

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年5月26日 (26.05.2006)

PCT

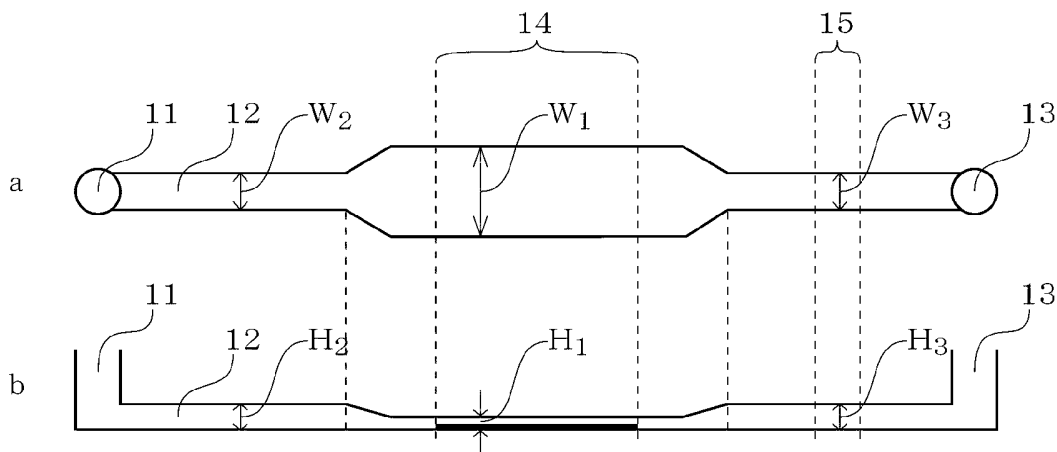
(10) 国際公開番号
WO 2006/054689 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
B81B 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/021231
- (22) 国際出願日: 2005年11月18日 (18.11.2005)
- (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 2004-338002
 2004年11月22日 (22.11.2004) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日水製薬株式会社 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1108736 東京都台東区上野三丁目2番3号 Tokyo (JP). 財団法人神奈川科学技術アカデミー (KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人(米国についてののみ): 赤羽 修一 (AKABA, Shuichi) [JP/JP]; 〒3070036 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究所内 Ibaraki (JP). 奥 裕一 (OKU, Yuichi) [JP/JP]; 〒3070036 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究所内 Ibaraki (JP). 渡慶次 学 (TOKESHI, Manabu) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸2-15-3 ローズガーデン304 Kanagawa (JP). 北森 武彦 (KITAMORI, Takehiko) [JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷2-32-2-304 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 光来出 良彦 (MITSUKUDE, Yoshihiko); 〒1600017 東京都新宿区左門町2番地4 マイネシुरूス四谷1105号 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: MICROCHIP

(54) 発明の名称: マイクロチップ



(57) Abstract: A microchip used for a diagnosis device having a micro fluid system, reaction efficiency of which microchip can be drastically increased and which has a flow path realizing measurement with high stability and reproducibility. A microchip in which at least a flow path (12) is formed in interfaces of two substrates and that has, in the flow path (12), a reaction region (14) and a detection region (15) on the downstream side of the reaction region (14). The depth of the flow path (12) in the detection region (15) is greater than the depth of the flow path (12) in the reaction region (14).

(57) 要約: マイクロ流体システムによる診断装置に利用されるマイクロチップにおいて、反応効率を大幅に上昇させることが可能で、且つ、安定性及び再現性の高い測定を実現する流路を設計したマイクロチップを提供する。2枚の基板の界面に少なくとも流路12が形成され、該流路12内に、反応領域14と、該反応領域14の下流側に検出領域15を有するマイクロチップにおいて、検出領域15の流路12の深さが、反応領域14の流路12の深さよりも深い。

WO 2006/054689 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

マイクロチップ

技術分野

- [0001] 本発明は、反応効率を大幅に上昇させることが可能で、且つ、安定性及び再現性の高い測定を実現する流路を設計したマイクロチップに関し、特に、高感度な診断用に適したマイクロチップに関する。

背景技術

- [0002] 近年、 μ TAS (micro total analysis system)、或いはlab-on-a-chipと呼ばれる化学システム・分析システムの開発が盛んに行われている。これはマイクロチップと呼ばれる数センチメートル角のガラス、シリコン或いはプラスチック基板に、断面幅が数 μ m～数mmの微細な流路を作製し、化学分析操作を集積化したマイクロチップを用いた化学システム・分析システム(以後、 μ TASと称することがある。)である。該システムは、比界面積の増大に伴う化学反応の効率化、反応時間の大幅な短縮などのメリットが発揮されることが知られている。比界面積は、液量に対する固液界面積で表され、微細な流路が形成されたマイクロチップにおいては、具体的には、試料体積あたりの流路壁面の表面積で表すことができる。比界面積は、数 μ m～数mmの微細な流路を形成したマイクロチップを採用することにより増大する。

また、 μ TASは、マイクロチップにおける流路内の空間が狭いため、物質の拡散距離が短くてすむことから、マイクロチップにおける反応時間の大幅な短縮が可能となる。

- [0003] μ TASを診断用分析システムに応用した、免疫測定システムが報告されている。 μ TASを用いた免疫測定システムの構築では被測定物質を流路内に捕捉するための抗体を何らかの手段で流路内に配置させる必要がある。佐藤らの報告 (Analytical chemistry 2001,73,1213-1218 Sato et al.) (非特許文献1) では、マイクロチップの流路内に堰き止め構造を形成しておき、抗体を結合させたポリスチレンビーズを堰き止め構造の上流側に充填し、続いて、試料及び標識抗体を順次送液することにより、該ビーズ表面において抗原抗体複合体を形成させ、続いて、熱レンズ顕微鏡により抗

原抗体複合体中の標識物質を検出することが報告されている。非特許文献1の免疫測定システムは、通常マイクロタイタープレート等を用いて行う免疫測定系を、マイクロチップ上の微小空間に集積化することにより構築したものであり、従来のマイクロタイタープレートを用いたシステムと比較して、反応時間の大幅な短縮、検出感度の上昇が実現されたことが、非特許文献1に報告されている。

[0004] 非特許文献1の、流路を形成し、流路内にポリスチレンビーズを堰き止めたマイクロチップを用いた免疫測定法において、感度を高めるためには流路内に高密度にビーズを充填して反応表面積を大きくする必要があるので、送液の際の圧力が高くなり正確な流速の維持、及び、ビーズ間の隙間での均一な送液の維持が困難であるという問題がある。

[0005] Lab on a chip 2002,2,27-30(非特許文献2)に、磁性粒子表面に抗体を固定化し、これを送液によりマイクロ流路内に設置した磁石上に移動させて該磁性粒子を固定化し、試料及び標識抗体を順次送液することにより磁性粒子表面で免疫複合体を形成させて電気化学的な検出を行う測定系が報告されている。非特許文献2の方法は、汎用されている従来法であるマイクロタイタープレート法と比べ反応時間は短縮されるものの、検出感度の上昇は認められないという不都合がある。その原因は、恐らく、抗原抗体複合体が形成されている磁性粒子表面と測定用の電気化学センサーとの距離が遠いため、センサーに到達する電気化学的信号が微弱であるからと考えられる。これを改善するために流路の深さを浅くすることも考えられるが、現状の技術では限界がある。

[0006] Biosensors and Bioelectronics 19(2004)1193-1202 (非特許文献3)に、多項目同時測定システムとしてMicromosaic immunoassay が報告されている。非特許文献3は、抗体を基板に直接固定化し、そこに試料及び蛍光標識抗体を順次送液することにより、基板上で免疫複合体を形成させ、蛍光顕微鏡により標識物質を検出している。非特許文献3の方法は免疫学的分析に一般的に用いられているラテックス比濁法と比較して優位性は認められていない。また、上記非特許文献3のマイクロチップは、固定化基板と流路基板を粘着性のあるポリジメチルシロキサンを用いて形成しているため、熱融着等の必要は無いが、基板の材質がゴム状で形態保持性が不安定なた

めに、厳密な検出精度が要求されるマイクロチップとしての製品化には不向きである。

[0007] 非特許文献1: Analytical chemistry 2001, 73, 1213-1218 Sato et al.

