

(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
2009 年 12 月 3 日(03.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/145333 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 35/02 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/059931
- (22) 国際出願日: 2009 年 5 月 26 日(26.05.2009)
- (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 2008-141155 2008 年 5 月 29 日(29.05.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋鋼板株式会社 (TOYO KOHAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1028447 東京都千代田区四番町 2 番地 1 2 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山野博文 (YAMANO, Hirofumi) [JP/JP]; 〒7448611 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼板株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP). 亀井修一 (KAMEI, Shuichi) [JP/JP]; 〒7448611 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼板株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP). 丹花通文 (TANGA,

Michifumi) [JP/JP]; 〒7448611 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼板株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP).

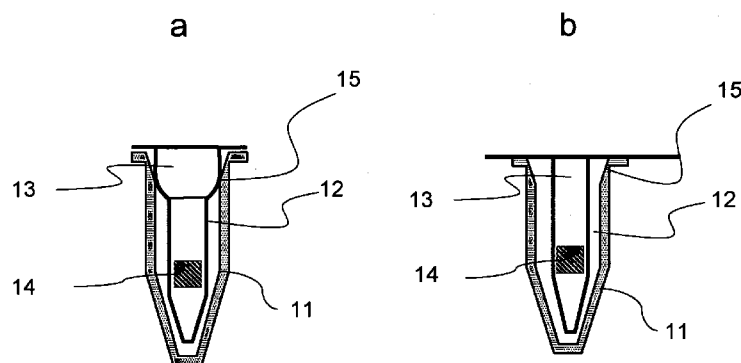
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, 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 (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,

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND UNIT FOR DETECTING INTERACTION OF BIOLOGICAL MOLECULES

(54) 発明の名称: 生体関連分子の相互作用を検出するための方法およびユニット

図 1



(57) Abstract: Disclosed is a unit for detecting the interaction of biological molecules using a carrier whereon the biological molecules are affixed. The unit has a hollow holder that has an open part at one end, the other end of which is closed, and a carrier support member to which is affixed a carrier whereon biological molecules are affixed that can be inserted into the hollow holder. By the rear end part of the carrier support member and the edge of the open part of the hollow holder engaging when the carrier support member is inserted into the hollow holder, the hollow holder is sealed, and the carrier support member and the hollow holder are positioned. In a cross-sectional view cut along a plane that includes the axial center of the hollow holder when positioned, the surface area delineated by the inside of the hollow holder and the outside of the carrier support member to which the carrier is affixed is approximately the same on the left and right of the axial center, in the region from where the carrier is affixed to the tip part of the carrier support member.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2009/145333 A1



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, 添付公開書類:

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
TG).

本発明は、生体関連分子が固定化された担体を用いた生体関連分子の相互作用の検出に使用するためのユニットであって、一端に開口部を有し他端が閉塞している中空ホルダーと、生体関連分子が固定化された担体が固定化されており中空ホルダーに挿入可能な担体支持部材とを有し、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することによって、中空ホルダーが密閉されるとともに担体支持部材と中空ホルダーとが位置決めされ、位置決め姿勢で中空ホルダーの軸心を含む面で切った断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積が、担体支持部材の担体固定部から先端部までの領域で、軸心の左右で略同一である、前記ユニットに関する。

明 細 書

生体関連分子の相互作用を検出するための方法及びユニット

5 技術分野

本発明は、生体関連分子が固定化された担体を用いて生体関連分子の相互作用を検出する方法及びそれに使用するためのユニットに関する。

背景技術

- 10 ゲノム解析の進展により、種々の生物の生理反応に関与する生体関連分子が解明されてきた。これら生体関連分子には、DNA、蛋白質、糖鎖、細胞などがあり、機能や構造等が解明されたものは、創薬や臨床検査、食品検査、環境検査などの各種産業用途に利用される。

- 臨床検査を始めとする検査では、以下の方法が一般的によく採用される。すなわち、検出したい生体関連分子（以下、アナライトと呼称する）と特異的に結合する
15 プローブ分子（以下、リガンドと呼称する）を担体上に固定したデバイスに検体を接触させると、検体のアナライトが存在する場合、リガンドと結合してアナライトが担体上に捕捉されるので、この補足されたアナライトが検出される。

- 上記のような検査方法においても、近年、高速化、自動化が求められ、数百～数
20 万の生体関連分子を同時に網羅的に計測する検出方法が要望されるようになり、生体関連分子固定の集積化技術、いわゆる、MEMS技術を用いたデバイス設計が可能となり、いわゆるマイクロアレイとして、創薬研究やバイオ研究における網羅的解析に用いられている。

- デバイスとしてのマイクロアレイは、担体上に固定されるプローブ分子の種類に
25 より、DNAマイクロアレイ（DNAチップとも呼ばれる）、蛋白質マイクロアレイ（蛋白質チップとも呼ばれる）、細胞マイクロアレイ（細胞チップとも呼ばれる）等がある。

- 解析は、マイクロアレイ上に、例えば、蛍光物質で予め蛍光標識を行った検体を
30 接触させ、その後にマイクロアレイを洗浄してから蛍光物質が発する蛍光シグナルを検出測定することにより検体に含まれるアナライトを同定又は定量する（特表 2

006-515065号公報)。

DNAチップ等のマイクロアレイは、通常、スライドガラス様の大きさで、専らその上に検体を垂らしプレパレートで覆い反応させる。今後は用途に応じてマイクロアレイを大量に自動処理する必要がある。その場合、マイクロアレイの小型化が望まれ、さらに小型化したマイクロアレイを自動で処理するための効率的な手段の開発が望まれる。

発明の概要

本発明者らは、小型化したマイクロアレイを自動で処理するために、マイクロアレイを支持部材に固定化し、これを検体を収容した中空ホルダーに挿入して反応させたところ、検体の容積が微量（数～数百 μ ）であるために、表面張力の影響により検体とマイクロアレイの接触が十分行われず、反応不十分となることを見出した。

従って、本発明の課題は、小型化したマイクロアレイの自動処理において微量の検体とマイクロアレイの接触を十分行うための手段を提供することである。

本発明者らは、マイクロアレイを支持部材に固定化し、これを反応液を収容した中空ホルダーに挿入して反応させる際に、支持部材が中空ホルダー内に偏りなく挿入されるよう位置決めを行うことにより、検体とマイクロアレイの接触が十分行われることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 生体関連分子が固定化された担体を用いた生体関連分子の相互作用の検出に使用するためのユニットであって、一端に開口部を有し他端が閉塞している中空ホルダーと、生体関連分子が固定化された担体が固定化されており中空ホルダーに挿入可能な担体支持部材とを有し、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することによって、中空ホルダーが密閉されるとともに担体支持部材と中空ホルダーとが位置決めされ、位置決め姿勢で中空ホルダーの軸心を含む面で切った断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積が、担体支持部材の担体固定部から先端部までの領域で、軸心の左右で略同一である、前記ユニット。

(2) 担体支持部材における担体固定部が底面と側面とを有する凹部であり、担体

が凹部の底面に配置されている、(1)記載のユニット。

(3)担体支持部材凹部の少なくとも後端部側の側面が傾斜面である、(2)記載のユニット。

5 (4)傾斜面の表面粗さが $10\mu\text{m}$ 以下であり、傾斜面と底面とのなす角度が 75° 以下である、(3)記載のユニット。

(5)担体支持部材凹部の先端部側の側面から先端部まで廃液溝が形成されている、(2)～(4)のいずれかに記載のユニット。

(6)担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の担体固定部より先端部側の領域で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積
10 の割合が60%以上である、(1)～(5)のいずれかに記載のユニット。

(7)担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が25～70%である、(1)～(6)のいずれかに記載のユニット。

(8)それぞれ担体が固定化された複数の担体支持部材を有し、担体支持部材の後
15 端部がそれぞれ面材に固定されており、それぞれの支持部材に対応した複数の中空ホルダーを有する、(1)～(7)のいずれかに記載のユニット。

(9)生体関連分子が固定化された担体を用いて生体関連分子の相互作用を検出する方法であって、一端に開口部を有し他端が閉塞しており反応液を収容している中空ホルダーに、生体関連分子が固定化された担体が固定されている担体支持部材を
20 挿入することによって、担体上の生体関連分子と反応液中の蛍光標識された生体関連分子とを相互作用させる相互作用工程、担体を洗浄することにより、担体に固定化された生体関連分子と相互作用しなかった生体関連分子を除去する洗浄工程、担体に励起光を照射し、検出器で蛍光を検出する検出工程を含み、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口
25 部のエッジとが係合することによって、中空ホルダーが密閉されるとともに担体支持部材と中空ホルダーとが位置決めされ、前記位置決め姿勢で中空ホルダーの軸心を含む面で切った断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積が、担体支持部材の担体固定部から先端部までの領域で、軸心の左右で略同一である、前記方法。

