

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4407271号
(P4407271)

(45) 発行日 平成22年2月3日(2010.2.3)

(24) 登録日 平成21年11月20日(2009.11.20)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 35/08 (2006.01)

G O 1 N 35/08 A

G O 1 N 21/03 (2006.01)

G O 1 N 21/03 Z

G O 1 N 37/00 (2006.01)

G O 1 N 37/00 1 O 1

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 F

請求項の数 14 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-421957 (P2003-421957)
 (22) 出願日 平成15年12月19日(2003.12.19)
 (65) 公開番号 特開2005-181095 (P2005-181095A)
 (43) 公開日 平成17年7月7日(2005.7.7)
 審査請求日 平成18年5月25日(2006.5.25)

(73) 特許権者 000005108
 株式会社日立製作所
 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
 (74) 代理人 100100310
 弁理士 井上 学
 (72) 発明者 竹中 啓
 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株
 式会社日立製作所基礎研究所内
 (72) 発明者 藤村 徹
 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株
 式会社日立製作所基礎研究所内
 (72) 発明者 後藤 康
 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株
 式会社日立製作所基礎研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チップ、反応分析装置、反応分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の基板と、

第2の基板と、

前記第1の基板と前記第2の基板との間に設けられ、疎水性及び通気性を有し、前記第1の基板上に所定の流路を形成する、中間部材とを有し、

前記中間部材と前記第2の基板との間の少なくとも一部に、前記流路内の気泡を前記流路外へ脱気可能な隙間を有することを特徴とするチップ。

【請求項2】

第1の基板と、

第2の基板と、

前記第1の基板と前記第2の基板との間に設けられ、疎水性及び通気性を有し、前記第1の基板上に所定の流路を形成する、中間部材とを有し、

前記中間部材と前記第2の基板との間で隙間が保たれていることを特徴とするチップ。

【請求項3】

請求項1又は2において、前記第1の基板の表面であって前記所定の流路の少なくとも一部に面して薄膜を設置し、前記薄膜の表面の少なくとも一部が親水性であることを特徴とするチップ。

【請求項4】

請求項3において、前記中間部材は、粒径が10nm程度から1mm程度の範囲の撥水

性粒子からなることことを特徴とするチップ。

【請求項 5】

請求項 3 において、前記中間部材は、フッ素樹脂微粒子、シリコン樹脂微粒子のいずれかからなることことを特徴とするチップ。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 において、第 2 の基板は、液体流入口と液体流出口を具備することことを特徴とするチップ。

【請求項 7】

請求項 6 において、少なくとも前記流路における溶液の流れる方向と垂直な方向で、前記流路の長さが、前記液体流入口の長さ及び前記液体流出口の長さよりも大きいことことを特徴とするチップ。

10

【請求項 8】

請求項 6 において、前記第 2 の基板は、前記第 1 の基板に向かい合う面の少なくとも一部が疎水性を有することことを特徴とするチップ。

【請求項 9】

第 1 の基板と、液体流入口と液体流出口を具備する第 2 の基板と、前記第 1 の基板と前記第 2 の基板との間に所定の流路を形成してかつ疎水性及び通気性を有する中間部材とを有し、前記中間部材と前記第 2 の基板との間の少なくとも一部に、前記流路内の気泡を前記流路外へ脱気可能な隙間を有するチップを、載せるための台と、

前記液体流入口へ液体もしくは気体を導入するための導入管と、

20

前記液体流出口から液体もしくは気体を導出するための導出管と、

前記流路に光を照射するための光学部と、

前記流路に固定した特定分子と前記流路に導入される試料に含まれる物質との反応を検出するための検出部と、

前記検出部の検出結果を分析する分析部とを有することことを特徴とする反応分析装置。

【請求項 10】

第 1 の基板と、液体流入口と液体流出口を具備する第 2 の基板と、前記第 1 の基板と前記第 2 の基板との間に所定の流路を形成してかつ疎水性及び通気性を有する中間部材とを有し、前記中間部材と前記第 2 の基板との間で隙間が保たれているチップを、載せるための台と、

30

前記液体流入口へ液体もしくは気体を導入するための導入管と、

前記液体流出口から液体もしくは気体を導出するための導出管と、

前記流路に光を照射するための光学部と、

前記流路に固定した特定分子と前記流路に導入される試料に含まれる物質との反応を検出するための検出部と、

前記検出部の検出結果を分析する分析部とを有することことを特徴とする反応分析装置。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 において、前記第 1 の基板上であって少なくとも一部が前記光学部に面して屈折率が 1.8 以上 3.0 以下の薄膜を有することことを特徴とする反応分析装置。

【請求項 12】

40

請求項 9 又は 10 において、前記第 1 の基板は、前記第 2 の基板と向き合う表面に金属薄膜を、前記第 2 の基板と向き合う面と対向する表面にはプリズムを各々有し、前記光学部は前記プリズムに前記光を照射し、前記検出部は前記プリズムを介して前記金属薄膜からの反射光を検出することことを特徴とする反応分析装置。

【請求項 13】

第 1 の基板と、液体流入口と液体流出口を具備する第 2 の基板と、前記第 1 の基板と前記第 2 の基板との間に、所定の流路を形成してかつ疎水性及び通気性を有する中間部材とを、前記中間部材と前記第 2 の基板とのあいだの少なくとも一部に、前記流路内の気泡を前記流路外へ脱気可能な隙間を有して容器に設置する工程と、

第 1 の液体と第 1 の気体層と試料と第 2 の気体層と第 2 の液体とを順に前記容器に導入

50

させる工程と、

前記流路の少なくとも一部に固定された特定分子と前記試料に含まれる物質との反応を行わせる工程と、

前記容器に光を照射することによって前記反応の結果を検出する工程とを有することを特徴とする反応分析方法。

【請求項 1 4】

第 1 の基板と、液体流入口と液体流出口を具備する第 2 の基板と、前記第 1 の基板と前記第 2 の基板との間に、所定の流路を形成してかつ疎水性及び通気性を有する中間部材とを、前記中間部材と前記第 2 の基板との間で隙間を保つように容器に設置する工程と、

第 1 の液体と第 1 の気体層と試料と第 2 の気体層と第 2 の液体とを順に前記容器に導入させる工程と、

前記流路の少なくとも一部に固定された特定分子と前記試料に含まれる物質との反応を行わせる工程と、

前記容器に光を照射することによって前記反応の結果を検出する工程とを有することを特徴とする反応分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中の特定分子に係る反応分析、それに用いるチップに関する。

【背景技術】

【0002】

2001年にヒトゲノムの解読がほぼ完了したことを契機に、バイオ分野の研究の重点はゲノムから、生物個体の持つ遺伝情報がいつ、どこで、どのような状況で発現し、蛋白質が作られていくか、そして、作られた蛋白質がその生物個体の細胞の中で、他の蛋白質と共同して、どのように機能していくかを調べるプロテオームの研究に移りつつある。ほとんどの蛋白質の機能は、他の生体分子との相互作用によるため、プロテオームの研究において、重要なひとつが、蛋白質と蛋白質、もしくは他の生体分子の相互作用である。さらに、生体分子の相互作用を調べる上では、平衡状態においての生体分子間の結合の強さを表す平衡定数と、平衡に達するまで速さをあらわす速度定数を知る必要がある。これらの生体分子の平衡定数や速度定数で表される相互作用を調べる機器は、たとえば表面プラズモン共鳴現象利用したバイオセンサがある。他には、二面偏波式干渉計を利用したバイオセンサがある。

