

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-114265

(P2015-114265A)

(43) 公開日 平成27年6月22日(2015.6.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO1N 35/00 (2006.01)	GO1N 35/00	B 2G058
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00	1O1
GO1N 35/08 (2006.01)	GO1N 35/08	A

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2013-258007 (P2013-258007)	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成25年12月13日 (2013.12.13)	(74) 代理人	100126240 弁理士 阿部 琢磨
		(74) 代理人	100124442 弁理士 黒岩 創吾
		(72) 発明者	村上 洋一 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ ヤノン株式会社内
			F ターム (参考) 2G058 BB02 BB09 BB19 BB27

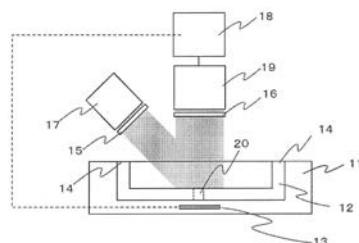
(54) 【発明の名称】マイクロ流体デバイス及びその測定温度の補正方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】正確な温度の測定が可能なマイクロ流体デバイスを提供する。

【解決手段】抵抗体の抵抗値と着目領域の温度とが対応付けられている関係式によって、着目領域20の温度を制御するマイクロ流体デバイス11であって、抵抗体13は、流路12を加熱するヒーターとしての機能と、流路12内の温度を測定するセンサーとしての機能を兼ね備え、着目領域20を含む流路12の下方に着目領域よりも広い領域に亘って設けられ、抵抗体によって抵抗体13の直上の着目領域20を含む任意の2点以上の温度分布を測定する測定手段と、抵抗体13の抵抗値が周囲温度の影響を受けることで見誤る温度を補正する温度補正手段とを有し、本測定前において前記関係式を求めた際に、測定手段によって測定された温度分布と、本測定において前記関係式を用いて着目領域20の温度制御をした際に、測定手段によって測定された温度分布とを比較し見誤る温度を補正する。

【選択図】図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

抵抗体の抵抗値と温度測定領域である着目領域の温度とが対応付けられている関係式における前記抵抗体の抵抗値によって、前記着目領域の温度を制御するマイクロ流体デバイスであって、

前記抵抗体は、前記マイクロ流体デバイスを構成する基体に設けられた流路を加熱するヒーターとしての機能と、流路内の温度を測定するセンサーとしての機能を兼ね備えると共に、

前記着目領域を含む前記流路の下方に該流路の長手方向に沿って該着目領域よりも広い領域に亘って設けられた構成を備え、

前記抵抗体によって抵抗体の直上の前記着目領域を含む任意の2点以上の温度分布を測定する測定手段と、

前記抵抗体の抵抗値が周囲温度の変化による影響を受けることによって見誤る温度を補正する温度補正手段と、を有し、

前記温度補正手段は、

本測定前において前記抵抗体の抵抗値と前記着目領域の温度とが対応付けられている関係式を求めた際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、

前記本測定において前記関係式を用いて前記着目領域の温度制御をした際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、を比較し、

前記見誤る温度を補正することを特徴とするマイクロ流体デバイス。

**【請求項 2】**

前記温度補正手段は、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記抵抗体の直上の全領域に対して積算し、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 3】**

前記温度補正手段は、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記流路内の任意の点において求め、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 4】**

前記温度補正手段は、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記抵抗体の直上の全領域に対して積算し、その値を用いて、求められた温度分布の中から最も近い温度分布を選択し、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 5】**

前記温度補正手段は、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記流路内の任意の点において求め、その値を用いて、求められた温度分布の中から最も近い温度分布を選択し、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項1に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 6】**

前記流路内の任意の点が、該流路内における前記抵抗体の端部に対応する位置であることを特徴とする請求項3または請求項5に記載のマイクロ流体デバイス。

**【請求項 7】**

10

20

30

40

50

抵抗体の抵抗値と温度測定領域である着目領域の温度とが対応付けられている関係式における前記抵抗体の抵抗値によって、前記着目領域の温度を制御するマイクロ流体デバイスにおける測定温度の補正方法であって、

前記抵抗体は、前記マイクロ流体デバイスを構成する基体に設けられた流路を加熱するヒーターとしての機能と、流路内の温度を測定するセンサーとしての機能を兼ね備えると共に、

前記着目領域を含む前記流路の下方に該流路の長手方向に沿って該着目領域よりも広い領域に亘って設けられた構成を有し、

前記抵抗体によって抵抗体の直上の前記着目領域を含む任意の2点以上の温度分布を測定する測定手段と、

前記抵抗体の抵抗値が周囲温度の変化による影響を受けることによって見誤る温度を補正する温度補正手段と、を用い

前記温度補正手段によって、

本測定前において前記抵抗体の抵抗値と前記着目領域の温度とが対応付けられている関係式を求めた際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、

前記本測定において前記関係式を用いて前記着目領域の温度制御をした際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、を比較し、

前記見誤る温度を補正することを特徴とする測定温度の補正方法。

#### 【請求項8】

前記温度補正手段によって、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記抵抗体の直上の全領域に対して積算し、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項7に記載の測定温度の補正方法。

#### 【請求項9】

前記温度補正手段によって、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記流路内の任意の点において求め、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項7に記載の測定温度の補正方法。

#### 【請求項10】

前記温度補正手段によって、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記抵抗体の直上の全領域に対して積算し、その値を用いて、求めめた温度分布の中から最も近い温度分布を選択し、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項7に記載の測定温度の補正方法。

#### 【請求項11】

前記温度補正手段によって、

前記本測定前において測定された温度分布と、前記本測定において測定された温度分布とによる差分量を、前記流路内の任意の点において求め、その値を用いて、求めめた温度分布の中から最も近い温度分布を選択し、