非特許文献2: Lab on a chip 2002, 2, 27-30

非特許文献3: Biosensors and Bioelectronics 19(2004)1193-1202

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] μ TASにおいてはその反応の場の微小性から、反応により得られたシグナルを検出する際の検出技術において制限を受ける。例えば、高感度で安定した検出を目指した μ TASにおいては、反応領域で得られたシグナルの増幅を行い、増幅されたシグナルを反応領域とは異なる検出領域に送り込んで検出する方法をとる場合がある。このような場合に単純に流路全体の体積を縮小することにより反応効率が増大されたマイクロチップを使用すると、当然に検出領域も縮小されるため、光路長が短くなり、検出する際の再現性を確保することが困難となる。

[0009] μ TASにおける検出する際の再現性を確保することが困難であることについて、免疫測定システムを例にして、次にさらに具体的に説明する。抗体の標識物質としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等の酵素を用いた場合(ELISA法)、最終的に標識物質を測定するのに酵素基質を送液して、酵素反応により変化した基質を反応領域より下流の検出領域で検出することが可能となる。このときの基質としては発色基質、蛍光基質、化学発光基質等が使用されるが、これらの酵素反応基質を検出する検出領域は、マイクロ流体システムにおいては、ある程度大きい方が検出感度の上昇や検出シグナルの安定性が期待できる。

例えば、蛍光基質や化学発光基質を用いて検出する場合には、検出領域において、酵素反応により生成した基質代謝物質の絶対量が多い程検出感度は上昇する。

[0010] また、発色基質を熱レンズ顕微鏡を用い励起光の焦点を流路内で絞り込んで検出する場合には、光路長が長いほうがシグナルの検出の高い再現性が得られる。しかし、光路長が一定以下になるとシグナルが小さくなり、シグナルの検出の再現性が得られない。即ち、熱レンズ顕微鏡では機械的な振動、測定位置合わせ精度の不備、

マイクロチップの作製精度誤差等の諸要因に起因する誤差が存在し、それらにより流路内における焦点の相対的な位置が変化することは避けられない。誤差が光路長よりも大きい場合は、例えば、光路長が余りにも短いために誤差が光路長よりも大きくなる場合には、熱レンズ顕微鏡の励起光の焦点が流路の外に位置してしまうこともあり、このような場合には、測定ができない状態になってしまうこともある。これに対して流路内の光路長が長ければ焦点距離が多少ずれても流路内での焦点の相対的な位置はほとんど変化しないために安定した再現性が得られる。なお、励起光が流路の上部(平板状マイクロチップの平板面)側から照射される場合は、照射される方向からの流路の深さが光路長にあたり、流路の側面(平板状マイクロチップの側面)側から照射される場合は流路の幅が光路長となる。

[0011] しかしながら、このような微小空間を測定できる検出技術は未だ発展途上であり、研究開発レベルの実験で測定が可能であっても、臨床検査、環境検査、食品検査等に代表される測定装置に求められる、検出感度、検出シグナルの安定性及び再現性を確保することが難しい。

[0012] 本発明の目的は、マイクロ流体システムによる診断装置に利用されるマイクロチップにおいて、反応効率を大幅に上昇させることが可能で、且つ、安定性及び再現性の高い測定を実現する流路を有するマイクロチップを提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 上記した目的を達成するための一番目の本発明のマイクロチップは、2枚の基板の界面に少なくとも流路が形成され、該流路内に、反応領域と、該反応領域の下流側に検出領域を有するマイクロチップにおいて、検出領域の流路の深さが、反応領域の流路の深さよりも深いことを特徴とする。

[0014] また、二番目の本発明のマイクロチップは、2枚の基板の界面に少なくとも流路が形成され、該流路内に、反応領域と、該反応領域の下流側に検出領域を有するマイクロチップにおいて、反応領域の流路の幅が、検出領域の流路の幅よりも広く、且つ、検出領域の流路の深さが、反応領域の流路の深さよりも深いことを特徴とする。

[0015] 本発明において「流路の深さ」とは、検出方向と同一方向の流路内の長さをいう。例えば平板状のマイクロチップにおいて、平板面に垂直に検出する場合には、流路の

深さは平板面に垂直の検出方向の流路の内寸である。また、側面から検出する場合には、流路の深さは、側面に垂直の検出方向の流路の内寸である。

[0016] 本発明において「流路の幅」とは、検出方向に対して垂直方向のマイクロチップ内の流路の内寸をいう。

[0017] 本発明において「検出方向」とは、熱レンズ顕微鏡による検出や蛍光法による検出の場合は流路内へ励起光が入射する方向のことをいい、吸光法による検出の場合は測定物質が吸収をもつ光が入射する方向のことをいい、発光法による検出の場合は、発光した光を検出する検出器に検出される光が入射する方向をいう。

[0018] 本発明において「反応領域」は、反応が寄与する界面を有し、該界面は流路の界面の少なくとも一部、即ち、一部又は全部である。反応領域には、例えば、被測定物質である生物学的物質を捕捉するための、該生物学的物質に親和的結合性のある抗生物学的物質が流路内の界面に固定されたものを好ましく用いることができる。

発明の効果

[0019] 1. 一番目の本発明のマイクロチップは、検出領域の流路の深さが、反応領域の流路の深さよりも深いので、検出の安定性、再現性が高いマイクロチップとなり、一方、反応領域の流路の深さが検出領域における深さよりも相対的に浅くなるので、反応領域の流路の比界面積が増大し、反応領域における反応効率が上昇し、高感度となる。

[0020] 2. 二番目の本発明のマイクロチップは、反応領域の流路の幅が、検出領域の流路の幅よりも広く、且つ反応領域の流路の深さが、検出領域の流路の深さよりも浅いので、反応領域の流路における比界面積が増大し、反応領域における反応効率が上昇し、高感度となり、検出領域の流路の深さが反応領域における深さよりも相対的に深くなるので、検出の安定性、再現性が高いマイクロチップとなる。

[0021] 3. 本発明のマイクロチップは、反応領域の流路の界面において、比測定物質である生物学的物質を捕捉するための、該生物学的物質に親和的結合性のある抗生物学的物質が固定されているので、前記1. 又は2. の効果に加えて、生物学的物質の分析が行え、診断用マイクロチップとしての利用価値が高い。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]図1は、対照としての標準型流路を示し、反応領域及び、反応領域の前後の領域が、共に同じ形状(幅0.3mm、深さ0.1mm)であり、図1aは流路の上面図、図1bは流路の断面図である。

[図2]図2は、本発明にかかる流路の1形態を示し、図2aは流路の上面図、図2bは断面図である。

[図3]図3は、本発明のマイクロチップにおける流路の別の形態を示し、図3aは流路の上面図、図3bは流路の断面図である。

[図4]図4は、本発明のマイクロチップにおける流路のさらに別の形態を示し、図4aは流路の上面図、図4bは流路の断面図である。

[図5]流路の深さが0.1mmの時の励起光の各焦点位置での熱レンズ顕微鏡による信号強度を、縦軸に熱レンズ信号をとり、横軸に励起光焦点の流路上面からの距離をとったグラフである。

[図6]流路の深さが0.02mmの時の励起光の各焦点位置での熱レンズ顕微鏡による信号強度を、縦軸に熱レンズ信号をとり、横軸に励起光焦点の流路上面からの距離をとったグラフである。

[図7]実施例2において、SATBlue(商品名、同仁化学研究所製)を送液しながら、反応領域の下流の検出領域で、励起光が633nm、プローブ光が488nmの波長に設定し、熱レンズ顕微鏡により流路の深さ方向のシグナルを検出し、得られた結果を、縦軸に熱レンズ信号強度、横軸に相補配列ビオチン標識オリゴヌクレオチドの濃度をとったグラフである。

[図8]実施例3において、SATBlue(商品名、同仁化学研究所製)を送液しながら、反応領域の下流の検出領域で、励起光が633nm、プローブ光が488nmの波長に設定し、熱レンズ顕微鏡により流路の深さ方向のシグナルを検出し、得られた結果を、縦軸に熱レンズ信号強度、横軸にHBsAgの濃度をとったグラフである。

[図9]比較例1において、SATBlue(商品名、同仁化学研究所製)の発色を660nmの吸収により測定し、得られた結果を、縦軸に吸光度、横軸にHBsAgの濃度をとったグラフである。