【0003】

これらのセンサにおいては、同時測定可能なセンサの数は、4つ程度とされている。目的生体分子の相互作用を効率よく解析するために、より多くのセンサを同時に測定できる装置が求められている。

多センサの同時測定においては、センサの小型化や高密度化、必要検体量の減少、測定時間の短縮、装置の小型化など、さらには、センサや流路系の微細化が重要になる。計測機器の微小化の研究は近年盛んに行われており、この研究分野は μ TAS (Micro Total Analysis System) や Lab-On-Tip と称されている。

【0004】

μ TASの分野では、特に、流体を扱うマイクロフローセル、マイクロバルブなどをマイクロ流体デバイスという。マイクロ流体デバイスと多センサを組み合わせたものとして、特許文献1に示されるマイクロチップや、特許文献2に示される集積化反応装置がある。特許文献1に示されるマイクロチップは、生体高分子をスポットもしくはストリップ状に固定した基板と、微細流路となる凹部を持つ基板を接合することで構成している。特許文献2に示される集積化反応装置は、ガラスやシリコンに溝を刻み、キャピラリーを形成したものの表面に、リソグラフィ技術を用いてDNAを結合している。

【0005】

10

20

30

40

50

【特許文献1】特開2002-243734号公報
【0006】

【特許文献2】特開2002-357607号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

マイクロ流体デバイスは、内部容量が小さいため、微小液量の制御が容易、微小空間での反応の高速化、デバイスの量産化が可能など優れている点が多い。しかし、その大きさ（幅および深さが数ミクロンから数百ミクロン）ゆえの課題がある。

特許文献3に記載されている分析チップは、横断面がスリット形状の微小流路の、横断面の長辺を形成する面の一方に、流動する液体と親和性の低い部分と高い部分を交互に設けることで、流動する液体の先端を流路の幅方向に揃え、微小流路内に初めて液体を送液するときに、液体が流路内にもともと入っている気泡を巻き込むことを防止する。

【0008】

特許文献4に記載の加熱機構を有する微小ケミカルデバイスは、毛細管流路の一部に加熱部をもうけ、加熱部にて、表面が疎水性のエア抜き路を分岐させることにより、エアを逃がしている。

上記2件の文献では流路への気泡の混入という課題に着目しているが、これらに記載された構成によっても気泡の混入の可能性は否定できない。

【0009】

【特許文献3】特開2003-302399号公報

【特許文献4】特開2002-102681号公報

【課題を解決するための手段】

【0010】

マイクロ流体デバイスに関しては、以下のような課題が考えられる。まず、マイクロ領域では表面張力が支配的となるため、マイクロ流路に留まった気泡を取り除くことは難しく、マイクロ流体デバイスを作製するにあたり、気泡をマイクロ流路内に入れない構造、マイクロ流路内で発生させない構造、マイクロ流路内から取り除く構造が求められる。また、微小な流路においては、液体の流動中に、作業者の操作や水圧の減少などの原因で液体中に混入もしくは発生した気泡を取り除くことが望ましい。また、エア抜きのための分岐路を設けた場合でも、分岐点以降の毛細管流路内に初めて液体を送液するときに、液体が流路内にもともと入っている気泡を巻き込むことを防止することや、液体の送液時に、液体に混入もしくは発生した気泡の除去が必要となる。さらに、毛細管流路を形成した後にエア抜き路を構成するため、作製工程が複雑となり、作製のためのコストが生じるとともに、毛細管流路の形状を限定される。

【0011】

もうひとつの問題として、マイクロ流路形成の際の接着・溶着の問題がある。自己接着性があるPDMS以外の材質、特にガラス、シリコン、またはアクリルなどの樹脂を用いてマイクロ流路を形成する場合、溝を形成した基板と他の平板を接着剤で接着するか、もしくは溶着する必要がある。接着剤の使用は、接着剤に含まれる物質が測定物質に影響を与える可能性があり、また、接着剤がマイクロ流路にはみ出すことで、光学測定を困難にする可能性もある。レーザーなどを用いて溶着する場合には、材質が限定され、さらに、接着面付近が溶着により乱れる。さらに、根本的な問題として、流路内の特定の箇所に生体分子を結合し、生体分子を用いたマイクロ流路の場合、接着・溶着の前に生体分子を結合する必要がある。装置使用者の目的に応じて、結合する生体分子を選択する場合、装置使用者が生体分子の結合を行うことが多い。その場合、上記理由により、装置使用者は接着・溶着のための技術および設備を要することになり、取扱いが困難になる可能性がある。

【0012】

そこで、上記の課題を解決するマイクロ流路を備えたチップ、および化学反応装置、お

10

20

30

40

50

よび化学反応方法を提供することを目的とした。

本発明に係るチップでは、第1の基板と、第1の基板上に所定の流路を形成する、疎水性及び通気性を有する中間部材とを有することを特徴とする。通気性とは溶液が流れる際に空気を通り抜けさせる性質をいい、疎水性とは水の接触角が90°以上になることをいう。ここで、第1の基板の表面の少なくとも一部に薄膜を設置し、薄膜の表面は少なくとも一部が親水性であってもよい。また、第1の基板は、シリコン、ガラス、石英、PMMA、酸化チタン、酸化シリコン、酸化ジルコニウム、酸化ハフニウム、酸化タンタルのいずれかを材料としてもよい。また、薄膜は、窒化シリコン、シリコン、ガラス、石英、PMMA、酸化チタン、酸化シリコン、酸化ジルコニウム、酸化ハフニウム、酸化タンタルのいずれかを材料としてもよい。また、液体流入口と液体流出口を具備する第2の基板をさらに有しても良い。

10

【0013】

また本発明に係る装置では、第1の基板と、液体流入口と液体流出口を具備する第2の基板と、第1の基板と第2の基板との間に所定の流路を形成して疎水性及び通気性を有する中間部材とを有するチップを保持するためのセルと、液体流入口へ液体もしくは気体を導入するための導入管と、液体流出口から液体もしくは気体を導出するための導出管と、流路に光を照射するための光学部と、流路に固定した特定分子と流路に導入する試料に含まれる物質との反応を検出するための検出部と、検出部の検出結果を分析する分析部とを有することを特徴とする。ここで、セルは蓋部材と台部材とを有し、チップは蓋部材と台部材との間の領域に保持されてもよい。また、光学部は光ファイバを有し、蓋部材は光ファイバを挿入する孔を有しても良い。また、第1の基板は、第2の基板と向き合う面に金属薄膜を、第2の基板と向き合う面と対向する表面にプリズムを各々有し、光学部はプリズムに光を照射し、検出部はプリズムを介して金属薄膜からの反射光を検出してもよい。

