

(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
2013 年 12 月 5 日(05.12.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/179342 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/553 (2006.01) *G01N 33/552* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/003561
- (22) 国際出願日: 2012 年 5 月 30 日(30.05.2012)
- (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): 株式会社バイオマーカーサイエンス(BIOMARKER-SCIENCE CO., LTD) [JP/JP]; 〒6068225 京都府京都市左京区田中門前町 1 0 3 番 5 号 Kyoto (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 民谷 栄一(TAMIYA, Eichi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 大木 誠(OHKI, Makoto) [JP/JP]; 〒6068225 京都府京都市左京区田中門前町 1 0 3

番 5 号 株式会社バイオマーカーサイエンス内 Kyoto (JP). 齊藤 真人(SAITO, Masato) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 村橋 瑞穂(MURA-HASHI, Mizuho) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 向井 準(MUKAI, Jun) [JP/JP]; 〒6068225 京都府京都市左京区田中門前町 1 0 3 番 5 号 株式会社バイオマーカーサイエンス内 Kyoto (JP). 中西 守(NAKANISHI, Mamoru) [JP/JP]; 〒6068225 京都府京都市左京区田中門前町 1 0 3 番 5 号 株式会社バイオマーカーサイエンス内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人前田特許事務所(MAEDA & PARTNERS); 〒5410053 大阪府大阪市中央区本町 2 丁目 5 番 7 号 大阪丸紅ビル 5 階 Osaka (JP).

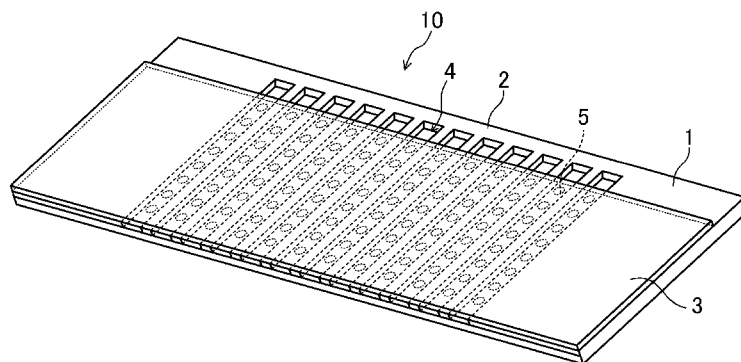
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

[続葉有]

(54) Title: BIOCHIP

(54) 発明の名称: バイオチップ

[図1]



(57) Abstract: A biochip provided with: a substrate (1) in which a metal layer has been deposited on the upper surface; a plurality of partitioning parts (2) provided on the substrate (1), each partitioning part (2) extending in parallel fashion; and a cover member (3) provided on the plurality of partitioning parts (2). A plurality of flow channels (4), each extending in parallel fashion, is formed on the substrate (1) by the substrate (1), the partitioning parts (2), and the cover member (3). A plurality of solid-phase-forming probes (5) is formed in the flow channels (4) in respective fashion on the substrate (1). The gap in the flow channels (4) between the substrate (1) and the cover member (3) has a size that allows a liquid to deploy by capillary phenomenon from one end of the flow channels (4) to the other end.

(57) 要約: バイオチップは、上面に金属層が堆積された基板(1)と、基板(1)の上に設けられ、それぞれ並行に延びる複数の仕切部(2)と、複数の仕切部(2)の上に設けられたカバー部材(3)とを備えている。基板(1)の上には、基板(1)、仕切部(2)及びカバー部材(3)により、それぞれ並行に延びる複数の流路(4)が形成され、基板(1)の上の各流路(4)には、それぞれ複数の固相化プローブ(5)が形成されている。流路(4)における基板(1)とカバー部材(3)との間隙は、液体が毛細管現象により流路(4)の一端から他端にまで展開できる大きさである。



WO 2013/179342 A1



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 (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))

明 細 書

発明の名称： バイオチップ

技術分野

[0001] 本発明は、バイオチップに関し、特に、生体試料中の生体分子の検出又は定量を簡便に行うためのバイオチップに関する。

背景技術

[0002] 近年、DNA及びタンパク質等の生体分子の解析のために、バイオチップが用いられている。従来のバイオチップには、その基板の上に、DNA、タンパク質又は糖鎖等のうち検出する物質に応じて所定のプローブが固定されており、プローブと血液等の生体試料とを反応させて、プローブに所望の生体分子を結合させる。これにより、生体試料中の生体分子の検出及び定量を可能とする。基板の上に種々のプローブを固定することにより、同時に種々の試験を行うことができる。

[0003] 従来、タンパク質の検出及び定量は、蛍光物質等により標的のタンパク質の標識を行い、その蛍光強度を測定することにより行われている。このような測定方法は、標識工程を必要とするため、一連の工程を行うのに長い時間を必要とし、生体分子が有する高い認識能を阻害するため、感度の低下及び作業の煩雑化を招くこととなる。

[0004] そこで、近年、このような標識を行うことなく、生体分子の検出及び定量をするための方法として局在プラズモン共鳴（localized surface plasmon resonance：LSPR）を用いた非標識法が注目されている（例えば、特許文献1等を参照。）。LSPRは、金、銀及び白金等の貴金属微粒子に発現する非線形光学現象である。LSPRを利用した測定法では、バイオチップの基板の上に堆積された貴金属粒子部分にプローブを介して生体分子を結合させ、貴金属粒子部分に測定光を照射し、透過又は反射した光の強度及び吸収ピーク波長のシフトの大きさを測定する。その大きさを指標にして、所望の生体分子の定量を行うことができる。このような非標識法を用いると、標識

