得ることができる。また、 $\mu PADs$ ではないが（使用する基材が多孔質基材ではない）、特許文献1には、作用電極部に供給される検体液と、参照電極部に供給される基準液が液絡部で接触することで、安定した電位を得るマルチイオンセンサプレートが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開平11-194109号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Nipapan Ruecha, Orawon Chailapakul, Koji Suzuki and Daniel Citterio, “Fully Inkjet-Printed Paper-Based Potentiometric Ion-Sensing Devices”, Analytical chemistry, August 29, 2017 Published, 89, pp. 10608-10616

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかしながら、非特許文献1のような構成では、血清や血漿等、成分中に蛋白質を含む検体の測定においては、検体が電解質層（KCl層）を浸透する時に、水和している蛋白質の水和水が電解質に奪われやすく、蛋白質の塩析や凝集が発生しやすい。その結果、塩析・凝集した蛋白質が流路内の検体の浸透を阻害し、測定電位が不安定になることや測定時間が長くなることがあった。

[0011] また、特許文献1では、検体液中に含まれる疎水性物質（ヘマトクリット又はその類似物質）の分散性を維持し、その沈降（沈殿）を防止するための界面活性剤を検体に含有させる構成と、検体液側電極に至る流路に界面活性剤塗膜を設ける構成の2つの構成が開示されている。しかしながら特許文献1の構成では、あらかじめ検体液に界面活性剤を十分に混合された状態で含有させるためには、混合液を攪拌するために数mL程度の検体量が必要となり、患者の負担が大きくなる場合がある。また、流路中に界面活性剤の塗膜を設ける場合には、流路壁面に塗膜することが制約となり、流路を流れる検体に均一に接触することができず、検体液との混合が不十分になり得る。

[0012] 本発明では、蛋白質の塩析・凝集を抑制する層が適切な位置に配置されており、適切な参照電極の電位を示し、簡便で安定した分析を行うことができる分析デバイスを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明は、多孔質基材の内部に設けられた流路壁で囲まれた流路領域を有する分析デバイスであって、

前記流路領域は、第一流路室、第二流路室、
及び前記第一流路室と前記第二流路室とを繋ぐ流路を有し、
前記第一流路室には、参照電極が配置されており、
前記第二流路室には、作用電極が配置されており、
前記流路領域における検体の進行方向を基準としたとき、

前記第一流路室の上流に、又は前記参照電極の表面に電解質が配置されており、

前記電解質が配置された位置の上流に、成分 A が配置されており、

前記成分 A が、検体中の蛋白質の立体構造を変化させる作用を及ぼす成分であることを特徴とする分析デバイスに関する。

発明の効果

[0014] 本発明により、簡便で測定電位の安定した分析を行うことができる分析デバイスを提供することができる。多孔質流路に成分Aを配置することによって検体と成分Aを効果的に混合することができるので参照電極付近に配置した電解質の塩析を抑制することができ、少量の検体で検査できる効果が得られる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1A]参照電極の構成図である。

[図1B]参照電極の図 1 A の破線部の断面図である。

[図2A]従来例の構成の図 2 B の破線部の断面図である。

[図2B]従来例の構成図である。

[図3]従来例の構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図4]従来例の構成で、限外濾過した血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図5]実施例 1 の分析デバイスの構成図である。

[図6]流路パターンの構成図である。

[図7]実施例 1 の参照電極のみの構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図8]実施例 1 の参照電極のみの構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図9]実施例 1 の参照電極のみの構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図10]実施例1の参照電極と作用電極を組み合わせた構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図11]実施例1の比較例の構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図12]実施例2の参照電極のみの構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

[図13]実施例2の参照電極のみの構成で、血清検体を測定した際の電位の時間変化を示す図である。

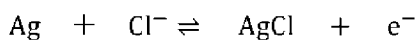
発明を実施するための形態

[0016] 本発明の作用を詳しく説明する。

本発明の電解質濃度測定における参照電極の役割は、作用電極で生じる電位に対し、基準電位となるものである。そのため、参照電極の電位が安定しなければ、参照電極と作用電極との電位差は不正確になる。

[0017] 一般的に参照電極のベース電極には Ag / AgCl 電極が用いられることが多い。 Ag / AgCl 電極では、検体との界面で下記の平衡反応が起こっており、 Cl^- の濃度によって電位が決まっている。

[化1]



よって、 Cl^- 濃度を一定にすることで、電位を安定させることができる。

[0018] したがって、飽和した塩化ナトリウム (NaCl) 溶液や塩化カリウム (KCl) 溶液においては、 Cl^- 濃度が一定なので、飽和した NaCl 溶液や KCl 溶液を Ag / AgCl 電極と反応させていれば、常に同じ界面電位が得られることになる。

検体が NaCl 溶液の場合、濃度が飽和濃度である $5.2 \text{ mol/L} \sim 5.4 \text{ mol/L}$ に到達すると、それ以上溶けることはないので、 Cl^- 濃度が一定となり、上記平衡状態に達し、電位もそれ以上変化することはなくなる。

[0019] この原理を元に、内部液タイプの参照電極では、飽和した KCl や NaCl

I が内部液として使用されている。一方、固体電極タイプの参照電極においては、基準液としてこの飽和液を Ag / AgCl 電極に直接分注し、安定した電位を確保する手法がとられている。

[0020] 固体電極タイプの参照電極を有する例として、非特許文献 1 では、図 2 A 及び図 2 B に示すように、参照電極 3 (Ag / AgCl 電極) 上に設けられた支持電解質膜 7 (検体と Ag / AgCl 電極との界面における接触電位をより安定させるために設けられる) 上に電解質層 4 (KCl 層) を積層した構成である。この構成においては、検体自体が浸透中に電解質層 4 を溶かすことで Cl^- 濃度を一定にする。そして Cl^- 濃度が一定になった検体が支持電解質膜 7 や Ag / AgCl 電極に供給されることで、基準液を用いることなく測定することが可能となる。

[0021] 同じく固体電極タイプの参照電極を有する構成である特許文献 1 では、検体とは別に基準液を分注して測定を行う手法がとられている。この手法により、安定した測定電位を得ることができるが、基準液を用いる分だけ測定の簡便さとコストが課題となりやすい。また、特許文献 1 では後述する蛋白質の凝集を防ぐために、界面活性剤を検体に含有させる構成と、検体液側電極に至る流路に界面活性剤塗膜を設ける構成の 2 つの構成が開示されている。しかしながら特許文献 1 の構成では、あらかじめ検体液に界面活性剤を十分に混合された状態で含有させるためには、混合液を攪拌するために数 mL 程度の検体量が必要となり、患者の負担が大きくなる場合がある。また、流路中に界面活性剤の塗膜を設ける場合には、流路壁面に塗膜することが制約となり、流路を流れる検体に均一に接触することができず、検体液との混合が不十分になり得る。

[0022] 電解質層を有する構成である非特許文献 1 のような構成においては以下に説明する課題がある。

それは、血清や血漿等、成分中に蛋白質を含む検体の測定においては、検体が電解質層 (KCl 層) を浸透する時に、水和している蛋白質の水和水が電解質に奪われやすく、蛋白質の塩析や凝集が発生しやすい、という点であ