20

【0014】

本発明に係る方法では、第1の基板と、液体流入口と液体流出口を具備する第2の基板と、第1の基板と第2の基板との間に、所定の流路を形成して疎水性及び通気性を有する中間部材とを容器に設置する工程と、第1の液体と第1の気体層と試料と第2の気体層と第2の液体とを順に容器に導入させる工程と、流路の少なくとも一部に固定された特定分子と試料に含まれる物質との反応を行わせる工程と、容器に光を照射することによって反応の結果を検出する工程とを有することを特徴とする。ここで、検出する工程では特定分子が固定された面における光吸収度、光散乱度、光反射度、蛍光・発光度のいずれかを検出してもよい。

30

【0015】

これらの構成により、液体導入時において、流路内にもともと入っている気体や、液体流動時において、液体内に混入もしくは発生した気泡は、中間部材とその他の部材との境界面、もしくは中間部材そのものより抜けることとなる。そのため、気泡が流路内に留まることを防ぐことができる。また、中間部材で構成する流路そのものが通気性をもっているため、脱気のための機構、工程が不要となる。そのため、低コストで自由度の高い設計からなる流路構造を製作することができる。

さらに、これらの構成により、中間部材と第2の基板との間で接着および溶着をせずに、流路を構成することができる。そのため、操作性の高い脱気機能を実現できる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下に本発明の実施の例を示す。

【実施例1】

【0017】

図1～図21を参照して、本発明によるチップを用いた反応分析装置、ここでは特に生体分子相互作用解析装置の実施例を説明する。本生体分子相互作用解析装置を用い、生体分子間の相互作用を解析する例について説明する。

【0018】

50

図 1 は、本生体分子相互作用解析装置の鳥瞰図である。生体分子相互作用解析装置 1 は、当装置を制御し、かつ当装置が検出した信号を解析するシステム装置 2 と連結し、システム装置 2 は、生体分子相互作用解析装置 1 の作業内容を出力表示するモニタ 3 と連結している。

【 0 0 1 9 】

図 2 は、生体分子相互作用解析装置 1 の全体構成図である。生体分子相互作用解析装置 1 は、目的とする生体分子と特異的に結合するプローブ分子を検出領域に固定したチップ 2 0 と、試薬および検体をチップ 2 0 に供給するための流路、およびチップ 2 0 から排出するための流路を備えるフローセル 1 0 と、フローセル 1 0 に、使用する試薬および検体を送液するための送液部 3 0 と、フローセル 1 0 より排出した試薬および検体を保管するための廃液容器 5 0 と、チップ 2 0 上のプローブ分子に特異的に結合した目的生体分子を、光学的に検出するための検出部 4 0 と、送液部 3 0 の動作、および検出部 4 0 より得た信号を解析するシステム装置 2 と作業内容を出力するモニタ 3 で構成している。

【 0 0 2 0 】

送液部 3 0 は、使用する試薬および検体に応じて、それぞれ試薬および検体を送液するための、緩衝液ポンプ 3 0 1、検体ポンプ 3 0 2、かい離液ポンプ 3 0 3、試薬および検体を保管するための、緩衝液リザーバ 3 0 4、検体リザーバ 3 0 5、かい離液リザーバ 3 0 6 があり、それぞれのポンプとリザーバとフローセルの間の流路を切り替えるための緩衝液バルブ 3 0 7、検体バルブ 3 0 8、かい離液バルブ 3 0 9、フローセルバルブ 3 1 0 がある。検体は検査対象物のことで、目的生体分子の含有物か、もしくは、目的生体分子を含有する可能性のある試料の溶液を主に指す。かい離液は、チップ 2 0 上のプローブに結合した目的生体分子をかい離し、チップ 2 0 を使用前の状況に戻す試薬である。緩衝液とは広義では液体であり、たとえば P B S バッファーを使用する。かい離液とは広義では液体であり、たとえば 2 0 m M H C l を使用する。

【 0 0 2 1 】

検出部 4 0 は、白色光源 4 1 と、目的生体分子の結合の様子を示すデータとしてチップ 2 0 から得られる出力光をスペクトル分解する分光器 4 2、およびスペクトルを検出する検出器 4 3 で構成する。

図 3 は、チップ 2 0 の鳥瞰図である。チップ 2 0 は、溝 2 1 を一の面に有し、溝 2 1 の表面上に目的生体分子を検出するための検出領域 2 2、2 2'を持つ。ここで、目的生体分子を結合するプローブを表面につけた検出領域 2 2 と、つけない検出領域 2 2'がある。プローブをつけない検出領域 2 2'はリファレンスとして使用する。検出領域 2 2 に対する検出結果は、目的生体分子とプローブの結合を由来とするもの以外に、光源の強度変化等の装置の安定性や目的生体分子の検出領域への非特異的吸着等の影響も反映される。そこで、検出結果から目的生体分子とプローブの結合以外の影響を取り除くために、プローブをつけた検出領域 2 2 の検出結果からプローブをつけない検出領域 2 2'の検出結果を差し引くことで、検出領域表面への非特異的結合の影響を取り除き、目的生体分子とプローブの正確な相互作用を解析することができる。

【 0 0 2 2 】

図 4 は、チップ 2 0 の断面図である。チップ 2 0 は基板 2 0 1 と、親水性の薄膜層 2 0 2 と、撥水性粒子層 2 0 3 である中間層とで構成する。溝 2 1 は、親水性表面の底、撥水性粒子の壁面で構成する。チップ 2 0 の溝 2 1 を持つ面のうち、親水性薄膜層 2 0 2 の面は親水性、撥水性粒子層 2 0 3 の面は撥水性になる。すなわち、撥水性粒子層 2 0 3 の面は疎水性でもある。たとえば基板 2 0 1 にはシリコン、薄膜層 2 0 2 は窒化シリコン、撥水性粒子層 2 0 3 にはフッ素樹脂微粒子を使用する。基板 2 0 1 の他の材料としては、ガラス、石英、P M M A (ポリメタクリル酸メチル(ポリメチルメタクリレート、アクリル樹脂))、酸化チタン、酸化シリコン、酸化ジルコニウム、酸化ハフニウム、酸化タンタルが挙げられる。親水性薄膜層 2 0 2 の他の材料としては、ガラス、石英、酸化チタン、酸化シリコン、酸化ジルコニウム、酸化ハフニウム、酸化タンタルが挙げられる。撥水性粒子層 2 0 3 は、粒径 1 0 n m 程度から 1 m m 程度の範囲の撥水性粒子が好ましく、他

10

20

30

40

50

の材料としては、シリコーン樹脂微粒子、シリコン粉末が挙げられる。ここでの撥水性（もしくは疎水性）とは水の接触角が 90° 以上になることをいい、親水性とは水の接触角が 90° 未満になることをいう。目的や使用する基板201、親水性薄膜層202、撥水性粒子層203の組み合わせで材質を選択する。

【0023】

図5は、フローセル10及びその内部の構成図である。フローセル10は、上ふた11、光学窓12である上部基板、台13で構成する。使用時には上ふた11、光学窓12、チップ20、台13の順に重ねて使用する。光学窓12である上部基板は、上記溝と向い合う領域に流路を形成する。このことから、チップ構成の一要素ということもできる。

