

(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
2018年2月22日(22.02.2018)



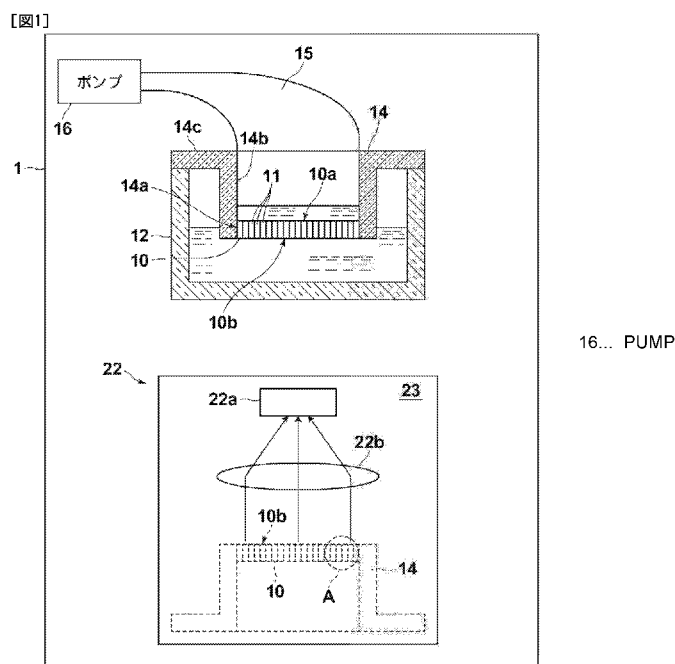
(10) 国際公開番号

WO 2018/034109 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 21/76* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/026705
- (22) 国際出願日: 2017年7月24日(24.07.2017)
- (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 2016-159451 2016年8月16日(16.08.2016) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 伊藤 孝明 (ITO, Takaaki); 〒2580023 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人太陽国際特許事務所 (TAIYO, NAKAJIMA & KATO); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) Title: INSPECTION METHOD AND INSPECTION DEVICE

(54) 発明の名称: 検査方法および検査装置



(57) Abstract: Through use of a plate-shaped inspection chip 10 having a plurality of pores 11 penetrating from one surface 10a to another surface 10b and having a constant pore diameter, a capture substance for specifically binding to a specific substance being immobilized on inside wall surfaces of the pores 11, and the pores 11 being shaped so as to be capable of retaining, by capillary action at atmospheric pressure, an inspection solution with which the pores 11 are filled, the other surface 10b is brought into contact with the inspection solution and the inspection solution is supplied into

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 補正された請求の範囲（条約第19条(1)）

the pores 11, after which the inspection chip 10 is separated from the inspections solution stored in a container while the inspection solution remains retained in the pores 11 of the inspection chip 10, and light emitted from the inspection chip 10 is detected from vertically above the inspection chip 10.

(57) 要約：一方の面 1 0 a から他方の面 1 0 b まで一定の孔径で貫通した複数の細孔 1 1 を有する板状の検査チップ 1 0 であって、細孔 1 1 の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、細孔 1 1 が細孔 1 1 内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップ 1 0 を用い、検査用溶液に他方の面 1 0 b を接触させて検査用溶液を細孔 1 1 中に供給した後、検査チップ 1 0 の細孔 1 1 内に検査用溶液を保持させたまま、検査チップ 1 0 を容器に貯留された検査用溶液から離間させ、検査チップ 1 0 から出射される光を、検査チップ 1 0 の鉛直上方から検出する。

明 細 書

発明の名称： 検査方法および検査装置

技術分野

[0001] 本発明は、被検物質である抗原、抗体もしくはデオキシリボ核酸などを検出するための検査方法および検査装置に関する。

背景技術

[0002] 生化学的な反応、例えば、酵素反応、核酸ハイブリダイゼーション、抗原－抗体反応などの特異的結合反応を検査する方法の一つとして、被検物質と捕捉物質との間の結合現象を光学的に検出する方法が知られている。この方法は、所定位置に固定されている捕捉物質に被検物質を結合させ、励起光を受けて蛍光を発する標識、あるいは基質の反応を触媒して発色、蛍光もしくは化学発光を生じさせる標識などをその被検物質に付与し、かかる標識に起因して生じる光を検出するものである。より具体的には、被検物質に特異的に結合する抗体などの結合物質に蛍光標識を付与し、蛍光標識から生じる蛍光を検出する方法、被検物質に特異的に結合する抗体などの結合物質に酵素を標識し、この酵素を触媒として反応する発色基質、蛍光基質、あるいは化学発光基質から生じる発色や蛍光、化学発光を検出する方法等が知られており、これらにより、被検物質の特定が可能となる。

[0003] このような検査に用いられるバイオチップとしては、支持体に多数の貫通孔（細孔）が整列配置されてなる多孔性基板からなるデバイスの検討が進められている。

[0004] 特表平 9－504864 号公報には、多孔性基板からなるバイオチップの細孔中に流体流動を供する手段や、結合反応を検出するための検出手段を備える旨は記載されている。しかしながら、具体的な装置構成は十分に開示されていない。

[0005] 一方、多孔性基板の細孔内に捕捉物質を固定化し、被検物質を含有する検体液を多孔性基板の裏面側から表面へと貫通孔を介してポンプで汲み上げ、

循環させることにより、検体液が捕捉物質に効率的に接触されて、被検物質を捕捉物質に結合させる方法が米国特許第 7 4 7 0 5 6 号明細書に提案されている。この方法により、測定時間の大幅な短縮化を図ることができる。米国特許第 7 4 7 0 5 6 号明細書には、具体的な構成として、多孔性基板の下面に検体液中に先端が挿入されたピペットを接続し、上面にダイアフラムポンプを備え、圧力制御を行うことで検体液を細孔中に供給し、その液面を制御する方法が提案されている。

[0006] 特表 2 0 0 1 - 5 2 1 1 4 8 号公報には、複数の毛細管を備えたデバイスの毛細管内でアッセイを行い、毛細管の縦方向から光を検出する毛細管アッセイ方法が提案されている。しかしながら、毛細管中への検体液の供給方法については言及されておらず、光検出時における液面の状態についても記載がない。

[0007] 他方、国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 3 8 3 2 号には、検体の光情報を検出する光情報認識装置において、光測定の精度を高めるために、光検出時における検体収容部に収容されている検体の液面と光測定のために検出器と検体との間に備えられる光導波先端との距離を制御する方法が開示されている。具体的には、すり鉢状の開口部の底部に検体を収容する貫通穴が設けられた検体収容部が開示されており、上部から供給された検体は開口部にある検体自体の重みによって下降してゆき、ほぼ一定の場所で止まるため、液面を一定に管理することができる旨記載されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 米国特許第 7 4 7 0 5 6 号明細書においては、ピペット毎にダイアフラムを配置する必要があり、また、ポンプの圧力を制御してチップ内に反応液を留めたまま、チップの下方から光検出を行うため、系が煩雑である。加えて、検査チップの孔の径や反応液の表面張力が違うと細孔中に吸い上げられる液面レベルが変わってしまい、光取り出し側の液表面の状態が不安定であり定量的な測定は困難である。このような系において、定量的な測定を行うた