る。蛋白質が塩析・凝集した結果、流路内での検体の浸透を阻害し、測定電位が不安定になることや測定時間が長くなることがあった。

[0023] 図2Bに示す従来構成のように参照電極側に電解質層を有する構成で、血清検体を測定した結果について説明する。同構成の2つのデバイスを用意し、検体として血清を用いたときデバイスにおける参照電極の電位差の測定結果を図3に示す。なお本実験では、参照電極3の性能だけに注目する為、本来、分析デバイスに作用電極6が形成される側には、作用電極6の代わりに市販の参照電極（RE-1BP、BAS株式会社）を置き、市販電極と参照電極3を検体で繋ぎ、両極間の電位差を測定した。測定結果からは分注後から100秒（s）程度までは測定電位が大きく変動していることがわかる。その後、時間経過で測定電位は変動が小さくなる方へ向かうが、安定した電位を維持することができず、200秒後には $\Delta 0.9\text{ mV}$ 程度の差が生じていることが確認できた。またこの構成においては、電解質層内での検体の浸透が不安定で遅く、流路上には凝集塊のようなものも確認された。

[0024] この測定の比較として、上記と同じ構成で血清検体を市販のフィルター（アミコンウルトラ0.5デバイス（NMWL：30K）、Merck）で限外濾過し、蛋白質等の分子を除去した上で測定した結果を図4に示す。この検体では電解質層内での浸透がスムーズであり、電位も安定していることが確認できた。

[0025] 以上の実験から、参照電極の電位を速く安定させるためには、検体が流路内で凝集しないことが必要であると確認できた。

本発明の分析デバイスは、血清や血漿等、成分内に蛋白質を含む検体の測定においても、検体の浸透が遅くならず、かつ検体のCl⁻濃度が飽和となった状態で安定して参照電極に接触することが可能なものである。

すなわち、本発明の分析デバイスは、流路領域における検体の進行方向を基準としたとき、前記電解質層が配置された位置の上流に蛋白質の塩析・凝集を抑制する層が配置されている構成を有する。

[0026] また、本発明の分析デバイスは、第一流路室及び第二流路室以外に、作用

電極が配された第三流路室などを複数有し、それらが流路で繋がっている構成であってもよい。尚、分析デバイス上に配する流路室の数は、特に制限はされない。

実施例

[0027] 以下、本発明の例示的な実施形態について図面を参照して説明する。なお、以下の実施形態は例示であり、本発明を実施形態の内容に限定するものではない。また、以下の各図においては、実施形態の説明に必要なではない構成要素については図から省略する。

[0028] <実施例 1>

実施例 1 について、図 5 ～図 8 を用いて説明する。

図 5 に実施例 1 の分析デバイスを示す。多孔質基材の内部に設けられた流路壁 2 で囲まれた流路領域を有する。流路領域は第一流路室 9、第二流路室 10、及び第一流路室 9 と第二流路室 10 とを繋ぐ流路 1 を有し、流路 1 には分注部 8 が存在する。流路領域は電極の第三流路室 11 と第四流路室 12 を有してもよいし、これらはなくてもよい。第一流路室 9 には参照電極 3 が配置されており、検体の進行方向を基準（すなわち、分注部側が上流となる）として、参照電極 3 の上流側には、電解質層 4 が配置されている。電解質層 4 を参照電極 3 の上流側に配置することによって、検体中の電解質濃度が飽和になった状態で安定して参照電極 3 に到達する。電解質層 4 の上流側には、検体中の蛋白質の立体構造を変化させる作用を有する成分 A 層 5 が配置されている。第二流路室 10 には作用電極 6 が配置されており、作用電極 6 は、作用電極のベース電極 6b とそれを覆うように設けられたイオン選択膜 6a で構成される。

[0029] 流路形成については、（特開 2021-37612 号公報）に記載された方法で行った。具体的には、熔融性に特徴を持つ流路形成用粒子（トナー）を用いて、濾紙上に所望の流路パターンを電子写真方式で未定着の状態で形成し、その後、オープンもしくはヒーターにより、流路パターンを紙の内部に浸透させることで、流路パターンを形成した。

[0030] 形成された流路パターンは図6に示すとおりであり、符号1が流路、符号2が、流路形成用粒子が浸透することで形成された流路壁である。

次いで、流路パターンに、参照電極3並びに作用電極6を、スクリーン印刷やインクジェット装置（1J）、もしくは、ディスペンサー等により形成する。本特許は参照電極に関する発明である為、参照電極中心にその構成を説明する。

[0031] 図1Aに示すように、流路パターン上に、参照電極として、 Ag/AgCl 電極をスクリーン印刷により印字し、さらに、図1A及び図1Bに示すように、流路上で且つ検体の進行方向に対し、 Ag/AgCl 電極の上流側となる位置に、電解質（ NaCl もしくは KCl ）を1Jやディスペンサーにより印字した。このような位置に電解質層（ NaCl もしくは KCl ）を配置することで、進んできた検体は必ず、電解質層を通過することになる。その際、電解質を溶かすことで、検体中の電解質の濃度（ Cl^- 濃度）が飽和となり、その状態で検体が参照電極（ Ag/AgCl 電極）に到達する。その結果、参照電極（ Ag/AgCl 電極）の電位が安定化される。

[0032] 電解質としては、塩化物が好ましく、特に、取り扱いが容易な塩化ナトリウム（ NaCl ）もしくは塩化カリウム（ KCl ）が好ましい。以下、溶解度の温度依存性がより安定している NaCl で説明する。

[0033] 電解質（ NaCl ）は参照電極手前の流路上に、参照電極3に供給される検体量1L当たり、 $3.0 \times 10^2 \text{ g/L}$ 以上、好ましくは $3.4 \times 10^2 \text{ g/L}$ 以上となるように、層状に配置した。これは、電解質の飽和濃度が検体量にも依存するため、飽和に必要な NaCl 量を参照電極3に供給される検体量で割った値となっている。参照電極3に供給される検体量1L当たり、 $3.0 \times 10^2 \text{ g/L}$ 以上の NaCl を配置すれば、 NaCl 層を通過した検体の濃度は 4.6 mol/L 以上となり、飽和に近い濃度となるため、安定した測定が可能となる。好ましくは、 $3.4 \times 10^2 \text{ g/L}$ 以上の NaCl を配置することであり、この場合、 NaCl 層を通過した検体の濃度は 5.2 mol/L 以上となり、 Cl^- の濃度が飽和した状態を保つのに十分な濃度と

