

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-187616

(P2007-187616A)

(43) 公開日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.

GO 1 N 37/00 (2006.01)

F I

GO 1 N 37/00

GO 1 N 37/00 1 O 1

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2006-7387 (P2006-7387)
 (22) 出願日 平成18年1月16日 (2006.1.16)

(出願人による申告) 平成17年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「先進ナノバイオデバイスプロジェクト (ハイスループット・タンパク質解析チップの研究開発)」に係る委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの

(71) 出願人 000003159
 東レ株式会社
 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
 (72) 発明者 山崎 義昭
 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内
 (72) 発明者 日笠 雅史
 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内
 (72) 発明者 鄭 基晩
 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内

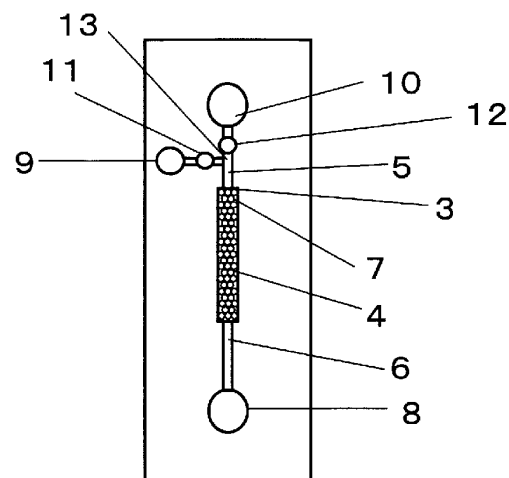
(54) 【発明の名称】 分析チップおよび分析方法

(57) 【要約】

【課題】液体流入口、液体流出口、および測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体を収納する反応室を有する従来の分析チップにおいては、測定対象成分の定量的な測定、再現性のある分析を行うことが困難であった。

【解決手段】流路を通じて反応室の下流側に連結されている分析チップを提供する。反応生成物を含む溶液を貯液槽に貯液して測定を行うことで、反応生成物の定量的、再現性のある分析が可能となった。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体流入口と液体流出口を有すると共に、液体流入口から導入した試料溶液中の測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体を収納する反応室を内部に備える分析チップであって、流路を通じて反応室の下流側に連結されている貯液槽を有することを特徴とする分析チップ。

【請求項 2】

貯液槽に反応生成物を含む溶液を貯溜して該貯液槽で分析することを特徴とする請求項 1 記載の分析チップ。

【請求項 3】

貯液槽が、反応室と液体流出口とを結ぶ流路から分岐して連結していることを特徴とする請求項 1 記載の分析チップ。

【請求項 4】

反応室と液体流出口および反応室と貯液槽を連結する各流路に、流路を開閉するバルブを有することを特徴とする請求項 1 記載の分析チップ。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の分析チップを用いて、測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体上で、試料溶液中の測定対象成分と選択結合性物質とを結合させ、該測定対象成分を免疫学的に測定することを特徴とする分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は主にタンパク質の構造・機能の解析又はタンパク質を使用した反応に用いる分析チップおよびその分析方法に関する。特に、抗原－抗体反応を用いたタンパク質の分析に使用する分析チップおよびその分析方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

免疫分析および選択結合性物質を用いる分析は、医療や生化学などの分野で重要な分析方法のひとつであることが知られている。しかし従来の試験管、マイクロプレート、マイクロチューブ、マイクロウェル等を用いて行う酵素免疫分析方法（ELISA）などは、複数種の試薬の導入、反応、洗浄等の工程があり、操作が煩雑であるため、分析に多くの時間を要し、あるいは容器の容積が大きいという欠点がある。そこで、一枚の基板上にマイクロメートルオーダーのマイクロチャネル（微細流路）を形成した分析チップを使用することにより、その特性である微小容積、大きな比表面積、短い拡散移動距離を利用して反応効率を高め、様々な化学システムを構築してきたことの実績と知見を踏まえて、そのひとつとして免疫分析法の分析チップへの適用が行われてきた。

【0003】

すなわち、分析チップのマイクロチャネル中において、試料溶液中の抗原または抗体と選択的に結合する抗体または抗原を固定化する固定化担体としてマイクロビーズを用い、このマイクロビーズに抗体または抗原を結合させることにより、複数種の試薬を連続的に導入、反応させ、洗浄を行うことが可能となり、効率よく抗原－抗体反応を行うことが可能となった。

