(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7517336号
(P7517336)

(45)発行日　令和6年7月17日(2024.7.17)

(24)登録日　令和6年7月8日(2024.7.8)

(51)国際特許分類
Ｇ０１Ｎ　35/02　(2006.01)

ＦＩ
Ｇ０１Ｎ　35/02　Ａ

請求項の数　11　（全29頁）

(21)出願番号　特願2021-522813(P2021-522813)
(86)(22)出願日　令和2年5月27日(2020.5.27)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/020925
(87)国際公開番号　WO2020/241689
(87)国際公開日　令和2年12月3日(2020.12.3)
審査請求日　令和5年4月17日(2023.4.17)
(31)優先権主張番号　特願2019-101305(P2019-101305)
(32)優先日　令和1年5月30日(2019.5.30)
(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　牧野 洋一
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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ウェルに液体を導入する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
基板と、前記基板の一方面に開口し、界面活性剤を含んでいる第１の液体を内部に収容した複数のウェルと、を含み、前記一方面に第１の封止液が積層され、前記複数のウェルの開口部が前記第１の封止液によって封止されている流体デバイスの前記一方面上に、第２の液体を導入することを含み、
その結果、前記第２の液体が前記第１の封止液を置換して前記ウェルの内部に導入される、前記ウェルへの前記第２の液体の導入方法。
【請求項２】
前記第２の液体を導入することの後に、前記流体デバイスに第２の封止液を導入することを更に含み、
その結果、前記第２の封止液が前記一方面に積層されて前記複数のウェルの開口部を封止し、前記ウェルの内部に前記第２の液体、又は、前記第１の液体及び前記第２の液体の混合物が封入される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
さらに、前記第２の液体を導入する前に、前記流体デバイスに前記第１の液体を導入することと、前記第１の封止液が前記一方面に積層されて前記複数のウェルの開口部を封止し、前記ウェルの内部に前記第１の液体が封入されるように前記流体デバイスに前記第１の封止液を導入すること、を含む請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】

前記第１の液体と前記第２の液体とが混和可能である、請求項１～３に記載の方法。
【請求項５】
前記流体デバイスが、前記一方面に対向して配置されたカバー部材を更に有し、
前記カバー部材と前記一方面との間の空間が流路を形成している、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記第２の液体が、前記流路を通じて前記流体デバイスに導入される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記第１の液体及び前記第２の液体が反応試薬を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記第２の液体が前記ウェルの内部に導入された後、前記第１の液体に含まれる成分の少なくとも一部が前記ウェルの内部に保持されている、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記第１の液体に含まれる成分の少なくとも一部が、担体に保持されることによって、前記ウェルの内部に保持されている、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記一方面と前記第１の封止液との親和性が、前記一方面と前記第２の液体との親和性と同程度又は低い、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記一方面の材質がシクロオレフィンポリマーであり、前記第１の液体及び前記第２の液体の主成分が水であり、前記第１の封止液がフッ素系オイルである、請求項１０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ウェルに液体を導入する方法に関する。
本願は、２０１９年５月３０日に日本に出願された特願２０１９－１０１３０５号について優先権を主張し、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。従来から、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いる。
【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及び非特許文献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区画に分割する。そして、各微小区画からの信号を２値化し、標的分子が存在するか否かのみを判別して、標的分子の分子数を計測する。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】
デジタル計測技術は、上記の診断用途への利用に留まらず、多数の標的分子を１分子ごとに分けて分析する用途に広く用いられており、例えば非特許文献２等には、膜貫通タンパク質の機能分析に利用されている。

【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【文献】特許第５５５１７９８号公報
【文献】特表２０１４－５０３８３１号公報
【非特許文献】
【０００７】
【文献】Kim S. H., et al., Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules., Lab on a Chip, 12 (23), 4986-4991, 2012.
【文献】Rikiya Watanabe, et al., High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition., Scientific Reports volume 4, Article number: 7076, 2014.
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
デジタル計測技術では、反応試薬と混合された標的分子を、封止液や脂質二重膜を用いて多数の微小区画に分割した後に、各微小区画の内部で個別に反応を行って標的分子を検出する。このため、微小区画の内部に含まれる反応試薬に応じた分析結果しか得ることができないのが通常である。そこで、本発明は、個別に封止された微小区画の内部の液体を置換す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】
【０００９】
本発明は以下の態様を含む。
［１］基板と、前記基板の一方面に開口し、界面活性剤を含んでいる第１の液体を内部に収容した複数のウェルと、を含み、前記一方面に第１の封止液が積層され、前記複数のウェルの開口部が前記第１の封止液によって封止されている流体デバイスの前記一方面上に、第２の液体を導入することを含み、その結果、前記第２の液体が前記第１の封止液を置換して前記ウェルの内部に導入される、前記ウェルへの前記第２の液体の導入方法。
［２］前記第２の液体を導入することの後に、前記流体デバイスに第２の封止液を導入することを更に含み、その結果、前記第２の封止液が前記一方面に積層されて前記複数のウェルの開口部を封止し、前記ウェルの内部に前記第２の液体、又は、前記第１の液体及び前記第２の液体の混合物が封入される、［１］に記載の方法。
［３］さらに、前記第２の液体を導入する前に、前記流体デバイスに前記第１の液体を導入することと、前記第１の封止液が前記一方面に積層されて前記複数のウェルの開口部を封止し、前記ウェルの内部に前記第１の液体が封入されるように前記流体デバイスに前記第１の封止液を導入すること、を含む［１］又は［２］に記載の方法。
［４］前記第１の液体と前記第２の液体とが混和可能である、［１］～［３］のいずれか一つに記載の方法。
［５］前記流体デバイスが、前記一方面に対向して配置されたカバー部材を更に有し、前記カバー部材と前記一方面との間の空間が流路を形成している、［１］～［４］のいずれか一つに記載の方法。
［６］前記第２の液体が、前記流路を通じて前記流体デバイスに導入される、［５］に記載の方法。
［７］前記第１の液体及び前記第２の液体が反応試薬を含む、［１］～［６］のいずれかに記載の方法。
［８］前記第２の液体が前記ウェルの内部に導入された後、前記第１の液体に含まれる成分の少なくとも一部が前記ウェルの内部に保持されている、［１］～［７］のいずれかに記載の方法。
［９］前記第１の液体に含まれる成分の少なくとも一部が、担体に保持されることによって、前記ウェルの内部に保持されている、［８］に記載の方法。

［１０］前記一方面と前記第１の封止液との親和性が、前記一方面と前記第２の液体との親和性と同程度又は低い、［１］～［９］のいずれかに記載の方法。
［１１］前記一方面の材質がシクロオレフィンポリマーであり、前記第１の液体及び前記第２の液体の主成分が水であり、前記第１の封止液がフッ素系オイルである、［１０］に記載の方法。
【発明の効果】
【００１０】
本発明によれば、個別に封止された微小区画の内部の液体を置換する技術を提供することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図２】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図３】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図４】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図５】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図６】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図７】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図８】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図９】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図１０】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図１１】流体デバイスの一例を示す模式断面図である。
【図１２】実施例１の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１３】実施例１の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１４】実施例２の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１５】実施例２の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１６】比較例１の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１７】比較例２の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１８】比較例１の結果を示す顕微鏡画像である。
【図１９】比較例２の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２０】実施例３の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２１】実施例３の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２２】実施例３の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２３】実施例４の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２４】実施例４の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２５】実施例４の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２６】比較例３の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２７】比較例３の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２８】比較例３の結果を示す顕微鏡画像である。
【図２９】実施例５の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３０】実施例５の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３１】実施例６の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３２】実施例６の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３３】実施例７の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３４】実施例７の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３５】比較例４の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３６】比較例４の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３７】比較例５の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３８】比較例５の結果を示す顕微鏡画像である。
【図３９】比較例６の結果を示す顕微鏡画像である。

【図４０】比較例６の結果を示す顕微鏡画像である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
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。
【００１３】
[ウェルに液体を導入する方法]
本発明の一実施形態は、基板と、前記基板の一方面に開口し、内部に界面活性剤を含んでいる第１の液体を収容した複数のウェルと、を含み、前記一方面に第１の封止液が積層され、前記複数のウェルの開口部が前記第１の封止液によって封止されている流体デバイスの前記一方面上に、第２の液体を導入することを含み、その結果、前記第２の液体が前記第１の封止液を置換して前記ウェルの内部に導入される、前記ウェルへの前記第２の液体の導入方法を提供する。
【００１４】
本実施形態の方法によれば、個別に封止された微小区画の内部の液体を置換することができる。これにより、例えば、デジタル計測技術において、微小区画の内部に収容された第１の液体に含まれる反応試薬で分析結果を得た後に、微小区画の内部の液体を第２の液体に置換し、第２の液体に含まれる反応試薬を用いて異なる分析を行うこと等が可能になる。
【００１５】
（流体デバイス）
まず、本実施形態の方法に用いることができる流体デバイスについて説明する。図１は、流体デバイスの一例を示す模式断面図である。図１に示すように、流体デバイス１００は、基板１１０と、基板１１０の一方面１１１に対向して配置されるカバー部材１２０とを備えている。カバー部材１２０は、凸部１２１を有している。凸部１２１の先端は、基板１１０に接している。流体デバイス１００においては、基板１１０の一方面１１１上にウェル１４１が複数一体成型されており、ウェルアレイ１４０を形成している。一方面１１１は、カバー部材１２０と対向している。カバー部材１２０は、基板１１０に溶着又は接着されていてもよい。
【００１６】
ウェル１４１は、基板１１０の表面に開口している。ウェル１４１の形状、寸法、及び配置は、特に限定されないが、１つのウェル１４１に１個の標的分子が導入されることが好ましい。ウェル１４１は、容積が小さい微小ウェルであることが好ましい。例えば、１つのウェル１４１の容積は、１０ｆＬ～１００ｐＬ程度であってもよい。流体デバイス１００では、同形同大の複数のウェル１４１がウェルアレイ１４０を構成している。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。
【００１７】
ウェル１４１の直径は、例えば１～３０μｍ程度であってもよい。ウェル１４１の深さは、例えば１～３０μｍ程度であってもよい。また、ウェル１４１の配置は、特に制限されず、例えば三角格子状に整列していてもよいし、正方格子状も整列していてもよいし、ランダムに配置されていてもよい。
【００１８】
流体デバイス１００では、凸部１２１の存在により、一方面１１１とカバー部材１２０との間に空間が形成されている。当該空間は、流路１３０を形成している。流路１３０は、後述する、第１の液体、第１の封止液、第２の液体、及び第２の封止液を送液するための経路として機能する。すなわち、第１の液体、第１の封止液、第２の液体、及び第２の封止液は、流路１３０を通じて流体デバイス１００に導入される。