符号の説明

- [0023] 1、11、21、31 送液口
2、12、22、32 流路
3、13、23、33 排液口
4、14、24、34 反応領域
5、15、25、35 検出領域

発明を実施するための最良の形態

- [0024] 本発明のマイクロチップによれば、流路における反応領域の比界面積が流路における検出領域よりも増大している。即ち、反応領域の体積が流路における検出領域よりも縮小しているため、反応領域においては、物質の界面への拡散効率が上昇することにより反応効率が増大する。
- [0025] 本発明のマイクロチップにおける反応領域は、反応が寄与する界面を有し、該界面は、流路の界面の少なくとも一部、即ち、一部又は全部である。
- [0026] 本発明のマイクロチップの流路の断面形状は、三角形、正方形、長方形、台形、平行四辺形、その他の四角形、5個以上の頂点を持つ多角形、円形・楕円形など界面の全部が曲面である形状、半月形のように界面のうち一面以上が平面でその他の部分が曲面である形状などが挙げられる。
- [0027] 流路内の界面における反応性について言えば、前記したように、流路の体積を小さくするに従い、比界面積が増大し、物質の界面への拡散効率が上昇することにより反応効率が増大する。例えば、長方形の断面を持つ流路で、流路上面から流路下面に向かって検出する場合を考えると、流路の下面又は上面、或いはその両方が反応に寄与する界面となっている場合には流路の深さを浅くすることで反応面の比界面積が増大するので反応性は増大する。また、流路の側面の一方もしくは両方が反応面となっている場合には流路の幅を縮めることにより反応面の比界面積が増大するので反応性は増大する。また、流路界面の全面が反応面である場合は、流路の幅及び深さの一方又は両方を縮小することにより比界面積が増大するので反応性が増大する。従って、反応領域の体積は、安定に送液できる程度に小さくすることが好ましい。
- [0028] この例において、「流路の下面」とは、平板上のマイクロチップを水平に載置したとき

の流路内の底面をいう。

[0029] この例において、「流路の上面」とは、平板上のマイクロチップを水平に載置したときの流路内の天井面をいう。

[0030] この例において、「流路の側面」とは、流路内面のうち平板上のマイクロチップの側面と平行な側面をいう。

[0031] 本発明において「比界面積」とは、流路の体積に対する流路壁面の表面積の割合のことをいう。例えば、幅0.1mm、深さ0.2mm、長さ0.5mmの断面が長方形の場合、比界面積は、

$(\text{流路壁面の表面積}) \div (\text{流路の体積}) = \{(0.1\text{mm} \times 0.5\text{mm} \times 2\text{面}) + (0.2\text{mm} \times 0.5\text{mm} \times 2\text{面})\} \div (0.1\text{mm} \times 0.2\text{mm} \times 0.5\text{mm}) = 30$ となり比界面積は30と算出される。

[0032] さらに、上記流路の底面(幅0.1mm、長さ0.5mm)の比界面積は、

$(\text{流路底面の表面積}) \div (\text{流路の体積}) = (0.1\text{mm} \times 0.5\text{mm}) \div (0.1\text{mm} \times 0.2\text{mm} \times 0.5\text{mm}) = 5$ となり、流路底面の比界面積は5と算出される。

[0033] そして、上記流路の深さを0.2mmから0.1mmに縮小したときの流路底面の比界面積を算出すると

$(\text{流路底面の比界面積}) \div (\text{流路の体積}) = (0.1\text{mm} \times 0.5\text{mm}) \div (0.1\text{mm} \times 0.1\text{mm} \times 0.5\text{mm}) = 10$ となり、上記のように流路の深さを縮小した場合に流路底面の比界面積が2倍になることが分かる。

[0034] 本発明において「線流速」とは、単位時間あたりに液体が進む距離のことをいい、単位時間あたりに送液される液体の量を表す流速とは異なる概念である。例えば、幅0.1mm、深さ0.2mm、の断面が長方形の筒型の流路Aと、幅0.1mm、深さ0.1mmの断面が正方形の筒型の流路Bを比較した場合、同じ流速で液体を送液すると、流路Bにおける一定時間に流路内を液体が進む距離は、流路Aにおけるそれに比べ2倍になる。これは、流路Aの深さが流路Bの深さの2倍であることにより、流路Aは流路Bの2倍の体積をもつことになるためである。つまり、流速が一定であっても、流路Bの線流速は流路Aの線流速の2倍になる。

[0035] 図2a、図2bは、本発明のマイクロチップにおける流路の1形態を示す。図2aは流

路の上面図、図2bは流路の断面図である。流路12の途中において、測定すべき生体物質を捕捉するための抗生物質が固定された反応領域14が形成されている。流路12の一方の末端には試薬や検体試料を供給するための送液口11、他方の末端には、流路12内の液体を排出するための排液口13が設けられている。前記反応領域14の下流の流路12において、検出領域15が設けられている。検出領域15は、蛍光法、化学発光法、熱レンズ分光法等の光学的な分析手段を利用して流路12におけるシグナルを測定するための領域である。反応領域14の流路の幅 W_1 は、反応領域14の前後の領域の幅 W_2 、 W_3 よりも広く、反応領域14の流路の深さ H_1 は、反応領域14の前後の領域の深さ H_2 、 H_3 よりも浅い。

[0036] 図3a、図3bは、本発明のマイクロチップにおける流路の別の形態を示す。図3aは流路の上面図、図3bは流路の断面図である。流路22の途中において、測定すべき生体物質を捕捉するための抗生物質が固定された反応領域24が形成されている。流路22の一方の末端には試薬や検体試料を供給するための送液口21、他方の末端には、流路22内の液体を排出するための排液口23が設けられている。前記反応領域24の下流の流路22において、検出領域25が設けられている。検出領域25は、蛍光法、化学発光法、熱レンズ分光法等の光学的な分析手段を利用して流路22におけるシグナルを測定するための領域である。反応領域24の流路の幅 W_4 は、検出領域25の幅 W_6 よりも広く、反応領域24の上流の流路の幅 W_5 と同じであり、反応領域24の流路の深さ H_4 は、反応領域24の前後の領域の深さ H_6 よりも浅く、反応領域24の上流の流路の深さ H_5 と同じである。

[0037] 図4a、図4bは、本発明のマイクロチップにおける流路のさらに別の形態を示す。図4aは流路の上面図、図4bは流路の断面図である。流路32の途中において、測定すべき生体物質を捕捉するための抗生物質が固定された反応領域34が形成されている。流路32の一方の末端には試薬や検体試料を供給するための送液口31、他方の末端には、流路32内の液体を排出するための排液口33が設けられている。前記反応領域34の下流の流路32において、検出領域35が設けられている。検出領域35は、蛍光法、化学発光法、熱レンズ分光法等の光学的な分析手段を利用して流路におけるシグナルを測定するための領域である。反応領域34の流路の幅 W_7 は、反

応領域34の前後の領域の幅 W_8 、 W_9 よりも広く、反応領域34の深さ H_7 が反応領域34の前後の領域の深さ H_8 、 H_9 よりも小さい。反応領域34の上流の流路32は、幅 W_8 が漸次増大しており、且つ、深さ H_8 が漸次減少している。このような流路32の形状を漸次変化させることにより、流路32における線流速を一定にコントロールしたり、線流速を漸増、漸減したりコントロールすることができる。