【0004】

分析チップを用いたタンパク質、すなわち選択結合性物質としての抗原および抗体の分析は、一般に以下のようにして行われる。

【0005】

測定対象成分を捕捉するための選択結合性物質としての抗原または抗体をガラス、樹脂基板、プラスチックビーズ、プラスチック試験管または紙などの固体担体に結合させ、そしてこれらの捕捉用抗原または抗体を固定化した担体に、同定すべき抗体または抗原を含む液体を加える。一定の反応時間後に、捕捉用抗原または抗体と測定対象成分が反応

10

20

30

40

50

すると、それらは担体と結合した状態となる。

【0006】

測定対象成分を検出する方法としては、例えば以下のような例があげられる。すなわち、測定対象成分を前もって放射性、蛍光性または酵素的に活性な標識物質で標識する工程、これらの標識された測定対象成分を担体に固定化された捕捉用抗原または抗体と反応される工程及びこれらの放射能、蛍光または酵素活性を利用して測定する工程を含む方法、或いは、測定対象成分を担体に固定化された捕捉用抗原または抗体と反応させる工程、捕捉された検出対象に対してさらに放射能、蛍光または酵素活性によって標識した検出用の物質を反応させる工程及びこれらの放射能、蛍光または酵素活性を利用して測定する工程を含む方法などがある。

10

【0007】

従来の分析チップの形態としては、分析チップ内部に反応室を有し、反応室内に担体（固体粒子）を収納し、担体を堰き止める堰部を設け、測定対象成分を担体に固定化し、固定化した測定対象成分を光分析、あるいは固定化した測定対象成分と発色試薬液を反応させ、これにより発色した発色試薬液を反応室下流の流路内で光分析するチップが知られている（例えば特許文献1参照）。

【0008】

また、ガラス、シリコン基板等からなるマイクロチップ内に反応室を有し、反応室内に免疫抗原－抗体反応のための反応固相としての直径1mm以下のガラスビーズもしくはポリスチレン等の担体（高分子固体微粒子）を装入し、マイクロチャネル流入部から導入した抗原および標識抗体の反応を担体上で行い、未反応物を洗浄した後、反応室内で反応生成物を光熱変換分析により分析する免疫分析チップが知られている（例えば特許文献2参照）。

20

【0009】

これらの分析チップにおいては、担体の充填は不均一になっていることが多く、測定対象成分と反応させた際、しばしば反応室の場所によって反応生成物の生成に差が生じることがあった。そのため、反応室で測定対象成分の分析を行う場合には、その分析場所によって測定値にばらつきが生じ、その結果再現性のある測定、更には定量的な測定を行うことが困難となることがあった。また、反応室に充填する担体が自家蛍光を有する場合は測定に自家蛍光による影響があるので、測定に用いることができる担体に制限があった。

30

【特許文献1】特開2004-132820号公報

【特許文献2】特開2001-4628号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上記の通り、従来の分析チップでは再現性のある測定を行うことができない、あるいは反応室に充填する担体として自家蛍光を持っている担体は使用が制限される、あるいは十分な検出感度を得ることができないといった問題があった。本発明は、これらの問題を解決しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

40

【0011】

上記課題を解決するために、本発明は次の構成を有する。

（1）液体流入口と液体流出口を有すると共に、液体流入口から導入した試料溶液中の測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体を収納する反応室を内部に備える分析チップであって、流路を通じて反応室の下流側に連結されている貯液槽を有することを特徴とする分析チップ。

（2）貯液槽に反応生成物を含む溶液を貯溜して該貯液槽で分析することを特徴とする（1）記載の分析チップ。

（3）貯液槽が、反応室と液体流出口とを結ぶ流路から分岐して連結していることを特徴とする（1）記載の分析チップ。

50

(4) 反応室と液体流出口および反応室と貯液槽を連結する各流路に流路を開閉するバルブを有することを特徴とする(1)記載の分析チップ。

(5) (1)に記載の分析チップを用いて、測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体上で、試料溶液中の測定対象成分と選択結合性物質とを結合させ、該測定対象成分を免疫学的に測定することを特徴とする分析方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明により以下のような優れた効果が得られる。

【0013】

反応生成物を含む溶液を貯液槽にまとめて貯液することができるため、反応生成物濃度を均一にすることが可能になる。貯液槽において反応生成物の測定を行うことで、反応生成物の定量的、再現性のある測定が可能になる。光分析においては、貯液槽で測定することにより、流路で測定する場合よりも光信号を検出する面積を広く確保できるため、より高い検出感度を得られる。また、用いる担体に制限がなくなり、自家蛍光を持つ担体でも使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

[分析チップ]

本発明は、液体流入口と液体流出口を有すると共に、液体流入口から導入した試料溶液中の測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体を収納する反応室を内部に備える分析チップであって、反応室の下流側に貯液槽を有することを特徴とする分析チップである。