めには、チップの設計や反応液の表面張力が変わるたびにダイアフラムの設定値を変更する必要がある、管理が煩雑なものとなる。

[0009] 多数の微細孔を備えた検査チップにおいて、微細孔からの低出力を精度よく測定するためには、複数の微細孔で同一のアッセイを行い、複数の微細孔からの信号を平均化することが好ましい。しかしながら、国際公開第2006/013832号のすり鉢状の開口部の底部に検体を収容する貫通穴が設けられた検体収容部では、検体収容部を複数設ける場合に、検体収容部同士の間隔は少なくともmmオーダー必要であり、検体収容部密度を高めることが難しい。

[0010] 本発明は、上記事情に鑑み、検査チップ内の複数の細孔間での信号バラツキを抑制し、より高い精度の信号検出を可能とする検査方法および検査装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明の検査方法は、一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した複数の細孔を有する板状の検査チップであって、細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、細孔が細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップを用い、

検査チップの細孔に、検査に供する検体液を供給して、検体液中の特定の物質を捕捉物質に結合させ、特定の物質と特異的に結合する標識物質を特定の物質に結合させた後、

検査チップを、検査用溶液が貯留された容器内に、一方の面を鉛直上向きとして水平に支持し、

容器内を加圧することにより、あるいは検査チップ上の空間を減圧することにより、検査用溶液を、検査チップの下面である他方の面側から細孔に供給し、

その後、加圧された容器内、あるいは減圧された空間を大気圧に開放し、検査チップの細孔内に検査用溶液を保持させたまま、検査チップを容器に

貯留された検査用溶液から離間させ、

検査チップから出射される光を、検査チップの鉛直上方から検出する検査方法である。

[0012] 本発明の検査方法においては、検査チップを検査用溶液から離間させた後に、検査チップの上下が逆になるように回転させて他方の面を鉛直上向きとして、水平に配置し、検査チップから出射される光を他方の面側から検出することが好ましい。

[0013] 本発明の検査方法においては、検査チップが、複数の細孔の各細孔の形状が、検査用溶液の表面張力を T 、検査用溶液の細孔内壁面に対する接触角を θ 、重力加速度を g 、および検査用溶液の密度を ρ としたとき、
$$\text{細孔の外周長} \times T \times \cos \theta > \text{細孔の中空部体積} \times g \times \rho$$

を満たすものであることが好ましい。

[0014] 本発明の検査方法においては、検査チップが、 Si 、 SiO_2 、 Al 、 Al_2O_3 、ステンレス鋼および樹脂材料のうちの1つまたは2つ以上の材料からなることが好ましい。

検査チップは、細孔の一方の面における開口領域の円相当直径が $1\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ であることが好ましい。

また、検査チップは、厚さが $100\ \mu\text{m} \sim 2000\ \mu\text{m}$ であることが好ましい。

[0015] 本発明の検査方法においては、検査チップの細孔の内壁面に固定化されている捕捉物質が、抗原、抗体またはデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid: DNA) であることが好ましい。

[0016] 本発明の検査方法においては、標識物質として酵素標識を含む物質を用い、検査用溶液として、酵素標識により触媒されて反応する基質を含む溶液を用い、出射される光として、検査用溶液中の基質が酵素標識により触媒されて生じる光を検出することが好ましい。

なお、上記基質としては、発色基質、蛍光基質および化学発光基質などが挙げられ、これらの基質は酵素標識の種類に応じて適宜選択される。また、

この基質に応じて、検査チップから出射される光は異なり、検出される光は、吸光（呈色）、蛍光または化学発光である。

[0017] 本発明の検査装置は、一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した細孔を複数有する板状の検査チップであって、細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、細孔が細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップと、

検査用溶液を貯留する容器と、

検査チップを、容器内において支持する支持部材と、

検査チップの細孔に検査用容器を供給する液体供給部と、

検査チップから出射される光を、水平に配置された検査チップの鉛直上方から検出する光検出器とを備えている。

発明の効果

[0018] 本発明の検査方法によれば、一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した複数の細孔を有する板状の検査チップであって、細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、細孔が細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップを用い、加圧もしくは減圧により検査チップに検査用溶液を供給した後、大気圧に戻しても検査チップの細孔内に検査用溶液を留まらせることができる。検査チップを容器中の検査用溶液から離間した状態において、検査チップの細孔内の検査用溶液の表面位置は複数の細孔間でほぼ同一となる。多数の細孔間で検査用溶液の表面位置がほぼ一致しているので、検査チップから出射される光を、検査チップの鉛直上方から検出することにより、光信号測定において、液面のバラツキによる信号ばらつきのない、高精度な信号検出が可能である。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の検査方法の第1の実施形態を実施するための検査装置の概略構成図である。

[図2]検査チップの細孔中に保持されている検査用溶液の状態を示す図である。

[図3]検査チップおよび支持部材の斜視図である。

[図4]検査チップおよび支持部材の組合せ例を示す断面模式図である。

[図5]検査チップおよび支持部材の組合せの他の例を示す断面模式図である。

[図6]検査工程のフローを示す図である。

[図7]反応プロセスにおける各種結合反応の過程を示す模式図である。

[図8]本発明の検査方法の第2の実施形態を実施するための検査装置の概略構成図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、図面を参照して本発明の実施形態を詳細に説明する。なお、本明細書において「～」とは、その前後に記載される数値を下限値および上限値として含む意味で使用される。

[0021] 本発明の第1の実施形態にかかる検査方法および検査装置を説明する。図1は検査装置1の概略構成を示す図である。

本実施形態の検査装置1は、一方の面10aから他方の面10bまで一定の孔径で貫通した細孔11を複数有し、細孔11の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなる板状の検査チップ10と、液体を貯留する容器12と、容器12中において、検査チップ10を一方の面10aを鉛直上向きとして水平に支持すると共に、検査チップ10の一方の面10a上に液体を保持する支持部材14とを備えている。本例における支持部材14は、検査チップ10の一方の面10a上に液体を保持する液体保持部を兼ねているが、液体保持部は支持部材とは別体としてもよい。

[0022] なお、ここで「水平に支持する」とは、検査チップ10の下面が液体の表面と平行となるように検査チップ10を支持することをいうが、液体の表面と検査チップ10の下面となる面10bのなす角度が $\pm 10^\circ$ の範囲であれば許容されるものとする。

また、本明細書中において上下方向は鉛直方向に一致し、検査チップ10

が水平配置される使用時における検査チップ10の鉛直上向きの面を上面、鉛直下向きの面を下面とする。

[0023] 本検査装置1は、さらに、検査チップ10の細孔への液体供給時において検査チップ10を水平配置した際の下面となる他方の面10bから細孔11に液体を供給する液体供給部として、検査チップ10の一方の面10aおよび支持部材14で囲われた空間15を閉じて、その空間15を減加圧するポンプ16を備えている。