前記見誤る温度の補正量を算出することを特徴とする請求項7に記載の測定温度の補正方法。

#### 【請求項12】

前記流路内の任意の点が、該流路内における前記抵抗体の端部に対応する位置であることを特徴とする請求項9または請求項11に記載の測定温度の補正方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、マイクロ流体デバイス及びその測定温度の補正方法に関し、特に抵抗体が環境温度の影響を受けることによって見誤る温度を補正するマイクロ流体デバイス及びその測定温度の補正方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、1枚のチップ上で化学・生化学分析に必要な全ての要素を組み込むマイクロトータルアナリシスシステム(μ-Tas)と呼ばれる技術についての研究開発が盛んである。  
チップはマイクロ流路、温度制御機構、濃度調整機構、送液機構、反応検出機構などから構成され、一般にマイクロ流体デバイスと呼ばれている。

その中でも特に、ヒトゲノムの1塩基多型(SNP)などの遺伝情報の検査を目的としたDNA分析デバイスに注目が集まっており、研究が盛んに行われている。

【0003】

DNAを分析する工程は、つぎの(1)DNAを増幅する工程と(2)DNAを判定する工程の2つの工程がある。

(1)のDNAを増幅する工程では、PCR(Polymerase Chain Reaction)法が一般的に用いられる。これは増幅対象のDNAの一部に対して相補的なプライマと酵素等とを混合し、サーマルサイクルをかけることでDNAを増幅させる手法である。本工程では、正確かつ反応時間短縮のための高速な温度制御が要求される。

(2)のDNAを判定する工程には様々な種類があるが、例えばSNPの判定では熱融解法が用いられることがある。

熱融解法とは、PCR後にDNA溶液の温度を徐々に上昇させることでDNAの融解温度(以下、Tm)を検出する方法である。

蛍光色素がインターラートされたDNAは、温度が低い時には、2本鎖を形成しているため、蛍光シグナルが検出される。

その後、徐々に温度が上昇しTmに達すると、DNAが解離し1本鎖になるため、蛍光シグナルが急激に低下する。

この温度と蛍光シグナルの関係からTmを求め、SNPを検出する手法である。本工程では、Tmを比較することによりDNA判定を行うため、正確な温度測定が求められる。

以上のように、前記DNAを分析する工程では温度制御が重要であり、特に高速性と正確性の2つが要求される。

【0004】

特許文献1では、マイクロ流路内で高速に流路の温度変化を起こすことを目的として、微小流路と流路に沿って配置されたヒーターを有するマイクロ流体デバイスが開示されている。

マイクロ流体デバイスを用いることは、高速な温度制御の観点から大きなメリットがある。各種反応を熱容量の小さい微小流路内で行うため、高速な加熱冷却が可能となるためである。

また特許文献1では、マイクロ流体デバイスにおいて正確な温度制御、特に流路内の温度測定するために、マイクロ流路下部にヒーター兼温度センサーの抵抗体を配置し、流路内温度と抵抗体の抵抗値を対応付けることで温度制御を行っている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2012-193983号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

マイクロ流体デバイスは、デバイスを構成する要素の熱容量が小さいために伝熱を速めることができ、高速に温度制御できるという利点がある。

10

20

30

40

50

一方で、構成要素、特に温度センサー機能を持つ抵抗体も熱容量が小さいために、デバイス周囲の環境変化、例えば温度変化の影響を受けやすく、誤った温度（以下、見誤り温度）を示してしまうという課題を有している。

以下に、このマイクロ流体デバイスにおける課題について、説明する

図2にその具体例として、マイクロチップの模式図及びそのデバイスが有する抵抗体の長手方向の温度分布プロファイルを示す。

図2に示すマイクロチップをモデルとして、環境温度変化による抵抗体抵抗値の変化量及びその変化量から求まる見誤り温度量を、シミュレーションにより計算した。

つぎに、計算で用いたモデルについて、具体的に説明する。

マイクロチップ28は厚さ0.5mmの2枚のガラス基板（熱伝導率は20で1.4W/m/Kとした）により構成され、一方の上基板24は10mm×30mm、下基板25は15mm×30mmとした。

上基板24には深さ20um、幅180um、長さ20mmのマイクロ流路26を施し、もう一方の下基板25には厚さ100nm、幅300um、長さ15mmの抵抗体27を配置した。

抵抗体27の抵抗値は20で100ohm、温度抵抗係数TCRは2500（10<sup>-6</sup>/K）とした。マイクロチップ28の環境温度は20と25に設定し、抵抗体27中央部の着目領域21が70となるように設定した。

その際の温度制御は、着目領域21の温度と抵抗体27の抵抗値との対応付けられている関係を用い、抵抗体27に電圧を印加した際のジュール加熱による熱を制御することにより行われる。

#### 【0007】

環境温度20での温度プロファイル22と25での温度プロファイル23を比較すると、環境温度を上昇させた際、抵抗体27の端部における温度分布が上昇していることがわかる。

これに伴い抵抗体27端部の抵抗値は増加するので、結果として抵抗体27全体の抵抗値も増加する。つまり、着目領域21の温度は変化せず同じ温度を示していたとしても、環境温度が変化することで測定される抵抗体27の抵抗値は変化してしまう。そのため、着目領域21の測定温度に対する見誤りが生じる。

すなわち、前記シミュレーションにより、環境温度20における抵抗体27の抵抗値は112.5、環境温度25では112.525であった。

この環境温度20では、抵抗体27の抵抗値が112.5であり着目領域21の温度が70を示していた。

これに対して、環境温度25では、抵抗体27の抵抗値が112.525に増加することから、上記したように着目領域21の温度と抵抗体27の抵抗値とが対応付けられていることにより、この増加した抵抗値との関係から、着目領域21の温度が変わっていなければかわらずその温度が70.1まで高くなったという見誤りが生じる。

以上により明らかのように、マイクロ流体デバイスの抵抗体の抵抗値が環境温度による影響を受けることにより、着目領域の温度を見誤るため、着目領域の温度を正確に評価するには、これらの見誤りを補正する必要がある。

