

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4270511号  
(P4270511)

(45) 発行日 平成21年6月3日 (2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日 (2009.3.6)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/553 (2006.01)

GO 1 N 33/553

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 5 U

GO 1 N 33/547 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 9 5

GO 1 N 33/547

請求項の数 26 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2005-53449 (P2005-53449)  
 (22) 出願日 平成17年2月28日 (2005.2.28)  
 (65) 公開番号 特開2006-234758 (P2006-234758A)  
 (43) 公開日 平成18年9月7日 (2006.9.7)  
 審査請求日 平成19年6月29日 (2007.6.29)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 306037311  
 富士フイルム株式会社  
 東京都港区西麻布2丁目26番30号  
 (74) 代理人 110000109  
 特許業務法人特許事務所サイクス  
 (72) 発明者 久保 利昭  
 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写  
 真フイルム株式会社内  
 (72) 発明者 江副 利秀  
 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写  
 真フイルム株式会社内  
 (72) 発明者 袴田 正志  
 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地  
 富士写真フイルム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親水性高分子でコーティングした金属表面又は金属膜を有する基板から成り、該基板が同一面上に、(i) カルボキシル基を有する親水性高分子を有する、生理活性物質を保持するための表面と、(ii) カルボキシル基及びブロッキングされたカルボキシル基を有さない親水性高分子を有する、生理活性物質を保持しない表面とを有しているバイオセンサー

。

【請求項 2】

1つの流路内に、生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面とを有している、請求項1に記載のバイオセンサー。

【請求項 3】

親水性高分子が自己組織化膜を介して基板に固定されている、請求項1又は2に記載のバイオセンサー。

【請求項 4】

自己組織化膜が、含硫黄化合物により形成されている、請求項3に記載のバイオセンサー。

。

【請求項 5】

含硫黄化合物がX-R-Y (Xは金属膜に対する結合性を有する基、Rは炭化水素鎖、Yは親水性高分子化合物を結合させるための基) である、請求項4に記載のバイオセンサー。

【請求項 6】

Xがチオール基である、請求項5に記載のバイオセンサー。

【請求項 7】

Rが5原子以上の炭化水素鎖である、請求項5又は6に記載のバイオセンサー。

【請求項 8】

Yがヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、ヒドラジド、カルボニル、エボキシ、又はビニル基である、請求項5から7の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 9】

親水性高分子層の膨潤膜厚が10 nmから500 nmである、請求項1から8の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 10】

親水性高分子が多糖類である、請求項1から9の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 11】

多糖類がデキストラン型である、請求項10に記載のバイオセンサー。

【請求項 12】

金属表面又は金属膜が、金、銀、銅、白金、及びアルミニウムからなる群より選ばれる自由電子金属からなるものである、請求項1から11の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 13】

金属膜の厚さが0.5 nmから500 nmである、請求項1から12の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 14】

非電気化学的検出に使用される、請求項1から13の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 15】

表面プラズモン共鳴分析に使用される、請求項1から14の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 16】

誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップであって、上記誘電体ブロックと上記金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む1つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化されている上記の測定チップに形成されている、請求項1から15の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 17】

金属表面又は金属膜で構成される基板を親水性高分子でコーティングする工程；及び、検出領域に固体を接触させることなく、基板上の同一面上に生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面とを形成する工程を含む、請求項1から16の何れかに記載のバイオセンサーの製造方法。

【請求項 18】

親水性高分子が、金属表面又は金属膜で構成される基板の全面にコーティングされる、請求項17に記載のバイオセンサーの製造方法。

【請求項 19】

隔壁を用いて同一面上に生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面を形成する、請求項17又は18に記載のバイオセンサーの製造方法。

【請求項 20】

親水性高分子層の上に隔壁を用いて同一面上に生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面を形成する、請求項19に記載のバイオセンサーの製造方法。

【請求項 21】

請求項1から16の何れかに記載のバイオセンサーと生理活性物質とを接触させて、該バ

10

20

30

40

50

イオセンサーの表面に該生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、バイオセンサーに生理活性物質を固定化する方法。

【請求項 2 2】

基板上の生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面に対して同一の処理を施すことによって生理活性物質をバイオセンサーに接触させる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

生理活性物質が共有結合により表面に結合している請求項 1 から 1 6 の何れかに記載のバイオセンサーと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法。

10

【請求項 2 4】

基板上の生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面に対して同一の処理を施すことによって被験物質をバイオセンサーに接触させる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

生理活性物質と相互作用する物質を非電気化学的方法により検出または測定する、請求項 2 3 又は 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

生理活性物質と相互作用する物質を表面プラズモン共鳴分析により検出または測定する、請求項 2 3 から 2 5 の何れかに記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、バイオセンサー及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。特に本発明は、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに用いるためのバイオセンサー及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

現在、臨床検査等で免疫反応など分子間相互作用を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、測定物質の結合量変化を高感度に検出することのできるいくつかの技術が使用されている。例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定技術、水晶発振子マイクロバランス (QCM) 測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術である。SPR 測定技術はチップの金属膜に接する有機機能膜近傍の屈折率変化を反射光波長のピークシフト又は一定波長における反射光量の変化を測定して求めることにより、表面近傍に起こる吸着及び脱着を検知する方法である。QCM 測定技術は水晶発振子の金電極 (デバイス) 上の物質の吸脱着による発振子の振動数変化から、ng レベルで吸脱着質量を検出できる技術である。また、金の超微粒子 (nm レベル) 表面を機能化させて、その上に生理活性物質を固定して、生理活性物質間の特異認識反応を行わせることによって、金微粒子の沈降、配列から生体関連物質の検出ができる。

30

40

【0 0 0 3】

上記した技術においては、いずれの場合も、生理活性物質を固定化する表面が重要である。以下、当技術分野で最も使われている表面プラズモン共鳴 (SPR) を例として、説明する。

【0 0 0 4】

一般に使用される測定チップは、透明基板 (例えば、ガラス)、蒸着された金属膜、及びその上に生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜からなり、その官能基を介し、金属表面に生理活性物質を固定化する。該生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定することによって、生体分子間の相互作用を分析する。

