

(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10月24日(24.10.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/157667 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/062310
- (22) 国際出願日: 2013年4月19日(19.04.2013)
- (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 2012-096885 2012年4月20日(20.04.2012) JP
- (71) 出願人: パナソニック株式会社 (PANASONIC CORPORATION) [JP/JP]; 〒5718501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP). アイメック (IMEC) [BE/BE]; B-3001 ルーヴァン、カペルドリーフ75番 Leuven (BE).
- (72) 発明者: 田中 浩之(TANAKA, Hiroyuki). 平岡 牧 (HIRAOKA, Maki). ジョーンズ ベンジャミン (JONES, Benjamin). フィオリーニ パオロ (FIORINI, Paolo).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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,

[続葉有]

(54) Title: DNA ANALYSIS MICRO-CHANNEL CHIP

(54) 発明の名称: DNA解析マイクロ流路チップ

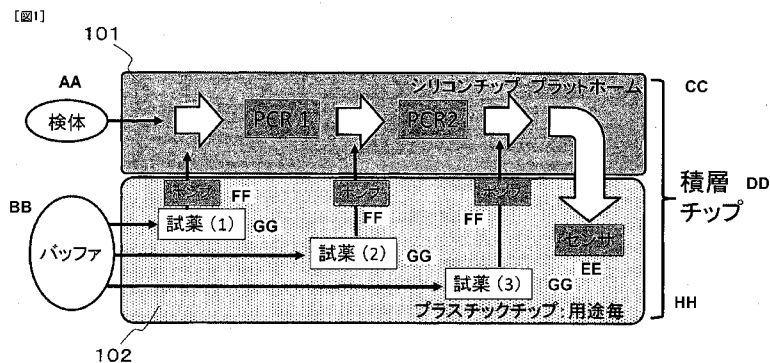


FIG. 1:

- AA Sample
- BB Buffer
- CC Silicon chip: platform
- DD Multilayer chip
- EE Sensor
- FF Pump
- GG Reagent
- HH Plastic chip: each application

(57) Abstract: A DNA analysis micro-channel chip having a structure in which a silicon layer (chip A) and a plastic layer (chip B) are layered. The DNA analysis micro-channel chip has a configuration characterized by: the micro-channel of chip A being provided with at least two serially connected PCR reactors, and filters between the PCR reactors; the micro-channel of chip B being provided with reagents, a fluid delivery mechanism, and a sensor; and the ability to change the reagents, the fluid delivery mechanism and the sensor according to the type of sample and the object to be detected.

(57) 要約: DNA解析マイクロ流路チップにおいて、シリコン層(チップA)とプラスチック層(チップB)が積層された構造であって、前記チップAは、マイクロ流路中に少なくとも2つ以上直列に接続されたPCRリアクタと、前記PCRリアクタ間にフィルタを具備し、前記チップBは、マイクロ流路中に試薬、送液機構およびセンサを具備し、かつ前記試薬、送液機構およびセンサは、検体の種類および検出対象によって可変できることを特徴とする構造を用いる。

WO 2013/157667 A1

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).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

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：DNA解析マイクロ流路チップ

技術分野

[0001] 本開示は、シリコンならびにプラスチックの積層基板上に形成されたマイクロ流路チップに関する。更に詳細には、本開示は、迅速・簡便に遺伝子を含む検体から所望のDNAを抽出、増幅、またはその配列を検出するための機能を集積したマイクロ流路チップに関する。

背景技術

[0002] 近年、DNA解析技術の向上により、遺伝子の多様性解析や発現解析の進展が目覚しい。特に医療分野では、遺伝子と疾患の関係が注目されている。例えば、疾患に関連した個々の遺伝子情報（特定のDNA配列）を解析することで、患者個人毎に適切な治療や投薬を行うこと（テーラーメイド医療）が可能になってきた。テーラーメイド医療では、その場診断が最も望ましく、POCT (Point of Care Testing) 性が高く、迅速、簡便な手法が求められる。そのため、血液など、採取した検体から解析対象の遺伝子のDNAを抽出、増幅し、その配列の検出を迅速・簡便に行えるデバイスの実現が強く求められている。

[0003] これらの要求に応える手段の一つとして、近年、マイクロ・トータル・アナリシス・システムズ (μ TAS) (またはラブ・オン・チップ (Lab-on-Chip) と呼ばれる) が注目されている。 μ TASやLab-on-chipは基板内にマイクロメートルオーダーの微細構造で構成されたマイクロ流路やポートを設け、その構造内で物質の混合、抽出、精製、化学反応及び/または分析など各種の操作を行うことができ、一部は実用化されている。各種の操作が微細構造内で行われるため、常用サイズの同種の装置に比べて、(1) サンプルおよび試薬の使用量が著しく少ない、(2) 分析時間が短い、(3) 感度が高い、(4) 現場に携帯し、その場で分析できる、及び(5) 使い捨てできるなどの特徴を有する。このような目的のために作

製された、基板内にマイクロ流路およびポート等の微細構造を有する構造物は総称してマイクロ流路チップ又はマイクロ流体デバイスと呼ばれる。

- [0004] マイクロ流路チップを用いて短時間で検体中の遺伝子内のDNAを解析するためには、チップ内に抽出・増幅の機能を組み込む必要があり、血球などの不純物を分離する微細なフィルタや高速で昇降温温度可能なPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）の実現が要求される。加えて、使用の簡便性が要求されるため、検体や試薬などをチップ内に安定して保持できることが望ましい。さらに、テーラーメイド医療用途では、血液から処理が可能である構成であることや、検出部でDNA中の一塩基多系（SNP）をセンシングできることが望ましい。すなわち、使用状況に柔軟に対応できる汎用性の高いチップの実現が求められている。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: BioMed Microdevice (2011) 13 : 19-27

非特許文献2: Proceeding of 43th International Symposium on Microelectronics (IMAPS2010) 000036

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] しかしながら、マイクロ流路チップを構成する基板材料の性質の制約から、前述した要求に全て答えられるマイクロ流路デバイスの実現が難しい。その理由を以下に説明する。

- [0007] マイクロ流路チップの基板材料は、プラスチックやシリコンが用いられる。プラスチック基板は、材料代が比較的安価、切削加工しやすい、生体・バイオ材料と比較的親和性が高く試薬の保持がしやすいなどの特徴を持つ反面、サブマイクロメートルオーダーの微細構造の加工が難しいことや材料の

熱伝導性が優れないため、血球などの不純物を分離するための微細なフィルタ構造や、PCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）のように高速の昇降温が要求されるサーマルリアクタの形成に向かないことが課題であった。また、シリコン基板は、半導体リソグラフィ技術により微細構造を容易に形成でき、熱伝導率はプラスチックの2～3桁高いことから、微細なフィルタ構造やPCRサーマルリアクタの形成に向く反面、材料単価がプラスチックと比較すると高価なことや、シリコンの表面と生体・バイオ材料との親和性が必ずしも高くないため、タンパク質やDNAの非特異吸着が起り、試薬の保存に向かないことが課題であった。このように、プラスチックとシリコンはそれぞれ相反する利点と欠点が存在し、各々の基板のみを用いた構成ではDNA解析用途のマイクロ流路チップに要求される条件を十分に満たすことができなかった。

[0008] 上記課題を解決する手段として、シリコン基板とプラスチック基板を積層したマイクロ流路チップが提案されている（例えば、非特許文献1、非特許文献2参照。）。

非特許文献1では、プラスチックとシリコンを積層し、マイクロ流路チップと送液部を分けて配置する構造が開示されている。しかしながら、この方法によると、サーマルリアクタがプラスチック材料で構成されている上、そのリアクタがガラス基板を挟んで加熱面であるシリコンから隔離されているため熱接触が非常に取りにくく、熱伝達が悪いため、高速な昇降温には対応できない。また、検体や試薬をチップ外部から供給する構造になっているため、簡便に使用できない。そのため、迅速・簡便な処理に向かないことが問題であった。

[0009] 非特許文献2では、サーマルリアクタをシリコンチップ内に形成し、チップ内部から検体や試薬を供給する構造が開示されている。それゆえ、高速な昇降温、簡便な処理に対応できる。しかしながら、この方法によると、センサはDNAマイクロアレイチップに限定されており、それがサーマルリアクタ（PCR）と同一のシリコン基板に形成されている。すなわち、サーマル

リアクタとセンサの製造工程は、続いて行われる必要があり、使用目的に応じた設計の変更が柔軟に行えない。さらに、搭載されているサーマルリアクタは1基のみであり、検体は精製されたゲノムしか使えず、血液からの処理ができない構成になっている。血液から解析対象となるゲノム抽出することを目的としたPCRと、その解析対象中のSNPの有無によって選択的にDNAを増幅することを目的したPCR等、PCRが2段階必要な用途には対応できない。さらに、その間に生じた血液由来の血球を分離・除去するためのフィルタが存在しない。すなわち、血液からの検出の用途には対応できず、汎用性に乏しいことが問題であった。

[0010] すなわち、開示されている方法においては、迅速・簡便にDNA解析を行うために必要な高機能なマイクロ流路チップ構成と、高い汎用性を有するマイクロ流路チップ構成の両立ができないことが非常に大きな課題であった。

[0011] 本開示は、上記課題を解決するためになされたものであり、DNA解析マイクロ流路チップにおいて、DNAの抽出、増幅、またはその配列の検出を迅速・簡便に行うことを実現すると同時に、チップの高い汎用性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

[0012] 上記目的を達成する本開示に係るDNA解析マイクロ流路チップは、検体に含有されるDNAをPCR法により解析するために用いられるDNA解析マイクロ流路チップであって、

シリコンからなる第1層(101)および

プラスチックからなる第2層(102)

を具備し、ここで、

前記第2層(102)が前記検体の種類および解析される対象物に応じて可変的に選択されるように、前記第2層(102)は前記第1層(101)上に積層され、

前記第1層(101)は、

少なくとも4個の開口部(291、292、293、294)

