(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7575189号
(P7575189)

(45)発行日　令和6年10月29日(2024.10.29)

(24)登録日　令和6年10月21日(2024.10.21)

(51)国際特許分類		FI		
C12Q 1/02 (2006.01)		C12Q	1/02	ZNA
C12N 15/10 (2006.01)		C12N	15/10	100Z
C12Q 1/6806(2018.01)		C12Q	1/6806	Z
G01N 33/53 (2006.01)		G01N	33/53	D
C12M 1/34 (2006.01)		C12M	1/34	B

請求項の数　10　（全30頁）

(21)出願番号　特願2019-554295(P2019-554295)
(86)(22)出願日　平成30年11月15日(2018.11.15)
(86)国際出願番号　PCT/JP2018/042362
(87)国際公開番号　WO2019/098301
(87)国際公開日　令和1年5月23日(2019.5.23)
審査請求日　令和3年10月20日(2021.10.20)
審判番号　不服2023-7869(P2023-7869/J1)
審判請求日　令和5年5月15日(2023.5.15)
(31)優先権主張番号　特願2017-222128(P2017-222128)
(32)優先日　平成29年11月17日(2017.11.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000003193
ＴＯＰＰＡＮホールディングス株式会社
東京都台東区台東１丁目５番１号
(74)代理人　100149548
弁理士　松沼 泰史
(74)代理人　100139686
弁理士　鈴木 史朗
(74)代理人　100169764
弁理士　清水 雄一郎
(74)代理人　100147267
弁理士　大槻 真紀子
(72)発明者　平瀬 匠
東京都台東区台東１丁目５番１号 凸版印刷株式会社内
(72)発明者　牧野 洋一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　標的分子の検出方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的分子の検出方法であって、

基材と、前記基材上に配置されたウェルアレイと、を備える流体デバイスを準備し、前記流体デバイスにおける前記ウェルアレイに、標的分子を含む構造体が分散した液体を送液し、前記ウェルアレイのウェルに前記構造体を導入する工程と、

前記ウェルアレイに封止液を送液し、前記ウェルに導入された前記液体の上層に前記封止液の層を形成させ、前記液体を前記ウェル内に封入する工程と、

前記ウェル内において前記構造体から前記標的分子を抽出する工程と、

前記ウェル内において前記標的分子を検出する工程と、

を備え、

前記標的分子を検出する工程が、シグナル増幅反応を含み、

前記導入する工程において、前記ウェルアレイにおける１つのウェルに１個以下の前記構造体を導入し、

前記ウェルの容積が１ａＬから１００ｆＬであり、

前記封入する工程と前記抽出する工程と前記検出する工程が連続して行われる、

標的分子の検出方法。

【請求項２】

前記構造体を検出する工程をさらに備える、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記標的分子を検出する工程と前記構造体を検出する工程とを同時に行う、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記標的分子を検出する工程において、２種類以上の前記標的分子を検出する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記構造体が、エクソソーム、細胞、細菌、ウイルス、真菌、および小胞体のうち少なくともいずれか１つである、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記標的分子が、核酸又はタンパク質である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記標的分子を抽出する工程を、物理的、化学的、生物学的手法のいずれかによって行う、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記構造体に対する特異的結合物質を有する捕捉物を、前記構造体に結合させる工程をさらに備える、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記構造体を導入する工程を、前記捕捉物を前記ウェルアレイの前記ウェルに導入することにより行う、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記特異的結合物質が抗体である、請求項８または９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、標的分子の検出方法に関する。
本願は、２０１７年１１月１７日に日本に出願された特願２０１７－２２２１２８号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。
【背景技術】
【０００２】
生体試料中の標的分子を定量的に検出することにより、疾患の早期発見や投薬の効果予測が行われている。従来、タンパク質の定量は酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）等により行われ、核酸の定量はリアルタイムＰＣＲ法等により行われてきた。
【０００３】
近年、疾患をより早期に発見する等の目的で、標的分子をより精度よく検出するニーズが高まっている。標的分子を精度よく検出する手法として、例えば、特許文献１、特許文献２、非特許文献１等には、多数の微小区画内で酵素反応を行う技術が記載されている。
これらの手法はデジタル計測と呼ばれている。
【０００４】
デジタル計測では、試料溶液を極めて多数の微小溶液に分割する。そして、各微小溶液からの信号を２値化し、標的分子が存在するか否かのみを判別して、標的分子数を計測する。デジタル計測によれば、従来のＥＬＩＳＡやリアルタイムＰＣＲ法等と比較して、検出感度及び定量性を格段に向上させることができる。
【０００５】
デジタルＰＣＲでは、１つの微小液滴に存在する鋳型となる核酸が０個ないし１個になるように、ＰＣＲ反応試薬と核酸との混合物が希釈されている。デジタルＰＣＲでは、核酸増幅の感度を高めるために、また多数の微小液滴に対して同時に核酸増幅を行うために、各微小液滴の体積は小さい方が好ましい。例えば、特許文献３には、各ウェルの容積が６ｎｌ（ナノリットル）となるように形成されたマイクロアレイ状の反応容器が開示されている。また、特許文献１には、深さ３μｍ、直径５μｍのウェルが流路内に多数形成さ

れたマイクロアレイに対して流路に試料を流して各ウェルに試料を導入した後、流路内の余剰試薬をオイルで押し出すことによって、各ウェル内に試料を導入する方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【文献】日本国特許第６１８３４７１号公報

【文献】日本国特表２０１４－５０３８３１号公報

【文献】国際公開第２０１３－１５１１３５号

【非特許文献】

【０００７】

【文献】Kim S. H., et al., Large-scale femtoliter droplet array fordigital counting of single biomolecules., Lab on a Chip, 12 (23), 4986-4991, 2012.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

デジタル計測においては、標的分子を含む構造体（例えば後述する、標的分子として核酸を有する構造体としての細胞等）から標的分子を抽出し、送液、分配した後に、微小液滴内に標的分子が存在する場合にシグナルを発生させ、標的分子の存在を検出する場合がある。しかしながら、構造体から標的分子を抽出する段階で、標的分子が失われ、減少する場合がある。また、特許文献１に記載されるような、マイクロアレイの各ウェルに流路とオイルを用いて試料を導入する検出方法では、試料中の標的分子が流路内に残存し、各ウェルに分配されずにオイルによって押し流され、標的分子の数が減少する場合がある。

この結果、標的分子の検出精度が低下してしまうという場合がある。

【０００９】

本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、標的分子を精度よく検出できる技術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】

【００１０】

（１）　本発明の第一態様に係る標的分子の検出方法は、基材と、前記基材上に配置されたウェルアレイと、を備える流体デバイスを準備し、前記流体デバイスにおける前記ウェルアレイに、標的分子を含む構造体が分散した液体を送液し、前記ウェルアレイのウェルに前記構造体を導入する工程と、前記ウェルアレイに封止液を送液し、前記ウェルに導入された前記液体の上層に前記封止液の層を形成させ、前記液体を前記ウェル内に封入する工程と、前記ウェル内において前記構造体から前記標的分子を抽出する工程と、前記ウェル内において前記標的分子を検出する工程と、を備え、前記標的分子を検出する工程が、シグナル増幅反応を含み、前記導入する工程において、前記ウェルアレイにおける１つのウェルに１個以下の前記構造体を導入し、前記ウェルの容積が１ａＬから１００ｆＬであり、前記封入する工程と前記抽出する工程と前記検出する工程が連続して行われる。

（２）　前記構造体を検出する工程をさらに備えてもよい。

（３）　前記標的分子を検出する工程と前記構造体を検出する工程とを同時に行ってもよい。

（４）　前記標的分子を検出する工程において、２種類以上の前記標的分子を検出してもよい。

（５）　前記構造体が、エクソソーム、細胞、細菌、ウイルス、真菌、および小胞体のうち少なくともいずれか１つであってもよい。

（６）　前記標的分子が、核酸又はタンパク質であってもよい。

（７）　前記標的分子を抽出する工程を、物理的、化学的、生物学的手法のいずれかによって行ってもよい。

（８）　前記構造体に対する特異的結合物質を有する捕捉物を、前記構造体に結合させる

工程をさらに備えてもよい。
（９）　前記構造体を導入する工程を、前記捕捉物を前記ウェルアレイの前記ウェルに導入することにより行ってもよい。
（１０）　前記特異的結合物質が抗体であってもよい。
【発明の効果】
【００１１】
本発明によれば、標的分子を精度よく検出できる技術を提供することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】流体デバイスへ試薬液を送液する方法を説明する模式断面図である。
【図２】流体デバイスへオイルを送液する方法を説明する模式断面図である。
【図３】流体デバイス内からシグナルを検出する方法を説明する模式断面図である。
【図４】（ａ）及び（ｂ）は、微小区画内で標的分子を検出する第１実施形態に係る方法を説明する模式断面図である。
【図５】（ａ）及び（ｂ）は、微小区画内で標的分子を検出する第２実施形態に係る方法を説明する模式断面図である。
【図６】実施例１に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【図７】実施例２に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【図８】実施例２に係るファージ濃度に対して蛍光が観察されたウェルの個数を示すグラフである。
【図９】実施例３に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【図１０】実施例４に係る様々なファージを崩壊させる手法によりファージ内部核酸の検出を検討した場合における時間に対する蛍光強度の変化を示すグラフである。
【図１１】図１０の拡大図であり、実施例４に係る様々なファージを崩壊させる手法によりファージ内部核酸の検出を検討した場合における時間に対する蛍光強度の変化を示すグラフである。
【図１２】実施例５に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【図１３】実施例６に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【図１４】実施例６に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【図１５】実施例６に係る蛍光顕微鏡観察の結果である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
以下、場合により図面を参照しつつ、本発明の実施形態について詳細に説明する。なお、図面中、同一又は相当部分には同一又は対応する符号を付し、重複する説明は省略する。なお、各図における寸法比は、説明のため誇張している部分があり、必ずしも実際の寸法比とは一致しない。
【００１４】
［流体デバイス］
本発明の一実施形態は、流体デバイスを用いて標的分子を検出する方法に関する。本実施形態に係る流体デバイスは、基材と、前記基材上に配置されたウェルアレイと、を備える。
また、本実施形態に係る流体デバイスは、流路と、前記流路内に配置されたウェルアレイとを備えていてもよい。
【００１５】
ウェルの形状、寸法、及び配置は特に限定されないが、本実施形態に係る方法において用いられる構造体、及び検出工程で使用する一定量の試薬液等を収容可能なウェルから構成されるウェルアレイを使用することが好ましい。ウェルは、無処理で使用してもよいし、目的に応じて、予めウェル内壁に抽出試薬、抗体等の検出試薬、特異的結合物質等を固定化したり、ウェル開口部を脂質二重膜で覆ったりする等の前処理を施してもよい。
【００１６】

流路は、構造体が分散した液体及び封止液を送液するための経路である。流路の形状、構造、容量等は特に限定されないが、流体デバイスに流路を形成した場合には、構造体が分散した液体を送液した際にウェルアレイの各ウェルに構造体が導入され、かつ封止液を挿入した際に各ウェルが個別に封止され微小液滴を形成することができるような流路を有する流体デバイスを使用することが好ましい。

なお、本実施形態において、流体デバイスにおける流路は、後述する試薬液、封止液などの液が充填、配置されるように形成された内部空間であればよく、流路のことを内部空間と呼ぶことがある。

例えば、流体デバイスにおいて、ウェルアレイに試薬液（例えば、水溶液）を滴下して満たした後に、封止液（例えば、オイル）を上から静かに滴下し、ウェルアレイ上を封止液で封止することができるような構成を有していてもよい。

