

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年9月4日 (04.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/105105 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/054376
- (22) 国際出願日: 2007年2月28日 (28.02.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 有限責任中間法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム (On-Chip Cellomics Consortium) [JP/JP]; 〒1000006 東京都千代田区有楽町1-10-1 有楽町ビル11階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野和宣 (OKANO, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒1600008 東京都新宿区三栄町23-3-204 Tokyo (JP). 安田賢二 (YASUDA, Kenji) [JP/JP]; 〒1350052 東京都江東区潮見2-8-14-1014 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書



WO 2008/105105 A1

(54) Title: BIOLOGICAL SUBSTANCE ANALYSIS CHIP, BIOLOGICAL SUBSTANCE ANALYSIS KIT AND METHOD OF BIOLOGICAL SUBSTANCE ANALYSIS USING THEM

(54) 発明の名称: 生体物質解析チップ、生体物質解析キットおよびこれらを用いる生体物質解析法

(57) Abstract: A biological substance analysis chip that by immobilizing of a biological substance trapping probe on a substrate surface with enhanced uniform density, enables quantitative measurement in a minute region; a biological substance analysis kit making use of the chip; and a method of biological substance analysis using them.

(57) 要約: 本発明は、生体物質捕捉用プローブを基板表面により均一な密度で固定することで微小な領域で、定量測定を行うことのできる生体物質解析チップとこれを用いる生体物質解析キットおよびこれらを用いる生体物質解析法を提供する。

明細書

生体物質解析チップ、生体物質解析キットおよびこれらを用いる生体物質解析法

5

技術分野

本発明は細胞ないし細胞集合体である組織で発現している遺伝子産物である mRNA ないしタンパク質を定量的に計測するための生体物質解析チップ、生体物質解析キットおよび生体物質解析方法に関する。

10

背景技術

ゲノム計画の進展とともに DNA レベルで生体を理解し、病気の診断や生命現象の理解をしようとする動きが活発化してきた。生命現象の理解や遺伝子の働きを調べるには遺伝子の発現状況を調べるのが有効である。遺伝子の発現状況を調べるには遺伝子の転写産物である mRNA を調べる方法と mRNA から翻訳されるタンパク質を調べる方法がある。mRNA を調べる有力な方法として、固体表面上に数多くの DNA プローブを種類毎に区分けして固定した DNA プローブアレー、あるいは DNA プローブチップ（実際には固定されているのはオリゴヌクレオチドの誘導体であるのでオリゴチップと呼ぶこともある）がある。DNA プローブアレーを用いる mRNA 検査では、予め十分多量な細胞検体から RNA 成分を抽出し、リバーストランスクリプターゼによる逆転写反応で cDNA を合成し、PCR 増幅や cRNA 合成により増幅を行う。また相補鎖合成時に標識 dNTP を取り込ませて多量の標識 DNA 鎖を得る。最近ではアミノアシル dNTP を取り込ませて、その後にアミノ基に蛍光色素を反応させて蛍光標識 DNA 鎖を得る方法が主流となっている。このようにして得られた蛍光標識 DNA 鎖をいわゆる DNA プローブアレーとハイブリダイズさせて各種発現遺伝子の解析を行う。DNA プローブアレー上には通常数十から $150 \mu m \phi$ の微小スポット状に高

密度にDNAプローブを固定して標的cDNA捕捉速度を高め、高感度検出ができるようにしている。

5 DNAチップを作るには光化学反応と半導体工業でよく用いられるリソグラフィを用いて区画された多数のセルに設計された配列のオリゴマーを一塩基ずつ合成して行く方法 (Science 251, 767-773(1991))、あるいはDNAプローブやタンパク質プローブを各区画に一つ一つ植え込んでいく方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4613-4918 (1996)) などがある。

10 これらチップは、いずれもスライドガラスなどの平面上に多数のプローブをアレイ状に整列させた構造をしている。どのプローブがどの位置にあるかは、プローブが固定されている物理的な位置のみでインデクシングされるのが一般的である。検出には、DNAチップの類では標識物に蛍光色素を用いるケースが圧倒的に多いが、電気化学発光を用いるケースや Dedox (酸化還元) 反応を用いて電気信号として検出する方法も
15 実用化している。

20 DNAプローブのかわりに抗体や抗原を基板上にアレイ状に固定したプロテインチップの概念も実用化されている。基板上にアレルギーを起こす数十から数百の抗原 (アレルゲン) を固定したデバイスに検体血清を反応させ、各抗原と抗原抗体反応を起こす血清中に存在する IgM を特異的に捕捉し、IgMに結合する酵素標識2次抗体を反応させ、酵素活性を化学発光と組み合わせることで測定して、アレルゲンを検出するアレルゲン検査用のシステムが医療検査用に実用化されている。プロテインチップにおいても、高感度検出を行うために固体表面に抗体や抗原を高密度に固定することで測定対象物質の捕捉速度を高めている。

25 プロテインチップ上に捕捉した測定対象物質の検出には、酵素標識物を用いて化学発光ないし生物発光の系で検出するケースが多い。そのほか、蛍光標識検出や、電気化学発光検出、質量分析器による分析を行うケースと多様な方法が実用化されている。

電気化学発光法では、電極表面に抗原捕捉用の抗体が存在する。サン

ドイツ用抗体の標識物にはルテニウム錯体を用いる (Clin. Chem., 37, 1534-1539 (1991))。電極表面ではルテニウムが酸化され、T P A のレドックス反応とカップルさせて還元するとき励起状態となったルテニウムの電子が基底状態に落ちる時に光を発する。

- 5 本発明に関連するところでは、生体物質検出法の一つでプロテインチップと類似の技術であるサンドイッチイムノアッセイ法において、標識物に粒子を用いて測定対象物質を分子計数する方法が報告されている (Analytical Biochemistry 202, 120-125 (1992))。

10

発明の開示

上記従来技術では、DNAプローブチップあるいはプロテインチップを用いる遺伝子転写産物である mRNA や翻訳産物であるタンパク質の識別や検出法に関してはよく検討されており、何らかの方法で溶液状の試料が準備できていればそれなりに測定ができる。また、出願人の一人

15 により特許出願されている特願 2004-226361、特願 2004-297194 あるいは特願 2004-318770 に開示されているように、mRNA や DNA マイクロアレイの分野においてもナノ粒子を用いて解析する方法が提案されている。

20

しかしながら、生体物質を基板上に捕捉するための親和性プローブ(以下生体物質に結合して生体物質の解析に有用な何らかの情報を得るために使われる物質の総称を親和性プローブと呼ぶことにする)は、DNA プローブや抗体などの生体有機物であるので、これらのガラスやシリコンの基板への固定には下記の問題がある。すなわち、

- 1) 親和性プローブを基板上に固定するために物理的な吸着や共有結合形成を用いるが、吸着反応と共有結合反応のいずれも基板表面の状態に
- 25 依存するために均一な固定が困難であるケースが多い。

2) 親和性プローブの基板への固定の3次元的な向きの制御ができない。すなわち、溶液中の測定対象生体物質を捕捉するための親和性部位を測定対象生体物質と反応する方角に向けて固定することが難しい。こ

のため、親和性プローブ自身の立体障害で測定対象の捕捉量が低下する。

3) 親和性プローブの密度がコントロールできない。一般的に、固定時の親和性プローブ濃度や固定時間をコントロールすることで任意の密度の親和性プローブを固定した基板が得られると思われがちであるが、実

5 際には制御が難しいことが多い。上記従来技術 (Analytical Biochemistry 202, 120-125 (1992)) では、親和性プローブの固定時にこれとは異なる生体物質を共存させて実際の親和性プローブ固定密度をコントロールしている。親和性プローブを希薄状態で基板表面に固定しようとする

10 くと、島状に密度の高いところと周りの密度の薄いところが出てしまう。

4) あるいは、上記1) から3) の問題に関連するが、親和性プローブの固定エリアが狭くなると各エリアで親和性プローブの固定量が異なるようになり、定量的な測定に害を及ぼす可能性がある。さらに、親和性

15 プローブの固定エリアが狭くなると蛍光法のように親和性プローブエリア全体の蛍光強度を測定し、その蛍光強度を基に試料中の目的生体物質の量を定量解析することができなくなる。このために、上記従来技術 (Analytical Biochemistry 202, 120-125 (1992)) あるいは特許出願

20 発明のように基板上に捕捉した目的生体物質にナノ粒子を結合させてこれを計数する方法を取るわけであるが、親和性プローブが均一についていないと、部位ごとに結合するナノ粒子の数が異なることになり、計数による定量検出精度が当然低下することになる。

基板に固定する親和性プローブ密度には最適条件が存在する。このために、親和性プローブ密度を任意にコントロールする必要性が出てくる。

従来のプローブ固定法ではシランカップリング反応を用いて無機質で

25 あるガラスやシリコンウエハー表面に官能性残基を導入し、この官能性残基に親和性プローブを固定する方法が多用されている。しかしながらシランカップリング反応は、基板の表面状態に依存し、必ずしも均一に親和性プローブを固定する方法として最適なものではない。