【0015】

図1～2に本発明の一実施形態を示す。図1は平面模式図、図2は分解斜視図である。

【0016】

図2に示すように本実施形態の分析チップは略平板状の分析チップ基板1に分析チップ蓋2が積層され、これらが接合により一体化されて構成されている。分析チップ基板1には流路等が形成されている。また、液体流入口8側および液体流出口9側の各流路5、6の間に反応室4が形成され、反応室の内部に担体7が封入されている。また、反応室4と液体流出口9側の流路5の間には、担体7の堰き止め手段3が形成されている。また、液体流出口9側の流路5には分岐部13が設けられ、液体流出口9とは別の流路に連結して貯液槽10が設けられている。分岐路13と液体流出口9および貯液槽10の間にはバルブ11および12が設けられている。

【0017】

[貯液槽]

本発明の分析チップは、貯液槽を有している。この貯液槽には、反応室で反応した反応生成物を含む溶液を貯溜し、該貯液槽において分析を行うことができるものである。

【0018】

貯液槽の形状、大きさは反応生成物の量に応じて適宜設定することができる。たとえば、貯液槽が円柱型の場合、反応生成物の液量および測定範囲の観点から直径0.05mm以上、10mm以下であることが好ましく、深さ(円柱高さ)も同様の観点から0.05mm以上、5mm以下であることが好ましい。更には、貯液槽の容積は、貯溜する反応生成物溶液の量およびハンドリングおよび十分な検出感度を得る点から、0.01μl以上10μl以下であることが好ましい。

【0019】

反応室と液体流出口をつなぐ流路および貯液槽をつなぐ流路のそれぞれに、該流路を開閉して送液および送液停止の切り替えが可能なバルブを設けてもよい。バルブを設けた場合、測定対象成分、選択性結合物質の反応時は、反応室下流の液体排出口側のバルブを開放、貯液槽側のバルブを閉鎖し、反応室にて反応生成物が生成後は、液体排出口側のバルブを閉鎖、貯液槽側のバルブを開放し、送液手段により貯液槽に反応生成物溶液を貯溜し

分析を行うことができる。流路を開閉するバルブは、送液／送液停止の切替が可能である公知のものを用いれば良い。また、バルブの代わりに弁のような流路の開閉を切り替えるものを用いても良い。あるいは、反応室と液体流出口および貯液槽を連結する流路分岐部に、反応室からの送液を液体流出口または貯液槽への切り替える三方コック等の機構を備えたものでも良い。

【0020】

貯液槽には、例えば攪拌子などの反応生成物を攪拌するための機構を備えていても良い。

【0021】

[送液手段]

本発明の分析チップで用いる送液手段は、流路内に測定対象成分溶液、選択結合性物質溶液、反応生成物溶液を流通させるためのものであり、マイクロリットル／分からミリリットル／分の流速で液体を流すことのできるマイクロポンプやシリンジタイプなどの送液ポンプが利用できる。また、送液の流量を制御する制御手段については、コンピュータを備え、予め設定されたプログラムにしたがって自動的に制御できるものが好ましいが、手動で制御できるものであっても良い。

【0022】

[担体]

本発明の分析チップに充填される担体は、反応室の中に収納されるものであり、担体表面に選択結合性物質が固定化されるものである。

【0023】

本発明の分析チップに充填される担体の大きさは特に限定はしないが、担体が反応室に封入される大きさであれば良い。担体の形状は、単位容積あたりの選択結合性物質の結合する比面積を大きくする点から粒状、更には球状が好ましい。担体が球状の場合、担体が堰き止め手段で堰き止められ、さらに液体が反応室を支障なく通過する点から、球体の直径は0.1 μm 以上1000 μm 以下であることが好ましく、更には10 μm 以上500 μm 以下であることが好ましい。

【0024】

担体の形状としては粒状、フィルム状、スポンジ状、繊維状などが挙げられる。担体の材料としては、粒状の場合、ガラス、アガロース、シリカゲル、アクリルアミドなどが挙げられ、フィルム状の場合、P V D F、セルロースなどが挙げられ、繊維状の場合、ナイロン、シルク、アミロイド繊維などが挙げられる。

【0025】

[選択結合性物質]

また、本発明において、選択結合性物質とは測定対象成分と特異的に結合する物質のことである。具体的には、抗体、抗体フラグメント、リガンド、抗原、ハプテン、レセプター、金属イオン、ヘパリン、ストレプトアビジン、ビオチン、ベンザミジン、グルタチオン、アルギニン、カルモジュリン、ゼラチン、リジン、マンノース、DNA、2'5'-アデノシン-2-リン酸、核酸、酵素基質、酵素阻害剤などが挙げられる。