30 (10)担体支持部材における担体固定部が底面と側面とを有する凹部であり、担

体が凹部の底面に配置されている、(9)記載の方法。

(11) 担体支持部材凹部の少なくとも後端部側の側面が傾斜面である、(10)記載の方法。

5 (12) 傾斜面の表面粗さが $10\mu\text{m}$ 以下であり、傾斜面と底面とのなす角度が 75° 以下である、(11)記載の方法。

(13) 担体支持部材凹部の先端部側の側面から先端部まで廃液溝が形成されている、(10)～(12)のいずれかに記載の方法。

10 (14) 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の担体固定部より先端部側の領域で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が60%以上である、(9)～(13)のいずれかに記載の方法。

(15) 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が25～70%である、(9)～(14)のいずれかに記載の方法。

15 (16) それぞれ担体が固定化された複数の担体支持部材を有し、担体支持部材の後端部がそれぞれ面材に固定されており、それぞれの支持部材に対応した複数の中空ホルダーを有する、(9)～(15)のいずれかに記載の方法。

本発明により、小型化したマイクロアレイの自動処理において微量の検体とマイクロアレイの接触を十分行うための手段が提供される。

20 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2008-141155号の明細書、特許請求の範囲及び図面に記載された内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の一実施形態を示す。

図2は、本発明の一実施形態を示す。

25 図3は、本発明の一実施形態を示す。

図4は、本発明の一実施形態を示す。

図5は、本発明の一実施形態を示す。

図6は、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合している場合(a)と係合していない場合(b)を比較した結果を示す。

30 図7は、廃液溝を有する担体支持部材(a)と廃液溝を有しない担体支持部材

(b) と中空ホルダー (c) の一実施形態を示す。

図 8 は、廃液溝を有する担体支持部材と廃液溝を有しない担体支持部材を用いた場合の検出結果を示す。

図 9 は、中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が 80% である担体支持部材 (a) と、50% である担体支持部材 (b) を、反応液を収容した中空ホルダーにそれぞれ挿入した結果を示す。

発明を実施するための形態

本発明において、生体関連分子には、DNA 及び RNA などの核酸、ペプチド、糖鎖及び細胞、これらの複合体、並びにこれらとその他の分子との複合体などが包含される。本発明において、ペプチドには、オリゴペプチド、ポリペプチド及びタンパク質が包含される。担体に固定化される生体関連分子が、ペプチドである場合、通常 1 ～ 1000 kDa、好ましくは 1 ～ 200 kDa のペプチドが好適である。また、担体に固定化される生体関連分子が核酸である場合、通常 3 ～ 5000 塩基、好ましくは 10 ～ 1000 塩基の核酸が好適である。また、担体に固定化する生体関連分子が糖鎖である場合、通常 1 ～ 100 糖、好ましくは 1 ～ 30 糖の糖鎖が好適である。本発明において、生体関連分子は、好ましくは核酸、より好ましくは DNA である。

生体関連分子の相互作用は、好ましくは生体関連分子間の特異的な相互作用をさし、例えば、タンパク質間の相互作用、タンパク質とペプチドの相互作用、核酸間の相互作用、タンパク質と核酸の相互作用、タンパク質と化合物との相互作用などが包含される。より具体的には、核酸相補鎖間のハイブリダイゼーション、抗原と抗体又はその断片との反応、酵素と基質又は阻害剤の結合反応、リガンドとレセプターの結合反応、アビジンとビオチンの結合反応、核酸と転写因子の結合反応、細胞接着因子の結合反応、糖鎖とタンパク質の結合反応、脂肪鎖とタンパク質の結合反応、リン酸基とタンパク質の結合反応、補欠因子とタンパク質の結合反応などが挙げられる。

本発明は、生体関連分子が固定化された担体（マイクロアレイと称する場合もある）を用いた生体関連分子の相互作用の検出において、一端に開口部を有し他端が閉塞している中空ホルダーと、マイクロアレイが固定化されており中空ホルダーに

挿入可能な担体支持部材とを有するユニットを用いることを特徴とし、反応液を収容している中空ホルダーに担体支持部材を挿入することにより、マイクロアレイと反応液とを接触させ、生体関連分子を相互作用させる。

一端に開口部を有し他端が閉塞している中空ホルダーは、反応液を収容できるものであれば特に制限されない。中空ホルダーは単独のものでもよいし、複数が連結されたものでもよい。中空ホルダーとしては、当技術分野で通常用いられるマイクロチューブやマイクロタイタープレート（例えば、96ウェルプレート）などが挙げられる。中空ホルダーの寸法は、当業者であれば用途に応じ適宜設定できるが、例えば、開口部の直径が6～12mmの範囲にあり、長さが15～35mmのチューブ状のものを使用できる。

中空ホルダーには反応液として、蛍光標識された生体関連分子を含む検体を収容させ、これに担体支持部材を挿入することにより、担体と反応液とを接触させ、担体上の生体関連分子と反応液中の蛍光標識された生体関連分子とを相互作用させる。反応液として核酸増幅産物を収容させてもよい。担体を洗浄することにより担体に固定化された生体関連分子と相互作用しなかった生体関連分子を除去する洗浄工程においては、中空ホルダーに洗浄液を収容し、相互作用後に担体支持部材をこれに挿入することにより、洗浄を行うこともできる。反応液として検体を収容した中空ホルダーと、反応液として洗浄液を収容した中空ホルダーを、それぞれ用いてもよい。

担体上の生体関連分子と反応液中の蛍光標識された生体関連分子とを相互作用させる相互作用工程においては、中空ホルダーを加熱することにより反応液を加熱することが好ましい。本発明では、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することによって中空ホルダーが密閉されることから、反応液の蒸発を抑制するとともに効率的に加熱することができる。加熱の際に一部蒸発した反応液が、中空ホルダーを密閉している担体支持部材後端部において冷却されて液滴を形成する場合がある。従って、相互作用工程において、担体支持部材後端部も合わせて加熱することにより、液滴の形成を抑制し、微量な反応液が減少して反応液における生体関連分子の濃度が増加することを防止できる。相互作用工程における加熱温度は30～60℃、好ましくは35～55℃であり、担体支持部材後端部の加熱温度も同様である。

本発明では、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することによって、担体支持部材と中空ホルダーとが位置決めされる。例えば、図 1 に示すように、担体支持部材 12 の後端部 13 と中空ホルダー 11 の開口部のエッジ 15 とが係合することによって、担体支持部材が中空ホルダー内において所定の位置に位置決めされるが（図 1 a）、担体支持部材 12 の後端部 13 と中空ホルダー 11 の開口部のエッジ 15 とが係合していないと、担体支持部材を中空ホルダーに挿入するたびに、中空ホルダー内における担体支持部材の位置が変わってしまい、所定の位置に位置決めすることができない（図 1 b）。

本発明では、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された上記位置決め姿勢で、中空ホルダーの軸心を含む面で切った断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積が、担体支持部材の担体固定部から先端部までの領域で、軸心の左右で略同一となるように、担体支持部材と中空ホルダーとが構成される。

例えば、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された上記位置決め姿勢で、中空ホルダーの軸心 21 を含む面で切った断面図の一例を図 2 に示す。この断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積のうち担体支持部材の担体固定部から先端部 24 までの領域の面積は、軸心の左側は 22 で表される部分の面積であり、軸心の右側は 23 で表される部分の面積である。この 22 の面積と 23 の面積が略同一となるように、担体支持部材と中空ホルダーとを構成することにより、左右の表面張力が等しくなり、反応液の液面が偏ることなく、担体 14 と反応液を十分接触させることができる。図 2 a では 22 の面積と 23 の面積が略同一ではないため、反応液は点線のように偏ってしまう。一方、図 2 b では 22 の面積と 23 の面積が略同一であるため、反応液は水性になる。略同一とは、相違が 20 % 以下、好ましくは 10 % 以下、より好ましくは 5 % 以下であることを意味する。図 2 は、中空ホルダーの軸心 21 を含む面で切った断面図のうち担体 14 を切断するような断面図を示しており、従って中空ホルダーの軸心に対して左右対称ではないが、中空ホルダーの軸心に対して左右対称となる断面についても同様である。すなわち、中空ホルダーの軸心を含むいずれの断面でも上記左右の面積は略同一となる。

