

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 12 月 11 日(11.12.2014)



(10) 国際公開番号

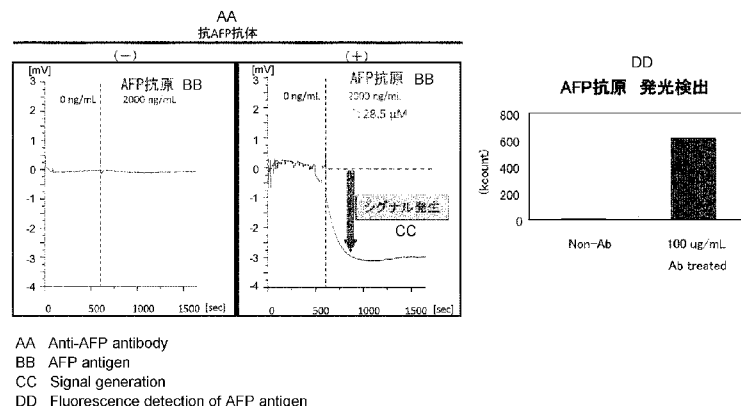
WO 2014/196606 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/064997
- (22) 国際出願日: 2014 年 6 月 5 日(05.06.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-119299 2013 年 6 月 5 日(05.06.2013) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人物質・材料研究機構(NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目 2 番地 1 Ibaraki (JP). 富士レボ株式会社(FUJIRE-BIO INC.) [JP/JP]; 〒1630410 東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 吉川 元 起(YOSHIKAWA Genki); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目 2 番地 1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 柴 弘太(SHIBA Kota); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目 2 番地 1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 細川 奈生(HOSOKAWA Nao); 〒1630410 東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士レボ株式会社内 Tokyo (JP). 中町 衛(NAKAMACHI Mamoru); 〒1630410 東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士レボ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫(NISHIZAWA Toshio); 〒1020073 東京都千代田区九段北 4 丁目 3 番 1 4 号 九段堀江ビル 6 F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) Title: MEMBRANE-TYPE SURFACE STRESS SENSOR HAVING ANTIBODY OR ANTIGEN IMMOBILIZED THEREON, METHOD FOR PRODUCING SAME, AND IMMUNOASSAY METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 抗体または抗原を固定化した膜型表面応力センサとその製造方法並びにこれを用いた免疫測定方法



(57) Abstract: A membrane-type surface stress sensor characterized in that a thin silicone membrane having an antibody or antigen immobilized thereon is supported at multiple points by a supporting member comprising a piezo-resistance element, and the deformation of the thin silicone membrane, which is induced by the binding of the antibody or antigen to an antigen or antibody in a sample solution, is detected by the piezo-resistance element so that the antigen-antibody binding can be detected or the binding amount thereof can be determined.

(57) 要約: 抗体または抗原が固定化されたシリコン薄膜が、ピエゾ抵抗素子を含む支持体によって複数点支持されており、前記抗体または抗原が試料溶液中の抗原または抗体と結合することによって引き起こされるシリコン薄膜の変形をピエゾ抵抗素子によって検出することにより、抗原と抗体との結合を検出またはその結合量を定量可能とすることを特徴とする。



WO 2014/196606 A1



MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

抗体または抗原を固定化した膜型表面応力センサとその製造方法並びにこれを用いた免疫測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、センサ素子表面に抗体または抗原を固定化した膜型表面応力センサ (membrane-type surface stress sensor、MSS) とその製造方法並びにこれを用いた免疫測定方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、抗体と抗原の結合反応を利用して、生体試料中に含まれる抗原の濃度を測定する免疫測定方法では様々な工夫がなされてきている。例えば、光学的検知方法などが開発され、近年では、より簡便な測定を可能とするための方法として、ピエゾ抵抗型カンチレバー方式での測定が提案されている（非特許文献1）。

[0003] 非特許文献1記載のピエゾ抵抗型カンチレバー方式による免疫測定においては、ピエゾ抵抗型カンチレバー表面に予め受容体層として抗体を固定化し、専用の抗体結合用、抗原結合用のチャンバーを設計して、抗原抗体反応に基づく免疫測定を行うようにしている。この方法では、抗原として用いた前立腺特異抗原 (PSA) の濃度に依存して、ピエゾ抵抗部の電気抵抗値変化に伴う出力電圧が大きくなり、抗原濃度の定量も可能である。しかしながら、検出感度が十分とは言えず、さらなる検出感度の向上が望まれていた。

[0004] ところで、従来のバイオセンサの品質保証に関する研究では、統計手法を用いた抜き取り法を行っているため、バイオセンサ群の感度を全数管理あるいは保証することは不可能であった。さらに、ロット単位で抜き取り検査し、抜き取り検査結果が不良と判定されたロットは全数破棄していた。このような品質管理手法では、良品まで破棄してしまうという無駄が発生するだけではなく、完成した製品の良品率が統計的にある程度以上であることは保証さ

れるが、個々の製品が良品であることは必ずしも保証されていない。これは、誤診が重大な問題を引き起こす可能性のある、本発明の適用分野では好ましいことではない。

[0005] このような課題を解決するために、バイオセンサの性能を製造工程中に非破壊で判定することが可能なバイオセンサの製造方法が提案されている（特許文献1）。特許文献1記載のバイオセンサの製造方法は、絶縁性の基板上に形成した作用電極と対電極とを用いて、液体試料と試薬との反応を検出し、液体試料と作用電極の接触面積を測定することによって、バイオセンサの性能を製造工程中に非破壊で判定し、同一品質のバイオセンサを安定して生産することができる。とされている。

[0006] しかしながら、免疫測定に用いるイムノセンサは、抗原または抗体処理を行い、実際に抗原抗体反応を確認することでしか性能を評価できず、一度抗原または抗体処理を行ったイムノセンサは、利用できなくなり破棄するより他はなかった。このため、医療や診断、食品分析などの分野で用いられ、高い信頼性を要求されているにもかかわらず、製造したイムノセンサの全数検査は実現不可能であった。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] そこで、以上のとおりの背景から、本発明は、従来のピエゾ抵抗型カンチレバー方式によるイムノセンサよりもはるかに高感度の測定が可能であって、しかも従来よりバイオセンサ一般の大きな課題であった品質保証を高度に、かつ安定して確実なものとし、かつセンサ製造も簡便な新しい技術的手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を進め、その過程において、本発明者らが精密測定的手段として新たに開発したピエゾ抵抗膜型表面応力センサの特徴を生かすことに着目した（特許文献2、非特許文献2、3）。その結果、本発明者は、免疫測定において従来では予期し得ない高い検

出感度と高い品質保証、さらには簡便な製造を可能とする方策として本発明を完成した。

[0009] 本発明は、第1には、膜型表面応力センサであって、抗体または抗原が固定化されたシリコン薄膜が、piezo抵抗素子を含む支持体によって複数点支持されており、前記抗体または抗原が試料中の抗原または抗体と結合することによって引き起こされるシリコン薄膜の変形をpiezo抵抗素子によって検出することにより、抗原と抗体との結合を検出またはその結合量を定量可能とすることを特徴とする。

[0010] また、本発明は、第2には、抗体または抗原が、シリコン薄膜の片面または両面に固定化されていることを特徴とする。第3には、抗体または抗原が、インクジェットスポッティング法、浸漬法のいずれかで固定化されていることを特徴とする。第4には、センサチップであって、上記第1から第3の発明のいずれかの膜型表面応力センサを半導体基板上に1つ以上配置されていることを特徴とする。

[0011] そして、第5には、抗体が抗原と結合することによって引き起こされるシリコン薄膜の変形をpiezo抵抗素子によって検出することにより、抗原と抗体との結合を検出またはその結合量を定量可能とする膜型表面応力センサの製造方法であって、少なくとも

<1>piezo抵抗素子を含む複数の支持体により支持されたシリコン薄膜の表面を洗浄する工程；

<2>洗浄したシリコン薄膜の表面に、自己組織化膜を形成する化合物を接触させる工程；

<3>表面に自己組織化膜が形成されたシリコン薄膜に、抗体または抗原溶液を接触させる工程；

<4>上記<1>～<3>の各工程において、膜型表面応力センサに電圧を印加して、出力電圧の変化をモニタリングする工程；

を含むことを特徴とする。

[0012] さらに、第6には、上記第1から第3の発明のいずれかの膜型表面応力セ

ンサを用いた免疫測定方法であって、少なくとも以下の工程

<1>抗体または抗原が固定化された膜型表面応力センサのシリコン薄膜に、試料溶液を接触させる工程；

<2>前記膜型表面応力センサに電圧を印加し、電気シグナルを測定する工程；

を含むことを特徴とする。

[0013] 第7には、上記第6の発明の免疫測定方法であって、膜型表面応力センサのシリコン薄膜に固定化された抗体または抗原と、試料溶液中の抗原または抗体との結合を、膜型表面応力センサを試料溶液に浸漬して行うことを特徴とする。

発明の効果

[0014] 第1の発明によれば、シリコン薄膜上の抗体または抗原と試料溶液中に含まれる抗原または抗体が結合することによって生じたシリコン薄膜上の応力が、ピエゾ抵抗素子の部分に集中するため、従来のピエゾ抵抗カンチレバーアレイセンサに比べて、例えば20倍以上の感度の向上が可能となる。これにより、従来のELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) やCLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay) などの免疫測定法で使用される二抗体系と異なり、一次抗体のみで感度よく抗原または抗体を検出することができるようになる。また、試料溶液をセンサに供給する際、流路等を設けて試料溶液を流す必要がない。

[0015] また、第2、第3の発明によれば、センサ表面を両面被覆してもピエゾ抵抗素子部に応力が集中するため、高い感度を維持することが可能となる。また、センサの被覆効率が向上するため、センサの大量生産を容易にすることができる。

[0016] 第4の発明によれば、膜型表面応力センサを複数備えたセンサチップを、半導体の製造ラインを用いて大量生産することが可能となり、センサチップの製造コストの低下やセンサチップの使い捨てが可能となる。また、一つの

