

(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
2012 年 11 月 29 日(29.11.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/161256 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/27 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/063337
- (22) 国際出願日: 2012 年 5 月 24 日(24.05.2012)
- (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 2011-115987 2011 年 5 月 24 日(24.05.2011) JP
特願 2011-164525 2011 年 7 月 27 日(27.07.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): コニカミノルタアドバンストレイヤー株式会社 (KONICA MINOLTA ADVANCED LAYERS, INC.) [JP/JP]; 〒1928505 東京都八王子市石川町 2 9 7 0 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 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). 村松 新一 (MURAMATSU, Shinichi) [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). 関矢 忠宣 (SEKIYA, Tadanobu) [JP/JP]; 〒1928505 東京都八

王子市石川町 2 9 7 0 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). 栗原 義一 (KURIHARA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒1928505 東京都八王子市石川町 2 9 7 0 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).

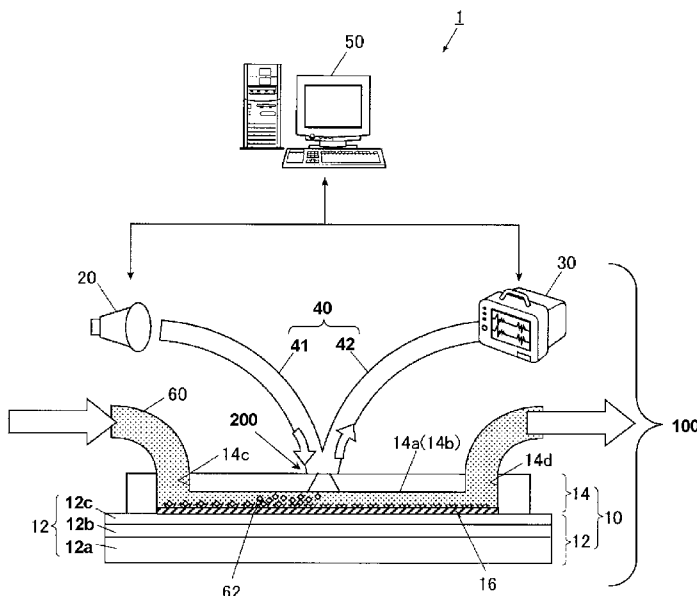
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目 1 3 番 6 号 五反田山崎ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: SENSOR CHIP COMPRISING CHARGED LAYER AND APPLICATION THEREFOR

(54) 発明の名称: 荷電層を備えるセンサーチップ及びその用途

[図1]



(57) Abstract: The present invention provides a sensor chip for an intermolecular interaction detection device, that is characterized by having a positively- or negatively-charged layer (a charged layer) formed on the outermost surface thereof. The charged layer is ideally a layer comprising an ionic polymer and the ionic polymer is ideally a polymer having a cationic functional group in a side chain thereof. As a result of using this kind of sensor chip, an intermolecular interaction detection method can be used that uses as the substance to be measured a negatively-or positively-charged substance having a counterion of the same charge as the sensor chip charged layer, and, for example, said method can calculate the thickness of a layer comprising the substance to be measured that has fixed on the outermost surface of the sensor chip as a result of the electrostatic interaction, i.e., can calculate the molecular length of the substance to be measured. In addition, the present invention provides a sensor chip having ligands affixed thereto, for use in measurement of intermolecular interaction and characterized by comprising a layer (an affixed ligand layer) formed by a complex (ligand-carrying charged fine particles) comprising fine particles (charged fine particles) having a reverse charge to the charged layer, and ligands bonded thereto, affixed by electrostatic in-

teraction to the upper surface of the sensor chip charged layer.

(57) 要約:

[続葉有]



(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明は、最表面に正または負に荷電した層（荷電層）が形成されていることを特徴とする、分子間相互作用検出装置用のセンサーチップを提供する。前記荷電層は、好ましくはイオン性ポリマーからなる層であり、当該イオン性ポリマーは好ましくはカチオン性官能基を側鎖に有するポリマーである。このようなセンサーチップを使用することにより、当該センサーチップの荷電層の電荷の対イオンを有する、負または正に荷電した物質を被測定物質とする分子間相互作用検出方法を行うことができ、たとえば、前記センサーチップの最表面に静電相互作用により固定化した前記被測定物質からなる層の厚さ、すなわち被測定物質の分子長を算出することが可能である。本発明はさらに、前記センサーチップの荷電層の上面に、静電相互作用により固定化されている、当該荷電層とは逆に荷電した微粒子（荷電微粒子）およびそれに結合したリガンドからなる複合体（リガンド担持荷電微粒子）により形成されている層（固定化リガンド層）を備えていることを特徴とする、分子間相互作用測定用のリガンド固定化センサーチップを提供する。

明 細 書

発明の名称：荷電層を備えるセンサーチップ及びその用途

技術分野

[0001] 本発明は、R I f S (Reflectometric Interference Spectroscopy：反射型干渉分光法)等のノンラベルの分子間相互作用測定用のセンサーチップ、および当該センサーチップを使用する分子間相互作用測定方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、ノンラベルの分子間相互作用測定方法、すなわち、放射性物質や蛍光体などの標識を用いることなく、生体分子や有機高分子などの分子間相互作用が働いたときに特有のシグナルを発する測定部材（センサーチップ）を用いて、そのシグナルを観測することにより、測定対象物を直接的かつ定量的に検出する方法の研究開発が進められている。たとえば、光学薄膜の干渉色変化を利用する検出法であるR I f S (Reflectometric Interference Spectroscopy：反射型干渉分光法)が提案され、実用化もされている。その他にも、Q C M (Quartz Crystal Microbalance：水晶発振子マイクロバランス)などの分子間相互作用測定方法も知られている。

[0003] これらの分子間相互作用測定用のセンサーチップには、被検出物質（アナライト）との間で特異的な分子間相互作用が働く捕捉物質（リガンド）が表層に固定化されている。たとえば、あるタンパク質（抗原）をアナライトとする場合は、それと特異的に結合しうるタンパク質（抗体）がリガンドとして表面に固定化されているセンサーチップが使用される。そして、それらのアナライトおよびリガンドが分子間相互作用、すなわち抗原抗体反応により結合すると、センサーチップの状態が変化し、それに起因するシグナルを観測することができる。この他にも、相補的な塩基配列を有する核酸同士のハイブリダイゼーションや、糖・レクチン相互作用などを利用して、アナライトをセンサーチップの表面に補足することができる。

[0004] 特許文献1には、ペロ毒素が認識・結合することのできる糖鎖およびイオ

ン性官能基を側鎖に有するポリマーが最外層を形成している、QCM、SPR等のセンサー基板が開示されている。また、上記ポリマーの最外層を設けるために、基板（金薄膜）との間に、複数のポリカチオン性ポリマーおよびポリアニオン性ポリマーを設け、カチオン性官能基とアニオン性官能基との結合によりそれらのポリマーを積層させることも記載されている。しかしながら、特許文献1には、ポリカチオン性ポリマーまたはポリアニオン性ポリマーを最外層に設けた場合に、それらのイオン性官能基が対イオンを有する単分子と結合するか否かや、そのような分子間相互作用を利用する新たな測定方法の可能性などについては記載されていない。

[0005] 特許文献2には、生理活性物質を化学的に固定化できる反応性基とカチオン性基とを一分子中に有するポリマーが開示されている。しかしながら、特許文献2には、対イオンを有する分子を配列制御して、単分子層として最密充填で集積できることも、イオン結合で固定化し得ることも記載されていない。

[0006] また、従来のセンサーチップへのリガンドの固定化は、次のような方法で行われていた。すなわち、センサーチップの表面に特定の結合を生じうる修飾基を導入しておき、一方でリガンドに当該修飾基に対応した反応基を導入しておき、これらの修飾基および反応基を反応させて結合させることにより、リガンドをセンサーチップに固定化していた。たとえば、RI f S用のセンサーチップの場合、無修飾のセンサーチップに形成されている光学薄膜（たとえばSiN）の表面を、末端にアミノ基を有するシランカップリング剤で処理してアミノ基で修飾し、つづいてNHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）-PEG4-ビオチンで処理して当該アミノ基にビオチンを結合させ、このビオチンにアビジンを反応させた後に、ビオチン化したリガンド（たとえば抗体）を反応させることにより、表面に当該リガンドが固定化されたセンサーチップを作製することができる。また、末端にカルボキシル基を有するシランカップリング剤で処理してカルボキシル基で修飾し、つづいてEDC（1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride）お

よびNH₂Sで処理してそのカルボキシル基を活性エステル化した後、アミノ基を有するリガンド（典型的にはタンパク質、たとえば抗体）を反応させることによって、表面に当該リガンドが固定化されたセンサーチップを作製することができる。

[0007] 一方、荷電した高分子微粒子が、静電相互作用によって反対の電荷をもつ荷電固体表面で単粒子膜を形成することは公知である。たとえば、非特許文献1には、スチレン（ST）と水溶性のメタクリル酸エステルとのソープフリー乳化共重合によって効率よく合成することができ、その表面に比較的高濃度のスルホニウム基に由来するカチオン電荷を持っている、P（ST-co-MAPDS）微粒子のラテックスに、水中で負の表面電荷を示すガラス基板を浸漬すると、静電相互作用による吸着が起こり、超音波照射しても脱離しない比較的稳定な単粒子膜が得られることが記載されている。しかしながら、上記文献に記載の方法は、ガラス表面への静電気帯電に由来するものであり、経時の安定性を保持することはできない。上記文献、およびその他の文献で知られている該静電相互作用に用いる荷電は静電気、あるいは電場を用いているため経時で劣化し単粒子層の安定性は確保できないのでセンサーへの展開は難しい。上記文献に記載の微粒子は230nm前後の比較的大粒子のため移流集積原理や、沈降を利用しており、純粋な静電相互作用とは考えにくい。また、静電相互作用を用いてリガンド固定化量の増大、有効抗体量の増大等が行えることに言及した公知文献はない。

[0008] また、特許文献3には、局在プラズモン共鳴センサーについて、ガラス製の基板を3-アミノプロピルトリメトキシシランのメタノール溶液に浸漬し、次いで金コロイド溶液に浸漬することにより、ガラス製の基板の表面に金コロイド単層膜を形成する方法や、この金コロイドに所定の受容体を吸着させた場合、当該受容体に所定の物質が吸着したときの吸光度の変化から当該物質の吸着を検出する、アフィニティ・センサーとしての用途が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開 2 0 0 4 - 3 4 6 2 0 9 号公報（特許第 4 0 0 9 7 2 1 号公報）

特許文献2：特開 2 0 0 6 - 3 3 5 9 1 2 号公報

特許文献3：特開 2 0 0 0 - 3 5 6 5 8 7 号公報（特許第 3 4 5 2 8 3 7 号公報）

非特許文献

[0010] 非特許文献1：長井 勝利，山口 敬三 ”高分子コロイドの固体基板上での単粒子膜形成” 繊維学会誌，Vol. 60，No. 4，pp. P-90-P-95（2004）.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、一つの側面において、新たな分析手法を可能とする、分子間相互作用検出装置に用いられるセンサーチップを提供することを課題とする。

[0012] また、前述したようにセンサーチップ表面にリガンドを固定化するためにシランカップリング剤を用いる従来の方法を採用した場合、センサーチップ表面に固定化されたりガンドについては、密度が低い、ムラがある、配向が揃っていないなどの問題があった。特に、R I f S用のセンサーチップの場合、その表面に形成される光学薄膜はS i Nからなるものが好適で多用されているが、アミノ基やカルボキシル基を導入するために用いられるシランカップリング剤（その一端に存在するシラノール基ないしアルコキシシリル基）は、S i Nが空気中の水と反応することにより生成するシラノール基と結合する。しかしながら、そのようにして生成するセンサーチップ側のシラノール基は少ないため、シランカップリング剤を用いる方法では、導入できるアミノ基やカルボキシル基の密度、すなわちそれにより最終的に導入されるリガンドの密度に限界があった。また、アミノ基やカルボキシル基とリガンドとの反応においてp Hコントロールでリガンド固定化量の増大が図れるが、配向性が損なわれるため、有効抗体数はむしろ減少することも知られてい

る。

[0013] 本発明は、別の側面において、従来よりも有効な抗体を高密度でリガンドを固定化した、分子間相互作用検出方法用のセンサーチップを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 発明者らは、まず、分子間相互作用測定用のセンサーチップの表面に、イオン性ポリマーからなる層を形成するによって、正または負の電荷を有するイオン性官能基を高密度で導入することができることを見いだした。そして、反射型 R I f S に基づく分子間相互作用検出方法において、上記のようにして作製したセンサーチップに、酢酸、S D S 等の荷電した化合物を接触させたところ、ボトムピーク波長が長波長側に移る、つまりそれらの化合物の結合による膜厚の増大を検出することができること、しかも化合物ごとにボトムピーク波長の変位差が異なる、つまり化合物の分子長が反映されていることなどを見出した。別の見方をすれば、上記のようにイオン性官能基を最表面に有するセンサーチップを用いることにより、静電相互作用（イオン結合）を利用して、対イオンを有する物質を高密度に集積、配列させることができたといえる。

[0015] さらに発明者らは、上記イオン性官能基とは逆の電荷を有するイオン性微粒子（荷電微粒子）にリガンドを担持させ、これらを分子間相互作用（静電相互作用）により前記イオン性官能基と結合させることによって、リガンドを均質かつ高密度でセンサーチップ表面に固定化することができること、このようにしてリガンドが固定化されたセンサーチップを使用することにより従来よりも高感度かつ高精度でシグナルを観測することができることを見いだした。発明者らはこれらの知見に基づき、本発明を完成させるに至った。

[0016] すなわち、本発明は下記の事項を包含する。

[0017] [1] 最表面に正または負に荷電した層（荷電層）が形成されていることを特徴とする、分子間相互作用測定用のセンサーチップ。

[0018] [2] 前記荷電層がイオン性ポリマーからなる層である、[1] に記載

のセンサーチップ。

- [0019] [3] 前記イオン性ポリマーがカチオン性官能基を側鎖に有するポリマーである、[2]に記載のセンサーチップ。
- [0020] [4] 前記荷電層の表面電荷密度が $50 \sim 200 \text{ mC/m}^2$ の範囲にある、[1]～[3]のいずれか一項に記載のセンサーチップ。
- [0021] [5] 前記荷電層の表面の算術平均粗さが $1 \sim 50 \text{ nm}$ の範囲にある、[1]～[4]のいずれか一項に記載のセンサーチップ。
- [0022] [6] 前記センサーチップがR I f S用である、[1]～[5]のいずれか一項に記載のセンサーチップ。
- [0023] [7] [1]～[6]のいずれか一項に記載のセンサーチップの荷電層の上面に、静電相互作用により固定化されている、当該荷電層とは逆に荷電した微粒子（荷電微粒子）とリガンドとの複合体（リガンド担持荷電微粒子）からなる層（固定化リガンド層）を備えることを特徴とする、分子間相互作用測定用のセンサーチップ。
- [0024] [8] 前記荷電微粒子が、 SiO_2 、 TiO_2 、イオン性ポリマーまたはリガンド固定可能な金属からなるものである、[7]に記載のセンサーチップ。
- [0025] [9] [1]～[6]のいずれか一項に記載のセンサーチップを使用する分子間相互作用測定方法であって、当該センサーチップの最表面に形成された荷電層の電荷の対イオンを有する物質を被測定物質とすることを特徴とする、分子間相互作用測定方法。
- [0026] [10] 前記荷電層が正に荷電した層であり、前記被測定物質が負に荷電した物質であり、当該被測定物質を当該荷電層に静電相互作用により固定化する工程を含む、[9]に記載の分子間相互作用測定方法。
- [0027] [11] 前記分子間相互作用測定方法がR I f Sに基づくものであって、測定されたシグナルから、前記荷電層に静電相互作用により固定化された前記被測定物質からなる層の厚さを算出する工程を含む、[9]または[10]に記載の分子間相互作用測定方法。

[0028] [12] [7] または [8] に記載のセンサーチップを使用する分子間相互作用測定方法であって、当該センサーチップに形成された固定化リガンド層にアナライトを接触させる工程を含むことを特徴とする、分子間相互作用測定方法。

[0029] [13] [7] または [8] に記載の分子間相互作用測定用のセンサーチップの製造方法であって、[1]～[6]のいずれか一項に記載のセンサーチップが備えている正または負に荷電した層（荷電層）に、当該荷電層とは逆に荷電した微粒子（荷電微粒子）とリガンドとの複合体（リガンド担持荷電微粒子）を接触させ、静電相互作用により固定化することにより、当該リガンド担持荷電微粒子からなる層（固定化リガンド層）を形成する工程を含むことを特徴とする、製造方法。

発明の効果

[0030] 本発明によれば、センサーチップ表面に設けられたイオン性官能基により、対イオンを有する種々の被測定物質を高密度に捕捉し、配列させることができる。これにより、たとえば被測定物質からなる層の厚さを測定し、そこから被測定物質の分子長を推定するなど、新たな分析を行うことが可能となる。また、この手法は、抗原抗体反応などのように特定の分子同士の組み合わせについてのみ適用することのできる手法とは異なり、同じセンサーチップで様々な被測定物質に対応することのできる汎用的な手法である。