本発明の目的は、生体物質捕捉用プローブを基板表面により均一な密

度で固定することで微小な領域で、定量測定を行うことのできる生体物質解析チップとこれを用いる生体物質解析キットおよびこれらを用いる生体物質解析法を提供することにある。

したがって、本発明は、以下の生体物質解析用チップ、生体物質解析用キットおよび生体物質解析方法を提供する。

- (1) 基板と、該基板の一つの表面に所定の生体物質の捕捉用残基（第3の官能基）を有する固体チップであり、上記基板の一つの表面に2種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層を有し、上記ポリマー層の内、第1の官能基を2箇所にも有する第1のモノマーと重合用の第2の官能基を2箇所にも有する第2のモノマーを実質的に交互に配するように重合した構造で、上記第1のモノマーおよび上記第2のモノマーの片方に第3の官能基を持つ構造であることを特徴とする生体物質解析チップ。
- (2) 上記第1のモノマーと第2のモノマーの組み合わせが $\text{NCS-R}_1\text{-NCS}$ (R_1 は任意の残基) の構造を有するジイソシアナートモノマーと $\text{NH}_2\text{-R}_2\text{-NH}_2$ (R_2 は任意の残基) の構造を有するジアミンモノマーでポリマー層とがポリ尿素ある上記(1)記載の生体物質解析チップ。
- (3) 上記第1のモノマーと第2のモノマーの組み合わせが $\text{R}_1\text{-C=O-O-O=O=C-R}_2$ あるいは $\text{R}_1\text{-C=O-O-O=O=C-R}_2\text{-C=O-O-O=O=C-R}_3$ ($\text{R}_1\sim\text{R}_3$ は任意の残基) の構造を有する酸無水物と $\text{NH}_2\text{-R}_5\text{-NH}_2$ (R_5 は任意の残基) の構造を有するジアミンモノマーで、ポリマー層がポリアミドないしポリイミドある上記(1)または上記(2)記載の生体物質解析チップ。
- (4) 上記第3の官能基がカルボキシル基である上記(1)ないし上記(3)のいずれかに記載の生体物質解析チップ。
- (5) 上記カルボキシル基にイソチオシアン酸が導入された構造である上記(4)記載の生体物質解析チップ。
- (6) 上記カルボキシル基にジアミン類を反応させて固体チップ表面にアミンを導入し、上記固体表面に導入したアミンにジイソチオシアナー

ト類を反応させて固体チップ表面にイソチオシアナート残基を導入した構造の上記（４）または上記（５）記載の生体物質解析チップ。

（７）所定の生体物質の捕捉用残基（第３の官能基）を有する固体チップが、上記固体チップ表面に２種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層を有し、少なくとも上記ポリマー層が重合用の上記２つのモノマーの内第１の官能基を２箇所にも有する第１のモノマーと重合用の第２の官能基を２箇所にも有する第２のモノマーを実質的に交互に配するよう

5

10

に重合した構造で、上記２つのモノマーの内少なくとも１種のモノマーに第３の官能基を持つ構造で、上記第３の官能基に所定の生体物質を捕捉するための分子（生体物質捕捉用プローブ）が共有結合で固定した細胞構成物質解析チップと、上記第３の官能基に固定した分子に捕捉された所定の生体物質に結合し該所定の生体物質を特定するための標識物を含む生体物質とを有することを特徴とする生体物質解析キット。

（８）上記標識物が５から３００nmのナノ粒子からなる上記（７）記載の生体物質解析キット。

15

（９）所定の生体物質の捕捉用残基（第３の官能基）を有する固体チップが、上記固体チップ表面に２種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層を有し、少なくとも上記ポリマー層が重合用の上記２つのモノマーの内第１の官能基を２箇所にも有する第１のモノマーと重合用の第２の官能基を２箇所にも有する第２のモノマーを実質的に交互に配するよう

20

25

に重合した構造で、上記２つのモノマーの内少なくとも１種のモノマーに第３の官能基を持つ構造で、上記第３の官能基に所定の生体物質を捕捉するための分子（生体物質捕捉用プローブ）が共有結合で固定した細胞構成物質解析チップの表面上の空間に生体物質を含む緩衝液を添加する工程、上記細胞構成物質解析チップ表面に存在し共有結合で固定された生体物質を捕捉するための分子で所定の生体物質を捕捉する工程、該所定の生体物質と結合し該所定の生体物質を特定するためのナノ粒子で標識された生体物質を結合する工程、細胞構成物質解析チップの表面に固定されるナノ粒子を計数する工程、からなることを特徴とする生体物

質解析法。

(10) 生体物質捕捉用プローブを備えた基板を含む生体物質解析用チップであって、

5 第1のモノマーおよび第2のモノマーから形成される2量体のユニットを含むポリマーを含むポリマー層を基板の表面に備え、

生体物質捕捉用プローブが、上記第1のモノマーまたは上記第2のモノマーに結合している、生体物質解析用チップ。

(11) 上記ポリマー層が、ポリ尿素、ポリアミドまたはポリイミドを含む、上記(10)に記載の生体物質解析用チップ。

10 (12) 上記第1のモノマーが2つの第1の官能基を備え、上記第2のモノマーが2つの第2の官能基を備えており、

上記第1のモノマーの第1の官能基の1つと上記第2のモノマーの第2の官能基の1つとが結合することによって、上記2量体が形成され、

15 上記2量体の残りの第1の官能基または残りの第2の官能基が、それぞれ別の2量体の第2の官能基または第1の官能基と結合することによって、上記ポリマーが形成される、上記(10)に記載の生体物質解析用チップ。

(13) 上記第1の官能基がイソシアナート基であり、上記第2の官能基がアミノ基である、上記(12)に記載の生体物質解析用チップ。

20 (14) 上記第1のモノマーが $\text{NCS}-\text{R}_1-\text{NCS}$ (R_1 は任意の残基) の構造を有するジイソシアナートモノマーであり、上記第2のモノマーが $\text{NH}_2-\text{R}_2-\text{NH}_2$ (R_2 は任意の残基) の構造を有するジアミンモノマーである、上記(13)に記載の生体物質解析用チップ。

25 (15) 上記第1のモノマーが $\text{R}_1-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{O}=\text{C}-\text{R}_2$ あるいは $\text{R}_1-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{O}=\text{C}-\text{R}_2-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{O}=\text{C}-\text{R}_3$ ($\text{R}_1\sim\text{R}_3$ は任意の残基) の構造を有する酸無水物であり、上記第2のモノマーが $\text{NH}_2-\text{R}_5-\text{NH}_2$ (R_5 は任意の残基) の構造を有するジアミンモノマーである、上記(10)に記載の生体物質解析用チップ。

(16) 上記第1のモノマーまたは上記第2のモノマーが、第3の官能

基をさらに備え、

上記第3の官能基を介して、上記生体物質捕捉用プローブが上記第1のモノマーまたは上記第2のモノマーに結合している、上記(10)～(15)のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

5 (17) 上記第3の官能基が、カルボキシル基である、上記(16)に記載の生体物質解析用チップ。

(18) 上記第3の官能基が、アミノ基である、上記(16)に記載の生体物質解析用チップ。

10 (19) 上記生体物質捕捉用プローブがそれに結合した第4の官能基を含み、上記第4の官能基と上記第3の官能基とが結合することによって、上記生体物質捕捉用プローブが上記第1のモノマーまたは上記第2のモノマーに結合している、上記(16)～(18)のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

15 (20) 上記生体物質捕捉用プローブが、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または抗体である、上記(10)～(19)のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

(21) 上記ポリマー層を含む生体物質解析用エリアが、上記基板上にアレイ状に形成されている、上記(10)～(20)のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

20 (22) 上記(10)～(21)のいずれかに記載の生体物質解析用チップ、および上記生体物質捕捉用プローブに結合した生体物質を標識するための標識物質を含む、生体物質解析用キット。

(23) 上記標識物質が、粒径が5～300nmの範囲の金ナノ粒子を含む、上記(22)に記載の生体物質解析用キット。

25 (24) 上記(10)～(21)のいずれかに記載の生体物質解析用チップを用いて生体物質を解析する工程を含む、生体物質解析方法。

(25) 上記(10)～(21)のいずれかに記載の生体物質解析用チップの上記ポリマー層に、生体物質を含む試料溶液を接触させる工程、上記ポリマー層に捕捉された生体物質を標識する工程、および

上記標識された生体物質を検出または定量する工程、を含む、上記（24）に記載の方法。

本発明により、生体物質捕捉用プローブが基板上へ均一に固定された生体物質解析用チップが提供される。本発明により、生体物質捕捉用プローブ自体の立体障害による生体物質の捕捉能力の低下の影響を極力なくすることができる。本発明によれば、ポリマー層を構成するモノマーの種類を変化させることによって生体物質捕捉用プローブの密度を制御することが可能となる。本発明により、被験試料中の生体物質の精度の向上した定量解析が可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明を実行するに好適な生体物質解析チップの1例を示す図である。図1（A）は本発明の一実施形態の生体物質解析チップを示す平面図、図1（B）は図1（A）のA-A位置で矢印方向に見た断面図である。