なる。

- [0034] 尚、分注部8に供給される検体量は、各デバイスの大きさや性能に伴い適正な量があり、一般的には、約 $10\mu\text{L}$ ～ $50\mu\text{L}$ である。例えば、小さいデバイスの一例として、参照電極の大きさが $3\text{mm}\times 3\text{mm}$ 、作用電極6の大きさが $3\text{mm}\times 3\text{mm}$ で、紙の厚みが $200\mu\text{m}$ の場合、その間の流路の体積も含めて、流路全体の体積は $3.6\times 10^{-9}\text{m}^3$ ($3.6\mu\text{L}$) 程度である(参照電極、作用電極 各 $1.8\mu\text{L}$ ずつ)。そのため、約 $10\mu\text{L}$ の検体があれば十分に参照電極と作用電極に検体を供給できる。
- [0035] デバイスの大きさを大きくすれば、必要検体量は多くなるが、検体は人の血液や尿がベースになるので、少ない方が好ましく、一般的には $50\mu\text{L}$ 以下である。本発明は、デバイスの大きさや必要検体量に依存するものではないが、上記の理由から、検体量の範囲として約 $10\mu\text{L}$ ～ $50\mu\text{L}$ でその説明を行うものとする。
- [0036] 実施例1の分析デバイスの場合、 $10\mu\text{L}$ の検体を流路領域中央にある分注部8に分注供給し、その約半分が参照電極側に供給され、残り半分が作用電極側に供給されるので、参照電極に供給される検体量は約 $5\mu\text{L}$ となる。尚、本実施例では図1Aの第一流路室の上流に飽和濃度になる電解質を配置した。
- [0037] 例えば、参照電極に供給される検体量が $5\mu\text{L}$ の場合、 1.5mg の NaCl を配置すれば、 4.6mol/L 以上の NaCl 濃度が得られる。そのため、 NaCl を $3\text{mm}\times 3\text{mm}$ の領域に厚さ $200\mu\text{m}$ で配置する場合には、 NaCl 配置領域の単位体積あたり $8.3\times 10^5\text{g/m}^3$ 以上の NaCl を配置すれば、 NaCl 層を通過した検体の NaCl 濃度は 4.6mol/L 以上となり、飽和に近い値となる。さらに、 NaCl 配置領域の単位体積あたり $9.4\times 10^5\text{g/m}^3$ 以上の NaCl を配置すれば、 NaCl 層を通過した検体の濃度は 5.2mol/L となり、 Ag/AgCl 電極を平衡状態にするには十分な濃度となる。
- [0038] 検体が、配置された電解質(NaCl)層に届くと、配置された電解質(

NaCl)を溶かしながら参照電極(Ag/AgCl電極)の方向に進む。このとき、電解質(NaCl)層を通った検体のCl⁻の濃度は、常に飽和あるいは飽和に近い状態が保たれ、この飽和検体が、継続的に参照電極(Ag/AgCl電極)に供給されるため、安定した電位が得られることになる。

[0039] 本構成では、参照電極と電解質層とが接していないが、電解質層は参照電極と接していても良いし、参照電極の上に重なっていても良い。重要な点は、検体中の電解質の濃度が飽和になった後に、検体が参照電極に到達することである。

[0040] 電解質層4の上流側、好ましくは隣接する位置に成分A層5として界面活性剤(Tween 20、化学式: C₅₈H₁₁₄O₂₆)を含んだ水溶液をIJやディスペンサーにより印字した。これらの手法により、多孔質基材上の所望の流路領域に界面活性剤を均一に配置することができる。加えて、多孔質構造の表面積の大きさを利用することができるため、検体と界面活性剤の接触面積を(多孔質基材でない場合と比較して)大きくすることができる。紙のBET比表面積から推定すると、特許文献1の構成に対して約1000倍以上も表面積を増加させることができ、それが界面活性剤と検体の混合に有利に作用する。この流路内を検体が毛細管現象で浸透しながら繊維間で攪拌されることで、μLオーダーの少量の検体でも界面活性剤と十分に混合することができる。この時使用する多孔質基材については多孔質構造を有していれば何でも良い(濾紙、ガラス濾紙等)。重要なことは所望の流路領域に所定量の界面活性剤を均一に配置することである。また、検体使用量の観点で多孔質流路の断面に注目すると、例えば空隙率50%の基材を用いた場合、同じ断面の空洞の流路(特許文献1のような流路)と比較して、半分の検体量で流路を満たすことができる。参照電極の電位発現の原理は上述の通り、Cl⁻の濃度に依存するため、作用電極と液絡さえすれば、半分の検体量でも同等の効果が得られる。よって以上の配置により、μLオーダーの少量の検体においても、界面活性剤と混合してミセルを形成すること(蛋白質の立体構造を変化させること)で、電解質層内を浸透する際の凝集を抑制することがで

き、安定した測定電位を得ることが期待できる。界面活性剤の種類については、陽イオン性、陰イオン性、両性、非イオン性等の種類があるが、電解質測定チップに関しては、 Ag/AgCl 電極上やイオン選択膜上での電位発現を阻害しにくい非イオン性のものが好ましい。また、本実施例では界面活性剤を用いたが、蛋白質の立体構造を変化させられるものであれば何でも良く、塩（例えば、カオトロピック塩としてグアニジン塩酸塩）や酸（例えば、クエン酸）や有機溶媒（例えば、エタノール）や水溶性高分子（例えば、ポリエチレングリコール）でも良い。

[0041] 界面活性剤の層の形成においても電解質層の形成時と同様、参照電極に供給される検体量に依存する。参照電極に供給される検体量が $5\text{ }\mu\text{L}$ の場合、電解質層の NaCl を飽和濃度にしつつ、蛋白質の凝集を抑制することのできる、界面活性剤の適正量を確認するため、以下の実験を行った。

[0042] 非イオン性界面活性剤 $\text{Tween } 20$ の量を 0.012 mg 、 0.058 mg 、 0.115 g とした3種類の分析デバイスを用意し、参照電極の電位を測定した。本実験では、参照電極の性能だけに注目する為、本来、分析デバイスに作用電極が形成される側には、作用電極の代わりに市販の参照電極をおき、市販電極と参照電極を検体で繋ぎ、両極間の電位差を測定した。

[0043] 0.012 mg の結果を図7に示し、 0.058 mg の結果を図8に示し、 0.115 mg の結果を図9に示す。従来構成が200秒後の電位差 $\Delta 0.9\text{ mV}$ であるのに対して 0.012 mg 、 0.058 mg の量で改善していることがわかる。また、 0.115 mg では電位が不安定であることがわかる。これは多量の界面活性剤を塗布したことで検体の浸透が速くなりすぎてしまい、電解質層で Cl^- の飽和濃度に達することなく Ag/AgCl 電極に到達したためであると考えられる。以上から、 $\text{Tween } 20$ は過不足なく配置した方がよいことがわかる。

[0044] さらに、図5に示すように、イオン選択電極である作用電極6を片側に配置し、両電極が配置された状態にて検体を分注し、参照電極との間の電位差を測定した。結果を図10に示す。また、比較例として界面活性剤層が無い

構成の結果を図 11 に示す。図 10 の実施例 1 の構成では分注後 60 秒程度から測定電位が安定しているが、図 11 の比較例の構成では電位が不安定であることが確認できた。

[0045] 作用電極（イオン選択電極）には、ベース電極 6b 上に、目的イオンについての選択性を持つイオン選択膜 6a を積層した固体接触型のイオン選択電極を用いた。本実施例では、 K^+ を目的イオンとするイオン選択電極とした。

[0046] 作用電極のベース電極については、 $Ag/AgCl$ やカーボン、並びに PEDOT（ポリ（3,4-エチレンジオキシフェン））/PSS（ポリ（4-スチレンサルフォネート））を使った取り組みが提案されており、本発明では特に限定されることなく用いることができる。コストや性能等、デバイスの必要特性に合わせたベース電極を選択すればよく、本実施例では $Ag/AgCl$ 電極をベース電極とした。