#### 【0008】

本発明は、上記課題に鑑み、マイクロ流体デバイスを構成する抵抗体の抵抗値が環境温度の影響を受けることによって見誤る温度を補正し、正確な温度を測定することが可能となるマイクロ流体デバイス及びその測定温度の補正方法を提供することを目的としている。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明のマイクロ流体デバイスは、

抵抗体の抵抗値と温度測定領域である着目領域の温度とが対応付けられている関係式における前記抵抗体の抵抗値によって、前記着目領域の温度を制御するマイクロ流体デバイ

10

20

30

40

50

スであって、

前記抵抗体は、前記マイクロ流体デバイスを構成する基体に設けられた流路を加熱するヒーターとしての機能と、流路内の温度を測定するセンサーとしての機能を兼ね備えると共に、

前記着目領域を含む前記流路の下方に該流路の長手方向に沿って該着目領域よりも広い領域に亘って設けられた構成を備え、

前記抵抗体によって抵抗体の直上の前記着目領域を含む任意の2点以上の温度分布を測定する測定手段と、

前記抵抗体の抵抗値が周囲温度の変化による影響を受けることによって見誤る温度を補正する温度補正手段と、を有し、

前記温度補正手段は、

本測定前において前記抵抗体の抵抗値と前記着目領域の温度とが対応付けられている関係式を求めた際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、

前記本測定において前記関係式を用いて前記着目領域の温度制御をした際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、を比較し、

前記見誤る温度を補正することを特徴とする。

また、本発明のマイクロ流体デバイスにおける測定温度の補正方法は、

抵抗体の抵抗値と温度測定領域である着目領域の温度とが対応付けられている関係式における前記抵抗体の抵抗値によって、前記着目領域の温度を制御するマイクロ流体デバイスにおける測定温度の補正方法であって、

前記抵抗体は、前記マイクロ流体デバイスを構成する基体に設けられた流路を加熱するヒーターとしての機能と、流路内の温度を測定するセンサーとしての機能を兼ね備えると共に、

前記着目領域を含む前記流路の下方に該流路の長手方向に沿って該着目領域よりも広い領域に亘って設けられた構成を有し、

前記抵抗体によって抵抗体の直上の前記着目領域を含む任意の2点以上の温度分布を測定する測定手段と、

前記抵抗体の抵抗値が周囲温度の変化による影響を受けることによって見誤る温度を補正する温度補正手段と、を用い

前記温度補正手段によって、

本測定前において前記抵抗体の抵抗値と前記着目領域の温度とが対応付けられている関係式を求めた際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、

前記本測定において前記関係式を用いて前記着目領域の温度制御をした際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、を比較し、

前記見誤る温度を補正することを特徴とする。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明によれば、マイクロ流体デバイスを構成する抵抗体の抵抗値が環境温度の影響を受けることによって見誤る温度を補正し、正確な温度を測定することが可能となるマイクロ流体デバイス及びその測定温度の補正方法を実現することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0011】

【図1】本発明の実施形態におけるマイクロ流体デバイスの構成例を説明する概念図。

【図2】マイクロチップの模式図及びそのデバイスが有する抵抗体の長手方向の温度分布プロファイルを示す図。

【図3】本発明の実施形態におけるマイクロ流体デバイスの着目領域における測定温度を補正する測定温度の補正方法のプロセスを示す図。

【図4】本発明の実施形態における測定温度の補正方法のプロセスでの抵抗体直上の任意の2点に対し、温度分布を測定した例を示す概念図。

【図5】本発明の実施形態における測定温度の補正方法のプロセスでの抵抗体直上の全領

10

20

30

40

50

域に対し、温度分布を測定した例を示す概念図。

【図6】本発明の実施例で作製したマイクロチップの構成を示す模式図。

【図7】本発明の実施例1～4で設定した着目領域を示す模式図。

【図8】本発明の実施例1による抗体直上全域の流路内温度分布を求めるための微小領域の配置を示す模式図。

【図9】本発明の実施例2による抗体直上の任意の2点の流路内温度分布を求めるための微小領域の配置を示す模式図。

【図10】本発明の実施例3による予め求めておいた積算値と温度見誤り補正量テーブルの概念図。

【図11】本発明の実施例4による予め求めておいた積算値と温度見誤り補正量テーブルの概念図。

【発明を実施するための形態】

【0012】

つぎに、本発明の実施形態におけるマイクロ流体デバイス及びその測定温度の補正方法について説明する。

抗体の抵抗値と温度測定領域である着目領域の温度とが対応付けられている関係式における前記抗体の抵抗値によって、前記着目領域の温度を制御するマイクロ流体デバイスは、つぎのように構成される。

前記抗体は、前記マイクロ流体デバイスを構成する基体に設けられた流路を加熱するヒーターとしての機能と、流路内の温度を測定するセンサーとしての機能を兼ね備えると共に、

前記着目領域を含む前記流路の下方に該流路の長手方向に沿って該着目領域よりも広い領域に亘って設けられている。

そして、前記抗体によって抗体の直上の前記着目領域を含む任意の2点以上の温度分布を測定する測定手段と、

前記抗体の抵抗値が周囲温度の変化による影響を受けることによって見誤る温度を補正する温度補正手段と、が構成されている。

この温度補正手段は、

本測定前において前記抗体の抵抗値と前記着目領域の温度とが対応付けられている関係式を求めた際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、

前記本測定において前記関係式を用いて前記着目領域の温度制御をした際に、前記測定手段によって測定された温度分布と、を比較し、前記見誤る温度を補正するように構成されている。

その際、温度補正手段として、温度と抗体抵抗値の関係を求めた際の温度分布と、実測定時の温度分布との差分量を流路内の抗体全域に対して積算し、その値を用いて補正量を求めてよい。

また、温度補正手段として、温度分布の差分量を流路内の任意の点、例えば抗体端部において求め、その値を用いて補正量を求めてよい。

また、温度補正手段として、温度分布の差分量を流路内の抗体全域に対して積算し、その値を用いて、あらかじめ求めた温度分布の中から最も近い温度分布を選択し、補正量を求めてよい。