図2（A）は、基板1の上面に蒸着重合で形成された第1のモノマーとしてアルキルジイソシアナートと第2のモノマーとしてジアミノフェニル酢酸を等モル比で反応させ重合させたポリマー薄膜層21の断面構造を示す模式図であり、図2（B）は、ポリマー薄膜層21の平面構造を示す模式図である。

図3は、基板1の表面に形成されたポリマー薄膜層21の第三の官能基26とDNAプローブ31の5'末端部分32の官能基33とが結合する様子を模式的に示す図である。

図4（A）～（D）は、図1～3に示す基板を用いて、mRNAを検出する工程を示す図である。

図5（A）～（D）は、複数のDNAプローブを同一スポット位置に固定し、各スポット位置でDNAプローブを異なるものとしたDNAマイクロアレイを用いて、mRNAを検出する工程を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の一つの実施形態によれば、生体物質捕捉用プローブを備えた基板を含む生体物質解析用チップが提供される。この生体物質解析用チップは、第1のモノマーおよび第2のモノマーから形成される2量体のユニットを含むポリマーを含むポリマー層を基板の表面に備える。生体物質捕捉用プローブは、前記第1のモノマーまたは前記第2のモノマーに結合している。

本明細書中、「生体物質」とは、DNA、RNA（例えば、遺伝子転写産物であるmRNA）の様なポリヌクレオチド、またはDNAの翻訳産物であるタンパク質もしくはペプチド、または抗原、抗体等の生体試料中の被験物質をいうものとする。

本明細書中、「ポリマー」は、生体物質を捕捉するためのポリマー層を構成するための化学物質の重合体をいう。本発明において使用するポリマーは、第1のモノマーと第2のモノマーとから形成される2量体が最小の繰り返し単位として重合して形成されたヘテロポリマーである。

本明細書中、「生体物質捕捉用プローブ」は、生体物質を上記ポリマー層に捕捉するための結合手段として機能し、生体物質の種類に応じて、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、抗原等であり得る。例えば、生体物質がmRNAである場合、これとハイブリダイズし得る相補的な配列を有するポリヌクレオチドが生体物質捕捉用プローブとして使用し得る。あるいは、生体物質が、抗原である場合には、これに特異的に結合する抗体を生体物質捕捉用プローブとして使用することができる。生体物質捕捉用プローブは、典型的には、上記ポリマー中の第1のモノマーまたは第2のモノマーに対して、例えば、特定の官能基のようなアンカー手段を介して、結合することによって、上記ポリマー層と結合することができる。

本発明では、ガラスやシリコン基板表面のSi-OHないしSi=Oあるいは、金属表面のMe-OHやMe=O（Me：金属原子）のよう

な残基に直接反応するようなシランカップリングを用いることはしない。このような表面に存在する-OHや=O残基は表面状態により存在する量が異なるので、本質的に均一な活性基を導入することが困難と考えたからである。そこで、基板表面の状態に依存せずに生体物質捕捉用プローブを固定する残基を導入する必要がある。これには、基板表面状態にかかわらず、ポリマー層を基板表面に導入し、このポリマー層が一定間隔で生体物質捕捉用プローブを固定するための官能基（第3の官能基）を持つように設計すればよい。このとき重要なのは、いかにして生体物質捕捉用プローブを固定するための第3の官能基の間隔をそろえるかである。

本発明においては、2種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層でできた重合生成薄膜を有するものを作成することとする。これは、前記ポリマー層が重合用の第1の官能基を2箇所にも有する第1のモノマーと重合用の第2の官能基を2箇所にも有する第2のモノマーを交互に配するよう重合した構造で、前記第1のモノマーおよび前記第2のモノマーの片方に生体物質捕捉用プローブ結合残基（第3の官能基）を持つ構造をしている。具体的には、基板に第1のモノマーとしてジイソシアナート類と第2のモノマーとしてジアミン類を等モル比で反応させ重合させる。このケースでは、第1の官能基はイソシアナート基、第2の官能基はアミノ基ということになる。ジイソシアナートとしてはたとえばアルキルジイソシアナートやフェニレンジイソシアナート類を用いることができる。また、生体物質捕捉用プローブ結合用にはジイソシアナート類かジアミン類の側鎖に第3の官能基を導入したモノマーを用いればよい。

例えば、ジアミン類の側鎖に第3の官能基としてカルボキシル基を導入したモノマーを用いる。これを基板表面で重合させると、ジイソシアナート類とジアミン類が交互に結合したポリマーが得られる。よって第3の官能基としてのカルボキシル基はジイソシアナート類とジアミン類からなる2量体ユニットのジアミン部分の側鎖に存在することになる。

このため、第3の官能基を介してポリマー上に一定間隔で生体物質捕捉用プローブを固定することが可能となる。このときの重合生成薄膜はポリ尿素ということになる。重合条件に関しては、既存の真空蒸着法を用いることができるジイソシアナート類とジアミン類の主鎖の長さを調製

5 することで導入するカルボキシル基（第3の官能基）の間隔を調製できる。また、これにより、従来は表面に官能基（第3の官能基）を導入することが困難であった金や白金などの電極上にも自在に官能基を持つ薄膜を形成することができる。

10 基板上に導入したカルボキシル基に対してカルボジイミド系の活性化剤を用いてアミノ基（第4の官能基）を有する生体物質捕捉用プローブを直接固定することができる。あるいは、この側鎖カルボキシル基にジシクロヘキシルカルボジイミド系の活性化剤存在下でエチレンジアミンを反応させると、高収率で側鎖カルボキシル基に一級アミン残基を導入

15 することができる。すなわち基板表面には一級アミンがほぼ一定間隔で並んだ状態となる。次に *Nucleic Acids Research*, 27, 1970-1977 (1999) および *CHEMBIOCHEM* 2, 686-694 (2001) 記載の1, 4-フェニレンジイソチオシアナートで一級アミンを修飾し、表面にイソチオシアナート基を導入する。最後に5'末端にアミノ基（第4の官能基）を有するDNA

20 DNAと反応する部分：平均32塩基長）を反応させる。この反応条件は上記文献に詳しい。上記方法でDNAプローブが約9nm間隔で固定された基板が得られる。このように、本発明に使用される「第3の官能基」は、一種類の残基からなるものに限定されず、複数種の残基の結合または組み合わせから形成される反応性残基をも意味するものとする。

25 カルボキシル基をもつポリ尿素を基板上に形成する例のほか、側鎖にプローブとなるポリヌクレオチドやペプチドなどを固定できるような反応基を導入できる残基を周期的に持つポリマーであればいずれも利用することができる。たとえば、2種のモノマーの組み合わせが $R_1-C=O-O-O=C-R_2$ や $R_1-C=O-O-O=C-R_2-C=O-O-O-$

O=C-R₃ (R₁~R₃は任意の残基)の構造を有する酸無水物とNH₂-R₅-NH₂ (R₅は任意の残基)の構造を有するジアミンモノマーで、R₅にカルボキシル基を有するジアミノフェニル酢酸モノマーを用いることができる。酸無水物としては、4,4'-ヘキサフルオロイソプロピリデンビスフタル酸無水物のような構造のものを用いることができる。

このようなポリマーは、すなわちポリイミドである。ポリイミドは一般的にこのようなビス無水フタル酸とビスアミノ化合物を用いる。あるいは、たとえば長カルボキシル基を有するジアミノフェニル酢酸あるいは1,10-ジアミノデカンのような脂肪族ジアミンの脂肪族位置にカルボン酸残基を有するモノマーとジ酸クロリドモノマーであるテレフタルイルジクロリドを蒸着重合により基板上に膜形成を行うポリアミドを利用することができる。プローブ固定用には長鎖脂肪族ジアミンに各種反応性残基を導入しておけばよい。蒸着重合としては既存の方法、たとえば、Jpn. J. Appl. Phys. 33, L1721-L1724(1994)やThin Solid Films, 215, 94-97(1992)記載の方法に準じて、使用するモノマーの気化条件を考慮して行えばよい。

以下、本発明の好適な実施形態について図面を参照しながら説明する。

図1は本発明を実行するに好適な生体物質解析チップの1例を示す図である。図1(A)は本発明の一実施形態にかかる生体物質解析チップを示す平面図、図1(B)は図1(A)のA-A位置で矢印方向に見た断面図である。

この生体物質解析チップ100は、ガラス基板1の上面に親和性官能基を固定するためのポリマー薄膜層21を作成する。ポリマー層21の上にはテフロン(登録商標)層22がプリントされている。したがって表面に出ているポリマー層21は図の23のような区画となっている。この区画は50×50μmで細胞1個を収納できる。ポリマー薄膜層21の上には生体物質捕捉用プローブとしてポリT(T30)を固定し、

mRNAを網羅的に捕捉するようにすることができる。あるいは、上記「発明の開示」に記載したDNAプローブ（スペーサー部：5'末端側10塩基+ターゲットのmRNAないしcDNAと反応する部分：平均32塩基長）を固定することで特定のmRNAあるいはcDNAを捕捉する5のようなチップを得ることができる。もちろん通常のDNAチップのように複数のDNAプローブをスポットした構造とする。ポリマー層21の周りには、必要に応じて、試料溶液の周辺への流出を防止するための仕切り5が存在する。仕切り5は樹脂などで構成され得る。