[0047] イオン選択膜としては、一般的に用いられるものであればよく、目的のイオンに対して感度を持ち、且つ妨害イオンに対し十分な選択性を持つ膜を用いればよい。イオン選択膜に使われる材料は、イオノフォアとしては、バリノマイシンが例示され、アニオン除剤としては、テトラフェニルホウ酸カリウム（KTPB）が例示され、可塑剤としては、NPOE（ α -ニトロフェニルオクチルエーテル）やDOS（セバシン酸ジ（2-エチルヘキシル））が例示され、高分子剤としてPVC（ポリ塩化ビニル）単体や、ポリ塩化ビニルとポリ酢酸ビニルとの共重合体が例示される。

[0048] そして、各成分をそれぞれ適量混合し、それらを溶媒であるTHF（テトラヒドロフラン）やシクロヘキサノンに溶解あるいは分散させ、得られた液をNaCl等の中間層を積層したベース電極（ $Ag/AgCl$ 電極）上にインクジェット方式で塗布することにより作製できる。また、塗布方法も、インクジェット方式にこだわるものではなく、ディスペンサーやスクリーン印刷等、各印刷方法に合わせて、溶液の粘度を調整した上でベース電極上にイオン選択膜を積層すればよい。

[0049] 尚、本発明は、参照電極として $Ag/AgCl$ 電極を単体で用いた分析デ

バイスに限るものではない。非特許文献1にあるように、 $Ag/AgCl$ を参照電極のベース電極とし、その表面に、検体との界面電位を安定させたり、妨害イオンの影響を低減させたりするための支持電解質層を設けた構成を有してもよい。例えば非特許文献1にあるようにTBA-TBB（テトラブチルアンモニウムテトラブチルホウ酸塩）やTDMACl（トリドデシルメチルアンモニウムクロリド）と可塑剤、並びにPVCを其々適量混合し、これらを溶媒であるTHFやシクロヘキサノンに混ぜて作製された溶液を塗布乾燥させて、支持電解質層を形成することができる。また、本発明において、分析デバイスの取り扱いの際に電解質層及び成分A層の流出やコンタミネーションを防止するために、参照電極の表面及び裏面にラミネート層を設けてもよい。

以上説明したように本発明によれば、多孔質流路に成分Aを配置することによって検体と成分Aを効果的に混合することができるので参照電極付近に配置した電解質の塩析を抑制することができ、少量の検体で検査できる効果が得られる。

[0050] <実施例2>

本実施例では成分A層にL-(+)-アルギニン-塩酸塩（化学式： $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$ ）を用いた。L-(+)-アルギニン-塩酸塩は界面活性剤ではないため検体中の蛋白質等とミセルを形成しないが、検体中の蛋白質の特定の疎水性残基（芳香族アミノ酸残基等）と疎水性相互作用することで、可溶化させる効果がある。そのため、検体が電解質層内を浸透する際の蛋白質の凝集を抑制することができる。

加えて、成分A層に界面活性剤を用いた場合には、界面活性剤とイオン選択膜の材料の組み合わせによっては、界面活性剤がイオン選択膜の膜構造を破壊して測定電位に影響を及ぼす可能性がある。したがって、界面活性剤が拡散してイオン選択膜と接触するような状況を引き起こす要因（参照電極-作用電極間距離や測定時間等）に注意する必要がある。一方、L-(+)-アルギニン-塩酸塩の場合は特定の疎水性残基（芳香族アミノ酸残基等）と

疎水性相互作用することで可溶化させる効果であるため、イオン選択膜への影響は小さく、膜材料の選択の自由度を大きくできる効果を有する。

このL-(+)-アルギニン-塩酸塩の量を0.13mg、0.65mgとした2種類の分析デバイスを用意し、参照電極の電位を測定した。本実験では、参照電極の性能だけに注目する為、本来、分析デバイスに作用電極が形成される側には、作用電極の代わりに市販の参照電極をおき、市販電極と参照電極を検体で繋ぎ、両極間の電位差を測定した。

[0051] 0.13mgの結果を図12、0.65mgの結果を図13に示す。従来構成が200秒後の電位差 $\Delta 0.9\text{ mV}$ であるのに対して0.13mgの量で電位の時間安定性が改善していることがわかる。0.65mgに関しては、電位差が $\Delta 1.2\text{ mV}$ とやや大きい。よって、より良い精度の測定を行う際にはL-(+)-アルギニン-塩酸塩量の量は0.13mg程度であることが好ましい。よって本実験により、成分A層として配置するL-(+)-アルギニン-塩酸塩量を適正化することで電位の時間安定性が改善し、かつ短時間で測定可能であることが確認できた。

[0052] 本発明は上記実施の形態に制限されるものではなく、本発明の精神及び範囲から離脱することなく、様々な変更及び変形が可能である。従って、本発明の範囲を公にするために以下の請求項を添付する。

[0053] 本願は、2023年6月13日提出の日本国特許出願特願2023-097172、及び2024年4月17日提出の日本国特許出願特願2024-067014を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てをここに援用する。

符号の説明

- [0054] 1・・・流路
2・・・流路壁
3・・・参照電極
4・・・電解質層
5・・・成分A層

6 . . . 作用電極

6 a . . . イオン選択膜

6 b . . . 作用電極のベース電極

7 . . . 支持電解質膜

8 . . . 分注部

9 . . . 第一流路室

1 0 . . . 第二流路室

1 1 . . . 第三流路室

1 2 . . . 第四流路室

請求の範囲

- [請求項1] 多孔質基材の内部に設けられた流路壁で囲まれた流路領域を有する分析デバイスであって、
- 前記流路領域は、第一流路室、第二流路室、及び前記第一流路室と前記第二流路室とを繋ぐ流路を有し、
- 前記第一流路室には、参照電極が配置されており、
- 前記第二流路室には、作用電極が配置されており、
- 前記流路領域における検体の進行方向を基準としたとき、前記第一流路室の上流に、又は前記参照電極の表面に電解質が配置されており、
- 前記電解質が配置された位置の上流に、成分 A が配置されており、
- 前記成分 A が、検体中の蛋白質の立体構造を変化させる作用を及ぼす成分であることを特徴とする分析デバイス。
- [請求項2] 前記成分 A と前記電解質が、隣接している又は混合している領域を有する請求項 1 に記載の分析デバイス。
- [請求項3] 前記成分 A が、蛋白質とミセルを形成する作用を有する成分である請求項 1 に記載の分析デバイス。
- [請求項4] 前記成分 A が、界面活性剤である請求項 3 に記載の分析デバイス。
- [請求項5] 前記成分 A が、非イオン性界面活性剤である請求項 4 に記載の分析デバイス。
- [請求項6] 前記成分 A が、T w e e n 2 0 である請求項 5 に記載の分析デバイス。
- [請求項7] 前記成分 A が、水溶性高分子である請求項 1 に記載の分析デバイス。
- [請求項8] 前記成分 A が、塩である請求項 1 に記載の分析デバイス。
- [請求項9] 前記成分 A が、カオトロピック塩である請求項 8 に記載の分析デバイス。
- [請求項10] 前記成分 A が、L - (+) - アルギニン - 塩酸塩である請求項 8 に