2以上のPCRリアクタ（203、204、403、404）、および前記開口部および各PCRリアクタの間と連通するマイクロ流路を具備し、

前記第2層（102）は、

前記PCR法のために用いられる試薬（1、2）、

ポンプ（312）、

センサ（315）

を具備し、

第1層（101）の法線方向から見たときに、前記試薬（1、2）は、前記複数の開口部の少なくとも1つの開口部に重なり合い、

第1層（101）の法線方向から見たときに、前記ポンプ（312）は、前記複数の開口部の少なくとも2つの開口部に重なり合い、

前記ポンプにより、前記試薬は、前記マイクロ流路を介して前記PCRリアクタに供給され、

前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が供給され、

前記混合物は、前記PCRリアクタから前記センサに送られ、前記センサを用いて前記検体に含有されるDNAをPCR法により解析する。

[0013] 上記構造にすることによって、高速な昇降温が可能なPCRが組み込める、および検体・試薬をチップ内部で操作および保存できるようになるため、迅速・簡便にDNA解析を行える。それと同時に、この構造にすることによって、ゲノムのみならず血液を対象としたPCR増幅およびフィルタリングが可能になる。それゆえ、チップAの構成を変えずに、チップBの試薬、送液機構およびセンサの構成を変えるだけで、（1）ゲノムからのDNAの抽出・増幅、（2）血液からのDNA抽出・増幅、（3）ゲノムまたは血液からのアレルト異DNAの抽出増幅、（4）ゲノムまたは血液からのSNP検出など複数用途（少なくとも4種類）への対応が可能になる。すなわち、チップに高い汎用性を付加できるようになる。

発明の効果

[0014] 本開示によれば、DNA解析マイクロ流路チップにおいて、DNAの抽出、増幅、またはその配列の検出を迅速・簡便に行えると同時に、チップを多様な用途に用いることが可能になり、汎用性が高まる。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]本開示のDNA解析マイクロ流路チップの全般的概念図
[図2]本開示のDNA解析マイクロ流路チップの構成要素を示す模式図
[図3(a)]本開示のDNA解析マイクロ流路チップの構成要素を示す断面模式図であって、試薬、ポンプ、バルブを含む断面図
[図3(b)]本開示のDNA解析マイクロ流路チップの構成要素を示す断面模式図であって、センサを含む断面図
[図4]本開示のシリコンチップ内に含まれる構成要素のレイアウト図
[図5]本開示のプラスチックチップ内に含まれる構成要素のレイアウト図
[図6] (a) 本開示の方法を用いて得られたシリコンチップ、(b) 本開示の方法を用いて得られたフィルタのSEM写真
[図7]本開示の方法を用いて得られたプラスチックチップとそれに接合されたシリコンチップ
[図8]本開示の汎用性を示す実施例の表
[図9]本開示の実施例1で得られた遺伝子型解析の結果を示す。
[図10]本開示の実施例2で得られた遺伝子型解析の結果を示す。
[図11]本開示の実施例3で得られた遺伝子型解析の結果を示す。
[図12]本開示の実施例4で得られた遺伝子型解析の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本開示の第1態様に係るDNA解析マイクロ流路チップは、検体に含有されるDNAをPCR法により解析するために用いられるDNA解析マイクロ流路チップであって、

シリコンからなる第1層(101)および

プラスチックからなる第2層(102)

を具備し、ここで、

前記第2層(102)が前記検体の種類および解析される対象物に応じて可変的に選択されるように、前記第2層(102)は前記第1層(101)上に積層され、

前記第1層(101)は、

少なくとも4個の開口部(291、292、293、294)、

2以上のPCRリアクタ(203、204、403、404)、

前記PCRリアクタの間に設けられた少なくとも1つのフィルタ(206)、および

前記開口部、各PCRリアクタおよび前記少なくとも1つのフィルタの間と連通するマイクロ流路

を具備し、

前記第2層(102)は、

前記PCR法のために用いられる試薬(1、2)、

ポンプ(312)、および

センサ(315)

を具備し、

第1層(101)の法線方向から見たときに、前記試薬(1、2)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部(291)に重なり合い、

第1層(101)の法線方向から見たときに、前記ポンプ(312)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも2つの開口部(292、293)に重なり合い、

前記ポンプにより、前記試薬は、前記マイクロ流路を介して前記PCRリアクタに供給され、

前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が供給され、

前記混合物は、前記PCRリアクタから前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部(294)を介して前記センサに送られ、前記センサを用いて前記検体に含有されるDNAを解析する。

[0017] 第2態様に係るDNA解析マイクロ流路チップは、上記第1態様において、前記PCRリアクタの周辺部のうち、マイクロ流路と接続されている付近以外のシリコン領域が掘り抜かれていてもよい。

上記のように、PCRリアクタの外周部を概ね掘り抜いて、周辺部と熱的に分離された構造とすることによって、リアクタ外周部への放熱、外周部からの吸熱を抑制できるため、より高速な昇降温が可能なPCRができるようになり、より迅速なDNA解析が行える。

[0018] 第3態様に係るDNA解析マイクロ流路チップは、上記第1態様において、前記フィルタは、シリコンのエッチングで形成された円柱形状のピラーにより構成され、前記ピラー間の間隔が $10\mu\text{m}$ 以下、 $1\mu\text{m}$ 以上であってもよい。

上記のように、ピラー間の間隔を $10\mu\text{m}$ 以下、 $1\mu\text{m}$ 以上とすることによって、検体に血液を用いたとき、PCRリアクタで破碎された不要な血球成分を、フィルタを目詰まりさせることなく、フィルタで効率的に取り除くことができる。

[0019] 第4態様に係るDNA解析マイクロ流路チップは、上記第1態様において、前記送液機構にポリマーアクチュエータを用いてもよい。

上記のように送液機構（例えば、ポンプ）にポリマーアクチュエータを用いることによって、送液を行うことに対して高い発生力が得られるため、フィルタでの検体由来物質の目詰まりを起こしにくい。さらに、送液機構（例えば、バルブ）にポリマーアクチュエータを用いることによって、送液を止めることに対して、高い耐圧性が得られるため、流路へのリークを抑制することができる。これらより、安定したチップ動作が行える。

[0020] 本開示の第5態様に係る検体に含有されるDNAをPCR法により解析する方法は、検体に含有されるDNAをPCR法により解析する方法であって

第1層(101)および複数の第2層(102)を用意する工程(a)、
ここで、

前記第1層(101)は、シリコンからなり、

前記第1層(101)は、

少なくとも4個の開口部(291、292、293、294)、

2以上のPCRリアクタ(203、204、403、404)、

前記PCRリアクタの間に設けられた少なくとも1つのフィルタ(206)、および

前記開口部、各PCRリアクタおよび前記少なくとも1つのフィルタの間と連通するマイクロ流路を具備し、

各第2層(102)は、プラスチックからなり、

各第2層(102)は、

前記PCR法のために用いられる試薬(1、2)、

ポンプ(312)、および

センサ(315)

を具備し、

前記複数の第2層(102)の中から、前記検体の種類および解析される対象物に応じて1つの第2層(102)を選択する工程(b)、

工程(b)において選択された第2層を前記第1層(101)上に積層し、DNA解析マイクロ流路チップを得る工程(c)、ここで、

第1層(101)の法線方向から見たときに、前記試薬(1、2)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部(291)に重なり合い、かつ

第1層(101)の法線方向から見たときに、前記ポンプ(312)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも2つの開口部(292、293)に重なり合い、

前記DNA解析マイクロ流路チップの内部に、前記検体を供給する工程(d)、

前記ポンプにより、前記試薬を、前記マイクロ流路を介して前記PCRリ

アクタに供給する工程 (e)、

ここで、前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が供給され、

前記PCRリアクタにおいて、前記PCR法を実施し、PCR生成物を得る工程 (f)、

前記工程 (f) において得られたPCR生成物を、前記PCRリアクタから前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部 (294) を介して前記センサに送る工程 (g)、および

前記センサを用いて前記PCR生成物を感知して、前記検体に含有されるDNAを解析する工程 (h)

を含む。

[0021] 本開示の第6態様に係る検体に含有されるDNAをPCR法によりDNA解析マイクロ流路チップを用いて解析する方法は、検体に含有されるDNAをPCR法によりDNA解析マイクロ流路チップを用いて解析する方法であって、

以下を具備するDNA解析マイクロ流路チップを用意する工程 (a')

シリコンからなる第1層 (101) および

プラスチックからなる第2層 (102)、ここで、

前記第2層 (102) は前記第1層 (101) 上に積層され、

前記第1層 (101) は、

少なくとも4個の開口部 (291、292、293、294)、

2以上のPCRリアクタ (203、204、403、404)、

前記PCRリアクタの間に設けられた少なくとも1つのフィルタ (2

06)、および

前記開口部、各PCRリアクタおよび前記少なくとも1つのフィルタの間と連通するマイクロ流路

を具備し、

前記第2層 (102) は、

前記PCR法のために用いられる試薬（1、2）、
ポンプ（312）、および
センサ（315）

を具備し、

第1層（101）の法線方向から見たときに、前記試薬（1、2）は、
前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部（291）
に重なり合い、かつ

第1層（101）の法線方向から見たときに、前記ポンプ（312）は
、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部（292
、293）に重なり合い、

前記DNA解析マイクロ流路チップの内部に、前記検体を供給する工程（
d）、

前記ポンプにより、前記試薬を、前記マイクロ流路を介して前記PCRリ
アクタに供給する工程（e）、

ここで、前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が
供給され、

前記PCRリアクタにおいて、前記PCR法を実施し、PCR生成物を得
る工程（f）、

前記工程（f）において得られたPCR生成物を、前記PCRリアクタか
ら前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部（294
）を介して前記センサに送る工程（g）、および