まず、基板1の上面に形成する親和性官能基を固定するためのポリマー10薄膜層について説明する。ポリマー薄膜層21は第1のモノマーとしてアルキルジイソシアナートと第2のモノマーとしてジアミノフェニル酢酸を等モル比で反応させ重合させる。すなわちポリマー薄膜としては尿素樹脂薄膜ということになる。アルキルジイソシアナートとしては、例えば、ヘキサメチレンジイソシアナートを用いることができる。また、15第3の官能基は第2のモノマーであるジアミノフェニル酢酸のカルボキシル基ということになる。重合条件に関しては、既存の真空蒸着法を用いることができる。

このようにして基板上に形成したポリ尿素薄膜21はアルキルジイソシアナートとジアミノフェニル酢酸モノマーが交互に反応して形成する20構造のため、側鎖のカルボン酸基が比較的そろった間隔で存在することになる。アルキル基の長さを調製することで導入するカルボキシル基の間隔を調製できる。また、これにより、従来は表面に官能基を導入することが困難であった金や白金などの電極上にも官能基を持つ薄膜を形成25することができる。基板上に導入したカルボキシル基に対してカルボジイミド系の活性化剤を用いて第3の官能基としてアミノ基を有するプローブを直接固定してもよい。あるいは、この側鎖カルボキシル基にジシクロヘキシルカルボジイミド系の活性化剤存在下でエチレンジアミンを反応させると、高収率で側鎖カルボキシル基に一級アミン残基を導入することができる。すなわち基板表面には一級アミンがほぼ一定間隔で並

んだ状態となる。

次に Nucleic Acids Research, 27, 1970-1977(1999) および CHEMBIOCHEM2, 686- 694(2001) 記載の 1, 4-フェニレンジイソチオシアナートで一級アミンを修飾し、表面にイソチオシアナート基を導入する。最後に 5' 末端にアミノ基を有するポリ T (T30) を反応させる。この反応条件は上記文献に詳しい。上記方法でポリ T が約 9 nm 間隔で固定された基板が得られる。

本実施形態では、カルボキシル基をもつポリ尿素を基板 1 上に形成して用いたが、このほかにも、側鎖にプローブとなるポリヌクレオチドやペプチドなどを固定できるような反応基を導入できる残基を周期的に持つポリマーであれば利用することができる。たとえば、2 種のモノマーの組み合わせが $R_1-C=O-O-O=C-R_2-R_3-C=O-O-O=C-R_4$ の構造を有する酸無水物 ($R_1 \sim R_4$ は任意の残基) と $NH_2-R_5-NH_2$ の構造を有するジアミンモノマー (R_5 は任意の残基) で、 R_5 にカルボキシル基を有するジアミノフェニル酢酸モノマーを用いることができる。酸無水物としては、4, 4'-ヘキサフルオロイソプロピリデンビスフタル酸無水物のような構造のものを用いることができる。このようなポリマーは、すなわちポリイミドである。ポリイミドは一般的にこのようなビス無水フタル酸とビスアミノ化合物を用いる。あるいは、たとえばカルボキシル基を有するジアミノフェニル酢酸あるいは 1, 10-ジアミノデカンのような脂肪族ジアミンの脂肪族位置にカルボン酸残基を有するモノマーとジ酸クロリドモノマーであるテレフタロイルジクロリドを蒸着重合により基板上に膜形成を行うポリアミドを利用することができる。プローブ固定用には長鎖脂肪族ジアミンに各種反応性残基を導入しておけばよい。蒸着重合としては既存の方法、たとえば、Jpn. J. Appl. Phys. 33, L1721-L1724 (1994) や Thin Solid Films, 215, 94-97 (1992) 記載の方法に準じて、使用するモノマーの気化条件を考慮して行えばよい。

図 2 (A) は、基板 1 の上面に蒸着重合で形成された第 1 のモノマー

としてアルキルジイソシアナートと第2のモノマーとしてジアミノフェニル酢酸を等モル比で反応させ重合させたポリマー薄膜層21の断面構造を示す模式図であり、図2(B)は、ポリマー薄膜層21の平面構造を示す模式図である。

- 5 ポリマー薄膜層21は、第1のモノマー部分22と第2のモノマー部分23が、第1のモノマー部分22の第1の官能基24と第2のモノマー部分23の第2の官能基25とがお互いに連結し、交互に重合した二つのモノマーの連鎖構造となっている。第2のモノマー部分23には側鎖として第3の官能基26が存在する。ポリマー層薄膜21は基板表面との間での弱い結合27と、基板1のガラス表面のシラノール基とポリマー側の官能基のπ電子がごく一部分で共有結合した状態28でアンカリングしていると推定される。図2(B)を参照して分かるように、
- 10 第1のモノマー部分22の第1の官能基24と第2のモノマー部分23の第2の官能基25とがお互いに連結し、交互に重合した二つのモノマーの連鎖構造は、全てが、平行に整然と並ぶわけではないので、第3の官能基26が、均等に、整然と配列されるわけではない。すなわち、図2(B)に示すように、反転したもの、傾いたものが混在する。しかし、
- 15 第3の官能基26を有する第2のモノマー部分23は、第1のモノマー部分22を介在させて配列されることになるので、第3の官能基26が、むやみに集まったり、閑散と分布してしまったりすることは防止できる。
- 20

- 25 図3は、基板1の表面に形成されたポリマー薄膜層21の第3の官能基26とDNAプローブ31の5'末端部分32の第4の官能基33とが結合する様子を模式的に示す図である。官能基33は、アミノ基、カルボキシル基などで構成される。例えば、官能基26がカルボキシル基である場合には、官能基33は、アミノ基が使用され得る。あるいは、例えば、官能基26がアミノ基である場合には、官能基33は、カルボキシル基が使用され得る。第3の官能基および第4の官能基の組み合わせはここに例示したもの限定されない。ここで、ポリマー薄膜層21は、第1のモノマー22と第2のモノマー23が交互に重合しているの

で、分子レベルで見ると第2のモノマー23の側鎖である第3の官能基26の間隔はほぼ一定となり、したがって第3の官能基26に結合するDNAプローブ31もほぼ一定間隔となる。もちろんポリマー鎖同士の2次元的な広がりも考える必要があるが、側鎖のカルボキシル基（図25 (A) では第3の官能基26に相当）のマイナス荷電の反発力により、図2 (B) に示すように、異なる鎖の間隔もほぼ一定となることが期待できる。

図4は、図1-3に示す基板を用いて、mRNAを検出する工程を示す図である。図4 (A) は基板1の上面のポリマー薄膜層21の上面に、
10 例えば、細胞を破碎して得られた試料溶液41を配し、試料溶液41中にはmRNA43やタンパク質45が分散した様子を模視的に示す断面図である。溶液41はいわゆるPBSでEDTAは含まないものを使用する。基板1の上面のポリマー薄膜層21の表面にプローブ31が固定されている。ここではプローブ31はポリTからなるものを使用する。
15 mRNAが測定対象であるので液滴中に細胞浸透性のRNaseインヒビターを予め入れておき、mRNAの分解を極力防ぐ。

図4 (B) は、図4 (A) の状態から時間が経過した状態を模視的に示す図である。時間が経過するのに応じて、mRNA43は基板上のポリTプローブ31にハイブリダイズする。mRNAのハイブリダイゼーションによる基板表面のポリAプローブへの捕捉には4時間程度を要する。
20

図4 (C) は、基板1の上面のポリマー薄膜層21の上面のポリTプローブ31に捕捉されたmRNA群43を識別する方法を説明する図である。まず、図4 (B) に示すポリTプローブ31に捕捉されたmRNA群を有する基板1を0.5% SDSと0.1MのNaClを含む50
25 mMリン酸緩衝液pH7.4で洗浄し、基板1上のポリTプローブ31にハイブリダイズしなかった物を除去する。次いで、ポリTプローブ31にハイブリダイズしたmRNA群43は、種々の異なったものがあるので、これを識別するための標識プローブの混合溶液51を添加する。

ここでは、標識プローブとしては異なる粒子径の金ナノ粒子に異なるDNA配列を持つDNAプローブを結合させたものを用いる。図では模式的に粒径が5 nmの金ナノ粒子53で標識したDNAプローブ63、10 nmの金ナノ粒子54で標識したDNAプローブ64、15 nmの金ナノ粒子55で標識したDNAプローブ65の3種を含む溶液51を基板上に加えた状態を表す。金ナノ粒子標識DNAプローブの非特異的な吸着を防ぐために、溶液51は0.5% SDSと0.1MのNaClを含む50 mMリン酸緩衝液pH7.4の組成としている。