上ふた11は、光学窓12およびチップ20を設置するための凹部110、光学窓12を介しフローセル10に試薬および検体を供給するための送入口111、光学窓12を介しフローセル10より試薬および検体を排出する排出口112、送液部30とフローセル10を連結する流路である送入流路113、フローセル10と廃液容器50を連結する流路である排出流路114、光学検出のための観測孔115を備える。ここで、観測孔115は検出領域に対する検出に光ファイバを用いる際に、後述するように、光ファイバの固定と、光ファイバへ外部から入る光の遮断との役割を持つ。ただし、必要に応じて観測孔を設けない構成としてもよい。

【0024】

光学窓12は、試薬および検体をフローセルへ供給するための貫通穴である送入孔121、および試薬および検体をフローセルから排出するための貫通穴である排出孔122を備え、チップ20に向かい合う面の少なくとも一部は撥水性（疎水性）をもつ。面の撥水処理では、検出波長領域における透過性が高く、散乱の小さい材質のものの使用が好ましく、たとえばフッ素樹脂、もしくはシリコーン樹脂のコーティングや、それらのフィルムを接着することで行う。光学窓の材質には、検出波長領域における透過性が高く、散乱の小さいものが好ましく、例えばガラス、石英、PMMAが挙げられる。

【0025】

図6は、フローセル10の組図の断面図である。フローセル10は、上ふた11、光学窓12、台13で構成する。使用時には上ふた11、光学窓12、チップ20、台13の順に重ねて使用する。チップ20は、溝21を持つ側の面の溝以外の部分のうち少なくとも一部が光学窓12に接触するように設置する。上ふた11の凹部110に光学窓12およびチップ20を設置し、台13と上ふた11を固定する。これにより、光学窓12およびチップ20を上ふた11に押し付けられた状態で、固定される。送入口111、送入孔121および溝21の一端、排出口112、排出孔122および溝21のもう一端、検出領域22と観測孔115が重なる。溝21と光学窓12が向かい合う領域に、流路が構成される。送液部30よりフローセル10に送る試薬および検体は送入流路113、送入口111、送入孔121、溝21、排出孔122、排出口112、排出流路114を介し、廃液容器に流動する。検出領域22は光学窓12を間に挟み、観測孔115から観測される。光学窓12は、検出波長領域における透過性が高く、散乱が無い場合、光学窓12を間に挟んでも、光学的に問題は無い。

【0026】

図7は、フローセル10内に設置したチップ20と光学窓12の断面図で、試薬もしくは検体などの液体23が、チップ20の溝21と光学窓12の向かい合った領域にできる流路を流動する時の様子を現したものである。チップ20と光学窓12の接触面は、上ふた11と台13による圧力でチップ20の表面の一部を押し付けているだけで、接着剤による接着や、熱や超音波などによる溶着はされていない。しかし、光学窓12のチップ20に向かい合う面とチップ20は、溝21を持つ側の面の溝以外の部分の少なくとも一部は撥水性（疎水性）の表面のため、溝21を流動する試薬もしくは検体などの液体23の圧力が、境界面24における表面張力と外気圧より小さい限り、試薬もしくは検体などの液体23は溝12から漏れずに流動する。また、流動の過程において気泡が混入した場合においても、気泡は溝21の撥水性粒子203により構成された壁もしくは、チップ20

と光学窓 12 の間に存在する隙間に逃げ、検出領域まで流動しないため、気泡の発生による測定 of 妨害を防止することができる。このような機構により、撥水性粒子層は通気性、すなわち溶液が流れる際に空気を通り抜けさせる性質を特に有する。

【0027】

また、撥水性粒子 203 の代用として、撥水性の物質を用いて溝 21 を構成したチップ 20 を使用した場合、チップ 20 と光学窓 21 の間の隙間を保つことにより、気泡はこの隙間へ逃げるため、同じく気泡の混入による測定妨害を防止することができる。

図 8 は、光学窓 12 の送入孔 121 の大きさと、送入孔 121 付近の溝 25 の大きさの関係を示すものである。少なくとも溝における溶液などが流れる方向と垂直な方向において、送入孔 121 付近の溝 25 の長さを、送入孔 121 の長さより大きくする。このこと

10

対比した場合に、領域 123 で示した分だけ位置的余裕を設けることができる。すなわち、送入孔 121 付近の溝 25 と送入孔 121 の大きさの差 123 程度のずれが生じて、光学窓 12 と溝 25 はその間に流路を構成することができる。そのため、チップ 20 をフローセル 10 に組み込む際の位置あわせが容易になり、また、位置あわせの精度を上げるために必要になるフローセル 10 の加工コストを低減することができる。排出孔 122 と、排出孔 122 付近の溝の大きさについても、同様である。

【0028】

図 9 は、検出部 40 とフローセル 10 の一部を組み合わせた構成図である。検出部 40 は、白色光源 41、入射光用光ファイバ 207、干渉光用光ファイバ 208、分光器 42、検出器 43 で構成する。入射光用光ファイバ 207 と干渉光用光ファイバ 208 の一端は、フローセル 10 の上ふた 11 の観測孔 115 に固定する。このとき、光学窓 12 の反射光の影響を少なくするために、それぞれの光ファイバの一端は光学窓 12 にできる限り近づけることが好ましい。屈折率が 1.8 以上、3.0 以下の高屈折率の光学特性を持つ薄膜、たとえば屈折率約 2.3 の窒化シリコンをチップ 20 の薄膜層 202 に、適当な反射率の物質、たとえば、シリコン基板をチップ 20 の基板 201 に適用する。白色光源 41 の白色光は、入射光用光ファイバ 207 を介してチップ 20 に入射し、薄膜層 202 からの反射光 209 と基板 201 からの反射光 210 の干渉光が干渉光用光ファイバ 208 を介して、分光器 42 に入射する。検出器 43 は分光器 42 がスペクトルに分解した干渉光を検出する。

20

30

【0029】

反射率の高い基板 201 と高屈折率の薄膜層 202 を用い、目的生体分子に特異的に結合するプローブを薄膜層 202 の表面に結合することで、目的生体分子を検出する機構することができる。生体分子の屈折率は約 1.5 であるため、目的生体分子がプローブに結合することで、薄膜層 202 の見かけの屈折率が上がるため、干渉光のスペクトルは、長波長側にずれる。また、目的生体分子がプローブからかい離すると、見かけの屈折率が元に戻るため、干渉光のスペクトルも元に戻る。スペクトルのピーク値を測定中にシステム装置 2 (図 2) で解析し、その時間変化を計測することで目的生体分子の結合の様子を測定することができる。

【0030】

40

図 10 は、送液部 30 の動作説明図である。図 10 を用いて、緩衝液、検体、かい離液の順番で送液する工程を説明する。緩衝液用ポンプ 301、検体用ポンプ 302、かい離液用ポンプ 303 はシリンジポンプで、吸引を下向きの矢印、送液を上向きの矢印で示す。送液部 30 の各ポンプおよびバルブの動作はシステム装置 2 (図 2) で制御する。

図 10 (a) は、緩衝液用ポンプ 301 がエアギャップ用の緩衝液 - 検体間設置用空気 315 を吸引するときの送液部 30 の様子を示す。このとき緩衝液用バルブ 307 は、緩衝液用ポンプ 301 と緩衝液用バルブ連結空気孔 311 を連結する。エアギャップは種類の異なる液体を連続して送液するとき、種類の異なる液体間に挟む空気層で、液体成分の拡散により二つの液体が混合することを防ぐ。この空気層とは、条件に応じて空気以外の気体の層としてもよい。

