



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50, C12M 1/00, 3/00, C07H 21/04, D06M 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/53736</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月14日(14.09.00)</p>																																												
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01353</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月6日(06.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr><td>特願平11/59361</td><td>1999年3月5日(05.03.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/84100</td><td>1999年3月26日(26.03.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/84101</td><td>1999年3月26日(26.03.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/83964</td><td>1999年3月26日(26.03.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/93043</td><td>1999年3月31日(31.03.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/93044</td><td>1999年3月31日(31.03.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/215014</td><td>1999年7月29日(29.07.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/240041</td><td>1999年8月26日(26.08.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/298613</td><td>1999年10月20日(20.10.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/324194</td><td>1999年11月15日(15.11.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/346288</td><td>1999年12月6日(06.12.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/346309</td><td>1999年12月6日(06.12.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願平11/346521</td><td>1999年12月6日(06.12.99)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願2000/55658</td><td>2000年3月1日(01.03.00)</td><td>JP</td></tr> <tr><td>特願2000/57075</td><td>2000年3月2日(02.03.00)</td><td>JP</td></tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.)(JP/JP) 〒108-8506 東京都港区港南一丁目6番41号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 秋田 隆(AKITA, Takashi)(JP/JP) 伊藤千穂(ITO, Chiho)(JP/JP) 石丸輝太(ISHIMARU, Teruta)(JP/JP)</p>	特願平11/59361	1999年3月5日(05.03.99)	JP	特願平11/84100	1999年3月26日(26.03.99)	JP	特願平11/84101	1999年3月26日(26.03.99)	JP	特願平11/83964	1999年3月26日(26.03.99)	JP	特願平11/93043	1999年3月31日(31.03.99)	JP	特願平11/93044	1999年3月31日(31.03.99)	JP	特願平11/215014	1999年7月29日(29.07.99)	JP	特願平11/240041	1999年8月26日(26.08.99)	JP	特願平11/298613	1999年10月20日(20.10.99)	JP	特願平11/324194	1999年11月15日(15.11.99)	JP	特願平11/346288	1999年12月6日(06.12.99)	JP	特願平11/346309	1999年12月6日(06.12.99)	JP	特願平11/346521	1999年12月6日(06.12.99)	JP	特願2000/55658	2000年3月1日(01.03.00)	JP	特願2000/57075	2000年3月2日(02.03.00)	JP	<p>宮内陽子(MIYAUCHI, Haruko)(JP/JP) 村瀬 圭(MURASE, Kei)(JP/JP) 高橋 厚(TAKAHASHI, Atsushi)(JP/JP) 隅 敏則(SUMI, Toshinori)(JP/JP) 前原 修(MAEHARA, Osamu)(JP/JP) 池田忠信(IKEDA, Tadanobu)(JP/JP) 大上暢子(OOGAMI, Nobuko)(JP/JP) 槇野隆之(MAKINO, Takayuki)(JP/JP) 〒739-0693 広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨン株式会社 中央技術研究所内 Hiroshima, (JP) 湯不二夫(YU, Fujio)(JP/JP) 渡辺文昭(WATANABE, Fumiaki)(JP/JP) 浦垣俊孝(URAGAKI, Toshitaka)(JP/JP) 藤井 渉(FUJII, Wataru)(JP/JP) 森下岳晴(MORISHITA, Takeharu)(JP/JP) 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 化学品開発研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AU, BA, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SK, TR, US, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平11/59361	1999年3月5日(05.03.99)	JP																																												
特願平11/84100	1999年3月26日(26.03.99)	JP																																												
特願平11/84101	1999年3月26日(26.03.99)	JP																																												
特願平11/83964	1999年3月26日(26.03.99)	JP																																												
特願平11/93043	1999年3月31日(31.03.99)	JP																																												
特願平11/93044	1999年3月31日(31.03.99)	JP																																												
特願平11/215014	1999年7月29日(29.07.99)	JP																																												
特願平11/240041	1999年8月26日(26.08.99)	JP																																												
特願平11/298613	1999年10月20日(20.10.99)	JP																																												
特願平11/324194	1999年11月15日(15.11.99)	JP																																												
特願平11/346288	1999年12月6日(06.12.99)	JP																																												
特願平11/346309	1999年12月6日(06.12.99)	JP																																												
特願平11/346521	1999年12月6日(06.12.99)	JP																																												
特願2000/55658	2000年3月1日(01.03.00)	JP																																												
特願2000/57075	2000年3月2日(02.03.00)	JP																																												
<p>(54) Title: CARRIERS HAVING BIOLOGICAL SUBSTANCE</p> <p>(54) 発明の名称 生体関連物質含有担体</p> <p>(57) Abstract Biological substance-immobilized fibers wherein a biological substance is immobilized on a fiber; fibers carrying a biological substance-immobilized gel; and fiber alignments having bundles of the above-described fibers and slices of the same.</p>																																														

(57)要約

生体関連物質が繊維に固定化された、生体関連物質固定化繊維及び生体関連物質固定化ゲル保持繊維、並びに前記繊維の束を含む繊維配列体及びその薄片。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 生体関連物質含有担体

## 技術分野

本発明は、生体関連物質を含有する担体に関する。詳しくは、生体関連物質が固定化された繊維、繊維配列体及びその薄片に関する。

## 背景技術

近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種の PCR 反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一単位レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とする DNA マイクロアレイ法（DNA チップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。

これらの方法は、いずれも核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数の DNA 断片が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用方法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識

したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合であると理解される。

核酸を基盤上に固定化するための技術としては、上記ノーザン法同様、ナイロンシート等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基盤の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、あるいはシリコン等の基盤の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。

しかし、例えば、ガラス等の固体表面を化学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポットティング固定化する方法 [Science 270, 467-470 (1995)] は、スポット密度でシート法より優れるものの、スポット密度及びスポット当たり固定できる核酸量がシリコン基盤上における直接合成法 (米国特許 5, 445, 934 号、米国特許 5, 774, 305 号) と比較して少量であり、再現が困難である点が指摘されている。他方、シリコン等の基盤の上にフォトリソグラフィ技術を用い、多種の短鎖核酸をその場で規則正しく固相合成していく方法に関しては、単位面積当たり合成しうる核酸種数 (スポット密度) 及びスポット当たりの固定化量 (合成量)、並びに再現性等において、スポットティング法より優れるとされるものの、固定化しうる化合物種は、フォトリソグラフィにより制御可能な比較的短鎖の核酸に限られる。さらに、高価な製造装置と多段の製造プロセスにより、チップ当たりの大きなコストダウンが困難とされる。その他、微小な担体上に核酸を固相合成しライブラリー化する手法として、微小なビーズを利用する方法が知られている。この方法は、チップ法より長鎖の核酸を多種・安価に合成することが可能であり、また cDNA 等より長鎖の核酸も固定可能と考えられる。しかしながら、チップ法と異なり、指定の化合物を指定の配列基準で再現性よく整列させたものを作製することは困難である。

さらに、現在使用されているマイクロアレイを用い、遺伝子解析を行う際、ハ

イブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション後の洗浄操作に、長時間を要する。

一方、ゲル中にプローブ核酸を固定化し、検体中の核酸とのハイブリダイゼーションを検出する試みがなされている。(特開平3-47097号、WO98/51823)

核酸をゲルに固定化する試みとしては、例えば、ヒドロキシスクシンイミドを脱離基としてもつ共重合体ゲルにアミノ化DNAを固定化する方法 (Polym. Gel. Netw., 4, (2), 111(1996))、アルデヒド基を導入したポリアクリルアミドゲルにアミノ化DNAを結合させる方法 (Nucleic Acid Res., 24, 3142(1996))、メシル基を導入したポリアクリルアミドゲルにアミノ化DNAを結合させる方法 (ibid.)、ヒドラジド基を導入したポリアクリルアミドゲルにアルデヒド化したDNAを結合させる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 4913(1996))等が知られている。

また、中空繊維内にゲルを充填する方法も試みられている。かかる方法としては、電気泳動用キャピラリー製造に関する特開平11-211694号公報に記載の方法等が提案されている。この方法は、キャピラリー紡糸時に中空部においてゲルを形成させ、キャピラリーを得るというものである。

しかしながら、充填されるゲルは重合中に通常生じる重合収縮により中空繊維から剥離し、中空繊維から抜け落ちやすい。従って、ゲルを充填した中空繊維をキャピラリー電気泳動やDNA等の分析用のマイクロアレイに利用することは困難であった。また、このマイクロアレイ中に存在するゲルは一般的に透明であり、すべてのサイトにゲルが存在することを確認することは容易ではなかった。従って、操作性と実用性の問題から、より優れた方法が求められていた。

#### 発明の開示

このような状況下、鎖長によらず核酸を所定の濃度に固定化でき、測定可能な形に高密度に再現よく配列化することが可能で、安価な大量製造に適応しうる新たな体系的な方法論の確立は、今後重要性を増すと考えられる遺伝子解析に強く求められるものであり、本発明が解決しようとする課題である。

具体的には、本発明が解決しようとする課題は、ナイロンシートやガラス基盤のような二次元担体上への微量スポットティングや微量分注による核酸配列体製造法に比べ、核酸固定化量が高く、単位面積あたり配列される核酸分子種の高密度化が可能で、大量生産により適した配列体、すなわち核酸が固定化された二次元的（平面的）配列体の製造法の確立である。また、本発明が解決しようとする課題はシリコン基盤上へのフォトリソグラフィと固相合成との組み合わせによる高密度オリゴ核酸配列体製造法と比べ、cDNAを含む長鎖の核酸にも適応可能で、製造コストのより低い固定化核酸二次元配列体製造法の確立である。

本発明者らの一部は、上記課題を解決すべく、鋭意検討を行った結果、先に、生体関連物質整列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上で行う従来法の発想を改め、生体関連物質の固定化プロセスを一次元構造体としての繊維上（1本の繊維上）に行い、次いで、生体関連物質を固定化した複数本の繊維が整然と配列された三次元構造体とした後、その三次元構造の繊維配列体を切断薄片化することにより、生体関連物質固定化繊維二次元高密度配列体薄片を作製し得ることを見いだしている。

この方法は、生体関連物質を固定化した繊維を如何に効率よく高密度に整然と配列するかが、さらに解決すべき重要な課題であり、その解決は、特に工業的生産において裨益するところが大きい。そこで、本発明者らは、治具を用いた高精度配列技術を用いることにより、生体関連物質固定化繊維二次元高密度配列体を作製し得ることを見いだした。

さらに、本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、中空繊維の中空部にゲルを充填する前に中空繊維の内壁部にゲル形成性モノマー溶液を付着させて重合し、ゲルを形成させる前処理（内壁処理）を行うことにより、その後に充填するゲルの剥離を防止することを見出した。

さらに、本発明者らは、ゲルに色素、例えば、蛍光色素を固定化することにより、蛍光顕微鏡を用いて製造時、及びハイブリダイゼーション時におけるゲルの充填、変形、脱落状態等を容易に検出できることを見出した。

すなわち、本願は、以下の発明を提供する。

(1) 本発明は、生体関連物質が直接繊維に固定化された、生体関連物質固定化

中空繊維、生体関連物質固定化多孔質繊維又は生体関連物質固定化多孔質中空繊維である。また、本発明は、生体関連物質が、生体関連物質が固定化されたゲルを介して繊維に保持された、生体関連物質固定化ゲル保持繊維である。

ゲル保持繊維としては、中実繊維、中空繊維、多孔質繊維又は多孔質中空繊維のものが挙げられる。かかる場合、生体関連物質固定化ゲルは、中実繊維の表面、中空繊維の中空部、多孔質繊維の多孔質部、又は多孔質中空繊維の中空部及び多孔質部に保持されたものである。

生体関連物質としては、以下の(a)～(c)の物質からなる群から選択されるいずれかのものが挙げられるが、核酸が好ましい。

(a) 核酸、アミノ酸、糖又は脂質

(b) 上記(a)の物質のうち1種類又は2種類以上の成分からなる重合物

(c) 上記(a)又は(b)の物質と相互作用を有する物質

ここで、上記生体関連物質固定化ゲル保持繊維には、さらに色素がゲルを介して繊維に保持されたものも含まれる。

(2) さらに、本発明は、前記繊維の束を含む繊維配列体である。かかる配列体としては、繊維配列体中の各繊維が規則的に配列されたものが挙げられ、また、繊維の束が、 $1\text{ cm}^2$ 当たり100本以上の繊維を含むものも挙げられる。この場合、生体関連物質の種類が、各繊維の全部又は一部において異なるものであってよい。

(3) さらに、本発明は、前記繊維配列体の繊維軸と交差する切断面を有する、該繊維配列体の薄片である。かかる薄片には、繊維単位及び該繊維単位の座標基準（例えば、薄片中の2以上のマーカー繊維単位）を含めることができる。なお、マーカー繊維単位が染色されたものが挙げられる。本発明においては、繊維単位の座標が座標基準に基づいて決定されている薄片も本発明の薄片に含まれる。

(4) さらに、本発明は、前記薄片中の各繊維に座標が付与された薄片の製造方法であって、以下の工程：

(a) 繊維単位を束ねて固定化した繊維配列体を、該繊維単位の繊維軸と交叉する断面で順次切断し、連続する繊維配列体薄片S(1)、S(2)、…、S(h)、…、S(m)を得る工程、

(b) m 個の薄片の中から任意の薄片 S (h) を選択し、該薄片 S (h) 中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、該薄片 S (h) 中の座標基準に基づいて決定する工程、

(c) 該 S (h) 薄片に近い位置にある S (i) 薄片中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、工程 (b) において得られた薄片 S (h) の座標データ及び該薄片 S (i) 中の座標基準に基づいて決定する工程、並びに

(d) 工程 (b) 及び (c) を繰り返して、該繊維配列体薄片中の各繊維単位の 2 次元座標を決定する工程、

を含有する前記方法である。

(5) さらに、本発明は、前記薄片中の各繊維単位の位置を決定する方法であって、以下の工程：

(a) 繊維単位を束ねて固定化した繊維配列体を、該繊維単位の繊維軸と交叉する断面で順次切断し、連続する繊維配列体薄片 S (1)、S (2)、…、S (h)、…、S (m) を得る工程、

(b) m 個の薄片の中から任意の薄片 S (h) を選択し、該薄片 S (h) 中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、該薄片 S (h) 中の座標基準に基づいて決定する工程、

(c) 該 S (h) 薄片に近い位置にある S (i) 薄片中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、工程 (b) において得られた薄片 S (h) の座標データ及び該薄片 S (i) 中の座標基準に基づいて決定する工程、並びに

(d) 工程 (b) 及び (c) を繰り返して、該繊維配列体薄片中の各繊維単位の 2 次元座標を決定する工程、

を含有する前記方法である。

(6) さらに、本発明は、前記薄片中の各繊維単位の座標データを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体である。

(7) さらに、本発明は、前記薄片及び記録媒体を含む検体検出用薄片セットである。

(8) さらに、本発明は、中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部に生体関連物質を導入、固定化させた後、該配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする前記薄片の製造方法である。かかる方法において、配列体を構成する各中空繊維の

内壁部及び／又は中空部への生体関連物質の固定化は、例えば該配列体を構成する各中空繊維の延長部分の先端を生体関連物質を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各中空繊維の中空部に導入することにより行うことができる。

(9) さらに、本発明は、多孔質中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質部に生体関連物質を導入、固定化させた後、該配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする前記薄片の製造方法である。かかる方法において、配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質壁部への生体関連物質の固定化は、例えば該配列体を構成する各多孔質中空繊維の延長部分の先端を生体関連物質を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各多孔質中空繊維の中空部及び／又は多孔質部に導入することにより行うことができる。

(10) さらに、本発明は、目的の配列パターンに従って配列させた繊維束に張力を与え、該繊維束の繊維間に樹脂を充填して該繊維束を固定し繊維配列体とすることを特徴とする繊維配列体の製造方法である。当該製造方法において、繊維束の配列は、以下の工程：

(a) 繊維を、目的の配列パターンと同一パターンの孔を有する複数個の治具の孔に通し、

(b) 該治具同士の間隔を拡げること、

により形成することができる。また、治具としては、縦線及び横線を交差させて得られる網目を構成する支持線群、又は多孔板が挙げられる。

(11) さらに、本発明は、ゲル形成性モノマー (a) 溶液を中空繊維の内壁部に付着させた後、前記モノマーを重合させて当該内壁部にゲルを形成させることを特徴とする中空繊維の内壁部の処理方法である。内壁部は多孔質のものが好ましい。また、モノマー (a) としては両親媒性モノマーが挙げられる。

(12) さらに、本発明は、前記内壁部の処理方法で処理された中空繊維の中空部にゲル形成性モノマー (b) 溶液を充填し、該モノマーを重合させて中空部にゲルを形成させることを特徴とする中空繊維の中空部にゲルを充填する方法、及び、このようにしてゲルが充填された繊維の製造方法である。モノマー (b) としては、アクリルアミドを主成分とするものが挙げられる。

(13) さらに、本発明は、修飾された核酸がグリシジル基を介して結合及び固定化された核酸固定化高分子ゲルである。修飾された核酸としては、末端をアミノ化したものが挙げられる。また、高分子ゲルとしては、グリシジル（メタ）アクリレート、重合性モノマー（例えばアクリルアミド）及び架橋剤との共重合体ゲルが挙げられる。

(14) さらに、本発明は、グリシジル（メタ）アクリレートと修飾された核酸とを反応させた後、得られる反応産物に重合性モノマー及び架橋剤を加えて重合させることを特徴とする前記核酸固定化高分子ゲルの製造方法、あるいは、グリシジル（メタ）アクリレート、重合性モノマー及び架橋剤との共重合体ゲルに、修飾された核酸を作用させることを特徴とする前記核酸固定化高分子ゲルの製造方法である。修飾された核酸としては末端をアミノ化したものが挙げられ、重合性モノマーとしてはアクリルアミドが挙げられる。

(15) さらに、本発明は、核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む核酸固定化高分子ゲルである。ここで、重合性モノマー成分の少なくとも1種類が、グリシジル基を有する重合性モノマー、例えばグリシジル（メタ）アクリレートであることが好ましい。また、核酸成分としては、末端をアミノ化したものが挙げられる。

(16) さらに、本発明は、核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む溶液を重合することを特徴とする前記核酸固定化高分子ゲルの製造方法、あるいは、核酸成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む溶液を重合した後、得られるポリマーを多価アミン成分により架橋することを特徴とする前記核酸固定化高分子ゲルの製造方法である。

(17) さらに、本発明は、生体関連物質（例えば核酸）がプローブとして担体に結合された前記繊維配列体の薄片を使用する検体の検出方法において、自由拡散以外の方法により試料を該薄片中に移動せしめてハイブリッド形成させ、生体関連物質プローブと結合しなかった試料をチップ中から除去することを特徴とする検出方法である。自由拡散以外の方法としては、繊維配列体薄片の両面に電圧をかけることにより試料をチップ中に移動せしめる方法、繊維配列体薄片の片面に吸水性物質を配置することにより、反対側に配置した試料を該薄片中に移動せ

しめる方法などが採用される。上記検出方法において、試料は蛍光ラベルされていることが好ましい。なお、担体としては水溶性高分子ゲル（例えばポリアクリルアミドを主成分とするゲル）が挙げられ、該担体は中空繊維の中空部に保持される。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願平 11-59361 号、平 11-84100 号、平 11-84101 号、平 11-83964 号、平 11-93043 号、平 11-93044 号、平 11-215014 号、平 11-240041 号、平 11-298613 号、平 11-324194 号、平 11-346288 号、平 11-346309 号、平 11-346521 号、2000-55658 号及び 2000-57075 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、新規なマイクロアレイに関するものである。これらの発明は、生体関連物質を固定化した繊維、又は生体関連物質を固定化したゲルを繊維の表面、中空部又は空隙部に保持する繊維、及びその配列体を作製し、これを配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより薄片を得るものである。この薄片は、固定化された核酸の二次元高密度配列体、すなわちマイクロアレイである。

## 1. 生体関連物質

本発明において、中実繊維、中空繊維又は多孔質中空繊維に直接固定化する対象となる生体関連物質、あるいはゲルに固定化する対象となる生体関連物質としては、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）、ペプチド核酸（PNA）などの核酸、あるいは、アミノ酸、蛋白質、糖質（多糖類等）、脂質などが挙げられる。

### (1) 核酸

生体関連物質として核酸を用いる場合には、鎖長はいずれでもよい。また、当該核酸は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blin らの方法（Blin et al., *Nucleic Acids Res.* 3: 2303 (1976)）

等により、また、RNAの抽出については、Favaloro らの方法 (Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)) 等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、あるいは、化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

本発明では、核酸をそのまま中空繊維に固定化してもよく、また、核酸に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた核酸を固定化してもよい。

核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られており [Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコール (I) DIGハイブリダイゼーション (秀潤社)]、本発明ではこれらの修飾法を採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。

アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中 (例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位) であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平 3-74239号公報、米国特許 4,667,025号、米国特許 4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬 [例えば、アミノリンク II (商標名); PEバイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers (商標名); クロンテック社] などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法 (Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983)) にしたがって調製することができる。

## (2) アミノ酸

本発明において繊維に固定化する対象となるアミノ酸とは、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを構成するアミノ酸のいずれをも意味する。アミノ酸の長さは特に限定されるものではなく、任意のものを選択することができる。例えば、アミノ酸数 2~10個のペプチド、11個以上のポリペプチド又はタンパク質などが挙げられる。

これらの物質は、通常のペプチド合成等により得ることができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法、酵素合成法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。

縮合方法や保護基の脱離としては、公知のいずれの手法を用いてもよい(例えば Bodanszky, M and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)、Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)、泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(1975)等)。

反応後は、通常の前製法、例えば溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて目的のペプチドを精製することができる。また、生体内から抽出・精製することにより得ることもできる。

### (3) 脂質

本発明において、脂質とは、分子中に長鎖脂肪酸又は類似の炭化水素鎖をもち、生物体内に存在するか生物に由来する物質を意味し、中性脂質、リポタンパク質、リン脂質、糖脂質等をいう。中性脂質としては、脂肪酸、ワックス、アシルグリセロール、ステロール、ドリコール、胆汁酸等が挙げられる。リポタンパク質としては、キロミクロン、VLDL、IDL、LDL、HDL 等が挙げられる。リン脂質としては、ジアシル型グリセロリン脂質(ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等)、エーテル型グリセロリン脂質、スフィンゴミエリン、ホスホノリピド等が挙げられる。糖脂質としては、中性糖脂質(セラミドモノヘキソシド、セラミドジヘキソシド等)、酸性糖脂質(ガングリオシド、スルファチド等)が挙げられる。

これらの脂質は、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることにより組織又は細胞から抽出することができる。また、市販品を使用することもでき、酵素反応による合成をすることもできる。

### (4) 糖

糖としては、単体である単糖類、単糖が数個(2~10個)縮合したオリゴ糖、

さらに多数の単糖からなる多糖類が挙げられ、糖タンパク質も含まれる。

上記糖としては、例えばプロテオグリカン、グリコサミノグリカン等、あるいは、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、ムチン、グリコホリン等の糖タンパク質が挙げられる。

糖の調製は、レクチンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー、CsCl 沈降平衡遠心法、ゾーン速度沈降遠心法、液体クロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー、免疫沈降法等を単独で又は適宜組み合わせることにより行うことができる。また、市販品を使用することもできる。

#### (5) 重合体

本発明において使用できる生体関連物質は、上記(1)～(4)の物質を、1種類又は2種類以上を組み合わせる重合したものも含まれる。例えば、1種類のアミノ酸からなるホモポリペプチド、一定配列の繰り返し構造をもつコポリマー（アミノ酸コポリマー）などが挙げられる。これらの重合体を得るには、同じ種類の核酸又はペプチド同士を重合する方法、種類の異なる核酸又はペプチドを重合する方法などが採用される。

#### (6) 相互作用する物質

本発明においては、上記(1)～(5)の物質と相互作用する物質も使用することが可能である。相互作用とは、ある物質が、特定の他の物質と結合又は会合することにより複合体を形成する作用を意味する。例えば、抗原と抗体との反応、核酸とアンチセンス核酸との反応、ビオチンとストレプトアビジンとの反応などが挙げられる。そして、上記相互作用する物質のいずれか一方を繊維に固定化する。

## 2. 繊維

### (1) 繊維の種類

本発明において、生体関連物質の固定化に用いることができる繊維としては、中実繊維、中空繊維、多孔質繊維、多孔質中空繊維等が挙げられる。これらの繊維は、合成繊維、半合成繊維、再生繊維及び天然繊維のいずれを用いることもできる。

合成繊維の代表例としては、ナイロン6、ナイロン66、芳香族ポリアミド等

のポリアミド系の各種繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種繊維、ポリビニルアルコール系の各種繊維、ポリ塩化ビニリデン系の各種繊維、ポリ塩化ビニル系繊維、ポリウレタン系の各種繊維、フェノール系繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系の各種繊維などが挙げられる。

半合成繊維の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キチン、キトサン等を原料としたセルロース系誘導体系各種繊維、プロミックスと称される蛋白質系の各種繊維などが挙げられる。

再生繊維の代表例としては、ビスコース法や銅-アンモニア法、あるいは有機溶剤法により得られるセルロース系の各種再生繊維（レーヨン、キュプラ、ポリノジック等）などが挙げられる。

天然繊維の代表例としては、綿、亜麻、苧麻、黄麻などの植物繊維、羊毛、絹などの動物繊維、石綿などの鉱物繊維などが挙げられる。これらの植物繊維は、中空状の繊維形態を示すので本発明に用いることができる。

無機繊維の代表例としては、ガラス繊維、炭素繊維などが挙げられる。

また、天然繊維以外の中空繊維は、特殊なノズルを用いて公知の方法で製造することができる。ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン等は熔融紡糸法が好ましく、ノズルとしては馬蹄型やC型ノズル、2重管ノズルなどを使用することができる。本発明においては、連続した均一な中空部を形成させることができる点で2重管ノズルを用いるのが好ましい。

熔融紡糸ができない合成高分子、半合成繊維又は再生繊維に用いられる高分子の紡糸は溶剤紡糸が好ましく用いられる。この場合も、熔融紡糸と同じく2重管ノズルを用いて、中空部に芯材として適切な液体を充填しながら紡糸することにより連続した中空部を有する中空繊維を得ることができる。

## (2) 繊維の形態

本発明において使用の対象となる繊維は、特にその形態が規定されるものでは

なく、中実繊維、中空繊維、多孔質繊維及び多孔質中空繊維のいずれをも意味するものである。中実とは、繊維の内部が空洞ではなく、繊維を構成する成分が詰まった状態を意味し、中空とは繊維の内部が空洞で管状又はストロー状の状態を意味し、多孔質とは、繊維に無数に存在する空隙（隙間）を意味する。断面形状は、円形断面のみならず、扁平断面や中空断面などの異形断面でもよい。形態は、特にゲルをより強固に固定化する観点から、中空かつ多孔質であることが好ましい。