【００１９】
流路１３０の形状、構造、及び容量等は特に限定されないが、流路１３０の高さ（つまり、基板１１０の一方面１１１と、カバー部材１２０の基板１１０と対向する面との間の距離）は、例えば１００μｍ以下であってもよい。
【００２０】
凸部１２１はカバー部材１２０と一体に成形されていてもよい。カバー部材１２０は、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１２１を有する板状に成形することができる。また、カバー部材１２０には試薬の導入ポート１２２及び排出ポート１２３が形成されていてもよい。
【００２１】
カバー部材１２０が凸部１２１を有する場合、基板１１０のウェル１４１が開口する面１１１に凸部１２１が接するように、カバー部材１２０と基板１１０とが重ねられる。この結果、カバー部材１２０と基板１１０との間の空間が流路１３０となる。カバー部材１２０と基板１１０とは、レーザー溶着等により溶着されてもよい。
【００２２】
（流体デバイスの変形例１）
本実施形態の方法に用いられる流体デバイスは上述した流体デバイス１００に限られない。図７は、流体デバイスの一例を示す模式断面図である。図７に示すように、流体デバイス２００は、基板１１０と、壁部材２１０とを備えている。流体デバイス２００においては、ウェルアレイ１４０は基板１１０の一方面１１１上に基板１１０と一体成形されている。ウェルアレイ１４０は複数のウェル１４１を有する。
【００２３】
流体デバイス２００は、カバー部材１２０を有していない点で上述した流体デバイス１００と主に異なっている。このため、流体デバイス２００は流路を有していない。
【００２４】
（流体デバイスの変形例２）
上述した流体デバイス１００においては、カバー部材１２０と凸部１２１は一体成形されている。しかしながら、カバー部材１２０と凸部１２１は別体として成形されていてもよい。
【００２５】
また、上述した流体デバイス１００及び流体デバイス２００においては、ウェルアレイ１４０は、基板１１０の一方面１１１上に基板１１０と一体成形されていた。しかしながら、ウェルアレイは、基板１１０と一体成形されていなくてもよい。例えば、流体デバイスとは別体として成形されたウェルアレイ１４０を、流体デバイスの基板１１０上に配置してもよい。あるいは、基板１１０の表面に樹脂層を積層し、エッチング等により、樹脂層にウェルアレイを形成してもよい。
【００２６】
（流体デバイスの材質）
基板１１０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、第１の液体、第２の液体、及び封止液に対して耐性のある樹脂であることが好ましい。また、検出するシグナルが蛍光である場合には、自家蛍光が少ない樹脂であることが好ましい。例えば、樹脂としては、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、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、及びアモルファスフッ素樹脂等が挙げられるがこれらに限定されない。
【００２７】
基板１１０の板厚方向の一方面１１１に複数のウェル１４１が形成されていてもよい。樹脂を用いたウェルの形成方法としては、射出成形、熱インプリント、及び光インプリント等が挙げられる。
【００２８】
あるいは、例えば、基板１１０の上にフッ素樹脂を積層し、当該フッ素樹脂をエッチン

グ等により加工してウェルアレイを形成してもよい。フッ素樹脂としては、例えばＣＹＴＯＰ（登録商標）（旭硝子）等を用いることができる。

【００２９】

また、流体デバイスがカバー部材１２０を有する場合、カバー部材１２０の材質は、自家蛍光の少ない樹脂であることが好ましく、例えば、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等の熱可塑性樹脂であってもよい。

【００３０】

また、カバー部材１２０は、シグナルを蛍光観察する際に検出される波長及びそ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、カバー部材１２０は、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。

【００３１】

（第１実施形態）

上述したように、本実施形態の方法は、基板と、前記基板の一方面に開口し、界面活性剤を含んでいる第１の液体を内部に収容した複数のウェルと、を含み、前記一方面に第１の封止液が積層され、前記複数のウェルの開口部が前記第１の封止液によって封止されている流体デバイスの前記一方面上に、第２の液体を導入することを含み、その結果、前記第２の液体が前記第１の封止液を置換して前記ウェルの内部に導入される、前記ウェルへの前記第２の液体の導入方法である。

【００３２】

場合により図１～６を参照しながら、流体デバイス１００を用いた場合を例に、第１実施形態の方法について説明する。

【００３３】

《第１の液体の導入》

まず、図１に示すように、流体デバイス１００の導入ポート１２２から第１の液体Ｌ１１０を導入し、流路１３０に送液する。第１の液体Ｌ１１０は、例えば、生体試料又は環境試料を含む。生体試料としては、特に制限されず、血清、血漿、尿、及び細胞培養液等が挙げられる。また、環境試料としては、例えば、河川の水及び工場排水等が挙げられる。

【００３４】

生体試料及び環境試料は、検出対象となる標的分子を含む場合がある。また、生体試料及び環境試料は、検出対象となる標的分子を含まない場合もある。標的分子としては、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、ウイルス、細胞、及び特定化合物等が挙げられる。ここで、ＲＮＡとしては、ｍｉＲＮＡ及びｍＲＮＡ等が挙げられる。また、細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、植物細胞、及び昆虫細胞等が挙げられる。

【００３５】

第１の液体Ｌ１１０は、標的分子を検出する反応試薬を含んでいてもよい。反応試薬としては、緩衝物質、酵素、基質、抗体、及び抗体断片等が挙げられる。酵素は、例えば標的分子が核酸である場合には、標的分子に関連する鋳型核酸に対する酵素反応等の生化学的反応を行うために、生化学的反応の内容に対応して選択される。鋳型核酸に対する生化学的反応は、例えば、鋳型核酸が存在する条件下でシグナル増幅が起こるような反応である。反応試薬は、採用する検出反応に応じて選択される。具体的な検出反応としては、Ｉｎｖａｓｉｖｅ　Ｃｌｅａｖａｇｅ　Ａｓｓａｙ（ＩＣＡ）法、ループ介在等温増幅（ＬＡＭＰ）法（商標登録）、５’→３’ヌクレアーゼ法（ＴａｑＭａｎ（登録商標）法）、及び蛍光プローブ法等が挙げられる。

【００３６】

第１の液体Ｌ１１０は、界面活性剤を含んでいる。界面活性剤としては、例えば、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００（ポリエチレングリコールモノ－４－オクチルフェニルエーテル（ｎ＝約１０）ともいう）、ドデシル硫酸ナトリウム、Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０（オクチルフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノールともいう）及びＴｗｅｅｎ２０（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラートともいう）等が挙げられる。

【００３７】
界面活性剤の濃度は、第１の液体Ｌ１１０の総体積に対し０．００１ｖ／ｖ％以上１．０ｖ／ｖ％以下であることが好ましく、０．００５ｖ／ｖ％以上０．５ｖ／ｖ％以下であることがより好ましく、０．０１ｖ／ｖ％以上０．１ｖ／ｖ％以下であることがさらに好ましい。界面活性剤の濃度が第１の液体Ｌ１１０の総体積に対し０．００１ｖ／ｖ％以上であると、第２の液体Ｌ４１０への置換が行われやすい。界面活性剤の濃度が第１の液体Ｌ１１０の総体積に対し１．０ｖ／ｖ％以下であると、後に行われる標的分子の検出における反応への影響が少ない。
【００３８】
流路１３０に送液された第１の液体Ｌ１１０は、ウェル１４１の内部に収容される。この結果、ウェル１４１に反応試薬、界面活性剤及び、存在する場合には標的分子が導入される。
【００３９】
１つのウェル１４１に導入される標的分子の数は特に制限されないが、好ましくは、１つのウェル１４１に１つ以下、すなわち、０個又は１個の標的分子が導入される。これにより、標的分子の検出を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１４０の全てのウェル１４１に標的分子が導入される必要はない。
【００４０】
標的分子をウェル１４１に導入する手段は、特に制限されず、選択した標的分子に応じた適切な手段を選択することができる。例えば、標的分子を自重により流体デバイス内（具体的には流路内）で沈降させ、ウェル１４１に分配する方法が挙げられる。あるいは、標的分子を捕捉する担体（つまり捕捉物）を利用し、自重で沈降しにくい標的分子に捕捉物を結合させて送液してもよい。また、予めウェル１４１に捕捉物を固定化させておき、送液された標的分子を捕捉させることで、標的分子のウェルへの導入効率を向上させることもできる。
【００４１】
捕捉物を標的分子に結合させる工程は、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１４１に標的分子を導入する前に、サンプルチューブ内で標的分子と捕捉物を接触させることにより行ってもよい。あるいは、捕捉物をウェル１４１に導入した後に、標的分子をウェルに導入し、ウェル内で捕捉物と標的分子とを接触させてもよい。
【００４２】
捕捉物は、標的分子を捕捉することができる物質である。捕捉物は、例えば、固相と標的分子に対する特異的結合物質との結合体であってもよい。
【００４３】
固相としては、粒子、膜、及び基板等が挙げられる。また、標的分子に対する特異的結合物質は１種類でもよいし、複数種類であってもよい。例えば３種類であってもよいし、４種類であってもよいし、５種類以上であってもよい。
【００４４】
粒子としては、特に制限されず、ポリマー粒子、磁気粒子、及びガラス粒子等が挙げられる。粒子は、非特異的な吸着を避けるための表面処理が施された粒子が好ましい。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が好ましい。より具体的には、粒子としてＪＳＲ社製の商品名「Ｍａｇｎｏｓｐｈｅｒｅ　ＬＣ３００」等を用いることができる。
【００４５】
あるいは、例えば標的分子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。
【００４６】
捕捉物における特異的結合物質としては、抗体、抗体断片、及びアプタマー等が挙げられる。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）、及びＣＤ

Ｒ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。

【００４７】

また、標的分子が糖鎖を含む場合、特異的結合物質は、レクチンであってもよい。また、標的分子が脂質膜を含む場合、特異的結合物質は、脂質膜に結合性を有する物質であってもよい。脂質膜に結合性を有する物質としては、例えば、ヘキサンジオール等の炭化水素及び膜貫通タンパク質等の膜タンパク質が挙げられる。膜タンパク質としては、例えばα－ヘモリシン等が挙げられる。

【００４８】

特異的結合物質を固相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、及びプロテイン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、疎水的相互作用又は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。

【００４９】

捕捉物を用いて標的分子をウェル１４１に導入する場合、捕捉物１個に標的分子が０個又は１個捕捉される条件で捕捉物と標的分子との結合体を形成することが好ましい。さらに、１つのウェル１４１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。