記載の分析デバイス。

[請求項11] 前記成分 A が、酸である請求項 1 に記載の分析デバイス。

[請求項12] 前記成分 A が、有機溶媒である請求項 1 に記載の分析デバイス。

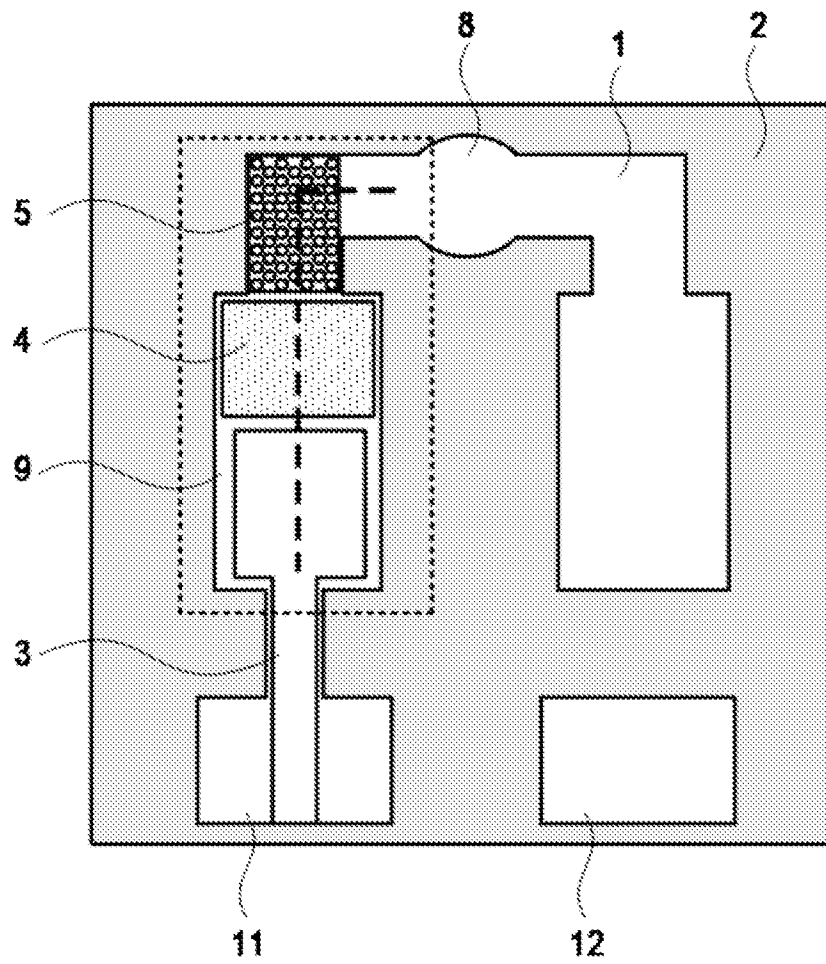
[請求項13] 前記参照電極のベース電極が、 Ag / AgCl 電極である請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の分析デバイス。

[請求項14] 前記参照電極が、前記参照電極の表面にラミネート層を有する請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の分析デバイス。

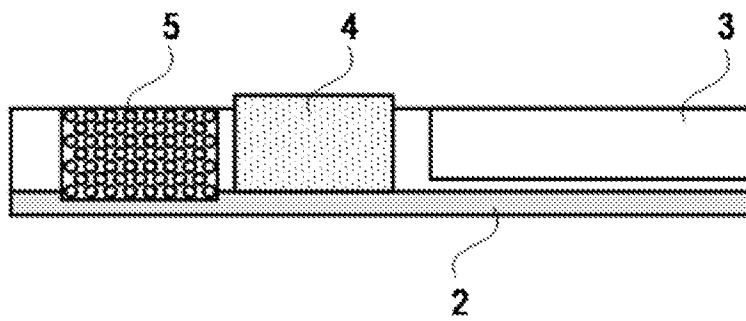
[請求項15] 前記参照電極が、ベース電極の上に、支持電解質膜を積層した参照電極である請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の分析デバイス。

[請求項16] 前記作用電極が、前記作用電極のベース電極の上に、イオン選択膜を積層したイオン選択電極である請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の分析デバイス。

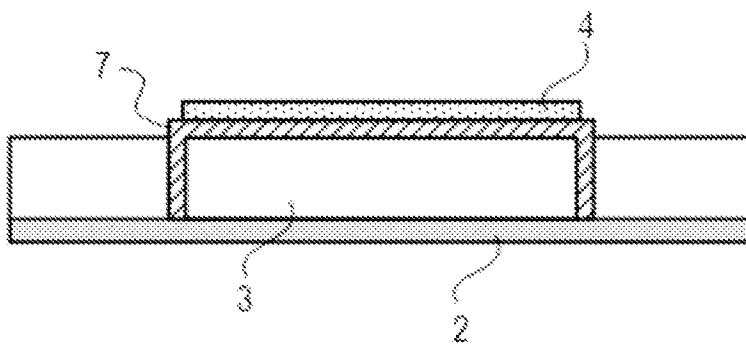
[図1A]



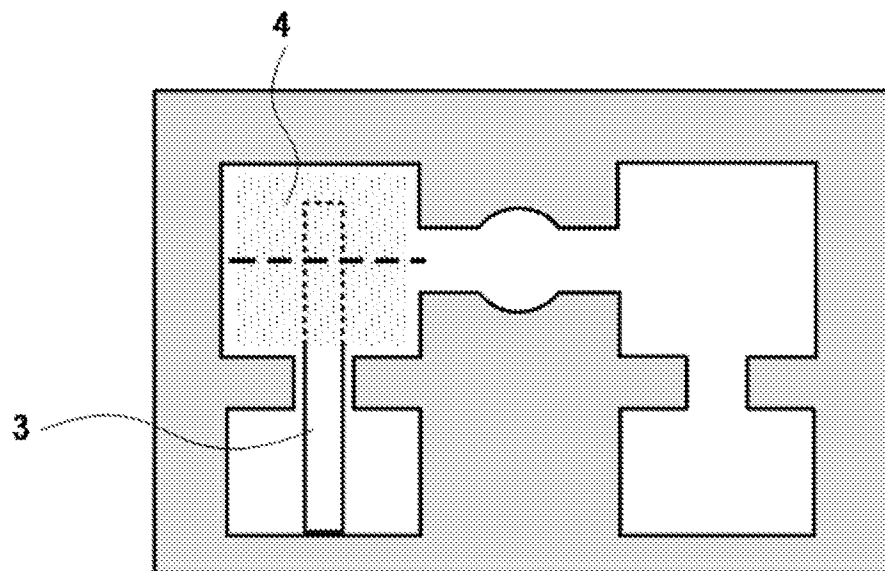
[図1B]