50

図10(b)は、緩衝液用ポンプ301が緩衝液316を吸引するときの送液部30の様子を示す。このとき緩衝液用バルブ307は、緩衝液用ポンプ301と緩衝液用リザーバ304を連結する。

【0031】

図10(c)は、緩衝液用ポンプ301が緩衝液と緩衝液-検体間設置用空気をフローセル10(図2)に送液し、検体用ポンプ302が、検体-かい離液間設置用空気317を吸引する様子を示す。緩衝液用ポンプ301は緩衝液、緩衝液-検体間設置用空気の順番にフローセル10に流動する。緩衝液用バルブ307は緩衝液用ポンプ301とフローセルバルブ310を連結し、フローセルバルブ310は緩衝液用バルブ307とフローセル10(図2)を連結する。検体用バルブ308は検体用ポンプ302と検体用バルブ連結空気孔312を連結する。

10

図10(d)は、緩衝液用ポンプ301が緩衝液と緩衝液-検体間設置用空気をフローセル10(図2)に送液し、検体用ポンプ302は、検体318を吸引する様子を示す。検体用バルブ308は検体用ポンプ302と検体用リザーバ305を連結する。

図10(e)は、検体用ポンプ302が検体と検体-かい離液間設置用空気をフローセル10(図2)に送液し、かい離液用ポンプ303は、かい離液-緩衝液間設置用空気319を吸引する様子を示す。検体用ポンプ302は検体、検体-かい離液間設置用空気の順番にフローセル10(図2)に流動する。検体用バルブ308は検体用ポンプ302とフローセルバルブ310を連結し、フローセルバルブ310は検体用バルブ308とフローセル10(図2)を連結する。かい離液用バルブ309はかい離液用ポンプ303とかい離液用バルブ連結空気孔313を連結する。緩衝液316と検体318の間に緩衝液-検体間設置用空気315が存在するため、緩衝液316と検体318はフローセル10(図2)への流動の過程での混合を回避することができる。続けて、かい離液をフローセル10(図2)に送液する。同様の理由で、検体とかい離液は流動の過程での混合を回避することができる。

20

【0032】

緩衝液-検体間設置用空気315などのエアギャップとして用いた空気は、フローセル10の中に設置したチップ20の溝21と光学板12の構成する流路(図6、図7)を流動するときに、撥水性粒子203や、チップ20と光学板12の間から抜けるため、測定を阻害することは無い。以上の機構により、チップ20に緩衝液と第1の空気層と検体(試料)と第2の空気層とかい離液とを順に導入することができる。

30

【0033】

図11は、本生体分子相互作用解析装置を用いて、検体中の目的生体分子を計測する工程をフローチャートにしたもので、工程中の緩衝液用ポンプ、検体用ポンプ、かい離液用ポンプの動作の内容を時間軸に沿って示す。ここで示される通り、緩衝液、検体、緩衝液、かい離液、緩衝液の順番でフローセル20に送液される。

【0034】

図12は、図10のフローチャートの測定工程を実行した場合における、本生体分子相互作用解析装置の解析結果の一例である。結合量は、干渉光のスペクトルピークの波長変移から求められる、プローブに結合した分子の量を示す値である。

40

区間1は最初の緩衝液流動時である。区間2は検体流動時で、時間経過とともに、チップ10の検出領域上のプローブに目的生体分子が結合していくため、結合量は増大する。区間3は、2回目の緩衝液の流動時である。プローブに結合した目的生体分子がかい離するため、結合量は減少する。区間4は、かい離液の流動時である。かい離液はプローブに結合した目的生体分子を全てかい離する。かい離液を一定時間流すことで、チップは初期状態に戻る。区間5は3回目の緩衝液の流動時である。緩衝液を流すことで、チップ20中の状態を区間1に戻す。区間5の次に検体濃度などの実験条件を変えて、測定工程を繰り返すことも可能である。

【0035】

図13は使用する試薬や検体間にエアギャップを使用しなかったときの解析結果の一例

50

、また図 1 4 は使用する試薬や検体間にエアギャップを用いたときの解析結果の一例である。図 1 3 および図 1 4 において、緩衝液追加の矢印が示す時点に、チップを流動する液体は検体から緩衝液に変わる。図 1 3 では、エアギャップを用いなかったために、検体と緩衝液の 2 液の混合状態ができ、検体から緩衝液に変わる遷移状態の液体がチップ上の流路を流動する。そのため、全体の解析結果は、遷移状態時の解析結果を含んでしまう。遷移状態時は、検体中の目的生体分子の濃度が変化するため、解析結果から速度定数や結合定数を求めることは難しくなる。また、遷移状態の区間が、解析結果の時間軸におけるどの区間かを解析結果から判断するのは困難となることも、目的生体分子の正確な速度定数や結合定数を求めることを難しくする。一方、図 1 4 では、エアギャップが検体と緩衝液の混合を防いだため、検体中の目的生体分子の濃度の変化を回避でき、2 液の切り替わり時もはっきりとわかる。そのため、目的生体分子の正確な平衡定数や速度定数を求めることができる。

10

【0036】

図 1 5 は、チップ 2 0 の作製方法の流れ図である。

シリコン基板 2 0 1 に厚さ 1 0 n m 程度から 1 0 0 n m 程度の光学薄膜である窒化シリコン 2 0 2 を堆積したものに、厚さ 0 . 1 m m 程度のドライフィルムレジスト膜 2 0 4 を貼り付け、ホトリソグラフィにより、チップ 2 0 の流路を構成する溝 2 1 の反転パターンを形成した。2 0 5 は溝 2 1 のマスク、2 0 6 は紫外線を示している。撥水性粒子層 2 0 3 として、フッ素樹脂微粒子を 1 0 n m から 0 . 1 m m の厚さでスプレー塗布した後、ドライフィルムレジスト膜 2 0 4 を剥離して、微粒子層中の流路を形成した。

20

本実施例では、レジストを用いて流路の反転パターンを形成したが、シリコン基板に光学薄膜を堆積したものに、感光性の撥水膜を堆積し、ホトリソグラフィ技術を用いて、直接流路パターンを形成することもできる。

本実施例では、高屈折率の薄膜を利用したチップを形成したが、その他の検出方法を用いたバイオセンサ、例えば、吸光度検出、蛍光検出、表面プラズモン共鳴現象、二面偏波式干渉計を利用したチップも形成できる。例えば、蛍光検出用のチップは、ガラスやアクリルの透明基板に流路を形成した後、プローブを結合する。

【0037】

図 1 6 は、チップの流路及び検出領域を複数設けた、多数の検出領域をもつチップの例である。溝 2 1 を計 8 列に分岐し、ひとつの溝あたりに検出領域 2 2 を 7 個設けることにより、計 5 6 個の検出領域を設けている。送液部 3 0 (図 2) より送られた試薬および検体は、アレイチップ 2 2 0 の注入端 2 2 1 から入り、溝 2 1 に沿って均等に分離し、それぞれの検出領域 2 2 上を通過したのち、それぞれの溝の排出端 2 2 2 から排出容器 5 0 へ流動する。アレイチップ 2 2 0 は、検出領域ごとに異なるプローブを結合することが可能であるため、ひとつの検体と多数の生体分子との相互作用を調べることが可能である。

