

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年9月7日(07.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/159795 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/34 (2006.01) B81C 1/00 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
B81B 1/00 (2006.01) G01N 35/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/007927

(22) 国際出願日: 2018年3月2日(02.03.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2017-040664 2017年3月3日(03.03.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 渡邊 力也 (WATANABE Rikiya); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 野地 博行 (NOJI Hiroyuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京

大学内 Tokyo (JP). 曾我 直樹 (SOGA Naoki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

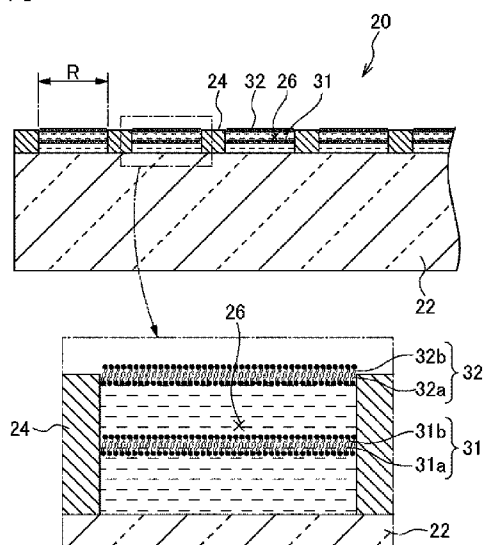
(74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

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

(54) Title: MICROREACTOR CHIP AND MANUFACTURING METHOD FOR SAME

(54) 発明の名称: マイクロリアクタチップおよびその製造方法

[図2]



(57) Abstract: Provided is a microreactor chip comprising a substrate and a hydrophobic layer which is a layer formed on the substrate and made of a hydrophobic substance, wherein the hydrophobic layer is formed such that a plurality of chamber openings are arranged regularly on a main surface of the layer. Each chamber is provided with a first lipid bilayer membrane and a second lipid bilayer membrane that are disposed with a gap therebetween in the depth direction so as to partition the chamber in the depth direction.

(57) 要約: マイクロリアクタチップは、基板と、基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備える。各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている。

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： マイクロリアクタチップおよびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロリアクタチップおよびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 特開第 2 0 1 5 - 0 4 0 7 5 4 号（特許文献 1）は、平坦な基板と、基板の表面に疎水性の物質により規則的に高密度に配列するように形成された容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下の複数の微小チャンバーと、試験用水溶液が満たされた状態の複数の微小チャンバーの開口部に試験用水溶液を液封するよう形成された脂質二重膜とを備える高密度微小チャンバーアレイを開示する。

発明の概要

[0003] 上記従来の高密度微小チャンバーアレイを基礎として、その応用技術の開発が望まれていた。

[0004] 本開示の一側面に係るマイクロリアクタチップは、
基板と、

前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、

を備え、

各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第 1 脂質二重膜と第 2 脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている。

図面の簡単な説明

[0005] [図1] 図 1 は、第 1 実施形態に係るマイクロリアクタチップの概略構成の一例を示す平面図である。

[図2] 図 2 は、第 1 実施形態に係るマイクロリアクタチップの図 1 における A

ー A 断面および該断面の一部を拡大して示す図である。

[図3]図3は、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップの製造方法の一例を示すフローチャートである。

[図4]図4は、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程（ステップS11）の一例を示すフローチャートである。

[図5A]図5Aは、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程において、基板を用意する工程を示す図である。

[図5B]図5Bは、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程において、基板上に物質膜を形成する工程を示す図である。

[図5C]図5Cは、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程において、物質膜上にレジストを形成する工程を示す図である。

[図5D]図5Dは、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程において、レジストをパターニングする工程を示す図である。

[図5E]図5Eは、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程において、パターニングされたレジストをマスクとして物質膜をエッチングする工程を示す図である。

[図5F]図5Fは、第1実施形態における脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程において、レジストを除去する工程を示す図である。

[図6]図6は、第1実施形態における第1脂質二重膜を形成する工程（ステップS12）の一例を示すフローチャートである。

[図7A]図7Aは、第1実施形態における第1脂質二重膜を形成する工程において、第1試験用水溶液を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図7B]図7Bは、第1実施形態における第1脂質二重膜を形成する工程にお

いて、脂質を含有する有機溶媒を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図7C]図7Cは、第1実施形態における第1脂質二重膜を形成する工程において、膜形成用水溶液を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図8A]図8Aは、第1実施形態における第1脂質二重膜を押し下げる工程（ステップS13）の一例を示すフローチャートである。

[図8B]図8Bは、第1実施形態における第1脂質二重膜を押し下げる工程において、第1試験用水溶液より濃度の高い液体を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図8C]図8Cは、第1実施形態における第1脂質二重膜を押し下げる工程において、浸透圧により第1脂質二重膜が押し下げられる工程を示す図である。

[図9]図9は、第1実施形態における第2脂質二重膜を形成する工程（ステップS14）の一例を示すフローチャートである。

[図10A]図10Aは、第1実施形態における第2脂質二重膜を形成する工程において、第2試験用水溶液を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図10B]図10Bは、第1実施形態における第2脂質二重膜を形成する工程において、脂質を含有する有機溶媒を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図10C]図10Cは、第1実施形態における第2脂質二重膜を形成する工程において、膜形成用水溶液を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図11A]図11Aは、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップにおいて第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタの容積を制御する方法を説明するための図である。

[図11B]図11Bは、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップにおいて第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタの容積を制御する方法を説明するための図である。

[図12A]図12Aは、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップにおいて第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタから反応生成物

を回収する方法を説明するための図である。

[図12B]図12Bは、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップにおいて第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタから反応生成物を回収する方法を説明するための図である。

[図13]図13は、第2実施形態に係るマイクロリアクタチップの縦断面および該断面の一部を拡大して示す図である。

[図14]図14は、第2実施形態に係るマイクロリアクタチップの製造方法の一例を示すフローチャートである。

[図15A]図15Aは、第2実施形態における第2脂質二重膜を押し下げる工程（ステップS15）の一例を示すフローチャートである。

[図15B]図15Bは、第2実施形態における第2脂質二重膜を押し下げる工程において、第1試験用水溶液より濃度の高い液体を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図15C]図15Cは、第2実施形態における第2脂質二重膜を押し下げる工程において、浸透圧により第2脂質二重膜が押し下げられる工程を示す図である。

[図16]図16は、第2実施形態における第3脂質二重膜を形成する工程（ステップS16）の一例を示すフローチャートである。

[図17A]図17Aは、第2実施形態における第3脂質二重膜を形成する工程において、第3試験用水溶液を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図17B]図17Bは、第2実施形態における第3脂質二重膜を形成する工程において、脂質を含有する有機溶媒を液体流路に導入する工程を示す図である。

[図17C]図17Cは、第2実施形態における第3脂質二重膜を形成する工程において、膜形成用水溶液を液体流路に導入する工程を示す図である。

発明を実施するための形態

[0006] 脂質二重膜を介して生じる様々の生体分子反応、例えば膜輸送過程や膜透過反応、膜表面での酵素反応などでは、反応生成物の拡散に長時間かかるこ

とや、酵素活性に伴った物質濃度の変化が極めて緩やかであることなどから、脂質二重膜を介して生じる様々な生体分子反応を高感度に検出することが困難となりやすい。チャンバーの容量が大きいと、チャンバー内の濃度変化が小さくなり、濃度変化としての検出が困難となる。チャンバー数が少ない場合は、計測のスループットが悪くなる。したがって、脂質二重膜により液封された極めて容量が小さな多数の微小チャンバーが高密度に形成された高密度微小チャンバーアレイが必要となる。上記特許文献 1 は、かかる高密度微小チャンバーアレイを開示する。しかしながら、その応用技術については未検討の部分があった。

[0007] 発明者は、従来的高密度微小チャンバーアレイの応用技術を見出すべく、鋭意検討した。その結果、以下の知見を得た。なお、以下の知見はあくまで本発明をなすきっかけとなったものであり、本発明を限定するものではない。

[0008] すなわち、上記高密度微小チャンバーアレイが開発されたことにより、膜タンパク質による膜横断型の物質輸送などの計測が効率的に実施可能となった。ところで、高密度微小チャンバーアレイにおいて各チャンバーをさらに細分化することができれば、活性の検出感度の向上が実現され、膜タンパク質の性質をより詳細に解明できる可能性がある。

[0009] かかる洞察に基づき、発明者は、従来的高密度微小チャンバーアレイにおいて、脂質二重膜の形成プロトコルを新規開発することにより、各チャンバーの内部に 2 層の脂質二重膜を形成する技術を確立し、すなわち、各チャンバーを脂質二重膜により細分化することに成功した。また、該技術においては、形成される 2 層の脂質二重膜の間隔を定量制御することが可能であり、細分化された各分画の容積を制御（超小型化）することができる。

[0010] さらに、該技術を利用すると、分画によるリアクタ容量の小型化に伴い、従来の膜タンパク質の活性検出感度が大幅に改善されるだけでなく、2 層膜オルガネラや細菌細胞膜を *in vitro* で人工的に構築することとなり、従来計測困難であった 2 層膜オルガネラや細菌細胞膜に存在する膜タンパ

ク質の機能解析への道筋が拓かれる。すなわち、該技術の開発は、膜タンパク質の機能解析におけるイノベーションである。

[0011] 以下で説明する実施形態は、このような知見に基づいて創案されたものである。

[0012] 実施形態の第1の態様に係るマイクロリアクタチップは、
基板と、

前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、

を備え、

各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている。

[0013] このような態様によれば、各チャンバーが2層の脂質二重膜により細分化されているため、リアクタの容積が大幅に小型化される。この結果、生体分子1個の反応によるリアクタ内の反応生成物や反応基質などの濃度変化を大きくし、濃度変化として検出する際の検出感度を高くすることができ、生体分子の反応が極めて遅くても、生体分子の反応を高感度で検出することができる。また、2層膜オルガネラや細菌細胞膜が*in vitro*で人工的に構築されていることになり、従来計測困難であった2層膜オルガネラや細菌細胞膜に存在する膜タンパク質の機能解析が可能となる。

[0014] また、このような態様によれば、各チャンバーが2層の脂質二重膜により深さ方向に分画されていることから、リアクタ内の液体に含まれる蛍光物質が発する光を、基板の下方に配置された共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出する際に、分画されたリアクタでのレンズ作用によって蛍光画像が歪んでしまうことが抑制され、定量的に観察することが可能である。

[0015] 実施形態の第2の態様に係るマイクロリアクタチップは、第1の態様に係るマイクロリアクタチップであって、

各チャンバーの容量は、 $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である。

[0016] 実施形態の第3の態様に係るマイクロリアクタチップは、第1または第2の態様に係るマイクロリアクタチップであって、

前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間の間隔は、 $10 \mu\text{m}$ 以下である。

[0017] このような態様によれば、2層膜オルガネラや細菌細胞膜の膜間隔を *in vitro* で再現することができる。

[0018] 実施形態の第4の態様に係るマイクロリアクタチップは、第1～第3のいずれか態様に係るマイクロリアクタチップであって、

前記第1脂質二重膜および前記第2脂質二重膜の少なくともいずれか一方は、膜タンパク質を保持している。

[0019] 実施形態の第5の態様に係るマイクロリアクタチップは、第1～第4のいずれか態様に係るマイクロリアクタチップであって、

各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向にさらに分画するように、第3脂質二重膜が前記第1脂質二重膜および第2脂質二重膜に対して深さ方向に間隔を空けて設けられている。

[0020] 実施形態の第6の態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法は、

基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備えた脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意するステップと、

前記チャンバーの開口部に第1脂質二重膜を形成するステップと、

前記疎水層の主面を底面とする液体流路に、前記チャンバーに満たされた液体より濃度の高い液体を導入し、浸透圧により前記第1脂質二重膜を前記チャンバーの内側に押し下げるステップと、

前記チャンバーの開口部に第2脂質二重膜を形成するステップと、を備える。

[0021] このような態様によれば、各チャンバーを2層の脂質二重膜により細分化

することができる。これにより、リアクタの容積が大幅に小型化される。この結果、生体分子1個の反応によるリアクタ内の反応生成物や反応基質などの濃度変化を大きくし、濃度変化として検出する際の検出感度を高くすることができ、生体分子の反応が極めて遅くても、生体分子の反応を高感度で検出することができる。また、このような態様によれば、2層膜オルガネラや細菌細胞膜が*in vitro*で人工的に構築されていることになり、従来計測困難であった2層膜オルガネラや細菌細胞膜に存在する膜タンパク質の機能解析が可能となる。

[0022] 実施形態の第7の態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法は、第6の態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法であって、

前記第1脂質二重膜を形成するステップでは、前記チャンバーが第1の液体で満たされた状態で、前記液体流路に脂質を含有する有機溶媒を流すことにより、前記脂質の親水基が前記チャンバーの前記第1の液体側を向いた状態の内側脂質単層膜を前記チャンバーの開口部に形成し、前記液体流路に膜形成用水溶液を流すことにより、前記脂質の疎水基が前記内側脂質単層膜側を向いた状態の外側脂質単層膜を前記内側脂質単層膜に重ねるように形成する。

[0023] このような態様によれば、チャンバーの開口部に第1脂質二重膜を効率的に形成することができる。

[0024] 実施形態の第8の態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法は、第6または第7の態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法であって、

前記第2脂質二重膜を形成するステップでは、前記チャンバーの前記第1脂質二重膜より開口部側が第2の液体で満たされた状態で、前記液体流路に脂質を含有する有機溶媒を流すことにより、前記脂質の親水基が前記チャンバーの前記第2の液体側を向いた状態の内側脂質単層膜を前記チャンバーの開口部に形成し、前記液体流路に膜形成用水溶液を流すことにより、前記脂質の疎水基が前記内側脂質単層膜側を向いた状態の外側脂質単層膜を前記内側脂質単層膜に重ねるように形成する。