前記センサを用いて前記PCR生成物を感知して、前記検体に含有される
DNAを解析する工程（h）、
を含む。

[0022] 以下、本開示の実施の形態について、図面を参照しながら説明する。

[0023] （実施の形態1）

図1は、本開示のマイクロ流路チップの全般的概念図である。本開示にお
けるDNA解析マイクロ流路チップは、シリコン層101（チップA）とプ

ラスチック層102（チップB）が積層された構造を有する。前記チップAは、マイクロ流路中に少なくとも2つ以上直列に接続されたPCRリアクタと、前記PCRリアクタ間に複数本のシリコンピラーで構成される少なくとも1つのフィルタを具備し、前記チップBは、マイクロ流路中に試薬、送液機構およびセンサを具備し、かつ前記試薬、送液機構およびセンサは、検体の種類および検出対象によって可変できることを特徴とする。検体や試薬の投入や各処理は図1の矢印の順番に進む。

[0024] 図2は、本開示のDNA解析マイクロ流路チップの構成要素を示す模式図である。チップAの材質は、シリコンであり、シリコン基板上にフォトリソグラフィとRIE（リアクティブイオンガスエッチング）により流路および構造体を掘りこみ、PCR1：203とPCR2：204の他にミキサー205およびフィルタ206を形成し、図のように接続する。

[0025] チップBの材質は、プラスチックであり、PMMA（ポリメタクリル酸メチル樹脂）やPDMS（ポリジメチルシロキ酸）を用いることが好ましい。また、シリコン層との接続部は、接着層やエラストマーを用いるのが好ましい。試薬は、それぞれのPCRリアクタでの反応に用いるプライマーやポリメラーゼなどの試薬（1）、（2）の他に、センサに用いる試薬（3）がこのチップ内に配置される。検体は、孔207、試薬（1）、試薬（2）はそれぞれ孔208、孔209から注入する。試薬は、フリーズドライ化させておき、使用するときにはバッファ液を注ぎ込んで溶かして使ってもよい。また、チップBには送液機構を有し、ポンプ210およびバルブ211を配置し、試薬をチップA内へ注ぐ機能を備える、その投入量、タイミングを制御する。

[0026] 図3（a）及び図3（b）は、本開示のDNA解析マイクロ流路チップの構成要素を示す断面模式図である。

図3（a）は、試薬、ポンプ、バルブを含む断面図である。ポンプ310は、バルブ311は、プラスチック部に埋め込まれ、脱着が容易にできるようになっている。ポンプの駆動部のアクチュエータ312は、ピエゾ素子や

ポリマーアクチュエータを用いるとよく、メンブレン313を上下できるように配置される。チップが使い捨てで使われることを想定すると、ポリマーアクチュエータを用いることが特に好ましい。図に示す通り、これらは下面のシリコンで形成されたポートと流路に接続され、シリコン層内での送液が行うことができる。シリコン層のマイクロ流路は、下面から、フォトリソグラフィとRIEによってパターニングされる。また、パターニングされた流路を密閉させるために、パイレックスガラス314を蓋として用いる。パイレックスガラス314は、陽極酸化法でシリコン面に対して接合されている。また、プラスチックとシリコンのマイクロ流路を接続するために、プラスチック層を接合する前に上面から貫通穴を形成している。

[0027] 図3(b)は、センサを含む箇所の断面図である。センサチップ315は検出面316が下面を向くように配置される。またセンサチップ317は脱着可能な状態にしておくことが好ましい。さらに検出面に試薬(3)をドライケム化してキャビティ318に保持しておいてもよい。またセンサチップとシリコンチップとの距離が遠い場合はスペーサ319を設けてもよい。センサのキャビティに送液するとき、脱気が必要になるため、空気穴320を上面に設けるとよい。

[0028] 図4は、本開示の実施の形態に用いたシリコンチップ内に含まれる構成要素のレイアウト図を示す。

シリコン基板の厚さは500~800 μ m程度が好ましい。2枚のマスクを用いて上面および下面からそれぞれのパーツがエッチングされる。PCR1の403、PCR2の404の周りは概ねRIEにより上面および下面の両面からエッチングされ、完全に掘り抜かれ、熱的に孤立している。一方で、流路およびミキサー405、マイクロシープ406は、RIEによって下面より約300 μ mの深さをエッチングして形成され、パイレックスガラスを陽極酸化接合し、表面がふさがれている。孔407、408、409とプラスチック部との接続部の貫通穴は、RIEによって上面より約300 μ mの深さをエッチングして形成されている。

[0029] また、図5は、本開示のプラスチックチップ内に含まれる構成要素のレイアウト図を示す。符号510の箇所にポリマーアクチュエータのポンプ、符号511の箇所にはポリマーアクチュエータのバルブが取り付けられる。また、符号515にはセンサが接続される。

[0030] 図6(a)は、本実施の形態によって実際に作製されたDNA解析マイクロ流路チップのシリコンチップ部の写真である。また加工の一例として、図6(b)は、本実施の形態の方法によって実際に作製されたフィルタ部の写真である。

[0031] 図7は、実施の形態によって実際に作製されたDNA解析マイクロ流路チップのプラスチックチップとそれに接合されたシリコンチップの写真である。

[0032] (実施例)

図8は、実施の形態で説明した本開示のDNA解析マイクロチップを4種類の目的に対して使用した実施例を表にまとめたものである。以下に、試薬の構成を記載する。

(A) タカラバイオ製のTaq-ポリメラーゼ: 0.2・L、PCR mix: 3・L、水: 2 μ L、2mMdNTP: 1・L、10・M Primer 1: 1・L、10・M Primer 2: 1・L (それぞれのPrimer配列は※に記載)

(B) 東洋紡製KOD-FXポリメラーゼ: 0.2・L、2 \times KOD-Buffer: 5・L、2mMdNTP: 1・L、10・M Primer 3: 1・L、10・M Primer 4: 1・L (それぞれのPrimer配列は※に記載)

(C) タカラバイオ製のTaq-ポリメラーゼ: 0.2・L、PCR mix: 3・L、Primer 3': 2・L、Primer 4: 2・L、蒸留水10.8・L (それぞれのPrimer配列は※に記載)

(D) トリシン緩衝液 (pH 8.8)	1.8 μ L	45mM
酸化型ニコチンアミドジヌクレオチド	0.2 μ L	1mM

塩化マグネシウム	0.4 μ L	1.7 mM
フェリシアン化カリウム	2 μ L	10 mM
グリセルアルデヒド-3-リン酸	0.66 μ L	10 mM
ジアホラーゼ	1 μ L	10 U/mL

L

グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1 μ L 3
2 U/mL

ピロホスファターゼ 0.5 μ L 5 U/mL

※ Primer 1 (5' -ACGGGCTGCAGGCATACACT-3' : 配列番号1)、Primer 2 (5' -GGC AGG TCC TGA ACC TC -3' : 配列番号2)、Primer 3 (5' -TAGGAAGGATGTCCTCG-3' : 配列番号3)、Primer 3' (5' -TAGGAAGGATGTCCTCGTGA CG-3' : 配列番号4)、および Primer 4 (5' -TTCTTG ATGGCAAACACAGTTAAC-3' : 配列番号5)

[0033] 以下、本開示のDNA解析マイクロ流路チップの汎用性を示す例を具体的に説明する。なお、本開示は以下の実施例によって限定されるものではない。

[0034] (例1)

本開示の一実施の形態に係るDNA解析マイクロ流路チップを用いて、ヒトゲノム検体からアセトアルデヒド脱水素酵素2 (ALDH2) 遺伝子の第12エクソンの114番目の塩基を含む所望のDNA断片の抽出・増幅を行った。プライマーは、前述したPrimer 1およびPrimer 2を用い、断片長141bpのDNA断片の抽出・増幅を試みた。

[0035] 試薬1には、(A)を用い、ミキサーで検体と攪拌した後に、PCR1リアクタでの反応を98°C30秒、60°C30秒、68°C30秒の条件で30サイクルPCRを行った。その後、フィルタおよびPCR2をそのまま通過させ、この3 μ Lを採取した。その後、アガロースゲルの電気泳動法により、DNA増幅の有無を確かめた。図9の第2レーンがサンプルから採取した

DNAフラグメントの増幅有無の結果である。図9の第2レーン(L2)に示すように、所望のDNA断片(141bp)が増幅されたことが確認された。

[0036] (例2)

本開示の一実施の形態に係るDNA解析マイクロ流路チップを用いて、血液検体からDNA増幅を行った。DNA増幅のモデルとして、テンプレートとしてAB型とO型それぞれの血液を用いた。ヒト血液のゲノム中の第6エクソンの261番目の塩基を含む、DNA断片の抽出・増幅を行った。プライマーとして、プライマーは前述したPrimer3およびPrimer4を用い、断片長134又は135bpのDNA断片の抽出・増幅を試みた。

[0037] 試薬1には、(B)を用い、ミキサーで検体と攪拌した後に、PCRリアクタでの反応を98℃30秒、60℃30秒、68℃30秒の条件で35サイクルPCRを行った。その後、フィルタを通過させ、PCRリアクタで破碎された不要な血球成分を除去した。そのままPCR2リアクタを通過させ、この試料液のうち3μL採取し、電気泳動により、DNA増幅の有無を確認した。図10の第2レーンがAB型、第3レーンがO型のサンプルから採取したDNAフラグメントの増幅有無の結果である。図10に示すように、AB(135bp)およびO(134bp)ともにDNA増幅したことが確認された。

[0038] (例3)

本開示の一実施の形態に係るDNA解析マイクロ流路チップを用いて、血液検体からアレル特異DNA増幅を行った。アレル特異DNA増幅のモデルとして、テンプレートとしてAB型とO型それぞれの血液を用いた。ヒトゲノムの第六エクソンの261番目の塩基(SNP部位)を含むDNA断片を増幅するプライマーとして、前述したPrimer3およびPrimer4を用いた。第六エクソンの261番目の塩基(SNP部位)の違いを見分けるアレル特異性プライマーとして、Primer3'、Primer4を用いて測定を行った。このアレル特異性プライマーはAB型の血液に対しての

