

(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10月4日(04.10.2012)



(10) 国際公開番号  
WO 2012/132313 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 35/08 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/001912
- (22) 国際出願日: 2012年3月21日(21.03.2012)
- (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 2011-067021 2011年3月25日(25.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 富士  
フィルム株式会社(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: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 堀井 和由  
(HORII, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒2588538 神奈川県足  
柄上郡開成町宮台798番地 富士フィルム株  
式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 柳田 征史, 外(YANAGIDA, Masashi et  
al.); 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜3-  
18-3 新横浜KSビル 7階 柳田国際特  
許事務所 Kanagawa (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,  
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, MD, 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).

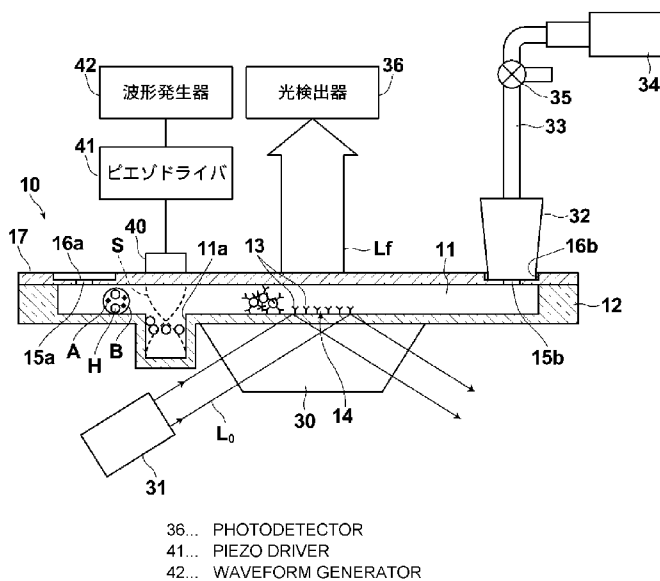
添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: IMMUNOASSAY DEVICE

(54) 発明の名称: 免疫測定装置

【図1】



36... PHOTODETECTOR  
41... PIEZO DRIVER  
42... WAVEFORM GENERATOR

(57) Abstract: [Problem] To provide a measurement device for optically measuring by using a sensor chip provided with a micro-channel for the passage of a specimen solution, the device being capable of easily removing blood cells from whole blood without causing hemolysis, and supplying the blood cells to a sensor unit. [Solution] A measurement device for measuring a substance to be detected that could be included in a specimen solution, by using a sensor chip (10) provided with a micro-channel (11) that is inside a channel member (12), causes a specimen solution to pass therethrough, and has a sensor unit (14) positioned in a section of the interior thereof, wherein: a recess (11a) is provided so as to form a recessed section in the channel wall of the channel member (12), at a location on the upstream side of the channel from the sensor unit (14); a piezoelectric element (40) is positioned at a location facing the bottom of the recess (11a); a stationary ultrasonic wave (S) is generated between the ultrasonic-wave-projecting surface of the piezoelectric element (40) and the bottom of the recess (11a); and the blood cells (H) in the specimen solution accumulate in the nodal section of the stationary ultrasonic wave (S).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2012/132313 A1



---

【課題】 試料液を流通させる微小流路を備えたセンサチップを用いて光学的測定を行う測定装置において、溶血を生じずに全血から簡単に血球を除去してセンサ部に供給可能とする。 【解決手段】 流路部材（12）内に試料液を流通させる微小流路（11）が設けられ、この微小流路（11）内の一部にセンサ部（14）が配設されてなるセンサチップ（10）を用いて、試料液中に含まれ得る被検出物質に関する測定を行う測定装置において、流路部材（12）に、センサ部（14）よりも流路上流側において、流路壁が凹んだ状態とされた凹部（11a）を設けるとともに、この凹部（11a）の底と対向する位置に圧電素子（40）を配し、圧電素子（40）の超音波照射面と凹部（11a）の底との間で定在超音波（S）を発生させ、試料液中の血球（H）を定在超音波（S）の節の部分に集積する。

## 明 細 書

**発明の名称：免疫測定装置**

### 技術分野

[0001] 本発明は、試料液中に含まれる可能性が有る被検出物質について測定を行う装置、特に詳細には、試料液を流通させる微小流路を備えたセンサチップを用いて光学的測定を行う測定装置に関するものである。

### 背景技術

[0002] バイオ測定においては、抗原抗体反応などの生体分子反応を検出することにより、被検出物質である抗原（あるいは抗体）などの存在の有無、量を測定している。

[0003] 例えば、互いに特異的に結合する2つの物質の一方（抗原、抗体、各種酵素、受容体など）を基板上に固定化し、他方の物質（これは被検出物質そのものであってもよいし、あるいは試料中で被検出物質と競合する競合物質であってよい）を基板上に固定された固定層に結合させ、この結合反応を検出することにより、試料中における被検出物質の有無、量を測定することができる。具体的には、試料に含まれる被検出物質である抗原を検出するため、基板上にその抗原と特異的に結合する抗体を固定しておき、基板上に試料を供給することにより抗体に抗原を特異的に結合させ、次いで、抗原と特異的に結合する、標識が付与された標識抗体を添加し、抗原と結合させることにより、抗体—抗原—標識抗体の、所謂サンドイッチを形成し、標識からの信号を検出するサンドイッチ法や、標識された競合抗原を被検出物質である抗原と競合的に固定化抗体と結合させ、固定化抗体と結合した競合抗原に付与されている標識からの信号を検出する競合法などのイムノアッセイが知られている。

[0004] なお上記サンドイッチ法においては、被検出物質である抗原が上記「他方の物質」に相当し、競合法においては競合抗原が上記「他方の物質」に相当する。後者の競合法においては、固定化抗体と結合した競合抗原の量が多い

ほど、被検出物質である抗原の量が少ないという関係があるので、この関係に基づいて、競合抗原の量に対応する標識からの信号レベルにより抗原の量を求めることができる。

[0005] また、上述のようなバイオ測定に適用可能で、高感度かつ容易な測定法として蛍光検出法が広く用いられている。この蛍光検出法は、特定波長の光により励起されて蛍光を発する被検出物質を含むと考えられる試料に上記特定波長の励起光を照射し、そのとき蛍光を検出することによって被検出物質の存在を確認する方法である。また、被検出物質が蛍光体ではない場合、蛍光色素で標識されて被検出物質と特異的に結合する物質を試料に接触させ、その後上記と同様にして蛍光を検出することにより、この結合すなわち被検出物質の存在を確認することも広くなされている。

[0006] 以上述べたような光学的手法を用いるバイオ測定においては測定時間の短縮化が望まれており、そこで、センサ部における反応を効率良く生じさせて、測定時間の短縮を図る方法が種々提案されている。例えば特許文献1には、微小流路（マイクロ流路）型のセンサチップを用い、試料液を一定の高速で流下させることにより測定の高速度を図ることが提案されている。この種のセンサチップは、上述した蛍光検出による被検出物質の検出や定量分析を行うために適用することも可能である。

[0007] さらに、このような蛍光検出法において、感度を向上させるため、プラズモン共鳴による電場増強の効果を利用する方法が特許文献2等に提案されている。この方法は、透明な支持体上の所定領域に金属層を設けたセンサチップを用い、支持体と金属膜との界面に対して支持体の金属層形成面と反対の面側から、全反射角以上の入射角で励起光を入射させ、この励起光の照射により金属層に表面プラズモンを生じさせ、その電場増強作用によって蛍光を増強させることにより、S/Nを向上させるものである。

[0008] ところで、上記のようなバイオ測定に供される試料液の代表的なものとして、人血等の血液が挙げられるが、流路を備えたセンサチップを用いる測定装置は、血液中に含まれ得る被検出物質の検出や定量分析にも適用可能とさ

れている。このように、血液を対象として光学的手法により各種測定を行う場合は、血液中に血球が存在すると、その血球が励起光や被検出光を散乱あるいは吸収するので、測定の感度や精度が損なわれる。また、免疫反応に関わる事象について測定を行う場合は、血球が免疫反応を阻害して、それにより測定の精度が損なわれることもある。そこで多くの場合は、全血から血球を除去した後の血漿を測定にかけようとしている。したがって、上記のセンサチップを利用する際には、その流路中に設定されたセンサ部よりも流路上流側で、全血から血球を除去しておくことが求められる。

[0009] 全血から血球を除去する方法としては、センサチップのセンサ部よりも流路上流側に血球分離フィルタを設けることが考えられるが、この場合には血球分離に時間がかかる、目詰まりを防止するためには真空ポンプによって流路に大きな吸引負圧を作用させる必要がある、フィルタが目詰まりして測定に供される血漿量が足りなくなる、といった問題が認められる。特に最後の問題は、いわゆるレート測定法によって測定を行う場合に発生すると、深刻な事態を招くことになる。すなわち、レート測定法とは、単位時間に対する反応量の変化量を測定するものであるが、上記のフィルタが目詰まりが生じてそれが時々刻々進行すると、流路中の血液の流速が次第に低下するために被検出物質が供給不足となって、正確な測定値を求めることが困難になるのである。