の工程を行う必要が無く簡便に試験を行うことができる。

[0005] バイオチップは、疾病の予防及び治療を目的として用いられている。例えば患者の血液を試料として、バイオチップにより、患者の血液中の疾病に関わるタンパク質等のバイオマーカーを検出及び定量することにより、患者の状態を検査することができる。また、バイオチップを用いると、同時に複数のバイオマーカーを検出でき、さらに、複数の患者の生体試料を同時に測定することも可能となる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2002-365210号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、従来のバイオチップは、その基板の上に複数のプローブが行列状に固定され、各プローブの上に微量の生体試料を順次滴下する必要がある、多大な労力及び時間が必要となる。また、自動的に試料を滴下することができる装置を用いたとしても、そのような装置は単一の試料を連続的に滴下することは可能であるが、複数の試料を滴下する場合に、工程が煩雑となり、装置内において試料同士のコンタミネーション等のおそれが生じる。例えば、ヒトの血液を試料とし、それをバイオチップに滴下すると共に、検量線を作成するための標準溶液を同一のバイオチップに滴下する場合、コンタミネーション等のおそれが生じることとなる。同様に、複数の患者の血液を同一のバイオチップに滴下する場合にもコンタミネーション等のおそれが生じる。

[0008] 本発明は前記の問題に鑑み、その目的は、高価な装置を用いる必要が無く、試料中の多種の物質の測定及び検量線の作成を共に容易に行うことができるバイオチップを得られるようにすることにある。

課題を解決するための手段

[0009] 前記の目的を達成するため、本発明は、バイオチップを、複数の流路を有し、その流路は液体が毛細管現象により展開する程度の間隙を有する構成とする。

[0010] 具体的に、本発明に係るバイオチップは、上面に金属層が形成された基板と、基板の上に設けられ、それぞれ並行に延びる複数の仕切部と、複数の仕切部の上に設けられたカバー部材とを備え、基板の上には、基板、仕切部及びカバー部材により、それぞれ並行に延びる複数の流路が形成され、基板の上の各流路には、それぞれ複数の固相化プローブが形成され、流路における基板とカバー部材との間隙は、液体が毛細管現象により流路の一端から他端にまで展開できる大きさである。

[0011] 本発明に係るバイオチップによると、基板の上に複数の流路が形成され、その流路における基板とカバー部材との間隙は、液体が毛細管現象により流路の一端から他端にまで展開できる大きさであるため、高価な装置を用いることなく容易に多数の試料を同時に測定することができる。また、試料の測定と共に検量線の作成を行うことも可能である。さらに、基板の上面には金属層が形成されているため、測定の際にはLSPRを利用することができ、標識の工程を行う必要はなく、より簡便に高感度の測定を行うことができる。

[0012] 本発明に係るバイオチップは、各流路の一端部又は他端部の一方に着脱可能に設けられ、流路内の液体を排出する液体排出手段をさらに備えていることが好ましい。

[0013] このようにすると、各流路の液体を迅速且つ簡便に排出することができる。

[0014] この場合、液体排出手段は、吸水性を有する吸水材であってもよい。

[0015] さらに、液体排出手段は、液体を吸引できる吸引ポンプであってもよい。

[0016] 本発明に係るバイオチップにおいて、金属層は、基板の上面に多孔質層を有する陽極酸化アルミナ皮膜を介して形成されていてもよい。

[0017] 本発明に係るバイオチップにおいて、基板は、その上面に凹凸構造を有し

、金属層は、凹凸構造の上に形成されていてもよい。

[0018] この場合、凹凸構造は、ナノインプリント法により形成されていることが好ましい。

[0019] 本発明に係るバイオチップにおいて、金属層は、基板の上面に二次元状に配列された複数のシリカビーズの上に形成されていてもよい。

[0020] 本発明に係るバイオチップにおいて、金属層は、基板の上に直接に金属ナノ粒子が配列されて形成されていてもよい。

[0021] 本発明に係るバイオチップにおいて、金属層は金を含んでもよい。

[0022] 本発明に係るバイオチップにおいて、仕切部とカバー部材とは、一体であってもよい。

[0023] このようにすると、仕切部とカバー部材とを同一の工程で設けることが可能となり、バイオチップの作製がより簡便となる。

発明の効果

[0024] 本発明に係るバイオチップによると、高価な装置を用いることなく容易に多数の試料の測定を行うと共に検量線の作成をも行うことができる。このため、一人の患者の複数の生体分子の測定、又は複数の患者の単一若しくは複数の生体分子の測定を容易に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]図1は本発明の一実施形態に係るバイオチップを示す斜視図である。

[図2]図2は本発明の一実施形態に係るバイオチップの仕切部の一例を示す平面図である。

[図3]図3は本発明の一実施形態に係るバイオチップにおける流路から液体を排出する形態を示す斜視図である。

[図4]図4は本発明のバイオチップと従来のバイオチップとを用いてトランスサイレチンを測定した結果を示すグラフである。

[図5]図5は本発明のバイオチップと従来のバイオチップとを用いてC反応性蛋白を測定した結果を示すグラフである。

[図6]図6は本発明のバイオチップと従来のバイオチップとを用いてシスタチ

ンCを測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0026] 本発明の一実施形態に係るバイオチップについて図1及び図2を参照しながら説明する。

[0027] 図1に示すように、本実施形態に係るバイオチップ10には、例えばガラス等からなる基板1の上面にそれぞれ並行に延びる複数の仕切部2が形成されている。基板1及び仕切部2の上にはカバー部材であるカバーガラス3が設けられている。基板1、仕切部2及びカバーガラス3によりそれぞれ並行に延びる複数の流路4が形成され、基板1の上面の流路4には、複数の固相化プローブ5が形成されている。ここで、流路4における基板1とカバーガラス3との間隙は、液体が毛細管現象により流路4の一端から他端にまで展開できる程度の大きさである。具体的に、間隙の大きさは、 $100\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 程度である。 $100\mu\text{m}$ 未満であると、流路4から液体を排出することが困難となり、 $1000\mu\text{m}$ よりも大きいと、固相化プローブ5に光を照射する際に光の焦点が合わず、測定が困難となる。また、図1では、流路4の一端は、基板1の端部よりも内側に形成されているが、他端と同様に基板1の端部にまで延びていても構わない。また、逆に、流路4の他端が基板1の端部よりも内側に形成されていても構わない。

[0028] 基板1の上面には、例えば金が蒸着されることにより形成された金属層（図示せず）が形成されている。また、基板1の上に形成された固相化プローブ5は、例えば抗体等を含み、具体的に、基板1の上に蒸着された金属層に抗体等が固定されている。固相化プローブ5の種類は、検出又は定量したい生体分子により選択でき、抗体の他に、所定のDNAを検出したい場合は、そのDNAと結合できるDNA断片等の核酸を用いることができる。また、金属層は、局在プラズモン共鳴（LSPR）を利用した検出又は測定を行うことが可能な金属層であればよく、金以外に、銀又は白金等を用いても構わない。