【0026】

上記抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、組換え抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、単鎖抗体、抗体断片としてはFab断片、F(ab')₂断片などが含まれる。ポリクローナル抗体は、精製ポリペプチドを結合した親和性カラムに結合させることを含む、いわゆる吸収法によって、特異的抗体として調製することができる。これらの選択結合性物質は、担体に固定して測定成分を捕捉する捕捉用選択結合性物質として用いることも、また何らかの標識物質によって標識した上で測定成分と反応させて、これを検出するために用いる検出用選択結合性物質としても用いることもできる。

【0027】

また、担体への選択結合性物質結合体の結合様式は特に限定しないが、担体表面または

10

20

30

40

50

内部に選択結合性物質結合体が共有または非共有的に結合している形態であれば良い。あるいは担体の組成物として選択結合性物質結合体が混在している状態でも良い。すなわち、一般的な免疫分析法において用いられる環境下で、選択結合性物質結合体が担体から剥がれない形態をとっていれば良い。

【0028】

〔測定対象成分〕

本発明の分析チップを用いて分析する測定対象成分としては特に限定されず、タンパク質、核酸、脂質又は低分子化合物等が挙げられるが、その中でもタンパク質が望ましい。タンパク質とは、複数のアミノ酸がペプチド結合により連結された構造を有する化合物をいい、天然由来物、合成物、および短鎖のペプチドをも含むことを意味する。構成成分としてアミノ酸以外に糖、核酸、脂質を含んでいてもよい。 10

【0029】

本発明の分析チップを用いて解析されうるタンパク質としては、特に限定されることなく、天然由来物または合成物でも良いが、核タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質などのアミノ酸以外の構成成分を含んでいるものでも良い。これらの中でも水溶性タンパク質が特に好適に使用される。

【0030】

〔分析方法〕

本発明の分析方法は、本発明の分析チップを用いて、測定対象成分と選択的に結合する選択結合性物質が表面に固定化されている担体上で、試料溶液中の測定対象成分と選択結合性物質とを結合させ、該測定対象成分を免疫学的に測定することを特徴とするものである。 20

【0031】

すなわち、本発明における分析方法は、測定対象成分とこれと選択的に反応する選択結合性物質とを結合させる第一の工程、該選択結合性物質に共有あるいは非共有的に結合させた発色性、発光性、放射性、蛍光性または酵素的に活性な標識物質による発色量、発光量、放射量、蛍光強度、あるいは酵素活性などを測定する免疫学的測定によって測定対象成分を分析する第二の工程を含む。

【0032】

また、本発明の分析チップを用いた分析方法としては、以下の(1)～(5)に挙げるものを採用することができるが、これに限定されるものではない。 30

(1) 試料溶液を反応室に導入し、試料溶液中の測定対象成分(A)を担体に結合させ、担体に結合した測定対象成分(A)を光分析する分析方法

(2) 試料溶液を反応室に導入し、試料溶液中の測定対象成分(A)を担体に結合させ、測定対象成分と選択的に結合する物質(B)の溶液を導入して、担体に結合した測定対象成分(A)に該物質(B)を結合させ、成分(A)を介して担体に結合した物質(B)を光分析する分析方法

(3) 試料溶液を反応室に導入し、試料溶液中の測定対象(A)を担体に結合させ、測定対象成分と反応しうる反応基質(B)の溶液を導入し、担体表面に結合した測定対象成分(A)と反応基質(B)の反応により生成した生成物(C)を光分析する分析方法 40

(4) 試料溶液を反応室に導入し、試料溶液中の測定対象(A)を担体に結合させ、続いて測定対象成分(A)と選択的に結合する物質(B)を結合させ、続いて物質(B)に選択的に結合する物質(C)を結合させて、成分(A)および物質(B)を介して担体に結合した物質(C)を光分析する分析方法

(5) 担体に結合した選択結合性物質に対して測定対象成分(A)と競争的に結合する成分(A')と試料とを混合させ、その混合液を反応質に導入し、成分(A')を光分析する分析方法。

【0033】

ここで成分(A')は、成分(A)、あるいは成分(A)の一部に標識物質を結合させたものとすることができるが、これに限定されるものではない。 50

【0034】

〔測定対象成分〕

本発明の分析チップで分析される測定対象成分としては、疾患の診断に用いる臨床検体である被験者の喀痰、唾液、尿、便、精液、血液、組織、臓器、その他の体液、またはこれらの体液の分画などが用いられる。ここで被験者としては、哺乳動物、例えば非限定的にヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ラットなどが挙げられる。