[0010] このような問題を生じない血球除去の手法として、例えば特許文献3には、流路を流れる全血に対して流れを横切る方向に進行超音波を当て、その放射圧によって血球を押圧することにより、血液を、血球を含むものと含まないもの（血漿）とに分離し、そうして分離された各血液を互いに分岐した別々の流路に導入することが記載されている。この構成によれば、血漿だけをセンサ部に供給することも可能と考えられる。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0011] 特許文献1：特開2007-101221号公報

特許文献2：特開平10-307141号公報

特許文献3：特開2005-319407号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0012] しかし、特許文献3に示された血球除去の手法を、前述のセンサチップを用いて光学的測定を行う装置に適用した場合、進行超音波により血球が溶血（損傷）するおそれがある。血球の溶血が発生すると、血球内のタンパク質が検体に暴露されるために、その後の免疫アッセイや化学分析に影響を与えるおそれがある。
- [0013] 本発明は上記の事情に鑑みてなされたものであり、試料液を流通させる微小流路を備えたセンサチップを用いて光学的測定を行う測定装置において、溶血を生じずに全血から簡単に血球を除去してセンサ部に供給可能とすることを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0014] 本発明による測定装置は、流路部材内に試料液を流通させる微小流路が設けられ、この微小流路内の一部にセンサ部が配設されてなるセンサチップを用いて、試料液中に含まれ得る被検出物質に関する測定を行う測定装置において、流路部材のセンサ部よりも流路上流側において微小流路を横断する定在超音波を発生させる超音波照射手段と、定在超音波の節に集積された微小粒子を捕捉する粒子捕捉部とを備えていることを特徴とするものである。
- [0015] 本発明の測定装置においては、粒子捕捉部を、流路部材の流路壁の超音波被照射部（流路壁において超音波が照射される部分）に形成された凹部とするとともに、超音波照射手段を、定在超音波の節を凹部内に位置させるように超音波を照射するものとしてもよい。また、粒子捕捉部を、定在超音波の節の位置よりも流路下流側において微小粒子を捕捉する構造物としてもよい。
- [0016] ここで、定在超音波が微小粒子に及ぼす力について説明する。この力は下記式のように表せられる。

[数1]

$$F(z) = \frac{5\pi}{4\rho_0 c_0^3} V p_0^2 f \sin\left(2\pi \frac{z}{\lambda/2}\right)$$

ただし、

F : 捕捉力

$\rho_0$  : 媒質の密度

$c_0$  : 媒質での音速

$\lambda$  : 超音波の波長

$z$  : 位置座標 (音波の伝搬方向の位置座標)

$p_0$  : 超音波の振幅 (音圧)

[0017]  $z = 0$  (すなわち節の位置) では  $\sin$  が 0 になるので定在超音波が微小粒子に及ぼす力はゼロになる。 $z = 0$  を基準に正側は定在超音波が微小粒子に及ぼす力の方向が正側になり、負側ではこの力の方向が負側になり、両者ともに微小粒子を  $z = 0$  (すなわち節の位置) の位置に近づける方向に力が発生する。

[0018] また、 $z = \lambda/4$  (すなわち腹の位置) では定在超音波が微小粒子に及ぼす力がピークとなる。 $z = \lambda/4$  より大きい側は定在超音波が微小粒子に及ぼす力の方向が負側になり、小さい側はこの力の方向が正側になり、両者ともに微小粒子を  $z = \lambda/4$  (すなわち腹の位置) の位置から遠ざける方向に力が発生する。

[0019] なお、ここで発生する力は  $\sin$  関数に比例するために、 $z = 0$  ではゼロの力が、 $z = 0$  から離れるに従い緩やかに大きくなる力が働く。

[0020] つまり、定在超音波の節 ( $z = 0$ ) に集積された微小粒子の大きさが  $\lambda/4$  を超えると、微小粒子内に逆方向の力が同時に加えられることになり、物質損傷の可能性が表れる。

[0021] 従って、微小粒子を損傷させずに定在超音波の節に集積させるためには、超音波照射手段が発生させる超音波の波長は、捕捉対象となる微小粒子の粒

径の4倍以上とすることが好ましい。

[0022] また、微小流路の流路壁の超音波被照射部に、流路部材よりも超音波の反射率が高い超音波反射部材を設けることが好ましい。

[0023] また、微小流路の流路壁の超音波被照射部から定在超音波の節までの領域に、試料液と流路部材との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層を設けることが好ましい。

[0024] また、超音波照射手段は、微小流路の流路壁の一部を構成するように配置してもよく、その場合には、超音波照射手段の表面に、超音波照射手段と試料液との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層を設けてもよい。

### 発明の効果

[0025] 本発明の測定装置においては、流路部材内に試料液を流通させる微小流路が設けられ、この微小流路内の一部にセンサ部が配設されてなるセンサチップを用いて、試料液中に含まれ得る被検出物質に関する測定を行う測定装置において、超音波照射手段により流路部材のセンサ部よりも流路上流側において微小流路を横断する定在超音波を発生させて、この定在超音波の節の部分に微小粒子を集積し、集積された微小粒子を粒子捕捉部で捕捉するようにしている。上述の通り、定在超音波の節の部分では、定在超音波が微小粒子に及ぼす力がゼロになるので、進行超音波で微小流路を集積する場合と比較して微小粒子の損傷を小さくすることができる。

[0026] そのため、特に全血から血球を除去する場合には、溶血を生じずに全血から簡単に血球を除去してセンサ部に供給できるため、検体等の他の物質に影響を及ぼすことがなくなり、免疫アッセイや化学分析を正確行うことが可能となる。

[0027] また、粒子捕捉部を、流路部材の流路壁の超音波被照射部に形成された凹部とするとともに、超音波照射手段を、定在超音波の節を凹部内に位置させるように超音波を照射するものとするか、粒子捕捉部を、定在超音波の節の位置よりも流路下流側において微小粒子を捕捉する構造物とすれば、簡単な構成で粒子捕捉部を構成することが可能となる。

- [0028] また、超音波照射手段が発生させる超音波の波長を、捕捉対象となる微小粒子の粒径の4倍以上とすれば、より微小粒子の損傷を小さくすることができる。
- [0029] また、微小流路の流路壁の超音波被照射部に、流路部材よりも超音波の反射率が高い超音波反射部材を設ければ、より確実に定在超音波を発生させることができる。
- [0030] また、微小流路の流路壁の超音波被照射部から定在超音波の節までの領域に、試料液と流路部材との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層を設ければ、音響整合層の表面付近に微小粒子を保持できるようになるので、微小粒子の捕捉や回収を容易にすることができる。
- [0031] また、超音波照射手段を、微小流路の流路壁の一部を構成するように配置してもよく、その場合に、超音波照射手段の表面に、超音波照射手段と試料液との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層を設ければ、超音波が試料液で反射することが抑えられるので、定在超音波を効率的に発生させることができる。

### 図面の簡単な説明

- [0032] [図1]本発明の第1実施形態による測定装置を示す概略側面図
- [図2]上記測定装置に用いられるセンサチップの外形形状を示す斜視図
- [図3]上記測定装置に用いられるセンサチップの要部を示す概略側面図
- [図4]本発明の第2実施形態の測定装置におけるセンサチップの要部を示す概略側面図
- [図5]本発明の第3実施形態の測定装置におけるセンサチップの要部を示す概略側面図
- [図6]本発明の第4実施形態の測定装置におけるセンサチップの要部を示す概略側面図
- [図7]本発明の第5実施形態の測定装置におけるセンサチップの要部を示す概略側面図
- [図8]本発明の第6実施形態の測定装置におけるセンサチップの要部を示す概略側面図

略側面図

[図9]上記測定装置におけるセンサチップの要部のその他の例を示す概略側面図

[図10]本発明の第7実施形態による測定装置を示す概略側面図

[図11]本発明の第8実施形態による測定装置を示す概略側面図

### 発明を実施するための形態

[0033] 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。図1は、本発明の第1の実施形態による測定装置の概略構成を示すものである。本実施形態の測定装置は、先に述べた微小流路型センサチップ（以下、単にセンサチップという）10を用いて生体由来物質を検出する装置として構成されたものである。まず図2および図3も参照して、このセンサチップ10について説明する。

[0034] センサチップ10は測定装置本体に対して着脱自在とされたものであり、図1および図2に示される通り、試料液が流される微小流路11を有する流路部材12と、微小流路11の一部を構成して、互いに特異的に結合する2つの物質のうち一方の物質13を壁面に固定しているセンサ部14と、流路部材12の上に固着された上板部材17とを備えている。なおセンサ部14の上流側つまり図中の左側において流路部材12には、微小流路11から下方に凹んだ状態とされた凹部11aが形成されている。この凹部11aは後述するように、粒子捕捉部として機能するものである。