また、内部空間は、ウェルアレイを試薬液で満たし、封止液でウェルアレイを封止した後で、蓋材を被せることによって形成してもよい。

【００１７】

（流体デバイスの一例）

図１は、流体デバイスの模式断面図である。図１に示すように、流体デバイス１００は、基材１０４と蓋材１０１とを備えている。

【００１８】

基材１０４は、光透過性樹脂から形成されていてよい。本実施形態に係る基材１０４は、実質的に透明であってもよい。

【００１９】

基材１０４は、複数のウェル（以下、複数のウェルを「ウェルアレイ」と呼ぶことがある）１０５を有する。基材１０４のウェル１０５は、基材１０４の表面に開口している。ウェル１０５の形状、寸法、および配置は特に限定されないが、１つのウェル１０５に１個の構造体が導入されるのに適した形状および寸法に設計するのが好ましい。通常、ウェル１０５は容積が小さい微小ウェルとするのが好ましい。例えば、１つのウェル１０５の容積としては１ａＬから１００ｆＬとしてもよい。

図１に示す例では、では、流体デバイス１００を用いて行われる生化学分析において使用される一定量の試薬液１０７（標的分子を含む構造体が分散した液体）を収容可能な同形同大の複数のウェル１０５が基材１０４に形成されている。また、流体デバイス１００を用いて行われる生化学分析において粒子が使用される場合には、粒子を１つ以上収容可能な形状及び寸法を有し、粒子を含んだ一定量の試薬液１０７を収容可能な同形同大のウェル１０５が基材１０４に形成されていてもよい。同形同大とは、デジタル計測を行うために要求される程度に同一の形状で同一の容量であればよく、製造上の誤差程度のばらつきであれば許容される。

【００２０】

流体デバイス１００では、ウェル１０５の直径は例えば３μｍ程度であってもよく、ウェル１０５の深さは例えば４．５μｍ程度であってもよい。また、ウェル１０５は、三角格子状又は正方格子状を形成するように整列して基材１０４に形成されていてもよい。

【００２１】

基材１０４の、複数のウェル１０５を含んだ領域は、生化学分析において分析対象となる試薬液１０７が充填される領域となっている。流体デバイス１００において、試薬液１０７が充填される領域の内側（内部空間）では、基材１０４と蓋材１０１との間に流路１０６（流路となるような内部空間）が設けられている。

なお、本実施形態において、流体デバイス１００における流路１０６は、試薬液１０７、後述する封止液２０１などの液が充填、配置されるように形成された内部空間であればよく、流路１０６のことを内部空間と呼ぶことがある。

例えば、流体デバイス１００において、複数のウェル１０５（ウェルアレイ）に試薬液１０７（例えば、水溶液）を滴下して満たした後に、封止液２０１（例えば、オイル）を上から静かに滴下し、複数のウェル１０５上を封止液２０１で封止することができるよう

な構成を有していてもよい。

【００２２】

蓋材１０１は、基材１０４に対して溶着または接着されていてもよい。例えば、蓋材１０１は、自家蛍光の少ない樹脂を選ぶことが好ましく、シクロオレフィンポリマー、シクロオレフィンコポリマーなどの熱可塑性樹脂から形成されていてもよい。また、蓋材１０１は、シグナルを蛍光観察する際に検出される波長の近傍の波長の光を透過しない材料から形成されていてもよく、完全に光を透過しない材料から形成されていてもよい。例えば、カーボンや金属粒子等を添加した熱可塑性樹脂から形成されていてもよい。

【００２３】

基材１０４は、例えば樹脂を用いて形成される。樹脂の種類は特に限定されないが、試薬及び液滴を形成する際の封止液に対し耐性のある樹脂を用いることが好ましい。また、シグナルを蛍光観察する場合には、自家蛍光の少ない樹脂を選ぶことが好ましい。例えば、シクロオレフィンポリマーや、シクロオレフィンコポリマー、シリコン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル、フッ素樹脂、アモルファスフッ素樹脂などが挙げられる。なお、基材１０４の例として示されたこれらの材質はあくまでも例であり、材質はこれらには限られない。

【００２４】

基材１０４に対しては、板厚方向の一方の面に複数のウェル１０５が形成されていてもよい。樹脂を用いた形成方法としては、射出成形のほか、熱インプリントや、光インプリントなどによってもよい。また、フッ素樹脂を用いる場合には、例えば、基材１０４の上にＣＹＴＯＰ（登録商標）（旭硝子）の層を有し、ＣＹＴＯＰ（登録商標）に形成された微小な孔がウェル１０５となっていてもよい。

【００２５】

蓋材１０１は、組立時に基材１０４に向けられる面に凸部を有するように成形される。

例えば熱可塑性樹脂の流動体を、成形型を用いて成形することで、凸部を有する板状に成形してもよい。また、蓋材１０１には送液ポート１０２および廃液ポート１０３が形成されてもよい。

【００２６】

蓋材１０１および基材１０４が上記のように成形されたら、基材１０４においてウェル１０５が開口する側の面に蓋材の凸部が接するように、蓋材１０１と基材１０４とが重ねられる。これによって、流路１０６が形成される。さらに、蓋材１０１と基材１０４とが上記のように重ねられた状態で、レーザー溶着等により溶着される。

【００２７】

［従来の検出方法］

最初に、流体デバイスを用いた従来の標的分子の検出方法について、図１～図３に示す代表的な流体デバイスの模式断面図を用いて説明する。

【００２８】

まず、図１に示すように、流体デバイス１００のウェル１０５に１ウェル当たり１分子の標的分子が入るように希釈された試薬液１０７を、蓋材１０１の送液ポート１０２から、基材１０４と蓋材１０１との間の流路１０６に送液する。送液工程において基材１０４と蓋材１０１との間の流路１０６に送液された試薬液１０７は、複数のウェル１０５の内部に収容される。続いて、図２に示すように、蓋材１０１の送液ポート１０２から、基材１０４と蓋材１０１との流路１０６に、封止液２０１、例えば油性のオイルを送液して複数のウェル１０５を個別に封止する。封止工程において、封止液２０１は、上記の送液工程において基材１０４と蓋材１０１との流路１０６に送液された試薬液１０７のうち、ウェル１０５に収容されていない試薬液１０７を置換する。これにより、封止液２０１が複数のウェル１０５を個別に封止し、ウェル１０５は独立した反応空間（微小区画２０２）となる。続いて、図３に示すように、ウェル１０５内で所定の生化学反応（反応工程）を行い、その後、反応工程におけるシグナル増幅反応によって増幅されたシグナルを観察する。

【００２９】
従来の検出方法では、細胞やウイルス等の構造体に含まれる核酸やタンパク質等の標的分子を検出する場合、予め構造体から標的分子を抽出し、送液工程において試薬液１０７として送液する。その際、構造体から標的分子を抽出する段階および送液工程で標的分子が失われ、減少する場合がある。また、標的分子がウェル１０５内に分配されず、流路１０６に留まり、封止工程において封止液２０１に押し流され、反応工程においてシグナル増幅反応が観測されず、存在が検出されない場合がある。
【００３０】
このように従来の検出方法では、送液、封止工程において、ウェルに標的分子がうまく分配されないことが生じると、構造体に含まれる標的分子を正確に検出することができない場合がある。
【００３１】
［標的分子の検出方法］
本発明の一実施形態に係る標的分子の検出方法は、基材と、前記基材上に配置されたウェルアレイと、を備える流体デバイスを準備し、前記流体デバイスにおける前記ウェルアレイに、標的分子を含む構造体が分散した液体を送液し、前記ウェルアレイのウェルに前記構造体を導入する工程と、前記ウェルアレイに封止液を送液し、前記ウェルに導入された前記液体の上層に前記封止液の層を形成させ、前記液体を前記ウェル内に封入する工程と、前記構造体から前記標的分子を抽出する工程と、前記標的分子を検出する工程と、を備える。
また、本実施形態において、流体デバイスが流路を有している場合には、本実施形態に係る標的分子の検出方法は、流路と、前記流路内に配置されたウェルアレイとを備える流体デバイスを準備し、前記流体デバイスの前記流路に、標的分子を含む構造体が分散した液体を送液し、前記ウェルアレイのウェルに前記構造体を導入する工程、前記流路に封止液を送液し、前記ウェルに導入された前記液体の上層に封止液の層を形成させ、前記液体を前記ウェル内に封入する工程、構造体から標的分子を抽出する工程、及び前記標的分子を検出する工程、を備えていてもよい。
【００３２】
本実施形態に係る検出方法によれば、ウェルに分配されずに失われる標的分子の数が少なくなるので、検出精度が向上する。また、事前に構造体から標的分子を抽出する工程を必要としないので、簡便に標的分子を検出することができる。以下、各工程について詳細に説明する。
【００３３】
（ウェルに構造体を導入する工程）
本工程では、流体デバイス（流体デバイスの流路）に、標的分子を含む構造体が分散した液体を送液し、ウェルアレイのウェルに前記構造体を導入する。
【００３４】
構造体としては、特に制限されず、任意の構造体を用いることができる。具体的な構造体としては、例えば、生体試料中のエクソソーム、細胞、細菌、ウイルス、真菌、小胞体等が挙げられる。生体試料としては特に制限されず、血清、血漿、尿等が挙げられる。
【００３５】
構造体は、標的分子を含む。本願明細書において、構造体が標的分子を「含む」とは、構造体が標的分子を内包することか、又は標的分子の一部若しくは全部が構造体の表面に存在することを指し得る。標的分子の具体的な例としては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ等の核酸、構造タンパク質、酵素等のタンパク質、糖、脂質等が挙げられる。
【００３６】
構造体を分散させる液体には、流体デバイスを用いて行われる生化学分析において使用される一般的な液体を用いることができ、好ましくは水性溶液である。界面活性剤等を含むことで、ウェル内に液体を封入しやすくしてもよい。また、後述する、標的分子を抽出する工程や、標的分子を検出する工程に必要な試薬等を含んでいてもよい。例えば、標的

分子の検出にＩｎｖａｓｉｖｅ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ａｓｓａｙ（ＩＣＡ）反応を用いる場合は、構造体を分散させる液体中に、アレルプローブ、ＩＣＡオリゴ、Ｆｌａｐ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ－１（ＦＥＮ－１）、蛍光基質等のＩＣＡ反応試薬が含まれていてもよい。

【００３７】

構造体をウェルに「導入する」とは、ウェルアレイの各ウェルに構造体を分配することを指す。例えば、微小液滴に標的分子を含む構造体全体が納入（収容）されるように構造体を各ウェルに導入してもよいし、あるいは、各ウェルの上部に構造体を配置し、構造体が各ウェルの上部に配置された状態で後述する抽出工程を行うことで標的分子のみをウェルに導入してもよい。後者の具体的な例としては、構造体としてのウイルスを、ウェル上部の開口部を覆う脂質二重膜に付着させ、ウイルス感染機構を利用してＲＮＡを抽出し、ウェルの内部に抽出したＲＮＡのみを導入する方法が挙げられる。すなわち、この例では、導入工程と抽出工程が同時に行われる。

【００３８】

導入工程において１つのウェルに導入される構造体の数は特に制限されないが、好ましくは、１つのウェルに０個又は１個の構造体が導入される。これにより、構造体の検出を１個単位で行うことができ、すなわちデジタル計測が可能となる。また、ウェルアレイの全てのウェルに構造体が導入される必要はない。

【００３９】

構造体をウェルに導入する手段は、特に制限されず、選択した構造体に応じた適切な手段を選択することができる。例えば、構造体を自重により流体デバイス内（流路内）で沈降させ、ウェルに分配する方法が挙げられる。あるいは、構造体を捕捉する物質（捕捉物）を利用し、自重で沈降し難い構造体に捕捉物を結合させて送液したり、予めウェルに捕捉物を固定化させておき、送液された構造体を捕捉したりすることで、導入効率を向上させることもできる。

【００４０】

（封入する工程）

本工程では、流体デバイスの内部空間（例えば、流路）に封止液を送液し、ウェルに導入された液体の上層に封止液の層を形成させ、液体をウェル内に封入する。この工程により、ウェル中に微小液滴が形成される。

なお、本工程では、流体デバイスにおいて、ウェルアレイに試薬液（例えば、水溶液）を滴下して満たした後に、封止液（例えば、オイル）を上から静かに滴下し、ウェルアレイ上を封止液で封止してもよい。