【0035】

また同様に、食品、飲料水、土壌、排水、河川水、海水、環境のふき取り液、環境のふき取り綿の滲出液などが被験材料として用いられる。また、菌体の培養液や、固形培地上に培養された菌体（コロニー）を使用することもできる。 10

【0036】

〔流路〕

本発明の分析チップにおける流路は、液体流入口、反応室、液体流出口、貯水槽を連結するものである。

【0037】

本発明における流路は凹部を形成した板状の基材を、別の基材と接合して作製することができる。あるいは、貫通したスリット形状の薄膜とこれを挟み込む少なくとも2つの基材を接合することによっても作製可能である。基材はシート状、板状、フィルム状、棒状、管状、塗膜状、円筒状、その他複雑な形状の成形物を取りうるが、これに限定されるものではない。加工性および取り扱いの容易さから、シート状、板状、フィルム状が好ましい。 20

【0038】

前記分析チップの流路の幅、深さは、分析チップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうる。微細な流路とする場合、具体的には、流路の幅は0.1 μm 以上1000 μm 以下が好ましく、更には10 μm 以上500 μm 以下が好ましい。微細な流路の深さは、具体的には、0.1 μm 以上1000 μm 以下が好ましく、更には10 μm 以上500 μm 以下が好ましい。

【0039】

流路の長さは、分析チップの大きさ、解析対象の化合物に応じて適宜選択することができる。 30

【0040】

〔反応室〕

本発明の反応室は、選択結合性物質が固定化されている担体が収納され、測定対象成分を選択的に結合させて反応を行うためのものである。反応室の大きさは担体が封入される大きさであれば良いが、具体的にはその幅は0.1 μm 以上10000 μm 以下が好ましく、更には10 μm 以上5000 μm 以下であることが好ましい。反応室の長さは、10 μm 以上50 cm以下が好ましく、更には100 μm 以上10 cm以下が好ましい。また、反応室の深さは分析チップの大きさ、使用目的などにより適宜設定される。具体的には0.1 μm 以上10000 μm 以下が好ましく、更には10 μm 以上5000 μm 以下であることが好ましい。 40

【0041】

〔液体流入口、液体流出口〕

液体流入口、液体流出口の大きさは、試料の容量に応じて適宜設定することができる。例えば液体流入口、液体流出口が円柱形の場合、試料導入の操作の観点から、直径0.05 mm以上4 mm以下であることが望ましい。深さも同様の観点から0.05 mm以上、5 mm以下であることが好ましい。

【0042】

〔分析チップの材料〕

本発明の分析チップに用いる基材の材料としては、無機材料、または合成樹脂もしくは 50

天然樹脂などの有機材料のいずれでも用いことができる。

【0043】

無機材料の場合、例えば鉄、ニッケル、銅、亜鉛、アルミニウム、シリコン、チタン、タンタル、マグネシウム、モリブデン、タングステン、ロジウム、パラジウム、銀、金、白金、ステンレス、真鍮、黄銅、青銅、磷青銅、アルミ銅合金、アルミマグネシウム合金、アルミマグネシウムシリコン合金、アルミ亜鉛マグネシウム銅合金、鉄ニッケル合金等の金属；シリカゲル、アルミナ、チタニア、ジルコニア、酸化タンタル等の金属酸化物；SiN、TiN、Ta₂N等の金属窒化物；SiC、WC等の金属炭化物；ダイヤモンド、グラファイト等の炭素材料；ソーダガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（登録商標）、石英ガラス等のガラスなどが挙げられる。

10

【0044】

合成樹脂としては、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂のいずれも用いることができる。これらの合成法としては既知の各種方法が例示されるが、本発明の樹脂材料には、これらのいずれの方法により得られる合成樹脂も含まれる。例えば、（１）付加重合体：オレフィン、オレフィン以外のビニル化合物、ビニリデン化合物およびその他の炭素－炭素二重結合を有する化合物からなる群から選ばれる単量体の単独重合体または共重合体、またはこれらの単独重合体もしくは共重合体の混合物あるいは改質物、（２）重縮合体：ポリエステル、ポリアミドなどの重合体、またはこれらの重合体の混合物あるいは改質物、（３）付加縮合体：フェノール樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、キシレン樹脂などの重合体、またはこれらの重合体の混合物あるいは改質物、（４）重付加生成物：ポリウレタン、ポリ尿素などの重合体、またはこれらの重合体の混合物あるいは改質物、（５）開環重合体：シクロプロパン、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、ラクトン、ラクタムなどの単独重合体または共重合体、またはこれらの単独重合体もしくは共重合体の混合物あるいは改質物、（６）環化重合体：ジビニル化合物（例えば：1,4-ペンタジエン）やジイン化合物（例えば：1,6-ヘプタジイン）などの単独重合体または共重合体、またはこれらの単独重合体もしくは共重合体の混合物あるいは改質物、（７）異性化重合体：例えばエチレンとイソブテンの交互共重合体など、（８）電解重合体：ピロール、アニリン、アセチレンなどの単独重合体または共重合体、またはこれらの単独重合体もしくは共重合体の混合物あるいは改質物、（９）アルデヒドやケトンのポリマー、（１０）ポリエーテルスルホン、（１１）ポリペプチド、などが挙げられる。