[0035] 本実施形態では、抗原抗体反応においてサンドイッチ法によるアッセイを行う場合を例とし、そこで上記物質13が、被検出物質である抗原Aと特異的に結合する抗体であるとして説明する。なお、抗体13は直接微小流路11の壁面に固定されてもよいが、後述するように表面プラズモンによる電場増強により蛍光を増強する場合は、この壁面の上に金属薄膜が形成され、その上に抗体13が固定される。

[0036] 上記上板部材17は、図2に示されるように、上表面に開口した試料液流入口16aおよび試料液流出口16bと、試料液流入口16aと微小流路1

1の上流端とを連通させる開口15aと、試料液流出口16bと微小流路11の下流端とを連通させる開口15bとを有している。この上板部材17と流路部材12は、例えば超音波溶接により接合されている。

[0037] 流路部材12および上板部材17はポリスチレン等の透明な誘電体材料からなり、射出成型によりそれぞれ成型されている。

[0038] また本例のセンサチップ10においては、図3にも示すように、抗体13が固定されている領域の上流側において微小流路11の内面に、標識抗体20が付着されている。標識抗体20は、被検出物質に対して、前述の抗体13とは異なるエピトープに特異的に結合する抗体23と蛍光標識22とから構成されたものである。ここでは蛍光標識22として、多数の蛍光色素分子fと該蛍光色素分子fを内包する光透過材料21とからなる蛍光微粒子が用いられている。

[0039] 上記蛍光微粒子の大きさには特に制限はないが、直径数十nm～数百nm程度が好ましく、ここでは一例として直径100nm程度のものが用いられている。光透過材料21としては、具体的には、ポリスチレンやSiO<sub>2</sub>などが挙げられるが、蛍光色素分子fを内包でき、かつ該蛍光色素分子fからの蛍光を透過させて外部に放出できるものであれば特に制限されない。本例における標識抗体20は、蛍光標識22を、それよりも小さい抗体23により表面修飾して構成されている。

[0040] 次に図1に戻って測定装置について説明する。この測定装置は、上記センサチップ10が例えば屈折率マッチングオイルを介して載置されるプリズム30と、微小流路11の底面（センサチップ10と試料液との界面）に対して、全反射条件となる入射角で励起光L<sub>0</sub>を入射させる半導体レーザ等からなる光源31と、センサチップ10の試料液流出口16bにノズル32を介して一端が連通される連通管33と、この連通管33の他端に吸込口が接続された試料吸引ポンプ34と、連通管33に介設された開放弁35と、センサチップ10のセンサ部14の近傍部分から後述するようにして発せられる蛍光L<sub>f</sub>を検出する光検出器36とを備えている。

- [0041] さらにこの測定装置は、微小流路11の前記凹部11aに対向するようにして流路部材12の上方に配置された、超音波照射手段としての圧電素子（本例では piezo 素子）40と、この圧電素子40を励振させる駆動電圧を該圧電素子40に印加する piezo ドライバ41と、上記駆動電圧の波形を規定する波形信号を生成して piezo ドライバ41に入力する波形発生器42とを有している。なお超音波照射手段としては、piezo 素子に限らず、それ以外の圧電セラミック等を適用することも可能である。
- [0042] この圧電素子40から凹部11aの底（超音波被照射部）に向けて超音波が照射され、圧電素子40の超音波照射面と凹部11aの底との間で定在超音波Sを発生させ、試料液中の微小粒子を定在超音波Sの節の部分に集積する。
- [0043] この定在超音波Sの波長は、捕捉対象となる微小粒子の粒径の4倍以上とすることにより、より微小粒子の損傷を小さくすることができる。本実施形態においては、後述するように、全血B中の血球Hを集積することを想定している。血球Hの粒径は最大で20 $\mu\text{m}$ 程度あるため、定在超音波Sの波長は少なくとも80 $\mu\text{m}$ 以上とすることが好ましい。
- [0044] 本実施形態においては、圧電素子40の超音波照射面と凹部11aの底との間の距離を750 $\mu\text{m}$ 、発生させる定在超音波Sの周波数を1MHz、波長を1500 $\mu\text{m}$ とする。
- [0045] 次に、この測定装置による被検出物質の検出について説明する。ここでは一例として、試料液としての血液（全血）Bに含まれる可能性のある抗原Aを検出する場合について説明する。まず、図1に示す試料液流入口16aに全血Bが注入され、それとともに試料吸引ポンプ34が駆動され、開放弁35は連通管33を開く状態に設定され、全血Bがセンサチップ10の微小流路11内に導入される。またこのとき、piezo ドライバ41により圧電素子40が駆動され、微小流路11を横切るように、圧電素子40の超音波照射面と凹部11aの底との間で定在超音波Sが発生させられる。
- [0046] 微小流路11に導入された全血Bは、図3に模式的に示すように血球（赤

血球、白血球および血小板) Hを含み、また抗原 A を含み得るものである。この全血 B が、微小流路 1 1 の上記凹部 1 1 a が設けられている部分に到達すると、全血 B 中において比較的粒径が大きい血球 H が、定在超音波 S の影響を受けて定在超音波 S の節の部分に集積される。定在超音波 S の節は、凹部 1 1 a 内に位置するように設定されているため、血球 H がこの凹部 1 1 a 内に捕捉される。こうして全血 B から血球 H が分離されるので、微小流路 1 1 の凹部 1 1 a よりも下流側の部分では、ほぼ血漿のみが流れるようになる。

[0047] 上記の血漿は、微小流路 1 1 に吸着固定されている標識抗体 2 0 と混ぜ合わされる。それにより、抗原 A が標識抗体 2 0 の抗体 2 3 と結合し、さらに抗体 2 3 と結合した抗原 A が、センサ部 1 4 の抗体 1 3 と結合し、抗原 A が抗体 1 3 と抗体 2 3 で挟み込まれたいわゆるサンドイッチが形成される。

[0048] このようにしてセンサ部 1 4 に吸着した抗原 A は、以下の通りにして検出される。光源 3 1 から発せられた励起光  $L_0$  は、微小流路 1 1 の底面 (センサチップ 1 0 と試料液との界面) に対して、全反射条件となる入射角で入射する。こうして励起光  $L_0$  が全反射すると、抗体 1 3 を固定している微小流路 1 1 の内壁面から試料液 B 中にエバネッセント光が滲み出す。このとき、エバネッセント光の滲み出し領域内に蛍光標識 2 2 が存在すると、その蛍光標識 2 2 が励起されて蛍光  $L_f$  が発生する。こうして発生した蛍光  $L_f$  は、光検出器 3 6 によって検出される。以上のようにして蛍光標識 2 2 の存在を検出することは、すなわち、抗体 1 3 と結合した抗原 A の存在を検出することになる。そこで光検出器 3 6 の蛍光検出信号に基づいて、抗原 A の存在の有無や、その量を検出可能となる。

[0049] 本実施形態においては、前述した通り血球 H が凹部 1 1 a に捕捉されるので、基本的にセンサ部 1 4 には血漿だけが到達する。そこで蛍光  $L_f$  は、血球 H による散乱や吸収の影響を受けることなく良好に検出されるようになり、精度良い測定が可能となる。また、血球によって免疫反応が阻害されるようなこともない。さらに、進行超音波ではなく定在超音波により血球 H を集

積しているため、血球除去の際に溶血を生じないようにできるため、検体等の他の物質に影響を及ぼすことがなくなり、免疫アッセイや化学分析を正確行うことが可能となる。

[0050] さらに本実施形態の測定装置では、血球Hを捕捉するために微小流路11にフィルタを配置するようなことはしていないので、フィルタが目詰まりして測定に供される血漿量が足りなくなる、そのために正確な測定値を求めることが困難になる、さらには、目詰まりを防止するために試料吸引ポンプ34によって微小流路11に大きな吸引負圧を作用させる必要がある、といった問題が発生することもない。

[0051] なお微小流路11中には、固定されている抗体13と結合していない抗原Aや標識抗体20が浮遊しており、またセンサ部14には標識抗体20が非特異吸着している。これらを除去するため、蛍光Lfの検出前に、適宜洗浄液を流路に導入するようにしてもよい。

[0052] また、例えば励起光L<sub>0</sub>として780nmに中心波長を有するレーザ光を用い、前述の金属膜として金(Au)膜を用いる場合、金属膜の厚みは50nm±20nmが好適である。さらに好ましくは、47nm±10nmである。なお、金属薄膜は、Au、Ag、Cu、Al、Pt、Ni、Ti、およびこれらの合金からなる群より選択される少なくとも1種の金属を主成分とするものが好ましい。

[0053] 次に図4を参照して、本発明の第2の実施形態について説明する。なおこの図4において、図1～3中の要素と同等の要素には同番号を付し、それらについての説明は特に必要のない限り省略する(以下、同様)。また、以下で説明する図4～9の構成は、すべて圧電素子40周辺の部分に特徴が有るものなので、それらの部分のみの概略断面形状を図示してある。