センサチップで多チャンネル化することが容易である。

[0017] また、第5の発明によれば、シリコン薄膜の表面を洗浄する工程；洗浄したシリコン薄膜の表面に、自己組織化膜を形成する化合物を接触させる工程；表面に自己組織化膜が形成されたシリコン薄膜に、抗体または抗原溶液を接触させる工程；の各工程において、センサ表面に印加された応力に応じた電気抵抗値の変化を出力電圧としてリアルタイムでモニタリングし、各工程が成功しているか評価することが可能となる。これにより、評価基準を満たさないセンサは、その時点で生産ラインから取り除くシステムを構築することができる。その結果、表面に自己組織化膜が形成されたシリコン薄膜に、抗体または抗原溶液を接触させる工程まで終了したセンサは、全製造工程が確実に成功していることが保証されており、製造したセンサの全数検査と同等の効果を得ることができる。したがって、医療や診断分野において高品質で、極めて信頼性の高い検査用キット等を提供することが可能となる。

[0018] 第6、7の発明によれば、従来のpiezo抵抗cantileverアレイセンサを用いた測定方法と比較して、高感度かつ高精度に免疫測定を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明における膜型表面応力センサ(MSS)の模式図である。

[図2]抗体または抗原を片面被覆または両面被覆した光学式cantileverセンサ、piezo抵抗型cantileverセンサ、および膜型表面応力センサの表面に、抗原または抗体が結合した際に生じる撓み等の変形の模式図である。

[図3]ポリマー(poly(sodium 4-styrenesulfonate)、PSS)を片面被覆または両面被覆した膜型表面応力センサを、水蒸気に曝露した際に得られるシグナルを示すグラフである。

[図4] (a) 本発明における膜型表面応力センサを複数配置させたセンサチップの写真である。(b) 本発明のセンサの拡大写真である。(c) 本発明のセンサを用いてフロー法で測定する場合の測定システムの例を示す図である。

[図5]ハンドディッピング（手動浸漬）法によるシリコン薄膜の両面被覆工程を表す図である。右のグラフは、ハンドディッピング（手動浸漬）法によってポリマー（Polyvinylpyrrolidone；PVP）が両面被覆された同一型の膜型表面応力センサ3つのシグナルを示し、3つのセンサのシグナルはほぼ完璧に重なっている。

[図6]図5のセンサチップと同様のセンサチップを試料溶液などに浸漬する際に用いるセンサチップホルダーを示している。

[図7]市販の96穴マイクロプレートを用いて、図5のセンサチップと同様のセンサチップを試料溶液などに浸漬することを示している。

[図8]抗AFP抗体を固定化したシリコン薄膜を備えた本発明の膜型表面応力センサを、AFP溶液に浸漬した際の抗原－抗体結合実験の結果を示している。

[図9]本発明の膜型表面応力センサの製造過程で、シリコン薄膜をホスホン酸処理中のモニタリングデータを示している。

[図10]本発明の膜型表面応力センサの製造過程で、シリコン薄膜のプラズマ洗浄後、5分以下でホスホン酸処理をした際のモニタリングデータを示している。

[図11]本発明の膜型表面応力センサの製造過程で、シリコン薄膜のプラズマ洗浄後、30分経過後ホスホン酸処理をした際のモニタリングデータを示している。

[図12]本発明の膜型表面応力センサの製造過程で、EDC／NHS溶液（DMF）処理したシリコン薄膜を抗体溶液に浸漬した際のモニタリングデータを示している。

[図13]左のシグナル図は、本発明の膜型表面応力センサの製造過程で、EDC／NHS溶液（DMF）処理したシリコン薄膜を、抗AFP抗体溶液に浸漬した際と抗AFP抗体を含まないMES（2-Morpholinoethanesulfonic acid）バッファーに浸漬した際のモニタリングデータを示している。右のヒストグラムは、抗AFP抗体溶液に浸漬したシリコン薄膜と抗AFP抗体を含

まないMESバッファーに浸漬したシリコン薄膜に抗マウスIgG抗体-AP標識体を添加し、化学発光させることによって、シリコン薄膜上に抗AFP抗体が固定化されていることを示している。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明は、上記のとおりの特徴をもつものであるが、図1に基づいて、その実施の形態について詳しく説明する。

[0021] 図1は、本発明における膜型表面応力センサ(MSS)の模式図である。

[0022] 本発明の膜型表面応力センサにおいては、図1に示したように、抗体または抗原が固定化されて受容体層(Receptor Layer)が形成されているシリコン薄膜が、piezo抵抗素子を含む支持体によって複数点支持されている。膜型表面応力センサのシリコン薄膜は、n型のSi(100)を用いることが好ましい。また、piezo抵抗素子としては、シリコン薄膜上に構成されたp型のSiを用いることが好ましい。

[0023] シリコン薄膜の支持は、例えば、図1に示したように4点支持が例示されるが、4点に限らない。

[0024] この膜型表面応力センサと測定対象の試料溶液を接触させることで、膜型表面応力センサのシリコン薄膜上に固定化された抗体または抗原と試料溶液中の抗原または抗体が結合する。その際、シリコン薄膜は、抗原-抗体結合による表面応力を受けて撓み等の変形が生じる。シリコン薄膜を支持するそれぞれのpiezo抵抗素子には、シリコン薄膜の変形量に応じた応力が発生し、この応力に比例してpiezo抵抗素子の抵抗値が変化する。

[0025] 本発明は、例えば、4つのpiezo抵抗素子によって構成されるホイートストンブリッジに電圧を印加することで、上記の抵抗値の変化によって、応力に比例した出力電圧が得られ、抗原または抗体の有無の検出および抗原または抗体量を測定するものである。既知の抗原または抗体量とそれに応じて生じる出力電圧との間で検量線を作成することで、試料溶液中の抗原または抗体の有無および抗原または抗体量(濃度)を定量することが可能となる。

[0026] シリコン薄膜上には、抗体を固定化してもよいし、抗原を固定化してもよ

い。試料溶液中に含まれる測定対象物質が抗原の場合はシリコン薄膜上に抗体を固定化し、試料溶液中に含まれる測定対象物質が抗体の場合はシリコン薄膜上に抗原を固定化する。

[0027] 抗体は、ポリクローナル抗体でもよいし、モノクローナル抗体でもよい。

[0028] 抗体は、例えば、Ig G、Ig M、Ig A、Ig D、Ig E、Ig Y等の免疫グロブリンのいずれのアイソタイプであってもよい。

[0029] 抗体はまた、全長抗体であってもよい。「全長抗体」とは、可変領域および定常領域を各々含む重鎖および軽鎖を含む抗体（例、2つのFab部分およびFc部分を含む抗体）をいう。

[0030] 抗体はまた、上記全長抗体に由来する抗体断片であってもよい。抗体断片は、全長抗体の一部であり、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv等が例示される。

[0031] 抗体はまた、単鎖抗体等の改変抗体であってもよい。

[0032] 単鎖抗体等の改変抗体としては、例えば、抗Ig G抗体、抗Ig M抗体、抗Ig A抗体、抗Ig E抗体、抗前立腺特異抗原（PSA）抗体、抗 α -フエトプロテイン（AFP）抗体、抗GAD抗体、抗HBV抗体、抗HCV抗体、抗HTLV-1抗体、HIV抗体、結核抗体、マイコプラズマ抗体、抗アレルギー物質抗体等が例示される。

[0033] 抗原は、高分子物質であってもよいし、低分子物質であってもよい。「高分子物質」とは、分子量1,500以上の化合物をいう。「低分子物質」とは、分子量1,500未満の化合物をいう。

[0034] 高分子物質としては、例えば、タンパク質や核酸等が例示される。

[0035] タンパク質としては、例えば、親和的結合の能力を有するタンパク質、凝集能を有するタンパク質等が例示される。

[0036] 親和的結合の能力を有するタンパク質としては、例えば、上記抗体、Gタンパク共役型レセプター等の細胞膜上レセプター、Ig G、Ig M、Ig A、Ig E等の免疫グロブリン、細胞膜上レセプターから切断された細胞外ドメインおよび核内レセプター等のリガンド依存性タンパク質、転写因子、核

酸の保護または輸送タンパク質等の核酸結合タンパク質、アダプタータンパク質等のタンパク質複合体を形成するタンパク質、細胞間接着タンパク質等の細胞外マトリクスタンパク質、チロシンキナーゼ、セリン／スレオニンキナーゼ等の酵素、糖タンパク質等が例示される。

[0037] 凝集能を有するタンパク質としては、例えば、変性タンパク質、 β アミロイド等の神経変性タンパク質等の病原性タンパク質等が例示される。

[0038] また、その他のタンパク質としては、例えば、アポ蛋白AⅠ、アポ蛋白AⅡ、アポ蛋白B、アポ蛋白E、リウマチファクター、D-ダイマー、グリコアルブミン、T3、T4、C-反応性蛋白（CRP）、前立腺特異抗原（PSA）、 α -フェトプロテイン（AFP）、DUPAN-2、癌胎児性抗原（CEA）、CA19-9、CA-125、PIVKA-II（Protein induced by vitamin K absence-II）、副甲状腺ホルモン（PTH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、インスリン、C-ペプチド、ペプシノーゲン、インフルエンザA型抗原、インフルエンザB型抗原、コロナウイルス抗原、HBV抗原、HCV抗原、HTLV-Ⅰ抗原、グリコアルブミン、ヘモグロビンA1c、アディポネクチン、シスタチンC、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、トロポニンT、トロポニンI、クレアチニンキナーゼ-MB（CK-MB）、ミオグロビン、H-FABP（ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白）等が例示される。

[0039] 核酸としては、DNA、RNA、メトキシ化RNA等が例示される。

[0040] 低分子物質としては、リガンド、ホルモン、脂質、脂肪酸、ビタミン、オピオイド、カテコールアミン等の神経伝達物質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、単糖、オリゴ糖、アミノ酸、およびオリゴペプチド、あるいは医薬、毒物、およびサイトカイン類、代謝産物等が例示される。これらの低分子物質は、天然物質であってもよいし、合成物質であってもよい。