20

30

【0045】

天然樹脂としては、セルロース、タンパク質、多糖類等の単独物または混合物やこれらの改質物等が挙げられる。

【0046】

また本発明の分析チップで用いられる基材の樹脂は、ガラス、金属、炭素材料等との混合により得られた材料も含まれる。

【0047】

また本発明の分析チップで用いられる基材のガラス転移温度は特に限定しないが射出成形を行い流路を有するチップに加工して量産する点から80℃以上200℃以下が好ましい。

40

【0048】

〔分析チップの黒色化〕

本発明の分析チップは、基材となる樹脂に黒色物質が含有またはコーティングされていても良い。ここでいう黒色とは、可視光（波長が400nmから800nm）範囲において、黒色部分の分光反射率が特定のスペクトルパターン（特定のピークなど）を持たず、一様に低い値であり、かつ、黒色部分の分光透過率も、特定のスペクトルパターンを持たず、一様に低い値であることをいう。

【0049】

この分光反射率、分光透過率の値としては、可視光（波長が400nmから800nm）の範囲の分光反射率が7%以下であり、同波長範囲での分光透過率が2%以下であるこ

50

とが好ましい。なお、ここでいう分光反射率は、J I S Z 8 7 2 2 条件Cに適合した、照明・受光光学系で、基材からの正反射光を取り込んだ場合の分光反射率をいう。

【0050】

黒色にする手段としては、基材、絶縁材料に黒色物質を含有させることにより達成しうる。この黒色物質は、光を反射したり透過し難いものであれば特に制限はないが、好ましいものを挙げると、カーボンブラック、グラファイト、チタンブラック、アニリンブラック、またはRu、Mn、Ni、Cr、Fe、Coおよび／もしくはCuの酸化物、またはSi、Ti、Ta、Zrおよび／もしくはCrの炭化物などの黒色物質が使用できる。

【0051】

これらの黒色物質は単独で含有させる他、2種類以上を混合して含有させることもできる。例えば、基材、絶縁材料がポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、シリコン樹脂などのポリマーの場合は、黒色物質の中でも、カーボンブラック、グラファイト、チタンブラック、アニリンブラックを好ましく含有させることができ、特にカーボンブラックを好ましく用いることができる。ガラス、セラミックの無機材料の場合は、Ru、Mn、Ni、Cr、Fe、Coおよび／またはCuの酸化物、Si、Ti、Ta、Zrおよび／またはCrの炭化物を好ましく含有させることができる。

【0052】

〔分析チップの作製方法〕

本発明の分析チップは凹部を形成した基材を別の基材と接合することによって作製できる。あるいは貫通したスリット形状を有する薄膜を複数の基材で挟みこみ、接合することによって作製できる。凹部または貫通したスリット形状を得る方法として、射出成形、ホットエンボシング、溶剤キャスト法、切削、旋削、研削、エッチング、打ち抜き、フォトリソグラフィ、リフトオフ、蒸着またはこれらの組み合わせなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。接合の方法としては、プラズマ処理などによる表面活性化、加熱を伴う方法、圧力を印加する方法、電場を印加する方法、接着剤を用いる方法、溶剤を用いる方法またはこれらの組み合わせなどを用いることができる。

【実施例】

【0053】

本発明を以下の実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0054】

実施例1

本実施例では、本発明の分析チップを作製し、測定対象成分としてヒトインターロイキン-8タンパク質(hIL-8)の測定を行った。

【0055】

射出成形を用いて、図1に記載のパターンで凹部を形成したポリメタクリルメタクリレート製の分析チップ基板1に別のポリメタクリルメタクリレート製の分析チップ蓋2を同時に加熱および加圧することにより接合し、分析チップを作製した。