【００５０】

《封止液の導入》

続いて、図２及び図３に示すように、導入ポート１２２から、第１の封止液Ｌ１２０を導入し、流路１３０に送液する。

【００５１】

第１の封止液は、複数のウェル１４１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る。第１の封止液は、好ましくは油性溶液であり、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る。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。ＦＣ－４０（ＣＡＳ番号：８６５０８－４２－１）はフッ素化脂肪族化合物であり、２５℃における比重が１．８５ｇ／ｍＬである。

【００５２】

流路１３０に送液された第１の封止液Ｌ１２０は、流路１３０に導入された第１の液体Ｌ１１０のうち、ウェル１４１に収容されていない第１の液体Ｌ１１０を押し流して置換する。これにより、第１の封止液Ｌ１２０が複数のウェル１４１をそれぞれ個別に封止し、ウェル１４１は独立した反応空間（微小区画１４２）となる。

【００５３】

流路１３０が第１の封止液Ｌ１２０で満たされると、余分な第１の封止液Ｌ１２０は排出ポート１２３から排出される。図３は、ウェルアレイ１４０のウェル１４１の全てが第１の封止液Ｌ１２０で封止され、封止されたウェル（微小区画）１４２が形成された状態を示す。

【００５４】

また、第１の液体Ｌ１１０に脂質を溶解させておき、第１の封止液Ｌ１２０を流路１３０に送液した後、再び脂質を含む液体を送液することにより、ウェル１４１の開口部に脂質二重膜を形成し、当該脂質二重膜によって複数のウェル１４１をそれぞれ個別に封止し

、封止されたウェル１４２を形成することもできる。脂質二重膜を形成する脂質としては、例えば、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホグリセロール（ＤＯＰＧ）、及びこれらの混合物等が挙げられるがこれらに限定されない。

【００５５】

《標的分子の検出》

ここで、第１の液体Ｌ１１０に含まれる反応試薬を反応させて、標的分子を検出してもよい。例えば、封止されたウェル１４２の内部でシグナル増幅反応を行う。すなわち、ウェル１４２の内部に反応試薬由来のシグナルが検出されるように、シグナルを観察可能なレベルまでシグナルを反応工程により増幅させる。シグナルとしては、蛍光、発色、電位変化、及びｐＨ変化等が挙げられる。

【００５６】

シグナル増幅反応は、例えば酵素反応である。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第１の液体Ｌ１１０がウェル１４２の内部に収容された状態で流体デバイス１００を、所望の酵素活性が得られる一定温度条件で所定時間維持する等温反応である。具体例として、シグナル増幅反応として、ＩＣＡ反応を用いることができる。この際、ウェル１４２の内部には、ＩＣＡ反応試薬及び標的分子である核酸が含まれている。酵素反応の結果、ウェル１４２に標的分子が収容されている場合には、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。図３中、符号１４２Ｒは、標的分子が収容され、シグナルを発したウェルを示す。

【００５７】

《第２の液体の導入》

続いて、図４に示すように、導入ポート１２２から、第２の液体Ｌ４１０を導入し、流路１３０に送液する。その結果、第２の液体Ｌ４１０が第１の封止液Ｌ１２０を押し流し、ウェル１４１の内部に導入される。ここで、第１の封止液Ｌ１２０は、第２の液体Ｌ４１０と完全に置換されて除去されることが好ましいが、第２の液体Ｌ４１０がウェル１４１の内部に導入される限り、第１の封止液Ｌ１２０の一部が残存していてもよい。

【００５８】

従来、封止液により封入されたウェル１４２は、もはや内部の液体を交換することはできないと考えられてきた。しかしながら、実施例において後述するように、発明者らは、本実施形態の方法により、第１の封止液Ｌ１２０により封入されたウェル１４２の内部に第２の液体Ｌ４１０を導入することができることを明らかにした。

【００５９】

第２の液体Ｌ４１０は、界面活性剤を含んでもよいし、含まなくてもよい。第２の液体Ｌ４１０が界面活性剤を含んでいる場合、界面活性剤の種類及びその濃度は、第１の液体Ｌ１１０に含まれる界面活性剤と同じものが挙げられる。

【００６０】

第２の液体Ｌ４１０も、第１の液体Ｌ１１０と同様に、標的分子を検出する反応試薬を含むことができる。反応試薬としては、上述した第１の液体Ｌ１１０が含むことができるものと同様のものが挙げられるが、第１の液体Ｌ１１０とは異なる試薬であることが好ましい。これにより、第１の液体Ｌ１１０に含まれる反応試薬とは異なる反応を実施することができる。

【００６１】

流路１３０に送液された第２の液体Ｌ４１０は、流路１３０に導入された第１の封止液Ｌ１２０を押し流して置換する。これにより、個別に封止されていたウェル１４２の封止が解除され、封止されていないウェル１４１となる。また、第１の液体Ｌ１１０が収容されているウェル１４１の内部には第２の液体Ｌ４１０が導入される。

【００６２】

第１実施形態の方法においては、一方面１１１と封止液Ｌ１２０との親和性が、一方面１１１と第２の液体Ｌ４１０との親和性と同程度であるか、又は、一方面１１１と第１の

封止液Ｌ１２０との親和性が、一方面１１１と第２の液体Ｌ４１０との親和性よりも低いことが好ましい。これにより、第２の液体Ｌ４１０を導入したときに、第２の液体Ｌ４１０が第１の封止液Ｌ１２０を押し流し、ウェル１４２の封止を解除しやすくなる。

【００６３】

一方面１１１と第１の封止液Ｌ１２０との親和性が、一方面１１１と第２の液体Ｌ４１０との親和性と同程度又は低い例としては、例えば、一方面１１１の材質がシクロオレフィンポリマーであり、第１の液体Ｌ１１０及び第２の液体Ｌ４１０の主成分が水であり、第１の封止液Ｌ１２０がフッ素系オイルである組み合わせが挙げられる。

【００６４】

本明細書において、液体の主成分が水であるとは、液体の５０質量％以上、例えば６０質量％以上、例えば７０質量％以上、例えば８０質量％以上、例えば９０質量％以上、例えば９５質量％以上、例えば９８質量％以上が水であることを意味する。また、フッ素系オイルとしては、例えば、シグマ社製の商品名「ＦＣ－４０」等を用いることができる。

【００６５】

第１の液体Ｌ１１０に界面活性剤が含まれているため、封止の解除されたウェル１４１の内部に第２の液体Ｌ４１０が導入され、その結果、ウェル１４１の内部を第２の液体Ｌ４１０に置換することができる。つまり、ウェル１４１の内部に界面活性剤を含んでいる第１の液体Ｌ１１０が導入され、第１の液体Ｌ１１０が第１の封止液Ｌ１２０により封止された後、第２の液体Ｌ４１０が導入され、ウェル１４１の内部を第２の液体Ｌ４１０に置換することができる。

【００６６】

第２の液体Ｌ４１０がウェル１４１の内部に導入された後、第１の液体Ｌ１１０に含まれる成分の少なくとも一部がウェル１４１の内部に保持されていてもよい。例えば、第１の液体Ｌ１１０に含まれていた標的分子が捕捉物に結合しており、当該捕捉物がウェル１４１の内部に保持されていてもよい。すなわち、第１の液体Ｌ１１０に含まれる成分の少なくとも一部が、捕捉物（担体）に保持されることによって、ウェル１４１の内部に保持されていてもよい。この場合、ウェル１４１の内部には、当該捕捉物及び標的分子と共に、第２の液体Ｌ４１０が存在することになる。

【００６７】

あるいは、例えば、第１の液体Ｌ１１０に含まれていた標的分子が捕捉物に結合しており、更に、第１の液体Ｌ１１０に含まれていた標的分子に対する抗体が前記標的分子に結合しており、当該捕捉物がウェル１４１の内部に保持されていてもよい。この場合、ウェル１４１の内部には、当該捕捉物、標的分子及び標的分子に結合した抗体と共に、第２の液体Ｌ４１０が存在することになる。

【００６８】

第１の液体Ｌ１１０と第２の液体Ｌ４１０とは混和可能であることが好ましい。第１の液体Ｌ１１０と第２の液体Ｌ４１０とが混和可能であると、ウェル１４１の内部の液体の置換が効率的に行われる。ここで、混和可能であるとは、第１の液体Ｌ１１０と第２の液体Ｌ４１０とを混合した場合に、層分離せず、均一な溶液又は分散液が形成されることを意味する。

【００６９】

流路１３０が第２の液体Ｌ４１０で満たされると、余分な第２の液体Ｌ４１０は排出ポート１２３から排出される。

【００７０】

《封止液の導入》

第２の液体Ｌ４１０を導入する工程の後に、流体デバイス１００に第２の封止液Ｌ１２０を導入する工程を更に実施してもよい。ここで、第２の封止液は、上述した第１の封止液と同じものであってもよいし、異なるものであってもよい。具体的には、図５に示すように、導入ポート１２２から、第２の封止液Ｌ１２０を再び導入し、流路１３０に送液してもよい。