【0 0 0 5】

50

生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜としては、金属と結合する官能基、鎖長の原子数が10以上のリンカー、及び生理活性物質と結合できる官能基を有する化合物を用いて、生理活性物質を固定化した測定チップが報告されている（特許文献1を参照）。また、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜からなる測定チップが報告されている（特許文献2を参照）。

#### 【0006】

生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定する場合、検体物質は必ずしも単一成分ではなく、例えば細胞抽出液中などのような不均一系で検体物質を測定することも要求される。その場合、種々の蛋白質、脂質などの夾雑物が検出表面に非特異的な吸着を起こすと、測定検出感度が著しく低下する。上記の検出表面では、非特異吸着が極めて起こりやすく問題があった。この問題を解決するためにいくつかの方法が検討されている。例えば、金属表面にリンカーを介し、親水性のハイドロゲルを固定化することで、物理吸着を抑制する方法も使用されてきた（特許文献1、特許文献3及び特許文献4を参照）。

#### 【0007】

一方、上記のようなバイオセンサーにおいて、生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定するための測定部と、このような結合反応を行わない対照部とは、同一平面に存在し、かつ、できるだけ近接していることが、測定上の外乱（温度変化、濃度変化、圧力変化）の影響を除去してベースライン変動を少なくする上で好ましい。そのためには、ポリマー薄膜を用いたSPRセンサー表面に参照部と測定部を共存させる必要が出てきた。

#### 【0008】

例えば、特許文献5には、層流によりリガンド固定領域（測定部）とリガンド非固定領域（参照部）とを分離して作成し、アナライトを同時に流すことが記載されている。しかしながら、この方法では、複雑な流路系が必要となり、また複数の手順が必要であった。また、特許文献5に記載のシステムは、検出面とプリズムが一体型ではなく、さらにリガンド非固定領域のカルボン酸のすべてをブロックすることはできないため、参照部に荷電が残存し、測定性能が劣化するという問題があった。

#### 【0009】

【特許文献1】特許第2815120号

【特許文献2】特開平9-264843号

【特許文献3】米国特許第5436161号

【特許文献4】特開平8-193948号公報

【特許文献5】国際公開WO03/002985号公報

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

本発明は上記した問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、生理活性物質の固定操作を一度行うだけで参照部と測定部を作成することができ、かつ参照部に不要な荷電を残存させないようにしたバイオセンサーを提供することを解決すべき課題とした。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、親水性高分子化合物でコーティングした金属表面又は金属膜で構成される基板から成るバイオセンサーにおいて、基板上の同一面上に、生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面を含む少なくとも2種類以上の表面を設けることによって、所望のバイオセンサーを提供できることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0012】

即ち、本発明によれば、親水性高分子化合物でコーティングした金属表面又は金属膜で構成される基板から成り、かつ基板上の同一面上に、生理活性物質を保持するための表面

10

20

30

40

50

と生理活性物質を保持しない表面とを有しているバイオセンサーが提供される。

【0013】

好ましくは、本発明のバイオセンサーは、基板上の同一面上に、生理活性物質を結合するための官能基を有する表面と、生理活性物質を結合するための官能基を有さない表面とを有している。

好ましくは、生理活性物質を結合するための官能基がカルボキシル基、アミノ基又は水酸基である。

好ましくは、本発明のバイオセンサーは、生理活性物質を保持するための表面としてカルボキシル基を有する表面を有し、生理活性物質を保持しない表面としてカルボキシル基及びブロッキングされたカルボキシル基を有さない表面を有している。

10

【0014】

好ましくは、親水性高分子化合物が自己組織化膜を介して基板に固定されている。

好ましくは、自己組織化膜は、含硫黄化合物により形成されている。

好ましくは、親水性高分子層の膨潤膜厚は10nmから500nmである。

【0015】

好ましくは、金属表面又は金属膜は、金、銀、銅、白金、及びアルミニウムからなる群より選ばれる自由電子金属からなるものである。

好ましくは、金属膜の厚さは0.5nmから500nmである。

【0016】

好ましくは、本発明のバイオセンサーは、非電気化学的検出に使用され、さらに好ましくは表面プラズモン共鳴分析に使用される。

20

【0017】

好ましくは、本発明のバイオセンサーは、誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップであって、上記誘電体ブロックと上記金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む1つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化されている上記の測定チップに形成されている。

30

【0018】

本発明の別の側面によれば、金属表面又は金属膜で構成される基板を親水性高分子化合物でコーティングする工程；及び、検出領域に固体を接触させることなく、基板上の同一面上に生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面とを形成する工程を含む、本発明のバイオセンサーの製造方法が提供される。

【0019】

好ましくは、隔壁を用いて同一面上に生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面を形成する。

【0020】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のバイオセンサーと生理活性物質とを接触させて、該バイオセンサーの表面に該生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、バイオセンサーに生理活性物質を固定化する方法が提供される。

40

好ましくは、基板上の生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面に対して同一の処理を施すことによって生理活性物質をバイオセンサーに接触させる。

【0021】

本発明のさらに別の側面によれば、生理活性物質が共有結合により表面に結合している本発明のバイオセンサーと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法が提供される。

50

好ましくは、基板上の生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面に対して同一の処理を施すことによって被験物質をバイオセンサーに接触させる。

好ましくは、生理活性物質と相互作用する物質を非電気化学的方法により検出または測定し、さらに好ましくは、生理活性物質と相互作用する物質を表面プラズモン共鳴分析により検出または測定する。

【発明の効果】

【0022】

本発明のバイオセンサーによれば、生理活性物質の固定操作を一回の操作で行うだけで参照部と測定部を作成することができる。また、本発明のバイオセンサーにおいては、参照部に不要な荷電を残存させないようにすることができるため、参照部への生理活性物質（リガンド）の吸着を最小限に抑制することができ、これにより性能の優れたバイオセンサーを提供することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明のバイオセンサーは、親水性高分子化合物でコーティングした金属表面又は金属膜で構成される基板から成り、かつ基板上の同一面上に、生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面とを有していることを特徴とする。

