

(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 1 月 16 日(16.01.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/010706 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) G01N 35/08 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/069053
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 11 日(11.07.2013)
- (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 2012-157625 2012 年 7 月 13 日(13.07.2012) JP
- (71) 出願人: 株式会社日立ハイテクノロジーズ(HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 大田 雄一郎(OTA Yuichiro); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 庄司

智広(SHOJI Tomohiro); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 藤岡 満(FUJIOKA Michiru); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 芳賀 孝信(HAGA Takanobu); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 磯野 道造(ISONO Michizo); 〒1020093 東京都千代田区平河町 2 丁目 7 番 4 号 砂防会館別館内 磯野国際特許商標事務所気付 Tokyo (JP).

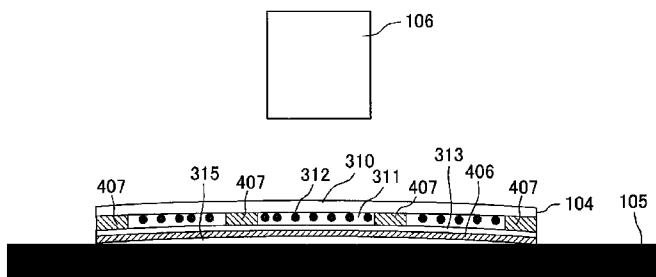
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

[続葉有]

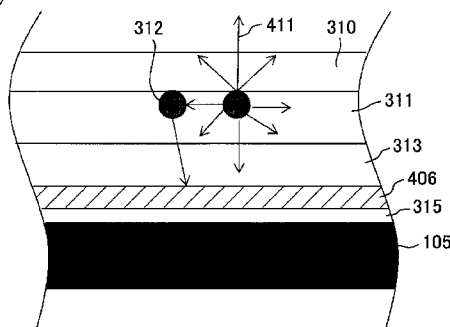
(54) Title: FLOW CELL FOR BIOMATERIAL ANALYSIS AND BIOMATERIAL ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称: 生体物質分析用フローセルと生体物質分析装置

(a)



(b)



(57) Abstract: In biomaterial analysis, the present invention prevents erroneous detection of particles emitting fluorescence, and enables high sensitivity and high precision in optical detection. The present invention provides a flow cell (104) for biomaterial analysis, provided with: an upper substrate (310) that is light-transmissive; a lower substrate (313) that is anti-reflective; and an inner layer section that is interposed between the upper substrate (310) and the lower substrate (313) and has a flow path (311) in which particles (312) emitting fluorescence are installed. The present invention also provides a biomaterial analysis device provided with the flow cell (104) for biomaterial analysis, an irradiation unit for irradiating with an excitation light, and an optical detection unit (106) for detecting the fluorescence emitted by the particles (312).

(57) 要約: 生体物質分析において、蛍光を発する粒子の誤検出を防止し、光学的な検出を高感度かつ高精度に行う。光透過性を有する上部基板(310)と、反射防止性を有する下部基板(313)と、前記上部基板(310)と前記下部基板(313)とに挟まれ、蛍光を発する粒子(312)が設置された流路(311)を有する内層部とを備える生体物質分析用フローセル(104)である。また、前記生体物質分析用フローセル(104)と、励起光を照射する照射部と、前記粒子(312)が発する蛍光を検出する光学検出部(106)とを備える生体物質分析装置である。



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, 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： 生体物質分析用フローセルと生体物質分析装置

技術分野

[0001] 本発明は、生体物質分析用フローセルおよび生体物質分析装置に関する。

背景技術

[0002] 近年、DNAやRNAの塩基配列を決定する新しい技術が開発されてきている。基板に分析対象となるDNA断片を数多く固定して、これら数多くのDNA断片の塩基配列を平行に決定する方法が提案されている。

[0003] 非特許文献1では、DNA断片を担持する担体として微粒子を用い、微粒子上でPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を行う。その後、微粒子のサイズに穴径を合わせた数多くの穴を設けたプレートに、PCR増幅されたDNA断片を担持した微粒子を入れて、パイロシーケンス方式で塩基配列を読み出している。

[0004] また、非特許文献2では、DNA断片を担持する担体として微粒子を用い、微粒子上でPCRを行う。その後、微粒子をガラス基板上にばら撒いて固定し、ガラス基板上で酵素反応（ライゲーション）を行い、蛍光色素付き基質を取り込ませて蛍光の検出を行うことにより各断片の配列情報を得ている。非特許文献2の方式では、ガラス基板はフローセルという形態で使用される。

[0005] ここで、フローセルとは、1つまたは複数のチャンネルにおいて流路が存在し、スペーサをガラス基板とガラス基板で挟み込む形で接着または溶着されたものである。DNA断片を担持する微粒子は、フローセルの流路内壁に付着されている。前記微粒子が数万から数十万個含まれる範囲を励起光で一括照射し、それら数万から数十万個の微粒子から発せられる蛍光（正確には、微粒子に固定されたDNA断片に取り込まれた蛍光色素から発せられる蛍光）を1台のカメラで同時に検出する。このカメラを含む検出光学系はそれぞれの微粒子の位置を特定できる光学的な分解能と光の強度を計る機能を有して

おり、どの位置の微粒子がどのくらいの強度で光っているかを検出する。

[0006] 以上のように、基板上に、核酸断片試料を数多く固定させることにより、
パラレルに数多くの断片の配列情報を決定する方法が開発され、実用化され
つつある。

特許文献1、特許文献2および特許文献3には、DNA断片を各種担体に
固定したミクロな流体デバイスを用いて、DNA断片の塩基配列を分析する
方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2005-224110号公報

特許文献2：特開2005-130795号公報

特許文献3：特開2004-333255号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Marcel Margulies et al., Nature, 2005, vol. 437, P376-380

非特許文献2：Jay Shendure et al., Science, 2005, vol. 309, P1728-1732

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] フローセルを用いたDNA塩基配列の分析においては、フローセル上に設
置された個々に異なるDNA断片を結合させた粒子から発せられる蛍光を精
密に区別して、それらの位置と色および光強度とを同時に検知することが求
められる。この粒子の数は、数万以上に及ぶこともあり、これらの粒子から
発せられる蛍光の検出には、極めて高い測定精度が求められている。しかし
ながら、フローセルの構造上、近接して存在している隣り合う粒子から発せ
られる光が相互に干渉するため、DNA塩基配列の分析精度があるレベル以
上に上がらないという問題が存在することが判明してきた。