【００７１】
その結果、第２の封止液Ｌ１２０が一方面１１１に積層されて複数のウェル１４１の開口部を封止し、ウェル１４１の内部に第２の液体Ｌ４１０、又は、第１の液体Ｌ１１０及び第２の液体Ｌ４１０の混合物が封入され、それぞれのウェル１４１は独立した反応空間（微小区画１４２）となる。
【００７２】
流路１３０が第２の封止液Ｌ１２０で満たされると、余分な第２の封止液Ｌ１２０は排出ポート１２３から排出される。図６は、ウェルアレイ１４０のウェル１４１の全てが第２の封止液Ｌ１２０で封止され、封止されたウェル（微小区画）１４２が形成された状態を示す。
【００７３】
また、第２の液体Ｌ４１０に脂質を溶解させておき、第２の封止液Ｌ１２０を流路１３０に送液した後、再び脂質を含む液体を送液することにより、ウェル１４１の開口部に脂質二重膜を形成し、当該脂質二重膜によって複数のウェル１４１をそれぞれ個別に封止し、封止されたウェル１４２を形成することもできる。脂質二重膜を形成する脂質としては、上述したものと同様のものが挙げられる。
【００７４】
《標的分子の検出》
ここで、第２の液体Ｌ４１０に含まれる反応試薬を反応させて、上述したものと同様にして、標的分子を検出してもよい。例えば、封止されたウェル１４２の内部でシグナル増幅反応を行ってもよい。図６中、符号１４２Ｒは、標的分子が収容されており、反応試薬を反応させた結果、シグナルを発したウェルを示す。
【００７５】
（第２実施形態）
続いて、図７～図１１を参照しながら、流体デバイス２００を用いた場合を例に、第２実施形態の方法について説明する。第２実施形態の方法は、流体デバイスがカバー部材を有していない点で、第１実施形態の方法と異なっている。また、第２実施形態の方法における第１の封止液及び第２の封止液は、第１実施形態の方法における第１の封止液及び第２の封止液と、後述する比重の条件を満たしている必要がある点において異なっている。
【００７６】
《第１の液体の導入》
まず、図７に示すように、流体デバイス２００の内部に第１の液体Ｌ１１０を導入する。第１の液体Ｌ１１０については上述したものと同様である。図７に示すように、第１の液体Ｌ１１０は、ウェル１４１の内部に収容される。この結果、ウェル１４１に反応試薬、及び、存在する場合には標的分子が導入される。１つのウェル１４１に導入される標的分子の数は特に制限されないが、１つのウェル１４１に１つ以下、すなわち、０個又は１個の標的分子が導入されることが好ましい。
【００７７】
《封止液の導入》
続いて、図８に示すように、流体デバイス２００の内部に第１の封止液Ｌ１２０を導入する。第１の封止液Ｌ１２０の比重は第１の液体Ｌ１１０の比重よりも大きい。このため、第１の封止液Ｌ１２０は、第１の液体Ｌ１１０よりも下に沈み、一方面１１１に接する。そして、封止液Ｌ１２０は、第１の液体Ｌ１１０を収容した複数のウェル２４１をそれぞれ個別に封止し、独立した反応空間（微小区画１４２）を形成する。
【００７８】
《標的分子の検出》
ここで、図９に示すように、ウェル１４２内で所定の反応を行い、発生したシグナルを観察してもよい。図９中、ウェル１４２Ｒは、標的分子が収容されており、シグナルが検出されたウェルであり、ウェル１４２は標的分子が収容されておらず、シグナルが検出されなかったウェルである。

【００７９】
《第２の液体の導入》
続いて、図１０に示すように、流体デバイス２００の内部に第２の液体Ｌ４１０を導入する。第２の液体Ｌ４１０の比重は、第１の封止液Ｌ１２０の比重よりも大きい。このため、第２の液体Ｌ４１０は、第１の封止液Ｌ１２０よりも下に沈む。これにより、個別に封止されていたウェル１４２の封止が解除され、封止されていないウェル１４１となる。また、ウェル１４１の内部には第２の液体Ｌ４１０が導入される。ウェル１４１において、第１の封止液Ｌ１２０は、第２の液体Ｌ４１０と完全に置換されて除去されることが好ましいが、第２の液体Ｌ４１０がウェル１４１の内部に導入される限り、第１の封止液Ｌ１２０の一部が残存していてもよい。
【００８０】
第２の液体Ｌ４１０は、標的分子を検出する反応試薬を含んでいてもよい。反応試薬としては、上述した第１の液体Ｌ１１０が含むことができるものと同様のものが挙げられるが、第１の液体Ｌ１１０とは異なる試薬であることが好ましい。これにより、第１の液体Ｌ１１０に含まれる反応試薬とは異なる反応を実施することができる。
【００８１】
第２実施形態においても、第１実施形態と同様に、第２の液体Ｌ４１０がウェル１４１の内部に導入された後、第１の液体Ｌ１１０に含まれる成分の少なくとも一部がウェル１４１の内部に保持されていてもよい。
【００８２】
《封止液の導入》
第２の液体Ｌ４１０を導入する工程の後に、流体デバイス２００に第２の封止液Ｌ６２０を導入する工程を更に実施してもよい。具体的には、図１１に示すように、流体デバイス２００の内部に第２の封止液Ｌ６２０を導入する。第２の封止液Ｌ６２０の比重は、第２の液体Ｌ４１０の比重よりも大きい。このため、第２の封止液Ｌ６２０は、第２の液体Ｌ４１０よりも下に沈み、一方面１１１に接する。そして、第２の封止液Ｌ６２０は、第２の液体Ｌ４１０、又は、第１の液体Ｌ１１０及び第２の液体Ｌ４１０の混合物を収容した複数のウェル２４１をそれぞれ個別に封止し、独立した反応空間（微小区画１４２）を形成する。
【００８３】
図１１は、ウェルアレイ１４０のウェル１４１の全てが第２の封止液Ｌ６２０で封止され、封止されたウェル（微小区画）１４２が形成された状態を示す。
【００８４】
《標的分子の検出》
ここで、第２の液体Ｌ４１０に含まれる反応試薬を反応させて、上述したものと同様にして、標的分子を検出してもよい。例えば、封止されたウェル１４２の内部でシグナル増幅反応を行ってもよい。図１１中、１４２Ｒは、標的分子が収容されており、反応試薬を反応させた結果、シグナルを発したウェルを示す。
【００８５】
第２実施形態の方法においては、第１の液体Ｌ１１０の比重よりも第１の封止液Ｌ１２０の比重が大きく、第１の封止液Ｌ１２０の比重よりも第２の液体Ｌ４１０の比重が大きく、第２の液体Ｌ４１０の比重よりも第２の封止液Ｌ６２０の比重が大きいことが好ましい。また、第１の液体Ｌ１１０及び第２の液体Ｌ４１０の主成分は水であることが好ましい。この場合、例えば、第２の液体Ｌ４１０にショ糖等を含有させることにより、比重を調整することができる。また、第１の封止液Ｌ１２０、第２の封止液Ｌ６２０としては、上述したものの中から、比重等の要件を満たすものを適宜選択して用いることができる。
【００８６】
ここまで、個別に封止された微小区画の内部の液体を１回置換する実施形態について説明したが、本発明の一態様によれば、個別に封止された微小区画の内部の液体を２回以上置換することができる。すなわち、本発明の一態様を繰り返して実施することにより、所

望の回数、液体を置換することが可能になる。
【００８７】
具体的には、上述の例では、上記第１の液体Ｌ１１０の導入、第１の封止液Ｌ１２０による封止、及び第２の液体Ｌ４１０の導入が連続的に行われている。しかしながら、これらの工程は必ずしも連続的に行われなくてもよい。例えば、第１の封止液Ｌ１２０による封止と、第２の液体Ｌ４１０の導入の間に、第３の液体を流体デバイス１００へ導入し、第３の封止液により第３の液体をウェル１４２の内部に封止してもよい。このとき、第３の液体は、界面活性剤を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。第３の液体が界面活性剤を含んでいなくても、第２の液体Ｌ４１０を流体デバイス１００に導入することによりウェル１４１の内部を、界面活性剤を含まない液体から第２の液体Ｌ４１０に置換することができる。
【００８８】
その理由として、第１の液体Ｌ１１０の導入により、ウェル１４１の内部に界面活性剤が導入され、その後、界面活性剤を含まない液体によってウェル１４１の内部を置換しても、界面活性剤がウェル１４１内に残存、又は界面活性剤がウェル１４１の内壁に付着していることが考えられる。そのため、第２の液体Ｌ４１０を導入すると、ウェル１４１の内部に残存する界面活性剤の作用により、ウェル１４１内部を第２の液体Ｌ４１０に置換することができる。
【００８９】
さらに、第３の封止液による封止と第２の液体Ｌ４１０の導入の間に、第４の液体を導入し、第４の封止液により第４の液体をウェル１４１の内部に封止してもよい。第４の液体も同様に、界面活性剤が含まれてもよいし、含まれなくてもよい。
【００９０】
本発明の一態様によれば、試料に複数の標的分子が含まれる場合、例えば試料が細胞等である場合に、標的分子の検出を簡便にすることができる。一つの例として、以下の態様が挙げられる。
【００９１】
細胞及び第１の反応試薬を含んでいる第１の液体Ｌ１１０は、ウェル１４１内に導入される。このとき、捕捉物を用いてこの細胞をウェル１４１内に導入することが好ましい。捕捉物として、第２の液体Ｌ４１０を導入した後も捕捉物と結合した細胞がウェル１４２に留まるような捕捉物を用いる。例えば、質量の十分大きい捕捉物を用いる、又はウェル１４１に固定化された補足物を用いる等が挙げられる。
【００９２】
その後、第１の封止液によりウェル１４２を得て、第１の反応試薬を用いた第１の標的分子の検出を行う。さらに、第２の反応試薬を含んでいる第２の液体Ｌ４１０をウェル１４１内に導入して、ウェル１４１を第２の液体に置換する。その後、第２の封止液を流路１３０内に導入して、封止されたウェル１４２を得る。このウェル１４２内には、捕捉物と結合した細胞及び第２の液体Ｌ４１０が含まれている。その後、第２の反応試薬を用いた第２の標的分子の検出を行う。
【００９３】
このように試料に複数の標的物質が含まれる場合、複数のデバイスを使用することなく、簡便に複数の標的物質の検出を行うことができる。
【実施例】
【００９４】
次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。
【００９５】
（流体デバイスの製造）
まず、図１に示すような構造を有する流体デバイスを製造した。射出成型で形成され、ウェルアレイ１４０を有するシクロオレフィンポリマー製の基板１１０と、カーボンブラ

ックを添加して着色したシクロオレフィンポリマー製のカバー部材１２０を、両面テープで接着して流体デバイスを製造した。両面テープは凸部１２１として機能するものであり、流路１３０の高さ（基板１１０の一方面１１１と、カバー部材１２０の基板１１０と対向する面との間の距離）は１００μｍであった。また、カバー部材１２０は、導入ポート１２２及び排出ポート１２３を有していた。また、ウェルアレイ１４０を構成するウェル１４１の直径は、５μｍであり、ウェル１４１の深さは、３μｍであった。ウェル１４１の１つあたりの体積Ｖｄは、９３ｆＬであった。

【００９６】

（第１の液体及び第３の液体）

第１の液体及び第３の液体は、水（ＡｃｃｕＧＥＮＥ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｇｒａｄｅ Ｗａｔｅｒ（ＬＯＮＺＡ社製））を溶媒とし、蛍光試薬として５μｇ／ｍｌのＲｅｄｍｏｎｄ Ｒｅｄ、緩衝物質として１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ニッポンジーン社製、ｐＨ：８．５）、塩として６．２５ｍＭ $MgCl_2$（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製）、及び界面活性剤として０．１ｖ／ｖ％ Ｔｗｅｅｎ ２０（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製）を含む液体であった。