[0031] さらに、本発明によれば、センサーチップ表面に設けられたイオン性官能基が有する電荷により、センサーチップの表面が従来の方法ではリガンドを固定化するための修飾基を導入しにくい素材で形成されている場合であっても、リガンドを担持した、逆の電荷を有する荷電微粒子を高密度で（最密充填状態で）固定化することができる。これにより、リガンドを均質かつ高密度で配列させるとともに、リガンドの配向性も揃えることができる。したがって、このような本発明によるセンサーチップを使用することにより、従来よりも高感度かつ高精度でアナライトの検出や定量を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0032] [図1]図1は、R I f Sに準じた態様における、本発明の実施形態の一例の概略図である。

[図2]図2は、実施例（作製例1-1）により作成したカチオン性修飾センサーチップ（C-1）の表面の原子間力顕微鏡（A F M）像である。表面のn点平均粗さ（R z : n = 10）は3.432nmである。

[図3]図3は、実施例（測定例1、表1参照）においてR I f Sにより測定した、酢酸を被測定物質としたときの反射率極小波長の経時変化を表す図である。

[図4]図4は、実施例（測定例1、表1参照）においてR I f Sにより測定した、n-デカン酸を被測定物質としてカチオン性修飾センサーチップに接触させたときの反射率極小波長の経時変化を表す図である。

[図5]図5は、実施例（測定例1、表2参照）においてR I f Sにより測定した、S D Sを被測定物質としてカチオン性修飾センサーチップに接触させたときの反射率極小波長の経時変化を表す図である。

[図6]図6は、実施例（測定例1、表2参照）においてR I f Sにより測定した、D B Sを被測定物質としてカチオン性修飾センサーチップに接触させたときの反射率極小波長の経時変化を表す図である。

[図7]図7は、実施例（測定例1、表4参照）においてR I f Sにより測定した、アミノ酢酸を被測定物質としてカチオン性修飾センサーチップに接触させたときの反射率極小波長の経時変化を表す図である。

[図8]図8は、実施例（測定例1、表4参照）においてR I f Sにより測定した、テレフタル酸を被測定物質としてカチオン性修飾センサーチップに接触させたときの反射率極小波長の経時変化を表す図である。

[図9]図9は、実施例（測定例1）においてR I f Sにより測定した、酢酸の濃度変化に伴う反射率極小波長（吸着膜厚）の経時変化を表す図である。

[図10]図10は、実施例（測定例3-1）においてR I f Sにより測定した、反射率極小波長の経時変化を表すグラフである。

[図11]図11は、実施例（測定例3-2）においてR I f Sにより測定した

、反射率極小波長の経時変化を表すグラフである。

[図12]図12は、実施例（測定例3-3）においてR I f Sにより測定した、反射率極小波長の経時変化を表すグラフである。

[図13]図13は、リガンド担持荷電微粒子（金ナノ粒子）からなる固定化リガンド層が形成された、実施例（測定例3-4）のリガンド固定化センサーチップ表面の原子間力顕微鏡（A F M）像である。

[図14]図14は、実施例（測定例3-4）においてR I f Sにより測定した、反射率極小波長の経時変化を表すグラフである。

発明を実施するための形態

[0033] 本発明において「分子間相互作用測定（検出）装置」とは、分析用部材（センサーチップ）の表面に設けられた分子と、分析対象となる分子との間に分子間相互作用が働いたときに現れるシグナルを測定（検出）することのできる装置の総称である。ただし、上記シグナルとして、蛍光色素生成用の酵素、蛍光体、放射性同位体等のラベルによって発生する蛍光や放射線に基づくシグナルを測定（検出）する方法は除外される。代表的な分子間相互作用測定（検出）装置としては、R I f S、S P R、Q C Mなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。以下、本発明における分子間相互作用測定（検出）装置として好適なR I f Sの実施形態を中心として、本発明についてさらに詳細に説明する。しかしながら、本発明における分子間相互作用測定（検出）装置はR I f Sに限定されるものではない。当業者であれば、本明細書の記載に基づき、本発明をR I f S以外の分子間相互作用測定（検出）装置を用いる実施形態に展開することが可能である。

[0034] イオン性官能基修飾センサーチップー

本発明では、最表面に正または負に荷電した層（本発明において「荷電層」と称する。）が形成されている、つまりイオン性官能基によって修飾されているセンサーチップ（本発明において「イオン性官能基修飾センサーチップ」と称する。）を使用する。

[0035] （イオン性官能基）

荷電層が有するイオン性官能基には、カチオン性官能基およびアニオン性官能基が包含される。アニオン性の被測定物質または荷電微粒子と組み合わせて使用される場合、センサーチップの上記イオン性官能基としてはカチオン性官能基が選択され、逆にカチオン性の被測定物質または荷電微粒子と組み合わせて使用される場合、センサーチップの上記イオン性官能基としてはアニオン性官能基が選択される。カチオン性官能基およびアニオン性官能基は、それぞれ、いずれか1種単独であっても、2種以上が混合していてもよい。荷電層中には、通常はカチオン性官能基またはアニオン性官能基のいずれか一方のみを存在させるようにするが、使用する上で支障がない荷電状態を生み出すことができる場合は、これら両方が存在していてもよい。

[0036] なお、荷電層（イオン性官能基）およびそれと組み合わせられる被測定物質または荷電微粒子の荷電状態は、それらが置かれている周囲のpHによっても変化する場合がありますので、使用時にはそのpHを適切な範囲に調節しておくべきである。

[0037] ・カチオン性官能基

カチオン性官能基としては、たとえば、グアニジノ基、 $-\text{NH}_3^+$ （アミノ基）、 $-\text{NH}_2\text{R}^+$ （モノアルキルアミノ基。Rはアルキル基、たとえばメチル基を表す。以下同様。）、 $-\text{NHR}_2^+$ （ジアルキルアミノ基）、 $-\text{NR}_3^+$ （第4級アンモニウム基）、イミノ基などが挙げられる。アミノ基、モノアルキルアミノ基、イミノ基等はpH依存性のカチオン性官能基である。表面電荷密度の観点からは、溶液のpHに依存せず常に正に帯電している、第4級アンモニウム基（カチオン）が好ましい。このようなカチオン性官能基は、分子内塩を形成していてもよいし、塩素、臭素などのハロゲン陰イオン、硫酸陰イオン、スルホン酸陰イオン、燐酸陰イオン、カルボン酸陰イオンなどと結合して対塩を形成していてもよい。

[0038] ・アニオン性官能基

アニオン性官能基としては、たとえば、 $-\text{CO}_2^-$ （カルボン酸基）、 $-\text{SO}_3^-$ （スルホン酸基）、 $-\text{OSO}_3^-$ （硫酸基）、 $-\text{OPO}_4^-$ （リン酸基）、 $-\text{B}$ （

$\text{OH})_2$ (ボロン酸) などが挙げられる。このようなアニオン性官能基は、分子内塩を形成していてもよいし、金属陽イオンまたは有機陽イオンと結合していてもよい。その金属陽イオンとしては、たとえば、 Na^+ (ナトリウム陽イオン)、 K^+ (カリウム陽イオン)、 Ca^{2+} (カルシウム陽イオン) などのアルカリ金属が挙げられ、有機陽イオンとしては、 $\text{Me}_3\text{N}^+\text{H}$ (トリメチルアンモニウム陽イオン)、 $\text{Et}_3\text{N}^+\text{H}$ (トリエチルアンモニウム陽イオン)、 $\text{Me}_2\text{N}^+\text{H}_2$ (ジメチルアンモニウム陽イオン) などが挙げられる。

[0039] なお、上記のイオン性官能基は、主鎖となるポリマーに直接結合していてもよいし、他の結合基Rを介してポリマー主鎖に結合していてもよい (A-R-ポリマー主鎖)。結合基-R-としては、たとえば、炭素原子数1~6のアルキレン基、フェニレン基、エチレンオキシ基 ($(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) などが挙げられる。

[0040] (イオン性ポリマー)

イオン性官能基でセンサーチップを修飾する方法は特に限定されるものではないが、表面電荷の強さ、耐久性の観点からは、本質的にイオン性官能基を側鎖に有するポリマー (イオン性ポリマー) からなる被膜でセンサーチップ表面を被覆する、つまり荷電層として本質的にイオン性ポリマーからなる層を形成する方法が好適である。なお、「本質的にイオン性ポリマーからなる層」は、イオン性ポリマーのみからなる層であってもよいし (表面電荷密度を極力高める観点などからはそのようにすることが好ましい)、表面電荷密度に悪影響を及ぼさないなど発明の作用効果を阻害しない範囲において、イオン性ポリマー以外の物質を含有する層であってもよい。

[0041] イオン性ポリマーは、あらかじめイオン性官能基を有するモノマーを重合して得られたものでもよいし、イオン性官能基を誘導または導入しうる他の官能基を有するモノマーを重合した後、当該官能基にイオン性官能基を誘導または導入することによって得られたものでもよい。たとえば、イオン性官能基を有さないポリマー (ポリメタクリル酸メチル等) からなる層を形成した後、プラズマ処理やUVおよびオゾン処理などの表面電荷を与える処理を

施すことによって荷電させ（上記の場合はアニオン性になる）、荷電層に変換することもできる。

[0042] センサー性能の観点からは、イオン性ポリマーは、成膜性が良く、水溶性でないものが適している。そのようなイオン性ポリマーの一つとして、炭化水素骨格を主鎖とする樹脂（炭化水素系樹脂）が挙げられる。炭化水素系樹脂は、ビニル基、アリル基、ジエンなどを有する、公知の各種のモノマーを用いて合成することができる。より具体的には、たとえば、（メタ）アクリルアミドなどのアミド類；（メタ）アクリル酸、または蟻酸ビニル、酢酸ビニル、酢酸アリル、アセト酢酸アリル、ビニルマレイン酸などのカルボン酸またはそのエステル類；スチレンスルホン酸、またはスチレンスルホン酸エステルなどのスルホン酸またはそのエステル類；その他、硫酸エステル、燐酸エステル、ホスホン酸エステルなどが上記のモノマーとして挙げられる。

[0043] また、イオン性官能基が導入されたウレタン系樹脂、たとえばカチオン性水性ポリウレタン樹脂（たとえば「ハイドラン（登録商標）CP」シリーズ、DIC株式会社）などとして公知の物質も、本発明で用いることのできるイオン性ポリマーとして挙げられる。

[0044] さらに、ポリアミノ酸由来の骨格を主鎖とするイオン性ポリマーも挙げられる。そのようなイオン性ポリマーとしては、たとえば、側鎖にカルボキシル基を有するポリアスパラギン酸およびポリグルタミン酸、ならびに側鎖にアミノ基を有するポリリジンが挙げられる。

[0045] 上記の各種のイオン性ポリマーは、公知の方法によって合成することができ、市販品として入手することもできる。イオン性ポリマーの化学的構造や性状（数平均分子量など）は、所望の荷電層を形成する上で適切なものを選択すればよい。

[0046] （荷電層形成工程）

最表面に荷電層を備えたセンサーチップは、無修飾または必要に応じて前処理が施されたセンサーチップの表面に、以下に述べるような方法により荷電層を形成する工程（荷電層形成工程）により作製することができる。

[0047] 「無修飾のセンサーチップ」は、分子間相互作用測定装置に応じたものを用意すればよい。R I f S用の無修飾のセンサーチップは、一般的には、基板（たとえばS i）と、その表層側に形成された光学薄膜（たとえばS i N）とにより構成される。

[0048] たとえば、荷電層としてイオン性ポリマーからなる層を形成する場合、そのイオン性ポリマーがセンサーチップの表面に対して十分な付着性を有するものであれば、ディップコーティング、スピンコーティング、スプレーコーティング等、公知のコーティング手法を用いてセンサーチップの表面に塗布することができる。このようなコーティング方法を用いる場合は、イオン性ポリマーの種類に応じて、適切な溶媒に、適切な濃度（たとえば0.1～10重量%）となるよう溶解させて塗布液を調製し、これを塗布するようにすればよい。一般的には、塗布液中のイオン性ポリマーの濃度は0.5～10重量%、塗布膜厚としてR I f S用センサーチップでは5 nm～500 nm、その他では5 nm～100 nmの範囲で調整することにより、イオン性ポリマーからなる荷電層を形成することができる。

[0049] また、必要であれば、センサーチップの表面にS A M（Self-Assembled Monolayer：自己組織化単分子膜）またはシランカップリング剤からなる膜を予め形成しておき、必要に応じた処理（たとえばシランカップリング剤が有するカルボキシル基を活性エステル化する処理）を行った上で、イオン性ポリマーを塗布ないし接触させて、それらの官能基間に結合を生じさせ、固定化する態様であってもよい。

[0050] あるいは、重合の起点となる化合物を基板に直接、またはS A Mやシランカップリング剤を介して固定化し、そこに重合させるモノマーおよび必要な試薬（重合開始剤等）を接触させて、逐次反応で分子長を制御可能なラジカルリビング重合法を用いて、またはランダム共重合法を用いて、in situでイオン性ポリマー膜を形成する（グラフト重合する）ようにしてもよい。

[0051] なお、上記の態様において、あらかじめセンサーチップ上に固定化されるS A M、シランカップリング剤、重合の起点となる化合物などがイオン性官

能基を有することがあったとしても、それらの物質の集合（膜ないし層）は本発明における「荷電層」の概念に該当するものではない。

[0052] また、上述したような方法は、あらかじめイオン性官能基を有するイオン性ポリマーからなる層を形成する場合のみならず、事後的にイオン性官能基を導入するために、イオン性官能基を有さないポリマーからなる層を形成する場合にも適用可能である。

[0053] ・表面電荷密度

本発明のセンサーチップは、高い密度で（好ましくは最密充填で）被測定物質またはリガンド担持荷電微粒子を吸着させるために、荷電層の表面電荷密度が少なくとも一定の水準を満たす程度に高いことが好ましい。センサーチップと被測定物質または荷電微粒子とを接触させる工程における条件下、より具体的には当該工程に用いられる被測定物質またはリガンド担持荷電微粒子を含む媒質（水溶液）のpH条件下において、荷電層の表面電荷密度は、通常 $10 \sim 500 \text{ mC/m}^2$ 、好ましくは $50 \sim 200 \text{ mC/m}^2$ で調整することができる。このような表面荷電密度は、ゼータポテンシャル測定装置（例えば、ゼータ電位測定システム「ELS Z-2」（大塚電子株式会社製）で平板試料用セルを用いて測定できる。）など、公知の手段を用いて測定することができる。荷電層にリガンド担持荷電微粒子を吸着させる場合は、リガンド担持荷電微粒子の投影断面積あたりのイオン性官能基の数が少なくとも1となるような表面電荷密度であることが好ましい。荷電層を形成するために用いるイオン性ポリマーの一分子あたりに導入するイオン性官能基の数や、センサーチップ表面の単位体積あたりに塗布するイオン性ポリマーの量などの条件を調節することにより、表面電荷密度が所望の範囲に収まるようにすることができる。

[0054] ・表面粗さ

荷電層に吸着させる物質（被測定物質、リガンド担持荷電微粒子層など）からなる層の表面を平滑にするために、特にセンサーチップが、その層の厚さによってシグナルが変動するRF用のものである場合、基礎となる荷

電層の表面は平滑であることが理想的である。このような平滑さは、代表的には、表面粗さを指標とすることができる。荷電層（たとえばイオン性ポリマーからなる層）の表面の算術平均粗さ（ R_z ）は、 $1 \sim 50 \text{ nm}$ であることが好ましく、 $1 \sim 30 \text{ nm}$ であることがより好ましく、 $1 \sim 10 \text{ nm}$ であることが特に好ましい。このような表面粗さは、表面粗さ測定装置や原子間力顕微鏡（AFM）など、公知の手段を用いて測定することができる。

[0055] リガンド固定化センサーチップー

本発明では、前記イオン性官能基修飾センサーチップの荷電層の表層側にさらに、荷電微粒子とリガンドとの複合体（本発明において「リガンド担持荷電微粒子」と称する。）からなる層（本発明において「リガンド固定化層」と称する。）を備えるセンサーチップ（本発明において「リガンド固定化センサーチップ」と称する。）を使用する。

[0056] （リガンド担持荷電微粒子）

リガンド担持荷電微粒子は、荷電微粒子とリガンドとの複合体（コンジュゲート）である。典型的には荷電微粒子およびリガンドのみから構成されるが、本発明の作用効果を阻害しない限り、荷電微粒子およびリガンド以外の物質が当該複合体の構成に加わることは排除されるものではない。

[0057] ・荷電微粒子

荷電微粒子としては、正または負に荷電した、通常 $1 \sim 100 \text{ nm}$ 程度のサイズを有する微粒子を用いることが、静電相互作用を利用した強固な固定化のために重要である。なお、このような荷電微粒子のサイズは、動的光散乱法により測定される体積平均粒子径、または商品の粒径等の公称値（カタログ値）によって表すことができる。荷電微粒子の分散形態は、結合力が強い自己乳化型の方が好ましいが、自己乳化型でなくても利用可能である。