また、本発明に用いる繊維は、モノフィラメントであってもよく、マルチフィラメントであってもよい。さらに、短繊維を紡績した紡績糸でもよい。尚、マルチフィラメントや紡績糸の繊維を用いる場合には、生体関連物質の固定に、単繊維間の空隙等を利用することも可能である。

本発明に用いる繊維は、無処理の状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて、反応性官能基を導入したものであってもよく、また、プラズマ処理や $\gamma$ 線、電子線などの放射線処理を施したものであってもよい。

また、衣料用以外の繊維、例えば、ポリメチルメタクリレートやポリスチレンなどの透明非晶質高分子を主材料とした光学繊維なども用いることができる。

本発明において多孔質繊維を用いる場合は、多孔質繊維は、熔融紡糸法又は溶液紡糸法に延伸法、ミクロ相分離法、抽出法などの公知の多孔化技術を組み合わせることにより得ることができる。

本発明に用いる多孔質繊維の多孔度は特に限定されるものではないが、繊維の単位長さ辺りに固定化される生体関連物質の密度を高めるという観点から、比表面積が大きくなるように高い多孔度であることが望ましい。多孔質繊維材料の多孔度は特に限定されるものではないが、繊維材料単位長さ辺りに固定化される生体関連物質の密度を高めるという観点からは、比表面積が大きくなるように、かつ繊維の強度を犠牲にしない程度に高い多孔度であることが望ましい。例えば、空隙率 20~80%のものが好ましく、30~60%のものがさらに好ましい。

本発明に用いる多孔質繊維の孔の大きさは、生体関連物質の固定化及びその後のハイブリダイゼーションが可能であれば特に限定されるものではないが、繊維の単位長さ辺りに固定化される生体関連物質の密度を高めるという観点から、よ

り小さい方が望ましい。

市販されている精密ろ過、限外濾過を目的とした多孔質中空糸膜、多孔質な中空糸膜の外表面に無孔性の均質膜を被覆した逆浸透膜、ガス分離膜、多孔質層の中間に無孔性の均質層を挟んだ膜などを多孔質繊維材料として用いることができる。

本発明に用いられる多孔質中空繊維の構造は、生体関連物質が固定化されたゲルの充填が可能であれば特に制限はされないが、多孔質中空繊維の外表面から内表面まで孔が連通した三次元網目構造、フィブリル状のものにより構成された連通した孔を有する構造、指型構造、独立気泡構造、一部が連通した気泡構造であるものを用いることができ、特に三次元網目構造、フィブリル状のものにより構成される構造が好ましい。また、孔の大きさは、およそ  $0.01\mu\text{m}$ ～数十 $\mu\text{m}$  程度まで用いることができ、多孔質層の一表面から他表面にわたって均一の孔径であってもよいし、多孔質層の厚み方向に孔径の変化がある対称/非対称な傾斜構造を持つ多孔質体であってもよい。更に、その空孔率及び比表面積は、生体関連物質を固定化したゲルをより強固に保持するという観点から、多孔質中空繊維としての取り扱い性を損なわない程度であれば、高いほど好ましい。

従って、市販されている精密ろ過、限外濾過を目的とした多孔質中空糸膜、多孔質な中空糸膜の外表面に無孔性の均質膜を被覆した逆浸透膜、ガス分離膜、多孔質層の中間に無孔性の均質層を挟んだ膜などを用いることができる。

### 3. 繊維への生体関連物質の固定化

本発明は、①生体関連物質が固定化された繊維（以下、「生体関連物質固定化繊維」ともいう。）、②生体関連物質をゲルに固定化し、その固定化ゲルを保持する繊維（以下、「生体関連物質固定化ゲル保持繊維」ともいう。）を提供する。対象となる繊維は、①においては、中空繊維、多孔質中空繊維及び多孔質繊維であり、②においては、中空繊維、中実繊維及び多孔質中空繊維である。

以下、それぞれの繊維について、生体関連物質の固定化の方法について説明する。

繊維に生体関連物質を固定化する場合には、繊維と生体関連物質との間におけ

る各種化学的又は物理的な相互作用、すなわち繊維が有している官能基と、生体関連物質を構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。また、多孔質繊維、中空繊維又は多孔質中空繊維については、配列体を構成する繊維の中空部又は多孔質部に生体関連物質を含む液を導入した後、繊維の中空部又は多孔質部の内壁面等に存在する官能基と生体関連物質を構成する成分との間の相互作用を利用してこれらの繊維に生体関連物質を導入することができる。

無修飾の生体関連物質を繊維に固定化する場合には、生体関連物質と繊維とを作用させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。

アミノ基で修飾された生体関連物質を繊維に固定化する場合には、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて繊維の官能基と結合させることができる。さらに、例えば熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定化された生体関連物質を変成させることもできる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた生体関連物質を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去する処理を行うこともできる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、生体関連物質を含む試料を繊維に固定化する前に適宜実施してもよい。

中空繊維及び多孔質中空繊維の場合、中空部分に生体関連物質を固定化できるのが特徴である。但し、本発明においては、内壁部に固定化できるほか、その繊維の外壁部にも生体関連物質を固定することができる。従って、繊維断面から見れば外壁部及び内壁部の両方に固定化が可能であり、単位断面積あたりの生体関連物質固定量が通常の繊維に比べて大きくできることが特徴である。また、内壁部だけに生体関連物質を固定した場合は、配列体を作製(後述)するとき使用する接着剤が付着しないため、固定化された生体関連物質を、有効に(接着剤の影響を受けることなく正確に)プローブとして使用することができる。

多孔質繊維に生体関連物質を固定化する方法としては、生体関連物質を含む試料を多孔質繊維に作用させればよい。多孔質繊維の場合、比表面積の大きい多孔

質部に生体関連物質を固定化できるのが特徴である。従って、単位断面積あたりの生体関連物質固定量が通常の繊維に比べて大きくできることが特徴である。

生体関連物質の固定化は、水、緩衝液、生理食塩水等に溶解又は懸濁して行うことができる。生体関連物質の溶媒は、当該生体関連物質の物理的又は化学的性質に応じて適宜選択することができる。上記溶液又は懸濁液中には、必要に応じて、安定化剤などが含まれていてもよい。

生体関連物質を含む試料を繊維に作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～60℃が更に好ましい。処理時間は通常5分～24時間であり、1時間以上が好ましい。

生体関連物質固定化ゲル保持繊維（中実繊維、中空繊維、多孔質繊維、多孔質中空繊維）を作製する方法は、特に制限されるものではないが、繊維とゲルとの間における各種化学的又は物理的な相互作用、すなわち繊維が有している官能基と、ゲルを構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。例えば、①単量体、開始剤、及び末端にビニル基を有する生体関連物質の3者を共重合したものと架橋剤とを混合した液に、繊維を浸しゲル化する方法、②単量体を開始剤で重合したものと、架橋剤と、生体関連物質とを混合した液に繊維を浸してゲル化する方法、③単量体を開始剤で重合したものと、架橋剤と、担体（高分子粒子、無機粒子等）に生体関連物質を結合した結合物とを混合した液に繊維を浸しゲル化する方法、④生体関連物質を固定化したアガロース等を加熱溶解し、繊維を浸し、冷却ゲル化させる方法等が挙げられる。

また、上述の方法において、生体関連物質を含む液に繊維を浸漬する代わりに、中空繊維、多孔質中空繊維等の場合、該液をこれら繊維の中空部、多孔質部等に注入又は吸引することにより充填した後ゲル化させてもよい。

本発明においては、生体関連物質固定化ゲル保持中空繊維を作成できるのが特徴であるが、中空部に保持したのと同様、その繊維の外壁部にも保持することができる。従って、前記と同様、繊維断面から見れば外壁部及び中空部の両方に固定化が可能であり、単位断面積あたりの生体関連物質固定量が通常の繊維に比べて大きくできることが特徴である。また、中空部にのみ生体関連物質固定化ゲルを保持した場合は、配列体を作製（後述）するとき使用する接着剤が付着しな

いため、有効に（接着剤の影響を受けることなく正確に）固定化生体関連物質プローブとして使用することができる。

また、生体関連物質固定化ゲル保持多孔質中空繊維は、その中空部のみならず多孔質部までゲルが充填されることにより、生体関連物質が固定化されたゲルと多孔質中空繊維との接触面積が大きく、複雑に入り組んだ形状となるなどのため、生体関連物質が固定化されたゲルが強固に多孔質部に保持されることとなる。

上述の方法により得られた生体関連物質固定化ゲル保持繊維は、ゲルが破壊されない限りにおいて適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定化された生体関連物質を変成させる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた生体関連物質を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去する。そして、処理後の生体関連物質固定化ゲル保持繊維を生体関連物質を検出する材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、生体関連物質を含む試料を中空繊維内部に保持する前に、適宜実施してもよい。

上記の通り調製された生体関連物質固定化ゲル保持繊維は、本発明の生体関連物質固定化ゲル保持繊維配列体を構成する基本単位とすることができる。

本発明に用いることができるゲルの種類は特に制限されないが、例えばアクリルアミド、N，N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、（メタ）アクリル酸、アシルデキストリン等の単量体の一種または二種類以上と、メチレンビス（メタ）アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート等との多官能性単量体を、例えば水性媒体中で共重合したゲルを用いることができる。その他本発明に用いることのできるゲルとして、例えばアガロース、アルギン酸、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等のゲル、またはこれらを架橋したゲルを用いることができる。

本発明では、重合性モノマーや多価アミンをゲルの原料として用いることがで

き、その種類は特に制限されるものではなく、例えばグリシジル基を有するモノマーを用いることができる。

グリシジル基を有する重合性モノマーとしては、例えばグリシジル（メタ）アクリレート等が挙げられる。他の重合性モノマーとしては、例えばアクリルアミド、N，N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、（メタ）アクリル酸、アリルデキストリン等が挙げられる。多価アミンとしては、例えばエチレンジアミン、ジアミノプロパン、ジアミノブタン、ジアミノペンタン、ヘキサメチレンジアミン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、ジエチルアミノプロピルアミン等が挙げられる。

生体関連物質として例えば核酸をグリシジル基を介してゲルに固定化する場合（例えば核酸の末端基へのビニル基の導入をグリシジル基を介して行う場合）、あらかじめ核酸を修飾しておく必要がある。修飾に際しては、グリシジル基と反応するものであれば特に制限を受けない。

核酸の一般的な化学的修飾としては、アミノ化、ビオチン化、デオキシゲニン化等が知られているが [Current Protocols In Molecular Biology, Ed. ; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコール (I) D I Gハイブリダイゼーション (秀潤社)]、本発明ではこれらのいずれの修飾法も採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。

アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中（例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位）であってもよいが、核酸の5'末端又は3'末端で結合することが好ましい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平 3-74239号公報、米国特許 4,667,025号、米国特許 4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬 [例えば、アミノリンク II (商標名) ; PEバイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers (商標名) ; クロンテック社] などを用いて、又はD

NAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法 (Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983) ) にしたがって調製することができる。

本発明では、生体関連物質をそのままゲルに固定化してもよく、また、生体関連物質に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた生体関連物質を固定化してもよい。生体関連物質のゲルへの固定化には、ゲルに物理的に包括する方法や、ゲル構成成分への直接的な結合を利用してもよく、生体関連物質を一旦高分子体や無機粒子などの担体に共有結合又は非共有結合により結合させ、その担体をゲルに固定化してもよい。

例えば、核酸の末端基にビニル基を導入し (WO 98/39351) 、アクリルアミド等のゲルの構成成分と共重合させることができる。共重合においては、単量体、多官能性単量体及び重合開始剤と共に共重合する方法、単量体及び重合開始剤と共に共重合したのち、架橋剤でゲル化する方法などがある。

また、アガロースを臭化シアン法でイミドカルボネート化しておき、末端アミノ化した核酸のアミノ基と結合させてからゲル化することもできる。この際、核酸固定化したアガロースと他のゲル (例えばアクリルアミドゲル等) との混合ゲルにしてもよい。

繊維にゲルを保持させるには、ゲル構成成分であるアクリルアミド等の単量体、多官能性単量体、開始剤及び生体関連物質成分を含む液に繊維を浸し重合、ゲル化させればよい。この際、生体関連物質は、上記したようにゲル構成成分であるアクリルアミド等の単量体や高分子粒子、無機粒子などの担体に結合させておくことが好ましい。

ゲル化は多官能性単量体の存在下に共重合させる方法の他、多官能性単量体の非存在下に共重合させたのち架橋剤を用いて行ってもよい。

その他、生体関連物質を固定化したアガロース等を加熱溶解し、繊維を浸し、冷却ゲル化させる方法等が挙げられる。

また、中空繊維及び多孔質中空繊維の場合、上述の各成分を含む液に繊維を浸漬する代わりに、該液をこれら繊維の中空部及び／又は多孔質部に注入又は吸引することにより充填した後、ゲル化させてもよい。

この場合の固定化は、生体関連物質並びに上記単量体及び重合開始剤を含む溶液を中空繊維等の中空部に導入後、重合ゲル化させることによって行うことができる。

三次元列体中の各々の中空繊維あるいは多孔質中空繊維に固定化されている生体関連物質の種類は、それぞれ異なる種類の生体関連物質とすることが可能である。即ち、本発明によれば、固定化された生体関連物質の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することが可能である。

本発明においては、上記ゲルの構成成分に色素を混合しておくこともできる。

本発明に用いることができる色素は、主に天然色素、合成染料に分類される。天然色素の代表例としてはフラボン誘導体、カルコン誘導体、アントラキノン誘導体、インジゴ誘導体などが挙げられる。合成染料の代表例としてはアゾ染料、アントラキノン染料、インジゴイド染料、ジフェニルメタン染料、トリフェニル染料、キサンテン染料、アクリジン染料などが挙げられる。特に、上記の染料色素には蛍光を有する色素も存在する。

本発明に用いることができる蛍光色素の種類は蛍光を発する色素であれば特に限定されるものではないが、例えば、ローダミン、TexasRed、Fluorescein、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、Oregon Green、Pacific Blue、R-Phycoerythrin、Rhodol Green、Coumarin 誘導体、Amino Methyl Coumarin などが挙げられる。

本発明に用いられる色素の固定化方法は、色素をそのままゲルに固定化してもよく、また、色素に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変性させた色素を固定化させても良い。色素のゲルへの固定化には、ゲルに物理的に包括する方法や、ゲル構成成分への直接的な結合を利用してもよく、色素を一旦高分子粒子や無機粒子などの担体に共有結合あるいは非共有結合により結合させ、その担体をゲルに固定化しても良い。例えば、色素に重合性基を導入し、アクリルアミド等のゲルの構成成分と共重合させることができる。

例えば、色素をゲル構成成分へ直接的に結合させるには、Polyscience 社製の Fluorecein Dimethacrylate や 1-Pyrenylmethyl Methacrylate などを用いアクリルアミド等のゲル構成成分と共重合させる方法、アミノ基を有する色素誘導体

をグリシジルメタクリレート (GMA) と反応させることによって重合性ビニル基を導入しておき、アクリルアミド等のゲル構成成分と共重合させる方法、また、ゲルにアニオン性モノマーを導入し、カチオン性色素をイオン結合させる方法等を挙げることができる。

本発明においては、特に、特定の波長の蛍光色素を固定化することにより、蛍光標識を用いた検体を利用したハイブリダイゼーションを行う場合に、検出波長におけるゲルの高度な透明性を損なうことなくゲルの視認性を付与できる。

生体関連物質の高分子ゲルへの固定化は、高分子ゲルと生体関連物質とを混合することによって行うことができる。反応率あるいは反応速度を考慮し、塩基などの触媒を用いることも可能である。

固定化温度は、0～100℃が好ましく、さらには、20～80℃が好ましい。

修飾された生体関連物質の高分子ゲルへの固定化は、高分子ゲルと修飾された生体関連物質とを混合することによって行うことができる。反応率あるいは反応速度を考慮し、塩基などの触媒を用いることも可能である。

固定化温度は、0℃から 100℃が好ましく、さらには、20℃から 80℃が好ましい。

その他の方法としては、高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合し、該粒子を上述のゲルに包括固定化する方法が挙げられる。例えば、ビオチン化した核酸とアビジン化したアガロースビーズ (シグマ社製 アビジン化アガロース等) を反応させることによって、核酸が固定化されたアガロースビーズを得ることができる。核酸固定化アガロースビーズはアクリルアミドゲル等に包括固定化することができる。

また、ゲルや担体への結合においては、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) 等の架橋剤を用いて結合させることもできる。

生体関連物質固定化高分子ゲルは、固定化された生体関連物質をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中における、生体関連物質と相互作用を有する物質の検出に用いることができる。例えば、ゲルに核酸を固定化すると、当該核酸と相補的な配列を有する核酸を検

出すことができる。

このようにして形成された各種形態の繊維（実施例参照）を図 1A～F に示す。

#### 4. 繊維配列体の製造

高密度に生体関連物質が固定化された繊維配列体の薄片を得るべく繊維を配列させるためには、それぞれの繊維の外径は細い方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、生体関連物質の固定化は  $1\text{ cm}^2$  あたり 100 以上の高密度であるが、これを達成するためには 1 本の繊維の外径はおよそ  $1\text{ mm}$  以下であることが必要である。例えば、外径が  $500\text{ }\mu\text{m}$  程度の多孔質中空糸膜を用いれば、 $1\text{ cm}^2$  あたり 400 以上の生体関連物質が固定化された多孔質中空繊維配列体の薄片を得ることができ、中空繊維紡糸技術を応用して外径が  $30\text{ }\mu\text{m}$  程度の多孔質中空繊維を製造し、これを用いれば、 $1\text{ cm}^2$  あたり 100000 以上の生体関連物質が固定化された多孔質中空繊維配列体の薄片を得ることが可能である。

上記の通り調製された生体関連物質固定化繊維（中実繊維、中空繊維、多孔質繊維、多孔質中空繊維、及びこれらのゲル保持繊維）は、本発明の繊維配列体を構成する基本単位とすることができる。そして、これらの生体関連物質固定化繊維を集束した後に接着して、繊維配列体（三次元配列体）となすことができる。

また、生体関連物質及び色素が固定されたゲルを保持する繊維は、収束した後に密着して、生体関連物質及び色素固定化ゲル保持繊維配列体となすことができる。

上記の三次元配列体を、繊維軸と交差する方向、好ましくは繊維軸に対して垂直方向に切断することにより、生体関連物質固定化繊維配列体断面（図 2）を有する薄片（図 3）を得ることができる。

この際、生体関連物質固定化繊維を規則的に配列し、樹脂接着剤等で接着することにより、例えば、縦横に生体関連物質固定化繊維が整然と規則的に配列した繊維配列体を得ることができる。繊維配列体の形状は特に限定されるものではないが、通常は、繊維を規則的に配列させることにより正方形又は長方形に形成される。

「規則的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる繊維の本数が一定となる

ように順序よく配列させることをいう。例えば、直径 1mm の繊維を束にして断面が縦 10mm、横 10mm の正方形となるように配列させようとする場合は、その正方形の枠内 (1cm<sup>2</sup>) における 1 辺に含まれる繊維の数を 10 本とし、この 10 本の繊維を 1 列に束ねて 1 層のシートとした後、このシートが 10 層になるように重ねる。その結果、縦に 10 本、横に 10 本、合計 100 本の繊維を配列させることができる。但し、繊維を規則的に配列させる手法は、上記のようにシートを重ねるものに限定されるものではない。

この場合に、特定の生体関連物質が固定化された繊維の位置があらかじめ決められた状態で配列することが望ましいが、必ずしもそのように配列させる必要はない。その理由は、配列体を形成した段階では特定の生体関連物質を固定化した繊維がどの位置に存在するのかが不明でも、配列体の断面を切断した後、一旦ハイブリダイゼーション手法等を用いて断面における生体関連物質の配置位置を決定することにより、特定の生体関連物質が固定された繊維の位置を確認することができるためである。従って、この手法を用いて、一度、薄片内に配置された複数種類の生体関連物質の位置を決定しておけば、同一配列体から得られる薄片はすべて同一の位置配置であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の生体関連物質の位置配置がわかる。

なお、本発明において束にする繊維の本数は 100 本以上、好ましくは 1,000~10,000,000 本であり、目的に応じて適宜設定することができる。但し、配列体における繊維の密度が、1 cm<sup>2</sup> 当たり 100~1,000,000 本となるように調製することが好ましい。そして、高密度に生体関連物質が固定化された繊維配列体の薄片を得るべく繊維を配列させるためには、繊維の太さは細い方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、繊維 1 本の太さは 1mm 以下であることが必要である。

本発明において直径 50 μm のモノフィラメントを用いた場合、1cm あたり 200 本の繊維を配列させることができるため、1cm<sup>2</sup> の正方形内に配列させることのできる繊維の本数は 40,000 本である。したがって、この場合は 1cm<sup>2</sup> あたり最高 40,000 種類の生体関連物質を固定化することができる。

例えば、外径が 500 μm 程度の中空繊維又は多孔質中空繊維のモノフィラメン

トを用いれば、固定化配列体断面  $1\text{cm}^2$  あたり 400 以上の中空繊維あるいは多孔質中空繊維が配列された三次元構造体を得ることができる。また、中空繊維紡糸技術を応用して外径が  $30\ \mu\text{m}$  程度の中空繊維あるいは多孔質中空繊維を製造し、これを用いれば、固定化配列体断面  $1\text{cm}^2$  当たり 100,000 本以上の中空繊維あるいは多孔質中空繊維が配列された三次元構造体を得ることが可能である。

モノフィラメントでは、例えば、市販の釣糸の場合  $50\text{--}900\ \mu\text{m}$  の太さの糸である。さらに、最近の紡糸技術によれば  $1\text{dtex}$ （ポリエチレンテレフタレートの場合、直径約  $14\ \mu\text{m}$  となる）のモノフィラメントも製造可能であり、更に細い繊維（極細繊維又は超極細繊維）の製造も可能である（直径  $1\text{--}10\ \mu\text{m}$ ）。

一方、マルチフィラメントにおいては  $83\text{dtex}/36$  フィラメントや  $82\text{dtex}/45$  フィラメント等をそのまま用いることもできる。

各繊維配列体中の各々の繊維内部に固定化されている生体関連物質の種類は、それぞれ異なる種類の生体関連物質とすることが可能であり、また、同一の生体関連物質が固定化された繊維から任意の本数の繊維を選択し、その選択された繊維を束ねて適宜配列させることも可能である。即ち、本発明によれば、固定化された生体関連物質の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することが可能である。

本発明においては、配列体を構成する各繊維に対して樹脂で固定しない延長部分を設け、この先端部分を生体関連物質を含む液槽に浸漬することにより、該液を配列体を構成する各繊維に導入することが可能となる（「6. 繊維の内壁処理」の項を参照）。

前記配列体を構成する各中空繊維又は各多孔質中空繊維に対して樹脂で固定しない延長部分は、配列体の一端、好ましくは両端に設けることにより、生体関連物質を含む液を導入する以外に必要な応じ種々の処理を行うことができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、配列体を構成する中空繊維あるいは多孔質中空繊維の内壁面等に固定化された生体関連物質を変成させる、あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた生体関連物質を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去することができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、生体関連物質を含

む試料を配列体を構成する中空繊維あるいは多孔質中空繊維に固定化する前に、適宜実施してもよい。

#### 5. 治具を用いた繊維配列体の製造

本発明は、治具を用いて繊維が3次元配列された構造を有する繊維配列体を製造することもできる。

本発明の繊維配列体は、繊維を1本ずつ通すことができる小孔を有する道具であって配列パターンが多数の小孔で形成されたもの（「治具」と呼ばれる）に繊維を通して繊維束を作成し、その繊維束に張力を与えた状態で繊維の間隙に樹脂を充填して固定化することにより作製することができる。

本発明において用いられる治具を貫く小孔は、所定のパターンに配列させたものが挙げられる。例えば、円形の孔を縦及び横に整列させたもの（図4）、あるいは縦線と横線とからなる支持線群で仕切り、網目を構成する空間を有するものが挙げられる（図5）。

図4に示すように、所定のパターンを形成し、くり貫かれた小孔を有する治具（多孔板）を用いる場合は、繊維12を治具11の孔に通した後、該治具同士の間隔を拡げる。但し、治具11の孔位置を、隣の治具の孔位置と合わせるため揃えて相接するよう配置させることが好ましい。あるいは、図5に示すように、縦線と横線から構成される支持線群21の一つの区画に繊維を通し繊維束とし、治具同士の間隔を広げることにもできる。そして、繊維に張力を与え、張力を与えた状態で繊維間に樹脂を充填して該繊維束を固定し、繊維配列体を得る。

この場合においても、三次元配列体とする繊維の本数は100本以上、好ましくは1,000~10,000,000本であり、目的に応じて適宜設定することができる。但し、配列体における繊維の密度が、1cm<sup>2</sup>当たり100~1,000,000本となるように調製することが好ましい。そして、高密度に繊維を配列させるためには、繊維の外径は細かい方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、繊維1本の外径は1mm以下、好ましくは300~10μmである。例えば、外径50μmのモノフィラメントを用いた場合、1cmあたり200本の繊維を配列させることができるため、1cm<sup>2</sup>の正方形内に配列させることのできる繊維の本数は40,000本である。した

がって、この場合は  $1\text{cm}^2$  あたり最高 40,000 種類の生体関連物質を固定化することができる。一方、マルチフィラメントにおいては 83dtex/36 フィラメントや 82dtex/45 フィラメント等をそのまま用いることもできる。また、外径が  $300\mu\text{m}$  程度の多孔質繊維、中空繊維又は多孔質中空繊維のモノフィラメントを用いれば、固定化配列体断面  $1\text{cm}^2$  あたり 1,000 本以上の繊維が配列された三次元配列体を得ることができる。

繊維の配列を規制する治具として繊維配列パターンと同一パターンの孔を有する多孔板を用いる場合、繊維配列体中の繊維同士の距離は、該治具の孔ピッチ（孔の中心とその隣の孔の中心との距離）と同じとなる。

また、治具の各孔径は用いる繊維外径の 100%以上 125%以下が好ましく、配列規制力と配列作業難易度とを考慮すると、105%が最も好ましい。

このような多孔板の製造法としては、フォトエッチング加工が最も安価且つ大量に精度良く製造できる点で好ましい。この場合、加工に適した板厚は、各孔間のすきま寸法の 200%以下、好ましくは 100%以下である。板の材質は通常ステンレス、銅又は銅合金が用いられるが、本発明においては材料強度と加工コスト及び材料費の面からステンレス鋼板（SUS304 材）が最も適している。

治具として縦横に張られた支持線群を用いると、繊維の配列パターンと同一形又は相似形で拡大又は縮小が可能な網目を構成することができる。また、多孔板を用いる場合に比して、配列規制力を向上し、配列作業難易度を易しくすることができる。