[0054] 図4は、本発明の第2の実施形態による測定装置に適用されたセンサチップの圧電素子40周辺の部分概略断面形状を示すものである。

[0055] このセンサチップは図3に示されたセンサチップと比べると、流路部材12の凹部11aの底面に流路部材12よりも超音波の反射率が高い超音波反

射部材 50 を設けている点が異なるものである。この超音波反射部材 50 は、例えばアルミニウムやクラウンガラス等を用いることができる。このような超音波反射部材 50 を設ければ、より確実に定在超音波を発生させることができる。

[0056] 次に図 5 は、本発明の第 3 の実施形態による測定装置に適用されたセンサチップを示すものである。このセンサチップは図 4 に示されたセンサチップと比べると、微小流路の流路壁の超音波被照射部（ここでは超音波反射部材 50 表面）から定在超音波 S の節までの領域に、試料液と流路部材 12 との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層 51 を設けている点が異なるものである。この音響整合層 51 は、例えばポリジメチルシロキサン（PDMS : Polydimethylsiloxane）等を用いることができる。このような音響整合層 51 を設ければ、音響整合層 51 の表面付近に血球 H を保持できるようになるので、血球 H の捕捉や回収を容易にすることができる。

[0057] ここで、音響整合層 51 の表面を疎水的にしておけば、血球 H を疎水性相互作用で吸着させることも可能になる。また、音響整合層 51 の表面の位置を定在超音波 S の節の位置よりもわずかに下げておけば、血球 H は音響整合層 51 表面に押しつけられないので、進行超音波のように壁面との間の圧力で溶血させてしまうことを防ぐことも可能である。

[0058] 次に図 6 は、本発明の第 4 の実施形態による測定装置に適用されたセンサチップを示すものである。このセンサチップは図 3 に示されたセンサチップと比べると、圧電素子 40 の超音波照射面と凹部 11a の底との間の距離を 2 倍の  $1500\ \mu\text{m}$  とし、定在超音波 S の節を凹部 11a 内に 2 つ発生させるようにした点が異なるものである。これにより血球 H の回収効率を向上させることができる。

[0059] 次に図 7 は、本発明の第 5 の実施形態による測定装置に適用されたセンサチップを示すものである。このセンサチップは図 3 に示されたセンサチップと比べると、粒子捕捉部を、凹部の代わりに、定在超音波 S の節の位置よりも流路下流側において血球 H を捕捉する隔壁 11b とした点が異なるもので

ある。

- [0060] 隔壁11bは、上流側が開口したコ字断面形状であり、コ字部の内側に血球Hを捕捉するように構成されている。また隔壁11bの下流側の壁面には開口11cが設けられており、血球H以外は隔壁11bを通過できるようにしている。この隔壁11bは、流路部材12と一体的に構成されている。このような態様としても血球Hを回収することができる。
- [0061] 次に図8は、本発明の第6の実施形態による測定装置に適用されたセンサチップを示すものである。このセンサチップは図3に示されたセンサチップと比べると、流路部材12の一部が圧電素子40によって構成されている点異なるものである。すなわちこの場合、圧電素子40はセンサチップ10と共に使い捨てされることになる。そしてセンサチップ10が測定装置本体にセットされると、ピエゾドライバ41（図1参照）と圧電素子40との間で、公知の機構を用いて電氣的接続が取られるようになっている。
- [0062] 上述のように圧電素子40をセンサチップ10と共に使い捨てとする場合、圧電素子40は、例えばMeasurement Specialties社製の厚さ数十 $\mu\text{m}$ のピエゾフィルム等から構成することが好ましい。
- [0063] このような態様とした場合、図9に示すように、圧電素子40の微小流路11側の表面に、圧電素子40と微小流路11内の試料液との間で音響インピーダンス整合を図る、ポリジメチルシロキサン（PDMS：Polydimethylsiloxane）等からなる音響整合層52を設けることが好ましい。このような音響整合層52を設けることにより、圧電素子40から発せられた超音波が試料液で反射することが抑制され、良好に凹部11aまで到達できるようになるため、定在超音波Sを効率的に発生させることができる。
- [0064] 次に図10を参照して、本発明の第7の実施形態による測定装置について説明する。本実施形態の測定装置は、図1に示した測定装置と比べると基本的に、センサ部14において流路部材12の流路壁に金属薄膜60が形成され、抗体13はその金属薄膜60の上に形成されている点異なるものである。

- [0065] 上記の構成において、光源 31 から発せられた励起光  $L_0$  を、微小流路 11 の底面（センサチップ 10 と金属薄膜 60 との界面）に対して全反射条件となる入射角で、かつ p 偏光として入射させると、金属薄膜 60 上の試料液中にエバネッセント光が滲み出し、このエバネッセント光によって金属薄膜 60 中に表面プラズモンが励起される。この表面プラズモンにより金属膜表面に電界分布が生じ、電場増強領域が形成される。
- [0066] このとき、エバネッセント光の滲み出し領域内に蛍光標識 22 が存在すると、その蛍光標識 22 が励起されて蛍光  $L_f$  が発生する。ここで、エバネッセント光の染み出し領域とほぼ同等の領域に存在する表面プラズモンによる電場増強効果により、蛍光  $L_f$  は増強されたものとなる。光検出器 36 は、この増強された蛍光  $L_f$  を検出する。この光検出器 36 が出力する蛍光検出信号に基づいて、抗原 A の存在の有無や、その量を検出可能であることは、既述の実施形態におけるのと同様である。
- [0067] 次に図 11 を参照して、本発明の第 8 の実施形態による測定装置について説明する。本実施形態の測定装置は、図 1 に示した測定装置と比べると基本的に、エバネッセント光を発生させる全反射光学系に代えて落射光学系が採用されている点が異なるものである。
- [0068] すなわち本実施形態においては、光源 31 が光検出器 36 と同様にセンサチップ 10 の上方側に配置され、そこからセンサチップ 10 のセンサ部 14 に向けて励起光  $L_0$  が照射される。したがってこの場合は、伝搬光である励起光  $L_0$  によって直接的に前記蛍光標識 22 が励起されて蛍光  $L_f$  が発生する。この蛍光  $L_f$  を検出した信号に基づいて、抗原 A の存在の有無や、その量を検出可能であることは、既述の実施形態におけるのと同様である。
- [0069] なお、以上説明した図 10 や図 11 の構成を採用する場合においても、図 4～9 に示したセンサチップの構成を適宜採用可能であることは勿論である。
- [0070] ここで、本発明の測定装置が対象とする被検出物質は、抗原や抗体の他、遺伝子、細胞などの固層化して観察できる物質であれば、特に制限がない。

遺伝子、細胞を検出する場合は、それらに特異的に吸着する物質を微小流路の内壁に固定しておけばよい。反対に、遺伝子、細胞に特異的に吸着する物質を本発明の測定装置によって検出することも可能であり、その場合は遺伝子、細胞を微小流路の内壁に固定しておけばよい。

[0071] また、被検出物質、あるいは試料中で被検出物質と競合する競合物質と特異的に結合する物質は、センサ表面に直接固定されている必要はなく、自己組織化単分子膜（SAM）、 $\text{SiO}_2$ 等の誘電体膜、カルボキシメチルデキストラン等の高分子膜などを介して固定されていてもよい。

[0072] また、被検出物質、あるいはこの被検出物質と試料液中で競合する競合物質と、それと特異的に結合する物質との組合せも、上述した抗原と抗体に限られるものではなく、その他、アビジン・ビオチン反応、酵素・基質反応など、バイオアッセイに使われる反応により結合する物質の組合せが用いられる場合にも、本発明は同様に適用可能である。