[0058] 本発明において用いることのできる荷電微粒子としては種々のものが知られており、後述するような適切な手段によりリガンドを担持することができるものであれば特に限定されるものではないが、代表的には、 SiO_2 および TiO_2 、イオン性ポリマー、ならびにリガンドを固定可能な金属からなるも

のを挙げることができる。

[0059] SiO_2 または TiO_2 からなる荷電微粒子は、いわゆるコロイダルシリカ（たとえば「スノーテック（登録商標）」シリーズ、日産化学工業株式会社）や超微粒子酸化チタン（たとえば「STT-65C-S」、チタン工業株式会社）などとして知られている物質である。これらの荷電微粒子は、酸性では正電荷を、アルカリ性では負電荷を帯びる。 TiO_2 は、アナターゼ型であっても、ルチル型であってもよい。

[0060] イオン性ポリマーからなる荷電微粒子としては、高分子コロイド、高分子ラテックスなどとして知られている物質を用いることができる。このような荷電微粒子は、イオン性ポリマーが有するイオン性官能基に応じて、水中で正または負に荷電する。このイオン性官能基としては、荷電層に関して前述したようなカチオン性官能基およびアニオン性官能基と同様のものが挙げられる。また、粒子状に凝集するものであれば、荷電層に関して前述したようなイオン性ポリマーと同様のものを荷電微粒子として用いることができる。

[0061] 金属としては、金、銀、銅、アルミニウム、鉄、等のナノ粒子、あるいは前記金属の酸化物を有する複合物等であってもよい。なお、これらの金属からなる微粒子（典型的にはコロイド粒子）は、通常正または負に荷電している。たとえば、金、銀等のコロイド粒子は通常負に荷電している。このような金属は、荷電微粒子の表面にリガンドを担持させるために、公知の手法（たとえば後述するように、所定の化合物で処理して金属微粒子の表面に所定の修飾基を導入する手法）を適用することができるものであればよい。また、あらかじめリガンドを担持した金属微粒子（例えば抗体固定金ナノ粒子）は製品として入手することができる。

[0062] ・リガンド

リガンドは、アナライトと特異的に結合する物質である。たとえば、アナライトがタンパク質である場合は、その一部を認識して特異的に結合する抗体（Fab、 F(ab)_2 等を含む）がリガンドとなり、アナライトが核酸である場合はそれと相補的な塩基配列を有する核酸がリガンドとなり、アナライ

トが糖鎖を有する分子である場合は、糖鎖を認識して結合するタンパク質であるレクチン等がリガンドとなる。また、特定の物質（たとえば被測定物質となるタンパク質）をあらかじめビオチンで修飾しておき、それをアビジンで捕捉する場合には、上記ビオチンがアナライト、上記アビジンがリガンドという関係になる（この場合、アナライトは被測定物質そのものではない）。

[0063] リガンドがタンパク質（抗体等）である場合、それを構成するアミノ酸の末端または側鎖に、チオール基、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基などの修飾基が存在するので、それらの修飾基を荷電微粒子との結合に利用することができる。一方、核酸は、それを構成する塩基中にアミノ基、ヒドロキシル基は存在するが、通常はカルボキシル基、チオール基は存在しないので、修飾基との関係において必要であれば、公知の手法を用いてそれらの反応基を核酸に導入しておいてもよい。

[0064] ・作製方法

リガンド担持荷電微粒子は、通常は液相中で、荷電微粒子とリガンドとを結合させる所定の反応を行うことにより作製することができる。荷電微粒子とリガンドとの結合の態様は特に限定されるものではなく、公知の手法を利用することができる。

[0065] たとえば、荷電微粒子が SiO_2 からなるものである場合、当該荷電微粒子をシランカップリング剤で処理してその表面に所定の修飾基を導入しておき、一方で当該修飾基に対応した反応基を有するリガンドを用意しておき、これらの修飾基および反応基を反応させることにより、当該荷電微粒子にリガンドを結合させることができる。荷電微粒子が TiO_2 からなるものである場合にも、同様にシランカップリング剤を用いることが可能である。

[0066] 荷電微粒子が金属からなるものである場合も、その金属に応じて適切な化合物を選択して処理し、その表面に所定の修飾基を当該荷電微粒子に導入し、それ以後は上記と同様、リガンドが有する反応基と反応させればよい。たとえば金属が金であれば、一方の末端に金と結合するチオール基を有し、も

う一方の末端にカルボキシル基、アミノ基等の修飾基を有するSAMを上記化合物として用いることができる。また、あらかじめ所定の修飾基が導入された荷電微粒子は製品としても入手可能である。

[0067] また、荷電微粒子がイオン性ポリマーからなるものである場合は、当該イオン性ポリマーが有するイオン性官能基（たとえばアニオン性官能基であるカルボキシル基）の一部を、リガンドが有する反応基（たとえばアミノ基）と反応させるために利用することにより、当該荷電微粒子にリガンドを結合させることができる。

[0068] 荷電微粒子に担持させるリガンドの量は、荷電微粒子が有する修飾基の数や反応させるリガンドの量（リガンド溶液の濃度）などを調整することにより、所望の範囲とすることができるが、センサーチップへの荷電層との分子間相互作用が妨げられない範囲とすることが適切である。

[0069] なお、リガンド担持荷電微粒子を作製した際の反応液は、そのまま、または適切な濃度に希釈して、後の固定化リガンド層形成工程において、荷電層を備えるセンサーチップに接触させて、リガンド担持荷電微粒子層を形成させるために用いることもできる。この反応液中にリガンドと結合していない荷電微粒子（未反応の荷電微粒子）が含まれていると、それも荷電層と結合するので、その分、リガンド担持荷電微粒子の荷電層への結合量（密度）が低下してしまうおそれがある。そのため、反応させる荷電微粒子とリガンドとの量比を適切に調整する、通常はリガンドの量を荷電微粒子に対して十分に多くすることにより、未反応の荷電微粒子が極力残存しないようにすることが望ましい。あるいは、たとえばアフィニティクロマトグラフィーにより反応液中から未反応の荷電微粒子を除去してリガンド担持荷電微粒子を精製し、この精製物を、必要に応じて所定の濃度の水溶液等を調製した上で、その後の工程で用いるようにすることが望ましい。

[0070] （固定化リガンド層形成工程）

リガンド固定化センサーチップは、あらかじめイオン性官能基修飾センサーチップの表面に形成されている荷電層に、リガンド担持荷電微粒子を接触

させ、静電相互作用により固定化することにより、リガンド担持荷電微粒子からなる固定化リガンド層を形成する工程（固定化リガンド層形成工程）により作製することができる。

[0071] 荷電層へのリガンド担持荷電微粒子の接触は、通常、リガンド担持荷電微粒子を含む媒質を荷電層に接触させることによって行うことが好適である。媒質としては、たとえば分子間相互作用測定方法において汎用されている水を用いること、つまりリガンド担持荷電微粒子の水溶液を用いることが好適である。この場合の水は、純水その他、緩衝液（たとえばリン酸緩衝液生理食塩水）や、その他の必要な試薬等の水溶液であってもよい。荷電層にリガンド担持荷電微粒子を静電相互作用により固定化することが可能であれば、水以外の媒質を用いることも可能である。

[0072] また、リガンド担持荷電微粒子を含む媒質の荷電層への接触のさせ方は特に限定されるものではなく、当該媒質が移動（流下）している状態において接触させてもよいし、静止した状態で接触させてもよい。前者の接触の態様としては、たとえば図1に示すような使用状態にある、あらかじめ荷電層が形成されているセンサーチップに対して、リガンド担持荷電微粒子を含む媒質をフローセルにより形成される密閉流路から導入することにより、上記センサーチップの表面に接触させることが好適である。このような態様は、次に述べる後者の態様に比べて、リガンド担持荷電微粒子による被覆を十分な水準に到達させるまでの時間が短くて済む。また、後者の接触の態様として、あらかじめ荷電層が形成されているセンサーチップを、容器内に収められたリガンド担持荷電微粒子を含む媒質に単に浸漬するようにしてもよいし、荷電層が形成されているセンサーチップが底面をなすウェル型の測定部材を構築し、そのウェルにリガンド担持荷電微粒子を含む媒質を注入するようにしてもよい。いずれの態様の場合も、リガンド担持荷電微粒子を含む媒質を接触させた後、必要に応じてセンサーチップを洗浄してもよい。また、ウェル型の構造において接触させる場合は、効率を高めるため、必要に応じて振盪、ボルテックス、攪拌、超音波等を用いてもよい。

[0073] 前記媒質中のリガンド担持荷電微粒子の濃度、前記媒質の送液速度や送液時間（荷電層と前記媒質との接触時間）などの各種条件は特に限定されるものではなく、目的とする状態の固定化リガンド層が形成されるような条件を採用すればよい。たとえば、センサーチップの表面がリガンド担持荷電微粒子で十分に（最密充填で）被覆されるようにするためには、前記媒質中のリガンド担持荷電微粒子の濃度を十分に高くする、および／または荷電層と前記媒質との接触時間を十分に長くすることが好ましい。一方、前記媒質中のリガンド担持荷電微粒子の濃度を調整することにより、センサーチップの固定化させるリガンドの密度を調整することも可能である。前記媒質中のリガンド担持荷電微粒子の濃度は、たとえば0.01～1wt%の範囲で調整することが可能である。

[0074] 固定化リガンド層形成工程が、前述したように、密閉流路にリガンド担持荷電微粒子を含む媒質を送液することでセンサーチップと接触させるような態様で行われる場合、適切な処理時間を判断するために、当該処理工程の開始前から分子間相互作用測定方法による測定値を取得し始め、以後連続的に取得し続けることが好適である。処理時間の経過と共に測定値が変化する（R I f Sにおいては通常ボトムピーク波長が長波長側に移る）様子の観測を通じて、荷電層にリガンド担持荷電微粒子が結合し、固定化リガンド層が形成されていく状態を随時確認することができる。たとえば、測定値が変化しなくなる、ないし変動が十分に小さくなることにより、リガンド担持荷電微粒子の結合、すなわち固定化リガンド層の形成が飽和（最密充填）に達したものと判断し、固定化リガンド層形成工程を終了させることができる。また、測定値の変化が所定の水準に達した段階で、固定化リガンド層の形成が所望の水準に達したと判断して、その段階で固定化リガンド層形成工程を終了させることも可能である。

[0075] ー分子間相互作用測定方法ー

本発明における分子間相互作用測定方法は、上述したようなイオン性官能基修飾センサーチップまたはリガンド固定化センサーチップを使用する。こ

のような分子間相互作用測定方法は、従来の一般的なセンサーチップを用いる分子間相互作用測定方法と、基本的に同様の手順で、同様の測定装置を用いて実施することができる。

[0076] (R I f Sの実施形態)

以下、図1を参照しながら、R I f Sに基づく分子間相互作用測定方法の一実施形態について説明する。

[0077] 分子間相互作用測定用の測定システム1は、主に、測定部材10、白色光源20、分光器30及び光伝達部40等から構成される分子間相互作用測定装置100と、制御装置50などから構成されている。白色光源20、分光器30、光伝達部40などは、好ましくは測定装置100本体に収容されており、この測定装置100本体に、例えばPC (Personal Computer) の形態をとる制御装置50が制御可能に接続される。また、測定部材10は、一般的には矩形であり、好ましくは上記測定装置100本体に着脱可能な形態である。この測定部材10 (センサーチップ12およびフローセル14) は、ディスプレイザブルタイプのものとすることができる。

[0078] 測定部材10は、測定の対象となる光学干渉を起こす場となるセンサーチップ12と、通常はさらに、当該センサーチップ12の表層側に積載された、各種の媒質60 (たとえばアナライト62を含む試料溶液等) を送液するための密閉流路14bを形成するためのフローセル14とによって構成される。

[0079] なお、R I f S用等のセンサーチップとしては、試料の溶液をポンプ等の送液手段 (図示せず) で送液し、微細な密閉流路14b内を流下させながらセンサーチップ12に接触させる「流路型」の構造のものが広く知られているが、より広い領域に各種の溶液を貯留してセンサーチップ12に接触させ、その後すすぐといった手順が行われる「ウェル型」の構造であってもよい。

[0080] センサーチップ12は、基本的に基板12aと、その表層側に形成された光学薄膜12bとを備え、本発明で使用されるイオン性官能基修飾センサー

チップはさらに、光学薄膜 1 2 b の表層側に形成された荷電層 1 2 c を備える。

[0081] 基板 1 2 a は、たとえば S i (シリコン) 製が好ましい。一方、光学薄膜 1 2 b は、基板の材質 (屈折率) に応じて選択される、白色光を用いたときに観測される反射率極小波長が適切な範囲 (好ましくは可視光領域) となるような屈折率および厚みを有する材質で形成される。たとえば、基板 1 2 a が S i 基板である場合、光学薄膜 1 2 b は、S i N、T a₂O₅、N b₂O₅、H f O₂、Z r O₂、I T O (酸化インジウム錫) などの酸化膜または窒化膜であることが好ましく、S i N 膜が特に好ましい。これらの酸化膜または窒化膜はいずれも、可視光領域 (波長約 4 0 0 から 8 0 0 n m の範囲) における屈折率が 1. 8 ~ 2. 4 で、S i 基板の表層側層に形成される光学薄膜としての性能を満たしており、なおかつ当該光学薄膜自体がある程度、非特異的吸着を抑制する効果を有している。たとえば、S i N 膜の膜厚を約 4 5 ~ 9 0 n m とすることにより、ボトムピークをおよそ 4 0 0 n m ~ 8 0 0 n m の範囲に調節することができる。荷電層 1 2 c は、たとえばイオン性ポリマーにより形成されていることが好ましい。

[0082] また、この図に示すように、本発明の一側面 (後記第 2 測定方法) において使用されるリガンド固定化センサーチップは、荷電層 1 2 c の表層側にさらに、分子間相互作用 (静電相互作用) によって固定化されたりリガンド担持荷電微粒子からなる、固定化リガンド層 1 6 が形成されている。

[0083] 固定化リガンド層 1 6 を形成しているリガンド担持荷電微粒子は、荷電層 1 2 c とは逆に荷電した荷電微粒子 1 6 a と、当該荷電微粒子 1 6 a に結合したリガンド 1 6 b とにより構成されている。荷電微粒子 1 6 a は、たとえばイオン性高分子からなるものが好ましい。リガンド 1 6 b には、分析の対象とするアナライト 6 2 に応じて、それと特異的に結合する適切な物質が選択される。たとえば、アナライト 6 2 が抗原となるタンパク質ないしペプチドであればその抗体となるタンパク質が、アナライト 6 2 が核酸であればそれと相補的な塩基配列を有する核酸が、アナライト 6 2 が糖であればそれと

結合するレクチン（タンパク質）などが、リガンド１６ｂとして使用される。

[0084] フローセル１４は、たとえばシリコンゴム（ポリジメチルシロキサン：PDMS）製の、センサーチップ１２に密着させることができる透明な部材である。フローセル１４には少なくとも１つの溝１４ａが形成されており、フローセル１４をセンサーチップ１２に密着させると、密閉流路１４ｂが形成される。この密閉流路１４ｂの底部に位置するセンサーチップの表面が、所定の分子間相互作用により発せられるシグナルを観測するための反応部位２００となる。溝１４ａの両端部はフローセル１４の表面から露出しており、一方の端部が送液部（たとえばシリンジポンプ）に接続されて媒質６０が供給される流入口１４ｃとして機能し、他方の端部は廃液部に接続されて当該媒質６０の流出口１４ｄとして機能するようになっている。

[0085] 光伝達部４０は、白色光源２０からの白色光を測定部２００に導くための第一の光伝達経路としての第一の光ファイバ４１と、第一の光ファイバ４１からの白色光の照射による反射光を測定部２００から分光器３０に導くための第二の光伝達経路としての第二の光ファイバ４２とを備えている。第一の光ファイバ４１の白色光源２０側の端部は、当該白色光源２０の接続ポートに接続されている。接続ポートに接続された光ファイバ４１は光入射端面がハロゲンランプ２１に対向するように配置されている。第二の光ファイバ４２の分光器３０側の端部は、当該分光器３０の受光を行う接続ポートに接続されている。

[0086] 上記各光ファイバ４１，４２は、いずれも微細ファイバを束ねた構造となっている。そして、第一の光ファイバ４１と第二の光ファイバ４２のフローセル１４側の端部は、各々の微細ファイバが一つの束となるように複合的に寄り合わされている。即ち、第一の光ファイバ４１を構成する微細ファイバは、フローセル１４側の端面において中央に分布し、第二の光ファイバ４２を構成する微細ファイバは第一の光ファイバ４１の微細ファイバの束を取り囲むようにその周囲に分布している。

[0087] 白色光源 20 は、ハロゲンランプと、これを格納する筐体とから構成されている。筐体には、第一の光ファイバ 41 を接続するための接続ポートが設けられている。なお、本実施形態では白色光源を用いているが、これに限られるものではなく、後述する反射率極小波長の変化を検出する波長域にわたって分布する光を発光する光源であればよい。

[0088] 白色光源 20 が点灯すると、その白色光が第一の光ファイバ 41 を介して測定部 200 に照射され、その反射光が光ファイバ 42 を介して分光器 30 に導かれる。この分光器 30 は、受光部で受光する光に含まれる一定の波長間隔ごとの光について光強度を検出し、分光強度として制御装置 50 に出力する。