【００４１】

封止液は、複数のウェルに導入された液体同士を互いに混合しないように個別に封止して液滴（微小液滴）を形成することができる液であり、好ましくは油性溶液、より好ましくはオイルである。オイルとしては、フッ素系オイル、シリコーン系オイル、炭化水素系オイル、又はこれらの混合物等を使用することができ、より具体的にはシグマ社製の商品名「ＦＣ－４０」等を用いることができる。

【００４２】

（構造体から標的分子を抽出する工程）

本工程では、構造体から標的分子を抽出する。抽出工程においては、構造体から全ての標的分子が抽出されてもよいし、構造体に含まれる標的分子の一部のみが抽出されてもよい。

【００４３】

構造体から標的分子を抽出する方法としては、特に制限されず、公知の手法を用いることができる。例えば、熱、超音波、光、磁力、電磁波等の物理的手法、界面活性剤、抗生物質、浸透圧誘導剤、ネクローシス・アポトーシス誘導剤等の化学的手法、酵素、ウイルス、ファージ等の生物学手法等が挙げられる。

より具体的には、抽出方法として熱を用いる場合、流体デバイスを７０℃以上、好まし

くは７５℃以上、例えば約８０℃で、少なくとも５分間、好ましくは少なくとも１０分間、例えば約１５分間又は約３０分間加熱することにより、構造体から標的分子を抽出することができる。

生物学的手法による抽出方法の具体例としては、ｆ１ファージ等のファージを大腸菌等の細菌に感染させて溶菌させる手法が挙げられる。また、生物学的手法による抽出方法の別の具体例としては、構造体としてのｆ１ファージ等のファージの中から、標的分子として核酸を溶出させる場合がある。より具体的には、ファージ（構造体）を細菌に接触させると、まずファージが細菌の表面膜構造(タンパク質、脂質二重膜)を認識し、結合する。続いて、ファージから細菌内に核酸（標的分子）が注入される。続いて、細菌内で核酸が複製され、新たなファージが生成される。その後、菌体内で生成されたファージの作用により、細菌の細胞膜が崩壊し（溶菌）、注入、複製された標的分子のＤＮＡが放出される。あるいは、上記ファージによる内部からの溶菌の代わりに、熱等の外力によって菌体を崩壊させ、中のファージを取り出してもよい。また、前記の場合において、細菌そのものを用いずに、細菌の膜構造を模した脂質二重膜様物質を用いてもよい。当該脂質二重膜様物質にファージを付着させることで、菌体に付着させた場合と同様にして、ファージはファージの内部に含まれる核酸をファージの外に溶出させる。このような場合は、溶菌のステップは行わなくてもよい。

【００４４】

構造体から標的分子を抽出する工程は、ウェルが封止された後、ウェル内で行われてもよい。これにより、標的分子の損失を抑制することができる。その結果、標的分子を構造体から抽出した後に流路を用いてマイクロアレイの各ウェルに分配する従来の方法と比較して、標的分子を精度よく検出することができる。

【００４５】

（標的分子を検出する工程）

本工程では、標的分子を検出する。標的分子を検出する方法は、検出したい標的分子の特性に合わせて、公知の任意の検出方法を使用することができる。例えば、まず必要に応じて標的分子由来のシグナルを検出可能なレベルまで増幅させる反応（シグナル増幅反応）を行い、次いで増幅されたシグナルを適切な手段を用いて検出することにより、行うことができる。本実施形態において、標的分子を検出する工程は、核酸を検出する方法により行う。

【００４６】

本実施形態に係る検出方法において使用することができるシグナルの例としては、蛍光、化学発光、発色、電位変化、ｐＨ変化等が挙げられる。

【００４７】

シグナル増幅反応は、例えば生化学反応、より具体的には酵素反応であってもよい。一例として、シグナル増幅反応は、シグナル増幅のための酵素を含んだ試薬液がウェル内に収容された状態で、流体デバイスを、所望の酵素活性が得られる一定温度条件下、例えば６０℃以上、好ましくは約６６℃で、所定時間、例えば少なくとも１０分間、好ましくは約１５分間、維持する等温反応である。

【００４８】

シグナル増幅反応の例としては、具体的には、核酸を検出する反応を使用する場合は、インベーダー（登録商標）法等のＩＣＡ反応や、ＬＡＭＰ法（商標登録）、ＴａｑＭａｎ（登録商標）法、蛍光プローブ法等が挙げられる。ＩＣＡ反応を用いることが特に好ましい。これは、（１）核酸同士の相補的結合と、（２）酵素による三重鎖構造の認識および切断との２つの反応のサイクルによってシグナル増幅が進行するというＩＣＡ反応の原理に関連する。このようなシグナル増幅反応においては、標的分子以外の夾雑物による反応サイクル阻害の影響が小さい。したがって、抽出工程において構造体内に存在する標的分子以外の様々な成分が微小区画内に放出される場合でも、ＩＣＡ反応を用いることにより、標的分子を精度よく検出することができる。例えば、シグナル増幅反応にＩＣＡ反応を用いる場合、ウェルに構造体を導入するための液体（構造体を分散させる液体）は、ＩＣ

Ａ反応に必要な反応試薬及び鋳型核酸を含む。反応工程における生化学反応がＩＣＡ反応である場合、等温反応による酵素反応によって、ウェルに標的分子が存在する場合には、蛍光物質が消光物質から遊離することによって、励起光に対応して所定の蛍光シグナルを発する。

【００４９】

あるいは、標的分子の検出は、標的分子に特異的に結合する物質（特異的結合物質）を標的分子に結合させ、結合した特異的結合物質を検出することによっても、行うことができる。例えば、標的分子がタンパク質である場合、ＥＬＩＳＡを用いて検出することができる。より具体的には、検出は、例えばＦＲＥＴの原理を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡにより、行ってもよい。ＦＲＥＴの原理を用いたサンドイッチ法を行う場合は、まず、第１の蛍光物質（ドナー）で標識した第１の特異的結合物質（例えば抗体）と、第１の蛍光物質の蛍光波長と重複する吸光波長を有する第２の蛍光物質（アクセプター）で標識した第２の特異的結合物質を準備する。続いて、標的分子（例えば抗原）を、第１の特異的結合物質と第２の特異的結合物質の両方と接触させ、複合体を形成させる。複合体が形成されると、ドナーとアクセプターの距離が近づき、ドナーの励起波長の照射によりアクセプターの蛍光波長を検出することができるようになる。あるいは、特異的結合物質を核酸断片で標識しておき、核酸断片をＩＣＡ反応により検出してもよい。

【００５０】

特異的結合物質としては、後述する構造体に対する特異的結合分子と同様のもの、例えば抗体、抗体断片、アプタマー等を使用することができる。標的分子に結合した特異的結合物質を検出するために、特異的結合物質を、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）等の酵素により、直接的又は間接的に標識してもよい。２以上の特異的結合物質を使用する場合は、各々の特異的結合分子を、互いに識別可能に標識することができる。

【００５１】

シグナルの観察方法は、観察するシグナルの種類に応じて公知の適切な方法を選択することができる。例えば、明視野観察を行う場合は、ウェルアレイが設けられた基材に対して垂直方向に白色光を照射する。蛍光シグナルを観察する場合は、蛍光物質に対応する励起光をウェルの底側からウェル内へ照射し、蛍光物質が発する蛍光を観察する。観察されたウェルアレイの全体又は一部の画像を撮影して保存し、コンピューターシステムによる画像処理を行う。

【００５２】

（検出工程の一例）

本実施形態において、１つの標的分子を２以上の特異的結合物質を用いて検出することができる。例えば、認識するエピトープが互いに異なる２種類のモノクローナル抗体を用いて１種類のタンパク質を検出することができる。これにより、特異的結合物質が誤認識を生じる場合や、ウェル中に類似する標的分子が混在する場合であっても、目的の標的分子を高精度に検出することができる。

【００５３】

本実施形態に係る標的分子の検出方法は、２種類以上の標的分子を検出することができる。この場合、各々の標的分子は、いずれの順序で検出してもよい。例えば、２種類の標的分子を検出する場合は、２種類の標的分子を単一の検出工程において同時に検出してもよいし、あるいは、独立した２つの検出工程において別個に検出してもよい。これにより、構造体が有する複数の標的分子を検出することが可能となる。

また、本実施形態に係る検出方法は、構造体を各微小液滴に分配した後に抽出工程を行うため、個々の構造体について、各標的分子の検出データを対応させて評価することができる。

なお、２種類以上の標的分子を同時に検出する場合や、同時ではなくても各標的分子が検出可能な状態で共存している状況で順次検出する場合等には、各標的分子それぞれの存在を示すシグナルが混同しないように反応系を設計する必要がある。例えば、蛍光シグナ

ルによって検出を行う場合には、第１の標的分子と第２の標的分子とで、励起光や蛍光の波長を異なる帯域とすることで、両者の存在による干渉を受けることなく独立して蛍光を検出することができる。

【００５４】

本実施形態に係る標的分子の検出方法は、抽出工程を行う前に標的分子を検出する工程をさらに備えていてもよい。この工程は、構造体に含まれる標的分子を、構造体から抽出されていない状態で検出する工程である。この工程において検出される標的分子は、構造体の表面に存在する標的分子であってもよいし、構造体の内部に存在する標的分子であってもよい。

【００５５】

検出工程を抽出工程の前に行う場合、検出工程の温度は、好ましくは標的成分が抽出される温度よりも低い温度、より具体的には室温から約６０℃の範囲の温度で行うことができる。

【００５６】

上で詳述した各工程は、上述の順序で順次行ってもよい。そうすること（例えば、標的分子を検出する工程が標的分子を抽出する工程の後に行われること）で、構造体から抽出された標的分子がウェルの内部に留められた状態で検出することができるので、目的の標的分子を高精度に検出することができる。あるいは、各工程を順序を入れ替えて行ったり、２つの工程を同時に行ったりしてもよい。例えば、導入工程の後、封止工程を行う前に抽出工程を行ってもよく、その場合、導入工程と抽出工程とを同時に行ってもよい。また、上述のように複数の検出工程を備える場合は、複数の検出工程の一部を、抽出工程を行う前に行ってもよい。

【００５７】

［構造体を検出する工程をさらに備える検出方法］

本発明の一実施形態に係る検出方法は、上記実施形態に係る標的分子の検出方法において、構造体を検出する工程をさらに備えていてもよい。構造体を検出する工程は、上記実施形態に係る検出方法中の任意の時点で行うことができ、例えば、構造体をウェルに導入する工程の後、構造体から標的分子を抽出する工程の前に行ってもよい。あるいは、構造体から標的物質を抽出した後に、構造体を検出してもよい。

本発明の特定の実施形態に係る方法においては、標的分子を検出する工程と構造体を検出する工程とを同時に行ってもよい。

なお、同時検出等を行う場合において、相互に干渉しないように反応系を工夫する点については、前述した２種類以上の標的分子を同時に検出する場合と同様である。

なお、ウェル内部で標的分子を抽出する場合には、ウェル内部で標的分子を抽出することにより、標的分子が間違いなく構造体から抽出されたものであることを確認できる。

【００５８】

構造体の検出は、構造体を明視野観察する等、直接的に行ってもよいし、あるいは、構造体に含まれる標的分子を、上述の検出工程と同様の操作を行って検出する等、間接的に行ってもよい。後者の例としては、細胞膜を染色する蛍光色素や、ウイルスコートタンパク質を認識する抗体等を用いる方法が挙げられる。

【００５９】

以下には、本発明の上記実施形態に係る標的分子の検出方法に関して、より具体的な実施形態を説明する。

（第１実施形態）

本発明の第１実施形態に係る標的分子の検出方法を説明する。本実施形態は、標的分子を有する構造体をウェルに導入する工程と、ウェルを封止する工程と、構造体から標的分子を抽出する工程と、標的分子を検出する工程とを備える。図４（ａ）及び（ｂ）は、微小区画内で標的分子を検出する本実施形態に係る方法を説明する模式断面図である。