[0073] さらに、免疫アッセイを適用する場合は、先に説明したサンドイッチアッセイだけではなく、競合法を適用することも可能である。

[0074] また標識物質は蛍光分子に限らず、蛍光ビーズ、金属微粒子など光応答性があるその他の物質からなるものも適用可能である。

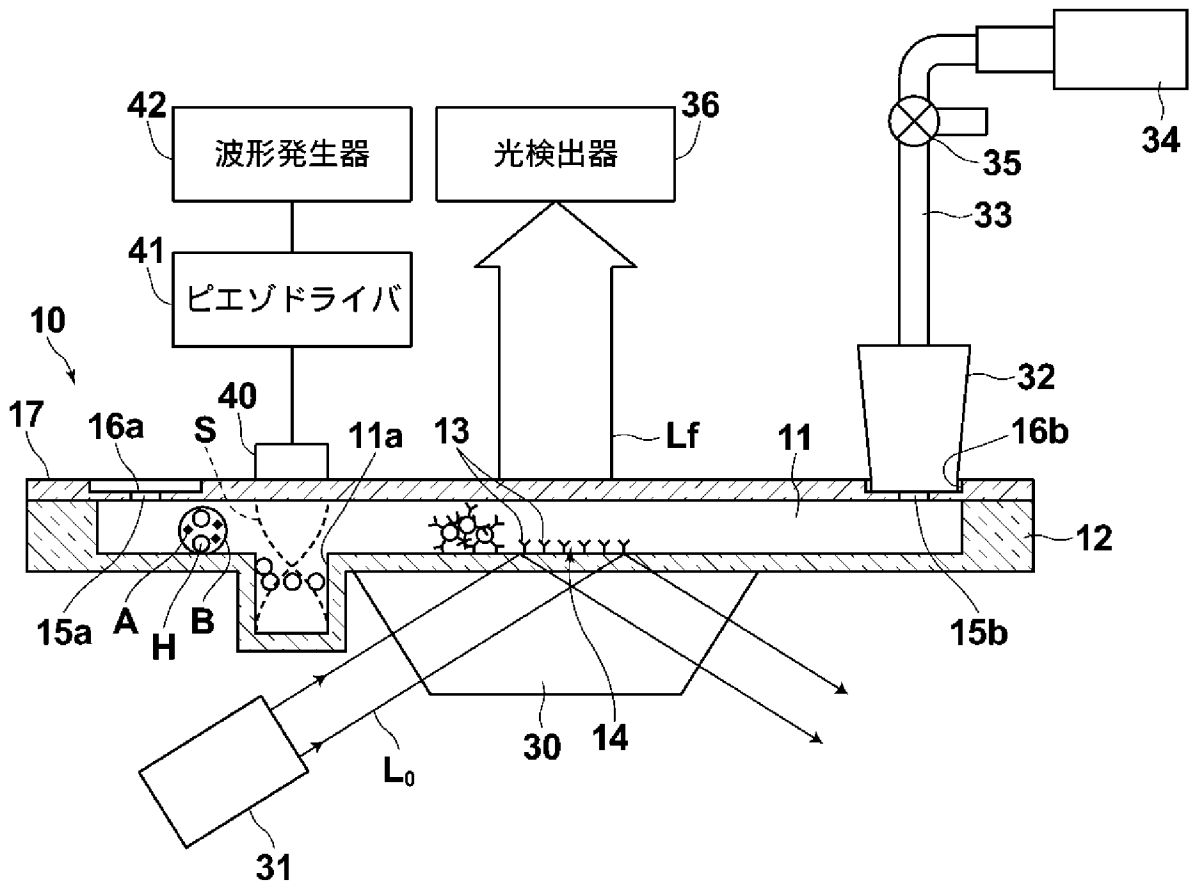
## 請求の範囲

- [請求項1] 流路部材内に試料液を流通させる微小流路が設けられ、該微小流路内の一部にセンサ部が配設されてなるセンサチップを用いて、試料液中に含まれ得る被検出物質に関する測定を行う測定装置において、  
前記流路部材のセンサ部よりも流路上流側において前記微小流路を横断する定在超音波を発生させる超音波照射手段と、  
前記定在超音波の節に集積された微小粒子を捕捉する粒子捕捉部とを備えていることを特徴とする測定装置。
- [請求項2] 前記粒子捕捉部が、前記流路部材の流路壁の超音波被照射部に形成された凹部であり、  
前記超音波照射手段が、前記定在超音波の節を前記凹部内に位置させるように超音波を照射するものであることを特徴とする請求項1記載の測定装置。
- [請求項3] 前記粒子捕捉部が、前記定在超音波の節の位置よりも流路下流側において前記微小粒子を捕捉する構造物であることを特徴とする請求項1記載の測定装置。
- [請求項4] 前記超音波照射手段が発生させる超音波の波長が、捕捉対象となる前記微小粒子の粒径の4倍以上であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項記載の測定装置。
- [請求項5] 前記微小流路の流路壁の超音波被照射部に、前記流路部材よりも超音波の反射率が高い超音波反射部材が設けられていることを特徴とする請求項1から4のいずれか1項記載の測定装置。
- [請求項6] 前記微小流路の流路壁の超音波被照射部から前記定在超音波の節までの領域に、試料液と前記流路部材との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層が設けられていることを特徴とする請求項1から5のいずれか1項記載の測定装置。
- [請求項7] 前記超音波照射手段が、前記微小流路の流路壁の一部を構成するように配置されていることを特徴とする請求項1から6のいずれか1項

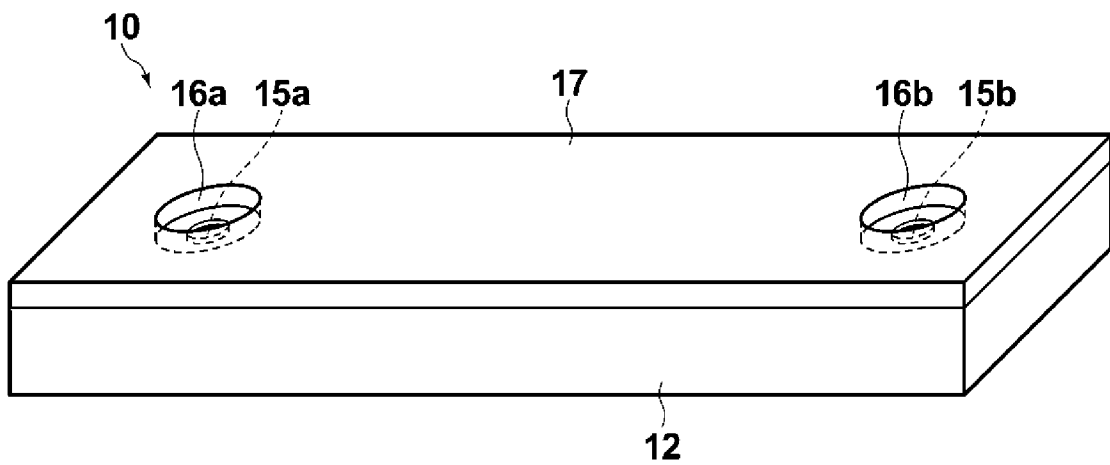
記載の測定装置。

- [請求項8] 前記超音波照射手段の表面に、該超音波照射手段と試料液との間で音響インピーダンス整合を図る音響整合層が設けられていることを特徴とする請求項7記載の測定装置。

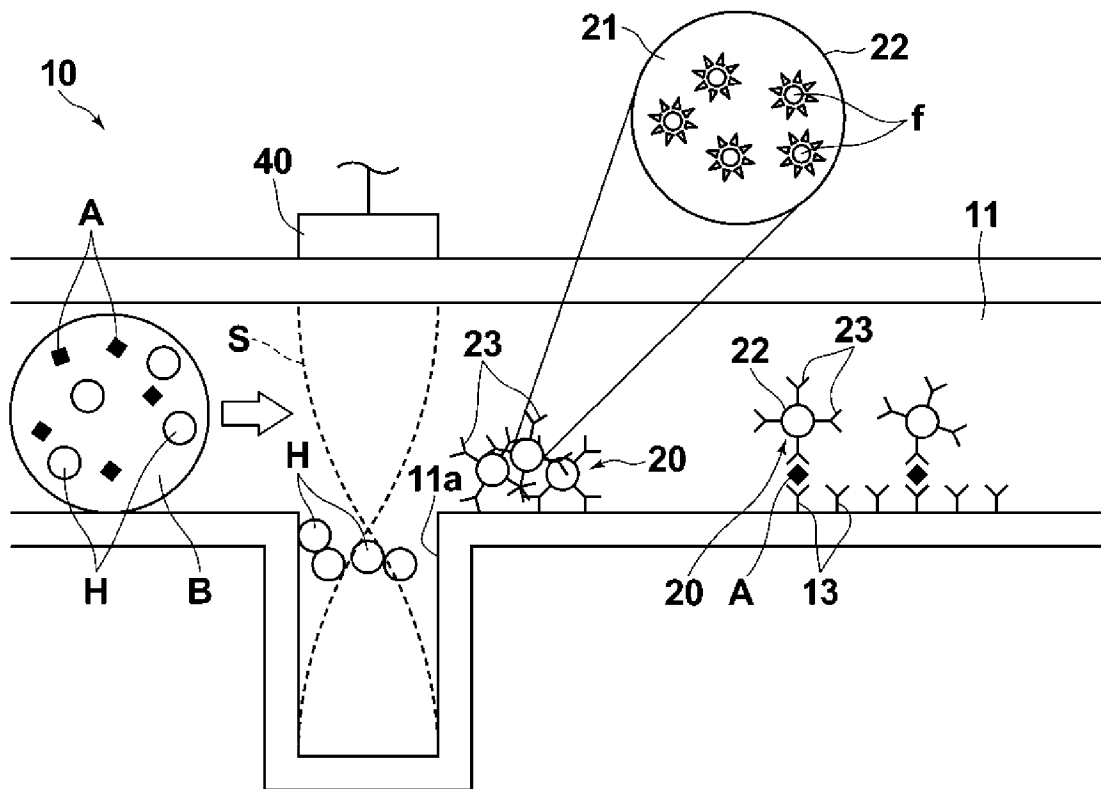
[図1]