1時間45°Cでインキュベーションした後、同一の緩衝液で洗浄後、さらに10 mMのNaClを含むクエン酸緩衝液pH7で洗浄する。この状態で基板には、ポリTプローブ31にハイブリダイズしたmRNA群とポリTプローブ31に捕捉された各mRNAにハイブリダイズした標識プローブ63、64、65が3体結合した状態になっている。標識プローブ63、64、65には、走査型電子顕微鏡や操作型原子間力顕微鏡で容易に識別できる粒子径の異なる金ナノ粒子標識物53、54、55が結合している。したがって、金ナノ粒子53、54、55を、粒子径を区別しながらカウントすることで、基板1上のポリTプローブ31に捕捉されたmRNAの種類と量を測定することができる。

区画21は5×5 μmと微小なため、そこに固定できるプローブ数としては限られた数となってしまう。各区画ごとのプローブ固定量を一定に保とうとすると、基板表面の状態に固定量が依存するような方法は取ることができない。本方法を用いることで、基板表面のプローブ分子間隔をほぼ9 nmに保つことができる。このため5×5 μm程度のスポットでのプローブ固定量のばらつきは従来法のCV=30%程度から本発明によりCV=7%程度まで少なくすることができる。

次に、本発明の一実施形態による識別能力について説明する。

基板1の上面のポリマー薄膜層21の表面にプローブ31が固定されるが、プローブ31としてポリTを用いることとし、通常のDNAチップ

5 プの様に複数の配列のDNAプローブをポリマー薄膜層21の表面にスポットして用いる例を考える。すなわち、上述したようにして調製したイソチオシアナート残基がほぼ一定間隔になるように配された表面にインクジェット装置を用いて各プローブをスポットする。スポットの大き

さは1 μ m ϕ とし、各スポットが2 μ mピッチで並んでいるとする。
また、各スポットに3種類の捕捉用DNAプローブをミクスチャーとして固定し、各々捕捉用プローブに対応する検出用のDNAプローブに上述のように3種類の異なる粒子径のナノ粒子を標識したものを

10 図5(A)に本発明を用いる3種類のDNAプローブを同一スポット位置に固定し、スポットごとに異なるDNAプローブを固定したDNAマイクロアレイの例を断面図で示す。基板1の上には蒸着重合で作成した反応性残基がほぼ等間隔で並んだ層21の活性基を利用して3種の

15 3種のプローブ92-1, 92-2, 92-3のグループと、これらとは異なる3種のプローブ93-1, 93-2, 93-3がスポットエリア92と93に別個に固定されている。試料混合液91を添加して2時間50 $^{\circ}$ Cでインキュベーションする。試料混合液91は1本鎖状態のcDNA混合物で、たとえば白血球由来のmRNA混合物を逆転写して得たものである。溶媒は0.5%SDSを含む50mMのリン酸緩衝液(pH7.4)である。反応終了後、0.5%SDSを含む50mMのリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄する。

25 図5(B)に基板上の層21の表面のプローブにcDNAが捕捉された状態を示す。異なるcDNA102-1, 102-2, 102-3がスポットエリア92の対応するDNAプローブにハイブリダイズ、cDN103-2, 103-3がスポットエリア93の対応するプローブにハイブリダイズしている。スポット93のプローブ93-1に対応しているcDNAは試料中に存在しないケースで、このためいずれのスポットエリアにもハイブリダイズした痕跡は見られない。

図5(C)に、基板上の層21の表面のプローブに捕捉されたcDN

Aが3種の異なる粒子径5、10、15 μm の金ナノ粒子を標識した第2のDNAプローブ112-1、112-2、112-3、113-1、113-2、112-3と反応させるためにリン酸緩衝液95を添加した状態を示す。第2のDNAプローブはそれぞれ1本鎖cDNA102-1、102-2、102-3、103-1、103-2、103-3に相補な配列を有する（cDNA103-1は試料中に含まれないので図には描かれていない）。反応は0.5% SDSを含む50 mMのリン酸緩衝液（pH 7.4）95中で、55°Cで30分間行う。金ナノ粒子標識DNAプローブの混合液は予め90°C 5秒加熱し、55°Cに冷却して直ちに基板上に滴下する。0.5% SDSを含む50 mMのリン酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄する。

図5（D）に、基板上の各スポットエリアにcDNA配列に従い金ナノ粒子112-1、112-2、112-3、113-2、113-3で標識したDNAプローブがハイブリダイズした状態を示す。操作型電子顕微鏡か原子間力顕微鏡で基板表面をスキャンして、各スポットエリアに結合している金ナノ粒子を粒径別にカウントする。

区画21は5 \times 5 μm と微小なため、そこに固定できるプローブ数としては限られた数となってしまう。各区画ごとに3種類のプローブを固定しようとするより更に固定量のばらつき変動が大きくなる。本方法を用いることで、基板表面のプローブ分子間隔をほぼ9 nmに保つことができる。3種類のプローブを固定すると、5 \times 5 μm 程度のスポットでのプローブ固定量のばらつきは従来法のCV = 40%程度から本発明によりCV = 10%程度まで少なくすることができる。

以上、本発明の例示的实施形態を説明したが、種々の変更、改変、および改良が当業者に容易に想起される。上記は、本発明の原理を例示的に示したものに過ぎず、当業者であれば、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、様々な改変を為し得る。

産業上の利用可能性

本発明により、細胞内発現している mRNA やタンパク質を分子レベルで検出できるようになる。本発明は、細胞ないし細胞集合体である組織で発現している遺伝子産物である mRNA ないしタンパク質を定量的に計測するための生体物質解析チップ、生体物質解析キットおよび生体

5 物質解析方法等として有用である。

請求の範囲

1. 基板と、該基板の一つの表面に所定の生体物質の捕捉用残基（第3の官能基）を有する固体チップであり、前記基板の一つの表面に2種類
- 5 のモノマーを重合させて調製するポリマー層を有し、前記ポリマー層の内、第1の官能基を2箇所にも有する第1のモノマーと重合用の第2の官能基を2箇所にも有する第2のモノマーを実質的に交互に配するように重合した構造で、前記第1のモノマーおよび前記第2のモノマーの片方に第3の官能基を持つ構造であることを特徴とする生体物質解析チップ。
- 10 2. 前記第1のモノマーと第2のモノマーの組み合わせが $\text{NCS-R}_1\text{-NCS}$ (R_1 は任意の残基)の構造を有するジイソシアナートモノマーと $\text{NH}_2\text{-R}_2\text{-NH}_2$ (R_2 は任意の残基)の構造を有するジアミンモノマーでポリマー層とがポリ尿素ある請求項1記載の生体物質解析チップ。
- 15 3. 前記第1のモノマーと第2のモノマーの組み合わせが $\text{R}_1\text{-C=O-O-O=C-R}_2$ あるいは $\text{R}_1\text{-C=O-O-O=C-R}_2\text{-C=O-O-O=C-R}_3$ ($\text{R}_1\sim\text{R}_3$ は任意の残基)の構造を有する酸無水物と $\text{NH}_2\text{-R}_5\text{-NH}_2$ (R_5 は任意の残基)の構造を有するジアミンモノマーで、ポリマー層がポリアミドないしポリイミドある請求項1または
- 20 請求項2記載の生体物質解析チップ。
4. 前記第3の官能基がカルボキシル基である請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の生体物質解析チップ。
5. 前記カルボキシル基にイソチオシアン酸が導入された構造である請求項4記載の生体物質解析チップ。
- 25 6. 前記カルボキシル基にジアミン類を反応させて固体チップ表面にアミンを導入し、前記固体表面に導入したアミンにダイソチオシアナート類を反応させて固体チップ表面にイソチオシアナート残基を導入した構造の請求項4または請求項5記載の生体物質解析チップ。
7. 所定の生体物質の捕捉用残基（第3の官能基）を有する固体チップ

- が、前記固体チップ表面に2種類のモノマーを重合させて調製するポリマー層を有し、少なくとも前記ポリマー層が重合用の前記2つのモノマーの内第1の官能基を2箇所にも有する第1のモノマーと重合用の第2の官能基を2箇所にも有する第2のモノマーを実質的に交互に配するように
- 5 重合した構造で、前記2つのモノマーの内少なくとも1種のモノマーに第3の官能基を持つ構造で、前記第3の官能基に所定の生体物質を捕捉するための分子（生体物質捕捉用プローブ）が共有結合で固定した細胞構成物質解析チップと、前記第3の官能基に固定した分子に捕捉された所定の生体物質に結合し該所定の生体物質を特定するための標識物を含む
- 10 生体物質とを有することを特徴とする生体物質解析キット。
8. 前記標識物が5から300nmのナノ粒子からなる請求項7記載の生体物質解析キット。
9. 所定の生体物質の捕捉用残基（第3の官能基）を有する固体チップが、前記固体チップ表面に2種類のモノマーを重合させて調製するポリ
- 15 マー層を有し、少なくとも前記ポリマー層が重合用の前記2つのモノマーの内第1の官能基を2箇所にも有する第1のモノマーと重合用の第2の官能基を2箇所にも有する第2のモノマーを実質的に交互に配するように重合した構造で、前記2つのモノマーの内少なくとも1種のモノマーに第3の官能基を持つ構造で、前記第3の官能基に所定の生体物質を捕捉
- 20 するための分子（生体物質捕捉用プローブ）が共有結合で固定した細胞構成物質解析チップの表面上の空間に生体物質を含む緩衝液を添加する工程、前記細胞構成物質解析チップ表面に存在し共有結合で固定された生体物質を捕捉するための分子で所定の生体物質を捕捉する工程、該所定の生体物質と結合し該所定の生体物質を特定するためのナノ粒子で標
- 25 識された生体物質を結合する工程、細胞構成物質解析チップの表面に固定されるナノ粒子を計数する工程、からなることを特徴とする生体物質解析法。
10. 生体物質捕捉用プローブを備えた基板を含む生体物質解析用チップであって、