また、温度補正手段として、温度分布の差分量を流路内の任意の点、例えば抗体端部において求め、その値を用いて、あらかじめ求めた温度分布の中から最も近い温度分布を選択し、補正量を求めてよい。

【0013】

以下、図1を用いて、本実施形態のマイクロ流体デバイスの構成例について具体的に説明する。

図1において、11はマイクロチップであり、マイクロ流路12を有しており、ポート14を通じて試薬を流入、流出させるように構成されている。

マイクロチップ11の材質は、流路内の試薬を蛍光観察するために、石英のような透明な

10

20

30

40

50

ガラス材料が望ましい。

マイクロ流路 12 の着目領域 20 における温度昇降および温度測定は、ヒーター機能と温度センサー機能を兼ねた抵抗体 13 により行う。

着目領域 20 における温度均一性を保つために抵抗体 13 は流路内の着目領域 20 よりも広いパターンのものが配置される。

抵抗体 13 の材料には、白金や銅といった測温抵抗体材料や、サーミスタが用いられる。流路内に導入した試薬の蛍光輝度を測定するために、光源 17 の光をフィルタ 15 を通して流路内の試薬に照射し、蛍光色素を励起、発光させる。

この時得られた蛍光シグナルはフィルタ 16 を通してカメラ 19 で受光し、PC (パソコン) 18 において画像データを収録する。

PC (パソコン) 18 は、マイクロ流体デバイス全体の制御を司る。上記した測定手段により測定された、本測定前の前測定における基準となる環境温度での温度分布と前記本測定における環境温度での温度分布とを比較し、前記本測定で測定された前記着目領域の温度の補正や、抵抗体への電圧を印加する際の制御等がここで司られる。

#### 【0014】

次に、図 3 に示す着目領域における測定温度を補正するためのプロセスを用いて、本実施形態の温度分布測定および着目領域温度の補正方法について説明する。

まず、工程 31 のキャリブレーションを行う。

キャリブレーションは、工程 31 (a) と工程 31 (b) の 2 つの工程で構成される。

工程 31 (a) は、次工程である本測定において着目領域温度を制御するために必要となる、流路内着目領域の温度と抵抗体抵抗値の関係式を求める工程であり、工程 31 (b) は温度分布を求める工程である。この 2 つの工程は同時に行われる。

例えば、抵抗体として、温度と抵抗値の関係が線形な材料を用いた場合、以下の関係式 (1) が用いられる。

$$T = k_1 \times R + k_0 \quad (1)$$

T は着目領域の温度、R は抵抗体抵抗値である。k<sub>0</sub> と k<sub>1</sub> は未知の係数である。係数を求ることで着目領域の温度と抵抗体抵抗値が対応付けられる。

前記関係式 (1) は、T<sub>m</sub> が既知の DNA 試薬を流路に導入し、熱融解時の抵抗値と対応付けることで求めてよい。また、試薬の蛍光輝度の温度応答性を利用して対応付けてよい。

工程 31 (b) の温度分布を求める工程では、抵抗体直上における蛍光シグナルの画像データを収録しておき、抵抗体直上かつ流路に沿った方向の流路内着目領域を含む 2 点以上の温度分布を測定する手段を用いて流路内温度の算出を行う。

図 4 と図 5 に温度分布の測定位置の例を示す。

温度分布は、図 4 に示すように着目領域を含む抵抗体直上の任意の 2 点について温度分布を測定してもよい。

この時、温度分布を測定する点は、工程 31 (a) で求めた着目領域に加えて流路内における抵抗体 41 の端部に対応する位置が好ましい。それは、着目領域のような抵抗体中央部に比べ端部ほど温度が低く、環境変化に敏感に反応するため補正精度が向上するからである。

また図 5 に示すように、抵抗体 51 直上の全領域について温度分布を測定してもよい。

#### 【0015】

次に、工程 32 に示す本測定を行う。

本測定も 2 つの工程で構成される。工程 32 (a) は、キャリブレーションで求めた関係式を用いて着目領域にて DNA の増幅および分析を行う工程である。

例えば SNP 判定として熱融解法を行うのであれば、検査検体の T<sub>m</sub> を求めることである。

工程 32 (b) は工程 32 (a) の分析と併せて抵抗体直上における蛍光シグナルの画像

データを収録し、キャリブレーションで温度分布を測定した位置と同一位置について温度分布を測定する工程である。

【0016】

最後に工程33に示す補正を行う。

ここで、補正とは、キャリブレーションと本測定で求めた2つの温度分布を比較し補正量を求め、本測定で測定した温度を補正する工程である。

温度分布の比較、補正量の算出は、キャリブレーション及び本測定において求めた抵抗体直上の全領域の差分値を積算して計算してもよい。

温度分布の比較、補正量の算出は、キャリブレーション及び本測定において求めた同一位置における温度分布の差分値を取り、その差分値を代表として補正量を計算し、補正してもよい。代表とした差分値と補正量の関係は、実際のデータから求めてよいし、シミュレーションから求めてよい。

温度分布の比較、補正量の算出は、キャリブレーション及び本測定において求めた同一位置における温度分布の差分値を取り、その差分値を代表として、あらかじめ求めておいた温度分布の中で最も近い温度分布を選択し、対応する補正量を用いて補正してもよい。

温度分布の比較、補正量の算出は、キャリブレーション及び本測定において求めた抵抗体直上の全領域の差分を積算し、その積算量から、あらかじめ求めておいた温度分布の中で最も近い温度分布を選択し、対応する補正量を用いて補正してもよい。

あらかじめ求めておく温度分布は、実際のデータから求めてよいし、シミュレーションから求めてよい。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0017】