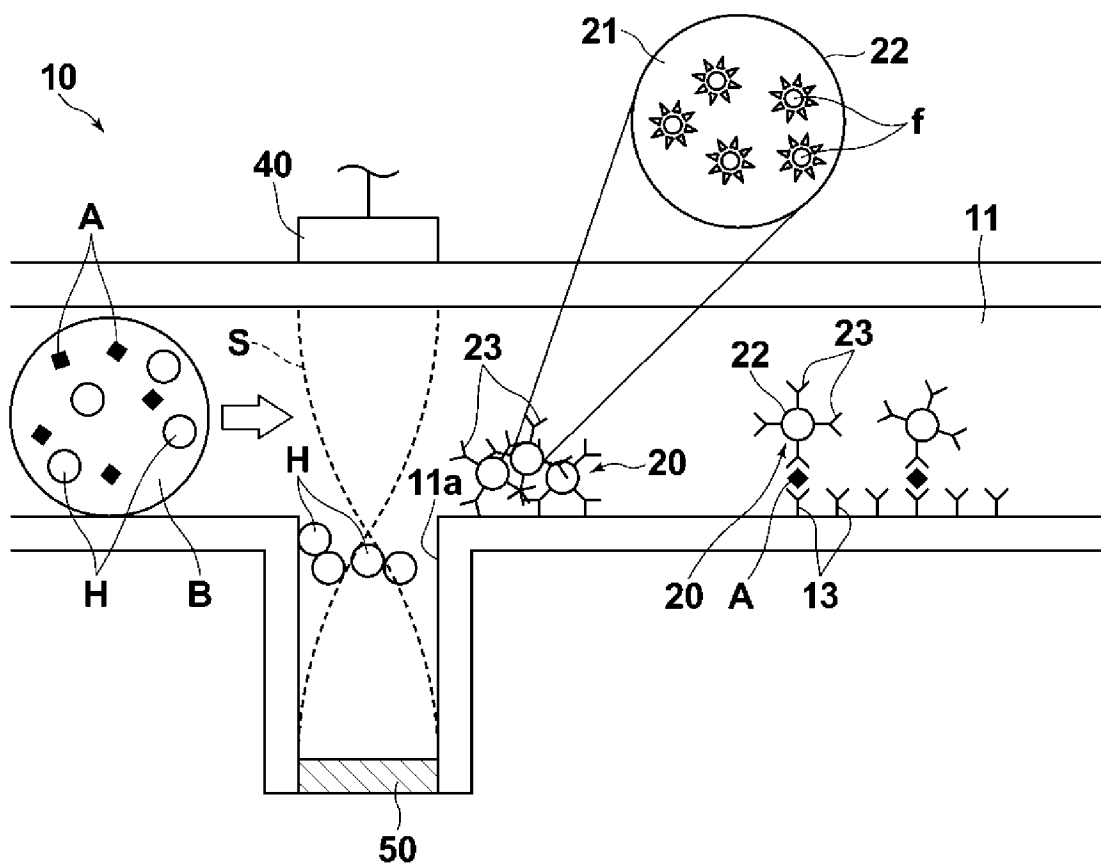
[図2]



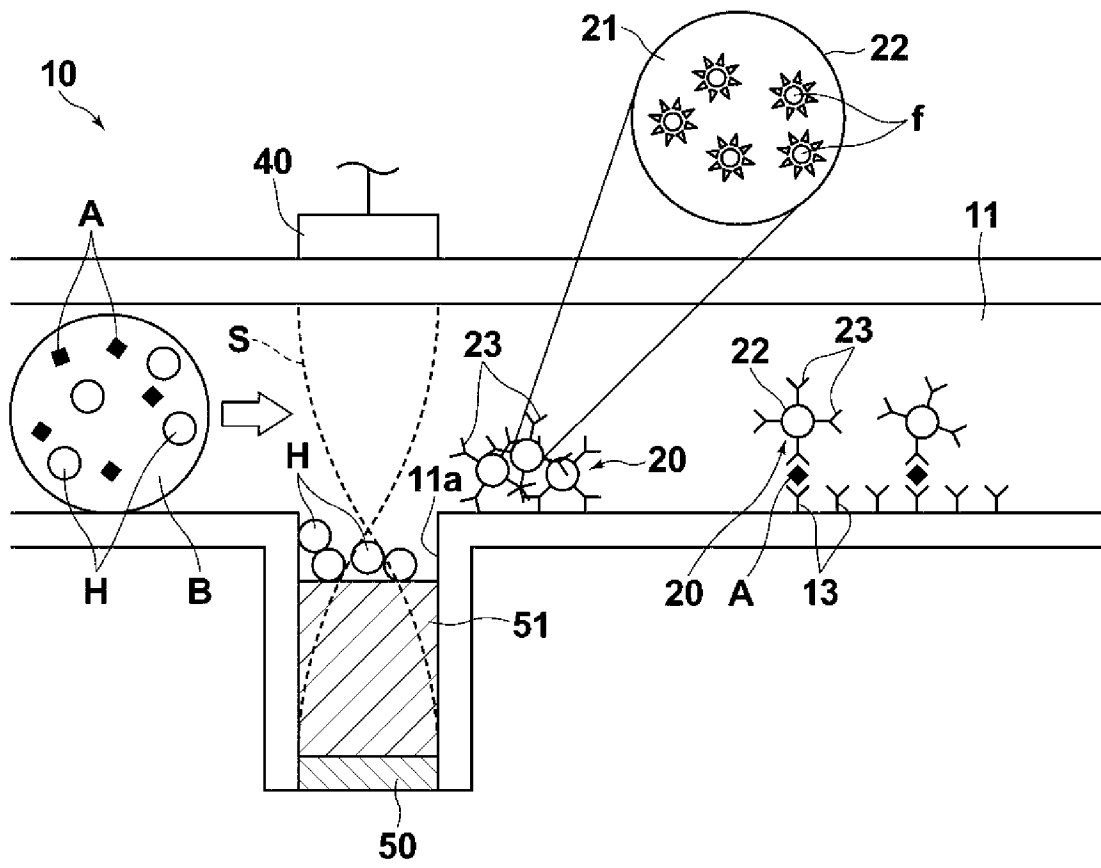
[図3]



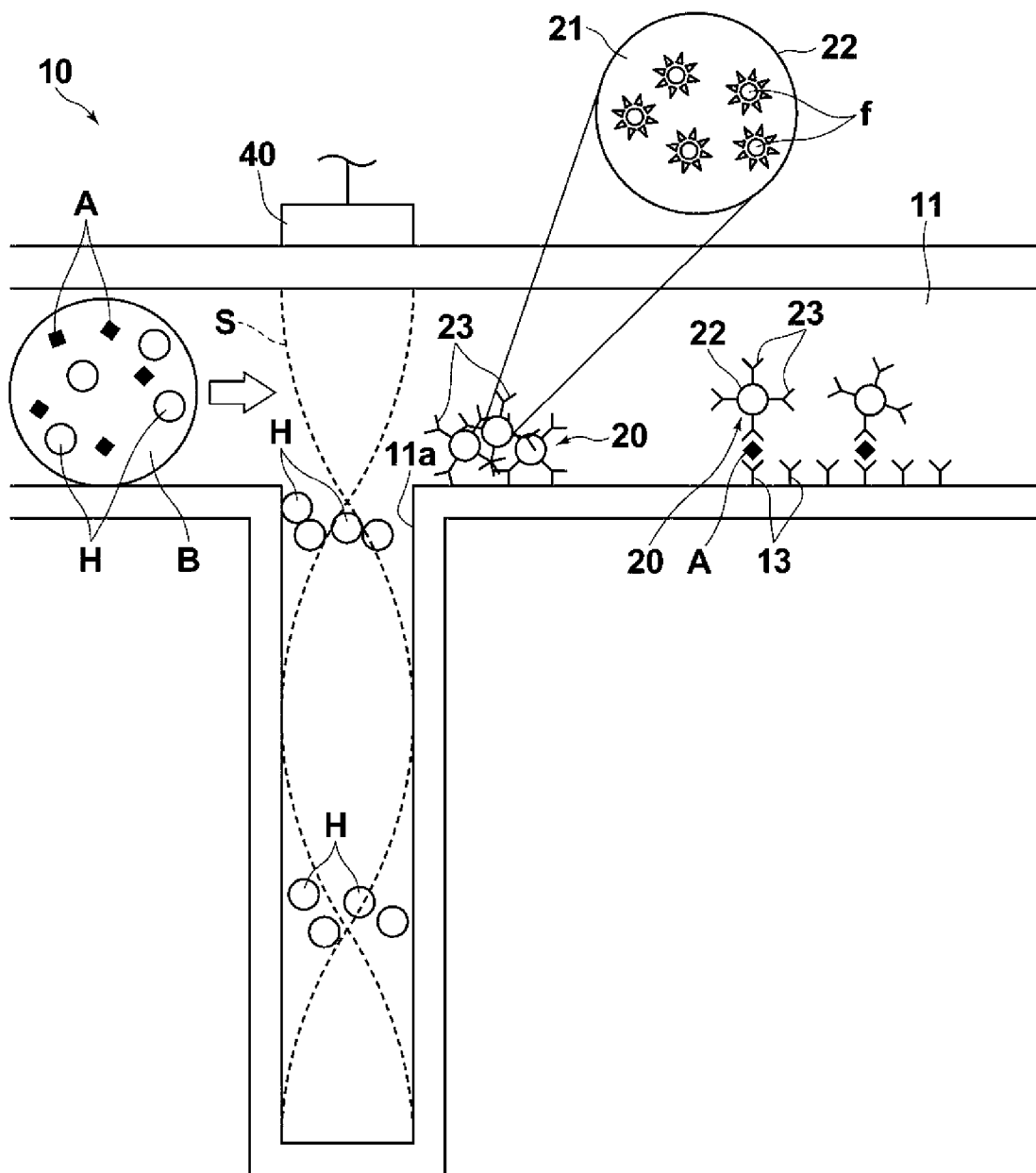
[図4]