[0041] 低分子物質としては、例えば、エストロゲンやトリヨードサイロニン等の

ホルモン、酸化LDL、糖化LDL等のコレステロール、ビタミンAやビタミンD等のビタミン類、DON、NIIV、T2等のカビ毒類、ビスフェノールA、ノニルフェノール、フタル酸ジブチル、ポリ塩素化ビフェニル（PCB）類、ダイオキシン類、p, p'-ジクロロジフェニルトリクロロエタン、トリブチルスズ等の内分泌攪乱物質類等が例示される。

[0042] また、抗原は、アレルギー物質（アレルゲン）であってもよい。アレルギー物質としては、例えば、大腸菌等の菌類、卵、乳、小麦、そば、落花生等の食物アレルギー物質やコナヒョウダニやトヤヒョウダニ等のダニ類由来のアレルギー物質、花粉、カビ類の孢子等が例示される。

[0043] 膜型表面応力センサのシリコン薄膜に固定化する抗体または抗原は、同一種類であってもよいし、異なる種類の抗体または抗原を二種類以上用いてもよい。例えば、免疫測定によりウイルスの抗原を検出することで該ウイルスの感染を診断する場合、該ウイルスの抗原タンパク質の異なる部位で結合する複数種の抗体を混合したものをシリコン薄膜に固定化することができる。また、ウイルスに対する抗体を検出することで該ウイルスの感染を診断する場合、該ウイルス由来の異なる複数の抗原をそれぞれ混合したものをシリコン薄膜に固定化することができる。

[0044] 抗体または抗原は、シリコン薄膜の片面または両面に固定化されている。図2には、(a) (b) 光学式カンチレバー、(c) (d) ピエゾ抵抗型カンチレバー、(e) (f) 本発明のピエゾ膜型表面応力センサの場合について、片面および両面の被膜について模式的に示している。図2 (e) (f) に示すように、本発明の膜型表面応力センサにおいては、片面被覆と両面被覆のいずれにおいても、ピエゾ抵抗素子部に応力集中が認められ、図2 (c) (d) のカンチレバー方式のセンサと比較して、両面被覆であっても効率良く検出対象の分子を検出することが可能である。ここで、片面被覆の膜型表面応力センサと両面被覆の膜型表面応力センサの感度を比較すると、片面被覆の方が高感度である（図3）。

[0045] また、従来のカンチレバーを使用したセンサでは、図2 (b) の両面被覆

の光学的カンチレバー、図2(c)(d)の片面および両面被覆のピエゾ抵抗型カンチレバーの構成では、実際にはほとんど検出出力が得られない。さらに、図2(a)の片面被覆の光学式カンチレバーにおいては、検出出力が得られるものの、試料溶液が光を透過しない場合には使用できず、試料溶液が流動している場合には、測定が安定しないため使用しづらい、という問題がある。また、図2(a)では、試料溶液の濃度変化に伴う屈折率変化により、測定結果が影響を受ける可能性が示唆される。

[0046] 本発明では、図4に示したように、膜型表面応力センサが半導体基板上に1つ以上配置されたマルチチャネルのセンサチップを構成することができる。この場合には、それぞれの膜型表面応力センサのシリコン薄膜に固定化する抗体または抗原が、同一種類であってもよいし、膜型表面応力センサごとに異なる種類の抗体または抗原を用いてもよい。あるいはひとつの膜型表面応力センサに異なる種類の抗体または抗原を二種類以上用いてもよい。図4(a)は、本発明の膜型表面応力センサを複数備えたセンサチップの一実施形態であり、センサ部分が二次元配列となっている新しい構成のMSSチップを示している。図4(b)は本発明のセンサの拡大図を示している。そして、図4(c)は、本発明のセンサを測定に用いた場合のフロー法による測定検出のシステム構成を示している。なお、本発明のセンサを用いた測定方法としては、浸漬法を用いてもよく、必ずしも図4(c)の装置構成をとる必要はない。

[0047] シリコン薄膜の片面または両面に抗体または抗原を固定化する方法としては、インクジェットスポッティング法、浸漬法のいずれかであることが好ましい。

[0048] 例えば、インクジェットスポッティング法を用いて、シリコン薄膜の片面のみに抗体または抗原を固定化することができる。インクジェットスポッティング法では、マルチチャネルのセンサチップ上に配置された膜型表面応力センサのシリコン薄膜ごとに異なる種類の抗体または抗原を固定化することが容易である。このため、一枚の半導体基板上に複数種の抗原または抗体と

結合可能な抗体または抗原を備えたマルチチャンネルの膜型表面応力センサを製造することが可能となる。

[0049] 一方、浸漬法によってシリコン薄膜の両面に一種類の抗体または抗原を固定化する場合は、インクジェットスポッティング法と比較して、シリコン薄膜の片面に抗体または抗原を固定化した後、センサチップを反転させる等の操作を必要としないので、図5に示したように製造工程が簡略化される。特に、浸漬法では、複数のチップを同一の溶液に同時に浸漬することが可能であるため、高度な生産設備を必要としない。このため、浸漬法では、1チップ1チャンネルの膜型表面応力センサを大量かつ安価に製造することが可能となる。具体的には、両面被覆の場合には、高度かつ大規模な生産設備を使用せず、単にシリコン薄膜を手動あるいは簡単な装置で抗体または抗原溶液に浸漬するだけで所要の膜型表面応力センサを製造することができる。しかも、後述の実施例においても説明しているが、シリコン薄膜を化学物質の溶液に浸漬した際に観測される出力電圧のシグナルの有無やシグナル変化の挙動をモニタリングし、フィードバックすることによって、製造の各処理工程において処理が成功していることを確かめることが可能である。このため、大規模な感染症が発生した際など、必要とされるセンサの量産体制を迅速に立ち上げることができ、また、動作が保証されたセンサを高い効率で生産できるので、信頼性の高い診断を安価に行うことを可能にするという顕著な効果を奏する。

[0050] センサチップには、抗原または抗体の結合に起因する信号を読み取るための電極等が組み込まれている。そのため、浸漬法によってシリコン薄膜の両面被覆を行う際には、電極等が抗体または抗原溶液等に接触しないよう保護する必要がある。図6および図7に示すような、センサチップの電極等の特定部分が液体状試料に接触しない状態を保ちながら、センサ素子部分のみを抗体溶液および試料溶液等に浸すことができるセンサチップホルダー（H）を用いることも好ましい。

[0051] このようなセンサチップホルダー（H）は、単にセンサチップを固定する

ための構成であってもよいし、センサチップをセンサチップホルダー（H）外部に電氣的に結合する導線を接続できるコネクタを備えていてもよい。

膜型表面応力センサの製造方法は、少なくとも

＜1＞piezo抵抗素子を含む複数の支持体により支持されたシリコン薄膜の表面を洗浄する工程；

＜2＞洗浄したシリコン薄膜の表面に、自己組織化膜を形成する化合物を接触させる工程；

＜3＞表面に自己組織化膜が形成されたシリコン薄膜に、抗体または抗原溶液を接触させる工程；

＜4＞上記＜1＞～＜3＞の各工程において、膜型表面応力センサに電圧を印加して、出力電圧の変化をモニタリングする工程；

を含むことを特徴としている。上記＜1＞～＜3＞の各工程は、いずれもシリコン薄膜に、以下に詳述する化学物質の溶液を接触させることで行われる。例えば、以下に浸漬法による両面被覆のセンサの製造方法を説明するが、インクジェットスポッティング法による片面被覆のセンサの製造方法も可能である。

[0052] 第1工程として、前記piezo抵抗素子を含む複数の支持体により支持されたシリコン薄膜の表面を洗浄する。シリコン薄膜の表面の洗浄方法としては、溶媒を用いる方法やプラズマ洗浄などの方法が例示される。シリコン薄膜の表面の洗浄に用いられる溶媒としては、例えば、アセトン、2-プロパノール、超純水などが例示される。シリコン薄膜の表面の洗浄は、2種類以上の溶媒を用いて、溶媒を変更しつつ複数回洗浄することが好ましい。

[0053] つづいて、第2工程として、洗浄したシリコン薄膜の表面に、自己組織化膜を形成する化合物を接触させる。シリコン薄膜の表面に自己組織化膜を形成する化合物としては、例えば、Glyphosineや10-CDPAなどのホスホン酸化合物が例示されるが、抗体を変性、失活させることなく保持できるような化合物であって、自己組織化膜を形成することができるものであれば、特に限定されない。

[0054] また、第2工程において、抗体または抗原の固定化のためのシリコン薄膜の表面修飾を行うことが好ましい。シリコン薄膜の表面修飾としては、例えば、シリコン薄膜の表面に被覆した自己組織化膜に含まれるカルボキシル基の活性エステルへの変換等が例示される。例えばN, N'-ジメチルカルボジイミド (D I C)、1-エチル-3-(3ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・ヒドロクロライド (E D C) 等のカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシスクシンイミド (N H S)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド等のスクシンイミドで処理することによって行うことができる。前記カルボジイミドの存在下での前記スクシンイミドの処理は、具体的には、前記カルボジイミド及び前記スクシンイミドをそれぞれN, N'-ジメチルホルムアミド (D M F) などの溶媒に溶解させた混合溶液に1～数時間程度浸漬することによって行うことができる。

[0055] 第3工程として、シリコン薄膜の表面に抗体または抗原を接触させる。シリコン薄膜の表面に抗体または抗原を接触させる工程は、抗体または抗原をM E Sバッファーや炭酸バッファー等の緩衝液に溶解し、適当な濃度に希釈したものを、上記表面修飾工程を経たシリコン薄膜に添加し、36℃で1時間もしくは4℃で1晩静置し、シリコン薄膜と抗体または抗原を接触させる。つづいて、リン酸緩衝液 (P B S) やトリス緩衝液 (T B S) などの洗浄液で、第3工程における余分な成分 (例えば、未結合の抗体または抗原等) を洗浄する。なお、洗浄液には、ブロッキング工程では、スキムミルクや牛血清アルブミン (B S A) などを含有させてもよい。

[0056] 第4工程として、上記第1～第3工程において、膜型表面応力センサに電圧を印加して、出力電圧の変化をモニタリングする。シリコン薄膜を上記の化学物質の溶液に接触させた際に観測される出力電圧のシグナルの有無やシグナル変化の挙動をモニタリングし、フィードバックすることによって、製造の各工程において作業が成功していることを確かめることが可能である。このため、評価基準を満たさないセンサは、その時点で生産ラインから取り除くシステムを構築することができる。