- [0038] マイクロチップへの試料液或いは薬液の送液において、目的とする流速を反応領域の流速に合わせると、反応領域を通過した後の溶液の流速が遅くなり、検出領域に到達するまでの時間が長くなり迅速な測定の障害となってしまうことがある。或いは逆の場合には、反応領域を溶液が瞬時に通過することになるために、増幅効率が低下し、シグナル増幅という目的の達成が困難となることがある。これらの不都合の解決策として、反応領域の流路の深さを縮小した場合には流路の幅を広げ、反応領域の流路の幅を縮小したときには流路の深さを増大させることにより、反応領域における反応面の比界面積を大きくしつつ流路全体の線流速を一定にコントロールする流路設計を行うことが好ましい。
- [0039] さらに、意図的に反応領域の線流速を早くし、或いは遅くする流路の設計も当然に可能である。例えば、反応領域の流路の深さを2分の1にしたときに線流速を一定に保つためには、流路の幅を2倍にする必要があるが、流路の幅を4倍にすれば、反応領域の線流速が2分の1となる。このような設計にすると測定時間は長くなるが、増幅効率を2倍に上げることができる。このように、目的に応じて反応領域での線流速をコントロールすることも可能である。
- [0040] 本発明のマイクロチップにおいて反応領域の流路の幅が、 $1\ \mu\text{m}$ 以上 2mm 以内が好ましく、さらに好ましくは $500\ \mu\text{m}$ 以内である。流路の幅が $1\ \mu\text{m}$ 未満だと溶液の表面張力に起因する抵抗が増大し、溶液を流路に送液する際に非常に高い圧力が必要となり安定した送液が困難である。また、流路の幅が 2mm を超えると溶液の流れが乱れ、流路内への均一な送液が困難である。
- [0041] 本発明のマイクロチップにおいて反応領域の流路の深さは、 $1\ \mu\text{m}$ 以上 2mm 以内が好ましく、さらに好ましくは $500\ \mu\text{m}$ 以内である。流路の深さが $1\ \mu\text{m}$ 未満だと溶液の表面張力に起因する抵抗が増大し、溶液を流路に送液する際に非常に高い圧力

が必要となり安定した送液が困難である。また、流路の深さが2mmを超えると溶液の流れが乱れ、流路内への均一な送液が困難である。

[0042] 本発明のマイクロチップにおいて、検出領域の流路の深さが、10 μ m以上2mm以内であることが好ましい。流路の深さが10 μ m未満だとマイクロチップにおいて測定することが困難と、流路の深さが2mmを超えると溶液の流れが乱れ、流路内への送液が困難である。

[0043] 本発明のマイクロチップを製造するための2つの基板の材質としては、ポリジメチルシロキサン(PDMS:略語、Anal.Chem.,Vol.69,pp.3451-3457,1997)、アクリル系樹脂(Anal.Chem.,Vol.69,pp.2626,1997)、ポリメチルメタクリレート(PMMA:略語、Anal.Chem.,Vol.69,pp.4783,1997)、ガラス、環状オレフィンポリマー、あるいは、これらの部材の表面にダイヤモンドもしくはダイヤモンドライクカーボン(特開2002-365293号公報)、cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)、Surmodics、Reacti-Bind (Analytical Biochemistry, 317 (2003) 76-84)、ポリ-L-リジン、カルボジイミド、アミノ基、アルデヒド基、マレイミド基、デキストランなどで表面が修飾された物質等を用いてもよい。基板は透明であっても、不透明であってもよいが、不透明な場合には少なくとも検出部は透明であることが望ましい。また、該基板は、親水処理又は疎水処理が施されていてもよい。

[0044] 本発明のマイクロチップは、例えば、次の方法により製造することができる。まず鋳型をシリコンウエハのエッチングにより作成しておく。これに融解したポリマーを流し込んで構造を転写し、ポリマーを固化させる。転写により、流路となる溝が形成された一方の基板が形成される。他方の平板状の基板と接合すれば、マイクロチップが製造される。

2枚の基板の接合は一般的には加熱により行われる。PDMSを素材とすればガラスやPDMSとの自然吸着により簡単に流路のシーリングが行える。プラスチックを用いたマイクロチップは量産化が容易なので、コストの点で有利である。またガラスの場合は、フッ化水素の反応時間によって深さを調整しなければならないが、プラスチック製の場合は、一度鋳型を作製してしまえば射出成型の技術により再現性高く生産することが可能となる。2枚の基板の接合には、一般的に接着剤を用いた接合、熱融着

による接合を行ってもよい。接着剤には、例えば、紫外線等の電離放射線硬化型接着剤、熱硬化型接着剤、アクリル系接着剤、エポキシ系接着剤等の有機系接着剤、あるいは無機系接着剤が挙げられる。

- [0045] 本発明のマイクロチップによる検出対象物は、生物学的物質が好適である。生物学的物質としては、抗原、抗体、糖鎖、糖タンパク質、レクチン、受容体、リガンド、DNA、RNA、その他、生体中の物質と特異的に結合することができる物質、その物質の分子量に依存しないものが挙げられる。これらの分析対象物を分析するための試料には、血液、血漿、血清、尿、唾液、その他体液や、DNA、RNA、染色体や、DNA、RNAを増幅させたもの、抗原、抗体、糖鎖、受容体、リガンドを含む物体が試料となりうる。
- [0046] 本発明のマイクロチップの反応領域の反応が寄与する界面に固定される抗生物学的物質としては、抗原に対する抗体、抗体に対する抗原、ビオチンに対するアビジン、アビジンに対するビオチン、DNAに対するDNA、RNAにたいするDNA、受容体に対するリガンド、リガンドに対する受容体などが挙げられる。
- [0047] 抗生物学的物質を反応領域の界面に固定化する方法として、界面に直接抗生物学的物質を結合させる方法と、結合子を介して間接的に固定化する方法が考えられる。抗生物学的物質を反応領域の界面に直接固定化する方法としては、イオン結合や、水素結合、疎水結合、或いは、化学修飾された界面に共有結合で固定化する方法が挙げられる。
- [0048] 抗生物学的物質を反応領域の界面に固定化するための結合子には、熱や有機溶媒に安定な性質を持つデオキシリボ核酸等の核酸が挙げられる。核酸を結合子として反応領域の界面に予め固定化しておき、該核酸を固定化した固定化基板と、流路となるべき溝部を形成した流路基板を加熱して張り合わせた後に、固定化基板に固定された核酸と相補的な配列を持つ核酸を抗生物学的物質に結合させたものを、流路に送液することにより、抗生物学的物質を反応領域の界面に固定化することができる。上記のプロセスを経たマイクロチップは、比較的熱に強い核酸のみが加熱を受けただけであり、抗生物学的物質に対する加熱が回避できるので、熱に弱い抗生物学的物質、例えば、タンパク質等は変性を回避でき、活性を保持できる。また、検出した

い生物学的物質が核酸である場合には、該核酸と相補的な配列を持つ核酸を反応領域の界面に固定しておけばよい。

- [0049] 抗生物学的物質を反応領域の界面に固定化するための結合子の他の例には、前記核酸以外に、磁性粒子を用いることができる。この場合、予め反応領域の流路内又は流路外に磁石を配置しておき、マイクロチップの流路に磁性粒子表面に固定された生物学的物質を含んだ液を送液することにより、抗生物学的物質を反応領域の界面に固定化することができる。
- [0050] 本発明のマイクロチップは反応領域の流路における少なくとも1つの界面自体が反応性を有するように設計されている。このように設計されてなる本発明のマイクロチップは、従来の流路内にポリスチレンビーズを堰き止めたマイクロチップにおける、送液に障害となるようなポリスチレンビーズを使用していないので、マイクロチップの流路における流速及び送液の均一性を損なうことがない。
- [0051] 本発明における検出領域における検出手段としては蛍光法、化学発光法、熱レンズ分光法、吸光法が挙げられる。本発明のマイクロチップは、検出領域の流路の深さが、反応領域の流路の深さよりも深いので、検出の安定性、再現性が高い。本発明のマイクロチップは、検出領域の流路の深さが深いことにより、例えば、熱レンズ顕微鏡による測定では、励起光の焦点を流路内に合わせる容易であると同時に、励起光の焦点位置が流路内の深さ方向に関して、光路中心付近では数十 μm ずれても信号強度がほとんど変化しないので、検出の安定性、再現性が高い。
- [0052] また、例えば、蛍光法による測定では、励起光の焦点を絞って流路内に照射する場合には、焦点を流路内に合わせる容易であり検出の安定性、再現性が高くなり、励起光の焦点を絞らずに照射する場合であれば、励起される蛍光物質の絶対量が増加するため検出感度が高くなる。
- また、例えば、化学発光法による測定では、発光物質の絶対量が増加するため検出感度が高くなる。
- [0053] 上記の各光学的測定法では、検出領域の流路の深さが、検出のための光を流路の長さ方向に対して垂直に透過したとき、光路長と同じ長さとなる。即ち、本発明において「光路長」とは、流路を横断して通過する光の、流路内の長さをいう。

実施例 1

[0054] マイクロチップの調製

(1) DNAの固定化

5'末端にアミノ基を導入した5'-TTGCTAACCCAGAACACTAT-3'なる配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、ジーンスライド(商品名、株式会社日本パーカーライジング製)上にジーンスライドの商品説明書にしたがって、反応領域となるべき位置に流路方向に沿って該オリゴヌクレオチドを固定化した。