[0029] 金属層は、基板1の上に多孔質層を有する陽極酸化アルミナ皮膜を介して

形成されていることが好ましい。また、金属層は基板 1 の上に二次元状に配列された複数のシリカビーズの上に形成されてもよい。さらに、金属層は、基板 1 の上に直接に金属ナノ粒子が配設されることによって形成されてもよい。

[0030] これらの他に、基板 1 に所望の形状を有する凹凸構造を形成し、その上に金属層を形成しても構わない。基板 1 に凹凸構造を形成するために、例えばナノインプリント法を用いることができる。ナノインプリント法を用いる場合、基板 1 に例えば高分子樹脂を用いることができる。このような基板 1 の上面に対して、特定の形状を有する鋳型を用いて型押しした後に、その上面に金属層を堆積してもよい。鋳型の形状は、金属層が基板 1 の上面に堆積するのに好適な形状であることが好ましい。

[0031] 仕切部 2 は、基板 1 とカバーガラス 3 との間に介在するように設けられており、これにより、基板 1 とカバーガラス 3 との間に間隙を形成している。また、仕切部 2 は、基板 1 及びカバーガラス 3 と流体密に接着されており、これにより仕切部 2 同士の間それぞれ流路 4 が形成されている。仕切部 2 は、基板 1 とカバーガラス 3 との間に、液体が毛細管現象により流路 4 の一端から他端にまで展開できる程度の大きさの間隙を形成できる厚さを有する。具体的に、仕切部 2 の厚さは、 $100\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ 程度である。このようにすると、各流路 4 の一端部に液体の試料を滴下するだけで、複数の固相化プローブ 5 が形成された流路 4 に試料が展開するため、高価な装置を用いることなく容易に多数の試料を同時に測定することができる。また、試料の測定と共に検量線の作成を行うことも可能であり、試料の滴下の際の試料同士等のコンタミネーションを防ぐこともできる。さらに、上述の通り、流路 4 から液体を排出することが可能となり、固相化プローブ 5 に光を照射する際に光の焦点が容易に合い、測定が可能となる。

[0032] 仕切部 2 には、例えば前記の厚さを有する両面テープを用いることができる。また、前記の厚さで接着剤を塗布することにより仕切部 2 を形成してもよい。これらの他に、基板 1 に複数の樹脂等からなるガスケットを接着する

ことにより仕切部 2 を形成することができる。また、複数のガスケットでなく、図 2 に示すような複数の仕切部 2 を有する櫛状のガスケット等の仕切部材 20 を用いてもよい。また、基板 1 又はカバーガラス 3 に、互いに並行に延びる複数の溝を形成することにより、溝の両側に仕切部 2 を形成してもよい。すなわち、基板 1 又はカバーガラス 3 と仕切部 2 とが一体となった構成であっても構わない。また、本実施形態では、カバー部材として、カバーガラス 3 を用いているが、透明なフィルムからなるカバー部材を用いてもよい。

[0033] 基板 1、仕切部 2 及びカバーガラス 3 に囲まれた各流路 4 には、複数の固相化プローブ 5 が形成されている。例えば、12本の流路 4 が形成されている場合、各流路 4 に 8 個の固相化プローブ 5 を形成すると、1つのバイオチップに行列状に 96 個の固相化プローブ 5 を形成できる。ここで、各固相化プローブ 5 は、同一の種類であってもよく、複数の種類であってもよい。なお、流路 4 及び固相化プローブ 5 の数は、上記の数に限定されない。

[0034] また、図 3 に示すように、流路 4 の一端部又は他端部の一方に、各流路 4 内に展開した液体を排出するための液体排出手段である吸水性を有する吸水材 6 を着脱可能に設けることができる。吸水材 6 には、例えば吸水性が高い濾紙及び樹脂等を用いることができる。吸水材 6 を流路 4 の他端部に設けることにより、吸水材 6 が流路 4 内の試料を吸収するため、流路 4 から試料を排出することができる。この他に、液体排出手段には、モータ等を用いた吸引ポンプ等を用いることができる。このような液体排出手段により、各流路 4 の液体を迅速且つ簡便に排出することができる。

[0035] 次に、本実施形態に係るバイオチップを用いて、試料中の所望の生体分子を検出及び測定する方法について説明する。

[0036] 例えばヒトの血液を試料として、血液内の疾病に関わるバイオマーカーを検出する場合、予め、本実施形態に係るバイオチップに、所望のバイオマーカーと結合する抗体又は核酸等を固相化プローブとして固定する。ここで、固相化プローブは各流路に複数形成されてよく、前記の通り、例えば 12 列

の流路が形成されている場合、各流路の8箇所に固相化プローブを形成すると、行列状に96個の固相化プローブを1つのバイオチップに形成できる。

[0037] 次に、ヒトの血液又は血清等である試料をバイオチップの流路の一端部に滴下する。滴下された試料は、毛細管現象により流路内に展開し、流路の他端部にまで達する。ここで、試料の滴下は、自動の分注装置を用いてもよく、通常のピペット又は分注器により手動で行っても構わない。但し、複数種の試料を1つのバイオチップに滴下する場合、チップを容易に交換できるピペットを用いる方が、コンタミネーションの防止の観点から好ましい。また、試料の滴下と共に、検量線の作成のために、例えばタンパク質標準液を同一のバイオチップに滴下することもできる。なお、この工程では、液体排出手段は、バイオチップに装着されていない。

[0038] 次に、所定の温度及び時間で試料と固相化プローブとを反応させる。反応時間等は、試料の種類及びプローブの種類に応じて適宜好適な条件を選択することができる。

[0039] 次に、液体排出手段をバイオチップに装着することにより、流路の他端部から試料を排出する。例えば、液体排出手段に吸水材を用いる場合、吸水材を基板の流路の他端部に、試料と接触するように載置する。これにより、吸水材が流路内の試料を吸収するため、流路から試料を排出することができる。また、液体排出手段に、吸引ポンプを用いる場合、吸引ポンプの吸引口を流路の他端部に載置することにより、各流路から試料を排出することができる。なお、流路の他端部に液体排出手段を設けずに、流路の一端部に設けることによって一端部から試料を排出してもよい。試料を排出した後、液体排出手段をバイオチップから外す。