[0024] さらに、本検査装置1は、暗室23内に配置された光検出器22aおよび検査チップ10からの光を集光するレンズ22bから構成される光信号測定部22を備えている。光信号測定部22において、検査チップ10は光検出器22aの下方に配置され、光検出器22aは検査チップ10から出射される光を、検査チップ10の鉛直上方から検出する。

[0025] 本実施形態において、検査チップ10は、複数の細孔11が二次元状に配列されてなる板状基材である。検査チップ10は、Si（シリコン）、SiO₂（シリコン酸化物）、Al（アルミニウム）、Al₂O₃（アルミナ）、ステンレス鋼および樹脂材料のいずれか1種もしくは2種以上の材料から構成されていることが好ましい。

[0026] 検査チップ10の厚さには、特に制限はないが、100μm～2000μm程度が好ましい。

[0027] 検査チップ10の細孔11の開口形状は、特に制限されず、円形、楕円形あるいは多角形であってもよい。細孔11は、柱状で断面形状が変化せず、孔径が一定のものである。なお、細孔11の少なくとも一方の面における開口の円相当直径が1μm～100μm程度であることが好ましい。より好ましくは3μm～50μmであり、特に好ましくは5μm～30μmである。なお、円相当直径とは、開口領域の面積と同等の面積を有する円の直径をいう。

1つの検査チップには基本的に同一形状の細孔11が二次元状に周期的に配列されており、最隣接の細孔11同士の距離dと開口直径φとの比d/φ

が5以下であることが好ましい。より好ましくは d/ϕ が3以下であり、特に好ましくは1以下である。比 d/ϕ が小さいほど検査チップにおける細孔密度が大きくなる。

[0028] 検査チップ10は、細孔11内に充填された検査用溶液50を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状を有している。具体的には、検査チップ10は、細孔11の形状が、検査用溶液の表面張力を T 、検査用溶液の細孔の内壁面に対する接触角を θ 、重力加速度を g 、および検査用溶液の密度を ρ としたとき、 $\text{細孔の外周長} \times T \times \cos \theta > \text{細孔の中空部体積} \times g \times \rho$ を満たす。

なお、細孔の外周長は、検査チップの一面における開口の外周長であり、例えば、細孔の開口が直径 ϕ の円であれば $\pi \phi$ で表される。

[0029] 図1の光信号測定部22にセットされた検査チップ10の領域Aの拡大図を図2に示す。図2に示すように、大気圧下において、細孔11は検査用溶液50を内部に保持することができる。検査用溶液50は細孔11内に保持され、その検査用溶液50の細孔11内における表面位置は、水平配置された検査チップ10の上面位置に揃い、すべての細孔11においてほぼ同一の位置となる。

[0030] 検査チップ10の平面形状は特に限定されないが、正方形、長方形などの矩形あるいは円形が好ましい。

[0031] 図3は図1に示す支持部材14および検査チップ10の斜視図である。

支持部材14は、検査チップ10の外形に応じた検査チップ受容部14aを備えている。支持部材14の検査チップ受容部14aおよび検査チップ10に、両者を係合するための係合部あるいは互いに嵌め合わせるための嵌合部等を備えていればよい。

さらに、支持部材14は検査チップ10の上面10a上に液体を保持する液体保持部14bと、検査チップ10を容器12中において支持するために、容器12の一部に係止される鰐部14cを備えている。この鰐部14cを容器12の上面の一部に係止することによって支持部材14を容器12に対

して固定することができる。

[0032] 支持部材 1 4 の形態は本例に限るものではない。既述の通り、液体保持部は支持部材とは別体として構成されていてもよく、例えば、容器 1 2 の一部に検査チップを載置するための台座を設けてその台座を、検査チップを支持する支持部材とし、検査チップの上面に対して押し付けられるようにして設置される、液体を保持可能な筒状部材を液体保持部として設けてもよい。

[0033] 図 4、図 5 は、検査チップと支持部材の他の構成例の断面模式図である。

図 4 に示すように、検査チップ 1 0 の細孔 1 1 の開口を有する一面に接続される支持部材 1 1 4 であってもよいし、図 5 に示すように、検査チップ 1 0 は支持部材の端部に接続されるのではなく、支持部材 2 1 4 の端部より中央よりに検査チップ 1 0 を保持可能にされていてもよい。

なお、支持部材と検査チップは、脱着自在として、支持部材を再利用するようにしてもよいし、支持部材と検査チップを一旦接続して使用した後は、そのまま破棄するようにしてもよい。また、支持部材と検査チップは一体的に形成されていてもよい。

[0034] なお、支持部材の少なくとも液体保持部は、液面位置の確認のため、光透過性を有するものであることが好ましい。

[0035] 本検査方法において検査対象とされる被検物質（標的分子）は、主として、生体由来分子であり、抗原および抗体などのタンパク質、糖類、ペプチド、DNA、リボ核酸（ribonucleic acid：RNA）、ペプチド核酸（peptide nucleic acid：PNA）などである。そして、細孔 1 1 の内壁面に固定されている、特定の物質と特異的に結合する捕捉物質としては、これらの被検物質と特異的に結合する物質である。

[0036] 本実施形態の検査方法において、検査チップ 1 0 の細孔 1 1 への液体の供給排出はポンプ 1 6 により行う。検査チップ 1 0 を、容器 1 2 中の液体に下面となる他方の面 1 0 b が接触するように水平に支持した状態で、ポンプ 1 6 により空間 1 5 が減圧されると、検査チップ 1 0 の他方の面 1 0 b 側から細孔 1 1 中に液体が吸引される。また、細孔 1 1 中に液体が入っている状態

で、空間 15 が加圧されると、検査チップ 10 の細孔 11 中から液体が下方に押し出され排出される。このポンプ 16 の動作により、細孔 11 内への液体の供給（吸引）および排出が行われる。本例では、ポンプ 16 による空間 15 の減圧動作が液体の供給動作に相当し、空間 15 の加圧動作が液体の排出動作に相当する。

以下において、検査チップ 10 の細孔 11 への各種液体の供給および排出は上記ポンプ 16 の減加圧動作によって行う。なお、検査チップ 10 への液体の供給排出を伴う工程における以下の説明では検査チップ 10 の一方の面 10a を上面 10a、他方の面 10b を下面 10b という場合がある。

[0037] 以下、図 6 および図 7 を参照して、図 1 に示した第 1 の実施形態の検査装置 1 を用いた、本発明の第 1 の実施形態の検査方法を説明する。図 6 は検査フローを示す図であり、図 7 は図 6 に示す検査フローの第 1 ～第 3 の反応プロセスにおける反応を模式的に示す図である。

[0038] まず、第 1 の反応プロセスを実施する（S1）。第 1 の反応プロセスにおける第 1 の反応液は、検査に供する検体液である。検体液の具体例としては、血漿、または血清が挙げられる。