具体的には、支持線を、繊維軸に対して直交する 2 方向に、1 方向当たりの生体関連物質固定化繊維配列数プラス 1 本ずつ配置し、生体関連物質固定化繊維配列数分の網目を構成する（図 5）。支持線の両端は、直線運動機構を有する支持端とする。支持線群で構成された網目は、各支持線が相隣り合う支持線に対して平行移動することで、拡大、縮小させることができる。網目を拡大させると、繊維の配列作業は非常に簡単になり、全ての繊維を配列した後、網目を縮小することで、治具と繊維の間に隙間を生じない状態となり、非常に精密な配列規制が可能である。すなわち、繊維配列体中の繊維同士の距離は、最大、支持線の直径または幅にまで縮小可能である。

このような治具を直列に2個、又は必要により2個以上、孔または網目の位置を揃えて、相接するよう配置し、治具の孔または網目を縫うように繊維を通して配列作業を行う。治具として支持線群を用いる場合は、全てあるいは一部の配列作業終了後に網目を縮小し所定の網目の大きさに調節する。

その後、該治具同士の間隔を広げる。この作業は、上記網目調節作業前又は網目調節作業と同時に行うこともできる。間隔は特に規定されるものではなく、適宜設定すればよい。間隔を広く採れば、三次元配列体の長尺品を成型することができ、薄片に切断するなどの後工程におけるロスを少なくすることによって製造コストを小さくすることができる。但し、間隔を過度に大きく採った場合、スパン中央付近で繊維の拘束力が低下して配列が乱れる恐れがあるため、そのような乱れを生じない程度に適宜調節する。また、スパン中央付近の配列規制を強化する目的で、治具の個数を適宜追加してもよい。

次いで、治具を通した全ての繊維に張力をかけ、その状態で繊維の間隙に樹脂を充填して固定化する。張力は、繊維の断面形状や材質、すなわち弾性係数や伸張率等によって異なるが、繊維が弛まず且つ破断しない程度とする。そして、繊維を弛み無く張った状態を維持するため、張力を維持する。その方法としては、全ての繊維をバネで引っ張る方法、エアーサッカーで非接触吸引する方法、繊維を適宜粘着テープで纏めて治具に貼付する方法、重力を利用する方法などが挙げられる。

本発明において用いることのできる支持線としては、張力により容易に破断しない材質であれば特に限定されず、SUS304ワイヤーや釣糸等が挙げられる。

また、本発明において繊維束を固定化する樹脂は、各繊維間の空隙への充填が容易となるよう低粘度液状を呈し、充填及び硬化が常温で行えるもの、例えば、ウレタン樹脂等の2液反応硬化性樹脂が好ましい。

## 6. 繊維の内壁処理

本発明は、中空繊維の内壁部（内壁表面、及び内壁表面から外壁表面までの領域も含む）にゲルを形成させる処理方法である。

この処理は、中空繊維の内壁部にゲル形成性モノマー (a) 溶液を付着させた後、

該モノマーを重合させてゲルを該内壁部に形成させることを特徴とするものである。本発明において、かかる処理を内壁処理という。ここで、モノマー溶液 (a) とは内壁処理に使用するための溶液を意味し、内壁表面から内壁内部に侵入し、内壁表面から外壁表面までの領域に渡って浸透することが可能なものである。従って、本発明において内壁部とは、内壁表面のほか、モノマーが内壁表面から内部に侵入できる部分、すなわち内壁表面から外壁表面までの領域も含む意味である。

このような内壁処理を行うことにより、その後、繊維の中空部にゲルを充填したときに、ゲルが中空繊維内壁部に物理的又は化学的に固定される。

また、本発明は、上記の方法で処理された中空繊維（すなわちゲルが内壁部に形成された中空繊維）の中空部にゲル形成性モノマー (b) 溶液を充填し、該モノマーを重合することにより、中空部にゲルを充填させる方法が提供される。本発明において、モノマー (b) 溶液とは、内壁部が処理された中空繊維の中空部に充填し、ゲルを形成させるために使用する溶液を意味する。さらに、中空繊維の中空部が上記充填方法により充填された繊維の製造方法も提供される。このようにして得られた繊維は、キャピラリー電気泳動や DNA 等の分析用のマイクロアレイへの利用に適したものである。

本発明において、内壁処理の対象となる中空繊維又は多孔質中空繊維の代表例としては、ナイロン 6、ナイロン 6 6、芳香族ポリアミド等のポリアミド系の各種繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種繊維、ポリメタクリル酸メチル等のポリメタクリレート系の各種繊維、ポリビニルアルコール系の各種繊維、ポリ塩化ビニリデン系の各種繊維、ポリ塩化ビニル系繊維、ポリウレタン系の各種繊維、フェノール系繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系の各種繊維等が挙げられる。

ところで、キャピラリー電気泳動においては、キャピラリー外部より検出光を照射する必要がある。そこで、キャピラリー電気泳動用の中空繊維として使用する

には透明性の材料が好ましく、ポリメタクリル酸メチルで代表されるメタクリレート系樹脂を材料とする中空繊維或いはキャピラリー（以降中空繊維と総称する）を用いるのが好ましい。

用いられる多孔質中空繊維の構造は、繊維の外表面から内表面まで孔が連通した三次元網目構造、フィブリル状のものにより構成された連通した孔を有する構造、指型構造、独立気泡構造、又は一部が連通した気泡構造であるもの等を挙げることができる。

また、精密濾過、限外濾過を目的とした多孔質中空繊維、また、外表面に無孔性の均質膜を被覆した逆浸透膜、ガス分離膜、多孔質層の中間に無孔性な均質層を挟んだ膜等で処理された多孔質中空繊維も用いることができる。本発明の中空繊維は外径が 2mm 以下、好ましくは 1mm 以下、さらに好ましくは 0.05mm~0.5mm である。また、内径は 0.03mm 以上が好ましく、0.03 mm~0.08mm がさらに好ましい。キャピラリー電気泳動用の中空繊維については、比較的肉厚の厚い中空繊維が、取り扱いが容易である点で好ましい。また、DNA 等の分析用のマイクロアレイとして、本発明においてゲルが充填された繊維（ゲル充填繊維）を用いることが出来る。この場合は、ゲル充填繊維にプローブ DNA を固定し、多数本の繊維を配列して樹脂で固めて、繊維軸に直角にスライスして繊維配列体薄片（マイクロアレイ）を製造する。このような用途で使用するマイクロアレイには単位面積当たりの繊維の本数が多く存在することが必要であり、繊維の外径は細い方が好ましく、0.5mm 以下、更に好ましくは 0.05mm~0.3mm である。また、繊維配列法では配列の規則性を保つ必要がある。そこで、配列段階で繊維に張力を付与するため、弾性率の高い材料、例えば芳香族ポリアミドやメタクリル酸メチル等のメタクリル系樹脂を素材とする繊維を用いることが好ましい。

本発明は、中空部に充填するゲルと内壁部とを物理的又は化学的に結合させ、中空部に充填されるゲルを安定に固定化することを目的としている。従って、用いる中空繊維の内壁部が少なくとも多孔質を形成している場合は、内壁部は、内壁処理用のゲル形成性モノマー (a) 溶液が内壁表面から内部に容易に浸透できる構造のものが好ましい。また、中空繊維の内壁部が多孔質を形成しない場合は、内壁部は、該モノマー又はモノマー溶液が中空繊維を構成する素材をある程度膨

潤させ、その内壁部に浸透できる構造のものが好ましい。その後、該モノマーを重合させることにより、内壁部に固着したゲルの形成が達成される。

本発明のゲル充填繊維は、電気泳動又は DNA 等の分析を用途としているため、中空部に充填されるゲルとしては水との親和性の高いポリアクリルアミドを主成分とするゲルが用いられる。従って、内壁部処理用のゲル形成性モノマー (a) は、中空繊維素材及び中空部に充填されるゲルの両者に親和性のある両親媒性のモノマーが好ましい。

このようなモノマー (a) としては、(メタ) アクリルアミド系モノマー、又は (メタ) アクリレート系モノマー等が挙げられる。アクリルアミド系モノマーの例としては、N-メチル (メタ) アクリルアミド、N, N-ジメチル (メタ) アクリルアミド、N-エチル-N-メチル (メタ) アクリルアミド、N, N-ジエチル (メタ) アクリルアミド、N-n-プロピル (メタ) アクリルアミド、N-イソプロピル (メタ) アクリルアミド、N-t-ブチル (メタ) アクリルアミド、N-s-ブチル (メタ) アクリルアミド、N-n-ブチル (メタ) アクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピル (メタ) アクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピル (メタ) アクリルアミド、N-エチル-N-イソプロピル (メタ) アクリルアミド、N-エチル-N-n-プロピル (メタ) アクリルアミド、N, N-ジ-n-プロピル (メタ) アクリルアミド等が例示される。また、(メタ) アクリレート系モノマーの例としては、モノメチルアミノエチル (メタ) アクリレート、モノメチルアミノプロピル (メタ) アクリレート、ジメチルアミノエチル (メタ) アクリレート、ジメチルアミノプロピル (メタ) アクリレート、ジエチルアミノエチル (メタ) アクリレート、ジプロピルアミノエチル (メタ) アクリレート、ジイソプロピルアミノエチル (メタ) アクリレート、ジエチルアミノプロピル (メタ) アクリレート、ジプロピルアミノプロピル (メタ) アクリレート、ジイソプロピルアミノプロピル (メタ) アクリレート、メチルエチルアミノエチル (メタ) アクリレート、メチルエチルアミノプロピル (メタ) アクリレート、ヒドロキシメチル (メタ) アクリレート、2-ヒドロキシエチル (メタ) アクリレート、3-ヒドロキシプロピル (メタ) アクリレート等が挙げられる。これらのモノマーは、単独でも使用可能であるが、2種以上を混合して用いることもで

きる。また、必要に応じて後述の中空部に充填するゲルと化学的な結合を起こすことが可能な官能基を有するモノマーも併用することが出来る。このようなモノマーとしては、上記水酸基を有するモノマー以外に、カルボン酸基やエポキシ基を有す（メタ）アクリル酸やグリシジルメタクリレート、グラフト交叉剤であるメタクリル酸アリル等が例示される。

また、ゲル形成に必要な架橋剤としては、2官能性以上のアクリルアミド系モノマーが挙げられるが、N, N' -メチレンビスアクリルアミド、N, N' - (1, 2-ジヒドロキシエチレン) -ビスアクリルアミド、N, N' -ジアリルタルタルジアミド、N, N' -シスタミン-ビスアクリルアミド、又はN-アクリロイルトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等が好ましい。

また、これらモノマーは、通常、モノマー及び架橋剤を溶解し、かつ中空繊維の内壁部から内部へ浸透可能な液体であるメタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類、アセトン等の溶液として用いられる。

重合開始剤としては、使用する溶媒に溶解可能なアゾ系、過酸化物系、レドックス系等の開始剤を用いることができる。例えば、2, 2' -アゾビスイソブチロニトリル、2, 2' -アゾビス（2-メチルブチロニトリル）イソブチロニトリル、過酸化ベンゾイル、又は過酸化ベンゾイル-ジメチルアニリン系等が挙げられる。

内壁部の処理の程度は、モノマー溶液におけるモノマー濃度、あるいは架橋剤濃度等で変化する。モノマー濃度は80%以下の範囲が好ましく、さらに好ましくは1~50%の範囲が良い。また、架橋剤濃度は、モノマー濃度に対して0.5~50%が好ましく、さらに好ましくは1~30%の範囲である。

次に具体的な処理方法について説明する。

まず、内壁部の処理方法について説明する。中空繊維又は多孔質中空繊維の先端をモノマー及び架橋剤を含む溶液に浸漬して吸入し、該モノマー液体を中空繊維又は多孔質中空繊維の内壁及び/又は多孔質部に導入して重合することにより、内壁表面及び内壁の内部にゲルを形成する。

中空繊維又は多孔質中空繊維の内壁部を処理する際、モノマー(a)溶液を吸引により中空繊維内に充填し、内壁部に付着させた後、付着せずに中空部に残存し

たものを放出し、重合を行う。

次に、内壁処理で得られた中空繊維の中空部にゲル形成性モノマー (b) 溶液を充填する方法について説明する。充填するゲル形成性モノマー (b) 溶液は、アクリルアミドを主成分とするモノマー溶液を使用することができる。溶剤としてメタノール、エタノール等のアルコール、水などが使用される。ゲル形成性モノマー (b) 溶液に混合されるモノマーとしては、通常、アクリルアミドが使用されるが、これと共重合可能な前記 (メタ) アクリルアミド系、(メタ) アクリレート系等のモノマーが挙げられるがこれらに限定されるものではない。この場合、モノマー濃度としてはモノマー溶液全量に対して2 - 20%の範囲が好ましく、水溶液に架橋剤と重合開始剤を加えて重合される。中空繊維の中空部にモノマー溶液を充填する方法は真空吸引法が一般的であるがこれに限定されるものではない。

本発明においては、多孔質繊維、中空繊維又は多孔質中空繊維を用いる場合、好ましくは、図6に示すように、樹脂で固定した繊維配列体31と、樹脂で固定しない繊維部分(延長部分)32とを設け、この先端部分32を、生体関連物質を含む容器33に浸漬することにより、該液を各繊維の中空部又は多孔質部に導入することができる(なお、先端部分32は、連続面34を経て容器33に続いている。)

すなわち、樹脂で固定しない繊維部分32が樹脂で固定した繊維配列体31から伸びているので、当該繊維部分32を、生体関連物質を含む容器33に浸漬した後、浸漬部とは反対側(樹脂で固定した繊維側)から吸引すると、繊維配列体31内の繊維の中空部に生体関連物質が吸い上げられ、生体関連物質を導入することができる。

三次元配列体中の各繊維に固定化される生体関連物質の種類は、それぞれ異なる種類とすることが可能である。

生体関連物質を含む試料を繊維に作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～60℃が更に好ましい。処理時間は通常5分～24時間であり、1時間以上が好ましい。

## 7. 繊維配列体の薄片

本発明においては、上述の生体関連物質固定化繊維配列体、又は生体関連物質及び色素固定化ゲル保持繊維配列体を、繊維軸と交差する方向、好ましくは繊維軸に対して垂直方向に切断することにより、任意に配列された生体関連物質固定化中空繊維配列体断面を有する薄片を得ることができる。この際の切断方法としては、例えば、ミクロトームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みに関しては任意に調整することができるが、通常 1~5,000  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 10~2,000  $\mu\text{m}$  である。

このようにして得られた薄片は、例えば、蛍光顕微鏡で観察することにより、ゲルの変形、脱落等の形状を容易に観察することができる。

本発明では、前述のように繊維に張力を付与する工程が含まれるので、用いられる繊維としては弾性率の高い繊維が好ましく、例えばメチルメタクリレート系繊維、芳香族ポリアミド繊維などが好ましく用いられる。

得られた生体関連物質固定化中空繊維配列体断面あるいは生体関連物質固定化多孔質中空繊維配列体断面を有する薄片（生体関連物質配列薄片）には、該配列体を構成する中空繊維あるいは多孔質中空繊維の数に応じた生体関連物質が存在する。薄片の断面積当たりの生体関連物質の数に関しては、用いる中空繊維あるいは多孔質中空繊維の外径等を適宜選択することにより、薄片断面積  $1\text{cm}^2$  あたり 100 個以上の生体関連物質が固定化された薄片を作製することが可能であり、更には、薄片断面積  $1\text{cm}^2$  あたり 1000 個以上の生体関連物質が固定化された薄片を作製することも可能である。

また、同一配列体から得られる薄片の生体関連物質の位置配列はすべて同一であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の生体関連物質の位置配置がわかる。

繊維に固定化された生体関連物質が例えば核酸である場合、該薄片を、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、前記核酸をプローブとして検体中に存在する特定のポリヌクレオチドを検出することができる。

## 8. 座標付き繊維配列体薄片、各繊維単位座標の決定及び座標データを記録した

## 記録媒体

本発明は、繊維配列体薄片中に含まれる各繊維単位の位置が座標として決定されている繊維配列体薄片を提供する。なお、本発明においては、用語を以下のように定義する。すなわち、繊維配列体とは繊維の集束物をいう。繊維配列体薄片とは、繊維配列体を切断することにより得られる薄片をいう。繊維単位とは、切断後の繊維配列体薄片中の各繊維をいう。座標とは、繊維配列体薄片上の位置をX座標及びY座標によって表す数値をいう。

本発明の繊維配列体薄片は、繊維を集束し、接着・固定化した繊維配列体を切断することにより製造することができる。本発明に用いられる繊維は、該繊維由来の繊維単位を含む繊維配列体薄片が使用目的に応じて何らかの機能（例えば、特定の物質を検出する機能）を果たすような役目を担うものであり、該目的を達成するために、各繊維には、染料、化学的に活性な官能基、リガンド、核酸や蛋白質（例えば抗体）のような化学物質を結合又は担持（以下結合及び担持をまとめて、固定という）させたり、また電氣的、磁氣的な物理的相互作用を及ぼす電荷等を固定させることができる。

以下、本発明の好ましい実施態様の一つとして、各繊維単位の位置が座標として決定されている、生体関連物質固定化繊維配列体薄片について詳しく説明する。

繊維配列体から切り出された薄片中の各繊維単位は、繊維配列体製造過程における各繊維基本単位の捩れや曲がり等により、各薄片間において互いに少しずつズレを生じ得る。該繊維配列体薄片を使用してサンプル中の生体関連物質の種類や量を分析する場合には、繊維配列体薄片中の各繊維単位を機械的に認識・検出するため、薄片上における各繊維単位の位置が予め決定されていることが所望される。このような同一の繊維配列体から得られた薄片間の繊維単位位置のズレは、繊維の連続的な蛇行により生じる場合が殆どである。そこで、以下のように各薄片中の2つの異なる位置に座標基準を設定し、該座標基準に基づくことにより、各薄片上の全ての繊維単位の座標を決定することができる。

### (1) 座標基準

座標基準は、繊維配列体の繊維軸方向に連続した目印であり且つ該目印から設定される座標の誤差が小さいものであれば、限定されず、様々なタイプのものを

用いることができる。具体的には、繊維配列体薄片中に存在する任意の繊維単位、繊維配列体側面にマジックインキ等を用いて書かれた線、繊維配列体側面に刃物等を用いて刻み込まれた溝等を座標基準として採用することができる。これらの座標基準は、一枚の繊維配列体薄片上に、1000 繊維単位当たり 2～10 個、最も好ましくは一枚の繊維配列体薄片上に 2 個設けることができる。

例えば、座標基準として繊維配列体薄片中に存在する繊維単位を用いる場合には、顕微鏡下で光と良く反応しその所在が容易に解る染料（例えば蛍光染料など）で染色した繊維（以下、マーカー繊維という）を、繊維配列体薄片の製造時に、繊維配列体中に予め含ませることによって、マーカー繊維単位入り繊維配列体薄片を製造することができる。

## (2) 各繊維単位座標の決定

繊維配列体薄片中の各繊維単位の座標は以下のようにして決定することができる。すなわち、まず上記 7 において切り出された薄片を切り出された順番に付番して  $S(1)$ 、 $S(2)$ 、…、 $S(h)$ 、…、 $S(m)$  とする。この薄片の任意の薄片を選びそれを  $S(h)$  とする。まずこの  $S(h)$  に含まれる  $n$  個の繊維の薄片に於ける座標を決定する。個々の座標の決定法は後に詳述するが、 $n$  個の生体関連物質を固定化した繊維が薄片にあるとすれば、個々の生体関連物質とハイブリダイゼーション反応等を起こす複数の何らかの標識体を付加した生体関連物質を用いて決定することができる。その場合の座標は薄片内に存在する座標基準を用いることが必要であり、薄片内に含まれる  $n$  個の繊維の座標はこの基準座標で規定される。一旦、 $S(h)$  の座標が決定されれば、それを基にその薄片に位置的に近い次の薄片  $S(i)$  に於ける  $n$  個の繊維の座標が、同様に薄片  $S(i)$  内の基準座標を基に決定される。決定法は後述するが既に決定されている  $S(h)$  薄片中の  $n$  個の繊維の座標データを用いる。この場合  $S(i)$  は  $S(h)$  に最近接、すなわちその両隣の薄片であることが好ましいことは上記説明から明らかであろう。同様にして  $S(i)$  に近い薄片  $S(j)$  の座標が、 $S(j)$  内に設けられた座標基準を基に、 $S(i)$  薄片に含まれる  $n$  個の座標データを基に決められる。このようにして、得られた薄片  $m$  個の全ての座標を決定することができる。

さて、繊維配列体の繊維軸方向に2つの連続した座標基準となる目印を有する繊維配列体から、説明を簡単にするために連続して2枚の薄片を切り出した場合について考える。

また、各薄片中の繊維単位は有限の面積を有するが、その中心部を代表して点として考える。最初に切り出した薄片内の座標基準を基に、最初に切り出した薄片中の全ての繊維単位ごとの2次元座標を決定する。座標の読み取りは、XY座標が読み取り可能なXYステージ付き投影顕微鏡等で読み取ることができる。座標の決定は、最初に切り出した薄片内の2つの座標基準をP1, P2とおき、それぞれXYステージ付き投影顕微鏡で読み取った座標を(P1X, P1Y), (P2X, P2Y)とし、最初に切り出した薄片中の任意の繊維単位をA1とおき、同じようにXYステージ付き投影顕微鏡で読み取った座標を(A1X, A1Y)とすれば、薄片内のP1, P2を基準とした座標系における、A1繊維単位の座標(B1X, B1Y)は、次式(1)及び(2)：

式(1)

$$\begin{pmatrix} B1X \\ B1Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(-\theta 1) & -\sin(-\theta 1) \\ \sin(-\theta 1) & \cos(-\theta 1) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A1X - P1X \\ A1Y - P1Y \end{pmatrix}$$

式(2)

$$\theta 1 = \tan^{-1} \left( \frac{P2Y - P1Y}{P2X - P1X} \right)$$

から求めることができる。

ここで、XYステージ付き投影顕微鏡で読み取る任意の繊維単位の座標は、繊維単位断面の重心位置が望ましい。

同じように、最初に切り出した薄片中の全ての繊維単位の座標をXY付き投影顕微鏡で読み取れば、薄片内のP1, P2を基準とした座標系における、全ての繊維単位の座標を得ることができる。

2番目に切り出した薄片については、薄片を薄く切り出せば、切り出された薄片内の座標基準を基にした座標系では、最初に切り出した薄片と2番目に切り出した薄片の薄片中の同じ繊維単位の2次元座標は近接した値となるので、2番目に切り出した薄片中の繊維単位の中から、容易に、最初に切り出した薄片中と同

じ繊維単位を見つけだし、2番目に切り出した薄片内の座標基準を基にした座標系における、その繊維単位の2次元座標を決定できる。例えば、最初に切り出した薄片内の座標基準を基にした任意の繊維単位A1の座標を(B1X, B1Y)とする。また、2番目に切り出した薄片内の2つの座標基準をP3, P4とし、XYステージ付き投影顕微鏡で読み取った座標をP3については(P3X, P3Y)、P4については(P4X, P4Y)とすれば、最初に切り出した薄片中の任意の繊維単位A1に対応する、2番目に切り出した薄片中の繊維単位(A1と同じ繊維単位)のXYステージ付き投影顕微鏡上での座標(C1X, C1Y)は、もしマーカ繊維単位と繊維単位A1が1番目の薄片と2番目の薄片で平行に移動していたとすれば、次式(3)及び(4)：

式(3)

$$\begin{pmatrix} C1X \\ C1Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\theta 2) & -\sin(\theta 2) \\ \sin(\theta 2) & \cos(\theta 2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B1X \\ B1Y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} P3X \\ P3Y \end{pmatrix}$$

式(4)

$$\theta 2 = \tan^{-1} \left( \frac{P4Y - P3Y}{P4X - P3X} \right)$$

のように表される。そして、XYステージ付き投影顕微鏡のXY座標を(C1X, C1Y)に合わせれば、その近傍に、最初に切り出された薄片中の繊維単位A1に対応する、2番目に切り出された薄片中の繊維単位を容易に見つけることができる。このように見つけた2番目の薄片に於けるA1繊維単位の正確な座標をXYステージ上でその座標(A2X, A2Y)を求め、先述の1番目の薄片で求めたと同様に、前記(1), (2)式を用いて2番目の薄片の座標基準P3, P4の座標を基にその座標(B2X, B2Y)が決定される。同様の操作で、2番目の薄片に含まれる全ての繊維単位の座標が、1番目に含まれる繊維単位の座標データを基に決定される。また別の方法として、2番目の薄片の任意の繊維単位の座標を2番目の薄片内の座標基準を基に、前記(1), (2)式を用いて決定し、この2番目の薄片の任意の繊維単位の座標と1番目の薄片内の座標基準を基に決定された1番目の薄片中の繊維単位の座標で最も近い物とを同じ繊維単位として決定することもできる。

同じように、3番目に切り出した薄片内の座標基準と2番目に切り出した薄片内の座標基準を基にして、2番目に切り出した薄片中の繊維単位の2次元座標を求める。得られる2次元座標から、2番目に切り出された薄片中の全ての繊維単位に対応する（すなわち、最初に切り出された薄片中の全ての繊維単位に対応する）、3番目に切り出された薄片中の全ての繊維単位の2次元座標を、3番目に切り出された薄片内の座標基準を基にして決定できる。以下、同じように繰り返せば、繊維配列体が振れたり、あるいは、繊維配列体内の繊維が曲がったり、絡まった場合でも、繊維配列体から切り出される薄片内の座標基準を基にした、繊維配列体から切り出される薄片中の全ての繊維単位の2次元座標を決定することができる。よって、最初に切り出した薄片中の繊維単位を特定すれば、繊維配列体から切り出された全ての薄片中の繊維単位の特定と繊維配列体から切り出された薄片内の座標基準を基にした、繊維配列体から切り出された薄片中の全ての繊維単位ごとの2次元座標が決定できる。

上述の説明は隣り合う薄片について、前の薄片の座標データを、後の薄片の座標の決定に用いる2つ方法を説明したが、必ずしも隣接した薄片の座標データを用いる必要はない。特に繊維束中の配列が比較的良好な場合、数個置きの薄片で座標を上記手法で決定し、その間の薄片については、既に座標が決められた2枚の薄片の座標データから内挿法でその座標を求めることも可能である。

(3) 繊維配列体薄片中の各繊維単位の座標データを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体

前記において決定された各繊維配列体薄片中の繊維単位の座標データは、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録して利用することができる。具体的には、座標データとしては、繊維配列体薄片ごとに座標基準に基づいて決定した座標を表にしたものが挙げられる。また用いることができる記録媒体としては、磁気ディスク、フロッピーディスク、磁気テープ、CD-ROM、ICカード、RAMなどが挙げられる。これらの座標データは、繊維配列体薄片の測定前に、検出器に連動するコンピュータに登録しておくことにより、どの繊維単位がどの生体関連物質プローブに対応するかを自動的に認識させることができる。