[0057] これまで用いられてきたイムノセンサの性能評価は、抗原または抗体処理を行うしかなく、性能評価に用いたイムノセンサは利用できなくなっていた。このため、製造したイムノセンサの全数検査は不可能であった。しかしながら、本発明において、各工程で処理が成功していることを確認しながらブロッキング工程まで終了したセンサは、全製造工程が確実に成功していることが保証されており、製造したセンサの全数検査と同等の効果を得ることができる。

[0058] したがって、医療や診断分野において高品質で、極めて信頼性の高い検査用キット等を提供することが可能となる。

[0059] また、本発明によれば、イムノセンサの製造工程において特定の不良品を見つけだすことが可能となるため、抜き取り検査を行い、不良品を見つけると同一ロットのイムノセンサをすべて廃棄していた従来の品質管理手法に比べ、製造コストを低減させることにもつながる。

[0060] 本発明の膜型表面応力センサを用いた免疫測定方法は、少なくとも以下の工程

＜1＞抗体または抗原が固定化された膜型表面応力センサのシリコン薄膜に、試料溶液を接触させる工程；

＜2＞前記膜型表面応力センサに電圧を印加し、電気シグナルを測定する工程；

を含むことを特徴としている。

[0061] 第1工程として、前記抗体または抗原が固定化された膜型表面応力センサのシリコン薄膜に、例えば、ヒトやサル、マウス、ラット、ヒツジ、ウマ等の生体から公知の方法で試料溶液（例えば、血液）を採取し、必要に応じて前処理を行って希釈調製した試料溶液を接触させることで、膜型表面応力センサの表面に固定された抗体または抗原と、試料溶液中の抗原または抗体とを結合させる。もちろん、試料溶液の由来は、上記生体由来である天然試料に限定されるものではない。

前記抗体または抗原が固定化された膜型表面応力センサのシリコン薄膜に、

試料溶液を接触させる工程は、当該膜型表面応力センサを試料溶液に浸漬して行うことが好ましい。

[0062] 第2工程として、上記第1工程の前後において膜型表面応力センサに電圧を印加し、電気シグナルを測定する。シリコン薄膜を上記の試料溶液に接触させた際に観測される出力電圧のシグナルの有無やシグナル変化の挙動を測定することによって、抗原抗体反応を検出することが可能となる。具体的には、シリコン薄膜は、抗原－抗体結合による表面応力を受けて撓み等の変形が生じる。シリコン薄膜を支持するそれぞれのピエゾ抵抗素子には、シリコン薄膜の変形量に応じた応力が発生し、この応力に比例してピエゾ抵抗素子の抵抗値が変化する。本発明の免疫測定法では、例えば、4つのピエゾ抵抗素子によって構成されるホイートストンブリッジに電圧を印加することで、上記の抵抗値の変化によって、応力に比例した出力電圧が得られ、試料溶液中の抗原または抗体の有無および抗原または抗体量（濃度）を定量することが可能となる。

[0063] したがって、本発明は、このような測定原理に基づくため、医療や診断分野において、従来の免疫測定法と比較して高感度な免疫測定法を提供することが可能となる。

[0064] 以下、本発明について実施例及び比較例を用いて詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0065] （実施例1）

図1に例示したように、シリコン薄膜がピエゾ抵抗素子を含む支持体によって4点支持され、抗体が結合される前のセンサ構成体のシリコン薄膜をアセトン、2-プロパノール、超純水（Milli Q水；MQ水）の順に溶媒中に浸漬し、最後にプラズマ洗浄を行うことで、シリコン薄膜を洗浄した。

[0066] 次に、洗浄したシリコン薄膜を1 mMのホスホン酸溶液（Glyphosine／MQ水）に浸漬し、室温で60分間静置した。ホスホン酸に浸漬したシリコン薄膜をMQ水、エタノールを用いて洗浄し、乾燥後にソケットから外し、1

40℃、1時間アニーリングすることによって、シリコン薄膜の表面をホスホン酸で修飾した。

[0067] その後、5 mMのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) と5 mMの1-エチル3-(3ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロライド (EDC) /N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液の混合溶液にホスホン酸修飾したシリコン薄膜を浸漬し、室温で60分間静置した。これをDMF、MESバッファの順に溶媒を用いて洗浄した。

[0068] EDC/NHS溶液 (DMF) 処理したシリコン薄膜をセンサチップホルダーに接続し、96穴プレートの各ウェルに分注した抗AFP (α -フェトпротеイン) 抗体溶液 (MESバッファ、pH 5.5) に、センサチップホルダーに接続したシリコン薄膜を浸漬し、4℃で1晩静置して抗AFP抗体と結合させた。抗AFP抗体を結合させたシリコン薄膜を、界面活性剤としてTriton X-100を含む洗浄バッファで洗浄し、37℃で60分間静置してマスキングした。これをマスキングバッファで洗浄することによって、センサチップ上に抗AFP抗体を固定化することができた。また、コントロールとして、抗AFP抗体溶液 (MESバッファ、pH 5.5) の代わりに、抗AFP抗体を含まないMESバッファに浸漬したシリコン薄膜を用いた。

[0069] このようにして得られた膜型表面応力センサ (抗体結合センサ) とコントロールのセンサを、センサチップホルダーに接続し、96穴プレートの各ウェルに分注した2000 ng/mL (約28.5 μ M) のAFP溶液中にセンサを浸漬した。

[0070] 結果を図8に示す。図8では、抗体結合センサをAFP溶液に浸漬することで、出力電圧が降下した。一方、コントロールのセンサでは、出力電圧に変化が認められなかった。計測されたAFP検出のシグナルの出力電圧は、単位バイアス電圧あたりの出力差が3 mVであった。この結果を、非特許文献1に記載のピエゾ抵抗カンチレバーアレイセンサでPSA (前立腺特定の抗原) を検出した際に計測されたシグナルの出力電圧と、ホイットストンブ

リッジに印加されたバイアス電圧に注意して、単位バイアス電圧あたりで比較した。その結果、非特許文献1に記載のpiezo抵抗カンチレバーアレイセンサのシグナルの出力電圧は、単位バイアス電圧あたり $7.5 \mu\text{V}$ であって、本発明の膜型表面応力センサは、非特許文献1に記載のpiezo抵抗カンチレバーアレイセンサと比較して、感度が約40倍に達することが認められた。また、検出可能な低濃度の抗原濃度を比較すると、非特許文献1に記載のpiezo抵抗カンチレバーアレイセンサでは、 0.3 nM であるのに対し、本発明の膜型表面応力センサでは、理論上 7.5 pM の抗原を検出可能であることが明らかになった。

[0071] また、アルカリフォスファターゼ（ALP）で標識した抗マウス IgG 抗体を用いて、シリコン薄膜に固定化したAFPを発光検出したところ、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗AFP抗体を固定化したセンサでは、顕著な発光が確認された。一方、コントロールのセンサでは発光が認められなかった。したがって、本発明の膜型表面応力センサが、AFPを特異的に結合していることを確認できた。

[0072] （実施例2）

膜型表面応力センサの製造工程のシリコン薄膜の表面処理工程で、ホスホン酸溶液処理中のシリコン薄膜のシグナルを測定した。その結果を図9に示した。この図9では、シグナルのパターンA、B、Cが示されている。なお、図9におけるCh1～Ch4（チャンネル4）は、一つのセンサチップに配置した4つのセンサ各々の検出電圧を示している。検出電圧相互の若干の差異は、シリコン薄膜製造時のロット差や固定化した抗体量の差等によるものと考えられる。

[0073] シグナルのパターンについて説明すると、まず、シリコン薄膜をアセトン、2-プロパノール、超純水（MilliQ水；MQ水）の順に溶媒中に浸漬し、最後にプラズマ洗浄を行うことで、シリコン薄膜を洗浄した。このプラズマ洗浄後のセンサをMQ水に浸漬した際のシグナルが、Aのパターンである。続いて、このシリコン薄膜をMQ水からMQ水に移動した際のシグナル

が、Bのパターンである。そして、シリコン薄膜をMQ水からホスホン酸溶液に移動した際のシグナルが、Cのパターンである。

[0074] 図9に示すとおり、Cのシグナルは、ホスホン酸溶液にシリコン薄膜を浸漬した直後に電圧が変化し始め、約1000秒経過後に電圧の変化が落ち着いた。この電圧の変化は、シリコン薄膜表面にホスホン酸が結合している様子を捉えていると考えられる。

[0075] 膜型表面応力センサの製造工程のシリコン薄膜の表面処理工程で、シリコン薄膜のプラズマ洗浄後、ホスホン酸溶液に浸漬するまでの時間を変化させて、ホスホン酸溶液処理中のシリコン薄膜のシグナルを測定した（図10、図11）。まず、シリコン薄膜をアセトン、2-プロパノール、超純水（Milli Q水；MQ水）の順に溶媒中に浸漬し、最後にプラズマ洗浄を行った。プラズマ洗浄後5分以内に、シリコン薄膜をホスホン酸溶液に浸漬したときのシグナルを図10に示す。また、プラズマ洗浄後30分経過後に、シリコン薄膜をホスホン酸溶液に浸漬したときのシグナルを図11に示す。

[0076] プラズマ洗浄後5分以内に、シリコン薄膜をホスホン酸溶液に浸漬したときのシグナルは、出力電圧が約700 μ Vであったのに対し、プラズマ洗浄後30分経過後に、シリコン薄膜をホスホン酸溶液に浸漬したときのシグナルは、出力電圧が約200 μ Vと大幅に低下した。このことから、プラズマ洗浄後、短時間のうちにホスホン酸溶液処理を行うことによって、表面活性が高い状態のシリコン薄膜を使用した処理を行うことができるが、洗浄後の放置時間が長いと、シリコン薄膜の表面活性が低下することが示唆された。

[0077] したがって、シリコン薄膜表面のホスホン酸修飾レベルと電圧変化の間に相関性を見出すことができると考えられる。

[0078] （実施例4）

膜型表面応力センサのシリコン薄膜表面に抗体を結合する工程で、抗AFP抗体溶液処理中のシグナルを測定した（図12）。まず、EDC/NHS溶液（DMF）処理したシリコン薄膜をMESバッファーに浸漬し、続いて、このシリコン薄膜をMESバッファーからMESバッファーに移動した。