検体液を容器 12 に入れ、検査チップ 10 を容器 12 中の検体液の表面に下面 10b が浸されるようにセットする。その後、ポンプ 16 により空間 15 を減圧して、細孔 11 内に検体液を供給する。空間 15 の減圧により検体液が細孔 11 中に吸い上げられ、その液面は、徐々に検査チップ 10 の上面 10a 側に上昇する。このとき、検体液の液面が検査チップ 10 の上面 10a よりも上方に予め設定された反応液基準位置まで到達したら、ポンプ 16 による減圧動作を停止して、空間 15 を大気圧に戻す。空間 15 を大気圧に戻しても検体液は細孔 11 内に留まる。検体液を細孔 11 中に留めた状態で 30 分間保持する。その後、ポンプ 16 により空間 15 を加圧して細孔 11 中の検体液を排出する（S2）。

S1－S2 の工程は、複数回繰り返してもよい。ここでは、例えば、3 回繰り返し、検体液中の特定の物質と細孔 11 中の内壁に固定されている捕捉

物質との特異的な結合反応を促進させる。

[0039] 次に、第1の洗浄プロセスを実施する（S3）。洗浄液を容器12に入れ、検査チップ10を容器12中の洗浄液の表面に下面10bが浸されるようにセットする。その後、ポンプ16により空間15を減圧して、細孔11内に洗浄液を供給する。空間15の減圧により洗浄液が細孔11中に吸い上げられ、その液面は、徐々に検査チップ10の上面10a側に上昇する。洗浄液の液面が少なくとも検査チップ10の上面10aを超え、反応液基準位置よりも上方に予め設定された洗浄液基準位置まで到達したら、ポンプ16による減圧動作を加圧動作に切り換えて、空間15を加圧して細孔11中の洗浄液を排出する。洗浄液は検体液が供給された位置よりも上方まで供給されるので、十分洗浄を行うことができる。

工程S3は、複数回繰り返してもよい。ここでは、例えば、3回繰り返して洗浄効果を高める。

[0040] 次に、第2の反応プロセスを実施する（S4）。第2の反応プロセスにおける第2の反応液は、標識物質を含む標識溶液である。標識物質は、被検物質と特的に結合する物質に標識が付与されたものである。

標識溶液を容器12に入れ、検査チップ10を容器12中の標識溶液の表面に下面10bが浸されるようにセットする。その後、ポンプ16により空間15を減圧して、細孔11内に標識溶液を供給する。空間15の減圧により標識溶液が細孔11中に吸い上げられ、その液面は、徐々に検査チップ10の上面10a側に上昇する。このとき、標識溶液が反応液基準位置まで到達したら、ポンプ16による減圧動作を停止して、空間15を大気圧に戻す。そして、標識溶液を細孔11中に留めた状態で30分間保持する。その後、ポンプ16により空間15を加圧して細孔11中の標識溶液を排出する（S5）。

S4－S5の工程は、複数回繰り返してもよい。ここでは、例えば、3回繰り返し、細孔11中の内壁に固定されている捕捉物質との特異的な結合した被検物質への標識物質の結合反応を促進させる。

[0041] 次に、第2の洗浄プロセスを実施する（S6）。第2の洗浄プロセスは第1の洗浄プロセスと同様である。

[0042] 続いて、第3の反応プロセスを実施する（S7）。第3の反応プロセスにおける第3の反応液は、検査用溶液である。

検査用溶液を容器12に入れ、検査チップ10を容器12中の検査用溶液の表面に下面10bが浸されるようにセットする。その後、ポンプ16により空間15を減圧して、検査用溶液を細孔11内に供給する。空間15の減圧により検査用溶液が細孔11中に吸い上げられ、その液面は、徐々に検査チップ10の上面10a側に上昇する。検査用溶液の液面が検査チップ10の上面10aを超えて反応液基準位置に到達したら、ポンプ動作を停止して、空間15を大気圧に戻す。空間15を大気圧に戻しても検体液は細孔11内に留まる。

[0043] 検査チップ10の細孔11中に検査用溶液を保持させたまま、検査チップ10を容器12から取り外し、その下面10bを検査用溶液から離間させる（S8）。ここで、検査用溶液供給時に下面であった検査チップ10の他方の面10bを上面となるように、検査チップ10を回転させて上下面を反転させる（S9）。

[0044] その後、検査チップ10を、光信号測定部22の光検出器22aの下方に、他方の面10bが鉛直上方となり、光検出器22aと対向するように水平に配置する（S10）。

大気圧下において、検査チップ10の細孔11中に検査用溶液を留めた状態で、光検出器22aにより検査チップ10から出射される光を検出し（S11）、検査工程は終了となる。

[0045] 検査チップ10の細孔11が、大気中において細孔11内に検査用溶液を保持できる形状であることから、上記のように、下面から吸い上げた検査用溶液を細孔11中に留めたまま、圧力制御をすることなく光信号測定部22へ移動することが可能である。また、検査チップ10の複数の細孔11中において、検査チップ10上面側の液体表面位置が、液体の自重と表面張力の

バランスによりほぼ一定位置に揃うため（図2参照）、複数の細孔11の各細孔11からの検査精度を向上させることができる。特に、本実施形態のように、支持部材14の一端に検査チップ10が支持される構成の場合には、検査チップ10の上下面を反転させることにより、検査チップ10の一方の面10bと光検出器22aとの間に支持部材14等の他の部材が位置しない状態となる。これにより、支持部材14の側壁などに残留する検査用溶液によるノイズを抑制することができ、さらなる精度向上が可能となる。

[0046] 図7は上記各反応プロセスにおける反応を模式的に示す図である。

検査チップ10の細孔11の内壁面11aにはアレルゲンなどの捕捉物質30が固定されている（S0）。第1の反応プロセス（S1）では、細孔11に検体液が供給され、検体液に含まれている被検物質（例えば、上記アレルゲンと特異的に結合する特異的IgE抗体）32を捕捉物質30に特異的に結合させる。

[0047] そして、検体液を排出し洗浄した後、第2の反応プロセス（S4）では、被検物質32と特異的に結合する物質33（例えば、二次抗体）に標識Fが付与されてなる標識物質35を含む標識溶液を細孔11が供給され、標識溶液に含まれている標識物質35を被検物質32に結合させる。

標識Fは、例えば、ルミノール、ロフィン、ルシゲニンおよびシュウ酸エステルなどの化学発光基質に対して触媒として機能する酵素標識である。

[0048] さらに、標識溶液を排出し洗浄した後、第3の反応プロセス（S7）では、細孔11内に標識Fを触媒として発光反応する発光基質を含む検査用溶液を供給し、発光基質を、標識Fを触媒として発光反応させる。光信号測定部22においては、この発光反応による光信号を光検出器22aにより検出する。

[0049] なお、第1の反応プロセスおよび第2の反応プロセスの後に実施される洗浄プロセスでは、検体液あるいは標識溶液の残液を洗浄し、細孔11中に非特異吸着している被検物質32や標識物質を除去するので、測定信号におけるノイズを抑制することができる。

[0050] 上記において、H R P（西洋わさびペルオキシダーゼ）酵素が標識として用いられる場合には、H R Pが触媒として機能するルミノール系の化学発光基質を含有する反応液（ルミノール反応液）を、A L P（アルカリホスファターゼ）酵素が用いられる場合にはジオキセタン系化学発光基質を含有する反応液を用いることが好ましい。