## 9. 繊維配列体薄片及び繊維単位座標データ記録媒体セット

本発明においては、前記7において得られた繊維配列体薄片、及び該繊維配列体薄片中の各繊維単位の座標データを記録した前記8において得られた記録媒体を含む生体関連物質検出用繊維配列体薄片セットを作製することができる。例えば、100枚の大腸菌遺伝子型解析用核酸繊維配列体薄片と、該繊維配列体薄片の個々の薄片中の各繊維単位の位置の座標が表になって記録されている磁気ディスクとを1セットとする、大腸菌遺伝子型解析用繊維配列体薄片セットを提供することができる。

## 10. ハイブリダイゼーション及び検体の検出

本発明の薄片は、固定化された生体関連物質をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の物質（生体関連物質と相互作用する物質）の検出に用いることができる。

本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在する蛋白質や低分子化合物等の検体試料側生体関連物質と特異的に結合することができる固定側生体関連物質を指す。また、本発明で言うプローブとは、狭義には検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸を指す。即ち、本発明の薄片を検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。

固定化された核酸とハイブリッドを形成する核酸や、固定化された核酸と特異的に結合する各種生体成分の検出には、公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の生体関連物質に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

上記のごとき手段によりハイブリッドを完成させた薄片は、蛍光顕微鏡で検出できる。

従って、本発明の薄片の利用法としては、固定化された核酸（プローブ）とハ

ハイブリッドを形成する核酸を検出するための利用に限定されず、固定化された核酸と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料（例えば生体成分等）を検出するために利用することも可能である。

本発明におけるプローブ含有物の種類、形態は、本発明の方法が適用されるものであれば特に制限されるものではない。本発明における生体関連物質プローブとは、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ペプチド核酸、タンパク質（酵素、抗体等）、抗原、多糖類等が挙げられる。

ここで、本発明においてプローブと検体とのハイブリッドの形成は、自由拡散によるよりも、物理的又は化学的な処理を施すことを行うことが好ましい。例えば、検体が電荷を有していれば、電圧をかけて検体とプローブとのハイブリダイズを効率良く行わせることができる。また、薄片の一方の面（表又は裏面）に吸水性物質（例えばろ紙、スポンジ、吸水性樹脂等）を接触させておくと、他方の面から吸水性物質に向かって水が移動するため、ハイブリッドの形成を容易にすることができる、特に薄片を構成する繊維が中空繊維の場合は、より効率的である。

本発明において、検体とプローブとのハイブリダイゼーションを行う際、本発明の薄片（生体関連物質チップともいう）の両面に電圧をかける場合には、例えば、サブマリン型泳動槽（図7）又はプロットング装置（図8）等を使用することが可能である。但し、装置はこれらに限定されるものではない。検体は、濾紙やメンブレンに吸着させたり、アクリルアミドやアガロースのような高分子ポリマーに包括させ、生体関連物質チップに密着させる。次に電圧を一定時間かけた後、ハイブリダイズした場所を検出器で特定する。また、生体関連物質チップの片面に吸水性物質を配置することにより、対面に配置した検体を該チップ中に移動させ結合反応を行う際、該吸水性物質はスポンジ、紙等を用いることができる。

以下に細胞由来の全 RNA の検出を例として具体的に説明する。

#### (1) 細胞からの全 RNA の調製

細胞からの全 RNA の調製は、常法 [例えば Sambrook, J et al., Molecular

Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) を参照のこと]に従って行うことができる。また、市販のキット（例えば RNeasy Total RNA KIT (Quiagen 社製)）を用いても行うことができる。

上記において得られた全 RNA は、蛍光物質、放射性物質などで検出可能なように標識する。蛍光標識の場合、蛍光物質として例えば、フルオレセン (FITC)、スルホローダミン (TR)、テトラメチルローダミン (TRITC) などを用いることができる。

### (2) ハイブリダイゼーション

上記 7 において作製した繊維配列体薄片に、上記のように調製した標識全 RNA をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの条件は、繊維配列体薄片上の固定化プローブの種類等により最適化する必要がある。すなわち、繊維配列体薄片上のプローブが相同性の高い塩基配列とのみハイブリダイズする条件を設定する必要がある。例えば、ハイブリダーゼーションを、繊維配列体薄片の標識全 RNA 溶液への浸漬により行う場合、ハイブリダーゼーション及び洗浄における溶液の塩濃度（例えば NaCl、クエン酸 3 ナトリウムの濃度など）、温度、時間などをプローブが相同性の高い塩基配列とのみハイブリダイズするように設定する。ここで、塩濃度が低いほどまた温度が高いほど、相同性の高いハイブリッド形成を促進することができる。

### (3) 検出

ハイブリダーゼーションにより、繊維配列体薄片上に形成された二重鎖は、RI 又は蛍光イメージスキャナーで解析する。このとき、繊維配列体薄片上の各繊維単位の位置は、上記 8 において得られた各繊維単位の座標データに基づいて認識する。繊維配列体薄片上の蛍光強度は、蛍光レーザー顕微鏡と CCD カメラ及びコンピュータを連結した装置で自動的に測定することができる。スキャナーは、各繊維単位の直径が約 10~500  $\mu\text{m}$  で、スポット間の距離が約 10~1000  $\mu\text{m}$  程度のスポットを定量的に識別できるものが好ましい。さらに、複数種の標識に対応できること、広範囲を高速でスキャンできること、基板のミクロな歪みに対応可能なオートフォーカス機能を有するものであることが好ましい。このような機能を備えたスキャナーとしては、例えば GMS 418 Array Reader (Micro Systems 社

(GMS 社) 製) などが挙げられる。また、データの解析に用いるソフトは、変異や多型の解析のように、部分的に重複した配列のオリゴヌクレオチドが多数含まれる複雑な解析にも対応できるものが好ましい。

#### 図面の簡単な説明

図 1 A～F は核酸固定化繊維（中空繊維、多孔質繊維、多孔質中空繊維、ゲル保持中空繊維、ゲル保持多孔質繊維、ゲル保持多孔質中空繊維）を示す模式図である。

図 2 は、2 種の核酸固定化繊維からなる核酸固定化繊維配列体を示す模式図である。

図 3 は、核酸固定化繊維配列体の薄片を示す模式図である。核酸固定化繊維配列体を繊維軸に対して垂直方向に切断した断面を示す。

図 4 は、治具として多孔板を用いた場合の繊維配列体を製造する方法を示す模式図である。

図 5 は、治具として網目を構成する支持線群を用いた場合の繊維配列体を製造する方法を示す模式図である。

図 6 は、中空繊維配列体の内部に生体関連物質を導入する工程の模式図である。

図 7 は、サブマリン型泳動槽を示す図である。

図 8 は、プロットング装置を示す図である。

図 9 は、プローブ作製のために合成したオリゴヌクレオチドの位置を示す図である。

#### 符号の説明

- 1 1 . . . . . 多孔板
- 1 2 . . . . . 中空繊維
- 2 1 . . . . . 支持線群
- 2 2 . . . . . 中空繊維
- 3 1 . . . . . 中空繊維配列体（樹脂で固定）
- 3 2 . . . . . 樹脂で固定されていない中空繊維
- 3 3 . . . . . 生体関連物質入り容器

## 3 4 . . . . . 連続面

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例によって更に具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

## 参考例 1

中空繊維の前処理 (1) :

ナイロン製中空繊維 (外径約 300  $\mu$ m) 約 1 m の中空部に、室温の蟻酸 (純度 99%) 0.1 ml を注入し、10 秒間保持した。次に、中空部に室温の水を多量に注入して十分洗浄後、乾燥して、ナイロン製中空繊維の前処理を行った。

## 参考例 2

中空繊維の前処理 (2) :

蟻酸 (純度 99%) の代わりに、硫酸の 10% エタノール溶液を用いた以外は、実施例 1 と同様にナイロン製中空繊維の前処理を行った。

## 参考例 3

5' 末端にアミノ基又はビオチンを有するオリゴヌクレオチドの調製:

以下に示したオリゴヌクレオチド (プローブ A、プローブ B) を合成した。

プローブ A : GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号 1)

プローブ B : GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号 2)

オリゴヌクレオチドの合成は PE バイオシステムズ社の自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model 394) を用いて行い、DNA 合成の最終ステップでアミノリンク II (商標名) (アプライドバイオシステム社) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$  を導入しアミノ化したプローブ及びビオチンアミダイドを用いてビオチン化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により、脱保護及び精製して使用した。

## 実施例 1

### 核酸固定化中空繊維の作製 (1) :

参考例 1 及び参考例 2 で前処理したナイロン製中空繊維に対し、参考例 3 において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (プローブ A 及びプローブ B) をそれぞれ、以下の方法により中空繊維内部に固定化した。

10 mM リン酸カリウム溶液 (pH8) 緩衝液に、参考例 3 において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (0.1~30 mM) を加えた溶液を、参考例 1 及び実施例 2 で前処理したナイロン製中空繊維に注入した後、20℃で終夜反応を行った。反応後、10 mM リン酸カリウム溶液 (pH8) 緩衝液、1M リン酸カリウム溶液 (pH8) 緩衝液、1M KCl 溶液、水で、中空繊維を洗浄し、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維を得た (図 1 A)。図 1 A において、(1) はプローブ A が固定された中空繊維、(2) はプローブ B が固定された中空繊維を表す。また、図 2 の繊維束のうち白丸 (○) で表示した繊維はプローブ A が固定化されたものを、黒丸 (●) で表示した繊維はプローブ B が固定されたものを表す。

### 実施例 2

#### 核酸固定化中空繊維の作製 (2) :

参考例 1 及び参考例 2 で前処理したナイロン製中空繊維に対し、参考例 3 において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (プローブ A 及びプローブ B) をそれぞれ、以下の方法により中空繊維内部に固定化した。

参考例 3 において作製したにアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの溶液 (核酸濃度 10  $\mu$ g/ml、溶媒として 0.1M  $MgCl_2$  を含むリン酸緩衝液-生理食塩水を使用) の 2500  $\mu$ l と、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) の 0.06g とを混合した溶液を、参考例 1 及び参考例 2 で前処理したナイロン中空繊維に注入した。その後、1/15 mol/l リン酸塩緩衝液 (pH8.0) で洗浄し、同緩衝液 5 ml に浸した。これに、EDC の 0.12g を加え、室温で 3 時間振とうした後、1/15 mol/l リン酸塩緩衝液 (pH8.0) で更に洗浄し、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維を得た。

### 実施例 3

核酸固定化繊維配列体の作製：

実施例 1 で得たプローブ A が固定化されたナイロン繊維（参考例 1 の前処理を行ったもの、長さ 20cm）20 本を、テフロン板上に互いに重なることなく且つ密着させて配列し、両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業（株）コロネート 4403、ニッポラン 4223）を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブ A が固定化された繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブ B が固定化された繊維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図 2 の配列となるように 20 枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々 20 本ずつ、計 400 本の繊維が規則的に正方形に配列した核酸固定化繊維配列体を得た。

参考例 2 により表面処理を行った繊維それぞれに対しても同様の操作により核酸固定化繊維配列体を得た。

さらに、実施例 2 で得られた核酸固定化繊維についても、上記と同様にして核酸固定化繊維配列体を得た。

### 実施例 4

核酸固定化繊維配列体の作製：

実施例 1 で得たプローブ A が固定化された表面処理の異なる 2 種のナイロン中空繊維（長さ 20cm）20 本を、それぞれテフロン板上に互いに重なることなく且つ密着させて配列し、両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業（株）コロネート 4403、ニッポラン 4223）を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がしプローブ A が固定化された繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブ B が固定化された繊維についても同様の操作を行った。

次いで、表面処理の同じ繊維同士について、プローブ A が固定化された繊維からなるシート状物、プローブ B が固定化された繊維からなるシート状物、及び繊維配列体の一行を構成する繊維のうち一部をプローブ B が固定化された繊維、残

りの一部をプローブAが固定化された繊維としたシート状物を作製した。これらのシート状物を図2に示すように20枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々20本ずつ、計400本の繊維が規則的に正方に配列した2種の核酸固定化繊維配列体を得た(図3)。

さらに、実施例2及び3で得られた核酸固定化中空繊維についても、上記と同様にして4種の核酸固定化中空繊維配列体を得た。

#### 実施例5

核酸固定化繊維配列体の薄片の作製:

実施例4で得られた核酸固定化繊維配列体を、繊維軸に直角方向にマイクロトームを用いて100 $\mu$ mの厚さに切り出すことにより、縦横各々20本、計400本の繊維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化繊維配列体の薄片を得た(図3)。

#### 参考例4

試料核酸の標識:

試料核酸のモデルとして、参考例3で合成したオリゴヌクレオチド(プローブA、プローブB)の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド(C、D)を合成した。

オリゴヌクレオチドC: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (配列番号3)

オリゴヌクレオチドD: CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (配列番号4)

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端を、参考例3と同様にしてアミノリンクII(商標名)(PEバイオシステムズジャパン社)を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン(DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で標識した。

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に終濃度2mMになるように溶かした。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg/mlジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。

上記溶液の量を 100  $\mu$ l に調整し、2  $\mu$ l のグリコーゲン（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）、10  $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)、300  $\mu$ l の冷エタノールを加え、15,000rpm 15 分の遠心により沈殿を回収した。沈殿に 500  $\mu$ l の 70%エタノールを加え 15,000rpm 5 分の遠心により沈殿を再びチューブの底に集めた。沈殿を風乾し、100  $\mu$ l の 10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA に溶かした。

こうして得られた DIG 標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

#### 実施例 6 核酸固定化ゲル保持中空繊維の作製 (1) :

参考例 3 で得られた 5' 末端にビオチン基を有するオリゴヌクレオチドを含む、以下の組成からなる水溶液を作製した。

アクリルアミド	3.7 重量部
メチレンビスアクリルアミド	0.3 重量部
2,2'-アゾビス (2-アミノプロパン) 二塩酸塩	0.1 重量部
ビオチン化オリゴヌクレオチド (プローブ A またはプローブ B)	0.005 重量部
アビジン化アガロース (6%) 懸濁液	1.0 重量部

本溶液を、参考例 1 及び参考例 2 で前処理したナイロン製中空繊維 (外径 300 ミクロン) の中空部に注入した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80  $^{\circ}$ C にて 4 時間放置することにより重合反応を行った。

その結果、オリゴヌクレオチド (プローブ A またはプローブ B) がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたゲルを内部に保持する中空繊維が得られた (図 1 B)。

図 1 B において、(1) はプローブ A が固定されたゲルを保持する中空繊維、(2) はプローブ B が固定されたゲルを保持する中空繊維を表す。また、(3) 及び (4) の繊維束のうち白丸 (○) で表示した繊維はプローブ A が固定化されたものを、黒丸 (●) で表示した繊維はプローブ B が固定されたものを表す。

#### 実施例 7

核酸固定化ゲル保持中空繊維の作製 (2) :

ナイロン製中空繊維の代わりに、表面を親水化処理したポリエチレン製中空繊維（外径約 300  $\mu\text{m}$ 、ポリエチレンービニルアルコール共重合体で表面を被覆）を用いて、実施例 1 と同様の方法により、核酸固定化ゲル保持中空繊維を得た。

#### 実施例 8

核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体の作製：

実施例 6 で得たプローブ A 固定化ゲルを保持するナイロン中空繊維（参考例 1 の表面処理を行ったもの、長さ 20cm）20 本を、テフロン板上に互いに重なることなく且つ密着させて配列し、両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業（株）コロネート 4403、ニッポラン 4223）を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブ A 固定化ゲルを保持する中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブ B 固定化ゲルを保持する中空繊維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図 2 の配列となるように 20 枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々 20 本ずつ、計 400 本の繊維が規則的に正方に配列した核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を得た。

参考例 2 により表面処理を行った繊維に対しても同様の操作により核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を得た。

さらに、実施例 7 で得られた核酸固定化ゲル保持中空繊維についても、上記と同様にして核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 9

核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体の薄片の作製：

実施例 8 で得られた核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を、繊維軸に直角方向にマイクロトームを用いて 100  $\mu\text{m}$  の厚さに切り出すことにより、縦横各々 20 本、計 400 本の繊維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体の薄片を得た（図 3）。

#### 実施例 10 核酸固定化ゲル保持繊維の作製

参考例 3 で得られた 5' 末端にビオチン基を有するオリゴヌクレオチドを含む、以下の組成からなる水溶液を作製した。

アクリルアミド	3.7 重量部
メチレンビスアクリルアミド	0.3 重量部
2, 2'-アゾビス (2-アミノプロパン) 二塩酸塩	0.1 重量部
ビオチン化オリゴヌクレオチド (プローブ A または プローブ B)	0.005 重量部
アビジン化アガロース (6%) 懸濁液	1.0 重量部

本溶液に 25tex の紡績糸 2 本を合糸した綿糸 (あらかじめメチルエチルケトンで洗浄後、乾燥) を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃にて 4 時間放置することにより重合反応を行った。

その結果、オリゴヌクレオチド (プローブ A または プローブ B) がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたゲルを保持した繊維が得られた。(図 1 C) 図 1 C において、(1) はプローブ A を固定化した核酸固定化ゲル保持繊維を、(2) はプローブ B を固定化した核酸固定化ゲル保持繊維を示す。

#### 実施例 11 核酸固定化ゲル保持繊維配列体の作製

実施例 10 で得たプローブ A が固定化されたゲルを保持する繊維 20 本を、テフロン板状に互いに重なることなく、且つ密着させて配列し両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業 (株) コロネート 4403、ニッポラン 4223) を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブ A が固定化された核酸固定化ゲル保持繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブ B が固定化された核酸固定化ゲル保持繊維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図 2 の配列となるように 20 枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々 20 本ずつ、計 400 本の繊維が規則的に正方に配列した核酸固定化繊維配列体を得た。

#### 実施例 12

核酸固定化ゲル保持繊維配列体の薄片の作製：

実施例 11 で得られた核酸固定化ゲル保持繊維配列体を、繊維軸に直角方向にマイクロトームを用いて 100  $\mu\text{m}$  の厚さに切り出すことにより、縦横各々 20 本、計 400 本の繊維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化ゲル保持繊維配列体の薄片を得た (図 3)。

#### 実施例 13

表面が親水化処理された市販のナイロン製多孔質中空糸膜 (中空糸外径約 0.6mm) を、参考例 3 により合成したオリゴヌクレオチド (プローブ A または B ; ただし最終段階でアミノ基の導入をしていないもの) の水溶液 (核酸濃度 10mg/l) に浸漬し、空气中で乾燥後 80°C で 1 時間ベーキングを行い、オリゴヌクレオチド (プローブ A または B) が固定化された多孔質ナイロン中空糸膜を得た (図 1 D)。図 1 D において、(1) はプローブ A が固定化された多孔質ナイロン中空糸を、(2) はプローブ B が固定化された多孔質ナイロン中空糸を示す。

#### 実施例 14

参考例 3 により得た 5' 末端にアミノ基を有する 25ml のオリゴヌクレオチド (プローブ A または B) の溶液 (核酸濃度 10mg/l, 溶媒として 0.1mol/l 塩化マグネシウムを含むリン酸緩衝液 (pH=8.0) を使用) と、0.6g 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、0.05g の実施例 1 で用いたナイロン製多孔質中空糸膜を 5ml の水に浸漬したものを混合し、室温で 10 分間放置した。

これを 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH=8.0) で洗浄後、同緩衝液 50ml に浸した。これに、1.2g の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを加え室温で 3 時間浸透した後、50mmol/l リン酸緩衝液 (pH=8.0) で洗浄し、オリゴヌクレオチド (プローブ A または B) が固定化された多孔質ナイロン中空糸膜を得た (図 1 D)。図 1 D において、(1) はプローブ A を多孔質部に固定化した核酸固定化多孔質中空繊維を、(2) はプローブ B を多孔質部に固定化した核酸固定化多孔質中空繊維を示す。

## 実施例 15

2ml の N,N-ジメチルホルムアミドに 1g の臭化シアンを溶解した。これを長さ約 20cm の多孔質セルロース繊維 5g を含む水溶液に添加し、pH が 10.5~11.5 に維持されるように 5mol/l の水酸化ナトリウム水溶液を添加しながら、15~20℃ で 10~20 分間放置した。反応後、約 15 倍量の冷水で洗浄し、最後に 10mmol/l のリン酸緩衝液 (pH=8.0) で洗浄した。

得られた多孔質セルロース繊維を含む 10mmol/l リン酸緩衝液に、参考例 3 で調整したアミノ基を有するオリゴヌクレオチド (プローブ A または B) (0.1~30mmol/l) を加え、20℃ で終夜放置し反応させた。反応終了後、10mmol/l リン酸緩衝液 (pH=8.0)、1mmol/l のリン酸緩衝液 (pH=8.0)、1mol/l 塩化カリウム水溶液、水で順次洗浄し、オリゴヌクレオチド (プローブ A または B) が固定化された多孔質セルロース繊維を得た (図 1 D (3) 及び (4))。図 1 D において、(3) はプローブ A を多孔質部に固定化した核酸固定化多孔質繊維を、(4) はプローブ B を多孔質部に固定化した核酸固定化多孔質繊維を示す。

## 実施例 16

実施例 13 により得た、プローブ A が固定化された多孔質中空繊維 20 本を、テフロン板上に互いに重なることなく密着させて配列し両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業 (株) コロネート 4403, ニッポラン 4223) を薄く塗布し、核酸固定化多孔質繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後これをテフロン板上から剥がし、核酸固定化多孔質繊維が一行に配列したシート状物を得た。

プローブ B が固定化された核酸固定化多孔質中空繊維についても、プローブ A のときと同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図 2 の配列となるように 20 枚積層し、ポリウレタン樹脂接着剤で接着し、縦横各々 20 本ずつ、計 400 本の繊維が規則的に正方に配列した核酸固定化多孔質繊維配列体を得た。

さらに、実施例 14 及び 15 で得られた多孔質繊維についても上記と同様の操作を行い、核酸固定化多孔質繊維配列体を得た (図 2)。

### 実施例 17

実施例 16 で得た 2 種のオリゴヌクレオチドを含む核酸固定化多孔質繊維配列体を、ミクロトームを用いて 0.1mm の厚さに切り出し、縦横各 20 本ずつ計 400 本の核酸固定化多孔質繊維の断面が規則的に配列した薄片を得た (図 3)。薄片には 1 cm<sup>2</sup>あたり約 220 となる密度で核酸が固定化されていた。

### 実施例 18 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の作製

参考例 3 で得られた 5' 末端にビオチン基を有するオリゴヌクレオチドを含む、以下の組成からなる水溶液を作製した。

アクリルアミド	3.7 重量部
メチレンビスアクリルアミド	0.3 重量部
2, 2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩	0.1 重量部
ビオチン化オリゴヌクレオチド (プローブ A または プローブ B)	0.005 重量部
アビジン化アガロース (6%) 懸濁液	1.0 重量部

本溶液にポリエチレン製多孔質繊維 (外径 200 μm) を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃にて 4 時間放置することにより重合反応を行った。

その結果、オリゴヌクレオチド (プローブ A または プローブ B) がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたゲルを多孔質繊維の空隙部分に保持した繊維が得られた (図 1E)。図 1E において、(1) はプローブ A を多孔質部に固定化した核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を、(2) はプローブ B を多孔質部に固定化した核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を示す。

### 実施例 19 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の作製

実施例 18 で得たプローブ A または プローブ B が固定化されたゲルを保持する多孔質繊維 20 本を、テフロン板状に互いに重なることなく、且つ密着させて配列し両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業

(株)コロネート 4403、ニッポラン 4223)を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブAが固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブBが固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図2の配列となるように20枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々20本ずつ、計400本の繊維が規則的に正方に配列した核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を得た。

#### 実施例 20

核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の薄片の作製：

実施例 19 で得られた核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を、繊維軸に直角方向にミクロトームを用いて 100  $\mu\text{m}$  の厚さに切り出すことにより、縦横各々20本、計400本の繊維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の薄片を得た(図3)。

#### 実施例 21

以下の組成からなる水溶液Aを調整し、この水溶液Aに無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF200TL(三菱レイヨン株式会社製、外径 290  $\mu\text{m}$ 、内径 200  $\mu\text{m}$ )を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃で4時間放置することにより重合反応を行った。

得られた多孔質中空糸膜の中空部及び無孔質な中間層よりも内側の多孔質層にはオリゴヌクレオチド(プローブAまたはプローブB)がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたゲルが保持されていた(図1F)。図1Fにおいて、(1)はプローブAがゲルに固定化された核酸固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維を、(2)はプローブBがゲルに固定化された核酸固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維を示す。

水溶液A

アクリルアミド	3.7	質量部
メチレンビスアクリルアミド	0.3	質量部

2, 2'-アゾビス (2-アミノプロパン) 二塩酸塩	0.1	質量部
ビオチン化オリゴヌクレオチド (プローブAまたはプローブB)	0.005	質量部
アビジン化アガロース (6%) 懸濁液	1.0	質量部

## 実施例 22

実施例 21 により得たプローブ A 固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維 20 本を、テフロン板上に互いに重なることなく密着させて配列し両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業 (株) コロネート 4403, ニッポラン 4223) を薄く塗布し、核酸固定化多孔質中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後これをテフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。

一方、プローブ B 固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維についても同様の操作によりシート状物を得た。

次いで、これらのシート状物を図 2 の配列となるように 20 枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々 20 本ずつ、計 400 本の核酸固定化多孔質繊維が正方形に規則的に配列した、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を得た (図 3)。

## 実施例 23

実施例 22 で得た 2 種のオリゴヌクレオチド (プローブ A 及び B) を含む核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を、マイクロームを用いて 0.1mm の厚さに切り出し、縦横各 20 本ずつ計 400 本の核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維の断面が規則的に配列した薄片を得た (図 3)。この薄片には  $1\text{ cm}^2$  あたり約 1100 となる密度で核酸が固定化されていた。

## 実施例 24 多孔質中空繊維の作製

以下の組成からなる水溶液 A を調整し、この水溶液 A に無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF200TL (三菱レイヨン株式会社製, 外径 290

$\mu\text{m}$ , 内径  $200\ \mu\text{m}$ ) を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、 $80^\circ\text{C}$  で4時間放置することにより重合反応を行った。

得られた多孔質中空糸膜の中空部及び無孔質な中間層よりも内側の多孔質層にはオリゴヌクレオチド(プローブAまたはプローブB)がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたゲルが保持されていた(図1D)。図1Dにおいて、(1)はプローブAがゲルに固定化された核酸固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維を、(2)はプローブBがゲルに固定化された核酸固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維を示す。

#### 水溶液A

アクリルアミド 3.7 質量部

メチレンビスアクリルアミド 0.3 質量部

2,2'-アゾビス(2-アミノプロパン)二塩酸塩 0.1 質量部

ビオチン化オリゴヌクレオチド 0.005 質量部

(プローブAまたはプローブB)