[0010] 本発明はかかる状況に鑑みてなされたものであり、生体物質分析において
、蛍光を発する粒子の誤検出を防止し、光学的な検出を高感度かつ高精度に

行うことを課題としている。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、フローセル上に設置された数万オーダーの多数の粒子から発せられる蛍光の分析精度があるレベル以上に上がらない原因を鋭意検討した結果、分析対象の粒子に近接して存在する粒子から発せられる光が、フローセルを構成する下部基板と外部の空気層との界面において反射し、分析対象の粒子から発せられる光と混じり合うために分析誤差が生じているとする原因を解明するに至り、本発明に到達したものである。

[0012] 即ち、本発明の生体物質分析用フローセルは、光透過性を有する上部基板と、反射防止性を有する下部基板と、前記上部基板と前記下部基板とに挟まれ、蛍光を発する粒子が設置された流路を有する内層部とを備えることを特徴とするものである。また、本発明の生体物質分析用フローセルは、光透過性を有する上部基板と、光透過性を有する下部基板と、前記上部基板と前記下部基板とに挟まれ、蛍光を発する粒子が設置された流路と反射防止性を有するスペーサ部とを有する内層部とを備えることを特徴とするものである。また、本発明の生体物質分析装置は、前記の生体物質分析用フローセルと、励起光を照射する照射部と、粒子が発する蛍光を検出する光学検出部とを備えることを特徴とするものである。

発明の効果

[0013] 本発明は、生体物質分析において、蛍光を発する粒子の誤検出を防止し、光学的な検出を高感度かつ高精度に行うことが可能である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の実施形態の生体物質分析装置の概要図である。

[図2]本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルを生体物質分析装置に取り付ける状況を示す図である。

[図3]本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルと生体物質分析装置の一部の模式的断面図である。

[図4]図4（a）は、本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルの一部の

模式的断面図である。図 4 (b) は、図 4 (a) の部分拡大図である。

[図5]図 5 (a) は、比較例の生体物質分析用フローセルの一部の模式的断面図である。図 5 (b) は、図 5 (a) の部分拡大図である。

[図6]本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルの構成を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下に、図面を参照しながら本発明の実施形態を詳細に説明する。尚、本発明の実施形態は以下に示す実施形態に限られるわけではない。但し、図 1 ～図 3 に示された内容と後述する図 1 ～図 3 に係る説明は、本発明の実施形態および比較例においても共通するものである。

[0016] 本発明において、生体物質とは、DNA や RNA 等の核酸、蛋白質、ペプチド、抗体、抗原、等の生体内において何らかの機能を発現する化学物質をいう。特に、単位となる化学物質が多数連結した高次構造を有し、個々の単位となる化学物質の配列により生体物質全体としての機能に係る化学物質をいう。本発明においては、生体物質の中でも、核酸が特に適性を有している。

[0017] 本発明の生体物質分析用フローセルおよび生体物質分析装置を用いて種々の生体物質の分析を行うことができる。例えば、DNA 配列 (DNA シーケンス) の決定やハイブリダイゼーションを行うことが可能である。

[0018] 図 1 を用いて、本発明の実施形態の生体物質分析装置の概要を説明する。ここでは、生体物質として核酸を対象として説明する。

[0019] 本発明の実施形態の生体物質分析装置 (核酸分析装置) 101 は、複数の試薬容器等を収容する試薬冷却保管庫 102 と、試薬容器の反応液を送液する送液機構 103 と、DNA 断片を結合している微粒子が設置された流路を有するフローセル 104 と、フローセル 104 内の流路を温調する温調基板 105 と、微粒子に結合した DNA 断片に取り込まれた蛍光物質が発する蛍光を検出する光学検出部 106 とを有する。事前に調整されたフローセル 104 の流路には、送液機構 103 によって核酸分析用の反応液が供給される。反応液によってフローセル 104 内の微粒子上で伸長反応が行われ、DN

A断片に取り込まれた蛍光物質によって蛍光が発せられる。光学検出部106は、発せられた蛍光を検出して、塩基配列の分析が行われる。反応後の余分な反応液や洗浄液等は、廃液タンク107に収容される。

[0020] 本発明の実施形態において、DNA配列の分析方法は特に限定されないが、例えば、段階的ライゲーション法を利用したDNA配列の分析方法 (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)がある。段階的ライゲーション法とは、微粒子上の1本鎖DNAを鋳型に蛍光標識されたプローブを順次結合させ、2塩基ずつ配列を決定していく手法をいう。リガーゼによる酵素反応として、DNA断片のターゲット配列に対応する蛍光部分を含むオリゴヌクレオチドが結合して、伸長反応が引き起こされる。反応完了後、蛍光部分に4色の励起光を照射し、光学検出部で蛍光の検出が行われる。その後、蛍光部分は切断され、さらに伸長反応が行われ、次の配列に対応した蛍光が検出される。これらを繰り返すことにより、4色の蛍光色に対応した塩基配列が次々と決定され、最終的にDNA断片の塩基配列として決定される。この方法により、1サイクルで数十～数百bpの解読を行うことができ、1ランで数十Gbのデータを解析することが可能である。段階的ライゲーション法においては、蛍光標識したオリゴヌクレオチドを繰り返しハイブリダイズすることで並列シーケンシングすることができる。

[0021] 図2は、本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルを生体物質分析装置に取り付ける状況を示す図である。生体物質分析用フローセル（以下、「フローセル」と記載することがある。）104は、平面度の高い温調基板105の上に置かれ、カバー108を押しつけながら取り付けることによって、生体物質分析装置の装着部109に装着される。フローセル104は、複数本を並列に並べることができる。図2においては6本のフローセル104が並列に並べられている。

また、DNA断片と反応液との反応を促進させるために、フローセル104内の流路を温調する温調基板105を有していることが望ましい。

[0022] 図3は、本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルと生体物質分析装

置の一部の模式的断面図である。図2の切断面A-Aにおける断面図として示してある。

励起光を照射する照射部は、ランプ301とミラー303と対物レンズ304から構成されている。ランプ301から発せられた蛍光物質励起のための励起光302は、ミラー303にて反射される。励起光302は、反射した後、対物レンズ304を通り、温調基板105の上に置かれたフローセル104の内層部の流路311に設置された粒子312に、上方から照射される。粒子312の表面に存在する蛍光物質は、励起光302によって励起され、蛍光307を発する。蛍光307は、上方にある対物レンズ304を通り、ミラー303、レンズ305を通過して、粒子312が発する蛍光を検出する光学検出部106を構成するカメラに到達する。

[0023] フローセル104は、光透過性を有する上部基板310と、下部基板313と、上部基板310と下部基板313とに挟まれ、蛍光を発する粒子312が設置された流路311を有する内層部と、を有している。フローセル104は、内層部の流路311の両端に、反応液を投入する流入口314と反応液を排液する流出口316とを備えている。