[0089] なお、本実施形態においては、測定部材 10 からの反射光を分光器 30 で受光するようにしているが（反射型 R I f S）、測定部材 10 として光透過性のものを用いて、白色光源 20 からの光を測定部材 10 に照射し、測定部材 10 を透過してきた光を受光するように分光器 30 を配置し、透過光の分光強度を検出するよう変形することも可能である。

[0090] 制御装置 50 は、オペレータから検出動作の実行の入力を受け付けて、分子間相互作用測定装置 100 への検出動作制御の実行指令を出力する。これにより、制御装置 50 は、制御部として機能する。

[0091] また、制御装置 50 は演算部としても機能する。制御装置 50 は、分光器 30 から測定光の分光強度のデータを取得し、波長帯域ごとに、測定光の分光強度を基準となる白色光の分光強度で除して反射率を算出する。基準光の分光強度データは、あらかじめ装置組み立て調整時に測定して保有していたものでもよいし、その他の手段によりたとえば測定の都度取得したものでもよい。算出された反射率に基づき反射スペクトルが作成され、反射率極小波長（ λ ）が決定される。また、ある基準となる反射率極小波長（ベースライン）に対する、測定された反射率極小波長の変化量（ $\Delta \lambda$ ）を取得することもできる。

[0092] 反射スペクトルの波形は、通常、微小な凹凸が繰り返されるような不規則

な形状を呈しており、反射率極小波長を算出・特定するのが困難な状態となっている場合があるが、たとえば、公知の手法を用いて反射スペクトルを高次関数で近似することにより波形を滑らかにし、高次多項式からその解（最小値）を求めて、これを反射率極小波長の値として特定することができる。

[0093] 白色光源 20 や分光器 30、および、後述する温度調節手段等を制御装置 50 で直接制御することも可能であるが、分子間相互作用測定装置 100 内に、制御装置 50 からの指示により、白色光源 20、分光器 30、温度調節手段等の各部の動作を制御するためのマイコンを含む制御部（図示せず）を別途設けることが好ましい。この場合、マイコンは、制御装置 50 の制御指令に応じて白色光源 20 の点灯と消灯を切り換える制御を行ったり、制御装置 50 の設定温度指令に応じて温度制御部の温度制御を行ったりする。

[0094] 温度調節手段（図示せず）は、例えば、ペルチェ素子のような加温と冷却を行う温度調節素子と温度検出素子とを備え、これらは測定部材 10 に併設される。そして、制御装置 50 が、直接又はマイコンを通じて、温度検出素子から測定部材 10 の温度情報を取得し、温度調節素子による加温又は冷却によって、設定温度となるように直接またはマイコンを通じて温度制御を実行する。

[0095] 検出を行う際には予め測定部材 10 の暖機が行われる。即ち、制御装置 50 は、予め定めた設定温度となるように温度制御部を制御するか、又は、予め定めた設定温度となるようにマイコンに指令を送り、マイコンは温度制御部の温度制御を実行する。暖機により測定部材 10 の温度が安定してから、分析を始める。

[0096] 制御装置 50 は、測定を継続するか判定を行い、継続しない場合には処理を終了する。かかる判定は、例えば、予め測定時間が設定され、当該測定時間が経過したか否かを判定してもよいし、測定の終了の入力を受けるまで測定を継続する設定として、測定終了の入力の有無を判定してもよい。測定を継続する場合には、再び、分光強度の測定が実行される。測定を繰り返すことにより、制御装置 50 は、周期的に反射率の算出、反射スペクトルの作成

および反射率極小波長の決定を行い、その時系列的な変化を記録する。

[0097] (シグナル測定工程)

分子間相互作用測定方法は、センサーチップの最表面に形成されている層、すなわちイオン性官能基修飾センサーチップにおける荷電層またはリガンド固定化センサーチップにおける固定化リガンド層に、被測定物質（アナライト）を接触させたときに、それらの間に分子間相互作用が働く結果、被測定物質からなる層が形成されることにより現れるシグナルを観測する工程を含む。

[0098] 上記のような被測定物質の接触（層の形成）の前後にわたって、望ましくは当該工程の開始前、途中および終了後にわたって連続的に、所定のシグナルを測定することにより、被測定物質の定量的または定性的な分析ができる。一定時間経過後、測定値がそれ以上変動しなくなる、ないし変動が十分に小さくなると見込まれるようになった時点をもって、測定を終了させることができるかと判断することが適切である。

[0099] たとえば、R I f Sであれば、分光反射率が極小となる波長（ λ ）を測定値として取得する。さらに、被測定物質を接触させる前の測定値（ λ_1 ）および後の測定値（ λ_1' ）の絶対値の差として、測定値の変化量（ $\Delta \lambda_1$ ）を算出することができる（通常、 $\lambda_1 < \lambda_1'$ であり、 $\Delta \lambda_1 = \lambda_1' - \lambda_1$ である）。このような $\Delta \lambda_1$ は、固定化されたりガンドに捕捉された被測定物質により形成される光学的薄膜の平均的な膜厚を反映している。

[0100] たとえば、ある試料溶液に含まれるアナライトの量は、その試料溶液についての λ_1 または $\Delta \lambda_1$ を、濃度が既知の試料を用いて取得した基準値と対比することにより定量的に評価することもできるし、他の試料溶液についての λ_1 または $\Delta \lambda_1$ と対比することにより相対的に評価することもできる。

[0101] λ_1 が実質的に変化しない、つまり $\Delta \lambda_1$ が0ないし十分に小さい（測定誤差の範囲である）場合、センサーチップに固定化されたりガンドと試料溶液中のアナライトとの分子間相互作用が起きなかった、つまり当溶試料溶液中にアナライトは存在しなかったと判断することができる。

[0102] 一方、 λ_1 が変化した、つまり $\Delta\lambda_1$ が一定の値（測定誤差の範囲）より大きい場合、センサーチップに固定化されたりガンドと試料溶液中のアナライトとの分子間相互作用が起きたことが示され、当該試料溶液中にアナライトが存在すると判断することができる。さらに、その変化の程度、つまり $\Delta\lambda_1$ の大きさから、試料溶液中のアナライトを定量することができる。

[0103] （第1測定方法）

本発明に係る分子間相互作用測定方法は、第1の態様において、前記イオン性官能基修飾センサーチップを使用し、当該センサーチップの最表面に形成されている荷電層の電荷の対イオンを有する物質を被測定物質とする。

[0104] ・被測定物質

本態様の分子間相互作用測定方法が対象とすることのできる被測定物質は、荷電層の電荷の対イオンを有する物質であり、静電相互作用により固定化することのできるものであれば、特に限定されるものではない。荷電層が正の電荷を有する（カチオン性官能基で修飾されている）場合は、負の電荷を有する物質が被測定物質となり、センサーチップの表面が負の電荷を有する（アニオン性官能基で修飾されている）場合、正の電荷を有する物質が被測定物質となる。

[0105] 負の電荷を有する被測定物質としては、たとえば水溶液中で電離する酸が挙げられる。酸には、塩酸、硝酸、リン酸、ホスホン酸（ $R-P(=O)(OH)_2$ ）、硫酸、アルキルスルホン酸（ $R-SO_3H$ ）、アルキルスルフィン酸（ $R-SO_2H$ ）、ホウ酸、炭酸、アルキルカルボン酸（ $R-COOH$ ）などが含まれる。

[0106] また、アルキル硫酸エステル塩（たとえばドデシル硫酸ナトリウム：SDS）、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（たとえばドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム）などの界面活性剤や、高分子材料のうち側鎖にアニオン性官能基またはカチオン性官能基が導入された合成、または天然高分子、例えばアクリル酸、メタクリル酸、デキストラン誘導体（たとえばカルボキシメチルデキストラン）なども被測定物質となり得る。

[0107] さらに、本態様の分子間相互作用測定方法を、核酸、脂質、タンパク質、細胞などの生体関連物質を被測定物質とするよう展開させることも可能である。この場合の上記生体関連物質は、後述する分子間相互作用測定方法の第2態様（第2測定方法）において「アナライト」として例示する物質と類似する。ただし、第2測定方法は「固定化リガンド層」が有する「リガンド」と「アナライト」との特異的な相互作用に基づき、特定の生体関連物質を吸着させて定量するなどの分析が行われる。これに対し、本態様（第1測定方法）は「荷電層」が有する電荷と被測定物質の電荷との静電相互作用に基づき、生体関連物質を吸着させて各種の分析を行う態様であり、生体関連物質同士の特異性は関与しないという違いがある。

[0108] センサーチップの表面電荷密度にもよるが、被測定物質についても体積電荷密度ないし表面電荷密度が低いとセンサーチップの表面に高密度で集積されにくいため、体積電荷密度ないし表面電荷密度が十分に高いものが好ましい。測定条件下（たとえば、被測定物質の水溶液中や、pH 7.4のリン酸緩衝液生理食塩水（PBS）中）において、荷電層（イオン性ポリマーからなる被膜）がたとえば 100 mC/m^2 以上である場合、その対イオンを有する被測定物質は強力に結合し安定性も十分なものとなる。

[0109] 第1測定方法は、たとえば、単分子層を形成する化合物を被測定物質とする場合、その分子長または最大吸着量を測定（推定）することができるという有用性を持つ。被測定物質からなる層が直立した単分子で形成されていて、被測定物質からなる層が重畳していない場合、その層の厚さは被測定物質の（通常は長軸方向の）分子長にほぼ等しいとみなすことができる。なお、一分子中の複数の部位に電荷を有し、それぞれの部位でセンサーチップ表面のイオン性官能基と反応することのできるような分子（特に高分子）については、当該分子からなる層の厚さは必ずしも当該分子の分子長とはならない。

[0110] また、タンパク質のようなイオン性の生体関連物質を被測定物質とする場合、当該生体関連物質の高さ（層の厚さ）を測定することで、その吸着密度

(1層あたり)を算出することができる。タンパク質は、適度な濃度で一気に入供給することで、荷電層に最密充填に近い密度で固定化することができる。分子間距離を求めることにより、タンパク質同士の反発力、最大吸着量を測定可能である。このようなデータは、タンパク質の集合構造、タンパク質同士の相互作用を考える上で意味を持つ。

[0111] 第1測定方法において上述したようなことを目的とする場合、荷電層が有するイオン性官能基に対して十分と見込まれる量の被測定物質を含む溶液を送液し、荷電層に接触させ、当該被測定物質からなる層を形成させることが適切である。また、被測定物質の送液後に、必要に応じて、除去剤（たとえばアニオン性分子に対してはグリシン-NaOH）を送液して、イオン性官能基同士の静電相互作用以外の結合によりセンサーチップ表面または被測定物質からなる層の上に重畳して吸着している被測定物質を除去すると、より正確に被測定物質からなる層の厚さを測定することが可能となる。

[0112] (第2測定方法)

本発明に係る分子間相互作用測定方法は、第2の態様において、前記リガンド固定化センサーチップを使用し、当該センサーチップの最表面に形成されている固定化リガンド層が有するリガンドと特異的な相互作用により結合するアナライトを被測定物質とする。換言すれば、前記イオン性官能基修飾センサーチップの荷電層に、被測定物質の代わりにリガンド担持荷電微粒子を相互作用させ、このリガンド担持荷電微粒子からなる層に被測定物質（アナライト）を特異的に相互作用させる。

[0113] ・アナライト

アナライトは、リガンドと特異的に結合する物質である。たとえば、タンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等を含む）、核酸（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）等を含む）、脂質、糖などの生体分子や、薬剤物質、内分泌錯乱化学物質などの生体分子と結合する外来物質、その他の生体関連物質などがアナライトとなり得る。がんの診断等において重要な指標となる、血液中に存在する腫瘍マ-

カー（たとえば α -フェトプロテイン）は、重要なアナライトの一例である。

[0114] なお、固定化リガンド層に含まれるリガンドと特異的に結合するアナライトを直接の被測定物質としない態様も本発明に含まれる。たとえば、ある抗原（タンパク質）を被測定物質とする場合、まず、リガンドとしてアビジンを有する固定化リガンド層を形成し、つづいて、当該リガンドに対応するアナライトとしてのビオチンで、上記抗原に対する抗体を標識化し、得られたビオチン標識化抗体と前記固定化リガンド層とを接触させることにより、前記固定化リガンド層の表層側に前記ビオチン標識化抗体からなる層を形成するような態様が考えられる。このようにして作製されたセンサーチップの最表層の抗体で、前記被測定物質としての抗原を捕捉し、定量することができる。

[0115] また、被測定物質としてのアナライトを含む、または含んでいる可能性のある物質として、一般的に、生体から採取した検体が用いられる。検体としては、たとえば、ヒトおよびヒト以外の動物（たとえばほ乳類）から採取される血液（血清・血漿）、尿、鼻孔液、唾液、便、体腔液（髄液、腹水、胸水等）などが挙げられる。このような検体は、必要に応じて、アナライト以外の不純物を除去するための精製処理をした上で用いてもよい。

[0116] （被測定物質層形成工程）

上述した測定方法の第1態様、第2態様いずれの場合も、一般的に、被測定物質を含む媒質（以下「試料溶液」と称することもある。）をあらかじめ調製しておき、この試料溶液を送液することで、当該媒質を介して荷電層（第1測定方法）または固定化リガンド層（第2測定方法）に接触させ、当該被測定物質からなる層を形成することが好適である。

被測定物質を含む媒質としては、一般的に、分子間相互作用測定方法において汎用されている水を用いること、つまり被測定物質の水溶液を調製することが好適である。この場合の水は、純水その他、必要に応じて、緩衝液（たとえばリン酸緩衝液生理食塩水）や、その他の試薬が溶解した水溶液であつ

てもよい。荷電層（第1測定方法）または固定化リガンド層（第2測定方法）と被測定物質との分子間相互作用を妨げずに、所定の測定を適切に行うことが可能な媒質であれば、水以外の媒質を用いることも可能である。

[0117] （分析内容）

被測定物質層形成工程の前後で測定されるシグナルの変化量から、被測定物質の定量的または定性的な測定を行うことができる。たとえば、R I f S に準じた態様においては、前記シグナルは、分光反射率が極小となる波長（ λ ）として取得され、被測定物質層形成工程の前後での変化量（ $\Delta \lambda$ ）を算出することができる。

[0118] 分光反射率極小波長の変化量（ $\Delta \lambda$ ）はさらに、被測定物質からなる層の厚さ（ d ）に換算することができる。被測定分子が単分子膜を形成する化合物である場合、 d は当該化合物の分子長と推定することができる。 d の算出方法は特に限定されるものではなく、要求される精度に応じて、一般的な方法→、それに改良を加えた方法を用いることができる。

[0119] たとえば、簡易的には、下記換算式により $\Delta \lambda$ から d を算出することができる：

$$d = \Delta \lambda / 2 n$$

ここで、 n は被測定物質の屈折率であり、通常、1.4～1.6程度の範囲になる。

[0120] より厳密に分子長を算出するには、水中、大気中であらかじめ分子長または膜厚の異なる標準物質を測定するか、あるいは信頼できるシミュレーションにより $\Delta \lambda$ と分子長等との関係を求めておき、係数化して用いることがより好ましい。

[0121] また、次のような、反射率の変化量を利用した光路長（c O P L）を用いる算出方法もある。光路長の変化に対する反射率曲線の（複数の）極値位置の波長シフトの関係を予めシミュレーションし、それを数学的に処理してテンプレートを作成しておく。そして、実測された反射率曲線の極値位置の波長をそのテンプレートに照らすと、近似的に被測定物質層（膜）の光路長が

得られる。このようにして得られる $cOPL$ は、大気中、水中の光路長（＝屈折率 $n \times$ 膜厚 d ）を表しているので、 $cOPL$ を被測定物質の屈折率 n で割ることで、被測定物質層（膜）の厚さ d を直接的に算出することができる。

- [0122] さらに、予め参照用（検量線作成用）に、濃度が既知の被測定物質を含む溶液を用いて反射率極小波長の変化量（ $\Delta\lambda'$ ）を測定ないし被測定物質層の厚さ（ d' ）を算出しておけば、被測定物質の濃度が未知の試料を用いて干渉波長の変化量（ $\Delta\lambda$ ）を測定ないし被測定物質層の厚さ（ d ）を算出した後、それらを比較することにより、サンプル中の被測定物質の濃度を定量化することができる。

実施例

- [0123] 以下の実施例において、 $RIfS$ 方式の分子間相互作用測定装置として「 $M I - A f f i n i t y$ 」（登録商標、コニカミノルタオプト株式会社）を使用し、無修飾のセンサーチップおよびフローセルとして、上記「 $M I - A f f i n i t y$ 」専用のセンサーチップ（基板：シリコンウェハ、光学薄膜：窒化シリコン）およびフローセル（PDMS製、幅2.5mm×長さ16mm×深さ0.1mmの溝及びこの溝の両末端にそれぞれ直径1mmの貫通口を有する。）を使用し、シリンジポンプとして「 $E c o n o f l o S y r i n g e P u m p 7 0 - 2 2 0 5$ 」（Harvard Apparatus製）を使用した。