【００６０】

まず、標的分子を有する構造体をウェルに導入する。構造体をウェルに導入する工程は

、例えば、図１に示すように、試薬液１０７を流路１０６に送液することでウェル１０５に構造体が分配されることにより行われる。
次に、図２に示すように、流路１０６に封止液２０１を送液し、ウェル１０５を個別に封止して微小区画２０２を形成する。
図４（ａ）では、標的分子１１を含む構造体１２が、基材１０４と封止液２０１により形成された微小区画２０２に収容されている。続いて、封止したウェル内において、構造物から標的分子を抽出する。
図４（ｂ）においては、抽出処理後の構造体１２’から、標的分子１１が抽出されている。
続いて、ウェル内で抽出された標的分子に対して、従来の検出方法と同様に反応工程にてシグナル増幅反応を用いて、標的分子を検出する。

【００６１】

（第２実施形態）

本発明の第２実施形態に係る標的分子の検出方法を説明する。本実施形態は、第１実施形態に係る方法において、捕捉物を構造体に結合させる工程をさらに備える。図５（ａ）及び（ｂ）は、微小区画内で標的分子を検出する本実施形態に係る方法を説明する模式断面図である。

【００６２】

図５（ａ）では、標的分子１１を含む構造体１２と、特異的結合物質１３と、捕捉物１４とが、基材１０４と封止液２０１により形成された微小区画２０２に収容されている。
捕捉物１４には、特異的結合物質１３が固定化されている。また、特異的結合物質１３は、構造体１２を認識し結合している。図５（ｂ）においては、抽出処理後の構造体１２’から、標的分子１１が抽出されている。

【００６３】

捕捉物を構造体に結合させる工程は、本実施形態の検出方法中の任意の時点で行うことができる。例えば、この工程は、ウェルに構造体を導入する工程の前に、サンプルチューブ内で構造体と捕捉物を接触させることにより行うことができる。あるいは、捕捉物をウェルに導入した後に、構造体を接触させることにより結合させてもよい。

【００６４】

捕捉物は、構造体を捕捉することができる物質である。例えば、標的分子に特異的に結合する物質（特異的結合物質）を固相、例えば粒子に固定化したものが挙げられるが、これに限定されない。捕捉物が有する特異的結合物質は１種類でもよいし、又は２種類以上、例えば３種類、４種類、５種類以上であってもよい。あるいは、例えば構造体としてウイルスを用いる場合、ウイルスが付着することができる細胞（すなわち、ウイルス受容体を有する細胞）を、捕捉物として用いてもよい。

【００６５】

特異的結合物質としては、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。抗体は、例えば、マウス等の動物に標的分子又は標的分子の断片を抗原として免疫反応させることによって作製することができる。あるいは、例えば、ファージライブラリーのスクリーニングにより作製することができる。抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、ジスルフィド安定化抗体（ｄｓＦｖ）、２量化体Ｖ領域断片（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ＣＤＲを含むペプチド等が挙げられる。抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよい。また、市販の抗体であってもよい。

【００６６】

粒子としては、特に制限されず、ポリマー粒子、磁気粒子、ガラス粒子等を利用することができる。粒子は、非特異的な吸着を避けるための表面処理を施してある粒子が好ましい。また、特異的結合物質を固定化するために、表面にカルボキシル基等の官能基を有する粒子を用いることが好ましい。より具体的には、ＪＳＲ社製の商品名「Ｍａｇｎｏｓｐｈｅｒｅ　ＬＣ３００」等を用いることができる。

【００６７】

特異的結合物質を粒子表面に固定化する方法としては、特に制限されず、物理吸着による方法、化学結合による方法、アビジン－ビオチンの結合を利用する方法、プロテインＧ又はプロテインＡと抗体との結合を利用する方法等が挙げられる。物理吸着による方法としては、疎水的相互作用、静電的相互作用により、特異的結合物質を粒子表面に固定化する方法が挙げられる。化学結合による方法としては、架橋剤を使用する方法が挙げられる。例えば、粒子の表面が水酸基を有する場合、特異的結合物質が有するカルボキシル基に架橋剤を反応させて活性エステル化した後、水酸基とこのエステル基とを反応させることにより、特異的結合物質を粒子表面に固定化させることができる。また、特異的結合物質による標的分子の認識能を阻害しないよう、特異的結合物質と粒子表面との間にスペーサーを設けることが好ましい。

【００６８】

本発明の一実施形態において、構造体を導入する工程を、捕捉物をウェルアレイのウェルに導入することにより行ってもよい。例えば、上述の方法で特異的結合物質を結合させた捕捉物に結合した構造体を分散させた液体を流路に送液し、ウェルに導入してもよい。

【００６９】

ここで、捕捉物１個に構造体が０個又は１個捕捉される条件で捕捉物と構造体とを接触させることが好ましい。さらに、１つのウェルには、捕捉物が０個又は１個導入されるように構成されることが好ましい。これによりデジタル計測が可能となる。すなわち、本実施形態において、構造体の検出は１個単位で行われてもよい。その場合は、構造体１個単位で、構造体に含まれる標的分子が検出される。

【００７０】

また、本発明の一実施形態において、構造体から標的分子を抽出する工程を、捕捉物によって行うことができる。さらに、本発明の一実施形態において、構造体を検出する工程を、捕捉物が有する特異的結合物質を検出することにより行うことができる。

【００７１】

（第３実施形態）

第３実施形態に係る標的分子の検出方法を説明する。本実施形態は、第１実施形態に係る方法において、構造体から標的分子を抽出する工程を、構造体に作用して標的分子を抽出することができる物質（抽出剤）を用いて行う。抽出剤は、上述の抽出工程に挙げた手法を行うために用いられる任意の物質であってよく、例えば、化学的手法において用いられる界面活性剤、抗生物質、浸透圧誘導剤、ネクローシス・アポトーシス誘導剤等、又は生物学的手法において用いられる酵素、ウイルス、ファージ等が挙げられる。例えば、構造体として細胞を用いる場合、抽出剤としてウイルスを細胞に感染させて細胞を溶解させ、標的分子として核酸を抽出することができる。

【００７２】

本実施形態に係る方法は、構造体と抽出剤とを接触させる工程を備える。構造体と抽出剤とは、いずれの順序で接触させてもよい。例えば、構造体と抽出剤とを、ウェルに構造体を導入する工程の前に混合し、続いて混合した液体を送液してウェルに導入してもよい。その場合、例えば構造体と抽出剤との混合比を調整する等の方法によって、ウェルが封止された後にウェル内で構造体から標的分子が抽出されるように、抽出条件を設計してもよい。あるいは、抽出剤をウェルに導入してから、構造体が分散した液体を送液し、ウェル内で接触させてもよい。

【００７３】

ウェルを封止した後に、ウェル内にて抽出剤が作用し、構造体が崩壊し、標的分子が抽出される。抽出された標的分子を、上述の検出方法により検出することができる。

【００７４】

（第４実施形態）

第４実施形態に係る標的分子の検出方法を説明する。本実施形態は、第１実施形態に係る方法において、構造体の表面に存在する第１の標的分子と、構造体の内部に存在する第２の標的分子とを検出する。

【００７５】
まず、第１実施形態と同様にしてウェルに構造体を導入し、封止する。続いて、第１の標的分子を検出する。第１の標的分子は、上述の任意の方法で検出することができ、例えば、第１の標的分子に対する特異的結合物質を用いて行ってもよく、特異的結合物質は、ウェルに導入する前に第１の標的分子に結合させてもよいし、ウェルに導入した後で結合させてもよい。
【００７６】
続いて、ウェル内にて第２の標的分子を抽出し、抽出された第２の標的分子を、上述の検出方法により検出する。
【００７７】
第１の標的分子と第２の標的分子は、上述のように順番に検出してもよいし、あるいは、同時に検出してもよい。
【実施例】
【００７８】
以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。本発明はこれらの実施例に何ら限定されない。
【００７９】
本実施例では、実験用の流体デバイスを製造するために、射出成形で形成したＣＯＰ製の基材とＣＯＰ製の蓋材（カーボンブラック添加着色、送液及び廃液ポート付）の２つの樹脂製の部材を使用した。基材に形成されたウェル（微小区画）の直径は５μｍであり、インベーダー反応によるシグナル検出が数分で可能な体積を有している。基材は蓋材に対して接着し、高さが１００μｍの流体デバイスの内部空間（流路）を形成した。
【００８０】
［実施例１］
（ファージの崩壊、および、ファージからの核酸の抽出検討）
構造体としてウイルスの一種であるｆ１ファージ（試薬名：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｐｈａｇｅ ｆ１、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：ＮＢＲＣ２００１０）（内包ＤＮＡ（ｆ１ ｐｈａｇｅ ｏｌｉｇｏ）として、「配列番号１」の塩基配列を有する）（表１参照）を用い、ファージの崩壊の検討、および、核酸、具体的にはｆ１ファージ内包ＤＮＡを標的分子として、標的分子の検出を行った。
【００８１】
（核酸検出試薬の調製）
ＩＣＡ反応の一種であるデジタルインベーダー反応を行うため、核酸検出試薬として、インベーダー反応試薬（ＩＣＡ反応試薬）を調製する。
実施例１におけるインベーダー反応試薬は、以下の表１に示す試薬を用いて、０．５μＭ アレルプローブ１（（ｆ１ｐｈａｇｅ）Ａｌｌｅｌｅ ｐｒｏｂｅ１）（配列番号２）、１μＭ インベーダーオリゴ１（配列番号３）（ＩＣＡオリゴ１）（以上ファスマック社）、４μＭ ＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅ１（Ａｌｅｘａ４８８－ＢＨＱ）（配列番号４）（日本バイオサービス社）（蛍光基質）、０．１ｍｇ／ｍＬ ＦＥＮ－１（Ｆｌａｐ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ－１）、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、および２０ｍＭ $MgCl_2$を含むように調製した。
なお、これらのインベーダー反応試薬における各成分の濃度は、実施例１に係るインベーダー反応試薬における終濃度である。
【００８２】

【表１】

試薬名	塩基配列 (5'→3')
f1phage oligo DNA (f1ファージ内包DNA)	ACGTTAAACAAAAAATCGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAATAATAT GGCTGTTTATTTTGTAACTGGCAAATTAGGCTCTGGAAAGACGCTCG TTAGCGTTGGTAAGATTCAGGATAAAATTGTAGCTGGGTGCAAAAT (配列番号1)
アレルプローブ1	CGCGCCGAGGGCCTAATTTGCCAGTTAC (配列番号2)
インベーダーオリゴ1 (ICAオリゴ1)	GCTAACGAGCGTCTTTCCAGAT (配列番号3)
FRET Cassette1 (Alexa488-BHQ)	XTTCTYAGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCGCG X:Alexa488-NHSで末端アミノ基を修飾 Y:BHQ1-dT phosphoramidite (配列番号4)
アレルプローブ2	CGCGCCGAGGCGCAGCTCATGCCC (配列番号5)
インベーダーオリゴ2 (ICAオリゴ2)	CCACCGTGCACTCATCAA (配列番号6)

【００８３】

＜ファージの崩壊、および、核酸抽出反応の検討＞

界面活性剤によって、ファージの崩壊が可能となるか検討を行った。

界面活性剤を含む試料として、サンプルチューブに、上記インベーダー反応試薬と界面活性剤を含む核酸抽出試薬であるＢｕｇｂｕｓｔｅｒ（メルクミリポア社製）とが１：１となるように調製した溶液と、上記ｆ１ファージ（１％）と、を混合した溶液（溶液Ａ）を調製し、室温で、１５分間撹拌した。

また、対照実験として、サンプルチューブに、上記インベーダー反応試薬と、上記ｆ１ファージ（１％）と、を混合した溶液（界面活性剤を含まない試料）（溶液Ｂ）を調製し、室温で、１５分間撹拌した。

なお、本実施例および以下の実施例におけるｆ１ファージの濃度は、販売されているｆ１ファージの懸濁液の濃度を１００％とした場合における希釈率として表している。

【００８４】

＜反応混合溶液の送液＞

流体デバイスに、界面活性剤を含む上記溶液Ａ　２０μＬを送液し、各ウェルに導入した。続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止した。これにより、１ウェル当たり１個以下のｆ１ファージがウェル内に封止された。