[0025] このような態様によれば、チャンバーの開口部に第2脂質二重膜を効率的に形成することができる。

[0026] 実施形態の第9の態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法は、第6～第8のいずれか態様に係るマイクロリアクタチップの製造方法であって、
前記液体流路に、前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間に満たされた液体より濃度の高い液体を導入し、浸透圧により前記第2脂質二重膜を前記チャンバーの内側に押し下げるステップと、
前記チャンバーの開口部に第3脂質二重膜を形成するステップと、
をさらに備える。

[0027] 実施形態の第10の態様に係る方法は、
基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備え、各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている、マイクロリアクタチップの前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタから反応生成物を回収する方法であって、

前記疎水層の主面を底面とする液体流路に、前記リアクタに満たされた試験用水溶液より濃度の低い回収用水溶液を導入し、浸透圧により前記第2脂質二重膜を前記チャンバーの外側に押し上げて破壊し、前記試験用水溶液中の反応生成物を前記回収用水溶液に移行させ、前記液体流路から前記回収用水溶液とともに前記反応生成物を回収する。

[0028] このような態様によれば、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタ内の反応生成物を一括で容易に回収することができる。

[0029] 実施形態の第11の態様に係る方法は、
基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備え、各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ

方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている、マイクロリアクタチップの前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタの容積を制御する方法であって、

前記疎水層の主面を底面とする液体流路に、前記リアクタに満たされた試験用水溶液より濃度の高い容積制御用水溶液を導入し、浸透圧により前記第2脂質二重膜を前記チャンバーの内側に押し下げる。

[0030] このような態様によれば、浸透圧を制御することで、2層の脂質二重膜の間隔を定量制御することが可能であり、細分化された各リアクタの容積を制御（超小型化）することができる。

[0031] 以下に、添付の図面を参照して、実施の形態の具体例を詳細に説明する。なお、各図において同等の機能を有する構成要素には同一の符号を付し、同一符号の構成要素の詳しい説明は繰り返さない。

[0032] （第1実施形態）

図1は、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップの概略構成の一例を示す図である。図2は、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップの図1におけるA-A断面および該断面の一部を拡大して示す図である。

[0033] 図1および図2に示すように、マイクロリアクタチップ20は、基板22と、基板22上に設けられた疎水層24とを備えている。

[0034] 基板22は、透光性を有しており、平坦である。基板22は、たとえばガラス、アクリル樹脂などで構成され得る。基板22の材料、厚み、および形状などは、基板22の下方から基板22へと入射した光が基板22を透過してチャンバー26の内部へと進入し、かつ、チャンバー26の内部から基板22へと入射した光が基板22を透過して基板22の下方へと脱出可能であれば特に限定されない。具体的には、たとえば、基板22の厚みは0.1mm以上5mm以下であってもよいし、0.3mm以上3mm以下であってもよいし、0.7mm以上1.5mm以下であってもよい。平面視における基板22の大きさは特に限定されない。

- [0035] 疎水層 24 は、疎水性物質からなる層である。疎水性物質としては、たとえばフッ素樹脂などの疎水性の樹脂、およびガラスなどの樹脂以外の物質が含まれる。疎水層 24 の厚みは、後述するチャンバー 26 の容量に応じて適宜に調整され得る。具体的には、たとえば、 10 nm 以上 $100\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよいし、 100 nm 以上 $5\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよいし、 250 nm 以上 $1\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよい。
- [0036] 疎水層 24 には、複数の微小なチャンバー 26 の開口部が、疎水層 24 の主面上に規則的かつ高密度に配列するように設けられている。チャンバー 26 の容量は $4000\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以下（ $4000\text{ }\mu\text{ m}^3$ 以下）である。チャンバー 26 の容量は、たとえば、 $0.1\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以上 $4000\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以下であってもよいし、 $0.5\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以上 $400\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以下であってもよいし、 $1\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以上 $40\times 10^{-18}\text{ m}^3$ 以下であってもよい。
- [0037] チャンバー 26 の深さは、たとえば、 10 nm 以上 $100\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよいし、 100 nm 以上 $5\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよいし、 250 nm 以上 $1\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよい。
- [0038] チャンバー 26 の開口部は、たとえば円形とすることができる。円形とする場合の円の直径は、たとえば、 $0.1\text{ }\mu\text{ m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよいし、 $0.5\text{ }\mu\text{ m}$ 以上 $5\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよいし、 $1\text{ }\mu\text{ m}$ 以上 $10\text{ }\mu\text{ m}$ 以下であってもよい。
- [0039] 「規則的」とは、たとえば、基板の厚み方向から見て、各チャンバーが基板上に、格子状、マトリクス状、千鳥状などに配列されていることを言う。
「規則的」とは、たとえば、各チャンバーが複数の列をなすように一定間隔で配列されていることを意味し得る。
- [0040] 「高密度」とは、たとえば、 1 平方mm （ 1 mm^2 ）あたりのチャンバーの数が、 0.1×10^3 個以上 2000×10^3 個以下であってもよいし、 1×10^3 個以上 1000×10^3 以下であってもよいし、 5×10^3 個以上 100×10^3 以下であってもよい。 1 cm^2 （ $1\times 10^{-4}\text{ m}^2$ ）あたりに換算すると

、 10×10^3 個以上 200×10^6 個以下であってもよいし、 100×10^3 個以上 100×10^6 個以下であってもよいし、 0.5×10^6 個以上 10×10^6 個以下であってもよい。

[0041] マイクロリアクタチップ20において、複数のチャンバー26は、深さが $100 \mu\text{m}$ 以下で、円形に換算したときに直径が $100 \mu\text{m}$ 以下となるよう形成されているものとしたり、深さが $2 \mu\text{m}$ 以下で、円形に換算したときも直径が $10 \mu\text{m}$ 以下となるよう形成されているものとしたり、深さが $1 \mu\text{m}$ 以下で、円形に換算したときに直径が $5 \mu\text{m}$ 以下となるよう形成されているものとしたりすることもできる。こうすれば、基板22の表面に疎水性物質による薄膜を形成し、該薄膜に複数の微小なチャンバー26を形成する手法を用いて、脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップ20を比較的容易に製造することができる。なお、「円形に換算したとき」の「直径」とは、深さ方向に対して垂直な断面の形状と同じ面積を有する円形の直径を言い、たとえば、該断面が $1 \mu\text{m}$ 四方の正方形の場合には、円形に換算したときの直径は $2/\sqrt{\pi} \div 1.1 \mu\text{m}$ となる。

[0042] チャンバー26は、それぞれ厚さが 500nm を含む所定厚範囲の疎水性物質による薄膜に、円形に換算したときに直径が $1 \mu\text{m}$ を含む所定直径範囲となるよう形成されているものとすることもできる。試験対象の生体分子の反応速度の大きさや生体分子の含有率を考慮するとともに製造の容易さも考慮すると、チャンバー26の深さや直径は数百 nm ～数 μm が好適であると考えられる。ここで、「所定厚範囲」は、たとえば、 500nm の0.1倍の 50nm 以上で 500nm の10倍の $5 \mu\text{m}$ 以下の範囲としたり、 500nm の0.5倍の 250nm 以上で 500nm の2倍の $1 \mu\text{m}$ 以下の範囲としたりすることができる。「所定直径範囲」は、たとえば、 $1 \mu\text{m}$ の0.1倍の 100nm 以上で $1 \mu\text{m}$ の10倍の $10 \mu\text{m}$ 以下としたり、 $1 \mu\text{m}$ の0.5倍の 500nm 以上で $1 \mu\text{m}$ の2倍の $2 \mu\text{m}$ 以下の範囲としたりすることができる。

[0043] 一例において、それぞれのチャンバー26は、厚さDが $1 \mu\text{m}$ の疎水層2

4に、直径Rが5 μm となるよう形成されている。したがって、それぞれのチャンバー26の容量Lは、 $L = \pi (2.5 \times 10^{-6})^2 \times 1 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \div 19.6 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ となる。仮に平面視においてチャンバー26を縦横2 μm の間隔で配列したものとすると、1つのチャンバー26に必要な面積Sは一辺が7 μm の正方形となり、 $S = (7 \times 10^{-6})^2 \text{ m}^2 = 49 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ と計算される。したがって、ガラス基板22には、1 cm^2 ($1 \times 10^{-4} \text{ m}^2$) あたり約 2×10^6 個 (1平方mmあたり 20×10^3 個) のチャンバー26が形成されることになる。

[0044] 図2に示すように、各チャンバー26には、それぞれ、該チャンバー26を深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32とが深さ方向に間隔を空けて設けられている。図示された例では、第1脂質二重膜31は、第2脂質二重膜32よりチャンバー26の内側（図2における下側）に設けられている。

[0045] 第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間の間隔は、10 μm 以下である。第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間の間隔は、たとえば、0.1 nm以上10 μm 以下であってもよいし、0.5 nm以上5 μm 以下であってもよいし、1 nm以上1 μm 以下であってもよい。

[0046] マイクロリアクタチップ20において、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間の間隔が10 μm 以下であることから、2層膜オルガネラや細菌細胞膜の膜間隔を *in vitro* で再現することができる。

[0047] 第1脂質二重膜31および第2脂質二重膜32により分画されたチャンバー26のそれぞれの内部空間には、試験用水溶液が満たされている。試験用水溶液は、第1脂質二重膜31および第2脂質二重膜32を形成可能な液体であれば特に限定されない。

[0048] 第1脂質二重膜31は、脂質の親水基がチャンバー26の内側（図2における下側）を向いた内側脂質単層膜31aと、脂質の疎水基がチャンバー26の内側（図2における下側）を向いた外側脂質単層膜31bとが、疎水基同士が向かい合うように重なるように形成されている。同様に、第2脂質二

重膜 3 2 は、脂質の親水基がチャンバー 2 6 の内側（図 2 における下側）を向いた内側脂質単層膜 3 2 a と、脂質の疎水基がチャンバー 2 6 の内側（図 2 における下側）を向いた外側脂質単層膜 3 2 b とが、疎水基同士が向かい合うように重なるように形成されている。

[0049] 内側脂質単層膜 3 1 a、3 2 a や外側脂質単層膜 3 1 b、3 2 b を構成する脂質としては、大豆や大腸菌由来などの天然脂質、D O P E（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）や D O P G（ジオレオイルホスファチジルグリセロール）などの人工脂質を用いることができる。

[0050] 第 1 脂質二重膜 3 1 および第 2 脂質二重膜 3 2 のいずれか一方または両方は、膜タンパク質を保持しているものとすることもできる。こうすれば、マイクロリアクタチップ 2 0 を、様々な膜タンパク質を介しての生体分子反応などの検出に用いることができる。膜タンパク質を脂質二重膜 3 0 に保持させる（再構成させる）方法については後述する。

[0051] チャンバー 2 6 が第 1 脂質二重膜 3 1 および第 2 脂質二重膜 3 2 により深さ方向に分画されているから、マイクロリアクタチップ 2 0 を生体分子反応の検出に用いることにより、第 1 脂質二重膜 3 1 と第 2 脂質二重膜 3 2 との間に画成される分画の容積を小さくすることができる。この結果、生体分子 1 個の反応によるマイクロリアクタ内の反応生成物や反応基質などの濃度変化を大きくし、濃度変化として検出する際の検出感度を高くすることができる。また、このような態様によれば、2 層膜オルガネラや細菌細胞膜が *i n v i t r o* で人工的に構築されていることになり、従来計測困難であった 2 層膜オルガネラや細菌細胞膜に存在する膜タンパク質の機能解析が可能となる。特に細菌細胞膜を *i n v i t r o* で再現することができれば、従来困難であった多剤耐性菌由来の薬剤排出膜タンパク質の機能解析が可能となることが予想され、すなわち、当該技術は、薬理学的に極めて重要な技術である。

[0052] 図示は省略するが、各チャンバー 2 6 の内部（たとえばチャンバー 2 6 の

内側面または底面)には電極が設けられていてもよい。各電極は互いに電氣的に接続されていてもよい。電極は、金属、たとえば、銅、銀、金、アルミ、クロムなどで構成されていてもよい。電極は、金属以外の材料、たとえば、ITO(酸化インジウムスズ)、IZO(酸化インジウムスズと酸化亜鉛とからなる材料)、ZnO、IGZO(インジウム、ガリウム、亜鉛、酸素から構成される材料)などで構成されていてもよい。

[0053] 電極の厚みは、たとえば、10nm以上100 μ m以下であってもよいし、100nm以上5 μ m以下であってもよいし、250nm以上1 μ m以下であってもよい。

[0054] かかる構成において、基板22の下方から基板22へと入射した光は、基板22を透過してチャンバー26の内部へと進入し、かつ、チャンバー26の内部から基板22へと入射した光は、基板22を透過して基板22の下方へと脱出する。

[0055] [マイクロリアクタチップの製造方法]

以下、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップ20の製造方法について説明する。図3は、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップ20の製造方法の一例を示すフローチャートである。

[0056] 図3に示すように、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップ20は、まず、脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意し(ステップS11)、各チャンバー26の開口部に第1脂質二重膜31を形成し(ステップS12)、浸透圧により第1脂質二重膜31を各チャンバー26の内側に押し下げ(ステップS13)、各チャンバー26の開口部に第2脂質二重膜32を形成して(ステップS14)、完成する。以下、各工程について詳しく説明する。

[0057] 1. 脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップの用意

図4は、脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程(ステップS11)の一例を示すフローチャートである。図5A~図5Fは、脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意する工程における各工程を