好ましい実施形態では、例えば図 3 に示すように、担体支持部材における担体固定部 3 1 が底面 3 2 と側面 3 3 (3 3 a と 3 3 b) とを有する凹部であり、担体 1 4 が凹部の底面 3 2 に配置されている。さらに好ましくは、担体支持部材凹部 3 1 の少なくとも後端部 1 3 側の側面 3 3 a は傾斜面である。担体支持部材凹部 3 1 の先端部 2 4 側の側面 3 3 b も傾斜面であることが好ましい。後端部側の側面 3 3 a を傾斜面とすることにより、担体支持部材を中空ホルダー内の反応液に挿入するときに混入しうる気泡が上部に逃げやすくなる。また、この傾斜面の表面粗さを $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下とし、傾斜面と底面とのなす角度 (図 3 の 3 4) を 75° 以下、好ましくは 45° 以下とすることにより、気泡がより逃げやすくなる。気泡がうまく逃げないと、担体と反応液との接触が阻害され、担体の一部で生体関連分子の相互作用が阻害される場合もあるが、気泡をうまく逃がす上記構成とすることにより、担体と反応液との良好な接触が達成できる。

担体支持部材には、凹部の先端部側の側面から先端部まで廃液溝が形成されていることが好ましい。例えば図 4 に示すように、凹部の先端部側の側面 3 3 b から先端部 2 4 まで廃液溝 4 1 が形成されていることにより、中空ホルダー内の反応液から担体支持部材を引き上げたときに凹部に残留しうる反応液を、効率よく廃液することができる。担体支持部材を引き上げた後、担体支持部材の先端部 2 4 をろ紙と接触させることにより、より効率的に廃液することができる。本発明では、生体関連分子の相互作用後に、担体に固定化された生体関連分子と相互作用しなかった生体関連分子を除去する洗浄工程において、潮解性の物質を含む洗浄液を用いることにより、担体を乾燥させることなくそのまま担体に励起光を照射し、検出器で蛍光を検出することができる。生体関連分子の相互作用及び洗浄では塩を含む溶液が使用されることから、担体を乾燥させると塩による乾燥ムラが発生し、乾燥ムラによる散乱光が強く、正確な検出が困難な場合がある。特に、結像光学系の検出器においては、乾燥ムラによる散乱光が強く、走査型検出器と比較して、正確な検出が非常に難しい場合があるが、潮解性物質を含む洗浄液を用いて乾燥させずに検出を行えば、乾燥ムラによる散乱光の発生を抑制できる。担体を乾燥させないで検出する態様においても、担体支持部材の凹部に液溜まりができてしまうと検出誤差が生じる可能性があるが、廃液溝を設けることにより、凹部に残留した余分な洗浄液をすみやかに廃液することができ、検出誤差を低減させることができる。

潮解性物質は、生体関連分子の相互作用を阻害しないものであれば、特に制限されないが、例えば、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、水酸化マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩、炭酸カリウム、臭化ナトリウムなどのアルカリ金属塩などが挙げられる。洗浄液における潮解性物質の濃度は、通常 $0.01 \sim 3.0 \text{ mol/l}$ 、好ましくは $0.05 \sim 1.0 \text{ mol/l}$ 、さらに好ましくは $0.2 \sim 0.5 \text{ mol/l}$ である。

本発明の好ましい態様では、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の担体固定部より先端部24側の領域で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合は、60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90～95%である。例えば図5においては、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材12の担体固定部より先端部側の領域（点線より下の領域）、即ち、担体固定部の先端部側末端で中空ホルダー11の軸心と垂直な面で切った場合に、担体固定部を含まない側において中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が上記値となる。担体支持部材の担体固定部より先端部側を大きめに設計することで、中空ホルダーに担体支持部材を挿入したときに、中空ホルダーに収容された反応液が微量の場合にも、液面が上昇して担体と十分接触させることが可能になる。従って、操作の際の液量を少なくすることができる。

また、担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合は、好ましくは25～70%、より好ましくは40～50%である。担体支持部材の体積の割合を一定の値以下とすることで担体支持部材の挿入時に液体がこぼれるのを防ぐことができる。

本発明で用いるユニットは複数の担体支持部材と、それぞれの支持部材に対応した複数の中空ホルダーを有していてもよい。複数の担体支持部材にはそれぞれ担体が固定化されており、好ましくは担体支持部材の後端部がそれぞれ面材に固定されており、一体として動作することができる。それぞれの担体支持部材に対応した複数の中空ホルダーを有するとは、複数の中空ホルダーに担体支持部材がそれぞれ挿入されるよう構成されていることをさす。それぞれ担体が固定化された複数の担体支持部材と複数の中空ホルダーを用いることで、大量の試験を効率的に実施することが可能になる。

本発明の検出方法では、担体を洗浄することにより、担体に固定化された生体関連分子と相互作用しなかった生体関連分子を除去する洗浄工程の後、担体に励起光を照射し、検出器で蛍光を検出する検出工程を実施する。

本発明では、検出器として結像光学系の検出器を用いることが好ましい。結像光学系の検出器は、励起光を担体に照射し、得られる蛍光の強度を検出するものである。結像光学系の検出器は、通常、励起光を照射するためのレーザー、目的の波長の蛍光のみを透過させる蛍光フィルター、蛍光フィルターを透過した蛍光を検出するための光検出部（例えば、CCDカメラ）を有する。本発明では、通常、レーザーで一度に担体全体に斜めに励起光を照射し、担体の正面から蛍光を検出する。励起光を担体に対して斜めに照射するとは、担体表面とレーザー光のなす角度が、90°未満であることをさし、通常、30°～70°、好ましくは40°～60°の角度で照射する。結像光学系の検出器では、担体の全面にレーザーを走査させる必要がなく、検出を短時間で実施することができる。一度に担体全体に励起光を照射するため、生体関連分子を固定化する担体としては、比較的サイズの小さいもの、例えば、寸法が10mm以下、好ましくは5mm以下、さらに好ましくは3mm以下の担体、最も好ましくは1～5mm四方の担体を用いる。

生体関連分子を固定化する担体の材料としては、当技術分野で公知のものを使用でき、特に制限されない。例えば、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、水銀、タングステン及びそれらの化合物などの貴金属、及びグラファイト、カーボンファイバーに代表される炭素などの導電体材料；単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表されるシリコン材料、SOI（シリコン・オン・インシュレータ）などに代表されるこれらシリコン材料の複合素材；ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、セラミクス、フォスファイト、感光性ガラスなどの無機材料；ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、環状ポリオレフィン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、ポリフェニ

レンオキサイド及びポリスルホンなどの有機材料等が挙げられる。

本発明においては、担体として、好ましくは表面にカーボン層と化学修飾基とを有する担体を用いる。表面にカーボン層と化学修飾基とを有する担体には、基板の表面にカーボン層と化学修飾基とを有するもの、及びカーボン層からなる基板の表面に化学修飾基を有するものが包含される。基板の材料としては、当技術分野で公知のものを使用でき、特に制限されず、上述の担体材料と同様のものを使用できる。

本発明は、微細な平板状の構造を有する担体に対し好適に用いられる。微細な平板状の構造の担体を製造しやすいことから、シリコン材料や樹脂材料からなる基板を用いるのが好ましく、特に単結晶シリコンからなる基板の表面にカーボン層及び化学修飾基を有する担体がより好ましい。単結晶シリコンには、部分部分でごくわずかに結晶軸の向きが変わっているものや（モザイク結晶と称される場合もある）、原子的尺度での乱れ（格子欠陥）が含まれているものも包含される。

基板上に形成させるカーボン層としては、特に制限されないが、合成ダイヤモンド、高圧合成ダイヤモンド、天然ダイヤモンド、軟ダイヤモンド（例えば、ダイヤモンドライクカーボン）、アモルファスカーボン、炭素系物質（例えば、グラファイト、フラーレン、カーボンナノチューブ）のいずれか、それらの混合物、又はそれらを積層させたものを用いることが好ましい。また、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化珪素、炭化タンタル、炭化トリウム、炭化チタン、炭化ウラン、炭化タングステン、炭化ジルコニウム、炭化モリブデン、炭化クロム、炭化バナジウム等の炭化物を用いてもよい。ここで、軟ダイヤモンドとは、いわゆるダイヤモンドライクカーボン（DLC: Diamond Like Carbon）等の、ダイヤモンドとカーボンとの混合体である不完全ダイヤモンド構造体を総称し、その混合割合は、特に限定されない。カーボン層は、化学的安定性に優れておりその後の化学修飾基の導入や生体関連分子との結合における反応に耐えることができる点、生体関連分子と静電結合によって結合できるためその結合が柔軟性を持っている点において有利である。また、生体関連分子との結合反応において、非特異的吸着が少ない点においても有利である。前記のとおり基板自体がカーボン層からなる担体を用いてもよい。