同様に、対照実験として、流体デバイスに、界面活性剤を含まない上記溶液Ｂ　２０μＬを送液し、各ウェルに導入した。続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止した。

【００８５】

＜核酸検出反応＞

上記流体デバイスをホットプレート上にセットし、６６℃で１５分間反応させた。これにより、アレルプローブ及びインベーダーオリゴによるファージ内包ＤＮＡの認識、ＦＥＮ－１によるアレルプローブの切断、放出されたアレルプローブ断片のＦＲＥＴ　Ｃａｓｓｅｔｔｅへの結合、ＦＥＮ－１によるＦＲＥＴ　Ｃａｓｓｅｔｔｅの切断、並びにＡｌｅｘａ４８８の蛍光シグナルの発生が起こる。

【００８６】

＜ウェルの蛍光観察＞

６６℃で１５分間加熱した後、蛍光顕微鏡ＢＺ－７１０（ＫＥＹＥＮＣＥ社）で１０倍

の対物レンズを用いて流体デバイスにおける各ウェルの核酸検出反応で得られる蛍光シグナルの蛍光画像を撮影した。露光時間は、ＧＦＰの蛍光フィルターを用いて３０００ｍｓｅｃとした。

実施例１の結果を図６に示す。

図６（ａ）に示されるように、インベーダー反応試薬（ＩＣＡ試薬）とＢｕｇｂｕｓｔｅｒとの混合溶液とｆ１ファージとを用いて調製した溶液Ａを、流体デバイスに供した際には、流体デバイスのウェル内に、検出対象であるファージ内包ＤＮＡ由来の蛍光シグナルを多数観察することができた。

一方、図６（ｂ）に示されるように、Ｂｕｇｂｕｓｔｅｒを加えずに、インベーダー反応試薬（ＩＣＡ試薬）とｆ１ファージとを用いて調製した溶液Ｂを、流体デバイスに供した際には、流体デバイスのウェル内に、検出対象であるファージ内包ＤＮＡ由来の蛍光シグナルはほとんど観察されなかった。

【００８７】

本実施例によれば、Ｂｕｇｂｕｓｔｅｒを加えた場合においてファージ内部の核酸（ｆ１ ｐｈａｇｅ ｏｌｉｇｏ、ｆ１ファージ内包ＤＮＡ）が検出され、ファージ内部から核酸が抽出されていると考えられた。

この結果から、インベーダー反応試薬のみではファージは崩壊せず、Ｂｕｇｂｕｓｔｅｒのような界面活性剤を含む試薬を用いれば、ファージが崩壊することが明らかになった。

なお、上記インベーダー反応試薬と界面活性剤を含む核酸抽出試薬であるＢｕｇｂｕｓｔｅｒが１：１となるように調製した溶液と、上記ｆ１ファージ（１％）と、を混合した溶液（溶液Ａ）を調製し、サンプルチューブ内にて、室温で、１５分間撹拌した時点で、部分的には過ぎないものの、ｆ１ファージの崩壊が始まり、ｆ１ファージ内部核酸の抽出が始まっていたと考えられる。

【００８８】

［実施例２］

（流体デバイスのウェル内におけるファージの崩壊、核酸抽出、および核酸検出の検討）

本実施例においては、あらかじめファージの崩壊および内部核酸の抽出を行った後に流体デバイスに測定試料を導入するのではなく、流体デバイスの内部でファージの崩壊を行い、かつ、流体デバイスの内部でファージ内部の核酸を検出可能か、検討を行った。

本実施例においても、実施例１と同様に、構造体としてウイルスの一種であるｆ１ファージ（試薬名：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｐｈａｇｅ ｆ１、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：ＮＢＲＣ２００１０）（内包ＤＮＡとして、「配列番号１」の塩基配列を有する）（表１参照）を用いた。

本実施例においては、流体デバイスのウェル内におけるファージの崩壊を検討し、流体デバイスのウェル内において核酸、具体的にはｆ１ファージ内包ＤＮＡを標的分子として、標的分子の検出を行った。

【００８９】

（核酸検出試薬の調製）

実施例２におけるインベーダー反応試薬は、表１に示す試薬を用いて、０．５μＭ アレルプローブ１（配列番号２）、１μＭ インベーダーオリゴ１（配列番号３）（ＩＣＡオリゴ１）（以上ファスマック社）、４μＭ ＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅ１（Ａｌｅｘａ４８８－ＢＨＱ）（配列番号４）（日本バイオサービス社）（蛍光基質）、０．１ｍｇ／ｍＬ ＦＥＮ－１、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、２０ｍＭ $MgCl_2$、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０を含んでいる。なお、これらのインベーダー反応試薬における各成分の濃度は、実施例２に係るインベーダー反応試薬における終濃度である。

上記インベーダー反応試薬と界面活性剤を含む核酸抽出試薬であるＢｕｇｂｕｓｔｅｒ（メルクミリポア社製）とが１：１となるように調製した溶液（溶液Ｃ）を調製した。

【００９０】

＜混合溶液の送液＞

流体デバイスに、ウイルスサンプルとして上記ｆ１ファージの懸濁液と、上記インベー

ダー反応試薬およびＢｕｇｂｕｓｔｅｒを混合した溶液Ｃと、を混合した溶液２０μＬを送液し、各ウェルに導入した。
なお、流体デバイスにおけるｆ１ファージの最終濃度が、０％（ｆ１ファージ未添加）、０．１％、０．５％、１．０％となるように、４種類のｆ１ファージ濃度にて、ｆ１ファージ懸濁液と溶液Ｃとの混合液を送液した。上記実施例１と同様に、ｆ１ファージの濃度は、販売されているｆ１ファージの懸濁液の濃度を１００％とした場合における希釈率として表している。
また、溶液Ｃの各成分の濃度は、ｆ１ファージの懸濁液と混合した直後にはｆ１ファージの崩壊は起こらず、ウェル内に導入した後で後述の核酸抽出反応を行うことによってｆ１ファージの崩壊が起こるような濃度に調整されている。
続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止した。

【００９１】

＜核酸抽出反応＞

上記流体デバイスをホットプレート上にセットし、６６℃で３０分間反応させた。これにより、封止されたウェル内で、ｆ１ファージのカプシド構造が壊れ、ＤＮＡが抽出される。

【００９２】

＜核酸検出反応＞

上記流体デバイスの加熱により、実施例１と同様にインベーダー法の各反応が進行し、最終的にＡｌｅｘａ４８８の蛍光シグナルが発生する。

【００９３】

＜ウェルの蛍光観察＞

６６℃で３０分間加熱した後、蛍光顕微鏡ＢＺ－７１０（ＫＥＹＥＮＣＥ社）で１０倍の対物レンズを用いて流体デバイスにおける各ウェルの核酸検出反応で得られる蛍光シグナルの蛍光画像を撮影した。露光時間は、ＧＦＰの蛍光フィルターを用いて３０００ｍｓｅｃとした。
実施例２の結果を図７および図８に示す。
図７および図８に示すように、標的分子であるｆ１ファージ内包ＤＮＡが存在するウェルでは、標的分子由来の蛍光シグナルを観察することができた。
また、図７の蛍光画像、および、図８のグラフに示すように、ｆ１ファージの濃度の増加に依存して、蛍光が観察されたウェルの数が増加した。

【００９４】

本実施例により、ｆ１ファージの濃度に依存して、ｆ１ファージがウェルに導入され、ｆ１ファージ内部の核酸を検出できたと考えられる。
換言すれば、上記の方法により、ｆ１ファージ中のＤＮＡの損失を抑制し、標的分子である核酸を精度よく検出できる。

【００９５】

［実施例３］

（ファージに対するビーズの結合、ビーズ結合ファージのウェル内への導入、および、ウイルス（ファージ）内核酸の検出）
構造体としてウイルスの一種であるｆ１ファージ（試薬名：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｐｈａｇｅ ｆ１、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：ＮＢＲＣ２００１０）（内包ＤＮＡとして、「配列番号１」の塩基配列を有する）（表１参照）を用いて、標的分子としてウイルス内核酸の検出を行った。また、構造体のウェルへの導入には、特異的結合物質として抗体を有する磁性ビーズを捕捉物として用いた。

【００９６】

＜核酸検出試薬の調製＞

実施例３におけるインベーダー反応試薬は、表１に示す試薬を用いて、０．５μＭ アレルプローブ１（（ｆ１ｐｈａｇｅ）Ａｌｌｅｌｅ ｐｒｏｂｅ１）（配列番号２）、１

μＭ インベーダーオリゴ１（配列番号３）（ＩＣＡオリゴ１）、（以上ファスマック社）、４μＭ ＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅ１（Ａｌｅｘａ４８８－ＢＨＱ）（配列番号４）（日本バイオサービス社）（蛍光基質）、０．１ｍｇ／ｍＬ ＦＥＮ－１、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、２０ｍＭ $MgCl_2$、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０を含んでいる。なお、これらのインベーダー反応試薬における各成分の濃度は、実施例３に係るインベーダー反応試薬における終濃度である。

上記インベーダー反応試薬と界面活性剤を含む核酸抽出試薬であるＢｕｇｂｕｓｔｅｒ（メルクミリポア社製）とが１：１となるように調製した溶液（溶液Ｄ）を調製した。

【００９７】

＜抗体固定化磁性ビーズの調製＞

ファージ抗体を磁性ビーズに固定化するため、カルボキシル基修飾磁性ビーズ（Ｍａｇｎｏｓｐｈｅｒｅ、ＬＣ３００、ＪＳＲ社）溶液に、抗ｆ１ファージ抗体（型式「Ａｎｔｉ－Ｍ－１３ Ｐｈａｇｅ Ｃｏａｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ」、フナコシ社)を添加し１００μＬに混合し、ローテーターにて３０分反応させ、さらに縮合剤ＥＤＣを加え３時間反応させ、抗体のカルボキシル磁性ビーズへの固定化を行う。

【００９８】

反応後未反応の抗体と試薬を取り除くため、マグネットスタンドを用いて抗体固定化カルボキシル磁性ビーズを磁気捕集した。続いて、ＰＢＳ－Ｔ（０．１％Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳ）による洗浄を３回繰り返し、抗体固定化カルボキシル磁性ビーズを調製した。これにより、特異的結合物質を有する捕捉物が調製された。

【００９９】

＜サンプルおよび抗体固定化ビーズの反応＞

構造体としてｆ１ファージ（０％、または、１％）、特異的結合物質を有する捕捉物として、１００μｇ／ｍＬ抗体固定化カルボキシル磁性ビーズを全量が１００μＬとなるように混合し、ローテーター上で室温１時間反応させ、複合体を形成させた。

【０１００】

反応後、マグネットスタンドを用いて得られた磁性ビーズを磁気捕集し、上清の除去及び０．１％Ｔｗｅｅｎ含有ＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）を加える操作を３回繰り返して洗浄し、最後に上清を除去して、複合体を得た。

この複合体は、ビーズに固定化された抗ｆ１ファージ抗体が、ｆ１ファージ表面のコートタンパク質を認識し、結合することにより、形成される。得られた複合体を洗浄後ＰＢＳにて希釈し、反応混合液を調製した。

【０１０１】

＜反応混合溶液の送液＞

流体デバイスに、上記反応混合液（ビーズにより回収されたｆ１ファージ０％、１％）と、本実施例におけるインベーダー反応試薬およびＢｕｇｂｕｓｔｅｒの１：１の溶液Ｄと、を混合した溶液２０μＬを送液し、各ウェルに導入する。続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止する。これにより、ビーズにより回収されたｆ１ファージを含む場合は、１ウェル当たり１個以下のｆ１ファージがウェル内に封止される。

【０１０２】

＜ウェルの観察＞

検出反応後、顕微鏡ＢＺ－７１０で１０倍の対物レンズを用いて、流体デバイスの明視野画像を撮影した。ビーズが導入されたウェルでは、図９右側に示すように、明視野画像上で黒色が観察される。