示す図である。

[0058] まず、図5に示すように、ガラス基板22のガラス表面を洗浄するための洗浄処理として、10Mの水酸化カリウム（KOH）溶液にガラス基板22を24時間程度浸す（ステップS111）。

[0059] 次に、図5Bに示すように、ガラス基板22の表面に、疎水性の物質（たとえば、旭硝子株式会社製のフッ素樹脂（CYTOP））をスピコートして物質膜24aを形成し、物質膜24aをガラス基板22の表面に密着させる（ステップS112）。スピコートの条件としては、たとえば、2000 rps、30秒という条件を用いることができ、この場合、物質膜24aの膜厚は約1 μ mとなる。物質膜24aのガラス基板22表面への密着は、たとえば、180℃のホットプレートで1時間ベークすることにより行うことができる。

[0060] 次に、図5Cに示すように、物質膜24aの表面にレジスト25aをスピコートにより形成し、レジスト25aを物質膜24aの表面に密着させる（ステップS113）。レジスト25aとしては、AZ Electronic Materials製のAZ-4903などを用いることができる。スピコートの条件としては、たとえば、4000 rps、60秒という条件を用いることができる。レジスト25aの物質膜24a表面への密着は、たとえば、110℃のホットプレートで5分間ベークして、レジスト25a内の有機溶媒を蒸発させることにより行うことができる。

[0061] 次に、図5Dに示すように、チャンバー26のパターンのマスクを用いてレジスト25aを露光し、レジスト専用の現像液に浸して現像して、チャンバー26を形成する部分が除かれたレジスト25bを形成する（ステップS114）。露光の条件は、たとえば、SAN-EI製の露光機によりUV power 250Wで7秒照射する条件を用いることができる。現像の条件としては、たとえば、AZ Electronic Materials製のAZ developerに5分浸す条件を用いることができる。

[0062] 次に、図5Eに示すように、レジスト25bによりマスクされた物質膜2

4 aをドライエッチングすることにより、物質膜24 aからチャンバー26となる部分を取り除いた物質膜24 bとし（ステップS115）、その後、図5Fに示すように、レジスト25 bを除去する（ステップS116）。ドライエッチングは、たとえば、Samco製のReactive ion etching装置を使用し、エッチング条件として、 O_2 50 sccm、Pressure 10 Pa、Power 50 W、Time 30 minという条件を用いることができる。レジスト25 bの除去は、アセトンに浸し、イソプロパノールで洗浄した後に純水で洗浄することにより行うことができる。

[0063] なお、ドライエッチング以外の手法、たとえばナノインプリンティングなどの手法を用いて疎水性物質の薄膜に複数のチャンバー26を形成するものとしてもよい。ドライエッチングの場合には、 O_2 プラズマの作用によりチャンバー26の内側面が親水性を帯び、後述する脂質二重膜形成の際にチャンバー26内に試験用水溶液を充填しやすくなるため好ましい。

[0064] 2. 第1脂質二重膜の形成

図6は、第1脂質二重膜31を形成する工程（ステップS12）の一例を示すフローチャートである。図7A～図7Cは、第1脂質二重膜31を形成する工程における各工程を示す図である。

[0065] まず、図7Aに示すように、マイクロリアクタチップにスペーサ42を介在させつつ、液体導入孔46が形成されたガラス板44を載せる。これにより、疎水層24の主面が略水平な底面となる液体流路48が形成される。次いで、液体導入孔46から液体流路48に第1試験用水溶液を導入し、液体流路48およびチャンバー26を第1試験用水溶液で満たしておく（ステップS121）。ここで、第1試験用水溶液としては、具体的には、たとえば、1 mMのHEPESと10 mMの塩化カリウムとを含有する液体（以下「緩衝液A」と呼ぶことがある）を60%に希釈したものに終濃度10 μ Mの蛍光色素（たとえばAlexa405（紫色））を添加したものをを用いることができる。

- [0066] 次に、図 7 B に示すように、液体流路 4 8 およびチャンバー 2 6 が第 1 試験用水溶液で満たされた状態で、液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に脂質 3 5 を含有する有機溶媒を導入する（ステップ S 1 2 2）。ここで、脂質としては、大豆や大腸菌由来などの天然脂質、D O P E（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）や D O P G（ジオレオイルホスファチジルグリセロール）などの人工脂質を用いることができる。有機溶媒としては、ヘキサデカンやクロロホルムを用いることができる。具体的な一例としては、0.3 mg / ml の D O P C と 0.045 mg / ml の蛍光脂質（たとえば N B D - P S（緑色））とを含有するものを用いることができる。
- [0067] 液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に脂質 3 5 を含有する有機溶媒が導入されると、チャンバー 2 6 が第 1 試験用水溶液で満たされた状態で、脂質 3 5 の親水基がチャンバー 2 6 の第 1 試験用水溶液側を向いた状態の内側脂質単層膜 3 1 a が、チャンバー 2 6 の開口部を液封するように形成される。
- [0068] 次に、液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に第 1 脂質二重膜 3 1 を形成するための膜形成用水溶液を導入する（ステップ S 1 2 3）。膜形成用水溶液としては、具体的には、たとえば、緩衝液 A を 6 0 % に希釈したものを用いることができる。
- [0069] 液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に膜形成用水溶液が導入されると、脂質 3 5 の疎水基が内側脂質単層膜 3 1 a 側を向いた状態の外側脂質単層膜 3 1 b が、内側脂質単層膜 3 1 a に重なるように形成され、これにより、チャンバー 2 6 の開口部に第 1 脂質二重膜 3 1 が形成される。
- [0070] 第 1 脂質二重膜 3 1 の形成工程の後に、第 1 脂質二重膜 3 1 に膜タンパク質を再構成させる工程を備えるものとすることもできる。再構成させる工程は、膜タンパク質を含む細胞膜断片、タンパク質を埋め込んだ脂質二重膜、水溶性タンパク質、タンパク質を取り込んだリポソーム、界面活性剤により可溶化させたタンパク質のいずれかを第 1 脂質二重膜 3 1 に導入し、第 1 脂質二重膜 3 1 にタンパク質を組み込んで膜タンパク質とする工程であってもよい。脂質二重膜にタンパク質を組み込む手法としては、リポソームの場合

には膜融合などを用いることができ、界面活性剤により可溶化させたタンパク質の場合には熱揺動などを用いることができる。

[0071] 3. 第1脂質二重膜の押し下げ

図8Aは、第1脂質二重膜31を押し下げる工程（ステップS13）の一例を示すフローチャートである。図8Bおよび図8Cは、第1脂質二重膜31を押し下げる工程における各工程を示す図である。

[0072] まず、図8Bに示すように、液体導入孔46から液体流路48に、チャンバー26に満たされた液体（すなわち第1試験用水溶液）より濃度の高い液体を導入し（ステップS131）、たとえば5分間インキュベーションする。液体流路48に導入される液体としては、具体的には、たとえば、緩衝液Aを80%に希釈したものをを用いることができる。

[0073] インキュベーション中に、図8Cに示すように、第1脂質二重膜31より外側（液体流路48側）の濃度が内側（チャンバー26側）の濃度より高いことから、浸透圧によって第1脂質二重膜31がチャンバー26の内側に押し下げられる（ステップS132）。

[0074] 第1脂質二重膜31の押し下げ量は、定量制御することが可能である。具体的には、たとえば、チャンバー26に100mMの電解質を含む液体が満たされた状態で、第1脂質二重膜31をチャンバー21の深さの1/2まで押し下げるためには、液体流路48に200mMの電解質を含む液体を導入する。この場合、チャンバー26の第1脂質二重膜31より内側の空間の容積が1/2に減少して第1脂質二重膜31より内側の液体の電解質の濃度が200mMとなるように、浸透圧により第1脂質二重膜31がチャンバー21の深さの1/2まで押し下げられる。

[0075] 4. 第2脂質二重膜の形成

図9は、第2脂質二重膜32を形成する工程（ステップS14）の一例を示すフローチャートである。図10A～図10Cは、第2脂質二重膜32を形成する工程における各工程を示す図である。

[0076] まず、図10Aに示すように、液体導入孔46から液体流路48に第2試

験用水溶液を導入し、液体流路48およびチャンバー26の第1脂質二重膜31より開口部側を第2試験用水溶液で満たしておく（ステップS141）。ここで、第2試験用水溶液としては、具体的には、たとえば、緩衝液Aの原液に終濃度10 μ Mの蛍光色素（たとえばAlexa647（赤色））を添加したものをを用いることができる。

[0077] 第2試験用水溶液の濃度が、第1脂質二重膜31より内側の液体の濃度より高い場合には、液体導入孔46から液体流路48に第2試験用水溶液を導入した後、たとえば5分間インキュベーションすることで、浸透圧により第1脂質二重膜31をチャンバー26の内側にさらに押し下げることができる。

[0078] 次に、図10Bに示すように、液体流路48およびチャンバー26の第1脂質二重膜31より開口部側が第2試験用水溶液で満たされた状態で、液体導入孔46から液体流路48に脂質35を含有する有機溶媒を導入する（ステップS142）。ここで、脂質としては、大豆や大腸菌由来などの天然脂質、DOP（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）やDOPG（ジオレオイルホスファチジルグリセロール）などの人工脂質を用いることができる。有機溶媒としては、ヘキサデカンやクロロホルムを用いることができる。具体的な一例としては、0.3mg/mlのDOPCと0.045mg/mlの蛍光脂質（たとえばNBD-PS（緑色））とを含有するものを用いることができる。

[0079] 液体導入孔46から液体流路48に脂質35を含有する有機溶媒が導入されると、チャンバー26の第1脂質二重膜31より開口部側が第2試験用水溶液で満たされた状態で、脂質35の親水基がチャンバー26の第2試験用水溶液側を向いた状態の内側脂質単層膜32aが、チャンバー26の開口部を液封するように形成される。

[0080] 次に、液体導入孔46から液体流路48に第2脂質二重膜32を形成するための膜形成用水溶液を導入する（ステップS143）。膜形成用水溶液としては、具体的には、たとえば、緩衝液Aを60%に希釈したものをを用いる

ことができる。

- [0081] 液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に膜形成用水溶液が導入されると、脂質 3 5 の疎水基が内側脂質単層膜 3 2 a 側を向いた状態の外側脂質単層膜 3 2 b が、内側脂質単層膜 3 2 a に重なるように形成され、これにより、チャンバー 2 6 の開口部に第 2 脂質二重膜 3 2 が形成される。
- [0082] 第 2 脂質二重膜 3 2 の形成工程の後に、第 2 脂質二重膜 3 2 に膜タンパク質を再構成させる工程を備えるものとすることもできる。再構成させる工程は、膜タンパク質を含む細胞膜断片、タンパク質を埋め込んだ脂質二重膜、水溶性タンパク質、タンパク質を取り込んだリポソーム、界面活性剤により可溶化させたタンパク質のいずれかを第 2 脂質二重膜 3 2 に導入し、第 2 脂質二重膜 3 2 にタンパク質を組み込んで膜タンパク質とする工程であってもよい。脂質二重膜にタンパク質を組み込む手法としては、リポソームの場合には膜融合などを用いることができ、界面活性剤により可溶化させたタンパク質の場合には熱揺動などを用いることができる。
- [0083] 以上のような方法により、図 2 に示すような、各チャンバー 2 6 が 2 層の脂質二重膜 3 1、3 2 により細分化されたマイクロリアクタチップ 2 0 を製造することができる。
- [0084] ここで、基板 2 2 の下方から基板 2 2 へと入射した光は、基板 2 2 を透過してチャンバー 2 6 の内部へと進入し、かつ、チャンバー 2 6 の内部から基板 2 2 へと入射した光は、基板 2 2 を透過して基板 2 2 の下方へと脱出する。第 1 脂質二重膜 3 1 または第 2 脂質二重膜 3 2 に膜タンパク質が再構成されている場合、該膜タンパク質の機能は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、チャンバー 2 6 の内部に収容されている試験用液体に含まれる蛍光物質が発する光を検出することなどにより解析することができる。顕微鏡として、落射型共焦点顕微鏡が用いられてもよい。
- [0085] 本実施の形態では、各チャンバー 2 6 が 2 層の脂質二重膜 3 1、3 2 により深さ方向に分画されているため、チャンバー 2 6 内の試験用液体に含まれる蛍光物質が発する光を、基板 2 2 の下方に配置された共焦点レーザー顕微

鏡を用いて検出する際に、分画されたリアクタでのレンズ作用によって蛍光画像が歪んでしまうことが抑制され、定量的に観察することが可能である。

[0086] [第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタの容積を制御する方法]

次に、図11Aおよび図11Bを参照し、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップ20において、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間に画成されるリアクタの容積を制御する方法について説明する。

[0087] まず、図11Aに示すように、液体導入孔46から液体流路48に、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間のリアクタに満たされた液体（すなわち第2試験用水溶液）より濃度の高い液体を導入し、たとえば5分間インキュベーションする。

[0088] インキュベーション中に、図11Bに示すように、第2脂質二重膜32より外側（液体流路48側）の濃度が内側（チャンバー26側）の濃度より高いことから、浸透圧によって第2脂質二重膜32がチャンバー26の内側に押し下げられる。

[0089] 第2脂質二重膜32の押し下げ量は、定量制御することが可能である。具体的には、たとえば、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間のリアクタに100mMの電解質を含む液体が満たされた状態で、該リアクタの容積が1/2に減少するまで第2脂質二重膜32を押し下げるためには、液体流路48に200mMの電解質を含む液体を導入する。この場合、リアクタ内の液体の電解質の濃度が200mMとなるように、浸透圧により第2脂質二重膜32が該リアクタの容積が1/2に減少するまで押し下げられる。