以下に、本発明の実施例について説明する。本発明は以上で説明した本発明の実施形態や、以下に説明する実施例によって、何ら限定されるものではない。

ここで、まず実施例で用いたマイクロ流体デバイスについて説明する。

図6に、実施例で作製したマイクロチップを示す。

マイクロ流体デバイスの構成は、図1を用いて説明する。

マイクロチップ61は厚さ0.5mmの2枚のガラス基板を貼り合わせることで作製され、一方の上基板62は10mm×30mm、下基板63は15mm×30mmとした。

上基板62には、深さ20μm、幅180μm、長さ20mmのマイクロ流路64をドライエッティングにより施した。試薬導入口は、ドリルにより貫通させることで設けた。

下基板63には、抗体65として厚さ100nm程度の白金をスパッタ成膜し、フォトリソグラフィーにより幅300μm、長さ15mmのパターンを形成した。続いて、抗体65の電極配線66として、厚さ300nmのチタン-金-チタンを連続スパッタにより成膜し、フォトリソグラフィーによりパターンを形成した。抗体65及び電極66をパターニングした後、マイクロ流路64との絶縁を取るために下基板63に酸化シリコンを1μm程度CVDにより成膜した。

最後に、上基板62と下基板63をプラズマ照射により表面を改質した後、接着することでマイクロチップ61を作製した。

【0018】

次に、図1を用いてマイクロ流体デバイスの構成について説明する。

流路内に導入した試薬の蛍光輝度を測定するために、光源17としてLEDを用い、LEDからの光をフィルタ15を通して流路内の試薬に照射し、蛍光色素を励起、発光させる。この時得られた蛍光シグナルはフィルタ16を通してカメラ19で受光し、PC18により画像データを収録した。

以下、前記マイクロ流体デバイスを用い、流路内の着目領域における測定温度を温度分布により補正する方法について詳細に説明する。

実施例では、図3に示した着目領域における測定温度の補正プロセスに則って補正を行った。その際、キャリブレーション時の環境温度を20、本測定時の環境温度を5増加させ25とすることで温度見誤りを生じさせ、補正による効果を確認した。

## 【0019】

以下では、まず比較例を用いて、本発明の補正を行わなかった場合の  $T_m$  を求め、環境温度の増加により着目領域の測定温度が見誤っていることについて説明する。

この説明に続いて、実施例 1 ~ 4 において、本発明を適用することで測定温度補正プロセスにより測定温度の見誤りを改善できたことについて説明する。

この実施例 1 ~ 4 では、温度分布の比較方法について詳細に説明する。

図 7 に実施例 1 ~ 4 で設定した着目領域を示す。

以下に示す比較例及び実施例 1 ~ 4 では、キャリブレーションおよび本測定時における流路内の着目領域 7\_2 を抵抗体 7\_1 中央直上の幅  $100 \mu\text{m} \times$  長さ  $1 \text{mm}$  と設定した。

また、キャリブレーションおよび本測定時における着目領域 7\_2 の温度測定及び温度分布は、 $T_m$  が既知の DNA 増幅産物溶液を用い、その溶液を熱融解法により  $T_m$  を測定することで求めた。

## 【0020】

## [比較例]

比較例では、まずキャリブレーションを行うために、流路内に  $T_m$  を 70 と 90 に設計した 2 種類の DNA の増幅産物溶液を流路内に導入した。

キャリブレーション時のマイクロ流体デバイス内の温度は 20 に設定した。

そして、PC を通じて抵抗体に電圧を印加し、流路内で DNA の熱融解反応を行い、熱融解時の抵抗値を測定した。

$T_m$  70 での抵抗体抵抗値は 112.5、90 では 117.5 であった。この結果から、 $k_0$  は -380、 $k_1$  は 4 と求められた。

## 【0021】

次に、本測定を行った。

今回は、流路内に  $T_m$  を 70 に設計した DNA の増幅産物溶液を流路内に導入した。本測定時のマイクロ流体デバイス内の温度は 25 に設定した。

そして、前記キャリブレーションで求めた関係式を用いて電圧を制御し、着目領域において熱融解法を行ったところ、112.525 で熱融解が起こった。以上より、前記関係式を用いて測定温度は 70.1 と求まる。

本比較例では、本発明の補正を行わなかった場合、環境温度の増加により温度見誤りが生じることを示した。着目領域の温度見誤り量は、環境温度が 5 増加すると、0.1 であった。

## 【0022】

## [実施例 1]

実施例 1 では、キャリブレーション及び本測定において、抵抗体直上の全領域について温度分布の比較を行い、全領域のキャリブレーション及び本測定時の温度分布の各点での差分値を積算し補正量を算出、補正を行った。

まず、比較例と同様の方法でキャリブレーションを行い、比較例と同じ係数の関係式を得た。キャリブレーション時のマイクロ流体デバイス内の温度は 20 に設定した。この時、抵抗体直上全域の流路内温度分布を求めるために、抵抗体直上の流路全域についても蛍光シグナルを撮像した。なお、ここまでプロセスは以下の実施例においても同様のため、以下の実施例では説明を省く。

## 【0023】

図 8 に抵抗体直上全域の流路内温度分布を求めるための微小領域の配置を示す。抵抗体 8\_1 直上の流路内温度分布を測定する際、収録した画像の流路内中央の長手方向を図 8 に示すような微小な領域で分割した。

微小な領域は、得られる蛍光輝度を揃えるために中央の着目領域 8\_2 と同じ、幅  $100 \mu\text{m} \times$  長さ  $1 \text{mm}$  と設定した。

そして、各微小領域に対し熱融解時の抵抗値を求めることで、抵抗体 8\_1 直上の全領域における抵抗値分布を求めた。

なお、補正時の都合上、抵抗値を単位長さあたりの抵抗値に変換し、流路内における単位

10

20

30

40

50

長さあたりの抵抗値の分布を求めた。その際、前記抵抗値分布は、流路内の温度が低い位置ほど大きい抵抗値を示すため、符号を反転させ、流路内温度分布との対応を取った。

【0024】

次に、本測定を行った。比較例と同様に流路内に  $T_m$  を 70 に設計した DNA の増幅産物溶液を流路内に導入した。本測定時のマイクロ流体デバイス内の温度は 25 に設定し、熱融解法により  $T_m$  を求めた。着目領域での  $T_m$  は 70.1 であった。同時に、前記キャリブレーションにおいて行った抵抗値分布導出方法と同様の方法により、本測定における単位長さあたりの抵抗値の分布を求めた。