[0055] (2) 流路の作製及びマイクロチップの調製

厚さ1mmのポリジメチルシロキサン(PDMS)の平板に、下記1)に示す対照の標準型流路及び2)に示す本発明の流路とするための溝を形成させて、溝を形成した2種類の平板を得た。溝の作製は、Electrophoresis.2000 Jan;21(1):27-40 McDonald JC et al.に記載の方法に従った。

[0056] 得られた溝を形成した2種類の平板を、上記工程(1)で得たオリゴヌクレオチド固定化スライドガラスと流路が設置されるように圧着するように貼り合わせるにより接合して、対照及び本実施例1の各マイクロチップを作製した。

[0057] 1) 対照の標準型流路

図1a、図1bは、対照としての標準型流路を示し、DNA固定領域(反応領域4)及び、DNA固定領域(反応領域4)の前後の領域が、共に同じ形状の標準型流路である。図1aは流路2の上面図、図1bは流路の断面図を示し、幅0.3mm、深さ0.1mmの流路2が形成されている。流路の一方の末端には試薬や検体試料を供給するための送液口1、他方の末端には、流路2内の液体を排出するための排液口3が設けられている。流路2の中間領域が測定すべき生物学的物質を捕捉するためのオリゴヌクレオチドを固定した反応領域4である。該反応領域4の下流側に、捕捉した生物学的物質を検出するための検出領域5が設けられている。

[0058] 2) 本発明にかかる流路の1形態

本実施例1で使用する、流路を有するマイクロチップは、前記に説明した図2a、図2bの形状の流路を有するものを使用する。本実施例1にかかる流路は、流路12の中間領域がDNAを固定した反応領域14であり、その寸法は、幅1.5mm、深さ0.02

mmである。該反応領域14の前後の領域における流路12は、幅0.3mm、深さ0.1mmである。

[0059] 十分な光路長を有する検出領域でのシグナルの安定性の確認

前記工程で得られた流路(反応領域の幅1.5mm、深さ0.02mm、検出領域の幅0.3mm、深さ0.1mm)が形成されたマイクロチップを、反応領域において励起光の光路が流路上面から底面に向かうように、光路に配置した。一方、本実施例1の流路の検出領域においても同様に励起光の光路が流路上面から流路底面に向かうように、マイクロチップを光路に配置した。反応領域については励起光の焦点位置を流路上面から流路底面にかけて5 μ mピッチで移動させていき、検出領域については励起光の焦点位置を流路上面から流路底面にかけて10 μ mピッチで移動させていき、それぞれの焦点位置での信号強度(シグナル強度)を熱レンズ顕微鏡により測定した。各流路には、水で 10^{-4} Mに調製したサンセットイエロー(商品名、和光純薬(株)製)を満たして熱レンズ顕微鏡により測定した。使用した熱レンズ顕微鏡は励起光波長がサンセットイエロー(商品名、和光純薬(株)製)が吸収をもつ波長である532nm、プローブ光の波長がサンセットイエロー(商品名、和光純薬(株)製)の吸収が低い633nmのものを使用した。

[0060] 得られた測定結果を、縦軸に熱レンズの信号強度(シグナル強度)をとり、横軸に励起光焦点の流路上面からの距離をとった図5(検出領域、流路深0.1mm)及び図6(反応領域、流路深0.02mm)のグラフに示す。図5及び図6のグラフによれば、流路の深さが0.1mmの検出部位では、流路の深さが0.02mmの反応部位に比べて流路内における光路中心付近では数十 μ m集点の位置がずれても信号強度がほとんど変化しないことがわかる。これは流路内に十分な光路長がある検出領域では流路上面及び、流路下面の近傍を除いた光路長における任意の位置を励起光焦点とすれば、機器の振動、測定地点の位置決め精度の不備、マイクロチップの平面性の誤差などによる焦点位置のわずかな変化には影響を受けずに再現性よくシグナルが得られることを示している。

実施例 2

[0061] 流路設計の違いによる検出感度の比較－核酸の検出

標準型流路を持つマイクロチップ(反応領域の流路深0.1mm、検出領域の流路深0.1mm)と本発明にかかる流路を持つマイクロチップ(反応領域の流路深0.02mm、検出領域の流路深0.1mm)を用いた標的核酸の検出感度の比較を次のようにして行った。

- [0062] 標的核酸として、5'末端をビオチン修飾した固定化オリゴヌクレオチドと相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドを用い、マイクロ流体システムにより標的核酸の検出を次のようにして行った。即ち、マイクロチップの流路内を1mM EDTA、0.05%Tween20 (Atlas Powder社の商品名)を含むPBS(-) (以下、「洗浄用バッファー」と呼ぶ)で2倍希釈したブロックエース(商品名、雪印乳業社製)で満たし、室温(以後の反応はすべて室温で反応)で1時間インキュベーションすることにより、流路内壁をブロッキングした。続いて、1%BSA、1mM EDTA、0.05%Tween20 (Atlas Powder社の商品名)を含むPBS(-) (以下、「反应用バッファー」と呼ぶ)で0、0.2、1、5nMの濃度になるように調製した標的核酸をそれぞれ異なる流路に5分間送液後、洗浄用バッファーを2分間送液して洗浄した。続いて反应用バッファーで10000倍に希釈したペルオキシダーゼ(POD)標識ストレプトアビジン(SA)を5分間送液し、洗浄用バッファーを2分間送液した。標的核酸の検出は、SATBlue(商品名、同仁化学研究所製)を基質としたPOD活性を熱レンズ顕微鏡(TLM)で検出することにより評価した。即ち、SATBlue(商品名、同仁化学研究所製)を送液しながら、反応領域より下流側に位置する検出領域で、励起光が633nm、プローブ光が488nmの波長に設定し、TLMにより流路の深さ方向のシグナルを検出した。得られた結果を、下記の表1、及び縦軸に熱レンズ信号強度、横軸に相補配列ビオチン標識オリゴヌクレオチドの濃度をとったグラフを図7に示す。

- [0063] [表1]

相補配列ビオチン標識オリゴヌクレオチド濃度(nM)	反応領域の深さ100 μ mでの信号強度(μ V)	反応領域の深さ20 μ mでの信号強度(μ V)
0	27.95	28.61
0.2	34.59	90.79
1	68.68	332.53
5	241.65	661.54

[0064] 表1及び図7によれば、反応領域の深さが0.02mmと浅い本発明のマイクロチップの方が、対照としての反応領域の深さが0.1mmと深い標準型流路のマイクロチップに比べて、検出感度が高く、飛躍的な検出感度の上昇が認められることがわかる。

実施例 3

[0065] 流路設計の違いによる検出感度の比較—タンパク質の検出

標準型流路を持つマイクロチップ(反応領域の流路深0.1mm、検出領域の流路深0.1mm)と本発明にかかる流路を持つマイクロチップ(反応領域の流路深0.02mm、検出領域の流路深0.1mm)を用いた標的タンパク質の検出感度の比較を次のようにして行った。

[0066] 標的タンパク質として、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg、明治乳業株式会社製の検出を行った。即ち、マイクロチップの流路内を、洗浄バッファーで2倍希釈したブロックエース(商品名、雪印乳業社製)で満たし、室温(以後の反応はすべて室温で反応)で1時間インキュベーションすることにより、流路内壁をブロッキングした。続いて、反应用バッファーで50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように調製した、固定化オリゴヌクレオチドと相補的な配列のオリゴヌクレオチドを結合させた抗HBsAgモノクローナル抗体(調製はOkuraの方法(J Immunol Methods. 2001Dec 1;258(1-2):73-84.)で行った)を流路に15分間送液後、洗浄用バッファーを5分間送液して洗浄した。続いて、反应用バッファーで0, 0.1, 0.2ng/mLの濃度に調製したHBsAgをそれぞれ異なる流路に15分間送液後、洗浄用バッファーを5分間送液して洗浄した。続いて、反应用バッファーで1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製したビオチン標識抗HBsAg抗体(上記のオリゴヌクレオチド結合抗体とはHBsAgとの結合部位が異なる)を15分間送液し、洗浄用バッファーを5分間送液して洗浄した。10000倍に希釈したPOD標識ストレプトアビジンSAを15分間送液し、洗浄用バッファーを5分間洗浄した。標的タンパク質の検出は、前記実施例2と同様に、SATBlue(商品名、同仁科学研究所製)を基質としたPOD活性を熱レンズ顕微鏡(TLM)で検出した。