[0024] 蛍光を発する粒子312は、フローセル104の内層部の流路311内にあり、光学検出部106によって粒子312が発する蛍光を検出することが可能であれば、どの位置に設置されていても構わない。図3においては、蛍光を発する粒子312は、フローセル104の内層部の流路311の上部、即ち上部基板310の下面上に設置されている。

[0025] また、フローセル104と温調基板105との間には隙間、即ち、空気層315が存在している。これは、フローセル104の下面を温調基板105の上面と完全に一致させて製造することは困難だからである。

[0026] 図4(a)は、本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルの一部の模式的断面図であり、図4(b)は、図4(a)の部分拡大図である。いずれの図も、図2の切断面B-Bにおける断面図として示してある。図2においてフローセル104は6本並列に存在しているが、図4(a)では、そのう

ちの3本を代表させて示してある。

[0027] 図4(a)において、図3と同様に、フローセル104は、光透過性を有する上部基板310と下部基板313と上部基板310と下部基板313とに挟まれ、蛍光を発する粒子312が設置された流路311を有する内層部を有している。流路311の両端は、スペーサ部407によって密封されている。フローセル104は、いくらか湾曲しているために、フローセル104と温調基板105との間には隙間、即ち、空気層315が存在している。さらに、本発明の実施形態として、下部基板313の空気層315側の表面には、反射防止性材料の層406が存在している。

[0028] 図5(a)は、比較例の生体物質分析用フローセルの一部の模式的断面図であり、図5(b)は、図5(a)の部分拡大図である。いずれの図も、図2の切断面B-Bにおける断面図として示してある。図2においてフローセル104は6本並列に存在しているが、図5(a)では、そのうちの3本を代表させて示してある。

[0029] 図5(a)において、図4(a)と同様に、フローセル104は、光透過性を有する上部基板310と下部基板313と上部基板310と下部基板313とに挟まれ、蛍光を発する粒子312が設置された流路311を有する内層部を有している。流路311の両端は、スペーサ部407によって密封されている。フローセル104は、いくらか湾曲しているために、フローセル104と温調基板105との間には隙間、即ち、空気層315が存在している。

[0030] 図5(b)を用いて、比較例について説明する。

フローセル104の内層部の流路311内に設置された粒子312に担持されたDNA断片に取り込まれた蛍光物質に励起光が照射されると、粒子312から全方向に放射状に蛍光411が発せられる。

[0031] 発せられた蛍光411の一部は、光透過性を有する上部基板310を透過し、粒子312が発する蛍光を検出する光学検出部106に取り込まれる。発せられた蛍光411の他の一部は、下部基板313内を進み、下部基板3

13と温調基板105の間に存在する空気層315との界面で反射する。下部基板313と空気層315との界面で反射した一部の蛍光413は、前述の光路とは異なる光路を通り、光学検出部106に取り込まれる。

[0032] 光学検出部106において検出された光の信号を、2次元の画像として観察すると、下部基板313と空気層315との界面で反射して、光学検出部106に取り込まれた蛍光413による光の信号は、当該蛍光の本来の発生源である粒子312が存在する位置とは異なる位置から発しているように観察される。こうした光の信号は、バックグラウンド光（迷光）となり、蛍光を発している粒子312の位置を正確に検出することの弊害となる。また、光学検出部106に取り込まれた蛍光413による光の信号が、当該蛍光の本来の発生源である粒子312と隣接する粒子312から発しているように観察されると（クロストーク）、分析ミスとなり、分析の信頼性を低下させる。これらの現象により、生体物質分析装置の精度は低下することとなる。

[0033] これらの現象は、蛍光強度が小さく、より高感度の検出をする際に、特に顕著となる。高感度の光学検出部106は、わずかな光でも検出するために、前述のような界面における反射光にも反応し、検出画像全体のバックグラウンドが明るくなってしまう。その結果、微弱な蛍光を発している粒子312を見落とししたり、粒子312の位置を誤ったりする可能性が増大する。

[0034] 図4（b）を用いて、本発明の実施形態について説明する。

フローセル104の内層部の流路311内に設置された粒子312に担持されたDNA断片に取り込まれた蛍光物質に励起光が照射されると、粒子312から全方向に放射状に蛍光411が発せられる。

[0035] 発せられた蛍光411の一部は、光透過性を有する上部基板310を透過し、粒子312が発する蛍光を検出する光学検出部106に取り込まれる。発せられた蛍光411の他の一部は、下部基板313内を進み、下部基板313の空気層315側の表面に存在する反射防止性材料の層406に入り、そのまま消滅する。ここでは、反射防止性材料の層406として、黒色の塗料膜を形成してある。

[0036] その結果、粒子 3 1 2 が発する蛍光の一部が、下部基板 3 1 3 と温調基板 1 0 5 の間に存在する空気層 3 1 5 との界面で反射して、光学検出部 1 0 6 に取り込まれるという現象が発生することを抑制することができる。そして、バックグラウンド光（迷光）が生じて、生体物質分析装置の精度が低下することを抑えることができる。即ち、蛍光を発する粒子 3 1 2 の誤検出を防止し、光学的な検出を高感度かつ高精度に行うことが可能となる。

[0037] 本発明の実施形態の生体物質分析用フローセル 1 0 4 において、下部基板 3 1 3 は、粒子 3 1 2 が発する蛍光の一部が空気層 3 1 5 との界面で反射することがないように、反射防止性を有することが必要である。下部基板 3 1 3 を反射防止性にするためには、下部基板 3 1 3 が反射防止性材料からなる基板であってもよいし、反射防止性材料の層 4 0 6 を有する基板であってもよい。反射防止性材料の層 4 0 6 は、下部基板 3 1 3 の空気層 3 1 5 側の表面に存在していてもよいし、下部基板 3 1 3 の内層部側の表面に存在していてもよいし、両者の間の内部に存在していてもよいし、さらには前記のうちの複数を併用してあってもよい。

[0038] 下部基板 3 1 3 に反射防止性材料の層 4 0 6 を成形するときは、反射防止性材料からなるフィルムやシートを下部基板 3 1 3 に積層してもよいし、印刷インキやコーティング剤として下部基板 3 1 3 の表面に塗布してもよい。反射防止性材料の層 4 0 6 を形成する際は、空気層が生じないように隙間なく取り付けることが重要である。また、反射防止性はフローセル 1 0 4 のうちの流路 3 1 1 において効果を有するものであるので、流路 3 1 1 が存在する部分に相当する下部基板 3 1 3 の部分にのみ反射防止性材料を用いてもよい。