最後に補正を行った。前記単位長さあたりの抵抗値分布の全領域においてキャリブレーション時と本測定時の温度分布の差分値を取り、その総和を計算し、キャリブレーションにおいて求めた関係式から温度見誤り量を計算した。総和は 0.025 であり、キャリブレーションで求めた関係式から、補正量は 0.1 と計算された。この値を用いて本測定時の着目領域の  $T_m$  を補正することができた

【0025】

[実施例 2]

実施例 2 では、キャリブレーション及び本測定において、抗体直上の任意の 2 点として、着目領域と抗体端部の 2 点を選択し、それぞれ温度分布の差分値を取り、この差分値を代表として補正量を計算し、補正を行った。

図 9 に抗体端部直上の流路内温度分布を求めるための微小領域の配置を示す。  
抗体直上の流路内分布を測定する際、収録した画像の流路内中央の長手方向に沿った任意の 2 点を選び、微小領域を設定した。

微小な領域は、得られる蛍光輝度を揃えるために着目領域と同じ、幅 100  $\mu\text{m}$  × 長さ 1  $\text{mm}$  と設定した。

本実施例では、着目領域と、抗体端部の 2 点を選択し、微小領域を設定した。そして、それらの微小領域において  $T_m$  を求めることで流路内の  $T_m$  分布を求めた。前記  $T_m$  分布は、流路内の温度が低い位置ほど大きい  $T_m$  を示すため、符号を反転させ、流路内温度分布との対応を取った。

【0026】

次に、本測定を行った。比較例と同様に流路内に  $T_m$  を 70 に設計した DNA の増幅産物溶液を流路内に導入した。本測定時のマイクロ流体デバイス内の温度は 25 に設定し、熱融解法により  $T_m$  を求めた。 $T_m$  は 70.1 であった。同時に、前記キャリブレーションと同様の流路内温度分布 ( $T_m$  分布) 導出方法により、本測定における流路内温度分布を求めた。

【0027】

最後に補正を行った。キャリブレーションおよび本測定時の抗体端部における温度分布の差分値を取り、シミュレーションにより求めた差分値と温度見誤り補正量との関係から、温度見誤り補正量を算出した。その結果、補正量は 0.1 と計算され、この値を用いて本測定時の着目領域の  $T_m$  を補正することができた。

【0028】

[実施例 3]

実施例 3 では、キャリブレーション及び本測定において、抗体直上の全領域について温度分布の比較を行い、キャリブレーション時と本測定時の温度分布の差分値を抗体直上の全領域について積算した。この積算量から、あらかじめ求めておいた温度分布の中で最も近い温度分布を選択し、補正量を求め、補正を行った。

実施例 1 と同様、図 8 に示すような微小な領域で分割し、各微小領域に対し  $T_m$  を求め、 $T_m$  分布として温度分布を求めた。実施例 1 で述べたように、前記  $T_m$  分布は、流路内の温度が低い位置ほど大きい  $T_m$  を示すため、符号を反転させ、流路内温度分布との対応を取った。

【0029】

次に、本測定を行った。比較例と同様に流路内に  $T_m$  を 70 に設計した DNA の増幅

10

20

30

40

50

産物溶液を流路内に導入した。本測定時のマイクロ流体デバイス内の温度は 25 に設定し、熱融解法により  $T_m$  を求めた。 $T_m$  は 70.1 であった。同時に、前記キャリブレーションと同様の流路内温度分布 ( $T_m$  分布) 導出方法により、本測定における流路内温度分布を求めた。

最後に補正を行った。キャリブレーションおよび本測定時の抵抗体直上の全領域における温度分布の差分値およびその積算値を計算した。図 10 にあらかじめ求めておいた積算値と温度見誤り補正量テーブルの概念図を示す。図 10 に示すようなテーブルをあらかじめシミュレーションにより求めた。そして、本工程において算出した積算値と対応付けられる補正量を選択した。その結果、選択された補正量は 0.1 と計算され、この値を用いて本測定時の着目領域の  $T_m$  を補正することができた。

10

### 【0030】

#### 【実施例 4】

実施例 4 では、キャリブレーション及び本測定において、抵抗体直上の任意の 2 点として、着目領域と抵抗体端部の 2 点を選択し、それぞれの温度分布の差分値を取った。この差分値を代表として、あらかじめ求めておいた温度分布の中で最も近い温度分布を選択し、補正量を得た。

実施例 2 と同様、図 9 に示すように、着目領域と、抵抗体端部の 2 点を選択し、微小領域を設定した。その微小領域において  $T_m$  を求めることで流路内の  $T_m$  分布を求めた。前記  $T_m$  分布は、流路内の温度が低い位置ほど大きい  $T_m$  を示すため、符号を反転させ、流路内温度分布との対応を取った。

20

### 【0031】

次に、本測定を行った。比較例と同様に流路内に  $T_m$  を 70 に設計した DNA の増幅産物溶液を流路内に導入した。本測定時のマイクロ流体デバイス内の温度は 25 に設定し、熱融解法により  $T_m$  を求めた。 $T_m$  は 70.1 であった。同時に、前記キャリブレーションと同様の流路内温度分布 ( $T_m$  分布) 導出方法により、本測定における流路内温度分布を求めた。

最後に補正を行った。図 11 にあらかじめ求めておいた差分値と温度見誤り補正量テーブルの概念図を示す。キャリブレーションおよび本測定時の抵抗体端部における温度分布の差分値を取り、図 11 に示すようなテーブルをあらかじめシミュレーションにより求めた。そして、本工程において算出した差分値と対応付けられる補正量を選択した。その結果、選択された補正量は 0.1 と計算され、この値を用いて本測定時の着目領域の  $T_m$  を補正することができた。