み特異的に伸長反応を起こす。

[0039] 試薬1には、(B)を用い、ミキサーで検体と攪拌した後に、PCR1リアクタでの反応を98℃30秒、60℃30秒、68℃30秒の条件で35サイクルPCRを行った。その後、マイクロシープで不純物を除去した後、試薬2には(C)を用い、PCR2リアクタを95℃30秒、60℃30秒、72℃30秒の条件で30サイクルPCRを行った。この試料液のうち3μL採取し、電気泳動により、アレル特異DNA増幅の有無を確かめた。図11の第2レーンがAB型、第3レーンがO型のサンプルから採取したDNAフラグメントの増幅有無の結果である。図11に示すように、ABのみが特異的にDNA増幅したことが確認された。

[0040] (例4)

本開示の一実施の形態に係るDNA解析マイクロ流路チップを用いて、血液検体からSNP検出を行った実施例について説明する。

例3と同様、SNP検出のモデルとして、テンプレートとしてAB型とO型それぞれの血液を用いた。用いたプライマーの種類は例3と同様である。

[0041] 試薬1には、(B)を用い、ミキサーで検体と攪拌した後に、PCR1リアクタでの反応を98℃30秒、60℃30秒、68℃30秒の条件で35サイクルPCRを行った。その後、フィルタを通過させ、PCRリアクタで破碎された不要な血球成分を除去した後、ミキサー2で試薬2と混合し、PCR2リアクタに導入、試薬2には(C)を用い、PCR2リアクタを95℃30秒、60℃30秒、72℃30秒の条件で30サイクルPCRを行った。この試料液のうち1μLだけをピロリン酸センサに送液し、乾燥させた試薬(D)と混合し、作用極に600mVの電圧を印可して、電流値の測定を行った。図12に示すように、アレル特異DNA増幅が起こった場合のみピロリン酸が副生成物として発生したことによりAB型とO型でそれぞれ顕著な電流の差が確認し、SNPの検出ができたことを確認した。

産業上の利用可能性

[0042] 本開示によれば、DNA解析マイクロ流路チップにおいて、DNAの抽出

、増幅、またはその配列の検出を迅速・簡便に行えると同時に、チップを多様な用途に用いることが可能になり、汎用性が高まる。テーラーメイド医療への貢献が期待される。

符号の説明

- [0043] 101 シリコン基板
102 プラスチック基板
203 PCR1
204 PCR2
205 ミキサー
206 フィルタ
207 孔（検体）
208 孔（試薬1）
209 孔（試薬2）
210、310 ポンプ
211、311 バルブ
312 アクチュエータ
313 メンブレン
314 パイレックスガラス
315 センサチップ
316 検出面
317 試薬3
318 キャビティ
319 スペーサ
320 空気穴

請求の範囲

- [請求項1] 検体に含有されるDNAをPCR法により解析するために用いられるDNA解析マイクロ流路チップであって、
- シリコンからなる第1層(101)および
- プラスチックからなる第2層(102)
- を具備し、ここで、
- 前記第2層(102)が前記検体の種類および解析される対象物に応じて可変的に選択されるように、前記第2層(102)は前記第1層(101)上に積層され、
- 前記第1層(101)は、
- 少なくとも4個の開口部(291、292、293、294)、
- 2以上のPCRリアクタ(203、204、403、404)、
- 前記PCRリアクタの間に設けられた少なくとも1つのフィルタ(206)、および
- 前記開口部、各PCRリアクタおよび前記少なくとも1つのフィルタの間と連通するマイクロ流路
- を具備し、
- 前記第2層(102)は、
- 前記PCR法のために用いられる試薬(1、2)、
- ポンプ(312)、および
- センサ(315)
- を具備し、
- 第1層(101)の法線方向から見たときに、前記試薬(1、2)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部(291)に重なり合い、
- 第1層(101)の法線方向から見たときに、前記ポンプ(312)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも2つの開口部(292、293)に重なり合い、

前記ポンプにより、前記試薬は、前記マイクロ流路を介して前記PCRリアクタに供給され、

前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が供給され、

前記混合物は、前記PCRリアクタから前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部(294)を介して前記センサに送られ、前記センサを用いて前記検体に含有されるDNAを解析する、DNA解析マイクロ流路チップ。

[請求項2] 請求項1記載のDNA解析マイクロ流路チップにおいて、前記PCRリアクタの周辺部のうち、マイクロ流路と接続されている付近以外のシリコン領域が掘り抜かれていることを特徴とする、DNA解析マイクロ流路チップ。

[請求項3] 請求項1記載のDNA解析マイクロ流路チップにおいて、前記フィルタは、シリコンのエッチングで形成された円柱形状のピラーにより構成され、前記ピラー間の間隔が10 μ m以下、1 μ m以上であることを特徴とする、DNA解析マイクロ流路チップ。

[請求項4] 請求項1記載のDNA解析マイクロ流路チップにおいて、前記送液機構にポリマーアクチュエータを用いることを特徴とする、DNA解析マイクロ流路チップ。

[請求項5] 検体に含有されるDNAをPCR法により解析する方法であって、第1層(101)および複数の第2層(102)を用意する工程(a)、ここで、

前記第1層(101)は、シリコンからなり、

前記第1層(101)は、

少なくとも4個の開口部(291、292、293、294)

2以上のPCRリアクタ(203、204、403、404)

前記PCRリアクタの間に設けられた少なくとも1つのフィルタ(206)、および

前記開口部、各PCRリアクタおよび前記少なくとも1つのフィルタの間と連通するマイクロ流路を具備し、

各第2層(102)は、プラスチックからなり、

各第2層(102)は、

前記PCR法のために用いられる試薬(1、2)、

ポンプ(312)、および

センサ(315)

を具備し、

前記複数の第2層(102)の中から、前記検体の種類および解析される対象物に応じて1つの第2層(102)を選択する工程(b)

工程(b)において選択された第2層を前記第1層(101)上に積層し、DNA解析マイクロ流路チップを得る工程(c)、ここで、

第1層(101)の法線方向から見たときに、前記試薬(1、2)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部(291)に重なり合い、かつ

第1層(101)の法線方向から見たときに、前記ポンプ(312)は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも2つの開口部(292、293)に重なり合い、

前記DNA解析マイクロ流路チップの内部に、前記検体を供給する工程(d)、

前記ポンプにより、前記試薬を、前記マイクロ流路を介して前記PCRリアクタに供給する工程(e)、

ここで、前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が供給され、

前記PCRリアクタにおいて、前記PCR法を実施し、PCR生成物を得る工程（f）、

前記工程（f）において得られたPCR生成物を、前記PCRリアクタから前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部（294）を介して前記センサに送る工程（g）、および

前記センサを用いて前記PCR生成物を感知して、前記検体に含有されるDNAを解析する工程（h）

を含む、検体に含有されるDNAをPCR法により解析する方法。

[請求項6]

検体に含有されるDNAをPCR法によりDNA解析マイクロ流路チップを用いて解析する方法であって、

以下を具備するDNA解析マイクロ流路チップを用意する工程（a）

シリコンからなる第1層（101）および

プラスチックからなる第2層（102）、ここで、

前記第2層（102）は前記第1層（101）上に積層され、

前記第1層（101）は、

少なくとも4個の開口部（291、292、293、294）

2以上のPCRリアクタ（203、204、403、404）

前記PCRリアクタの間に設けられた少なくとも1つのフィルタ（206）、および

前記開口部、各PCRリアクタおよび前記少なくとも1つのフィルタの間と連通するマイクロ流路を具備し、

前記第2層（102）は、

前記PCR法のために用いられる試薬（1、2）、

ポンプ（312）、および

センサ (315)

を具備し、

第1層 (101) の法線方向から見たときに、前記試薬 (1、2) は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部 (291) に重なり合い、かつ

第1層 (101) の法線方向から見たときに、前記ポンプ (312) は、前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部 (292、293) に重なり合い、