【０１０３】

＜核酸抽出反応＞

上記デバイスをホットプレート上にセットし、６６℃で１５分間反応させた。これにより、封止されたウェル内で、ｆ１ファージのカプシド構造が壊れ、ＤＮＡが抽出される。

【０１０４】

＜核酸検出反応＞
上記６６℃、１５分間加熱より、実施例１と同様にインベーダー反応の各反応が進行し、最終的にＡｌｅｘａ４８８の蛍光シグナルが発生する。
【０１０５】
＜ウェルの蛍光観察＞
６６℃で１５分間加熱した後、蛍光顕微鏡ＢＺ－７１０（ＫＥＹＥＮＣＥ社）で１０倍の対物レンズを用いて流体デバイスにおける各ウェルの核酸検出反応で得られる蛍光シグナルの蛍光画像を撮影した。露光時間は、ＧＦＰの蛍光フィルターを用いて３０００ｍｓｅｃとした。
実施例３の結果を図９に示す。
図９の右側（明視野画像）に示すように、黒く表示されたウェルが、ビーズが導入されたウェルである。
また、図９の左側における１％の蛍光画像に示すように、標的分子であるｆ１ファージ内包ＤＮＡが存在するウェルでは、標的分子由来の蛍光シグナルを観察することができた。
【０１０６】
上記の方法により、ｆ１ファージ中のＤＮＡの損失を抑制し、標的分子である核酸を精度よく検出できた。さらに、特異的結合物質として抗体を有する磁性ビーズを捕捉物として用いることにより、構造体をウェルへ効率よく導入することができた。
また、抗ｆ１ファージ抗体は、ｆ１ファージ表面のコートタンパク質を認識する。そのため、上記の方法により、ｆ１ファージ内に含まれていた標的分子を検出できたことに加えて、ｆ１ファージの表面の標的分子を、捕捉物を用いることにより検出できたとも言える。
【０１０７】
［実施例４］
（種々のファージ崩壊の手法の検討）
本実施例では、種々の手法を用いて、ファージ崩壊が可能か検討した。
構造体としてウイルスの一種であるｆ１ファージ（試薬名：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｐｈａｇｅ ｆ１、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：ＮＢＲＣ２００１０）（内包ＤＮＡとして、「配列番号１」の塩基配列を有する）（表１参照）を用い、種々の手法を用いたファージ崩壊の検討、および、核酸、具体的にはｆ１ファージ内包ＤＮＡを標的分子として、標的分子の検出を行った。
【０１０８】
（核酸検出試薬の調製）
ＩＣＡ反応の一種であるデジタルインベーダー反応を行うため、核酸検出試薬として、インベーダー反応試薬（ＩＣＡ反応試薬）を調製した。
実施例４におけるインベーダー反応試薬は、表１に示す試薬を用いて、０．５μＭ アレルプローブ１（（ｆ１ｐｈａｇｅ）Ａｌｌｅｌｅ ｐｒｏｂｅ１）（配列番号２）、１μＭ インベーダーオリゴ１（配列番号３）（ＩＣＡオリゴ１）（以上ファスマック社）、２μＭ ＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅ１（Ａｌｅｘａ４８８－ＢＨＱ）（配列番号４）（日本バイオサービス社）（蛍光基質）、０．１ｍｇ／ｍＬ ＦＥＮ－１（Ｆｌａｐ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ－１）、
５０ｍＭ ＭＯＰＳ（３－モルホリノプロパンスルホン酸緩衝液）（ｐＨ７．９）、および２０ｍＭ $MgCl_2$を含むように調製した。
なお、これらのインベーダー反応試薬における各成分の濃度は、実施例４に係るインベーダー反応試薬における終濃度である。
【０１０９】
＜種々の手法によるファージの崩壊検討、および、核酸抽出反応の検討＞
以下の条件により、ファージの崩壊の検討を行った。
・試料１：ファージ（１０％）に、Ｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ（プローブ型超音波）を１分間加えた。

・試料２：ファージ（１０％）に、Ｂｕｇｂｕｓｔｅｒ（５０％）を加え、３７℃で３０分間撹拌した。
・試料３：ファージ（１０％）を７０℃で３０分間加熱した。
・試料４：ファージ（１０％）に、Ｂｕｇｂｕｓｔｅｒ（５０％）を加え、７０℃で３０分間撹拌した。
【０１１０】
次に、サンプルチューブに、上記インベーダー反応試薬と試料１～４とを混合して、ファージ濃度が１％、容量１０μＬとなる溶液（試料１Ａ～４Ａ）を調製した。
なお、ネガティブコントロールとして、インベーダー反応試薬（試料５Ａ）のみ、および、インベーダー反応試薬およびファージの混合溶液（試料６Ａ）を準備して評価した。
また、ポジティブコントロールとして、インベーダー反応試薬に、予めファージから抽出したファージ由来核酸（ｐｈａｇｅ　ｏｌｉｇｏ）（配列番号１）３０ｐＭとなるように加えた溶液（試料７Ａ）を準備して評価した。
これらの試料１Ａ～７Ａの試料溶液を、リアルタイムＰＣＲ装置Ｌｉｇｈｔ　Ｃｙｃｌｅｒ（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製）にて、６６℃、６０分間処理した。
実施例４の結果を図１０、図１１に示す。
なお、図１１は、図１０において１２００秒付近までの拡大図である。
図１０および図１１のグラフにおいて、横軸は処理時間（秒）であり、縦軸は蛍光強度である。
図１０、図１１中の項目と、試料番号と、の対応は以下の通りである。
・試料１Ａ：ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ＋ｓｏｎｉｃ
・試料２Ａ：ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ＋ｂｕｇ
・試料３Ａ：ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ＋ｈｅａｔ
・試料４Ａ：ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ＋ｂｕｇ＋ｈｅａｔ
・試料５Ａ：ＩＣＡ
・試料６Ａ：ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ
・試料７Ａ：ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ＋ｐｈａｇｅ　ｏｌｉｇｏ　３０ｐＭ
【０１１１】
超音波処理した試料１Ａ、ファージに界面活性剤を含むＢｕｇｂｕｓｔｅｒ を加えた試料２Ａ、ファージに７０℃の熱処理を加えた試料３Ａ、ファージに界面活性剤を含むＢｕｇｂｕｓｔｅｒを加え、かつ、７０℃で３０分間加熱処理した試料４Ａ、およびポジティブコントロールの試料７Ａにおいて、いずれも３００秒、６００秒といった処理時間が短い段階から蛍光強度が増加した。
ファージに超音波処理を加えた試料１Ａ、および、界面活性剤を含むＢｕｇｂｕｓｔｅｒをファージに加え、７０℃の熱処理を行った試料４Ａで、特に短い時間での蛍光強度の増加が観察された。
ネガティブコントロールとして、インベーダー反応試薬のみをＬｉｇｈｔ　Ｃｙｃｌｅｒに供した試料５Ａでは、蛍光強度の増加はほとんど観察されなかった。
なお、Ｌｉｇｈｔ　Ｃｙｃｌｅｒを用いて６６℃で処理しているため、試料６Ａ（ＩＣＡ＋ｐｈａｇｅ）でも、時間の経過とともに、蛍光強度の増加は観察されたが、試料１Ａ～４Ａと比較すると緩やかな増加であった。
試料５Ａおよび試料６Ａと比較して、種々の手法でファージを崩壊させた試料１Ａ～４Ａにおいて、短い時間での蛍光強度の増加が観察された。
これらの結果から、ファージを崩壊させるためには、界面活性剤による処理に加えて、例えば、超音波処理、熱処理など複数の手法、および、複数の手法の組み合わせが有効であることが明らかになった。
本実施例によれば、上記複数の手法を組み合わせることにより、ファージの溶解およびファージ内部の核酸抽出を短時間で行うことができることが明らかになった。
【０１１２】
［実施例５］

（ウイルス内核酸の検出、大腸菌の溶菌による内部核酸の検出）
本実施例では、ファージと大腸菌とを用いた溶菌を利用して、ファージ由来の核酸を検出する検討を行った。
構造体としてウイルスの一種であるｆ１ファージ（試薬名：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｐｈａｇｅ ｆ１、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：ＮＢＲＣ２００１０）（内包ＤＮＡとして、「配列番号１」の塩基配列を有する）（表１参照）を用いて、ウイルス内核酸を検出する。また、標的分子であるウイルス内核酸の抽出には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（大腸菌）（独立行政法人製品評価技術基盤機構、型番：ＮＢＲＣ１３９６５）を脂質二重膜供与体とする、生物学的手法を用いる。
【０１１３】
＜サンプル、脂質二重膜供与体の混合液の調製＞
ウイルスサンプルとして終濃度１％ｆ１ファージ（ＮＢＲＣ２００１０）復元水溶液、及び、終濃度１％大腸菌（ＮＢＲＣ１３９６５）の復元水溶液を全量が１００μＬとなるように混合した。
ｆ１ファージが大腸菌の細胞表面にあるウイルス受容体に結合することにより、ｆ１ファージと大腸菌の複合体を形成する。
なお、ｆ１ファージの終濃度および大腸菌の終濃度は、流体デバイス中における終濃度である。
【０１１４】
（核酸検出試薬の調製）
ＩＣＡ反応の一種であるデジタルインベーダー反応を行うため、核酸検出試薬として、インベーダー反応試薬（ＩＣＡ反応試薬）を調製した。
実施例５におけるインベーダー反応試薬は、表１に示す試薬を用いて、０．５μＭ アレルプローブ１（（ｆ１ｐｈａｇｅ）Ａｌｌｅｌｅ ｐｒｏｂｅ１）（配列番号２）、１μＭ インベーダーオリゴ１（配列番号３）（ＩＣＡオリゴ１）（以上ファスマック社）、４μＭ ＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅ１（Ａｌｅｘａ４８８－ＢＨＱ）（配列番号４）（日本バイオサービス社）（蛍光基質）、０．１ｍｇ／ｍＬ ＦＥＮ－１、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、２０ｍＭ $MgCl_2$および０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０を含むように調製した。
なお、これらのインベーダー反応試薬における各成分の濃度は、実施例５に係る流体デバイス内のインベーダー反応試薬における終濃度である。
【０１１５】
＜混合溶液の送液＞
流体デバイスに、上記混合液（ｆ１ファージと大腸菌との混合液）と、上記インベーダー反応試薬と、が１：１となるように混合した溶液２０μＬを送液し、各ウェルに導入した。続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止した。これにより、１ウェル当たり１個以下のｆ１ファージがウェル内に封止される。
また、ウェル封止後、室温で６０分間流体デバイスを静置した。
なお、ネガティブコントロールとして、上記反応混合液（ｆ１ファージと大腸菌との反応混合液）に代えて、大腸菌を用いずにｆ１ファージのみを用いた溶液についても、同様の操作を行った。
すなわち、流体デバイスに、ｆ１ファージと、上記インベーダー反応試薬と、が１：１となるように混合した溶液２０μＬを送液し、各ウェルに導入した。続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止した。
【０１１６】
＜核酸抽出反応、核酸の検出反応＞
ウェルを封止して６０分間反応させたことにより構造体であるｆ１ファージが大腸菌の表面膜構造(タンパク質、脂質二重膜)を認識、結合し、ｆ１ファージから大腸菌内に標的分子であるＤＮＡが注入される。すなわち、６０分間の反応の間で徐々にｆ１ファージと大腸菌との複合体が形成される。さらに大腸菌内でＤＮＡが複製され、ファージが生成さ