[0051] ルミノール反応液には、少なくともルミノール基質と過酸化水素水が含まれる。酵素標識は、過酸化水素水存在下において、ルミノールの酸化を触媒するものである。なお、反応液中には、化学発光を増感する増感剤を含むことが好ましい。

[0052] なお、酵素標識を用いた光検出においては、上記の化学発光基質のみならず、発光基質あるいは蛍光基質を含む反応液を用い、呈色（吸光）反応や、蛍光を検出してもよい。

[0053] 図8は、本発明の第2の実施形態にかかる検査装置2の概略構成図である。以下においては、第1の実施形態の検査装置1と異なる点を主に説明し、共通する構成については同一の符号を付して詳細な説明を省略する。

[0054] 本実施形態の検査装置2は、液体を保持する容器24の形状、および液体供給部であるポンプ16が容器24に接続されている点で、上記検査装置1の構成と異なる。本検査装置2においては、ポンプ16は容器24の空間25を加減圧することにより検査チップ10の細孔11への液体の供給及び細孔11からの液体の排出を行う。

[0055] 容器24は、容器24内部に検査チップ10と容器24により閉じた空間25を構成できる形状を有している。支持部材14の鰐部14cは容器24の上面の一部に係止可能とされて、容器24中に検査チップ10を水平に支持することができる。

[0056] 検査チップ10が容器24中の液体に他方の面10bが接触するように水平に支持された状態で、ポンプ16により空間25が加圧されると、検査チップ10の面10b側から細孔11中に液体が押し上げられる。また、細孔11中に液体が入っている状態で、空間25が減圧されると、検査チップ1

0の細孔11中から液体が下方に吸引されて排出される。このポンプ16の動作により、細孔11内への液体の供給および排出が行われる。本例では、ポンプ16による空間25の加圧動作が液体の供給動作に相当し、空間25の減圧動作が液体の排出動作に相当する。

[0057] 検査方法は、細孔11内への液体の供給および排出の動作が減加圧であるか加減圧であるかが違うだけで、先に説明した検査方法と同様である。なお、上記で説明した検査方法においては、検査チップ10に検査溶液を供給した後、検査チップ10の上下面を反転させることとしたが、図8の光信号測定部22において示すように、検査チップ10の上下面の反転することなく、供給時の上下関係のまま光信号測定部22に設置されて、光検出に供されても構わない。但し、既述の通り、上下面を反転させることにより、液体保持部14bに残留する検査溶液によるノイズを抑制することができるため、反転工程を経ることがより好ましい。

符号の説明

- [0058] 1、2 検査装置
- 10 検査チップ
- 10a 検査チップの一方の面
- 10b 検査チップの他方の面
- 11 細孔
- 11a 内壁面
- 12 容器
- 14、114、214 支持部材（検査チップ支持部）
- 14a 検査チップ受容部
- 14b 液体保持部
- 14c 鰐部
- 15 空間
- 16 ポンプ（液体供給部）
- 22 光信号測定部

2 2 a 光検出器

2 2 b レンズ

2 3 暗室

2 4 容器

2 5 容器内の空間

3 0 捕捉物質

3 2 被検物質

3 3 物質

3 5 標識物質

5 0 検査用溶液

F 標識

請求の範囲

[請求項1] 一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した複数の細孔を有する板状の検査チップであって、前記細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、前記細孔が該細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップを用い、

該検査チップの前記細孔に、検査に供する検体液を供給して、前記検体液中の特定の物質を前記捕捉物質に結合させ、前記特定の物質と特異的に結合する標識物質を前記特定の物質に結合させた後、

前記検査チップを、前記検査用溶液が貯留された容器内に、一方の面を鉛直上向きとして水平に支持し、

前記容器内を加圧することにより、あるいは前記検査チップ上の空間を減圧することにより、前記検査用溶液を、前記検査チップの下面である前記他方の面側から前記細孔に供給し、

その後、前記加圧された前記容器内、あるいは前記減圧された前記空間を大気圧に開放し、

前記検査チップの前記細孔内に前記検査用溶液を保持させたまま、前記検査チップを前記容器に貯留された前記検査用溶液から離間させ、

前記検査チップから出射される光を、前記検査チップの鉛直上方から検出する検査方法。

[請求項2] 前記検査チップを前記検査用溶液から離間させた後に、前記検査チップの上下が逆になるように回転させて前記他方の面を鉛直上向きとして、水平に配置し、

前記光を前記他方の面側から検出する請求項1記載の検査方法。

[請求項3] 前記検査チップが、前記複数の細孔の各細孔の形状が、前記検査用溶液の表面張力を T 、前記検査用溶液の前記細孔の内壁面に対する接触角を θ 、重力加速度を g 、および前記検査用溶液の密度を ρ とした

とき、

$\text{前記細孔の外周長} \times T \times \cos \theta > \text{前記細孔の中空部体積} \times g \times \rho$

を満たす、請求項1または2に記載の検査方法。

[請求項4] 前記検査チップが、Si、SiO₂、Al、Al₂O₃、ステンレス鋼および樹脂材料のうちの1つまたは2つ以上の材料からなる請求項1から3いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項5] 前記検査チップは、前記細孔の前記一方の面における開口領域の円相当直径が1 μm～100 μmである請求項1から4いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項6] 前記検査チップは、厚さが100 μm～2000 μmである請求項1から5いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項7] 前記捕捉物質が、抗原、抗体またはデオキシリボ核酸である請求項1から6いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項8] 前記標識物質として酵素標識を含む物質を用い、
前記検査用溶液として、前記酵素標識により触媒されて反応する基質を含む溶液を用い、

前記出射される光として、前記検査用溶液中の前記基質が前記酵素標識により触媒されて生じる光を検出する請求項1から7いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項9] 一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した細孔を複数有する板状の検査チップであって、前記細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、前記細孔が該細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップと、

前記検査用溶液を貯留する容器と、

前記検査チップを、前記容器内において支持する支持部材と、

前記検査チップの前記細孔に前記検査用溶液を供給する液体供給部と、

前記検査チップから出射される光を、水平に配置された前記検査チップの鉛直上方から検出する光検出器とを備えた検査装置。

補正された請求の範囲
[2017年12月6日(06.12.2017)国際事務局受理]

- [請求項 1] (補正後) 一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した複数の細孔を有する板状の検査チップであって、前記細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、前記細孔が該細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップを用い、
- 該検査チップの前記細孔に、検査に供する検体液を供給して、前記検体液中の特定の物質を前記捕捉物質に結合させ、前記特定の物質と特異的に結合する標識物質を前記特定の物質に結合させた後、
- 前記検査チップを、前記検査用溶液が貯留された容器内に、一方の面を鉛直上向きとして水平に支持し、
- 前記容器内を加圧することにより、あるいは前記検査チップ上の空間を減圧することにより、前記検査用溶液を、前記検査チップの下面である前記他方の面側から前記細孔に供給し、
- その後、前記加圧された前記容器内、あるいは前記減圧された前記空間を大気圧に開放し、
- 前記検査チップの前記細孔内に前記検査用溶液を保持させたまま、前記検査チップを前記容器に貯留された前記検査用溶液から離間させ、
- 前記検査チップを前記検査用溶液から離間させた後に、前記検査チップの上下が逆になるように回転させて前記他方の面を鉛直上向きとして、水平に配置し、
- 前記検査チップから出射される光を、前記検査チップの前記他方の面側の鉛直上方から検出する検査方法。