前記DNA解析マイクロ流路チップの内部に、前記検体を供給する工程 (d)、

前記ポンプにより、前記試薬を、前記マイクロ流路を介して前記PCRリアクタに供給する工程 (e)、

ここで、前記PCRリアクタには、前記試薬および前記検体の混合物が供給され、

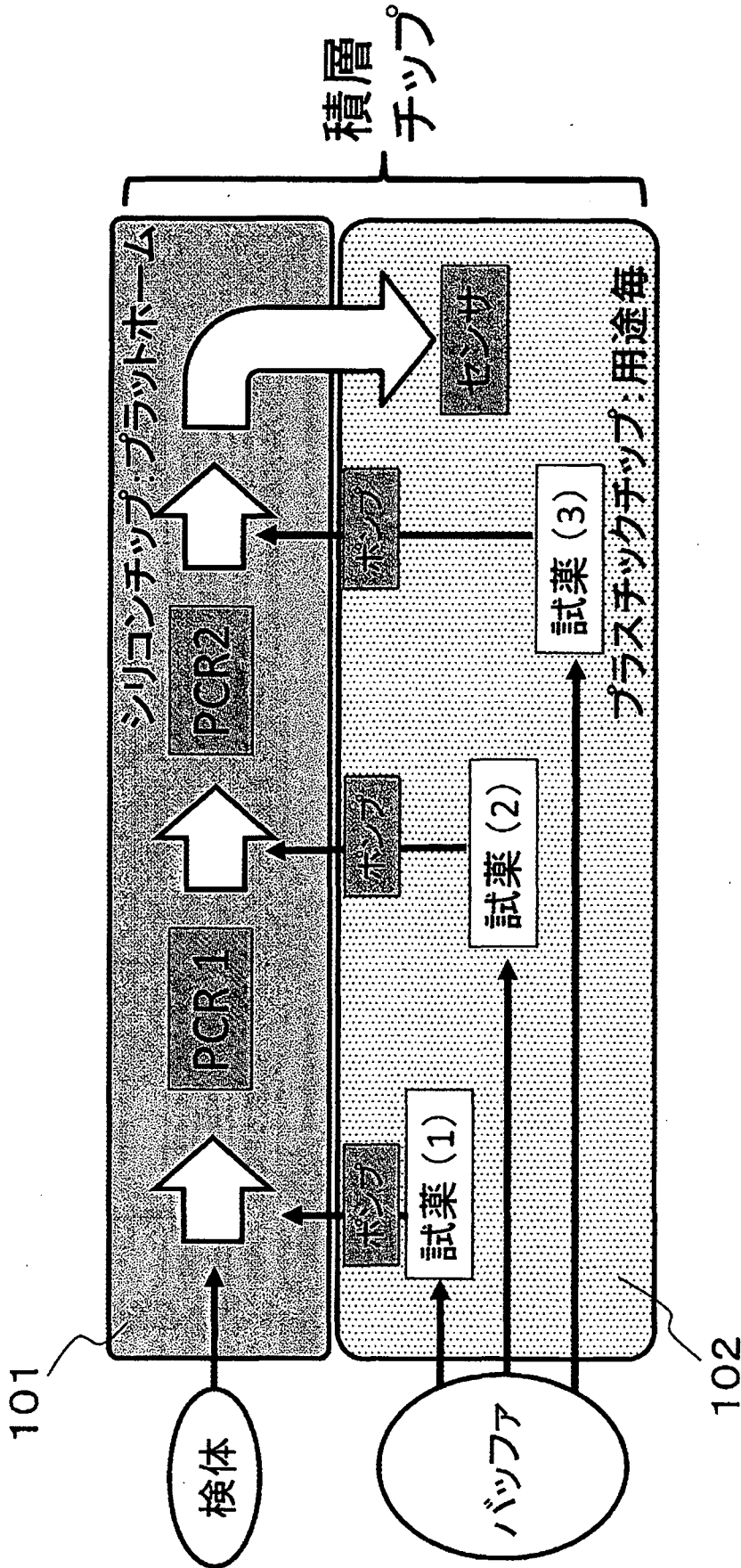
前記PCRリアクタにおいて、前記PCR法を実施し、PCR生成物を得る工程 (f)、

前記工程 (f) において得られたPCR生成物を、前記PCRリアクタから前記少なくとも4個の開口部に含まれる少なくとも1つの開口部 (294) を介して前記センサに送る工程 (g)、および

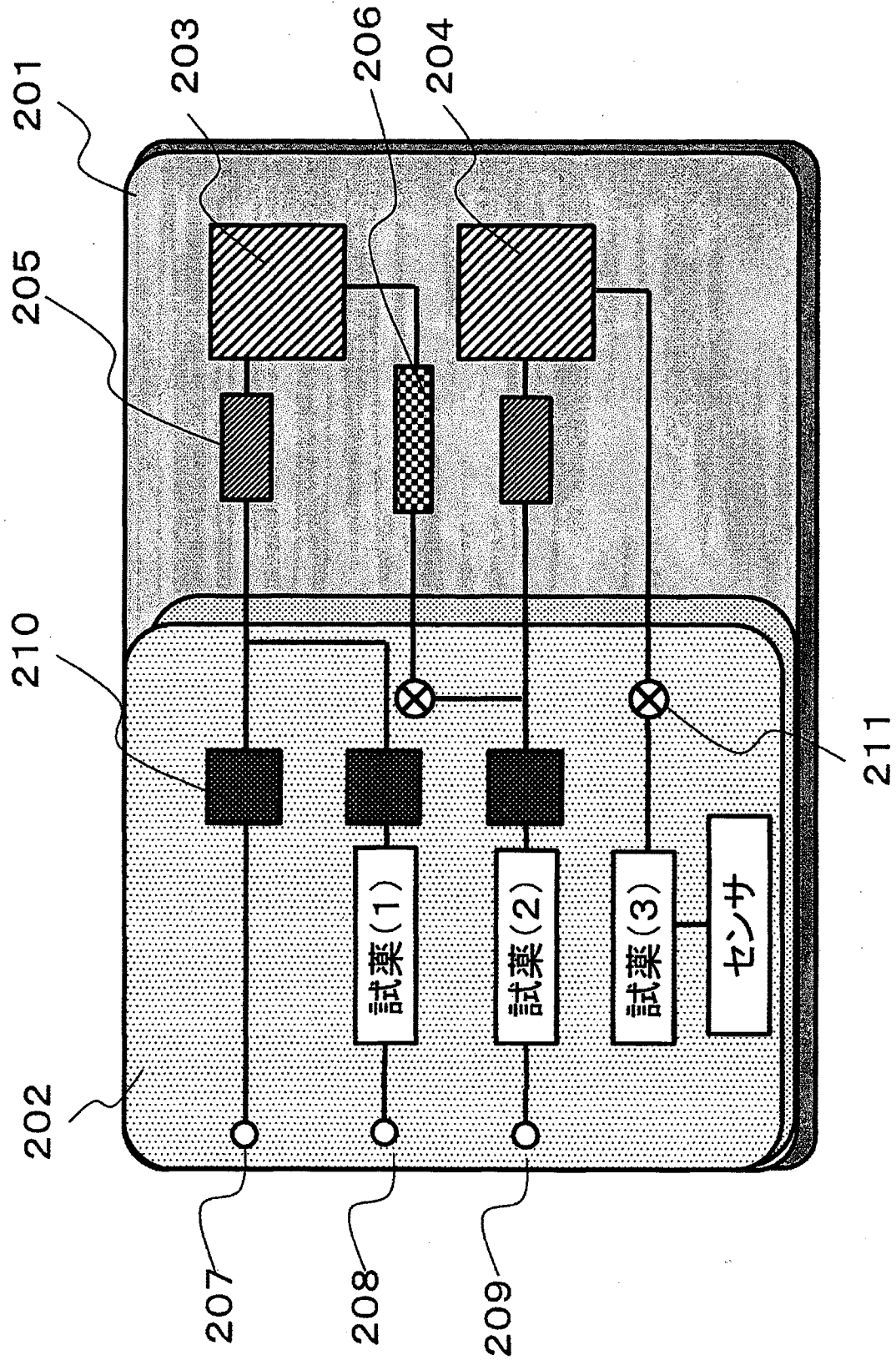
前記センサを用いて前記PCR生成物を感知して、前記検体に含有されるDNAを解析する工程 (h)、

を含む、検体に含有されるDNAをPCR法によりDNA解析マイクロ流路チップを用いて解析する方法。

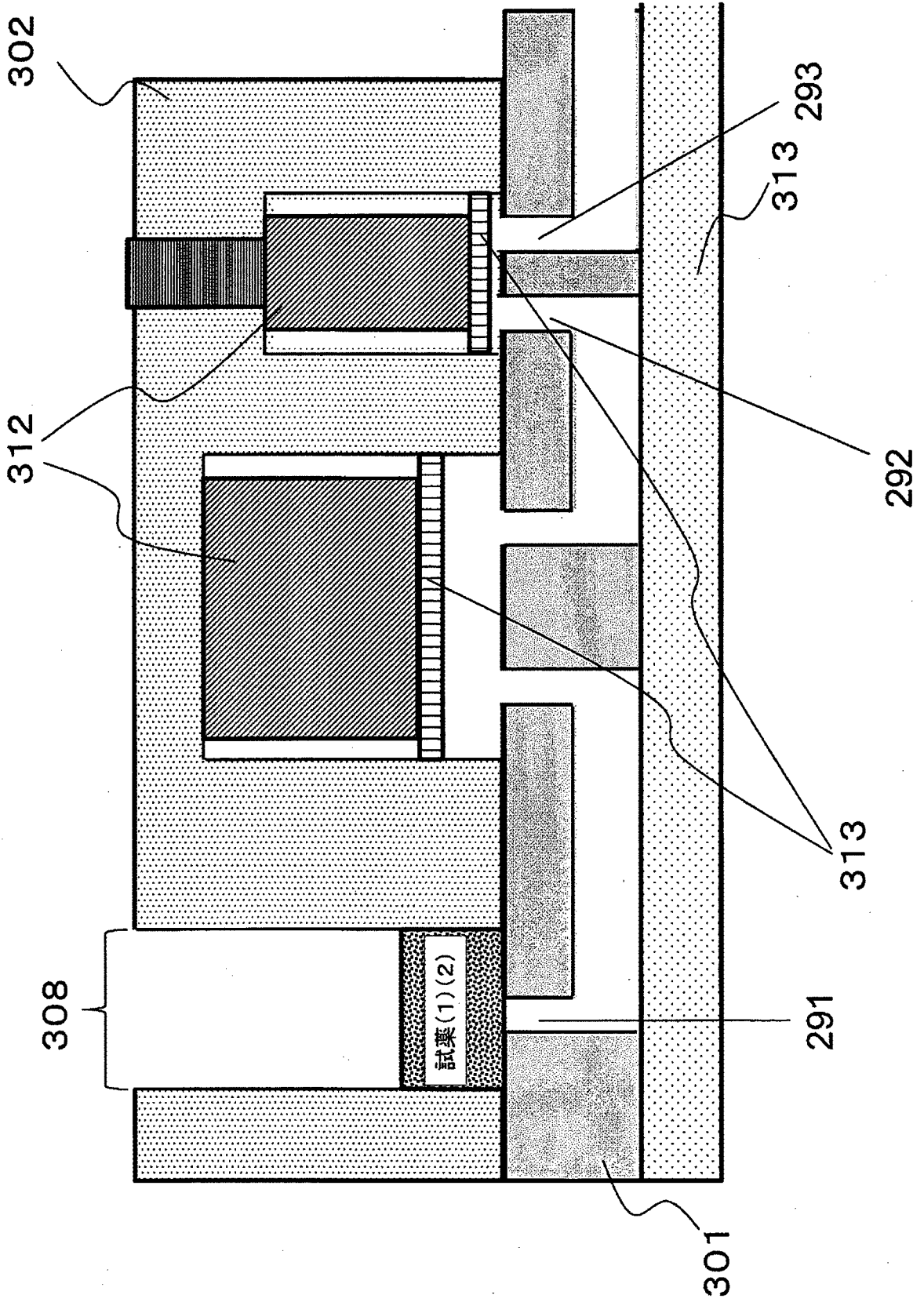
[図1]