れる。菌体内で生成されたｆ１ファージにより大腸菌が崩壊し、注入、複製されたＤＮＡが放出される。
　また、上記流体デバイスをホットプレートで６６℃、３０分間反応させた。これにより、放出されたｆ１ファージＤＮＡを認識して実施例１と同様にインベーダー反応の各反応が進行し、最終的にＡｌｅｘａ４８８の蛍光シグナルが発生した。
【０１１７】
＜ウェルの蛍光観察＞
　上記のように流体デバイスを６６℃で３０分間加熱した後、蛍光顕微鏡ＢＺ－７１０（ＫＥＹＥＮＣＥ社）で１０倍の対物レンズを用いて流体デバイスにおける各ウェルの核酸検出反応で得られる蛍光シグナルの蛍光画像を撮影した。露光時間は、ＧＦＰの蛍光フィルターを用いて３０００ｍｓｅｃとした。
　実施例５に係る蛍光画像撮影の結果を図１２に示す。
　図１２の左側に示すように、ｆ１ファージと大腸菌とが存在するウェルでは、標的分子由来の蛍光シグナルを観察することができた。
　図１２の蛍光画像に示すように、ｆ１ファージを大腸菌に感染させて流体デバイスに導入した場合（図１２左側）は、ｆ１ファージのみを流体デバイスに導入した場合（図１２右側）よりも多くのＤＮＡを検出することができた。
　この結果は、ｆ１ファージが大腸菌に感染して、大腸菌の中でｆ１ファージ由来のＤＮＡが増幅され、最終的に大腸菌が溶菌して、標的分子であるｆ１ファージＤＮＡが放出されたことにより、標的分子由来の多くの蛍光シグナルが観察されたためと考えられる。
　また、図１２の右側に示すように、大腸菌を加えずに、ｆ１ファージのみを流体デバイスに導入した場合は、蛍光シグナルがわずかに観察された。大腸菌を加えない例においては、加熱とバッファ中に含まれる界面活性剤であるＴｗｅｅｎ２０の影響により、わずかにＤＮＡがウェル内に放出されたと考えられる。
【０１１８】
　上記の方法により、ｆ１ファージ中のＤＮＡの損失を抑制し、標的分子である核酸を精度よく検出できた。さらに、脂質二重膜を有する大腸菌を利用して、構造体であるウイルスから標的分子であるＤＮＡをウェルの内部で抽出することができた。
　また、このことから、ファージのように膜が固い対象であっても、他のもの（例えば、大腸菌）に一度ＤＮＡを移してから加熱等を行うことで、容易にファージ内部のＤＮＡを検出することができることが分かった。
【０１１９】
［実施例６］
（細胞内核酸の検出１）
　構造体としてヒト結腸腺癌細胞ＨＴ２９を用い、核酸、具体的にはＤＮＡであるＥＧＦＲ（上皮増殖因子受容体）遺伝子の一塩基多型（野生型）を含む領域を標的分子として、標的分子の検出を行った。
＜ＨＴ２９細胞のＰＫＨ染色＞
　流体デバイスに対するＨＴ２９細胞の導入を確認するために、ＨＴ２９細胞をＰＫＨ染色したものを調製した。
　なお、ＨＴ２９細胞のＰＫＨ染色の手順は以下の通りである。
　ＨＴ２９培養細胞をはがして、懸濁液を調製した。また、懸濁液を３５００ｒｐｍで１分間遠心分離して、細胞を回収した。続けて、回収した細胞に、Ｄｉｌｌｕｅｎｔ　Ｃ試薬を十分な量添加した。Ｄｉｌｌｕｅｎｔ　Ｃ試薬を添加した細胞にＰＫＨ溶液を添加し、室温で１０分間静置した。
　その後、ＰＫＨ溶液を添加した細胞懸濁液を３５００ｒｐｍで１分間遠心分離して、ＰＫＨ染色した細胞を回収し、ＤＭＥＭ培地液に再懸濁した。
　ＤＭＥＭ培地液に再懸濁したＰＫＨ染色ＨＴ２９細胞を後述するインベーダー反応試薬と混合して流体デバイスへの導入に用いた。
　なお、ＨＴ２９細胞をＰＫＨ染色した細胞は、後に導入する流体デバイスにおける細胞

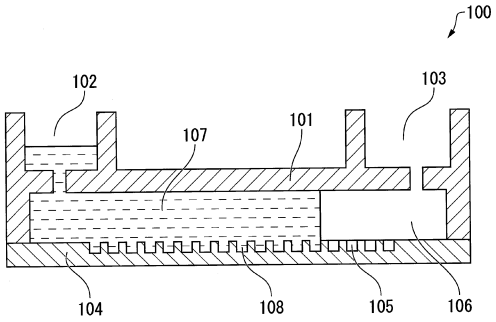
数が５．１６×１０^{5}ｃｅｌｌ／ｍＬとなるように調製した。
【０１２０】
＜核酸検出試薬の調製＞
ＩＣＡ反応の一種であるデジタルインベーダー反応を行うため、核酸検出試薬として、インベーダー反応試薬を調製した。本実施例におけるインベーダー反応試薬は、表１に示す試薬を用いて、０．５μＭ アレルプローブ２（配列番号５）、１μＭ インベーダーオリゴ２（配列番号６）（ＩＣＡオリゴ２）（以上ファスマック社）、４μＭ ＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅ１（Ａｌｅｘａ４８８－ＢＨＱ）（日本バイオサービス社）（蛍光基質）（配列番号４）、０．１ｍｇ／ｍＬ ＦＥＮ－１、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、２０ｍＭ $MgCl_2$、および０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０を含んでいる。なお、これらのインベーダー反応試薬における各成分の濃度は、実施例６に係る流体デバイス中のインベーダー反応試薬における終濃度である。
【０１２１】
＜反応混合溶液の送液＞
流体デバイスに、ＰＫＨ染色したヒト結腸腺癌細胞ＨＴ２９と上記インベーダー反応試薬とを混合した溶液（細胞数：５．１６×１０^{5}ｃｅｌｌ／ｍＬ）２０μＬを送液し、各ウェルに導入した。続いて、封止液としてＦＣ－４０（Ｓｉｇｍａ社）を１５０μＬ送液し、各ウェルを封止した（図１４、図１５）。これにより、１ウェル当たり１個以下のＨＴ２９細胞がウェル内に封止された。
なお、対照実験として、インベーダー反応試薬を添加しないことを除いて同様の条件でＰＫＨ染色したヒト結腸腺癌細胞ＨＴ２９の溶液（細胞数：５．１６×１０^{5}ｃｅｌｌ／ｍＬ）を流体デバイスに送液し、ウェル内にＨＴ２９細胞をウェル内に導入した場合についても検討した（図１３）。
【０１２２】
＜核酸抽出反応＞
上記流体デバイスをホットプレート上にセットし、６６℃で１５分間反応させた。これにより、封止されたウェル内で、ＨＴ２９細胞の細胞膜構造が壊れ、ゲノムＤＮＡが抽出された。
【０１２３】
＜核酸検出反応＞
抽出反応後の上記流体デバイスをホットプレート上にセットし、６６℃で１５分間反応させた。これにより、アレルプローブ及びインベーダーオリゴによるＥＧＦＲ遺伝子領域の認識、ＦＥＮ－１によるアレルプローブの切断、放出されたアレルプローブ断片のＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅへの結合、ＦＥＮ－１によるＦＲＥＴ Ｃａｓｓｅｔｔｅの切断、並びにＡｌｅｘａ４８８の蛍光シグナルの発生が起こる。
なお、対照実験として、上記流体デバイスの６６℃、１５分間の加熱を行わない場合の検討も行った（図１４）。
【０１２４】
＜ウェルの蛍光観察、および、明視野観察＞
６６℃で１５分間加熱した後、蛍光顕微鏡ＢＺ－７１０（ＫＥＹＥＮＣＥ社）で１０倍の対物レンズを用いて流体デバイスにおける各ウェルの核酸検出反応で得られる蛍光シグナルの蛍光画像を撮影した。
露光時間はそれぞれ、Ａｌｅｘａ４８８の蛍光観察の際にはＧＦＰの蛍光フィルターを用いて３０００ｍｓｅｃとし、ＰＫＨの蛍光観察の際にはＴｅｘａｓ Ｒｅｄの蛍光フィルターを用いて２０００ｍｓｅｃとした。
また、ウェルの封止後、顕微鏡ＢＺ－７１０で１０倍の対物レンズを用いて明視野画像も撮影した。
実施例６の結果を図１３～１５に示す。
【０１２５】
図１３は、インベーダー反応試薬を添加しない例であり、ＰＫＨ染色ＨＴ２９細胞の蛍

光画像である。
図１３に示すように、ＰＫＨ染色したことで、ウェル内に細胞が導入されたことが明らかとなった。
図１４は、ＰＫＨ染色したヒト結腸腺癌細胞ＨＴ２９と上記インベーダー反応試薬とを混合した溶液とを流体デバイスに導入し、流体デバイスを加熱する前の（６６℃、１５分間の加熱を行わない場合の）蛍光画像であり、ＰＫＨ由来の蛍光しか検出されなかった。
図１５は、ＰＫＨ染色したヒト結腸腺癌細胞ＨＴ２９と上記インベーダー反応試薬とを混合した溶液とを流体デバイスに導入し、流体デバイスを加熱した後の蛍光画像であり、ＰＫＨ由来の蛍光、および、Ａｌｅｘａ４８８の蛍光のいずれも検出された。
【０１２６】
図１３のように、ＨＴ２９細胞をＰＫＨ染色したことで、ＨＴ２９細胞が確かに流体デバイスのウェル内に存在するということが確認できた。
また、Ａｌｅｘａ４８８の蛍光は、ＨＴ２９細胞内部に存在するＤＮＡが溶液に出てきたときに検出できるものである。
そのため、図１５に示すように、Ａｌｅｘａ４８８が検出できたことによって、ＨＴ２９細胞の細胞膜が破壊されているということが明らかになった。
本実施例では、ＰＫＨの蛍光画像とＡｌｅｘａ４８８の蛍光画像を重ねると（図１３～図１５におけるＯｖｅｒｌａｙの画像）、界面活性剤を含むインベーダー反応試薬を混合していない場合（図１３）と、界面活性剤を含むインベーダー反応試薬を混合しても加熱する前の場合（図１４）と、では、ＰＫＨしか検出できなかった。
しかしながら、図１５に示すように、加熱後ではＰＫＨを検出したウェルと同じウェルにＡｌｅｘａ４８８の蛍光を検出できていた。
そのため、界面活性剤を加え、かつ、加熱を行った図１５の例においては、ＨＴ２９細胞が存在するウェル中でインベーダー反応が進行し、ＨＴ２９細胞内部のＤＮＡを検出できたと考えられる。
これらの結果から、本実施例によれば、ＨＴ２９細胞を加熱により破壊して内部の核酸を検出することができ、ウェル内部に存在していた細胞から核酸を抽出できることが明らかになった。
このように、標的分子である一塩基多型を含むＥＧＦＲ遺伝子領域が存在するウェルでは、標的分子由来の蛍光シグナルを観察することができた。
【０１２７】
上記の方法により、ＨＴ２９細胞中のゲノムＤＮＡの損失を抑制し、標的分子である核酸を精度よく検出できることが明らかになった。
【０１２８】
以上に、本発明の実施形態を説明したが、実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は一例であり、本発明の趣旨から逸脱しない範囲内で、構成の付加、省略、置換、及びその他の変更が可能である。また、本発明は実施形態によって限定されない。
【産業上の利用可能性】
【０１２９】
本発明によれば、標的分子を構造体から抽出した後に流路を用いてマイクロアレイの各ウェルに分配する従来の方法と比較して、標的分子を精度よく検出できる技術を提供することができる。
【符号の説明】
【０１３０】
１００…流体デバイス
１０１…蓋材
１０２…送液ポート
１０３…廃液ポート
１０４…基材
１０５…ウェル

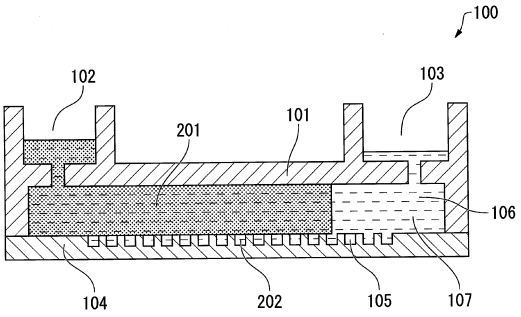
１０６…流路
１０７…試薬液
１０８…ウェルに充填された試薬液
２０１…封止液
２０２…微小区画
３０１…シグナルを発する微小液滴
１１…標的分子
１２…構造体
１２’…抽出処理後の構造体
１３…特異的結合物質
１４…捕捉物