そして、シリコン薄膜をME Sバッファから抗A F P抗体溶液に移動し、この間のシグナルを計測し続けた。

[0079] 図1 2に示すとおり、ME SバッファからME Sバッファへの移動に際しては、シグナル変動は顕著ではなく、シリコン薄膜をME Sバッファから抗A F P抗体溶液に移動したときのシグナル変化は顕著であった。このため、膜型表面応力センサの製造の各工程でシグナル変化を確認することによって、各工程が成功していることを確認しながらセンサを製造することができると考えられる。

[0080] (実施例5)

EDC/N H S溶液(DMF)処理したシリコン薄膜をセンサチップホルダーに接続し、9 6穴プレートの各ウェルに分注した1 0 0 μ g/mLの抗A F P抗体溶液(ME Sバッファ、p H 5. 5)にシリコン薄膜を浸漬した。また、コントロールとして、抗A F P抗体を含まないME Sバッファにシリコン薄膜を浸漬した。

[0081] 図1 3の左側のグラフに示すように、コントロールのME Sバッファにセンサチップを浸漬したところ、ME Sバッファに浸漬したシリコン薄膜のシグナル(A b (−)シグナル)は、溶液への浸漬の影響で、ベースラインが落ちこみ、その状態を維持した。一方、抗A F P抗体溶液にセンサチップを浸漬したシリコン薄膜のシグナル(A b (+)シグナル)はコントロールに比べて、緩やかかつ大幅に降下した後、規定レベルに落ち着いた。この変動が規定レベルに落ち着くまでの挙動をモニタリングすることで、センサチップの表面に抗体が結合したことを保証することができると考えられる。

[0082] (実施例6)

EDC/N H S溶液(DMF)処理したシリコン薄膜をセンサチップホルダーに接続し、9 6穴プレートの各ウェルに分注した抗A F P抗体溶液(ME Sバッファ、p H 5. 5)に、シリコン薄膜を浸漬し、4℃に1晩置いて抗体を固定化した。翌日、このシリコン薄膜を、界面活性剤(T r i t o n X − 1 0 0)を含む洗浄バッファを用いて洗浄し、3 7℃に6 0分間お

いてマスキングした。これをマスキングバッファーで洗浄することによって、シリコン薄膜上に抗AFP抗体を固定化することができた。また、コントロールとして、抗AFP抗体溶液（MESバッファー、pH 5.5）の代わりに、抗AFP抗体を含まないMESバッファーに浸漬したシリコン薄膜を用いた。

[0083] また、抗AFP抗体溶液に浸漬したチップとコントロールのチップをブロッキング処理した後、96穴プレートの各ウェルに分注したアルカリフォスファターゼ（ALP）で標識した抗マウスIgG抗体を $0.1\mu\text{g/mL}$ 含有する溶液に、前述のシリコン薄膜を37度で30分浸漬した。その後、前記シリコン薄膜を、界面活性剤（Triton X-100）を含む洗浄液で洗浄し、ALPの発光基質溶液で、37℃で5分間反応させた後、化学発光シグナルを計測した。

[0084] 図13の右側のヒストグラムに示すように、コントロールのシリコン薄膜（Ab（-））においては、ALP標識抗マウスIgG抗体による発光が検出されなかったが、抗AFP抗体溶液に浸漬したシリコン薄膜（Ab（+））においては、ALP標識体による発光が強く検出された。したがって、抗AFP抗体溶液に浸漬したシリコン薄膜（Ab（+））は、その表面に抗AFP抗体が固定化しており、AFPを検出可能であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0085] 従来のイムノセンサよりもはるかに高感度の測定が可能であって、しかも従来よりバイオセンサ一般の大きな課題であった品質保証を高度に、かつ安定して確実なものとし、かつセンサ製造も簡便な新しい技術的手段を実現できる。

先行技術文献

特許文献

[0086] 特許文献1：日本国公開特許公報第2003-185618号

特許文献2：国際公開2011/1487741号のパフレット

非特許文献

- [0087] 非特許文献1 : Wee, K.W. ; Kang, G.Y. ; Park, J. ; Kang, J.Y. ; Yoon, D.S. ; Park, J.H. ; Kim, T. S. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 1932.
- 非特許文献2 : Yoshikawa, G. ; Akiyama, T. : Gautsch, S. ; Vettiger, P. ; Rohrer, H. Nano Letters 2011, 11, 1044-1048.
- 非特許文献3 : Yoshikawa, G. ; Akiyama, T. ; Loizeau, F. ; Shiba, K. ; Gautsch, S. ; Nakayama, T. ; Vettiger, P. ; de Rooij N. F. ; Aono, M. Sensors 2012, 12, 15873-15887.

請求の範囲

- [請求項1] 抗体または抗原が固定化されたシリコン薄膜が、ピエゾ抵抗素子を含む支持体によって複数点支持されており、前記抗体または抗原が試料溶液中の抗原または抗体と結合することによって引き起こされるシリコン薄膜の変形をピエゾ抵抗素子によって検出することにより、抗原と抗体との結合を検出またはその結合量を定量可能とすることを特徴とする膜型表面応力センサ。
- [請求項2] 前記抗体または抗原が、前記シリコン薄膜の片面または両面に固定化されていることを特徴とする請求項1に記載の膜型表面応力センサ。
- [請求項3] 前記抗体または抗原が、インクジェットスポッティング法または浸漬法のいずれかで固定されていることを特徴とする請求項1または2に記載の膜型表面応力センサ。
- [請求項4] 請求項1から3のいずれか一項に記載の膜型表面応力センサを半導体基板上に1つ以上配置されていることを特徴とするセンサチップ。
- [請求項5] 抗体が抗原と結合することによって引き起こされるシリコン薄膜の変形をピエゾ抵抗素子によって検出することにより、抗原と抗体との結合を検出またはその結合量を定量可能とする膜型表面応力センサの製造方法であって、少なくとも
- <1>ピエゾ抵抗素子を含む複数の支持体により支持されたシリコン薄膜の表面を洗浄する工程；
 - <2>洗浄したシリコン薄膜に、自己組織化膜を形成する化合物を接触させる工程；
 - <3>表面に自己組織化膜が形成されたシリコン薄膜の表面に、抗体または抗原溶液を接触させる工程；
 - <4>上記<1>～<3>の各工程において、膜型表面応力センサに電圧を印加して、出力電圧の変化をモニタリングする工程；
- を含むことを特徴とする膜型表面応力センサの製造方法。

[請求項6] 請求項1から3のいずれか一項に記載された膜型表面応力センサを用いた免疫測定方法であって、少なくとも以下の工程

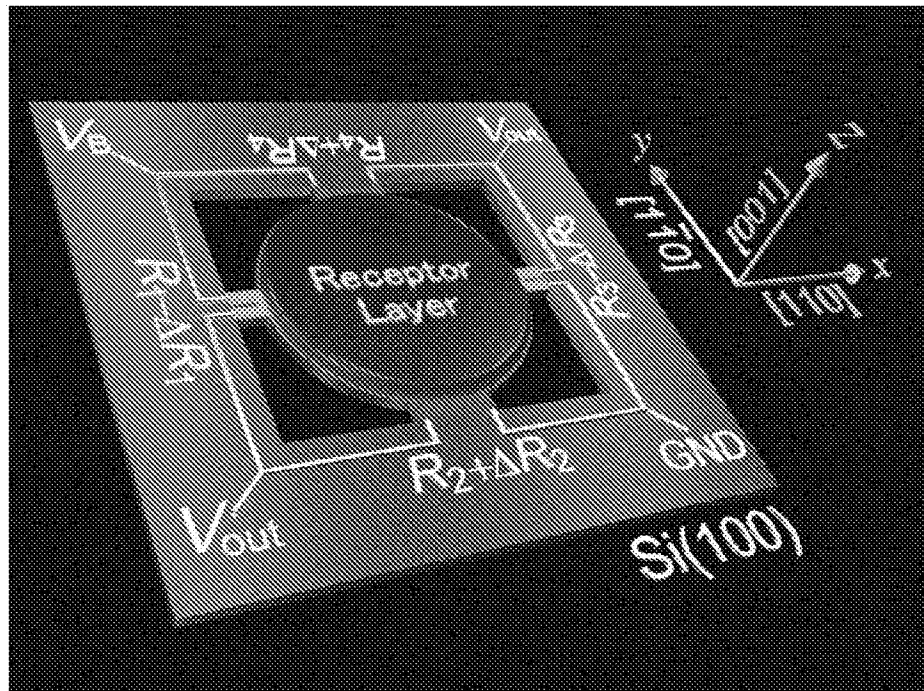
＜1＞抗体または抗原が固定化された膜型表面応力センサのシリコン薄膜に、試料溶液を接触させる工程；

＜2＞前記膜型表面応力センサに電圧を印加し、電気シグナルを測定する工程；

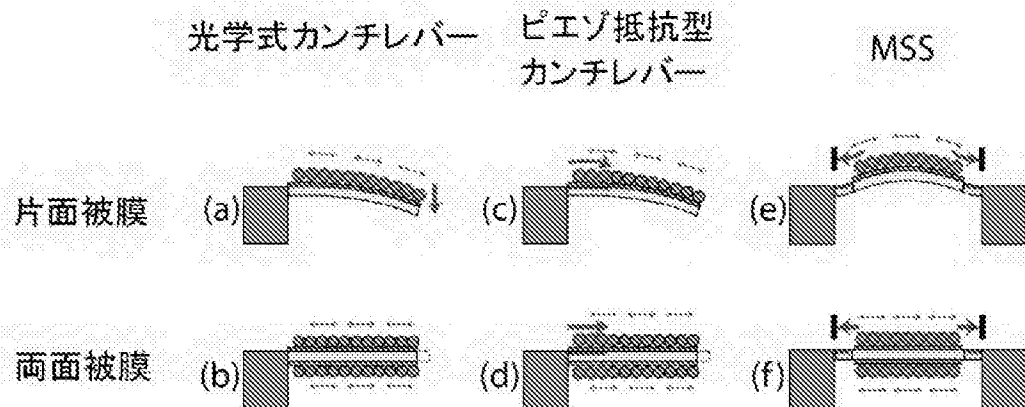
を含むことを特徴とする免疫測定方法。

[請求項7] 請求項6に記載の膜型表面応力センサを用いた免疫測定方法であって、前記抗体または抗原が固定化された膜型表面応力センサのシリコン薄膜に、試料溶液を接触させる工程を、当該膜型表面応力センサを試料溶液に浸漬して行うことを特徴とする免疫測定方法。