[0090] 以上のような方法によれば、浸透圧を制御することで、2層の脂質二重膜31、32の間隔を定量制御することが可能であり、細分化された各リアクタの容積を制御（超小型化）することができる。

[0091] [第1脂質二重膜と第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタから反応生成物を回収する方法]

次に、図12Aおよび図12Bを参照し、第1実施形態に係るマイクロ

アクタチップ20において、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間に画成されるリアクタから反応生成物を回収する方法について説明する。

[0092] まず、図12Aに示すように、液体導入孔46から液体流路48に、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間のリアクタに満たされた液体（すなわち第2試験用水溶液）より濃度の低い回収用水溶液を導入し、たとえば5分間インキュベーションする。回収用水溶液としては、具体的には、たとえば、緩衝液Aを10%に希釈したものをを用いることができる。

[0093] インキュベーション中に、図12Bに示すように、第2脂質二重膜32より外側（液体流路48側）の濃度が内側（チャンバー26側）の濃度より低いことから、浸透圧によって第2脂質二重膜32がチャンバー26の外側に押し上げられ、破壊される。これにより、リアクタと液体流路48とが連通され、第2試験用水溶液中の反応生成物が回収用水溶液に移行される。そして、液体流路48から回収用水溶液とともに反応生成物を回収する。

[0094] 以上のような方法によれば、リアクタ内の反応生成物を一括で容易に回収することができる。

[0095] なお、第1実施形態に係るマイクロリアクタチップ20において、第1脂質二重膜31と第2脂質二重膜32との間に画成されるリアクタから反応生成物を回収する方法は、かかる方法に限定されるものではなく、たとえば第2脂質二重膜32にニードルを刺して該リアクタから反応生成物を回収するものであってもよい。

[0096] （第2実施形態）

図13は、第2実施形態に係るマイクロリアクタチップの縦断面および該断面の一部を拡大して示す図である。第2実施形態において、上述した第1実施形態と同様に構成され得る部分について、第1の実施形態における対応する部分に対して用いた符号と同一の符号を用いるとともに、重複する説明を省略する。

[0097] 上述した第1実施形態では、チャンバー26が2層の脂質二重膜31、32により深さ方向に分画された例について説明した。これに対して、第2実

施形態では、図 1 3 に示すように、各チャンバー 2 6 には、それぞれ、該チャンバー 2 6 を深さ方向にさらに分画するように、第 3 脂質二重膜 3 3 が第 1 脂質二重膜 3 1 および第 2 脂質二重膜 3 2 に対して深さ方向に間隔を空けて設けられており、すなわち、チャンバー 2 6 が 3 層の脂質二重膜 3 1 ~ 3 3 により深さ方向に分画されている。図示された例では、第 3 脂質二重膜 3 3 は、第 1 脂質二重膜 3 1 および第 2 脂質二重膜 3 2 よりチャンバー 2 6 の開口部側（図 1 3 における上側）に設けられている。

[0098] 3 層の脂質二重膜 3 1 ~ 3 3 により分画されたチャンバー 2 6 のそれぞれの内部空間には、試験用水溶液が満たされている。試験用水溶液は、脂質二重膜 3 1 ~ 3 3 を形成可能な液体であれば特に限定されない。チャンバー 2 6 が 3 層の脂質二重膜 3 1 ~ 3 3 により分画されているため、3 種類の液体の関係を観察することができる。

[0099] [マイクロリアクタチップの製造方法]

次に、第 2 実施形態にかかるマイクロリアクタチップ 2 0 の製造方法について説明する。図 1 4 は、第 2 実施形態に係るマイクロリアクタチップ 2 0 の製造方法の一例を示すフローチャートである。

[0100] 図 1 4 に示すように、第 2 実施形態に係るマイクロリアクタチップ 2 0 は、まず、脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意し（ステップ S 1 1）、各チャンバー 2 6 の開口部に第 1 脂質二重膜 3 1 を形成し（ステップ S 1 2）、浸透圧により第 1 脂質二重膜 3 1 を各チャンバー 2 6 の内側に押し下げ（ステップ S 1 3）、各チャンバー 2 6 の開口部に第 2 脂質二重膜 3 2 を形成し（ステップ S 1 4）、浸透圧により第 2 脂質二重膜 3 2 を各チャンバー 2 6 の内側に押し下げ（ステップ S 1 5）、各チャンバー 2 6 の開口部に第 3 脂質二重膜 3 3 を形成して（ステップ S 1 6）、完成する。各チャンバー 2 6 に第 2 脂質二重膜 3 2 を形成するまでの工程（ステップ S 1 1 ~ S 1 4）は、上述の第 1 実施形態と同様であり、説明を省略する。

[0101] 5. 第 2 脂質二重膜の押し下げ

図 1 5 A は、第 2 脂質二重膜 3 2 を押し下げる工程（ステップ S 1 5）の

一例を示すフローチャートである。図 1 5 B および図 1 5 C は、第 2 脂質二重膜 3 2 を押し下げる工程における各工程を示す図である。

[0102] まず、図 1 5 B に示すように、液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に、第 1 脂質二重膜 3 1 と第 2 脂質二重膜 3 2 との間の空間に満たされた液体（すなわち第 2 試験用水溶液）より濃度の高い液体を導入し（ステップ S 1 5 1）、たとえば 5 分間インキュベーションする。

[0103] インキュベーション中に、図 1 5 C に示すように、第 2 脂質二重膜 3 2 より外側（液体流路 4 8 側）の濃度が内側（チャンバー 2 6 側）の濃度より高いことから、浸透圧によって第 2 脂質二重膜 3 2 がチャンバー 2 6 の内側に押し下げられる（ステップ S 1 5 2）。

[0104] 6. 第 3 脂質二重膜の形成

図 1 6 は、第 3 脂質二重膜 3 3 を形成する工程（ステップ S 1 6）の一例を示すフローチャートである。図 1 7 A ～図 1 7 C は、第 3 脂質二重膜 3 3 を形成する工程における各工程を示す図である。

[0105] まず、図 1 7 A に示すように、液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に第 3 試験用水溶液を導入し、液体流路 4 8 およびチャンバー 2 6 の第 2 脂質二重膜 3 2 より開口部側を第 3 試験用水溶液で満たしておく（ステップ S 1 6 1）。

[0106] 第 3 試験用水溶液の濃度が、第 2 脂質二重膜 3 2 より内側の液体の濃度より高い場合には、液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に第 3 試験用水溶液を導入した後、たとえば 5 分間インキュベーションすることで、浸透圧により第 2 脂質二重膜 3 2 をチャンバー 2 6 の内側にさらに押し下げることができる。

[0107] 次に、図 1 7 B に示すように、液体流路 4 8 およびチャンバー 2 6 の第 2 脂質二重膜 3 2 より開口部側が第 3 試験用水溶液で満たされた状態で、液体導入孔 4 6 から液体流路 4 8 に脂質 3 5 を含有する有機溶媒を導入する（ステップ S 1 6 2）。ここで、脂質としては、大豆や大腸菌由来などの天然脂質、D O P E（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）や D O P G

(ジオレオイルホスファチジルグリセロール)などの人工脂質を用いることができる。有機溶媒としては、ヘキサデカンやクロロホルムを用いることができる。

[0108] 液体導入孔46から液体流路48に脂質35を含有する有機溶媒が導入されると、チャンバー26の第2脂質二重膜32より開口部側が第3試験用水溶液で満たされた状態で、脂質35の親水基がチャンバー26の第3試験用水溶液側を向いた状態の内側脂質単層膜33aが、チャンバー26の開口部を液封するように形成される。

[0109] 次に、液体導入孔46から液体流路48に第3脂質二重膜33を形成するための膜形成用水溶液を導入する（ステップS163）。

[0110] 液体導入孔46から液体流路48に膜形成用水溶液が導入されると、脂質35の疎水基が内側脂質単層膜33a側を向いた状態の外側脂質単層膜33bが、内側脂質単層膜33aに重なるように形成され、これにより、チャンバー26の開口部に第3脂質二重膜33が形成される。

[0111] 第3脂質二重膜33の形成工程の後に、第3脂質二重膜33に膜タンパク質を再構成させる工程を備えるものとすることもできる。再構成させる工程は、膜タンパク質を含む細胞膜断片、タンパク質を埋め込んだ脂質二重膜、水溶性タンパク質、タンパク質を取り込んだリポソーム、界面活性剤により可溶化させたタンパク質のいずれかを第3脂質二重膜33に導入し、第3脂質二重膜33にタンパク質を組み込んで膜タンパク質とする工程であってもよい。脂質二重膜にタンパク質を組み込む手法としては、リポソームの場合には膜融合などを用いることができ、界面活性剤により可溶化させたタンパク質の場合には熱揺動などを用いることができる。

[0112] 以上のような方法により、図13に示すような、各チャンバー26が3層の脂質二重膜31～33により細分化されたマイクロリアクタチップ20を製造することができる。

[0113] なお、同様にして、浸透圧により最上層の脂質二重膜をチャンバー26の内側に押し下げた後、チャンバー26の開口部に新たな脂質二重膜を形成す

るという工程を繰り返すことで、各チャンバー 26 に 4 層以上の脂質二重膜を設けることも可能である。

[0114] なお、上述した実施の形態および個々の変形例の記載ならびに図面の開示は、特許請求の範囲に記載された発明を説明するための一例に過ぎず、上述した実施の形態および個々の変形例の記載または図面の開示によって特許請求の範囲に記載された発明が限定されることはない。上述した実施の形態および個々の変形例の構成要素は、発明の主旨を逸脱しない範囲で任意に組み合わせることが可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 基板と、
- 前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、
- を備え、
- 各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている、
- マイクロリアクタチップ。
- [請求項2] 各チャンバーの容量は、 $4000 \times 10^{-18} \text{m}^3$ 以下である、
- 請求項1に記載のマイクロリアクタチップ。
- [請求項3] 前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間の間隔は、 $10 \mu\text{m}$ 以下である、
- 請求項1または2に記載のマイクロリアクタチップ。
- [請求項4] 前記第1脂質二重膜および前記第2脂質二重膜の少なくともいずれか一方は、膜タンパク質を保持している、
- 請求項1～3のいずれかに記載のマイクロリアクタチップ。
- [請求項5] 各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向にさらに分画するように、第3脂質二重膜が前記第1脂質二重膜および第2脂質二重膜に対して深さ方向に間隔を空けて設けられている、
- 請求項1～4のいずれかに記載のマイクロリアクタチップ。
- [請求項6] 基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、
- 複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備えた脂質二重膜形成前のマイクロリアクタチップを用意するステップと、
- 前記チャンバーの開口部に第1脂質二重膜を形成するステップと、
- 前記疎水層の主面を底面とする液体流路に、前記チャンバーに満た

された液体より濃度の高い液体を導入し、浸透圧により前記第1脂質二重膜を前記チャンバーの内側に押し下げるステップと、

前記チャンバーの開口部に第2脂質二重膜を形成するステップと、
を備えた、マイクロリアクタチップの製造方法。

[請求項7] 前記第1脂質二重膜を形成するステップでは、前記チャンバーが第1の液体で満たされた状態で、前記液体流路に脂質を含有する有機溶媒を流すことにより、前記脂質の親水基が前記チャンバーの前記第1の液体側を向いた状態の内側脂質単層膜を前記チャンバーの開口部に形成し、前記液体流路に膜形成用水溶液を流すことにより、前記脂質の疎水基が前記内側脂質単層膜側を向いた状態の外側脂質単層膜を前記内側脂質単層膜に重ねるように形成する、
請求項6に記載のマイクロリアクタチップの製造方法。

[請求項8] 前記第2脂質二重膜を形成するステップでは、前記チャンバーの前記第1脂質二重膜より開口部側が第2の液体で満たされた状態で、前記液体流路に脂質を含有する有機溶媒を流すことにより、前記脂質の親水基が前記チャンバーの前記第2の液体側を向いた状態の内側脂質単層膜を前記チャンバーの開口部に形成し、前記液体流路に膜形成用水溶液を流すことにより、前記脂質の疎水基が前記内側脂質単層膜側を向いた状態の外側脂質単層膜を前記内側脂質単層膜に重ねるように形成する、
請求項6または7に記載のマイクロリアクタチップの製造方法。

[請求項9] 前記液体流路に、前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間に満たされた液体より濃度の高い液体を導入し、浸透圧により前記第2脂質二重膜を前記チャンバーの内側に押し下げるステップと、
前記チャンバーの開口部に第3脂質二重膜を形成するステップと、
をさらに備えた、請求項6～8のいずれかに記載のマイクロリアクタチップの製造方法。

[請求項10] 基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、

複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備え、各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている、マイクロリアクタチップの前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタから反応生成物を回収する方法であって、