【図面】

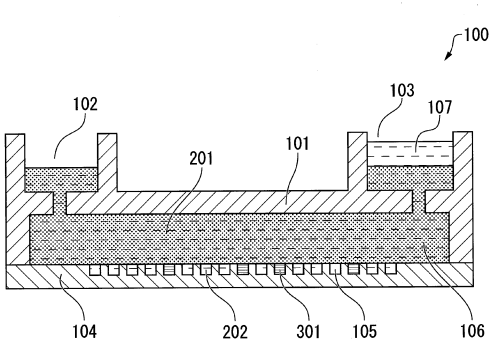
【図１】



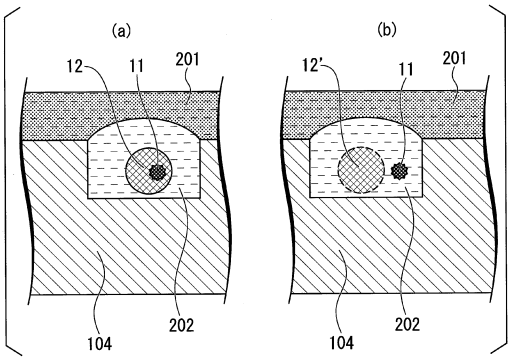
【図２】



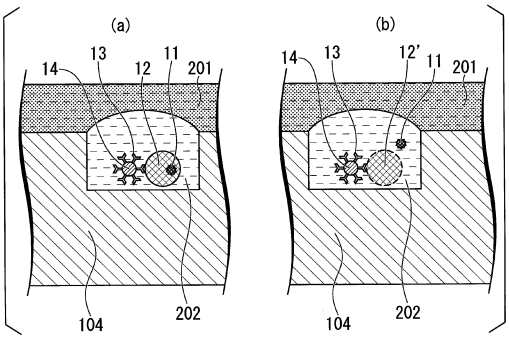
【図３】


100
102
103
107
101
201
104
202
301
105
106

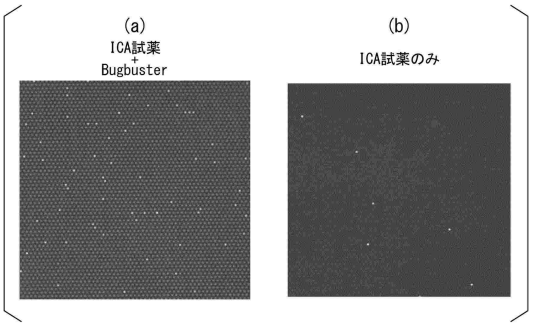
【図４】


(a)
12
11
201
104
202
(b)
12'
11
201
104
202

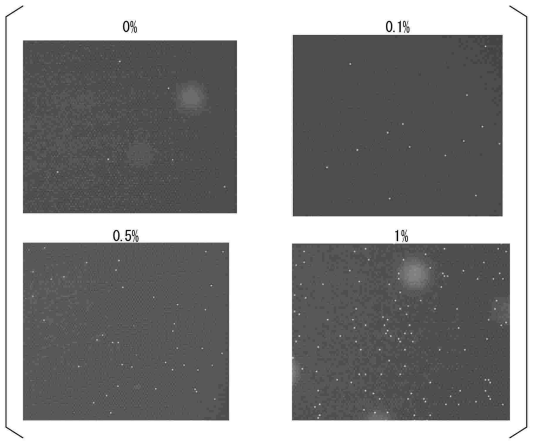
【図５】


(a)
14
13
12
11
201
104
202
(b)
14
13
12'
11
201
104
202

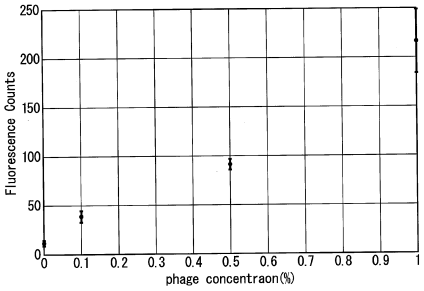
【図６】


(a)
ICA試薬
+
Bugbuster
(b)
ICA試薬のみ

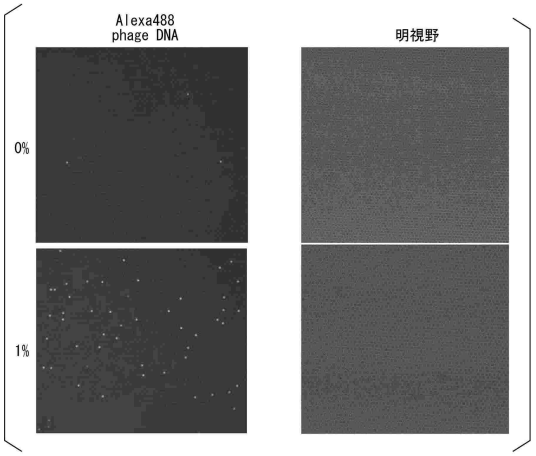
【図７】


0%
0.1%
0.5%
1%

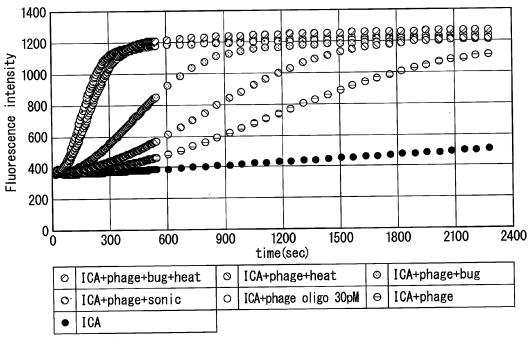
【図８】


Fluorescence Counts
250
200
150
100
50
0
0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1
phage concentraon(%)

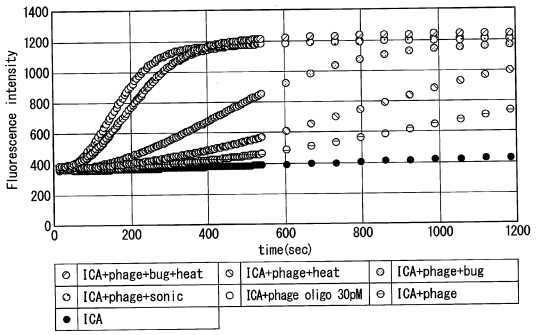
【図９】


Alexa488
phage DNA
明視野
0%
1%

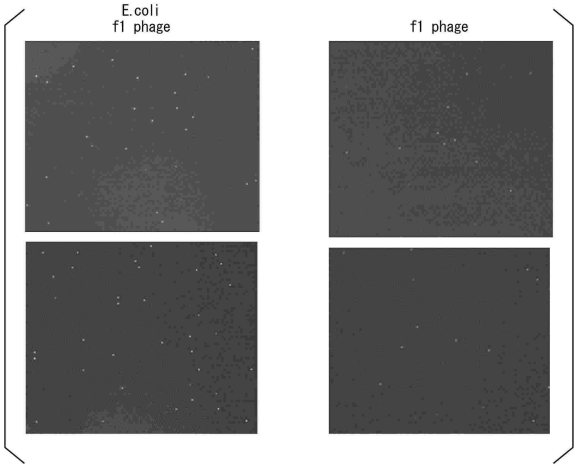
【図１０】


Fluorescence intensity
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 300 600 900 1200 1500 1800 2100 2400
time(sec)
ICA+phage+bug+heat
ICA+phage+heat
ICA+phage+bug
ICA+phage+sonic
ICA+phage oligo 30pM
ICA+phage
ICA

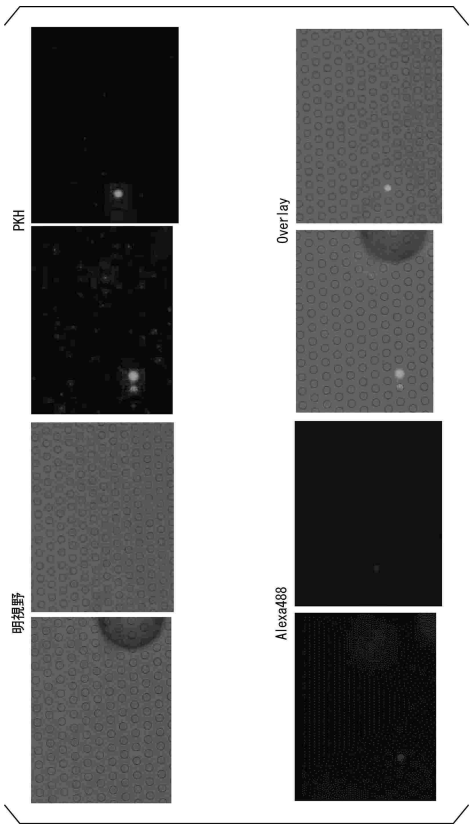
【図１１】



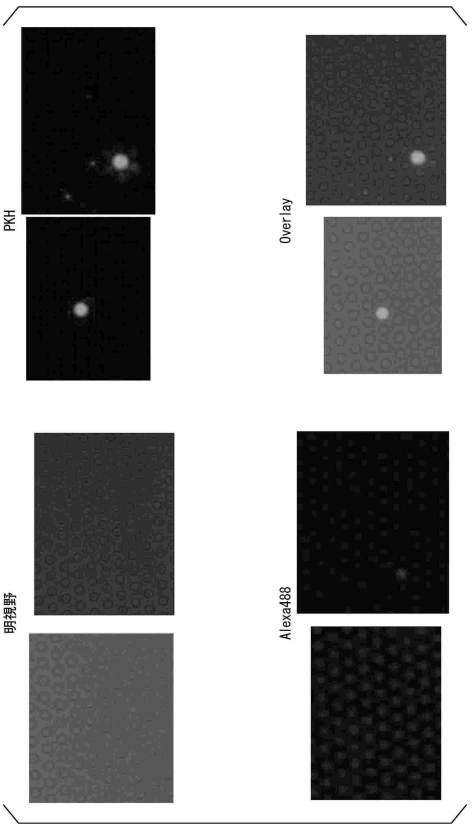
【図１２】



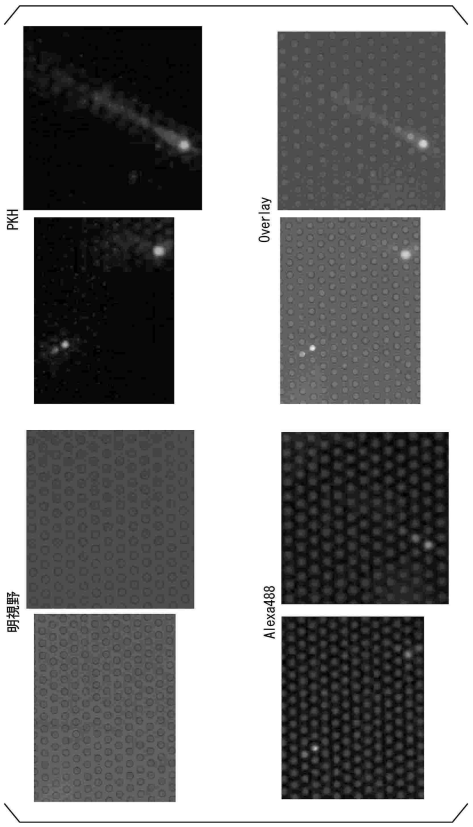
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【配列表】

0007575189000001.app

フロントページの続き

東京都台東区台東１丁目５番１号 凸版印刷株式会社内
(72)発明者 堀内 陽介
東京都台東区台東１丁目５番１号 凸版印刷株式会社内

合議体
審判長 加々美 一恵
審判官 長井 啓子
審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特許第６１８３４７１（ＪＰ，Ｂ２）
特開２００８－２８３９７７（ＪＰ，Ａ）
特開２００６－２７１３４８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１７／０９５９１７（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／１４９６３９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／１６６７６８（WO，Ａ１）
Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１５年，５：９５５１

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N
ＪＳＴＰｌｕｓ
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＣＡＰｌｕｓ（ＳＴＮ）