【0024】

本発明において、生理活性物質を保持しない表面とは、生理活性物質を保持するための表面に対して行われる生理活性物質を固定するための処理（例えば、カルボン酸の活性化剤であるEDCとNHSの混合物で処理した後、生理活性物質で処理する）を実施した場合における当該生理活性物質の保持量が、生理活性物質を保持するための表面の保持量の1/10未満であるような表面のことを言う。

20

【0025】

生理活性物質を保持するための表面は、好ましくは、生理活性物質を結合するための官能基を有する表面であり、生理活性物質を保持しない表面は、好ましくは、生理活性物質を結合するための官能基を有さない表面である。

【0026】

生理活性物質を結合するための官能基の具体例としては、 $-COOH$ 、 $-NR^1R^2$ （式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-CHO$ 、 $-NR^3NR^1R^2$ （式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す）、 $-NCO$ 、 $-NCS$ 、エポキシ基、またはビニル基などが挙げられる。ここで、低級アルキル基における炭素数は特に限定されないが、一般的にはC1～C10程度であり、好ましくはC1～C6である。

30

【0027】

生理活性物質を結合するための官能基は、好ましくは、カルボキシル基、アミノ基又は水酸基である。

【0028】

本発明における生理活性物質を結合するための官能基は、生理活性物質の固定化方法に依存して選択される。即ち、同じ官能基（例えば、水酸基など）であっても、生理活性物質の固定化方法に依存して「生理活性物質を結合するための官能基」に該当する場合もあるし、該当しない場合もある。

40

【0029】

例えば、生理活性物質を結合するための官能基がカルボキシル基である場合、よく用いられる方法として、カルボジイミドとN-ヒドロキシスクシンイミドなどの組み合わせを用いて活性エステルを生成し、生理活性物質のアミノ基と共有結合を生成することができる。この場合、生理活性物質を結合するための官能基を有さない表面には、生理活性物質を結合できない官能基として、水酸基、アミノ基、又はポリエーテル類などを導入しておく。

50

## 【0030】

また、生理活性物質を結合するための官能基がアミノ基である場合、よく用いられる方法としては、グルタルアルデヒドを作用させた後に、生理活性物質のアミノ基と共有結合を生成する方法、生理活性物質を過ヨウ素酸塩で酸化してアミノ基と直接共有結合させる方法がある。この場合、生理活性物質を結合するための官能基を有さない表面には、生理活性物質を結合できない官能基として、水酸基、カルボキシル基、ポリエーテル類などを導入しておくことができる。

## 【0031】

また、生理活性物質を結合するための官能基が水酸基である場合、よく用いられる方法としては、ポリエポキシ化合物やエピクロロヒドリンを作用させた後に、生理活性物質のアミノ基と共有結合を生成する方法がある。なお、化学的には、ハロゲン化アルキルを用いた直接的なエーテル結合形成反応などもあるが、生理活性物質に適用する場合、生理活性を維持することが困難となる場合がある。この場合、生理活性物質を結合するための官能基を有さない表面には、生理活性物質を結合できない官能基として、反応活性のある水素（具体的には、水酸基、アミノ基又はカルボキシル基などの水素）を有さない水溶性基（例えばポリエチレングリコールなどのポリエーテル）などを導入しておくことができる。

## 【0032】

基板上の同一面上に生理活性物質を保持するための表面と生理活性物質を保持しない表面とを形成する場合、検出領域に固体（例えばスタンプ）が接触しないことが好ましい。具体的には、シリンジの先に液滴を作製し液滴のみを接触させる、ノズルから液滴を噴射する、流路を作製し反応液を流す、隔壁を設けて液を満たす等が挙げられるが、隔壁を使用することが好ましい。

## 【0033】

本発明のバイオセンサーに固定化した生理活性物質と被験物質との相互作用の測定の際には、バイオセンサーにおける生理活性物質を保持するための表面は測定部として使用され、生理活性物質を保持しない表面は参照部として使用される。なお、測定部としては、結合する生理活性物質として異なる物質を使用することにより、複数の測定部を設けることもできる。

## 【0034】

本発明のバイオセンサーにおいては、基板は親水性高分子化合物でコーティングされている。本発明で用いることができる親水性高分子としては、生体適合性多孔質マトリックス、例えばヒドロゲルなどが挙げられる。生体適合性多孔質マトリックスの厚さは、数nm～数百nmであり、好ましくは10～500nmである。本発明で用いることができるヒドロゲルとしては、Merrill等（1986年）、Hydrogels in Medicine and Pharmacy, III巻、Peppas NA編集、1章、CRCにより定義されているヒドロゲルなどを挙げることができる。本発明で用いることができるヒドロゲルとしては、例えば多糖類、例えばアガロース、デキストラン、カラゲナン、アルギン酸、澱粉、セルロース、又はこれらの誘導体、例えばカルボキシメチル誘導体、又は水膨潤性有機ポリマー、例えばポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコールなどを使用することができる。特にデキストラン型の多糖類は、セルロースとは対照的に、性質が非結晶性であり、好ましく用いられる。

## 【0035】

上記したような親水性高分子化合物（好ましくは、ヒドロゲル）は、以下に説明するような自己組織化膜を介して基板に固定してもよいし、あるいはモノマーを含む溶液から直接基板上に形成させることもできる。さらに、上記したヒドロゲルは架橋することもできる。ヒドロゲルの架橋は当業者に自明である。

## 【0036】

本発明では、基板上に自己組織化膜を形成してから、その上に、親水性高分子化合物をコーティングすることができる。本発明で言う自己組織化膜とは、外からの細かい制御を

10

20

30

40

50

加えていない状態で、膜材料そのものがもつ機構によって形成される一定の秩序をもつ組織をもった単分子膜やLB膜などの超薄膜のことを言う。この自己組織化により、非平衡な状況で長距離にわたって秩序がある構造やパターンが形成される。

【0037】

例えば、自己組織化膜は、含硫黄化合物により形成することができる。含硫黄化合物によって金表面に自己組織化膜を形成することは、例えば、Nuzzo RG等（1983年）、J Am Chem Soc、105巻、4481～4483頁、Porter MD等（1987年）、J Am Chem Soc、109巻、3559～3568頁、Troughton EB等（1988年）、Langmuir、4巻、365～385頁などに記載されている。