第1のモノマーおよび第2のモノマーから形成される2量体のユニットを含むポリマーを含むポリマー層を基板の表面に備え、

生体物質捕捉用プローブが、前記第1のモノマーまたは前記第2のモノマーに結合している、生体物質解析用チップ。

- 5 1 1. 前記ポリマー層が、ポリ尿素、ポリアミドまたはポリイミドを含む、請求項10に記載の生体物質解析用チップ。
- 1 2. 前記第1のモノマーが2つの第1の官能基を備え、前記第2のモノマーが2つの第2の官能基を備えており、
- 10 前記第1のモノマーの第1の官能基の1つと前記第2のモノマーの第2の官能基の1つとが結合することによって、前記2量体が形成され、
- 前記2量体の残りの第1の官能基または残りの第2の官能基が、それぞれ別の2量体の第2の官能基または第1の官能基と結合することによって、前記ポリマーが形成される、請求項10に記載の生体物質解析用チップ。
- 15 1 3. 前記第1の官能基がイソシアナート基であり、前記第2の官能基がアミノ基である、請求項12に記載の生体物質解析用チップ。
- 1 4. 前記第1のモノマーが $\text{NCS}-\text{R}_1-\text{NCS}$ (R_1 は任意の残基)の構造を有するジイソシアナートモノマーであり、前記第2のモノマーが $\text{NH}_2-\text{R}_2-\text{NH}_2$ (R_2 は任意の残基)の構造を有するジアミンモノマーである、請求項13に記載の生体物質解析用チップ。
- 20 1 5. 前記第1のモノマーが $\text{R}_1-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{O}=\text{C}-\text{R}_2$ あるいは $\text{R}_1-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{O}=\text{C}-\text{R}_2-\text{C}=\text{O}-\text{O}-\text{O}=\text{C}-\text{R}_3$ ($\text{R}_1\sim\text{R}_3$ は任意の残基)の構造を有する酸無水物であり、前記第2のモノマーが $\text{NH}_2-\text{R}_5-\text{NH}_2$ (R_5 は任意の残基)の構造を有するジアミンモノマーである、請求項10に記載の生体物質解析用チップ。
- 25 1 6. 前記第1のモノマーまたは前記第2のモノマーが、第3の官能基をさらに備え、
- 前記第3の官能基を介して、前記生体物質捕捉用プローブが前記第1のモノマーまたは前記第2のモノマーに結合している、請求項10～1

5 のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

17. 前記第3の官能基が、カルボキシル基である、請求項16に記載の生体物質解析用チップ。

18. 前記第3の官能基が、アミノ基である、請求項16に記載の生体物質解析用チップ。

19. 前記生体物質捕捉用プローブがそれに結合した第4の官能基を含み、前記第4の官能基と前記第3の官能基とが結合することによって、前記生体物質捕捉用プローブが前記第1のモノマーまたは前記第2のモノマーに結合している、請求項16～18のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

20. 前記生体物質捕捉用プローブが、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または抗体である、請求項10～19のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

21. 前記ポリマー層を含む生体物質解析用エリアが、前記基板上にアレイ状に形成されている、請求項10～20のいずれかに記載の生体物質解析用チップ。

22. 請求項10～21のいずれかに記載の生体物質解析用チップ、および前記生体物質捕捉用プローブに結合した生体物質を標識するための標識物質を含む、生体物質解析用キット。