30

【0038】

図 1 7 は、フローセル 1 0 を上下反対の構成にしたものの断面図である。チップ 2 0 の位置が、排出孔 1 2 2、排出口 1 1 2 および、排出流路 1 1 4 よりも高い位置にあるため、溝 2 1 を流動する液体の水圧は小さくなる。そのため、液体は溝 2 1 と光学窓 1 2 の間より漏れにくくなるという効果がある。

40

【実施例 2】

【0039】

表面プラズモン共鳴現象を利用したチップについての実施例を示す。

図 1 8 は、チップ 7 0 の鳥瞰図である。チップ 7 0 は、プリズム 7 0 4 と溝 7 1 がそれぞれの面にあり、溝 7 1 の表面上に目的生体分子を検出するための検出領域 7 2、7 2' を持つ。ここで検出領域 7 2 は、実施例 1 と同様に、目的生体分子を結合するプローブを表面につけた検出領域 7 2 と、つけない検出領域 7 2' がある。プローブをつけない検出領域 7 2' はリファレンスとして使用する。

図 1 9 は、チップ 7 0 の断面図である。チップ 7 0 は、光透過性基板 7 0 1、金属薄膜層 7 0 2、撥水性粒子層 7 0 3、プリズム 7 0 4、検出領域 7 2 で構成する。たとえば光

50

透過性基板 701 は、石英ガラス基板、金属薄膜層 702 は金薄膜、撥水性粒子層 703 にはフッ素樹脂微粒子を使用する。

【0040】

図 20 は、チップ 70 とフローセルの構成図である。フローセルは、上ふた 61、中ふた 62、台 63 で構成する。使用時には上ふた 61、中ふた 62、チップ 70、台 63 の順に重ねて使用する。

上ふた 61 は、中ふた 62 を介しフローセルに試薬および検体を供給するための送入口 611、中ふた 62 を介しフローセル 60 より試薬および検体を排出する排出口 612、試薬および検体を送液を行う送液部（図示せず）とフローセルを連結する流路である送入流路 613、フローセルと使用後の試薬および検体を保管する廃液容器（図示せず）を連結する流路である排出流路 614 を備える。

10

中ふた 62 は、試薬および検体をフローセルへ供給するための貫通穴である送入孔 621、および試薬および検体をフローセルから排出するための貫通穴である排出孔 622 を備え、チップ 70 と接触する面は撥水性をもつ。

台 63 は、中ふた 62 およびチップ 70 を設置するための凹部 630、プリズム 704 をフローセルの外部に露出するための貫通穴 635 を備える。

【0041】

図 21 は、フローセルと、プローブ分子に特異的に結合した目的生体分子を、表面プラズモン共鳴現象を利用し検出する検出部を組み合わせた関連図である。フローセルは組図の断面図で示す。実施例 1 と同様に、チップ 70 は、溝 71 を持つ面が中ふた 62 に接触するように設置する。台 63 の凹部 630 に中ふた 62 およびチップ 70 がはまり、台 63 と上ふた 61 を固定することで、中ふた 62 およびチップ 70 を上ふた 61 に押し付け固定する。送入口 611、送入孔 621 および溝 71 の一端、排出口 612、排出孔 622 および溝 71 のもう一端が重なる。溝 71 と中ふた 62 が組み合うことで、チップ 70 上に流路を構成する。送液部よりフローセルに送る試薬および検体は送入流路 613、送入口 611、送入孔 621、溝 71、排出孔 622、排出口 612、排出流路 614 を介し、廃液容器に流動する。

20

【0042】

検出部は、単色光源 91、検出器 92 で構成する。単色光源 91 は、金属薄膜層 702 の全反射条件で p 偏光の入射光 93 をチップ 70 に入射し、検出器は、金属薄膜層 702 からの反射光 94 を検出する。表面プラズモン共鳴現象により、ある角度の反射光強度が低下する。

30

検体中の目的生体分子が検出領域 72 のプローブに結合することで、金属薄膜層 702 の見かけの屈折率を変えるため、反射光強度の低下する角度が変化する。この変化をシステム装置（図示せず）で解析することで、目的生体分子の結合の様子を測定することができる。

なお、前記実施例 1、2 ではセンサを有するチップに疎水性、通気性を有する粒子状の層を設けることで、脱気をおこない、検出時の気泡の影響を排除するとともに、送液時のエアギャップを速やかに除去する旨を記載したが、このような脱気機構は、二液の混合流路や、電気泳動や電気浸透流を送液手段として用いたマイクロチップにも利用できる。この場合、実施例 1、2 と同様に、混入した気泡の脱気を図ることができる。すなわち、本脱気機構はマイクロ流路チップの脱気方法として有効である。

40

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図 1】本発明の実施例による生体分子相互作用解析装置の鳥瞰図である。