[0067] 得られた結果を、下記の表2、及び縦軸に熱レンズ信号強度、横軸にHBsAgの濃度をとったグラフを図8に示す。

[0068] [表2]

IIBsAg濃度 (ng/mL)	反応領域の深さ100 μ m での信号強度 (μ V)	反応領域の深さ20 μ m での信号強度 (μ V)
0	31	29
0.1	31	40.255
0.2	34	95.15

[0069] 表2及び図8によれば、反応領域の深さが0.02mmと浅い本発明のマイクロチップの方が、対照としての反応領域の深さが0.1mmと深い標準型流路のマイクロチップに比べて、検出感度が高く、飛躍的な検出感度の上昇が認められることがわかる。

[0070] [比較例1]

マイクロタイタープレートを用いたELISAでのHBsAg検出感度

前記実施例3の測定で用いた抗体と同じHBsAg抗体の組み合わせを使用して、マイクロタイタープレートによるサンドイッチELISAを行った。即ち96ウェルノマイクロプレートにPBSで10 μ g/mLに調製した抗HBsAg抗体をウェル当たりそれぞれ100 μ L加え、室温(これ以下の反応はすべて室温で反応)で1時間反応させた。その後PBSで1回洗浄し、PBS(-)で2倍希釈したブロックエースを200 μ L入れて1時間ブロッキングを行い測定用のプレートとした。これらのウェルに反应用バッファーで0, 0.1, 0.2ng/mLの濃度に調製したHBsAgを100 μ L加え、1時間反応させた。PBSで洗浄した後、反應用バッファーで1 μ g/mLの濃度に調製したビオチン標識抗HBsAg抗体を100 μ L加え、1時間反応させた。PBSで洗浄した後、反應用バッファーで10000倍希釈したPOD標識ストレプトアビジンを100 μ Lを加え、1時間反応させた。引き続き洗浄した後、SATBlueを基質とした発色反応によりPOD活性を660nmの吸収で測定した。

[0071] 得られた結果を、下記の表3、及び縦軸にPOD活性、横軸にHBsAgの濃度をとったグラフを図9に示す。

[0072] [表3]

HBsAg濃度 (ng/mL)	OD660nm
0	0.0495
0.1	0.043
0.2	0.0485

[0073] 図9に示すようにマイクロタイタープレート法では0.2ng/mLのHBsAgでも全く検出できず、前記実施例3で示したように本発明にかかわる流路を用いたマイクロ流体システムによる免疫測定系がマイクロタイタープレート法と比較して高感度であることが示された。

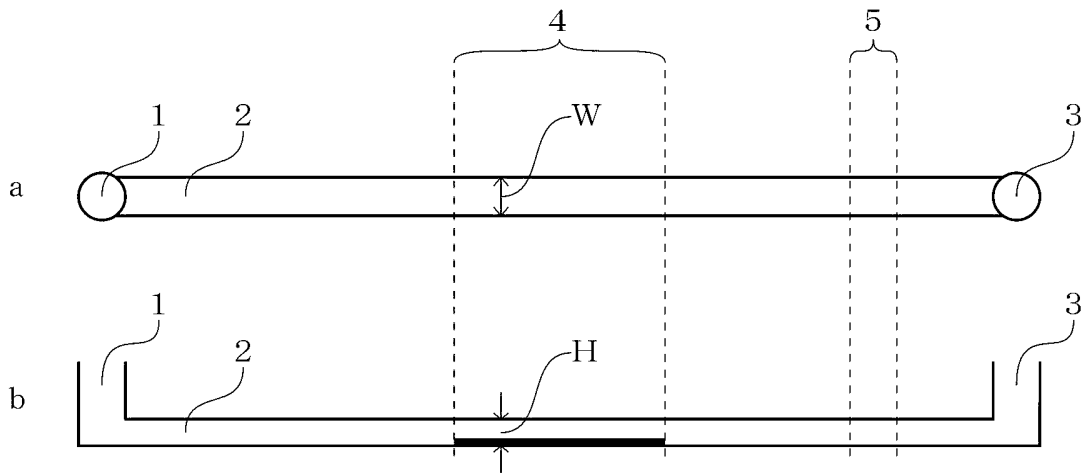
産業上の利用可能性

[0074] 本発明のマイクロチップは、生物学的物質の分析に適しており、各種疾病診断、動植物や微生物のゲノムやタンパク質の解析、遺伝子組み換え食品の安全性検査、環境中の有害物質の検査に利用可能である。

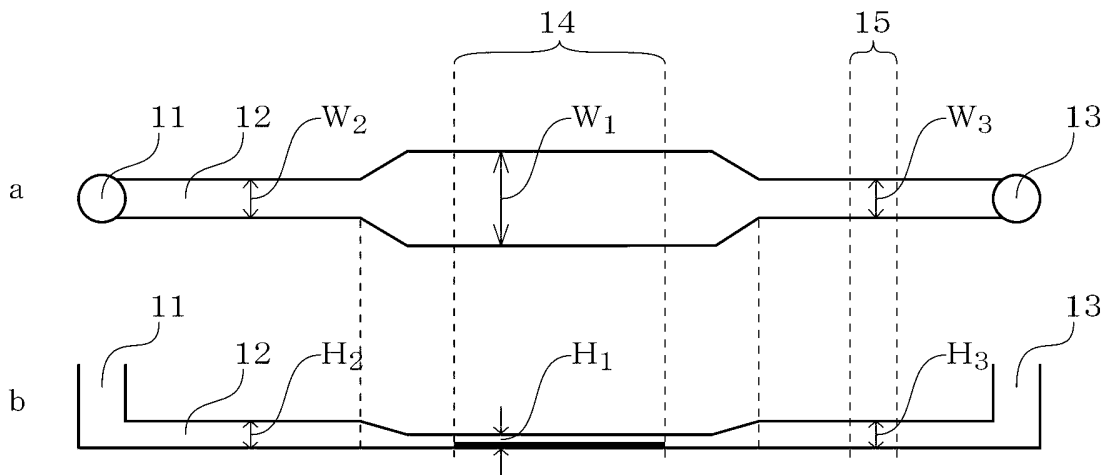
請求の範囲

- [1] 2枚の基板の界面に少なくとも流路が形成され、該流路内に、反応領域と、該反応領域の下流側に検出領域を有するマイクロチップにおいて、検出領域の流路の深さが、反応領域の流路の深さよりも深いことを特徴とするマイクロチップ。
- [2] 2枚の基板の界面に少なくとも流路が形成され、該流路内に、反応領域と、該反応領域の下流側に検出領域を有するマイクロチップにおいて、反応領域の流路の幅が、検出領域の流路の幅よりも広く、且つ、検出領域の流路の深さが、反応領域の流路の深さよりも深いことを特徴とするマイクロチップ。
- [3] 前記反応領域は反応に寄与する界面を有し、該界面は流路の界面の少なくとも一部である請求項1又は2記載のマイクロチップ。
- [4] 前記反応が寄与する界面は、被測定物質である生物学的物質を捕捉するための、該生物学的物質に親和的結合性のある抗生物学的物質が固定された界面である請求項1又は2記載のマイクロチップ。
- [5] 前記抗生物学的物質は、流路内の界面に固定された核酸に結合されている請求項4記載のマイクロチップ。
- [6] 前記抗生物学的物質は磁性粒子表面に固定され、該磁性粒子は、流路内又は流路外に設置された磁石の磁力により流路内の界面に固定されている請求項4記載のマイクロチップ。
- [7] 反応領域の流路の幅が、 $1\ \mu\text{m}$ 以上 2mm 以内である請求項1、2、3、4、5又は6記載のマイクロチップ。
- [8] 反応領域の流路の幅が、 $1\ \mu\text{m}$ 以上 $500\ \mu\text{m}$ 以内である請求項1、2、3、4、5又は6記載のマイクロチップ。
- [9] 検出領域の流路の深さが、 $10\ \mu\text{m}$ 以上 2mm 以内である請求項1、2、3、4、5、6、7又は8記載のマイクロチップ。