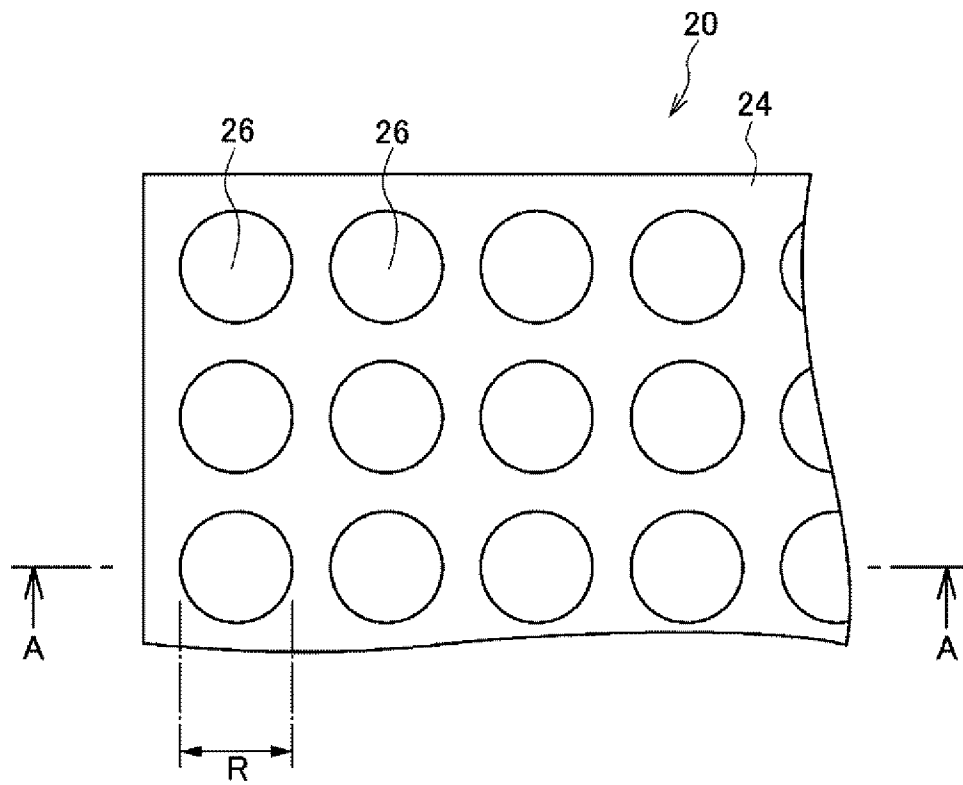
前記疎水層の主面を底面とする液体流路に、前記リアクタに満たされた試験用水溶液より濃度の低い回収用水溶液を導入し、浸透圧により前記第2脂質二重膜を前記チャンバーの外側に押し上げて破壊し、前記試験用水溶液中の反応生成物を前記回収用水溶液に移行させ、前記液体流路から前記回収用水溶液とともに前記反応生成物を回収する、方法。

[請求項11]

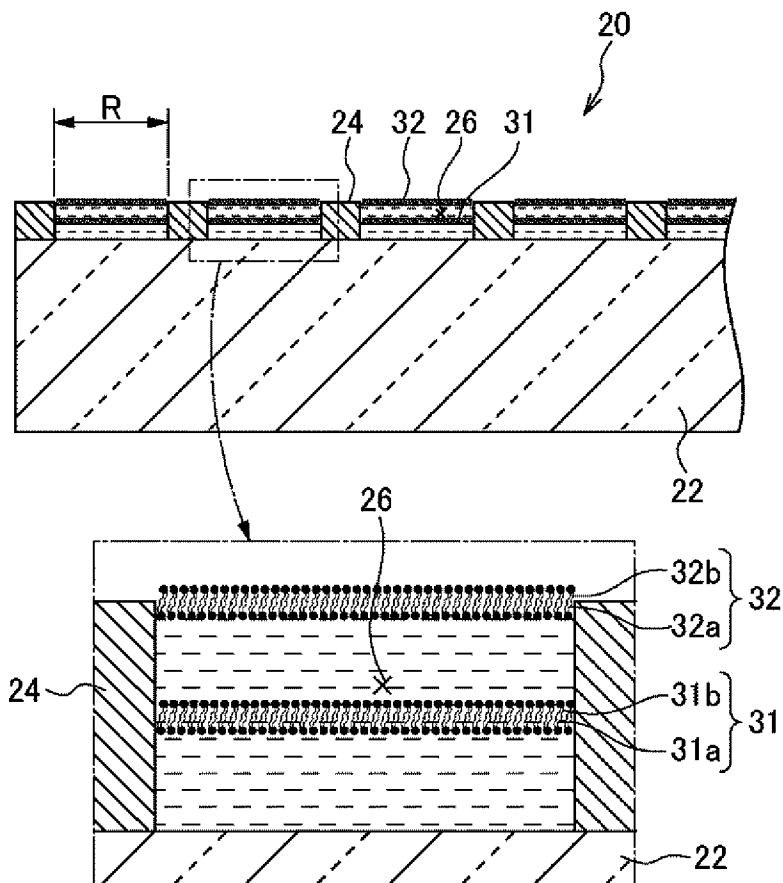
基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数のチャンバーの開口部が該層の主面上に規則的に配列するように形成されている、疎水層と、を備え、各チャンバーには、それぞれ、該チャンバーを深さ方向に分画するように、第1脂質二重膜と第2脂質二重膜とが深さ方向に間隔を空けて設けられている、マイクロリアクタチップの前記第1脂質二重膜と前記第2脂質二重膜との間に画成されるリアクタの容積を制御する方法であって、

前記疎水層の主面を底面とする液体流路に、前記リアクタに満たされた試験用水溶液より濃度の高い容積制御用水溶液を導入し、浸透圧により前記第2脂質二重膜を前記チャンバーの内側に押し下げる、方法。

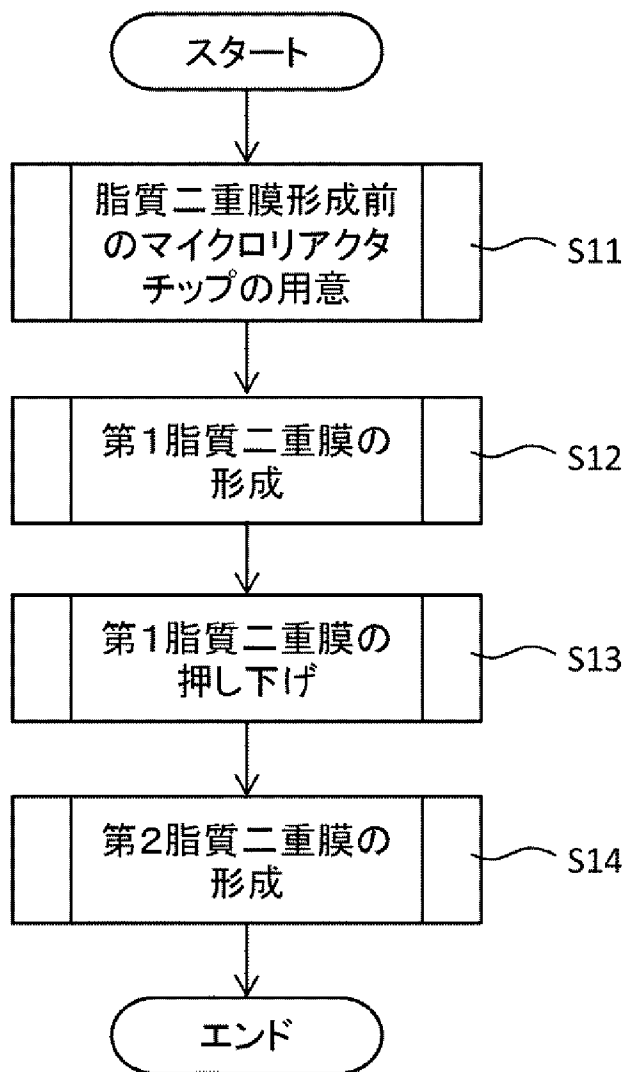
[図1]



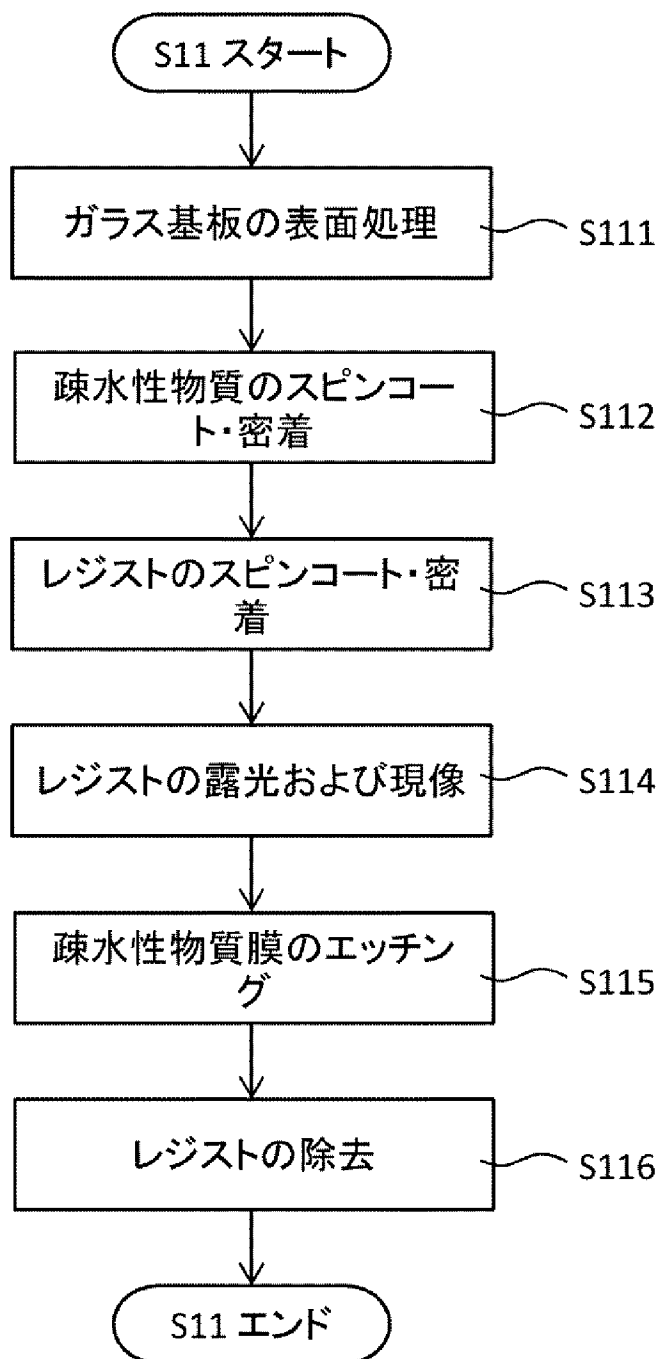
[図2]



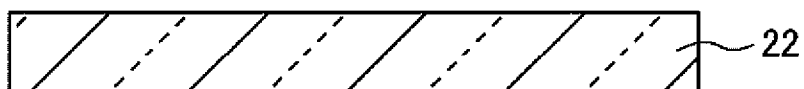
[図3]



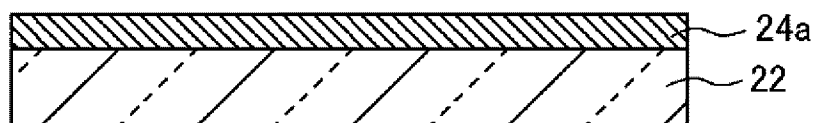
[図4]



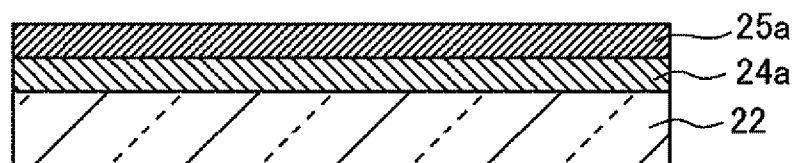
[図5A]



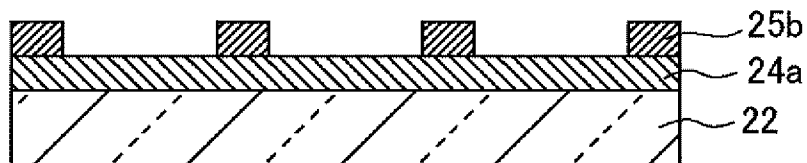
[図5B]



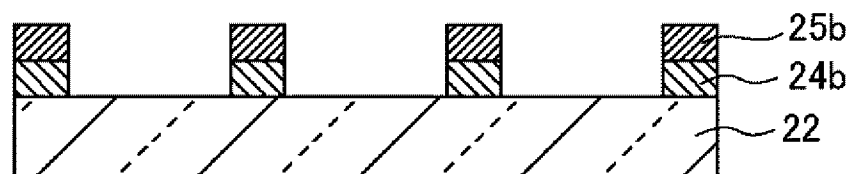
[図5C]



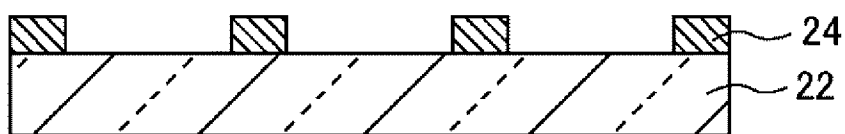
[図5D]



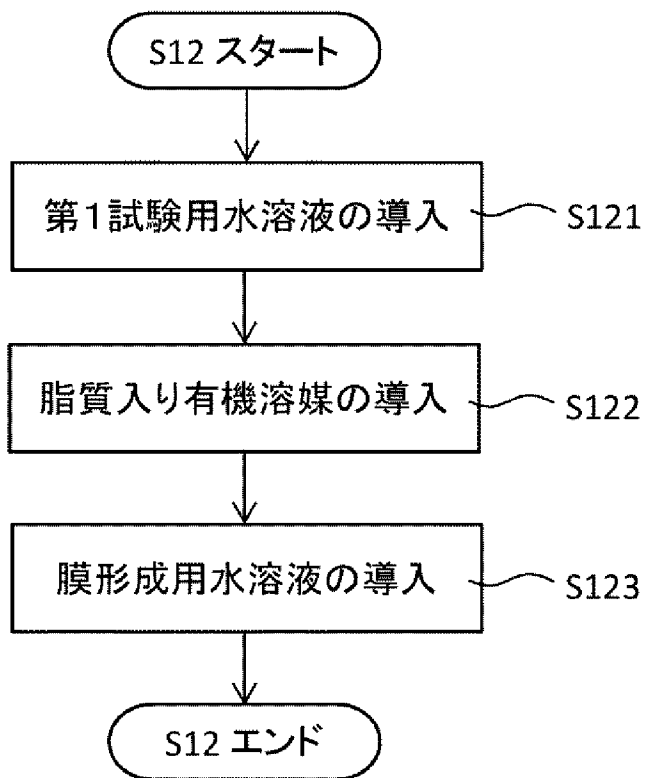
[図5E]