本発明においてカーボン層の形成は公知の方法で行うことができる。例えば、マイクロ波プラズマCVD（Chemical vapor deposit）法、

ECRCVD (Electric cyclotron resonance chemical vapor deposit) 法、ICP (Inductive coupled plasma) 法、直流スパッタリング法、ECR (Electric cyclotron resonance) スパッタリング法、イオン化
5 蒸着法、アーク式蒸着法、レーザー蒸着法、EB (Electron beam) 蒸着法、抵抗加熱蒸着法などが挙げられる。

高周波プラズマCVD法では、高周波によって電極間に生じるグロー放電により原料ガス（メタン）を分解し、基板上にDLC（ダイヤモンドライクカーボン）層を合成する。イオン化蒸着法では、タングステンフィラメントで生成される熱電子
10 を利用して、原料ガス（ベンゼン）を分解・イオン化し、バイアス電圧によって基板上にカーボン層を形成する。水素ガス1～99体積%と残りメタンガス99～1体積%からなる混合ガス中で、イオン化蒸着法によりDLC層を形成してもよい。

アーク式蒸着法では、固体のグラファイト材料（陰極蒸発源）と真空容器（陽極）の間に直流電圧を印加することにより真空中でアーク放電を起こして陰極から
15 炭素原子のプラズマを発生させ蒸発源よりもさらに負のバイアス電圧を基板に印加することにより基板に向かってプラズマ中の炭素イオンを加速しカーボン層を形成することができる。

レーザー蒸着法では、例えばNd：YAGレーザー（パルス発振）光をグラファイトのターゲット板に照射して熔融させ、ガラス基板上に炭素原子を堆積させることによりカーボン層を形成することができる。
20

基板の表面にカーボン層を形成する場合、カーボン層の厚さは、通常、単分子層～100 μ m程度であり、薄すぎると下地基板の表面が局部的に露出する可能性があり、逆に厚くなると生産性が悪くなるので、好ましくは2nm～1 μ m、より好ましくは5nm～500nmである。

カーボン層が形成された基板の表面に化学修飾基を導入することにより、生体関連分子を担体に強固に固定化できる。導入する化学修飾基は、当業者であれば適宜選択することができ、特に制限されないが、例えば、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、ホルミル基、ヒドロキシル基、金属キレート、及び活性エステル基が
25 挙げられる。

アミノ基の導入は、例えば、カーボン層をアンモニアガス中で紫外線照射するこ
30

とにより又はプラズマ処理することにより実施できる。又は、カーボン層を塩素ガス中で紫外線を照射して塩素化し、さらにアンモニアガス中で紫外線照射することにより実施できる。又は、メチレンジアミン、エチレンジアミン等の多価アミン類ガス中で、塩素化したカーボン層と反応させることによって実施することもできる。

- 5 カルボキシル基の導入は、例えば、前記のようにアミノ化したカーボン層に適当な化合物を反応させることにより実施できる。カルボキシル基を導入するために用いられる化合物としては、例えば、式： $X-R^1-COOH$ （式中、 X はハロゲン原子、 R^1 は炭素数10～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるハロカルボン酸、例えばクロロ酢酸、フルオロ酢酸、ブromo酢酸、ヨード酢酸、2-クロロプロピオン酸、3-クロロプロピオン酸、3-クロロアクリル酸、4-クロロ安息香酸；式： $HOOC-R^2-COOH$ （式中、 R^2 は単結合又は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるジカルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸；ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、トリメリット酸、ブタンテトラカルボン酸などの多価カルボン酸；式： R^3-CO-R^4-COOH （式中、 R^3 は水素原子又は炭素数1～12の2価の炭化水素基、 R^4 は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるケト酸又はアルデヒド酸；式： $X-OC-R^5-COOH$ （式中、 X はハロゲン原子、 R^5 は単結合又は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるジカルボン酸のモノハライド、例えばコハク酸モノクロリド、マロン酸モノクロリド；無水フタル酸、
10 無水コハク酸、無水シュウ酸、無水マレイン酸、無水ブタンテトラカルボン酸などの酸無水物が挙げられる。

- エポキシ基の導入は、例えば、前記のようにアミノ化したカーボン層に適当な多価エポキシ化合物を反応させることにより実施できる。あるいは、カーボン層が含有する炭素＝炭素2重結合に有機過酸を反応させることにより得ることができる。
25 有機過酸としては、過酢酸、過安息香酸、ジペルオキシフタル酸、過ギ酸、トリフルオロ過酢酸などが挙げられる。

 ホルミル基の導入は、例えば、前記のようにアミノ化したカーボン層に、グルタルアルデヒドを反応させることにより実施できる。

- ヒドロキシル基の導入は、例えば、前記のように塩素化したカーボン層に、水を
30 反応させることにより実施できる。

活性エステル基は、エステル基のアルコール側に酸性度の高い電子求引性基を有して求核反応を活性化するエステル群、すなわち反応活性の高いエステル基を意味する。エステル基のアルコール側に、電子求引性の基を有し、アルキルエステルよりも活性化されたエステル基である。活性エステル基は、アミノ基、チオール基、
5 水酸基等の基に対する反応性を有する。さらに具体的には、フェノールエステル類、チオフェノールエステル類、N-ヒドロキシアミンエステル類、シアノメチルエステル、複素環ヒドロキシ化合物のエステル類等がアルキルエステル等に比べてはるかに高い活性を有する活性エステル基として知られている。より具体的には、活性
10 エステル基としては、たとえばp-ニトロフェニル基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、コハク酸イミド基、フタル酸イミド基、5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド基等が挙げられ、特に、N-ヒドロキシスクシンイミド基が好ましく用いられる。

活性エステル基の導入は、例えば、前記のように導入したカルボキシル基を、シアナミドやカルボジイミド（例えば、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-
15 3-エチルカルボジイミド)などの脱水縮合剤とN-ヒドロキシスクシンイミドなどの化合物で活性エステル化することにより実施できる。この処理により、アミド結合を介して炭化水素基の末端に、N-ヒドロキシスクシンイミド基等の活性エステル基が結合した基を形成することができる（特開2001-139532）。

DNA及びRNA等の核酸を固定化する場合は、アミノ基、エポキシ基、カルボ
20 ジイミド基、ホルミル基又は活性エステル基を導入するのが好ましい。ポリペプチドを固定化する場合は、アミノ基、カルボジイミド基、エポキシ基、ホルミル基、金属キレート又は活性エステル基を導入するのが好ましい。金属キレートを導入した担体を使用すると、ポリヒスチジン配列等の金属イオンと親和性のある標識を有するポリペプチドを効果的かつ安定に固定化することができる。

25 本発明の担体に生体関連分子を固定化する方法は、特に制限されない。例えば、生体関連分子をバッファーに溶解して溶液を作成し、これに上記のような担体を浸漬することによって、担体表面に生体関連分子を固定化することができる。浸漬は、通常、0~98℃、好ましくは4℃~50℃で、通常、1分~24時間、好ましくは10分~1時間行う。この場合、一定時間浸漬した後、担体を洗浄することによ
30 って、固定化されていない生体関連分子を除去することができる。また、スポット

一といわれる装置を使用することによって、多種類の生体関連分子を担体の表面に固定化できる。スポットターを用いる場合には、例えば、スポットターで生体関連分子溶液を担体上にスポットした後、加熱したオープン中で一定時間ベーキングを行い、その後洗浄によって固定していない分子を除去する。スポットター装置を用いること

5 により他種類の生体関連分子を担体上の異なる位置に固定化できるため一度に多数の試験を実施することができる。

実施例

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下

10 下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

図 1 の a と b に示す担体支持部材を反応液の入った中空ホルダーに挿入した。結果を図 6 の a と b にそれぞれ示す。図 6 a では、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することにより担体支持部材が中空ホルダーの中央部に挿入されるよう位置決めされ、その結果、反応液の液面が水平となり担体と反応

15 液が接触している。図 6 b では、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合していないため、担体支持部材が中空ホルダー内で右側に偏ったかたちで挿入されてしまい、その結果、表面張力によって反応液の液面が傾き、担体と反応液が接触していない部分が生じている。