[0040] 次に、例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）等の緩衝液である所定の洗浄液を流路の一端部に滴下する。滴下された試料は、毛細管現象により流路内に展開し、流路の他端にまで達する。その後、試料と同様に、液体排出手段により洗浄液を流路の他端部から排出する。この洗浄を2回～3回程度行う。

[0041] 次に、バイオチップを乾燥した後に、吸光度の測定を行うことにより所望の生体分子の検出及び測定を行う。ここで、吸光度の測定は、試料とプローブとを反応させる前に予め行っておき、反応後の吸光度と比較する。反応前の吸収ピーク波長と反応後の吸収ピーク波長のシフト量により測定する。

[0042] 本発明の一実施形態に係るバイオチップによると、測定対象の生体分子と結合する複数の固相化プローブが、液体が毛細管現象により展開できる程度の間隙を有する流路に形成されているため、各固相化プローブと生体分子を含む試料との反応を容易に行うことができる。従って、高価な装置を用いることなく容易に多数の生体分子の測定ができる。また、生体分子の測定と共に同一のバイオチップを用いて検量線を作成することもできる。

実施例

[0043] 以下、本発明のバイオチップの具体的な実施例を示す。本実施例では、本発明のバイオチップを用いて、ヒトの血清中のトランスサイレチン（TTR）、C反応性蛋白（CRP）及びシスタチンCの量を測定し、その結果を従来の方法を用いて測定した結果と比較した。

[0044] （バイオチップ用基板の作製）

まず、市販されている通常のスライドガラスの上面に、厚さが3 μ m程度のアルミニウム膜を蒸着させた。続いて、形成されたアルミニウム膜に対して、0.3 Mのシュウ酸溶液を用いて、印加電圧40 Vで、0℃で60分間の1回目の陽極酸化処理を行い、陽極酸化アルミナ皮膜を形成した。その後、形成されたアルミナ皮膜に対して10分間の超音波処理を行い、超純水を用いて洗浄を行った。

[0045] 次に、上記工程で形成された陽極酸化アルミナ皮膜を除去した。陽極酸化アルミナ皮膜の除去は、リン酸と水とを8：2の比率で含む溶液に50 g/Lのクロム酸を加えた溶液を用いて、60℃～80℃で3分間反応させることにより行った。反応後に、10分間の超音波処理を行い、超純水を用いて洗浄を行った。

[0046] 次に、0.3 Mのシュウ酸溶液を用いて、印加電圧40 Vで、10℃で5

分間の条件で2回目の陽極酸化処理を行い、その後、10分間の超音波処理を行い、超純水を用いて洗浄を行った。これにより、スライドガラスの上面に厚さが約600nmの多孔質層を有する陽極酸化アルミナ皮膜が得られた。

[0047] 次に、得られた陽極酸化アルミナ皮膜の上に、スパッタ法により金を堆積した。具体的に、陽極酸化アルミナ皮膜の多孔質層の開口部の周辺に金を付着させた。これにより、金からなる金属層を含むバイオチップ用の基板が得られた。この基板は、使用時までデシケータ内に保存することができる。

[0048] (バイオチップの作製)

作製した基板の上に固相化プローブを固定するために、まず、基板を1mMの10-カルボキシル-1-デカンチオールを含むエタノールに一晩、好ましくは6～12時間浸漬した。その後、基板を超純水により洗浄し、乾燥させた。続いて、基板を0.1MのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)と0.4Mの水溶性カルボジイミド(WSC)とを含む水溶液に10分間浸漬した。その後、基板をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)により洗浄し、乾燥させた。

[0049] 次に、基板の上に抗TTR抗体、抗CRP抗体及び抗シスタチンC抗体をそれぞれ滴下し、30分間静置した。ここで、抗体の滴下は、行列状に複数箇所に行う。本実施例では、各抗体を2列×4行の8スポットずつ配列し、合計で6列×4行の計24スポットを配列した。その後、基板をTween-20含有PBS(PBST)により2回洗浄し、PBSにより1回洗浄し、乾燥させた。これにより、複数のスポット状の固相化プローブが形成された。

[0050] 次に、固相化プローブが形成された基板を、1%のウシ血清アルブミン(BSA)に30分間浸漬してブロッキングを行った。その後、基板をPBSTにより2回洗浄し、PBSにより1回洗浄し、乾燥させた。

[0051] 次に、基板の上に仕切部を設けた。仕切部には、厚さが136μmの両面テープを用い、これを基板の上に、上記工程で形成されたプローブの行に沿って、プローブ同士の間及び両端に5本の両面テープをそれぞれ並行に貼着

した。

[0052] 次に、基板の上に、複数のプローブを覆うように、仕切部である両面テープを介して、市販されている通常のカバーガラスを貼着した。これにより、基板とカバーガラスとの間には、両面テープの厚み分の間隙が形成され、この間隙が流路となる。本実施例では4本の流路が形成されることとなる。

[0053] また、流路からの試料の排出のために、液体排出手段である濾紙からなる吸水パッドを準備した。

[0054] 上記の工程により、本実施例のバイオチップが完成した。

[0055] (試料の測定)

以下、上記の工程により作製したバイオチップを用いて、試料を測定する方法を説明する。本実施例では、TTR、CRP及びシスタチンCの3種のタンパク質を含む標準タンパク質混合液を用いて検量線を作成し、血清を試料として3種のタンパク質を検出及び定量した結果について示す。

[0056] まず、予め上記方法により得られたバイオチップの各固相化プローブが形成された領域の吸光度の測定を行い、吸収ピーク波長を記録しておく。

[0057] 次に、標準タンパク質混合液及び血清をそれぞれ流路の一端部に滴下する。本実施例では、 10 ng/mL 及び 100 ng/mL の標準タンパク質混合液、並びに100倍希釈及び1000倍希釈したヒト血清を用いた。これらをそれぞれ流路の一端部に滴下した。基板とカバーガラスとの間隙の大きさは両面テープの厚み分であり、極めて小さいため、毛細管現象により、ヒト血清及び標準タンパク質混合液が流路の一端から他端にまで展開する。これにより、流路における各プローブとヒト血清及び標準タンパク質混合液とが反応することができる。この状態で30分間静置した後に、流路の他端部に、試料と接するように濾紙からなる吸水パッドを載置して、流路内の試料を排出した。その後、流路内に試料を展開させた工程と同様に、流路をPBSにより2回洗浄し、PBSにより1回洗浄し、その後に乾燥させた。