【００９７】

（第２の液体）

第２の液体は、水（ＡｃｃｕＧＥＮＥ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｇｒａｄｅ Ｗａｔｅｒ（ＬＯＮＺＡ社製））を溶媒とし、蛍光試薬として１μＭのフルオレセインイソチオシアネート（以下ＦＩＴＣと称す）、緩衝物質として１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ニッポンジーン社製、ｐＨ：８．５）、塩として６．２５ｍＭ $MgCl_2$（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製）、及び界面活性剤として０．１ｍａｓｓ％ Ｔｗｅｅｎ ２０（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製）を含む液体であった。

【００９８】

（封止液）

封止液として、オイル（Ｆｌｕｏｒｉｎｅｒｔ ＦＣ－４０、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製）を用いた。

【００９９】

（顕微鏡観察）

使用した装置は、以下の通りであった。

顕微鏡：ＢＺ－８００（キーエンス社製）

対物レンズ：ＣＦＩ プランアポクロマート Ｌａｍｂｄａ １０Ｘ（ニコン社製）

フィルタ１：ＢＺ－Ｘフィルタ ＴｅｘａｓＲｅｄ（キーエンス社製）

フィルタ２：ＢＺ－Ｘフィルタ ＧＦＰ（キーエンス社製））

【０１００】

［実施例１］

（第１の液体の導入）

流体デバイスの導入ポート１２２から、第１の液体を２０μＬ注入した。

【０１０１】

（シグナルの検出１）

続いて、流体デバイス１００の基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から、ウェル１４１に焦点が合うように、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。このとき、基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から励起光を照射した。フィルタ１を用いて、露光時間１／４秒で蛍光画像を撮影し、同一視野の明視野画像も撮影した。

【０１０２】

図１２の（ａ）の画像は、シグナル検出１の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。その結果、視野の全面において蛍光が観察された。

【０１０３】

（封止液の導入）

流体デバイスの導入ポート１２２から、封止液を１００μＬ注入した。この結果、ウェル１４１が個別に封止され、封止されたウェル１４２が形成された。

【０１０４】

（シグナルの検出２）

続いて、流体デバイス１００の基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から、ウェル１４１に焦点が合うように、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。このとき、基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から励起光を照射した。フィルタ１を用いて、露光時間５秒で蛍光画像を撮影し、同一視野の明視野画像も撮影した。

【０１０５】

図１２の（ｂ）の画像は、シグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。その結果、ウェル１４２の配置に対応した蛍光シグナルが観察された。つまり、第１の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。

【０１０６】

（第２の液体の導入）

流体デバイスの導入ポート１２２から、第２の液体を２０μＬ注入した。

【０１０７】

（シグナルの検出３）

続いて、流体デバイス１００の基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から、ウェル１４１に焦点が合うように、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。このとき、基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から励起光を照射した。フィルタ１を用いて、露光時間５秒で蛍光画像を撮影し、フィルタ２を用いて、露光時間１／４０秒で蛍光画像を撮影し、同一視野の明視野画像も撮影した。

【０１０８】

図１３の（ａ）の画像は、シグナル検出３の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。その結果、Ｒｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光は観察されず、全面にＦＩＴＣの蛍光が観察された。

【０１０９】

（封止液の導入）

流体デバイスの導入ポート１２２から、封止液を１００μＬ注入した。この結果、ウェル１４１が個別に再封止され、封止されたウェル１４２が形成された。

【０１１０】

（シグナルの検出４）

続いて、流体デバイス１００の基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から、ウェル１４１に焦点が合うように、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。このとき、基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から励起光を照射した。フィルタ１を用いて、露光時間５秒で蛍光画像を撮影し、フィルタ２を用いて、露光時間１．５秒で蛍光画像を撮影し、同一視野の明視野画像も撮影した。

【０１１１】

図１３の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。その結果、Ｒｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像では蛍光シグナルが観察されず、ＦＩＴＣの蛍光画像ではウェル１４２の配置に対応した蛍光シグナルが観察された。

【０１１２】

［実施例２］

第２の液体がＴｗｅｅｎ　２０を含まないこと以外は、実施例１と同じ条件にて実験を行った。

【０１１３】

図１４の（ａ）の画像は、シグナル検出１の観察画像である。画像の上段は明視野の画

像、下段は蛍光画像である。その結果、視野の全面において蛍光が観察された。
【０１１４】
図１４の（ｂ）の画像は、シグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。その結果、ウェル１４２の配置に対応した蛍光シグナルが観察された。つまり、第１の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。
【０１１５】
図１５の（ａ）の画像は、シグナル検出３の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。その結果、Ｒｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光は観察されず、全面にＦＩＴＣの蛍光が観察された。
【０１１６】
図１５の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。その結果、Ｒｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像では蛍光シグナルが観察されず、ＦＩＴＣの蛍光画像ではウェル１４２の配置に対応した蛍光シグナルが観察された。
【０１１７】
［比較例１］
第１の液体がＴｗｅｅｎ　２０を含まないこと以外は、実施例１と同じ条件にて実験を行った。
【０１１８】
［比較例２］
第１の液体及び第２の液体がＴｗｅｅｎ　２０を含まないこと以外は、実施例１と同じ条件にて実験を行った。
【０１１９】
図１６の（ａ）の画像は、比較例１のシグナル検出１の観察画像である。図１７の（ａ）の画像は、比較例２のシグナル検出１の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。その結果、視野の全面において蛍光が観察された。
【０１２０】
図１６の（ｂ）の画像は、比較例１のシグナル検出２の観察画像である。図１７の（ｂ）の画像は、比較例２のシグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。その結果、ウェル１４２の配置に対応した蛍光シグナルが観察された。つまり、第１の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。
【０１２１】
図１８の（ａ）の画像は、比較例１のシグナル検出３の観察画像である。図１９の（ａ）の画像は、比較例２のシグナル検出３の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。その結果、ウェル１４２の配置に対応したＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光シグナルが観察された。つまり、第１の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。さらに、ＦＩＴＣの蛍光シグナルが全面に観察された。
【０１２２】
図１８の（ｂ）の画像は、比較例１のシグナル検出４の観察画像である。図１９の（ｂ）の画像は、比較例２のシグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。その結果、ウェル１４２の配置に対応したＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光シグナルが観察された。つまり、第１の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。ＦＩＴＣの蛍光シグナルは、観察されなかった。
【０１２３】
実施例１～２及び比較例１～２の結果より、第１の液体に界面活性剤が含まれると、第１の液体が封止液により個別に収容されていても第２の液体によりウェル１４１内を置換

することができることが明らかとなった。このとき、第２の液体に界面活性剤が含まれるか否かに関係なく、第２の液体によりウェル１４１内を置換することができることがわかった。さらに、第２の液体に界面活性剤が含まれていたとしても、第１の液体に界面活性剤が含まれていない場合、第２の液体によりウェル１４１内を置換することができないことがわかった。

【０１２４】

［実施例３］

実施例１と同じ手順により（第１の液体の導入）から（シグナルの検出４）までを行った。その後、以下の操作を行った。

【０１２５】

（第３の液体の導入）

流体デバイスの導入ポート１２２から、第３の液体を２０μＬ注入した。

【０１２６】

（シグナルの検出５）

続いて、流体デバイス１００の基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から、ウェル１４１に焦点が合うように、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。このとき、基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から励起光を照射した。フィルタ１を用いて、露光時間１／４秒で蛍光画像を撮影し、フィルタ２を用いて、露光時間１．５秒で蛍光画像を撮影し、同一視野の明視野画像も撮影した。

【０１２７】

（封止液の導入）

流体デバイスの導入ポート１２２から、封止液を１００μＬ注入した。この結果、ウェル１４１が個別に再封止され、封止されたウェル１４２が形成された。

【０１２８】

（シグナルの検出６）

続いて、流体デバイス１００の基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から、ウェル１４１に焦点が合うように、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。このとき、基板１１０のウェルアレイ１４０が形成されている面とは反対の面から励起光を照射した。フィルタ１を用いて、露光時間５秒で蛍光画像を撮影し、フィルタ２を用いて、露光時間１．５秒で蛍光画像を撮影し、同一視野の明視野画像も撮影した。

【０１２９】

図２０の（ａ）の画像は、シグナル検出１の観察画像である。図２０の（ｂ）の画像は、シグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。

【０１３０】

図２１の（ａ）の画像は、シグナル検出３の観察画像である。図２１の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。

【０１３１】

図２０及び図２１の結果より、実施例１と同じ結果が得られたことが分かる。

【０１３２】

図２２の（ａ）の画像は、シグナル検出５の観察画像である。図２２の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。

【０１３３】

図２２の（ａ）の画像の通り、Ｒｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光シグナルが全面に観察された。一方で、ＦＩＴＣの蛍光シグナルは観察されなかった。図２２の（ｂ）の画像の通り、ウェル１４２の配置に対応したＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光シグナルが観察された。つまり、第３の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。一方で、ＦＩＴＣの蛍光シグナルは観察されなかった。

【０１３４】

［実施例４］
第２の液体がＴｗｅｅｎ　２０を含まないこと以外は、実施例３と同じ条件にて実験を行った。
【０１３５】
図２３の（ａ）の画像は、シグナル検出１の観察画像である。図２３の（ｂ）の画像は、シグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。
【０１３６】
図２４の（ａ）の画像は、シグナル検出３の観察画像である。図２４の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。
【０１３７】
図２３及び図２４の結果より、実施例２と同じ結果が得られたことが分かる。
【０１３８】
図２５の（ａ）の画像は、シグナル検出５の観察画像である。図２５の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。
【０１３９】
図２５の（ａ）の画像の通り、Ｒｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光シグナルが全面に観察された。一方で、ＦＩＴＣの蛍光シグナルは観察されなかった。図２５の（ｂ）の画像の通り、ウェル１４２の配置に対応したＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光シグナルが観察された。つまり、第３の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。一方で、ＦＩＴＣの蛍光シグナルは観察されなかった。
【０１４０】
この結果から、界面活性剤を含んでいる液体（本実施例においては第１の液体）の導入と、封止液による封止と、最終的に置き換えられる液体（本実施例においては第３の液体）の導入とは連続的に行われなくても、最終的に置き換えられる液体をウェルに収容できることがわかった。言い換えれば、最終的に置き換えられる液体（本実施例においては第３の液体）の直前に収容される液体（本実施例においては第２の液体）が界面剤を含んでいなくても、最終的に置き換えられる液体より前に界面活性剤を含んでいる液体（本実施例においては第１の液体）がウェル１４１収容されていれば、最終的に置き換えられる液体がウェル１４１に収容されることがわかった。
【０１４１】
その理由として、第１の液体の導入により、ウェル１４１の内部に界面活性剤が導入され、その後界面活性剤を含まない第２の液体によってウェル１４１の内部を置換しても、界面活性剤がウェル１４１内に残存、又は界面活性剤がウェル１４１の内壁に付着していることが考えられる。そのため、第３の液体を導入すると、ウェル１４１の内部に残存する界面活性剤の作用により、ウェル１４１内部を第３の液体に置換することができたと考えられる。
［比較例３］
第１の液体がＴｗｅｅｎ　２０を含まないこと以外は、実施例３と同じ条件にて実験を行った。
【０１４２】
図２６の（ａ）の画像は、シグナル検出１の観察画像である。図２６の（ｂ）の画像は、シグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。図２６の結果より、比較例１と同じ結果が得られたことが分かる。
【０１４３】
図２７の（ａ）の画像は、シグナル検出３の観察画像である。図２７の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。図２７の（ａ）の画像から、比較例１と同じ結果が得られたことが分かる。図２７の（ｂ）の画像では、Ｒｅｄｍｏｎｄ