23. 前記標識物質が、粒径が5～300nmの範囲の金ナノ粒子を含む、請求項22に記載の生体物質解析用キット。

24. 請求項10～21のいずれかに記載の生体物質解析用チップを用いて生体物質を解析する工程を含む、生体物質解析方法。

25. 請求項10～21のいずれかに記載の生体物質解析用チップの前記ポリマー層に、生体物質を含む試料溶液を接触させる工程、

前記ポリマー層に捕捉された生体物質を標識する工程、および

前記標識された生体物質を検出または定量する工程、

を含む、請求項24に記載の方法。

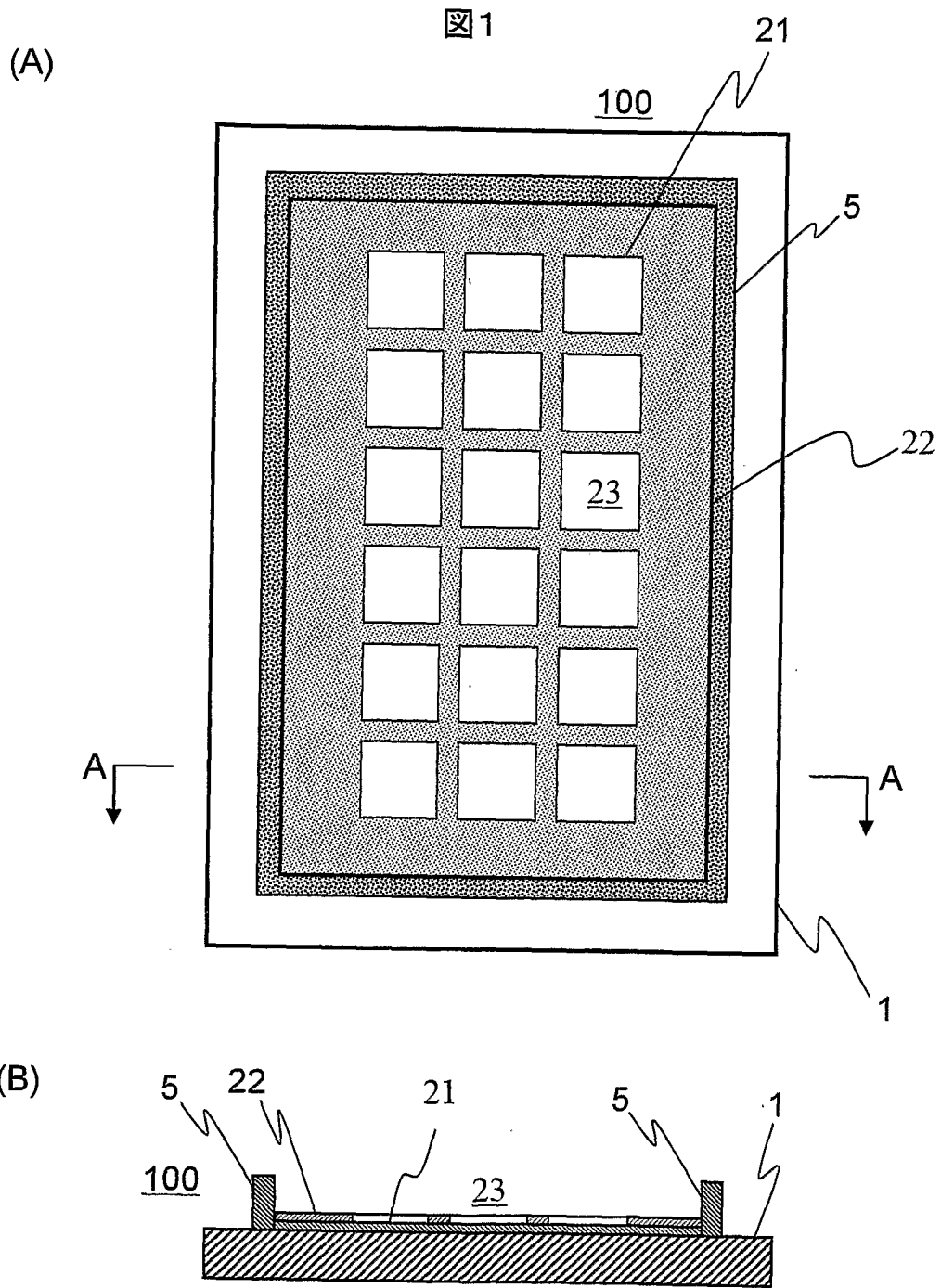


図2

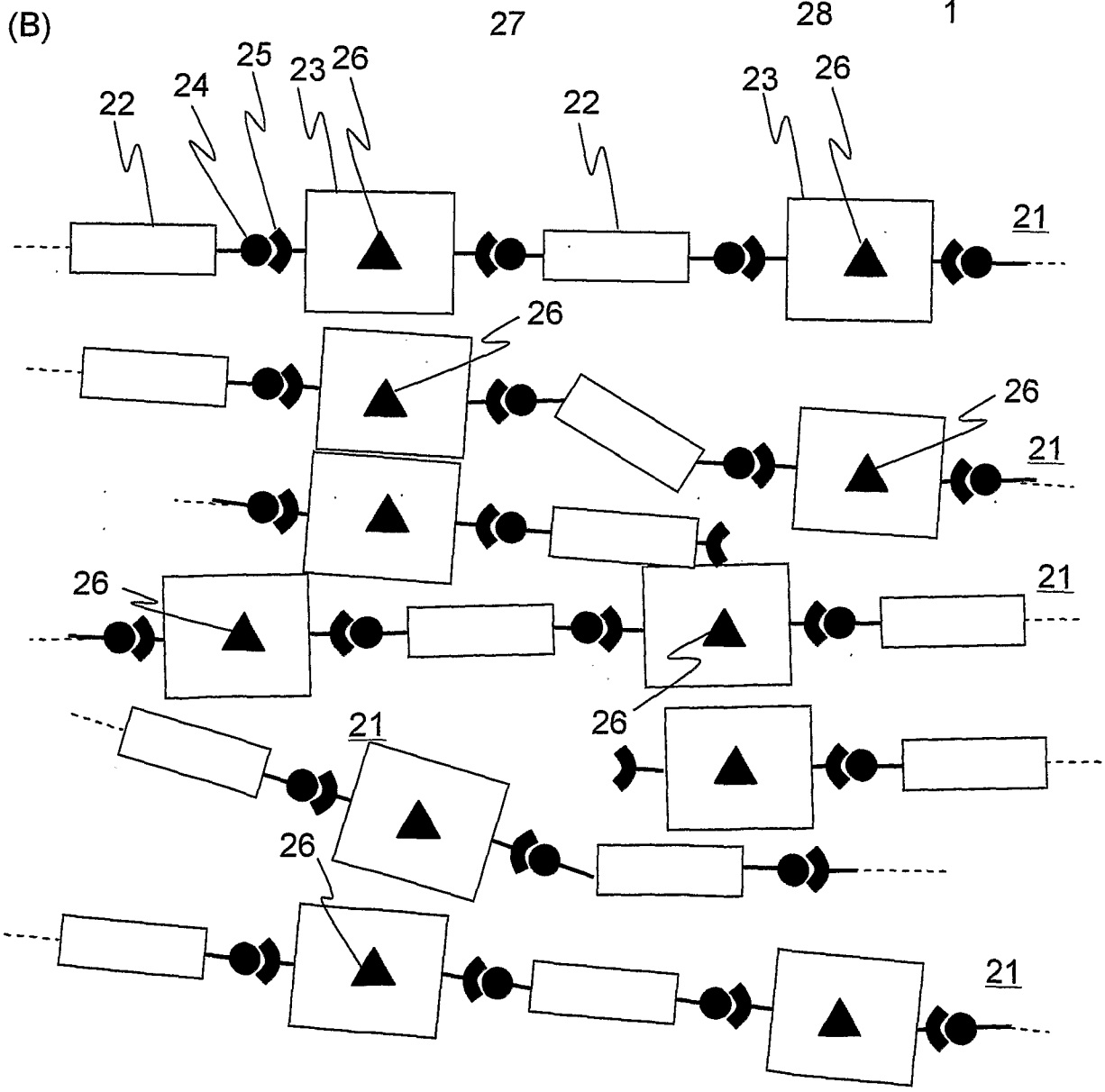
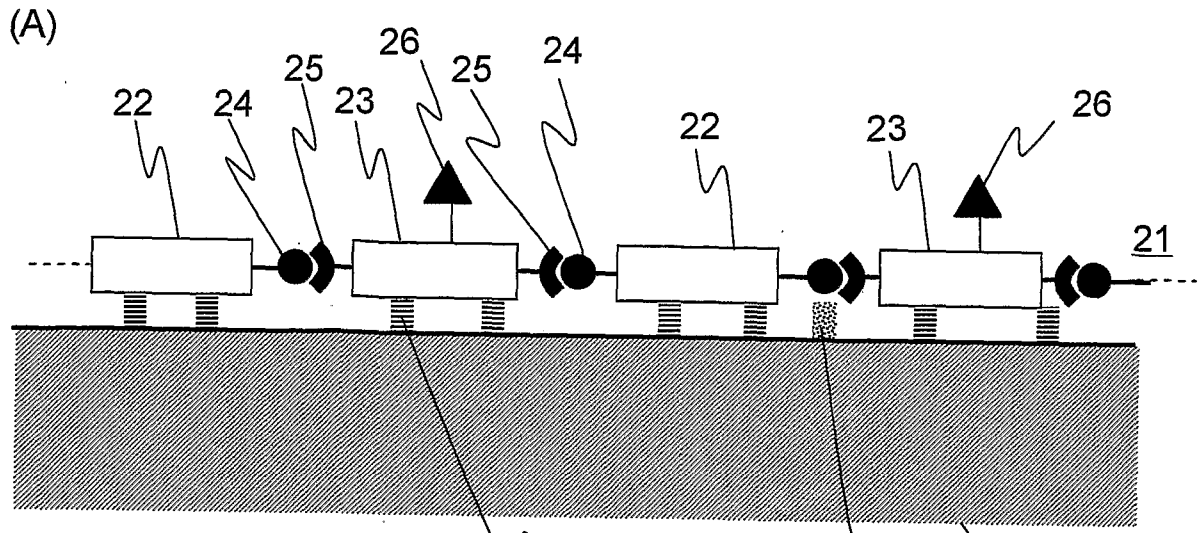
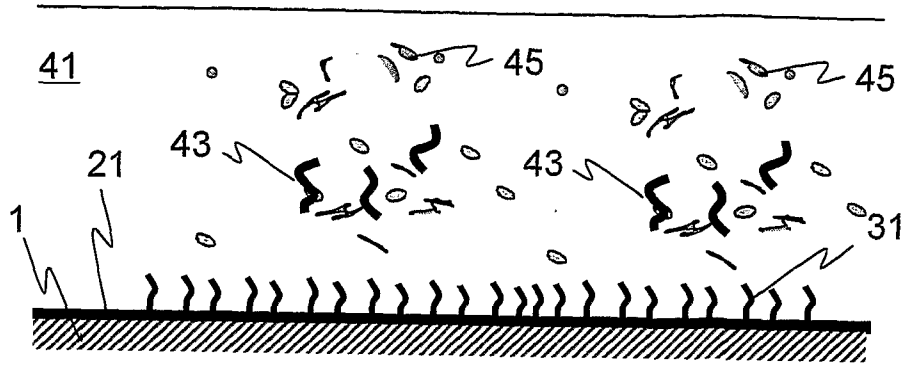
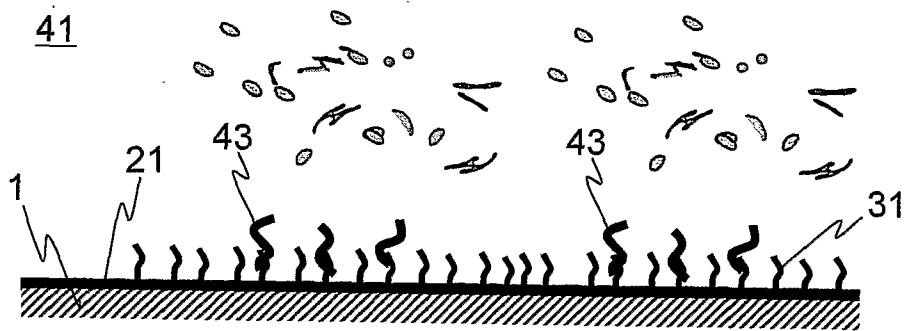


図4

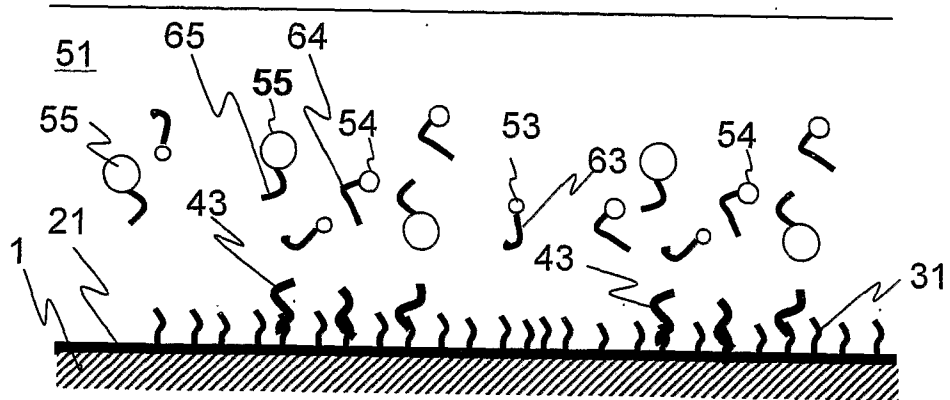
(A)



(B)



(C)



(D)