【0056】

上記のように作製した分析チップを、親水性高分子として分子量500,000、2,000ppmのポリエチレングリコール水溶液に浸漬した。浸漬したポリメチルメタクリレート板を密封し、2.5kGyのガンマ線を照射し、グラフト化した。

【0057】

表面が親水性高分子からなる担体として、ポリスチレンからなるビーズ(Poly Science社)7.5μlをリン酸緩衝液で洗浄し、200μlの10μg/ml抗hIL-8抗体(鎌倉テクノサイエンス社)0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液を添加し4℃で一晩反応させた。浸透後、ポリスチレンビーズを0.05%トゥイーン20含有リン酸緩衝液で洗浄し、200μlのBlock Ace(大日本製薬社)を添加し、1時間静置し、ブロッキングを行った。ブロッキング後のポリスチレンビーズを0.05%

10

20

30

40

50

トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で洗浄し、上記分析チップの流路内に 0.1 μ l (反応室長にして 10 mm) 充填した。

【0058】

バルブ 12 を閉、バルブ 11 を開にし、チップの流路内を 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で洗浄した後、0.25 % ウシ血清アルブミン、0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で溶解させた 500 pg/ml の hIL-8 (鎌倉テクノサイエンス社) 20 μ l を 4 μ l/分の流速でシリンジポンプを用いて流路内に注入した後、引き続いて 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液を 15 μ l/分の流速で注入することにより、流路内を 10 分間洗浄した。洗浄後、0.25 % BSA、0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で溶解させた 8.2 μ g/ml の HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) 標識抗 hIL-8 抗体 (鎌倉テクノサイエンス社) 20 μ l を 4 μ l/分の流速でシリンジポンプを用いて流路内に注入して先に注入した hIL-8 と反応させ、さらに 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液を 20 μ l/分の流速で流路内に注入して 10 分間洗浄した。洗浄後、20 μ M 過酸化水素水、13 μ g/ml Amp lex Red (Molecular Probes 社) を含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を 4 μ l/分の流速でシリンジポンプを用いて流路内に注入し、5 分間静置した。静置後、バルブ 12 を開、バルブ 11 を閉にし、生成したレゾルフィンを貯液槽 10 へ送り、流路内で生成されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡 IX-71 (オリンパス社) を用いて分析した。測定条件は励起波長 510 ~ 560 nm、575 ~ 650 nm、露光時間は 0.5 秒とした。

【0059】

本測定条件においては蛍光強度が 0 ~ 4096 の範囲で測定可能であり、通常 1000 ~ 4000 が実用的な範囲である。従って、蛍光強度のばらつきが 50 以下程度なら再現性があると言える。

【0060】

上記操作を 5 回繰り返したときの分析の再現性を検討した結果を表 1 に示す。実施例 1 でのばらつきが 32 となり、各回の測定結果に再現性があることが確認された。

【0061】

比較例 1

本比較例では、実施例 1 と同様な方法で作成した、反応室下流に貯液槽を設けていない図 3 に示す分析チップを用いて、ヒトインターロイキン-8 タンパク質 (hIL-8) の測定を行った。

【0062】

表面が親水性高分子からなる担体として、ポリスチレンからなるビーズ (Poly Science 社) をリン酸緩衝液で洗浄し、ポリスチレンビーズと同量の 0.1 μ g/ml 抗 hIL-8 抗体 (鎌倉テクノサイエンス社) 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液を添加し 4 $^{\circ}$ C で一晩浸透させた。浸透後、ポリスチレンビーズを 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で洗浄し、上記分析チップの流路内に 0.1 μ l (反応室長にして 10 mm) 充填した。

【0063】

チップの流路内を 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で洗浄した後、0.25 % ウシ血清アルブミン、0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で溶解させた 500 pg/ml の hIL-8 (鎌倉テクノサイエンス社) 20 μ l を 4 μ l/分の流速でシリンジポンプを用いて流路内に注入した後、引き続いて 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液を 15 μ l/分の流速で注入することにより、流路内を 10 分間洗浄した。洗浄後、0.25 % BSA、0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液で溶解させた 0.6 μ g/ml の HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) 標識抗 hIL-8 抗体 (鎌倉テクノサイエンス社) 20 μ l を 4 μ l/分の流速でシリンジポンプを用いて流路内に注入して先に注入した hIL-8 と反応させ、さらに 0.05 % トウイーン 20 含有リン酸緩衝液を 15 μ l/分の流速で流路内に注入して 10 分間洗浄した。洗浄後、20 μ M