アビジン化アガロース(6%)懸濁液 1.0 質量部

#### 実施例 25 多孔質中空繊維配列体の作製

実施例 24 により得たプローブA固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維 20 本を、テフロン板上に互いに重なることなく密着させて配列し両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤(日本ポリウレタン工業(株)コロネート 4403, ニッポラン 4223)を薄く塗布し、核酸固定化多孔質中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後これをテフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。

一方、プローブB固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維についても同様の操作によりシート状物を得た。

次いで、これらのシート状物を図2の配列となるように20枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々20本ずつ、計400本の核酸固定化多孔質繊維が正方形に規則的に配列した、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を得た(図2)。

## 実施例 26 核酸固定化薄片の作製

実施例 25 で得た 2 種のオリゴヌクレオチド (プローブ A 及び B) を含む核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を、マイクロトームを用いて 0.1mm の厚さに切り出し、縦横各 20 本ずつ計 400 本の核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維の断面が規則的に配列した薄片を得た (図 3)。この薄片には 1 cm<sup>2</sup> あたり約 1100 となる密度で核酸が固定化されていた。

## 実施例 27 核酸固定化薄片の作製及び核酸の検出

### (1) 染色体 DNA の調製

ロドコッカス・ロドクロウス J1 株を栄養培地 (グルコース 15 g、酵母エキス 1 g、グルタミン酸ナトリウム 10 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g/L、pH7.2) 100ml で 30℃、3 日培養し、集菌した。この菌体から染色体 DNA を調製し、PCR の鋳型に用いた。なお、ロドコッカス・ロドクロウス J1 株は FERM BP-1478 として工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に寄託されている。

### (2) プローブの作製

プローブ作製のために合成したオリゴヌクレオチドの位置を、図 9 に示した。オリゴヌクレオチド A (配列番号 1) はオリゴヌクレオチド B (配列番号 2) の約 400 塩基上流に位置しており、オリゴヌクレオチド E (配列番号 5) はオリゴヌクレオチド A から 400 塩基、オリゴヌクレオチド F (配列番号 6) はオリゴヌクレオチド B から 600 塩基下流に位置している。

オリゴヌクレオチド E : GCTCAAGCGC GATTTTCGGTT TCGACATCCC C (配列番号 5)

オリゴヌクレオチド F : CATGTCGCGT CGTTGTTGGA CGAAGCGGTA (配列番号 6)

オリゴヌクレオチド A、B の 5' 末端をアクリルアミド修飾 (W098/39351) したオリゴヌクレオチド (5' 末端にアクリルアミドが結合したオリゴヌクレオチド) (和光純薬に委託合成) を合成し、PCR に使用した。

PCR は、一方のプライマーを他方の過剰量存在させる Asymmetric PCR を行い、プライマー濃度を 5' アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチド A : オリゴヌクレ

オチド E=100:1 又は 5' アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチド B:オリゴヌクレオチド F=100:1 に調製した。その他の条件は Ex-Taq (宝酒造) の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて行った。反応は 100 $\mu$ l で行い、温度条件は 93 $^{\circ}$ C 30 秒、65 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分を 40 サイクル行った。

この PCR によって約 400 (プローブ G:配列番号 7)、600 塩基 (プローブ H:配列番号 8) の 5' アクリルアミド修飾されたプローブ DNA を増幅した。

### (3) 核酸固定化薄片の作製

核酸固定化薄片は、実施例 24~26 と同様にして作製した。ただし、核酸のゲルへの固定化には工程 2 で作製したアクリルアミド修飾されたプローブ DNA を用いた。これに伴い、水溶液 A の組成は以下のように変更した。

#### 水溶液 A

アクリルアミド	3.7 質量部
メチレンビスアクリルアミド	0.3 質量部
2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩	0.1 質量部
プローブ G (またはプローブ H)	0.005 質量部

得られた多孔質中空糸膜の中空部及び無孔質な中間層よりも内側の多孔質層にはプローブ G または H が固定化されたゲルが保持されていた。

こうして得られたプローブ G 固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維 5 本を、フロン板上に互いに重なることなく密着させて配列し、両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業 (株) コロネート 4403、ニッポラン 4223) を薄く塗布し、核酸固定化多孔質中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後これをテフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。プローブ H についても同様のものを得た。また、核酸を固定化していない同様のシート状物を作製した (ブランク)。

次いで、これらのシート状物をブランク、プローブ G、ブランク、プローブ H、ブランクの順に 5 枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々 5 本ずつ、計 25 本の核酸固定化多孔質繊維が正方に規則的に配列した、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を得た。

#### (4) 蛍光標識検体の作製

プローブGのみにハイブリダイズする検体の作製には、オリゴヌクレオチドEとオリゴヌクレオチドAを用いてPCRを行い、約400塩基の検体Iを調製した。プローブHのみにハイブリダイズする検体の作製には、オリゴヌクレオチドFとオリゴヌクレオチドBを用いてPCRを行い、約600塩基の検体Jを調製した。

検体を蛍光標識するために、オリゴヌクレオチドE、Fの5'末端がCy5でラベルされたもの(Cy5-オリゴヌクレオチドE、Cy5-オリゴヌクレオチドF)を合成し(アマシャムファルマシアバイオテク社、OligoExpress)、PCRに使用した。PCRは、プライマー濃度をCy5-オリゴヌクレオチドE：オリゴヌクレオチドA=100：1又はCy5-オリゴヌクレオチドF：オリゴヌクレオチドB=100：1に調製し、その他はEx-Taq(宝酒造)の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALを用いて行った。反応は100 $\mu$ lで行い、温度条件は93 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分を40サイクル行った。このPCRによって約400(検体I：配列番号9)、600塩基(検体J：配列番号10)のDNAを増幅した。

反応終了液はSUPEC-02(宝酒造)を用いて未反応プライマーを除き、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(アマシャムファルマシアバイオテク)によって回収した。

#### (5) ハイブリダイゼーション

上記工程(3)で得た核酸固定化薄片をハイブリダイゼーション用バッグに入れ、ハイブリダイゼーション溶液を注ぎ、45 $^{\circ}$ Cで30分間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、蛍光標識検体を加え、さらに45 $^{\circ}$ Cで15時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化薄片をあらかじめ保温しておいた50mlの0.1xSSC、0.1% SDS溶液に移し、振盪しながら45 $^{\circ}$ C、20分間の洗浄を3回行った。この後、0.5xSSCに置換し、蛍光検出器(蛍光顕微鏡)で観察した。その結果、核酸固定化薄片中のプローブGを固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体Iが、プローブHを固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体Jが特異的にハイブリダイゼーションしていることが確認できた。

## 実施例 28 核酸固定化薄片の作製及び核酸の検出

## (1) 酵母 (JCM7255) 染色体 DNA の調製

*Saccharomyces cerevisiae* (JCM7255) を YPD 培地 (グルコース 20 g、酵母エキス 10 g、ポリペプトン 20 g/L pH6.0) 100ml で 30℃、1 日培養し、集菌した。この菌体から染色体 DNA を調製し、PCR の鋳型に用いた。

## (2) プローブの作製

酵母遺伝子群から任意に 4 種のオープンリーディングフレーム (ORF) を選び、その ORF を PCR で増幅した。4 種のプローブ (配列番号 11、12、13、14) と PCR に使用したオリゴの関係を表 1 に示した。

表 1

プローブ	PCR 用プライマー		検体
プローブ K (配列番号 11)	オリゴヌクレオチド O (配列番号 15)	オリゴヌクレオチド S (配列番号 19)	オリゴヌクレオチド W (配列番号 23)
プローブ L (配列番号 12)	オリゴヌクレオチド P (配列番号 16)	オリゴヌクレオチド T (配列番号 20)	オリゴヌクレオチド X (配列番号 24)
プローブ M (配列番号 13)	オリゴヌクレオチド Q (配列番号 17)	オリゴヌクレオチド U (配列番号 21)	オリゴヌクレオチド Y (配列番号 25)
プローブ N (配列番号 14)	オリゴヌクレオチド R (配列番号 18)	オリゴヌクレオチド V (配列番号 22)	オリゴヌクレオチド Z (配列番号 26)

オリゴヌクレオチドのうちオリゴ O、P、Q、R は、5' 末端をアクリルアミド修飾したオリゴヌクレオチドであり、合成により得た (製造は和光純薬に委託)。PCR は、一方のプライマーを他方の過剰量存在させる Asymmetric PCR を行い、プローブ K を増幅する場合は、プライマー濃度を 5' アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチド O : オリゴヌクレオチド P = 100 : 1 に調製した。その他の条件は Ex-Taq (宝酒造) の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて行った。反応は 100  $\mu$  l で行い、温度条件は 93℃ 30 秒、65℃ 30 秒、72℃ 2 分を 40 サイクル行った。この PCR によって約 600 (プローブ K : 配列番号 11) の 5' アクリルアミド修飾されたプローブ DNA を増幅した。同様の方法で、プローブ L、M、N を調製した。

### (3) 核酸固定化薄片の作製

核酸固定化薄片は、実施例 24~26 と同様にして作製した。ただし、核酸のゲルへの固定化には工程 2 で作製したアクリルアミド修飾されたプローブ DNA を用いた。これに伴い、水溶液 A の組成は以下のように変更した。

#### 水溶液 A

アクリルアミド	3.7 質量部
メチレンビスアクリルアミド	0.3 質量部
2,2'-アゾビス(2-アミノプロパン)二塩酸塩	0.1 質量部
プローブ K (またはプローブ L, M, N)	0.005 質量部

こうして得られたプローブ K 固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維 7 本を、フロン板上に互いに重なることなく密着させて配列し、両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤(日本ポリウレタン工業(株)コロネート 4403、ニッポラン 4223)を薄く塗布し、核酸固定化多孔質中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後これをテフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。プローブ L、M、N についても同様のものを得た。また、核酸を固定化していない同様のシート状物を作製した(ブランク)。

次いで、これらのシート状物をブランク、プローブ K、プローブ L ブランク、プローブ N、プローブ M、ブランクの順に 7 枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々 7 本ずつ、計 49 本の核酸固定化多孔質繊維が正方に規則的に配列した、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を得た。

### (4) 蛍光標識検体の作製

それぞれのプローブにのみハイブリダイズする検体 W (配列番号 23) 及び Z (配列番号 26) はオリゴヌクレオチドの 5' 末端が Cy5 でラベルされたものを、検体 X (配列番号 24) 及び Y (配列番号 25) は 5' 末端が Cy3 でラベルされたものを合成(アマシャムファルマシアバイオテク社、OligoExpress)し、用いた。

### (5) ハイブリダイゼーション

工程 3 で得た核酸固定化薄片をハイブリダイゼーション用バッグに入れ、ハイブリダイゼーション溶液を注ぎ、45℃で 30 分間プレハイブリダイゼーションを

行った。続いて、蛍光標識検体を加え、さらに 45℃で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化薄片をあらかじめ保温しておいた 50ml の 0.1xSSC、0.1% SDS 溶液に移し、振盪しながら 45℃、20 分間の洗浄を 3 回行った。この後、0.5xSSC に置換し、蛍光検出器（蛍光顕微鏡）で観察した。

その結果、核酸固定化薄片中のプローブ K を固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体 W が、プローブ L を固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体 X が、プローブ M を固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体 Y が、プローブ N を固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体 Z が、特異的にハイブリダイゼーションしていることが確認できた。

#### 実施例 29

##### (1) ハイブリダイゼーション：

実施例 5, 9, 12, 17, 20, 23, 26 で作製した核酸固定化薄片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。

参考例 4 で得られた DIG 標識 DNA を加え、45℃で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。

##### ハイブリダイゼーション溶液組成：

5xSSC (0.75M 塩化ナトリウム、0.075M クエン酸ナトリウム、pH7.0)

5% ブロッキング試薬（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

0.1% N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02% SDS（ラウリル硫酸ナトリウム）

50%ホルムアミド

##### (2) 検出：

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化薄片を、あらかじめ保温しておいた 50ml の 0.1 x SSC, 0.1% SDS 溶液に移し、振盪しながら 20 分間の洗浄を 45℃で 3 回行った。

DIG 緩衝液 1 を加え、室温で振盪しながら SDS の除去を行った。これを再度繰

り返した後、DIG 緩衝液 2 を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG 緩衝液 2 に 10000 分の 1 量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液を加えた溶液 10 ml を加え、30 分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に 0.2% Tween 20 を含む DIG 緩衝液 1 で 15 分間 2 回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG 緩衝液 3 に 3 分間浸した。DIG 緩衝液 3 を除いた後、AMPPD を含む DIG 緩衝液 3 ml を加え、10 分間平衡化した。

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃で 1 時間おいた後、X 線フィルム用のバインダーに X 線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

その結果、何れも、プローブ A が配置された場所には、オリゴヌクレオチド C が結合し、プローブ B が配置された場所には、オリゴヌクレオチド D が結合していることが確認された。

DIG 緩衝液 1 : 0.1 M マレイン酸、0.15M 塩化ナトリウム (pH7.5)

DIG 緩衝液 2 : DIG 緩衝液 1 に 0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したものの

DIG 緩衝液 3 : 0.1 M トリシュー塩酸 (pH9.5)、0.1 M 塩化ナトリウム、0.05M 塩化マグネシウム

ブロッキング試薬 : 抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液および AMPPD は DIG Detection キット (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) 中の試薬である。

### 実施例 30 繊維配列体薄片の作製

繊維単位ごとの識別ができるように、繊維単位として、橙、ピンク、薄緑、青、緑、青緑、赤、茶、白、黄に染色された繊維の太さが約 0.25 (mm) の 10 本の繊維を用意し、橙、ピンクの繊維を座標基準として、約 10mm 角、長さ 50mm のプラスチック容器の中にその 10 本の繊維を適当な間隔で吊し、ポリウレタン樹脂接着剤をプラスチック容器に充填・硬化させて、繊維配列体を作製した。

この繊維配列体をプラスチック容器から取り出し、繊維配列体を繊維軸に直角方向にマイクロトームを用いて 0.25mm の厚さに切り出し、繊維配列体薄片を得た。

## 実施例 31 繊維単位座標の決定

以下のようにして、繊維単位座標を決定した。すなわち、まず、実施例 30 において得られた繊維配列体薄片を、切り出した順に 1, 2, 3, ..., m と番号を付けた。繊維配列体から切り出された薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標を決定するために、切り出された薄片のうち、1 番目から 5 番目までを XY 座標が読み取り可能な XY ステージ付き投影顕微鏡 (Nikon PROFILER PROJECTOR V-12 拡大倍率 100 倍) 上に置き、目視にて、1 番目に切り出した薄片中の繊維単位ごとの断面の重心の位置の XY ステージ上の座標を読み取り、1 番目の薄片の座標基準の座標を基に式 (1), (2) により、1 番目の薄片の座標基準を基にした、1 番目の薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標を求めた。求めた座標を表 2 に示した。

表 2

## 1 番目の薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標

1 番目の薄片				
座標基準の繊維単位	X (mm)	Y (mm)		
橙 (P 1)	4.147	7.894		
ピンク (P 2)	12.084	7.744		
$\theta 1$ (ラジアン)	-0.0189			
繊維単位	1 番目の薄片中の繊維単位の XY ステージ上での座標		1 番目の薄片中の繊維単位の座標基準を基にした座標	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
薄緑	6.636	4.056	2.561	-3.790
青	6.062	5.182	1.966	-2.675
緑	5.266	8.840	1.101	0.967
青緑	9.792	4.100	5.716	-3.687
赤	9.866	4.998	5.773	-2.787
茶	10.876	7.463	6.736	-0.304
白	8.044	9.870	3.859	2.049
黄	8.800	10.480	4.603	2.673

2 番目に切り出された薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標を決定するために、2 番目に切り出した薄片を XY ステージ付き投影顕微鏡上に置き、1 番目に切り出した薄片中の繊維単位ごとの 1 番目の薄片の座標基準を基にした座標データか

ら、式 (3), (4) により、1 番目の薄片中の繊維単位と同じ、2 番目の薄片中の繊維単位の X Y ステージ上での座標を求め、その座標の位置へ X Y ステージを移動させた、この時、その座標の位置に最も近い繊維単位が、繊維単位の色から 1 番目の薄片中の繊維単位と同じであることを確認できた。その座標の位置に最も近い繊維単位の断面の重心の位置の X Y ステージ上の座標を読み取り、2 番目の薄片の座標基準を基に式 (1), (2) により、2 番目の薄片の座標基準を基にした、1 番目の薄片中の繊維単位と同じ、2 番目の薄片中の繊維単位の 2 次元座標を求めた。求めた座標を表 3 に示した。表 3 から明らかなように、計算によって求めた各繊維単位の座標と投影顕微鏡を用いて目測により求めた各繊維単位の座標とは互いに近似しており、上記方法によって極めて正確に各繊維単位の座標を推測することのできる事が分かった。

表 3

2 番目の薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標

2 番目の薄片		座標基準の繊維単位		X (m)		Y (m)	
				m)		m)	
橙	(P 3)	3.893	19.277				
ピンク	(P 4)	11.738	20.350				
$\theta 2$	(ラジアン)	0.1359					
繊維単位		式 (3), (4) により算出した、1 番目の薄片中の繊維単位に相当する計算座標		2 番目の薄片中の繊維単位の X Y ステージ上での座標		2 番目の薄片中の繊維単位の座標基準を基にした座標	
		X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)
薄緑		6.944	15.869	6.910	15.870	2.527	-3.784
青		6.203	16.893	6.160	16.885	1.922	-2.677
緑		4.853	20.384	4.830	20.351	1.074	0.937
青緑		10.056	16.399	10.004	16.421	5.668	-3.658
赤		9.990	17.298	9.943	17.306	5.727	-2.773
茶		10.608	19.889	10.545	19.858	6.669	-0.326
白		7.439	21.830	7.443	21.819	3.862	2.037
黄		8.092	22.550	8.052	22.492	4.556	2.622

同じようにして、2 番目に切り出された薄片中の繊維単位の座標データから、3 番目に切り出された薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標を求めることが出来た。

同様の操作を繰り返し、 $m$  番目の薄片中に含まれる繊維単位の 2 次元座標を求めることができる。この時、何れの薄片においても、同じ繊維単位であれば、 $n - 1$  番目に切り出した薄片中の繊維単位の、 $n - 1$  番目の薄片の座標基準を基にした座標データから、式 (3), (4) により求めた XY ステージ上での座標と、 $n$  番目の薄片中の XY ステージ上での座標の位置が最も近い繊維単位が、繊維単位の色から  $n - 1$  番目の薄片中の繊維単位と同じであることを確認できた。また、 $n - 1$  番目に切り出した薄片中の、 $n - 1$  番目の座標基準を基にした繊維単位の座標と、 $n$  番目に切り出した薄片中の、 $n$  番目の座標基準を基にした繊維単位の座標が、最も近い物が、同じ繊維単位であることも確認出来た。表 4、5 及び 6 にそれぞれ、3, 4, 5 番目に切り出された薄片中の繊維単位の座標を示す。

表 4

3 番目の薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標

3 番目の薄片								
座標基準の繊維単位	X (m)	Y (m)						
	m)	m)						
橙 (P 3)	4.66	30.414						
ピンク (P 4)	12.575	30.399						
$\theta 2$ (ラジアン)	-0.0019							
繊維単位	式 (3), (4) により算出した、2 番目の薄片中の繊維単位に相当する計算座標		3 番目の薄片中の繊維単位の XY ステージ上での座標		3 番目の薄片中の繊維単位の座標基準を基にした座標			
	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)		
	m)	m)	m)	m)	m)	m)		
薄緑	7.180	26.625	7.190	26.629	2.537	-3.780		
青	6.577	27.733	6.626	27.742	1.971	-2.668		
緑	5.736	31.349	5.730	31.339	1.068	0.927		
青緑	10.321	26.745	10.315	26.736	5.662	-3.667		
赤	10.382	27.630	10.389	27.638	5.734	-2.765		
茶	11.329	30.076	11.325	30.026	6.666	-0.375		
白	8.526	32.444	8.522	32.385	3.858	1.978		
黄	9.221	33.027	9.212	32.992	4.547	2.587		

表 5

## 4 番目の薄片中の繊維単位ごとの 2 次元座標

4 番目の薄片						
座標基準の繊維単位	X (m)	Y (m)				
	m)	m)				
橙 (P 3)	15.506	7.738				
ピンク (P 4)	23.356	7.173				
$\theta 2$ (ラジアン)	-0.0719					
繊維単位	式 (3), (4) により算出した、3 番目の薄片中の繊維単位に相当する計算座標		4 番目の薄片中の繊維単位の X Y ステージ上での座標		4 番目の薄片中の繊維単位の座標基準を基にした座標	
	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)
	m)	m)	m)	m)	m)	m)
薄緑	17.765	3.785	17.721	3.789	2.493	-3.780
青	17.280	4.935	17.240	4.939	1.930	-2.667
緑	16.638	8.586	16.623	8.549	1.056	0.889
青緑	20.890	3.674	20.846	3.700	5.616	-3.644
赤	21.027	4.568	20.969	4.583	5.675	-2.755
茶	22.128	6.885	22.059	6.853	6.600	-0.412
白	19.496	9.434	19.417	9.392	3.782	1.930
黄	20.227	9.992	20.177	9.977	4.498	2.569

表 6

5番目の薄片中の繊維単位ごとの2次元座標

5番目の薄片						
座標基準の繊維単位	X (m)	Y (m)				
橙 (P 3)	15.78	18.445				
ピンク (P 4)	23.575	18.323				
$\theta 2$ (ラジアン)	-0.0156					
繊維単位	式(3), (4)により算出した、4番目の薄片中の繊維単位に相当する計算座標		5番目の薄片中の繊維単位のXYステータス上の座標		5番目の薄片中の繊維単位の座標基準を基にした座標	
	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)	X (m)	Y (m)
薄緑	18.213	14.627	18.195	14.662	2.474	-3.745
青	17.668	15.748	17.634	15.768	1.896	-2.648
緑	16.850	19.317	16.845	19.346	1.051	0.918
青緑	21.338	14.713	21.297	14.715	5.575	-3.643
赤	21.412	15.602	21.375	15.624	5.638	-2.733
茶	22.372	17.929	22.309	17.904	6.537	-0.439
白	19.592	20.316	19.581	20.301	3.771	1.915
黄	20.318	20.943	20.297	20.881	4.478	2.506

## 実施例 32 繊維単位座標をさせたコンピュータ読み取り可能な記録媒体

実施例 31 において決定された各繊維配列体中の個々の繊維単位の座標データをパーソナルコンピュータ（日本電気社製 PC9821 型）を用いて、テキスト形式でフロッピーディスクに記録した。得られた座標情報記録ディスクから、上記パーソナルコンピュータを用いてデータを読み取ったところ、入力したときの形態のまま繊維単位の座標データを出力することができた。

## 実施例 33

中空繊維配列体の作製 (1) :

1cm<sup>2</sup> 四方に縦横各々 20 個、合計 400 個の孔が規則正しく正方配列された繊維

ガイド板 2 枚を用い、その繊維ガイド板の各孔にナイロン製中空繊維（外径約 300  $\mu\text{m}$ 、長さ約 50cm）400 本を通過させることにより中空繊維配列体を得た。

2 枚の繊維ガイド板の間隔を 20cm とし、その間をポリウレタン樹脂により固定化することにより、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 34

中空繊維配列体の作製（2）：

ナイロン製中空繊維の代わりに、ポリエチレン-ビニルアルコール共重合体で内表面を親水化処理したポリエチレン製中空繊維（外径約 300  $\mu\text{m}$ 、長さ約 50cm）を用いて、実施例 33 と同様の方法により、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 35

多孔質中空繊維配列体の作製：

ナイロン製中空繊維の代わりに、無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF200TL（三菱レイヨン株式会社製、外径 290  $\mu\text{m}$ 、内径 200  $\mu\text{m}$ 、長さ約 50cm）を用いた以外は、実施例 33 と同様に実施し、両端に樹脂で固定化されない部分を有する多孔質中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 36

中空繊維の内表面処理（1）：

実施例 33 で得られた中空繊維配列体を構成する各中空繊維の中空部に、一方の樹脂で固定化されない繊維部分から蟻酸を導入し、1 分間保持した。次に、中空部に室温の水を多量に導入して十分洗浄し、その後、乾燥することによりナイロン製中空繊維の前処理を行った。

#### 実施例 37

中空繊維の内表面処理（2）：

蟻酸の代わりに、硫酸の 10% エタノール溶液を用いた以外は、実施例 36 と同様に実施し、ナイロン製中空繊維の前処理を行った。

### 実施例 38

中空繊維配列体への生体関連物質の導入及び固定化（1）：

実施例 33 で作製した中空繊維配列体に対して実施例 36 及び 37 により各構成中空繊維の内表面処理を行った後、生体関連物質の一例として、参考例 3 において合成したアミノ基を有するオリゴヌクレオチド（プローブ A 及びプローブ B）を、以下の方法により中空繊維配列体を構成する各中空繊維内部に導入し、固定化した。

中空繊維配列体の一方の端より、リン酸カリウム溶液緩衝液に参考例 1 において合成したアミノ基を有するオリゴヌクレオチドを加えた溶液を導入した後、20℃で終夜保持した。

その後、リン酸カリウム溶液緩衝液、塩化カリウム溶液、水で、中空繊維内部を洗浄し、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維配列体を得た。

この際に、プローブ A 及びプローブ B のオリゴヌクレオチドは、中空繊維配列体における配列が図 2 の如くなるように導入し、固定化した。

### 実施例 39

中空繊維配列体への生体関連物質の導入及び固定化（2）：

実施例 34 で作製した中空繊維配列体を用いて、実施例 38 と同様の方法により、オリゴヌクレオチドが中空繊維の内壁面に固定化された核酸固定化中空繊維配列体を得た。

この際にも、中空繊維配列体におけるプローブ A 及びプローブ B のオリゴヌクレオチドの配列は、実施例 38 と同様である。

### 実施例 40

生体関連物質固定化繊維配列体薄片の作製：

実施例 38 及び 39 で得られた生体関連物質固定化中空繊維配列体を、各々の繊維軸に直角方向に、マイクロトームを用いて約 100  $\mu\text{m}$  の厚さに薄片を切り出すことにより、縦横各々 20、計 400 のオリゴヌクレオチドが規則的に正方に配列された生体関連物質固定化繊維配列体薄片得た。(図 3)

#### 実施例 41

##### (1) ハイブリダイゼーション：

実施例 40 で作製した各々のオリゴヌクレオチドが規則的に正方に配列された生体関連物質配列シートをハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。

参考例 4 で得られた DIG 標識 DNA を加え、45℃で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション溶液組成：

- 5xSSC (0.75M 塩化ナトリウム、0.075M クエン酸ナトリウム、pH7.0)
- 5%ブロッキング試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
- 0.1%N-ラウロイルザルコシンナトリウム
- 0.02% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)
- 50%ホルムアミド