[0039] ここで、反射防止性とは、粒子 3 1 2 が発する蛍光等を反射することが少ないことをいう。具体的には、入射された光に対して、反射される光の強度の比率が、50%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下である物質が望ましい。一般に、核酸分析装置のような生体物質分析装置に用いられ、DNA断片に取り込まれる蛍光物質が発する蛍光は、可視光が多

いことから、可視光に対して反射防止性を有するものであることが好ましい。可視光とは、おおよそ400～700nmの波長を有する光である。

[0040] 可視光の反射防止に有効な反射防止性材料の具体例としては、下記のものがある。

(1) 黒色顔料あるいは黒色染料；カーボンブラックや黒鉛等の炭素系黒色顔料、鉄酸化物や銅とクロムの複合酸化物、銅、クロム、亜鉛の複合酸化物などの金属酸化物系黒色顔料、金属錯塩系黒色染料、等。

(2) 上記の黒色顔料や黒色染料を含有する樹脂組成物（熱硬化性、熱可塑性）；黒色の樹脂、塗料、インキ、コーティング剤、等。樹脂の具体例としては、アクリル樹脂、シクロオレフィンポリマー、等がある。

(3) 上記の黒色顔料や黒色染料を含有するガラス、等。

(4) 異なる屈折率材料の膜；フッ化マグネシウムや金属酸化物等の屈折率の異なる材料の単層あるいは多層膜を形成する。

[0041] 下部基板313として、反射防止性材料の層406を成形するときは、反射防止性材料の層406以外の下部基板313の材料としては、後述する上部基板310と同様に、光透過性の材料である、ガラス、アクリル樹脂、ポリシクロオレフィン樹脂、等を使うことができる。

[0042] 図6は、本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルの構成を示す図である。

本発明の実施形態の生体物質分析用フローセルは、上部基板310と下部基板313と上部基板310と下部基板313とに挟まれた内層部602とから構成されている。

内層部602は、蛍光を発する粒子が設置された流路と、流路の周囲に、流路に供給される反応液が漏れ出ないようにするためのスペーサ部407を有している。

[0043] 上部基板310は、光透過性である。ここで、光透過性とは、粒子が発する蛍光等を透過することができ、光学検出部106によって検知することができることをいう。一般に、核酸分析装置のような生体物質分析装置に用い

られ、DNA断片に取り込まれる蛍光物質が発する蛍光は、可視光が多いことから、可視光に対して透過性を有するものであることが好ましい。上部基板310として使用可能な光透過性の材料としては、ガラス、アクリル樹脂、ポリシクロオレフィン樹脂、等がある。

[0044] 上部基板310は、光透過性に優れていることが必要であるため、薄くすることが望ましい。一方、下部基板313は、フローセル104としての取扱性に係るため、ある程度厚みを有し、機械的強度を有していることが望ましい。そのため、上部基板310の厚みは、下部基板313の厚みと同一かそれ以下であることが望ましい。

[0045] 流路を有するフローセルの製造方法としては、以下のような方法がある。

(i) 流路に相当する部分が空洞であり、流路の周囲のスペーサ部407のみからなるシートを上部基板310と下部基板313によって挟み込むことによって製造する。

(ii) 上部基板310または下部基板313の流路に相当する部分をくり抜くことによって製造する。

[0046] 上記(i)の方法では、蛍光を発する粒子が設置された流路として形成されるためには、上部基板310または下部基板313の流路に相当する部分に蛍光を発する粒子を予め設置しておくこととなる。粒子が発する蛍光をより精度よく検知するために、前記粒子は、上部基板310の下面上に設置されていることが望ましい。

[0047] 流路311の高さ、即ちスペーサ部407の厚さとしては、精度よく温調を行うためにも、1mm以下であることが望ましい。また、フローセル104の流路311には、1つ以上の反応液の流入口314と流出口316を有していることが望ましい。

[0048] 本発明の実施形態において、蛍光を発する粒子312は、DNA断片等を結合している粒子312を予め作成して、上部基板310または下部基板313上に固着剤等を用いて固定することができる。あるいは、予め粒子312を作成することはしないで、上部基板310または下部基板313上に、

粒子状の形状で、DNA断片等を結合している担体を直接、固着させていくこともできる。あるいは、DNA断片等を直接、上部基板310または下部基板313上に点状に固定させることもできる。

[0049] 蛍光を発する粒子312を上部基板310上または下部基板313上に設置する際は、上記の予め作成した粒子や粒子状の担体やDNA断片等を固着させるために、基板上に予め無機酸化物からなる固定層を設けることが望ましい。固定層を設けることで、粒子や粒子状担体やDNA断片等をより強固に基板上に固定させることができる。無機酸化物としては、チタニア、ジルコニア、アルミナ、ゼオライト、五酸化バナジウム、シリカ、サファイア、酸化タングステン、五酸化タンタル、およびそれらの少なくとも2種類の混合物からなる群から選択することができる。

[0050] 以上説明してきた本発明の実施形態とは異なる本発明の第2の実施形態について、以下説明する。本発明の第2の実施形態は、光透過性を有する上部基板と、光透過性を有する下部基板と、上部基板と下部基板とに挟まれ、蛍光を発する粒子が設置された流路と反射防止性を有するスペーサ部とを有する内層部、を備える生体物質分析用フローセルを用いるものである（不図示）。

[0051] 本発明の第2の実施形態では、上部基板と下部基板はいずれも光透過性を有しており、励起光は、フローセルの上方から照射され、粒子が発する蛍光は、フローセルの下方にある光学検出部によって検出される。そのため、流路において粒子が発する蛍光の一部が下部基板と空気層との界面で反射されて、分析の弊害となることは少ない。

[0052] しかし、粒子が発する蛍光の一部がスペーサ部に漏れ出て、下方の光学検出部によって検出されて、分析の誤差を生じる懸念がある。そのため、スペーサ部が反射防止性を有することにより、スペーサ部に入射された蛍光の一部が反射されて、測定誤差が生じることを防止することができる。

符号の説明

[0053] 101 生体物質分析装置（核酸分析装置）

1 0 2	試薬冷却保管庫
1 0 3	送液機構
1 0 4	フローセル
1 0 5	温調基板
1 0 6	光学検出部
1 0 7	廃液タンク
1 0 8	カバー
1 0 9	装着部
3 0 1	ランプ
3 1 0	上部基板
3 1 1	流路
3 1 2	粒子
3 1 3	下部基板
3 1 5	空気層
4 0 6	反射防止性材料の層
4 0 7	スペーサ部
6 0 2	内層部