[0058] 次に、洗浄及び乾燥後のバイオチップの各固相化プローブが形成された領域の吸光度を測定し、試料と反応させる前に測定した吸収ピーク波長とのシ

フト量を指標として、標準タンパク質混合液による検量線を用いて各タンパク質の含有量を測定した。その結果を図4～図6に示す。なお、図4～図6には、本実施例の結果と共に、流路を有さない従来のバイオチップを用いて、各プローブの上に順次試料を滴下して試験した結果を示している。

[0059] 図4～図6に示すように、本発明に係るバイオチップを用いても、従来のバイオチップを用いた場合と比較して同等の結果が得られた。すなわち、従来よりも簡便な方法で、従来と同等の測定結果を得ることができた。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明に係るバイオチップは、高価な装置を用いることなく容易に多数の試料を同時に測定することができ、特に、生体試料中の生体分子の検出又は定量のためのバイオチップ等に有用である。

符号の説明

- [0061] 1 基板
2 仕切部
3 カバーガラス
4 流路
5 固相化プローブ
6 吸水材
10 バイオチップ
20 仕切部材

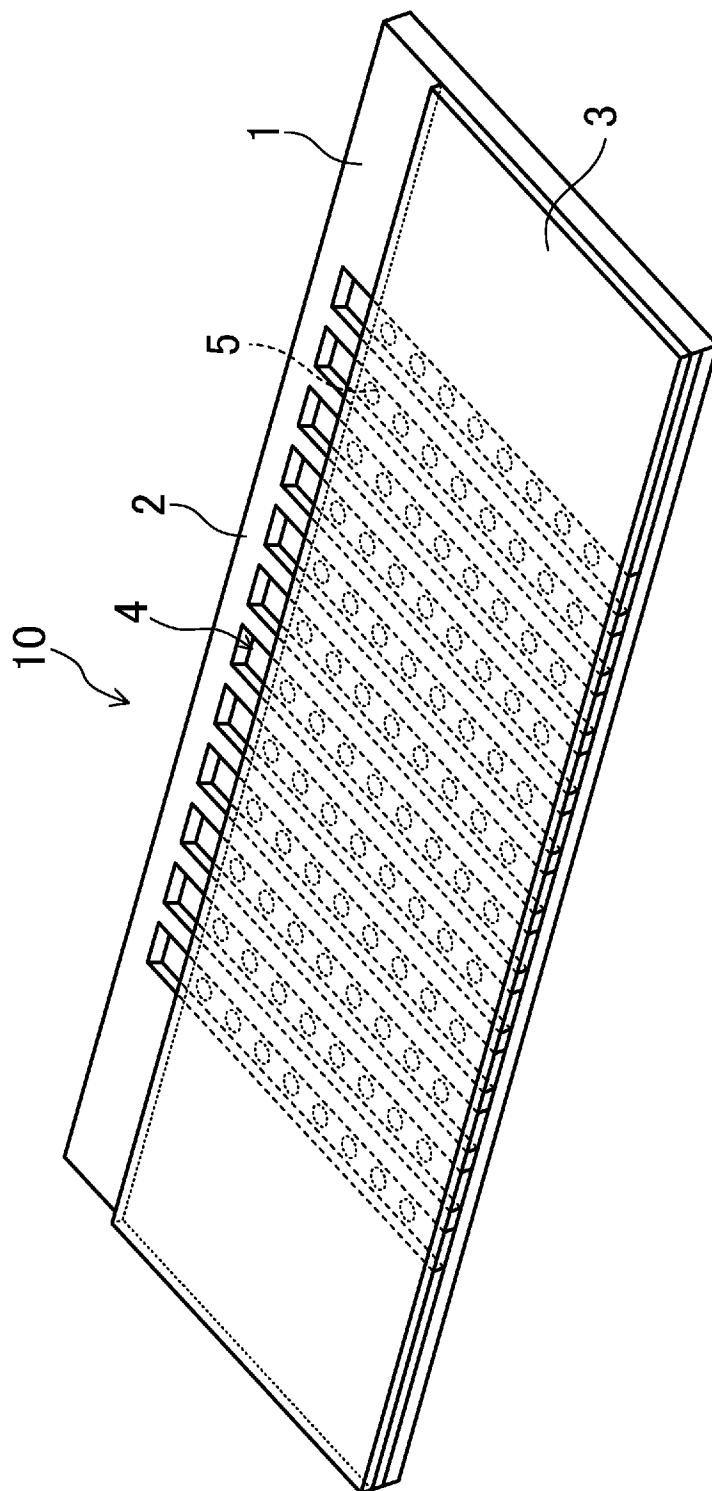
請求の範囲

- [請求項1] 上面に金属層が形成された基板と、
前記基板の上に設けられ、それぞれ並行に延びる複数の仕切部と、
前記複数の仕切部の上に設けられたカバー部材とを備え、
前記基板の上には、前記基板、仕切部及びカバー部材により、それぞれ並行に延びる複数の流路が形成され、
前記基板の上の前記各流路には、それぞれ複数の固相化プローブが形成され、
前記流路における前記基板と前記カバー部材との間隙は、液体が毛细管現象により前記流路の一端から他端にまで展開できる大きさであるバイオチップ。
- [請求項2] 請求項1において、
前記各流路の一端部又は他端部の一方に着脱可能に設けられ、前記流路内の液体を排出する液体排出手段をさらに備えているバイオチップ。
- [請求項3] 請求項2において、
前記液体排出手段は、吸水性を有する吸水材であるバイオチップ。
- [請求項4] 請求項2において
前記液体排出手段は、液体を吸引できる吸引ポンプであるバイオチップ。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項において、
前記金属層は、前記基板の上面に、多孔質層を有する陽極酸化アルミナ皮膜を介して形成されているバイオチップ。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか1項において、
前記基板は、その上面に凹凸構造を有し、
前記金属層は、前記凹凸構造の上に形成されているバイオチップ。
- [請求項7] 請求項6において、
前記凹凸構造は、ナノインプリント法により形成されているバイオ