##### (2) 検出：

ハイブリダイゼーション終了後、オリゴヌクレオチドが規則的に正方に配列された生体関連物質配列薄片を、あらかじめ保温しておいた 50ml の 0.1xSSC、0.1%SDS 溶液に移し、振盪しながら 20 分間の洗浄を 45℃で 3 回行った。

DIG 緩衝液 1 を加え、室温で振盪しながら SDS の除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG 緩衝液 2 を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG 緩衝液 2 に 10000 分の 1 量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液を加えた溶液 10ml を加え、30 分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に 0.2% Tween20 を含む DIG 緩衝液 1 で 15 分間 2 回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG 緩衝液 3 に 3 分間浸した。DIG 緩衝液 3 を除いた後、

AMPPD を含む DIG 緩衝液 3ml を加え、10 分間平衡化した。

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃で1時間おいた後、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

その結果、何れの生体関連物質配列薄片も、プローブAが配置された場所には、オリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBが配置された場所には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

DIG 緩衝液 1: 0.1M マレイン酸、0.15M 塩化ナトリウム (pH7.5)

DIG 緩衝液 2: DIG 緩衝液 1 に 0.5% 濃度でブロッキング試薬を添加したもの

DIG 緩衝液 3: 0.1M トリシュー塩酸 (pH9.5)、0.1M 塩化ナトリウム、0.05M 塩化マグネシウム

ブロッキング試薬: 抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液および AMPPD は DIG Detection キット (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) 中の試薬である。

#### 実施例 42

中空繊維配列体の作製 (1) :

直径 0.32mm の孔が 10mm<sup>2</sup> 四方に 0.5mm ピッチで縦横各 20 個、合計 400 個配列された、厚さ 0.1mm の多孔板 2 枚を用い、その多孔板の全ての孔に、ナイロン製中空繊維 (外径 0.3mm、長さ 500mm) 400 本を通過させることにより中空繊維配列体を得た。

2 枚の繊維ガイド板の間隔を 50mm とし、その間をポリウレタン樹脂により固定化することにより、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 43

中空繊維配列体の作製 (2) :

ナイロン製中空繊維の代わりに、ポリエチレンービニルアルコール共重合体で内表面を親水化処理したポリエチレン製中空繊維 (外径 0.3mm、長さ 500mm) を

用いて、実施例 42 と同様の方法により、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 44

中空繊維配列体の作製 (3) :

ナイロン製中空繊維の代わりに、ポリメチルメタクリレート製中空繊維 (外径 0.3mm、長さ 500mm) を用いて、実施例 42 と同様の方法により、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 45

多孔質中空繊維配列体の作製 :

ナイロン製中空繊維の代わりに、無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF200TL (三菱レイヨン株式会社製、外径 0.29mm、内径 0.2mm、長さ 500mm) を用いた以外は、実施例 42 と同様に実施し、両端に樹脂で固定化されない部分を有する多孔質中空繊維配列体を得た。

#### 実施例 46

ポリエチレン性多孔質中空糸膜 MHF200TL (三菱レイヨン株式会社製、外径 290  $\mu$ m、内径 200  $\mu$ m) を 25 本束ねて、その一端部は中空糸膜の中空部が開口した状態になるようにウレタン樹脂で固めた。反応容器内において、以下の組成から成るエタノール溶液 A をこのブロックの中空繊維内に吸引により充填した。この後、反応容器内の圧力を常圧からやや減圧し、中空部のエタノール溶液 A の一部を放出した。再び反応容器内を常圧に戻し、窒素雰囲気下 70°C で 3 時間重合することにより処理を行った。重合終了後、真空乾燥機内で終夜乾燥することによりエタノールを除いた。

#### エタノール溶液 A

N, N-ジメチルアクリルアミド	19	質量部
N, N'-メチレンビスアクリルアミド	1	質量部

2,2'-アゾビスイソブチロニトリル	0.1	質量部
エタノール	80	重量部

## 実施例 47

以下の組成から成るエタノール溶液Bを調整し、実施例 46 と同様に中空繊維内の処理を行った。

## エタノール溶液B

N,N-ジメチルアクリルアミド	10	質量部
2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート	9	質量部
N,N'-メチレンビスアクリルアミド	1	質量部
2,2'-アゾビスイソブチロニトリル	0.1	質量部
エタノール	80	重量部

## 実施例 48

以下の組成から成るエタノール溶液Cを調整し、実施例 46 と同様に中空繊維内の処理を行った。

## エタノール溶液C

N,N-ジメチルアクリルアミド	38	質量部
N,N'-メチレンビスアクリルアミド	2	質量部
2,2'-アゾビスイソブチロニトリル	0.2	質量部
エタノール	60	重量部

## 実施例 49

以下の組成から成るエタノール溶液Dを調整し、実施例 46 と同様に中空繊維内の処理を行った。

## エタノール溶液D

N, N-ジメチルアクリルアミド	19	質量部
N, N' -メチレンビスアクリルアミド	1	質量部
過酸化ベンゾイル	0.1	質量部
エタノール	80	重量部

#### 実施例 50

以下の組成から成るメタノール溶液Eを調整し、実施例 46 と同様にして中空繊維内の処理を行った。

#### メタノール溶液E

N, N-ジメチルアクリルアミド	19	質量部
N, N' -メチレンビスアクリルアミド	1	質量部
2, 2' -アゾビスイソブチロニトリル	0.1	質量部
メタノール	80	重量部

#### 実施例 51

ポリメタクリル酸メチル性中空繊維（外径 300  $\mu$ m、内径 180  $\mu$ m）を25本束ねて、その一端部は中空繊維の中空部が開口した状態になるようにウレタン樹脂で固めた。以下の組成から成るメタノール溶液Fを調整し、実施例 46 と同様にして中空繊維内の処理を行った。

#### エタノール溶液F

N, N-ジメチルアクリルアミド	19	質量部
N, N' -メチレンビスアクリルアミド	1	質量部
2, 2' -アゾビスイソブチロニトリル	0.1	質量部
エタノール	80	重量部

#### 実施例 52

実施例 46 で中空繊維内に処理を施したブロックを用いて処理の効果を確認し

た。各中空繊維内において下記の方法でアクリルアミドゲルの重合を行った後、ブロックを中空繊維軸に直角方向にスライスして厚さ約 750 $\mu$ mの薄片を得た。この薄片を水中に入れ、38℃において終夜、50℃において1時間振とうした。振とう後、薄片を観察し、25本の中空繊維すべてにアクリルアミドゲルが充填していることを確認した。

#### <アクリルアミドゲルの重合>

以下の組成から成る水溶液Gを調整し、反応容器内において、実施例 46 から実施例 51 までで作成したブロックの中空繊維内に吸引により充填した。水溶液充填後、窒素雰囲気下 70℃で3時間重合した。

#### 水溶液G

アクリルアミド	9 質量部
N,N'-メチレンビスアクリルアミド	1 質量部
2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)	
ジヒドロクロライド (V-50)	0.1 質量部
水	90 重量部

#### 実施例 53

実施例 47 で中空繊維内に処理を施したブロックを用い、実施例 52 と同様の方法で処理の効果を確認した。操作後、薄片を観察し、25本の中空繊維すべてにアクリルアミドゲルが充填していることを確認した。

#### 実施例 54

実施例 48 で中空繊維内に処理を施したブロックを用い、実施例 52 と同様の方法で処理の効果を確認した。操作後、薄片を観察し、25本の中空繊維すべてにアクリルアミドゲルが充填していることを確認した。

#### 実施例 55

実施例 49 で中空繊維内に処理を施したブロックを用い、実施例 52 と同様の方法で処理の効果を確認した。操作後、薄片を観察し、25 本の中空繊維すべてにアクリルアミドゲルが充填していることを確認した。

#### 実施例 56

実施例 50 で中空繊維内に処理を施したブロックを用い、実施例 52 と同様の方法で処理の効果を確認した。操作後、薄片を観察し、25 本の中空繊維すべてにアクリルアミドゲルが充填していることを確認した。

#### 実施例 57

実施例 51 で中空繊維内に処理を施したブロックを用い、実施例 52 と同様の方法で処理の効果を確認した。操作後、薄片を観察し、25 本の中空繊維すべてにアクリルアミドゲルが充填していることを確認した。

#### 比較例 1

中空繊維の内壁が未処理のポリエチレン性多孔質中空糸膜 MHF200TL（三菱レイヨン株式会社製、外径 290  $\mu$ m、内径 200  $\mu$ m）を 25 本束ねて、その一端部は中空糸膜の中空部が開口した状態になるようにウレタン樹脂で固めた。

#### 比較例 2

以下の組成から成るエタノール溶液 G を調整し、実施例 46 と同様にして中空繊維内の処理を行った。

#### エタノール溶液 G

N, N-ジメチルアクリルアミド	86	質量部
N, N'-メチレンビスアクリルアミド	4	質量部
2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル	0.45	質量部
エタノール	10	重量部

### 比較例 3

比較例 1 で作成したブロックを用い、実施例 46 と同様の方法で処理の効果を観察した。ブロックをスライスして薄片を得る際に、25 本の中空繊維のうち 4 本でゲルの欠落が見られた。薄片を振とうした後は、計 12 本の中空繊維でゲルの欠落が観察された。

### 比較例 4

比較例 2 で作成したブロックを用い、実施例 46 と同様の方法で処理の効果を観察しようとしたが、中空繊維内部は処理用のゲルにより詰まっており、アクリルアミド水溶液の注入を行うことができなかった。

### 参考例 5

#### (a) メタクリレート基を有するオリゴヌクレオチドプローブの調製

以下に示したオリゴヌクレオチド（プローブ A、プローブ B）を合成した。

プローブ A : GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号 1)

プローブ B : GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号 2)

オリゴヌクレオチドの合成は PE バイオシステムズ社の自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model 394) を用いて行い、DNA 合成の最終ステップで、アミノリンク II (商標名) (アプライドバイオシステム社) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$  を導入しアミノ化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

得られたプローブ A または B (500 nmol/ml) 5  $\mu\text{l}$  及びグリシジルメタクリレート (GMA) 0.5  $\mu\text{l}$  を混合し、70°C で 2 時間反応させ、メタクリレート基を有するオリゴヌクレオチドプローブを調整し、水 190  $\mu\text{l}$  を加えて、100 nmol/ml のメタクリレート基を有するプローブ (GMA 変性プローブ A 及び GMA 変性プローブ B) の溶液を得た。

#### (b) 試料核酸のモデルの調製

試料核酸のモデルとして、(a) で合成したオリゴヌクレオチド (プローブ A、プローブ B) の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド (C、D) を合成した。

オリゴヌクレオチドC : GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (配列番号3)

オリゴヌクレオチドD : CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (配列番号4)

オリゴヌクレオチドの合成は(a)と同様に行い、オリゴヌクレオチドCの5'末端にCy3を、オリゴヌクレオチドDの5'末端にCy5を導入した蛍光標識試料核酸のモデルを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

#### (c) 繊維配列体の調製

ポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF200TL (三菱レイヨン株式会社製, 外径 290  $\mu\text{m}$ , 内径 200  $\mu\text{m}$ ) 5本を、テフロン板上に互いに重なることなく密着させて配列し両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤 (日本ポリウレタン工業 (株) コロネート 4403, ニッポラン 4223) を薄く塗布し、中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後これをテフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。これらのシート状物を5枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々5本ずつ、計25本の中空繊維が正方形に規則的に配列した、多孔質中空繊維配列体を得た。

### 実施例 58

#### (1) 蛍光標識オリゴヌクレオチドの合成

参考例 5 (a) と同様にして 5' 末端にフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を導入した GCAT の配列のオリゴヌクレオチドを合成した。

#### (2) メタクリレート基を有する蛍光色素の調製

(1) で得られた、5' 末端に FITC を有するオリゴヌクレオチド (500nmol/ml) 50  $\mu\text{l}$  及び、グリシジルメタクリレート 5  $\mu\text{l}$ 、ジメチルホルムアミド (DMF) 5  $\mu\text{l}$  を混合し、70°C で 2 時間反応させて、メタクリレート基を有する蛍光色素を調製し、水 190  $\mu\text{l}$  を加えて、100nmol/ml のメタクリレート基を有する蛍光色素 (GMA 変性 FITC) の溶液を得た。

#### (3) 生体関連物質固定化ゲル保持繊維配列体の調製

表 7 の組成からなる重合液 1 ~ 3 を調整し、参考例 5 (c) で得られた配列体の所定の列の中空繊維の中空部に充填し、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器

に移し、80℃で4時間放置することにより重合反応を行った。

<モノマー液及び重合開始剤液の調整>

下記の質量比で混合して、モノマー液及び開始剤液を調製した。

a) モノマー液

アクリルアミド	0.76 質量部
メチレンビスアクリルアミド	0.04 質量部
水	4.2 質量部

b) 開始剤液

2, 2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩	0.01 質量部
水	4.99 質量部

<重合液の調製>

上述のモノマー液 a)、開始剤液 b) 及び参考例 5 (a) で調製した GMA 変性プローブ A 又は GMA 変性プローブ B、(2) で調製した GMA 変性 FITC を表 7 に示す体積比で混合して重合液 1~3 を調製した。得られた重合液を参考例 (c) で得られた中空繊維配列体の所定列の中空繊維の中空部に充填し、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃で4時間放置することにより重合反応を行った。

表 7

	重合液 1	重合液 2	重合液 3
モノマー液	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
開始剤液	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
GMA 変性 FITC (100nmol/ml)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
GMA 変性プローブ A (100nmol/ml)	0	50 $\mu$ l	0
GMA 変性プローブ B (100nmol/ml)	0	0	50 $\mu$ l
配列体 列番号	1、3、5	2	4

(4) スライスおよびゲルの充填状態の観察

(3) で得られたの配列体からミクロトームを用いて 500  $\mu$  m の薄片を切り出した。この薄片を蛍光顕微鏡 (ニコン製蛍光顕微鏡 E400) で FITC 用フィルター (励起波長域 465~495nm、蛍光波長域 515~555nm) を用いて観察したところ、ゲルの充填状態が容易に観察できた。

(5) ハイブリダイゼーション

(4) で得られた薄片をハイブリダイゼーション用バッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。

< ハイブリダイゼーション溶液組成 >

5xSSC (0.75mol/l 塩化ナトリウム、0.075mol/l クエン酸ナトリウム、Ph7.0)

5%ブロッキング試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

0.1%N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

50% ホルムアミド

続いて、参考例 5 (b) で調製した蛍光標識試料核酸のモデルを 50pmol/ml の濃度になるように加え、45℃で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化薄片をあらかじめ保温しておいた 50ml の 0.1 x SSC、0.1% SDS 溶液に移し、振盪しながら 45℃、20 分間の洗浄を 3 回行った。

(6) 検出

(5) で得られたハイブリダイゼーション後のチップを CY3 用フィルター (励起波長ピー域 535nm、半値幅 50nm、蛍光波長ピーク 610nm、半値幅 75nm) で観察したところ、GMA 変性 FITC の蛍光に妨げられることなく、配列体列番号 2 のみが蛍光を発生する画像が得られた。次に、(4) と同様に蛍光顕微鏡で FITC 用フィルターを用いて観察し、CY3 用フィルターで蛍光が観察されない列番号についても、ゲルが全ての中空糸に充填されていることを確認できた。同様に CY5 用フィルター (励起波長ピー域 620nm、半値幅 60nm、蛍光波長ピーク 700nm、半値幅 75nm) で観察したところ、GMA 変性 FITC の蛍光に妨げられることなく、配列体列番号 4 のみが蛍光を発生する画像が得られた。以上の結果より、薄片中のプローブ A を固定化した断面部にのみオリゴヌクレオチド C が、プローブ B を固定化した断面部にのみオリゴヌクレオチド D が、特異的にハイブリダイゼーションしていることが確認でき、なおかつハイブリダイゼーション操作の過程でのゲルの脱落や変形が無かったことが確認できた。

### 実施例 59

実施例 58 における GMA 変性 FITC を Polysciences, Inc. 社製 Fluorescein Dimethacrylate に代えた以外は同様な条件で繊維配列体の薄片を得た。この薄片を蛍光顕微鏡で観察したところ、ゲルの充填状態が容易に観察できた。また実施例 58 と同様にハイブリダイゼーションを実施し、Fluorescein の蛍光により CY 3 及び CY 5 の蛍光検出が妨げられないことと、ハイブリダイゼーション操作の過程でのゲルの脱落や変形が無かったことが確認できた。

### 比較例 5

GMA 変性 FITC を用いずに実施例 58 と同様の方法で薄片を得た。この薄片を顕微鏡で CY 3 用フィルターを用いて観察したところ、配列体列番号 2 のみが蛍光を発生する画像が得られたが、配列体列番号 2 以外の列のゲルの欠落等充填状態を観察することは困難で、蛍光を発生しない列がハイブリッドを形成していないのか、ゲルが欠落しているのかを容易に判断することができなかった。

### 実施例 60

(1) 5' 末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの作製

以下に示したオリゴヌクレオチド（プローブ A、プローブ B）を合成した。

プローブ A : GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号 1)

プローブ B : GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号 2)

オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model 394) (PE バイオシステムズ社製) を用いて行い、DNA 合成の最終ステップで、アミノリンク II (アプライドバイオシステム社製) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$  を導入しアミノ化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

(2) 核酸固定化高分子ゲルの作製

(1) で得られたプローブ A 又は B (500nmol/ml) 5  $\mu$ l 及びグリシジルメタクリレート 5  $\mu$ l を混合し、70°C で 2 時間反応させた。そこへモノマー混合水溶液 (アクリルアミド 47.5%w/w 及びメチレンビスアクリルアミド 2.5%w/w を含む水溶

液) 50 $\mu$ l、水 450 $\mu$ l 及び 10%アゾビスイソブチロニトリル水溶液 5 $\mu$ l を加え、70℃で2時間重合反応を行い、核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは5mmの厚さに切り出し、検出操作を行った。

### (3) 試料核酸の標識

試料核酸のモデルとして、(1)で作製したプローブA及びBの配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチドC及びDを合成した。

オリゴヌクレオチドC : GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (配列番号 3)

オリゴヌクレオチドD : CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (配列番号 4)

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端を、(1)と同様にしてアミノリンクII (PE バイオシステムズジャパン社製) を用いて、それぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端に  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$  を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン (DIG: Digoxigenin, ロシュ・ダイアグノスティックス社製) で標識した。

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドを、それぞれ終濃度 2mMとなるように 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.5) に溶解した。等量の Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg/ml ジメチルホルムアミド溶液) を加え、室温にて一晩静置した。

容量を 100 $\mu$ l に調整し、2 $\mu$ l のグリコーゲン (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)、10 $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)、300 $\mu$ l の冷エタノールを加え、15,000rpm、15分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。さらに、沈殿に 500 $\mu$ l の 70%エタノールを加え、15,000rpm 5分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿を風乾し、100 $\mu$ l の 10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA に溶解した。こうして得られた DIG 標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

### (4) ハイブリダイゼーション

(2)で作製した核酸固定化高分子ゲル切片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、下記の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間、プレハイブリダイゼーションを行い、(3)で得られた DIG 標識 DNA を加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション溶液組成；

5XSSC

5% ブロッキング試薬 (DIG Detection キット中の試薬)

0.01% N-ラウロイルザルコシナトリウム

0.02% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

50% ホルムアミド

#### (5) 検出

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化高分子ゲル切片を、あらかじめ保温しておいた 50ml の 0.1xSSC、0.1%SDS 溶液に移し、振盪しながら 45℃、20 分間、洗浄を 3 回行った。

次に、DIG 緩衝液 1 (0.1M マレイン酸、0.15M 塩化ナトリウム (pH7.5)) を加え、室温で振盪しながら SDS の除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG 緩衝液 2 (DIG 緩衝液に 0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したもの) を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、 $10^{-4}$  量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体 (DIG Detection キットの試薬) を含む DIG 緩衝液 2 10ml を加え、30 分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に 0.2%Tween20 を含む DIG 緩衝液 1 で 15 分間、2 回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG 緩衝液 3 (0.1M トリシュー塩酸 (pH9.5)、0.1M 塩化ナトリウム、0.05M 塩化マグネシウム) に 3 分間浸した。DIG 緩衝液 3 を除いた後、CDP-Star (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) を含む DIG 緩衝液 3ml を加えた。

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

その結果、プローブAのゲル切片には、オリゴヌクレオチドCが結合し、またプローブBのゲル切片には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

#### 実施例 61

##### (1) グリシジル基含有高分子ゲルの作製

アクリルアミド 4.65 重量部、メチレンビスアクリルアミド 0.25 重量部、グリシジルメタクリレート 0.1 重量部からなる水溶液にアゾビスイソブチロニトリルを 0.1%濃度になるように加え、70℃で 2 時間反応させ、高分子ゲルを作成

した。

## (2) 核酸固定化高分子ゲルの作製

(1) で作製した高分子ゲルを 10mm 角の厚さに切り出し、実施例 60 の (1) の方法で作製したプローブ A 又は B (500nmol/ml) 100  $\mu$ l を混合し、70°C で 2 時間反応させ、核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは 5mm の厚さに切り出し、実施例 60 の (3)、(4)、(5) と同様の操作で検出を行った。

その結果、プローブ A のゲル切片にはオリゴヌクレオチド C が結合し、またプローブ B のゲル切片には、オリゴヌクレオチド D が結合していることが確認された。

## 実施例 62

### (1) 5' 末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの作製

以下に示したオリゴヌクレオチド (プローブ A、プローブ B) を合成した。

プローブ A : GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号 1)

プローブ B : GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号 2)

オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model 394) (PE バイオシステムズ社製) を用いて行い、DNA 合成の最終ステップで、アミノリンク II (アプライドバイオシステム社製) を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$  を導入しアミノ化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

### (2) 核酸固定化高分子ゲルの作製

(1) で得られたプローブ A 又は B (500nmol/ml) 5  $\mu$ l、及びグリシジルメタクリレート 5  $\mu$ l を混合し、70°C で 2 時間反応させた。そこへ 50% アクリルアミド水溶液 50  $\mu$ l、10% エチレンジアミン水溶液 10  $\mu$ l および水 450  $\mu$ l、10% のアゾビスイソブチロニトリル水溶液 5  $\mu$ l を加え、70°C で 2 時間重合反応を行い、核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは、5mm の厚さに切り出し、検出操作を行った。

### (3) 試料核酸の標識

試料核酸のモデルとして、(1) で作製したオリゴヌクレオチド (プローブ A、

プローブB)の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド(C、D)を合成した。

オリゴヌクレオチドC:GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG(配列番号3)

オリゴヌクレオチドD:CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC(配列番号4)

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端に、(1)と同様にしてアミノリンクII(PEバイオシステムズジャパン社製)を用いて、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン(DIG:Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス社製)で標識した。

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドを、それぞれ終濃度2mMとなるように100mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解した。等量のDigoxigenin-3-0-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester(26mg/mlジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。

容量を100 $\mu$ lに調整し、2 $\mu$ lのグリコーゲン(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)、10 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)、300 $\mu$ lの冷エタノールを加え、15,000rpm、15分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。さらに、沈殿に500 $\mu$ lの70%エタノールを加え、15,000rpm 5分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿を風乾し、100 $\mu$ lの10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTAに溶解した。こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

#### (4) ハイブリダイゼーション

(2)で作製した核酸固定化高分子ゲル切片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45°Cで30分間、プレハイブリダイゼーションを行い、(3)で得られたDIG標識DNAを加え、45°Cで15時間ハイブリダイゼーションを行った。

(ハイブリダイゼーション溶液組成)

5XSSC

5% ブロッキング試薬(DIG Detectionキット中の試薬)

0.01% N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)

50% ホルムアミド

#### (5) 検出

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化高分子ゲル切片を、あらかじめ保温しておいた 50ml の 0.1XSSC、0.1% SDS 溶液に移し、振盪しながら 45℃、20 分間、洗浄を 3 回行った。

次に、DIG 緩衝液 1 (0.1M マレイン酸、0.15M 塩化ナトリウム (pH7.5)) を加え、室温で振盪しながら SDS の除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG 緩衝液 2 (DIG 緩衝液に 0.5% 濃度でブロッキング試薬を添加したもの) を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、 $10^{-4}$  量の抗 DIG アルカリフォスファターゼ標識抗体 (DIG Detection キットの試薬) を含む DIG 緩衝液 2 10ml を加え、30 分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に 0.2% Tween20 を含む DIG 緩衝液 1 で 15 分間、2 回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG 緩衝液 3 (0.1M トリス-塩酸 (pH9.5)、0.1M 塩化ナトリウム、0.05M 塩化マグネシウム) に 3 分間浸した。DIG 緩衝液 3 を除いた後、CDP-Star (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) を含む DIG 緩衝液 3ml を加えた。

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、X線フィルム用のバインダーに X線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

その結果、プローブ A のゲル切片には、オリゴヌクレオチド C が結合し、プローブ B のゲル切片には、オリゴヌクレオチド D が結合していることが確認された。

## 実施例 63

### (1) グリシジル基含有高分子ゲルの作成

アクリルアミド 4.88 重量部、エチレンジアミン 0.02 重量部、グリシジルメタクリレート 0.1 重量部からなる水溶液にアゾビスイソブチロニトリルを 0.1% 濃度になるように加え、70℃で 2 時間反応させ、高分子ゲルを作成した。

### (2) 核酸高分子ゲルの作製

高分子ゲルを 10mm 角の厚さに切り出し、実施例 62 (1) の方法で作製したプローブ A 又は B (500nmol/ml) 100  $\mu$ l を混合し、70℃で 2 時間反応させ、核酸固定化高分子ゲルを作製した。また、プローブ B についても同様に操作を行い核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは 5mm の厚さに切り出し、実施例 62 の (3) ~ (5) と同様の操作で検出を行った。

その結果、プローブAのゲル切片にはオリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBのゲル切片にはオリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

#### 実施例 64

##### (1) 染色体 DNA の調製

ロドコッカス ロドクロウス J-1 (FERM BP-1478) を栄養培地 (グルコース 15g、酵母エキス 1g、グルタミン酸ナトリウム 10g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L pH 7.2) 100ml で 30℃、3日培養し、集菌した。該菌体から染色体DNAを調製し、PCRの鋳型に用いた。