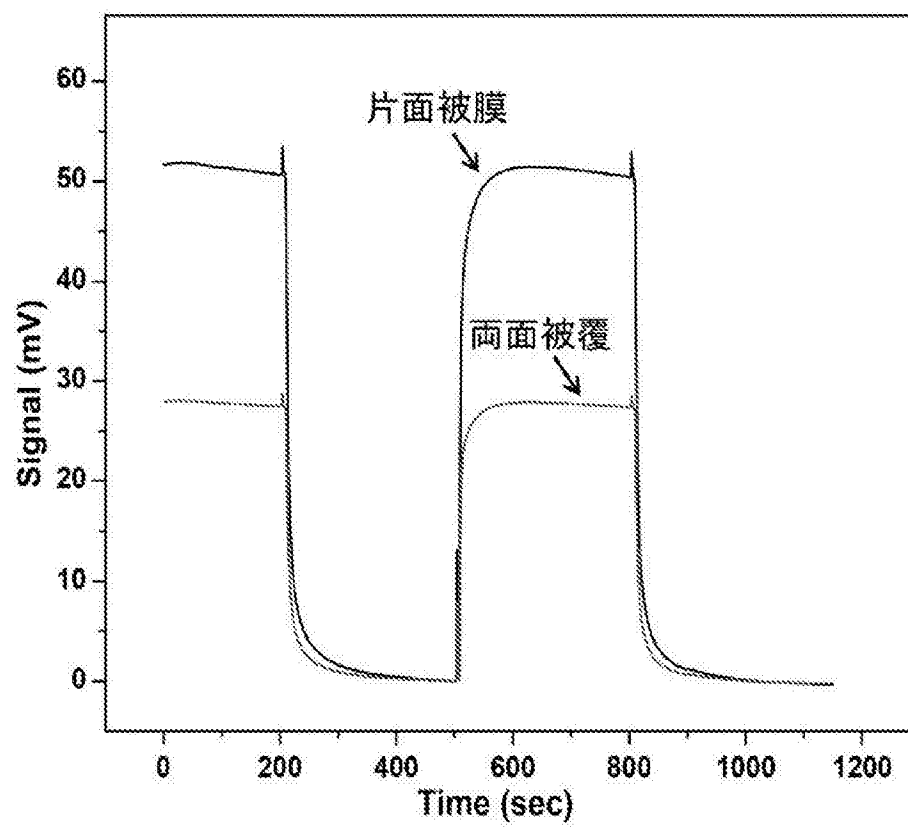
[図1]



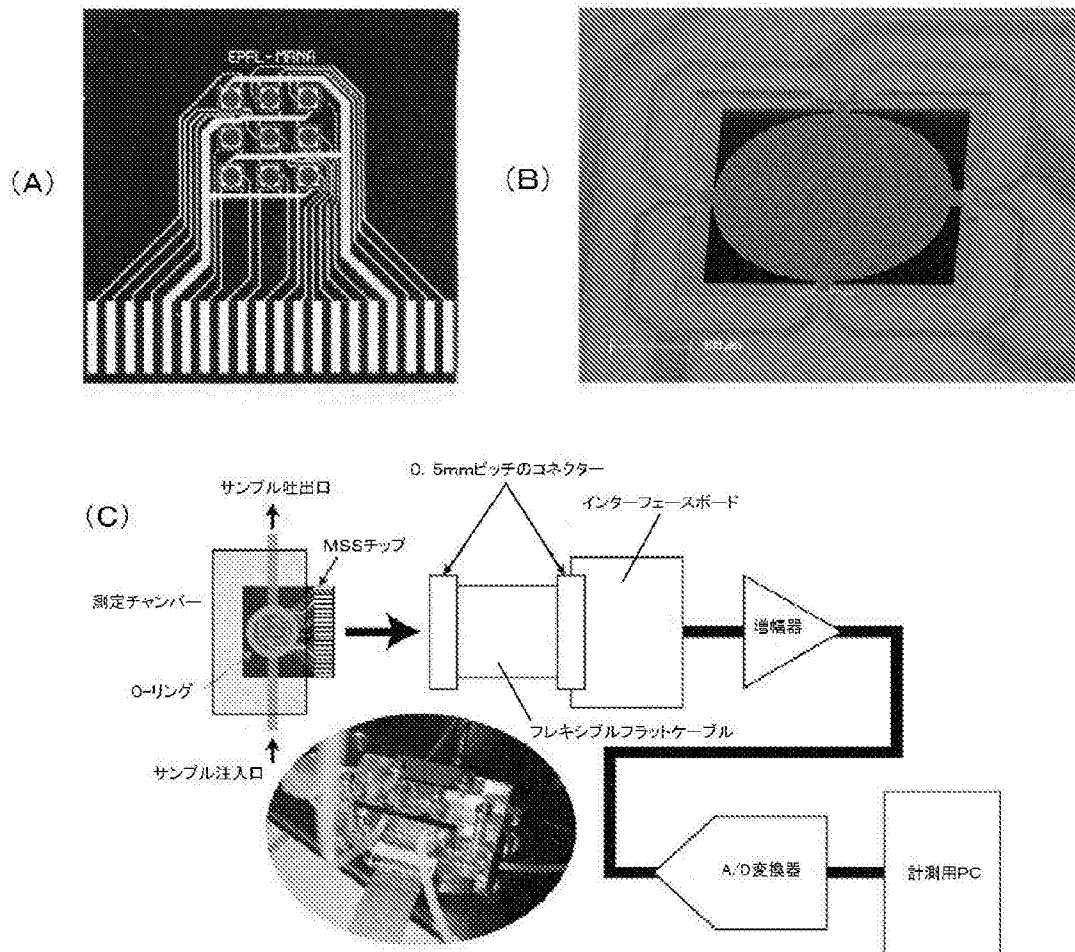
[図2]



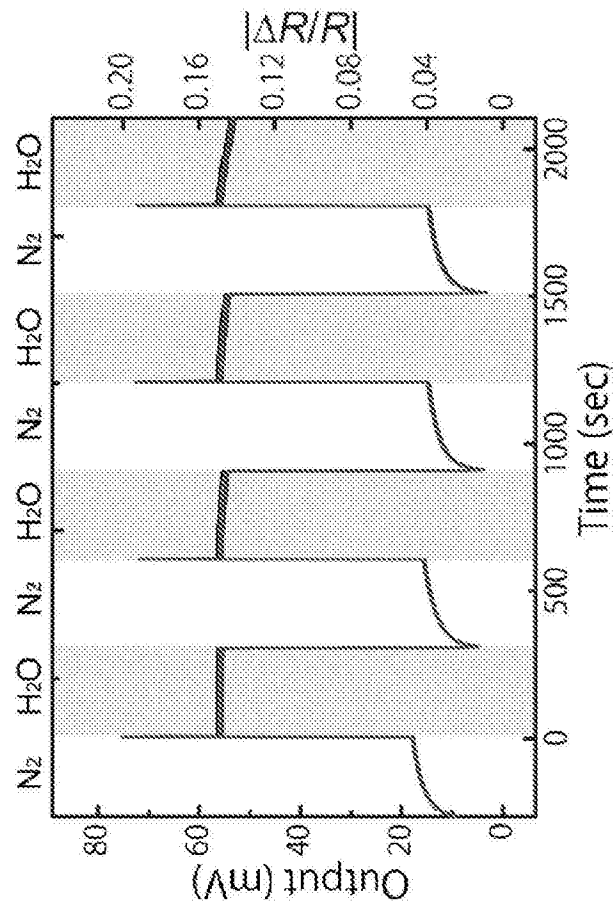
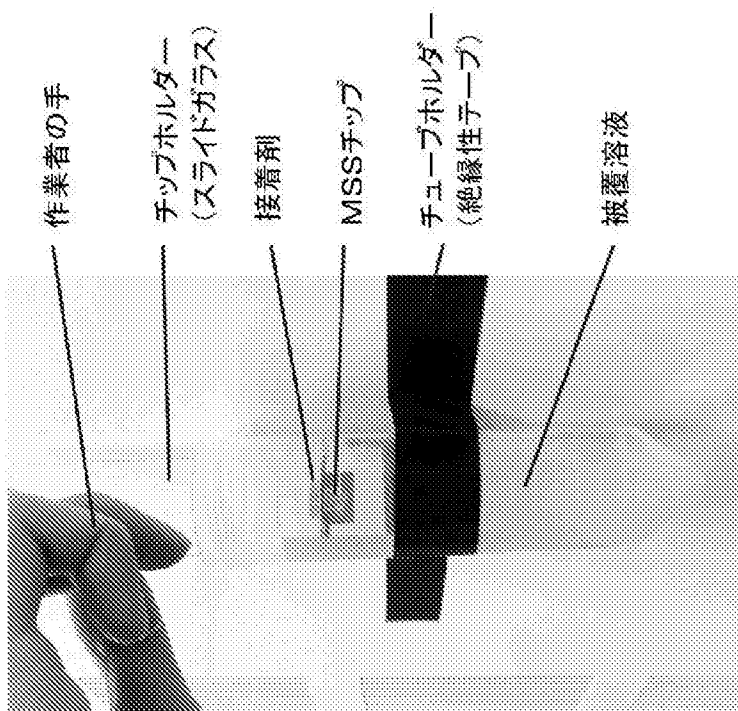
[図3]