- [0124] [作製例1-1] カチオン性修飾センサーチップ（C-1）

カチオン性水性ポリウレタン樹脂「ハイドラン CP-7610」（DIC株式会社製、体積平均粒径38nm、第4級アンモニウム基含有）を水で希釈し、濃度1wt%の塗布液を調製した。この塗布液を、スピンコーター（回転数：3000rpm）を用いて、UVオゾンクリーナーで洗浄した無修飾のセンサーチップの表面に塗布した。塗布後70℃で30分間乾燥して、上記カチオン性ポリウレタンからなる被膜が形成された、カチオン性修飾センサーチップ（C-1）を作製した。このカチオン性修飾センサーチップ

表面の原子間力顕微鏡（A F M）像を図 2 に示す。

[0125] [作製例 1 - 2] カチオン性修飾センサーチップ（C - 2）

前記作成例 1 - 2 において、カチオン性水性ポリウレタン樹脂「ハイドラ
ン CP - 7 6 1 0」の塗布液の濃度を 2 w t % に変更し、スピンコーター
の回転数を 6 0 0 0 r p m に変更した以外は同様の手順により、カチオン性
修飾センサーチップ（C - 2）を作製した。

[0126] [測定例 1] カチオン性修飾センサーチップへのアニオン性分子の吸着

上記のようにして作製したカチオン性修飾センサーチップ（C - 1）にフ
ローセルを積載した後、「M I - A f f i n i t y」に装着した。表 1 ~ 4
に示す各種のアニオン性分子を 0. 5 w t %（S D S のみ凝集が大きかった
ので 0. 0 5 w t %）含む水溶液をシリンジポンプで送液し、その前後にお
ける、反射率極小波長およびその変化量（ $\Delta \lambda$ ）を測定した。酢酸、n - デ
カン酸、S D S、D B S、アミノ酢酸、テレフタル酸についての結果を図 3
~ 8 に示す。なお、上記各種の水溶液の送液後には、非特異的吸着をしたア
ニオン分子を除去するための除去剤（グリシン - N a O H）を 0. 5 w t %
含む水溶液を送液した。

[0127] 測定された反射率極小波長の変化量（ $\Delta \lambda$ ）から、実測膜厚との換算係数
として（ $\Delta \lambda / 2$ ）で膜厚を算出し、さらに、分子軌道計算手法として MM2/M
OPAC AM1 の構造最適化で得られたアニオン性分子の計算上の分子長に対する
、上記換算膜厚の比の値を「単分子層比」として算出した。結果を表 1 ~ 4
にあわせて示す。

[0128] [表 1]

表 1 カチオン性修飾センサーチップに吸着したアニオン性分子（酸）の測定結果

サンプル	$\Delta \lambda$ (nm)	換算膜厚 (nm)	計算分子長 (nm)	単分子層比
酢酸	0.83	0.42	0.41	1.01
HOC ₂ H ₄ COOH	2.91	1.46	0.63	2.31
n-デカン酸	4.56	2.28	1.41	1.62

[0129]

[表2]

カチオン性修飾センサーチップに吸着したアニオン性分子
(界面活性剤)の測定結果

表2

サンプル	$\Delta \lambda$ (nm)	換算膜厚 (nm)	計算分子長(nm)	単分子層比
SDS	3.19	1.60	1.7	0.94
DBS	3.96	1.98	2	0.99

[0130] [表3]

カチオン性修飾センサーチップに吸着したアニオン性分子
(高分子材料)の測定結果

表3

サンプル	$\Delta \lambda$ (nm)	換算膜厚 (nm)
CMD:MW1 万、置換度 1.7	1.3	0.65
CMD:MW50 万、置換度 2.6	1.53	0.77
アクリル酸	1.63	0.82

[0131] [表4]

カチオン性修飾センサーチップに吸着したアニオン性分子
(多官能性分子)の測定結果

表4

サンプル	$\Delta \lambda$ (nm)	換算膜厚 (nm)	計算分子長(nm)	単分子層比
アミノ酢酸	1.13	0.57	0.52	1.09
テレフタル酸	2.13	1.07	0.95	1.12

[0132] また、サンプルに酢酸を使用して、単層膜を形成するのに最適な濃度を求めた結果、酸については0.5%が最適であることが分かった（図9参照）。一方、界面活性剤ではCMC（臨界ミセル濃度）以上だとミセルが単層膜形成を邪魔することがあるため、CMC以下が好ましい。その場合の濃度としては概ね0.01~0.1%が好ましく、最適濃度としては0.01%~1%にあると考えられる。他の分子でも概ね同じ傾向である。2回目、3回目の添加では、疎水性同士の結合が起きるようで、2層膜あるいは集合体を形成していると思われる。但しこのような多層膜は前述のグリシン-NaOH等のリンス剤で2層目以降を除去洗浄可能なことが多い。

[0133] 表1から明らかなように、本発明のカチオン性コートをRIFSセンサーチップ上に形成することで、対イオンを有する各種の酸を最密充填で集積可

能であり、結果的に分子長が測定できた。このことは、センサー上に強力なイオン性被膜を形成し、酸を供給することで完全な被覆率を誇る表面処理が容易にできることを示している。また、機能性分子や生体有用性の分子に適宜酸を導入することでセンサーチップの表面改質、表面修飾が可能なことを示している。相互作用が高い、ヒドロキシプロピオン酸や疎水基の大きい n -デカン酸は酢酸と同一条件では凝集構造を作りやすいことが見られるが、適宜希釈することで単層膜が形成可能と考えられる。

[0134] 表2から明らかなように、界面活性剤を添加した場合に単層膜が観測されており、酸同様センサーチップの高度な表面改質、表面修飾が容易なことを示している。

[0135] 表3から明らかなように、高分子材料では酸性基が多すぎるため、分子が基板に垂直に並ぶことはないものの、充填率は高く、ほぼ完全にセンサーチップを覆っていることが推測されるので、センサーチップの高度な表面改質、表面修飾が容易なことを示している。また、分散技術解析において、単分子層を基準として分散剤の凝集構造を推測することが可能である。

[0136] 表4から明らかなように、多官能性分子が単層膜として最密充填されており、これらは、センサーチップ上に容易にアミノ基、カルボキシル基を高密度に形成できることを示しており、バイオ分野における有用性が高いことがわかる。

[0137] [作製例2-1] アニオン性修飾センサーチップ (A-1)

アニオン性水性ポリウレタン樹脂「ハイドラン AP-201」(DIC株式会社製、カルボキシル基含有)を水で希釈し、濃度1wt%の塗布液を調製した。この塗布液を、スピンコーター(回転数:3000rpm)を用いて、UVオゾンクリーナーで洗浄した無修飾のセンサーチップの表面に塗布した。塗布後70℃で30分間乾燥して、上記アニオン性ポリウレタンからなる被膜が形成された、アニオン性修飾センサーチップ(A-1)を作製した。表面電荷密度は約150mC/m²と推測される。

[0138] [作製例2-2] アニオン性修飾センサーチップ (A-2)

前記作成例 2-2 において、アニオン性水性ポリウレタン樹脂「ハイドラ
ン AP-201」の塗布液の濃度を 2 wt %に変更し、スピンコーターの
回転数を 6000 rpmに変更した以外は同様の手順により、アニオン性修
飾センサーチップ（A-2）を作製した。

[0139] [測定例 2] アニオン性修飾センサーチップへのカチオン性分子の吸着

上記のようにして作製したアニオン性修飾センサーチップ（A-2）にフ
ローセルを積載した後、「M I - A f f i n i t y」に装着した。表 5 に示
す各種のカチオン性分子を 0.5 wt %含む水溶液をシリンジポンプで送液
し、その前後における、反射率極小波長の変化量（ $\Delta \lambda$ ）を測定した。

[0140] 前記測定例 1 と同様、測定された反射率極小波長の変化量（ $\Delta \lambda$ ）から換
算係数（ $d = \Delta \lambda / 2$ ）を用いて膜厚を算出し、さらに、各カチオン性分子
の計算上の分子長に対する、上記換算膜厚の比の値を「単分子層比」として
算出した。結果を表 5 にあわせて示す。

[0141] [表 5]

表 5 アニオン性修飾センサーチップに吸着したカチオン性分子の測定結果

サンプル	$\Delta \lambda$ (nm)	換算膜厚 (nm)	計算分子長 (nm)	単分子層比
アミノ酢酸	1.12	0.56	0.52	1.08
ドデシルアミン	3.52	1.76	1.67	1.05

[0142] 表 5 から明らかなように、アニオン性修飾センサーチップ上でも上記カチ
オン性修飾センサーチップと同様の効果を達成可能なことがわかる。なお、
双性イオンであるアミノ酢酸（グリシン）の測定結果は、前記測定例 1 にお
いてカチオン性修飾センサーチップに固定化したときとほぼ同じであった。

[0143] [作製例 3-1] リガンド担持荷電微粒子（L-1）

以下の手順により、荷電微粒子として SiO_2 微粒子「スノーテックス XS
」（日産化学社工業社製、体積平均粒径 5 nm）を用い、リガンドとして抗
 α フェトプロテイン [AFP] マウスモノクローナル抗体（clone : 1
D5 ; ミクリ免疫研究所（株））を用いた、リガンド担持荷電微粒子（L-
1）を作製した。

[0144] 「スノーテックスXS」の5%溶液を10mL採取し、5-カルボキシーペンチルトリエトキシシランを0.5mL加えて3時間室温で反応させた。更に、25mM MES（2-モルホリノエタンスルホン酸）バッファー（pH5.5）1mL、100当量の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：（株）同人化学研究所製）およびN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS：Thermo Scientific社製）を加え、カルボキシル基を活性化させた。AFP抗体1D5を1mL添加し、室温で30分間反応させて1D5を微粒子に反応させた。スピнкаラムを利用して未反応の抗体を除去した。

[0145] [作製例3-2] リガンド担持荷電微粒子（L-2）

以下の手順により、荷電微粒子としてアニオン性ポリマー微粒子「ハイドランWLS 202」（DIC株式会社製、カルボキシル基含有）を用い、リガンドとして抗 α フェトプロテイン〔AFP〕マウスモノクローナル抗体（clone：1D5；ミクリ免疫研究所（株））を用いた、リガンド担持荷電微粒子（L-2）を作製した。

[0146] 「ハイドランWLS 202」の10%溶液を20mL採取し、25mM MES（2-モルホリノエタンスルホン酸）バッファー（pH5.5）1.5mL、100当量の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：（株）同人化学研究所製）およびN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS：Thermo Scientific社製）を加え、カルボキシル基を活性化させた。上記溶液に1mg/mLのAFP抗体1D5を1mL添加し、室温で30分間反応させて1D5を微粒子に反応させた。スピнкаラムを利用して未反応の抗体を除去した。

[0147] [測定例3-1]

（固定化リガンド層形成工程）

作製例3-1で作製したリガンド担持荷電微粒子（L-1）を1重量%の濃度で含有する水溶液を、シリンジポンプにより30 μ L/minの送液速度で3分間（計90 μ L）、測定部材の密閉流路に導入し、作製例1-1で

作製したカチオン性修飾センサーチップ（C-1）の表面に接触させて、固定化リガンド層を形成した。測定基準となる分光反射率が最小となる波長 λ_0 （ベースライン）が約599nm付近で安定するのを確認した。

[0148] （アナライト接触工程）

PBS（pH7.4；ナカライテスク(株)製）中、アナライトとして α -フエトプロテイン（AFP）（Acris Antibodies GmbH製）を $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含むサンプルを調製した。このサンプルを、シリンジポンプにより $20\mu\text{L}/\text{min}$ の送液速度で70分間（計 $1400\mu\text{L}$ ）、測定部材の密閉流路に導入し、前記工程により固定化リガンド層が形成されたセンサーチップの表面に接触させて、固定化リガンドにアナライトを結合させた。

[0149] 前記固定化リガンド層形成工程およびアナライト接触工程の前後にわたる測定値の経時変化を図10に示す。この図から、荷電微粒子として SiO_2 微粒子を用いた場合、リガンド（抗AFP抗体）担持荷電微粒子が高密度で基板上に固定化されて固定化リガンド層を形成したこと、その後アナライト（AFP）が抗原抗体反応により当該固定化リガンド層に効率的に捕捉され、高感度で検出できていることが分かる。

[0150] [測定例3-2]

前記固定化リガンド層形成工程において、作製例3-1で作製したリガンド担持荷電微粒子（ SiO_2 ）を含有する水溶液に代えて、作製例3-2で作製したリガンド担持荷電微粒子（アニオン性ポリマー）を含有する水溶液を使用したこと以外は、測定例3-1と同様の手順で測定を行った。

[0151] 測定例3-2の固定化リガンド層形成工程およびアナライト接触工程の前後にわたる測定値の経時変化を図11に示す。この図から、荷電微粒子としてアニオン性ポリマー微粒子を用いた場合も、リガンド（抗AFP抗体）担持荷電微粒子が高密度で基板上に固定化されて固定化リガンド層を形成したこと、その後アナライト（AFP）が抗原抗体反応により当該固定化リガンド層に効率的に捕捉され、高感度で検出できていることが分かる。

[0152] [作製例 3-3] リガンド担持荷電微粒子 (L-3)

荷電微粒子として、表面にカルボキシル基を有するアニオン性ポリマー微粒子「ハイドラン 202」(DIC株式会社製)を用いた。「ハイドラン WLS 202」の0.1%懸濁液(25 mM MES (2-モルホリノエタンスルホン酸)バッファー、pH 5.5) 1 mLに、100当量の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: (株) 同人化学研究所製)およびN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS: Thermo Scientific社製)を加え、カルボキシル基を活性化させた。上記溶液に1 mg/mLのNeutrAvidin (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製) 1 mLを添加し(5当量)、室温で30分間反応させてNeutrAvidinを微粒子に反応させた。反応後、遠心式限外ろ過(Millipore社製)により精製することで、リガンドとしてNeutrAvidinを担持したアニオン性荷電微粒子の懸濁液を得た。得られたリガンド担持荷電微粒子は吸光度測定器によりタンパク質を定量後、4℃で保存した。

[0153] [測定例 3-3]

(NeutrAvidin標識微粒子の固定化)

作製例 1-1 で作製したカチオン性修飾センサーチップ(C-1)にフローセルを積載した後「MI-Affinity」に装着した。PBSバッファー、0.005% tween 20 溶液を20 μ L/minの速度で送液した後、NeutrAvidin標識微粒子懸濁液(Nexus Rods, SPR=550 nm, Neutravidin-Polymer (50 OD/1ml)、金粒子、フナコシ(株)製) 100 μ Lをシリンジポンプで送液し、MI-Affinityソフトウェア上で、その前後における反射率極小波長の変化量($\Delta\lambda$ 値)を測定した。

[0154] (ビオチン標識抗体固定化)

上記工程に続いて、ビオチン標識抗 α フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体(1D5、ミクリ免疫研究所(株)製)を、当該抗体が100 μ g/mLとなるようPBSバッファー、0.005% tween 20に

て希釈し、得られた溶液 100 μ L をシリンジポンプで送液し、M I - A f f i n i t y ソフトウェア上で、その前後における反射率極小波長の変化量 ($\Delta \lambda$ 値) を測定した。

[0155] (抗原の結合測定)

工程 3 に続いて、A F P (10 μ g/mL、P B S バッファー、0.005% t w e e n 20) 溶液をインジェクトし、M I - A f f i n i t y ソフトウェア上で、シグナル変化 ($\Delta \lambda$ 値) を測定した。反応の経時変化を図 12 に示す。

[0156] [比較例 1]

N e u t r A v i d i n 標識微粒子の固定化工程において、N e u t r A v i d i n 標識微粒子懸濁液にカチオン性修飾されていない無修飾のセンサーチップを一昼夜浸漬し、当該センサーチップの無電荷の S i N 上に N e u t r A v i d i n 標識微粒子を物理的な吸着により固定化した以外は、測定例 3-3 と同様にして、シグナル変化 ($\Delta \lambda$) を測定した。

[0157] 測定例 3-3 および比較例 1 それぞれについて、抗体 (ビオチン標識化抗 A F P 抗体) インジェクト前のシグナル値をブランクとしたときの、抗原 (A F P) インジェクト後のシグナル値の変化量 ($\Delta \lambda$) を算出した。結果は下記表に示す通りである。

[0158] [表6]

表6

	センサーチップ	リガンド担持荷電微粒子	$\Delta \lambda$
測定例 3-3	C-1	NeutrAvidin 標識微粒子	0.28nm
比較例	無修飾	NeutrAvidin 標識微粒子	0.15nm

[0159] 上記表の結果から、N e u t r A v i d i n を標識したアニオン性微粒子をカチオン性ウレタン微粒子で被覆したセンサーチップに固定化した場合 (測定例 3-3) は、そのような微粒子で修飾していないセンサーチップに固定化した場合 (比較例 1) に比べてシグナルが大きく、アナライトをより高感度で検出できることがわかる。この結果は、本発明により N e u t r A v

i d i n およびビオチン標識化抗 A F P 抗体（リガンド）を高密度でセンサーチップ上に配置でき、それにより A F P （アナライト）を効率的に捕捉できたことを示している。

[0160] [測定例 3 - 4]