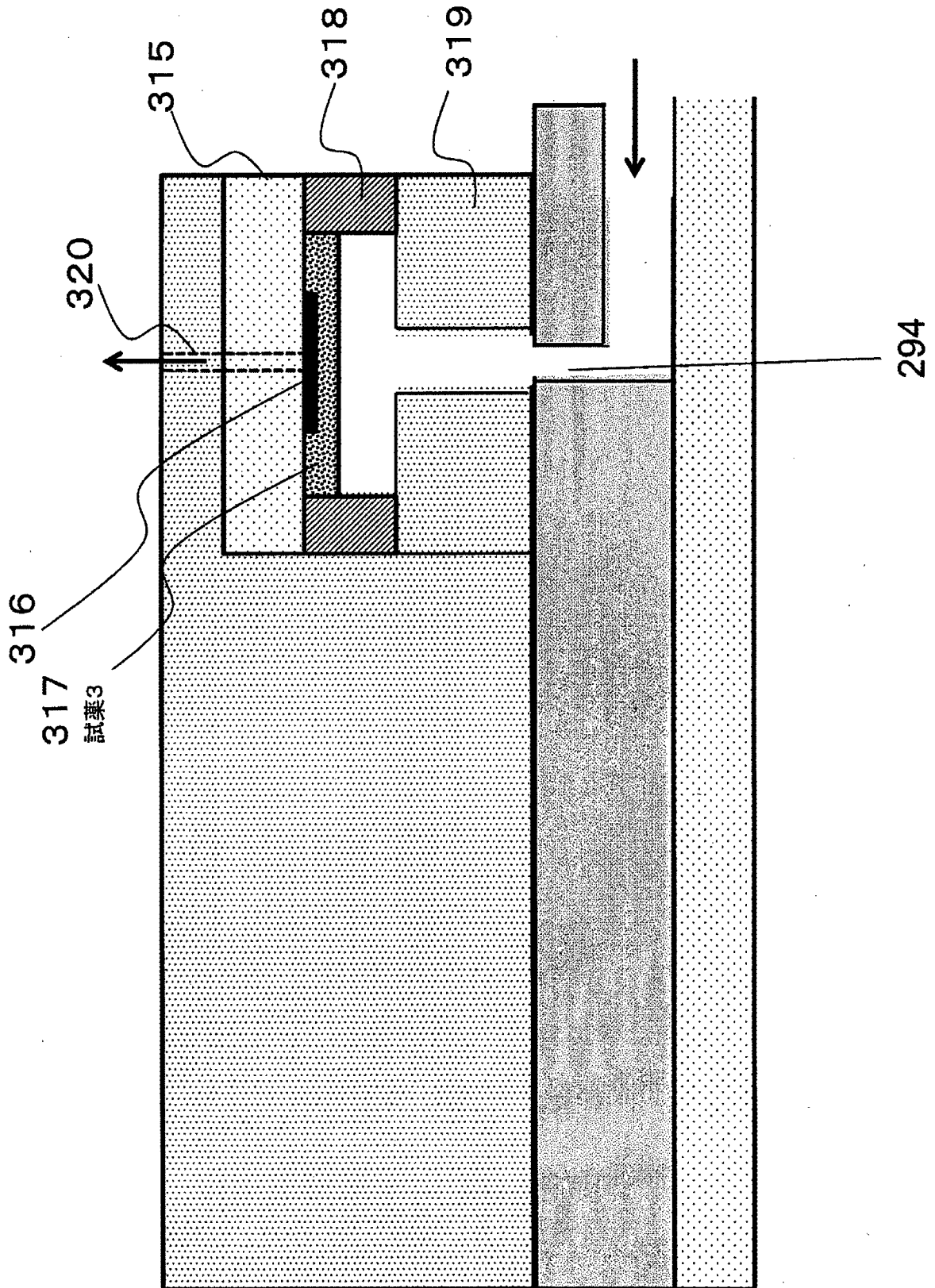
[図2]



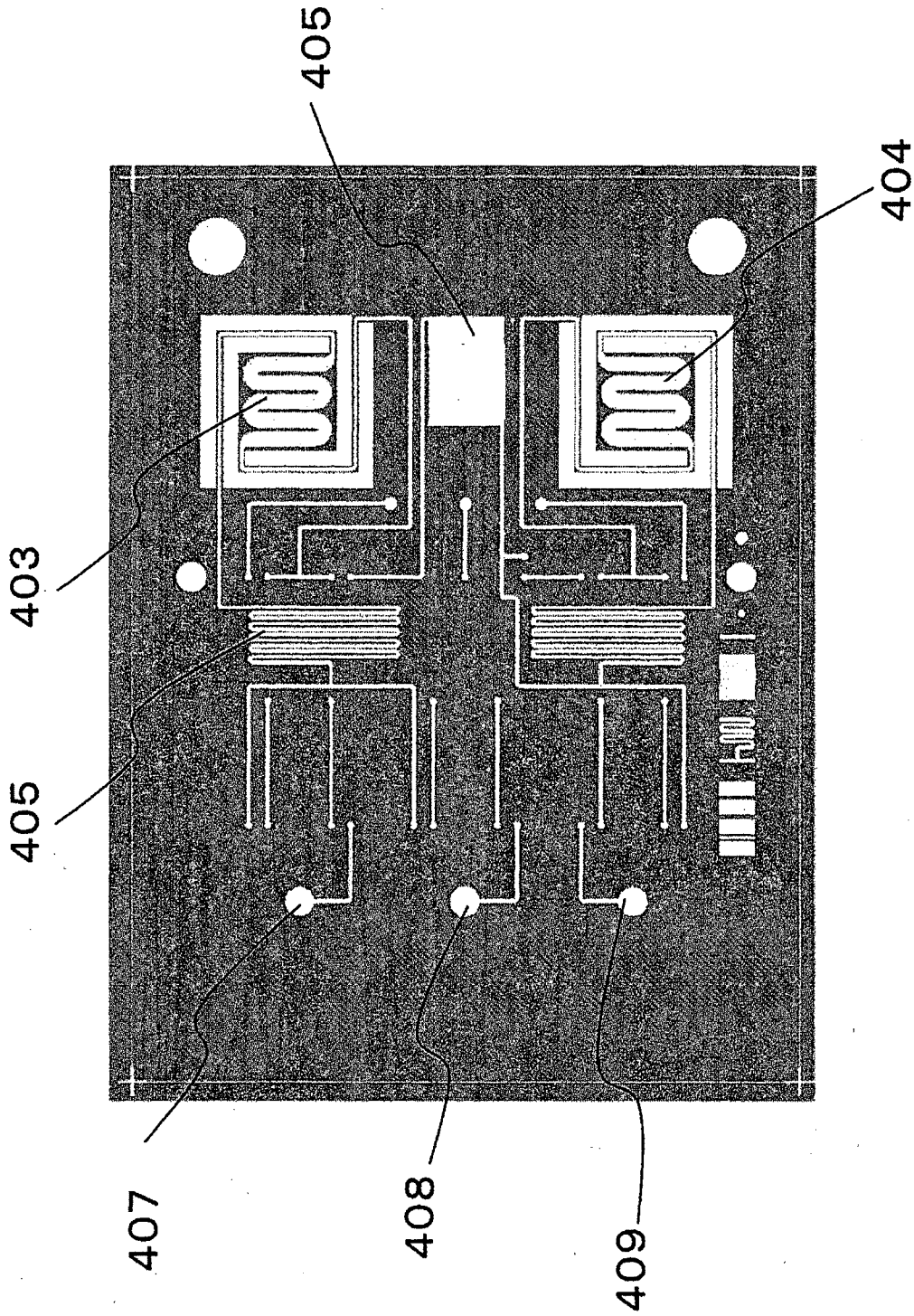
[図3(a)]



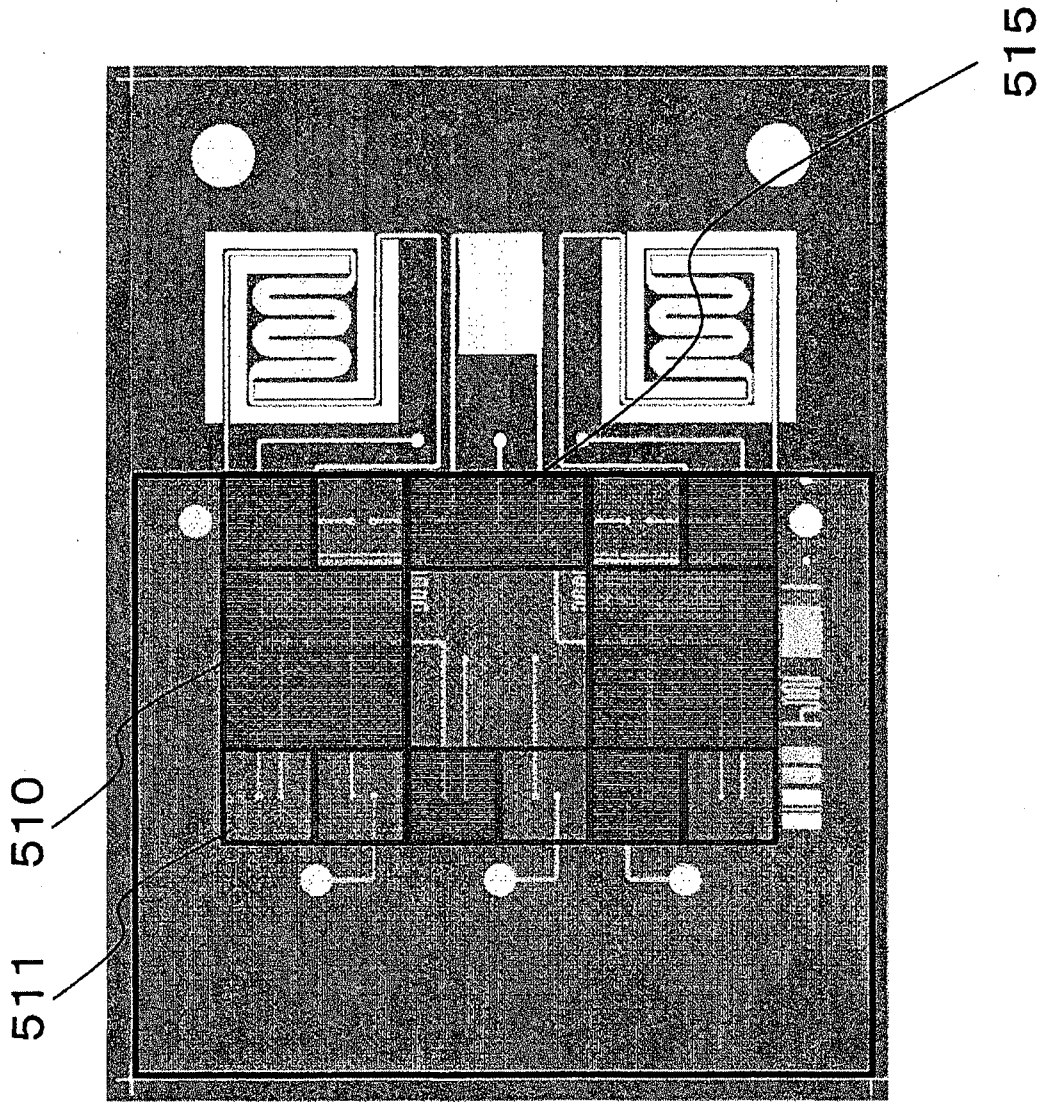
[図3(b)]