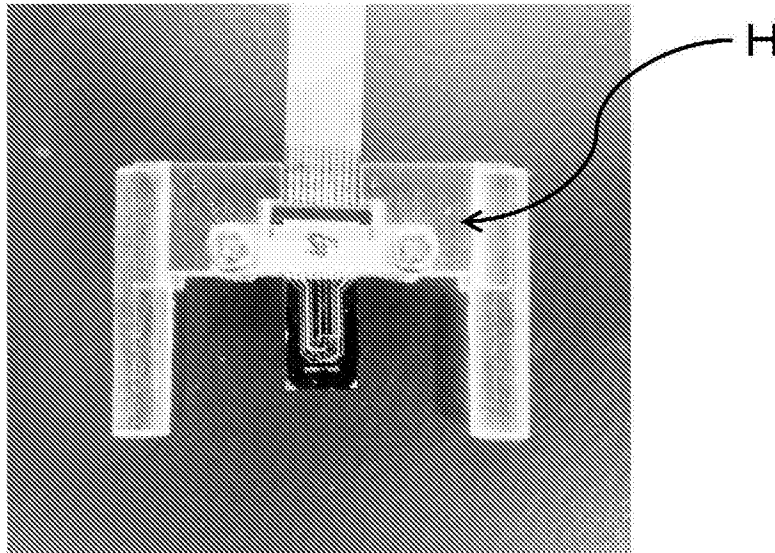
[図4]



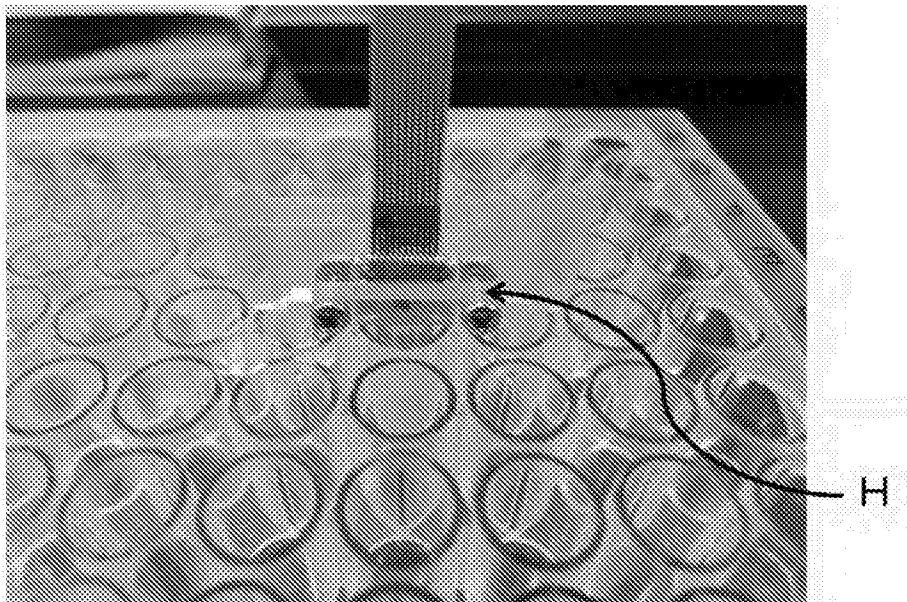
[図5]



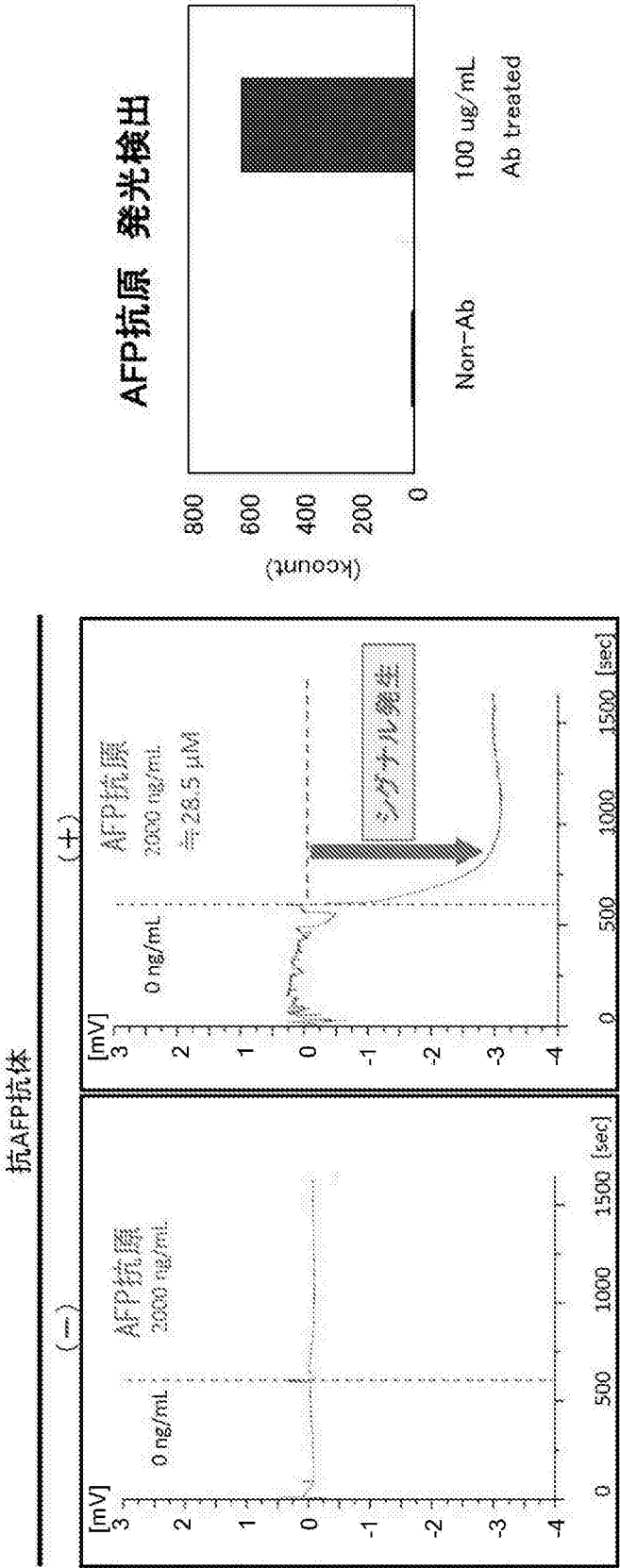
[図6]



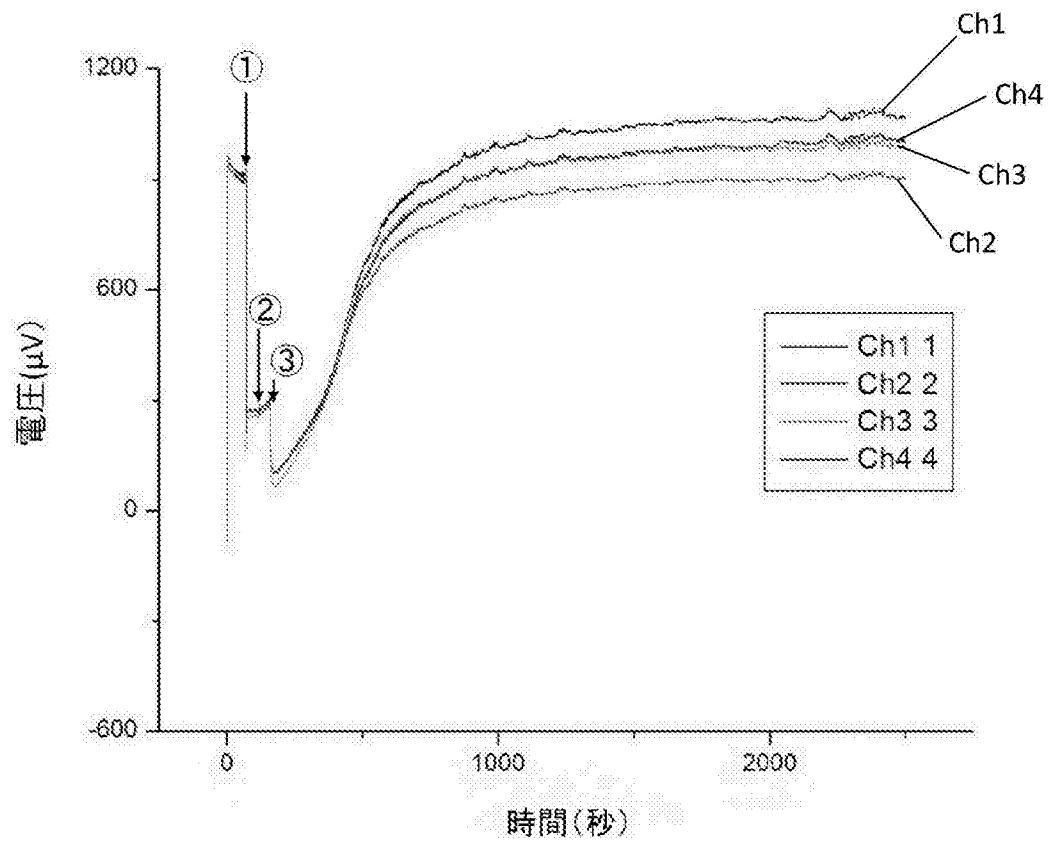
[図7]