【0038】

含硫黄化合物は、好ましくは、X - R - Yで表される。

【0039】

Xは金属膜に対する結合性を有する基である。具体的には、非対称又は対称スルフィド（-SSR'Y"、-SSRY）、スルフィド（-SR'Y"、-SRY）、ジセレニド（-SeSeR'Y"、-SeSeRY）、セレニド（SeR'Y"、-SeRY）、チオール（-SH）、ニトリル（-CN）、イソニトリル、ニトロ（-NO<sub>2</sub>）、セレノール（-SeH）、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、チオ酸またはジチオ酸（-COSH、-CSSH）が好ましく用いられる。

【0040】

R（とR'）は場合によりヘテロ原子により中断されており、好ましくは適当に密な詰め込みのため直鎖（枝分かれしていない）であり、場合により二重及び/又は三重結合を含む炭化水素鎖である。鎖の長さは通常5原子以上であり、10原子以上であることが好ましく、10～30原子がさらに好ましい。炭素鎖は場合により過弗素化されることができる。そして非対称分子の場合R又はR'は、Hでもよい。

【0041】

YとY"は、親水性高分子化合物を結合させるための基である。YとY"は好ましくは同一であり、親水性高分子化合物（例えば、ヒドロゲルなど）に直接又は活性化後結合できるような性質を持つ。具体的にはヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、ヒドラジド、カルボニル、エポキシ、又はビニル基などを用いることができる。

【0042】

密に詰め込まれた単層の形態にあるX - R - Yで表される化合物は、Xで表される基が金属に結合することにより、金属表面に付着することができる。

【0043】

X - R - Yで表される化合物の具体例としては、10-カルボキシ-1-デカンチオール、4,4'-ジチオジブチリックアシッド、11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール、11-アミノ-1-ウンデカンチオール、16-ヒドロキシ-1-ヘキサデカチオールなどが挙げられる。

【0044】

本発明で言うバイオセンサーとは最も広義に解釈され、生体分子間の相互作用を電気的信号等の信号に変換して、対象となる物質を測定・検出するセンサーを意味する。通常のバイオセンサーは、検出対象とする化学物質を認識するレセプター部位と、そこに発生する物理的变化又は化学的变化を電気信号に変換するトランスデューサー部位とから構成される。生体内には、互いに親和性のある物質として、酵素/基質、酵素/補酵素、抗原/抗体、ホルモン/レセプターなどがある。バイオセンサーでは、これら互いに親和性のある物質の一方を基板に固定化して分子認識物質として用いることによって、対応させるもう一方の物質を選択的に計測するという原理を利用している。

【0045】

本発明のバイオセンサーは、金属表面又は金属膜を親水性高分子化合物でコーティングしたものである。金属表面あるいは金属膜を構成する金属としては、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。好ましくは金、銀、銅、アルミニウム、白金等の自由電子金属が

10

20

30

40

50



挙げられ、特に金が好ましい。それらの金属は単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0046】

金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、0.1 nm以上500 nm以下であるのが好ましく、0.5 nm以上500 nm以下がさらに好ましく、特に1 nm以上200 nm以下であるのが好ましい。500 nmを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、0.1 nm以上10 nm以下であるのが好ましい。

10

【0047】

金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

【0048】

金属膜は好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意味である。本発明で使用する基板としては例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、一般的にはBK7等の光学ガラス、あるいは合成樹脂、具体的にはポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンポリマーなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。

20

【0049】

本発明のバイオセンサーにおいては、基板の最表面に生理活性物質を固定化することができる官能基を有することが好ましい。ここで言う「基板の最表面」とは、「基板から最も遠い側」という意味であり、さらに具体的には、「基板上にコーティングした親水性高分子化合物中の基板から最も遠い側」という意味である。

【0050】

最表面にそれらの官能基を導入する方法としては、それらの官能基の前駆体を含有する親水性高分子を金属表面あるいは金属膜上にコーティングした後、化学処理により最表面に位置する前駆体からそれらの官能基を生成させる方法などが挙げられる。

30

【0051】

上記のようにして得られたバイオセンサー用表面において、上記の官能基を介して生理活性物質を共有結合させることによって、金属表面又は金属膜に生理活性物質を固定化することができる。

【0052】

本発明のバイオセンサー用表面上に固定される生理活性物質としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、核酸、低分子有機化合物、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、脂肪酸もしくは脂肪酸エステル、あるいはリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドなどが挙げられる。

40

【0053】

免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

50

## 【 0 0 5 4 】

酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

10

## 【 0 0 5 5 】

微生物としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用することができる。

核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA（cDNAを含む）、RNAのいずれも使用できる。DNAの種類は特に限定されず、天然由来のDNA、遺伝子組換え技術により調製した組換えDNA、又は化学合成DNAの何れでもよい。

低分子有機化合物としては通常の有機化学合成の方法で合成することができる任意の化合物が挙げられる。

## 【 0 0 5 6 】

20

非免疫蛋白質としては、特に限定されることなく、例えばアビジン（ストレプトアビジン）、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。

免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子（RF）等を使用することができる。

糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。

脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ベヘン酸エチル等が挙げられる。

## 【 0 0 5 7 】

生理活性物質が抗体や酵素などの蛋白質又は核酸である場合、その固定化は、生理活性物質のアミノ基、チオール基等を利用し、金属表面の官能基に共有結合させることで行うことができる。

30

## 【 0 0 5 8 】

上記のようにして生理活性物質を固定化したバイオセンサーは、当該生理活性物質と相互作用する物質の検出及び／又は測定のために使用することができる。

## 【 0 0 5 9 】

即ち、本発明によれば、生理活性物質が固定化された本発明のバイオセンサーを用いて、これに被験物質を接触させることにより、該バイオセンサーに固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び／又は測定する方法が提供される。

被験物質としては例えば、上記した生理活性物質と相互作用する物質を含む試料などを使用することができる。

40

## 【 0 0 6 0 】

本発明では、バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を非電気化学的方法により検出及び／又は測定することが好ましい。非電気化学的方法としては、表面プラズモン共鳴（SPR）測定技術、水晶発振子マイクロバランス（QCM）測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術などが挙げられる。