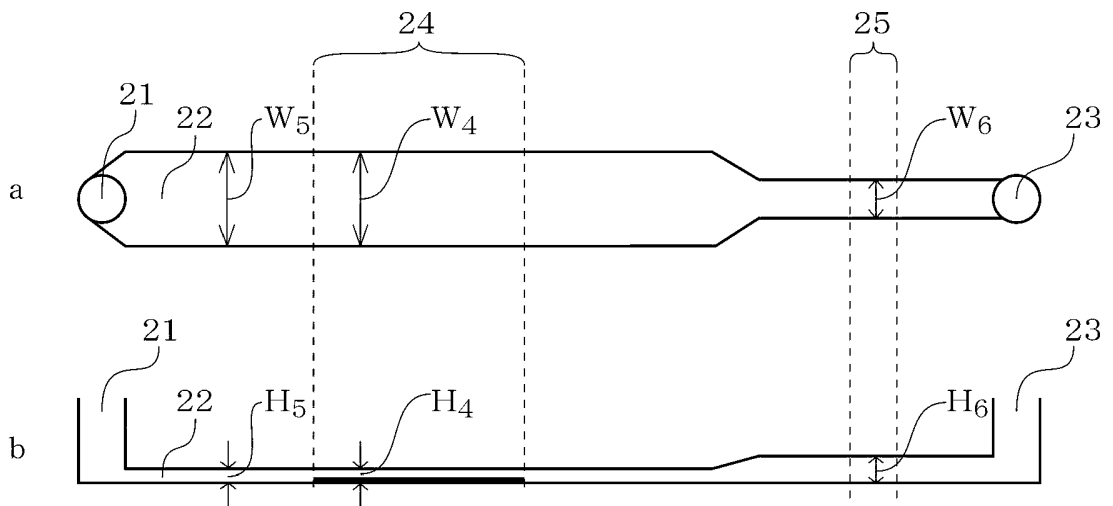
[図1]



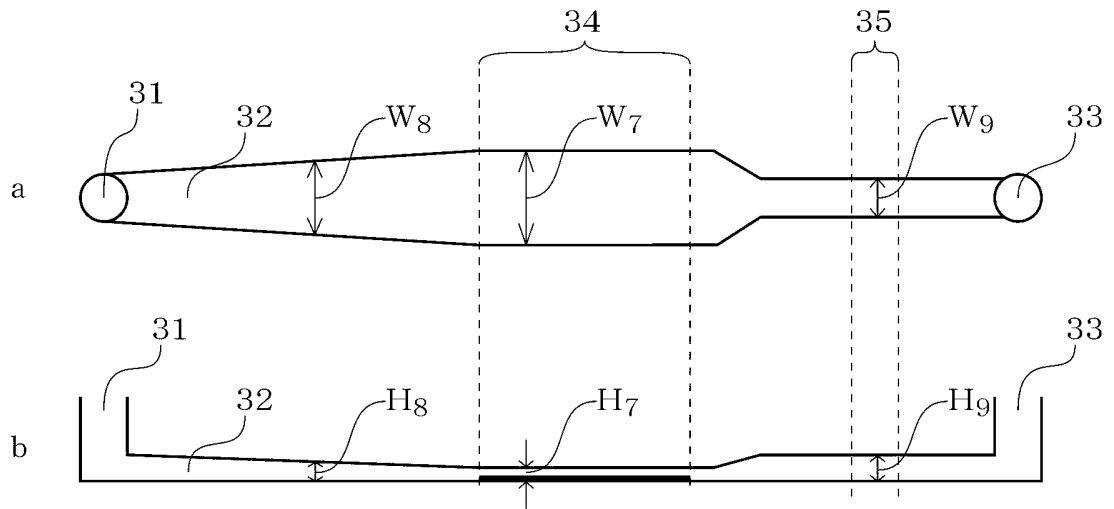
[図2]



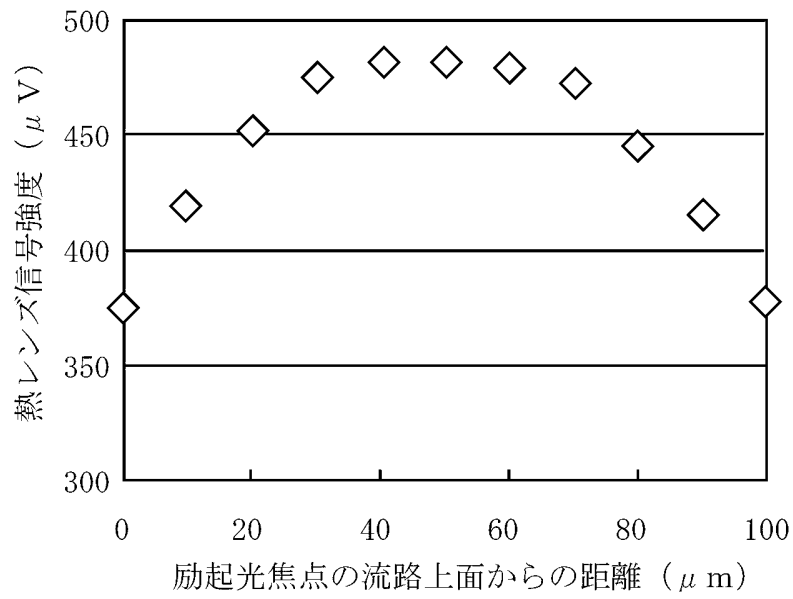
[図3]



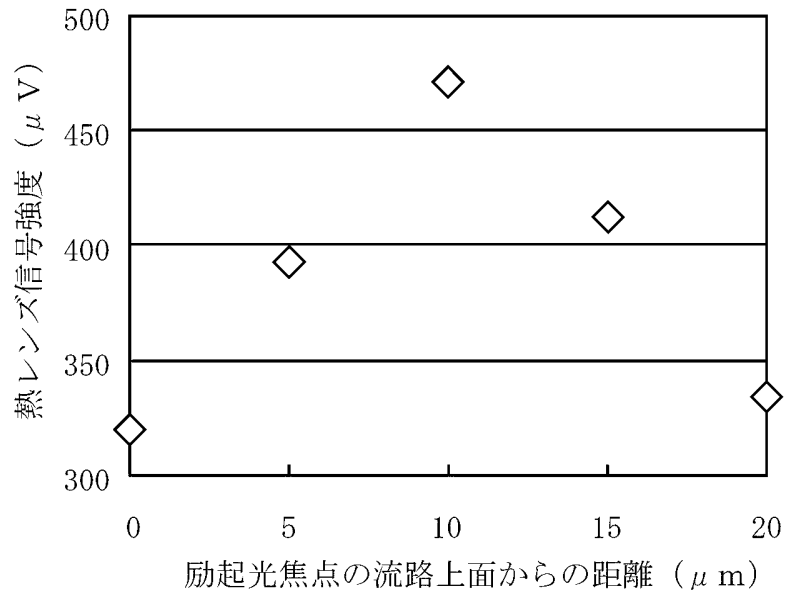
[図4]



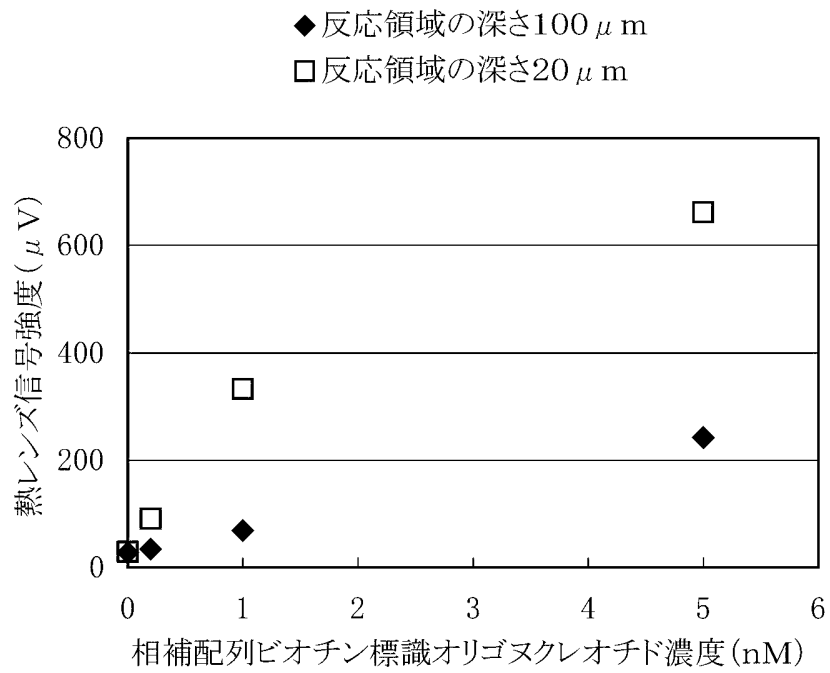
[図5]