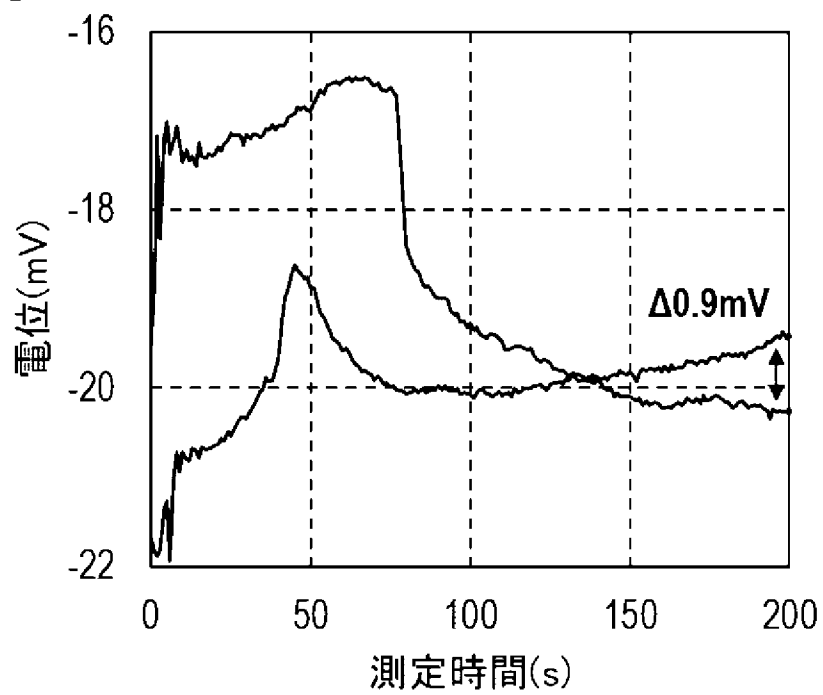
[図2A]



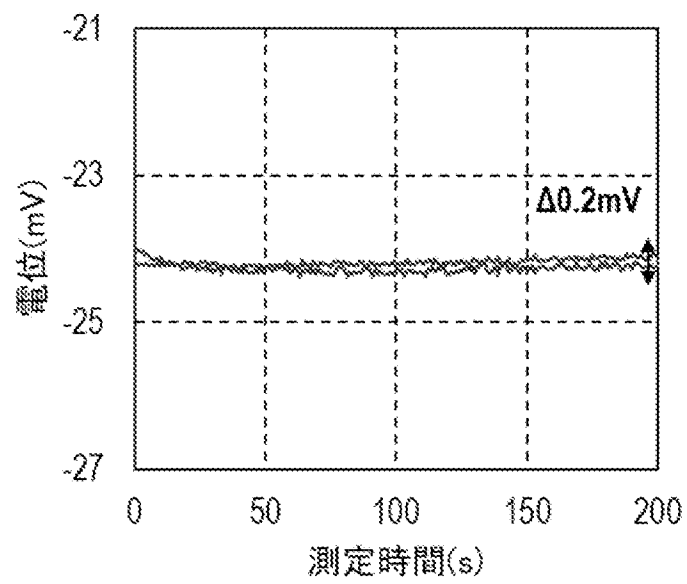
[図2B]



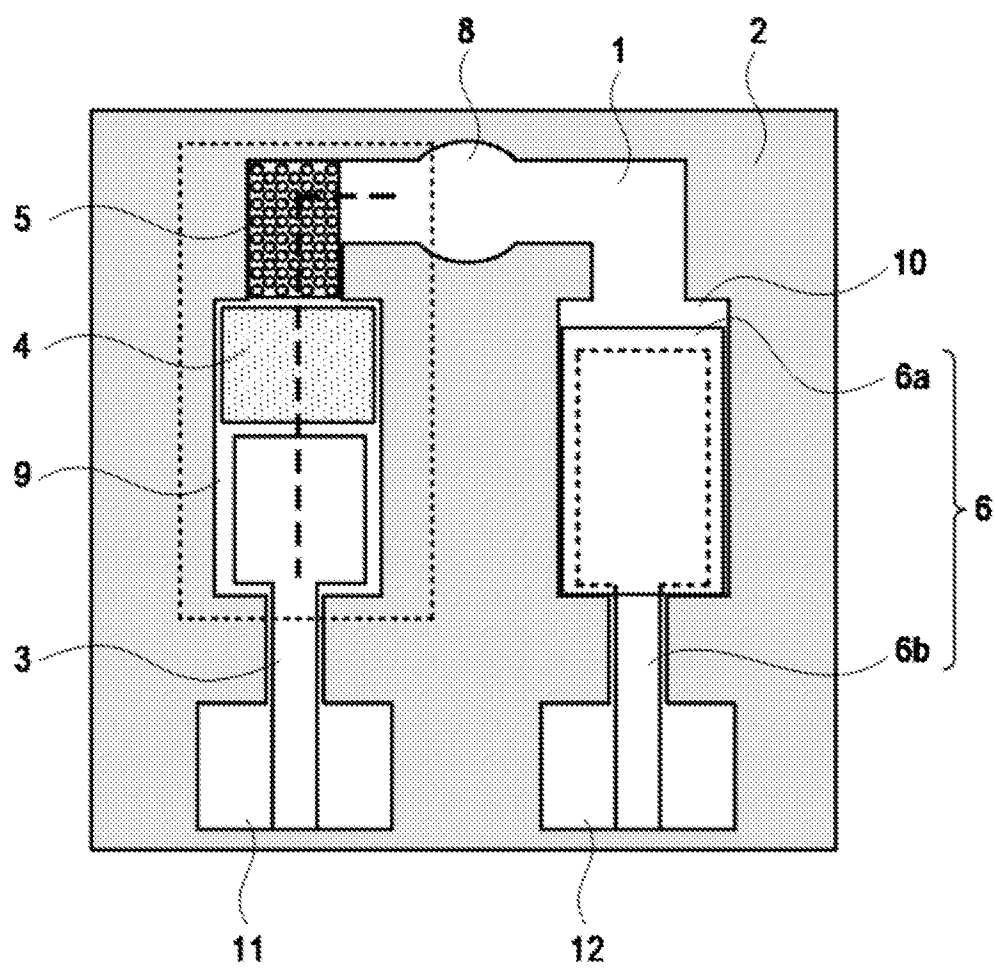
[図3]



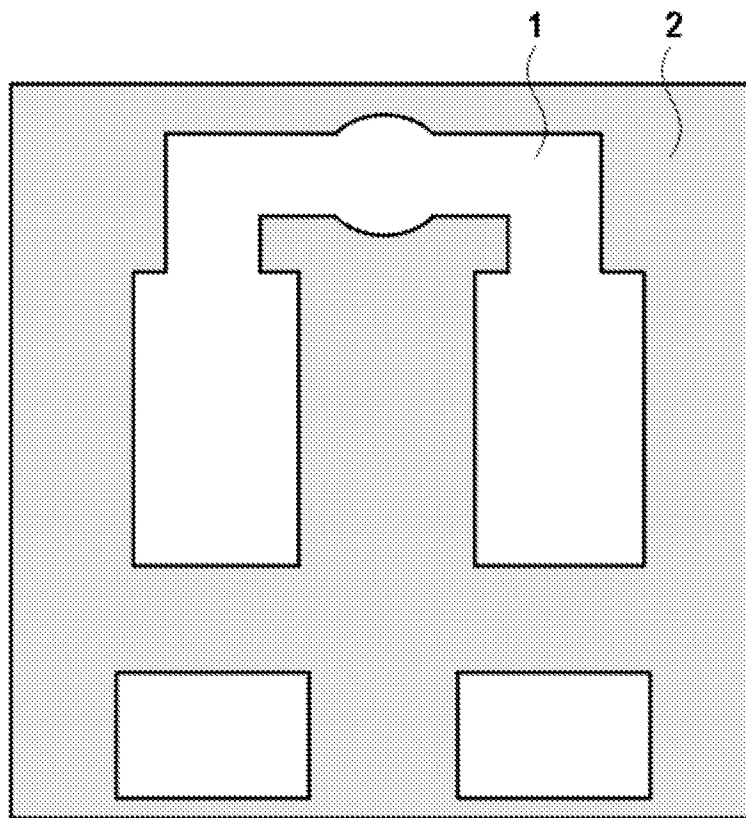
[図4]