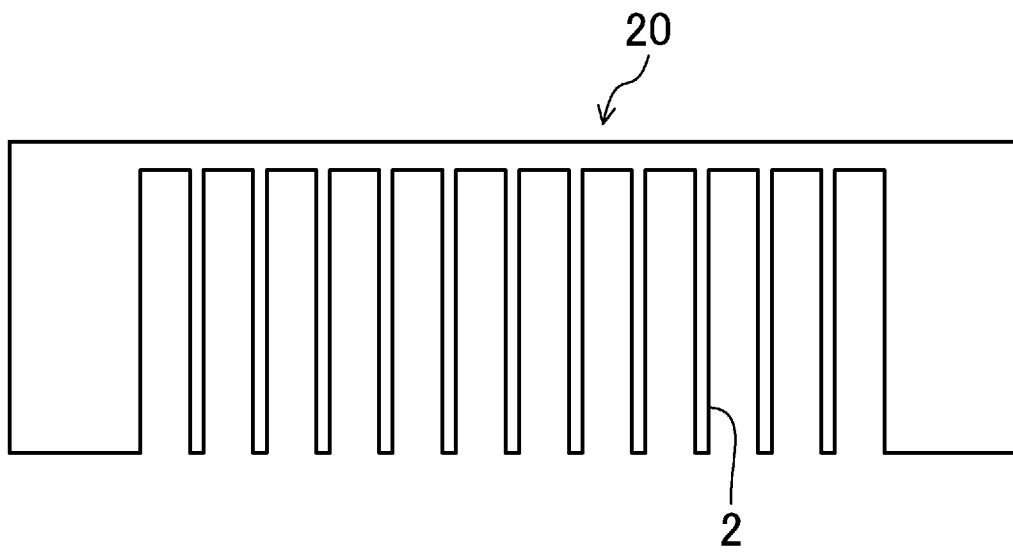
チップ。

- [請求項8] 請求項1～4のいずれか1項において、
 前記金属層は、前記基板の上面に二次元状に配列された複数のシリカビーズの上に形成されているバイオチップ。
- [請求項9] 請求項1～4のいずれか1項において、
 前記金属層は、前記基板の上に直接に金属ナノ粒子が配列されて形成されているバイオチップ。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか1項において、
 前記金属層は、金を含むバイオチップ。
- [請求項11] 請求項1～10のいずれか1項において、
 前記仕切部と前記カバー部材とは、一体に形成されているバイオチップ。

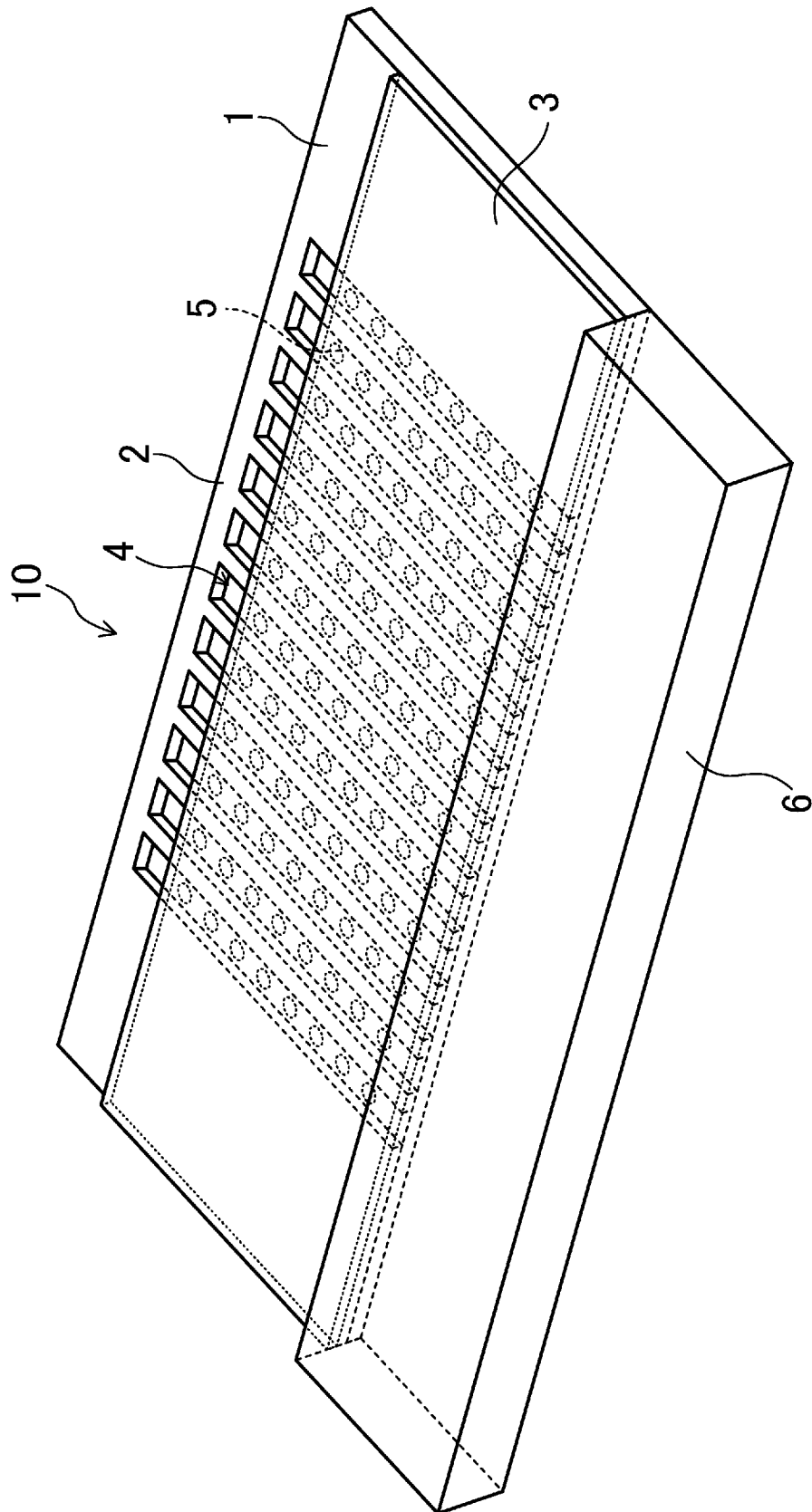
[図1]