20 実施例 2

3 mm 角のシリコン基板にイオン化蒸着法を用いて、下記の条件で 2 層の DLC 層の製膜を行った。

		1 層目	2 層目	
原料ガス	CH ₄	4.75	47.5	(sscm)
	H ₂	0.25	2.5	(sscm)
作動圧力		3.0	8.0	(Pa)
基板バイアス	直流電圧	500	500	(V)
	高周波出力	100	—	(W)
アノード電圧		50	50	(V)
フィラメント	電圧	7	7	(V)
	電流	22	22	(A)

得られた表面にDLC層を有するシリコン基板上に、下記の条件でアンモニアプラズマを用いて、アミノ基を導入した。

原料ガス	NH ₃	30	(sscm)
作動圧力		8.0	(sscm)
基板バイアス	直流電圧	500	(Pa)
	高周波出力	—	(W)
アノード電圧		50	(V)
フィラメント	電圧	7	(V)
	電流	22	(A)

- 5 140 mM 無水コハク酸及び0.1 M ホウ酸ナトリウムを含む1-メチル-2-ピロリドン溶液に30分間浸漬し、カルボキシル基を導入した。0.1 M リン酸カリウムバッファー、0.1 M 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド、20 mM N-ヒドロキシスクシイミドを含む溶液に30分間浸漬し、活性化を行い、シリコン基板表面にDLC層及び化学修飾基としてのN-ヒドロキシスクシイミド基を有する担体を得た。

- DNAプローブをS o l . 6 (東洋鋼鈑製)で10 μ Mに溶解し、担体上にスポットした。80℃で1時間、ベーキングを行い、2×SSC/0.2% SDSで洗浄した後、超純水で洗浄し、遠心乾燥を行うことにより、担体にDNAプローブを固定化した。上記プローブとハイブリダイズする領域をPCRで増幅した。標識は、
- 15 C y D y eを用いて行った。PCR溶液の組成は以下のとおりとした。得られたPCR産物30 μ lを、ハイブリダイズ溶液(4×SSC/0.2% SDS溶液)30 μ lに溶かして試料を調製した。試料50 μ lを図7 cに示す中空ホルダーに入れた。図7 a及びbに示す担体支持部材に、上記で得られたDNAプローブを固定化した担体をそれぞれ固定化し、試料が入った中空ホルダーにそれぞれ挿入した。
- 20 図7 aに示す担体支持部材は廃液溝を有するが、図7 bに示す担体支持部材は廃液溝を有しない。担体支持部材を挿入後、55℃で2分間反応させ、2×SSC/0.2% SDSで1回、1 N酢酸ナトリウム/0.5% t w e e n 2 0で1回、1 N M g C l₂/0.5% t w e e n 2 0で1回洗浄した。冷却CCDカメラを用い、蛍光フィルター(C y 5用、エドモンド社製)を介して、担体上の相互作用した生体

関連分子の蛍光標識を検出した。φ 5 mmのレーザー（640 nm波長）を用いて、担体表面に対して50°の角度で励起光を照射した。結果を図8に示す。

廃液溝を有する担体支持部材（図7a）を用いた場合には、担体固定部に液溜まりができず、良好に検出することができた（図8a）。一方、廃液溝を有しない担体支持部材（図7b）を用いた場合には、一部液溜まりが観察された（図8b）。

実施例3

中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が80%である担体支持部材（図9a）と、50%である担体支持部材（図9b）を、反応液を収容した中空ホルダーにそれぞれ挿入した。図9aの場合は、挿入時に気泡が生成したが、図9bの場合には、挿入時に気泡が生成せず反応液と担体の接触が良好であることがわかる。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

符号の説明

11：中空ホルダー、12：担体支持部材、13：担体支持部材の後端部、14：担体、15：中空ホルダー開口部、21：中空ホルダー軸心、24：担体支持部材の先端部、31：担体固定部、32：担体固定部の底面、33：担体固定部の側面（傾斜面）、34：底面と側面（傾斜面）のなす角度、41：廃液溝

請 求 の 範 囲

1. 生体関連分子が固定化された担体を用いた生体関連分子の相互作用の検出に使用するためのユニットであって、

5 一端に開口部を有し他端が閉塞している中空ホルダーと、生体関連分子が固定化された担体が固定化されており中空ホルダーに挿入可能な担体支持部材とを有し、

担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することによって、中空ホルダーが密閉されるとともに担体支持部材と中空ホルダーとが位置決めされ、

10 位置決め姿勢で中空ホルダーの軸心を含む面で切った断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積が、担体支持部材の担体固定部から先端部までの領域で、軸心の左右で略同一である、前記ユニット。

15 2. 担体支持部材における担体固定部が底面と側面とを有する凹部であり、担体が凹部の底面に配置されている、請求の範囲第1項記載のユニット。

3. 担体支持部材凹部の少なくとも後端部側の側面が傾斜面である、請求の範囲第2項記載のユニット。

20

4. 傾斜面の表面粗さが $10\mu\text{m}$ 以下であり、傾斜面と底面とのなす角度が 75° 以下である、請求の範囲第3項記載のユニット。

5. 担体支持部材凹部の先端部側の側面から先端部まで廃液溝が形成されている、
25 請求の範囲第2～4項のいずれか1項記載のユニット。

6. 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の担体固定部より先端部側の領域で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が60%以上である、請求の範囲第1～5項のいずれか1項記載のユニット。

30

7. 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が25～70%である、請求の範囲第1～6項のいずれか1項記載のユニット。

5. 8. それぞれ担体が固定化された複数の担体支持部材を有し、担体支持部材の後端部がそれぞれ面材に固定されており、それぞれの支持部材に対応した複数の中空ホルダーを有する、請求の範囲第1～7項のいずれか1項記載のユニット。

9. 生体関連分子が固定化された担体を用いて生体関連分子の相互作用を検出する方法であって、

一端に開口部を有し他端が閉塞しており反応液を収容している中空ホルダーに、生体関連分子が固定化された担体が固定されている担体支持部材を挿入することによって、担体上の生体関連分子と反応液中の蛍光標識された生体関連分子とを相互作用させる相互作用工程、

15 担体を洗浄することにより、担体に固定化された生体関連分子と相互作用しなかった生体関連分子を除去する洗浄工程、

担体に励起光を照射し、検出器で蛍光を検出する検出工程を含み、

20 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の後端部と中空ホルダー開口部のエッジとが係合することによって、中空ホルダーが密閉されるとともに担体支持部材と中空ホルダーとが位置決めされ、

前記位置決め姿勢で中空ホルダーの軸心を含む面で切った断面図において、中空ホルダーの内側と担体が固定化された担体支持部材の外側とで画成される面積が、担体支持部材の担体固定部から先端部までの領域で、軸心の左右で略同一である、

25 前記方法。

10. 担体支持部材における担体固定部が底面と側面とを有する凹部であり、担体が凹部の底面に配置されている、請求の範囲第9項記載の方法。

1 1. 担体支持部材凹部の少なくとも後端部側の側面が傾斜面である、請求の範囲第 1 0 項記載の方法。

1 2. 傾斜面の表面粗さが $10\ \mu\text{m}$ 以下であり、傾斜面と底面とのなす角度が 75° 以下である、請求の範囲第 1 1 項記載の方法。

1 3. 担体支持部材凹部の先端部側の側面から先端部まで廃液溝が形成されている、請求の範囲第 1 0 ～ 1 2 項のいずれか 1 項記載の方法。

10 1 4. 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢において、担体支持部材の担体固定部より先端部側の領域で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が 60% 以上である、請求の範囲第 9 ～ 1 3 項のいずれか 1 項記載の方法。

15 1 5. 担体支持部材が中空ホルダーに挿入された姿勢で、中空ホルダーの容積に占める担体支持部材の体積の割合が $25\sim70\%$ である、請求の範囲第 9 ～ 1 4 項のいずれか 1 項記載の方法。

20 1 6. それぞれ担体が固定化された複数の担体支持部材を有し、担体支持部材の後端部がそれぞれ面材に固定されており、それぞれの支持部材に対応した複数の中空ホルダーを有する、請求の範囲第 9 ～ 1 5 項のいずれか 1 項記載の方法。