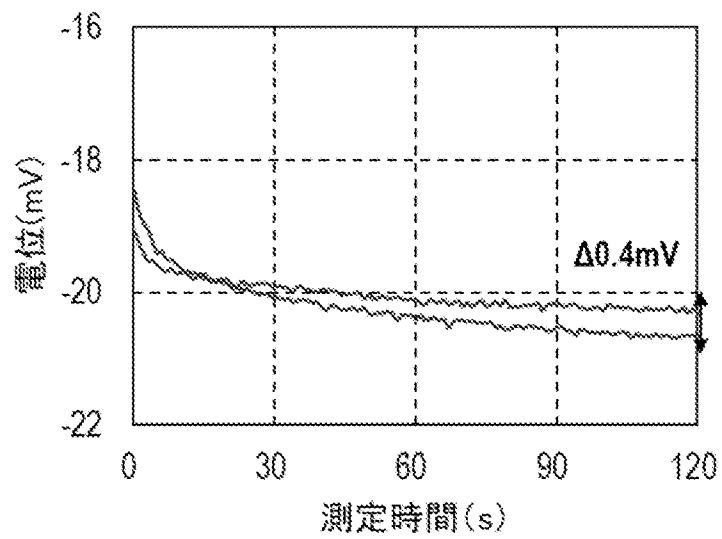
[図5]



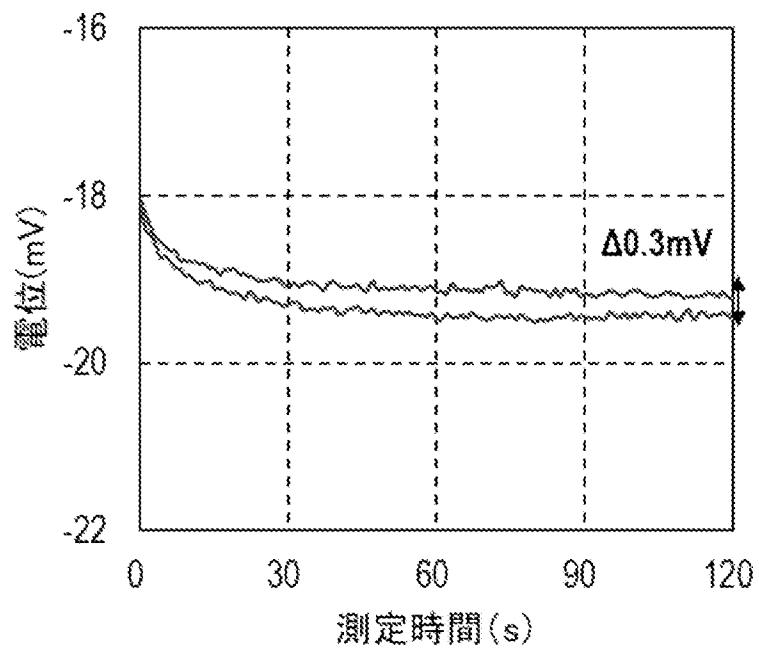
[図6]



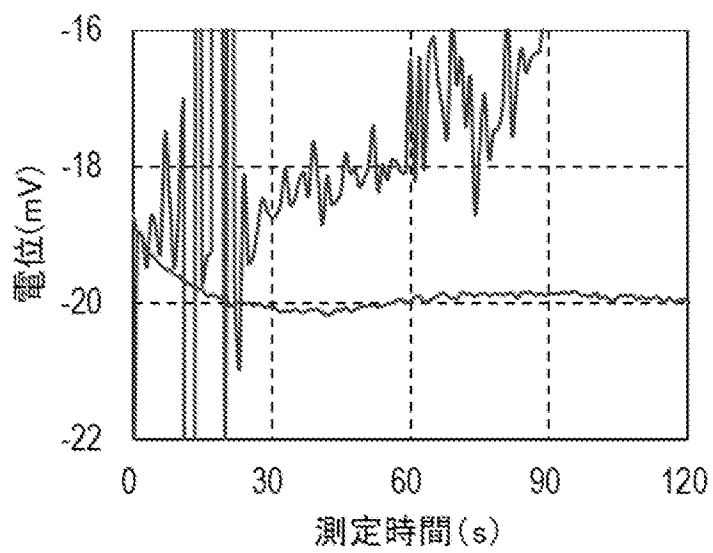
[図7]



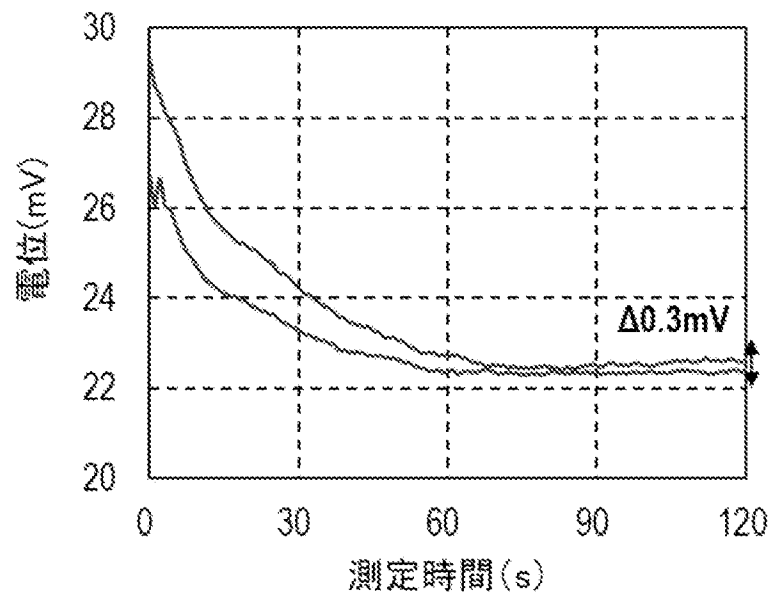
[図8]