作製例 1 - 1 で作製したカチオン性修飾センサーチップ（C - 1）にフローセルを積載した後、「M I - A f f i n i t y」に装着した。リガンド担持荷電微粒子として、抗 I g G 抗体を担持した金ナノ粒子（Immunogold conjugate em. Gmhl 10）を 1 重量%の濃度で含有する水溶液を調製した。この水溶液を、シリンジポンプにより $20 \mu\text{L} / \text{min}$ の送液速度で 3 分間（計 $90 \mu\text{L}$ ）、測定部材の密閉流路に導入し、前記カチオン性修飾センサーチップの表面に接触させて、固定化リガンド層を形成した。このリガンド固定化センサーチップ表面の原子間力顕微鏡（A F M）像を図 1 3 に示す。

[0161] P B S （p H 7 . 4 ; ナカライテスク(株)製）中、アナライトとして I g G を $500 \text{ ng} / \text{mL}$ の濃度で含むサンプルを調製した。このサンプルを、シリンジポンプにより $20 \mu\text{L} / \text{min}$ の送液速度で 15 分間（計 $300 \mu\text{L}$ ）、測定部材の密閉流路に導入し、上記工程により固定化リガンド層が形成されたセンサーチップの表面に接触させて、固定化リガンドにアナライトを結合させた。これらの工程の前後にわたる測定値の経時変化を図 1 4 に示す。

[0162] [作製例 1 - 3] カチオン性修飾センサーチップ（C - 3）

以下の手順に従い、シランカップリング剤を用いた化学的な結合による固定化で、カチオン性基としてイミノ基を含有するポリエチレンジイミン（P E I）からなる被膜が形成された、カチオン性修飾センサーチップ（C - 3）を作製した。

[0163] （1）カルボキシシル基修飾基板の作製

超純水 10 mL に Triethoxysilylpropylmaleamic acid を $100 \mu\text{L}$ 、酢酸を $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 1 時間攪拌して、加水分解を進行させた。このシランカップリング剤溶液に、SiN 基板（無修飾のセンサーチップ）を室温で 1 時間浸漬し、

水素結合的にシランカップリング剤を吸着させた。基板を引き上げ、エタノール、超純水で順次洗浄し、窒素ブローにより乾燥させた後、乾熱機にて80℃、1時間脱水縮合させることにより、カルボキシル基修飾基板を作製した。

[0164] (2) PEIの固着

活性エステル化処理：NHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）とEDC（エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）とを、それぞれ50mMおよび200mMの濃度で含有する水溶液を25mM MESバッファ（pH5.0）を用いて調製した。得られた水溶液に、前記工程（1）で作製したカルボキシル基修飾基板を室温で20分間、攪拌しながら浸漬した。その後、基板を引き上げ、超純水で洗浄した。

[0165] 固着処理：10mM Acetateバッファ（pH6.0）を用いて、PEIを5wt%含有する水溶液を調製した。得られた水溶液に、前記活性エステル化処理で得られた基板を室温で4時間、攪拌しながら浸漬した。基板を引き上げ、超純水で洗浄した後、乾燥した。膜厚12nm（RI-fsにより測定）のPEIからなる荷電層を備えたセンサーチップが得られた。

[0166] [作製例1-4] カチオン性修飾センサーチップ（C-4）

以下の手順に従い、センサーチップ上に固定化された光重合反応可能なモノマー（シランカップリング剤）を基点とする、4級アンモニウム構造を有するカチオンモノマー「アロンDA-C」（2-(アクリロイルオキシ)エチルトリメチルアンモニウムクロリド、MTアクアポリマー株式会社）のグラフト重合により、カチオン性ポリマー被膜が形成されたセンサーチップ（C-4）を作製した。

[0167] (1) モノマー固着基板の作製

3-メタクリロイルプロピルトリエトキシシラン（信越シリコン社製）を1g秤量し、19mlのエタノールで溶解し、室温で1時間攪拌して、加水分解を進行させた。このシランカップリング剤溶液に、SiN基板（無修飾のセンサーチップ）を室温で1時間浸漬し、シランカップリング反応を行った。反応後、電

気オーブンで80℃、1時間乾燥させて成膜し、モノマー固着基板を作製した。

[0168] (2) グラフト重合

イソプロパノールを用いて、モノマー「アロンDA-C」を10wt%、光重合開始剤「イルガキュア2959」（長瀬産業社製）を当該モノマーの1/100モル%含有する溶液（モノマー反応液）を調製した。得られたモノマー反応液を前記工程（1）で作製したモノマー固着基板に塗布し、キセノンランプを照射して光共重合反応を行った。反応終了後、純水で洗浄し、乾燥した。膜厚18nm（R I f Sにより測定）カチオン性グラフト重合ポリマーからなる荷電層を備えたセンサーチップが得られた。

[測定例3-5]

前記カチオン性修飾センサーチップ（C-1）に代えて作製例1-3で作製したセンサーチップ（C-3）を使用した以外は測定例3-4と同様の条件で、IgG500ng/mlのアッセイを行った。

[測定例3-6]

前記カチオン性修飾センサーチップ（C-1）に代えて作製例1-4で作製したセンサーチップ（C-4）を使用した以外は測定例3-4と同様の条件で、IgG500ng/mlのアッセイを行った。

[比較例2]

前記カチオン性修飾センサーチップ（C-1）に代えて無修飾のセンサーチップを使用した以外は測定例3-4と同様の条件で、IgG500ng/mlのアッセイを行った。

[0169] 測定例3-4、3-5および3-6それぞれについて、形成された荷電層の厚さ、固定化されたりガンドの量を反映する、固定化リガンド層（抗IgG抗体担持金ナノ粒子からなる層）形成工程におけるシグナルの変化量、および当該リガンドと反応したアナライトの量を反映する、被測定物質層（IgGからなる層）形成工程におけるシグナルの変化量を下記表に示す。なお、比較例2については表に結果は示していないが、固定化リガンド層形成工

程における $\Delta\lambda$ はほとんど0であり、固定化リガンド層は全く形成されなかった。

[0170] [表7]

表7

	センサーチップ	荷電層の厚さ	固定化リガンド層 形成工程における $\Delta\lambda$	被測定物質層形 成工程における $\Delta\lambda$
測定例 3-4	C-1	35nm	17nm	1.6nm
測定例 3-5	C-3	12nm	15nm	1.3nm
測定例 3-6	C-4	18nm	18nm	1.65nm

[0171] 上記表の結果から、リガンド（抗IgG抗体）におけるアミンカップリング等の化学的な反応によらず、当該リガンドを担持する荷電微粒子と荷電層との静電的相互作用により、当該リガンドを高密度でセンサーチップ表面に配置することができ、アッセイの反応性も高いことが分かる。また、前記カチオン性の荷電層を化学結合（測定例3-5）またはグラフト重合（測定例3-6）によって形成した場合は、塗布（測定例3-4）によって形成した場合と同等の性能が得られ、しかもより薄い荷電層（膜）を形成できることが分かる。このように、静電相互作用を利用する本発明により、極めて簡易かつ高感度でアナライトの測定を行えることが示された。

符号の説明

- [0172]
- 1 測定システム
 - 10 測定部材
 - 12 センサーチップ
 - 12a 基板
 - 12b 光学薄膜
 - 12c 荷電層
 - 14 フローセル
 - 14a 溝
 - 14b 密閉流路

- 1 4 c 流入口
- 1 4 d 流出口
- 1 6 固定化リガンド層
- 2 0 白色光源
- 3 0 分光器
- 4 0 光伝達部
- 4 1 第一の光ファイバ
- 4 2 第二の光ファイバ
- 5 0 制御装置
- 6 0 媒質
- 6 2 アナライト
- 1 0 0 分子間相互作用測定装置
- 2 0 0 測定部

請求の範囲

- [請求項1] 最表面に正または負に荷電した層（荷電層）が形成されていることを特徴とする、分子間相互作用測定用のセンサーチップ。
- [請求項2] 前記荷電層がイオン性ポリマーからなる層である、請求項1に記載のセンサーチップ。
- [請求項3] 前記イオン性ポリマーがカチオン性官能基を側鎖に有するポリマーである、請求項2に記載のセンサーチップ。
- [請求項4] 前記荷電層の表面電荷密度が $50 \sim 200 \text{ mC/m}^2$ の範囲にある、請求項1～3のいずれか一項に記載のセンサーチップ。
- [請求項5] 前記荷電層の表面の算術平均粗さが $1 \sim 50 \text{ nm}$ の範囲にある、請求項1～4のいずれか一項に記載のセンサーチップ。
- [請求項6] 前記センサーチップがRF用である、請求項1～5のいずれか一項に記載のセンサーチップ。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載のセンサーチップの荷電層の上面に、静電相互作用により固定化されている、当該荷電層とは逆に荷電した微粒子（荷電微粒子）とリガンドとの複合体（リガンド担持荷電微粒子）からなる層（固定化リガンド層）を備えることを特徴とする、分子間相互作用測定用のセンサーチップ。
- [請求項8] 前記荷電微粒子が、 SiO_2 、 TiO_2 、イオン性ポリマーまたはリガンド固定可能な金属からなるものである、請求項7に記載のセンサーチップ。
- [請求項9] 請求項1～6のいずれか一項に記載のセンサーチップを使用する分子間相互作用測定方法であって、
当該センサーチップの最表面に形成された荷電層の電荷の対イオンを有する物質を被測定物質とすることを特徴とする、分子間相互作用測定方法。
- [請求項10] 前記荷電層が正に荷電した層であり、前記被測定物質が負に荷電した物質であり、当該被測定物質を当該荷電層に静電相互作用により固

定化する工程を含む、請求項 9 に記載の分子間相互作用測定方法。

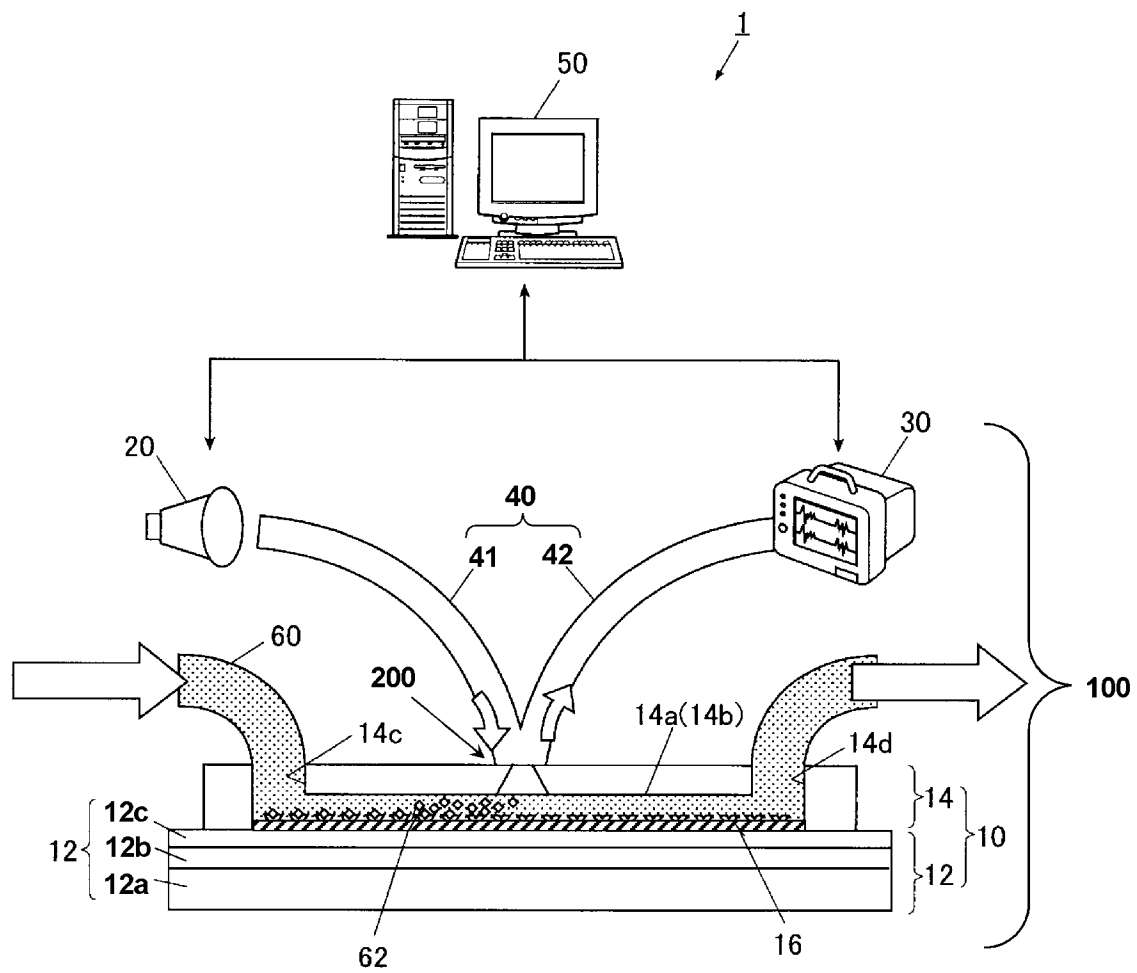
[請求項11] 前記分子間相互作用測定方法が R I f S に基づくものであって、測定されたシグナルから、前記荷電層に静電相互作用により固定化された前記被測定物質からなる層の厚さを算出する工程を含む、請求項 9 または 10 に記載の分子間相互作用測定方法。

[請求項12] 請求項 7 または 8 に記載のセンサーチップを使用する分子間相互作用測定方法であって、

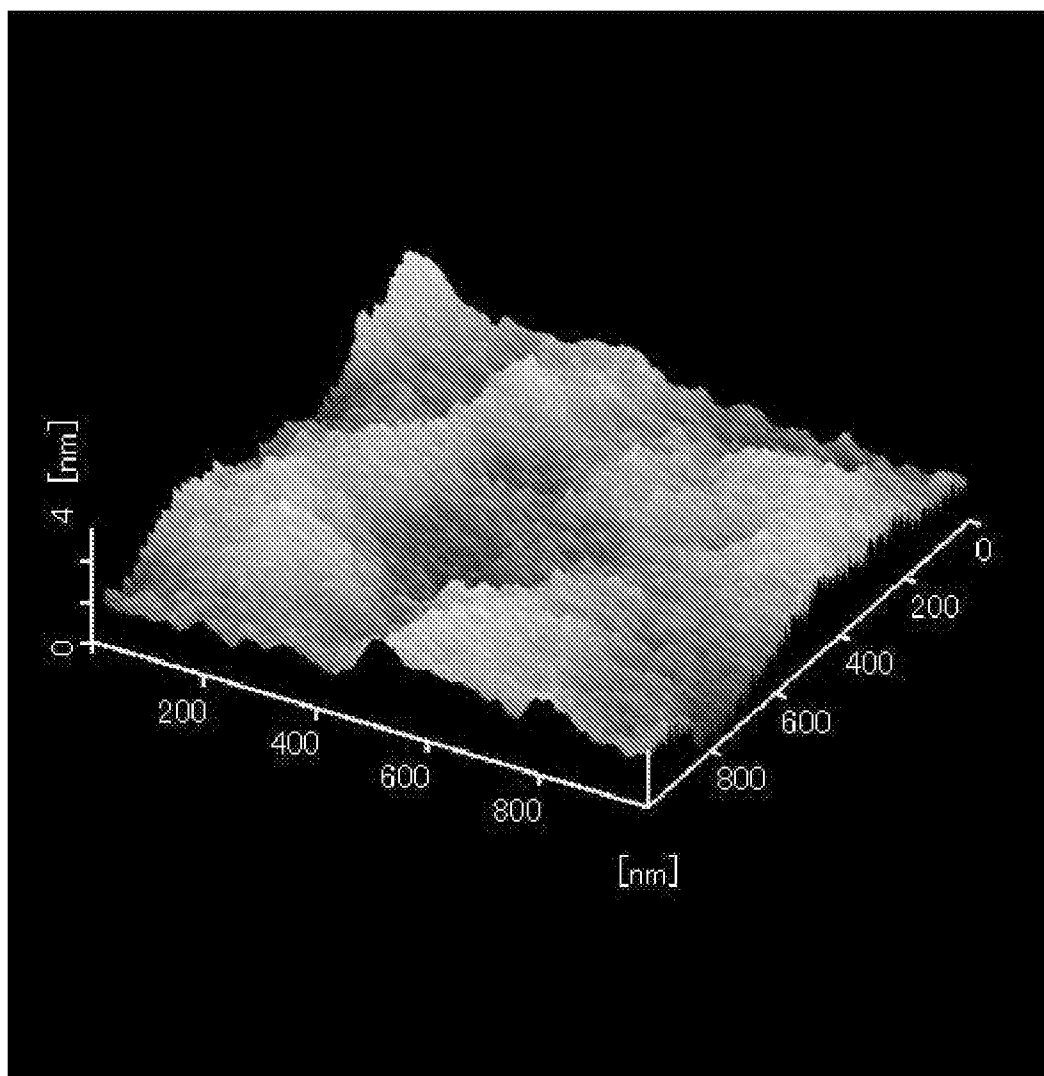
当該センサーチップに形成された固定化リガンド層にアナライトを接触させる工程を含むことを特徴とする、分子間相互作用測定方法。