【図 2】本発明の実施例による生体分子相互作用解析装置 1 の全体構成図である。

【図 3】本発明の実施例によるチップの鳥瞰図である。

【図 4】本発明の実施例によるチップの断面図である。

【図 5】本発明の実施例によるフローセルの構成図である。

【図 6】本発明の実施例によるフローセルの組図の断面図である。

50

【図 7】本発明の実施例によるチップと光学窓の断面図である。

【図 8】本発明の実施例によるチップと光学窓の断面図である。

【図 9】本発明の実施例による検出部とフローセルの構成図である。

【図 10】本発明の実施例による送液部の動作手順の説明図である。

【図 11】本発明の実施例による動作手順の説明図のである。

【図 12】本発明の実施例による生体分子相互作用解析装置の解析結果のイメージ図である。

【図 13】本発明の実施例による生体分子相互作用解析装置の解析結果である。

【図 14】本発明の実施例による生体分子相互作用解析装置の解析結果である。

【図 15】本発明の実施例によるチップ作製手順の説明図である。

10

【図 16】本発明の実施例によるチップの鳥瞰図である。

【図 17】本発明の実施例によるフローセルの断面図である。

【図 18】本発明の実施例によるチップの鳥瞰図である。

【図 19】本発明の実施例によるチップの断面図である。

【図 20】本発明の実施例によるフローセルの構成図である。

【図 21】本発明の実施例による検出部とフローセルの構成図である。

【符号の説明】

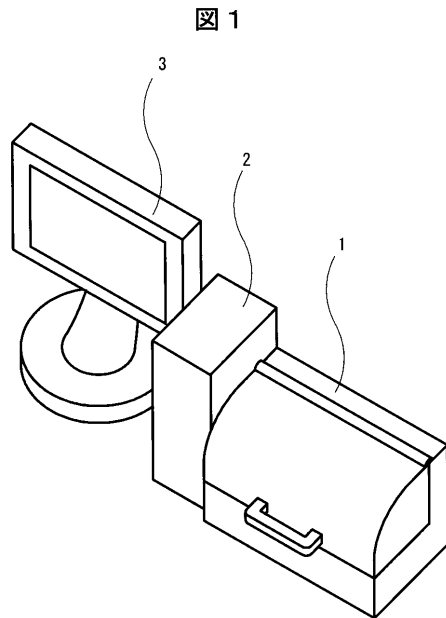
【0044】

- | | | | |
|-----------------|---------------------|--------------|----------------|
| 1. 生体分子相互作用解析装置 | 2. システム装置 | 3. モニタ | 10. フローセル |
| 11. 上ふた | 12. 光学窓 | 13. 台 | 20. チップ |
| 21. 溝 | 22. 検出領域 | 23. 液体 | 24. 境界面 |
| 25. 溝 | 30. 送液部 | 40. 検出部 | 41. 白色光源 |
| 42. 分光器 | 43. 検出器 | 50. 廃液容器 | 61. 上ふた |
| 62. 中ふた | 63. 台 | 70. チップ | 71. 溝 |
| 72. 検出領域 | 91. 単色光源 | 92. 検出器 | 93. 入射光 |
| 94. 反射光 | 110. 凹部 | 111. 送入口 | 112. 排出口 |
| 113. 送入流路 | 114. 排出流路 | 115. 観測孔 | 121. 送入孔 |
| 122. 排出孔 | 123. 大きさの差 | 201. 基板 | 202. 親水性薄膜層 |
| 203. 撥水性粒子層 | 204. ドライフィルムレジスト | 205. マスク | 206. 紫外線 |
| 207. 入射光用光ファイバ | 208. 干渉光ファイバ | 209. 反射光 | 210. 反射光 |
| 220. アレイチップ | 221. 注入端 | 222. 排出端 | 301. 緩衝液ポンプ |
| 302. 検体ポンプ | 303. かい離液ポンプ | 304. 緩衝液リザーバ | 305. 検体リザーバ |
| 306. かい離液リザーバ | 307. 緩衝液バルブ | 308. 検体バルブ | 309. かい離液バルブ |
| 310. フローセルバルブ | 311. 緩衝液用バルブ | 312. 検体用バルブ | 313. かい離液用バルブ |
| 314. 連結空気孔 | 315. 緩衝液 - 検体間設置用空気 | 316. 緩衝液 | 317. 検体 - かい離液 |
| 318. 検体 | 611. 送入口 | 612. 排出口 | 613. 送入流路 |
| 614. 排出流路 | 621. 送入孔 | 622. 排出孔 | 630. 凹部 |
| 701. 光透過性基板 | 702. 金属薄膜層 | 703. 撥水性粒子層 | 704. プリズム |