請求の範囲

- [請求項1] 光透過性を有する上部基板と、
反射防止性を有する下部基板と、
前記上部基板と前記下部基板とに挟まれ、蛍光を発する粒子が設置された流路を有する内層部と
を備える生体物質分析用フローセル。
- [請求項2] 前記下部基板が、反射防止性材料からなる基板または反射防止性材料の層を有する基板であることを特徴とする請求項1に記載の生体物質分析用フローセル。
- [請求項3] 前記上部基板の厚みが前記下部基板の厚みと同一かそれ以下であることを特徴とする請求項1に記載の生体物質分析用フローセル。
- [請求項4] 前記粒子が前記上部基板の下面上に設置されていることを特徴とする請求項1に記載の生体物質分析用フローセル。
- [請求項5] 前記生体物質が核酸である請求項1に記載の生体物質分析用フローセル。
- [請求項6] 前記粒子には核酸断片が結合していることを特徴とする請求項5に記載の生体物質分析用フローセル。
- [請求項7] 前記流路には核酸分析用の反応液が供給されることを特徴とする請求項5に記載の生体物質分析用フローセル
- [請求項8] 請求項1に記載の生体物質分析用フローセルと、
励起光を照射する照射部と、
前記粒子が発する蛍光を検出する光学検出部と
を備える生体物質分析装置。
- [請求項9] さらに、前記生体物質分析用フローセルの流路を温調する温調基板を備えていることを特徴とする請求項8に記載の生体物質分析装置。
- [請求項10] 光透過性を有する上部基板と、
光透過性を有する下部基板と、
前記上部基板と前記下部基板とに挟まれ、蛍光を発する粒子が設置

された流路と反射防止性を有するスペーサ部とを有する内層部とを備える生体物質分析用フローセル。

[請求項11] 前記上部基板の厚みが前記下部基板の厚みと同一かそれ以下であることを特徴とする請求項10に記載の生体物質分析用フローセル。

[請求項12] 前記粒子が前記上部基板の下面上に設置されていることを特徴とする請求項10に記載の生体物質分析用フローセル。

[請求項13] 前記生体物質が核酸である請求項10に記載の生体物質分析用フローセル。

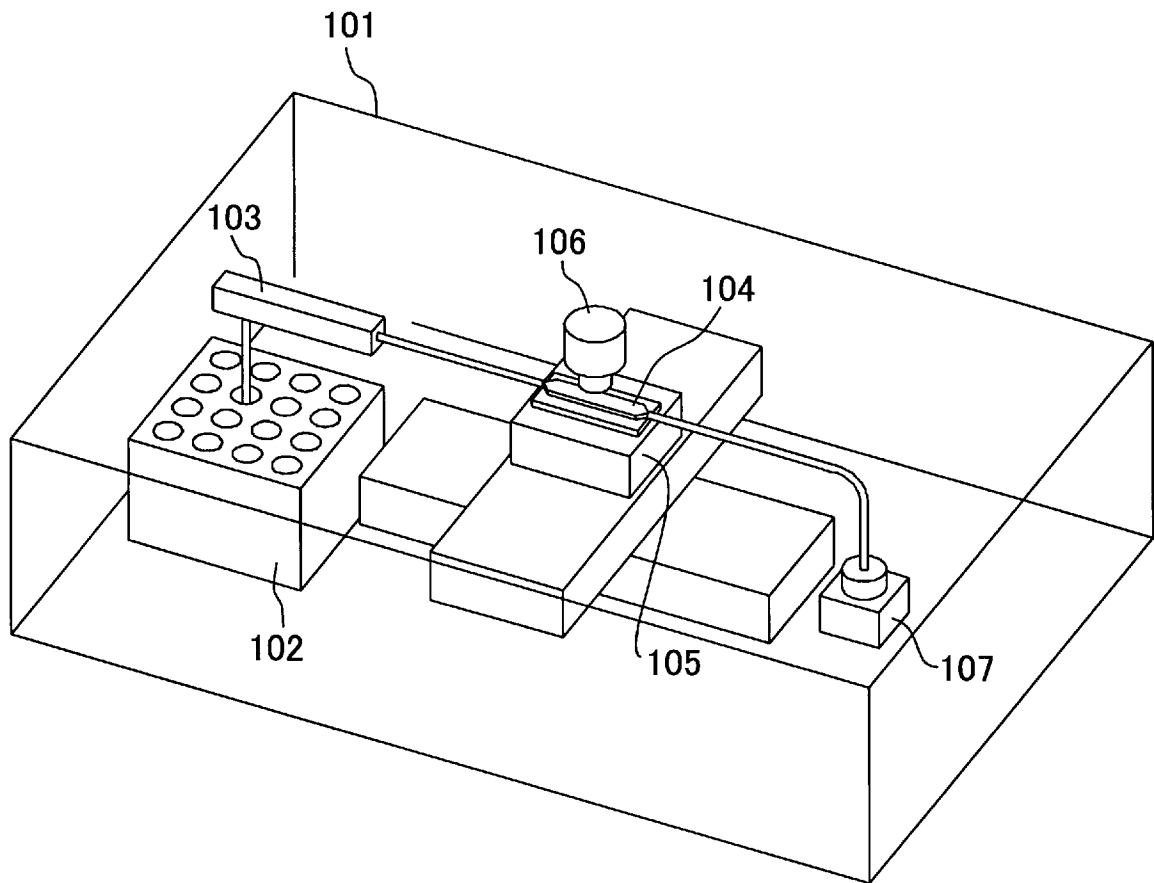
[請求項14] 前記粒子には核酸断片が結合していることを特徴とする請求項13に記載の生体物質分析用フローセル。