## 【 0 0 6 1 】

本発明の好ましい態様によれば、本発明のバイオセンサーは、例えば、透明基板上に配置される金属膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴用バイオセンサーとして用いることができる。

50

## 【 0 0 6 2 】

表面プラズモン共鳴用バイオセンサーとは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるバイオセンサーであって、該センサーより照射された光を透過及び反射する部分、並びに生理活性物質を固定する部分とを含む部材を言い、該センサーの本体に固着されるものであってもよく、また脱着可能なものであってもよい。

## 【 0 0 6 3 】

表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の出射側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

10

## 【 0 0 6 4 】

表面プラズモンが光波によって励起される現象を利用して、被測定物質の特性を分析する表面プラズモン測定装置としては、Kretschmann配置と称される系を用いるものが挙げられる（例えば特開平 6 - 1 6 7 4 4 3 号公報参照）。上記の系を用いる表面プラズモン測定装置は基本的に、例えばプリズム状に形成された誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成されて試料液などの被測定物質に接触させられる金属膜と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように種々の角度で入射させる光学系と、上記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態、つまり全反射減衰の状態を検出する光検出手段とを備えてなるものである。

20

## 【 0 0 6 5 】

本発明のバイオセンサーは、誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを前記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように、かつ、種々の入射角成分を含むようにして入射させる光学系と、前記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態を検出する光検出手段とを備えてなる表面プラズモン共鳴測定装置に用いられるための測定チップが好ましく、上記誘電体ブロックと上記金属膜とから構成され、上記誘電体ブロックが、前記光ビームの入射面、出射面および前記金属膜が形成される一面の全てを含む 1 つのブロックとして形成され、この誘電体ブロックに前記金属膜が一体化されている上記の測定チップ中に形成して、使用することができる。

30

## 【 0 0 6 6 】

なお上述のように種々の入射角を得るためには、比較的細い光ビームを入射角を変化させて上記界面に入射させてもよいし、あるいは光ビームに種々の角度で入射する成分が含まれるように、比較的太い光ビームを上記界面に収束光状態であるいは発散光状態で入射させてもよい。前者の場合は、入射した光ビームの入射角の変化に従って、反射角が変化する光ビームを、上記反射角の変化に同期して移動する小さな光検出器によって検出したり、反射角の変化方向に沿って延びるエリアセンサによって検出することができる。一方後者の場合は、種々の反射角で反射した各光ビームを全て受光できる方向に延びるエリアセンサによって検出することができる。

## 【 0 0 6 7 】

40

上記構成の表面プラズモン測定装置において、光ビームを金属膜に対して全反射角以上の特定入射角で入射させると、該金属膜に接している被測定物質中に電界分布をもつエバネッセント波が生じ、このエバネッセント波によって金属膜と被測定物質との界面に表面プラズモンが励起される。エバネッセント光の波数ベクトルが表面プラズモンの波数と等しくて波数整合が成立しているとき、両者は共鳴状態となり、光のエネルギーが表面プラズモンに移行するので、誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射した光の強度が鋭く低下する。この光強度の低下は、一般に上記光検出手段により暗線として検出される。なお上記の共鳴は、入射ビームが p 偏光のときにだけ生じる。したがって、光ビームが p 偏光で入射するように予め設定しておく必要がある。

## 【 0 0 6 8 】

50

この全反射減衰 ( A T R ) が生じる入射角、すなわち全反射減衰角 ( S P ) より表面プラズモンの波数が分かると、被測定物質の誘電率が求められる。この種の表面プラズモン測定装置においては、全反射減衰角 ( S P ) を精度良く、しかも大きなダイナミックレンジで測定することを目的として、特開平 1 1 - 3 2 6 1 9 4 号公報に示されるように、アレイ状の光検出手段を用いることが考えられている。この光検出手段は、複数の受光素子が所定方向に配設されてなり、前記界面において種々の反射角で全反射した光ビームの成分をそれぞれ異なる受光素子が受光する向きにして配設されたものである。

【 0 0 6 9 】

そしてその場合は、上記アレイ状の光検出手段の各受光素子が出力する光検出信号を、該受光素子の配設方向に関して微分する微分手段が設けられ、この微分手段が出力する微分値に基づいて全反射減衰角 ( S P ) を特定し、被測定物質の屈折率に関連する特性を求めることが多い。

10

【 0 0 7 0 】

また、全反射減衰 ( A T R ) を利用する類似の測定装置として、例えば「分光研究」第 4 7 巻 第 1 号 ( 1 9 9 8 ) の第 2 1 ~ 2 3 頁および第 2 6 ~ 2 7 頁に記載がある漏洩モード測定装置も知られている。この漏洩モード測定装置は基本的に、例えばプリズム状に形成された誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成されたクラッド層と、このクラッド層の上に形成されて、試料液に接触させられる光導波層と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを上記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックとクラッド層との界面で全反射条件が得られるように種々の角度で入射させる光学系と、上記界面で全反射した光ビームの強度を測定して導波モードの励起状態、つまり全反射減衰状態を検出する光検出手段とを備えてなるものである。

20

【 0 0 7 1 】

上記構成の漏洩モード測定装置において、光ビームを誘電体ブロックを通してクラッド層に対して全反射角以上の入射角で入射させると、このクラッド層を透過した後に光導波層においては、ある特定の波数を有する特定入射角の光のみが導波モードで伝搬するようになる。こうして導波モードが励起されると、入射光のほとんどが光導波層に取り込まれるので、上記界面で全反射する光の強度が鋭く低下する全反射減衰が生じる。そして導波光の波数は光導波層の上の被測定物質の屈折率に依存するので、全反射減衰が生じる上記特定入射角を知ることによって、被測定物質の屈折率や、それに関連する被測定物質の特性を分析することができる。

30

【 0 0 7 2 】

なおこの漏洩モード測定装置においても、全反射減衰によって反射光に生じる暗線的位置を検出するために、前述したアレイ状の光検出手段を用いることができ、またそれと併せて前述の微分手段が適用されることも多い。