[請求項 2] (削除)

[請求項 3] (補正後) 前記検査チップが、前記複数の細孔の各細孔の形状が、前記検査用溶液の表面張力を T 、前記検査用溶液の前記細孔の内壁面に対する接触角を θ 、重力加速度を g 、および前記検査用溶液の密度

を ρ としたとき、

$$\text{前記細孔の外周長} \times T \times \cos \theta > \text{前記細孔の中空部体積} \times g \times \rho$$

を満たす、請求項1記載の検査方法。

[請求項4] (補正後) 前記検査チップが、Si、SiO₂、Al、Al₂O₃、ステンレス鋼および樹脂材料のうちの1つまたは2つ以上の材料からなる請求項1または3に記載の検査方法。

[請求項5] (補正後) 前記検査チップは、前記細孔の前記一方の面における開口領域の円相当直径が1 μ m～100 μ mである請求項1、3および4いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項6] (補正後) 前記検査チップは、厚さが100 μ m～2000 μ mである請求項1、および3から5いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項7] (補正後) 前記捕捉物質が、抗原、抗体またはデオキシリボ核酸である請求項1、および3から6いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項8] (補正後) 前記標識物質として酵素標識を含む物質を用い、
前記検査用溶液として、前記酵素標識により触媒されて反応する基質を含む溶液を用い、
前記出射される光として、前記検査用溶液中の前記基質が前記酵素標識により触媒されて生じる光を検出する請求項1、および3から7いずれか1項に記載の検査方法。

[請求項9] 一方の面から他方の面まで一定の孔径で貫通した細孔を複数有する板状の検査チップであって、前記細孔の内壁面に特定の物質と特異的に結合する捕捉物質が固定化されてなり、前記細孔が該細孔内に充填された検査用溶液を、大気圧下において毛細管現象により保持できる形状である検査チップと、