[請求項15] 前記流路には核酸分析用の反応液が供給されることを特徴とする請求項13に記載の生体物質分析用フローセル

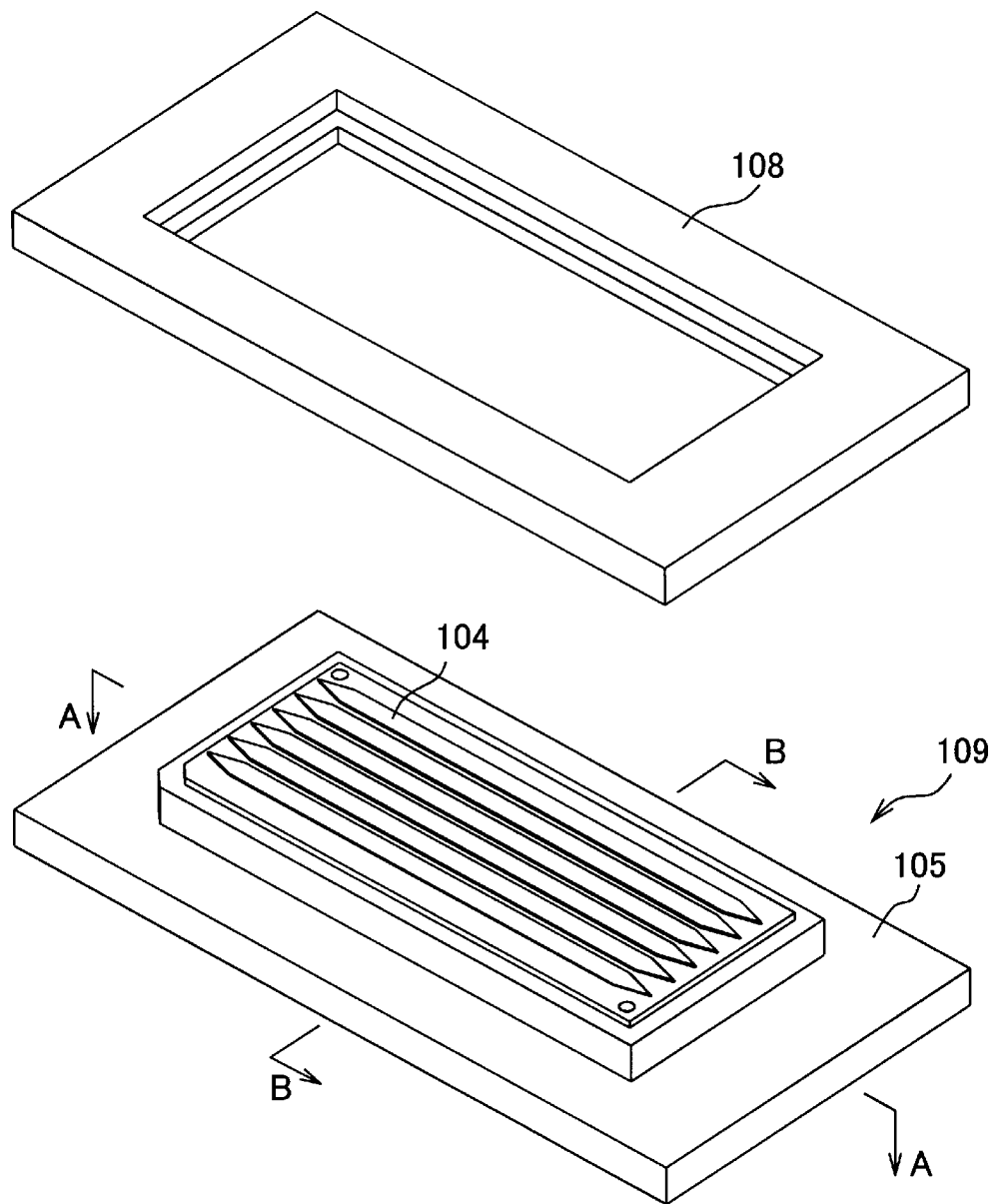
[請求項16] 請求項10に記載の生体物質分析用フローセルと、
励起光を照射する照射部と、
前記粒子が発する蛍光を検出する光学検出部と
を備える生体物質分析装置。

[請求項17] さらに、前記生体物質分析用フローセルの流路を温調する温調基板を備えていることを特徴とする請求項16に記載の生体物質分析装置。
。

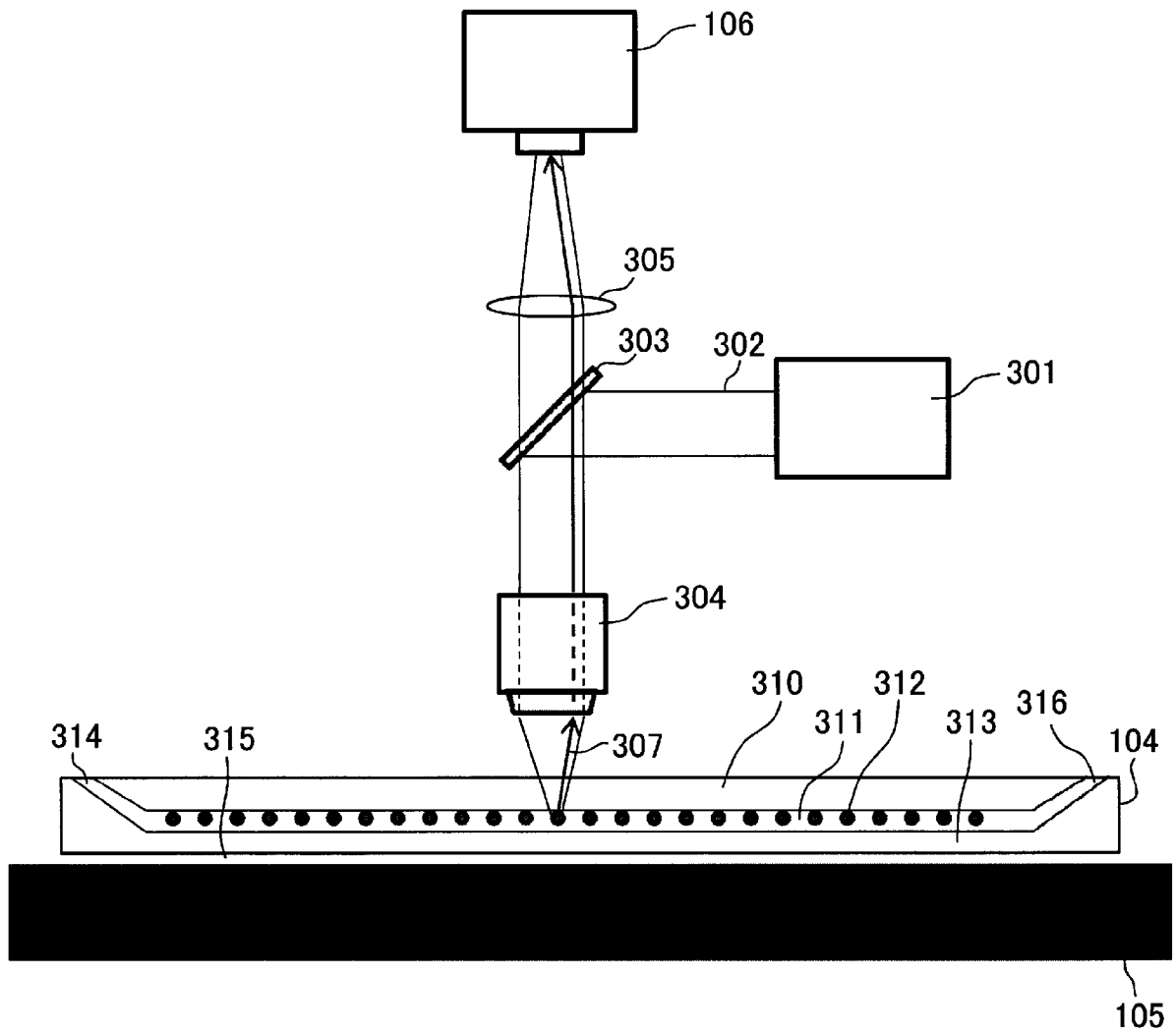
[図1]