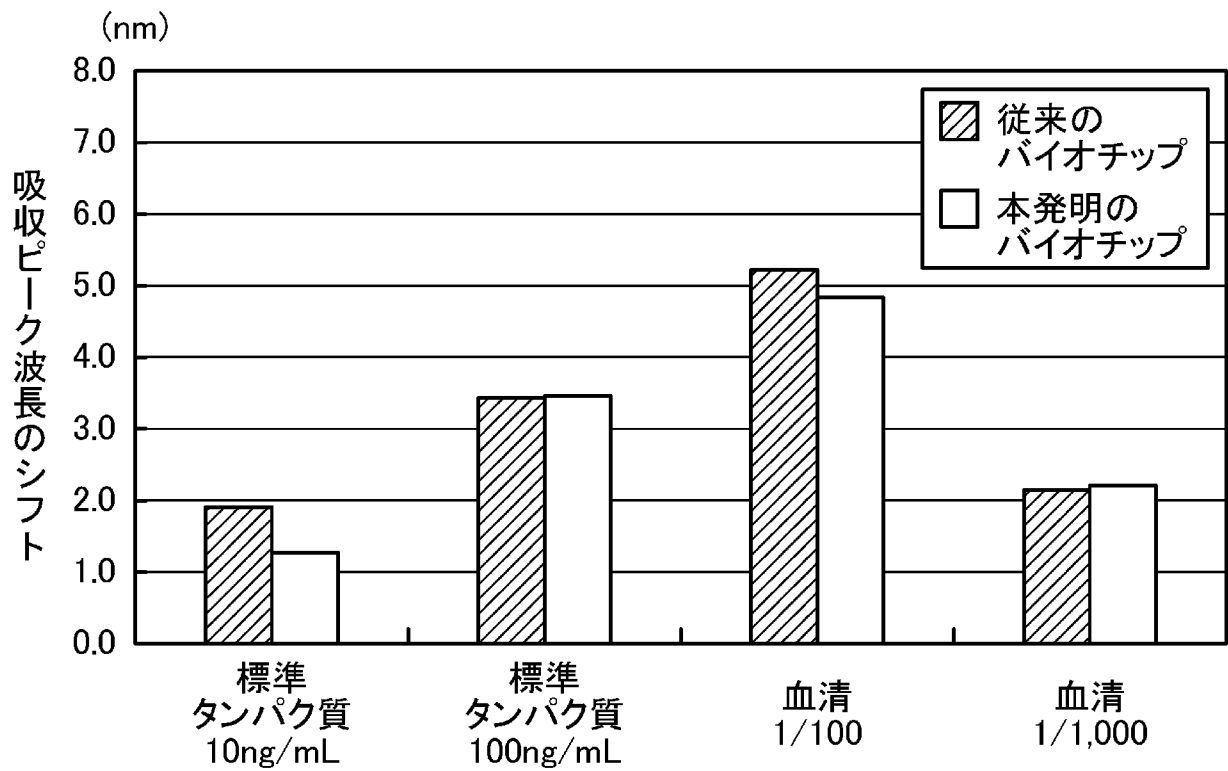
[図2]



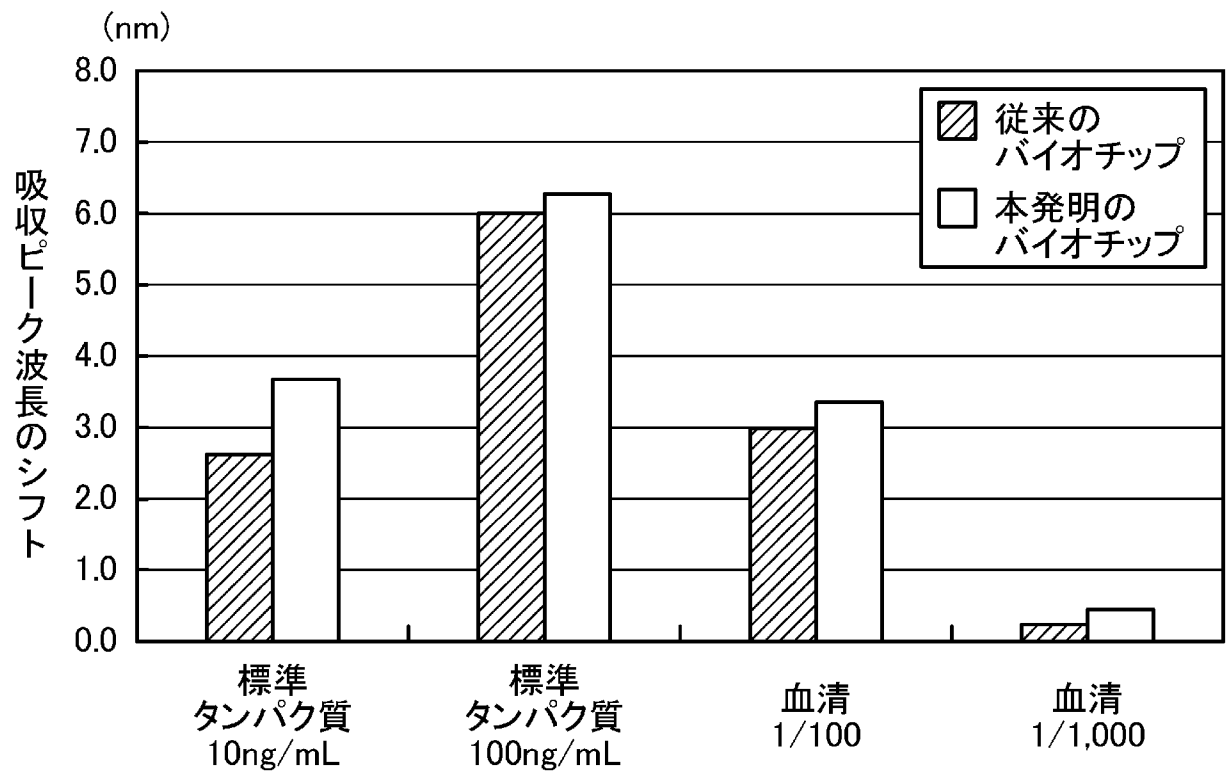
[図3]