【 0 0 7 3 】

また、上述した表面プラズモン測定装置や漏洩モード測定装置は、創薬研究分野等において、所望のセンシング物質に結合する特定物質を見いだすランダムスクリーニングへ使用されることがあり、この場合には前記薄膜層 ( 表面プラズモン測定装置の場合は金属膜であり、漏洩モード測定装置の場合はクラッド層および光導波層 ) 上に上記被測定物質としてセンシング物質を固定し、該センシング物質上に種々の被検体が溶媒に溶かされた試料液を添加し、所定時間が経過する毎に前述の全反射減衰角 ( S P ) の角度を測定している。

40

【 0 0 7 4 】

試料液中の被検体が、センシング物質と結合するものであれば、この結合によりセンシング物質の屈折率が時間経過に伴って変化する。したがって、所定時間経過毎に上記全反射減衰角 ( S P ) を測定し、該全反射減衰角 ( S P ) の角度に変化が生じているか否か測定することにより、被検体とセンシング物質の結合状態を測定し、その結果に基づいて被検体がセンシング物質と結合する特定物質であるか否かを判定することができる。このような特定物質とセンシング物質との組み合わせとしては、例えば抗原と抗体、あるいは

50

は抗体と抗体が挙げられる。具体的には、ウサギ抗ヒトIgG抗体をセンシング物質として薄膜層の表面に固定し、ヒトIgG抗体を特定物質として用いることができる。

【0075】

なお、被検体とセンシング物質の結合状態を測定するためには、全反射減衰角（SP）の角度そのものを必ずしも検出する必要はない。例えばセンシング物質に試料液を添加し、その後の全反射減衰角（SP）の角度変化量を測定して、その角度変化量の大小に基づいて結合状態を測定することもできる。前述したアレイ状の光検出手段と微分手段を全反射減衰を利用した測定装置に適用する場合であれば、微分値の変化量は、全反射減衰角（SP）の角度変化量を反映しているため、微分値の変化量に基づいて、センシング物質と被検体との結合状態を測定することができる（本出願人による特願2000-398309号参照）。このような全反射減衰を利用した測定方法および装置においては、底面に予め成された薄膜層上にセンシング物質が固定されたカップ状あるいはシャーレ状の測定チップに、溶媒と被検体からなる試料液を滴下供給して、上述した全反射減衰角（SP）の角度変化量の測定を行っている。

【0076】

さらに、ターンテーブル等に搭載された複数個の測定チップの測定を順次行うことにより、多数の試料についての測定を短時間で行うことができる全反射減衰を利用した測定装置が、特開2001-330560号公報に記載されている。

【0077】

本発明のバイオセンサーを表面プラズモン共鳴分析に使用する場合、上記したような各種の表面プラズモン測定装置の一部として適用することができる。

【0078】

以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0079】

実施例1（本発明のチップ作成）

以下の方法で、本発明のセンサチップを作成した。

（1）プラスチックプリズム上への金製膜

ゼオネックス（日本ゼオン社製）を射出成型して得られたプラスチックプリズム（図1）の上面に以下の方法で金薄膜を製膜した。

（1-1）金製膜

スパッタ装置の基板ホルダにプリズムを取付け、真空（ベースプレッシャー $1 \times 10^{-3}$ Pa以下）に引いてからArガスを導入し（1Pa）、基板ホルダを回転（20rpm）させながら、基板ホルダにRFパワー（0.5kW）を約9分間印加してプリズム表面をプラズマ処理（基板エッチング、逆スパッタとも呼ばれる）する。プラズマ照射後の光学ブロックの光反射面の表面粗さがRa 30nmであった。次に、Arガスを止めて真空に引き、Arガスを再び導入し（0.5Pa）、基板ホルダを回転（10～40rpm）させながら、8inchのCrターゲットにDCパワー（0.2kW）を約30秒間印加して2nmのCr薄膜を成膜する。次に、Arガスを止めて再び真空に引き、Arガスを再び導入し（0.5Pa）、基板ホルダを回転（20rpm）させながら、8inchのAuターゲットにDCパワー（1kW）を約50秒間印加して50nm程度のAu薄膜を成膜する。Auの粒子サイズは、20nm程度である。得られた試料をチップAと呼ぶ。

【0080】

（1-2）自己組織化膜製膜

・調液

SAM液は、11-Hydroxy-1-undecanethiol（同仁化学社製）0.0102g、超純水2mL、及びエタノール8mLを十分に混合して作成した。洗浄液は、超純水2mL、及びエタノール8mLを十分に混合して作成した。

【0081】

・操作

10

20

30

40

50

チップAに図2に示す形状の隔壁をセットし、各穴にSAM液を150 $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、40の振とうインキュベータで30分インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、25で16時間放置する。放置後、洗浄液で15回置換洗浄を行う。得られた試料をチップBと呼ぶ。表面を乾燥させないように注意し、隔壁を付けたまま次の操作に進む。

#### 【0082】

##### (1-3) ヒドロゲル層作成

###### ・調液

エピクロロヒドリン液は、エピクロロヒドリン(和光純薬製)500 $\mu$ l、ジエチレングリコールジメチルエーテル4.5ml、超純水3ml、及び1mol/LのNaOH2mlを十分に混合して作成した。デキストラン液は、デキストランT-500(アマシャム社製)3g、超純水9ml、及び1mol/LのNaOH1mlを十分に混合して作成した。

#### 【0083】

###### ・操作

隔壁がセットされたチップBの各穴にエピクロロヒドリン液を150 $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25の振とうインキュベータで4時間インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、放置後、エタノールで10回、超純水で5回置換洗浄を行う。洗浄水を抜いた後、各穴にデキストラン液を150 $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25の振とうインキュベータで20時間インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、60の超純水で15回置換洗浄を行う。得られた試料をチップCと呼ぶ。

#### 【0084】

##### (1-4) パターン化(カルボキシメチル化)

###### ・調液

ブromo酢酸液は、ブromo酢酸1.2g、超純水5.4ml、5mol/lのNaOH3.2mlを十分に混合して作成した。

#### 【0085】

###### ・操作

チップCに図3に示す形状の隔壁をセットし、生理活性物質を固定する側の穴にのみ、ブromo酢酸液を100 $\mu$ lずつ入れる。生理活性物質を固定しない側には、超純水を100 $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25の振とうインキュベータで16時間インキュベートする。その後、超純水で5回洗浄した後、上記と同様な操作を再度実施する。超純水で10回洗浄し、得られた試料をチップDと呼ぶ。