[図4]

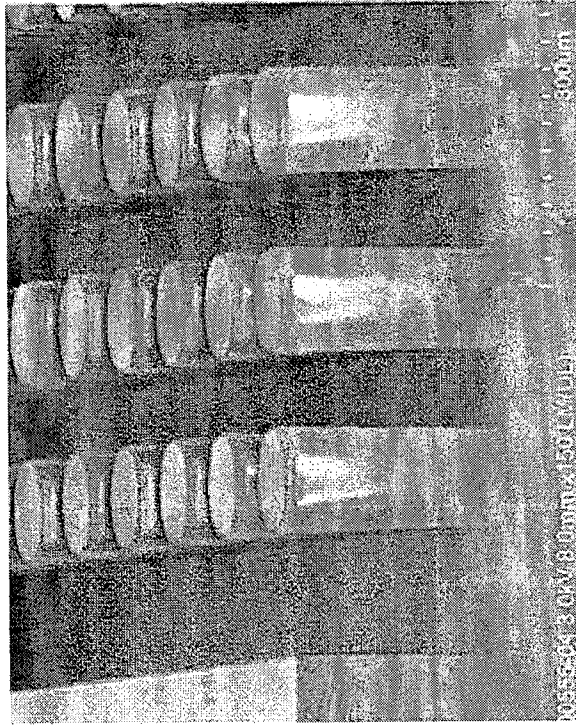


[図5]

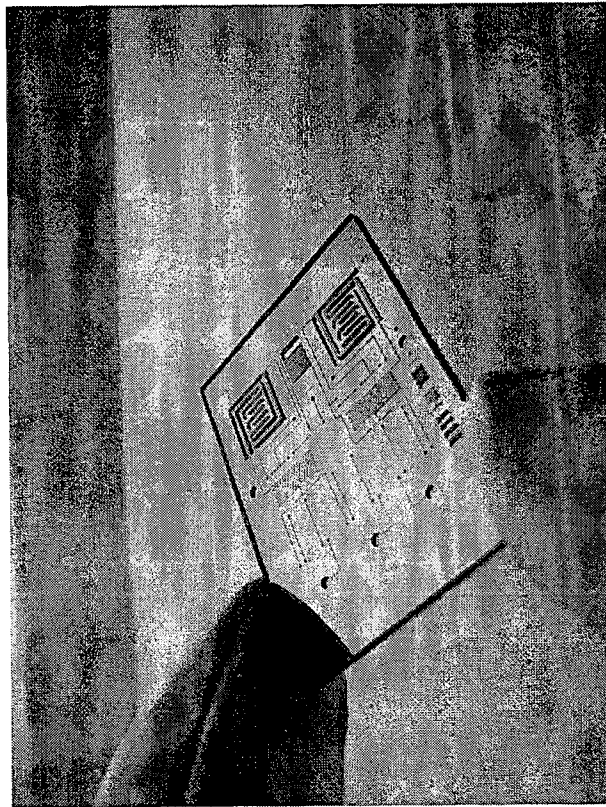


[図6]

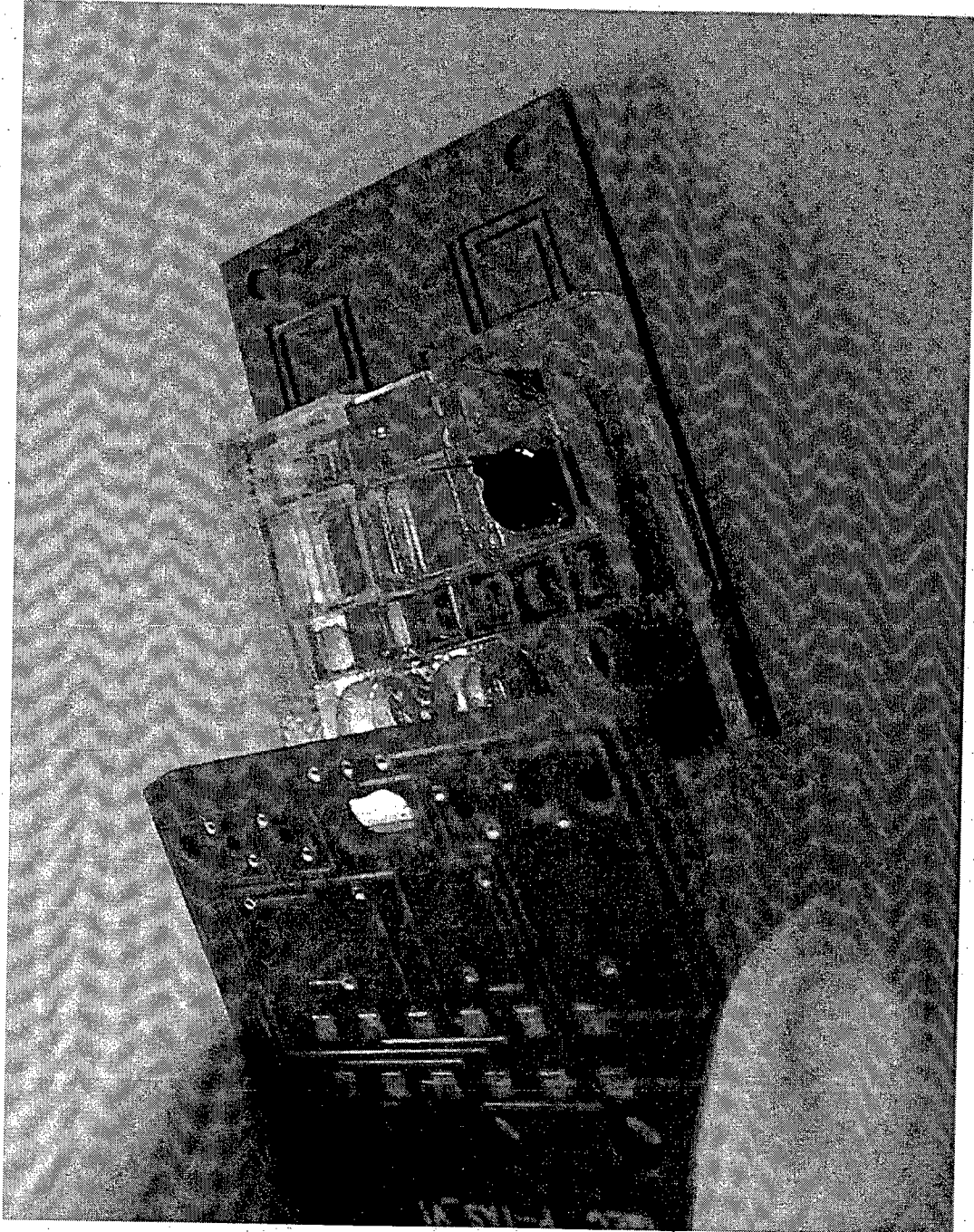
(b)



(a)



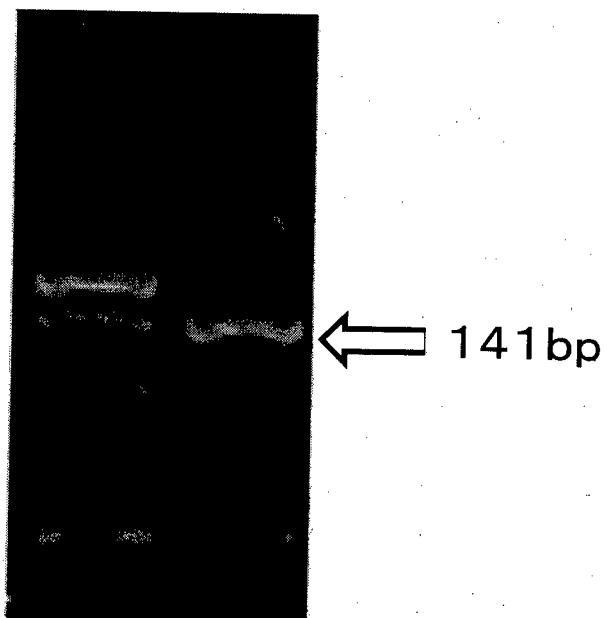
[図7]