[図6]

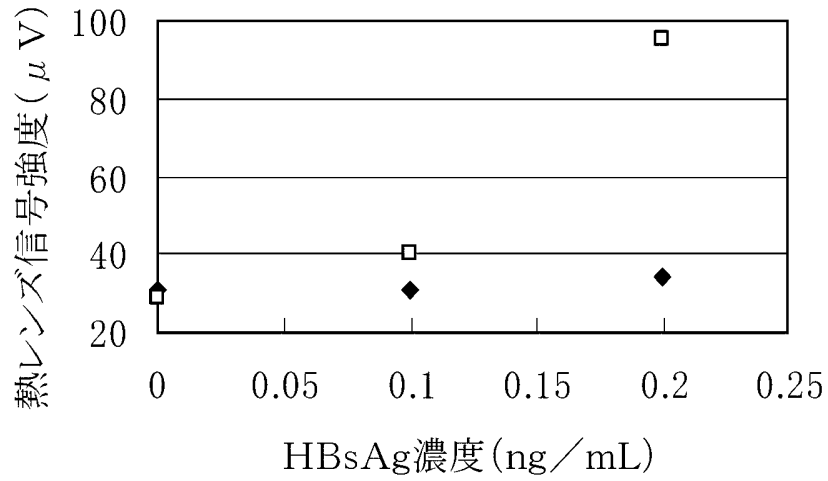


[図7]



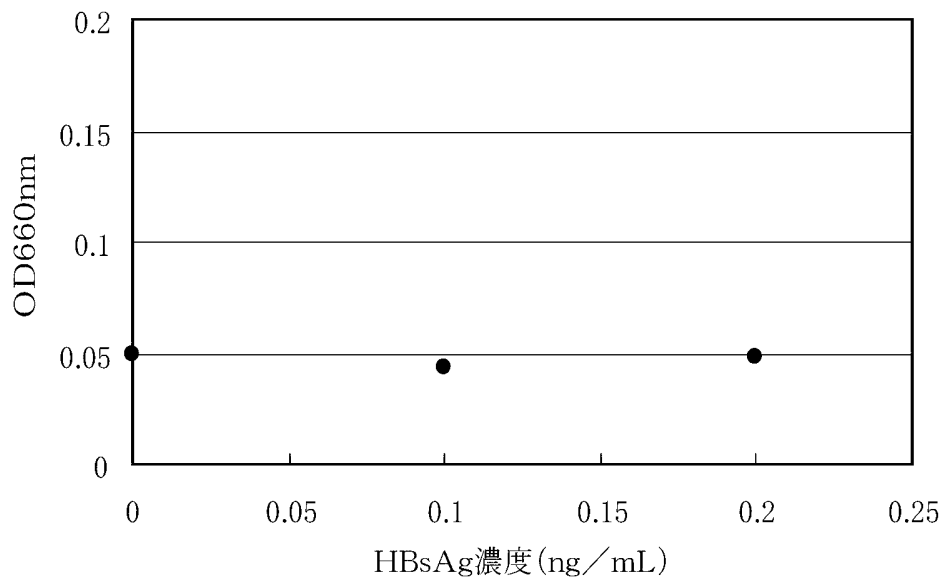
[図8]

- ◆ 反応領域の深さ100 μm での信号強度 (μV)
- 反応領域の深さ20 μm での信号強度 (μV)



[図9]

マイクロタイタープレートによるHBsAg検出系の検討



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/021231

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M1/00(2006.01), B01J19/00(2006.01), B81B1/00(2006.01), C12M1/34 (2006.01), G01N37/00(2006.01)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M1/00-3/10(2006.01)</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p>												
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">Y</td> <td>JP 7-506430 A (Trustees of the University of Pennsylvania), 13 July, 1995 (13.07.95),</td> <td align="center">1-9</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td>JP 2000-508528 A (The Perkin Elmer Corp.), 11 July, 2000 (11.07.00),</td> <td align="center">1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	JP 7-506430 A (Trustees of the University of Pennsylvania), 13 July, 1995 (13.07.95),	1-9	Y	JP 2000-508528 A (The Perkin Elmer Corp.), 11 July, 2000 (11.07.00),	1-9	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	JP 7-506430 A (Trustees of the University of Pennsylvania), 13 July, 1995 (13.07.95),	1-9										
Y	JP 2000-508528 A (The Perkin Elmer Corp.), 11 July, 2000 (11.07.00),	1-9										
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>“&” document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			“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 application or patent 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	
“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 application or patent 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												
<p>Date of the actual completion of the international search 13 December, 2005 (13.12.05)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 27 December, 2005 (27.12.05)</p>										
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>										
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2005/021231

JP 7-506430 A

1995.07.13

JP 7-506256 A
JP 7-506257 A
JP 7-506258 A
JP 7-506431 A
JP 9-509498 A
JP 9-511407 A
JP 3220158 B
WO 1993/022053 A1
WO 1993/022055 A2
WO 1993/022054 A1
WO 1993/022058 A1
WO 1993/022421 A1
WO 1996/014933 A1
WO 1996/014934 A1
WO 1996/015269 A2
EP 0637996 A1
EP 0637997 A1
EP 0637998 A1
EP 0637999 A1
EP 0639223 A1
EP 0739240 A1
EP 0739423 A1
US 5304487 A1
US 5296375 A1
US 5635358 A1
US 5726026 A1
US 5928880 A1
US 6184029 B1
US 5427946 A1
US 5744366 A1
US 5498392 A1
US 5587128 A1
US 5955029 A1
US 2003/0199081 A1
US 6660517 B1
US 5486335 A1
US 5637469 A1
US 5866345 A1
US 6551841 B1
US 2003/0129671 A1
US 2005/0079634 A1

JP 2000-508528 A

2000.07.11

WO 1997/036681 A1
EP 0889751 A1
US 6124138 A1
US 6126899 A1
US 2003/0152994 A1
US 6825047 B

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/00 (2006.01), B01J19/00 (2006.01), B81B1/00 (2006.01), C12M1/34 (2006.01), G01N37/00 (2006.01)		
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. C12M1/00-3/10 (2006.01)		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 7-506430 A (トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ペンシルベニア) 1995.07.13	1-9
Y	JP 2000-508528 A (ザ パーキン-エルマー コーポレーション) 2000.07.11	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.12.2005	国際調査報告の発送日 27.12.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 村上 騎見高 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3228

JP 7-506430 A	1995. 07. 13	JP 7-506256 A
		JP 7-506257 A
		JP 7-506258 A
		JP 7-506431 A
		JP 9-509498 A
		JP 9-511407 A
		JP 3220158 B
		WO 1993/022053 A1
		WO 1993/022055 A2
		WO 1993/022054 A1
		WO 1993/022058 A1
		WO 1993/022421 A1
		WO 1996/014933 A1
		WO 1996/014934 A1
		WO 1996/015269 A2
		EP 0637996 A1
		EP 0637997 A1
		EP 0637998 A1
		EP 0637999 A1
		EP 0639223 A1
		EP 0739240 A1
		EP 0739423 A1
		US 5304487 A1
		US 5296375 A1
		US 5635358 A1
		US 5726026 A1
		US 5928880 A1
		US 6184029 B1
		US 5427946 A1
		US 5744366 A1
		US 5498392 A1
		US 5587128 A1
		US 5955029 A1
		US 2003/0199081 A1
		US 6660517 B1
		US 5486335 A1
		US 5637469 A1
		US 5866345 A1
		US 6551841 B1
		US 2003/0129671 A1
		US 2005/0079634 A1
JP 2000-508528 A	2000. 07. 11	WO 1997/036681 A1

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 2 1 2 3 1

EP 0889751 A1
US 6124138 A1
US 6126899 A1
US 2003/0152994 A1
US 6825047 B