Ｒｅｄの蛍光画像において、ウェル１４２の配置に対応して黒く抜けている部分がある。この黒く抜けている部分と、ＦＩＴＣの蛍光画像における蛍光シグナルが観察された部分が一致していることから、ウェル１４２の一部のみ第２の液体により置換されているといえる。このように、第１の液体に界面活性剤が含まれていない場合、第２の液体により確実にウェル１４２を置換することができないことがわかった。

【０１４４】

図２８の（ａ）の画像は、シグナル検出５の観察画像である。図２８の（ｂ）の画像は、シグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。

【０１４５】

図２８の（ａ）の画像の通り、Ｒｅｄｍｏｎｄ Ｒｅｄの蛍光シグナルが全面に観察された。一方で、ＦＩＴＣの蛍光シグナルは観察されなかった。図２８の（ｂ）の画像の通り、ウェル１４２の配置に対応したＲｅｄｍｏｎｄ Ｒｅｄの蛍光シグナルが観察された。つまり、第３の液体が複数のウェル１４２に個別に収容されていることが確認された。一方で、ＦＩＴＣの蛍光シグナルは観察されなかった。つまり、第２の液体に界面活性剤が含まれていると、ウェル１４２内に収容された第２の液体が第３の液体に置換されることがわかった。

【０１４６】

［実施例５］

流体デバイスのカバー部材１２０の材質をガラスに変えた以外は、実施例１と同じ条件で実験を行った。

【０１４７】

［実施例６］

流体デバイスのカバー部材１２０の材質をポリプロピレン（アズワン社製、品番：ＰＰＮ－０５１００１）に変えた以外は、実施例１と同じ条件で実験を行った。

【０１４８】

［実施例７］

流体デバイスのカバー部材１２０の材質をシリコン（十川ゴム社製、品番：Ｋ－１２５（５０））に変えた以外は、実施例１と同じ条件で実験を行った。

【０１４９】

［比較例４］

第１の液体及び第２の液体が界面活性剤を含まないこと以外は、実施例５と同じ条件で実験を行った。

【０１５０】

［比較例５］

第１の液体及び第２の液体が界面活性剤を含まないこと以外は、実施例６と同じ条件で実験を行った。

【０１５１】

［比較例６］

第１の液体及び第２の液体が界面活性剤を含まないこと以外は、実施例７と同じ条件で実験を行った。

【０１５２】

図２９の（ａ）の画像は、実施例５のシグナル検出１の観察画像である。図２９の（ｂ）の画像は、実施例５のシグナル検出２の観察画像である。図３１の（ａ）の画像は、実施例６のシグナル検出１の観察画像である。図３１の（ｂ）の画像は、実施例６のシグナル検出２の観察画像である。図３３の（ａ）の画像は、実施例７のシグナル検出１の観察画像である。図３３の（ｂ）の画像は、実施例７のシグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。

【０１５３】

図３０の（ａ）の画像は、実施例５のシグナル検出３の観察画像である。図３０の（ｂ

）の画像は、実施例５のシグナル検出４の観察画像である。図３２の（ａ）の画像は、実施例６のシグナル検出３の観察画像である。図３２の（ｂ）の画像は、実施例６のシグナル検出４の観察画像である。図３４の（ａ）の画像は、実施例７のシグナル検出３の観察画像である。図３４の（ｂ）の画像は、実施例７のシグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。

【０１５４】

図２９～図３４の結果より、実施例５～７は、実施例１と同じ結果が得られたことが分かる。つまり、流体デバイスのカバー部材１２０の材質がガラス、ポリプロピレン、又はシリコンであっても、第１の液体に界面活性剤が含まれると、封止液により第１の液体が個別に収容されているウェル１４２を第２の液体により置換することができることが明らかとなった。

【０１５５】

図３５の（ａ）の画像は、比較例４のシグナル検出１の観察画像である。図３５の（ｂ）の画像は、比較例４のシグナル検出２の観察画像である。図３７の（ａ）の画像は、比較例５のシグナル検出１の観察画像である。図３７の（ｂ）の画像は、比較例５のシグナル検出２の観察画像である。図３９の（ａ）の画像は、比較例６のシグナル検出１の観察画像である。図３９の（ｂ）の画像は、比較例６のシグナル検出２の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、下段は蛍光画像である。

【０１５６】

図３６の（ａ）の画像は、比較例４のシグナル検出３の観察画像である。図３６の（ｂ）の画像は、比較例４のシグナル検出４の観察画像である。図３８の（ａ）の画像は、比較例５のシグナル検出３の観察画像である。図３８の（ｂ）の画像は、比較例５のシグナル検出４の観察画像である。図４０の（ａ）の画像は、比較例６のシグナル検出３の観察画像である。図４０の（ｂ）の画像は、比較例６のシグナル検出４の観察画像である。画像の上段は明視野の画像、中段はＲｅｄｍｏｎｄ　Ｒｅｄの蛍光画像、下側はＦＩＴＣの蛍光画像である。

【０１５７】

図３５～図４０の結果より、比較例４～６は、比較例２と同じ結果が得られたことが分かる。つまり、流体デバイスのカバー部材１２０の材質がガラス、ポリプロピレン、又はシリコンであっても、第１の液体に界面活性剤が含まれていないと、封止液により第１の液体が個別に収容されているウェル１４２を第２の液体により置換することができないことが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【０１５８】

本発明によれば、個別に封止された微小区画の内部の液体を置換する技術を提供することができる。

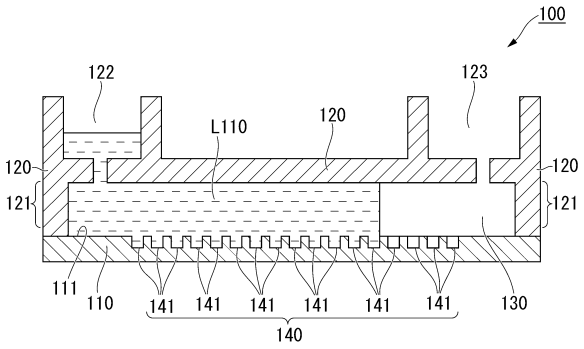
【符号の説明】

【０１５９】

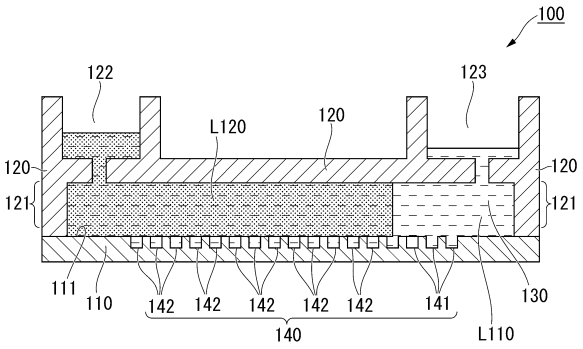
１００，２００…流体デバイス、１１０…基板、１１１…一方面、１２０…カバー部材、１２１…凸部、１２２…導入ポート、１２３…排出ポート、１３０…流路、１４０…ウェルアレイ、１４１…ウェル、１４２…封止されたウェル（微小区画）、２１０…壁部材、Ｌ１１０…第１の液体、Ｌ１２０，Ｌ６２０…封止液、Ｌ４１０…第２の液体。