図 1

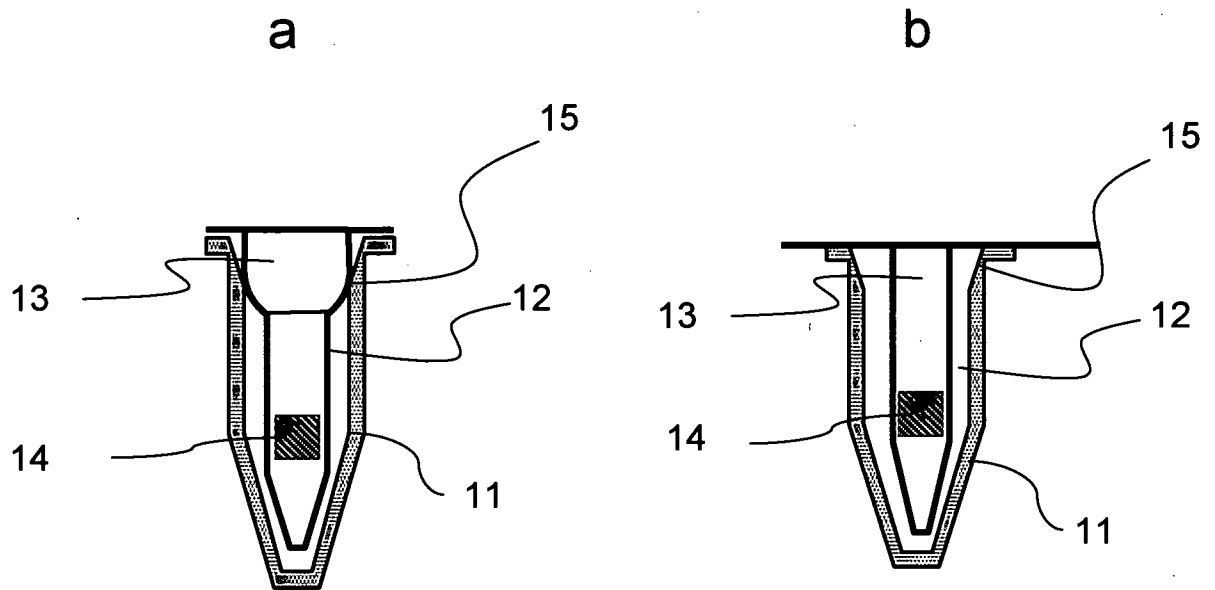


図2

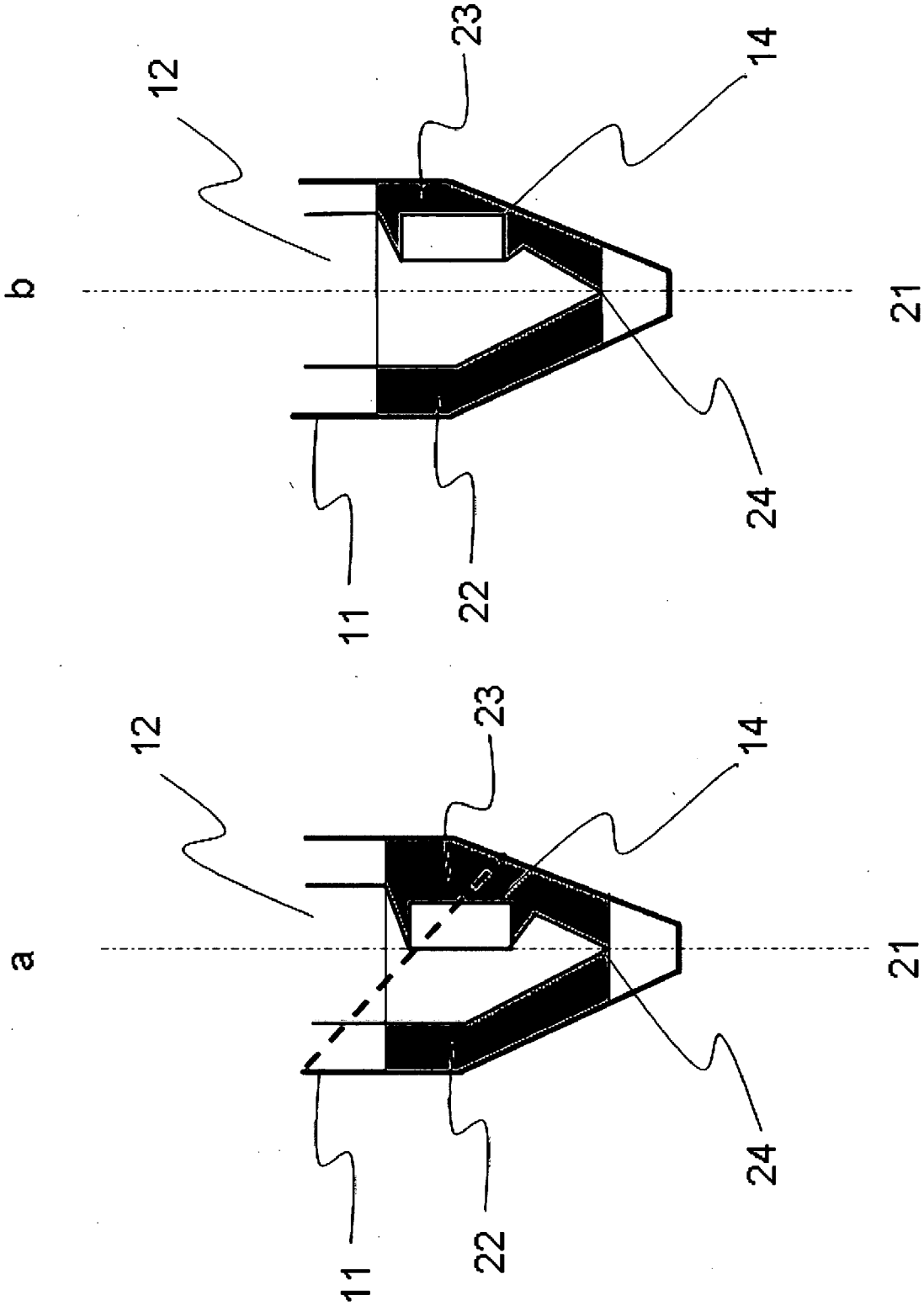


図 3

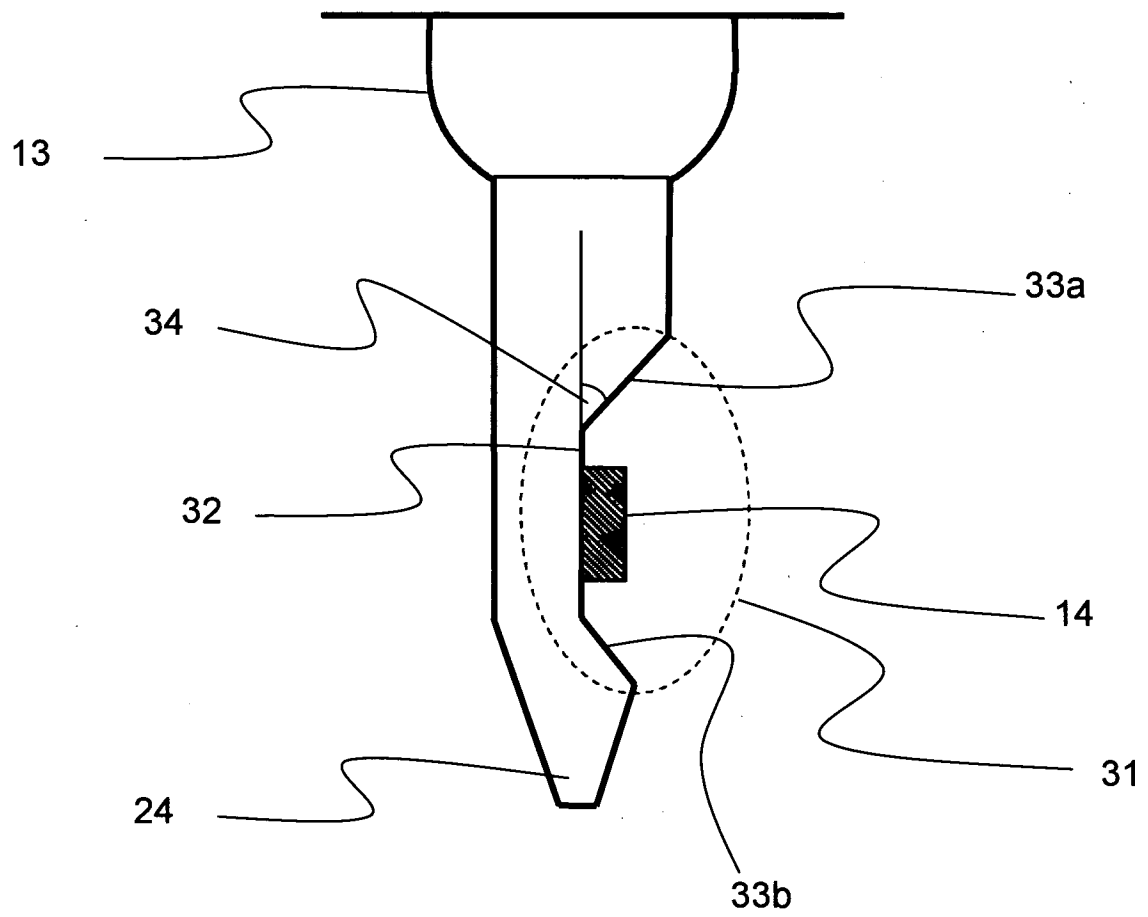


図 4

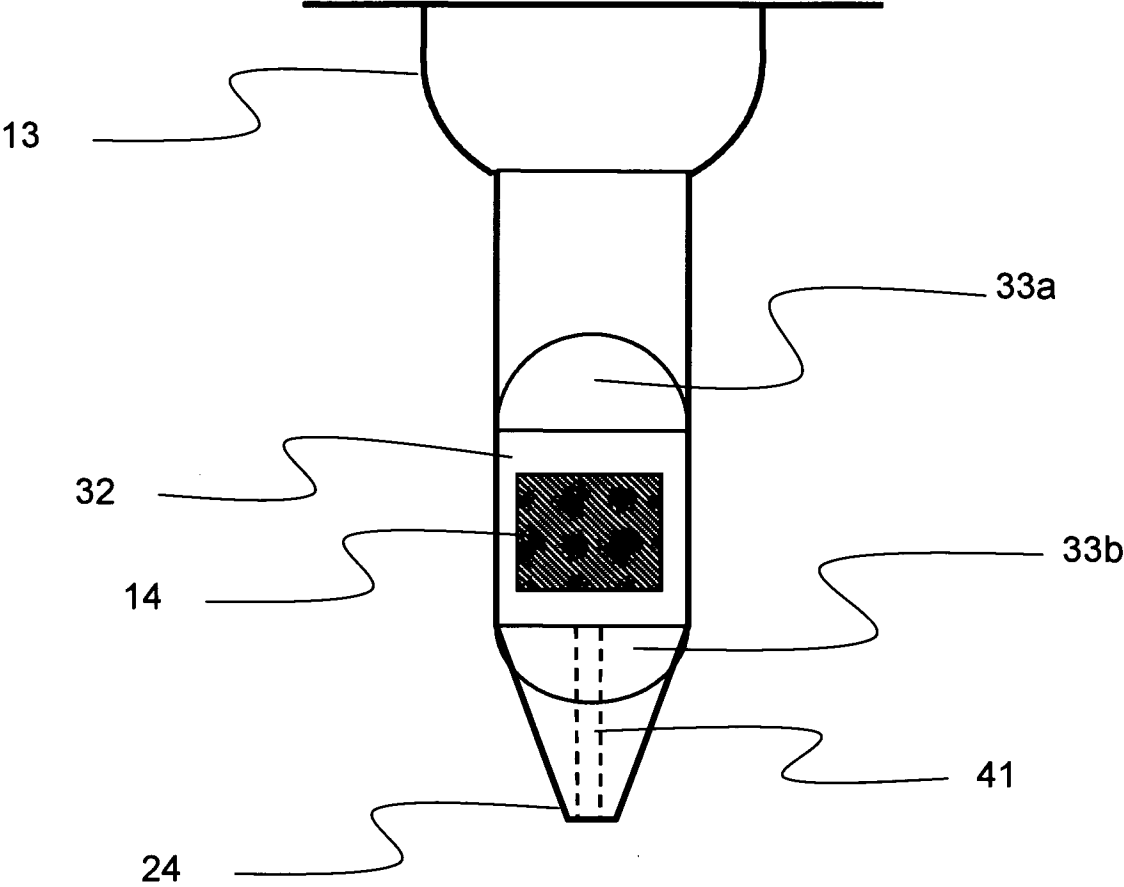


図 5

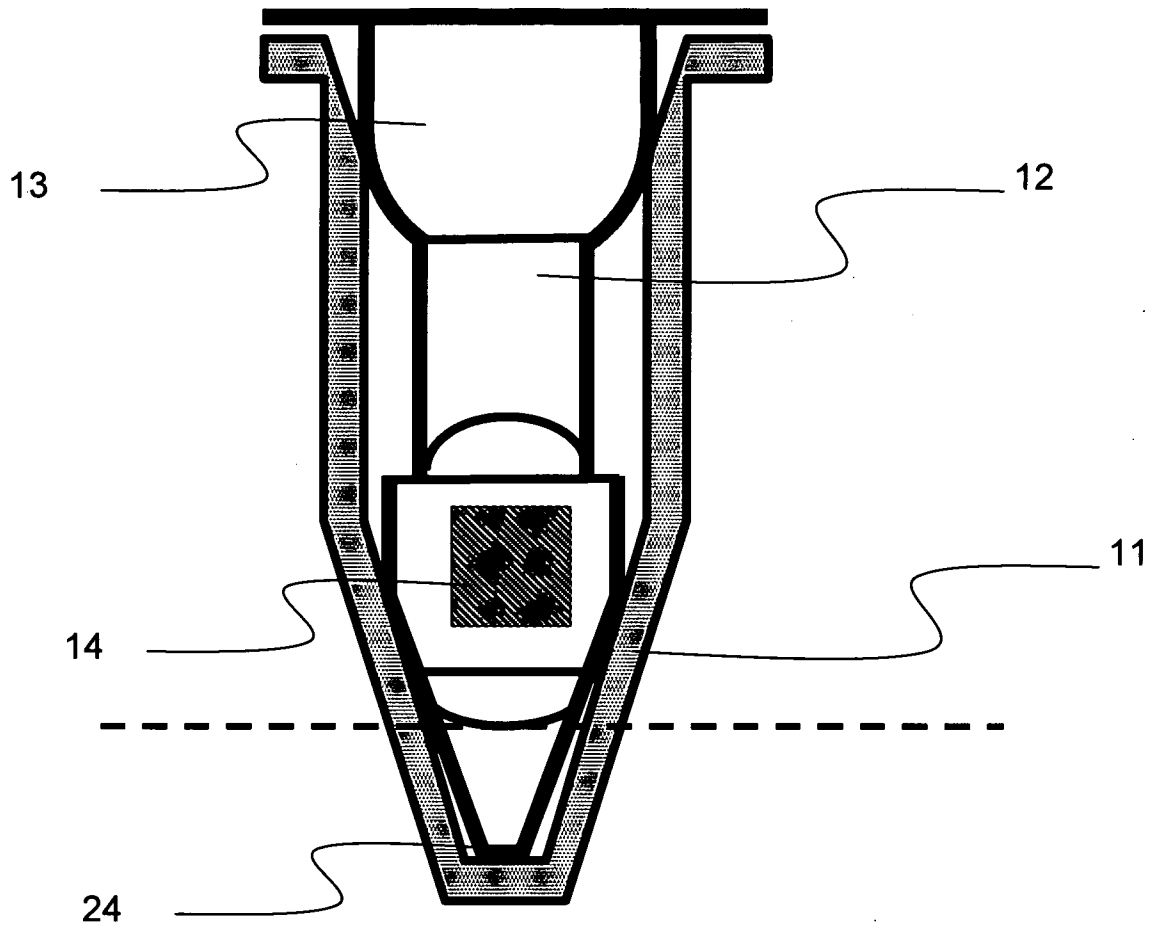


図 6

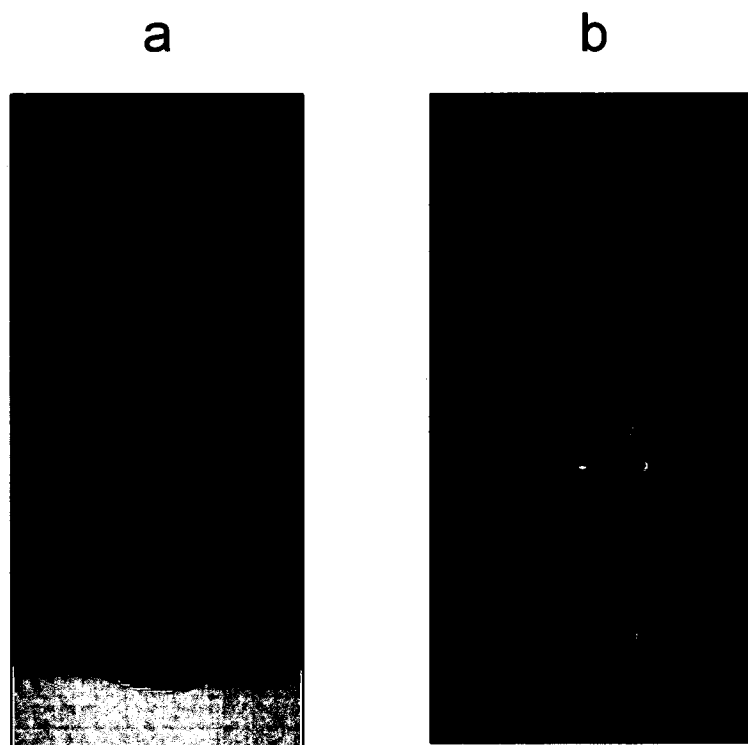


図 7

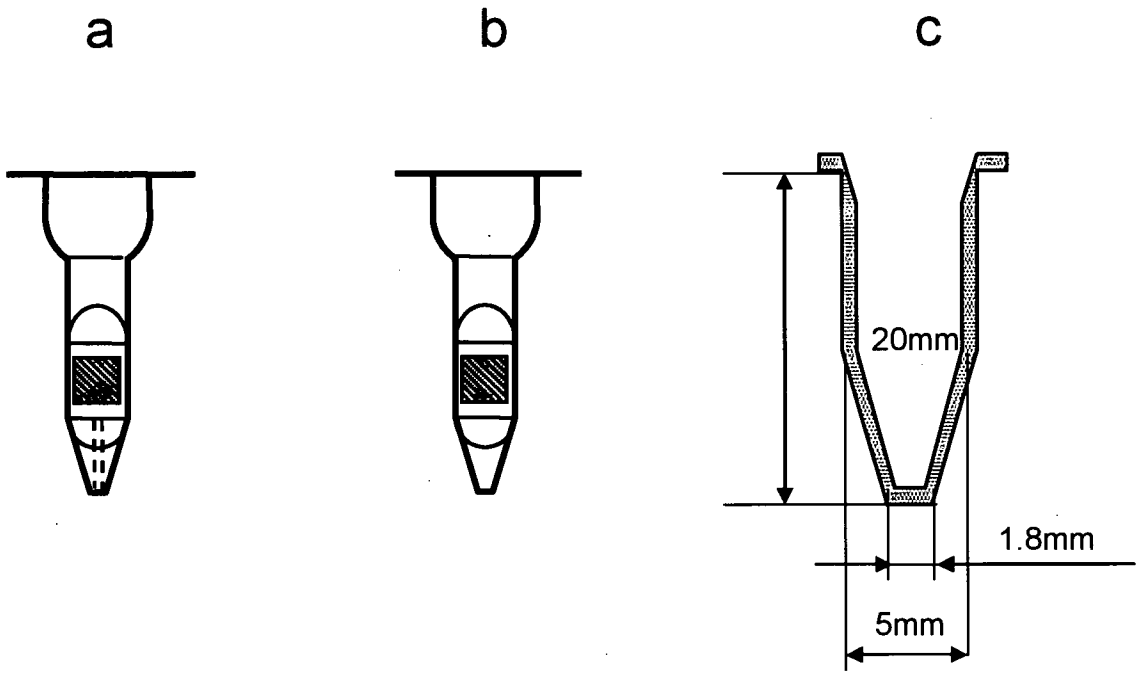
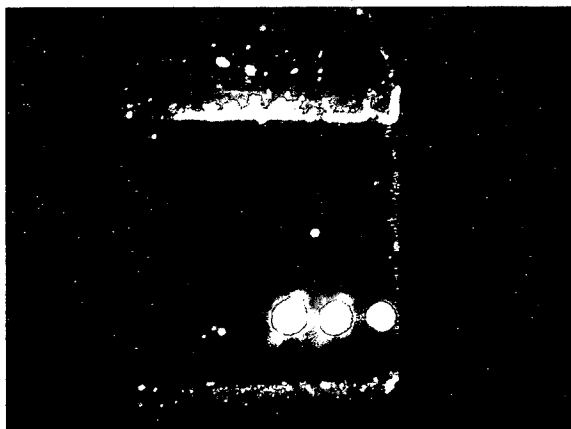


図 8

a



b

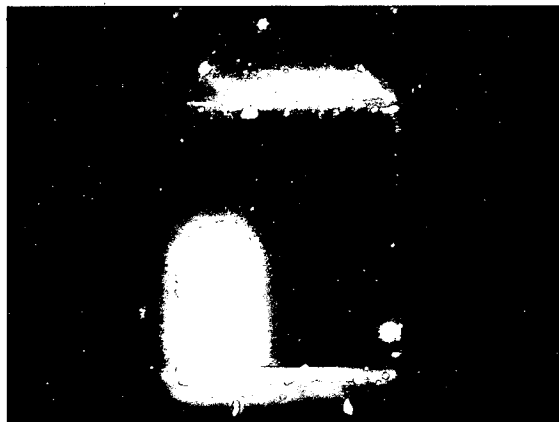
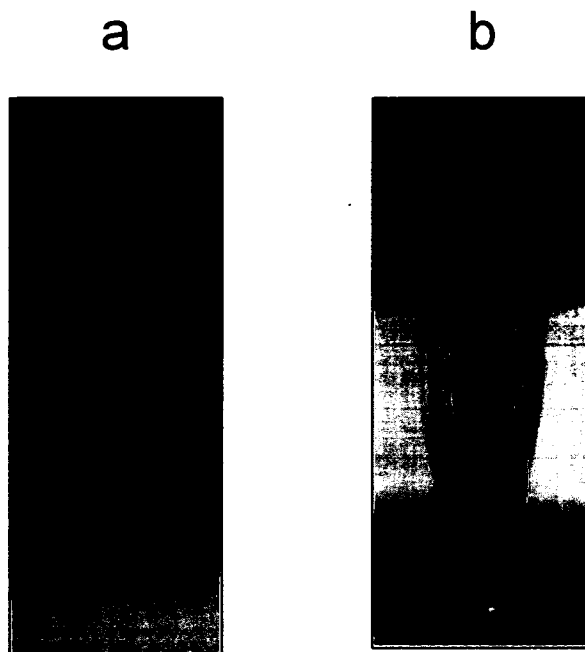


図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059931

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N35/02(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)

G01N35/02, G01N33/543, G01N37/00

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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.
X	JP 2003-107083 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 09 April, 2003 (09.04.03), Full text; all drawings & US 2003/0064386 A1	1, 6-9, 14-16