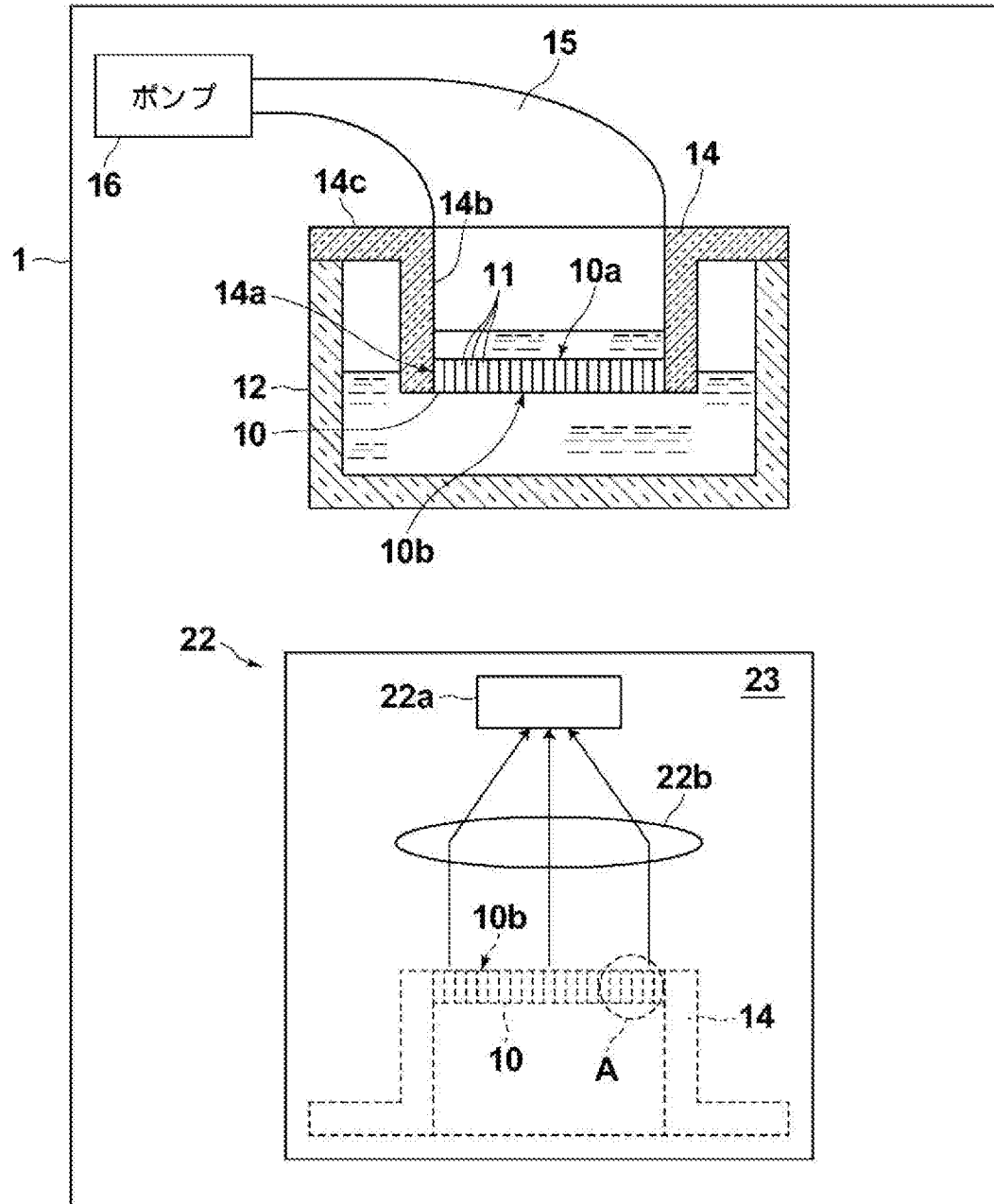
前記検査用溶液を貯留する容器と、

前記検査チップを、前記容器内において支持する支持部材と、

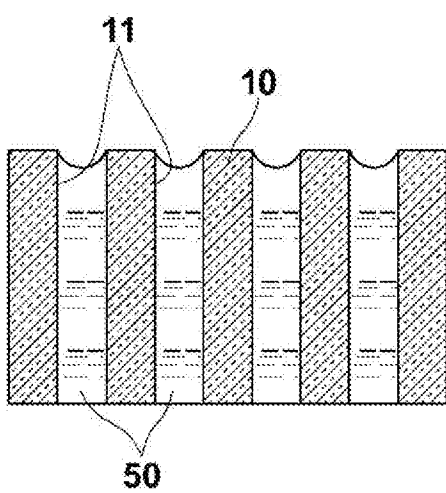
前記検査チップの前記細孔に前記検査用溶液を供給する液体供給部と、

前記検査チップから出射される光を、水平に配置された前記検査チップの鉛直上方から検出する光検出器とを備えた検査装置。

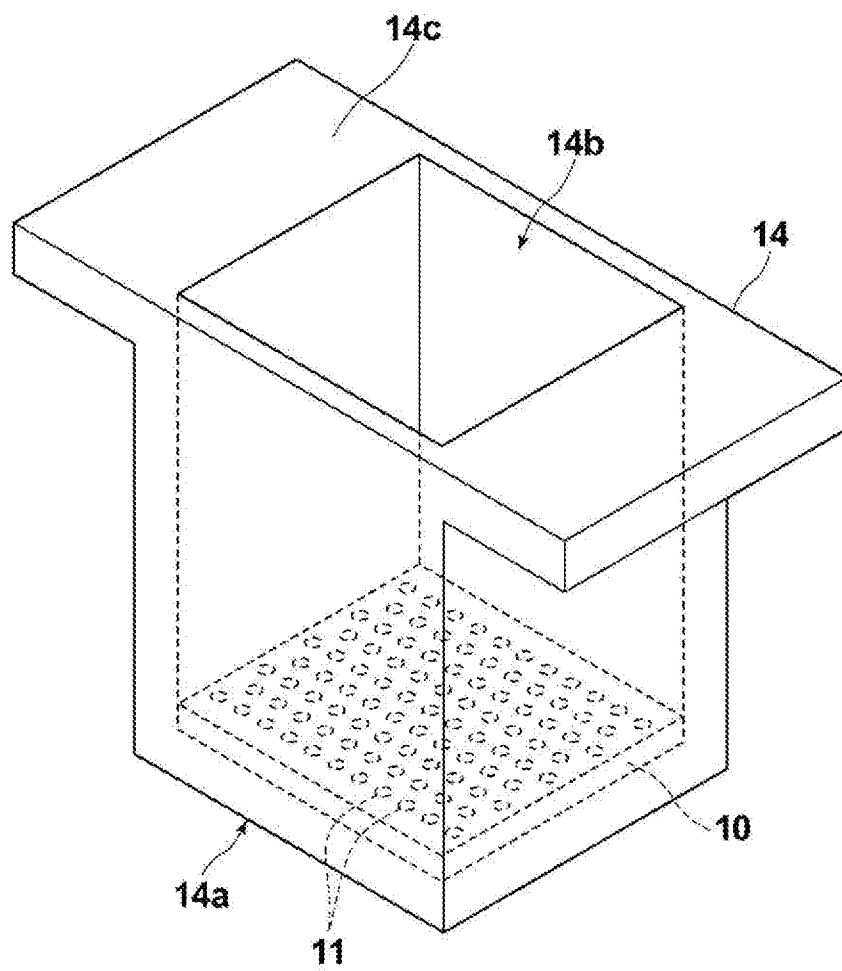
[図1]



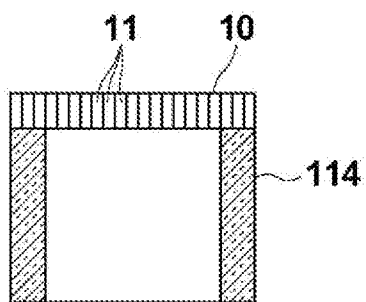
[図2]



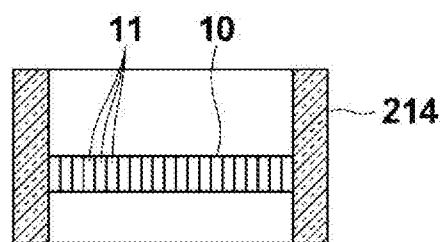
[図3]



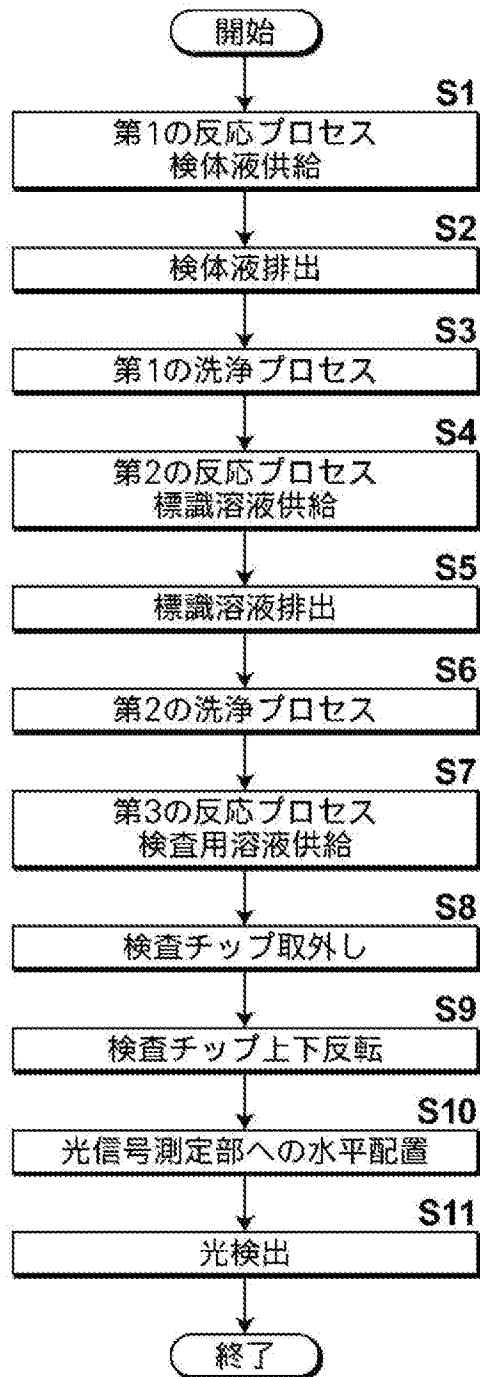
[図4]



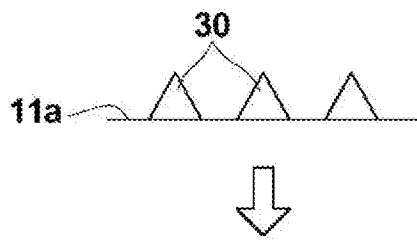
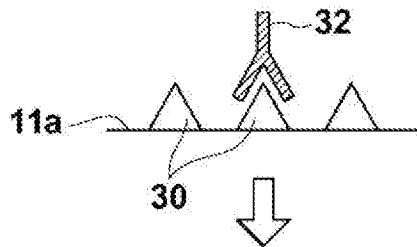
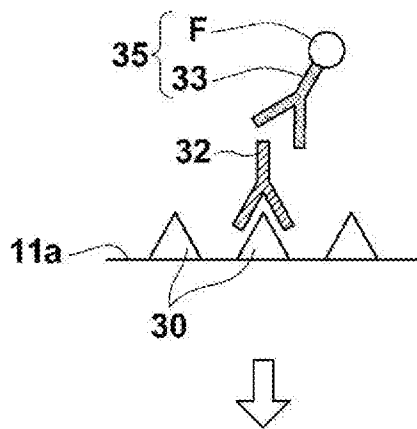
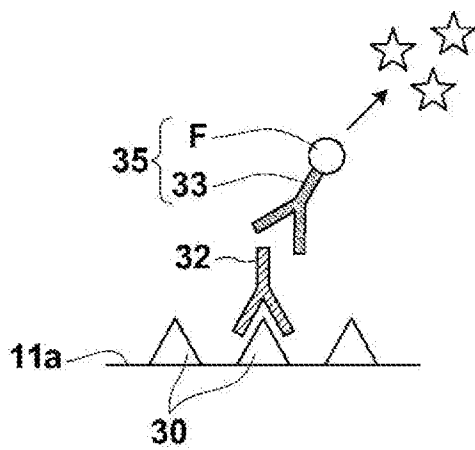
[図5]