過酸化水素水、 $13\mu\text{g}/\text{ml}$ Amplex Red (Molecular Probes 社) を含む 0.1M トリスー塩酸緩衝液 ($\text{pH}7.5$) を $4\mu\text{l}/\text{分}$ の流速でシリンジポンプを用いて流路内に注入し、5分間静置した。静置後、反応室内で生成されたレゾルフィンの量を蛍光顕微鏡 IX-71 (オリンパス社) を用いて分析した。分析は、図4に示すように、反応室内の担体が充填されている上流端14から2.0、4.0、6.0、8.0、10mmの測定ポイントで行った。測定条件は実施例1と同じとした。

【0064】

上記操作を5回繰り返したときの分析結果を表2に示す。

【0065】

各測定ポイントでの測定を5回繰り返したときのばらつきは、162～715の範囲となり、それぞれ再現性が見られなかった。また、測定各回における各測定ポイントでのばらつきは436～638となった。

【0066】

この結果から、貯液槽のない分析チップを使用して反応室部分で測定を行った場合には、反応室内に斑が生じるために、測定場所によって分析結果が異なってしまう、再現性ある分析ができないことがわかった。

【0067】

【表1】

回数	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目
蛍光強度	2240	2251	2256	2272	2250

【0068】

【表2】

蛍光強度					
上端からの距離(mm)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目
2.0	2163	2517	2060	2517	2100
4.0	2085	2116	2116	2202	2040
6.0	2116	2085	2202	2116	2521
8.0	2521	2078	2442	2078	2334
10	2334	2040	2754	2039	2110

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】本発明の分析チップの一実施形態の平面模式図である。

【図2】図1に示す分析チップの分解模式図である。

【図3】比較例1における貯液槽のない分析チップの平面模式図である。

【図4】図1に示す本発明の分析チップの反応室部分の拡大図である。

【符号の説明】

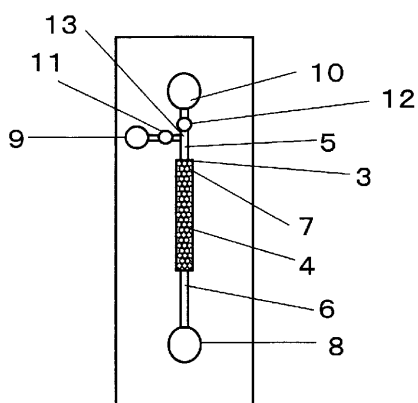
【0070】

1 分析チップ基板

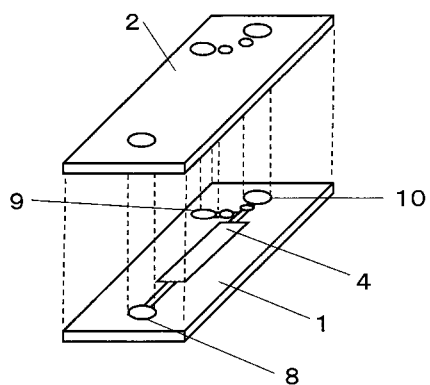
- 2 分析チップ蓋
- 3 堰き止め手段
- 4 反応室
- 5 流路（液体流出口側）
- 6 流路（液体流入口側）
- 7 担体
- 8 液体流入口
- 9 液体流出口
- 10 貯液槽
- 11 バルブ（液体流出口側）
- 12 バルブ（貯液槽側）
- 13 分岐部
- 14 反応室内の担体の上流端

10

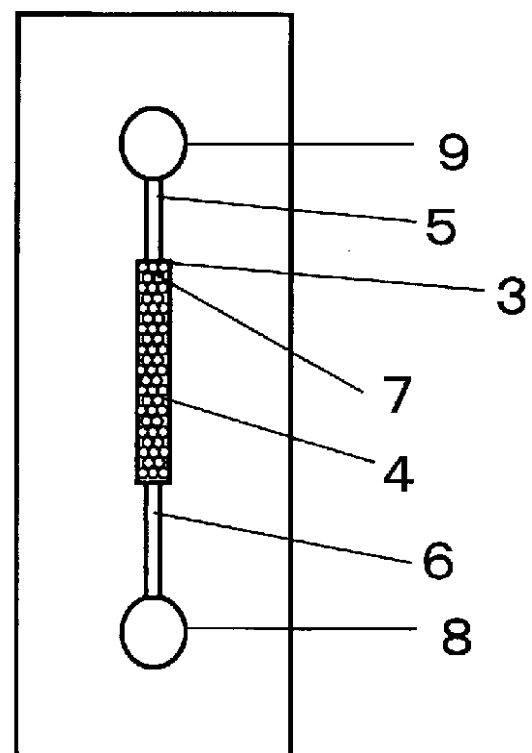
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