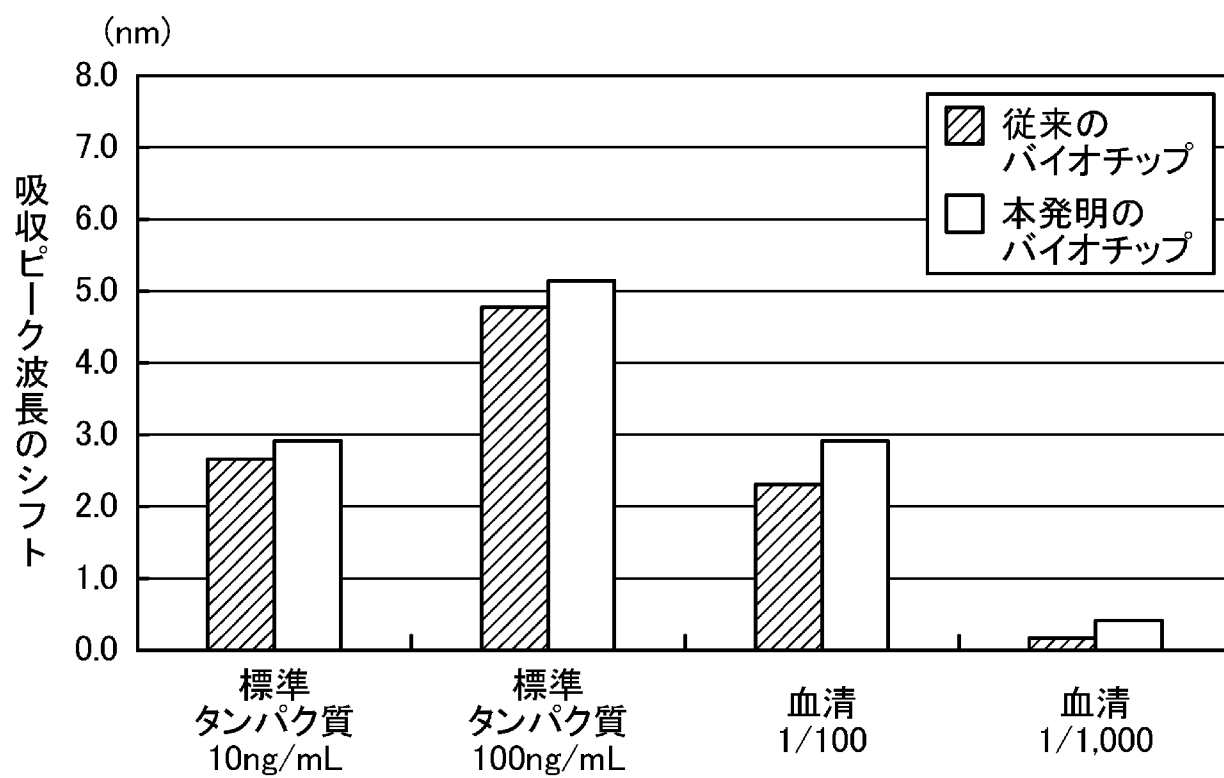
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/003561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/553(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/552(2006.01)i,
G01N37/00(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)

G01N33/553, G01N33/543, G01N33/552, G01N37/00

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2004-093558 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 25 March 2004 (25.03.2004), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0119], [0126], [0130]; fig. 9, 11 & JP 2009-8690 A & US 2005/0229696 A1 & EP 1542010 A1 & WO 2004/008142 A1 & AU 2003248273 A	1-4, 6, 10, 11/ 5, 7-9
Y	JP 2008-076313 A (Japan Advanced Institute of Science and Technology), 03 April 2008 (03.04.2008), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0024] to [0032]; fig. 1 (Family: none)	5

☒ 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
07 August, 2012 (07.08.12)

Date of mailing of the international search report
21 August, 2012 (21.08.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/003561

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/044274 A1 (Tokyo Institute of Technology, SCIVAX Corp.), 22 April 2010 (22.04.2010), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0019], [0039], [0054] (Family: none)	7
Y	JP 2007-303938 A (Kobe University), 22 November 2007 (22.11.2007), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0030], [0044], [0052], [0053], [0059] (Family: none)	8, 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/553 (2006.01) i, G01N33/543 (2006.01) i, G01N33/552 (2006.01) i, G01N37/00 (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. G01N33/553, G01N33/543, G01N33/552, G01N37/00

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 2004-093558 A (三菱化学株式会社) 2004.03.25, 全文・全図、特に、 【特許請求の範囲】、段落【0 1 1 9】、【0 1 2 6】、【0 1 3 0】、【図 9】、 【図 1 1】等参照 & JP 2009-8690 A & US 2005/0229696 A1 & EP 1542010 A1 & WO 2004/008142 A1 & AU 2003248273 A	1-4, 6, 10, 11 /5, 7-9
Y	JP 2008-076313 A (国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学) 2008.04.03, 全文・全図、特に、【特許請求の範囲】、段落【0 0 2 4】 - 【0 0 3 2】、【図 1】等参照 (ファミリーなし)	5

☒ 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

0 7 . 0 8 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 8 . 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)

草川 貴史

2 J

4 0 7 5

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
Y	WO 2010/044274 A1 (国立大学法人東京工業大学、S C I V A X株式会社) 2010. 04. 22, 全文・全図、特に、【特許請求の範囲】、段落【0 0 1 9】、【0 0 3 9】、【0 0 5 4】等参照 (ファミリーなし)	7
Y	JP 2007-303938 A (国立大学法人神戸大学) 2007. 11. 22, 全文・全図、特 に、【特許請求の範囲】、段落【0 0 3 0】、【0 0 4 4】、【0 0 5 2】、【0 0 5 3】、【0 0 5 9】等参照 (ファミリーなし)	8, 9