【図面】

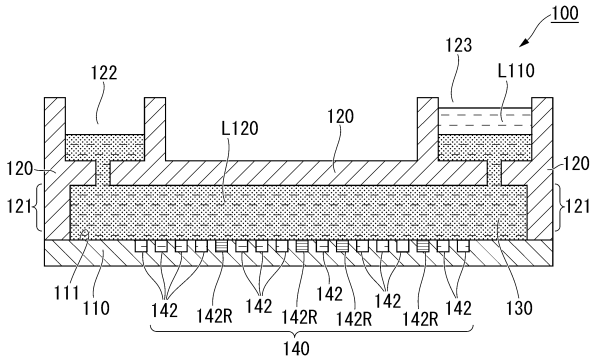
【図１】



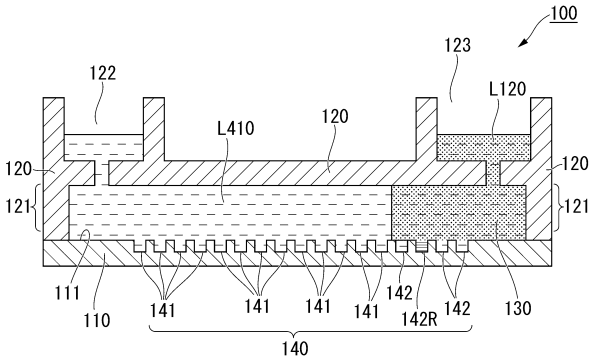
【図２】



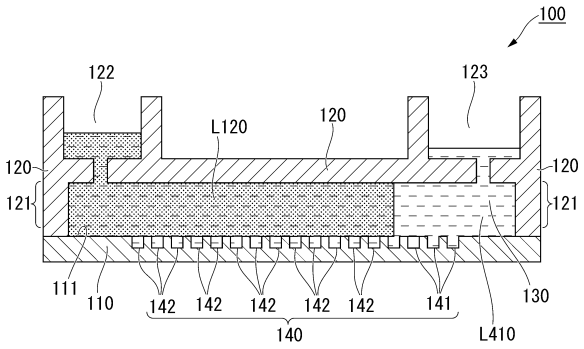
【図３】



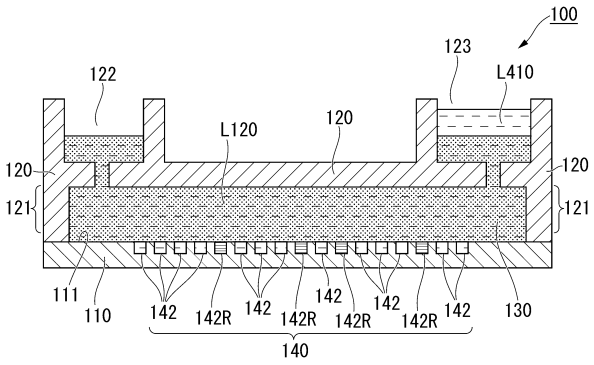
【図４】



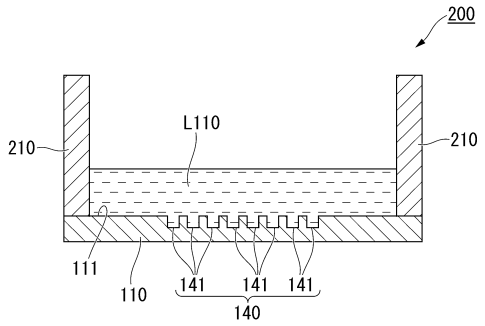
【図５】



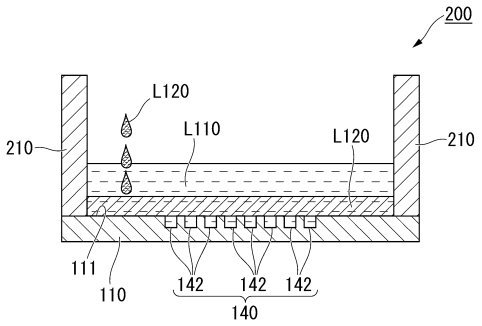
【図６】



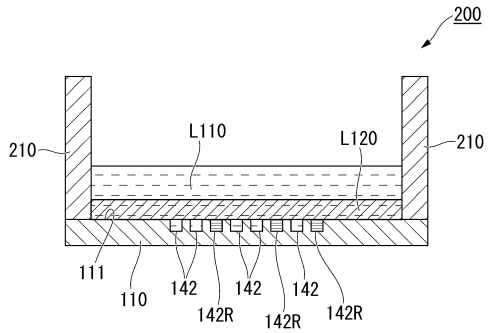
【図７】



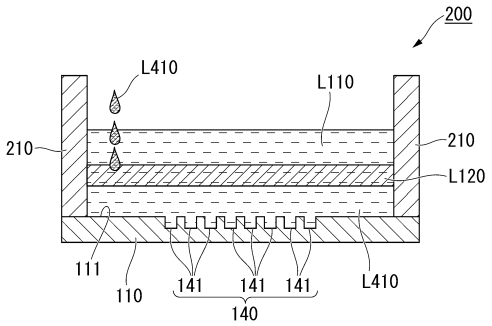
【図８】



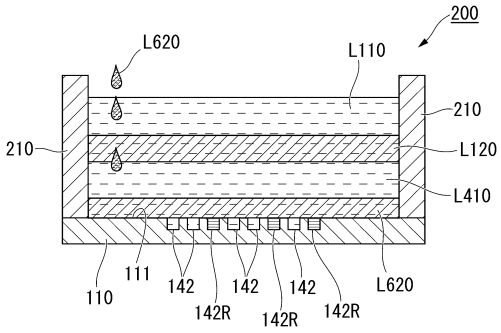
【図９】



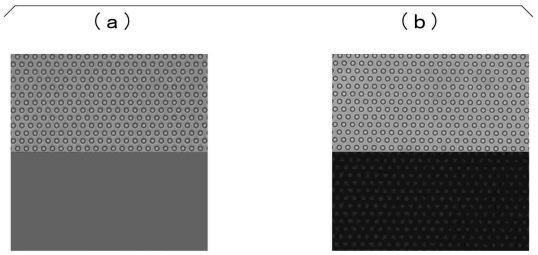
【図１０】



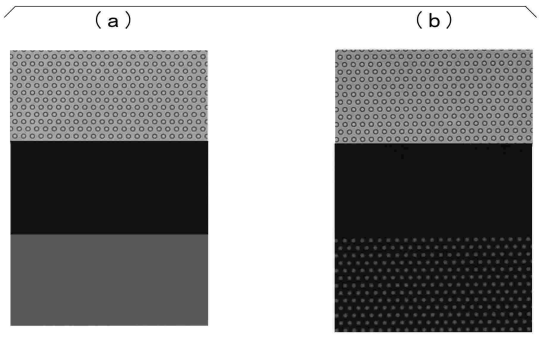
【図１１】



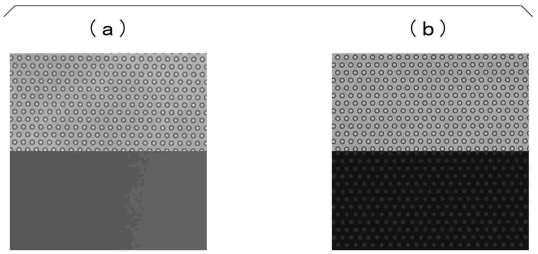
【図１２】



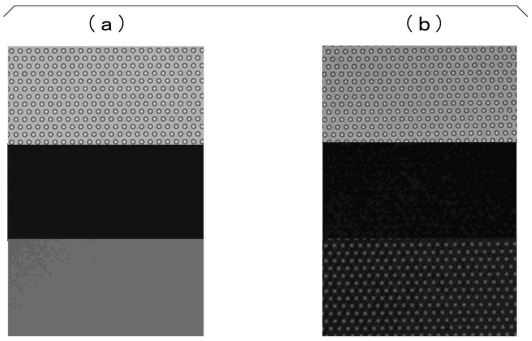
【図１３】



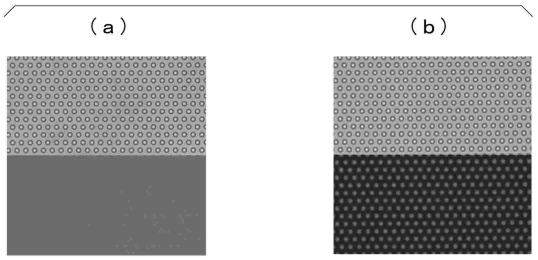
【図１４】



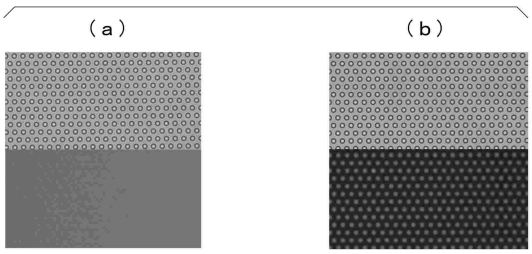
【図１５】



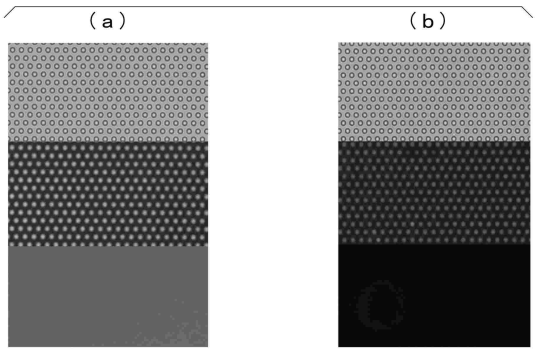
【図１６】



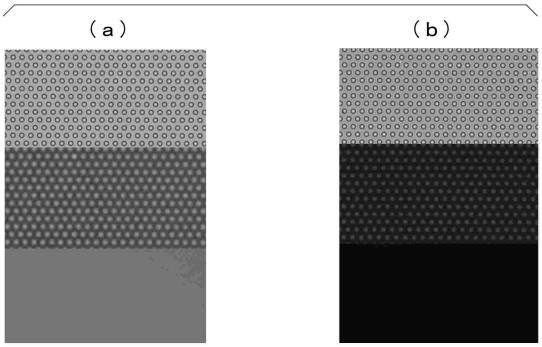
【図１７】



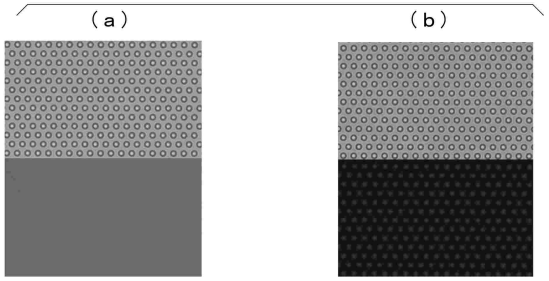
【図１８】



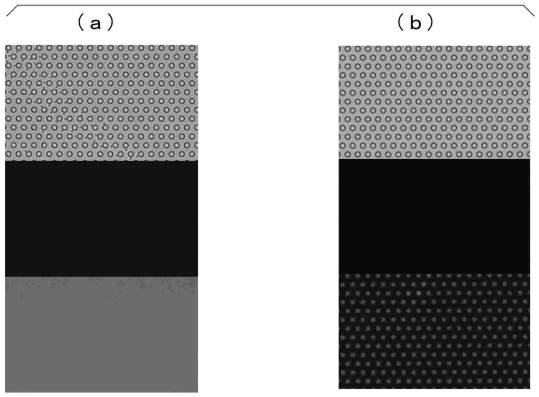
【図１９】



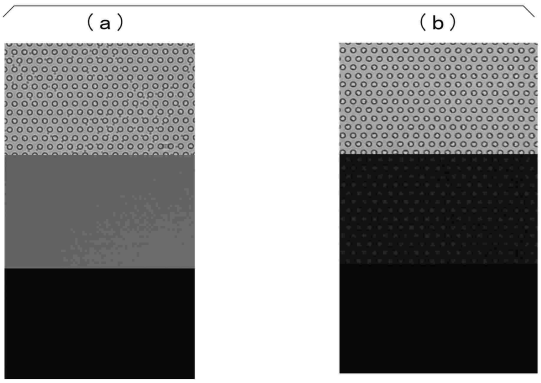
【図２０】



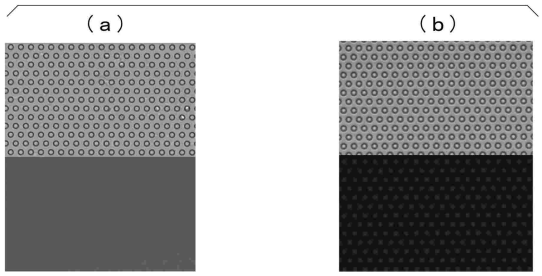
【図２１】



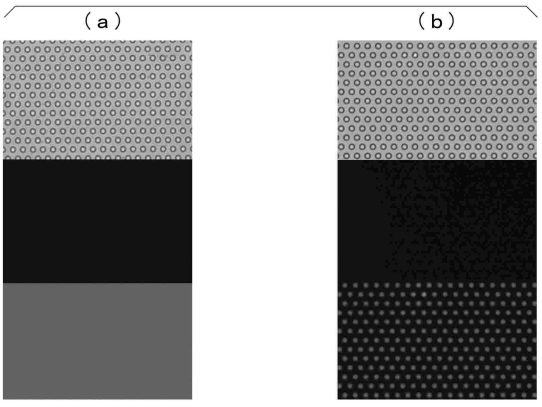
【図２２】



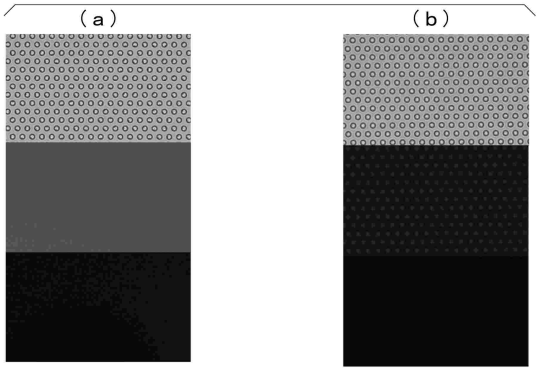
【図２３】



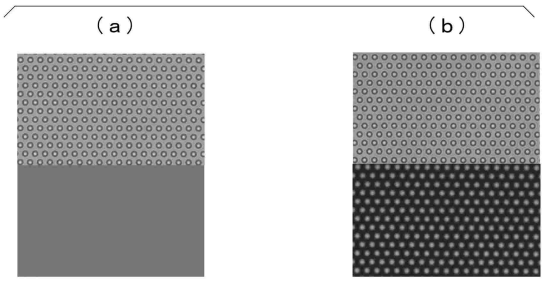
【図２４】



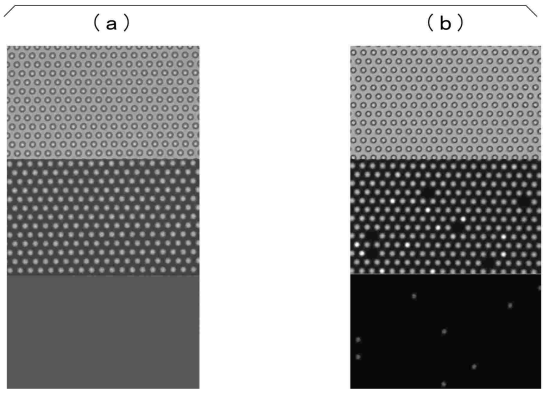
【図２５】



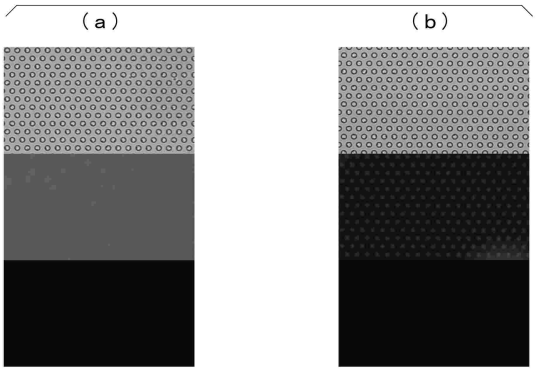
【図２６】



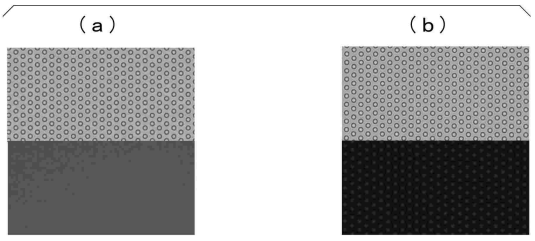