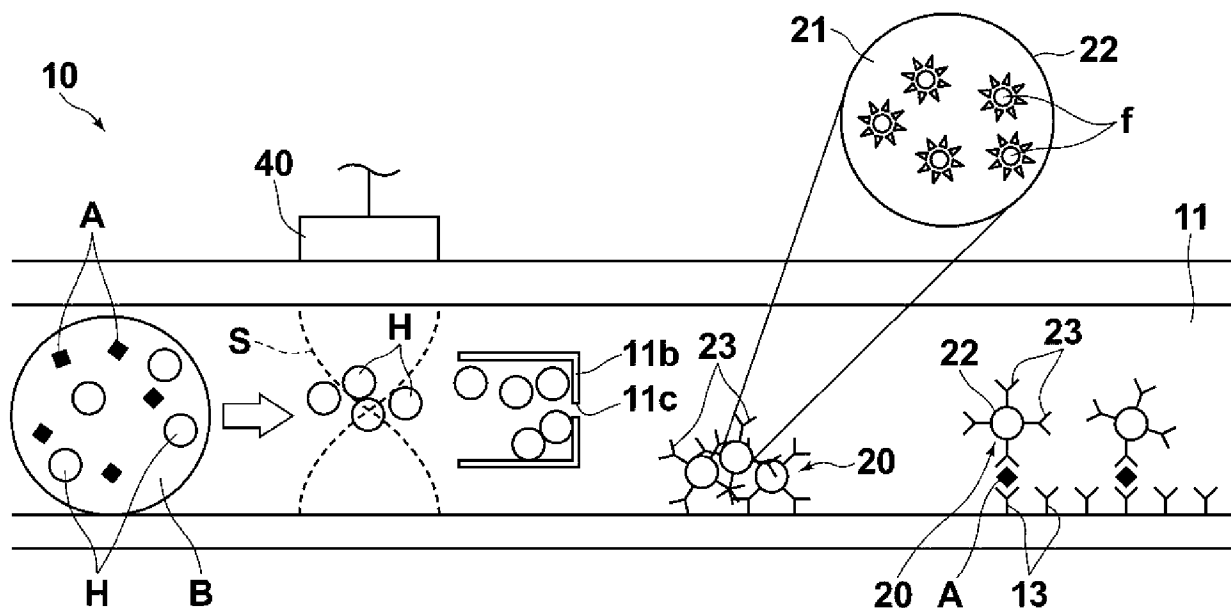
[図5]



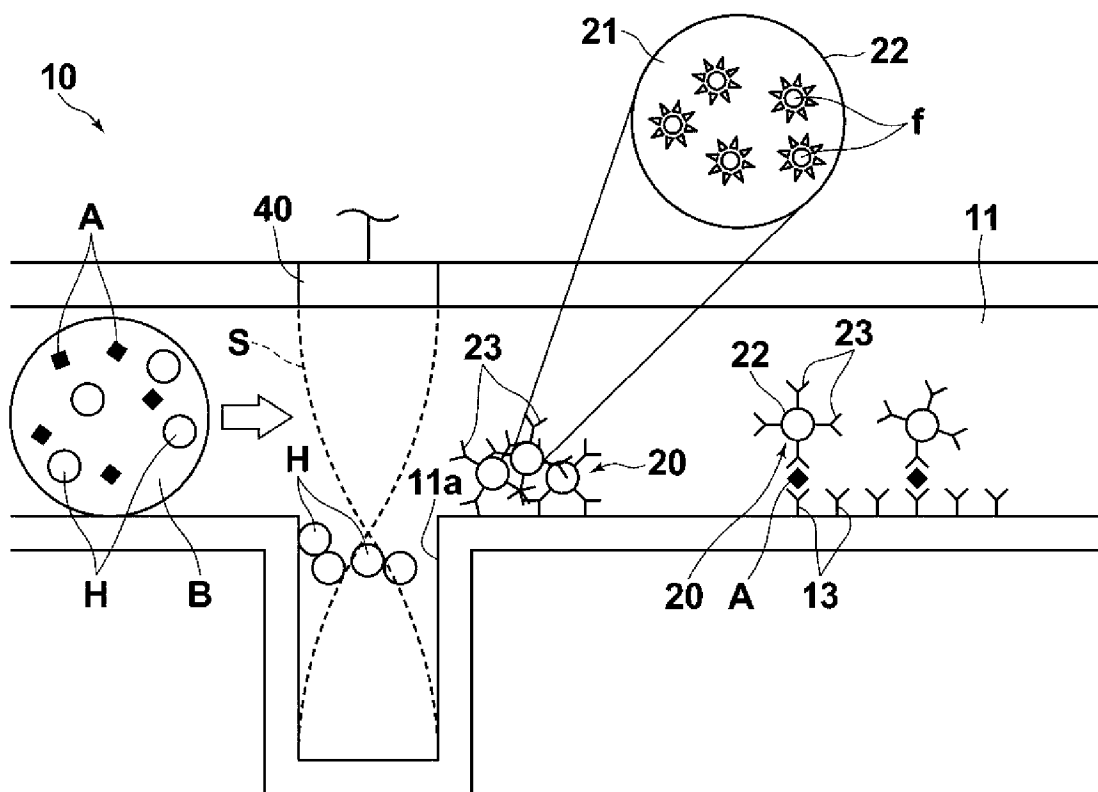
[図6]



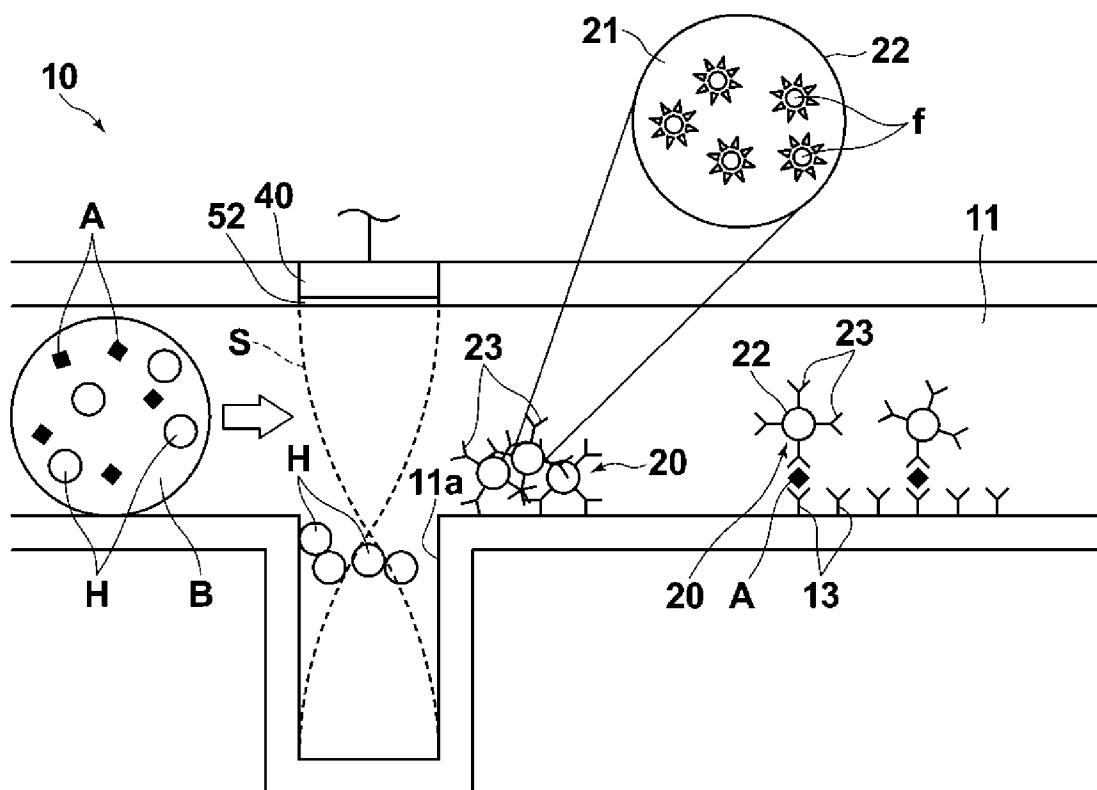
[図7]