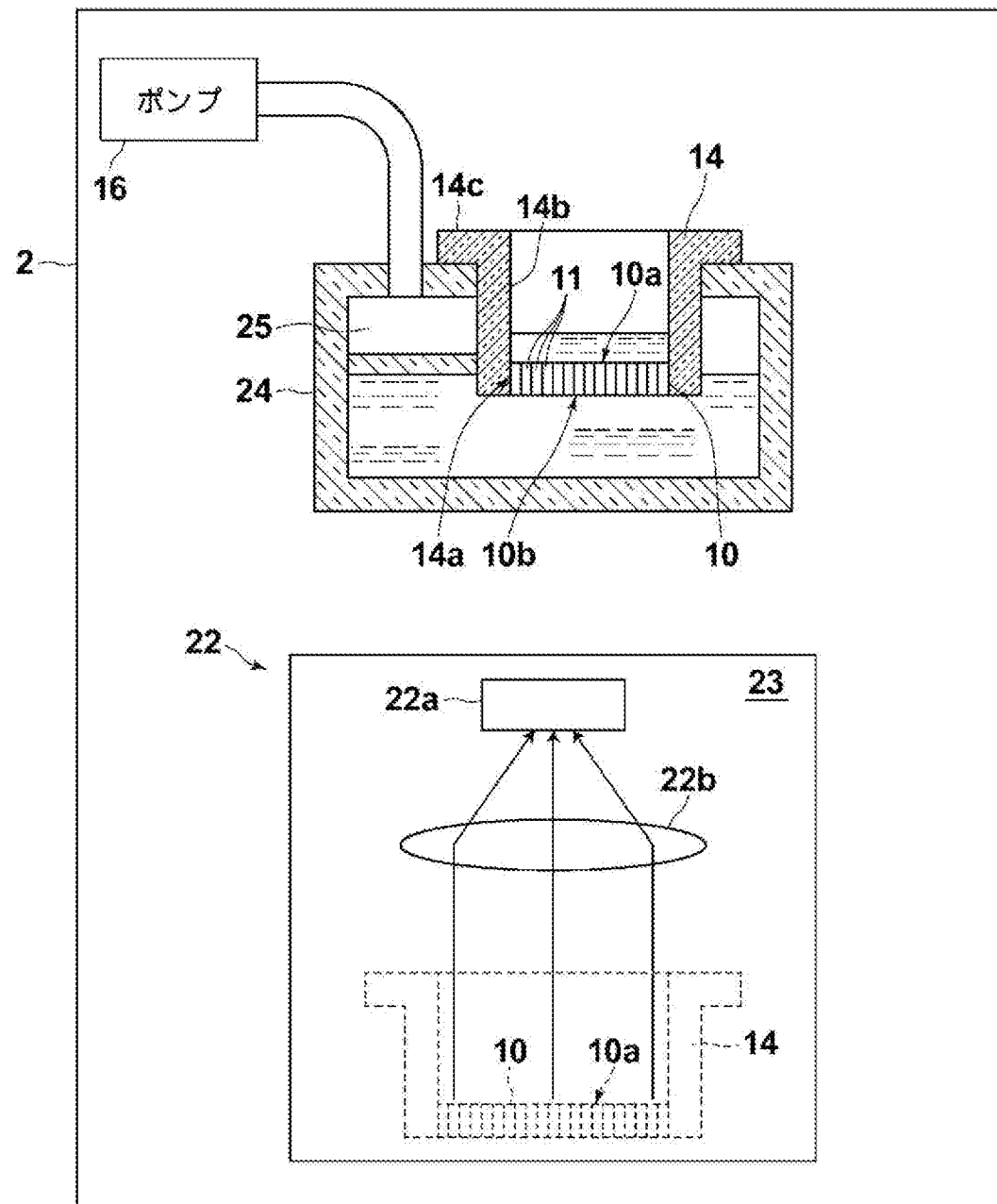
[図6]



[図7]

S0**S1****S3****S7**

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/76(2006.01)i, G01N33/53(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, C12M1/00, C12Q1/68, G01N21/76, G01N33/53

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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.
Y/A	JP 2005-148048 A (JSR Corp.), 09 June 2005 (09.06.2005), paragraphs [0086], [0228] to [0230], [0246], [0264], [0266]; fig. 20(b-1 to b-2) & US 2006/0252044 A1 paragraphs [0166], [0337] to [0340], [0367], [0390], [0392]; fig. 20(b-1 to b-2) & WO 2004/097415 A1 & EP 1619500 A1 & CA 2523749 A1 & AU 2004235238 A1	1, 3-9/2
Y/A	JP 06-27111 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 04 February 1994 (04.02.1994), fig. 1, 2 (Family: none)	1, 3-9/2

☒ 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
16 October 2017 (16.10.17)

Date of mailing of the international search report
24 October 2017 (24.10.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2006-153889 A (Olympus Corp.), 15 June 2006 (15.06.2006), paragraph [0010]; fig. 2(b), 27 & US 2002/0168665 A1 paragraph [0013]; fig. 2(b), 27 & EP 1867992 A1	1, 3-9/2

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, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/76(2006.01)i, G01N33/53(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, C12M1/00, C12Q1/68, G01N21/76, G01N33/53

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 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 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
Y/A	JP 2005-148048 A (J S R株式会社) 2005.06.09, 段落[0086]、 [0228]～[0230]、[0246]、[0264]、[0266]、図2 O (b-1～b-2) & US 2006/0252044 A1, [0166]、[0337]～[0340]、[0367]、[0390]、[0392]、 fig. 20 (b-1～b-2) & WO 2004/097415 A1 & EP 1619500 A1 & CA 2523749 A1 & AU 2004235238 A1	1, 3-9/2
Y/A	JP 06-27111 A (オリンパス光学工業株式会社) 1994.02.04, 図1、 2 (ファミリーなし)	1, 3-9/2

☒ 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 6 . 1 0 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

2 4 . 1 0 . 2 0 1 7

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)

海野 佳子

2 J

3 9 0 6

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/A	JP 2006-153889 A (オリンパス株式会社) 2006.06.15, 段落[0010]、 図 2 (b)、27 & US 2002/0168665 A1, 段落[0013]、図 2 (b)、27 & EP 1867992 A1	1, 3-9/2