#### 【0086】

##### 実施例2

実施例1と同様な方法でチップBを作成し、さらに下記の様なパターンニングを行った。

#### 【0087】

###### ・調液

エピクロロヒドリン液は、エピクロロヒドリン(和光純薬製)500 $\mu$ l、ジエチレングリコールジメチルエーテル4.5ml、超純水3ml、及び1mol/lのNaOH2mlを十分に混合することによって作成した。デキストラン液は、デキストランT-500(アマシャム社製)3g、超純水9ml、及び1mol/lのNaOH1mlを十分に混合することによって作成した。カルボキシメチルデキストラン液は、カルボキシメチルデキストラン(カルボン酸導入率ユニットあたり1個)3g、超純水8ml、及び1mol/lのNaOH2mlを混合して作成した。

#### 【0088】

###### ・操作

チップBに図3の隔壁をセットし、各穴にエピクロロヒドリン液を150 $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25の振とうインキュベータで4時間インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、放置後、エタノールで10回、超純水で5回置換洗浄を行う。洗浄水を抜いた後、生理活性物質を固定化する領域の穴にはカルボキシメチルデキストラン液

を、生理活性物質を固定化しない領域の穴にはデキストラン液を150  $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25 の振とうインキュベータで20時間インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、60 の超純水で15回置換洗浄を行う。得られた試料をチップEと呼ぶ。

#### 【0089】

比較例1（比較例のチップ作成）

以下の方法で、比較例のセンサチップを作成した。

##### （1）プラスチックプリズム上への金製膜

ゼオネックス（日本ゼオン社製）を射出成型して得られたプラスチックプリズム（図1）の上面に以下の方法で金薄膜を製膜した。

#### 【0090】

##### （1-1）金製膜

スパッタ装置の基板ホルダにプリズムを取付け、真空（ベースプレッシャー $1 \times 10^{-3}$ Pa以下）に引いてからArガスを導入し（1Pa）、基板ホルダを回転（20rpm）させながら、基板ホルダにRFパワー（0.5kW）を約9分間印加してプリズム表面をプラズマ処理（基板エッチング、逆スパッタとも呼ばれる）する。プラズマ照射後の光学ブロックの光反射面の表面粗さがRa 30nmであった。次に、Arガスを止めて真空に引き、Arガスを再び導入し（0.5Pa）、基板ホルダを回転（10～40rpm）させながら、8inchのCrターゲットにDCパワー（0.2kW）を約30秒間印加して2nmのCr薄膜を成膜する。次に、Arガスを止めて再び真空に引き、Arガスを再び導入し（0.5Pa）、基板ホルダを回転（20rpm）させながら、8inchのAuターゲットにDCパワー（1kW）を約50秒間印加して50nm程度のAu薄膜を成膜する。Auの粒子サイズは、20nm程度である。得られた試料をチップA2と呼ぶ。

#### 【0091】

##### （1-2）自己組織化膜製膜

###### ・調液

SAM液は、11-Hydroxy-1-undecanethiol（同仁化学社製）0.0102g、超純水2mL、及びエタノール8mLを十分に混合して作成した。洗浄液は、超純水2mL、エタノール8mLを十分に混合して作成した。

#### 【0092】

###### ・操作

チップAに図2に示す形状の隔壁をセットし、各穴にSAM液を150  $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、40 の振とうインキュベータで30分インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、25 で16時間放置する。放置後、洗浄液で15回置換洗浄を行う。得られた試料をチップB2と呼ぶ。表面を乾燥させないように注意し、隔壁を付けたまま次の操作に進む。

#### 【0093】

##### （1-3）ヒドロゲル層作成

###### ・調液

エピクロロヒドリン液は、エピクロロヒドリン（和光純薬製）500  $\mu$ l、ジエチレングリコールジメチルエーテル4.5mL、超純水3mL、及び1mol/lのNaOH 2mLを十分に混合して作成した。デキストラン液は、デキストランT-500（アマシャム社製）3g、超純水9mL、1mol/lのNaOH 1mLを十分に混合して作成した。

#### 【0094】

###### ・操作

隔壁がセットされたチップBの各穴にエピクロロヒドリン液を150  $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25 の振とうインキュベータで4時間インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、放置後、エタノールで10回、超純水で5回置換洗浄を行う。洗浄水を抜いた後、各穴にデキストラン液を150  $\mu$ lずつ入れる。蒸発を防止して、25 の振とうインキュベータで20時間インキュベートする。その後、サンプルを取り出し、60 の超純水で15回置換洗浄を行う。得られた試料をチップC2と呼ぶ。表面を乾燥させないよ

うに注意し、隔壁を付けたまま次の操作に進む。

【0095】

(1-4) カルボキシメチル化

・調液

ブロモ酢酸液は、ブロモ酢酸 1.2 g、超純水 5.4 mL、5 mol/l の NaOH 3.2 mL を十分に混合して作成した。

【0096】

・操作

隔壁がセットされたチップC2の各穴に、ブロモ酢酸液を100 µl ずつ入れる。生理活性物質を固定しない側には、超純水を150 µl ずつ入れる。蒸発を防止して、25 の振とうインキュベータで16時間インキュベートする。その後、超純水で5回洗浄した後、上記と同様な操作を再度実施する。超純水で10回洗浄し、得られた試料をチップD2と呼ぶ。

【0097】

(1-5) パターン化

・調液

活性化液（使用直前に0.1M NHS溶液と0.4M EDC溶液を1:1（体積比）で混合する。）  
0.1M NHS溶液：1.16gのNHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）を超純水で溶解し100mLにする。

0.4M EDC溶液：7.7gのEDC（塩酸1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）を超純水で溶解し100mLにする。

使用直前に0.1M NHS溶液と0.4M EDC溶液を1:1（体積比）で混合する。

【0098】

1Mエタノールアミン液：エタノールアミン1塩酸塩 9.76gを超純水 90mlに溶解し、1NのNaOHにてpH8.5に調整後、100mlになる様に超純水を加える。