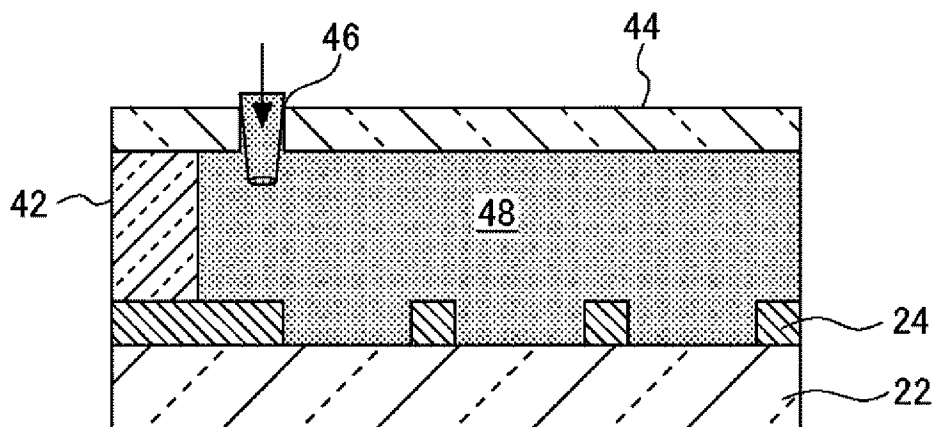
[図5F]



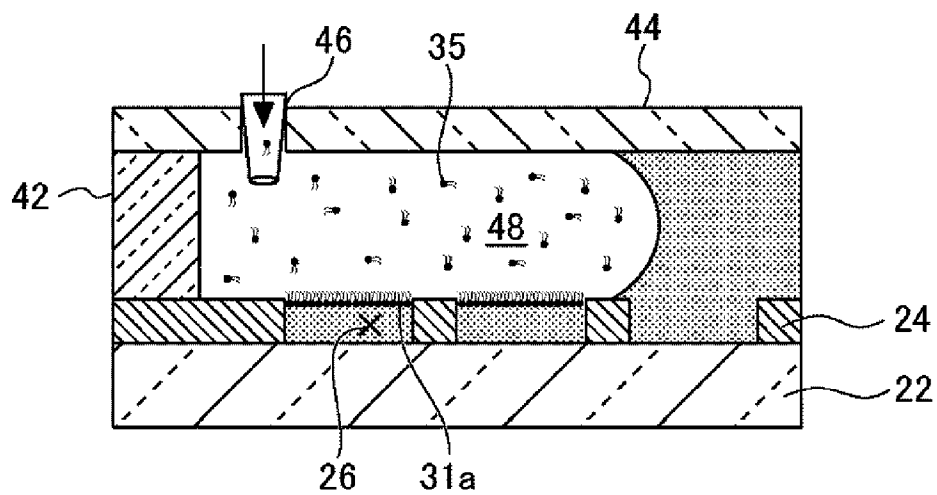
[図6]



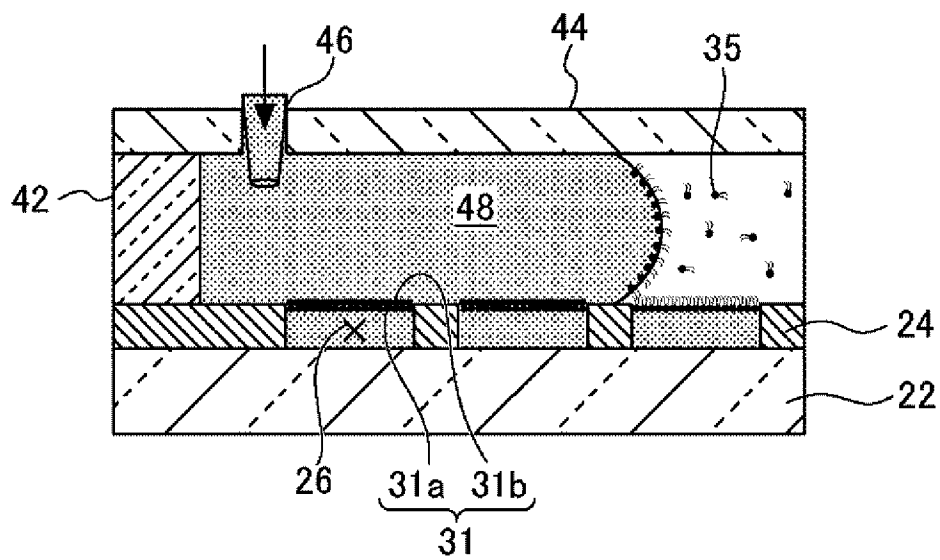
[図7A]



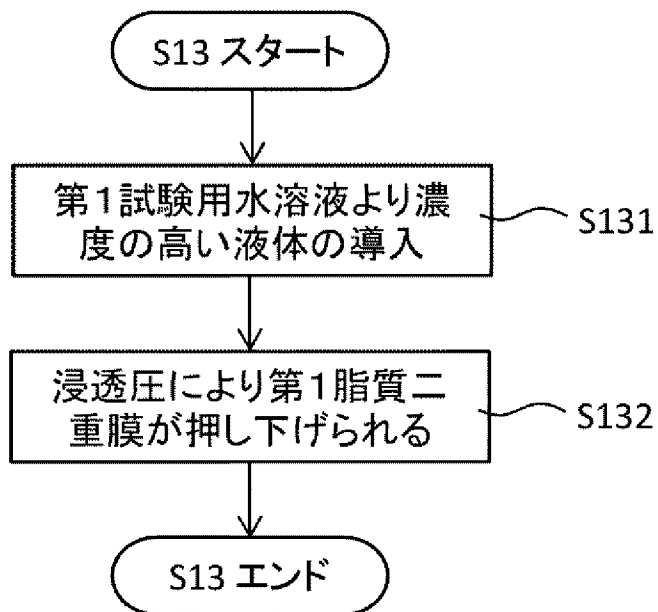
[図7B]



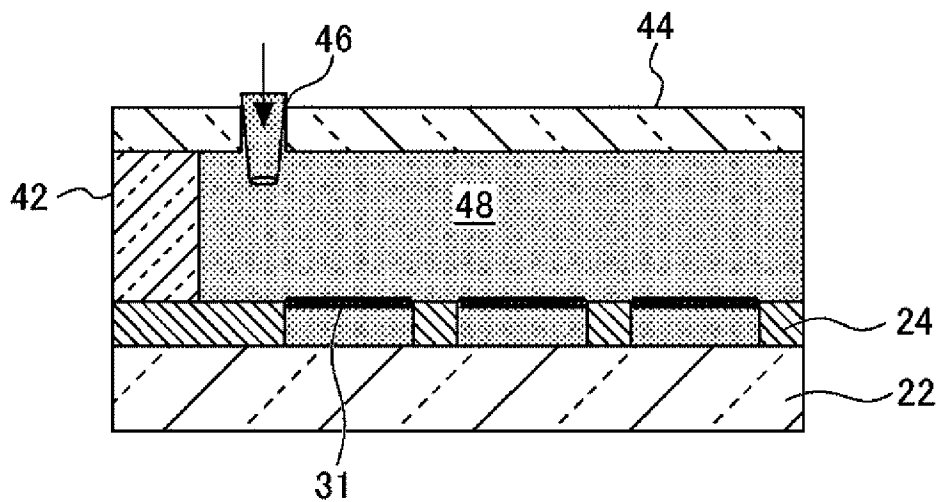
[図7C]



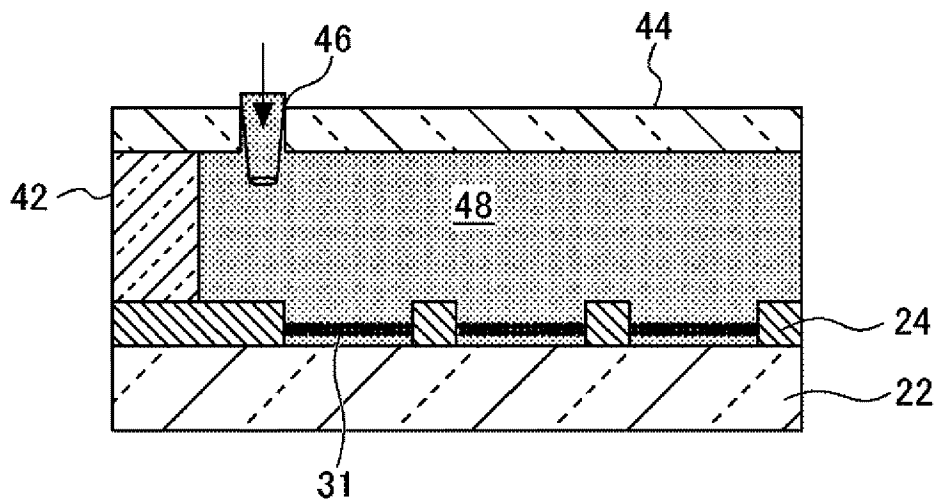
[図8A]



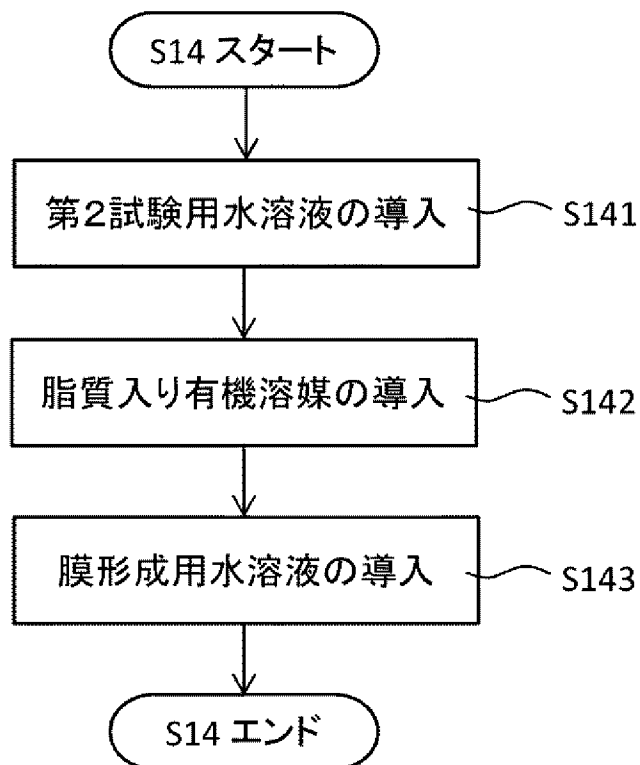
[図8B]



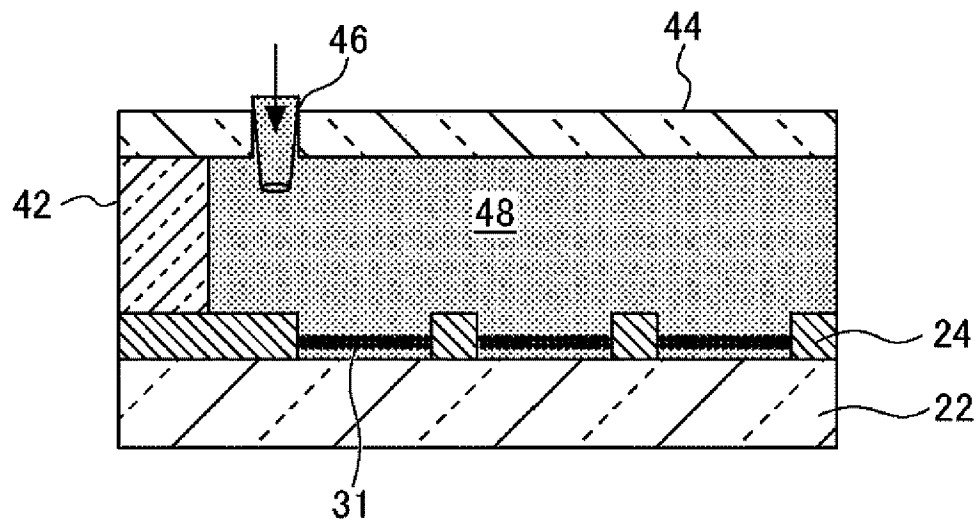
[図8C]



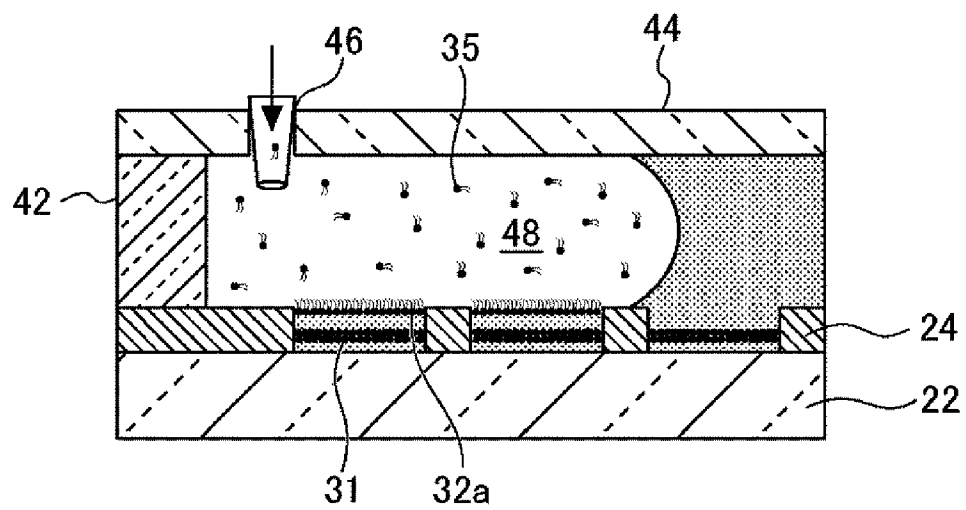
[図9]