30

#### 【符号の説明】

### 【0032】

1 1 : マイクロチップ

1 2 : マイクロ流路

1 3 : 抵抗体

1 4 : ポート

1 5 : フィルタ

1 6 : フィルタ

1 7 : 光源

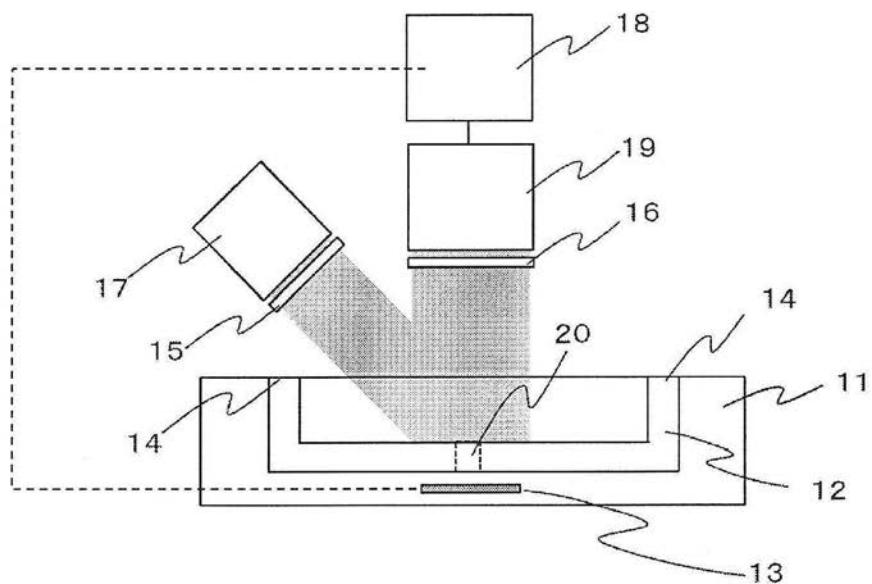
1 8 : PC (パソコン)