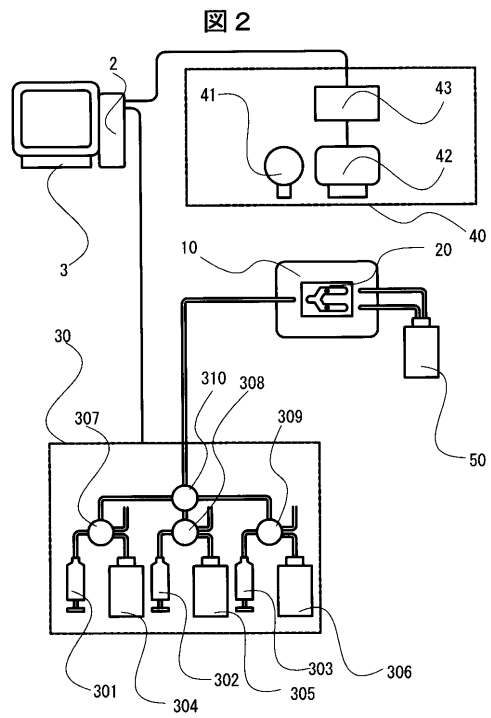
20

30

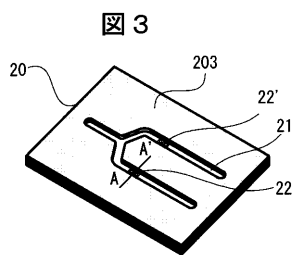
【図 1】



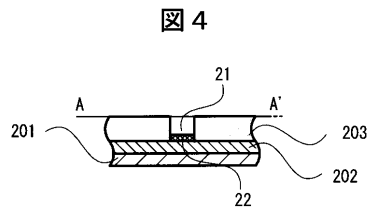
【図 2】



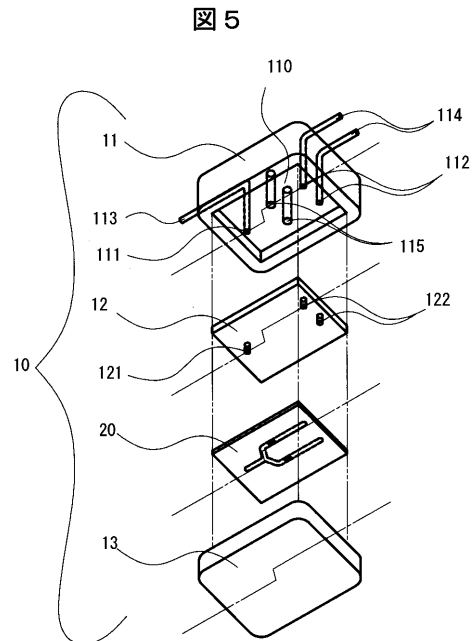
【図 3】



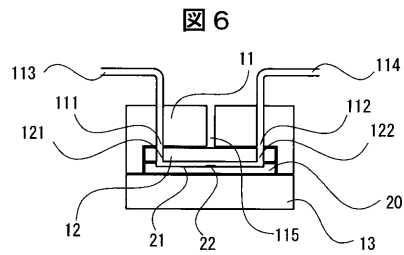
【図 4】



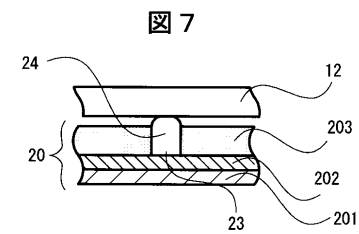
【図 5】



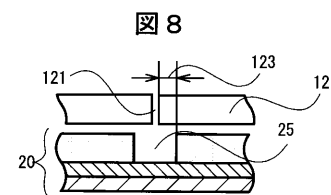
【図 6】



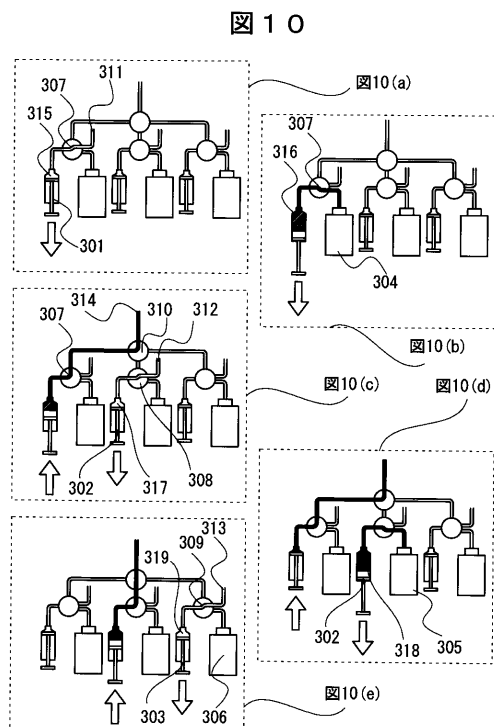
【図 7】



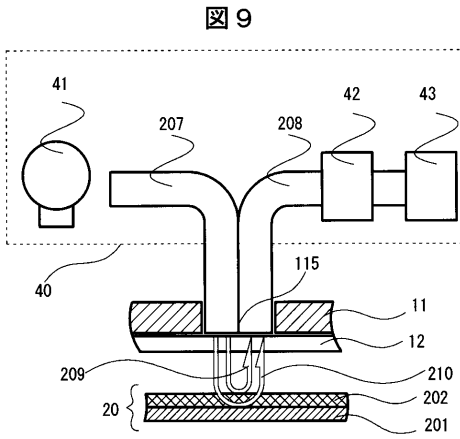
【図 8】



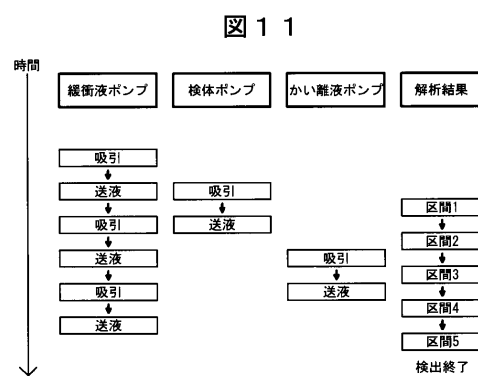
【図 10】



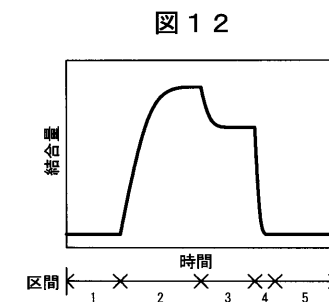
【図 9】



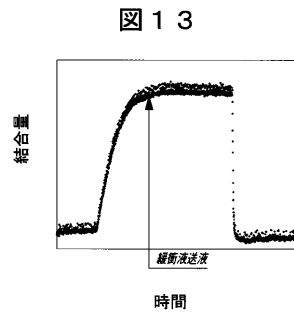
【図 11】



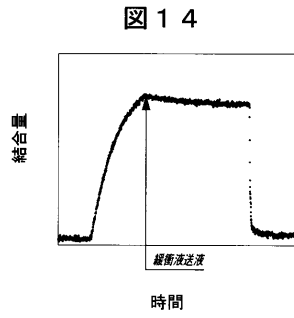
【図 12】



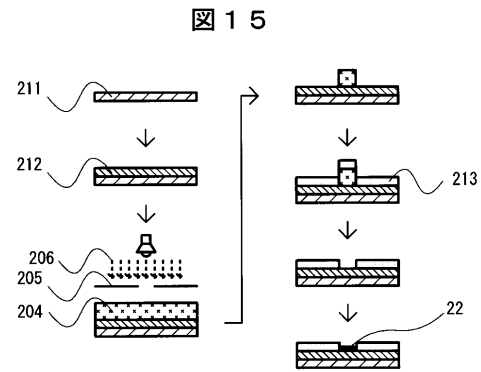
【図 13】



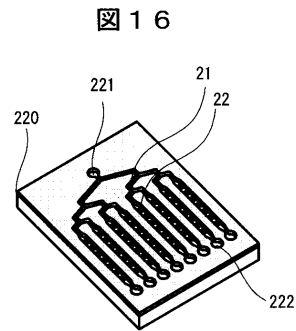
【図 14】



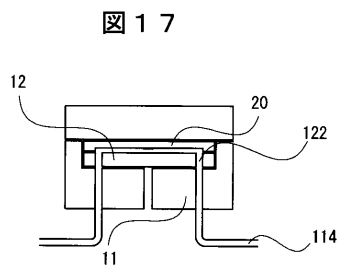
【図 15】



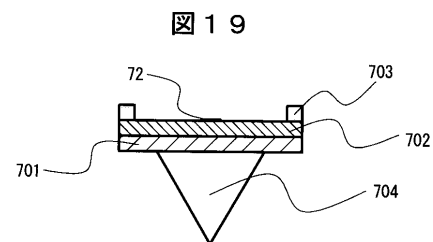
【図 16】



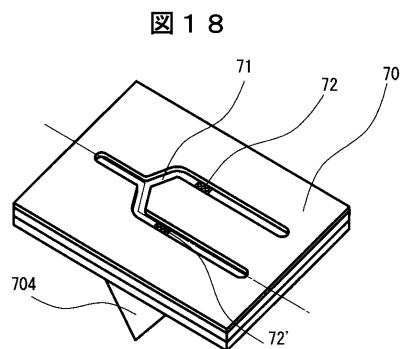
【図 17】



【図 19】

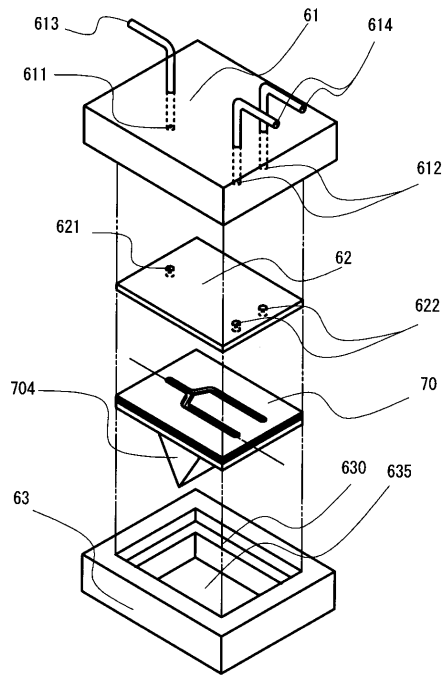


【図 18】



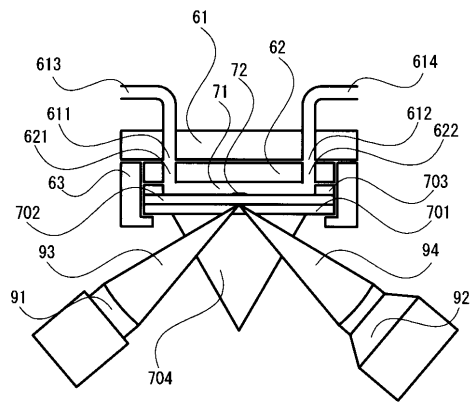
【図 20】

図 20



【図 21】

図 21



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

審査官 長谷 潮

(56)参考文献 特開平 0 9 - 2 5 7 7 4 8 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 1 4 5 4 8 6 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 4 3 2 7 (W O , A 1)
特開 2 0 0 3 - 3 0 2 3 9 9 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 0 4 6 7 9 7 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 2 7 5 8 0 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 1 4 6 9 8 9 (J P , A)
特開 2 0 0 2 - 3 5 7 6 1 6 (J P , A)
特開 2 0 0 4 - 3 4 0 7 5 8 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 5 / 0 0
G 0 1 N 3 5 / 0 8
G 0 1 N 3 7 / 0 0
G 0 1 N 2 1 / 0 3
C 1 2 M 1 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C 1 2 Q 1 / 6 8