##### (2) プローブの作製

プローブ作製のために合成したオリゴヌクレオチドの位置を、図9に示した。オリゴヌクレオチドA (配列番号1) はオリゴヌクレオチドB (配列番号2) の約400塩基上流に位置しており、オリゴヌクレオチドE (配列番号5) はオリゴヌクレオチドAから400base、オリゴヌクレオチドF (配列番号6) はオリゴヌクレオチドBから600base下流に位置している。PCRには、オリゴヌクレオチドA及びBの5'末端をアクリルアミド修飾したオリゴヌクレオチドヌクレオチド (和光純薬へ委託合成) を使用した。PCRは、一方のプライマーを過剰量存在させる Asymmetric PCR を行った。プライマー濃度は、5'アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチドA-オリゴヌクレオチドE (100:1) 又は 5'アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチドB-オリゴヌクレオチドF (100:1) に調製した。他の条件は、Ex-Taq (宝酒造株式会社製) の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて行った。反応は 100 $\mu$ l で行い、温度条件は 93℃ 30秒、65℃ 30秒、72℃ 2分を 40サイクル行った。このPCRによって約400塩基 (プローブG: 配列番号7) 及び 600塩基 (プローブH: 配列番号8) の5'アクリルアミド修飾されたプローブDNAを増幅した。

##### (3) 核酸固定化薄片の作製

以下の組成からなる水溶液A (アクリルアミド 3.7質量部、メチレンビスアクリルアミド 0.3質量部、2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン) 2塩酸塩 0.1質量部、プローブG又はプローブH 0.005質量部) を調製した。この水溶液A

に無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜 MHF200TL（三菱レイヨン株式会社製、外径 290  $\mu\text{m}$ 、内径 200  $\mu\text{m}$ ）を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80°Cで4時間放置することにより重合反応を行った。

得られた多孔質中空糸膜の内側の多孔質層には、中空部及び無孔質な中間層よりもプローブG又はHが固定化されたゲルが保持されていた。該方法で得られたプローブG固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維5本を、フロン板上に重なることなく密着させて配列し両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業株式会社 コロネート 4403、ニッポラン 4223）を薄く塗布し、核酸固定化多孔質中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、テフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。プローブHについても同様に核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。また、ブランクとして、核酸を固定化していない同様のシート状物を作製した。

次いで、これらのシート状物をブランク、プローブG、ブランク、プローブH、ブランクの順に5枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々5本ずつ、計25本の核酸固定化多孔質繊維が正方形に規則的に配列した核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を得た。こうして得られた核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を、マイクロトームを用いて0.1mmの厚さに切り出し、縦横各20本ずつ計400本の核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維の断面が規則的に配列した薄片を得た。

#### (4) 蛍光標識検体の作製

検体核酸のモデルとして以下のような検体DNAを作製し、ハイブリダイゼーションに用いた。プローブGのみにハイブリダイズする検体の作製には、オリゴヌクレオチドEとオリゴヌクレオチドAを用いてPCRを行い、約400塩基の検体I（配列番号9）を調製した。プローブHのみにハイブリダイズする検体の作製には、オリゴヌクレオチドFとオリゴヌクレオチドBを用いてPCRを行い、約600塩基の検体J（配列番号10）を調製した。

検体を蛍光標識するために、オリゴヌクレオチドヌクレオチドE及びFの5'

末端が Cy5 でラベルされたもの (Cy5-オリゴヌクレオチド E、Cy5-オリゴヌクレオチド F) を合成 (アマシャムファルマシアバイオテック社、OligoExpress) し、PCR に使用した。PCR は、プライマー濃度を Cy5-オリゴヌクレオチドヌクレオチド E-オリゴヌクレオチド A (100:1) 又は Cy5-オリゴヌクレオチドヌクレオチド F-オリゴヌクレオチド B (100:1) に調製し、その他は Ex-Taq (宝酒造株式会社製) の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて行った。反応は 100  $\mu$ l で行い、温度条件は 93 $^{\circ}$ C 30 秒、65 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分を 40 サイクル行った。この PCR によって検体 I 及び検体 J の DNA を増幅した。反応終了液は SUPEC-02 (宝酒造) を用いて未反応プライマーを除き、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) によって回収した。

#### (5) ハイブリダイゼーション

回収した蛍光標識検体 2  $\mu$ l を濾紙 (PhastTransfer Filter Paper : アマシャムファルマシアバイオテック) にスポットし、実施例 64 (3) で得られた DNA 固定化薄片の片側に密着させ、図 7 で示した装置を用いて 5 V、2 時間電圧をかけることにより、ハイブリダイゼーションと洗浄を行い、蛍光検出器 (蛍光顕微鏡) で観察した。

その結果、核酸固定化薄片中のプローブ G を固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体 I が、プローブ H を固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体 J が特異的にハイブリダイゼーションしていることが確認できた。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 15 : 5' 末端にアクリルアミドが結合した合成 DNA

配列番号 16 : 5' 末端にアクリルアミドが結合した合成 DNA

配列番号 17 : 5' 末端にアクリルアミドが結合した合成 DNA

配列番号 18 : 5' 末端にアクリルアミドが結合した合成 DNA

配列番号 23 : 5' 末端が Cy5 でラベルされた合成 DNA

配列番号 24 : 5' 末端が Cy3 でラベルされた合成 DNA

配列番号 25 : 5' 末端が Cy3 でラベルされた合成 DNA

配列番号 26 : 5' 末端が Cy5 でラベルされた合成 DNA

#### 産業上の利用可能性

本発明により、生体関連物質を高密度かつ強固に固定化させた生体関連物質固定化高分子材料を得ることが可能となる。また、固定化プロセスを二次元平面上で行わず、一次元構造体としての繊維上で分離・独立して行うことにより、鎖長によらず核酸の定量的固定が可能となったこと、整列化プロセスに各種の繊維賦形技術、ないし織物作製技術の導入により高密度化が可能となったこと、その結果得られる得られる三次元構造体としての繊維束から目的とする二次元配列体を作製するために従来法にはない切片化プロセスが新たに導入されたが、それに伴いスポッティング法のような誤差の多い微量分注操作が不要となり、連続切片化を可能としたことにより、わずかな面積に多種多数の核酸を固定化した薄片を多量にまた容易に得ることができる。これにより、遺伝子構造解析等を用いた臨床検査や、食品検査等の分野において有用である。

また、本発明により、中空繊維の内壁部の処理方法、中空繊維の中空部にゲルを充填する方法、及びゲルが充填された繊維の製造方法が提供される。

本発明により充填した繊維内部のゲルは、中空繊維内壁部に物理的に固定されることにより抜けにくくなり、このように製造されたゲルを充填した繊維は、キャピラリー電気泳動やDNA分析用のマイクロアレイ等の製造への利用が可能となる。特に、キャピラリー電気泳動ではゲルとキャピラリーの内壁部の界面が

強固に結合しており、DNA等の泳動溶質の内壁部でのショートパスがなくなり、均一なバンドを形成した泳動を行うことができる。

## 請求の範囲

1. 生体関連物質が直接繊維に固定化された、生体関連物質固定化中空繊維、生体関連物質固定化多孔質繊維又は生体関連物質固定化多孔質中空繊維。
2. 生体関連物質が、生体関連物質が固定化されたゲルを介して繊維に保持された、生体関連物質固定化ゲル保持繊維。
3. 繊維が中実繊維、中空繊維、多孔質繊維又は多孔質中空繊維である請求項 2 記載の繊維。
4. 中実繊維の表面に生体関連物質固定化ゲルが保持された、請求項 3 記載の繊維。
5. 中空繊維の中空部に生体関連物質固定化ゲルが保持された、請求項 3 記載の繊維。
6. 多孔質繊維の多孔質部に生体関連物質固定化ゲルが保持された、請求項 3 記載の繊維。
7. 多孔質中空繊維の中空部及び多孔質部に生体関連物質固定化ゲルが保持された、請求項 3 記載の繊維。
8. 生体関連物質が、以下の (a) ~ (c) の物質からなる群から選択されるいずれかのものである請求項 1 又は 2 記載の繊維。
  - (a) 核酸、アミノ酸、糖又は脂質
  - (b) 上記 (a) の物質のうち 1 種類又は 2 種類以上の成分からなる重合物
  - (c) 上記 (a) 又は (b) の物質と相互作用を有する物質
9. 生体関連物質が核酸である請求項 8 記載の繊維。
10. さらに色素がゲルを介して繊維に保持された、請求項 2 記載の繊維。
11. 請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の繊維の束を含む繊維配列体。
12. 繊維配列体中の各繊維が規則的に配列されたものである請求項 11 記載の繊維配列体。
13. 繊維の束が、 $1\text{ cm}^2$  当たり 100 本以上の繊維を含むものである請求項 11 記載の繊維配列体。
14. 生体関連物質の種類が、各繊維の全部又は一部において異なるものである

請求項 1 1 記載の繊維配列体。

- 1 5. 請求項 1 1 記載の繊維配列体の繊維軸と交差する切断面を有する、該繊維配列体の薄片。
- 1 6. 繊維単位及び該繊維単位の座標基準を含む請求項 1 5 記載の薄片。
- 1 7. 座標基準が、薄片中の 2 以上のマーカー繊維単位である請求項 1 6 記載の薄片。
- 1 8. マーカー繊維単位が染色されたものである請求項 1 7 記載の薄片。
- 1 9. 繊維単位の座標が座標基準に基づいて決定されている請求項 1 6 記載の薄片。
- 2 0. 請求項 1 6 記載の薄片中の各繊維に座標が付与された薄片の製造方法であって、以下の工程：
  - (a) 繊維単位を束ねて固定化した繊維配列体を、該繊維単位の繊維軸と交叉する断面で順次切断し、連続する繊維配列体薄片 S (1)、S (2)、…、S (h)、…、S (m) を得る工程、
  - (b) m 個の薄片中から任意の薄片 S (h) を選択し、該薄片 S (h) 中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、該薄片 S (h) 中の座標基準に基づいて決定する工程、
  - (c) 該 S (h) 薄片に近い位置にある S (i) 薄片中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、工程 (b) において得られた薄片 S (h) の座標データ及び該薄片 S (i) 中の座標基準に基づいて決定する工程、並びに
  - (d) 工程 (b) 及び (c) を繰り返して、該繊維配列体薄片中の各繊維単位の 2 次元座標を決定する工程、を含有する前記方法。
- 2 1. 請求項 1 6 記載の薄片中の各繊維単位の位置を決定する方法であって、以下の工程：
  - (a) 繊維単位を束ねて固定化した繊維配列体を、該繊維単位の繊維軸と交叉する断面で順次切断し、連続する繊維配列体薄片 S (1)、S (2)、…、S (h)、…、S (m) を得る工程、
  - (b) m 個の薄片中から任意の薄片 S (h) を選択し、該薄片 S (h) 中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、該薄片 S (h) 中の座標基準に基づいて決定する工程、

(c) 該 S (h) 薄片に近い位置にある S (i) 薄片中に含まれる各繊維単位の 2 次元座標を、工程 (b) において得られた薄片 S (h) の座標データ及び該薄片 S (i) 中の座標基準に基づいて決定する工程、並びに

(d) 工程 (b) 及び (c) を繰り返して、該繊維配列体薄片中の各繊維単位の 2 次元座標を決定する工程、

を含有する前記方法。

2 2. 請求項 1 6 記載の薄片中の各繊維単位の座標データを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体。

2 3. 請求項 1 6 記載の薄片及び請求項 2 2 記載の記録媒体を含む検体検出用薄片セット。

2 4. 中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部に生体関連物質を導入、固定化させた後、該配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする請求項 1 5 記載の薄片の製造方法。

2 5. 多孔質中空繊維を複数本束ねて配列体とし、次いで該配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質部に生体関連物質を導入、固定化させた後、該配列体を繊維軸と交差する方向にスライスすることを特徴とする請求項 1 5 記載の薄片の製造方法。

2 6. 配列体を構成する各中空繊維の内壁部及び／又は中空部への生体関連物質の固定化を、該配列体を構成する各中空繊維の延長部分の先端を生体関連物質を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各中空繊維の中空部に導入することにより行う請求項 2 4 記載の薄片の製造方法。

2 7. 配列体を構成する各多孔質中空繊維の内壁部、中空部及び／又は多孔質壁部への生体関連物質の固定化を、該配列体を構成する各多孔質中空繊維の延長部分の先端を生体関連物質を含む液に浸漬し、該液を該配列体を構成する各多孔質中空繊維の中空部及び／又は多孔質部に導入することにより行う請求項 2 5 記載の薄片の製造方法。

2 8. 目的の配列パターンに従って配列させた繊維束に張力を与え、該繊維束の繊維間に樹脂を充填して該繊維束を固定し繊維配列体とすることを特徴とする織

維配列体の製造方法。

29. 繊維束の配列が、以下の工程：

- (a) 繊維を、目的の配列パターンと同一パターンの孔を有する複数個の治具の孔に通し、
  - (b) 該治具同士の間隔を拡げること、
- により形成されるものである請求項28記載の製造方法。

30. 治具が、縦線及び横線を交差させて得られる網目を構成する支持線群、又は多孔板である請求項29記載の製造方法。

31. ゲル形成性モノマー(a)溶液を中空繊維の内壁部に付着させた後、前記モノマーを重合させて当該内壁部にゲルを形成させることを特徴とする中空繊維の内壁部の処理方法。

32. 内壁部が多孔質である請求項31記載の処理方法。

33. モノマー(a)が両親媒性モノマーである請求項31記載の処理方法。

34. 請求項31～33のいずれかの方法で処理された中空繊維の中空部にゲル形成性モノマー(b)溶液を充填し、該モノマーを重合させて中空部にゲルを形成させることを特徴とする中空繊維の中空部にゲルを充填する方法。

35. モノマー(b)がアクリルアミドを主成分とするものである請求項34記載の方法。

36. 請求項31～33のいずれかの方法で処理された中空繊維の中空部にゲル形成性モノマー(b)溶液を充填し、該モノマーを重合させて中空部にゲルを形成させることを特徴とする、ゲルが充填された繊維の製造方法。

37. モノマー(b)がアクリルアミドを主成分とするものである請求項36記載の製造方法。

38. 修飾された核酸がグリシジル基を介して結合及び固定化された核酸固定化高分子ゲル。

39. 修飾された核酸が末端をアミノ化した核酸である請求項38記載の核酸固定化高分子ゲル。

40. 高分子ゲルがグリシジル(メタ)アクリレート、重合性モノマー及び架橋剤との共重合体ゲルである請求項38記載の核酸固定化高分子ゲル。

- 4 1. 重合性モノマーがアクリルアミドである請求項 4 0 記載の核酸固定化高分子ゲル。
- 4 2. グリシジル（メタ）アクリレートと修飾された核酸とを反応させた後、得られる反応産物に重合性モノマー及び架橋剤を加えて重合させることを特徴とする請求項 3 8 記載の核酸固定化高分子ゲルの製造方法。
- 4 3. グリシジル（メタ）アクリレート、重合性モノマー及び架橋剤との共重合体ゲルに、修飾された核酸を作用させることを特徴とする請求項 3 8 記載の核酸固定化高分子ゲルの製造方法。
- 4 4. 修飾された核酸が、末端をアミノ化した核酸である請求項 4 2 又は 4 3 記載の製造方法。
- 4 5. 重合性モノマーがアクリルアミドである請求項 4 2 又は 4 3 記載の製造方法。
- 4 6. 核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも 2 種類以上の重合性モノマー成分を含む核酸固定化高分子ゲル。
- 4 7. 重合性モノマー成分の少なくとも 1 種類が、グリシジル基を有する重合性モノマーである請求項 4 6 記載の核酸固定化高分子ゲル。
- 4 8. グリシジル基を有する重合性モノマーがグリシジル（メタ）アクリレートである請求項 4 7 記載の核酸固定化高分子ゲル。
- 4 9. 核酸成分が、末端をアミノ化した核酸である請求項 4 6 記載の核酸固定化高分子ゲル。
- 5 0. 核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも 2 種類以上の重合性モノマー成分を含む溶液を重合することを特徴とする請求項 4 6 記載の核酸固定化高分子ゲルの製造方法。
- 5 1. 核酸成分及び少なくとも 2 種類以上の重合性モノマー成分を含む溶液を重合した後、得られるポリマーを多価アミン成分により架橋することを特徴とする請求項 4 6 記載の核酸固定化高分子ゲルの製造方法。
- 5 2. 生体関連物質がプローブとして担体に結合された請求項 1 5 記載の繊維配列体の薄片を使用する検体の検出方法において、自由拡散以外の方法により試料を該薄片中に移動せしめてハイブリッド形成させ、生体関連物質プローブと結合

- しなかった試料を該薄片中から除去することを特徴とする検出方法。
- 5 3. 自由拡散以外の方法が、繊維配列体薄片の両面に電圧をかけることにより試料を該薄片中に移動せしめる方法である請求項 5 2 記載の検出方法。
  - 5 4. 自由拡散以外の方法が、繊維配列体薄片の片面に吸水性物質を配置することにより、反対側に配置した試料を該薄片中に移動せしめる方法である請求項 5 2 記載の検出方法。
  - 5 5. 生体関連物質が核酸である請求項 5 2 記載の検出方法。
  - 5 6. 試料が蛍光ラベルされている請求項 5 2 記載の検出方法。
  - 5 7. 担体が水溶性高分子ゲルである請求項 5 2 記載の検出方法。
  - 5 8. 水溶性高分子ゲルがポリアクリルアミドを主成分とするゲルである請求項 5 7 記載の検出方法。
  - 5 9. 担体が中空繊維の中空部に保持されていることを特徴とする請求項 5 2 記載の検出方法。