[図2]

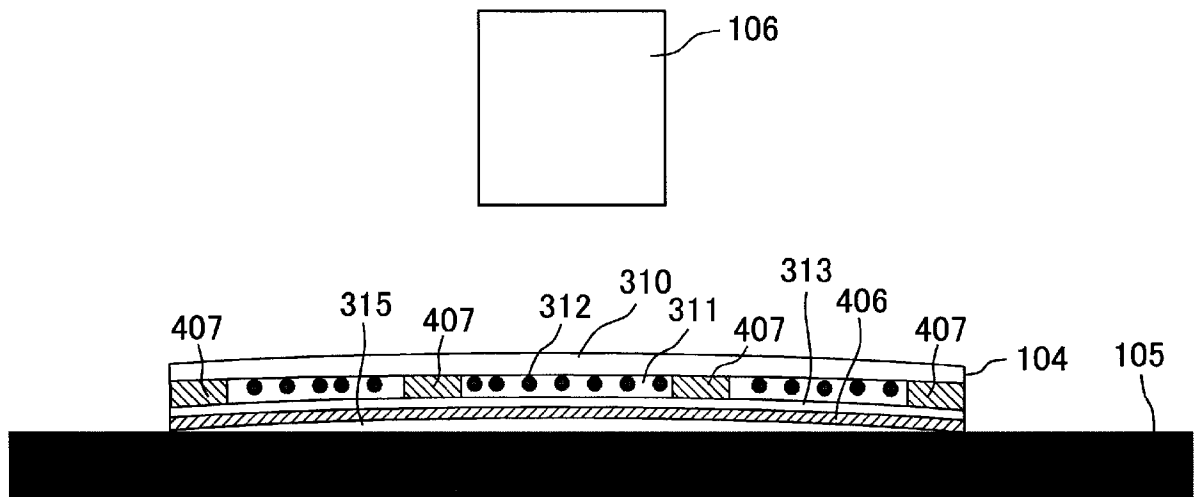


[図3]

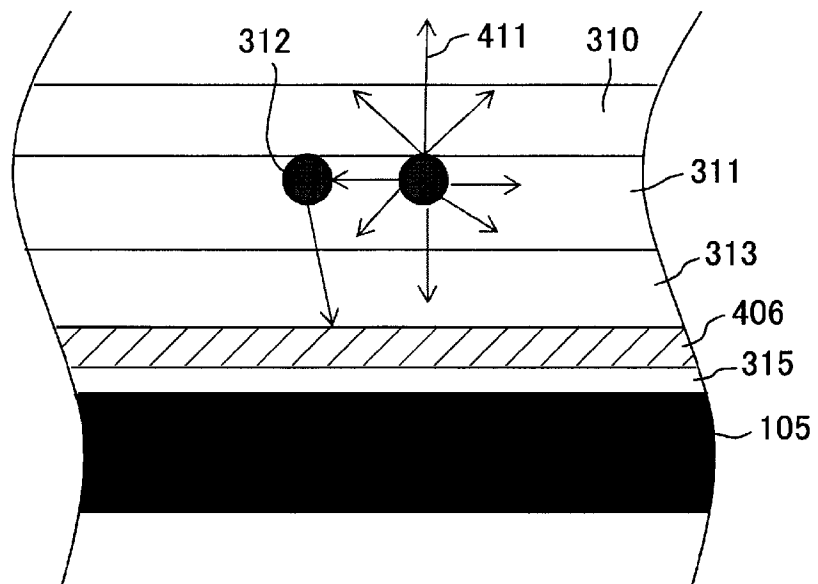


[図4]

(a)

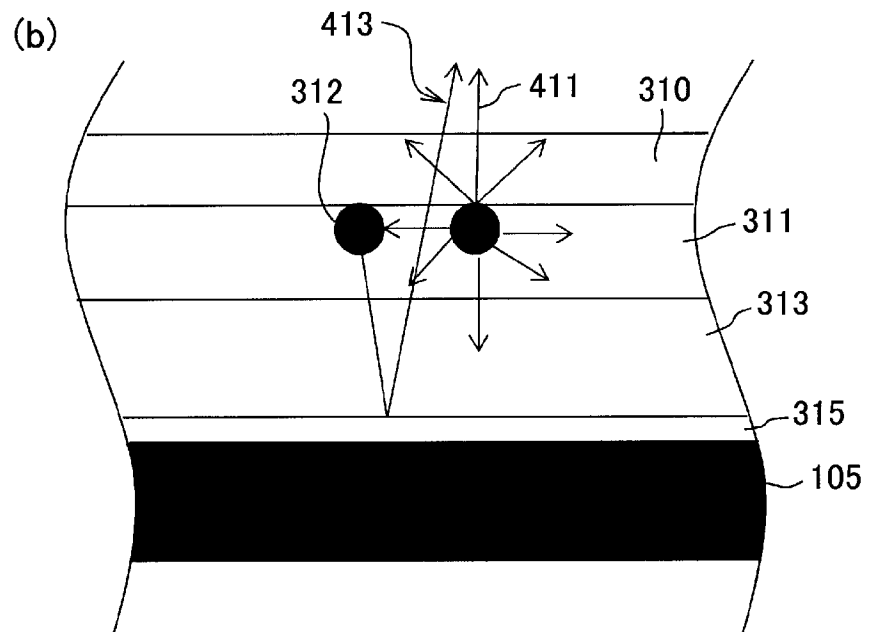
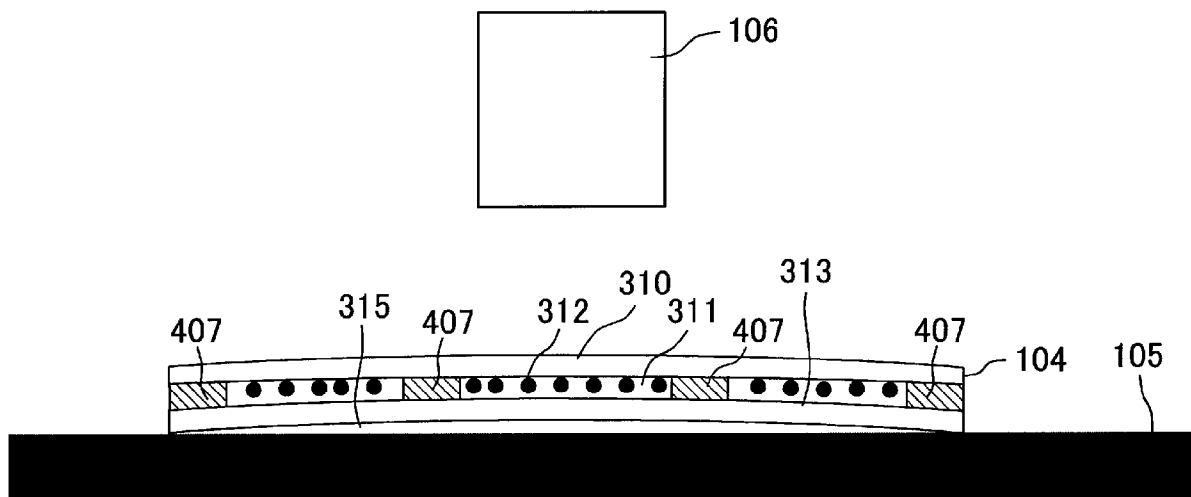