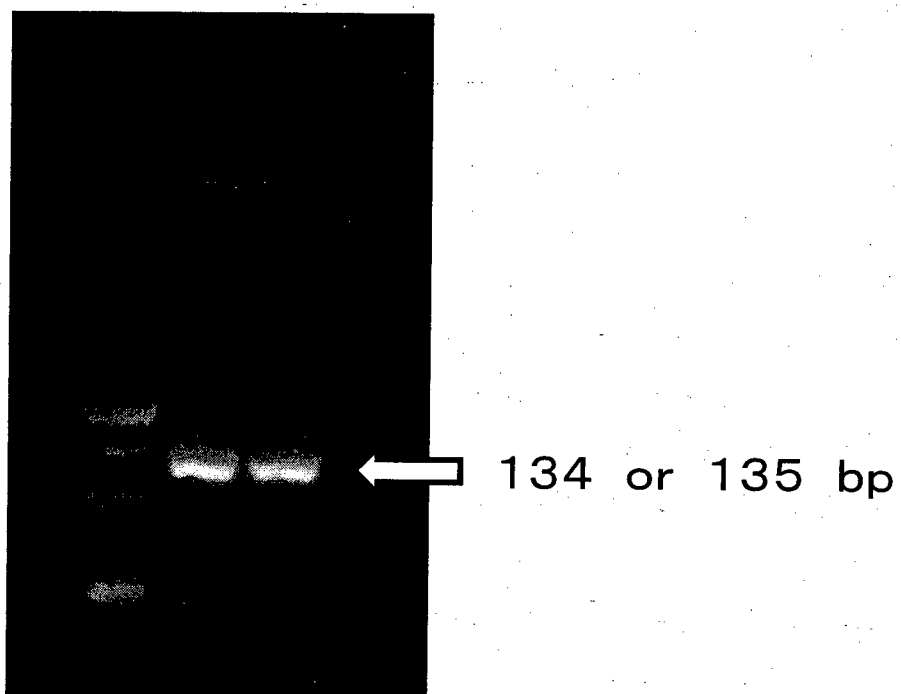
[図8]

	目的	検体	試薬(1)	試薬(2)	試薬(3)	センサ
実施例 1	ゲノムからの DNA 増幅	ヒトゲノム	(A)	-	-	-
実施例 2	血液からの DNA 増幅	ヒト全血	(B)	-	-	-
実施例 3	アレルト特異DNA 増幅	ヒト全血	(B)	(C)	-	-
実施例 4	SNPセンシング	ヒト全血	(B)	(C)	(D)	ピロリン酸センサ

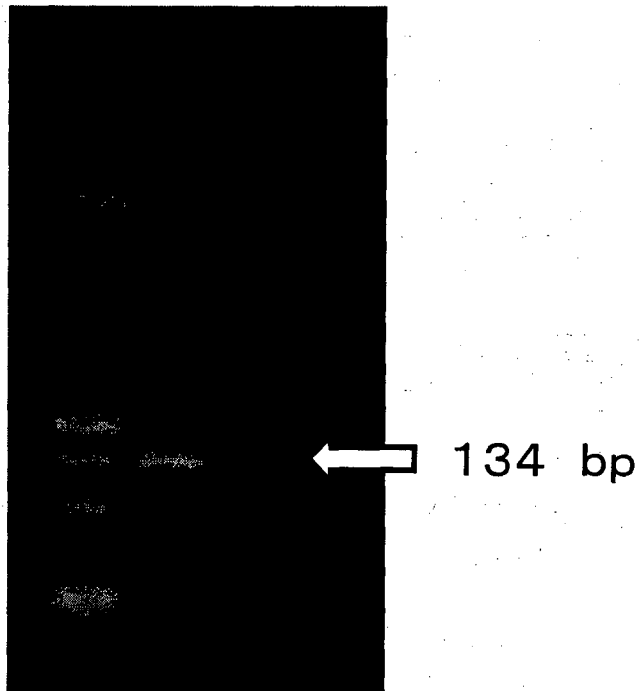
[9]



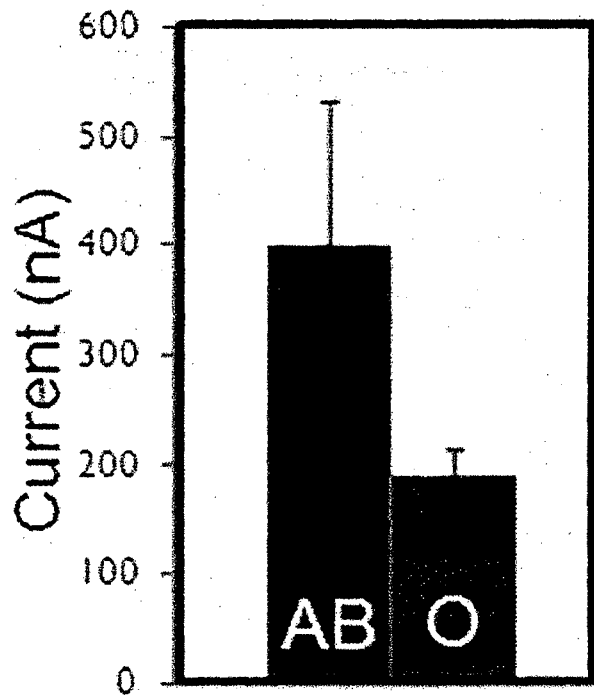
[10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i</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) <i>C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00</i>																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2013</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2013</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2013</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013										
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013																	
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</i>																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	MAN, P.F. et al., Microfluidic plastic capillaries on silicon substrates: a new inexpensive technology for bioanalysis chips, Micro Electro Mechanical Systems, 1997. MEMS '97, Proceedings, IEEE., Tenth Annual International Workshop on, 1997.01.26, p.311-316	1-6																		
A	PALMIERI, M. et al., Advanced Microfluidic Packaging for Molecular Diagnostics, 43rd International Symposium on Microelectronics 2010, (IMAPS 2010), 2010, p.36-41	1-6																		
あ	LEE, D.S. et al., Bulk-micromachined submicroliter-volume PCR chip with very rapid thermal response and low power consumption, Lab on a Chip, 2004.03.29, Vol.4, No.4, p.401-407	1-6																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"T"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"&"	document member of the same patent family	"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		
* Special categories of cited documents:	"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																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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																		
"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)	"&"	document member of the same patent family																		
"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																				
Date of the actual completion of the international search 18 July, 2013 (18.07.13)		Date of mailing of the international search report 30 July, 2013 (30.07.13)																		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer																		
Facsimile No.		Telephone No.																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062310

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-522219 A (Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus), 28 July 2011 (28.07.2011), entire text & US 2009/0269767 A1 & EP 2276570 A1 & WO 2009/125067 A1 & AU 2009235344 A1 & CA 2718838 A1 & KR 10-2011-0008174 A & CN 102083533 A	1-6
A	Ichiro YAMASHITA et al., "Realizing rapid on-site SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Diagnosis", Panasonic Technical Journal, 15 October 2011 (15.10.2011), vol.57, no.3, pages 21 to 26	1-6
P,A	US 2013/0078155 A1 (IMEC; PANASONIC; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U. LEUVEN R&D), 28 March 2013 (28.03.2013), entire text & US 2013/0078155 A1 & EP 2572788 A1 & CN 103007856 A	1-6
P,A	MAJEED, B. et al., Silicon Based System for Single-Nucleotide-Polymorphism Detection: Chip Fabrication and Thermal Characterization of Polymerase Chain Reaction Microchamber, Japanese Journal of Applied Physics, 2012.04.20, Vol.51, 04DL01 (9 pages)	1-6
P,A	MAJEED, B. et al., Silicon micro-pillar filter fabrication for DNA separation in Lab-on-chip system, Electronics Packaging Technology Conference (EPTC), 2012 IEEE 14th, 2012.12.05, p.52-56	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(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. C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68, 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 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2013年
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年
 日本国登録実用新案公報 1994-2013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)
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
A	MAN, P.F. et al., Microfluidic plastic capillaries on silicon substrates: a new inexpensive technology for bioanalysis chips, Micro Electro Mechanical Systems, 1997. MEMS '97, Proceedings, IEEE., Tenth Annual International Workshop on, 1997.01.26, p.311-316	1-6
A	PALMIERI, M. et al., Advanced Microfluidic Packaging for Molecular Diagnostics, 43rd International Symposium on Microelectronics 2010, (IMAPS 2010), 2010, p.36-41	1-6

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 18.07.2013
 国際調査報告の発送日 30.07.2013

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) 木原 啓一郎 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	4867
---	---	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	LEE, D.S. et al., Bulk-micromachined submicroliter-volume PCR chip with very rapid thermal response and low power consumption, Lab on a Chip, 2004.03.29, Vol.4, No.4, p.401-407	1-6
A	JP 2011-522219 A (ヴァルティオン・テクニッリネン・トウトキム スケスクス) 2011.07.28, 全文 & US 2009/0269767 A1 & EP 2276570 A1 & WO 2009/125067 A1 & AU 2009235344 A1 & CA 2718838 A1 & KR 10-2011-0008174 A & CN 102083533 A	1-6
A	山下一郎他, 一塩基多型センシングチップーその場遺伝子情報解析の実現ー, パナソニック技報, 2011.10.15, Vol.57, No.3, p.21-26	1-6
P, A	US 2013/0078155 A1 (IMEC; PANASONIC; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U. LEUVEN R&D) 2013.03.28, 全文 & US 2013/0078155 A1 & EP 2572788 A1 & CN 103007856 A	1-6
P, A	MAJEED, B. et al., Silicon Based System for Single-Nucleotide-Polymorphism Detection: Chip Fabrication and Thermal Characterization of Polymerase Chain Reaction Microchamber, Japanese Journal of Applied Physics, 2012.04.20, Vol.51, 04DL01 (9 pages)	1-6
P, A	MAJEED, B. et al., Silicon micro-pillar filter fabrication for DNA separation in Lab-on-chip system, Electronics Packaging Technology Conference (EPTC), 2012 IEEE 14th, 2012.12.05, p.52-56	1-6