☒ 1

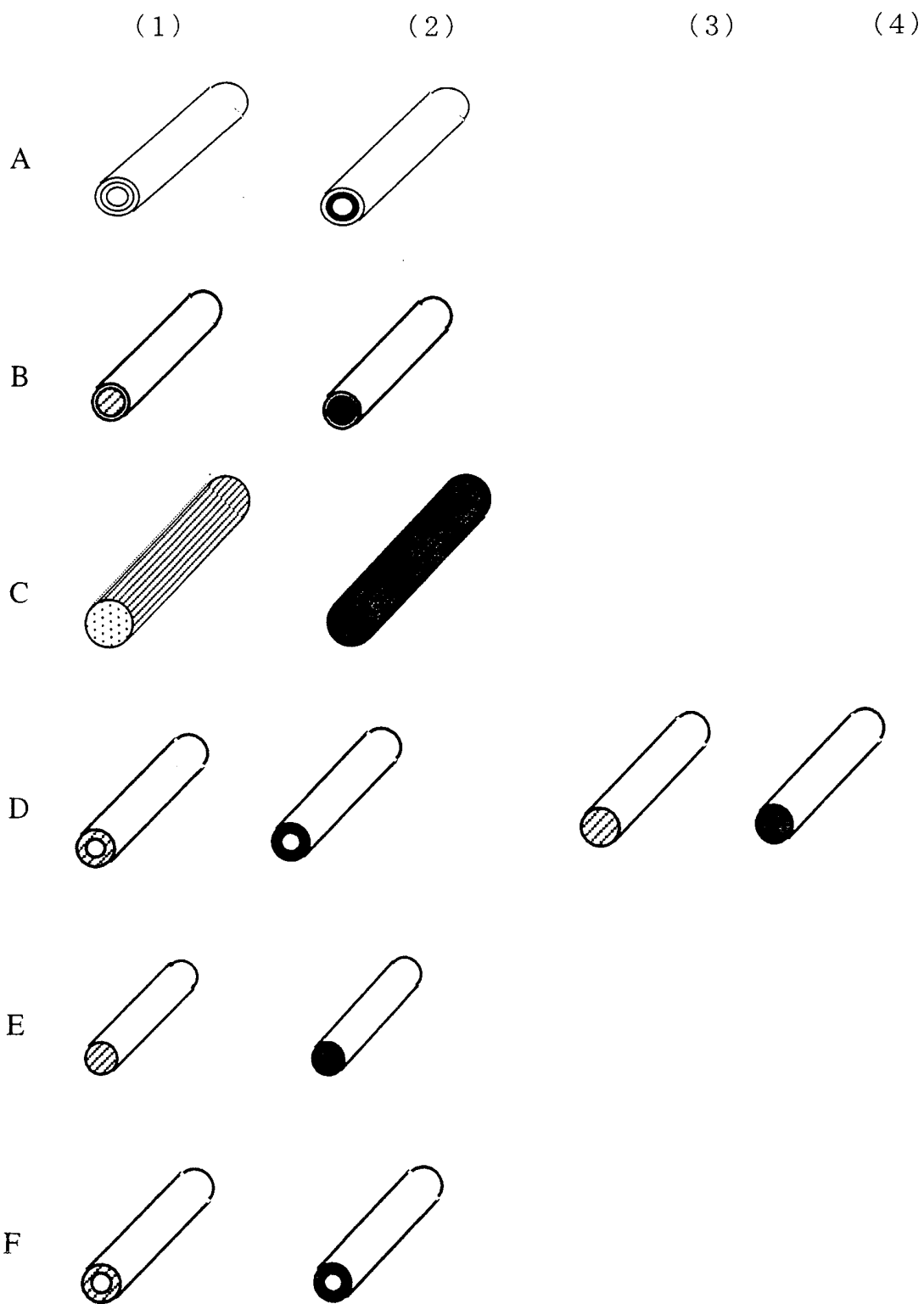


図 2

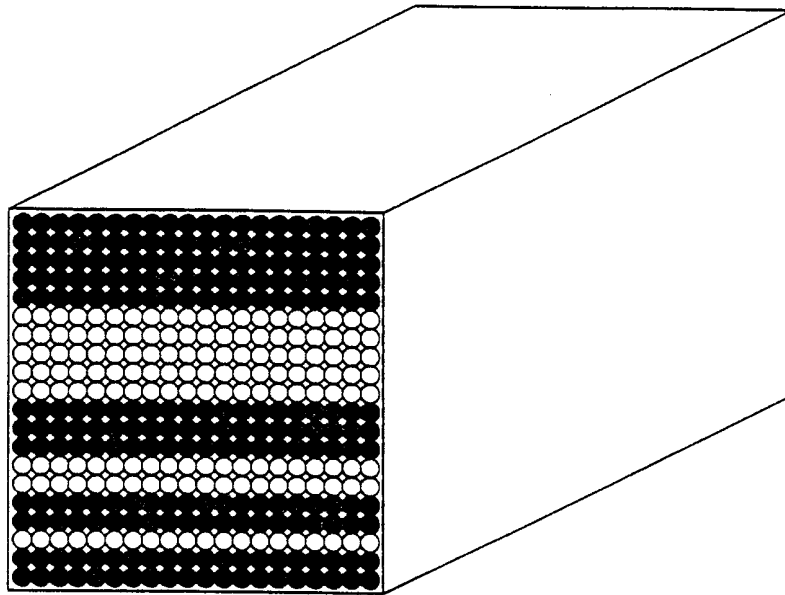


図 3

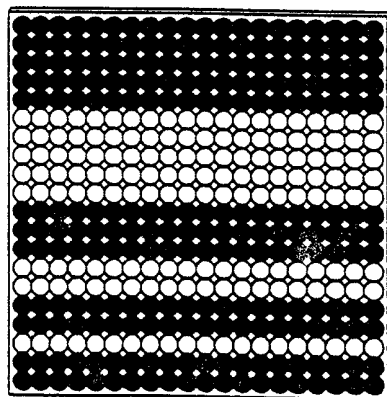


図 4

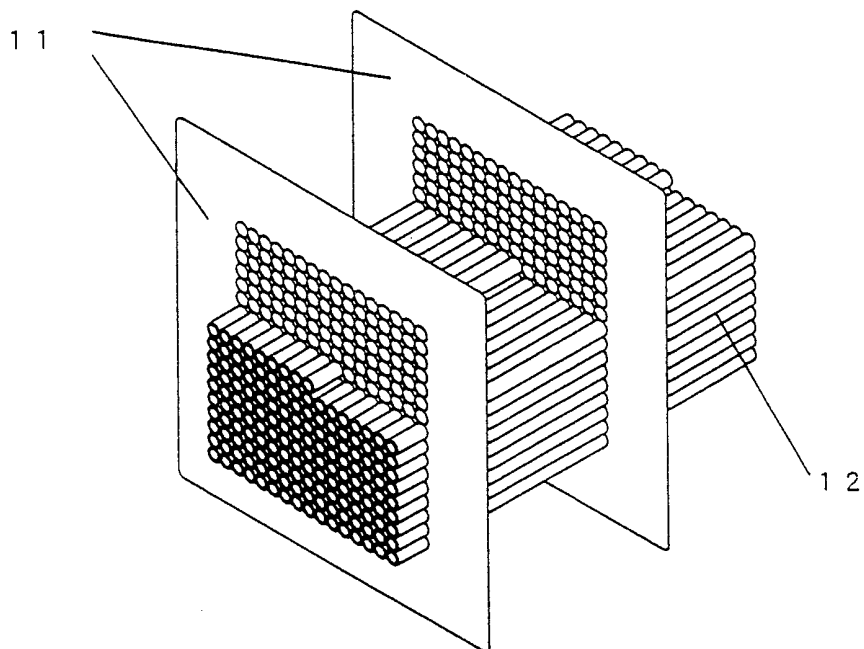


図 5

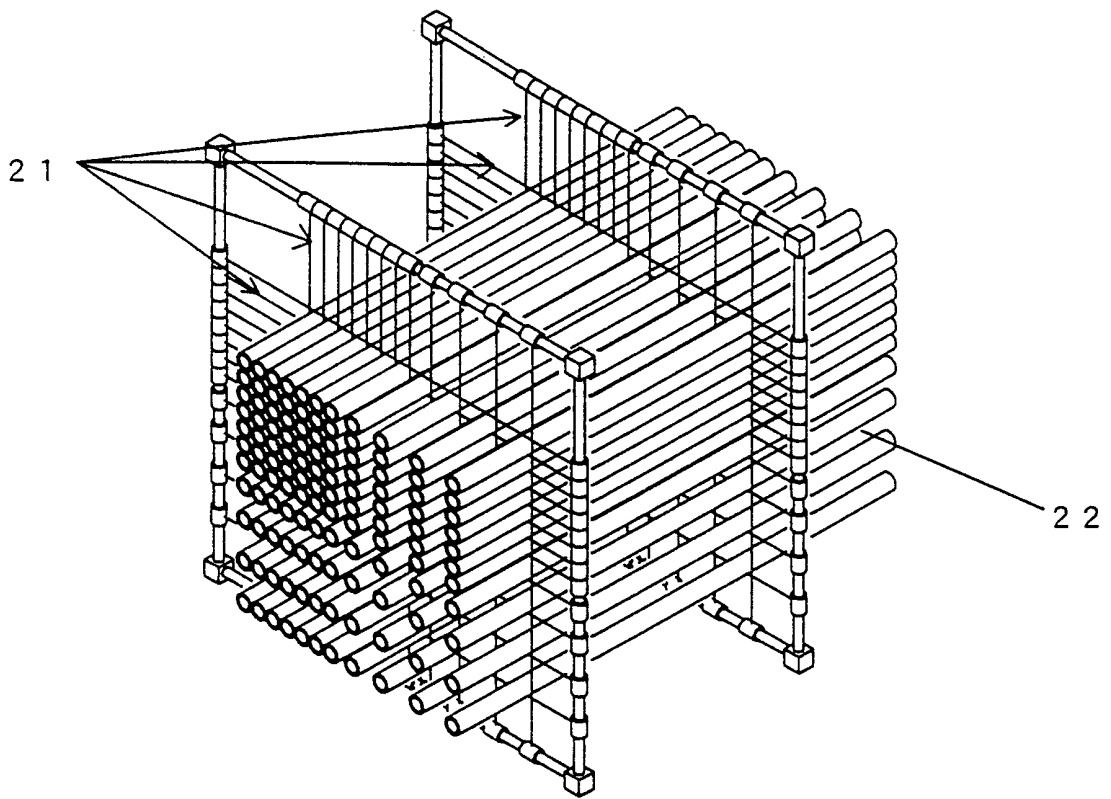


図 6

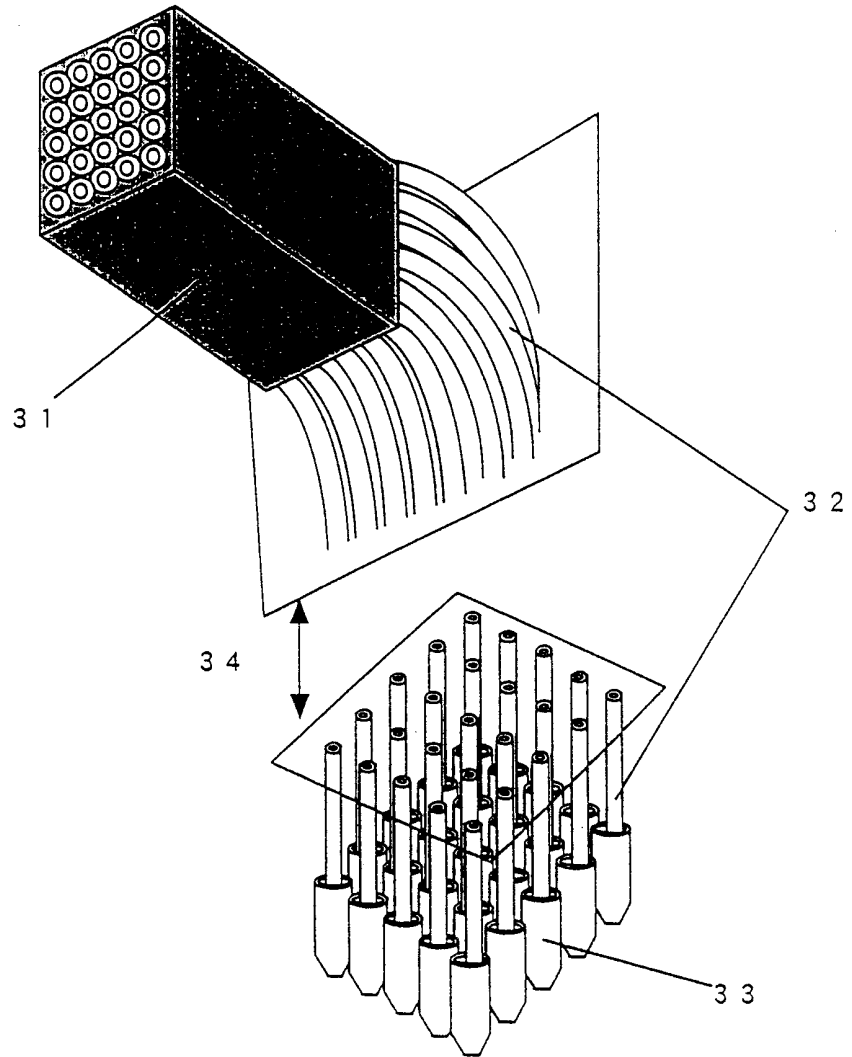
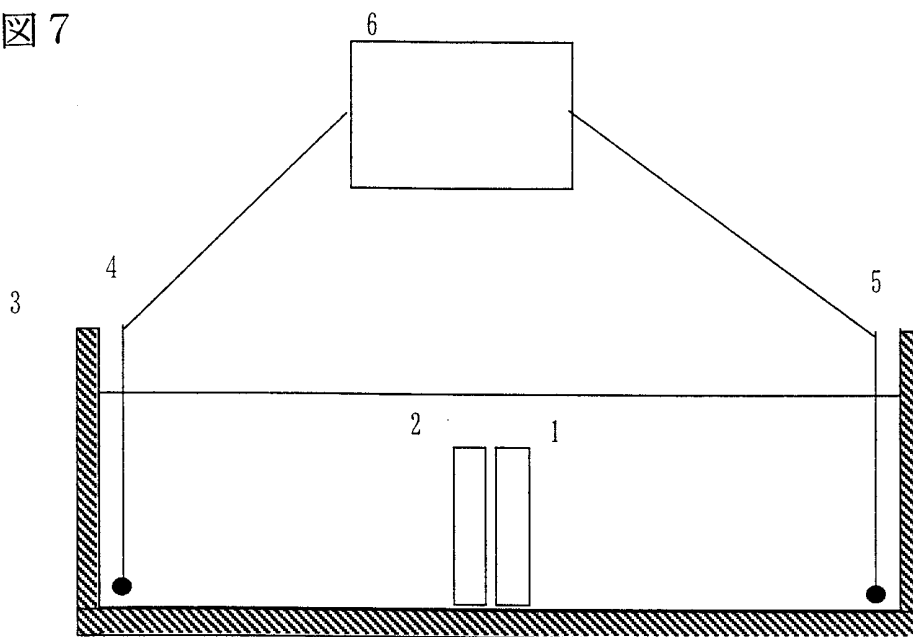
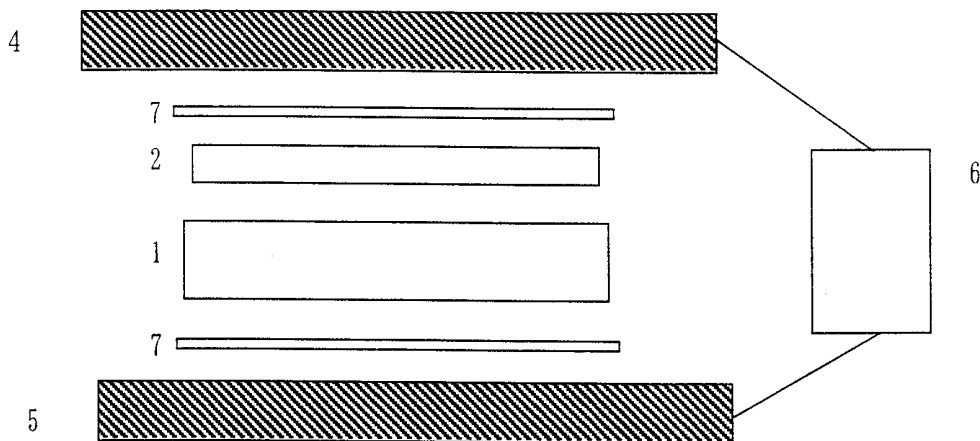


図 7



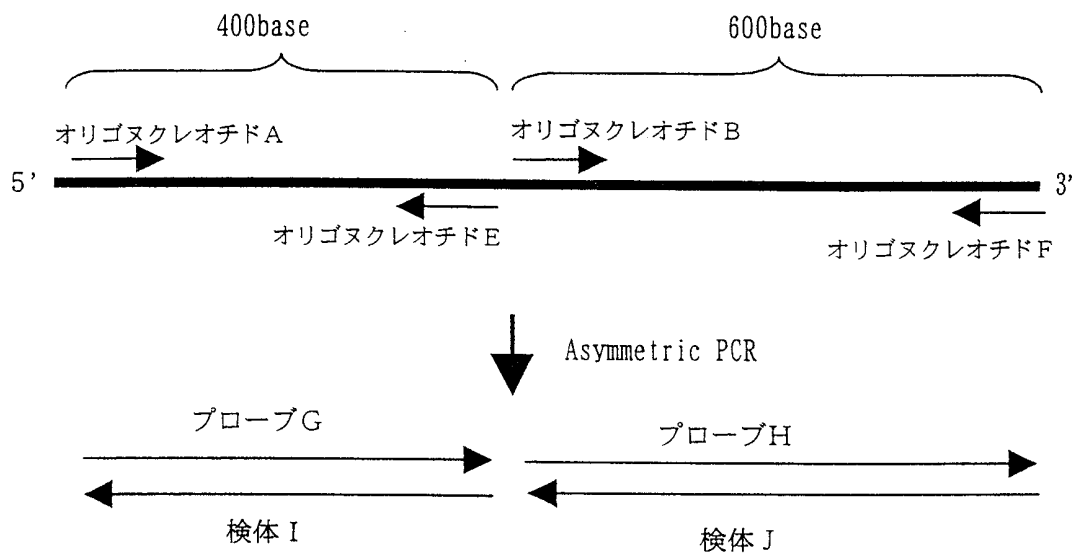
1. DNA 固定化薄片    2. 検体    3. 泳動槽    4. 負極    5. 正極  
 6. 直流電流    7. 濾紙    8. 電解液槽

図 8



1. DNA 固定化薄片    2. 検体    3. 泳動槽    4. 負極    5. 正極  
 6. 直流電流    7. 濾紙

図 9



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

<120> A fiber carrying biologically related substances

<130> PH-789-PCT

<140>

<141>

<150> JP99/59361

<151> 1999-03-05

<150> JP99/84100

<151> 1999-03-26

<150> JP99/84101

<151> 1999-03-26

<150> JP99/83964

<151> 1999-03-26

<150> JP99/93043

<151> 1999-03-31

<150> JP99/93044

<151> 1999-03-31

<150> JP99/215014

<151> 1999-07-29

<150> JP99/240041

<151> 1999-08-26

<150> JP99/298613

<151> 1999-10-05

<150> JP99/324194

<151> 1999-11-15

<150> JP99/346288

<151> 1999-12-06

<150> JP99/346309

<151> 1999-12-06

<150> JP99/346521

<151> 1999-12-06

<150> JP2000/55658

<151> 2000-03-01

<150> JP2000/57075

<151> 2000-03-02

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg etc

33

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcaggt ttgggacagc ag

32

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg

28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

27

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gctcaagcgc gatttcgggt tcgacatccc c

31

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

catgtcgcgt cgttggtgga cgaagcggta 30

<210> 7

<211> 388

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

<400> 7

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctcatcacgc ccgcccggt cgaccgagtc 60  
 gtttcgtact acgagaacga gatcggcccg atgggcggtg ccaaggtcgt ggccaagtcc 120  
 tgggtggacc ctgagtaccg caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgtca 180  
 ttgggctatg ccggtgagca ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg 240  
 catcacgtgg tgggtgtcac tctgtgtteg tgctatccgt ggccggtgct tggctctccc 300  
 cccgcctggt acaagagcat ggagtaccgg tcccagatgg tagcggacce tcgtggagtg 360  
 ctcaagcgcg atttcggttt cgacatcc 388

<210> 8

<211> 611

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

&lt;400&gt; 8

gatgaggtgg aggtcaggt ttgggacagc agtccgaaa tccgctacat cgteatcccg 60  
gaacggcccg ccggcaccga cggttgggcc gaggaggagc tgacgaagct ggtgagcccg 120  
gactcgatga tcggtgtcag taatgcgctc acaccgcagg aagtgatcgt atgagtgaag 180  
acacactcac tgateggctc ccggcgactg ggaccgccgc accgccccgc gacaatggcg 240  
agcttgtatt caccgagcct tgggaagcaa cggcattcgg ggtcgccatc gcgctttcgg 300  
atcagaagtc gtacgaatgg gagttcttcc gacagcgtct cattcactcc atcgctgagg 360  
ccaacggttg cgaggcatac tacgagagct ggacaaaggc gctcgaggcc agcgtggctc 420  
actcggggct gatcagcga gatgagatcc gcgagcgcac ggaatcgatg gccatcatcg 480  
actgacatcc cctgtgtctc catctagcag cagtgcgggc gtacccccgac ggtgctgagc 540  
cgacggggta cccccgact tcatcaatga cggtggttcc taatttggtc cggtggtatc 600  
tgatctcgcg g 611

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 388

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rhodococcus rhodochrous

&lt;400&gt; 9

ggatgtcgaa accgaaatcg cgcttgagca ctccacgagg gtccgctacc actcgggacc 60  
ggtactccat gctcttgtac caggcgggcg ggagaccaag caccggccac ggatagcagc 120  
aacacagagt gcacaccacc acgtgatgcg tttgggagtc gttgaagacc gccgaaattt 180  
ggtgtgcctg ctcaccggca tagcccaatg acgccatcgc ggccgtcgcg tcctcttcga 240  
gccacttgcg gtactcaggg tccaccagg acttggccac gaccttggca ccgcccacgc 300  
ggccgatcic gttctcgtag tacgaaacga ctcggtcgcac cgcggcgggc gtgatgagcc 360  
ctcgcctcgtc cagcaaggtt tcgatcgc 388

&lt;210&gt; 10

<211> 611

<212> DNA

<213> *Rhodococcus rhodochrous*

<400> 10

```

ccgcgagatc agtatccacc gagccaaatt aggaaccacc gtcattgatg aagtgcgggc 60
gtaccccgtc ggctcagcac cgtcggggta cgcccgcaact gctgctagat ggagacacag 120
gggatgtcag tcgatgatgg ccatcgattc catgcgctcg cggatctcat cttecgctgat 180
cagccccgag tcgaccacgc tggcctcgag cgccctttgtc cagctctcgt agtatgcctc 240
gcaaccgttg gcctcagcga tggagtgaat gagacgctgt cggaagaact cccattcgta 300
cgacttctga tccgaaagcg cgatggcgac cccgaatgcc gttgcttccc aaggctcggc 360
gaatacaagc tcgccattgt cgcggggcgg tgcggcggtc ccagtcgccg ggagccgatc 420
agtgagtgtg tcttcaactca tacgatcact tcctgcggtg tgagcgcatc actgacaccg 480
atcatcgagt cccggctcac cagcttcgtc agctcctcct cggaccaacc gtcggtgccc 540
gccggccggt cccgggatgac gatgtagcgg atttcggagc tgctgtccca aacctgacc 600
tccacctcat c

```

611

<210> 11

<211> 651

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 11

```

caaccaacca caactacata cacatacata cacaatggtc gctcaagttc aaaagcaagc 60
tccaactttt aagaaaactg ccgtcgtcga cgggtgtctt gacgaagtct ccttggacia 120
atacaagggt aagtacgttg tcctagcctt tattccattg gccttcaact tcgtctgtcc 180
aaccgaaatc attgcittct cagaagetgc taagaaattc gaagaacaag gcgctcaagt 240
tcttttcgcc tccactgact ccgaatactc ctttttggca tggaccaata tcccaagaaa 300
ggaaggtggt ttgggccc aa tcaacattcc attgttggct gacaccaacc actctttgtc 360

```

cagagactat ggtgtcttga tcgaagaaga aggtgtcgcc ttgagaggtt tgttcatcat 420  
 cgacccaaag ggtgtcatta gacacatcac cattaacgat ttgccagtcg gtagaaacgt 480  
 tgacgaagcc ttgagattgg ttgaagcctt ccaatggacc gacaagaacg gtactgtctt 540  
 gccatgtaac tggactccag gtgctgctac catcaagcca accgttgaag actccaagga 600  
 atacttcgaa gctgccaaca aataagacgc ttgcagagtt gtctaaatga c 651

<210> 12

<211> 586

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 12

caaagcatac ctaataacaa tataatecca taatgctagc cctagctgat aacattctac 60  
 gtataataaa tttcctatft ttggttatft ccatcggitt aatcagttcg ttgttaaaca 120  
 cccaacatag gcacagctcc agagtaaact actgtatggt tgcttgtgca tatggtatat 180  
 tcaccgattc attgtacggt gtctttgcca acttcattga accattggca tggccactag 240  
 ttttgttcac actggacttt ttgaactttg tgttcacttt cactgccggt acagtgttgg 300  
 cegttgggtat cagagctcac tcatgtaaca acagtcata cgttgacagt aacaagatta 360  
 ctcaaggttc cggtagcaga ttagacaag ctcaagecgc tgttgcatte ctctacttct 420  
 cttgtgcat ctttttggct aagaccctga tgtctgtttt caacatgac tccaatgggtg 480  
 cctttggttc tggttcttcc tccaagagaa gaagaactgg ccaagtcggt gttccaacca 540  
 tttccaagt ctaattgaag cgcaccaact taaattttac gccact 586

<210> 13

<211> 1105

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 13

aagaaacatc cctcatacta ccacacatat gccaaactcta gtaaattggac caagaagaga 60  
ctctaccgaa gggtttgata cegatatcat cactcttct agattcataa tegagcacca 120  
gaagcaatth aagaacgcta ctgggtgattt cacattagta ctgaatgcct tgcaattcgc 180  
gttcaaattt gtatctcaca ccatcagacg tgctgaattg gtttaacttgg ttgggttagc 240  
aggcgcttcc aacttcactg gtgaccagca aaagaagttg gacgttctag gtgatgaaat 300  
atthtatcaat gccatgaggg ctagtgggat catcaaggte cttgtatctg aagaacagga 360  
agacttgatc gtttttccca caaacacggg ctcatacgcg gtgtgtttgtg atcctattga 420  
tggctcctca aatttggacg ccgggtgtctc cgttggaaact atcgcgtcta tattcagact 480  
gctaccagac tcatcaggta ctataaacga cgtactgaga tgttgtaaag aaatggtagc 540  
cgcttgctat gccatgtacg gatcctctac gcacttagta ttgacattgg gtgatggagt 600  
tgatgggttt accttagaca caaacttggg cgaattcacc ttgactcacc ctaacttaag 660  
aattccgcct caaaaggcca tetactcaat taatgaaggt aacaccctct actggaacga 720  
gactataaga acatttattg agaaagtcaa acaaccccaa gcagacaaca acaacaagcc 780  
tttctcggct aggtatgttg gatccatggt tgctgatgtt cacaggacgt ttctttacgg 840  
tggccttttc gcataacctt gcgacaagaa gagccccaac ggaaaactga ggttgcttta 900  
tgaggccttc ccaatggctt tcttaatgga acaagcaggg ggaaaagcgg tcaacgatcg 960  
cggagagaga atcttggatt tggtgccaag tcatatccat gacaaatctt ctatttgggt 1020  
gggttcttca ggtgaaattg acaaattttt agaccatatt ggcaagtcac agtagttcaa 1080  
tgategcctt cttttcttat tttct 1105

<210> 14

<211> 670

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 14

ctaagaaaac cacgatcaaa caaataaate agcaatgggt gcctacaaat atttggaaaga 60  
attgcaaaga aagaagcaat ctgaigttht gagattcttg caaagagtea gagtctggga 120  
atacagacaa aagaatgtca ttcacagagc cgctagacca actagaccag acaaggctag 180

aagattgggt tacaaagcta agcaaggttt cgttatctac cgtgtcagag ttagacgtgg 240  
taacagaaag agacctgttc caaaggggtgc tacttacggt aagccaacta accaaggtgt 300  
caatgaattg aaataccaaa gatccttgag agctaccgct gaagaaagag ttggtcgctg 360  
tgccgctaac ttgagagtct tgaactccta ctgggtaac caagattcta cttacaagta 420  
cttcgaagtt atcttggctg acccicaaca caaggtatc agaagagatg ctcgttacaa 480  
ctggatctgt gaccagttc acaagcaccg tgaagctaga ggtttgactg ccaactggtaa 540  
gaaatccaga ggtatcaaca agggtcacaa attcaacaac accaaggctg gtagaagaaa 600  
gacctggaag agacaaaaca ctttgcctt gtggagatac agaaaataag ctggttgatg 660  
gaaaatataa 670

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus

<400> 15

caaccaacca caactacata cacatac 27

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus

<400> 16

ctaagaaaac cacgatcaaa c

21

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus

<400> 17

aagaaacatc cctcatacta ccacac

26

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA bound with acrylamide at 5' terminus

<400> 18

ctaagaaaac cacgatcaaa c

21

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

gtcatttaga caactctgca agcgt

25

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

ttatattttc catcaaccag c

21

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

agaaaataag aaaagaaggc gatca

25

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

ttatattttc catcaaccag c

21

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA labelled with Cy5 at 5' terminus

<400> 23

gaacttgagc gaccattgtg tatgtatgtg tatgtagttg

40

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA labelled with Cy3 at 5' terminus

<400> 24

atcagctagg gctagcatta tgggattata ttgttattag 40

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA labelled with Cy3 at 5' terminus

<400> 25

gtccatttac tagagttggc atatgtgtgg tagtatgagg 40

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA labelled with Cy5 at 5' terminus

<400> 26

attttaggc acccattgct gatttatttg tttgatcgtg 40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01353

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50, C12M 1/00, C12M 3/00, C07H 21/04, D06M 15/00		
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) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50, C12M 1/00, C12M 3/00, C07H 21/04, D06M 15/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, 11-108928, A (DAINAKOMU K.K.), 23 April, 1999 (23.04.99) (Family: none)	1-27,52-59
X	WO, 98/50782, A2 (TUFTS COLLEGE), 12 November, 1998 (12.11.98) & AU, 9872872, A	1-27,52-59
X	FERGUSON, J.A. et al. "A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression", Nat. Biotechnol. (1996) Vol. 14, No. 13, p. 1681-1684	1-27,52-59
X	JP, 11-000959, A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 06 January, 1999 (06.01.99) (Family: none)	28
X	JP, 9-111010, A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 28 April, 1997 (28.04.97) (Family: none)	28
X	JP, 8-188967, A (Teijin Limited), 23 July, 1996 (23.07.96) (Family: none)	31-37
X	EP, 843019, A2 (Kyowa Medetsukusu K.K.), 20 May, 1998 (20.05.98) & JP, 10-179179, A	38-45
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 June, 2000 (05.06.00)		Date of mailing of the international search report 13.06.00
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01353

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 4-046193, A (Nippon Zeon Co., Ltd.), 17 February, 1992 (17.02.92) (Family: none)	38-45
X	PROUDNIKOV,D.et al."Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips", Anal.Biochem.(1998)Vol.259,No.1,p.34-41	46,49
P,A	JP, 11-211694, A (Yuichi MORI), 06 August, 1999 (06.08.99) (Family: none)	1-59
A	YERSHOV,G.et al. "DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips", Proc.Natl.Acad.Sci.,USA(1996)Vol.93,No.10,p.4913-4918	1-59

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01353

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Extra Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01353

Extra Sheet

1. Claims 1 to 27 and 52 to 59 pertain to biological substance-immobilized hollow fibers, biological substance-immobilized porous fibers or biological substance-immobilized porous and hollow fibers, wherein a biological substance is immobilized directly on a fiber, fiber alignments having bundles of these fibers, slices of these fiber alignments and processes for producing the same.

2. Claims 28 to 30 pertain to processes for producing fiber alignments which comprise applying a tensile stress to fiber bundles aligned in accordance with a desired alignment pattern and immobilizing these fiber bundles by filling a resin among fibers in these fiber bundles to give a fiber alignment.

3. Claims 31 to 37 pertain to methods for treating the inner wall of hollow fibers which comprise adhering a solution of a gel-forming monomer to the inner wall of the hollow fibers and then polymerizing the monomer to thereby form a gel on the inner wall.

4. Claims 38 to 45 pertain to nucleic acid-immobilized polymer gels wherein a modified nucleic acid is bonded and immobilized via glycidyl group and processes for producing the same.

5. Claims 46 to 51 pertain to nucleic acid-immobilized polymer gels which contain a nucleic acid component, a polyvalent amine component and at least two polymerizable monomer components and processes for producing the same.

Since there is no technical feature common to all of the claims cited above, the above groups 1 to 5 of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50, C12M 1/00, C12M 3/00, C07H 21/04, D06M 15/00

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 (IPC))  
 Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50, C12M 1/00, C12M 3/00, C07H 21/04, D06M 15/00

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

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)  
 CA(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

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 請求の範囲の番号
P, X	JP, 11-108928, A (株式会社ダイナコム) 23. 4月. 1999 (23. 04. 99) (ファミリーなし)	1-27, 52-59
X	WO, 98/50782, A2 (TUFTS COLLEGE) 12. 11月. 1998 (12. 11. 98) & AU, 9872872, A	1-27, 52-59
X	FERGUSON, J. A. et al. "A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression", Nat. Biotechnol. (1996) Vol. 14, No. 13, p. 1681-1684	1-27, 52-59

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 05. 06. 00	国際調査報告の発送日 <b>13.06.00</b>
--------------------------	-------------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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) 高堀 栄二	4 B	9 2 8 1
	電話番号 03-3581-1101	内線	3448

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 請求の範囲の番号
X	JP, 11-000959, A (三菱レイヨン株式会社) 6. 1月. 1999 (06. 01. 99) (ファミリーなし)	28
X	JP, 9-111010, A (三菱レイヨン株式会社) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) (ファミリーなし)	28
X	JP, 8-188967, A (帝人株式会社) 23. 7月. 1996 (23. 07. 96) (ファミリーなし)	31-37
X	EP, 843019, A2 (協和メデックス株式会社) 20. 5月. 1998 (20. 05. 98) & JP, 10-179179, A	38-45
X	JP, 4-046193, A (日本ゼオン株式会社) 17. 2月. 1992 (17. 02. 92) (ファミリーなし)	38-45
X	PROUDNIKOV, D. et al. "Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide micro chips", Anal. Biochem. (1998) Vol. 259, No. 1, p. 34-41	46, 49
P, A	JP, 11-211694, A (森有一) 6. 8月. 1999 (06. 08. 99) (ファミリーなし)	1-59
A	YERSHOV, G. et al. "DNA analysis and diagnostics on oligonucleo tide microchips", Proc. Natl. Acad. Sci. , USA (1996) Vol. 93, No. 10, p. 4913-4918	1-59

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
  
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
  
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

## 別紙参照

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 別紙

1. 請求の範囲1-27、52-59は、生体関連物質が直接繊維に固定化された、生体関連物質固定化中空繊維、生体関連物質固定化多孔質繊維又は生体関連物質固定化多孔質中空繊維、該繊維の束を含む繊維配列体、該繊維配列体の薄片及びその製造方法に関するものである。
2. 請求の範囲28-30は、目的の配列パターンに従って配列させた繊維束に張力を与え、該繊維束の繊維間に樹脂を充填して該繊維束を固定し繊維配列体とする繊維配列体の製造方法に関するものである。
3. 請求の範囲31-37は、ゲル形成性モノマー溶液を中空繊維の内壁部に付着させた後、前記モノマーを重合させて当該内壁部にゲルを形成させる中空繊維の内壁部の処理方法に関するものである。
4. 請求の範囲38-45は、修飾された核酸がグリシジル基を介して結合及び固定化された核酸固定化高分子ゲル及びその製造方法に関するものである。
5. 請求の範囲46-51は、核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む核酸固定化高分子ゲル及びその製造方法に関するものである。

上記請求の範囲の全てに共通の事項はなく、上記1～5の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。