(b)

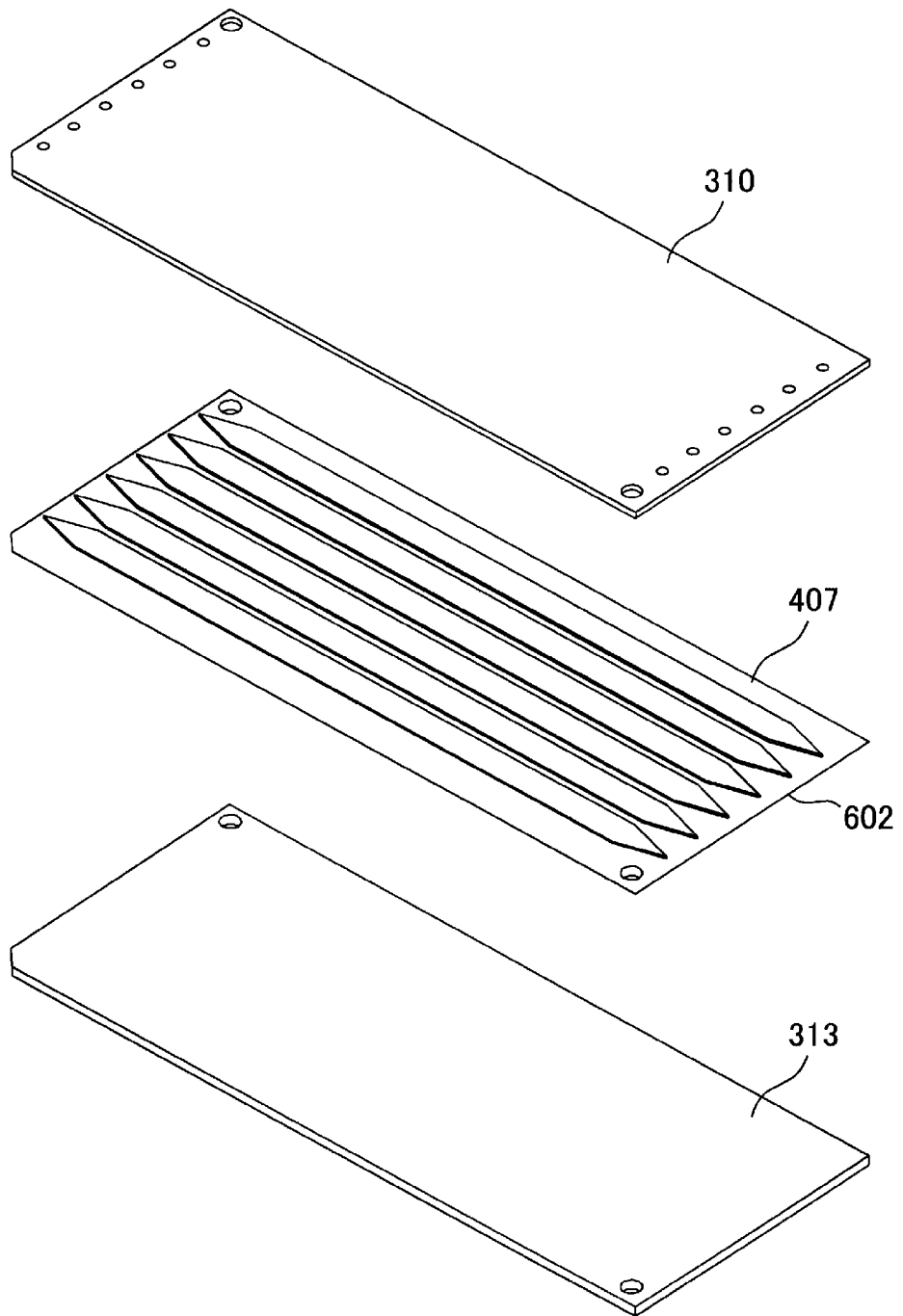


[図5]

(a)



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N21/05
(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N35/08
(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)n

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)

G01N21/64, G01N21/05

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-214956 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 17 August 2006 (17.08.2006), paragraphs [0001], [0030] to [0038], [0048] to [0054]; fig. 1, 2, 4, 6 (Family: none)	1-17
Y	JP 2006-53094 A (Alps Electric Co., Ltd.), 23 February 2006 (23.02.2006), paragraphs [0001], [0038] to [0039]; fig. 1 to 3 (Family: none)	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"I"

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

"X"

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

"Y"

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

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 October, 2013 (04.10.13)

Date of mailing of the international search report

15 October, 2013 (15.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069053

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 2005-195582 A (Samsung Electronics Co., Ltd.), 21 July 2005 (21.07.2005), paragraphs [0022] to [0023]; fig. 1 & US 2005/0140978 A1 & EP 1550858 A1 & DE 602004031189 D & KR 10-2005-0068809 A & CN 1637407 A	9, 17

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N35/08(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)n

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. G01N21/64, G01N21/05

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 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-214956 A（松下電器産業株式会社）2006.08.17, 【0001】、【0030】－【0038】、【0048】－【0054】、図1、図2、図4、図6（ファミリーなし）	1－17
Y	JP 2006-53094 A（アルプス電気株式会社）2006.02.23, 【0001】、【0038】－【0039】、図1－図3（ファミリーなし）	1－17

☒ 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 4 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 5 . 1 0 . 2 0 1 3

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100-8915
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）

波多江 進

2W

9508

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

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 2005-195582 A (三星電子株式会社) 2005. 07. 21, 【0022】－【0023】、図1 & US 2005/0140978 A1 & EP 1550858 A1 & DE 602004031189 D & KR 10-2005-0068809 A & CN 1637407 A	9, 17