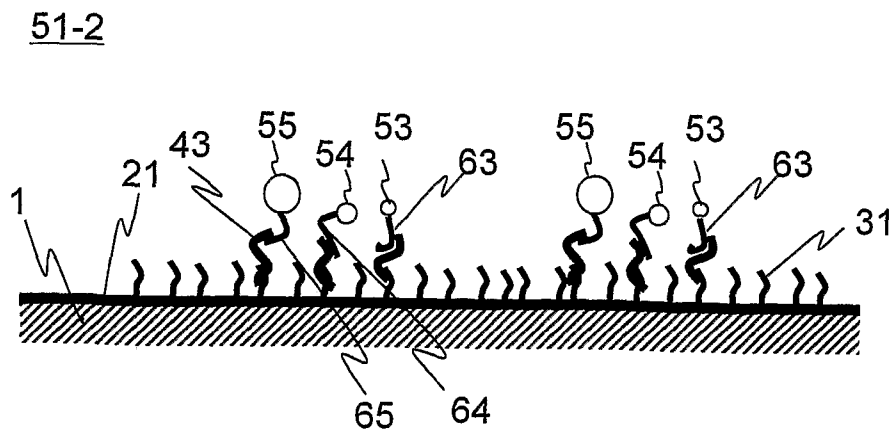
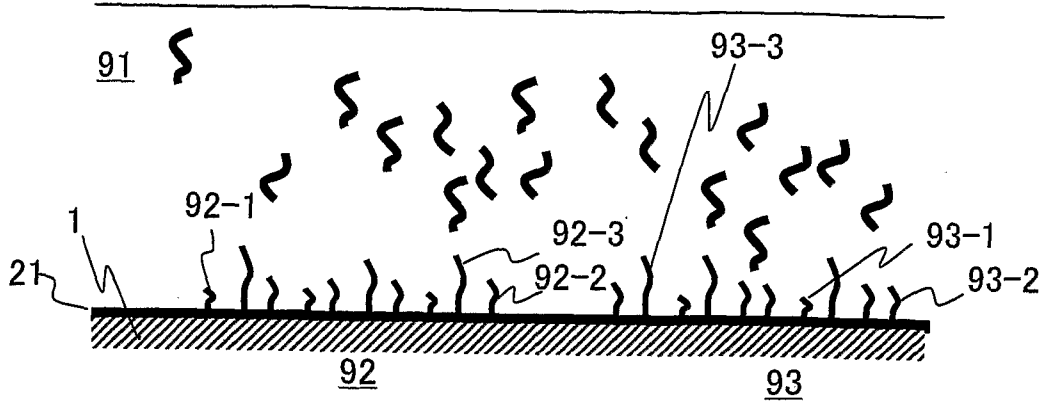
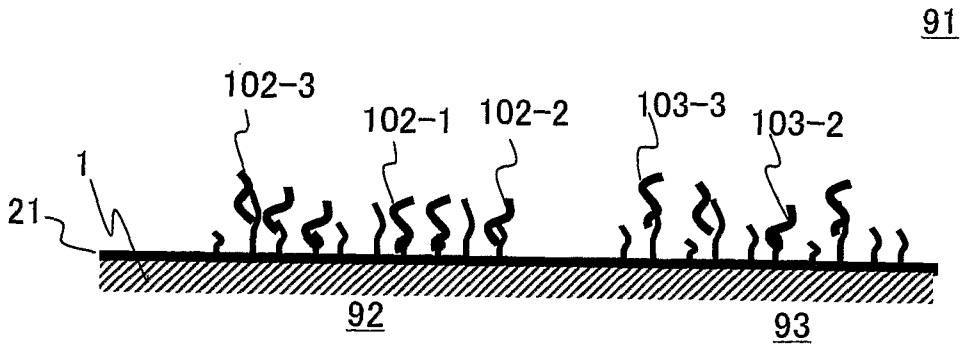


図5

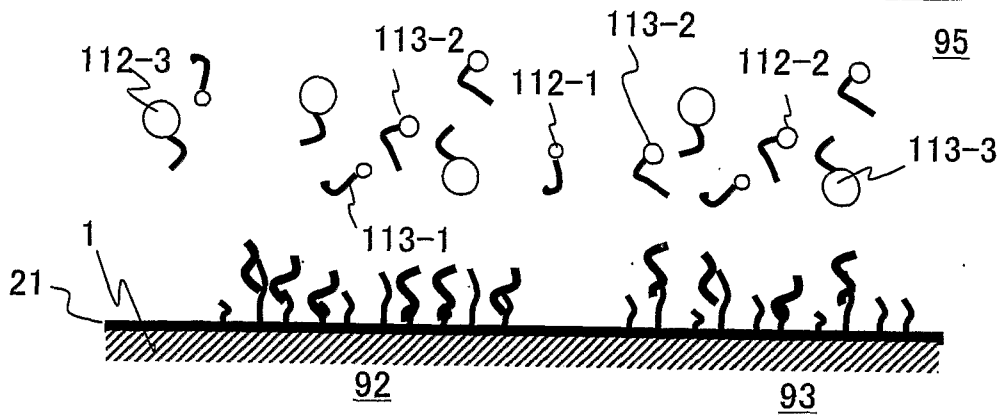
(A)



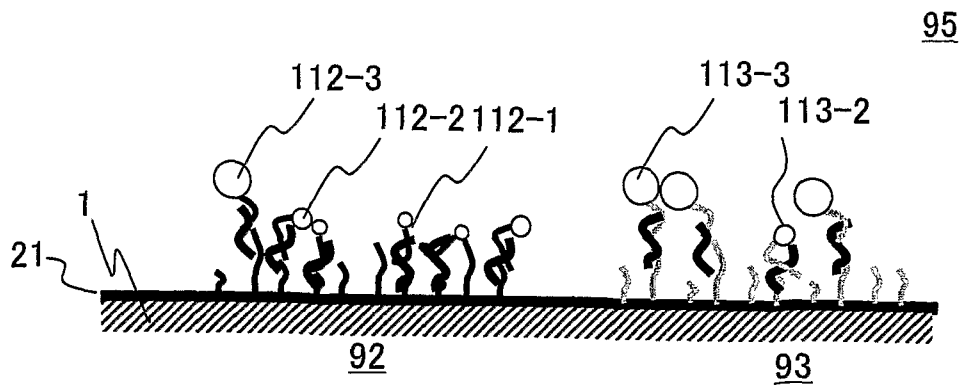
(B)



(C)



(D)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/054376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12M1/00(2006.01) i, C12Q1/68(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)

C12N15/00-15/90, C12M1/00-1/42, C12Q1/68

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

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

BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, IEEE, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2),
Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, G-Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIRA A. et al. Direct formation of homogeneous DNA-probe surface on polyimide thin film by vapor deposition polymerization. Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2005 International, Oct.26-28, 2005, p.204 (27P-7-51)	1-25
X	KIRA A. et al. Homogeneous DNA-probe surface on polymer thin film on glass chip by vapor deposition polymerization. International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-4), Nov.14-17, 2005, p.184 (P1-143)	1-25

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
22 March, 2007 (22.03.07)

Date of mailing of the international search report
17 April, 2007 (17.04.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/054376

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Atsushi KIRA et al., "Kin'itsu na Probe Koteika Yo Hyomen to shite no Jochaku Jugo ni yoru Poly Nyosomaku no Hyoka", Dai 43 Kai The Biophysical Society of Japan Koen Yokoshu, 23-25 November, 2005 (23-25.11.05), 2P322	1-25
X	KIRA A. et al. Quantitative evaluation of polyurea thin film method by vapor deposition polymerization for formation of uniformly arranged even interval reactive substrates on DNA chip. Biophys.J. (50 th Biophysical Society Meeting Abstracts), 2006, Vol.90 (Suppl.), 1444-Pos	1-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12M1/00-1/42, C12Q1/68		
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		
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) BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, IEEE, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース, G-Search		
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 請求の範囲の番号
X	KIRA A. et al. Direct formation of homogeneous DNA-probe surface on polyimide thin film by vapor deposition polymerization. Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2005 International, Oct. 26-28, 2005, p. 204(27P-7-51)	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 2 2 . 0 3 . 2 0 0 7	国際調査報告の発送日 1 7 . 0 4 . 2 0 0 7	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 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) 三原 健治 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8	4 N 2 9 3 7

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 請求の範囲の番号
X	KIRA A. et al. Homogeneous DNA-probe surface on polymer thin film on glass chip by vapor deposition polymerization. International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-4), Nov. 14-17, 2005, p. 184 (P1-143)	1-25
X	吉良 敦史 他 均一なプローブ固定化用表面としての蒸着重合によるポリ尿素膜の 評価 第43回日本生物物理学会講演予稿集, 2005年11月23~25日, 2P322の項	1-25
X	KIRA A. et al. Quantitative evaluation of polyurea thin film method by vapor deposition polymerization for formation of uniformly arranged even interval reactive substrates on DNA chip. Biophys. J. (50 th Biophysical Society Meeting Abstracts), 2006, Vol. 90 (Suppl.), 1444-Pos	1-25