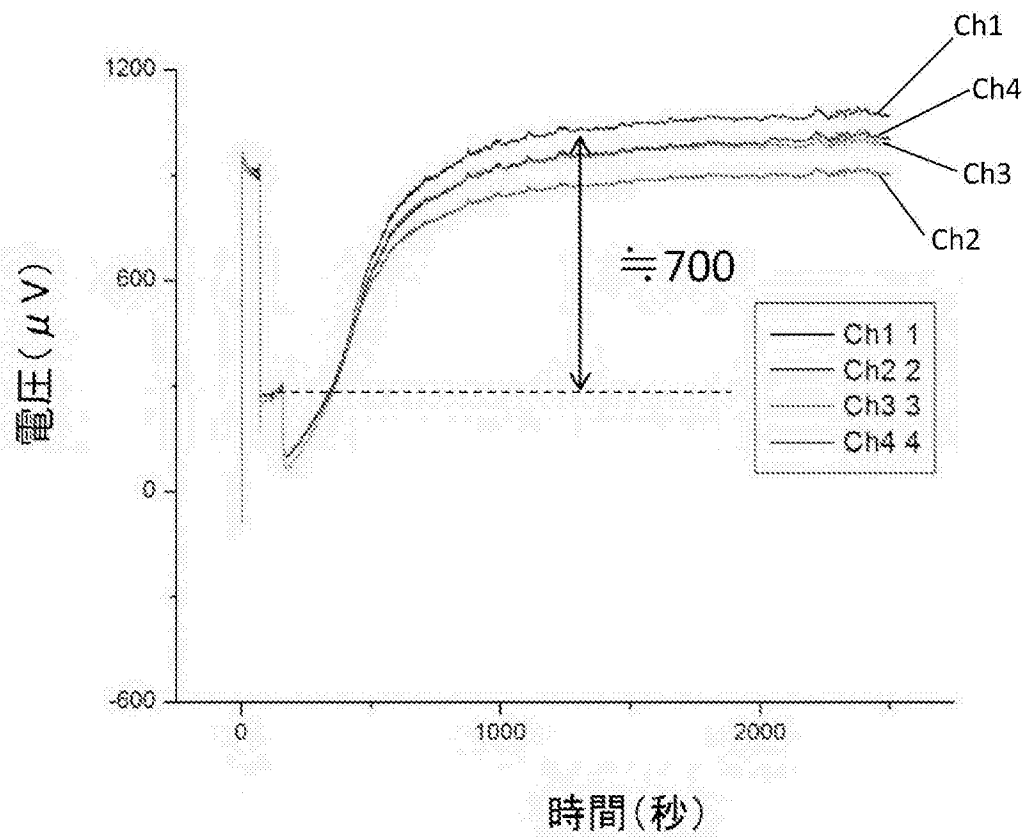
[図8]



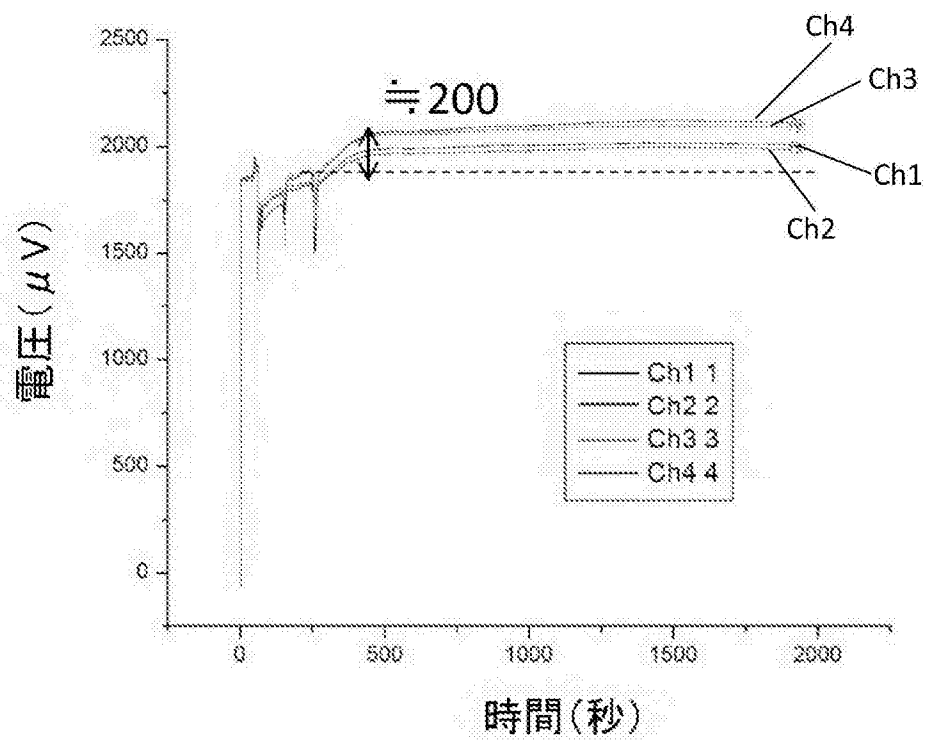
[図9]



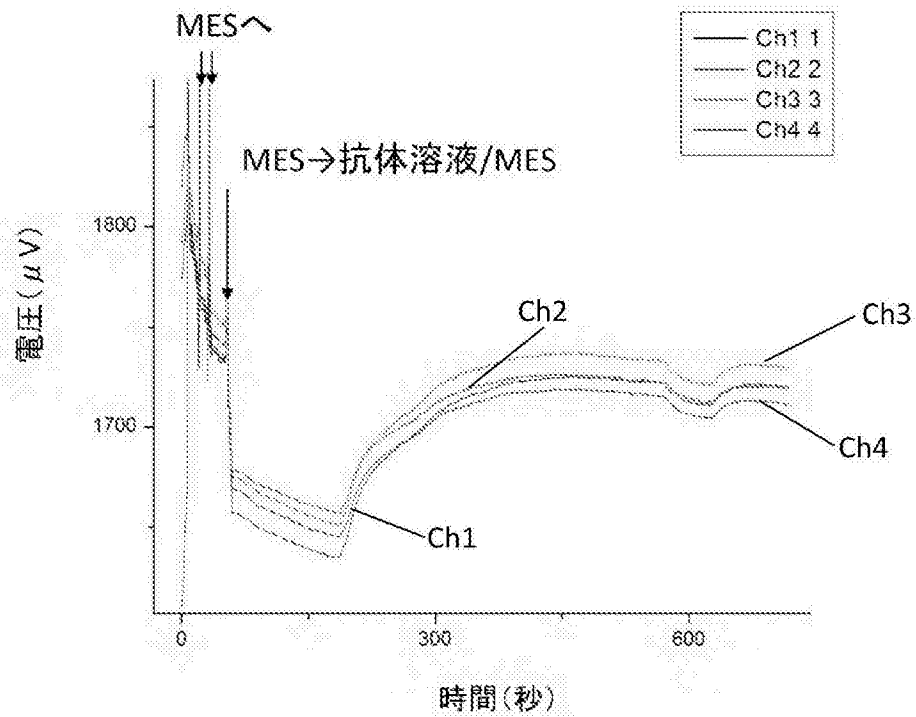
[図10]



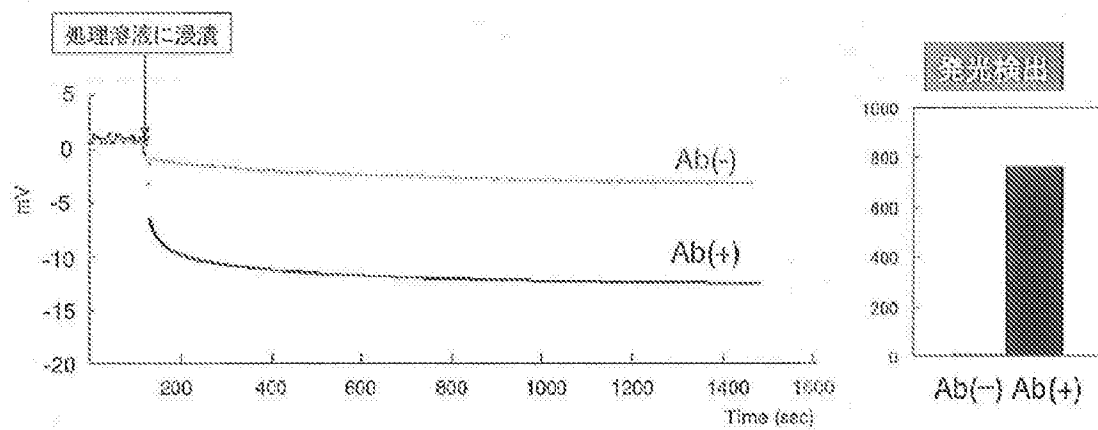
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Genki YOSHIKAWA, "Cho Kogata Cho Kokando Makugata Hyomen Oryoku Sensor (MSS) - Iryo Kankyo Security eno Oyo ni Kitai", Expected Materials for the Future, 10 April 2012 (10.04.2012), vol.12, no.4, pages 53 to 55	1, 2, 4, 6, 7/3, 5
Y	JP 2004-510130 A (Zeptosens AG.), 02 April 2004 (02.04.2004), claim 21 & US 2003/0148542 A1 & EP 1287360 A2 & WO 2001/092870 A2	3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 August, 2014 (05.08.14)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2014 (12.08.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064997

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-538126 A (Koninklijke Philips Electronics N.V.), 05 November 2009 (05.11.2009), paragraph [0093] & US 2009/0264308 A1 & EP 2029280 A1 & WO 2007/135651 A1	3
Y	JP 2011-247859 A (Universal Bio Research Co., Ltd.), 08 December 2011 (08.12.2011), paragraphs [0016] to [0018] (Family: none)	5
Y	Handotai Device no Kosho Kaiseki, URL: http://japan.renesas.com/media/products/common_info/reliability/reliability_handbook/pdf/rjj2710001_05.pdf , 12 June 2006 (12.06.2006), [retrieved on 29 July 2014 (29.07.2014)]	5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/543 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	吉川元起, 超小型・超高感度膜型表面応力センサー (M S S) —医療・環境・セキュリティーへの応用に期待, 未来材料, 2012.04.10, Vol.12/No.4, pp.53-55	1, 2, 4, 6, 7/ 3, 5
Y	JP 2004-510130 A (ツェプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト) 2004.04.02, 【請求項 2 1】 & US 2003/0148542 A1 & EP 1287360 A2 & WO 2001/092870 A2	3

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 5 . 0 8 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 8 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉田 将志

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

2 J

4 6 3 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-538126 A (コーニンクレッカ フィリップス エレクトロ ニクス エヌ ヴィ) 2009. 11. 05, 【0093】 & US 2009/0264308 A1 & EP 2029280 A1 & WO 2007/135651 A1	3
Y	JP 2011-247859 A (ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社) 2011. 12. 08, 【0016】 - 【0018】 (ファミリーなし)	5
Y	半導体デバイスの故障解析, URL: http://japan.renesas.com/media/products/common_info/reliability/reliability_handbook/pdf/rjj2710001_05.pdf , 2006. 06. 12, [retrieved on 2014-07-29]	5