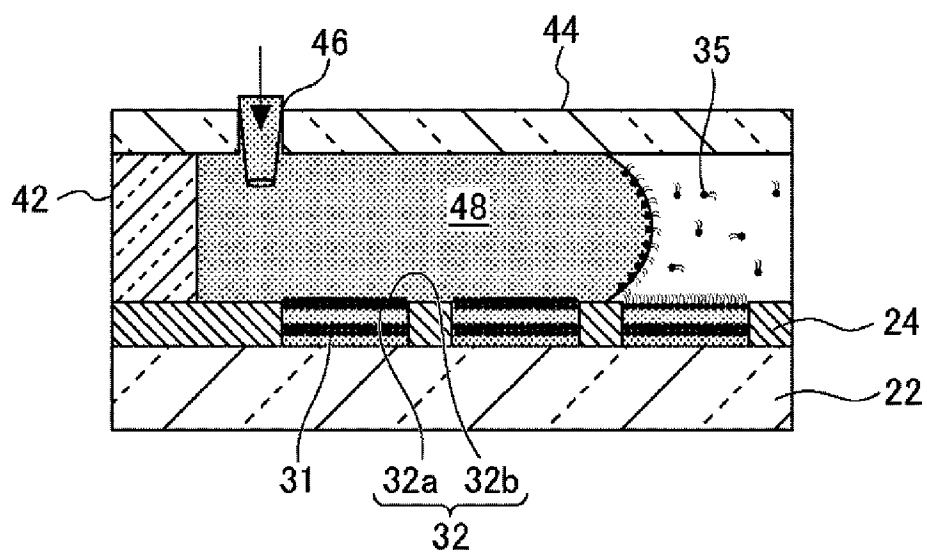
[図10A]



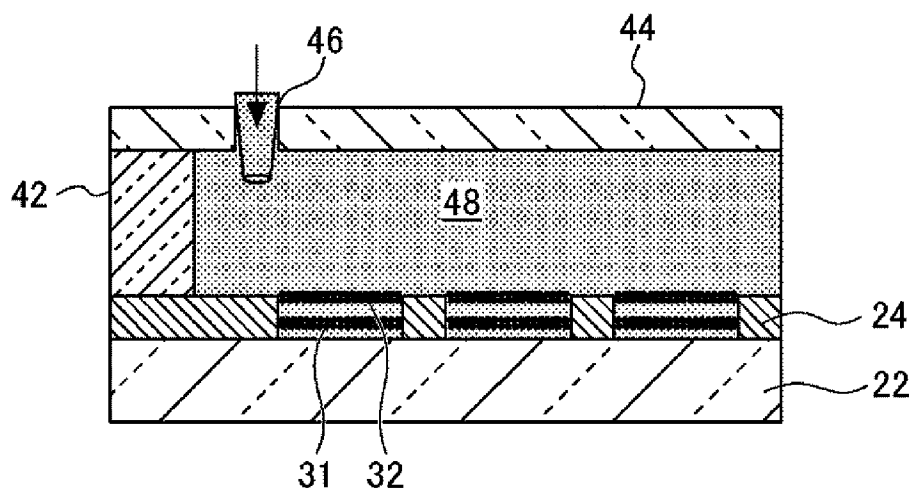
[図10B]



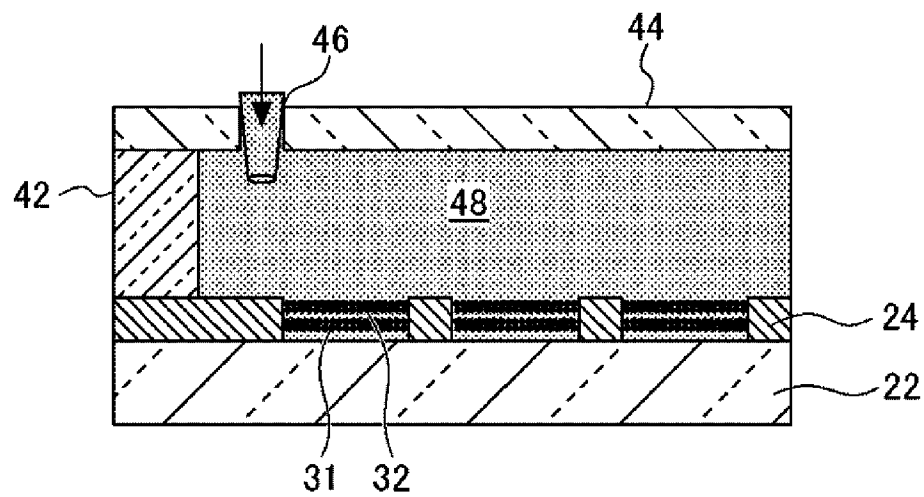
[図10C]



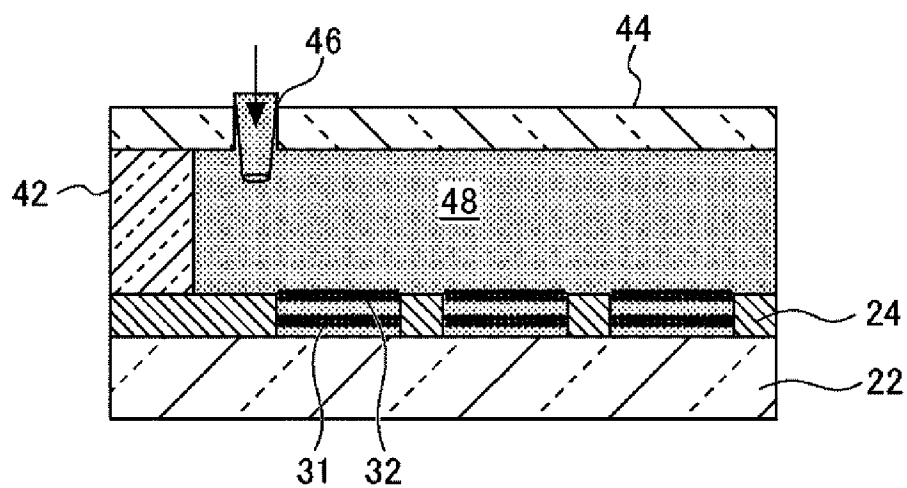
[図11A]



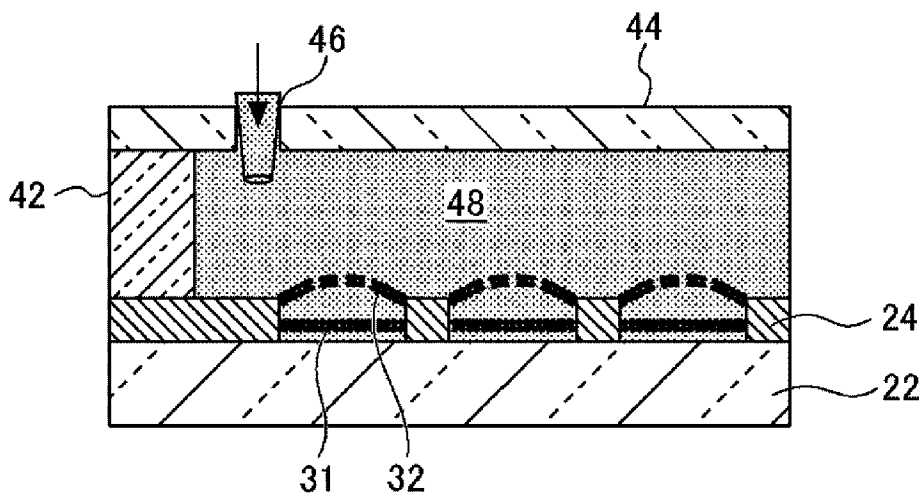
[図11B]



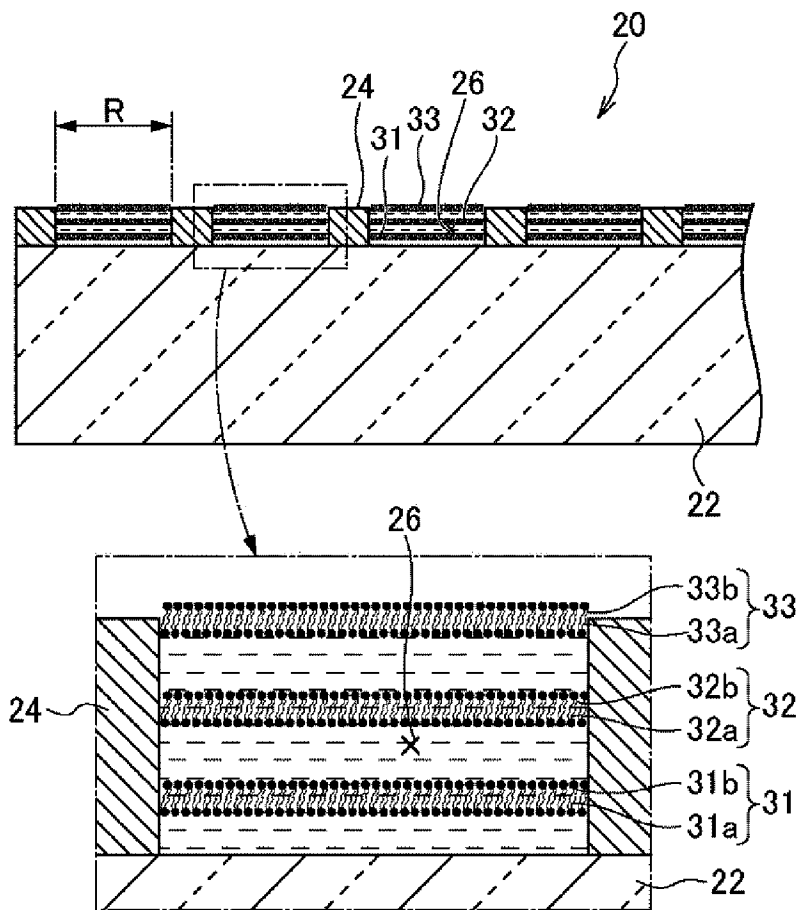
[図12A]



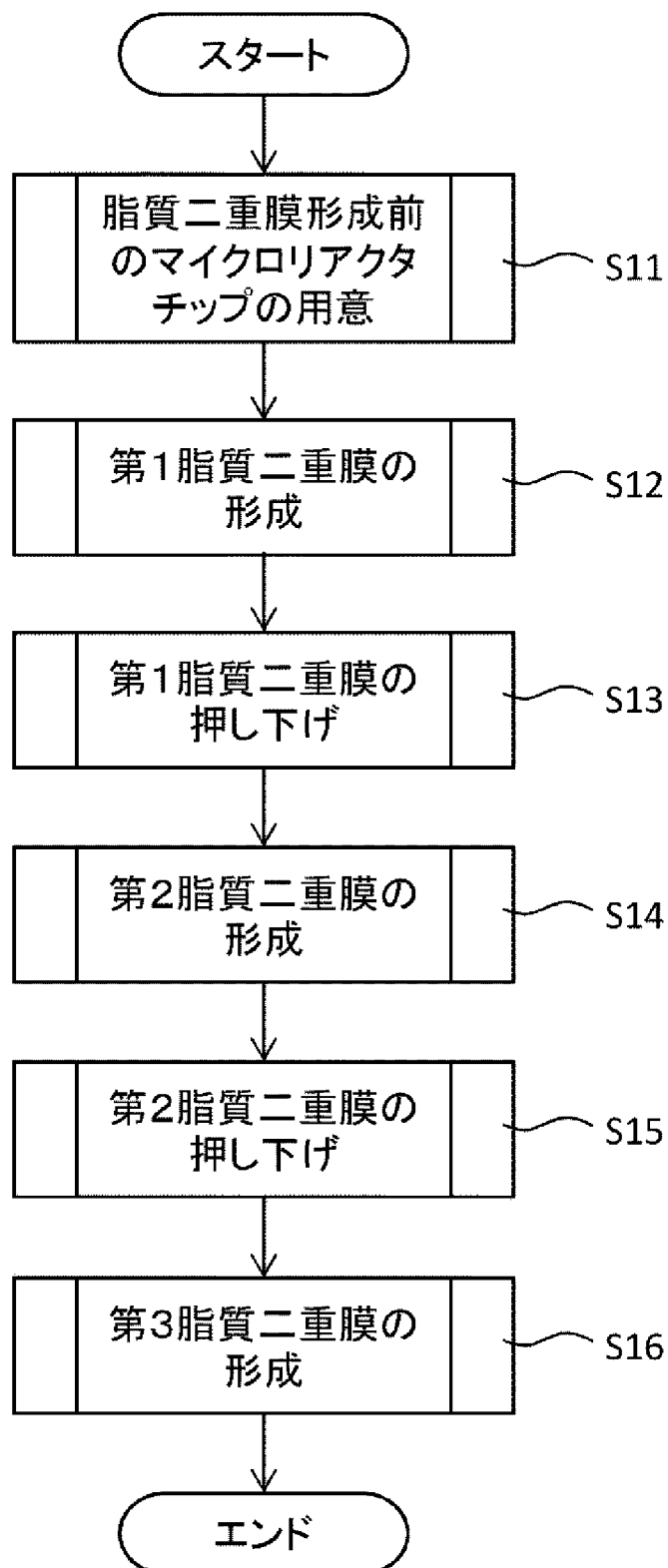
[図12B]