【図２７】



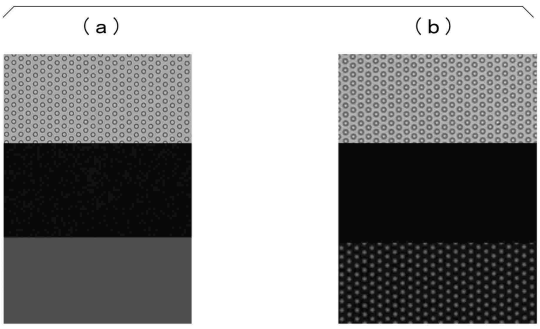
【図２８】



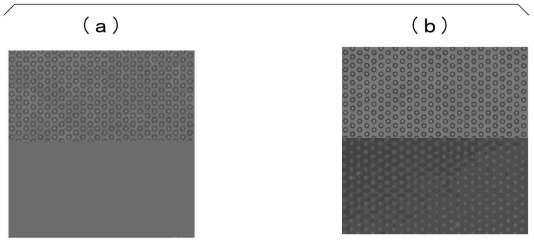
【図２９】



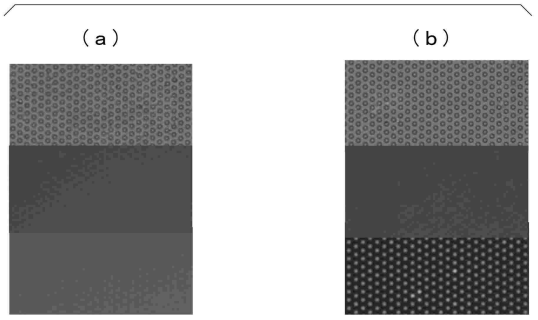
【図３０】



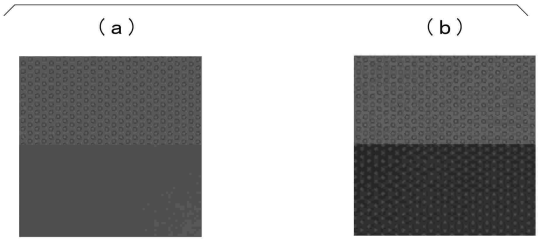
【図３１】



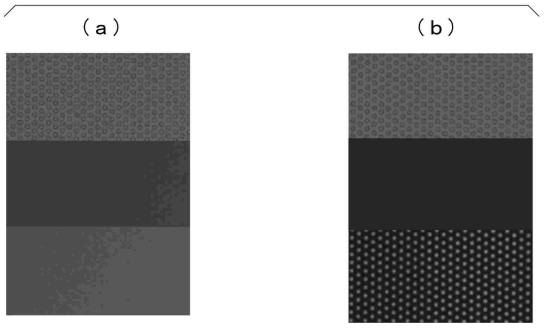
【図３２】



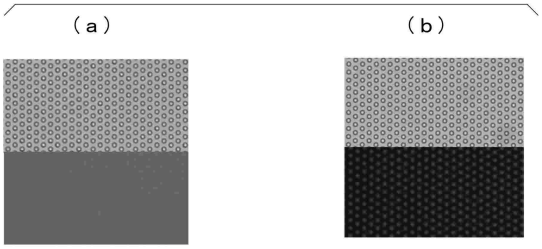
【図３３】



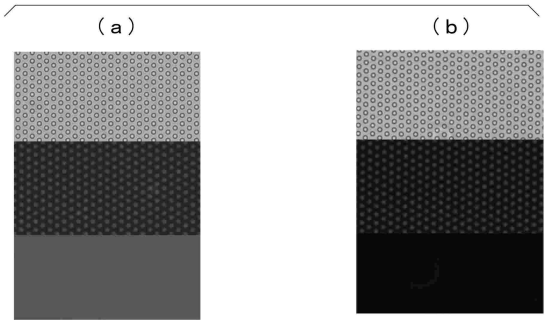
【図３４】



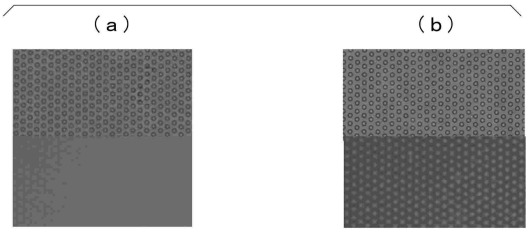
【図３５】



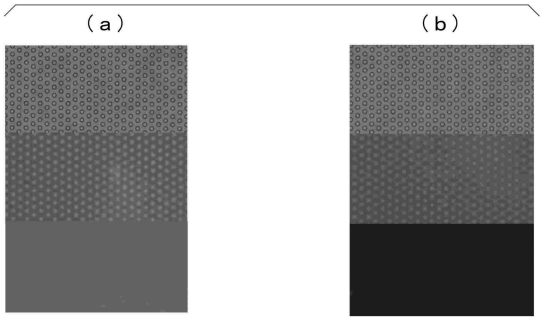
【図３６】



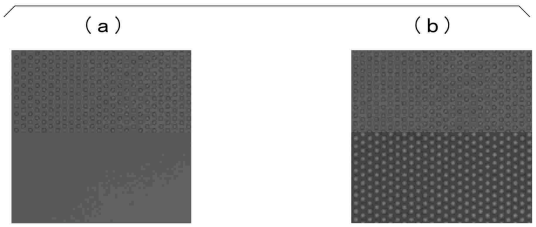
【図３７】



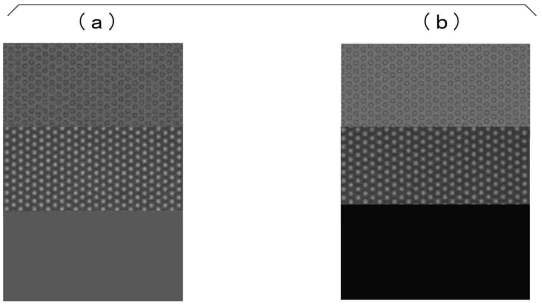
【図３８】



【図３９】



【図４０】



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

審査官　三木 隆

(56)参考文献　国際公開第２０１５／１１５６３５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１７／１８８４４１（WO，Ａ１）
国際公開第２０１７／０４３５３０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／１５９０６８（WO，Ａ１）
国際公開第２０１９／０９８３０１（WO，Ａ１）
KIM Soo Hyeon，Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules，Lab Chip，2012年，Vol.12，Page.4986-4991
MORIIZIMI Yoshiki，Hybrid cell reactor system from Escherichia coli protoplast cells and arrayed lipid bilayer chamber device，SCIENTIFIC REPORTS，2018年，Vol.8，Page.11757
WATANABE Rikiya，High-throughput single-molecule bioassay using micro-reactor arrays with a concentration gradient of，Lab Chip，2018年，Vol.18，Page.2849-2853

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３５／０２