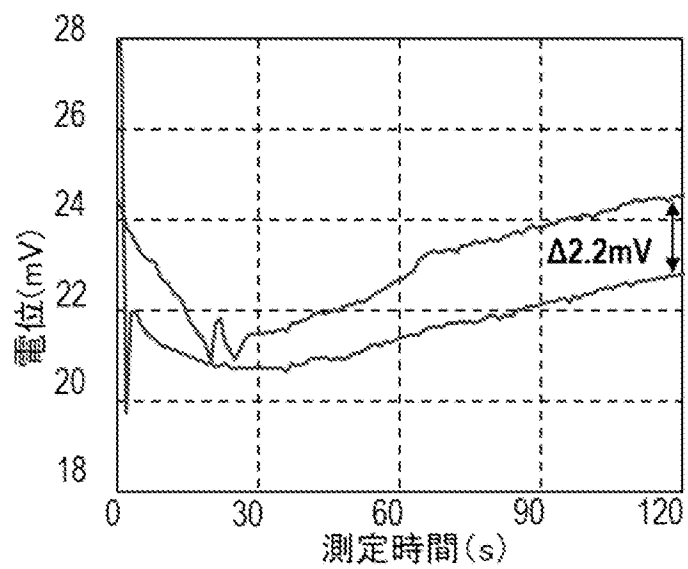
[図9]



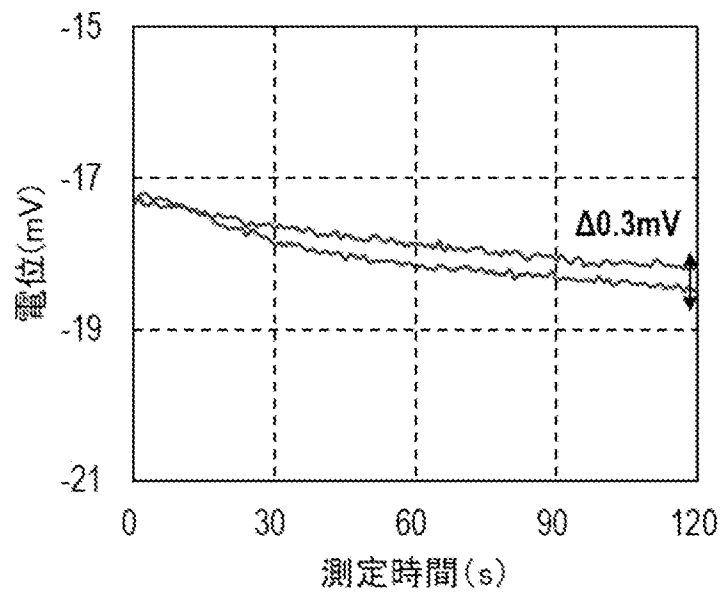
[図10]



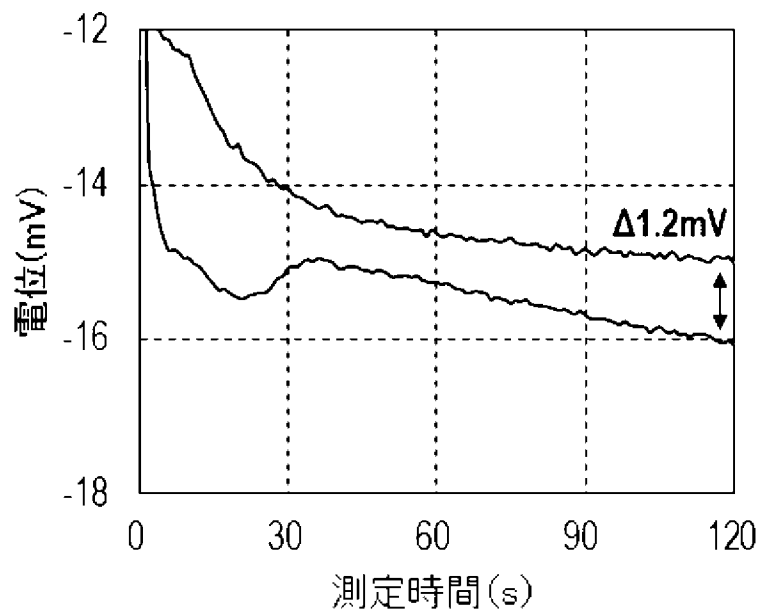
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 27/28 (2006.01)i; G01N 27/30 (2006.01)i; G01N 27/333 (2006.01)i; G01N 27/416 (2006.01)i FI: G01N27/28 321F; G01N27/416 351K; G01N27/416 351B; G01N27/28 321A; G01N27/30 311Z; G01N27/333; G01N27/333 331C; G01N27/416 351; G01N27/416 346 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) G01N27/26-27/49 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 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 2023-048923 A (CANON KABUSHIKI KAISHA) 07 April 2023 (2023-04-07) entire text, all drawings	1-16
A	JP 2023-048924 A (CANON KABUSHIKI KAISHA) 07 April 2023 (2023-04-07) entire text, all drawings	1-16
A	JP 2023-048922 A (CANON KABUSHIKI KAISHA) 07 April 2023 (2023-04-07) entire text, all drawings	1-16
A	US 2016/0033438 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 04 February 2016 (2016-02-04) entire text, all drawings	1-16
A	JP 11-194109 A (TAIYO YUDEN CO., LTD.) 21 July 1999 (1999-07-21) entire text, all drawings	1-16
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 15 August 2024		Date of mailing of the international search report 27 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021045

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2023-156182 A (CANON KABUSHIKI KAISHA) 24 October 2023 (2023-10-24) entire text, all drawings	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/021045

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2023-048923	A	07 April 2023	(Family: none)	
JP	2023-048924	A	07 April 2023	CN 118043657	A
				entire text, all drawings	
JP	2023-048922	A	07 April 2023	CN 118019973	A
				entire text, all drawings	
US	2016/0033438	A1	04 February 2016	WO 2014/149611	A1
				entire text, all drawings	
JP	11-194109	A	21 July 1999	(Family: none)	
JP	2023-156182	A	24 October 2023	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

G01N 27/28(2006.01)i; G01N 27/30(2006.01)i; G01N 27/333(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i
FI: G01N27/28 321F; G01N27/416 351K; G01N27/416 351B; G01N27/28 321A; G01N27/30 311Z; G01N27/333;
G01N27/333 331C; G01N27/416 351; G01N27/416 346

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））

G01N27/26-27/49

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 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024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 2023-048923 A（キャノン株式会社）07.04.2023（2023-04-07） 全文、全図	1-16
A	JP 2023-048924 A（キャノン株式会社）07.04.2023（2023-04-07） 全文、全図	1-16
A	JP 2023-048922 A（キャノン株式会社）07.04.2023（2023-04-07） 全文、全図	1-16
A	US 2016/0033438 A1（PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE）04.02.2016 （2016-02-04） 全文、全図	1-16
A	JP 11-194109 A（太陽誘電株式会社）21.07.1999（1999-07-21） 全文、全図	1-16
P, A	JP 2023-156182 A（キャノン株式会社）24.10.2023（2023-10-24） 全文、全図	1-16

☐ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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抵触するものではなく、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
15. 08. 2024

国際調査報告の発送日
27. 08. 2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

黒田 浩一 2J 9218

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/021045

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2023-048923	A	07.04.2023	(ファミリーなし)	
JP	2023-048924	A	07.04.2023	CN 118043657	A
				全文、全図	
JP	2023-048922	A	07.04.2023	CN 118019973	A
				全文、全図	
US	2016/0033438	A1	04.02.2016	WO 2014/149611	A1
				全文、全図	
JP	11-194109	A	21.07.1999	(ファミリーなし)	
JP	2023-156182	A	24.10.2023	(ファミリーなし)	