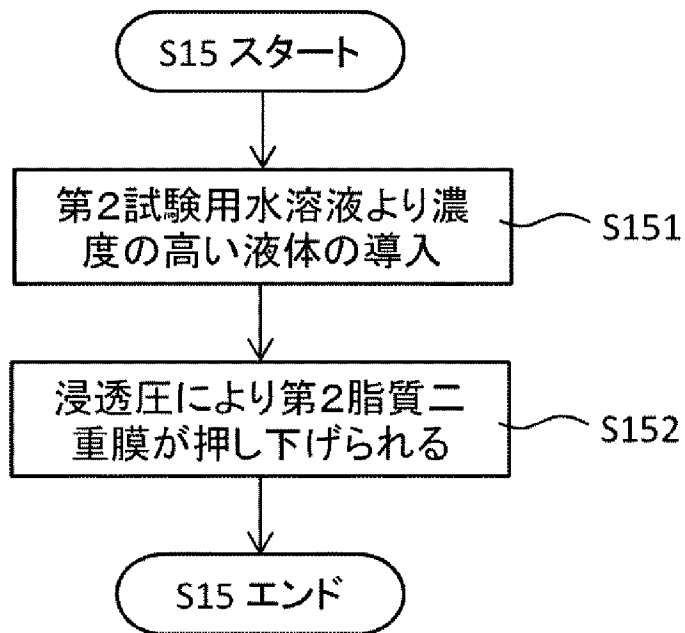
[図13]



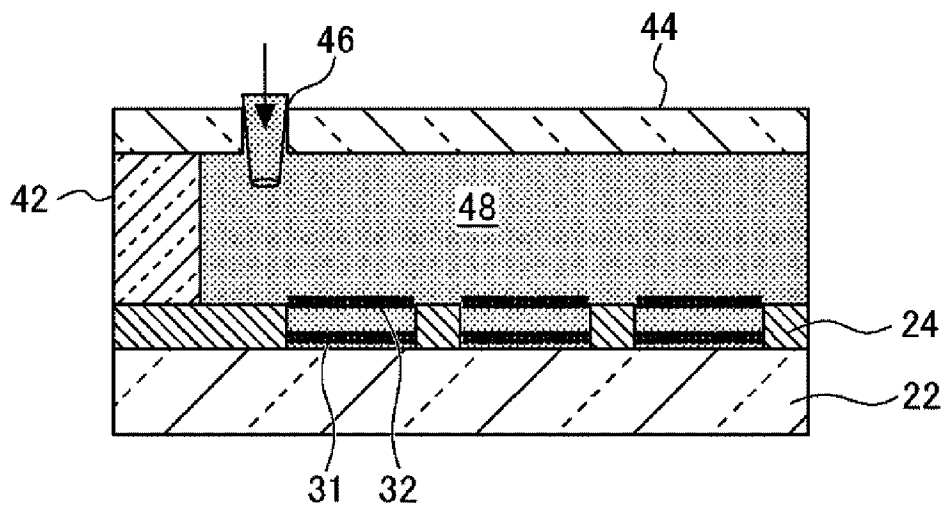
[図14]



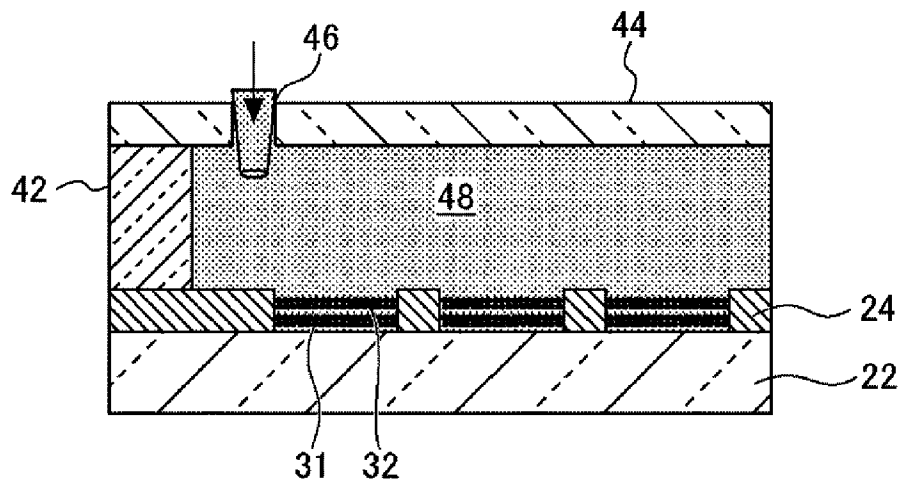
[図15A]



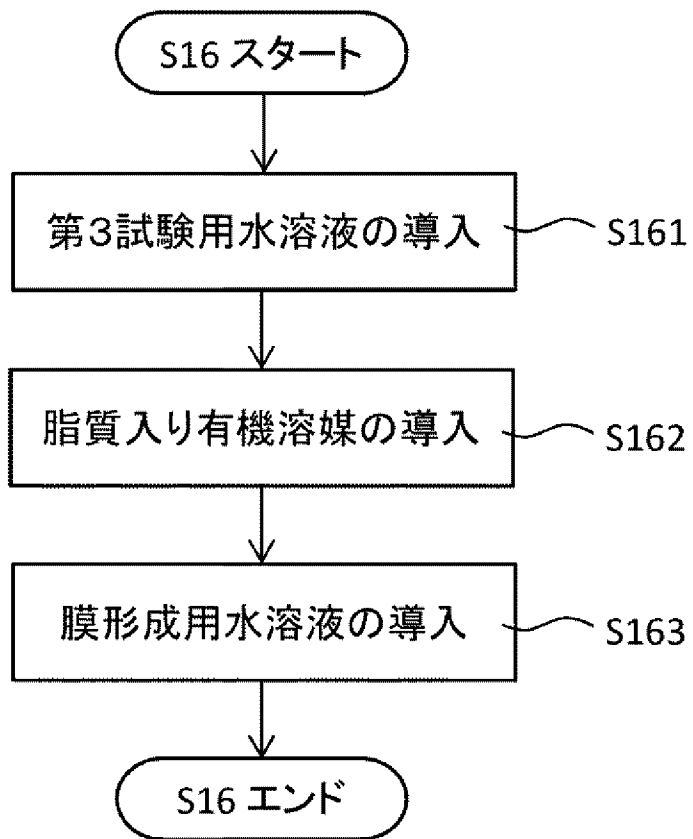
[図15B]



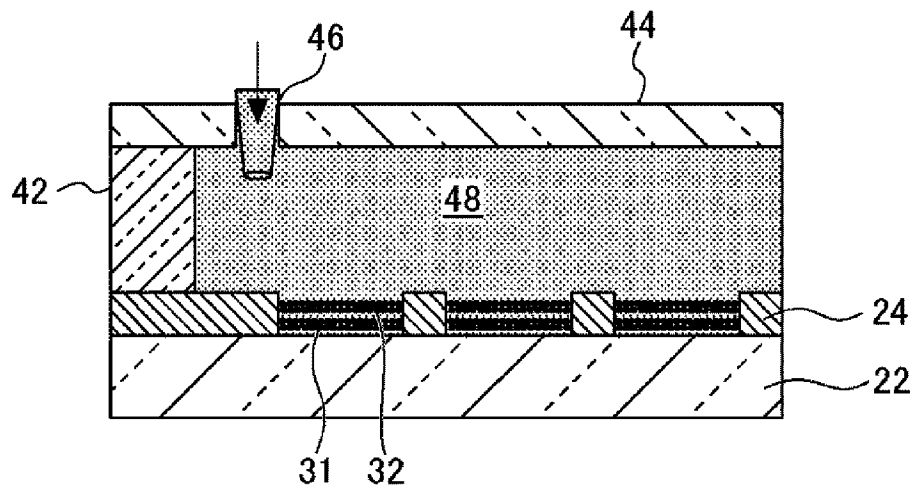
[図15C]



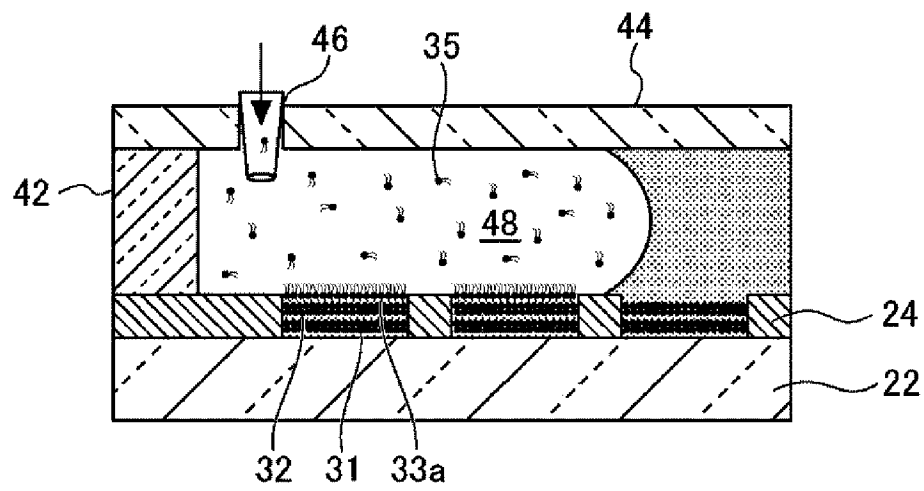
[図16]



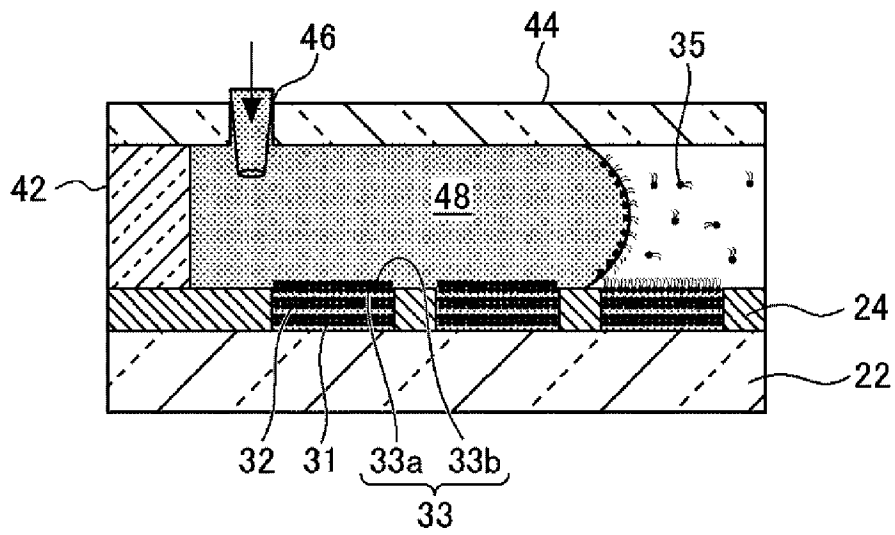
[図17A]



[図17B]



[図17C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/007927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12M1/34 (2006.01)i, B01J19/00 (2006.01)i, B81B1/00 (2006.01)i,
B81C1/00 (2006.01)i, C12M1/00 (2006.01)i, G01N35/02 (2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12M1/34, B01J19/00, B81B1/00, B81C1/00, C12M1/00, G01N35/02

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-040754 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 02 March 2015, entire description, claims, fig. 1-16 & US 2016/0296928 A1, whole document, claims, fig. 1-16 & WO 2015/025822 A1 & EP 3037815 A1	1-11
A	WATANABE, Rikiya et al., "High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition", Scientific Reports, 2014, vol. 4, 4, DOI: 10.1038/srep07076, entire text, abstract, fig. 2	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 May 2018 (24.05.2018)

Date of mailing of the international search report
05 June 2018 (05.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/007927

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-100252 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF FUKUI) 23 May 2013, entire description, claims, fig. 2-4 (Family: none)	1-11
A	JP 2015-231588 A (KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 24 December 2015, entire description (Family: none)	1-11
A	JP 2008-194573 A (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 28 August 2008, entire description (Family: none)	1-11
A	JP 2007-187560 A (FOUNDATION FOR THE PROMOTION OF INDUSTRIAL SCIENCE) 26 July 2007, entire description (Family: none)	1-11
A	WO 2009/069608 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 04 June 2009, entire description & JP 2009-128206 A & US 2010/0304980 A1, whole document & EP 2219032 A1	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, B01J19/00(2006.01)i, B81B1/00(2006.01)i, B81C1/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N35/02(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34, B01J19/00, B81B1/00, B81C1/00, C12M1/00, G01N35/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2015-040754 A (国立大学法人東京大学) 2015.03.02, 全体、特許請求の範囲、図1-16 & US 2016/0296928 A1 whole document, claims, Fig. 1-16 & WO 2015/025822 A1 & EP 3037815 A1	1-11
A	WATANABE, Rikiya et al., High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition, Scientific Reports, 2014, Vol. 4, 4, DOI: 10.1038/srep07076, 全体, abstract, Fig. 2	1-11

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「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

24.05.2018

国際調査報告の発送日

05.06.2018

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)

濱田 光浩

4 N

3763

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-100252 A (国立大学法人福井大学) 2013.05.23, 全体、特許請求の範囲、図2-4 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2015-231588 A (公益財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2015.12.24, 全体 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2008-194573 A (松下電器産業株式会社) 2008.08.28, 全体 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2007-187560 A (財団法人生産技術研究奨励会) 2007.07.26, 全体 (ファミリーなし)	1-11
A	WO 2009/069608 A1 (国立大学法人東京大学) 2009.06.04, 全体 & JP 2009-128206 A & US 2010/0304980 A1 whole document & EP 2219032 A1	1-11