[請求項13] 請求項 7 または 8 に記載の分子間相互作用測定用のセンサーチップの製造方法であって、

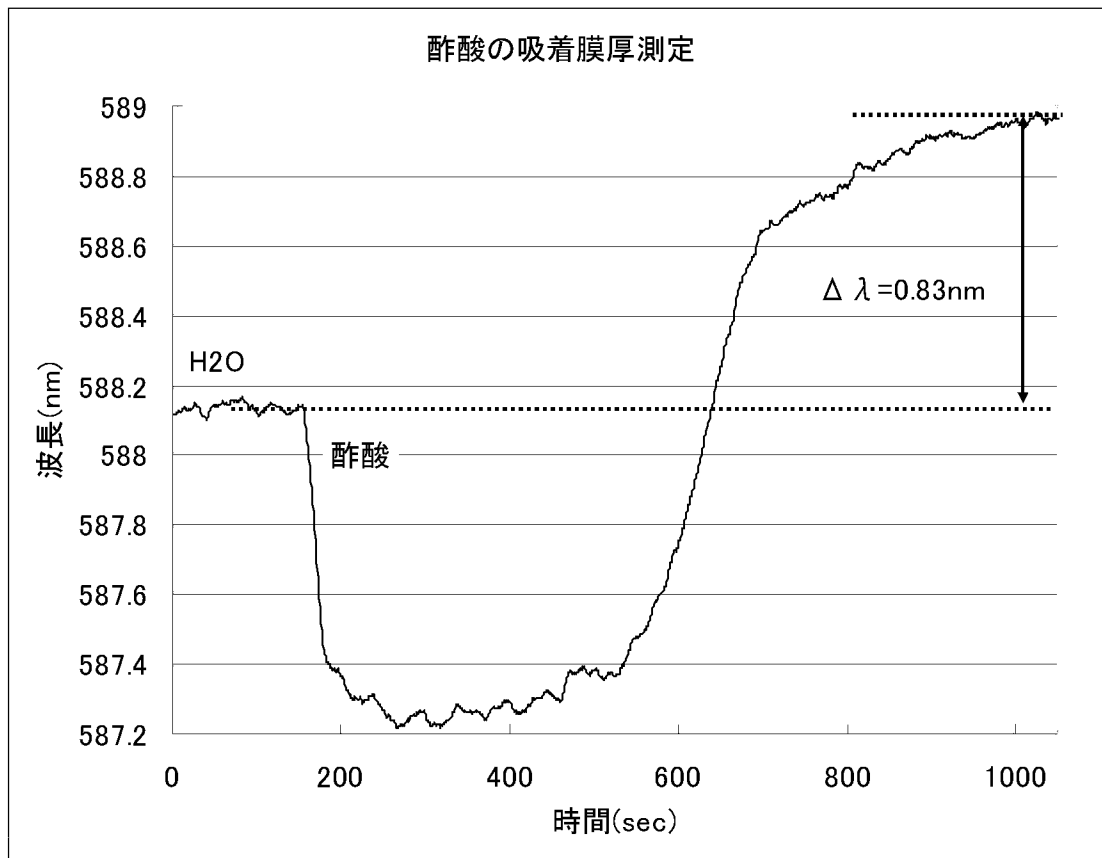
請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のセンサーチップが備えている正または負に荷電した層（荷電層）に、当該荷電層とは逆に荷電した微粒子（荷電微粒子）とリガンドとの複合体（リガンド担持荷電微粒子）を接触させ、静電相互作用により固定化することにより、当該リガンド担持荷電微粒子からなる層（固定化リガンド層）を形成する工程を含むことを特徴とする、製造方法。



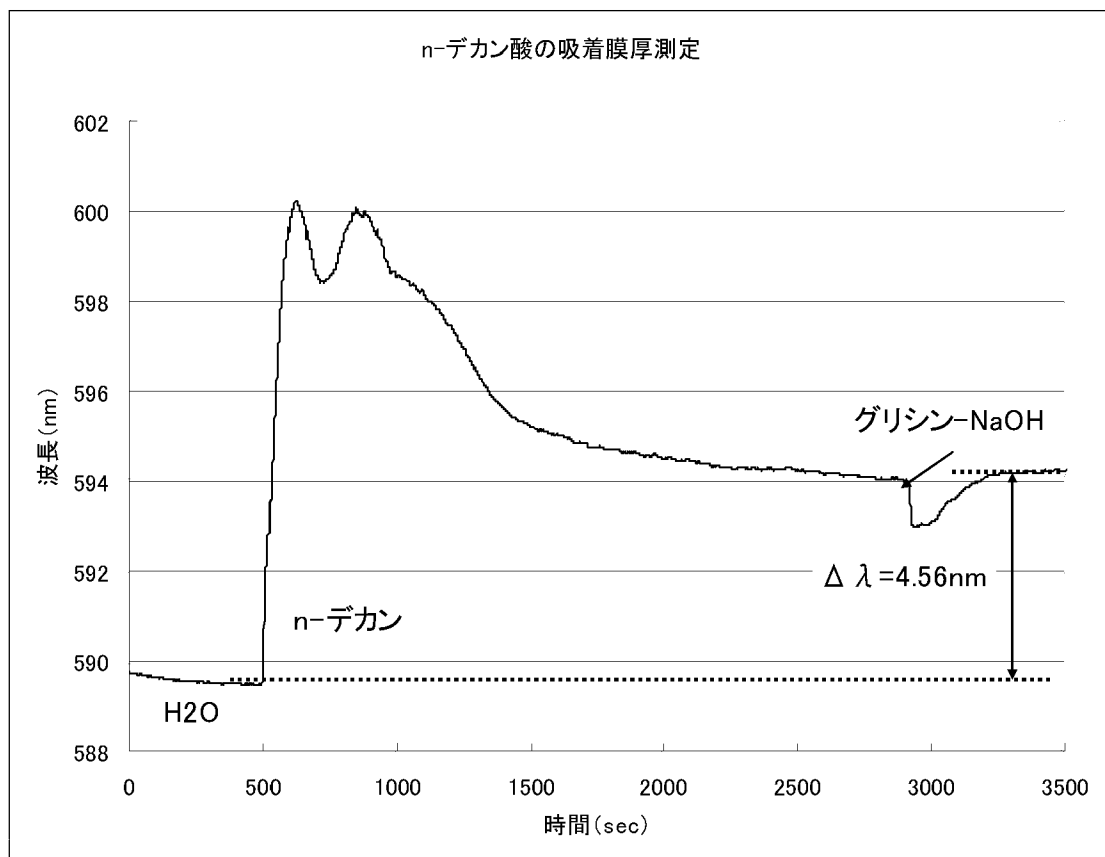
[図2]



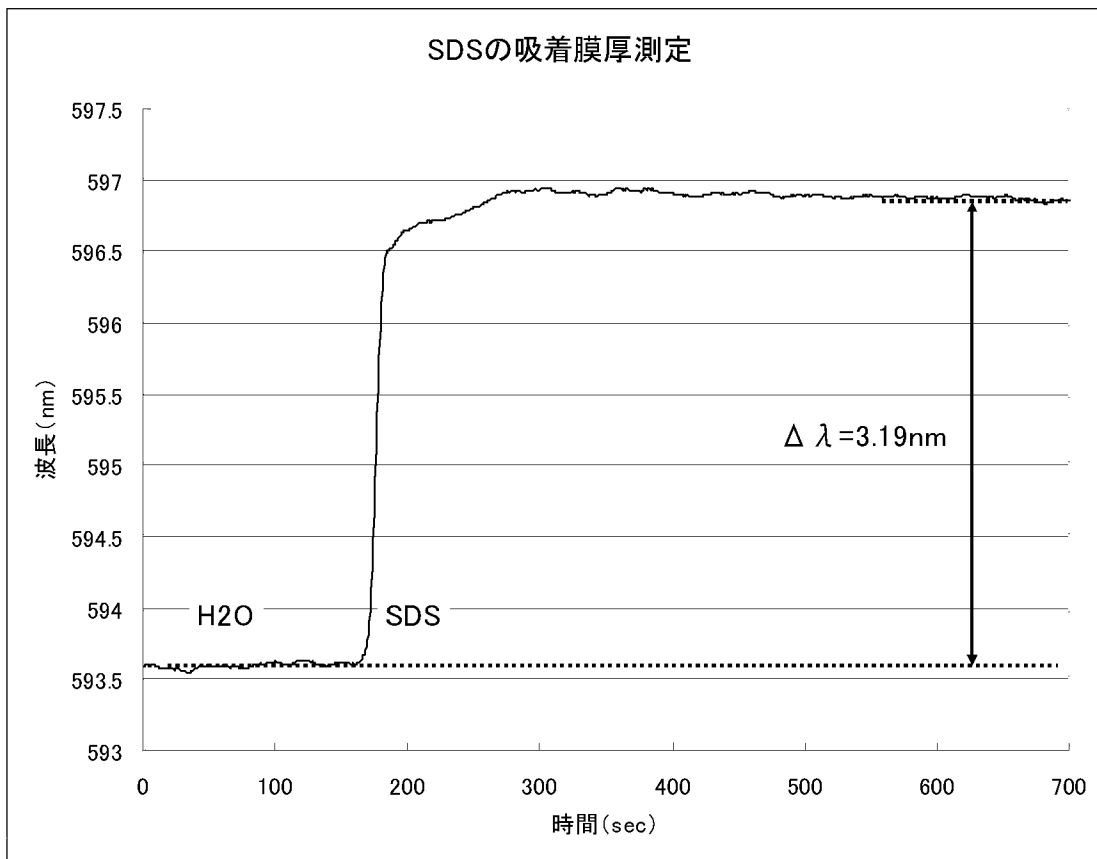
[図3]



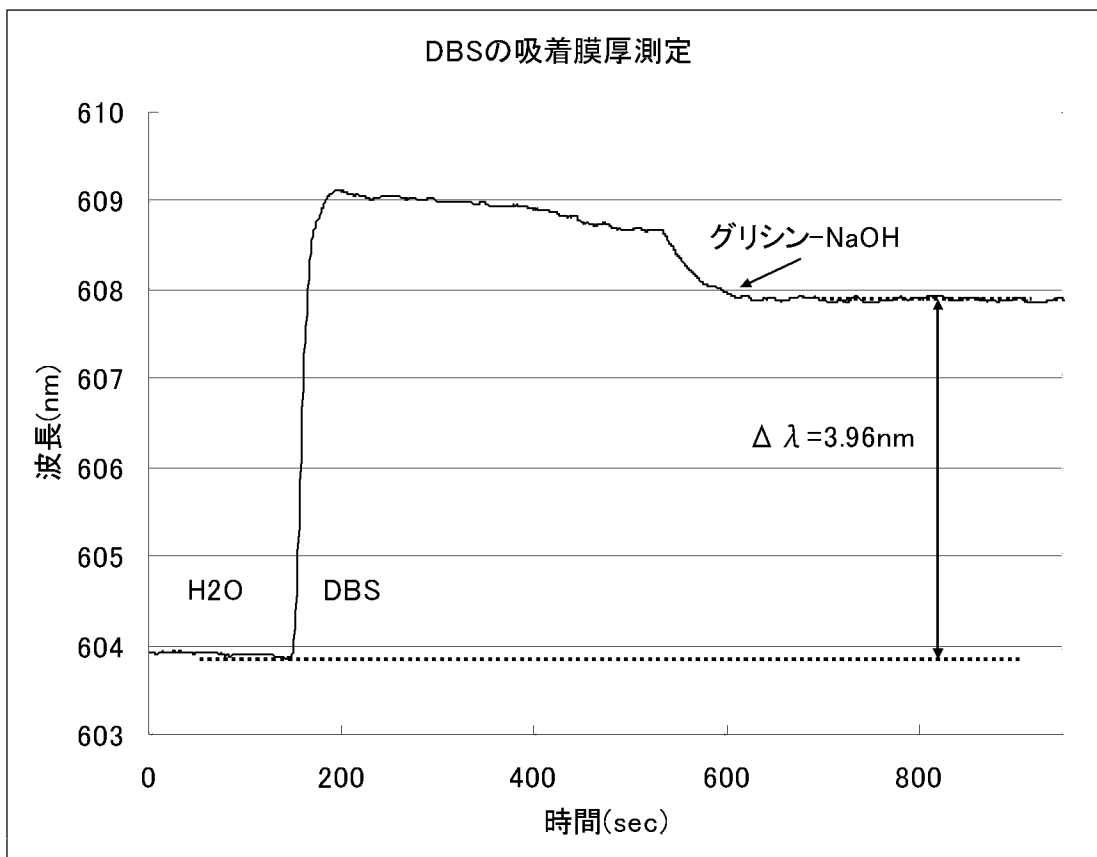
[図4]



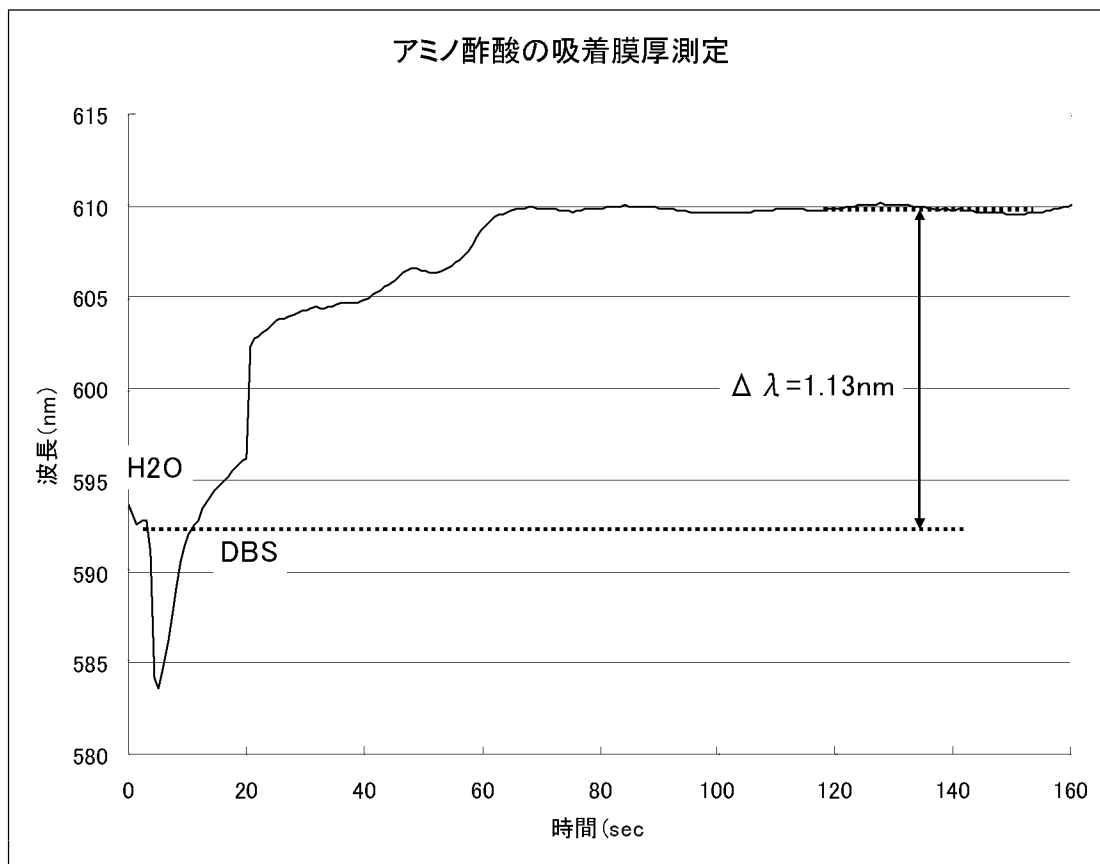
[図5]



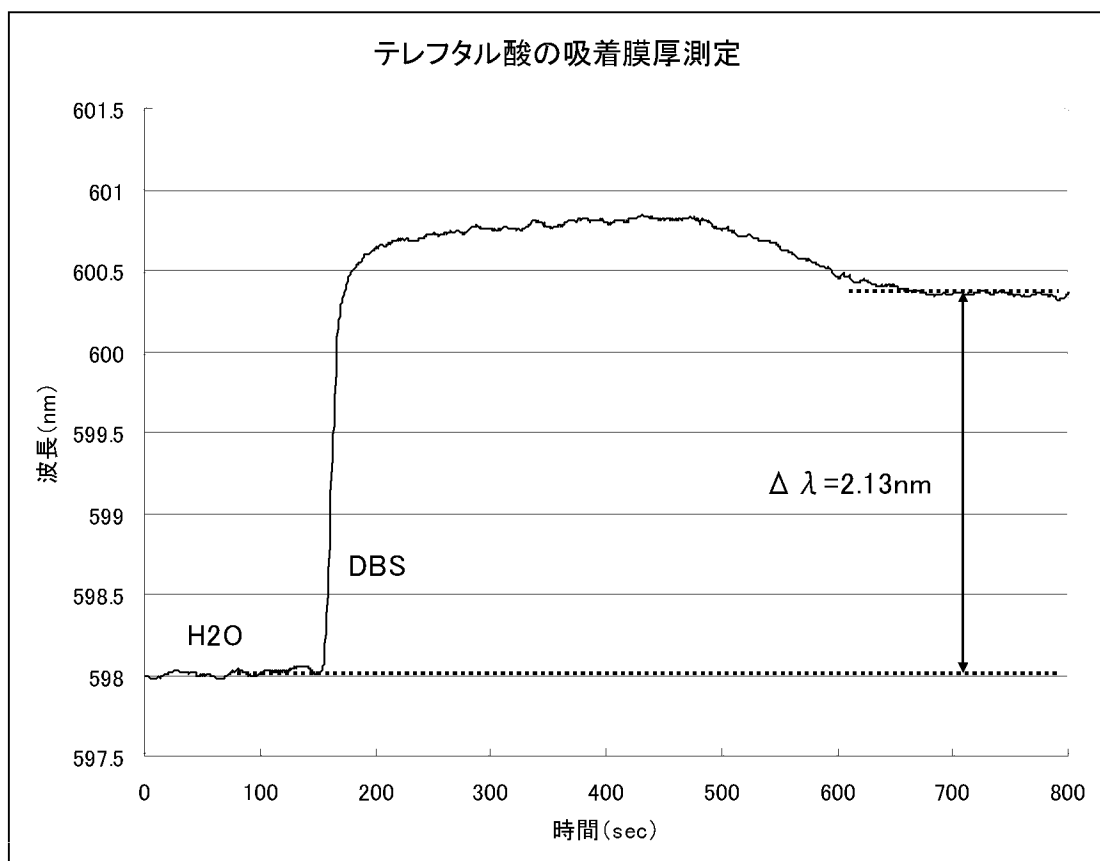
[図6]