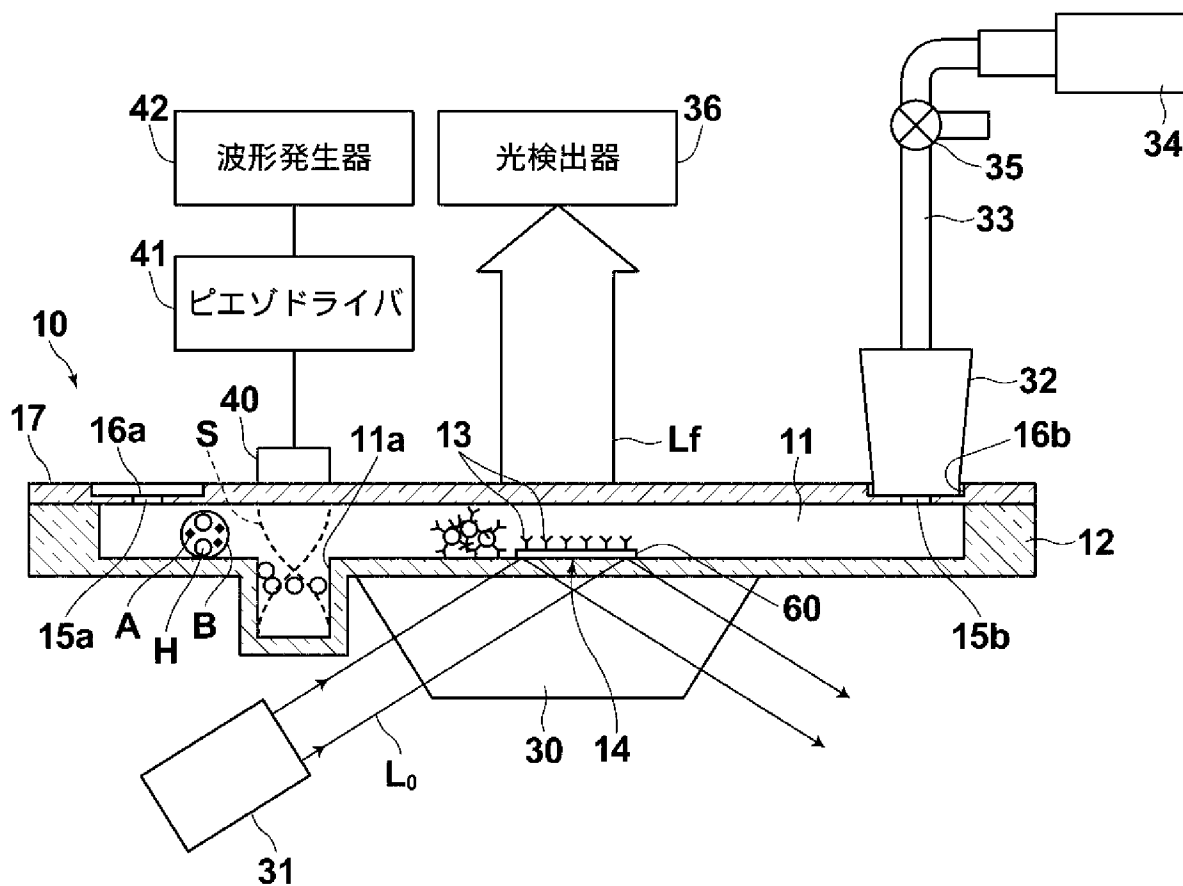
[図8]



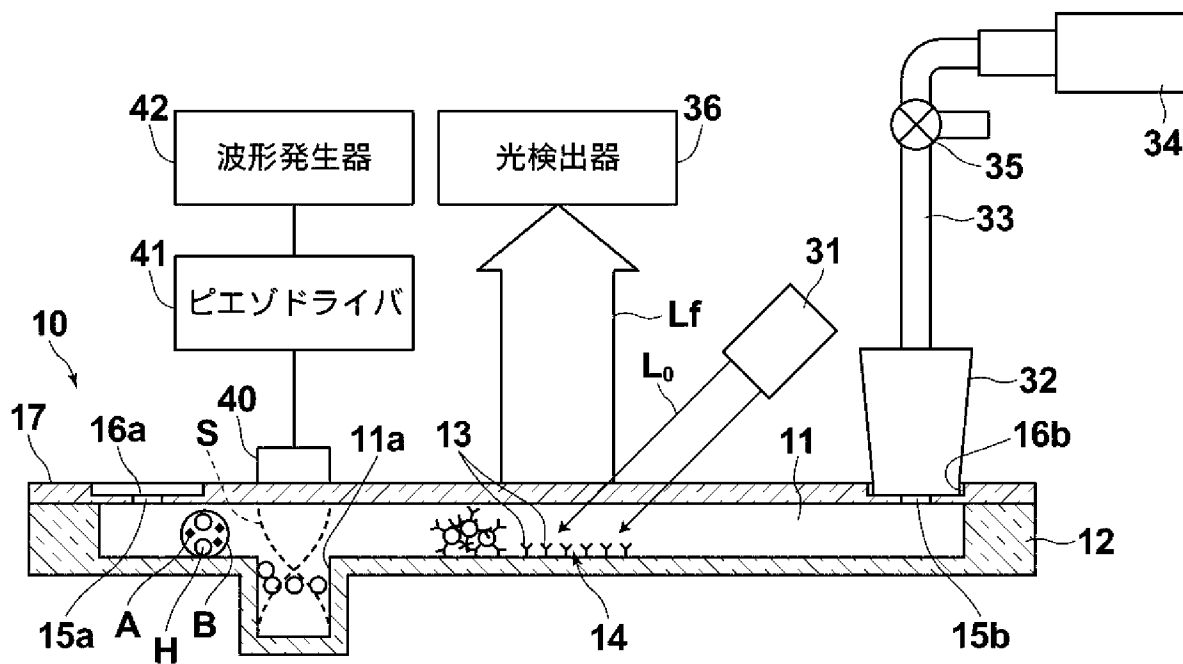
[図9]



[図10]



[図11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/001912

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N35/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(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)

G01N35/08, G01N33/53, G01N33/543, G01N37/00, G01N1/10

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.
Y	JP 2010-190880 A (Fujifilm Corp.), 02 September 2010 (02.09.2010), entire text; all drawings & US 2009/0261269 A1 & EP 2110658 A1	1, 3-8
Y	WO 2010/036667 A2 (ABBOTT LABORATORIES), 01 April 2010 (01.04.2010), page 20, lines 30 to 32; fig. 16 & US 2010/0078384 A1 & EP 2352570 A & CA 2737654 A & JP 2012-503776 A	1-8
Y	JP 2005-319407 A (Hitachi, Ltd.), 17 November 2005 (17.11.2005), paragraphs [0030] to [0033], [0052] to [0056]; fig. 3, 11 & WO 2005/107939 A1	1, 2, 4-8



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 June, 2012 (20.06.12)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/JP2012/001912

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0037915 A1 (David Strand et al.), 23 February 2006 (23.02.2006), paragraphs [0071] to [0073]; fig. 19 to 22 & WO 2003/102737 A2	5, 7
Y	JP 2010-88977 A (Olympus Corp.), 22 April 2010 (22.04.2010), paragraphs [0018], [0027], [0046], [0052], [0059] (Family: none)	6, 8
A	JP 2008-134063 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 12 June 2008 (12.06.2008), entire text; all drawings & US 2010/0078323 A1 & EP 2053411 A1 & WO 2008/065897 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. G01N35/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(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 (IPC))  
 Int.Cl. G01N35/08, G01N33/53, G01N33/543, G01N37/00, G01N1/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2012年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2012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	JP 2010-190880 A (富士フイルム株式会社) 2010.09.02, 全文全図 & US 2009/0261269 A1 & EP 2110658 A1	1, 3-8
Y	WO 2010/036667 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 2010.04.01, 第20頁第30-32行, 第16図等 & US 2010/0078384 A1 & EP 2352570 A & CA 2737654 A & JP 2012-503776 A	1-8
Y	JP 2005-319407 A (株式会社日立製作所) 2005.11.17, 段落【0030】-【0033】、【0052】 - 【0056】、第3, 11図 & WO 2005/107939 A1	1, 2, 4-8

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。

<p>* 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</p>	<p>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                  「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 20.06.2012	国際調査報告の発送日 03.07.2012
--------------------------	--------------------------

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100-8915 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) 谷垣 圭二	2 J	3 0 1 0
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

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	US 2006/0037915 A1 (David Strand et al.) 2006.02.23, 段落 [0071]-[0073], 第 19-22 図 & WO 2003/102737 A2	5, 7
Y	JP 2010-88977 A (オリンパス株式会社) 2010.04.22, 段落【0018】、【0027】、 【0046】、【0052】、【0059】 (ファミリーなし)	6, 8
A	JP 2008-134063 A (松下電器産業株式会社) 2008.06.12, 全文全図 & US 2010/0078323 A1 & EP 2053411 A1 & WO 2008/065897 A1	1-8