X	WO 92/17782 A1 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 15 October, 1992 (15.10.92), Full text; all drawings & JP 3126383 B & US 5418171 A & EP 532762 A1 & DE 69226916 C & AT 170981 T	1, 2, 6-10, 14-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 August, 2009 (12.08.09)

Date of mailing of the international search report
25 August, 2009 (25.08.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059931

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 10-501069 A (Becton Dickinson and Co.), 27 January, 1998 (27.01.98), Full text; all drawings & US 5578446 A & EP 770214 A & WO 1996/001997 A1 & AU 3001395 A & BR 9508258 A & CA 2194589 A	1-16
A	JP 2006-3349 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 05 January, 2006 (05.01.06), Full text; all drawings (Family: none)	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N35/02(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（I P C））

Int.Cl. G01N35/02, G01N33/543, 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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 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
X	JP 2003-107083 A（オリンパス光学工業株式会社）2003.04.09, 全文, 全図 & US 2003/0064386 A1	1, 6-9, 14-16
X	WO 92/17782 A1（明治製菓株式会社）1992.10.15, 全文, 全図 & JP 3126383 B & US 5418171 A & EP 532762 A1 & DE 69226916 C & AT 170981 T	1, 2, 6-10, 14-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 2 . 0 8 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 5 . 0 8 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

2 J

9 1 1 6

▲高▼見 重雄

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 10-501069 A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) 1998.01.27, 全文, 全図 & US 5578446 A & EP 770214 A & WO 1996/001997 A1 & AU 3001395 A & BR 9508258 A & CA 2194589 A	1-16
A	JP 2006-3349 A (三菱レイヨン株式会社) 2006.01.05, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-16