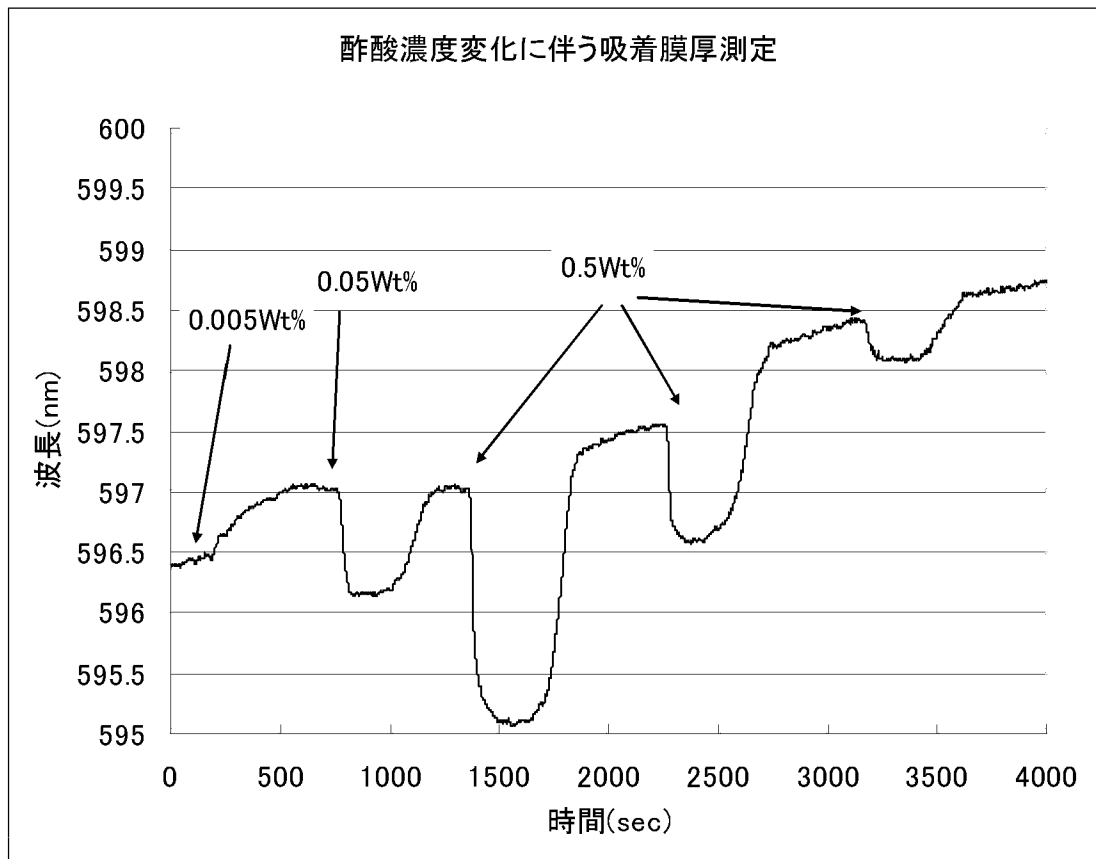
[図7]



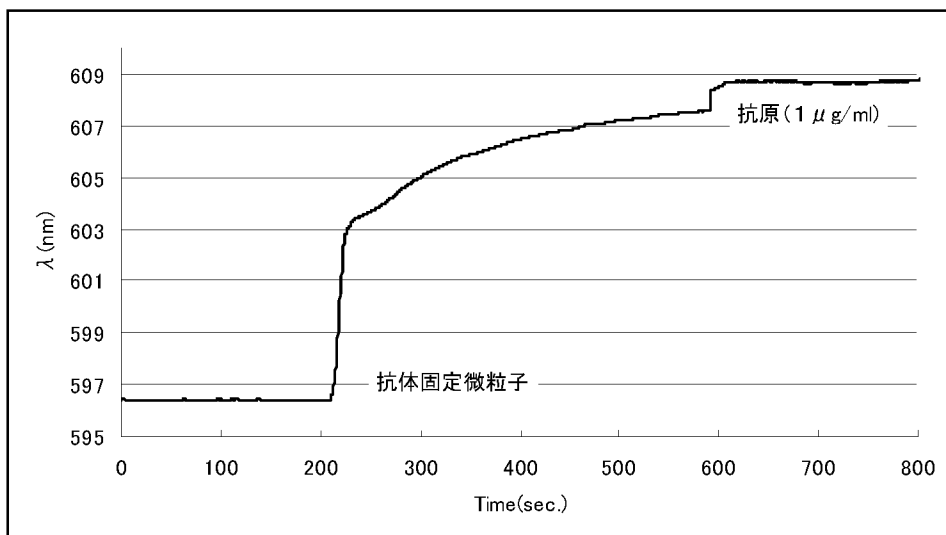
[図8]



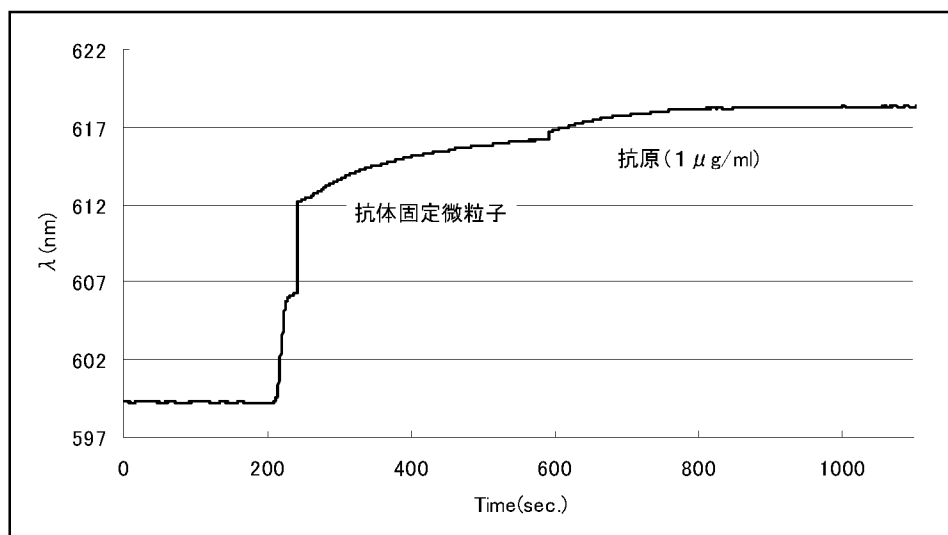
[図9]



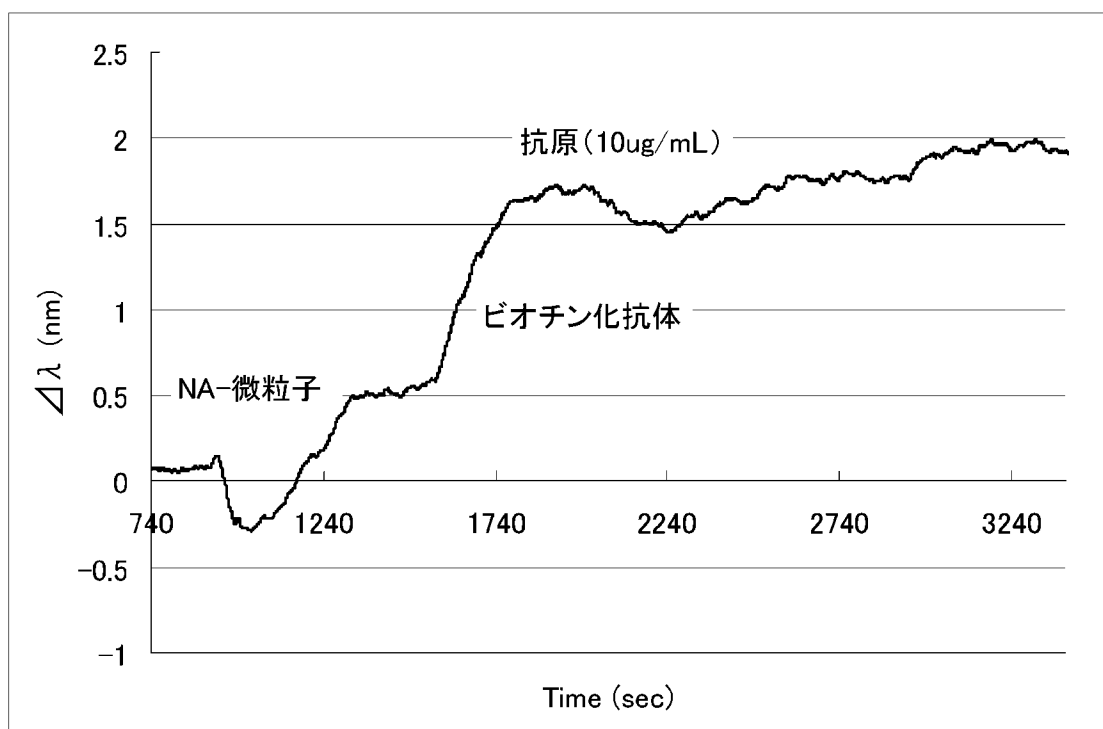
[図10]



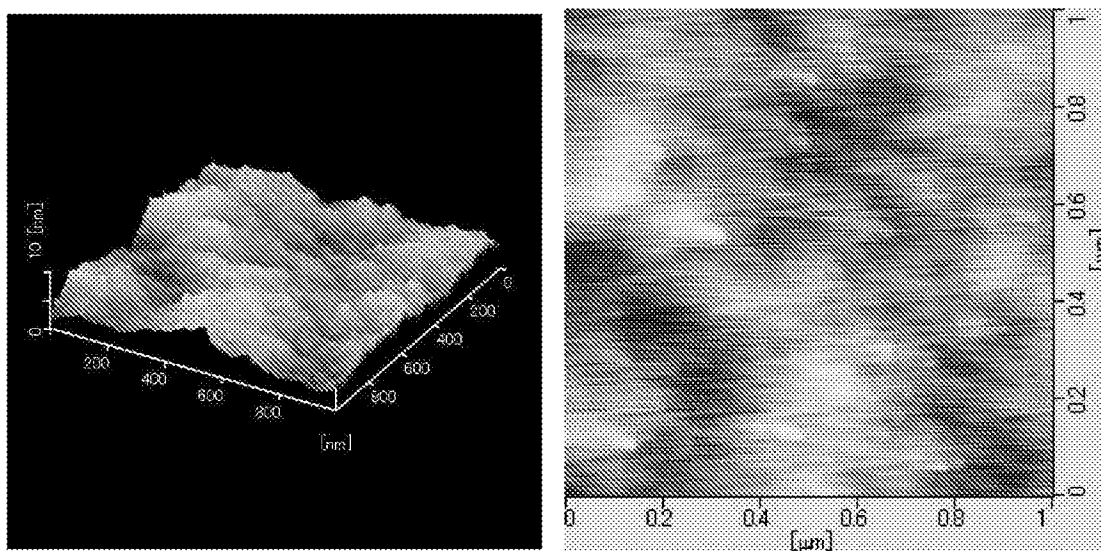
[図11]



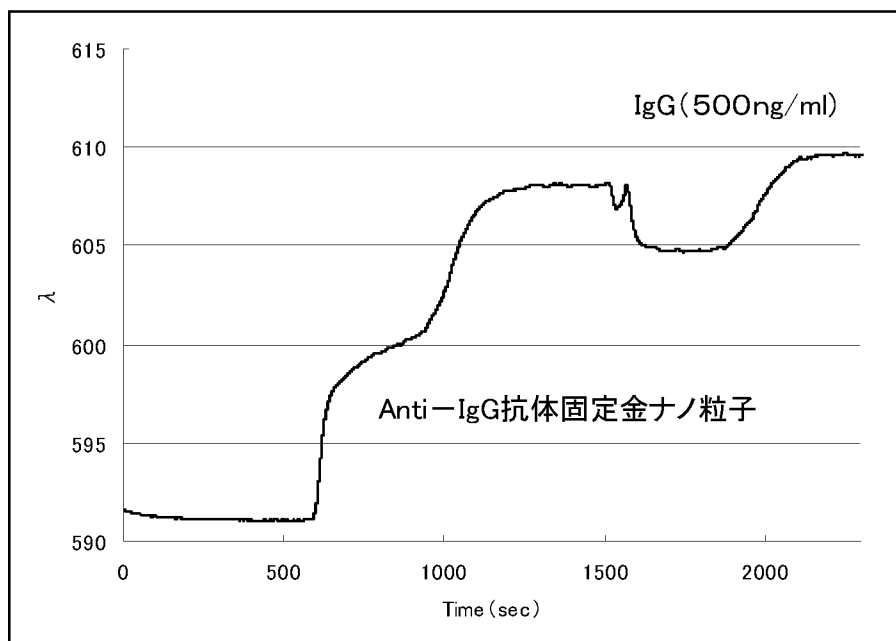
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/063337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

G01N33/543, G01N21/27

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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.
X	JP 2005-291951 A (KYOCERA Chemical Corp.), 20 October 2005 (20.10.2005), abstract; claims (Family: none)	1-13
X	JP 2005-520163 A (Ciphergen Biosystems, Inc.), 07 July 2005 (07.07.2005), claims 1, 2, 5, 16, 18, 19, 27; paragraphs [0013] to [0015], [0018], [0019], [0142], [0173], [0195], [0196]; fig. 7 & US 2003/0017464 A1 & US 2003/0032043 A1 & EP 1483794 A & WO 2003/079402 A2 & AU 2002367582 A	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June, 2012 (19.06.12)

Date of mailing of the international search report

03 July, 2012 (03.07.12)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/063337

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/109281 A1 (Asahi Glass Co., Ltd.), 16 December 2004 (16.12.2004), Best Mode for carrying out the Invention & US 2006/0078939 A1 & EP 1630556 A1	1-13
A	JP 2009-128297 A (Tokyo Medical and Dental University), 11 June 2009 (11.06.2009), abstract (Family: none)	1-13
A	JP 2009-292804 A (Canon Inc.), 17 December 2009 (17.12.2009), paragraphs [0025], [0030] & US 2009/0137064 A1	1-13
A	JP 2004-352542 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 16 December 2004 (16.12.2004), abstract (Family: none)	1-13
P,A	JP 2012-23964 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 09 February 2012 (09.02.2012), abstract (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

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

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 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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
X	JP 2005-291951 A（京セラケミカル株式会社）2005.10.20, 【要約】 【特許請求の範囲】（ファミリーなし）	1 - 1 3
X	JP 2005-520163 A（シファージェン バイオシステムズ, インコーポレ イテッド）2005.07.07, 【請求項1】【請求項2】【請求項5】【請求 項16】【請求項18】【請求項19】【請求項27】【0013】～ 【0015】【0018】【0019】【0142】【0173】【01 95】【0196】図7 & US 2003/0017464 A1 & US 2003/0032043 A1 & EP 1483794 A & WO 2003/079402 A2 & AU 2002367582 A	1 - 1 3

☒ 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 9 . 0 6 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

三木 隆

2 J

3 3 1 2

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2004/109281 A1 (旭硝子株式会社) 2004. 12. 16, 【発明を実施するための最良の形態】 & US 2006/0078939 A1 & EP 1630556 A1	1 - 1 3
A	JP 2009-128297 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2009. 06. 11, 【要約】 (ファミリーなし)	1 - 1 3
A	JP 2009-292804 A (キヤノン株式会社) 2009. 12. 17, 【0025】【0030】 & US 2009/0137064 A1	1 - 1 3
A	JP 2004-352542 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2004. 12. 16, 【要約】 (ファミリーなし)	1 - 1 3
P A	JP 2012-23964 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2012. 02. 09, 【要約】 (ファミリーなし)	1 - 1 3