1 9 : カメラ

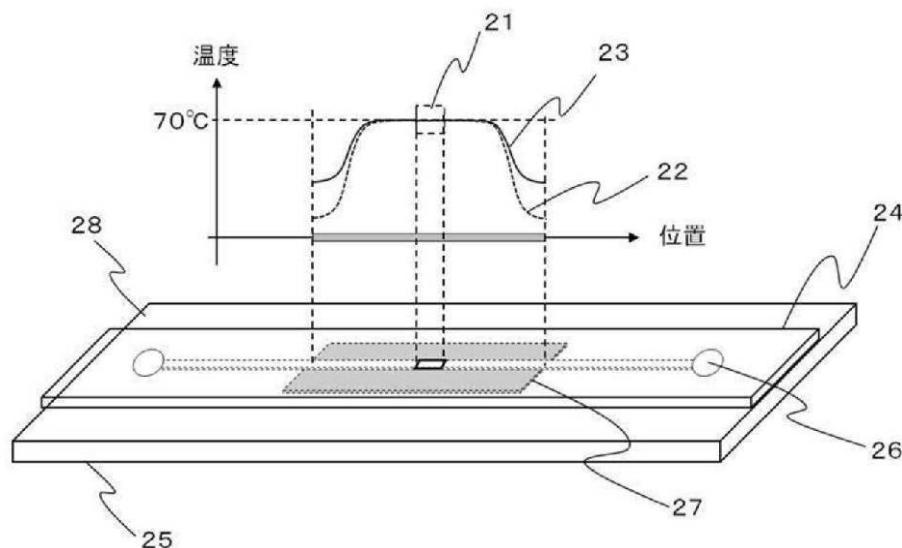
2 0 : 着目領域

40

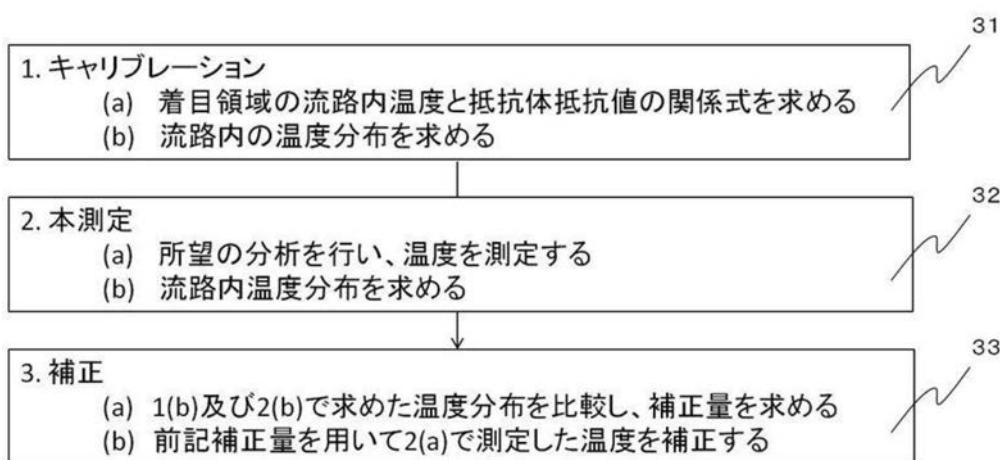
【図1】



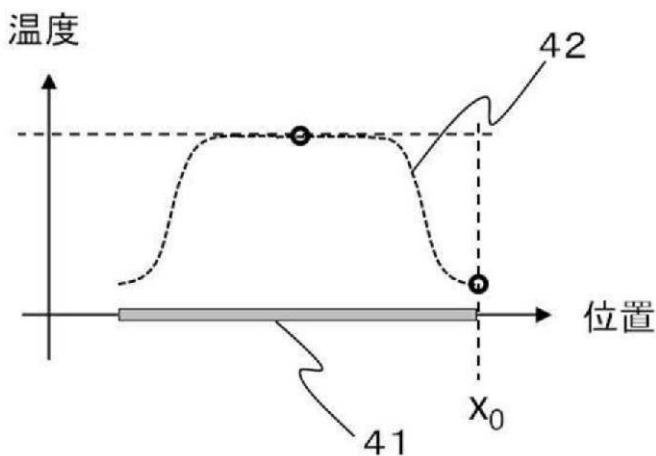
【図2】



【図3】

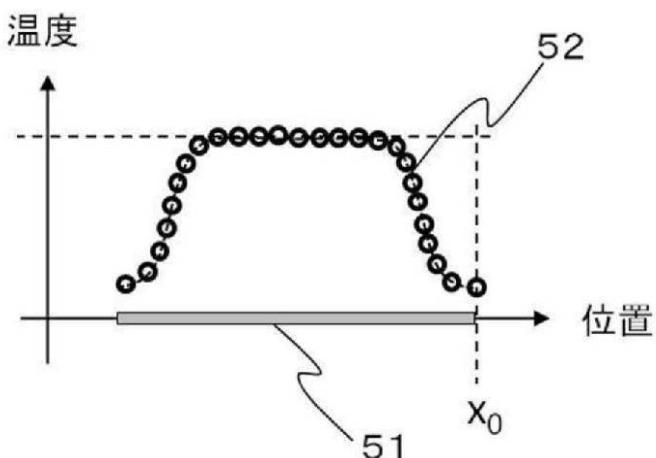


【図4】



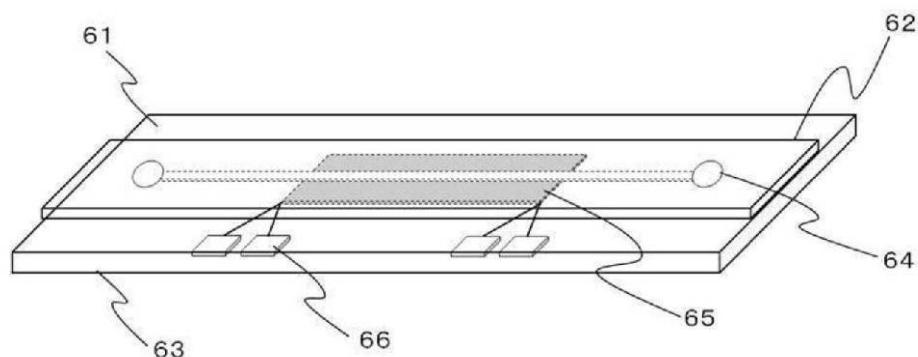
● : 温度分布測定箇所

【図 5】

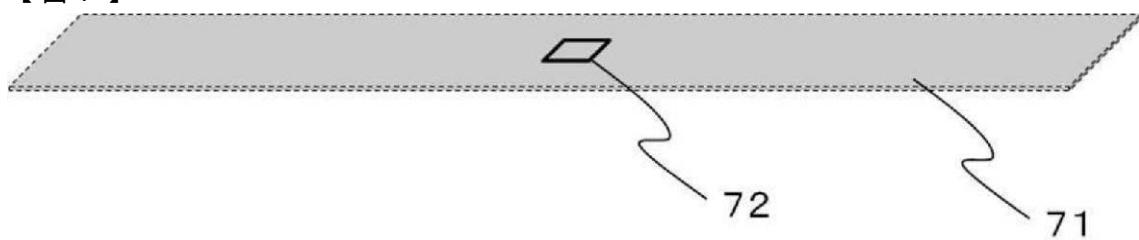


○ : 温度分布測定箇所

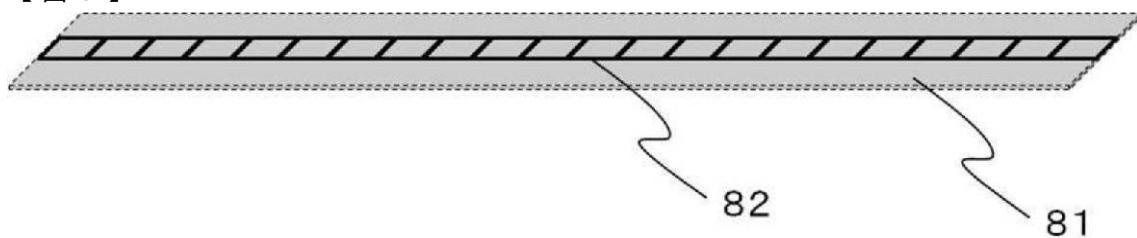
【図 6】



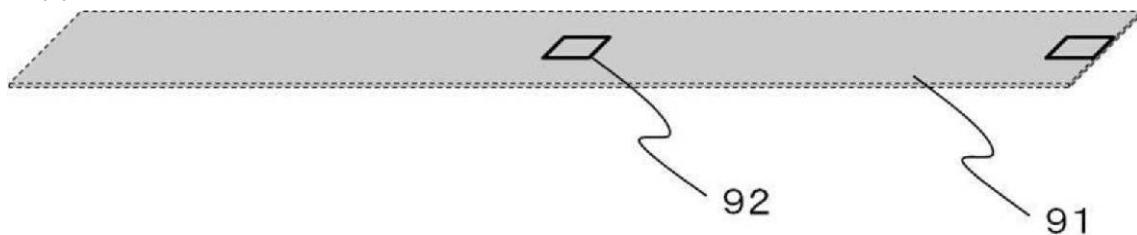
【図 7】



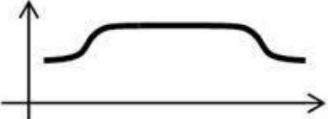
【図 8】



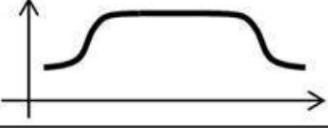
【図 9】



【図 10】

積算量	温度分布	補正量
0(基準)		0(基準)
$S_1$		$T_1$
$S_2$		$T_2$
$S_3$		$T_3$

【図 11】

差分量	温度分布	補正量
0(基準)		0(基準)
$t_1$		$T_1$
$t_2$		$T_2$
$t_3$		$T_3$