【0099】

・操作

チップD2に図3に示す形状の隔壁をセットし、生理活性物質を固定しない側の穴にのみ、活性化液を100 µl ずつ入れる。生理活性物質を固定する側には、超純水を100 µl ずつ入れる。蒸発を防止して、25 の振とうインキュベータで30分間インキュベートする。超純水で2回洗浄した後、生理活性物質を固定しない側の穴にのみ、エタノールアミン液を100 µl ずつ入れる。生理活性物質を固定する側には、超純水を100 µl ずつ入れる。超純水で5回洗浄し、得られたチップをチップFとする。

【0100】

試験例1（リガンド固定量測定）

上記処理を施したチップD（本発明）、チップE（本発明）、チップF（比較例）について以下の方法でリガンド蛋白を固定し、さらにアナライトを流して結合量を評価した。蛋白固定量測定は図4に示すSPR装置を用いた。測定には、図1の部品41のタフセレン製の流路を用いた。

(1) リガンド溶液の調製：CA(Carbonic Anhydrase)（シグマ社製）0.5mgを酢酸バッファ（pH5.5）1mlに溶解した。

(2) 活性化液の調整：下記溶液を使用直前に体積比1:1で混合した。

0.1M NHS溶液、0.4M EDC溶液（液処方は、比較例1を参照）

(3) ブロッキング液：1Mエタノールアミン液(pH8.5)（液処方は、比較例1を参照）

【0101】

(4) アナライト測定用バッファ：

×10PBS（pH7.4）（和光純薬製）20ml、DMSO10ml、及び超純水170mlを十分に混合して作成した。

【0102】

(5) アナライト液

Chlorothiazide（シグマ社製）2.95mgをDMSO10mlに溶解して（A）液とした。（A

10

20

30

40

50



液 10  $\mu$ l に 9.99 ml のアナライト測定用バッファーを加えた。

#### 【0103】

チップを装置にセットし、HBS-EPバッファーで流路を満たす。なお、HBS-EPバッファーの組成は、H E P E S (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonicAcid) 0.01mol/l (pH7.4)、NaCl 0.15mol/l、EDTA 0.003mol/l、Surfactant P20 0.005質量%である。測定は、リガンド固定化部 (Act)、リガンド非固定部 (Ref) を同時に行った。その状態で測定を開始し、測定開始後 30 秒後の信号値を 0 とする。測定を続けながら、活性化液 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、15 分放置する。続けて、HBS-EPバッファー 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、そのあと、リガンド溶液 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、15 分放置する。続けて、HBS-EPバッファー 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、そのあと、ブロッキング液 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、15 分放置する。続けて、HBS-EPバッファー 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、続けて、10 mM NaOH 溶液 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入することを 2 回連続で行い、さらに、HBS-EPに置換して 30 秒放置し、そのときの信号値を固定量とした。

#### 【0104】

チップを装置にセットしたまま、アナライトの測定を行った。測定は、リガンド固定化部 (Act)、リガンド非固定部 (Ref) を同時に行った。流路をアナライト測定用バッファーで満たし、その状態で測定を開始し、測定開始後 60 秒後の信号値を 0 とする。測定を続けながら、アナライト液 100  $\mu$ l を流路に 1 秒間で注入し、3 分放置する。3 分後の信号値を測定した。バルク効果を除くために、Act-Ref の値を結合量とした。結果を表 1 に示す。

#### 【0105】

#### 【表 1】

表1.

	リガンド固定量		アナライト結合量	備考
	Act	Ref	Act-Ref	
チップD	7150	10<	60	本発明
チップE	6800	10<	55	本発明
チップF	7200	1050	35	比較例

#### 【0106】

カルボン酸がRef部に存在すると、ブロッキング処理してもリガンドが固定してしまうという弊害が残る。そのため、アナライトの結合量も少なくなってしまう。本発明の方法により、性能の良いRefが作成できる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0107】

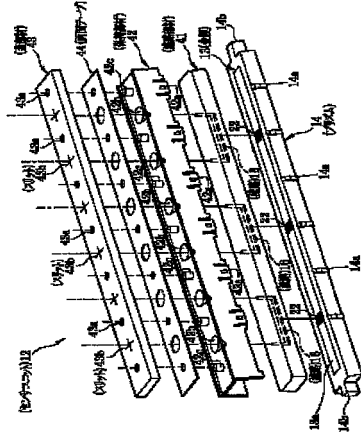
【図 1】図 1 は、実施例で使用したプラスチックプリズムを示す。

【図 2】図 2 は、実施例で使用した隔壁を示す。

【図 3】図 3 は、実施例でパターン化のために使用した隔壁を示す。

【図 4】図 4 は、実施例で使用した SPR システムを示す。

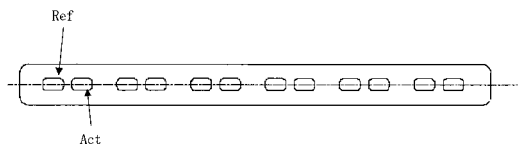
【図 1】



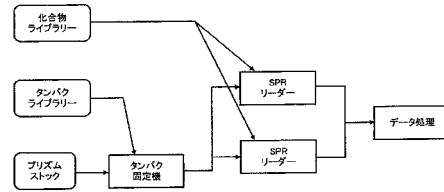
【図 2】



【図 3】



【図 4】



---

フロントページの続き

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開2002-323497(JP,A)  
米国特許第06413587(US,B1)  
特開2004-125625(JP,A)  
特開2004-264027(JP,A)  
特開2000-146976(JP,A)  
特許第2833778(JP,B2)  
特開2003-057173(JP,A)  
特開2004-279204(JP,A)  
特開2000-039401(JP,A)  
特表2002-520620(JP,A)  
特表2004-523749(JP,A)  
特表2005-528583(JP,A)  
特表2003-524178(JP,A)  
Anal Chem, 2001年, Vol.73, No.1, Page.1-7  
Annu. Rev. Phys. Chem., 2000年, 51巻, 41頁~63頁  
Anal. Chem., 2001年, 73巻, 1頁~7頁
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N33/48~33/98  
JSTPlus(JDreamII)